

## 鹅绒委陵菜多糖抗肿瘤作用研究

刘素君<sup>1</sup>, 李世元<sup>1</sup>, 宋九华<sup>1</sup>, 江南<sup>2</sup>, 曹玫<sup>2\*</sup> (1.乐山师范学院天然产物研究所, 四川 乐山 614004; 2.四川省医学科学院·四川省人民医院临床医学中心实验室, 成都 610072)

**摘要:**目的 探讨鹅绒委陵菜多糖(PAP)的抗肿瘤作用。方法 采用 MTT 法研究 PAP 对体外培养人肝癌细胞 SMMC-7721 的增殖抑制作用; 并将 S180 荷瘤小鼠随机分组, 灌胃给予 50, 100, 200 mg·kg<sup>-1</sup> 剂量的 PAP, 研究 PAP 对荷瘤小鼠的抑瘤率和免疫功能的影响。结果 体外实验结果显示 PAP 对 SMMC-7721 细胞的体外增殖有显著抑制作用, 400 mg·L<sup>-1</sup> PAP 组抑制率最高, 为 43.57%; PAP 对人肝癌 SMMC-7721 细胞的抑制作用呈剂量依赖性, 拟合曲线呈线性相关。动物实验结果显示低、中、高 3 个剂量的 PAP 对 S180 荷瘤小鼠的抑瘤率分别为 46.41%, 52.29% 和 59.48%, 其中环磷酰胺和低剂量的多糖组合抑瘤率与中、高剂量的多糖抑瘤率相当, 并显著高于单用环磷酰胺组的抑瘤率; 同时 PAP 能够显著提高 T-淋巴细胞和巨噬细胞吞噬率。结论 PAP 具有抗肿瘤活性和增强免疫的功能。

**关键词:** 鹅绒委陵菜; 多糖; 抗肿瘤

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2011)03-0185-04

### Anticancer Effects of Polysaccharide from *Potentilla anserine* L.

LIU Sujun<sup>1</sup>, LI Shiyuan<sup>1</sup>, SONG Jiuhua<sup>1</sup>, JIANG Nan<sup>2</sup>, CAO Mei<sup>2\*</sup> (1. Natural Products Utilization Research Unit, Leshan Normal College, Leshan 614004, China; 2. Core Laboratory, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To study the antitumor effects and immunological function of polysaccharide from *Potentilla anserine* L.(PAP) *in vivo* and *in vitro*. **METHODS** The SMMC-7721 cells were treated with different concentration of PAP. The effects of PAP on proliferation of human hepatoma SMMC-7721 cell were examined by MTT assay *in vitro*, and the relative results were fitted with mathematical model. The S180-bearing mice were intragastrically administered with 50, 100, 200 mg·kg<sup>-1</sup> PAP, respectively. The inhibition rate of S180 tumor and immunological function of PAP were measured *in vivo*. **RESULTS** The effects on proliferation of SMMC-7721 cell were correlated with the concentration of PAP *in vitro*. The highest inhibition was 43.57% at the dose of 400 mg·L<sup>-1</sup> PAP. The effects and PAP concentration were correlated and regressed. The inhibiting tumor rates were 46.41%, 52.29% and 59.48% in different groups treated with 50, 100 and 200 mg·kg<sup>-1</sup> *in vivo*, respectively. The T-lymphocytes and macrophage phagocytic index increased significantly after the effects of PAP in S180-bearing mice. **CONCLUSION** The compound PAP had significant activities of antitumor and immunological function.

**KEY WORDS:** *Potentilla anserine* L.; polysaccharide; antitumor

鹅绒委陵菜(*Potentilla anserina* L.)属蔷薇科委陵菜属, 为多年生匍匐草本植物, 俗称人参果, 又称蕨麻, 可食用<sup>[1]</sup>。主产于我国甘肃、四川、青海、西藏、宁夏等十多个省区。鹅绒委陵菜全身都是宝, 为藏民四季常用传统滋补品, 使用历史悠久, 在当地常作为保健品和中草药使用。《月王药诊》、《图鉴》、《藏医药选编》和《中药大辞典》等中记载鹅绒委陵菜性平、味甘温, 具

有生津止渴、健脾益胃、益气补血、收敛止血、止泻、止咳、利痰的功效, 主治吐血、下血、崩中、疟疾痲疮、脾虚腹泻、下痢等症<sup>[2]</sup>。在蒙药里鹅绒委陵菜味甘, 性凉、轻, 用于止泻、身倦乏力、清热、强身。现代药理学研究显示鹅绒委陵菜水提物具有提高机体免疫力、抗疲劳、耐缺氧、止泻抑菌、抗氧化、抗应激、清除自由基、抗损伤等作用<sup>[3-4]</sup>。

**基金项目:** 国家科技支撑项目(2007BAC18B04); 四川省教育厅重点项目(08ZA095); 四川省应用基础研究计划(2010JY0043)

**作者简介:** 刘素君, 女, 博士, 副教授 Tel: (0833)2270785 E-mail: zouliurui@126.com \*通信作者: 曹玫, 女, 博士, 副研究员 Tel: (028)87394680 E-mail: cm1023@163.com

鹅绒委陵菜多糖(PAP)是鹅绒委陵菜的主要活性成分之一,从植物中提取分离多糖成分的技术已有陆续报道<sup>[5]</sup>。本试验旨在探讨PAP抗肿瘤及免疫调节等生物学活性,为PAP的进一步开发利用奠定基础。

## 1 材料

### 1.1 材料与试剂

实验动物为昆明种小鼠,♂,体重(22±2)g,清洁级,由长征制药厂提供,实验动物合格证号:09-4123。小鼠肉瘤细胞S180及人肝癌细胞SMMC-7721由四川中药研究所提供。

注射用环磷酰胺(cyclophosphamide, CY,江苏恒瑞医药股份有限公司,批号:090221);DMSO(Sigma公司);MTT(上海普飞生物技术有限公司);胰蛋白酶(Gibco);RPMI 1640培养液(Gibco)。鹅绒委陵菜购于四川省阿坝州若尔盖,由四川大学杨志荣教授鉴定为*Potentilla anserina* L.;5-氟尿嘧啶(5-FU,上海旭东海普,批号:090311)。

### 1.2 仪器与设备

二氧化碳培养箱(美国NBS公司);倒置显微镜(Nikon DEAPHOT Fx-35DX);UV-2100分光光度计(尤尼柯上海仪器有限公司);酶标仪(Bio-Rad, Model 3550)。

## 2 方法

### 2.1 PAP的制备及含量测定

取鹅绒委陵菜根在65℃下烘干后,进行粉碎,称取500g粗粉,采用原料和蒸馏水之比为1:5,浸提温度为75℃,浸提时间3~5h,共提取4次,合并浸提液。减压抽滤浓缩至800mL左右。对PAP提取液进行脱色处理,搅拌均匀加热煮沸15min后,5000 r·min<sup>-1</sup>离心15min,收集上层清液,弃沉淀。在上清液中加入3倍体积的95%乙醇,搅拌均匀,有白色略带黄色絮状沉淀,沉淀为多糖和蛋白质的混合物,此为粗多糖。放置冰箱过夜,经抽滤,收集沉淀物(滤液减压抽滤回收乙醇)。加适量的蒸馏水搅拌使沉淀溶解,以每100mL溶液加20mL Sevag试剂(氯仿:正丁醇=4:1),置恒温振荡器中振荡60min后,以5000 r·min<sup>-1</sup>离心15min,去除下层氯仿及中层变性蛋白,取上部水层再重复去蛋白操作,至无明显中层为止。收集

去蛋白后的上部水层,加入3倍量95%乙醇,搅拌均匀,有白色略带黄色絮状沉淀。放置冰箱过夜,经抽滤,收集沉淀物(滤液减压抽滤回收乙醇)<sup>[6]</sup>。再依次分别用无水乙醇、丙酮、乙醚充分洗涤沉淀物后,5000 r·min<sup>-1</sup>离心15min,弃上清<sup>[7]</sup>,将沉淀物(即多糖)于30℃下真空干燥至恒重,即得多糖。苯酚-硫酸法测定多糖含量。

### 2.2 对人肝癌细胞SMMC-7721增殖的影响<sup>[8-9]</sup>

取对数生长期肝癌细胞SMMC-7721,用RPMI-1640培养液制备细胞悬液,接种于96孔板中,每孔细胞数为3×10<sup>4</sup>个。CO<sub>2</sub>培养箱中培养24h后加药,分别设空白对照组、PAP 5个剂量组、5-FU组及调零孔,设3个平行复孔。每孔加入相应的药物,使药物终浓度分别为25, 50, 100, 200, 400 mg·L<sup>-1</sup>;空白对照组加入等体积的磷酸盐缓冲液(PBS),阳性对照5-Fu的终浓度为25 mg·L<sup>-1</sup>。处理24h后,取出培养板,吸出培养液,加入150 μL无血清培养液,每孔加入10 μL MTT溶液,孵育4h;孵育后取出培养板,1000 r·min<sup>-1</sup>离心5min,倾尽培养液,每孔吸出MTT溶液,加入50 μL DMSO,振荡15min,用酶标仪在570nm波长下测定光密度(OD<sub>570nm</sub>),结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,并计算细胞抑制率。计算公式为:细胞抑制率(%)=(对照组OD值-给药组OD值)/对照组OD值×100%。

### 2.3 对荷瘤小鼠肉瘤S180的影响<sup>[10-11]</sup>

抽取小鼠S180腹水,用生理盐水稀释至细胞浓度为2×10<sup>10</sup>个·L<sup>-1</sup>。取小鼠72只,右侧腋下接种肿瘤细胞悬液0.2mL,制备局灶性实体瘤模型。接种24h后,随机分为6组,①阴性对照组;②CY组;③PAP 50 mg·kg<sup>-1</sup>组;④PAP 100 mg·kg<sup>-1</sup>组;⑤PAP 200 mg·kg<sup>-1</sup>组;⑥CY+PAP(20+50) mg·kg<sup>-1</sup>组。PAP腹腔注射,每天1次,连续给药8d;CY腹腔注射20 mg·kg<sup>-1</sup>,隔日给药,给药4次。停药24h后,颈椎脱臼处死动物,分别称体重,分离腋下肿瘤,称瘤重。按照以下公式计算抑瘤率:抑瘤率(%)=(模型组平均瘤重-给药组平均瘤重)/模型组平均瘤重×100%。

### 2.4 巨噬细胞吞噬实验

在实验前1d,给小白鼠腹腔注射6%淀粉肉汤(含台盼蓝)1mL。实验时,腹腔注射1%鸡红细胞悬液1mL,轻按小白鼠腹部,使悬液分散。20min

后, 颈椎脱臼法处死小鼠, 吸取腹腔液置显微镜下观察。

### 2.5 对小鼠脾脏细胞的作用

以颈椎脱臼法处死小鼠, 无菌取脾脏, 分离脾细胞, 尼龙网过滤, 蒸馏水破坏红细胞, 调节至等渗, 以RPMI-1640培养基洗3次, 计数, 调节细胞浓度为 $5 \times 10^6$ 个 $\cdot$ mL<sup>-1</sup>。于96孔培养板, 每孔加入100  $\mu$ L细胞, 再加入不同浓度的样品联合ConA或脂多糖(LPS), 置37  $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub>培养箱48 h, 同时设空白(仅加细胞)及阳性对照组(ConA和LPS组)。培养终止前每孔加50  $\mu$ L MTT染液, 继续培养4 h 后, 加入十二烷基硫酸钠(SDS)100  $\mu$ L, 于37  $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub>培养箱中过夜, 让结晶物完全溶解, 用酶标仪测定每孔的570 nm处OD值。

### 2.6 统计学方法

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用SPSS10软件对数据作统计学方差分析和相关性分析。

## 3 结果

### 3.1 PAP含量测定

称取纯化后的PAP 20 mg, 溶于100 mL蒸馏水中, 作为多糖储备液。精确吸取样品溶液1.0 mL, 加蒸馏水至2.0 mL, 再加入1.0 mL 5%苯酚溶液, 摇匀, 迅速加入浓硫酸5.0 mL摇匀, 放置10 min, 置40  $^{\circ}$ C水浴保温15 min, 迅速冷却至室温, 在490 nm处测吸光度, 按公式: 多糖含量(%)= $C \cdot D \cdot F / W \times 100\%$ (W为供试品的重量, mg; C为供试液中葡萄糖的浓度, mg $\cdot$ mL<sup>-1</sup>; D为样品的稀释因素), 计算样品溶液中多糖的含量, 其多糖含量为49.38%。

### 3.2 对人肝癌细胞SMMC-7721增殖的影响

PAP对人肝癌细胞SMMC-7721体外增殖能力有显著的抑制作用。PAP抑制SMMC-7721细胞体外增殖作用随剂量的增大而增强。400 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup> PAP的抑制率为43.57%, 接近阳性对照组25 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup> 5-Fu的47.20%。结果显示, PAP对人肝癌SMMC-7721细胞的抑制作用呈剂量依赖性, 拟合曲线呈线性相关, 回归方程为 $y=0.0608x+20.56$ ( $r=0.9802$ )。结果见图1、表1。

### 3.3 对S180荷瘤小鼠的作用

在实验剂量下, 高低剂量的PAP均能显著抑制肿瘤的生长, 与阴性对照组比较均有极显著性差

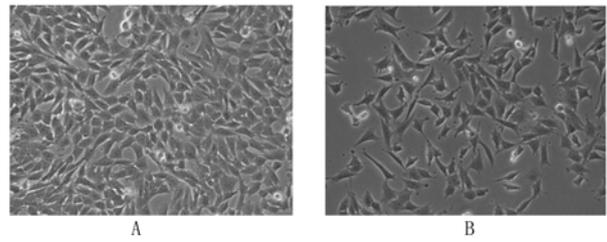


图1 多糖处理前后的 SMMC-7721 细胞

A-多糖处理前; B-多糖处理后

Fig 1 Effects of PAP on proliferation of human hepatoma SMMC-7721 cells

A-untreated SMMC-7721 cells; B-treated SMMC-7721 cells with PAP

表1 PAP体外对 SMMC-7721 增殖的影响( $n=3$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab 1 Effects of PAP on proliferation of SMMC-7721 cells in vitro( $n=3$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/mg $\cdot$ L <sup>-1</sup>	OD <sub>570 nm</sub> 值	抑制率/%
阴性对照组	-	0.867 5 $\pm$ 0.051 3	0
PAP 组	25	0.694 3 $\pm$ 0.056 8 <sup>1)</sup>	19.97 <sup>1)</sup>
PAP 组	50	0.649 2 $\pm$ 0.035 6 <sup>1)</sup>	23.16 <sup>1)</sup>
PAP 组	100	0.588 5 $\pm$ 0.046 5 <sup>1)</sup>	28.36 <sup>1)</sup>
PAP 组	200	0.547 6 $\pm$ 0.036 7 <sup>1)</sup>	34.88 <sup>1)</sup>
PAP 组	400	0.489 5 $\pm$ 0.054 6 <sup>1)</sup>	43.57 <sup>1)</sup>
5-Fu 组	25	0.458 0 $\pm$ 0.042 6 <sup>1)</sup>	47.20 <sup>1)</sup>

注: 与阴性对照组比较, <sup>1)</sup> $P<0.01$

Note: Compared with negative control group, <sup>1)</sup> $P<0.01$

异, 并随PAP作用浓度升高抑瘤效率增加。50 mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup> PAP抑瘤效果与20 mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup> CY实验组相似, 而中剂量和高剂量PAP抑瘤效果较之CY组分别提高了8.49%和15.68%。PAP低剂量组和CY联合用, 与对照组相比有显著性差异( $P<0.01$ ), 并能显著增强CY的抗肿瘤作用, 提高13.06%。结果见表2。

表2 PAP对 S180 荷肿瘤小鼠的抑制作用( $n=12$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab 2 Antitumor effects of PAP on S180 tumor mice( $n=12$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/mg $\cdot$ kg <sup>-1</sup>	只数/ $n$		瘤重/g	抑瘤率/%
		开始	结束		
阴性对照组	-	12	11	1.53 $\pm$ 0.46	0
PAP 组	50	12	12	0.82 $\pm$ 0.44 <sup>1)</sup>	46.41 <sup>1)</sup>
PAP 组	100	12	11	0.73 $\pm$ 0.49 <sup>1)</sup>	52.29 <sup>1)</sup>
PAP 组	200	12	12	0.62 $\pm$ 0.41 <sup>1)</sup>	59.48 <sup>1)</sup>
CY 组	20	12	12	0.86 $\pm$ 0.37 <sup>1)</sup>	43.80 <sup>1)</sup>
PAP+CY 组	50+20	12	12	0.66 $\pm$ 0.38 <sup>1)</sup>	56.86 <sup>1)</sup>

注: 与阴性对照组比较, <sup>1)</sup> $P<0.01$

Note: Compared with negative control group, <sup>1)</sup> $P<0.01$

### 3.4 PAP对荷瘤小鼠巨噬细胞吞噬率和T、B淋巴细胞的影响

各剂量组PAP对小鼠腹腔巨噬细胞增殖均具有显著的促进作用,且随着浓度增大,增殖效果增强。同时,各剂量组PAP对小鼠脾脏细胞增殖均具有显著的促进作用。与阴性对照组比较,各剂量组PAP均能提高T、B淋巴细胞的增殖,且随着浓度增大,增殖效果增强。结果见表3。

表3 PAP对巨噬细胞吞噬率和T、B淋巴细胞的影响 ( $n=12, \bar{x} \pm s$ )

Tab 3 Effects of PAP on macrophage phagocytic activity and proliferation of T and B lymphocyte ( $n=12, \bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	巨噬细胞 吞噬率/%	T淋巴细胞/ $A_{570 \text{ nm}}$	B淋巴细胞/ $A_{570 \text{ nm}}$
阴性对照组	-	9.28±2.04	0.84±0.40	0.790±0.18
PAP组	50	14.83±3.32	1.83±0.32	1.753±0.21
PAP组	100	16.56±3.05	2.06±0.15 <sup>1)</sup>	1.960±0.27 <sup>1)</sup>
PAP组	200	19.32±2.78 <sup>1)</sup>	2.32±0.28 <sup>1)</sup>	2.060±0.15 <sup>1)</sup>
CY组	20	10.64±2.33	0.64±0.33	0.660±0.28
PAP+CY组	50+20	16.85±3.23	2.15±0.23 <sup>1)</sup>	2.100±0.23 <sup>1)</sup>

注:与阴性对照组比较,<sup>1)</sup> $P<0.05$

Note: Compared with negative control group, <sup>1)</sup> $P<0.05$

## 4 讨论

多糖为一大类具有重要生物活性的天然产物,广泛存在于动物、植物、微生物等有机体中。近年来,由于天然药物化学、药理学研究的不断深入,多糖分析手段得到突飞猛进的发展,多糖多种多样的生物活性功能以及在功能食品和临床上广泛使用,成为天然药物和生物化学等学科的研究热点,其中以从中药中提取的水溶性多糖最为重要<sup>[12]</sup>。多糖不仅可以作为广谱免疫促进剂,还在抗肿瘤、抗病毒、抗炎、降血糖、降血脂、抗辐射等方面具有广泛的药理作用<sup>[13]</sup>。本试验研究了PAP对人肝癌细胞SMMC-7721增殖的抑制作用和PAP对S180荷瘤小鼠的肿瘤抑制率和免疫功能的影响,结果显示,PAP对人肝癌细胞SMMC-7721体外增殖能力有显著的抑制作用。PAP的小鼠实验研究表明其能提高T淋巴细胞和B细胞的增殖能力。因此,PAP对肿瘤的作用不仅直接作

用于肿瘤细胞,而且通过调动机体的免疫系统,增强机体T淋巴细胞和B细胞的活性,从而具有抵抗肿瘤的作用<sup>[14]</sup>。

## REFERENCES

- [1] ZHOU J S. Study on X-ray energy spectrum microanalysis chemical element of root tuber tissue in *Potentilla anserina* L. [J]. J Qinghai Univ(青海大学学报), 2003, 21(1): 7-8.
- [2] TIE G C, LIU H X. Property and application of *Potentilla anserina* L. [J]. Journal of Qinghai Agriculture and Animal Husbandry(青海农牧业), 2008, 1(1): 42-43.
- [3] CHEN J R, WANG Q. Extraction of *Potentilla anserine* polysaccharide and its effects of scavenging oxygen free radicals [J]. Chin J Vet Sci Technol(中国兽医科技), 2004, 34(4): 59-61.
- [4] WEI X, CHENG F. Research advancement on chemical constituent and pharmacological action of *Potentilla anserine* [J]. Mod Med J China (中国现代医药杂志), 2008, 10(1): 131-132.
- [5] YANG H, JIA X, YI H. Determination of polysaccharide in root of Tibetan medicine *Potentilla anserine* [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2001, 32(1): 29-31.
- [6] LIAN B, YU J P. The extraction, isolation and the composition of polysaccharides from *Ganoderma apparatus* and *Poria cocos* [J]. J Chongqing Univ(重庆大学学报), 2004, 27(1): 120-122.
- [7] WANG X Z, HU T J, LI X M, et al. Extraction and content measurement of polysaccharide from *Potentilla anserine* and analysis on its physicochemical property [J]. J Tradit Chin Vet Med (中兽医医药杂志), 2006, 2(2): 34-35.
- [8] DAI Z K, YU L M, YANG X S. Anticancer effect of CL extract of *Rosa roxburghii* [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2007, 32(14): 1453-1457.
- [9] LI S M, WU X D, ZENG S, et al. Study on anticancer activity of *Syngnathus in vitro* [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2001, 26(3): 198-200.
- [10] ZHANG Y L, YANG Y D, LI Z Q, et al. Antitumor activity of Santamarin and its effect on topoisomerase [J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2007, 23(10): 1370-1374.
- [11] ZHAO Y J, WANG L, HOU L, et al. A study on the antitumor effect of polysaccharides from pinellia tuber [J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2006, 22(3): 368-371.
- [12] ZHANG Y M, LI B C, ZHU L P, et al. Research advancement on chemistry and bioactivities of natural polysaccharide [J]. J Kunming Univ Sci Technol: Sci Technol(昆明理工大学学报:理工版), 2003, 28(3): 140-149.
- [13] DENG X Y, DING D F, DAI M H, et al. Study progress of plant polysaccharides in pharmacological action [J]. Guiding J Tradit Chin Med Pharmacol(中医药导报), 2006, 12(6): 86-88.
- [14] JIAO L L, LI X, LI T B, et al. Characterization and anti-tumor activity of alkali-extracted polysaccharide from *Enteromorpha intestinalis* [J]. Int Immunopharmacol, 2009, 9(9): 324-329.

收稿日期: 2010-04-26