

水溶性高支化多糖及硫酸酯衍生物抗癌活性研究*

陶咏真^{1,2} 张俐娜^{1**} 韩 露³ 曾凡波³ 丁 侃⁴

(¹ 武汉大学化学与分子科学学院 武汉 430072)

(² 武汉科技学院 新型纺织材料绿色加工及其功能化教育部重点实验室 武汉 430073)

(³ 华中科技大学同济医学院药理学系 武汉 430030) (⁴ 中国科学院上海药物研究所 上海 201203)

摘 要 从虎奶菇菌核中提取出一种水溶性高支化葡聚糖,并用氯磺酸和吡啶在无水二甲亚砜中进行硫酸酯衍生化,制备出硫酸酯衍生物.用巴比赛小鼠动物实验研究该多糖及其硫酸酯衍生物的体内抗肉瘤 S-180 活性,以及用肝癌细胞株 HepG2 研究体外活性,同时讨论多糖分子尺寸与抗癌活性的关系.通过形态学、组织切片、以及酶联免疫法研究硫酸酯化对多糖抗肿瘤活性的影响.结果表明,支链多糖的均方根旋转半径在 42.5 ~ 113 nm 之间,显示出较高的体内和体外抗肿瘤活性,硫酸酯衍生物的均方根旋转半径在 17.8 ~ 34.9 nm 之间,抗癌活性随其分子尺寸的增大而逐渐提高.多糖及其硫酸酯衍生物能诱导人体肝癌 HepG2 细胞凋亡,且具有时间依赖性.它们对免疫反应的调节作用可通过肿瘤坏死因子 TNF- α 来介导.

关键词 高支化多糖, 分子尺寸, 链构象, 硫酸酯化, 抗肿瘤活性

真菌多糖显示多种生物活性,在生物医药和食品保健等领域具有广泛应用前景^[1-4].多糖抗肿瘤活性与它诱导肿瘤细胞凋亡和坏死相关.自 1972 年病理学家 Kerr^[5] 首次提出细胞凋亡的概念后,涌现出从细胞、核染色质和分子水平等角度检测凋亡的新技术及新方法.然而,形态学观察仍是判断凋亡最经典、最可靠的方法^[6,7].多糖一方面可促进肿瘤细胞凋亡与坏死,另一方面还可促进白介素-1 (IL-1)、白介素-2 (IL-2)、白介素-6 (IL-6) 和肿瘤坏死因子 (TNF- α) 等细胞因子的表达与分泌.1975 年 Carswell 等^[8] 提出 TNF- α 的概念后,人们对它的研究进入一个新时代,并且取得巨大的进展. TNF- α 具有双重生物学效应,在浓度较低时,主要作为白细胞和内皮细胞的自分泌及旁分泌的调节物,参与抵抗细菌、病毒和寄生虫的感染,促进组织修复及调节炎症反应,引起肿瘤细胞凋亡等.在高浓度时,过量的 TNF- α 在体内产生和释放则会破坏机体的免疫平衡,与其他炎症因子一起产生多种病理损伤^[9].

前几年报道主要强调多糖分子量及链构象对抗肿瘤活性的影响^[10-13].例如,茯苓多糖,一种线型的葡聚糖,经硫酸酯化后,分子量在 3.64×10^4

~ 7.06×10^4 范围内,其抗肿瘤活性随分子量的增大而逐渐增强;当分子量高于 8.81×10^4 时,抗肿瘤活性逐渐下降^[12].最近发现,高支化多糖衍生化后,分子量高达 31.5×10^4 时,也具有较高的生物活性(肿瘤抑制率为 72.1%)^[14].这可能与高支化多糖在溶液中呈球形链构象以及链尺寸较小有关.球形的链构象使多糖具有比相同分子量线型多糖更小的均方根旋转半径和体积.因此,研究多糖对肿瘤细胞的作用时,多糖分子尺寸的影响比分子量影响更直接.

前文^[14,15],我们从虎奶菇中分离出一种水溶性高支化多糖 TM3b.分级后,将其中几个级分进行硫酸酯化,研究了 TM3b 高支化多糖及其衍生物的结构和溶液性质.本文试图对这些结构清晰的多支化多糖进行结构与生物活性之间的构效关系研究.主要采用巴比赛小鼠 (BALB/C) 动物实验研究多糖及硫酸酯衍生物体内抗肉瘤 Sarcoma 180 (S-180) 活性,用肝癌细胞株 HepG2 研究体外活性.通过形态学、组织切片、以及酶联免疫法研究硫酸酯化对虎奶菇水溶性高支化多糖抗肿瘤活性的影响及抗肿瘤活性初步机理.

* 2008-09-23 收稿,2008-10-09 修稿.国家自然科学基金重点项目(基金号 30530850)和面上项目(基金号 20474048,20874079)以及国家高技术研究发展计划(863 计划,项目号 2006AA02Z102)资助项目; ** 通讯联系人, E-mail: lnzhang@public.wh.hb.cn

1 实验部分

1.1 多糖及其衍生物试样制备

采用高温高压的方法从虎奶菇菌核中提取出水溶性多糖,编号为 TM3b.采用红外光谱、 ^{13}C 核磁共振和气相色谱-质谱联用等检测其结构,结果表明 TM3b 是一种高支化多糖^[15].用重沉淀分级法对其进行分级,得到分子量范围为 $57.3 \times 10^4 \sim 7.75 \times 10^4$ 的 8 个级分,其中 5 个级分(F2、F3、F4、F5 和 F8)被硫酸酯化.运用激光光散射和黏度法研究衍生化前后的分子尺寸及链构象,结果表明 TM3b 及其硫酸酯衍生物在水溶液中都呈球形链构象^[14].用于本工作的原始多糖及衍生物试样标记及分子参数详见文献[14].

1.2 体内抗 S-180 肿瘤活性试验

S-180 肿瘤细胞株由华中科技大学同济医学院动物中心提供.试验动物采用无菌清洁级 BALB/c 雌性小鼠,8 周龄,体重 $(19 \pm 1)\text{g}$.在无菌条件下,从培养 1 周的荷瘤小鼠腹腔中抽取出含 S-180 腹水,用无菌生理盐水稀释至 1:20 浓度.摇匀后取此稀释细胞液加入台盼蓝(Trypan blue)将细胞染色,混合均匀后用血球计数器(hemocytometer)在显微镜下进行细胞计数.在无菌条件下,将 S-180 肿瘤细胞液 0.2 mL(细胞浓度为 5×10^6 cells/mL)接种于试验小鼠的右前肢腋皮下制备移植瘤模型.24 h 后将小鼠随机分组,每组 10 只.治疗组将多糖级分或硫酸酯衍生物溶解于 0.9% NaCl 水溶液中,以高低两种浓度(20 mg/kg 和 60 mg/kg)的剂量注射给药.阳性对照组注射 5-氟脲嘧啶(5-fluorouracil, 5-Fu),剂量为 20 mg/kg;阴性对照组不给药只注射等体积无菌 0.9% NaCl 水溶液.小鼠接种 24 h 后开始给药,连续 8 天对小鼠进行腹腔注射,每天给药 1 次,每次注射量为 0.2 mL.给药结束后,将小鼠称重,然后颈椎脱臼处死,解剖并剥离瘤块,称重.由式(1)和(2)计算肿瘤抑制率(ξ)和小鼠体重变化率(f).

$$\xi = [(W_c - W_t)/W_c] \times 100\% \quad (1)$$

$$f = [(W_a - W_b)/W_b] \times 100\% \quad (2)$$

式中 W_t 为治疗组或阳性对照组小鼠肿瘤的平均重量, W_c 为阴性对照组肿瘤的平均重量, W_b 和 W_a 分别为给药前后每组小鼠的平均体重.

1.3 体外抗人体肝癌 HepG2 细胞活性试验

人体肝癌细胞株(HepG2)由华中科技大学同

济医学院药学系实验室提供.体外抗 HepG2 细胞试验在标准无菌条件下进行.取培养液稀释细胞悬浮液配成人体肝癌 HepG2 细胞浓度为 1×10^6 cells/mL 的溶液,并将细胞悬浮液(100 μL)均匀接种在 96 孔平板的每个孔中.试验组分别加入 20 μL 不同浓度的试样溶液(试样溶于 0.9% NaCl 水溶液,使每孔试样浓度分别为 0.002、0.02 和 0.2 mg/mL).阳性对照组加入浓度为 0.2 mg/mL 的 5-氟脲嘧啶(5-Fu)溶液 20 μL ,阴性对照组中只加入空白培养液.然后将 96 孔板放入细胞培养箱中孵育 24 h,再在 96 孔板中加入 10 μL 终浓度为 5 mg/mL 的四甲基偶氮唑蓝(MTT, 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide),继续培养 4 h 后,离心除去上清液,加入 100 μL Me_2SO ,轻轻振荡以使结晶物完全溶解.活的肿瘤细胞通过自动酶标仪(Bio-Tek ELx 800, USA)在波长为 540 nm 下比色测定每孔光强度(OD)值,然后由试验组和阴性对照组的 OD 值按式(3)计算试样对人体肝癌 HepG2 细胞的抑制率(Φ):

$$\Phi = [(OD_a - OD_b)/OD_a] \times 100\% \quad (3)$$

式中 OD_a 和 OD_b 分别为阴性对照组和试验组的光强度.

1.4 Hoechst/PI 双荧光染色法对凋亡的评价

将人体肝癌细胞株 HepG2 置于含 10% 小牛血清、青霉素 100 mg/mL 和链霉素 100 mg/mL 的合成培养基 RPMI-1640(Roswell Park Memorial Institute)中.用 NaHCO_3 调节 $\text{pH} = 7.2$,在 37°C 含有 5% CO_2 和 100% 湿度大气的恒温培养箱中培养并达到细胞浓度为 10^6 cells/mL 的对数增长期.将支化多糖 F3 及其硫酸化衍生物 S-F3 溶液加入到上述肝癌细胞悬浮液中,使 F3 和 S-F3 与 HepG2 细胞作用不同时间(0、12 和 24 h),离心收集处理了不同时间的 HepG2 细胞,并用磷酸盐缓冲溶液(PBS)清洗.采用 Hoechst 33342/PI 双染色,通过荧光显微镜观测 HepG2 细胞的凋亡和坏死.方法简述如下,在暗室,用细胞非渗透染料碘化丙啶 PI(20 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Sigma)和细胞渗透性染料 Hoechst 33342(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Sigma)将多糖及其衍生物作用不同时间后收集的 HepG2 细胞染色 15 min.然后在荧光显微镜(Olympus DP70, Tokyo, Japan)下观察试样对 HepG2 细胞核形态的影响.在荧光显微镜下的随机视野中计数至少 500 个细胞,将凋亡细胞核形态与正常细胞核形态进行比较,并记录凋亡(包括早期凋亡和晚期)凋亡细胞的数目.细胞凋亡指数(AI),即凋亡细胞的百

分率,可由式(4)计算:

$$AI = AN/TN \times 100\% \tag{4}$$

式中 AN 和 TN 分别为凋亡细胞和总细胞数目.

1.5 小鼠肿瘤和脾脏的组织学(histology)观察

小鼠体内活性试验进行 8 天后,将小鼠处死,立即对其肿瘤组织及脾脏进行取材.取材的组织块用 10% 中性福尔马林固定 24 h,用乙醇为脱水剂对组织块进行脱水,二甲苯透明后进行浸蜡和包埋.用切片机(Leica RM-2125, Germany)进行石蜡切片,厚度为 5 μm . 苏木精和伊红染色(H&E staining)后用光学显微镜观察.

1.6 小鼠细胞浆(plasma)的制备及血浆中 TNF- α 含量测试

多糖 F5 和硫酸酯衍生物 S-F4 以每 kg 小鼠体重 20 mg 的剂量对背部植入 S-180 实体肉瘤的 8 周大 BALB/C 雄性小鼠进行连续 8 天腹腔注射给药.停药 24 h 后,每个测试组的一半小鼠以每只 1 μg 剂量静脉注射脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)作为引发剂. LPS 在小鼠体内作用 1 h 以后,经 LPS 引发的和未经 LPS 引发的小鼠麻醉后由眼部取得血样.血样中加入肝素(heparin)作为抗凝血剂,然后以 1000 g 转速离心 10 min,收集上清液作为血浆样本,测试多糖及其硫酸酯衍生物对小鼠体内细胞因子含量的影响.

血浆中 TNF- α 含量采用固相酶联免疫吸收法(ELISA)测试.浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的鼠抗 TNF- α 单克隆抗体(PharMingen, San Diego, CA)贴附固定在 96 孔平底测试板上,加入 0.1 mol/L 重碳酸盐缓冲液(pH 9.6)并置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中避光过夜孵育.平底测试板用含有重量百分比为 0.05% Tween20 的磷酸缓冲液(PBST)冲洗,在室温下加入测试稀释液(含 10% 小牛血清的 PBS 溶液, pH = 7.0)作用 60 min,封闭未分开的抗体与缓冲液.用 PBST 彻底冲洗测试板后,分别加入 100 μL 标样(鼠类重组 TNF- α ; PharMingen)和制备的 BALB/c 小鼠血浆样品(10 μL 血浆试样用测试稀释液稀释至 100 μL),在室温下与 TNF- α 单克隆抗体作用 120 min.接着在平底测试中加入稀释 2000 倍的测试抗体(鼠抗 TNF- α 多克隆抗体),在室温下保育 60 min.反复冲洗和封闭后,平底测试板中加入稀释 5000 倍的抗生素蛋白-辣根过氧化物酶(PharMingen)与 TNF- α 多克隆抗体结合并在室温下保持 30 min.最后一次用 PBS 冲洗后,与过氧化物酶结合的二抗在室温下加入含有 3, 3', 5, 5'-四甲基二

氨基联苯(TMB, PharMingen)的培养基溶液,并保持 30 min.加入反应中止液(2 mol/L H_2SO_4)后,检测 96 孔平底测试板在 450 nm 处的吸光率,并在 570 nm 处修正波长.由鼠类重组 TNF- α 标样的标准曲线,计算小鼠血浆中 TNF- α 的浓度.

1.7 统计分析

所有试验重复 3 次,试验结果采用 t 检验(Student's t-test)方法进行统计分析, p 值小于 0.05 时认为试验组与对照组存在显著差异.

2 结果与讨论

2.1 体外抗肿瘤活性

前文指出多糖 TM3b 级分在不同浓度条件下(0.002、0.02 和 0.2 mg/mL)对 HepG2 细胞增殖都显示一定的抑制作用^[14],而且抑制率具有明显的剂量依赖关系,表明它们对 HepG2 细胞增殖有较稳定的抑制能力.分子量较高的级分(分子量范围在 $3.71 \times 10^6 \sim 3.90 \times 10^7$)比低分子量的级分显示更高的体外抗 HepG2 细胞增殖活性.据报道^[16],线型(1 $\rightarrow$ 3)- β -葡聚糖的分子量在 $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$ 之间具有最强生物活性.前文证明 TM3b 高支化多糖呈球状链构象^[14,15],从分子尺寸看,这些高分子量级分的均方根旋转半径 $\langle S^2 \rangle_z^{1/2}$ (67.2 ~ 113 nm)比相同分子量的线型多糖的 $\langle S^2 \rangle_z^{1/2}$ 小得多^[17,18].因此,较高分子量的高支化多糖级分仍具有较强生物活性可能与它具有球形链构象和较小的分子尺寸有关. TM3b 各级分对 HepG2 细胞增殖抑制率的体外活性与 $\langle S^2 \rangle_z^{1/2}$ 的依赖关系示于图 1.当 $\langle S^2 \rangle_z^{1/2}$ 达 83.2 nm 时, TM3b 高支化多糖对 HepG2 细胞增殖抑制率的体外活性最强.此外,硫酸酯衍生物 S-TM3b 对 HepG2 细胞增殖抑制率的体外活性结果表明,所有硫酸酯衍生物显示出比原始多糖更高的体外抗 HepG2 细胞增殖作用^[14](参看图 1 和图 2).硫酸根在硫酸酯多糖的生物活性中起着一定的作用.硫酸根聚阴离子具有强负电荷,能与病毒分子或细胞表面的正电荷分子结合,从而阻断病毒对细胞的吸附,消除细胞病变^[19].另外,多糖糖单元上的羟基被硫酸酯基取代后,引起多糖立体结构的变化,例如硫酸酯基间的排斥作用导致多糖链构象呈相对伸展状态,从而使多糖抗癌活性增强^[20].硫酸酯多糖 S-F2、S-F3 和 S-F8 在 2 mg/mL 浓度时的抑制率分别达到 54.7%、58.2% 和 69.5%,甚至超过 5-氟脲嘧

啉(5-Fu)在 0.2 mg/mL 浓度下的抑制率(36.1%)。S-TM3b 各级分对 HepG2 细胞增殖抑制率的体外活性与 $\langle S^2 \rangle_z^{1/2}$ 的依赖关系示于图 2。在该工作研究的 $\langle S^2 \rangle_z^{1/2}$ 范围内,S-TM3b 对 HepG2 细胞增殖抑制率的体外活性随 $\langle S^2 \rangle_z^{1/2}$ 增大而逐渐增强。这些硫酸酯衍生物的分子尺寸在 25 ~ 35 nm 之间。硫酸酯化过程中,多糖分子发生了一定程度的降解,导致分子尺寸减小。但其对 HepG2 细胞增殖抑制率一直上升。基于以上结果表明链刚性增加及适当的分子尺寸(35 ~ 100 nm)有利于多糖抑制 HepG2 细胞增殖。

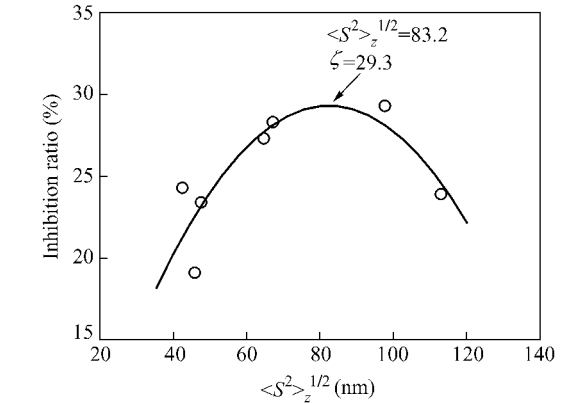


图 1 抑制率 of proliferation of HepG2 liver cancer cells *in vitro* versus radius of gyration ($\langle S^2 \rangle_z^{1/2}$) for the TM3b(0.2 mg/mL) fractions of F2, F3, F4, F5, F6, F7, and F8 with $\langle S^2 \rangle_z^{1/2} = 113, 97.7, 64.7, 67.2, 45.9, 47.6, \text{ and } 42.5$ nm, respectively

2.2 体内抗 S-180 肿瘤活性

TM3b 级分及 5-Fu 在小鼠体内抗 S-180 肿瘤

表 1 Antitumor activity of the TM3b and S-TM3b fractions from the sclerotia of *P. tuber-regium* against xenografted S-18 tumor grown in BALB/C mice

Sample	$\langle S^2 \rangle_z^{1/2}$ (nm)	Dose (mg/kg·days)	Inhibition ratio (%)	Enhancement ratio of body weight (%)	Complete regression
5-Fu		60 × 8	48.6 [*]	16.7	0/10
F2	113.0	20 × 8	17.9	22.6	0/10
		60 × 8	39.7	45.3	0/10
F3	97.7	20 × 8	30.5	29.2	0/10
		60 × 8	67.9 [*]	39.0	0/10
F5	67.2	20 × 8	32.1	32.5	0/10
		60 × 8	51.3 [*]	40.5	0/10
F8	42.5	20 × 8	42.3	37.2	0/10
		60 × 8	38.5	26.0	0/10
S-F2	30.9	20 × 8	21.6	35.1	0/10
		60 × 8	72.1 [*]	10.3	0/10
S-F3	25.3	20 × 8	17.0	30.9	0/10
		60 × 8	24.3	29.1	0/10
S-F5	22.0	20 × 8	39.6 [*]	22.9	0/10
		60 × 8	36.9 [*]	30.5	0/10
S-F8	34.9	20 × 8	25.2	25	0/10
		60 × 8	44.0 [*]	26.9	0/10

P < 0.05, statistically significant when compared to the control

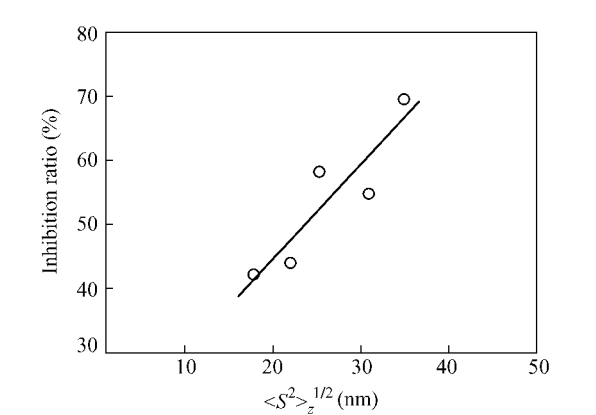


图 2 Inhibition ratio of proliferation of HepG2 liver cancer cells *in vitro* versus radius of gyration ($\langle S^2 \rangle_z^{1/2}$) for the S-TM3b(0.2 mg/mL) fractions of S-F2, S-F3, S-F4, S-F5, and S-F8

细胞活性结果示于表 1。F3($\langle S^2 \rangle_z^{1/2}$ 为 97.7 nm)的抗癌活性最高。值得一提的是,两个级分(F3 和 F5)的高剂量组在体内抗 S-180 肿瘤细胞活性接近甚至超过 5-Fu,而且给药后治疗组小鼠体重增加也明显高于 5-Fu 组。由此说明多糖抗癌作用机制与 5-Fu 不同,多糖基本不具有细胞毒性,而 5-Fu 在杀死肿瘤细胞的同时也杀死正常细胞。TM3b 硫酸酯衍生物在小鼠体内抗 S-180 肿瘤细胞活性结果也示于表 1。在所有研究的硫酸酯衍生物中,S-F2($\langle S^2 \rangle_z^{1/2}$ 为 30.9 nm)的高剂量组具有最高的体内抗 S-180 肿瘤细胞活性。与原始多糖相比,除了 S-F2,硫酸酯衍生物体内抗 S-180 肿瘤细胞活性并未发现显著提高。

2.3 Hoechst/PI 双荧光染色法和凋亡的评估

PI 和 Hoechst 都是 DNA 染料,其中 PI 是细胞非渗透性染料,只能将胞膜破裂的核染为红色;Hoechst 是细胞渗透性染料,染色所有的核为蓝色.活细胞只被 Hoechst 染成蓝色,坏死细胞由于胞膜破裂而被 PI 高染为红色(Hoechst 低染)^[21].因此,用荧光染料 PI/Hoechst 双染色后,可通过荧光显微镜观察凋亡细胞的形态变化.同时,PI/Hoechst 双荧光染色也可用于凋亡常规定量分析^[6].凋亡是一个相对缓慢的过程,12 h 前 PI 阳性的细胞是坏死细胞;12 h 后 PI 阳性,但可见核染色质浓聚或核碎片的认定为晚期凋亡细胞^[6].早期凋亡细胞由于胞膜的完整性只被 Hoechst 染

成蓝色.图 3 示出多糖(F3)和硫酸酯多糖(S-F3)处理 HepG2 细胞分别为 0、12 和 24 h 后,用 PI/Hoechst 双染荧光显微镜观察的细胞核形态.蓝色的圆核代表活细胞.红色的圆核代表坏死细胞.蓝色,核呈固缩状或存在核碎片代表早期凋亡细胞;红色,可见核染色质的浓聚或存在核碎片代表晚期凋亡细胞.在图 3 中(0 h),绝大多数是活细胞,几乎未观察到凋亡和坏死细胞.多糖(F3)和硫酸酯多糖(S-F3)处理 HepG2 细胞 12 h 后,可观察到具有细胞浓缩、核染色质浓聚凋亡特征的细胞以及肿胀的坏死细胞.由此表明高支化多糖及其硫酸酯衍生物具有促进 HepG2 细胞凋亡的功能.而且,凋亡和坏死细胞的比例随试样作用时间延长

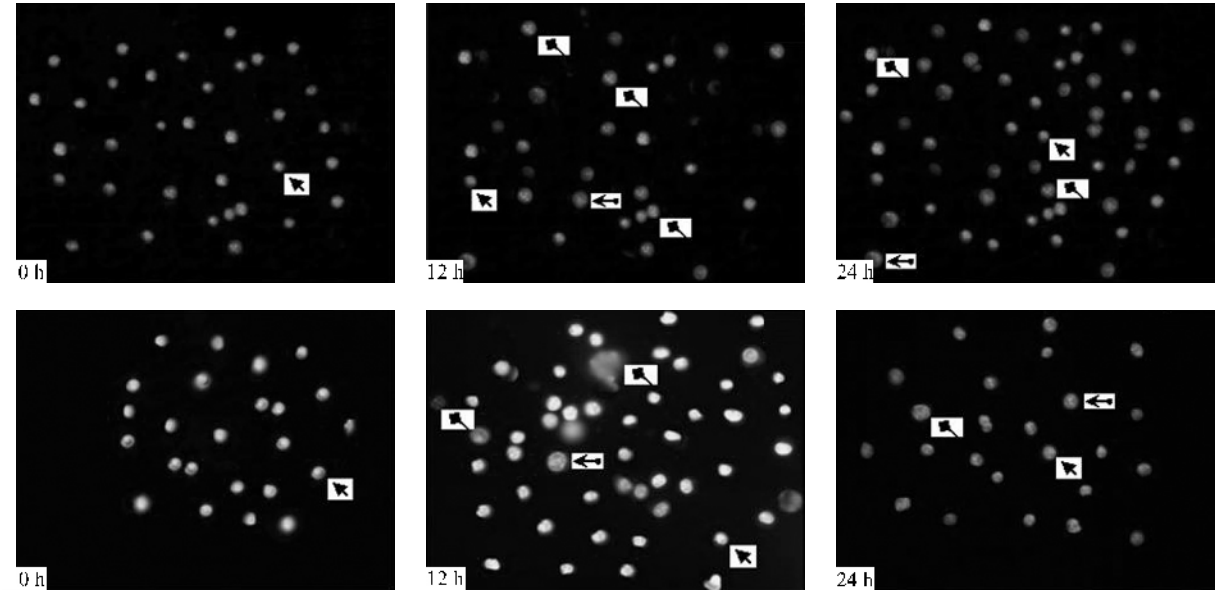


图 3 HepG2 细胞分别用 F5 (上方) 和 S-F3 (下方) 处理 0 h (a)、12 h (b) 和 24 h (c) 后用 PI/Hoechst 核染色并借助荧光显微镜观察.照片是用 Olympus DP70 相机在 320 倍放大下拍摄的.活细胞(三角箭头),凋亡细胞(四角箭头)和坏死细胞(三角箭头和点)被标记.

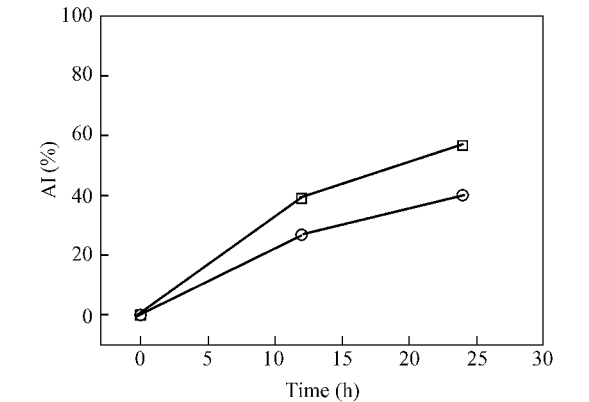


图 4 F3 (□) 和 S-F3 (○) 在 HepG2 细胞中诱导凋亡的时间-剂量关系图(0.2 mg/mL)

而增加.在 2 mg/mL 浓度下多糖(F3)和硫酸酯多糖(S-F3)诱导 HepG2 细胞凋亡的时间依赖关系示于图 4.可以看出,HepG2 细胞凋亡率具有明显的时间依赖关系.由此表明,多糖(F3)和硫酸酯多糖(S-F3)能同时诱导人体肝癌 HepG2 细胞的凋亡和坏死,有望用于抗肝癌候选药物的研究.

2.4 小鼠组织的 HE 染色法观察

图 5 示出光学显微镜观察到的阴性对照组(a)、阳性组(b)和实验组(c, d)的 S-180 肿瘤组织照片.从光镜下可见,未经过任何治疗的阴性对照组(a)的肿瘤细胞生长正常,坏死面积较小,肿瘤细胞异型性明显,肿瘤组织表面无明显的脂肪组

组织,可观察到血管转移灶.经 5-Fu 治疗的阳性组 (b)的肿瘤细胞出现大面积坏死区,肿瘤组织周边有脂肪组织包裹,说明肿瘤生长受到限制.经多糖及其衍生物治疗的实验组 (c, d)的肿瘤细胞与阳

性组相似,均促进肿瘤坏死.但实验组同时也能观察到某些肿瘤细胞的核染色质浓缩和边聚,说明这种高支化多糖及其衍生物能引导肿瘤细胞凋亡.

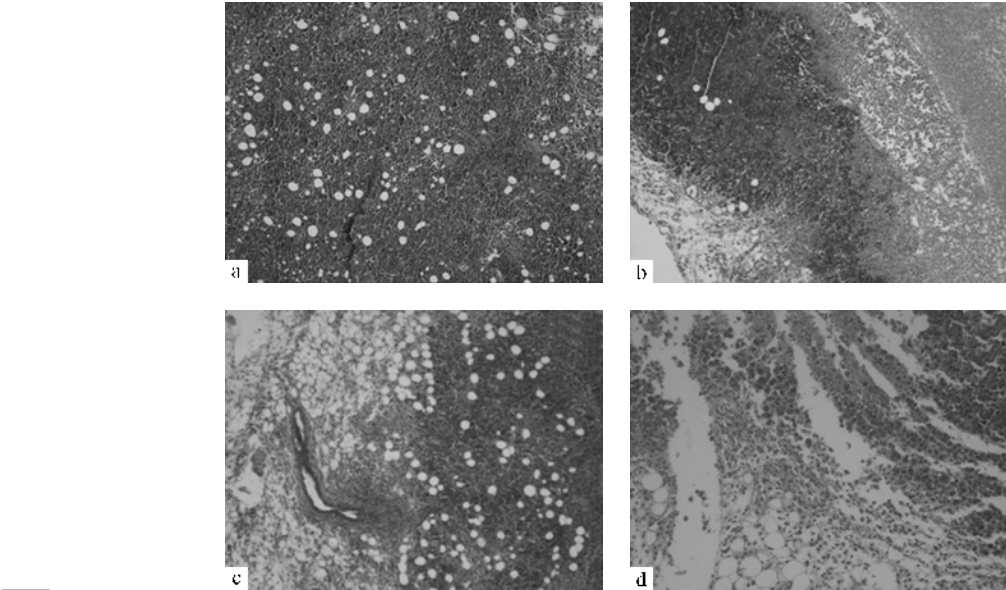


Fig. 5 Histological section of tumor in negative control group (a), 5-Fu (b), F3 (c) and S-F2 (d)

2.5 小鼠血浆 TNF-α 含量

图 6 示出 ELISA 法测试小鼠血浆中 TNF-α 含量的标准曲线. F5 和 S-F4 对小鼠处理后,经 LPS (每只小鼠注射量为 10 μg) 激活前后小鼠血浆 TNF-α 含量结果示于表 2. 可以看出,没有静脉注射 LPS 的小鼠,其体内 TNF-α 的含量与对照组相比无明显变化.在 LPS 刺激作用下,接种肿瘤小鼠血浆中 TNF-α 含量明显升高.值得注意的是,与对照组相比,原始多糖 F5 高剂量治疗组的 TNF-α 含量有很明显的降低,这说明多糖对高浓度 TNF-α 的产生有抑制效应.但是,与对照组相比,原多糖 F5 及硫酸酯衍生物多糖 S-F4 的低剂量组能显

著增加小鼠体内 TNF-α 的含量.由此说明,该多糖是一种免疫调节剂,能根据机体的外部环境刺激免疫系统进行调节从而达到抗肿瘤活性作用.

Table 2 Priming effect of F5 and S-F4 on TNF-α production in the plasma of mice

Sample	Dose (mg/kg·days)	TNF-α			
		No LPS-triggered		LPS-triggered	
		A	Concentration (pg/mL)	A	Concentration (pg/mL)
F5	60 × 8	0.234	53.9	1.107	1612.8
	20 × 8	0.320	207.5	2.404	3928.9
S-F4	60 × 8	0.249	80.7	2.035	3270.0
	20 × 8	0.267	112.8	2.419	3955.7
Control group	20 × 8	0.246	75.4	1.972	3157.5

3 结论

高支化多糖及其硫酸酯衍生物都显示较高的体内、外抗肿瘤细胞活性.而且硫酸酯衍生物在体外对人体肝癌 HepG2 细胞增殖抑制率活性明显比原始多糖高,这归功于硫酸酯基的引入.结果表明链刚性增加及适当大小的尺寸 (35 ~ 100 nm) 有利于多糖抗癌活性提高.荧光显微镜的形态学观察揭示多糖及其硫酸酯衍生物能诱导人体肝癌 HepG2 细胞凋亡,且具有时间依赖性.组织学观察

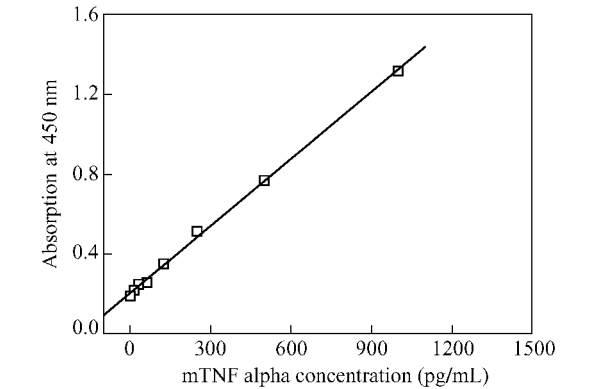


Fig. 6 Representative standard curve for m TNF-α ELISA

结果表明多糖及硫酸酯衍生物可促进肿瘤细胞坏死. 多糖及其衍生物试样的低剂量治疗组可以在 LPS 的刺激下进一步促使小鼠体内 TNF- α 含量增高,高剂量组在 LPS 的刺激下能非常明显地抑制 TNF- α 在血浆中的生成,表明它们对免疫反应的

调节可通过 TNF- α 细胞因子介导,这与内毒素 LPS 作用无关. 由此证明高支化多糖及其硫酸酯衍生物是一种免疫调节剂,可根据机体的外部环境刺激免疫系统进行调节从而达到抗肿瘤活性作用.

REFERENCES

1 Azzam T,Raskin A,Makovitzki A,Brem H,Vierling P,Lineal M,Domb A J. *Macromolecules*,2002,35 9947 ~ 9953

2 Redgwell R J,Fischer M. *Mol Nutr Food Res*,2005,49 521 ~ 535

3 Wasser S P,Weis A L. *Crit Rev Immunol*,1999,19 55 ~ 96

4 Kanekiyo K,Lee J B,Hayashi K,Takennaka H,Hayakawa Y,Endo S,Hayashi T. *J Nat Prod*,2005,68 1037 ~ 1041

5 Kerr J F,Wyllie A H,Currie A R. *J Cancer*,1972,26 239 ~ 257

6 Liu L,Trimarchi J R,Keefe D L. *Biol Reprod*,1999,61 1162 ~ 1169

7 Harmon B V,Allan D J. Apoptosis. In Hall J C,Dunlap J C ed. *Advances in Genetics*. San Diego :Academic Press,1997,Vol. 35 35 ~ 56

8 Carswell E A,Old L J,Kassel R L,Green S,Fiore N,Williamson B. *Proc Natl Acad Sci,USA*,1975,72 3666 ~ 3670

9 Ishida Y,Kondo T,Tsuneyma K. *J Leukoc Biol*,2004,75 59 ~ 67

10 Bao X,Duan J,Fang X,Fang J. *Carbohydr Res*,2001,336 127 ~ 140

11 Zhang M,Cheung P C K,Ooi V E C,Zhang L. *Carbohydr Res*,2004,339 2297 ~ 2301

12 Huang Q,Zhang L,Cheung P C K,Tan X T. *Carbohydr Polym*,2006,64 337 ~ 334

13 Ding Q,Zhang L,Zeng F. *Chinese J Polym Sci*,1998,16(1) 62 ~ 66

14 Tao Y,Zhang L,Cheung P C K. *Carbohydr Res*,2006,341 2261 ~ 2269

15 Tao Y,Zhang L. *Biopolymers*,2006,83 414 ~ 423

16 Bohn J A,BeMiller J N. *Carbohydr Polym*,1995,28 3 ~ 14

17 Ioan C E,Aberle T,Burchard W. *Macromolecules*,2001,34 3765 ~ 3771

18 Tao Y,Zhang L,Yan F,Wu X. *Biomacromolecules*,2007,8 2321 ~ 2328

19 Jeon K J J,Katsuraya K,Inazu T,Kaneko Y,Mimura T,Uryu T. *J Am Chem Soc*,2000,122 12536 ~ 12541

20 Zhang L,Zhang M,Zhou Q,Chen J,Zeng F. *Biosci Biotechnol Biochem*,2000,64 2172 ~ 2178

21 Shimizu S,Eguchi Y,Kamiike W,Itoh Y,Hasegawa J,Yamabe K,Otsuki Y,Matsuda H,Tsujimoto Y. *Cancer Res*,1996,56 2161 ~ 2166

STUDIES ON ANTITUMOR ACTIVITY OF A WATER-SOLUBLE
HYPERBRANCHED POLYSACCHARIDE AND ITS SULFATED DERIVATIVES

TAO Yongzhen^{1,2}, ZHANG Lina¹, HAN Lu³, ZENG Fanbo³, DING Kan⁴

(¹ Department of Chemistry, Wuhan University, Wuhan 430072)

(² Key Lab of Green Processing & Functional Textiles of New Textile Materials, Ministry of Education,
Wuhan University of Science and Engineering, Wuhan 430073)

(³ Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030)

(⁴ Glycochemistry and Glycobiology Lab, Shanghai Institute of Material Medical, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203)

Abstract A water-soluble hyperbranchend β -glucan, extracted from sclerotia of *Pleurotus tuber-regium* was fractionated to obtain the fractions with different molecular weight. The polysaccharide fractions were treated with chlorosulfonic acid to synthesize sulfated derivatives. The antitumor activities of the water-soluble hyperbranched polysaccharide fractions and their sulfated derivatives were evaluated by *in vivo* test using SARCOMA 180 xenografted BALB/C mice, and *in vitro* measurement against HepG2 cell, respectively. The effect of introduction of sulfate groups in the polysaccharide on antitumor activities was compared with that of the native polysaccharides by morphological, histological and ELISA methods. The results indicated that the native polysaccharides, in the radius of gyration ($\langle S^2 \rangle_z^{1/2}$) range from 42.5 nm to 113 nm, exhibited significantly inhibition impact on the xenografted tumor cell growth and antiproliferative activities against HepG2 cell *in vitro*. The antitumor activities of the sulfated derivatives increased progressively with the $\langle S^2 \rangle_z^{1/2}$ change from 17.8 nm to 34.9 nm. Mechanism study indicated that the native and sulfated glucans inhibited the proliferation of HepG2 cell through inducing the tumor cells apoptosis in a time dependent way. Immunological test demonstrated that both the native polysaccharide and its sulfated derivatives using low dose (20 mg/kg) increased production of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in mouse plasma while the native one decreased amount of TNF- α using high doses (60 mg/kg) with or without lipopolysaccharide (LPS) stimulation.

Keywords Hyperbranched polysaccharide, Molecular size, Chain conformation, Sulfation, Antitumor activity