

波纹巴非蛤多糖对高脂模型小鼠血脂的影响

范秀萍, 董晓静, 吴红棉, 钟敏, 胡雪琼

(广东省水产品加工与安全重点实验室, 广东普通高等学校水产品深加工重点实验室, 广东海洋大学食品科技学院, 广东湛江, 524088)

摘要: 本文对波纹巴非蛤多糖进行纯化分析并研究了其对高脂模型小鼠血脂的影响。波纹巴非蛤粗多糖(PUG-1)经DEAE-52纤维素柱层析后, 得到PUG-1a、PUG-1b两个主要级分, 总糖胺聚糖含量分别为68.3%和62.8%, 两个级分组成中氨基葡萄糖:氨基半乳糖:己糖醛酸:硫酸基比例分别为:1.8:0.9:1.3:1.0和1.5:0.8:0.9:1.0; 相对分子质量分别为30000 Da和10000 Da。红外光谱分析显示具有糖胺聚糖的特征基团吸收峰。体内实验采用高脂饮食建立小鼠高脂模型, 同时给药组灌服高、中、低(400、200、100 mg/kg·d)3个剂量的波纹巴非蛤多糖溶液(PUG-1)和阳性药物(辛伐他汀, 0.2 mg/kg·d), 4周后检测各组小鼠血清中TC、TG、LDL-c、HDL-c的含量。PUG-1低、中、高三剂量组均能显著降低高脂模型小鼠的TC、TG、LDL-c水平与LDL-c/HDL-c($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$), 中高剂量组能提高HDL-c水平($p < 0.05$), 提示波纹巴非蛤多糖PUG-1对高脂模型小鼠具有较好的降低血脂与预防动脉粥样硬化作用。

关键词: 波纹巴非蛤多糖(PUG-1); 分离; 结构特征; 血脂; 高脂模型小鼠

文章编号: 1673-9078(2014)1-7-10

Effect of Polysaccharide From *Paphia undulate* on Blood Lipid of Hyperlipidemia Model Mice

FAN Xiu-ping, DONG Xiao-jing, WU Hong-mian, ZHONG Min, HU Xue-qiong

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Product Processing and Safety, Key Laboratory of Advanced Processing of Aquatic Products of Guangdong Higher Education Institution, College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: Polysaccharides (PUG-1) were prepared from *Paphia undulate* by protease hydrolysis, and the effect of PUG-1 on blood lipid of hyperlipidemia model mice was investigated. PUG-1 was separated to two fractions named PUG-1a and PUG-1b by DEAE-52-cellulose exchange chromatography, with relative molecular weight of 30.0 kDa and 10.0 kDa respectively. The glycosaminoglycan contents of PUG-1a and PUG-1b were 68.3% and 62.8%, respectively. And the ratio of glucosamine, galactosamine, hexuronic acid and sulfate in PUG-1a and PUG-1b were 1.8:0.9:1.3:1.0 and 1.5:0.8:0.9:1.0, respectively. FT-IR spectrum showed the characteristic absorption of glycosaminoglycan. The hyperlipidemia model mice were established by feeding with high fat diet (basal laboratory diet with 2% cholesterol). Meanwhile, the mice were administered PUG-1 orally at dosage of 400, 200 and 100 mg/kg·d, respectively. Normal control and positive control group were treated with distilled water and Simvastatin (0.2 mg/kg·d). The contents of total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein-cholesterol (LDL-c) and high density lipoprotein-cholesterol (HDL-c) in serum were examined after four weeks. The PUG-1 decreased the contents of TC, TG and LDL-c in serum and increased HDL-c significantly ($p < 0.05$ or $p < 0.01$) in the experimental hyperlipidemic mice. These results suggest that PUG-1 can modulate the level of blood lipid in hyperlipidemia mice and can be prevention of atherosclerosis.

Key words: *Paphia undulata* polysaccharide; purification; characterization; blood lipid; hyperlipidemia model mice

高脂血症和高脂质过氧化物含量是动脉粥样硬化(AS)发病的重要因素。大量资料表明, 血浆中TG、TC及LDL-c含量升高或HDL-c降低, 能促进动脉粥

收稿日期: 2013-09-23

基金项目: 广东省科技厅科技计划项目(2010B020313003)

作者简介: 范秀萍(1979-), 女, 讲师, 研究方向: 水产品加工及贮藏、海洋生物活性物质

样硬化的发生; 脂质过氧化使LDL氧化为氧化型LDL(OX-LDL), 也是AS的促发因素。研究表明, 氧化应激的增强在动脉粥样硬化发生的起始阶段起着关键作用, 其中自由基和过氧化物是主要因素, 自由基和过氧化物对血管壁细胞有毒性作用。实验证明血液中的自由基水平和脂质过氧化物浓度的增加, 某些血液成分容易被自由基、脂质过氧化物攻击或修饰, 并且

修饰后的这些成分更易于导致动脉粥样硬化的发生^[1]。因此,通过有效清除体内自由基与抑制脂质过氧化物的含量可起到预防与治疗动脉粥样硬化的作用。

已有的研究表明,贝类糖复合物具有较好的生物活性与应用前景,如具有抗肿瘤作用的珠母贝糖胺聚糖^[2]、菲律宾蛤仔多糖^[3]、青蛤多糖^[4]、非洲大蜗牛多糖^[5]等;具有抗衰老作用的翡翠贻贝多糖^[6]等,具有抗病毒作用的扇贝裙边糖胺聚糖^[7]等;鲍鱼脏器多糖能明显抑制试验性高胆固醇血症的发生^[8]。另外,对海参的研究表明:海参多糖的抗高脂血症作用与其清除自由基作用有关^[9]。

波纹巴非蛤(*Paphia undulata*)是南海著名的一种海产贝类,俗称花甲螺,产量较大,且是一种尚未得到充分开发利用的海洋贝类资源。本课题组对波纹巴非蛤多糖的初步研究表明其具有较好的清除自由基与降低脂质过氧化物含量的作用^[10],因此本文对波纹巴非蛤多糖进行了纯化与分析,并探讨了其对高脂模型小鼠血脂的影响,为其开发应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 原料与设备

波纹巴非蛤(*Paphia undulate*),采自湛江市东海临西,贝肉取出后-18℃冷冻备用;D-葡萄糖醛酸、硫酸软骨素、盐酸氨基半乳糖、岩藻糖、D-半乳糖、D-果糖, Sigma 公司;实验用昆明种小鼠(合格证号 SYXK(粤)2008-0002),雄性,体重 21±2 g,由广东省医学实验动物中心提供;总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白(HDL-C)、低密度脂蛋白(LDL-C)测定试剂盒:北京中生物试剂公司产品。辛伐他汀,济南利民制药有限责任公司。

高效液相色谱仪, Waters 600E, 美国 Waters 公司; Waters 410 示差折光检测器; 红外光谱仪 FTS-175C, Bio-Rad Win 公司。

1.2 方法

1.2.1 波纹巴非蛤多糖的纯化分析

波纹巴非蛤全脏器经酶解、醇沉得到糖胺聚糖粗品(PUG)再经等电点除杂蛋白、超滤、醇沉得到糖胺聚糖精制品(PUG-1)。PUG-1经 DEAE-52-纤维素离子交换柱(160 mm×80 mm),柱温:4~8℃,进样量:5.0 mL,进样浓度:20 mg/mL,洗脱液:0.5 mol/L NaAc (pH 6.0)缓冲液加 1.5 mol/L NaCl 梯度洗脱;流速:15 mL/h,每管收集 3 mL。阿利新蓝比色法检测各管总糖胺聚糖含量。

1.2.2 组成分析方法

总氮含量的测定:半微量凯氏定氮法;总糖含量的测定:蒽酮-硫酸法;总糖胺聚糖含量的测定:阿利新蓝比色法;氨基己糖测定:Wanger 法;己糖醛酸含量的测定:呋唑-硫酸法;硫酸基含量的测定:明胶-氯化钡沉淀法。

1.2.3 纯度鉴定与相对分子质量测定

采用高效凝胶过滤色谱(HPGFC)法测定, Waters-PROTEIN-PAK 60 柱,流动相为 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.4),上样量 10 μL,流动相流速 0.7 mL/min。以标准分子质量标品的保留时间与分子质量的对数作回归,得回归方程 $LgM = -0.2177t + 6.2791$,将样品配制为 5 mg/mL 的溶液,测得多糖样品的保留时间,利用标准曲线求得多糖相对分子质量。

1.2.4 红外光谱分析

样品用 KBr 压片,以 FTS-175C 型红外光谱仪测定,光谱扫描范围 4000~400 cm⁻¹,分辨率 8 cm⁻¹。并结合已知标准糖胺聚糖标准图谱对波纹巴非蛤多糖进行分析。

1.2.5 高脂模型实验动物分组及给药方式

每 97.6 g 基础饲料添加 2 g 胆固醇和 0.4 g 胆盐配成高脂饲料,按照卫生部《保健食品功能学评价程序和检验方法》及《药理实验方法学》的基本要求建模拟及分组实验。

将 72 只雄性小鼠,随机分为 6 组:空白对照组、高脂模型组、阳性对照辛伐他汀 0.2 mg/kg·d 剂量组及糖胺聚糖精品 100、200 和 400 mg/kg·d 三个剂量组。分笼饲养,自由饮水。除空白对照组外,其余 5 组小鼠每天按时给予高脂饲料,连续给予高脂饲料至实验结束。并灌胃给药,每日定时灌胃 1 次,小鼠灌胃体积为 0.1 mL/10 g·bw。对照组和模型组每日 1 次灌胃给予等容积生理盐水。受试动物按上述剂量连续给药 28 d,实验第 29 天,禁食 12 h 后,小鼠摘眼球取血,3000 r/min 离心 20 min,取血清,测定血清 TC、TG、HDL-c 和 LDL-c 含量。

1.3 数据处理

所有实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用方差分析,采用 SAS/V8 软件进行差异显著性检验。

2 结果与讨论

2.1 波纹巴非蛤多糖 DEAE-52-纤维素离子交

换柱层析分离结果

由图 1 可以看出: PUG-1 经 DEAE-52 纤维素柱可得到 2 个主要级分, 即 PUG-1a 和 PUG-1b, 分别在 NaCl 离子浓度 0.4~0.8 mol/L 和 1.0~1.4 mol/L, 两个吸收峰相对狭窄较对称, 说明纯化分离效果较好。将这 2 个级分分别收集, 并冷冻干燥, 对其进行组成分析与红外光谱检测。

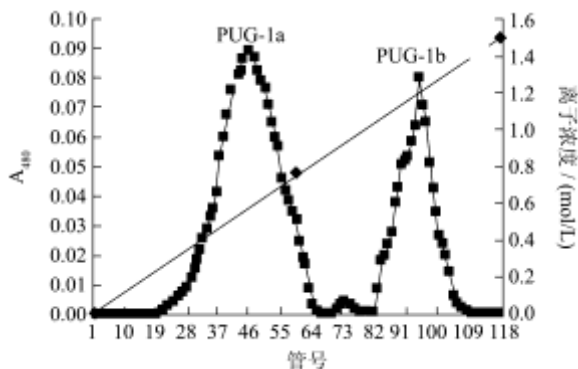


图1 波纹巴非蛤糖胺聚糖DEAE-52-纤维素离子交换柱层析分离色谱图

Fig.1 DEAE-52-cellulose exchange chromatography of PUG-1

2.2 波纹巴非蛤多糖的组成分析

由表 1 可以看出, PUG-1a 和 PUG-1b 两个纯化级

表1 波纹巴非蛤多糖各级分的组成分析 (%)

Table 1 Compositions of glycosaminoglycan fractions from *Paphia undulate*

样品	糖胺聚糖	粗蛋白	硫酸基	氨基己糖	氨基半乳糖	氨基葡萄糖	GlcNAc	己糖醛酸 HexUA
PUG	31.4	28.7	3.3	13.3	3.4	9.9		9.5
PUG-1	46.7	19.8	5.6	20.6	5.7	14.9		7.7
PUG-1a	68.3	10.3	11.5	31.7	10.7	21.0		15.2
PUG-1b	62.8	9.4	15.2	35.1	12.5	22.6		13.7

注: 氨基己糖=氨基半乳糖+氨基葡萄糖

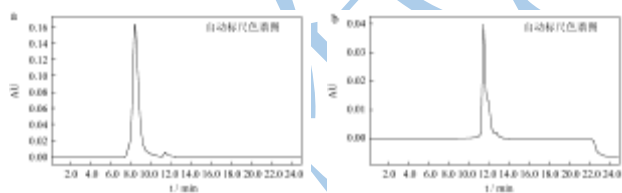


图2 PUG-1a和PUG-1b的的HPGFC图谱

Fig.2 HPGFC chromatogram of PUG-1a and PUG-1b

注: a: PUG-1a; b: PUG-1b。

2.4 波纹巴非蛤多糖红外光谱分析

图 3 是 PUG-1a 与 PUG-1b 的红外图谱, 结果显示具有典型的糖胺聚糖红外吸收光谱。在 3600~3000 cm^{-1} 都出现了一个宽的 O-H 伸缩振动峰, 另外还有 -CH₃(2930 cm^{-1})、糖环 C-O-C(1082 cm^{-1} 、1024 cm^{-1})、-NH(1636 cm^{-1} 、1573 cm^{-1})、-COO-(1411 cm^{-1})、-OSO₃-(1240 cm^{-1}) 等的较强吸收, 这些基团均为多糖

分的总糖胺聚糖和硫酸基含量均明显高于 PUG-1, 表明经过 DEAE-52 纤维素柱分离纯化效果较好。两个级分是由氨基己糖与己糖醛酸分别以 2.1:1 和 2.6:1 的比例构成主体结构, 硫酸基含量分别可达到 11.5%、15.2%。PUG-1a 和 PUG-1b 组成中氨基葡萄糖: 氨基半乳糖: 己糖醛酸: 硫酸基比例分别为: 1.8:0.9:1.3:1.0 和 1.5:0.8:0.9:1.0。

2.3 波纹巴非蛤多糖高效液相色谱分析结果

图 3 为两个级分的 HPGFC 图谱。从图谱可以看出, 峰形良好, 明显差异是其最大吸收峰的峰值及出峰时间, 这说明两个级分的分子量差异显著, 由图可以看出 PUG-1a 的相对分子质量约为 30000 Da。PUG-1b 的相对分子质量约为 10000 Da。这说明两个级分的平均分子量都相对单一, 纯化效果较好。Ryzhenkov 等 (1996) 在硫酸酯化多糖的降血脂活性研究中发现: 相对分子质量在 20~40×10³ Da, 硫酸基含量在 9~14% 范围内的多糖具有较显著的降血脂作用^[11]。波纹巴非蛤多糖 PUG-1a 的相对分子质量与硫酸基含量正好在这范围内, 这提示 PUG-1a 可能具有较强的降血脂作用, 有待下一步研究。

的特征基团。

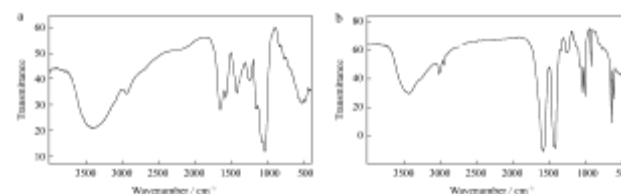


图3 PUG-1a和PUG-1b的红外光谱图

Fig.3 Infrared spectrum of PUG-1a and PUG-1b

注: a: PUG-1a; b: PUG-1b。

PUG-1a 在 923 cm^{-1} 处有吸收说明含有吡喃单体。PUG-1b 在 1500 cm^{-1} 两侧吸收强, 表明样品含有较多的硫酸基或羧基, 表明含有少量的蛋白质; 840 cm^{-1} 处有弱吸收峰为 α 型糖苷键的特征吸收。

2.5 PUG-1对高脂模型小鼠的影响

实验前后小鼠体重变化见表2, 由表2可知各组实

验小鼠的体重在实验前后基本一致, 组间差异不显著 ($p>0.05$), 无统计学意义, 说明多糖的添加对小鼠的生长、食欲、觅食、消化及其物质代谢不存在显著影响。

PUG-1 对高脂模型小鼠血脂的影响见表 3。与空白对照组比较, 高脂模型组小鼠的 TC、TG 和 LDL-c 均极显著升高, HDL-c 水平极显著下降 ($p<0.01$), 表明高脂血症模型建立成功。PUG-1 低、中、高三个剂量组均能显著降低高脂模型小鼠的 TC、TG、LDL-c 水平与 LDL-c/HDL-c ($p<0.05$ 或 $p<0.01$), 中、高剂量组能提高 HDL-c 水平 ($p<0.05$), 且高剂量组的各项指标与空白对照组比较无显著性 ($p>0.05$), 表明 PUG-1 对高脂模型小鼠具有较好的降低血脂与预防动脉粥样硬化作用。400 mg/kg·d 剂量的 PUG-1 能使高脂模型小鼠的 TC、TG、LDL-c 与 LDL-c/HDL-c 分别

降低 42.6%、31.9%、56.3% 和 69.2%, 使 HDL-c 水平升高 42.0%。

表2 实验前及10周后各实验组的体重变化 ($\bar{x}\pm s$, $n=12$)

Table 2 Weight change of the mice before and after

10-week-experiment				
组别	剂量/(mg/kg·d)	实验前重量/g	10w 后重量/g	增长重量/g
空白对照组	0	20.67±0.68	40.23±0.67	19.58±0.87
模型对照组	0	20.75±0.59	40.26±0.62	19.51±0.45
阳性对照	10	20.90±0.86	40.35±0.73	19.51±1.22
低剂量组	100	20.70±0.47	40.30±0.76	19.60±0.90
中剂量组	200	20.68±1.16	40.41±0.72	19.73±1.12
高剂量组	400	20.96±0.51	40.48±0.66	19.52±0.86

表3 PUG-1对高脂模型小鼠血脂的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 3 Effect of PUG-1 on serum TC, TG, LDL-C, HDL-C and LDL-c/HDL-c in hyperlipidemia model mice

Group	剂量/(mg/kg·d)	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)	LDL-C(mmol/L)	HDL-C(mmol/L)	LDL-c/HDL-c
ND	-	2.74±0.46**	0.85±0.13**	1.21±0.12**	0.79±0.12**	1.53**
HFD	-	5.37±0.67▲▲	1.35±0.24▲▲	3.02±0.71▲▲	0.50±0.09▲▲	6.04▲▲
SIM	0.2	3.69±0.50**▲	1.08±0.19**	2.14±0.25**▲▲	0.67±0.11	3.19**▲▲
PUG-1-L	100	4.59±0.44**▲▲	1.16±0.19**▲	2.59±0.34**▲▲	0.56±0.14▲	4.63**▲▲
PUG-1-M	200	3.29±0.34**▲	0.97±0.20**	1.95±0.20**▲	0.64±0.13**▲	3.05**▲▲
PUG-1-H	400	3.08±0.58**	0.92±0.15**	1.32±0.18**	0.71±0.10*	1.86**

注: * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs HFD group; ▲ $p<0.05$, ▲▲ $p<0.01$ vs ND group。

脂质代谢异常特别是高水平的LDL-c是AS形成的重要因素。通过食物成分或药物降低循环血液中LDL-c是预防和延缓AS的主要途径。实验结果显示, 波纹巴非蛤多糖能显著降低高脂血症小鼠血清中的TC、TG和LDL-c, 同时升高HDL-c, 显著降低动脉硬化指数, 提示波纹巴非蛤多糖对高脂血症的形成和AS的发生具有显著预防作用。

3 结论

波纹巴非蛤多糖精制品 (PUG-1) 经 DEAE-52 柱层析得到 PUG-1a、PUG-1b 两个主要级分, 总糖胺聚糖含量分别为 68.3% 和 62.8%, 硫酸基含量分别为 11.5% 和 15.2%。两个级分是由氨基己糖与己糖醛酸分别以 2.1:1 和 2.6:1 的比例构成主体结构; 相对分子质量分别为 30000 Da 和 10000 Da。红外光谱分析显示具有糖胺聚糖的特征基团吸收峰。PUG-1 低、中、高三个剂量组均能显著降低高脂模型小鼠的 TC、TG、LDL-c 水平与 LDL-c/HDL-c ($p<0.05$ 或 $p<0.01$), 中高剂量组能提高 HDL-c 水平 ($p<0.05$), 400 mg/kg·d 剂量的 PUG-1 能使高脂模型小鼠的 TC、TG、LDL-c 与 LDL-c/HDL-c 分别降低 42.6%、31.9%、56.3% 和

69.2%, 使 HDL-c 水平升高 42.0%。提示波纹巴非蛤多糖 PUG-1 对高脂模型小鼠具有较好的降低血脂与预防动脉粥样硬化作用, 其作用机制可能与体内自由基的清除和脂质过氧化物含量的降低有关, 还有待进一步的探讨。

参考文献

- [1] Peterson M S J, Dwyer JD. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity [J]. Nutr Res, 1998, 18: 1995-2018
- [2] 吴红棉, 雷晓凌, 洪鹏志, 等. 珠母贝糖胺聚糖的结构初探及其生理活性 [J]. 水产学报, 2001, 25(2): 166-170
Wu Hong-mian, lei Xiao-ling, Hong Peng-zhi, et al. The preliminary probe of structure and physiological activity of glycosaminoglycan from Pinctada martensis [J]. Journal of Fisheries of China, 2001, 25(2): 166-170
- [3] Zhang Li, Liu Wan-shun, Han Bao-qin, et al. Isolation and characterization of antitumor polysaccharides from the marine mollusk *Ruditaps philippinarum* [J]. Eur Food Res Technol., 2008, 227: 103-110
- [4] Jiang Changxing, Wang Mingchun, Liu Jun, et al. Extraction, preliminary characterization, antioxidant and anticancer

- activities in vitro of polysaccharides from *Cyclina sinensis* [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 84: 851-857
- [5] Lee Yeon Sil, Yang Hynn Ok, Shin Kuk Hyun, et al. Suppression of tumor growth by a new glycosaminoglycan isolated from the African giant snail *Achatina fulica* [J]. European Journal of Phammanology, 2003, 465: 191-198
- [6] 李江滨,侯敢.翡翠贻贝多糖对衰老模型小鼠的抗氧化和免疫功能调节作用[J].检验医学与临床,2010,7(12):1153-1156
Li Jiang-bing, Hou Gan. Effect of Perna viridis polysaccharides on antioxidation and immune function of aging model mice [J]. Laboratory Medicine and Clinic, 2010, 7(12): 1153-1156
- [7] 于囡,刘赛,王海桃,等.扇贝裙边糖胺聚糖体外抗I型单纯疱疹病毒实验研究[J].中国药理学通报,2008,24(2):210-213
YU Nan, LIU Sai, WANG Hai-tao, et al. Experimental study of the antiviral effect of glycosaminoglycan from scallop skirt on herpes simplex virus type I in vitro [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2008, 24(2): 210-213
- [8] 余鑫.鲍鱼脏器粗多糖的提取工艺及降血脂活性研究[D].福建农林大学,2008
Yu Xin. Studies on extraction and lipid-lowering function of crude polysaccharides in Abalone Viscus [D]. Fujian Agriculture and Forestry University, 2008
- [9] Liu Xin, Sun Zhen-liang, Zhang Mian-song, et al. Antioxidant and antihyperlipidemic activities of polysaccharides from sea cucumber *Apostichopus japonicas* [J]. Carbohydrate polymers, 2012, 90: 1664-1670
- [10] 董晓静,范秀萍,吴红棉,等.波纹巴非蛤糖胺聚糖抗氧化作用的研究[J].食品工业科技,2012,33(66):181-184
Dong Xiao-jing, Fan Xiu-ping, Wu Hong-mian, et al. Study on antioxidation effect of glycosaminoglycan from Paphia undulate [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(66): 181-184
- [11] Ryzhenkov V E; Solov'eva M A; Remezova O V, et al. Hypolipidemic effect of sulfated polysaccharides [J]. Voprosy meditsinskoi khimii, 1996, 42(2): 115-119