

综 述

鲨软骨粘多糖及其分离、纯化和应用

SHARK CARTILAGE MUCOPOLYSACCHARIDE AND ITS PURIFICATION, SEPARATION AND APPLICATION

肖凯军 李琳 郭祀远 蔡妙颜

(华南理工大学轻化工研究所, 广州 510641)

XIAO Kai-Jun, LI Lin, GUO Si-Yuan, CAI Miao-Yan

(*Light Chemical Engineering Research Institution,*

South China University of Technology, Guangzhou 510641)

关键词 鲨软骨, 粘多糖, 分离, 纯化

KEYWORDS shark cartilage, mucopolysaccharide, separation, purification

中图分类号 Q539.7, TQ28.96

鲨是我国海水经济鱼类之一,也是软骨鱼中最重要的一类。美国科学家经过数十年发现,鲨几乎不患癌症,对癌症有天然免疫力。这主要由于鲨的骨骼全是软骨,软骨中含有抗癌作用的成份[沈先荣等 1997,郝秀兰 1992]。鲨软骨中含有大量胶原蛋白、酸性粘多糖、抗癌特效因子 CDI 和丰富的磷、钙以及微量元素等等,对人体非常有益[王长云等 1997,唐有祺等 1992]。目前,市场上出现的美国鲨软骨粉胶囊约为4800元/公斤以上,远高于螺旋藻粉胶囊的价格。其中,鲨软骨中的粘多糖,有很强的生理功能,例如抗凝、降血脂、抗病毒及抗肿瘤等作用,是重要的海洋保健食品和药品原料[王长云等 1997,沈先荣等 1997,郝秀兰等 1992]。因此,对鲨软骨粘多糖的研究已经成为国内外研究的热点,对其结构、组成、药理以及应用等方面进行了大量的研究,我国也列入“863”国家海洋高新技术项目计划书中。本文从鲨软骨粘多糖的组成、结构、生理作用、分离和纯化、物理化学性质与应用等方面阐述了鲨软骨粘多糖研究的进展。

1 鲨软骨的结构特点和组成

鲨又名鲛鱼、沙鱼、鲛鲨等,属于脊椎动物门软骨纲(Chondrichthyes),种类很多,据统计

有250多种。我国沿海常见种类有扁头哈那鲨、姥鲨、白斑星鲨、角鲨和虎鲨等,广东沿海主要有鲸鲨、梅花鲨和灰星鲨等。一般都是从大型鲨例如姥鲨、鲸鲨等提取鲨软骨。鲨的骨骼全是软骨,成骨细胞在骨化过程中停留在软骨阶段,故其骨骼中没有骨膜。软骨约占体重(除头部)6.23%,软骨组织含有软骨硫酸粘蛋白(Chondroinmucoïd),骨胶原蛋白和软骨硬蛋白(Chondroalbuminoid)三种成份,前两种的含量较多。软骨硫酸粘蛋白水解后,生成蛋白质和硫酸软骨素(Chondroitin Sulfuric acid)。新鲜鲨软骨水分约为50%,软骨干重中蛋白质约为41%~47%,脂肪约为0%~1.3%,灰分约为45%~48%[Manisseri 和 Chandrasekhar 1978]。软骨中蛋白质主要为胶原蛋白,含有大量的甘氨酸、羟脯氨酸和丙氨酸。脂肪主要为胆固醇,还含有棕榈酸、油酸和硬脂酸等。所含主要的无机盐,钠最多,其余还有钾、钙、镁、铁、氯、磷、硫等成分。此外,对于鲨软骨中无机盐钙和磷酸的组成,Lieflaender, M. 等用分子式近似表示: $Ca_4(PO_4)_2(HPO_4)_{0.6}(CO_3)_{0.4}$ [Lieflaender 等 1968]。鲨的头骨和肋骨含大量的6-硫酸软骨素钠盐,按干燥原料计算收率,头骨为23%,肋骨高达37.4%[Manisseri 和 Chandrasekhar 1978]。鲨软骨中还含有其他物质,如高效的细胞生长素、溶菌酶及蛋白酶抑制因子等[Lee 和 Langer 1984]。

2 鲨软骨粘多糖的组成的结构

蛋白多糖由多糖(约95%)和蛋白质(约5%)单位组成,而粘多糖(Mucopolysaccharide)是存在于生物体内的一类生物高分子化合物,是蛋白质的糖链部分。软骨粘多糖为氨基己糖和己糖醛酸交替结合而成的长链分子,是一类杂多糖。在这些线型长链分子上分布着组成和数量不同酸性基团,其中主要为羧酸根离子和硫酸根离子,它们具有和带正电荷离子和大分子相互作用的能力,故又称为聚阴离子(Polyanion)如图1所示,在软骨多糖中,硫酸角质素和

硫酸软骨素可能是与一个多肽骨干共价键结合在一起,多肽骨干成为核心蛋白,蛋白多糖单体,按照一定间隔交错在透明质酸长丝的两侧出现[唐有祺等 1992]。

鲨软骨中的酸性多糖由透明质酸、软骨素、4-硫酸软骨素、6-硫酸软骨素、硫酸角质素、肝素等组成,二糖中至少有一个带有负电荷的羧基或硫酸基(图2)。鲨粘多糖化学组成和结构呈不均一性,不均一性来自粘多糖生物合成过程中的不完全修饰反应4-硫酸软骨素、6-硫酸软骨素等双糖单位中所含硫酸基的数量及位置并不严格一致。鲨软骨粘多糖不仅是单纯的葡萄糖醛酸和乙酰氨基半乳糖的二糖单位聚合物,在分子中还含有葡萄糖、半乳糖、果糖、甘露糖、木糖、鼠李糖,其在糖链中的结合方式和位置有待深入研究。鲨软骨粘多糖在核心蛋白质的表面,核心蛋白质通过共价键和硫酸软骨素以及硫酸角质素结合而成,自然状态的蛋白多糖大约是轴向比为3的两个相同同心椭圆壳体[Sugahara 等 1991]。

鲨软骨蛋白多糖主要带有6-硫酸软骨素,从多糖和蛋白质的结合部分可以分离得到13种

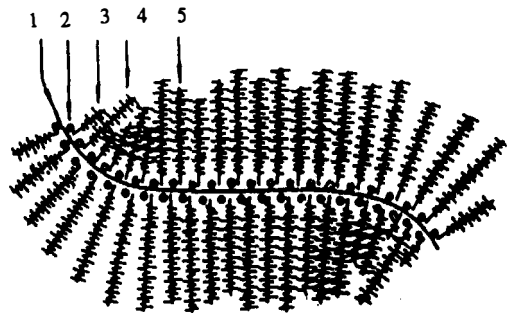


图1 蛋白多糖集合体示意图

Fig. 1 Structure of Proteoglycan Complex

1. 透明质酸; 2. 连接蛋白; 3. 硫酸角质素;
4. 硫酸软骨素; 5. 核心蛋白

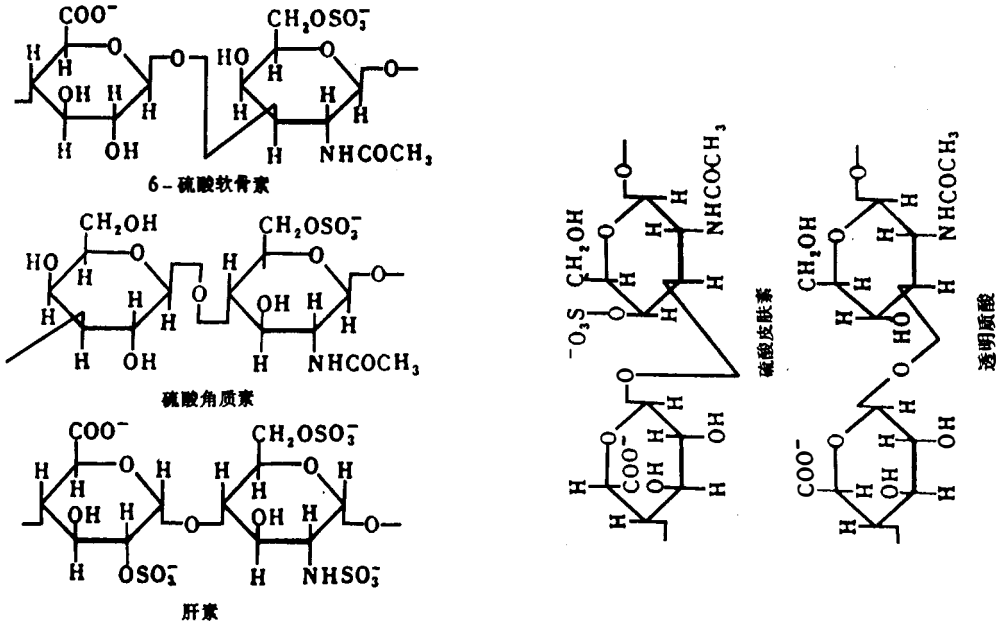


图2 氨基多糖中重复的二糖单位结构

Fig. 2 The structures of repeating disaccharides in the glycosaminoglycan

非硫酸化、硫酸化或磷酸化的己糖醇，其中，六种化合物包含0或1位的硫酸盐(或者磷酸盐)残基，约占分离得到的己糖醇40%。这六种物质具有相同的结构[Sugahara 等 1992]: $\Delta_{4,5}$ -GlcA β 1-3GalNAc β 1-4GlcA β 1-3Gal β 1-3Gal β 1-4Xyl-ol。其中， $\Delta_{4,5}$ -GlcAc:4,5-不饱和葡萄糖醛酸;GlcA:葡萄糖醛酸;GalNAc:2-脱氧-2-N-己酰氨-D-半乳糖;Gal:半乳糖;Xyl:木糖醇。

此外，一种化合物既无硫酸盐又无磷酸盐，两种单硫酸化的己糖醇在 GalNAc 残基的 C-6 或 C-4 位置上带有一个硫酸盐，第三种单硫酸化的己糖醇在和木糖醇相连的 Gal 残基的 C-6 上有一个硫酸盐，两种磷酸化的化合物在木糖醇的 C-2 上有磷酸盐(其中一种在 GalNAc 的 C-6 上还有一个硫酸盐)[Ward 等 1992]。

3 鲨软骨粘多糖的物理化学性质和生理药物作用

3.1 鲨粘多糖物理化学性质

鲨软骨粘多糖分子具有高度的亲水性，粘弹性和聚阴离子性，可以通过众多的羟基与水紧密结合，赋予组织高度的弹性。其中，硫酸软骨素钠有吸湿性，可吸收16%~17%的水分，易溶于水，难溶于丙酮、乙醇等有机溶剂，水溶液粘稠状；添加酸或碱，则粘度降低，发生降解；有离子交换性，可与阳离子形成金属盐而发生沉淀。由于提取分离的粘多糖的成分和分子量的大小不同，鲨粘多糖的比旋光度，动力粘度，乳化性，沉淀阳离子的能力也不同。

3.2 鲨粘多糖的生理药物作用

鲨软骨粘多糖具有连接蛋白质的特异寡糖顺序,这些寡糖的修饰,在一定程度上构成了粘多糖分子的不均一性和特异性。粘多糖的生物合成起始于核心蛋白上,经过多种糖基转移酶和有关的修饰酶的作用,形成多种有特定顺序的重复单位的线型分子。粘多糖特有的聚阴离子性质以及它们在溶液中的不同构象形成了它们多种生物学作用基础。

鲨粘多糖分子通过众多羟基与水的高度亲和性赋予组织高度弹性,所携带的阴离子基团易与 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{++} 、 Ca^{++} 等离子结合。鲨粘多糖在动物生存过程中生成,并在完成动物功能上起着重要作用的物质。鲨粘多糖生理药物活性一般认为有以下几点:①抗凝血作用。鲨软骨粘多糖均具有较缓和的抗凝血作用,其机制可能与抑制凝血因子有关。郝秀兰等研究表明,鲨软骨粘多糖具有多糖抗凝血活酶样作用和抗凝血酶样作用,使凝血时间和凝血酶原时间延长,其作用机制于肝素类似。冠心病是冠状动脉硬化引起冠状动脉阻塞造成的心肌缺血,而在动脉粥样硬化的病因中,血液凝固过程和改变、血小板凝集、血栓形成是重要的危险因素。因此,缓和的抗血药酸性粘多糖用于冠心病的治疗和预防具有重要作用。②降血脂的作用。鲨软骨酸性粘多糖有阻滞脂蛋白透过动脉壁的作用,有澄清动脉壁脂质的作用,也可以降低血浆胆固醇和甘油三酯的功能。酸性粘多糖通过甘油三酯部分水解形成脂肪酸,使大分子复合物变成较小的分子,从而对 β -脂蛋白抑制,故对血脂过高引起的血清混浊有澄清的功效。另外,有研究结果表明:酸性粘多糖可抑制磷酸二酯酶,增加CAMP浓度,激活脂蛋白酶,加速脂质的分解。③抗炎症和抗病毒的作用。许多粘多糖可增加溶酶体膜的稳定性。资料表明:硫酸软骨素对大鼠心肌、主动脉的结缔组织有明显的抗炎作用,并能保护红细胞,减少细胞破裂。酸性粘多糖在一定程度上可以抑制水肿、抗肉芽肿、解热和镇痛。机体免疫机能与炎症反应有密切关系,而酸性粘多糖可通过多方面作用影响免疫机能,这类物质常带有强大的聚阴离子,能于炎症递质,如组织胺、5-羟色胺、缓激肽及白细胞趋化因子结合,保护血管内皮,减少渗透,抑制炎症反应。此外,酸性粘多糖能阻碍抗原-抗体复合物的形成,抑制补体系统并能吸附病毒生物。④抗动脉硬化。鲨软骨素具有抗动脉化的功效。傅德华等从姥鲨软骨中提取酸性粘多糖,在大鼠腹腔和家兔注射实验中,可明显地抑制体外血栓的形成[傅德华等 1992]。⑤抗肿瘤活性。酸性粘多糖具有一定抗肿瘤活性,鲨软骨中含有一种抑制肿瘤新血管形成的因子,中流生长是依赖血管的,因此,抑制血管生成可抑制肿瘤的生长和转移。鲨软骨通过抑制细胞骨架的形成,对内皮细胞迁移的抑制,从而抑制血管的生成。

4 鲨软骨粘多糖分离和提纯

鲨软骨粘多糖的提取不同于高等植物、微生物(细菌和真菌)、地衣和藻类。高等植物、微生物、地衣和藻类中的细胞比较脆弱、结构相对松散,一般采用研磨法、组织捣碎法、超声波法、压榨法和冻溶法等。但是,鲨软骨粘多糖链与核心蛋白通过共价键连接,而蛋白多糖的聚合体则通过次级键(氢键、盐键等)形成,因而提取分离粘多糖仅仅是依靠破坏次级键的作用是不够的(这只能分离蛋白多糖),而必须以降解蛋白质的方法,破坏多糖与蛋白质的共价键结合方能达到粘多糖提取目的。由于鲨软骨组织中存在多种蛋白多糖,而多糖又含有多种粘多糖,因此,粘多糖的分级提纯是必要的。

4.1 鲨粘多糖的提取

提取鲨软骨多时,可以使用剧烈方法降解核心蛋白或断裂糖肽键,从而释放出糖链,有利于提取完全。提取粘多糖时,应该使软骨组织处于良好的分离状态,因此,粉碎和均浆处理是必要的。鲨软骨多糖,一般采用碱提取法和蛋白酶水解法两种[樊会曾 1983]。

4.1.1 碱提取法

碱法提取粘多糖早在一百年前已经为 Krukenberg 首次分离硫酸软骨素时开始应用[樊会曾 1983]。蛋白多糖肽键对碱的不稳定性,部分糖苷键可能因碱处理而断裂。硫酸软骨素是通过 β -消除反应而释放的。反应时,糖肽键(即丝氨酸-O-木糖-)断裂。丝氨酸脱水形成 α -氨基丙烯酸,而释放出木糖,处于糖链的还原端在碱性下逐渐生成间糖酸或异糖酸而脱落,又称“去皮反应”(Peeling reaction),并使还原端不断外切,如图3。

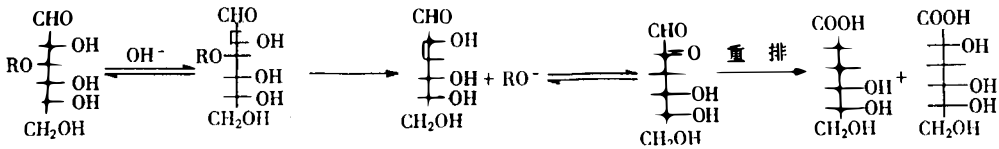


图3 糖苷键在碱性溶液中的去皮反应

Fig. 3 Peeling reaction of glycosidic in the alkali solution

硫酸皮质素和硫酸软骨素在碱解时不发生脱硫反应,而硫酸角质素经过碱处理后,由于生成3,6内醚衍生物,而使多糖中氨基己糖减少52%以上,这是因为硫酸酯基与邻位羟基处于反式结构,或硫酸酯基在C6或C3上,而此同时在C3或C6有游离羟基都可以发生脱氨反应,发生Walden 转化或形成3,6内醚衍生物。

4.1.2 酶水解法

蛋白酶水解法是从鲨软骨中提取粘多糖较好的方法。蛋白酶不能断裂糖肽键及其附近的肽链,酶解后产物能保留较长的肽链。常用蛋白酶有胃蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、链霉菌蛋白酶、肌动蛋白酶E等,其中肌动蛋白酶、木瓜蛋白酶应用较广。一般来说,由于木瓜蛋白酶、链霉菌蛋白酶水解软骨所得到产品硫酸软骨素残留肽键数由5个组成,因此,蛋白酶消化一般采用两次法。

蛋白酶消化后,鲨软骨多糖释放出来,通过各种沉淀法、除去大分子蛋白质,而小分子非多糖物质用超滤、透析等方法除去,从而得到硫酸软骨素的肽葡聚糖。

4.2 鲨鱼粘多糖的提纯

4.2.1 乙醇沉淀法

在鲨鱼软骨粘多糖提取液中,添加乙醇-醋酸钠或醋酸钾,使粘多糖沉淀比较安全。在粘多糖中加入乙醇后,沉淀呈糖浆状,处理困难,加入醋酸盐后则可获得分散良好的絮状沉淀。

由于乙醇沉淀需要重复操作,得率少,所以采用纤维素柱分离提纯。以多孔惰性纤维素或 Celite 柱用乙醇沉淀,洗脱,使分离效果得到改善,但是手续较麻烦,溶剂消耗大。

4.2.2 盐沉淀法

鲨鱼粘多糖在水溶液中经过有机酸、碱和盐处理,即发生不溶性沉淀,盐沉淀以水液为介质,对酸性粘多糖的特异性沉淀,可用于多硫酸多粘多糖与单硫酸粘多糖的分离;也可用于不同 $\text{SO}_4^{2-}/\text{CO}_3^{2-}$ 比值多糖的分离,通过控制醋酸钾浓度控制析出多糖 $\text{SO}_4^{2-}/\text{CO}_3^{2-}$ 的比值。

4.2.3 利用电离性质分离法

鲨鱼粘多糖分子中可电离基团数有羟基和硫酸基,其 pK 值不同,主体结构位置及硫酸基相连的基团不一样,不同羟基的硫酸基 pK 值又稍微不同,季铵盐络合沉淀与离子交换法广泛应用于毫克量级以上粘多糖的制备。

4.2.4 凝胶过滤色谱分离法

以 Sepharose 作填充柱,根据鲨鱼软骨粘多糖的分子量和分子大小不同,流 Sepharose 填充柱的时间不同,进而进行分离,大分子组分首先被洗脱,最后是小分子组分被洗脱下来。此外,使用多孔玻璃漏或多孔硅胶作填充物也同样有效。

4.2.5 电泳分离法

电泳分离主要用于鲨鱼软骨多糖的微量分离和鉴定,电泳分离法有多种,有 SDS 凝胶电泳法、等电点聚焦电泳法等。聚焦电泳法主要使鲨鱼软骨粘多糖在电场下与存在于聚丙烯酰胺或琼脂糖等凝胶中含氨基的两性载体形式一系列不溶性复合物区带,趋向阳极的组分分子量小,接近加样处的组分分子量大。

4.2.6 超滤膜分离法

超滤膜分离法是一种分离提纯鲨鱼粘多糖比较好的方法,可以大量分离鲨鱼粘多糖。利用超滤膜孔径的大小不同,除去小分子的多肽和非多糖物质,还可以得到不同分子量的粘多糖。但是,存在着膜污染和浓差极化的问题,可以通过提高流动速度和外加电场强化分离过程等步骤减少膜污染和浓差极化现象[李雁等 1996]。

5 鲨鱼软骨粘多糖的鉴定和分子量的测定

鲨鱼软骨粘多糖的定性分析,可以采用硫酸-苯酚-萘酮颜色反应和红外光谱测定。

粘多糖结构分析采用醋酸纤维素薄膜电泳、超离心分析、红外吸收光谱、HNMR、薄层分析等方法。对多糖整体结构分析,必须将各种方法结合起来。气相色谱、H 和 C-NMR、小角度中子衍射、质谱和色谱联用等已经应用于结构分析,此外,HPLC、圆二色谱及旋光色散分析法也已用于鲨鱼软骨多糖的结构分析。

氨基半乳糖含量、己糖醛糖、含硫量、含氮量等分析多采用化学分析法,例如比色法、沉淀法等等。

粘多糖分子量过去常采用粘度法、蒸汽压渗透法、沉淀法、端基法、光衍射法等,但由于测定方法复杂,误差大,现多不采用。目前,主要采用凝胶过滤色谱法、HPLC、SDS 凝胶电泳法。

6 鲨鱼软骨粘多糖的应用

6.1 食品方面

鲨鱼软骨粘多糖在食品方面的应用已有较多的专利报道,美国、日本、澳洲等制成鲨鱼软骨胶囊作为高级保健食品已经在市场上公开出售。鲨鱼软骨含有丰富的粘多糖和胶原蛋白,用来作为

良好的滋补强壮剂和汤料。鲨翅中粘多糖和蛋白复合物,以及芝麻中 V_E 则是预防皮肤病的优良保健食品。

日本把鲨粘多糖和蛋白复合物、多不饱和脂肪酸研制成营养强化剂,鲨粘多糖、D-苯丙氨酸、 V_{B_3} 、 V_{B_5} 、 V_{B_6} 等调配成止痛膳食。

此外,鲨软骨中的硫酸软骨素钠盐作为乳化剂、保水剂在食品中也大量使用。在鱼肉香肠中添加量3克/千克;蛋黄酱、调味酱中添加量为20克/千克。硫酸软骨素钠盐不但能消除鱼臭,保护胶质感强,而且在蛋黄酱中添加后,可改善风味、口感及制品的光泽。

6.2 在医疗方面的应用

鲨软骨切碎,用水提取的粘多糖,分子量 >100000 ,具有抗炎活性。鲨软骨中的硫酸软骨素具有降血脂、抗动脉硬化和抗凝血的作用,临床用于动脉硬化和冠心病的治疗。鲨鳍和软骨也可治疗腹泻、神经性头痛、关节炎、偏头痛和肝炎。

鲨软骨中的粘多糖,例如肝素,可以抵抗一系列毒素并阻断抗原-抗体反应从而对机体起保护作用,已成为治疗烧伤、肾小球炎的依据。鲨软骨粘多糖能防止肿瘤转移及提高化疗药物的作用,在降低化疗药物副作用等方面为抗癌治疗提供新方法。硫酸软骨素长期以来用于链霉素所引起的听觉障碍和预防。

6.3 其它方面的应用

鲨软骨中的粘多糖和蛋白质、脂肪等多种添加物,可以制成很好的化妆品。

参 考 文 献

- 王长云,傅秀梅,管华诗. 1997. 海洋功能食品研究现状和展望. 海洋科学, (2):20~23
- 沈先荣,贾福星,王玲等. 1997. 鲨鱼软骨制剂抑制血管生成的研究. 生物化学与生物物理进展, 24(2):155~159
- 李雁,郭祀远,蔡妙颜等. 1996. 电磁作用改善酶膜反应分离过程的探讨. 食品与发酵工业, 5:66~69
- 郝秀兰,叶淑芳,吴钟高等. 1992. 鲨鱼骨粘多糖抗凝血作用. 中国海洋药物, 44(4):17~22
- 唐有祺,张惠珠,吴香钰等(译). 1992. 生物化学. 北京:北京大学出版社,320~670
- 傅德华,何志坚,李领华等. 1992. 鲨鱼酸性粘多糖抗栓作用的研究. 中国海洋药物, 43(3):18~19
- 樊会曾. 1983. 粘多糖及其提取、分离. 海洋药物, 5(1):40~55
- Lee A, Langer R. 1984. Biotechnology in the marine sciences, Edited by Rita R. Colwell, Plenum, New York. 215~218
- Lieflander M, Thomas K, Bohn E, et al. 1968. Molecular anatomy of the spine. Z Kin Chem Kin Biochem, 6(4):235~240
- Manisseri M K, Chandrasekhar T C. 1978. Some aspects of rational utilisation of skate for the preparation of fish products. Seafood Export Journal, 10(8):11~17
- Sugahara Kazuyuki, Masao Masuda, Tadashi Harada, et al. 1991. Structural studies on sulfated oligosaccharides derived from the carbohydrate-protein linkage region of chondroitin sulfate proteoglycans of whale cartilage. Eur J Biochem, 202(2):805~811
- Sugahara Kazuyuki, Yumiko Ohi, Tadashi Harada. 1992. Structural studies on sulfated oligosaccharides derived from the carbohydrate-Protein linkage region of chondroitin 6-sulfate proteoglycans of Shark cartilage. J Bio Chem, 267(9):6027~6035
- Waard, Pieter de, Johannes F G, Vliegthart, et al. 1992. Structural studies on sulfated oligosaccharides derived from the carbohydrate-Protein linkage region chondroitin 6-sulfate proteoglycans of shark cartilage. J Bio Chem, 267(9):6036~6943