

厚叶海带岩藻聚糖硫酸酯分离纯化及其体外肿瘤抑制活性研究

彭雍博, 宋悦凡, 武 龙, 汪秋宽*, 丛海花, 刘 舒

(1. 大连海洋大学食品科学与工程学院, 辽宁大连 116023;

2. 国家海藻加工技术研发分中心, 辽宁大连 116023;

3. 辽宁水产品加工及综合利用重点实验室, 辽宁大连 116023)

摘要:本研究以日本厚叶海带 (*Kjellmaniella crassifolia*) 中提取的岩藻聚糖硫酸酯 (Fuciodan) 为原料, 采用 DEAE-Sephrose Fast Flow 弱阴离子交换柱层析分离纯化, 通过苯酚-硫酸法和氯化钡-明胶法检测各组分中多糖及硫酸根 (SO_4^{2-}) 含量, MTT 法分析 50、200、800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的日本厚叶海带岩藻聚糖硫酸酯粗品 (F) 及分离组分对肝癌细胞 HepG2、肺癌细胞 A549 和结肠癌细胞 HT-29 细胞存活率影响。研究表明, DEAE-Sephrose Fast Flow 弱阴离子交换柱对粗品 F 的分离纯化效果良好, 可以得到 5 个组分 (F-0、F-1、F-2、F-3 和 F-4); 组分 F-4 多糖与 SO_4^{2-} 含量最高, 分别为 64.25% 和 26.32%。MTT 实验结果显示, 岩藻聚糖硫酸酯粗品及各分离组分对三种肿瘤细胞均具有肿瘤抑制活性, 不同组分对 HepG2、A549、HT-29 的最低细胞存活率分别为 67.69%、56.03% 和 27.56%。基于以上研究结果, 表明日本厚叶海带岩藻聚糖硫酸酯具有很大的发展潜力, 开发成为一种有效的天然抗肿瘤药物。

关键词: 厚叶海带, 岩藻聚糖硫酸酯, 分离纯化, MTT 实验, 抗肿瘤

Study on separation and purification of fucoidan from *Kjellmaniella crassifolia* and antitumor activity *in vitro*

PENG Yong-bo, SONG Yue-fan, WU Long, WANG Qiu-kuan*, CONG Hai-hua, LIU Shu

(1. College of Food Science and Engineering, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;

2. Nation R&D Branch Center For Seaweed Processing, Dalian 116023, China;

3. Key and Open Laboratory of Aquatic Product Processing and Utilization of Liaoning Province, Dalian 116023, China)

Abstract: In this study, the crude fucoidan extracted from *Kjellmaniella crassifolia* was taken as raw material, and then purified by DEAE-Sephrose Fast Flow weak anion exchange column. The contents of total polysaccharide and sulfate (SO_4^{2-}) of fucoidan in each fraction were determined by phenol-sulfuric acid colorimetry method and barium chloride-gelatin method, respectively. The antitumor activities for all in the crude and separated fractions with 50, 200, 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentrations against HepG2 cells, A549 cells and HT-29 cells were determined by MTT assay. The results showed that, crude fucoidan from *Kjellmaniella crassifolia* could be well separated and purified by DEAE-Sephrose Fast Flow weak anion exchange column, and five different fractions (F-0, F-1, F-2, F-3, F-4) were obtained. Total polysaccharide and SO_4^{2-} content in F-4 were the highest, which were 64.25% and 26.32%, respectively. The results of MTT assay indicated that the crude fucoidan and the fractions had significant inhibitory activities on HepG2, A549 and HT-29 cells. The lowest cell viability of 67.69%, 56.03% and 27.56% were obtained for HepG2, A549 and HT-29 cells respectively. Based on those findings, it suggested that fucoidan from *Kjellmaniella crassifolia* had great potential to be a kind of effective natural antineoplastic drugs.

Key words: *Kjellmaniella crassifolia*; fucoidan; separation and purification; MTT assay; antitumor

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2017)17-0283-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2017.17.055

厚叶海带 (*Kjellmaniella crassifolia*) 属褐藻门、褐藻纲、海带目、海带科, 主要分布于日本北海道南部函馆至室兰区域沿海, 成体长 1.5~2.0 m, 宽 20~35 cm, 生

长期 4~5 年, 细胞壁基质中含有丰富的岩藻聚糖硫酸酯^[1]。岩藻聚糖硫酸酯是一种由岩藻糖、半乳糖、甘露糖、木糖、葡萄糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸等单

收稿日期: 2017-03-03

作者简介: 彭雍博 (1992-), 男, 硕士, 研究方向: 农产品加工及贮藏工程, E-mail: pengyongbo2011@126.com。

* 通讯作者: 汪秋宽 (1962-), 女, 硕士, 教授, 研究方向: 水产品加工及综合利用, E-mail: wqk320@dlou.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金 (31471610); 辽宁省海洋与渔业厅渔业推广项目 (GCNT-LN-19)。

糖组成,并链接有独特硫酸基团的活性多糖,具有抗氧化^[2]、抗病毒^[3]、抗炎症^[4]、抗凝血^[5]、抗肿瘤^[6-7]和免疫调节^[8-9]等活性功效。国内现阶段多采用从海带^[10] (*Laminaria japonica*)、裙带菜^[11] (*Undaria pinnatifida*)、马尾藻^[12] (*Sargassum.thunbergii*)等提取的岩藻聚糖硫酸酯为原料,评价其对不同肿瘤细胞的抑制效果,研究证明褐藻中提取的岩藻聚糖硫酸酯对结肠癌、淋巴瘤等细胞具有较强的体外抑制活性,而低剂量的岩藻聚糖硫酸酯对肝癌、肺癌、乳腺癌、宫颈癌等体外抑制效果不佳。大量的研究发现不同来源或提取方式的岩藻聚糖硫酸酯其岩藻聚糖硫酸酯含量、 SO_4^{2-} 含量、结构差异显著,进而影响其抗肿瘤活性的表达^[13-14]。而日本厚叶海带岩藻聚糖硫酸酯在早期的研究则被证明,其总糖含量和 SO_4^{2-} 含量较其它褐藻更高,活性作用效果也较佳^[1]。但由于野生日本厚叶海带资源少、价格昂贵,国内仅有大连海洋大学的国家海藻加工技术研发分中心引进并在大连沿海培育成功,因此关于厚叶海带岩藻聚糖硫酸酯抗肿瘤活性研究,尤其是不同分离纯化组分的日本厚叶海带岩藻聚糖硫酸酯抗肿瘤活性研究一直鲜有报道。

综上,本研究采用 DEAE-Sephrose Fast Flow 弱阴离子交换柱层析对日本厚叶海带岩藻聚糖硫酸酯粗品进行分离纯化,得到不同的有效分离组分,并研究 50、200、800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的岩藻聚糖硫酸酯粗品及分离组分对肝癌细胞 HepG2、肺癌细胞 A549 和结肠癌细胞 HT-29 的体外存活率影响,以期证明日本厚叶海带岩藻聚糖硫酸酯是一种有效的天然抗肿瘤药物,同时为岩藻聚糖硫酸酯保健产品开发和进一步的临床研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

日本厚叶海带岩藻聚糖硫酸酯粗品 大连海洋大学国家海藻加工技术研发分中心和辽宁省水产品加工及综合利用重点实验室提供;肝癌细胞 HepG2、肺癌细胞 A549、结肠癌细胞 HT-29 中国科学院大连化学物理研究所提供;岩藻糖、半乳糖 美国 Sigma 公司;DMEM 培养基、RPMI1640 培养基、McCoy's 5A 培养基、胰蛋白酶、胎牛血清、二甲基亚砜(DMSO)、青霉素-链霉素(双抗)、噻唑蓝(MTT) 生工生物工程(上海)股份有限公司;氯化钠、氯化钾、氯化钡、磷酸氢钾、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、硫酸钾、山梨醇、浓盐酸、苯酚、浓硫酸、无水乙醇等均 为分析纯。

354 型酶标仪、991 型超低温冰箱 美国 Thermo 公司;TS-100 型倒置显微镜 日本 Nikon 公司;SW-CJ-2F型洁净工作台 上海博迅实业有限公司;MCO-18AIC 型 CO_2 恒温培养箱 北京瑞尔欣科技有限公司;LDZX-50KB 型立式电热压力蒸汽灭菌器 上海申安医疗器械厂。

1.2 实验方法

1.2.1 日本厚叶海带岩藻聚糖硫酸酯分离纯化 岩藻聚糖硫酸酯分离纯化参考刘舒等^[15],并略加修改。

精确称取 300 mg 粗品 F,溶于 20 mL 磷酸盐缓冲液(0.02 mol/L、pH7.4),溶液经 DEAE-Sephrose Fast Flow 弱阴离子交换色谱柱(1.6 cm \times 30 cm)分离,经磷酸盐缓冲液和 0~2.0 mol/L 的 NaCl 溶液梯度洗脱。设定流速为 0.75 mL,自动收集器收集(每管 3 mL)。以洗脱管数为横坐标,多糖浓度(测定方法同多糖测定)和 NaCl 浓度为纵坐标,绘制岩藻聚糖硫酸酯梯度洗脱曲线。根据梯度洗脱曲线确定分离组分并分别收集,透析,冷冻干燥。

1.2.2 多糖测定 苯酚-硫酸法测定多糖含量^[16]。24 mg 标准糖(L-岩藻糖:D-半乳糖 = 3:1),去离子水定容至 500 mL。分别吸取 0、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mL 于比色管,去离子水补至 2 mL,依次加入 1 mL 的 6% 苯酚溶液、5 mL 浓硫酸,摇匀放置至室温。取 150 μL 混匀液于 96 孔板,酶标仪 490 nm 检测,以标准糖含量($\mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标,吸光度为纵坐标,去离子水组校零,绘制标准曲线。称取 10 mg 粗品 F 及分离纯化组分,定容至 100 mL,吸取 1.0 mL 于比色管,按上述步骤,测定吸光度并计算多糖含量。

1.2.3 硫酸根测定 明胶-氯化钡法测定硫酸根含量^[17]。取适量 K_2SO_4 于 105 $^\circ\text{C}$ 烘干,配制成 0.05% 的 K_2SO_4 标准溶液,分别吸取 0、0.1、0.3、0.5、0.7、0.9、3.0 mL 于比色管中,去离子水补至 4 mL,依次加入 0.8 mL 盐酸(体积比 = 1:1)、4 mL 的 70% (w/v) 山梨醇、4 mL 的 20% (w/v) 氯化钡,混匀放置 10 min,470 nm 处测定比浊度,以 SO_4^{2-} 含量($\mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标,吸光度为纵坐标,去离子水组校零,绘制标准曲线。取 100 mg 粗品 F 及分离纯化组分,置于 10 mL 的 2 mol/L 盐酸中,室温下密封避光过夜保存,然后于 105 $^\circ\text{C}$ 烘箱恒温水解 5 h。冷却至室温后用活性炭水洗脱色,滤液氨水调 pH 至中性后定容至 50 mL。吸取 0.5 mL 的溶解液加入 25 mL 比色管,按上述步骤测吸光度,测定并计算硫酸根含量。

1.2.4 细胞抑制实验 肝癌细胞 HepG2、肺癌细胞 A549 和结肠癌 HT-29 体外培养及 MTT 实验参考李亚娟等^[18],并略以修改。

1.2.4.1 细胞复苏及原代培养 液氮罐中取冻存的肝癌细胞 HepG2、肺癌细胞 A549 和结肠癌细胞 HT-29,于 37 $^\circ\text{C}$ 水浴中快速解冻,吸取细胞液,置于 15 mL 离心管中,加入适量细胞培养液,1000 r/min 离心 3 min,弃去上清液。加入完全培养液(含 1% 双抗和 10% 胎牛血清)重悬细胞,计数,调整细胞密度,接种在培养瓶中,在 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育。

1.2.4.2 细胞的传代培养 细胞密度铺满瓶底,加入胰蛋白酶消化液,覆盖细胞表面,倒置显微镜观察,细胞皱缩变圆,弃去消化液后加入完全培养液终止消化,弯头吸管吹打细胞制成细胞悬液。将细胞悬液稀释后接种于新培养瓶中,37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育。

1.2.4.3 MTT 法检测肿瘤细胞存活率 取对数生长期的细胞,胰蛋白酶消化、弯头吸管吹打制成细胞悬液,并稀释至 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 密度接种于 96 孔板,每孔 100 μL 。孵育 48 h 后小心弃去培养液,加入含有不同浓度(50、200、800 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的岩藻聚糖硫酸酯组分

培养液 150 μL , 孵育 24 h, 设置平行组及空白对照组。培养结束后, 弃去培养液, 每孔加入 150 μL 经培养液稀释的 MTT 溶液 (0.5 mg/mL), 继续培养 4 h 后吸去培养基, 每孔加入 150 μL DMSO 以溶解蓝紫色结晶物, 使用平板振荡器匀速振荡 10 min, 待结晶物充分溶解后用酶标仪测定 570 nm 吸光值, 根据下式计算细胞相对存活率。

$$\text{细胞相对存活率} (\% \text{ 空白对照组}) = (\text{OD}_3 - \text{OD}_2) / (\text{OD}_1 - \text{OD}_2) \times 100$$

式中: OD_1 对照组吸光度值; OD_2 空白组吸光度值; OD_3 实验剂量组吸光度值。

1.3 数据处理

所有数据均以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 IBM SPSS Statistics 21.0 统计软件进行统计学分析, Duncan 法进行组间多重比较。

2 结果与分析

2.1 日本厚叶海带岩藻聚糖硫酸酯的分离纯化

日本厚叶海带岩藻聚糖硫酸酯经 DEAE-Sephrose Fast Flow 弱阴离子交换色谱分离纯化后, 得到 5 个分离组分, 依次标记为 F-0、F-1、F-2、F-3 和 F-4, 各分离组分峰形相对尖锐且对称, 无拖尾现象。结果表明 DEAE-Sephrose Fast Flow 弱阴离子交换柱层析对粗品 F 的分离效果良好, 且洗脱后的岩藻聚糖硫酸酯组分主要集中在盐洗脱部分, 仅 F-0 为流出峰。

2.2 多糖含量及硫酸根含量测定分析

苯酚硫酸法测定溶液中多糖的含量, 多糖在 1.20~12.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 内线性良好, 标准曲线 $Y = 0.0116X - 3E^{-6}$ ($r = 0.9991$); 氯化钡明胶法测定溶液中 SO_4^{2-} 含量, SO_4^{2-} 在 3.90~117.19 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 内线性良好, 标准曲线: $Y = 0.0001X - 0.0024$ ($r = 0.9995$)。如表 1 所示, 粗品 F 中多糖与 SO_4^{2-} 含量分别为 60.92%、23.77%, 高于海带、裙带菜、马尾藻等其它褐藻中提取的岩藻聚糖硫酸酯, 与王亚芳等^[19] 研究结果一致; 但由于目前尚缺乏日本厚叶海带岩藻聚糖硫酸酯分离纯化组分的研究, 因此现阶段无法对分离纯化组分进行比较分析。洗脱组分 F-1 中多糖与 SO_4^{2-} 含量在各组分中最低, 分别为 35.86% 和 8.77%; 组分 F-4 具有最高的多糖与 SO_4^{2-} 含量, 分别为 64.25% 和 26.32%。比较粗品 F 和分离纯化组分 (F-0、F-1、F-2、F-3 和 F-4) 中岩藻聚糖硫酸酯含

表 1 各组分多糖及硫酸根含量测定

Table 1 The contents of total polysaccharide and sulfate of different fucoidan composition

组分	多糖含量 (%)	SO_4^{2-} 含量 (%)	Fucoidin 含量 (%)
F	60.92 \pm 1.44	23.77 \pm 0.36	84.69
F-0	47.36 \pm 1.74	19.26 \pm 0.39	66.62
F-1	35.86 \pm 3.01	8.77 \pm 2.73	44.63
F-2	51.04 \pm 1.38	19.16 \pm 3.19	70.20
F-3	42.30 \pm 0.80	21.74 \pm 1.46	64.04
F-4	64.25 \pm 2.96	26.32 \pm 2.92	90.57

量发现, 除盐洗脱组分 F-4 中岩藻聚糖硫酸酯高于粗品 F, 为 90.57%; 流出峰 F-0 及盐洗脱组分 F-1、F-2、F-3 的岩藻聚糖硫酸酯含量都低于粗品 F, 特别是 F-1 组分的岩藻聚糖硫酸酯含量仅为 44.63%。

2.3 岩藻聚糖硫酸酯粗品及各分离组分对肿瘤细胞存活率影响

2.3.1 岩藻聚糖硫酸酯对肝癌细胞 HepG2 存活率影响 如图 1 所示, 不同浓度的粗品 F 及各分离纯化组分对 HepG2 细胞作用 24 h 后, HepG2 细胞的存活率都受到显著抑制 ($p < 0.05$); 而且随着岩藻聚糖硫酸酯作用剂量的增加, HepG2 细胞存活率下降明显。另外, 研究发现 HepG2 细胞相对存活率并未随各实验组分中 Fucoidan 含量的不同, 呈现规律性的变化。组分 F-1、F-2 的低、中、高 (50、200、800 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 剂量组对 HepG2 细胞抑制活性显著优于 F、F-0、F-3 的对应剂量组 ($p < 0.05$), 其中 F-2 三个剂量组的细胞存活率最低, 分别为 73.88%、72.26%、67.69%。而浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 F 与 F-0、F 与 F-4 组分间未表现出对 HepG2 细胞抑制差异。各实验组分中, 三种剂量水平的 F-3 对 HepG2 细胞体外抑制活性均较低, 细胞存活率分别为 91.62%、90.54% 和 88.26%。早期研究指出 SO_4^{2-} 含量与多糖的活性密切相关, 一般硫酸化程度高的多糖具有更好的生物学活性。但体外细胞实验结果显示, 日本厚叶海带岩藻聚糖硫酸酯对 HepG2 细胞存活率影响, 未随 SO_4^{2-} 含量出现规律性变化; 这证明硫酸化程度并不是影响岩藻聚糖硫酸酯生物活性的唯一因素。结合相关研究我们认为岩藻聚糖硫酸酯的这种特殊的抗肿瘤活性与多糖含量、单糖组成^[20]、 SO_4^{2-} 含量^[21]、分子质量大小^[22-23]、及岩藻聚糖硫酸酯结构^[24-25] 等多项理化指标相关。

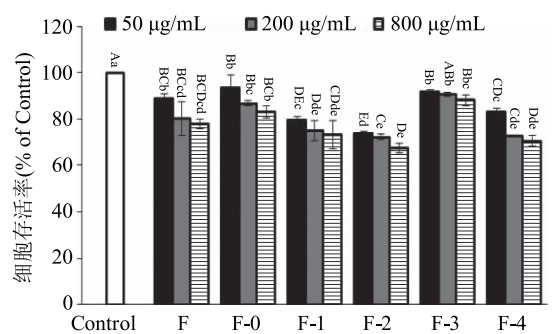


图 1 日本厚叶海带岩藻聚糖硫酸酯对 HepG2 细胞存活率影响

Fig.1 The effect of HepG2 cell viability by fucoidan from *Kjellmaniella crassifolia*

注: 同剂量水平标有不同大写字母表示组间差异极显著 ($p < 0.01$); 同剂量水平标有不同小写字母表示组间差异显著 ($p < 0.05$), 图 2、图 3 同。

2.3.2 岩藻聚糖硫酸酯对肺癌细胞 A549 存活率影响 如图 2 所示, 不同浓度的各组分岩藻聚糖硫酸酯对 A549 细胞存活率均具有极显著抑制作用 ($p < 0.01$); 同时随着作用剂量的上升, A549 细胞存活率逐渐下降。其中低 Fucoidan 含量的 F-1 组分在三种

剂量下对 A549 细胞的抑制效果均显著优于高 Fucoidan 含量的 F-4 组分 ($p < 0.01$)。而 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 F-0 组分相较于其它组分能显著降低 A549 细胞存活率 ($p < 0.05$)，200、800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ F-0 对 A549 细胞存活率影响，相较于其它组分极显著升高 ($p < 0.01$)，三种剂量下 F-0 对 A549 细胞存活率分别为 75.07%、64.20% 和 56.03%。这一研究结果优于蔡璐等^[26]在探讨马尾藻岩藻聚糖硫酸酯及其分离组分对人肺癌细胞 A549 的体外生长抑制效果 ($< 1.25 \text{ mg}/\text{mL}$ 时，马尾藻岩藻聚糖硫酸酯各组分均未表现出 A549 细胞抑制活性)。日本厚叶海带与马尾藻岩藻聚糖硫酸酯对 A549 细胞的这种抑制差异，可能是因为两种褐藻中 Fucoidan 含量不同^[12]，还可能与褐藻种类、藻龄、产地、收获季节、提取方式等有关，因岩藻聚糖硫酸酯的多糖、 SO_4^{2-} 含量及其结构随褐藻种类、藻龄、产地、收获季节、提取方式等因素产生差异，进而表现出显著的生物学活性的差异^[25,27]。此外，研究也发现组分 F-4 具有最高的 Fucoidan 含量和 SO_4^{2-} 含量，但在三种剂量条件下 A549 细胞存活率均较高，存活率分别为 91.53%、86.54% 和 81.08%。根据前期单糖组成研究，F-4 组分中岩藻糖含量为 100%，是一种高纯度的岩藻聚糖硫酸酯^[15]；而岩藻聚糖硫酸酯的活性糖苷键主链结构是由岩藻糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖、木糖、鼠李糖等多种单糖构成，并连接有硫酸基侧链基团。F-4 组分对 A549 细胞的低抑制活性证明，高度纯化的岩藻聚糖硫酸酯可能会导致其活性糖苷键结构破坏^[28]，导致 A549 细胞抑制活性下降。

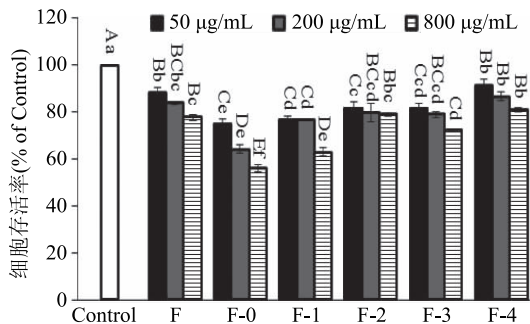


图2 日本厚叶海带岩藻聚糖硫酸酯对 A549 细胞存活率影响

Fig.2 The effect of A549 cell viability by fucoidan from *Kjellmaniella crassifolia*

2.3.3 岩藻聚糖硫酸酯对结肠癌细胞 HT-29 存活率影响 粗品 F 及各分离组分对结肠癌 HT-29 细胞的研究结果如图 3 所示，不同浓度的各组分岩藻聚糖硫酸酯对 HT-29 细胞存活率均有极显著统计学意义 ($p < 0.01$)。很显然，同一组分的不同剂量呈现剂量相关，即高剂量条件下 HT-29 细胞呈现较低的存活率。同时，结果分析发现三种剂量水平下 F 和 F-0、F-3、F-4 组分能使 HT-29 细胞存活率极显著下降 ($p < 0.01$)；而且粗品 F 和流出峰 F-0 在高剂量时表现出优于盐洗脱组分 (F-1、F-2、F-3、F-4) 的体外细胞抑制效果 ($p < 0.01$)。通过比较四种盐洗脱组分对 HT-29 细胞存活率影响发现，高 Fucoidan 含量的 F-4 组分在 50、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对 HT-29 细胞的抑制活

性极显著优于低 Fucoidan 含量的 F-1 组分 ($p < 0.01$)；而在 50、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度时具有较高 Fucoidan 含量的 F-2 组分对 HT29 细胞的抑制活性与 F-1 组分间未展现出统计学意义。研究结果表明，Fucoidan 含量可能是影响日本厚叶海带岩藻聚糖硫酸酯对 HT-29 细胞的抑制活性的主要因素，但这种抑制活性可能是多重因素共同作用的结果，例如还与相对分子质量 (F-1、F-2、F-3、F-4 相对分子质量分别为：136、136、119、104 kDa^[15]) 密切相关，即岩藻聚糖硫酸酯含量越高、相对分子质量越低，对 HT-29 细胞抑制效果越佳。此外，六个不同组分日本厚叶海带岩藻聚糖硫酸酯及其分离组分在三种剂量水平下都能表现出较强的 HT-29 细胞抑制率 (最低存活率分别为 30.24%、27.56%、38.40%、50.94%、34.48% 和 35.85%)，研究结果和 Han 等^[29]研究墨角藻 (*Fucus vesiculosus*) 岩藻聚糖硫酸酯对 HT-29 抑制作用一致，证明日本厚叶海带岩藻聚糖硫酸酯适宜作为抗 HT-29 肿瘤细胞的药物研究，有较大开发潜力。

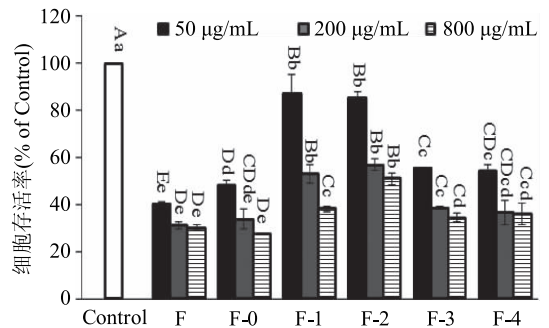


图3 日本厚叶海带岩藻聚糖硫酸酯对 HT-29 细胞存活率影响

Fig.3 The effect of HT-29 cell viability by fucoidan from *Kjellmaniella crassifolia*

3 结论

综上所述，日本厚叶海带岩藻聚糖硫酸酯中含有丰富的硫酸化酯多糖，可通过 DEAE-Sephrose Fast Flow 弱阴离子交换色谱达到有效分离，得到一种水洗脱组分 (F-0) 和四种盐洗脱组分 (F-1、F-2、F-3、F-4)，其中组分 F-4 中多糖与 SO_4^{2-} 含量最高，分别为 64.25% 和 26.32%。体外细胞实验结果表明，50、200、800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的粗品 F 及分离纯化组分 F-0、F-1、F-2、F-3、F-4 对肝癌细胞 HepG2、肺癌细胞 A549 和结肠癌细胞 HT-29 均具有显著的体外肿瘤细胞抑制活性，三种肿瘤细胞的最低存活率分别为 67.69% (800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 F-2)、56.03% (800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 F-0) 和 27.56% (800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 F-0)，尤以结肠癌细胞 HT-29 抑制效果最佳，适宜作为抗肿瘤细胞的药物研发；而且三种细胞的存活率与岩藻聚糖硫酸酯作用剂量总体上呈现出一定的剂量相关关系。同时，研究中也发现不同组分的日本厚叶海带岩藻聚糖硫酸酯的抗肿瘤作用机制，不仅与岩藻聚糖硫酸酯含量和硫酸根含量有关，还可能与岩藻聚糖硫酸酯的单糖组成、分子质量及岩藻聚糖硫酸酯结构密切相关；但这种岩藻聚糖硫酸酯功能性结构与活性作用机制的关系，仍需要进一步的深入研究。

参考文献

- [1] 刘舒,汪秋宽,何云海,等.厚叶海带生物活性成分的研究现状[J].水产科学,2013,32(6):361-367.
- [2] Mak W, Hamid N, Liu T, et al. Fucoidan from New Zealand *Undaria pinnatifida*: monthly variations and determination of antioxidant activities [J]. Carbohydrate polymers, 2013, 95 (1): 606-614.
- [3] Negishi H, Mori M, Mori H, et al. Supplementation of elderly Japanese men and women with fucoidan from seaweed increases immune responses to seasonal influenza vaccination [J]. The Journal of nutrition, 2013, 143 (11): 1794-1798.
- [4] Kang S M, Kim K N, Lee S H, et al. Anti-inflammatory activity of polysaccharide purified from AMG-assistant extract of *Ecklonia cava* in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 52 (1): 1010-1016.
- [5] Wang J, Zhang Q B, Zhang Z S, et al. In-vitro anticoagulant activity of fucoidan derivatives from brown seaweed *Laminaria japonica* [J]. Chinese Journal of Oceanology & Limnology, 2011, 29 (3): 679-685.
- [6] Ermakova S, Sokolova R, Kim S M, et al. Fucoidans from brown seaweeds *Sargassum hornery*, *Ecklonia cava*, *Costaria costata*: structural characteristics and anticancer activity [J]. Applied Biochemistry & Biotechnology, 2011, 164 (6): 841-850.
- [7] Ping S, Jia L, Chen X, et al. Structural features and antitumor activity of a purified polysaccharide extracted from *Sargassum horneri* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 73 (5): 124-130.
- [8] Heim G, O' Doherty J V, O' Shea C J, et al. Maternal supplementation of seaweed-derived polysaccharides improves intestinal health and immune status of suckling piglets [J]. Journal of Nutritional Science, 2015, 4 (27): 1-12.
- [9] Lee K W, Jeong D, Na K. Doxorubicin loading fucoidan acetate nanoparticles for immune and chemotherapy in cancer treatment [J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 94 (2): 850-856.
- [10] 史大华,刘玮炜,刘永江,等.低分子量海带岩藻多糖的制备及其抗肿瘤活性研究[J].时珍国医国药,2012,23(1):53-55.
- [11] 李巧梅,杨丽丽,王培胜,等. Fucoidan对Lewis肺癌荷瘤小鼠抑瘤及免疫调节作用[J].中国海洋药物,2013,32(2):12-16.
- [12] Thinh P D, Menshova R V, Ermakova S P, et al. Structural characteristics and anticancer activity of fucoidan from the brown alga *Sargassum mcclurei* [J]. Marine Drugs, 2013, 11 (5): 1456-1476.
- [13] Ale M T, Meyer A S. Fucoidans from brown seaweeds: an update on structures, extraction techniques and use of enzymes as tools for structural elucidation [J]. Rsc Advances, 2013, 3 (22): 8131-8141.
- [14] Mak W, Hamid N, Liu T, et al. Fucoidan from New Zealand *Undaria pinnatifida*: Monthly variations and determination of antioxidant activities [J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 95 (1): 606-614.
- [15] 刘舒.三种褐藻中岩藻聚糖硫酸酯的纯化及结构分析[D].大连:大连海洋大学,2013.
- [16] 郭峰君,胡靖,赵雪.海带岩藻聚糖硫酸酯降解及基本结构分析[J].食品工业科技,2014,35(18):93-97.
- [17] 刘玉凤,贾淑颖,刘飞飞,等.不同取代度的硫酸化肠浒苔多糖抗氧化活性研究[J].食品工业科技,2016,37(19):142-147,152.
- [18] 李亚娟.羊栖菜多酚粗品的纯化及其抗肿瘤活性研究[D].大连:大连海洋大学,2016.
- [19] 王亚芳,汪秋宽,何云海,等.褐藻多糖硫酸酯与山楂提取物混合剂的降血脂作用[J].大连海洋大学学报,2015(3):309-313.
- [20] Wu L, Sun J, Su X, et al. A review about the development of fucoidan in antitumor activity: Progress and challenges [J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 154 (8): 96-111.
- [21] Oliveira C, Ferreira A S, Novoa C R, et al. The key role of sulfation and branching on fucoidan antitumor activity [J]. Macromolecular Bioscience, 2016, 1600340.
- [22] Anastuyuk S D, Shevchenko N M, Ermakova S P, et al. Anticancer activity *in vitro* of a fucoidan from the brown alga *Fucus evanescens* and its low-molecular fragments, structurally characterized by tandem mass-spectrometry [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 87 (1): 186-194.
- [23] You S G. Molecular characteristics of partially hydrolyzed fucoidans from sporophyll of *Undaria pinnatifida* and their *in vitro* anticancer activity [J]. Food Chemistry, 2010, 119 (2): 554-559.
- [24] Vishchuk O S, Ermakova S P, Zvyagintseva T N. The fucoidans from brown algae of Far-Eastern seas: anti-tumor activity and structure-function relationship. [J]. Food Chemistry, 2013, 141 (2): 1211-1217.
- [25] Ale M T, Mikkelsen J D, Meyer A S. Important determinants for fucoidan bioactivity: A critical review of structure-function relations and extraction methods for fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds [J]. Marine Drugs, 2011, 9 (10): 2106-2130.
- [26] 蔡璐,王维民,谌素华,等.不同组分马尾藻岩藻聚糖硫酸酯对人肺癌细胞 A549 作用的研究 [J].食品工业科技,2014,35(1):116-119.
- [27] Skriptsova A V, Shevchenko N M, Zvyagintseva T N, et al. Monthly changes in the content and monosaccharide composition of fucoidan from *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyta) [J]. Journal of Applied Phycology, 2010, 22 (1): 79-86.
- [28] Lee J B, Takeshita A, Hayashi K, et al. Structures and antiviral activities of polysaccharides from *Sargassum trichophyllum* [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 86 (2): 995-999.
- [29] Han Y S, Hee L J, Hun L S. Fucoidan inhibits the migration and proliferation of HT-29 human colon cancer cells via the phosphoinositide-3 kinase/Akt/mechanistic target of rapamycin pathways [J]. Molecular Medicine Reports, 2015, 12 (3): 3446-3452.