

铜绿微囊藻酸性多糖药理作用的研究

王习达^{1,2}, 吴国荣¹

(1. 南京师范大学生命科学学院 210097, 江苏 南京)

(2. 江苏省水产技术推广站 210036, 江苏 南京)

[摘要] 采用南京师范大学生命科学学院资源生物学实验室提取分离的铜绿微囊藻酸性多糖(MAAP), 研究体外清除超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)的作用以及对 S-180 肿瘤细胞模型小鼠体重、胸腺、脾脏指数、红细胞和肝脏 GSH 含量的影响. 结果显示浓度小于 $18 \mu\text{g/mL}$ 的 MAAP 样品与 $O_2^{\cdot-}$ 的清除率呈正相关($R^2 = 0.9885$). MAAP 对 S-180 引起的小鼠体重减轻、胸腺、脾脏等免疫器官萎缩有明显的保护作用. 高剂量治疗组($200 \text{ mg/kg} \cdot \text{d}$)、低剂量治疗组($80 \text{ mg/kg} \cdot \text{d}$)小鼠血液红细胞的 GSH 含量升高, 且各项指标高剂量治疗组与模型组均达到显著差异. 表明在一定范围内, MAAP 具有提高机体免疫力、抗氧化及抑制体内肿瘤的作用.

[关键词] 铜绿微囊藻, 酸性多糖, 抗氧化作用, 抗肿瘤

[中图分类号] R282.71, S567, [文献标识码] A, [文章编号] 1001-4616(2005)04-0099-04

Study on the Pharmacologic Functions of Acidic Polysaccharides from *Microcystic Aeruginosa*

Wang Xida^{1,2}, Wu Guorong¹

(1. School of Life Science, Nanjing Normal University, 210097, Nanjing, China)

(2. Jiangsu Provincial Aquatic Technology Extension Station, 210036, Nanjing, China)

Abstract The pharmacologic functions of Acidic polysaccharides from *Microcystic aeruginosa* (MAAP) are studied in this paper. The experimental results show that MAAP is positively co-related with the eliminate rate of $O_2^{\cdot-}$ ($R^2 = 0.9885$) when its concentration is lower than $18 \mu\text{g/mL}$. MAAP obviously improves the immune function of model mice, and protects its thymus, spleen and body weight. With the dosage range from $200 \text{ mg/(kg} \cdot \text{d)}$ to $80 \text{ mg/(kg} \cdot \text{d)}$, MAAP can improve GSH content in liver, blood of the treated mice. All these indicate that MAAP can inhibit the growth of tumor S-180 in mice in a certain range.

Key words *Microcystic Aeruginosa*, acidic polysaccharides, anti-oxidant activity, anti-tumor

多糖作为天然高分子化合物,是构成生命的四大基本物质之一,具有多种生理活性.自 20 世纪 50 年代发现真菌多糖具有抗癌活性以来,多糖的研究受到越来越广泛的重视.天然多糖类成分已经被证明是一种非特异性免疫增强剂,并且具有抗衰老、降血压、抗肿瘤等活性^[1].从天然多糖中筛选抗衰老、抑制肿瘤药物,已为世界各国科研工作者所瞩目.

铜绿微囊藻(*Microcystic Aeruginosa*)是一种广泛存在于水域生态系统的植物,属于蓝藻门色球藻科微囊藻属.蓝藻富含多糖,有关螺旋藻(*Spirulina Platensis*)多糖提高免疫力及抑制肿瘤的报道在国内外被广泛证实^[2,3],这为铜绿微囊藻多糖的免疫和抗肿瘤研究提供了基础.作者此前已成功地分离出铜绿微囊藻酸性多糖(MAAP)并初步鉴定了其理化性质和结构^[4].分析显示,MAAP 含有较高水平的糖醛酸,据报道,糖醛酸的存在是许多酸性多糖具有特殊生理活性的重要原因之一^[5].本文首次研究铜绿微囊藻酸性多糖(MAAP)的体外抗氧化效应和体内对荷瘤小鼠的保护作用,为更深入地研究其药效功能提供参考.

收稿日期:2004-12-18.

基金项目:江苏省自然科学基金资助项目(2000SWX0000SJ3).

作者简介:王习达,1977—,硕士研究生,主要从事植物化学与天然药物的学习与研究.此同时 E-mail: xidawang@163.com

通讯联系人:吴国荣,1947—,教授,主要从事植物生理生化的教学与研究. E-mail: wuguorong@njnu.edu.cn

万方数据

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 铜绿微囊藻酸性多糖样品

铜绿微囊藻酸性多糖(MAAP) ,南京师范大学生命科学学院资源生物学实验室提取制备 ,参照预实验结果^[4] ,实验前用生理盐水配成不同浓度的溶液.

1.1.2 肿瘤细胞株

选用 Sarcom-180 (S-180)腹水瘤细胞 ,为南京师范大学分子医学重点实验室传代保存细胞.

1.1.3 试剂

超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒、丙二醛(MDA)试剂盒、还原型谷胱甘肽(GSH)试剂盒 ,均购自南京建成生物工程研究所.

1.1.4 实验用小鼠

NIH 雄性小鼠 ,5 周龄 ,体重 18 ~ 20 g. 购自南京医科大学实验动物中心.

1.2 方法

1.2.1 体外清除超氧阴离子作用

参照 Stewert R C ,Bewley J D 方法^[6] .平均清除率(average clearance rate)的计算 :

CI =(A_{对照} - A_{样品}) × 100 % / A_{对照} ^[7]

1.2.2 建立腹水瘤小鼠模型

取连续接种 S - 180 腹水瘤细胞 5 d 后的小鼠 ,腹部皮肤消毒 ,用无菌空针抽吸腹水 ,生理盐水稀释 ,苔芬蓝染色后用血球计数板在倒置显微镜下计数 ,计算存活率 ,稀释细胞悬液使活细胞达到 10⁷ 个/mL ,对模型组和治疗组每只小鼠腹腔注射 0. 2 mL 该细胞悬液.

1.2.3 动物分组

实验小鼠在动物房饲养 1 周后开始实验 ,随机分成 4 组 ,每组 30 只.

- (1) 正常对照组 :对每只正常小鼠每隔 1 d 腹腔注射生理盐水 0. 2 mL ,共 14 d.
- (2) 模型对照组 :建模 24 h 后 ,每只小鼠腹腔注射生理盐水 0. 2 mL ,其后每隔 1 d 重复注射 1 次 ,共 14 d.

(3) 低剂量治疗组 :建模 24 h 后 ,每只小鼠腹腔注射低剂量 MAAP 溶液 0. 2 mL(即 80 mg/kg · d ,根据小鼠体重变化调整糖浓度) ,其后每隔 1 d 重复注射 1 次 ,共 14 d.

(4) 高剂量治疗组 :建模 24 h 后 ,每只小鼠腹腔注射 MAAP 高剂量溶液 0. 2 mL(200 mg/kg · d) ,其后每隔 1 d 重复注射 1 次 ,共 14 d.

1.2.4 实验过程处理

保持室温 22 ± 1℃ ,固定鼠笼和垫料 ,小鼠均自由进食 .每 2 d 称 1 次体重 ,并记录小鼠的毛色、饮食及活动状况 .末次给药后禁食 12 h ,尾部取血 .然后将小鼠脱颈椎处死 ,分别剖取胸腺、脾脏、肝脏 ,称取胸腺、脾脏重量 ,并测定红细胞和肝脏中 GSH 含量.

1.2.5 数据统计学方法

实验数据均以 \bar{X} (平均值) ± S 表示 ,采用 SPSS 11. 5 软件包进行统计分析 ,方差齐性者 ,进行 LSD 检验 ,反之则进行 Dunnett ' t 检验 ,均以 P < 0. 05 为显著差异.

2 结果与分析

2.1 MAAP 体外去除 O₂⁻ 作用

以超氧阴离子清除率为纵坐标 ,样品浓度做横坐标 ,如图 1 显示 :浓度小于 18 μg/mL 的 MAAP 样品对超氧阴离子的清除作用随 MAAP 浓度而增加(R² = 0. 988 5) ,呈正相关 .在浓度为 18 μg/mL 时清除率达到最高 ,为 48. 6% ,接近一个类 SOD 活性单位 .浓度超过 18 μg/mL 之后 MAAP 样品对超氧阴离子

— 100 万方数据

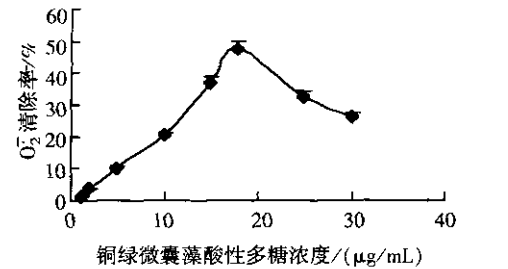


图 1 铜绿微囊藻酸性多糖对超氧阴离子的清除作用

的清除作用随其浓度增加而下降. 该实验体系是通过抑制 NBT 光化还原来测定的 ,MAAP 浓度大于 18 $\mu\text{g/mL}$ 之后 ,清除作用下降的原因可能是 MAAP 还原性基团对 NBT 在光下还原的促进.

2.2 MAAP 对荷 S-180 腹水瘤小鼠生长状态的影响

实验过程中 ,正常对照组小鼠生长状况良好 ,体毛滑顺 ,有光泽 ,活动正常. 而模型对照组逐渐表现出体毛散乱 ,毛色暗淡无光泽 ,自实验第 6 天 ,有部分小鼠表现出行动迟缓 ,腹部鼓胀 ,用手触摸可感觉到似有水肿 ,且症状逐日加重 ,直至浑身颤抖. 到第 11 天首次出现模型组小鼠死亡. 两个治疗组无论在体重、毛色还是活动状态方面都要优于模型组 ,低剂量组在第 13 天有 1 只小鼠死亡 ,高剂量组除到实验后期出现毛色较凌乱外 ,其余外在表现基本正常.

2.3 MAAP 对小鼠体重的影响

体重是小鼠生长状况直接的量化指标 ,每天称量小鼠质量 ,借以监测肿瘤细胞在腹水中的生长情况. 各组每隔 1 d 的体重变化的统计结果如表 1 所示 ,正常对照组 14 d 内体重增加 $11.5 \pm 0.4 \text{ g}$,而模型组体重增加为 $-3.1 \pm 2.3 \text{ g}$,MAAP 低剂量组与高剂量组体重均有增长 ,但较对照缓慢. 自第 10 天开始 ,正常对照组和高剂量治疗组与模型组出现显著差异 ,到第 14 天出现极显著差异. 实验第 14 天后 ,低剂量组也与模型组体重表现出显著差异. 而两个治疗组小鼠体重与正常对照组之间始终没有表现出显著的差异性.

表 1 MAAP 对小鼠体重的影响/g

处理时间/d							
0	2	4	6	8	10	12	14
① 18.7 ± 1.4	19.4 ± 1.9	20.1 ± 1.9	22.4 ± 1.8	24.6 ± 2.1	$26.3 \pm 2.2^{\Delta}$	$28.1 \pm 2.1^{\Delta}$	$30.2 \pm 1.8^{\Delta\Delta}$
② 18.6 ± 1.2	18.8 ± 1.4	18.8 ± 1.8	18.6 ± 2.3	18.3 ± 2.4	$17.9 \pm 2.5^*$	$17.1 \pm 3.1^*$	$15.9 \pm 3.5^{**}$
③ 18.4 ± 1.1	18.4 ± 1.3	18.8 ± 1.4	19.0 ± 1.7	19.5 ± 1.9	20.2 ± 2.3	21.3 ± 2.6	22.2 ± 2.8
④ 18.9 ± 1.3	19.1 ± 1.5	19.9 ± 1.9	21.8 ± 2.1	22.2 ± 2.4	23.8 ± 2.7	25.2 ± 2.6	26.8 ± 2.7

* ① 正常对照组 ,② 模型对照组 ,③ 低剂量治疗组 ,④ 高剂量治疗组 ;

* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ VS ① ; $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ VS ②.

2.4 MAAP 对荷瘤小鼠免疫器官重量的影响

结果如表 2 所示 ,模型组荷瘤小鼠的胸腺、脾脏明显萎缩 ,重量显著减小. 模型组与正常对照组比较 ,胸腺指数和脾指数均呈显著性差异. 低剂量治疗组与模型组之间脾指数呈现显著差异 ,而高剂量组与模型组之间胸腺指数呈显著差异 ,脾指数差异极显著. 显示 MAAP 对荷瘤小鼠免疫器官的保护和促进作用.

表 2 MAAP 对荷瘤小鼠胸腺指数、脾指数的影响/g

实验组	胸腺指数	脾指数
① 正常对照组	$1.53 \pm 0.35^{\Delta}$	$4.89 \pm 0.36^{\Delta\Delta}$
② 模型对照组	$0.93 \pm 0.23^*$	$3.02 \pm 0.28^{**}$
③ 低剂量治疗组	1.453 ± 0.27	$4.40 \pm 0.31^{\Delta}$
④ 高剂量治疗组	$1.87 \pm 0.21^{\Delta}$	$5.07 \pm 0.29^{\Delta\Delta}$

* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ VS ① ; $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ VS ②.

2.5 MAAP 对小鼠血液红细胞与肝脏还原型谷胱甘肽 (GSH) 含量的影响

GSH 是组织中主要的非蛋白质的巯基化合物 ,是一种重要的低分子氧自由基清除剂 ,缺乏或损耗 GSH 会促使许多化学物质或环境因素产生或加重中毒作用. 按照试剂盒说明书的方法测定实验小鼠血液红细胞与肝脏组织匀浆中 GSH 的含量 ,结果见表 3 ,高剂量组红细胞中的 GSH 含量与模型组差异显著 ,而肝脏中 GSH 含量没有表现出显著差异.

表 3 MAAP 对小鼠血液红细胞与肝脏 GSH 含量的影响

	红细胞/($\text{mg}/100 \text{ mL}$)	肝/($\mu\text{g}/\text{mg}$)
① 正常对照组	$18.2 \pm 2.36^{\Delta}$	6.7 ± 0.58
② 模型对照组	$10.4 \pm 1.49^*$	4.4 ± 0.24
③ 低剂量治疗组	14.6 ± 2.15	5.1 ± 0.35
④ 高剂量治疗组	$16.7 \pm 2.04^{\Delta}$	6.0 ± 0.67

* $P < 0.05$ VS ① , $^{\Delta}P < 0.05$ VS ②.

3 讨论

在分离纯化得到铜绿微囊藻酸性多糖 (MAAP) 并完成基本结构分析的基础上^[4] ,本实验选用化学模拟系统和小鼠活体培养方法 ,初步研究 MAAP 的相关药理活性.

实验显示较低浓度的 MAAP 能有效清除化学模型系统中产生的超氧阴离子 ,提示可提高机体抗氧化、抗理化因子胁迫伤害的能力. 两个 MAAP 治疗组红细胞中 GSH 含量均能维持较高的水平 ,表明 MAAP 万方数据

进入机体后也有促进机体自身抗氧化防御系统的生理途径.

肿瘤模型实验结果显示 MAAP 可以抑制体内腹水瘤细胞的生长. 治疗组小鼠,无论在重量、毛色还是在采食上都明显优于模型组,两个实验剂量的多糖均能有效缓解肿瘤小鼠体重的减轻.可见 MAAP 能明显改善模型小鼠的健康状况.对 S-180 引起的小鼠胸腺、脾脏等免疫器官的萎缩有明显的保护作用甚至促进作用.胸腺和脾脏是动物与人体内重要免疫器官,胸腺为初级淋巴器官,游走的造血干细胞在此分化增殖成 T 淋巴细胞,与细胞免疫有关.脾脏为次级淋巴器官,免疫淋巴细胞在此进一步增殖,分化和成熟,脾脏中有 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞和巨噬细胞,与细胞免疫和体液免疫均有密切联系^[8,9].显示 MAAP 在肿瘤治疗过程中的潜在作用.从小鼠红细胞及肝脏 GSH 的变化也反映出 MAAP 有改善和提高免疫功能,从而抑制肿瘤生长的功效,且在一定范围内有剂量累积效应.

天然多糖增强小鼠免疫能力和抑瘤功能的可能机制有许多相关报道,可能是通过抑制肿瘤细胞的生长及其蛋白质的合成来实现^[10],也有报道多糖抑制 S-180 细胞增殖的机理在于使细胞膜磷脂特性的改变,改变了细胞膜的流动性,引起肿瘤细胞凋亡^[11].目前大多认为提高生物机体免疫功能是多糖抗肿瘤的主要机理之一^[12].本实验表明,MAAP 能有效改善荷瘤小鼠的健康状况,延长荷瘤小鼠的存活时间并改善生存质量与有效升高荷瘤小鼠的脾指数和胸腺指数的结果是吻合的,初步说明提高机体免疫力是其抗肿瘤的可能途径之一.MAAP 抗氧化、抗肿瘤的具体机制还有待深入研究.

[参考文献]

- [1] Srivastava R ,Kulshreshtha D K. Bioactive polysaccharides from plant[J]. Phyto Chemistry ,1989 ,28(4) :2877—2883.
- [2] 邹建华. 国外对多糖的抗肿瘤作用研究简况[J]. 国外医学中医中药分册 ,1991 ,13(6) :321—324.
- [3] Mishima T ,Murata J ,Toyoshima M ,et al. Inhibition of tumor invasion and metastasis by calcium spirulan (Ca-Sp) , a novel sulfated polysaccharide derived from a blue-green algae , Spirulina platensis[J]. Clin Exp Metastasis ,1998 ,16(6) :541—550.
- [4] 王习达 ,吴国荣. 铜绿微囊藻酸性多糖的分离、纯化与结构研究[J]. 中药材 ,2003 ,26(12) :865—867.
- [5] Shi mizu N ,Tomoda M ,Kanari M ,et al. An acidic polysaccharide having activity on the reticulo end othelial system from the root of Astragalus mongolicus[J]. Chem Pharm Bull ,1991 ,39(11) :2969—2970.
- [6] Stewart R C ,Bewley J D. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes[J]. Plant Physiol ,1980 ,65(2) :245—248.
- [7] 杨海龙 ,李伟. 短裙竹荪多糖清除 O₂⁻ 及对人红细胞膜自由基氧化的影响[J]. 科技通报 ,2000 ,16(5) :371—374.
- [8] 戴岳. 女贞子煎剂对小鼠免疫系统的作用[J]. 中国药科大学学报 ,1987 ,18(7) :301—302.
- [9] 杭秉茜. 银耳芽孢多糖的实验药理研究[J]. 中药通报 ,1982 ,7(4) :35—36.
- [10] 宋旭红 ,张月明 ,邓红. 新疆阿魏蘑菇提取物体外抑制肿瘤实验研究[J]. 癌变、畸变、突变 ,2002 ,14(2) :89—92.
- [11] Zhang H Q ,Lin A P ,Sun Y ,et al. Chemo - and radio protective effects of polysaccharide of *Spirulina platensis* on hemopoietic system of mice and dogs[J]. Acta Pharmacol Sin ,2001 ,22(12) :1121—1124.
- [12] Liu F. Analysis of immuno modulating cytokine mRNA in the mouse induced by Mushroom polysaccharides [J]. Life Science ,1999 ,64(12) :1005—1011.

[责任编辑 孙德泉]