

文章编号: 1004-7271(2001)02-0158-05

翡翠贻贝糖胺聚糖的制备及其生理活性初探

洪鹏志¹, 章超桦¹, 吴红棉¹, 杨文鸽², 郝记明¹, 张静¹

(1. 湛江海洋大学食品科学与工程系, 广东 湛江 524025; 2. 宁波大学生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211)

摘要:探讨了翡翠贻贝中提取糖胺聚糖的蛋白酶水解及乙醇沉淀等条件。所制备的翡翠贻贝糖胺聚糖含GAG72.1%, 经动物实验, 当剂量为80mg/kg体重时, 对昆明小鼠移植性肿瘤S-180的抑瘤率可达52.4%, 且有增强免疫力的活性。

关键词:翡翠贻贝; 糖胺聚糖; 蛋白酶水解法; 提取; 抗肿瘤活性

中图分类号: S986.2; R931.74 文献标识码: A

Primary exploration for extracting technology and physiological activity of *Perna viridis* glycosaminoglycan

HONG Peng-zhi¹, ZHANG Chao-hua¹, WU Hong-mian¹, YANG Wen-gu², HAO Ji-ming¹, ZHANG Jing¹

(1. Department of Food Science and Technology, Zhanjiang University, Zhanjiang 524025, China;

2. The Faculty of Life Science and Biotechnology University, Ningbo 315211, China)

Abstract: The extraction of glycosaminoglycan (GAG) from *Perna viridis* was studied. The conditions for proteinase hydrolysis and the deposition with ethanol were proposed. The findings in antitumor test indicated the inhibition rate on Sarcoma 180 was 52.4% when the dosage of *P. viridis* glycosaminoglycan used was 80 mg/kg, and the weight of spleen (immunity organ) in mice was obviously increased.

Key words: *Perna viridis*; glycosaminoglycan; proteinase hydrolyzation method; Extraction; antitumor activity

近十年来, 动物中蛋白多糖的糖链部分——糖胺聚糖(GAG), 因具有抗凝血、抗肿瘤、降血脂、提高免疫力等多种活性^[1], 已引起国内外医药界的广泛关注。就国内而言, 研究者从刺参^[2]、海星^[3]、鲍鱼^[4]、扇贝^[5]、马氏珠母贝^[6]等海洋动物中提取后分离出各种糖胺聚糖, 并对这些糖胺聚糖的理化性质、生理活性、药用价值进行了广泛研究, 国外的研究者也对海参^[7]、乌贼^[8]、甲壳动物^[9]中分离提取糖胺聚糖进行了研究报道。Cassaro^[10]的研究结果表明, 软体动物中含有多种糖胺聚糖。翡翠贻贝(*Perna viridis*)别名青口螺, 广泛分布于东海南部和南海, 其繁殖能力很强, 易于养殖。但由于缺乏市场及有效的加工手段, 其资源未能得到充分的利用。本文探索从翡翠贻贝中提取糖胺聚糖的工艺条件, 并对其抗肿瘤活性进行了初探, 以期对翡翠贻贝的开发利用提供基础依据。

收稿日期: 2001-02-14

资助项目: 国家教委留学回国人员资助项目(1993-360)

第一作者: 洪鹏志(1966-), 男, 湖北黄梅人, 硕士, 讲师, 主要从事水产品加工及综合利用方面的研究。Tel: 0759-2382049, E-mail:

hangz@163.net

1 材料和方法

1.1 材料

原料:翡翠贻贝购自湛江市霞山区民享市场,开壳后取其肉清洗后装袋冷冻备用。

酶制剂:胃蛋白酶,酶活力 1:3 000,上海生化制品厂;胰蛋白酶,酶活力 1:25,苏州东吴医用制品厂;枯草杆菌中性蛋白酶,酶活力 1:1 000,无锡生达生物工程有限公司。

其它材料及试剂:无水乙醇、乙酸钠、丙酮、氢氧化钠、盐酸、阿尔辛蓝、甲苯胺蓝均为分析纯
昆明小鼠、S-180 腹水瘤:广东医学院动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 分析测定方法

水分,直接干燥法^[1];灰分,高温灼热法^[1];蛋白质,凯氏定氮法^[1];脂肪,索氏抽提法^[12];总糖,苯酚—硫酸法^[13];非蛋白氮,半微量凯氏定氮法^[14];糖元,直接滴定法^[11];阿尔辛蓝染色反应,Gold 法^[4];甲苯胺蓝染色反应,Pietrich 法^[15];GAG 测定,Clod 法^[14]。

1.2.2 糖胺聚糖的提取

翡翠贻贝肉→加 4 倍体积水用组织捣碎机匀浆→匀浆液→胃蛋白酶水解→胰蛋白酶水解→枯草杆菌中性蛋白酶水解→水解液→5 000r/min,10min 离心→清液→95%乙醇沉淀→5 000r/min,15min 离心收集沉淀→依次用无水乙醇和丙酮各洗涤三次→真空干燥→糖胺聚糖粗制品 P₁。

1.2.3 糖胺聚糖的纯化

用吸附法^[16]和透析法^[10]。粗制品 P₁ 溶于蒸馏水中,配制成 5% 糖液,加 1% (w/v) 活性炭,不断搅拌吸附 30min,硅藻土助滤,除去活性炭及其吸附的蛋白质、色素等杂质,得清液,用 6mol/L HCl 调 pH 至 2.0,5 000r/min 离心除去沉淀,再用 10% NaOH 调 pH 7.0,5 000r/min,20min 离心除去沉淀,清液注入透析袋,透析时先用流动自来水透析 24h,再用蒸馏水透析 24h (每 6h 换一次蒸馏水),透析结束后,收集透析液,按醇沉操作法不断搅拌下缓缓加入乙醇,使醇量达 50% (w/v),于 4℃ 下静置 12h,移去上清液,5 000r/min,20min 离心回收多糖得精制品 P₂。

1.2.4 抗肿瘤试验

抗肿瘤试验方法参考文献^[17]。

S-180 腹水瘤制备与分组:选取小鼠 60 只,体重 20 克左右,常规采用 S-180 小鼠右液皮下接种制备模型(每只 0.2ml),随机分为:带瘤对照组;阳性对照组;翡翠贻贝糖胺聚糖对照(包括三个剂量:20mg/kg,40mg/kg,80mg/kg)。

治疗方法:移植肿瘤 24h 后,不同剂量给药于小鼠右液皮下肉瘤内,每日一次,连续给药七天,停药 24 小时后将小鼠处死,称重,解剖剥离瘤块,称瘤重,计算抑瘤率,并取出脾脏,称重,观察脾脏重量的变化。

$$\text{抑瘤率}(\%) = \frac{(\text{对照组平均瘤重} - \text{给药平均组瘤重})}{\text{对照组平均瘤重}} \times 100$$

对照脾脏重量的影响:计算每 10 克体重的脾脏重量数,用 mg/10g 体重表示。

2 结果与讨论

2.1 原料成分分析

鲜活翡翠贻贝去壳后得翡翠贻贝肉,其一般成分见表 1。

表 1 翡翠贻贝肉的一般营养成分(%)
Tab.1 Proximate composition of *Perna viridis* meat (%)

水分	粗蛋白	粗脂肪	灰分	总糖	糖元	非蛋白氮 (mg/100g)
84.0	11.9	1.42	1.84	1.72	0.79	326
	(74.4)	(8.9)	(11.5)	(10.8)	(4.9)	

注:括号内数值以千基计

2.2 翡翠贻贝糖胺聚糖的提取

2.2.1 胃蛋白酶、胰蛋白酶、枯草杆菌酶水解条件

匀浆液先后用胃蛋白酶、胰蛋白酶及枯草杆菌酶在各自最适 pH 和温度下水解,即胃蛋白酶 pH 2.2, 50℃,胰蛋白酶 pH 8.5, 50℃, 枯草杆菌酶 pH 7.0, 50℃, 在不同酶量的条件下进行 4h 水解得水解图(图 1)显示,三种酶水解 3-4h 后水解度上升已不明显,因此三种酶的水解时间均定为 4h,胃蛋白酶达 0.2%, 胰蛋白酶达 0.4%, 枯草杆菌酶达 0.4% 时,对水解度提高已很微小。综上述结果,三种酶的酶解条件为:胃蛋白酶 0.2%, pH 2.2, 50℃ 水解 4h; 胰蛋白酶 0.4%, pH 8.5, 50℃, 水解 4h; 枯草杆菌酶 0.4%, pH 7.0, 50℃, 水解 4h。

2.2.2 醇沉试验

将无水乙醇在不停搅拌下缓缓加入离心上清液,此时上清液立即呈乳浊状,在不同乙醇用量下,观察沉淀效果,并以沉淀得率 \times 含糖量作为指标,确定最佳乙醇用量。结果见表 2。

表 2 显示,随着乙醇量的增加,沉淀物得率增加。据有关资料显示^[15]。当乙醇加入量过大时,会引起非消化性产物同时沉淀及盐析如蛋白质、无机盐等,本实验中也观察到这一现象,随着乙醇量的增大,沉淀物中蛋白质的含量增加,但 GAG 含量却相应减少。为此,本实验以得率 \times GAG 含量最高作最佳醇沉条件。从表中可以看出,应选 50% 醇量为宜。

乙醇沉淀后经真空干燥所得的糖胺聚糖粗制品 P₁ 得率为 1.08% (相对于鲜原料) 含 GAG 为 44.2%, 总氮量 22.7%, 灰分 26.6%, 说明 P₁ 中尚有大量的蛋白质和无机盐。为得到糖胺聚糖的精制品,须除去 P₁ 中的蛋白质及无机盐。

2.3 翡翠贻贝糖胺聚糖的纯化

采用活性炭吸附处理,主要除去 P₁ 中残留的蛋白质,并分别调节 pH2.0 和 pH7.0 后进行离心处理以除去微量的残存蛋白质。进一步采用透析法进行脱盐。纯化后翡翠贻贝糖胺聚糖精制品 P₂ 得率为 0.21% (相对于鲜原料)。

2.4 翡翠贻贝糖胺聚糖的初步鉴定

P₂ 中 GAG 含量 72.1%, 总氮量 11.5%, 灰分 9.6%, 制品呈灰白色粉末状, 无臭无味, 易潮解, 易溶于水, 水溶液对阿尔辛蓝染色反应和甲苯胺蓝染色反应呈阳性, 表明所得制品为典型的糖胺聚糖, 但其中仍含有蛋白质、灰分等杂质, 有待进一步分离纯化。

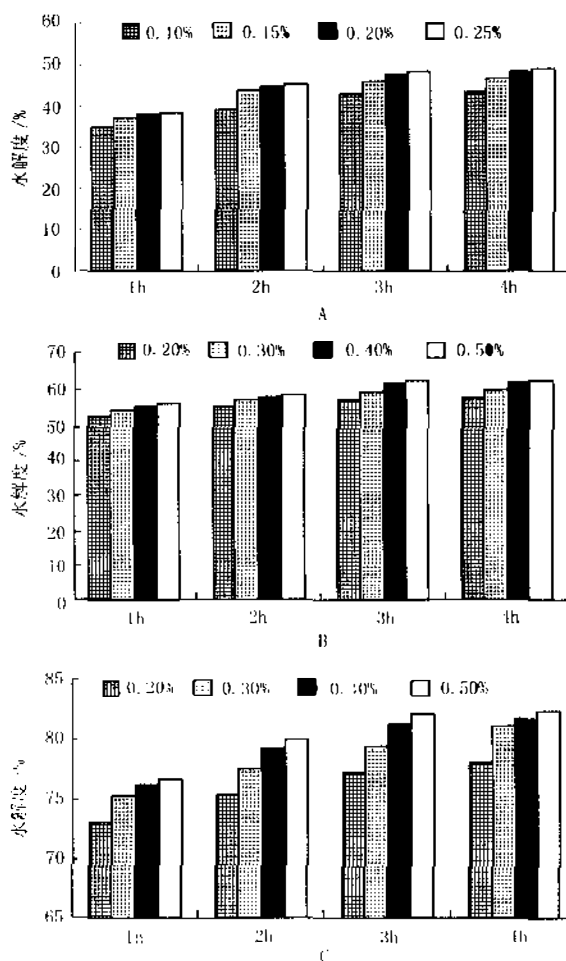


图 1 蛋白酶水解图

Fig. 1 Profiles of proteinase hydrolysis
A. 胃蛋白酶, B. 胰蛋白酶, C. 枯草杆菌酶

表 2 醇沉效果

Tab. 2 Efficiency of Ethanol Deposition

乙醇量 (%)	得率 (%)	蛋白质含量 (%)	GAG 含量 (%)	得率 \times GAG 含量 ($\times 10^{-4}$)
40	0.71	11.6	17.7	12.6
50	1.08	22.7	44.2	44.7
60	1.34	24.1	27.8	34.3
70	2.02	25.3	15.3	30.3

2.5 翡翠贻贝糖胺聚糖的抗肿瘤活性

翡翠贻贝糖胺聚糖对小鼠移植性肿瘤 S-180 的作用见表 3, 结果提示, 翡翠贻贝糖胺聚糖有较显著的抑瘤作用, 最大抑瘤率为 52.4%, 比阳性对照组(62.2%)略低。关于翡翠贻贝糖胺聚糖的抗癌作用机理、最佳剂量效应关系及临床应用等的研究有待进一步探索。

表 3 翡翠贻贝糖胺聚糖对小鼠移植性肿瘤 S-180 的作用
Tab.3 Antitumor effect of *Perna viridis* GAG on S-180 mice

组别	动物数(只)		体重(g)		瘤重 (X) ± SD	抑瘤率 (%)
	开始	最后	开始	最后		
对照组	12	11	21.09	28.36	1.234 ± 0.766	
阳性对照组 (环磷酸腺) 治疗组 (糖胺聚糖)	12	11	20.82	26.64	0.466 ± 0.345	62.2
20mg/kg	11	10	20.8	25.65	0.811 ± 0.489	34.3
40mg/kg	11	10	21.2	26.55	0.656 ± 0.356	46.8
80mg/kg	11	11	21.18	28.59	0.588 ± 0.312	52.4

2.6 翡翠贻贝糖胺聚糖对小鼠脾脏重量的影响

由表 4 可以看出, 翡翠贻贝糖胺聚糖可显著增加小鼠脾脏重量, 对特异性免疫功能有增强作用, 具量效关系, 而阳性对照组不仅无增强免疫作用, 而且降低小鼠的免疫功能。目前, 多数抗肿瘤药物都有降低机体免疫功能的副作用, 翡翠贻贝糖胺聚糖既可抑制 S-180 小鼠肿瘤的生长, 又可提高机体的免疫功能, 若将翡翠贻贝糖胺聚糖与放疗或化疗药物合用, 势必在肿瘤治疗方面有协同作用, 并可降低毒性, 所以我们认为翡翠贻贝糖胺聚糖不仅是一种较好的保健食品, 而且可能成为一种较好的保健药物, 值得进一步探讨。

表 4 翡翠贻贝糖胺聚糖对小鼠脾脏重量的影响

Tab.4 Influence of *Perna viridis* GAG on weights of spleen

组别	对脾脏重量影响 (mg/kg) X ± CD	P 值
对照组	97.74 ± 644.46	
阳性对照组 (环磷酸腺) 治疗组 (糖胺聚糖)	71.32 ± 33.79	
20mg/kg	113.49 ± 13.22	< 0.05
40mg/kg	118.64 ± 54.62	< 0.05
80mg/kg	127.03 ± 54.85	< 0.01

3 结论

从翡翠贻贝中提取糖胺聚糖蛋白酶水解条作为: 胃蛋白酶 0.2%, pH 2.2, 温度 50℃, 水解 4h; 胰蛋白酶 0.4%, pH 8.5, 温度 50℃, 水解 4h; 枯草杆菌酶 0.4%, pH 7.0, 温度 50℃, 水解 4h, 醇沉时最佳乙醇用量为 50%。所得翡翠贻贝糖胺聚糖中含 GAG 72.1%, 经动物实验不仅有抗肿瘤活性, 而且有增强免疫力的功效。可以预言, 我国沿海常见并广泛分布的翡翠贻贝资源很可能在医药与保健上具有良好的开发前景。

参考文献:

- [1] 张露中, 温玉麟. 动物活性成分化学[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1995, 996-998.
- [2] 樊绘曾, 陈菊娣, 林克忠. 刺参酸性粘多糖的分离及其理化性质[J]. 药学学报, 1980, 15(5): 263-269.
- [3] 沈文梅, 骆传环, 王益, 等. 海星酸性粘多糖的理化性质研究[J]. 海洋药物, 1986, (2): 1-5.
- [4] 郝秀兰, 叶淑芳, 吴钟高, 等. 鲨鱼骨粘多糖抗凝血作用[J]. 中国海洋药物, 1992, (4): 17-22.
- [5] 王长云, 傅华诗. 海湾扇贝边中氨基多糖的研究[J]. 中国水产科学, 1994, 1(2): 32-39.
- [6] 吴红棉, 雷晓凌, 洪鹏志, 等. 珠母贝糖胺聚糖的纯化及其化学性质[J]. 水产学报, 2000, 24(6): 570-574.

- [7] Kariya Y, Watabe S, Ochiai Y, et al. Glycosaminoglycan from the Body Wall of the Sea Cucumber *Stichopus Japonicus* [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1990, 95(2):387 - 392.
- [8] Karamanos N K, Mamouras A, Tsegmidis T, et al. Isolation and Chemical Study of the Glycosaminoglycan from Squid *Carnea* [J]. *Biochem*, 1999, 23(1):67 - 72.
- [9] Ehrlich J, Patel B, Stivals S. Comparative Studies of Mucopolysaccharides from Marine Animals. II. III ex III cecobrosus (Lesueur) and Various Crustaceans [J]. *J Exp Mar Biol Ecol*, 1981, 52(1):9 - 101.
- [10] Caserio C M F, Dietrich C P. Distribution of Sulphated Mucopolysaccharides in Invertebrates [J]. *J Biol Chem*, 1977, 252:2254 - 2261.
- [11] 大连理工大学. 食品分析[M]. 北京:北京轻工业出版社, 1996, 97 - 156.
- [12] 刘福岭, 戴行均. 食品物理与化学方法[M]. 北京:北京轻工业出版社, 1978, 53.
- [13] Dubois M, Gilles K A. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances [J]. *Anal Chem*, 1956, 28:350.
- [14] Glod E W. A simple spectrophotometric method of estimating glycosaminoglycan concentrations [J]. *Analytical Biochem*, 1979, 99:183 - 188.
- [15] Dietrich C P, McDuffie N M, Sampaio L O. Identification of Acidic Mucopolysaccharides by Agarose Gel Electrophoresis [J]. *J Chromatogr*, 1977, 130:299 - 304.
- [16] 樊绘曾. 粘多糖及其提取分离[J]. 海洋药物, 1983, (1):40 - 45.
- [17] 徐叔云, 卞如濂, 陈修, 等. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1982. 1115.