

大米草中生物活性物质的筛选

徐年军, 严小军, 徐继林, 马红辉

(宁波大学 海洋生物工程重点实验室, 浙江 宁波, 315211)

摘要: 大米草 (*Spartina anglica*) 是一种资源丰富的盐沼植物, 目前已在中国沿海大量分布, 综合开发利用大米草具有重要的生态意义和经济效益。利用硅胶柱层析方法分离大米草甲醇提取物, 再分别用 DPPH 法、纸碟法和 MTT 法对大米草中 40 多个组分进行了抗氧化、抗菌和抗肿瘤活性的筛选。结果得到抗氧化活性组分 5 个、抗菌活性组分 2 个、抗肿瘤活性组分 3 个。目前对其活性先导化合物的分离纯化研究正在进行中。

关键词: 大米草 (*Spartina anglica*); 抗氧化; 抗菌; 抗肿瘤

中图分类号: S986.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096 (2005) 03-0017-03

大米草是一种具有重要生态意义的抗盐植物, 中国的大米草是 1963 年首次从英国引进的。最初主要考虑到其能够防护海堤海岸, 促淤造陆^[1]。但由于其巨大的生长速度和繁殖能力, 如今已广泛分布于中国沿海滩涂, 给滩涂养殖业造成了较大的破坏。全世界都在寻找大米草防除的良方, 但目前还没有公认有效的办法^[2]。关于大米草生理生态研究已经有较多的文献报道^[3-6], 但其生物活性物质及相关的化学成分方面研究尚未见报道。为更好开发利用这种生物资源, 有必要对其次生代谢物进行系统研究。作者对大米草提取物及其初级分离样品进行了抗氧化、抗菌、抗肿瘤活性的筛选, 找到了一些有重要生物活性的活性部位, 为进一步进行深入的化学成分分析和药物研究打下了基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

大米草 (*Spartina anglica* C. E. Hubbard) 样品于 2003 年 6 月采于浙江宁海县三门湾沿海。

1.2 提取方法

大米草的主干部分粉碎后用工业甲醇浸泡提取 3 次, 每次 5 d。用旋转蒸发器蒸干后, 萃取分成乙酸乙酯相和水相。

1.3 柱层析分离

乙酸乙酯相样品分别用石油醚:丙酮、二氯甲烷:甲醇梯度洗脱成 45 个组分。对其中主要组分进行生物活性测定。

1.4 抗氧化测定

按照 DPPH 法^[7]。准确称取柱分离组分各 1 mg, 用丙酮溶解成 0.2 mg/L。取 1 mL 待测样品加入 2 mL 新配置的 DPPH 液 (6×10^{-5} mg/L) 中, 30 min 后测其 A_{517} 值。平行测定 3 次, 取平均值后根据以下公式计算自由基清除率:

$$\text{清除率}(\%) = [1 - (A_i - A_j) / A_0] \times 100\%$$

其中, 样品的吸光值 $A_i = 2$ mL DPPH + 1 mL 待测样品, 阴性对照吸光值 $A_j = 2$ mL DPPH + 1 mL DPPH, 溶剂的吸光值 $A_0 = 2$ mL DPPH + 1 mL 丙酮溶剂。

1.5 抗菌活性测定

纸碟法: 主要实验菌为金黄色葡萄球菌。将活化后菌体在液体培养基中培养 1 d 后, 取 2 mL 与 100 mL 溶化的固体培养基 (40℃) 混合倒上层平板。每个培养皿 10 mL, 凝固后倒置冰箱中过夜。将 1 mg 待测样品加到滤纸片上, 待其挥发干燥后放在培养皿中, 37℃ 培养。用青霉素做阳性对照, 用加有二氯甲烷溶剂的滤纸片做空白对照。上述每个样品 2 个

收稿日期: 2004-03-28; 修回日期: 2004-09-20

基金项目: 宁波市重点博士基金项目 (2004A610012)

作者简介: 徐年军 (1973-), 男, 湖北赤壁人, 博士, 助研, 从事海洋生物资源及海洋药物研究, E-mail: xunianjun@nbu.edu.cn

平行样，结果取平均值。

1.6 抗肿瘤活性测定

MTT法：测定的细胞系有人口腔癌KB细胞、人宫颈癌Hela细胞和作为对照的临床分离正常细胞L-02。取对数生长期的细胞，加入适量Trypsin-EDTA液，使贴壁细胞脱落，用10 mL含5%胎牛血清的RPMI 1640培养液配成细胞悬液。在96孔培养板中，依次加入稀释后的细胞悬液100 μL，于37℃、5%CO₂培养24 h，再加待测样品至终浓度250 mg/L。相同条件下培养2 d，再加入1 mg/mL的MTT 50 μL，于37℃培养4 h，反应完毕后加150 μL DMSO（二甲基亚砷）溶解，用酶联免疫检测仪测A₅₅₀值。

表1 大米草乙酸乙酯相级分组分的抗氧化活性

Tab. 1 The antioxidative activities of the EtOAc fraction from *Spartina anglica*

样品	自由基清除率 (%)	样品	自由基清除率 (%)	样品	自由基清除率 (%)
D2	1.74	D19	16.56	D32	45.63
D4	3.78	D21	16.50	D33	37.07
D7	4.01	D23	31.25	D36	22.13
D9	4.42	D25	95.58	D38	18.72
D11	3.17	D26	93.12	D40	15.60
D13	2.21	D28	84.54	D43	10.32
D15	8.31	D29	95.12	D45	12.70
D17	8.29	D30	83.51		

结果显示，大米草乙酸乙酯相中D25、D26、D28、D29、D30组分都具有较强的抗氧化活性，在200 mg/L浓度下的自由基清除率都在83.51%~95.58%。而且，由于以上5个样品是通过柱层析连续获得的，而各组分的自由基清除活性具有2个极限峰，因而从理论上可以肯定这些组分中至少含有两类抗氧化活性成分。通过进一步分析，其分别可能含生物碱类和黄酮类物质。

2.3 大米草的抗菌活性

对大米草乙酸乙酯相和水相样品分别进行抗菌活性测定，实验表明其乙酸乙酯相有一定的抗菌活性，对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径平均为9.9 mm，而水相样品基本上不具有抗菌活性。对乙酸乙酯相进行层析分离得到的6个主要样品的活性检测结果显示有两个组分具有较强的活性。其中D19的抑菌圈直径为13.8 mm，D25的抑菌圈直径为16.9 mm。通过分析，D19为酚类物质，D25可能含生物碱类物质。

2.4 大米草的抗肿瘤活性

2 结果与分析

2.1 大米草抗氧化活性

对大米草提取物经萃取后的两相样品分别进行抗氧化活性测定。结果显示：大米草乙酸乙酯相样品具有较强的抗氧化活性，其对自由基的清除率约为48.71%，而水相样品的抑制活性较低，其自由基清除率为13.56%。

2.2 大米草乙酸乙酯相的抗氧化活性

由于大米草的乙酸乙酯相中可能含有某些抗氧化活性成分。作者对其进行了初步的硅胶柱梯度层析，分离得到45个级分组分，对其中样品量较大的进行了抗氧化活性测定。结果如表1。

对大米草乙酸乙酯相、水相分别进行抗肿瘤活性测定，结果发现大米草乙酸乙酯相具有一定的抗肿瘤活性，而水相基本上没有。因此，本实验进一步设计对大米草乙酸乙酯相的级分组分进行活性测定，结果见表2。

表2显示多个组分具有抑制肿瘤细胞的活性，其中D15、D19、D25、D29、D32、D33的抑制率超过50%。在这6个具有较强的抗肿瘤活性的样品中，其中3个（D15、D25和D33）具有选择性细胞毒活性。由于这3个样品的样品量较大，拟对其进行进一步的活性跟踪的分离纯化。根据这些样品在实验过程中表现的特性，对其进行了基本的定性，其中D2、D4可能是甾醇类化合物，而D7可能含有有机酸。D15可能含黄酮类物质，D19可能含酚类化合物，D25可能含生物碱类化合物，D33可能含皂甙类物质。

3 讨论

大米草是一种重要的入侵生物，生物量非常大，如今已经在我国造成了较大的生态危害和经济

表2 大米草乙酸乙酯相柱层析组分对肿瘤的选择性抑制活性(%)

Tab. 2 Selective inhibition rate of the EtOAc fraction in *Spartina anglica* against tumor cells(%)

样品	肿瘤细胞 Hela	肿瘤细胞 KB	正常细胞 L-02	样品	肿瘤细胞 Hela	肿瘤细胞 KB	正常细胞 L-02
D2	-8.6	-1.2	-21.1	D26	+22.1	+34.7	+19.6
D4	-1.4	+5.2	-16.7	D28	-14.7	-3.8	-21.5
D7	-3.8	+1.3	-21.0	D29	-54.7	-50.9	-40.1
D12	-13.3	-12.0	-29.0	D30	-46.5	-45.6	-50.2
D13	-21.1	-32.5	-35.2	D32	-55.7	-59.2	-55.0
D14	-20.1	-26.0	-38.5	D33	-53.4	-58.0	-33.6
D15	-32.0	-50.9	-19.9	D37	-19.2	-40.9	-7.4
D19	-57.5	-39.0	-49.3	D39	+28.9	-36.6	+20.9
D23	-10.6	-22.6	-14.7	D42	+29.5	-30.6	+4.4
D25	-55.5	-53.8	-28.4	D45	+13.2	-18.6	+9.1

损失。如何有效地防除和利用大米草，现在还没有良好的对策。虽然大米草中的生物活性物质没有相关的文献报道，但其同属的互花米草 (*Spartina alterniflora* Loisel) 中已经开发出具有治疗心血管疾病、抗炎症、降血脂、增强免疫等活性的生物矿质液^[8, 9]。作者对大米草进行生物活性物质的筛选，旨在寻找这种盐沼植物的药用功能，从而为综合利用大米草提供理论依据。

本研究中检测到的主要活性组分均为极性较低的乙酸乙酯相，而极性较高的水相在3种检测中都不具有活性。其中有抗氧化活性的组分为D25、D26、D28、D29、D30，有抗菌活性的组分为D19、D25，有抗肿瘤活性的组分为D15、D25、D33。综合以上活性筛选结果，D25样品同时具有3种生物活性，且含量较高。我们将其作为重点研究对象，进一步分离其有效活性成分。

参考文献:

[1] 唐廷贵, 张万钧. 论中国海岸带大米草生态工程效益与“生态入侵”[J]. 中国工程科学, 2003, 5(3): 15-20.

[2] 王蔚, 张凯, 汝少国. 米草生物入侵现状及防治技术研究进展[J]. 海洋科学, 2003, 27(7): 38-42.

[3] 陈国祥, 刘冬, 魏锦城. 盐生植物大米草 PS II 颗粒的放氧活性及多肽组分[J]. 南京师大学报(自然科学版), 1996, 19(4): 36-39.

[4] 庄树宏, 王克明, 曲复宁. 三种生态型大米草在逆境条件下同工酶表达的差异[J]. 烟台大学学报(自然科学与工学版), 1998, 11(3): 188-194.

[5] 张平宇, 王颖, 卢青, 等. 大米草盐胁迫蛋白的表达及 cDNA 文库的构建[J]. 草业学报, 1998, 7(4): 67-73.

[6] Baumel A, Ainouche M L, Levasseur J E. Molecular investigations in populations of *Spartina anglica* C.E. Hubbard invading coastal Brittany (France)[J]. *Mol Ecol*, 2001, 10(7): 1 689-1 701.

[7] Yan X, Nagata T, Fan X. Antioxidative activities in some common seaweeds[J]. *Plant Foods for Human Nutrition*, 1998, 52(3): 253-262.

[8] Qin P, Xie M, Jiang Y. *Spartina* green food ecological engineering[J]. *Ecol Eng*, 1998, 11(1-4): 147-156.

[9] 胡芝华, 钦佩, 蔡鸣, 等. 互花米草总黄酮降血脂作用研究[J]. 海洋科学, 1998, 22(2): 16-18.

(下转第24页)

Study of antihypertensive effect of polypeptides from *Acetes chinensis* on renovascular antihypertensive rats

FU Xue-yan¹, XUE Chang-hu¹, NING Yan², XU Ping¹, MIAO Ben-chun³

(1. Department of Foods Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Pharmacy of Taidong, Qingdao 266003, China; 3. Department of Pharmacology, Marine Drug and Food Institute, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Received: Nov., 16, 2003

Key words: polypeptides; renovascular hypertensive rats; Ang II; antihypertensive effect

Abstract: To investigate the antihypertensive effects of polypeptides prepared from *Acetes chinensis* on renovascular hypertensive rats (RHR) and related mechanisms, polypeptides were prepared from *Acetes chinensis* with alkaline and neutral proteases, and the effects of these two polypeptides on the activity of ACE were measured by Cushman-Cheung assay *in vitro*. RHR models were made with two-kidney one clip assay, and antihypertensive effects were studied in RHR pretreated with polypeptides for long course or by acute venous injection. Arterial blood pressure, respiration and plasma angiotensin II (Ang II) were measured respectively. The two polypeptides markedly inhibited the activity of ACE *in vitro* with IC₅₀ of AP (15.61 mg/L) and NP (16.95 mg/L). They remarkably reduced the arterial blood pressure in the two cases referred above. Plasma Ang II of RHR greatly decreased after pretreated with the polypeptides. Respiration of RHR had the same variation trend as blood pressure. Moreover, AP showed stronger antihypertensive and Ang II-reducing effects than that of NP. The effects of 200 μg/g AP were similar to that of 14 μg/g captopril. Polypeptides from *Acetes chinensis* showed strong antihypertensive effects in RHR. One possible mechanisms underlying the antihypertensive effects may be associated with its actions on decreasing the production of Ang II.

(本文编辑: 张培新)

(上接第 19 页)

Screening of bioactive materials in *Spartina anglica*

XU Nian-jun, YAN Xiao-jun, XU Ji-lin, MA Hong-hui

(Key Laboratory of Marine Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Received: Mar., 28, 2004

Key words: *Spartina anglica*; antioxidant; antibacterial; antitumor

Abstract: *Spartina anglica* is a common marsh plant along coast of China. To explore its ecological and economic values, we screened more than 40 fractions of the extracts were screened by DPPH, paper disc and MTT methods, after *S. anglica* was methanol extracted of and isolated by silicon column chromatography, for antioxidant, antibacterial and antitumor activities. Results showed that 5 fractions could fight to antioxidant activities, 2 to bacteria, and 3 to tumor cells.

(本文编辑: 张培新)