

海洋来源硫酸多糖体外抗氧化活性作用的初步研究

杨文盛¹, 袁春红², 韩 华^{1*}¹同济大学医学院, 上海 200092; ²岩手大学农学部食料生产环境学科, 岩手 020-8550

摘要:利用不同极性的溶剂提取、分离并检测裙带菜、紫菜、羊栖菜、糙海参这四种海洋生物的多糖类抗氧化活性物质,以期筛选出具有显著体外活性的海洋来源抗氧化剂。采用过氧化值(POV)、稳定自由基(DPPH·)、多酚氧化酶(PPO)、超氧阴离子自由基(O₂⁻)四种体外筛选方法表征不同来源硫酸多糖产物的抗氧化活性。结果显示,四种硫酸多糖可显著抑制猪油的过氧化,并可清除自由基和超氧阴离子,抑制多酚氧化酶的活性,抗氧化活性呈现出一定的浓度依赖性,显示了不同程度的抗氧化作用。这四种硫酸多糖具有发展为天然高效抗氧化剂的潜力。

关键词:抗氧化性;POV;DPPH;PPO;海洋生物;硫酸多糖

中图分类号:R914

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021)7-1081-05

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.7.001

The antioxidant activity *in vitro* of sulfated polysaccharides from marine sources

YANG Wen-sheng¹, YUAN Chun-hong², HAN Hua^{1*}¹School of Medicine, Tongji University, Shanghai 200092, China; ²Department of Food Production and Environmental Management, Faculty of Agriculture, Iwate University, Iwate 020-8550, Japan

Abstract: To screen out the marine antioxidants with activity, we extracted and isolated four polysaccharides from *Undaria pinnatifida*, *Porphyra*, *Sargassum fusiforme* and *Holothuria scabra* through different polar solvents. The antioxidant activities of sulfated polysaccharide were determined via peroxide value (POV), polyphenol oxidase (PPO), and two free radical tests (DPPH· and O₂⁻). The results showed that four kinds of sulfated polysaccharides significantly inhibited the peroxidation of lard, scavenged free radicals in DPPH and superoxide anion system, and exhibited considerable antioxidant activities against PPO, with a certain concentration dependence. In conclusion, these four sulfated polysaccharides have the potential to develop into natural antioxidants.

Key words: antioxidant activity; POV; DPPH; PPO; marine organism; sulfated polysaccharide

活性氧(reactive oxygen species, ROS)系氧代谢的天然次级产物,在细胞信号传导和体内平衡中充当重要的“氧化还原信使”。近年研究表明,ROS与许多病理生理现象密切相关,如肿瘤、炎症、衰老、体循环失调等,而当体内氧化和抗氧化动态平衡被打破,机体过负荷的ROS攻击靶器官,触发不饱和烷基自由基引发的链式自由基反应,所形成的过氧化物可造成细胞膜脂质过氧化,破坏核酸主链及蛋白质多肽键,而致细胞凋亡^[1,2]。抗氧化剂按来源有天然和人工合成之分。天然来源抗氧化剂如生育

酚、类黄酮、硫酸多糖等,合成抗氧化剂如叔丁基对苯二酚(TBHQ)、没食子酸丙酯(PG)、丁基化羟基甲苯(BHT)、丁基化羟基茴香醚(BHA)等。人工合成的抗氧化剂对肝、肾具有一些较为严重毒副作用,在使用上存在安全隐患^[3,4],而天然抗氧化剂可避免这些副作用。由此,对自由基失衡相关疾病的防治而言,发现能有效阻断氧自由基反应且毒副作用较低天然抗氧化剂具有重要意义。海洋生物因含有多种营养成分和生理活性物质而倍受人们的重视,其中有些成分是陆生植物所没有的。在研究中人们发现,以海藻、海参等为代表的海洋生物广泛存在着天然抗氧化活性物质,其组织中有许多直接通过清除自由基或提高机体自身抗氧化防御体系的自由基清除剂和抗氧化剂^[5,6]。为此,本文拟从三种

海藻(紫菜、裙带菜、羊栖菜)及一种海参(糙海参)生物活性物质的提取开始,对它们进行系统的分离与检测,重点研究这几种海洋来源硫酸多糖的抗氧化作用,从中筛选出具有抑制自由基及多酚氧化酶活性的抗氧化物质,以期拓展药用天然抗氧化剂的生物资源。

1 材料与方法

1.1 试剂及生物材料

邻苯二酚、邻苯三酚、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、无水乙醇、正丁醇、三氯甲烷(CHCl_3)、石油醚、冰醋酸(HAc)、Brij35、Tris、维生素C(V_C)、维生素E(V_E)、茶多酚(tea polyphenols, TP)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、碘化钾(KI)、硫代硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)、盐酸、重铬酸钾、可溶性淀粉等购自中国医药集团有限公司,均为分析纯。紫菜(*Porphyra*)、羊栖菜(*Sargassum fusiforme*)、裙带菜(*Undaria pinnatifida*)、糙海参(*Holothuria scabra*)、乌贼墨(sepia)等为市购,用水漂洗,去除表面污物杂质,晾干备用。猪肉市售,小火熬出猪油,待降温后过滤,备用。

1.2 硫酸多糖粗提物的制备

三种海藻多糖的提取参照文献^[7,8]。裙带菜(干重680 g)粉碎,无水乙醇常温浸提三次,每次24 h,过滤,保留残渣。取残渣约150 g, HCl 溶液调节

pH 值至3,在90 °C热水浴提取5 h,得水提液。30%乙醇溶液多次离心去除海藻酸,合并上清液,60%乙醇溶液搅拌,静置、离心、沉淀,真空冷冻干燥得裙带菜硫酸多糖(sulfated polysaccharide from *U. pinnatifida*, UPSP)粗品。紫菜(干重900 g)粉碎后同上法浸提,合并滤液,旋转蒸发浓缩,合并后制成浸膏, Sevag 法脱蛋白^[8],冻干后可得紫菜硫酸多糖(sulfated polysaccharide from *Porphyra*, PSP)粗品。羊栖菜(干重1 000 g)粉碎过筛(40目),80 °C热水浴提取两次,每次3 h,合并提取液,浓缩离心,得上清后浓缩成浸膏,冻干后得水提羊栖菜硫酸多糖(sulfated polysaccharide from *S. fusiforme*, SFSP)。海参多糖的提取参照 Wang 等^[9]的方法。糙海参(干重6 500 g)粉碎,用70%乙醇冷浸提取三次,每次7天,回收乙醇得流浸膏。分散在水中,不同极性溶剂依次萃取,得石油醚相和正丁醇相,后者减压浓缩,大孔树脂柱脱盐得粗提多糖,再经 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶过滤纯化,得糙海参硫酸多糖(sulfated polysaccharide from *H. scabra*, HSSP)。

1.3 硫酸多糖含量的测定

参照文献^[10]使用苯酚-硫酸法测定硫酸多糖的含量,以葡萄糖标准溶液建立标准曲线,根据标准曲线计算待测样品的硫酸多糖含量(见表1)。

表1 四种海洋来源硫酸多糖的粗提结果

Table 1 Extraction results of sulfated polysaccharides from four marine sources

样本 Sample	提取方法 Extraction method	粗提物质量 Mass of crude extract(g)	硫酸多糖含量 Sulfated polysaccharide content(%)
UPSP	溶剂提取法	8.189 2	90.12
PSP	溶剂提取法	14.532 1	86.74
SFSP	溶剂提取法	81.001 4	89.24
HSSP	溶剂提取法+凝胶层析	75.802 1	88.73

1.4 抗氧化活性检测

1.4.1 过氧化值(POV)法测定抗氧化活性

称取80 g猪油,与0.2 g的各待测物混合,制成浓度为0.25%的油脂溶液,置于 60 ± 2 °C的烘箱中。在各时间点分别取出适量转移至碘量瓶中,以 CHCl_3 -HAc/饱和KI体系放置暗处反应3 min, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 标准溶液(N , mol/L)滴定,至淡黄色时,加入淀粉指示剂(1%)后继续滴定至蓝色消失为终点,记录下消耗 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 标准溶液的体积(V)。使用公式计算过氧化率: $\text{POV} = (V \times N \times 0.1269 /$

$m) \times 100\%$;其中: m 为样品的质量(g),0.1269为1 mL $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (1 mol/L)相当于碘的质量(g)数值^[11]。 V_C 和 V_E 为阳性对照,不加干预物的猪油为空白对照(control, Con)。

1.4.2 DPPH法测定抗氧化活性

分别准确称取各受试样品于容量瓶中溶解并定容至刻度线,配置溶液用于抗氧化活性的测定。分别量取样品溶液及DPPH溶液各2 mL于比色皿中,静置反应,于517 nm处测定吸光度(A_i)。设立对照并测定:溶剂与DPPH溶液体系(阴性对照, A_c),受

试样品与溶剂体系(空白对照, A_j)^[12,13]。计算清除率: $I = [1 - (A_i - A_j)/A_c] \times 100\%$ 。 V_c 和 V_e 为阳性对照。

1.4.3 多酚氧化酶(PPO)法测定抗氧化活性

取乌贼墨以 1:5 的比例加入磷酸钠缓冲液(0.05 mol/L, pH7.2), 在 4 °C 搅拌提取 1 h, 冷冻离心, 上清液为粗提 PPO, 利用邻苯二酚/磷酸缓冲液体系(30 °C)评价 PPO 酶活性, 并于 420 nm 测定加入样品后 PPO 酶活性的变化^[14,15]。PPO 抑制率为: $I = (1 - \Delta A_1/\Delta A_2) \times 100\%$; 其中: ΔA_1 为样品吸光度变化值, ΔA_2 为酶吸光度变化值。 V_c 和 TP 为阳性对照。

1.4.4 超氧阴离子自由基体系测定抗氧化活性

Tris-HCl 缓冲液与双蒸水混匀后水浴(25 °C), 取出后立即加入已预热过的邻苯三酚溶液, 迅速转移至比色皿中。以盐酸为空白管, 隔 30 s 于 325 nm 处测一次吸光度, 计算邻苯三酚的自氧化速率(K_0)。同法建立邻苯三酚体系, 在加入双蒸水前施以一定量的受试样品, 并保持反应体系总体积的恒定, 测定此时邻苯三酚的自氧化速率(K_1), 即可计算受试品超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)的清除率^[12,13]: $I = (K_1 - K_0)/K_0 \times 100\%$ 。 V_c 为阳性对照。

1.5 统计学方法

数据以 mean \pm SD 表示, 每个实验处理组均为三个重复。使用 GraphPad Prism(ver. 8.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) 计算相应的 IC_{50} 值, SPSS Program(ver. 25.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 进行统计学分析, 采用 One way ANOVA with Dunnett's test 进行显著性检验。设 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学显著性。

2 结果

2.1 UPSP 的抗氧化活性

提取得 UPSP 粗品 8.189 2 g, 硫酸多糖含量 90.12%。由此, 对 UPSP 进行 POV 测定。结果表明, UPSP 可抑制猪油的过氧化, 具有显著的抗氧化

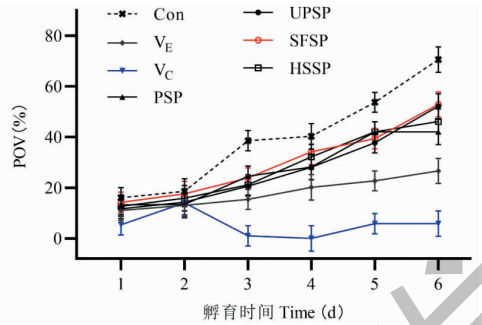


图1 四种海洋硫酸多糖不同孵育天数对猪油过氧化值的影响

Fig. 1 Effects of four marine sulfated polysaccharides on POV in different incubation days

注:各受试物的浓度为 0.25 g/kg。 Note: $C_{sample} = 0.25$ g/kg.

效果(见图 1、2, $P < 0.05$)。同时, DPPH 法的结果显示, UPSP 有非常明显的自由基清除作用(IC_{50} 为 2.72 mg/mL), 见表 2; 当 UPSP 浓度增加至 20 mg/mL 时, 其对 DPPH · 清除率接近 100% (见图 3)。超氧阴离子自由基的测试结果证实了 UPSP 对自由基的抑制活性(见图 4)。为了进一步探讨 UPSP 的抗氧化作用, 以 PPO 法进一步表征。随着浓度的上升, UPSP 对 PPO 的抑制率逐渐提高, 当浓度达到 0.1 mg/mL 时达到 31.20%, 表明 UPSP 具有抑制 PPO 的抗氧化活性, 但作用有限(见图 5)。总体来看, UPSP 仍可为一种优良的抗氧化剂。

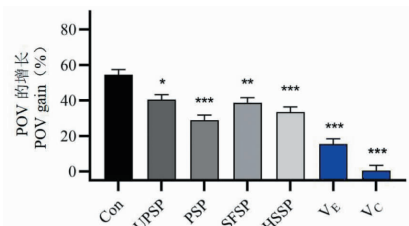


图2 截至第 6 日猪油过氧化值的净增长

Fig. 2 Net increase of POV up to day 6

注:各受试物的浓度为 0.25 g/kg; 与空白对照组比较, $* P < 0.05$, $** P < 0.01$, $*** P < 0.001$ 。 Note: $C_{sample} = 0.25$ g/kg; Compared with Con, $* P < 0.05$, $** P < 0.01$, $*** P < 0.001$.

表 2 四种海洋来源硫酸多糖对自由基及多酚氧化酶的抑制作用($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effects of four marine sulfated polysaccharides against radicals and PPO ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样本 Sample	IC_{50} (mg/mL)		
	DPPH ·	$O_2^{\cdot-}$	PPO
UPSP	2.72 \pm 0.21	0.33 \pm 0.12	2.29 \pm 0.02
PSP	8.97 \pm 0.16	0.30 \pm 0.09	0.45 \pm 0.04
SFSP	9.38 \pm 0.17	0.17 \pm 0.07	0.42 \pm 0.05

续表 2 (Continued Tab. 2)

样本 Sample	IC ₅₀ (mg/mL)		
	DPPH ·	O ₂ ^{-·}	PPO
HSSP	22.82 ± 0.21	0.05 ± 0.03	0.20 ± 0.04
V _C	1.17 ± 0.11	0.07 ± 0.03	0.02 ± 0.07
V _E	5.11 ± 0.19	-	-
TP	-	-	0.01 ± 0.00

注: V_C、V_E、TP 为阳性对照; IC₅₀ 为自由基或多酚氧化酶抑制率为 50% 时的样本浓度。

Note: V_C, V_E and TP are positive controls; IC₅₀ is the concentration when the inhibition rate is 50%.

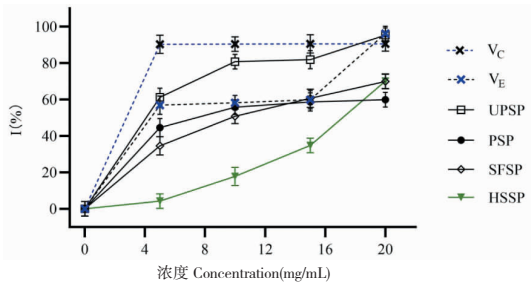


图 3 四种海洋硫酸多糖对稳定自由基的清除作用

Fig. 3 Scavenging effects of four marine sulfated polysaccharides on DPPH ·

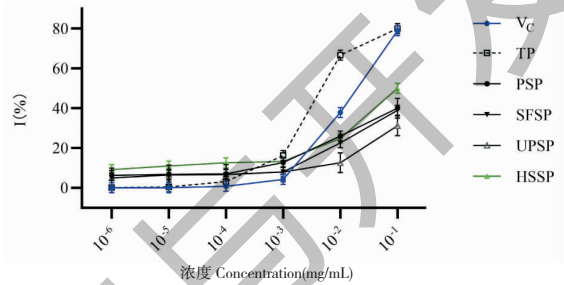


图 5 四种海洋硫酸多糖对多酚氧化酶的抑制作用

Fig. 5 Inhibition of four marine sulfated polysaccharides on PPO

2.2 PSP 及 SFSP 的抗氧化活性

提取得 PSP 粗品 14.532 1 g, SFSP 粗品 81.001 4 g, 多糖含量分别为 86.74% 及 89.24%。将这些粗提硫酸多糖进行抗氧化活性的测定。POV 结果显示, PSP 在前 3 日对猪油的过氧化抑制不理想, 第 3 日之后开始明显抑制猪油的过氧化, 第 6 日时抑制作用更为显著 (见图 1, $P < 0.05$), 表明紫菜提取的多糖类物质对猪油有优良的抗氧化效果。为此, 通过 DPPH 法分析 PSP 是否有清除自由基的作用。结果显示, PSP 对 DPPH · 的 IC₅₀ 为 8.97 mg/mL, 当 PSP 浓度在 0 ~ 10 mg/mL 时, 对 DPPH · 清除率随浓度明显提高; 但大于 10 mg/mL 时, DPPH · 清除率的增长开始放缓 (见图 3)。另外, PPO 及超氧阴离子

自由基的结果也表明了 PSP 与浓度正相关的抗氧化化效果 (见图 4、5)。而 SFSP 也同样发现具有降低猪油过氧化率, 抑制自由基及抑制多酚氧化酶活性的作用, 其中, 对超氧阴离子自由基的 IC₅₀ 为 0.17 mg/mL, 优于 UPSP 与 PSP。

2.3 HSSP 的抗氧化活性

大孔树脂脱盐的粗提物经葡聚糖凝胶过滤纯化, 得正丁醇相 HSSP 粗品 75.802 1 g, 硫酸多糖含量 88.73%。该多糖可显著抑制猪油的过氧化 (见图 2, $P < 0.05$), 并明显抑制多酚氧化酶的活性 (见图 5), 也具有一定抗氧化活性 (IC₅₀ = 0.20 mg/mL)。超氧阴离子自由基的测试结果显示, HSSP 对邻苯三酚的抑制率随浓度的增大而增大, 且在浓度为 0.01 g/mL 时接近 100%, 与 V_C 类似, 这说明此体系下 HSSP 对邻苯三酚的自氧化有很强的抑制作用 (见图 4), 抗氧化性较好 (IC₅₀ = 0.05 mg/mL)。HSSP 也具有清除 DPPH · 的抗氧化活性, 但作用不及其他三种硫酸多糖 (见图 3)。总的趋势表明, HSSP 具有良好的抗氧化活性。

3 讨论

多糖是一种由十个以上单糖通过糖苷键链接的高分子聚合物, 有广泛的药理活性。大量研究表明, 这种高效低毒的自由基清除剂保护机体免受氧损伤, 具有清除体内超氧阴离子、稳定自由基及其他

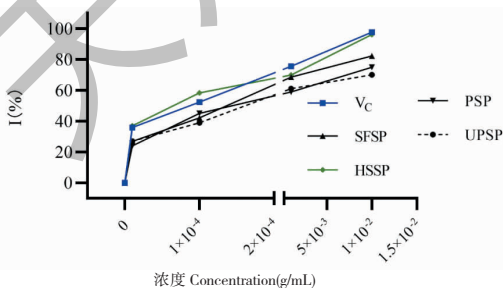


图 4 四种海洋硫酸多糖对超氧阴离子自由基的影响

Fig. 4 Effects of four kinds of marine sulfated polysaccharides on superoxide anion radicals

ROS 的抗氧化作用,从而参与机体抗血栓、降血脂、降血糖、免疫调节、抗肿瘤、抗炎、抗衰老等多种重要的生理病理进程^[5,16]。在我们的研究结果中,UPSP 与 PSP 表现出一定的抗氧化作用,而结合 SFSP 和 HSSP 的数据,发现这几种海洋来源的硫酸多糖在清除自由基方面确有明显效果,提示这些硫酸多糖可能具有抗炎、抗衰老等方面^[15]的活性。近年来天然来源多糖的抗氧化作用有一定的报道,其中陆生植物及中药来源的仍占一定比例,而海洋来源多糖主要多见藻类来源,海参来源的报道较为少见^[5,17,18]。本研究结果表明,这些海藻、海参来源的硫酸多糖可通过清除稳定自由基及超氧阴离子,并抑制多酚氧化酶活性,从而发挥抗氧化的作用。后续拟针对这些硫酸多糖的组成和结构,及其跟 ROS 和多酚氧化酶抑制活性之间的关系进行研究,进一步从体内水平探究它们提高机体抗氧化能力的作用机制。总之,本研究通过这四种体系的检测,得到了良好的抗氧化活性数据,表明这几种海洋来源的硫酸多糖具有开发为药用和保健功能的天然高效抗氧化剂的潜力,从而应用于食品、药品及食品添加剂等方面。

参考文献

- 1 Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis[J]. *Free Radical Bio Med*, 2010, 48: 749-762.
- 2 Hayyan M, Hashim MA, AlNashef IM. Superoxide ion: generation and chemical implications[J]. *Chem Rev*, 2016, 116: 3029-3085.
- 3 Powell CJ, Connelly JC, Jones SM, et al. Hepatic responses to the administration of high doses of BHT to the rat; their relevance to hepatocarcinogenicity [J]. *Food Chem Toxicol*, 1986, 24(10): 1131-1143.
- 4 Klausner A. Two preservatives to avoid? [EB/OL]. (2011-02-01) [2020-08-01]. <http://www.berkeleywellness.com/healthy-eating/food-safety/article/two-preservatives-avoid>.
- 5 De Jesus Raposo MF, De Morais AMB, De Morais RMSC. Marine polysaccharides from algae with potential biomedical applications[J]. *Mar Drugs*, 2015, 13: 2967-3028.
- 6 Zeng YY, Han ZR, Yang MT, et al. An overview of marine

polysaccharide-derived drugs in China[J]. *Chin J Mar Drugs* (中国海洋药物), 2013, 2: 67-75.

- 7 Liu H, Chen SJ, Yang XQ. Advances of extraction, purification and application of polysaccharides from seaweeds[J]. *Sci Tech Food Ind* (食品工业科技), 2018, 39(12): 341-346.
- 8 Xu S, Zhang Y, Jiang K. Antioxidant activity *in vitro* and *in vivo* of the polysaccharides from different varieties of *Auricularia auricula*[J]. *Food Funct*, 2016, 7: 3868-3879.
- 9 Wang XH, Zou ZR, Yi YH, et al. Variegatusides: new non-sulphated triterpene glycosides from the sea cucumber *Stichopus variegatus* Semper[J]. *Mar Drugs*, 2014, 12: 2004-2018.
- 10 Zhang YY, Zhang B. Comparison of phenol-sulfuric acid and anthrone-sulfuric methods for determination of polysaccharide in green tea[J]. *Food Sci* (食品科学), 2016, 37: 158-163.
- 11 Takagi T, Mitsuno Y, Masumura M. Determination of peroxide value by the colorimetric iodine method with protection of iodide as cadmium complex[J]. *Lipids*, 1978, 13: 147-151.
- 12 Fu Y. The Research of *in vitro* antioxidant function evaluation methods[J]. *Meat Res* (肉类研究), 2010, 11: 41-46.
- 13 Chen BZ, Wand J, Hou JH, et al. Study on the antioxidant activity *in vitro* of crude polysaccharides from six medicinal plants of *Cistanche* and its adulterants[J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2020, 32: 26-31.
- 14 Wojdyło A, Oszmiański J, Bielicki P. Polyphenolic composition, antioxidant activity, and polyphenol oxidase (PPO) activity of quince (*Cydonia oblonga* Miller) varieties[J]. *J Agr Food Chem*, 2013, 61: 2762-2772.
- 15 Han H, Wang MZ, Li B. An experimental method for detecting antioxidant activity by inhibition of polyphenol oxidase [J]. *Chin J Mar Drugs* (中国海洋药物), 2011, 30(5): 49-52.
- 16 Liu YT, Li JL. Advances in research on antioxidant activity of polysaccharides *in vitro*[J]. *Food Res Dev* (食品研究与开发), 2019, 40(6): 214-219.
- 17 Lee YE, Kim H, Seo C, et al. Marine polysaccharides: therapeutic efficacy and biomedical applications[J]. *Arch Pharm Res*, 2017, 40: 1006-1020.
- 18 Huang YX, Li HF, Huang ZB. Recent progress on antioxidant products from natural sources[J]. *J Guangdong Pharm Univ* (广东药学院学报), 2016, 32: 532-536.