

海胆黄多糖SEP对S180的体内抑制作用

高宇 虞剑 李冰 康迪 王慧

窦洁 周伟东 奚涛* 周长林*

(中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009)

摘要 研究海胆黄多糖SEP对S180肉瘤的抑制作用及初步机制。MTT法检测SEP对体外培养S180细胞生长的抑制作用; 建立小鼠S180肉瘤模型观察SEP抗肿瘤活性; 检测SEP协同ConA/LPS刺激小鼠脾淋巴细胞增殖作用; 同时, 考察SEP对NK细胞和杀伤性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)活性的影响; 碳粒廓清检测SEP对小鼠单核巨噬细胞吞噬功能的影响。研究表明, 海胆黄多糖SEP高中低剂量(16、8、4 mg/kg)显著抑制小鼠S180实体瘤生长, 增加小鼠脾指数和胸腺指数, 协同ConA/LPS刺激小鼠脾淋巴细胞增殖, 提高小鼠NK细胞和CTL活性, 增强小鼠单核巨噬细胞的吞噬功能, 通过免疫调节提高小鼠免疫功能达到抑制S180作用。

关键词 海胆黄多糖SEP; 抗肿瘤; 免疫调节; NK细胞和CTL活性

多糖不仅是参与构成生命的基本物质, 还具有作为细胞骨架、传递细胞间信号等功能, 更重要的是多糖在机体中的免疫调节, 增强细胞抗肿瘤活性等方面具有的重要生物活性。大量研究表明, 多糖具有抗氧化、抗炎、抗辐射等活性^[1-4]。海胆属于棘皮动物门海胆纲。海胆黄营养丰富, 是人们喜爱的食品之一, 食后能明显促进性功能, 安神补血, 提高机体免疫力^[5]。从有毒的绿海胆(*Strongylocentrotus droebachiensis*)中分离得到的Stongylostain 1和2, 是具有抗肿瘤活性的糖蛋白^[6]。从大连紫海胆的海胆黄中提取的多糖具有抗肿瘤作用^[7]。我国海胆资源丰富, 因此从海胆中寻找具有抗肿瘤活性多糖, 意义重大。本研究考察从光棘球海胆(*Strongylocentrotus nudus*)中提取的海胆黄多糖SEP对S180的体内抑制作用, 为SEP作为抗肿瘤药物开发提供实验依据。

1 材料与实验方法

1.1 材料

1.1.1 海胆 新鲜海胆采自大连, 经鉴定为光棘球海胆。

1.1.2 试剂 Cellulose DE-52购于Waterman公司; Sephacryl S-400 HR购于GE Healthcare公司; MTT购于Biosharp公司; 环磷酰胺购于江苏恒瑞医药股份有限公司; LPS、ConA购于Sigma公司; RPMI 1640、DMEM高糖培养基、新生小牛血清均购于GIBCO公司。

1.1.3 动物及细胞株 ICR小鼠购自南通大学实

验动物中心, 合格证号: SOXK(苏)20080010。

S180肉瘤细胞由中国药科大学药理教研室提供; YAC-1小鼠淋巴瘤细胞购自中科院上海生物化学与细胞生物学研究所。

1.2 方法

1.2.1 SEP的提取 新鲜海胆黄经丙酮脱脂、热水浸提(75 mL/g, 90 °C, 6 h)、去蛋白(木瓜蛋白酶——Sevag法, 5次)、浓缩、乙醇沉淀、Cellulose DE52离子交换柱层析、Sephacryl S-400凝胶过滤柱层析、干燥后溶解透析(分子量14 000), 冷冻干燥后得到SEP。

1.2.2 SEP多糖纯度测定 采用Shodex KS-805色谱柱, 2414示差折光检测器, 流动相为双蒸水, 5.0 mg/mL进样量20 μ L, 流速1 mL/min, 柱温30 °C, 记录样品色谱曲线。

1.2.3 SEP对体外培养的S180细胞生长影响 采用MTT法测定。取对数生长期S180肿瘤细胞, 离心收集细胞, 用含有10% FBS的RPMI-1640培养基调整细胞浓度为 1×10^4 /mL, 在96孔板上每孔加入细胞悬液100 μ L, 37 °C、5% CO₂培养24 h后, 每孔加入SEP (50、100、150、200 μ g/mL) 100 μ L, 并以顺铂(Cisplatin, 0、5、10、15、25、50、100 μ g/mL)作为阳性对照, 培养20 h后弃上清, 加入80 μ L的新鲜培养液, 再每孔

收稿日期: 2011-04-29 接受日期: 2011-06-10

“重大新药创制”科技重大专项(No.2009ZX09103-655)和国家自然科学基金(No.J0630858)资助项目

*通讯作者。Tel: 025-83271323, E-mail: xitao_18@hotmail.com; Tel: 025-83271323, E-mail: cl_zhou@cpu.edu.cn

加入5 mg/mL的MTT 20 μ L, 继续培养4 h, 弃上清, 每孔加入DMSO 150 μ L, 酶标仪570 nm处测吸光值。

1.2.4 SEP对S180体内抑制作用 选择接种S180 7 d的小鼠, 消毒腹部皮肤, 抽取腹水, 生理盐水稀释, 台盼蓝染色后显微镜下计数, 活细胞数为98%以上, 调整细胞浓度为 1×10^7 /mL。取ICR小鼠60只, 随机分为6组: 正常对照组、模型组、环磷酰胺阳性对照及SEP高中低剂量组, 称重并记录。除正常对照组外, 于其他各组小鼠右前肢腋窝皮下接种0.2 mL肿瘤细胞悬液。接种24 h后开始给药, 正常对照组和模型组均给等量的生理盐水, 环磷酰胺组剂量为20 mg/(kg·d), SEP高、中、低三个剂量组分别为16、8、4 mg/(kg·d)。尾静脉注射(iv), 每天固定时间给药一次, 连续10 d。

末次给药24 h后称体重, 颈椎脱臼处死小鼠, 摘取瘤块、脾脏及胸腺并称量, 计算抑瘤率、脾指数及胸腺指数。公式如下:

抑瘤率=[1-给药组小鼠平均体重(g)/肿瘤对照组平均瘤重(g)] \times 100%

脾指数=小鼠的脾重(mg)/小鼠的体重(g)

胸腺指数=小鼠的胸腺重(mg)/小鼠的体重(g)

1.2.5 SEP对ConA/LPS诱导脾淋巴细胞增殖的影响 各组实验小鼠, 颈椎脱臼处死, 分别无菌制备脾淋巴细胞悬液, 用含有10% FBS的RPMI-1640培养液调整细胞浓度为 5×10^5 /mL。在96孔培养板每孔加入100 μ L细胞悬液, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养24 h后分别加入ConA (5 μ g/mL)或LPS (4 μ g/mL)继续培养, 44 h后离心弃上清, 加入80 μ L的新鲜培养液, 再每孔加入5 mg/mL的MTT 20 μ L, 继续培养4 h, 弃上清, 每孔加入DMSO 150 μ L, 酶标仪570 nm处测吸光值。

1.2.6 SEP对NK细胞与CTL活性影响 (1) SEP对NK细胞活性影响。各组小鼠颈椎脱臼处死, 常规制备无菌脾细胞悬液, 5% FBS的RPMI 1640培养液, 调整细胞浓度为 1×10^6 /mL作为效应细胞, 靶细胞为对数生长期的Yac-1细胞。先取脾细胞悬液100 μ L加入96孔培养板中。同时设不加靶细胞的效应细胞对照孔和不加效应细胞的靶细胞对照孔, 各3副孔。每组测定孔加入YAC-1靶细胞 1×10^5 /mL 100 μ L, 以培养液将其他各孔补至200 μ L, 分别培养6 h。将反应板离心去上清, 每孔加入MTT (5 mg/mL) 20 μ L, 继续培养4 h, 离心去上清, PBS清洗效应细胞和被杀伤的靶细胞, 每孔加入DMSO 150 μ L, 酶标仪570 nm处分别测实验组、靶细胞、效应细胞D值, 结果以NK细胞活性表示:

NK细胞的活性(%)=[1-(D_{实验组}-D_{效应细胞})/D_{靶细胞}] \times 100%

(2) SEP对CTL活性影响。实验方法同SEP对NK细胞活性影响测定。靶细胞为对数生长期的S180细胞, 效应细胞: 靶细胞为10:1, 检测方法同上。结果以CTL活性表示:

CTL细胞的活性(%)=[1-(D_{实验组}-D_{效应细胞})/D_{靶细胞}] \times 100%

1.2.7 SEP对小鼠单核巨噬细胞功能影响 碳粒廓清法。经尾静脉注射稀释的印度墨汁, 5 μ L/g, 待墨汁注射完毕, 立即计时。于2 min (t_1)和5 min (t_2)分别从眼眶后静脉丛取血20 μ L, 加到2 mL Na₂CO₃ (0.1%) 溶液中, 摇匀。以Na₂CO₃溶液调零, 650 nm处测吸光度, 计算如下:

廓清指数K=(lgD₁-lgD₂)/(t_2 - t_1)

吞噬指数 α =体重/[(肝重+脾重) \times 3K]

2 结果

2.1 SEP高效液相色谱

高效液相色谱显示, 纯化得到的SEP纯度为94.6% (图1)。

2.2 SEP对体外培养的S180细胞生长影响

与阳性对照顺铂相比, SEP在50、100、150、200 μ g/mL时, 对体外培养的S180细胞生长没有抑制作用, 顺铂对肿瘤细胞有直接杀伤作用, 说明SEP的抗肿瘤作用不是直接杀伤肿瘤细胞(图2)。

2.3 SEP对S180体内抑制作用

如表1所示, 与模型组相比, 不同剂量(16、8、4 mg/kg)的SEP均可明显抑制对小鼠S180实体瘤生长

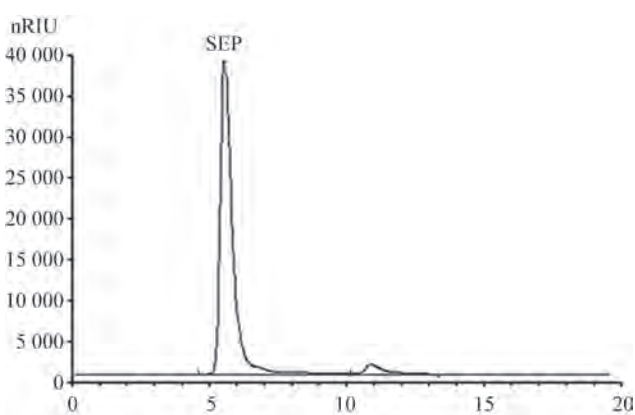
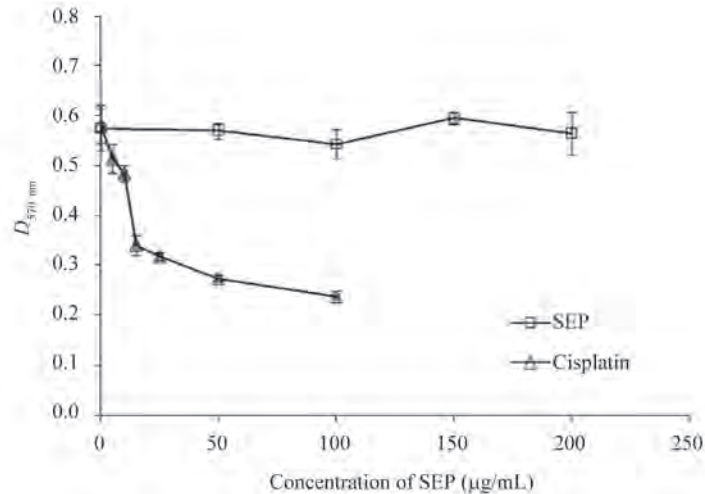


图1 SEP高效液相色谱

Fig.1 HPLC of SEP



体外培养的S180细胞分别用SEP (0、50、100、150、200 µg/mL)、Cisplatin (0、5、10、15、25、50、100 µg/mL)刺激20 h后MTT法测吸光度变化。S180 cells *in vitro* treated by SEP (0, 50, 100, 150, 200 µg/mL) and Cisplatin (0, 5, 10, 15, 25, 50, 100 µg/mL) for 20 h, then change of absorbance was assayed by MTT method.

图2 SEP对体外培养的S180细胞生长影响
Fig.2 Influence of SEP on S180 growth *in vitro*

表1 SEP对小鼠S180实体瘤的抑制作用 (n=10, $\bar{x}\pm s$)

Table 1 Inhibitory effect of SEP on S180 tumor bearing mice (n=10, $\bar{x}\pm s$)

组别	剂量(mg/kg)	瘤重(g)	脾指数(mg/g)	胸腺指数(mg/g)	抑制率(%)
Group	Dose (mg/kg)	Tumor weight (g)	Spleen index (mg/g)	Thymus index (mg/g)	Inhibitory rate (%)
Control	—	—	6.02 ± 0.03	1.40 ± 0.01	—
Tumor control	—	1.14 ± 0.12	7.5 ± 0.06	1.20 ± 0.01	—
CTX	20	0.30 ± 0.07**	5.39 ± 0.07	1.07 ± 0.01	73.6
	16	0.38 ± 0.07**	10.59 ± 0.03 ^{##}	1.96 ± 0.02 ^{##}	66.9
SEP	8	0.40 ± 0.12**	9.31 ± 0.07 ^{##}	1.35 ± 0.02 [#]	65.1
	4	0.58 ± 0.15**	8.78 ± 0.05 ^{##}	1.53 ± 0.02 [#]	49.3

注: 与荷瘤鼠对照, 瘤重差异, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与环磷酰胺对照, 脾指数与胸腺指数差异, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$ 。

Note: compared with tumor control group, difference of tumor weight, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; compared with CTX group, difference of spleen index and thymus index, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$.

($P<0.01$), 且成剂量依赖性。与环磷酰胺组(20 mg/kg)相比, SEP能够显著增加小鼠脾指数和胸腺指数 ($P<0.01$), 环磷酰胺虽抑瘤率较高, 但小鼠的脾指数和胸腺指数都有所下降。可见, SEP对小鼠S180实体瘤有明显抑制作用, 且能增强小鼠免疫功能。

2.4 SEP协同ConA/LPS诱导脾淋巴细胞增殖

与模型组对照, 在ConA/LPS诱导下, SEP给药小鼠脾淋巴细胞显著增殖, 且呈剂量依赖关系; 环磷酰胺组的脾淋巴细胞增殖能力明显低于空白对照组及各SEP组, 说明SEP可以增强小鼠的免疫功能, 提高淋巴细胞增殖能力(图3)。

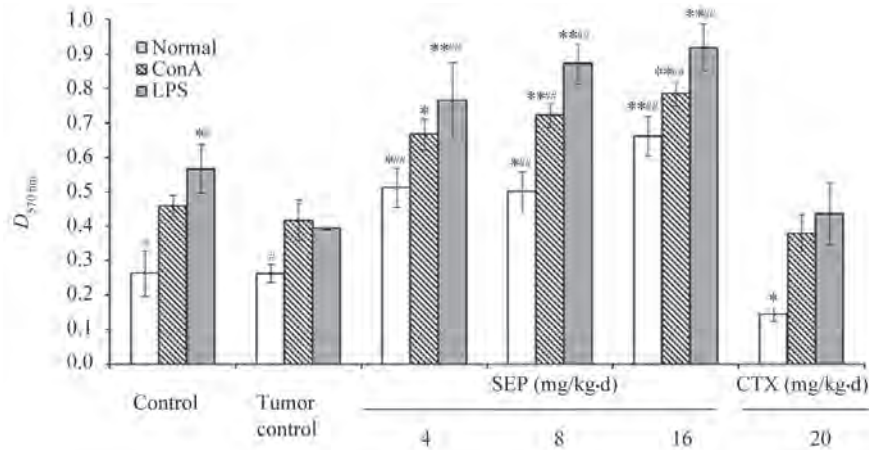
2.5 SEP对NK细胞与CTL活性影响

NK细胞杀伤活性可以表示机体固有免疫功能的强弱, 用YAC-1小鼠淋巴瘤细胞做靶细胞, 检测

SEP对NK细胞杀伤活性影响。CTL是获得性免疫系统一部分, 用S180细胞做靶细胞, 检测SEP对CTL活性影响。如表2, 实验结果表明, SEP能够明显提高荷瘤鼠的NK细胞活性, 且成剂量依赖; 同时能够提高CTL活性, 中剂量最高。同环磷酰胺组对照, SEP高剂量和中剂量的NK细胞活性与CTL活性均有显著性差异($P<0.01$)。

2.6 SEP对小鼠单核巨噬细胞吞噬功能的影响

SEP的3个剂量组吸光度随时间减少, 数值降低较快, 说明碳粒在血液中的消失速度快。如表3, 与荷瘤鼠对照, SEP各组的廓清指数K和吞噬指数 α 均显著提高, 与空白组对照, 廓清指数K有显著提高, 吞噬指数 α 接近于空白组。说明SEP能够增强荷瘤鼠单核巨噬细胞系统的吞噬功能。



各组实验小鼠脾细胞分别与培养液/ConA (5 $\mu\text{g/mL}$)/LPS (4 $\mu\text{g/mL}$)培养, MTT法测吸光度变化。与荷瘤鼠对照, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与环磷酰胺对照, # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$ 。

Mice spleen lymphocytes of each experiment group were cultured with medium/ConA (5 $\mu\text{g/mL}$)/LPS (4 $\mu\text{g/mL}$), and change of absorbance was assayed by MTT method. Compared with tumor control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; compared with CTX group, # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$.

图3 SEP协同ConA/LPS诱导脾淋巴细胞增殖

Fig.3 Synergism effect of SEP on spleen lymphocyte proliferation induced by ConA/LPS

表2 NK细胞活性及CTL活性($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

Table 2 NK cells activity and CTL activity ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(mg/kg)	NK细胞活性(%)	CTL活性(%)
Group	Dose (mg/kg)	NK cells activity (%)	CTL activity (%)
Control		41.11 \pm 1.10 [#]	50.46 \pm 1.83 [#]
Tumor control		44.00 \pm 0.99 ^{##}	45.34 \pm 0.96
CTX	20	38.95 \pm 0.32 ^{**}	44.89 \pm 1.14 [*]
	16	60.97 \pm 2.80 ^{***}	61.38 \pm 1.05 ^{***}
	8	56.47 \pm 0.50 ^{***}	63.75 \pm 1.61 ^{***}
SEP	4	49.08 \pm 0.80 [#]	57.67 \pm 1.68 ^{**}

注: 与荷瘤鼠对照, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与环磷酰胺对照, # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$ 。

Note: compared with tumor control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; compared with CTX group, # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$.

表3 SEP对小鼠单核巨噬细胞吞噬功能的影响($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

Table 3 Influence of SEP on the phagocytic function of mice mononuclear macrophages ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(mg/kg)	廓清指数 K	吞噬指数 α
Group	Dose (mg/kg)	Carbon expurgation Index K	Phagocytic index α
Control		0.044 \pm 0.001 ^{**}	4.984 \pm 0.73 ^{**}
Tumor control		0.013 \pm 0.005 [#]	3.067 \pm 1.25 ^{##}
CTX	20	0.012 \pm 0.003 ^{***}	3.689 \pm 0.98 ^{***}
	16	0.028 \pm 0.013 ^{***}	4.104 \pm 1.04 ^{**}
	8	0.037 \pm 0.010 ^{***}	4.548 \pm 0.89 ^{**}
SEP	4	0.041 \pm 0.002 ^{***}	4.037 \pm 1.34 [*]

注: 与荷瘤鼠对照, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与空白对照, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

Note: compared with tumor control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; compared with control group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

3 讨论

多糖的抗肿瘤途径主要是抑制肿瘤细胞的生长、蛋白质及核酸的合成, 诱导肿瘤细胞凋亡、影响癌基因表达及改变肿瘤细胞膜的生长特性等^[8]。

本研究通过建立小鼠S180肉瘤模型观察SEP对其抑制作用, 发现SEP剂量依赖抗肿瘤, 与环磷酰胺组相比, 显著提高荷瘤鼠脾指数和胸腺指数。SEP可以使T细胞显著增殖, 对B细胞增殖作用小于T细胞的

增殖作用, 增殖的T细胞主要分化成Th1细胞, 某些疾病的发病机制与Th1与Th2之间含量的失衡有关^[9], SEP具有调节Th1与Th2含量失衡的潜力。

机体免疫系统由固有免疫和获得性免疫组成, 其中NK细胞杀伤活性和单核巨噬细胞吞噬功能是反映机体固有免疫的重要指标^[10], 一些活性多糖通过提高机体内巨噬细胞过氧化酶活性和吞噬功能, 加强其细胞毒作用^[11]。SEP能剂量依赖提高小鼠NK细胞杀伤力; 碳粒廓清结果表明, SEP明显提高廓清指数K和吞噬指数 α , 增强小鼠单核巨噬细胞吞噬功能, 巨噬细胞可以通过吞噬功能杀伤肿瘤细胞, 也可以产生多种细胞因子, 如TNF- β , TNF- β 对肿瘤细胞和病毒感染细胞有抑制生长和细胞毒作用, 对T细胞生长有协同刺激作用。目前, 在医学基础与临床研究中重视CTL活性, 将其作为了解机体获得性免疫功能的指标之一, SEP能够剂量依赖增加荷瘤鼠CTL活性, 增强小鼠获得性免疫功能。

综上所述, SEP通过发挥免疫调节作用抑制S180生长, 具有低毒性和免疫佐剂的特点, 有良好的研究开发前景。影响多糖抗肿瘤活性的因素很多, 包括多糖的作用时间、浓度、多糖的结构、侧链基团的影响、多糖的构型、相对分子量、有无结合蛋白及多糖的收获时间等^[12]。对SEP的抗肿瘤活性的分子水平机制和影响因素仍有待于深入研究。

参考文献 (References)

- Hong Z, Lin Y, Kuiwu W. Structural characterization and anti-inflammatory activity of two water-soluble polysaccharides from *Bellamyia purificata*. Carbohydr Polym 2010(4); 81: 953-60.
- Qi H, Zhang Q, Zhao T, Hu R, Zhang K, Li Z. *In vitro* antioxidant activity of acetylated and benzoyleated derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). Bioorg Med Chem Lett 2006; 16(6): 2441-5.
- Pillai TG, Nair CKK, Janardhanan KK. Enhancement of repair of radiation induced DNA strand breaks in human cells by Ganoderma musroom polysaccharides. Food Chem 2010; 119(3): 1040-3.
- Popov SV, Popova GY, Ovodova RG, Ovodov YS. Antiinflammatory activity of the pectic polysaccharide from *Comarum palustre*. Fitoterapia 2005; 76(3/4): 281-7.
- 阎红, 任坤, 张晶, 刘永宏. 海胆的化学成分及药理活性研究概况. 中国药师 2008; 11(1): 51-3.
- Cheung PCK. The hypocholesterolemic effect of extracellular polysaccharide from the submerged fermentation of mushroom. Nutr Res 1996; 16(11/12): 1953-7.
- Chunhui L, Qinxiong L, Yi G, Liang Y, Yingying X, Tao X. Characterization and antitumor activity of a polysaccharide from *Strongylocentrotus nudus* eggs. Carbohydr Polym 2007; 67(3): 313-8.
- 王统一, 赵兵, 王玉春. 多糖免疫调节和抗肿瘤研究进展. 过程工程学报 2006; 6(4): 674-82.
- Luane MM, Monique SB, Dirceu S, Virmondes R. TH1/TH2 balance in concomitant immediate and delayed type hypersensitivity diseases. Immunol Lett 2009; 124(2): 88-94.
- Turvey SE, Broide DH. Innate immunity. J Allergy Clin Immun 2010; 125(2): S24-32.
- 周庆峰, 李明月, 那广水, 李成伟. 海洋生物多糖抗肿瘤作用机制的研究进展. 中国药理学通报 2009; 25(8): 995-7.
- 李松, 吴青华, 陈畅, 顾黎. 多糖的抗肿瘤活性的最新研究进展. 中国生化药物杂志 2007; 28(3): 213-5.

Antitumor Activity of the Polysaccharride from the Eggs of *Strongylocentrotus Nudus* (SEP) on S180 *in vivo*

Gao Yu, Yu Jian, Li Bing, Kang Di, Wang Hui, Dou Jie, Zhou Weidong, Xi Tao*, Zhou Changlin*

(School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract This research is about the antitumor activity of the polysaccharride from the eggs of *Strongylocentrotus Nudus* (SEP) on S180 *in vivo*. MTT assay detected the inhibition effect of SEP on S180 *in vitro*. Model of S180-bearing mice was built to study the antitumor activity of SEP *in vivo*. Synergism effect of SEP on spleen lymphocyte proliferation induced by ConA/LPS. Besides, influences of SEP on NK cells and CTL activity were assayed. Carbon expurgation method was used to observe the function of mice mononuclear macrophages treated by SEP. The research found that SEP (16, 8, 4 mg/kg) could obviously inhibit the growth of S180 *in vivo* and increase the tumor-bearing mice's spleen index and thymus index. SEP could stimulate spleen lymphocyte proliferation, increase NK cells and CTL activity. In addition, SEP could enhance the phagocytic function of mice mononuclear macrophages. So, SEP realizes its antitumor activity through immunomodulation.

Key words SEP (eggs of *Strongylocentrotus Nudus*); antitumor; immunomodulation; NK cells and CTL activity

Received: April 29, 2011 Accepted: June 10, 2011

This work was supported by the National Science and Technology Major Project Foundation of China (No.2009ZX09103-655) and the National Found for Fostering Talents of Basic Science (No.J0630858)

*Corresponding author. Tel: 86-25-83271323, E-mail: xiaotao_18@hotmail.com; Tel: 86-25-83271323, E-mail: cl_zhou@cpu.edu.cn