不同硫酸软骨素对口腔癌 KB 细胞的抑制作用

张扬星，汪兰，熊光权，吴文锦，石柳，乔宇，王俊

（湖北省农业科学院农产品加工与核农技术研究所，湖北武汉 430064）

摘要：以鲟鱼软骨和鸡软骨为原料，采用碱提-酶解-醇沉的工艺流程提取硫酸软骨素后，利用 Sephadex G-50 凝胶色谱及 Sephacryl S-300 HR 凝胶色谱对硫酸软骨素进行纯化，并通过高效凝胶渗透色谱法进行分子质量测定与纯度鉴定。采用 MTT 法检测硫酸软骨素对口腔癌 KB 细胞增殖活性的影响，并采用流式细胞术检测口腔癌 KB 细胞凋亡情况。研究结果表明鲟鱼及鸡软骨硫酸软骨素粗制品得率分别为 23.80%和 25.23%。经高效液相凝胶渗透色谱分析可得纯化的鲟鱼及鸡软骨硫酸软骨素均为高纯度多糖，且鲟鱼软骨硫酸软骨素的平均分子量比鸡软骨硫酸软骨素的大。以体外抗肿瘤的方法研究硫酸软骨素粗提物和纯化样品对口腔癌 KB 细胞的抑制作用，结果所得鲟鱼软骨硫酸软骨素粗制品和纯化样品的 IC_{50} 值分别为 80.18 μg/mL 和 58.78 μg/mL；鸡软骨硫酸软骨素粗制品和纯化样品的 IC_{50} 值分别为 68.55 μg/mL 和 53.71 μg/mL。流式细胞术表明硫酸软骨素能够诱导 KB 细胞发生凋亡，细胞凋亡率与药物的浓度呈剂量依赖关系，且鸡软骨硫酸软骨素诱导 KB 细胞凋亡率高于鲟鱼软骨硫酸软骨素。

关键词：软骨；硫酸软骨素；提取；纯化；口腔癌；细胞凋亡

文章篇号：1673-9078(2020)06-24-32 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.6.1069

Inhibition Activity of Oral Cancer KB Cell of Chondroitin Sulfate from Different Sources

ZHANG Yang-xing, WANG Lan, XIONG Guang-quan, WU Wen-jin, SHI Liu, QIAO Yu, WANG Jun

(Institute of Agricultural Products Processing and Nuclear Agriculture, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430064, China)

Abstract: Chondroitin sulfate was extracted from the sturgeon cartilage and chicken cartilage using the alkaline extraction-enzymatic-alcohol precipitation process, and purified by Sephadex G-50 gel chromatography and Sephacryl S-300 HR gel chromatography. The molecular mass and purity of the obtained chondroitin sulfate were determined by HPGPC. The effect of chondroitin sulfate on the proliferation of oral cancer KB cells was detected by the MTT assay, and the apoptosis of oral cancer KB cells was examined by flow cytometry. The results showed that the yield of crude chondroitin sulfate from sturgeon cartilage and chicken cartilage was 23.80% and 25.23%, respectively. HPGPC analysis showed that the purified chondrocytes from sturgeon cartilage and chicken cartilage were highly pure polysaccharides, with the average molecular weight of the chondroitin sulfate in sturgeon cartilage higher than that in chicken cartilage. The inhibitory effects of crude and purified chondroitin sulfate on oral cancer KB cells were studied *in vitro*. The results showed that the IC_{50} values were 80.18 μg/mL and 58.78 μg/mL, respectively, for the crude and purified chondroitin sulfate from sturgeon cartilage, and 68.55 μg/mL and 53.71 μg/mL, respectively, for the crude and purified chondroitin sulfate from chicken cartilage. Flow cytometry showed that chondroitin sulfate could induce the apoptosis of KB cells, and the apoptosis rate was dependent on the concentration of the chondroitin sulfate. The apoptosis rate induced by the chondroitin sulfate in chicken cartilage was higher than that from sturgeon cartilage.

Key words: cartilage; chondroitin sulfate; extract; purify; oral cancer; cell apoptosis

引文格式：

张扬星,汪兰,熊光权,等.不同硫酸软骨素对口腔癌 KB 细胞的抑制作用[J].现代食品科技,2020,36(6):24-32

ZHANG Yang-xing, WANG Lan, XIONG Guang-quan, et al. Inhibition activity of oral cancer KB cell of chondroitin sulfate from different sources [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(6): 24-32

收稿日期：2019-11-04

基金项目：现代农业产业技术体系专项资金资助（CARS-46）；湖北省技术创新专项（重大项目）（2018ABA112）

作者简介：张扬星（1995-），女，本科，研究方向：水产品加工及副产物综合利用

通讯作者：王俊（1981-），女，副研究员，研究方向：水产品加工及副产物综合利用

硫酸软骨素(Chondroitin sulfate，CS)多存在于动物的软骨、喉骨、鼻骨和气管中，是一种在动物软骨组织中分布较广泛的酸性杂多糖[1]。硫酸软骨素具有促进骨形成、降血脂、抗动脉粥样硬化、防治关节炎、抑制肿瘤细胞和病毒等良好的生物活性，在医药和营养工业中得到了广泛的应用[2-6]。不同生物或者同一生物的不同组织所含硫酸软骨素的种类均不同[7]，是由于硫酸软骨素的骨架链-软骨素骨架糖链发生不同磺基化修饰产生了二糖单位排列组合的多样化，CS 链结构多样化导致其可与许多蛋白发生相互作用，从而可参与细胞分裂增殖、迁移、细胞间相互识别等生物学过程的调控[8-10]。素有“活化石”之称的鲟鱼是中国经济上最重要的淡水养殖鱼类之一，产量约占世界总产量的 80%[11]，它的头、脊索、鳍中软骨占鱼体的 10%左右，可作为天然优质硫酸软骨素的提取原料[12,13]。我国也是全球最大的鸡肉及鸡蛋生产和消费国，而鸡软骨中含有丰富的硫酸软骨素、糖蛋白和胶原蛋白[14]，同样可作为硫酸软骨素的来源。

口腔鳞状细胞癌是头颈部最常见的恶性肿瘤，早期易发生转移，属于生存率较低的恶性肿瘤，现期的治疗主要以化疗和手术切除为主的综合治疗[15,16]。化疗的毒副作用大，而手术切除易造成脸部畸形，影响患者生活。因此，寻找天然提取物来诱导口腔癌细胞凋亡，对于预防和治疗口腔癌已成为新的研究热点[17]。现在许多研究表明硫酸软骨素是一种很有前景的抗癌药物，如对黑色素瘤[18]、结直肠癌[19]、乳腺癌[20]等恶性肿瘤有显著的抑制作用。许永安[21]等人提取鲟鱼硫酸软骨素后进行抗肿瘤实验得出鲟鱼硫酸软骨素对乳腺癌细胞、胃癌细胞及肝癌细胞有明显抑制作用。但现有的研究还很少有关于鸡硫酸软骨素抗肿瘤方面。

在前期的研究中，已对鲟鱼及鸡的硫酸软骨素的提取工艺进行了优化，为后期的实验的开展提供方案。本研究选用鲟鱼及鸡软骨提取并纯化硫酸软骨素，对口腔癌 KB 细胞的活性进行测定，为开发口腔癌新的药物和口腔保健品提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与方法

鲟鱼软骨，湖北天峡鲟业有限公司；鸡软骨，沈阳成达牧业发展有限公司。

木瓜蛋白酶(>800 U/mg)，丙烯葡聚糖凝胶 S-300 HR，上海源叶生物科技有限公司；胰蛋白酶(>280 U/mg)，德国 BioFroxx 公司；Sephadex G-50，Biosharp 公司；胰蛋白酶，MTT 试剂盒，武汉维诺赛生物公司；RMPI-1640 培养基，青霉素/链霉素双抗，Hyclone 公司；胎牛血清，浙江天杭生物科技股份有限公司；口腔癌细胞株(KB 细胞)，武汉普诺赛生命科技有限公司；Annexin V-Alexa Fluor488/PI Kit 凋亡试剂盒，北京索莱宝科技有限公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

LE2002E 型电子天平，梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司；FE20 型 pH 计，梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司；DF-101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器，郑州长城科工贸有限公司；GTR10-1 型高速冷冻离心机，北京时代北利离心机有限公司；DHG-9123A 型电热恒温鼓风干燥箱，上海精宏实验设备有限公司；HL-2 恒流泵，BSZ-100 自动部分收集器，上海泸西分析仪器厂有限公司；BB15 型 CO_2 培养箱，美国 Thermo 公司；CKX31 型倒置显微镜，日本奥林巴斯公司；Centrifuge 5418 型离心机，德国 eppendorf 公司；Multiskan MK3 全自动酶标仪，Thermo Fisher Scientific 公司；CytoFLEX 流式细胞仪，美国 Beckman Coulter 公司；Waters 2690 高效液相色谱仪(配有 2410 示差折光检测器)，美国 Waters 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 不同来源的硫酸软骨素提取

1.3.1.1 碱提

将鲟鱼软骨和鸡软骨分别切小块，脱脂，冻干后粉碎备用。按照王俊[22]等人提取鲟鱼软骨硫酸软骨素的最优方案，分别称取鲟鱼软骨粉及鸡软骨粉 50 g，加入 6% NaOH 溶液，以料液比为 1:7，在 40 ℃水浴搅拌提取 4.5 h。提取液用双层纱布过滤，弃滤渣，取滤液待用。

1.3.1.2 酶解

将滤液 pH 调至 8~9 左右，采用质量比 1:1 的木瓜蛋白酶和胰蛋白酶的混合酶，按质量分数 2.5%加入，55 ℃水浴酶解 5 h。酶解结束后升温至 80 ℃灭酶 20 min，待冷却后，调节 pH 值至 6.5。

1.3.1.3 醇沉

加入无水乙醇至其醇沉体系的乙醇为 70%浓度，室温静置过夜后离心，沉淀用少量无水乙醇洗涤脱水二次，于 60 ℃干燥 2.5 h，粉碎后得淡黄色鲟鱼及鸡硫酸软骨素粗制品。鲟鱼及鸡硫酸软骨素粗制品得率根据公式（1）计算。

$$\text{硫酸软骨素得率}/\% = \frac{CS\text{粗制品质量}/g}{\text{软骨粉末质量}/g} \times 100\% \quad (1)$$

1.3.2 不同来源的硫酸软骨素纯化

参考郑江[23]等人纯化鲟鱼软骨硫酸软骨素的方法，取鲟鱼及鸡软骨硫酸软骨素粗制品先分别进行乙醇分级沉淀[24]。之后将鲟鱼软骨硫酸软骨素沉淀配制成 20 mg/mL 的样品液，鸡软骨硫酸软骨素沉淀配制成 2.5 mg/mL 的样品液，分别过葡聚糖凝胶 Sephadex G-50 柱（75 cm×1.6 cm），上样体积均为 5 mL，双蒸水为洗脱液，流速设为 1 mL/min，每管 4 mL 收集洗脱液。用咔唑法[25]测定每管硫酸软骨素含量，并合并含有硫酸软骨素的洗脱液。将合并的洗脱液再分别过丙稀葡聚糖凝胶柱 Sephacryl S-300 HR 柱（75 cm×1.6 cm），上样体积 2 mL，双蒸水为洗脱液，流速设为 0.5 mL/min，每管 4 mL 收集洗脱液。用咔唑法[25]测定每管硫酸软骨素含量，合并含有硫酸软骨素的洗脱液。将纯化后的洗脱液进行冷冻干燥，备用。

1.3.3 不同来源的软骨硫酸软骨素纯度鉴定

采用高效凝胶渗透色谱法鉴定多糖的纯度。Waters 高效液相色谱系统，色谱条件：Ultrahydrogel™ 2000（7.8 mm×30 cm）色谱柱，检测器为 Waters 2410 Refractive Index Detector；柱温为 35 ℃；流动相为 0.1 mol/L $NaNO_3$；流速 0.6 mL/min；进样量：100 μL。

1.3.4 不同来源的硫酸软骨素对口腔癌细胞活性影响

1.3.4.1 口腔癌细胞培养

将购买的口腔癌 KB 细胞培养于含 10%胎牛血清以及 1×10^4 U/mL 的青霉素，1×10^4 μg/mL 的链霉素的 RMIP-1640 培养基中，置于 37 ℃，饱和湿度 5% CO_2 培养箱中培养，待细胞长满培养瓶底部 80%左右时，用 0.25%的胰酶进行消化并传代，倒置显微镜下对细胞的形态进行观察。每两天传代一次[26]。

1.3.4.2 MTT 法检测 KB 细胞增殖

取对数生长期的 KB 细胞用 0.25%的胰酶消化，用培养基调整细胞浓度至 1×10^5/mL，加入到 96 孔板中，每个孔板加入 100 μL，5% CO_2，37 ℃孵育 24 h，弃去培养基，每孔分别加入 100 μL 以培养基稀释的浓度梯度为 500、250、125、62.5、31.25 μg/mL 的鲟鱼及鸡软骨硫酸软骨素粗制品和纯化样品作为实验组，设置 4 个复孔，并设置不加硫酸软骨素为对照组和不加细胞的空白组，5% CO_2，37 ℃孵育 72 h 后，倒置显微镜下观察。之后每孔加入 40 μL MTT 溶液（5 mg/mL，即 0.5% MTT），继续培养 4 h。弃 MTT 上清，每孔加 100 μL 二甲基亚砜，置于恒温摇床上低速振荡 10 min，充分溶解培养液中的结晶物。在酶联免疫检测仪波长 490 nm 处测量各孔吸光值[17]。实验重复 3 次，按公式（2）测定不同来源的硫酸软骨素对口腔癌细胞增殖的抑制作用。并用 SPSS 软件检测 IC_{50} 值。

$$细胞生长抑制率(\%)=(1-\frac{A_{实验组}-A_{空白组}}{A_{对照组}-A_{空白组}})\times100\% \quad (2)$$

1.3.4.3 流式细胞法检测 KB 细胞凋亡

取对数生长期的 KB 细胞消化、计数，按细胞数 1×10^5/孔接种于 6 孔细胞培养板中，37 ℃、5% CO_2 培养箱中贴壁过夜培养，吸去原细胞培养液，每孔加入以 RPMI-1640 培养基稀释的不同浓度的鲟鱼及鸡软骨 CS 粗制品和纯化样品（31.25 和 500 μg/mL），另设置不添加任何受试物只加细胞的对照组。培养 48 h 后，按流式 Annexin V-FITC/PI Kit 双染细胞凋亡试剂盒说明书操作，用不含 EDTA 的胰酶消化细胞并收集细胞，用预冷 PBS 洗涤细胞。之后用 1×结合缓冲液悬浮细胞，取 100 μL 的细胞悬液加入 Annexin V 5 μL 混匀后于室温避光条件孵育 5 min，加入 10 μL 的碘化丙锭溶液(PI)，并加 400 μL PBS，立刻进行流式检测。

1.3.4.4 统计学分析

应用 SPSS 20.0 统计软件分析所得数据，实验独立重复做 3 次，计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)，组间两两比较采用 LSD 法检验，以 $p<0.05$ 为差异显著，$p<0.01$ 为差异极显著有统计学意义[27]。

2 结果与讨论

2.1 不同来源的硫酸软骨素粗制品得率

由鲟鱼软骨和鸡软骨经碱提-酶解-醇沉的工艺流程提取硫酸软骨素粗制品后，所得鲟鱼软骨硫酸软骨素粗制品得率为 23.80%，鸡软骨硫酸软骨素粗制品得率为 25.23%。

2.2 鲟鱼软骨硫酸软骨素的纯化

鲟鱼软骨硫酸软骨素粗制品由乙醇分级沉淀后再经 Sephadex G-50 凝胶柱层析初步纯化得到的 CS，再用 Sephacryl S-300 HR 凝胶柱层析进一步纯化，得到两次洗脱曲线如图 1。由图可知，Sephadex G-50 层析柱和 Sephacryl S-300 HR 层析柱均洗脱出了一个单峰，此峰为样品峰。收集峰洗脱液，经真空冷冻干燥后，得到白色絮状多糖。将第二次纯化样品经高效凝胶渗透色谱法分析得到纯化结果呈单一峰，进一步显示出纯化出均一组分，纯度较好，末端出现的极小峰可能为溶剂峰，也可能是因为 CS 类为阴离子类物质，纯化时盐类小分子未完全除净[28]。由表 1 可得鲟鱼硫酸软骨素的三种分子量，其中峰值分子量 MP 最大，数均分子量 Mn 最小，重均分子量 Mw 则介于两者之间。

宋居易[29]等人在对鲟鱼硫酸软骨素制备工艺优化时得到鲟鱼头骨硫酸软骨素的数均分子质量 Mn 为 28265 u，重均分子量 Mw 为 38500 u，而鲟鱼脊骨硫酸软骨素的数均分子质量 Mn 为 32000 u，重均分子量 Mw 为 49170 u。由此可看出鲟鱼硫酸软骨素的重均分子量比数均分子量大。

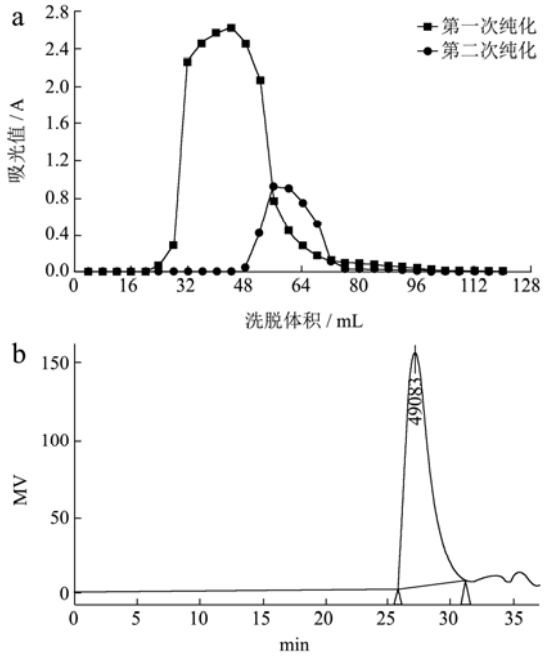


图 1 鲟鱼软骨硫酸软骨素纯化洗脱曲线（a）；纯化样品高效凝胶渗透色谱图（b）

Fig.1 Purification and elution curve of chondroitin sulfate from sturgeon cartilage (a); HPGPC chromatogram of purified samples (b)

表 1 鲟鱼软骨硫酸软骨素的分子量及其分布

Table 1 Molecular weight and its distribution of sturgeon chondroitin sulfates

样品	平均分子量			多分散性
	数均 Mn	重均 Mw	峰值 MP	
鲟鱼硫酸软骨素	34579	44314	49083	1.279494

2.3 鸡软骨硫酸软骨素的纯化

鸡软骨硫酸软骨素粗制品同样经乙醇分级沉淀再经 Sephadex G-50 凝胶柱层析和 Sephacryl S-300 HR 凝胶柱层析两步分离纯化，得到二次纯化洗脱曲线，结果如图 2 所示。由图可知，Sephadex G-50 层析柱和 Sephacryl S-300 HR 层析柱也均洗脱出了一个单峰，此峰为样品峰，峰型均较为对称，表明分离成分单一，分离效果较好[4]，将其冷冻干燥得到白色絮状多糖。第二次纯化的样品经 HPGPC 检测该多糖的主峰均匀对称，无杂峰，表明该多糖分子量分布均匀，纯度相对较高[30]。在熊双丽[31]等人对鸡胸软骨活性成分的研究中测得鸡胸软骨硫酸软骨素分子量为 21007 u。而由表 2 可得鸡硫酸软骨素的三种分子量，其中重均分子量 Mw 最大，数均分子量 Mn 最小，峰值分子量 MP 则介于两者之间。这比一般碱提取的分子量大，其主要是由于提取有碱的存在，会发生 β 消除反应，使糖链发生降解[32]。

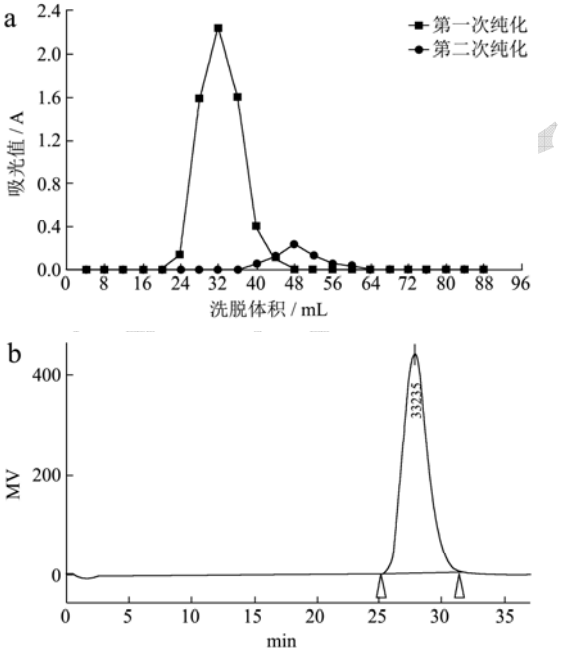


图 2 鸡软骨硫酸软骨素纯化洗脱曲线（a）；纯化样品高效凝胶渗透色谱图（b）

Fig.2 Purification and elution curve of chondroitin sulfate from chicken cartilage (a); HPGPC chromatogram of purified samples (b)

表 2 鸡软骨硫酸软骨素的分子量及其分布

Table 2 Molecular weight and its distribution of chicken chondroitin sulfates

样品	平均分子量			多分散性
	数均 Mn	重均 Mw	峰值 MP	
鸡硫酸软骨素	26626	34173	33235	1.283436

2.4 不同来源的软骨硫酸软骨素对 KB 细胞生长的形态学观察

细胞形态学观察结果显示，经 500 μg/mL 浓度的鲟鱼及鸡硫酸软骨素处理 KB 细胞 72 h 后，显微镜下观察发现，细胞经药物处理出现明显的体积变小，呈圆形，皱缩、核质浓缩等凋亡形态学特征(见图 3)。

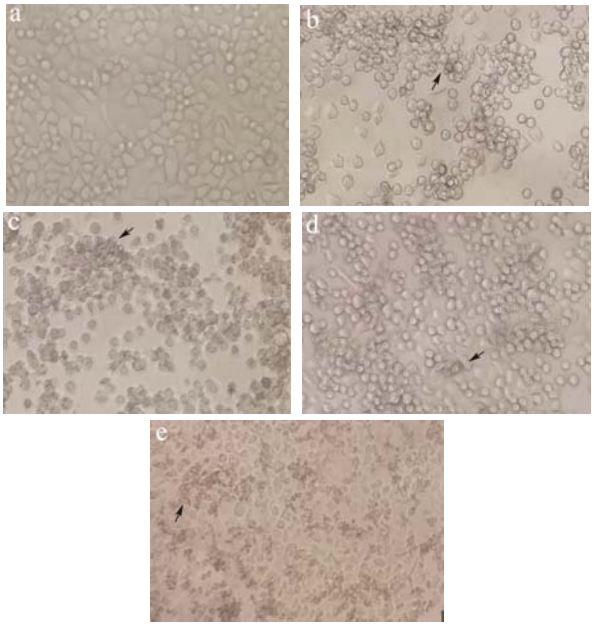


图 3 KB 细胞形态学观察(10×)

Fig.3 Morphology observation of KB cells

注：a: 对照；b: 500 μg/mL 鲟鱼 CS 粗制品；c: 500 μg/mL 鲟鱼 CS 纯化样品；d: 500 μg/mL 鸡 CS 粗制品；e: 500 μg/mL 鸡 CS 纯化样品

2.5 不同来源的软骨硫酸软骨素对口腔癌细胞增殖抑制作用

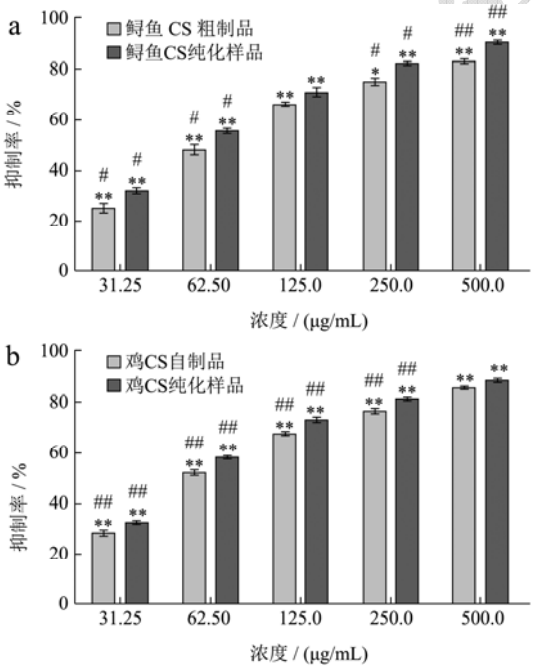


图 4 不同来源的软骨硫酸软骨素对 KB 细胞的增殖抑制率

Fig.4 Inhibitory rate of chondroitin sulfate from different sources on proliferation of KB cells

注：a: 鲟鱼软骨硫酸软骨素；b: 鸡软骨硫酸软骨素，同一样品不同浓度之间比较，*: p<0.05，**: p<0.01；粗制品和纯化样品之间比较，#: p<0.05，##: p<0.01。

MTT 法检测细胞增殖抑制情况见图 4。从图中我们可以看出，在硫酸软骨素作用于口腔癌 KB 细胞 72 h，硫酸软骨素可以显著抑制 KB 细胞的增殖，细胞增殖抑制率与硫酸软骨素呈剂量依赖性抑制，即硫酸软骨素的浓度越大，细胞增殖的抑制率越高。经硫酸软骨素处理细胞 72 h 后，鲟鱼软骨硫酸软骨素粗制品的 IC_{50} 值为 80.65 μg/mL，纯化样品的 IC_{50} 值为 58.78 μg/mL；鸡软骨硫酸软骨素粗制品的 IC_{50} 值为 68.55 μg/mL，纯化样品的 IC_{50} 值为 53.71 μg/mL。同时对比鲟鱼和鸡软骨硫酸软骨素的抑制效果，发现鸡硫酸软骨素对口腔癌细胞的增殖抑制率均大于鲟鱼软骨硫酸软骨素的作用，说明鸡硫酸软骨素对 KB 细胞增殖的抑制效果更明显。同时从 IC_{50} 数值分析还可以看出鲟鱼及鸡软骨硫酸软骨素纯化样品对口腔癌细胞的抑制效果均比粗制品的抑制效果好。因此，四种样品对口腔癌细胞的抑制作用顺序是鸡软骨硫酸软骨素纯化样品>鲟鱼软骨硫酸软骨素纯化样品>鸡软骨硫酸软骨素粗制品>鲟鱼软骨硫酸软骨素粗制品。

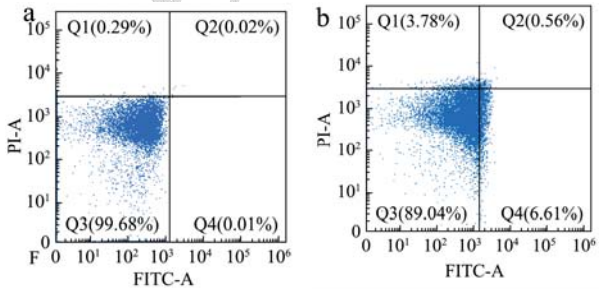
硫酸软骨素的分子结构及分子量对肿瘤细胞与正常组织细胞的作用有明显差异。硫酸软骨素是由重复二糖单位，即葡萄糖醛酸与 N-乙酰氨基半乳糖通过 β1→3 糖苷键组成的结构多样化的阴离子多糖链[33]，因为具有聚阴离子性质，这一性质有助于它同体内多种带正电荷的蛋白相结合，进一步影响多种信号转导途径[34]，包括细胞迁移，细胞黏附，细胞侵袭以及细胞外基质的组装等[35-38]，从而达到对肿瘤细胞增殖的抑制作用。多糖的生物活性与其结构和理化性质紧密相关，硫酸软骨素的结构侧链带有硫酸基团，其空间位阻和静电排斥效应增大，糖链的屈伸度增加、水溶性提高，因此生物活性提高[39]。不同硫酸化位点和硫酸化度的硫酸软骨素具有不同的生物活性，根据已报道的鸡软骨和鲟鱼软骨的硫酸软骨素结构，鸡软骨中的硫酸软骨素主要是由 4-硫酸化二糖组成，鲟鱼软骨中则是 4,6-硫酸化二糖含量较高。熊双丽[31]等人在研究鸡胸软骨硫酸软骨素结构时发现鸡胸软骨硫酸软骨素主要是 4-硫酸化软骨素。而在对鲟鱼硫酸软骨素的红外光谱进行分析时，郑江等人得出鲟鱼硫酸软骨素则是一种同时含有 4-硫酸基团和 6-硫酸基团的复杂酸性粘多糖[40]。正常组织的 CS 二糖以 4-硫酸化二糖居多，在恶性肿瘤组织中 4-硫酸化二糖含量会下降，6-硫酸化二糖以及无硫酸化的 CS 二糖含量则大幅升高。外源 CS 的摄入可以调节 CS 蛋白聚糖的微观结构，从而影响相关蛋白细胞因子（CD-44、KGF-7、HB-EGF、MK、PTN、VEGF、PDGF、TGF-I3、HARP 等）的

活性，起到治疗癌症的作用[41]。并且在一定分子量范围内，分子量越小的组分，主链螺旋体表面含有相对较多的亲水性基团如硫酸基可以增加亲水性和结构的稳定性，从而使其更好的发挥抗肿瘤的活性[42]。因此这也可能是鸡软骨硫酸软骨素呈现更为明显抗肿瘤效果的原因。

2.6 不同来源的软骨硫酸软骨素对口腔癌细胞凋亡程度的影响

如图 5 所示，经不同来源的硫酸软骨素作用口腔癌细胞 48 h 后，用流式细胞仪检测细胞凋亡水平。与对照组相比，不同来源的硫酸软骨素均会提高口腔癌细胞的凋亡率。其中，500 μg/mL 鲟鱼软骨硫酸软骨素粗制品诱导细胞的早期凋亡率为 47.50%，纯化样品为 51.02%，31.25 μg/mL 鲟鱼软骨硫酸软骨素粗制品诱导细胞的早期凋亡率为 6.61%，纯化样品为 7.79%；鸡软骨硫酸软骨素粗制品诱导细胞的早期凋亡率为 50.85%，纯化样品为 55.23%，31.25 μg/mL 鸡软骨硫酸软骨素粗制品诱导细胞的早期凋亡率为 10.69%，纯化样品为 11.55%。细胞凋亡率随着硫酸软骨素浓度的加大而增大，且鸡软骨硫酸软骨素诱导口腔癌细胞的凋亡率高于鲟鱼软骨硫酸软骨素诱导的凋亡率，纯化样品诱导口腔癌细胞的凋亡率也均高于粗制品的凋亡率。

硫酸软骨素可通过促进癌细胞的凋亡、诱导细胞发生周期的阻滞，从而抑制肿瘤细胞的侵袭和转移，达到干扰癌症的发生、增殖生长[43]。武瑞赟[12]等人在研究鲟鱼硫酸软骨素对结直肠癌细胞凋亡活性的影响时发现鲟鱼硫酸软骨素可以引起直肠癌细胞凋亡的发生，且不会引起细胞坏死。在研究硫酸软骨素对抗黑色素瘤细胞的免疫调控作用中，张敏敏通过流式细胞术检测硫酸软骨素刺激小鼠脾脏细胞、肺浸润性淋巴细胞后分析得出硫酸软骨素能够提高小鼠机体的免疫力，减少肿瘤个数[44]。由不同的研究可以看出硫酸软骨素均有诱导肿瘤细胞凋亡的能力。



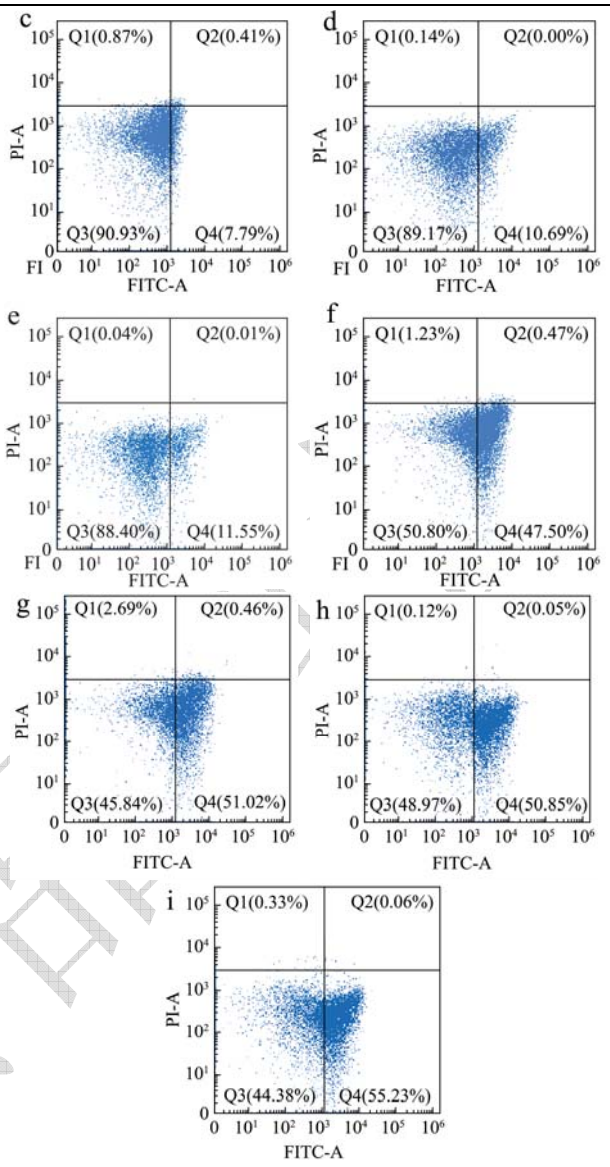


图 5 不同来源的软骨硫酸软骨素对 KB 细胞凋亡率的影响

Fig.5 Effect of chondroitin sulfate from different sources on apoptosis rate of KB cells

注：a：对照组；b：31.25 μg/mL 鲟鱼 CS 粗制品组；c：31.25 μg/mL 鲟鱼 CS 纯化样品组；d：31.25 μg/mL 鸡 CS 粗制品组；e：31.25 μg/mL 鸡 CS 纯化样品组；f：500 μg/mL 鲟鱼 CS 粗制品组；g：500 μg/mL 鲟鱼 CS 纯化样品组；h：500 μg/mL 鸡 CS 粗制品组；i：500 μg/mL 鸡 CS 纯化样品组。

3 结论

3.1 本研究通过采用碱提-酶解-醇沉的方法提取鲟鱼及鸡软骨中的硫酸软骨素，并通过两次凝胶色谱柱层析得到纯度较高的硫酸软骨素，再将硫酸软骨素粗制品和纯化样品作用于口腔癌细胞。由抗肿瘤的实验结果表明，鸡硫酸软骨素对 KB 细胞增殖的抑制效果更

明显，纯化样品对口腔癌细胞的抑制效果均比粗制品的抑制效果好。流式细胞术 Annexin V-FITC/PI 的结果可得细胞凋亡率与药物的浓度呈剂量依赖关系，且鸡软骨硫酸软骨素诱导口腔癌细胞的凋亡率高于鲟鱼软骨硫酸软骨素诱导的凋亡率，纯化样品诱导口腔癌细胞的凋亡率也均高于粗制品的凋亡率，进一步表明硫酸软骨素能促进口腔癌 KB 细胞凋亡。

3.2 本研究初步判定了鲟鱼及鸡硫酸软骨素可以引起口腔癌细胞的凋亡，硫酸软骨素的抗肿瘤作用的活性成分及其作用机制还有待于进一步研究，同时可为开发和利用硫酸软骨素药用价值提供理论依据。

参考文献

[1] 宫瑞泽,祁玉丽,霍晓慧,等.鹿气管硫酸软骨素的提取分离与抗氧化活性研究[J].食品科技,2019,44(1):291-296
GONG Rui-ze, QI Yu-li, HUO Xiao-hui, et al. Extraction and antioxidant activity of chondroitin sulfate from deer trachea [J]. Food Science and Technology, 2019, 44(1): 291-296

[2] Sugahara K, Yamada S. Potential therapeutic application of chondroitin sulfate/dermatan sulfate [J]. Current Drug Discovery Technologies, 2008, 5(4):289-301

[3] Egea J, A.G. Garcia, Verges J, et al. Antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective actions of chondroitin sulfate and proteoglycans [J]. Osteoarthritis & Cartilage, 2010, 18(1): 24-27

[4] 叶琳弘.鱿鱼软骨中硫酸软骨素的提取、纯化及降血脂活性的研究[D].福州:福建农林大学,2015
YE Lin-hong. Studied on extraction, purification and hypolipidemic activity of chondroitin sulfate from cartilage of *squid* [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2015

[5] Han L K, Sumiyoshi M, Takeda T, et al. Inhibitory effects of chondroitin sulfate prepared from salmon nasal cartilage on fat storage in mice fed a high-fat diet [J]. International Journal of Obesity, 2000, 24(9): 1131-1138

[6] Verbruggen G. Chondroitin sulfate in the management of erosive osteoarthritis of the Interphalangeal finger joints [J]. Advances in Pharmacology, 2006, 53(5): 491-505

[7] Schiraldi C, Cimini D, Rosa M D. Production of chondroitin sulfate and chondroitin [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2010, 87(4): 1209-1220

[8] Kobayashi T, Yan H, Kurahashi Y, et al. Role of gal-NAc4S-6ST in astrocytic tumor progression [J]. Plos One, 2013, 8(1): e54278

[9] ZHOU Yuegang. Chondroitin sulfate in the preparation of glycosaminoglycan from mackerel (*Pneumatophorus japonicas* Houttuyn) nasal cartilage and its interaction with growth factors [J]. J Agri Biotech, 2012, 20(1): 48-53

[10] Du Souich P. Absorption, distribution and mechanism of action of SYSADOAS [J]. Pharmacology & Therapeutics, 2014, 142(3): 362-374

[11] Gui Meng, Bin Zhao, Song Juyi, et al. Biogenic amines formation, nucleotide degradation and TVB-N accumulation of vacuum-packed minced sturgeon (*Acipenser schrencki*) stored at 4 ℃ and their relation to microbiological attributes [J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2014, 94(10), 2057-2063

[12] 武瑞赟,刘蕾,张金兰,等.鲟鱼软骨硫酸软骨素对结直肠癌细胞抑制作用[J].食品科学,2017,38(21):223-229
WU Rui-yun, LIU Lei, ZHANG Jin-lan, et al. Inhibitory effect of chondroitin sulfate from sturgeon bone on colorectal cancer cells [J]. Food Science, 2017, 38(21): 223-229.

[13] 李圣男,蔡大川,郑家概,等.鲟鱼骨中硫酸软骨素的提取及测定[J].广州化工, 2016, 44(21): 111-113
LI Sheng-nan，CAI Da-chuan，ZHENG Jia-gai, et al. Extraction and determination of chondroitin sulfate from sturgeon [J]. Guangzhou Chemical Industry, 2016, 44(21): 111-113

[14] 付莹.硫酸软骨素的制备及其降血脂作用的研究[D].哈尔滨:哈尔滨商业大学,2014
FU Yin. Extraction and research of the chondroitin sulfate on the function in blood lipid reduction [D]. Harbin: Harbin University of Commerce, 2014

[15] Vikulova Iuv. The state-of-the-art of the diagnosis of oral and oropharyngeal cancer [J]. Vestn Rentgenol Radiol, 2012, 5(3): 51-54

[16] Nohata N, Hanazawa T, Kikkawa N, et al. Tumor suppressive mi-croRNA-375 regulates oncogene AEG-1/MTDH in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) [J]. Journal of Human Genetics, 2011, 56(8): 595-601

[17] 杜晓芬.莲房原花青素对口腔癌的药理作用及其机制研究[D].武汉:华中农业大学,2004
DU Xiao-fen. Study on pharmacological activities of procyanidins from lotus seedpod on oral cancer and their mechanism [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2004

[18] Lin Ruiting, Xia Siyuan, Shan Changliang, et al. The dietary supplement chondroitin-4-sulfate exhibits oncogene-specific pro-tumor effects on BRAF V600E melanoma cells [J]. Molecular Cell, 2018, 69(6): 923-937

[19] Zu Menghang, Ma Lijun, Zhang Xueqing, et al. Chondroitin sulfate-functionalized polymeric nanoparticles for colon cancer-targeted chemotherapy [J]. Colloids & Surfaces B: Biointerfaces, 2019, 177: 399-406

[20] Iida J, Dorchak J, Clancy R, et al. Role for chondroitin sulfate glycosaminoglycan in NEDD9-mediated breast cancer cell growth [J]. Experimental Cell Research, 2015, 330(2): 358-370

[21] 许永安,陈守平,苏金华,等.史氏鲟鱼硫酸软骨素的提取及抗肿瘤活性的研究[J].上海海洋大学学报,2010,19(4):553-559
XU Yong-an, CHEN Shou-ping, SU Jin-hua et al. Extraction of chondroitin sulfate from Amur sturgeon and its antitumor activity [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2010, 19(4): 553-559

[22] 王俊,程薇,李静,等.人工养殖鲟鱼脊骨硫酸软骨素提取工艺研究[J].农产品加工(学刊),2014,1:40-43
WANG Jun, CHENG Wei, LI Jing, et al. Extracting technology of sturgeon chondroitin sulfate [J]. Academic Periodical of Farm Products Processing, 2014, 1: 40-43.

[23] 郑江,关瑞章,黄文树.鲟鱼软骨硫酸软骨素的纯化及其特性[J].水产学报,2008,32(3):478-483
ZHENG Jiang, GUAN Rui-zhang, HUANG Wen-shu. Purification and characteristics of sturgeon chondroitin sulfate [J]. Journal of Fisheries of China, 2008, 32(3): 478-483

[24] 张惟杰.复合多糖生化研究技术[M].上海:科学技术出版社,1987:270-272,293-298
ZHANG Wei-jie. Biochemical Research Technology of Glycoconjugates [M]. Shanghai: Science and Technology Press, 1987: 270-272, 293-298

[25] 周叶,赵婷,冯伟伟,等.咔唑法测定中华鲟软骨中硫酸软骨素的含量[J].安徽农业科学,2011,39(19):11597-11598
ZHOU Ye, ZHAO Ting, FENG Wei-wei, et al. Determination of the content of chondroitin sulfate from Chinese sturgeon cartilage by carbazole method [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2011, 39(19): 11597-11598

[26] WANG Yufan, ZHANG Wei, HE Kefei, et al. Induction of autophagy-dependent cell death by the survivin suppressant YM155 in salivary adenoid cystic carcinoma [J]. Apoptosis, 2014, 19(4): 748-758

[27] 张婕,齐聪.熊果酸联合顺铂对卵巢癌干细胞的增殖、凋亡、侵袭和迁移的影响[J].现代肿瘤医学,2019,27(10):1655-1661
ZHANG Jie, QI Cong. Effect of ursolic acid combined with cisplatin on proliferation, apoptosis, invasion and migration of ovarian cancer stem cells [J]. Journal of Modern Oncology, 2019, 27(10): 1655-1661

[28] 熊双丽.猪喉软骨硫酸软骨素的制备和抗氧化、降血脂机理研究[D].无锡:江南大学,2006
XIONG Shuang-li. Preparation of chondroitin sulfate from pig laryngeal cartilage and Its mechanism of antioxidation and blood lipid reduction [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2006

[29] 宋居易,桂萌,马长伟,等.鲟鱼硫酸软骨素制备工艺优化[J].中国农业大学学报,2014,19(5):116-123
SONG Ju-yi, GUI Meng, MA Chang-wei, et al. Optimized technology of chondroitin sulfate preparation from cultured sturgeon [J]. Journal of China Agricultural University, 2014, 19(5): 116-123

[30] 王恒禹,罗云凤,姜京华,等.玉米须多糖的提取纯化及结构研究[J].首都师范大学学报(自然科学版),2019,40(1):44-49
WANG Heng-yu, LUO Yun-feng, JIANG Jin-hua, et al. Extraction, purification and structural characterization analysis of stigma maydis polysaccharide [J]. Journal of Capital Normal University (Natural Science Edition), 2019, 40(1): 44-49

[31] 熊双丽,任飞,吴照民,等.鸡胸软骨硫酸软骨素的制备及结构分析[J].食品科学,2008,29(12):79-82
XIONG Shuang-li, REN Fei, WU Zhao-min, et al. Preparation and structure analysis of chondroitin sulfate from chicken sternal cartilage [J]. Food Science, 2008, 29(12): 79-82

[32] 熊双丽,金征宇.猪喉软骨硫酸软骨素的制备和自由基清除活性[J].食品与生物技术学报,2006,4:85-88
XIONG Shuang-li, JIN Zheng-yu. Preparation of chondroitin sulfate from pig laryngeal cartilage and free radicals-scavenging activities [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2006, 4: 85-88.

[33] 周跃钢.硫酸软骨素的研究进展及其应用前景[J].中国药学杂志,2016,51(21):1821-1825
ZHOU Yue-gang. Chondroitin sulfate with potential pharmacological activities: Research progress and Its application prospect [J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2016, 51(21): 1821-1825

[34] 田志强.鲨鱼软骨多糖的分离纯化及其抗类风湿性关节炎作用机制研究[D].济南:山东大学,2006
TIAN Zhi-qiang. Study on separation and purification of shark cartilage polysaccharides and their anti-rheumatoid arthritis mechanisms [D]. Jinan: Shandong University, 2006

[35] Butcher D T, Alliston T, Weaver V M. A tense situation: forcing tumor progression [J]. Nature Reviews Cancer, 2009，9: 108-122

[36] Wang Qian, Xue Liang, Zhang Xiaoyu, et al. Autophagy protects ovarian cancer-associated fibroblasts against oxidative stress [J]. Cell Cycle, 2016, 15(10): 1376-1385

[37] Pasanen I, Lehtonen S, Sormunen R, et al. Breast cancer carcinoma-associated fibroblasts differ from breast fibroblasts in immunological and extracellular matrix regulating pathways [J]. Experimental Cell Research, 2016, 344(1): 53-66

[38] Lau E Y, Lo J, Cheng B Y, et al. Cancer-associated fibroblasts regulate tumor-initiating cell plasticity in hepatocellular carcinoma through c-Met/FRA1/HEY1 signaling [J]. Cell Reports, 2016, 15(6): 1175-1189

[39] Zhang Lina, Chen Li, Xu Xiaojuan, et al. Comparison on chain stiffness of a water-insoluble (1→3)-*α*-d-glucan isolated from Poria cocos mycelia and its sulfated derivative [J]. Carbohydrate Polymers, 2005, 59(2): 257

[40] 郑江,关瑞章,黄世玉.鲟鱼和鲨鱼硫酸软骨素红外光谱特性的比较研究[J].光谱学与光谱分析,2008,1:106-109
ZHEN Jiang, GUAN Rui-zhang, HUANG Shi-yu. Comparative studies on the characteristics of the fourier-transform infrared spectra between sturgeon and shark chondroitin sulfates [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2008, 1: 106-109

[41] 黄世玉.鲟鱼硫酸软骨素的免疫功能以及抗肿瘤生物活性研究[D].厦门:集美大学,2017
HUANG Shi-yu. Studies on Immune function and antitumor biological activity of sturgeon chondroitin sulfate [D]. Xiamen: Jimei University, 2017

[42] 刘晓菲.羧甲基茯苓多糖的纯化及生物活性研究[D].广州:华南理工大学,2018
LIU Xiao-fei. Purification and biological activity of carboxymethyl pachyman [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2018

[43] O'Connell M P, Weeraratna A T. A spoonful of sugar makes the melanoma go: the role of heparan sulfate proteoglycans in melanoma metastasis [J]. Pigment Cell Melanoma Research, 2011, 24(6): 1133-1147

[44] 张敏敏.硫酸软骨素对抗黑色素瘤细胞的免疫调控作用[D].烟台:鲁东大学,2017
ZHANG Min-min. The Immunoregulatory effect of chondroitin sulfate on melanoma cells [D]. Yantai: Ludong University, 2017

（上接第 225 页）

[12] 翟明勇,张瑞霞,赵思明.工艺参数对排骨汤营养特性的影响[J].食品科技,2007,12:123-126
QU Ming-yong, ZHANG Rui-xia, ZHAO Si-ming. Nutrition quality and cooking process optimization of porkchop soup [J]. Food Science and Technology, 2007, 12: 123-126

[13] 许雪萍.不同加工方式处理对猪肉中脂质的影响研究[D].南昌:南昌大学,2018
XU Xue-ping. Effects of different processing methods on lipid in pork [D]. Nanchang: Nanchang University, 2018

[14] 唐学艳,陈洁,李更更,等.加工方法对鱼汤营养成分的影响[J].食品工业科技,2008,10:248-255
TANG Xue-yan, CHEN Jie, LI Geng-geng, et al. Effect of processing conditions on the nutrition value of fish soup [J]. Science and Technology of Food Industry, 2008, 10: 248-255

[15] 荣胜忠,邹立娜,崔新宇,等.中国居民膳食嘌呤摄入量评估[J].营养学报,2015,37(3):15-17
RONG Sheng-zhong, ZOU Li-na, CUI Xin-yu, et al. Assessments of dietary purine intake in Chinese residents [J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2015, 37(3): 15-17

[16] 杨海斌.各种肉类食物中嘌呤类物质的检测[D].太原:山西医科大学,2012
YANG Hai-bin. Detection of purine substances in meat [D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2012

[17] 蒋静.电磁加热模式对鲫鱼汤营养素释放的影响[D].武汉:华中农业大学,2016
JIANG Jing. The influence of electromagnetic heating mode on the nutrients release [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2016

[18] 田沁,吴珂剑,谢雯雯,等.鲢鱼头汤烹制工艺优化及烹饪模式对汤品质的影响[J].华中农业大学学报,2014,33(1):103-111
TIAN Qin, WU Ke-jian, XIE Wen-wen, et al. Optimization of cooking process of silver carp head soup and influence of cooking mode on soup quality [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2014, 33(1): 103-111