

柚子皮多糖抑制小鼠结肠癌细胞增殖的机制研究

李佳宁 白 宏 张一雯 王丽森 韩 怡

西安培华学院 中国·陕西西安 710125

【摘要】目的：研究柚子皮多糖对小鼠结肠癌细胞 SW480 细胞的杀伤作用，探讨柚子皮多糖对 SW480 细胞抑癌的作用机制。方法：体外培养肿瘤细胞，用 MTT 法检测柚子皮多糖对 SW480 细胞的细胞毒；建立 SW480 结肠癌小鼠模型，用不同剂量的柚子皮多糖灌胃小鼠，研究柚子皮多糖对结肠癌的体内抑制效应；通过小鼠血常规检查，研究柚子皮多糖对小鼠外周血淋巴细胞数量的影响。结果：MTT 试验结果显示柚子皮多糖对 SW480 细胞有明显的抑制效应；体内试验显示柚子皮多糖具有显著的体内抗肿瘤效应。血液分析结果显示柚子皮多糖可以提高小鼠血液中淋巴细胞亚群的比例。

【关键词】柚子皮多糖，结肠癌，免疫

[Abstract] Objective: To study the killing effect of yuzu peel polysaccharide on mouse colon cancer cells SW480 cells, and to explore the mechanism of yuzu peel polysaccharide on SW480 cells. Methods: Tumor cells were cultured in vitro, and the cytotoxicity of grapefruit peel polysaccharide to SW480 cells was detected by MTT assay. SW480 colon cancer mouse model was established, and the inhibitory effect of grapefruit peel polysaccharide on colon cancer in vivo was studied in mice given different doses of grapefruit peel polysaccharide. The effect of grapefruit peel polysaccharide on the number of peripheral blood lymphocytes in mice was studied by blood routine examination. Results: The results of MTT test showed that the polysaccharide of pomelo peel had obvious inhibitory effect on SW480 cells. In vivo experiments showed that grapefruit peel polysaccharide had significant antitumor effect in vivo. The results of blood analysis showed that yuzu peel polysaccharide could increase the proportion of lymphocyte subsets in the blood of mice.

Keywords: Grapefruit peel polysaccharides, colon cancer, immunity

引言

结直肠癌(CRC)是全球最常见的恶性肿瘤之一,男性发病率第二高,女性发病率第三高,男性和女性癌症相关死亡率分别为第三和第四。尽管最近在筛查策略和更有效的CRC治疗方法的发展方面有所改进,但晚期CRC的预后仍然较差。许多危险因素,包括病毒和细菌感染、酒精、烟草、衰老、溃疡性结肠炎、久坐的生活方式以及基因突变可能与CRC相关^[1]。机体的免疫功能也与肿瘤的发生有密切关系,当宿主免疫功能低下或受抑制时,肿瘤发生率增高。在之前观察到的荷瘤动物和癌症患者中,发现其都有免疫抑制的现象,说明免疫系统在对肿瘤细胞监视作用中起着很重要的作用^[2]。机体免疫系统通过细胞免疫机制能识别并特异地杀伤突变细胞,使突变细胞在未形成肿瘤前即被清除。但当机体免疫监视功能不能清除突变细胞时,则可形成肿瘤。免疫抑制不仅能够使肿瘤细胞增殖生长,而且也会阻碍肿瘤患者机体的好转,肿瘤发生后机体可通过免疫效应机制发挥抗肿瘤作用。植物多糖由于其特性是一种免疫调节剂。可以通过激活巨噬细胞、T淋巴细胞和B淋巴细胞,促进细胞因子生成,增加补体等方式对机体的免疫系统进行调节^[3]。

柚子在我国南方大部分地区都有种植,产量丰富,一般都食用其果肉,果皮被丢弃,而柚皮约占整个柚子重量的30%左右,所以产生了大量的柚子皮渣,不仅造成了资源浪费,也对环境造成了负担^[4]。目前,对柚子皮的利用主要停留在饲料化和纤维粗加工的利用研究上,近年来,国内许多学者对柑橘类果皮的综合利用做过许多探索和尝试,但柑橘类果皮的综合利用仍缺乏多级加工和深度加工,特别是柚皮的综合利用尚未引起足够的重视。国外柑橘加工业发达国家的经验表明,搞好皮渣综

合利用,不仅可提高原料综合利用率,降低生产成本,提高附加值和经济效益,而且可以减少环境污染,这已成为现代化柑橘加工中不可忽视的重要环节^[5]。

本研究以柚子皮多糖为,以昆明小鼠为实验动物研究其体内抗肿瘤活性,并通过柚子皮多糖体外细胞培养、动物体内抗肿瘤、血液中各淋巴细胞亚群相关指标检测等手段探讨其抑制肿瘤作用机理。以期进一步挖掘柚子的生物功能,提高柚子的综合利用率。

1 材料与方 法

1.1 主要仪器与试剂

人结肠癌 SW480 细胞购于中国科学研究院上海细胞研究所, RPMI-1640 培养基购于南京凯基生物科技发展有限公司,青-链霉素混合液购置于上海碧云天生物技术有限公司,胎牛血清由杭州四季青生物科技公司提供,柚子皮多糖来源于西安培华学院药学系。噻唑蓝(MTT)来源于美国 Sigma 公司。全自动血液细胞分析仪来源于南京普朗医疗设备有限公司。全自动酶标仪购于 Bio-Rad 公司。

1.2 细胞培养

将人结肠癌 SW480 细胞于含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中进行培养,添加 100U/mL青霉素-链霉素溶液和 1mM L-谷氨酰胺,常规传代培养并孵育在 37℃,5%CO₂恒温箱中培养,选取对数生长期的细胞用于实验研究。

1.3 检测柚子皮多糖对结肠癌 SW480 的细胞毒性

取对数生长期的 SW480 细胞,调整细胞密度为 5×10⁴个/L,以 100 μL/孔的数量接种于 96 孔板中,每组至少设置 6 个重复。按照柚子皮多

糖的浓度, 分组如下: 对照组 (0 μg/ml), 100 μg/ml, 200 μg/ml, 400 μg/ml。将各组细胞置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中孵育后, 分别于 24h, 48h, 72h, 取出 96 孔细胞培养板, 每孔加入 100 μL 的 MTT 溶液 (5g/L), 培养 4h 后弃去上清, 再加入 150 μL 二甲亚砜 (DMSO), 摇床摇匀, 用酶标仪检测样品在 450nm 处的吸光值。

1.4 检测柚子皮多糖体内抗肿瘤活性研究

(1) 分组及灌胃

将 30 只 Bab/c 雌性小鼠随机分为 5 组: 空白对照组 (灌胃生理盐水), 模型组 (灌胃生理盐水), 低剂量组 (100mg/kg.d), 中剂量组 (200mg/kg.d), 高剂量组 (300mg/kg.d), 每组 6 只。模型组和多糖组在灌胃前均于小鼠右后背部接种 0.2ml 密度为 1.0 × 10⁷ 的 SW480 细胞。各组小鼠在相同的时间点持续灌胃 3 周, 试验前一天停止灌胃。

(2) 柚子皮多糖处理后小鼠外周血淋巴细胞比例的变化

灌胃结束后, 将各组小鼠进尾静脉取血, 利用全自动血细胞分析仪测定小鼠血常规, 检测柚子皮多糖处理后小鼠血液中红细胞、白细胞及血小板的变化。

(3) 分析柚子皮多糖对小鼠肿瘤生长的影响

各组小鼠接种 SW480 细胞后, 从第 6 天开始每隔一天测量小鼠肿瘤体积的变化, 肿瘤体积 = (长 × 宽)² / 2。

1.5 统计学方法

用 Graphpad Prism 7 软件进行数据统计与分析, 统计学数据以均数 ± 标准差 (X ± SD) 表示, 组间比较采用 T 检验, P ≤ 0.05 为有统计学差异。

2 结果

2.1 柚子皮多糖对 SW480 细胞体外抗肿瘤作用

图 1 结果表明, 柚子皮多糖与 SW480 细胞分别共孵育 24h, 48h, 72h 后, 随着多糖浓度的上升 (依次为 100 μg/ml, 200 μg/ml, 400 μg/ml), SW480 细胞的存活逐渐降低, 提示柚子皮多糖对 SW480 细胞生长有抑制作用, 且呈浓度依赖相关性。

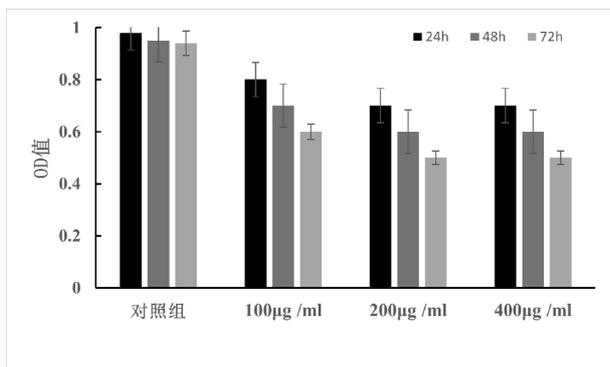


图 1 柚子皮多糖对 SW480 细胞增殖的影响 (x̄ ± s)

2.2 柚子皮多糖处理后小鼠血常规分析结果

表 1 结果显示, 与空白对照组相比, 模型组小鼠的淋巴细胞和红细胞总数显著降低 (P < 0.05), 而白细胞、粒细胞和血小板数量显著增加

(P < 0.05)。与模型组相比, 柚子皮多糖处理组小鼠淋巴细胞和红细胞总数显著增加 (P < 0.05), 白细胞、粒细胞和血小板数量显著降低 (P < 0.05)。

表 1 不同处理组小鼠血常规检测 (x̄ ± s) ^P < 0.05, *P < 0.05

类别	单位	空白组	模型组	多糖组
白细胞总数	10 ⁹ /L	6.31±0.91	9.38±2.11 [△]	6.94±0.56*
淋巴细胞百分比	%	78.26±4.81	32.63±12.31 [△]	72.04±10.77*
粒细胞百分比	%	21.46±5.3	65.73±12.87 [△]	26.46±10.41*
淋巴细胞数	10 ⁹ /L	4.96±0.78	2.96±1.07 [△]	4.81±0.89*
红细胞总数	10 ⁹ /L	8.88±1.11	7.54±0.79 [△]	8.61±1.60*
粒细胞数	10 ¹² /L	1.28±0.3	6.28±2.13 [△]	1.86±0.77

2.3 柚子皮多糖对小鼠肿瘤体积变化的影响

图 2 结果显示, 与模型组相比, 柚子皮多糖处理组小鼠肿瘤体积显著减小, 说明柚子皮多糖 (200mg/kg.d) 抑制小鼠肿瘤细胞在体内的生长。

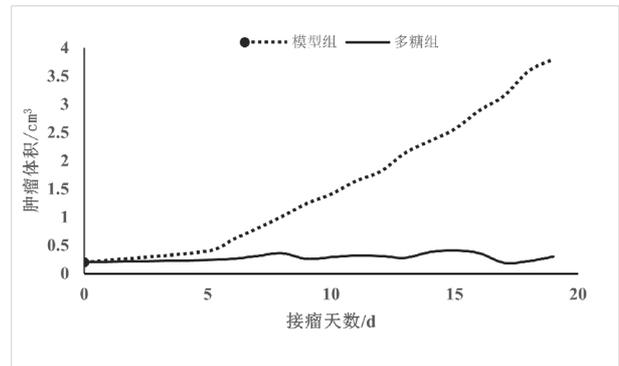


图 2 小鼠 SW480 实体肿瘤体积变化

3 结论

本课题通过利用细胞生物学的方法对柚子皮多糖体内外抗结肠癌的效应及机制进行了研究, 结果显示柚子皮多糖能显著抑制小鼠结肠癌 SW480 细胞的增殖, 动物实验结果显示, 灌胃剂量为 200mg/kg.d 时, 柚子皮多糖可以显著抑制体内肿瘤的生长。通过对小鼠进行血常规分析发现柚子皮多糖可以显著提升小鼠血液中淋巴细胞的数量, 提示柚子皮多糖可能通过提高小鼠免疫水平达到抗肿瘤效应。

参考文献:

[1]Min, Zhu, Xiaojue, et al. Apigenin suppresses colorectal cancer cell proliferation, migration and invasion via inhibition of the Wnt/beta-catenin signaling pathway[J]. Oncology letters, 2016.

[2]赵爱月, 苏云霞, 傅德强.MiR-4772 通过调控卵巢癌免疫相关基因改变肿瘤免疫微环境[J].南方医科大学学报, 2022, 42(11):1638-1645.

[3]钟雪峰, 王彤敏.LAG-3 在肿瘤免疫治疗中的研究进展[J].重庆医学, 2022, 51(22):3943-3947.

[4]万刘静, 张利.柚子皮多糖体外消化抗氧化活性的变化规律[J].食品研究与开发, 2021, 42(11):82-88.

[5]王玉芳. 柚子皮多糖抗肿瘤活性研究[D].天津科技大学, 2016.

作者简介: 李佳宁(2001.1), 女, 汉族, 籍贯:陕西汉中, 学历:本科。基金项目: 西安培华学院 2022 年大学生创新创业训练计划项目。项目编号: PHDC2022075