

含硒紫球藻胞外多糖的制备及对体内外肿瘤细胞生长的影响

王 敏, 朱劲华, 马宇翔, 张成武, 李朝军

(南京师范大学 生命科学学院 分子细胞研究所, 江苏 南京 210097)

摘要: 采用在培养液中添加亚硒酸来实现藻对无机硒的富集和转化, 制备一种含硒的紫球藻(*Porphyridium* sp.)胞外多糖(Se-PSP); 通过 DAN 荧光法测硒含量及红外光谱, 对硒是否结合在多糖上进行了初步探讨; 用四唑盐比色法(MTT)研究了不同浓度含硒的紫球藻胞外多糖对 3 种体外肿瘤细胞生长的影响。通过建立荷瘤小鼠模型, 研究了含硒多糖对腹水瘤 S180 的作用。结果表明含硒的胞外多糖含硒量约为 0.015 mg/g, 40,80 mg/L Se-PSP 对 3 种肿瘤细胞 SMMC7721、A549、A357 均有一定程度的抑制作用, 尤其是对 SMMC7721 抑制程度最为明显。荷瘤小鼠模型实验结果表明 100 mg/(kg·d) Se-PSP 可以延长荷瘤小鼠的生存时间, Se-PSP 有可能成为一种抗肿瘤药物。

关键词: 紫球藻(*Porphyridium* sp.); 多糖; 硒; 抗肿瘤

中图分类号: Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000 - 3096(2006)01 - 0023 - 05

紫球藻(*Porphyridium* sp.)是红藻门中的一种单细胞微藻, 广泛分布于海水、淡水、咸水及潮湿的土地中, 对环境的适应能力强, 生理营养要求简单, 具有速生长、繁殖周期短, 可密集培养、适于工厂化生产等特点, 在生产过程中能合成一种胞外多糖, 该多糖是硫酸酯多糖, 其在工业及医疗方面有广泛的应用前景^[1-2]。

硒是氧族元素, 它的化学性质有很多地方与硫相似, 是人体必需的一种微量元素, 构成若干抗氧化酶的活性中心, 可影响机体抗氧化能力和相关疾病的抵抗能力^[3]。但无机硒的毒性较大, 在医疗保健行业应用范围较窄。作者采用在培养液中添加无机硒的方法来实现藻对无机硒的富集和转化, 制备了一种含硒胞外多糖, 并研究了它的抗肿瘤作用。

1 材料及方法

1.1 材料

紫球藻: 产于以色列, 由本古里昂大学 Arad 教授实验室馈赠; 细胞株: 人肝癌细胞 SMMC7721、人肺癌细胞 A549、人黑色素瘤细胞 A357、小鼠腹水瘤 S180 均由本实验室保存; 亚硒酸: 相对分子质量 128.97, 购于德国 Aldrich Chem.Co 公司。ASW 培养

基: 详细配方见参考文献[2]; 昆明小鼠: 雌雄各半, 体质量 18~22 g, 购于南京中医药大学动物实验中心。

1.2 方法

1.2.1 含硒紫球藻胞外多糖的制备

在 ASW 培养基中, 加入一定量的亚硒酸, 使硒终浓度达到 0.5 mg/L, 加入对数生长期藻种, A_{604} 值为 0.065 ± 0.003 , 细胞密度为 6.20×10^5 个/mL。培养条件: 温度 22~26 °C; pH 6.8~7.2; 光强 4 000 lx; 光照时间 12 h:12 h^[4]。培养 21 d 后, 取藻培养液, 离心(10 000 r/min, 10 min), 取上清液, 用无水乙醇沉淀, 离心(4 000 r/min, 5 min), 弃上清, 将沉淀冷冻干燥后, 得粗多糖。将粗多糖干品配成 50 g/L 的水溶液, 在蒸馏水中充分透析, 去除小分子物质。以氯离子(Cl⁻)为检测指标, AgNO₃ 示踪检测透析程度, 直至透析外液无白色浑浊出现。将透析后的多糖浓缩干燥后, 得含硒紫球藻胞外多糖。紫球藻胞外多

收稿日期: 2003 - 10 - 09; 修回日期: 2004 - 05 - 11

作者简介: 王敏(1978 -), 女, 硕士, 从事细胞生物学的研究, 电话: 025 - 83598500, E-mail: wangmin1351@sina.com.cn; 张成武, 联系人, 男, 教授, 主要从事微藻技术的研究, E-mail: C.Zhang@exchange.curtin.edu.cn

糖的制备方法与含硒紫球藻胞外多糖的制备方法相同, 仅在 ASW 培养基中, 不添加亚硒酸。

1.2.2 纯度鉴定

将两种胞外多糖用磷酸氢钠缓冲液 (PBS) 配成 10 g/L 的溶液, 紫外可见分光光度计测 A_{280} , 并用双缩脲反应^[5]测蛋白含量; 将 2 种胞外多糖用 PBS 配成 10 g/L 的溶液, 测 A_{260} , 并用磷酸钼蓝比色法^[6]测核酸含量。

1.2.3 硒含量测定

将冷冻干燥后的 PSP、Se-PSP 用超纯水配成 1 g/L 的水溶液, 然后用 DAN 荧光法测硒含量^[7]。

1.2.4 红外光谱

取多糖 10 mg 与 KBr 压片, 用 IR-440 扫描。

1.2.5 细胞培养

SMMC7721 用含 10% 的小牛血清、100U 青霉素、100 mg/L 链霉素的双抗 RPMI1640 培养基进行常规培养 (37 °C, 5% 的 CO₂)。

1.2.6 MTT 法检测 PSP 与 Se-PSP 对 SMMC7721、A549、A357 增殖的影响

用 PBS 将 PSP 与 Se-PSP 配成 32 g/L 的溶液, 高压灭菌后备用。将对数生长期的 SMMC7721、A549、A357 分别接种在 96 孔板上, 待 4 h 细胞贴壁后加多糖, 每孔加不同浓度的等体积的多糖, 使每孔总体积为 200 μ L, 细胞密度 7.5×10^3 个/mL, 多糖浓度为 10, 20, 40, 80 mg/L, 每个浓度设 6 个平行孔。对照组用等体积的不含糖 PBS 代替多糖, 并设不加细胞, 只加培养基的空白对照组。加入多糖后, 培养 48 h 后, 用 MTT 法测细胞活力^[8]。

1.2.7 2 种多糖对小鼠体内腹水瘤 S180 的作用

将 30 只昆明小鼠, 接种小鼠腹水瘤 S180, 接种细胞数 2×10^6 个/只, 接种 24 h 后, 将小鼠随机分成 3 组, 每组 10 只, 一组腹腔注射 100 mg/(kg·d) 紫球藻胞外多糖 (PSP 组), 一组腹腔注射 100 mg/(kg·d) 含硒紫球藻胞外多糖 (Se-PSP 组), 一组腹腔注射等体积的生理盐水 (对照组), 连续注射多糖 7 d。每天观察小鼠的生长状况并统计每天小鼠的死亡数, 腹水瘤生成时间以腹部出现隆起为标准。

1.2.8 数据分析

数据均用 SPSS 软件分析。数据采用 $\bar{x} \pm S$, 组间差异用单因子方差分析。

2 结果及分析

2.1 紫球藻多糖及含硒多糖的生成量

1 L 藻液可获得紫球藻多糖冻干粉约为 1.54 g \pm 0.08 g, 含硒多糖冻干粉约为 2.23 g \pm 0.12 g, 硒可以提高多糖的产量 (含硒多糖与紫多糖收获量相比, $P < 0.05$)。

2.2 多糖的纯度鉴定

2 种多糖的 $A_{280} < 0.07$, 又经双缩脲反应鉴定, 2 种多糖均呈阴性反应, 可判断为 2 种多糖不含蛋白。测得 2 种多糖的 $A_{260} < 0.05$, 磷酸钼蓝比色法也显示 2 种多糖不含磷酸, 由此可判断 2 种多糖不含核酸。

2.3 多糖的硒含量

2 种多糖的硒含量有显著性差异, 紫球藻胞外多糖只有极微弱的荧光, 可认为该多糖不含硒, 而紫球藻含硒胞外多糖经换算可知硒含量约是 0.015 mg/g \pm 0.005 mg/g, 见表 1。

表 1 2 种多糖硒含量测定结果

参数	荧光强度	硒含量 (mg/g)
紫多糖	0.036 \pm 0.02	0
含硒多糖	25.6 \pm 1.23	0.015 \pm 0.005

2.4 两种多糖的红外光谱

多糖经 KBr 压片, 在 400~4 000 cm^{-1} 范围内摄得的红外光谱显示, Se-PSP 与不含硒的紫球藻胞外多糖 (PSP) 相比, 其基本构型相差不大, 2 种糖均在 3 600~3 200 cm^{-1} 出现的一宽峰, 是 O-H 的伸缩震动, 各种糖的水化物均有 1 665~1 635 cm^{-1} 的吸收峰, 可能是 C=O 基吸收峰, 但 2 种多糖除此之外在 3 000~2 500 cm^{-1} 之间有强宽的吸收峰, 可判断此 Se-PSP 与 PSP 为酯多糖, 2 种多糖均出现 1 240 cm^{-1} 吸收峰, 这是 SO_4^{2-} 的对称伸缩振动峰^[9, 10]。区别是 PSP 在 1 665~1 635 cm^{-1} 只出现一个 C=O 吸收峰, 而 Se-PSP 在 1 665~1 635 cm^{-1} 有 2 种 C=O 吸收峰, 据推测可能形成硫酸酯多糖与硒酸酯多糖两种。PSP 在 3 000~2 800 cm^{-1} 的弱吸收峰是 C-H 伸缩震动, 这是糖类的特征峰, 而含硒多糖中这组弱吸收峰不太明显, 可能是硒取代一部分 C-H 链上的氢, 见图 1。

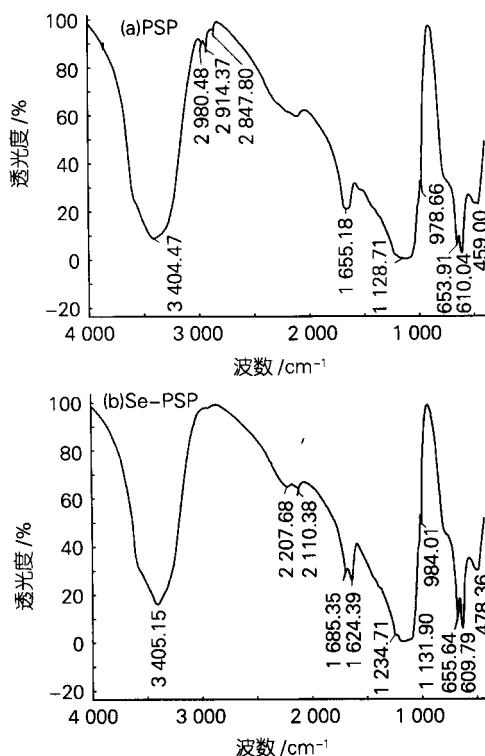


图 1 2 种多糖的红外光谱

Fig. 1 IR of two kinds of polysaccharides

(a)紫球藻胞外多糖的红外光谱; (b)含硒紫球藻胞外多糖的红外光谱

(a) IR of PSP; (b) IR of Se- PSP

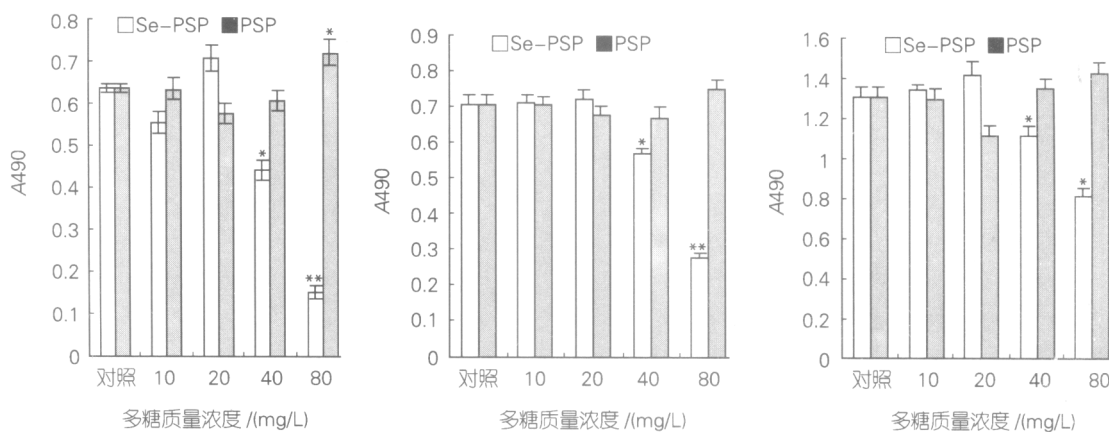


图 2 2 种不同浓度的多糖对 SMMC7721, A549, A357 增殖的作用

Fig.2 The effects of PSP and Se- PSP on the growths of SMMC7721, A549, A357

(a) 2 种不同浓度的多糖对 SMMC7721 增殖的作用; (b) 2 种不同浓度的多糖对 A549 增殖的作用; (c) 2 种不同浓度的多糖对 A357 增殖的作用

2.5 硒化紫球藻多糖对细胞增殖的影响

经 MTT 法检测, 40, 80 mg/L Se-PSP 对 3 种肿瘤细胞 SMMC7721, A549, A357 的增殖均有一定程度的抑制作用, 尤其是对 SMMC7721 抑制程度最为明显 (图 2)。在倒置显微镜 $\times 200$ 倍下观察细胞形态, 发现添加 40, 80 mg/L Se-PSP 的 SMMC7721 与对照相比, 细胞生长的缓慢, 且细胞形态发生很大改变, 细胞变圆, 细胞核皱缩, 细胞贴壁能力降低, 而添加 40, 80 mg/L PSP 的 SMMC7721 细胞形态未发生显著变化。

2.6 2 种多糖对荷瘤小鼠生长的影响

注射生理盐水的对照组小鼠腹水瘤生成时间为 $3.8 \text{ d} \pm 0.4 \text{ d}$, 注射紫球藻胞外多糖的小鼠腹水瘤生成时间约 4.1 d, 而注射含硒多糖的小鼠腹水瘤生成时间约 4.9 d, 通过单因子方差统计学分析组间差异, 发现 PSP 组的小鼠腹水瘤生成时间与对照组相比, 没有统计学差异 ($P > 0.05$)。Se-PSP 组小鼠的腹水瘤生成时间与对照组相比, 可推迟腹水瘤生成 ($P < 0.05$)。注射生理盐水的对照组小鼠平均生存时间约为 15 d, 注射紫球藻胞外多糖的小鼠 15.4 d, 注射含硒多糖的实验组 2 小鼠平均生存时间约为 20.1 d, 与对照组相比, 紫球藻胞外多糖没有延长荷瘤小鼠的生存时间 ($P > 0.05$), 含硒多糖延长了荷瘤小鼠的生存时间 ($P < 0.05$), 见表 2。

(a) the effect of Se-PSP and PSP on growth of SMMC7721; (b) the effects of Se-PSP and PSP on growth of A549; (c) the effects of Se-PSP and PSP on growth of A357

与对照相比, * $P<0.05$; ** $P<0.01$
 compared with control, * $P<0.05$; ** $P<0.01$

表 2 Se-PSP、PSP 对体内腹水瘤 S180 生长的影响

组别	肿瘤生成时间(d)	小鼠生存时间(d)
对照组	3.8±0.4	15±1.7
紫多糖	4.1±0.5	15.4±1.9
含硒多糖	4.9±0.7*	20.1±3.2*

注: 与对照相比, * $P<0.05$

3 讨论

早在 20 世纪 70 年代, 科学家们就证实了硒是肺癌、胃癌、乳腺癌、肝癌、结肠癌等恶性肿瘤的强有力的抑制剂。特别是胃肠道、肝部等恶性肿瘤受硒的影响最明显, 硒能大大降低癌症的发病率和死亡率^[11,12]。

作者通过采用紫球藻培养液中添加无机硒, 获得一种有活性的含硒的胞外多糖, 该多糖收量高, 1L 藻液可收获多糖冻干粉 2.23 g, 而螺旋藻胞外多糖产量为 2~9.46 mg/L^[13], 硅藻的胞外多糖产量为 37.5~48.3 mg/L^[14], 隐杆藻胞外多糖产量为 11.5~79.4 mg/L^[15]。在对硒是否结合在多糖上的探讨过程中, 为防止游离硒的干扰, 将酒精沉淀、冷冻干燥后的多糖配成水溶液后充分透析, 并以培养液中最多的氯离子 (Cl⁻) 作是否透析充分的检测指标, 这样可在一定程度上排除游离硒的干扰。在测硒含量时, 发现紫球藻胞外多糖几乎不含硒, 而且通过红外光谱发现, 含硒紫球藻胞外多糖与紫球藻胞外多糖结构相似, 但又不是完全相同, 说明是外源性的硒结合了上去。但硒是采取什么样的方式结合上去, 取代了哪些部位上的 H 及 S 还有待于进一步研究。因为该多糖分子量较大, 成分、结构比较复杂^[16], 因此对紫球藻胞外多糖结构的研究进展缓慢。

紫球藻胞外多糖及含硒紫球藻胞外多糖均不含蛋白和核酸, 排除了蛋白与核酸对体内外肿瘤细胞的作用。80 mg/L Se-PSP 可显著抑制人肝癌细胞 SMMC7721、人肺癌细胞 A549 的生长 (与对照相比, $P<0.01$), 并对人黑色素瘤细胞 A357 有一定程度的抑

制作用 (与对照相比, $P<0.05$)。荷瘤小鼠模型实验也表明给小鼠腹腔注射 100 mg/ (kg·d) 含硒紫球藻胞外多糖可推迟腹水瘤的形成时间, 延长腹水瘤 S180 小鼠的生存时间 (与对照相比, $P<0.05$)。但含硒紫球藻胞外多糖采取何种途径抑制细胞的生长, 还不明确, 有待于进一步研究。

致谢: 感谢本实验室所有成员的帮助, 并特别感谢陆冬冬博士、南京军事医学院动物实验室施正良主任、南京军区总医院动物实验室田小芸老师、江苏省中医药大学附属医院洪建军的帮助。

参考文献:

- [1] Surendra S. Extracellular polysaccharide production in outdoor mass cultures of *Porphyridium* sp. in flat glass reactors[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2000, **65** (12): 269 - 275.
- [2] 王明兹, 施巧琴. 紫球藻的培养与利用[J]. 亚热带植物科学, 2001, **30** (2): 66 - 69.
- [3] Gyurasics Á, Perjési P. Role of glutathione and methylation in the biliary excretion of selenium. the paradoxical effect of sulfobromophthalein[J]. *Biochemical Pharmacology*, 1998, **56** (10): 1381 - 1389.
- [4] Singh S, Arad S, Richmond A. Extracellular polysaccharide production in outdoor mass cultures of *Porphyridium* sp. in flat plate glass reactors[J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2000, **75** (12): 1119 - 1126.
- [5] 黄如彬. 生物化学实验教程[M]. 北京: 世界图书出版公司, 1998. 32 - 34.
- [6] 黄伟坤. 食品化学分析[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1978. 69 - 70.
- [7] 徐辉碧. 硒的化学、生物化学及其在生命科学中的应用[M]. 武昌: 华中理工大学出版社, 1994. 85 - 86.
- [8] 辛华. 细胞生物学实验[M]. 北京: 科学技术出版社, 2001. 77 - 78.
- [9] 伍越襄. 有机结构分析[M]. 合肥: 中国科学技术出版社,

- 1993,54 - 56.
- [10] 谭周进, 谢达平, 王征, 等. 蜜环菌的分离纯化及性质的研究[J]. 食品科学, 2002, **23** (9): 49 - 54.
- [11] 林番平. 硒营养研究的最新进展[J]. 福建畜牧兽医, 2002, **2** (2): 45 - 51.
- [12] Margaret P. The importance of selenium to human health[J]. *The Lancet*, 2000, **356** (15): 233 - 241.
- [13] 尤珊, 郑必胜, 郭祀远. 光照对螺旋藻形态及胞外多糖的影响和机理[J]. 海湖盐与化工, 2004, **33** (1): 23 - 25,31.
- [14] 王大志, 黄世玉, 程兆第. 营养盐水平对四种海洋浮游硅藻胞外多糖产量的影响[J]. 台湾海峡, 2003, **22** (4): 487 - 492.
- [15] 欧瑜, 刘志礼. 盐生隐杆藻胞外多糖含量的影响因子[J]. 植物资源与环境, 1997, **6** (2): 58 - 60.
- [16] Geresh S . Sulfation of extracellular polysaccharides of red microalgae: preparation, characterization and properties [J]. *Biochem Biophys Methods*, 2002, **50** (4): 179 - 187.

Preparation of Se-PSP and effect of Se-PSP on growth of invitro and invivo tumors

WANG Min, ZHU Jin-hua, MA Yu-xiang, ZHANG Cheng-wu, LI Chao-jun

(Institute of Molecular Cell Biology, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Received: Oct.,9,2003

Key words: *Porphyridium* sp.; polysaccharide; selenium; antitumor

Abstract: The exopolysaccharide containing selenium (Se-PSP) of *Porphyridium* sp. was isolated from the algal solution in which H_2SeO_3 was appended. Selenium with exopolysaccharide was investigated by means of the methods of DAN fluorescence and IR spectrum .The antitumor activities of Se-PSP and PSP in vitro and in vivo were studied with MTT and animal experiments . According to the results of DAN fluorescence and IR spectrum, its structure was similar to that of non-selenium exopolysaccharide of *Porphyridium* sp. (PSP). Se-content of Se-PSP was $0.015\text{ mg/g} \pm 0.05\text{ mg/g}$. We also studied the effects of different concentrations of Se-PSP on growth of in vitro cells and found 40 mg/L, 80 mg/L Se-PSP could inhibit multiplication of 7721 and change the cells' shape, 100mg/ (kg • d) Se-PSP can postpone the form of cancer and prolong the life span of mice but the same concentration PSP couldn't do so. Se-PSP can become a new antitumor medication.

(本文编辑: 张培新)