

极大螺旋藻胞内多糖对体外肿瘤细胞抑制作用的实验研究

朱劲华¹, 张威¹, 王敏², 李朝军², 张成武²

(1. 江苏职工医科大学, 江苏 南京 210029; 2. 南京师范大学 江苏省分子医学生物技术重点实验室, 江苏 南京 210097)

摘要: 研究了极大螺旋藻 (*Spirulina maxima*) 胞内多糖对 SMMC7721 等肿瘤细胞系的生长及凋亡的影响。在体外培养条件下, 用半抑制浓度 (80, 5 mg/L) 的极大螺旋藻胞内多糖 (IPS I, IPS II) 处理肿瘤细胞, 并用 MTT, SRB, DNA ladder, Annexin V 等方法测定。结果表明, IPS I (80 mg/L) 对 SMMC7721, A549, HeLa, U251 等肿瘤细胞系抑制率分别为 64.97%、46.1%、43.3%、27.02%; IPS II (5 mg/L) 能诱导 SMMC7721 细胞凋亡。

关键词: 极大螺旋藻 (*Spirulina maxima*); 胞内多糖; 细胞凋亡

中图分类号: Q2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096 (2007) 01-0001-05

螺旋藻是一种在碱性水体中生长的螺旋形丝状蓝藻, 因含有独特的藻蓝蛋白及藻多糖等多种活性成分, 具有潜在的多种保健和药理功效。研究表明螺旋藻中具抗癌及免疫调节作用的生物活性物质主要是多糖^[1-3]。国内外研究结果显示, 螺旋藻多糖在体内外都有较好的抑瘤效果^[4-6], 为了进一步验证极大螺旋藻胞内多糖的抑瘤功能, 探索其抑瘤机制, 作者利用肿瘤细胞系 (SMMC7721, A549, HeLa, U251) 进行体外抑瘤研究, 主要观察其对肿瘤细胞生长及凋亡的影响, 以明确其作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料及试剂来源

极大螺旋藻 (*Spirulina maxima*) 藻种来源于美国 Texas 大学藻种保藏中心 (原产于非洲乍得湖); 藻种鉴定人: 南京大学生物系曾昭琪教授; 人肝癌细胞 SMMC7721、人小细胞肺腺癌细胞 A549、人宫颈癌细胞 HeLa、人神经瘤细胞 U251、正常人胚肝细胞 LO-2 等细胞株皆由中科院上海生物研究所提供; RPMI1640 培养粉为美国 sigma 公司产品; 胰酶、胎牛血清 (Fetal bovineserum, FBS) 购自卫生部上海生物制品研究所; 培养板为美国 Falcon 96 孔板; MTT (四甲基偶氮唑盐)、SRB (Sulforhadamine B, 磺基罗丹 B)、染色剂 Annexin-V-Fluos 购自美国 sigma 公

司; DE-52、DEAE-Sephadex A-25、Sephadex G-100 购自美国 sigma 公司; 极大螺旋藻胞内半精品多糖 (IPS I)、极大螺旋藻胞内半精品多糖 (IPS II) 皆由本实验室制备。

1.2 主要仪器和设备

RE-52 型旋转蒸发器, CO₂ 恒温培养箱 (Forma Scientific 公司 美国), ELx800 型酶联免疫检测仪 (Bio-Tek 公司 美国), Leitz 倒置显微镜, 超净工作台, LeicaDMR 型荧光显微镜, 分光光度计, Leica 数码相机等。

1.3 胞内多糖的制备

热水提取胞内粗多糖, 丙酮、乙醚脱水脱色, 在经改良的 Sevag 等方法脱蛋白, 获得胞内多糖半精品 (IPS I), 经 DE-52、Sephadex G-100 层析柱纯化, 得到两种单一组分的多糖精品 (IPS II): IPS II A 和 IPS II B。利用 HPLC, IR 等方法测定其初步结构, 结果显示: IPS II A 的平均分子质量为 238 000u, 主要单糖组成为 L-岩藻糖、L-鼠李糖、D-木糖、D-甘露糖 (摩尔比为 6.09: 3.38: 0.66: 0.072), 硫酸根质量浓

收稿日期: 2004-07-10 修回日期: 2004-10-21

作者简介: 朱劲华 (1973-), 江苏南京人, 女, 江苏职工医科大学讲师, 硕士, 电话: 025-86278261, E-mail: zhjh7312@163.com

度为 26.3 mg/L \pm 3.7 mg/L, 糖醛酸质量浓度约为 13.37 mg/L \pm 0.45 mg/L; IPS II B 的平均分子质量为 34 900u, 主要单糖组成包括 D-木糖、L-鼠李糖、D-果糖、D-葡萄糖、L-岩藻糖、D-半乳糖 (摩尔比为 6.66: 4.63: 0.28: 0.12: 0.087: 0.022), 硫酸根质量浓度为 21.5 mg/L \pm 1.2 mg/L。

1.4 肿瘤细胞、正常细胞的培养

细胞生长的培养基为 RPMI-1640 (含 10% 的小牛血清, 链霉素 100 mg/L, 青霉素 100 单位/mL), 置于 5%CO₂、37 °C 的培养箱中培养至对数生长期。

1.5 测定半抑制浓度

取对数生长期的人正常胚肝 LO-2 细胞 (稀释为 8 \times 10³ 个/mL), 按每孔 100 μ L 接种到 96 孔培养板中, 设不加多糖的对照组 (加 100 μ L 1640 培养液) 和 6 种多糖质量浓度的实验组 (各加 100 μ L 不同质量浓度药液), 6 个实验组中多糖的终浓度分别为 320, 80, 20, 5, 1.25, 0.312 mg/L。每组各设 12 个平行孔, 培养 72h 后 MTT 法检测每孔的吸光度 (A 值)。按下式计算各多糖浓度的抑制率, 选出抑制率为 50% 的多糖浓度即半抑制浓度, 作为 IPS I 体外抗肿瘤细胞的实验浓度。以相同方法测得 IPS II A 的半抑制浓度。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{实验组}} - A_{\text{对照组}}) / A_{\text{对照组}} \times 100\%$$

1.6 IPS 对肿瘤细胞生长的影响

分别取对数生长期的 SMMC7721, A549, HeLa, U251 细胞 (2 \times 10⁴ 个/mL) 按每孔 100 μ L 接种到 96 孔培养板中, 设不加多糖的对照组 (加 100 μ L 1640 培养液) 和多糖终质量浓度为 80 mg/L 的实验组。每组各设 12 个平行孔, 培养 72 h 后, 用 MTT 法检测。

1.7 IPS 对 SMMC7721 细胞生长的影响

取对数生长期的 SMMC7721 细胞 (2 \times 10⁴ 个/mL) 按每孔 1mL 接种到 5 个 24 孔培养板中, 设一个对照组和一个 IPS I 质量浓度为 80 mg/L 实验组, 每组各设 12 个平行孔。细胞培养 2 d 后开始, 每隔 2d 取出一个 24 孔板, 用 SRB 法检测直至第 10 天。

1.8 IPS A 和 IPS B 分别对 SMMC7721 细胞生长的影响

取对数生长期的 SMMC7721 细胞 (8 \times 10³ 个/mL) 100 μ L 接种到 96 孔培养板中, 设不加多糖的对照组 (加 100 μ L 1640 培养液) 和分别加 IPS II A (100 μ L, 终质量浓度 5 mg/L) 和 IPS II B (100 μ L, 终质量浓度 5 mg/L) 的实验组。细胞培养 48, 72 h 时观察。

1.9 细胞凋亡检测法

1.9.1 琼脂糖凝胶电泳法

将对数生长期的 SMMC7721 细胞接种在 4 个直径为 90 cm 的培养皿内, 其中一个作为对照 (加 1640 培养液) 其余 3 个加胞内多糖精品 IPS II A (终质量浓度为 5 mg/L); 24, 48, 60, 72 h 后取出培养皿, 收集 DNA; 取制备好的样品 20 μ L, 用 1.5% 琼脂糖凝胶, 36V 电泳 3h, 拍照。

1.9.2 细胞膜磷脂酰丝氨酸外翻荧光显示分析法 (Annexin V 法)

对数期的 SMMC7721 细胞调整使其密度达到 4 \times 10⁴ 个/mL, 转移至加有灭菌盖玻片的 6 孔板中培养, 培养细胞密度达 50% 左右加入多糖精品 IPS II A (终质量浓度为 5 mg/L), 培养 48, 60, 72 h 后, 取出盖玻片加上染色剂 Annexin-V-Fluos 与 PS 双染细胞, 荧光观察。

2 结果

2.1 半抑制浓度的测定

表 1, 2 结果表明, IPS I, IPS II A 对正常胚肝细胞 LO-2 生长的半抑制浓度分别约为 80, 5 mg/L。

表 1 MTT 法检测 IPS 对 LO-2 细胞生长的影响 (A 值 $n=12$)

Tab.1. The effect of IPS on the growth of LO-2 by MTT method (A value, $n=12$)

| IPS I 质量浓度(mg/L) | A _{490nm} | 抑制率 (%) |
|------------------|--------------------|---------|
| 0 | 0.860 \pm 0.085 | |
| 320 | 0.334 \pm 0.024 | 61.21 |
| 80 | 0.447 \pm 0.024 | 48.07 |
| 20 | 0.605 \pm 0.029 | 29.63 |
| 5 | 0.762 \pm 0.038 | 11.63 |
| 1.25 | 0.853 \pm 0.032 | |
| 0.312 | 0.951 \pm 0.025 | |

2.2 IPS 对肿瘤细胞生长的影响

2.2.1 IPS I 对不同肿瘤细胞生长的抑制率

由表 3 可见, 半抑制浓度 (80 mg/L) 的 IPS I 对 SMMC7721, A549, HeLa, U251 4 种肿瘤细胞的生长抑制率分别为 64.97%、46.1%、43.3%、27.02%, 其中对 SMMC7721 抑制率最高, 所以选择 SMMC7721 作为实验细胞株, 进一步研究 IPS I 抑制肿瘤细胞生长的机制。

2.2.2 IPS I 对 SMMC7721 细胞生长的影响

设立多糖作用时间的梯度为 2, 4, 6, 8, 10 d。用

SRB 法检测 IPS I 对 SMMC7721 细胞生长的影响 (A 值)。由表 4 可以看出终质量浓度为 80 mg/L 的 PS I 能有效地抑制 SMMC7721 细胞的生长, 具体表现为: 起始浓度相同的情况下, 对照组 A 值增大较快, 第 8 天已达到 1.072, 第 10 天有所下降, 而实验组 A 值增加较慢, 第 8 天才达到 0.395, 第 10 天稍有增加到 0.426; 抑制率在第 4 天时, 达到最大值 72.54%, 然后逐渐下降。由此可见, IPS I 对 SMMC7721 细胞生长抑制作用在前 4 天逐渐增强, 然后逐渐减弱。

2.3 IPS A 和 IPS B 分别对 SMMC7721 形态和生长密度的影响

由表 5 可见, 与对照组相比, 终质量浓度为 5mg/L 的 IPS II A 和 IPS II B 对 SMMC7721 的生长有明显的抑制作用, 且随着时间的延长抑制作用愈明显, 而且可以明显看出 IPS II A 的抑制作用比 IPS II B 强。具体

表 2 MTT 法检测 IPS A 对 LO-2 细胞生长的影响 (A 值, n=12)

Tab.2 The effect of IPS A on the growth of LO-2 by MTT method(A value, n=12)

| IPS II A 质量浓度(mg/L) | A _{490nm} | 抑制率 (%) |
|---------------------|--------------------|---------|
| 0 | 1.083±0.061 | |
| 320 | 0.125±0.014 | 88.45 |
| 80 | 0.364±0.016 | 66.39 |
| 20 | 0.401±0.029 | 62.97 |
| 5 | 0.539±0.042 | 50.23 |
| 1.25 | 0.732±0.038 | 32.41 |
| 0.312 | 0.865±0.044 | 20.13 |

表 3 用 MTT 法检测 IPS 对 SMMC7721, A549, HeLa, U251 细胞生长的影响 (A 值, n=12)

Tab.3 The effect of IPS on the growths of SMMC7721, A549, HeLa, U251 by MTT method(A value, n=12)

| 细胞 | A | | IPS I 80 mg/L 的抑制率(%) |
|----------|-------------------|-------------|-----------------------|
| | IPS I 质量浓度 (mg/L) | | |
| | 0 | 80 | |
| SMMC7721 | 1.199±0.086 | 0.420±0.027 | 64.97 |
| A549 | 0.935±0.039 | 0.504±0.016 | 46.1 |
| HeLa | 0.993±0.041 | 0.563±0.035 | 43.3 |
| U251 | 1.088±0.021 | 0.749±0.039 | 27.02 |

表 4 用 SRB 法检测 IPS 对 SMMC7721 细胞生长的影响 (A 值, n=12)

Tab.4 The effect of IPS on the growth of SMMC7721 by SRB method(A value, n=12)

| 时间 (d) | A | | IPS I 80 mg/L 的抑制率(%) |
|--------|-------------------|-------------|-----------------------|
| | IPS I 质量浓度 (mg/L) | | |
| | 0 | 80 | |
| 2 | 0.381±0.015 | 0.172±0.009 | 54.86 |
| 4 | 0.743±0.023 | 0.204±0.014 | 72.54 |
| 6 | 0.959±0.036 | 0.287±0.017 | 70.07 |
| 8 | 1.072±0.041 | 0.395±0.022 | 63.15 |
| 10 | 0.993±0.031 | 0.426±0.019 | 57.10 |

表现为: IPS II A 作用 48 h 后, 与对照组相比, 细胞密度明显减小, 从形态上看部分细胞变圆; 作用 72 h 后, 与对照组相比, 细胞密度减小得更加明显, 从形态上看绝大部分细胞变圆。IPS II B 作用 48 h 后, 与对照组相比, 细胞密度略小, 从形态上看个别细胞变

圆; 作用 72 h 后, 与对照组相比, 细胞密度减小得较为明显, 从形态上看大部分细胞变圆 (图未显示)。

2.4 细胞凋亡的检测

2.4.1 琼脂糖凝胶电泳法

图 1 显示, SMMC7721 细胞在终浓度为 5mg/L 的

IPS II A 作用下, 37 °C 培养 72 h 后, 才有明显的显示细胞凋亡过程中 DNA 降解的特征性“梯状”条带, 而在培养 24, 48, 60 h 时“梯状”条带不明显。由此可见,

终浓度为 5 mg/L 的 IPS II A 作用约 72 h 左右, SMMC7721 细胞呈现凋亡状态。

表 5 IPS A、IPS B 对 SMMC7721 生长的影响

Tab.5 The effects of IPS A and IPS B on the growth of SMMC7721

| 作用时间 (h) | 细胞密度 ($\times 10^4$ 个/mL) | | |
|-------------|----------------------------|-----------------|-----------------|
| | 对照 | IPS II A | IPS II B |
| 0 | 2.22 \pm 1.05 | 2.25 \pm 1.23 | 2.19 \pm 1.09 |
| 24 | 4.73 \pm 2.51 | 2.96 \pm 1.85 | 3.38 \pm 1.83 |
| 48 | 8.45 \pm 3.46 | 3.04 \pm 1.71 | 5.46 \pm 2.14 |
| 72 | 15.68 \pm 6.32 | 2.12 \pm 0.94 | 4.13 \pm 1.73 |

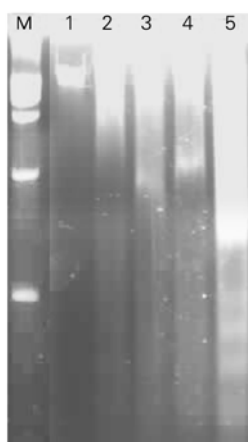


图 1 IPS II A 对 SMMC7721 作用后的 Ladder 电泳图

Fig.1 Ladder electrophoreses results of SMMC7721 after adding IPS II A

M: 标样; 1: 对照; 2: 24 h; 3: 48 h; 4: 60 h; 5: 72 h

2.4.2 细胞膜磷脂酰丝氨酸外翻荧光显示分析法 (Annexin V 法)

SMMC7721 细胞在终浓度为 5mg/L 的 IPS II A 作用下, 37 °C 培养 48 h, 细胞膜 PS 外翻结合 Annexin-V-Fluos 发出绿色荧光, 细胞核未见红色荧光, 可见 PI 未能进入细胞, 所以细胞处于早期凋亡状态; 培养 60 h, 细胞膜发出绿色荧光, 细胞核发出红色荧光, 可见 PI 已能进入细胞, 细胞处于中期凋亡状态; 培养 72 h, 可见细胞形态变圆, 红色荧光范围扩大, 细胞处于晚期凋亡状态。

3 讨论

由于实验条件和时间的限制, 测定半抑制率时, 作者选用的正常细胞不是通过原代培养得到的正常人体细胞, 而是作者所在的实验室多次传代后的人胚胎肝细胞 LO-2, 这种细胞与正常人体肝细胞有一定的差异, 主要表现为增殖能力较强。所以测得的半抑制浓度仅仅是一个参考浓度, IPS I, IPS II A 对正常人体细胞的生长是否有影响还有待于进一步实验才能确定。

通过体外肿瘤细胞药物敏感性实验, 用 MTT 法进行检测, 发现 IPS I 能直接抑制离体培养的多种肿瘤细胞生长, 同时发现 IPS I 对肿瘤细胞生长的抑制作用具有选择性, 其中对肝癌细胞 SMMC7721 的抑制作用最强, 抑制率达到 64.97%。在研究 IPS I 对 SMMC7721 生长曲线影响时, 作者运用了 SRB 检测法, 与 MTT 检测法相比, SRB 法对活细胞的染色更敏感, 操作也较为简便, 从实验结果来看, 第 4 天的抑制率达到 72.54%, 与 MTT 法检测结果基本一致, 表明实验结果比较可靠。IPS I 对 SMMC7721 细胞生长抑制作用, 随着时间的延长逐渐减弱, 其作用机制还有待于进一步研究。

IPS I 经过 DE-52 柱, 分离出 2 个组分 IPS II A 和 IPS II B, 这两个组分成分有差异 (另文发表), 对 SMMC7721 细胞的抑制作用也有差异, 且 IPS II A 作用更明显; 琼脂糖凝胶电泳和 Annexin V 荧光分析两个实验都证实了 IPS II A 能引起肿瘤细胞凋亡。但具体的凋亡机制还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Gitte S, Donald I, Christian D, *et al.* Blue-green algae as an immuno-enhancer and biomodulator[J]. *Canada Winter*, 2001, **3**(4):24-30.
- [2] Misako M, Kaoru H, Yoshiko S, *et al.* Activation of the human innate immune system by *Spirulina*: augmentation of interferon production and NK cytotoxicity by oral administration of hot water extract of *Spirulina platensis*[J]. *International Immunopharmacology*, 2002, **2**(1):423-434.
- [3] Mishima T, Murata J, Toyoshima M, *et al.* Inhibition of tumor invasion and metastasis by calcium spirulan (Ca-SP), a novel sulfated polysaccharide derived from a blue-green alga, *Spirulina platensis*[J]. *Clin Exp Metastasis*, 1998, **16**(6):541-550.
- [4] Patier P. Anticancer activity of polysaccharide of *Spirulina platensis* [J]. *Appl Phycol*, 1993, **5**(5):343-348.
- [5] 刘宇峰, 张成武, 沈海雁, 等. 极大螺旋藻胞内多糖对人癌细胞的影响[J]. *中草药*, 1999, **30**(2):115-119.
- [6] Liu Y, Xu L, Cheng N, *et al.* Inhibitory effect of phycocyanin from *Spirulina platensis* on the growth of human leukemia K562 cells[J]. *J Appl Phycol*, 2001, **22**(12):1121-1124.

Effect of polysaccharides from *Spirulina maxima* on the growth of human tumor cell lines

ZHU Jin-hua¹, ZHANG Wei¹, WANG Min², LI Chao-jun², ZHANG Cheng-wu²

(1. Jiangsu Staff Medical College, Nanjing 210029, China; 2. Molecular & Medical Biotechnology Laboratory, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Received: Jul., 10, 2004

Key words: *Spirulina maxima*; intracellular polysaccharides; apoptosis

Abstract: We observed the effect of inopolysaccharide of *Spirulina maxima* (IPS) on the growth and apoptosis of SMMC7721, A549, HeLa, U251 tumor cell lines. In vitro, human tumor cells were cultured in IPS I and IPS II with concentrations of 80 mg/L and 5 mg/L, the result of which was determined by MTT, SRB cell morphology, annexin V apoptosis assay and DNA fragmentation. IPS I (80 mg/L) displayed strong growth inhibitory effects on SMMC7721, A549, HeLa, U251 human cancer cell lines with 64.97%, 46.1%, 43.3%, 27.02% of inhibition rate, respectively. IPS II (5 mg/L) inducing the apoptosis of SMMC7721. IPS can significantly restrain the growth of human tumor cell lines and induce apoptosis.

(本文编辑 : 张培新)