

半枝莲多糖的纯化及抗肿瘤作用的体内实验研究

杨姗姗¹, 吴大军¹, 张秀娟²

(1. 淮安信息职业技术学院 江苏 淮安 223003; 2. 哈尔滨商业大学 生命科学与环境科学研究中心生物安全评价研究所, 国家教育部抗肿瘤天然药物工程研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076)

摘要: 初步探究半枝莲多糖的纯化方法及其对动物体内的抑瘤作用。通过 Sevag 法纯化半枝莲多糖, 并采用苯酚-硫酸法测定多糖含量; 动物移植性肿瘤实验观察半枝莲多糖对小鼠体内肿瘤细胞生长和免疫器官—胸腺、脾的影响。多糖含量提高到 49.99%; 对 S180 肉瘤生长的抑制率以中剂量为佳; 各剂量组均对脾脏指数有显著性差异, 但大剂量注射(200 mg/kg) 对胸腺有抑制作用。Sevag 法处理后的纯多糖含量与粗多糖中的多糖含量相比有明显差异, 该法切实可行; 半枝莲多糖对 S180 小鼠有抗肿瘤作用和免疫增强作用。

关键词: 半枝莲; 多糖纯化; 抗肿瘤

中图分类号: S681.9 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2012)02-0392-05

Experimental Study on Anti-tumor Effects of *Scutellaria barbata* D. Don Polyaccharides in Vivo

YANG Shan-shan¹, WU Da-jun¹, ZHANG Xiu-juan²

(1. Huai'an College of Information Technology, Huaian 223003, China; 2. Life Sciences and Environment Research Center, Harbin University of Commerce, Institute of Biological Safety, Assessment Research Center of the Ministry of Education anti-tumor natural medicine works, Harbin 150076, China)

Abstract: Objective: To study the purifying method for *Scutellaria barbata* D. Don polyaccharides (SPS) and its anti-tumor effect of SPS in entrails. Methods: Using Sevag and Phenol-sulfuric acid method the content of polysaccharide was determined; the anti-tumor effect of SPS and the spleen index and the thymus index were observed by tumor transplant experiment on animal. Results: SPS can inhibit the growth of S180 and the effect on middle dose group was the best; the spleen index was affected remarkably in every group and the thymus index was inhibited by big dose (200 mg/kg). Conclusion: The content of polysaccharide purified with Sevag method and the polysaccharide content in crude polysaccharide were significantly different; the method is practical; SPS has anti-tumor effect and can improve immunity.

Key words: *Scutellaria barbata* D. Don polyaccharides; polyaccharides purification; antitumor

半枝莲(*Scutellaria babarta* D. Don) 别名狭叶韩信草、并头草、牙刷草等, 以干燥全草入药。其名最早见于明末医学家陈实功所著《外科正宗》, 为唇形科黄芩属植物。本品味辛、苦, 性寒、归肺、肝、肾经, 有清热解毒、散瘀止血、利尿消肿的功能, 是一种常用中药^[1]。半枝莲的化学成分繁多、药理药效作用广泛。近年来学者们对植物多糖的药理活性作用的研究很多, 并发现了多糖广泛的抗肿瘤作用, 有的植物多糖药物制剂已应用到了临床。而关于半枝莲多糖的系统研究较少。鉴于此, 笔者采用 Sevag 法进

收稿日期: 2011-09-14 修回日期: 2012-02-20

基金项目: 黑龙江省自然科学基金资助项目(D201043)

作者简介: 杨姗姗(1981—) 女 助理研究员 硕士 主要从事抗肿瘤药理研究 E-mail: yangshanshan810707@163.com。

行初步纯化后,应用苯酚-硫酸法测定其含量。并通过测定瘤重、胸腺和脾脏的重量来探讨半枝莲多糖的抗肿瘤作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象 半枝莲多糖(SPS 纯度 30%): 徐州弘康科技有限公司。

1.1.2 主要试剂 氯仿: 天津市耀华化学试剂有限责任公司,批号 20090820; 正丁醇: 天津市标准科技有限公司,批号 20091106; 浓硫酸: 哈尔滨市新达化工厂,批号 091103; 苯酚: 廊坊市兴达化工有限公司,批号 20080213; H_2O_2 : 沈阳市新西试剂厂,批号 20090711; 葡萄糖: 北京奥博星生物技术有限责任公司,批号 20090223; 0.01 mol/L $NaHCO_3$ 、0.001 mol/L EDAAE、无水乙醇: 天津市永大化学试剂开发中心,批号 20091108; 氨水: 哈尔滨市新达化工厂,批号 090524。

1.1.3 主要仪器 LD4-2A 型台式低速离心机: 北京医用离心机厂; PHS-3C 型 pH 计(上海伟业仪器厂); R-201 旋转蒸发仪(上海申胜生物科技有限公司); UV-752 型紫外可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司); DZF-6030 型真空干燥箱(南京菲奇工贸)。

1.2 方法

1.2.1 样品纯化^[2-4] 除蛋白: 取半枝莲多糖 5 g 溶于 100 mL 蒸馏水中,将 20 mL Sevag 液($V_{\text{氯仿}}:V_{\text{正丁醇}}=4:1$)加入多糖溶液中,混合物剧烈振摇 5 min 后,离心 10 min (4 000 r/min),蛋白质与氯仿-正丁醇生成凝胶物而分离,除去水层与溶剂层交界处的变性蛋白,将上层水相反复操作 6 次。

氧化脱色: 除去蛋白的多糖溶液用 30% 氨水调节 pH8~9,加 10% 双氧水 50 mL,置 4 °C 冰箱 24 h。

除小分子物质: 透析袋用 50% 的乙醇蒸制 1 h,接着依次用 0.01 mol/L 的 $NaHCO_3$ 、0.001 mol/L 的 EDAAE 和蒸馏水洗涤。将脱色后的多糖溶液装入处理好的透析袋中,先用自来水流水透析 3 d,然后再用蒸馏水透析 2 d。

醇沉: 将透析过的多糖溶液经 70 °C 减压浓缩至 25 mL,待自然冷却后加入 95% 的乙醇调节醇浓度为 80%,放置 1 d。

1.2.2 多糖含量测定^[5-6] 标准溶液的制备: 精密称取 105 °C 下干燥恒重的葡萄糖对照品 10.0 mg,置 100 mL 容量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀。即配得葡萄糖标准溶液,置冰箱中备用。

供试品溶液的配制: 分别精密称取初步纯化后的样品多糖 10.0 mg,置 100 mL 容量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,使其充分溶解,即得 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的供试品溶液。

苯酚溶液的配制: 称取苯酚 100 g 加铝片 0.1 g 和碳酸氢钠 0.05 g(最好加少量沸石),常压蒸馏,收集(180 \pm 2) °C 馏分,用蒸馏水溶解,摇匀,配得 5% 苯酚试剂,放在棕色玻璃瓶内,置冰箱 4 °C 备用。

最佳波长的选择: 精密量取葡萄糖标准溶液和供试品溶液各 1.0 mL,用蒸馏水补足至 2.0 mL,加 5% 苯酚溶液 1.0 mL 混匀,迅速加浓硫酸 5.0 mL,震荡 2 min。用蒸馏水同上作空白,室温放置 20 min,流水冲洗。用紫外分光光度计检测 450~520 nm 波长间吸光度(A),以确定最佳波长。

标准曲线的制备: 精密量取标准溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8 mL,蒸馏水补足至 2.0 mL。再分别加入 5% 苯酚溶液 1.0 mL,摇匀后迅速加入 5.0 mL 浓硫酸,充分摇匀,放置室温 20 min,流水冲洗降温。取 2.0 mL 蒸馏水同法操作作空白。在最佳波长处测定吸光度(A)。以 A 对多糖含量(mg/L) 绘制标准曲线,并得标准曲线方程。

换算因子的测定: 精密量取供试液 1.0 mL,用蒸馏水补足至 2.0 mL。按测定标准曲线同样的方法测其吸光度值。

样品含量的测定: 精密量取样品多糖的供试液 2.0 mL,按测定标准曲线同样的方法操作并测其吸光度值。

1.2.3 抗肿瘤作用检测 建立小鼠模型: 将昆明种小鼠随机分为 6 组,每组 8 只。无菌条件下抽取接种 7 d 的生长良好的 S180 荷瘤小鼠腹水(活癌细胞数 >95%),用无菌生理盐水(体积比 1:4)稀释,按 0.2 mL/只,小鼠右腋部皮下接种。

接种 24 h 后, 分别对 6 组小鼠进行腹腔注射给药。分别为半枝莲多糖高 200 mg/(kg · d)、中 100 mg/(kg · d)、低 50 mg/(kg · d) 剂量组, 阳性组给环磷酰胺 30 mg/(kg · d) 和黄芪多糖 100 mg/(kg · d) 模型对照组给相同体积的生理盐水。连续给药 10 d。

测抑瘤率: 停药次日处死, 称取小鼠瘤重^[7]。

$$\text{抵制率} = \frac{\text{对照组平增瘤重} - \text{治疗组平均瘤重}}{\text{对照组平增瘤重}} \times 100\% \quad (1)$$

1.2.4 免疫活性测试 实验动物模型制造方法同上, 给药剂量及途径也相同。末次给药后 24 h 处死, 分别称取体重、胸腺及脾脏的重量, 按公式计算胸腺指数和脾指数^[8-9]。

$$\text{胸腺指数}(\text{mg/g}) = \text{胸腺重} / \text{体重} \quad (2)$$

$$\text{脾指数}(\text{mg/g}) = \text{脾重} / \text{体重} \quad (3)$$

2 结果与分析

2.1 多糖的纯化收率

将沉淀用适量无水乙醇、丙酮洗涤, 干燥后得棕黄色半枝莲多糖粉末 0.3 g, 收率为 6%。

2.2 多糖含量测定

2.2.1 最佳波长的选择 紫外分光光度计测得 450 ~ 520 nm 波长间吸光度(A) (表 1)。

表 1 葡萄糖(G)标准液和纯化后多糖溶液的紫外吸光度

Tab.1 Glucose normal liquid and UV absorbency of purified polysaccharides liquid

波长/nm wavelength	450	460	470	480	485	490	495	500	510	520
G 标准溶液 G normal liquid	0.052	0.059	0.073	0.094	0.102	0.109	0.104	0.091	0.057	0.034
纯化后多糖 Purified polysaccharides	0.038	0.045	0.054	0.070	0.075	0.081	0.077	0.064	0.040	0.024

从表 1 中可以看出葡萄糖标准液和供试品溶液均在 490 nm 处有最大吸收, 故选 490 nm 为检测波长。

2.2.2 标准曲线的制备 实验得到的回归方程为: $A = 0.013C + 0.0284$, 相关系数 $r = 0.9979$ 。实验表明, 在葡萄糖质量浓度为 10 ~ 60 $\mu\text{g/mL}$ 时, 吸光度值与葡萄糖质量浓度呈线性关系。

2.2.3 换算因子的测定 按下式计算换算因子: $f = W/C \times D$ 。

W 为多糖质量(mg), C 为供试液中多糖(以葡萄糖计)的浓度(mg/mL), D 为多糖的稀释倍数。计算得 $f = 1.4650 (n = 3)$ 。

2.2.4 样品含量的测定 按下式计算多糖含量: 多糖含量% = $(CDf/W) \times 100\%$

C 为样品试液中葡萄糖的浓度($\mu\text{g/mL}$), D 为供试液稀释倍数, f 为换算因子, W 为样品质量(μg)。计算得多糖含量% = 49.99%。

2.3 半枝莲多糖对 S180 小鼠瘤重的影响

不同剂量半枝莲多糖对 S180 小鼠表现出不同的抑瘤作用(表 2)。与生理盐水组比较中、高剂量组表现出良好的抑瘤效果, 有显著性差异($P < 0.01$), 低剂量有差异($P < 0.05$), 与阳性对照比较, 中剂量组与黄芪多糖组比, 抑瘤率有明显升高; 与环磷酰胺组比较, 略有升高。

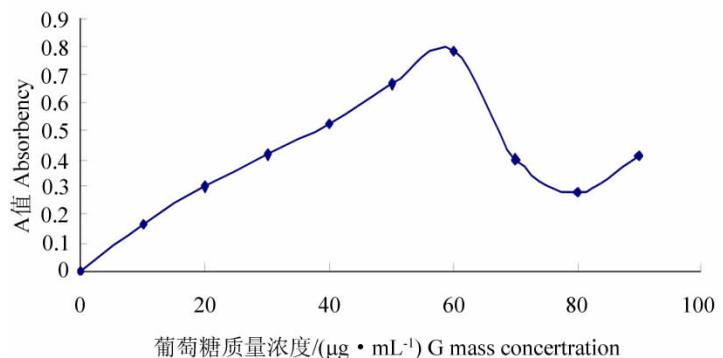


图 1 葡萄糖标准曲线

Fig.1 Glucose normal curve

2.4 半枝莲多糖对 S180 荷瘤小鼠胸腺、脾脏指数的影响

不同剂量半枝莲多糖对 S180 小鼠胸腺、脾脏指数的影响(表 3)。与生理盐水组比较,半枝莲低、中剂量组胸腺指数都有显著提高,而高剂量组明显受到抑制,且差异显著($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$);给药各组脾脏指数均较生理盐水组有显著提高($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$),半枝莲多糖给药剂量表现出剂量依赖关系,只是高剂量组对胸腺有抑制作用。

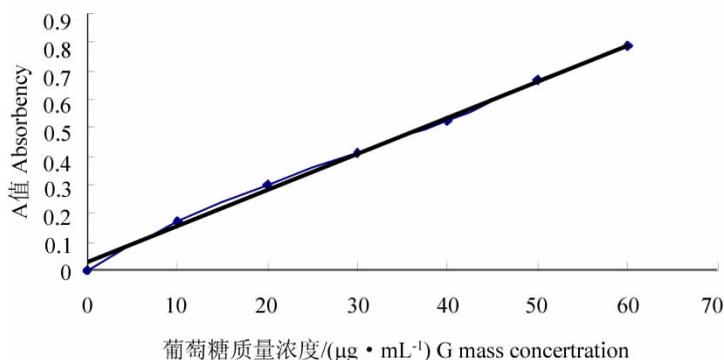


图 2 葡萄糖标准曲线线性部分

Fig. 2 Linear part of glucose normal curve

表 2 半枝莲多糖对 S180 荷瘤小鼠瘤重的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab. 2 The influence of tumor weight of *Scutellaria barbata* D. Don polyaccharides on mice of bearing S180($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别 Group	给药途径 Means	剂量 $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d}^{-1})$ Dose	瘤重/g Tumor weight	抑瘤率/% Inhibition rate
空白 Control	腹腔注射 ip		0.922 3 \pm 0.124 7	
环磷酰胺 CTX	腹腔注射 ip	30	0.501 9 \pm 0.067 7	46.70
黄芪多糖 APS	腹腔注射 ip	100	0.568 2 \pm 0.056 5	38.39
半枝莲多糖低剂量 SPS Low	腹腔注射 ip	50	0.721 8 \pm 0.064 8*	21.74
半枝莲多糖中剂量 SPS Mid	腹腔注射 ip	100	0.463 3 \pm 0.048 2**	49.76
半枝莲多糖高剂量 SPS High	腹腔注射 ip	200	0.589 8 \pm 0.070 6**	36.05

* 表示与空白组比较差异小于 0.05 水平显著性; ** 表示与空白组比较差异小于 0.01 水平显著性。

* $P < 0.05$ Compared with control; ** $P < 0.01$ Compared with control.

表 3 半枝莲多糖对 S180 荷瘤小鼠胸腺、脾脏指数的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab. 3 The influence of spleen index and thymus index of *Scutellaria barbata* D. Don polyaccharides on mice of bearing S180($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别 Group	给药途径 Means	剂量 $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d}^{-1})$ Dose	脾指数/ $(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$ Spleen index	胸腺指数/ $(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$ Thymus index
Control	腹腔注射 ip		8.909 5 \pm 0.689 2	1.182 5 \pm 0.085 5
CTX	腹腔注射 ip	30	11.536 4 \pm 0.793 8**	1.180 5 \pm 0.113 0
APS	腹腔注射 ip	100	10.026 4 \pm 0.592 4*	1.026 3 \pm 0.152 2*
SPS Low	腹腔注射 ip	50	10.112 9 \pm 1.188 8*	1.232 4 \pm 0.204 9*
SPS Mid	腹腔注射 ip	100	10.420 8 \pm 0.901 9**	1.385 8 \pm 0.177 8**
SPSHigh	腹腔注射 ip	200	11.542 4 \pm 1.246 8**	0.893 1 \pm 0.074 7**

* 表示与空白组比较差异小于 0.05 水平显著性; ** 表示与空白组比较差异小于 0.01 水平显著性。

* $P < 0.05$ Compared with control; ** $P < 0.01$ Compared with control.

3 结论与讨论

半枝莲作为民间常用中药,近年来临床应用已经较为广泛,具有清热解毒、活血化瘀、消肿止痛及抗癌等功效。但我国用半枝莲治疗某些肿瘤疾病大多数是口服粗制剂,半枝莲的有效化学成分和抗肿瘤有效化学部位均缺乏系统的研究报道。鉴于多糖作为一种重要的天然大分子物质,生物活性的多样化,尤其是多糖的抗肿瘤药理作用已经得到肯定^[11-12]。因此,本次实验针对半枝莲的抗肿瘤作用,以及在

多糖具有抗肿瘤作用的基础上,研究半枝莲多糖的抗肿瘤机制。

多糖的质量标准建立包括许多方面,如样品的各种理化性质,而最主要的是活性多糖的含量。本实验采用 Sevage 法除蛋白、双氧水脱色、透析、醇沉处理后的纯多糖的含量比粗多糖中的糖含量有明显差异,糖含量提高到 49.99%,纯化方法切实可行。应用苯酚-硫酸法测多糖含量,测定时要注意时间把握。时间过长吸光度值会有所下降,最好在 20 min 内完成。

整体水平抗肿瘤实验结果是评价候选抗肿瘤化合物有效性的最重要指标,整体水平肿瘤模型的建立是进行药效学评价的先决条件,早在 20 世纪 50 年代早期,小鼠肿瘤移植瘤模型就被用作抗肿瘤药物的主要筛选模型,现有临床上有效的抗肿瘤药物多为动物瘤移植模型实验所发现,因此本实验采用动物移植性肿瘤实验判断在动物耐受剂量下药物是否有抑制肿瘤生长的作用,这是任何体外实验所不能替代的,其结果可为抗癌药物临床疗效提供有意义的依据^[13-15]。本实验通过对 S180 荷瘤小鼠体内抑瘤率试验,结果表明半枝莲多糖在体内对 S180 肉瘤的生长有一定的抑制作用,能够增加免疫器官的重量,肿瘤抑制率以中剂量为佳,高剂量对胸腺指数有影响;初步说明了半枝莲多糖具有明确的抗肿瘤作用,同时作为生物诱导剂很有可能是通过免疫调节的方式起到间接的抗肿瘤作用。因此,深入探究其抗肿瘤作用的机制,并有必要从免疫的角度来阐明半枝莲多糖的抗肿瘤机制,以此来帮助我们更深刻地认识肿瘤发生发展的规律。

参考文献:

- [1] 蔡少青,王璇.常用中药材品种整理和质量研究[M].北京:北京医科大学出版社,2003:673-704.
- [2] 季宇彬,郭守东,汲晨锋.野西瓜成熟果实中多糖的含量测定及毛细管电泳分析[J].中国药学杂志,2006,15(41):1186-1189.
- [3] 杨帆,郝爱国,徐恒瑰,等.附子多糖的含量测定[J].大连医科大学学报,2007,29(5):453-454.
- [4] 刘晓涵,陈永刚,林励.蒽酮硫酸法与苯酚硫酸法测定枸杞子中多糖含量的比较[J].食品科技,2009,34(9):270-272.
- [5] 裴瑾,万德光,杨林.苯酚-硫酸比色法测定远志及地上部分多糖的含量[J].华西药学杂志,2005,20(4):37-339.
- [6] 余薇,查文良,夏勇,等.大蒜多糖组分 B 的纯与糖含量测定[J].时珍国医国药,2008,19(4):915-916.
- [7] 李建军,雷林生,余传林.灵芝多糖抗肿瘤作用的免疫学相关性研究[J].中药材,2007,30(1):71-73.
- [8] 严奉伟,王辰,严赞开,等.菜籽多糖对 S180 小鼠肉瘤及其免疫能力的影响[J].食品科学,2007,28(4):309-312.
- [9] 徐淑云,卞如濂,陈修.药理实验方法学[M].第3版.北京:人民卫生出版社,2001:228.
- [10] 祝寿芬,裴秋玲.现代毒理学基础[M].第1版.北京:中国协和医科大学出版社,2003:67.
- [11] 陈意生,史景泉.肿瘤分子细胞生物学[M].第1版.北京:人民军医出版社,2002.
- [12] 董志伟,乔友林,李连弟,等.中国癌症控制策略研究报告[J].中国肿瘤,2002,11(5):250-260.
- [13] 祝寿芬,裴秋玲.现代毒理学基础[M].第1版.北京:中国协和医科大学出版社,2003:67.
- [14] 沈映君.中药药理学[M].第1版.北京:人民卫生出版社,2000:100.
- [15] 郝素珍,王桂琴.实用医学免疫学[M].第1版.北京:高等教育出版社,2005:81-85.