

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.12.006

青果多糖组分对人宫颈癌 Hela 细胞增殖的抑制作用研究*

刘梅, 王颖, 王耀登, 刘洪, 王琴[△]

(重庆市中医院, 重庆 400021)

摘要:目的 探讨青果多糖不同组分对人宫颈癌 Hela 细胞增殖的抑制作用。方法 以乙醇除脂、水提、醇沉法制备青果粗多糖,经 DEAE-琼脂糖凝胶 FF 离子交换色谱分离,得 CFW(蒸馏水溶液洗脱部位)、CF1(0.5 mol/L 氯化钠溶液洗脱部位)、CF2(1.0 mol/L 氯化钠溶液洗脱部位)和 CF3(2.0 mol/L 氯化钠溶液洗脱部位),测定总多糖和总蛋白含量;将不同浓度的上述组分作用于人宫颈癌 Hela 细胞,以细胞培养液作空白对照,采用四氮唑盐(MTT)法检测 Hela 细胞增殖程度。结果 4 组分总糖含量均大于 70%,总蛋白含量均大于 0.87%;与空白对照比较,62.5,125,250,500,1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CFW,500,1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CF1,1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CF2 和 CF3 的吸光度值显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 青果 CFW 组分可显著抑制人宫颈癌 Hela 细胞的增殖。

关键词:青果;多糖;人宫颈癌 Hela 细胞;增殖;抑制作用

中图分类号:R932;R285.5;R273

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2019)12-0021-03

Inhibition Effect of *Canarii Fructus* Polysaccharides on Proliferation of Human Cervical Cancer Hela Cells

LIU Mei, WANG Ying, WANG Yaodeng, LIU Hong, WANG Qin

(Chongqing Traditional Chinese Medicine Hospital, Chongqing, China 400021)

Abstract: Objective To investigate the inhibition effect of different polysaccharides from *Canarii Fructus* on the proliferation of human cervical cancer Hela cells. **Methods** Raw polysaccharides was extracted from *Canarii Fructus* through alcohol degreasing, water extraction, alcohol precipitation and further purified by DEAE-sepharose fast flow ion exchange chromatography to obtain CFW(the washing part of distilled water solution), CF1(the washing part with 0.5 mol/L sodium chloride solution), CF2(the washing part with 1.0 mol/L sodium chloride solution) and CF3(the washing part with 2.0 mol/L sodium chloride solution), the contents of total polysaccharides and proteins were determined. Human cervical cancer Hela cells were treated with the above components at different concentrations, the proliferation of Hela cells was detected by MTT assay with cell culture fluid as blank control. **Results** The content of total polysaccharide of the 4 components was more than 70%, and the content of total protein of the 4 components was more than 0.87%. Compared with the blank control, the absorbance values of 62.5, 125, 250, 500 and 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CFW, 500 and 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CF1, 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CF2 and CF3 decreased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** The CFW fraction from *Canarii Fructus* can significantly inhibit the proliferation of human cervical cancer Hela cells.

Key words: *Canarii Fructus*; polysaccharides; human cervical cancer Hela cells; proliferation; inhibition effect

癌症是严重危害人类健康的恶性疾病,根据 2017 年国家癌症中心发布的中国最新癌症报告,中国每年新发癌症病例 429 万,即全国每天约 1 万人确诊癌症,每 1 分钟约 7 人确诊患癌。癌症已成为严重影响国民身体健康和社会发展的因素,为我国的医疗系统带来了巨大压力^[1]。目前,临床预防和治疗恶性肿瘤主要以化学治疗为主,顺铂和 5-氟尿嘧啶等是常用药物,但因毒副作用较大而限制了使用,故开发研制新型有效、副作用低的抗肿瘤药物成为科研工作者关注的重点。多糖是一类由多羟基醛或多羟基酮通过糖苷键连接而成的天然高分子聚合物,具有多种天然活性,如调节免疫、降血糖、抗肿瘤^[2-3]等作用。青果 *Canarii Fructus* 为橄榄科植物橄榄 *Canarium album*(Lour.) Raeusch. 的干燥成熟

果实,味甘、酸,性平,具有清热解毒、利咽、生津的功效。现代药理学研究表明,青果具有抗炎^[4]、镇痛^[5]、抗氧化^[6]及抑制肿瘤细胞增殖^[7]的作用。本研究中提取分离青果中的多糖类成分,并对其部位多糖和蛋白多糖类成分抑制人宫颈癌 Hela 细胞的增殖作用进行研究。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 细胞、试剂与仪器

细胞:人宫颈癌 Hela 细胞株[美国菌种保藏中心(ATCC),批号为 bc1043]。

药材:青果(四川欣康中药饮片有限公司,批号为 170401),经重庆市中医院药剂科药检室王琴副主任中药师鉴定为正品。

*基金项目:重庆市卫生计生委中医药科技项目[Zy201702003]。

第一作者:刘梅,女,硕士研究生,主管中药师,研究方向为中药药理学及中药制剂学,(电子信箱)2397769800@qq.com。

[△]通信作者:王琴,女,博士研究生,副主任中药师,研究方向为中药药理学,(电话)023-67063946(电子信箱)78wangqin@sina.cn。

仪器: Synergy HT 型全自动酶标仪(美国 Biotek 公司); BSA124S 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司); TDA-8002 型电热恒温水浴锅(上海精宏设备有限公司); DHG-9053A 型电热鼓风干燥箱(上海申贤恒温设备厂)。

试剂: DMEM 高糖培养基、胎牛血清、1% 青-链霉素、0.25% 胰蛋白酶(美国 Gibco 公司); BCA 蛋白定量试剂盒(美国 Thermo 公司); 四氮唑盐(MTT)试剂盒(杭州联科生物技术有限公司); DEAE-琼脂糖凝胶 FF(中国北京瑞达恒辉科技发展有限公司); 3 500 Da 透析袋(中国上海源叶生物科技有限公司); 无水乙醇、氯化钠(重庆川东化工集团有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 青果粗多糖的制备及含量测定

提取流程: 取青果饮片, 粉碎, 加 8 倍量无水乙醇, 加热回流提取 4 h, 滤过; 药渣置电热鼓风干燥箱中, 40℃ 烘干, 加 8 倍量水煎煮 3 次, 合并水煎液, 滤过, 去残渣; 减压浓缩至浓稠液, 加 4 倍量无水乙醇使醇体积分数达 80%, 静置过夜, 去上清液, 收集沉淀, 挥干, 依次用无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤, 挥干, 加水溶解, 冷冻干燥, 即得青果粗多糖。

DEAE-琼脂糖凝胶 FF 预处理: 以 0.2 mol/L 氢氧化钠溶液清洗 DEAE-琼脂糖凝胶 FF 至无色, 以蒸馏水洗至中性, 再以 0.1 mol/L 盐酸溶液清洗至无色, 以蒸馏水洗至中性, 蒸馏水配置成匀浆, 减压脱气 1 h, 直至浆液无任何气泡, 装柱(35 mm × 30 cm), 蒸馏水平衡过夜。

青果粗多糖各部位分离: 称取约 5 g 青果粗多糖, 溶于 20 mL 蒸馏水, 4 000 × g 离心 5 min, 取上清液, 玻璃棒引导, 沿色谱柱壁缓缓加样, 依次以蒸馏水、0.5 mol/L 氯化钠溶液、1.0 mol/L 氯化钠溶液、2.0 mol/L 氯化钠溶液洗脱, 采用苯酚-硫酸法检测洗脱液含糖部分, 收集, 透析袋用自来水流水透析 24 h, 减压浓缩, 冷冻干燥, 得青果粗多糖各部位, 即 CFW, CF1, CF2, CF3。

总多糖含量测定: 称取 D-葡萄糖对照品 20 mg, 精密称定, 置 250 mL 容量瓶中, 加去离子水定容, 分别量取 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8 mL, 置 2 mL 容量瓶中, 加去离子水定容, 加 6% 苯酚 1.0 mL 及浓硫酸 5.0 mL, 摇匀, 静置 20 min; 于 490 nm 波长处测定吸光度, 以去离子水为空白对照, 得标准曲线。吸取待测溶液适量, 按上述步骤操作, 根据标准曲线计算总多糖含量。

总蛋白含量测定: 以 BCA 蛋

白定量法测定, 配制工作液, 并配制 1 g/L 待测溶液。根据微孔板方案(样品与工作液的比例为 1:8), 取 3 组样品, 按标准曲线法操作, 取平均值, 根据标准曲线计算总蛋白含量。

1.2.2 细胞试验

细胞培养: 置 HeLa 细胞于含 10% 胎牛血清和 1% 青-链霉素的高糖 DMEM 培养液中, 于 37℃ 及 5% CO₂ 细胞培养箱内培养, 0.25% 胰蛋白酶消化传代。

药液制备: 分别称取 CFW, CF1, CF2, CF3 约 2 mg, 精密称定, 置灭菌 EP 管中, 加入含 10% 胎牛血清和 1% 青-链霉素的高糖 DMEM 培养液, 使质量浓度为 1 000 μg/mL, 振摇混匀, 4 000 × g 离心 5 min, 取上清液, 经 0.22 μm 无菌滤头滤过除菌, 倍比稀释, 得质量浓度均为 62.5, 125, 250, 500 μg/mL 的 CFW, CF1, CF2, CF3 溶液。

细胞增殖抑制试验: 采用 MTT 法, 选取对数生长期细胞, 用 0.25% 胰蛋白酶进行消化, 重悬, 调整细胞密度约为 5 × 10⁴ 个/mL, 以每孔 100 μL 接种于 96 孔板中; 于 37℃ 及 5% CO₂ 细胞培养箱内培养 24 h, 待细胞贴壁后, 弃去上清液, 加入 200 μL 不同质量浓度的 CFW, CF1, CF2, CF3 溶液, 每组设置 3 个复孔; 同时以不含多糖的细胞培养液为空白对照; 于 37℃ 及 5% CO₂ 细胞培养箱内培养 48 h 后, 每孔加 20 μL MTT 溶液(25 mg MTT 溶于 5 mL MTT 溶液中), 细胞培养箱中静置培养 4 h, 弃去培养液, 每孔加 150 μL Formazan 溶解液, 摇床上振摇 15 min, 于 37℃ 下、570 nm 波长处, 以酶标仪测定每孔吸光度(A)。抑制率(%) = (1 - A_{试验} / A_{对照}) × 100%。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计学软件分析。计数资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析(One way ANOVA), 各组与控制组之间的差异采用 Duncan post-hoc 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 青果多糖的总糖和总蛋白含量

青果粗多糖得率为 7.11%, 性状为淡黄色粉末。CFW, CF1, CF2, CF3 得率分别为 36.8%, 25.5%, 14.1%, 13.7%, 总回收率为 90.1%, 性状均为白色粉末状。结果见表 1。

表 1 青果粗多糖总糖和总蛋白含量($\bar{X} \pm s$, %, n = 3)

成分	总糖	总蛋白
CFW	80.43 ± 1.99	14.59 ± 0.19
CF1	76.38 ± 1.03	3.37 ± 0.23
CF2	70.90 ± 0.53	1.56 ± 0.13
CF3	72.54 ± 1.12	0.87 ± 0.09

本栏自由

重庆赢英康医疗器械有限公司

协办

表2 CFW, CF1, CF2, CF3 对Hela细胞增殖的抑制作用($\bar{X} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	CFW		CF1		CF2		CF3	
		A_{570}	抑制率(%)	A_{570}	抑制率(%)	A_{570}	抑制率(%)	A_{570}	抑制率(%)
空白对照	0	0.959 ± 0.075	0	0.959 ± 0.075	0	0.959 ± 0.075	0	0.959 ± 0.075	0
	62.5	$0.795 \pm 0.050^{\Delta}$	17.1 ± 5.2	0.915 ± 0.030	4.6 ± 3.2	0.945 ± 0.048	0.1 ± 7.8	0.943 ± 0.039	1.7 ± 4.0
	125	$0.667 \pm 0.042^{\Delta}$	30.5 ± 4.4	0.880 ± 0.046	8.2 ± 4.8	0.882 ± 0.051	1.5 ± 5.0	0.912 ± 0.026	4.9 ± 2.8
CFW	250	$0.542 \pm 0.038^{\Delta}$	43.5 ± 3.9	0.850 ± 0.049	11.3 ± 5.1	0.843 ± 0.055	8.0 ± 5.3	0.860 ± 0.042	10.3 ± 4.4
	500	$0.471 \pm 0.022^{\Delta}$	50.8 ± 2.3	$0.797 \pm 0.044^{\Delta}$	16.9 ± 4.5	0.830 ± 0.062	12.1 ± 5.7	0.850 ± 0.046	11.4 ± 4.8
	1 000	$0.406 \pm 0.030^{\Delta}$	57.6 ± 3.1	$0.744 \pm 0.038^{\Delta}$	22.4 ± 3.9	$0.785 \pm 0.057^*$	13.4 ± 6.5	$0.775 \pm 0.039^{\Delta}$	19.2 ± 4.1

注:与空白对照比较,* $P < 0.05$, $^{\Delta}P < 0.01$ 。 A_{570} 指570 nm波长处的吸光度。

2.2 Hela细胞增殖抑制效果

与空白对照比较,62.5,125,250,500,1 000 $\mu\text{g/mL}$ CFW,500 $\mu\text{g/mL}$ 和1 000 $\mu\text{g/mL}$ CF1及1 000 $\mu\text{g/mL}$ CF2和CF3的 A 显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),表明以上质量浓度组分对Hela细胞增殖有抑制作用。结果见表2。

3 讨论

本试验中利用乙醇除脂、水提、醇沉的方法从青果中提取得到粗多糖和粗多糖复合物成分,进一步利用DEAE-琼脂糖凝胶FF离子交换色谱对提取得到的粗多糖和粗多糖复合物成分进行部位分离,得到CFW,CF1,CF2,CF3 4个部位,通过总多糖和总蛋白含量测定,得CFW为含有 $(80.43 \pm 1.99)\%$ 总多糖和 $(14.59 \pm 0.19)\%$ 总蛋白的蛋白多糖类,而CF1,CF2,CF3为含有极少量蛋白的多糖类成分。

MTT法是一种检测细胞增殖和存活的方法,原理为活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性MTT还原为水不溶性的蓝紫色结晶甲瓖并沉积在细胞中,而死细胞无此功能。二甲基亚砜(DMSO)能溶解细胞中的甲瓖,以酶标仪测定 A ,可间接反映活细胞数量。在一定细胞数范围内,MTT结晶形成的量与细胞数呈正相关。

本试验中采用MTT法检测CFW,CF1,CF2,CF3这4个组分抑制人宫颈癌Hela细胞增殖的作用,结果显示,CFW在62.5,125,250,500,1 000 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度下均可显著抑制Hela细胞增殖,1 000 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度下的抑制率达 $(57.6 \pm 3.1)\%$,CF1,CF2,CF3在高质量浓度条件下也可显著抑制Hela细胞的增殖,但抑制活性较弱。

近年来,具有抗肿瘤活性的多糖类和糖蛋白类成分不断被发现,如绞股蓝多糖GPP2可显著抑制人肝癌HepG2细胞和人宫颈癌Hela细胞的增殖^[8],蛤蚧糖蛋白GSPP可抑制人肝癌SMMC-7721细胞的增殖^[9],鲍

鱼菇糖蛋白LB-1b可显著抑制人肝癌HepG2细胞和人乳腺癌MCF7细胞的增殖^[10]。本试验在体外试验中发现,青果中CFW组分具有显著抑制人宫颈癌Hela细胞的增殖作用,为青果开发为抗肿瘤药物提供了前期的理论基础。

参考文献:

- [1] 国家癌症中心. 2017年中国城市癌症最新数据报告[R/OL]. [2018-05-27]. <http://www.cicams.ac.cn/html/news>.
- [2] WU J, SHI S, WANG H, et al. Mechanisms underlying the effect of polysaccharides in the treatment of type 2 diabetes: A review[J]. Carbohydrate polymers, 2016, 144: 474-494.
- [3] ZONG A, CAO H, WANG F. Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research[J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 90(4): 1395-1410.
- [4] 何颖,杨桂林,胡翔宇,等. 青果总黄酮的抗炎作用研究[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(5): 2632.
- [5] 杨桂林,何颖,董小娟,等. 青果总黄酮的急性毒性及镇痛作用研究[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(5): 2674-2675.
- [6] 罗安才,李朋,柳建平,等. 青果抗氧化酶类的测定及其测定时的最适pH和温度[J]. 西南农业学报, 2011, 24(2): 535-537.
- [7] 向丽,叶迎春,胡晓燕,等. 青果多酚对人宫颈癌Hela细胞增殖与凋亡的影响[J]. 泸州医学院学报, 2013, 36(4): 343-346.
- [8] CHEN T, LI B, LI Y, et al. Catalytic synthesis and antitumor activities of sulfated polysaccharide from *Gynostemma pentaphyllum* Makino[J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 83(2): 554-560.
- [9] CHEN D, YAO WJ, ZHANG XL, et al. Effects of Gekko sulfated polysaccharide-protein complex on human hepatoma SMMC-7721 cells: Inhibition of proliferation and migration[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2010, 127(3): 702-708.
- [10] LI N, LI L, FANG JC, et al. Isolation and identification of a novel polysaccharide-peptide complex with antioxidant, anti-proliferative and hypoglycaemic activities from the abalone mushroom[J]. Bioscience Reports, 2012, 32(3): 221-228.

(收稿日期:2018-10-22)