

海黍子乙酸乙酯相提取物的抑菌和体外免疫活性的研究

李 丽¹, 马伟伟¹, 曲 雁², 曹务波³, 周革非¹

(1. 烟台大学 生命科学学院, 山东 烟台 264005; 2. 烟台市产品质量监督检验所, 山东 烟台 264005; 3. 莱阳翰霖生物技术有限公司, 山东 烟台 264005)

摘要: 研究 7 种海黍子(*Sargassum kjellmanianum*)乙酸乙酯相提取物的抗菌活性和对小鼠免疫细胞功能的影响, 筛选出抗菌和体外免疫活性较强的提取物。考察 7 种提取物的抗菌活性, 以及对小鼠腹腔巨噬细胞 RAW264.7 增殖、脾淋巴细胞增殖、释放 NO、吞噬中性红能力的影响。抑菌实验结果表明, 7 种提取物对真菌无明显的抑制作用, 而针对不同的细菌表现出不同程度的抑制活性; 免疫实验结果表明, 乙酸乙酯相的 7 个样品都具有一定的体外免疫活性, 不但可以促进小鼠巨噬细胞 RAW264.7 增殖和体外刺激淋巴细胞增殖, 还可以促进小鼠腹腔巨噬细胞产生 NO 和吞噬中性红。

关键词: 海黍子(*Sargassum kjellmanianum*); 硅胶柱层析; 抗菌活性; 体外免疫活性

中图分类号: R284.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2013)12-0047-05

海黍子(*Sargassum kjellmanianum*), 为潮间带海藻, 属褐藻门(Phaeophyta), 墨角藻目(Fucales), 马尾藻科(Sargassaceae), 马尾藻属(*Sargassum*), 海黍子种(*Sargassum kjellmanianum* Yendo)^[1]。

海黍子具有多方面的生理活性, 《本草便读》中记载: “海藻生海中, 其叶如发, 即水藻之属也咸寒润下之品。软坚行水, 是其本功, 故一切瘰癧瘤痰胶结之症, 皆可用之。”现代药理实验证明, 海黍子中含有多种抗老化、抑菌、抗病毒的成分^[2-3]。海黍子虽然有确切的生物活性, 但是其活性成分尚未得到有效的确认。本文以乙醇为溶剂对海黍子进行提取, 再依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取, 然后对乙酸乙酯相进行硅胶柱层析得到 7 种提取物, 并对这 7 种提取物进行抑菌及免疫活性的研究, 为海黍子这一药用资源的研究开发提供实验依据。

1 实验材料

1.1 实验材料

海黍子, 2010 年 9 月采摘于烟台市长岛县, 经烟台大学海洋学院张全胜教授鉴定为马尾藻属海黍子(*Sargassum kjellmanianum*); 大肠杆菌、枯草杆菌、金黄色葡萄球菌、啤酒酵母菌和面包酵母菌: 烟台大学海洋学院微生物实验室提供; 清洁级昆明种小鼠, 雌性, 体重 18~22 g: 山东绿叶制药有限公司(许可证号: SYXK(鲁)20030020); LB 培养基和马铃薯培养基;

噻唑蓝(MTT)十二烷基磺酸钠(SDS): Sigma 公司; RPMI-1640 培养基: Gibco 公司; 新生小牛血清: 杭州四季青生物工程材料有限公司; 无水乙醇, 石油醚, 乙酸乙酯, 正丁醇, 二甲基亚砜(DMSO), 甲醇, 丙酮均为国产分析纯。

1.2 实验仪器

台式高速离心机: Anke TGL-16G; 全自动立式电热压力蒸气灭菌器: 上海博迅实业有限公司医疗设备厂; CO₂ 培养箱: 美国希尔顿公司; 96 孔细胞培养板: 美国 Coostar 公司; ELX-800 酶联免疫检测仪: 美国 Bio-Tek Instruments INC 公司; ZF-20C 暗箱式紫外分析仪(紫外光源波长 254、300、365 nm): 上海宝山顾村电光仪器厂。

2 实验方法

2.1 海黍子活性物质的提取

将磨细的海黍子样品 12.3 kg, 阴干粉碎, 粉末置于 4 倍于其质量的 90%乙醇溶液中冷浸 1 周, 连续

收稿日期: 2012-02-08; 修回日期: 2012-05-10

基金项目: 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金 2008BS06012; 山东省自然科学基金(ZR2009BL030); 烟台市科技发展计划项目(2008GGA0020080410084458)

作者简介: 李丽, 女, (1986-), 山东潍坊人, 硕士研究生, 从事海洋活性物质方面研究, 电话: 15966480703, E-mail: ydlili@163.com; 周革非, 通信作者, 副教授, 硕士生导师, E-mail: gefeizhou@hotmail.com

提取 10 次, 过滤去除藻渣, 合并 10 次提取液。水浴中减压蒸干溶剂, 得深绿色油状浸膏。将得到的粗提取物加水悬浮, 并用等量石油醚萃取 8 次, 每次均将石油醚层与水层分离, 合并石油醚相; 向水层加入等量乙酸乙酯萃取, 并分离, 萃取 8 次, 合并乙酸乙酯相; 再向水相加入等量正丁醇萃取, 同上, 萃取 8 次, 合并正丁醇相^[4]。其中乙酸乙酯相继续用柱层析进行分离, 用洗脱剂氯仿: 甲醇=1:0、30:1、20:1、14:1、7:1、2:1、1:3、0:1 进行洗脱, 并对洗脱液进行 TLC 跟踪, 并根据颜色和 R_f 值进行合并得到 A-G 7 种活性物质。

2.2 活性成分的抑菌试验

抑菌试验采用纸片扩散法。整个实验在超净工作台上进行。首先制备菌含量为 $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ cfu/mL 的大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、啤酒酵母菌和面包酵母菌的菌悬液。在 LB 培养基中均匀涂布大肠杆菌、枯草杆菌和金黄色葡萄球菌, 在马铃薯培养基中涂布啤酒酵母菌和面包酵母菌, 于室温下干燥 5 min。将上述 7 种提取物用石油醚配制成浓度为 100 g/L 的溶液, 各取 10 μ L, 分 2 次滴加在干燥的无菌滤纸片上(直径为 5 mm), 待溶剂挥发干燥后用无菌镊子夹取带药的滤纸片水平放入培养基上, 用蒸馏水作为空白对照。每个培养皿中放 4 片, 每个样品做 3 个平行, 然后将大肠杆菌、枯草杆菌和金环葡萄球菌的平板置 37 $^{\circ}$ C 培养箱中, 面包酵母菌和啤酒酵母菌的平板于 28 $^{\circ}$ C 的培养箱中, 培养 18~24 h 后用十字交叉法测量抑菌圈的直径。

将上步有抑菌效果的海葵子提取物稀释到终浓度分别为 50、25、12.5、6.25、3.125 g/L, 方法同上重复实验, 细菌 37 $^{\circ}$ C, 真菌 28 $^{\circ}$ C, 培养 24 h 后观察结果。菌落被完全抑制的最高稀释度提取物浓度即最低抑菌浓度 MIC^[5]。

2.3 活性成分的免疫试验

2.3.1 小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 释放 NO 能力的检测

取处于对数生长期的 小鼠单核-巨噬细胞 RAW264.7, 胰酶消化收集细胞, 用含 10% 胎牛血清的培养液将其制备成巨噬细胞悬液, 调整细胞浓度为 1×10^6 个/mL, 于 96 孔板接种 100 μ L/孔, 置 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养 24 h。加入用培养液稀释的不同浓度的海葵子乙酸乙酯提取物溶液 100 μ L/孔, 并以 100 μ L LPS(2 mg/L)培养液作阳性和空白对照。继续培养 48 h

后, 从每个孔取 50 μ L 培养上清液到一个新的 96 孔板中, 加入等量的 Griess 试剂, 室温反应 10 min, 半小时之内在 520~550 nm 之间(540 nm)测定吸光度。根据标准曲线计算 NO 的含量^[6]。

2.3.2 RAW264.7 吞噬中性红实验

制备细胞浓度为 1×10^6 个/mL 的巨噬细胞悬液, 加入 96 孔板, 100 μ L/孔, 如 2.3.1 加药, 培养 22 h 后, 每孔加入 0.1% 中性红生理盐水液 100 μ L, 继续培养 20 min, 倾去上清, 温 PBS 洗 3 遍, 每孔加入细胞溶解液(为体积分数 50% 的乙酸和体积分数 50% 的无水乙醇)0.2 mL, 室温下静置 2~3 h, 待细胞溶解后, 即在酶联免疫检测仪上测 540 nm 处的吸光度^[7]。

2.3.3 RAW264.7 增殖能力的测定

制备细胞浓度为 5×10^5 个/mL 的巨噬细胞悬液, 于 96 孔板接种 100 μ L/孔, 如 2.3.1 加药, 培养 24 h 后, SRB 法检测 570 nm 处吸光值^[8-9]。

2.3.4 脾淋巴细胞增殖实验

无菌取脾, 制备小鼠脾淋巴细胞悬液, 调整细胞浓度为 $(8 \sim 10) \times 10^6$ 个/mL, 于 96 孔板接种 100 μ L/孔, 再分别加入培养液(空白对照)、10 mg/L ConA(阳性对照)及不同浓度的海葵子乙酸乙酯提取物溶液各 100 μ L/孔, 置 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养 48 h。培养结束前 4 h, 用 MTT 法测定酶标仪在 570 nm 的吸光值^[10]。淋巴细胞增殖指数 SI=供试样品组吸光值/空白对照组吸光值。

2.3.5 数据处理

所有数据均以均值 $\pm$ 标准差表示。t 检验采用 SPSS11.5 统计软件包完成。以 $P < 0.05$ 表示差异显著; $P < 0.01$ 表示差异极其显著。

3 实验结果

3.1 抑菌试验结果

由表 1 海葵子提取物的抑菌试验结果可知, 7 种提取物对大肠杆菌均有抑制作用; A、B、C、D 对枯草杆菌有抑制作用; A、D、E、F、G 能抑制金黄色葡萄球菌的生长; 所有的提取物均不能抑制面包酵母菌和啤酒酵母菌的生长。

表 2 是有抑菌作用的海葵子提取物的最低抑菌浓度, 不同提取物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和枯草杆菌的最低抑菌浓度不同。

3.2 海葵子提取物对小鼠单核巨噬细胞 Raw264.7 释放 NO 能力的影响

如图 2 所示, 海葵子活性物质在 12.5~200 mg/L

表 1 海黍子提取物抑菌圈直径实验结果(mm)

Tab. 1 The antibacterial circle diameter of extracts (mm)

菌种	大肠杆菌	枯草杆菌	金黄色葡萄球菌	啤酒酵母菌	面包酵母菌
A	17.0	12.1	14.2	—	—
B	20.1	11.0	—	—	—
C	20.0	10.2	—	—	—
D	19.3	9.3	15.0	—	—
E	15.1	—	15.0	—	—
F	16.3	—	12.1	—	—
G	14.2	—	14.3	—	—

注：以上结果均为 3 个重复实验的平均值，所有阴性对照均无抑菌圈产生

表 2 海黍子提取物最低抑菌浓度实验结果(g/L)

Tab. 2 The minimal inhibitory concentration of extracts (g/L)

	A	B	C	D	E	F	G
大肠杆菌		6.25	3.12	6.25	6.25	3.12	6.25
枯草杆菌	12.5	6.25	12.5	6.25	—	—	—
金黄色葡萄球菌	6.25	—	—	3.12	3.12	6.25	6.25

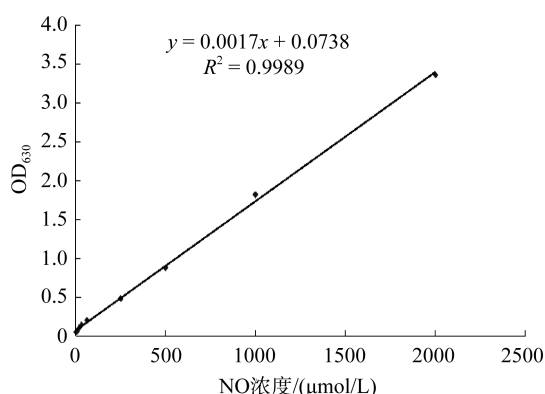


图 1 NO 标准曲线

Fig.1 Standard curve of NO

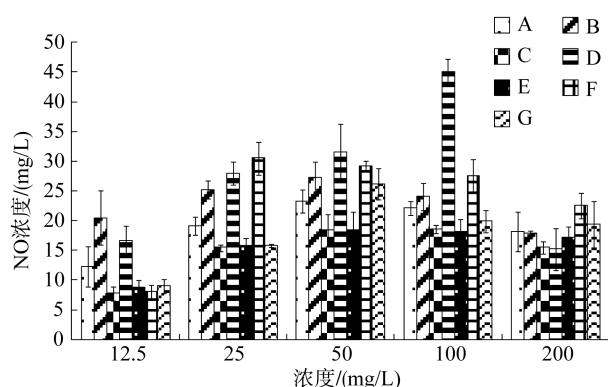


图 2 海黍子提取物对小鼠巨噬细胞产生 NO 能力的影响

Fig. 2 The effects of the extracts to the ability of the mice macrophages producing NO

的浓度范围内，可明显地促进小鼠腹腔巨噬细胞产生 NO。随活性物质浓度的提高 Raw264.7 释放 NO 能力各不相同。

所有样品随其浓度的增加促进作用总是先增大后减小。其中样品 A、样品 B、样品 E、样品 G 均在浓度为 50 mg/L 时促进作用最大；样品 C、样品 D 在浓度为 100 mg/L 时促进作用最大；样品 F 则在浓度为 25 mg/L 时促进作用为最大。与对照组相比，样品 A、样品 C、样品 E、样品 F、样品 G 均在低浓度时有显著性差异，而样品 D 在高浓度是有显著性差异($P < 0.01$)。总体说来样品 B、样品 D 在 12.5、25、50、100 mg/L 的浓度促进作用较显著，样品 F 在 25、50、100、200 mg/L 浓度下促进作用较显著，均优于阳性药 LPS。

3.3 海黍子提取物对 RAW264.7 增殖能力的影响

由图 3 可知，样品浓度在 12.5~200 mg/L 之间时，海黍子活性物质可显著的促进小鼠巨噬细胞 RAW264.7 增殖，其作用的强弱随浓度变化各不同。样品 A 和样品 B、样品 E、样品 F、样品 G 最大促进浓度皆为 50 mg/L，样品 C 和样品 D 在浓度为 100 mg/L 时促进作用达到最大。同浓度比较，样品 D 的增殖效果最显著，在各个浓度均优于阳性药 LPS。

3.4 海黍子提取物对脾淋巴细胞增殖能力的影响

如图 4 所示，海黍子活性物质均有体外刺激淋

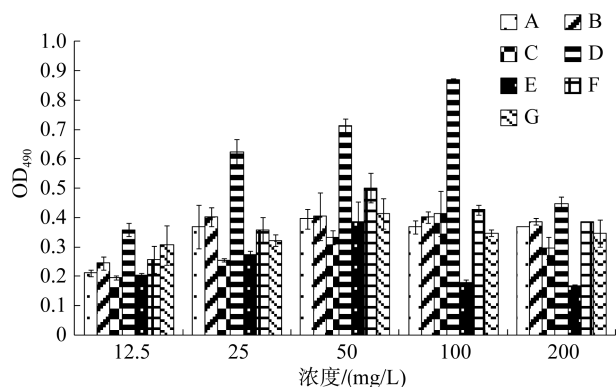


图3 海葵子提取物对小鼠腹腔巨噬细胞增值能力的影响
Fig.3 The effects of the extracts to the ability of proliferation of the mice macrophages

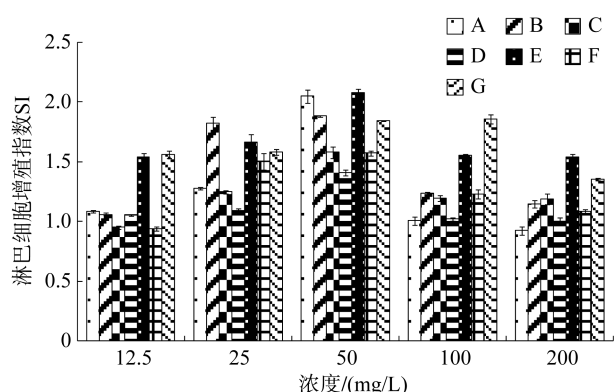


图4 海葵子提取物对小鼠脾细胞增值能力的影响
Fig.4 The effects of the extracts to the ability of lymphopoiesis

巴细胞增殖的作用。从样品 A 至样品 G 均有最大刺激浓度,多数在 50 mg/L 到 100 mg/L 之间,并且最大促进效果均优于阳性药 ConA。同浓度比较样品 E 的增殖效果最显著,且增殖效果均大于阳性药物 ConA,其次为样品 G,其在浓度为 12.5、25、50、100 mg/L 时的增殖效果也都优于阳性药物 ConA。

3.5 海葵子提取物对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬中性红能力的影响

如图 5 所示,海葵子活性物质均对小鼠单核巨噬细胞 Raw264.7 吞噬能力有促进作用。从样品 A 到样品 G 的最大刺激浓度均为 50 mg/L,而且最大促进效果都远远优于阳性药 ConA。其中,样品 E 对小鼠单核巨噬细胞 Raw264.7 吞噬能力的促进作用最明显,各个浓度的促进效果均优于阳性药物 ConA。另外,样品 A 的促进效果也较为好,其在浓度分别为 25、50、100、200 mg/L 时的促进效果也都优于阳性药物 ConA。与对照组相比,各个样品均有显著性差异。

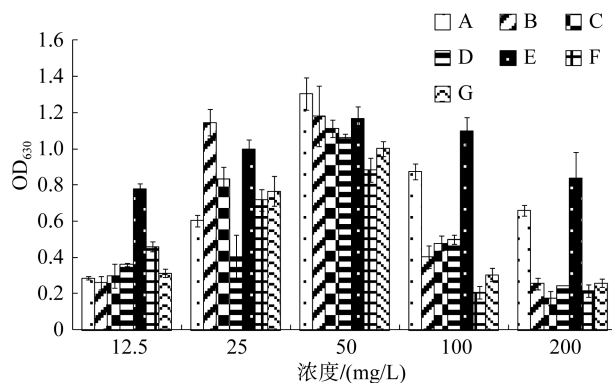


图5 海葵子提取物对小鼠巨噬细胞吞噬中性红能力的影响
Fig. 5 The effects of the extracts to the ability of the macrophages devouring neutral red

4 讨论

由于褐藻形态复杂,分布广,更因其生存环境特殊,从而使褐藻体内化学成分复杂而多样。近年来,各国科学家对褐藻进行了生化药理及毒理等研究,并进行了广泛的生理活性物质的筛选,发现了许多有价值的化合物,有些已开发为海洋药物^[11-12]。

本文将海葵子的乙醇提取物经石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取,并将乙酸乙酯相进行硅胶柱层析得到 7 种提取物,并对这 7 种提取物进行了抑菌和免疫活性的研究。抑菌试验结果可知,7 种提取物对细菌均有不同程度的抑制作用,而对真菌的抑制作用不明显。这可能与提取物的组成有一定的关系,因此有必要对这些提取物的成分以及对其他细菌和真菌的作用做进一步的研究。体外免疫实验结果表明,海葵子活性物质在 12.5~200 mg/L 的浓度范围内,可明显地促进小鼠腹腔巨噬细胞产生 NO,随活性物质浓度的提高 Raw264.7 释放 NO 能力各不相同。所有样品随其浓度的增加促进作用总是先增大后减小;而样品浓度在 12.5~200 mg/L 之间时,海葵子活性物质可显著的促进小鼠巨噬细胞 RAW264.7 增殖,其作用的强弱随浓度变化各不同;海葵子活性物质均有体外刺激淋巴细胞增殖的作用。从样品 A 至样品 G 的最大刺激浓度多在 50~100 mg/L 之间,最大促进效果均优于阳性药 ConA;海葵子活性物质均对小鼠单核巨噬细胞 Raw264.7 吞噬能力有促进作用。从样品 A 到样品 G 的最大刺激浓度均为 50 mg/L,而且最大促进效果都远远优于阳性药 ConA。由此可以看出,对于同一免疫指标,不同提取物的最佳反应浓度不同,量效关系不一致,且不同提取物对同一免疫指标的影响程度有较大差别,另外,同一提取物对不

同免疫指标作用结果也不一致,这可能由于其对免疫细胞的作用机制不同造成的。因此,对这些提取物的免疫作用还需进一步评价。对实验结果的比较分析看,抑菌活性不高,免疫活性较强,因此需要继续开展免疫活性研究。

参考文献:

- [1] 李伟新, 朱仲嘉, 刘凤贤. 海藻学概论[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1982: 170.
- [2] Doty M S, Caddy J F, Santelices B. Case studies of seven commercial seaweed resources[C]. FAO fisheries technical paper 281, Food and Agriculture Organization Of the United Nations. Rome, 1987.
- [3] 张秉成. 本草便读[M]. 北京: 学苑出版社, 2010: 56.
- [4] 孔娜娜, 周革非, 王长海. 角叉菜提取物的抑菌和免疫活性的研究[J]. 食品科技, 2010, 35(11): 219-222.
- [5] 沈萍, 范秀容. 微生物学实验(第3版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 1996: 6.
- [6] Mullet D, Fertel R h, Kniss D, et al. An increase in intracellular cyclic AMP modulates nitric oxide production in IFN- γ treated macrophage[J]. J Immunol, 1997, 158: 897.
- [7] Wang Z T, Ng T B, Yeung H W, et al. Immunomodulatory effect of a polysaccharide-enriched preparation of *Codonopsis pilosula* roots[J]. General Pharmacology: The Vascular System, 1996, 27: 1 347-1 350.
- [8] 周思朗, 屈艳妮, 张健. SRB 与 MTT 法细胞计数应用的比较[J]. 中国现代医药杂志, 2005, 5(17): 2616.
- [9] 刘建文. 药理实验方法学: 新技术与新方法[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 30-59.
- [10] 周革非, 魏元臣, 孔娜娜, 等. λ -卡拉胶降解组分的分离纯化、抗氧化及免疫活性研究[J]. 海洋科学, 2009, 33(8): 58-62.
- [11] 于广利, 梁平方, 徐家敏. 海藻中活性物质研究概况[J]. 青岛海洋大学学报, 1995, 增刊: 138-144.
- [12] 张翼, 李晓明, 王斌贵. 海藻生物活性物质研究的回顾与展望[J]. 科技前沿与学术评论, 2005, 27(5): 56-63.

Antimicrobial and in vitro immunomodulating activity of extracts from ethyl acetate phase of *Sargassum kjellmanianum*

LI Li¹, MA Wei-wei¹, QU Yan², CAO Wu-bo³, ZHOU Ge-fei¹

(1. Life Science School, Yantai University, Yantai 264005, China; 2. Product Quality Supervision and Inspection Institute of Yantai, Yantai 264005, China; 3. Laiyang Hanlin Bio-technology Co.Ltd, Yantai 264005, China)

Received: Feb., 8, 2012

Key words: *Sargassum kjellmanianum*; silicagel column chromatography; antimicrobial activity; in vitro immunomodulating

Abstract: In this paper, the antimicrobial and immunomodulating activities of the extracts from ethyl acetate phase of *Sargassum kjellmanianum* were studied to screen out the extracts with strongest activities. The antimicrobial activity of these seven extracts as well as their effects on proliferation of mice abdominal macrophage RAW264.7 and spleen lymphocytes, release of nitro oxide (NO), ability to devour neutral red were investigated. The results showed that these seven extracts had little inhibitory effect on the fungus, while showed different inhibitory effect towards different bacterium. All of these 7 extracts showed immunomodulating activity. They could stimulate the proliferation of both mice macrophage RAW264.7 and the spleen lymphocytes. They could stimulate the mice abdominal macrophage to produce NO and devour the neutral red.

(本文编辑: 康亦兼)