

降解的角叉菜多糖的抗肿瘤活性*

师然新 徐祖洪 李智恩

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 1997 年 9 月自青岛太平角潮间带采集角叉菜, 采用不同的提取和降解方法, 得到不同分子量的角叉菜多糖, 利用其进行对小鼠肝癌 H- 22 的抗肿瘤实验。结果表明, 用蒸馏水直接提取并用 H_2O_2 降解角叉菜多糖, 所得样品的特性粘度与所加 H_2O_2 的量呈近似指数关系; 分子量是影响角叉菜多糖抗肿瘤作用的重要因素。对于肝癌 H- 22 而言, 角叉菜多糖分子量适当减小可使抑瘤率升高, 但分子量太小又会使抑瘤率迅速降低, 具有适中分子量的角叉菜多糖能保持高的抑瘤率。

关键词 角叉菜多糖 降解 抗肿瘤活性

学科分类号 R931. 77

角叉菜多糖是从红藻角叉菜 (*Chondrus ocellatus*) 中提取的一种多糖, 由于它具有粘性、凝固性以及和蛋白质发生沉淀等性质, 不仅被广泛应用于工业, 而且在医药领域也有重要的应用 (Chapman, 1979; Honma, 1982; 赖利, 1983), 例如作为药品的赋形剂、崩解剂、镇咳、治疗结肠炎、降低胆固醇水平、降血脂、抗病毒等。Noda (1990) 研究了多种红藻多糖对小鼠艾氏腹水瘤和 Meth- A 纤维素瘤的抑制作用, 发现角叉菜多糖具有明显的抗肿瘤作用。一般认为多糖的生物活性与分子量等因素有关 (方积年, 1986)。本文初步探讨了角叉菜多糖分子量的大小与抗肿瘤活性的关系, 以期为提高角叉菜多糖的生物活性, 最终可能用于临床提供理论资料。

1 材料与方 法

1.1 材 料

角叉菜: 1997 年 9 月采自青岛太平角。挑除杂藻, 洗净, 晒干备用。

瘤株: 小鼠肝癌 H- 22, 由山东省医学科学院药物研究所细胞室提供。

实验动物: 昆明种小鼠, 雌雄各半, 体重为 (20 ± 1) g, 由山东省实验动物中心提供。

1.2 方 法

1.2.1 H_2O_2 对降解程度的影响 取 10g 干海藻, 加 1000ml 蒸馏水, 沸水浴, 同时以不同条件的 H_2O_2 处理后 (具体见结果 2. 1), 筛绢粗过滤。以硅藻土为助滤剂, 滤液用二层滤纸抽滤, 所得精滤液在冰箱里冻透, 乙醇融化脱水, 95% 乙醇浸洗二次, 干燥。

1.2.2 制备特性粘度不同的样品 根据不同因素与降解程度的关系及考虑保持较高的得率, 提取制备特性粘度不同的样品。

* 国家自然科学基金资助项目, 39870067 号。师然新, 男, 出生于 1974 年 3 月, 博士, E-mail: xzh@ms. qdio. ac. cn

收稿日期: 1999- 10- 25, 收修改稿日期: 2000- 02- 15

1.2.3 样品的化学分析 硫酸根的测定: 采用明胶 - BaCl₂ 分光光度法 (Kawai, 1969)。特性粘度的测定: 采用稀释外推法 (纪明侯, 1997), 以特性粘度 $[\eta]$ 代表分子量。元素分析: 用 PE240C 元素分析仪测定各样品的 C、N、H 的百分含量。红外光谱分析: 样品用 KBr 压片, 用 Nicolet 红外光谱仪, 在 400—4 000cm⁻¹ 区间进行扫描。

1.2.4 抗肿瘤动物实验 各样品分别用蒸馏水配成 20mg/ml 的溶液备用。在无菌条件下, 抽取接种 5—7d 的荷瘤小鼠腹腔肿瘤, 用灭菌的生理盐水制成 1×10^7 个/ml 细胞悬液。每只小鼠腋窝皮下注射 0.2ml。24h 后通过灌胃的方式, 每天每只分别灌 0.2ml 样品溶液。以蒸馏水为空白对照, 1.5% 的优福定 (UFT) 为阳性对照。连续给药 7d, 停药 24h 后, 脱椎处死小鼠, 解剖剥离瘤块, 称瘤重计算抑瘤率。

2 结果

2.1 H₂O₂ 对降解程度的影响

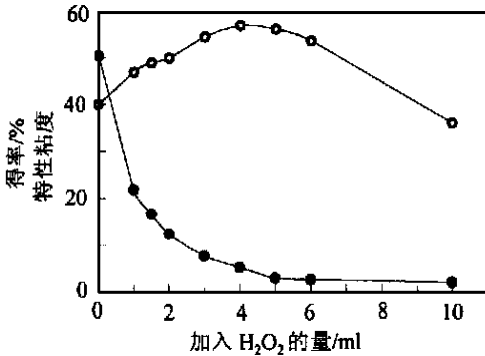


图 1 H₂O₂ 加入量对特性粘度和得率的影响

Fig. 1 The effect of H₂O₂ amount on intrinsic viscosity and gaining rate

● 特性粘度; ○得率

在 H₂O₂ 量为 1—6ml 时得率比较高, 再增加 H₂O₂ 的量, $[\eta]$ 变化不大, 但得率迅速降低。

2.2 样品特性的测定

根据上述结果提取得到三个不同降解程度的样品, 其特性粘度、硫酸基含量、元素分析测定结果见表 1。由表 1 可知, 3 个样品的硫酸基含量相近, 而特性粘度相差很大。多糖的特性粘度是与分子量有关的物理量, 与粘均分子量之间存在指数关系, 可以在一定程度上代表分子的平均大小进行比较。3 个样品的红外图谱表明, 降解程度不同的样品都在 1260cm⁻¹、845cm⁻¹、927cm⁻¹ 位置有吸收。833cm⁻¹ 吸收微弱, 只表现为 845cm⁻¹ 内侧的一个肩, 说明其主要为 κ 型 (史升耀等, 1986; 徐祖洪等,

加入 H₂O₂ 后, 提取 1.5h 得到样品的特性粘度为 4.36 ± 0.38 。提取 0.5h 后加入 H₂O₂, 再提取 1h 得到样品的特性粘度为 5.09 ± 0.05 。可看出不同的制备方法的重复性不同, 提取 0.5h 后加入 H₂O₂ 的方法比较稳定。

H₂O₂ 加入量对降解程度和得率的影响见图 1; 由 $\ln[\eta]$ 对 H₂O₂ 的量作图, 结果见图 2。

以上实验结果表明, 在其它条件相同的情况下, 加入 H₂O₂ 的量对降解程度影响很大。加 H₂O₂ 越多, 降解的程度越高, $[\eta]$ 越小。并且 $[\eta]$ 与加入 H₂O₂ 量成近似指数关系。随着 H₂O₂ 量的增加, $[\eta]$ 减小, 但减小的速度减慢。

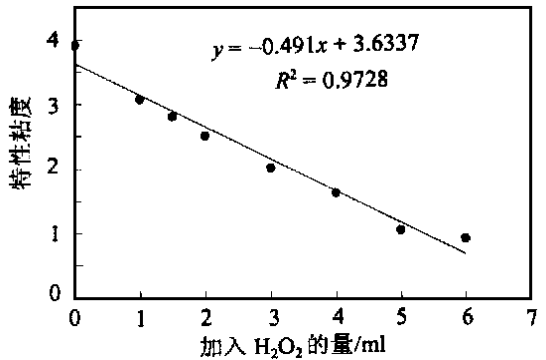


图 2 加入 H₂O₂ 的量与特性粘度对数的关系

Fig. 2 The relationship between amount of H₂O₂ and logarithm of intrinsic viscosity

1987)。

2.3 抗肿瘤动物实验结果

A、B、C 三个样品及阳性对照对肝癌 H- 22 的抑瘤结果见表 1。

表 1 样品的性质和抑瘤率

Tab. 1 Specimens' properties and tumor inhibiting rates (TIR)

样品	对 H- 22 的抑瘤率(%)	特性粘度	硫酸基含量(%)	含氮量(%)
A	23.2	53.5	26.36	0.34
B	63.6	5.6	27.46	0.72
C	5.1	0.84	27.85	0.77
UFT	91.0			

由表 1 可知,对于 H- 22 而言,样品 A ($[\eta] = 53.5$) 的抑瘤率为 23.02%,降解至 $[\eta] = 5.6$ 时(样品 B)抑瘤率明显提高,达 63.6%。但进一步降解至 $[\eta] = 0.84$ 时(样品 C)抑瘤率则迅速降至 5.1%,基本上不起抑瘤作用。说明适中的分子量对于其抗肿瘤活性非常重要。

3 讨论

Abraharm 等研究了角叉菜多糖对鼠的长毒作用,发现其对肝脏、消化道都无明显影响。多年来应用于食品工业的实践也证明角叉菜多糖没有毒性。在本研究的抗肿瘤动物实验中,阳性对照组(UFT)小鼠表现出明显的中毒特征,而角叉菜多糖组小鼠未有中毒迹象。

Sugawara (1982) 发现角叉菜多糖可以促进淋巴细胞的分裂,王克夷(1994)报道角叉菜多糖可以选择性抑制一些生长调节因子,如 PDGF、bEGF、TGF- β 1 等的活性。因此认为,角叉菜多糖对肿瘤细胞的抑制作用,不通过细胞毒作用,而是可能象其它多糖一样作为一种免疫促进剂,通过作用于某种靶细胞(如促进淋巴细胞的分裂),并抑制生长调节因子的活性,间接地抑制肿瘤细胞的生长。殷丽明等(1988)通过美兰试管法体外抗肿瘤试验,未发现角叉菜对 S- 180 和 HeLa 细胞具有抑制作用。体外实验与体内实验结果的不同,也说明角叉菜多糖抗肿瘤生物活性,只有通过动物机体反应才能发挥出来。

不同分子量的角叉菜多糖的生物活性不同,可能是因为多糖作用于生物体内的靶细胞时,多糖的结构起着非常重要的作用,而且多糖的空间结构比一级结构更为重要。许多受体识别反应都是以空间结构为基础的。如果多糖的分子很大,则生物体不易吸收,不易达到靶细胞;而如果多糖的分子很小,则不能形成识别反应所必需的空间结构。

多糖的生物活性是由其分子组成、结构决定的。许多研究(方积年等,1997;梁忠岩等,1996)表明,多糖的分子连接方式,分子量的大小,取代基的类型、数目、位置等因素,都可影响其生物活性。本研究结果表明,通过一定的条件可以获得一定分子量大小的角叉菜多糖,并可提高其生物活性,但真正应用于临床尚有很多工作要做。如何进一步提高角叉菜多糖的生物活性,比如通过改变硫酸基的数目、位置等,是未来解决这一问题的关键,对于开发利用我国丰富的角叉菜资源有着非常重要的意义。

参 考 文 献

- 王克夷, 1994. 生长因素和细胞因子与糖复合物间的相互作用. 生命的化学, 3: 11—29
- 方积年, 1986. 多糖研究现状. 药学学报, 21: 944—946
- 方积年, 王顺春, 1997. 硫酸酯化多糖的研究进展. 中国药学杂志, 6: 332—334
- 史升耀, 李智恩, 刘万庆, 1986. 角叉菜卡拉胶的研究 I. 不同世代的产率和性质. 海洋与湖沼, 2: 130—134
- 纪明侯, 1997. 海洋化学. 北京: 科学出版社, 171—175
- 徐祖洪, 李智恩, 1987. 海藻胶专辑. 海洋科学译报, 31: 27—46
- 殷丽明, 魏明莉, 1988. 青岛沿海常见海藻抗肿瘤及抗菌活性初报. 中国海洋药物, 1/2: 39—41
- 梁忠岩, 李雪宁, 陈秋潮, 1996. 化学修饰对斜顶菌多糖抑瘤活性的影响. 中国药学杂志, 10: 613—615
- 赖利 J P, 1983. 化学海洋学. 北京: 海洋出版社, 247—263
- Chapman V J, 1979. Marine Algae in Pharmaceutical Science, Vol. 1. Berlin: Walter de Gruyter, 139—147
- Honma K, 1982. Marine Algae in Pharmaceutical Science, Vol. 2. Berlin: Walter de Gruyter, 99—108
- Kawai Y, 1969. Modified methods to determine sulfate in polysaccharide. Anal Chem, 32: 314—321
- Noda H, 1990. Antitumor activity of marine algae. Proc Int Seaweed Symp, 13: 577—584
- Sugawara I, 1982. Carrageenans, highly sulfated polysaccharide and macrophage-toxic agents, newly found human T lymphite mitogens. Immunobiology, 163: 527—531

ANTITUMOR ACTIVITY OF DEGRADED *CHONDRUS OCELLATUS* POLYSACCHARIDE

SHI Ran-xin, XU Zu-hong, LI Zhi-en

(Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

Abstract *Chondrus ocellatus* polysaccharide is a polysaccharide of high molecular weight in the cell wall of *C. ocellatus*. It can be applied in industry and pharmacology, producing food additives, thickening agent, emulsifying agent and drug's excipient, release delaying agent, and is also used as drug to cure ulcer, dysentery and enteritis. Its effects of antiviral and treating cardiovascular diseases have been reported.

Recent discovery of the antitumor effect of *C. ocellatus* polysaccharide led us to further study its antitumor activity. Polysaccharides with different molecular weight were obtained by depolymerization. Extracts' intrinsic viscosity presented an index decrease with H_2O_2 added, the logarithm of extract's intrinsic viscosity presented a linear decrease with H_2O_2 added. In vivo antitumor experiments showed that molecular weight of *C. ocellatus* polysaccharide were important to its antitumor effects. As to hepatitis virus tumor (H-22), tumor inhibit rate would be higher if the molecular weight was reduced to certain limit, but it would be lower if the molecular weight was reduced too much.

Key words *Chondrus ocellatus* polysaccharide Degradation Antitumor activity

Subject classification number R931.77