

海藻多糖中硫酸基含量对抑制草酸钙晶体形成 和修复受损伤肾小管上皮细胞的影响

刘静鸿 桂 琴 欧阳健明*

(暨南大学化学与材料学院, 生物矿化与结石病防治研究所, 广州 510632)

摘要: 采用X射线衍射法、傅里叶变换红外光谱仪、扫描电子显微镜、 ζ 电位仪和电感耦合等离子体发射光谱仪, 比较了4种分子量相近(约3 700 Da)、但硫酸基($-\text{OSO}_3^-$)含量不同的降解海藻多糖对草酸钙(CaC_2O_4)晶体生长的调控作用; 采用细胞实验比较了它们对受损伤肾小管上皮细胞(HK-2)的修复能力。这4种海藻多糖分别是降解紫菜多糖(PY-1)、降解龙须菜多糖(GL-2)、降解羊栖菜多糖(SF-3)和降解裙带菜多糖(UP-4), 其 $-\text{OSO}_3^-$ 含量分别为17.9%、13.3%、8.2%和5.5%。结果表明, 这4种多糖均能够抑制一水草酸钙(COM)生长, 诱导二水草酸钙(COD)生成, 增加溶液中可溶性 Ca^{2+} 离子浓度, 增加晶体表面的 ζ 电位绝对值, 从而降低晶体的聚集程度; 这些多糖均能修复被草酸氧化损伤的HK-2细胞, 提高细胞活力和超氧化物歧化酶(SOD)活力, 降低丙二醛(MDA)的释放量。结果表明, 多糖中 $-\text{OSO}_3^-$ 含量越高, 多糖对 CaC_2O_4 晶体生长的抑制作用和对受损伤HK-2细胞的修复作用均越强。

关键词: 海藻多糖; 草酸钙; 硫酸基含量; 结晶抑制

中图分类号: R69; O614.23

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2023)03-0465-10

DOI: 10.11862/CJIC.2023.015

Effect of seaweed polysaccharides with different sulfate group contents on crystal growth of calcium oxalate and on the repair of damaged renal epithelial cells

LIU Jing-Hong GUI Qin OUYANG Jian-Ming*

(College of Chemistry and Materials Science, Institute of Biomineralization and Lithiasis Research, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: X-ray diffraction, Fourier transform infrared spectrometer, scanning electron microscope, ζ potential analyzer, and inductively coupled plasma emission spectrometer were used to compare the regulation of four degraded seaweed polysaccharides with a similar molecular weight of about 3 700 Da and different contents of sulfate group ($-\text{OSO}_3^-$) on the inhibition of crystal growth of calcium oxalate (CaC_2O_4), and the repair ability of the polysaccharides on damaged renal epithelial cells was compared by cell experiments. These four seaweed polysaccharides were degraded *Porphyra* polysaccharide (PY-1), degraded *Gracilaria lemaneiformis* polysaccharide (GL-2), degraded *Sargassum fusiforme* polysaccharide (SF-3) and degraded *Undaria pinnatifida* polysaccharide (UP-4), and their $-\text{OSO}_3^-$ contents were 17.9%, 13.3%, 8.2%, and 5.5%, respectively. The results showed that these four polysaccharides could inhibit the growth of calcium oxalate monohydrate (COM), induce the formation of calcium oxalate dihydrate (COD), increase the concentration of soluble Ca^{2+} ions in solution, and increase the absolute value of ζ potential on the crystal surface, thereby reducing the degree of crystal aggregation. In addition, these polysaccharides could repair HK-2 cells damaged by oxalic acid, increase cell viability and superoxide dismutase (SOD) activity, and reduce the release of malondialdehyde (MDA). The results show that the higher the content of $-\text{OSO}_3^-$ in poly-

收稿日期: 2022-09-02。收修改稿日期: 2022-12-06。

国家自然科学基金(No.21975105, 82270800)资助。

*通信联系人。E-mail: toyjm@jnu.edu.cn

saccharides, the stronger the inhibitory effect of polysaccharides on CaC_2O_4 crystal growth and the repair effect on damaged HK-2 cells.

Keywords: seaweed polysaccharide; calcium oxalate; sulfate group content; crystallization inhibition

0 引言

肾结石是病理矿化的产物^[1-2],其发病率近年呈上升趋势^[3-4]。肾结石的主要成分为一水草酸钙(COM)和二水草酸钙(COD)^[5-6]。目前医学上治疗肾结石的主要药物是柠檬酸盐和镁制剂,但对这些药物的作用机制仍不清楚,部分药物对人体的副作用较大。因此,开发高效、低毒、廉价的新型防石药物,具有重要的科学和现实意义。

植物多糖里所含有的酸性基团(如 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{OSO}_3^-$ 与 $-\text{OPO}_3^-$ 等)可以与尿液中的钙离子配位,生成可溶性配合物,降低草酸钙(CaC_2O_4)溶液体系的过饱和度;并可以吸附在COM晶体的特定键合位点上,抑制 CaC_2O_4 晶体的生长与聚集^[7-8]。酸性多糖还可以修复受损伤细胞^[9],阻止 CaC_2O_4 晶体与肾上皮细胞的黏附,有利于尿液中晶体的排出,故酸性植物多糖具有潜在的防治结石功能。

在以前的研究中^[10],我们通过控制双氧水浓度对4种海藻多糖进行降解,获得了分子量均在约3 700 Da,但硫酸基($-\text{OSO}_3^-$)含量分别为17.9%、13.3%、8.2%和5.5%的4种多糖,即降解紫菜多糖(PY-1)、降解龙须菜多糖(GL-2)、降解羊栖菜多糖(SF-3)和降解裙带菜多糖(UP-4),这4种多糖的单糖结构较为相近,主要由半乳糖和(或)岩藻糖构成^[11-14]。在质量浓度0~100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内,上述多糖对人肾近曲小管上皮细胞(HK-2)均不表达毒性,且对受损伤的HK-2具有修复作用。

本工作中,我们比较研究了这些多糖抑制 CaC_2O_4 晶体生长和修复受损伤肾上皮细胞的能力,

特别是与多糖中 $-\text{OSO}_3^-$ 含量的关系,希望为择优筛选防治 CaC_2O_4 肾结石的药物提供启示。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

四种海藻多糖(紫菜多糖、龙须菜多糖、羊栖菜多糖和裙带菜多糖)均由陕西慈缘生物有限公司生产,通过控制降解条件(如双氧水的浓度、降解温度和降解时间)^[10],得到4种降解多糖PY-1、GL-2、SF-3和UP-4,其基本理化性质见表1。多糖采用如下方法进行纯化:(1)溶解在蒸馏水中,采用Sevag方法去除蛋白质;(2)然后采用3 000 Da透析膜透析3 d,在减压下蒸发透析后的多糖溶液;(3)采用无水乙醇醇沉12 h,离心收集所得沉淀,在60 $^{\circ}\text{C}$ 下干燥。这一系列纯化过程已经基本去除了酚类和黄酮类等化合物^[15]。采用UV法在200~300 nm区间对多糖水溶液进行扫描,在此区间没有发现吸收峰^[16],茆三酮实验没有显示紫色,这表明多糖中已经不含蛋白质成分^[17]。采用Folin-Ciocalteu法测定总酚类化合物^[18],亦未发现酚类的存在。

人肾近曲小管上皮细胞(HK-2细胞)购自中国科学院上海细胞库。细胞培养板购自无锡耐思生命科技股份有限公司。青霉素-链霉素抗生素(100 $\times$)、胰酶、胎牛血清和DMEM/F12培养液(Gibco,美国)。Cell Counting Kit-8(CCK-8试剂盒)、总超氧化物歧化酶(SOD)活性检测试剂盒(NBT法)和脂质氧化检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。草酸钠($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$)和氯化钙(CaCl_2)等常规试剂均为分析纯,实验用水均为二次蒸馏水。

表1 多糖的分子量M、 $-\text{OSO}_3^-$ 含量、 $-\text{COOH}$ 含量及其在浓度0.8 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时诱导的COD含量
Table 1 Molecular weights M, contents of $-\text{OSO}_3^-$, contents of $-\text{COOH}$ of the polysaccharides, and the contents of COD induced by the polysaccharides with a concentration of 0.8 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

Polysaccharide	Molecular weight / Da	$-\text{OSO}_3^-$ content / %	$-\text{COOH}$ content / %	COD content / %
PY-1	4 020	17.9	1.7	92.7
GL-2	3 343	13.3	1.0	62.9
SF-3	3 828	8.2	1.3	36.7
UP-4	3 635	5.5	1.2	15.2
Blank				0

所用主要仪器有紫外可见近红外分光光度计(Cary 5000, Agilent, 美国)、X射线衍射仪(XRD, D/MAX-2400, Rigaku, 日本)、傅里叶红外光谱仪(Nicolet 6700, Thermo Fisher Scientific, 美国)、扫描电子显微镜(SEM, XL-30, Philips, 荷兰)、纳米粒度- ζ 电位分析仪(Zetasizer 300HS, Malvern, 英国)、电感耦合等离子体发射光谱仪(ICP, Optima 2000DV, Perkin Elmer, 美国)、多功能酶标仪(SafireZ, Tecan, 瑞士)。

1.2 CaC_2O_4 晶体生长

CaC_2O_4 结晶实验参照文献^[19]进行。在一组烧杯中分别加入40 mL 22 mmol·L⁻¹的 CaCl_2 及一定量的不同种类的多糖,磁力搅拌10 min后,迅速加入40 mL 22 mmol·L⁻¹的 $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$,通过补充蒸馏水使体系终体积为88 mL,此时溶液中 $c_{\text{Ca}^{2+}}=c_{\text{C}_2\text{O}_4^{2-}}=10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,多糖的质量浓度在0~3.0 g·L⁻¹之间。反应10 min后,在37℃恒温条件下静置2 h,离心分离。用ICP测定上层清液中的可溶性 Ca^{2+} 离子浓度(包括游离的钙离子和被多糖配位后溶解在溶液中的钙离子),底层 CaC_2O_4 沉淀在真空干燥器中干燥后称重,并取一定量的 CaC_2O_4 样品进行XRD、FT-IR、SEM和 ζ 电位检测。

1.3 CaC_2O_4 晶体的表征

1.3.1 XRD检测

将干燥并在研钵中研磨后的 CaC_2O_4 晶体粉末置于标准凹槽板上,样品表面必须平滑且与凹槽面相平。每次测定所需 CaC_2O_4 粉末质量为40~50 mg。测试条件:石墨单色器 $\text{Cu K}\alpha$ 射线,工作电压为30 kV,工作电流为25 mA,扫描范围5°~60°,扫描速度8 (°)·min⁻¹,步宽0.02 (°)·s⁻¹。

CaC_2O_4 中COM和COD的相对百分含量根据XRD图采用 K 值法计算^[19]:

$$w_{\text{COD}} = \frac{I_{\text{COD}}}{I_{\text{COD}} + I_{\text{COM}}} \times 100\%$$

式中 I_{COM} 和 I_{COD} 分别为COM的主衍射峰($\bar{1}01$)晶面($d=0.591\text{ nm}$)和COD的主衍射峰(200)晶面($d=0.617\text{ nm}$)的强度。

1.3.2 FT-IR检测

取少量已干燥的 CaC_2O_4 样品,与750 mg KBr充分混匀,用玛瑙研钵进行研磨,研磨至看不见粉末的光泽,压片,红外光谱仪于4 000~400 cm⁻¹波数范围内扫描。

1.3.3 SEM观察

称取上述 CaC_2O_4 沉淀1 mg,分散在10 mL无水

乙醇中,在低功率下超声3 min后,立即点样在10 mm×10 mm的玻片上,于50℃下烘干,样品喷金后用SEM观察晶体的尺寸与形貌。操作条件:电压为5.00 kV,工作距离为5~10 mm,放大倍数为5 000。

1.3.4 晶体的 ζ 电位测量

称取上述 CaC_2O_4 沉淀10 mg,分散在30 mL二次蒸馏水中,悬浮液超声10 min后,用 ζ 电位分析仪测量其 ζ 电位。

1.4 不同多糖对HK-2细胞的细胞毒性

将细胞浓度 $1.0\times 10^5\text{ mL}^{-1}$ 的细胞悬液接种于96孔培养板(每孔100 μL),置于37℃、CO₂体积分数5%、饱和湿度的培养箱中孵育24 h后,改用无血清DMEM培养液孵育12 h,使细胞同步化。弃去培养液,将细胞分为2组:(A)正常组,即未经多糖处理的对照细胞;(B)多糖组,分别加入含0.1、1、10和100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的上述4种多糖孵育24 h。严格按照CCK-8检测试剂盒说明书进行操作。

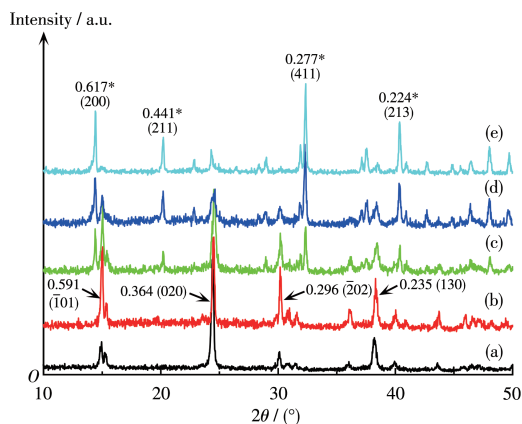
1.5 多糖修复前后HK-2细胞的细胞活力、SOD水平和丙二醛释放量检测

将细胞浓度 $1.0\times 10^5\text{ mL}^{-1}$ 的细胞悬液接种于24孔培养板(每孔100 μL),置于37℃、CO₂体积分数5%、饱和湿度的培养箱中孵育24 h后,改用无血清DMEM培养液孵育12 h,使细胞同步化。弃去培养液,将细胞分为3组:(A)正常组,即未经多糖处理的对照细胞;(B)草酸损伤组,加入2.8 mmol·L⁻¹草酸的无血清培养液,损伤3.5 h;(C)多糖修复组,分别加入60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的上述4种多糖,对损伤组细胞修复12 h。吸取上清液,进行细胞活力、SOD和丙二醛(MDA)释放量检测,严格按照CCK-8、SOD和MDA试剂盒说明书进行操作。

2 结 果

2.1 不同种类多糖存在下 CaC_2O_4 晶体的XRD图

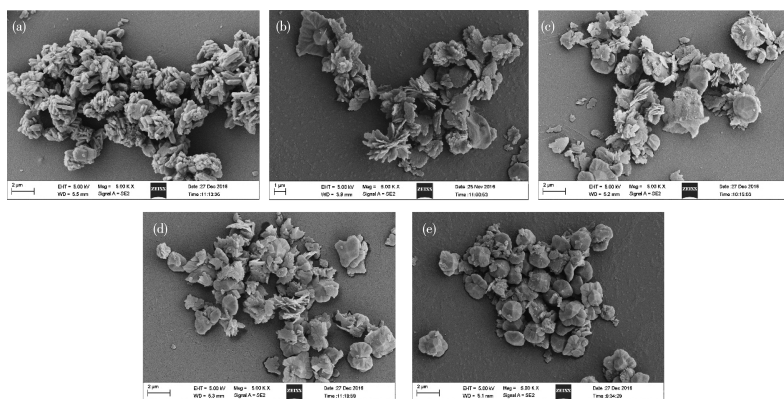
图1为4种多糖在质量浓度0.8 g·L⁻¹时诱导生成的 CaC_2O_4 晶体的XRD图,可以发现:(1)这些多糖均可以诱导COD形成。例如,没有加入多糖的空白对照组只诱导COM形成(图1a),COM的衍射峰出现在晶面间距 $d=0.591$ 、0.364、0.296和0.235 nm处,分别归属于COM的($\bar{1}01$)、(020)、($\bar{2}02$)和(213)晶面。加入多糖后,在 $d=0.617$ 、0.441、0.280和0.224 nm处出现了COD的衍射峰(图1b~1e),分别归属于COD的(200)、(211)、(411)和(213)晶面。(2)—OSO₃—基含量高的多糖诱导COD的能力更强(表1)。例如,在浓度为



(a) Blank; (b) UP-4; (c) SF-3; (d) GL-2; (e) PY-1; The crystal faces with asterisks show COD and those without asterisk show COM

图1 在 $0.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的多糖存在下形成的 CaC_2O_4 晶体的 XRD 图

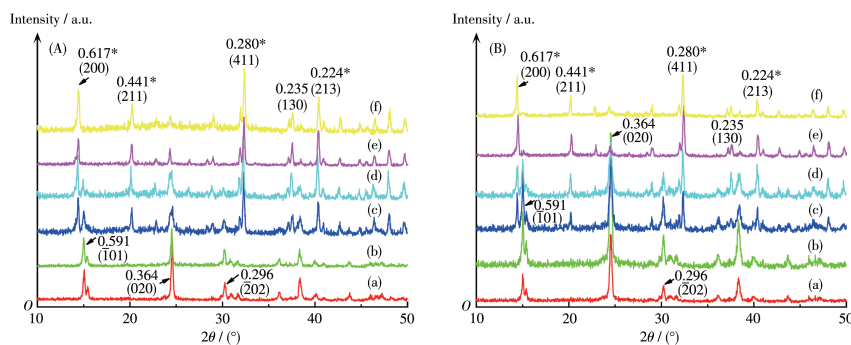
Fig.1 XRD patterns of CaC_2O_4 crystals formed in the presence of the polysaccharides with a concentration of $0.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$



(a) Blank; (b) UP-4; (c) SF-3; (d) GL-2; (e) PY-1

图2 在浓度 $0.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的多糖存在下形成 CaC_2O_4 晶体的 SEM 图

Fig.2 SEM images of CaC_2O_4 crystals formed in the presence of the polysaccharides with a concentration of $0.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$



(a) $0.15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; (b) $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; (c) $0.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; (d) $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; (e) $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; (f) $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; The crystal faces with asterisks show COD and those without asterisk show COM

图3 不同浓度多糖存在下 CaC_2O_4 晶体的 XRD 图: (A) GL-2; (B) SF-3

Fig.3 XRD patterns of CaC_2O_4 crystals formed in the presence of the polysaccharides with different concentrations: (A) GL-2; (B) SF-3

$0.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, PY-1、GL-2、SF-3 和 UP-4 分别诱导 92.7%、62.9%、36.7% 和 15.2% 的 COD 晶体形成。

2.2 不同多糖存在下 CaC_2O_4 晶体的 SEM 图像

图2为4种多糖诱导形成的 CaC_2O_4 晶体的 SEM 图像。随着多糖中 $-\text{OSO}_3^-$ 基含量增加,诱导的草帽状的 COD 晶体含量增加,其中 $-\text{OSO}_3^-$ 基含量最大 (17.9%) 的 PY-1 诱导的晶体中 COD 含量为 92.7% (图 2e)。而没有多糖存在时,只形成聚集状的 COM 晶体 (图 2a)。

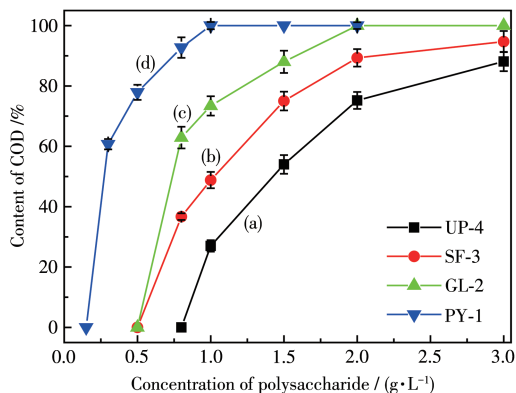
$-\text{OSO}_3^-$ 基含量为 13.3%、8.2% 和 5.5% 的 GL-2 (图 2d)、SF-3 (图 2c) 和 UP-4 (图 2b) 诱导的晶体中同时存在 COM 和 COD, XRD 结果表明 COD 含量分别为 62.9%、36.7% 和 15.2% (表 1); 而没有多糖的空白对照组只诱导 COM 晶体形成 (图 2a)。

2.3 多糖浓度对 CaC_2O_4 晶体生长的影响

图3为不同浓度 SF-3 和 GL-2 存在下得到的 CaC_2O_4 晶体的 XRD 图, PY-1 和 UP-4 的 XRD 图与之

类似。而随着多糖浓度增加,归属于COD的衍射峰增强,即诱导的 CaC_2O_4 晶体中COD含量增加(图4)。

同时研究了不同浓度SF-3(图5A)和GL-2(图5C)存在下生成的 CaC_2O_4 晶体的FT-IR谱图。没有多糖

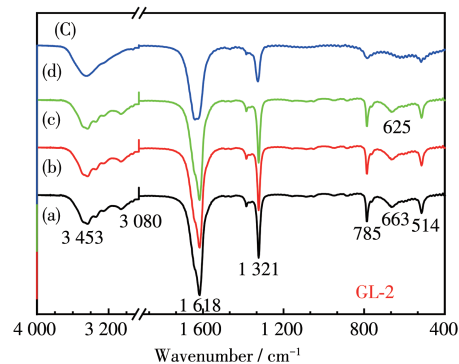
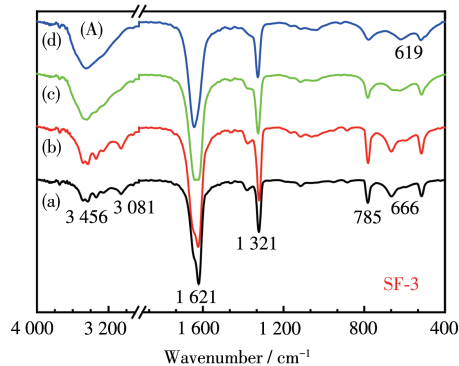


(a) UP-4; (b) SF-3; (c) GL-2; (d) PY-1

图4 不同浓度多糖存在下 CaC_2O_4 晶体中COD百分含量

Fig.4 COD content in CaC_2O_4 crystals formed in the presence of the polysaccharides with different concentrations

存在时, CaC_2O_4 晶体中的羧基不对称伸缩振动 $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ 出现在 $1\,618\text{ cm}^{-1}$,对称伸缩振动 $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ 位于 $1\,321\text{ cm}^{-1}$,表明这些晶体是COM晶体^[20-21]。而加入不同浓度的SF-3或GL-2后, $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ 和 $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ 都发生不同程度的蓝移(图5B和5D),其中加入SF-3后的 $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ 从 $1\,618\text{ cm}^{-1}$ 蓝移到 $1\,639\text{ cm}^{-1}$, $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ 从 $1\,321\text{ cm}^{-1}$ 蓝移到 $1\,327\text{ cm}^{-1}$;同样加入GL-2后的 $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ 从 $1\,618\text{ cm}^{-1}$ 蓝移到 $1\,644\text{ cm}^{-1}$, $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ 从 $1\,321\text{ cm}^{-1}$ 蓝移到 $1\,328\text{ cm}^{-1}$,表明此时生成的 CaC_2O_4 晶体中COM百分含量在不断下降,而COD含量则逐渐增加^[22],因为COD比COM多一个结晶水分子,水分子中—OH存在吸电诱导作用,使C=O双键极性增强,所以COD的特征峰相对于COM蓝移。纯COM的 $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ 和 $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ 位于 $1\,618$ 和 $1\,321\text{ cm}^{-1}$,而纯COD的分别位于 $1\,643$ 和 $1\,329\text{ cm}^{-1}$,因此,当晶体中COD含量增加后, $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ 和 $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ 均向COD的特征吸收峰靠近,即向长波数方向移动(蓝移)。FT-IR结果与XRD结果(图3A和3B)基本一致。COM晶体在 $3\,439\text{ cm}^{-1}$ 左右的水峰分裂成5个小峰,而COD在 $3\,439\text{ cm}^{-1}$ 左右



(a) $0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; (b) $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; (c) $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; (d) $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; $c_{\text{CaC}_2\text{O}_4}=10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

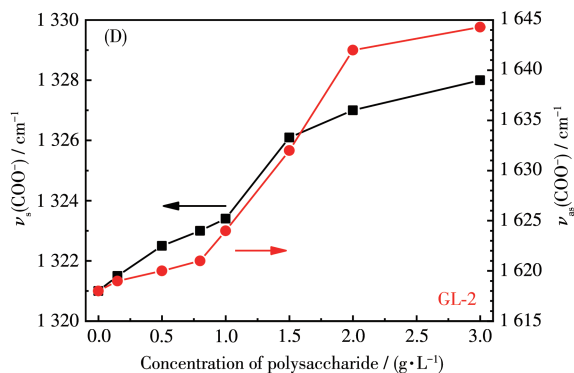
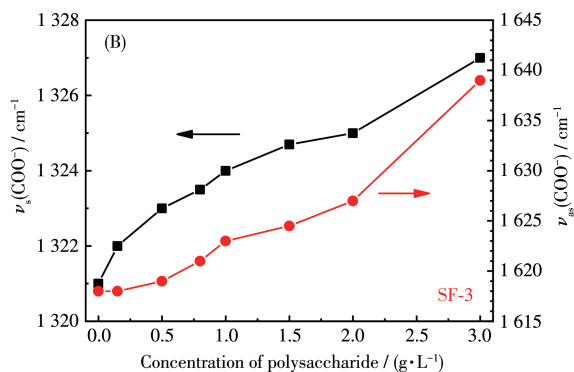


图5 不同浓度SF-3(A、B)和GL-2(C、D)存在下生成的 CaC_2O_4 晶体的FT-IR谱图(A、C)及其主吸收峰波数变化(B、D)

Fig.5 FT-IR spectra (A, C) and wavenumber changes of the main peaks (B, D) of CaC_2O_4 crystals formed in the presence of SF-3 (A, B) and GL-2 (C, D) with different concentrations

为1个大的水峰,其强度亦比COM强,这归因于COD比COM多含有1个水分子。

在相同浓度时,随着多糖中 $-\text{OSO}_3^-$ 含量增加,其诱导形成的 CaC_2O_4 晶体的 $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ 和 $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ 也显示出明显的蓝移。图6为在浓度分别为0.8和1.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时4种多糖的红外特征峰移动情况。加入0.8 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的UP-4时, CaC_2O_4 晶体的 $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ 和 $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ 分别位于1 618和1 321 cm^{-1} ,而加入0.8 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的

PY-1时, $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ 和 $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ 分别蓝移至1 639和1 327 cm^{-1} (图6a)。当加入更高浓度(1.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)的多糖后, $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ 和 $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ 发生更大程度的蓝移,UP-4的分别蓝移到1 620和1 325 cm^{-1} ,而PY-1的分别蓝移到了1 642和1 328 cm^{-1} (图6b),这是因为加入0.8 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的UP-4和PY-1时,其诱导的COD含量分别为15.2%和92.7%(图4),而加入1.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的UP-4和PY-1后,COD含量增加到54%和100%。

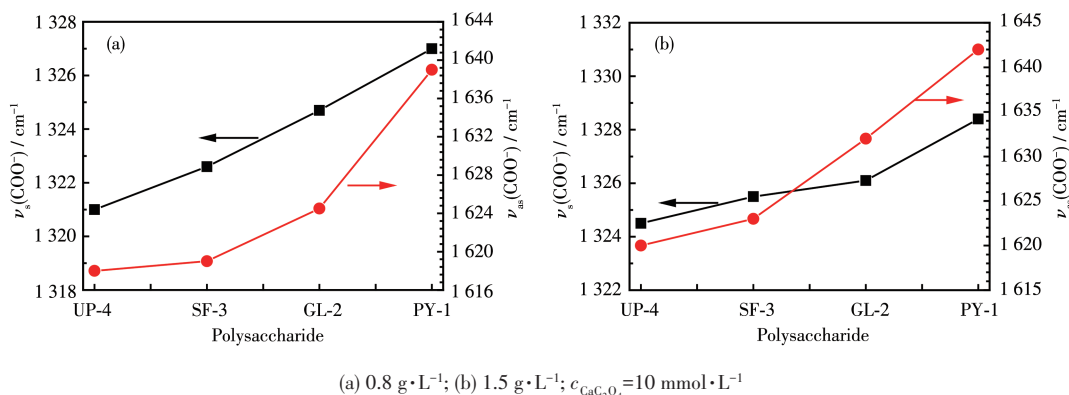


图6 相同浓度时不同多糖存在下生成的 CaC_2O_4 晶体FT-IR主吸收峰波数变化

Fig.6 Wavenumber changes of the main peaks of CaC_2O_4 crystals formed in the presence of different polysaccharides at the same concentration

2.4 不同多糖对晶体 ζ 电位的影响

ζ 电位可作为粒子间排斥力大小的量度,晶体表面 ζ 电位绝对值越大,说明晶体表面的电荷密度越大,晶体间的排斥力越大,即晶体在溶液中的分散性越好,越不易聚集,越有利于抑制 CaC_2O_4 晶体的聚集。4种多糖诱导生成的 CaC_2O_4 晶体的 ζ 电位如图7所示。可以看出:(1)多糖的 ζ 电位均为负值,

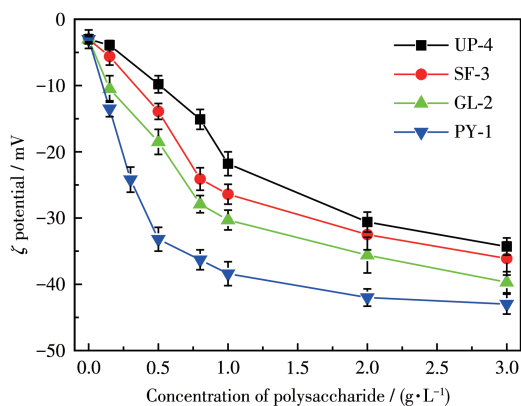


图7 多糖浓度和多糖中 $-\text{OSO}_3^-$ 含量对 CaC_2O_4 晶体表面 ζ 电位的影响

Fig.7 Effect of the polysaccharide concentration and the content of $-\text{OSO}_3^-$ groups in the polysaccharides on ζ potential of CaC_2O_4 crystal surface

同一多糖,随着其浓度增加, ζ 电位的绝对值越来越大,表明晶体表面的负电荷密度越来越大。例如,随着PY-1浓度从0.15 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 增大到3 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,诱导生成的晶体的 ζ 电位绝对值从13.5 mV增大到了43 mV。(2)不同多糖,随着多糖中 $-\text{OSO}_3^-$ 基含量增加,诱导生成的晶体的 ζ 电位绝对值也增大。例如,在浓度为0.8 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,各多糖诱导生成的 CaC_2O_4 晶体的 ζ 电位绝对值大小顺序:PY-1(36.3 mV)>GL-2(27.9 mV)>SF-3(24.1 mV)>UP-4(15.1 mV)。

2.5 多糖可增加体系中可溶性 Ca^{2+} 浓度

采用ICP检测了在不同浓度多糖存在下上清液中可溶性 Ca^{2+} 浓度(图8)。随着多糖浓度的增加,上清液中可溶性 Ca^{2+} 的浓度增加。而在相同浓度时,多糖中 $-\text{OSO}_3^-$ 基含量越高,其上清液中 Ca^{2+} 的浓度越大。

2.6 不同多糖对HK-2细胞的细胞毒性

采用CCK-8法检测了质量浓度分别为0.1、1、10和100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的4种多糖对HK-2细胞的毒性(表2)。将HK-2细胞与多糖孵育24 h后,细胞存活率均保持在93.5%以上,表明所有的多糖对HK-2细胞的细胞毒性较小,且在多糖浓度高时还能促进细胞生长。例如,用0.1、1、10和100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的PY-1处理

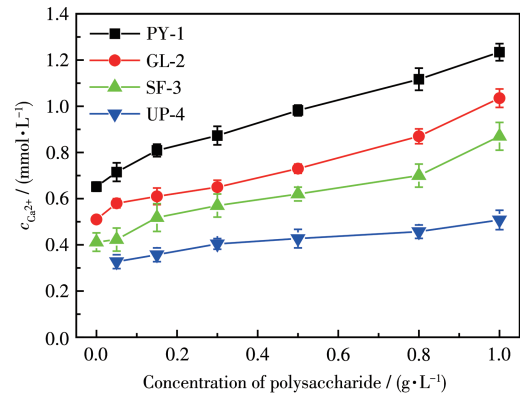


图8 不同浓度多糖诱导下生成上清液中可溶性Ca²⁺浓度

Fig.8 Concentrations of soluble Ca²⁺ in supernatant induced by the polysaccharides with different concentrations

表2 四种不同浓度多糖对HK-2细胞毒性的评价

Table 2 Toxicity evaluation of four polysaccharides with different concentrations to HK-2 cells

Polysaccharide	0 μg·mL ⁻¹	0.1 μg·mL ⁻¹	1 μg·mL ⁻¹	10 μg·mL ⁻¹	100 μg·mL ⁻¹
PY-1	100±1.8	100.1±2.1	103.5±4.7	105.8±3.3	111.2±4.8
GL-2	100±1.2	96.8±1.2	98.5±3.6	105.0±3.7	106.2±1.6
SF-3	100±1.4	96.8±5.2	98.8±4.0	103.0±1.9	114.3±5.2
UP-4	100±1.4	93.5±1.2	93.3±2.6	96.0±4.2	103.5±5.2

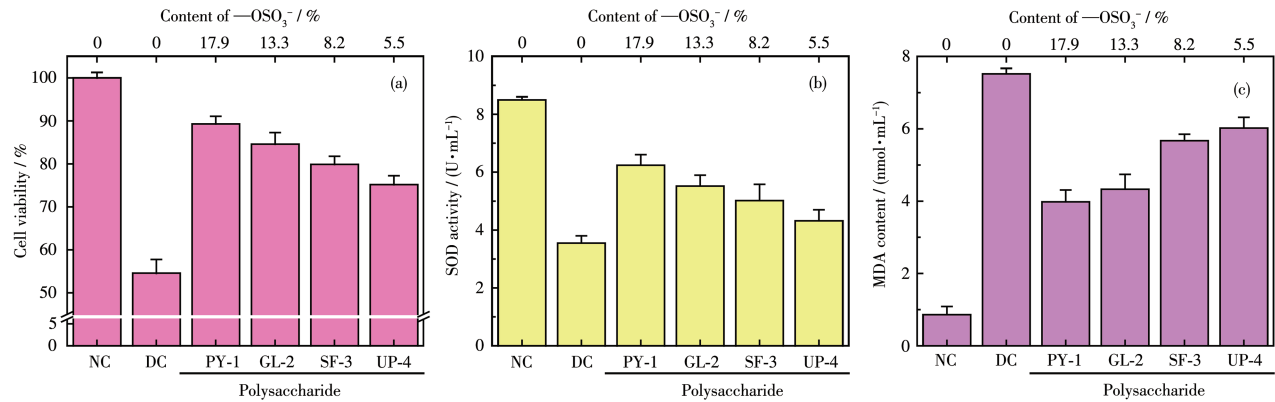
HK-2 细胞 24 h 后,细胞存活率分别为 100.1%、103.5%、105.8% 和 111.2%。

2.7 不同多糖修复后损伤细胞的细胞活力、SOD 水平和MDA 释放量变化

图 9a 显示了不同多糖对草酸损伤的细胞进行修复后的细胞活力水平变化。经草酸损伤后的 HK-2 细胞活力仅为 54.6%;而经浓度为 60 μg·mL⁻¹

的不同种类的多糖修复后,各组细胞的活力均有不同程度的提高(75.2%~89.3%),其中硫酸基含量最高的 PY-1 对损伤的 HK-2 细胞的修复能力最强(89.3%)。

SOD 可对抗氧自由基对细胞造成的损害,并及时修复受损细胞。生物体内 SOD 含量的降低意味着生物体抵抗自由基损伤的能力降低,反映机体受



NC: normal control; DC: damaged control; Polysaccharide concentration: 60 μg·mL⁻¹; Oxalate damage concentration: 2.8 mmol·L⁻¹; Damaged time: 3.5 h; Repaired time: 12 h

图9 四种不同—OSO₃⁻基含量的多糖修复损伤HK-2细胞后细胞活力(a)、SOD活性(b)和MDA释放量(c)变化
Fig.9 Changes in cell viability (a), SOD activity (b) and MDA release amount (c) of damaged HK-2 cells after being repaired by four polysaccharides with different —OSO₃⁻ contents

自由基损伤的程度增加^[23]。检测MDA的释放量变化常常可反映机体内脂质过氧化的程度,间接地反映出细胞损伤的程度^[24]。草酸损伤造成了细胞中SOD含量的明显下降(图9b)和细胞外释放的MDA水平明显升高(图9c),说明草酸造成了HK-2细胞的氧化应激损伤。采用降解海藻多糖对上述受损伤的细胞进行修复后,细胞中的SOD含量和MDA水平逐渐得到恢复,且随着多糖中—OSO₃⁻基含量的增加,修复后HK-2细胞的SOD活性逐渐增强,MDA释放量逐渐下降,即—OSO₃⁻基含量最高的PY-1对损伤的HK-2细胞的修复能力最强。

3 讨论

3.1 多糖中—OSO₃⁻基含量越高,对CaC₂O₄晶体的调控能力越强

尿液中存在多种抑制剂如柠檬酸、葡胺聚糖(GAGs)与磷酸盐等,它们通过抑制CaC₂O₄晶体的成核、生长、聚集及其与肾上皮细胞的黏附,从而抑制CaC₂O₄肾结石的形成^[25-27]。降解海藻多糖含有大量酸性基团(如—OSO₃⁻基和—COOH等),并具有与GAGs类似的结构,因而可以抑制CaC₂O₄结石的形成。多糖对CaC₂O₄晶体生长的调控机制如下:

第一,富含酸性—OSO₃⁻和—COOH基的多糖可与游离的Ca²⁺离子结合生成可溶性配合物(图8),且多糖中—OSO₃⁻和—COOH基含量越高,其与Ca²⁺的配位能力越强。体系中可溶性Ca²⁺浓度增大后,可以增加CaC₂O₄晶体的过饱和度,减少与C₂O₄²⁻结合的Ca²⁺量,有利于抑制草酸结石的形成。

第二,多糖抑制CaC₂O₄晶体聚集。从SEM图像(图2)可知,没有多糖存在的对照组生成的CaC₂O₄晶体聚集程度较大(图2a),这些晶体都是由针状的小尺寸COM晶体团聚而成;这种小尺寸针状晶体的比表面积大,比表面能高,为了降低表面能往往通过团聚而达到稳定的状态。加入多糖后,多糖吸附在晶体表面,使得晶体表面的 ζ 电位变负(图7),且随着多糖中—OSO₃⁻基含量增加, ζ 电位绝对值更大,这可以增加晶体间的排斥力,从而抑制了晶体的团聚。团聚的晶体不但增大了对肾上皮细胞的损伤,而且更容易滞留在体内,这均会增加结石形成的危险。

第三,多糖在溶液里形成聚阴离子,可吸附在带正电荷的COM晶体的表面,导致晶体生长的缺陷,阻止游离粒子渗入,从而抑制COM的生长。例

如,Gomes等^[28]研究发现海藻Caulerpa cupressoides多糖(SPs)可以抑制CaC₂O₄晶体的生长,导致形成的晶体尺寸减小,晶体形貌变得圆钝,此外SPs还促进COD的形成,并明显增加了晶体表面的负电荷。

第四,多糖促进COD生成。多糖中的酸性—OSO₃⁻和—COOH基可通过静电引力吸附溶液里的大量Ca²⁺,在多糖表面处的阳离子浓度比体相中显著提高,从而使阴/阳离子之比 $R_i(R_i=c_{Ca^{2+}}/c_{C_2O_4^{2-}})$ 偏离晶体的化学计量比。由于Ca²⁺离子过量($R_i>1.0$)有利于COD晶体形成,而C₂O₄²⁻离子过量($R_i<1.0$)有利于COM晶体形成^[21,29],因此,多糖吸附Ca²⁺离子后促进了COD的形成。此外,多糖中的—OSO₃⁻和—COOH基能够与溶液中游离的Ca²⁺离子配位,增加Ca²⁺在多糖表面的富集,并使得多糖表面形成高能界面;同时,多糖中的—OSO₃⁻和—COOH基与Ca²⁺配位后降低了Ca²⁺离子的自由度,导致钙能态增加。高能界面和高钙能态均会促进热力学亚稳定的COD形成^[28]。由于4种多糖的—COOH含量差别不大(1.0%~1.7%,表1),而PY-1中的—OSO₃⁻含量最高,对溶液中游离的Ca²⁺离子配位能力最强,因此,PY-1更容易诱导COD的形成。

由于COD晶体表面的吸附位点较COM少,且COM晶体表面带更多正电荷,与带负电荷的受损伤肾上皮细胞黏附力显著大于COD^[29-30],因此,COD相对容易随尿液排出体外。将尿液中的COM转化为COD,可减小肾结石形成的风险。故硫酸基含量高的多糖抑制尿结石的效果会更好。

第五,随着多糖中—OSO₃⁻基含量增加,生成的COD更圆钝(图2),圆钝的晶体也更容易随尿液排出体外。

3.2 多糖中—OSO₃⁻基含量对其修复受损伤细胞能力的影响

草酸盐是肾结石的主要危险因素^[31]。高浓度草酸盐会产生自由基,通过氧化应激损伤肾上皮细胞^[32]。在本研究中,草酸盐被用于损伤HK-2细胞以建立损伤模型。使用外源性抗氧化剂(如多糖)可以消除活性氧(ROS)的产生,从而阻断ROS介导的损伤途径,有效地保护肾上皮细胞免受氧化损伤。

四种多糖均能提高细胞活力(图9a)和细胞SOD活性(图9b),并降低MDA释放量(图9c),表明这些多糖对受损伤的HK-2细胞具有修复作用^[33],且这种修复作用与多糖中的—OSO₃⁻基含量呈正相关,即—OSO₃⁻基越多的多糖表现出越高的修活性。

这一结果表明多糖的修复能力与多糖所含有的功能性负电荷基团密切相关;多糖通过降低草酸盐诱导的氧化应激,修复受损伤的肾上皮细胞。

4 结 论

四种分子量相近、但—OSO₃⁻基含量不同的降解海藻多糖均可以抑制 CaC₂O₄ 晶体生成。随着多糖中—OSO₃⁻基含量增加或多糖浓度增大,溶液中可溶性 Ca²⁺ 离子增多,生成的 CaC₂O₄ 晶体质量减少,容易排出体外的 COD 晶体比例增加,晶体表面的 ζ 电位变得更低,晶体聚集程度降低,这些作用均有利于抑制 CaC₂O₄ 结石形成。此外,多糖还能够修复受损伤的细胞,提高细胞的抗氧化能力。因此,这 4 种多糖,特别是—OSO₃⁻基含量最高的降解紫菜多糖有可能是潜在的防石药物。

参考文献:

- [1]Wang Z, Zhang Y, Zhang J W, Deng Q, Liang H. Recent advances on the mechanisms of kidney stone formation. *Int. J. Mol. Med.*, **2021**,**48** (2):1-10
- [2]Vidavsky N, Kunitake J A M R, Estroff L A. Multiple pathways for pathological calcification in the human body. *Adv. Healthcare Mater.*, **2021**,**10**(4):2001271
- [3]D'costa M R, Haley W E, Mara K C, Enders F T, Vrtiska T J, Pais V M, Jacobsen S J, Mccollough C H, Lieske J C, Rule A D. Symptomatic and radiographic manifestations of kidney stone recurrence and their prediction by risk factors: A prospective cohort study. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **2019**,**30**(7):1251-1260
- [4]Gillams K, Juliebø-Jones P, Juliebø S Ø, Somani B K. Gender differences in kidney stone disease (KSD): Findings from a systematic review. *Curr. Urol. Rep.*, **2021**,**22**(10):1-8
- [5]Wigner P, Grębowski R, Bijak M, Szemraj J, Saluk - Bijak J. The molecular aspect of nephrolithiasis development. *Cells*, **2021**,**10**(8): 1926
- [6]Sorokin I, Mamoulakis C, Miyazawa K, Rodgers A, Talati J, Lotan Y. Epidemiology of stone disease across the world. *World J. Urol.*, **2017**, **35**(9):1301-1320
- [7]Bhadja P, Lunagariya J, Ouyang J M. Seaweed sulphated polysaccharide as an inhibitor of calcium oxalate renal stone formation. *J. Funct. Foods*, **2016**,**27**:685-694
- [8]Huang L S, Sun X Y, Gui Q, Ouyang J M. Effects of plant polysaccharides with different carboxyl group contents on calcium oxalate crystal growth. *CrystEngComm*, **2017**,**19**(32):4838-4847
- [9]Chen X W, Sun X Y, Tang G H, Ouyang J M. Sulfated *Undaria pinnatifida* polysaccharide inhibits the formation of kidney stones by inhibiting HK-2 cell damage and reducing the adhesion of nano-calcium oxalate crystals. *Biomaterials Advances*, **2021**,**134**:112564
- [10]Bhadja P, Tan C Y, Ouyang J M, Yu K. Repair effect of seaweed polysaccharides with different contents of sulfate group and molecular weights on damaged HK-2 cells. *Polymers*, **2016**,**8**(5):188
- [11]Ye H, Zhou C H, Li W, Hu B, Wang X Q, Zeng X X. Structural elucidation of polysaccharide fractions from brown seaweed *Sargassum pallidum*. *Carbohydr. Polym.*, **2013**,**97**(2):659-664
- [12]Zhou C S, Yu X J, Zhang Y Z, He R H, Ma H L. Ultrasonic degradation, purification and analysis of structure and antioxidant activity of polysaccharide from *Porphyra yezoensis* Udea. *Carbohydr. Polym.*, **2012**,**87**(3):2046-2051
- [13]Fan Y L, Wang W H, Song W, Chen H S, Teng A G, Liu A J. Partial characterization and anti-tumor activity of an acidic polysaccharide from *Gracilaria lemaneiformis*. *Carbohydr. Polym.*, **2012**,**88**(4):1313-1318
- [14]Skriptsova A V, Shevchenko N M, Zvyagintseva T N, Imbs T I. Monthly changes in the content and monosaccharide composition of fucoidan from *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyta). *J. Appl. Phycol.*, **2010**,**22**(1):79-86
- [15]Ma X T, Sun X Y, Yu K, Gui B S, Gui Q, Ouyang J M. Effect of content of sulfate groups in seaweed polysaccharides on antioxidant activity and repair effect of subcellular organelles in injured HK-2 cells. *Oxidative Med. Cell. Longev.*, **2017**,**2017**:2542950
- [16]Wang K P, Wang J, Li Q, Zhang Q L, You R X, Cheng Y, Luo L, Zhang Y. Structural differences and conformational characterization of five bioactive polysaccharides from *Lentinus edodes*. *Food Res. Int.*, **2014**,**62**:223-232
- [17]Liu J, Xu L, Gui W, Dorjpalam N, Gerile W L. The study on the antioxidant activity of polysaccharides isolated from *Polygonatum odoratum* (Mill.) Druce. *Mongolian J. Chem.*, **2020**,**21**(47):12-18
- [18]Vardizadeh F, Babaei S, Naseri M, Golmakani M T. Effect of marine sulfated polysaccharides derived from Persian Gulf seaweeds on *Oncorhynchus mykiss* oil stability under accelerated storage conditions. *Algal Res.*, **2021**,**60**:102553
- [19]Chen X W, Huang W B, Sun X Y, Xiong P, Ouyang J M. Antioxidant activity of sulfated *Porphyra yezoensis* polysaccharides and their regulating effect on calcium oxalate crystal growth. *Mater. Sci. Eng. C-Mater. Biol. Appl.*, **2021**,**128**:112338
- [20]Selvaraju R, Thirupathi G, Raja A. FT-IR spectral studies on certain human urinary stones in the patients of rural area. *Spectrosc. Acta Pt. A-Molec. Biomolec. Spectr.*, **2012**,**93**:260-265
- [21]Ouyang J M, Duan L, Tieke B. Effects of carboxylic acids on the crystal growth of calcium oxalate nanoparticles in lecithin-water liposome systems. *Langmuir*, **2003**,**19**(21):8980-8985
- [22]Chatterjee P, Chakraborty A, Mukherjee A K. Phase composition and morphological characterization of human kidney stones using IR spectroscopy, scanning electron microscopy and X-ray Retveld analysis. *Spectrosc. Acta Pt. A-Molec. Biomolec. Spectr.*, **2018**,**200**:33-42
- [23]Yang W J, Huang G L, Chen F, Huang H L. Extraction/synthesis and biological activities of selenopolysaccharide. *Trends Food Sci. Technol.*, **2021**,**109**:211-218
- [24]Meng M, Zhang R, Han R, Kong Y, Wang R H, Hou L H. The poly-

- saccharides from the *Grifola frondosa* fruiting body prevent lipopolysaccharide/*D*-galactosamine-induced acute liver injury via the miR-122-Nrf2/ARE pathways. *Food Funct.*, **2021**,**12**(5):1973-1982
- [25] Abd El - Salam M, Bastos J K, Han J J, Previdi D, Coelho E B, Donate P M, Romero M F, Lieske J. The synthesized plant metabolite 3,4,5-tri-*O*-galloylquinic acid methyl ester inhibits calcium oxalate crystal growth in a *Drosophila* model, downregulates renal cell surface annexin A1 expression, and decreases crystal adhesion to cells. *J. Med. Chem.*, **2018**,**61**(4):1609-1621
- [26] Li S, Macaringue E G J, Zhou D H, Shi P, Tang W W, Gong J B. Discovering inhibitor molecules for pathological crystallization of CaOx kidney stones from natural extracts of medical herbs. *J. Ethnopharmacol.*, **2022**,**284**:114733
- [27] Dissayabutra T, Kalpongkukul N, Chindaphan K, Srisa-Art M, Ungjaroenwathana W, Kaewwongse M, Iampengkhae K, Tosukhowong P. Urinary sulfated glycosaminoglycan insufficiency and chondroitin sulfate supplement in urolithiasis. *PLOS One*, **2019**,**14**(3):e0213180
- [28] Gomes D L, Melo K R T, Queiroz M F, Batista L, Santos P, Costa M, Lima J, Camara R, Costa L, Rocha H. *In vitro* studies reveal antiurolithic effect of antioxidant sulfated polysaccharides from the green seaweed *Caulerpa cupressoides* var *flabellata*. *Mar. Drugs*, **2019**,**17**(6):326
- [29] Jung T S, Kim W S, Choi C K. Biomineralization of calcium oxalate for controlling crystal structure and morphology. *Mater. Sci. Eng. C-Mater. Biol. Appl.*, **2004**,**24**(1/2):31-33
- [30] Gan Q Z, Sun X Y, Bhadja P, Yao X Q, Ouyang J M. Reinjury risk of nano-calcium oxalate monohydrate and calcium oxalate dihydrate crystals on injured renal epithelial cells: Aggravation of crystal adhesion and aggregation. *Int. J. Nanomed.*, **2016**,**11**:2839-2854
- [31] Mitchell T, Yarlagaadda V, Patel M, Knight J, Assimos D, Holmes R. Dietary oxalate induces monocyte mitochondrial dysfunction and crystalluria in healthy subjects: A role of spinach in kidney stone disease? *FASEB J.*, **2017**,**31**:561-573
- [32] Thamilselvan V, Menon M, Thamilselvan S. Oxalate at physiological urine concentrations induces oxidative injury in renal epithelial cells: Effect of α -tocopherol and ascorbic acid. *BJU Int.*, **2014**,**114**(1):140-150
- [33] Yao R Y, Huang C, Chen X F, Yin Z Q, Fu Y P, Li L X, Feng B, Song X, He C L, Yue G Z, Jing B, Lv C, Su G, Ye G, Zou Y F. Two complement fixing pectic polysaccharides from pedicel of *Lycium barbarum* L. promote cellular antioxidant defense. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2018**,**112**:356-363