

河蚬多糖分离纯化及抗氧化、抗肿瘤活性研究

Study on isolation, antioxidation and anti-tumor activities of polysaccharide in *Corbicula fluminea*

赵琪¹ 赵利¹ 杨玉婵¹ 陈丽丽¹ 袁美兰¹ 白春清¹

ZHAO Qi¹ ZHAO Li¹ YANG Yu-luan¹ CHEN Li-li¹ YUAN Mei-lan¹ BAI Chun-qing¹

(1. 江西科技师范大学生命科学学院, 江西南昌 330013; 2. 国家淡水鱼加工技术研发分中心〔南昌〕, 江西南昌 330013)

(1. College of Life Science, Jiangxi Science and Technology Normal University, Nanchang, Jiangxi 330013, China;

2. National R&D Branch Center for Freshwater Fish Processing, Nanchang, Jiangxi 330013, China)

摘要:采用 DEAE-52 纤维素色谱法和 SephadexTM G-100 葡聚糖凝胶色谱法对河蚬多糖进行分离纯化, 获得 CFP-1 和 CFP-2 两个纯化组分, 并对两组分进行紫外光谱和红外光谱扫描, 结果表明: 两组分中没有蛋白质和核酸, 并证明它们是多糖类物质。液相色谱分析得到 CFP-1 和 CFP-2 的平均相对分子质量分别为 1 172, 3 627 kD。对河蚬多糖的抗肿瘤、抗氧化活性研究表明: CFP-1 对人肝癌细胞 (HepG-2) 抑制作用较 CFP-2 明显, 作用 48 h 时, CFP-1 对人肝癌细胞的抑制活性 IC₅₀ 值为 0.24 mg/mL; 而在抗氧化活性方面 CFP-2 优于 CFP-1。

关键词:河蚬; 多糖; 分离纯化; 抗氧化

Abstract: CFP-1 and CFP-2 were purified from *Corbicula fluminea* by DEAE-52 cellulose anion-exchange chromatography and SephadexTM G-100 gel-filtration chromatography. The molecule structure was analyzed by ultraviolet spectrum scanning and infrared spectrum. Ultraviolet spectrum showed that CFP-1 and CFP-2 contained little DNA and protein, and infrared spectrum showed that both of them were polysaccharides. Purity of CFP-1 and CFP-2 was further confirmed by using HPLC, they were homogenous with a molecular weight of 1 172 kD and 3 627 kD. The result showed that CFP-1 could significantly inhibit proliferation of HepG-2 than CFP-2. with the IC₅₀ value of 0.24 mg/mL after 48 h treating. In addition, radical scavenging tests revealed that CFP-2 showed significant function of

antioxidation activity.

Keywords: *Corbicula fluminea*; polysaccharide; separation and purification; antioxidation activity

多糖参与生物体内各项生理活动, 是生命有机体不可缺少的重要成分^[1-2]。有机体中的多糖大多与其它大分子物质聚合在一起, 其提取方法主要有水提法、碱提法、氯化钠溶液提取法、酶提取法等^[3-4]。为了得到单一的多糖组分需要进行纯化, 多糖的分级纯化方法有沉淀法、盐析法、柱层析法等^[5]。近年来, 人们相继发现了多糖具有抗肿瘤、抗氧化等活性^[6-7]。目前关于研究贝类多糖的抗肿瘤作用的报道特别多。范秀萍等^[8]研究发现, 从珠母贝中提取的多糖对体外肿瘤细胞的生长具有显著的抑制作用。胡健饶等^[9]发现, 从三角帆蚌中提取的多糖对 HepA 癌细胞的增殖具有明显的抑制作用。贝类多糖对肿瘤细胞的抑制作用可能是具有细胞毒性作用, 抑制了肿瘤细胞 DNA 的合成^[10]。多糖的抗氧化活性可能是对肿瘤细胞抑制作用的机理之一。恶性肿瘤患者血液或组织中的脂质过氧化物含量增高, 而过氧化氢酶活性和超氧化物歧化酶的活性明显下降, DNA 被活性氧持续氧化损伤而不能得到有效修复导致细胞癌变。

河蚬 (*Corbicula fluminea*) 又称为黄蚬, 是一种淡水类贝壳, 在中国的江河湖泊中分布广泛, 天然资源十分丰富。本试验拟研究 DEAE-52 纤维素柱以及葡聚糖凝胶 SephadexTM G-100 对河蚬多糖的分离纯化效果; 河蚬多糖对体外培养的人肝癌 HepG-2 细胞活性的抑制效果, 通过研究河蚬多糖对 DPPH·、·OH、O₂^{-·} 的清除率以及对铁离子的还原力, 建立体外抗氧化模型来评价河蚬多糖的抗氧化活性, 为更好地了解河蚬多糖的抗氧化和抗肿瘤性提供依据。

基金项目:江西省科技厅发明专利产业化技术示范项目(编号: 20143BBM26108); 江西省教育厅科技重点项目(编号: GJJ12582); 江西省科技厅科技支撑重大项目(编号: 20152ACF60008)

作者简介:赵琪, 女, 江西科技师范大学在读硕士研究生。

通信作者:赵利(1967—), 女, 江西科技师范大学教授, 博士。

E-mail: lizhao618@hotmail.com

收稿日期:2017-02-26

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

河蚬:壳长 1.5~2.5 cm,采自鄱阳湖水域的鲜活河蚬。

DEAE-52 纤维素、葡聚糖凝胶 Sephadex™ G-100:北京索莱宝科技有限公司;

1, 1-二 苯 基-2-三 硝 基 苯 肼 (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, DPPH):纯度 > 97%,美国 Sigma 公司;

三吡啶吡嗪:纯度 > 98%,美国 Sigma 公司;

邻菲罗啉:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

其它试剂:分析纯,南康市华亿化工有限公司;

人肝癌 HeGp-2 细胞:南昌大学第一附属医院。

1.2 仪器与设备

全自动部分收集器:DBS 型,上海沪西仪器有限公司;

电脑定时恒流泵:DHL-B 型,上海沪西仪器有限公司;

层析柱:φ 2.5 cm×60 cm,上海华美实验仪器厂;

高效液相色谱仪:1100series 型,美国 Agilent 公司;

红外光谱仪:L-8900 型,日本日立公司;

全自动酶标仪:Mode 680 型,美国 Bio-rad 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 河蚬粗多糖的提取 取新鲜的河蚬吐沙 48 h(每 12 h 换一次清水),取肉、匀浆。取河蚬浆于酶反应器中进行水解,水解所用的酶为碱性蛋白酶 Alcalase,条件为水解温度 50 ℃,加酶量 2%,底物浓度 2%,起始 pH 为 8.5,水解得到河蚬酶解液^[11]。河蚬酶解液流经大孔吸附树脂层析柱,达到穿透点后,用去离子水冲洗至电导率与纯水相当,此流出液经减压浓缩、冷冻干燥得河蚬粗多糖粉末。

1.3.2 河蚬多糖的分离纯化

(1) DEAE-52 纤维素凝胶的预处理^[12]:称取 100 g DEAE-52 纤维素凝胶,先用大量蒸馏水浸泡 24 h 使其充分溶胀后,用碱液—酸液—碱液依次浸泡。每一次换浸泡液之前用大量蒸馏水洗反复冲洗至中性后再浸泡,浸泡所用酸液和碱液浓度为 0.5 mol/L 的盐酸溶液和氢氧化钠溶液,浸泡时间为 0.5 h,体积为 1 500 mL。

(2) DEAE-52 纤维素色谱柱法分离:称取 60 mg 河蚬粗多糖溶于 3 mL 蒸馏水中,缓慢加入层析柱中,然后打开层析柱下端止水夹使多糖溶液进入柱填料内,再缓慢加入 3 mL 蒸馏水,随后打开恒流泵用浓度分别为 0.0, 0.1, 0.2, 0.3 mol/L 的 NaCl 溶液进行梯度洗脱,流速为 1.0 mL/min,5 mL 自动收集 1 管,每梯度共收集 50 管^[13]。用苯酚—硫酸法^[14]检测各管在 490 nm 处吸光值,绘制 DEAE-52 纤维素色谱柱的洗脱曲线。收集峰值处的多糖溶液,经减压浓缩、蒸馏水透析、冷冻干燥得到粗多糖。

(3) Sephadex™ G-100 葡聚糖凝胶色谱柱的分离:Sephadex™ G-100 凝胶干粉 100 g 加入大量蒸馏水浸泡 12 h 后,进行湿法装柱,平衡备用^[15]。取河蚬粗多糖 20 mg,溶于 5 mL 蒸馏水中,从上端缓慢加入凝胶柱中,以蒸馏水洗脱,流速 0.2 mL/min,每 4 mL 自动收集 1 管,用苯酚—硫酸法

检测各管多糖溶液在 490 nm 处的吸光度值,绘制 Sephadex™ G-100 凝胶色谱柱洗脱曲线。收集主峰的部分多糖溶液,蒸馏水透析 2 d,45 ℃ 减压浓缩冷冻干燥即得多糖纯化产品。

1.3.3 河蚬多糖的紫外扫描图谱 用紫外可见分光光度计对浓度为 0.5 mg/mL 的河蚬多糖溶液进行扫描,波长范围为 200~400 nm。

1.3.4 河蚬多糖的红外扫描图谱 用溴化钾压片法来测河蚬多糖的红外图谱。

1.3.5 河蚬多糖分子量的测定以及纯度鉴定

(1) 分子量标准曲线的制作:用流动相将已知分子量的标准多糖配制成 1.0 mg/mL 的标准溶液,并用 0.45 μm 的滤膜进行过滤,采用 Agilent 1100series 型高效液相色谱仪进行分析,色谱柱为 PL aquagel-OH MIXED 8 μm,以静态光散射检测器和示差检测器进行检测。具体操作条件:检测器及柱温均为 25 ℃,流动相为浓度为 0.1 mol/L 的 NaNO₃ 的磷酸盐缓冲液,流速为 0.8 mL/min,进样体积为 20 μL。

(2) 样品多糖平均分子量的测定:称取多糖样品配制 1.0 mg/mL 溶液,测定方法同标准品的测定,并计算出多糖样品的平均分子量,鉴定其纯度。

1.3.6 河蚬多糖的抗氧化活性研究

(1) DPPH 自由基清除率的测定:参照 Li 等^[16]的方法。分别向试管中加入经过纯化的不同质量分数的河蚬多糖 CFP-1、CFP-2,然后再加入 0.1 mmol/L DPPH 溶液各 2 mL,涡漩振荡混匀,在暗室中反应 30 min,测波长 517 nm 处的吸光度值,并计算清除率。

$$K = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

K——DPPH 自由基清除率, %;

A₁——样品的吸光值;

A₀——以水代替河蚬提取液的对照试验的吸光值;

A₂——以无水乙醇代替 DPPH 溶液的样品干扰试验的吸光值。

(2) 羟自由基(·OH)清除率的测定:参照文献^[17],在 10 mL 试管中依次加入邻二氮菲(5 mmol/L)1.0 mL, PBS 缓冲液(0.2 mol/L pH 7.4)2.0 mL, 1.0 mL 纯化的河蚬多糖 CFP-1、CFP-2, H₂O₂ (0.1 mL/100 mL) 1.0 mL, 37 ℃ 水浴 1 h。用紫外—可见分光光度计测波长 536 nm 处的吸光度值,并计算清除率。

$$K = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

K——·OH 清除率, %;

A₀——双蒸水代替样品的空白对照试验的吸光值;

A₁——样品的吸光值;

A₂——双蒸水代替除样品以外的物质的干扰实验的吸光值。

(3) 铁离子还原力的测定:将 0.02 mol/L 的氯化铁溶

液、0.3 mol/L, pH 3.7 的醋酸盐缓冲液和 0.01 mol/L 的三吡啶啉溶液,用 0.04 mol/L 的盐酸溶液配制,以 1:10:1 的比例混合均匀,即可获得 FRAP 试剂。

FeSO₄ 标准曲线的绘制:分别取 1.0 mmol/L 硫酸亚铁溶液 0.00, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50, 0.60 mL, 按顺序加入双蒸水 2.0, 1.9, 1.8, 1.7, 1.6, 1.5, 1.4 mL 再加入 10.0 mL FRAP 试剂。摇匀, 37 °C 反应 10 min, 测定其在波长 593 nm 处的吸光度值, 绘制标准曲线。

样品的测定:10 mL FRAP 溶液中加入 2 mL 样品(纯化的河蚬多糖 CFP-1、CFP-2), 摇匀, 37 °C 反应 10 min 后, 593 nm 记录吸光度值, 以蒸馏水代替河蚬多糖溶液做空白对照, A₁ 为样品的吸光度, A₂ 为以蒸馏水代替氯化铁溶液做干扰试验吸光度, 以每毫克样品达到相同吸光度(A₁ - A₂) 时所需 FeSO₄ 的微摩尔数表示样品的抗氧化能力。

(4) 超氧阴离子自由基(O²⁻·)清除率的测定:按表 2 加入样品和试剂, 迅速混匀, 倒入比色皿中, 在 420 nm 波长处测定邻苯三酚的自氧化速率(0~5 min), 计算对 O²⁻· 的清除率:

$$SA = \frac{V_0 - V_s}{V_0} \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

SA——超氧阴离子自由基(O²⁻·)清除率, %;

V₀——对照管吸光度随时间的变化率, %;

V_s——样品管吸光度随时间的变化率, %。

pH=8.2 Tri-HCl 缓冲液(0.1 mol/L)用 2 mmol/L EDTA 配制; 邻苯三酚(60 mmol/L)用 10 mmol/L HCl 配制。

表 1 超氧阴离子自由基清除活性测定加样表

Table 1 Determination of superoxide anion radical scavenging activity mL

组别	Tris-HCl	蒸馏水	10 mmol/L HCl	邻苯三酚	总体积
空白试验	4.5	4.2	0.3	0.0	9
对照试验	4.5	4.2	0.0	0.3	9
样品	4.5	4.2	0.0	0.3	9

1.3.7 河蚬多糖的抗肿瘤活性研究

(1) 肿瘤细胞的复苏:采用快速融化法。一般要求在 20 s 内完全融化, 以避免水分渗入细胞内再结晶对细胞造成损害^[18]。将无菌 RPMI-1640 完全培养基(含 10% 胎牛血清)置于 37 °C、5% 的 CO₂ 培养箱中, 放置 30 min; 取出冻存管后迅速放入 37 °C 水浴锅中复温, 轻轻振动融化, 待冻存管中融化 90% 左右时取出; 在无菌操作台中用 75% 的乙醇消毒冻存管后开启, 用移液器吸出细胞悬液注入离心管, 并滴加 10 倍左右的 RPMI-1640 培养基, 混匀后 1 000 r/min 离心 5 min, 弃去培养液; 用无菌的 RPMI-1640 完全培养基重新配成细胞悬液, 并转移至细胞培养瓶中, 计数并检查细胞活力, 然后置于 CO₂ 培养箱中静置培养。

(2) 细胞的传代与培养:以无菌操作, 打开瓶口过火后, 用移液枪轻轻吸去上层培养液; 用 2 mL 无菌 PBS 缓冲液洗涤 2 次, 加入胰蛋白酶 800 μL, 放入 CO₂ 培养箱中进行消化。待贴壁细胞如流沙状脱落时(约 2~3 min)加入 RPMI-1640 完全培养基 4 mL 终止消化, 用吸管轻轻吹打制成均匀的细胞悬液。将细胞悬液分置于 3 个培养瓶中, 分别加入 5 mL RPMI-1640 完全培养基轻轻混匀置于培养箱中培养^[19]。

(3) 抗肿瘤活性的测定:采用 MTT 法^[20-21]。培养人肝癌 HepG-2 细胞至对数生长期, 经胰酶消化后加入培养液终止消化, 离心后去除上清液, 加入适量的培养基调节细胞浓度为 1 × 10⁵ 个/mL。在 96 孔培养板中接种细胞悬液 100 μL, 待细胞贴壁后(一般需要 6 h)加多糖溶液 100 μL; 每组设 6 个复孔; 置于 CO₂ 培养箱中培养 24 h 或 48 h 后取出做 MTT 检测, 试验方法为:每孔加入 5.0 mg/mL MTT 溶液(以 PBS 配制, 并用 0.22 μm 滤膜过滤除菌)20 μL, 继续培养 4 h 后弃去上清液, 每孔加入 150 μL 二甲基亚砜, 低速振荡 10 min 后, 用酶标仪于 492 nm 处测吸光度, 重复 3 次, 取平均值, 并按式(4)计算不同浓度纯化河蚬多糖 CFP-1、CFP-2 对人肝癌 HepG-2 肿瘤细胞的抑制率。绘制抑制率与多糖浓度关系曲线。

$$A = (1 - \frac{OD_1}{OD_2}) \times 100\%, \quad (4)$$

式中:

A——抑制率, %;

OD₁——样品的吸光值;

OD₂——对照试验的吸光值。

1.3.8 数据分析及作图 试验数据用 SPSS 13.0 分析, Origin 8.0 作图。

2 结果与分析

2.1 河蚬多糖的分离及纯化

2.1.1 DEAE-52 纤维素色谱柱的初步分离 由图 1 可知, 经不同浓度 NaCl 溶液梯度洗脱, 以苯酚-硫酸法示踪检测到 2 个主要洗脱峰, 得到河蚬粗多糖 2 个主要组分并命名, 分别是以蒸馏水洗脱得到的 CFP-1 和以 0.1 mol/L NaCl 溶液洗脱所得 CFP-2。合并相同组分经减压浓缩、蒸馏水透析、冷冻干燥之后得到 CFP-1 和 CFP-2 2 个多糖产品, 之后再通过凝胶层析柱进行更进一步的纯化。

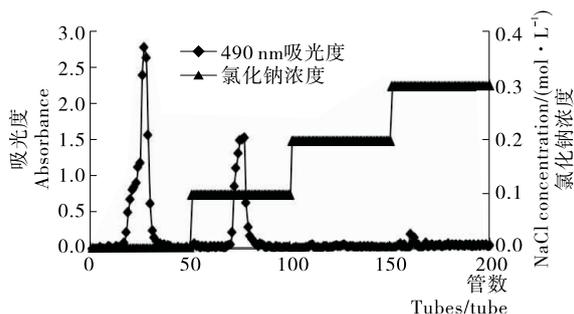


图 1 DEAE-52 纤维素色谱柱的梯度洗脱曲线

Figure 1 Gradient elution curve of DEAE-52 cellulose chromatography column

2.1.2 Sephadex™ G-100 葡聚糖凝胶色谱柱的分离 葡聚糖 G-100 凝胶柱对 CFP-1 和 CFP-2 的洗脱曲线见图 2,3,经葡聚糖 G-100 凝胶柱分离 CFP-1 和 CFP-2 两组分的洗脱峰都为单一峰且峰型对称性良好。收集合并相同组分,经减压浓缩、蒸馏水透析、冷冻干燥得到棉絮状的纯化多糖 CFP-1 和 CFP-2。

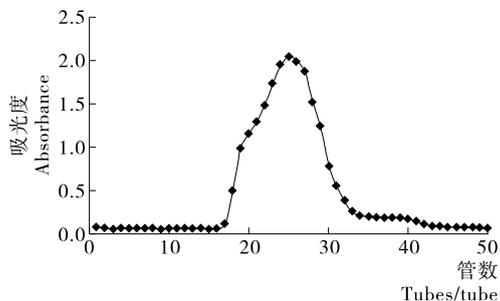


图 2 CFP-1 流经 Sephadex™ G-100 柱洗脱曲线

Figure 2 CFP-1 Sephadex™ G-100 column elution curves

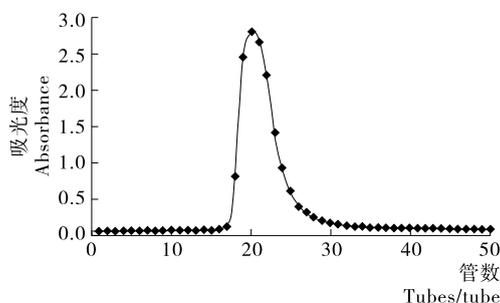


图 3 CFP-2 流经 Sephadex™ G-100 柱洗脱曲线

Figure 3 CFP-2 Sephadex™ G-100 column elution curves

2.2 河蚬多糖的紫外扫描图谱分析

由图 4 可知,粗多糖和分离纯化的 2 个多糖组分在 200 nm 附近都有一大的吸收峰;该吸收峰为多糖的特征吸收峰,在 260~280 nm 处,粗多糖有吸收峰,而经分离纯化的多糖 CFP-1 和 CFP-2 均没有此峰,说明经分离纯化的多糖组分已无蛋白质和核酸。

2.3 河蚬多糖的红外扫描图谱

图 5、6 为河蚬多糖 CFP-1、CFP-2 的红外光谱图。在图 5、6 中,3 370 nm⁻¹ 左右处 2 种组分都出现了明显的吸收峰,在 3 700~3 300 nm⁻¹ 处出现的吸收带是羟基的 O—H 伸

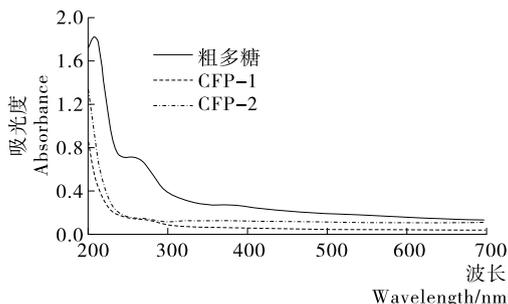


图 4 河蚬多糖的紫外吸收图谱

Figure 4 UV absorbance spectra of polysaccharides of *Cobicula fluminea*

缩振动;2 928 nm⁻¹ 2 种组分都出现了明显吸收峰,在 3 000~2 800 nm⁻¹ 处出现的吸收峰是由烷基的 C—H 伸缩振动引起的,由此可知 CFP-1 和 CFP-2 含有多糖类物质的特征基团。在 1 700~1 600 nm⁻¹ 处 2 种组分出现的强吸收峰可能是羧基的 C=O 非对称伸缩振动引起的,也可能是氨基的 N—H 变角振动引起的,1 400~1 300 nm⁻¹ 处 2 种组分都出现了强吸收峰是羧基的 C=O 对称伸缩振动,说明这 2 种河蚬多糖组分都含有羧基基团;在 1 200~900 nm⁻¹ 处 2 种组分都出现一组强的吸收峰,它是由羟基(O—H)的变角振动和吡喃糖环中醚键(C—O—C)的伸缩振动引起^[22]。CFP-1 在 840 nm⁻¹ 处的吸收峰表明该多糖含有 α-型糖苷键^[23]。

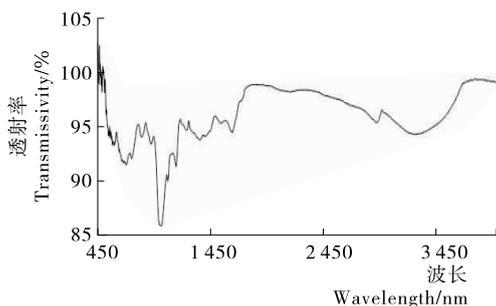


图 5 河蚬多糖纯化组分 CFP-1 傅立叶变换红外光谱图

Figure 5 Isolation and Purification components CFP-1 of Fourier Transform Infrared spectrum from *Cobicula fluminea* Polysaccharide

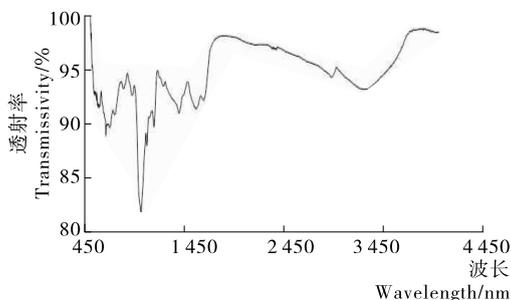
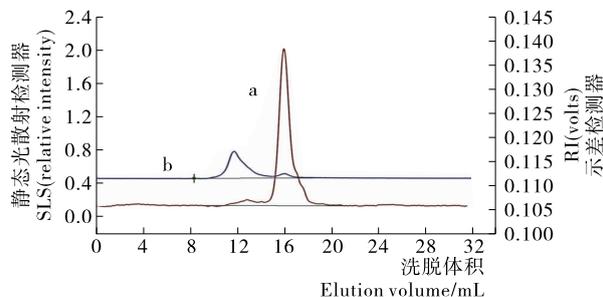


图 6 河蚬多糖纯化组分 CFP-2 傅立叶变换红外光谱图

Figure 6 Isolation and Purification components CFP-2 of Fourier Transform Infrared spectrum from *Cobicula fluminea* Polysaccharide

2.4 河蚬多糖的分子量测定及纯度鉴定

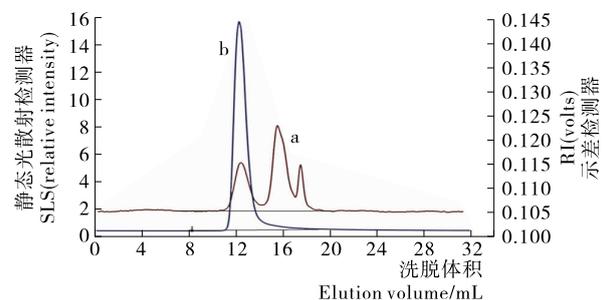
由图 7 可知,经 DEAE-52 纤维素柱和 sephadex™ G-100 凝胶柱纯化后的多糖组分 CFP-1 经 2 种检测器得到的结果显示,出现且峰型尖锐对称性好的单一峰,与凝胶色谱图结果相吻合,说明河蚬粗多糖经两步柱层析分离纯化后得到的多糖 CFP-1 分子量相对均一。由图 8 可知,静态光散射检测器检测结果显示有一个峰形尖锐且对称的峰,而示差检测器检测结果显示有多个峰,说明河蚬多糖 CFP-2 中还含有一定的其他物质。经计算河蚬多糖 CFP-1 与 CFP-2 的平均相对分子量分别为 1 172,3 627 kD。



a 为示差检测器对 CFP-1 的检测结果, b 为静态光散射检测器对 CFP-1 的检测结果

图 7 河蚬多糖纯化组分 CFP-1 的高效液相色谱图

Figure 7 Isolation and Purification components CFP-1 of High performance liquid chromatography from *Corbicula fluminea* Polysaccharide



a 为示差检测器对 CFP-2 的检测结果, b 为静态光散射检测器对 CFP-2 的检测结果

图 8 河蚬多糖纯化组分 CFP-2 的高效液相色谱图

Figure 8 Isolation and Purification components CFP-2 of High performance liquid chromatography from *Corbicula fluminea* Polysaccharide

2.5 河蚬多糖的体外抗氧化活性分析

2.5.1 对 DPPH 自由基的清除率 由图 9 可知,随着河蚬多糖浓度的增大,河蚬多糖 CFP-2 对 DPPH· 的清除率显著增大,CFP-1 对 DPPH· 的清除能力增加缓慢,当浓度为 3 mg/mL 时,CFP-2 对 DPPH· 的清除率为 52.04%,CFP-1 对 DPPH· 的清除率为 16.60%,所以 CFP-2 表现出了更强的清除 DPPH· 活性。显著性分析结果显示 CFP-1 浓度升高到 2.5 mg/mL 之后,清除率的变化不显著;CFP-2 在各浓度条件下对 DPPH· 的清除率变化均显著。

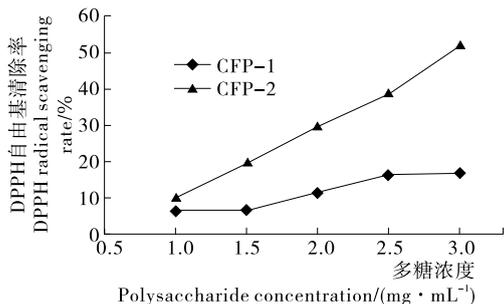


图 9 河蚬多糖对 DPPH 自由基的清除作用

Figure 9 Scavenging effect of Polysaccharide from *Corbicula fluminea* on DPPH Free Radical

2.5.2 对羟自由基的清除率 由图 10 可知,随着河蚬多糖浓度的增大,CFP-1 对 ·OH 的清除率减小,CFP-2 对 ·OH 的清除率增大,当 CFP-1 浓度为 0.5 mg/mL 时,对 ·OH 的清除率为 27.81%,当浓度增大为 3 mg/mL 时,对 ·OH 的清除率下降到 15.63%;当 CFP-2 浓度为 0.5 mg/mL 时,对 ·OH 的清除率为 16.88%,当浓度增大为 3 mg/mL 时,对 ·OH 的清除率增大到 63.75%。由此可知,对比 2 种多糖对 ·OH 的清除率,结果显示 CFP-2 表现出更强的活性,显著性分析结果显示 CFP-2 在各浓度条件下对 ·OH 的清除率变化均显著。

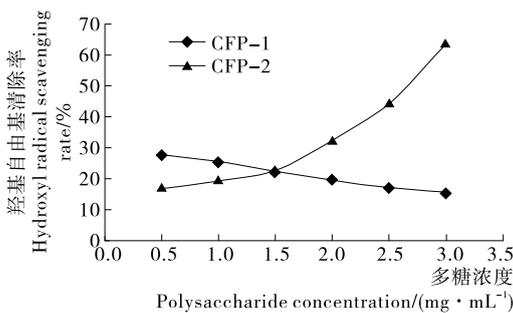


图 10 河蚬多糖对 ·OH 的清除作用

Figure 10 Scavenging effect of Polysaccharides from *Corbicula fluminea* on Hydroxyl radical

2.5.3 对铁离子的还原力 由图 11 可知,随着河蚬多糖浓度的增大,CFP-2 吸光度明显增大,而 CFP-1 吸光度变化缓慢,说明 CFP-2 对铁离子还原力强于 CFP-1。当多糖浓度为 3 mg/mL 时,CFP-1 和 CFP-2 的 FRAP 值分别为 24.64, 65.24 μmol/mg。显著性分析结果显示 CFP-2 在各浓度条件下对铁离子还原力的变化均显著。

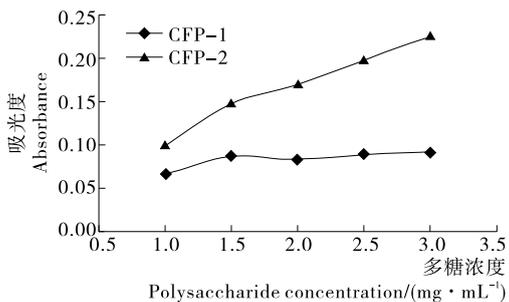


图 11 河蚬多糖的铁离子还原力

Figure 11 Reducing power of *Corbicula fluminea* Polysaccharide

2.5.4 对超氧阴离子自由基的清除率 由图 12 可知,河蚬多糖 CFP-1 和 CFP-2 对 O²⁻· 的清除能力都随着浓度的增大呈增大趋势。CFP-2 对 O²⁻· 的清除率增加缓慢,CFP-1 对 O²⁻· 的清除率增加明显,当 CFP-2 浓度为 0.5 mg/mL 时,对 O²⁻· 的清除率为 0.32%,当浓度为 3 mg/mL 时,对 O²⁻· 的清除率增加到 2.86%;当浓度为 0.5 mg/mL 时,CFP-1 对 O²⁻· 的清除率为 1.59%,当浓度为 3 mg/mL 时,CFP-1 对 O²⁻· 的清除率增大到 16.19%。由此可知,CFP-1 对 O²⁻· 的清除活性高于 CFP-2。但试验结果显示 2 种多

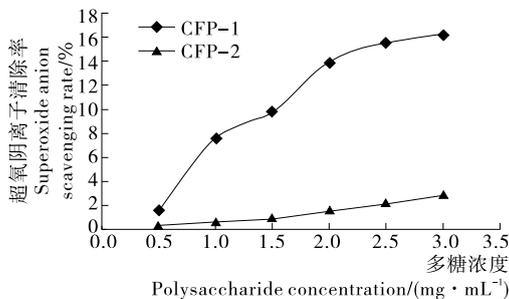


图 12 河蚬多糖对 O²⁻ · 的清除作用

Figure 12 Scavenging effect of Polysaccharides from *Corbicula fluminea* on Superoxide anion

糖对 O²⁻ · 的清除活性都较弱。

2.6 河蚬多糖的体外抗肿瘤活性分析

由图 13 可知,加药培养 24 h 和 48 h 后,河蚬多糖 CFP-1 对外培养的人肝癌 HeGp-2 细胞生长都有一定的抑制作用,当河蚬多糖 CFP-1 浓度为 0.2 mg/mL 时,作用 24 h 抑制不明显,作用 48 h 其抑制率达到 44.17%,表现出了较强的体外抑瘤活性。

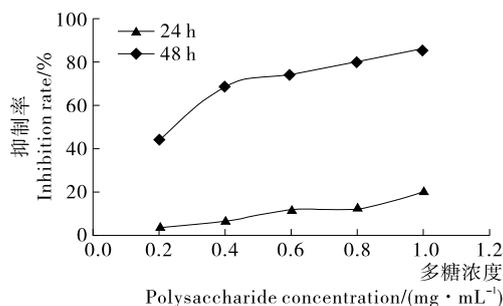


图 13 CFP-1 对外培养的 HeGp-2 细胞的生长抑制作用

Figure 13 Effect of CFP-1 on proliferation of HeGp-2 cells

由图 14 可知,加药培养 24 h 和 48 h 后,河蚬多糖 CFP-2 对外培养的人肝癌 HeGp-2 细胞生长都有一定的抑制作用,当河蚬多糖 CFP-2 浓度为 0.2 mg/mL 时,作用 24 h 抑制不明显,作用 48 h 其抑制率达到 37.56%,比 CFP-1 的抗肿瘤活性稍弱。

3 结论

通过 DEAE-52 纤维素色谱法,获得河蚬粗多糖 2 个初步分离组分,再利用 SephadexTM G-100 葡聚糖凝胶色谱法对

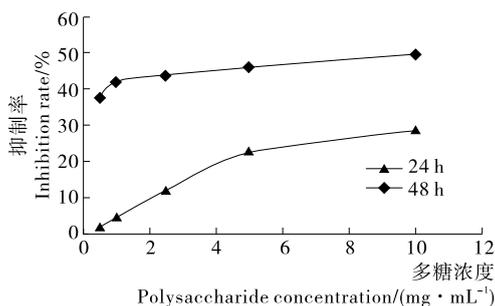


图 14 CFP-2 对外培养的 HeGp-2 细胞的生长抑制作用

Figure 14 Effect of CFP-2 on proliferation of HeGp-2 cells

初步分离的 2 个组分进行进一步纯化,得到 CFP-1 和 CFP-2 2 个组分。经计算得到河蚬多糖 CFP-1 与 CFP-2 的平均相对分子量分别为 1 172,3 627 kD。对河蚬粗多糖、CFP-1、CFP-2 的紫外光谱扫描得出经分离纯化的多糖组分已无蛋白质和核酸。对其进行红外扫描得出 CFP-1 和 CFP-2 均为多糖类物质。河蚬多糖对人肝癌细胞 HepG-2 抑制结果表明:CFP-1 对人肝癌细胞 HepG-2 抑制作用效果显著;纯化多糖 CFP-1 和 CFP-2 都具一定的抗氧化能力,在对 DPPH · 、· OH、O²⁻ · 的清除率以及铁离子还原力方面,CFP-2 的抗氧化活性均优于 CFP-1。

本试验对河蚬多糖的分离纯化,得到了 2 种纯化产品 CFP-1 和 CFP-2,并对其纯度、分子量、抗肿瘤活性和抗氧化活性进行了研究,但是对 2 种多糖的结构特征等还不是很了解,可以进行进一步的试验研究,对其它可能存在的一些性质也可以进行试验分析。

参考文献

- [1] XIE Jing-tian, WU Ji-an, MEHENDALE S, et al. Anti-hyperglycemic effect of the polysaccharides fraction from American ginseng berry extract in ob/ob mice[J]. Phytomedicine International Journal of Phytotherapy & Phytopharmacology, 2004, 11 (2/3): 182-187.
- [2] MATSUNAGA K, IJIMA H, KOBAYASHI H. Neonatal Inoculation with the Protein-bound Polysaccharide PSK Increases Resistance of Adult Animals to Challenge with Syngeneic Tumor Cells and Reduces Azoxy methane-induced Precancerous Lesions in the Colon [J]. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 2000, 9(12): 1 313.
- [3] 叶凯贞,黎碧娜,王奎兰,等.多糖的提取、分离与纯化[J].广州食品工业科技,2004,20(3):144-145.
- [4] ALBANO R M, MOURAO P A. Isolation, fractionation and preliminary characterization of anovel class of sulfated glycans from the tunic of Styda plicata(Chordata Tunicata)[J]. J Biol Chem, 1986, 261(2): 758-765.
- [5] LUO Ao-xue, HE Xing-jin, ZHOU Song-dong, et al. Purification, composition analysis and antioxidant activity of the polysaccharides from Dendrobium nobile Lindl[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 79(4): 1 014-1 019.
- [6] LEUNG M Y, LIU C, ZHU L F, et al. Chemical and biological characterization of a polysaccharide biological response modifier from Aloe veral. var. chinensis (Haw.) Berg[J]. Glycobiology, 2004, 14(6): 501-510.
- [7] HUANG Qi-lin, JIN Yong, ZHANG Li-na, et al. Structure, molecular size and antitumor activities of polysaccharides from Poria cocos mycelia produced in fennenter[J]. Carbohydrate Polymers, 2007, 70(3): 324-333.
- [8] 范秀萍,吴红棉,雷晓凌.珠母贝氨基多糖的分离纯化及其抗肿瘤活性的初步研究[J].中国海洋药物,2005,24(2):32-36.
- [9] 胡健饶,曹明富.三角帆蚌多糖抑瘤作用的实验研究[J].中国现代应用药学,2003,20(1):11-13.

(下转第 138 页)

- [21] LEE C, SHIH P, HSU C, et al. Hepatoprotection of tea seed oil (*Camellia oleifera* Abel.) against CCl_4 -induced oxidative damage in rats[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2007, 45(6): 888-895.
- [22] FEÁS X, ESTEVINHO L M, SALINERO C, et al. Triacylglyceride, Antioxidant and Antimicrobial Features of Virgin *Camellia oleifera*, *C. reticulata* and *C. sasanqua* Oils[J]. *Molecules*, 2013, 18(4): 4 573-4 587.
- [23] 李好, 钟海雁, 方学智, 等. 油茶籽成熟过程中抗氧化物质的变化规律[J]. *食品与机械*, 2013, 29(5): 6-9.
- [24] DU Li-chun, WU Bei-li, CHEN Jian-min. Flavonoid triglycosides from the seeds of *Camellia oleifera* Abel. [J]. *Chinese Chemical Letters*, 2008, 19(11): 1 315-1 318.
- [25] 刘应珍, 邹天才. 贵州山茶属植物资源及其开发利用探讨[J]. *贵州科学*, 2008, 26(2): 75-81.
- [26] 田畔林. 湖南省山茶属红茶组植物分类及园林应用研究[D]. 长沙: 中南林学院, 2001: 33-37.
- [27] 廖义秀, 钟海雁. 茶油贮藏的稳定性及高效液相色谱分析[J]. *食品与机械*, 2013, 29(1): 173-176.
- [28] 漆龙霖, 吕芳德, 李克瑞, 等. 湖南山茶属植物种质资源调查、收集和利用的研究[J]. *武汉植物学研究*, 1989, 7(3): 275-284.
- [29] 张微微, 于大永, 史丽颖, 等. 南山茶果皮化学成分的研究[J]. *广西植物*, 2012, 32(5): 698-700.
- [30] 石海峰, 冯宝民, 史丽颖, 等. 西南山茶化学成分分离与鉴定[J]. *沈阳药科大学学报*, 2010, 27(5): 357-360.
- [31] 彭晓, 于大永, 冯宝民, 等. 金花茶化学成分的研究[J]. *广西植物*, 2011, 31(4): 550-553.
- [32] 佟小静. 油茶根化学成分研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2011.
- [33] TENG Xi-feng, YANG Jia-yue, YANG Chong-ren, et al. Five New Flavonol Glycosides from the Fresh Flowers of *Camellia reticulata* [J]. *Helvetica Chimica Acta*, 2008, 91(7): 1 305-1 312.
- [34] 李菁. 茶籽饼抗肿瘤活性成分与茶籽壳抗氧化的初步研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2012: 29.
- [35] 侯蕾, 于大永, 冯宝民, 等. 西南红茶茶花化学成分分离与鉴定[J]. *时珍国医国药*, 2011, 22(7): 1 701-1 703.
- [36] SONG Li-xia, WANG Xiang-she, ZHENG Xue-qin, et al. Polyphenolic antioxidant profiles of yellow camellia [J]. *Food Chemistry*, 2011, 129(2): 351-357.
- [37] PARK J S, YEOM M H, PARK W S, et al. Enzymatic hydrolysis of green tea seed extract and its activity on 5 α -reductase inhibition [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2006, 70(2): 387-394.
- [38] LIN L, CHEN P, HARNLY J M. New phenolic components and chromatographic profiles of green and fermented teas [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(17): 8 130-8 140.
- [39] KIM Y, GOODNER K L, PARK J, et al. Changes in antioxidant phytochemicals and volatile composition of *Camellia sinensis* by oxidation during tea fermentation [J]. *Food Chemistry*, 2011, 129(4): 1 331-1 342.
- [40] 成桂仁, 金静兰, 文永新. 白茶中二种新黄酮甙的结构[J]. *药学报*, 1987, 22(3): 203-207.
- [41] ZHAO Yang, CHEN Pei, LIN Long-ze, et al. Tentative identification, quantitation, and principal component analysis of green pu-erh, green, and white teas using UPLC/DAD/MS [J]. *Food Chemistry*, 2011, 126(3): 1 269-1 277.

(上接第 132 页)

- [10] 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]. *食品工业科技*, 2003, 24(9): 73-76.
- [11] 杨玉婵. 河蚬精的制备及活性物质的研究[D]. 南昌: 江西科技师范大学, 2016: 26-34.
- [12] CAI Wei-rong, GU Xiao-hong, TANG Jian. Extraction, Purification, and characterization of the Polysaccharides from *OPuntia milpa alta* [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2008, 71(3): 403-410.
- [13] WANG Chia-Chi, CHANG Shyh-Chang, CHEN Bing-Huei. Chromatographic determination of polysaccharides in *Lycium barbarum* Linnaeus [J]. *Food Chemistry*, 2009, 116(2): 595-603.
- [14] DUBOIS M, GILLES K A, HAMILTON J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. *Analytical Chemistry*, 1956, 28(3): 350-356.
- [15] LIU Jun, LUO Jian-guang, YE Hong, et al. Production, characterization and antioxidant activities in vitro of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3 [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2009, 78(2): 275-281.
- [16] LI Xiao-lan, ZHOU Ai-guo, HAN Yong. Anti-oxidation and anti-microorganism activities of purification polysaccharide from *Lygodium japonicum* in vitro [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2006, 66(1): 34-42.
- [17] ROGINSKY V, LISSI E A. Review of methods to determine chain breaking antioxidant activity in food [J]. *Food Chemistry*, 2005, 92(2): 235-254.
- [18] 高林. MCP 多糖的制备、分析鉴定及其抗肿瘤作用的研究[D]. 天津: 天津大学, 2005: 49.
- [19] 李雪梅. 海湾扇贝多糖的提取、纯化及抗肿瘤活性研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2014: 33.
- [20] MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. *Journal of Immunological Methods*, 1983, 65(2): 55-63.
- [21] 吕俊, 李璐, 毕富勇. 银耳多糖抑制肝癌 HepG-2 细胞体外增殖机制的实验研究[J]. *中国肿瘤*, 2009, 18(5): 413-415.
- [22] KACDURDKOVD M, CAPEK P, SASINKOVD V, et al. FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2000, 43(2): 195-203.
- [23] YE S N, KIM W J, KIM S M, et al. Purification, characterization and immunostimulating activity of water-soluble polysaccharide isolated from *Capsosiphon fulvescens* [J]. *International Immunopharmacology*, 2010, 10(3): 364-370.