

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.06.008

· 基础研究 ·

螺旋藻硒多糖组分的提纯及其体外抗肿瘤作用

尚俊英¹, 谢裕安², 陈文彰¹, 燕丽香¹ (1. 北京市石景山医院 肿瘤科, 北京 100043; 2. 广西医科大学 附属肿瘤医院 实验研究部, 广西壮族自治区 南宁 530021)

[摘要] 目的: 研究螺旋藻硒多糖 (polysaccharide from Se-enriched spirulina platensis, Se-PSP) 各组分对肿瘤细胞生长的影响。方法: 超声波法从富硒螺旋藻 (Se-enriched spirulina, Se-SP) 中提取 Se-PSP 总糖和各组分 (Se-PSP₁、Se-PSP₂、Se-PSP₃ 和 Se-PSP₄), DEAE-纤维素层析对各组分进行分离纯化。MTT 法检测 10 μg/ml 时 Se-PSP 总糖及不同组分对卵巢癌 SKOV-3 细胞生长的影响; 观察不同质量浓度的 Se-PSP₂ 对卵巢癌 SKOV-3 细胞、肝癌 HepG-2 细胞、胃癌 BGC-803 细胞、鼻咽癌 CNE 细胞和舌鳞癌 Tca-8113 细胞生长的影响。结果: Se-SP 分离纯化得到 4 个不同组分 (Se-PSP₁、Se-PSP₂、Se-PSP₃ 和 Se-PSP₄), 其中 Se-PSP₂ 质量分数最高。10 μg/ml Se-PSP 总糖及其 4 个组分对 SKOV-3 细胞生长的抑制率分别为 (33.393 ± 5.437)%、(22.290 ± 8.399)%、(44.881 ± 4.878)%、(45.354 ± 4.931)% 和 (46.203 ± 4.455)%, 其中 Se-PSP₂、Se-PSP₃ 和 Se-PSP₄ 抑制率显著大于 Se-PSP 总糖及 Se-PSP₁ ($P < 0.05$), 但前 3 者无明显差别 ($P > 0.05$)。Se-PSP₂ 能剂量依赖性抑制 SKOV-3、HepG-2、BGC-803 和 Tca-8113 肿瘤细胞的增殖 (均 $P < 0.05$), 抑制作用具有肿瘤广谱性。结论: Se-PSP₂ 是 Se-PSP 的主要成分, 对多种肿瘤细胞的生长有抑制作用, 有望成为治疗肿瘤的辅助药物。

[关键词] 螺旋藻硒多糖; 卵巢肿瘤; 肝肿瘤; 胃肿瘤; 鼻咽肿瘤; 增殖

[中图分类号] R979.1; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2010)06-0630-04

Isolation and purification of polysaccharide from Se-enriched spirulina platensis and their *in vitro* anti-tumor activity

SHANG Jun-ying¹, XIE Yu-an², CHEN Wen-zhang¹, YAN Li-xiang¹ (1. Department of Tumor, Shijingshan Hospital of Beijing, Beijing 100043, China; 2. Department of Experimental Research, Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxizhuang Autonomous Region, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of different polysaccharides isolated from Se-enriched spirulina platensis (Se-PSP) on the growth of tumor cells. **Methods:** Crude total sugar Se-PSP and its different components (Se-PSP₁, Se-PSP₂, Se-PSP₃ and Se-PSP₄) were extracted from se-enriched spirulina (Se-SP) by ultrasonic method, and four Se-PSP components were further isolated and purified by DEAE-cellulose column. The effects of total sugar Se-PSP and four different components (10 μg/ml) on the growth of SKOV-3 cells, and different concentrations of Se-PSP₂ on the growth of SKOV-3 cells, HepG-2 cells, BGC-803 cells, CNE cells and Tca-8113 cells were examined by MTT method. **Results:** Four different components (Se-PSP₁, Se-PSP₂, Se-PSP₃ and Se-PSP₄) were isolated and purified from Se-PSP, with Se-PSP₂ being the most abundant one. The inhibitory rates of Se-PSP and four different components (Se-PSP₁, Se-PSP₂, Se-PSP₃ and Se-PSP₄) on growth of SKOV-3 cells were (33.393 ± 5.437)%, (22.290 ± 8.399)%, (44.881 ± 4.878)%, (45.354 ± 4.931)% and (46.203 ± 4.455)%, respectively, with the inhibitory rates of Se-PSP₂, Se-PSP₃ and Se-PSP₄ being significantly higher than those of Se-PSP and Se-PSP₁ ($P < 0.05$), but those of Se-PSP₂, Se-PSP₃ and Se-PSP₄ showing no difference ($P > 0.05$). Se-PSP₂ dose-dependently inhibited the proliferation of SKOV-3, HepG-2, BGC-803 and Tca-8113 cells (all $P < 0.05$), and showed broad anti-tumor spectra. **Conclusion:** Se-PSP₂ is the main component of Se-PSP, and it can inhibit the growth of various types of tumor cells, making it a promising adjuvant drug for treatment of malignant tumors.

[Key words] polysaccharide from Se-enriched spirulina platensis; ovarian neoplasms; liver neoplasms; stomach neoplasms; nasopharyngeal neoplasms; proliferation [Chin J Cancer Biother, 2010, 17(6): 630-633]

[基金项目] 广西研究生教育创新计划资助项目 (No. 2007105981002M07)。Project supported by the Innovation Education Foundation for Post-graduates (No. 2007105981002M07)

[作者简介] 尚俊英 (1976 -), 女, 山西省运城市人, 硕士, 主要从事肿瘤生物治疗的研究。E-mail: sjy285639@163.com

[通信作者] 谢裕安 (XIE Yu-an, corresponding author), E-mail: 452767082@qq.com

富硒螺旋藻(Se-enriched spirulina, Se-SP)中提取出的螺旋藻硒多糖(polysaccharide from Se-enriched spirulina platensis, Se-PSP)含有硒和螺旋藻多糖(polysaccharide from spirulina platensis, PSP)两种有效成分。硒具有抑制肿瘤生长^[1]、调节免疫、清除体内自由基等功效^[2]。临床研究^[3]证实,硒还可以减轻癌症患者放、化疗的毒性作用。螺旋藻多糖则有着独特的药理作用,能增强机体免疫功能^[4]、防癌^[5]、抗病毒^[7]、降血脂^[8]、降血糖^[9]、抗凝血^[10]、抗辐射和抗突变等,有较高的临床药用价值。由于Se-PSP是天然化合物,不同于细胞毒类的抗肿瘤药物,具有无毒、高效的特点,在肿瘤防治中有着十分广阔的应用前景。本课题组前期实验^[11]已经证实,将超声波用于Se-PSP的提取,可以缩短提取时间并增加提取率。本实验进一步观察Se-PSP各组分对卵巢癌SKOV-3细胞、肝癌HepG-2细胞、胃癌BGC-803细胞、鼻咽癌CNE细胞和舌鳞癌Tca-8113细胞增殖的影响,为Se-PSP开发成为抗肿瘤新药奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株和试剂

Se-SP产自广西北部湾海域,Zarrouk培养基中添加10~40 mg/L亚硒酸钠溶液获得^[12],干燥磨粉后常温干燥保存,干粉中硒含量为25 $\mu\text{g/g}$ 。SKOV-3卵巢癌细胞株由广西医科大学妇科肿瘤实验室惠赠,BGC-803胃癌细胞株和Tca-8113舌鳞癌细胞株由广西医科大学生理实验室惠赠,HepG-2肝癌细胞株和CNE鼻咽癌细胞株购于中科院上海细胞库,本实验室传代保种。SKOV-3细胞、CNE细胞、BGC-803细胞和Tca-8113细胞在含10% FBS、100 U/ml青霉素、100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素的RPMI 1640培养液中培养;HepG-2细胞在含10% FBS、100 U/ml青霉素、100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素的DMEM高糖培养液中培养。

RPMI-1640、DMEM、胎牛血清、胰蛋白酶和MTT购自美国Sigma公司,DEAE-纤维素购自北京恒业中远化工有限公司,相对分子质量为10 000的葡聚糖购自北京华美生物工程公司,盐酸多柔比星购自深圳万乐药业(生产批号为070802),其余化学试剂均为国产分析纯。

1.2 Se-PSP的分离纯化

Se-PSP总糖在pH 11和60 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴条件下超声波处理60 min^[11]获得。应用XK-16层析柱装填DEAE-纤维素(2.0 cm \times 62 cm)进行层析,紫外仪在波长210 nm处监测,自动收集器收集每个峰的洗

脱液,浓缩后再透析。完成10次DEAE-纤维素层析,分离的Se-PSP总糖(每次上样0.50 g)及各多糖组分与NaCl混合物透析纯化后,收集各Se-PSP组分并测其质量。计算各组分在Se-PSP总糖中含量。

1.3 Se-PSP各组分溶液的配制和实验分组

精确称取Se-PSP总糖及分离后的Se-PSP₁、Se-PSP₂、Se-PSP₃和Se-PSP₄,用PBS缓冲液分别配制成1 mg/ml的溶液,0.22 μm 滤膜过滤除菌,使用前用培养液稀释100倍,配制成10 $\mu\text{g/ml}$ 各组分培养液。同时,将Se-PSP₂稀释不同倍数,分别配制成1 000、100、10、1、0.1、0.01、0.001 $\mu\text{g/ml}$ Se-PSP₂培养液。实验分为空白对照组(不加肿瘤细胞,只加入培养液)、阴性对照组(肿瘤细胞加培养液)、阳性对照组(肿瘤细胞加含10 $\mu\text{g/ml}$ 盐酸多柔比星的培养液)、7个不同质量浓度Se-PSP₂实验组。

1.4 MTT法测定各肿瘤细胞的药物敏感性

0.25%胰蛋白酶消化各肿瘤细胞,调整细胞密度为 $5 \times 10^4/\text{ml}$,铺96孔培养板, 1×10^4 个细胞/孔,终体积为200 μl ,各组设8个复孔。将培养板置在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱中培养72 h后,以MTT法检测,在酶联免疫检测仪上测定光密度值(D 值)。肿瘤细胞的抑制率按下列公式计算:各孔实际 D 值=该孔实测 D 值-空白孔平均 D 值;抑制率(%)=(阴性对照组平均 D 值-实验组平均 D 值)/阴性对照组平均 D 值 $\times 100\%$ 。抑制率 $\geq 30\%$ 判定为药敏阳性,反之为阴性。

1.5 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS13.0统计软件分析数据,组间各时点总体均数比较用方差分析,组间各时点两两比较用 q 检验, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Se-PSP的分离纯化结果

Se-PSP经超声波提取、DEAE-纤维素柱纯化分离后,得到4种不同分子质量的多糖组分,按洗脱顺序分别命名为Se-PSP₁、Se-PSP₂、Se-PSP₃、Se-PSP₄。由紫外检测仪在波长210 nm处监测,21~27管中洗脱液出现Se-PSP₁洗脱峰,46~65管中出现Se-PSP₂洗脱峰,66~72管中出现Se-PSP₃洗脱峰,75~79管中出现Se-PSP₄洗脱峰,洗脱曲线见图1。完成10次DEAE-纤维素柱层析分离Se-PSP总糖及透析脱盐后,收集得到Se-PSP₁、Se-PSP₂、Se-PSP₃和Se-PSP₄的质量依次为0.24、3.01、0.49、0.16 g,测得4种多糖组分在Se-PSP总糖中的质量分数依

次为 4.8%、70.2%、9.8%、3.2%。Se-PSP₂ 是 Se-PSP 总糖中的主要成分,硫酸-恩酮比色法测得 Se-PSP₂ 的糖含量为(98.49 ± 3.873)%,考马斯亮蓝比色法测得 Se-PSP₂ 蛋白含量为(0.450 ± 0.028)%。

2.2 各 Se-PSP 组分对 SKOV-3 细胞生长的抑制结果

质量浓度在 10 μg/ml 时 Se-PSP 总糖及 Se-PSP₁、Se-PSP₂、Se-PSP₃ 和 Se-PSP₄ 对 SKOV-3 细胞的生长均有抑制作用,抑制率分别为(33.3 ± 5.44)%、(22.3 ± 8.40)%、(44.9 ± 4.88)%、(45.4 ± 4.93)%和(46.2 ± 4.46)%。从 Se-PSP₁、Se-PSP₂、Se-PSP₃ 到 Se-PSP₄ 随着分子质量的减小,对 SKOV-3 细胞生长的抑制作用逐渐增强。阳性对照药物盐酸多柔比星对 SKOV-3 细胞生长的抑制率为(72.8 ± 4.08)%。但 Se-PSP₂、Se-PSP₃ 和 Se-PSP₄ 三个组分两两比较,差异没有统计学意义(P > 0.05),同时

这三个组分别与 Se-PSP 总糖及 Se-PSP₁ 相比,抑制率均明显高于后两者(P < 0.05)。

2.3 不同质量浓度的 Se-PSP₂ 体外抑制 5 种肿瘤细胞的增殖

以质量浓度为 0.001、0.01、0.1、1、10、100 和 1 000 μg/ml 的 Se-PSP₂ 作用卵巢癌 SKOV-3 细胞、肝癌 HepG-2 细胞、胃癌 BGC-803 细胞、鼻咽癌 CNE 细胞和舌鳞癌 Tca-8113 细胞 72 h,随 Se-PSP₂ 质量浓度的增加,5 种细胞的存活率逐渐降低,抑制率逐渐增加,其抑制作用呈剂量依赖性(表 1)。

阳性药物盐酸多柔比星对卵巢癌 SKOV-3 细胞、肝癌 HepG-2 细胞、胃癌 BGC-803 细胞、鼻咽癌 CNE 细胞、舌鳞癌 Tca-8113 细胞的抑制率分别为(73.0 ± 5.07)%、(76.2 ± 4.08)%、(88.9 ± 1.77)%、(36.2 ± 3.21)%、(88.2 ± 3.09)%。

表 1 不同浓度的 Se-PSP₂ 对 5 种肿瘤细胞生长的抑制作用[($\bar{x} \pm s$)%]

Tab. 1 Inhibitory effects of different concentrations of Se-PSP₂ on growth of 5 different types of tumor cells [($\bar{x} \pm s$)%]

Se-PSP ₂ ($\rho_B/\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	SKOV-3*	HepG-2**	BGC-803 Δ	CNE $\Delta\Delta$	Tca-8113 \blacktriangle
0.001	22.9 ± 10.14	0.1 ± 3.15	8.7 ± 10.55	6.2 ± 4.73	14.2 ± 6.06
0.01	28.4 ± 5.98	1.2 ± 5.89	12.6 ± 5.88	7.7 ± 1.56	18.6 ± 3.56
0.1	34.2 ± 6.73	5.7 ± 5.96	13.2 ± 10.13	13.2 ± 3.44	20.7 ± 5.15
1	38.2 ± 7.15	12.5 ± 17.51	26.9 ± 5.26	19.6 ± 5.25	29.9 ± 6.62
10	44.9 ± 4.88	31.3 ± 7.88	33.5 ± 6.24	21.8 ± 1.99	34.7 ± 10.59
100	45.2 ± 4.41	38.6 ± 4.33	38.6 ± 5.26	22.2 ± 2.48	35.6 ± 8.01
1 000	44.5 ± 6.59	40.7 ± 6.65	38.7 ± 5.85	18.9 ± 4.12	30.3 ± 9.07

* F = 13.592 4, P < 0.000; ** F = 122.112 7, P < 0.000; Δ F = 24.849 1, P < 0.000 0; $\Delta\Delta$ F = 27.169 1, P < 0.000 2; \blacktriangle F = 11.027, P < 0.000

3 讨论

实验结果显示,质量浓度在 10 μg/ml 时, Se-PSP₁、Se-PSP₂、Se-PSP₃ 和 Se-PSP₄ 相对分子质量越小,对 SKOV-3 细胞增殖的抑制作用越强。这可能与相对分子质量小的 Se-PSP 更容易穿过生物膜进入胞质或核膜内发挥作用,更易干扰肿瘤细胞的增殖有关。图 1 和以往研究^[13]结果提示, Se-PSP₂、Se-PSP₃ 和 Se-PSP₄ 这 3 个组分的相对分子质量比较接近,穿过生物膜进入细胞的能力也应相近,可能是它们之间抑制率差异没有统计学意义的原因。但是由于 Se-PSP₂ 不仅抑菌活性强,而且含量大,是 Se-PSP 的主要成分,所以实验选用 Se-PSP₂ 作为螺旋藻硒多糖的抑瘤活性成分进行下一步的研究。

许多研究^[14-17]结果提示,PSP 抗肿瘤作用机制

主要集中在增强机体免疫功能上,PSP 通过促进 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞及 NK 细胞的增殖,刺激机体 IL-1、IL-2、TNF- α 及 IFN- γ 分泌等方面,提高机体细胞及体液免疫发挥抗肿瘤作用;同时这些研究还认为,PSP 体外对肿瘤细胞的增殖基本无直接抑制作用。本实验经过优化实验条件后提取的 Se-PSP₂ 不仅纯度高,而且体外可以直接抑制肿瘤细胞增殖;MTT 法检测能够证实 Se-PSP₂ 可抑制离体培养的多种肿瘤细胞增殖,此抑制作用呈剂量依赖趋势。同时 Se-PSP₂ 对不同的肿瘤细胞增殖的抑制率有所不同,其中对 SKOV-3 卵巢癌细胞抑制作用较强,抑制率最高达到(45.2 ± 4.40)%;对 CNE 鼻咽癌细胞抑制作用较弱,抑制率仅为(22.3 ± 2.48)%。这可能与提取过程中使用超声波处理,使 PSP 分子量及局部结构发生变化,加上硒^[18-20]元素的掺入,使得 Se-

PSP₂ 产生直接抑制肿瘤细胞增殖的功效,此结论尚待进一步研究证实。

分离纯化后的 Se-PSP₂,其纯度高,对多种肿瘤细胞的增殖均有抑制作用,有望成为治疗恶性肿瘤的辅助药物。通过 5 种肿瘤细胞抑制实验结果的分析,得出 Se-PSP₂ 有效浓度应在 10 μg/ml 以上;同时也发现,当浓度超过 1 mg/ml 时个别肿瘤细胞的抑制率有所下降,可能与部分糖作为能量促进细胞生长,相对抵消其抑制作用有关,该结论尚待进一步研究证实。Se-PSP 总糖经 DEAE-纤维素柱分离后,得到的 4 种组分为 Se-PSP₁、Se-PSP₂、Se-PSP₃、Se-PSP₄,其中 Se-PSP₂ 组分是 Se-PSP 总糖的主要成分(质量分数为 70.2%),与以往研究^[13]结果基本一致。本实验提取的多糖组分分子质量应与其接近,但在提取过程中,考虑超声波对大分子多糖的剪切作用,本实验提取硒多糖的相对分子质量偏小,故需进一步研究明确 Se-PSP 各组分分子质量的大小、元素组成及分子结构。

[参 考 文 献]

- [1] Thirunavukkarasu C, Premkumar K, Jagadeeswaran R, Sakthisekaran D. The inhibitory effect of sodium selenite on N-nitrosodiethylamine-induced and phenobarbital promoted liver tumorigenesis in rats based on the modulation of polyamine levels [J]. *Mol Cell Biochem*, 2005, 280(1/2): 165-172.
- [2] Plano D, Baquedano Y, Ibáñez E, Jiménez I, Palop JA, Spallholz JE, et al. Antioxidant-prooxidant properties of a new organoselenium compound library [J]. *Molecules*, 2010, 15(10): 7292-7312.
- [3] Dennert G, Horneber M. Selenium for alleviating the side effects of chemotherapy, radiotherapy and surgery in cancer patients [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2006, 3: 35-37.
- [4] Lobner M, Walsted A, Larsen R, Bendtzen K, Nielsen CH. Enhancement of human adaptive immune responses by administration of a high-molecular-weight polysaccharide extract from the cyanobacterium *arthrospira platensis* [J]. *J Med Food*, 2008, 11(2): 313-322.
- [5] 张志娟, 乔明霞, 郝言芝, 于蕾妍, 郭春生, 王清吉. 复合螺旋藻多糖对人肝癌 7402 细胞的抑制作用 [J]. *陕西医学杂志*, 2009, 38(3): 279-281.
- [7] Zhang WQ, Liu B, Yu H. Effects of the polysaccharides from *Spirulina platensis* on the activities of hepatitis B virus [J]. *J Microbiol Immunol*, 2005, 3(3): 211-218.
- [8] 左绍远, 钱金楸, 万顺康, 狄勇, 周静华. 钝顶螺旋藻多糖降血糖调血脂实验研究 [J]. *中国生化药物杂志*, 2000, 21(6): 289-291.
- [9] 黄智璇, 梅雪婷, 许东晖, 许实波, 吕军仪. 螺旋藻多糖和鼠尾藻多糖对四氧嘧啶致糖尿病大鼠血管的保护作用 [J]. *中国中药杂志*, 2005, 30(3): 211-215.
- [10] Majdoub H, Ben Mansour M, Chaubet F, Roudesli MS, Maaroufi RM. Anticoagulant activity of a sulfated polysaccharide from the green alga *arthrospira platensis* [J]. *Biochim Biophys Acta*. 2009, 1790(10): 1377-1381.
- [11] 尚俊英, 谢裕安, 杨帆, 李安娜. 螺旋藻多糖超声波提取方案的优化 [J]. *湖南师范大学学报(医学版)*, 2007, 4(3): 23-26.
- [12] 李志勇, 郭祀远, 李琳. 富硒螺旋藻培养技术研究 [J]. *水生生物学报*, 2001, 25(4): 386-391.
- [13] 孙远征, 张学成. 钝顶螺旋藻多糖及其抗肿瘤作用的研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2006.
- [14] Hirahashi J, Takayanagi A, Hishikawa K, Takase O, Chikaraishi A, Hayashi M, et al. Overexpression of truncated I kappa B alpha potentiates TNF-alpha-induced apoptosis in mesangial cells [J]. *Kidney Int*, 2000, 57(3): 959-968.
- [15] Shibata H, Kimura-Takagi I, Nagaoka M, Hashimoto S, Aiyama R, Iha M, et al. Properties of fucoidan from *cladosiphon okamurarms tokida* in gastric mucosal protection [J]. *Biofactors*, 2000, 11(4): 235-245.
- [16] Grzanna R, Polotsky A, Phan PV, Pugh N, Pasco D, Frondoza CG. Immolina, a high-molecular-weight polysaccharide fraction of *Spirulina*, enhances chemokine expression in human monocytic THP-1 cells [J]. *J Altern Complement Med*, 2006, 12(5): 429-435.
- [17] Reddy MC, Subhashini J, Mahipal SV, Bhat VB, Srinivas Reddy P, Kiranmai G, et al. C-Phycocyanin, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 304(2): 385-392.
- [18] Whanger PD. Selenium and its relationship to cancer: An update [J]. *British Journal of Nutrition*, 2004, 91(1): 11-28.
- [19] Zhao H, Whitfield ML, Xu T, Botstein D, Brooks JD. Diverse effects of methylseleninic acid on the transcriptional program of human prostate cancer cells [J]. *Mol Biol Cell*, 2004, 15(2): 506-519.
- [20] 王敏, 朱劲华, 马宇翔. 含硒紫球藻胞外多糖的制备及对体内外肿瘤细胞生长的影响 [J]. *海洋科学*, 2006, 30(1): 23-27.

[收稿日期] 2010-07-24

[修回日期] 2010-08-27

[本文编辑] 王莹