

文章编号: 1001-1498(2007)06-0782-05

蚕蛹多糖的碱液提取及免疫活性初步研究^{*}

孙龙, 冯颖^{**}, 何钊, 马涛, 张欣

(中国林业科学研究院资源昆虫研究所, 国家林业局资源昆虫培育与利用重点实验室, 云南 昆明 650224)

摘要:以多糖含量为指标,以碱液浓度、提取温度、提取时间为实验因素和水平,采用正交实验设计,对蚕蛹多糖进行了碱液提取研究。结果表明,碱液提取蚕蛹多糖的最佳实验条件是碱液浓度 $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、提取温度 80°C 、提取时间 3 h。在此最佳实验条件下所得的蚕蛹多糖粗品中总糖含量为 27.9%,氨基酸总量为 35.85%,蛋白含量为 38.1%。免疫活性实验显示,该多糖可以显著提高小鼠腹腔巨噬细胞吞噬指数和吞噬百分率、淋巴细胞转化率及血清溶血素,与对照组相比,差异具有显著性意义,表明蚕蛹碱提粗多糖可以明显增强小鼠的非特异性免疫、细胞免疫和体液免疫功能。

关键词:蚕蛹;多糖;正交实验;免疫功能

中图分类号: S881

文献标识码: A

Studies on Alkaline Solution Extraction of Polysaccharide from Silkworm Pupa and Its Immunomodulating Activities

SUN Long, FENG Ying, HE Zhao, MA Tao, ZHANG Xin

(Research Institute of Resources Insects, CAF; Key Laboratory of Cultivation and Utilization of Resource Insects, State Forestry Administration, Kunming 650224, Yunnan, China)

Abstract: The extraction of polysaccharide from silkworm pupa by alkaline solution was studied. The optimum conditions were obtained by using orthogonal design $L_9(3^4)$. The result showed the optimum conditions were as follows: concentration of alkaline solution $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, temperature 80°C , time 3 hours. Under these conditions, the contents of total polysaccharide, protein and amino acids in extractives were 27.9%, 38.1% and 35.85% respectively. The immunological test in mice showed the polysaccharide of silkworm pupa (PSP) could increase significantly macrophage phagocytosis, enhance remarkably hemolysin antibody and lymphocyte transformation, which indicated PSP had evident non-specific, cellular and humoral immunity.

Key words: silkworm pupa; polysaccharide; orthogonal test; immunomodulating activities

多糖是由 10 个以上单糖通过苷键连接而成的聚糖,在自然界广泛分布于高等植物、动物、微生物、海藻、真菌等机体内。多糖具有增强机体

免疫、抗肿瘤、抗病毒、抗衰老、降血糖等多方面的生物活性,因而受到人们的关注,成为医药和食品领域的研究热点之一^[1]。蚕 (*Bombyx mori*

收稿日期: 2007-05-20

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划重点项目“特产资源高效利用关键技术与示范”项目(2006BAD06B07)、国家林业局引进国外先进农业技术项目“资源昆虫体内活性物质诱导及提取技术引进”(20064116)、国家林业局重点项目“喙尾琵琶甲养殖及活性物质提取技术研究”(200665)的部分研究内容

作者简介: 孙龙(1977—):新疆伊犁人,助理研究员,硕士,主要从事资源昆虫利用方面的研究。

* 免疫活性实验在昆明医学院天然药物重点实验室完成,特此致谢!

** 通讯作者。

Linnaeus)蛹是蚕丝生产过程中的副产品,作为世界上最大的蚕丝生产国和供应国,我国年均有 53 万 t 干蚕蛹可以利用^[2]。但是目前由于综合利用技术不足,长期以来大量的蚕蛹被当作饲料或肥料出售,资源利用率低,效益不高。本实验采用正交试验设计,用碱液法对蚕蛹多糖的提取条件进行研究,筛选出了优化方案,并初步探讨了所得多糖对小鼠免疫功能的影响,以期进一步提高蚕蛹的综合利用和附加值,为开发蚕蛹多糖在医药领域的应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

蚕蛹:购自云南省蒙自蚕丝厂。

实验动物:SPF级 ICR 小鼠,5~6 周龄,体质量 18~22 g;豚鼠(*Cavia porcellus* Linnaeus);由昆明医学院实验动物中心提供,实验动物许可证:滇 SCXK 2005-0008。

主要试剂:氢氧化钠,盐酸,硫酸,苯酚,95%乙醇,无水乙醇,葡萄糖均为国产分析纯;0.9%注射用氯化钠溶液;瑞氏染液;0.5 mg·mL⁻¹ PHA 液。

仪器与设备:F160 型粉碎机;DHG-9245A 型电热恒温鼓风干燥箱;RE-2000 型旋转蒸发器;DU-800 型紫外可见分光光度计;PL203 型分析天平;Heraeus 15R 型低温离心机;KY820 188 型显微镜;CL-770 型临床分光光度计,氨基酸自动分析仪。

1.2 实验方法

1.2.1 蚕蛹粗多糖提取条件研究 (1)原料预处理:将蚕蛹在 50 ℃ 烘干,然后用粉碎机粉碎。称取蚕蛹粉末适量,按照原料 石油醚 = 1 : 3 (W : V) 加入石油醚脱脂,室温下浸泡 8~12 h,过滤,滤渣重复浸提两次,置于室温下晾干。(2)多糖提取:为了确定稀碱液提取的最佳条件,本实验以提取的粗多糖含量为评价指标,以碱液浓度、提取温度、提取时间为实验因素和水平设计了三因素三水平正交实验 L₉(3⁴),见表 1。称取适量经过预处理的蚕蛹干燥粉末,以料液比 1 : 10 的量加入稀碱液,恒温水浴加热,按设计条件进行试验,重复 1 次,合并 2 次提取液,纱布过滤,滤液用盐酸调 pH 值至 7.0 左右,于 50 ℃ 下用真空旋转蒸发器浓缩至适当体积,4 倍量的 95%乙醇沉淀,4 ℃ 冰箱内过夜,离心,沉淀用无水乙醇洗涤两次,低温干燥得粗多糖。测定多糖含量,确

定最佳方案。(3)多糖含量测定:采用苯酚-硫酸法^[3]进行检测,(a)葡萄糖标准曲线制作:精确称取 105 ℃ 干燥至恒质量的葡萄糖 92.9 mg,置 100 mL 容量瓶中定容。准确吸取标准葡萄糖溶液 20、40、60、80、100 μL,分别置于比色管中,各加蒸馏水使体积为 2.0 mL,再加入 5%的苯酚 2.0 mL,摇匀,迅速加入浓硫酸 6.5 mL,室温显色 25 min 左右。另取蒸馏水 2.0 mL,同上操作加苯酚和浓硫酸进行显色反应,作为空白对照。于最大吸收波长 490 nm 处测定吸光度,以葡萄糖浓度 (μg·mL⁻¹) 为横坐标,吸光度值为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程为 $A = 0.0092C - 0.0062$,相关系数 $R^2 = 0.9977$ 。(b)样品多糖含量测定称取粗多糖样品 100 mg,置 100 mL 容量瓶中定容。准确吸取上述样品溶液 1.0 mL,补加蒸馏水至 2.0 mL,按上述步骤操作,测定吸光度,从回归方程中求得样品中的葡萄糖浓度,按下式计算样品中多糖含量:多糖含量 (%) = $C \times 100 \times D \times 10^{-3} \times 100 / W$ [C:供试液中葡萄糖的浓度 (μg·mL⁻¹);D:供试液的稀释倍数;W:供试样品质量量 (mg)]。

表 1 蚕蛹多糖碱液提取的因素和水平

水平	因素		
	A 碱液浓度 / (mol·L ⁻¹)	B 提取温度 /	C 提取时间 / h
1	0.01	60	1
2	0.02	70	2
3	0.03	80	3

1.2.2 多糖中蛋白质及氨基酸分析 蛋白质采用福林-酚法^[4];氨基酸采用氨基酸自动分析仪检测。

1.2.3 蚕蛹粗多糖对小鼠免疫功能的影响^[5]

(1)小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能测定:取健康 SPF 级 ICR 小鼠 32 只,雌雄各半,随机分成对照组及受试多糖低、中、高剂量组 3 组,每组 8 只。受试组按 0.2 mL·10 g⁻¹ 的体积每日分别尾静脉注射蚕蛹多糖 62.5、125、250 mg·kg⁻¹,对照组同途径给予等体积的生理盐水,连续 1 周。末次给药后每鼠腹腔注射 5% 鸡红细胞 (CRBC) 0.5 mL,3 h 后颈椎脱臼处死小鼠,剪开腹腔皮肤,腹腔注射 0.9% 氯化钠溶液 2 mL,轻揉小鼠腹部。吸取腹腔冲洗液滴片,放入垫有湿纱布的搪瓷盘内,于 37 ℃ 温育 30 min,孵毕,于生理盐水中漂去未被吞噬的 CRBC 及其他细胞,吹干,甲醇溶液固定 5 min,晾干后,瑞氏染色 30 min,油

镜下观察,计算吞噬百分率和吞噬指数。(2)小鼠淋巴细胞转化率测定:小鼠给药方式和时间同 1.2.3(1)。于给药的第 1~3 天每日肌肉注射 PHA $0.2 \text{ mL} \cdot 10 \text{ g}^{-1}$,剂量为 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体质量。末次给药后剪尾,取血推片,瑞氏染色,油镜下观察,计数淋巴细胞 100 个,包括转化细胞(淋巴母细胞、过渡态细胞),计算淋巴细胞转化率。(3)小鼠血清溶血素测定:每鼠腹腔注射 5% CRBC 0.2 mL 免疫后,给药方式和时间同 1.2.3(1)。末次给药后摘眼球取血,离心,取血清用生理盐水稀释 100 倍,取稀释血清 1 mL ,与 5% CRBC 0.5 mL 、10% 补体 0.5 mL 混合,在 37°C 恒温箱中保温 30 min 后,置 4°C 冰箱中中止反应。离心,取上清液测光密度(OD 值)。

2 结果与分析

2.1 蚕蛹多糖碱液提取

多糖含量是多糖提取过程中需要重点考察的指标之一,多糖含量越高,杂质越少,后续的分离纯化步骤越简单,所以本试验以多糖含量为碱液提取方法的评价指标。实验根据正交设计分 9 组,苯酚-硫酸法测定多糖的含量,实验结果及极差分析如表 2 所示。

表 2 蚕蛹多糖稀碱液提取条件及结果

实验号	A 碱液浓度 / ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	B 提取 温度 /	C 提取 时间 /h	多糖 含量 /%
1	0.01	60	1	16.30
2	0.01	70	2	20.14
3	0.01	80	3	23.27
4	0.02	60	2	23.46
5	0.02	70	3	29.15
6	0.02	80	1	21.98
7	0.03	60	3	26.20
8	0.03	70	1	21.14
9	0.03	80	2	26.61
以多糖含量 为评价指标				
K_1	19.90	21.99	19.81	
K_2	24.86	23.48	23.40	
K_3	24.65	23.95	26.21	
极差	4.96	1.96	6.40	

从表 2 可以看出,稀碱液提取的多糖除了 1 号实验含量最低为 16.3% 外,其余的均在 20% 以上;由极差分析,提取时间对多糖含量的影响最大,其次是碱液浓度,最后是提取温度,三者的顺序依次为 C

$>A >B$ 。用稀碱液提取蚕蛹多糖实验的最佳组合是 $A_2B_3C_3$,即碱液浓度为 $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,实验提取温度 80°C ,提取时间为 3 h。

为了考查所选的碱液浓度、提取温度、提取时间对评价指标多糖含量影响的大小及程度,再作方差分析,见表 3。

表 3 方差分析

方差来源	自由度	平方和	均方	F	显著性
A	2	5.25	2.63	13.46	$P < 0.05$
B	2	0.70	0.35	1.79	
C	2	6.86	3.43	17.59	$P < 0.05$
(误差)	2	0.39	0.20		
(总和)	8	13.20			

$$F_{0.05}(2, 8) = 4.46$$

从方差分析可以看出,碱液浓度和提取时间对多糖含量有显著性影响 ($p < 0.05$),而提取温度虽有影响却还没有达到显著程度。这说明在保证多糖含量的前提下,蚕蛹多糖碱液提取可以选用较低的温度。

采用上述优化后的最佳实验条件,即碱液浓度 $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,实验提取温度 80°C ,提取时间 3 h,对蚕蛹多糖重复提取 3 次,测定多糖含量,结果稀碱液提取的粗多糖含量平均为 27.9%。由此可见,正交试验确定的最佳试验方案所提多糖含量较高,验证效果较好。

2.2 蛋白质与氨基酸分析

采用福林酚法对所得多糖中的蛋白进行了测定,结果蛋白含量为 38.1%。氨基酸分析结果表明,多糖中含有常见氨基酸 17 种,氨基酸总量达到 35.85% (见表 4)。由此分析粗多糖中含有较多的蛋白质,所得多糖可能是多糖-蛋白复合物。

表 4 蚕蛹多糖的氨基酸分析

氨基酸	百分含量 /%	氨基酸	百分含量 /%
天门冬氨酸 ASP	4.48	异亮氨酸 LEU	1.47
苏氨酸 THR	1.70	亮氨酸 LEU	1.83
丝氨酸 SER	1.52	酪氨酸 TYR	1.43
谷氨酸 GLU	6.71	苯丙氨酸 PHE	1.30
甘氨酸 GLY	3.16	赖氨酸 LYS	2.40
丙氨酸 ALA	1.88	组氨酸 HIS	1.58
胱氨酸 CYS	0.70	精氨酸 ARG	1.51
缬氨酸 VAL	1.97	脯氨酸 PRO	1.84
蛋氨酸 MET	0.37	氨基酸总量	35.85

表 5 蚕蛹粗多糖对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响 ($\bar{x} \pm sD$, %)

组别	剂量 / (mg · kg ⁻¹)	动物数 / 只	吞噬百分率 / %	吞噬指数
对照组	0	8	17.38 ± 3.38	23.88 ± 5.67
低剂量组	62.5	8	42.25 ± 14.64a	65.50 ± 8.32a
中剂量组	125	8	53.13 ± 14.91a	68.25 ± 10.91a
高剂量组	250	8	46.67 ± 6.34a	70.56 ± 10.15a

注: a与对照组比较差异有显著性意义 ($P < 0.05$)

2.3 小鼠腹腔巨噬细胞功能测定

巨噬细胞在机体的非特异性免疫反应中具有重要作用,它被激活后,主要表现为吞噬作用增强,溶酶体酶活性升高,杀菌能力增强等^[6]。由表 5 可知,蚕蛹粗多糖高、中、低 3 个剂量组均能使小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬百分率和吞噬指数上升,说明蚕蛹粗多糖对小鼠体内腹腔巨噬细胞吞噬功能有明显的增强作用。且吞噬指数呈量效关系。

2.4 小鼠 PHA 刺激淋巴细胞转化率的测定

淋巴细胞转化率的高低,反映了机体细胞免疫水平的高低。由表 6 可以看出,蚕蛹粗多糖高、中、低 3 个剂量组都可以不同程度地增加小鼠淋巴细胞的转化率,其中以低剂量组作用为好 ($P < 0.05$),量效关系不明显,说明蚕蛹粗多糖在低剂量时可以增强小鼠的细胞免疫功能。

表 6 蚕蛹粗多糖对 PHA 刺激小鼠淋巴细胞转化率的影响 ($\bar{x} \pm sD$, %)

组别	剂量 (mg · kg ⁻¹)	动物数 / 只	淋巴细胞	淋巴母细胞	过渡态细胞	淋巴细胞转化率 / %
对照组	0	8	21.13 ± 7.59	17.63 ± 6.05	61.25 ± 9.90	78.88 ± 7.59
低剂量组	62.5	8	13.38 ± 5.13	21.75 ± 6.58	65.13 ± 7.22	86.88 ± 4.76a
中剂量组	125	8	14.88 ± 4.64	18.25 ± 5.47	66.88 ± 4.82	85.13 ± 4.64
高剂量组	250	8	16.13 ± 8.84	16.00 ± 5.66	67.88 ± 7.18	83.88 ± 8.84

注: a与对照组比较差异有显著性意义 ($P < 0.05$)

2.5 小鼠血清溶血素的测定

血清溶血素的含量表示血清总补体活性,因此血清溶血素引起的相关免疫属于体液免疫的范畴^[7]。由表 7 可以看出,蚕蛹粗多糖高、中、低 3 个剂量组可以显著提高小鼠血清溶血素的 OD 值 ($P < 0.001$),表明蚕蛹粗多糖可以明显增强机体体液免疫功能作用,但量效关系不明显。

表 7 蚕蛹粗多糖对小鼠溶血素 OD 值的影响 ($\bar{x} \pm sD$)

组别	剂量 / (mg · kg ⁻¹)	动物数 / 只	OD 值
对照组	0	8	0.0049 ± 0.0026
低剂量组	62.5	8	0.046 ± 0.032a
中剂量组	125	8	0.037 ± 0.016a
高剂量组	250	8	0.044 ± 0.017a

注: a与对照组比较差异有非常显著性意义 ($P < 0.001$)。

3 讨论与结论

多糖的提取主要有水提、酸液提取、碱液提取、蛋白酶水解法 4 种。选择不同的溶剂,不同的提取方法,可以得到不同组分和活性的多糖^[8,9]。动物来源的多糖常与蛋白质牢固地结合在一起,因此可

采用蛋白酶降解蛋白质部分或用碱液使蛋白质同多糖之间的键断裂开来以促进多糖溶解在提取液中^[10]。文献报道,干蚕蛹粗蛋白含量较高,可达 55% ~ 60%^[11]。本文通过正交实验法对蚕蛹多糖的碱液提取条件进行研究,结果以多糖含量为评价指标筛选出的优化方案是碱液浓度为 0.02 mol · L⁻¹,提取温度 80 °C,提取时间为 3 h,在此条件下所得多糖含量为 27.9%,蛋白含量为 38.1%,含有常见氨基酸 17 种,氨基酸总量为 35.85%,分析可能是多糖-蛋白复合物。此外,在实验过程中,保持了碱液的低浓度,一方面是操作方面的考虑,因为如果碱液浓度太高,过滤将十分困难,另一方面是出于节省成本和保护环境的目的。同时,实验温度不高,避免了溶液的大量蒸发,有利于节约能源。

大量的科学实验证明,多糖对机体非特异性免疫与特异性免疫的细胞免疫与体液免疫有广泛的药理活性。多糖作为生物免疫调节剂,主要通过以下 5 个途径作用于人体的免疫系统: (1) 激活巨噬细胞,促进 T_H 细胞转变为活性 T_C 细胞,提高 B 淋巴细胞和 NK 细胞的数量与活性; (2) 激活巨噬细胞系统和补体系统; (3) 诱导多种免疫因子,如 IFN、IF、TNF

等; (4)影响神经-内分泌-免疫系统网络; (5)促进细胞中的 RNA、DNA、蛋白质的合成和细胞内环核苷酸的含量等^[12~17]。多糖作为一类重要的天然生物活性物质,其最大的优点是毒副作用小,来源广泛,目前已有香菇多糖、云芝多糖、猪苓多糖、灰树花多糖、裂褶菌多糖、黄芪多糖、牛膝多糖等应用于临床,它们在调节免疫、抗肿瘤、抗病毒等方面的作用使多糖类药物显示出了诱人的前景。但目前多糖的研究多集中于真菌多糖的研究,而对动物多糖的研究较少。本实验提取的蚕蛹多糖在较低的剂量时可显著增强小鼠血清溶血素的生成,提高小鼠淋巴细胞的转化率,促进小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能,表明蚕蛹多糖对小鼠有促进特异性免疫和非特异性免疫功能的作用,因而具有较好的医药和食品开发潜力,值得进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 王玉华,袁久荣. 中药多糖的化学研究概况 [J]. 中成药, 2004, 26 (6): 496~498
- [2] 王敦,白耀宇,张传溪,等. 家蚕蛹营养成分及其开发利用研究进展 [J]. 昆虫知识, 2004, 41 (5): 418~421
- [3] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术 [M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2003
- [4] 陈钧辉. 生物化学实验 (第三版) [M]. 北京: 科学出版社, 2003
- [5] 毛根年,许牡丹. 功能食品生理特性与检测技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005
- [6] 金宗濂. 保健食品的功能评价与开发 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2001
- [7] 司传平. 医学免疫学实验 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999
- [8] 韦巍. 多糖的研究进展 [J]. 国外医学药学分册, 2005, 32 (3): 179~184
- [9] 叶凯贞,黎碧娜. 多糖的提取、分离与纯化 [J]. 广州食品工业科技, 2004, 20 (3): 144~145
- [10] 陈来同. 生化工艺学 [M]. 北京: 科学出版社, 2004
- [11] 宋燕青,邓树海,隋志义,等. 蚕蛹药用成分及提取工艺研究概况 [J]. 中国生化药物杂志, 2006, 27 (5): 306~309
- [12] Wasser S P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 60: 258~274
- [13] Ooi V E, Liu F. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes [J]. Curr Med Chem, 2000, 7: 715~729
- [14] 聂伟,张永祥. 多糖的免疫调节作用及其作用机制研究 [J]. 中国药理学通报, 1999, 15 (6): 484~487
- [15] 祖炬雄. 论中药与机体免疫的研究概况 [J]. 中医药信息, 1996, 13 (2): 17~18
- [16] 田庚元. 中药免疫调节剂的研究和开发 [J]. 中国新药杂志, 1999, 8 (11): 793~797
- [17] Nergard C S, Dialto D, et al. Isolation partial characterization and immunomodulating activities of polysaccharides from *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. ex Walp [J]. J of Ethnopharmacology, 2004, 91: 141~152