

瘤背石磺多糖对人宫颈癌细胞的体外抑制作用

贾晶晶, 土志涵, 练颖康, 郁东晨, 沈和定

Inhibitory effect of *Onchidium reevesii* polysaccharides on Hela cells *in vitro*

JIA Jingjing, TU Zhihan, LIAN Yingkang, YU Dongchen, SHEN Heding

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12024/jsou.20210303314>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

壳寡糖对黄曲霉毒素B₁诱导大鼠肝细胞毒性损伤的干预作用

Intervention effect of chitooligosaccharides on aflatoxin B₁-induced toxic damage of rat liver cells

上海海洋大学学报. 2021, 30(6): 1164 <https://doi.org/10.12024/jsou.20201103229>

瘤背石磺磷脂酶C基因的克隆及在不同声波刺激下的表达

Cloning and expression of the phospholipase C gene in *Onchidium reevesii* under different frequency sound wave stimulation

上海海洋大学学报. 2022, 31(1): 29 <https://doi.org/10.12024/jsou.20200803152>

水解单宁对副溶血弧菌感染凡纳滨对虾血液及血细胞免疫指标的影响

Effect of Hydrolyzable Tannins on Hemolymph and Cellular Immunological Responses of *Litopenaeus vannamei* Challenged by *Vibrio parahaemolyticus*

上海海洋大学学报. 2021, 41(3): 12 <https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-9159.2021.03.002>

瓦氏雅罗鱼鳃细胞系的建立及其耐碱生长特性初探

Establishment of the gill cell line of *Leuciscus waleckii* and alkaline-tolerant growth characteristics

上海海洋大学学报. 2023, 32(2): 283 <https://doi.org/10.12024/jsou.20210403390>

斑马鱼白细胞介素34对细菌和病毒感染的转录应答

Transcriptomic response of zebrafish Interleukin-34 to bacterial and viral infection

上海海洋大学学报. 2022, 31(5): 1078 <https://doi.org/10.12024/jsou.20210303359>

文章编号: 1674-5566(2023)02-0441-08

DOI:10.12024/jsou.20210303314

瘤背石磺多糖对人宫颈癌细胞的体外抑制作用

贾晶晶^{1,2,3}, 土志涵^{1,2,3}, 练颖康^{1,2,3}, 郁东晨^{1,2,3}, 沈和定^{1,2,3}

(1. 上海海洋大学 国家海洋生物科学国际联合研究中心, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 海洋动物系统分类与进化上海高校重点实验室, 上海 201306; 3. 上海海洋大学 农业农村部鱼类营养与环境生态研究中心, 上海 201306)

摘要: 体外试验研究瘤背石磺多糖 (*Onchidium reevesii* polysaccharides, OSP) 和硫酸酯化修饰后瘤背石磺多糖 (Sulfated *Onchidium reevesii* polysaccharides, S-OSP) 对人宫颈癌 Hela 细胞生长的影响, 并以阳性药物顺铂 (0.5、0.75、1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 作为对照。将不同质量浓度 (50、75、150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 OSP 和 S-OSP 作用于 Hela 细胞, 用 CCK-8 法分析 Hela 细胞在 12、24、48 和 72 h 的增殖情况, 用流式细胞仪分析细胞周期, 并应用 qRT-PCR 检测相关凋亡基因的表达变化。结果表明, OSP 和 S-OSP 均能降低 Hela 细胞活性并诱导其凋亡, 而且 S-OSP 比 OSP 更能显著抑制 Hela 细胞增殖活性, 表明硫酸酯化修饰改变了多糖结构进而影响多糖抗肿瘤活性。作用 48 h 后, 3 种质量浓度 OSP 组 Hela 细胞生长抑制率分别为 60%、67% 和 71%; S-OSP 组 Hela 细胞生长抑制率分别为 74%、77% 和 84%; 顺铂组 Hela 细胞生长抑制率分别为 82%、86% 和 90%。流式细胞术检测显示 OSP 和 S-OSP 作用 24 h 后, 细胞早期和晚期凋亡的比率显著, G0/G1 期细胞比例增多, S 期细胞比例不断降低; 实时荧光定量表明促凋亡基因 *Caspase-3* 的表达量随药物质量浓度的提高显著增加, 抗凋亡基因 *Bcl-2* 和 *Bcl-xL* 的表达量随药物质量浓度的提高无明显变化, 说明 OSP 和 S-OSP 可通过调节 *Caspase* 信号通路诱导 Hela 细胞凋亡。

关键词: 瘤背石磺多糖; 硫酸酯化修饰; 人宫颈癌细胞; 细胞凋亡; 实时荧光定量

中图分类号: R 285 **文献标志码:** A

多年来, 癌症一直是全球人类第二大致死因素^[1], 所以对抗癌症是研究人员面临的巨大挑战。然而, 现有的很多化疗药物毒性高, 副作用多, 急需一种能够克服这些问题的抗肿瘤化合物。在这方面, 天然物质似乎是一个重要的来源, 因为它们对多种类型的癌症有效^[2-3], 而且毒性弱, 副作用小。

海洋由于其丰富的海洋物种和特殊的环境条件, 已被证明是具有活性的潜在天然药物的宝贵来源。近十几年来, 海洋贝类多糖在抗肿瘤、降血糖、提高机体免疫力等方面显示出良好的应用前景^[4]。李天等^[5]研究发现海参多糖通过抑制 AKT/mTOR 信号通路进而抑制肾癌细胞增殖并诱导肾癌细胞发生自噬。孙艳等^[6]研究发现翡翠贻贝 (*Perna viridis*) 多糖可将体外 HepG2 肝癌细胞阻滞于 G1 期从而抑制其增殖。而且近年

来有研究发现硫酸化多糖不仅能增强水溶性, 还能增强抗氧化、抗病毒和抗肿瘤的活性^[7-8]。国内外许多研究^[9]表明硫酸化多糖具有较好抗肿瘤作用。硫酸化多糖也称硫酸酯化多糖或多糖硫酸酯, 是多糖大分子链中含硫酸根的一类多糖, 可分为天然硫酸多糖和化学合成硫酸酯化多糖。陈萌萌^[10]研究发现马氏珠母贝 (*Pinctada martensi*) 多糖及其硫酸酯化衍生物均具有增强细胞免疫活性的能力, 说明人为进行硫酸酯化修饰的多糖分子结构和空间构象发生变化, 还可能产生一些新的活性。

瘤背石磺 (*Onchidium reevesii*) 是一种长期栖息于潮间带的海洋软体贝类, 食用历史悠久, 具有滋阴补阳、治疗哮喘和风湿等功效, 多糖含量高达 26%^[11], 比翡翠贻贝^[12]、紫贻贝 (*Mytilus galloprovincialis*) 和文蛤 (*Meretrix meretrix* L.)^[13]

收稿日期: 2021-03-01 修回日期: 2022-06-03

基金项目: 上海海洋大学水产种质资源研究与支撑平台能力提升 (A1-3201-20-300206)

作者简介: 贾晶晶 (1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向为贝类活性物质的生物学功能。E-mail: 15755074571@163.com

通信作者: 沈和定, E-mail: hdshen@shou.edu.cn

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部 (CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

等贝类含量都丰富。已有研究报道,翡翠贻贝多糖能够抑制 HeLa 细胞^[14]、西施舌 (*Maetra antiquata*) 能够抑制人食管癌细胞 EC-9706 增殖^[15]。然而尚未有研究报道瘤背石磺多糖的抗肿瘤能力。本实验利用瘤背石磺多糖含量丰富且药用价值较高的这一优势,分析瘤背石磺多糖 (OSP) 和硫酸酯化修饰后的瘤背石磺多糖 (S-OSP) 对体外培养的人宫颈癌细胞 (Hela) 在 12、24、48 和 72 h 的增殖情况和细胞阻滞周期,并检测相关凋亡基因的表达变化,从而探究硫酸化后的瘤背石磺多糖对 HeLa 细胞的生长抑制作用是否有所改变,以期 OSP 的药用价值开发提供新线索,也为进一步挖掘潜在的天然多糖化合物的抗肿瘤活性提供参考。

1 材料与方 法

1.1 主要材料

瘤背石磺采集于低潮时的上海市崇明岛,去除内脏保留肌肉部分存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱待用。瘤背石磺多糖的提取在程知庆等^[16]和宋佩林^[17]的最佳提取条件下进行,得到的多糖含量为 89.6%。

人宫颈癌 (Hela) 株由中国科学院上海细胞库提供。

1.2 主要试剂

DMEM 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶-EDTA 消化液 (0.25%, 含酚红)、PBS (pH = 7.2 ~ 7.4)、青链霉素混合液 (100 ×)、CCK-8 试剂盒、细胞周期检测试剂盒、顺铂、二甲基亚砜 (DMSO)、SYBR premix Ex Taq™ II 试剂盒等由生工生物提供。

1.3 实验方法

1.3.1 硫酸酯化瘤背石磺多糖的制备

用浓硫酸法^[18]取 7.5 mL 浓硫酸和 2.5 mL 正丁醇于三颈烧瓶中,搅拌后,缓缓加入 12.5 mL 浓硫酸,冰水浴冷却至 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$,缓慢加入 0.5 g 瘤背石磺多糖粉末,于 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min 后,加入氢氧化钠溶液中和至 pH 为 7.0 ~ 7.5,离心后用蒸馏水透析 24 h,减压浓缩至 20 mL 左右,加入 75% 乙醇溶液,静置过夜后收集沉淀,再将沉淀物溶于蒸馏水中再透析 24 h,透析液经冷冻干燥后得硫酸化多糖产物,做 3 组平行 (S-OSP1、S-OSP2、S-OSP3)。

1.3.2 硫酸酯化瘤背石磺多糖含量测定

采用苯酚-硫酸法^[17],吸取 0.2、0.3、0.4、

0.5、0.6、0.7、0.8 和 0.9 mL 葡萄糖标准溶液后蒸馏水补足至 1.0 mL。以 1.0 mL 蒸馏水作为空白,加入 1 mL 5% 的苯酚溶液和 5 mL 浓硫酸,摇匀后,室温静置 20 min,酶标仪 490 nm 下测吸光度。以葡萄糖质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线。用酶标仪测定吸光度。

1.3.3 硫酸酯化瘤背石磺多糖的取代度测定

称取 108 mg K_2SO_4 ,用 1 mol/L HCl 溶液溶解并定容至 100 mL,即得硫酸基标准液。分别取 K_2SO_4 标准溶液 0.08、0.16、0.24、0.32 和 0.40 mL (每管做 3 个平行),用 1 mol/L HCl 补足至 0.4 mL,以 0.4 mL 的 HCl 溶液作为空白,加 7.6 mL 3% 三氯乙酸及 2 mL 0.5% 氯化钡-明胶溶液,混匀后室温静置 15 min,酶标仪 360 nm 下测吸收度 A_1 。用 0.5% 明胶溶液代替 0.5% 的氯化钡-明胶溶液,按上述步骤操作,酶标仪 360 nm 下测吸收度 A_2 。以硫酸根的含量为横坐标,纵坐标 ($A_1 - A_2$) 绘制标准曲线^[16]。

$$w_{\text{SO}_4} = C \times V / W \times 100 \quad (1)$$

式中: w_{SO_4} 为硫酸根含量,% ; C 为样品测定质量浓度, $\mu\text{g}/\text{mL}$; V 为样品溶液体积, mL; W 为称量样品质量, mg。

称取硫酸酯化瘤背石磺多糖粉末 20 mg 于安瓿瓶中,加入 2 mL 1 mol/L HCl 溶液,沸水浴加热 1 h,取 0.2 mL 反应液进行分析,按照标准曲线的方法测定其吸光度 A_1 。根据标准曲线得到试样中 SO_4^{2-} 的百分含量,按式(3)计算硫酸酯化瘤背石磺多糖取代度 (DS)。

$$w_s = 32 \times w_{\text{SO}_4} / 96 \quad (2)$$

$$D_s = 1.62 \times w_s / (32 - 1.02 \times w_s) \quad (3)$$

式中: D_s 为硫酸化修饰物中 S 的硫酸取代度; w_s 为硫酸根离子的质量分数。

1.3.4 药物配制

瘤背石磺多糖 (OSP)、硫酸化瘤背石磺多糖 (S-OSP) 和阳性药物顺铂分别在给药前用 DMEM 培养基配制成 50、75、150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (OSP 和 S-OSP) 和 0.5、0.75、1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (顺铂) 的药剂,无菌细胞筛过滤备用。

1.3.5 Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 检测 HeLa 细胞增殖抑制作用

取对数生长期的 HeLa 细胞,以 $5 \times 10^4\text{ mL}^{-1}$ (100 μL 细胞悬液) 接种于 96 孔板中,于培养箱培养 24 h 后给药处理,每孔加 5 μL 药物,设置 5

个平行孔。空白组加入 100 μL DMEM 培养液和 10 μL CCK-8 溶液,对照组加 100 μL 含细胞的 DMEM 培养液和 10 μL CCK-8 溶液,试验组分别加入质量浓度为 50、75、150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的药物,培养 24 h 后,加入 10 μL CCK-8 溶液,分别培养 12、24、48、72 h 后用酶标仪在 450 nm 处测定 OD 值,计算细胞存活率:

$$C_v = [(A_s - A_b) / (A_c - A_b)] \times 100 \quad (4)$$

式中: C_v 为细胞存活率,%; A_s 为试验孔(含有细胞的培养基、CCK-8、药物)OD 值; A_c 为对照孔(含有细胞的培养基、CCK-8、没有药物)OD 值; A_b 为空白孔(不含有细胞和药物、含有 CCK-8)OD 值。

1.3.6 流式细胞仪检测 HeLa 细胞的周期分布

取对数生长期的 HeLa 细胞,以 5×10^4 个/mL 接种于 12 孔板中,每孔加入 1 mL 细胞悬液,于培养箱培养 24 h 后给药处理,每孔加入 100 μL 药物,对照组加入 100 μL 新鲜的 HeLa 细胞培养液,

培养药物作用 24 h 后, $500 \times g$ 离心 10 min,小心吸出上清液,预冷的 PBS 清洗 2 次,小心吸出上清液,然后加入 1 mL 70% 乙醇于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 固定 18 h 以上,再于 $500 \times g$ 离心 10 min 得到固定后的细胞沉淀,用预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次,最后加入 0.5 mL RNaseA/PI 染料,涡旋振荡使细胞分散, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 避光培养 30 min,再于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 避光培养 30 min,用无菌细胞网过滤,置流式细胞仪检测。

1.3.7 qRT-PCR 检测凋亡相关基因 mRNA 的表达

取生长状态良好的 HeLa 细胞以 5×10^4 个/mL 接种于 6 孔板中,每孔加入 2 mL 细胞悬液,于细胞培养箱中继续培养 24 h 后给药处理,每孔加入 200 μL 药物,24 h 后用 Trizol 法提取总 RNA,并反转成 cDNA 于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。根据 NCBI Gene 数据库中 *Caspase-3*、*Bcl-2*、*Bcl-xL* 的基因序列用软件 Primer 5.0 设计引物后送至上海生物工程技术有限公司合成,见表 1。

表 1 引物序列

Tab. 1 The primer sequences

基因 Gene	正向引物(5'-3') Forward primer (5'-3')	反向引物(5'-3') Reverse primer (5'-3')
<i>Caspase-3</i>	GGGAGGAAGAGGCAATGGAAGAAGA	TGGAAGACAGACACAATGGCCCTGA
<i>Bcl-2</i>	CGCAATTGGATCAGCAGCCACAA	ACCCTCTCTAGCCGCCCAT
<i>Bcl-xL</i>	GCCCAGTCCTGCAGCAGCATA	AACGATGTACGTGGATAATGAGTTGCC
β -actin	GTCCACCGCAAGTGCTTCT	CGGTCGTGGTTGTTTCATT

以 β -actin 为内参基因,使用 SYBR premix Ex TaqTM II 试剂盒(Vazyme Biotech, 南京)在 ABI Q6 仪器上进行 qRT-PCR。反应体系为 20 μL : Premix Ex TaqTM ($2 \times$) 10 μL 、引物各 0.8 μL 、ddH₂O 6.4 μL 、cDNA 模板 2 μL 。运用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各基因 mRNA 相对表达量,运用 SPSS 22.0 进行差异显著性检验,利用 One-way ANOVA 和独立样本 *T* 检验法进行差异显著性检验, $P < 0.05$ 表示差异显著,结果以平均值 \pm 标准差表示。

2 结果

2.1 硫酸酯化瘤背石磺多糖的含量和取代度

以葡萄糖毫克数为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线(图 1),得回归方程为 $y = 10.973 0x -$

0.059 9, $R^2 = 0.996$ 。以硫酸基质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线(图 2),得回归方程为 $y = 0.022 1x - 0.168 4$, $R^2 = 0.993 6$ 。取代度的结果见表 2。

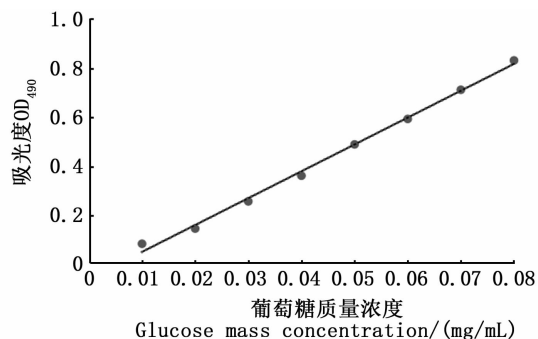


图 1 葡萄糖标准曲线

Fig. 1 Standard curve of glucose

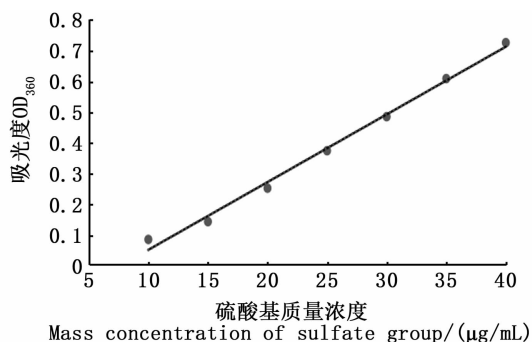


图2 硫酸基标准曲线

Fig.2 Sulfate group standard curve

2.2 各药物组对Hela细胞存活率的影响

试验用CCK-8检测各药物组对Hela细胞的增殖作用,以阳性药物顺铂为对照组,结果见图3,各质量浓度下的药物对Hela细胞均有抑制作用,且随着质量浓度的增加细胞存活率不断下降;

48 h时,OSP质量浓度为150 μg/mL时细胞存活率下降至29.14%,S-OSP质量浓度为150 μg/mL时细胞存活率下降至16.16%,而阳性药物顺铂质量浓度为1.5 μg/mL细胞存活率下降至10.76%,S-OSP的抑制效果明显高于OSP;在药物作用48 h后,Hela细胞存活率有所提高,说明OSP和S-OSP的最佳作用时间是48 h内。

表2 硫酸酯化瘤背石磺多糖含量、硫酸基含量和取代度
Tab.2 Content of sulfated *O. reevesii* polysaccharides, sulfate content and degree of substitution of sulfate group

样品 Samples	多糖含量 Content of polysaccharides/ %	硫酸基含量 Content of sulfated group/ %	取代度 Degree of substitution
S-OSP1	44.65	28.59	0.69
S-OSP2	44.77	27.67	0.66
S-OSP3	43.16	30.30	0.75

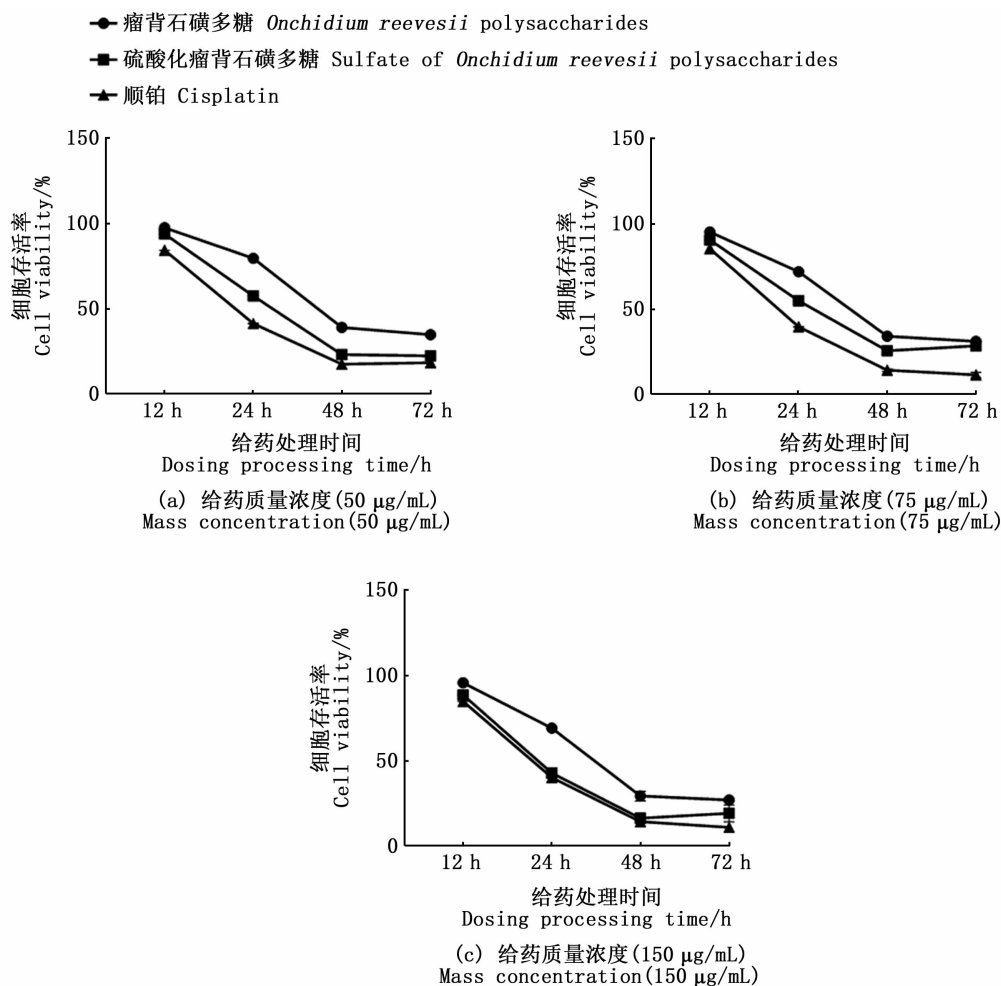


图3 各药物组对Hela细胞存活率的影响

Fig.3 Effects of medicine groups on survival rate of Hela cells

2.3 各药物组对 HeLa 细胞周期分布的影响

探究 OSP 和 S-OSP 如何影响 HeLa 细胞的生长,利用流式细胞技术测定不同质量浓度处理条件下 HeLa 细胞的细胞周期分布情况,见表 3。随着药物质量浓度的增加,多糖组的 G1 期的比例显著增高,S 期的比例不断减少。瘤背石磺多糖

对 HeLa 细胞的 G1 期和 S 期凋亡比例并不是很明显,而硫酸酯化修饰后的瘤背石磺多糖对 HeLa 细胞的 G1 期和 S 期凋亡比例明显高于未处理的瘤背石磺多糖组,更接近阳性药物顺铂的抑制效果。说明 S-OSP 使 HeLa 细胞阻滞在 G1 期,这可能是其抑制细胞增长和克隆能力的重要原因。

表 3 HeLa 细胞周期变化
Tab.3 Changes of HeLa cell cycle

实验样品 Samples	%		
	DNA 合成前期 DNA Presynthetic phase	DNA 合成期 DNA Synthesis phase	DNA 合成后期 DNA Postsynthetic phase
瘤背石磺多糖 OSP(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	43.51	42.16	14.33
瘤背石磺多糖 OSP(75 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	46.37	41.82	11.81
瘤背石磺多糖 OSP(150 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	56.07	32.47	11.46
硫酸酯化瘤背石磺多糖 S-OSP(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	45.32	40.57	14.11
硫酸酯化瘤背石磺多糖 S-OSP(75 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	54.68	36.74	8.61
硫酸酯化瘤背石磺多糖 S-OSP(150 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	59.49	30.38	10.13
顺铂 Cisplatin(0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	40.03	45.44	14.53
顺铂 Cisplatin(0.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	56.13	34.52	9.35
顺铂 Cisplatin(1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	62.05	28.28	9.67

2.4 各药物组对 HeLa 细胞凋亡基因的影响

qRT-PCR 分别测定 OSP 和 S-OSP 对 HeLa 细胞凋亡相关基因的影响结果见图 4 和图 5,促凋亡基因 *Caspase-3* 的表达随药物质量浓度的增加不断提高,在 OSP 质量浓度为 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时相对表达量显著升高为 8.27 ($P < 0.05$),在 S-OSP 质量浓度为 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时相对表达量为 15.6,表达量极显著升高 ($P < 0.01$);而抗凋亡基因 *Bcl-xL* 和 *Bcl-2* 随着 OSPH 和 S-OSP 质量浓度的增加无明显变化。

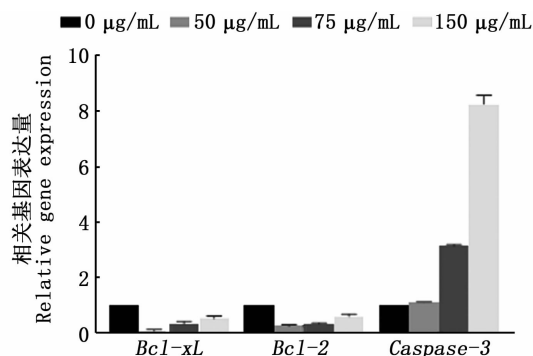


图 4 OSP 组凋亡基因的表达

Fig.4 Expression of apoptotic genes in OSP group

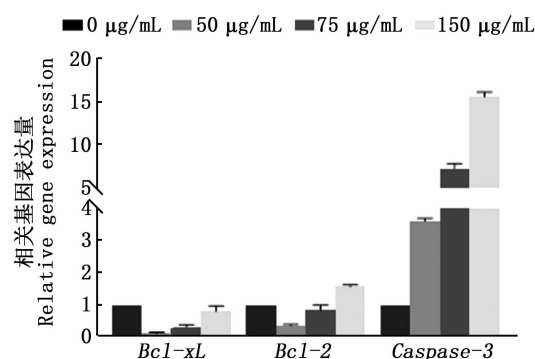


图 5 S-OSP 组凋亡基因的表达

Fig.5 Expression of apoptotic genes in S-OSP group

3 讨论

目前肿瘤免疫疗法已成为癌症治疗中至关重要的选择之一^[19]。选择这一疗法的主要原因不仅是要获得有效的抗癌药物,而且要对人体产

生最小的副作用。因此,海洋衍生抗癌药物的开发成为趋势^[20]。多糖是广泛存在动植物和微生物中的重要生物大分子化合物,且具有多种生物活性,其中抗肿瘤活性深受关注^[21]。ZHANG 等^[22]发现泥螺多糖能明显抑制 Bcap37 乳腺癌细胞、SW1990 胰腺癌细胞和 HeLa 宫颈癌细胞生长。本研究中也得到类似的结果,我们以体外培养的人宫颈癌 HeLa 细胞为模型,发现 OSP 能抑制 HeLa 细胞的增殖,而且随着 OSP 质量浓度上升,HeLa 细胞存活率呈剂量依赖性下降,说明 OSP 抑制了人宫颈癌 HeLa 细胞的生长,能够有效的发挥抗肿瘤活性,验证了其药用价值。有研究^[23]发现,如果将硫酸在多糖的 C-1、2、3、4 或 6 的羟基处引入,可能会导致多糖的生物活性增强。而且,硫酸化后的多糖对癌细胞的增殖有更

为明显的抑制作用,例如硫酸酯化后的青蛤多糖对人胃癌细胞增殖具有显著抑制作用^[24]。此外,本研究还发现硫酸酯化修饰后瘤背石磺多糖能抑制 Hela 细胞的增殖,而且随着 S-OSP 质量浓度上升,Hela 细胞存活率呈剂量依赖性下降,这说明 S-OSP 较 OSP 诱导 Hela 细胞凋亡的能力显著提高。

细胞凋亡是生物体进行的一项十分重要的活动,在真核细胞中以上任何一个阶段被中断都会阻碍整个细胞复制,因此细胞周期的调控对调节肿瘤生长方面尤其重要^[25]。而且细胞的凋亡会伴随着细胞外在形态的明显改变,细胞膜破裂导致胞膜磷脂酰丝氨酸外露,该物质与磷脂结合蛋白 Annexin V 高度亲和。因此,为进一步确定 OSP 和 S-OSP 对 Hela 细胞活力影响是否与细胞凋亡相关,我们使用 Annexin V / PI 标记细胞,并用流式细胞仪测定细胞阻滞周期,发现 OSP 只在高质量浓度处理下,Hela 细胞的 G1 期比例明显高于 S 期比例,而低、中、高 3 种质量浓度的 S-OSP 处理时,Hela 细胞周期均发生显著变化,G1 期细胞呈剂量依赖性增加,S 期的细胞呈剂量依赖性减少。结果表明 OSP 导致 Hela 细胞不能复制受损的 DNA,诱导细胞在 G0/G1 期被阻滞。而且硫酸化修饰后的 OSP 阻滞 Hela 细胞周期的能力更强。RONG 等^[26]研究表明羊栖菜多糖通过使细胞周期停滞在 G2/M 期。BIE 等^[27]也发现,RAW264.7 细胞在 G2/M 期被多糖所阻滞,并通过降低细胞周期下游调控蛋白的表达来控制。本研究所得结果与以上研究类似,说明瘤背石磺多糖可以抑制 Hela 细胞周期阻滞在 DNA 合成前期从而阻止 Hela 细胞的无限增殖达到抑癌作用。

细胞凋亡是一个十分复杂并受基因调控的过程。发挥主要凋亡作用的基因分别是促凋亡基因和抗凋亡基因,Caspase-3 是 Caspase 家族中较典型的促凋亡基因,Bcl-2 是被研究最广泛的基因。本试验发现 OSP 处理 Hela 细胞后,促凋亡基因 Caspase-3 的表达以质量浓度依赖性的方式显著升高,S-OSP 处理 Hela 细胞后,促凋亡基因 Caspase-3 的表达以质量浓度依赖性的方式处理极显著升高,抗凋亡基因 Bcl-2 和 Bcl-xL 的表达量无显著变化。郑华山等^[28]从灰树花子实体中分离的一种中性多糖,作用于 HT-29 可以提高促凋亡基因 Bax 的表达进而降低抗凋亡基因 Bcl-2

的表达,增加细胞色素 c 释放至细胞质中,导致 Caspase-9 激活引发 Caspase 级联反应。张山等^[29]发现真姬菇菌糠多糖可抑制 β -catenin 和 Caspase-3 的表达,通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路相关基因的表达及上调其下游的 Bax 的表达而促进 HepG2 细胞发生凋亡。这些结果都表明多糖能够通过受体依赖性或非受体依赖性的死亡途径促进肿瘤细胞凋亡,为本试验的结果提供了有力证明。

综上所述,瘤背石磺多糖和硫酸酯化瘤背石磺多糖均具有促 Hela 细胞凋亡的作用,而且硫酸化修饰导致 OSP 结构改变增强了瘤背石磺多糖的抗肿瘤能力;初步表明瘤背石磺多糖抗肿瘤活性的发挥是通过调控细胞周期和 Caspase 家族反应体系来实现的。但是瘤背石磺多糖促 Hela 细胞凋亡的细胞分子调控功能基因尚需深入研究,以期阐明瘤背石磺多糖抗肿瘤作用的信号通路分子级联机制,这将对阐明多糖抗肿瘤机制具有重要的科学价值,也为天然的治疗肿瘤药物开发提供新材料。

参考文献:

- [1] CHRISTINA F, TOMI F A T, HASAN A L F, et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2016: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study [J]. JAMA Oncology, 2018, 4(11): 1553-1568.
- [2] DEMAIN A L, VAISHNAV P. Natural products for cancer chemotherapy [J]. Microbial Biotechnology, 2011, 4(6): 687-699.
- [3] AUNG T N, QU Z P, KORTSCHAK R D, et al. Understanding the Effectiveness of Natural Compound Mixtures in Cancer through Their Molecular Mode of Action [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(3): 656.
- [4] 刘志昌, 王海波, 洪滨, 等. 海洋贝类多糖的研究进展 [J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(11): 4231-4238. LIU Z C, WANG H B, HONG B, et al. Progress of polysaccharides isolated from marine shellfish [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2017, 8(11): 4231-4238.
- [5] 李天, 周东梅, 刘一帆, 等. 海参多糖对肾癌 ACHN 细胞自噬的影响 [J]. 郑州大学学报(医学版), 2019, 54(5): 758-762. LI T, ZHOU D M, LIU Y F, et al. Effects of sea cucumber polysaccharide on autophagy of renal cancer ACHN cells [J]. Journal of Zhengzhou University (Medical Sciences), 2019, 54(5): 758-762.

- [6] 孙艳,李江滨. 翡翠贻贝多糖抑制体外培养肝癌细胞生长的研究[J]. 中医临床研究, 2017, 9(13): 46-47.
SUN Y, LI J B. Inhibitory effects of *Perna viridis* polysaccharides on the growth of hepatocellular carcinoma cells in vitro [J]. Clinical Journal of Chinese Medicine, 2017, 9(13): 46-47.
- [7] 阿地拉·艾皮热,李金玉,付长霜,等. 硫酸多糖生物活性研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(1): 7-13.
AIPIRE · D, LI J Y, FU C S, et al. Research Progress on Bioactivity of Sulfate Polysaccharide [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2019, 38(1): 7-13.
- [8] 曾茂林,周本宏,郭咸希. 硫酸化多糖抗肿瘤研究进展[J]. 中国药师, 2018, 21(6): 1078-1082.
ZENG M L, ZHOU B H, GUO X X. Research Progress in the Antitumor Effects of Sulfated Polysaccharides[J]. China Pharmacist, 2018, 21(6): 1078-1082.
- [9] GUNASEKARAN S, GOVINDAN S, RAMANI P. Sulfated modification, characterization and bioactivities of an acidic polysaccharide fraction from an edible mushroom *Pleurotus eous* (Berk.) Sacc[J]. Heliyon, 2021, 7(1): e05964.
- [10] 陈萌萌. 马氏珠母贝多糖的硫酸酯化修饰及其细胞免疫调节活性的初步研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2015: 11-54.
CHEN M M. Sulfated modification and cellular immunomodulatory activity of polysaccharides from *Pinctada martensii* [D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2015:11-54.
- [11] 宋佩林,李硕,杨岚,等. 瘤背石磺多糖的提取工艺优化、理化性质及其 α -葡萄糖苷酶抑制活性[J]. 食品工业科技, 2019, 40(20): 215-222.
SONG P L, LI S, YANG L, et al. Optimization Processing, Physicochemical Properties and α -Glucosidase Inhibitory Activity of *Onchidium struma* Polysaccharides [J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(20): 215-222.
- [12] 庆宁,林岳光,金启增. 翡翠贻贝软体部营养成分的研究[J]. 热带海洋, 2000(1): 81-84.
QING N, LIN X G, JIN Q Z. Studies on nutritive compositions of soft part in mussel *Perna viridis*[J]. Journal of Tropical Oceanography, 2000(1): 81-84.
- [13] 李莘莘. 五种经济贝类的营养成分及蛋白质质量分析[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(15): 99-101.
LI P P. The Analysis of nutrient ingredients and protein quality on five economic shellfish [J]. Food Research and Development, 2014, 35(15): 99-101.
- [14] 许子茂,李江滨,侯敢. 翡翠贻贝多糖的制备及体外对Hela肿瘤细胞生长的抑制作用[J]. 中国现代药物应用, 2010, 4(7): 1-2.
XU Z M, LI J B, HOU G. The preparation of *Perna viridis* polysaccharide and it's inhibiting effect on the growth of Hela tumor cell in vitro [J]. Chinese Journal of Modern Drug Application, 2010, 4(7): 1-2.
- [15] 温扬敏,杨维群,陈长明,等. 西施舌多糖对人食管癌 EC-9706 细胞增殖及抗氧化活性的影响[J]. 食品工业科技, 2013, 34(21): 357-360.
WEN Y M, YANG W Q, CHEN C M, et al. Effect of polysaccharides from *Coelomactra antiquata* on proliferation and antioxidant activities of human esophageal carcinoma EC-9706 cell [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(21): 357-360.
- [16] 程知庆,沈和定,姚理想,等. 干燥方法对瘤背石磺多糖抗氧化性和还原力的影响[J]. 食品与机械, 2015, 31(6): 169-172.
CHENG Z Q, SHEN H D, YAO L X, et al. Effects of drying methods on antioxidant activities and reducing capacity of polysaccharides extracted from *Onchidium struma* [J]. Food & Machinery, 2015, 31(6): 169-172.
- [17] 宋佩林. 瘤背石磺多糖的分离纯化、理化性质及降血糖活性研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2020.
SONG P L. Study on isolation, purification, physicochemical properties and hypoglycemic activity of *Onchidium struma* polysaccharides [M]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2020.
- [18] 黄小燕,孔祥峰,王德云,等. 多糖硫酸化修饰和多糖硫酸酯的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19(2): 328-383.
HUANG X Y, KONG X F, WANG D Y, et al. Research Progress on Sulfating Modification of Polysaccharides and Sulfated Polysaccharides [J]. Natural Product Research and Development, 2007, 19(2): 328-383.
- [19] 彭清,孙柳,苗雪圆,等. 天然产物化合物作为肿瘤免疫调节剂的研究进展[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2021, 27(1): 136-140.
PENG Q, SUN L, MIAO X Y, et al. Research progress of natural product compounds as tumor immunomodulators [J]. Chinese Journal of Surgery of Integrated Traditional and Western Medicine, 2021, 27(1): 136-140.
- [20] PEREIRA R B, EVDOKIMOV N M, LEFRANC F, et al. Marine-Derived Anticancer Agents: Clinical Benefits, Innovative Mechanisms, and New Targets [J]. Marine Drugs, 2019, 17(6): 329.
- [21] LI W, SONG K, WANG S, et al. Anti-tumor potential of astragalus polysaccharides on breast cancer cell line mediated by macrophage activation [J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2019, 5(98): 685-695.
- [22] ZHANG D, WU H, XIA Z, et al. Partial characterization, antioxidant and antitumor activities of three sulfated polysaccharides purified from *Bullacta exarata* [J]. Journal of Functional Foods, 2012, 4(4): 784-792.
- [23] 蒋长兴. 青蛤多糖分离鉴定、硫酸酯化及其生物活性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2011.
JIANG C X. Isolation, structural elucidation, sulfated modification and biological activities of polysaccharides from *Cyclina sinensis* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2011.
- [24] SHALABY A S G, RAGAB T I M, MEHANY A B M, et al.

- Antitumor and prebiotic activities of novel sulfated acidic polysaccharide from ginseng [J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2018, 14: 402-409.
- [25] BAILON-MOSCOSO N, CEVALLOS-SOLORZANO G, ROMERO-BENAVIDES J C, et al. Natural Compounds as Modulators of Cell Cycle Arrest: Application for Anticancer Chemotherapies [J]. *Current Genomics*, 2017, 18(2): 106-131.
- [26] RONG B W, PENG L Z, WEI Z Q, et al. *Astragalus* Polysaccharide RAP Selectively Attenuates Paclitaxel-Induced Cytotoxicity Toward RAW 264. 7 Cells by Reversing Cell Cycle Arrest and Apoptosis [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2019, 11(9): 1580.
- [27] BIE N, HAN L, WANG Y, et al. A polysaccharide from *Grifola frondosa* fruit body induces HT-29 cells apoptosis by PI3K/AKT-MAPKs and NF- κ B-pathway [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 147: 79-88.
- [28] 郑华山, 陈成辉, 蔡亲平, 等. 山药多糖通过 miR-98-5p/TGF β R1 分子轴调控肝癌细胞凋亡的机制研究[J]. *中华普通外科学文献(电子版)*, 2021, 15(1): 11-17.
- ZHENG H S, CHEN C H, CAI Q P, et al. Chinese Yam polysaccharide regulating apoptosis of hepatocellular carcinoma cells through miR-98-5p/TGF β R1 axis [J]. *Chinese Archives of General Surgery (Electronic Edition)*, 2021, 15(1): 11-17.
- [29] 张山, 董超, 吴澳华, 等. 真姬菇菌糠多糖促进肝癌 HepG2 细胞凋亡的功能和机制[J]. *泰山医学院学报*, 2020, 41(11): 813-816.
- ZHANG S, DONG C, WU A H, et al. The function and mechanism study of polysaccharides of *Hypsizygus marmoreus* promoting apoptosis in HepG2 cell [J]. *Journal of Taishan Medical College*, 2020, 41(11): 813-816.

Inhibitory effect of *Onchidium reevesii* polysaccharides on Hela cells *in vitro*

JIA Jingjing^{1,2,3}, TU Zhihan^{1,2,3}, LIAN Yingkang^{1,2,3}, YU Dongchen^{1,2,3}, SHEN Heding^{1,2,3}

(1. *International Research Center for Marine Biosciences, Ministry of Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China*; 2. *Shanghai Universities Key Laboratory of Marine Animal Taxonomy and Evolution, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China*; 3. *Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China*)

Abstract: In vitro experiments were conducted to study the effects of *Onchidium reevesii* polysaccharides and sulfated *Onchidium reevesii* polysaccharides on the growth of Hela human cervical cancer cells, and with positive drug cisplatin (0.5, 0.75, 1.5 μ g/mL) as control. Different mass concentrations (50, 75, 150 μ g/mL) of OSP and S-OSP were applied to Hela cells, and we used CCK-8 method to analyze the proliferation of Hela cells at 12, 24, 48 and 72 h, and analyzed the cell cycle with flow cytometry, and used qRT-PCR to detect the expression changes of related apoptosis genes. The results show that both OSP and S-OSP can reduce the viability of Hela cells and induce their apoptosis, moreover, S-OSP can more significantly inhibit the proliferation activity of Hela cells than OSP, It shows that the sulfation modification changes the structure of the polysaccharide and affects the anti-tumor activity of the polysaccharide. After 48 hours of treatment, the growth inhibition rates of Hela cells in the three concentrations of OSP group were 60%, 67%, and 71%, respectively; the growth inhibition rates of Hela cells in the S-OSP group were 74%, 77%, and 84%, respectively; the growth inhibition rates of Hela cells in the cisplatin group were 82%, 86%, and 90%, respectively. Flow cytometry showed that after OSP and S-OSP had acted for 24 h, the ratio of early and late apoptosis of cells was significant, and increased proportion of cells in G0/G1 phase, and the proportion of S-phase cells continued to decrease; Real-time fluorescence quantification showed that the expression of pro-apoptotic gene *Caspase-3* increased significantly with the increase of drug mass concentration, and the expression of anti-apoptotic genes *Bcl-2* and *Bcl-xL* did not change significantly with the increase of drug mass concentration. It shows that OSP and S-OSP can induce Hela cell apoptosis by regulating the Caspase signaling pathway.

Key words: *Onchidium reevesii* polysaccharide; sulfated modification; Hela cell; cell apoptosis; qRT-PCR