

焦云鹏,顾立众.海蛭多糖性质及抗癌活性[J].江苏农业科学,2013,41(10):237-239,245.

海蛭多糖性质及抗癌活性

焦云鹏,顾立众

(江苏食品药品职业技术学院/江苏食品加工工程技术研究开发中心,江苏淮安 223003)

摘要:采用红外光谱法、气相色谱法、体外抗肿瘤活性测定法对海蛭多糖(CP)及3个纯化组分(F_1 、 F_2 、 F_3)的性质及抗癌活性进行研究。结果表明, F_1 、 F_2 主要有葡萄糖构成; F_3 由鼠李糖、岩藻糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖组成,摩尔百分比分别为11.48%、17.15%、12.44%、21.57%、37.36%;海蛭多糖纯化组分 F_1 、 F_2 、 F_3 具有多糖的特征吸收,存在 α 型构型;在50~400 $\mu\text{g/mL}$ 时,海蛭多糖对人胃癌细胞BGC-823有一定的抑制活性,随着多糖浓度提高,抑制活性呈上升趋势。

关键词:海蛭;多糖;理化性质;抗癌活性

中图分类号:R284.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2013)10-0237-03

多糖是生物体内广泛存在的一类大分子物质,一些天然多糖已被证实具有抗肿瘤、抗病毒、抗感染、抗氧化、增强免疫力等多种生物学功能^[1]。多糖的这些生物学功能与其自身的理化性质、空间结构、取代基的类型等密切相关^[2]。较多研究表明,海蛭多糖具有抗肿瘤、增强免疫力、抗感染等生理功能^[3]。然而到目前为止有关海蛭多糖的理化性质及活性等方面的研究报道不多。本试验以海蛭多糖纯化组分为材料,测定其单糖组成,研究其红外特性,并采用体外细胞模型对海蛭多糖及纯化组分的抗肿瘤活性进行体外评价。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜海蛭,南京惠民桥水产品批发市场提供;DEAE-纤维素(DE52)、单糖标准品、葡聚糖标准品、噻唑蓝(MTT)、100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素、100 U/mL青霉素、胰蛋白酶购自美国Sigma公司;PRMI1640培养基、10%小牛血清购自上海生工生物工程技术公司;顺铂(冻干型)购自江苏豪森制药股份有限公司;甲酰胺、氢氧化钠、硫酸钾、盐酸、三氯乙酸、氯化钡、明胶等均为国产分析纯试剂。

1.2 仪器与设备

气相色谱仪(Agilent 6890N型,美国Agilent公司产品);高效液相色谱仪(Agilent 1100 Series型,美国Agilent公司产品);旋转蒸发器(Laborota-400型,Heidolph公司产品);Tensor-27型傅立叶变换红外光谱仪(德国Bruker公司产品);Thermo Scientific Forma 3111型CO₂培养箱(美国Thermo公司产品);BX-50型倒置显微镜(日本Olympus公司产品);SW-CJ-IBU型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司产品);Synergy美国宝特-2酶标仪(美国BioTek公司产品)。

1.3 方法

1.3.1 红外光谱测定 多糖样品的红外光谱分析参照

Maciel等^[4]报道的溴化钾(KBr)压片法。称取100~200 mg KBr粉末,充分干燥,并用压片机压成薄片。称取1~2 mg经冷冻干燥的多糖样品,与已干燥的KBr粉末在研钵中研磨均匀,用压片机压成薄片。用不加多糖样品的KBr薄片上传立叶变换红外光谱仪进行空白实验调整基线,再将含多糖样品的KBr薄片进行红外光谱扫描,扫描范围为4 000~500 cm^{-1} 。

1.3.2 单糖组成测定 多糖样品的单糖组成分析,参照Luo等^[5]、Guerrant等^[6]报道的糖腈乙酸酯衍生物的气相色谱法并稍作修改。(1)称取多糖样品约5 mg,加入2 mol/L三氟乙酸(TFA)4 mL封管,120 $^{\circ}\text{C}$ 水解2 h。水解液50 $^{\circ}\text{C}$ 旋转蒸发至干,加入甲醇约2 mL,再蒸干,如此重复3次,最后蒸干备用。(2)水解后的糖样中加入盐酸羟胺10 mg、肌醇(内标物)5 mg、吡啶0.6 mL,封口,90 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应30 min并振荡。反应液冷却至室温,加入1.0 mL醋酸酐,90 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中继续反应30 min,冷却后得糖腈乙酸酯衍生物。反应产物可直接用于气相色谱分析。(3)使用Agilent 6890N气相色谱仪,5%苯甲基硅氧烷毛细管色谱柱(HP-5,30.0 m \times 320 μm ,0.25 μm)、火焰离子检测器(FID)进行分析。操作条件如下:色谱柱升温程序为120 $^{\circ}\text{C}$ 保持3 min,以3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 速度升温至210 $^{\circ}\text{C}$,210 $^{\circ}\text{C}$ 保持4 min。色谱柱流速为1.0 mL/min。进样口温度为250 $^{\circ}\text{C}$ 。检测器温度为280 $^{\circ}\text{C}$ 。进样体积为1.0 L。氮气、氢气、空气的流速分别为25、30、400 mL/min。(4)各标准单糖(鼠李糖、岩藻糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖)相同条件下进行糖腈乙酸酯衍生化处理,然后以相同条件进行气相色谱分析。

1.3.3 海蛭多糖体外抗肿瘤活性测定 取对数生长期内生长期良好的人胃癌细胞BGC-823,用0.25%胰蛋白酶消化,使贴壁细胞脱落,然后用PBS冲洗,再用含10%小牛血清的RPMI-1640培养基稀释成浓度约为1 mL 1.0×10^5 的细胞溶液。将细胞溶液接种于96孔板培养板中(1孔50 μL),放入37 $^{\circ}\text{C}$ 含5% CO₂的培养箱内培养,24 h后加入含不同浓度药物的培养液50 μL 。试验设正常对照组、阳性药物组、多糖样品组。正常对照组为RPMI-1640培养基,阳性药物组为5 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂,多糖样品组为终浓度50、100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ 的海蛭多糖及硫酸化多糖样品。培养时间分别为

收稿日期:2013-03-10

作者简介:焦云鹏(1977—),女,河南南阳人,硕士,讲师,主要从事食品加工、检测、生物技术方面的研究。E-mail: jyp771122@163.com。

24、48、72 h。培养结束后,每孔加入 10 μL 的 MTT 溶液 (5 mg/mL),于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱内继续培养 4 h,每孔加入 100 μL 的 SDS 溶液 (10%,质量体积比),轻轻振荡以溶解结晶,用酶标仪于 570 nm 波长下测量吸光值 (D)。按下列公式计算癌细胞抑制率:抑制率 = $[1 - (D_{\text{样品}} - D_{\text{空白}}) / (D_{\text{对照}} - D_{\text{空白}})] \times 100\%$ 。

1.3.4 统计分析 试验结果数据表示为“平均值 \pm 标准差”,采用单因素方差分析 (ANOVA)、Duncan's 多重比较进行差异显著性分析,所有数据分析均采用软件 SPSS V11.5 进行。

2 结果与分析

2.1 海蜇多糖的红外光谱分析

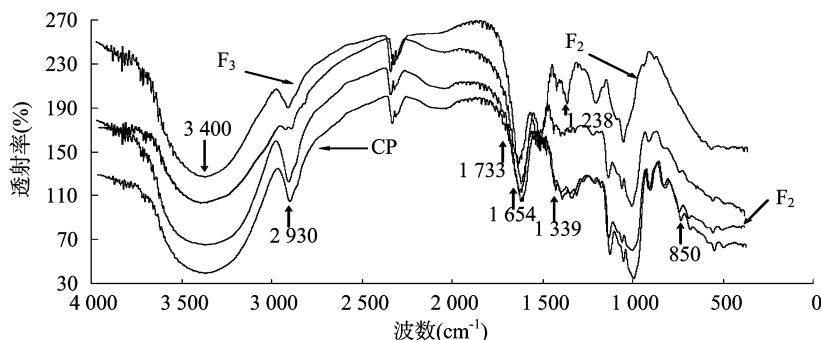


图1 海蜇多糖傅立叶变换红外光谱图

2.2 海蜇多糖的组分

标准单糖经糖腈乙酸酯衍生化后,在检测条件下测得的标准单糖的气相色谱图见图 2-A。由左至右,显示为鼠李糖、阿拉伯糖、岩藻糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖、肌醇,出峰时间依次为:20.847、21.430、21.769、21.953、28.849、29.226、29.950、33.269 min。

由图 2-B 和对照标准单糖的气相色谱图 (图 2-A) 可知,海蜇多糖纯化组分 F_1 由木糖、葡萄糖组成,其物质的量的百分比分别为 4.92%、95.08%。

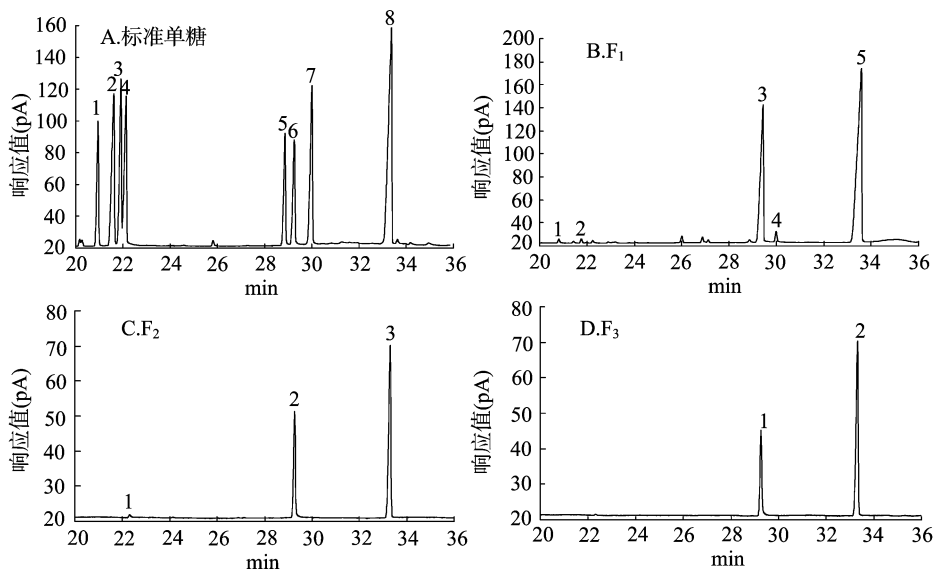
海蜇多糖 (CP) 及 3 个纯化组分 F_1 、 F_2 、 F_3 的红外光谱图见图 1。样品在 4000 ~ 400 cm^{-1} 区具有多糖类物质的一般特征吸收。在 3400 cm^{-1} 处出现的宽而强的吸收峰是羟基的 O-H 伸缩振动吸收峰;在 2930 cm^{-1} 处出现的弱吸收峰是烷基的 C-H 伸缩振动吸收峰,在 1733 cm^{-1} 处出现的弱吸收峰是烷基的 C-H 变角振动吸收峰^[7];在 1654 cm^{-1} 处出现的强吸收峰是羧基的 C=O 非对称伸缩振动,在 1339 cm^{-1} 处出现的强吸收峰是羧基的 C=O 对称伸缩振动;在 932 cm^{-1} 处出现的弱吸收峰是吡喃糖的特征吸收峰^[8-9];在 1238 cm^{-1} 处出现的吸收峰是磺酸基的 S=O 伸缩振动吸收峰^[10]。

由图 2-C 和对照标准单糖的气相色谱图 (图 2-A) 可知,海蜇多糖纯化组分 F_2 由葡萄糖组成。

由图 2-D 和对照标准单糖的气相色谱图 (图 2-A) 可知,海蜇多糖纯化组分 F_3 由鼠李糖、岩藻糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖组成,其物质的量的百分比分别为 11.48%、17.15%、12.44%、21.57%、37.36%。

2.3 海蜇多糖体外抗癌活性

由图 3 可以看出,作用 24 h 时,海蜇多糖及纯化组分 F_1 、 F_2 、 F_3 对人胃癌细胞 BGC-823 均表现出一定的增殖抑制效



1—鼠李糖; 2—阿拉伯糖; 3—岩藻糖; 4—木糖; 5—甘露糖; 6—葡萄糖; 7—半乳糖; 8—肌醇

图2 标准单糖与海蜇多糖的气相色谱图

果。随着海蜇多糖浓度升高,抑制率呈上升趋势。对海蜇多糖来说,50 $\mu\text{g/mL}$ 处理分别与 100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ 处理差异显著 ($P < 0.05$),而 100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ 处理间差异不显著 ($P > 0.05$);对海蜇多糖纯化组分 F_2 来说,400 $\mu\text{g/mL}$ 处理分别与 50、100、200 $\mu\text{g/mL}$ 处理间差异显著 ($P < 0.05$),而 50、100、200 $\mu\text{g/mL}$ 处理间差异不显著 ($P > 0.05$);对海蜇多糖纯化组分 F_1 、 F_3 来说,所有剂量处理间差异均不显著 ($P > 0.05$)。浓度为 400 $\mu\text{g/mL}$ 时,海蜇多糖及纯化组分 F_1 、 F_2 、 F_3 对人胃癌细胞 BGC - 823 抑制率分别为 27.92%、35.63%、44.83%、58.13%。药物顺铂浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$ 时,对人胃癌细胞 BGC - 823 的抑制率为 66.32%。

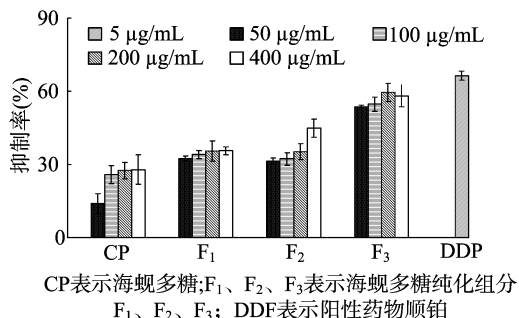


图3 不同浓度海蜇多糖及纯化组分作用24 h对人胃癌细胞BGC-823的抑制效果

48 h 时,海蜇多糖对人胃癌细胞 BGC - 823 均表现出一定的增殖抑制效果。随着海蜇多糖浓度升高,抑制率呈上升趋势。对海蜇多糖来说,除 400、50 $\mu\text{g/mL}$ 两处理间差异显著 ($P < 0.05$) 外,其余剂量组间差异均不显著 ($P > 0.05$);对海蜇多糖纯化组分 F_1 来说,50、100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ 处理间差异显著 ($P < 0.05$);对海蜇多糖纯化组分 F_2 来说,除 50 $\mu\text{g/mL}$ 与 100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ 处理差异不显著 ($P > 0.05$) 外,其余剂量组间差异均达到显著水平 ($P < 0.05$);对海蜇多糖纯化组分 F_3 来说,除 400、200 $\mu\text{g/mL}$ 处理间差异不显著 ($P > 0.05$) 外,其余剂量组间差异均达到显著水平 ($P < 0.05$)。浓度为 400 $\mu\text{g/mL}$ 时,海蜇多糖及纯化组分 F_1 、 F_2 、 F_3 对人胃癌细胞 BGC - 823 抑制率分别为 27.48%、54.06%、63.62%、74.35%。药物顺铂浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$ 时,对人胃癌细胞 BGC - 823 的抑制率达到 78.47% (图 4)。

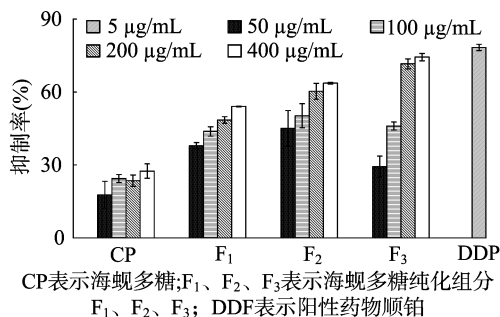


图4 不同浓度海蜇多糖及纯化组分48 h对人胃癌细胞BGC-823的抑制效果

由图 5 可以看出,作用 72 h 时,海蜇多糖及纯化组分 F_1 、 F_2 、 F_3 对人胃癌细胞 BGC - 823 均表现出一定的增殖抑制效果,随着海蜇多糖浓度升高,抑制率呈上升趋势。对海蜇多糖来说,除 400 $\mu\text{g/mL}$ 与 50 $\mu\text{g/mL}$ 、400 $\mu\text{g/mL}$ 与 100 $\mu\text{g/mL}$ 、

200 $\mu\text{g/mL}$ 与 50 $\mu\text{g/mL}$ 处理间差异显著 ($P < 0.05$) 外,其余剂量组两两之间差异均不显著 ($P > 0.05$);对 F_1 、 F_2 或 F_3 来说,50、100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ 处理间差异均达到显著水平 ($P < 0.05$)。浓度为 400 $\mu\text{g/mL}$ 时,海蜇多糖及纯化组分 F_1 、 F_2 、 F_3 对人胃癌细胞 BGC - 823 抑制率分别为 35.15%、58.98%、53.05%、79.89%。药物顺铂 (5 $\mu\text{g/mL}$) 对人胃癌细胞 BGC - 823 的抑制率为 90.21%。

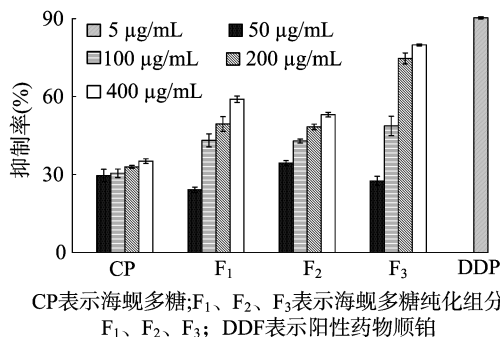


图5 不同浓度海蜇多糖及纯化组分作用72 h对人胃癌细胞BGC-823的抑制效果

多糖的抗肿瘤活性取决于多糖的分子量、单糖组成、取代基种类与取代位置、主链构型、支链分支情况等^[11-12]。海蜇多糖及其纯化组分体外抗肿瘤试验结果表明,海蜇多糖及纯化组分 F_1 、 F_2 、 F_3 在不同的时间段 (24、48、72 h) 对人胃癌细胞 BGC - 823 均表现出较好的增殖抑制活性,表明海蜇多糖具有一定的抗癌活性。另外,与海蜇多糖及纯化组分 F_1 、 F_2 相比,纯化组分 F_3 对人胃癌细胞 BGC - 823 的增殖抑制效果最好。纯化组分 F_3 与纯化组分 F_1 、 F_2 在人胃癌细胞 BGC - 823 增殖抑制活性之间的差异可能与纯化组分 F_3 、 F_1 、 F_2 在单糖组成、结构特征等方面的差异有关。

3 结论

对海蜇多糖 3 个纯化组分 (F_1 、 F_2 、 F_3) 进行红外光谱分析,结果表明,海蜇多糖纯化组分 F_1 、 F_2 、 F_3 具有多糖的特征吸收,存在 α 型构型。气相色谱分析结果表明,海蜇多糖纯化组分 F_1 由木糖、葡萄糖组成,物质的量的百分比分别为 4.92%、95.08%;海蜇多糖纯化组分 F_2 由葡萄糖组成;海蜇多糖纯化组分 F_3 由鼠李糖、岩藻糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖组成,百分比分别为 11.48%、17.15%、12.44%、21.57%、37.36%。

海蜇多糖体外抗癌试验结果表明,海蜇多糖及纯化组分 F_1 、 F_2 、 F_3 对人胃癌细胞 BGC - 823 的增殖抑制率呈一定的量效关系,随着浓度提高,海蜇多糖及纯化组分 F_1 、 F_2 、 F_3 对人胃癌细胞 BGC - 823 的增殖抑制率呈上升趋势。海蜇多糖纯化组分 F_3 对人胃癌细胞 BGC - 823 的增殖抑制效果最好,抗癌活性最强。

参考文献:

- [1] Lu Y, Wang D, Hu Y, et al. Sulfated modification of epimedium polysaccharide and effects of the modifiers on cellular infectivity of IBV [J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 71 (2): 180 - 186.

树等研究发现,茶叶品质及水浸出物含量除与茶树品种、鲜叶嫩度和环境条件等有很大关系外,还与制作工艺技术、茶叶级别密切相关,茶叶级别越高、水浸出物含量就越高^[10]。李元钦对乌龙茶做青过程中对水浸出物与成茶品质的关系进行了研究^[11]。方世辉等对茶树品种加工工艺季节对乌龙茶品质的研究表明,不同工艺对水浸出物的含量有一定的影响^[12]。而对普洱茶水浸出物的研究鲜有报道。本研究结果表明,普洱茶水浸出物和普洱茶的存放时间有关,存放时间越久,茶水浸出物含量越少;同时普洱茶水浸出物和普洱茶加工工艺有关,生茶水浸出物明显高于熟茶。这可能与特定的加工工艺使水浸出物的转化速率发生变化造成的^[13]。

本试验结果还显示,同品牌茶叶、不同的存放时间,茶水浸出物含量不同。随着茶叶存放时间的延长,茶水浸出物含量呈现下降趋势。相同的存放时间,加工工艺不同(生茶和熟茶),茶水浸出物含量也不同,生茶水浸出物含量高于熟茶水浸出物含量。殷涌光等研究发现,经过高压脉冲电场处理,增加红酒中干浸出物的含量,提高酒的色度稳定性,降低醇的含量,与陈酿葡萄酒成分变化趋势基本相同^[7]。本研究结果显示,经高压脉冲电场处理后,茶水浸出物含量明显增加,其中经 HPEFB(14 kV/120 Hz/60 min)处理后茶水浸出物含量大幅增加。本研究结果为提升普洱茶的品质提供了新的途径,也为今后普洱茶深加工和开发普洱茶功能食品提供理论依据。

参考文献:

- [1] GB/T 22111—2008 地理标志产品 普洱茶[S].
- [2] 吴礼辉. 普洱茶概述[J]. 茶叶科学技术, 2005(3): 44—45.
- [3] 吕文英, 吕品. 茶叶及其浸出物中微量元素的测定与研究[J]. 食品科学, 2001, 22(11): 78—81.
- [4] 王白娟, 戴富强, 蒋明忠, 等. 高压脉冲电场对普洱茶中微生物的选择性灭活[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2011, 33(1): 118—124.
- [5] Elez - Martinez P, Escola - Hernandez J, Soliva - Fortuny R C, et al. Inactivation of *Lactobacillus brevis* in orange juice by high - intensity pulsed electric fields[J]. Food Microbiology, 2005, 22: 311—319.
- [6] Jeyamkondan S, Jayas D S, Holley R A. Pulsed electric field processing of foods: a review[J]. Journal of Food Protection, 1999, 62(9): 1088—1096.
- [7] 殷涌光, 刘学军, 朱畅, 等. 高压脉冲电场对干红葡萄酒物性的影响研究[J]. 食品科学, 2006, 27(11): 221—223.
- [8] 蒙肖虹, 孙云, 张惠芬, 等. 普洱茶发酵工艺研究[J]. 昆明理工大学学报: 理工版, 2008, 33(4): 81—83.
- [9] 徐准盾, 龚淑英. 茶汤浓度对绿茶水浸出物含量及其感官审评的影响[J]. 茶叶, 2005, 31(3): 166—169.
- [10] 王宏树, 方吴云. 若干处理对红茶水浸出物含量及品质影响研究[J]. 茶叶通讯, 2009, 36(1): 14—16.
- [11] 李元钦. 乌龙茶做青过程主要生化变化与成茶品质关系的研究——水浸出物、茶多酚、茶黄素的变化与成茶品质关系[J]. 茶叶科学简报, 1990(2): 39—41.
- [12] 方世辉, 张秀云, 夏涛, 等. 茶树品种、加工工艺、季节对乌龙茶品质影响的研究[J]. 茶叶科学, 2002, 22(2): 135—139, 146.
- [13] 宿迷菊, 毛志方, 施海根, 等. 做青过程中水浸出物、茶多酚和氨基酸总量的变化研究[J]. 中国茶叶加工, 2007(3): 17—20.
- [1] Alban S, Schauerte A, Franz G. Anticoagulant sulfated polysaccharides; Part I. Synthesis and structure - activity relationships of new pullulan sulfates[J]. Carbohydrate Polymers, 2002, 47(3): 267—276.
- [2] 湛孝东. 贝类多糖生物学活性研究进展[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(7): 1285—1286.
- [3] Maciel J S, Chaves L S, Souza B S, et al. Structural characterization of cold extracted fraction of soluble sulfated polysaccharide from red seaweed *Gracilaria birdiae*[J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 71(4): 559—565.
- [4] Luo J, Liu J, Sun Y, et al. Medium optimization, preliminary characterization and antioxidant activity *in vivo* of mycelial polysaccharide from *Phellinus baumii* Pilát[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 81(3): 533—540.
- [5] Guarrant G O, Wayne M C. Determination of monosaccharides as aldono-nitrile, *O* - methyloxime, alditol, and cyclitol acetate derivatives by gas chromatography[J]. Analytical Chemistry, 1984, 56(4): 633—638.
- [6] He Y, Liu C, Chen Y, et al. Isolation and structural characterization of a novel polysaccharide prepared from *Arca subcrenata* Lischke[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2007, 104(2): 111—116.
- [7] Liu C, Lin Q, Gao Y, et al. Characterization and antitumor activity of a polysaccharide from *Strongylocentrotus nudus* eggs[J]. Carbohydrate Polymers, 2007, 67(3): 313—318.
- [8] Zhao G, Kan J, Li Z, et al. Characterization and immunostimulatory activity of an(1→6) - α - *D* - glucan from the root of *Ipomoea batatas*[J]. International Immunopharmacology, 2005, 5(9): 1436—1445.
- [9] Gan D, Ma L P, Jiang C X, et al. Production, preliminary characterization and antitumor activity *in vitro* of polysaccharides from the mycelium of *Pholiota dinghuensis* Bi[J]. Carbohydrate Polymers, 2009, 78: 275—281.
- [10] Cui F J, Tao W Y, Xu Z H, et al. Structural analysis of anti - tumor heteropolysaccharide GFPS1b from the cultured mycelia of *Grifola frondosa* GF9801[J]. Bioresource Technology, 2007, 98(2): 395—401.
- [11] Jin Y, Zhang L, Zhang M, et al. Antitumor activities of heteropolysaccharides of *Poria cocos* mycelia from different strains and culture media[J]. Carbohydrate Research, 2003, 338(14): 1517—1521.

(上接第 239 页)