

华贵栉孔扇贝全脏器中糖胺聚糖的分离提取及其抗肿瘤活性研究

金晓石, 胡雪琼, 吴红棉, 范秀萍, 钟敏

(广东海洋大学海洋食品研究所, 广东 湛江 524025)

摘要: 以湛江地区盛产的华贵栉孔扇贝全脏器为原料, 经木瓜蛋白酶和枯草杆菌中性蛋白酶双酶水解、醇沉后得到华贵栉孔扇贝糖胺聚糖粗品, 采用 MTT 法检测粗品体外对人宫颈癌细胞 (Hela) 活性的影响。实验结果表明: 采用双酶水解法粗品得率为 1.26%, 总糖含量为 41.4%, 糖胺聚糖(GAG)含量为 26.9%。粗品具有对 Hela 肿瘤细胞的生长显著性抑制作用($p < 0.05$)。

关键词: 华贵栉孔扇贝; 糖胺聚糖; 人宫颈癌细胞; 抑制作用

中图分类号: TS254.9; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2007)03-0036-03

Extraction and Isolation of Glycosaminoglycan from *Chlamys Nobilis* and Study on its Anti-tumour Effect

JIN Xiao-shi, HU Xue-qiong, WU Hong-mian, FAN Xiu-ping, ZHONG Min

(Marine Food Institute, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

Abstract: Glycosaminoglycan (GAG) from the whole viscera of *Chlamys nobilis* was achieved via enzymatic hydrolysis by papain and neutral proteinase and ethanol precipitation. Its anti-tumor activity was also examined by MTT colorimetric assay. Results showed that the yield of crude product reached 1.26%, and the content of total sugar and GAG were 41.4% and 26.9%, respectively. Besides, it showed significant anti-tumor activity towards Hela cell ($p < 0.05$).

Key words: *Chlamys nobilis*; Glycosaminoglycan; Hela cell; inhibited effect

近十多年国内外对海洋贝类糖胺聚糖(如文蛤、马氏珠母贝、鲍鱼等)的研究报道表明其具有明显的抗肿瘤活性^[1]。湛江地区的华贵栉孔扇贝(*Chlamys nobilis*)产量丰富, 如表 1, 其全脏器的干基总糖含量为 6.7%, 为进一步开发深加工及发挥其药用价值, 有必要对其提取工艺和活性功能做深入研究。本文探讨了从华贵栉孔扇贝中提取糖胺聚糖的酶解方法及其抗肿瘤活性的研究。

表 1 华贵栉孔扇贝全脏器成分测定 单位: %

成分	水分	灰分	脂肪	蛋白质	总糖
湿基	85.1	2.40	0.69	10.1	1.00
干基	0.00	10.1	2.60	80.2	6.70

1 材料及方法

1.1 材料

1.1.1 原料

华贵栉孔扇贝 (*Chlamys nobilis*) 全脏器: 广东

收稿日期: 2006-11-21

作者简介: 金晓石, 在读硕士, 研究方向: 海洋活性物质

海洋大学蔡英亚教授鉴定, 购自湛江市东风市场, 于 -18 °C 冷冻备用。

人宫颈癌细胞 (Hela 细胞): 广东医学院提供。

1.1.2 试剂

枯草杆菌中性蛋白酶 (酶活 50,000 U/g)、胰蛋白酶 (酶活 500 u/g)、木瓜蛋白酶 (酶活 150,000 U/g): 无锡酶制剂厂; 葱酮、葡萄糖、阿利新蓝: 均为分析纯; 活性炭: 化学纯; 5-氟尿嘧啶 (5-Fu, 市售针剂); RPMI1640 培养基 (美国 Sigma 公司); 新生牛血清 (杭州四季清生物材料研究所); MTT (美国 Sigma)。

1.2 仪器设备

高速组织捣碎机 (PHILIPS); 真空抽滤机 (2× Z-05 旋片真空泵, 浙江黄岩真空泵厂); YX5-A 台式离心机 (裕鑫实业有限公司); 721 型分光光度计 (上海第三分析仪器厂); NAPCO5420-1 型 CO₂ 培养箱 (美国 Precision Scientific 公司); CJT-12 超净工作台 (北京昌平长城空气净化公司); DG5031 酶联免疫检测仪 (国营华东电子管厂); CH30RF200 倒置显微镜 (日本 Olympus Optical 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 粗提工艺^[2]

扇贝全脏器→解冻、匀浆→酶解→单层纱布粗滤→脱色→双层纱布过滤→离心除杂蛋白→醇沉→分离→洗涤→干燥→糖胺聚糖粗品(CPG)

1.3.2 基本成分的测定^[3]

水分测定:常压直接干燥法;总灰分测定:550℃灰分法;粗脂肪测定:索式抽提法;粗蛋白质测定:半微量凯氏定氮法;总糖测定:蒽酮比色法;总GAG的测定:阿利新蓝法;活性检测:MTT法。

2 结果与讨论

2.1 酶解最适条件的确定

2.1.1 单酶酶解最佳条件的确定

以华贵栉孔扇贝全脏器为原料,选用适宜的胰蛋白酶、枯草杆菌中性蛋白酶及木瓜中性蛋白酶,作为水解用酶^[4],采用不同的酶用量在各酶的理论最适条件下进行单酶水解,以粗品得率和总糖含量为评估指标,选取最佳的酶解条件。结果见表2、3、4。

表2 胰酶水解结果 单位:%

添加量(g/g 原料)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
得率(以干基计)	1.88	2.01	3.36	4.89	4.17
总糖含量	13.5	14.6	12.1	11.5	13.2

注:酶解条件为在pH7.8、50℃下酶解4h

表3 枯草杆菌中性蛋白酶水解结果 单位:%

添加量(g/g 原料)	0.1	0.2	0.4	0.5	0.6	0.8
得率(以干基计)	5.43	5.50	5.23	5.50	5.44	5.44
总糖含量	40.3	38.2	40.2	40.9	38.1	37.4

注:酶解条件为在pH7.0、50℃下酶解4h

表4 木瓜蛋白酶水解结果 单位:%

添加量(g/g 原料)	0.05	0.1	0.2	0.4	0.6	1.2
得率(以干基计)	2.42	4.16	4.97	4.23	4.70	2.62
总糖含量	27.2	30.2	30.1	27	24.9	36.2

注:酶解条件为在pH7.0、50℃下酶解4h

表2、3、4可得出:胰酶、枯草杆菌中性酶和瓜蛋白酶最佳酶的最佳用量为0.4%、0.5%和0.2%。由于单酶水解最佳pH值存在差异,需进一步确定双酶水解的条件。

2.1.2 双酶水解工艺的比较^[5-8]

根据单酶水解得出的三种单酶的最佳条件,采用两组不同的酶组合。其中A组为(胰酶+枯草杆菌酶),B组为(胰酶+木瓜蛋白酶),C组为(木瓜蛋白酶+枯草杆菌酶)。水解结果比较见表5、6、7。考虑到枯草杆菌酶在单酶水解时水解效果相差甚微,在双酶水

解时做进一步筛选。

表5 A组(胰酶+枯草杆菌酶)的酶解结果 单位:%

	酶添加量(g/g 原料)					
	胰酶		0.4			
枯草杆菌中性蛋白酶	0.1	0.5	0.8			
pH值	7.8	7	7.8	7	7.8	7
得率(以干基计)	4.30	3.76	2.68	3.22	2.68	3.42
总糖含量	18.6	20.1	5	5	10	13

注:酶解条件为50℃下酶解4h。

由表5可得出A组酶解最适pH为7.0,最佳组合为0.4%胰酶+0.1%枯草杆菌中性蛋白酶。

表6 B组(胰酶+木瓜蛋白酶)的酶解结果 单位:%

酶添加量(g/g 原料)	0.4%胰酶+0.2%木瓜蛋白酶	
pH值	7.8	7
得率(以干基计)	3.83	3.22
总糖含量	20.6	17

注:酶解条件为50℃下酶解4h

由表6可得出B组酶解最适pH为7.8,最佳组合为0.4%胰酶+0.2%木瓜蛋白酶。

表7 C组(木瓜蛋白酶+枯草杆菌酶)的酶解结果 单位:%

	酶添加量(g/g 原料)		
	木瓜蛋白酶	0.2	
枯草杆菌酶	0.1	0.5	0.8
得率(以干基计)	5.37	6.04	7.38
总糖含量	40	41.4	30

注:酶解条件为pH7.0、50℃下酶解4h

由表7可得出C组酶解最佳组合为0.2%木瓜蛋白酶+0.5%枯草杆菌酶。

不同的酶因水解部位不同,使得水解产物中的总糖和总GAG的含量不同,若两种酶先后加,则需要的时间较长,考虑到实际生产需要,本实验双酶水解时同时加入,使其在最适条件下水解。以总糖含量和得率为指标,C组的整体水解效果优于A组和B组,这说明木瓜蛋白酶和枯草杆菌酶的水解效果较好,其组合水解效果也优于单酶。因此选取C组的最佳组合:0.2%木瓜蛋白酶+0.5%枯草杆菌酶在pH7.0,50℃下酶解4h,作为华贵栉孔扇贝全脏器糖胺聚糖粗提中的最优组合。

2.2 糖胺聚糖粗品的初步鉴定

华贵栉孔扇贝糖胺聚糖粗品中总糖为41.40%;华贵栉孔扇贝糖胺聚糖(GAG)粗品中GAG为26.90%。

2.3 华贵栉孔扇贝糖胺聚糖体外对Hela细胞生长影响的研究^[9]

采用MTT法检测华贵栉孔扇贝糖胺聚糖体外对

Hela 细胞生长的抑制作用。以 5-Fu 为阳性对照, 剂量 120 $\mu\text{g/ml}$ 。实验样品选择了 3 个浓度: 300 $\mu\text{g/ml}$ 、400 $\mu\text{g/ml}$ 、500 $\mu\text{g/ml}$ 。结果见表 8。

表 8 扇贝糖胺聚糖对 Hela 细胞生长的抑制作用($\bar{x} \pm s, n=4$)

样品剂量 ($\mu\text{g/ml}$)	时间			
	24 h		48 h	
	OD ₅₇₀	抑制率/%	OD ₅₇₀	抑制率/%
空白对照	0.67 \pm 0.002	0	0.52 \pm 0.003	0
5-Fu 120	0.037 \pm 0.002	44.8	0.017 \pm 0.002	67.3**
300	0.057 \pm 0.006	14.9	0.042 \pm 0.002	19.2
粗品 400	0.051 \pm 0.007	23.9	0.033 \pm 0.005	32.5
500	0.044 \pm 0.005	34.3	0.023 \pm 0.005	44.8*

注: *表示 $p < 0.05$; **表示 $p < 0.01$ 。

表 8 表明华贵栉孔扇贝糖胺聚糖粗品三个剂量组 (300 $\mu\text{g/ml}$ 、400 $\mu\text{g/ml}$ 、500 $\mu\text{g/ml}$) 对体外培养的 Hela 细胞均有一定的抑制作用, 24 h 作用后, 三个剂量组 (300 $\mu\text{g/ml}$ 、400 $\mu\text{g/ml}$ 、500 $\mu\text{g/ml}$) 抑制率可达 14.9%、23.9%、34.3%, 48 h 后, 500 $\mu\text{g/ml}$ 剂量的糖胺聚糖粗品对 Hela 细胞的抑制率达 44.8%, 有显著抑制效果 ($p < 0.05$)。

3 结论

华贵栉孔扇贝全脏器 (干基) 的灰分为 10.1%, 脂肪 2.6%, 蛋白质 80.2%, 总糖 6.7%。说明其是一种高蛋白, 低脂肪, 低糖, 含有丰富矿物质的可食用海鲜产品, 具有丰富的营养价值。

在扇贝糖胺聚糖的提取中, 双酶的水解工艺明显优于单酶作用结果。在 pH 7.0、50 $^{\circ}\text{C}$ 下酶解 4 h 的条件下, 最适组合为 0.2% 木瓜蛋白酶+0.5% 枯草杆菌中

性蛋白酶。

体外活性实验显示该扇贝糖胺聚糖具有一定的抗肿瘤活性, 500 $\mu\text{g/ml}$ 剂量作用 48 h 后抑制 Hela 细胞生长明显。

参考文献

- [1] 沈鸣, 陈建伟. 氨基多糖的药理研究进展[J]. 上海医药, 2001, 22 (6): 268-270.
- [2] Rosenberg L., Hellmann W., et al. Biol Chem, 1970, 245: 4123-4139.
- [3] 吴谋成. 食品分析与感官评定[M]. 中国农业出版社, 2002, (1): 43-144.
- [4] 王长云, 管华诗, 李八方. 氨基多糖的研究概况和展望[J]. 青岛海洋大学学报: 海洋药物专辑, 1992: 71-77.
- [5] 吴红棉, 雷晓凌, 洪鹏志. 珠母贝全脏器中糖胺聚糖粗提物的制备及其生理活性的初探[J]. 湛江海洋大学学报, 2000, 20 (3): 50-55.
- [6] Gold E.W. A Simple Spectrophotometric Method of Estimating Glycosaminoglycan Concentrations[J]. Analytical Biochem, 1979: 183-188.
- [7] 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]. 中国水产学报, 2000, 24 (6): 570-574.
- [8] 范秀萍, 吴红棉, 雷晓凌, 等. 菲律宾蛤仔氨基多糖的分离提取及其抗肿瘤活性的初步研究[J]. 湛江海洋大学学报, 2003, 24 (9): 73-76.
- [9] 雷晓凌, 吴红棉, 范秀萍, 等. 缙圣糖胺聚糖的提取分离及其体外抗肿瘤活性的初步研究[J]. 湛江海洋大学学报, 2004, 11 (3): 146-149.

(上接第 35 页)

高到了 5989 U/mL, 是出发菌株的 2.67 倍。可见该菌株对紫外和微波比较敏感, 可以通过此方法改造其遗传特性, 提高其产酶能力, 对于利用该菌株工业化生产豆豉溶栓酶奠定了基础。

参考文献

- [1] 宋永生, 张炳文. 中国豆豉与日本纳豆功能成分的比较中国食物与营养[J]. 中国食物与营养, 2004, (4): 22-24
- [2] 罗明典. 微生物制药研究新进展[J]. 微生物学通报, 1998, 25(1): 61-62
- [3] 柯若仪. 不同溶栓剂的作用机制及其治疗[J]. 内科急危重症杂志, 1996 (2) 4: 178-179
- [4] 董明盛, 江晓, 刘诚等. 胞外纤溶酶产生菌的筛选及其产酶

条件研究[J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(1): 23-27

- [5] 王骏, 王敏, 王以光等. 链霉菌产生的新型纤溶酶的纯化和性质研究[J]. 生物工程学报, 1999, 15(2): 147-153
- [6] 卢立志, 刘振川. 溶栓疗法与抗凝剂在缺血性脑血管病中的应用现状[J]. 现代诊断与治疗, 2000, 11(2): 93-95
- [7] Astrup T and Mullertz. S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity[J]. Arch. Biochem. Biophys, 1952, 40: 346-351
- [8] 施巧琴, 吴松刚. 工业微生物育种学[M]. 北京: 科技出版社, 2004: 139-142
- [9] 李豪, 车振明. 微波诱变微生物育种的研究[J]. 山西食品工业, 2005, (2): 5-8
- [10] 祖若夫, 胡宝龙, 周德庆等. 微生物学实验教程[M]. 上海: 复旦大学出版社, 1993: 177-180