

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 颢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; R 967 **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(N0 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(Watman 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Sephacrose 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 V_0 ,以分子量的对数值对 V_e/V_0 作标准曲线。然后以PY2上柱,同法洗脱,得 V_e/V_0 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 $\mu\text{g/mL}$),再加入PY2,分成3个浓度组,使其最终浓度分别为40 $\mu\text{g/mL}$, 80 $\mu\text{g/mL}$ 和160 $\mu\text{g/mL}$ 。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 $\mu\text{g/mL}$,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(2×10^6 /孔), 再加入相同数量的NIH 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 3 d, 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。

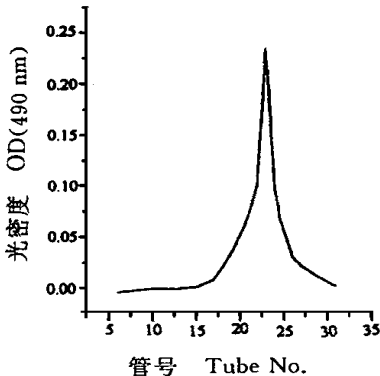


图 1 紫菜多糖 PY2 的纯度鉴定
Fig. 1 Purity identification of polysaccharide PY2

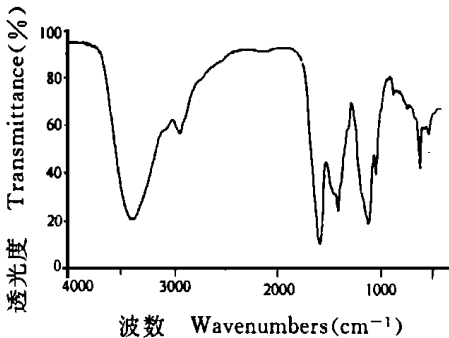


图 2 紫菜多糖 PY2 的红外吸收光谱
Fig. 2 The infrared spectrum of polysaccharide PY2

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 $3\,600\sim 3\,200\text{ cm}^{-1}$ 、 $3\,000\sim 2\,800\text{ cm}^{-1}$ 、 $1\,400\sim 1\,000\text{ cm}^{-1}$ 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 $Y = 7.498\,48 - 1.488\,69X$ ($R = -0.996\,99$), Y 代表 $\lg M$, X 代表 V_e/V_0 。由PY2 的 V_e/V_0 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($\mu\text{g/mL}$) Dosage		0	40	80	160
小鼠数 Mouse Num.		6	6	6	6
骨髓细胞增殖 Bone marrow cell proliferation($A \times 100$)		28.50 \pm 0.96	28.50 \pm 1.52	27.33 \pm 1.09	26.33 \pm 1.07
脾脏细胞增殖 Spleen lymphocyte proliferation($A \times 100$)		23.83 \pm 1.17	19.83 \pm 0.83*	18.67 \pm 0.49**	16.67 \pm 0.21***
胸腺细胞增殖 Thymus lymphocyte proliferation($A \times 100$)		43.67 \pm 2.42	37.00 \pm 1.79	33.33 \pm 0.95**	37.17 \pm 0.41*
混合淋巴细胞反应 Mixed lymphocyte reaction($A \times 100$)		43.00 \pm 1.71	36.67 \pm 2.26*	31.33 \pm 0.80***	28.83 \pm 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 $40 \mu\text{g/mL}$ 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, $40 \mu\text{g/mL}$ 组与对照无显著差异, $80 \mu\text{g/mL}$ 组与对照组差异最大($P < 0.01$), $160 \mu\text{g/mL}$ 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 $40 \mu\text{g/mL}$ 时即有显著差异($P < 0.05$),而当浓度达到 $80 \mu\text{g/mL}$ 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 SO_3 - α L-半乳糖]组成^[8]。而 PY2 是一种少见的紫菜多糖,它不含 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 $40 \mu\text{g/mL}$, $80 \mu\text{g/mL}$, $160 \mu\text{g/mL}$ 3 个不同浓度组中,以 $80 \mu\text{g/mL}$ 组对胸腺淋巴细胞的增殖有最大抑制效果($P < 0.01$),其次为 $160 \mu\text{g/mL}$ 组($P < 0.05$)。而 $40 \mu\text{g/mL}$ 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 *Mikrochim 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