

海参酶解物中抗老年痴呆相关活性及成分初步研究

杨静明¹, 卢虹玉¹, 谢慧风¹, 刘亚月¹, 聂影影^{1,2}, 张永平¹, 宋采¹, 秦邦伟³, 张翼^{1,2}

(1. 广东海洋大学 食品科技学院, 广东省海洋生物制品工程实验室, 广东省水产品加工与安全重点实验室, 广东海洋大学海洋药物研究所, 广东 湛江 524088; 2. 广东海洋大学 深圳研究院, 广东 深圳 518120; 3. 山东圣洲海洋生物科技股份有限公司, 山东 威海 264211)

摘要: 通过国标方法分析海参酶解原液的基本营养成分; 并将海参酶解原液用不同极性的有机溶剂进行提取, 利用乙酰胆碱酯酶抑制活性自显影的方法进行活性组分的追踪。利用硅胶柱层析、Sephadex LH-20 凝胶柱、高效液相色谱逐步纯化, 得到具有较高乙酰胆碱酯酶抑制活性的组分; 另外, 采用 MTT 法考察海参酶解液总脂溶性组分对小胶质细胞(BV-2 细胞)生长的影响; 并利用 LPS 诱导细胞建立细胞炎症模型, 分别采用 Griess 法和 ELISA 法检测其对 LPS 诱导的 BV-2 细胞中 NO 和 IL-6 水平的影响。结果表明: 海参酶解原液含有丰富的钙、锌等矿物质, 含量较高的多不饱和脂肪酸和必需氨基酸其提取物中具有乙酰胆碱酯酶抑制活性的薄层层析斑点均无明显紫外与荧光吸收, 其中活性最强组分 C4-2-E 在浓度为 0.25 g/L 时对乙酰胆碱酯酶的抑制率为 91.04%; 海参酶解液总脂溶性组分在一定的浓度范围内对 BV-2 细胞均无显著的抑制作用, 并且能够显著的抑制 LPS 诱导的 BV-2 细胞所产生的 NO 和 IL-6 的分泌。故海参酶解液的脂溶性成分可能具有一定的抗神经炎症和老年痴呆作用, 具体活性物质的化学结构还需进一步分析鉴定。

关键词: 海参; 提取分离; 阿尔兹海默氏症; 乙酰胆碱酯酶抑制活性; 抗炎活性

中图分类号: TS254.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2019)07-0041-12

DOI: 10.11759/hyxx 20190106001

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是老年痴呆的主要类型, 也是目前医学领域研究的热点^[1]。目前有关其发病机制众说纷纭, 包括 A β -淀粉样肽级联假说、胆碱能损伤学说、免疫异常学说、氧化应激假说等^[2]。随着人口老龄化的不断加剧, 老年痴呆的发病率逐年增加, 截至 2017 年, 我国老年痴呆患者人数约为 780 万, 居世界第一位^[3]。因此, 寻找能够有效治疗老年痴呆症的药物已迫在眉睫。随着一系列基于主流的 A β -淀粉样肽级联假说新药的失败以及科学界对 A β 生理作用的新认识, 传统的胆碱能假说仍然是现有临床药物的主要作用机制, 多功能的胆碱酯酶抑制剂的研究成为新的趋势^[4]。另外, 神经炎症假说也愈来愈受重视^[5], 近年来的研究表明, AD 的发生伴随着慢性炎症反应。A β 沉积是炎症的诱因, 在 A β 的影响下, 小胶质细胞可诱导炎症因子不断分泌, 这些炎症因子包括肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、干扰素 γ (interferon γ , IFN- γ)等, 由于这些炎症因子既有神经毒性, 又能减弱胰岛素降解酶的降解能力, 而降解 A β 的关键酶是胰岛素降解酶^[6], 故炎症反应能

够间接促成 A β 的不断沉积, 进而引起神经元的丢失和认知功能障碍, 加快 AD 的发生发展^[7]。故在 AD 发展进程中, 抑制炎症反应可以减少神经细胞的损伤, 提高学习记忆能力^[8]。因此研发新型的胆碱酯酶抑制剂和抗神经炎症药物, 对于防治 AD 意义重大。

收稿日期: 2019-01-06; 修回日期: 2019-03-22

基金项目: 广东省扬帆计划引进紧缺拔尖人才项目(201433009); 广东省自然科学基金(2018A030307046); 广东海洋大学科研启动项目(E15155); 深圳市科创委基础研究自由探索项目(JCYJ20170306165013264); 深圳市大鹏新区产业发展资金(KY20180203; PT201901-05; KY20170210)

[Foundation: the Yangfan Talent Project of Guangdong Province, No. 201433009; the Natural Science Foundation of Guangdong Province, No. 2018A030307046; the Program for Scientific Research Start-Up Funds of Guangdong Ocean University (GDOU), No. E15155; the Free Exploration Project of the Shenzhen Fund for Basic Research, No. JCYJ20170306165013264; Shenzhen Dapeng New District Industrial Development Fund, No. KY20180203, No. PT201901-05, No. KY20170210]

作者简介: 杨静明(1994-), 女, 河南洛阳人, 硕士研究生, 研究方向: 海洋生物活性物质的研究与开发, E-mail: gdouyjm1994@163.com; 卢虹玉(1976-), 女, 博士, 副教授, 共同第一作者, 研究方向: 食品科学与技术, E-mail: irishly@126.com; 张翼(1978-), 通信作者, 男, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 研究领域: 海洋天然产物, 电话: 13828241058, Email: hubeizhangyi@163.com

海参(Sea cucumber, *Holothurian*)属棘皮动物门(Echinodermata)海参纲(Holothuroidea)生物。世界海参资源丰富,全球约有海参 1 100 余种,其中可食用者 40 余种^[9]。海参自古以来即被我国人民视为滋补食品,近年来,随着人们保健意识的提高,海参的营养保健价值越来越受到关注^[10]。现已证实海参体壁中含有海参多糖、胶原蛋白、磷脂、海参皂苷、脑苷脂、神经节苷脂等多种生物活性物质^[11],而进一步的研究证明其具有免疫调节^[12]、抗肿瘤^[13]、抗癌^[14]、抗真菌^[15]、镇痛^[16]、抗凝血^[17]、抗氧化^[18]抗神经炎症^[19]等生理药理活性,其中与抗 AD 相关的生物活性包括抗氧化活性、乙酰胆碱酯酶抑制活性和抗神经炎症活性等,已有一些相关报道,如刘程慧等^[20]从海参酶解产物中分离制备分离得到海参肽 I,对 DPPH 自由基的清除率达 56.3%(1 g/L); Lin 等^[21]发现冰岛刺参(*Cucumaria frondosa*)的酶解多肽可导致老化小鼠大脑乙酰胆碱酯酶活性降低; Song 等^[22]采用 Griess 反应,评估 NO 的释放和 RT-PCR 以确定 IL-6 和 TNF- α 在 LPS 刺激的 RAW 264.7 鼠巨噬细胞中的 IL-4 mRNA 表达水平,结果显示,刺参提取物具有抗外周炎症的活性。由此可见,从海参的提取物中寻找和开发抗 AD 相关活性的物质具有一定的可行性,将其开发成为干预 AD 的新型功能性食品乃至药物已经成为海参深度开发利用的重要方向。

脂溶性小分子物质具有更好的血脑屏障透过性,然而迄今为止,对海参生物活性的相关研究主要集中在肽类物质,尚未见到海参脂溶性成分抑制乙酰胆碱酯酶及缓解神经炎症的报道。本研究基于胆碱能缺失假说和神经炎症假说,主要针对海参酶解原液中的脂溶性小分子成分,追踪其具有良好乙酰胆碱酯酶抑制活性的组分,同时对其脂溶性成分也进行了抗炎活性的探究,为防治老年痴呆海洋药物与营养保健品的研究提供依据。

1 材料与仪器

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料与细胞株

海参酶解原液,由山东圣洲海洋科技生物股份有限公司提供; BV-2 细胞株,购自昆明细胞库。

1.1.2 试剂

碘化乙酰硫代胆碱(Acetylthiocholine iodide, ATCI)、5, 5'-二硫代二硝基苯甲酸(Dithiobisnitrobenzoic acid, DTNB)、乙酰胆碱酯酶(Acetylcholinesterase, AChE)、

牛血清白蛋白(BSA); Silica gel 60 F254(Merck 公司); 大茴香醛,纯度 $\geq 98\%$,(上海麦克林生化有限公司); 正相硅胶(青岛海洋化工厂); 反相硅胶填料 ODS-AQ (日本 YMC 株式会社); 凝胶填料 Sephadex LH-20(瑞士 GE-Healthcare Bio-sciences 公司); 高糖培养基(DMEM)、0.25% Trypsin-EDTA 胰酶、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、磷酸盐缓冲液(Gibco 公司)、胎牛血清(Fetal bovine serum, 上海双迦生物科技有限公司); 青霉素-链霉素溶液双抗(Penicillin-Streptomycin Solution, HyClone 公司); MTT(苏云生物科技有限公司); 一氧化氮试剂盒(Promega 公司); IL-6 ELISA 试剂盒(达科为生物技术有限公司); 其他所用试剂及材料均为国产分析纯试剂。

1.2 仪器设备

IKA RV10 旋转蒸发仪(德国 IKA 集团); Biotek Epoch2 全波长酶标仪(美国博腾仪器有限公司); HP Plus 50D 全自动中高压制备液相色谱仪(江苏利德科技有限公司); Aglient 1260 II 高效液相色谱仪-配二极阵列检测器(DAD, 美国 Aglient 公司); CKX41-A32 PH 倒置显微镜(奥林巴斯工业有限公司); Eppendorf 5804R/5810R 高速冷冻离心机(德国 EPPENDORF 公司); SW-CJ-2FD 超净工作台(上海博讯实业有限公司); IC1000 细胞计数仪(北京伯辉生物科技有限公司); MCO-175 CO₂ 培养箱(日本三洋电机株式会社); SHA-82A 恒温振荡器(常州恒隆仪器有限公司)。

Agilent 反相 C18 分析柱, 填料为 Poroshell 120 EC-C18, 规格 4.6 mm \times 250 mm, 填料粒径 4.0 μm 。

2 实验方法

2.1 海参酶解液的制备

2.1.1 海参酶解

每 1 kg 鲜海参洗净后,切碎投入酶解罐,加入中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、酸性蛋白酶(加入量按照海参重量依次为 0.2%、0.125%和 0.1%),料液比为 1 : 1.5,酶解温度为 52 $^{\circ}\text{C}$,酶解时间为 4 h。

2.1.2 酶解液干燥

将 1 L 酶解液经 50 $^{\circ}\text{C}$ 以下减压浓缩至较小体积,分装入浅盘中,进行真空冷冻干燥至固体含水量低于 5%。

2.2 海参酶解液成分的分析及氨基酸评分

2.2.1 海参酶解液成分的检测

将海参酶解液送至广州分析测试中心进行成分检测,检测采用国标方法,详见表 1~表 3。

表 1 海参酶解液主要成分分析检测结果

Tab. 1 Main ingredient analysis results of sea cucumber enzymatic hydrolysate

分析项目	检测结果	计量单位	检测方法
总糖	<0.5	g/100 g	GB/T 5009.8-2008/第二法
灰分	1.3	%	GB 5009.4-2010
粗脂肪	<0.5	g/100 g	GB/T 5009.6-2003/第一法
蛋白质(N×6.25)	2.51	g/100 g	GB 5009.5-2010/第一法
钾	38.1	mg/100 g	GB/T 5009.91-2003
钠	402	mg/100 g	GB/T 5009.91-2003
钙	31.4	mg/100 g	FAAS(GB/T 5009.90-2003)
镁	62.5	mg/100 g	GB/T 5009.90-2003
锌	1.4	mg/kg	GB/T 5009.14-2003/第一法
铁	0.23	mg/100 g	GB/T 5009.90-2003
锰	<0.1	mg/100 g	GB/T 5009.90-2003
铬	<0.1	mg/kg	GB 5009.123-2014
镉	0.079	mg/kg	GB 5009.15-2014
铅	<0.1	mg/kg	GB 5009.12-2010/第一法
砷	0.48	mg/kg	GB 5009.11-2014/第一篇 第二法
硒	0.145	mg/kg	GB 5009.93-2010/第一法

表 2 海参酶解液中的脂肪酸组成(%)

Tab. 2 Fatty acid composition in sea cucumber enzymatic hydrolysate

分析项目	检测结果	分析项目	检测结果
豆蔻酸(C14: 0)	2.9	亚麻酸(C18: 3)	5.5
豆蔻一烯酸(C14: 1)	1.5	花生酸(C20: 0)	2.3
十五烷酸(C15: 0)	0.27	花生一烯酸(C20: 0)	7.1
十五碳一烯酸(C15: 1)	0.37	花生二烯酸(C20: 2)	1.4
棕榈酸(C16: 0)	16.3	花生三烯酸(C20: 3)	1.1
棕榈一烯酸(C16: 1)	11.1	ARA(C20: 4)	6.7
十七烷酸(C17: 0)	1.8	芥酸(C22: 1)	2.5
十七碳一烯酸(C17: 1)	0.65	EPA(C20: 5)	6.3
硬脂酸(C18: 0)	5.3	二十二碳四烯酸(C22: 4)	2.0
油酸(C18: 1)	17.0	二十四碳一烯酸(C24: 1)	0.60
亚油酸(C18: 2)	5.2	DHA(C22: 6)	2.0

注: 检测方法 GB/T 17377-2008

表 3 海参酶解液中的氨基酸组成(g/100 g)

Tab. 3 Amino acid composition in sea cucumber enzymatic hydrolysate

分析项目	检测结果	分析项目	检测结果
天冬氨酸 ASP	0.24	异亮氨酸 ILE	0.093
苏氨酸 THR	0.13	亮氨酸 LEU	0.13
丝氨酸 SER	0.11	酪氨酸 TYR	0.065
谷氨酸 GLU	0.36	苯丙氨酸 PHE	0.082
甘氨酸 GLY	0.28	组氨酸 HIS	0.045
丙氨酸 ALA	0.15	赖氨酸 LYS	0.11
缬氨酸 VAL	0.11	精氨酸 ARG	0.17
蛋氨酸 MET	0.044	脯氨酸 PRO	0.17

以上水解氨基酸的总和 2.3

注: 检测方法 GB/T 5009.124-2003

2.2.2 海参酶解液的氨基酸评分

氨基酸评分(amino acid score, AAS)也即蛋白质化学评分(chemical score), 该指标是指用被测试蛋白质

的必须氨基酸评分模式和推荐的理想模式或参考蛋白的模式进行比较的得分。本文参照成年人的氨基酸需求模式, 对海参酶解液的氨基酸进行评分^[23]。

$$\text{氨基酸评分} = \frac{\text{被测蛋白质每克氮(或蛋白质)中氨基酸含量(mg)}}{\text{理想模式或参考蛋白质中每克氮(或蛋白质)中氨基酸含量(mg)}}$$

2.3 海参酶解原液的提取分离

2.3.1 海参酶解原液的提取

将海参酶解原液冻干粉(617.4 g)依次按极性从小到大用正己烷、二氯甲烷、乙酸乙酯、甲醇、水五种溶剂按料液比 1 : 1 浸泡 24 h, 超声提取 3 次,

每次 30 min, 用布氏漏斗抽滤, 合并 3 次滤液, 用旋转蒸发仪浓缩干燥, 转移至样品瓶, 称重, 得到五部分粗提物。其中正己烷、二氯甲烷、乙酸乙酯粗提物用于接下来活性组分的分离, 甲醇相粗提物与水相粗提物置于 4℃ 隔氧保存。

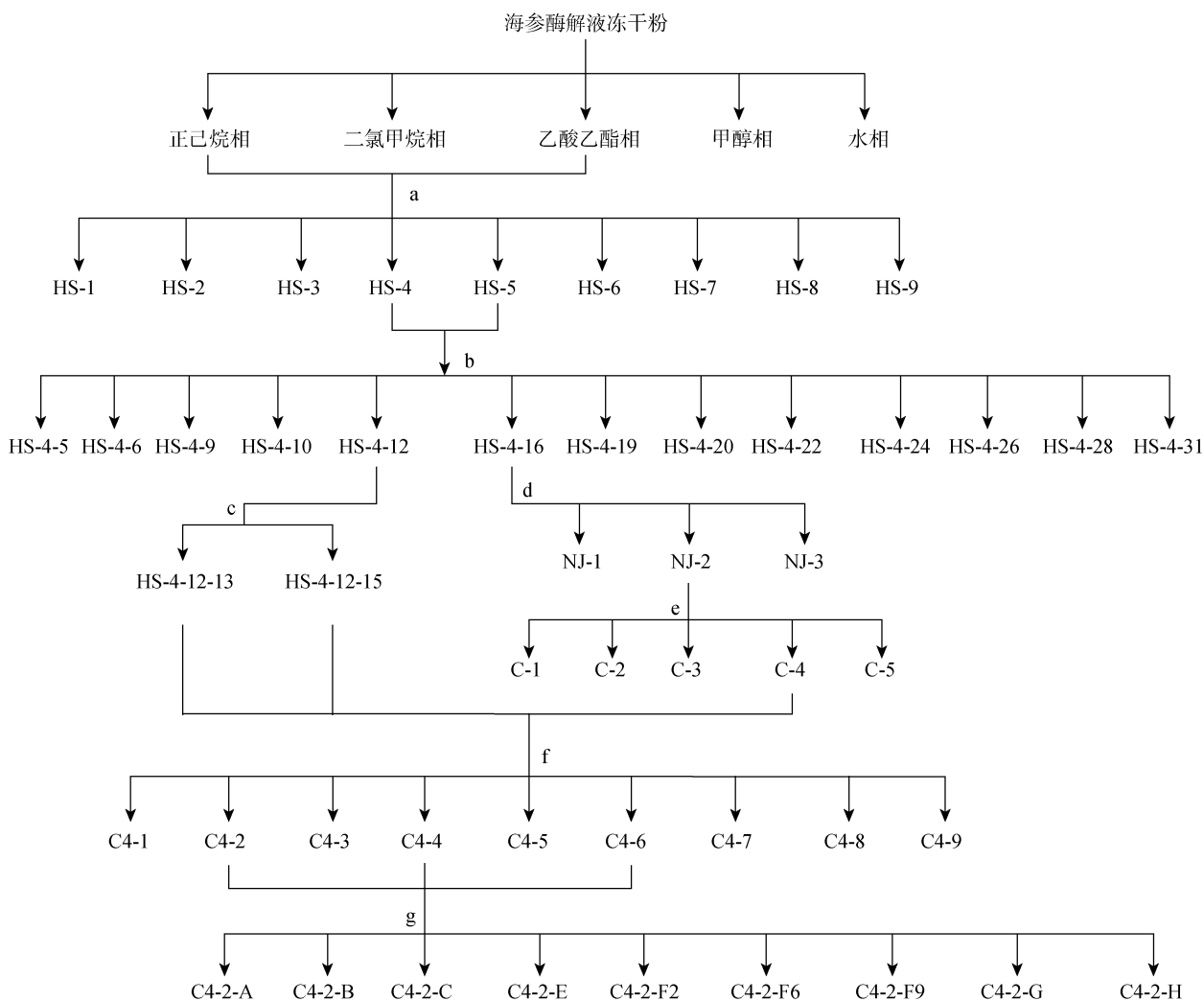


图 1 海参酶解液提取物分离流程

Fig. 1 Sea cucumber enzymatic hydrolysate extract separation process

注: a: 减压柱(玻璃柱, 填料: 正相硅胶 100~200 目), 依次用氯仿、1%甲醇、2%甲醇、4%甲醇、8%甲醇、15%甲醇、30%甲醇、50%甲醇、纯甲醇梯度洗脱; b: 减压柱(玻璃柱, 填料: 正相硅胶 200~300 目), 依次用石油醚: 乙酸乙酯=50 : 1、10 : 1、8 : 1、5 : 1、2 : 1、1 : 1 梯度洗脱; c: 正相常压柱(玻璃柱, 填料: 正相硅胶 200~300 目), 依次用石油醚: 丙酮=50 : 1、30 : 1、20 : 1、10 : 1、5 : 1、2 : 1、1 : 1 梯度洗脱; d: 凝胶柱(玻璃柱, 填料 Sephadex LH-20), 用氯仿: 甲醇=1 : 3 等度洗脱; e: 反相硅胶柱(玻璃柱, 填料: C18), 用甲醇: 水=20 : 1 等度洗脱; f: 反相硅胶柱(玻璃柱, 填料: C18), 用丙酮: 甲醇: 水=3 : 1 : 1 等度洗脱; g: 反相液相制备(不锈钢柱, 填料: SinoChrom ODS-AP, 填料粒径 15 μm, 规格: 20.0 mm×250 mm)依次用 45%、60%、70%、100%乙腈-水梯度洗脱

2.3.2 粗提物的分离纯化

根据化学显色结果及生物活性自显影结果,将海参粗提物的正己烷相、二氯甲烷相、乙酸乙酯相进行合并(以下称为“总脂溶性组分”,TLF)。依次通过减压硅胶柱、常压正相硅胶柱层析、Sephadex LH-20 凝胶柱层析、C18 反相硅胶柱层析、制备型 HPLC 用适宜的洗脱体系逐级分离纯化。通过各组分 TLC 板的紫外特征、茴香醛显色与乙酰胆碱酯酶抑制生物活性自显影斑点等特征,区分差异组分,合并相似组分,定位目标活性化合物,实现目标活性化合物的追踪分离,得到具有较好乙酰胆碱酯酶抑制活性的精细组分。

2.4 提取物的乙酰胆碱酯酶抑制生物活性自显影

此部分方法参照本实验室之前报道方法^[23]。

2.5 目标精细组分的 HPLC 分析

将精细组分用色谱甲醇配成浓度为 1 g/L 的样品溶液,进样量为 10 μ L,洗脱条件为: 0~5 min, 60%~100%的甲醇-水; 15~20 min, 100%纯甲醇; 20~25 min, 100%~60%的甲醇-水。流速 1 mL/min。DAD 检测器信号采集波长为: 190~500 nm, 监测波长: 254 nm 及 210 nm。

2.6 目标精细组分的 IC₅₀ 值的测定

此部分方法参照本实验室之前报道方法^[24]。

2.7 海参总脂溶性组分抗炎活性研究

2.7.1 MTT 法检测细胞活性

采用 MTT 法检测海参酶解液 TLF 对 BV-2 细胞的生长影响。参考 Wang 等^[25]的方法,选择处于对数生长期的 BV-2 细胞制成单细胞悬液,调节细胞密度为 5.04×10^4 个/mL,接种于 96 孔板,每孔体积为 100 μ L,培养 24 h 后,需换一次培养基,每孔加新的无血清培养基 100 μ L,根据实验情况而定,设空白对照组、模型组和实验组,每组设 5 个平行孔,空白组加入 50 μ L DMEM,模型组加入含 0.5%DMSO 的 DMEM 培养基 50 μ L,实验组加入各浓度样品 50 μ L。置 CO₂ 培养箱中孵育 24 h 后,往每个孔中加入 20 μ L 的 MTT(5 g/L)溶液,继续放入培养箱培养 4 h 后,弃去培养液的上清部分。再往每个孔中加入 100~150 μ L DMSO 溶液,震荡 10 min,待蓝紫色结晶充分溶解后,在波长 490 nm 下测定 OD 值,按照

下面的计算公式进行计算细胞存活率。

计算公式:

$$\text{细胞存活率}\% = 1 - \frac{\text{OD空白组} - \text{OD实验组}}{\text{OD空白组}}$$

2.7.2 Griess 法检测 NO

采用 Griess 法检测 TLF 对 LPS 诱导的 BV-2 细胞中 NO 的含量。在 BV-2 细胞到达对数生长期时,将其分散为单细胞悬液,调节其密度为 1.14×10^5 /mL,均匀接种于 96 孔板,每孔 100 μ L,待细胞生长至贴壁后,更换一次培养液,每孔加入新的培养液(不含血清)100 μ L,根据实验情况而定,设置空白对照组、模型组和实验组,每组分别设置 5 个平行,其中空白对照组和模型组每孔加入 50 μ L DMEM,实验组加入不同浓度的样品各 50 μ L。将 96 孔板放置于培养箱中继续培养 24 h 后,在空白对照组的孔中加入 50 μ L DMEM,模型组和实验组则分别加入 50 μ L 的 LPS(1 μ g/mL),诱导刺激细胞 17 h 后,收集细胞上清液,按照一氧化氮试剂盒说明书操作,在波长 540 nm 下测定 OD 值,根据标准曲线求出 NO 的浓度。

2.7.3 ELISA 法检测 IL-6

采用 ELISA 法检测 TLF 对 LPS 诱导的 BV-2 细胞中 IL-6 的水平。在 BV-2 细胞到达对数生长期时,将其分散为单细胞悬液,调节其密度为 1.23×10^5 个/mL,均匀接种于 96 孔板,每孔 100 μ L,待细胞生长至贴壁后,更换一次培养液,每孔加入新的培养液(不含血清)100 μ L。实验分为空白对照组、DMSO 组(浓度为 0.5%)、LPS 组(1 μ g/mL)和实验组(加入样品的终浓度依次为 80、120、160、200 μ g/mL),每组分别设置 5 个平行,空白对照组和 LPS 组每孔加入 50 μ L DMEM, DMSO 组加入含 0.5% DMSO 的 DMEM 培养基 50 μ L,实验组加入各浓度的样品 50 μ L。置于培养箱中继续培养 24 h 后,空白对照组加入 50 μ L DMEM, DMSO 组、LPS 组和实验组分别加入 1 μ g/mL LPS 50 μ L,诱导刺激细胞 19 h 后,收集细胞上清液,2 000 r/min 离心 20 min。详细步骤按照试剂盒说明书进行操作,在波长 450 nm 下测定 OD 值,计算细胞上清液中 IL-6 的含量。

2.7.4 统计学分析

实验结果用均数 \pm 标准差 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS17.0 软件进行数据处理以及分析,对各组数据进行单因素方差分析和 LSD 检验,以 $P < 0.05$ 表明有显著性差异,具有统计学意义。

3 结果

3.1 海参酶解液固形物含量及基本成分分析及氨基酸评分

3.1.1 海参酶解液成分分析

海参酶解液成分分析结果显示(表 1~表 3), 其主要成分为: 矿物质占 24.3%(如含钙 31.4、铁 0.23、锌 1.4、硒 0.145 mg/kg), 总糖占 1.48%, 粗脂肪占 2.4% (其中亚油酸占比 5.2%, 亚麻酸 5.2%, ARA 6.2%, EPA 5.4%, DHA 1.9%), 蛋白质总含量占 55.2% (含多种必需氨基酸, 如植物性食物中缺少的限制性氨基酸-赖氨酸 2.33%、苏氨酸 2.01%)。

从表 2 可看出海参酶解液中含有大量不饱和脂肪酸, 2011 年, Lou 等^[26]采用 GC-MS 对海参体壁脂肪酸进行分析, 发现其含有 C20: 4, 而它具有改善记忆力和视力、调节血脂和血糖、神经功能调节等作用; 海参酶解液中含有大量的(6.7%)C20: 4, 因此其可能具有潜在的神经保护作用, 其也可能成为 C20: 4 的重要膳食来源。

3.1.2 海参酶解液氨基酸评分

参照成人所需氨基酸的标准, 对海参酶解液中的各人体必需氨基酸进行评分, 从表 4 可以看出: 海参酶解液中的需氨基酸含量可满足成人所必须的氨基酸。

表 4 海参酶解液氨基酸评分

Tab. 4 Amino acid score of sea cucumber enzymatic hydrolysate

氨基酸	成人所需蛋白质中必需氨基酸含量 (mg/g)	海参酶解液蛋白质必需氨基酸含量 (mg/g)	氨基酸评分
异亮氨酸	13	40.4	311
亮氨酸	19	56.5	297
赖氨酸	16	47.8	298
苯丙氨酸+酪氨酸	17	63.9	375
苏氨酸	9	56.5	627
缬氨酸	13	47.8	367
最终氨基酸评分		297	

3.2 提取物的 TLC、化学显色及乙酰胆碱酯酶抑制活性自显影

为探讨海参经酶解后脂溶性物质的抗老年痴呆相关性, 本文采用不同极性溶剂提取其脂溶性成分, 对其进行了乙酰胆碱酯酶抑制活性和抗炎活性的研究。

将正己烷相、二氯甲烷相、乙酸乙酯相粗提物, 用合适的展开剂在 TLC 薄层层析板上展开(图 2)。从

展开结果来看, 正己烷相、二氯甲烷相、乙酸乙酯相提取物三相的组分均较为丰富, 且通过茴香醛-硫酸显色可以看出此三相具有多个相似组分, 且都具有乙酰胆碱酯酶抑制活性, 故将三相粗提物合并为总脂溶性组分(total liposoluble fraction, TLF)。

一次减压柱后, 将洗脱下来的组分用合适的展开剂在 TLC 薄层层析板上展开, 采用薄层生物活性自显影追踪其 AChE 抑制活性成分(图 3)。由于

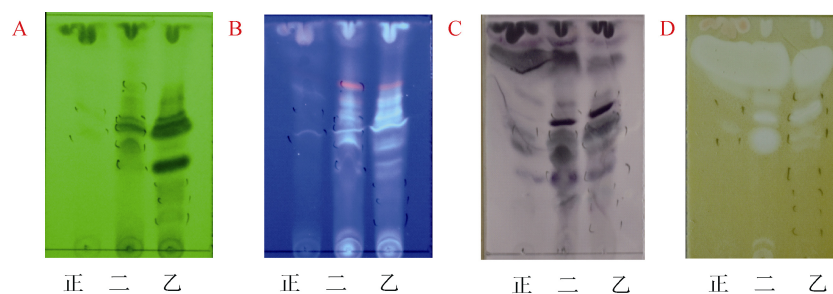


图 2 脂溶性组分活性自显影及化学显色对比

Fig. 2 Comparison of the bioautography and chemical coloration of the liposoluble fractions

注: 正: 正己烷; 二: 二氯甲烷; 乙: 乙酸乙酯; A: 254 nm 紫外图像; B: 365 nm 荧光图像; C: 茴香醛硫酸化学显色; D: 乙酰胆碱酯酶抑制活性自显影

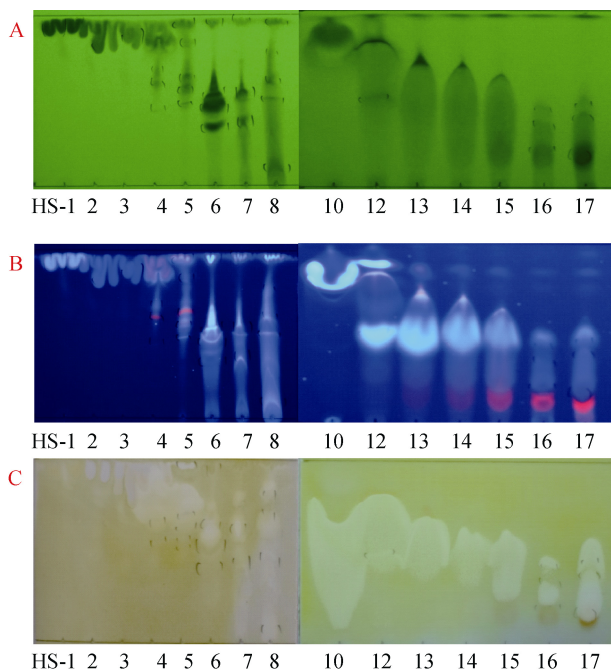


图3 中等级性洗脱组分的薄层层析图及活性自显影图
Fig. 3 Thin layer chromatograms and bioautographies of medium elution fractions

注: A: 254 nm 紫外图像; B: 365 nm 荧光图像; C: 乙酰胆碱酯酶抑制活性自显影

HS-1~HS-3 洗脱的组分极性较小, 前三个洗脱梯度洗脱下来的组分极性较小, TLC 展开效果不理想; HS-4~HS-8 都有 AChE 抑制活性, HS-10~HS-17 的 AChE 抑制活性很明显且较集中。

经过正相硅胶柱、凝胶柱逐级纯化过的精细组分, 继续利用制备液相进行反相制备, 将相似组分 C4-2~C4-2-6 合并利用制备型液相采取截峰收集模式, 洗脱体系为: 乙腈-水梯度洗脱, 得到的 9 个精细组分进行薄层层析和生物活性自显影, 结果表明, C4-4-E、C4-4-F6、C4-4-F9 有较强乙酰胆碱酯酶抑制活性。从图 4 薄层化学显色及活性结果可知, 组分 C4-4-F6 和组分 C4-4-F9 具有相似组分, 且乙酰胆碱酯酶抑制活性斑点位置相同, 可以推测两者可能具有相似活性组分。对这三个组分分别进行高效液相分析, 进一步检测其纯度。

3.3 精细组分的 HPLC 分析结果及乙酰胆碱酯酶抑制活性测定

3.3.1 精细组分的 HPLC 纯度测定

由图 5 可知, 组分 C4-2-E 只有一个主峰, 保留时间为 10.694 min, 该主峰峰面积占比 85.3%。组分 C4-2-F6 主峰的保留时间为 14.703 min, 峰面积占比

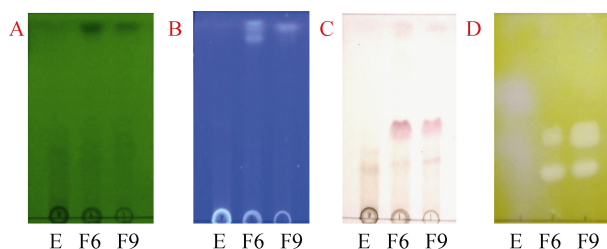


图4 C18 反相制备柱洗脱组分的薄层层析图及活性自显影图

Fig. 4 Thin layer chromatograms and bioautography of elution fractions from C18 reversed-phase preparative column

注: A: 254 nm 紫外图像; B: 365 nm 荧光图像; C: 茴香醛硫酸化学显色; D: 乙酰胆碱酯酶抑制活性自显影

29.3%; C4-2-F9 主峰的保留时间为 14.716 min, 峰面积占比 30.7%; 组分 C4-2-F6 与组分 C4-2-F9 两组分的主峰保留时间极为接近, 对照组分 C4-2-F6 在保留时间为 14.703 min 的紫外光谱和组分 C4-2-F9 在保留时间为 14.716 min 的紫外光谱, 两者紫外光谱很相似, 且都在波长 280 nm 下有最大吸收, 推测两者可能是同一系列物质。

3.3.2 96 孔板测定海参提取物目标精细组分乙酰胆碱酯酶抑制活性

图 6 显示: 在同等浓度下, 三个目标组分中, C4-2-E 对乙酰胆碱酯酶的抑制率最强, 在浓度为 0.25 g/L 时, 抑制率达 91.04%。而 C4-2-F6 和 C4-2-F9 定量检测乙酰胆碱酯酶抑制活性较弱, C4-2-F6 在最大浓度 0.5 g/L 时, 抑制率为 28%。

3.4 海参酶解液总脂溶性组分抗神经炎活性

3.4.1 海参酶解液总脂溶性组分对 BV-2 细胞的毒性作用

由图 7 可见, TLF 在 75~150 g/mL 的范围内, 对细胞没有抑制作用, 但超过 300 g/mL, 会对细胞有明显的毒性作用, 会对细胞的生长造成影响, 原因在于样品的浓度过高, 其中对细胞有害物质的浓度的增加以至于影响到细胞的生长。设置正常组的细胞活性为 100, 与空白组相比, DMSO(浓度为 0.05%) 75~150 $\mu\text{g/mL}$ 的混合层分离组分作用 BV-2 细胞 24 h, 其细胞活性差异均无统计学意义 ($P>0.05$), 表明无明显细胞毒性作用。而 300 $\mu\text{g/mL}$ 的 TLF 有明显的抑制作用 ($P<0.05$), 说明 300 $\mu\text{g/mL}$ 的 TLF 在这个实验剂量范围内有毒性作用, 因而选择这个剂量范围内的浓度进行下一步检测。

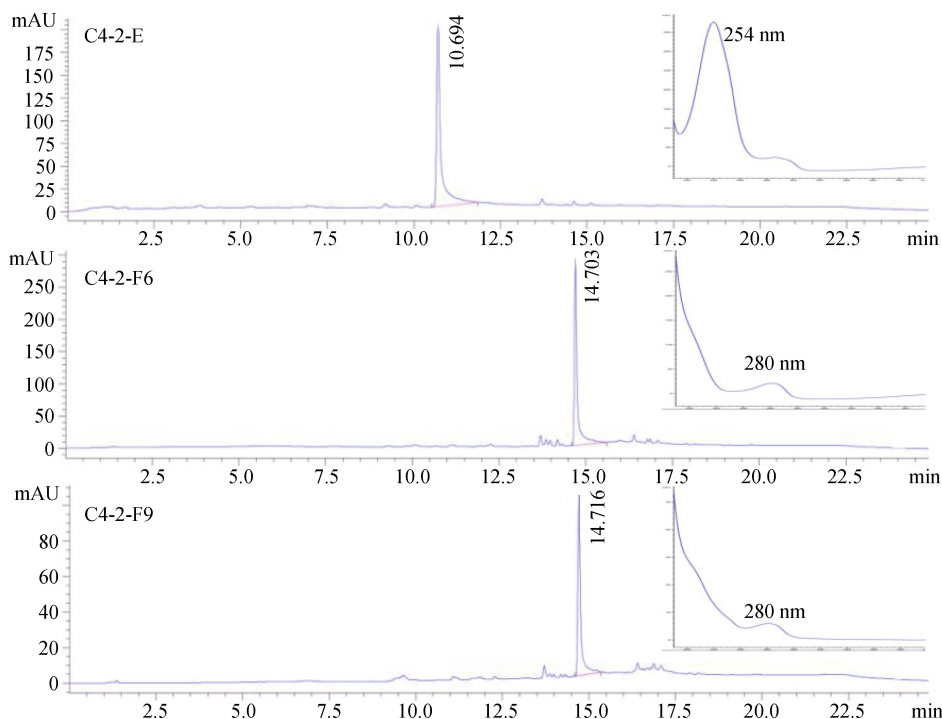


图5 三个目标精细组分的 HPLC 图谱及主峰 UV 图谱

Fig. 5 HPLC chromatogram and UV map of three targeted fine components

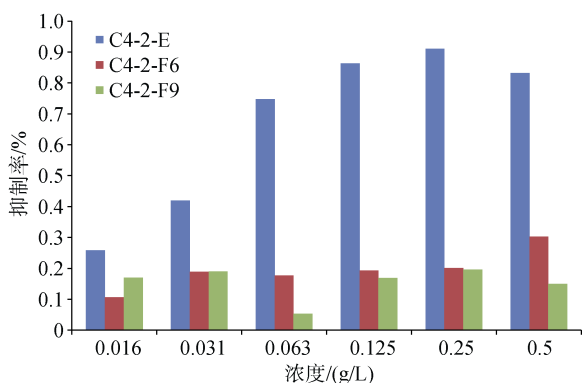


图6 C4-2-E、F6、F9 组分 AChE 抑制率

Fig. 6 Inhibition rates of samples C4-2-E, F6, F9 to AChE

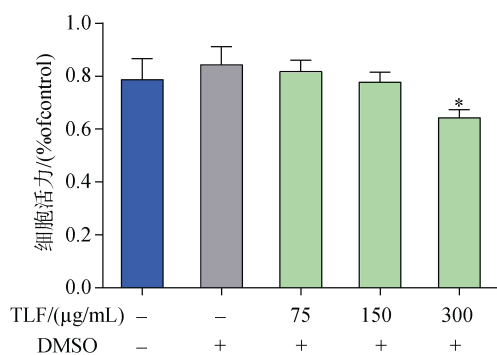


图7 总脂溶性组分对 BV-2 细胞活性的影响

Fig. 7 Effect of mixed solvent soluble fraction on the activity of BV-2 cells

注: 与空白组相比, * $P < 0.05$

3.4.2 海参酶解液总脂溶性组分对 LPS 诱导 BV-2 细胞中 NO 含量及 IL-6 水平表达的影响

在一定的浓度范围内, TLF 能够明显的抑制 LPS 诱导 BV-2 细胞分泌 NO, 均具有抑制效果(图 8a)。与空白组相比, BV-2 细胞经 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 处理 17 h 后 NO 分泌水平明显升高, 不同剂量(** $P < 0.001$), 说明 LPS 刺激小胶质细胞由静息状态转化为活化状态, 成功建立炎症细胞模型。不同浓度 TLF 处理 BV-2 细胞 24 h, 可明显的抑制 LPS 刺激 BV-2 细胞释放 NO, 具有统计学意义(### $P < 0.001$), 因此选择 TLF 进行进一步的抗炎检测。

在一定的浓度范围内, TLF 抑制 LPS 诱导 BV-2 细胞中 IL-6 的表达, 为治疗炎症方面提供了理论依据(图 8b)。与空白相比, LPS 诱导 BV-2 细胞内 IL-6 分泌明显增加, 具有统计学差异(** $P < 0.001$)。而在与 LPS 组相比, 80、120 $\mu\text{g/mL}$ 的 TLF 并没有抑制 LPS 刺激 BV-2 细胞中 IL-6 的表达, 不具有显著性差异($^{\#}P > 0.05$), 160、200 $\mu\text{g/mL}$ 的 TLF 有效的抑制了 LPS 处理后 BV-2 细胞内 IL-6 水平, 具有统计学意义($^{\#}P < 0.01$)。

4 讨论

本研究采用酶解海参, 目的在于最大程度的使海参体内的小分子活性成分得到释放; 对海参酶解

液成分进行分析,结果显示其含有多种人类必须营养物质,其中人体必需氨基酸的含量大大高于成人每日所必须的量。其中的营养成分如 DHA 等对老年痴呆具有改善作用。如:胡为民等^[26]用富含 DHA 的饲料喂养 AD 小鼠共 5 个月,其脑内的 A β 水平下降

60%,可能通过减少炎症细胞介质分泌,减轻炎症反应;恢复不饱和脂肪酸在脑磷脂中的正常比例,维持正常的脑细胞膜稳定性,防止脑细胞的退行性变,减少了 A β 在脑内的沉积,减轻其病理改变。故海参酶解液含有丰富的抗老年痴呆相关活性物质。

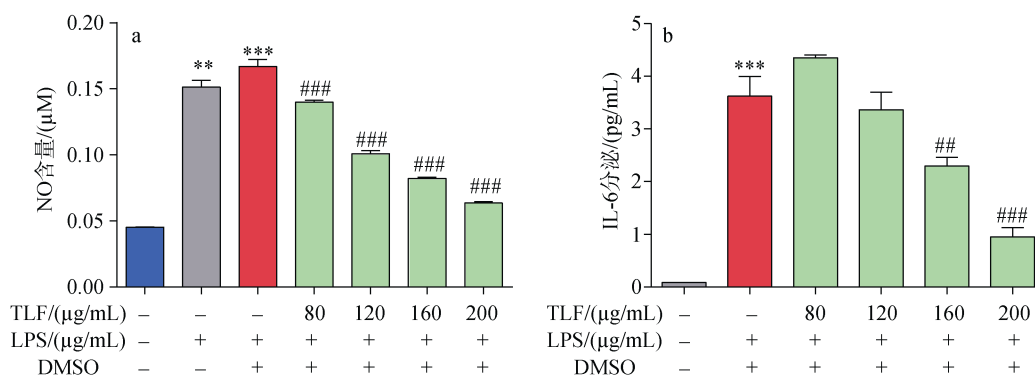


图 8 总脂溶性组分对 LPS 诱导 BV-2 细胞上清液中 NO 含量(a)和 IL-6(b)分泌的影响

Fig. 8 Effect of the mixed solvent soluble fraction on the content of NO and secretion of IL-6 in the culture supernatants of BV-2 cells induced by LPS

注:与空白组相比,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$;与模型组相比,### $P < 0.01$,#### $P < 0.001$

胆碱能假说表明导致 AD 患者失忆的直接原因是大脑内神经递质-乙酰胆碱(ACh)的缺失,故用乙酰胆碱酯酶抑制剂抑制 AChE 的活性,延缓 ACh 水解的速度,提高突触间隙 ACh 的水平,从而发挥对 AD 的治疗作用^[27]。但现阶段尚未见到海参脂溶性成分抑制乙酰胆碱酯酶及缓解神经炎症的报道。故本文采用活性追踪引导的方法对海参酶解液进行提取分离,并追踪其各级组分的乙酰胆碱酯酶抑制活性,从而分离出具有良好乙酰胆碱酯酶抑制活性的组分。

1994 年,Whitehouse 等^[19]发现 SAMP8 小鼠的记忆受损,膳食海参葡萄糖脑苷脂(SCG)显著改善了这些小鼠的空间记忆缺,因此,SCG 在 AD 中具有潜在的改善作用,并且外源性鞘脂摄入可能潜在地影响体内的鞘脂代谢;2016 年,Song 等^[28]测试了海参肽(SCP)在脂多糖(LPS)刺激的 RAW264.7 鼠巨噬细胞中的抗炎作用,结果表明,SCP 通过抑制 NF- κ B 和 MAPK 活化并在巨噬细胞中诱导 HO-1 表达而发挥抗炎功能;2018 年,Olivera 等^[29]发现,来自尤卡坦半岛的冻干海参 *Isostichopus badionotus* 的提取物在体内表现出强大的抗炎活性,它们减弱由炎症因子引起的组织学破坏,抑制包括 TNF α , iNOS, COX2, NF κ B 或 IL-6 在内的促炎基因的表达,并略微增强抗炎或存活基因的表达。本文进一步对海参酶解液提

取物的总脂溶性组分进行了抗炎活性的测定,采用小胶质细胞 BV2,测试其对 NO 和 IL-6 表达产生的影响,其异于以上文献报道中所采用的细胞,结果表明,TLF 能够明显抑制 LPS 诱导 BV-2 细胞分泌 NO,且能抑制 BV-2 细胞中 IL-6 的表达,表明其小分子脂溶性组分具有潜在的抗神经炎症活性,异于上述文献报道的海参肽,对海参葡萄糖脑苷脂的改善记忆作用也是一个重要的补充。此研究为海参的抗老年痴呆相关活性药物的开发提供了理论依据。但是,由于实验时间和条件的限制,其具体的胆碱酯酶抑制、抗神经炎症等抗阿尔茨海默症的成分还需要更深入的研究。

5 结论

海参酶解液能满足成年人日常身体所必须的蛋白质需求量,且具有较好的乙酰胆碱酯酶抑制活性和抗神经炎症活性,通过抑制乙酰胆碱酯酶的活性,可延缓 ACh 水解的速度,提高突触间隙 ACh 的水平,从而发挥对 AD 的治疗作用;通过抑制 LPS 诱导 BV-2 细胞分泌 NO 和抑制 BV-2 细胞中 IL-6 的表达,从而起到神经保护作用。本研究是对现有海参抗老年痴呆相关活性成分研究的有益补充,并为开发海参来源的新型抗老年痴呆相关活性药物及功能性食品的开发提供了一定的理论依据。

参考文献:

- [1] 柯莉, 晏勇. 脑小血管疾病与阿尔茨海默病的相关研究[J]. 重庆医学, 2016, 45(5): 701-704.
Ke Li, Yan Yong. Correlation between cerebral small vessel disease and Alzheimer's disease[J]. Chongqing Medicine, 2016, 45(5): 701-704.
- [2] 张琳琳, 宋宛珊, 王凯, 等. 阿尔茨海默病发病机制及药物治疗研究进展[J]. 世界中医药, 2017, 12(5): 1200-1203.
Zhang Linlin, Song Wanshan, Wang Kai, et al. Progress in mechanism of pathogenesis and medical treatment of Alzheimer's disease[J]. World Chinese Medicine, 2017, 12(5): 1200-1203.
- [3] 李智慧, 相玮, 韩嘉琪, 等. 感觉刺激疗法干预老年痴呆患者睡眠障碍的研究进展[J]. 解放军护理杂志, 2018, 35(1): 49-52.
Li Zhihui, Xiang Wei, Han Jiaqi, et al. Research progress of sensory stimulation therapy on sleep disorders in elderly patients with dementia[J]. Nursing Journal of Chinese People's Liberation Army, 2018, 35(1): 49-52.
- [4] 李娜. 基于“A β 级联假说”的中药治疗阿尔茨海默病研究进展[J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(12): 1714-1720.
Li Na. Advances in research on treatment of Alzheimer's disease based on "A β cascade hypothesis"[J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 2011, 31(12): 1714-1720.
- [5] 牛静亚. 氧化应激诱导小鼠海马神经元 microRNA 表达谱的改变及验证[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2012.
Niu Jingya. Alterations and validation of microRNA expressive profile induced by oxidative stress in mouse hippocampal neurons[D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2012.
- [6] 单延凤, 郭莹莹, 陶涛, 等. TBK1 的 O-GlcNAc 修饰促进 LPS 诱导的 BV-2 小胶质细胞炎性介质的释放[J]. 南通大学学报(医学版), 2017, 4: 311-314.
Shan Yanfeng, Guo Yingying, Tao Tao, et al. O-GlcNAc modification of TBK1 increases LPS-induced inflammatory mediator release from BV-2 microglia[J]. Journal of Nantong University (Medical Sciences) 2017(4): 311-314.
- [7] 林珍. 瞬时受体电位通道 7(TRPM7) 在 A β 25-35 诱导大鼠学习记忆功能损害模型中的作用及其初步机制研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2013.
Lin Zhen. Effects of transient receptor potential channel 7 (TRPM7) on the learning and memory deficits induced by amyloid beta-peptide(25-35) in rats and its preliminary mechanism research[D]. Hefei: Anhui Medical University, 2013.
- [8] 左茹. 黄连素基于 PPAR γ -IDE 信号通路对 A β 代谢的影响及 A β 毒性损伤保护作用的研究[D]. 保定: 河北大学, 2014.
Zuo Ru. The research of berberine affect on metabolism and cytotoxicity based PPAR γ -IDE signaling pathway[D]. Baoding: Hebei University, 2014.
- [9] 唐黎, 王吉桥, 程骏驰, 等. 海参饲料使用和发展方向[J]. 饲料工业, 2007, 28(22): 22-23.
Tang Li, Wang Jiqiao, Cheng Junchi, et al. Sea cucumber feed use and development direction[J]. Feed Industry, 2007, 28(22): 22-23.
- [10] 樊绘曾. 海参: 海中人参——关于海参与其成分保健医疗功能的研究与开发[J]. 中国海洋药物, 2001, 20(4): 37-44.
Fan Huiheng. Sea cucumber: sea ginseng: the research and development on medical and health function of sea cucumber and its components[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2001, 20(4): 37-44.
- [11] 徐雷雷. 海参磷脂型二十碳五烯酸降血糖作用及机制的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013.
Xu Leilei. Study on hypoglycemic effect and mechanism of sea cucumber phospholipid eicosapentaenoic acid[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013.
- [12] 赵芹, 王静凤, 薛勇, 等. 3 种海参的主要活性成分和免疫调节作用的比较研究[J]. 中国水产科学, 2008, 15(1): 154-159.
Zhao Qin, Wang Jingfeng, Xue Yong, et al. Comparative study on the bioactive components and immune function of three species of sea cucumber[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15(1): 154-159.
- [13] Hu S, Wang J, Wang J, et al. Long-chain bases from sea cucumber inhibits renal fibrosis and apoptosis in type 2 diabetic mice[J]. Journal of Functional Foods, 2018, 40: 760-768.
- [14] Wijesinghe W A J P, Jeon Y J, Ramasamy P, et al. Anticancer activity and mediation of apoptosis in human HL-60 leukaemia cells by edible sea cucumber (*Holothuria edulis*) extract[J]. Food Chemistry, 2013, 139(1-4): 326-331.
- [15] Farjami B, Nematollahi M, Moradi Y, et al. Derivation of extracts from Persian Gulf sea cucumber (*Holothuria leucospilota*) and assessment of its antifungal effect[J]. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 2014, 13(4): 785-795.
- [16] Yaacob H, Shahimi M M, Kim K H. Evaluation of antinociceptive activity of the water soluble extract of sea cucumber [Malaysia][J]. Malaysian Applied Biology, 2013, 24(1): 23-28
- [17] 王学锋, 李志广, 储海燕, 等. 海参糖胺聚糖抗血栓形成机制的研究[J]. 中国新药与临床杂志, 2002, 21(12): 718-721.
Wang Xuefeng, Li Zhiguang, Chu Haiyan, et al. Study on antithrombotic mechanism of glycosaminoglycan

- extracted from sea cucumber[J]. Chinese Journal of New Drugs and Clinical Remedies, 2002, 21(12): 718-721.
- [18] Liu X, Sun Z, Zhang M, et al. Antioxidant and antihyperlipidemic activities of polysaccharides from sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 90(4): 1664-1670.
- [19] Whitehouse M W, Fairlie D P. Anti-Inflammatory activity of a *Holothurian* (sea cucumber) food supplement in rats[J]. Inflammopharmacology, 1994, 2(4): 411-417.
- [20] 刘程惠, 朱蓓薇, 董秀萍, 等. 海参酶解产物的分离及其体外抗氧化作用的研究[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(9): 50-53.
Liu Chenghui, Zhu Beiwei, Dong Xiuping, et al. Study on the separation and antioxidant activity of enzymatic hydrolysates from sea cucumber[J]. Food and Fermentation Industries, 2007, 33(9): 50-53.
- [21] Lin L, Yang K, Zheng L, et al. Anti-aging effect of sea cucumber (*Cucumaria frondosa*) hydrolysate on fruit flies and D-galactose-induced aging mice[J]. Journal of Functional Foods, 2018, (47): 11-18.
- [22] Song M, Park D K, Cho M, et al. Anti-inflammatory and anti-allergic activities of sea cucumber (*Stichopus japonicus*) extract[J]. Food Science and Biotechnology, 2013, 22(6): 1661-1666.
- [23] 孙远明. 食品营养学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2008, 63-64.
Sun Yuanming. Food nutrition[M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2008, 63-64.
- [24] 张翼, 鲍海燕, 聂影影, 等. 海洋真菌抗老年痴呆相关活性成分的筛选与追踪研究[J]. 现代食品科技, 2016(11): 63-71.
Zhang Yi, Bao Haiyan, Nie Yingying, et al. Screening and tracing of anti-Alzheimer related bioactive constituents from marine fungi[J]. Modern Food Science & Technology, 2016(11): 63-71.
- [25] 王雪妹, 王晶, 张全斌. 褐藻多糖硫酸酯对脂多糖诱导大鼠肾小球系膜细胞 NO 产生量的影响[J]. 海洋科学, 2014, 38(10): 1-5.
Wang Xuemei, Wang Jing, Zhang Quanbin. Effect of fucoidan on NO production induced by LPS in rat glomerular mesangial cells[J]. Marine Science, 2014, 38(10): 1-5.
- [26] 楼乔明, 王玉明, 薛长湖, 等. 黑海参脂肪酸的气相色谱/质谱法分析[J]. 海洋科学, 2011, 35(6): 35-38.
Lou Qiaoming, Wang Yuming, Xue Changhu, et al. Analysis of fatty acid composition of *Holothuria atra* by gas chromatography/mass spectrometry[J]. Marine Science, 2011, 35(6): 35-38.
- [27] 胡为民, 符明. ω -3 多不饱和脂肪酸改善老年痴呆症动物模型病理的研究[J]. 临床医药实践, 2003, 12(12): 891-892.
Hu Weimin, Fu Ming. The study of ω -3 polyunsaturated acid on pathology in models of alzheimers disease[J]. Proceeding of Clinical Medicine, 2003, 12(12): 891-892.
- [28] Lawrence A D, Sahakian B J. The cognitive psychopharmacology of Alzheimer's disease: focus on cholinergic systems[J]. Neurochemical Research, 1998, 23(5): 787-794.
- [29] Song Jiajia, Li Tiange, Cheng Xue, et al. Sea cucumber peptides exert anti-inflammatory activity through suppressing NF- κ B and MAPK and inducing HO-1 in RAW264.7 macrophages[J]. Food & Function, 2016, 7(6): 2773-2779.
- [30] Olivera-Castillo L, Grant G Kantún-Moreno, Nuvia, et al. Sea cucumber (*Isostichopus badionotus*) body-wall preparations exert anti-inflammatory activity, in vivo[J]. PharmaNutrition, 2018, 6(2): 74-80.

Preliminary study on anti-Alzheimer's activity and composition in sea cucumber hydrolysate

YANG Jing-ming¹, LU Hong-yu¹, Xie Hui-feng¹, LIU Ya-yue¹, NIE Ying-ying^{1, 2}, ZHANG Yong-ping¹, SONG Cai¹, QIN Bang-wei³, ZHANG Yi^{1, 2, *}

(1. College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Guangdong Marine Biological Products Engineering Laboratory, Key Laboratory of Guangdong Province Aquatic Products Processing and Safety, Research Institute for Marine Drugs and Nutrition, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, 524088, China; 2. Shenzhen Institute of Guangdong Ocean University, Shenzhen, 518120, China; 3. Shandong Shengzhou Marine Biological Technology Co., Ltd. Weihai, 264211, China)

Received: Jan. 6, 2019

Key words: sea cucumber; extraction and separation; Alzheimer's disease; acetylcholinesterase inhibitory activity; anti-inflammatory activity

Abstract: The basic nutrients in the enzymatic hydrolysate of sea cucumber were analyzed by national standard methods. The enzymatic hydrolysate further was extracted with organic solvents of different polarities, and the active components were tracked by acetylcholinesterase inhibition self-development. Silica gel column chromatography, Sephadex LH-20 gel column and HPLC were used to obtain components with higher acetylcholinesterase inhibitory activity. In addition, MTT method was used to investigate the effect of total fat-soluble components of sea cucumber enzymatic hydrolysate on the growth of microglial cells (BV-2 cells). LPS-induced cells were used to establish a model of cellular inflammation; and the effects on the levels of NO and IL-6 in LPS-induced BV-2 cells were detected by Griess method and ELISA method. The results showed that the enzymatic hydrolysate contains rich mineral elements like calcium and zinc, as well as high content of unsaturated fatty acids and essential amino acids. From the solvent extract, the TLC spots with acetylcholinesterase inhibitory activity showed no significant UV and fluorescence absorption, and the inhibition rate of the most active component C4-2-E was 91.04% at the concentration of 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. The TLF of sea cucumber had no significant inhibitory effect on BV-2 cells within a certain concentration range, and could significantly inhibit the secretion of NO and IL-6 produced by LPS-induced BV-2 cells. Therefore, the TLF of sea cucumber enzymatic hydrolysate may have certain effects of anti-neuroinflammation and Alzheimer's disease, and the chemical structure of specific active substances needs further analysis and identification.

(本文编辑: 康亦兼)