

米氏凯伦藻多糖的酶法制备及其体外抑制肿瘤血管生成活性

陈宇婷¹, 孟繁桐^{1,2}, 孔亮¹, 田夕凡¹, 谭成玉^{1*}¹大连海洋大学海洋科技与环境学院, 大连 116023; ²天津德恒科技有限公司, 天津 300384

摘要: 研究碱性蛋白酶酶解制备米氏凯伦藻多糖及其抑制肿瘤血管活性。采用闪式萃取结合酶法制备米氏凯伦藻多糖, 其适宜提取条件为碱性蛋白酶酶解温度 40 °C、酶解 pH 为 8.5、酶用量为 2.5%、酶解时间为 2 h。其提取液经三氯乙酸除蛋白、乙醇沉淀获得米氏凯伦藻多糖。制备的米氏凯伦藻多糖在一定浓度时可抑制肿瘤细胞培养液诱导的内皮细胞增殖和迁移作用, 具有一定的抑制肿瘤血管生成活性。

关键词: 米氏凯伦藻; 多糖; 闪式萃取结合酶法; 抑制血管生成

中图分类号: O629.1

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.9.023

Enzymatic Preparation of *Karenia* Polysaccharides and Its Anti-angiogenic Activity

CHEN Yu-ting¹, MENG Fan-tong^{1,2}, KONG Liang¹, TIAN Xi-fan¹, TAN Cheng-yu^{1*}¹College of Marine Technology and Environment, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;²Tianjin Deheng Science and Technology Co., Ltd, Tianjin 300384, China

Abstract: To investigate the preparation method on *karenia* polysaccharides with alkali protease enzymolysis from *Karenia mikimotoi* and its anti-angiogenic activity. The extraction of *karenia* polysaccharides was obtained by flash extraction combined with enzymolysis method, and the optimal process conditions were determined as enzymolysis temperature of 40 °C, pH 8.5, enzymolysis dosage of 2.5% and enzymolysis time of 2 h. The *karenia* polysaccharides were obtained by using trichloroacetic acid to get rid of protein and ethanol for precipitation. The *karenia* polysaccharides showed some inhibition on the viability and migration of induced human umbilical vein endothelial cells at certain concentration.

Key words: *Karenia mikimotoi*; polysaccharides; flash extraction-enzymolysis; anti-angiogenic activity

米氏凯伦藻 (*Karenia mikimotoi* Hansen) 为裸甲藻目 (Gymnodiniales), 凯伦藻属 (*Karenia*) 微藻, 常见于温带和热带浅海水域, 世界广布种, 是一种典型的鱼毒性赤潮甲藻。该藻于 1935 年在日本京都 Gokasho 湾首次发现, 随后在其它海域相继被发现。近年来已经在世界各国沿海及我国南海、渤海等海域引发过赤潮灾害, 造成了严重的渔业经济损失^[1,2]。其毒性作用主要在于分泌溶血性毒素和鱼毒素, 具有溶解鱼类鳃组织细胞的作用, 一直以来对其的研究主要集中于毒性方面, 如 Yamasaki、Parrish 等人^[3,4] 研究发现, 藻体中含有的某种不饱和脂肪酸及其糖基酰化甘油是其致毒的主要成份, 而对于其中的活性成分研究未见报道。前期我们从十余种海洋微藻提取物中筛选到米氏凯伦藻水提物对肿瘤

细胞培养液诱导的内皮细胞迁移具有一定的抑制作用^[5]。为了进一步确定米氏凯伦藻的活性成分, 本论文进行了闪式萃取结合酶法制备米氏凯伦藻多糖 (KPS) 的工艺优化, 并研究其对肿瘤细胞培养液诱导的内皮细胞增殖和迁移的抑制活性, 旨在为开发利用赤潮微藻——米氏凯伦藻提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

米氏凯伦藻 (*Karenia mikimotoi*), 为本实验室培养; 酶解用蛋白酶 (Solarbio 公司), 葡萄糖, 6% 苯酚, 硫酸, 磷酸二氢钠, 磷酸氢二钠, 95% 乙醇, 氯化钠, 三氯乙酸均为分析纯。

人脐静脉内皮细胞株 ECV304 购自中国科学院典型生物保藏中心细胞库; 人肝癌细胞, 人乳腺癌细胞 MCF-7 由大连大学医学院曾常茜教授惠赠; RPMI-1640 和 DMEM 细胞培养液; MTT, 台盼蓝, 蛋白酶 (Solarbio 公司); 胎牛血清 (杭州四季青公司); 二

收稿日期: 2016-01-11 接受日期: 2016-05-05

基金项目: 国家自然科学基金 (41306137); 辽宁省自然科学基金 (2013020127); 辽宁省高校杰出青年学者成长计划 (LJQ2014078)

* 通讯作者 Tel: 86-411-84763512; E-mail: tanchyu@dlou.edu.cn

甲基亚砷(Solarbio 公司),乙二胺四乙酸二钠(沈阳市联邦试剂厂),双抗(青霉素和链霉素,Invitrogen 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 米氏凯伦藻多糖的含量测定方法

精密称取 105 ℃ 下恒重的葡萄糖对照品配制浓度为 0.1 mg/mL 对照品溶液,精密量取对照品溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL,依次添加蒸馏水使其最终体积为 1 mL,各管再加入 6% 苯酚 1 mL,加入浓硫酸 5 mL,摇匀,静置 30 min。以 1.0 mL 水按同样显色操作作为空白,在 490 nm 处测定吸光度(A)值。以多糖质量浓度为横坐标,A 为纵坐标,绘制标准曲线。

样品的测定:取样品 5 mg 定容至 10 mL,配成 0.5 mg/mL 的样品溶液,取 1 mL 按标准曲线法测定吸光度值。由标准曲线计算出以葡萄糖计的 KPS 含量。

$\text{KPS 提取率} = (\text{提取物多糖含量} / \text{藻粉重量}) \times 100\%$ 。

1.2.2 KPS 的提取方法

分别采用:1. 连续加热回流提取(索氏提取器):每次提取 2 h,提取 2 次,合并提取液;2. 超声波提取:超声 30 min,热水回流提取 2 h,提取 2 次,合并提取液;3. 闪式提取器提取:闪式破碎 10 min,提取 2 次,合并提取液;4. 酶法 + 闪式破碎提取,酶用量 1%,闪式破碎 5 min,酶解温度为 35 ℃,提取 2 次,合并提取液;分别测定各提取液中 KPS 含量。

1.2.3 KPS 的酶法提取工艺优化

选用闪式破碎结合五种不同蛋白酶进行酶解,筛选较优蛋白酶,并优化适宜酶解工艺。

1.2.3.1 单因素实验

考察酶解 pH 值(A)、酶解时间(B)、酶解温度(C)和酶用量(D)4 个因素。每个因素取 4~6 个水平,测定各个因素对 KPS 提取率的影响。

1.2.3.2 正交实验

在单因素实验基础上,考察 A、B、C、D 4 个因素,每个因素取 3 个水平,按 $L_9(3^4)$ 正交表进行正交实验,并测定各组多糖提取率,获得适宜提取工艺条件。

1.2.4 乙醇沉淀 KPS

对上述米氏凯伦藻提取液中加入 80% 的三氯乙酸,至溶液的最终体积的 3%,静置过夜,在 4 ℃,10000 rpm 条件下离心 20 min。弃去沉淀,留上清液,并加入乙醇溶液,静置过夜后于 4 ℃,10000 rpm

条件下离心 20 min,收集沉淀,干燥,得 KPS 粗品。

1.2.5 KPS 对肿瘤细胞培养液诱导的内皮细胞增殖的影响实验

采用 MTT 法测定 KPS 对人脐静脉内皮细胞增殖的作用:取对数生长期的 ECV304 细胞,室温下用 0.25% 的胰酶消化 3 min 后,用完全培养基停止消化。0.4% 台盼蓝染色进行活细胞计数,调整细胞浓度为 5×10^4 个/mL。按 200 μL /孔的体积将上述细胞悬液接种于 96 孔板。正常细胞培养条件下培养 24 h 后,弃培养液。

实验分为阴性对照组、诱导组和处理组。诱导组为在阴性对照组中加入 10% 肿瘤细胞培养液 20 μL ;处理组为加入 10% 肿瘤细胞培养液 20 μL 后,再分别加入 KPS 溶液,使其终浓度分别为 5、10、25、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在 5% CO_2 的 37 ℃ 培养箱中继续培养 24 h 后,每孔加入 20 μL MTT(5 mg/mL,用 pH 7.4 的 PBS 配制),培养 4 h 后,弃去培养基,每孔加入 100 μL DMSO,在恒温振荡器上振荡 10 min,使结晶充分溶解。用酶标仪在 570 nm 波长处检测吸光度(A),每组均设 5 个重复。设定阴性对照组 ECV304 的生长率为 100%,其它组细胞生长率依据测得的吸光度值与阴性对照组相比而得。

1.2.6 KPS 对肿瘤细胞培养液诱导的内皮细胞迁移的影响

采用创伤愈合法检测 KPS 对肿瘤细胞培养液诱导的血管内皮细胞迁移的影响^[6]:取对数生长期的 ECV304 细胞正常条件培养 24 h 细胞长成单层后,用直径为 0.5 mm 的细胞刮棒在 24 孔板中间划痕,切断细胞单层,用 PBS 冲洗 2 遍去掉刮下的游离细胞。

实验分为阴性对照组、诱导组和处理组。其中诱导组为在阴性对照组中加入 10% 肿瘤细胞培养液;处理组为加入 10% 肿瘤细胞培养液 100 μL 后,再分别加入 KPS 溶液(浓度为 1 mg/mL,由 1640 完全培养基配制,0.22 μm 微孔滤膜过滤),使其终浓度分别为 50 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,每组均设 5 个重复。在 5% CO_2 的 37 ℃ 培养箱中培养 24 h 后,在 100 倍的倒置光学显微镜下观察不同处理条件下,细胞向中间划痕部位迁移情况。

2 结果与分析

2.1 葡萄糖标准曲线的绘制

回归方程为 $y = 11.240x - 0.0086, R^2 = 0.9996,$

表明葡萄糖的含量在 20 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内呈现良好的线性关系。

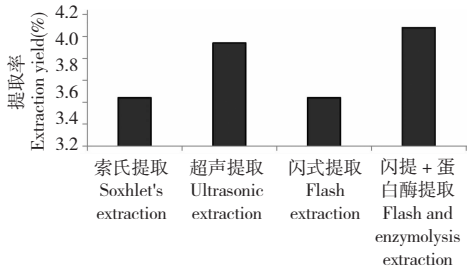


图 1 不同提取方法对多糖提取率的影响

Fig. 1 The effect of different extraction methods on the yield of polysaccharides

2.2 KPS 的提取方法

由图 1 可以看出,采用四种方法提取 KPS,以闪式破碎处理结合酶法提取多糖的提取率最高,主要原因是由于微藻细胞壁坚硬,普通方法难以将其破碎。采用闪式破碎提取技术结合蛋白酶的恰当处理,可使细胞壁软化、膨胀和崩溃,改变其通透性,彻底破碎细胞壁,使细胞内的有效成分“迅速”直接溶解到溶剂中去,瞬间完成提取过程。因此采用物理方法和酶法相结合提高了多糖提取率。

2.3 KPS 的酶法提取工艺优化

采用 5 种酶酶解提取 KPS,酶用量均为 1%,闪式破碎 5 min,酶解温度 35 $^{\circ}\text{C}$,酶解时间 1 h (如图 2)。可以看出,5 种酶中使用碱性蛋白酶对 KPS 的提取率最高,其次是木瓜蛋白酶,最低的为酸性蛋白酶。因此选择碱性蛋白酶为米氏凯伦藻多糖提取的

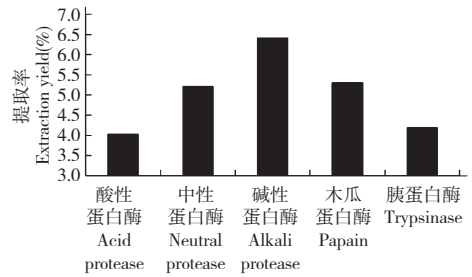


图 2 不同种类蛋白酶对多糖提取率的影响

Fig. 2 The effect of different enzymes on the extraction yield of polysaccharides

最佳蛋白酶。

2.3.1 单因素实验

由图 3A 可以看出,酶解 pH 值对 KPS 提取率具有一定的影响。pH 的增大与减小都直接影响酶的活性,当 pH = 8.5 时 KPS 提取率最高,因此选取 pH = 8.5 为适宜酶解 pH 值。在图 3B 中,可以看出当酶解时间为 1.5 h 时多糖的提取率达到最大值,而后逐渐下降,因此选取酶解的适宜提取时间为 1.5 h。图 3C 可见,在酶解温度为 40 $^{\circ}\text{C}$ 之前,随着温度升高,分子间的运动越激烈,反应物之间相互接触的机会大大增加,反应速率加快,多糖提取率变大,但当温度高于 40 $^{\circ}\text{C}$ 后,导致酶的稳定性降低,酶活性下降。因而可确定适宜酶解温度为 40 $^{\circ}\text{C}$ 。图 3D 显示出,随着酶用量的增加,KPS 的提取效率整体呈现上升的趋势,当酶用量为 0.5% 至 2.0% 之间多糖提取率逐渐升高,到 2.0% 达到一个波峰,2.0% 至 2.5% 又略微减少,因此选取 2.0% 为适宜酶用量值。

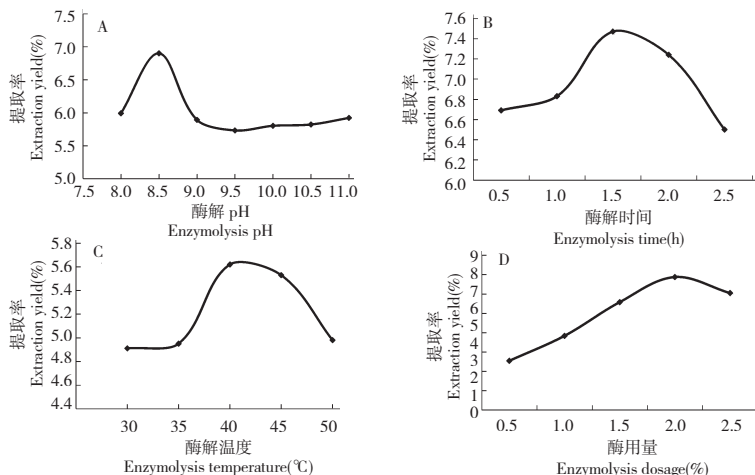


图 3 酶解 pH 值 (A)、酶解时间 (B)、酶解温度 (C) 及酶用量 (D) 对米氏凯伦藻多糖提取率的影响

Fig. 3 Effects of enzymolysis pH (A), enzymolysis time (B), enzymolysis temperature (C) and enzymolysis dosage (D) on the extraction yield of polysaccharides

2.3.2 正交实验

在单因素的基础上,考察酶解 pH 值、酶解时间、酶解温度、酶用量 4 个因素对 KPS 提取率的影响,选取因素和水平见表 1。

以单因素实验得出的较优因素为水平设计正交试验,选取 $L_9(3^4)$ 正交表进行实验,以米氏凯伦藻多糖提取率作为考察指标进行实验。正交实验结果及方差分析见表 2。

表 1 正交因素及水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiments

水平 Level	1	2	3
(A) 酶解 pH Enzymolysis pH	8.0	8.5	9.0
(B) 酶解时间 Enzymolysis time (h)	1.0	1.5	2.0
(C) 酶解温度 Enzymolysis temperature (°C)	35	40	45
(D) 酶用量 Enzymolysis dosage (%)	1.5	2.0	2.5

由表 2 可以看出极差 $C > A > D > B$, C 影响最显著,其次为 A、D 影响较小,B 最小。由此确定米氏凯伦藻多糖提取的较佳工艺参数为:C2A2D3B3,

即较佳工艺条件为:酶解温度 40 °C、酶解 pH 为 8.5、酶用量为 2.5%、酶解时间为 2 h。在此条件下米氏凯伦藻多糖 KPS 的提取率为 9.71%。

表 2 正交实验结果及方差分析

Table 2 Orthogonal experimental results and analysis

组别 Group	A	B	C	D	提取率 Extraction yield (%)
1	1	1	1	1	5.70
2	1	2	2	2	7.09
3	1	3	3	3	7.13
4	2	1	2	3	8.01
5	2	2	3	1	8.07
6	2	3	1	2	6.90
7	3	1	3	2	7.00
8	3	2	1	1	6.52
9	3	3	2	3	7.87
K1	19.92	20.71	19.12	20.29	
K2	22.98	21.68	22.97	20.99	
K3	21.39	21.90	22.20	23.01	
极差 R	3.06	1.19	3.85	2.72	
因素主次 Factor	C	A	D	B	
最优条件 Optimal Condition	C2	A2	D3	B3	

2.4 KPS 对肿瘤细胞培养液诱导的内皮细胞增殖的影响

在肿瘤生长过程中,肿瘤细胞通过自分泌或旁分泌产生 VEGF 等大量促进血管生成的因子,存在于血管内皮细胞上的这些细胞因子的受体在接受相应细胞因子刺激后血管内皮细胞就被活化、增殖。由图 4 可以看出,以 10% 的人肝癌细胞培养液诱导

后,ECV304 的生长率可达 116.2%,即肿瘤细胞培养液能够明显促进 ECV304 的增殖,而用不同浓度的 KPS 溶液处理后在一定程度上可以抑制肿瘤细胞培养液对 ECV304 生长的促进作用,特别是当 KPS 浓度在 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,抑制作用明显,但当 KPS 的浓度为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,抑制作用有减弱,但仍有一定的抑制作用。可见,

KPS 对肿瘤细胞培养液诱导的内皮细胞增殖具有一定的拮抗作用。

在肿瘤血管生成时,血管内皮细胞在肿瘤细胞分泌的促血管生成因子的作用下的增殖是肿瘤血管生成的起始步骤,也是肿瘤血管生成必不可少的过程,因此抑制血管内皮细胞在这些促血管生成因子诱导下的增殖对于抑制肿瘤血管生成来说是非常有意义的。

2.5 KPS 对肿瘤细胞培养液诱导的内皮细胞迁移的影响

肿瘤细胞能产生 VEGF、bFGF 等多种促血管生成因子,通过不同机制诱发血管生成,同时还能引起

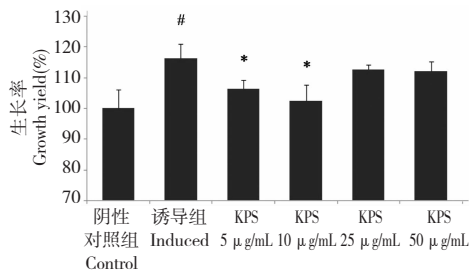


图4 KPS 对肿瘤细胞培养液诱导的 ECV304 增殖的影响

Fig. 4 Effect of KPS on tumor cell-induced ECV304 viability

注:与阴性组相比,[#] $P < 0.01$;与诱导组相比,^{*} $P < 0.01$

Note: Compared with the control group, [#] $P < 0.01$; compared with the induced group, ^{*} $P < 0.01$

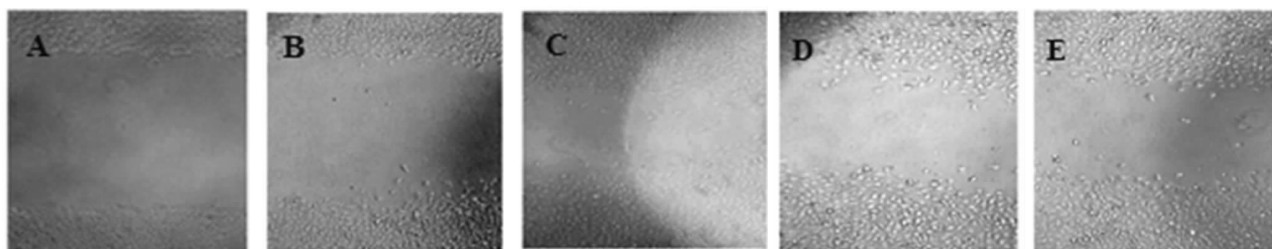


图5 KPS 对肿瘤细胞培养液诱导的 ECV304 细胞迁移的影响

Fig. 5 The effect of KPS on induced cell ECV 304 migration

注:A. 空白对照组 0 h; B. 空白对照组 24 h; C. 肿瘤细胞培养液诱导组 24 h; D. 肿瘤细胞培养液 + 50 μg/mL KPS 24 h; E. 肿瘤细胞培养液 + 100 μg/mL KPS 24 h

Note: A. medium alone for 0 h; B. medium alone for 24 h; C. MCF-7 culture fluid alone for 24 h; D. MCF-7 culture fluid and 50 μg/mL KPS for 24 h; E. MCF-7 culture fluid and 100 μg/mL KPS for 24 h

血管内皮细胞的迁移,经由血管内皮细胞移向肿瘤内,实现肿瘤血管生成。由图 5 可以看出,10% MCF-7 培养液能够明显促进 ECV304 细胞的迁移,而浓度为 50 和 100 μg/mL 的 KPS 均能抑制 MCF-7 培养液对 ECV304 细胞的迁移促进作用,两者抑制作用相当,提示米氏凯伦藻多糖具有一定的抑制肿瘤血管生成作用。

3 结论

本文基于传统水提醇沉法对米氏凯伦藻采用闪式破壁处理,并结合蛋白酶水解制备米氏凯伦藻多糖 KPS。通过单因素和正交试验考察了酶解时间、酶解 pH 值、酶解温度和酶用量对 KPS 提取率的影响,采用碱性蛋白酶提取 KPS 的适宜工艺条件为碱性蛋白酶酶解温度 40 ℃、酶解 pH 为 8.5、酶用量为 2.5%、酶解时间为 2 h。制备纯化得到的米氏凯伦藻多糖在一定浓度时具有抑制肿瘤细胞培养液诱导的内皮细胞增殖和迁移活性,即具有一定的抑制肿

瘤血管生成活性。

致谢:感谢研究生胡晓娟、刘斌在多糖的制备和活性测定给予的帮助。

参考文献

- Zhang DP (张冬鹏), Yang EL (杨二俐), Huang YH (黄毅华). Status and tendency of harmful algal blooms in Shenzhen waters near years. *Environ Monit Chin* (中国环境监测), 2002, 18(5): 24-27.
- Cao CH (曹春晖), Sun ZN (孙之南), Wang XK (王学魁), et al. Preliminary study on net-phytoplankton community structure and red tide causative species in Tianjin sea area, Bohai sea. *J Tianjin Univ Sci Tech* (天津科技大学学报), 2006, 21(3): 34-37.
- Yamasaki Y, Kim D, Matsuyama Y, et al. Production of superoxide anion and hydrogen peroxide by the red tide dinoflagellate *Karenia mikimotoi*. *J Biosci Bioeng*, 2004, 97: 212-215.

(下转第 1442 页)