

· 实验研究 ·

植物多糖对 S180、K562 细胞增殖和唾液酸、磷脂、胆固醇含量的影响*

佟 丽¹ 黄添友¹ 李吉来¹ 吴 波² 梁 谋² 梁念慈²

内容提要 本实验用 MTT 比色分析法研究了茯苓多糖(PPS)、刺五加多糖(ASPS)、银耳多糖(TF)和香菇多糖(Lentinan)4 种植物多糖对体外培养的小鼠腹水型肉瘤 S180 细胞和人慢性髓性白血病 K562 细胞增殖的影响, 结果证实 PPS、ASPS 在体外具有直接抗肿瘤作用。PPS 对两种肿瘤细胞的半数有效抑制浓度(IC₅₀)均为 1.5 mg/ml, ASPS 对 S180 和 K562 细胞的 IC₅₀ 分别为 0.38 mg/ml 和 0.28 mg/ml; TF 和 Lentinan 对两种细胞的增殖无抑制作用。本实验同时检测了 PPS、ASPS 作用于 S180 细胞 24 h 后, 细胞膜唾液酸(SA)、磷脂(PI)、胆固醇(Ch)含量的变化, 发现除 Ch 及 Ch/PI 比值无明显变化外, SA 升高($P < 0.05$)、PI 减少($P < 0.05$), 提示 PPS、ASPS 的抗肿瘤作用可能与之有关。

关键词 植物多糖 肿瘤 细胞增殖 唾液酸 磷脂 胆固醇

Effects of Plant Polysaccharides on Cell Proliferation and Cell Membrane Contents of Sialic Acid, Phospholipid and Cholesterol in S 180 and K 562 Cells Tong Li, Huang Tian-you, Li Ji-Lai, et al *The First Military Medical University of PLA, Guangzhou (510515)*

The four kinds of plant polysaccharides, i.e., pachyman polysaccharides (PPS), Acanthopanax senticosus polysaccharides (ASPS), polysaccharides of tremella fuciformis (TF) and lentinan, have obviously inhibitory action against the animal tumor growth and have been applied to the treatment of cancer. The mechanism was that they could enhance the body immune function, but whether the tumor cells were killed is not clear. In this paper, the effects of the four plant polysaccharides on cell proliferation in mice sarcoma (ascitic type) S180 and human chronic myelogenous leukemia K562 cells were studied with MTT chromometry. It was found that TF and lentinan had no effect on both cell line, but PPS and ASPS could obviously inhibit the proliferation of them, the IC₅₀ of PPS was 1.5 mg/ml in both cell line, that of ASPS was 0.38 mg/ml (S180 cells) and 0.28 mg/ml (K562 cells) respectively. This result indicated that the PPS and ASPS were able to kill the tumor cell directly. To investigate the mechanism of antitumor action of PPS and ASPS, the sialic acid (SA), phospholipid (PI) and cholesterol (Ch) contents of S180 cell membrane were examined after the PPS or ASPS application for 24 hours. No significant changes were observed for the Ch and Ch/PI ratio, the amount of SA increased and that of PI lowered respectively ($P < 0.05$). The results suggested that the antitumor action of PPS and ASPS not only related to the action of enhancing the body immune function but also related to the changes of cell membrane.

Key words plant polysaccharides, tumor, cell proliferation, sialic acid, phospholipid, cholesterol

*全军青年科学基金课题

¹第一军医大学中西医结合研究所(广州 510515)²广东医学院医用生物化学研究所

本研究选择我国已用于临床的茯苓多糖(pachyman polysaccharides, PPS)、刺五加多糖(acanthopanax santicosus polysaccharides, ASPS)、银耳多糖(polysaccharides of tremella fuciformis, TF)和香菇多糖(Lentinan), 观察它们对体外培养的小鼠腹水型肉瘤 S180 细胞、人慢性骨髓性白血病 K562 细胞增殖的影响, 以探讨它们对肿瘤细胞是否有直接杀灭作用。同时从细胞膜唾液酸、磷脂、胆固醇含量, 脂肪酸组成和肌醇磷脂代谢变化几方面研究其作用机制。报道如下。

材料与方法

1 试剂 PPS、ASPS、TF、Lentinan 粉剂由第一军医大学中医系提供, 用生理盐水配成一定浓度溶液, 微孔滤膜过滤除菌后使用。MTT [溴化-3-(4, 5-二甲基-2-噻唑基)-2, 5-二苯基四氮唑] 为 Sigma 公司产品。RPMI 1640 购自 Gibco 公司。其它试剂为进口或国产分析纯。

2 动物 昆明种小鼠, 雄性, 体重 18~21 g, 购自第一军医大学动物中心, 合格证号: 92010。

3 细胞 S180 和 K562 细胞引自第一军医大学免疫室。S180 细胞接种于昆明种小鼠腹腔内连续传代, 实验时无菌抽取 7 日龄腹腔内瘤细胞, 以 Hank's 液洗涤两次, 用含 100 IU/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素、20% 灭活小牛血清的 RPMI 1640 培养液调配成一定浓度的细胞悬液, 置 CO₂ 培养箱于 5% CO₂、37°C、充分湿化条件培养 24 h 备用。K562 细胞常规于含 20% 灭活小牛血清的 RPMI 1640 培养液中传代。

4 方法

4.1 细胞增殖检验 生长良好的 S180 细胞 (1×10^5 /ml)、K562 细胞 (5×10^4 /ml) 分别接种于 96 孔培养板 (Falcon, USA) 每孔 100 μ l, 再加入待测药物 (对照组加入生理盐水) 20 μ l/孔后于 5% CO₂、37°C、充分湿化条件下培养 24 h。每孔加入 5 mg/ml 的 MTT 10 μ l, 继续培养 4 h 进行显色反应, 以 50% N, N'-二甲基甲酰胺 (含 20% SDS) 100 μ l/孔终止反应, 再置 5% CO₂、37°C、充分湿化条件下 16~18 h 后在 511 型全自动酶标仪测 570 nm 波长处吸光度, 计算百分抑制率。

4.2 药物与细胞作用 离心收集体外培养 24 h 的 S180 细胞, 以 RPMI 1640 培养液调配成 5×10^5 /ml 细胞悬液, 取 20 ml 接种于 100 ml 培养瓶, 培养液中加入 PPS 和 ASPS, 使其终浓度均为 20 μ g/

ml, 对照组加入相应体积灭菌生理盐水, 于 5% CO₂、37°C、充分湿化条件下培养, 每 6 h 更换一次含药物的培养液。24 h 后收集细胞, 用 40 mmol/L Tris-HCL 缓冲液 (含 1 mmol/L EGTA, 0.1 mmol/L PMSF, pH 7.4) 洗涤 3 次并悬浮。冰浴中用超声波细胞破碎仪制备细胞匀浆, 30 000 $\times$ g 离心 30 min 分离细胞粗膜, Lowry 法测蛋白质含量。

4.3 唾液酸、磷脂、胆固醇含量测定 唾液酸含量测定按文献^[1]进行, 磷脂和胆固醇分别用硫酸-高氯酸消化法和高铁-硫磷法进行常规测定并计算胆固醇/磷脂 (Ch/Pl) 比值。

结 果

1 植物多糖对 S180 细胞增殖的影响 植物多糖与细胞接触 24 h, 细胞增殖抑制率见表 1。可以看出 PPS、ASPS 的最大抑制率均超过 70%, 按抗癌药敏判断标准为高度敏感, 计算它们的半数有效抑制浓度 (IC₅₀) 分别为 1.5 mg/ml 和 0.38 mg/ml。TF、Lentinan 的最大抑制率均远低于 30%, 为不敏感, 并且不同剂量间无差异 (t 检验, $P > 0.05$), 说明 TF、Lentinan 对 S180 细胞增殖无抑制作用。

表 1 植物多糖对细胞增殖的百分抑制率 ($\bar{x} \pm S$)

剂量 (μ g/ml)	抑制率(%)				
	PPS	ASPS	TF	Lentinan	
S180	1	1.93 $\pm$ 1.47	1.47 $\pm$ 0.80	7.50 $\pm$ 4.16	3.57 $\pm$ 2.75
	10	5.53 $\pm$ 2.30	3.13 $\pm$ 1.96	8.75 $\pm$ 2.76	5.17 $\pm$ 1.82
	100	8.05 $\pm$ 4.03	13.20 $\pm$ 4.78	6.20 $\pm$ 0.57	8.73 $\pm$ 2.84
	500	——	60.70 $\pm$ 7.02	——	—
	1000	10.68 $\pm$ 3.25	78.78 $\pm$ 3.50	5.17 $\pm$ 0.71	7.73 $\pm$ 4.16
	2000	93.70 $\pm$ 2.50		7.17 $\pm$ 2.22	6.89 $\pm$ 3.35
K562	1	16.95 $\pm$ 5.16	17.00 $\pm$ 3.82	19.20 $\pm$ 1.00	20.55 $\pm$ 1.77
	10	22.73 $\pm$ 1.16	22.67 $\pm$ 4.39	20.65 $\pm$ 2.76	16.10 $\pm$ 2.83
	100	27.80 $\pm$ 3.57	32.00 $\pm$ 3.93	16.47 $\pm$ 4.46	20.67 $\pm$ 3.59
	500	——	63.15 $\pm$ 3.80	——	——
	1000	46.97 $\pm$ 2.31	77.57 $\pm$ 3.17	20.33 $\pm$ 7.84	16.50 $\pm$ 5.67
	2000	52.95 $\pm$ 1.20		15.88 $\pm$ 2.44	14.65 $\pm$ 1.77

2 植物多糖对 K562 细胞增殖的影响 从表 1 可看出 PPS 对 K562 细胞的增殖抑制率略低于对 S180 细胞的抑制率, IC₅₀ = 1.5 mg/ml; ASPS 对 K562 细胞的抑制与对 S180 细胞作用一样, 属高度敏感, 其 IC₅₀ = 0.28 mg/ml。TF、Lentinan 的抑制率均低于 30%, 为不敏感, 且不同剂量间比较,

$P > 0.05$, 说明两者对 K562 细胞增殖无抑制作用。

3 植物多糖对 S180 细胞膜唾液酸含量影响

S180 细胞与 PPS、ASPS 接触 24 h, 膜唾液酸含量分别为 $74.23 \pm 6.06 \mu\text{g}/\text{mg}$ 蛋白质 ($\bar{x} \pm S$, $n=3$, 下同)、 $94.97 \pm 4.73 \mu\text{g}/\text{mg}$ 蛋白质, 与对照组 ($68.73 \pm 2.14 \mu\text{g}/\text{mg}$ 蛋白质) 相比, 明显升高 ($P < 0.05$), 说明 PPS、ASPS 能增加 S180 细胞膜唾液酸含量。

4 植物多糖对 S180 细胞膜脂质影响 PPS、ASPS 作用 24 h, 引起 S180 细胞膜磷脂减少, 与对照组相比, 具有统计学差异 ($P < 0.05$)。对胆固醇和 Ch/Pl 比值, PPS 虽有所增加, 但无统计学意义 ($P > 0.05$), ASPS 则无影响, 见表 2。

表 2 植物多糖对 S180 细胞膜磷脂、胆固醇含量及比值的影响 (nmol/mg 蛋白质, $\bar{x} \pm S$)

组别	Pl	Ch	Ch/Pl
对照	289 ± 15	159 ± 21	0.548 ± 0.058
PPS	$246 \pm 8^*$	185 ± 34	0.745 ± 0.144
ASPS	$258 \pm 2^*$	154 ± 21	0.599 ± 0.076

注: 与对照组比, $*P < 0.05$; 各组样本数均为 3

讨 论

大量的动物实验和临床研究确证 PPS 具有显著的抗肿瘤作用, 本实验结果也表明其能明显抑制 S180 细胞、K562 细胞增殖。PPS 的抗癌机制除依赖宿主免疫系统外, 有人认为还与细胞毒作用有关, 但实验资料明显不足⁽²⁾。本实验结果进一步证实了 PPS 对动物和人肿瘤细胞具有直接细胞毒作用。ASPS 也具有明显体内抑瘤和免疫促进作用⁽³⁾, 但缺少 ASPS 直接作用于肿瘤细胞的证据。本实验通过 ASPS 直接作用于动物性肿瘤细胞(S180)和人肿瘤细胞(K562), 强烈抑制细胞增殖的结果, 为 ASPS 直接作用于肿瘤细胞找到了依据, 并且与 PPS 相比, ASPS 的抗肿瘤效果更明显, 其 IC_{50} 仅为前者的 $1/5 \sim 1/4$ 。本实验在研究 4 种植物多糖抗肿瘤作用的同时, 检测了氟脲嘧啶、氨甲喋呤、长春新碱、高三尖杉酯碱、塞替派、阿霉素和多粘菌素 B 对 S180、K562 细胞增殖的影响, 只有阿霉素和多粘菌素 B 达高度敏感, 而 ASPS 对两种细胞均为高度敏感, PPS 对 S180 细胞也达高度敏感, 说明 ASPS 和 PPS 具有诱人的临床应用前景, 值得在临床推广应用。

TF 具有免疫调节、抗肿瘤、抗衰老等药理作用。Lentinan 除对植物性肿瘤的生长有抑制作用外, 还对原发性自身肿瘤的生长有强烈抑制作用, 对化学致癌、病毒致癌也有抑制效果, 已成为国际上评价最高的抗癌药之一⁽⁴⁾。TF 和 Lentinan 的抗癌作用必须通过宿主的免疫系统间接起作用, 属于免疫激活性多糖⁽⁴⁾。本实验也发现 TF 和 Lentinan 对体外培养的 S180 细胞和 K562 细胞增殖无抑制作用, 与文献报道一致。

唾液酸(sialic acid, SA)与细胞膜的许多功能有关, 肿瘤细胞膜 SA 含量发生明显改变, 并涉及肿瘤转移、肿瘤相关抗原的暴露、免疫应答细胞活化等过程⁽⁵⁾。PPS、ASPS 作用后 S180 细胞的 SA 含量明显升高, 可能与它们的抗肿瘤作用有一定的联系。因为 SA 的增多影响细胞膜物质转运、抗原决定簇的暴露、免疫活性细胞的活化、膜表面受体功能的改变等与细胞增殖有关的因素, 而且本实验中作为阳性抗癌药物对照的多粘菌素 B 和氨甲喋呤亦引起 S180 细胞 SA 含量的明显升高。

胆固醇和磷脂是组成细胞膜脂质双层的重要成分, 胆固醇与磷脂的比值(Ch/Pl)是表示细胞膜流动性大小的一个常用参数, 与膜流动性呈反比关系。腹水瘤、白血病等肿瘤细胞膜的流动性较相应正常细胞明显增大, 而且膜流动性增大, 肿瘤转移的可能性亦提高⁽⁶⁾, 降低膜流动性, 肿瘤细胞的恶性程度也随之下降, 因此降低膜流动性可能起到一定抗癌作用。本实验 PPS 和 ASPS 对 S180 细胞的 Ch/Pl 比值和胆固醇无明显影响, 表明它们对 S180 细胞的增殖抑制, 与之没有明显联系, 但 PPS、ASPS 引起膜磷脂的减少值得注意, 其意义有待进一步研究。

参 考 文 献

1. 秦德安, 等. 用 Bialsche 试剂直接测定红细胞膜上唾液酸含量. 生物化学与生物物理进展 1987; (4): 63.
2. 陈春霞. 茯苓多糖体的药理药化研究及其临床应用初探. 中草药 1985; 16(4): 40.
3. 程秀娟, 等. 刺五加多糖的抗肿瘤作用及免疫作用. 癌症 1984; 3(3): 191.
4. 千原吴郎. 抗癌剂の現状と将来特に生药药理の观点から. 药理学杂志 1988; 108(3): 171.
5. 张惟杰. 唾液酸. 生物化学杂志 1986; 2(5): 1.
6. 田长富, 等. 高低转移性肺腺癌细胞膜流动性的测定及比较. 哈尔滨医科大学学报 1991; 25(4): 252.

(收稿: 1993-12-03 修回: 1994-04-28)