

中华猕猴桃果多糖的分离纯化与 抗肿瘤试验研究

卢丹, 俞立超, 姚善涇*

(浙江大学生物工程研究所, 浙江 杭州 310027)

摘 要: 从中华猕猴桃果中提取粗多糖 FP, FP 经阴离子交换层析得到多糖 FP1 和 FP2。采用 S180 移植瘤模型, 考察 FP、FP1 和 FP2 的抗肿瘤作用。结果表明, 多糖 FP2 具有显著的抗肿瘤活性, 在 150mg/kg 的给药剂量下, 对 S180 肿瘤细胞的抑制率达到 54.2%。凝胶过滤层析表明, FP2 为单一的组分。纸层析表明, FP2 含有 D-葡萄糖、D-甘露糖和 D-半乳糖。

关键词: 中华猕猴桃; 多糖; 纯化; 抗肿瘤

Studies on Purification and Antitumor Activity of Fruit Polysaccharide

Isolated from *Chinensis Actinidia Planch.*

LU Dan, YU Li-chao, YAO Shan-jing*

(Department of Chemical and Biochemical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract: A raw fruit polysaccharide (FP) was isolated from *Chinensis Actinidia Planch.* By using ion exchange chromatography, FP was separated into two parts, FP1 and FP2. The inhibitory effects of FP, FP1 and FP2 on the transplanted tumor cells of Sarcinoma 180 (S180) in mice were tested. The results showed that with the dosage of 150mg/kg FP2 could evidently reduce the tumor weight of S180, and the inhibitory rate reached 54.2%. The homogeneity of FP2 was proved by size exclusion chromatography. Paper chromatography showed that FP2 contained D-glucose, D-mannose and D-galactose.

Key words: *Chinesis Actinidia Planch.*; polysaccharide; purification; anti-tumor activity

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)02-0213-03

中华猕猴桃(*Chinensis Actinidia Planch.*)是一种风味独特、营养丰富的水果珍品,素有“水果之王”的美誉。研究表明,从中华猕猴桃根中提取的根多糖具有显著的抗肿瘤活性^[1],从软枣猕猴桃茎中提取的茎多糖也具有一定的抗肿瘤作用^[2]。

本文以中华猕猴桃果实为研究对象,拟对中华猕猴桃果多糖(fruit polysaccharide, FP)进行分离、纯化研究,并用分离纯化得到的果多糖进行抗肿瘤活性的初步试验。

1 实验材料

原料: 中华猕猴桃果实 产自陕西周至。

主要试剂: DEAE-琼脂糖 杭州争光树脂有限公司; Superdex G75 Amersham Pharmacia 公司产品; 其余

化学试剂为国产分析纯。

仪器: ÄKTA explorer 100、Column XK16、HiPrep 26/10 Desalting、Ultrospec 3300 pro 紫外/可见光分光光度计 均为 Amersham Pharmacia 公司产品; 冷冻干燥系统 为美国热电公司产品。

实验动物: ICR 小鼠, 体重 18~22g, 雌雄各半 由浙江中医学院动物实验中心提供。

2 方法与结果

2.1 猕猴桃果多糖的分离纯化

取一定量新鲜、可食的中华猕猴桃果实榨汁, 然后在果汁中加入 3%(体积比)的 2mol/L 三氯乙酸除蛋白。离心弃沉淀, 向上清液中加入 2 倍体积的 95% 乙醇, 均匀

搅拌，离心后取沉淀。将沉淀复溶于水，同时加入 20% (V/V)H₂O₂ 脱色。脱色处理后，重新用 2 倍体积的 95% 乙醇沉淀溶液中的多糖，并将所得的粗多糖(FP)冷冻干燥后备用。粗多糖(FP)的得率为 0.45%。

将粗多糖(FP)溶于 pH8.5 的 Tris-HCl 缓冲液，经以 DEAE-琼脂糖为介质的层析柱(柱体积为 15ml)层析分离，以 1mol/L 的 NaCl 溶液洗脱，流速为 2ml/min，苯酚-硫酸法检测分部收集液，所得的结果如图 1 所示。结果表明存在未被吸附的多糖穿透峰(FP1)和洗脱得到的多糖洗脱峰(FP2)。分别合并糖反应阳性高峰部分，过脱盐柱(HiPrep 26/10 Desalting)脱盐，冷冻干燥后得到多糖 FP1 和 FP2 备用。

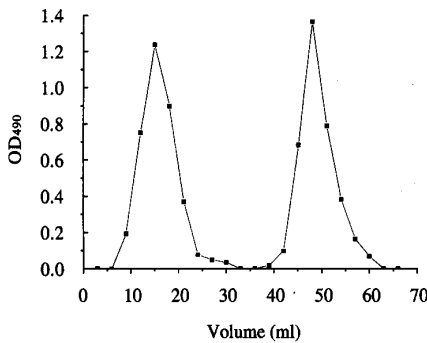


图 1 粗多糖 FP 在阴离子交换柱上的色谱图

Fig.1 Anion exchange chromatogram of the raw fruit polysaccharide

2.2 抗肿瘤实验

为了从中华猕猴桃果中分离得到具有抗肿瘤活性的活性多糖，我们以接种了肉瘤细胞 S180 的小鼠为实验对象，分别考察多糖 FP、FP1 和 FP2 的抑瘤效果。

2.2.1 活性多糖的筛选

从已接种 S180 肉瘤细胞 7d 的小鼠腹腔中抽取瘤性腹水，以无菌水稀释、调整细胞数至约 1×10^7 个/ml，然后在每只小鼠的右腋下接种瘤细胞悬液 0.2ml。接种后，小鼠随机分组，每组 10 只，雌雄各半，分为 FP 给药组(300mg/kg)，FP1 给药组(150mg/kg)，FP2 给药组(300mg/kg)和无菌水空白对照组。各组以 0.2ml/10g 体重的剂量分别灌胃给药，连续 7d。最后，以颈椎脱臼法处死小鼠，剥取瘤块，称重，并计算各给药组的抑瘤率^[3]。实验所得的结果如表 1 所示。

$$\text{抑瘤率} = \frac{\text{对照组平均瘤重} - \text{给药组平均瘤重}}{\text{对照组平均瘤重}} \times 100\%$$

由表 1 数据可知，从中华猕猴桃果中获得的粗多糖 FP 和纯化后所得的多糖 FP1、FP2 中，只有 FP2 具有显著的抗肿瘤活性($p < 0.01$)，对肉瘤 S180 的抑制率达到了 50.8%。粗多糖 FP 对于肿瘤细胞 S180 也有一定的抑制作用，但作用不显著($p > 0.05$)。而多糖 FP1 对肿瘤细胞的抑制作用为负值，说明该组小鼠的平均瘤重大于对照组，但不显著($p > 0.05$)。

表 1 FP、FP1 和 FP2 对肉瘤 S180 的影响 ($\bar{X} \pm s$)

Table 1 The effect of FP, FP1 and FP2 to sarcoma S180 ($\bar{X} \pm s$)

组别	剂量(mg/kg)	瘤重(g)	抑瘤率(%)
Group	Dosage(mg/kg)	Tumor weight(g)	Percentage of antitumor effect(%)
对照组	无菌水	0.636 ± 0.310	—
Control	Sterile water		
FP	300	0.529 ± 0.199	16.8
FP1	150	0.773 ± 0.290	-24.5
FP2	300	0.313 ± 0.1831 ¹	50.8

注：与对照组相比，1.p < 0.01。

表 2 不同浓度的 FP2 对肉瘤 S180 的影响 ($\bar{X} \pm s$)

Table 2 The effect of FP2 with different concentration to sarcoma S180

组别	剂量(mg/kg)	体重增加(g)	瘤重(g)	抑瘤率(%)
Group	Dosage(mg/kg)	Weight increment(g)	Tumor weight(g)	Percentage of antitumor effect(%)
对照组	无菌水			
Control	Sterile water	3.68 ± 1.83	1.228 ± 0.343	-
低剂量组	45	4.22 ± 1.48	1.062 ± 0.294	13.5
Low dosage group				
高剂量组	150	5.22 ± 0.861 ¹	0.563 ± 0.2322 ²	54.2
High dosage group				

注：与对照组相比，1. p < 0.05, 2. p < 0.01。

2.2.2 多糖浓度对抗肿瘤活性的影响

为了再次验证多糖 FP2 的抗肿瘤活性, 我们将 FP2 分成低剂量组(50mg/kg)和高剂量组(150mg/kg), 按照与前面相同的方法对 S180 荷瘤小鼠给药。所得的实验结果如表 2 所示。

由表 2 可知, 高剂量的 FP2 给药(150mg/kg), 对肉瘤 S180 的生长有显著的抑制作用($p < 0.01$), 抑瘤率达到 54.2%, 而且小鼠体重增加与对照组相比具有显著性($p < 0.05$)。但以低剂量的 FP2 给药(50mg/kg), 对肿瘤细胞的抑制作用和小鼠体重的变化都不显著($p > 0.05$)。

2.3 多糖 FP2 的初步鉴定

2.3.1 紫外光谱分析

对多糖 FP2 的水溶液进行紫外扫描。

结果表明, 在波长 260nm 和 280nm 处无特征吸收峰, 说明多糖 FP2 不含核酸和蛋白质。

2.3.2 Superdex G75 凝胶柱层析

取 1ml 的多糖 FP2 溶液, 上 Superdex G75 柱(柱高 10cm), 流速为 1ml/min, 以去离子水洗脱, 分部收集(每管 1.5ml), 苯酚-硫酸法检测多糖。

结果表明, 所得的洗脱峰为单一的洗脱峰, 说明多糖 FP2 是均一的组分。

2.3.3 纸色谱分析

称取多糖 FP2 样品 10mg, 置于安瓿瓶中, 加入 2mol/L 的硫酸 2ml, 封口后沸水浴中水解 6h, 水解液离心, 在上清液中加入 BaCO_3 中和过量的硫酸, 再将离心得到的上清液浓缩至适当浓度, 点样于 30×10 的慢速中华层析滤纸上, 展开剂为正丁醇:乙酸:水(4:1:5), 以苯胺-二苯胺显色, 用标准单糖作对照来确定多糖中的单糖组成^[4]。

结果表明, 多糖 FP2 中含有 D-葡萄糖、D-甘露糖和 D-半乳糖。

3 讨论

本文采用 S180 移植瘤模型对从中华猕猴桃果中取得到的粗多糖 FP 和从 FP 中分离得到的 FP1、FP2 进行抗肿瘤活性试验, 发现经阴离子交换层析洗脱得到的多糖 FP2 具有显著的抗肿瘤活性, 对肉瘤 S180 肿瘤细胞的生长有明显的抑制作用, 抑瘤率达到 54.2%(给药剂量 150mg/kg)。而多糖 FP 和 FP1 的抑瘤作用不明显。这说明, 通过离子交换层析, 除去粗多糖 FP 中不具有活性的 FP1 组分后, 得到的 FP2 组分的抗肿瘤活性提高了。

通过考察多糖 FP2 的不同给药剂量, 我们发现, 低剂量给药(50mg/kg)对肉瘤 S180 的抑制作用不明显; 而较高的剂量给药(150、300mg/kg)对肿瘤细胞的生长有明显的抑制作用。这说明如果多糖的给药剂量太小, 就达不到刺激免疫的作用, 因而必须给予足够的剂量, 才能发挥多糖的免疫调节作用。

参考文献:

- [1] 林佩芳, 张菊明, 徐杭明, 等. 中华猕猴桃多糖复合物的抗肿瘤作用[J]. 中华肿瘤杂志, 1988, 10(6): 441-443.
- [2] 侯芳玉, 陈飞, 陆意, 等. 长白山产软枣猕猴桃茎多糖抗感染和抗肿瘤作用的研究[J]. 白求恩医科大学学报, 1995, 21(5): 472-474.
- [3] 甘露, 张声华, 枸杞多糖的抗肿瘤活性和对免疫功能的影响[J]. 营养学报, 2003, 25(2): 200-203.
- [4] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1994.

信息

美国研究人员培植多种颜色的健康胡萝卜

据海外媒体报道, 美国农业部农业研究服务局的研究人员目前正在培植各种不同颜色的健康胡萝卜。这些色彩各异的胡萝卜分别含有不同的、对人体健康有益的营养成分。

据了解, 这些胡萝卜外表呈现出黄色、暗红色、鲜红色以及紫色等, 每种色素中均含有一种能促进人体健康的营养成分。其中, 黄色胡萝卜里含有对人眼睛有益的叶黄素; 暗红、鲜红等红色胡萝卜里含有能防止心脏病和某些癌症的茄红素; 而紫色胡萝卜里则含有花青素成分, 这种花青素能产生强烈的抗氧化作用, 防止人体内细胞遭受被称作自由分子的易分解分子的破坏性影响。

研究人员指出, 这些不同颜色的健康胡萝卜中的营养成分可以较好地为人所吸收。