

田螺多糖抑制肿瘤细胞增殖生物活性的实验研究*

朱 涛, 许礼发, 刘小燕, 付计锋

(安徽理工大学医学院, 安徽 淮南 232001)

摘要: 目的 分析田螺多糖的理化性质;研究其体外抑制癌细胞的生物活性。方法 苯酚-硫酸法测定多糖含量,紫外分析检测多糖蛋白,电解法检测硫酸基。以人宫颈癌细胞(Hela)、人大肠癌细胞株(HCT-8)为体外实验模型,将不同浓度的田螺多糖、5 氟尿嘧啶(5-Fu)分别与癌细胞作用 72 h,以不加药物的细胞对照,利用 MTT 法检测细胞活性,计算细胞抑制率,评价田螺多糖体外抗肿瘤生物活性。结果 田螺多糖含量 86.26%,蛋白含量少,含有硫酸基。田螺多糖在体外对 Hela 细胞、HCT-8 细胞均有抑制作用,但抑制后者效果较差。结论 田螺多糖具有抗肿瘤活性,但对抑制不同的肿瘤细胞可能存在一定的选择性或不同的抑制机理。

关键词: 田螺多糖; Hela 细胞; HCT-8 细胞; 体外抗肿瘤

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2016)01-0013-04

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2016.01.004

《本草纲目》记载中,田螺有利湿清热,止咳醒酒,利大小便,治脚气、黄疸的功效。近年来,国内外有关田螺多糖的研究多集中在抗病毒作用,关于其抗肿瘤的生物活性研究报道较少。贝类多糖是动物多糖研究领域较为重要的分支^[1]。我国田螺资源丰富,开发潜力大。因此,制备田螺多糖并探讨其生物活性具有一定的应用价值。在本学科点陆续对陆生贝类、淡水贝类多糖抗病毒等实验研究基础上^[2-6],本实验以淮南地区常见的中国圆田螺为材料,提取贝类多糖,对其理化性质及抑制肿瘤细胞增殖的生物活性做进一步深入研究,现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验药品与试剂

纯化后的中国圆田螺多糖(Polysaccharide of Cipangopaludina chinensis,简称 PCC),人宫颈癌细胞(Hela)、大肠癌细胞(HCT-8)由安徽理工大学医学院病原生物教研室提供;胰蛋白酶、RPMI1640(Gibco 公司)、5-Fu(上海旭东海普药业公司)。

1.2 主要仪器

CO₂ 培养箱(德国 Memmert 公司);倒置显微镜(日本 Olympus Optical 公司);UV2550 紫外分光光

度计(日本 Shimadzu 公司);MK3 酶联免疫检测仪(美国 Thermo 公司)。

1.3 田螺多糖理化性质分析

1.3.1 多糖含量测定

以葡萄糖为标准品,采用苯酚-硫酸法测定田螺多糖的多糖含量^[7-8]。以 2.0 mL 蒸馏水做空白对照组。用分光光度计在波长 490 nm 处测定吸光度 A。以 A 值和葡萄糖标准浓度 C 值分别作为横坐标与纵坐标,绘制标准曲线,计算标准曲线线性回归方程。

1.3.2 紫外分析蛋白含量

将提取的田螺多糖配成 2 mg·mL⁻¹ 多糖溶液,以蒸馏水为空白对照,在 200~400 nm 波长下进行紫外可见光吸收扫描,检查 260 nm、280 nm 处有无吸收峰。

1.3.3 硫酸基测定

提取的多糖用浓盐酸在 100 °C 回流水解 15 h 后,取一干燥试管,加入电解后多糖溶液,滴入 5% BaCl₂ 溶液,产生白色沉淀(阳性),即证实有硫酸基存在^[9]。

1.4 MTT 法-体外抑制癌细胞增殖的实验方法

细胞抑制率=(对照组 OD 值-药物组 OD 值)/

* 基金项目: 安徽省教育厅高校省级自然科学重点研究项目(KJ2008A014);安徽理工大学青年教师科研基金项目(QN201146)

收稿日期: 2015-11-02

作者简介: 朱涛(1979-),男,安徽淮南人,讲师,主要研究方向:药物免疫学。E-mail:kwk@aust.edu.cn

OD 值对照组 $\times 100\%$

若抑制率为正说明药物对细胞增殖具有抑制作用,若值为零表明药物对细胞增殖无影响;若值为负说明药物对细胞增殖具有促进作用。

分别检测田螺多糖对 HeLa 细胞、HCT-8 细胞的体外抑制实验,共设 4 个组,分别为 ①空白组:加培养液;②细胞对照组:加入培养液与癌细胞;③药物组:7 个不同浓度梯度的多糖溶液($12.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $400 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $800 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$);④阳性药物组:5 氟尿嘧啶(5-Fu),选取 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度配制。

具体实验步骤^[10]如下:①收集对数期细胞,进行细胞计数,最后稀释成 2×10^4 个/mL 的细胞悬液, $200 \mu\text{L}$ /孔加入到 96 孔细胞培养板,其中空白孔只加细胞培养液(无细胞)。放置到 37°C , 2.5% CO_2 细胞培养箱中过夜;②第 2 天吸弃细胞培养液,按照加样顺序加入实验多糖药物(田螺多糖),每种浓度 5 复孔,其中对照孔加细胞培养液(有细胞);③于 37°C , 2.5% CO_2 细胞培养箱中培养 72 h 后,吸弃孔内溶液。 $20 \mu\text{L}$ /孔加入 MTT 溶液,继续在 37°C 培养箱中培养 4 h;④离心,去上清, $150 \mu\text{L}$ /孔加入 DMSO 溶液,室温震荡 10 min;⑤MK3 酶标仪上于 570 nm 处测定吸光度 OD 值。分别计算不同浓度的多糖溶液对癌细胞增殖的抑制率。

1.5 数据处理

计算不同多糖浓度、阳性参照药物(5-Fu)对癌细胞增殖的抑制率。使用 Origin9.0 绘制量效曲线,使用 SPSS16.0 软件对实验数据处理,计算半数抑制浓度 IC_{50} 并进行 t 检验比较,若 $P<0.05$,则表示差异有显著性。

2 结果

2.1 田螺多糖性质

乳白色颗粒状晶体,无味,易溶于水,不溶于高浓度乙醇等有机溶剂。计算得标准曲线线性回归方程: $A=0.0071C-0.0022(R=0.9969)$,测得多糖纯度为 86.27%,260 nm、280 nm 处无明显吸收峰(如图 1),表明多糖中蛋白含量低。硫酸基测定实验中产生白色沉淀,说明硫酸基存在。

2.2 田螺多糖对 HeLa 细胞增殖的抑制效果

根据表 1 可知,各浓度的 PCC 对 HeLa 细胞的增殖均有较好的抑制作用,且抑制率随多糖的浓度成正比,存在一定的量效关系,两者之间的量效关

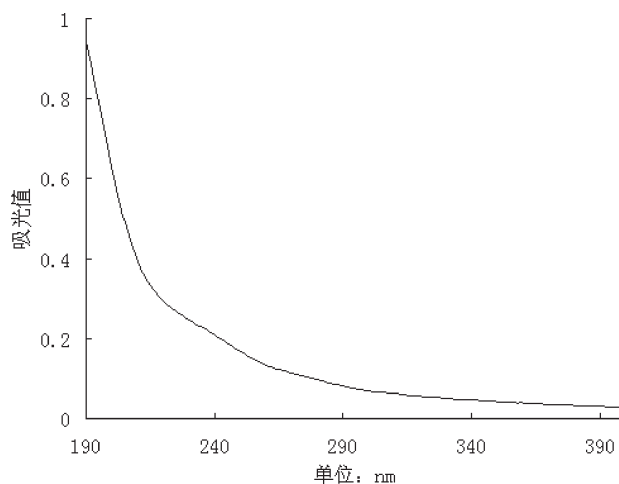


图 1 田螺多糖的紫外扫描图(190~400 nm)

表 1 各药物组对 HeLa 细胞增殖的抑制率

组别	OD ₅₇₀ 值	抑制率/%
空白组	0.081 $\pm$ 0.012	
细胞对照组	1.282 $\pm$ 0.153	
5-Fu/($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	0.462 $\pm$ 0.049 [▲]	68.28
PCC/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		
12.5	1.188 $\pm$ 0.136 [*]	7.83
25	1.111 $\pm$ 0.159 [*]	14.24
50	1.071 $\pm$ 0.172 [*]	17.57
100	0.941 $\pm$ 0.137 [*]	28.39
200	0.820 $\pm$ 0.118 [*]	38.47
400	0.624 $\pm$ 0.082 [*]	54.79
800	0.494 $\pm$ 0.093 [*]	65.61

注:与细胞对照组比较:^{*} $P<0.05$;与 5-FU 组比较:[▲] $P<0.05$

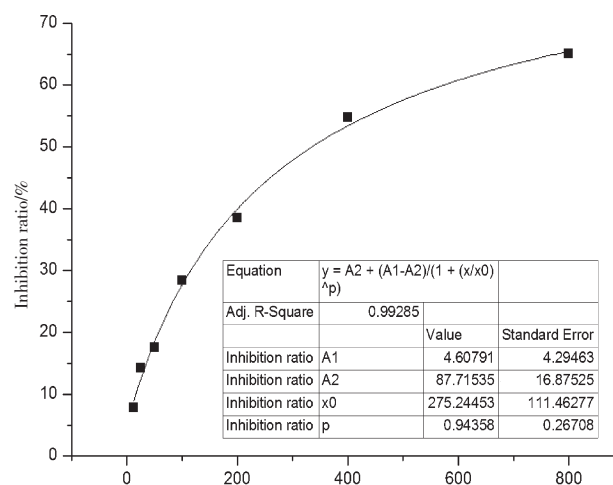


图 2 田螺多糖抑制 HeLa 细胞增殖量效曲线

系曲线,如图 2 所示,经 SPSS 中 Probit 分析,用概率模型计算,半数抑制率浓度约为 $340.2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

(95%置信区间 261.66~470.55 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。与细胞对照组相比,PCC 浓度 12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以上均具有显著性差异($P<0.05$)。阳性药物 5-Fu 对比同浓度 PCC,其抑制 Hela 细胞增殖效果好于同浓度田螺多糖。

2.3 田螺多糖对 HCT-8 细胞的体外抑制效果

根据表 2 可知,各浓度的 PCC 对 HCT-8 细胞的增殖有抑制作用,但抑制效果较差,PCC 浓度 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以上,与细胞对照组相比具有显著性差异($P<0.05$),当浓度达到 800 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时的,抑制效果无显著变化,两者之间的量效关系曲线,如图 3 所示,但是其抑制率无法达到 50%。阳性药物 5-Fu 对比同浓度 PCC,抑制 HCT-8 细胞增殖效果明显高于同浓度的田螺多糖。

表 2 各药物组对 HTC-8 细胞增殖的抑制率

组别	OD ₅₇₀ 值	抑制率/%
空白组	0.072±0.012	
细胞对照组	1.156±0.173	
5-Fu/(100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	0.329±0.020 [▲]	76.33
PCC/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		
12.5	1.151±0.153	0.46
25	1.143±0.091	1.21
50	1.135±0.102	1.98
100	1.110±0.129 [*]	4.25
200	1.081±0.054 [*]	6.92
400	1.016±0.071 [*]	12.92
800	0.980±0.132 [*]	16.24

注:与细胞对照组比较:^{*} $P<0.05$;与 5-FU 组比较:[▲] $P<0.05$

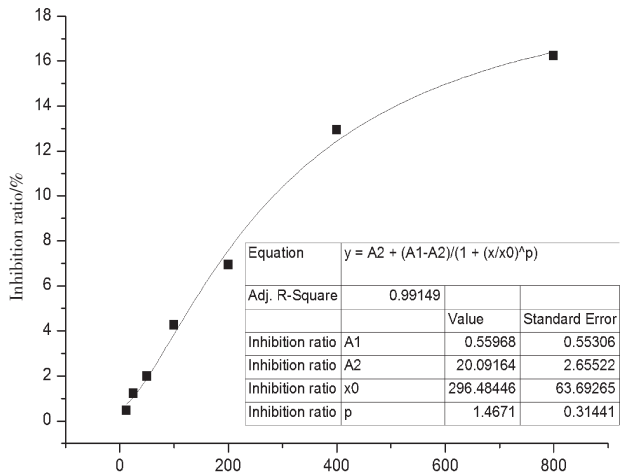


图 3 田螺多糖抑制 HTC-8 细胞增殖量效曲线

3 讨论

多糖是具有广泛生物活性的物质,随着近年来

学者的深入研究,贝类多糖的抗肿瘤生物活性^[11-15]也逐步受到重视,有研究表明,贝类多糖可直接抑制肿瘤细胞的增殖或诱导肿瘤细胞的凋亡,还可以以免疫反应调节剂作用间接抑制癌细胞。在本实验研究中,田螺多糖对 Hela 细胞、HCT-8 细胞体外具有抑制作用,证实其具备抗肿瘤生物活性。另外,有研究报道证实多糖的活性与其化学结构密切相关,两者组成的构效关系与多糖的官能团、分子量等理化性质也有关。已有学者实验证实贝类多糖是由葡萄糖、氨基葡萄糖、半乳糖、葡萄糖醛酸四种成分组成,其分子结构中含有的硫酸基与多糖活性密切相关。本实验证实田螺多糖含有硫酸基,属于酸性粘多糖。参考有关研究报道^[16],硫酸基团的含量、分布或相对分子质量等因素都会影响多糖的体外抗肿瘤活性。

实验结果与半数抑制浓度对比还显示,同浓度下田螺多糖体外抑制 Hela 细胞增殖效果较好,抑制人大肠癌细胞增殖效果较差,初步推断或证实该多糖抑制不同的肿瘤细胞可能存在一定的选择性,或者可能存在不同的抑制机理。本研究为进一步深入研究贝类多糖的抗肿瘤生物活性提供了理论和实验依据。由于影响多糖抗肿瘤活性的因素很多,如与药物浓度、作用时间、自身的结构等等,仅局限在体外抗肿瘤实验中,药物直接作用于肿瘤细胞,而无法体现肝、肾对药物的修饰、排泄作用,有些多糖在体外抗肿瘤细胞活性差,但在体内抗肿瘤细胞中表现出一定的活性,其机理也尚待深入探讨。因此,对贝类多糖的深入研究,一方面亟待加强其构效关系,化学修饰等方面的研究,另一方面需要在体内抗肿瘤实验中继续研究田螺多糖的抗肿瘤活性,进一步探讨其抗肿瘤的作用机理。贝类多糖作为一种新型、高效、低毒的抗肿瘤药物,具有光明的开发与应用前景。

参考文献:

- [1] 殷涌光,韩玉珠,丁宏伟. 动物多糖的研究进展[J]. 食品科学,2006,27(3):256.
- [2] 张超,李朝品,刘群红. 天螺多糖抑制 HBV 复制的体外实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2004,10(4):63-64.
- [3] 刘小燕,李朝品,王克霞. 中国圆田螺多糖体外抗乙肝病毒的实验研究[J]. 中国中药杂志,2013,38(6):879-883.
- [4] 刘小燕,李朝品,王克霞,等. 中国圆田螺多糖体内抗鸭乙型肝炎病毒作用的研究 [J]. 中国病原生物学杂志,2014,9(12):1104-1107.

- [5] 王克霞,湛孝东,李朝品,等. 江西巴蜗牛多糖对乙肝病毒复制的抑制作用研究 [J]. 中国药理学通报,2006,22(3): 378-379.
- [6] 湛孝东,王克霞,李朝品,等. 蜗牛多糖的提取和免疫学活性研究[J]. 时珍国医国药,2006,17(11):2191-2192.
- [7] 张青,张天民. 苯酚—硫酸比色法测定多糖含量[J]. 山东食品科技,2004,6(7):17-18.
- [8] 董群,郑丽伊,方积年. 改良的苯酚—硫酸法测定多糖和寡糖含量的研究[J]. 中国药学杂志,1996,31(9):550.
- [9] 朱玉强. 海参活性多糖的研究[D]. 济南:山东师范大学,2003.
- [10] 王瑞廷,申兴斌,许倩,等. 黄芩茎叶总黄酮对人宫颈癌 Hela 细胞株体外生长的影响 [J]. 山东医药,2005,45(2):15-16.
- [11] 童朝阳,林福生,张守兰,等. 皱纹冠蚌 *Cristaria plicata* 提取物抗肿瘤作用的实验研究 [J]. 中国海洋药物,2003,22(3):20-24.
- [12] 姚滢,魏江洲,王俊,等. 厚壳贻贝多糖的提取和免疫学活性研究[J]. 第二军医大学学报,2005,26(8):896-898.
- [13] 许子茂,李江滨,侯敢. 翡翠贻贝多糖的制备及体外对 Hela 肿瘤细胞生长的抑制作用 [J]. 中国现代药物应用,2010,4(7):1-2.
- [14] 王兵,蒋建敏,许东晖,等. 鲍鱼多糖对荷人鼻咽癌裸鼠抗癌作用的研究[J]. 中草药,2000,31(8):597.
- [15] 祝雯,林志铿,吴祖建,等. 河蚬糖蛋白对人肝癌细胞凋亡的影响[J]. 中国公共卫生,2004,20(6):674.
- [16] 程婷婷,李冬梅,刘娜,等. 一种鲍鱼脏器多糖的鉴定及活性研究[J]. 中国海洋药物,2008,27(2):9-13.

(编辑:杨阳)

Study on the Inhibitive Effect of Polysaccharide in Snail on Tumor Cells in Vitro

ZHU Tao, XU Lifa, LIU Xiaoyan, FU Jifeng

(School of Medicine, Anhui University of Science and Technology, Huainan 232001, China)

ABSTRACT: **Objective** The extraction process of polysaccharide in snail will be analyzed to study on polysaccharide in snail physicochemical property and the effect of it against tumor cells in vitro. **Methods** The content of polysaccharides is determined by phenol-sulphoacid method, the protein content of polysaccharides is tested by ultraviolet spectrometry, UV and the sulfate of polysaccharides is detected by electrolysis. With HCT-8 colorectal carcinoma and Hela cell line being the cell model in vitro, the polysaccharides of snail with different concentration and 5-Fu are to interact with cancerous cells. After 72 hours, comparing with the cells with no drug, through detecting the cell activity by MTT method, the rate of cell inhibition will be calculated. Finally, evaluate the anti-tumor activity of polysaccharide of snail in vitro according to all the above results. **Results** The amount of polysaccharides is 86.26%, containing low protein and sulfate. The polysaccharide can inhibit the proliferation on Hela cell line and HCT-8 colorectal carcinoma cell line, but weak in the latter. **Conclusion** The polysaccharides of snail show anti-tumor activity, but have certain selectivity or different inhibition mechanism against different types of tumor cells.

KEY WORDS: polysaccharide of snail; Hela cell line; HCT-8 colorectal carcinoma cell line; anti-tumor in vitro

《云南中医学院学报》欢迎网上投稿

网址:<http://www.xb.ynutcm.edu.cn>