

半夏凝集素的分离纯化及其对 HeLa 细胞生长的影响

冯瑞娟, 刘学锋, 汪 波, 陈文铎, 董 淼, 徐 涛

(浙江理工大学生命科学学院生物工程研究所, 杭州 310018)

摘 要: 利用甘露糖-Sepharose 4B 亲和柱从半夏总蛋白中分离纯化得到一种 12 kD 的半夏凝集素,经质谱分析明确其为半夏凝集素单体。将该 12 kD 凝集素单体作用于体外培养的 HeLa 细胞,MTT 法检测细胞活性并用倒置相差显微镜观察凝集素对 HeLa 细胞生长状态的影响。结果显示:低浓度(0.004、0.02、0.1 mg/mL)半夏凝集素具有一定促进 HeLa 细胞增殖的作用;高浓度(0.5、1 mg/mL)半夏凝集素有一定抑制 HeLa 细胞增殖的作用。

关键词: 半夏凝集素; 亲和柱; 分离纯化; HeLa 细胞; MTT 法

中图分类号: R284.2, R73-35 **文献标识码:** A

0 引 言

半夏(*Pinellia ternata* (Thunb.) Breit.)为天南星科半夏属植物^[1],是一种常用中药材,性温、味辛、有毒。半夏的主要成分有淀粉、半夏蛋白^[2]、生物碱^[3]、多糖、氨基酸^[4]、挥发油、有机酸类^[5]、甾醇类、黄酮类、鞣质及微量元素^[6]等多种化学成分。归脾、胃、肺经,具有抗生育、抗肿瘤、抗心律失常、抗溃疡、降血脂、镇静催眠、镇咳、解毒抗炎等作用^[7-8]。半夏蛋白是一种能与甘露糖专一结合的植物凝集素。研究已确定半夏植物凝集素分子量是 44 kD,由四个约 12 kD 的亚基组成,半夏蛋白常以单体、二聚体、四聚体共存^[9]。

半夏对肿瘤细胞的抑制作用的研究,最早始于 1978 年,上海医科大学妇产科医院用掌叶半夏鲜汁涂抹患处治疗宫颈癌收到良好的效果,临床试用证实掌叶半夏有抗宫颈癌的良好疗效^[10]。而后,关于半夏提取物抗癌作用的研究成果相继发表:朱铭伟等^[11]1999 年研究发现半夏提取物能延长腹水模型小鼠生存时间,并能抑制荷瘤小鼠瘤体生长;郑国灿等^[12]2004 年研究发现半夏乙醇提取物具有抗癌作

用,能抑制人结肠癌细胞(HT-29)、直肠癌细胞(HRT-18)、肝癌细胞(HepG2)的生长;黄必胜^[13]的研究结果表明只有用 30% 饱和度硫酸铵沉淀的半夏蛋白对肝癌 Bel-7402 细胞生长才具有明显抑制作用,认为是半夏蛋白促进 Bel-7402 细胞的凋亡而达到抗肿瘤的目的。

目前关于半夏蛋白的抑癌作用都集中在掌叶半夏方面。孙光星等^[14]发现掌叶半夏总蛋白有抑制小鼠 S-180 肉瘤生长的作用。朱铭伟等^[11]的研究证实了掌叶半夏抑瘤成分存在于总蛋白中,同时也证实了掌叶半夏总蛋白对卵巢癌具有选择杀伤作用,且对人脐血造血细胞没有抑制作用,认为其抑瘤作用并不是通过一般的细胞毒作用,而是另有途径。掌叶半夏对卵巢癌细胞株(SKOV-3)和耐药细胞亚株有不同程度的抑制作用,抑制率对掌叶半夏总蛋白浓度变化表现良好的量效反应^[15]。

大量的研究表明半夏蛋白具有抗肿瘤的作用,而这种研究主要停留在半夏总蛋白水平上,半夏总蛋白中成分较多,对于具体或主要由哪种蛋白成分对肿瘤细胞起增殖抑制作用的研究却很少。本文利用甘露糖-Sepharose 4B 亲和柱分离纯化出半夏凝

集素单体,并将分离得到的半夏凝集素单体制备成梯度浓度作用于 HeLa 细胞,初步研究其对肿瘤细胞增殖抑制的作用,为利用半夏凝集素开发新抗癌药物提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂及仪器

材料:三叶半夏块茎采集于山东菏泽,经植物形态鉴定为 *Pinellia ternata*;HeLa 细胞为本实验室保存。

试剂:甘露糖-Sepharose 4B 凝胶、1×DMEM/HIGH GLUCOSE、1×Hanks 缓冲液、胎牛血清、二甲基噻唑二苯基四唑溴盐(MTT)(Sigma)、二甲基亚砷(DMSO)。

仪器:HTM30 倒置显微镜(上海绘统光学仪器有限公司)、BC-J80S 二氧化碳细胞培养箱(苏州江东精密仪器有限公司)、SW-CJ-1F 超净工作台(上海精密仪器仪表有限公司)、ST-360 酶标仪(上海精密仪器仪表有限公司)、HD-97-1 核酸蛋白检测仪(上海嘉鹏科技有限公司)、Mini-Protean Tean 电泳仪(Bio-RAD)、ZD-9556 水平脱色摇床(太仓市科教器材厂)、CR22G 高速离心机(日立 HITACHI)。

1.2 实验方法

1.2.1 亲和凝胶的制备

将甘露糖偶联到环氧活化琼脂糖凝胶上(委托北京过程控制研究所合成)。

1.2.2 半夏凝集素粗品的制备

半夏块茎洗净去皮充分研磨成糊状,20% NaCl 溶液浸泡过夜。12 000 r/min,4℃,离心 30 min,取上清,加入固体硫酸铵使饱和度达到 95%,冰上静置过夜。12 000 r/min,4℃,离心 30 min,弃上清,沉淀用 20% NaCl 溶液溶解,然后对 20% NaCl 溶液透析至透析液中检测不到硫酸铵,离心除去不溶物得到上清即为半夏凝集素粗品。

1.2.3 亲和层析制备半夏凝集素

甘露糖-Sepharose 4B 凝胶装柱后用 20% NaCl 溶液平衡,将上述半夏凝集素粗品上柱,以 20% NaCl 溶液为洗脱液,上样量相同的条件下,分别用 0.2 mol/L 甘露糖溶液和 0.9% NaCl 溶液为解离液,用核酸蛋白检测仪 A280 检测,均只出现一个比较明显的吸收峰,收集解离下来的样品,透析脱盐浓缩,SDS-PAGE 凝胶检测洗脱样品。

1.2.4 HeLa 细胞培养

培养条件为 37℃、5% CO₂、饱和湿度下,用含

10% FBS 的 DMEM 培养液将细胞培养至铺满瓶底后,用含 0.25% 胰蛋白酶的消化液消化细胞,按 1:3 的比例分装于三个培养瓶,每 3~5 d 传代 1 次。

1.2.5 细胞增殖抑制实验(MTT 法)

取对数生长期的 HeLa 细胞,胰酶消化后吹打成单细胞悬液(2×10^4 /mL)接种于 96 孔培养板,90 μL/孔。细胞贴壁后加入不同浓度的半夏凝集素样品(样品用 PBS 溶解),使最终浓度分别为 0.004、0.02、0.1、0.5 mg/mL 及 1 mg/mL。同时设 PBS 溶剂对照组,培养基为空白组,每一浓度设 3 复孔,分别培养 24 h、48 h、72 h,每孔加 20 μL 5 mg/mL 的 MTT 溶液,37℃ 孵育 4 h,弃培液,加 150 μL DMSO,室温下振荡 20 min,使充分溶解后于 490 nm 测定吸光值 A,实验重复 3 次。

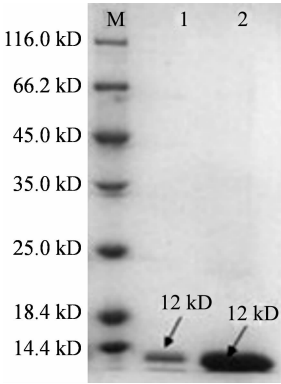
1.2.6 倒置相差显微镜摄影

取对数生长期的 HeLa 细胞,胰酶消化制成单细胞悬液(2×10^4 /mL)等量接种于培养瓶中,培养细胞贴壁后加入 0.004 mg/mL 和 1 mg/mL 的半夏凝集素样品。分别培养 24 h、48 h、72 h,倒置相差显微镜下观察摄影。

2 结果与分析

2.1 亲和层析分离到半夏凝集素单体

经 95% 硫酸铵饱和度盐析沉淀的半夏块茎凝集素粗品,透析处理后过甘露糖-Sepharose 4B 亲和柱收集活性峰进行 15% SDS-PAGE 凝胶电泳检测,结果显示为单一条带,表观分子量约为 12 kD(图 1),经质谱分析法测定其相对分子量为 12.165 kD。



M:标准蛋白质;1:0.2 mol/L 甘露糖解离样品;
2:0.9% NaCl 解离样品

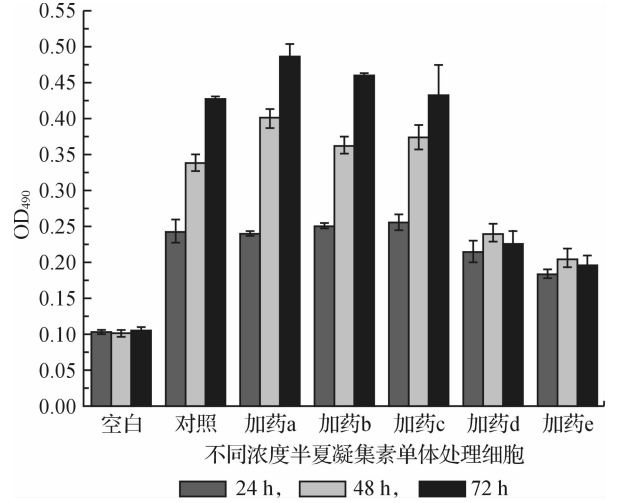
图 1 甘露糖-Sepharose 4B 亲和解离样品 15% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

凝胶电泳检测出现单一条带,纯度相对较高。由分子量大小分析得出,甘露糖亲和柱分离得到的是半夏凝集素单体。由图 1 可知,0.2 mol/L 甘露

糖溶液解离样品和 0.9% NaCl 溶液解离样品为同一蛋白;用 NANODROP 2000 测定分离得到的样品浓度,经计算,0.2 mol/L 甘露糖溶液解离样品量为 0.9 mg,0.9% NaCl 解离样品量为 3 mg,可知 0.9%NaCl 解离效果较 0.2 mol/L 甘露糖好。推测可能是因为半夏凝集素与亲和柱的结合不仅是甘露糖亲和专一性作用的效果,同时,蛋白的疏水基也在起作用。

2.2 不同浓度的半夏凝集素单体对细胞增殖的影响

不同浓度半夏凝集素分别作用 HeLa 细胞 24、48、72 h 后的细胞生长状况如图 2 和图 3 所示。



空白:HeLa 细胞培养液;对照:PBS 缓冲液;加药 a:0.004 mg/mL;加药 b:0.02 mg/mL;加药 c:0.1 mg/mL;加药 d:0.5 mg/mL;加药 e:1 mg/mL

图2 不同浓度半夏凝集素单体处理下的 HeLa 细胞的 A₄₉₀ 值

由图 2 和图 3 可知,低浓度(0.004、0.02 mg/mL 及 0.1 mg/mL)半夏凝集素有促进 HeLa 细胞增殖的作用。

0.004 mg/mL 半夏凝集素作用 HeLa 细胞 24 h 时,活细胞数与对照组基本一样,促增殖作用尚不明显,促增殖效率为 1.26%;作用时间为 48 h 时,其促增殖作用明显增强,促增殖效率为 23.36%;作用时间为 72 h 时,其促增殖作用开始减弱,促增殖效率为 18.42%。

当半夏凝集素浓度为 0.02、0.1 mg/mL 时,两者的促增殖作用效果均低于浓度为 0.004 mg/mL 时。三种浓度对 HeLa 细胞增殖抑制作用的关系为:同一浓度不同作用时间时,三种浓度的促增殖作用效果均为 48 h>72 h>24 h,原因可能是半夏凝集素作用 HeLa 细胞需要一定的时间才起明显作用,而作用时间足够(48 h)时,作用效果达到最大,

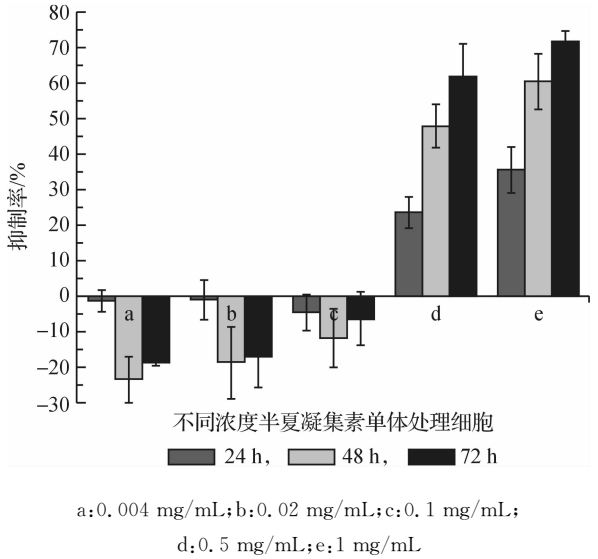


图3 不同浓度半夏凝集素单体对 HeLa 细胞增殖作用的影响

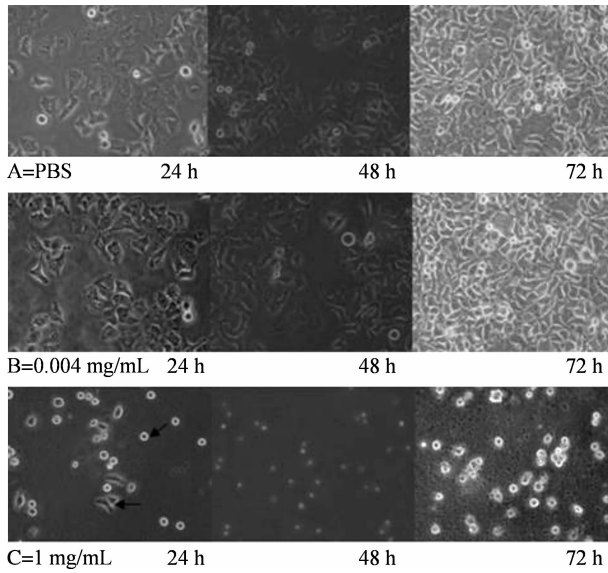
随着时间的增长,药用成分消耗随之促增殖作用有所减弱,但仍强于 24 h 的作用效果;不同浓度同一作用时间,促增殖效果基本为 0.004 mg/mL>0.02 mg/mL>0.1 mg/mL,原因可能是更低浓度的半夏凝集素有明显的促增殖作用,随浓度增高,促增殖作用则减弱。

高浓度(0.5 mg/mL 及 1 mg/mL)半夏凝集素有明显抑制 HeLa 细胞增殖的作用,且两浓度的抑制作用均有时间依赖性,两者在 72 h 时有最大抑制率,分别为 62.03%和 71.89%。同一作用时间下,浓度 1 mg/mL 的抑制作用强于浓度 0.5 mg/mL 的。

2.3 不同浓度的半夏凝集素单体对细胞形态的影响

将对 HeLa 细胞增殖有促进作用的浓度为 0.004 mg/mL 的半夏凝集素和对 HeLa 细胞有抑制作用的浓度为 1 mg/mL 半夏凝集素分别作用于 HeLa 细胞,培养 24、48、72 h 后倒置显微镜下观察,结果如图 4。

分析结果可知,0.004 mg/mL 半夏凝集素作用的细胞生长状态良好,大部分细胞都处于分裂状态,与空白溶剂作用的细胞生长状态相似,细胞形态正常,培养 72 h 后,细胞基本铺满瓶底。1 mg/mL 半夏凝集素作用的细胞,作用 24 h 时,有部分细胞还有分裂增殖的能力,但其细胞形态和溶剂空白作用的细胞相比,细胞已开始缩小,分裂增殖力明显减弱,一部分细胞死亡,悬浮于培养液中,作用 48 h 和 72 h 后细胞生长能力全部被抑制,皱缩死亡,在培养液中呈悬浮状态。



A: PBS 缓冲液; B: 半夏凝集素浓度 0.004 mg/mL;
C: 半夏凝集素浓度 1 mg/mL

图 4 半夏凝集素各处理下 HeLa 细胞的生长状态显微观察结果

3 结 论

本文研究半夏凝集素的分离纯化及半夏凝集素对抗肿瘤活性。研究发现 20% NaCl 溶液作为提取液提取半夏凝集素才能和亲和凝胶上的配基有很高的结合效率,降低 NaCl 溶液浓度则结合效率降低,其原因可能是高盐离子浓度使原本处于半夏凝集素内部的疏水基团暴露,促进其与配基的结合;解离液根据半夏凝集素甘露糖结合专一性,选用 0.2 mol/L 甘露糖溶液,又因可能由于高盐的原因促进半夏凝集素与凝胶配基结合,故考虑降低盐离子浓度解离样品。首先选择用蒸馏水解离,但没有解离峰出现,用 0.9% NaCl 溶液解离样品,得到了很好的解离效果,与甘露糖解离效果比较分析发现,0.9% NaCl 溶液解离效果要优于 0.2 mol/L 甘露糖溶液,这也说明半夏凝集素与凝胶配基的结合,凝集素的疏水基团起了很大的作用。

低浓度(0.004、0.02 mg/mL 及 0.1 mg/mL)半夏凝集素有一定促进 HeLa 细胞增殖的作用,而高浓度(0.5 mg/mL 及 1 mg/mL)半夏凝集素有一定抑制 HeLa 细胞增殖的作用。孙册等^[2,16]研究表明半夏蛋白亦具有促使细胞分裂的活性,并且这种作用具有动物种属专一性。本研究表明低浓度的半夏凝集素有促 HeLa 细胞分裂的活性,而高浓度的半夏凝集素有抑制 HeLa 细胞增殖的活性,但其作

用机理还需要进一步研究。

本文初步研究了半夏凝集素单体对 HeLa 细胞的作用,为利用半夏凝集素开发新抗肿瘤药物提供了一定的研究基础。但半夏凝集素是否对其它癌细胞有作用,还需对多种癌细胞进行筛选及动物实验。

参考文献:

- [1] 顾德兴,郭巧生. 半夏群体生物学特性的研究[J]. 南京农业大学学报, 1990, 13(2): 11-16.
- [2] 孙 册. 半夏蛋白的若干生物学性质[J]. 生物化学与生物物理学报, 1983, 15(4): 333-338.
- [3] 吴 皓,束建清. 半夏姜制对 β 谷甾醇和总生物碱含量的影响[J]. 中国中药杂志, 1995, 20(11): 662-664.
- [4] 郭巧生,段金厥,贺善安. 半夏不同居群 3 种化学成分的动态比较研究[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(5): 296-299.
- [5] 吴 皓,张科卫,李 伟,等. 半夏的化学成分研究[J]. 中草药, 2003, 34(7): 593-595.
- [6] Ge X Y, Wu H. Phytochemical properties and quality evaluation methods of *Pinellia ternata* [J]. China Pharmaceuticals, 2009, 18(9): 3-5.
- [7] 李 斌,程秀民,周永妍,等. 半夏的研究进展[J]. 中国民族民间医药, 2010, 19(1): 47-48.
- [8] 王志强,李炳超. 半夏药理作用研究进展[J]. 山西医药杂志, 2009, 38(1): 65-67.
- [9] 徐 陶,杜 娟,谢丽霞,等. 半夏蛋白及其基因研究进展[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(10): 2557-2559.
- [10] 上海第一医学院妇产科医院基础部化学教研组. 掌叶半夏治疗子宫颈癌的研究[J]. 上海医学, 1978, 1(1): 13-16.
- [11] 朱铭伟,周抗美,丁声颂,等. 掌叶半夏总蛋白对卵巢癌细胞株及人脐造血细胞的作用[J]. 上海医科大学学报, 1999, 26(6): 455-456.
- [12] 郑国灿. 半夏提取液的抗肿瘤性研究[J]. 四川中医, 2004, 22(9): 9-11.
- [13] 黄必胜. 半夏蛋白对人肝癌细胞 Bel-7402 的诱导凋亡作用[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(5): 1056-1057.
- [14] 孙光星,丁声颂,钱瑶君. 掌叶半夏总蛋白的提取、化学分析和对小鼠 S-180 瘤株的抑制作用[J]. 上海医科大学学报, 1992, 19(1): 17-20.
- [15] 周 莉,王汉楚,郑飞云,等. 应用双向凝胶电泳分析掌叶半夏总蛋白对人卵巢癌 SKOV3 细胞蛋白质表达谱的影响[J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(4): 789-791.
- [16] Yoko Tachibana, Kazuko Kawanishi. Mitogenic activities in the protein fractions of crude drugs[J]. Planta Medica, 1992, 58: 250-254.

Preliminary Study of Hela Cell Treated with *Pinellia ternata* lectin

FENG Rui-juan, LIU Xue-feng, WANG Bo, CHEN Wen-duo, DONG Miao, XU Tao

(Institute of Bioengineering, School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: One kind of *Pinellia ternata* lectin is isolated from the total protein of *Pinellia ternata* via mannose-Sepharose 4B affinity chromatography. The cultured Hela cell added with different concentrations of lectin is detected via the MTT method and observed with an inverted phase contrast microscope. The results showed that low concentrations (0.004 mg/mL, 0.02 mg/mL, 0.1 mg/mL) of *Pinellia ternata* lectin can promote the proliferation of Hela cells, but high concentrations (0.5 mg/mL, 1 mg/mL) of *Pinellia ternata* lectin can inhibit the proliferation of Hela cells.

Key words: *Pinellia ternata* lectin; affinity column; isolation and purification; Hela cell; MTT method

(责任编辑: 许惠儿)

(上接第 846 页)

Construction of Lentiviral-based System with Fluorescent Reporter Gene Regulated by E-cadherin Promoter

HE Qian, YANG Geng-bing, YAO Chao, QIAN Cheng

(School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: The loss of E-cadherin is a significant marker of epithelial-mesenchymal transition (EMT), which promotes the progression of tumor invasion and metastasis. To further examine the relationship between E-cadherin and EMT, the lentiviral vector with yellow fluorescent protein reporter gene driven by E-cadherin promoter is successfully constructed. The supernatant of virus-producing cells transfected by calcium phosphate is then used to transfect PLC/PRF/5 cells. The fluorescent microscopy and qRT-PCR results show that the E-cadherin gene is expressed highly and stably in the target cells. This work is expected to provide a high-quality transfection vector for further research on the relevant functions of the E-cadherin gene and EMT.

Key words: E-cadherin; lentiviral vector; yellow fluorescent protein

(责任编辑: 许惠儿)