

## 中国鲎素的分离提取及其生物活性测定

指导老师：洪水根教授

硕士研究生：陈菲

鲎，又名马蹄蟹，是一种我国拥有的极其珍贵的海洋动物资源。在动物界屈指可数的活化石中，它是经济价值和科研价值最高的一个种类。在它的蓝色血液中蕴藏着丰富的生物活性物质，因而具有很好的开发应用前景。

实验材料中国鲎从厦门市场购得，以 20mM 的茶碱为抗凝剂直接心脏穿刺法取血。采用 1000rpm 冷冻离心分离得出鲎血细胞，经 Sephadex G-50 凝胶层析与 CM-Sepharose CL-6B 离子交换层析等方法，从鲎血细胞中分离提纯鲎素。检查测定鲎素的抗细菌活性和抗肿瘤活性。结果如下：

1. 抗细菌活性实验：体外(in vitro)实验表明，鲎素在较低浓度下就可抑制革兰氏阴性菌(大肠杆菌、氧化绿脓杆菌)和革兰氏阳性菌(枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌)的生长。其中金黄色葡萄球菌(人体致病菌)相对于其它三种菌对鲎素更为敏感。由此可知，鲎素是鲎血细胞用以抵抗入侵微生物的自我防御系统的主要组份。

2. 体内(in vivo)急性毒理实验：用小白鼠为实验动物，以腹腔注射和皮下注射两种方式给药所进行的鲎素活体急性毒理实验表明，在给药量高达 80 $\mu$ g/ml 时，小白鼠仍能活跃生活，除皮下注射组在最高给药量 80 $\mu$ g/ml 时，个别小鼠有脱毛等现象外，并未观察到其它异常生理现象发生，说明鲎素对正常活体毒性较小，可用于活体实验使用。

3. 抗肿瘤活性实验：抗肿瘤实验表明鲎素对裸鼠皮下接种的 HL60 肿瘤细胞有一定抑制作用，肿瘤抑制率约为 42.3%。与对照组相比较，经鲎素皮下注射和腹腔注射处理肿瘤细胞形态学变化表明，肿瘤细胞明显出现空泡化、细胞器毁坏、核固缩等损伤及死亡的变化。这说明鲎素在经过裸鼠体内正常代谢过程后，仍保持生物活性性质的稳定，对肿瘤细胞具有靶向杀伤作用和效果。

关键词：中国鲎 鲎素 抗细菌活性 抗肿瘤活性

### 惠柑附

#### 1. 前言

##### 惠操流 1.1 鲎的分类及地理分布

鲎，又名马蹄蟹(horseshoe crab)隶属于节肢动物门(Arthropoda)、螯肢亚门(Chelicerata)、肢口纲(Merostomata)、剑尾目(Xiphosura)。鲎早在古生代泥盆纪鲎就已出现，直到现在它的形态仍无重大变化，故人们称其为“活化石”。鲎在胚胎发育过程中要经过三叶幼虫阶段，说明它们是从古生代的三叶虫演化而来。所以有关鲎的生物学研究对节肢动物的系统发生研究具有一定的意义[1]。

现在地球上生存的鲎有三属四种，它们的分类地位如下：

鲎科(Family Limnidae)

(1) Subfamily Limulinae

改 Limulus polyphemus 科

美洲鲎亚科

美洲鲎

(2) Subfamily Tachypleinae

改 Tachypleus tridentatus 科

改 Tachypleus gigas 科

东方鲎亚科

东方鲎(中国鲎)

南方鲎

## 改 Carinoscorpins rotundicanda 攪 圆尾鲎攪攪[1,2,3]攪

在欧洲大陆和北美洲大陆发现过很多地质时代的鲎化石，此外在崑亚洲大陆，澳大利亚大陆也有报告。但是现存鲎的分布仅局限于北美崑洲的大西洋沿岸和亚洲东南海域。北美洲东南海岸的鲎生息在加拿大崑新斯科舍省，美国东部海岸到墨西哥尤卡坦半岛樞之间的海岸线上攪攪[4,5]攪。

攪东方鲎分布在我国沿海，故又名中国鲎，从浙江乍浦以南，到福建、崑台湾和广东均有分布，但以福建、广东产的鲎个体大、数量多攪[1]攪。崑除中国沿海地区外，东方鲎也有分布在日本西部沿岸，同时，菲律宾崑各地，加里曼丹岛北部西岸及东岸，苏拉威西岛北部、爪哇岛东部、崑苏门答腊岛印度洋侧也有其踪迹。南方鲎和圆尾鲎以印度恒河河口附崑近为西限，由此到东南沿海广大地区均为其生息地攪[2]攪。

鲎的繁殖季节为每年3月到10月，每当春末夏初，水温上升之际，崑鲎从深海游向沿岸沙滩，挖穴产卵繁殖后代。在厦门地区5月份-9月崑份都有鲎出现，7-8月份达高潮，9月份以后，天气转冷水温下降，鲎崑又陆续到深海去越冬攪[1]攪。

### 1.2. 鲎的研究

早在19世纪末国外就有学者开展鲎生物学研究。我国周楠生、崑郑重(1950)最先发表有关对厦门地区鲎研究的论文。以下着重介绍国崑内外有关鲎研究的概况。

#### 1.2.1 鲎血细胞等形态学方面的研究

1927年Loeb,L.等研究发现由鲎心脏采集的血液中,大约含有4%崑(V/V)血球,血球中充满着很多颗粒,血球具运动性,所以称之为阿米巴崑细胞(变形细胞)(amebocytes)或颗粒细胞(granulocyte)攪[6]攪。鲎血液崑中的细胞除极少数是含有血蓝蛋白的原蓝细胞(cyanoblast)外,其余崑约99%的细胞是变形细胞攪[7]攪。有关变形细胞的超微结构问题

Dumont崑等在1966年作过较早较仔细的观察。发现变形细胞大致为圆形或椭圆崑形,细胞膜显现出三分层结构,核呈圆形或卵圆形,有时表面有浅的崑凹陷攪[9,10,11]攪。从比较生物学的角度可把这种变形细胞看作一种原崑始血细胞。1980年左右的几年中,日本筑波大学的宾仓文夫和关口晃崑一等以东方鲎为材料,从构造、组织化学性质、血球内成分的免疫组崑织化学等不同角度来描述了鲎血球的种类和机能。

同样,我国的科研工作者对鲎也进行了大量的研究。如福建医科崑大学的梁平、倪子绵等对中国鲎变形细胞樞做了超微结构方面的观察攪[9]攪。

攪厦门大学汪德耀、方永强等报道了中国鲎变形细胞的细胞学、生物学崑特性及对细菌的研究报告攪[10]攪。厦门大学汪德耀、洪水根等,崑除了对中国鲎的生殖细胞发生及受精生物学进行了一系列系统的研究崑外,也开展鲎血蓝蛋白的结构与功能研究攪[37.74.88.90]攪。

#### 1.2.2. 鲎试剂的研究及开发

1956年Bang等发现美国产美洲鲎血液遇革兰氏阴性细菌时会产生崑凝胶攪[13]攪。其后Levin和Bang进一步研究发现,微量革兰氏阴性细菌内崑毒素也引起鲎血凝集反应,而且凝集反应有关的全部血液凝固因子都崑存在于血球中攪[14]攪。于是利用鲎血液的这一特性发明了鲎试验法。近崑几年国内外都对此做了广泛的开发研究。美国于1971年开始建立海上崑实验室,用在Chincoteague, Va附近30~40尺深海处捕获的鲎,首次成崑功地大规模生产鲎试剂。我国自1975年开始利用丰富的鲎资源提取鲎崑试剂,1977年首次报导制备鲎试剂成功,现厦门鲎试剂厂已可成批量生崑产标准化鲎试剂产品。

鲎试验法是以鲎血变形细胞溶解物作为试剂,用以检测微量细菌崑内毒素的一种生物学测试法。由于这种方法操作简便、灵敏度高、特崑异性好、反应迅速、有利于大批试验,因此很快便成为检测内毒素的崑新的有效工具,这种试验称为鲎蛛溶解物试验(Limulus

Lysate Test),

简称 LLT 试验。我国采用东方鲎制备鲎脲试剂, 简称为 TAL 试验(Tachypleus Amebocyte Lysate)。鲎试验法的应用随着研究的开展而日益广泛, 从临床上各种体液(如脑脊液、血液、尿液、痰液、胸腹水等)的内毒素检查, 到各种药物、水质、食品中细菌污染情况的检测, 都可采用鲎试验法。特别是制药行业用以检测注射药物的热原质, 以及控制生药生产工艺流程中的热原污染情况, TAL 试验在保证药品质量方面起到很大作用[15, 16, 17]。

### 1.2.3 鲎血细胞内的活性物质及其细胞内分布

随着对鲎血细胞形态和功能研究的深入展开及各种生化分离方法的日趋成熟, 迄今已从鲎血细胞溶解物中分离出多种活性多肽与蛋白质。

Bang 等研究发现鲎血细胞与细菌内毒素 (Lipopolysaccharide, LPS) 接触后将导致血细胞内凝集系统的激活。这一细胞内凝集系统由因子 C 凝集素、因子 B 凝集素、凝集素原等几种丝氨酸蛋白酶原及凝集素原组成[18]。

当鲎血细胞遇到细菌 LPS 时, 首先 LPS 诱导因子 C 的激活, 因子 C 的活性形式因子 C 又使因子 B 激活为活性因子 B, 之后因子 B 再激活凝集素原成为凝集素, 凝集素最后催化凝集素原转化成凝集素, 使鲎血液发

生凝集[19, 20, 21, 22, 23]。除上述这些鲎血凝集系统中活性蛋白因子之外, 研究者们近年来从鲎血细胞中分离提纯了其它活性多肽和蛋白质如下: 1988 年 Takatori Nakamura 等提纯出一种多活性小肽鲎毒素(tachypleusin)[34]; 凝集素(lectin)、凝集素抗脂多糖因子(anti-LPS factor)[18, 30, 31]、defensin[33]及 Complements 等等。所具有这些活性物质都是鲎用以抵御入侵微生物的自我防御系统的组成部分[24, 25, 26]。

在鲎血细胞中发现了越来越多的各种活性物质, 于是有了一个问题: 这么多的活性物质在结构简单原始的鲎血细胞中是怎样贮存? 如何发挥其生物学作用呢? 前面也有提到, 99% 的鲎血细胞是一种变形细胞, 因其中充满大量致密颗粒, 所以变形细胞又称为颗粒细胞。颗粒细胞所含有的致密颗粒分成两种类型: 大颗粒(L-granules)和小颗粒(S-granules)。大颗粒较大(直径达  $1.5\mu\text{m}$ ), 密度比小颗粒低, 小颗粒直径小于  $0.6\mu\text{m}$ [45, 46]。1993 年 Takeshi S. 等设计一种连续蔗糖密度梯度离心方法首次从颗粒细胞中将大、小颗粒分离出来。颗粒组份的分离分析表明, 大、小颗粒所含有的多肽和蛋白质在数量上具有特异性, 即来自每一个颗粒的不同区位的蛋白质剖面(Protein profiles)总是相同的。凝集素原(coagulogen)[47, 48]、凝集素因子 C(factor C)[49, 50]、

凝集素原[51, 52]及抗脂多糖因子[53, 54], 这四种主要成份协同存在于大颗粒中, 而凝集素家族的多肽组份存在于小颗粒中。其中凝集素原和凝集素分别是大、小颗粒中的主要组份。分别存在于大、小颗粒中的这些特征性蛋白质和多肽可用来作为研究 LPS 介导的胞吐作用及颗粒在细胞内形成时的分子标记[55]。

对鲎血细胞功能的进一步研究发现, 鲎血细胞经 LPS 介导的胞吐作用释放大小颗粒内活性物质就可参与抵抗入侵微生物[57, 58, 59]。由此可见鲎血颗粒细胞中的大、小颗粒不但是上述多种生物活性物质的贮存库, 而且是作为鲎血淋巴的主要防御机制来抵抗外源微生物的入侵。曾用革兰氏阴性细菌改 E.coli 和革兰氏阳性细菌改 S. aureus 测定来自大、小颗粒的提取物的抗微生物活性。测定结果表明, 来自小颗粒的含有大量凝集素的提取物对上述二种类型细菌的生长有强烈的抑制作用, 而来自大颗粒的提取物却只有很微弱的抑制活性。除了所提取的凝集素组份外, 几乎所有大、小颗粒的其它组份都没有抗微生物活性[32]。这些结果说明大颗粒主要含有凝集系统的关键活性因子, 其生物学功

能是对入侵微生物的制动作用；而小颗粒主要成分是具有强抑菌作用素的螯素，从而形成螯血淋巴抵抗入侵微生物的自我防御系统[55]。

### 1.3 螯素族的研究

螯素(tachypleisin) 是一类具有多种生物学活性的多肽家族的总称。第一个螯素家族成员 tachypleisin I 是于 1988 年由 Takanori Nakamura 等从螯血细胞残渣中分离纯化得到。由于 tachypleisin I 抗菌、抗病毒等多方面生物活性的测定及其独特新颖的多肽结构的发现，使得日本和美国的很多学者投入到螯素的研究之中，这是自 Bang(1956)发现螯变形细胞与内毒素产生凝集作用之后在螯的研究方面出现的第二次研究高潮。在我国，厦门大学细胞生物学研究室螯研究组所做有关螯及螯素方面的研究一直处于国内领先地位。下面详细讨论有关螯素的国内外研究进展。

#### 1.3.1 螯素生物化学结构及分子生物学研究

1988 年 Takanori Nakamura 等从东方螯血细胞残渣中分离提取出一种具强抗菌活性的有 17 个氨基酸的小肽，后将之定名为 tachypleisin I。研究发现 tachypleisin I 是一种阳离子多肽，在螯血细胞溶解物中含量丰富，每只螯血淋巴中含螯素约 10mg。通过生物化学和 FAB 质谱仪分析得知 tachypleisin I 的羧基端氨基酸残基是精氨酸，虽然自然状态下螯具有羧基端精氨酸的多肽曾在蝎子的多肽毒素和改 Sarcophaga peregrina 的内毒素中发现，但至今未发现与螯素家族具同源结构的其它多肽或蛋白质[34]。

此后，美、日两国的研究者们分别在亚洲螯改 (*T. tridentatus*), 改 *Tachypleus gigas* 和改 *Carcinoscorpius rotundicansa* 和改 *Limulus polyphemus* 的血细胞中发现几种类似 tachypleisin I 的类似物多肽: tachypleisin II、III 和 polyphemusin I、II [35, 36] 和 polyphemusin I、II [35]。这几种天然存在螯的类似物多肽即所谓的螯素家族成员，它们的化学结构和生物活性都非常近似，其结构比较如下[36]：

其中 tachypleisin I 是存在于螯亚洲螯所有三个种属血细胞中的常见主要组成，而 polyphemusin I 和 II 仅在美洲螯改 *L. polyphemus* 中发现。就象以前报导的不同种属的凝胶蛋白原的氨基酸序列比较所指出的一样[37, 38, 39, 40, 41]，上述四种螯素类似物多肽的氨基酸顺序也说明螯了亚洲螯的三个种之间在进化关系上比同美洲螯更接近。研究发现，螯 tachypleisin 和 polyphemusin 多肽链上最多见的氨基酸替换发生在 Arg 和 Lys 之间，说明维持一种基本结构特征对于螯素生物活性而言是至关重要的。位于 tachypleisins 和 polyphemusins 氨基酸序列第 10 位和第 11 位的 Gly 在进化上是高度保守的。H-NMR 研究表明螯素具有一种“发卡”状结构，该结构由在 Glu 残基部位形成的反向平行  $\beta$ -片层组成，螯因而位于中间部位的 Glu 残基对于多肽分子三维结构的维持是很重要。

从 1990 年起，国外研究者从分子生物学方面对螯素进行基因克隆和多肽合成前体的研究[43, 46]。Takeshi 等对编码螯素多肽前体的 mRNA 进行了 cDNA 克隆，并检测由 cDNA 转录的 mRNA 在螯各组织中的分布。研究发现，螯素前

体由 77 个氨基酸残基组成, 至少有两类 mRNA 分别编码 tachyplesin I 和 II。这一鲎素前体由三部分肽段组成, 即: 一段具有 23 个氨基酸残基的肽段, 一段带有酰胺信号 "Gly-Lys-Arg" 的成熟肽段和羧基端含有一个酸性氨基酸簇的 34 个氨基酸的肽段。这些肽段的存贮在说明成熟的鲎素多肽是通过进化保守的蛋白质加工机制产生, 首先肽是信号肽的释放, 随后识别大段前体双碱性序列(Lys-Arg) 的加工酶在 20 和 21 位置的 Arg-Asn 之间进行剪切, 第三由 B 型羧肽酶解释放出 Lys-19 和 Arg-20, 最后由一类识别多肽羧基端 Glu 残基的酶催化氧化胺酰化[43]。

各类组织提取的总 RNA 的 Northern blot 分析表明, 鲎素前体只在鲎血细胞中表达。这一结果与只在鲎血细胞中发现高水平鲎素多肽的情况相一致。一种大小与在鲎血细胞中所发现的转录本相同的 mRNA 也存在于心脏和脑组织中, 但信号相对较弱。而肝胰腺、胃、肠、肌肉和基节腺等组织中的鲎素前体 mRNA 数量均极少[43]。

### 1.3.2 鲎素的生物学活性

如前所述研究表明, 鲎素是鲎血淋巴抵抗入侵微生物的自我防御机制重要组份。鲎素在低浓度时就可抑制革兰氏阴性和阳性细菌的生长[43], 而目前已发现的其它鲎血细胞活性物质都不具有这一特殊活性, 鲎素的这种抗双性细菌的特性可作为其检验指标。除具有抗细菌活性外, 鲎素还能抑制真菌生长。1990 年 Takeshi 等发现鲎素能抑制象白色念珠菌(改 *Candida albicans* 戎) 一类真菌的生长[43]。

1993 年 Morimoto 等人最先报导 tachyplesin I 具有抑制人类免疫缺陷病毒 HIV 复制的活性[61]。这一重要发现引起众多相关研究。Morimoto 等人人工合成四种天然鲎素多肽及十六种人造鲎素类似物多肽并分别检测其抗 HIV 活性。其中一些多肽在低浓度下就可明显抑制 HIV 对人体 T 细胞的感染。tachyplesin I 对 HIV-1、单纯疱疹病毒和 A 型流感病毒均有抑制活性[61, 62], 研究发现人工合成的鲎素类似物多肽中 T 11、T 14 及 T 15 的抗 HIV 活性比它们的原始多肽 tachyplesin II 强。定名为 T 22 的多肽, 即 [Tyr<sub>5,12</sub>, Lys<sub>7</sub>]-polyphemusin II 具有最强的抗 HIV 活性。T 22 的抗 HIV 50% 抑制浓度 (EC<sub>50</sub>) 是 0.008 μg/ml, 而其 50% 细胞毒浓度 (CC<sub>50</sub>) 是 54 μg/ml, 这样的数据已与目前用于治疗艾滋病 (AIDS) 病人最有效药物 AZT 相当。T 11、T 14、T 15 和 T 22 都带有两个 Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys 重复序列和两个二硫键, 这种独特的结构可能与其强抗 HIV 活性密切相关。T 22 的生化结构与任何一种已知的抗病毒化合物的结构都不相似[63]。最近研究发现 T 22 吸入病毒后会立即进行病毒-细胞融合, 但这一事件仍需进一步研究, 对 T 22 抗病毒活性的研究可为病毒感染方面的研究提供重要线索。由于 T 22 的强抗 HIV 活性、高选择指标及其特殊的作用模式, T 22 将成为治疗和预防 HIV 感染的候选药物[64]。

目前尚未有鲎素与肿瘤细胞作用的报导, 但从鲎中分离出几种同源凝集素 (lectin) 能够使肿瘤细胞发生凝集反应。凝集素可作为多种生理活动的信息传递媒介, 例如激活 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞[84], 与肿瘤细胞等变异细胞作用[85], 参与细胞粘着[86], 介导胞饮作用等[28, 88]。1977 年 Schimizu 等最早用牛甲状腺粘蛋白作为配基的亲亲和层析从中国鲎血淋巴中分离出四类对唾液酸特异的凝集素[28]。1990 年北京大学杨端等人采用交联琼脂糖亲和层析及高效分子筛液相层析的新方法有效简便地从中国鲎试剂成产品中分离纯化出一种凝集素[27]。

1994 年德国 Fischer 等从东方鲎血淋巴中提取出一种唾液酸特异性凝集素。实验发现, 这种凝集素使人红细胞发生凝集。在用唾液酸酶处理小鼠淋巴系 Eb 和 Esb 及人类结肠癌 HT29 等肿瘤细胞后, 凝集素就可使这些肿瘤细胞发生凝集反应, 说明这些肿瘤细胞缺乏

一种鲨凝集受体, 当用唾液酸酶处理这些细胞后, 暴露出这种受体, 凝集素就可使这些肿瘤细胞发生凝集反应[91]。

综上所述, 多年来尤其是近十年, 美国、日本和中国等世界各国学者对鲨进行了大量的研究。研究结果表明, 鲨作为一种活化石, 从比较生物学角度为血细胞发生等方面的研究提供了原始证据, 而鲨血液蕴藏丰富的功能特殊的活性物质更是研究热点。从鲨血液中提取的鲨素本身就是一类具有多种生物学活性的多肽家族, 它可以抑制革兰氏阴性细菌和革兰氏阳性细菌及真菌的生长, 也可以抑制 HIV 等病毒复制, 还具有潜在的抗肿瘤活性。因此, 充分利用鲨这一宝贵资源, 大力开展鲨素药用价值的研究, 具有十分广阔的开发前景。

摘要

## 2. 实验材料和方法

### 2.1 实验材料

#### 2.1.1 生物材料

中国鲨(改 *Tachypleus tridentatus* 改) 鲨血淋巴是从厦门曾厝安渔村捕获的新鲜活鲨采集。

小白鼠、BALB/C 裸鼠及 HL-60 细胞购自厦门大学抗癌中心实验动物室。

埃希氏大肠杆菌(改 *Escherichia coli*, *E. coli* 改)、氧化绿脓杆菌(改 *Gluconobacter oxydans* 改)、枯草芽孢杆菌(改 *Bacillus subtilis* 改)、金黄色葡萄球菌(改 *Staphylococcus aureus* 改)等菌株由厦大学生物系微生物专业姚炳新老师提供。

#### 2.1.2. 主要试剂及配制

Sephadex G-50 和 CM-Sephadex CL-6B 购自 Pharmacia 生物制品公司。鲨试剂为厦门鲨试剂厂产品。其余所用试剂均为化学分析纯试剂。

##### (1) 抗凝剂

采集鲨血所用的茶碱是浓度 0.02M 的 3%NaCl 溶液, 用 0.05M Tris-HCl 缓冲液调 pH7.2 左右[68,69,70]。1.5 磅高压灭菌 30 分钟备用。

##### (2) 鲨素分离提取的缓冲液

含有 50mM NaCl 的 20mM Tris-HCl 缓冲液, pH8.0。

20mM HCl 缓冲液, pH5.4 左右。

20mM NaAc 缓冲液, pH6.0。

含 1.5M NaCl 的 20mM NaAc 缓冲液, pH6.0。

##### (3) 鲨素的浓度测定的试剂

###### ①试剂甲:

A 液:

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	10g	NaOH	2g
酒石酸钾钠	0.25g	蒸馏水	500ml

B 液:

CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.5g	蒸馏水	100ml
---------------------------------------	------	-----	-------

每次使用前将 A 液与 B 液按 50:1 比例混合即为试剂甲。

###### ②试剂乙:

6NKOH

③牛血清白蛋白由厦大学生物学系生物化学实验室提供

###### (4) 鲨素生物活性测定

牛肉膏培养基配方:

蛋白胨	1%	牛肉膏	0.3%	
NaCl	0.5%	蒸馏水	100%	崐
琼脂	2%	调 pH7.2-7.4		

(5) 鲎素处理裸鼠肿瘤细胞光镜和电镜标本制备

- ① 0.135M 磷酸缓冲液
- ② Hollande Bouin Fixative (Romeis 1948)
- ③ 卡拉基氏(Carrazzi's)苏木素染液(汪德耀改良)
- ④ 1%伊红染液, 用 95%酒精配制
- ⑤ 2.5%戊二醛固定液

### 2.1.3. 主要仪器

- (1) 离心机(TGL-16G)
- (2) Olympus BHS 型显微镜
- (3) 石蜡切片机
- (4) 核酸蛋白仪(ZW2080-A)
- (5) 梯度混合器(TH-250)
- (6) 分步自动收集器(BS-100A)
- (7) 恒温振荡器(THZ-C)
- (8) 721 型分光光度计
- (9) 超薄切片机(LKB-V)
- (10) JEM-100CX II 电子显微镜

### 2.2. 实验方法

鲎素提取与活性测定过程所用试剂、器皿均需无菌处理(高压灭崐菌 15 磅, 30 分钟)。所有过程在无菌室内进行。

#### 2.2.1 鲎血细胞的采集

将新鲜活鲎体表泥沙洗净, 用 70% 酒精消毒头胸与腹部关节部崐位, 用带一段塑料管的 18G 注射针头直接刺入鲎心门, 蔚蓝色鲎血液自崐行流入 500ml 接收瓶中, 瓶内先装好 200ml 左右抗凝剂, 采集过程中轻崐微震摇接收瓶, 使鲎血液与抗凝剂充分混合, 当鲎血液与抗凝剂比例崐到 1:1 时, 另换一接受瓶攪[64, 65, 66]攪。

将所取鲎血 1000rpm, 4℃离心 10 分钟, 弃去上清液, 收集沉淀为鲎崐血细胞, 置-20℃冰箱保存待用攪[67]攪。

#### 2.2.2 鲎素的分离提取

##### 2.2.2.1 酸提取物的制备

将鲎血细胞悬浮于含 50mM NaCl 的 20mM Tris-HCl 缓冲液中, 将此崐悬液倒入玻璃匀浆器中充分匀浆。之后将匀浆液在 8000rpm 下 4℃离心 30 分钟, 弃去上清液, 收集的沉淀用上述缓冲液洗涤两次。洗涤后的沉崐淀悬浮于 20mM HCl 中, 将悬液例入玻璃匀浆器中再次充分匀浆, 将匀崐浆液在 8000rpm 4℃离心 30 分钟, 收集上清液, 沉淀用 20mM HCl 重抽提崐两次, 同样收集上清液, 最后弃去沉淀。三次所收集的上清液即为所崐需要的酸提取物。

##### 2.2.2.2. Sephadex G-50 凝胶层析攪[71, 72, 73]攪

###### ① 凝胶的选择

凝胶层析的机理是分子筛效应。能否用凝胶层析法有效分离混崐合物主要取决于凝胶颗粒内部微孔的孔径和混合物的分子量分布范围崐这两个因素。凝胶的孔径大小与凝胶的交联度直接相关, 凝胶的交崐联度越高, 孔径越小。交联度决定了被排阻物质的分子量范

围, Sephadex

G-50 的工作范围( $M_r$ )在 500-10000 分子量之间, 所以考虑到鲎素为一分子量 2300 左右的小分子量物质, 故采用高交联度凝胶即 Sephadex G-50。

#### ②凝胶的预处理

凝胶使用前须在洗脱液内得到充分彻底地溶胀, 本实验采用热溶胀法, 即耗时短又可达到灭菌目的。在沸水浴中, 将湿凝胶浆逐渐升温至近沸, 保持 2-3 小时, 不能激烈搅拌。沸水溶胀后, 用无菌水洗凝胶数次, 每次应将沉降缓慢的细小颗粒随水倾倒入去, 以免在装柱后产生阻塞现象, 降低流速。洗涤后将凝胶放在洗脱液中待用。

#### ③凝胶装柱

将长 100cm, 直径约 3cm 的玻璃层析柱垂直装好, 之后将已溶胀好的凝胶小心徐徐灌到柱中, 尽量一次装完, 保证凝胶柱高 90cm。

#### ④洗脱过柱

将酸提取物上 Sephadex G-50 柱, 用 20mM HCl 溶液洗脱, 调整流速至 40ml/h, 用核酸蛋白仪在 280nm 处记录, 用自动分步收集器收集含鲎素组份[71]。

### 2.2.2.3 CM-Sepharose CL-6B 离子交换层析[73]

#### ①凝胶选择

鲎素为一类阳离子小肽, 因此选用阳离子交换剂 CM-Sepharose CL-6B。

#### ②凝胶预处理及装柱

将凝胶悬浮于 20mM NaAc(pH6.0)缓冲液, 置于沸水浴中充分溶胀 2-3 小时, 备用。

将长 20cm, 直径 1.5cm 玻璃层析柱垂直装好, 将溶胀好的凝胶徐徐装入柱中, 直到凝胶柱高 15cm, 装好柱后用 20mM NaAc 缓冲液平衡层析柱过夜。

#### ③洗脱

将 Sephadex G-50 层析收集的含鲎素组份先用 1M NaOH 调节 pH 为 6.0, 之后上柱。梯度混合器的两个容器中分别装入等体积的含 1.5M NaCl 的 20mM NaAc 缓冲液和 20mM NaAc 缓冲液, 将梯度混合器与层析柱连接进行线性梯度洗脱, 调节流速 80ml/h, 最后用含 1.5M NaCl 的 20mM NaAc 缓冲液清洗层析柱。用核酸蛋白仪在 280nm 处记录, 自动分步收集器收集含鲎素组份, 于 4℃ 保存待用, 长期保存放于 -20℃ 冰箱。

### 2.2.3 鲎素的浓度测定

#### 2.2.3.1 标准曲线制作

配制浓度为 250  $\mu$ g/ml 的结晶牛血清白蛋白溶液 10ml。取 11 支试管, 按梯度加入牛血清白蛋白标准溶液及蒸馏水, 之后加试剂甲 5ml, 混匀后室温下放置 10 分钟, 再加试剂乙 0.5ml, 立即混合均匀(混合速度要快, 否则会使显色程度减弱), 30 分钟后, 以不含蛋白质而试剂量相同的试管为空白对照, 用 721 型分光光度计测定 650nm 处 OD 值。

以蛋白质浓度为横坐标, OD 值为纵坐标作出标准曲线。

#### 2.2.3.2. 样品浓度测定

将待测样品溶液按标准曲线制作的操作步骤进行, 由此测得的样品溶液 OD 值, 查标准曲线, 求得待测样品的浓度。

### 2.2.4 鲎素生物活性的测定

#### 2.2.4.1 鲎素抗细菌活性[74]

将斜面培养的细菌用适量无菌生理盐水洗脱下来, 用玻璃珠打散成团细菌, 得到均匀细菌母液, 稀释细菌母液浓度至 10<sup>6</sup> 个细菌/ml, 置 4℃ 冰箱待用。

在每支试管中分别加入 1ml 稀释菌液、1ml 不同浓度梯度鲎素及 8ml 牛肉膏培养基, 37℃ 恒温振荡器中温育 15 小时, 随后以未加鲎素而加入 1ml 相应缓冲液、

1ml 菌液及 8ml 牛肉膏培养基的试管作为空白对照,用崑 721 型分光光度计测定 550nm 处各试管细菌培养液的 OD 值。

#### 2.2.4.2 鲨素活体急性毒理实验

选健康小白鼠 16 只,随机分成两组,每组 8 只,按不同药物浓度分别崑给药。给药途径两种:皮下注射及腹腔注射。即一组 8 只进行皮下注射给药,另一组 8 只腹腔注射给药。给药一次后,观察期为 14 天,每天崑记录小白鼠生理变化情况[76,77]。

#### 2.2.4.3 鲨素体内抗肿瘤活性[76,77]

##### ①接种:

选择 HL-60 肿瘤生长旺盛且无溃破,健康情况良好的皮下荷瘤动物,崑脱臼处死,固定于手术板上,用碘酒、酒精消毒动物皮肤,无菌条件下崑在无菌超净台内剥离肿瘤。剥离出肿瘤按一定比例(1:2~1:4),加入崑无菌生理盐水,用组织匀浆器制成细胞悬液,用注射器于裸鼠腋窝皮下崑接种 0.2ml。接种肿瘤前应用碘酒、酒精消毒接种部位的皮肤。当裸鼠皮下接种肿瘤长到可触摸到时,即可给药治疗。

##### ②给药剂量: 60 $\mu$ g/ml

##### ③给药途径: 腹腔注射给药和皮下注射给药

##### ④治疗天数: 14 天

##### ⑤动物个数: 14 只。对照组 6 只,腹腔注射组 6 只,皮下注射组 2 只

##### ⑥疗效评价:

停药 24 小时后处死动物,解剖剥离瘤块,称瘤重。

疗效评价公式:

$$\text{肿瘤抑制率} = \frac{C \text{ 样禁-榭} - T \text{ 样禁-榭}}{C \text{ 样禁-榭}} \times 100\%$$

式中 T 样禁-榭为给药组平均瘤重; C 样禁-榭为对照组平均瘤重。

#### 2.2.4.4 鲨素抗肿瘤活性光镜和电镜样品的制备[93]

将裸鼠颈骨脱臼处死,快速解剖出瘤块,用磷酸缓冲液清洗瘤块崑后,经 Bouin 固定液固定 6-8 小时后,按常规石蜡切片法切片。切片经崑卡拉基苏木素和 1%伊红对染,用 Olympus HB2 型显微镜观察拍照。

同一标本按常规方法制备电镜样品,醋酸铀和枸橼酸铅双重染色,崑 JEM-100CX II 电镜观察摄影。

附熹柑

### 3. 实验结果

#### 3.1. 鲨素分离提取

从血细胞残渣制得的酸提取物过 Sephadex G-50 层析柱的初步分离结果如图 3.1 所示,鲨素出现在低分子量分离组份中,图中横线表示崑所要收集的分离组份。鲨素经 CM-Sepharose CL-6B 离子交换层析得到崑进一步分离纯化,如图 3.2 所示。鲨素分离提取步骤及提取率在表 3.崑中总结。可知 30g 湿重的血细胞中提取出 5.0mg 鲨素,提取率大约为崑 0.32%。

↑

图 3.1 血细胞残渣酸提取物过 Sephadex G-50 柱的凝胶过滤曲线图。

↑

图 32. 富含 tachyplesin 组分的 CM-Sepharose CL-6B 离子交换柱曲线图。

表 3.1 鲨素的分离提取过程及提取率

浪拌櫬

提取步骤	体积 (ml)	浓度 (mg/ml)	总蛋白量 (mg)	提取率 (%)
血细胞残渣	300	3.139	941.7	100

的酸提取物

Sephadex G-50	250	0.114	28.5	3.63
CM-Sepharose CL-6B	500	0.010	5.0	0.32

崑

### 滄熹揀 3.2. 蜚素抗菌活性测定愁

选用四类细菌作为实验菌株，其中两种革兰氏阴性菌株分别为埃崑希氏大肠杆菌和氧化绿脓杆菌；两种革兰氏阳性细菌为枯草芽孢杆菌崑和金黄色葡萄球菌。

各试管的蜚素样品浓度如表 3.2 所示，四类菌株的适宜培养时间及崑由 550nm 测定的 OD 值如表 3.3 所示。表 3.4 表示出蜚素对四类菌的抑制崑效果。由表 3.4. 所得半致死浓度在表 3.5. 中显示。注

拌欄注表 3.2. 各个试管中蜚素样品浓度

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
蜚 素	165.8	82.8	66.2	49.6	41.4	20.7	16.8	12.4	8.3

揀

### 揀拌 表 3.3. 四种菌株不同培养时间下的生长情况(37℃)

	埃希氏大 肠杆菌	氧化绿 脓杆菌	金黄色葡 萄球菌	枯草芽孢 杆菌
12	0.155	0.360	0.428	0.251
15	0.623	0.946	0.698	0.548
18	0.740	1.004	0.816	0.635

滄揀 由表 3.3. 可知, 进行蜚素抗菌活性测定时, 四种菌株的培养时崑间在 15 小时最适宜。沉

拌欄表 3.4. 蜚素的抗菌活性 ( $\lambda$ : 550nm 下吸收值)

评揀

试管号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
对 照									
菌 种									
沉									
大肠杆菌	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.208	0.293	0.372	
	0.494	0.623							
绿脓杆菌	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.139	0.253	0.426	
	0.509	0.946							
金黄色葡萄球菌	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.004	0.290	0.445	
	0.540	0.698							
枯草杆菌	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.160	0.396	0.443	
	0.469	0.548							

揀

拌藥

表 3.5. 鲨素的半致死浓度

μg/ml	半致死浓度	岷
岷	大肠杆菌	20.7~10.4
岷	金黄色葡萄球菌	10.4~8.28
岷	枯草杆菌	20.7~10.4

滄

揀滄 从表 3.5 可看出金黄色葡萄球菌比其它三种菌株对鲨素更敏感。

随着三步分离提取步骤的进行, tachypleisin 逐步得到纯化,同时岷由各步骤所得溶液的抗菌能力也在逐步增强。表 3.6 所示为各步所对岷应的各个浓度梯度。表 3.7 为每步各个浓度梯度的抗菌活性, 由表 3.7

总结出的各步半致死浓度见表 3.8。所用菌株为埃希氏大肠杆菌, 37℃岷培养 15 小时。注

表 3.6 各步骤所对应的浓度梯度

步 聚	序号及浓度梯度( $\mu\text{g/ml}$ )							
1. 酸提取物	序 号	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6	
	浓 度	50	40	30	20	10	5	
2. Sephadex G-50	序 号	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6	2.7
	浓 度	40	30	25	20	15	10	5
3. CM-Sepharose CL-6B	序 号	3.1	3.2					
	浓 度	10	5					

表中序号前一个数字表示步骤,各一个数字表示试管号,下同。

表 3.7. 各步骤各浓度梯度的抗菌活性

	大肠杆培养液吸收值( $\lambda$ :550nm)						
酸 提	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6	
取 物	0.000	0.000	0.002	0.072	0.186	0.191	
Sephadex	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6	2.7
G-50	0.000	0.000	0.000	0.006	0.0014	0.061	0.179
CM-Sepharose	3.1	3.2					
CL-6B	0.009	0.050					

蔡拜

表 3.8. 各步骤的大肠大杆菌半致死浓度

步 骤	半致死浓度 ( $\mu$ g/ml)
酸提取物	20~15
Sephadex G-50	12.5~10
CM-Sepharose CL-6B	5

標憲

憲滄 3.3. 鲎试剂分离提取结果及几个分离组分的抗菌活性憲憲

鲎试剂一般用于热原检测，是鲎血细胞的粗提物，由众多的活性物质组成。将厦门鲎试剂厂购得的鲎试剂成品经过 Sephadex G-50 柱收集到三个含小分子量物质的洗脱峰，见图 3.3。对这三个峰进行了细菌活性测定，结果见表 3.10。

↑

→

图 3.3 鲎试剂的凝胶过滤曲线图

標滄 如图 3.3 所示，取 I、II、III 三个分离组份做样品，测定其抗菌活性，所用菌株为埃希氏大肠杆菌。三种样品的浓度梯度序号如表 3.9 所示，其抗菌结果如表 3.10 所示。

表 3.9. 鲎试剂中三种样品的浓度梯度( $\mu$ g/ml)

沉

	1	2	3	4	5
I	40.9	20.4	10.2	5.1	2.6
II	41.5	20.8	10.4	5.2	2.6
III	30.7	15.4	7.7	3.8	1.9

表 3.10. 鲎试剂中三种样品的抗菌活性(550nm 吸收值表示)

	1	2	3	4	5	对 照	崐	
I	0.094	0.466	0.489	0.550	0.584	崐	崐	
0.076	0.499	0.510	0.553	0.584	崐	II	0.038	
0.530	0.584	崐	崐	III	0.011	0.160	0.314	0.433

由表 3.10 可知,从鲎试剂中得到的三种分离组份在浓度为 30 $\mu$ g/ml 左右均对革兰氏阴性菌大肠杆菌有较明显的抑制作用,说明在鲎试剂中含有抗菌活性物质,这也是鲎试剂能够作为热原检测剂的原理基础所在。

### 3.4. 鲎素抗肿瘤活性

#### 3.4.1. 鲎素急性毒理实验

本实验以健康小白鼠作为实验动物,采用皮下注射和腹腔注射两种给药方式,每个浓度注射 2 只小鼠,给药一次后观察 14 天,观察小鼠生活、外形有无变化。

表 3.11. 鲎素急性毒理实验结果

给 药 方 式	给药浓度及效果			
皮 下	80 $\mu$ g/ml	60 $\mu$ g/ml	40 $\mu$ g/ml	20 $\mu$ g/ml
注 射	+	-	-	-
腹 腔	80 $\mu$ g/ml	60 $\mu$ g/ml	40 $\mu$ g/ml	20 $\mu$ g/ml
注 射	-	-	-	-

滄

表中“—”表示未观察到小白鼠有什么生理变化。“+”表示有变化。即皮下注射组小白鼠在给药浓度为 80 $\mu$ g/ml 时,饲养 7 天后,发现在注射药物部位皮毛脱落,皮肤红肿,其它各未观察到有异常现象。

#### 3.4.2. 鲨素活体抗肿瘤实验

实验具体步骤见前节所述,将药物处理过的裸鼠处死解剖出肿瘤称瘤重,见表 3.12。

表 3.12. 鲨素抗肿瘤活性结果

组别	每只裸鼠的瘤重(g)
对照组	1.17 0.20 0.04 0.13 0.22 0.24
腹腔注射组	0.065 0.23 0.16 0.15 0.11 0.13
皮下注射组	0.14 0.20

以腹腔注射组为例,肿瘤抑制率计算公式如下:

$$\text{抑瘤率} = \frac{C \text{ 样禁-橛} - T \text{ 样禁-橛}}{C \text{ 样禁-橛}} \times 100\% = 42.3\%$$

其中: T 样禁-橛为药物组平均瘤重, C 样禁-橛为对照组平均瘤重。

#### 3.4.3. 鲨素抗肿瘤实验光镜和电镜标本分析

裸鼠处死后,立即取材固定,制作了石蜡标本切片。光镜观察见图版 II,为放大 4000 倍下对照组与处理组比较,照片显示了对照组中细胞间排列紧密,约 4 个 cell/cm<sup>2</sup> 而处理组细胞间有间隙存在,细胞排列疏散,约 1.5 个 cell/cm<sup>2</sup>。可明显观察到处理后肿瘤细胞的形态变化:对照组细胞核形状大致为圆形,核质分布均匀,与之相比处理组细胞核形状不定,细胞核膨大且有空泡,有的细胞核核质松散,难以确定界线,处理组细胞间还可观察到大的空白间隙。这些光镜观察结果说明鲨素作用于肿瘤细胞,引起细胞形态结构方面明显可见的变化。

电镜下照片如图版 III 所示,可明显看出处理后的 HL-60 细胞与对照组相比,有的核膜突起包住细胞器。HL-60 细胞出现细胞质空泡化并消失,细胞核异染色质化,形状不规则。细胞器消化、核固缩等损伤及死亡变化。

#### 3.5. 鲨素浓度测定标准曲线

表 3.13. 为用牛血清白蛋白测定标准曲线时每个试管所加试剂及 650nm 处 OD 值。根据表 3.13 制作的标准曲线如图 3.4 所录

表 3.13. 用小牛血清白蛋白制作标准曲线 OD 值

蛋白质	250 $\mu$ g/ml 牛血清白蛋白	H <sub>2</sub> O(ml)	OD <sub>650</sub>
( $\mu$ g)	体积(ml)		

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库