

几种化学修饰的三角褐指藻胞内多糖对宫颈癌Hela细胞增殖的抑制效果比较

孙寒, 刘松, 宁紫月, 玉杏珊, 王雅, 吴昊卓, 藏颖, 李媚, 梁钟文, 刘红全*

(广西多糖材料与改性重点实验室, 广西民族大学海洋生物资源保护与利用重点实验室, 广西民族大学海洋与生物技术学院, 广西南宁 530007)

摘要: 为探究化学修饰对三角褐指藻胞内多糖抑制宫颈癌Hela细胞增殖抑制效果的影响。该研究采用超声破壁法结合热水辅助浸提法提取三角褐指藻胞内多糖PTP (Intracellular Polysaccharide from *Phaeodactylum tricornutum*), 对三角褐指藻胞内多糖PTP进行四种化学修饰(硫酸化修饰、磷酸化修饰、乙酰化修饰和羧甲基化修饰), 对三角褐指藻胞内多糖PTP、硫酸化多糖S-PTP、磷酸化多糖P-PTP、乙酰化多糖A-PTP和羧甲基化多糖C-PTP进行抑制宫颈癌Hela细胞增殖活性研究。结果显示, 得到的硫酸化多糖S-PTP取代度为0.714, S-PTP较PTP抑制宫颈癌Hela细胞增殖率最大可提高9.22%、磷酸化多糖P-PTP取代度为0.191, P-PTP较PTP抑制宫颈癌Hela细胞增殖率最大可提高4.01%、乙酰化多糖A-PTP取代度为0.513, A-PTP较PTP抑制宫颈癌Hela细胞增殖率最大可提高13.53%, 羧甲基化多糖C-PTP取代度为0.915, C-PTP较PTP抑制宫颈癌Hela细胞增殖率最大可提高8.39%。研究结果显示, 四种修饰多糖对Hela细胞增殖抑制效果较PTP均有所提升, 化学修饰对Hela细胞增殖抑制提升效果最大的为乙酰化修饰, A-PTP较PTP抑制宫颈癌Hela细胞增殖率最大可提高13.53%, 达到46.05%。该实验通过对三角褐指藻多糖PTP进行化学修饰, 证明三角褐指藻多糖在分子结构上引入新的化学基团对抑制宫颈癌细胞增殖有着较大影响, 对进一步研究三角褐指藻的生物活性提供了重要参考, 为后续的药物研发提供实验基础。

关键词: 三角褐指藻; 胞内多糖; 化学修饰; 抗肿瘤活性

文章编号: 1673-9078(2024)07-8-16

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.7.0935

Comparison on the Inhibitory Effects of Several Chemically Modified Intracellular Polysaccharides from *Phaeodactylum tricornutum* against the Proliferation of Hela cells

SUN Han, LIU Song, NING Ziyue, YU Xingshan, WANG Ya, WU Haozhuo, ZANG Ying, LI Mei,
LIANG Zhongwen, LIU Hongquan*

引文格式:

孙寒, 刘松, 宁紫月, 等. 几种化学修饰的三角褐指藻胞内多糖对宫颈癌Hela细胞增殖的抑制效果比较[J]. 现代食品科技, 2024, 40(7): 8-16.

SUN Han, LIU Song, NING Ziyue, et al. Comparison on the inhibitory effects of several chemically modified intracellular polysaccharides from *Phaeodactylum tricornutum* against the proliferation of hela cells [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(7): 8-16.

收稿日期: 2023-08-03

基金项目: 广西自然科学基金项目(2023GXNSFAA026409; 2018GXNSFAA294032)

作者简介: 孙寒(1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 植物分子生物学, E-mail: sunhan9901@163.com

通讯作者: 刘红全(1975-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 植物分子生物学, E-mail: lhongquan@163.com

(Guangxi Key Laboratory of Polysaccharide Materials and Modification, Key Laboratory of Marine Biological Resources Protection and Utilization, Guangxi Minzu University, School of Marine and Biotechnology, Guangxi Minzu University, Nanning 530007, China)

Abstract: In order to explore the effect of chemical modification on the inhibitory effect of intracellular polysaccharides of *Phaeodactylum tricornutum* (PTP) on the proliferation of cervical cancer Hela cells, in this study, the PTP was extracted by the ultrasound-assisted wall-breaking method combined with the hot water extraction method. Four types of chemical modification (sulfation modification, phosphorylation modification, acetylation modification and carboxymethylation modification) were carried out on the PTP. The inhibitory effects of the initial PTP, sulfated polysaccharide (S-PTP), phosphorylated polysaccharide (P-PTP), acetylated polysaccharide (A-PTP) and carboxymethylated polysaccharide (C-PTP) on the proliferation of cervical cancer Hela cells were studied. The results showed that the degree of substitution of the S-PTP was 0.714, and the inhibitory effect of S-PTP on the proliferation rate of Hela cells could be up to 9.22% higher than that of PTP. The degree of substitution of P-PTP was 0.191, and the inhibitory effect of P-PTP on the proliferation rate of Hela cells could be up to 4.01% higher than that of PTP. The degree of substitution of acetylated polysaccharide A-PTP was 0.513, and the inhibitory effect of P-PTP on the proliferation rate of Hela cells could be up to 13.53% higher than that of PTP. The degree of substitution of C-PTP was 0.915, and the inhibitory effect of C-PTP on the proliferation rate of Hela cells could be up to 8.39% higher than that of PTP. The results showed that the inhibitory effects of four modified polysaccharides on the proliferation of Hela cells were all greater than that of PTP. Acetylation modification had the greatest inhibitory effect on the proliferation of Hela cells. Compared with PTP, the inhibitory effect of A-PTP against the proliferation rate of cervical cancer Hela cells was increased by 13.53%, reaching 46.05%. Through the experiments of chemical modification of PTP, it was proven that the introduction of a new chemical group into the molecular structure of PTP can lead to a great influence on the inhibition of cervical cancer cell proliferation. This result provides an important reference for further study on the biological activity of *Phaeodactylum tricornutum* and an experimental basis for subsequent drug research and development.

Key words: *Phaeodactylum tricornutum*; polysaccharide; chemical modification; antitumor activity

21 世纪以来, 肿瘤发病率居高不下, 恶性肿瘤不仅对社会经济产生巨大影响, 而且对人类健康也构成严重威胁^[1]。近年来随着恶性肿瘤发病率逐年上升, 恶性肿瘤已成为威胁人类健康的重大疾病, 其中宫颈癌作为最常见的妇科恶性肿瘤之一, 其发病率在女性癌症发病率中位于前三名, 每年都有数十万新发的宫颈癌症病例^[2]且近年来发病率呈现出年轻化趋势, 对女性的生命健康造成极大的危害^[3]。

随着海洋生物资源的日益开发利用, 藻类的开发逐渐成为近年来的研究热点。微藻具有多种活性物质, 如胡萝卜素、蛋白质、多糖等, 其中微藻多糖因具有天然无毒的特点而成为研究热点^[4]。近年来, 越来越多的证据表明, 从海洋微藻中提取的多糖可以用作有效的抗肿瘤活性物质^[5]。

多糖是由大量单糖分子通过糖苷键聚合而成的大分子碳水化合物。多糖的化学修饰是一种通过在糖环上用化学基团取代糖链其他基团来进行的实验方法, 多糖的化学基团修饰可以使其内在的生物活性得到改变, 继而产生新的功能性质^[6]。近几年有

关多糖的分子修饰研究已大有进展, 贾晶晶^[7]对瘤背石磺多糖进行硫酸化修饰、磷酸化修饰、乙酰化修饰, 结果表明三种化学修饰均可提高多糖抑制宫颈癌 Hela 细胞增殖效果。彭天元等^[8]对枸杞多糖进行乙酰化修饰, 结果表明, 乙酰化修饰后多糖可显著提高多糖抗氧化活性及抗肿瘤活性。陈栅等^[9]对酸枣多糖进行羧甲基化修饰, 研究表明羧甲基化修饰多糖可明显提高酸枣多糖抗氧化活性。崔政^[10]对当归多糖进行化学修饰, 修饰后的当归多糖具有良好的抗肿瘤活性。

三角褐指藻, 在分类上属硅藻门羽纹纲褐指藻目褐指藻科褐指藻属^[11], 三角褐指藻繁殖快、易调控, 内含蛋白质、脂类、藻多糖、 β -胡萝卜素、多种无机元素等多种活性物质^[12]。目前, 三角褐指藻主要用于动物饲料, 对其生物活性物质研究较少^[13]。本研究选用三角褐指藻作为研究材料, 对提取的胞内多糖 PTP 进行化学修饰(硫酸化修饰、磷酸化修饰、乙酰化修饰、羧甲基化修饰), 以期通过化学修饰提高其抗肿瘤活性, 为三角褐指藻多糖

的进一步开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与设备

吡啶、三氧化硫-吡啶、氢氧化钠、氯化钡、三氯乙酸、乙酸酐、酚酞、钼酸铵、异丙醇、一氯乙酸, 国药集团化学试剂有限公司; 明胶, 天津欧博凯化工有限公司; 硫酸钾、盐酸、无水乙醇, 成都市科隆化学品有限公司; 三聚磷酸钠、三偏磷酸钠, 天津市致远化学试剂有限公司。

ZNCL-T 磁力搅拌器, 巩义市予华仪器有限公司; HH-4 恒温水浴锅, 常州国华电器有限公司; JY92-II 超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; LGJ-10 真空冷冻干燥机, 北京松源华兴科技发展有限公司。

1.2 多糖提取

采用碱提法结合热水辅助浸提法对冻干藻粉进行胞内多糖提取, 采用 Seville 法对其进行脱蛋白处理, 得到脱蛋白的多糖溶液, 酒精醇沉过夜, 得三角褐指藻胞内多糖 (*Phaeodactylum tricornutum* Polysaccharide, PTP)。

1.3 紫外光谱分析

配制 0.5 mg/mL 多糖溶液, 在 200~400 nm 范围内进行紫外光谱扫描, 得扫描曲线。

1.4 红外光谱分析

多糖样品 PTP 采用压片法制样, 在 4000~400 cm⁻¹ 波数范围内进行红外光谱扫描样品, 得到红外光谱曲线。

1.5 硫酸化修饰

1.5.1 硫酸化修饰方法

量取 15 mL 吡啶加入烧杯中进行冰水浴, 冰水浴中边搅拌边加入三氧化硫-吡啶 1.5 g, 烧杯放于热水浴中常温加热, 水浴温度达到 90 °C 取出, 加入 0.25 g 多糖, 55 °C 恒温搅拌 3 h, 冰水浴冷却至室温, 配置 2 mol/L 的 NaOH 溶液, 使反应液 pH 值至 7, 透析 72 h, 4 倍体积无水乙醇醇沉, 4 °C 过夜, 8 000 r/min 离心 10 min, 收集沉淀, 冷冻干燥后得到硫酸化修饰多糖 S-PTP。

1.5.2 取代度测定

产物的硫酸根取代度测定用硫酸钡比浊法。配

制 0.6 mg/mL K₂SO₄ 标准溶液, 分别吸取 0、40、80、120、160、200 μL 的 K₂SO₄ 标准溶液于试管中, 补充 1 mol/mL HCl 至 200 μL, 再加 3% 三氯乙酸 (TCA) 3.8 mL 以及 1 mL 0.5% 氯化钡-明胶, 再用 0.5% 明胶溶液代替氯化钡-明胶, 充分振荡混匀, 室温放置 20 min 后于 360 nm 处测定吸光值。以硫酸根量为横坐标, 吸收值为纵坐标, 绘制硫酸根标准曲线。

取 2 mg S-PTP 溶解于 1 mL 1 mol/L HCl, 沸水浴 5 h, 于 360 nm 波长处测定吸光度, 根据以下公式计算硫酸根取代度 (DS), 每个试验均做 3 个重复:

$$D = \frac{1.62 \times S}{3.2 - 1.02 \times S} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

D—硫酸化取代度;

S—PTP 中硫酸基含量, %。

1.6 磷酸化修饰

1.6.1 磷酸化修饰方法

称取 0.25 g 多糖, 加入适量蒸馏水溶解, 按照 1:1 加入 5 wt.% 三聚磷酸钠和 2 wt.% 三偏磷酸钠各 5 mL, 配制 1 mol/L 的 NaOH 溶液, 调节反应液 pH 值至 9, 85 °C 水浴 5 h, 透析 72 h, 4 倍体积无水乙醇醇沉, 4 °C 过夜, 8 000 r/min 离心 10 min, 收集沉淀, 冷冻干燥, 得到磷酸化修饰后多糖 P-PTP。

1.6.2 取代度测定

采用钼蓝比色法测定多糖磷酸化取代度, 配制磷试剂和 Tris 缓冲溶液, 配制 0.05 mg/mL 的 KH₂PO₄ 溶液, 取 8 支试管, 分别加入 KH₂PO₄ 溶液 0.5、1、2、4、8、10、12 mL, 加入 2 mL Tris 溶液, 加入定磷试剂 2 mL, 加蒸馏水定容至 20 mL, 室温静置 30 min, 在 660 nm 波长处测定吸光度, 绘制标准曲线。根据以下公式计算磷酸根取代度 (DP), 每个试验均做 3 个重复:

$$B = \frac{5.23 \times C}{100 - 3.32 \times C} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

B—磷酸基化取代度;

C—PTP 磷酸基含量, %。

1.7 乙酰化修饰

1.7.1 乙酰化修饰方法

称取多糖 0.25 g, 加入适量水溶解多糖, 配制 2 mol/L 的 NaOH 溶液, 调节反应液 pH 值至 9, 反

应液常温反应 10 min。加入 5 次适量乙酸酐，配制 2 mol/L 的 HCL 溶液，调节 pH 值至 7，透析 72 h，4 倍体积无水乙醇醇沉，4 °C 过夜，8 000 r/min 离心 10 min，收集沉淀，冷冻干燥，得到乙酰化修饰后多糖 A-PTP。

1.7.2 取代度测定

采取酸碱滴定法测定乙酰化的取代度，称取 20 mg 乙酰化多糖 A-PTP，加入 10 mL 氢氧化钠溶液，反应 10 min，使其完全溶解，将反应液进行 50 °C 水浴，搅拌水浴时间为 2 h，使其充分发生皂化反应，冷却至室温，将酚酞作为指示剂，加入一滴，用盐酸溶液滴定至红色消失，记录盐酸消耗的体积，按照以下公式计算取代度 (DY)，每个试验均做 3 个重复：

$$E = \frac{132A}{4300 - 42A} \times 100\% \quad (3)$$

式中：

E ——乙酰化取代度；

A ——PTP 乙酰基含量，%。

1.8 羧甲基化修饰

1.8.1 羧甲基化修饰方法

称取 300 mg 多糖，加入 10 mL 20% NaOH 和 25 mL 异丙醇，冰水浴搅拌 3 h，得溶液一，称取 2.62 g 氯乙酸，加入 10 mL 20% NaOH 和 25 mL 异丙醇，搅拌混匀，得溶液二。将二分之一溶液二倒入溶液一中，搅拌 1.5 h，水浴至 60 °C，30 min，将剩余的二分之一溶液二加入混合液一中，60 °C 水浴 1 h，冷却，用 0.5 mol/L 冰乙酸调节 pH 值至 7，透析 72 h，4 倍体积无水乙醇醇沉，4 °C 过夜，8 000 r/min 离心 10 min，收集沉淀，冷冻干燥，得到羧甲基化修饰后的多糖 C-PTP。

1.8.2 取代度测定

取 10 mg 羧甲基化多糖 C-PTP。缓慢加入 10 mL 0.01 mol/L 的 NaOH，搅拌 30 min 使其完全溶解，加入 1 滴酚酞，用 0.01 mol/L 的 HCl 进行滴定，当红色消失停止滴定，以 30 s 不变色作为滴定终点，按照以下公式计算取代度 (DC)，每个试验均做 3 个重复：

$$G = \frac{0.162H}{1 - 0.058H} \times 100\% \quad (4)$$

式中：

G ——羧甲基取代度；

H ——PTP 中羧甲基含量，%。

1.9 抑制宫颈癌Hela细胞增殖活性实验

1.9.1 细胞复苏与培养

取出保存于液氮罐中的猴肾源细胞 Vero 及宫颈癌细胞 Hela，静置于 37 °C 的恒温水浴锅中解冻 1 min，将解冻后的细胞移入培养瓶内，添加 DMEM 培养液，置于 CO₂ 培养箱中，于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 2~3 d。

1.9.2 细胞毒性试验

取 Vero 细胞培养至对数期，加 1 mL 胰酶细胞消化液消化 1 min，显微镜下观察至细胞收缩时停止消化，加入细胞培养基进行吹打，使贴壁细胞不再贴壁成悬浮细胞。每孔 200 μL 接种于 96 板，使每孔细胞数为 1.0×10⁵ 个。细胞培养箱培养 24 h。配置多糖培养液：用 DMEM 培养液将三角褐指藻胞内多糖配置成 100、200、500、800、1 000 μg/mL 的细胞培养液，以正常的细胞培养液为阴性对照。将每孔 200 μL 的量加入到 96 孔板当中，每孔细胞数约为 1.0×10⁵ 个。再放置到细胞培养箱中，在 5% CO₂、温度 37 °C 的条件下培养 12 h。采用 CCK-8 (Cell Counting Kit-8) 试剂盒检测细胞存活率。每个试验均做 3 个重复。

1.9.3 多糖抑制宫颈癌细胞Hela增殖活性试验

取宫颈癌细胞 Hela，加 1 mL 胰酶细胞消化液消化 1 min，显微镜下观察至细胞收缩时停止消化，加入细胞培养基吹打均匀，每孔 200 μL 接种于 96 板，使每孔细胞数为 1.0×10⁵ 个。细胞培养箱培养 12 h。配置多糖培养液：根据细胞毒性结果用细胞培养基将 PTP、S-PTP、P-PTP、A-PTP、C-PTP 配置成低质量浓度 (100 μg/mL)、中质量浓度 (200 μg/mL)、高质量浓度 (500 μg/mL) 三种质量浓度的多糖细胞培养基。采用 CCK-8 (Cell Counting Kit-8) 试剂盒检测细胞增殖抑制率。弃掉 96 孔原有细胞培养基，用 PBS 缓冲液清洗 96 孔板 1~2 次，每孔加入 100 μL 细胞培养基和 10 μL CCK-8 溶液，细胞培养箱孵育 1 h，用酶标仪在 450 nm 处测定吸光值：含 DMEM 培养基、CCK-8、不含细胞组为空白组，含细胞、DMEM 培养基、CCK-8 溶液组为对照组，含多糖细胞培养基、CCK-8、细胞组为试验组，每个试验均做 3 个重复。

$$X = \frac{Ac - As}{Ac - Ab} \times 100\% \quad (5)$$

式中：

X —抑制率, %;

A_c 、 A_s 、 A_b —对照组、试验组、空白组的吸光度。

1.10 数据分析

本试验所作图谱均采用 Origin 软件作图, 且每个试验均做 3 个重复。

2 结果与讨论

2.1 PTP紫外光谱分析

经过紫外光谱扫描, 由图 1 可知, 多糖在波长为 260~280 nm 范围内无特征吸收峰, 证明多糖提取物中无蛋白质等杂质^[14]。

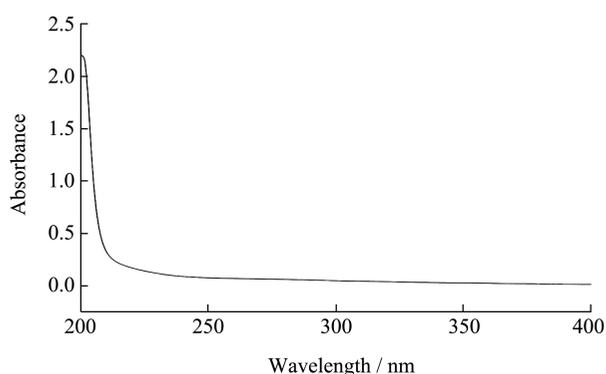


图 1 紫外光谱图

Fig.1 UV spectra

2.2 PTP红外光谱分析

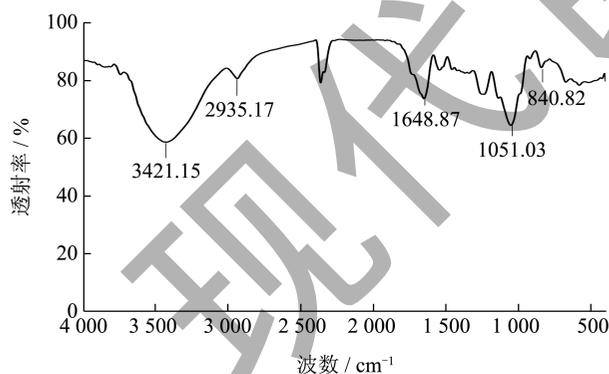


图 2 PTP 红外光谱图

Fig.2 Infrared spectra of PTP

FT-IR 光谱如图 2 所示, 在 3421.15 cm^{-1} 附近有一个强峰表示由于分子间和分子内氢带引起的羟基拉伸振动, 2935.17 cm^{-1} 显示出对游离糖的 C-H 拉伸振动的吸收; 1648.87 cm^{-1} 是由 C=O 拉伸振动引起的糖醛酸的中等强度峰值。 1051.03 cm^{-1} 处强吸收峰归因于吡喃糖环上 C-O-C 的拉伸振动。观察到的峰值大约在 840 cm^{-1} 被认为是该多糖中 α -构

型的特征^[15,16]。上述结果表明 PTP 是一种含有糖醛酸的 α -构型吡喃糖。

2.3 硫酸化修饰

2.3.1 红外光谱比较

对 S-PTP 及 PTP 在 $4000\sim400\text{ cm}^{-1}$ 进行红外光谱扫描, 见图 3, 可看到 S-PTP 在 769.47 cm^{-1} 处的吸收峰为 C-O-SO₂ 中 C-O-S 的伸缩振动产生的, 在 1251.59 cm^{-1} 处可以看到由 S=O 的对称伸缩振动产生的特征吸收峰, 表明硫酸化成功修饰^[17]。

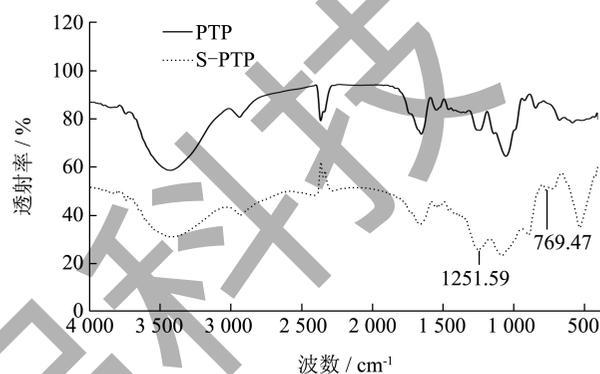


图 3 S-PTP 及 PTP 红外光谱图

Fig.3 Infrared spectra of S-PTP and PTP

近年来有大量研究表明, 多糖修饰衍生物在人类癌症的治疗上具有有效疗效 ADDIN。硫酸化修饰通常是通过硫酸基团取代多糖链中羟基的位置来完成。研究表明, 多糖中硫酸基团取代位置比取代度对生物活性有更重要的作用, 其中硫酸基团的位置可以改变多糖直链的结构, 但是硫酸化修饰对多糖的抗肿瘤活性影响的分子机制鲜有报道^[18]。研究表明, 多糖硫酸化修饰中硫酸基团的取代位置影响多糖的抗肿瘤活性。牡蛎糖中经硫酸化修饰得两种多糖 (取代基团在 C6 位及在 C2、C3 位), 其中取代度在 C-6 位处硫酸化多糖比取代度在 C2、C3 位处硫酸化多糖具有更强得刺激淋巴细胞增殖活性^[19]。对两种红藻多糖进行硫酸化修饰及抗增殖活性研究, 除取代度及取代位置的影响, 硫酸基团侧链、及主链和支链的结构对硫酸化多糖的抗肿瘤活性也有影响^[18]。王梦绕^[20]对罗汉果多糖进行硫酸化修饰, 结果表明多糖链中 C3 位被硫酸基团取代, 推测多糖链中硫酸基团可增加静电排斥作用增强多糖链中的刚性, 从而提高多糖抗肿瘤作用。Jiang 等^[21]研究表明龙眼肉硫酸化修饰多糖 LP1-S 较多糖 LP1 具有增强免疫活性及提高抑制鼻咽癌活性的效果, 其可能作用的机制是通过促进淋巴细胞

增殖及提高巨噬细胞活性从而增强抗肿瘤活性。王梦绕^[20]的研究表明硫酸化修饰多糖可能通过增加胞内活性氧水平及降低线粒体电位激活线粒体凋亡通路从而促进肺癌细胞凋亡。本研究中硫酸化修饰多糖 S-PTP 的取代度为 0.714, 在 100、200、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度下, S-PTP 对抑制宫颈癌 Hela 细胞活性均有增加。

2.3.2 标准曲线及取代度计算

硫酸根质量浓度的标准曲线为 $Y=0.5165X-0.0211$, 其中 $R^2=0.9996$, 说明标准曲线的结果真实可信。根据公式计算硫酸根取代度为 0.714。

2.4 磷酸化修饰

2.4.1 红外光谱比较

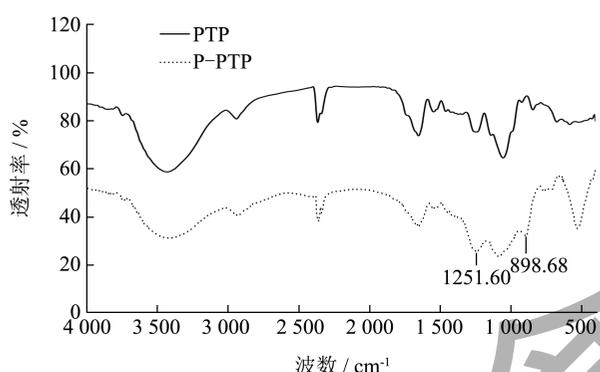


图 4 P-PTP 及 PTP 红外光谱图
Fig.4 IR spectra of P-PTP and PTP

对 P-PTP 及 PTP 在 4 000~400 cm^{-1} 进行红外光谱扫描, 如图 4 所示, 1 251.60 cm^{-1} 处的吸收峰为 P=O 键的伸缩振动吸收峰, 898.68 cm^{-1} 处的吸收峰为 P-O-C 键的吸收峰, 这两个峰的变化加强表明磷酸化修饰成功^[22]。

磷酸化修饰多糖可通过提高带电磷酸盐群从而提高多糖的溶解度及改变链条构象来促进与巨噬细胞表面受体结合进而提高免疫功能从而提高抗肿瘤活性。磷酸化修饰的原理是将磷酸基团取代多糖链中的羟基来完成^[23]。目前, 关于多糖的磷酸化修饰与生物活性之间的构效关系研究较少, 作用的分子机制有待研究^[24]。Huang 等^[25]对葡聚糖进行磷酸化修饰, 结果表明磷酸化多糖通过增强激活机体的免疫应答, 促进免疫细胞的增殖与分化从而发挥抗肿瘤活性。本研究中磷酸化修饰多糖 P-PTP 的取代度为 0.191, 在 100、200、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度下, P-PTP 对抑制宫颈癌 Hela 细胞活性均有增加。

2.4.2 标准曲线及取代度计算

磷酸根质量浓度的标准曲线为 $Y=0.00328X+0.03422$, 其中 $R^2=0.9999$, 说明标准曲线的结果真实可信。根据公式计算磷酸根取代度为 0.191。

2.5 乙酰化修饰

2.5.1 红外光谱比较

对 A-PTP 及 PTP 在 4 000~400 cm^{-1} 进行红外光谱扫描, 如图 5 所示, 1 710.58 cm^{-1} 处的乙酯基的 C=O 伸缩振动特征吸收峰及 1 253.52 cm^{-1} 处的酯基的 C-O 伸缩振动特征吸收峰明显加强^[26], 两个峰值较 PTP 更为明显, 证明乙酰化修饰成功^[9]。

乙酰化修饰是多糖结构修饰中重要的支链修饰方法之一。多糖经过乙酰化修饰后, 羟基暴露在外, 增加多糖在水中的溶解度, 有利于生物活性的增强^[26]。地衣类多糖因乙酰化而增加多糖链的溶解性, 从而使多糖链增加抗肿瘤活性, 多糖链脱乙酰化后多糖链的溶解性降低, 导致抗肿瘤活性丧失^[24]。研究表明, 多糖链乙酰化取代位置影响多糖的抗肿瘤活性, 多糖乙酰基取代位置在 O-3 位时比多糖乙酰基取代位置在 O-5 位时, 多糖的抗肿瘤活性更强, 结果表明乙酰基取代位置对多糖链空间结构造成改变, 进而影响多糖抗肿瘤活性^[27]。乙酰化后的多糖具有抗肿瘤活性增加的作用, 主要与乙酰基的引入改变了多糖的水溶性并使其活性部位暴露有关, 如地衣类多糖, 部分乙酰化后水溶性增加, 表现出抗肿瘤活性, 脱乙酰化或全乙酰化后则失去抗肿瘤活性^[28]。本研究中乙酰化修饰多糖 A-PTP 的取代度为 0.513, 在 100、200、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度下, A-PTP 对抑制宫颈癌 Hela 细胞活性均有增加。

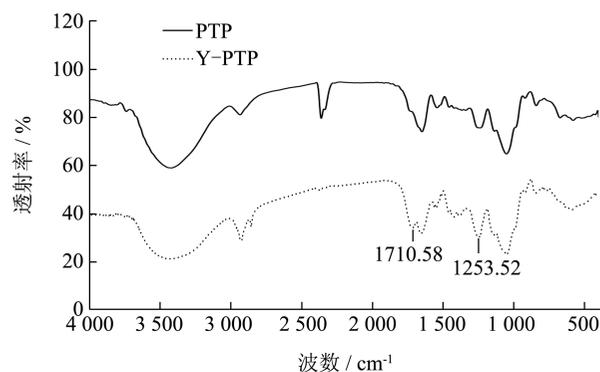


图 5 A-PTP 及 PTP 红外光谱图
Fig.5 Infrared spectra of A-PTP and PTP

2.5.2 取代度计算

采用酸碱滴定法测定乙酰化修饰的取代度为 0.513。

2.6 羧甲基化修饰

2.6.1 红外光谱比较

对 C-PTP 及 PTP 在 4 000 到 400 cm^{-1} 进行红外光谱扫描, 如图 6 所示, 1 631.51 cm^{-1} 处的 C=O 伸缩振动吸收峰明显加强。1 421.30 cm^{-1} 处出现的新峰为 COOH 中的 C-O 伸缩振动^[9], 以上特征吸收峰证明羧甲基化修饰成功。

多糖的羧甲基化是一种常见的化学修饰的方法。羧甲基化的原理是将多糖链中的羟基去质子化并在碱性溶液中形成烷氧基, 从而提高多糖的亲核性^[23]。对小枣多糖进行羧甲基化修饰后, 多糖链中氧原子含量增加, 可提高多糖水溶性及降低黏度, 从而提高生物活性^[29]。多糖可以通过羧甲基化从而提升其免疫功能, 通过免疫功能的增强进而提升抗肿瘤活性^[30]。研究表明, 羧甲基化修饰多糖可以促进肿瘤细胞凋亡并对肿瘤细胞的周期有影响, 可以提高抗氧化活性及免疫活性并在抑制肿瘤血管生成等方面也具有显著影响^[31]。金樱子多糖通过羧甲基化进行化学修饰后, 对 HepG2 细胞表现出明显的抑制作用^[31]。王建国的研究表明, 灵芝多糖经过羧甲基化后对 S180 肿瘤细胞的抑制效果可代替传统抗癌药物^[32]。玉米糠多糖经过羧甲基化修饰后, 具有显著抑制肺癌 A549 细胞和肝癌 HepG2 细胞的增殖的作用, 研究表明基因 CASP3、CASP8、CASP9 和 p53 的表达上调, 基因 Bcl-2 和 iNOS 的表达显著下调, 推测抗肿瘤机制可能通过这些基因调控^[33]。本研究中羧甲基化修饰多糖 C-PTP 的取代度为 0.915, 在 100、200、500 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度下, C-PTP 对抑制宫颈癌 Hela 细胞活性均有增加。

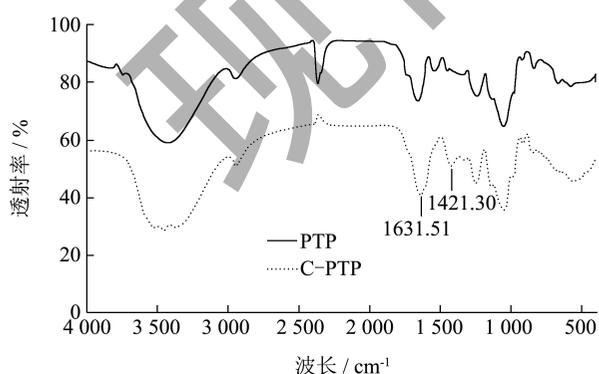


图 6 C-PTP 与 PTP 红外光谱图

Fig.6 Infrared spectra of C-PTP and PTP

2.6.2 取代度计算

按照公式计算出羧甲基化修饰的取代度为 0.915。

2.7 抗肿瘤活性

2.7.1 细胞毒性

由图 7 知, 在设置的低质量浓度组别下 (100、200、500 $\mu\text{g/mL}$), 三角褐指藻多糖 PTP 对 Vero 细胞无毒性 ($P < 0.05$), 且稍微对 Vero 细胞有促进作用, 但效果并不显著。在 100 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度组别下, PTP、S-PTP、P-PTP、A-PTP、C-PTP 的 Vero 相对存活率分别为 102.76%、100.18%、101.16%、102.04%、100.18%。在 200 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度组别下, PTP、S-PTP、P-PTP、A-PTP、C-PTP 的 Vero 存活率分别为 108.55%、102.50%、103.33%、103.17%、104.35%。在 500 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度组别下, PTP、S-PTP、P-PTP、A-PTP、C-PTP 的 Vero 存活率分别为 110.77%、105.38%、108.39%、106.38%、106.44%。

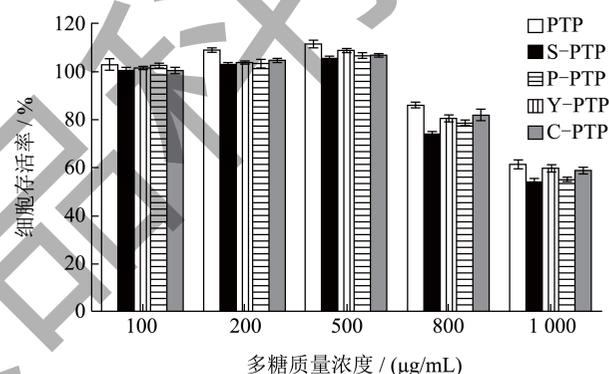


图 7 对 Vero 细胞的毒性作用

Fig.7 Toxic effect on Vero cells

在设置的高质量浓度组 (800、1 000 $\mu\text{g/mL}$) 中, 三角褐指藻多糖 PTP 及 4 种化学修饰多糖对 Vero 细胞的生长抑制有较显著的影响。在 800 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度组别下, PTP、S-PTP、P-PTP、A-PTP、C-PTP 的 Vero 存活率分别为 85.73%、73.32%、80.37%、78.25%、81.4%。在多糖质量浓度为 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 时对 Vero 细胞的存活率已经低于 70%, 在 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度组别下, PTP、S-PTP、P-PTP、A-PTP、C-PTP 的 Vero 存活率分别为 61.03%、53.23%、9.47%、54.37%、58.38%。在高质量浓度下, 存活率较低, 没有研究意义。

研究小球藻多糖 CEP4 对小鼠 RAW264.7 巨噬细胞的毒性实验, 结果表明, 多糖 CEP4 在 0.75~6 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度时, 对 RAW264.7 巨噬细胞的存活有明显的促进作用, 当 CEP4 质量浓度为 12~24 $\mu\text{g/mL}$ 时, CEP4 对 RAW264.7 巨噬细胞产生毒性作用。检测结果表明, NO 分泌量、促炎因子 IL-6 及 TNF- α 释

放量在 CEP4 质量浓度为 6 $\mu\text{g/mL}$ 时达到最高, 质量浓度 3~24 $\mu\text{g/mL}$, 开始分泌抗炎性细胞因子 IL-10, 研究推测 CEP4 低质量浓度时, CEP4 对巨噬细胞主要发挥免疫活性作用, 对巨噬细胞的生长具有促进作用, 当多糖质量浓度过高, 会引发巨噬细胞过度炎症反应, 从而导致细胞存活率下降^[34]。

大量研究表明, 藻类多糖具有良好的免疫调节活性及抗肿瘤活性^[26]。研究中低质量浓度组 (500 $\mu\text{g/mL}$) 三角褐指藻多糖 PTP 对 Vero 细胞的增殖有轻微促进作用, 推测是由于多糖 PTP 增加了细胞的免疫调节活性, 从而使 Vero 细胞的相对存活率大于 100%。研究中高质量浓度组 (800 $\mu\text{g/mL}$) 三角褐指藻多糖 PTP 对 Vero 细胞的增殖有显著抑制作用, 推测是由于高质量浓度多糖主要导致 Vero 细胞炎症, 导致 Vero 细胞存活率下降。

2.7.2 抗肿瘤活性

由图 8 可见, 三角褐指藻多糖 PTP 及四种化学修饰多糖对宫颈癌 HeLa 细胞生长均有一定抑制作用, 在质量浓度 100~500 $\mu\text{g/mL}$, PTP 及 4 种化学修饰多糖生长抑制率均随质量浓度增加而增高。

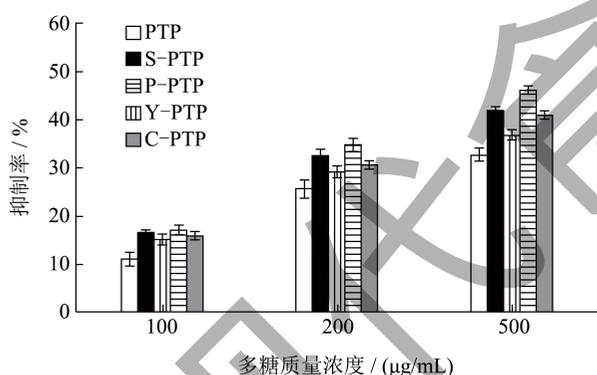


图 8 PTP、S-PTP、P-PTP、A-PTP 及 C-PTP 对宫颈癌细胞 HeLa 的体外抑制作用

Fig.8 Inhibitory effects of PTP, S-PTP, P-PTP, A-PTP and C-PTP on cervical cancer cell HeLa in vitro

在 100 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度下, PTP、S-PTP、P-PTP、A-PTP、C-PTP 对宫颈癌 HeLa 细胞抑制率分别为 11.27%、16.93%、15.03%、17.06%、15.89%。在 200 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度下, PTP、S-PTP、P-PTP、A-PTP、C-PTP 对宫颈癌 HeLa 细胞抑制率分别为 25.42%、32.38%、29.12%、34.75%、30.62%。在 500 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度下, PTP、S-PTP、P-PTP、A-PTP、C-PTP 对宫颈癌 HeLa 细胞抑制率分别为 32.52%、41.74%、36.53%、6.05%、40.91%。在 500 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度下,

S-PTP、P-PTP、A-PTP、C-PTP 较 PTP 抑制宫颈癌 HeLa 细胞增殖率分别提高 9.21%、4.01%、13.53%、8.39%。

在 PTP 和四种改性多糖中, 改性多糖抑制宫颈癌 HeLa 细胞生长抑制率均高于 PTP, 且具有显著性提高效果 ($P < 0.05$), 且化学修饰对抑制宫颈癌 HeLa 细胞增殖活性提升效果从大到小分别为乙酰化、硫酸化、羧甲基化、磷酸化。南征^[35]研究杏鲍菇多糖 WPP 对 K532 细胞在 400 $\mu\text{g/mL}$ 下抑制率为 13.367%, 硫酸化多糖 S-WPP、磷酸化多糖 P-WPP、乙酰化多糖 Ac-WPP、羧甲基化多糖 C-WPP 抑制率相较于 WPP 分别提高 8.32%、3.27%、3.36%、2.20%。本研究在 500 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度下, S-PTP、P-PTP、A-PTP、C-PTP 较 PTP 抑制宫颈癌 HeLa 细胞增殖率分别提高 9.21%、4.01%、13.53%、8.39%, 相对南征的研究本研究化学修饰对细胞的抑制有所提升。

这些研究表明, 多糖的化学修饰增强抗肿瘤活性的机制大致可以概括为两类, 一种是通过增加其促凋亡基因及促凋亡通路从而提高抑制宫颈癌 HeLa 细胞增殖活性; 另一种是通过增强其免疫活性及增加识别肿瘤细胞的功能从而提高抑制宫颈癌 HeLa 细胞增殖活性。本实验通过对三角褐指藻多糖 PTP 进行化学修饰, 证明三角褐指藻多糖在分子结构上引入新的化学基团对抑制宫颈癌细胞增殖有着较大影响, 对进一步研究三角褐指藻的生物活性提供了重要参考, 为后续的药物研发提供实验基础。然而, 论文结果显示化学修饰可进一步提高对肿瘤细胞的直接抑制作用, 但是本文没有进一步研究化学修饰提高抑制肿瘤细胞效果具体的分子机制, 需要进一步研究与探索。

3 结论

本文对三角褐指藻胞内多糖 PTP 进行化学修饰, 以期进一步提高抑制宫颈癌 HeLa 细胞增殖活性。通过紫外光谱扫描, 证明多糖提取物中无蛋白质等杂质。通过红外光谱检测结果表明, 4 种化学修饰均成功修饰。研究结果显示, 四种修饰多糖对 HeLa 细胞增殖抑制效果较 PTP 均有所提升, 化学修饰对 HeLa 细胞增殖抑制提升效果最大的为乙酰化修饰, A-PTP 较 PTP 抑制宫颈癌 HeLa 细胞增殖率最大可提高 13.53%, 达到 46.05%。然而仍需进一步探索多糖结构与活性之间的构效关系以更好地了解其抗肿瘤活性机制。

参考文献

- [1] PORTILLO L R, ANNABI N. Microengineered cancer-on-a-cPTP platforms to study the metastatic microenvironment [J]. Lab on a cPTP, 2016, 16(21): 4063-4081.
- [2] ZHAO R, GAO X, CAI Y, et al. Antitumor activity of *Portulaca oleracea* polysaccharides against cervical carcinoma *in vitro* and *in vivo* [J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 96(2): 376-383.
- [3] 芦静波,陈靠山,曹剑锋,等.多糖抗肿瘤活性及其机制研究[J].医学理论与实践,2015,28(22):3048-3050.
- [4] 林甜甜,徐晓阳,张子聪,等.响应面法优化纤维素酶提取海洋微藻多糖的研究[J].食品工程,2022,4:66-70.
- [5] ARUMUGAM P, ARUNKUMAR K, SIVAKUMAR L, et al. Anticancer effect of fucoidan on cell proliferation, cell cycle progression, genetic damage and apoptotic cell death in HepG2 cancer cells [J]. Toxicology Reports, 2019, 6(C): 556-563.
- [6] 李爽,赵宏,王宇亮,等.蒲公英多糖乙酰化修饰、体外抗氧化及抑菌作用研究[J].食品工业科技,2022,43(3):18-25.
- [7] 贾晶晶.瘤背石磺多糖的化学修饰及诱导Hela细胞凋亡作用研究[D].上海:上海海洋大学,2021.
- [8] 彭天元,刘家水,颜红专.乙酰化修饰枸杞多糖及其抗氧化、抗肿瘤活性研究[J].安徽中医药大学学报,2015, 34(6):61-66.
- [9] 陈栅,冯润芳,袁野,等.酸枣多糖羧甲基化修饰及活性研究[J].中国食品学报,2022,22(4):55-66.
- [10] 崔政.改性当归多糖作为肝癌靶向纳米抗肿瘤药物载体的可行性研究[D].武汉:华中科技大学,2021.
- [11] 刘力源,李长青,姬广磊,等.三角褐指藻和小球藻藻粉添加对皱纹盘鲍稚鲍生长的影响[J].广东农业科学,2022, 49(12):135-142.
- [12] 舒明雨,龚一富,吕欣梦,等.三角褐指藻dxs基因克隆与诱导表达[J].水生生物学报,2022,46(9):1310-1318.
- [13] 岳伟萍.三角褐指藻作为饲料蛋白质的开发前景研究[J].河北渔业,2010,12:13-14.
- [14] 贾红倩,刘崑,颜军,等.杏鲍菇多糖的分离纯化、乙酰化修饰及其抗氧化活性[J].食品工业科技,2018,39(3):39-44.
- [15] 吴思伟,李思雨,孙寒,等.一株产胞外多糖微藻的分离鉴定及其多糖抗氧化活性的研究[J].食品与发酵工业, 2021,47(24):193-200.
- [16] XU R, SHEN Q, DING X, et al. Chemical characterization and antioxidant activity of an exopolysaccharide fraction isolated from *Bifidobacterium animalis* RH [J]. European Food Research and Technology, 2011, 232(2): 231-240.
- [17] 李思雨.小球藻多糖提取纯化及其改性研究[D].南宁:广西民族大学,2022.
- [18] 卢可可,张月巧,袁娅,等.硫酸化修饰多糖抗肿瘤活性构效关系及分子机制研究进展[J].食品科学,2014,35(23): 297-302.
- [19] YANF J, ZHU B, ZHENG J, et al. Stimulation of lymphocyte proliferation by oyster glycogen sulfated at C-6 position [J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 94(1): 301-308.
- [20] 王梦绕.罗汉果多糖的结构表征、化学修饰及对A549肺癌细胞凋亡的影响[D].西安:陕西科技大学,2022.
- [21] JIANG J, MENG F, HE Z, et al. Sulfated modification of longan polysaccharide and its immunomodulatory and antitumor activity *in vitro* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 67: 323-329.
- [22] 程浩.大蒜多糖衍生物的制备及抗氧化活性研究[D].重庆:重庆师范大学,2020.
- [23] 杨艺,赵媛,孙纪录,等.化学修饰多糖的方法及生物活性研究进展[J].食品工业科技,2023,44(11):468-479.
- [24] 周鹏,谢明勇,傅博强.多糖的结构研究[J].南昌大学学报(理科版),2001,2:197-204.
- [25] HUANG Q, ZHANG L. Preparation, chain conformation and anti-tumor activities of water-soluble phosphated (1→3)- α -D-glucan from *Poria cocos* mycelia [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 83(3): 1363-1369.
- [26] 李顺峰,许方方,崔国梅,等.香菇柄多糖乙酰化修饰及其抗氧化活性[J].食品与发酵工业,2022,48(3):130-134.
- [27] 刘晓宇.黄药子中性多糖的结构分析及其抗肿瘤活性研究[D].吉林:东北师范大学,2013.
- [28] 高小荣,刘培勋.多糖构效关系研究进展[J].中草药,2004, 2:115-117.
- [29] 陈栅,冯润芳,袁野,等.酸枣多糖羧甲基化修饰及活性研究[J].中国食品学报,2022,22(4):55-66.
- [30] 牛庆川,李银莉,李玉萍.天然多糖羧甲基化对其生物活性影响的研究进展[J].天然产物研究与开发,2019,31(1): 170-174.
- [31] XIAO K J, ZHANG L, LIU X H, et al. *In vitro* anti-tumor effects of chemically modified polysaccharides from *Cherokee rose* fruit [J]. International Journal of Food Engineering, 2014, 10(3): 473-479.
- [32] 王建国.灵芝多糖的结构及生物活性研究[D].武汉:武汉大学,2010.
- [33] LI J, SHANG W, SI X, et al. Carboxymethylation of corn bran polysaccharide and its bioactive property [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2017, 52(5): 1176-1184.
- [34] 吴思伟.小球藻多糖CEP4对RAW264.7小鼠巨噬细胞免疫调节活性的研究[D].南宁:广西民族大学,2021.
- [35] 南征.杏鲍菇多糖的化学修饰及体外生物活性研究[D].西安:陕西师范大学,2014.