

海带褐藻多糖硫酸酯的抗氧化活性研究

张全斌^{1,2}, 于鹏展^{1,2}, 周革非^{1,2}, 李智恩¹, 徐祖洪¹

(1. 中国科学院海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: 目的 研究海带褐藻多糖硫酸酯的抗氧化作用。方法 采用体外实验研究海带褐藻多糖硫酸酯对超氧阴离子、羟自由基、DPPH的清除作用以及对 H₂O₂诱导的红细胞氧化溶血和大鼠肝匀浆脂质过氧化的保护作用。结果 海带褐藻多糖硫酸酯对超氧阴离子具有良好的清除作用, IC₅₀为 20.3 μg/mL, 其对羟自由基的清除作用较弱, 对有机自由基 DPPH的作用很弱。褐藻多糖硫酸酯能够抑制 H₂O₂诱导的红细胞氧化溶血, 对 FeSO₄-抗坏血酸体系造成的脂质过氧化具有良好的保护作用。结论 海带褐藻多糖硫酸酯具有显著的体外抗氧化活性。

关键词: 褐藻多糖硫酸酯; 海带; 氧自由基; 脂质过氧化; 抗氧化

中图分类号: R286.02; R286.75 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)09-0824-03

Studies on antioxidant activities of fucoidan from *Laminaria japonica*

ZHANG Quan-bin^{1,2}, YU Peng-zhan^{1,2}, ZHOU Ge-fei^{1,2}, LI Zhi-en¹, XU Zu-hong¹

(1. Institute of Oceanology, CAS, Qingdao 266071, China; 2. Graduate School, CAS, Beijing 100039, China)

Abstract Object To study the preliminary antioxidant activities of fucoidan extracted from *Laminaria japonica* Aresch. **Methods** The *in vitro* scavenging activities of fucoidan on superoxide radical, hydroxyl radical and DPPH, and its protective effects on H₂O₂-induced hemolysis of rat erythrocytes and lipid peroxidation of liver homogenate in rat were investigated in this study. **Results** Fucoidan had strong scavenging effect on superoxide radical with IC₅₀ of 20.3 μg/mL; its effect on hydroxyl radical was weak; it had less influence on DPPH. Fucoidan inhibited H₂O₂-induced hemolysis of rat erythrocytes effectively and showed significant protective effect on lipid peroxidation of liver homogenate in rat induced by FeSO₄-ascorbic acid. **Conclusion** Fucoidan from *L. japonica* shows significant antioxidant activity in experiments *in vitro*.

Key words fucoidan; *Laminaria japonica* Aresch.; oxygen radical; lipid peroxide; antioxidation

褐藻多糖硫酸酯是从褐藻中提取的一类硫酸多糖, 主要由岩藻糖和硫酸基组成, 是高度 3-支链化的 (1-2) 或 (1-3) 连接的 α-L-岩藻糖-4-硫酸酯^[1]。对褐藻多糖硫酸酯进行的广泛研究表明其具有多种生物活性, 包括抗凝血、降血脂、抗肿瘤、抗病毒以及免疫调节作用^[2,3]。海带是中国最重要的人工养殖经济藻类。研究发现海带褐藻多糖硫酸酯具有抗肿瘤、降血脂和治疗慢性肾功能衰竭等作用^[4]。自由基医学的研究表明, 炎症、肿瘤、组织缺血再灌注损伤均与活性氧引发的脂质过氧化密切相关^[5]。为了阐明海带褐藻多糖硫酸酯的作用机制, 并对其进行进一步的开发和利用, 本实验对海带褐藻多糖硫酸酯的体外抗氧化活性进行了研究。

1 材料

褐藻多糖硫酸酯系采用徐祖洪等的方法^[6]从青岛人工养殖的海带中制备。其化学分析结果表明: 总

糖占 48%, 岩藻糖占 28%, 硫酸根占 29%; HPLC 分析单糖组成显示岩藻糖是其主要的组份, 除岩藻糖外, 半乳糖的比例也比较高 (Fuc: Gal 为 1: 0.24)。HPLC 测定多糖的平均相对分子质量为 189 000 (Waters 高效液相色谱仪, TSK G4000PWxl 柱)。在下述的各试验中, 褐藻多糖硫酸酯溶液均以相应的缓冲液配制而成。

2 方法

2.1 褐藻多糖硫酸酯对超氧阴离子自由基 (O₂⁻) 的清除作用^[7]: 采用吩嗪硫酸甲酯-NADH 体系产生反应体系为 3.0 mL Tris-HCl 缓冲液, 其中含有 78 μmol/L 还原型辅酶 I (NADH), 50 μmol/L 硝基四氮唑蓝 (NBT), 10 μmol/L 吩嗪硫酸甲酯 (PMS), 以及不同浓度的多糖溶液。O₂⁻ 和 NBT 的显色反应采用分光光度法在 560 nm 波长处测定反应液的吸光度值。

收稿日期: 2002-10-25

作者简介: 张全斌 (1971-), 男, 山东章丘人, 中国科学院研究生院博士研究生, 研究方向为海藻化学和海洋药理学。

Tel (0532) 2898703 E-mail xzh@ms.qdio.ac.cn

2.2 褐藻多糖硫酸酯对羟自由基 ($\cdot\text{OH}$) 的清除作用: 按照 Smirnoff 等^[8]的方法改进 在 3 mL 150 mmol/L 磷酸缓冲液中含有 0.15 mmol/L $\text{FeSO}_4\text{-EDTA}$, 2 mmol/L 水杨酸钠, 6 mmol/L H_2O_2 以及不同浓度的褐藻多糖硫酸酯 37℃ 反应 1 h, 在 510 nm 处测定吸光度值。

2.3 褐藻多糖硫酸酯对有机自由基的清除作用^[9]: 1, 1-二苯基苦基苯肼 (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 是一种稳定的自由基 DPPH 溶于少量的甲苯后, 以 50% 乙醇配成 120 $\mu\text{mol/L}$ 的溶液。加 0.1 mL 多糖与 1.9 mL DPPH 在室温下静置 20 min 后测定 525 nm 处的吸光度值。

2.4 褐藻多糖硫酸酯对 H_2O_2 诱导的红细胞氧化溶血试验: 健康 Wistar 大鼠眼眶取血, 制成抗凝血, 1 000× g 离心 10 min, 移弃血浆和白细胞, 向沉淀的红细胞中加入等渗的生理盐水, 混匀, 1 000× g 离心 10 min, 弃上清液, 如此反复 2 次洗涤红细胞, 将红细胞制成 0.5% 的悬浮液 取红细胞悬液 1 mL, 加不同的多糖样品, 最后加 100 mmol/L 的 H_2O_2 , 混匀, 37℃ 温浴 60 min, 用生理盐水稀释 5 倍, 1 000× g 离心 10 min, 上清液于 415 nm 处测定吸光度值。

2.5 褐藻多糖硫酸酯对大鼠肝匀浆脂质过氧化作用的影响: 健康 Wistar 大鼠, 颈椎脱臼致死 迅速分离肝组织, 用冰冷的 Tris-HCl 缓冲液 (20 mmol/L) 制成 20% 的匀浆, 9 810× g 离心 20 min, 沉淀再洗一次并离心, 合并上清液 在 0.2 mol/L Tris-HCl 缓冲液中 (pH 7.4) 加含肝匀浆液 0.2 mL, FeSO_4 10 $\mu\text{mol/L}$, 抗坏血酸 0.1 mmol/L 及不同浓度的多糖, 在 37℃ 温浴 1 h, 保温结束后加入 20% 三氯乙酸 (TCA) 1.0 mL 终止反应 混匀, 再加入 0.67% 硫代巴比妥酸 (TBA) 1.5 mL, 沸水浴加热 15 min 离心去除蛋白质沉淀后, 于 532 nm 测定吸光度值。

2.6 抑制率的计算: 褐藻多糖硫酸酯对自由基的清除作用以下式计算:

$$\text{抑制率} = (A - A_1) / (A - A_0) \times 100\%$$

式中 A 为对照体系的吸光度值, A_1 为样品的吸光度值, A_0 为空白组的吸光度值。

2.7 数据处理: 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示 采用 t 检验对实验结果进行比较。

3 结果

3.1 褐藻多糖硫酸酯对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除作用: 见表 1 海带褐藻多糖硫酸酯具有很强的清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的作用。

表 1 海带褐藻多糖硫酸酯对超氧阴子的清除作用 ($n=5$)

Table 1 Scavenging effect of fucoidan on superoxide radical ($n=5$)

浓度 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	$A_{560\text{nm}}$	抑制率 / %
对照	0.803±0.004	-
3.3	0.700±0.003*	12.8
13.3	0.540±0.007**	32.6
23.3	0.340±0.009**	57.6
33.3	0.126±0.003**	84.3
50.0	0.036±0.002**	95.5
83.3	0.024±0.004**	97.0

与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group

并且随着多糖浓度的增加, 其清除能力增强 其对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的 IC_{50} 为 20.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

3.2 褐藻多糖硫酸酯对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用: 见表 2 褐藻多糖硫酸酯对 $\cdot\text{OH}$ 具有一定的清除作用。

表 2 褐藻多糖硫酸酯对羟自由基的清除作用 ($n=5$)

Table 2 Scavenging effect of fucoidan on hydroxyl free radical ($n=5$)

浓度 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	$A_{510\text{nm}}$	抑制率 / %
对照	0.482±0.003	-
0.17	0.477±0.003	-
0.33	0.468±0.004 ^f	2.9
0.67	0.448±0.004*	7.1
1.33	0.378±0.004**	21.8
2.33	0.32±0.005**	33.4

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group

3.3 褐藻多糖硫酸酯对有机自由基的清除作用: 见表 3 结果表明, 褐藻多糖硫酸酯对稳定的自由基 DPPH 作用很弱 在低浓度时其对 DPPH 没有清除作用, 只是在高浓度时表现出微弱的作用。

表 3 褐藻多糖硫酸酯对 DPPH 的清除作用 ($n=5$)

Table 3 Scavenging effect of fucoidan on DPPH ($n=5$)

浓度 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	$A_{525\text{nm}}$	抑制率 / %
对照	0.99±0.014	-
0.2	0.972±0.007	-
0.5	0.948±0.008 ^g	4.3
0.7	0.933±0.002*	5.8
1.3	0.913±0.005*	7.8
1.5	0.904±0.029	9.6

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

3.4 褐藻多糖硫酸酯对 H_2O_2 诱导的红细胞溶血作用: 见表 4 结果表明, 褐藻多糖硫酸酯在较高浓度时能够抑制 H_2O_2 诱导的红细胞氧化溶血, 该作用的 IC_{50} 为 4.1 mg/mL 。

3.5 褐藻多糖硫酸酯对大鼠肝匀浆液脂质过氧化的作用: 见表 5 结果表明, 褐藻多糖硫酸酯对 $\text{FeSO}_4\text{-}$

表 4 褐藻多糖硫酸酯对 H_2O_2 诱导的大鼠
红细胞氧化溶血的作用 ($n=5$)

Table 4 Effect of fucoidan on rat erythrocytes
hemolysis induced by H_2O_2 ($n=5$)

浓度 /($\mu g \cdot mL^{-1}$)	$A_{415\text{ nm}}$	抑制率 %
正常	0.042±0.006	-
对照	1.304±0.008	-
1.0	1.212±0.006	7.2
2.0	1.020±0.005*	22.3
3.0	0.834±0.006*	37.2
4.0	0.695±0.004**	48.3
5.0	0.470±0.005**	66.1

与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group

表 5 褐藻多糖硫酸酯对肝匀浆脂质过氧化的作用 ($n=5$)

Table 5 Effect of fucoidan on lipid peroxidation
of liver homogenate in rat ($n=5$)

浓度 /($\mu g \cdot mL^{-1}$)	$A_{532\text{ nm}}$	抑制率 %
正常	0.14±0.003	-
对照	1.018±0.005	-
0.2	1.020±0.004	-
0.6	0.982±0.006	4.1
1.0	0.206±0.004**	92.5
1.6	0.16±0.005**	97.6
2.0	0.158±0.006**	97.9

与对照组比较: *** $P < 0.001$

*** $P < 0.001$ vs control group

抗坏血酸体系造成的大鼠肝匀浆液脂质过氧化具有良好的抑制作用。在浓度达到 1.0 mg/mL 时其对 $FeSO_4$ 抗坏血酸体系造成的大鼠肝匀浆液脂质过氧化的抑制率可以达到 90% 以上。

4 讨论

活性氧自由基 (主要是超氧阴离子和羟自由基) 对机体产生一系列的有害作用,如进攻多不饱和脂肪酸可引起脂质过氧化,导致生物膜结构和功能的改变;损伤蛋白质的巯基和氨基使蛋白质变性、交联,使酶的活性丧失;损伤 DNA 可导致细胞突变。种种有害后果与许多疾病如肿瘤、炎症、衰老的发生有密切的关系,因此生物体内活性氧的生成与清除的平衡对生命过程的正常进行是十分重要的^[5]。

近年来,多糖的抗氧化作用受到广泛的重视。研究表明许多多糖具有提高抗氧化酶活性、清除自由基、抑制脂质过氧化的作用,从而起到保护生物膜的作用^[10]。Tasiipari 等^[11]对葡聚糖及其衍生物的抗氧化性研究表明多糖的抗氧化性与其化学组成有关,磷酸化和硫酸化的葡聚糖的抗氧化性较葡聚糖提高,说明多糖的荷电性与其抗氧化性相关。海藻生长于独特的海洋环境,由于海水的硫酸盐含量较高,因

而许多的海藻多糖为硫酸化多糖。最近几年的研究表明海藻多糖具有较高的抗氧化能力。鼠尾藻多糖能有效的清除活性氧自由基^[12]。浒苔多糖能提高 SOD 活力及降低 LPO 的含量^[13]。褐藻多糖硫酸酯是在褐藻中存在的一类硫酸化多糖,本实验所用海带褐藻多糖硫酸酯样品中硫酸根达到 29%。在本研究中,海带褐藻多糖硫酸酯表现出较高的自由基清除活性,在较高浓度时对 H_2O_2 诱导的红细胞氧化溶血以及肝匀浆脂质过氧化具有保护作用,其清除超氧阴离子自由基的 IC_{50} 为 20.3 $\mu g/mL$,这在海藻多糖中是比较突出的,较已经报道的鼠尾藻多糖和褐藻硫酸多糖的 IC_{50} 要低数倍和数十倍。对褐藻多糖硫酸酯的抗氧化性,特别是其清除超氧阴离子自由基和抗脂质过氧化的活性值得进一步的研究和开发。

References

- [1] Zhang Q B, Xu Z H. Progress in the chemistry of fucoidan [J]. *Chin J Mar Drugs* (中国海洋药物杂志), 1996, 15(4): 38-41.
- [2] Zhuang C, Itoh H, Mizuno T, et al. Antitumor active fucoidan from the brown seaweed, *Umitoranoo* (*Sargassum thunbergii*) [J]. *Biosci Biotech Biochem*, 1995, 9(4): 563-567.
- [3] Mauray S, Sternberg C, Theveniaux J, et al. Antithrombotic and anticoagulant activities of a fucoidan fraction [J]. *Thromb Haemast*, 1995, 74(5): 1280-1285.
- [4] Xu Z H, Li Z E, Zhang X J, et al. Application of fucoidan in the preparation of drug for the treatment of renal failure [P]. CN: ZL98120283.7, 1999-09-22.
- [5] Cuzzocrea S, Riley D, Caputi A P, et al. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury [J]. *Pharmacol Rev*, 2001, 53: 135-139.
- [6] Xu Z H, Li Z E, Zhang X J, et al. Preparation method of fucoidan form *Laminaria japonica* [P]. CN: ZL95112292.4, 1996-08-21.
- [7] Ponti V, Dianzani M V, Cheeseman K J, et al. Studies on the reduction of nitroblue tetrazolium chloride mediated through the action of NADH and phenazine methosulaf [J]. *Chem Biol Interact*, 1978, 23: 281-286.
- [8] Smirnoff N, Cumbes Q J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes [J]. *Phytochemistry*, 1989, 28(4): 1057-1060.
- [9] Peng C L, Chen S W, Lin Z F, et al. Detection of antioxidative capacity in plants by scavenging organic free radical DPPH [J]. *Prog Biochem Biophys* (生物化学与生物物理进展), 2000, 27(6): 658-661.
- [10] Xin X L, Liu C H. Progress in the study of antioxidant effects of Chinese herbal polysaccharides [J]. *J Beijing Univ Tradit Chin Med* (北京中医药大学学报), 2000, 23(5): 54-55.
- [11] Tsipai E, Whaley S, Kalbfleisch J, et al. Glucans exhibit weak antioxidant activity, but stimulate macrophage free radical activity [J]. *Free Rad Biol Med*, 2001, 30(4): 393-402.
- [12] Zhang E X, Yu L J. Studies on polysaccharide from *Sargassum thunbergii* for its ability to scavenge active oxygen radicals [J]. *Chin J Mar Drugs* (中国海洋药物杂志), 1997, 17(3): 1-4.
- [13] Zhou H P, Jiang X T. Effect of polysaccharide from *Eutermorpha prolifera* on lipemia, SOD activity and LPO content [J]. *Chin Biochem J* (生物化学杂志), 1995, 11(2): 161-164.