

栉孔扇贝糖蛋白的制备及其抗肿瘤活性初步研究

顾谦群 王长云 方玉春 仲 娜

(青岛海洋大学海洋药物与食品研究所, 266003)

关键词 栉孔扇贝, 糖蛋白, 抗肿瘤活性

近年, 对海洋贝类药用研究较多。80 年代末日本报道虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*) 中的糖蛋白有很强的肿瘤抑制作用; 国内对扇贝边氨基多糖的抗凝作用^[1,2], 扇贝边提取物对药物性肝损伤的保护作用^[3]以及对大鼠血脂水平的影响^[4]作过研究。本文首次从栉孔扇贝边中分离获得糖蛋白, 并对其抗肿瘤活性进行了初步研究。

1 材料与方 法

1.1 材 料

扇贝边鲜品系从栉孔扇贝 *Chlamys farreri* 中剥离获得, 于 1995 年 5 月采自青岛麦岛海珍品养殖场; 昆明种小鼠由山东省医科院动物中心提供; S₁₈₀ 腹水瘤由山东省医科院药物研究所提供; 其他试剂均为 A. R. 级。

1.2 方 法

1.2.1 糖蛋白的分离、纯化

取鲜扇贝边, 加 10 倍量热水煮提, 过滤除渣。滤液喷雾干燥后得粉末状粗提物, 4℃ 下保存。粗提物用适量水溶解, 注入透析袋中透析。透析液通过 DEAE-纤维素柱分离, 收集洗脱液, 浓缩后, 再通过 Sephadex G-100 柱层析纯化, 冷冻干燥得栉孔扇贝糖蛋白 [Glycoprotein of *Chlamys farreri* (GCF)]。

1.2.2 GCF 分析

电泳分析 将样品点于醋酸薄膜上, 在 0.1% 1 mol/L 吡啶醋酸溶液中, 用 DYY-III 8 型稳压稳流电泳仪, 在 100 V 下, 电泳 10 min, 甲苯胺蓝显色。用 Nicolet-550 红外光谱仪, 测定红外光谱, KBr 压片法。总蛋白含量测定用 Folin-酚试剂法^[5], 以牛血清蛋白为标准制作标准曲线, 牛血清蛋白用凯氏定氮法测定其蛋白质含量^[6]。总糖含量测定用改良的苯酚-硫酸法^[7], 以葡萄糖作为参比。组成单糖分析采用纸层析法 (PC)。取样品 10 mg, 加 1 mol/L H₂SO₄ 6 ml, 封管, 于 100℃ 水解 6 h, BaCO₃ 中和, 浓缩后点样于层析滤纸。用正丁醇: 冰醋酸: 水 (4: 1: 5) 展开剂展开, 苯

胺-邻苯二甲酸试剂显色, 并与单糖标准品的纸层析

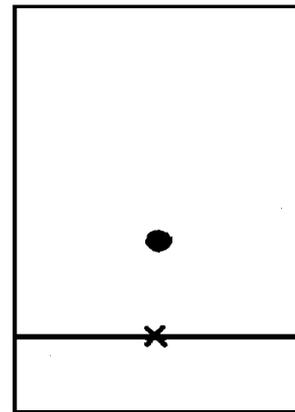


图 1 GCF 的电泳层析

Fig. 1 The electrophoretic chromatography of GCF

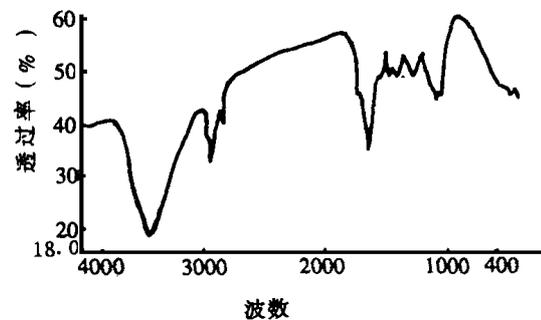


图 2 GCF 的红外光谱

Fig. 2 The IR spectra of GCF

结果对照。 1.2.3 抗肿瘤活性测定

选取昆明种小鼠 50 只, 体重 18~22 g。采用 S₁₈₀ 腹水瘤, 小鼠右腋皮下接种制备模型 (每只 0.2 ml)。随机分成治疗组 (GCF 设 3 个剂量组, 分别为 40 mg/kg, 80 mg/kg 和 160 mg/kg)、阳性对照组 (5-Fu, 20 mg/kg) 和对照组 (生理盐水)。移植肿瘤 24 h 后给药, 于小鼠皮下瘤周瘤内注射, 隔 2 d 一次, 共给药 5 次。

收稿日期: 1998-06-20

停药 24 h 后将小鼠处死, 称重, 解剖剥离瘤块, 称重, 计算抑瘤率; 并取出脾脏, 称重, 观察脾脏重量的变化。

2 结果与讨论

2.1 GCF 分析

电泳分析表明, GCF 在 0.1% 1 mol/L 吡啶醋酸溶液中向阳极移动, 并显示单一的蓝色斑点(图 1)。GCF 红外光谱分析在 3 445 cm^{-1} , 2 824 cm^{-1} , 1 641 cm^{-1} , 1 078 cm^{-1} 处有多糖羟基、酰胺基及糖环醚键的特征吸收峰(图 2)。GCF 总蛋白含量为 60%, 总糖含量为 36%。PC 分析显示, GCF 的组成单糖为 D-葡萄糖醛酸、D-葡萄糖、D-半乳糖、D-甘露糖、D-木糖、L-岩藻糖、L-鼠李糖。Rf 值分别为: 0.13, 0.20, 0.26, 0.31,

表 1 GCF 对小鼠移植性肿瘤 S₁₈₀ 抑制作用及对脾指数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tab. 1 Tumor-inhibition and spleen weight on S₁₈₀-bearing mice

组别	剂量 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	体重		瘤重 (g)	抑瘤率 (%)	脾指数 ($\text{mg}/10 \text{g}$ 体重)
		药前	药后			
对照组	/	20.30	20.41	1.29 ± 0.56	/	84.25 ± 33.88
5-FU	20	20.45	20.09	0.41 ± 0.24*	68.22	59.20 ± 18.55*
GCF	40	20.50	22.76	0.68 ± 0.37*	47.29	80.23 ± 28.52
	80	20.45	19.69	0.81 ± 0.38*	37.21	75.00 ± 18.54
	160	20.45	21.63	0.78 ± 0.49*	39.53	81.57 ± 23.98

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

近年, 随着生命科学的发展, 糖蛋白的重要生物活性不断被揭示, 尤其许多糖蛋白能提高机体的免疫力, 对肿瘤有显著的抑制作用, 引起医药界的关注。栉孔扇贝糖蛋白在药理初试中发现对肿瘤也有显著的抑制作用, 有待进一步对其分子组成与活性的关系及作用机制进行研究。

参考文献

1 王长云、管华诗。中国水产科学, 1994, 1(2): 32~34

0.37, 0.47, 0.56。由电泳和 PC 分析可知, GCF 的糖链部分为含葡萄糖醛酸的酸性杂多糖。

2.2 GCF 抑瘤作用及对小鼠脾脏的影响

药理实验结果表明, GCF 能显著抑制移植性小鼠 S₁₈₀ 肉瘤的生长, 给药剂量为 40 mg/kg 效果最好, 抑瘤率可达 47.29% (表 1); 对小鼠脾脏重量的影响, 无显著性差异。GCF 的抑瘤率比日本报道的虾夷扇贝糖蛋白的抑瘤率略低^[2]。栉孔扇贝与虾夷扇贝是不同属的贝类, 生长环境亦不同, 糖蛋白的组成和结构也有差异。虾夷扇贝糖蛋白的糖链部分主要是由 N-乙基葡萄糖胺, N-乙基半乳糖胺, L-岩藻糖, D-半乳糖, D-甘露糖和 D-葡萄糖组成^[2], 与栉孔扇贝边中的糖蛋白的单糖组成有差异, 推测这是其抑瘤效果差异的原因之一。

2 王长云、管华诗等。海洋与湖沼, 1995, 26(增刊 5): 66~69

3 孙 谧、向葆卿等。海洋水产研究, 1996, 16(4): 436~438

4 汪之项、李珏声。营养学报, 1994, 16(4): 436~439

5 万建荣、洪玉箐等。水产食品化学分析手册。上海: 上海科技出版社, 1991。66~68

6 黄伟坤、唐英章等。食品检验与分析。北京: 轻工业出版社, 1989。51~57

7 董 群、郑丽伊等。中国药理学杂志, 1996, 31: 9~11

PRELIMINARY STUDIES ON THE ANTI-TUMOUR ACTIVITY OF GLYCOPROTEIN FROM *Chlamys farreri*

GU Qian-qun WANG Chang-yun FANG Yu-chun ZHONG Na

(Marine Drugs and Foods Institute, Ocean University of Qingdao, 266003)

Received: Jun. 20, 1998

Key Words: *Chlamys farreri*, Glycoprotein, Antitumor activity

Abstract

A Glycoprotein was prepared from the skirt of *Chlamys farreri* by extraction with hot water, isolation and purifi-

cation with column chromatography on DEAE-cellulose and Sephadex G-100 successively. The content of protein and total sugar of the glycoprotein were 60 % and 36 % respectively. Pharmacological tests showed that the glycoprotein could obviously inhibit Sarcoma 180 neoplastic proliferation mice with the inhibition rate of 47.29 %.