

文章编号: 1000- 0615(2001)01- 0064- 05

# 低分子量海带岩藻聚糖硫酸酯的 清除活性氧自由基和体内抗氧化作用

李兆杰, 薛长湖, 陈磊, 方昱, 林洪  
(青岛海洋大学水产学院, 山东 青岛 266003)

**摘要:** 用化学发光分析法研究了 3 种低分子量海带岩藻聚糖硫酸酯(LMWF-M、LMWF-I、LMWF-IV) 体外清除超氧阴离子自由基( $O_2^{\cdot-}$ ) 及羟基自由基( $\cdot OH$ ) 的作用, 并观察了 LMWF-M 对高脂血症大鼠的抗氧化作用。结果表明低分子量海带岩藻聚糖硫酸酯组分均有清除活性氧自由基的能力, 随体系中 LMWF 浓度的增加, 其清除活性氧自由基的能力增强。LMWF-I 清除自由基的能力最强, 它对  $O_2^{\cdot-}$  的  $IC_{50}$  为  $0.044 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 对  $\cdot OH$  的  $IC_{50}$  为  $0.062 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。LMWF-M 能显著降低高脂血症大鼠血清和组织中 LPO 含量 ( $P < 0.01$ ), 增强 SOD 活力 ( $P < 0.01$ )。

**关键词:** 海带; 低分子量岩藻聚糖硫酸酯(LMWF); 活性氧自由基

中图分类号: S917 文献标识码: A

## Scavenging effects of fucoidan fractions of low molecular weight extracted from *Laminaria japonica* on radicals of active oxygen and antioxidation *in vivo*

LI Zhao-jie, XUE Chang-hu, CHEN Lei, FANG Yu, LIN Hong  
(Fisheries College, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** The scavenging effects of three fucoidan fractions (LMWF-M, LMWF-I, and LMWF-IV) of low molecular weight extracted from *Laminaria japonica* on free radicals of active superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) and hydroxyl ( $\cdot OH$ ) were studied by means of the chemiluminescence analysis. The experimental results showed that three fractions all exhibited significant scavenging capacity on  $O_2^{\cdot-}$  which was increased with the increase of LMWF concentration. LMWF-I containing high glucuronic acid but low sulfate content displayed the highest scavenging effect on free radicals of active oxygen, and its  $IC_{50}$  on  $O_2^{\cdot-}$  was  $0.044 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  and  $0.062 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  on  $\cdot OH$ . Moreover, LMWF-M showed strong antioxidative activity in the experimental rat with hyperlipidemia. The content of LPO in serum and tissue was greatly reduced in hyperlipidemic rats ( $P < 0.01$ ), while the activity of SOD was effectively enhanced ( $P < 0.01$ ).

**Key words:** *Laminaria japonica*; low molecular weight fucoidan(LMWF); active oxygen radicals

收稿日期: 2000-05-30

基金项目: “863” 青年基金资助课题(819-Q-02)

第一作者: 李兆杰(1970-), 男, 山东临朐人, 工程师, 主要从事水产化学研究。E-mail: xuech@ouqd.edu.cn

岩藻聚糖硫酸酯(Fucoidan)是褐藻中特有的一类水溶性硫酸多糖,又被称为褐藻糖胶、褐藻硫酸多糖。组成以岩藻糖和有机硫酸酯为主,还含有半乳糖、甘露糖、木糖及少量的糖醛酸,具有降血脂、抗肿瘤、抗病毒及增强机体免疫力等多种生理功能。不同来源岩藻聚糖硫酸酯的结构不同,其功能也存在着显著差异。对墨角藻(*Fucus vesiculosus*)<sup>[1-3]</sup>、泡叶藻(*Ascophyllum nodosum*)<sup>[4]</sup>、爱森藻(*Eisenia bicyclis*)<sup>[5]</sup>、鼠尾藻(*Sargassum thunbergii*)<sup>[6]</sup>、海黍子(*Sargassum kjellmanianum*)<sup>[7,8]</sup>及昆布(*Ecklonia kurone*)<sup>[9,10]</sup>中的岩藻聚糖硫酸酯的结构与功能已作过较系统的研究。

过去几年,植物来源的自由基清除剂成为研究热点。这些自由基清除剂从结构上来划分,大多属于黄酮类化合物,它们通过酚羟基与过氧化物发生氧化还原反应而发挥作用。最新的研究表明生物活性多糖也具有较强的抗氧化能力。张尔贤等<sup>[11]</sup>发现鼠尾藻中的水溶性多糖能有效地清除活性氧自由基。田晓华等<sup>[12]</sup>用 ESR 法对褐藻硫酸多糖清除活性氧的作用进行了动力学研究, Xue 等<sup>[13]</sup>以脂质氢过氧化物含量的变化为指标研究了几种合成的硫酸多糖的抗氧化活性, Nicola 和 Patrizia 等<sup>[14]</sup>及 Riccardo 等<sup>[15,16]</sup>分别研究了肝素和硫酸软骨素对  $\text{Cu}^{2+}$  诱导的人血浆低密度脂蛋白(LDL)过氧化修饰的保护作用。海带是我国最丰富的褐藻资源,并含有较高含量的岩藻聚糖硫酸酯。本文对从海带科植物日本海带(*Laminaria japonica*)中提取制备的低分子量海带硫酸多糖(Low molecular weight fucoidan, LMWF)的体外清除活性氧自由基和对高脂血症大鼠的抗氧化作用进行了探讨。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

低分子量海带岩藻聚糖硫酸酯(LMWF):从海带中经热水提取、分子量降解、超滤分级、透析及冷冻干燥等步骤得到的组分 M(LMWF-M),以及从 M 纯化得到的组分 I(LMWF-I)和组分 IV(LMWF-IV)。它们的平均分子量为 8 000~10 000。

实验动物:Wistar 大鼠,180~220g,山东省海洋药物研究所实验动物中心提供。

### 1.2 实验方法

LMWF 对超氧阴离子自由基( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )的清除作用:按文献[11]用化学发光法观察 LMWF 对连苯三酚-鲁米诺体系产生的  $\text{O}_2^{\cdot-}$  的清除作用。

LMWF 对羟基自由基( $\cdot\text{OH}$ )的清除作用:按文献[17]用化学发光法观察 LMWF 对抗坏血酸- $\text{Cu}^{2+}$ -酵母悬浮液-鲁米诺- $\text{H}_2\text{O}_2$  体系产生的  $\cdot\text{OH}$  的清除作用。

LMWF-M 对实验性高脂血症大鼠血清及组织中过氧化脂质(LPO)及超氧化物歧化酶(SOD)含量的影响:按文献[18]建立高脂血症大鼠模型。Wistar 大鼠 24 只,雌雄各半,实验前喂基础饲料 10d,空腹称重,测血脂水平。根据体重、性别和血脂水平随机分为 4 组:正常对照组(NC)、高脂对照组(HFC)、低剂量组(LD)和高剂量组(HD),每组 6 只。NC 组喂基础饲料。其余 3 组均喂高脂饲料,LD 组按  $150\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  LMWF-M 灌胃,HD 组按  $300\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  LMWF-M 灌胃。实验大鼠自由进食及饮水,每天记进食量,每周称重,实验周期 30d。实验结束后的方法取血和心、脑、肝组织测 LPO 含量<sup>[19]</sup>和 SOD 活力(放免法,试剂盒购自北京北方药物技术研究所)。

数据处理:样品对  $\text{O}_2^{\cdot-}$  及  $\cdot\text{OH}$  的清除作用以抑制体系发光强度的百分率为:

$$\text{抑制率}(\%) = (\text{空白对照发光强度} - \text{样品体系发光强度}) / \text{空白对照发光强度} \times 100$$

定义抑制发光强度达到 50% 时的样品浓度为  $\text{IC}_{50}$ 。

血清和组织中 LPO 和 SOD 含量均以均数  $\pm$  标准误( $\bar{X} \pm S_X$ )表示,两组之间比较用 t 检验,  $P < 0.05$  统计学有显著意义,  $P < 0.01$  统计学有非常显著意义。

## 2 结果与讨论

### 2.1 LMWF 对 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的清除作用

图1显示了不同的海带岩藻聚糖硫酸酯组分和超氧化物歧化酶(SOD)对超氧阴离子(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)的清除作用。SOD是O<sub>2</sub><sup>-</sup>的专一性清除剂,在连苯三酚-鲁米诺发光体系中随SOD浓度的增加,化学发光强度降低。SOD在此体系中抑制O<sub>2</sub><sup>-</sup>产生的IC<sub>50</sub>为0.80ng·mL<sup>-1</sup>,与对碱性二甲亚砷-鲁米诺体系产生O<sub>2</sub><sup>-</sup>的抑制作用基本一致<sup>[20]</sup>。从图中可以看出,3种岩藻聚糖硫酸酯组分都有清除O<sub>2</sub><sup>-</sup>的作用,且随体系中浓度的增加,其清除活性氧自由基的能力增强。LMWF-I和LMWF-IV清除O<sub>2</sub><sup>-</sup>的能力高于LMWF-M。它们清除超氧离子的IC<sub>50</sub>分别为0.044mg·mL<sup>-1</sup>、0.046mg·mL<sup>-1</sup>和0.150mg·mL<sup>-1</sup>。与SOD相比,3种岩藻聚糖硫酸酯组分清除O<sub>2</sub><sup>-</sup>的能力要低得多。

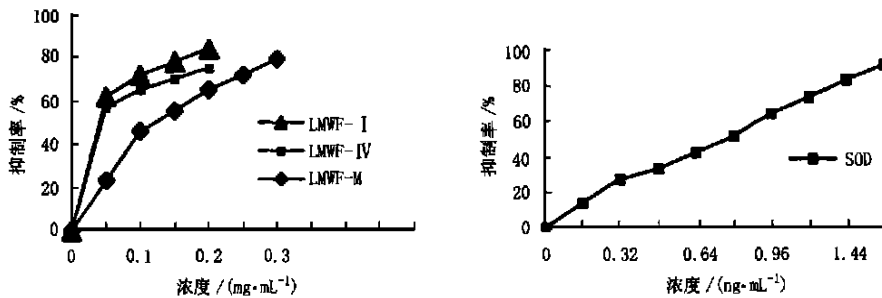


图1 岩藻聚糖硫酸酯组分和SOD对O<sub>2</sub><sup>-</sup>的清除作用

Fig.1 The scavenging effects on O<sub>2</sub><sup>-</sup> of LMWFs from *L. japonica* and SOD

### 2.2 LMWF 对·OH 的清除作用

3种海带岩藻聚糖硫酸酯组分对抗坏血酸-Cu<sup>2+</sup>-酵母悬浮液-鲁米诺-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>体系产生·OH的抑制作用见图2。3种组分的IC<sub>50</sub>分别为0.062mg·mL<sup>-1</sup>、0.098mg·mL<sup>-1</sup>和0.200mg·mL<sup>-1</sup>。从混合组分M分离得到的LMWF-I和LMWF-IV清除·OH的能力提高了一倍多。也比从鼠尾藻中分离的水溶性多糖要高得多<sup>[11]</sup>。甘露醇是·OH的专一性清除剂,但在此体系中,甘露醇清除·OH的能力仅为LMWF-I的1/7。

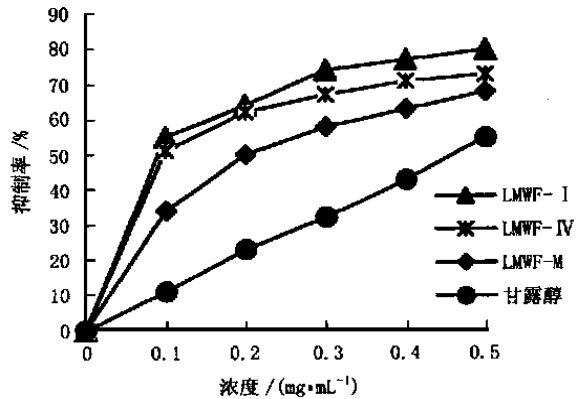


图2 岩藻聚糖硫酸酯组分和甘露醇对·OH的清除作用

Fig.2 The scavenging effects on ·OH of LMWFs from *L. japonica*

### 2.3 LMWF-M 对大鼠血清和组织中LPO含量的影响

高血脂症大鼠血清和心组织中LPO的含量显著升高(P<0.05),岩藻聚糖硫酸酯能显著降低实验性高脂大鼠血清和组织中LPO含量(P<0.01),且肝、脑组织中LPO含量在LD和HD组间有显著差异(P<0.05)(表1)。高血脂和高血清LPO含量是动脉粥样硬化(AS)发生的重要原因。血清中活性氧自由基导致的脂质过氧化而产生的MDA能与LDL结合成MDA-LDL复合物,该复合物对血管内皮细胞有较强的损伤作用且极易被单核巨噬细胞和血管内皮细胞的清道夫受体识别而进入细胞,使细胞内胆

固醇堆积并转变为泡沫细胞, 形成动脉粥样硬化(AS)的早期病变。王春波等<sup>[21]</sup>和石晶等<sup>[22]</sup>分别研究了抗氧化剂 $\beta$ -胡萝卜素和姜黄素预防 AS 的可能机制, 认为抗氧化剂 $\beta$ -胡萝卜素和姜黄素能预防 AS 发生的主要原因就是二者都能显著降低血清中 LPO 的含量。研究已经表明, 海带岩藻聚糖硫酸酯能显著降低高脂血症大鼠血清中总甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)含量, 同时显著升高血清中高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)含量<sup>[23]</sup>。因此, 可以认为 LMWF 在预防 AS 形成方面具有重要的临床意义。

表 1 岩藻聚糖硫酸酯组分 M 对高脂血症大鼠血清及组织中 LPO 含量的影响

Tab. 1 Effect of LMWF-M on LPO content in serum and tissues of rats ( $\bar{x} \pm S_x, n=$  )

组别	血清( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	肝脏( $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ )	脑( $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ )	心脏( $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ )
NC	3.58 $\pm$ 0.32	31.1 $\pm$ 13.4	71.2 $\pm$ 16.1	223.1 $\pm$ 36.6
HFC	6.76 $\pm$ 0.55 <sup>a</sup>	48.8 $\pm$ 11.2 <sup>b</sup>	84.3 $\pm$ 14.9	235.6 $\pm$ 36.9
LD	3.53 $\pm$ 0.65 <sup>c</sup>	36.6 $\pm$ 17.2	42.7 $\pm$ 28.2 <sup>c</sup>	88.4 $\pm$ 8.4 <sup>c</sup>
HD	3.10 $\pm$ 0.28 <sup>c</sup>	17.9 $\pm$ 5.0 <sup>c</sup>	26.3 $\pm$ 5.5 <sup>c</sup>	65.3 $\pm$ 25.9 <sup>c</sup>

注: a 和 NC 组比较,  $P < 0.01$ ; b 和 NC 组比较,  $P < 0.05$ ; . c 和 HFC 组比较,  $P < 0.01$ , 下同。

## 2.4 LMWF-M 对 SOD 活力的影响

组分 M 能显著提高实验性高脂血症大鼠血清及组织中 SOD 活力(表 2)。血清和肝、脑组织中 SOD 活力在 LD 和 HD 组之间有显著差异( $P < 0.05$ )。但对心组织中的 SOD 活力无显著影响( $P > 0.05$ )。活性氧自由基是生物体氧化还原反应的代谢产物。在正常的生理状态下, 机体内仅含有微量的活性氧自由基, 以保持机体正常的生理功能。当机体的过量活性氧自由基不能清除时, 就会产生巨大的损伤作用<sup>[24]</sup>。超氧阴离子自由基是生物体中第一个生成的自由基, 是所有氧自由基的前体。与超氧阴离子自由基的专一性清除剂 SOD 相比, LMWF-M 体外清除超氧阴离子自由基的能力要小的多, 但 LMWF-M 能显著地升高高脂血症大鼠血清和组织中 SOD 的含量, 因此对机体的过氧化损伤有很强的保护作用。海带岩藻聚糖硫酸酯对高脂血症大鼠的抗氧化作用除与其自身的清除活性氧自由基能力有关外, 可能与其促进 SOD 从细胞表面释放有关<sup>[25]</sup>, 也可能与结合产生 $\cdot\text{OH}$  所必需的金属离子从而抑制 $\cdot\text{OH}$  的产生有关<sup>[26]</sup>。

表 2 岩藻聚糖硫酸酯组分 M 对高脂血症大鼠血清和组织中 SOD 活力的影响

Tab. 2 Effect of LMWF-M on SOD activity in serum and tissues of rats ( $\bar{x} \pm S_x, n=$  )

组别	血清( $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ )	肝脏( $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ )	脑( $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ )	心脏( $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ )
NC	1570.5 $\pm$ 225.6	2210.0 $\pm$ 282.0	861.0 $\pm$ 128.0	276.9 $\pm$ 64.1
HFC	1270.0 $\pm$ 183.3 <sup>b</sup>	826.9 $\pm$ 193.3 <sup>a</sup>	614.3 $\pm$ 80.5 <sup>a</sup>	266.7 $\pm$ 66.6
LD	1554.8 $\pm$ 258.1	2085.1 $\pm$ 307.7 <sup>c</sup>	1143.8 $\pm$ 361.6 <sup>c</sup>	273.7 $\pm$ 29.0
HD	1928.7 $\pm$ 131.5 <sup>c</sup>	2843.0 $\pm$ 218.7 <sup>c</sup>	1409.3 $\pm$ 304.5 <sup>c</sup>	326.7 $\pm$ 40.3

注: 同上。

## 3 结论

海带低分子量岩藻聚糖硫酸酯(LMWF)在体外具有较强的清除活性氧自由基的能力, LMWF 经过分级后清除自由基的能力显著增强。LMWF 能显著降低高脂血症大鼠血清中 LPO 含量, 同时显著提高血清和组织中 SOD 活力, 提示 LMWF 在预防 AS 方面具有较大的临床意义。

## 参考文献:

- [1] Takashi N, Chie N, Hiroaki V, et al. Isolation and partial characterization of a novel amino sugar-containing fucan sulfate from commercial *Fucus vesiculosus* [J]. Carbohydr Res, 1994, 255: 213-224.
- [2] Shinji S, Satoshi I, Hiroashi S, et al. Inhibitory effects of oversulfated fucoidan on invasion through reconstituted basement membrane by murine

- Lewis' lung carcinoma[J]. Jap J Cancer Res, 1994, 85: 1144- 1150.
- [ 3 ] Manish S P, Sorgio O ,Townsend B, et al. A revised structure of fucoidan may explain some of its biological activities[J]. J Biol Chem, 1993, 268: 21770- 21776.
- [ 4 ] Darrell G, Terry L S, Richard W B. Structural features of a novel glucuronicgalactifucan from *Ascophyllum nodosum*[J]. Carbohydr Res, 1978, 66: 167- 171.
- [ 5 ] Taichi U, Katsuko A, Takashi M. Isolation of highly purified fucoidan from *Eisenia bicydis*[J]. Agric Biol Chem, 1980, 44: 1965- 1966.
- [ 6 ] Cun Z, Hiroko I, Takashi M, et al. Antitumor active fucoidan from the brown seaweed, *Umitoranoo*(*Sargassum thunbergii*)[J]. Biosci Biotech Biochem, 1995, 59: 563- 567.
- [ 7 ] Ichiro Y, Terukazu N, Masatoshi T, et al. Antitumor effects of seaweeds. III Antitumor effect of an extract from *Sargassum kjellmanianum*. [J]. Jap J Exp Med, 1981, 51: 198- 189.
- [ 8 ] Ichiro Y, Terukazu N, Masatoshi T, et al. Antitumor effects of seaweed. IV Enhancement of antitumor activity by sulfation of a crude fucoidan from *Sargassum kjellmanianum*[J]. Jap J Exp Med, 1984, 54: 143- 151.
- [ 9 ] Takashi N, Terukazu N. Structural characterization of a new anticoagulant fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia karone*[J]. Carbohydr Res, 1991, 211: 77- 90.
- [ 10 ] Takashi N, Terukazu N. The sulfate-content dependence of the anticoagulant activity of a fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia karone*[J]. Carbohydr Res, 1991, 214: 193- 197.
- [ 11 ] 张尔贤, 俞君丽, 肖 湘. 鼠尾藻多糖清除自由基作用的研究[J]. 中国海洋药物, 1995, 15(1): 1- 4.
- [ 12 ] 田晓华, 丛建波, 施定基, 等. 褐藻硫酸多糖清除活性氧自由基作用及动力学的 ESR 研究[J]. 营养学报, 1997, 19(1): 32- 37.
- [ 13 ] Xue C H, Yu G L, Takashi H, et al. Antioxidative activities of several marine polysaccharides evaluated in a phosphatidylcholine-liposomal suspension and organic solvents[J]. Biosci Biotech Biochem, 1998, 62(2): 206- 209.
- [ 14 ] Nicola V, Patrizia T. Influence of chondroitin sulfate charge density, sulfate group position, and molecular mass on  $\text{Cu}^{2+}$ -mediated oxidation of human low-density lipoproteins: Effect of normal human plasma-derived chondroitin sulfate[J]. J Biochem, 1999, 125: 297- 304.
- [ 15 ] Riccardo A, Pilar R, Andreas G, et al. Chondroitin 4-sulfate exhibits inhibitory effect during  $\text{Cu}^{2+}$ -mediated LDL oxidation[J]. FEBS Lett, 1997, 403: 154- 158.
- [ 16 ] Riccardo A, Pilar R, Andreas G, et al. Heparin exhibits inhibitory effect during  $\text{Cu}^{2+}$ -mediated LDL oxidation[J]. FEBS Lett, 1995, 377: 240- 242.
- [ 17 ] 陈季武, 胡天喜. 测定 $\cdot\text{OH}$ 产生与清除的化学发光体系[J]. 生物化学与生物物理进展, 1992, 19: 136- 140.
- [ 18 ] 王素敏, 刘福英, 徐增年, 等. 大豆低聚糖对大鼠血清和抗氧化作用的影响[J]. 营养学报, 1997, 19: 468- 469.
- [ 19 ] Reily C A. Ethane evolution: a new index of lipid peroxidation[J]. Science, 1974, 183: 208- 210.
- [ 20 ] 赵琢道, 黎 鳌, 杨宗城, 等. 一种测定 SOD 活力的新方法——碱性二甲亚砷- 鲁米诺化学发光法[J]. 生物化学与生物物理进展, 1987, 14(6): 55- 59.
- [ 21 ] 王春波, 蓝孝贞, 张鲁平, 等. 盐藻 $\beta$ -胡萝卜素对实验性动脉粥样硬化预防作用的研究[J]. 中国海洋药物, 1998, 1: 7- 10.
- [ 22 ] 石 晶, 王中孝, 田亚平, 等. 姜黄素对高血脂症大鼠血浆和肝脏超氧化物歧化酶和脂质过氧化物的影响[J]. 中草药, 1997, 28: 285- 287.
- [ 23 ] 李兆杰, 薛长湖, 林 洪, 等. 岩藻聚糖硫酸酯降血脂和抗氧化作用的研究[J]. 营养学报, 1999, 21(3): 280- 284.
- [ 24 ] 赵保路. 氧自由基和天然抗氧化剂[M]. 北京: 科学出版社, 1999. 138- 152.
- [ 25 ] Katlsson K, Marklund S L. Heparin-induced release of extracellular superoxides dismutase to human blood plasma[J]. Biochem J, 1987, 242: 55.
- [ 26 ] Grant D. Pericellular heparin may contribute to the protection of cells from free radicals[J]. Med Hypotheses, 1987, 23: 67.