

龙葵多糖细胞毒活性物质基础研究

季宇彬^{1,2}, 袁会成^{1,2}, 高世勇^{1,2}, 孙海波^{1,2}

1. 哈尔滨商业大学 生命科学与环境科学研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076

2. 国家教育部抗肿瘤天然药物工程研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076

摘要: 目的 研究龙葵多糖细胞毒活性的物质基础。方法 从龙葵青果中分离出龙葵粗多糖; Sevage 法除去游离蛋白; 10% H₂O₂ 脱色, 95% 乙醇沉淀, 分离出龙葵多糖。龙葵多糖经 DEAE-52 纤维素柱色谱分离得多糖-蛋白复合物; 采用 SDS-PAGE 电泳法检测多糖-蛋白复合物是否为糖蛋白, 并测定其相对分子质量; MTT 法检测多糖-蛋白复合物对乳腺癌细胞 MCF-7 的 IC₅₀; 多糖-蛋白复合物再经 SephadexG-200 凝胶柱色谱精制, 采用 MTT 法进行活性检测。结果 SDS-PAGE 电泳法测得龙葵多糖-蛋白复合物是相对分子质量 3.0×10^4 和 2.5×10^4 的 2 种糖蛋白的复合物, 经 MTT 法测得其对乳腺癌细胞 MCF-7 的 IC₅₀ 为 804.51 $\mu\text{g/mL}$; 多糖-蛋白复合物经 SephadexG-200 凝胶柱色谱精制得糖蛋白 A、B, 并测得其对 MCF-7 的 IC₅₀ 分别为 532.96、613.91 $\mu\text{g/mL}$ 。结论 龙葵多糖细胞毒活性的物质基础是相对分子质量为 3.0×10^4 和 2.5×10^4 的 2 种糖蛋白。

关键词: 龙葵多糖; 糖蛋白; 乳腺癌细胞 MCF-7; 细胞毒活性; 物质基础

中图分类号: R282.710.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)11-2275-04

Material basis of cytotoxicity in polysaccharide from *Solanum nigrum*

Ji Yu-bin^{1,2}, YUAN Hui-cheng^{1,2}, GAO Shi-yong^{1,2}, SUN Hai-bo^{1,2}

1. Life Science and Environmental Science Research Center, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

2. Engineering Research Center of Natural Anticancer Drugs, Ministry of Education, Harbin 150076, China

Abstract: Objective To study the material basis of cytotoxicity in polysaccharide from *Solanum nigrum*. **Methods** Crude products of polysaccharide were isolated from *S. nigrum* fruit with free protein being removed by Sevage method. The crude products were decolorized by 10% H₂O₂ and precipitated by 95% ethanol treatment. Polysaccharide-protein complex was isolated by DEAE-52 fiber column and the relative molecular weight was detected by SDS-PAGE. MTT assay was used in detecting the cytotoxicity of polysaccharide-protein complex for MCF-7 cells *in vitro*. Then polysaccharide-protein complex was separated by SephadexG-200 gel column and the cytotoxicity was detected by MTT method. **Results** Polysaccharide-protein complex was isolated by DEAE-52 fiber column and the relative molecular weight was detected by SDS-PAGE as 3.0×10^4 and 2.5×10^4 for the two polysaccharide-protein complexes. It suggested that IC₅₀ was 804.51 $\mu\text{g/mL}$ by MTT. Glycoproteins A and B were gained by Sephadex G-200 gel column from polysaccharide-protein complex. The IC₅₀ of glycoproteins A and B were 532.96 and 613.91 $\mu\text{g/mL}$, respectively. **Conclusion** Material basis of cytotoxicity in polysaccharide from *S. nigrum* is two kinds of glycoproteins whose relative molecular weight are 3.0×10^4 and 2.5×10^4 .

Key words: polysaccharide from *Solanum nigrum* L.; glycoproteins; MCF-7 cells; cytotoxicity; material basis

植物多糖作为抗肿瘤制剂及肿瘤治疗的辅助制剂在临床上使用已非常普遍^[1-4], 且疗效确切。其抗肿瘤作用的基础研究近年来受到相关研究人员的高度关注, 产生了大量的研究成果, 植物多糖通过增强机体免疫力进而激活免疫系统的抗肿瘤理论已经为业内多数人士所认可^[5-8]。此外, 植物多糖以其细胞毒活性而发挥抗肿瘤作用的实验研究也陆续见诸

报道^[9-10], 但这一结论目前尚存在争议, 原因在于到目前为止尚无确切的证据证明和解释植物多糖对肿瘤细胞的细胞毒活性的具体物质基础及结构基础。本实验室开展多糖抗肿瘤研究多年^[11-14], 在研究过程中发现高纯度多糖成分对肿瘤细胞的细胞毒活性不及低纯度植物多糖的效果好^[15]。同时国外有研究显示植物糖蛋白对多种肿瘤细胞株具有较强抑

收稿日期: 2011-03-06

基金项目: 国家教育部博士点基金项目 (20102332110001, 20092332110001, 200802400001); 黑龙江省自然科学基金资助项目 (D200931)

作者简介: 季宇彬 (1956—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为抗肿瘤药物研究。

制作用^[16-17]。因此,笔者经过反复的论证后提出假设:植物多糖中的糖蛋白有较强的细胞毒活性,是近年来逐渐发现植物多糖具有细胞毒活性的物质基础。根据这一假设,本实验以从龙葵中提取的龙葵多糖和龙葵多糖糖蛋白为研究对象,观察龙葵多糖中的糖蛋白是否为龙葵多糖发挥细胞毒活性的物质基础。

1 材料

1.1 药材与试剂

龙葵青果,购于安徽省亳州市保华药业有限公司,经哈尔滨商业大学药学院鉴定教研室张德连教授鉴定为茄科一年生草本植物龙葵 *Solanum nigrum* L. 的果实。阿霉素, Pfizer Italia S. r. l (辉瑞公司,意大利),批号 9QL0141; DEAE-52, Whatman 公司产品; Sephadex G200, Pharmacia 公司产品; NaHCO_3 、硫酸、苯酚、葡萄糖、正丁醇、氯仿、无水乙醇、丙酮、石油醚、硝酸银等均为国产分析纯。

1.2 主要仪器

色谱柱 (55 cm×2.6 cm, 80 cm×1.6 cm), 上海康华生化仪器制造厂; 752 型紫外可见分光光度计, 上海光谱仪器有限公司; AR1140 型电子天平, 美国奥豪斯公司; 旋转蒸发仪, 天津玻璃仪器厂; DYCZ—24DN 型迷你双垂直电泳仪, 北京六一仪器厂; Allegra 64R 台式高速冷冻离心机, 美国贝克曼公司; CO—150 型 CO_2 培养箱, 美国 NBS 公司; 680 型酶标仪, 美国 Bio-Rad 公司。

2 方法与结果

2.1 龙葵多糖的提取

称取龙葵青果 200 g, 乙醇 4 °C 浸泡 7 d, 滤过收集残渣, 用 10 倍体积去离子水于 4 °C 浸泡 3 个月, 滤过收集滤液, 冷冻离心机 8 000 r/min 离心 10 min 后收集上清液, 去除沉淀, 旋转蒸发仪浓缩得上清液, 然后加入相当于水提液 4 倍体积的 95% 乙醇, 静止沉淀过夜, 滤过, 依次加入无水乙醇、丙酮和石油醚进行干燥得龙葵多糖粗提物^[18]。

2.2 龙葵多糖的初步精制

2.2.1 **Sevage 法除蛋白** 取龙葵多糖粗提物 5 g 溶于 100 mL 去离子水中, 加入体积为 20 mL 的 Sevage 液 (氯仿-正丁醇, 4:1), 震荡 5 min 后 4 000 r/min 离心 10 min 以除去水相与有机相间的游离蛋白, 反复操作 5 次。

2.2.2 **脱色** 将除去游离蛋白后的龙葵多糖粗品溶液用氨水调 pH 为 8~9, 加入 10% H_2O_2 50 mL, 在

50 °C 水浴中反应 2 h 后置于 4 °C 冰箱中静置 24 h。除去沉淀物, 放入透析袋中流水透析 3 d, 去离子水透析 1 d, 然后用 4 倍体积的 95% 乙醇沉淀, 分离出龙葵多糖。

2.3 龙葵多糖的 DEAE-52 纤维素柱色谱分离

初步精制的龙葵多糖进行 DEAE-52 (55 cm×2.6 cm) 柱色谱分离, DEAE-52 经活化后, 湿法装柱, 双蒸水平衡, 上样量为 1 mL, 样品质量浓度为 300 mg/mL, 依次用水以及 0.05、0.1、0.2、0.3、0.5、0.8 mol/L NaHCO_3 洗脱, 收集洗脱液, 每管 5 mL, 隔管紫外分光光度计检测 280 nm 处的吸光度 (*A*) 值, 同时用苯酚硫酸法于 490 nm 检测糖的量, 以 *A* 为纵坐标, 管数为横坐标做洗脱曲线。0.3 mol/L NaHCO_3 的洗脱管中 9~15 管洗脱峰在 280、490 nm 处重叠, 为糖蛋白的特征吸收。合并既有蛋白又有糖的检出管, 流水透析, AgNO_3 法检测至无 Cl^- 后, 冷冻干燥得一种具有糖蛋白特征吸收的多糖-蛋白复合物^[19]。结果见图 1。

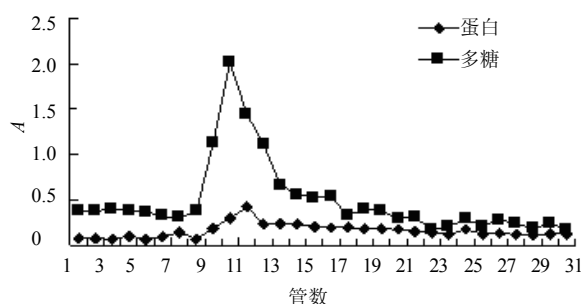


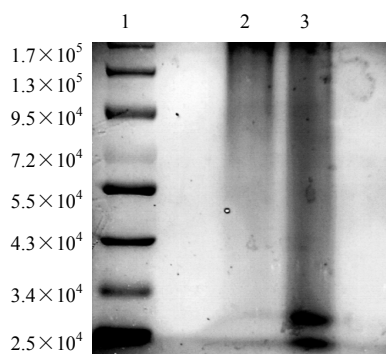
图 1 龙葵多糖的 DEAE-52 纤维柱色谱分离洗脱曲线

Fig. 1 Eluting curve of polysaccharide from *S. nigrum* by DEAE-52 fiber column

2.4 SDS-PAGE 电泳检测多糖-蛋白复合物^[20-21]

采用 SDS-PAGE 电泳法鉴定糖蛋白, 浓缩胶质量浓度为 5%, 分离胶质量浓度为 10%; 采用糖蛋白的特异性染色剂 Schiff's 试剂染色; 采用蛋白 Marker 作为相对分子质量标准, 溴酚蓝为指示剂, 指示剂迁移率为 1.0; 采用凝胶成像系统数据处理软件, 以蛋白 Marker 为标准, 求得糖蛋白的相对分子质量。

SDS-PAGE 电泳结果见图 2, 可知龙葵多糖-蛋白复合物是由 2 种低相对分子质量糖蛋白组成。采用凝胶成像系统, 以标准蛋白 Marker 相对迁移率为标准, 计算出这 2 种糖蛋白的相对分子质量分别约 3.0×10^4 、 2.5×10^4 。



1-Marker 2-水洗脱液 3-0.3 mol/L NaHCO₃ 洗脱液
1-Marker 2-aqueous elution 3-0.3 mol/L NaHCO₃ elution

图 2 龙葵多糖-蛋白复合物电泳图

Fig. 2 Electrophoretogram of polysaccharide-protein complex from *S. nigrum*

2.5 多糖-蛋白复合物的细胞毒活性

取处于对数生长期的乳腺癌 MCF-7 细胞，用 0.25% 胰蛋白酶消化，细胞计数并用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液调细胞浓度为 2×10^4 /mL，接种于 96 孔板，每孔 100 μ L，放置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h 后，每孔分别加入 25、50、100、200、400 μ g/mL 的药液 100 μ L，设 6 个平行孔。给药后于 37 $^{\circ}$ C 继续培养 72 h，弃上清液，每孔加入 200 μ L 新鲜配制的 0.5 mg/mL MTT，继续培养 4 h，弃上清液，每孔加 DMSO 150 μ L 溶解，微型振荡器振荡混匀，酶标仪测定 *A* 值，参考波长 490 nm，检测波长 570 nm，以 RPMI 1640 培养液作阴性对照，计算 IC₅₀^[22-23]。以阿霉素作阳性对照。MTT 法检测结果显示，龙葵多糖-蛋白复合物对乳腺癌 MCF-7 细胞的 IC₅₀ 为 804.51 μ g/mL，对照药阿霉素的 IC₅₀ 为 0.85 μ g/mL。

2.6 多糖-蛋白复合物的精制

取多糖-蛋白复合物 30 mg 溶于少量水中，用 Sephadex G-200 凝胶柱 (80 cm $\times$ 1.6 cm) 进行精制，水洗脱，收集洗脱液，在 280 nm 下测定蛋白的量；用苯酚硫酸法于 490 nm 检测糖的量。以 *A* 值为纵坐标，管数为横坐标做洗脱曲线。合并既有蛋白又有糖的检出管，流水透析至无 Cl⁻ 后，冷冻干燥。结果从多糖-蛋白复合物中得到龙葵糖蛋白 A、B。分别收集、合并 A、B 组分，透析，冷冻干燥得白色粉末。见图 3。

2.7 多糖-蛋白复合物中糖蛋白的细胞毒活性

MTT 法检测多糖-蛋白复合物中糖蛋白对 MCF-7

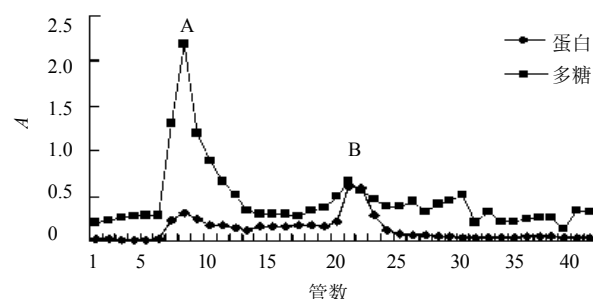


图 3 龙葵多糖蛋白 A 和 B 的 Sephadex G-200 凝胶柱洗脱曲线
Fig. 3 Eluting curve of glycoproteins A and B in polysaccharide from *S. nigrum* by Sephadex G-200 gel column

细胞的 IC₅₀，操作同“2.5”项。结果显示，龙葵糖蛋白 A 和 B 的 IC₅₀ 分别为 532.96、613.91 μ g/mL，阳性对照阿霉素的 IC₅₀ 为 0.84 μ g/mL。

3 讨论

根据文献报道及本实验室多年来对多糖研究的成果，笔者推断植物多糖中的糖蛋白可能有较强的细胞毒活性，是植物多糖细胞毒活性的物质基础。为验证这一推断，进行了本研究。首先通过水提醇沉的方法，得到龙葵多糖粗品，龙葵粗多糖经 DEAE-52 纤维素柱处理，在 280 nm 下测定蛋白的量，苯酚硫酸法于 490 nm 下检测糖的量，绘制各个浓度洗脱趋势图，结果发现在 0.3 mol/L NaHCO₃ 的洗脱趋势峰中，具有多糖-蛋白的特征吸收峰。合并既有蛋白又有糖的组分后透析、冷冻干燥得多糖-蛋白复合物。有文献报道龙葵糖蛋白对乳腺癌细胞 MCF-7 有细胞毒活性^[24]。因此本实验选用 MCF-7 细胞检测多糖-蛋白复合物是否具有细胞毒活性，测得 IC₅₀ 为 804.51 μ g/mL。SDS-PAGE 电泳结果和 MTT 检测结果表明，糖-蛋白复合物中发挥细胞毒活性的物质可能是糖蛋白，也可能是糖、蛋白和糖蛋白的混合物。因此笔者采用 Sephadex G-200 柱对多糖-蛋白复合物进行精制，结果得到糖蛋白 A 和糖蛋白 B。MTT 检测结果显示，这 2 个糖蛋白对 MCF-7 细胞的 IC₅₀ 分别为 532.96、613.91 μ g/mL。根据以上实验结果，可以推测龙葵多糖发挥细胞毒活性的物质基础是糖蛋白 A 和 B。

参考文献

- [1] Li J, Bao Y, Lam W, et al. Immunoregulatory and anti-tumor effects of polysaccharopeptide and *Astragalus* polysaccharides on tumor-bearing mice [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2008, 30(4): 771-782.
- [2] Liu X N, Zhang C Y, Jin X D, et al. Inhibitory effect of

- schisandrin B on gastric cancer cells *in vitro* [J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(48): 6506-6511.
- [3] Hu K, Liu Q, Wang S, *et al.* New oligosaccharides prepared by acid hydrolysis of the polysaccharides from *Nerium indicum* Mill and their anti-angiogenesis activities [J]. *Carbohydr Res*, 2009, 344(2): 198-203.
- [4] Ohashi Y, Watanabe M, Ikeda M, *et al.* Regression of metastatic hepatic cancer from gastric cancer by polysaccharide K and UFT administration—a case report [J]. *Gan To Kagaku Ryoho*, 2008, 35(13): 2409-2412.
- [5] Chen G Y, Shaw M H, Redondo G, *et al.* The innate immune receptor Nod1 protects the intestine from inflammation-induced tumorigenesis [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(24): 10060-10067.
- [6] Mills K H. Designer adjuvants for enhancing the efficacy of infectious disease and cancer vaccines based on suppression of regulatory T cell induction [J]. *Immunol Lett*, 2008, 122(2): 108-111.
- [7] Faber J, Vos P, Kegler D, *et al.* Beneficial immune modulatory effects of a specific nutritional combination in a murine model for cancer cachexia [J]. *Br J Cancer*, 2008, 99(12): 2029-2036.
- [8] 陶遵威, 郑奇, 邸明磊, 等. 植物多糖的研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2010, 33(2): 149-152.
- [9] 李楠, 王明和, 郭素华, 等. 巴戟天多糖含药血清对体外培养成骨细胞凋亡的保护作用观察 [J]. *中国骨伤*, 2008, 21(1): 39-41.
- [10] Wong V K, Yu L, Cho C H. Protective effect of polysaccharides from *Angelica sinensis* on ulcerative colitis in rats [J]. *Inflammopharmacology*, 2008, 16(4): 162-167.
- [11] 汲晨锋, 肖凤, 季宇彬. 青龙衣多糖对 S_{180} 小鼠红细胞 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶活性及 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响 [J]. *中草药*, 2008, 39(12): 1842-1844.
- [12] 季宇彬, 东方, 高世勇, 等. 野西瓜多糖诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡的实验研究 [J]. *中草药*, 2008, 39(9): 1364-1367.
- [13] 季宇彬, 高世勇. 羊栖菜多糖体外抗肿瘤作用及其作用机制研究 [J]. *中草药*, 2003, 34(12): 1111-1114.
- [14] 季宇彬, 高世勇, 张秀娟. 羊栖菜多糖体外抗肿瘤作用及其诱导肿瘤细胞凋亡的研究 [J]. *中草药*, 2003, 34(7): 638-640.
- [15] 张秀娟, 杨姗姗. 半枝莲多糖体内抗肿瘤及其免疫调节作用的实验研究 [J]. *亚太传统医药*, 2008, 4(2): 54-56.
- [16] Shim J U, Lim K T. Inhibitory effect of glycoprotein isolated from *Cudrania tricuspidata* bureau on expression of inflammation-related cytokine in bisphenol A-treated HMC-1 cells [J]. *Inflammation*, 2009, 32(4): 211-217.
- [17] Sarkar K, Goswami S, Roy S, *et al.* Neem leaf glycoprotein enhances carcinoembryonic antigen presentation of dendritic cells to T and B cells for induction of anti-tumor immunity by allowing generation of immune effector/memory response [J]. *Int Immunopharmacol*, 2008, 10(8): 865-874.
- [18] 叶振南, 邵家坪, 陆惠文. 粗多糖的提取、分离及结构研究 [J]. *中国药事*, 2000, 14(5): 239-332.
- [19] 龚钢明, 邵海, 张丽雯. 山药糖蛋白提纯工艺 [J]. *中国野生植物资源*, 2008, 27(6): 54-56.
- [20] Guerin-Dubiard C, Pasco M, Hietanen A, *et al.* Hen egg white fractionation by ion-exchange chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1090(10): 58-67.
- [21] 郭君. 蛋白质电泳实验技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2003.
- [22] 牛晓阁, 汪森明, 丁为民, 等. Apogossypolone 抑制乳腺癌 MCF-7 细胞增殖及诱导细胞凋亡 [J]. *肿瘤*, 2010, 30(12): 1022-1026.
- [23] 李健, 韩增胜, 李青旺. 龙葵多糖抗肿瘤和免疫调节作用的研究 [J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(33): 14589-14590.
- [24] Heo K S, Lee S J, Ko J H, *et al.* Glycoprotein isolated from *Solanum nigrum* L. inhibits the DNA-binding activities of NF- κ B and AP-1, and increases the production of nitric oxide in TPA-stimulated MCF-7 cells [J]. *Toxicol In Vitro*, 2004, 18(6): 755-763.