

红栓菌多糖的分级、表征、分子链构型参数和抗癌活性研究*

郑昌仁 张 军 赵晓霞 王新生

(南京化工学院化工系,南京,邮政编码:210009)

傅庭治

(南京大学生物系,南京,邮政编码:210008)

摘 要

本文研究了以水为溶剂,乙醇为沉淀剂,获得6个级分的红栓菌多糖,并运用动态膜渗透压法、VPO法、超速离心沉降法、小角激光光散射和高效液相色谱等,对其进行了表征.使用分光光度计,以浊点滴定法与修正的Elias公式确定红栓菌多糖溶液的 θ 组成为: $V_{H_2O}:V_{CH_3COCH_3}=89.82:10.18$ (体积比).再在 θ 条件下建立红栓菌多糖的Mark-Houwink方程: $[\eta]=5.01 \times 10^{-4} \bar{M}^{0.502}$ 计算出它的无扰尺寸.由色谱法和董履和函数逆应法解得红栓菌多糖的分子量分布.

通过抗癌药理活性实验,发现该多糖对小白鼠肉瘤S₁₈₀有较强的生理活性,能抑制肿瘤生长.同时还发现多糖II活性高于多糖I活性.

关键词 多糖、红栓菌、链结构参数、分子量、抗癌药理活性

多糖是一类生物高分子,以前对其生理活性却一直未加重视,近年来发现多糖具有复杂的多方面的功能.多糖的研究工作,曾集中于化学实验方法的改进、理化性质分析及生物活性测定等^[1,2].自70年代以来,随着现代分析技术的发展,为多糖结构分析、性质鉴定等方面取得突破创造了条件.目前探讨多糖的结构、性质和药效之间的关系,是一个很热门的课题.经研究,发现红栓菌多糖不仅对食管癌、胃癌有治疗效果,而且还具有增加免疫能力,延长生命的作用.有关红栓菌多糖的研究工作,迄今国内外文献报道较少.本文对红栓菌多糖的研究,是从不同角度,且着眼于由抗病的分子水平进行实验探索,以期达到揭示多糖结构与药效功能之间的关系.实验工作分为四部分进行,即红栓菌多糖的分级、分子表征、溶液结构参数、抗癌药理活性等.

实验部分

1. 红栓菌多糖的分级

红栓菌菌丝体与固体培养基混合物,系由南京中医学院提供,使用前粉碎.南京大学

* 1991年9月14日收到;曾在1991年全国高聚物分子量和分子量分布论文报告及讨论会上宣读,武汉

生物系对红栓菌多糖的制备、分离、纯化及其化学组成与结构进行了较深入研究,详细结果待发表.本工作所用的红栓菌多糖样品为南大生物系提供.乙醇为CP级,蒸馏水重蒸,红栓菌多糖经水溶解后,置于 $25^{\circ}\text{C} \pm 0.02^{\circ}\text{C}$ 恒温水槽中恒温,以乙醇为沉淀剂,采用逐步沉淀分级法,依次共得6个级分,再经真空干燥(45°C)至恒重.

2. 重均分子量的测定^[4]

在MSE-75Centriscan型分析超速离心机上,测定红栓菌多糖的重均分子量.

3. 数均分子量的测定^[4]

以Bruss型膜渗透计和VPO法测定红栓菌多糖的各级分的数均分子量 M_n .

4. θ 组成的确定^[5-9]

采用721型分光光度计,以浊度滴定法确定红栓菌多糖溶液的 θ 组成.

5. 特性粘数的测定

特性粘数测定在I.D-4-0.54mm稀释型乌氏(Ubbelohde)粘度计中进行,温度控制 $25 \pm 0.02^{\circ}\text{C}$,溶剂采用水与丙酮体积比为89.82:10.18的 θ 溶剂.

6. 分子量分布的测定^[4]

在LC-4A岛津高效液相色谱仪上进行.

7. 抗癌药理活性实验^[9]

以生理盐水作对照,采用腹腔给药对小鼠肉瘤S₁₈₀进行抑制.

结果与讨论

1. 分级效率

为了提高分级效率,对采用逐步沉淀分级法所得的第一级分和第二级分进行了重沉淀分级,克服了开始分级时由于溶液浓度大,尤其是第一个级分沉淀时,往往要带下很多低分子量的部分,使沉淀出现难以控制的现象.采用部分重沉淀分级是提高分级效率与节约时间的较好处理方法.

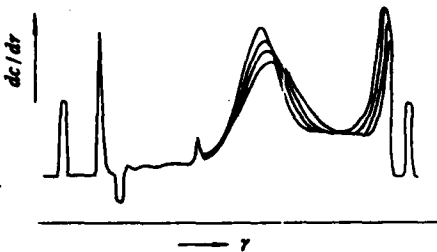


Fig. 1 The figure of ultracentrifugation of polysaccharide of pycnorus cinnabarius

2. 重均分子量测定方法的比较

采用超速离心法测定三个多糖均一体的分子量.将3个样品分别溶于0.85%NaCl溶液,浓度为10mg/ml,在MSE-75 Centriscan型分析超速离心机上进行Schlieren光电扫描,结果如图1所示.根据

扫描结果,在同一浓度下,离心速度5000rpm,温度 20.0°C ,扫描时间间隔 $15' - 15' - 10'$,测定每个样品的沉降系数 S 和扩散系数 D ,代入Svedbers方程

$$\bar{M}_w = RTS / (1 - \bar{V}\rho) \cdot D$$

式中 R 为气体常数, T 为实验绝对温度, \bar{V} 为样品的偏比容, ρ 为溶剂密度.求出的样品重均分子量见表1.

超速离心技术测定高聚物分子量的实验数据,可以从照相底片上的 $(dn/dr) \sim r$ 曲线得到,在此 n 是折光指数, r 为从池内的观察点至转轴中心的距离.通常将折光指数的增

量 dn/dc 数据转换成 $(dc/dr) \sim r$ 曲线.Tab. 1 The subsidence coefficient (S), diffusion coefficient (D) and \bar{M}_w of polysaccharide of pycnorus cinnaharius

Sample	S	D	\bar{M}_w
Polysaccharide I	2.5×10^{-13}	8.76×10^{-7}	17500
Polysaccharide II	1.4×10^{-13}	11.0×10^{-7}	7800
Polysaccharide III	1.3×10^{-13}	1.4×10^{-6}	5600

应用超速离心技术在进行测定分子量的同时,还能测得高分子物的多分散性及获得有关高分子形状的讯息.此法的可靠性取决于 S 、 D 在 $C \rightarrow 0$ 时外推值的准确程度.但是一般说来,它对于刚性的蛋白质分子的应用,比对于无规线团的高聚物的应用更为有效.因此这方法主要还是在生物高分子的研究方面.诚然对多糖研究也是适用的.

由中国科学院长春应用化学研究所高分子溶液研究室,用岛津 PG-L₁ 型光散射光度计,在室温下,波长 λ 为 546nm,测量角度为 $30^\circ - 150^\circ$,对多糖 III 进行测定得 $dn/dc^{25^\circ\text{C}} = 0.1506$,从所得的 Zimm 图来看,是非正常的图形,类似于体系中有光学各向异性体的光散射 Zimm 图,这样外推得到表现分子量 \bar{M}_w ,求得样品的 $\bar{M}_w = 1.15 \times 10^5$, $A_2 = 5.58 \times 10^{-4}$,此结果与在超速离心机上所测得的数值相差较大.另在实验中还发现该号样品溶解性能不好,这可能与红栓菌多糖的制备、分离、纯化的影响有关.糖蛋白不除尽就会影响实验结果.根据超速离心沉降法和光散射法所具有的特点,从实验情况来看,我们认为测定多糖的重均分子量,以采用超速离心技术为好.

3. 数均分子量和链构型参数

用快速动态渗透压法和 VPO 法(蒸气渗透压法)测得的红栓菌多糖的各级分的数均分子量 \bar{M}_n 及第二 Virial 系数 A_2 如表 2 所示

Tab. 2 The \bar{M}_n and configuration parameter determined by dynamic osmometry method

Fraction	I	II	III	V	VI
\bar{M}_n	5.61×10^3	5.25×10^3	4.63×10^3	4.07×10^3	2.97×10^3
A_2	3.95×10^{-4}	4.29×10^{-4}	3.25×10^{-4}	4.64×10^{-4}	8.69×10^{-4}
R_0 (nm)	0.436		0.302	0.233	
h_0 (cm)	1.07×10^{-7}		0.74×10^{-7}	0.57×10^{-7}	
h_0^* (cm)	0.91×10^{-7}		0.83×10^{-7}	0.77×10^{-7}	

采用 VPO 法测定的 \bar{M}_n 和链构型参数Tab. 3 The \bar{M}_n and configuration parameter determined by VPO method

Fraction	I	II	III	V	VI	crude polysaccharide
\bar{M}_n	1.24×10^4	8.29×10^3	5.40×10^3	4.31×10^3	2.82×10^3	6.43×10^3
$[\eta]$ (ml/g)	12.75	10.1	8.81	7.08	4.98	8.89
R_0 (nm)	3.34	2.72	2.25	1.94	1.50	2.39
h_0 (cm)	8.18×10^{-7}	6.66×10^{-7}	5.51×10^{-7}	4.75×10^{-7}	3.66×10^{-7}	5.86×10^{-7}
h_0^* (cm)	7.94×10^{-7}	6.55×10^{-7}	5.28×10^{-7}	4.71×10^{-7}	3.80×10^{-7}	5.76×10^{-7}

4. θ 组成的确定

将浊点滴定法和修正的 Elias 公式 $\varphi_3 = A - B \ln \varphi_2$, 应用于生物高分子水溶液, 求得红栓菌多糖溶液的 θ 条件为: $25^\circ\text{C} \pm 0.02^\circ\text{C}$ 时, 其 $V_{\text{H}_2\text{O}}:V_{\text{CH}_3\text{COCH}_3}$ (体积比) = 89.82:10.18 为该溶液的 θ 组成, 见图2和图3.

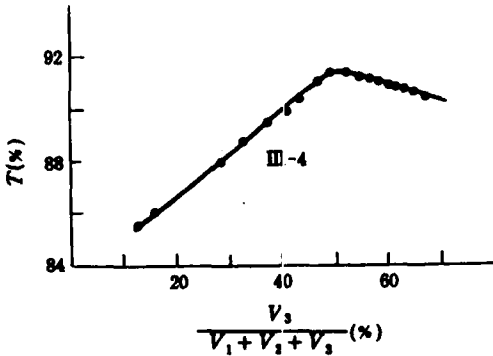


Fig. 2 The relation between transmittancy of polysaccharide of pycnorus cinnaharius in water and $V_3/(V_1+V_2+V_3)$

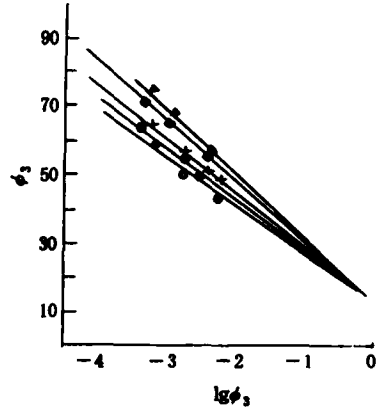


Fig. 3 The cloud-point titration result of polysaccharide of pycnorus cinnaharius

浊度滴定法测定高聚物溶液的 θ 组成, 在理论和实验中都是可行的. 我们尝试将其应用于生物高分子水溶液体系也获得了成功. 但前文^[9]系采用阿贝氏折射仪测定浊点, 本文改用721型分光光度计测定浊点. 该法不仅简单, 而且图中显示的浊点明显, 大大节约了实验时间.

5. Mark-Houwink 方程参数

在 θ 条件下订定红栓菌多糖的 Mark-Houwink 方程的参数 K 和 α . 利用粘度法测得特性粘数后, 再以 $\lg[\eta]$ 对 $\lg \bar{M}$ 作图, 得一直线, 如图4所示.

求得直线的斜率为 α , 截距为 $\lg K$, 因此其方程式为: $[\eta] = K \bar{M}^\alpha = 5.01 \times 10^{-4} \bar{M}^{0.502}$

α 是一个特性常数, 它的数值取决于高分子~溶剂体系的性质及高分子链结构, 是与分子链的刚性程度和溶剂化能力有关. 一般地说, 当高分子在溶液中线团松散成线形、在流动时线团内的溶剂分子是完全自由的, 线性高分子在良溶剂的稀溶液, $\alpha = 1$, 当 $\alpha = 1$ 时, 分子链为棒状结构, 高聚物呈现刚性. 大部分实验所得 α 数值在 0.5 至 1 之间, 则表示高聚物呈现柔性. 本文在 θ 条件下获得 $\alpha = 0.5$, 表示红栓菌多糖分子在 θ 溶剂中的形态为无规线团.

6. 无扰尺寸的估算

根据 Kirkwood 和 Riseman 所提出的在 θ 溶剂

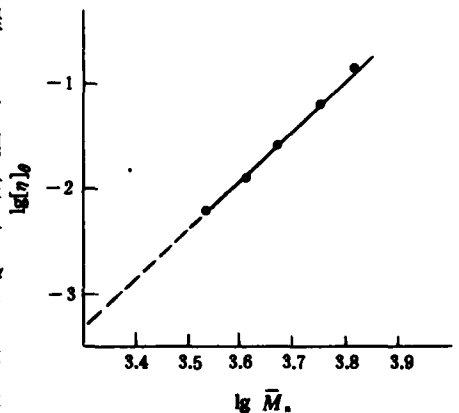


Fig. 4 The relation between intrinsic viscosity and molecular weight of polysaccharide of pycnorus cinnaharius

中,特性粘液 $[\eta]_\theta$ 、分子量和分子链的尺寸之间存在如下关系^[10,11]

$$[\eta]_\theta = 2.84 \times 10^{23} h_0^3 / \bar{M} = 4.17 \times 10^{24} R_0^3 / \bar{M}$$

式中 h_0 、 R_0 分别为高分子链在 θ 溶剂中的末端距和旋转半径。

Flory-Fox 方程为:

$$(\bar{h}_0^2)^{1/2} = (K_\theta / \varphi_0)^{1/3} \cdot \bar{M}^{1/2}$$

式中 φ_0 为 Flory 常数, $\varphi_0 = 2.80 \times 10^{23}$, K_θ 为 Mark-Houwink 方程中的 K , 即为 $K_\theta = 5.01 \times 10^{-4}$

$$\therefore (\bar{h}^2)^{1/2} = 1.24 \times 10^{-9} \cdot \bar{M}^{1/2} (\text{cm})$$

用上述两方程计算所得的无扰尺寸见表2. 表中 R_0 、 h_0 系由 Kirkwood-Riseman 方程求得、 h_0^* 由 Flory-Fox 方程求得, 结果表明, 两个经验公式求得的无扰尺寸相近。

7. 分子量分布

分子量分布的测定实验条件为: 采用 Shim-Pask OH 色谱柱, 以 0.2 Mol Na₂ SO₄ 水溶液为淋洗剂, 紫外($\lambda = 214\text{nm}$), 示差双检测器检测, 流速为 0.5ml/min, 所得谱图是对称分布的, 如图5所示. 由董履和函数适应法, 求得的分子量分布曲线, 参见图6.

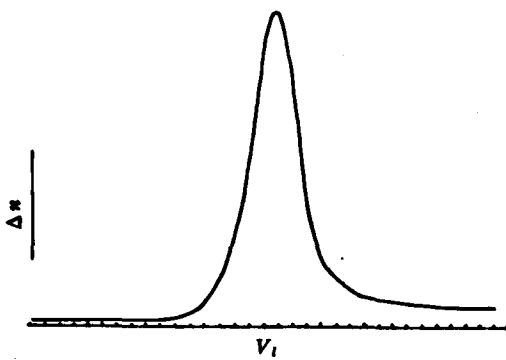


Fig. 5 The gel permeation chromatography figure of polysaccharide of pycnorus cinnaharius

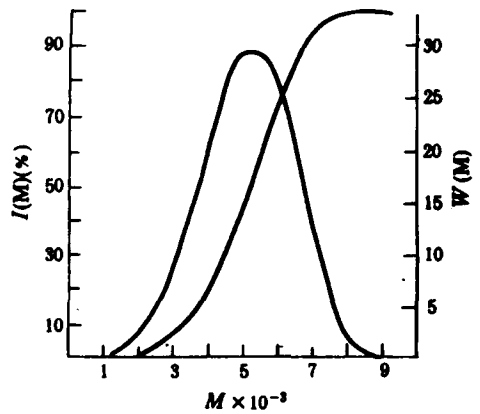


Fig. 6 The molecular weight distribution determined by Tung function

8. 红栓菌多糖的药理活性

红栓菌多糖抗瘤作用的药理活性实验是以生理盐水作对照, 采用腹腔给药对小鼠肉瘤180(S₁₈₀)的抑制作用见表4.

Tab. 4 Polysaccharide inhibition effect on S₁₈₀ in mice

Dosage (mg/kg)	100	150	200	300
Antitumour				
Polysaccharide I	21	31	34	38
Polysaccharide I	22	30	36	41

同时测定红栓菌多糖灌胃给药对 S₁₈₀ 的抑制率, 结果都表明, 红栓菌多糖具有明显的生理活性, 能抑制肿瘤生长, 提高机体免疫能力, 起着延长生命的作用, 并且安全无毒, 可

以作为一种理想的免疫促进剂. 实验数据还提示, 多糖Ⅰ的活性有强于多糖Ⅱ的趋势. 这是否说明红栓菌多糖粗品中存在的大量杂蛋白及其它杂质, 对生物活性的显示就呈现负作用呢? 这需要进一步的药理实验来证实. 至于具有不同分子量和分子量分布的多糖体, 其生物活性如何? 多糖的结构与药效之间关系怎样? 有待今后继续深入探讨与揭示.

参 考 文 献

- [1] 吴东儒编著, 糖类的生物化学, 高等教育出版社, 北京, 1986, 532—626; 814—915
- [2] Zaporozhets TS, *Antibiot Med Biotechnol*, 1985, 30, 43
- [3] 杭秉茜、吴 燕、方静娴、查永喜、周 曙、俞新民, 中药通报, 1982, 7(4), 35
- [4] 郑昌仁编著, 高聚物分子量及其分布, 化学工业出版社, 北京, 1986
- [5] Elias. H-G. , *Makromol. Chem.* , 1959, 33, 140
- [6] Elias. H-G. , *Makromol. Chem.* , 1961, 50, 1
- [7] Cornef, C. F. ; Ballegooijem van H. , *Polymer.* , 1966, 7, 29
- [8] 郑昌仁、余考明、吴永虎、王国用、傅庭治、耿惠春, 高分子学报, 1991, 3, 350
- [9] 郑昌仁、钱晓茵、王海波, 高分子学报, 1988, 3, 227
- [10] 郑昌仁、朱志敏、谷云乐、胡 雷、傅庭治、耿惠春, 物理化学学报, 1992, 8(4)
- [11] Kirkwood J. G., Riseman J. , *J. Chem. Phys.* , 1948, 16, 565

THE FRACTION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION AND THE STUDY ON THE CONFIGURATION PARAMETER OF POLYSACCHARIDE OF PYCNORUS CINNABARIUS IN θ -SOLVENT

ZHENG Changren,

(*Nanjing Institute of Chemical Technology,
Nanjing, Post code: 210009*)

FU Tingzhi

(*Nanjing University, Nanjing,
Post code: 210008*)

ZHANG Jun, ZHAO Xiaoxia, WANG Xinsheng

(*Department of Chemical Engineering, Nanjing Institute of Chemical Technology,
Nanjing, Post code: 210009*)

ABSTRACT

The polysaccharide of pycnorus cinnabarius was prepared, fractionated and characterized. By using the water as solvent and the alcohol as precipitant, six fractions of polysaccharide were obtained. All fractions and the unfractionated sample have been characterized by dynamic osmometry, VPO, ultracentrifugation, light scattering and gel permeation chromatography. Modified Elias cloud-point titration method with a UV spectrophotometer was used to determine the cloud-point. It was found that water/acetone (89.82:10.18 by volume) is a θ -solvent for the polymer at 25°C. The relationships between molecular weight and intrinsic viscosity $[\eta]$, unperturbed chain dimension, Second Virial coefficient A_2 of polysaccharide in a θ -solvent at 25°C were as follows

$$[\eta] = 5.01 \times 10^{-4} M^{0.502}; \quad A_2 = 2.33 M^{-1.015}$$

From the result above the unperturbed dimension(\bar{h}) was found to be $1.21 \times 10^{-9} M^{1/2}$ (cm). It was found that the polysaccharide has the styomgest inhibition effect on S_{180} in mice.

The relationship between the antitumour activity and their solubilities in water was discussed.

Key words Polysaccharide, Antitumor activity, Configuration parameter, Molecular weight, Pycnorus cinnabarius