

贻贝水溶性多糖 MP- I 的分离纯化及体外抗肿瘤活性研究

徐红丽¹, 郭婷婷², 郭一峰¹, 张建鹏¹, 冯伟华^{1*}, 焦炳华^{1*}

(1. 第二军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433; 2. 上海水产大学生命学院中心实验室, 上海 200090)

[摘要] **目的:** 分离纯化贻贝多糖 MP- I, 并进行体外抗肿瘤活性的研究。 **方法:** 采用热水提取, Sevage 法除蛋白分离得粗多糖, DEAE-Sepharose、Sepharose CL-6B 柱层析纯化的方法从东海厚壳贻贝中得到贻贝多糖纯品 MP- I。用 GC 及 TLC 法进行单糖组分的分析, 用 MTT 法进行体外抗肿瘤活性的研究。 **结果:** 得到贻贝多糖纯品 MP- I, 多糖的得率为 2.14%。单糖组分分析显示 MP- I 主要由葡萄糖组成, MP- I (0.5, 0.1, 0.02 mg/ml) 对体外 HO-8910、MCF-7、K562、SMMC-7721 肿瘤细胞均有不同程度抑制作用 ($P < 0.01$), 其中高浓度组对 HO-8910、MCF-7 肿瘤细胞的抑制率分别达到 30.55% 和 36.38%。 **结论:** 贻贝多糖 MP- I 主要由葡萄糖组成, 对 HO-8910、MCF-7、K562、SMMC-7721 肿瘤细胞有体外抑制作用。

[关键词] 贻贝; 多糖类; 分离和提纯; 抗肿瘤药**[中图分类号]** R 282.77 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)09-0998-04**Isolation and purification of water-soluble polysaccharide MP- I from *Mytilus coruscus* and study on its *in vitro* anti-tumor activity**XU Hong-li¹, GUO Ting-ting², GUO Yi-feng¹, ZHANG Jian-peng¹, FENG Wei-hua^{1*}, JIAO Bing-hua^{1*} (1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Central Laboratory, Aqua-life Science and Technology College, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090)

[ABSTRACT] **Objective:** To separate and purify polysaccharide MP- I from *Mytilus coruscus* and to investigate its *in vitro* anti-tumor activity. **Methods:** The crude polysaccharide was extracted from *Mytilus coruscus* with hot water and the protein was removed using Sevage method. The polysaccharide MP- I was purified using DEAE-Sepharose and Sepharose CL-6B column chromatography. Monosaccharides analysis was carried out using thin-layer chromatography and gas chromatography. The *in vitro* anti-tumor activity of MP- I was carried out using MTT method. **Results:** The yield of MP- I was 2.14%. MP- I is mainly constituted by glucose. MP- I (at 0.5, 0.1, 0.02 mg/ml) had different degrees of inhibitory effects on HO-8910, MCF-7, K562, and SMMC-7721 tumor cells *in vitro* ($P < 0.01$). The inhibitory rates of MP- I at 0.5 mg/ml against HO-8910 and MCF-7 cells were 30.55% and 36.38%, respectively. **Conclusion:** Polysaccharide MP- I is mainly constituted by glucose and it has inhibitory effect on tumor cell lines HO-8910, MCF-7, K562, and SMMC-7721 *in vitro*.

[KEY WORDS] mussels; polysaccharides; isolation and purification; antineoplastic drugs

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(9): 998-1001]

多糖是生物体内普遍存在的一类生物大分子, 具有促进机体免疫力、抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗放射性、抗衰老等多种活性。随着对陆地植物、真菌多糖的大量开发, 海洋生物多糖也越来越引起人们的注意, 但研究较多集中在海洋植物, 而对海洋动物多糖的相关研究较少。

厚壳贻贝 (*Mytilus coruscus*) 属于海洋软体动物门, 双壳纲, 贻贝目, 贻贝科, 盛产于我国渤海、黄海等海域^[1], 在我国北方称海红, 江浙一带称淡菜。已有研究表明, 贻贝提取物有抗肿瘤、抗衰老、抗病毒和抗菌功能, 具有增加机体免疫能力、降低血脂含量的功效^[2]。而多糖是其中重要的有效活性成分。本文报道厚壳贻贝水溶性多糖 MP- I 的分离纯化及体外抗肿瘤的活性测定。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器 厚壳贻贝, 由舟山嵊山县提供, 经浙江海洋学院赵盛龙教授鉴定为 *Mytilus coruscus*。氯仿、正丁醇为国药集团化学试剂有限公司产品; DEAE-Sepharose, Sepharose CL-6B 为 Pharmacia Bio-tech 产品; 5-氟尿嘧啶 (5-Fu), 上海制药十二厂产品; RPMI 1640 培养基, Gibco 产品; MTT,

[基金项目] 国家高技术研究发展计划/863 计划 (2002AA2Z3325); 浙江省科技计划项目 (2005ZJKJH2202)。Supported by National High-tech R&D Program (863 Program) (2002AA2Z3325) and Sci-tech Program of Zhejiang Province (2005ZJKJH2202)。

[作者简介] 徐红丽, 硕士生。E-mail: beam1981@21.cn.com

* Corresponding author. E-mail: fwh402@163.com; jiaobh@uninet.com.cn

Sigma 产品;小牛血清,杭州四季青产品。HP1100 型自动进样高效液相仪及 KS-804、KS-805 糖柱为 Agilent 公司产品;himac CR21 型冷冻离心机为 Hitachi 公司产品;722S 型可见分光光度计,上海精密科学仪器有限公司产品;96 孔细胞培养板,美国 Corning 公司;Model 550 酶联反应仪,美国 Bio-Rad 公司;CO₂ 恒温培养箱,日本三洋公司。

1.2 肿瘤细胞系 人卵巢癌 HO-8910 细胞、人乳腺癌 MCF-7 细胞、白血病细胞 K562 细胞、人肝癌 SMMC-7721 细胞均为本实验室保存。

1.3 多糖 MP-I 的分离纯化

1.3.1 多糖 MP-I 的分离 取新鲜贻贝肉组织 700 g,组织捣碎匀浆,加水煮沸 5 h,纱布过滤,残渣再加水煮沸 3 h,纱布过滤,合并两次滤液,加乙醇至终浓度 75%,4℃ 静置醇沉过夜,离心收集沉淀,沉淀分别用无水乙醇和丙酮洗涤 2 次,干燥得贻贝水提物。贻贝水提物溶于水,Sevage 法除蛋白 8 次,至界面无白色沉淀,浓缩水溶液,流水透析 2 d,冷冻干燥得粗多糖。

1.3.2 多糖 MP-I 的纯化 将粗多糖溶于蒸馏水,终浓度 0.2 g/ml,离心去不溶物,上 DEAE-Sepharose 离子交换树脂,蒸馏水 24 ml/h 洗脱,苯酚-硫酸法跟踪检测收集多糖组分,至无糖洗出为止。浓缩冷冻干燥多糖溶液,上 Sepharose CL-6B 凝胶柱,蒸馏水 10 ml/h 洗脱,苯酚-硫酸法跟踪检测收集多糖组分,至无糖洗出为止。重复上 Sepharose CL-6B 凝胶柱,至 HPLC 检测呈单一对称峰。

MP-I 配成 1.0 g/L 的水溶液,紫外分析仪上 200~400 nm 区间扫描。

取 1 mg 的 MP-I 样品用 KBr 压片,红外分光光度仪在 500~4 000 nm 区间进行扫描。

MP-I 配制成 10 mg/ml 水溶液,旋光仪测定旋光度。

1.4 多糖 MP-I 糖组分分析

1.4.1 GC 法^[3] 5 mg 多糖样品置于安瓿瓶中,加 2 mol/L 三氟乙酸(TFA)中,封口,置于 120℃ 水解 2 h。旋转蒸发蒸去 TFA,蒸干后加 25 mg NaBH₄,加 3 ml 水溶解,室温还原过夜。加冰醋酸至无气泡生成,加甲醇蒸至白色干燥粉末,加醋酐 5 ml,100~120℃ 烘箱密封乙酰化 1 h,加甲苯 50℃ 反复蒸至粉末,加 5 ml 水,用 5 ml 氯仿萃取 3 次,合并氯仿层,水洗氯仿 3 次,氯仿层加无水硫酸钠干燥后用于 GC 分析。测定条件:色谱柱:Lichrosorb 5 NH₂柱串联 Hypersil APS2 柱。流动相为乙腈-水(85:15),流速为 0.6 ml/min。衍生化试剂:50 mmol/L 盐酸胍

的 0.2 mol/L NaOH 溶液,流速为 0.3 ml/min。柱温:室温;反应温度:80℃。反应管:不锈钢管 0.5 mm×10 m;冷却管:不锈钢管 0.25 mm×3 m。测定波长:激发波长(E_x)=310 nm,发射波长(E_m)=430 nm。

1.4.2 硅胶薄层色谱法 5 mg 多糖 MP-I 样品加 2 mol/L TFA 安瓿瓶封管,120℃ 水解 2 h 后用 BaCO₃ 中和并进行薄层色谱,展开剂为正丁醇:乙酸乙酯:异丙醇:水(7:4:7:2),硅胶板在展层剂中饱和 3 h 后室温展开,晾干后苯胺-邻苯二甲酸显色。

1.5 多糖的体外抗肿瘤活性测定(MTT 法)^[4]

0.25% 胰酶消化对数生长期的卵巢癌细胞 HO-8910,乳腺癌细胞 MCF-7,调整细胞密度为 2×10⁵/ml,接种于 96 孔板,每组 6 个重复空,每孔 90 μl,37℃,5% CO₂ 条件下贴壁 24 h,加入不同浓度的多糖溶液 10 μl,使终浓度分别为 500、100、20 μg/ml,同时设阴性(0.9% NaCl)和阳性(5-Fu)对照组,终浓度 5 μg/ml,每组设 6 个平行孔。用药后培养 72 h,每孔加入 10 μl MTT(5 mg/ml),继续培养 4 h。小心吸弃上清(悬浮细胞离心后弃上清),每孔加入 100 μl 10% SDS,37℃ 放置过夜,待结晶完全溶解后,用酶标免疫测定仪 590 nm 处测定各孔光密度(D)。计算抑制率:抑制率=(1-D_{实验组}/D_{对照组})×100%。

1.6 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 MP-I 的分离纯化结果 DEAE-Sepharose 柱层析水洗脱部分为一单峰,收集此组分, Sepharose CL-6B 柱层析进一步纯化,得到相对分子质量相对均一的多糖 MP-I,纯多糖的得率为 2.14%,HPLC 检测呈单一对称峰(图 1),为白色粉末状固体,易溶于水,不溶于乙醇、丙酮等有机溶剂,硫酸-苯酚反应呈阳性。

紫外扫描在 250~280 nm 之间无蛋白质和核酸的特征吸收峰。红外光谱显示出多糖的特征吸收峰:3 600~3 200 cm⁻¹ 的宽峰为 O-H 的伸缩振动,2 933 cm⁻¹ 附近的峰为 C-H 的伸缩振动,1 410 cm⁻¹ 附近的峰为 C-H 变角振动,以上三峰为糖类物质的特征吸收峰。1 200~1 000 cm⁻¹ 为糖环上 C-O-C 不对称伸缩振动。850 cm⁻¹ 的峰为 α 端基差向异构的 C-H 变角振动,说明该多糖为 α 型吡喃糖。旋光度 $[\alpha]_{20}^D = +108.4^\circ (c 1.0, H_2O)$ 。

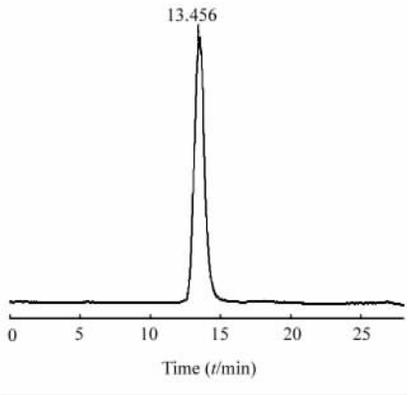


图1 MP-I 高效液相色谱图
Fig 1 High performance liquid chromatogram of polysaccharide MP-I

2.2 MP-I 糖组分分析

2.2.1 GC法 结果表明,多糖主要由葡萄糖组成(图2)。

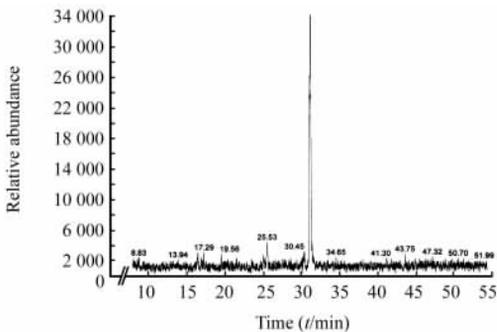


图2 MP-I 气相色谱图
Fig 2 Gas chromatogram of polysaccharide MP-I

2.2.2 硅胶薄层色谱法 硅胶薄层上可见一个明显的褐色斑点,其位置与标准单糖的葡萄糖对应(图3)。

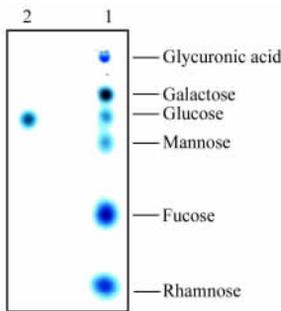


图3 MP-I 硅胶薄层色谱图
Fig 3 TLC of polysaccharide MP-I
1; Standard monosaccharide; 2; Sample

2.3 MP-I 的体外抗肿瘤实验结果 MP-I 对 HO-8910、MCF-7 的直接抑制作用较强,对 K562、

SMMC-7721 的直接抑制作用相对较弱,除对 SMMC-7721 低浓度抑制作用优于高浓度组外,对其余细胞抑制作用与多糖的剂量呈正相关,与空白组相比均有显著差异($P < 0.01$,表1)。

表1 MP-I 对外培养 HO-8910、MCF-7、K562、SMMC-7721 的抑制作用

Tab 1 Inhibitory effect of MP-I on HO-8910, MCF-7, K562 and SMMC-7721 in vitro

Group	Inhibition rate (%)			
	HO-8910	MCF-7	K562	SMMC-7721
Control	0	0	0	0
5-Fu				
5 μg/ml	25.54**	49.56**	35.61**	23.19**
MP-I				
0.5 mg/ml	30.55**	36.38**	15.62**	8.42**
0.1 mg/ml	15.72**	19.77**	12.36**	10.48**
0.02 mg/ml	4.96**	10.17**	9.57**	15.14**

** $P < 0.01$ vs control group

3 讨论

本文选用舟山群岛的厚壳贻贝为原料,分离纯化得到厚壳贻贝多糖纯品 MP-I,纯品得率为鲜组织的 2.14%,确定了主要单糖组分为葡萄糖。MP-I 体外抗肿瘤活性显示,MP-I 对 HO-8910、MCF-7 的直接抑制作用较强,对 K562、SMMC-7721 的直接抑制作用相对较弱,除对 SMMC-7721 低浓度抑制作用优于高浓度组外,对其余细胞抑制作用与多糖的剂量呈正相关,与空白组相比均有显著差异($P < 0.01$)。

多糖的体外抗肿瘤作用,可能是诱导某些基因的表达而影响肿瘤细胞的增殖、分化和凋亡^[5],影响细胞周期改变以及某些相关基因的表达有关^[6-8]。而对不同肿瘤细胞的抑制差异可能是由于不同的肿瘤细胞有不同的凋亡阈,即对药物浓度和(或)药物类型的敏感性不同所致。而糖的化学结构是其生物活性的基础,多糖受溶解度、单糖组成、相对分子质量的大小、糖苷键的连接方式、多糖的立体结构等多种因素的影响,从而呈现出生理活性的多样性。多糖独特复杂的化学结构,决定了对其构效关系研究的复杂性和难度。因此,贻贝多糖 MP-I 的抗肿瘤活性可能与其糖组成、支链及其连接方式、空间构型有密切联系。

本实验室前期工作中对贻贝多糖的分离提取及生物学活性做了初步研究,初步得到了贻贝多糖的 3 个组分,证明贻贝粗多糖能在细胞免疫、体液免疫、单核-巨噬细胞及 NK 细胞活性方面促进正常小

鼠的免疫活性作用^[9],并具有明显的体内抗肿瘤作用,本文对提取及纯化工艺进行了优化,纯多糖的得率达到了2.14%。而贻贝多糖 MP-I 具体的结构及抗肿瘤机制正在研究中。

[参考文献]

- [1] 王桢瑞. 中国动物志[M]. 北京:科学出版社,2000:55.
- [2] 李江滨,黄迪南. 贻贝的药用价值研究进展[J]. 水产科学, 2004, 23: 43-44.
- [3] Zhao C, Li M, Luo Y, et al. Isolation and structural characterization of an immunostimulating polysaccharide from fuzi, *Aconitum carmichaeli*[J]. Carbohydrate Res, 2006, 341: 485-491.
- [4] 陈晓超, 柯李晶, 陈躬瑞, 等. 鹿茸粗提液对大鼠成骨肉瘤细胞增殖的调节作用[J]. 中国中药杂志, 2004, 29: 74-77.
- [5] Cao Q, Lin Z. Ganoderma lucidum polysaccharides peptide inhibits the growth of vascular endothelial cell and the induction of VEGF in human lung cancer cell[J]. Life Sci, 2006, 78: 1457-1463.
- [6] 李 循, 孔繁智, 朱婉萍. 中药多糖抗肿瘤作用研究进展[J]. 浙江中医杂志, 2006, 41: 113-116.
- [7] 周 永. 多糖类抗肿瘤作用的研究进展[J]. 国外医学·卫生学分册, 2001, 28: 129-132.
- [8] Sarangi I, Ghosh D, Bhutia SK. Anti-tumor and immunomodulating effects of *Pleurotus ostreatus mycelia*-derived proteoglycans[J]. 2006, 6: 1287-1297.
- [9] 姚 滢, 魏江洲, 王 俊, 等. 厚壳贻贝多糖的提取和免疫学活性研究[J]. 第二军医大学学报, 2005, 26: 896-866.

[收稿日期] 2006-07-12

[修回日期] 2006-08-31

[本文编辑] 尹 茶