

江蓼硫酸酯多糖的体外抗肿瘤和免疫活性研究

刘慧燕¹, 赵广才¹, 赵谋明²

(1. 广州市体育科学研究所运动营养实验室, 广东 广州 510650) (2. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640)

摘要: 目的: 体外实验探讨江蓼硫酸酯多糖的抗肿瘤和免疫调节活性, 方法: 将离子交换分离得到的硫酸基含量不同的两种多糖(GTHSP、GTLSP)以不同浓度加入 S-180 细胞和脾淋巴细胞培养液中, 采用 MTT 法测定; 结果: 两种多糖均对 S-180 肿瘤细胞生长无抑制作用, 高硫酸酯多糖 GTHSP 对淋巴细胞有显著增殖作用($P < 0.01$); 低硫酸酯多糖 GTLSP 对淋巴细胞增殖无作用。结论: 体外实验结果表明两种多糖均无抗肿瘤活性; GTHSP 有免疫活性, 其免疫活性与硫酸基含量有关。

关键词: 江蓼; 硫酸酯多糖; 免疫活性

中图分类号: R282.75; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2007)01-0028-03

Study on Anti-tumor Activity and Immunomodulating Effects of Sulfated Polysaccharides from *Gracilaria tenuistipitata* in Vitro

LIU Hui-yan¹, ZHAO Guang-cai¹, ZHAO Mou-ming²

(1. Sports nutrition lab of Guangzhou sports science institute, Guangzhou 510650, China)

(2. College of light industry and food science, South China University of technology, 510640 China)

Abstracts: Objective: To study the anti-tumor activity and immunomodulating effects of polysaccharide from *Gracilaria tenuistipitata* in vitro. **Method:** The S-180 cell and spleen lymphocyte were cultured in vitro with different dosage of two polysaccharides (GTHSP and GTLSP) separated via ion-exchange and tested by MTT method. **Result:** High sulfate-containing polysaccharide GTHSP could markedly induce proliferation of spleen lymphocyte ($P < 0.01$), while no such effect was found with low sulfate-containing polysaccharide GTLSP. Additionally, none of the two samples showed inhibition effect on the growth of S-180 cell. **Conclusion:** Neither of the tested polysaccharides had anti-tumor activity. It was also confirmed that the immunomodulating effect was related with the content of SO_4^{2-} in sulfated polysaccharides and the polysaccharide GTHSP with high SO_4^{2-} content showed immunomodulating effect.

Key words: *Gracilaria tenuistipitata*; Sulfated polysaccharides; Immunocompetence;

琼胶是食品添加剂中重要的稳定剂, 根据其性质分为琼胶糖 (Agarose) 和硫酸琼脂 (Agaropectin), 其中琼胶糖硫酸基含量低, 凝固性好; 硫酸琼脂硫酸基含量高, 胶凝力弱。含有琼胶的海藻主要是红藻中的石花菜、江蓼、鸡毛菜、紫菜、海萝及多管藻等, 其中石花菜、江蓼和鸡毛菜为生产琼胶的主要原料。

硫酸琼脂长期以来被看作是提取琼胶糖的废弃物。随着对海藻硫酸多糖生物学功能的深入研究, 发现江蓼属硫酸酯多糖在体内均具有抗凝血作用、抗病毒、抗肿瘤等生理活性。多糖具有多方面的生物活性, 诸如抗病毒、抗肿瘤与免疫调节等; 而且对机体正常细胞没有毒副作用, 可能成为理想的药物来源。植物多糖最重要的药理作用为免疫调节作用, 这也是多糖抗肿瘤、抗病毒的机制之一。本文采用 MTT 法测定

收稿日期: 2006-07-10

作者简介: 刘慧燕, 硕士, 从事运动营养研究与保健食品的研发

了纯化分离后的江蓼多糖在体外对小鼠 S-180 肿瘤细胞和小鼠脾淋巴细胞增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 研究对象

江蓼多糖分级组分 GTLSP、GTHSP 是从海南文昌养殖场产细基江蓼 (*Gracilaria tenuistipitata*) 中, 通过热水提取和离子交换分离分级得到 2 个多糖组分, 均为半乳糖硫酸酯, 硫酸基含量分别为 0.65%、24.1%。

小鼠 S-180 肿瘤细胞株购自中山医科大学肿瘤研究所。

昆明种小白鼠, 体重 18~22g, ♀♂ 兼用, 购自南方医科大学实验动物中心。

1.1.2 试剂

四氮唑盐(MTT)、刀豆蛋白 A (ConA), Sigma 公司; DMEM 培养基、胰蛋白酶、RPMI-1640 细胞培养液, Gibco 公司; 2-巯基乙醇 (2-ME), Fluka 公司; 小牛血清, 杭州四季青生物技术材料公司; 青霉素、链霉素、盐酸、谷氨酰胺、异丙醇、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、DMSO、均为分析纯试剂。

1.1.3 仪器

微量培养板平台振荡机, Cole-Parmer 公司; 酶标仪, 美国 Bio-Rad; 96 孔培养板, 美国 Corning 公司; CO₂ 培养箱, 日本 Sanyo 公司; 超净工作台, 苏州净化设备公司

1.2 实验方法

将 DEAE-Sepharose 离子交换分离收集得到的不同组分透析脱盐, 浓缩至 1mg/mL, 采用 0.2 μ m 滤膜无菌条件下过滤除菌后待用。

1.2.1 多糖的抑制肿瘤细胞增殖活性测定^[1]

S-180 肿瘤细胞按每孔 3.0×10^3 个接种于 96 孔板, 调整细胞悬液体积为每孔 190 μ L, 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 饱和湿度培养箱中培养, 24h 后加入不同浓度的多糖样品, 对照孔加 0.9%氯化钠溶液, 使每孔体积为 200 μ L; 每组 6 孔, 继续培养 48h, 加入 MTT 20 μ L/孔 (5mg/mL) 后再培养 6h, 离心弃上清后加二甲亚砜 (DMSO) 150 μ L, 振荡 10min, 酶标仪以 570nm 波长测定 OD 值, 按抑制率(%)=(1-给药组 OD 值/空白组 OD 值) \times 100%计算多糖抗肿瘤细胞增殖活性, 重复 3 次。

1.2.2 多糖的淋巴细胞转化活性测定^[2]

脾细胞悬液制备: 无菌取脾, 置于盛有适量无菌 Hank's 液的平皿中, 用镊子轻轻将脾脏撕碎, 制成单细胞悬液。经 200 目筛网过滤, 用 Hank's 液洗 3 次, 每次 1000r/min 离心 10min。然后将细胞悬液浮于 1mL 完全培养液中, 用台盼蓝染色计数活细胞数, 调整细胞浓度为 2×10^6 个/mL。

淋巴细胞增殖反应: 将脾细胞悬液分别加入 96 孔培养板中, 每孔 100 μ L, 分别加 20 μ L 50 μ g/ml ConA 液, 每孔加入不同体积的江蓐多糖 GTLSP、GTHSP, 调整体系多糖浓度分别为 500、250、125、62.5、31.25 μ g/mL, 每组 4 个复孔, 对照组加完全培养液, 置 5%CO₂ 培养箱 37 $^{\circ}$ C 培养。培养 68h 后加入 MTT (5 mg/ml) 20 μ L/孔, 继续培养 4h 后 1500r/min 离心 10min, 每孔吸取上清液 100 μ L, 加入 DMSO 100 μ L, 震荡 5min, 用酶标仪在 570nm 测 OD 值。

2 结果分析

2.1 多糖的抗肿瘤细胞增殖活性

观察加入多糖后的细胞生长情况, 进行形态学观察, 发现多糖对肿瘤细胞的培养增殖与对照相比无差异。多糖对抑制肿瘤细胞增殖效果为阴性。

与其它多糖一样, 藻类多糖抗肿瘤作用大致也可以分为 2 大类^[3]: 一类是对肿瘤细胞的直接作用, 即多糖直接杀死了肿瘤细胞, 包括对肿瘤细胞膜生化特性的作用、抗自由基作用、诱导分化与诱导凋亡以及对肿瘤细胞超微结构的影响; 第二类是作为生物免疫反应调节剂, 通过增强机体的免疫功能而间接抑制或杀死肿瘤细胞。有报道江蓐多糖能抑制小鼠体内 S-180 肿瘤细胞, 而本实验表明江蓐各组分多糖不能直接抑制肿瘤细胞活性, 体外抑瘤实验为阴性, 可能是多糖提高小鼠免疫系统功能而达到抑制肿瘤的效果, 具体需要进一步研究。

2.2 多糖的淋巴细胞转化活性

MTT 法检测淋巴细胞增殖活性, 数据结果以均数 \pm 标准差表示, 采用 SPSS11.0 单因素方差分析对数据进行处理, 组间差异以 Dunnett-t 检验进行分析。表 1 为多糖的淋巴细胞转化实验结果; 表 2 为不同浓度多糖 GTHSP 对淋巴细胞刺激指数的影响。

表 1 多糖的淋巴细胞增殖实验结果

CONC/ μ g/mL	N	GTLSP	GTHSP
control	5	0.44740 \pm 0.01472	0.44740 \pm 0.01472
31.25	4	0.34867 \pm 0.02676**	0.45675 \pm 0.02037
62.5	4	0.44700 \pm 0.03487	0.53350 \pm 0.01767**
125	4	0.43967 \pm 0.01305	0.59300 \pm 0.01488**
250	4	0.26533 \pm 0.01834**	0.57800 \pm 0.01257**
500	4	0.30867 \pm 0.02676**	0.56525 \pm 0.01255**

与对照组相比, ** P<0.01, * P<0.05

表 1 结果显示, 样品 GTLSP 对淋巴细胞增殖无作用, 而样品 GTHSP 在 62.5~500 μ g/mL 范围内能显著刺激脾淋巴细胞增殖 (P<0.01)。

表 2 不同浓度多糖 GTHSP 对淋巴细胞刺激指数

多糖浓度/ μ g·mL ⁻¹	31.25	62.5	125	250	500
刺激指数	1.021	1.192	1.325	1.292	1.264

从表 2 知, 多糖 GTHSP 对淋巴细胞的刺激指数与多糖浓度呈明显的剂量-效应关系 (P<0.01)。随多糖浓度从 31.25 μ g/mL 增加到 125 μ g/mL, 其刺激指数增加最大值; 继续增加多糖浓度至 500 μ g/mL 其刺激指数逐渐降低。

海藻多糖作为免疫调节剂已被国内外大多数学者所认可^[4], 其抗肿瘤作用主要是通过激活免疫细胞、提高机体免疫力, 从而达到有效控制癌细胞的增殖。本实验能验证多糖能否协同有丝分裂原 ConA 促进脾

(下转第 37 页)