

芦荟凝集素的理化性质及其 对动物细胞生长的影响

田 兵¹ 王关林^{1,2} 方宏筠²

(1.大连理工大学化工学院,大连 116012; 2.辽宁师范大学生物工程研究所,大连 116029)

摘要:对分别从中华芦荟、库拉索芦荟和木立芦荟叶肉组织中分离提取得到的 3 种凝集素(命名为 Lec1、Lec2 和 Lec3)进行了理化性质的比较研究,考察了二者的分子质量,对糖抑制的专一性和糖基组成。结果表明 Lec1 和 Lec3 的相对分子质量为 23 000,而 Lec2 为 26 000,只有 Lec3 能被麦芽糖抑制。糖基组成分析结果表明,二者的糖链部分主要由甘露糖、葡萄糖和 N-乙酰氨基葡萄糖构成。三种芦荟凝集素能够识别并抑制 K562 乳腺癌细胞的生长,中华凝集素、库拉索凝集素、木立凝集素的抑瘤率 IC₅₀ 值分别为 4.193、2.305、1.418 mg/ml。而在质量浓度 > 2.5 mg/ml 时它们对成纤维细胞 FC 的生长有一定的促进作用。动物体内实验进一步证实了芦荟凝集素的抑瘤作用,同时表明芦荟凝集素能够激发机体的免疫功能来抵御癌细胞的入侵。

关键词:芦荟;凝集素;理化性质;抑瘤作用

中图分类号:TQ461;R979.1

文献标识码:A

Characterization of lectins from aloe species and their influences on growth of animal cells

TIAN Bing¹, WANG Guan-lin^{1,2}, FANG Hong-jun²

(1. School of Chemical Engineering, Dalian University of Technology, Dalian 116012, China;

2. Bioengineering Institute, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China)

Abstract: Properties of physico-chemistry of lectins (named as Lec1, Lec2 and Lec3 respectively) from *A. chinensis*, *A. barbadensis* and *A. arborescens* were studied and compared by molecular weight, carbohydrate binding specificity and glycoside composition. Results show that among them only Lec3 with relative molecular mass of 23 000 while Lec2 only 26 000 can be inhibited by maltose. Glycoside of lectins is mainly composed of *D*-mannose, *D*-glucose and N-GlcNAc. Lectins from aloe has the ability of recognising K562 tumor cells and inhibiting their growth. Lec3 has stronger inhibitive activity (IC₅₀ = 1.418 mg/ml) than Lec1 (IC₅₀ = 4.193 mg/ml) and Lec2 (IC₅₀ = 2.305 mg/ml). These lectins show promoting effect on the growth of FC cells at high concentration. Anti-tumor effect of aloe lectins was further proved by animal experiment. The results show lectins from aloe can prevent the invasion of tumor cells by activating the immunity system of the living organisms.

Key words: aloe; lectin; physico-chemical properties; anti-tumor effect

芦荟是一种百合科芦荟属的植物,种类超过 500 多种,也是一类传统上用于治疗创伤、致泻等方面的中草药,目前广泛地应用于保健食品、化妆品、医药等方面^[1]。芦荟叶肉组织中的多糖具有提高人体免疫力的功能,可用于治疗癌症的辅助药物^[2]。植物凝集素是一类能够非共价地和糖类结合的简单蛋白质或糖蛋白,因为它具有高度的糖结合专一性而成为生物化学和免疫学研究中的一种广泛应用的

工具。笔者从 3 种主要药用芦荟中分离纯化出了具有较强凝集效价的凝集素^[3],证明它们为单一组分的糖蛋白,并且能够促进淋巴细胞的分裂。目前有关芦荟凝集素对动物正常细胞和肿瘤细胞生长的影响,还未见研究报道。笔者考察了这几种芦荟凝集素的理化性质,探讨芦荟凝集素对动物细胞生长的影响和抑瘤作用。

收稿日期:2002-05-16

作者简介:田兵,男,1977 年生,博士生;王关林,男,1945 年生,博士,教授,博导,主要从事天然产物化学和植物基因工程方面的研究。

1 材料与方 法

1.1 主要仪器及材料、试剂

Lec1、Lec2、Lec3 分别提取自中华芦荟 (*Aloe vera* L. var. *chinensis* Haw)、库拉索芦荟 (*Aloe barbadensis* Mill)、木立芦荟 (*Aloe arborescens* Mill)。提取纯化及鉴定参照文献[3], 采用 DEAE-cellulose 52 柱层析和凝胶层析法纯化。

ESA Coulochem II 5200A 电化学检测器; EL340 酶联检测仪; 单糖、双糖标准品, 上海试剂二厂产品; N-乙酰氨基葡萄糖, Sigma 公司。

BALB-c 纯系小鼠, 体重 (20 ± 2) g, 雌雄各半。乳腺癌 K562, 成纤维细胞 FC, 小鼠肝腹水癌 HCa-F, 大连医科大学病理教研室。动物血液采自雌性青紫蓝兔, 体质量为 3.0 ~ 3.5 kg, 大连医科大学实验动物中心。

2 实验方法

2.1 芦荟凝集素的分析鉴定

凝集效价的测定用微量 V 型凝血小板法测定^[4]。

糖抑制专一性试验^[5]是将各种标准糖的缓冲液在 V 型板上倍比稀释, 加入各种凝集素样品 (浓度为能使兔红细胞发生凝集的最低浓度), 产生糖抑制凝集作用所需的最低糖浓度表示糖抑制的能力。分子质量的测定采用凝胶过滤法^[6], 用 Sephadex G-75 凝胶层析柱 (1.1×100 cm), 以溶菌酶 (分子质量 14.3×10^3 g/mol)、胰凝乳蛋白酶原 (24×10^3 g/mol)、胃蛋白酶 (34.7×10^3 g/mol)、卵白蛋白 (45×10^3 g/mol)、牛血清白蛋白 (67×10^3 g/mol) 为标准蛋白质。用 6 mol/L 氯化胍平衡, 洗脱。流速 0.3 ml/min, 测定柱的外水体积 V_0 和样品、标准品的洗脱体积 V_e 。

糖基组成的分析: 先将样品酸水解^[5], 采用电化学法 (ECHPLC) 分析凝集素的单糖组成。流动相 A 为水, 流动相 B 为 20% 的 100 mmol/L NaOH 溶液, 流速 1 ml/min。采用 CoulArray for Windows 色谱工作站, 标准糖进样量 10 μ l, 质量浓度 0.2 mg/ml, 样品进样量 20 μ l。

2.2 芦荟凝集素对体外培养动物细胞生长的影响

分别以 K562 乳腺癌细胞和 FC 成纤维细胞作为靶细胞, 制备成 1×10^5 ml⁻¹ 的细胞悬液。取无菌 96 孔培养板, 每孔加入 100 μ l 倍比稀释的样品, 对照孔加入等量的 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液, 每个样品设复孔一次。然后每孔加入 100 μ l 的

靶细胞悬液, 混匀, 置 37℃ 的 5% CO₂ 孵育箱中培养 48 h, 弃上清液, 每孔加入 5 mg/ml 的四甲基唑氮蓝 10 μ l, 再入孵育箱培养 4 h, 取出后连板离心, 弃去上清液, 每孔加入 100 μ l 二甲基亚砷, 振荡 2 min, 用酶联检测仪测吸收值 OD₄₉₀。计算细胞生长率: $\eta(\%) = (\text{样品的 OD}_{490} / \text{对照的 OD}_{490}) \times 100\%$ 。

2.3 芦荟凝集素对小鼠腹水癌 HCa-F 抑制作用的体内实验

取实验小鼠 40 只, 于小鼠右侧腋中线背部皮下接种 HCa-F 细胞悬液 (2×10^5 ml⁻¹) 0.2 ml, 接种次日随机分为 4 组, 每组雌雄各半: 对照组, Lec1 组, Lec2 组, Lec3 组。实验组小鼠于接种 24 h 后腹腔注射给药 0.2 ml, 剂量为 10 mg/(kg·d)⁻¹; 对照组在同样条件下腹腔注射生理盐水 0.2 ml。连续 20 天, 停药次日处死动物, 称量体重、瘤重, 数据进行统计学处理, 组间差异进行 t 检验。抑瘤率 = $(1 - \text{实验组平均瘤重} / \text{对照组平均瘤重}) \times 100\%$ 。将肿瘤组织用福尔马林固定 2 天后, 进行肿瘤病理组织切片染色分析。

3 结果与讨论

3.1 芦荟凝集素分子质量的测定

用 Sephadex G75 凝胶过滤法分析凝集素的分子质量, 测得柱外水体积 V_0 为 50 ml, 各种凝集素的洗脱体积 V_e 分别为 93 ml (Lec1)、90 ml (Lec2)、93 ml (Lec3)。以各标准蛋白质的分子质量对数 ($\lg M_w$) 对洗脱体积 V_e 进行线性回归计算, 得出分子质量与洗脱体积关系的标准曲线如图 1。其中标准蛋白为: 溶菌酶 (14.3×10^3 g/mol)、胰凝乳蛋白酶原 (24×10^3 g/mol)、胃蛋白酶 (34.7×10^3 g/mol)、卵白蛋白 (45×10^3 g/mol) 和牛血清白蛋白 (67×10^3 g/mol)。

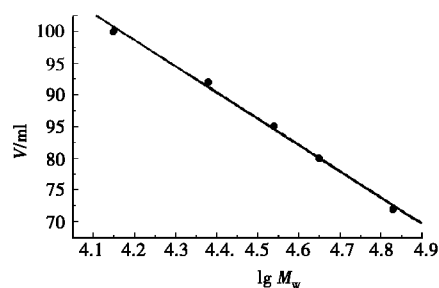


图 1 Sephadex G75 凝胶过滤法测定凝集素分子质量

回归方程关系式为 $\lg M_w = 6.71 - 0.0325 V_e$, 相关系数 R 为 0.99821。根据各种凝集素的洗脱体积计算得到分子质量, 库拉索凝集素的分子质量为 26

$\times 10^3$ g/mol,而中华芦荟凝集素和木立芦荟凝集素的分子质量均为 23×10^3 g/mol。

3.2 芦荟凝集素的糖抑制试验

糖(包括单糖、寡糖)对凝集素凝集活性的抑制作用是凝集素对糖基结合特异性的一种表现,也是凝集素的分类特征之一。测定了单糖(*D*-木糖、*D*-半乳糖、*D*-葡萄糖、*D*-甘露糖、*L*-鼠李糖、*L*-山梨糖),双糖(乳糖、蔗糖、麦芽糖)、*N*-乙酰氨基葡萄糖及糖原对各种芦荟凝集素的凝集活性的抑制作用,结果只有木立凝集素 Lec3 能够被麦芽糖抑制,糖抑制的最小浓度为 25 mmol/L,其他两种凝集素的活性均不能被以上各种糖所抑制,如图 2。这种糖抑制是对凝集素糖基结合位点的一种竞争性抑制,由此推测与木立芦荟凝集素 Lec3 结合的受体糖可能为与麦芽糖结构相类似的寡糖。另外,中华凝集素和库拉索凝集素(Lec1、Lec2)的凝集作用不被所测试的单糖、寡糖抑制。Yagi 等人^[7]报道了一种专一结合半乳糖和甘露糖的木立芦荟凝集素,本实验中得到的木立凝集素 Lec3 与上述文献报道的不同,它能够被麦芽糖抑制,Lec3 的分子质量也不同于报道的凝集素。

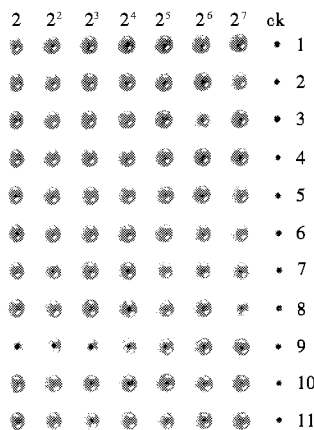
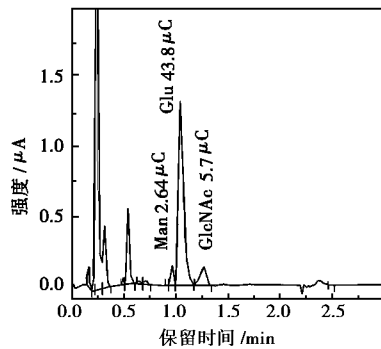


图 2 麦芽糖对木立凝集素 Lec3 的抑制作用

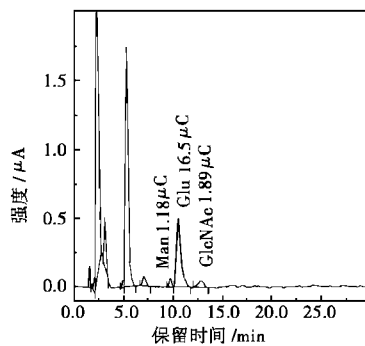
图 2 中 1~11 行分别表示测试糖样 *D*-木糖、*D*-半乳糖、*D*-葡萄糖、*D*-甘露糖、*L*-鼠李糖、*L*-山梨糖、乳糖、蔗糖、麦芽糖、*N*-乙酰氨基葡萄糖及糖原; 2、2²、2⁴等表示稀释倍数;ck 为对照;红细胞呈圆点状沉淀于孔底,为不凝集;红细胞形成片状布满孔底,为凝集反应。

3.3 芦荟凝集素糖基组成的分析

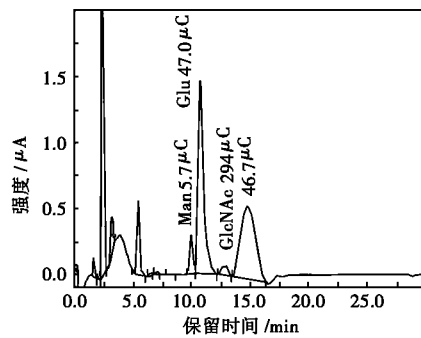
电化学分析结果如图 3。研究表明,库拉索凝集素(Lec2)和中华凝集素(Lec1)主要由甘露糖、葡萄糖、*N*-乙酰氨基葡萄糖构成,摩尔比分别为 1.2:



(Lec1)



(Lec2)



(Lec3)

Man—甘露糖;Glu—葡萄糖;GlcNAc—*N*-乙酰氨基葡萄糖;
图中保留时间 8 min 之前的为蛋白质成分

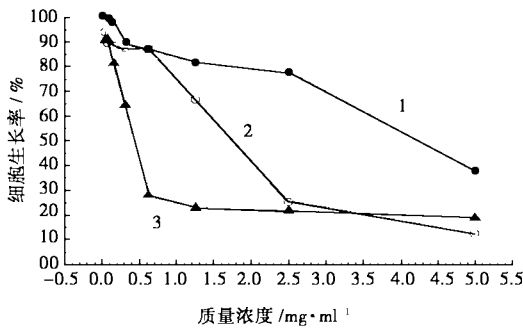
图 3 芦荟凝集素的糖基单糖组成

16.5:1.9 和 2.6:44:5.7;木立凝集素(Lec3)的单糖组成为甘露糖、葡萄糖、*N*-乙酰氨基葡萄糖和一种未知名单糖,其摩尔比为 5.7:47:2.9:46。糖蛋白中糖基与蛋白部分有两种结合方式,即 *N*-连接和 *O*-连接,前者为糖基中的 *N*-乙酰氨基葡萄糖与多肽链中天冬酰胺残基连接,后者是糖蛋白糖基的 *N*-乙酰氨基半乳糖与多肽链的丝氨酸或苏氨酸等残基相连而成。*N*-乙酰氨基葡萄糖是糖蛋白中仅有的一种能与天冬酰胺残基连接的糖基^[8]。3 种凝集素中只检测

到了 N-乙酰氨基葡萄糖,表明其糖基与蛋白之间是以 N-连接方式连接的。

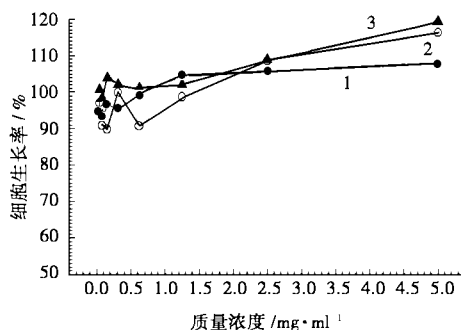
3.4 芦荟凝集素对动物细胞生长作用的影响

通过对 K562 乳腺癌细胞和正常生理细胞(成纤维细胞 FC)的生长率影响分析,结果显示如图 4 和图 5。图 4 显示随着凝集素浓度的增加,K562 乳腺癌细胞的生长率迅速下降。而芦荟凝集素浓度的变化对正常生理细胞的生长率影响不大,如图 5 所示。由以上结果得出,芦荟凝集素能够抑制肿瘤细胞的生长繁殖,而对正常的生理细胞无明显影响。中华凝集素的抑瘤率 IC₅₀(抑瘤率达到 50% 时的凝集素质量浓度)为 4.193 mg/ml;库拉索凝集素的 IC₅₀ 值为 2.305 mg/ml;木立凝集素的 IC₅₀ 值为 1.418 mg/ml。由此可见木立凝集素 Lec3 对肿瘤细胞的抑制能力最强。抑瘤作用强弱的顺序为木立凝集素 > 库拉索凝集素 > 中华凝集素。



1—Lec1;2—Lec2;3—Lec3

图 4 芦荟凝集素对 K562 肿瘤细胞生长率的影响



1—Lec1;2—Lec2;3—Lec3

图 5 芦荟凝集素对成纤维细胞 FC 生长率的影响

植物凝集素能够与某些细胞表面受体(含糖大分子)产生抗原-抗体反应,凝集细胞或沉淀生物大

分子。正常细胞癌变后,细胞膜表面结构明显改变,其对凝集素的亲和力也明显改变,如人的消化道腺癌细胞对凝集素(PHA-P)的亲和力比其周围组织更强^[9]。从芦荟凝集素对正常细胞和肿瘤细胞生长的不同影响来看,这几种芦荟凝集素能够有效地识别肿瘤细胞表面上的受体,产生特异性的抗原抗体反应,从而发挥抑制作用;与正常细胞表面的受体不能产生上述的抗原抗体反应,因此无明显影响。由图 5 可以看出,当浓度较高(>2.5 mg/ml)时凝集素对 FC 细胞的生长具有一定的促进作用,这可能与凝集素糖蛋白对正常细胞的营养作用有关,而在较低浓度下对 FC 细胞的生长没有显著影响。

3.5 芦荟凝集素对小鼠腹水癌 HCa-F 抑制作用的体内实验

小鼠腹水癌细胞 HCa-F 是一种高转移性恶性瘤细胞,对小鼠腹水癌 HCa-F 实体瘤抑制作用的动物体内实验结果如表 1 所示。

表 1 芦荟凝集素体内抗肿瘤(小鼠腹水癌 HCa-f 实体瘤)实验

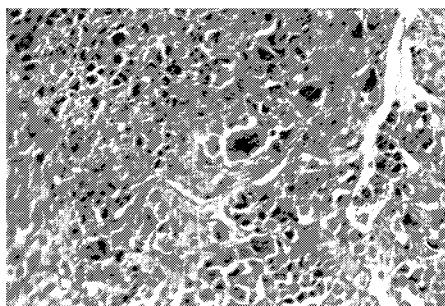
分组	剂量/mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	瘤重/g	抑瘤率/%
Lec1	10	0.93 ± 0.19 ^①	22.5
Lec2	10	0.69 ± 0.15 ^②	42.5
Lec3	10	0.32 ± 0.10 ^③	73.3
对照	—	1.20 ± 0.23	—

注:①、②、③与对照组比较,差异显著, $p < 0.01$;给药途径为腹腔注射。

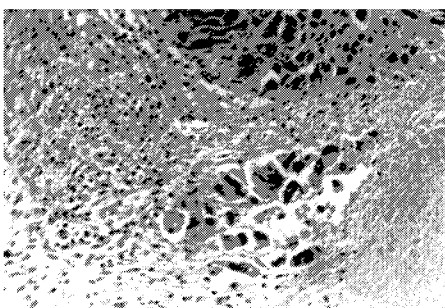
对小鼠腹水癌 HCa-F 抑制作用的动物体内实验结果表明,芦荟凝集素对腹水癌 HCa-F 实体瘤有显著的抑制作用,与对照组比较差异显著($p < 0.01$)。其中木立凝集素的抑制作用最强(抑瘤率为 73.3%),高于库拉索凝集素(42.5%)和中华凝集素(22.5%)。抑制能力顺序与体外实验结果相一致,这表明芦荟凝集素在体内可以抑制肿瘤细胞的生长。

利用肿瘤组织切片技术分析凝集素抑瘤作用的机制,结果如图 6。图 6(a)对照组肿瘤组织切片照片,癌细胞大小、形状差异较大,不规则(即异型性较大),并且病理性核分裂像增多(染色深),表明癌细胞恶性程度高,生长迅速。图 6(b)给药组肿瘤组织切片照片,表明肿瘤细胞被结缔组织和炎症细胞包裹,分为三层结构:外围的结缔组织、炎症细胞,中间的瘤细胞,中心部分坏死的瘤细胞。结缔组织增生和炎症的出现是机体的免疫反应之一,这表明凝集素激发了机体的免疫功能来抵御癌细胞的入侵。

此外,本研究还发现凝集素能够促进体内淋巴细胞分裂,提高机体的免疫能力^[3]。由实验结果看出,芦荟凝集素能够有效地抑制肿瘤细胞的生长,其作用机制主要是一方面通过特异性抗原抗体反应识别肿瘤细胞直接抑制癌细胞生长,详细的作用途径正在研究中;另一方面是激活机体的免疫系统(促进淋巴细胞转化等),通过自体免疫功能来抵御肿瘤细胞。染色深的较大细胞为核分裂像明显的肿瘤细胞,图6(a)为对照组切片,肿瘤细胞异型性大,核分裂像较多;图6(b)为给药组切片,肿瘤组织周围染色较深的小细胞为炎症细胞,染色浅的狭长细胞为结缔组织细胞。



(a)



(b)

图6 肿瘤组织切片染色比较分析(×400)

4 结论

对3种芦荟凝集素的理化性质进行了比较研究,中华凝集素和木立凝集素的分子质量相同,库拉索凝集素分子质量较大。分离得到了一种能够被麦芽糖抑制的芦荟凝集素 Lec3,它不同于国外已报道的木立凝集素。3种凝集素中糖基与蛋白成分之间是通过 N-乙酰氨基葡萄糖与天冬酰胺残基以 N-连接方式连接的。体内和体外动物实验表明,芦荟凝集素能够抑制肿瘤细胞的繁殖,木立凝集素的抑制能力最强。芦荟凝集素通过与细胞表面糖基受体的特异性抗原抗体反应识别肿瘤细胞,并能够激活机体的免疫系统来抑制肿瘤细胞,有关芦荟凝集素对肿瘤细胞的识别机制正在进一步研究中。

参考文献

- [1] Reynolds T, Dweck A C. Aloe vera leaf gel: A review update[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 1999, 68: 3 ~ 37
- [2] 王蜀秀, 温远影, 王雷, 等. 芦荟多糖的研究[J]. *植物学报*, 1989, 31(5): 389 ~ 392
- [3] 田兵, 王关林, 方宏筠. 芦荟凝集素提取及促免疫活性功能初步研究[J]. *大连理工大学学报*, 2001, 3: 296 ~ 299
- [4] 孙册. 凝集素[M]. 北京: 科学出版社, 1986
- [5] 田庚元, 王晨, 冯宇澄. 枸杞子糖蛋白的分离纯化、物化性质及糖肽键特征[J]. *生物化学与生物物理学报*, 1995, 27(2): 201 ~ 205
- [6] 张维杰. 糖复合物生化技术研究[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1999. 126 ~ 127
- [7] Yagi A, Machii K, Nishimura H, et al. Effect of aloe lectin on deoxyribonucleic acid synthesis in babyhamster kidney cells[J]. *Experientia*, 1985, 41: 669 ~ 671
- [8] 吴东儒. 糖类的生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1987. 695 ~ 701
- [9] 许风浩, 刘在贵. 中性红染色后细胞对凝集素的反应性[J]. *生物化学与生物物理进展*, 1992, 19(4): 288 ~ 290

《中国化工产品目录》2001 ~ 2002 年第 10 版

该书是由中国化工信息中心、中化信富邦信息技术有限公司主编的大型化工工具书,第10次出版,经过每年的更新充实,积累了丰富翔实的信息,可满足不同读者的要求。

上册(产品):十九大类 24 000 余种(类)产品。

下册(企业):全国 18 000 余家企业。

附录:石油化工上市企业简介、化工进出口贸易公司名录、化工社团机构名录、化工企业网址名录、石油科研院所及设计院名录、化工产品中英文名称索引及 CA 登记号

索引。

订价:350 元/套(含邮资)

中化信富邦信息技术有限公司

网上书店:www.cheminfo.gov.cn

地址:北京安外小关街 53 号 (100029)

联系人:马立红

电话:010-64444193 传真:010-64437137

开户行:北京农行亚运村支行

帐号:230101040004176