

3 种念珠藻多糖对自由基的清除作用

汤俊^{1,2}, 胡征宇^{1,*}

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: 研究了地木耳(*Nostoc commune*)、葛仙米(*N. sphaeroides*)和发菜(*N. flagelliforme*)3种念珠藻多糖对自由基的清除作用。结果表明,3种念珠藻多糖对超氧阴离子自由基和羟自由基具有很强的清除作用,且呈量效关系,地木耳清除超氧自由基作用最强,最高清除率达72.3%,葛仙米和发菜分别为46.7%、35.5%;发菜清除羟自由基效果最强,最高清除率达74.3%,葛仙米和地木耳清除率分别为49.0%、46.7%;3种念珠藻多糖对DPPH自由基的清除作用不显著。

关键词: 念珠藻; 多糖; 清除自由基; 活性氧自由基

中图分类号: Q949.22

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2006)01-0063-04

Radical Scavenging Activities of Polysaccharides in Three *Nostoc* Species

TANG Jun^{1,2}, HU Zheng-Yu^{1*}

(1. Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China;

2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: The radical scavenging activities of polysaccharides in three *Nostoc* species were investigated employing three *in vitro* systems. The result showed that they all have a concentration-dependent scavenging effect on superoxide anion radical and hydroxyl radical. *N. commune*, with a high inhibition rate of 72.3% at 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, was the most effective scavenger on superoxide radical, while that were 46.7% and 35.5% of *N. sphaeroides* and *N. flagelliforme* respectively. Moreover, *N. flagelliforme* showed an excellent capacity on hydroxyl radical scavenging. Its maximal scavenging effect was 74.3% at the test concentration of 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, while 49.0% and 46.7% were *N. sphaeroides* and *N. commune*'s, respectively. However, three *Nostoc* polysaccharides had no significant effect on DPPH radical scavenging.

Key words: *Nostoc*; Polysaccharides; Antioxidant activity; Reactive oxygen species

念珠藻是世界上分布比较广泛的一类蓝藻,由于其较强的多糖分泌能力,近年来关于念珠藻多糖的提取、组分分析、结构特点和生物活性等方面的研究越来越受到重视。地木耳(*Nostoc commune*)、葛仙米(*N. sphaeroides*)、发菜(*N. flagelliforme*)是3种来自不同生境的可食用念珠藻,不仅含有多种人体所必需的氨基酸、微量元素和维生素,还具有高蛋白低脂肪的特点^[1-3],具有很高的食用和保健价值。多糖是一类具有抗衰老、抗肿瘤、降血糖、抗凝血及免疫促进等生物活性作用的生物大分子,关于多糖活性的研究已有许多报道,如极大螺旋藻多糖具有很强的清除羟自由基作用^[4],海带褐藻多糖硫酸酯具有清除超氧自由基的作用^[5],半叶马尾藻多糖通过提高机体免疫和抗氧化能力可抑制肿瘤的生长^[6],香菇多糖具有抗HIV活性^[7]等。人类许

多疾病的发生都与自由基有着密切的联系,因此对天然食品活性成分清除自由基作用的研究具有重要的意义。笔者通过热水抽提法提取了3种念珠藻多糖并对其自由基清除活性进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

3种念珠藻(地木耳 *Nostoc commune*、葛仙米 *N. sphaeroides*、发菜 *N. flagelliforme*)均为本实验室人工培养的液体培养物。

1.2 试剂

N-甲基吩嗪甲基硫酸盐(PMS)、还原性辅酶I二钠盐(NADHNa_2)、氯化硝基四氮唑蓝(NBT)、2-脱氧-D-核糖(DR)、二苯基苦基苯肼(DPPH)均为Sigma公司产品。抗坏血酸(L-Ascorbic Acid)、

收稿日期:2005-05-19,修回日期:2005-07-06。

基金项目:科技部农业科技成果转化资金资助项目(04EFN216600329)。

作者简介:汤俊(1980-),女,山东济南人,硕士研究生,研究方向为藻类生物技术。

* 通讯作者(E-mail:Huzy@ihb.ac.cn)。

D-甘露醇为 Duchefa 产品,三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl)为 Promega 进口分装,三氯乙酸(TCA)、硫代巴比妥酸(TBA)及其余试剂均购自中国医药集团上海化学试剂公司。

1.3 多糖制备

藻样干燥粉碎后用 80% 乙醇浸泡过夜,索氏提取器提取 4~6 h 至浸出液近无色,蒸馏水浸泡过夜,80℃水提 3 h,离心收集上清液,藻体加水再提取 2 h,离心并合并 2 次上清液。旋转蒸发仪浓缩,醇沉,乙醇和丙酮重复洗涤 2 次,干燥,得到褐色粗提物。配制 1% 粗提物溶液,采用 Sevag 法反复去除蛋白直至紫外吸收法检测无蛋白质残留,蒸馏水透析 3 d,醇沉、洗涤、干燥,得到多糖。再溶解,经 0.45 μm 玻璃纤维滤纸(Whatman 公司)过滤,醇沉,洗涤,干燥,4℃冰箱保存备用^[8,9]。

1.4 多糖对自由基的清除作用

1.4.1 清除超氧阴离子自由基 由 NADH/PMS 体系产生^[10-12],本实验对其略作修改。PMS 与 NADH-Na₂ 反应生成超氧阴离子自由基,还原 NBT 为蓝色物质,在波长 560 nm 处有最大吸收^[13]。反应体系为 4.0 mL Tris-HCl 缓冲液(20 mmol/L, pH 8.0),其中含有 20 μmol/L PMS、100 μmol/L NADHNa₂、50 μmol/L NBT 以及不同浓度(2、6、12、24 和 40 μg/mL)的多糖溶液。摇匀,室温反应 5 min,于 560 nm 波长处测定吸光度值(A)并计算清除率。

1.4.2 清除羟自由基 由 Fe³⁺/H₂O₂/DR 体系产生^[14,15],本实验对其略作修改。H₂O₂ 在 Vc 和 Fe³⁺ 存在条件下反应生成羟自由基攻击脱氧核糖,在酸性加热条件下,与硫代巴比妥酸反应生成红色化合物,在波长 532 nm 处有最大吸收^[13]。2.1 mL 磷酸缓冲液(20 mmol/L, pH 7.4)中,包含 104 μmol/L EDTA、100 μmol/L FeCl₃·6H₂O、100 μmol/L 抗坏血酸、1 mmol/L H₂O₂、2.8 mmol/L DR 及不同浓度(3、6、12、18 和 30 μg/mL)的多糖溶液,D-甘露醇作为阳性对照,37℃水浴 1 h,加 10% TCA 及 1% TBA(50 mmol/L NaOH 配制),沸水浴 15 min,测定 532 nm 波长处吸光值(A)并计算清除率。

1.4.3 清除有机自由基 有机自由基由 DPPH 体系产生^[16],本实验对其略作修改。DPPH 是一种稳定的自由基,其醇溶液呈现强紫色,在 517 nm 波长处有强吸收,加入抗氧化剂后,单电子捕获电子成对,致使 517 nm 波长下的吸光值减弱。在 3 mL 的

体系中含有 100 μmol/L DPPH 以及不同浓度(2、6、12、24 和 36 μg/mL)的样品溶液,摇匀,室温放置 20 min 后,于 517 nm 波长处测定吸光值(A)并计算清除率。清除率计算方法:

$$\text{清除率} = [(A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}) / A_{\text{对照}}] \times 100\%$$

2 结果

2.1 清除超氧阴离子自由基

在 NADH/PMS 体系产生的超氧阴离子自由基清除实验中,地木耳、葛仙米和发菜多糖在测试浓度范围内对超氧自由基均具有一定的清除作用,并且清除能力随样品浓度的升高而增强(见图 1)。其中地木耳多糖清除能力最强,在 40 μg/mL 的最高测试浓度下清除率高达 72.3%,并且随多糖浓度的升高,清除能力显著增强。葛仙米和发菜多糖的最高清除率分别为 46.4% 和 34.6%,在测试浓度低于 12 μg/mL 时,随浓度升高,清除能力明显增强,浓度高于 12 μg/mL 时,清除能力的增长幅度有所降低,但仍呈现上升趋势。

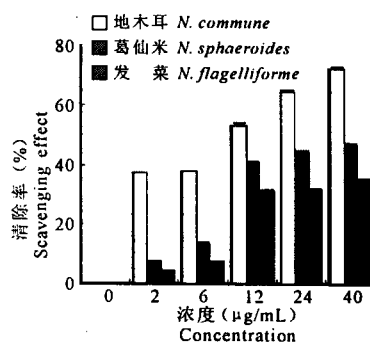


图 1 3 种念珠藻多糖清除超氧阴离子自由基作用

Fig. 1 The scavenging effects of three *Nostoc* polysaccharides on superoxide anion radical

2.2 清除羟自由基

地木耳、葛仙米及发菜对 Fe³⁺/H₂O₂/DR 体系产生的羟自由基具有很强的清除能力,并且随样品浓度的升高清除率显著增强(见图 2)。

发菜多糖对羟自由基的清除能力最强,在 30 μg/mL 浓度下清除率为 74.3%,D-甘露醇为 49.9%,葛仙米和地木耳多糖分别为 49.0% 和 46.7%。葛仙米和地木耳多糖在各个测试浓度对羟自由基的清除能力均相近,且在实验浓度范围内(30 μg/mL 浓度除外)的清除能力均高于 D-甘露醇。

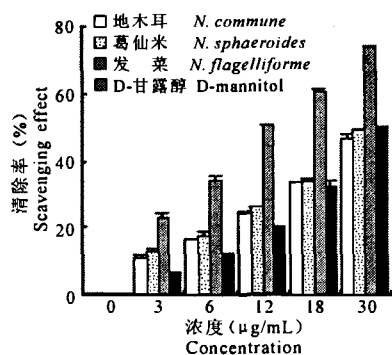


图 2 3 种念珠藻多糖清除羟自由基作用
Fig. 2 The scavenging effects of three *Nostoc* polysaccharides on hydroxyl radical

2.3 清除 DPPH 自由基

结果显示,地木耳、葛仙米和发菜多糖对 DPPH 自由基的清除作用不显著,在 36 µg/mL 浓度处清除率依次为 4.4%、3.9% 和 4.1% (图 3)。

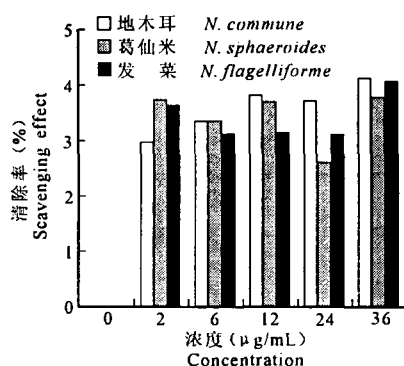


图 3 3 种念珠藻多糖清除 DPPH 自由基
Fig. 3 The scavenging effects of three *Nostoc* polysaccharides on DPPH radical

3 讨论

自由基产生于机体内的许多氧化还原过程,他们由特定的酶(超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶等)捕获或破坏。正常情况下,机体自由基的产生和清除处于一种动态平衡中,如果这个平衡被打破,机体内就会产生过量的氧自由基而对机体造成伤害,如引起脂质过氧化而改变生物膜结构及功能,损伤 DNA,使蛋白质变性及酶活力丧失等,这些危害直接或间接地导致了炎症、衰老、心血管疾病及肿瘤的发生^[5]。超氧阴离子自由基和羟自由基是最具代表性的活性氧自由基,在机体的氧化反应中,超氧阴离子自由基通常最先形成,可通过形成其他多种有破坏作用的自由基而使其功能放大。羟自由基毒性最强,几乎能与所有的功能性生物大分子起反应,造成生物体的巨大伤害^[17]。本

实验结果表明:地木耳、葛仙米和发菜多糖具有很强的清除超氧自由基和羟自由基的作用,且不同种念珠藻对不同自由基的清除能力不同,但对 DPPH 自由基的清除作用不明显。

地木耳、葛仙米及发菜多糖的抗氧化作用可能与它们的生境有关。地木耳主要分布在石灰石或喀斯特地形区,生境特点是周期性渍水;葛仙米主要生活在水稻田;发菜则主要分布于荒漠地带。水分及辐射可能影响藻体正常代谢而产生过多自由基,而抗氧化性则可能是对生境的一种适应。此外,据念珠藻多糖组分及结构的研究,地木耳、葛仙米及发菜多糖含有半乳糖、葡萄糖、木糖、海藻糖等组分^[18],这些单糖都是有效的还原剂,可以推测 3 种藻的抗氧化作用可能与单糖的还原性质有关。但是 3 种多糖在组成、含量和糖链结构上又有所不同,这可能是导致抗氧活性强弱不同的原因。

3 种念珠藻多糖对 DPPH 自由基的清除作用不显著,可能与糖分子的极性有关:DPPH 自由基为醇溶性,而多糖在醇中易沉淀,即使醇浓度不足以使多糖沉淀,也可能在一定程度上限制了其抗氧化作用的发挥。对 DPPH 自由基清除作用不显著的另一种推测是与多糖的结构有关。据报道,Vc 对 DPPH 自由基有很强的清除作用,这种强抗氧化作用可能来源于其特殊结构。Vc 结构中的烯二醇基团极不稳定,易脱氢而被氧化为二酮,这使得抗坏血酸具有很强的还原性^[19]。据此推测,多糖的抗氧化作用可能与自身结构有关,但具体的构效关系及作用机理还有待于进一步的研究。

参考文献:

- [1] 盛家荣,范会钦,曾令辉.普通念珠藻的主要营养成分分析[J].广西师院学报(自然科学版),1998,15(4):68-70.
- [2] 韩丹翔,毕永红,胡征宇.念珠藻的研究进展及其应用前景[J].高技术通讯,2004,14(3):106-110.
- [3] 毕永红,胡征宇.葛仙米的营养价值及其开发利用[J].中国野生植物资源,2004,23(1):40-42.
- [4] 周志刚,刘志礼,刘雪娟.极大螺旋藻多糖的分离、纯化及其抗氧化特性的研究[J].植物学报,1997,39(1):77-81.
- [5] 张全斌,于鹏展,周革非,李智恩,徐祖洪.海带褐藻多糖硫酸酯的抗氧化活性研究[J].中草药,2003,34(9):824-826.
- [6] 刘秋英,孟庆勇.半叶马尾藻多糖体内抗肿瘤作用及其机制探讨[J].第一军医大学学报,2004,24(4):434-436.
- [7] 李丹,尚红,姜拥军,王亚男.香菇多糖体外抗 HIV 的免疫调节作用的实验研究[J].中国免疫学杂志,2004,20(4):253-255.
- [8] 莫开菊,谢笔均,汪兴平,刘怀臣.葛仙米多糖的提取、分离与纯化技术研究[J].食品科学,2004,25(10):103-107.

- [9] 盛家荣,翟春,邓学联. 均匀设计法用于提取普通念珠藻粗多糖条件优选的研究[J]. 广西师院学报(自然科学版), 2000, 17(2): 46-49.
- [10] Nishikimi M, Rao N A, Yagi K. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulphate and molecular oxygen [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1972, 46(2): 849-854.
- [11] Liu F, Ooi V E, Chang S T. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts[J]. *Life Sci*, 1997, 60(10): 763-771.
- [12] Sun C, Wang J W, Lei F, Gao X D, Tan R X. Free radical scavenging and antioxidant activities of EPS2, an exopolysaccharide produced by a marine filamentous fungus *Keissleriella* sp. YS 4108[J]. *Life Sci*, 2004, 75(9): 1 063-1 073.
- [13] 文镜,贺素华,杨育颖,唐秀华. 保健食品清除自由基作用的体外测定方法和原理[J]. 食品科学, 2004, 25(11): 190-195.
- [14] Nandita S, Rajini P S. Free radical scavenging activity of an aqueous extract of potato peel[J]. *Food Chem*, 2004, 85(4): 611-616.
- [15] Halliwell B, Gutteridge J M C, Aruoma O. The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals [J]. *Analy Biochem*, 1987, 165(1): 215-219.
- [16] Blois M S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical[J]. *Nature*, 1958, 181(26): 1 199-1 200.
- [17] Liu F, Ng T B. Antioxidative and free radical scavenging activities of selected medicinal herbs [J]. *Life Sci*, 2000, 66(8): 725-735.
- [18] Huang Z B, Liu Y D, Berit S P, Dag K. Studies on polysaccharides from three edible species of *Nostoc* (Cyanobacteria) with different colony morphologies: comparison of monosaccharide compositions and viscosities of polysaccharides from field colonies and suspension cultures [J]. *J Phycol*, 1998, 34(6): 962-968.
- [19] 许申鸿,杭翊. DPPH·分光光度法测定抗坏血酸[J]. 食品科学, 1999(7): 55-57.

《武汉植物学研究》声明

为了扩大影响,推进科技信息交流的网络化进程,本刊已先后入编《中国学术期刊(光盘版)》、万方数据——数字化期刊群、中文科技期刊数据库等出版介质。凡向本刊投稿并被录用的稿件,将一律由编辑部统一纳入《中国学术期刊(光盘版)》、万方数据——数字化期刊群、中文科技期刊数据库等电子出版介质,为读者提供信息服务。如有不同意将纸质出版物以外的其它各种出版权(包括光盘、网络电子期刊版权)转让给本刊的,请在投稿时予以说明。本刊付给作者的稿酬已包含以上出版介质服务报酬,除此外不再另付。

读者可通过以下网址查询浏览本刊内容,并征订本刊:

<http://wzxy.Chinajournal.net.cn> ;

<http://whzwxyj.periodicals.net.cn> ;

<http://202.127.158.171/kp/yyzy/cscd/swu/cscd/wuhan/index.htm> ;

<http://www.cqvip.com>

《武汉植物学研究》编辑部

2006年2月