

一个鼠尾藻异多糖的结构特征及其抗氧化和抗结肠癌细胞增殖作用

曹 森, 周 容, 聂开颖, 罗焯辉*

华侨大学生物工程与技术系, 厦门 361021

摘要: 采用 DEAE-琼脂糖凝胶 CL-6B 凝胶层析对鼠尾藻多糖 STP-I 进行分离纯化。通过红外光谱法, 高碘氧化-Smith 降解法, 甲基化分析以及核磁共振法对多糖 STP-I 的结构进行分析。建立了 STP-I 的重复结构单位, STP-I 主要由 6- β -D-Glcp 和 4- α -D-Galp 组成, 还包括 5- α -L-Araf, 2, 3- α -D-Xylp, T- β -D-Xylp 和 T- β -D-Glcp 糖残基。STP-I 的分支度是 26.7%。基于自由基清除实验, STP-I 展现出高于维生素 C 的抗氧化活性, 其清除羟自由基和超氧自由基的 EC₅₀ 值分别是 0.15 mg/mL 和 1 mg/mL。STP-I 对人结肠癌细胞 Caco-2 具有抑制增殖的作用, 其 IC₅₀ 是 2.56 mg/mL, 同时 STP-I 对正常细胞没有杀伤作用。

关键词: 鼠尾藻; 结构分析; 抗氧化活性; 抗增殖作用

中图分类号: Q53

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.10.001

Structural Characterization of a Heteropolysaccharide from *Sargassum thunbergii* and Its Antioxidant and Anti-colon Cancer Cells Proliferation Activity

CAO Sen, ZHOU Rong, NIE Kai-ying, LUO Dian-hui*

Huaqiao University, Department of Bioengineering and Biotechnology, Xiamen 361021, China

Abstract: DEAE-Sepharose CL-6B column chromatography was used to separate and purify a polysaccharide STP-I from the algae *Sargassum thunbergii*. The structural assignment of STP-I was performed using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis, periodate oxidation-smith degradation, methylation analysis and nuclear magnetic resonance (NMR). The repeating unit of STP-I was therefore determined. Major sugar residues of STP-I were 6- β -D-Glcp and 4- α -D-Galp, other residues including 5- α -L-Araf, 2, 3- α -D-Xylp, T- β -D-Xylp and T- β -D-Glcp. The degree of branching (DB) of STP-I was 26.7%. On the basis of radical assays, STP-I exhibited higher scavenging activities of hydroxyl and superoxide radicals than Vitamin C with EC₅₀ values of 0.15 and 1 mg/mL, respectively. STP-I also exhibited the capability of anti-proliferation in human colon cancer cells Caco-2 with IC₅₀ value of 2.56 mg/mL, and cause little loss to common cells.

Key words: *Sargassum thunbergii*; structural analysis; antioxidant activity; anti-proliferation capability

马尾藻属隶属于褐藻门墨角藻目, 主要分布在亚洲, 是一种可食用的海藻。马尾藻属主要包括羊栖菜, 马尾藻, 鼠尾藻和海蒿子四个种。从马尾藻属提取的多糖具有多种生物活性, 例如抗氧化活性, 抗肿瘤活性, 免疫抑制作用及治疗纽卡斯尔病合并传染性支气管炎等^[1-3]。然而, 关于鼠尾藻多糖的研究报道很少。

鼠尾藻生长在中国及日本等亚洲地区, 其生长

迅速且价格低廉, 因此主要被用于鲍鱼和海参的饲料^[4]。研究表明, 鼠尾藻粗多糖具有降血糖, 抗肿瘤, 抗炎及抗凝血作用^[5-8]。关于鼠尾藻多糖的单糖组成已被报道^[6], 然而鼠尾藻纯化多糖的细节结构未见任何研究, 我们之前报道了鼠尾藻主要多糖 (STP-II) 的提取, 结构特征及生物活性^[9, 10], 鼠尾藻主要多糖是一种岩藻糖丰富的异多糖, 其具有抗氧化和抑制结肠癌细胞 Caco-2 增殖的能力。目前研究主要是从鼠尾藻中提取另一种新的多糖 (STP-I), 并通过甲基化-GC-MS 和核磁共振 (NMR) 等技术对其化学结构进行研究, 与之前报道的鼠尾藻主要多糖 STP-II 结构不同^[10]。

收稿日期: 2017-04-27 接受日期: 2017-07-10

基金项目: 华侨大学中青年教师科研提升资助计划 (ZQN-PY316); 国家自然科学基金 (31201314); 华侨大学研究生科研创新能力培育项目

* 通信作者 Tel: 86-592-6162346; E-mail: dianhuiluo@163.com

1 材料与amp;方法

1.1 材料与amp;化学试剂

鼠尾藻购自于辽宁省。单糖标准品 (Sigma Co., St Louis, MO, USA), 氯化硝基四氮唑蓝 (NBT, Amresco Inc., Solon, OH, USA), 辅酶 (NADH, Amresco Inc., Solon, OH, USA), 吩嗪硫酸甲酯 (PMS, Fluka Inc., St Louis, MO, USA), 重水 (D_2O , Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Andover, MA, USA) 购自于厦门泰京生物技术有限公司。DEAE Sepharose CL-6B 购自 Pharmacia 公司, 目前是 GE-医疗代理, 所有试剂都是分析纯。

1.2 多糖的提取和纯化

新鲜的鼠尾藻在太阳下曝晒 3 d, 待干燥后使用粉碎机粉碎。100 g 粉末用蒸馏水浸泡提取粗多糖, 提取液过滤后使用旋转蒸发仪浓缩, 浓缩液加入 4 倍体积的无水乙醇沉淀粗多糖, 沉淀干燥后得到 20 g 粗多糖。将粗多糖溶解在蒸馏水中, 使用 DEAE-Sepharose CL-6B 柱层析进行分离纯化, 自动部分收集器收集洗脱液, 洗脱液经过透析, 浓缩和冷冻干燥后得到纯化多糖^[9,10]。

1.3 多糖理化特性研究

采用高效体积排阻色谱法 (HPSEC) 研究多糖的均一性和分子质量 (MW), 使用安捷伦 1100 液相色谱仪, 配备昭和 Sugar KS-804 色谱柱和视差折光检测器 (RID)。洗脱液是超纯水, 流速是 1 mL/min, 根据标准葡聚糖 (蓝色葡聚糖, 葡聚糖 T10、T40、T70、T500 和葡萄糖) 的保留时间获得分子量标准曲线, 通过标准曲线和鼠尾藻多糖的保留时间计算鼠尾藻多糖的分子量^[9]。

使用苯酚-硫酸法和考马斯亮蓝法研究总糖和总蛋白含量。气相色谱法 (GC) 对单糖组成进行定性和定量, 使用 1 mol/L 盐酸-甲醇水解多糖, 三甲基硅烷化试剂进行衍生化 (六甲基二硅胺烷: 三甲基氯硅烷 = 2:1)^[10]。衍生化产物使用安捷伦气相色谱仪 6890 进行分析, 色谱柱是 HP-5 毛细管色谱柱 (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm), 检测器是氢火焰检测器 (FID), 载气是氢气 (45 mL/min)、空气 (400 mL/min) 和氮气 (20 mL/min), 检测器温度 280 °C, 柱流速 2 mL/min, 采用程序升温 180 ~ 220 °C (保持 2 min, 8 °C/min), 然后 220 °C 升温到 250 °C (保持 2 min, 20 °C/min)。

1.4 红外光谱 (FT-IR) 分析

1 ~ 2 mg 鼠尾藻多糖与 0.2 g 溴化钾粉末共同研磨并压片, 使用红外光谱仪检测, 条件如下: 检测频率 4000 ~ 400 cm^{-1} , 分辨率 4 cm^{-1} , 扫描 32 次。

1.5 高碘酸氧化与 Smith 降解

25 mg 多糖溶解在 12.5 mL 蒸馏水中, 加入 12.5 mL 30 mM 高碘酸钠, 放置溶液在暗处。每隔 6 h 取样 0.1 mL, 稀释到 25 mL 后在 223 nm 处读取吸光值。待吸光值稳定后加入 2 mL 乙二醇, 溶液装入透析袋 (截留分子量 3500), 流水和蒸馏水分别透析 24 h。向透析液中加入 80 mg 硼氢化钠室温反应 24 h, 使用 50% 乙酸中和至 pH 6.0, 如上方法透析。透析液浓缩至 10 mL 后, 取 1/3 冷冻干燥后进行 GC 分析, 剩余的液体加入 1 mol/L 硫酸在 25 °C 水解 40 h, 使用碳酸钡中和至 pH 6.0, 过滤, 滤液透析, 透析袋外部分进行 GC 分析, 袋内部分使用 4 倍体积无水乙醇沉淀, 上清和沉淀分别进行 GC 分析。

1.6 甲基化与 GC-MS 分析

30 mg 多糖甲基化后进行 FT-IR 检测, 3400 cm^{-1} 无吸收峰说明甲基化完全。完全甲基化后的样品被水解并衍生化^[10], 糖醇乙酸酯产物在气相-质谱联用仪 (GC-MS) 进行分析。使用安捷伦 HP7890A-5975C 联用仪, HP-5ms (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm) 毛细管色谱柱, 色谱柱温度从 160 °C (保持 1 min) 以 8 °C/min 的速度升温至 250 °C (保持 2 min), 进样口和检测器均是 280 °C, 氦气作为载气, 流速是 2 mL/min。

1.7 核磁共振分析

20 mg 样品在含有五氧化二磷的干燥器内干燥数天, 彻底干燥的多糖用重水 (D_2O , 99.96%) 溶解后冷冻干燥, 反复 3 次, 干燥样品溶解在 0.7 mL 重水中, 进行核磁共振 (NMR) 分析。使用 AVANCE-500 核磁共振仪 (Bruker Inc., Rheinstetten, Germany) 在 27 °C 下记录, 1D NMR 包括氢谱 (1H , 500 MHz, 延迟时间 1.0 s; 扫描次数 256; 收集时间 3.28 s) 和碳谱 (^{13}C , 125 MHz, 延迟时间 2.0 s; 扫描次数 8192; 收集时间 0.9 s)。2D NMR 使用标准的 Bruker 软件, 主要包括 $^1H/^{13}C$ 同核相关谱 ($^1H-^{13}C$ COSY, 延迟时间 1.6 s; 扫描次数 32; 谱宽 1824 Hz), 双量子滤波 COSY (DQF-COSY, 延迟时间 1.6 s; 扫描次数 32; 谱宽 1824 Hz), 全相关谱 (TOCSY, 延迟时间 2.0 s; 扫描次数 32; 谱宽 5000 Hz) 和异核单量子相干 (HSQC, 延迟时间 1.3 s; 扫描次数 32; 谱宽 1712 × 20833 Hz)^[10,11]。

1.8 生物活性分析

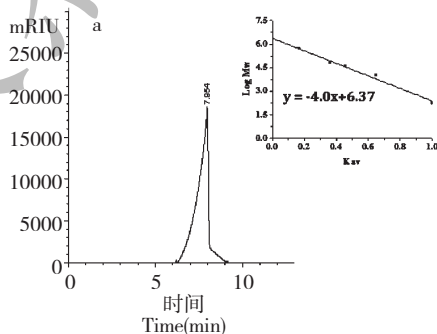
超氧自由基清除实验和羟基自由基清除实验参见先前描述的方法^[9,12]。使用高糖 DMEM 培养基培养结肠癌细胞 Caco-2 和成纤维细胞 L929,二氧化碳培养箱控制在 5% CO₂ 和 37 °C 条件下。当细胞生长到 80% 浓度时,进行细胞传代实验,每组实验做 3 个平行样。多糖 STP-I 抗 Caco-2 和成纤维细胞 L929 增殖作用研究采用 MTT 法,将细胞(5 × 10⁵/mL)种植在 96 孔板中,每孔 100 μL,培养 12 ~ 24 h 后,吸出培养基,加入 100 μL 含 STP-I 的培养基(STP-I 终浓度为 0.3、0.6、2.5 和 5 mg/mL),阳性对照组加入含顺铂的培养基(顺铂终浓度为 6.25、25、50、100 和 200 μg/mL),继续培养 36 h。加入 20 μL MTT(5 mg/mL)再培养 4 h,吸出全部培养基,加入 150 μL 二甲基亚砜,在 570 nm 下测吸光值,根据下面公式计算抑制率(1%)。

$$\text{抑制率}(1\%) = (1 - A_{570\text{nm, 样品组}} / A_{570\text{nm, 阴性组}}) \times 100\%$$

2 结果与讨论

2.1 STP-I 的提取纯化与理化特性

100 g 干燥的鼠尾藻粉末提取后得到粗多糖 STP,得率为 20%。STP 经 DEAE-Sepharose CL-6B 柱层析分离纯化后得到两个多糖组分(STP-I 和 STP-II),得率分别是 3.5% 和 63.75%,STP-II 先前已经报道^[10],这里主要研究 STP-I。STP-I 经高效液相色谱显示单一的洗脱峰,说明 STP-I 是均一物质(图 1a)。STP-I 的糖含量为 95.6%,不含糖醛酸,蛋白质含量是 0.39%。GC 分析表明 STP-I 主要由阿拉伯糖,木糖,半乳糖和葡萄糖组成,摩尔比为 1 : 1.4 : 2.3 : 3.2。根据分子量标准曲线(图 1a)计算得出 STP-I 的平均分子量为 29 kDa。



2.2 高碘酸氧化与 Smith 降解

STP-I 能够被高碘酸氧化,40 h 后氧化完成,高碘酸的消耗量(0.191 mmol)大于 2 倍甲酸生成量(0.065 mmol),说明存在(1→)或(1→6)糖苷键。高碘酸氧化产物降解后进行 GC 分析,检测出木糖,说明木糖存在不被高碘酸氧化的糖苷键型,即(1→3)-糖苷键型。未检测出半乳糖,说明半乳糖全部被氧化,此外检测出赤鲜醇和甘油,说明存在(1→)-糖苷键,(1→6)-糖苷键,(1→2)-糖苷键,(1→2,6)-糖苷键,(1→4)-糖苷键或(1→4,6)-糖苷键。袋内无沉淀说明 STP-I 全部被氧化或可氧化与不可氧化糖苷键间隔排列。

2.3 红外与甲基化-GC-MS 分析

STP-I 的红外光谱如图 1b,3400 cm⁻¹左右有一个强的宽峰,是 O-H 伸缩振动,在 2900 cm⁻¹左右有微弱的 C-H 伸缩振动,在 1400 ~ 1200 cm⁻¹的吸收峰是 C-H 变角振动,在 1100 cm⁻¹左右的吸收峰 C - O 伸缩振动,这四个吸收峰是糖类物质的特征吸收峰,由此可以判断 STP-I 是糖类物质。STP-I 甲基化后的红外光谱图如图 1c 所示,与图 1b 相比,在 3400 cm⁻¹处没有 O-H 吸收峰,表明甲基化完全。STP-I 的 GC-MS 分析结果如表 1 所示,含有 5 个碎片,主要成分是 1,5,6-三-O-乙酰基-2,3,4-三-O-甲基-D-葡萄糖醇和 1,4,5-三-O-乙酰基-2,3,6-三-O-甲基-D-半乳糖醇。

2.4 NMR 分析

¹H NMR 光谱图(图 2a)在异头区有 5 个信号,分别是 δ 5.25、5.05、4.87、4.37 和 4.32 ppm,峰面积比为 1:3:3:7:2。¹H NMR 不能提供异头区全部的信息,在 HSQC 图谱(图 3a)中发现有另外一个异头氢信号在 δ 4.64 ppm,该信号在¹H NMR 中被 HOD

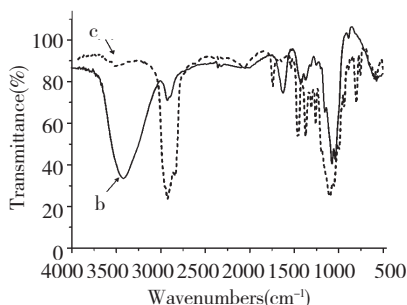


图 1 STP-I 的 HPLC 图与分子量标准曲线(a)及 STP-I(b)和甲基化 STP-I(c)的红外光谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of STP-I with a standard molecular weight curve (a), and IR spectra of STP-I (b) and methylated STP-I (c)

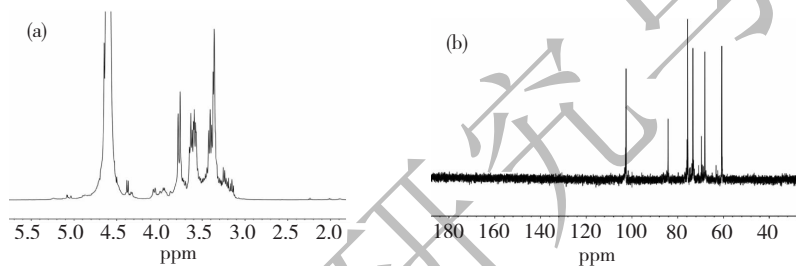
表 1 STP-I 甲基化产物的 GC-MS 分析结果

Table 1 GC-MS analysis results of methylated products of STP-I

甲基化产物 Methylation product	摩尔比 Molar ratio	碎片 Mass fragment (m/z)	键型 Linkage type
2,3,4,6--Me ₄ -Glc	1	43,45,71,87,101,117,129,145,161,205	1→
2,3-Me ₂ -Ara	1.5	43,87,113,117,129,233	1→5
2,3,6-Me ₃ -Gal	3.5	43,45,87,99,101,113,117,233	1→4
2,3,4-Me ₃ -Glc	3.2	43,87,99,101,117,129,161	1→6
4-Me-Xyl	1.1	43,44,96,108,138,182	1→2,3

信号掩盖。六个异头氢信号代表六种不同类型的糖苷键,根据¹³C NMR (图 2b) 和 HSQC 光谱图 (图 3a),对应的异头碳信号分别为 δ 99.68、 δ 106.85、 δ 98.45、 δ 102.76、 δ 102.78 和 δ 101.92 ppm,其他碳

的化学位移结果如表 2 所示。这六种糖基团按照氢的化学位移递减顺序在 TOCSY (图 3b), 2D-COSY (图 4a) 和 DQF-COSY (图 4b) 中分别以 A、B、C、D、E、F 标记。

图 2 鼠尾藻 STP-I 的¹H 谱 (a) 和¹³C 谱 (b)Fig. 2 ¹H NMR (a) and ¹³C NMR (b) spectra of polysaccharide STP-I from *S. thunbergii*

A 的异头氢化学位移为 δ 5.25 ppm, $^1J_{1,2}$ 为 3, 表明 A 是 α 型残基^[13]。残基 A 的异头碳信号在 δ 99.68 ppm, C-1 ~ C-5 化学位移通过 HSQC 光谱图得到归属, 根据化学位移可确认残基 A 是 T- α -D-Xylp^[14]。

在¹H NMR 光谱图中, 残基 B 的化学位移为 δ 5.05 ppm, $^1J_{1,2}$ 为 1, 残基 B 应为 α 型残基。异头碳的化学位移为 δ 106.85 ppm, H-1, H-2, H-3 和 H-4 的化学位移根据¹H-¹H COSY 和 DQF-COSY 光谱图

进行归属。从 TOCSY 光谱图中, 可以确定 H-5 在 δ 3.99 ppm。残基 B 相应的碳的化学位移通过 HSQC 光谱图归属 (表 2)。异头氢 $^3J_{1,2} < 2$, 异头碳的信号在 δ 103 ~ 112 ppm, ¹³C NMR 中信号在 δ 82 ~ 84 ppm 显示 C-4 位置的碳为醛糖的碳或者 C-5 位置的碳为酮糖的碳, 这表明糖残基 B 为呋喃构型。根据文献报道^[11,14-16], 可以确认残基 B 为 \rightarrow 5)- α -L-Araf-(1→。

残基 C 的 H-1 信号在 δ 4.87 ppm, $^1J_{1,2}$ 为 1.5,

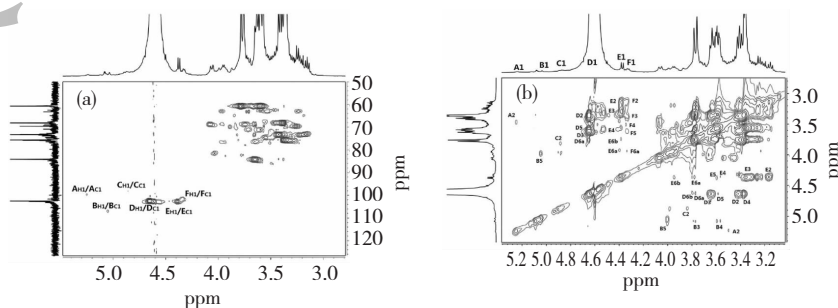


图 3 鼠尾藻 STP-I 的 HSQC 谱 (a) 和 TOCSY 谱 (b)

Fig. 3 HSQC (a) and TOCSY (b) spectra of polysaccharide STP-I from *S. thunbergii*

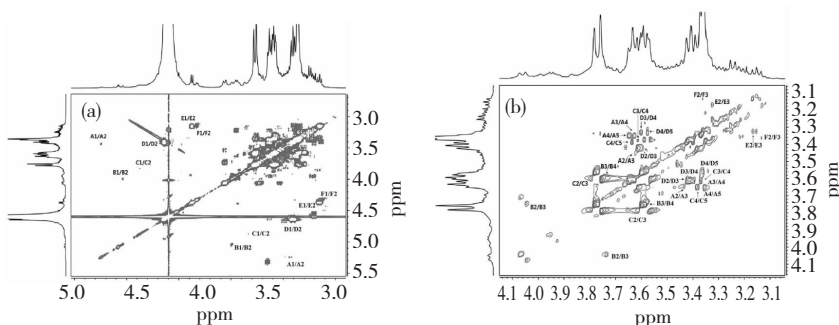


图4 鼠尾藻 STP-I 的¹H-¹H COSY (a) 和 DQF-COSY 谱 (b)

Fig. 4 ¹H-¹H COSY (a) and DQF-COSY (b) spectra of polysaccharide STP-I from *S. thunbergii*

通过¹H-¹H COSY 的交叉峰和 DQF-COSY 光谱图可以归属 H-1 ~ H-5 的化学位移,根据 HSQC 光谱图归属相应的碳的化学位移。C-2 和 C-3 位置的碳的化学位移与标准值相比向低场移动,表明在这两个位置有连接。与文献^[17]报道对比,残基 C 应该是→2,3)-α-D-Xylp-(1→。

过¹H-¹H COSY 的交叉峰和 DQF-COSY 光谱图可以归属 H-2, H-3, H-4 和 H-5 的化学位移, H-6 的化学位移由其在 TOCSY 光谱图与 H-1 的相关峰得到归属。根据 HSQC 光谱图归属相应的碳的化学位移。C-4 位置的碳的化学位移与标准值相比向低场移动,表明在这个位置有连接。与文献^[18,19]报道对比,残基 D 是→4)-α-D-Galp-(1→。

残基 D 的 H-1 信号在 4.64 ppm, ¹J_{1,2} 为 1.5, 通

比,残基 D 是→4)-α-D-Galp-(1→。

表 2 多糖 STP-I 在重水 27 °C 下的¹H 和¹³C 化学位移

Table 2 ¹H and ¹³C chemical shifts of polysaccharide STP-I recorded in D₂O at 27 °C

编号 No.	糖残基 Glycosyl residue	化学位移 Chemical shift, δ (ppm)							
		1	2	3	4	5	6a	6b	
A	T-α-D-Xylp	H	5.25	3.44	3.62	3.35	3.65		
		C	99.68	73.21	71.52	68.53	61.34		
B	→5)-α-L-Araf-(1→	H	5.05	4.04	3.76	3.59	3.99		
		C	106.85	81.42	77.85	84.18	69.36		
C	→2,3)-α-D-Xylp-(1→	H	4.87	3.81	3.62	3.37	3.64		
		C	98.45	76.46	84.18	68.78	61.37		
D	→4)-α-D-Galp-(1→	H	4.64	3.41	3.60	3.33	3.57	3.80	3.77
		C	102.76	73.46	70.92	76.40	69.57	60.96	
E	→6)-β-D-Glcp-(1→	H	4.37	3.16	3.32	3.55	3.59	3.92	3.74
		C	102.78	73.33	76.03	70.50	75.66	69.15	
F	T-β-D-Glcp	H	4.32	3.14	3.36	3.50	3.62	3.95	-
		C	101.92	73.12	75.53	71.72	75.43	62.72	

-: Not obtained due to low resolution.

残基 E 和 F 的异头氢信号分别为 δ 4.37 ppm (³J_{1,2} 为 8) 和 δ 4.32 ppm (³J_{1,2} 为 7), 异头氢信号 δ < 5 ppm, 异头碳信号 δ > 102 ppm, 表明残基 E 和 F 为 β-D-吡喃糖^[18]。残基 E 和 F 的 H-2 和 H-3 根据 DQF-COSY 光谱图进行归属, H-4、H-5 和 H-6 的化学位移通过其在 TOCSY 光谱图中与 H-1 的相关峰进行归属。残基 E 和 F 相应的 C-1 ~ C-6 的化学位移根据 HSQC 光谱图进行归属。残基 E 的 C-6 (δ 69.15 ppm) 化学位移向低场移动, 表明残基 E 在 C-6 位置有连接, 综合甲基化和 NMR 结果, 并与文献

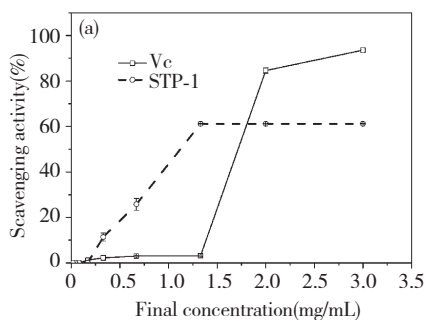
报道^[20]对比, 残基 E 是→6)-β-D-Glcp-(1→, 残基 F 是 T-β-D-Glcp。

残基 A (T-β-D-Xylp) 和残基 F (T-β-D-Glcp) 都是末端糖残基, 残基 A 和 F 的摩尔数应该等同于支链残基 C 的摩尔数, 根据 NMR, 残基 B 和 F 摩尔比是 3:2, 推测残基 A、B 和 F 摩尔比是 1:3:2。残基 D (δ 4.64 ppm) 由于被 HOD 峰覆盖, 无法检测其摩尔浓度, 由单糖组成的实验, 残基 E 和 F 是残基 D 的 1.39 倍, 推测 D、E 和 F 摩尔比是 6.5:7:2。推测残基 D 和残基 E 的摩尔比为 1:1.08。根据公式分支

度值 $DB = (NT + NB) / (NT + NB + NL)$ 计算 STP-I 的分支度值为 26.7%^[17], NT、NB 和 NL 分别是末端残基、支链残基和线性链残基。甲基化结果按上述公式计算得到的分支度为 27.2%, 与 NMR 结果相符。

2.5 STP-I 抗氧化活性分析

超氧自由基清除实验采用 PMS/NADH 体系还原 NBT 实验。Fe-EDTA 与 H_2O_2 在抗坏血酸的存在下产生羟基自由基, 羟基自由基攻击脱氧核糖得到一种产物, 与 2-硫代巴比妥酸加热条件下生成一种粉红色化合物, 采用上述反应体系测多糖清除羟自



由基的能力^[21]。

维生素 C (Vc) 作为阳性对照, EC_{50} 值显示清除能力 50% 时的效应浓度。结果如图 5 所示, STP-I 对超氧和羟基自由基的清除作用分别在测试浓度 0.33 ~ 3 mg/mL 和 0.17 ~ 1.33 mg/mL 范围内呈浓度依赖型。STP-I 对超氧和羟基自由基的清除能力 EC_{50} 值分别是 1 mg/mL 和 0.15 mg/mL, 而 Vc 的 EC_{50} 值分别是 1.67 mg/mL 和 0.51 mg/mL, 说明 STP-I 能有效清除超氧和羟基自由基, 且其清除能力均强于 Vc。

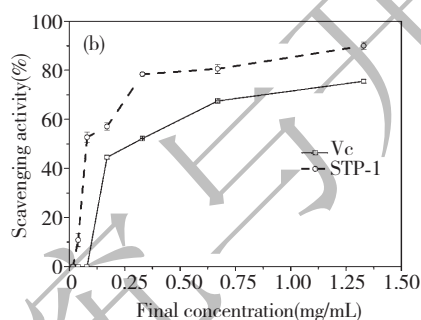


图 5 STP-I 对超氧自由基 (a) 和羟基自由基 (b) 的清除作用

Fig. 5 Scavenging effects of STP-I on superoxide radical (a) and hydroxyl radical (b)

2.6 STP-I 抗癌细胞增值能力测定

采用 MTT 法研究 STP-I 对人结肠癌细胞 Caco-2 生长的抑制作用, 结果如图 6 所示。STP-I 在实验浓度 0.3 ~ 5 mg/mL 范围内能够有效抑制结肠癌细胞 Caco-2 的增殖, 且呈现剂量效应, IC_{50} 值是 2.56 mg/

mL。顺铂作为阳性对照显示出更强的抗 Caco-2 细胞增殖能力 ($IC_{50} = 35.09 \mu\text{g/mL}$)。然而, 顺铂对正常成纤维细胞 L929 展现出更强的杀伤作用, STP-I 在抑制结肠癌细胞 Caco-2 增殖的同时并未对正常细胞 L929 造成损失。

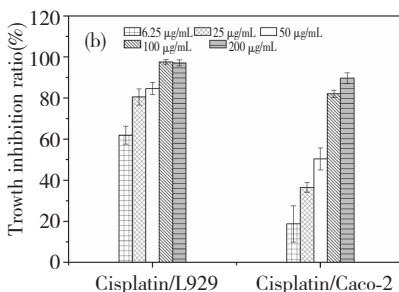
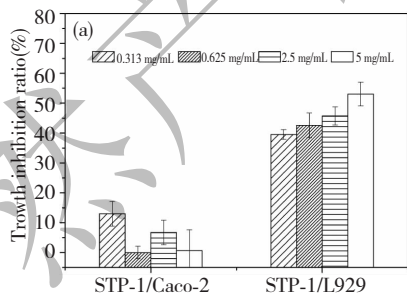


图 6 STP-I (a) 和顺铂 (b) 对结肠癌细胞 Caco-2 和小鼠成纤维细胞 L929 增殖抑制作用

Fig. 6 Inhibitory effects of STP-I (a) and Cisplatin (b) on colon cancer cells Caco-2 and mouse fibroblast cells L929 growth

3 结论

鼠尾藻粗多糖经 DEAE Sepharose CL-6B 柱层析分离纯化后得到 STP-I, 其主要由 $\rightarrow 6) -\beta\text{-D-Glcp-}(1 \rightarrow, \rightarrow 4) -\alpha\text{-D-Galp-}(1 \rightarrow$ 和 $\rightarrow 5) -\alpha\text{-L-Araf-}(1 \rightarrow$ 构成主链核心部分。基于 $DB = (NT + NB) / (NT +$

NB + NL), STP-I 的分支度是 26.7%。STP-I 能有效清除超氧和羟基自由基, 其 EC_{50} 值分别是 1 mg/mL 和 0.15 mg/mL。STP-I 能有效抑制人结肠癌细胞 Caco-2 的增殖, 同时对正常细胞 L929 不会产生杀伤作用。

STP-I 不是鼠尾藻主要多糖, 其结构与先前报道

的鼠尾藻主要多糖 STP-II 不同^[9,10],STP-I 是中性强多糖,其展现出较好的抗氧化与抗癌细胞 Caco-2 增殖能力,这可能与其低分支度有关^[14,17]。

参考文献

- Chen XM, Nie WJ, Fan SR, *et al.* A polysaccharide from *Sargassum fusiforme* protects against immunosuppression in cyclophosphamide-treated mice. *Carbohydr Polym*, 2012, 90: 1114-1119.
- Ye H, Wang KQ, Zhou CH, *et al.* Purification, antitumor and antioxidant activities in vitro of polysaccharides from the brown seaweed *Sargassum pallidum*. *Food Chem*, 2008, 111: 428-432.
- Li LJ, Li MY, Li YT, *et al.* Adjuvant activity of *Sargassum pallidum* polysaccharides against combined Newcastle disease, infectious bronchitis and avian influenza inactivated vaccines. *Mari Drugs*, 2012, 10: 2648-2660.
- Tang ZH(汤志宏), Liu ZY(刘振宇), Wang J(王军), *et al.* Development of *Sargassum thunbergii* microsatellites and genetic diversity description of Qingdao population. *Periodical Ocean Univ China*(中国海洋大学学报), 2015, 45: 35-40.
- Huang ZX(黄智璇), Mei XT(梅雪婷), Xu DH(许东晖), *et al.* Protective effects of polysaccharide of *Spirulina platensis* and *Sargassum thunbergii* on vascular of alloxan induced diabetic rats. *China J Chin Mater Med*(中国药理学杂志), 2005, 30: 211-215.
- Zhuang C, Itoh H, Mizuno T, *et al.* Antitumor active fucoidan from the brown seaweed, umitoranoo (*Sargassum thunbergii*). *Biosci Biotechnol Biochem*, 1995, 59: 563-567.
- Itoh H, Noda H, Amano H, *et al.* Immunological analysis of inhibition of lung metastases by fucoidan (GIV-A) prepared from brown seaweed *Sargassum thunbergii*. *Anticancer Res*, 1995, 15: 1937-1947.
- Wei YX(魏玉西), Li J(李敬), Zhao AY(赵爱云), *et al.* Preliminary studies on the preparation of polysaccharide from Kuntze (PST) and its anticoagulation activity. *Chin J Mar Drugs*(中国海洋药物), 2006, 25: 41-44.
- Yuan X, Zeng Y, Nie K, *et al.* Extraction optimization, characterization and bioactivities of a major polysaccharide from *Sargassum thunbergii*. *PLoS One*, 2015, 10: e0144773.
- Luo D, Yuan X, Zeng Y, *et al.* Structure elucidation of a major fucopyranose-rich heteropolysaccharide (STP-II) from *Sargassum thunbergii*. *Carbohydr Polym*, 2016, 143: 1-8.
- Liu J, Wen XY, Kan J, *et al.* Structural characterization of two water-soluble polysaccharides from black soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *J Agric Food Chem*, 2015, 63: 225-234.
- Wang ZY, Zhao YY, Su TT, *et al.* Characterization and antioxidant activity in vitro of polysaccharide purified from *Rana chensinensis*. *Carbohydr Polym*, 2015, 126: 17-22.
- Yang Y, Zhang JS, Liu YF, *et al.* Structural elucidation of a 3-O-methyl-D-galactose-containing neutral polysaccharide from the fruiting bodies of *Phellinus igniarius*. *Carbohydr Res*, 2007, 342: 1063-1070.
- Chen L, Liu J, Zhang Y, *et al.* Structural, thermal, and anti-inflammatory properties of a novel pectic polysaccharide from alfalfa (*Medicago sativa* L.) stem. *J Agric Food Chem*, 2015, 63: 3219-3228.
- Jing Y, Zhu J, Liu T, *et al.* Structural characterization and biological activities of a novel polysaccharide from cultured *Cordyceps militaris* and its sulfated derivative. *J Agric Food Chem*, 2015, 63: 3464-3471.
- Liang F, Hu C, He Z, *et al.* An arabinogalactan from flowers of *Chrysanthemum morifolium*; structural and bioactivity studies. *Carbohydr Res*, 2014, 387: 37-41.
- Chen L, Liu J, Zhang Y, *et al.* A novel alkaline hemicellulosic heteroxylan isolated from alfalfa (*Medicago sativa* L.) stem and its thermal and anti-inflammatory properties. *J Agric Food Chem*, 2015, 63: 2970-2978.
- Rout D, Mondal S, Chakraborty I, *et al.* The structure of a polysaccharide from fraction-II of an edible mushroom, *Pleurotus florida*. *Carbohydr Res*, 2006, 341: 995-1002.
- Pramanik M, Mondal S, Chakraborty I, *et al.* Structural investigation of polysaccharide (Fr. II) isolation from the aqueous extract of an edible mushroom, *Pleurotus sajor-caju*. *Carbohydr Res*, 2005, 340: 629-636.
- Ghosh K, Chandra K, Roy SK, *et al.* Structural investigation of a polysaccharide (Fr. I) isolated from the aqueous extract of an edible mushroom, *Volvariella diplasia*. *Carbohydr Res*, 2008, 343: 1071-1078.
- Cheng ZY, Ren J, Li YZ, *et al.* Study on the multiple mechanisms underlying the reaction between hydroxyl radical and phenolic compounds by qualitative structure and activity relationship. *Bioorgan Med Chem*, 2002, 10: 4067-4073.