

抗肿瘤活性青蛤多肽的提取工艺研究

闫海强, 滕芳芳, 刘志新, 黄芳芳, 杨最素, 丁国芳*

(浙江海洋学院, 浙江省海洋生物医用制品工程技术研究中心, 浙江舟山

316022)

摘要 [目的] 探究具有抗肿瘤活性的青蛤多肽的最佳提取工艺路线。[方法] 选择胰蛋白酶酶解青蛤, 以酶解液对 PC-3 细胞增殖抑制率 (IR) 为指标, 研究料液比、温度、pH、加酶量和酶解时间对多肽提取率的影响, 探讨最佳工艺, 并采用超滤及 G25 洗脱分离纯化提取液。[结果] 当温度为 45 °C、pH 为 7.0、料液比为 1:3、酶解时间为 6 h、加酶量为 300 U/g 时, 分子量为 3~5 kD 青蛤提取液的抗肿瘤活性最好; 分离纯化后在 280 nm 波长处得到 3 个峰, 其中峰 1 和峰 2 成分抗肿瘤活性显著。[结论] 以细胞增殖抑制率为指标可以确定青蛤多肽的提取及优化工艺路线。

关键词 青蛤多肽; 细胞增殖抑制率; 分离纯化

中图分类号 S966 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)12-03576-02

Anticancer Activity of Peptides Isolated from Hydrolysates of *Cyclina sinensis*

YAN Hai-qiang, DING Guo-fang et al (School of Food Science and Medical of Zhejiang Ocean University, Zhejiang Provincial Engineering Technology Research Center of Marine Biomedical Products, Zhoushan, Zhejiang 316022)

Abstract [Objective] To explore optimal extraction process for *Cyclina sinensis* peptides. [Methods] *Cyclina sinensis* was hydrolyzed with trypsin to get peptides; the conditions of hydrolysis were optimized according to its antitumor activity on PC-3 cell; solid to liquid ratio, extraction times, temperature, pH and enzyme concentration were studied; the technology parameters was determined by the orthogonal test. *Cyclina sinensis* hydrolysates were isolated by ultra-filtration and purified using G-25 gel filtration. [Results] The best conditions of enzymatic hydrolysis were temperature of 45 °C, pH 7.0, enzyme concentration of 300 U/g, solid-liquid ratio of 1:3, and time of 6 h. After gel filtration, three anticancer peptide fractions were collected. Peak 1 and peak 2 had the higher anticancer activity. [Conclusion] Taking inhibition of cell proliferation as indicators can effectively extract clam *Cyclina sinensis* peptides and optimize process routes.

Key words *Cyclina sinensis* peptides; Cell proliferation inhibition rate; Isolation and purification

青蛤 (*Cyclina sinensis* Gmelin) 隶属软体动物门、瓣鳃纲、帘蛤目、帘蛤科, 俗称黑蛤、圆蛤、铁蛤等, 是我国沿海地区常见的一种贝类。青蛤属于海洋高蛋白食品, 具有较高的食用价值与经济价值, 是我国沿海城市的主要经济来源之一^[1]。从海洋贝类中提取活性物质是近年来的研究热点。研究表明, 青蛤肉提取液能显著提高脾脏淋巴细胞、淋巴结巨噬细胞和巨噬细胞酸性酯酶的活性, 具有促进机体免疫应答、提高机体免疫力和防止疾病发生、延缓机体细胞衰老等作用^[2], 同时具有显著调节机体淋巴细胞数量及各亚群比例的能力, 提高试验小鼠的免疫功能^[3]。然而, 应用酶解的方法提取青蛤多肽进行抗肿瘤的瘤试验报道甚少。笔者采用 L₁₆(4⁵) 正交试验, 以 MTT 法细胞增殖抑制率 (IR) 为标准, 探讨胰蛋白酶酶解青蛤内脏的最佳条件, 经超滤得到的酶解液进行体外的抗前列腺癌试验, 以期在抗肿瘤领域寻找新的活性物质, 并为进一步研究青蛤提供科学依据。

1 材料与与方法

1.1 原料与试剂 新鲜青蛤购自当地农贸市场, 去壳取内脏匀浆后, -20 °C 冷冻备用; 胰蛋白酶、MTT (Sigma 公司); 人前列腺癌细胞 PC-3、人前列腺癌细胞 PC-3 (购自中国科学院上海细胞库); F12 培养基 (Gibco 公司); 胎牛血清 (杭州四季青生物工程有限公司); 青霉素、链霉素, 均购自山东鲁抗医药股份有限公司; 二甲基亚砷 (美国 AMRESKO 公司); Sephadex G-25 (上海源叶生物科技有限公司)。其他试剂均

为国药分析纯。

1.2 主要仪器与设备 DS-1 型高速组织捣碎机 (上海标本模型厂); 722S 可见分光光度计 (上海恒平科学仪器有限公司); BSA124S 型电子天平 (德国 Sartorius AG 公司); 超滤杯、滤膜等 (上海摩速科学器材有限公司); 倒置显微镜 (OLYMPUS 公司); SSW 型微电脑电热恒温槽 (上海博迅实业有限公司医疗设备厂); CF16RXII 高速冷冻离心机 (HITACHI 公司); Forma 3111 型 CO₂ 培养箱 (Thermo 公司); ZHJH-C1209C 型超净工作台 (上海智诚分析仪器制造有限公司); 酶标仪 (Bio-Rad 公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 青蛤多肽的酶解工艺优化。 选用胰蛋白酶进行酶解, 以 A (料液比)、B (pH)、C (酶解时间)、D (加酶量) 和 E (酶解温度) 5 个因素进行正交试验 (表 1), 比较在不同酶解条件下酶解液的细胞增殖抑制率, 从而确定青蛤多肽的最佳酶解条件。酶解工艺流程为: 青蛤洗净→去壳取肉→匀浆→酶解→灭酶 (90 °C, 15 min)→10 000 r/min 离心 30 min→上清液→浓缩→冷冻干燥→抗肿瘤活性检测。

表 1 胰蛋白酶提取青蛤多肽的因素与水平设定值

水平	因素				
	A 料液比	B pH	C 酶解时间/h	D 加酶量 U/g	E 酶解温度/°C
1	1:0	7.0	2	300	30
2	1:1	7.5	4	600	35
3	1:2	8.0	6	900	40
4	1:3	8.5	8	1 200	45

1.3.2 细胞培养。 选取人前列腺癌 PC-3 细胞, 用含 10% 胎

基金项目 浙江省自然科学基金项目 (LY12C20005, LY12C20008)。
作者简介 闫海强 (1978 -), 男, 陕西丹凤人, 讲师, 在读硕士, 从事海洋活性物质研究。* 通讯作者, 教授, 硕士生导师, 从事海洋药物研究。

收稿日期 2014-04-09

牛血清的 F12 培养液于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 试验时选取对数生长期细胞。

1.3.3 细胞增殖抑制指数(IR)的测定。采用 MTT 法进行细胞增殖抑制指数(IR)的测定。制备 PC-3 细胞悬液以 1 × 10⁴ 个/ml 接种至 96 孔培养板, 每孔 200 μl, 于 5% CO₂、37 ℃ 贴壁培养 24 h; 然后分别加入不同正交组分的青蛤酶解液, 每个浓度设置 3 个平行孔, 同时设立 PBS 对照组, 培养 24 h 后弃营养液; 加入 MTT 200 μl, 继续培养 4 h, 吸弃 MTT, 加入 150 μl 的 DMSO 充分振荡 10 min 后, 置于酶标仪上在波长 490 nm 处测定吸光度 A 值, 按下列公式计算细胞增殖抑制指数(IR): $IR = [(对照组 A 值 - 药物组 A 值) / 对照组 A 值] \times 100\%$ 。

1.3.4 青蛤样品的分离与纯化。

1.3.4.1 超滤。采用“1.3.1”中得到的最佳酶解工艺青蛤多肽离心后上清液进行超滤收集孔 > 10 kD、5 ~ 10 kD、3 ~ 5 kD、1 ~ 3 kD、< 1 kD 的 5 种滤液。采用 MTT 法检测各组分的细胞增殖抑制率。

1.3.4.2 G-25 凝胶层析分离。以最佳提取工艺条件下提取青蛤多肽, 冷冻干燥后得到样品。将样品配置成 0.1 g/ml 的水溶液, 1 000 r/min 离心 10 min, 取上清液。将所得上清液过滤, 除杂。经 G-25 分离纯化(上样量 2 ml/次, 流速 3 ml/min), 自动收集洗脱液(每管 2 ml), 在 280 nm 处检测, 收集各峰洗脱液。采用 MTT 法检测各峰的细胞增殖抑制率(青蛤酶解液浓度为 5 mg/ml)。

表 2 胰蛋白酶对青蛤酶解工艺条件的正交试验结果

编号	A 温度 ℃	B pH	C 料液比	D 时间 h	E 加酶量 U/g	用药组平均 OD 值	IR %
1	1(30)	1(7)	1(1:0)	1(2)	1(300)	0.330	25.66
2	1	2(7.5)	2(1:1)	2(4)	2(600)	0.372	9.88
3	1	3(8)	3(1:2)	3(6)	3(900)	0.348	18.87
4	1	4(8.5)	4(1:3)	4(8)	4(1 200)	0.370	10.57
5	2(35)	1	2	3	4	0.310	33.21
6	2	2	1	4	3	0.330	25.66
7	2	3	4	1	2	0.422	9.06
8	2	4	3	2	1	0.370	10.57
9	3(40)	1	3	4	2	0.219	67.55
10	3	2	4	3	1	0.217	68.30
11	3	3	1	2	3	0.375	8.68
12	3	4	2	1	4	0.414	6.04
13	4(45)	1	4	2	3	0.216	68.68
14	4	2	3	1	4	0.371	10.19
15	4	3	2	3	1	0.190	78.49
16	4	4	1	4	2	0.216	68.68
k ₁	0.138	0.488	0.314	0.052	0.458		
k ₂	0.143	0.277	0.289	0.244	0.342		
k ₃	0.346	0.242	0.268	0.473	0.260		
k ₄	0.565	0.186	0.322	0.424	0.133		
极差	0.427	0.302	0.054	0.421	0.325		

2 结果与分析

2.1 最佳酶解条件的确定 由表 3 可知, 以细胞增殖抑制率为指标, 影响青蛤多肽提取率的主要因素顺序依次为温度 > 时间 > 加酶量 > pH > 料液比。青蛤多肽的最佳提取工艺

为 A₄B₁C₄D₃E₁, 即温度为 45 ℃、pH 为 7.0、料液比为 1:3、酶解时间为 6 h、加酶量为 300 U/g。以此为酶解条件所得到的酶解物作为下一步试验用样品。

2.2 青蛤样品的分离与纯化结果

2.2.1 超滤结果。从表 3 可以看出, 青蛤酶解液的大小在 3 ~ 5 kD 时抗肿瘤活性最好, 且其活性随着青蛤酶解液浓度的减小而减弱。超滤条件选取 3 ~ 5 kD, 得到的液体作为下一步试验的样品。

表 3 不同分子量青蛤酶解液对前列腺癌细胞的增殖抑制率 %

多肽分子量//kD	1 mg/ml	5 mg/ml	10 mg/ml
	青蛤酶解液	青蛤酶解液	青蛤酶解液
<1	8.68 ± 7.9	53.60 ± 6.5	73.26 ± 4.7
1~3	7.43 ± 5.4	40.65 ± 8.4	58.68 ± 7.5
3~5	9.59 ± 11.9	62.33 ± 7.0	76.24 ± 5.7
5~10	13.07 ± 8.4	36.99 ± 7.6	58.21 ± 5.2

2.2.2 G-25 凝胶层析分离。从图 3 可以看出, 经 G-25 葡聚糖凝胶柱分离, 在波长 280 nm 处紫外检测得到 3 个峰, 分别标记其为峰 1、峰 2、峰 3, 其 IR 值分别为 0.958、0.956 和 0.149。这说明峰 1 和峰 2 较峰 3 具有更加显著的抗肿瘤活性, 且其抗肿瘤活性比阴性对照组更为理想。

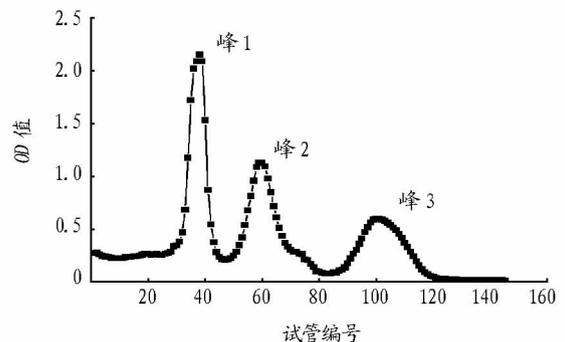


图 3 样品的 Shephadax G25 分离色谱结果

3 讨论

笔者首先以青蛤为材料采用 L₁₆(4⁵) 正交试验, 由于参考其他类似报道从而得出水解程度与肿瘤细胞增殖抑制率没有相关性^[4-6], 故笔者直接选择肿瘤细胞增殖抑制率(IR)作为正交试验的考察指标, 考察了各因素及水平对胰蛋白酶酶解的影响, 确定从青蛤中提取多肽的最佳酶解条件: 温度为 45 ℃、pH 为 7.0、料液比为 1:3、酶解时间为 6 h、加酶量为 300 U/g。青蛤酶解液的分子量在 3 ~ 5 kD 时抑制前列腺癌细胞 PC-3 活性最为显著, 但其分子量小于 1 kD 时的活性与分子量为 3 ~ 5 kD 时相差不多, 据此推测青蛤酶解液中含有多种对前列腺癌细胞 PC-3 具有抑制作用的活性结构, G25 凝胶层析图谱证实了该结论。G25 凝胶层析图谱中的峰 1 和峰 2 对前列腺癌细胞 PC-3 的抑制作用都非常显著, 其活性较阴性对照组更为显著。

青蛤胰蛋白酶提取液中的活性物质具体结构暂时还不明确, 有待进一步试验验证, 其抗肿瘤作用机制尚不清楚。此外, 为了能够更加准确、全方位地评价青蛤多肽的抗肿瘤

无菌采集病猪病料,分别接种于鲜血琼脂平板和普通肉汤培养基中,将接种的鲜血琼脂平板放置于 37 °C 下培养 24 h 后,可见由细菌接种点向周围迁徙性扩散生长的灰色平铺菌落,且以接种点为中心形成水波纹状同心圈,覆盖整个平板上;另外,血平板变黑,散发出特殊的腐败性臭味。普通肉汤培养基于 37 °C 下培养 24 h 后呈均匀混浊样,并有气泡产生。培养物经革兰氏染色,油镜观察均可见革兰氏阴性杆菌,大小不等但较为一致,无芽孢和荚膜。分离的细菌接种于麦康凯平板中,没有粉红色菌落形成。

3.2 生化鉴定 将分离的细菌按照猪奇异变形杆菌的生化特性进行生化试验,应与该菌的生化特性相符合。

3.3 动物致病性试验 取已培养 24 h 的肉汤培养物按照 0.2 ml/只的剂量腹腔注射试验组小白鼠 4 只;对照组 4 只小白鼠则腹腔注射生理盐水 0.2 ml/只。试验组小白鼠在接种肉汤培养物后 24 ~ 48 h 期间相继出现腹泻症状,并陆续全部死亡。对照组小白鼠没有异常表现。取死亡小白鼠的肝脏接种于鲜血琼脂平板中,于 37 °C 下培养 24 h 后可见鲜血琼脂平板上生长有迁徙性扩散的灰色平铺菌落。取该灰色平铺菌落进行革兰氏染色并镜检,可见革兰氏阴性、大小不等的杆菌。对照组的小白鼠的肝脏接种于鲜血琼脂平板中,37 °C 恒温箱培养 24 h 后没有观察到任何菌落。

3.4 奇异变形杆菌的分子生物学检测 林红乐等^[9]针对编码奇异变形杆菌脲酶调节子的基因序列设计 2 条 PCR 引物,扩增片段长度为 225 bp,结果发现 PCR 检测 PM 的结果与传统培养方法一致,PCR 方法较传统培养方法更加快捷,在 4 h 内即可完成扩增反应,PCR 方法敏感度可达 30 cfu/ml。苏良等^[10]也针对奇异变形杆菌脲酶调节子编码基因特异性序列的 6 个位点设计 4 条 LAMP 引物,建立一种检测奇异变形杆菌快速且特异的环介导等温扩增(LAMP)检测方法,该方法检测奇异变形杆菌的特异性与普通 PCR 相同,但其敏感性比普通 PCR 高 10 倍,且检测速度更快,在 60 min 内即可完成扩增反应。

4 猪奇异变形杆菌病的防治措施

虽然该病已经成为危害养猪业较为严重的一种新的细

菌性传染病,但其重要性还未引起养猪行业的足够重视,还未研制出有效的疫苗对该病进行预防,因此该病的防治只能从加强饲养管理和进行药物治疗 2 个方面进行。

4.1 饲养管理措施 预防该病首先必须加强生物安全管理和改善饲养管理,对环境、饲料、饮水供应等的管理应严格加强,改善猪舍的卫生条件,特别注意通风、保持干燥、防寒及降低饲养密度。在各阶段都尽量实行全进全出,以便猪舍在全部猪出栏后彻底消毒 7 d 以上。

4.2 药物治疗 猪变形杆菌容易对临床常用的抗生素产生耐药性。夏修三等^[11]对从人体内分离的 28 株奇异变形杆菌进行了药敏试验,结果表明奇异变形杆菌对一代头孢菌素头孢唑啉耐药率为 100%,对二代头孢呋辛的耐药率为 51.9%,对氨苄西林的耐药率为 73.7%,对诺氟沙星的耐药率为 50%。因此在确诊该病病原以后应根据细菌的药敏试验结果选用敏感的抗菌药物进行预防和治疗。对有严重脱水的仔猪则另外加服补液盐水和电解多维溶液。为了预防该病的再次发生,养殖场也可在饲料中添加适量的敏感抗菌药物进行预防。

参考文献

- [1] W·A·黑根, D·W·布隆纳尔. 家畜传染病[M]. 7 版. 北京: 农业出版社, 1988: 83 - 84.
- [2] 曲信芹, 穆晓惠, 李甜甜. 一株致病性奇异变形杆菌的分离与鉴定[J]. 山东畜牧兽医, 2012(4): 15 - 16.
- [3] 潘玉善, 苑丽, 刘建华, 等. 鸡大肠杆菌和奇异变形杆菌的分离、鉴定及药敏分析[J]. 江西农业学报, 2009, 21(12): 156 - 159.
- [4] 肖定汉, 杨通广, 李兰华, 等. 犊牛变形杆菌病[J]. 中国奶牛, 2009(1): 31 - 32.
- [5] 叶树株, 黄言钧, 张理谋. 猪变形杆菌感染症的调查研究[J]. 畜牧兽医学报, 1991, 22(1): 74 - 77.
- [6] 吴凌, 徐春厚. 猪链球菌和变形杆菌混合感染的诊断[J]. 中国兽医杂志, 2003, 39(4): 56 - 57.
- [7] 封会茹, 董晓根, 赵伟, 等. 变形杆菌菌落计数方法的探讨[J]. 现代预防医学, 2008, 35(1): 126 - 129.
- [8] 李仲兴, 郑家齐, 李家宏, 等. 诊断细菌学[M]. 香港: 黄河文化出版社, 1992: 330 - 331.
- [9] 林红乐, 文岚, 张如胜. PCR 快速检测奇异变形杆菌的研究[J]. 实用预防医学, 2009, 16(2): 560 - 562.
- [10] 苏良, 张如胜, 宋克云, 等. 环介导等温扩增(LAMP)技术检测奇异变形杆菌方法的建立[J]. 现代预防医学, 2010, 37(4): 741 - 743.
- [11] 夏修三, 宋翠云, 金秋平, 等. 34 株变形杆菌的检出及药物敏感试验结果分析[J]. 淮海医药, 2013, 31(3): 238 - 239.
- [12] 张桂兰, 刘翠, 蒙一纯, 等. 青蛤、扇贝肉提取液对老龄鼠免疫器官巨噬细胞、淋巴细胞 ANAE 活性影响[J]. 空军医高专学报, 1997, 19(1): 4 - 6.
- [13] 杨永芳, 丁国芳, 杨最素, 等. 紫贻贝酶解多肽体外抗肿瘤活性研究[J]. 浙江海洋学院学报, 2011, 30(2): 113 - 118.
- [14] LIN W J, CHIEN Y L, PAN C Y, et al. Epinecidin-1, an antimicrobial peptide from fish (*Epinephelus coioides*) which has an antitumor effect like lytic peptides in human fibrosarcoma cells[J]. Peptides, 2009, 30: 283 - 290.
- [15] GUO H, YOSHIAKE K, MASE Y. Isolation and properties of antioxidative peptodes from water-soluble roral jelly protein hydrlysate[J]. Food Science Technology Research, 2005, 11(2): 222 - 230.

(上接第 3577 页)

活性及其瘤谱,还应该使用青蛤多肽对其他癌细胞进行抗肿瘤活性测试,明确其抑制作用,并进行体内试验和活性作用机理研究及药理学药剂学方面的研究。该研究为青蛤多肽的提取提供了依据,对天然活性物质抗肿瘤的开发与利用具有深远意义。

参考文献

- [1] 顾润润, 于业绍, 蔡友琼. 青蛤的营养成分分析与评价[J]. 动物学杂志, 2006(3): 70 - 74.
- [2] 徐根峰. 即食青蛤食品的研制[D]. 无锡: 江南大学, 2006.