

鲨鱼生理活性物质的研究现状*

THE RESEARCH STATUS OF PHYSIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES OF SHARK

肖凯军 郭祀远 李琳 蔡妙颜 阮天恩

(华南理工大学食品与生物工程学院轻化所 广州 510640)

鲨鱼种类很多,是我国海水经济鱼类之一。全世界鲨鱼有 300 多种,我国沿海海域鲨鱼资源也很丰富,据统计有 90 多种,主要分布在东海、南海,但一些名贵品种在黄海、渤海产量也相当可观^[1]。

美国生物学家经过数十年研究发现,鲨鱼几乎不患癌症,由此推断鲨鱼有天然免疫力。Luer 将高剂量的强致癌剂黄曲霉素 B 注射到鲨体内,也不能诱发鲨鱼患癌症^[3]。国外对于鲨鱼活性成分的研究领域比较活跃,许多研究成果已经进入应用阶段,取得良好的效果。我国在鲨鱼生理活性物质的研究方面也取得重大进展,从鲨鱼软骨中提取并发现具有抗肿瘤活性成分,并进入二级临床实验阶段。

1 鲨鱼生理特点及其利用

鲨又名鲨鱼、鲛鱼、沙鱼、鲛鲨、鳍鱼等,属于脊椎动物门软骨纲(Chondrichthyes)板鳃亚纲。鲨内骨骼完全由软骨组成,常钙化,但无任何真骨头组织,外骨骼不很发达或退化,身体常被皮齿(质鳞),牙多样化,具有硬肌,但膜骨则永不存在,脑颅无缝。上颌由腭方软骨组成,下颌由梅氏软骨组成。

最新研究表明,鲨体内含有多种生物活性成分,如抗癌因子、角鲨烯、黏多糖等等。鲨药用始见于《本草经集注》,在中国民间,鲨鱼软骨提取物、鲨肝油等早已被用于治疗癌症等疾病。

国外经过数十年的研究,从鲨中提取分离各种生理活性物质,并深入研究其结构和功能,已经研制出各种鲨鱼保健品和药品。目前,我国对于鲨的开发利用,主要是对鲨的鳍、肉、皮、软骨和油等进行初级加工,生产鲨鱼片、鲨油、鲨鱼软骨粉、鲨鱼皮膘、鱼翅、鲨鱼粉、鲨鱼胎粉、鲨肉松等产品^[2]。

2 鲨体内的主要生理活性成分

2.1 鲨血液中的生理活性成分

Sondgrass 等 1976 年发现,真鲨属 *Carcharhinus plumbeus* 的全血清,可抑制小鼠体内接种的 Lewis 肺癌,而 IgM 抗体是主要的血清免疫蛋白,其作用机制与直接细胞毒作用及间接作用于淋巴网状内皮系统有关。鲨免疫球蛋白中的 IgM 分子,一些分子具有特异抗原结合活性,而另一些分子具有能结合多种特异性抗原的部位。抗原与免疫球蛋白结合形成免疫复合物,可抑制淋巴细胞致有丝分裂因子刺激的反应。鲨血浆可抑制植入鸡体的劳斯氏肉瘤细胞生长; Sphma Le wini 鲨有抗肿瘤作用的糖蛋白。

2.2 鲨内脏中的生理活性成分

国外已报道从鲨肝脏获取抑制肿瘤生长的活性物质,有超强的抗感染及抗癌能力^[4]。鲨肝油含有的抗癌活性物质含有角鲨烯(三十碳六烯酸)及其衍生物,如环氧角鲨烯、2,3-乙二角鲨烯可用作抗癌剂。角鲨烯可参与人体内胆固醇的生物合成,促进机体对氧的利用及机体的新陈代谢,增强机体耐力,消除疲劳和阻止癌转移,有广泛的药理作用^[5]。同时,角鲨烯是甾族化合物母体的前体,对于理论研究具有重要意义。此外,鲨肝脂肪中除了含有多不饱和脂肪酸,例如油酸、棕榈酸等,还有二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA)等 n-3 多不饱和脂肪酸以及大量 V_A、V_B 等。多不饱和脂肪酸可抑制某些前列腺素的合成,能调节机体生理平衡,对血小板的聚集有抑制作用。

* 国家教育部科学技术重点资助项目 CI-321-359 号。

收稿日期:1999-10-08;修回日期:2000-01-20

用,可增强免疫功能,EPA和DHA在抗心血管疾病方面有明显疗效。

鲨肝中的另一种主要活性成分是鲨肝醇。人口服后,可升高白血球,用于各种原因引起的粒细胞减少症,并促进乳酸菌的生长和抗体的形成。

我国科技工作者已经对鲨肝油脂质的生物化学开展初步研究,结果表明,尖头斜齿鲨肝脏中以甘油三酯为主,约占脂质总量的90%,胆甾醇酯1.4%,游离脂肪酸1.3%,甾醇2.8%,磷脂1.4%。此外,还研究了鲨肝油脂质组分的理化特征和多不饱和脂肪酸变化规律^[6]。

张尔贤等从鲨肝脏中提取分离出铜锌超氧化物歧化酶,亚基分子量为16.0 kD,具有较高的活力和很好的热稳定性。鲨胆汁中含有胆甾醇、胆酸外,尚有胆红素及牛黄酸等,有清热解毒功能,药理实验有明显抑菌作用。

鲨体内的鱼精蛋白非常丰富,其药用价值较大,如提取DNA制备成注射液,对白血球减少症、再生性贫血等,疗效较好。

2.3 鲨软骨生理活性成分

鲨软骨中含有多种抗肿瘤活性成分,根据目前的报道,主要包括以下3种:(1)血管生成抑制因子(Angiogenesis inhibiting factor, AGIF),为小分子的多肽或含糖蛋白。在体内可通过抑制新生血管生成来抑制肿瘤组织的生长,但对肿瘤细胞(Tumor cells, TC)没有直接的抑制作用。(2)抗肿瘤因子(Antitumor factor),为多肽类,它可对TC的生长起直接的杀伤作用。(3)抗入侵因子(Anti-invasion factor),是一类小分子蛋白,它具有蛋白酶、EC增殖和肿瘤生长抑制活性,能使鲨软骨抵抗多种细胞(如血管内皮细胞和恶性肿瘤细胞)的入侵。

在这3类活性因子中,国内外对抗肿瘤因子和抗入侵因子研究得较少,而血管生成抑制因子则研究得较为深入。

2.3.1 鲨软骨中的血管生成抑制因子

1983年Lee和Langer首次从鲨软骨中分离得到具有抑制新生血管生长的活性物质,产率为1/500。与牛软骨相比,该物质的血管生成抑制活性高得多。随后,Okawa等从日本鲨软骨中发现一种新的血管生成抑制因子,该抑制新生血管生长的活性主要存在于MW 000~10 000的80%丙酮沉淀部分,对热处理有一定的抵抗性。Burt等1995年获取MW 3 000~100 000的

抗血管生成组分的粗提物,经过载体包埋制成胶囊、微粒、药片等,对血管生成和肿瘤生长具有明显的抑制效果^[9]。

近几年来,我国也开展鲨软骨中血管生成抑制成分的研究。王路等从姥鲨中提取MW约为16 000的亲水性蛋白糖(含糖量8%),具有胶原酶、EC的DNA合成和血管生成抑制活性^[7]。沈先荣等从鲨软骨中得到的粗提物对EC的迁移和细胞骨架形成有明显的抑制作用。

2.3.2 鲨软骨抗肿瘤因子

Dupont等1977年用水从鲨软骨中抽提得到的MW 500 000组分,不但具有血管生成抑制活性,还有抗肿瘤增殖、抗胶原酶等性质,并表现出细胞毒性。沈先荣等发现鲨软骨与牛软骨的粗提物性质十分相似,而且能使肿瘤的细胞骨架发生凝聚或固缩,并有明显的浓度依赖关系^[8]。美国、古巴、墨西哥从鲨软骨提取物中发现一种抗癌特效因子CDI,对骨髓癌的有效率100%、对大肠癌94.2%、对乳腺癌88.5%^[1]。

2.3.3 鲨软骨抗入侵因子

经研究发现,鲨软骨抗入侵因子具有下列抗入侵活性:(1)蛋白酶抑制活性;(2)体外血管内皮细胞增殖抑制活性;(3)肿瘤生长抑制活性。Parkins 1994年还发现,鲨软骨提取物具有抑制哺乳动物胶原蛋白酶作用,能抑制使血管内皮细胞基质膜溶解的蛋白酶的活性,并且耐热。抗入侵因子在分子大小和生物活性上与血管生成抑制因子十分相似,需要进一步研究两者的结构、性质和作用机制。

2.3.4 鲨软骨抗炎肽

鲨软骨提取物,对风湿性关节炎有一定的疗效,免疫功能可得到改善,有效物质包括肽类。通过阴离子系统电泳后,发现鲨软骨提取液的抗炎、消炎主要成分为小分子肽和多种氨基酸如His, Lys, Arg, Pro等。

2.4 鲨体表分泌物中生理活性成分

美国科学家从双唇鲨体表分泌物分离出一种超强抗癌因子,该因子可迅速阻止恶性癌细胞生长扩散并切断癌细胞与周围组织联系,其组成及分子结构正在研究中。鲨体表分泌物也含有蛋白多糖,具有抗凝血、降血脂、抗病毒及抗肿瘤作用。

2.5 鲨脑和眼中活性成分

鲨脑中牛磺酸可促进大脑发育,改善心力衰竭,抗心率失常,保护视力。鲨眼球的提取物中含有17种氨基酸及核酸、糖、磷、钙等,能补充眼球的营养,促进新陈代谢,对老年性白内障和假性近视有疗效。此外,鲨鱼

脑中含有许多多肽类激素,具有十分重要的生理功能。

2.6 鲨鱼鳍和鳞中活性成分

名贵的鱼翅即鲨鱼鳍,其弹性胶原可制成鲨鱼鳍胶,除了作为良好的滋补品外,对胃溃疡、肺结核等出血病症,均有良好的止血作用。鱼鳞的胶原蛋白容易水解制成鱼鳞胶,对于妇女病、牙龈出血、紫癜等有治疗效果。此外,鲨鱼鳞中含有较多的卵磷脂,能延缓细胞老化作用。

3 鲨鱼主要生理活性成分的提取和分离

3.1 鲨鱼活性脂质的提取

从鲨中提取活性脂质大都采用有机溶剂萃取和水蒸气蒸馏的方法。鲨鱼油主要从鲨肝中制取。新鲜鲨肝除去异物,热水洗干净,切成浆状,然后在 pH 9.0 条件下通入蒸气水解,接着离心分离,分离肝渣和水分得到粗鲨肝油。

粗鲨肝油经过精练,即通过加入天然脱胶剂,分离蛋白质、多肽类胶体杂质和水,可以得到澄清透明无腥精炼鲨肝油。通过进一步加工制备成鱼肝油酸钠注射液,作为硬化剂,用于下肢静脉曲张、上消化道出血及晚期宫颈癌。

3.2 肽葡聚糖的分离

鲨鱼软骨经过沸水处理后,磨碎,在硼酸缓冲液中用 Actinase E 酶两次水解,得到乙醇沉淀物。溶解后产物经过活性炭脱色,乙醇多次沉淀,冷冻干燥后,得到以氨基半乳糖和 Pro、Gly 为主的肽葡聚糖,得率约为 5%^[1]。

肽葡聚糖在硼酸钠存在下,通过碱处理得到含有 Ser 氨基酸残基的多糖,采用软骨素酶 ABC 处理后,用 Sephadex G-15 凝胶过滤柱层析可以分离得到低聚糖。

3.3 铜锌超氧化歧化酶的提取和纯化

取洗净的鲨肝脏,加入 KCl,充分绞碎匀浆,离心分离得到上清液。采用 70℃ 热处理后,硫酸铵分级分离和 Sephadex G-100, DEAE 纤维素柱层析,经过浓缩和冷冻干燥后,得到鲨肝铜锌超氧化歧化酶,该物质具有很强的热稳定性。

3.4 酸性黏多糖的提取与分离

鲨软骨粉碎后,经过稀碱浸泡、中和以及加热处理后,通过蛋白酶法除去蛋白聚糖中的蛋白质,加入

蛋白质沉淀剂除去蛋白质,透析后经过凝胶过滤色谱分离得到酸性黏多糖。

3.5 鲨鱼血管生成抑制因子的提取

鲨软骨粉经过 1 ml/L 盐酸胍抽提 48 h, 45%~65% 丙酮分级沉淀,采取截留分子量为 100 000~300 000 膜超滤分离后,再通过柱层析得到鲨鱼血管生成抑制因子,其含有 20 种氨基酸,其中以亮氨酸、异亮氨酸和甘氨酸为主。

3.6 活性多肽的制取

鲨中的多肽类激素如脑下垂体生长激素 (GH)、促生殖腺生长激素 (GTH)、促皮质激素 (ACTH) 以及鲨鱼蛋白质的水解产物多肽具有多种生理功能。从脑下垂体,采取凝胶过滤、离子交换、反相 HPLC 等分离技术可以分离多种激素。精制过程中,多肽的纯度以反相 HPLC、SDS 电泳、毛细管电泳等检测。在 GTH 提取过程中,用乙醇进行抽提得到的抽提物以 DEAE 纤维素柱层析,调节缓冲液中盐浓度洗脱,然后用凝胶过滤色谱精制。在鲨鱼活性多肽的分离过程中都应用层析方法,经常采取溶剂萃取、超滤、电渗析等脱盐。近年发展起来的灌注层析系统是生物大分子分离纯化技术的重大突破,而毛细管电泳技术具有高分离性能,可以直接定量,适合 HPLC 不容易分离的组分,并且能和质谱联机方便。

4 鲨鱼生理活性成分的应用

4.1 抗肿瘤药物

以姥鲨鱼肝油中的角鲨烯及多种不饱和脂肪酸的综合成分研制成口服乳剂,能明显增强机体的抗癌能力,经组织学研究表明,能趋向性进入癌细胞内使癌细胞退化和坏死。鲨鱼中的角鲨烯与一些抗癌药配伍用,具有良好的协同效果。鲨鱼软骨作为抗肿瘤药物是非特异性的,现在已经有沙克 1 号产品,对肺癌、肝癌和骨癌等有治疗作用。

4.2 降低血脂药物

鲨软骨酸性黏多糖有阻滞脂蛋白透过动脉壁,有澄清动脉壁脂质的作用,和降低血浆胆固醇和甘油三酯的功能,作为降低血脂的药物。酸性黏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。

鲨鱼油可以和 EPA、DHA、精制卵磷脂、维生素 E 等制成乳剂、鱼油胶丸等,用于降低血液中胆固醇和

甘油三酯,在心血管疾病的预防和治疗方面效果明显。

4.3 抗炎症和抗病毒药物

资料表明,鲨软骨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。酸性黏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,而酸性黏多糖可通过多方面作用影响免疫机能,能与炎症递质,如组织胺、5-羟色胺、缓激肽及白细胞趋化因子等结合,保护血管内皮,减少渗透,抑制炎症反应。

4.4 防止和治疗视觉和听力疾病

鲨鱼皮和软骨中的透明质酸,有保护、润滑皮肤作用,防止细菌感染及外力的伤害,临床用于眼科手术、外伤性关节炎等。从鲨鱼眼提取制成的眼灵注射液,对初期老年性白内障有效率达到80%以上。硫酸软骨素对于链霉素引起的听觉障碍,冠心病和心绞痛有一定疗效。

4.5 其他应用

鲨皮胶可制成止血海绵,并治疗肾虚滑精等。鲨鱼肝油酸钠有杀死精子的作用,作节育用药。鲨脑制备成口服牛磺酸片,可治偏头痛,含有牛磺酸的药用

软膏可治疗牛皮癣。

5 展望

国内对于鲨生理活性物质的开发研究还处于刚起步阶段,相当多可作为药用和保健品的鲨资源仅作为低价品加以利用或出口国外。因此,对鲨及其废弃物进行深加工,并采取现代科学技术手段提取分离具有生理调节功能的物质,研制风味独特、保健功能显著的系列功能食品或药品,具有广阔的应用开发前景。

参考文献

- 1 沈开惠.中国水产,1997,1:34
- 2 谢宗墉.海洋水产品营养与保健.青岛:青岛海洋大学出版社,1990.32~45
- 3 蔡平,于志洁.中国海洋药物,1996,59(3):37
- 4 陈向齐.第一军医大学学报,1996,17(4):24
- 5 宋修俭等.中国海洋药物,1996,4:26~28
- 6 刘晓春等.厦门大学学报(自然科学版),1997,36(5):669~773
- 7 王路等.药物生物技术,1997,4(3):138
- 8 沈先荣等.中国生化药物杂志,1997,18(3):123
- 9 Burt H. M. . WO9503036. 1995