

银条水苏糖抑制人结肠癌 Caco-2 细胞增殖的作用及机制

Inhibiting effect of stachyose from *Stachys floridana* Schuttl. ex Benth on proliferation of Caco-2 cell line and its potential mechanism

钟先锋¹ 黄桂东² 张继如¹ 张 勇¹ 华 东¹

ZHONG Xian-feng¹ HUANG Gui-dong² ZHANG Ji-ru¹ ZHANG Yong¹ HUA Dong¹

(1. 江南大学附属医院, 江苏 无锡 214062; 2. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122)

(1. Affiliated Hospital of Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214062, China;

2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

摘要:研究中国传统蔬菜银条中所含天然活性成分——银条水苏糖对人结肠癌细胞 Caco-2 增殖的抑制作用及其可能机制。采用无血清培养基培养 Caco-2 细胞,分析银条水苏糖对 Caco-2 细胞增殖的抑制作用,流式细胞术考察银条水苏糖对 Caco-2 细胞凋亡的影响,通过检测 LDH 释放率分析细胞损伤程度。结果表明:银条水苏糖对 Caco-2 细胞株具有生长抑制作用,且存在剂量和时间依赖关系,Annexin-V-PI 双染的结果提示,Caco-2 细胞凋亡率随着银条水苏糖浓度的升高而上升,同时比较各试验组 Caco-2 细胞 LDH 释放率,发现银条水苏糖抑制了 Caco-2 细胞还原丙酮酸为乳酸的能力,限制了 Caco-2 细胞能量通路,影响了细胞周期,进而导致细胞凋亡,说明抑制细胞能量通路,“饿死细胞”可能是银条水苏糖抗肿瘤作用的机理之一。

关键词:水苏糖;结肠癌;Caco-2 细胞;抑制增殖

Abstract: The inhibiting effect of stachyose from *Stachys floridana* Schuttl. ex Benth on the proliferation of Caco-2 cell line and its potential mechanism were investigated. Caco-2 cells were incubated in serum-free media, the inhibiting effect of stachyose on Caco-2 cell proliferation were analyzed by MTT assay and the apoptosis of Caco-2 cells were determined by flow cytometry, then cell damage degree was studied by the detection of LDH release rate. The results showed that stachyose inhibited the proliferation of Caco-2 cell lines in a dose- and time- dependent manner. After pretreatment with different concentrations of stachyose (0.5, 1, 2, 4 mmol/L), cell ap-

optosis were obtained. The rise of LDH release rate indicated that stachyose inhibited the reduction ability of pyruvate to lactic acid, and limited the ability of gaining energy via glycolysis path way in Caco-2 cells, which suggests the inhibiting effect of stachyose on the proliferation of tumor cell may be related to hindering anaerobic glycolysis pathway and reducing the release of energy.

Keywords: stachyose; colon cancer; Caco-2 cells; inhibiting proliferation

银条(*Stachys floridana* Schuttl. ex Benth.)是原产于中国的传统蔬菜,大部分产于洛阳,洛阳偃师银条已获得“原产地域保护”。银条富含维生素、氨基酸,主要的生理活性物质是水苏糖、水苏碱等^[1]。水苏糖具有明显而独特的生物活性和优良的理化性及纯真口感,在药品、保健品、营养品、饮料、美容产品中得到广泛的应用。同时,由于人体内缺乏降解水苏糖的酶系统,因此它在小肠内不会被吸收,可直接进入结肠,这为它作为功能食品对结肠疾病产生保健作用提供了条件。

作者^[1]在前期工作中发现银条可能有减缓肿瘤细胞生长的功效,其中银条水苏糖是其中重要的功效成分。水苏糖是一种新型的功能性低聚糖^[2]。由于人体内缺乏降解水苏糖的酶系统,因此它在小肠内不会被吸收,可直接进入结肠,这为它作为靶向性食品对结肠疾病产生影响提供了条件^[3]。但目前国内外关于水苏糖的研究报道并不多,主要集中在水苏糖的提取分离^[4]及其作为益生菌增殖剂的间接作用分析及研究方面^[5-8],有关其直接生理活性的研究报道较少,水苏糖对人类癌症的直接防治作用及其机制的研究尚未见诸报道。魏小龙等^[9]曾对低分子量地黄多糖(low molecular weight *Rehmannia glutinosa* polysaccharides, LRPS)的抗癌活性及其机制进行过研究,地黄多糖中四糖的含量占 60%,

基金项目:无锡市卫生局科研项目(编号:Q201307);无锡市医院管理中心科研项目(编号:YGZY1508)

作者简介:钟先锋(1981—),江南大学附属医院副研究员,博士。

E-mail:zhongxf81@126.com

通讯作者:华东

收稿日期:2015-09-30

水苏糖是主要糖类之一,结果发现 LRPS 对小鼠 Lewis 肺癌有明显的抑制作用,并推测 LRPS 通过影响癌基因的表达,影响肿瘤细胞生长速度及周期,最终使肿瘤细胞增殖减缓甚至停滞,或改善肿瘤细胞分化能力,从而起到抗肿瘤作用。陈超等^[10]的报道也认为地黄中糖类的变化与其抗癌作用有关,炮制后水苏糖含量明显降低,其抗癌效果随之减弱。目前,在国外的研究报道中,还未见关于水苏糖抗癌活性的报道,但 Rastall^[11]认为功能性低聚糖,如低聚果糖(fructo-oligosaccharides)和低聚乳糖(galacto-oligosaccharides),具有防治结肠癌的作用。这些报道为研究水苏糖对结肠癌的防治作用提供了理论依据。本课题组在前期研究中,已从银条中提取得到水苏糖^[12],在此基础上,本研究拟探讨作为小分子功能性低聚糖的水苏糖,其本身的直接抑癌作用以及相关的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

银条水苏糖:水苏糖本实验室自制,制作过程:新鲜银条,经干燥,超微粉碎得到银条干粉,再经醇提、除杂、脱色、膜过滤等精制而得;

细胞株:人结肠癌细胞 Caco-2,上海中科院细胞库;

无血清培养液:由江南大学食品学院提供;

LDH 试剂盒:南京建成生物试剂公司。

1.1.2 主要仪器设备

生物安全柜: AIRTECH BSC-1000 II A2 型,苏净集团安泰公司;

酶标仪: MK3 型,赛默飞世尔(上海)仪器有限公司;

CO₂ 恒温恒湿培养箱: MCO-20AIC 型,日本 SanYo 公司;

倒置显微镜: 37XC 型,上海光学仪器进出口有限公司;

台式冷冻高速离心机: Neofuge 18R 型,德国 Heal Force 公司。

1.2 方法

1.2.1 Caco-2 细胞的常规培养 Caco-2 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中。细胞培养条件为 37℃,湿润,5% CO₂,每 48 h 更换一次培养基。

1.2.2 Caco-2 细胞的无血清培养 将在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中生长良好,处于对数生长期的 Caco-2 消化,传代。通过逐渐减少培养基中血清含量的方式使 Caco-2 细胞最终适应无血清的培养基环境。

1.2.3 绘制 Caco-2 细胞生长曲线 Caco-2 细胞培养 48 h 后,用胰酶消化脱壁,吹打成 2×10³ mL⁻¹ 单细胞悬液后,接种于 24 孔培养板中,每孔加入单细胞悬液 1 mL,每组设 18 个复孔,放入 CO₂ 培养箱中再次常规培养 7 d,每隔 24 h 采集样品,消化成单细胞悬液后,细胞计数,每个孔重复计数 2 次,得出细胞浓度的平均值,绘制生长曲线。

1.2.4 银条水苏糖对 Caco-2 细胞增殖抑制试验 Caco-2 细胞接种于常规 96 孔培养板中,培养方法同上,开始用血清培养液,接种量为 100 μL/孔,培养 24 h 后换无血清培养液,

避免培养液中血清干扰试验结果,并添加含不同浓度的水苏糖溶液,使水苏糖的终浓度达到 4.0,2.0,1.0,0.5 mmol/L。细胞培养 24,48,72 h 后 MTT 法测定 OD 值。

1.2.5 细胞凋亡试验 采用 Flow Cytometry 法^[13]。本试验应用流式细胞仪检测 Caco-2 细胞凋亡,使用 Annexin V-FITC/ PI 法。在 6 孔细胞培养板每孔接种 Caco-2 细胞,使用无血清 DMEM 培养基恒温培养 48 h 后吸净孔中培养液,更换新的培养液 1.5 mL 并添加含不同浓度的水苏糖溶液,使水苏糖的终浓度达到 4.0,2.0,1.0,0.5 mmol/L。对照组添加超纯水。培养 24 h。用不含 EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶消化细胞 1 min,吸净胰蛋白酶液,每孔加入约 500 μL PBS,用移液枪反复吹打溶液至形成单细胞悬浮液,吸取细胞悬浮液移入一次性 2 mL 离心管,在冷冻干燥离心机中离心去上清并重复此操作两次。按照 FITC V Apoptosis Detection Kit 1 (BD, USA) 的说明,先后添加 FITC、PI 染料 5 μL 染色室温避光反应 5~15 min。上流式细胞仪检测。

1.2.6 乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase, LDH)释放率测定 试验分组和前期操作同前,Caco-2 细胞收集于 Eppendorf 小管中,然后 1 500 r/min 离心 5 min,静置数分钟后,分离上清液待测,Caco-2 细胞仔细用 PBS 洗 3 次,然后向细胞中加细胞裂解液 600 μL/管,反复冻融 3 次裂解细胞,用高速离心机在 14 000 r/min 离心 20 min,后取裂解液的上清液 100 μL,用于细胞内 LDH 含量测定(LDH 试剂盒),同时用考马斯亮蓝法测定细胞蛋白含量进行公式校正^[14]。

1.2.7 数据处理 试验数据结果均以 $\bar{X} \pm SD$ 表示,组间进行统计学分析。细胞凋亡试验采用 WinMDI Version 2.9 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 细胞生长曲线

图 1 为 Caco-2 细胞的生长曲线图。由图 1 可知,Caco-2 细胞的对数生长期是 24~96 h。

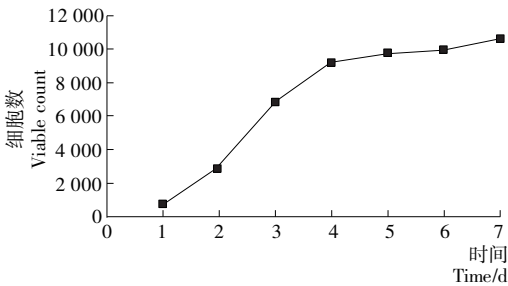


图 1 Caco-2 细胞的生长曲线

Figure 1 Growth curve of Caco-2 cell

2.2 Caco-2 细胞无血清培养液培养

由图 2 可知,本试验中所培养的 Caco-2 细胞在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基和无血清培养基中均可良好生长,培养 24 h 后,部分细胞贴壁,其中的单个细胞为不规则形状;培养 48 h 后大部分细胞贴壁,细胞相连,贴壁率达 80% 左右,说明细胞进入了对数生长旺盛期,可传代进行后续试验。

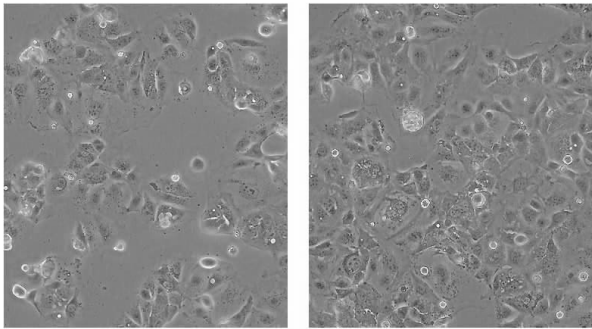


图 2 培养 48 h 的 Caco-2 细胞

Figure 2 Caco-2 cell in the DMEM and serum-freemedia for 48 h

2.3 不同浓度水苏糖在不同时间对 Caco-2 细胞的抑制作用

由表 1 可知,银条水苏糖对 Caco-2 细胞株具有细胞生长抑制作用且存在剂量和时间依赖关系,其中 1 mmol/L 的银条水苏糖共培养 3 d 对 Caco-2 细胞株的抑制率为 49.53%,表明其对 Caco-2 细胞具有显著的细胞毒作用,能显著抑制或者减缓肿瘤细胞的生长,同时发现这种增殖抑制作用呈现出一定的时效和量效关系。但是,当水苏糖浓度超过 1 mmol/L

表 1 银条水苏糖对 Caco-2 细胞增殖抑制作用[†]

Table 1 Effect of stachyose on the proliferation of Caco-2 cell line (n=6)

浓度/ (mmol · L ⁻¹)	抑制率/%		
	24 h	48 h	72 h
0.5	12.25±0.52 ^a	31.39±0.95 ^a	42.21±1.99 ^a
1.0	15.38±1.84 ^b	38.52±1.12 ^b	49.53±2.31 ^b
2.0	16.11±1.12 ^b	39.47±3.11 ^b	50.74±1.32 ^b
4.0	16.98±0.56 ^b	41.23±1.25 ^b	51.54±1.95 ^b

[†] 不同小写字母表示同一孵育时间各试验组间差异显著 (P<0.05)。

后,抑制率之间没有明显的差异 (P<0.05)。

2.4 银条水苏糖诱导 Caco-2 细胞的凋亡

FCM 检测结果见图 3。水苏糖作用 24 h 后,Caco-2 细胞的凋亡率随浓度的增加而增加。0 mmol/L 的对照组 Caco-2 细胞的凋亡和死亡率为 21.2%;0.5 mmol/L 的水苏糖作用的 Caco-2 细胞凋亡和死亡率为 36.6%;2 mmol/L 的水苏糖作用的 Caco-2 细胞凋亡和死亡率为 50.5%;4 mmol/L 的水苏糖作用的 Caco-2 细胞的凋亡和死亡率为 69.0%。Annexin-V-PI 双染进一步验证了银条水苏糖能够诱导 Caco-2 细胞凋亡。

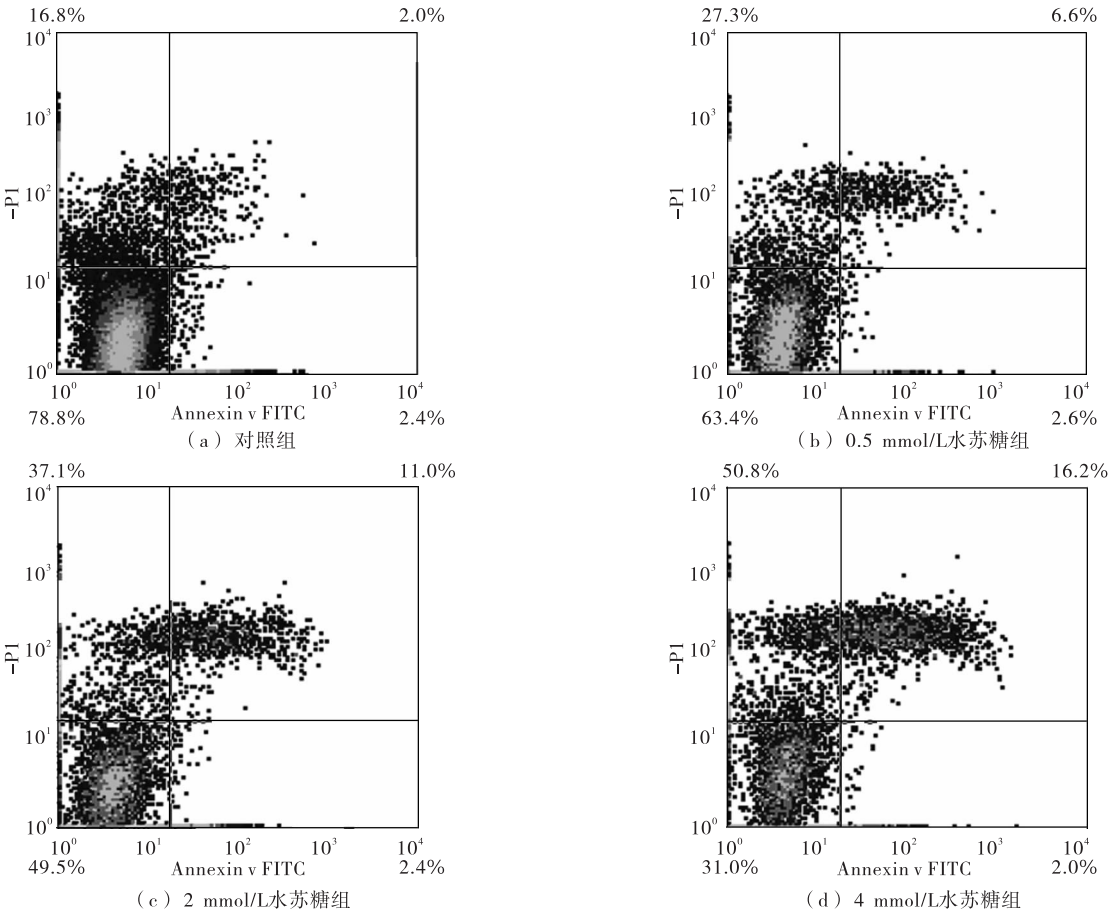


图 3 检测的 Caco-2 细胞凋亡结果

Figure 3 The result of flow cytometry on the apoptosis of Caco-2 cell

2.5 水苏糖对 LDH 释放率的影响

LDH 是生物机体内重要的酶类,参与生物机体代谢过程,当生物机体有组织器官发生病变或者处于不健康状态时,组织器官中的 LDH 含量和状态发生变化,进而引起血液 LDH 含量改变^[15]。LDH 释放率是细胞受损伤的标志性指标。由图 4 可知,当 Caco-2 细胞与 0.5 mmol/L 水苏糖共孵育 6 h 后,与对照组相比,LDH 释放率显著升高($P<0.05$),而且 LDH 释放率的升高均与银条水苏糖呈浓度依赖关系。本研究设计 LDH 试验,希望从细胞损伤的角度来验证银条水苏糖的抗癌活性,LDH 释放率的上升提示银条水苏糖抑制了肿瘤细胞获取能量的能力,导致细胞生长功能不足,进而影响生长周期,减缓肿瘤细胞生长和凋亡率上升,原理可能是阻断了丙酮酸还原为乳酸的代谢过程,即限制了肿瘤细胞经由糖酵解获得能量的能力,导致细胞为了获得生长能量加重了三羧酸循环有氧氧化供能的负担,或者引起生长能量供应不足,而使 Caco-2 细胞生长减缓、死亡。显微镜下观察也显示,4 mmol/L 银条水苏糖组 Caco-2 细胞内线粒体肿胀,胞浆中出现大量空泡等能量供应不足的现象,提示糖酵解作用受到了阻碍^[16]。这从两个方面相互验证了抑制肿瘤细胞内的无氧糖酵解作用有可能是银条水苏糖抗肿瘤作用的机理之一这一假说^[17-18]。

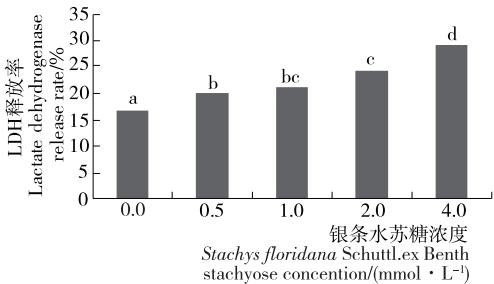


图 4 水苏糖对 Caco-2 细胞的 LDH 释放率的影响
Figure 4 The effect of stachyose on the LDH release in Caco-2 cell

3 结论

本试验研究结果表明银条水苏糖可以调节 Caco-2 细胞中丙酮酸还原为乳酸的能力,使得肿瘤细胞生长的能量来源偏向三羧酸循环有氧氧化供能,细胞获得生长所需能量的缺乏,也加重了三羧酸循环负担,影响细胞生长周期,最终导致肿瘤细胞生长减缓或者死亡,说明抑制肿瘤细胞能量来源途径(无氧糖酵解作用)可能是银条水苏糖抗肿瘤作用的机理之一。这对水苏糖对结肠癌防治作用的理解提供了理论依据,也对水苏糖保健食品的开发起到一定指导作用。

参考文献

1 陈燕,钟先锋,黄桂东,等. 银条水苏糖提取条件研究[J]. 天然产物研究与开发, 2011, 23(1):123~130.
2 Pukacka S, Ratajczak E, Kalembe E. Non-reducing sugar levels in beech (*Fagus sylvatica*) seeds as related to withstanding desiccation and storage[J]. J. Plant Physiol, 2009, 166(13):1 381~

1 390.
3 马丽苹. 银条多糖分离纯化、抗肿瘤和免疫调节活性研究[D]. 南京:南京农业大学,2012.
4 宋春丽,王文侠,曾风彩,等. 超声波和微波辅助提取大豆低聚糖的工艺比较[J]. 食品与机械, 2011, 27(2):47~50.
5 岳春,李靖靖,方永远. 虫草多糖微波辅助提取工艺的优化[J]. 食品与机械, 2014, 30(1):192~195.
6 Grmanová M, Rada V, Sirotek K, et al. Naturally occurring prebiotic oligosaccharides in poultry feed mixtures[J]. Folia Microbiol (Praha), 2010, 55(4):326~328.
7 Shin R, Suzuki M, Mizutani T, et al. Improvement of experimentally induced hepatic and renal disorders in rats using lactic acid bacteria-fermented soybean extract (Biofermentics TM)[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2009, 6(3):357~363.
8 Dan Qiu, Tri Vuong, Babu Valliyodan, et al. Identification and characterization of a stachyose synthase gene controlling reduced stachyose content in soybean[J]. Theor Appl Genet, 2015, 128(11):2 167~2 176.
9 魏小龙,茹祥斌,刘福君,等. 低分子量地黄多糖对癌基因表达的影响[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1998, 12(2):159~160.
10 陈超,许莉,王栋. 地黄中糖类的变化对其抗癌作用的影响[J]. 实用肿瘤学杂志, 2002, 16(4):312.
11 Rastall R A. Functional oligosaccharides: application and manufacture[J]. Annu Rev Food Sci. Technol, 2010(1):305~339.
12 Zhong Xian-feng, Huang Gui-dong, Chen Yan, et al. Optimization of extracting stachyose from *Stachys floridana* Schuttl. ex Benth by response surface methodology[J]. J. Food Sci. Technol, 2013, 50(5):942~949.
13 马伟伟,李丽,周革非. 海黍子硫酸多糖体外免疫与抗肿瘤活性[J]. 食品科学, 2013, 34(7):270~274.
14 张平,李鹏飞,金素钰,等. 蛋白质变性剂和金属离子对中华皮蝇单体乳酸脱氢酶活力的影响[J]. 湖北农业科学, 2014, 53(7):1 609~1 612.
15 姜绍通,郑志,潘丽军,等. 6L-乳酸米根霉发酵体系 LDH 活力及代谢调控研究[J]. 食品科学, 2005, 26(1):41~44.
16 杨艳,刘东波,康信聪,等. H₂O₂ 诱导胰岛 RIN-m5F 细胞构建氧化应激模型[J]. 食品与机械, 2014, 30(2):40~43.
17 侍银宝,钟海雁. 油茶果皮多酚粗提物对 DNA 氧化损伤的影响[J]. 食品与机械, 2013, 29(6):143~146.
18 亓树艳,王荔,莫晓燕. 大枣多糖的提取工艺及抗氧化作用研究[J]. 食品与机械, 2012, 28(4):117~120.