

三种多糖降解复合物体外抑制 HeLa 细胞的增殖作用

钟思恩, 刘杨, 曹纯洁, 陈美珍

(汕头大学理学院, 广东汕头 515063)

摘要: 本文探讨了毛头鬼伞、龙须菜和坛紫菜三种多糖降解复合物体外抑制 HeLa 细胞增殖的协同效应及其作用机制。将毛头鬼伞、龙须菜和坛紫菜的多糖降解物复配成复合多糖降解物, 采用 MTT 法检测复合多糖降解物对 HeLa 细胞增殖影响, DCFH-DA 检测细胞内活性氧水平, JC-1 检测线粒体膜电位变化情况。正交实验结果显示, 当毛头鬼伞、龙须菜和坛紫菜三种多糖降解物以质量比为 4:4:5 组合时, 对 HeLa 细胞的增殖抑制作用最强, 在浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 抑制率达 75.72%, 远高于三种单味多糖降解物单独使用时的最高抑制率 56.09%; DCFH-DA、JC-1 检测结果表明, 复合多糖降解物可以显著提高细胞内活性氧水平, 降低线粒体膜电位。以上结果均说明毛头鬼伞、龙须菜和坛紫菜三种多糖降解物复合后, 对 HeLa 细胞的增殖抑制活性存在协同增效作用, 该复合多糖降解物的作用机制可能与提高细胞内活性氧水平和降低线粒体膜电位有关。

关键词: 复合多糖降解物; HeLa 细胞; 活性氧; 线粒体膜电位

文章编号: 1673-9078(2018)10-72-80

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.10.111

Inhibitory Effect of Complex Polysaccharides Degradation Products on Proliferation of HeLa Cells *in vitro*

ZHONG Si-en, LIU Yang, CAO Chun-jie, CHEN Mei-zhen

(College of Science Shantou University, Shantou 515063, China)

Abstract: The synergistic inhibitory effect of complex polysaccharides degradation products from *Coprinus comatus*, *Gracilaria Lemaneiformis* and *Porphyra haitanensis* on HeLa cell proliferation *in vitro* and its mechanism were investigated. In the experiment, the complex polysaccharides degradation products were combined by three kinds of polysaccharides degradation products from *Coprinus comatus*, *Gracilaria Lemaneiformis* and *Porphyra haitanensis*. The influence of complex polysaccharides degradation products on HeLa cells proliferation was assayed by MTT test. The intracellular level of reactive oxygen species was determined by DCFH-DA and the change of mitochondrial membrane potential was measured by JC-1. Based on orthogonal experiment, when the quality ratio of three kinds of polysaccharides degradation products from *Coprinus comatus*, *Gracilaria Lemaneiformis* and *Porphyra haitanensis* was 4:4:5, the inhibition effect on proliferation of HeLa cells was the strongest. In a concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the inhibition rate was 75.72%, which outclassed the maximum inhibition rate of 56.09% when the three kinds of single polysaccharides degradation product were used alone. The results indicated that treatments of complex polysaccharides degradation products could significantly improve the intracellular level of reactive oxygen species and decrease mitochondrial membrane potential by DCFH-DA and JC-1, respectively. Combination of polysaccharides degradation products from *Coprinus comatus*, *Gracilaria Lemaneiformis* and *Porphyra haitanensis*, exhibited syneigistic the inhibition on proliferation of HeLa cells. The effect of complex polysaccharides degradation products might be related to increasing reactive oxygen species and reducing mitochondrial membrane potential.

Key words: complex polysaccharides degradation products; HeLa cell; reactive oxygen species; mitochondrial membrane potential

毛头鬼伞(*Coprinus comatus*)俗称鸡腿菇, 其子实体含有 4.11% 多糖, 且多糖主要由 D-葡萄糖、D-半乳糖、L-岩藻糖、D-甘露糖和少量葡萄糖醛酸组成^[1]。

收稿日期: 2018-06-04

基金项目: 广东省海洋与渔业局科技推广专项资金项目 (2017.03)

作者简介: 钟思恩 (1991-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 活性物质研究与开发

通讯作者: 陈美珍 (1956-), 女, 教授, 研究方向: 活性物质研究与开发

龙须菜(*Gracilaria Lemaneiformis*)和坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)均属红藻类, 都富含由 D-半乳糖和 3,6-内醚-L-半乳糖组成的琼胶型多糖, 分别占其藻体干重的 31.05%^[2]和 20%~40%^[3]。其中, 龙须菜多糖的平均分子量较大。研究发现, 这三种多糖均有多种生理功能, 如免疫调节^[4-6]、抗氧化^[7-10]、抗肿瘤^[11-13]、降血糖^[14,15]等。

多糖具有多种生物活性, 但一种多糖的功效一般

侧重于某一方面,有一定的局限性;将多糖按一定比例配伍后,其生理活性能起到协同增效作用^[16,17]。如谢好贵等^[16]将龙须菜多糖、坛紫菜多糖和毛头鬼伞多糖以质量配比为6:6:3组合的1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 复合多糖作用于HeLa细胞,其增殖抑制率达76.30%,远高于3种同剂量单味多糖的最高抑制率59.63%。梁金强等^[18]将五种真菌多糖按一定比例组成复合多糖作用于免疫抑制小鼠,发现复合多糖的免疫增强作用比各单一多糖好。多糖的生物活性也受其分子大小的影响,大分子多糖适度降解后活性增强。如Liao等^[19]将龙须菜多糖GLP及其多糖降解组分GLP-1和GLP-2(分子量分别为121.89、57.02和14.29 ku)分别灌胃糖尿病小鼠,发现GLP、GLP-1、GLP-2都能降低糖尿病小鼠血糖水平,其中GLP-1降低作用最显著;Sun等^[20]将蜈蚣藻多糖GFP(220 ku)降解得到多种降解物LGFPs,发现LGFP-3(8.7 ku)抗病毒活性最强。然而,这些报道仅限于对未降解的复合多糖和降解后的单一多糖的研究,对于降解后的海藻复合多糖尚未见国内外有任何报道。

为了提高海藻多糖的抗肿瘤活性,本实验在前期工作的基础上,将毛头鬼伞多糖、龙须菜多糖和坛紫菜多糖进行降解,并比较降解前、后的多糖对HeLa细胞生长抑制影响;利用正交实验优选三种降解物的最佳复配比例,探究复配的三种多糖降解物体外抑制HeLa细胞增殖的协同效应及其作用机制,以期为多糖的高效利用提供前期研究基础。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

毛头鬼伞子实体购于福建;龙须菜、末水坛紫菜:来自汕头南澳海区,由汕头大学海洋生物研究所南澳试验站陈伟洲教授鉴定。

肿瘤细胞:人宫颈癌HeLa细胞,由汕头大学多学科研究中心提供。

正常细胞:人胚胎肾细胞293T细胞,由汕头大学多学科研究中心提供。

木瓜蛋白酶, sigma公司; DMEM高糖培养基, 美国Hyclone公司; 胎牛血清, 杭州四季青科技有限公司; 四甲基偶氮唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO), 美国Amresco公司; 5-氟尿嘧啶(5-FU), 上海源叶生物科技有限公司; 胰酶细胞消化液、青霉素-链霉素溶液、N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)、活性氧(ROS)检测试剂盒, 碧云天生物技术研究; 三氯乙酸(TCA)、过氧化氢

(H_2O_2)和抗坏血酸(Vc)等均为国产试剂分析纯。

1.2 仪器与设备

UNICO UV2100型分光光度计, 尤尼柯(上海)仪器有限公司; AdVantage 2.0 BenchTop Freeze Dryer, 美国VIRTIS公司; BT124S型电子分析天平, 德国Sartorius公司; 倒置荧光显微镜, 日本Nikon公司; 普通光学显微镜, Olympus公司; 离心机, Eppendorf公司; 超低温冰箱, Thermo公司; 全波段扫描型酶标仪, TECAN公司; 3111型 CO_2 培养箱, Thermo公司; BCM-13WA超净工作台, 苏净安泰公司; CK30-F200型倒置显微镜, Olympus公司。

1.3 方法

1.3.1 三种多糖的提取

将原料烘干、粉碎后,按以下条件进行提取^[16]:

- (1) 毛头鬼伞多糖: 料液比1:15, 94.5 $^\circ\text{C}$ 浸提4 h;
- (2) 龙须菜多糖: 料液比1:100, 90 $^\circ\text{C}$ 浸提5 h;
- (3) 末水坛紫菜多糖: 料液比1:50, 80 $^\circ\text{C}$ 浸提6 h。

多糖提取后过滤收集多糖液,进行除蛋白处理。

- (1) 毛头鬼伞多糖除蛋白采用木瓜蛋白酶-TCA法联用: 在多糖液中加入0.5 mg/mL 木瓜蛋白酶, 60 $^\circ\text{C}$ 反应50 min, 再加入TCA使其终浓度为4.6%, 22.5 $^\circ\text{C}$ 反应30 min后离心, 收集上清液;
- (2) 龙须菜多糖采用TCA法除蛋白: 在多糖液中加入终浓度为4% TCA溶液, 过夜后, 离心, 收集上清液;
- (3) 末水坛紫菜多糖采用木瓜蛋白酶-TCA法联合除蛋白, 按文献[9]方法进行。各上清液经流水透析2 d, 蒸馏水透析1 d后, 冷冻干燥得相应的多糖样品: 毛头鬼伞多糖CCP、龙须菜多糖GLP和末水坛紫菜多糖PHP。

1.3.2 三种多糖降解物的制备

根据前期建立的条件^[19], 采用维生素C(Vc)和 H_2O_2 降解体系, 按照 $\text{Vc}:\text{H}_2\text{O}_2=1:1$ 的质量浓度比配制浓度为3、5、7 mmol/L 降解剂分别降解三种多糖。三种多糖液浓度均为2.5 mg/mL , 其中, 以降解剂浓度为3 mmol/L 降解CCP、5 mmol/L 降解PHP、7 mmol/L 降解GLP, 作用2 h后, 然后用超滤方法收集分子量在10~50 Ku的降解物, 以分子量为8000~12000 u的透析袋蒸馏水透析1 d, 分别收集相应的多糖降解液, 冷冻干燥后得多糖降解物: 毛头鬼伞多糖降解物D-CCP、坛紫菜多糖降解物D-PHP、龙须菜多糖降解物D-GLP。

1.3.3 多糖含量测定

采用苯酚-硫酸比色法^[21], 以D-半乳糖为标准品, 吸光值为纵坐标, D-半乳糖微克数(μg)为横坐标, 绘

制标准曲线; 得到线性回归方程: $Y=0.0071X+0.0037$, Y 为吸光度, X 为多糖含量, 相关系数 $R^2=0.9991$; 求得 D-CCP、D-GLP 和 D-PHP 的多糖含量分别为 $93.63 \pm 0.98\%$ 、 $95.64 \pm 1.83\%$ 和 $97.65 \pm 2.07\%$ 。

1.3.4 多糖降解物蛋白含量测定

根据考马斯亮蓝法^[9,22]测得牛血清蛋白含量与吸光度的关系, 绘制标准曲线, 得出回归方程为 $Y=0.0046X-0.0058$, $R^2=0.9993$, X 表示蛋白质含量, Y 表示吸光值。测得 D-CCP、D-GLP 和 D-PHP 蛋白含量分别为 $1.83 \pm 0.20\%$ 、 $1.24 \pm 0.12\%$ 和 $0.92 \pm 0.08\%$ 。

1.3.5 多糖降解物重均分子量测定

采用凝胶过滤层析法测定各多糖降解物的重均分子量^[23,24]。

绘制标准曲线: 在 Sephadex G-150 层析柱中加入 3 mL 浓度为 1 mg/mL Dextran blue 2000, 采用 0.1 mmol/L NaCl 洗脱, 每管收集 1 mL。收集后, 采用苯酚-浓硫酸法检测外水体积 V_0 。在相同条件下, 测定已知分子量的 T-500、T-70、T-40、T-20、T-10 标准葡聚糖洗脱体积 V_e , 根据 $K_{av}=(V_e-V_0)/(V_t-V_0)$ 对分子量对数值绘制分子量标准曲线, V_t 为内水体积。

按上述处理, 测定各多糖降解物洗脱体积 V_e , 根据标准曲线回归方程求出重均分子量。

1.3.6 多糖及其降解物抑制 HeLa 细胞增殖作用单因素实验

取对数生长期 HeLa 细胞配成 1×10^5 个/mL 的细胞悬液接种于 96 孔板, 每孔 100 μ L, 于 5% CO_2 、饱和湿度培养箱中 37 $^{\circ}C$ 培养 18 h。随机分 6 组: CCP、GLP、PHP 组和 D-CCP、D-GLP、D-PHP 组, 其中, CCP、GLP、PHP 组分别加入由完全培养基(含 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM 培养基)稀释的浓度梯度为 200、400、600、800、1000、1200 μ g/mL 的各多糖液; D-CCP、D-GLP、D-PHP 组分别加入由完全培养基稀释的浓度梯度为 20、40、60、80、100 μ g/mL 的各多糖降解物, 作用 48 h 后除去上清液, 加入 MTT 反应 4 h, 弃上清, 加入 DMSO, 室温振荡 10 min, 用全自动酶标仪作双波长检测, 检测波长 490 nm、参考波长 570 nm, 测定其 OD 值, 按式(1)计算各组别的细胞增殖抑制率。

$$\text{细胞增殖抑制率}/\% = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\% \quad (1)$$

注: A_0 为对阴性对照组 OD 值; A_1 为给药组 OD 值。

1.3.7 正交实验优化三种多糖降解物最适配比

复合多糖降解物(简称 CDP)由 D-CCP、D-GLP、D-PHP 组成。在单因素实验基础上, 以对 HeLa 细胞的增殖抑制率为考察指标, 设计三因素三水平正交实

验优化复合多糖降解物的最适配比, 实验因素水平安排如表 1 所示。给药剂量均以单因素实验得到的最高抑制率的作用浓度 80 μ g/mL 进行处理。

表 1 因素水平表

Table 1 Factor levels table

水平	因素		
	D-CCP/ μ g/mL	D-GLP/ μ g/mL	D-PHP/ μ g/mL
1	60	60	60
2	80	80	80
3	100	100	100

1.3.8 CDP 抑制 HeLa 细胞增殖的测定

取 HeLa 细胞和 293T 细胞分别配成 1×10^5 个/mL 的细胞悬液, 接种于 96 孔板, 每孔 100 μ L, 培养 18 h。实验设空白组、阳性组和实验组, 其中空白组加入完全培养基; 阳性组加入 25 μ g/mL 5-FU; 实验组分别加入 40、60、80、100、120、160、200 μ g/mL CDP 作用液, 按分组情况对培养的 HeLa 细胞和 293T 细胞分别进行处理。作用 48 h 后移除上清液, MTT 法测其 OD 值, 计算各组的细胞增殖抑制率, 方法同 1.3.6。

1.3.9 细胞内 ROS 水平的测定

采用细胞活性氧检测试剂盒测定, 检测方法按照试剂盒说明书进行, 酶标仪测定其荧光值, 并于倒置荧光显微镜下观察、拍照。实验重复 3 次。具体操作如下:

取密度 1×10^5 个/mL HeLa 细胞悬液接种于 6 孔板, 1 mL/孔, 培养 18 h。随机分组: 空白组、活性氧阳性对照(Rosup)组和 40、100、160 μ g/mL CDP 给药组。空白组、Rosup 组分别加完全培养基, CDP 组分别加入各浓度 CDP 作用液, 培养 48 h。在装载探针前, Rosup 组加入 50 μ g/mL Rosup, 孵育 30 min, 立即装载探针。

细胞内 ROS 含量测定: 选择原位装载探针, 每孔加 1 mL 终浓度为 10 μ mol/L DCFH-DA, 于培养箱内孵育 30 min, 用 PBS 洗涤细胞 3 次, 充分洗去未进入细胞内的 DCFH-DA 探针, 并用胰酶消化, 离心收集细胞, 重悬于 PBS 中, 通过细胞计数器获取 5×10^6 个/mL 细胞悬液, 在 96 孔板中每孔加入 100 μ L, 用荧光酶标仪于 488 nm 激发波长和 525 nm 发射波长下检测刺激后荧光的强弱作为评价指标。

1.3.10 NAC 对 CDP 抑制 HeLa 细胞增殖的检测

实验设空白组、阳性组、实验组, 其中, 空白组加入完全培养基、阳性组加入 25 μ g/mL 5-FU、实验组分别加入 40、60、80、100、120、160、200 μ g/mL CDP 作用液。空白组和阳性组均加入新鲜培养基、实

实验组加入 10 mmol/L NAC, 孵育 6 h, 移除上清液, PBS 洗涤 3 次。

按分组情况进行处理, 培养 48 h 后移除上清液, MTT 法测其 OD 值, 计算各组的细胞增殖抑制率^[25,26], 方法同 1.3.6。

1.3.11 细胞线粒体膜电位检测

实验随机分 3 组: 空白组、CCCP 阳性对照组和 CDP 给药组。空白组、CCCP 阳性对照组分别加完全培养基, 其中 CCCP 组在装载 JC-1 前加入 10 μmol/L CCCP 处理 20 min, CDP 组分别加入 40、100、160 μg/mL CDP 作用液, 培养 48 h。

吸除培养液, 用 PBS 洗涤 1 次, 加入细胞培养液 1 mL。参照试剂盒方法, 加入 JC-1 染色工作液 1 mL, 充分混匀, 于培养箱中孵育 20 min。吸除上清, 用 JC-1 染色缓冲液洗涤 2 次, 加入细胞培养液 2 mL, 在荧光显微镜下观察。

1.4 统计方法

实验结果采用 SPSS 17.0 统计软件分析。用单因素方差分析组间差异的显著性, 结果采用平均值±标准差表示($\bar{x}\pm s$), $p<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 多糖降解物平均分子量

根据凝胶过滤层析法测得的标准葡聚糖洗脱体积, 以 K_{av} 对分子量对数值绘制分子量标准曲线, 求得回归方程为 $Y=-4.6117X+5.7678$, $R^2=0.9989$, Y 表示分子量对数值, X 表示 K_{av} 。

在相同条件下, 测定不同降解剂浓度下相应多糖降解物的洗脱体积, 根据回归方程, 求得各多糖降解物的重均分子量如表 2 所示。以下实验所用三种多糖降解物即为表 2 中的 D-CCP、D-PHP、D-GLP, 其重均分子量分别为 18.1、15.7、18.9 ku。

表 2 多糖降解物重均分子量

Table 2 Molecular weight content of polysaccharides degradation products

降解剂浓度/(mmol/L)	多糖降解物	重均分子量/ku
3	D-CCP	18.1
5	D-PHP	15.7
7	D-GLP	18.9

2.2 三种多糖及其降解物抑制 HeLa 细胞增殖作用比较

MTT 法检测三种多糖及其降解物对 HeLa 细胞增殖抑制作用, 结果见图 1、2。

与未降解的多糖比较, 一定浓度的多糖降解物对 HeLa 细胞的增殖抑制率成倍提高, 其中在浓度 80 μg/mL 时, D-CCP、D-GLP、D-PHP 对 HeLa 细胞的抑制率最大, 分别为 56.09 ± 3.20 、 42.97 ± 1.73 、 $47.35\pm 3.06\%$, 其中 D-CCP 的半数抑制浓度 IC_{50} 为 $84.68\ \mu\text{g/mL}$; 而对应的未降解多糖要达到最大的抑制率 41.13 ± 1.45 、 52.47 ± 2.28 、 $35.52\pm 1.93\%$, 则需作用剂量为 $1000\ \mu\text{g/mL}$ 的浓度, 结果说明对三种多糖适度降解可有效提高其生理活性, 其中毛头鬼伞多糖降解物效果最为显著, 其次是坛紫菜多糖降解物。

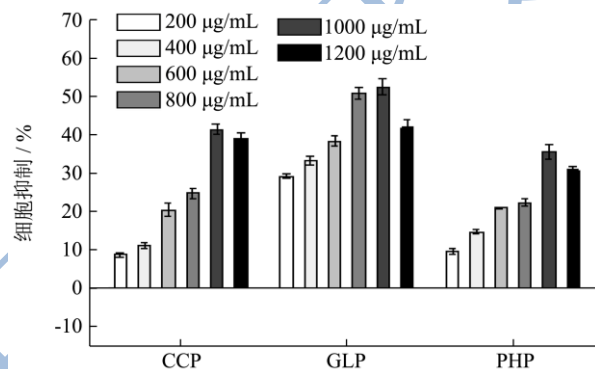


图 1 CCP、GLP、PHP 对 HeLa 细胞增殖抑制率

Fig.1 The inhibition rate of CCP, GLP, PHP on HeLa cells

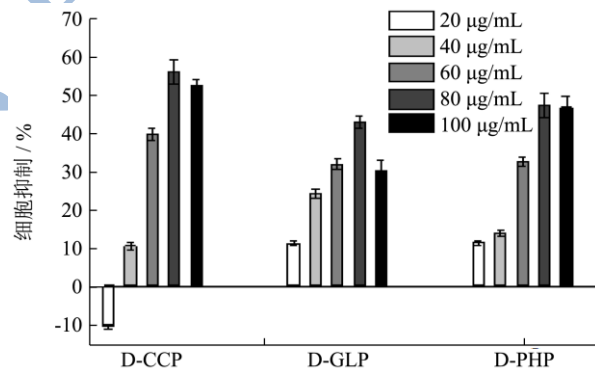


图 2 D-CCP、D-GLP、D-PHP 对 HeLa 细胞增殖抑制率

Fig.2 The inhibition rate of D-CCP, D-GLP, D-PHP on HeLa cells

2.3 正交实验确定 CDP 组方配比

正交实验优化 D-CCP、D-GLP 和 D-PHP 组合配比的结果及方差分析见表 3、4。

由表 3 可见, D-CCP、D-GLP 和 D-PHP 对 HeLa 细胞增殖抑制的影响大小为 $D\text{-PHP}>D\text{-CCP}>D\text{-GLP}$, CDP 的最佳配方为 $A_2B_2C_3$, 即 $D\text{-CCP}:D\text{-GLP}:D\text{-PHP}=4:4:5$, 在表 4 方差分析中, D-CCP 和 D-PHP 对 CDP 作用有显著性影响。对该最佳配比形成的 CDP 作用 HeLa 细胞进行验证实验($n=3$), 得到的抑制率为

70.79±0.57%，显著高于三种多糖降解物单独作用时的最高抑制率 56.09±3.20%，抑制率提高了 26%，说明三种多糖降解物复合后对 HeLa 细胞的抑制作用存在协同效应。因此，确定 CDP 的最适组合为 D-CCP:D-GLP:D-PHP=4:4:5。

表 3 正交实验结果

Table 3 The result of orthogonal experiment

组别	CDP 配伍方案			抑制率/%
	A/D-CCP	B/D-GLP	C/D-PHP	
1	60	60	60	45.24±1.86
2	60	80	80	52.16±1.75
3	60	100	100	60.45±1.40
4	80	60	80	64.39±2.59
5	80	80	100	71.34±3.22
6	80	100	60	57.52±1.67
7	100	60	100	66.81±2.12
8	100	80	60	59.47±1.41
9	100	100	80	61.50±2.35
K1	52.617	58.813	54.077	
K2	64.417	60.990	59.350	
K3	62.593	59.823	66.200	
R	11.800	2.177	12.123	

注：各组别按表中配伍制备复合多糖降解物，用培养液稀释成终浓度均为 80 μg/mL 多糖液作用细胞。

表 4 方差分析

Table 4 Analysis is of variance

因素	偏差平方和	自由度	F 值	F 临界值	显著性
D-CCP	242.098	2	21.259	19.000	*
D-GLP	7.119	2	0.625	19.000	
D-PHP	221.706	2	19.468	19.000	*

2.4 CDP 对 HeLa 细胞的增殖抑制作用

由表 5 可见 CDP 对 HeLa 细胞作用 48 h 的增殖抑制率，在低浓度时，随浓度增加而增加，但当浓度为 100 μg/mL 时，抑制率达最大值 75.72% ($p < 0.01$)，之后随浓度增加而显著下降，其 IC_{50} 值为 67.07 μg/mL。而谢好贵^[16]的研究发现，将未降解的龙须菜、坛紫菜和毛头鬼伞三种多糖以最优配比构成的复合多糖，对 HeLa 细胞作用 48 h 的增殖抑制率是在剂量为 1000 μg/mL 时达最高值 76.30%。相比之下，本实验通过将这三种多糖分别降解后再进行配伍，可有效提高其对 HeLa 细胞增殖抑制活性，具有显著的增效作用。其作用效果与小分子阳性药物 5-FU 在浓度为 25 μg/mL 时的抑制率接近。但 5-FU 对正常细胞 293T 有较强毒副作用，而 CDP 对 293T 细胞不仅无毒，还具有促生长作用。表明多糖通过降解再复配可有效提高其生理活性，是一种安全有效的提高多糖功效的修饰方法，CDP 具有进一步研究开发价值。

表 5 CDP 对 HeLa 细胞增殖的影响

Table 5 The effect on proliferation of HeLa cells

组别	HeLa			293T	
	剂量/(μg/mL)	吸光度值	抑制率/%	吸光度值	抑制率/%
空白		0.795±0.011		1.114±0.129	
阳性/5-FU	25	0.212±0.013**	73.37	0.243±0.021**	78.19
CDP	40	0.608±0.003*	23.52	1.229±0.092*	-10.32
	60	0.458±0.045**	42.45	1.264±0.189**	-13.46
	80	0.232±0.029**	70.85	1.325±0.106**	-18.94
	100	0.193±0.032**	75.72	1.349±0.086**	-21.10
	120	0.373±0.028**	53.08	1.326±0.193**	-19.03
	160	0.445±0.047**	43.95	1.301±0.175**	-16.79
	200	0.426±0.033**	45.85	1.250±0.124**	-12.21

注：*表示 $p < 0.05$ vs 空白组；**表示 $p < 0.01$ vs 空白组。

2.5 CDP 对细胞内 ROS 水平的影响

由图 3 可知，CDP 处理组(图中的 c、d、e)的荧光强度明显高于空白组，说明经 CDP 处理后 HeLa 细胞内 ROS 含量增加，其中作用剂量 100 μg/mL 的荧光强度最强，这与其对 HeLa 细胞增殖抑制率最高相对应。

图 4 表明，CDP 可诱导细胞内 ROS 产生，结合表 5 可知：

当 CDP 浓度为 40~160 μg/mL 时，CDP 对 HeLa 细胞增殖抑制能力和细胞内 ROS 含量呈正相关，说明 CDP 对 HeLa 细胞的抑制作用可能与其升高细胞内 ROS 水平有关。

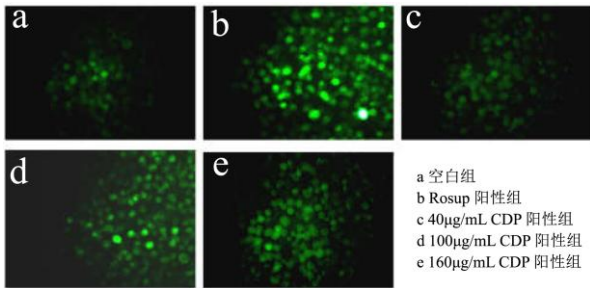


图3 DCFH-DA 染色观察 CDP 处理 48 h 后 HeLa 细胞内 ROS 水平

Fig.3 ROS level in HeLa cells after CDP treading 48 h by

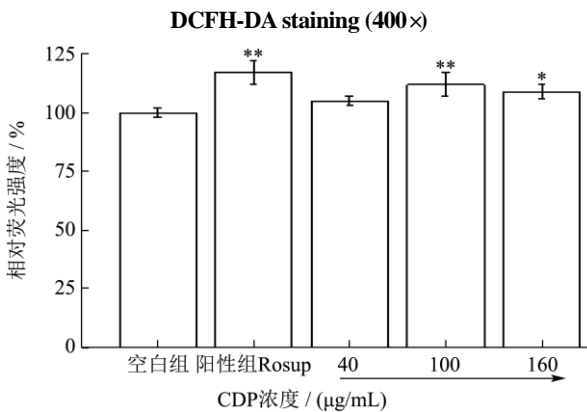


图4 CDP 对 HeLa 细胞内 ROS 水平的影响

Fig.4 The effect of ROS level on HeLa cells

注: *表示 $p < 0.05$ vs 空白组; **表示 $p < 0.01$ vs 空白组。

2.6 NAC 对 CDP 抑制 HeLa 细胞增殖的影响

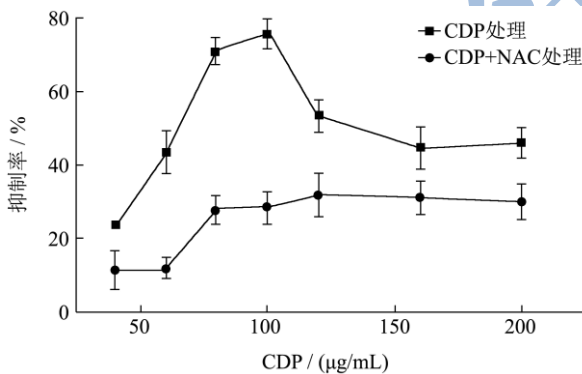


图5 NAC 对 CDP 抑制 HeLa 细胞增殖活性的影响

Fig.5 The effect of NAC for CDP suppressing HeLa cells proliferation

NAC 是常用的细胞 ROS 清除剂,其作用是通过促进 GSH 的产生来清除 ROS^[26]。本实验利用 NAC 的干预,以证实 CDP 对 HeLa 细胞的增殖抑制作用与其升高细胞内 ROS 有关,结果见表 6。根据表 5 和表 6 的数据,得图 5。由图 5 可知,经 NAC 处理后,CDP 对 HeLa 细胞的增殖抑制作用明显减弱,证实了 CDP 是通过提高 HeLa 细胞内 ROS 含量来抑制 HeLa 细胞增殖的。并且已有研究表明,5-FU 对肿瘤细胞的毒性作用也与 ROS 生成相关^[27]。

表 6 NAC 对 CDP 抑制 HeLa 细胞增殖的影响

Table 6 The effect of NAC on CDP suppressing HeLa cells

proliferation			
组别	剂量/($\mu\text{g/mL}$)	吸光度值	抑制率/%
空白		0.802 ± 0.021	
阳性/5-FU	25	$0.228 \pm 0.031^{**}$	71.63
	40	$0.712 \pm 0.044^*$	11.30
	60	$0.711 \pm 0.023^*$	11.38
CDP+NAC/ (10 mmol/L)	80	$0.579 \pm 0.031^{**}$	27.83
	100	$0.574 \pm 0.035^{**}$	28.43
	120	$0.548 \pm 0.048^{**}$	31.65
	160	$0.553 \pm 0.036^{**}$	31.04
	200	$0.561 \pm 0.039^{**}$	30.05

注: *表示 $p < 0.05$ vs 空白组; **表示 $p < 0.01$ vs 空白组。

2.7 CDP 对 HeLa 细胞线粒体膜电位的影响

JC-1 是一种检测线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential) 的理想荧光探针。当细胞线粒体膜电位比较高时,JC-1 聚集于线粒体基质中,形成产生红色荧光的聚合物;当膜电位比较低时,JC-1 不能聚集于线粒体的基质中,以单体形式存在,呈绿色荧光。

由图 6 可见,空白组中 HeLa 细胞呈现红色荧光;CCCP 阳性对照组中,细胞线粒体膜电位几乎完全丧失呈现绿色荧光;经 CDP 处理后,d、e、f 中细胞染色大多呈现绿色荧光,红色荧光减少,表明 CDP 可诱导 HeLa 细胞线粒体膜电位降低。

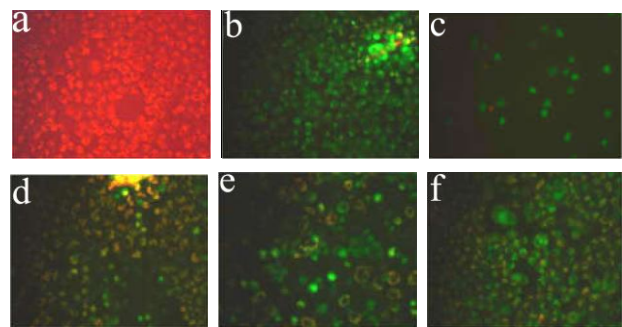


图6 CDP 对 HeLa 细胞线粒体膜电位的影响(400 \times)

Fig.6 The effect of mitochondrial membrane potential MMP

注: a.空白组; b.CCCP 阳性对照组; c.5-Fu 处理组; d、e、f.分别为: 40、100、160 $\mu\text{g/mL}$ CDP 处理组。

3 结论

3.1 分子量是多糖的重要指标,研究表明,一定大小的分子量是多糖具备生物活性的必要条件,分子量大小的改变将直接影响到其理化性质和生理活性^[28]。史大华等^[29]研究发现酸水解 1 min 后得到的低分子量岩藻多糖,其在浓度为 1000 $\mu\text{g/mL}$ 时对 KB 细胞作用

48 h 后的抑制率为 74.2%，显著高于未降解的岩藻多糖在相同条件下的抑制率 43.0%。Dong 等^[30]采用 H₂O₂ 降解海参多糖 HOP(135.80 ku)，得到的降解物 o-HOP(7.90 ku)，对人胃腺癌细胞 SGC-7901 细胞处理 48 h，其 IC₅₀ 为 7.21 μM 显著低于 HOP 的 IC₅₀ (为 14.01 μM)。邓六勤等^[31]利用 Vc 和 H₂O₂ 体系降解黄芪多糖，发现黄芪多糖体外抗氧化和抗肿瘤作用会随着降解片段相对分子质量的降低而活性增强，其中浓度为 800 μg/mL 的黄芪多糖降解片段 1 的作用效果最好，其对 HepG2 细胞作用 48 h 后的抑制率达到 57% (未降解黄芪多糖的抑制率在 40%~50% 之间)。而本文利用优化的降解条件对毛头鬼伞、龙须菜和坛紫菜多糖分别进行适度降解，获得的降解产物对 HeLa 细胞的抑制作用显著增强。如对 HeLa 细胞，毛头鬼伞多糖在 1000 μg/mL 时达到最高抑制率为 41.13%，而其降解产物仅在 80 μg/mL 时即可达到最高抑制率 56.09%，IC₅₀ 为 84.68 μg/mL。可见，本实验中多糖适度降解后活性增强与前人实验结果相似。这可能是大分子多糖，其分子量达到几十万到数百万不等，导致多糖分子粘度高、溶解度低，不利于生物吸收^[32,33]。而经适度降解后，多糖分子量降低，可改善其黏度、溶解性等，还能改善生物利用度，从而提高多糖分子生物活性^[34]。

3.2 多糖的协同作用并不是单一多糖简单地混合一起，而是受到包括多糖结构、分子量、溶解度和立体构象等诸多因素影响^[35]。研究表明，复合多糖中各单一多糖的结构与活性之间具有互效性，其药理和营养作用方面存在协调性和增效性，可以使单一多糖的作用得到发挥，并克服其作用的局限性^[36]。实验以毛头鬼伞、龙须菜和坛紫菜三种多糖降解物复配成复合多糖降解物，发现在浓度为 100 μg/mL 时，复合多糖降解物对 HeLa 细胞的抑制率最大达到 75.72%，IC₅₀ 为 67.67 μg/mL，均显著高于单一多糖。证实了毛头鬼伞、龙须菜和坛紫菜三种多糖或其降解物以一定比例复配成复合多糖^[16]或复合多糖降解物，均可进一步提高复合物对 HeLa 细胞的毒性作用，说明了复合多糖确实存在协同增效性。目前，复合多糖已在临床应用，其活性研究也取得一定进展，但其作用机理尚不明确，仍需进一步探讨。

3.3 线粒体是细胞内 ROS 生成的重要部位，同时也是 ROS 的攻击目标。在正常情况下，呼吸链在氧化磷酸化过程中不断释放 ROS^[37]，然而，当线粒体受到损伤时，会有大量的 ROS 被释放出来^[38]。低浓度的 ROS 参与了细胞的增殖过程，可以促进细胞有丝分裂与细胞增殖，但随着 ROS 不断增加，氧化-还原系统将出现失衡，随之造成氧化应激反应，最终诱导细胞凋亡

和引起细胞坏死。肿瘤细胞对 ROS 引起的氧化应激反应比正常细胞更为敏感，因此 ROS 对肿瘤细胞有选择性杀伤力。Maillet 等^[39]以含铁有机金属化合物作用于结肠癌鼠类模型后，发现结肠癌鼠中的线粒体形态和功能发生改变，肿瘤细胞发生凋亡、肿瘤生长得到抑制，而这一过程是依赖 ROS 途径实现的。此外 ROS 含量迅速提升，能够导致线粒体膜电位下降。一旦线粒体膜电位发生变化，细胞凋亡将不可逆^[40]。而 NAC 是一种抗氧化剂，具有清除细胞内 ROS 的作用，从而可以抑制细胞凋亡^[41]和细胞坏死。游如旭等^[42]研究发现，香菇多糖刺激鼠肝癌细胞 H₂₂ 后，可以诱导细胞内 ROS 含量升高，从而引起细胞凋亡。王小军等^[43]研究发现红芪多糖-1 能抑制人肺腺癌 A549 细胞增殖、诱导细胞凋亡，并且存在剂量依赖性，这一作用机制可能是红芪多糖-1 能够调控 A549 细胞氧化/抗氧化能力比例。Li 等^[44]发现石榴皮多糖抗肿瘤的作用机制与线粒体途径有关，其能引起线粒体膜电位下降，释放细胞色素 C，激活 caspase 3、9 蛋白。本研究发现，CDP 可以提高 HeLa 细胞内的 ROS 含量，同时可以降低细胞线粒体膜电位。而当加入 NAC 与 CDP 共同作用时，CDP 对 HeLa 细胞的抑制作用显著降低。表明 CDP 可以通过提高 ROS 含量直接抑制 HeLa 细胞增殖；而 CDP 是否通过诱导细胞内 ROS 产生，导致过多的 ROS 攻击线粒体，引起线粒体膜电位下降，从而通过线粒体途径启动细胞内凋亡程序，造成细胞凋亡，这一机制尚待研究。

参考文献

- [1] Li B, Dobruchowska J M, Gerwig G J, et al. Structural investigation of water-soluble polysaccharides extracted from the fruit bodies of *Coprinus comatus* [J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 91(1): 314-321
- [2] 余杰,王欣,陈美珍,等.潮汕沿海龙须菜的营养成分和多糖组成分析[J].食品科学,2006,27(1):93-97
YU Jie, WANG Xin, CHEN Mei-zhen, et al. Analysis on nutritional components and polysaccharide composition of *Gracilaria Lemaneiformis* from Chaoshan coast [J]. Food Science, 2006, 27(1): 93-97
- [3] 赵保力,张英锋,李长江,等.紫菜多糖的提取及化学成分[J].化学教学,2010,3:52-54
ZHAO Bao-li, ZHANG Ying-feng, LI Chang-jiang, et al. Extraction and chemical composition of polysaccharides from *Porphyra* [J] Education of Chemistry, 2010, 3: 52-54
- [4] Ren Y, Zheng G, You L, et al. Structural characterization and macrophage immunomodulatory activity of a polysaccharide

- isolated from *Gracilaria lemaneiformis* [J]. Journal of Functional Foods, 2017, 33: 286-296
- [5] Liu Q M, Xu S S, Li L, et al. *In vitro* and *in vivo* immunomodulatory activity of sulfated polysaccharide from *Porphyra haitanensis* [J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 165: 189-196
- [6] Xu S Y, Huang S, Cheong K L. Recent advances in marine algae polysaccharides: isolation, structure, and activities [J]. Marine Drugs, 2017, 15(12): 388
- [7] You L J, Zhang Y L, Wen L R, et al. Effect of extraction method on the properties of polysaccharides from *Gracilaria lemaneiformis* [J]. Modern Food Science & Technology, 2016, 32(6): 148-155, 182
- [8] Ma X T, Sun X Y, Yu K, et al. Effect of content of sulfate groups in seaweed polysaccharides on antioxidant activity and repair effect of subcellular organelles in injured HK-2 cells [J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2017, 2017(5): 1-13
- [9] 谢飞,曹纯洁,陈美珍,等.响应面优化优化末水坛紫菜多糖除蛋白工艺及其抗氧化活性[J].食品科学,2016,37(22): 77-84
XIE Fei, CAO Chun-jie, CHEN Mei-zhen, et al. Optimization of deproteinization process of polysaccharides extracted from abandoned *Porphyra haitanensis* and their antioxidant activity [J]. Food Science, 2016, 37(22): 77-84
- [10] Cai C, Yang Y, Zhao M, et al. Extraction and antioxidation of polysaccharide from *Porphyra haitanensis* using response surface method [J]. Pakistan Journal of Botany, 2017, 49(3): 1137-1141
- [11] Kang Y, Wang Z J, Xie D, et al. Characterization and potential antitumor activity of polysaccharide from *Gracilariopsis lemaneiformis* [J]. Marine Drugs, 2017, 15(4): 100
- [12] Yu X, Zhou C, Yang H, et al. Effect of ultrasonic treatment on the degradation and inhibition cancer cell lines of polysaccharides from *Porphyra yezoensis* [J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 117: 650-656
- [13] Jiang X G, Lian M X, Han Y, et al. RETRACTED: Antitumor and immunomodulatory activity of a polysaccharide from fungus *Coprinus comatus*, (Mull.:Fr.) Gray [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 58(26): 349-353
- [14] Wen L, Zhang Y, Sunwaterhouse D, et al. Advantages of the polysaccharides from *Gracilaria lemaneiformis* over metformin in antidiabetic effects on streptozotocin-induced diabetic mice [J]. Rsc Advances, 2017, 7(15): 9141-9151
- [15] Zhou S, Liu Y, Yang Y, et al. Hypoglycemic activity of polysaccharide from fruiting bodies of the shaggy ink cap medicinal mushroom, *coprinus comatus* (higher basidiomycetes), on mice induced by alloxan and its potential mechanism [J]. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2015, 17(10): 957-964
- [16] 谢好贵,韦明钊,陈美珍,等.3种多糖复合体外抗肿瘤协同增效作用[J].食品科学,2013,34(15):289-294
XIE Hao-gui, WEI Ming-qian, CHEN Mei-zhen, et al. Synergistic antitumor activity *in vitro* of polysaccharides from three different matrices [J]. Food Science, 2013, 34(15): 289-294
- [17] 杨丹,任谓明,王艳红,等.复合多糖药理活性研究进展[J].上海中医药杂志,2016,3:94-97
YANG Dan, REN Wei-ming, WANG Yan-hong, et al. Research progress on pharmacological activity of complex polysaccharides [J]. Shanghai Journal of Traditional Chinese Medicine, 2016, 3: 94-97
- [18] 梁金强,王园园,胡明华,等.复合多糖对CTX致免疫低下小鼠的免疫增强作用[J].中药材,2017,40(4):953-956
LIANG Jin-qiang, WANG Yuan-yuan, HU Ming-hua, et al. The effect of compound polysaccharide on the immune enhancement of ctx-induced immunodeficiency mice [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2017, 40(4): 953-956
- [19] Liao X, Yang L, Chen M, et al. The hypoglycemic effect of a polysaccharide (GLP) from *Gracilaria lemaneiformis* and its degradation products in diabetic mice [J]. Food & Function, 2015, 6(8): 2542-2549
- [20] Sun Y H, Chen X L, Cheng Z Q, et al. Degradation of Polysaccharides from *Grateloupia filicina* and Their Antiviral Activity to Avian Leucosis Virus Subgroup [J]. Marine Drugs, 2017, 15(11): 345
- [21] 尤玲玲,田楠,任寅,等.秋葵多糖的提取及对 α -淀粉酶的抑制作用[J].食品科技,2017,2:193-196
YOU Ling-ling, TIAN Nan, REN Yin, et al. Extraction and Inhibition of *Okra* Polysaccharides on α -amylase [J]. Food Science and Technology, 2017, 2: 193-196
- [22] 朱琳,肖国鑫,周亮,等.波密稀有品种绿杆天麻杂交后代品质的初步研究[J].中药材,2017,40(2):273-276
ZHU Lin, XIAO Guo-xin, ZHOU Liang, et al. A Preliminary study on the quality of the offspring of the rare green stem *gastrodia elata* hybrid of bomi [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2017, 40(2): 273-276

- [23] 张惟杰.复合多糖生化研究技术[M].上海:上海科学技术出版社,1987
ZHANG Wei-jie. Biochemical research technology of compound polysaccharide [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1987
- [24] 郝慧慧,陈永,陈国华,等.北五味子多糖单一组分制备与分子量测定[J].潍坊医学院学报,2013,35(3):180-181,190
HAO Hui-hui, CHEN Yong, CHEN Guo-hua, et al. The preparation of the single component from the polysaccharide *schisandra chinensis* and measurement of its molecular weight [J]. Acta Academiae Medicinae Weifang, 2013, 35(3): 180-181, 190
- [25] 戴米洋,侯桂琴,贝维娟,等.抗癌新药 OP46 通过升高 ROS 诱导 EC9706 细胞凋亡[A]. 2012 年中国药学会大会暨第十二届中国药师周, 2012
DAI Mi-yang, HOU Gui-qin, BEI Wei-juan, et al. OP46, a novel antitumor drug, induces apoptosis in EC9706 cells by increasing ROS[A]. 2012 China Pharmaceutical Congress and the 12th China Pharmacist Week, 2012
- [26] 刘芸野,谢青,王晖,等.N-乙酰半胱氨酸对内质网应激介导的 HepG2 细胞凋亡的作用[J].中华肝脏病杂志,2008,16(7): 524-527
LIU Yun-ye, XIE Qing, WANG Hui, et al. The effect of n-acetyl-l-cysteine on endoplasmic reticulum stress mediated apoptosis of HepG2 cells [J]. Chinese Journal of Hepatology, 2008, 16(7): 524-527
- [27] Afzal S, Jensen S A, Sørensen J B, et al. Oxidative damage to guanine nucleosides following combination chemotherapy with 5-fluorouracil and oxaliplatin [J]. Cancer Chemotherapy & Pharmacology, 2012, 69(2): 301-307
- [28] 方积年.多糖研究的现状[J].药学学报,1986,12:944-950
FANG Ji-nian. Research status of polysaccharide [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 1986, 12: 944-950
- [29] 史大华,刘玮炜,刘永江,等.低分子量海带岩藻多糖的制备及其抗肿瘤活性研究[J].时珍国医国药,2012,23(1):53-55
SHI Da-hua, LIU Wei-wei, LIU Yong-jiang, et al. The preparation and antitumor effects of low-molecular weight *laminaria* fucoidan [J]. Lishizhen Medicine & Materia Medica Research, 2012, 23(1): 53-55
- [30] Dong X, Pan R, Zou S, et al. Oxidative degradation of the sulfated polysaccharide isolated from sea cucumber *holothuria nobilis* [J]. Process Biochemistry, 2015, 50(2): 294-301
- [31] 邓六勤,黎梅桂,吴宝仪.黄芪多糖的氧化降解及其抗氧化和抗肿瘤活性研究[J].中国药业,2018,1:13-16
DENG Liu-qin, LI Mei-gui, WU Bao-yi. Oxidative degradation, antioxidation and antitumor activity of *astragalus* polysaccharides [J]. China Pharmaceuticals, 2018, 1: 13-16
- [32] Shi L. Bioactivities, isolation and purification methods of polysaccharides from natural products: A review [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 92: 37-48
- [33] Choi J I, Kim H J. Preparation of low molecular weight fucoidan by gamma-irradiation and its anticancer activity [J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 97(2): 358-362
- [34] 李彩金,杨焱,吴迪,等.超声降解对猴头菌多糖的理化性质及体外免疫活性的影响[J].食用菌学报,2017,4:44-49
LI Cai-jin, YANG Yan, WU Di, et al. Effects of ultrasonic degradation on physicochemical properties and *in vitro* immunological activity of *hericium erinaceus* polysaccharide [J]. Acta Edulis Fungi, 2017, 4: 44-49
- [35] 吴林秀,胡荣康,陈艺焯,等.多糖与酚类物质的相互作用研究进展[J].食品工业科技,2017,38(12):328-332
WU Lin-xiu, HU Rong-kang, CHEN Yi-xuan, et al. Research progress in the interaction between polysaccharides and phenolics [J]. Science & Technology of Food Industry, 2017, 38(12): 328-332
- [36] 王立娜,陈喜君,王辉,等.复合药用真菌多糖抗肿瘤活性的研究进展[J].生物技术通讯,2016,27(6):888-891
WANG Li-na, CHEN Xi-jun, WANG Hui, et al. Progress on anti-tumor activity of compound of medicinal fungus polysaccharides [J]. Letters in Biotechnology, 2016, 27(6): 888-891
- [37] Raha S, Robinson B H. Mitochondria, oxygen free radicals, and apoptosis [J]. American Journal of Medical Genetics, 2001, 106(1): 62-70
- [38] Sandeep Raha, Brian H Robinson. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing [J]. Trends in Biochemical Sciences, 2000, 25(10): 502-508
- [39] Maillet A, Yadav S, Loo Y L, et al. A novel Osmium-based compound targets the mitochondria and triggers ROS-dependent apoptosis in colon carcinoma [J]. Cell Death & Disease, 2013, 4(6): e653
- [40] 刘亮,左连富,王静.青蒿琥酯对食管癌 Ec9706 细胞线粒体膜电位及凋亡的影响[J].解放军医学杂志,2014,39(1):25-29
LIU Liang, ZUO Lian-fu, WANG Jing. Effects of artesunate on membrane potential of mitochondria and cell apoptosis of Ec9706 cells [J]. Medical Journal of Chinese Peoples Liberation Army, 2014, 39(1): 25-29

- [41] Zafarullah M, Li W Q, Sylvester J, et al. Molecular mechanisms of N -acetylcysteine actions [J]. Cellular & Molecular Life Sciences Cmls, 2003, 60(1): 6-20
- [42] 游如旭,张玉,汪柳,等.香菇多糖诱导鼠肝癌 H22 细胞凋亡机制的初步探讨[J].中国医院药学杂志,2015,35(9):776-781
YOU Ru-xu, ZHANG Yu, WANG Liu, et al. Preliminary study on the apoptosis mechanisms of mouse hepatocarcinoma h22 cells induced by polysaccharides derived from *Lentinus Edodes* [J]. Chinese Journal of Hospital Pharmacy, 2015, 35(9): 776-781
- [43] 王小军,刘华.红芪多糖-1 对人肺腺癌 A549 细胞氧化应激的影响[J].中国呼吸与危重监护杂志,2017,16(2):127-131
WANG Xiao-jun, LIU Hua. Effects of *Hedysarum Polysaccharides-1* on oxidative stress in lung adenocarcinoma A549 cells [J]. Chinese Journal of Respiratory & Critical Care Medicine, 2017, 16(2): 127-131
- [44] Li J, Zhang F, Wang S. A polysaccharide from pomegranate peels induces the apoptosis of human osteosarcoma cells via the mitochondrial apoptotic pathway [J]. Tumor Biology, 2014, 35(8): 7475-7482