

野生仙人掌多糖对肺鳞癌细胞 SK-MES-1 生长的抑制作用

吴迪 魏斌 王双 孙海霞 辛毅 张翠丽[△]

(大连医科大学生物技术系 辽宁 大连 116044)

摘要 目的:探讨仙人掌多糖对体外肺鳞癌细胞(SK-MES-1)生长抑制作用。方法:体外培养 SK-MES-1 细胞,四甲基偶氮唑盐(MTT)法观察野生仙人掌多糖对其生长的抑制,计算最低抑制浓度及抑制率;观察不同浓度多糖对细胞形态的影响;SDS-PAGE 凝胶电泳分析不同组别蛋白质表达的差异。结果:野生仙人掌多糖 24 h 和 48 h 对肿瘤细胞的最低抑制浓度和抑制率分别为 0.0625 mg/ml、34.06%和 0.0625 mg/ml、35.37%;不同组间蛋白质表达有差异。结论:野生仙人掌多糖对 SK-MES-1 肺鳞癌细胞有抑制作用。

关键词: 仙人掌多糖; 肺鳞癌; 抑制作用; SDS-PAGE; 凝胶电泳

中图分类号: R734.2 R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2012)09-1651-04

The Inhibiting Effect of Wild Cactus Polysaccharide on Lung Squamous Carcinoma Cells (SK-MES-1)

WU Di, WEI Bin, WANG Shuang, SUN Hai-xia, XIN Yi, ZHANG Cui-li[△]

(Biotechnology Department, Dalian Medical University, Liaoning, Dalian, 116044, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the anti-tumor effect of wild Cactus polysaccharide on SK-MES-1 lung squamous carcinoma cells. **Methods:** SK-MES-1 cells were cultivated in vitro. MTT assay was used to detect the inhibition phenomena of wild Cactus polysaccharide on the growth of tumor cells, calculated the lowest inhibition concentration and tumor inhibitive ratio(IR). The influence of different concentrations of polysaccharide on cell shape was examined respectively. SDS-PAGE assay was used to estimate the difference of protein expression among each group. **Results:** The lowest inhibition concentration and IR of wild Cactus polysaccharide to SK-MES-1 for 24 h and 48h were 0.0625 mg/ml, 34.06% and 0.0625 mg/ml, 35.37%. The protein expression was different in each group. **Conclusion:** Wild Cactus polysaccharide had anti-tumor effect on lung squamous carcinoma cells.

Key words: Wild Cactus polysaccharide; Lung squamous carcinoma; Anti-tumor Effect; SDS-PAGE

Chinese Library Classification (CLC): R734.2 R285.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)09-1651-04

前言

仙人掌(*Opuntia dillenii*)为仙人掌科植物,味淡性寒,有抗炎、降血糖、抗溃疡等作用^[1]。能行气活血、清热解毒。有增强免疫、消肿止痛、健脾止泻、安神利尿、创伤愈合等功效^[2-6]。仙人掌多糖(*Opuntia dillenii* polysaccharide, ODP)在清除自由基、抗癌及提高机体免疫活性等方面均有作用^[7-8]。本文以仙人掌多糖为原料,探讨其体外抗肿瘤作用,为其进一步研发提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要设备 FA2004B 电子分析天平,上海精密科学仪器有限公司;E100 倒置相差显微镜,尼康仪器(上海)有限公司;SCC-A-700 洁净工作台,上海三超净化专业有限公司;RE-301 旋转蒸发器,北京瑞成伟业仪器设备有限公司;Thermo 酶标仪,赛默飞世尔科技(上海)有限公司。

1.1.2 药品和试剂 野生仙人掌,自备;RPMI1640 培养基、细胞

裂解液、胎牛血清(Thermo 公司),二甲基亚砜(DMSO)、胰蛋白酶(Sigma 公司),MTT(Amresco 公司),Marker(Takara 公司),其他均为国产分析纯。

1.1.3 细胞系 SK-MES-1 肺鳞癌细胞,大连医科大学组织胚胎学教研室惠赠。

1.2 实验方法

1.2.1 仙人掌多糖的提取 称取适量新鲜仙人掌,60℃干燥。称重后按 1:20 加入蒸馏水,75℃水浴浸提 2 h,冷却、过滤,滤渣重复提取 3 次,合并滤液,脱色素(活性炭)、除蛋白(Sevag 法)^[9]后,按照 1:4 加入 95%乙醇,静置过夜,4 000 rpm 离心 5 min,沉淀用无水乙醇、丙酮洗涤多次,冷冻干燥^[10]。

1.2.2 仙人掌多糖溶液的配制 以 0.2 mol/L 的 PBS (pH7.4) 溶液溶解,配制 4 mg/ml 的多糖液,4℃保存。

1.2.3 细胞培养 10%胎牛血清的 1640 培养液,常规培养细胞,每 2 d 传代换液 1 次。

1.2.4 生长抑制实验 取浓度为 5×10^4 个/ml 的对数生长期 SK-MES-1 细胞悬液,接种于 96 孔培养板(100 μ l/孔),培养至细胞贴壁后,实验组加入 100 μ l 不同终浓度(2 mg/ml、1 mg/ml、0.5 mg/ml、0.25 mg/ml、0.125 mg/ml、0.0625 mg/ml、0.03125 mg/ml、0.015625 mg/ml、0.0078125 mg/ml)的仙人掌多糖溶液培养基(每浓度设 3 个复孔),对照组加入等量的 PBS 缓冲液,继

作者简介:吴迪(1989-)男,大连医科大学 2008 级生物技术专业学生 E-mail:walterdi@163.com

[△]通讯作者:张翠丽 E-mail:biot_zhangcl@sina.com

(收稿日期:2011-09-14 接受日期:2011-10-10)

续培养 24h 和 48h ,弃去培养液 ,每孔加入 MTT 溶液(5 mg/ml) 20 μ l ,孵育 4 h ,吸弃 MTT 液 ,每孔加入 DMSO 100 μ l ,振荡溶解 10 min。492 nm 酶联免疫检测仪检测吸光度值(A)。

1.2.5 多糖对细胞生长形态的影响实验 取对数生长期的 SK-MES-1 肺鳞癌细胞 ,0.25%胰酶消化 ,调整浓度为 1×10^5 个/ml ,取 2 ml 该细胞悬液接种于培养瓶中 ,37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 条件下继续培养至细胞贴壁 ,弃去培养液 ,加入含有多糖浓度为 0.000 mg/ml 0.015 mg/ml、0.250 mg/ml、0.500 mg/ml 的胎牛血清培养液培养 12 h 和 24 h ,用 95%酒精固定 ,HE 染色后在 Nikon 倒置显微镜下观察细胞形态^[11]。

1.2.6 SDS-PAGE 凝胶电泳 取 0.062 5 mg/ml 多糖溶液作用 24 h 和 48 h 的细胞及对照组细胞 ,0.25%胰酶消化 ,4 $^{\circ}$ C、4 000 rpm 离心 5 min ,收集沉淀。加入 100 μ l 细胞裂解液 ,低温细胞破碎。用考马斯亮蓝法检测蛋白质含量。蛋白质上样量为 20 μ g ,分离胶浓度 10% ,电流 30 A 至溴酚蓝距底端 1 cm 处停止电泳 ,考马斯亮蓝染色^[12]。

1.2.7 细胞增殖抑制率计算公式

抑制率 =1- $\frac{\text{实验组 A 均值}}{\text{对照组 A 均值}} \times 100\%$

1.2.8 统计学分析 所有数据以 $\bar{X}\pm S$ 表示。显著性比较用 t 检验和 spss10.0 软件分析。

2 结果

2.1 不同浓度的野生仙人掌多糖对 SK-MES-1 细胞生长的影响

仙人掌多糖对 SK-MES-1 细胞生长均有一定的抑制作用 (表 1 表 2)。与对照组相比 ,各多糖组 OD492nm 值均有降低趋势 ,差异均有统计学意义 (P<0.01) ;多糖组间两两比较 ,除 0.25 mg/ml 和 0.125mg/ml 培养 24h 的结果差异不显著 ,其余均有统计学意义 (P<0.05)。同一浓度野生仙人掌多糖对 SK-MES-1 细胞的抑制率随时间延长而增加 ,除药物浓度为 0.0125mg/ml 比较差异无统计学意义外 ,其他各组不同时间有统计学意义(P<0.05)。

表 1 24 h 不同仙人掌多糖对 SK-MES-1 细胞生长抑制作用(n=3 $\bar{X}\pm S$)

Table 1 The Inhibiting effect of different Wild Cactus Polysaccharide on SK-MES-1 at 24 h

组别 Different group	药物浓度 mg/ml Concentration	吸光度 $\bar{X}\pm S$ Absorbance	生长抑制率% Inhibiting rate
1	2.00	0.089 $\pm$ 0.00024	67.52
2	1.00	0.113 $\pm$ 0.00016	58.79
3	0.50	0.129 $\pm$ 0.00011	52.97
4	0.25	0.149 $\pm$ 0.00018	45.70
5	0.125	0.152 $\pm$ 0.00057	44.61
6	0.0625	0.181 $\pm$ 0.00023	34.06
7	0.03125	0.214 $\pm$ 0.00029	22.30
8	0.015625	0.222 $\pm$ 0.00084	19.27
9	0.078125	0.268 $\pm$ 0.00015	2.55
10	0	0.275 $\pm$ 0.00017	0.00

表 2 48 h 不同仙人掌多糖对 SK-MES-1 细胞生长抑制作用(n=3 $\bar{X}\pm S$)

Table 2 The Inhibiting effect of different Wild Cactus Polysaccharide on SK-MES-1 at 48 h

组别 Different group	药物浓度 mg/ml Concentration	吸光度 $\bar{X}\pm S$ Absorbance	生长抑制率% Inhibiting rate
1	2.00	0.081 $\pm$ 0.00015	70.86
2	1.00	0.107 $\pm$ 0.00042	61.63
3	0.50	0.124 $\pm$ 0.00042	55.52
4	0.25	0.143 $\pm$ 0.00019	48.56
5	0.125	0.152 $\pm$ 0.00040	45.20
6	0.0625	0.180 $\pm$ 0.00049	35.37
7	0.03125	0.197 $\pm$ 0.00027	29.02
8	0.015625	0.216 $\pm$ 0.00107	22.30
9	0.078125	0.255 $\pm$ 0.00122	8.15
10	0	0.278 $\pm$ 0.00012	0.00

多糖浓度为 0.0625 mg/ml~2.0 mg/ml 时对其抑制作用较明显 ,随浓度增加对 SK-MES-1 细胞的抑制率增加(图 1)。

2.2 细胞形态变化

倒置显微镜观察 ,空白对照组细胞排列紧密 ,边界清楚 ,核

分裂多见 ,部分细胞重叠生长。多糖浓度为 0.015 mg/ml 组的细胞排列较紧密 ,边界较清楚 ,核分裂多见 ,与空白组相比差别不明显。0.25 mg/ml 组细胞排列逐渐稀疏 ,边界较模糊 ,核分裂相减少 ,核固缩明显增多 ,胞浆内多见空泡变性细胞膜出现棱角

状。0.5 mg/ml 组细胞生长十分稀疏 细胞不完整 核固缩现象多见 胞浆内多量空泡变性 细胞形状改变。出现部分细胞胞膜破损现象。伴随培养时间的增加 现象愈加显著(以 0.5 mg/ml 多糖组为例 图 2)。

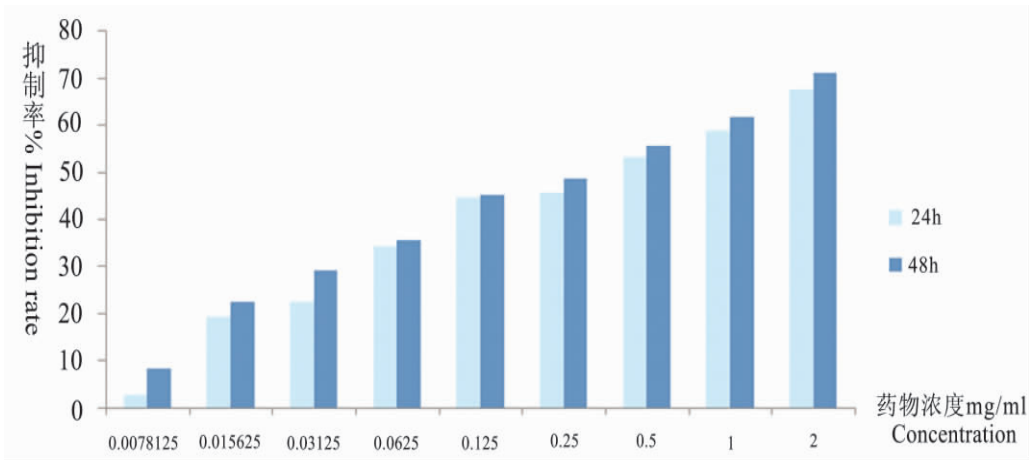


图 1 24 h 和 48 h 野生仙人掌多糖对肿瘤细胞的抑制率
Fig.1 Inhibiting rate of different Wild Cactus Polysaccharide on SK-MES-1 at 12 h and 48 h

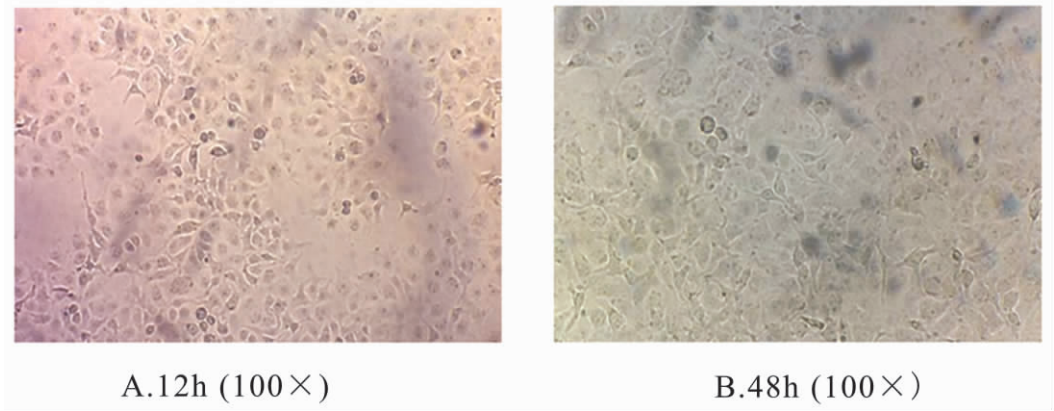


图 2 0.5 mg/ml 仙人掌多糖对 SK-MES-1 细胞形态的影响
Fig.2 The effect on the cell form of Wild Cactus Polysaccharide (0.5 mg/ml) on SK-MES-1 at 12 h and 48 h

2.3 SDS-PAGE 凝胶电泳

2.3.1 蛋白含量测定 考马斯亮蓝法测得对照组、24 h 及 48 h 组蛋白浓度分别为 1.23 mg/ml、3.23 mg/ml、1.28 mg/ml(图 3)。

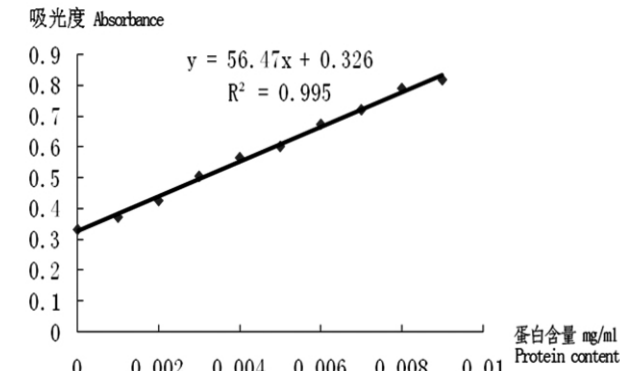


图 3 蛋白标准曲线
Fig.3 Standard curve of protein

2.3.2 SDS-PAGE 电泳 野生仙人掌多糖作用的 SK-MES-1 细胞,蛋白质表达有较明显的变化。加入多糖培养的细胞,蛋白质含量高于对照组;分子量在 55KD~43KD 之间的蛋白质,药物

作用后含量增加;而 43KD~34KD 之间的某些蛋白质,24h 的含量高于对照组,48 h 组则低于对照组(见图 4)。

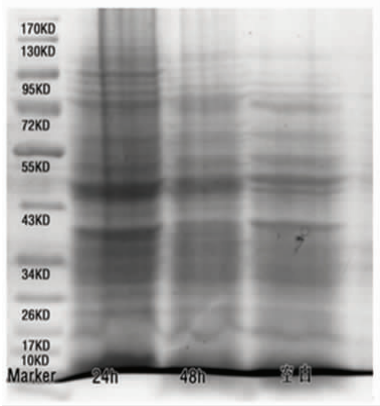


图 4 SDS-PAGE 电泳
Fig.4 Electrophoresis of SDS-PAGE

3 讨论

仙人掌作为天然中草药,含有有机酸类、甾醇类、黄酮类、生物碱类、糖类和萜类。具有作用范围广、副作用小等优点。仙

人掌的药用价值最早记载于清代赵学敏所著的《本草纲目拾遗》。仙人掌中多糖含量较高,平均干重得率为 8.53%^[13]。仙人掌多糖不仅可作为广谱免疫促进剂,调节免疫功能,还具有抗感染、抗放射、抗凝血、抗肿瘤、降血脂,促进核酸与蛋白质的生物合成作用^[8,14]。

恶性肿瘤已经成为导致人类死亡的主要原因之一,每年全世界约有 700 万人死于癌症。尽管与一些发达国家相比,我国恶性肿瘤死亡率占总死亡的比例相对较低,但在各种死因中也已经排在第二位^[15]。本实验结果表明,MTT 法测定不同野生仙人掌多糖对 SK-MES-1 肺鳞癌细胞的生长具有抑制作用,呈现剂量正相关,多糖浓度达 0.0625 mg/ml 时即有良好的抑制作用。且随作用时间的延长抑制率增高。SDS-PAGE 电泳结果显示,多糖作用 24 h 和 48 h 后与对照组相比,分子量在 55KD~43KD 和 43KD~34KD 的两个区间的蛋白质表达有不同的变化,可能与细胞生长受到抑制及抑制效果有关,尚需进一步研究。本结果初步表明野生仙人掌多糖对肺鳞癌细胞生长有一定的抑制作用,为仙人掌多糖的抗肿瘤作用提供了基础依据。

参考文献(References)

- [1] Laurenz JC, Collier CC, Kuti JO. Hypoglycaemic effect of *Opuntia lindheimeri* Engelm in a diabetic pig model [J]. *Phytother Res*, 2003, 17(1): 26-29
- [2] Qiu Y, Chen Y. Constituents with radical scavenging effect from *Opuntia Dillenii*. Structures of new alpha-pyrone and flavonol glycoside[J]. *Chem pharm bull(Tokyo)*, 2002, 50(11): 1507-1510
- [3] 谷江霞, 龚德强. 食用仙人掌降糖活性成分研究[J]. *中国现代中药*, 2007, 9(11): 15-16
Gu Jiang-xia, Dou De-qiang. Studies on the Anti-diabetic Components of *Opuntia Milpa Aim Haw* [J]. *Modern Chinese Medicine*, 2007, 9(11): 15-16
- [4] 韦国锋, 韦启后, 黄祖良, 等. 仙人掌总黄酮的提取及其镇痛作用研究[J]. *右江民族医学院学报*, 2006, 26(6): 779-781
Wei Guo-feng, Wei Qi-hou, Huang Zu-liang et al. The extraction of total flavone from *Opuntia dillenii* Haw and the analgesic effect of total flavone on mice [J]. *Journal of Youjiang Medical College for Nationalities*, 2006, 26(6): 779-781
- [5] 陈世兴, 王亮, 杨哲, 等. 仙人掌提取物对浅度烫伤小鼠 VEGF 及 FGF-2 表达的影响[J]. *天然产物研究与开发*, 2011, 23(2): 246-249
Chen Shi-xing, Wang Liang, Yang Zhe, et al. Effect of Cactus Extracts on the Expression of VEGF and FGF-2 in Rats with Superficial Second-degree Burns [J]. *Nat Prod Res Dev*, 2011, 23(2): 246-249
- [6] 韦国锋, 李振中, 黄祖良等. 仙人掌药用成分的提取及其镇痛作用的实验研究[J]. *时珍国医国药*, 2006, 17(11): 2133-2134
Wei Guo-feng, Li Zhen-zhong, Huang Zu-liang, et al. Studies on Extraction and Analgesic Effect of Medicinal Components in *Opuntia dillenii* Haw [J]. *lishizhen medicine and material medica research*, 2006, 17(11): 2133-2134
- [7] 史德芳, 杨洋, 任红, 等. 仙人掌多糖的提取及其对自由基的清除作用[J]. *四川食品与发酵*, 2006, 42(130): 42-45
Shi De-fang, Yang Yang, Ren Hong, et al. Extraction of Polysaccharide from Cactus and the Effect of Scavenging Free Radicals[J]. *Sichuan Food and Fermentation*, 2006, 42(130): 42-45
- [8] 王素芳, 黄娇. 仙人掌多糖的研究进展[J]. *中国生化药物杂志*, 2006, 27(3): 186-187
Wang Su-fang, Huang Jiao. Development of research on opuntia polysaccharides [J]. *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics*, 2006, 27(3): 186-187
- [9] 孙晓雪, 孙卫东, 史德芳, 等. 仙人掌多糖提取过程中脱蛋白方法的研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2007, 19: 117-119
Sun Xiao-xue, Sun Wei-dong, Shi De-fang. Protein Removal from Polysaccharide Extract of Cactus [J]. *Nat Prod Res Dev*, 2007, 19: 117-119
- [10] 高宛莉, 王丽, 杜瑞卿. 仙人掌多糖提取工艺优化 [J]. *农技服务*, 2009, 26(11): 133-134
Gao Wan-li, Wang Li, Du Rui-qing. Study on the Optimization of Extraction of Polysaccharides in Cactus [J]. *Service of Agricultural Technique*, 2009, 26(11): 133-134
- [11] 梁蓓蓓, 刘华钢. 天然药物抗肿瘤作用的研究进展 [J]. *中国肿瘤*, 2007, 9(16): 705-708
Liang Bei-bei, Liu Hua-gang. Research Progress of Natural Antitumor Medicine[J]. *China Cancer*, 2007, 9(16): 705-708
- [12] 郭晓君. 蛋白质电泳实验技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2005: 123-157
Guo Xiao-jun. The experiment technology of protein electrophoresis [M]. Beijing: Science Press, 2005: 123-157
- [13] 蒋长明, 唐孟忠, 刘树兴. 仙人掌多糖提取工艺的研究 [J]. *农产品加工·学刊*, 2009, 6(6): 72-74
Jiang Chang-ming, Tang Meng-zhong, Liu Shu-xing. Study on the Extracting Technology of *Opuntia* Polysaccharides [J]. *Academic Periodical of Farm Products Processing*, 2009, 6(6): 72-74
- [14] 韩淑琴, 杨洋, 黄涛, 等. 仙人掌提取物的抑菌机理 [J]. *食品科技*: 2007, (3): 130-134
Han Shu-qin, Yang Yang, Huang Tao, et al. The bacteriostatic mechanism of the cactus extracts [J]. *Food Science and Technology*, 2007, (3): 130-134
- [15] 伊焕发, 唐军民, 唐岩等. 人外周血树突状细胞与人肺鳞癌细胞的融合研究[J]. *解剖学报*, 2003, 34(5): 496-499
Yi Huan-fa, Tang Jun-min, Tang Yan, et al. Study on Fusion of Human Lung Squamous Cancer Cells With Peripheral Blood Dendritic Cells[J]. *Acta Anatomica Sinica*, 2003, 34(5): 496-499