

半枝莲多糖的纯化及对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠的抑瘤作用

张秀娟^{a,b}, 张丽娟^{a,b}, 张晶^c, 季宇彬^{a,b} (哈尔滨商业大学, a. 生命科学与环境科学中心; b. 药物研究所博士后工作站抗肿瘤天然药物教育部工程研究中心; c. 药学院, 哈尔滨 150076)

摘要:目的 将半枝莲粗多糖纯化后测定多糖含量, 并比较粗多糖与精多糖的抑瘤率, 为半枝莲化学及药理研究提供有益的参考。方法 采用分光光度法、苯酚-硫酸显色法, 在 490 nm 处测定其含量; 并利用体内实验测定多糖的抑瘤效果。结果 精多糖的多糖含量为 54.12%, 平均加样回收率为 99.66%, 粗多糖的抑瘤率为 45.96%, 精多糖的抑瘤率为 22.14%。结论 测定多糖含量的方法操作简便, 准确可靠, 精多糖的抑瘤效果没有粗多糖抑瘤效果明显。

关键词: 半枝莲; 多糖; 含量测定; 硫酸苯酚法; 抑瘤率

中图分类号: R931.6; R963

文献标识码: A

文章编号: 1007-7693(2009)01-0006-03

Purification and Determination of Polysaccharide from *Scutellaria barbata* D. Don and Tumor-Inhibitory Effect of Polysaccharide in Mice Bearing of Sarcoma-180

ZHANG Xiujuan^{a,b}, ZHANG Lijuan^{a,b}, ZHANG Jing^c, JI Yubin^{a,b} (a. Center of Reserch & Development on Life Science and Environmental Sciences; b. Center of Institute of Materia Medica, Engineering Research Center of Antitumor Natural Drug, Ministry of Education; c. School of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin, 150076, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To detect the content of purificatus polysaccharide from SPS, and compare the tumor-inhibitory of crude materials and purificatus polysaccharide and provide some references for research on chemistry and pharmacology of polysaccharide from *cutellaria barbata* D. Don. **METHODS** UV-spectrophotometer and phenol-sulfuric method were used, the detection wavelength was 490 nm and tumor-inhibitory effect of polysaccharide was detected through intracorporeal test. **RESULTS** The percent of purificatus polysaccharide was 54.12%, average recovery was 99.66%, the rate of inhibiting tumor of crude and purificatus polysaccharide were 45.96% and 22.14% respectively. **CONCLUSION** This method is simple, convenient, reliable and the anti-tumor activity of crude polysaccharide is better than that of purificatus polysaccharide.

KEY WORDS: *Scutellaria barbata* D. Don; polysaccharide; determination; phenol-sulfuric acid method; rate of inhibiting tumor

半枝莲 (*Scutellaria barbata* D. Don) 为唇形科黄芩属植物, 主要产于江苏、浙江等地。全草入药, 味辛微苦, 性寒, 具有清热解毒、散瘀止血、利尿消肿、抗癌等功效^[1-2], 现代临床应用其治疗癌症、肝炎等且疗效确切。半枝莲多糖是半枝莲中主要功能性成分, 研究表明半枝莲多糖具有抗肿瘤、免疫调节、抗氧化、抗病原微生物等生物活性。但是在研究中只是笼统的将半枝莲多糖提取、分离纯化, 对其纯化后含量测定以及其抗肿瘤作用的研究方面并未做进一步深入研究。笔者进行了粗多糖纯化并对所得多糖的含量进行了测定, 同时对粗多糖和精多糖的抑瘤率进行了比较。

1 药品、试剂及仪器

1.1 药品

含量为 30% 半枝莲多糖 (SBP): 徐州弘康科技有限公司; 黄芪多糖 (APS): 由哈尔滨商业大学博士

后工作站提供; 环磷酰胺 (CTX): 江苏恒瑞医药股份有限公司, 批号: 06061921。

1.2 试剂

氯仿、正丁醇、乙醇、乙二胺四乙酸 (EDAE)、葡萄糖、苯酚、铝片、浓硫酸、H₂O₂ 和 NaHCO₃, 溶剂均为分析纯。

1.3 主要仪器

离心机、pH 计、透析袋、旋转蒸发仪、紫外分光光度计、高精度微量电子称。

1.4 实验动物和瘤株

昆明种小鼠, 体重 (20 ± 2.0) g, S₁₈₀ (肉瘤), 均购自哈尔滨医科大学附属肿瘤医院肿瘤研究所。

2 方法与结果

2.1 多糖的纯化^[3]

2.1.1 除蛋白质 采用 Sevage 法: 取半枝莲粗多糖 5.0 g 溶于 100 mL 水中, 将 20 mL 的 Sevage 液

(氯仿-正丁醇 = 4:1)加入粗多糖液中,混合物剧烈振摇 5 min 后 4 000 r · min⁻¹离心 10 min,蛋白质与氯仿-正丁醇生成凝胶物而分离,除去水层和溶剂层交界处的变性蛋白质,将上层水相反复操作 6 次。

2.1.2 氧化脱色 除蛋白后的多糖溶液调节 pH 为 8~9,加入 10%的 H₂O₂ 100 mL,置 4 °C 冰箱中放置 24 h。

2.1.3 透析 透析袋用 50% 乙醇蒸 1 h,接着依次用 0.01 mol · L⁻¹的 NaHCO₃, 0.001 mol · L⁻¹的 EDAA 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,然后用流动的蒸馏水透析 2 d。

2.1.4 醇沉 将透析过的多糖液经 70 °C 减压浓缩至 50 mL,待自然冷却后加入 95% 乙醇调整乙醇浓度为 80%,沉淀,离心,干燥后得半枝莲多糖精制品 0.16 g。

2.2 多糖的含量测定^[4-9]

2.2.1 标准曲线的制备 精密量取对照品溶液 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 mL, 分别加入到 20 mL 的试管中,依次添加蒸馏水使其最终体积为 2 mL,各管再加入 5% 苯酚 1.0 mL 混匀,迅速加入浓硫酸 5.0 mL,摇匀,室温放置 30 min,流水冲洗降温。在 490 nm 处测定吸收度,以多糖的量(*C*, μg · mL⁻¹)为横坐标,以吸收度(*A*)为纵坐标,绘制标准曲线,经回归处理得线性回归方程。结果表明,葡萄糖质量浓度在 10~60 μg · mL⁻¹内 $y = 0.0148x - 0.0443$, $r = 0.9990$ 。

2.2.2 样品含量测定 取半枝莲精多糖溶液 1 mL (5 份),置于 20 mL 的试管中,依次加入蒸馏水使其最终体积为 2 mL,各管再加入 5% 苯酚 1.0 mL,混匀,迅速加入浓硫酸 5.0 mL,摇匀,室温放置 30 min,流水冲洗降温。在 490 nm 处测定吸收度,结果平均含量为 54.12%。

2.2.3 稳定性试验 取半枝莲精多糖 1 mL,按照“2.2.2”项下方法操作,分别在 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180 min 处测定吸光度值, RSD 为 0.37%, 稳定性良好。

2.2.4 精密度试验 精密称取半枝莲精多糖 10 mg,按照“2.2.2”项下方法操作,测定吸光度,连续测定 5 次, RSD 为 0.35%, 精密度良好。

2.2.5 加样回收率试验 分别精密称取精多糖 0.5 mL (5 份),然后分别加入葡萄糖标准溶液 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mL,用蒸馏水补足 2.0 mL。取 2.0 mL 蒸馏水同法操作做空白,按照上述方法测定

加样回收率。(0.5 mL 的粗多糖供试液相当于粗多糖 50 μg; 每 0.1 mL 的葡萄糖标准溶液相当于葡萄糖 10 μg) 计算平均回收率为 99.66%, RSD 为 1.71%。

2.3 半枝莲多糖对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠瘤重的影响

2.3.1 动物模型的制作 无菌条件下抽取接种 7 d,生长良好的 S₁₈₀ 荷瘤小鼠腹水(癌细胞数 ≥ 95%),用无菌生理盐水体积比 1:4 稀释,按每只 0.2 mL,小鼠右腋部皮下接种。

2.3.2 给药剂量、分组及途径 选用昆明种小鼠,体重(18~22 g),雌雄各半。将小鼠随机分为 9 组,每组 8 只,于接种 24 h 后开始定时腹腔注射给药,分别为半枝莲粗多糖高(200 mg · kg⁻¹)、中(100 mg · kg⁻¹)、低(50 mg · kg⁻¹),半枝莲精多糖高(200 mg · kg⁻¹)、中(100 mg · kg⁻¹)、低(50 mg · kg⁻¹),环磷酰胺(25 mg · kg⁻¹),黄芪多糖(100 mg · kg⁻¹),阴性对照组(相同体积的生理盐水), 0.2 mL · 只⁻¹ · d⁻¹,连续 10 d,停药次日处死,分别称取小鼠体重,瘤块重,计算抑瘤率。进行 3 次重复实验^[10]。

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

2.3.3 数据处理 用 SPSS16.0 软件处理,各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,样本比较采用方差检验。

2.3.4 实验结果 对 S₁₈₀ 小鼠瘤重的影响见表 1, 表 1 半枝莲多糖对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠抑瘤率($n = 8, \bar{x} \pm s$)

Tab 1 Effect of SPS on tumor weight of mice with S180 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别	给药方式	剂量 /mg · kg ⁻¹	瘤重/g	抑制率/%
对照组	ip	-	1.019 3 ± 0.235 9	/
环磷酰胺	ip	25	0.462 2 ± 0.096 5	54.66
黄芪多糖	ip	100	0.647 8 ± 0.057 6	36.45
粗半枝莲多糖	ip	50	0.703 8 ± 0.021 5 ²⁾	30.95
粗半枝莲多糖	ip	100	0.550 8 ± 0.085 1 ²⁾	45.96
粗半枝莲多糖	ip	200	0.802 6 ± 0.085 1 ¹⁾	21.26
纯化半枝莲多糖	ip	50	0.793 6 ± 0.071 0 ¹⁾	22.14
纯化半枝莲多糖	ip	100	0.779 2 ± 0.049 2 ¹⁾	23.56
纯化半枝莲多糖	ip	200	0.872 1 ± 0.045 8	14.44

注:与对照组比较:¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

半枝莲多糖对 S₁₈₀ 小鼠表现出不同的抑瘤作用。与生理盐水组比较粗多糖低、中剂量组表现出良好的抑瘤效果,有显著性差异($P < 0.01$),高剂量有差异($P < 0.05$),与阳性对照比较,中剂量组的抑瘤率处于环磷酰胺组和黄芪多糖组之间;而精多糖的各剂量的抑瘤效果均不如粗多糖明显。

3 讨论

本实验表明半枝莲粗多糖在体内对 S₁₈₀ 肉瘤的生长有一定的抑制作用,肿瘤抑制率以低、中剂量为佳可能与高剂量对胸腺抑制有关^[11];而精多糖的抑瘤效果远不及粗多糖明显,这可能是由于精多糖在精制过程中除去了大量的蛋白质,这些蛋白质与多糖结合共同作用才表现出良好的抑瘤效果。

REFERENCES

- [1] JIANG X G, GU Z L. Chemical constituent and pharmacological effects of *Scutellaria barbata* [J]. Chin Wild Plant Resour(中国野生植物资源), 2004, 23(1): 3-5.
- [2] XIAO H T, LI X. Chemical constituents of *Scutellaria barbata* D. Don [J]. J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报), 2006, 23(10): 637-640.
- [3] SHENG J R, ZENG L H, ZAI C, et al. The Extraction, isolation and structure analysis of polysaccharids [J]. J Guangxi Teachers Education Univ(Nat Sci Ed) (广西师范学院学报:自然科学版), 1999, 4(16): 49-54.
- [4] YANG L S, LI Y X, LI M L, et al. Determination for the content of polysaccharides in the *Lilium Brownii* by phenol-vitriolic [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med(中国中医药信息杂志), 2004, 8(11): 704-705.

- [5] ZHANG J X, KONG X L, JIANG W Z. Determination of amylose in long yan shen [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学杂志), 2002, 19(2): 108-190.
- [6] WAN P J, YANG D G, L. Determining the polysaccharides from *Polygala tenuifolia* by phenol-sulphate colormetry [J]. West China J Pharm Sci(华西药科学杂志), 2005, 4(20): 337-339.
- [7] MA W K, YANG L Q, WU X Y, et al. Study on extraction of polysaccharides from *Scutellaria barbata* and their immunomodulation [J]. Acad J Jiangsu Univ(Med Ed) (江苏大学学报:医学版), 2007, 7(4): 315-317.
- [8] LI J. Comparison of polysaccharide in herba *Scutellariae barbatae* from different places [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med(中国中医药信息杂志), 2006, 10(10): 49-50.
- [9] XUE M, WANG Z J, ZHOU J. Microwave extraction and determination of total flavonoids and polysaccharides in *Scutellaria barbata* D. Don [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2005(10): 965-966.
- [10] JI Y B, GAO S Y, ZHANG X J. Studies on anti-tumor activities of *Sargassum fusi forme* polysaccharide (SFPS) and its mechanism [J]. Chin J Mar Drugs(中国海洋药物), 2004, 23(4): 7-9.
- [11] LU P C, XU Y M. Effects of *Scutellaria barbata* on the regulation of cell immunity [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med(南京中医药大学学报), 1989(2): 32-33.

收稿日期: 2007-12-25