

油菜花粉多糖的制备及其对荷瘤小鼠的影响

杨晓萍¹, 罗祖友², 吴谋成³

(1. 华中农业大学园艺林学学院, 湖北 武汉 430070; 2. 湖北民族学院生命科学与技术学院, 湖北 恩施 445000; 3. 华中农业大学食品科技学院, 湖北 武汉 430070)

摘 要: 本文以油菜蜂花粉为原料提取制备油菜花粉多糖(RPP), 采用动物抑制性肿瘤法, 以环磷酰胺为对照, 观察RPP的抑瘤作用, 并对其抗氧化作用与抗肿瘤作用的相关性进行研究。结果表明RPP对荷瘤小鼠肿瘤生长有明显抑制作用, 剂量组200mg/kg·d抑瘤率高达51.26%; RPP可以明显增加荷瘤小鼠血清SOD、GSH-Px活性, 降低荷瘤小鼠血清LDH活性、MDA含量, 由此可见, RPP可通过增强机体抗氧化能力而抑制肿瘤生长。

关键词: 油菜花粉多糖; 制备; 抗肿瘤; 抗氧化

Study on Preparation of Rape Pollen Polysaccharide and Its Effect on Tumor-bearing Mice

YANG Xiao-ping¹, LUO Zu-you², WU Mou-cheng³

(1. College of Horticulture and Forestry, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China
2. College of Life Science and Technology, Hubei Nationality Institute, Enshi 445000, China 3. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Preparation of rape pollen polysaccharide (RPP) in rape bee-pollen was studied in this paper. Through transplantable animal tumor, the anti-tumor effect of RPP and the relationship between anti-tumor and antioxidant effect were investigated in comparison with Cy. The results showed that RPP could significantly inhibit the growth of tumor, and the inhibition rate of 200mg/kg·d dosage group was 51.26%. RPP could remarkably increase SOD and GSH-Px activity, decrease LDH activity and MDA content in serum. The anti-tumor effect of RPP might be due to enhancing its antioxidant capacity in tumor-bearing mice.

Key words: rape pollen polysaccharide; preparation; anti-tumor; antioxidation

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)12-0202-03

花粉是一种国际公认营养完全而均衡的天然营养品和保健品, 有增强机体的代谢能力、提高机体免疫力、调节内分泌、改善心血管状态、促生长、抗疲劳、延缓衰老等多种功能^[1]。随着植物多糖免疫增强功能和高效抗癌作用研究的日益深入, 对花粉多糖的研究也引起了人们广泛的关注, 花粉多糖具有较好的抑瘤效果^[2]和免疫增强功能^[3]也初步得到了证实。但有关花粉多糖抗氧化方面研究报道较少, 更未见有关花粉多糖抗氧化与抗肿瘤作用之间的相关性报道。本文以我国主要油料作物油菜(*Brassica campestris* L.)的蜂花粉为原料分离得到油菜花粉多糖, 并对其抗癌、抗氧化作用进行了研究, 旨在探讨RPP的抗癌、抗氧化作用之间的相关性及其抗癌机理。

1 材料与方法

1.1 试验材料

油菜蜂花粉由武汉小蜜蜂保健食品有限公司提供。

1.2 动物与肿瘤

SPF级昆明种小鼠, 体重 20 ± 2 g, 雌雄各半, 由湖北省预防医学科学院实验动物中心提供。S₁₈₀细胞由华中科技大学同济医学院病理研究室提供, 动物生产许可证为SCXK(鄂)2003-0005, 实验设施动物使用许可证号为SYXK(鄂)2003-0014。

1.3 试验方法

1.3.1 油菜花粉多糖的制备

油菜蜂花粉破壁^[4]后, 用热水按最佳工艺流程^[5]提取, 合并提取液, 真空浓缩, 加入3倍体积95%乙醇沉淀, 离心; 沉淀以热水再次溶解, Sevag法脱蛋白, 再加入乙醇, 4℃静置24h, 离心, 收集沉淀, 用95%

收稿日期: 2004-11-18

基金项目: 湖北省十五重点科技攻关项目(2001AA204A03)

作者简介: 杨晓萍(1971-), 女, 副教授, 在读博士, 研究方向为食品化学。

乙醇、无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤后, 挥干即得RPP粗多糖。将RPP经硫酸-蒽酮反应、硫酸-苯酚反应、斐林试剂反应、碘-碘化钾反应、硫酸-吡啶反应、双缩脲反应定性鉴定, 凝胶渗透色谱法(GPC)测定分子量, 气相色谱法测定单糖糖基组成后, 进行动物试验。

1.3.2 接种方法

无菌抽取传代第7d的S₁₈₀小鼠腹腔肿瘤腹水, 以生理盐水制成细胞数为 1×10^6 个/ml的细胞悬液, 每只小鼠右前腋下接种0.2ml。接种次日随机分组, 每试验组12只, 设正常对照组、肿瘤模型组、环磷酰胺对照组、给药组。给药组每天灌服50、100、200mg/kg·d溶液, 环磷酰胺对照组每天灌服20mg/kg·d溶液, 每日一次, 每次0.2ml, 共10d, 正常对照组、肿瘤模型组给等量生理盐水。停药24h摘除眼球取血, 处死小鼠, 剥离瘤块精确称重, 并计算抑瘤率。

1.3.3 GSH-Px、LDH、SOD活性和MDA含量测定

分别以DTNB法^[6]测GSH-Px活性, DNPH显色法^[6]测LDH活性, 黄嘌呤氧化酶(NBT)还原法^[6]测SOD活性, TBA比色法^[7]测MDA含量。GSH-Px、LDH、SOD、MDA测试盒购于南京建成生物工程研究所。

1.3.4 统计学处理

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用SPSS11.5软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 RPP的性状

RPP为淡黄色粉末状固体, 溶于水, 不溶于高浓度的乙醇、乙醚、丙酮等有机溶剂。硫酸-蒽酮反应、硫酸-苯酚反应为阳性, 说明为糖类化合物; 斐林试剂反应为阴性, 说明不含单糖等还原性糖; 碘-碘化钾反应为阴性说明不是淀粉类多糖; 硫酸-吡啶反应、双缩脲反应为阳性, 说明含有糖醛酸和蛋白质; GPC测定分子量大于 2.5×10^4 道尔顿, 说明RPP为多糖类化合物, 经气相色谱分析RPP主要由阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖组成。

2.2 RPP的抑瘤作用

由表1可知, RPP对S₁₈₀肉瘤小鼠肿瘤生长有明显抑制作用, 各剂量组抑瘤率与肿瘤对照组相比差异均达

极显著水平; 且随RPP浓度增加抑瘤率显著增强, 当灌胃剂量为200mg/kg·d时, RPP的抑瘤率可达51.26%, 较环磷酰胺抑瘤率46.22%高出5.04%。

2.3 RPP对荷瘤鼠血清GSH-Px活性的影响

通过测定给药10d荷瘤小鼠血清GSH-Px酶活力可知, 荷瘤小鼠血清GSH-Px活性明显低于正常组, 而RPP可显著增加S₁₈₀肉瘤小鼠血清GSH-Px活性, 除低剂量组差异不显著外, 中、高剂量组均达极显著水平(与荷瘤组相比), 尤其是高剂量组, 可将荷瘤小鼠血清GSH-Px活性恢复至正常水平(见表2)。尽管常用抗癌药环磷酰胺有明显的抗癌效果, 但对荷瘤小鼠血清GSH-Px活性却有明显破坏作用。

表2 RPP对荷瘤鼠血清GSH-Px、SOD酶活性的影响 (n=12, $\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of RPP on GSH-Px, activity and SOD activity in serum of tumor-bearing mice (n=12, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(mg/kg·d)	GSH-Px(U/ml)	SOD(U/ml)
正常组		266.03 ± 5.63** ^{√√}	210.08 ± 40.52 ^{√√}
荷瘤组		174.5 ± 20.58	175.76 ± 46.73 [√]
Cy	20	167.25 ± 23.67	144.28 ± 15.49*
RPP	50	207.75 ± 65.57 [√]	184.45 ± 31.98 [√]
	100	248.75 ± 50.03** ^{√√}	198.83 ± 32.85 ^{√√}
	200	267.25 ± 35.01** ^{√√}	226.04 ± 32.53** ^{√√}

注: *p < 0.05, **p < 0.01, 与荷瘤组比; [√]p < 0.05, ^{√√}p < 0.01, 与Cy组比。

2.4 RPP对荷瘤鼠血清SOD活性影响

由表2结果可看出, 荷瘤小鼠血清SOD活性明显低于正常组, 而RPP能明显提高荷瘤小鼠血清SOD酶活性, 但与荷瘤组相比, 中、低剂量组差异不显著, 仅高剂量组达极显著水平, 将荷瘤小鼠血清SOD酶活性恢复至正常水平。环磷酰胺的使用导致荷瘤小鼠血清SOD酶活性下降, 与荷瘤组相比达显著水平。

2.5 RPP对荷瘤鼠血清LDH活性影响

荷瘤小鼠血清LDH活性显著高于正常组, 环磷酰胺组血清LDH活性高于肿瘤组, 但差异未达显著水平; RPP各剂量组均能降低荷瘤小鼠血清LDH活性, 尤其是中剂量组, 差异达极显著水平, 可使荷瘤小鼠血清LDH活性恢复至正常水平。

2.6 RPP对荷瘤鼠血清MDA含量的影响

由表3可见, RPP各剂量组均可以降低荷瘤小鼠血清MDA含量, 但与荷瘤组相比, 仅200mg/kg·d剂量

表1 RPP的抑瘤作用 (n=12, $\bar{x} \pm s$)

Table 1 Inhibition effect of RPP (n=12, $\bar{x} \pm s$)

组别	荷瘤组	Cy	RPP
剂量(mg/kg·d)	-	20	50 100 200
瘤重(g)	1.19 ± 0.12	0.64 ± 0.11**	0.87 ± 0.16** 0.78 ± 0.15** 0.58 ± 0.12**
抑瘤率(%)		46.22	26.89 34.45 51.26

注: **p < 0.01, 与荷瘤组比。

表3 RPP对荷瘤鼠血清LDH酶活性、MDA含量影响 (n=12, $\bar{x} \pm s$)
Table 3 Effect of RPP on LDH activity and MDA content in serum of tumor-bearing mice (n=12, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(mg/kg·d)	LDH(U/L)	MDA(nmol/L)
正常组		2195.21±368.22 ^{√√}	4.77±0.42 [√]
荷瘤组		2582.04±220.99	7.13±0.75
Cy	20	2768.86±108.57	6.89±0.37
RPP	50	2323.35±347.56 ^{√√}	6.16±0.54
	100	2168.86±376.63 ^{√√}	5.65±0.65 [√]
	200	2433.53±481.06 [√]	4.82±0.82 [√]

注: *p<0.05, **p<0.01, 与荷瘤组比; [√]p<0.05, ^{√√}p<0.01, 与Cy组比。

组达到显著水平, 可将体内血清MDA含量降至正常水平。

3 讨论

花粉具有抗癌作用早已引起国内外学者的广泛关注, 现初步探明花粉抗肿瘤的化学基础主要是花粉多糖。花粉多糖不仅能增强小鼠的免疫功能, 促进相关细胞因子的分泌(作者已做了相关研究, 待发表), 且还能缓解抗肿瘤药、衰老、辐射^[8]所致的免疫功能抑制, 使之恢复至正常水平。本试验结果表明, RPP能显著提高机体抑瘤率, 且存在明显量效关系; 同时, RPP还能显著提高荷瘤小鼠体内抗氧化酶SOD、GSH-Px的活性, 减少脂质过氧化产物MDA含量及降低LDH活性。

SOD、GSH-Px在体内的主要作用是还原过氧化物, 及时清除体内过量自由基。体内过量的自由基不仅容易导致机体衰老, 降低机体免疫功能, 且是导致机体发生癌变的根本原因。MDA为脂质过氧化的终产物, 其生成量的多少反应了过氧化的程度。Cutier等^[9]人研究表明, 动物血清中过氧化物含量越少, 动物寿命越长, 机体含有过多MDA可引起细胞功能改变、基因毒性以及癌变等多种损伤。

机体含有过多自由基, 不仅会导致癌变发生, 且很容易损害细胞膜, 使膜通透性增加, LDH从细胞内进入细胞间增加, 从而使血清LDH升高; 同时, LDH酶是糖酵解的关键酶之一, 肿瘤细胞快速增殖所需能源主要依靠糖酵解, 因此, 细胞发生癌变时, LDH活性

通常会升高^[10]。本试验结果表明, 荷瘤小鼠血清LDH活性明显较正常小鼠增加, 而RPP可有效降低LDH活性, 尤其是100mg/kg·d剂量组, 可将荷瘤小鼠血清LDH酶活恢复至正常水平, 从而抑制肿瘤细胞的快速增殖。

由此可见, RPP可明显提高荷瘤鼠机体抗氧化酶活性, 且与RPP的高效抗癌作用之间具有直接相关性, RPP可通过提高机体抗氧化酶活性来达到抑瘤作用。油菜是主要油料作物之一, 我国是油菜生产大国, 种植面积和总产量居世界首位, 因此, 花粉产量十分惊人, 可广泛利用油菜花粉资源来开发具有良好抗癌、增强免疫的功能食品, 对油菜的综合开发和增加油菜的附加值具有深远意义。

参考文献:

- [1] 郑建仙. 功能性食品(第二卷)[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 718-722.
- [2] 王开发, 邹朝中, 陆明. 玉米花粉多糖抑制肿瘤的作用效应研究[J]. 蜜蜂杂志, 2001, (2): 3-4.
- [3] 耿越, 王开发. 玉米花粉多糖对小白鼠免疫功能影响[J]. 山工师大学学报(自然科学版), 1999, 14(2): 184-186.
- [4] 杨晓萍, 余志勤. 油菜花粉破壁方法研究[J]. 华中农业大学学报, 2004, 23(6): 671-673.
- [5] 杨晓萍, 罗祖友, 吴谋成. 油菜花粉多糖提取工艺条件研究[J]. 食品科学, 25(9): 128-131.
- [6] 郑建仙. 功能性食品(第三卷)[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 195-196, 204-206.
- [7] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K, et al. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction [J]. Anal Biochem, 1979, 95: 351-358.
- [8] 王明锁, 陈政, 黄美英, 等. 蜂花粉受照大鼠抗辐射效应的研究[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 1998, 16(2): 110-112.
- [9] 贾长恩, 牛建昭. 分子细胞学与疾病[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 430.
- [10] Ferrara F, Mrto S. Serum LDH value as a predictor of clinical outcome in acute myelogenous leukemia of the elderly [J]. Br Hematol, 1997, 92(3): 627-631.

学位与研究生教育中文重要期刊