

黑木耳多糖顺铂配合物抗 HeLa 和 LoVo 细胞增殖活性

邱军强¹, 苗晶因¹, 张华², 刘树民³ (1.海南医学院药学院, 海口 570100; 2.哈尔滨工业大学化工与化学学院, 哈尔滨 150001; 3.黑龙江中医药大学药学院, 哈尔滨 150090)

摘要: 目的 研究不同分子量黑木耳多糖(*Auricularia auricula* polysaccharide, AAP)能否与顺铂形成配合物, 同时研究其配合物对 HeLa 和 LoVo 细胞的抗肿瘤细胞增殖活性。方法 采用“*One pot*”法合成不同分子量的黑木耳多糖顺铂配合物(*Auricularia auricula* polysaccharide-cis-diaminedichloroplatinum, AAP-CDDP), 并应用 MTT 法对其体外抗肿瘤细胞增殖活性进行研究。结果 AAP-CDDP 的抑制 HeLa 和 LoVo 肿瘤细胞增殖活性与其整合顺铂量密切相关, 相关系数 r^2 分别为 0.877 5 和 0.913 2; 其中 AAP(V)-CDDP 具有最强的抗肿瘤细胞增殖活性。结论 AAP 与顺铂形成配合物具有很好的抗肿瘤细胞增殖活性。

关键词: 黑木耳多糖; 顺铂; 配合物; 抗肿瘤

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2019)14-1729-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.14.001

引用本文: 邱军强, 苗晶因, 张华, 等. 黑木耳多糖顺铂配合物抗 HeLa 和 LoVo 细胞增殖活性[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(14): 1729-1732.

Antiproliferative Activity of *Auricularia Auricula* Polysaccharide-cis-diaminedichloroplatinum Complex Against HeLa and LoVo Cell

QIU Junqiang¹, MIAO Jingnan¹, ZHANG Hua², LIU Shumin³ (1.School of Pharmacy, Hainan Medical University, Haikou 570100, China; 2.School of Chemistry Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150001, China; 3.School of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150090, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study whether *Auricularia auricula* polysaccharide(AAP) can form complexes with cisplatin, and study the anti-tumor cell proliferation activity of the complexes against HeLa and LoVo cells. **METHODS** *Auricularia auricula* polysaccharide-cis-diaminedichloroplatinum(AAP-CDDP) complexes with different molecular weights were synthesized using “*One pot*” method, and their anti-tumor cell proliferation activity *in vitro* were studied by MTT method. **RESULTS** The inhibition activity of AAP-CDDP on the proliferation of HeLa and LoVo cervical cancer cells was closely related to the amount of cisplatin in AAP-CDDP, and the correlation coefficients of r^2 were 0.877 5 and 0.913 2, respectively. Among them, AAP(V)-CDDP had the strongest anti-tumor cell proliferation activity. **CONCLUSION** The complex of AAP and cisplatin has good anti-tumor cell proliferation activity.

KEYWORDS: *Auricularia auricula* polysaccharide; CDDP; complex; anti-tumor

作为生长在朽木上的一种真菌类担子菌纲腐生菌, 黑木耳(*Auricularia auricula*)在亚洲各国作为药食同源真菌被广泛食用, 在我国黑木耳主要分布于东北部的大、小兴安岭山区^[1-2]。国内外研究证实黑木耳多糖(*Auricularia auricula* polysaccharide, AAP)具有多种生物功能, 包括降血脂^[3]、抗氧化^[4]、抗肿瘤^[5]、降血糖^[6]、抗凝血^[7]和抗衰老、改善心肌功能等^[8-10]。顺铂(cis-diaminedichloroplatinum, CDDP)作为第 1 代铂类抗代谢药物一直被用于治疗多种实体肿瘤^[11]。目前国内外文献报道了 APP 与蛋白质、多糖、多

酚、锌(Zn)、铁(Fe)、铬(Cr)和银(Ag)复合物的合成及生物活性, 而黑木耳多糖顺铂配合物(*Auricularia auricula* polysaccharide-cis-diaminedichloroplatinum, AAP-CDDP)的合成未见报道, 本实验通过“*One pot*”法合成了不同分子量的 AAP-CDDP, 并对其抗宫颈癌 HeLa 和结肠癌 LoVo 肿瘤细胞增殖活性进行了研究, 为 APP 及其衍生物开发为新的抗肿瘤药提供进一步的理论基础。

1 仪器与试剂

N-1000 型旋转蒸发器(上海亚荣仪器有限公司); PB-10 型精密 pH 计、R200-D 型电子分析天

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(31401483); 黑龙江省博士后基金(LBH-Z14098); 黑龙江省科学基金项目(C2018034)

作者简介: 邱军强, 男, 博士, 讲师 Tel: (0898)31350616 E-mail: qjq000000@163.com

平(Sartorius); LD5-2A 型超净工作台(上海一恒科技有限公司); DF-101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器(上海力晨科技设备有限公司); TENSOR27 型红外光谱仪(德国 Bruker 公司); ICP-AES-5000 型感应耦合等离子体原子发射(杭州聚光科技有限公司)。

AAP 均由笔者所在实验室自制: AAP(I)、AAP(II)、AAP(III)、AAP(IV)、AAP(V)、AAP(VI)和 AAP(VII)多糖片段的黏均分子量分别为 $(41\ 000\pm1\ 000)$, $(23\ 000\pm1\ 000)$, $(14\ 000\pm200)$, $(4\ 800\pm400)$, $(4\ 500\pm300)$, $(3\ 500\pm300)$, $(3\ 400\pm200)$ Da; 氢氧化钠、氯仿、正丁醇、氯化钠、无水乙醇、丙酮、乙醚、硫酸、苯酚、二甲基亚砷均为分析纯, 均购自国药集团化学试剂有限公司; CDDP(批号: 15663-27-1)、四甲基偶氮唑蓝(MTT, 批号: M2128)均购自美国 Sigma 公司; RPMI1640 培养基(批号: GNM-11835)、胰蛋白酶(批号: 9002-07-7)、胎牛血清(批号: 16000-044)、青霉素-链霉素溶液(批号: P1400-100)均为赛默飞世尔生物化学制品有限公司产品。

实验用宫颈癌 HeLa 细胞和结肠癌 LoVo 细胞由哈尔滨医科大学肿瘤医院惠赠, 在哈尔滨工业大学化工学院食品系细胞室传代备用。

2 方法

2.1 AAP-CDDP 的合成

AAP(V)-CDDP 的合成参考 Liao 等^[12]的方法, 将 AAP(15.0 mg)溶解到 15.0 mL 蒸馏水中, 将一定量的 CDDP 加入到上述多糖溶液中, 通过加入一定量的 $0.1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸或者氢氧化钠溶液调整上述混合溶液的 pH 值至 6~7。通过磁力搅拌设置不同温度和搅拌时间进行合成, 反应结束后, 通过透析袋对反应溶液透析 48 h, 从而将游离的 CDDP 除去; 然后将反应得到 AAP(V)-CDDP 冻干, 称取一定量的 AAP(V)-CDDP, 采用电感耦合等离子体原子发射光谱法(ICP-AES)测定 AAP(V)-CDDP 中 CDDP 含量^[13]。

2.2 ICP-AES 光谱法检测铂金属含量

ICP-AES 工作条件为蠕动泵: $100\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$; 反射功率: 5 W; 入射功率: 1 150 W; 冷却气流量: $14\ \text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ (Ar); 载气流量: $0.5\ \text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ (Ar); 分析线波长: 铂为 265.95 nm。

2.3 CDDP、AAP(V)和 AAP(V)-CDDP 红外谱图的测定

采用溴化钾压片法: 分别将 CDDP、AAP(V)和 AAP(V)-CDDP 样品与 KBr 粉末按照 1:100

的比例进行混合、研磨。将研磨好的混合粉末通过 TENSOR27 红外光谱仪进行扫描测定, 光谱扫描范围 $4\ 000\sim650\ \text{cm}^{-1}$; 分辨率为 $4.00\ \text{cm}^{-1}$; 扫描次数为 32 次^[14]。

2.4 MTT 法测定细胞存活率

将处于对数生长期的宫颈癌 HeLa 细胞的细胞浓度调整为 $2.0\times10^5\ \text{mL}^{-1}$; 将细胞转移到 96 孔板中, 培养 24 h 后, 加入受试药物; 培养结束后, 弃去培养基, 用灭菌的 PBS 溶液洗涤 2 次, 加入新鲜完全培养基, 每孔加入 10 μL 的无菌 MTT($5.0\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 溶解于 PBS 溶液中)溶液, 培养箱中继续培养 4 h, 弃去上清液, 每孔加入 150 μL 的 DMSO 溶解甲瓚结晶, 490 nm 测定各孔的吸光度值, 细胞活力表达为空白对照细胞的百分比^[15-17]。

2.5 数据分析

采用 SPSS 16.0 软件通过单因素方差分析(One-way ANOVA)和 Duncan's 多重比较法进行数据统计分析, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义, $P<0.01$ 为差异具有极显著统计学意义。所有的数据以 $\bar{x}\pm s$ 进行表达, 通过 Origin 9.0 对数据进行作图。

3 结果与讨论

3.1 合成的 AAP-CDDP 中顺铂含量及红外光谱图

ICP-AES 检测发现 AAP(I)-CDDP~AAP(VII)-CDDP 的铂金属含量分别为 (12.7 ± 0.3) , (14.6 ± 0.3) , (14.7 ± 0.1) , (16.8 ± 0.2) , (17.8 ± 0.4) , (15.9 ± 0.6) , $(15.1\pm0.7)\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 其中 AAP(V)-CDDP 中所含有的 CDDP 含量最高, 结果见图 1。CDDP、AAP(V)和 AAP(V)-CDDP 配合物的红外谱图分析结果见图 2, 其中 AAP(V)在 $3\ 100\ \text{cm}^{-1}$ 和 $3\ 500\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰归属于多糖中的羟基基团振动峰; 而 AAP(V)-CDDP 配合物在相同位置处的吸收峰更为陡峭, 表明多糖与顺铂配位过程中羟基基团参与了反应; AAP(V)-CDDP 配合物中 $1\ 724\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1\ 253\ \text{cm}^{-1}$ 处的特异性吸收峰证实配位过程中形成了乙酰基基团; $2\ 926\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰归属于多糖中的 C-H 键; $1\ 200\sim1\ 050\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰则是由多糖中糖苷键的伸缩振动引起; $796.4\ \text{cm}^{-1}$ 和 $619.9\ \text{cm}^{-1}$ 处吸收峰则表明存在 N-H 基团^[18]。

3.2 AAP-CDDP 抗肿瘤细胞增殖活性

通过“One pot”法合成不同分子量的 AAP-CDDP 配合物, 采用 MTT 法对不同分子量的 AAP-CDDP 配合物抗肿瘤细胞增殖活性进行分析。

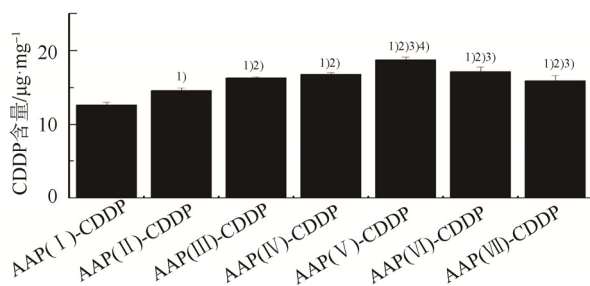


图1 不同 AAP-CDDP 配合物的顺铂含量 ($\bar{x} \pm s, n=3$) 与 AAP(I)-CDDP 相比, ¹⁾ $P<0.05$; 与 AAP(II)-CDDP 相比, ²⁾ $P<0.05$; 与 AAP(III)-CDDP 相比, ³⁾ $P<0.05$; 与 AAP(IV)-CDDP 相比, ⁴⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 1 Content of CDDP in different AAP-CDDP complexes ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Compared with AAP(I)-CDDP, ¹⁾ $P<0.05$; compared with AAP(II)-CDDP, ²⁾ $P<0.05$; compared with AAP(III)-CDDP, ³⁾ $P<0.05$; compared with AAP(IV)-CDDP, ⁴⁾ $P<0.05$ 。

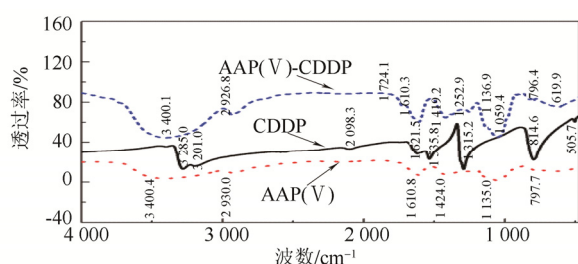


图2 CDDP、AAP(V)和 AAP(V)-CDDP 配合物的红外光谱图

Fig. 2 FTIR spectrogram of CDDP, AAP(V) and AAP(V)-CDDP complex

结果显示, 在 $0\sim 5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, AAP-CDDP 配合物对 HeLa 和 LoVo 细胞的增殖抑制率呈现剂量相关性, 随着 AAP-CDDP 配合物浓度增加, 其对 2 种肿瘤细胞的增殖抑制率逐渐增加。结果见图 3。

上述结果表明, 所有的 AAP-CDDP 配合物均能显著地抑制 HeLa 和 LoVo 细胞的生长, 并呈剂量依赖关系($P<0.05$ 或 0.01)。

与其他 AAP-CDDP 配合物相比, AAP(V)-CDDP 对 HeLa 和 LoVo 细胞具有最低的 IC_{50} 值。结果表明, AAP(V)-CDDP 具有最佳的抗肿瘤细胞增殖活性, 其对 LoVo 和 HeLa 2 种肿瘤细胞的抑制率大约为 AAP(I)-CDDP 的 7.0~7.2 倍。结果见图 4。

3.3 AAP(V)-CDDP 抗肿瘤细胞增殖活性与 CDDP 含量相关性分析

以配合物中 CDDP 含量为 x , 以 AAP-CDDP 配合物对 LoVo 和 HeLa 2 种肿瘤细胞增殖抑制率的 IC_{50} 值为 y , 做相关性分析。结果显示, AAP(V)-CDDP 中的铂金属含量与其对 LoVo 和

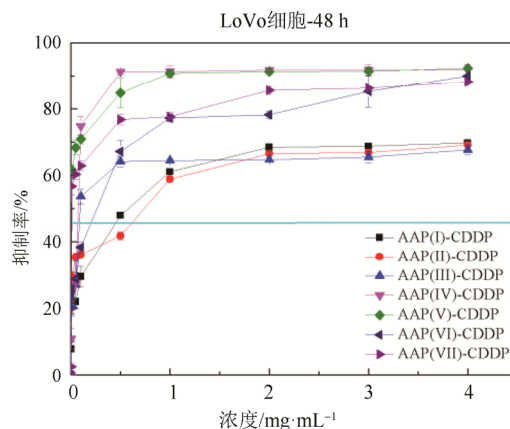
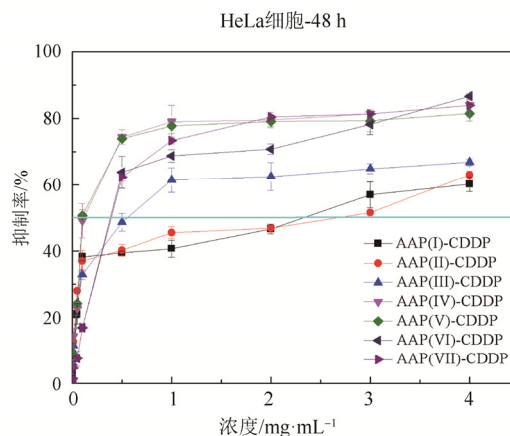


图3 不同浓度的 AAP-CDDP 作用 48 h 对 2 种肿瘤细胞增殖活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Inhibition of two tumor cells proliferation by the treatments of different concentrations of AAP-CDDP complexes for 48 h ($\bar{x} \pm s, n=3$)

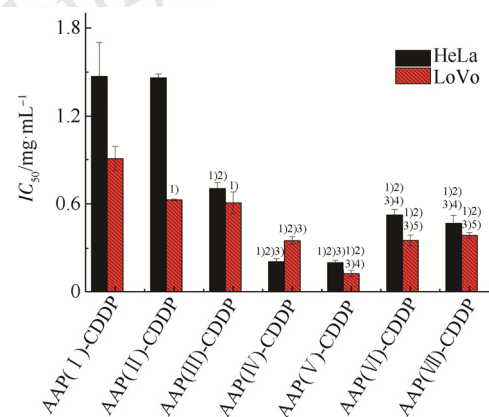


图4 AAP-CDDP 对 2 种肿瘤细胞增殖抑制率的 IC_{50} 值 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

与 AAP(I)-CDDP 相比, ¹⁾ $P<0.05$; 与 AAP(II)-CDDP 相比, ²⁾ $P<0.05$; 与 AAP(III)-CDDP 相比, ³⁾ $P<0.05$; 与 AAP(IV)-CDDP 相比, ⁴⁾ $P<0.05$; 与 AAP(V)-CDDP 相比, ⁵⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 4 IC_{50} values of inhibitory activity of different AAP-CDDP complexes against two tumor cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Compared with AAP(I)-CDDP, ¹⁾ $P<0.05$; compared with AAP(II)-CDDP, ²⁾ $P<0.05$; compared with AAP(III)-CDDP, ³⁾ $P<0.05$; compared with AAP(IV)-CDDP, ⁴⁾ $P<0.05$; compared with AAP(V)-CDDP, ⁵⁾ $P<0.05$ 。

HeLa 2 种肿瘤细胞增殖抑制率的 IC_{50} 值密切相关,从而得到了 2 个线性方程,分别为 $y=0.233\ 3x+0.165\ 38$ 和 $y=0.114\ 3x+0.927\ 5$, 2 个线性方程的相关系数 r^2 分别为 0.877 5 和 0.913 2。上述结果表明,配合物的抗肿瘤细胞增殖活性与其螯合 CDDP 的含量呈现正相关的关系。AAP(V)-CDDP 中结合的 CDDP 量最高,同时体外抗肿瘤细胞增殖活性实验结果表明,制备得到的 AAP(V)-CDDP 具有最强的抗肿瘤细胞增殖活性,同时发现 AAP(V)-CDDP 中的 CDDP 含量与其对 LoVo 和 HeLa 2 种肿瘤细胞增殖抑制率的 IC_{50} 值呈正相关关系。

4 展望

多糖类聚合物-药物配合物靶向系统逐渐引起了国内外研究人员的重视^[19-21],其在药物化学、化学合成、材料学等领域具有广阔的应用前景,多糖类聚合物-药物配合物靶向系统能够通过被动靶向改善药物在生物体内的扩散与分布,从而实现了药物的靶向给药,并能够控制药物的释放,同时能够减少有毒试剂的使用和产生。化学疗法有效治疗肿瘤的最大障碍为药物的全身性毒性,其对肿瘤细胞缺乏靶向性,同时在整个机体中平均分布,此外细胞毒性药物较短的半衰期和不良的药动学也降低了其抗肿瘤疗效。越来越多的多糖(透明质酸、葡聚糖和环糊精等)被用于与低分子药物偶联从而提高药物的抗肿瘤疗效,本研究通过将不同分子量 AAP 与 CDDP 合成配合物,从而为 AAP 的应用提供新的思路和研究基础。

REFERENCES

- BIAN C, WANG Z Y, JOHN S. Research progress of *Auricularia auricular* polysaccharide(AAP) biological functions [J]. Sci Technol Food Ind(食品工业科技), 2015, 36(16): 390-394, 400.
- ZHANG N X, YIN H L, ZHAO X, et al. Effect of polyphenols from *Pinus koraiensis* and polysaccharides from *Auricularia auricula* on recoveries of antioxidant injury in radiation mice [J]. Drug Eval Res(药物评价研究), 2016, 39(5): 722-729.
- ACHARYA K, SAMUI K, RAI M, et al. Antioxidant and nitric oxide synthase activation properties of *Auricularia auricula* [J]. Indian J Exp Biol, 2004, 42(5): 538-540.
- FAN L S, ZHANG S H, YU L, et al. Evaluation of antioxidant property and quality of breads containing *Auricularia auricula* polysaccharide flour [J]. Food Chem, 2007, 101(3): 1158-1163.
- YOON S J, YU M A, PYUN Y R, et al. The nontoxic mushroom *Auricularia auricula* contains a polysaccharide with anticoagulant activity mediated by antithrombin [J]. Thromb Res, 2003, 112(3): 151-158.
- TAKEUCHI H, HE P M, MOOI L Y. Reductive effect of hot-water extracts from woody ear(*Auricularia auricula*-Judae Quel.) on food intake and blood glucose concentration in genetically diabetic KK-Ay mice [J]. J Nutr Sci Vitaminol, 2004, 50(4): 300-304.
- SONG G L, DU Q Z. Structure characterization and antitumor activity of an α β -glucan polysaccharide from *Auricularia polytricha* [J]. Food Res Int, 2012, 45(1): 381-387.
- MA Z C, WANG J G, ZHANG L N, et al. Evaluation of water soluble β -d-glucan from *Auricularia auricular*-Judae as potential anti-tumor agent [J]. Carbohydr Polym, 2010, 80(3): 977-983.
- QIU J Q, ZHANG H, LIU D D, et al. Comparative study on antioxidant properties of alkaline water extracts of nine edible mushrooms [J]. Food Res Dev(食品研究与开发), 2017, 38(15): 1-5.
- ZHANG Z, LIU D M, HU J F, et al. Study on derivatization technology of polysaccharide from *Auricularia auricular* [J]. Sci Technol Food Ind(食品工业科技), 2014, 35(20): 263-268.
- WANG S Q, PANG L P, ZHU Y Z, et al. Study on the drug combination of cisplatin and baicalin in LKB-1 differential expression cell lines [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2014, 31(8): 907-911.
- LIAO W Z, LU Y J, FU J N, et al. Preparation and characterization of *Dictyophora indusiata* polysaccharide-zinc complex and its augmented antiproliferative activity on human cancer cells [J]. J Agric Food Chem, 2015, 63(29): 6525-6534.
- AVICHEZER D, SCHECHTER B, ARNON R. Functional polymers in drug delivery: carrier-supported CDDP (cis-platin) complexes of polycarboxylates: effect on human ovarian carcinoma [J]. React Funct Polym, 1998, 36(1): 59-69.
- HU F, LI Y, CHEN Y. Characterization study of polymorphism of doxazosin mesylate [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2017, 34(2): 242-246.
- ANGIUS F, FLORIS A. Liposomes and MTT cell viability assay: an incompatible affair [J]. Toxicol In Vitro, 2015, 29(2): 314-319.
- JING L L, YANG Y, WU N Z, et al. Protective effect of negletin against hypoxia induced injury on PC12 cells [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2018, 35(6): 787-792.
- CHEN J, LI Y L, BAO Y Q, et al. Study on toxic effects and mechanism of osthole on L02 cells [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2018, 35(6): 859-863.
- GAO J B, SUN L N, TENG Y, et al. Isolation, purification and analysis of glycoprotein from *Taraxacum* polysaccharides [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2010, 27(10): 905-908.
- GOODARZI N, VARSHOCHIAN R, KAMALINIA G, et al. A review of polysaccharide cytotoxic drug conjugates for cancer therapy [J]. Carbohydr Polym, 2013, 92(2): 1280-1293.
- BASSI P F, VOLPE A, D'AGOSTINO D, et al. Paclitaxel-hyaluronic acid for intravesical therapy of *Bacillus Calmette-Guérin* refractory carcinoma *in situ* of the bladder: results of a phase I study [J]. J Urol, 2011, 185(2): 445-449.
- DAVIS M E. Design and development of IT-101, a cyclodextrin-containing polymer conjugate of camptothecin [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2009, 61(13): 1189-1192.

收稿日期: 2018-08-11

(本文责编: 李艳芳)