

异枝麒麟菜硫酸多糖的降解及其对尿石矿物草酸钙的抑制作用

王 森,于海燕,欧阳健明

(暨南大学 生物矿化与结石病防治研究所,广东 广州 510632)

摘要:采用过氧化氢法降解了相对分子质量约为 141 万 \pm 8.3 万的海藻异枝麒麟菜 (*Eucheuma striatum* Schmitz) 硫酸多糖 (ESPS),降解产物平均相对分子质量为 4 819 \pm 440。降解后多糖的硫酸基 (OSO_3^-) 质量分数稍有下降,由 16.03% 降至 15.20% 左右。同时,用体外模拟方法研究了降解前后 ESPS 对草酸钙 (CaOxa) 晶体生长的抑制作用,降解后的 ESPS 明显优于未降解多糖,其诱导生成的一水草酸钙 (COM) 晶体尺寸进一步减小,晶体数量减少,且棱角更为圆钝。表明低分子质量 ESPS 更能抑制 CaOxa 晶体的成核和生长。

关键词: 异枝麒麟菜 (*Eucheuma striatum* Schmitz) 多糖;降解;草酸钙;尿结石

中图分类号:O629.12; R282.77

文献标识码:A

文章编号:1000-3096(2008)08-0034-04

泌尿系结石(简称尿石)是一种世界范围的多发病,其患病率呈上升趋势,在中国的广东省及港澳地区,泌尿系结石与鼻咽癌一样,成为一种严重的地方高发病,其患病率高达 5%~15%。目前治疗尿石的药物主要是柠檬酸盐、镁制剂、正磷酸盐、别嘌醇和噻嗪类利尿剂等,但对这些药物的作用机理仍欠清楚,一些药物的疗效也欠佳。因此,开发具有自主知识产权、高效、低毒、廉价的新型防石药物,具有极为重要的科学和现实意义。

海藻硫酸多糖 (SPS) 是存在于海藻中的由多种单糖组成的硫酸杂多糖,主要存在形式为硫酸岩藻糖(褐藻糖胶)和硫酸半乳糖(卡拉胶和琼胶)。不同来源的 SPS 其结构、单糖组成和硫酸基含量各有差异^[1]。SPS 的生物活性不仅与链中硫酸基的含量有关,而且与其分子质量密切相关。SPS 分子质量越大,分子体积越大,越不利于多糖跨越多重细胞膜障碍进入生物体内发挥生物学活性^[2]。天然的 SPS 由于分子质量大(从几十万至几百万),其溶解性差,导致其应用受到很大的限制。

将大分子质量的 SPS 降解后,一般能显著提高其活性,如低分子质量的螺旋藻多糖的硫酸酯化物比高分子质量的具有更良好的体外抗肿瘤活性^[2]。又如,普通肝素经化学解聚或酶催化降解后,得到的低分子质量肝素(LMWH)及肝素寡糖,由于其相对分子质量减小至 $(2\sim 8)\times 10^3$,因而表现出较降解前好的生物药效,并且减少了毒作用^[3]。与普通肝素比较,LMWH 作用时间长,生物利用度高,超低分子

质量肝素被认为能够抑制冠状和外周动脉硬化的形成^[4]。因此,制备低分子质量的多糖及其硫酸酯化物,成为新药筛选的一个重要方向。但关于低分子质量海藻异枝麒麟菜 (*Eucheuma striatum* Schmitz) 硫酸多糖 (ESPS) 的研究还未有报道。本研究采用过氧化氢法来降解海藻异枝麒麟菜多糖,并在水溶液中比较了降解前后两种不同分子质量多糖对尿石矿物草酸钙晶体生长的影响,期望为新型防石药物开发提供启示。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

草酸钠、二水氯化钙和氯化钠均为分析纯;实验用水为二次蒸馏水;异枝麒麟菜产于印尼,由暨南大学化学系岑颖洲教授提供,用水提法提取^[5]。

XL-30 型环境扫描电子显微镜 (ESEM) (Philips 公司),测量电压 15 kV;乌式黏度计(毛细管内径为 0.5 mm);恒温水浴锅。

1.2 多糖的降解

准确称取 1.2 g 异枝麒麟菜多糖,溶解于 70

收稿日期:2007-08-28;修回日期:2008-02-29

基金项目:广东省科技攻关项目(2006B36501001);国家自然科学基金项目(30672103,20471024);国家自然科学基金重点项目(20031010)

作者简介:王森(1980-),男,山东潍坊人,硕士研究生,主要从事海藻多糖类研究,电话:020-85221574, E-mail: wangmiaomiao-1997@163.com;欧阳健明,通讯作者,教授,博士生导师,电话:020-85223353, E-mail: toyjm@jnu.edu.cn

的 60 mL 蒸馏水中,待温度升至 90 后,迅速加入 15 mL 30% 的过氧化氢。降解 2 h 后,用 2 mol/L NaOH 溶液调节多糖溶液 pH 至 7.0,在 60 条件下减压浓缩,旋转蒸发至原体积的 1/3 左右,加入 3 倍体积的无水乙醇沉淀多糖,放置过夜后抽滤,真空干燥得到降解多糖 0.40 g 左右,产率 33%。

1.3 多糖平均相对分子质量的测定^[6]

精确配制降解前后两种多糖样品溶液,其质量浓度分别为 0.1 g/L 和 33 g/L,移入 10 mL 原溶液于乌氏黏度计中,用秒表准确测定 30 时不同浓度的多糖溶液流经毛细管的下落时间 t ,纯水的为 t_0 ,重复测定 3 次,取平均值。其中 η_r (相对黏度) = t/t_0 , η_{sp} (增比黏度) = $\eta_r - 1$ 。采用外推法,以 η_{sp}/c 和 $\ln \eta_r/c$ 为纵坐标,多糖浓度 c 为横坐标作图,得两条直线,分别外推到 $c=0$ 处,其截距即为特性黏度。然后按下列方程式求出平均相对分子质量 \overline{M}_r : 特性黏度 = $1.92 \times 10^{-4} \overline{M}_r^{1.23}$ 。

1.4 硫酸基质量分数的测定

采用 BaCl₂-明胶比浊法^[7]测定硫酸基的质量分数。

多糖溶液的处理:分别称取未降解和降解多糖 75.3 mg,置于 50 mL 容量瓶中,加入 1 mol/L HCl 溶液 10 mL 于 100 水浴中,水解 4 h,冷却后,加盐酸溶液补至刻度线,用滤纸过滤,除去少量不溶物质,得质量浓度约 1.51 g/L 的多糖样品溶液。

紫外光谱的测定:取标准品 K₂SO₄ (SO₄²⁻ 质量浓度为 0.60 g/L) 和多糖样品溶液各 0.20 mL,加三氯乙酸 3.8 mL 和氯化钡溶液 1.0 mL,混匀,进行紫外光谱测定,多糖和 K₂SO₄ 均在 360 nm 处显最大吸收峰。

标准曲线制作:准确称取 105 干燥至衡重的 K₂SO₄ 固体 108.75 mg,以 1.0 mol/L 的 HCl 溶解,定容至 100 mL 容量瓶中,摇匀,即得硫酸基标准贮备液 (0.60 mg/mL)。分别准确吸取标准 K₂SO₄ 溶液 0、0.06、0.08、0.1、0.12、0.14、0.16、0.18 mL,各以 HCl 溶液补至 0.20 mL,加入三氯乙酸 3.8 mL 及氯化钡溶液 1.0 mL,摇匀,室温静置 15 min,于 360 nm 测得吸收度 A_1 ,以 1.0 mL 的明胶溶液代替氯化钡溶液依法操作,测得吸收度 A_2 。以硫酸基质量

为横坐标,纵坐标为吸收度 ($A_1 - A_2$) 值,每点做 3 个平行样品,取平均值,作得标准曲线。然后吸取降解前后多糖样品液 0.20 mL,同时测定吸收度 A_1 和 A_2 值,测定 3 次。根据标准曲线计算硫酸基质量分数 (w)。

1.5 草酸钙晶体的生长

草酸钙晶体的生长参照文献 [8,9] 进行。在 50 mL 容量瓶中,加入 1.5 mL 10 mmol/L CaCl₂, 1 mL 0.50 mol/L NaCl,一定量的未降解和降解 ESPS,然后加二次水至 46 mL 左右,加入 1.5 mL 10 mmol/L Na₂Oxa,最后用二次水稀释至刻度,摇匀后用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,得到的溶液中 $c(\text{Ca}^{2+}) = c(\text{Oxa}^{2-}) = 0.30 \text{ mmol/L}$, $c(\text{NaCl}) = 10 \text{ mmol/L}$ 。实验中 ESPS 质量浓度为 0.010 g/L。将上述 CaOxa 亚稳溶液倒入 50 mL 烧杯中进行结晶,预先在烧杯底部放入处理好的基片。为防止由于溶剂水的挥发而造成体系过饱和驱动晶体形成,晶体生长在密闭环境中进行。晶体生长 3 d 后,取出基片,置于干燥器中干燥,然后对基片上 CaOxa 晶体进行 XRD 测试和 SEM 观察。

2 结果与讨论

2.1 降解前后多糖的平均分子质量

采用黏度法测定了降解前后异枝麒麟菜多糖的平均分子质量,利用外推法作图得图 1。从图 1a 外推至 $c=0$ 时得未降解多糖的特性黏度 = 7.050 ± 510 , 带入公式: $7.050 \pm 510 = 1.92 \times 10^{-4} \times \overline{M}_r^{1.23}$, 得未降解多糖的平均相对分子质量 $\overline{M}_r = 141 \text{ 万} \pm 8.3 \text{ 万}$; 从图 1b 外推至 $c=0$ 时得降解多糖的特性黏度 = 6.51 ± 0.73 , 带入公式: $6.51 \pm 0.73 = 1.92 \times 10^{-4} \times \overline{M}_r^{1.23}$, 得降解多糖的平均相对分子质量 $\overline{M}_r = 4819 \pm 440$ 。即采用过氧化氢降解后,异枝麒麟菜多糖平均相对分子质量由降解前的 141 万 ± 8.3 万显著下降到降解后的 4819 ± 440 左右。降解前多糖的相对黏度 (η_r) 为 7.500, 降解后下降至 = 6.6 左右。未降解多糖在 50 条件下形成的溶液在冷却后形成凝胶状,而相同条件下降解后的多糖溶液冷却后仍然成稀溶液。多糖的溶解度亦由降解前的 5 g/L 增加至降解后 300 g/L, 表明降解后多糖的水溶性显著增大。

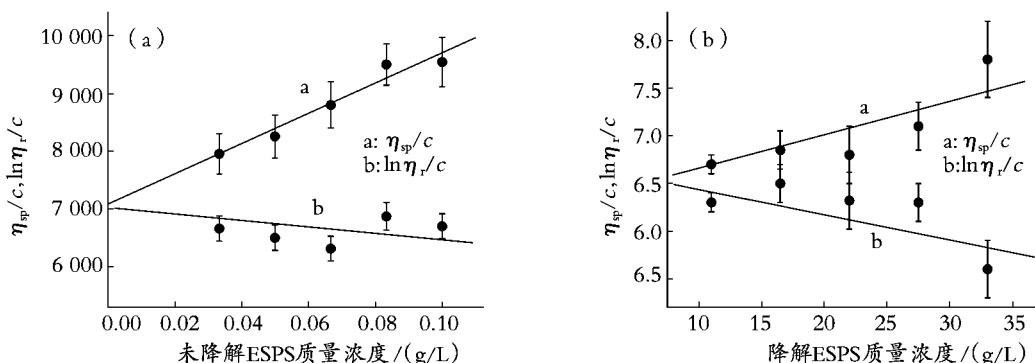


图 1 利用外推法计算未降解多糖(a)和降解多糖(b)的特性黏度

Fig. 1 Intrinsic viscosity of ESPS before (a) and after (b) degradation calculated by an extrapolation method

r 为相对黏度, $r = t/t_0$; η_{sp} 为增比黏度, $\eta_{sp} = r - 1$

r was relative viscosity, $r = t/t_0$; η_{sp} was specific viscosity, $\eta_{sp} = r - 1$

2.2 硫酸基质量分数

采用 BaCl_2 -明胶法测定了降解前后多糖中硫酸基的质量分数 (w), 标准工作曲线如图 2 所示, 其回归方程为: $Y = -0.00314 + 2.79762X$, $n = 7$, $R = 0.99691$ 。

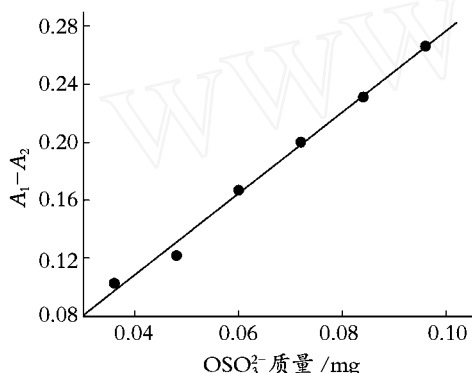


图 2 采用 BaCl_2 -明胶法测定多糖中硫酸基质量分数的标准工作曲线

Fig. 2 The standard curve of mass fraction (w) of sulfate group in ESPS determined by BaCl_2 -gelatin method

根据标准工作曲线, 分别测得降解前后多糖中硫酸基质量分数的 3 次数据如表 1 所示。可见, 降解后多糖中硫酸基质量分数稍有下降, 这是因为在酸性和高温条件下, 会引起多糖脱去部分硫酸基^[10], 由于过氧化氢本身微酸性, 加上本实验降解温度为 90 高温, 因此, 引起了硫酸基质量分数的下降。

表 1 降解前后 ESPS 硫酸基的质量分数 (%)

Tab. 1 The mass fraction (w) of sulfate group of ESPS before and after degradation (%)

组别	降解前	降解后
1	16.24	15.30
2	15.97	14.92
3	15.88	15.37
平均值	16.03	15.20

2.3 降解前后硫酸多糖对草酸钙晶体生长的抑制作用

图 3 为添加质量浓度为 0.010 g/L 的降解前后 ESPS 及空白实验中形成的 CaOxa 晶体的 SEM 形貌图。在没有添加 ESPS 的空白实验中 (图 3a), 形成的 CaOxa 为棱角尖锐的三维的拉长六边形、叉生型和聚集体晶体, XRD 表明这些晶体均为一水草酸钙 (COM) 晶体, 其主衍射峰晶面间距 d 值为 0.593, 0.365 和 0.298 nm, 分别归属于 COM 晶体的 (101) , (020) 和 (202) 晶面。加入质量浓度为 0.010 g/L 的未降解多糖后 (图 3b), 生成的 COM 晶体逐渐拉长并且变薄。而添加 0.010 g/L 的降解多糖后 (图 3c), COM 晶体数量显著减少, 尺寸亦变小, 且棱角更为圆钝。这可能是由于: (1) ESPS 是聚阴离子^[8,11], 其硫酸基质量分数高达 15.2% ~ 16%, ESPS 可结合到 CaOxa 晶体的含钙位点, 特别是富 Ca^{2+} 离子的 COM 的 (101) 晶面^[12,13]; ESPS 粘附在晶体表面后, 阻止游离晶粒的渗入, 从而抑制晶体的生长。(2) 降解后的 ESPS 由于分子链大大缩短, 更易与 Ca^{2+} 发生络合, 这致使溶液中可溶性 Ca^{2+} 离子浓度显著增加。如用原子吸收光谱法测量加入 0.010 g/L 的 ESPS 和 0.010 g/L 的降解 ESPS 后, 上层清液中可溶性 Ca^{2+} 离子的浓度分别为 51.1 $\mu\text{mol/L}$ 和 87.6 $\mu\text{mol/L}$, 草酸钙的相对过饱和度分别为 1.29 和 3.79, 而空白对照实验中上层清液中的钙离子浓度为 45.0 $\mu\text{mol/L}$, CaOxa 的相对过饱和度为 1.02。这说明, 随着 ESPS 浓度增加, 体系中的草酸钙的相对过饱和度增加, 可溶性 Ca^{2+} 离子的

浓度增大。可溶性 Ca^{2+} 离子浓度增加后,可抑制草酸钙晶体的成核和生长,从而可阻止草酸钙结石的

形成。(3) 降解多糖与 Ca^{2+} 之间存在更强的溶解-络合平衡,使得 COM 晶体棱角变得圆钝。

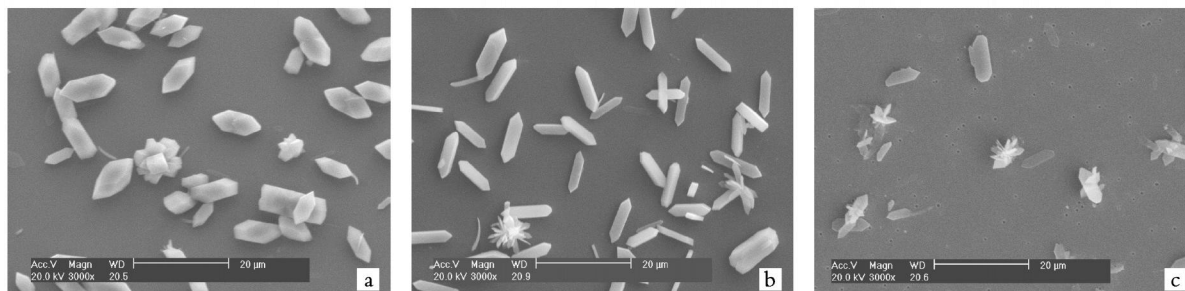


图3 降解前后海藻异枝麒麟菜多糖 ESPS 对 CaOx 晶体生长影响的 SEM

Fig. 3 SEM images of CaOx crystals grown in the presence of algal *Eucheuma striatum* polysaccharide before and after degradation

- a. 空白; b. 降解前质量浓度 0.010 g/L; c. 降解后质量浓度 0.010 g/L
a. blank; b. 0.010 g/L before degradation; c. 0.010 g/L after degradation

3 结论

利用过氧化氢降解了异枝麒麟菜多糖 (ESPS), 降解前多糖相对分子质量为 141 万 \pm 8.3 万, 而降解后显著下降到 4 819 \pm 440; 多糖中硫酸基质量分数亦由 16.03 % 稍微下降到 15.20 %。采用过氧化氢法降解海藻多糖, 硫酸基质量分数损失小, 成本适中, 且由于较少引入杂质离子, 产物的后处理简单。降解后 ESPS 对尿石矿物草酸钙晶体生长的抑制效果显著增强, 其诱导生成的晶体尺寸更小, 数量更少。因此在保持活性基团(如硫酸基)质量分数基本不变的情况下, 分子质量大小在草酸钙晶体生长过程中发挥了更大的作用。采用低分子质量海藻多糖抑制草酸钙结石的研究仍在进行中。

参考文献:

- [1] Lu R, Yoshida T. Structure and molecular weight of Asian lacquer polysaccharides [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2003, 54: 419-424.
- [2] 乐晓桐, 尹鸿萍, 徐士君. 低分子螺旋藻多糖的制备及其硫酸酯化物体外抗肿瘤活性的初步研究 [J]. *药物生物技术*, 2006, 13(2): 119-122.
- [3] Holmer E, Kurachi K, Sodertrom G. The molecular weight dependence of the rate-enhancing effect of heparin on the inhibition of thrombin by antithrombin [J]. *Biochem*, 2002, 193: 395-400.
- [4] 杨素仙, 董学畅. 低分子肝素的制备和应用 [J]. *云南民族学院学报*. 2000, 9(3): 173-175.
- [5] 马夏军, 岑颖洲, 邱玉明, 等. 超声波辅助过氧化氢氧化降解制备相对低分子质量异枝麒麟菜硫酸多糖 [J]. *中国海洋药物杂志*, 2005, 24(4): 10-13.
- [6] 赵立明, 全哲山, 金海善, 等. 壳聚糖粘均分子质量的测定 [J]. *延边大学医学学报*, 2005, 28(1): 36-37.
- [7] 丛建波, 王长振, 李妍, 等. 褐藻硫酸多糖硫酸基含量测定——硫酸钡比浊法研究 [J]. *解放军药学报*, 2003, 19(3): 181-183.
- [8] Ouyang J M, Wu X M. Morphological and phase changes in calcium oxalate crystals induced by sulfated polysaccharide extracted from algae *Eucheuma striatum* [J]. *Chem Lett*, 2005, 34(9): 1 296-1 297.
- [9] 邓穗平, 欧阳健明, 吴秀梅, 等. 海藻硫酸多糖抑制草酸钙结石形成的化学模拟 [J]. *化学学报*, 2006, 64(7): 589-592.
- [10] 王长云, 顾谦群, 周鹏, 等. 红藻多糖卡拉胶分子修饰研究. 酸降解 [J]. *中国海洋药物*, 2003, (2): 24-27.
- [11] 郭凌, 包惠燕, 叶绍明, 等. 琼枝麒麟菜和异枝麒麟菜硫酸多糖及其水解产物的抑菌作用 [J]. *暨南大学学报*, 2002, 23(3): 79-83.
- [12] Ouyang J M, Deng S P, Zhong J P, et al. Crystallization of calcium oxalate monohydrate at dipalmitoylphosphatidylcholine monolayers in the presence of chondroitin sulfate A [J]. *J Cryst Growth*, 2004, 270: 646-654.
- [13] Deng S P, Ouyang J M. Effects of dipalmitoylphosphatidylcholine monolayers to the crystallization of calcium oxalate monohydrate from the solution containing chondroitin sulfate C [J]. *Coll Surf A*, 2005, 257-258: 47-50.

(下转第 43 页)

Degradation of sulfated polysaccharide from *Eucheuma striatum* and its inhibition on urinary mineral calcium oxalate

WANG Miao , YU Hai-yan , OUYANG Jian-ming

(Institute of Biomineralization and Lithiasis Research , Jinan University , Guangzhou 510632 , China)

Received :Feb. ,29 ,2008

Key words :*Eucheuma striatum* polysaccharide ; degradation ; calcium oxalate ; urinary stones

Abstract :Algal *Eucheuma striatum* sulfated polysaccharide was degraded by hydrogen peroxide (H_2O_2) from average molecular weight of $1\ 410\ 000 \pm 83\ 000$ to $4\ 819 \pm 440$ or so. The mass fraction (w) of sulfate group (OSO_3^-) decreased from 16.03 % to 15.20 %. The effects of ESPS before and after degradation on crystal growth of calcium oxalate (CaOxa) were investigated in vitro. The size and number of CaOxa crystals induced by degraded ESPS were much smaller than those of the undegraded polysaccharide , and the edges and angles of the former were much rounder and blunter. That is , the ESPS with a low molecular weight could more inhibit the nucleation and growth of CaOxa crystals.

(本文编辑 :康亦兼)