

菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*) 蛋白聚糖的分离提取及其抗肿瘤活性的初步研究*

张 莉 刘万顺^① 韩宝芹 刘 文 刘 冰

(中国海洋大学生命科学与技术学部 青岛 266003)

提要 采用凝胶过滤层析、SDS-PAGE 电泳、Bradford 法和苯酚-硫酸法等生物化学方法对菲律宾蛤仔中的蛋白聚糖 (PG1 和 PG2) 进行分离纯化, 研究其理化性质。采用 MTT 方法研究蛋白聚糖对人肝癌细胞 SMMC-7721 和人正常肝细胞 HL-7702 生长的影响。通过小鼠体内实验研究蛋白聚糖的抗肿瘤活性和对荷瘤小鼠免疫功能的影响。结果表明, PG1 分子量大约为 20kDa, 多糖含量为 70.09%, 蛋白质含量为 15.4%。PG2 的多糖含量为 82.53%, 蛋白质含量为 7.26%。PG1 在 200 μ g/ml 浓度时对 SMMC-7721 的生长抑制率为 73.30%, 随浓度的升高, 抑制率并未发生明显改变。PG2 对 SMMC-7721 的生长抑制作用呈剂量依赖性, 在 500 μ g/ml 的浓度下, 其抑制效果与 PG1 的抑制效果相当。在同样浓度下, PG1 对人正常肝细胞的生长和功能没有明显影响。PG1 呈剂量-效应关系明显增加荷瘤小鼠脾指数, 促进荷瘤小鼠脾淋巴细胞转化, 且没有降低体重及其他毒副作用。PG1 对小鼠 S180 肉瘤的抑制作用可能是通过直接杀伤肿瘤细胞的细胞毒作用和提高小鼠细胞免疫水平来实现。

关键词 蛋白聚糖, 菲律宾蛤仔, SMMC-7721, HL-7702, S180

中图分类号 Q556.3

海洋作为一个巨大的资源宝库, 吸引着人们越来越多的注意力。自 20 世纪 50 年代初, Bergman 和 Feeney 的工作开启了海洋天然产物的研究 (Bergman *et al.*, 1951)。最近几十年, 人们已经从海洋生物中分离出数万种新型化合物, 包括肽类、蛋白质类、多糖类、生物碱类、萜类、大环聚酯类等 (丁燊等, 2006; Bergman *et al.*, 1951; Bhakuni, 1994; Faulkner, 2000)。

由于海洋动物的生态环境比陆生动物的复杂得多, 已经从中发现了许多结构独特、具有重要生物学功能的物质。美国国家癌症研究所的研究表明, 海洋无脊椎动物含有的细胞毒类化合物比其他任何动物种类都要多。海绵、苔藓虫和被囊动物是其中最具有前途的作为抗肿瘤药物合成依据的几类生物 (Kisugi *et al.*, 1989)。Pettit 等 (1997a, b) 已经从海兔 (*Dolabella auricu-*

laria) 中分离得到 18 种抗肿瘤多肽 Dolastatin 1-18, 这些多肽通过引起微管解聚导致肿瘤细胞凋亡。Yamazaki 等 (1997) 从黑斑海兔 (*Aplysia kurodai*) 分离得到的一种糖蛋白 Aphysianins P, 在 3—25g/L 浓度下可以裂解所有的肿瘤细胞, 但并不破坏红细胞和白细胞, 并且能够延长 MM46 腹水瘤小鼠的生存时间。来自于栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 的一种糖蛋白不仅能抑制小鼠 S180 肉瘤的生长, 还能诱导荷瘤小鼠的 NK 细胞活性 (顾谦群等, 2001)。另外, 胡水根等 (1997) 已证明从圆背角无齿蚌 (*Anodonta woodiana* Lea)、虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*) 和长砗磲蛤 (*Tridacna maxima*) 分离得到的糖蛋白也具有抗肿瘤活性。

在本研究中, 首次从一种主要分布在中国北部沿海的软体动物菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*), 分离得到两种蛋白聚糖组分 PG1 和

* 国家“十五”科技攻关项目资助, 2001BA708B04-07 号。张 莉, 博士, E-mail: qdzhangli@ouc.edu.cn

① 通讯作者: 刘万顺, 教授, 博导, E-mail: WanshunLiu@hotmail.com

收稿日期: 2005-06-22, 收修改稿日期: 2006-04-13

PG2。通过体外实验研究了其对肝癌细胞 SMMC-7721 和人正常肝细胞 HL-7702 生长的影响,并通过小鼠体内实验进一步探讨了对 S180 荷瘤小鼠的免疫激活和抗肿瘤作用。

1 材料与方 法

1.1 化学试剂

MTT 购自 Sigma 化学公司, RPMI-1640 培养基购自 GIBCO 公司,小牛血清为杭州四季青生物工程材料有限公司产品,胰蛋白酶购自上海华美生物工程有限公司。其他所有化学试剂均为国产商品试剂,分析纯。体外实验时,PG1 和 PG2 分别溶解在含有 15% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基中,终浓度为 2mg/ml,然后稀释成 40—2000 μ g/ml 的所需浓度。体内实验时用生理盐水配制所需浓度。

1.2 细胞及动物

人肝癌细胞 SMMC-7721 和人正常肝细胞 HL-7702,购自中国科学院上海细胞研究所;S180 小鼠肉瘤瘤株由山东省医科院药物研究所提供;昆明种小鼠,清洁级,18—22g,雄性,购自青岛市实验动物和动物实验中心,合格证号为 20030010。

1.3 蛋白聚糖的提取分离

菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*) 于 2004 年 7 月采自青岛麦岛养殖场。-20 $^{\circ}$ C 冰冻,去壳,可食用部分加入冰蒸馏水匀浆,所得组织匀浆于 70 $^{\circ}$ C 水浴加热,使大分子蛋白质变性,离心。取上清液,继续 70 $^{\circ}$ C 下缓慢搅拌 20min,离心,上清液冰冻干燥得到粗提物。

粗提物(2.0g)溶于蒸馏水,经 Sephadex G25 层析柱(60cm \times 2.6cm)洗脱分离,全自动部分收集器收集洗脱峰。洗脱剂为蒸馏水,洗脱液流速为 30ml/h,每管收集 6ml。每隔一管用双缩脲反应检测蛋白质含量(Morozova *et al*,1991)。

1.4 蛋白聚糖的性质分析

采用 Bradford 法测定总蛋白含量,小牛血清白蛋白制作标准曲线(Bradford,1976)。苯酚-硫酸法测定总糖含量(Dubois *et al*,1956)。SDS-PAGE 电泳参照 Laemmli 的方法进行,分离胶浓度为 12%(Laemmli,1970)。凝胶用考马斯亮蓝 R-250 染色。电泳条件为 90V 恒定电压,2—3h。

1.5 蛋白聚糖对肝癌细胞 SMMC-7721 和肝细胞 HL-7702 生长影响的实验

取对数生长期的细胞,0.25% 胰酶消化,计

数。每孔 100 μ l 接种到 96 孔细胞培养板,接种密度为 5×10^5 — 7×10^5 个细胞/ml。分别加入 100 μ l 含有 PG1 和 PG2 的 15% 小牛血清 RPMI-1640 培养液,使每种蛋白聚糖终浓度分别为 20、50、100、200、500 和 1000 μ g/ml。每个浓度设置 3 个平行孔。对照组加入 100 μ l 15% 小牛血清 RPMI-1640 培养液。37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 恒温培养箱培养 96h 或 120h。取出培养板,每孔加入 20 μ l MTT,继续培养 4h。小心吸出培养上清液,每孔加入 140 μ l DMSO 液,震荡混匀后,测定 490nm 处的光吸收值(OD 值),重复三次(Mosmann,1983)。抑制率(%)=(1-实验组 OD 值/对照组 OD 值) \times 100%。

1.6 蛋白聚糖对肝细胞 HL-7702 特定功能影响的实验

离心并收集不同浓度的 PG1 作用 96h 的肝细胞培养上清。Dimension AR 型全自动生化分析仪分析培养上清中总蛋白、白蛋白、胆汁酸和谷氨酰胺转氨酶含量。

1.7 蛋白聚糖对小鼠 S180 肉瘤的抑制作用实验

无菌传代后 7 天的 S180 肉瘤细胞悬液,生理盐水稀释调整浓度为 2×10^7 — 6×10^7 个细胞/ml,接种于昆明种小鼠右前腋窝皮下,0.2ml/只。次日随机分为 5 组,每组 8 只,分别为正常对照组、肿瘤对照组、PG1 低剂量组(125mg/kg)、PG1 中剂量组(250mg/kg)和 PG1 高剂量组(500mg/kg)。接种后 24h 灌胃给药,正常对照组和肿瘤对照组灌胃生理盐水,0.1ml/10g,每日 1 次,连续 10 天。末次给药后 24h,小鼠称重,处死小鼠剥取瘤块,分离、摘取脾脏和胸腺,精密称重,计算抑瘤率、脾指数和胸腺指数。抑瘤率=(1-实验组平均瘤重/对照组平均瘤重) \times 100%,脾指数=脾脏重量(mg)/g 体重,胸腺指数=胸腺重量(mg)/g 体重。

1.8 蛋白聚糖促进荷瘤小鼠脾淋巴细胞转化实验

昆明种小鼠按以上方法接种 S180 瘤细胞并分组给药 10 天。无菌取脾,常规制备脾细胞悬液,经 200 目筛网过滤,以含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基调整细胞浓度为 8×10^6 个细胞/ml。将配制好的脾脏细胞悬液加到 96 孔细胞培养板上,100 μ l/孔,加入 ConA 液(终浓度为 7.0 μ g/ml),用 10% 小牛血清 RPMI-1640 培养

基补足至 200 μ l/孔,每组设 3 个复孔。37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 恒温培养箱培养 48h,每孔加入 25 μ l MTT,继续培养 4h,轻轻吸去上清液 100 μ l,然后加入 DMSO,100 μ l/孔,静置 15min,轻轻混匀后,测定 490nm 下的 OD 值。用加 ConA 孔的 OD 值减去不加 ConA 孔的 OD 值表示淋巴细胞的转化率。

1.9 数据统计

采用 SPSS10.0 统计软件 One-Way ANOVA 方差分析和 Duncan 多重比较。

2 结果

2.1 蛋白聚糖的分离纯化

菲律宾蛤仔粗提物经 Sephadex G25 柱分离,可分离出 4 个组分,结果见图 1。收集峰 1 和峰 2 对应的洗脱液,冰冻干燥得 PG1 和 PG2。

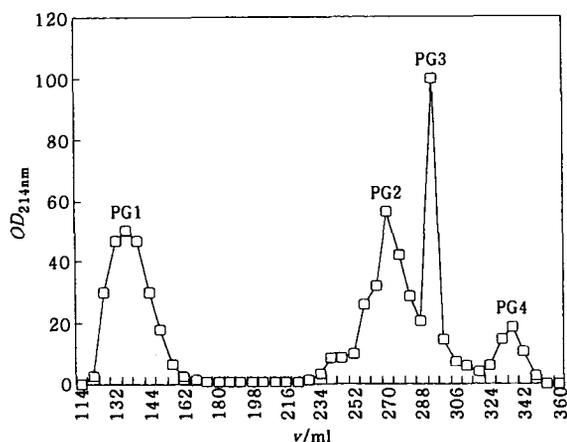


图 1 菲律宾蛤仔粗提物经 Sephadex G25 柱分离图谱
Fig.1 The Sephadex G25 elution profile of crude extract from *R. philippinarum*

2.2 蛋白聚糖的性质分析

根据双缩脲反应,PG1 和 PG2 在 540nm 处的光吸收值分别为 0.131 和 0.035,表明 PG1 的蛋白含量比 PG2 高。冰冻干燥后,PG2 极易吸潮,说明 PG2 的糖含量比 PG1 高。PG1 的多糖含量为 70.09%,蛋白质含量为 15.4%,PG2 的多糖含量为 82.53%,蛋白质含量为 7.26%。SDS-PAGE 电泳结果见图 2。B 带为粗提物电泳图谱,C 带为 PG1 电泳图谱。在 18.4kDa 和 25.0kDa 之间有一条泳动位置一致的单一一条带,以标准蛋白质分子量之对数对电泳迁移率作图,求得 PG1 的分子量约为 20kDa。粗提物的电泳图谱中(图 2B),

除了含有相当于 PG1 的条带,还含有一些分子量小于 18.4kDa 的条带。

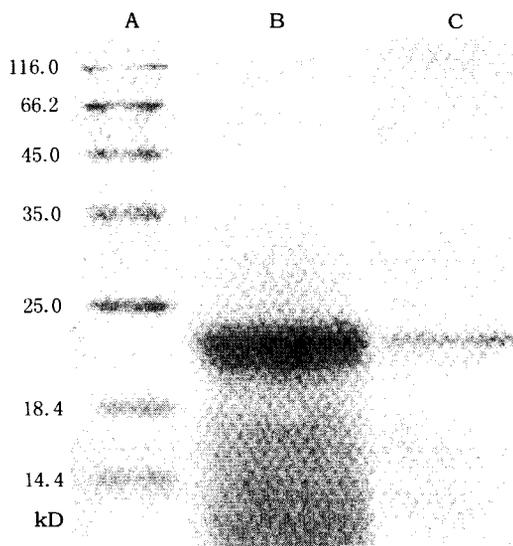


图 2 菲律宾蛤仔粗提物和 PG1 组分的 SDS-PAGE 电泳
Fig.2 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of crude extract and PG1 from *R. philippinarum*
考马斯亮兰 R-250 染色。A:Marker; B:粗提物; C:PG1

2.3 PG1 和 PG2 对人肝癌细胞 SMMC-7721 生长的抑制作用

PG1 和 PG2 在 20—1000 μ g/ml 浓度范围下作用 SMMC-7721 细胞 120h,结果见图 3。PG2 对 SMMC-7721 细胞生长的抑制作用呈剂量依赖性,

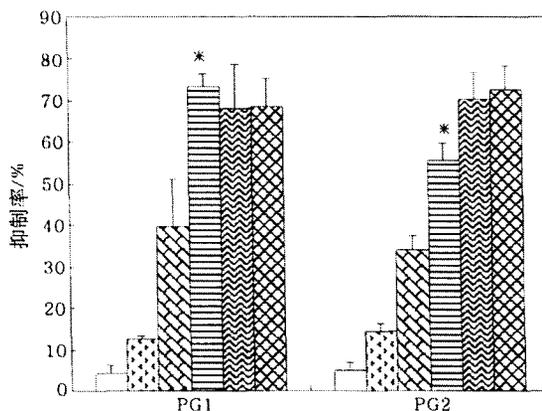


图 3 不同浓度的 PG1 和 PG2 作用 SMMC-7721 细胞 120h 对其生长的抑制作用
Fig.3 Inhibition of proliferation of SMMC-7721 cells by various concentrations of PG1 and PG2 for 120h
* $P < 0.05$, 图中柱状自左至右分别为 20,50,100,200,500,1000 μ g/ml

200、500 和 1000 $\mu\text{g/ml}$ 的抑制率分别为 55.61%、70.31% 和 72.73%。PG1 在上述浓度下的抑制率分别为 73.30%、67.94% 和 68.45%，可见随着浓度增加，抑制率并未产生量效关系。PG1 和 PG2 在 200 $\mu\text{g/ml}$ 时的抑制率有明显差别 ($P < 0.05$)。

如图 4 所示，SMMC-7721 对照组细胞 (图 4a) 呈六角型，细胞质清楚透亮，细胞生长良好，汇集成片，无接触抑制。PG1 和 PG2 分别在 200 $\mu\text{g/ml}$ 和 500 $\mu\text{g/ml}$ 下，引起细胞形态发生改变，细胞成纤维状，细胞质中出现许多小颗粒，细胞边界模糊，细胞核出现凝聚固缩 (图 4c, 4e)。然而，PG1 和 PG2 分别在 100 $\mu\text{g/ml}$ 和 200 $\mu\text{g/ml}$ 浓度下，未对细胞生长产生明显的抑制作用 (图 4b、图 4d)。

2.4 PG1 对人正常肝细胞 HL-7702 生长及肝细胞功能的影响

不同浓度的 PG1 作用 HL-7702 细胞 96h，对细胞活力的影响见表 1。结果表明，除最高浓度组外，每一组的细胞活力均比对照组高 ($P < 0.05$)。细胞形态和对照组也没有明显差别，细胞呈立方体形，聚集成片，可以清楚地观察到有丝分裂相 (Arterburn *et al.*, 1995) (图 5a—5c)。实验组的肝细胞培养上清液中的总蛋白、白蛋白、 γ -谷氨酰胺转氨酶和总胆汁酸的含量与对照组无明显差别 ($P > 0.05$)。

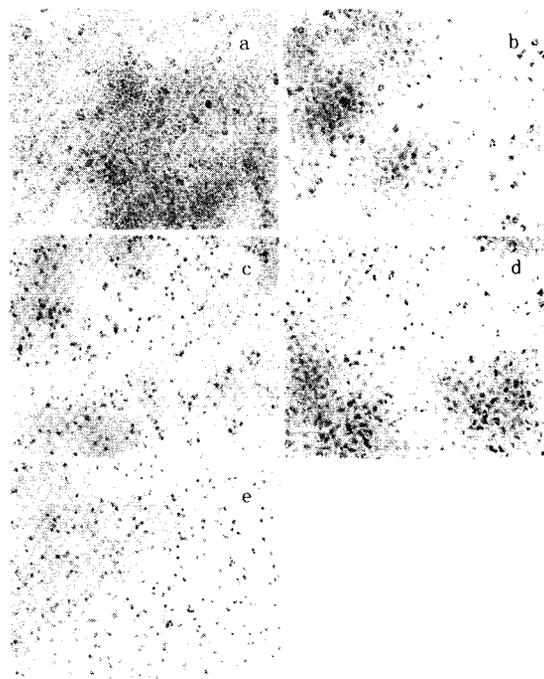


图 4 经 PG1 和 PG2 作用 120h 的 SMMC-7721 细胞和对照组的细胞照片 (10 × 10)

Fig. 4 The pictures (10 × 10) of SMMC-7721 cells treated or untreated with PG1 and PG2 for 120h

a: 对照组, b: 100 $\mu\text{g/ml}$ PG1 组, c: 200 $\mu\text{g/ml}$ PG1 组, d: 200 $\mu\text{g/ml}$ PG2 组, e: 500 $\mu\text{g/ml}$ PG2 组

表 1 人正常肝细胞 HL-7702 经不同浓度的 PG1 作用 96h 后的细胞活力比较 ($OD_{490\text{nm}}$)

Tab. 1 Assessment of relative viability in human hepatocyte HL-7702 cells treated with various concentrations of PG1 for 96h ($OD_{490\text{nm}}$)

对 照	PG1 浓度 ($\mu\text{g/ml}$)				
	20	50	100	200	500
0.51 ± 0.07	0.64 ± 0.05	0.58 ± 0.03	0.60 ± 0.02	0.66 ± 0.06	0.69 ± 0.05

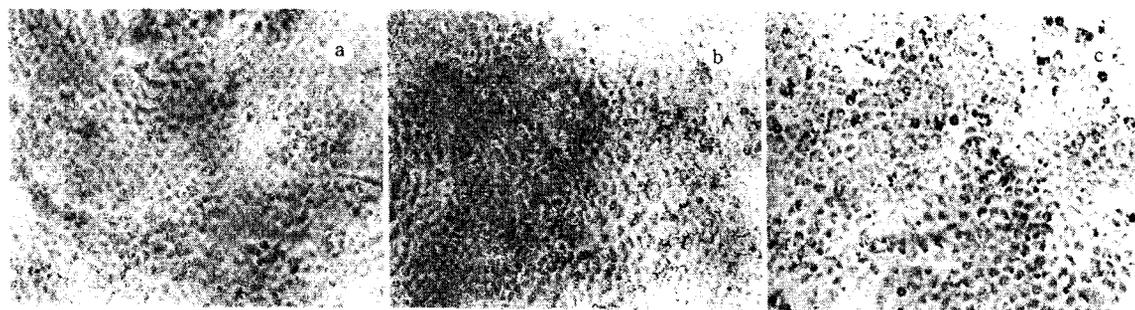


图 5 经 PG1 作用 96h 的 HL-7702 细胞和对照组的细胞照片 (10 × 10)

Fig. 5 The pictures (10 × 10) of HL-7702 cells treated or untreated with PG1 for 96h

a: 对照组, b: 200 $\mu\text{g/ml}$ PG1 组, c: 500 $\mu\text{g/ml}$ PG1 组

表 2 PG1 对肝细胞功能的影响

Tab. 2 Effect of PG1 on hepatocyte-specific functions

浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	总蛋白 (g/L)	白蛋白 (g/L)	γ -谷氨酰胺转氨酶 (U/L)	总胆汁酸 ($\mu\text{mol}/\text{L}$)
20	6.4 ± 0.06	2.4 ± 0.08	1 ± 0.02	1.2 ± 0.03
50	6.1 ± 0.09	2.3 ± 0.06	1 ± 0.03	1.2 ± 0.03
100	6.3 ± 0.08	2.3 ± 0.08	2 ± 0.02	1.1 ± 0.04
200	6.3 ± 0.06	2.3 ± 0.09	1 ± 0.04	1.2 ± 0.02
500	6.1 ± 0.07	2.3 ± 0.07	1 ± 0.03	1.1 ± 0.04
对照	6.5 ± 0.05	2.4 ± 0.06	2 ± 0.04	1.1 ± 0.03

2.5 PG1 对小鼠 S180 肉瘤的抑制作用

PG1 在 125—500mg/kg 的剂量范围内对小鼠 S180 肉瘤,均有一定的抑制作用,平均抑瘤率在 24.74%—42.27% 之间,其中高剂量的抑制作用较强。PG1 对荷瘤小鼠具有明显增加脾指数

的作用,同时促进荷瘤小鼠脾淋巴细胞转化,呈剂量-效应关系,没有降低体重或其他毒副作用,而肿瘤对照组的小鼠出现毛发竖立、消瘦等症状,结果见表 3。

表 3 PG1 对 S180 肉瘤小鼠的抗肿瘤活性

Tab. 3 Antitumor activities of PG1 against Sarcoma 180 solid tumor grown in KM mice

组别	剂量 ($\text{mg}/\text{kg} \times \text{days}$)	瘤重 (g)	抑瘤率 (%)	胸腺指数 (mg/g)	脾指数 (mg/g)	淋巴细胞转化率 (OD)
对照组	—	0.97 ± 0.41	—	2.87 ± 0.39	9.51 ± 2.13	0.13 ± 0.04
PG1	125 \times 10	$0.73 \pm 0.20^*$	24.74	2.95 ± 0.39	9.65 ± 1.71	0.14 ± 0.03
	250 \times 10	$0.68 \pm 0.33^*$	29.90	2.93 ± 0.49	$9.84 \pm 1.63^*$	$0.19 \pm 0.02^*$
	500 \times 10	$0.56 \pm 0.45^*$	42.27	2.90 ± 0.54	$10.10 \pm 4.40^*$	$0.25 \pm 0.04^*$

* $P < 0.05$, 与对照组比较

3 讨论

蛋白聚糖是胞外基质和细胞表面的基本成分,由 1 个核心蛋白与 1 条或多条带负电荷的糖胺聚糖共价连接组成。由于蛋白聚糖极大的结构多样性,在细胞黏附和信号传导中起重要作用。Kim 等(2003a, b)报道从桑黄 (*Phellinus linteus*) 分离出的蛋白聚糖能够在体外经由受体途径诱导骨髓来源的 DC 细胞的表型和功能的成熟。该蛋白聚糖可以促进脾淋巴细胞的增殖,还可以通过酪氨酸激酶和蛋白激酶 C 途径促进 B 淋巴细胞的增殖。此外,已经证明蛋白聚糖在体内和体外均可以显著促进细胞免疫和体液免疫 (Kim *et al.*, 1996)。Kim 等(2004)报道蛋白聚糖可以明显抑制 MCA-102 肿瘤的生长和转移。然而,蛋白聚糖的抗肿瘤机制仍然没有研究清楚。

Yamazaki 等(1989)认为糖组分的识别是 aplysianin P 引起的细胞溶解的关键一步,而 aply-

sianin P 是一种来自于黑斑海兔 (*Aplysia kurodai*) 的糖蛋白。由于细胞溶解会被单糖抑制,推测靶细胞可能含有 aplysianin P 的受体。PG1 可能是通过引起细胞周期阻滞或细胞凋亡来发挥其生物学活性的,因为 PG1 处理后的细胞会出现核固缩及核碎片。为何 PG1 会选择性地抑制肿瘤细胞生长而不影响正常细胞生长,其中可能包括复杂的分子识别机制 (Scott, 2000)。此外,PG1 对荷瘤小鼠具有明显增加脾指数的作用,同时促进荷瘤小鼠脾淋巴细胞转化,没有降低体重或其他毒副作用。而 T 淋巴细胞是机体细胞免疫系统的重要组成部分,可见 PG1 可能是通过直接杀伤肿瘤细胞和提高荷瘤小鼠的免疫功能来抑制肿瘤生长的。

一些天然产物的大分子可以通过改善宿主免疫功能而发挥抗肿瘤作用。菲律宾蛤仔蛋白聚糖的结构组成和免疫调节的生物活性,值得进

一步深入研究。

参 考 文 献

- 丁 楠, 缪锦来, 王全富等, 2006. 温度对南极衣藻 ICE-L (*Chlamydomonas* sp. ICE-L) 谷胱甘肽含量及其相关酶活性的影响. 海洋与湖沼, 37(2): 154—161
- 胡水根, 朱国平, 吴萍萍等, 1997. 圆背角无齿蚌抗肿瘤有效成分的研究 I. HB-II 糖蛋白的分析鉴定. 中国海洋药物, 16(1): 23—25
- 顾谦群, 方玉春, 辛现良等, 2001. 栉孔扇贝糖蛋白的肿瘤抑制活性和对免疫功能的影响. 营养学报, 23(3): 200—202
- Arterburn L M, Zurlo J, Yager J D *et al*, 1995. A morphological study of differentiated hepatocytes *in vitro*. *Hepatology*, 22(1): 175—187
- Bergman W, Freeney R J, 1951. Nucleosides of sponges. *J Org Chem*, 16: 981—987
- Bhakuni D S, 1994. Bioactive marine alkaloids. *J Indian Chem Soc*, 71: 329—340
- Bradford M M, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248—254
- Dubois M, Gilles K, Hamilton J *et al*, 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3): 350—356
- Faulkner D J, 2000. Marine natural products. *Nat Prod Rep*, 17: 7—55
- Kim G Y, Oh W K, Shin B C *et al*, 2004. Progeoglycan isolated from *Phellinus linteus* inhibits tumor growth through mechanisms leading to an activation of CD11c + CD8 + DC and type I helper T cell-dominant immune state. *FEBS Letters*, 576: 391—400
- Kim G Y, Park H S, Nam B H *et al*, 2003a. Purification and characterization of acidic proteo-heteroglycan from the fruiting body of *Phellinus linteus* (Berk. & M. A. Curtis) Teng. *Bioresour Technol*, 89: 81—87
- Kim G Y, Park S K, Lee M K *et al*, 2003b. Proteoglycan isolated from *Phellinus linteus* activates murine B lymphocytes via protein kinase C and protein tyrosine kinase. *Int Immunopharmacol*, 3(9): 1281—1292
- Kim H M, Han S B, Oh G T *et al*, 1996. Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. *Int J Immunopharmacol*, 18(5): 295—303
- Kisugi J, Ohye H, Kamiya H *et al*, 1989. Biopolymers from marine invertebrates, X. Mode of action of an antibacterial glycoprotein, Aplysianin E, from eggs of a sea hare, *Aplysia kurodai*. *Chem Pharm Bull*, 37(11): 3050—3053
- Laemml U K, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680—685
- Morozova N A, Baryshnikova T A, 1991. Determination of protein in urine using biuret method. *Clin Chem*, 37(1): 23—25
- Mosmann T, 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; application to proliferation and cytotoxicity assays. *Immunol Methods*, 65: 55—56
- Pettit G R, Xu J P, Hogan F *et al*, 1997a. Isolation and structure of the human cancer cell growth inhibitory cyclodepsipeptide dolastatin 16. *J Nat Prod*, 60(8): 752—754
- Pettit G R, Xu J P, Williams M D *et al*, 1997b. Isolation and structure of dolastatin 18. *Bioorg Med Chem Lett*, 7(7): 827—832
- Scott B, 2000. Selleck Proteoglycans and pattern formation. *TIG* May, 16(5): 206—212
- Yamazaki M, Kimura K, Kisugi J *et al*, 1989. Isolation and characterization of a novel cytolytic factor in purple fluid of the sea hare, *Aplysia kurodai*. *Cancer Research*, 49: 3834—3838
- Yamazaki M, Kisugi J, Iijima R, 1997. Antineoplastic glycoproteins in marine invertebrates. *Jpn J Cancer Chem*, 24(11): 1477—1485

PRELIMINARY STUDY ON THE ANTITUMOR ACTIVITIES OF PROTEOGLYCAN FROM *RUDITAPES PHILIPPINARUM*

ZHANG Li, LIU Wan-Shun, HAN Bao-Qin, LIU Wen, LIU Bing

(College of Marine Life Sciences and Technology, Ocean University of China, Qingdao, 266003)

Abstract Marine animals provide us a wide variety of structurally unique, biologically significant substances for human being's benefits. Sponges, bryozoans, and ascidians are among the most promising groups. The compounds with antimicrobial and antitumor activity have been frequently found in marine mollusks. *Ruditapes philippinarum*, belonging to Ruditapes, Veneridae, Bivalvia, is frequently taken as tasty seafood and also a traditional medicine in the Far East for its nutrients and bioactivities for treating internal fever, infections and tumescence.

So far no report is available on the antitumor effect of proteoglycan extract from *R. philippinarum* both *in vitro* and *in vivo*. In this study, we studied the antitumor activities of purified extract from *R. philippinarum* flesh using tumor-bearing mice and cell lines.

Two proteoglycans (PG1, PG2) were purified from hot water extract of *R. philippinarum*. PG1 was a single Mw 20000 proteoglycan, containing 70.09% of polysaccharide and 15.4% of protein. PG2 contained 82.53% of polysaccharide and 7.26% of protein. The inhibition ratio for SMMC-7721 cells of PG1 at concentration of 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ was 73.30%, and increasing concentration did not enhance the inhibitory effect obviously. PG2 inhibited SMMC-7721 cells proliferation in a dose-dependent manner, and it achieved the same inhibitory effect at concentration of over 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ as PG1 achieved at 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. PG1 did not inhibit the growth of human hepatocyte cell HL-7702 when tested in the same concentrations shown to be cytotoxic towards tumor cells. PG1 exhibited antitumor activity against Sarcoma 180 in KM mice at the dosage of 125—500 mg/kg with an inhibition ratio of 24.74%—42.27%, and could enhance the immune function of tumor-bearing mice. The authors believed that the antitumor effect of PG1 is probably host-mediated and cytocidal.

Key words Proteoglycan, *Ruditapes philippinarum*, SMMC-7721, HL-7702, S180