

鲨鱼软骨多糖的理化性质及其与 DNA 分子相互作用的研究*


李东霞¹ 李德良² 张双全¹

(¹ 南京师范大学生命科学学院 210097)

(² 内蒙古中医院生化室,呼和浩特 010020)

提要 以鲨鱼软骨为原料,用改进的提取工艺,制得纯度较高的鲨鱼软骨多糖(SCAMP)。对其进行理化性质分析,表明 SCAMP 含有 29.90% N 乙酰半乳糖胺、27.00% 葡萄糖醛酸、13.50% 硫酸根及 0.20% 蛋白质。红外光谱测试表明 SCAMP 的糖残基可能是 α -糖苷键,推测其主要成分是硫酸软骨素类多糖。用荧光探针法证实 SCAMP 与 DNA 分子能相互作用,并呈量效关系,为进一步探索 SCAMP 抗癌作用机理提供了一项实验依据。

关键词 鲨鱼软骨, SCAMP, DNA, 荧光探针, 抗癌

 自从 Langer 及 Lane 首先发现鲨鱼软骨中含有阻止肿瘤血管形成的物质,其后有关鲨鱼软骨多糖(SCAMP)抗癌及其药理分析方面的研究越来越多,并引起人们的关注。1997年,沈先荣等发现鲨鱼软骨抗

肿瘤制剂(SCATP)使荷瘤小鼠血浆中 6-Keto-PGF_{1a} 和

* 江苏省自然科学基金资助项目。

收稿日期:1999-09-05;修回日期:1999-12-29

TXB2的水平显著下降,而不改变两者之间的比值平衡;同时使Hela细胞骨架发生凝聚或固缩;并显著抑制实验动物肿瘤的生长^[1]。1998年,吕家本、于志洁等证实鲨鱼软骨提取物(SCAE)对C57BL/6J小鼠的B16黑色素瘤经血道肺转移有明显的抑制作用;对S180肉瘤和Lewis肺癌小鼠的抑瘤率达到50%以上^[2,3]。但上述研究均是以鲨鱼软骨粗提物为实验材料,为了阐明鲨鱼软骨中有效抗癌成分及其作用机制,作者在前人研究的基础上改进工艺技术,提取制备了SCAMP精品,对其进行了理化性质的测定,并应用荧光探针法研究了它与DNA的相互作用,初步探讨了SCAMP的抗癌作用机理。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料 鲨鱼软骨由市场购买。

1.1.2 试剂 溴化乙锭、考马斯亮蓝G250为瑞士Fluka公司产品;D-半乳糖醛酸为Sigma进口分装;DNA、N-乙酰葡萄糖胺、牛血清白蛋白(电泳纯)、碱性品红等试剂均为国产分析纯。

1.1.3 仪器 日本岛津RF540荧光分光光度计;美国PE公司Lambda17型紫外分光光度计;日本岛津IR408红外光谱仪;美国Beckman Allegra21R冷冻高速台式离心机。

1.2 方 法

1.2.1 SCAMP的制备 鲨鱼软骨脱水、脱脂、粉碎,加6倍的6%NaOH溶液50℃抽提4h,调pH=7.0左右,沸水浴40min,1%胰蛋白酶40℃水解10h,然后用10%三氯乙酸去蛋白质,以3倍无水乙醇沉淀SCAMP,脱水干燥^[4]。

1.2.2 SCAMP组分及含量测定 用改进的Ehrlich-Morgan反应鉴别氨基乙糖,用吡啶法和地衣酚法鉴别乙糖醛酸,用BaCl₂试剂鉴别硫酸根^[5]。

1.2.3 光谱测试 (1)测试样品浓度配制成100μg/ml,在190~300nm波长范围内进行紫外扫描;(2)取测试样品1.5mg与一定量溴化钾粉末在玛瑙研钵中轻轻研磨均匀,混合压片,选择波长4000~650cm⁻¹范围进行红外光谱扫描。

1.2.4 蛋白质含量测量 以牛血清白蛋白为标准,用G250考马斯亮蓝染色法定量分析。显色液(称取考马斯亮蓝G250,10mg,溶于95%乙醇5ml,再加入85%HPQ 10ml混匀,用双蒸水定容至100

ml,滤纸过滤,4℃放置备用)。配制300μg/ml的标准蛋白溶液和1mg/ml的SCAMP溶液。标准曲线制作和蛋白浓度测定参见文献[6]。

1.2.5 SCAMP与DNA的相互作用 称取1mg和2mgSCAMP,分别溶于1ml10mmol/LKNO₃母液(5μg/mlEB+25μg/mlDNA)中,为测试样品组;同时用10mmol/LKNO₃溶液分别配制含5μgEB,5μgEB+25μgDNA作为两种溶液对照组,总体积为1ml。上述溶液配好后,于4℃暗处静置一段时间。然后在狭缝为Ex=10nm,Em=10nm,激发波长为520nm,扫描范围为500~750nm,扫描速度中等的条件下进行荧光光谱扫描,方法参见文献[7]。

2 结 果

2.1 光谱分析

紫外光谱测试表明其在280nm,260nm处均没有明显的光吸收,说明SCAMP样品中几乎不含有蛋白质和核酸,这和蛋白质含量分析结果一致,在200nm处有糖的较强光吸收峰,见图1。

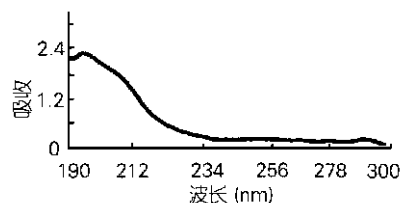


图1 SCAMP的紫外吸收光谱

Fig.1 Ultraviolet absorption spectrogram of SCAMP

红外吸收光谱显示典型的硫酸粘多糖的吸收特征,与透明质酸有相似的吸收峰^[8],如表1、图2所示。SCAMP在波数3400cm⁻¹处有强OH和NH的伸缩振动特征吸收峰;在1400cm⁻¹~1320cm⁻¹处有C-O伸缩振动和OH弯曲振动耦合产生的两个吸收峰;说明存在糖醛酸上游羧基结构和多糖羟基结构;在1640cm⁻¹,1560cm⁻¹处有C=O和CN伸缩振动特征吸收峰,表明存在乙酰氨基结构。在930,820cm⁻¹和760cm⁻¹处均有较弱的硫酸软骨素的特征吸收,并且在850,830cm⁻¹处有吸收峰,而在900cm⁻¹处无吸收峰,提示糖苷键为α-构型的可能性。

2.2 组分及含量测定

表 1 SCAMP 的红外光谱

Tab.1 Infrared spectrogram of SCAMP

波数(cm^{-1})	强度	功能基团
3 400	强	- NH ₂ , OH
2 900	弱	C-H
1 730	中	C=O
1 640	中	C=O, NHCOCH ₃
1 560	中	C-N
1 460	较弱	C-O
1 375	中	S=O
1 310	较弱	O-H
1 240	强	- OSO ₃ , S=O
1 120	强	C-O
1 070	强	C-O-C
930	较弱	C-O-C
820	中	C-O-S

结果表明, SCAMP 含有 29.90% 乙酰半乳糖胺、27.00% 葡萄糖醛酸、13.50% 硫酸根及 0.20% 蛋白质。其中蛋白质含量小于 0.5%, 低于瑞典 Healon 对蛋白质的最底限度要求, 可以进行注射液的制备, 如表 2。

表 2 SCAMP 的组分含量测定

Tab.2 Constituent content determination of SCAMP

组分	含量($\times 10^{-3}$)($\bar{X} \pm \text{SD}$)	百分含量(%)
氨基乙糖	299 \pm 26.5	29.90 \pm 2.65
乙糖醛酸	270 \pm 14.6	27.00 \pm 1.46
硫酸基	135 \pm 19.6	13.50 \pm 1.96
蛋白质	2 \pm 0.30	0.20 \pm 0.003

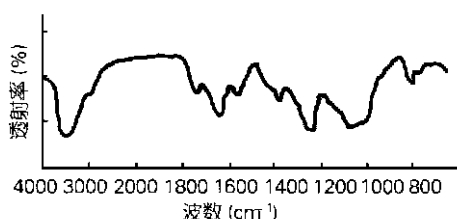


图 2 SCAMP 的红外光谱

Fig.2 Infrared spectrogram of SCAMP

2.3 SCAMP 与 DNA 的相互作用

图 3 显示: A 为单纯 EB 产生的荧光; B 为 EB 和 DNA 混合作用后, 其荧光光谱的荧光强度值最大, 当在 EB 和 DNA 的混合液中加入 SCAMP 后, 由于

SCAMP 与 DNA 能相互作用, 使荧光强度明显降低, 并呈量效关系, 即随着 SCAMP 量的增加, DNA 与 EB 结合后产生的荧光锐减。

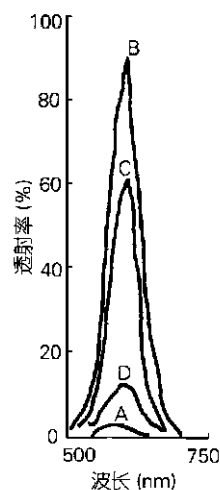


图 3 SCAMP 与 DNA 相互作用的荧光光谱

Fig.3 Fluorescent spectrogram of interaction of SCAMP and DNA

A. EB; B. EB + DNA; C. EB + DNA + 1 mg; SCAMP;


D. EB + DNA + 2 mg

3 讨论

目前, 有关鲨鱼软骨的研究很多, 但一般都以鲨鱼软骨粉或粗提物为实验材料。作者在柴向华等人提出的工艺流程的基础上, 增加了热水抽提和三氯乙酸去蛋白得到了无蛋白的鲨鱼软骨多糖纯品 (SCAMP)。该多糖为白色, 水溶性好, 得率为 12.46%。根据 SCAMP 的组分及百分含量测定, 以及紫外-红外光谱的分析, 推测 SCAMP 的主要成分为硫酸软骨素类多糖。

鲨鱼软骨的抗癌机理目前还不甚清楚, 就所掌握的资料认为这可能与软骨中所含大量粘多糖、胺基糖及丰富的活性蛋白, 主要包括血管生成抑制因子、肿瘤细胞抑制因子和抗肿瘤侵犯因子等的综合作用有关。血管生成抑制因子可能通过两种方式抑制血管生成: 其一, 抑制遗传物质的合成, 影响染色体复制, 使细胞分裂受阻, 或者影响细胞代谢, 使其不能合成所需的蛋白水解酶, 从而抑制内皮芽的生长。其二, 通过抑制癌细胞骨架的形成, 或者使细胞骨架发生凝聚和固缩, 破坏其结构完整性, 抑制内皮

细胞的分裂增殖及其运动迁移,并因此抑制新生血管生成,使之保持在无血管静止状态。

最近,陈季武等^[7]报道3种真菌多糖在体外能与DNA相互作用,并呈量效关系。其作用机理可能是:通过大分子之间的相互作用,多糖使EB从DNA分子上解离下来,修复损伤DNA;或者使DNA双螺旋结构解体或切断,释放出EB分子,从而使嵌入的EB荧光减弱。作者应用荧光探针法研究SCAMP与DNA的体外作用,发现其也能与DNA相互作用,并呈量效关系,提示了微生物、植物和动物多糖与DNA可能都具有不同程度的相互作用,这也可能是多糖防癌、抗癌作用的关键所在。某些细菌、真菌和植物多糖抗肿瘤活性是通过刺激宿主,提高其免疫活性,促进细胞免疫和体液免疫,诱导生成IL-1,IL-2,TNF,IFN等细胞因子,调节补体和抗体的生成,以达到抗癌目的,而SCAMP是否也具有上述作用,需要进一步深入研究。

参考文献

- 1 沈先荣,贾福星,王玲等。中国生化药物杂志,1997,18(3):123~126
- 2 吕家本,蒋定文,于志洁等。中国生化药物杂志,1998,19(6):378~380
- 3 于志洁,苏福强,吕家本等。中国生化药物杂志,1998,19(2):85~87
- 4 柴向华,余刚哲,吴克刚等。中国生化药物杂志,1999,20(1):38~40
- 5 张惟杰。复合多糖生化研究技术。上海:上海科学技术出版社,1987。291~298
- 6 彭秀铃,袁汉英,谢毅等。基因工程实验技术(第二版)。长沙:湖南科学技术出版社,1997。264~266
- 7 陈季武,胡天喜,朱振勤等。华东师范大学学报,1999,1:94~97
- 8 高玉琼,刘建华,霍晰等。生物化学杂志,1996,12(2):215~218

STUDIES ON THE PHYSIOCHEMICAL PROPERTIES OF SCAMP AND ITS INTERACT WITH DNA

LI Dong-xia¹ LI De-liang² ZHANG Shuangquan¹

(¹ College of Life Sciences, Nanjing Normal University, 210097)

(² Department of Biochemistry, Neijiang Traditional Chinese Medicine Hospital, Hubehaote, 010020)

Received: Sep.5,1999

Key Words: Shark cartilage, SCAMP, DNA, Fluorescence probe, Anticancer

Abstract

In this paper, shark cartilage acid mucopolysaccharide (SCAMP) was extracted from shark cartilage by the improved method. The results of physicochemical properties experiments showed that SCAMP is composed of 29.90% aminogalactose, 27.00% glucuronic acid, 13.50% SO₄²⁻ and 0.20% protein. Farred spectra experiment suggested that all residues of SCAMP are linked by α-glucosidic bond. By conclusion, the most of SCAMP is likely chondroitin sulfate. By fluorescence probe method it is proved that SCAMP can interact with DNA, and the inhibitory rate was concentration dependent, which is an important proof to understand its preventive effect of cancer and anticancerous effect more.

(本文编辑:李本川)