

# $\lambda$ -卡拉胶降解组分的分离纯化、抗氧化及免疫活性研究

周革非, 魏元臣, 孔娜娜, 王长海

(烟台大学 海洋学院, 山东 烟台 264005)

**摘要:**采用离子交换纤维素色谱 DE52 柱对微波降解所得  $\lambda$ -卡拉胶(PC2)进行分级,得到 3 个  $\lambda$ -卡拉胶降解组分(CF1、CF2、CF3)。同时,通过光度法研究了 CF1、CF2 和 CF3 清除羟基自由基( $\cdot\text{OH}$ )、超氧阴离子( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )和  $\text{H}_2\text{O}_2$  的活性及体外免疫活性。结果表明,3 个多糖组分均具有不同程度的清除自由基及促进淋巴细胞增殖的作用,其中,硫酸基含量高的 CF3 具有较好的抗氧化活性(CF1、CF2、CF3 清除  $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$  和  $\text{H}_2\text{O}_2$  的  $\text{IC}_{50}$  值分别为:0.217、0.619、0.087 g/L,0.166、0.214、0.090 g/L 和 0.602、1.060、0.261 g/L),而分子质量较小的 CF1 具有较好的体外免疫活性,说明  $\lambda$ -卡拉胶的生物活性不仅与硫酸基含量有关,还与分子质量大小有关。

**关键词:** $\lambda$ -卡拉胶;降解;抗氧化活性;分离纯化;体外免疫活性

**中图分类号:**Q949.2

**文献标识码:**A

**文章编号:**1000-3096(2009)08-0058-05

卡拉胶(Carrageenan)又名角叉菜胶、鹿角藻胶,是从红藻中提取的一种高分子亲水性多糖。根据其半乳糖残基上硫酸酯基团的不同,可分为  $\kappa$ -型、 $\iota$ -型、 $\lambda$ -型、 $\mu$ -型等 7 种最小重复结构单位。 $\lambda$ -卡拉胶是一种高硫酸酯化的天然多糖资源,其降解产物  $\lambda$ -卡拉胶寡糖的活性研究已得到充分的开展,如抗凝血、抗病毒、抗肿瘤等<sup>[1,2]</sup>。国内外的研究者从提取、结构、活性等方面对卡拉胶进行了研究<sup>[1,3]</sup>。但对微波降解的  $\lambda$ -卡拉胶组分生物活性研究未见报道。

由于微波降解可导致  $\lambda$ -卡拉胶降解产物的不均一性,从而得到分子质量、硫酸基含量等不同的多糖组分,便于探讨多糖生物活性的作用机制。本工作对微波降解法得到的  $\lambda$ -卡拉胶降解产物 PC2<sup>[3]</sup>,采用离子交换纤维素色谱进行分离纯化,并探讨了其体外抗氧化和免疫活性,以期通过对微波降解的  $\lambda$ -卡拉胶组分的分离及相关活性的研究,以明确多糖组分的生理功能,为  $\lambda$ -卡拉胶的进一步开发利用提供理论基础。

## 1 实验材料与仪器

### 1.1 原料

$\lambda$ -卡拉胶降解组分 PC2 是从青岛太平角沿海角叉菜(*Chondrus crispus*)中分离纯化、微波降解所得<sup>[3]</sup>。

### 1.2 试剂

DEAE 纤维素 DE52,美国 Whatman 公司;硫代巴比妥酸(TBA),上海试剂二厂;RPMI1640 培养液,美国 HyClone 公司,Milli-Q 水配制,加 10% 小牛血清、双抗、HEPES,过滤除菌分装;小牛血清,美国 HyClone 公司,56℃ 灭活;氯化硝基四氮唑蓝(NBT)为上海前进试剂厂产品;酵母多糖 A,3-(4,5-二甲基噻唑-2 酰基)-2,5 二苯基四氮唑溴盐(MTT 或噻唑蓝),Sigma 公司产品;DMSO,上海生工生物工程股份有限公司,AMRESCO 分装;其余试剂均为分析

纯试剂及生化试剂。

昆明种小鼠,雄性,质量 32 g,购自山东省实验动物中心。

### 1.3 仪器

WD-9403A 型荧光-紫外分析仪(紫外光源波长 254、300、365 nm),北京市六一仪器厂生产;Agilent1100 型高效液相色谱仪,美国安捷伦科技有限公司;ELX-800 酶联免疫检测仪,美国 Bio-Tek Instruments INC;CO<sub>2</sub> 培养箱,美国希尔顿公司产品;96 孔细胞培养板,美国 Coastrar 公司产品。

## 2 实验方法

### 2.1 粗多糖的分级与纯化

通过离子交换纤维素色谱对卡拉胶降解组分 PC2 进行分级。PC2 溶于蒸馏水,加到以蒸馏水预先平衡好的 DEAE-纤维素 DE52 柱(2.5 cm×40 cm)上,通过分步洗脱得到不同的级分。首先以蒸馏水进行洗脱,然后依次用 0.5、1.0、1.5、2.0 mol/L NaCl 溶液进行洗脱。洗脱液以苯酚-硫酸法检测,每一洗脱组分直到检测不到多糖成分后,再换下一浓度的洗脱液进行洗脱。收集每一级分的洗脱液,三氯乙酸法去除蛋白,过滤,透析,减压浓缩,最后冷冻干燥得到纯化的样品。

收稿日期:2008-10-16;修回日期:2009-02-24

基金项目:山东省中青年科学家科研奖励基金资助项目(2008BS06012);烟台市科学技术发展计划项目(2008GGA0020080410084458)

作者简介:周革非(1968-),女,山东烟台人,博士,副教授,研究方向:海洋生物活性物质,E-mail:zhougf3325@sina.com,电话:13792559255;王长海,通信作者,男,博士,教授,研究方向为海洋生物化工,E-mail:chwang2001@sina.com

## 2.2 理化性质测定

### 2.2.1 硫酸基含量测定

采用氯化钡-明胶法<sup>[4]</sup>将样品数据代入硫酸基标准曲线回归方程,可得样品的硫酸基含量。

### 2.2.2 紫外光谱分析

将多糖样品配成 0.1% 水溶液,在 LabTeach UV-1100 型紫外分析仪上对 200~500 nm 区间进行扫描。

### 2.2.3 多糖分子质量测定

样品 CF1、CF2、CF3 及标准多糖 Dextran T 系列用 ddH<sub>2</sub>O 溶解,并配成质量分数为 0.2% 的溶液,分别经 HPGPC 分离,根据峰型判断样品纯度,由标准多糖的分子质量对数与洗脱体积求得标准曲线,再由标准曲线求得样品的平均分子质量<sup>[5]</sup>。色谱实验条件:色谱柱为 TSKGel-4000 Pw 凝胶色谱柱(10 μm,7.5 mm×300 mm),流动相为水,流速为 0.5 mL/min,进样量为 20 μL,示差检测器检测,柱温为 35℃,分析时间为 45 min。

## 2.3 红细胞的制备<sup>[6]</sup>

小鼠摘眼球取血,肝素抗凝,2 000 g×6 min 离心,弃血浆,所剩红细胞用 4 倍量生理盐水洗涤及同法离心,洗 3 次后用生理盐水悬浮,调红细胞体积分数为 0.5%,贮存备用。

## 2.4 中性粒细胞的制备<sup>[6]</sup>

小鼠腹腔注射液体石蜡 10 mL,48 h 后脱颈处死,4℃ Hanks(Ca<sup>2+</sup> 1.3 mmol/L,Mg<sup>2+</sup> 0.8 mmol/L,Glucose 10.0 mmol/L,pH7.4)分 3 次抽洗出腹腔渗出液,4℃,500 g×10 min 离心,弃上清,4 倍量 Hanks 液洗涤及同法离心,洗 3 次后用 Hanks 液悬浮,调中性粒细胞计数为 1×10<sup>6</sup>/L,低温贮存备用。

## 2.5 对小鼠肝匀浆脂质过氧化作用的测定<sup>[7]</sup>

健康昆明种小鼠,雄性,质量 32 g,摘眼球取血后,迅速分离肝组织,将肝组织用冰冷的 Tris-HCl 缓冲液(20 mmol/L)经研磨棒制备成 20% 的肝匀浆。

使反应体系中含肝匀浆液 0.2 mL,FeSO<sub>4</sub> 的终浓度为 10 μmol/L,V<sub>C</sub> 的终浓度为 0.1 mmol/L。不同浓度的多糖,在 37℃ 温浴 1 h,保温结束后加入 20% 三氯乙酸(TCA)1.0 mL 终止反应,混匀,再加入 0.67% 硫代巴比妥酸(TBA)1.5 mL,沸水浴加热 15 min。离心去除蛋白质沉淀后,于 532 nm 测定吸光度(以 Tris-HCl 缓冲液为空白)。

## 2.6 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱发小鼠红细胞氧化溶血的测定<sup>[6]</sup>

取红细胞悬浮液 1 mL,加入 100 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (空白管不加 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)及多糖,37℃ 温育 1 h,加 4 倍量生理盐水稀释,3 000 g×6 min 离心,上清液于 415 nm

处测 A。用线性回归求算 IC<sub>50</sub>。

$$\text{溶血度} = (A_{\text{测试}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$$

## 2.7 多糖刺激小鼠中性粒细胞生成 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的测定<sup>[6]</sup>

取中性粒细胞悬浮液 1 mL,按 NBT 还原法测定 O<sub>2</sub><sup>-</sup> ·,用吡啶作参比,515 nm 处测吸光值 A,以 NBT 还原物甲替的量反映 O<sub>2</sub><sup>-</sup> · 的变化。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{测试}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$$

## 2.8 小鼠脾淋巴细胞增殖实验

取昆明种小鼠,颈椎脱臼处死,75%酒精浸泡 10 min,无菌条件下剖开小鼠腹腔取脾,研磨过 100 目筛网,Hank's 液冲洗,收集分离的脾细胞悬液,5 000 r/min 离心 5 min,弃上清;加红细胞裂解液 10 mL,混匀脾细胞,静置 4~5 min,待红细胞完全破碎,5 000 r/min 离心 5 min,弃上清去除红细胞,Hank's 液洗 2~3 遍,用 RPMI-1640 培养液(含 2% 的胎牛血清)重悬细胞,计数调整细胞密度为 8×10<sup>6</sup>~10×10<sup>6</sup> 个/mL。

于 96 孔培养板中,每孔加入 100 μL 细胞悬液,再加 100 μL 培养液(空白对照)、10 mg/L ConA(阳性对照)及含有不同浓度的 λ-卡拉胶,使其最终质量浓度分别为 25、50、100、200、400 mg/L,置 5%CO<sub>2</sub>,37℃ 培养 48 h。MTT 法检测。

## 3 结果与分析

### 3.1 多糖洗脱级分及洗脱曲线

保持柱温 25℃,柱床体积 100 mL,洗脱流速 0.5 mL/min,本实验中可收集到 3 个分离较好的组分,它们分别为:经 200 mL 的 0.5 mol/L NaCl 溶液洗脱得到 CF1,200 mL 的 1.0 mol/L NaCl 溶液洗脱得到 CF2,300 mL 的 1.5 mol/L NaCl 溶液洗脱得到 CF3,蒸馏水洗脱和 2.0 mol/L 的洗脱部分基本未检测到多糖(图 1)。

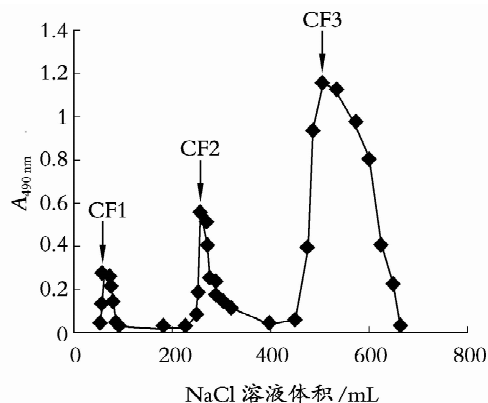


图 1 PC2 在 DEAE-52 柱上的洗脱曲线

Fig. 1 Elution curve of PC2 on DEAE-52 column

### 3.2 多糖组分的理化性质

在 190~500 nm 范围内对角叉菜多糖进行紫外光谱扫描,在 260~280 nm 范围内没有吸收,表明没有蛋白质与核酸;再经 TSK 柱进行纯度鉴定,CF1、CF2 和 CF3 在 HPGPC 中均呈现为单一对称尖峰,表明三者均为均一多糖组分。根据标准曲线  $\lg M_w = -3.0649K_{av} + 6.445$ ,  $r = 0.9981$ ,可确定多糖组分的平均分子质量,由硫酸基标准曲线回归方程  $y = 2.1097x + 0.119$ ,  $R^2 = 0.9992$ ,测得多糖组分的硫酸基含量。结果如表 1 所示,样品 CF3 的硫酸基含量远高于 CF1 和 CF2,CF1 的最低;CF1 的平均分子质量最小,CF3 的最大。

表 1 多糖样品的理化性质

Tab. 1 Physico-chemical property of polysaccharides

| 多糖  | 硫酸基质量<br>分数(%) | 蛋白质质量<br>分数(%) | 平均分子<br>质量(u)       | 样品纯度 |
|-----|----------------|----------------|---------------------|------|
| CF1 | 2.94±0.36      | —              | 3.8×10 <sup>4</sup> | 均一多糖 |
| CF2 | 7.83±0.15      | —              | 6.0×10 <sup>4</sup> | 均一多糖 |
| CF3 | 37.52±0.29     | —              | 2.0×10 <sup>5</sup> | 均一多糖 |

### 3.3 多糖对肝组织脂质过氧化的影响

丙二醛是脂质过氧化生成的过氧化物的最终分解产物,其含量常常反映机体细胞脂质过氧化程度,也间接反映细胞受自由基攻击的严重程度。由图 2 可以看出,各多糖组分的 5 个剂量组小鼠肝匀浆中的 MDA 含量均随浓度的增加,MDA 生成的抑制率相应增高。CF3 的抑制效果最好,IC<sub>50</sub> 为 0.087 g/L,CF2 的抑制效果最差,IC<sub>50</sub> 为 0.619 g/L。经方差分析,发现各多糖组分不同浓度组对脂质过氧化的抑制作用差异极显著( $P < 0.01$ )。

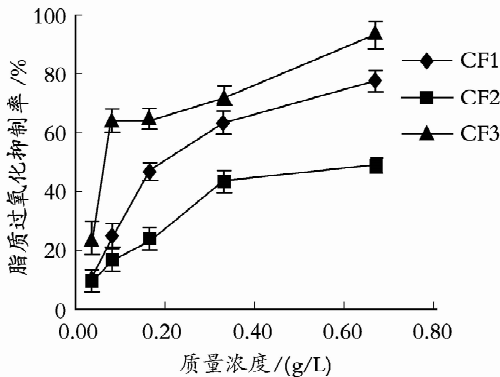


图 2 CF1、CF2 和 CF3 对小鼠肝匀浆脂质过氧化的影响  
Fig. 2 Effects of CF1, CF2 and CF3 on lipid peroxide of liver homogenate

### 3.4 多糖对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导小鼠红细胞溶血的抑制作用

小鼠红细胞经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱发后吸光值增加,溶血度显著高于正常组,说明 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可以氧化红细胞膜,导致胞内容物外流<sup>[8]</sup>。加入多糖组分后,各个剂量组溶血度显著低于对照。表明多糖可抑制红细胞的氧化损伤,保护红细胞膜,且溶血率随多糖浓度的增加而降低。从图 3 可以看出,各多糖组分抑制溶血效果均较好。CF1、CF2 和 CF3 的 IC<sub>50</sub> 分别为 0.602、1.060 和 0.261 g/L,其中 CF3 的抑制效果最好。经方差分析,发现各多糖组分不同浓度组对小鼠红细胞溶血的抑制作用差异极显著( $P < 0.01$ )。

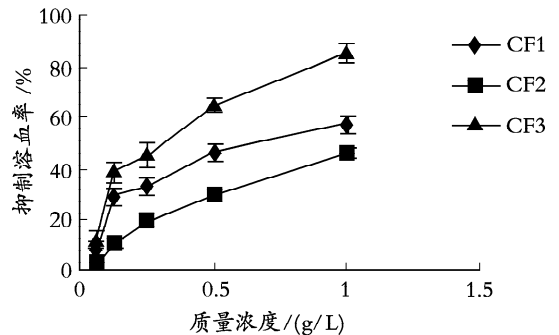


图 3 CF1、CF2 和 CF3 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导小鼠红细胞溶血的影响  
Fig. 3 Effects of CF1, CF2 and CF3 on RBC hemolysis induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### 3.5 多糖对小鼠中性粒细胞生成 O<sub>2</sub><sup>-</sup> · 的影响

小鼠中性粒细胞受酵母多糖 A 刺激后 O<sub>2</sub><sup>-</sup> · 显著升高,加入多糖的样品组不同程度抑制酵母多糖 A 刺激小鼠中性粒细胞生成 O<sub>2</sub><sup>-</sup> · 。从图 4 可以看出,CF3 的抑制效果最好,IC<sub>50</sub> 为 0.090 g/L。CF1 和 CF2 的抑制效果相当,其 IC<sub>50</sub> 分别为 0.166 g/L 和 0.214 g/L。经方差分析,发现各多糖组分不同浓度组对小鼠中性粒细胞生成 O<sub>2</sub><sup>-</sup> · 的抑制作用差异极显著( $P < 0.01$ )。

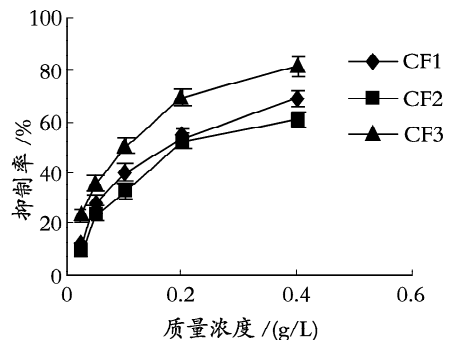


图 4 CF1、CF2 和 CF3 对小鼠中性白细胞生成 O<sub>2</sub><sup>-</sup> · 的影响  
Fig. 4 Effects of CF1, CF2 and CF3 on O<sub>2</sub><sup>-</sup> · from zymosan-stimulated neutrophils of mice

### 3.6 多糖对脾淋巴细胞增殖能力的作用

从图 5 可以看出,CF1、CF2 和 CF3 均有体外刺激淋巴细胞增殖的作用,且随浓度的增大而加强,但

增殖效果均小于阳性药物 ConA。CF1 的增殖效果最显著,仅次于阳性药;在样品终质量浓度在 50~200 mg/L 时,CF2 与 CF3 对淋巴细胞的增殖率接近。

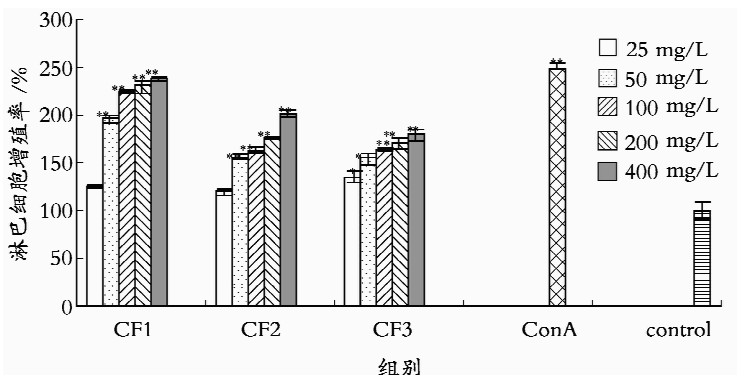


图 5 CF1、CF2 和 CF3 对淋巴细胞的增殖作用

Fig. 5 Effects of CF1, CF2 and CF3 on the proliferation of mouse peritoneal macrophage

ConA 为阳性药物;control 为不加多糖组; \* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$

Note ConA is the positive medicine; control presents the group without polysaccharides; \* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$

## 4 讨论

多糖是继蛋白质、核酸之后的又一信息分子,是构成生物体的一类十分重要的有机化合物,是生命的物质基础。海藻多糖作为药物和药物中间体的潜在功能,只是最近几年才被认识,实验和临床已经发现海藻多糖具有免疫调节、降血压、抗氧化等生物活性。

国内外研究表明,多糖具有较好的清除自由基和抗氧化作用。生物体内自由基的生成与清除的平衡对生命过程的正常进行是十分重要的,Cuzzocrea 等<sup>[9]</sup>的研究证实不少疾病如肿瘤、炎症、衰老等的起因和发展与自由基和脂质过氧化作用有关。因此,寻找抑制自由基和脂质过氧化的物质越来越受到生物学家和医学家的重视。

免疫调节作用是多糖类物质最基本的作用之一<sup>[10]</sup>,近年来分子水平研究表明,多糖是通过与淋巴细胞表面多糖受体相结合,影响淋巴细胞的信息传递过程,从而影响淋巴细胞基因表达和淋巴细胞功能,调节机体免疫功能<sup>[11]</sup>。

多糖具有较强的生物活性,但由于多糖结构的不均一性,如分子质量过大、难溶解、极性、组成的不均一,因此它的分离纯化和鉴定存在一定的困难,这在一定程度上限制了多糖生物活性的研究。目前的研究多以粗多糖为研究对象,少有均一多糖活性方面的研究报道。为了更好地研究多糖的作用机制及多糖活性与其结构的相关性,必须以均一多糖为主要的研究对象。本实验通过对密闭微波降解后的  $\lambda$ -卡拉胶分离纯化,得到 3 个均一多糖组分 (CF1、CF2、CF3)。理化性质测定结果表明 CF3 的硫酸基

含量最高,分子质量最大;CF1 的硫酸基含量最低,分子质量最小。卡拉胶对肝组织脂质过氧化的实验中,CF1、CF2、CF3 的  $IC_{50}$  分别为 0.217、0.619、0.087 g/L;卡拉胶对  $H_2O_2$  诱导小鼠红细胞溶血实验中,CF1、CF2、CF3 的  $IC_{50}$  分别为 0.602、1.060、0.261 g/L;卡拉胶对小鼠中性粒细胞生成  $O_2^{\cdot-}$  的实验中, $IC_{50}$  分别为 0.166、0.214、0.090 g/L。三个抗氧化实验结果均显示硫酸基含量最高的 CF3 具有较好的抗氧化效果,CF1 次之,CF2 最弱,说明多糖硫酸基的含量对抗氧化效果影响较大。体外免疫实验显示最小分子质量的 CF1 免疫效果最好,CF3 的效果最差,表明免疫实验与多糖分子质量具有密切关系。以上实验结果表明,卡拉胶的生物活性不仅与硫酸基含量有关,还与分子质量大小有关。但具体机制还需进一步实验证明。

### 参考文献:

- [1] Guven K C, Ozsoy Y, Ulutin O N. Anticoagulant, fibrinolytic and antiaggregant activity of carrageenans and alginate acid [J]. *BotMar*, 1991, 34: 429-432.
- [2] Luescher-Mattli M. Algae, a possible source for new drugs in the treatment of HIV and other viral diseases [J]. *Curr Med Chem Anti-Infect Agents*, 2003, 2: 219-225.
- [3] Zhou Gefei, Yao Wenhong, Wang Changhai, *et al.* Kinetics of microwave degradation of lambda-carrageenan from *Chondrus ocellatus* [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2006, 64(1): 73-77.
- [4] Dobios M, Gilles K A, Hamiton J K, *et al.* Colorimetric method for determination of sugar and related substances [J]. *Anal Chem*, 1956, 28: 350-355.

- [5] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术 [M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2003. 117-120.
- [6] 葛斌, 陈立德, 张振明. 4-磺酸酯-2, 2, 6, 6-四甲基哌啶氮氧自由基对大鼠组织和红细胞的抗脂质过氧化作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2001, **15**(1): 47-50.
- [7] 张全斌, 于鹏展, 周革非, 等. 海带褐藻多糖硫酸酯的抗氧化活性的研究 [J]. 中草药, 2003, **34**(9): 11-13.
- [8] 李俊丽, 王运强, 向长萍. 南瓜水溶性多糖的体外抗氧化作用 [J]. 华中农业大学学报, 2007, **26**(2): 256-259.
- [9] Cuzzocrea S, Riley D, Caputi A P, *et al.* Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/Reperfusion injury [J]. **Pharmacol Reviews**, 2001, **53**: 135-159.
- [10] 苏子峰, 戴志明, 杨建发. 多糖免疫机制研究进展 [J]. 云南农业大学学报, 2006, **21**(2): 205-209.
- [11] Jamas S, Easson D, Strofe G R O, *et al.* Method for producing soluble glucan [P]. United States Patent, 5633369. 1997.

## Research on preparation, antioxidant function and immunomodulatory function of degraded lambda-carrageenan

ZHOU Ge-fei, WEI Yuan-chen, KONG Na-na, WANG Chang-hai

(Ocean School of Yantai University, Yantai 264005, China)

**Received:** Oct. , 16, 2008

**Key words:** lambda-carrageenan; degraded; antioxidant activity; separation and purification; immunomodulatory

**Abstract:** Three kinds of polysaccharides(CF1, CF2 and CF3) were prepared by anion-exchange column chromatography from degraded lambda-carrageenan PC2 which was obtained by microwave technique. The effects of CF1, CF2 and CF3 on clearing hydroxyl radical, superoxide anion radical and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> have been studied on the paper. The results showed that all three principles had scavenging effects on radical and could advance the immunity of healthy mice. The intensities of the scavenging effects were relative to the molecular weight and sulfite contents. The lower the molecular weight of lambda-carrageenan was, the stronger the immunomodulatory was. The higher the sulfite contents of lambda-carrageenan was, the stronger the intensity of scavenging was. The IC<sub>50</sub> values of CF1, CF2 and CF3 on clearing hydroxyl radical, superoxide anion radical and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were 0.217, 0.619, 0.087 g/L; 0.166, 0.214, 0.090 g/L; 0.602, 1.060, 0.261 g/L respectively.

(本文编辑:康亦兼)