

文章编号: 1004 - 7271(2000)03 - 0268 - 04

·研究简报·

海带褐藻糖胶的药理活性

Pharmacological activity of fucoidan from *Laminaria japonica*

施志仪¹ 郭亚贞² 王 慥²

(1. 上海水产大学生物技术研究中心, 上海 200090; 2. 上海水产大学食品学院, 上海 200090)

SHI Zhi-yi¹, GUO Ya-zhen², WANG Zao²

(1. Reseach Center of Biotechnology, SFU, Shanghai 200090, China; 2. College of Food Science, SFU, Shanghai 200090, China)

关键词: 海带; 褐藻糖胶; 药理活性

Key words: *Laminaria japonica*; fucoidan; pharmacological activity

中图分类号: S985.4*1 文献标识码: A

褐藻糖胶是所有褐藻固有的一种细胞间多糖, 据报道有抗凝血、抗肿瘤、澄清血脂等药理活性^[1-3]。本文对采自浙江省象山县台下礁的海带中提取纯化得到的褐藻糖胶进行了抗肿瘤细胞实验与抗凝血实验, 初步观察了褐藻糖胶对体外培养的人肝癌细胞的杀伤作用, 并比较了其不同剂量对肿瘤细胞的影响。同时, 还作了褐藻糖胶对小鼠体内的抗凝血实验, 比较了其不同组分的抗凝血活性的大小。

1 材料与方法

1.1 试验材料

海带藻粉经稀盐酸提取, 乙醇沉淀, 进一步纯化得到褐藻糖胶。然后用不同酒精浓度(20%, 30%, 40%, 50%, 60%及70%)进行分级沉淀得到组分分别为20%, 30%, 40%, 50%, 60%和70%的褐藻糖胶。

QGY7703 肝癌细胞, 来源于复旦大学, 属人肝癌细胞系^[4]; 小牛血清购于中国科学院上海细胞生物研究所; RPMI 1640 为 GIBCO 公司产品; 台盼蓝, 进口分装, 购于上海化学试剂采购供应站; 青霉素、链霉素, 购于华美生物公司; 肝素钠购于上海生化试剂商店, 效价 172.4 μ /mg。

实验小鼠, 昆明种系, 购自第二军医大学动物饲养所, 平均体重约 20g。

1.2 对体外 QGY7703 肝癌细胞的抑制试验

将 QGY7703 肝癌细胞用含 10% 小牛血清(FCS)的 1640 培养液, 在 37 $^{\circ}$ C CO₂ 培养箱连续传代培养 4-5 代^[5]。取对数生长期的 QGY 7703 肝癌细胞, 先倾去培养液, 用 EDTA 清洗倒去, 用胰蛋白酶消化后用含 10% FCS 的 1640 培养液调细胞浓度为 10⁴/mL, 继续培养 24h 后, 加入 25 μ L/mL 褐藻多糖于培养液中, 每隔 12h 取样, 用 0.4% 台盼蓝(Trypan blue)染色^[6], 血细胞计数器上记数检查细胞活力, 观察细胞死亡情况, 连续记数 70h。同时用 PBS 作对照实验。结果按活细胞率(%) = 活细胞总数/(活细胞总数 + 死细胞总数) \times 100 计算。

收稿日期: 2000 - 02 - 18

基金项目: 本课题为农业部水产增殖生态、生理重点开放实验室资助项目(KFT1998 - 6)。

作者简介: 施志仪(1954 -), 男, 上海市人, 副教授, 博士, 现从事海洋药物研究。

1.3 多糖抗凝血性测定

实验小鼠采用腹腔注射 500 μ L 不同组分的褐藻多糖, 30min 后用眼科弯镊摘去一侧眼球, 滴血在载玻片上后开始计时, 每隔 30s 用大头针自血滴边缘向里轻挑一次, 直至能挑出血丝停止计时, 该停止记时的时间即为凝血时间^[7]。为了考察注射方式对多糖样品的吸收有无影响, 实验又采用小鼠尾静脉注射进行比较。同时都用肝素及生理盐水作对照实验, 注射浓度为 400mg/kg。

2 结果

2.1 海带褐藻多糖不同组分对 QGY₇₇₀₃ 肝癌细胞的影响

取 25 μ L/mL 浓度的 20%, 30%, 40%, 50%, 60% 及 70% 等不同组分多糖加入到 QGY₇₇₀₃ 肝癌细胞培养液中, 测细胞活力率, 结果见图 1。

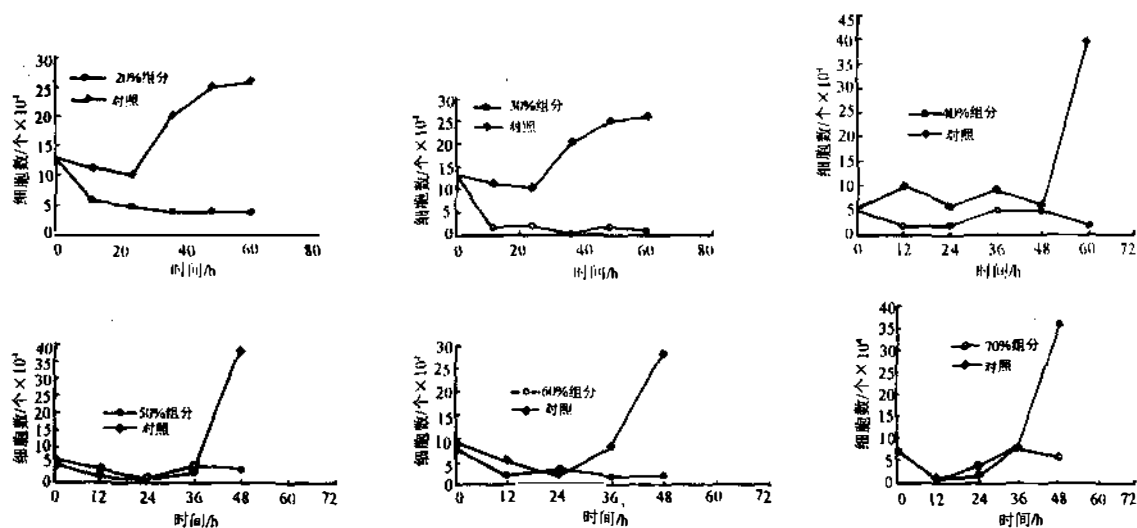


图 1 海带褐藻糖胶对人肝癌细胞 QGY₇₇₀₃ 生长曲线的影响

Fig. 1 Effect of fucoidan on the proliferation of hepatoma QGY₇₇₀₃ cell line

图 2 为加入 50% 组分多糖 36 小时后镜下观察细胞形态如照片 1, 加入 PBS 36 小时后细胞形态如照片 2(对照)。

2.2 不同剂量褐藻糖胶对 QGY₇₇₀₃ 细胞的影响

为了进一步验证褐藻糖胶对肿瘤细胞的杀伤作用, 本实验以 50% 组分为例, 分别取 25, 125, 250 μ L/5mL 三种不同浓度, 加至生长有 QGY₇₇₀₃ 细胞的培养液中以研究不同剂量褐藻多糖对肝癌细胞的作用, 实验结果见图 3。

2.3 海带褐藻糖胶的抗凝血性

腹腔注射的小鼠抗凝血性结果见表 1。

选用 40%、50% 及 60% 组分多糖样品, 采用小鼠尾静脉注射进行比较。并用肝素作对照, 药品注射浓度为 400mg/kg, 所测定各组的开始凝血时间见表 2。

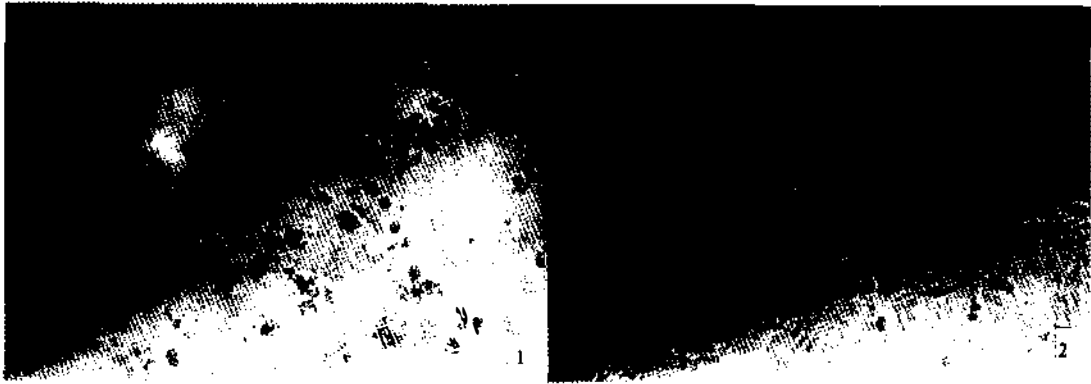


图2 褐藻糖胶对体外培养的人肝癌细胞的杀伤作用

Fig. 2. Inhibitory effect of fucoidan on the hepatoma QGY₇₇₀₃ cell line

1.加入50%组分多糖36h后镜下观察细胞形态,箭头所示杀伤细胞; 2.加入PBS 36h后细胞形态(对照)。

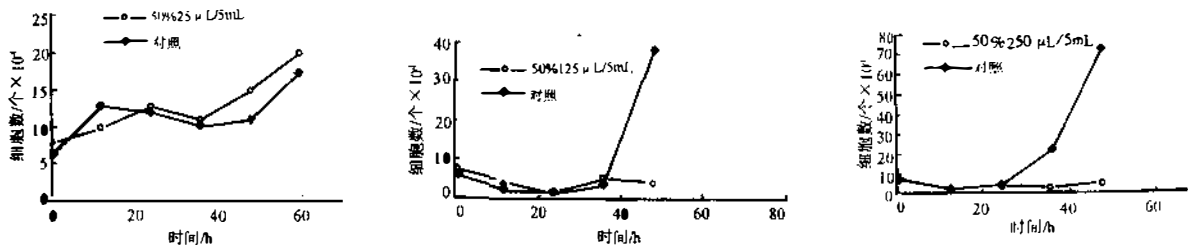


图3 不同剂量褐藻糖胶对人肝癌 QGY₇₇₀₃生长曲线的影响

Fig. 3. Effect of varied doses of fucoidan on the proliferation of hepatoma QGY₇₇₀₃ cell line

表1 各多糖组分对小鼠凝血时间的影响

Tab.1 Effect of varied fractions of polysaccharides on rat blood coagulation

剂量 (mg/kg)	组 分					
	20%	30%	40%	50%	60%	70%
600	52"	1'22"	1'27"	2'22"	2'40"	2'
400	—	—	—	—	1'22"	1'13"
300	—	—	—	1'07"	—	—
200	—	—	—	—	53"	—

注:(1)肝素的凝血时间为6'01";(2)对照空白27";(3)一,未测;(4)不同组分为不同酒精浓度得到的沉淀。

表2 尾静脉注射对小鼠凝血时间的影响

Tab.2 Effect on blood coagulation by vein injection at mouse tail

药剂(400mg/kg)	40%组分	50%组分	60%组分	肝素
凝血时间	3'40"	6'42"	8'29"	11'35"
抗凝性%(相当肝素)	29.95	56.56	73.03	100

注:不同组分为不同酒精浓度得到的沉淀。

3 讨论

多糖被认为是抗肿瘤的有效物质,但其抗肿瘤作用的机制还不清楚,至今大部分多糖抗肿瘤作用的结论是以抑制动物体内肿瘤的研究得出的。但由于体内环境相当复杂,特别是多糖作为抗原性极强的物质无疑能够引起体内特异或非特异免疫反应,这给分析多糖直接抗肿瘤活性带来一定难度。因此,利用体外细胞培养显然有利于阐明抗肿瘤作用的机理。

体外细胞培养分为 3 个不同的时期,即缓慢期、对数生长期、水平静止期,表现为近似“S”型曲线^[8]。一般在细胞传代后经过 10~30h 的缓慢期,这是细胞再培养过程引起的细胞损伤后的修复期。然后细胞进入对数生长期,这是细胞经过缓慢期后出现的指数增殖的阶段。最后进入静止生长期,细胞总数趋于水平。从结果图 1 可见,对照组细胞在开始时经过一段低细胞水平后,骤然出现细胞快速增殖,而实验组细胞一直处于低水平状态。另从细胞形态来看,实验组细胞生长缓慢,细胞形态较小,多呈圆形,分布不均匀,积成较密集的块状,无光泽;对照组细胞长得如先前形状,细胞较大,呈不规则菱形状,分布均匀;加样培养的培养液表面可见有许多漂浮的死亡细胞。这表明褐藻糖胶抑制了癌细胞进入对数生长期,从而遏制了肿瘤的增长。各个组分的多糖对癌细胞都有杀伤作用,组分间看不出明显的差别。

以 50% 组分为例对不同剂量褐藻糖胶对 QCY₇₀₃ 细胞的杀伤效果进行实验。从实验结果图 3 来看,当剂量为 25 μ L/5mL 时,几乎未见有杀伤效果产生;当剂量达到 125 μ L/5mL 时,在加样 36h 表现出有杀伤作用,而加样为 250 μ L/5mL 时,则在 24h 就表现出杀伤作用。说明褐藻糖胶的不同浓度对肝癌细胞的杀伤效果不同,随剂量增大,杀伤效果越明显。由于体外培养的细胞系统基本上排除了免疫作用,至今未见多糖在培养细胞中诱发干扰素的报道。上述结果说明褐藻糖胶抗肿瘤效应至少包括它们直接杀伤肿瘤细胞的途径。

本实验结果还表明,褐藻糖胶具有明显的抗凝血作用。由表 1 结果可得出,各多糖组作用下小鼠的凝血时间都较空白对照有明显的延长;以 50%,60% 及 70% 来看,同一组分不同浓度的抗凝作用也随着组分浓度增加而增强;对比肝素其抗凝效果似又弱一点,这可能跟多糖腹腔注射有关,可能因为多糖的平均分子量测得在 30 余万,所以在 30min 时间内的吸收效果不如肝素。从表 1、2 结果比较可见,各组分尾静脉注射的抗凝效果都较腹腔注射有显著提高;以同样剂量的 60% 组分看,尾静脉注射时其抗凝性由腹腔注射时相当肝素的 20.29% 提高到 73.03%,其抗凝血效果已相当显著。由此可见,多糖的抗凝血效果还跟摄取方式有关,静脉注射的效果明显高于腹腔注射。

本研究证明了海带褐藻糖胶的抗肿瘤和抗凝血活性,展示其良好的开发前景。

上海水产大学渔业学院生物技术专业 1999 届郑秋勇、张碧峰、方世雄参加了本实验部分工作,在此表示感谢。

参考文献:

- [1] 日本水产学会. 海藻の生化学と利用[M]. 东京: 恒星社厚生阁刊, 1983. 33-45.
- [2] 西泽 一俊. ガンと海藻[J]. 食品と开关. 1992, 25(3):32-38.
- [3] 酒井 武, 加藤 郁之进. 昆布由来フコイダンの特性と食品への利用[J]. 食品と科学, 1998, 6: 89-93.
- [4] 王金兵, 朱德厚, 叶秀珍, 等. 启东肝癌细胞系(QCY-7703)的建立及其特征[J]. 中华肿瘤杂志, 1981, 3(4):241-244.
- [5] 李志孝, 孟延发, 孟雪琴, 等. 栀子多糖的分离纯化及其性质[J]. 生物化学与生物物理学报, 1993, 25(3):301-305.
- [6] Yan Shangjun. Inhibitory effect of parvovirus H-1 on the formation of colonies of human hepatoma cell line in vitro and its tumors in nude mice[J]. Cell Res, 1994, 4:47-56.
- [7] 陈 奇主编. 中药药理研究方法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993. 485-486.
- [8] 翟中和主编. 细胞生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1995. 344-359.