

一种紫菜多糖的制备及 对淋巴细胞生长的影响*

张伟云¹ 刘宇峰¹ 陈 颀² 谭仁祥² 侯亚义¹

(1. 南京大学医学院, 南京 210093; 2. 南京大学生命科学学院, 南京 210093)

摘要: 用DEAE-纤维素和Sephadex G-200柱层析法分离纯化条斑紫菜的热水提取物, 从中得到多糖PY2, 并测出其分子量为 2.0×10^4 。用紫外和红外光谱对PY2的性质进行了鉴定。进一步测定了PY2对体外培养的小鼠骨髓细胞及淋巴细胞生长的影响。结果表明, PY2是一种少见的紫菜多糖, 它不含有大多数紫菜多糖具有的3, 6-内醚-半乳糖和硫酸基, 它对小鼠脾脏淋巴细胞、胸腺淋巴细胞以及混合淋巴细胞的增殖有一定的抑制作用, 而对骨髓细胞的增殖没有明显的影响。

关键词: 多糖; 条斑紫菜; 淋巴细胞生长

中图分类号: Q 946 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-470X (2001) 02-0149-04

Preparation of Polysaccharide from *Porphyra yezoensis* Ueda and Its Effects on Growth of Lymphocytes

ZHANG Wei-Yun¹, LIU Yu-Feng¹, CHEN Hao², TAN Ren-Xiang², HOU Ya-Yi¹

(1. Medical School, Nanjing University, Nanjing 210093, China;

2. Department of Biological Science and Technology, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: The purified polysaccharide PY2 was obtained by DEAE-cellulose and Sephadex G-200 column chromatography from *Porphyra yezoensis*. The average molecular weight was determined to be 2.0×10^4 by using column chromatography. PY2 was also identified by UV and IR spectra. The results showed that PY2 is a kind of infrequent polysaccharide from *Porphyra*, which could inhibit the proliferation of murine spleen cells, thymus cells and mixed lymphocyte reaction. There were no distinct effects of PY2 on bone marrow cells.

Key words: Polysaccharide; *Porphyra yezoensis*; Lymphocyte proliferation

多糖是重要的生物大分子物质, 在生命现象中参与细胞的各种活动, 因其具有多种多样的生物功能, 近年来人们对它的各种生理、药理作用很感兴趣, 多糖作为免疫调节剂,

收稿日期: 2000-05-19, 修回日期: 2000-07-31。

基金项目: 中国科学院海洋生物学开放实验室课题(Na 973005a)。

* 作者简介: 张伟云(1964-), 女, 博士, 讲师, 主要从事天然产物中生物大分子的研究。

还具有毒副作用小的特点。紫菜是营养价值较高的海洋藻类植物, 紫菜多糖是紫菜中的重要组成部分, 不同的紫菜所含的多糖种类及生物学活性也有所区别。条斑紫菜是我国的主要养殖品种之一, 已有研究发现条斑紫菜多糖提取物有多种生物功能^[1~3]。笔者对条斑紫菜多糖 PY2 进行了分离纯化和初步的性质鉴定, 并采用细胞培养法测定了它对小鼠骨髓细胞、脾脏以及胸腺淋巴细胞增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*), 来自江苏赣榆。8 周龄 BALB/c 小鼠, 购自南京军区总医院实验动物中心。

1.2 多糖的制备

1.2.1 提取和纯化 新鲜的条斑紫菜切碎后经乙醇脱脂, 再用蒸馏水煮沸提取, 提取物按 Sevag 法进行脱蛋白^[4], 冻干得粗多糖。粗多糖首先经阴离子交换纤维素 DE-23 (Whatman 产品)柱分离, 苯酚-硫酸法检测^[5]。得 Da 和 Db 两个组分, 冷冻干燥。再用 Sephadex G-200 (Pharmacia 产品)层析柱(2.6 cm × 60 cm)进一步纯化 Da, 苯酚-硫酸法检测, 得到两个多糖组分, 其中分子量较小的样品称为 PY2, 透析脱盐并冷冻干燥, 得其纯品。

1.2.2 纯度鉴定 将上述 PY2 约 5 mg 溶解在少量 0.02 mol/L NaCl 溶液中, 在 1.6 cm × 50 cm 的 Sephadex G-200 层析柱上以 0.02 mol/L NaCl 溶液洗脱, 流速为 6 mL/h, 每 20 min 收集 1 管, 用苯酚-硫酸法检测, 结果只出现单一对称峰。

1.3 紫外和红外光谱测定

将少量多糖样品溶解于蒸馏水, 在 U-3000 型 (Hitachi) 紫外可见分光光度计上记录 190~400 nm 之间的紫外吸收。将纯化的多糖干燥后经溴化钾压片, 用 170SX FT-IR 仪记录红外光谱。

1.4 分子量测定

分别将标准葡聚糖(分子量分别为 11 500、41 000、71 000、267 000 和 580 000)和蓝色葡聚糖上 Sepharose 6B (Pharmacia 产品)层析柱(1.1 cm × 85 cm), 以 0.1 mol/L NaCl 溶液洗脱, 测出它们的洗脱体积 V_e 及外水体积 V₀, 以分子量的对数值对 V_e/V₀ 作标准曲线。然后以 PY2 上柱, 同法洗脱, 得 V_e/V₀ 为 2.150。

1.5 紫菜多糖对小鼠骨髓细胞及淋巴细胞体外生长的影响

1.5.1 小鼠骨髓细胞和淋巴细胞悬液的制备 将小鼠经眼眶放血处死后于无菌条件下取出脾脏、胸腺及骨髓, 分别用完全培养液 DMEM 制成细胞悬液, 计数。

1.5.2 小鼠骨髓细胞增殖 将小鼠骨髓细胞置 24 孔培养板中培养 2 h, 离心去上清, 加入含 20% L929 培养上清的 DMEM 完全培养液, 使细胞终浓度为 5×10^5 /孔, 加入 PHA (终浓度 30 μg/mL), 再加入 PY2, 分成 3 个浓度组, 使其最终浓度分别为 40 μg/mL, 80 μg/mL 和 160 μg/mL。每个浓度设 6 个相同样本, 对照组不加 PY2。置 5% CO₂ 培养箱中 37℃ 培养 3 d, 从每孔吸取 100 μL 细胞悬液, 进行 MTT 检测^[6]。

1.5.3 脾脏和胸腺淋巴细胞增殖 分别取小鼠脾脏细胞和胸腺细胞加到 24 孔培养板中, 用量为 2×10^6 /孔, 加 PHA 30 μg/mL, 再加入 3 个不同浓度的 PY2, 同时设对照组。置 CO₂ 培养箱中培养 3 d, 进行 MTT 检测。

1.5.4 混合淋巴细胞反应 取BALB/c小鼠脾细胞, 加到96孔培养板中($2 \times 10^6/\text{孔}$), 再加入相同数量的N II小鼠的脾细胞, 同样加入3个不同浓度的PY2, CO²培养箱中培养3d, 进行MTT检测。

2 结果

2.1 多糖的性质及分子量

由离子交换柱层析及凝胶柱层析纯化得到多糖PY2, 再经Sephadex G-200柱层析鉴定PY2纯度, 由洗脱曲线可知, 只有单一对称峰(图1), 说明PY2为均一多糖组分。

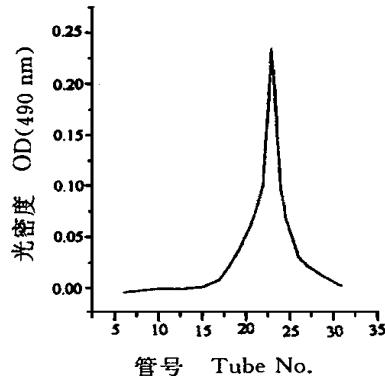


图1 紫菜多糖PY2的纯度鉴定

Fig. 1 Purity identification of polysaccharide PY2

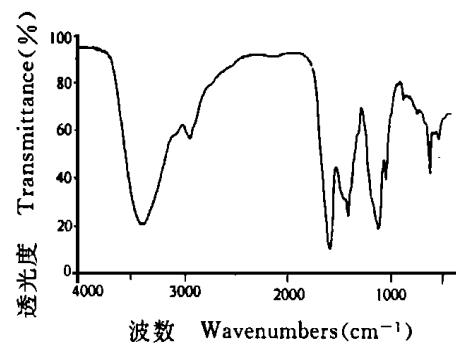


图2 紫菜多糖PY2的红外吸收光谱

Fig. 2 The infrared spectrum of polysaccharide PY2

从紫外检测结果可知, 在260 nm和280 nm无吸收峰, 说明多糖样品中没有核酸和蛋白质等杂质。从红外光谱可以看出, 在3600~3200 cm⁻¹、3000~2800 cm⁻¹、1400~1000 cm⁻¹处有多糖特征吸收峰存在(图2)。此多糖无3,6-内醚的吸收峰(930 cm⁻¹)和硫酸基的吸收峰(1250 cm⁻¹), 这两种基团是大多数紫菜多糖所具有的^[7], 由此可见, 多糖PY2是一种特殊的紫菜多糖。

一般来说, 多糖的分子量大小是指它的平均分子量。本研究以凝胶柱层析法, 得出标准曲线 $Y = 7.49848 - 1.48869X$ ($R = -0.99699$), Y 代表LgM, X 代表Ve/V₀。由PY2的Ve/V₀计算出它的分子量约为 2.0×10^4 。

2.2 PY2对骨髓细胞、脾脏细胞、胸腺细胞和混合淋巴细胞增殖的影响

由表1结果可以看出, 在骨髓细胞增殖试验中3个给药组与对照组之间均无明显差

表1 紫菜多糖PY2对淋巴细胞增殖的影响

Table 1 Effects of polysaccharide PY2 on lymphocyte proliferation

组别 Group	1(CK)	2	3	4
给药浓度(μg/mL) Do dosage	0	40	80	160
小鼠数 Mouse N um.	6	6	6	6
骨髓细胞增殖 Bone marrow cell proliferation (A × 100)	28.50 ± 0.96	28.50 ± 1.52	27.33 ± 1.09	26.33 ± 1.07
脾脏细胞增殖 Spleen lymphocyte proliferation (A × 100)	23.83 ± 1.17	19.83 ± 0.83*	18.67 ± 0.49**	16.67 ± 0.21***
胸腺细胞增殖 Thymus lymphocyte proliferation (A × 100)	43.67 ± 2.42	37.00 ± 1.79	33.33 ± 0.95**	37.17 ± 0.41*
混合淋巴细胞反应 Mixed lymphocyte reaction (A × 100)	43.00 ± 1.71	36.67 ± 2.26*	31.33 ± 0.80***	28.83 ± 0.91***

注(Notes): t检验(各组与对照组比较) t-test (compared with control) * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。

异($P > 0.05$)。而脾脏淋巴细胞生长试验中, 当给药浓度为 $40 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 给药组与对照组即存在显著差异($P < 0.05$)。在胸腺淋巴细胞增殖中, $40 \mu\text{g}/\text{mL}$ 组与对照无显著差异, $80 \mu\text{g}/\text{mL}$ 组与对照组差异最大($P < 0.01$), $160 \mu\text{g}/\text{mL}$ 组与对照组有显著差异($P < 0.05$)。此外, PY2 对于混合淋巴细胞反应, 当浓度为 $40 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时即有显著差异($P < 0.05$), 而当浓度达到 $80 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 即存在非常显著差异($P < 0.001$), 与脾脏淋巴细胞增殖相同, 对照组与给药组的差异性随浓度增大而增加。

3 讨论

PY2 是从条斑紫菜中获得的几种多糖中的一个。一般地, 典型的紫菜多糖是由琼胶二糖和它的前体组成即[(1→3)- β D-半乳糖-(1→4)-3,6-内醚- α L-半乳糖]和[(1→3)- β D-半乳糖-(1→4)-6-O SO₃- α L-半乳糖]组成^[8]。而 PY2 是一种少见的紫菜多糖, 它不含有 3,6-内醚- α L-半乳糖和硫酸基, 由此说明它不是由这两种结构单元组成。因此 PY2 可能有一些独特的生物学活性。

许多研究报道, 多糖作为免疫调节剂可以促进机体的细胞免疫和体液免疫^[9], 本研究所得到的多糖 PY2 对免疫系统主要具有负向的调节作用。从实验结果可以看出, 它对脾脏细胞、胸腺细胞以及混合淋巴细胞增殖皆有显著的抑制作用, 尤其是对混合淋巴细胞抑制程度最高。而骨髓细胞的对照组与给药组的增殖没有显著差异, 说明 PY2 对骨髓细胞的增殖没有明显影响。对胸腺细胞增殖的影响还存在最适浓度的问题, 在 $40 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $80 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $160 \mu\text{g}/\text{mL}$ 3 个不同浓度组中, 以 $80 \mu\text{g}/\text{mL}$ 组对胸腺淋巴细胞的增殖有最大抑制效果($P < 0.01$), 其次为 $160 \mu\text{g}/\text{mL}$ 组($P < 0.05$)。而 $40 \mu\text{g}/\text{mL}$ 组没有显著抑制作用($P > 0.05$)。本实验的结果提示紫菜多糖 PY2 有可能开发成为免疫抑制剂用于临床免疫亢进的治疗。笔者仅就紫菜多糖对体外培养淋巴细胞的增殖作了一些初步的研究, 至于 PY2 抑制免疫细胞增殖的机理还有待于进一步的研究。

参考文献:

- [1] 周慧萍, 陈琼华. 紫菜多糖抗衰老作用的实验研究. 中国药科大学学报, 1989, 20(4): 231—234.
- [2] 周慧萍, 陈琼华. 紫菜多糖对机体细胞的保护作用. 中国药科大学学报, 1989, 20(6): 340—343.
- [3] 周慧萍, 陈琼华. 紫菜多糖的抗凝血和降血脂作用. 中国药科大学学报, 1990, 21(6): 358—360.
- [4] Staub A M. Removal of proteins Sevag method. *Methods Carbohydr Chem*, 1965, 5: 5—6.
- [5] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Colorimetric method for the determination of sugar and related substances. *Anal Chem*, 1956, 28: 350—356.
- [6] 刘宇峰, 张成武, 沈海雁等. 嗜盐隐杆藻胞外多糖对小鼠免疫功能的影响. 中国海洋药物, 1998, 2: 10—13.
- [7] Sekkal M, Huvenne J P, Legrand P, et al. Direct structural identification of polysaccharides from red algae by FT IR microspectrometry I Localization of agar in *Gracilaria verrucosa* sections. *Makrochima Acta*, 1993, 112: 1—10.
- [8] 高洪峰, 纪明侯, 曹文达. 南、北方坛紫菜多糖结构特征的比较研究. 海洋与湖沼, 1992, 23(5): 541—549.
- [9] 周世文, 徐传福. 多糖的免疫药理作用. 中国生化药物杂志, 1994, 15(2): 143—147.