

OA 对人肝细胞 HL-7702 和肝癌细胞 Bel-7402 增殖的影响和对细胞凋亡的诱导作用研究*

陈 洋^{1,2}, 颜 天¹, 于仁成¹, 周名江¹

(1. 中国科学院海洋研究所海洋生态与环境科学重点实验室, 山东 青岛 266071;

2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘 要: 以人肝细胞 HL-7702 和肝癌细胞 Bel-7402 为研究对象, 通过 MTT 法、细胞外部形态观察、Annexin V-FITC&PI 双染法及 TUNEL 法等方法, 研究了腹泻性贝毒的主要组分大田软海绵酸 (Okadaic acid, OA) 对其增殖的影响及对细胞凋亡的诱导作用。结果表明: OA 对人两株细胞的增殖均有显著的抑制作用, 24 h IC_{50} 分别为 65 ng/mL 和 60 ng/mL, 且这种抑制作用呈剂量依赖性。OA 导致两株细胞的形态均发生明显变化: 细胞变圆, 脱壁, 细胞膜形成泡状突起, 最终形成膜包裹的凋亡小体。Annexin V-FITC 和 PI 双染法及 TUNEL 法检测均发现: OA 能够诱导两株细胞发生不同程度的凋亡, 且凋亡细胞的比例与 OA 的浓度相关。以上结果表明: OA 能够通过抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡而对人肝细胞和肝癌细胞造成影响, 且这种影响的程度与 OA 的浓度和作用时间密切相关。

关键词: 大田软海绵酸; 人肝细胞 HL-7702; 人肝癌细胞 Bel-7402; 增殖; 细胞凋亡

中图分类号: Q25 **文献标识码:** X55A **文章编号:** 0529-6579 (2008) 05-0086-07

近年来, 有害赤潮在我国和世界各国沿海频繁爆发, 对人类和水产养殖业等造成巨大危害, 并对社会经济造成严重影响, 赤潮问题已引起国内外生态学研究者的广泛关注^[1]。其中, 由一些能产生毒素的赤潮藻形成的有毒赤潮严重破坏了海洋生态系统并威胁着人类的健康, 赤潮毒素已成为水产品中重要的污染物之一^[2-3]。作为一类重要的赤潮毒素, 腹泻性贝毒 (Dihydroxy Shellfish Poisoning, DSP) 毒素在世界各地和我国沿海广泛分布^[4], 可以产生 DSP 毒素的有毒赤潮生物如尖刺藻 (*Dinophysis acuminata*)、具尾鳍藻 (*D. caudata*)、倒卵鳍藻 (*D. fortii*) 和利玛原甲藻 (*Prorocentrum lima*) 等在我国沿岸水域均有分布^[5], 严重威胁着我国的水产品安全和人类健康。大田软海绵酸 (okadaic acid, OA) 及其衍生物是 DSP 毒素的主要组分, 它能够促进肿瘤形成^[6], 促进脂质过氧化^[7-8], 同时具有细胞毒性, 能够诱导人上皮细胞、肾细胞、肺成纤维细胞, 鼠肝细胞、人内皮细胞等多种哺乳动物细胞发生凋亡^[9-11]。然而, 有关腹泻性贝毒毒素的危害, 尤其是其对人类健康可能造成的影响及其危害机制还不清楚, 针对该类毒素灵敏、特异的生物检测方法还需要进一步发展。因

此, 本文以人肝细胞 HL-7702 和肝癌细胞 Bel-7402 为研究对象, 采用 MTT 法、细胞外部形态观察、磷脂酰丝氨酸不对称性分析 (Annexin V-FITC 和 PI 双染法) 及 DNA 断裂分析 (TUNEL 法) 的方法, 研究了 OA 对哺乳类细胞增殖的影响及对细胞凋亡的诱导作用, 以期进一步了解腹泻性贝毒毒素对人类可能造成的影响, 并探讨其可能的危害机制, 同时筛选快速、准确、灵敏的 DSP 毒素细胞毒性的检测指标和检测方法, 为我国海洋管理、环境保护、海洋水产和食品卫生部门的水产品安全检测提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 毒素及试剂 大田软海绵酸 (okadaic acid, OA) 购自 Sigma 公司, 用甲醇溶解, 配成 25 μ g/mL 的储备液, 0.22 μ m 滤膜过滤除菌, -20 $^{\circ}$ C 保存, 使用时用完全培养液稀释至相应浓度。MTT 购自 Sigma 公司, 以 D-Hank's 溶液配制成 5 mg/mL 贮存液, 0.22 μ m 滤膜过滤除菌, -20 $^{\circ}$ C 避光保存。二甲亚砜 (DMSO) 购自 Sigma 公司, 分装后 -20 $^{\circ}$ C 避光保存。所用试剂均为生物级别或细

* 收稿日期: 2007-10-29

基金项目: 中国科学院知识创新资助项目 (KZCX2-YW-208); 国家自然科学基金资助重点资助项目 (U0733006)

作者简介: 陈洋 (1979 年生), 女, 博士研究生; 通讯联系人: 颜天; E-mail: tianyan@ms.qdio.ac.cn

胞培养级。Annexin V - FITC Apoptosis Detection Kit 购自 Calbiochem 公司, 4 °C 避光保存; TUNEL (In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red) 购自 Roche 公司, -20 °C 避光保存。

1.1.2 细胞与细胞培养 人肝细胞 HL-7702 购自中科院上海细胞所细胞库, 人肝癌细胞系 Bel-7402 由中科院海洋研究所林秀坤研究员提供。细胞用 25 cm² 的细胞培养瓶, 在 37 °C、 $\varphi=5\%$ 的 CO₂ 饱和水汽培养箱中培养, 培养液为 RPMI 1640 (Gibco 公司), 添加 $w=10\%$ 的胎牛血清, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 青霉素, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的硫酸链霉素。细胞汇合后, 用 $w=0.25\%$ 的胰酶 (含 0.02 mol/L EDTA) 消化, 1:3 传代。

1.2 实验方法

1.2.1 OA 对人肝细胞 HL-7702 和肝癌细胞 Bel-7402 增殖的影响 细胞经 $w=0.25\%$ 的胰酶 (含 0.02 mol/L EDTA) 消化后, 用完全培养液重悬 (密度为 5×10^4 个/mL), 接种于 96 孔细胞培养板, 每孔 200 μL 细胞悬液, 于 37 °C、 $\varphi=5\%$ CO₂ 的饱和水汽培养箱内培养 24 h 后, 弃培养液, 加入含不同质量浓度 OA 的培养液 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 共设 9 个质量浓度: 1, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 200, 400 ng/mL, 同时, 设置空白对照 (不加 OA) 和甲醇对照 (甲醇浓度与 400 ng/mL OA 实验组中的甲醇浓度相当), 每个实验组 6 个平行, 培养箱内作用 24 h 后, 弃培养液, 加入新鲜培养液 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 并加入 MTT (5 mg/mL) 10 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 放入培养箱内避光培养 4 h 后, 弃上清液, 加入 150 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 的 DMSO, 室温避光振荡 30 min, 待紫色的甲簪产物完全溶解后, 用酶标仪测定 490 nm 下的光密度 (A) 值。根据公式 (1) 计算各质量浓度组的细胞增殖抑制率:

$$\text{细胞增殖抑制率} = (1 - A_{\text{实验组}}/A_{\text{对照组}}) \times 100\% \quad (1)$$

1.2.2 OA 对人肝细胞 HL-7702 和肝癌细胞 Bel-7402 形态的影响 取消化后的细胞悬液 (密度为 5×10^4 个/mL) 接种于细胞培养瓶中, 于 37 °C、 $\varphi=5\%$ CO₂ 的饱和水汽培养箱中培养 24 h 后, 更换培养液, 并添加不同体积的 OA, 使得 OA 的最终质量浓度分别为 10 ng/mL、50 ng/mL 和 100 ng/mL, 同时设置不加 OA 的对照组, 于培养箱内作用 24 h 后, 倒置显微镜观察各实验组细胞形态并拍照。

1.2.3 Annexin V - FITC 和 PI 双染法检测 OA 对细胞凋亡的诱导作用 取消化后的细胞悬液接种于 35 mm 细胞培养皿中, 其它实验设计与 1.2.2 相同, OA 作用 24 h 后, 收集各实验组中悬浮的和贴壁的细胞, 参照 Annexin V - FITC Apoptosis Detection Kit (Cat. No. PF032) 的方法进行染色。主要步骤为: 将收集的细胞用 $1 \times \text{Binding Buffer}$ 调整至密度约为 1×10^6 个/mL, 取 0.5 mL 至 1.5 mL 离心管中, 加入 10 μL Media Binding Reagent, 再加入 1.25 μL Annexin V - FITC, 室温避光 15 min (18 ~ 24 °C), 1 000 g 室温离心 5 min, 去除上清, 用 0.5 mL 冷的 $1 \times \text{Binding Buffer}$ 重悬细胞, 加入 10 μL PI, 将样品置于冰上, 避光, 荧光显微镜观察。

1.2.4 TUNEL (Terminal - deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling) 法检测 OA 对细胞凋亡的诱导作用 取无菌的盖玻片放入 35 mm 细胞培养皿中, 其它实验方法与 1.2.2 相同, 实验结束后, 取出盖玻片放在洁净的载玻片上, 参照 In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red (Cat. No. 12 156 792 910) 的方法进行染色, 主要步骤为: 盖玻片空气干燥后用固定液 (PBS 配制的 $\varphi=4\%$ 多聚甲醛, pH 7.4) 室温放置 60 min, PBS 洗玻片 1 遍, 去除 PBS, 滴加 100 μL 渗透液于盖玻片上, 冰上渗透 2 min, PBS 洗玻片 2 遍, 干燥后滴加 50 μL TUNEL 反应混和液于盖玻片上, 密封于 37 °C 湿润培养箱内孵育 60 min 后, PBS 洗细胞 3 遍, 立即用荧光显微镜观察。

2 结 果

2.1 OA 对人肝细胞 HL-7702 和肝癌细胞 Bel-7402 增殖的影响

不同质量浓度的 OA 对人肝细胞 HL-7702 和肝癌细胞 Bel-7402 增殖的影响结果如图 1 所示: OA 对人肝细胞和肝癌细胞的增殖有显著的抑制作用, 且这种抑制作用与 OA 的质量浓度正相关。但两株细胞对 OA 的敏感性不同, 暴露于 10 ng/mL 的 OA 24 h, 人肝癌细胞的增殖即受到显著的抑制 ($P < 0.05$), 而当 OA 的质量浓度增加到 40 ng/mL 时, 人肝细胞的增殖才受到明显的抑制 ($P < 0.05$)。从图 2 可以看出: 当 OA 的质量浓度在 10 ~ 100 ng/mL 范围内时, 其对两株细胞增殖的抑制作用与 OA 的浓度线性相关, OA 对人肝细胞和肝癌细胞的 24 h IC₅₀ 分别为 65 ng/mL 和 60 ng/mL。

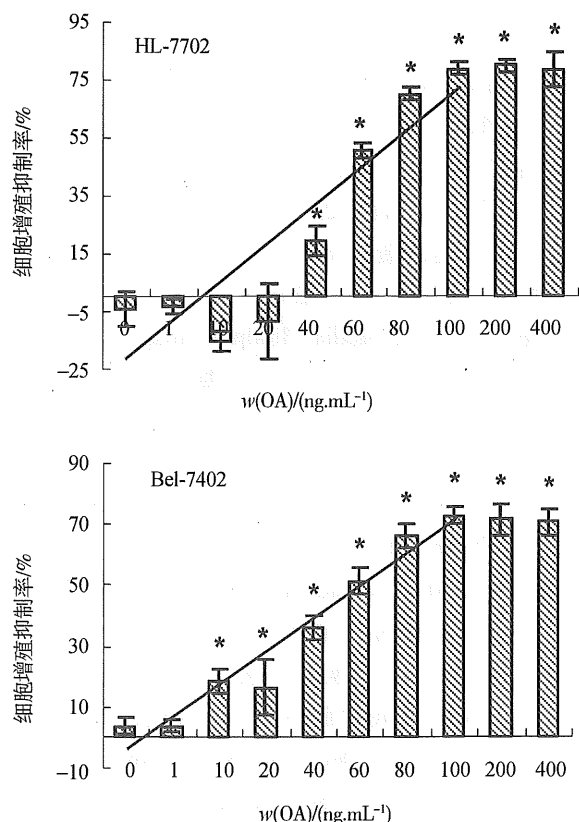


图 1 大田软海绵酸 OA 对人肝细胞 HL-7702 和肝癌细胞 Bel-7402 增殖的影响 (*: $P < 0.01$)

Fig. 1 Effects of okadaic acid on the proliferation of human hepatocyte cell line HL-7702 and human hepatocellular cancer cell line Bel-7402

2.2 OA 对人肝细胞 HL-7702 和肝癌细胞

Bel-7402 形态的影响

OA 对人肝细胞 HL-7702 和肝癌细胞 Bel-7402 形态的影响如图 2 所示: 对照组细胞大部分呈梭形或多角形, 细胞连接紧密, 胞质较透明。而不同质量浓度的 OA 作用 24 h 后, 两株细胞的形态均发生不同程度的变化, 且随着 OA 质量浓度的增加, 变化逐渐显著。暴露于 10 ng/mL 的 OA, HL-7702 细胞形态无明显变化, 但 50 ng/mL 的 OA 导致大部分细胞变圆, 个别细胞出现“发泡”现象, 100 ng/mL 的 OA 导致细胞凋亡小体的形成, 细胞不同程度地碎裂。对于 Bel-7402 细胞, 10 ng/mL 的 OA 即导致细胞变圆, 失去多角形形状, 50 ng/mL 的 OA 影响更为显著: 大部分细胞变圆, 细胞膜皱褶、卷曲、发泡, 细胞之间相互分离, 部分细胞脱壁, 可见膜包裹的凋亡小体; 当 OA 质量浓度达到 100 ng/mL 时, 细胞凋亡小体明显可见, 细胞不同程度地碎裂。

2.3 Annexin V-FITC 和 PI 双染法检测 OA 对人肝细胞 HL-7702 和肝癌细胞 Bel-7402 凋亡的诱导作用

OA 作用 24 h 的 HL-7702 细胞和 Bel-7402 细胞经 Annexin V-FITC 和 PI 双染后的结果如图 3 所示: OA 对这两株细胞的影响趋势类似, 对照组细胞既不被 PI 染色, 也不被 Annexin V-FITC 染色, 表明对照组细胞活性较好, 细胞膜完整, 未发

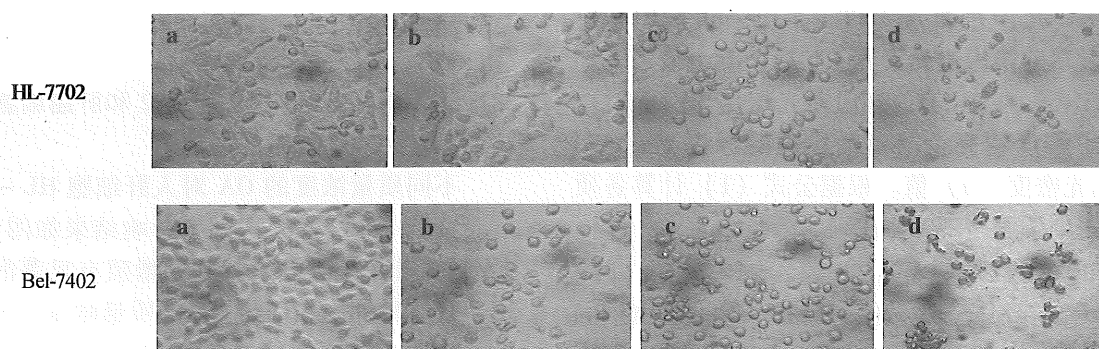


图 2 OA 对人肝细胞 HL-7702 (上) 和肝癌细胞 Bel-7402 (下) 形态的影响

Fig. 2 The effect of okadaic acid on morphology of HL-7702 and Bel-7402 cell line
(a: 对照; b: 10 ng/mL; c: 50 ng/mL; d: 100 ng/mL)

生凋亡或坏死。而各实验组细胞均可被 Annexin V-FITC 不同程度的染色, 表明各实验组细胞磷脂酰丝氨酸外翻, 细胞发生不同程度的凋亡。其中,

100 ng/mL 的 OA 作用 24 h, Bel-7402 细胞的个别细胞可被 PI 染色, 呈红色荧光, 表明个别细胞发生坏死, 细胞膜破裂。

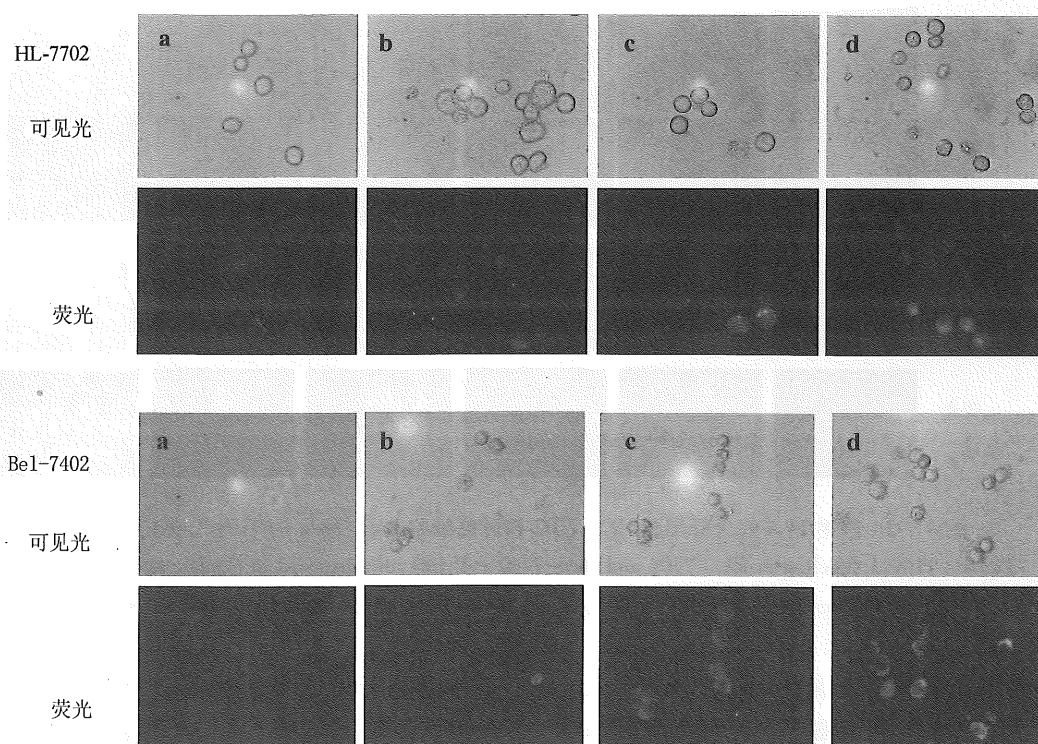


图3 OA作用24 h的人肝细胞 HL-7702 和肝癌细胞 Bel-7402 经 Annexin V-FITC 和 PI 双染的结果

Fig. 3 HL-7702 and Bel-7402 cell line stained with Annexin V-FITC and PI after exposed to okadaic acid for 24 h
(a: 对照; b: 10 ng/mL; c: 50 ng/mL; d: 100 ng/mL)

2.4 TUNEL (Terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling) 法检测 OA 对人肝癌细胞 Bel-7402 凋亡的诱导作用

10 ng/mL、50 ng/mL 和 100 ng/mL 的 OA 作用 24 h 后的 HL-7702 细胞和 Bel-7402 细胞经 TUNEL 染色后的结果如图 4 所示: 10 ng/mL 的 OA 不能诱导人肝细胞 HL-7702 发生凋亡, 但能导致人肝癌细胞 Bel-7402 的 DNA 断裂, 诱导该细胞凋亡, 但细胞形态完整, 未见凋亡小体; 而暴露于 50 ng/mL OA, 人肝细胞 HL-7702 和肝癌细胞 Bel-7402 细胞均发生凋亡, 且凋亡细胞的红色荧光更强, 表明该质量浓度下细胞凋亡更加显著; 100 ng/mL 的 OA 对两株细胞凋亡的诱导作用更加显著, 细胞可见凋亡小体, 且 Bel-7402 细胞不同程度的解体。由此可见, OA 能诱导两株细胞发生凋亡, 且细胞凋亡的程度与 OA 的质量浓度正相关。

3 讨论

本研究表明: OA 对人肝细胞 HL-7702 和肝癌细胞 Bel-7402 的增殖有十分明显的抑制作用, 且这种抑制作用与 OA 的质量浓度线性相关。以往其它学者的研究也发现了类似的现象, 如 Rogers 等^[12]研究发现: 20 ng/mL 的 OA 作用 24 h, 中国硕鼠肺细胞 V79 克隆形成的数目明显降低, 24 ng/mL 的 OA 使细胞克隆形成率降低 50%, 30 ng/mL 的 OA 使得细胞 100% 死亡; Creppy E E 等^[13]的研究发现: 3.75 ~ 60 ng/mL 的 OA 对人肠内皮细胞 (Caco-2) 的增殖有显著的抑制作用, 并且随着质量浓度的增加, 影响增强, 24 h 时, 15 ng/mL 的 OA 作用 24 h 即导致细胞 50% 死亡。这些研究得出的 OA 对不同细胞增殖的 24 h IC_{50} 之间存在差异, 这种差异可能与不同细胞株对毒素的敏感性不同有关^[14]。

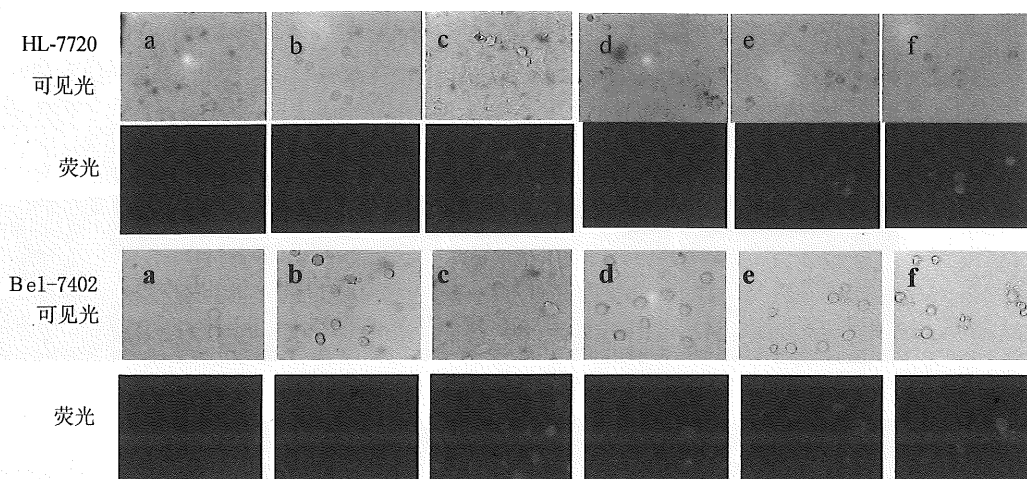


图 4 OA 作用 24 h 的人肝细胞 HL-7702 和肝癌细胞 Bel-7402 的 TUNEL 标记结果

Fig. 4 TUNEL labeling in HL-7702 and Bel-7402 cell line after exposed to okadaic acid for 24 h

(a: 对照; b: 阴性对照; c: 阳性对照; d: 10 ng/mL; e: 50 ng/mL; f: 100 ng/mL)

本文通过形态学观察发现 OA 作用 24 h 的人肝细胞 HL-7702 和人肝癌细胞 Bel-7402 的形态学变化符合凋亡细胞的特征。Keer 等^[15]首先描述了动物细胞凋亡的形态学特点, 主要的形态学变化为: 细胞体积缩小, 微绒毛消失, 细胞核的固缩以及凋亡小体的形成。随后一些学者的研究均发现凋亡细胞的形态变化与上述特征类似^[16-18]。对于 OA 导致的人肝细胞和肝癌细胞超微结构的变化将作进一步研究。Annexin V-FITC/PI 双染法和 TUNEL 法检测发现: OA 能导致细胞磷脂酰丝氨酸 (PS) 外翻, 细胞 DNA 断裂, 这均表明: OA 能够诱导两株细胞发生凋亡, 这与形态学观察的结果一致。已有研究表明: OA 是一种肿瘤促进剂^[6], 对于其具体的促癌机制还不完全清楚, 但已往对促癌物作用机制的研究发现: 一些促癌物能够引发生长抑制或凋亡效应, 启动细胞有选择性的存活优势, 从而迅速增殖, 成为转化克隆或肿瘤^[19]。同时也有研究发现: OA 作用早期可能是通过诱导凋亡而对细胞进行“负向选择”, 使具有存活优势的启动细胞增殖起来形成转化克隆^[20]。对于 OA 对人肝细胞和人肝癌细胞凋亡的诱导作用与其促癌作用的关系有待于进一步研究。

目前针对 DSP 毒素的检测方法可以分为生物检测法和化学检测法两大类^[21-23]。生物测试法主要有小白鼠分析、酶学法 and 细胞毒性测试等方法; 化学检测法中高效液相色谱法被广为应用, 薄层色谱、色谱-质谱、毛细管电泳、X-射线结晶分析法和核磁共振等法也有应用。这些检测方法虽然各有优势, 但目前还没有一种针对 DSP 毒素的标准检测方法。为了更快速、准确地检测水体及水产

品体内的 DSP 毒素, 亟需发展快速、简便、灵敏的方法, 使之能够用于 DSP 毒素的长期监测。细胞毒性检测方法无需大型仪器和专业人员, 结果可靠, 操作简便、快速, 是一种很有发展潜力的毒素检测方法^[24]。然而针对 DSP 毒素, 目前还无标准的细胞毒性测试细胞株和测试指标, 这在一定程度上限制了该方法的发展。本研究发现: 人肝癌细胞对 OA 的反应更为敏感。当 OA 的质量浓度为 10 ng/mL (12.5 nmol/L) 时, 该株细胞的形态即发生明显改变, 且细胞磷脂酰丝氨酸外翻, 细胞 DNA 断裂, 这一检出限与应用其它类型哺乳类细胞进行的研究的检出限相当^[25-26], 与 HPLC-FLD 法和酶活力抑制法的检出限 (1 $\mu\text{g eq. / kg}$ 贝组织) 也相当^[27-28]。实验中还发现: 双染法相对于 TUNEL 法而言更敏感, 能检测到细胞的早期凋亡, 且该法不需要固定细胞, 因此更加省时, 并可进一步用流式细胞仪进行快速检测, 是目前较为理想的凋亡检测方法^[29]。另外, 人肝癌细胞生长快速、易于培养、对毒素反应敏感, 因此, 应用该株细胞进行的细胞毒性测试方法有望替代传统、耗时的小鼠生物测试用于 OA 等赤潮毒素毒性的常规监测。

致谢: 感谢中科院海洋所的林秀坤研究员提供人肝癌细胞株, 并感谢王征博士、董平原硕士在细胞培养技术方面给予的帮助。

参考文献:

- [1] HALLEGRAEFF G M. Harmful algal blooms; a global overview [C] // HALLEGRAEFF G M, ANDERSON D M, CEMBELLA A D. Manual on harmful marine microal-

- gae. UNESCO: IOC Manuals and Guides 33, 1995: 1 - 22.
- [2] SHUMWAY S E. A review of the effects of algal blooms on shellfish culture [J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 1990, 21: 65 - 104.
- [3] AUNE T. Risk assessment of toxins associated with DSP, PSP and ASP in seafood [C] // DEKOE W J, SAMSON R A, VAN EGMOND H P, et al. Mycotoxins and phycotoxins in perspective at the turn of the millennium, proceedings of the X international IUPAC symposium on mycotoxins and phycotoxins. Wageningen, the Netherlands: Ponsen & Looyen, 2001: 515 - 526.
- [4] 周名江, 朱明远, 张经. 中国赤潮的发生趋势和研究进展 [J]. *生命科学*, 2001, 13(2): 54 - 59.
- ZHOU Mingjiang, ZHU Mingyuan, ZHANG Jing. Status of harmful algal blooms and related research activities in China [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2001, 13(2): 54 - 59.
- [5] 陈则玲, 付云娜, 巩宁. 腹泻性贝毒及其高效液相色谱检测方法 [J]. *海洋通报*, 2000, 19(1): 73 - 78.
- CHEN Zeling, FU Yunna, GONG Ning. Analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins by high performance liquid chromatography [J]. *Marine Science Bulletin*, 2000, 19(1): 73 - 78.
- [6] FUJIKI H, SUGANUMA M. Unique features of the okadaic acid activity class of tumor promoters [J]. *Journal of Cancer Research Clinic Oncology*, 1999, 125: 150 - 155.
- [7] TRAORÉA, AMBALIOU S, DANO S D, et al. Combined effects of okadaic acid and cadmium on lipid peroxidation and DNA bases modifications (m5dC and 8-(OH)-dG) in Caco-2 cells [J]. *Archives of Toxicology*, 2000, 74: 79 - 84.
- [8] MATIAS W G, TRAORÉA, BONINI M, et al. Oxygen reactive radicals production in cell culture by okadaic acid and their implication in protein synthesis inhibition [J]. *Human & Experimental Toxicology*, 1999, 18: 634 - 639.
- [9] BOE R, GJERTSEN B T, VINTERMYR O K, et al. The protein phosphatase inhibitor okadaic acid induced morphological changes typical of apoptosis in mammalian cell [J]. *Experimental Cell Research*, 1991, 195: 237 - 246.
- [10] LERGA A, RICHARD C, DELGRADO M D. Apoptosis and mitotic arrest are two independent effects of the protein phosphatases inhibitor okadaic acid in K562 Leukemia cells [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 1999, 24: 256 - 264.
- [11] TRAORÉA, MAEVE L, SANNI A, et al. Induction of apoptosis in human colonic epithelial cells (Caco - 2) by Okadaic acid [J]. *Toxicology Letter Supplement*, 1999, 1/99: 73.
- [12] ROGER C G, HÉROUX - METCALF C, LANGLOIS I. Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of okadaic acid, a non - phorbol ester type tumour promoter, in V79 Chinese hamster lung cells [J]. *Toxicology in Vitro*, 1994, 8(2): 269 - 276.
- [13] CREPPY E E, TRAORÉA, BAUDRIMONT I, et al. Recent advances in the study of epigenetic effects induced by the phycotoxin okadaic acid [J]. *Toxicology*, 2002, 181/182: 433 - 439.
- [14] OTERI G, ZUCCO F, STAMMATI A. Cytoskeleton perturbations induced by okadaic acid in two human cell lines [J]. *Toxicology Letters*, 1998, 95 (supplement 1): 151 - 152.
- [15] KERR J F R, WYLLIE A H, Currie A R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics [J]. *British Journal of Cancer*, 1972, 26: 239 - 257.
- [16] WYLLIE A H, KERR J F R, CURRIE A R. Cell death: the significance of apoptosis [J]. *International Review of Cytology*, 1980, 68: 251 - 303.
- [17] LAM E, PONTIER D, POXO O. Die and live: programmed cell death in plants [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 1999, 2: 502 - 507.
- [18] LI W C, KUSZAK J R, DUNN K, et al. Lens epithelial cell apoptosis appears to be a common cellular basis for non-congenital cataract development in humans and animals [J]. *The Journal of Cell Biology*, 1995, 130: 169 - 181.
- [19] ANDERSEN M E, MILLS J J, JINLE R L, et al. Negative selection in hepatic tumor promotion in relation to cancer risk assessment [J]. *Toxicology*, 1995, 102(1 - 2): 223 - 237.
- [20] 敖琳, 高利宏, 胡冉, 等. 岗田酸促癌作用过程中对 Balb/c 3T3 细胞凋亡的影响 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2006, 20(5): 414 - 420.
- AO Lin, GAO Lihong, HU Ran, et al. Influence of okadaic acid on apoptosis of Balb/c 3T3 cells during the tumor promotion stage. *Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology*, 2006, 20(5): 414 - 420.
- [21] QUILLIAN M A. Analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins in shellfish tissue by liquid chromatography with fluorometric and mass spectrometric detection [J]. *Journal of AOAC International*, 1995, 78(2): 555 - 570.
- [22] DRAISCI R, FERRETTI E, PALLESCHI L, et al. High levels of yessotoxin in mussels and presence of yessotoxin and homoyessotoxin in dinoflagellates of the Adriatic Sea [J]. *Toxicon*, 1999, 37: 1187 - 1193.
- [23] GOTO H, IGARASHI I, YAMAMOTO M, et al. Quantitative determination of marine toxins associated with di-

- arrhetic shellfish poisoning by liquid chromatography coupled with mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography (A)*, 2001, 907: 181 - 189.
- [24] CEMBELLA A D, DOUCETTE G J, GARTHWAITE I. In vitro assays for phycotoxins [C] // HALLEGRAEFF G M, ANDERSON D M, CEMBELLA A D. *Manual on Harmful Marine Microalgae*. UNESCO, 1995: 297 - 345.
- [25] LEIRA F, VIEITES J M, VIEYTES M R, et al. Apoptotic events induced by the phosphatase inhibitor okadaic acid in normal human lung fibroblasts [J]. *Toxicology in Vitro*, 2001, 15: 199 - 208.
- [26] BOE R, GJERTSEN B T, VINTERMYR O K, et al. The protein phosphatase inhibitor okadaic acid induced morphological changes typical of apoptosis in mammalian cell [J]. *Experimental Cell Research*, 1991, 195: 237 - 246.
- [27] LI A F, YU R C, LI J. Protein Phosphatase Inhibition Assay for Detection of Diarrhetic Shellfish Poison in Oyster [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2006, 34(3): 283 - 287.
- [28] QUILLIAM M A. Analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins in shellfish tissue by liquid chromatography with fluorometric and mass spectrometric detection [J]. *Journal of AOAC International*, 1995, 78(2): 555 - 570.
- [29] SPAN L P, PERMINGS A H, VIERWINDEN G, et al. The dynamic process of apoptosis analyzed by flow cytometry using Annexin - V/propidium iodide and a modified in situ end labeling technique [J]. *Cytometry*, 2002, 47(1): 24 - 31.

Okadaic Acid Inhibits Cell Proliferation and Induces Apoptosis of Human Hepatocyte Cell Line HL-7702 and Hepatocellular Cancer Cell Line Bel-7402

CHEN Yang^{1,2}, YAN Tian^{1*}, YU Ren-cheng¹, ZHOU Ming-jiang¹

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China;

2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: The effects of okadaic acid (OA) on cell proliferation of human hepatocyte cell line HL-7702 and human hepatocellular cancer cell line Bel-7402 were studied using MTT assay. And its induction on apoptosis of these two cell lines was investigated by morphological observation, AnnexinV-FITC and propidium iodide (PI) double-staining and TUNEL assay. The results showed that OA inhibited the cell proliferation significantly in a dose-dependent manner with 24 h IC_{50} being 65 ng/mL and 60 ng/mL, respectively. The cells treated with OA rounded up and detached from the substratum. Then, the protrusions and membrane-bounded fragments of cells formed. The results of detection by Annexin V-FITC and PI double-staining and TUNEL assay indicate that OA induces apoptosis of the two cell lines. The results suggest that okadaic acid could inhibit the cell proliferation significantly and induce apoptosis of HL-7702 and Bel-7402 cell line in a dose and time dependent manner.

Key words: okadaic acid; human hepatocyte cell line HL-7702; human hepatocellular cancer cell line Bel-7402; cell proliferation; apoptosis