

尖紫蛤糖胺聚糖抑制肿瘤细胞生长作用的研究

刘倩, 范秀萍, 吴红棉, 胡雪琼

(广东海洋大学食品科技学院, 广东湛江 524025)

摘要: 采用四氮唑蓝还原法(MTT法)研究了尖紫蛤糖胺聚糖对人宫颈癌细胞(Hela细胞)、人鼻咽癌细胞(CNE-2Z细胞)、慢性髓性白血病细胞(K562细胞)的体外抗肿瘤活性。结果显示:尖紫蛤糖胺聚糖对三种肿瘤细胞具有较强的抑制能力,并存在一定的量效关系;尖紫蛤糖胺聚糖与阳性药物(5-Fu)合用呈单纯相加作用或增强、协同作用。

关键词: 尖紫蛤; 糖胺聚糖; 抑瘤率

文章编号: 1673-9078(2012)4-396-398

Inhibition Effect of Glycosaminoglycan from *Sanguinolaria acutas* on the Growth of Tumor Cells

LIU Qian, FAN Xiu-ping, WU Hong-mian, HU Xue-qiong

(College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Guangdong Zhanjiang 524025, China)

Abstract: The anti-tumor effect of Glycosaminoglycan from *sanguinolaria acutas* on Hela cell, CNE-2Z cell and K562 cell *in vitro* were analyzed by MTT colorimetric method. Results showed that the GAG had anti-tumor activity and the anti-tumor effect of GAG ranged with its concentration. In synergistic inhibition effect of GAG with positive drug (5-Fu) on tumor cells have a simple addition effect or synergistic effect.

Key words: *Sanguinolaria Acutas*; glycosaminoglycan; the rate of anti-tumor

尖紫蛤俗称“沙螺”或“西施舌”,分布于我国福建和广东沿海,生活在河口咸、淡水交汇处,尤以广东省吴川市鉴江产量最多^[1]。尖紫蛤目前在我国的产量逐年上升,但其用途十分单调,主要用于直接食用,对其深加工的研究还相对较少。

糖胺聚糖又称氨基多糖,是由氨基己糖和己糖醛酸交替结合而成得长链分子,广泛存在于动物体内。目前临床应用的抗肿瘤化学合成药物虽然抗癌作用确切、疗效显著,但是不良反应较大,长期使用易产生耐药性等缺点。研究表明,糖胺聚糖具有增强机体免疫功能^[2]、抗肿瘤^[3]、降血脂^[4]、抗氧化^[5]等药理作用,而且几乎没有毒性,愈来愈引发国内外药理、生物和化学专家们得兴趣,成为当前的研究热点。本文通过尖紫蛤糖胺聚糖对Hela、CNE-2Z、K562,三种肿瘤细胞生长抑制作用进行研究,为糖胺聚糖的进一步开发利用提供参考。

1 材料与方法

收稿日期: 2012-01-08

基金项目: 广东海洋大学自然科学研究项目(C1012115)

作者简介: 刘倩(1985-),女,硕士研究生,研究方向为海洋生物活性物质

通讯作者: 范秀萍,女,讲师,硕士,研究方向为海洋生物活性物质

1.1 材料

尖紫蛤全脏器→匀浆→双酶酶解→单层纱布过滤→脱色→双层纱布过滤→离心除杂蛋白→上清液醇沉→分离→洗涤→干燥→糖胺聚糖粗提物(GAG-1)

尖紫蛤糖胺聚糖精制品(GAG-2):对酶解法得到的GAG-1进行等电点除蛋白得到。

MTT,北京鼎国生物有限责任公司;新生牛血清,杭州四季青生物工程材料有限公司;PBS,GIBCO生物医药有限公司;5-氟尿嘧啶(5-Fu),国药集团化学试剂有限公司;RPMI.1640培养液(1X),GIBCO生物医药有限公司;0.5%胰蛋白酶溶液,吉诺生物医药技术有限公司;青-链霉素双抗溶液,GIBCO公司;Hela、K562、CNE-2Z细胞株,广东海洋大学海洋药物重点实验室提供。

1.2 试验方法

1.2.1 MTT法测定GAG对肿瘤细胞的抑制作用

分别取对数生长期细胞:Hela细胞和CNE-2Z细胞胰酶溶液消化后、K562细胞无需消化,分别用RPMI1640-10%FCS培养液配制成 $1\sim 3\times 10^4$ 个/mL单细胞悬液,分别接种于96孔板中,每孔100 μ L,设空白、阴性对照、阳性对照、样品组及样品阳性药合用组,空白组为培养液做调零用,阴性对照为不加样品的细胞悬液,阳性对照组为5-FU。培养24h和48h

后分别用四氮唑蓝还原法 (MTT 法)^[6,7]对抑制率进行检测。

1.2.2 计算抑制率

抑制率%=(1-OD 实/OD 对)×100%。

1.2.3 计算 Q 值

用金氏公式计算 Q 值,检测 GAG 与阳性药之间的相互作用。

$$Q = Ea + b / (Ea + Eb - Ea \times Eb)$$

注:其中 Ea+b 为样品与对照药用组的抑制率, Ea 和

Eb 分别是样品和对照药的抑制率。

Q 在 0.85~1.15 为单纯相加作用,大于 1.15 为增强或协同作用,小于 0.85 为拮抗作用。

1.3 数据统计

采用 SPSS 11.0 对试验结果进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 尖紫蛤糖胺聚糖粗提物和精制品体外对 HeLa 细胞生长的影响

表 1 GAG 对 HeLa 细胞生长的抑制作用 (n=4)

Table 1 Inhibition effect of GAG on growth of HeLa tumor cells

组别	剂量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	24 h		48 h	
		OD570	抑制率/%	OD570	抑制率/%
阴性对照组		0.26±0.01	/	0.42±0.01	/
阳性对照组 (5-Fu)	10	0.14±0.01**	46.33	0.22±0.02**	48.93
GAG-1	50	0.24±0.01*	8.88	0.29±0.01**	31.59
	100	0.22±0.02**	16.99	0.28±0.02**	34.44
GAG-2	200	0.20±0.01**	23.94	0.23±0.01**	45.61
	50	0.23±0.01**	11.58	0.24±0.01**	43.71
GAG-1 + 5-Fu	100	0.22±0.01**	15.83	0.20±0.01**	52.97
	200	0.21±0.00**	18.53	0.18±0.02**	56.77
GAG-2 + 5-Fu	50+10	0.13±0.02**	49.42#	0.18±0.01**	57.48##
	100+10	0.12±0.01**	55.21#	0.16±0.00**	62.23##
	200+10	0.11±0.01**	58.69#	0.13±0.01**	68.17##
GAG-1 + 5-Fu	50+10	0.13±0.01**	51.74#	0.11±0.01**	73.16##
	100+10	0.12±0.01**	54.83#	0.11±0.01**	74.11##
	200+10	0.11±0.03**	59.46#	0.10±0.02**	76.72##

注: *P<0.05, **P<0.01 vs Control; 显著差异, 极显著差异。#为与阳性药物单纯相加作用, ##为增强或协同作用, ###为拮抗作用。

尖紫蛤糖胺聚糖粗提物和精制品体外对 HeLa 细胞生长的影响见表 1。由表 1 可以看出, 尖紫蛤糖胺聚糖粗提物 GAG-1 和精制品 GAG-2 的三个剂量(50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 对 HeLa 细胞均有一定的抑制作用, 并显示出明显的量效关系, 在 48 h 内随着时间的延长机制作用增强。其中 GAG-2 的 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的剂量组抑制率在 48 h 分别达到了 52.97% (P<0.01) 和 56.77% (P<0.01), 有极显著差异, 均比阳性对照组的抑制率高。24 h 和 48 h 分别与阳性药物分别表现出增加作用和增强、协同作用, 未表现出拮抗作用。

2.2 尖紫蛤糖胺聚糖粗提物和精制品体外对 CNE-2Z 细胞生长的影响

尖紫蛤糖胺聚糖对体外培养的 CNE-2Z 细胞生长的抑制作用实验结果见表 2。由表 2 可以看出, 尖紫蛤糖胺聚糖粗提物 GAG-1 和精制品 GAG-2 的三个剂量 (50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 对 CNE-2Z 细胞均有一定

的抑制作用, 并显示出明显的量效关系。其中 48 h 的抑制率较 24 h 强, 48 h 时 GAG-2 对 CNE-2Z 细胞的抑制作用较 GAG-1 强。200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的剂量组抑制率在 48 h 分别达到了 58.14% (P<0.01) 和 71.63% (P<0.01), 有极显著差异。GAG-1 和 GAG-2 在 48 h 时的抑制作用均比阳性对照组的抑制率高。GAG-1 和 GAG-2 与阳性药物合用, 均表现出增强或协同作用。

2.3 尖紫蛤糖胺聚糖粗提物和精制品体外对 K562 细胞生长的影响

尖紫蛤糖胺聚糖对体外培养的 K562 细胞生长的抑制作用实验结果见表 3。由表 3 可以看出, 尖紫蛤糖胺聚糖粗提物 GAG-1 和精制品 GAG-2 的三个剂量 (50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 对 K562 细胞均有一定的抑制作用, 并显示出明显的量效关系。其中 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量组的抑制率于 24 h 和 48 h 均极显著于空白组, 但三个剂量的抑制效果均不如阳性对照组。GAG-1 和 GAG-2 在 24 h 和 48 h 时分别与阳性药物分别表现出

增加作用和增强、协同作用，未表现出拮抗作用。

表 2 GAG 对 CNE-2Z 细胞生长的抑制作用 (n=4)

Table 2 Inhibition effect of GAG on growth of CNE-2Z tumor cells treated with GAG

组别	剂量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	24 h		48 h	
		OD570	抑制率/%	OD570	抑制率/%
阴性对照组		0.30 \pm 0.01	/	0.57 \pm 0.01	/
阳性对照组 (5-Fu)	10	0.27 \pm 0.01**	11.29	0.30 \pm 0.01**	46.76
GAG-1	50	0.30 \pm 0.01	1.99	0.28 \pm 0.01**	50.61
	100	0.28 \pm 0.01*	8.31	0.27 \pm 0.01**	52.18
	200	0.22 \pm 0.01**	26.58	0.24 \pm 0.01**	58.14
GAG-2	50	0.30 \pm 0.01	1.66	0.23 \pm 0.01**	60.42
	100	0.26 \pm 0.01**	14.29	0.19 \pm 0.01**	66.19
	200	0.21 \pm 0.02**	28.90	0.16 \pm 0.01**	71.63
GAG-1 + 5-Fu	50+10	0.23 \pm 0.02**	22.92##	0.17 \pm 0.02**	70.75##
	100+10	0.21 \pm 0.01**	29.90##	0.16 \pm 0.01**	72.15##
	200+10	0.21 \pm 0.00**	31.56##	0.14 \pm 0.00**	75.83##
GAG-2 + 5-Fu	50+10	0.19 \pm 0.01**	37.87##	0.13 \pm 0.00**	77.86##
	100+10	0.18 \pm 0.01**	39.53##	0.10 \pm 0.01**	82.66##
	200+10	0.16 \pm 0.03**	48.51##	0.09 \pm 0.00**	85.11##

注: *P<0.05, **P<0.01 vs Control; 显著差异, 极显著差异。#为与阳性药物单纯相加作用, ##为增强或协同作用, ###为拮抗作用。

表 3 GAG 对 K562 细胞生长的抑制作用 (n=4)

Table 3 Inhibition effect of GAG on growth inhibition of K562 tumor cells

组别	剂量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	24 h		48 h	
		OD570	抑制率/%	OD570	抑制率/%
阴性对照组		0.22 \pm 0.01	/	0.53 \pm 0.01	/
阳性对照组 (5-Fu)	10	0.18 \pm 0.00**	18.30	0.40 \pm 0.01**	25.75
GAG-1	50	0.22 \pm 0.00	3.13	0.50 \pm 0.01	6.39
	100	0.21 \pm 0.00	6.69	0.47 \pm 0.00*	11.27
	200	0.19 \pm 0.00**	16.96	0.43 \pm 0.01**	18.98
GAG-2	50	0.21 \pm 0.00	5.80	0.49 \pm 0.00	8.27
	100	0.20 \pm 0.01*	11.61	0.47 \pm 0.01*	12.59
	200	0.19 \pm 0.01**	16.96	0.45 \pm 0.02**	14.66
GAG-1 + 5-Fu	50+10	0.18 \pm 0.01**	21.88#	0.34 \pm 0.01**	36.27##
	100+10	0.17 \pm 0.01**	24.55##	0.31 \pm 0.01**	41.35##
	200+10	0.15 \pm 0.01**	31.25##	0.30 \pm 0.01**	42.85##
GAG-2 + 5-Fu	50+10	0.17 \pm 0.01**	25.00##	0.39 \pm 0.01**	27.25##
	100+10	0.16 \pm 0.00**	30.80##	0.38 \pm 0.01**	29.51##
	200+10	0.15 \pm 0.01**	62.05##	0.37 \pm 0.00**	31.20##

注: *P<0.05, **P<0.01 vs Control; 显著差异, 极显著差异。#为与阳性药物单纯相加作用, ##为增强或协同作用, ###为拮抗作用。

3 结论

GAG-1 和 GAG-2 对三种肿瘤细胞的抑制效果进行比较能够得出, GAG-1 和 GAG-2 均对三种肿瘤细胞具有抑制作用, 并存在一定的量效关系。在抑制效果上, 48 h 的抑制效果强于 24 h, 24 h 和 48 h 分别与

阳性药物合用, 计算所得到的 Q 值范围均在 0.85 以上, 表现出增加作用和增强、协同作用, 未表现出拮抗作用。

参考文献

[1] 蔡英亚, 绍何. 广东的海贝[M]. 广东: 汕头大学出版社, 2006

- [2] 胡雪琼,吴红棉,林志明.毛蚶糖胺聚糖的理化性质及其对小鼠免疫脏器影响的初步研究[J].现代食品科技,2008,24(8):763-766
- [3] 李瑞,吴红棉,范秀萍.翡翠贻贝糖胺聚糖体外抑制 CNE-2Z 肿瘤细胞生长作用的研究[J].现代食品科技,2010,26(5):437-440
- [4] 范秀萍,林志明,吴红棉.毛蚶糖胺聚糖降血脂作用及其机制的初步研究[J].中国食品学报,2011,11(2):70-76
- [5] 李孟婕,范秀萍,吴红棉.翡翠贻贝糖胺聚糖的体外抗氧化活性研究[J].现代食品科技,2011,27(7):759-762
- [6] 张卓然.使用细胞培养技术[M].北京:人民卫生出版社,1999
- [7] 甄永苏.抗肿瘤药物研究与开发[M].北京:化学工业出版社,2004

现代食品科技