

## 贻贝多糖 MPs 的制备、组分鉴定和免疫学活性研究

王 俊,徐红丽,张建鹏,刘军华,冯伟华\*,焦炳华\*

(第二军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室,上海 200433)

**[摘要]** **目的:**分离纯化厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)多糖 MPs,并测定其纯度和单糖组分。**方法:**用组织匀浆后热水抽提,Sevage 法除蛋白,乙醇沉淀,再经 DEAE-cellulose 52、Sephacryl S-200 柱层析和高效液相色谱(HPLC),分离纯化得到贻贝多糖 MPs。分离到多糖粗品行全波段的最大吸收波长光谱扫描、硫酸-苯酚比色法测定糖含量;经紫外光谱扫描分析、红外光谱扫描分析、染料结合比色法、HPLC 鉴定其纯度,再经气相色谱(GC)进行单糖组分分析。纯化得到纯品进行免疫学活性测定。**结果:**经分离纯化获得贻贝多糖纯品多个组分 MPs-A1/A2/B1/B2/B3/C1/C2/C3,其中 MPs-B1 纯度较高,相对分子质量为 3 510 000,主要含有葡萄糖、半乳糖 2 种单糖组分,二者比例接近 1:1,<sup>1</sup>HNMR 表明为  $\alpha$ -吡喃己糖。MPs-B1 增强小鼠 NK 细胞活性、抗体形成细胞活性、腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞活性。**结论:**经工艺改进后获得的 MPs-B1 与同类和前期研究所报道的贻贝多糖在理化性质、含糖量、单糖组分上均有显著区别。MPs-B1 具有正向免疫调节作用。

**[关键词]** 厚壳贻贝;多糖类;分离和提纯;免疫活性

**[中图分类号]** R 282.77 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)01-0012-05

### Preparation, identification and immunological activities of polysaccharides extracted from *Mytilus coruscus*

WANG Jun, XU Hong-li, ZHANG Jian-peng, LIU Jun-hua, FENG Wei-hua\*, JIAO Bing-hua\* (Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To isolate and purify active polysaccharides from *Mytilus coruscus* (MPs) and to determine their purities and monosaccharide components. **Methods:** The homogenization of *Mytilus coruscus* was extracted by boiling water, followed by protein removal (Sevage method), alcohol fractional precipitation, chromatography with DEAE-cellulose 52, Sephacryl S-200 column and HPLC. The sugar concentrations in MPs were determined by  $\lambda_{max}$  of full wave-length scan and sulphuric acid-phenol colorimetry. IR chromatogram, UV absorption spectrum, staining-combined colorimetry and HPLC were separately applied to determine the homogeneity of the obtained MPs; GC-MS was used to analyze their monosaccharide components. The immunological activities of purified MPs were tested. **Results:** Eight components, MPs-A1/A2/B1/B2/B3/C1/C2/C3, were extracted from *Mytilus coruscus*. <sup>1</sup>HNMR indicated that MPs-B1, with a molecular weight of 3 510 000, was an  $\alpha$ -hexapyranose, with glucose and galactose (1:1) as its major components. Immunological tests showed that MPs-B1 promoted the activities of NK cells, peritoneal macrophages and plaque-forming cells. **Conclusion:** With modified preparation process, the MPs in this paper are obviously different from those obtained from other similar studies in physiochemical properties, sugar contents and monosaccharide components. MPs-B1 has a positive regulatory immunological function.

**[KEY WORDS]** *Mytilus coruscus*; polysaccharides; isolation and purification; immunocompetence

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(1):12-16]

主产于浙江省嵊山列岛的厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)中碳水化合物含量达 13.4%,此外还含钙、磷、铁、维生素等多种营养物质<sup>[1]</sup>。据文献<sup>[2,3]</sup>报道,紫贻贝和翡翠贻贝的酶水解提取物具有抗肿瘤、抗氧化、抗凝血、降血压、降血脂、提高免疫力等作用,紫贻贝中的抗菌成分,被认为与脂多糖和紫贻贝中的一些因子相关<sup>[4~6]</sup>。同时在三角帆蚌多糖中发现其抑制肿瘤生长的作用<sup>[7]</sup>。研究结果表明,软体动物中含有多种糖胺聚糖<sup>[8]</sup>。近十年来,动物中的蛋白多糖的糖链部分——糖胺聚糖(GAG)因具有抗凝血、抗肿瘤、降血脂、提高免疫力等多种活性<sup>[9]</sup>,已引起国内外医药界的广泛关注。就国内而言,研

究者从多种海洋动物中分离提取出各种糖胺聚糖进行了广泛研究,洪鹏志等<sup>[10]</sup>研究认为,翡翠贻贝中提取的糖胺聚糖在剂量为 80 mg/kg 时,对昆明小鼠移植性肿瘤 S-180 的抑瘤率可达 52.4%,且有增强免疫力的活性。

为进一步研究贻贝的药用活性物质,构建开发

**[基金项目]** 国家高技术研究发展计划/863 计划(2002AA2Z3325);浙江省科技计划项目(2005ZJKJH2202)。Supported by National High-tech R&D Program/863 Program(2002AA2Z3325)and Zhejiang Science and Technology Research Program (2005ZJKJH2202)。

**[作者简介]** 王 俊,硕士。E-mail: zero991127@126.com

\* Corresponding authors. E-mail: fwh402@163.com; jiaobh@uninet.com.cn

海洋动物多糖药物技术平台及寻找新的药用资源,我们对东海厚壳贻贝多糖(MPs)的分离纯化工艺进行了改进,并对其活性作用及组分结构进行了研究。

## 1 材料和方法

1.1 材料 新鲜东海厚壳贻贝,由浙江省嵊泗市嵊山镇提供,品系经浙江海洋学院赵盛龙教授鉴定为 *Mytilus corus Gould* [*Mytilus crassitesta* Lischke]。

1.2 试剂和仪器 DEAE-cellulose 52, Sephacryl S-200(Pharmacia); 标准葡聚糖、各标准单糖(Fluka); 考马斯亮蓝 G250 试剂盒(南京建成生物工程有限公司); 其他均为国产试剂。CR21 型高速冷冻离心机(Hitachi); 高效液相色谱(Agilent 1100), 液相色谱柱 Sephadex G2000SW (TOSOH BIOSEP); Bruker vector 22 型红外光谱仪(Bruker Optics); 紫外扫描仪 UV-260(Shimadzu); HP-6890 气相色谱仪(惠普)。

### 1.3 实验方法<sup>[11]</sup>

1.3.1 样品制备 新鲜厚壳贻贝湿肉 700 g, 匀浆后甲醇除脂, 热水浴提取 8 h, 离心去沉淀。提取液浓缩后 Seavage 法除蛋白。上清液滤膜透析 24 h。浓缩后加入 3 倍体积 95% 乙醇沉淀, 离心除上清, 真空冷冻干燥得到贻贝多糖粗品(crude MPs, CMPs)。

取 CMPs 500 mg 制成溶液上至 DEAE-cellulose 柱(2 cm×100 cm), 分别以 dH<sub>2</sub>O、0.01 mol/L NaCl、0.05 mol/L NaCl 洗脱至无糖液流出<sup>[12]</sup>, 每管收集 5 ml, 硫酸-苯酚比色法跟踪检测, 合并相同组分, 透析除盐后经 Sephacryl S-200 纯化, dH<sub>2</sub>O 洗脱, 每管收集 5 ml, 硫酸-苯酚比色法跟踪检测, 合并相同组分, 透析除盐。

取经分子筛柱层析纯化后的多糖制成 5 mg/ml MPs 的 NaCl 溶液, 0.4 μm 微孔滤膜过滤除去细小颗粒杂质, 以 0.1 mol/L NaCl 为流动相, 上样量 500 μl, 流速 1.0 ml/min, 温度设定为 30℃, 压力波动范围 1~9 MPa, 检测器为 RID 折光视差检测器, TSK-GEL G2000SW 柱。分部收集, 用硫酸-苯酚比色法跟踪检测, 合并相同组分, 真空冷冻干燥得到纯化的精品多糖。

1.3.2 最大吸收波长、糖含量、纯度与相对分子质量测定 2 mg/ml CMPs 进行全波段的最大吸收波长光谱扫描, dH<sub>2</sub>O 作空白。MPs 纯品紫外分析仪上 200~400 nm 区间扫描。MPs-B1 KBr 压片, 红外分光光度仪上 4 000~400 cm<sup>-1</sup> 区间扫描。

精确配制标准葡萄糖梯度液, 硫酸-苯酚法比

色, 487 nm 测定光密度, dH<sub>2</sub>O 作空白对照。以光密度对葡萄糖浓度作图得标准曲线。取贻贝多糖 CMPs 1.0 ml, 根据所测光密度值与标准曲线计算样品糖含量。

2 mg/ml MPs 粗品、半纯品、纯品各组分溶液 0.5 ml, 考马斯亮蓝染色, 487 nm 处比色。

采用 HPLC 洗脱, 先测出标准相对分子质量多糖 Dextran T-10、T-40、T-70、T-500、T-2000 的洗脱时间, 绘制与各相对分子质量对数关系标准曲线, 再测样品洗脱时间, 由标准曲线确定样品相对分子质量。色谱柱: SUGAR KS-805(8 mm×300 mm); 柱温 35℃, 流动相 H<sub>2</sub>O, 进样量 20 μl, 流速 1 ml/min。

1.3.3 MPs 单糖组分鉴定 MPs-B1 三氟乙酸 100℃ 完全水解 10 h, 用盐酸羟胺/醋酐法制成相应的糖腈乙酸酯衍生物<sup>[12]</sup>, GC-MS 分析, HP-6890 气相色谱仪, HP-55% 苯甲基硅烷, 毛细管柱(30.0 mm×0.25 mm×0.25 μm)。分流-不分流进样口, 进样口温度 260℃。程序升温: 110~190℃, 3℃/min; 190~206℃, 2℃/min; 206~280℃, 20℃/min, 保留 2 min。FID 检测器, 载气为氮气, 流速 25.0 ml/min, 检测器温度 300℃。

1.3.4 <sup>1</sup>H NMR 分析 溶剂为 D<sub>2</sub>O, 浓度为 60 g/L。

1.3.5 MPs 对小鼠免疫功能的影响 昆明种小鼠 24 只, 体质量 18~20 g, 随机分为 4 组, 6 只/组。除对照组外, 其他 3 组 MPs 溶液浓度为 2.0、5.0、10.0 mg/ml。腹腔注射 0.1 ml, 对照组注射等量生理盐水, 连续注射 10 d。

利用分离得到的 NK 细胞与对数生长期中的 K562 细胞, 共同培养测定 LDH 释放率计算 NK 细胞自然杀伤率, 以此反映 NK 细胞活性。自然杀伤率(%)=(样品释放平均值-自然释放平均值)/(最大释放平均值-自然释放平均值)×100%。

5% SRBC 免疫后的脾淋巴细胞与 10% SRBC、RPMI 1640 琼脂糖液、1:10 稀释的豚鼠混匀温育计算溶血空斑数, 检测抗体生成细胞。

分离得到小鼠腹腔巨噬细胞悬液与鸡红细胞悬液混匀, 置 37℃ 水浴中 5 min 后弃上清, 留得液体悬浮细胞涂片, Gimsa 染色。得到吞噬百分比(100 个吞噬细胞中吞噬了鸡红细胞的巨噬细胞数目)来指示腹腔巨噬细胞的吞噬活力。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 软件进行 *t* 检验。

## 2 结果

2.1 样品制备 得到贻贝多糖粗品 14.35 g, 收率 2.05%, 呈淡黄色粉末状, 吸水性强, 溶解性好, 水中

溶解度达到 6~8 mg/ml。CMPs 经 DEAE-cellulose 纯化得到 3 个明显的洗脱峰,洗脱曲线如图 1 所示。粗品上样量为 4.594 g,收集到半纯品多糖 MP<sub>s</sub>-A/B/C 分别为 1.707、0.902、1.406 g,总收率为 87.73%,三者收率分别为 37.16%、19.63%、30.62%。

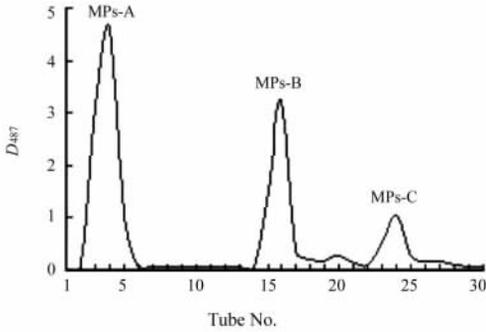


图 1 CMPs 的 DEAE-cellulose 洗脱曲线

Fig 1 Elution curve of CMPs with DEAE-cellulose

半纯品多糖 MP<sub>s</sub>-A/B/C 经 Sephacryl S-200 柱,蒸馏水洗脱均得到 1 个峰。其中 MP<sub>s</sub>-B 的洗脱曲线如图 2 所示。HPLC 纯化后共出现 MP<sub>s</sub>-A1/A2/B1/B2/B3/C1/C2/C3 8 个单一对称峰。纯品 MP<sub>s</sub>-B 分离出 3 个峰的组分,再经 HPLC 鉴定后三者均呈单一对称峰。各组分经过真空冷冻干燥后得到干品,均呈白色细颗粒粉末状,水溶性好。

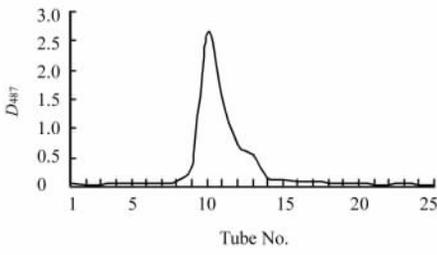


图 2 MP<sub>s</sub>-B 的 Sephacryl S-200 洗脱曲线

Fig 2 Sephacryl S-200 column chromatography of MP<sub>s</sub>-B

2.2 最大吸收波长、糖含量、纯度与相对分子质量测定 根据全波段的最大吸收波长光谱扫描图谱,贻贝多糖粗品最大吸收波长为 487 nm。根据测得的  $D_{487}$  结果,回归方程:  $Y = 0.0037X + 0.0281$ ,  $R^2 = 0.9931$ ,  $r = 0.9965$ 。绘制含糖量标准曲线,根据标准曲线,测得贻贝多糖粗品含糖量 70.78%。

经考马斯亮蓝 G250 染色测得  $D_{原料} = 0.195$ ,  $D_{粗品} = 0.374$ ,而纯品 MP<sub>s</sub>-A/B/C 各组分光密度均为 0,初步鉴定经纯化所得纯品多糖各组分均不含蛋白质。MP<sub>s</sub>-B1 在 260、280 nm 处无明显吸收峰,

说明不含核酸和蛋白。

图 3 示 MP<sub>s</sub>-B1 的 4 000~400  $cm^{-1}$  区间红外光谱,可见 3 400、2 900、1 640、1 400  $cm^{-1}$  等多糖的特征性吸收峰。

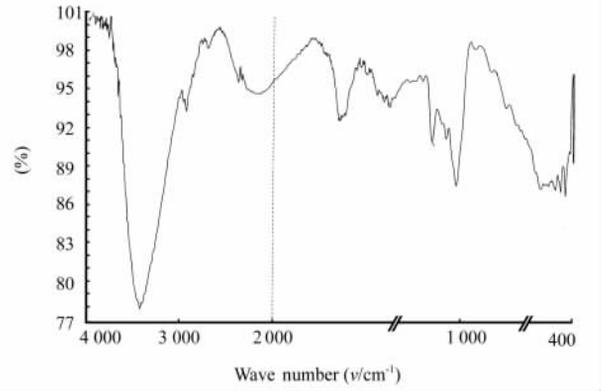


图 3 MP<sub>s</sub>-B1 的红外吸收光谱图

Fig 3 IR chromatogram of MP<sub>s</sub>-B1

制得洗脱时间(X)对相对分子质量对数(Y)的标准曲线,标准方程:  $Y = -0.5036X + 9.7009$ ,  $R^2 = 0.9584$ 。结果见表 1。

表 1 MP<sub>s</sub> 的洗脱时间、峰面积和相对分子质量

Tab 1 Elution time, peak area and molecular weight of MP<sub>s</sub>

Compd.	Elution time (t/min)	Peak area	Mr (×10 <sup>3</sup> )
MP <sub>s</sub> -A1	10.162	91	38.000
MP <sub>s</sub> -A2	12.081	9	4.139
MP <sub>s</sub> -B1	6.265	17.1	3.510
MP <sub>s</sub> -B2	9.897	64	52.000
MP <sub>s</sub> -B3	12.075	18.9	4.168
MP <sub>s</sub> -C1	9.880	20.3	4.220
MP <sub>s</sub> -C2	9.661	100	68.500
MP <sub>s</sub> -C3	9.849	100	55.000

2.3 单糖组分 GC-MS 结果(图 4)显示 MP<sub>s</sub>-B1 含有葡萄糖与半乳糖 2 种组分,二者比例接近 1:1。

2.4 <sup>1</sup>HNMR 分析 多糖 <sup>1</sup>HNMR 谱质子信号大多堆集  $\delta 4.0 \sim 5.5$  的狭小范围内,除端基质子的信号在  $\delta 4.8 \sim 5.5$  较易解析外,其他 C2-C6 的信号均集中在  $\delta 4.0 \sim 4.8$  之间,解析困难,通常  $\alpha$ -吡喃己糖端基质子的  $\delta$  值通常超过 5.0,而  $\beta$  型的  $\delta$  值则小于 5.0<sup>[11]</sup>。多糖 MP<sub>s</sub>-B1 的 <sup>1</sup>HNMR 谱显示在  $\delta 5.2$ 、 $5.6$  处各有一端基质子信号,表明为  $\alpha$ -吡喃己糖的 C-1 质子(图 5)。

图 4 MP<sub>s</sub>-B1 的气相色谱图

Fig 4 GC-MS chromatography of hydrolyzated MP<sub>s</sub>-B1

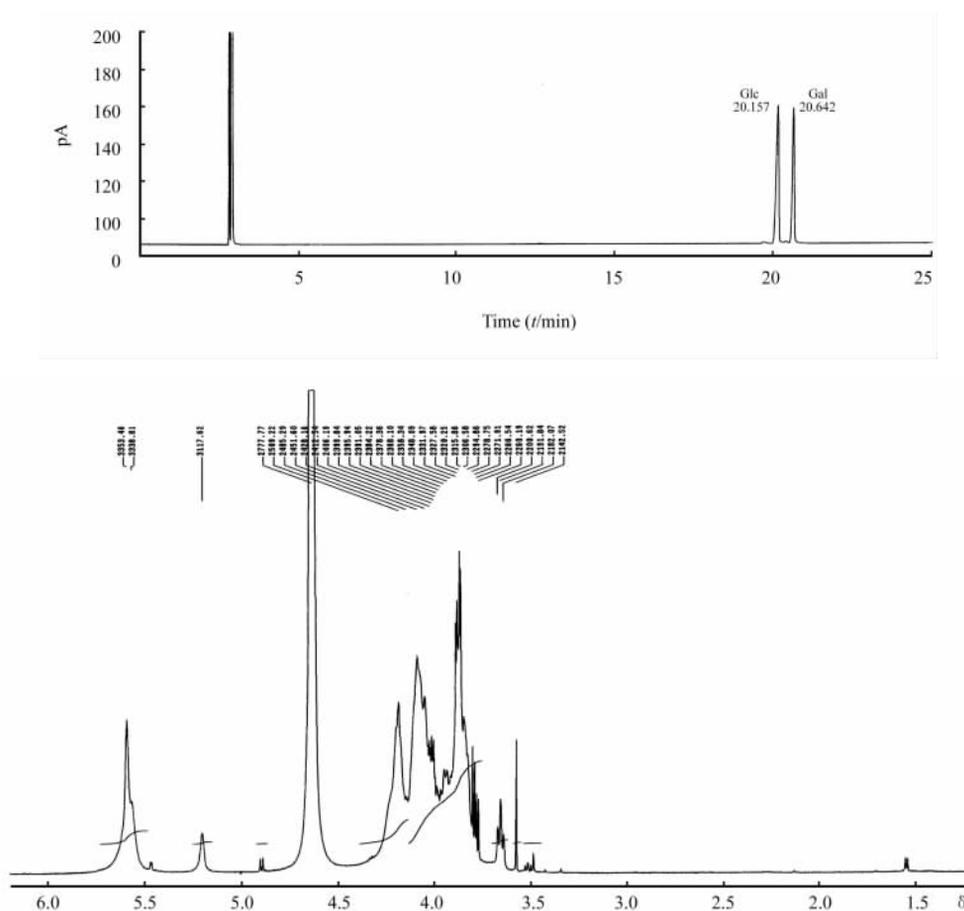


图 5 MPs-B1 的 <sup>1</sup>H NMR 图

Fig 5 <sup>1</sup>H NMR of MPs-B1

2.5 免疫调节功能 结果表明 MPs-B1 溶液能增强小鼠 NK 细胞活性、抗体形成细胞活性、腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞活性 ( $P < 0.01$ ), 且随多糖浓度增高而增强 (各浓度组间相比  $P < 0.01$ , 表 2)。

表 2 MPs-B1 对正常小鼠免疫功能的影响

Tab 2 Influence of MPs-B1 on immunological function of normal mice

( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

Group	NK rate(%)	Number of hemolytic plaque	Percent of phagocytosis(%)
Control	0.49 ± 0.05	22.00 ± 1.19	11.00 ± 1.53
MPs-B1 ( $\rho_B/mg \cdot ml^{-1}$ )			
2.0	0.61 ± 0.02 **	46.42 ± 0.63 **	22.67 ± 3.35 **
5.0	0.78 ± 0.06 ** $\Delta\Delta$	60.25 ± 1.42 ** $\Delta\Delta$	62.83 ± 6.41 ** $\Delta\Delta$
10.0	0.93 ± 0.07 **	68.00 ± 1.01 **	81.17 ± 7.29 **

\*\*  $P < 0.01$  vs control group;  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs 2.0 or 10.0 mg/ml MPs-B1 group

### 3 讨论

本实验室海洋多糖课题组前期研究中, 对产自我国东海的厚壳贻贝进行了多糖组分的提取, 发现仅存在单一组分, 且其粗品生物学活性较强<sup>[13]</sup>, 而纯化至纯品后某些活性明显降低。我们分析原因在

于其提取纯化过程未能分离得到具有活性的贻贝多糖纯品 MPs, 故对其分离纯化过程进行详细分析后进行了工艺改进, 结果发现厚壳贻贝中存在多个多糖组分。粗品 MPs 溶于水后首先离心除去不溶物, DEAE-cellulose 柱洗脱液体也从单纯的 dH<sub>2</sub>O 改为分别以 dH<sub>2</sub>O、0.01 mol/L NaCl、0.05 mol/L NaCl 梯度洗脱, 同时对合并后的相同组分依次经过透析除盐, 乙醇沉淀, 真空冷冻干燥等步骤得到半纯品多糖 MPs-A/B/C, 且 3 种组分从表面性状观察各不相同。因此, 可以推断贻贝多糖本身由于有多种组分, 分带负电荷与不带电荷的, 同时与阳离子结合强度不同, 故用 3 种洗脱液后能出现 3 个明显的洗脱组分峰。经免疫学实验均具有显著活性。

另外, 我们取其中活性较强的一个组分 MPs-B1 进行了纯度鉴定和单糖组分测定。MPs-B1 经过考马斯亮蓝 G250、紫外光谱扫描鉴定不含核酸与蛋白质, HPLC 显示其为单一组分。经过薄层色谱我们发现 MPs-B1 含有葡萄糖(Glc)这一单一单糖组分, 然而经过分辨率更高的的气相色谱后发现 MPs-B1 还包括半乳糖(Gal)。故初步鉴定 MPs-B1 含有 Glc

和 Gal 二种组分,有文献<sup>[14]</sup>报道厚壳贻贝提取物为单一组分,且单糖组分与我们的测定结果并不一致,其原因有待于进一步探究。

我们先前的活性测定发现贻贝多糖粗品具有良好的生物学活性,尤其是免疫学的正向调节作用显著,然而利用其先前提取纯化得到的多糖纯品再进行同样活性测定时发现没有统计学差异<sup>[13]</sup>。经过提取纯化工艺改进后得到的 MPs-B1 通过 NK 细胞活性测定、抗体生成细胞的检测、腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验结果 MPs-B1 溶液能增强小鼠 NK 细胞活性、抗体形成细胞活性、腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞活性,且随多糖浓度增高而增强。故我们分析出现这种差异的原因可能在于:(1)前期的提取方法使得粗糖内有活性或高活性的组分丢失;(2)前期得到的纯品各个组分没有细致分离,各个组分间相互作用,因其内含有拮抗正性活性的物质导致其活性丢失;(3)粗糖提取纯品过程中因工艺不精细导致粗品内的杂质影响了活性成分的作用发挥。

我们正在进行 MPs 其他组分的理化性质、纯度鉴定、单糖组分测定以及结构测定,将为贻贝多糖的深入研究打下基础。

[参考文献]

[1] 苏秀榕,李太武,丁明进.紫贻贝和厚壳贻贝营养成分的研究[J].中国海洋药物,1998,17:30-32.

[2] 刘志峰,李桂生,李萍.贻贝提取物抗高血脂作用的观察[J].中国海洋药物,2001,20:9-10.

[3] Zhu H,Geng M,Guan H. Antihypertensive effects of D-poly-

mannuronic sulfate in renovascular hypertensive rats (Series I)[J]. J Ocean Univ Qingdao, 2000,30:463-469.

[4] Hernroth B. Factors influencing bactericidal activity of blue mussel (*Mytilus edulis*) haemocytes against *Salmonella typhim-urium*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2003, 14:93-104.

[5] Herntoth B. The influence of temperature and dose on antibacterial peptide response against lipopolysaccharide in the blue mussel,*Mytilus edulis*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2003,14: 25-37.

[6] Xu B,Per H, Henrik S, et al. Endo-beta-1,4-mannanases from blue mussel,*Mytilus edulis*; purification, characterization, and mode of action[J]. J Biotechnol,2001, 2:267-277.

[7] 胡健饶,曹明富.三角帆蚌多糖抑瘤作用的实验研究[J].中国现代应用药学杂志,2003,20:11-13.

[8] Cassaro CM,Dietrich CP. Distribution of sulfated mucopolysaccharides in invertebrates[J]. J Biol Chem,1977,252:2254-61.

[9] 张豁中,温玉麟.动物活性成分化学[M].天津:天津科学技术出版社,1995.996-998.

[10] 洪鹏志,章超桦,杨文鸽,等.翡翠贻贝肉酶解动物蛋白营养评价及其生理活性初探[J].水产学报,2002,26:85-90.

[11] 张惟杰.糖复合物生化研究技术[M].2版,杭州:浙江大学出版社,1999.38-408.

[12] 季春.仙茅多糖 COPb-1 和 COPf-1 的分离纯化和结构研究[J].贵州化工,2005,30:17-19.

[13] 姚滢,魏江洲,王俊,等.厚壳贻贝多糖的提取和免疫学活性研究[J].第二军医大学学报,2005,26:896-899.

[14] 马明华,易杨华,汤海峰.厚壳贻贝多糖 MA 的分离纯化、理化性质及活性研究(I)[J].中国海洋药物,2004,23:14-18.

[收稿日期] 2005-09-01 [修回日期] 2005-11-22  
[本文编辑] 尹茶

热烈祝贺我校曹雪涛、王红阳教授当选为中国工程院院士

中国工程院 2005 年当选院士名单于日前公布,第二军医大学副校长、免疫学研究所所长曹雪涛教授和第二军医大学东方肝胆外科研究所副所长王红阳教授(女)均当选为中国工程院医药卫生工程学部院士。

中国工程院院士增选每两年举行一次。2005 年新当选的院士分别来自于教育部(14 人)、科学院(1 人)、国务院所属其他部委(9 人)、国资委管理企业(12 人)、军队(6 人)、省、直辖市、自治区(7 人)、香港特别行政区(1 人)。除教育部系统的 14 人外,国务院其他部委、各省市所属高校有 9 位当选。平均年龄为 62 岁,其中 65 岁以下的 27 人,占新当选人数的 54%;60 岁以下的 16 人,占新当选人数的 32%;50 岁以下的 5 人,占新当选人数的 10%;年龄最小的 40 岁。此外,新当选的院士中有 4 名女性。