

小球藻提取物的生物活性研究

刘海琴, 韩士群

(江苏省农科院 农业资源与环境研究中心, 江苏 南京 210014)

摘要:研究了小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)酶解提取物(CGF)的主要成分、稳定性及其增强小鼠免疫调节的生理活性功能。CGF中蛋白质、氨基酸、核苷酸、多糖、维生素分别达到56.6%, 42.59%, 6.8%, 4.8%, 1.7%。采用75, 150, 450 mg/(kg·d)剂量经30 d对小鼠喂食, 进行免疫调节试验, 结果表明, 150, 450 mg/(kg·d)剂量的小球藻生长因子可以明显增强二硝基氟苯(DNFB)引起的小鼠迟发性超敏反应, 对造血功能受损的小鼠有恢复作用, 以及增强小鼠单核-巨噬细胞吞噬功能的作用。实验表明服用CGF可以增强免疫能力。

关键词:小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*); 提取物; 免疫

中图分类号: Q51 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2005)09-0023-04

世界粮农组织推荐:“21世纪人类最理想的绿色食品是微藻产品”。目前, 小球藻包括海洋小球藻与淡水小球藻, 是产业化生产的主要微藻种类, 由于是单细胞藻类, 细胞壁结构特殊, 人直接食用的消化率及蛋白效率较低^[1,2], 甚至连反刍动物也不能消化其纤维素。故小球藻一般要经过深加工处理^[3]。目前, 国外小球藻的研究重点由一般性生产技术研究转向其深加工与特殊物质提取的研究^[4~6]。

世界上没有任何动植物像小球藻那样能够每20 h增长4倍, 主要是由于小球藻的生长因子(CGF)决定的^[7]。小球藻生长因子(*Chlorella Growth Factor*, CGF), 也叫小球藻精, 是细胞活性物质, 包括氨基酸、核酸、多糖、多肽、蛋白质、酶、维生素、矿物质、“神秘成分”, 被称为“类荷尔蒙”^[10]。国外对其生理功有较多的研究, 其生理功能: 具有激活淋巴细胞, 增强机体免疫能力; 活化人体细胞, 使儿童生长发育加快, 抵抗外来疾病的入侵; 促进人体受伤组织修复, 有机物、重金属等中毒的人服用后能迅速康复; 还能防治胃溃疡、高血压和心血管等疾病^[8,9~11]。可以预见CGF在食品、饮料、保健品、医药等有广阔的应用前景。目前, 小球藻生长因子的提取技术及其生理活性的研究已成为欧、美、日、等国家开发小球藻的热点。国内研究了CGF对酵母菌和乳酸菌的生长及生理活动的影响^[12], 但对于CGF的成分、生理活性以及毒理等系统研究的未见报道。本文为江苏省疾病预防控制中心分析测试CGF主要成分及稳定性、生理功能、毒理的部分结果^[13], 为国内进行小球藻生长因子的产业化生产和应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

小球藻种类及CGF的提取 小球藻为粉核小球藻(*Chlorella vulgaris*), 藻粉从江苏省农科院永康微藻研究开发公司购买。采用酶解方法, 提取CGF。

功能试验用的小鼠为昆明种小鼠120只, 雌、雄性各半, 健康, 每只18~22 g, 由东南大学实验动物中心提供, 动物证号: SCXK(苏)2001-0005。

1.2 方法

成分与稳定性测定: 蛋白质含量采用开氏定氮法; 氨基酸含量采用氨基酸自动分析仪测定; 核苷酸采用高效液相色谱仪测定。

二硝基氟苯诱导小鼠迟发型变态反应(DTH): 将小鼠按体质量随机分入450、150和75 mg/(kg·d)3个剂量组和1个对照组, 每组10只。CGF样品用双蒸水配制, 每日经口灌胃, 灌胃体积20 mg/(kg·d), 对照组灌双蒸水。25 d后, 用1%二硝基氟苯(DNFB)丙酮麻油溶液50 μL涂抹致敏。致敏后5 d, 小鼠右耳均匀涂抹DNFB丙酮麻油溶液10 μL进行攻击, 左耳涂抹丙酮麻油溶液作为对照, 攻击24 h后处死小鼠, 剪下左右耳朵, 于同一部位取直径8 mm的耳片称取质量, 左右耳朵质量之差作为肿胀度。同

收稿日期: 2003-08-18; 修回日期: 2003-08-30

基金项目: 江苏省高新技术项目(BG2003321)

作者简介: 刘海琴(1971-), 女, 助理研究员, 主要从事藻类研究, 电话: 025-4390241, E-mail: shqunh66@yahoo.com.cn

时取小鼠的胸腺及脾脏,以每 10 g 小鼠的脾质量(mg),胸腺质量(mg)作为脾脏/体质量比值以及胸腺/体质量比值。

血清溶血素测定:采用半数溶解值(HC_{50})法,动物分组,剂量和处理同 DTH 试验。连续灌胃 25 d 后,每只鼠腹注射 2% SRBC 0.2 mL 致敏。免疫 5 d 后,摘小鼠眼球采血,取血清测溶血反应,另设不加血清(以 SA 缓冲液代替)的对照管为闭塞空白,于 540 nm 测定各管光密度值。按以下公式计算各小鼠样品 HC_{50} : 样品 HC_{50} = 样品光密度值/SRBC 半数溶血时的光密度值 $\times 200$ 。

小鼠碳廓清试验:动物分组,剂量和处理同 DTH 试验。连续灌胃 30 d 后,小鼠每 10 g 体质量尾静脉注射 1:3(体积比)稀释的印度墨汁 0.1 mL 注射后立即计时,并分别于 2、10 min 从内眦静脉丛取血 0.025 mL,加到 2 mL 0.1% 碳酸钠中,测 $OD_{600\text{ nm}}$ 。并取肝、脾称质量,按公式 $a = K^{-3} \times \text{体质量}/(\text{肝质量} + \text{脾质量})$,求小鼠的吞噬指数 a 值($K = \lg OD_1 - \lg OD_2 / (t_2 - t_1)$)。

2 结果

2.1 小球藻生长因子的主要成分与稳定性

表 1 中列出了小球藻生长因子的主要成分蛋白质、氨基酸、核酸、多糖、维生素。蛋白质主要以短链蛋白、多肽存在;氨基酸的总含量为 42.59%,含有 19

种氨基酸,其中有 7 种为人体必需氨基酸,精氨酸、脯氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺等功能性氨基酸含量较高,分别达到 2.1%、2.2%、1.5%。核苷酸的总含量达 6.8%,包括腺嘌呤核苷酸、次黄嘌呤核苷酸、胞嘧啶核苷酸、脱氧腺嘌呤核苷酸等,核苷酸具有抗衰老、修复受损基因等功能,其作用越来越被人们所重视。CGF 中的多糖含量为 4.8%,多糖的生理活性已经被广泛应用于食品、医药以及保健品等。CGF 中含有多种维生素,其中包括维生素 A、B 以及生物素等。

高温、高湿的稳定性试验表明,CGF 经过 30、60、90 d 后其成分组成基本不变,经统计分析在误差范围内。

表 1 CGF 的主要成分及稳定性

Tab. 1 The main Components of CGF and its stability

主要成分	含量(%)			
	实际值	30 d	60 d	90 d
蛋白质	56.6	55.8	56.0	53.9
氨基酸总和	42.59	42.44	41.82	41.33
核苷酸总和	6.8	6.9	6.8	6.7
多糖	4.8	5.0	4.9	4.8
维生素总和	1.7	1.6	1.7	1.6

2.2 对免疫调节系统功能的影响

2.2.1 二硝基氟苯诱导小鼠迟发型变态反应(DTH)

表 2 对小鼠脾脏、耳廓肿胀度的影响

Tab. 2 The effect of CGF to the spleen and auricle tumidness of mice

组别	剂量	数量	脾脏(mg)/体质量(g)	胸腺(mg)/体质量(g)	肿胀度(mg)
	[mg/(kg·d)]	(只)	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
对照	0	10	34.60 $\pm$ 4.21	20.04 $\pm$ 4.61	8.90 $\pm$ 1.26
1	75	10	35.32 $\pm$ 10.42	21.67 $\pm$ 4.16	9.94 $\pm$ 1.60
2	150	10	44.34 $\pm$ 12.02	23.46 $\pm$ 4.74	13.10 $\pm$ 2.27 * *
3	450	10	40.51 $\pm$ 8.49	17.76 $\pm$ 4.66	12.79 $\pm$ 2.18 * *

注:表中 * * 表示组处理达极显著水平($P < 0.01$),以下表中同。

表 2 显示,在 30 d 中每天经口给小鼠 450,150,75 mg/(kg·d) 的 CGF 摄入量,试验后各受试剂量组小鼠体质量增长于对照组,相比无显著性差异;各组小鼠胸腺/体质量比值、脾脏/体质量比值与对照组相比较,亦没有产生显著性差异($P > 0.05$)。各剂量组小鼠的耳廓肿胀度均高于阴性对照组值,经方差分析及两级比较统计学处理,每天给小鼠喂 450,150 mg/(kg·d) 的 CGF,与对照相比小鼠耳廓肿胀度

达极显著水平。说明中高剂量的 CGF 可以增强 DNFB 引起的小鼠迟发性超敏反应。

2.2.2 对小鼠血清溶血素水平的影响

从表 3 可知,用 CGF 连续灌胃 25 d 后,各处理小鼠的血清半数溶血值(HC_{50})均高于对照组值;且随剂量的增加而升高,经方差分析及两级比较统计学处理,150,450 mg/(kg·d) 两组处理的 HC_{50} 值和对照比较,达极显著水平。从而说明给小鼠服用中高剂量的

小球藻生长因子具有增强小鼠血清溶血素的反应。

表 3 对小鼠血清溶血素水平、碳廓清的影响

Tab. 3 The effect of CGF to the serum hemolysin level of mice

组别	剂量	数量	半数溶血值	K 值	吞噬指数 a
	[mg / (kg · d) (只)]		(HC ₅₀)	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
			$\bar{x} \pm s$		
对照	0	10	126.86 ± 10.55	0.031 8 ± 0.009	6.631 ± 0.47
1	75	10	134.33 ± 9.67	0.039 0 ± 0.006	7.717 ± 0.62 * *
2	150	10	140.80 ± 7.43 * *	0.035 4 ± 0.011	7.190 ± 0.79 * *
3	450	10	141.29 ± 9.44 * *	0.035 0 ± 0.008	7.308 ± 0.78

2.2.3 对小鼠吞噬指数的影响

将小鼠连续灌胃 30 d 后,各处理组小鼠的吞噬指数 a 值均高于对照组(表 3),结果经方差分析及两两统计学处理,每天灌胃 75,150 mg/(kg · d)的两组处理达极显著水平($P < 0.01$),说明小球藻生长因子(小球藻精)具有增强小鼠单核—巨噬细胞吞噬功能的作用。

3 讨论

小球藻提取物(CGF)中含有氨基酸、核苷酸、多糖、蛋白质、维生素等功能性成分;动物实验表明,可以增强 DNFB 引起的小鼠迟发性超敏反应,增强小鼠血清溶血素的反应,增强小鼠单核—巨噬细胞吞噬功能的作用,从而说明 CGF 具有良好的免疫调节功能。CGF 对免疫系统不同环节的作用究竟是何种具体成分的作用还是多种成分的共同作用的结果,其机理较为复杂,有待进一步研究。从毒理试验结果可知,该提取物没有毒性,因此 CGF 作为保健品、功能食品添加剂等方面具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] 华汝成. 单细胞藻类的培养与利用[M]. 北京: 农业科学出版社, 1980, 437.
- [2] 朱明军, 梁世中, 陈峰, 等. 富硒小球藻食品的开发[J]. 郑州粮食学院学报, 1999, 20(3): 77.
- [3] 王业勤, 李勤. 小球藻应用研究动态[J]. 微生物学通报, 1985, 12(6): 275.
- [4] 秦松, 严小军, 曾呈奎. 第五届国际藻类学大会反映的藻类生物技术的最新进展[J]. 生物工程进展, 1995, 15(4): 2.
- [5] 陈颖, 李文彬, 孙勇如. 小球藻生物技术研究进展及展望[J]. 生物工程进展, 1998, 18(6): 12.
- [6] Borowitzka M A. Botowitzka L J. Micro-Algal Biotechnology [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1992. 254.
- [7] Yamaguchi K. Recent Advance in micro-algal Bioscience in Japan [J]. *Journal of Applied Phycology*. 1997, 8: 487.
- [8] 李师翁, 李虎乾. 植物单细胞蛋白资源—小球藻开发利用研究的现状 [J]. 生物技术, 1997, 7(3): 45.
- [9] 曹健, 漆丹华, 高孔荣. 微藻的营养价值及生产应用的开发[J]. 粮食与饲料工业, 1997, 5: 28.
- [10] Merchant R E, Rice C E. Young H, F Dietary. *Chlorella pyrenoidosa* for patients with malignant glioma; Effect on immunocompetence, quality of life and survival. [J] *Phytotherapy Research*. 1990, 4(6): 220
- [11] Kitano M Yoshida T. Degradation of *Chlorella* cells during composition [J]. *Journal of Biotechnology*, 1998, 66: 2
- [12] 韩士群, 常志州, 郑勤. 小球藻生长因子对啤酒和乳酸发酵的影响[J]. 食品科学, 2001, 22(10): 54.
- [13] 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991. 276—289.

Physiological function of *Chlorella* growth factor

LIU Hai-qin, HAN Shi-qun

(Institute of Soil and Fertilizer, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing, 210014)

Received: Aug. ,18,2003

Key words: *Chlorella pyenoidosa* , extract, immunity function,

Abstract: The main components and stability of *Chlorella* Growth Factor (CGF) which was extracted from cells of *Chlorella* with enzyme were analyzed. Meanwhile, its function of stimulating immunity on mice was investigated. CGF contained 56.6% protein, 42.59% amino acid, 6.8% nucleoside acid, 4.8% polysaccharide and 1.7% vitamin. The mice was fed with CGF at the rates of 75, 150 and 450mg/kg. d in the experiment of stimulating immunity function. The results showed that applying CGF at the rates of 150 and 450mg/kg. d could increase allergic reaction induced by Dinitrofluorobenzene (DNFB), enhance the proliferation of immunoinhibited murine splenocytes, and stimulate phagocytic function by macrophages. In general, CGF can enhance immunity function.