

恒山黄芪多糖对人宫颈癌细胞 SiHa 的抑制效应分析

李平, 胡建燃*, 铁军

长治学院生物科学与技术系, 长治 046011

摘要: 本文旨在探讨道地药材恒山黄芪的多糖成分对人宫颈癌细胞 SiHa 生长和迁移能力的抑制效应。通过采用 MTT 法验证恒山黄芪多糖对 SiHa 细胞生长活力的抑制效应, 利用细胞黏附试验和铺展试验检测恒山黄芪多糖对 SiHa 细胞的粘附能力和铺展能力的影响, 并采用划痕试验检测恒山黄芪多糖对 SiHa 细胞迁移运动能力的抑制效应。结果表明: 恒山黄芪多糖具有抑制 SiHa 细胞增殖的活性 (IC_{50} 值为 0.25 mg/mL), 并且在低浓度 (0.0625 mg/mL) 时仍然能够有效抑制其生长; 与对照细胞相比, 恒山黄芪多糖处理的细胞在培养器皿底部的黏附能力和铺展能力显著下降 ($P < 0.01$), 并且明显抑制了 SiHa 细胞迁移运动能力 ($P < 0.01$)。因此, 道地药材恒山黄芪的多糖成分具有抑制人宫颈癌细胞 SiHa 的增殖、粘附、铺展以及迁移运动的活性。

关键词: 恒山黄芪; 多糖; 肿瘤细胞; 粘附; 铺展; 迁移

中图分类号: R737.3

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.4.021

Inhibitory Effect of Hengshan Astragalus Polysaccharides on Human Cervical Cancer Cell SiHa

LI Ping, HU Jian-ran*, TIE Jun

Department of Biological Sciences and Technology of Changzhi University, Changzhi 046011, China

Abstract: To evaluate the effects of Hengshan *Astragalus* polysaccharides on human cervical cancer cell SiHa, MTT assay was used to determine cell proliferation and viability of SiHa. The cell adhesive assay and cell spreading assay were used to detect the adhesive and spreading capabilities of SiHa, and the wound-healing assay was used to access the migration capability of SiHa. The results indicated that Hengshan *Astragalus* polysaccharides showed significant activity of suppressing SiHa cell proliferation (IC_{50} value was 0.25 mg/mL) even at a low concentration (0.0625 mg/mL). Compared with the control group, the adhesive and spreading capability of SiHa cells treated with Hengshan *Astragalus* polysaccharides were obviously reduced ($P < 0.01$), and the migration capability was also depressed remarkably ($P < 0.01$). Therefore, polysaccharides from the genuine medicinal material Hengshan *Astragalus* can inhibit the proliferation, adhesion, spreading and migration capability of human cervical cancer cell SiHa.

Key words: Hengshan *Astragalus*; polysaccharides; cancer cells; cell adhesion; cell spreading; cell migration

黄芪是中国传统的中药材, 在我国内蒙古、山西、黑龙江、辽宁、河北、四川等省份均有分布^[1]。其中, 以产于恒山山脉的山西省浑源县的恒山黄芪品质最优, 分叉少, 成品绵性大、粉性和甜味足, 又称为“正北芪”。

黄芪多糖是黄芪的主要活性成分, 可分为葡聚糖和杂多糖。近年来, 大量研究表明黄芪多糖具有调节免疫、抗炎、抗氧化、抗肿瘤、抑菌等生理活性^[2]。其中, 关于黄芪多糖的抗肿瘤活性的研究,

主要集中于抑制肿瘤细胞的增殖以及诱导肿瘤细胞凋亡方面, 例如 Huang 等的研究发现黄芪多糖可能通过下调 Notch1 的表达, 诱导肝癌细胞的凋亡^[3]; Zhang 等人则发现: 在 H460 等非小细胞肺癌细胞株中, 黄芪多糖可能通过抑制 Notch1 和 Notch3 以及上调 p53、p21 等抑癌基因的表达, 抑制其增殖并诱导其凋亡^[4]; Guo 等的临床研究表明黄芪多糖注射液、长春瑞滨和顺铂三者联用有利于提高进展期的非小细胞肺癌患者的生活质量和存活率, 但是其机制尚待阐明^[5]; 武有明等发现黄芪多糖对肺癌环境中骨髓间充质细胞的增殖、分化具有抑制效应^[6]。肿瘤转移是恶性肿瘤致死的重要原因, 然而, 少有文献对黄芪多糖与肿瘤细胞侵袭运动能力的相关性方面进

收稿日期: 2016-08-26 接受日期: 2016-11-14

基金项目: 山西省“服务产业创新学科群”培育项目; 山西省高校创新学科群项目子项目 (XKQZXM200601)

* 通讯作者 Tel: 86-355-2178013; E-mail: hjr_possible@163.com

行报道。本文以道地药材恒山黄芪为材料,提取并精制其多糖成分,以人宫颈癌细胞 SiHa 为测试对象,首先验证恒山黄芪多糖对该细胞株增殖的抑制效应,然后重点探讨其对肿瘤细胞黏附、铺展以及迁移能力的影响,以期为进一步揭示黄芪多糖抗肿瘤机制奠定基础,也为恒山黄芪的深度开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人宫颈癌细胞株 SiHa 购买于江苏齐氏生物科技有限公司;DMEM 培养基购买于北京索来宝生物科技有限公司;胎牛血清购买于杭州四季青生物工程材料有限公司;四氮甲唑蓝(MTT)、丝裂霉素 C、二甲基亚砷(DMSO)等购买于北京依托华茂生物科技有限公司;本实验中所用的恒山黄芪购自山西省浑源县黄芪基地,其多糖制备方法参看文献^[7]。

1.2 仪器与设备

CO₂ 培养箱(美国热电公司);超净工作台(上海博迅实业有限公司);XSP-6C 光学倒置显微镜(日本 Olympus 公司);SpectraMax M2 多功能酶标仪[美谷分子仪器(上海)有限公司];BSA 124S-CW 电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

人宫颈癌细胞 SiHa 采用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,在 5% CO₂、37 °C 的细胞培养箱中培养,约 2 d 后利用胰酶-EDTA 消化液进行消化、传代。

1.3.2 MTT 法检测细胞的增殖及活力

配制浓度为 2.5×10^4 个/mL 的细胞悬液,向 96 孔培养板中每孔加入 200 μ L,分为空白对照组和多糖处理组,每组设置 5 个复孔,于 5% CO₂、37 °C 条件下培养过夜后,向多糖处理组孔内加入对应浓度的恒山黄芪多糖溶液,培养结束后,向其中加入 1/10 体积的 5 mg/mL MTT 溶液,继续培养 4 h,然后弃去培养基,加入 150 μ L DMSO,振荡 10 min 后,在酶标仪上测定 OD₅₇₀ 值,并计算抑制率。

1.3.3 细胞黏附及铺展能力检测

配制浓度为 1×10^5 个/mL 的细胞悬液,向 96 孔培养板中每孔加入 200 μ L,分为空白对照组和多糖处理组,每组设置 5 个复孔,培养 30 min 后,弃去培养基并用 37 °C 预热的磷酸盐缓冲液洗去未贴壁的细胞,然后用 MTT 法检测贴壁细胞的相对数量,

分析恒山黄芪多糖对细胞黏附能力的影响。

配制浓度为 5×10^4 个/mL 的细胞悬液,向 6 孔培养板中每孔加入 2.0 mL,然后分别在不同时间点对对照组和多糖处理组细胞进行显微拍照,分析恒山黄芪多糖对细胞铺展过程的影响。

1.3.4 划痕试验

配制浓度为 5×10^4 个/mL 的细胞悬液,向 12 孔培养板中每孔加入 1.0 mL,分为空白对照组和多糖处理组,在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 48 h 至细胞汇合率接近 100%,用 25 μ g/mL 丝裂霉素 C 处理 1 h。划痕后,用磷酸盐缓冲液漂洗,确保脱落细胞被清除干净。然后,加入培养基继续培养,在不同时间点进行显微拍照。然后,采用 Image-Pro Plus 6.0 软件测量划痕宽度,计算迁移率,分析恒山黄芪多糖对细胞迁移能力的影响。

2 结果与分析

2.1 恒山黄芪多糖抑制 SiHa 细胞的增殖

用磷酸盐缓冲液将恒山黄芪多糖配制成 50 mg/mL 的溶液,然后对其进行依次稀释成浓度为 37.5、25、18.75、12.5、6.25、3.125 mg/mL 和 1.5625 mg/mL 的溶液,以 1% 的体积比加入到培养基中处理 SiHa 细胞 72 h,然后采用 MTT 法检测不同浓度的恒山黄芪多糖对该细胞活力的影响。结果如图 1 所示,当恒山黄芪多糖浓度从 1.5625 mg/mL (终浓度为 0.0156 mg/mL) 提高至 50 mg/mL (终浓度为 0.50 mg/mL) 时,抑制率从 1.89% 达到 84.40%,呈明显的量效关系,经计算,其 IC₅₀ 值为 0.25 mg/mL。该结果表明恒山黄芪多糖对人宫颈癌细胞 SiHa 具有抑制作用。

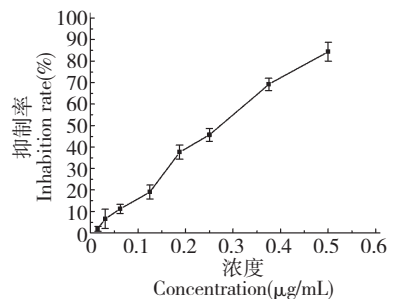


图 1 不同浓度的恒山黄芪多糖溶液对 SiHa 细胞活力的抑制效应

Fig. 1 The inhibitory effect of Hengshan *Astragalus* polysaccharides with different concentrations on SiHa cell viability

当恒山黄芪多糖终浓度为 0.0625 mg/mL 时,其对 SiHa 细胞的抑制率为 11.19%,相对较低,因此选为后续实验的使用浓度。以该浓度的恒山黄芪多糖溶液处理细胞,分析低浓度的多糖对细胞长期生长的活力的影响。结果如图 2 所示,从第 2 天起,对照组的细胞活力即大于多糖处理组,从第 3 天至第 5 天,多糖处理组的细胞活力明显小于对照组 ($P < 0.01$),表明低浓度的恒山黄芪多糖在 SiHa 细胞的长期生长过程中呈现出明显的抑制效应。

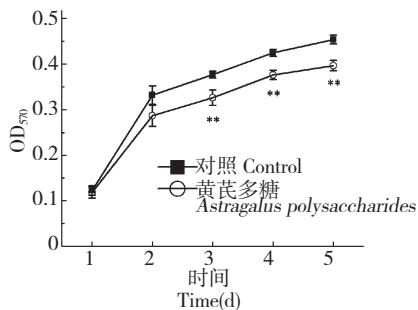


图 2 低浓度的恒山黄芪多糖对 SiHa 细胞增殖的抑制效应

Fig. 2 The inhibitory effect of Hengshan *Astragalus polysaccharides* at a low concentration on SiHa cell proliferation

注:与对照组相比, ** $P < 0.01$

Note: Compared with control group, ** $P < 0.01$

2.2 恒山黄芪多糖抑制 SiHa 细胞的黏附和铺展

以终浓度为 0.0625 mg/mL 的恒山黄芪多糖溶液处理 SiHa 细胞 72 h 后,通过细胞黏附试验检测恒山黄芪多糖对该细胞黏附的影响。结果如图 3 所示,恒山黄芪多糖显著减弱了 SiHa 细胞的黏附能力 ($P < 0.01$)。

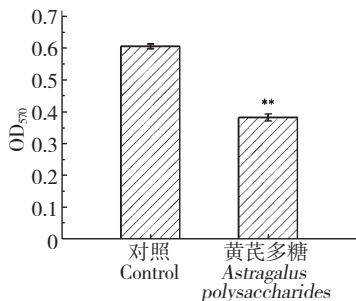


图 3 恒山黄芪多糖对 SiHa 细胞黏附的抑制效应

Fig. 3 Inhibitory effect of Hengshan *Astragalus polysaccharides* on SiHa cells adhesion

注:与对照组相比, ** $P < 0.01$

Note: Compared with control group, ** $P < 0.01$

通过细胞铺展试验,检测恒山黄芪多糖对 SiHa

细胞铺展过程的影响,结果如图 4A 所示,在培养 6 h 后,在显微镜下观察,对照组和多糖处理组细胞均已贴壁,但是对照细胞呈明显比恒山黄芪多糖处理的细胞更为扁平;培养 12 h 后,这种差异依然存在。通过软件对两组细胞的铺展面积进行测量和计算,经统计学分析,结果如图 4B 所示,在培养 6 h 和 12 h 时,恒山黄芪多糖处理的细胞铺展面积均显著小于对照细胞 ($P < 0.01$)。

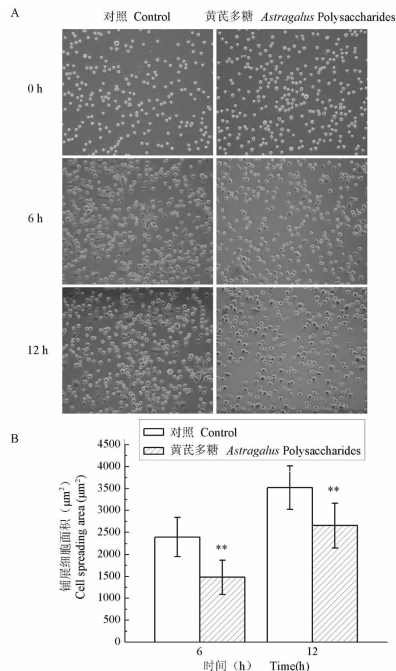


图 4 低浓度的恒山黄芪多糖对 SiHa 细胞铺展的抑制效应

Fig. 4 Inhibitory effect of Hengshan *Astragalus polysaccharides* on SiHa cell spreading

A. SiHa 细胞铺展过程 (×20); B. SiHa 细胞铺展面积统计

A. The spreading process of SiHa cells (×20); B. The spreading areas of SiHa

注:与对照组相比, ** $P < 0.01$

Note: Compared with control group, ** $P < 0.01$

2.3 恒山黄芪多糖抑制 SiHa 细胞迁移

以终浓度为 0.0625 mg/mL 的恒山黄芪多糖溶液处理 SiHa 细胞 72 h 后,进行划痕试验,结果如图 5A 所示,用丝裂霉素 C 抑制细胞增殖,培养 6 h 后,恒山黄芪多糖处理组细胞划痕的宽度明显大于对照组划痕,培养 12 h 后,这种差异更为明显。利用软件对划痕宽度进行测量并计算两组细胞的迁移率,结果如图 5B 所示,恒山黄芪多糖处理后, SiHa 细胞的迁移率显著小于对照组细胞 ($P < 0.01$),表明恒山黄芪多糖抑制了 SiHa 细胞的迁移运动能力。

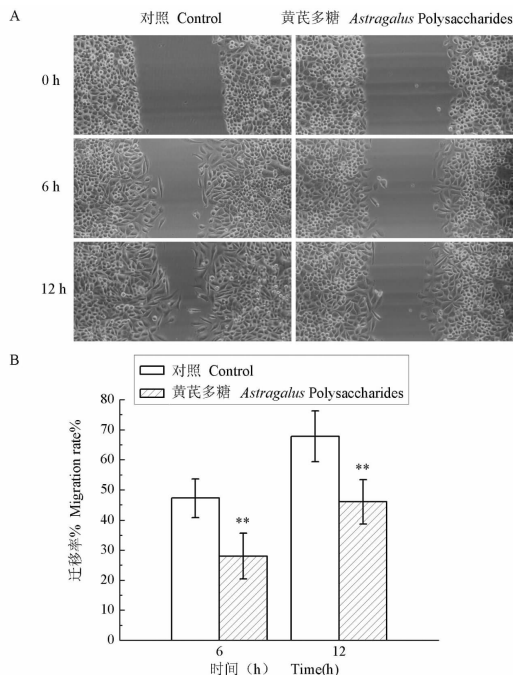


图5 低浓度的恒山黄芪多糖抑制 SiHa 细胞的迁移运动
Fig. 5 Inhibitory effect of Hengshan *Astragalus* polysaccharides on SiHa cell migration

A. 划痕试验 ($\times 20$); B. 细胞迁移率统计结果(与对照组相比, ** $P < 0.01$)

A. Scratch test ($\times 20$); B. Migration of SiHa cells (Compared to the control group, ** $P < 0.01$)

3 讨论与结论

多糖是中草药的主要活性成分之一,目前其在肿瘤治疗中的应用主要涉及三个方面的机制,即抑制肿瘤组织生长、减少化疗所造成的免疫损伤以及保护造血系统^[8]。对于抑制肿瘤细胞生长方面的研究,目前已有大量文献报道了多种中药多糖具有抑制肿瘤细胞增殖或诱导其凋亡的活性,例如石见穿多糖能有效提高荷瘤小鼠免疫相关细胞数量,并促进 IFN- γ 和 IL-2 的分泌,起到显著的抗肿瘤免疫增强活性^[9];纳米山药多糖能够活化 Caspase-3 和 Caspase-8,诱导人肝癌细胞 HepG2、人胃癌细胞 SGC7901、人宫颈癌细胞 Hela 以及人前列腺癌细胞 DU145 的凋亡^[10];硒化的纹党参多糖则能够显著抑制肺腺癌细胞 A549 的增殖^[11];金樱根多糖与 5-氟尿嘧啶联用对小鼠体内肿瘤抑制具有明显的增效减毒作用^[12]。本研究发现道地药材恒山黄芪多糖能够抑制人宫颈癌细胞 SiHa 的增殖 (IC_{50} 值为 0.25 mg/mL),即使是在低浓度(0.0625 mg/mL)时,从培

养的第 3 天开始,多糖处理的细胞活力就显著低于对照组,证实恒山黄芪多糖具有抑制人宫颈癌细胞 SiHa 活力的作用。但是,其分子机制需要进一步的研究才能予以揭示。

肿瘤细胞对其周围组织及血管的侵袭浸润是恶性肿瘤转移的关键,也是癌症威胁人类生命的重要因素,找到抑制肿瘤细胞迁移运动的药物是控制癌症扩散的有效方法。其中,黏附能力是肿瘤细胞铺展以及转移扩散的重要因素之一,因为细胞与外基质的相互作用为其生长提供了关键的微环境。然而,目前少有文献报道黄芪多糖与肿瘤细胞粘附和侵袭运动的相关性研究。有文献显示黄芪多糖可能通过 p38 MAPK 信号通路下调人心脏微血管内皮细胞缺血再灌注损伤黏附分子的表达^[13];Liu 等发现由黄芪多糖、黄芪皂苷以及丹参多酚酸组成的复合制剂能够有效抑制人肝癌细胞 HepG2 的侵袭运动^[14];明海霞等发现黄芪多糖可能通过抑制 NF- κ B 和 MAPK 信号通路的活化,抑制小鼠 Lewis 肺癌细胞的转移^[15];李超等的研究发现黄芪多糖可能通过下调 MMP-9 和 MMP-2 的表达,抑制视网膜母细胞瘤细胞 RB44 的侵袭运动^[16]。本文以低浓度(0.0625 mg/mL)的恒山黄芪多糖处理人宫颈癌细胞 SiHa 后,发现其有效抑制了该肿瘤细胞的黏附、铺展以及迁移运动能力,提示该多糖可能具有抗肿瘤细胞转移的药理作用。但是,恒山黄芪多糖的成分组成、影响肿瘤细胞粘附和迁移的分子机制以及在体内环境是否还具备上述功能,需要后续的研究予以证实。

参考文献

- Deng XX (邓晓霞), Li QS (李清宋), Chen Z (陈中), *et al.* Advances in antitumor mechanisms of Radix Astragali. *Tradit Chin Drug Res Pharmacol* (中药新药与临床药理), 2016, 27: 307-312.
- Yuan H (袁红), Zhang SF (张淑芳), Jia SH (贾绍辉), *et al.* Progress in application and biological activity of Radix Astragali in health foods. *Food Sci* (食品科学), 2014, 35: 330-334.
- Huang WH, Liao WR, Sun RX. Astragalus polysaccharide induces the apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells by decreasing the expression of notch1. *Int J Mol Med*, 2016, 38: 551-557.
- Zhang JX, Han YP, Bai C, *et al.* Notch1/3 and p53/p21 are a potential therapeutic target for APS-induced apoptosis in

- non-small cell lung carcinoma cell lines. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 15:12539-12547.
- 5 Guo L, Bai SP, Zhao L, et al. Astragalus polysaccharide injection integrated with vinorelbine and cisplatin for patients with advanced non-small cell lung cancer: effects on quality of life and survival. *Med Oncol*, 2012, 29:1656-1662.
 - 6 Wu YM (武有明), Zhang Q (张齐), Liu YQ (刘永琦), et al. Effects of Astragalus polysaccharides on proliferation and expression of TAFs related molecule of bone marrow mesenchymal stem cells in the lung cancer microenvironment. *Pharmacol Clin Chin Mater Clin Med* (中药药理与临床), 2015, 31(6):76-79.
 - 7 Hu JR (胡建燃), Li P (李平), Qin LP (秦路鹏), et al. Extraction and comparative analysis on antioxidative activities *in vitro* of polysaccharides from Hengshan Astragalus and *Lycium barbarum*. *Acta Bot Bor-Occid Sin* (西北植物学报), 2016, 36:1654-1661.
 - 8 Lin J (林俊), Li P (李萍), Chen KS (陈靠山). Advance in studies on anti-tumor activity of polysaccharides in latest five years. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2013, 38:1116-1125.
 - 9 Cheng Z (程卓), Zhao WH (赵文豪), Huang X (黄旭), et al. Anti-tumor and immunomodulatory effects of polysaccharides from *Salvia chinensis* Benth. on H22 tumor-bearing mice. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2016, 28:846-851.
 - 10 Shi YX (石亿心), Yu L (于莲), Zhai MF (翟美芳), et al. Effect of nano Chinese Yam polysaccharide on 4 kinds of tumor cells. *Chin J Modern Appl Pharm* (中国现代应用药学), 2016, 33:967-971.
 - 11 Chen WX (陈文霞), Zhang P (张培), Gao X (高霞), et al. Selenylation of polysaccharides from *Codonopsis pilosula* and its inhibition against A549 cells. *Chin Tradit Patent Med* (中成药), 2015, 37:2408-2413.
 - 12 Feng CE (冯承恩), Tian SY (田素英). Separating and purifying polysaccharides from root of cherokee rose and its *in vivo* effect of antitumor activity. *Chin J Exp Med Formul* (中国实验方剂学杂志), 2011, 17:209-212.
 - 13 Zhu HY, Gao YH, Wang ZY, et al. Astragalus polysaccharide suppresses the expression of adhesion molecules through the regulation of the p38 MAPK signaling pathway in human cardiac microvascular endothelial cells after ischemia-reperfusion injury. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013:280493.
 - 14 Liu X, Yang Y, Zhang X, et al. Compound Astragalus and *Salvia miltiorrhiza* extract inhibits cell invasion by modulating transforming growth factor-beta/Smad in HepG2 cell. *J Gastroenterol Hepatol*, 2010, 25:420-426.
 - 15 Ming HX (明海霞), Chen YW (陈彦文), Zhang F (张帆), et al. Effects of Astragalus polysaccharide combined with Cis-dichlorodiamineplatinum II dichloride on Lewis lung transplanted tumor metastasis and its mechanism. *Acta Acad Sin* (解剖学报), 2016, 47:493-501.
 - 16 Li C (李超), Qian XH (钱新华), Qian XL (千新来), et al. Effects of Astragalus polysaccharide on the invasive ability of retinoblastoma cells. *Rec Adv Ophthalmol* (眼科新进展), 2014, 34:530-532.

(上接第 663 页)

- 17 Zhou XL, Kong XF, Lian GQ, et al. Dietary supplementation with soybean oligosaccharides increases short-chain fatty acids but decreases protein-derived catabolites in the intestinal luminal content of weaned Huanjiang mini-piglets. *Nutr Res*, 2014, 34:780-788.
- 18 Segain JP, Raingeard DABD, Bourreille A, et al. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut*, 2000, 47:397-403.
- 19 Kong XF, Zhou XL, Lian GQ, et al. Dietary supplementation with chitoooligosaccharides alters gut microbiota and modifies intestinal luminal metabolites in weaned Huanjiang mini-piglets. *Livest Sci*, 2014, 160:97-101.
- 20 Xin N (辛娜), Diao QY (刁其玉), Zhang NF (张乃锋). The mechanism of skatole effects on animals and effective ways to reduce emissions. *J China Feed* (中国饲料), 2011, 8:7-9.
- 21 Blachier F, Mariotti F, Huneau JF, et al. Effects of amino acid-derived luminal metabolites on the colonic epithelium and physiopathological consequences. *Amino Acids*, 2007, 33:547-562.
- 22 Wang DS (王东升). Effects of high concentrate feeding on the concentration of biogenic amines in the rumen and hindgut. Nanjing: Nangjing Agricultural University (南京农业大学), Msc. 2012.
- 23 Fang TT (方婷婷), Liu GM (刘光芒), Jia G (贾刚), et al. Polyamines: regulation on intestinal homeostasis and possible mechanisms. *Chin J Anim Nutr* (动物营养学报), 2016, 28:3400-3407.