

文章编号: 1000-0615(2001)02-0166-05

珠母贝糖胺聚糖的结构初探及其生理活性

吴红棉¹, 雷晓凌¹, 洪鹏志¹, 陈方², 吴铁², 艾春媚²

(1. 湛江海洋大学食品工程系, 广东 湛江 524025, 2. 广东医学院药理教研室, 广东 湛江 524023)

摘要:以马氏珠母贝全脏器为原料提取、纯化后所得的珠母贝糖胺聚糖 PG2-3-2, 经醋酸纤维素薄膜电泳显示其迁移率相对接近于 6-硫酸软骨素(C-6-S), 红外光谱类似于 C-6-S。抗肿瘤试验结果显示: PG2-3-2 对体内 S180 肉瘤和艾氏腹水癌可显著增敏临床抗癌药的抑瘤作用, 抑瘤率分别达 61.96% 与 46.3%。并有抗凝血作用。

关键词: 马氏珠母贝; 糖胺聚糖; 结构; 生理活性

中图分类号: S968.2; R931.74 文献标识码: A

The preliminary probe of structure and physiological activity of glycosaminoglycan from *Pinctada martensis*

WU Hong-mian¹, LEI Xiao-ling¹, HONG Peng-zhi¹, CHEN Fang², WU Tie², AI Chun-mei²

(1. Department of Food Science and Technology, Zhanjiang Ocean University, Zhanjiang 524025, China;

2. Pharmacological Department of Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China)

Abstract: Glycosaminoglycan PG2-3-2 from whole viscera of *Pinctada martensis* was obtained after extraction and purification. The fraction showed that its migration rate was relatively near to that of Chondroitin 6-sulphate (C-6-S) by acetate film electrophoresis. The infrared spectra (IR) of it was similar to that of C-6-S. The result of antitumor test in vivo demonstrated that PG2-3-2 could obviously enhance the sensitivity of inhibitive function of clinical antitumor drugs, the inhibition rates of which to Sarcoma 180 and Ehrlich's Ascipes Carcinoma (EAC) were 61.96% and 46.3% respectively. Moreover, PG2-3-2 had certain function of anticoagulant by the test in vitro.

Key words: *Pinctada martensis*; glycosaminoglycan; structure; physiological activity

近年来,糖胺聚糖的重要生理活性不断被揭示,包括抗凝血^[1]、抗肿瘤^[2]等。糖胺聚糖的结构与其生理功能有着密切关系^[3]。笔者以马氏珠母贝全脏器为原料,提取、纯化得一珠母贝糖胺聚糖级分(PG2-3-2),并对其化学性质进行了报道^[4],本文对 PG2-3-2 的结构特征进行了初步的探讨,并通过抗肿瘤试验与抗凝血试验进一步探讨其生理活性。

收稿日期: 2000-09-30

基金项目: 广东省重点科技攻关课题(97-66)

第一作者: 吴红棉(1953-),男,广东恩平人,硕士,副教授,硕士生导师,主要从事水产品加工及综合利用方面的研究。Tel: 0759-

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

珠母贝糖胺聚糖(PG2- 3- 2): 本课题组以马氏珠母贝全脏器为原料提取纯化所得。

硫酸软骨素 C: Sigma 产品。

肝素钠: 上海伯奥公司产品, 效价为 $150\text{IU}\cdot\text{mg}^{-1}$ 。

染色剂: 阿利新蓝。

吡啶、甲酸、盐酸: 分析纯。

醋酸纤维素薄膜: 规格为 $8\times 12\text{cm}$ 。

移植性肿瘤: S180 肉瘤、艾氏腹水癌(Ehrlich's Ascipes Carcinoma, 简称 EAC), 中山医科大学肿瘤研究中心提供, 广东医学院药理教研室肿瘤研究小组常规传代培养。

昆明(KM) 小鼠、日本大耳白兔: 广东医学院动物中心提供。

1.2 仪器设备

DYY-VI8 型稳压稳流电泳仪; FTS-175C 型傅立叶变换红外光谱仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 分析测试方法

醋酸纤维素薄膜电泳: 按文献[5]方法, 采用了二种缓冲液进行电泳: $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 吡啶- $0.47\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲酸(pH3.0), $8\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ 电泳 55min; $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸(pH 1.2), $2.5\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ 电泳 200~ 250min。以 0.2% 阿利新蓝染色。

红外光谱分析: 样品与 KBr 混磨后压片, 以红外光谱仪测定, 光谱扫描范围 $4000\text{cm}^{-1}\sim 400\text{cm}^{-1}$, 扫描 50 次。

抗肿瘤活性试验: 珠母贝糖胺聚糖 PG2- 3- 2 对移植性肿瘤 S₁₈₀肉瘤、艾氏腹水癌的抑瘤作用试验, 按文献[6]中“抗肿瘤药物实验方法”进行。

抗凝血活性试验: 按文献[7]方法进行。

2 结果与讨论

2.1 珠母贝糖胺聚糖的电泳行为

文献[4]采用了巴比妥钠、乙酸钡两种缓冲系统进行醋酸纤维素薄膜电泳, 以鉴别 PG2- 3- 2 的纯度。本文采用了另两种缓冲系统, 即吡啶- 甲酸缓冲系统及盐酸缓冲系统, 以对 PG2- 3- 2 的结构特征进行探索。PG2- 3- 2 的电泳图谱及相对迁移率分别见图 1 与表 1。

在吡啶- 甲酸缓冲系统中, PG2- 3- 2、6- 硫酸软骨素(C- 6- S)、肝素(Hp)的迁移率分别为 0.53、0.74、1.0, 说明 PG2- 3- 2 的一级结构与二种参比糖胺聚糖(GAG)均有差异, 但相对接近于 C- 6- S, 与 Hp 相比差距较大。

在盐酸缓冲系统中, 糖胺聚糖的迁移与其硫酸基含量呈正比。C- 6- S 的迁移率为 1.0, PG2- 3- 2 的迁移率为 0.72, 提示 PG2- 3- 2 的硫酸基含量低于 C- 6- S 的硫酸基含量。这点与元素分析的结果吻合^[4]。

表 1 PG2- 3- 2 的电泳相对迁移率

Tab. 1 The relative migration rate of PG2- 3- 2

电泳液	pH	Hp	C- 6- S	PG2- 3- 2
$0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 吡啶- $0.47\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲酸	3.0	1.0	0.74	0.53
$0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸	1.2		1.0	0.72

2.2 珠母贝糖胺聚糖的红外光谱分析

对照 PG2-3-2、肝素、硫酸软骨素的红外光谱图(图2),无论从谱峰的位置(波数)、谱峰的形状、谱峰的强度来看,PG2-3-2都与硫酸软骨素较为接近。对 PG2-3-2 的红外光谱图进行分析,在 3438cm^{-1} 处有强吸收,说明含有 -OH 的 O-H 键和 -NH_2 的 N-H 键伸缩振动;在 2939cm^{-1} 和 2839cm^{-1} 的两组较弱吸收,说明有 -CH_3 的 C-H 的伸缩振动和 $\text{-CH}_2\text{-}$ 的 C-H 的伸缩振动;在 1655cm^{-1} 有强吸收,示有 -COO 和 -NHCOCH_3 的 C=O 键的伸缩振动和非对称伸缩振动(各种糖的水化物的特征吸收),以及 N-H 键的弯曲振动;在 1558cm^{-1} 有中强吸收,示有 $\text{-NH}_2/\text{>NH/}-\text{NH}_3^+$ 的 N-H 弯曲振动;在 1438cm^{-1} 有弱吸收,在 1378cm^{-1} 有弱吸收,示有 $\text{-O-SO}_2\text{-R}$ 的 S=O 非对称伸缩振动;在 1320cm^{-1} 、 1256cm^{-1} 、 1076cm^{-1} 有中强吸收,示有 C-O-C 糖环的 C-O 伸缩振动; 1047cm^{-1} 有中强吸收,在 $800\text{cm}^{-1}\sim 900\text{cm}^{-1}$ 指纹区, 899cm^{-1} 有吸收,示有 -O-SO_2 的磺酰基的 C-O-S 伸缩振动(axial 配位), 850cm^{-1} 和 822cm^{-1} 有弱吸收,示有 -O-SO_3 的 C-O-S 键的伸缩振动,并分别表明在氨基己糖上的 C_4 (axial 配位)和 C_6 (equatorial 配位)上有硫酸酯键。从谱图的红外吸收波数分析可知: PG2-3-2 中含有 -OH (3488cm^{-1})、 -COO^- (1656cm^{-1}) 以及 -NH (1558cm^{-1})、 C-O-C (糖环, 1076cm^{-1})、 OSO_3^- (1047cm^{-1} 、 899cm^{-1} 、 850cm^{-1} 、 822cm^{-1}) 等结构或基团,这些均为糖胺聚糖的特征基团。

2.3 珠母贝糖胺聚糖的生理活性

2.3.1 对 S_{180} 肉瘤的抑瘤作用

对 S_{180} 肉瘤的抑瘤作用,试验结果见表2。试验结果表明: PG2-3-2 单用时有微弱的抑瘤作用,剂量为 $50\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,抑瘤率为 6.5%,剂量提高到 $200\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,抑瘤率亦提高到 14.1%,呈现一定的量效关系。尤其值得注意的是:剂量仅为 $50\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的 PG2-3-2 与化疗药 5-Fu 合用时,可使 5-Fu 的抑瘤率由原来的 34.5% ($P < 0.05$) 提高到 61.96% ($P < 0.001$)。前后剂量一致,均为 $25\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。提示 PG2-3-2 可显著增敏化疗药的抑瘤作用。

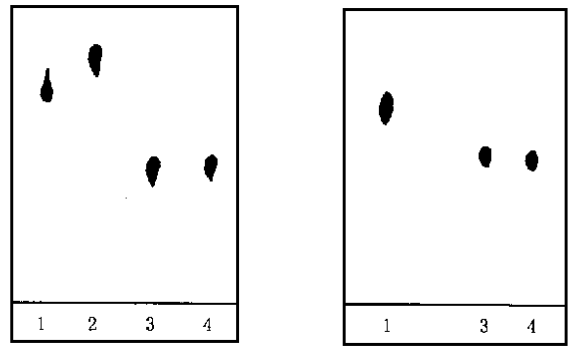


图1 PG2-3-2 醋酸纤维素薄膜电泳图谱

Fig. 1 A cetate film electrophoresis of fraction PG2-3-2
1. 硫酸软骨素; 2. 肝素; 3. PG2-3; 4. PG2-3-2

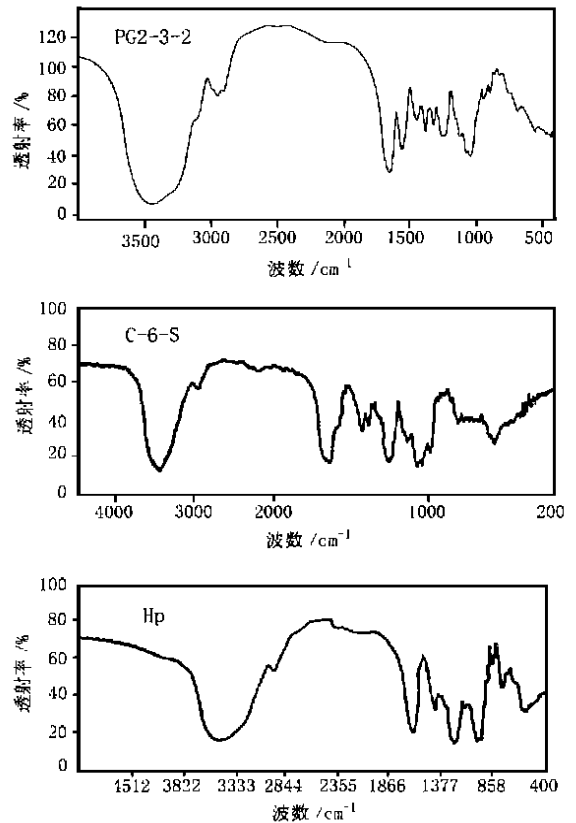


图2 PG2-3-2、6- 硫酸软骨素(C-6-S) 和肝素(Hp)的红外光谱图

Fig. 2 Infrared spectrometry of fraction PG2-3-2, Chondroitin 6- sulphate(C-6-S) and Heparin(Hp)

2.3.2 对艾氏腹水癌(EAC)的抑瘤作用

对艾氏腹水癌(EAC)的抑瘤作用, 试验结果见表3。从表3可见, PG2-3-2单用($5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)对EAC有明显的抑瘤效果, 抑瘤率达24.5%, 接近化疗药替加氟的抑瘤率($5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 抑瘤率为25.6%); PG2-3-2($5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)与替加氟($5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)合用, 则抑瘤率提高到46.3% ($P < 0.05$)。

表2 PG2-3-2对S₁₈₀肉瘤的抑瘤作用

Tab. 2 Inhibition to Sarcoma 180 of PG2-3-2

组别	剂量 ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	动物数	体重(g)		瘤重(g)	抑瘤率 (%)
			给药前	给药后		
(1)N.S对照组		13	21.6±2.5	30.6±4.7	0.92±0.4	
(2)5-FU	25	10	22.3±2.4	27.9±3.4	0.60±0.43	34.5*
(3)PG2-3-2	50	11	21.3±2.7	29.1±4.5	0.86±0.36	6.5
(4)PG2-3-2	200	12	22.0±2.5	28.3±3.7	0.79±0.47	14.1
(2)+(3)		12	22.2±2.7	26.6±1.8	0.35±0.16	61.96**

注: * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$ 。

表3 PG2-3-2对艾氏腹水癌(EAC)的抑瘤作用

Tab. 3 Inhibition to EAC of PG2-3-2

组别	剂量 ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	动物数	体重(g)		瘤重(g)	抑瘤率 (%)
			给药前	给药后		
(1)N.S对照组		10	24.6±2.2	30.7±4.1	2.12±1.16	
(2)替加氟	5	10	24.3±2.7	32.8±6.8	1.58±0.89	25.6
(3)PG2-3-2	5	10	24.8±3.2	29.6±2.9	1.60±0.77	24.5
(4)PG2-3-2	10	10	25.9±1.8	31.1±3.5	1.89±0.57	10.1
(2)+(3)		10	24.3±3.0	29.1±4.8	1.14±0.70	46.3*

注: * $P < 0.05$

2.3.3 体外抗凝血试验

体外抗凝血试验见表4, 结果提示PG2-3-2有一定的抗凝活性。

表4 三种浓度的PG2-3-2的体外抗凝作用

Tab. 4 Anticoagulant of PG2-3-2 in vitro

	凝血时间(S)	T值	P值
生理盐水	8.01±2.68		
2.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 肝素	18.64±2.22	10.16	< 0.001
0.1% PG2-3-2	10.09±3.29	1.30	> 0.05
0.25% PG2-3-2	16.55±3.33	5.28	< 0.001
0.5% PG2-3-2	18.30±3.56	6.10	< 0.001

3 结论

(1) 珠母贝糖胺聚糖PG2-3-2经醋酸纤维素薄膜电泳, 在吡啶-甲酸缓冲液中, 其相对迁移率为0.53, 相对接近于硫酸软骨素; 在盐酸缓冲液中其迁移率为0.72, 提示其硫酸基含量低于硫酸软骨素的。

(2) PG2-3-2的红外光谱图与硫酸软骨素的谱图接近; 谱图分析证实PG2-3-2中含有糖胺聚糖(GAG)的特征基团。

(3) 抗肿瘤试验表明: 珠母贝糖胺聚糖PG2-3-2对S₁₈₀肉瘤和艾氏腹水癌有一定的抑制作用, 与临床抗癌药(5-Fu与替加氟)合用可显著增敏抗癌药的抑瘤作用, 抑瘤率分别从34.5%和25.6%提高到61.96%和46.3%。

(4) 体外抗凝血试验表明: 珠母贝糖胺聚糖有一定的抗凝活性。

文献[4]对PG2-3-2所作的化学成分分析表明: 其氨基己糖中以氨基半乳糖为主, 提示在一级结构的重复单位组成上与软骨素有相似之处^[3,5], 但其氨基己糖与己糖醛酸比例悬殊, 提示该糖胺聚糖在结构上有其特殊性, 结合本文所作的电泳分析、红外光谱分析, 我们倾向认为: 本文纯化所得的珠母贝糖

胺聚糖级分 PG2- 3- 2 为一种组成特殊、但结构相对接近于硫酸软骨素的未见报道的贝类糖胺聚糖化合物, 其结构有待于进一步研究。由于其初步显示出具有抗肿瘤、抗凝血等生理活性, 因此有着广阔的研究开发前景。

参考文献:

- [1] 郝秀兰, 叶淑芳, 吴钟高, 等. 鲨鱼骨粘多糖抗凝血作用[J]. 中国海洋药物, 1992, (4): 17- 22.
- [2] 樊绘曾, 陈菊娣, 林克忠. 刺参酸性粘多糖的分离及其理化性质[J]. 药学学报, 1980, 15(5): 263- 269.
- [3] 商业部脏器生化制药情报中心站. 动物生化制药学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1983. 207- 209.
- [4] 吴红棉, 雷晓凌, 洪鹏志, 等. 珠母贝糖胺聚糖的纯化及其化学性质[J]. 水产学报, 2000, 25(6): 570- 574.
- [5] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1999. 398- 400.
- [6] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991. 1423- 1464.
- [7] 章元沛, 苏怀德. 药理学实验[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991. 95.