

毛蚶中天然牛磺酸的提取和活性研究

徐艳¹, 宋成芝², 孙雪萍^{1*}, 张向云³, 童万平¹ (1. 广西海洋研究所 海洋生物技术重点实验室, 广西北海 536000; 2. 昭通师范高等专科学校化学系, 云南昭通 657000; 3. 中国科学院广州地球化学研究所, 有机地球化学国家重点实验室, 广东广州 510640)

摘要 [目的]提取和纯化毛蚶(*Scapharca subcrenata*)中的天然牛磺酸,并对其活性进行研究。[方法]采用薄层色谱法(TLC)对提取的牛磺酸纯度进行分析,并对其结构用红外光谱(IR)和核磁共振波谱(NMR)进行鉴定,然后对其细胞毒活性进行检测。[结果]毛蚶富含牛磺酸,对人白血病细胞 HL-60、肝癌细胞 SMMC-7721、肺癌细胞 A-549、乳腺癌细胞 MCF-7 和结肠癌细胞 SW480 没有明显的细胞毒活性。[结论]该研究为天然牛磺酸的开发和利用提供了依据。

关键词 毛蚶; 牛磺酸; 提取; 细胞毒性

中图分类号 S968.3; Q58 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2012)17-09288-02

Isolation and Activity Study of Nature Taurine in *Scapharca subcrenata*

XU Yan et al (Guangxi Institute of Oceanology, Guangxi Key Laboratory of Marine Biotechnology, Beihai, Guangxi 536000)

Abstract [Objective] The aim was to isolate and purify taurine in *Scapharca subcrenata*, and its activity was studied. [Method] The purity of isolated taurine was analyzed by TLC, and its structure was determined by IR and NMR, and then its cytotoxicity in vitro was detected. [Result] The results showed that the yield of taurine in *S. subcrenata* was high, and there were no significant cytotoxic activities against human leukemia cell line HL-60, hepatocarcinoma cancer cell line SMMC-7721, lung cancer cell A-549, human breast cancer cell line MCF-7 and colorectal cancer cell line SW480. [Conclusion] The study provides a basis for development and utilization of nature taurine.

Key words *Scapharca subcrenata*; Taurine; Isolation; Cytotoxicity

毛蚶(*Scapharca subcrenata*)是我国重要的海产经济埋栖型贝类,为蚶科动物,产于我国南北沿海。《神农本草经》及历代主要本草中均有记载。毛蚶多以壳入药,名瓦楞子,具有消痰化痰、软坚散结和止痛止痛的功效。蚶肉为海产食品,据《随息居饮食谱》记载,能“补血、润肠、生津、健胃”,民间用于抗肿瘤、抗贫血和抗炎等。

牛磺酸(Taurine)学名2-氨基乙磺酸,是一种非蛋白质氨基酸,其是人体必需氨基酸之一,具有很强的生物活性,在临床上可用于治疗急性慢性肝炎、感冒、高血压、动脉硬化和癌症等疾病,同时具有解热、镇痛、降血压、抗菌、提高免疫力和抗肿瘤活性等作用^[1]。牛磺酸在鱼贝类中含量十分丰富,软体动物中尤甚,此外,一些海藻中也含有不少牛磺酸,可以说海洋生物是牛磺酸的天然宝库^[1]。

目前国内对牛磺酸的研究大多集中在中枢神经、视觉系统和心血管系统等方面,但关于牛磺酸对肿瘤作用的研究较少,作用机制也尚未明确。由于牛磺酸具有一定的抗肿瘤活性^[2-3],因此可将牛磺酸与其他氨基酸、维生素并用,用于癌症的治疗^[4]。

笔者以广西北海野生毛蚶为研究对象,通过提取纯化得到天然牛磺酸,然后进行抗肿瘤作用的初步研究,以期天然牛磺酸在医药方面的开发应用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试原料。毛蚶样品于2010年4月采自广西北海,

由重庆文理学院生命科学与技术学院徐敬明老师鉴定。

1.1.2 细胞株。5种人体肿瘤细胞株分别为人白血病细胞 HL-60、肝癌细胞 SMMC-7721、肺癌细胞 A-549、乳腺癌细胞 MCF-7 和结肠癌细胞 SW480,均购自中国科学院上海细胞库。

1.1.3 主要试剂。噻唑蓝(MTT, Sigma); 甲醇、正丁醇、石油醚和乙酸乙酯等均为国产分析纯; 显色剂为茚三酮 0.2% 乙醇溶液,喷洒后加热显色。

1.1.4 主要仪器。核磁图谱由 Bruker 公司的 AM-400 和 DRX-500 型超导核磁共振仪测定, TMS 作为内标; 红外由 Bruker 公司的 Tenor 27 光谱仪测定; 酶联免疫检测仪为 Bio-Red 680。

1.2 方法

1.2.1 牛磺酸的提取和分离。将鲜毛蚶(15 kg)洗净、去壳、取肉(提取后干重 64.4 g),于组织捣碎机中匀浆,经 90% 甲醇提取 3 次,每次 7 d,浓缩提取液,将提取液分别用乙酸乙酯、正丁醇萃取。然后将萃取后的水层浓缩,于 4℃ 冰箱中放置 2 h 左右,即有牛磺酸析出。往粗品牛磺酸中加适量水溶解,再加 3 倍体积的无水乙醇,牛磺酸白色晶体析出,反复操作,提高纯度^[5],经反复分离纯化得天然牛磺酸晶体(2.3 g)。

1.2.2 结构鉴定。采用红外光谱(IR)和核磁共振波谱(NMR)对提取的天然牛磺酸晶体结构进行鉴定。

1.2.3 细胞毒活性检测。采用 MTT 法^[6],以顺铂为阳性对照。用 10% 胎牛血清的培养液(RMPH1640)将 5 种细胞株配成浓度为 $(1 \sim 2) \times 10^4$ 个/ml 的细胞悬液,每孔 100 μ l 接种于 96 孔板,置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 12 h 后,加入浓度为 40 μ mol/ml 的牛磺酸水溶液 100 μ l 进行筛选,3 个重复。37℃ 培养 48 h 后,每孔加 MTT 溶液 20 μ l,继续孵育 4 h 终止培养,小心吸弃孔内培养上清液 100 μ l 以避免细胞丢失,每孔加 20% 的 SDS100 μ l,37℃ 过夜孵育,选择 595 nm 波长,酶联免疫检测仪读取吸光值。

基金项目 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科攻 11107011-8)。
作者简介 徐艳(1981-),女,山东临沂人,助理研究员,硕士,从事海洋天然产物研究, E-mail: xyyanxu@tom.com。* 通讯作者,助理研究员,博士,从事海洋天然产物研究, E-mail: 690917809@qq.com。

收稿日期 2012-03-01

2 结果与分析

2.1 结构鉴定结果 所得化合物为白色针状晶体,以茚三酮喷雾,110 °C 烘干显色得提取样品的斑点呈蓝紫色,IR (KBr) 图谱含有-NH₂ 的吸收峰(2 969.55、3 047.63、3 211.45 cm⁻¹) 和-SO₃H 的吸收峰(1 213.18、1 511.74、

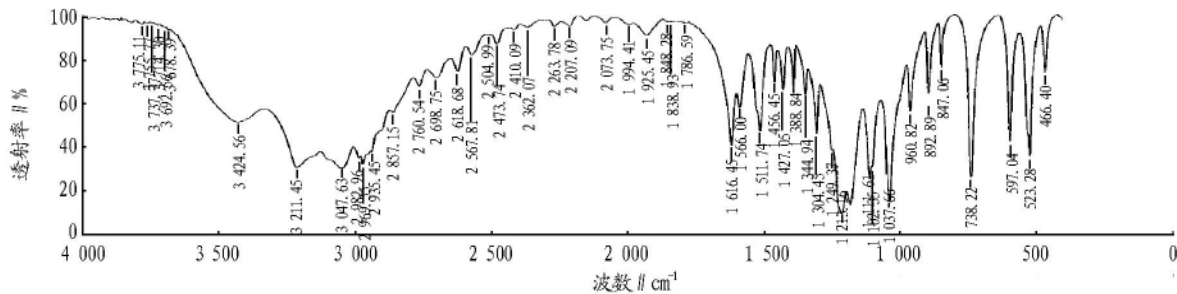


图1 牛磺酸的红外光谱分析

2.2 细胞毒活性检测结果 牛磺酸的送筛检测结果显示,40 μmol/ml 牛磺酸水溶液对 5 种细胞株没有明显的细胞毒活性。

3 讨论

牛磺酸对维持机体免疫系统功能有非常重要的作用。是很好的免疫佐剂,具有增效减毒作用,从而起到抗肿瘤的作用。但也有研究发现,牛磺酸具有一定的条件性毒性作用,在体外试验中,牛磺酸浓度大于 100 mmol/L 能抑制角膜基质细胞增殖和移行^[9-10]。该试验用结晶法提取了毛蚶牛磺酸,其纯度采用 TLC 分析,结构用 IR、NMR 得到确证,未见明显的细胞毒性。牛磺酸的抗肿瘤活性可能与用量有关,但还有待于进一步深入研究。

参考文献

- [1] 谭乐义,章超桦,薛长湖.牛磺酸的生物活性及其在海洋生物中的分布[J].湛江海洋大学学报,2000,20(3):75-79.
- [2] OKAMOTO K, SUGIE S, OHNISHI M et al. Chemopreventive effects of tau-

rine on diethylnitrosamine and phenobarbital-induced hepatocarcinogenesis in male F344 rats [J]. Jpn J Cancer Res, 1996, 87: 30-36.

[3] 田庆伟,余鸣,王永明等.牛磺酸与高脂膳对二甲苯基诱发生大鼠乳癌的影响[J].营养学报,2001,23(3):230-233.

[4] 林钧明,邱珊.牡蛎肉中牛磺酸的研究近况[J].中国海洋药物,1991,40(4):23-25.

[5] 龚丽芬,黄慰生,谢晓兰等.文蛤中牛磺酸的提取[J].精细化工,2003(7):393-395.

[6] MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. J Immunol Methods, 1983, 65 (1/2): 55.

[7] MARIANNE K, JURGEN L, GERO B et al. Assignment of Overlapping 1H NMR Signals in Carp Seminal Plasma by Protein-Detected 2D-C¹³H Correlation Spectroscopy [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000, 269: 76.

[8] 张辉,管华诗,赵志强.长牡蛎中天然牛磺酸的提取[J].海洋科学,2005,29(4):1-4.

[9] 周文艳,胡琦,张月桂等.牛磺酸对体外培养的兔角膜基质细胞移行的影响[J].中国伤残医学,2007,15(5):20-21.

[10] 胡琦,杨宝峰,周文艳等.牛磺酸对体外培养的兔角膜基质细胞增殖的影响[J].哈尔滨医科大学学报,2005,39(4):21-23.

(上接第 9248 页)

性。合理调节水、氮供应,不仅能获得较高产量,还能提高水分生产效率。

3 结论与讨论

该研究结果表明,油菜水分生产效率与氮肥用量和灌水控制水平关系极为密切,它们之间的数量关系可以用二元二次回归方程表达。油菜水分生产效率随着氮肥用量的增加而增加,但超过某一氮肥用量后,则表现为下降;油菜水分生产效率随灌水控制水平的提高也表现出相同的变化趋势。这与油菜产量随灌水控制水平和氮肥用量的变化而变化的趋势相同。由此可见,施用氮肥过多、过少和灌水控制水平过高、过低都不利于获得高产和较高的水分生产效率,只有灌水与氮肥配合才能发挥更大效应。各水氮处理间,水分生产效率与油菜产量具有高度的协同性。从生产实际考虑,将灌水水平控制在田间持水量的 80% 左右,氮肥用量控制在 0.24 g/kg(土)是适宜的。

综上所述,在油菜类蔬菜栽培生产中,应注重水、肥因子配合,水肥协调供应是高产和提高水分生产效率的重要措施。

参考文献

- [1] 唐登银,罗毅,于强.农业节水的科学基础[J].灌溉排水,2000,19(2):1-3.
- [2] 李晖.必须高度重视蔬菜节水灌溉[J].中国蔬菜,2001(1):20-22.
- [3] 张振贤,于贤昌.蔬菜施肥原理和技术(下册)[M].北京:中国农业大学出版社,1996.
- [4] 陈新平,张福锁.北京地区蔬菜施肥的问题与对策[J].中国农业大学学报,1996,1(5):63-66.
- [5] 何华,赵世伟,陈国良.不同水肥条件对马铃薯肥料 N 利用率的影响[J].应用生态学报,2000,11(2):235-239.
- [6] 李世清,李生秀.水肥配合对玉米产量和肥料效果的影响[J].干旱地区农业研究,1994,12(1):47-53.
- [7] 李韵珠,王凤仙,刘来华.土壤水氮资源的利用与管理[J].植物营养与肥料学报,1999,5(3):206-213.
- [8] 鲍士旦.土壤农化分析[M].北京:中国农业出版社,2000.
- [9] 李韵珠,王凤仙,黄元仿.土壤水分和养分利用效率几种定义的比较[J].土壤通报,2000,31(4):150-155.
- [10] 赵国苹,虞娜,刘启等.水分-氮肥配合对油菜生物量影响的研究[J].土壤通报,2006(2):298-302.