

文章编号:1673-1689(2007)02-0038-05

甘薯糖蛋白的体外抗氧化作用研究

刘主, 高建林, 朱必凤, 彭凌

(韶关学院 英东生物工程学院, 广东 韶关 512005)

摘要:经水溶提取、乙醇沉淀、凝胶过滤层析,从广薯98中提取甘薯糖蛋白,并研究了甘薯糖蛋白对超氧阴离子自由基、羟基自由基的清除作用,以及对肝微粒体脂质过氧化产物丙二醛的抑制作用和对 H_2O_2 引起红细胞溶血的抑制作用。结果表明,甘薯糖蛋白能有效地清除超氧阴离子自由基和羟基自由基,并能明显地抑制肝微粒体脂质过氧化产物丙二醛的生成,但不能抑制 H_2O_2 引起的红细胞溶血。

关键词:甘薯;糖蛋白;提取;抗氧化

中图分类号:O 513.2

文献标识码:A

Studies on Antioxidant Activity of Sweet Potato Glycoprotein in Vitro

LIU Zhu, GAO Jian-lin, ZHU Bi-feng, PENG Ling

(Yinydong College of Bioengineering, Shaoguan University, Shaoguan 512005, China)

Abstract: Sweet potato glycoprotein (SPG) was obtained from the cultivar GuangDong 98 by water extraction, alcohol precipitation and gel filtration. Scavenging effects of SPG on superoxide radical and hydroxyl free radical were studied, and the protective effects on H_2O_2 -induced hemolysis of mice erythrocytes and the lipid peroxidation of liver homogenate in mice were also investigated. The results showed that SPG exhibited strong scavenging effects on superoxide radical and hydroxyl free radical, on the hand, a significant protective effects on lipid peroxidation of liver homogenate in mice were observed. But SPG could not inhibit H_2O_2 -induced hemolysis of mice erythrocytes.

Key words: sweet potato; glycoprotein; extraction; antioxidation

甘薯(*Ipomoea batatas* LAM.)是食品工业、轻工业和饲料工业的重要原料,也是我国四大主要粮食作物之一^[1]。据《本草纲目》记载:甘薯蔓生,叶如豆,其根固如卵,肉白皮黄;性平,味甘,无毒;主治补虚乏、益气力、健脾胃、强肾阴^[2]。近年来有学者指出,甘薯具有增强免疫、抗衰老、抗癌等作

用^[3]。日本的营养学家发现,甘薯含有丰富的粘液蛋白,这是一种多糖与蛋白质混合物,对人体有特殊保护作用,能保持消化道、呼吸道、关节腔、膜腔的润滑和血管的弹性。这种物质可防止脂类物质在动脉管壁上沉积而引起的动脉硬化,可以防止肝及肾脏等器官结缔组织的萎缩,可以减缓人体器

收稿日期:2006-05-12.

作者简介:刘主(1977-),男,湖南宁远人,讲师,工学硕士,主要从事生物化学与分子生物学的研究.

Email:liu-zhu@21cn.com

官的老化,提高肌体免疫力^[4]。国内的研究结果也表明,甘薯糖蛋白(SPG)具有很好的降血脂^[5]和增强免疫力^[6]的作用。作者提取甘薯糖蛋白,并进行体外抗氧化研究,为甘薯糖蛋白用于保健食品、化妆品提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料

品种:广薯 98,来源于韶关市农业科学研究所。

1.2 试剂与仪器

Sephadex G-75(进口分装):广州威佳科技有限公司产品;2-Deoxy-D-Ribose, AMRESCO, 硫代巴比妥酸(进口分装):广州威佳科技有限公司产品。其它试剂均为分析纯。

微控高速冷冻离心机:美国 BECKMAN COULTER 公司制造;台式冷冻离心机:SIGMA 公司产品;台式酸度计:美国 ORION 公司制造;电子分析天平(LP620):SARTORIUS(德国进口);旋转蒸发器(SFNCO R 系列:R-201):上海申生科技有限公司产品;分光光度计:Ultrospec 2000, 瑞士 Amersham Pharmacia Bioiech 公司制造;BSZ-160 型自动部分收集器:上海沪西分析仪器厂产品。

1.3 方 法

1.3.1 甘薯糖蛋白的提取 甘薯去皮→称量→切成细条→组织捣碎机捣碎→加入一定量的水→水浴锅恒温提取(50℃, 3 h)→过滤除渣(滤渣加水,重复上面的步骤)→离心(10 000 r/min, 15 min)→合并上清液旋转蒸发浓缩(100 r/min, 50℃)→离心(10 000 r/min, 15 min)取上清液→加 3 倍体积乙醇沉淀甘薯糖蛋白→离心(10 000 r/min, 15 min), 弃上清液→用水溶解沉淀→离心(10 000 r/min, 15 min)取上清液→Savage 法除蛋白(氯仿与正丁醇的体积比为 4:1, V(样品):V(混合液)为 3:1, 重复 3 次)→透析除杂(相对分子质量 14 000, 自来水透析, 蒸馏水透析 1 d)→旋转蒸发浓缩(100 r/min, 50℃)→离心(10 000 r/min, 15 min)取上清液。将 Sephadex G-75 装柱(1.5 cm×50 cm), 体积流量 0.75 mL/min, 上样量(上清液)2 mL, 0.15 mol/L NaCl-0.05 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0)洗脱, 3.0 mL 体积分部收集。对收集的每管溶液分别于 490 nm(苯酚-硫酸法)、280 nm 波长测定 OD 值, 作出甘薯多糖、蛋白质的洗脱曲线。收集多糖与蛋白质的重叠峰, 旋转蒸发浓缩(100 r/min, 40℃), 透析(相对分子质量 14 000, 2 d 自来水, 蒸馏水透析 1 d),

离心(10 000 r/min, 15 min)取上清液, 加 3 倍体积乙醇沉淀甘薯糖蛋白→无水乙醚洗涤→真空干燥得甘薯糖蛋白。

1.3.2 甘薯糖蛋白糖含量及蛋白含量的测定

1) 苯酚-硫酸法^[7], 以葡萄糖为标准品。

2) Folin-酚法^[8], 以牛血清白蛋白为标准品。

1.3.3 甘薯糖蛋白体外抗氧化作用

1) 甘薯糖蛋白对超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)的清除作用^[9,10]:采用邻苯三酚自氧化法, 2.4 mL 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.2), 加 0.1 mL 不同质量浓度(0、80、160、320、640 $\mu\text{g/mL}$)的甘薯糖蛋白, 混合后加入 7 mmol/L 的邻苯三酚 0.3 mL, 混合, 测 A_{325} 值(A_1), 在 4 min 时加入 10 mol/L HCl 1 滴中止反应, 测 A_{325} 值(A_2)。计算抑制率: $P = ((\Delta A_0 - \Delta A_i) / \Delta A_0) \times 100\%$ 。 $\Delta A = A_2 - A_1$, A_0 为空白吸光度, A_i 为试样吸光度。

2) 甘薯糖蛋白对羟基自由基($\cdot\text{OH}$)的清除作用^[11]:在试管中依次加入 0.1 mL 不同质量浓度(0、80、160、320、640 $\mu\text{g/mL}$)的甘薯糖蛋白, 0.4 mL 磷酸缓冲液(50 mmol/L, pH 7.5), 0.1 mL 1.04 mmol/L 的 EDTA 溶液, 0.1 mL 10 mmol/L 的 H_2O_2 , 0.1 mL 2 mmol/L 的 VC, 0.1 mL 60 mmol/L 的脱氧核糖(DR)(对照不加 DR, 补充蒸馏水), 0.1 mL 1 mmol/L 的 FeCl_3 , 各管最终体积 1.0 mL, 混匀后 37℃保温 1 h, 取出立即加入 1 mL 体积分数 25% 的 HCl 终止反应, 再加入 1 mL 质量分数 1% 的硫代巴比妥酸(TBA)显色, 沸水浴反应 15 min, 立即冷却, 532 nm 处比色(若有浑浊, 加入 3 mL 正丁醇萃取后再比色)。

$$\cdot\text{OH} \text{ 清除率} = \frac{(A_0 - (A_1 - A_2))}{A_0} \times 100\%$$

其中 A_0 、 A_1 、 A_2 分别代表对照、样品及样品空白的吸光度。

3) 甘薯糖蛋白抗 H_2O_2 引起的红细胞溶血作用^[12]:小鼠摘眼球取血, 制成抗凝血液, 3 000 r/min 离心得红细胞, 用生理盐水洗 3 次, 制成体积分数 0.5% 的红细胞悬浮液, 取该悬浮液 1 mL, 加 0.1 mL 不同质量浓度(0、80、160、320、640 $\mu\text{g/mL}$)的甘薯糖蛋白, 最后加 1 mL 10 mmol/L 的 H_2O_2 启动反应, 37℃作用 1 h, 用生理盐水稀释 6 倍, 3000 r/min 离心 5 min, 取上清测 415 nm 处的 OD 值。

4) 甘薯糖蛋白对肝微粒体脂质过氧化产物丙二醛(MDA)的抑制作用^[12]:迅速去血后的小鼠肝, 用冷生理盐水洗净后称重, 冰浴中匀浆, 制成体积分数 0.5% 的悬浮液, 500 r/min 离心去杂, 得匀浆

液;各取匀浆液 1 mL,加 0.1 mL 不同质量浓度(0、80、160、320、640 $\mu\text{g/mL}$)的甘薯糖蛋白和 6 mmol/L 的 FeSO_4 100 μL ,最后加 60 mmol/L 的 H_2O_2 40 μL ,在 37 $^\circ\text{C}$ 下水浴 1 h 后加入 1 mL 质量分数 15% 的 TCA 终止反应,再加入 1 mL 体积分数 0.7% 的 TBA,于沸水中显色 15 min,冷却后离心,测 532 nm 处上清液的 OD 值,以吸光值表示 MDA 含量的多少,吸光值越大,MDA 含量越高。

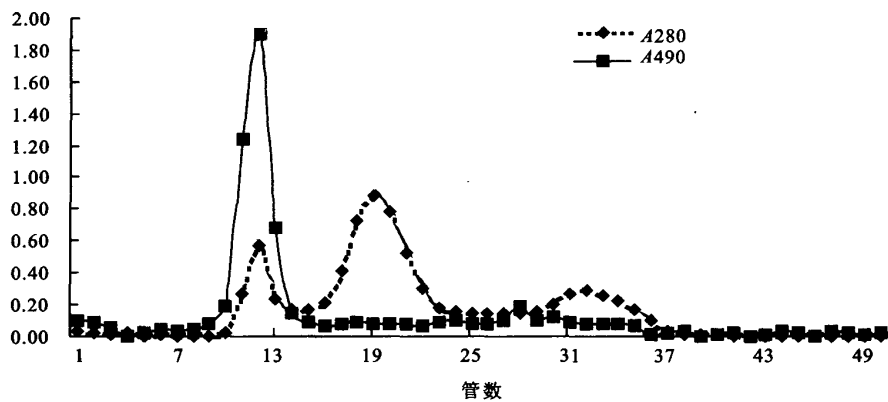


图 1 甘薯糖蛋白在 Sephadex G-75 层析柱上的洗脱曲线
Fig. 1 Elution curve of SPG on Sephadex G-75 column

洗脱后得一多糖峰与蛋白峰的重叠峰(11~13 管),收集,浓缩,透析,乙醇沉淀,无水乙醚洗涤,真空干燥得甘薯糖蛋白,为淡黄色粉末。

2.2 甘薯糖蛋白糖质量分数及蛋白质质量分数

甘薯糖蛋白的糖质量分数为 89.3%,蛋白质质量分数为 10.7%。

2.3 甘薯糖蛋白体外抗氧化作用

2.3.1 甘薯糖蛋白对超氧阴离子自由基($\text{O}_2\cdot^-$)的清除作用 室温下测定不同质量浓度的甘薯糖蛋白对邻苯三酚自氧化体系的影响,结果见表 1。

表 1 甘薯糖蛋白对 $\text{O}_2\cdot^-$ 的清除作用 ($\bar{x}\pm s$)				
Tab. 1 Scavenging effect of SPG on $\text{O}_2\cdot^-$ ($\bar{x}\pm s$)				
甘薯糖蛋白 质量浓度/ ($\mu\text{g/mL}$)	A_1 (325 nm)	A_2 (325 nm)	超氧阴离子 自由基生成量 ($\Delta A/4\text{ min}$)	抑制 率/%
0	0.644	0.857	0.053 $\pm$ 0.010	
80	0.671	0.870	0.050 $\pm$ 0.008	6.4
160	0.722	0.902	0.045 $\pm$ 0.007	15.3
320	0.813	0.954	0.035 $\pm$ 0.006*	33.8
640	0.985	1.052	0.017 $\pm$ 0.004**	68.5

注: $n=4$, * $p<0.05$; ** $p<0.01$; 相比如对照组

由表 1 可见,在测定体系中加入甘薯糖蛋白

1.3.4 统计处理 $\bar{x}\pm s$ 表示采用 SPSS 软件进行 t 检验统计学分析, $p<0.05$ 表示差异显著, $p<0.01$ 表示差异非常显著。

2 结 果

2.1 甘薯糖蛋白的分离纯化

上清液经 Sephadex G-75 层析柱洗脱后,结果如图 1。

时,当甘薯糖蛋白的质量浓度为 80、160 $\mu\text{g/mL}$ 时,虽有清除邻苯三酚自氧化反应中所产生的超氧阴离子自由基的作用,但并无显著差异($p>0.05$)。当甘薯糖蛋白的质量浓度为 320 $\mu\text{g/mL}$ 时,甘薯糖蛋白对邻苯三酚自氧化反应中所产生的超氧阴离子自由基具有明显的清除作用($p<0.05$)。当甘薯糖蛋白的质量浓度为 640 $\mu\text{g/mL}$ 时,甘薯糖蛋白对邻苯三酚自氧化反应中所产生的超氧阴离子自由基具有非常明显的清除作用($p<0.01$)。

2.3.2 甘薯糖蛋白对羟基自由基($\cdot\text{OH}$)的清除作用 试验结果见表 2。

表 2 甘薯糖蛋白对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用 ($\bar{x}\pm s$)		
Tab. 2 Scavenging effect of SPG on $\cdot\text{OH}$ ($\bar{x}\pm s$)		
甘薯糖蛋白 质量浓度/($\mu\text{g/mL}$)	$A_{532\text{ nm}}$	抑制率/%
对照	0.951 $\pm$ 0.011	
$\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{SPG } 80$	0.710 $\pm$ 0.009**	25.34
$\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{SPG } 160$	0.662 $\pm$ 0.008**	30.39
$\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{SPG } 320$	0.566 $\pm$ 0.006**	40.48
$\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{SPG } 640$	0.449 $\pm$ 0.005**	51.74

注: $n=4$, ** $p<0.01$; 相比如对照组

表 2 表明:以上各质量浓度的甘薯糖蛋白组与对照组比较均具有极显著差异($p < 0.01$),表明甘薯糖蛋白对羟基自由基具有非常明显的清除作用。

2.3.3 甘薯糖蛋白抗 H_2O_2 引起的红细胞溶血作用 试验结果见表 3。

表 3 甘薯糖蛋白抗 H_2O_2 引起的红细胞溶血作用($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Effect of SPG on the hemolysis of rat RBC induced by H_2O_2 ($\bar{x} \pm s$)

甘薯糖蛋白 质量浓度/($\mu\text{g/mL}$)	$A_{532\text{ nm}}$	抑制率/%
对照	0.324 ± 0.005	
$\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{SPG } 80$	0.322 ± 0.006	0.6
$\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{SPG } 160$	0.325 ± 0.004	-0.3
$\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{SPG } 320$	0.328 ± 0.005	-1.2
$\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{SPG } 640$	0.331 ± 0.006	-2.16

注: $n=4$ 。

表 3 表明,甘薯糖蛋白不能抑制 H_2O_2 诱导的红细胞溶血。

2.3.4 甘薯糖蛋白对肝微粒体脂质过氧化产物丙二醛(MDA)的抑制作用 试验结果见表 4。

表 4 甘薯糖蛋白对 $\text{Fe}^{2+} - \text{H}_2\text{O}_2$ 诱导的小鼠肝组织丙二醛生成的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab. 4 Effect of SPG on lipid peroxidation of liver homogenate($\bar{x} \pm s$)

甘薯糖蛋白 质量浓度/($\mu\text{g/mL}$)	$A_{532\text{ nm}}$	抑制率/%
对照	1.328 ± 0.015	
$\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{SPG } 80$	$1.195 \pm 0.013^{**}$	10.02
$\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{SPG } 160$	$1.033 \pm 0.012^{**}$	22.21
$\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{SPG } 320$	$0.632 \pm 0.010^{**}$	52.41
$\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{SPG } 640$	$0.156 \pm 0.007^{**}$	88.25

注: $n=4$, $^{**} p < 0.01$;相比对照组

表 4 表明:以上各质量浓度的甘薯糖蛋白组与对照组比较均具有极显著差异($p < 0.01$),表明甘薯糖蛋白对 $\text{Fe}^{2+} - \text{H}_2\text{O}_2$ 诱导的小鼠肝组织丙二醛生成具有非常明显的抑制作用。

3 讨 论

自由基是指含有奇数价电子并因此在一个轨道上具有一个未成对电子的原子或原子团。超氧阴离子自由基、羟自由基等含氧自由基统称为氧自由基^[9]。活性氧自由基对机体产生一系列的有害作用,如进攻不饱和脂肪酸可引起脂质过氧化,导致生物膜结构和功能的改变;损伤蛋白质的巯基和氨基使蛋白质变性、交联,使酶的活性丧失;损伤 DNA 可导致细胞突变^[13]。种种有害后果与许多疾病如肿瘤、炎症、衰老的发生有密切的关系,因此生物体内活性氧生成与清除的平衡对生命过程的正常进行十分重要^[14]。作者的研究表明,甘薯糖蛋白还对邻苯三酚自氧化速率、 $\text{Fe}^{2+} - \text{H}_2\text{O}_2$ 体系产生的 $\cdot\text{OH}$ 和对 $\text{Fe}^{2+} - \text{H}_2\text{O}_2$ 诱导的小鼠肝组织丙二醛生成具有明显的抑制作用。说明甘薯糖蛋白具有较强的抗氧化活性,能抑制 $\cdot\text{OH}$ 所致的过氧化的发生,从而保护膜系统免受 $\cdot\text{OH}$ 损伤;防止膜脂质过氧化的发生,维持膜的流动性,维持正常的生理功能。甘薯糖蛋白对 O_2^- 和 $\cdot\text{OH}$ 有直接的清除作用,提示该糖蛋白可能在防衰老、抗肿瘤和抗炎等方面发挥作用。目前国内外已将抗氧化检测用于抗衰老等保健食品的评价,因此甘薯糖蛋白对保健食品的开发可能具有积极的作用。另外利用甘薯糖蛋白的抗氧化功能进行化妆品的开发,也是一个新的应用方向。

参考文献(References):

[1] 张立明,王庆美,王荫嫒.甘薯的主要营养成分和保健作用[J]. 杂粮作物,2003,23(3):162-166.
ZHANG Li-ming, WANG Qing-mei, WANG Yin-chi. The mail nutrient components and health care function of sweet potato[J]. *Rain Fed Crops*, 2003,23(3):162-166. (in Chinese)

[2] 李时珍.本草纲目(校点本),第3册[M]. 北京:人民卫生出版社,1997.

[3] 王方生,陈淑英. Simon 1 号对免疫功能影响的研究[J]. 中国甘薯,1998,2:70.
WANG Fang-sheng, CHEN Shu-ying. Studies on immune function of Simon 1[J]. *Chinese Sweet Potato*, 1998,2:70. (in Chinese)

[4] 杨立明.浅谈甘薯综合开发利用[J]. 国外农学-杂粮作物,1995,2:44-45.
YANG Li-ming. An elementary introduction to comprehensive development of Sweet potato[J]. *Foreign agriculture-rain*

- fed crops**, 1995,2:44—45. (in Chinese)
- [5] 李亚娜,赵谋明,彭志英,等. 甘薯糖蛋白的分离、纯化及其降血脂功能[J]. 食品科学,2003,24(1):118—121.
LI Ya-na, ZHAO Mou-ming, PENG Zhi-ying, et al. Studies of Sweet potato glycoprotein on purification and reducing blood lipid[J]. **Food Science**, 2003,24(1):118—121. (in Chinese)
- [6] 阚建全,阎磊,陈宗道,等. 甘薯糖蛋白的免疫调节作用研究[J]. 西南农业大学学报,2000,22 (3):257—260.
KAN Jian-quan, YAN Lei, CHEN Zong-dao, et al. Studies on immunomodulation function of Sweet potato glycoprotein [J]. **Journal of Southwest Agricultural University**, 2000,22 (3):257—260. (in Chinese)
- [7] 郭勇. 现代生化技术[M]. 上海:上海科技出版社,1987,121.
- [8] 李建武,萧能赓,余瑞元,等. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京大学出版社,1994.
- [9] 赵云涛,国兴明,李付振. 金樱子多糖的抗氧化作用[J]. 生物学杂志, 2003,20(2):23—24.
ZHAO Yun-tao, GUO Xing-ming, LI Fu-zhen. Anti-oxidative activity of polysaccharide from *Rosa Laevigata* Mickx[J]. **Journal of Biology**, 2003,20(2):23—24. (in Chinese)
- [10] 高春严,田呈瑞. 枸杞多糖体外抗氧化特性研究[J]. 粮食与油脂,2005(7):28—29.
GAO Chun-yan, TIAN Cheng-rui. Study on antioxidant effectiveness of Ch. wolfberry polysaccharide[J]. **Cereals & oils**, 2005(7):28—29. (in Chinese)
- [11] 李小定,荣建华,吴谋成. 灰树花多糖 PGF-1 体外对羟基自由基的抑制作用[J]. 食品科学,2003, 24(7):126—130.
LI Xiao-ding, RONG Jian-hua, WU Mou-cheng. Scavenging effect of PGF-1 on hydroxyl radicals in vitro[J]. **Food science**, 2003, 24(7):126—130. (in Chinese)
- [12] 李永泉,吴炬,花立民,等. 白阿魏菇菌丝体多糖(PNMP)体外抗氧化活性[J]. 兰州大学学报(自然科学版) 2003,39(6): 70—73.
LI Yong-quan, WU Ju, HUA Li-min, et al. Antioxidative activity of polysacche antiocharide from *pleurotus nebrodensis* mycelium[J]. **Journal of Lanzhou University (Natural Sciences)**, 2003,39(6):70—73. (in Chinese)
- [13] 张全斌,于鹏展,周革非,等. 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.
ZHANG Quan-bin, YU Peng-zhan, ZHOU Ge-fei, et al. Studies on antioxidant activities of fucoidan from *Laminaria japonica*[J]. **Chinese traditional and herbal Drugs**, 2003,34(9):824—826. (in Chinese)
- [14] Cuzzocrea S, Riley D, Caputi A P, et al. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury [J]. **Pharmacol Rev**, 2001, 53:135—139.

(责任编辑:朱 明)