

## *Rhizobium* sp. N613 胞外多糖的抗氧化活性

陈艳丽 任盛 魏国琴 吕利华 赵良启\*

(山西大学化学生物学与分子工程教育部重点实验室 山西 太原 030006)

**摘要:** 以铁氰化钾和铁离子为检测系统测定了 *Rhizobium* sp. N613 胞外多糖(REPS)对氧化物的还原力;  $\text{H}_2\text{O}_2$  和  $\text{Fe}^{2+}$  为羟自由基生成系统检测了 REPS 对羟自由基的清除作用; 邻苯三酚自氧化法检测了 REPS 对超氧阴离子的清除作用; 并体外检测了 REPS 对  $\text{H}_2\text{O}_2$  引起的氧化溶血现象的抑制作用及对小鼠肝组织脂质过氧化损伤的保护作用。结果显示, REPS 对氧化物具有明显的还原力, 其对羟自由基的清除作用达到 35.46% (多糖浓度为 2 mg/mL), 对超氧阴离子的清除作用达到 36.84% (多糖浓度为 0.78 mg/mL), 对  $\text{H}_2\text{O}_2$  引起的氧化溶血现象的抑制作用达到 43.84% (多糖浓度为 1.14 mg/mL), 对小鼠肝组织脂质过氧化的保护作用达到 34.46% (多糖浓度为 1.14 mg/mL), 表明 REPS 具有良好的抗氧化作用, 有着重要的应用价值。

**关键词:** 锦鸡儿根瘤菌胞外多糖, 活性氧自由基, 脂质过氧化, 抗氧化活性

## Antioxidant Activity of Exopolysaccharide from *Rhizobium* sp. N613

CHEN Yan-Li REN Sheng WEI Guo-Qin LV Li-Hua ZHAO Liang-Qi\*

(Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Shanxi University, Taiyuan, Shanxi 030006, China)

**Abstract:** We investigated the reducing capacity of Caragana rhizobium exopolysaccharides (REPS) by the system of potassium ferricyanide and ferric chloride, determined the hydroxyl radical scavenging capacity of REPS by  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$  system, measured the Superoxide radical scavenging capacity of REPS by the pyrogallol system, and we also determined its protective effects on  $\text{H}_2\text{O}_2$  in hemolysis of erythrocytes and lipid per-oxidation of liver homogenate in rat. The results indicated that REPS has reductive capacity to oxides, the hydroxyl radical scavenging capacity of REPS was 35.46% (at the concentration of 2 mg/mL), the Superoxide radical scavenging capacity of REPS was 36.84% (at the concentration of 0.78 mg/mL), the protective effects of REPS on  $\text{H}_2\text{O}_2$  induced hemolysis of rat erythrocytes was 43.84% (at the concentration of 1.14 mg/mL), and the protective effects on lipid per-oxidation of liver homogenate in rat was 34.46% (at the concentration of 1.14 mg/mL).

**Keywords:** Exopolysaccharide from *Rhizobium* sp. N613, Reactive oxygen species, Lipid per-oxidation, Antioxidant activity

众所周知, 氧化还原反应是生物体新陈代谢的一个重要组成部分, 机体在生理代谢过程中自由基产生与清除一般处于动态平衡状态<sup>[1]</sup>。一旦这种动态平衡被破坏, 导致自由基超过机体耐受限度, 就会造成组织器官损伤和许多疾病发生。现代医学研究表明, 心脑血管系统损伤、癌症、动脉硬化症、早发性痴呆症等疾病的发生与自由基过量有着直接的关系。因此, 防止自由基过量对于维持机体正常代谢和保障人民身体健康具有重要作用。随着医疗事业的发展, 人们对抗氧化剂, 尤其是天然抗氧化剂的研究已经成为最为活跃的热门课题之一<sup>[2]</sup>。近年来, 越来越多的研究表明许多生物多糖及复合物具有良好的抗氧化作用, 能够提高抗氧化酶活性并清除自由基, 是一种天然抗氧化剂<sup>[1]</sup>。此外, 还发现其中一些多糖除具有抗氧化作用外, 尚兼有抗肿瘤、抗衰老、抗辐射、抗凝血等作用。这些生理学功能虽然各自有着不同的代谢机理, 但有可能直接或间接地与其抗氧化活性有关。

目前, 多糖中研究得较为热门的是植物多糖、海藻多糖和真菌多糖, 而从细菌中、动物活体中提取多糖研究较少<sup>[3]</sup>。近来, 我们课题组获得一株锦鸡儿根瘤菌(*Rhizobium* sp. N613), 能产生丰富的胞外多糖(REPS)。研究表明, 该多糖不仅具有发酵周期短、产量高、成本低<sup>[3]</sup>等优良的生产性状, 而且具有良好的免疫活性和抗肿瘤活性<sup>[4-5]</sup>, 有着诱人的开发前景和应用价值。

本文旨在研究锦鸡儿根瘤菌胞外多糖(REPS)的抗氧化活性, 为拓展 REPS 的应用范围提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

*Rhizobium* sp. N613 胞外多糖(以下简称 REPS), 由本实验室以 *Rhizobium* sp. N613 为生产菌株发酵纯化制得, 经检测其纯度达 99%以上。

### 1.2 主要试剂与仪器

铁氰化钾(天津化学试剂三厂), 三氯化铁(天津化学试剂三厂), 三氯乙酸(天津大茂化学试剂厂), 过氧化氢(天津化学试剂三厂), 硫酸亚铁(天津化学试剂三厂), 水杨酸钠(天津化学试剂三厂), 邻苯三酚(遵义佳宏化工有限责任公司), 硫代巴比妥酸(Solarbio)。以上试剂均为分析纯。

日立 CR22G 高速冷冻离心机(日本日立公司), 752N 紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限

公司), 恒温振荡器(太仓市实验设备厂), 日立 U-2010 紫外分光光度计(日本日立公司), SC-15 超级恒温槽(宁波新芝科器研究所), 雷磁 PHS-25 型酸度计(德国 WTW 公司)。

### 1.3 实验动物

4 周龄昆明种小鼠( $20 \pm 2$ ) g 及基础饲料, 由山西医科大学实验动物中心提供。

### 1.4 方法

**1.4.1 还原力测定<sup>[6-7]</sup>:** 在具塞试管中加入适量不同浓度的 REPS、磷酸钠缓冲溶液(0.2 mol/L, pH 6.6)和 1%铁氰化钾溶液。置 50°C 恒温水浴中反应 20 min, 迅速冷却, 再加入适量的 10%三氯乙酸溶液, 1%三氯化铁溶液(REPS 在反应体系中的终浓度分别为 0.18、0.36、0.73、1.09 和 1.46 mg/mL), 振荡均匀, 静置 5 min, 在  $\lambda_{700}$  处以蒸馏水为空白测定其吸光值。

**1.4.2 对羟自由基的清除<sup>[8-9]</sup>:** 在试管中依次加入适量 FeSO<sub>4</sub> 溶液(6 mmol/L)、不同浓度的 REPS 以及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液(8.8 mmol/L), 振荡均匀, 静置 10 min, 再加入适量水杨酸钠溶液(10 mmol/L)(REPS 在反应体系中终浓度分别为 0.25、0.5、1.0、1.5 和 2 mg/mL), 振荡均匀, 静置 30 min, 于  $\lambda_{510}$  处测得不同 REPS 浓度下的吸光值  $A_i$ , 用水代替水杨酸钠时测得不同浓度 REPS 的本底吸光值  $A_j$ , 用水代替水杨酸钠时测得空白对照吸光值  $A_0$ 。按下式计算羟自由基( $\cdot$ OH)的清除率:

$$\cdot\text{OH 清除率}(\%) = [1 - (A_i - A_j)/A_0] \times 100$$

**1.4.3 对超氧阴离子的清除<sup>[9-10]</sup>:** 取适量的蒸馏水, 不同浓度的 REPS 以及 Tris-HCl 缓冲液(50 mmol/L, pH 8.2)(REPS 在反应体系中终浓度分别为 0.10、0.19、0.39、0.58 和 0.78 mg/mL), 振荡均匀, 加入适量的经 25°C 预热过的邻苯三酚(以 10 mmol/L HCl 配制, 空白管用 10 mmol/L HCl 代替邻苯三酚的 HCl 溶液), 迅速摇匀后倒入石英杯,  $\lambda_{325}$  下测定其吸收光谱, 计算线性范围内每分钟吸光度的增加。按下述方法计算超氧阴离子(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)清除率:

$$\text{O}_2^{\cdot-}\text{清除率}(\%) = (1 - \Delta A/\Delta A_0) \times 100$$

其中:  $\Delta A_0$  为邻苯三酚自氧化速率,  $\Delta A$  为加入多糖溶液后邻苯三酚的自氧化速率

**1.4.4 氧化溶血的抑制试验<sup>[11]</sup>:** 红细胞悬液的制备: 健康小鼠摘除眼球采血, 加入 1 mg/mL 的肝素钠 0.2 mL, 制成抗凝血, 先以 5000 r/min 离心 10 min, 移弃血浆和白细胞, 再向沉淀的红细胞中加入等渗

的生理盐水,混匀,离心,弃上清液,反复2次,洗涤红细胞,将红细胞制成5%的悬浮液。

取红细胞悬液0.5 mL,加不同浓度的REPS样品,最后加3%的 $H_2O_2$ (REPS在反应体系中终浓度分别为0.14、0.29、0.57、0.86和1.14 mg/mL),混匀,37°C温浴60 min后,再用生理盐水稀释至合适倍数,离心。上清液于 $\lambda_{415}$ 波长处测定吸光度。按下述公式计算氧化溶血抑制率:

$$\text{氧化溶血抑制率}(\%) = (1 - A/A_0) \times 100$$

**1.4.5 对肝组织自发性脂质过氧化的保护作用<sup>[11]</sup>:**肝匀浆的制备:健康小鼠,颈椎脱臼致死。迅速分离肝组织,用冰冷的生理盐水匀浆,制成10%的匀浆。

在试管中加肝匀浆液1 mL及不同浓度的REPS样品0.5 mL,37°C温浴1 h。保温结束后加入20%三氯乙酸(TCA)1.0 mL终止反应,混匀后再加入0.67%硫代巴比妥酸1.5 mL(REPS在反应体系中终浓度分别为0.14、0.29、0.57、0.86和1.14 mg/mL),沸水浴加热15 min。离心去除蛋白质沉淀后,于 $\lambda_{532}$ 波长处测定吸光度。按下述公式计算脂质过氧化的抑制率:

$$\text{肝组织脂质过氧化抑制率}(\%) = (1 - A_{\text{样品}}/A_{\text{对照}})$$

## 2 结果与分析

### 2.1 还原作用

铁氰化钾 $[K_3Fe(CN)_6]$ 可被还原试剂还原成亚铁氰化钾 $[K_4Fe(CN)_6]$ ,亚铁氰化钾再和铁离子作用生成普鲁士蓝,在 $\lambda_{700}$ 处有最大吸收值,以检测其还原力,吸光值越大,说明其还原力越高<sup>[6-7]</sup>。REPS的还原力结果见图1。

由图1中可以看出,REPS在浓度为1.46 mg/mL时OD为1.256,且随浓度的增加,还原能力逐渐增加,其还原力与浓度呈线性关系,其回归方程为: $y = 0.1272x + 0.2652$ , $R^2 = 0.9971$ 。结果表明,REPS具有较强的还原作用,为其抗氧化活性奠定了还原力基础。

### 2.2 对羟自由基的清除作用

利用 $H_2O_2$ 和 $Fe^{2+}$ 混合发生Fenton反应<sup>[12]</sup>,生成具有很高反应活性的 $\cdot OH$ ,在该体系内加入水杨酸钠可捕捉 $\cdot OH$ 并产生深色物质,该物质在 $\lambda_{510}$ 下有最大吸收。但若加入具有清除作用的物质,便会与水杨酸钠竞争,从而减少深色产物的生成量<sup>[8-9]</sup>。REPS对羟自由基的清除结果见图2。

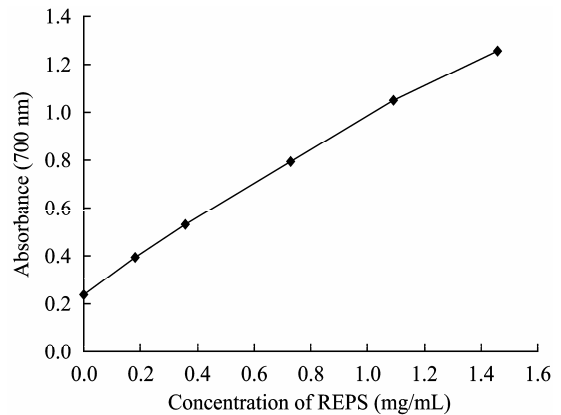


图1 REPS的还原力

Fig. 1 Reducing power of different concentrations of REPS

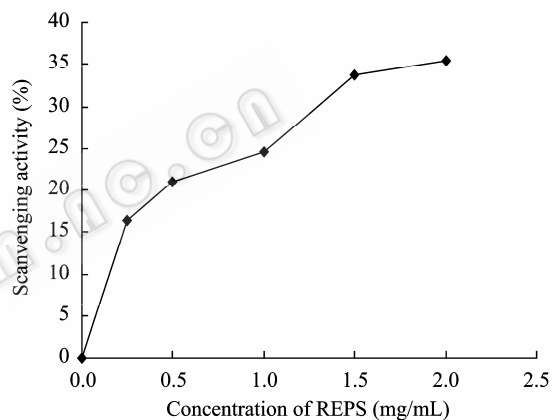


图2 REPS的羟自由基清除能力

Fig. 2 Hydroxyl radical scavenging activity of different concentrations of REPS

由图2中可以看出,REPS在浓度为2.0 mg/mL时清除率达到35.46%,由此可见REPS对 $\cdot OH$ 具有清除作用,且随加入量的增加,清除率上升,清除率与多糖的用量存在一定的量效关系。

### 2.3 对超氧阴离子的清除作用

邻苯三酚可以在碱性条件下经自氧化产生中间产物 $O_2^{\cdot -}$ ,该自由基可加速其自氧化反应。因此,通过测定某物质对邻苯三酚自氧化的抑制作用,即可表征其对 $O_2^{\cdot -}$ 的清除作用<sup>[9-10]</sup>。REPS对超氧阴离子的清除结果见图3。

由图3中可以看出,REPS在0.78 mg/mL时清除率达到37%,由此可见REPS能显著降低邻苯三酚发生自氧化的速率,即对 $O_2^{\cdot -}$ 有显著的清除能力,并呈一定的量效关系。

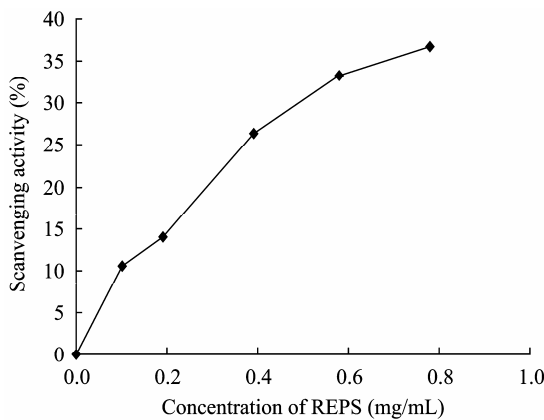


图3 REPS 的超氧阴离子清除能力  
Fig. 3 Superoxide radical scavenging activity of different concentrations of REPS

#### 2.4 氧化溶血的抑制作用

$H_2O_2$  可以引发氧化作用, 导致红细胞膜损伤, 血红蛋白逸出<sup>[13]</sup>。因此通过测定加入某物质后血红蛋白的减少量, 即可表征其对氧化溶血的抑制作用。REPS 对  $H_2O_2$  引起的氧化溶血的抑制结果见图 4。

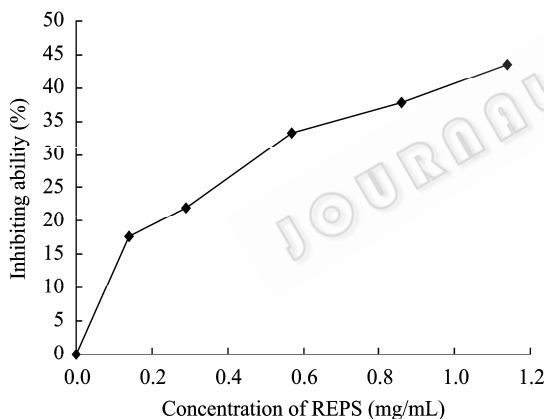


图4 REPS 对  $H_2O_2$  引起的氧化溶血的抑制  
Fig. 4 Protective effects on  $H_2O_2$  induced hemolysis of rat erythrocytes of REPS

由图 4 中可以看出, REPS 溶液在 1.14 mg/mL 时抑制率可达到 44%。由此可见 REPS 能显著抑制细胞溶血的发生, 抑制氧化损伤, 保护红细胞膜, 并呈一定的量效关系。

#### 2.5 对肝组织自发性脂质过氧化的保护作用

肝组织自发性过氧化脂质的二级分解产物丙二醛能与硫代巴比妥酸反应生成粉红色产物, 在  $\lambda_{532}$  处有最大吸收<sup>[11]</sup>。REPS 对肝组织自发性脂质过氧化的保护作用见图 5。

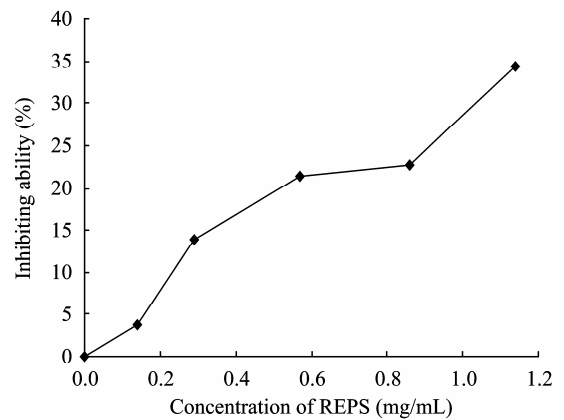


图5 REPS 对肝组织自发性脂质过氧化的抑制  
Fig. 5 Protective effects on  $H_2O_2$  induced hemolysis of rat erythrocytes of REPS

由图 5 中可以看出, REPS 溶液在 1.14 mg/mL 时对肝组织脂质过氧化的抑制率可达到 34%。由此可见, REPS 在体外能明显抑制小鼠肝组织脂质过氧化, 其氧化产物丙二醛的含量随加入 REPS 浓度的上升而下降, 即 REPS 对小鼠肝组织脂质过氧化的清除率随着 REPS 浓度的增大而增大, 呈一定的量效关系。

### 3 讨论

从体外试验结果可以看出, REPS 在具有较好的还原力, 能够有效清除羟自由基、超氧阴离子、抑制  $H_2O_2$  诱导红细胞氧化溶血和降低小鼠肝组织自发性脂质过氧化作用。

REPS 的抗氧化作用很可能与如下机制有关: (1) REPS 直接作用于活性氧自由基(ROS)。多糖分子上具有还原性基团, 可以作为供氢体与 ROS 发生氧化还原作用, REPS 自身正常氧化而将 ROS 还原为无毒害作用的离子或分子, 终止或缩短脂质过氧化链式反应<sup>[14-16]</sup>。(2) ROS 产生的酶促反应需要金属离子(如  $Fe^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 等), REPS 多糖的醇羟基可以与这些金属离子络合, 使自由基的产生受到抑制, 进而影响脂质过氧化过程的启动, 最终抑制 ROS 的产生<sup>[17]</sup>。

许多资料证明, 肿瘤的产生与生长同自由基关系非常密切<sup>[1]</sup>。我们的研究表明 REPS 既具有良好的抗氧化活性, 又具有良好的抗肿瘤作用<sup>[4-5]</sup>, 至于清除自由基和抗肿瘤活性之间的关系还有待进一步的研究。

本文证实了 REPS 具有良好的抗氧化效果, 不仅可以将其开发为抗肿瘤多糖药物, 而且可用于保健食品与化妆品, 拓展了其应用范围。

## 参 考 文 献

- [1] 纪立金, 李奕祺, 于晓艳, 等. 强脾补精化痰益智胶囊对多发梗塞性痴呆大鼠自由基的影响. 中华中医药杂志, 2007, **22**(3): 153–156.
- [2] 陈彦, 孙玉军, 方伟. 威灵仙多糖的抗氧化活性研究. 中华中医药杂志, 2008, **23**(3): 266–270.
- [3] 俞慧红, 竺巧玲, 戴飞, 等. 多糖抗氧化作用的研究现状. 食品研究与开发, 2008, **29**(3): 172–176.
- [4] 黄晓波, 张建国, 韩勇, 等. 一种根瘤菌胞外多糖对小鼠免疫功能的影响. 免疫学杂志, 2006, **22**(3): 149–154.
- [5] 韩勇, 黄晓波, 董岳峰, 等. 根瘤菌 N613 胞外多糖发酵条件及抗肿瘤作用研究. 微生物学通报, 2007, **34**(5): 909–913.
- [6] 罗祖友, 严奉伟, 薛照辉, 等. 藤茶多糖的抗氧化作用研究. 食品科学, 2004, **25**(11): 291–295.
- [7] Zou C, Du YM, Li Y, *et al.* Preparation of lacquer polysaccharide sulfates and their antioxidant activity *in vitro*. *Carbohydrate Polymers*, 2008(10): 1016–1026.
- [8] 邵佳, 郁建平, 胡美忠. 草珊瑚水溶性粗多糖提取及抗氧化性能研究. 食品科学, 2007(28): 283–286.
- [9] 杨江涛, 杨娟, 谢红, 等. 刺梨多糖粗品与纯品体外抗氧化作用. 食品工业科技, 2008, **29**(2): 94–96.
- [10] 程超, 李伟. 几种植物水溶性多糖的体外抗氧化作用. 食品工业科技, 2006, **27**(9): 63–65.
- [11] 邓云霞, 瞿伟菁. 金耳胞外多糖体外抗氧化作用研究. 食用菌学报, 2007, **14**(3): 47–49.
- [12] Smironff N, Cumbes QJ. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 1989(28): 1057–1060.
- [13] Qi HM, Zhang QB, Zhao TT, *et al.* *In vitro* antioxidant activity of acetylated and benzoylated derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2006(16): 2441–2445.
- [14] 吴广枫, 汤坚. 芦荟多糖的纯化与体外抗氧化活性的研究. 食品工业科技, 2002, **23**(7): 10–12.
- [15] 陈发河, 吴光斌, 周凌婕. 茶树菇多糖的制备及其对活性氧自由基的清除作用. 中国食品学报, 2007, **7**(6): 33–38.
- [16] 张静丽, 王宏勋, 张雯, 等. 灵芝、枸杞多糖复合抗氧化作用. 食品与机械, 2004, **20**(6): 11.
- [17] Volpi N, TanIgi P. Influence of chondroitin sulfate charge density, sulfate group position and molecular mass on Cu<sup>2+</sup> mediated oxidation of human low density lipoproteins: effect of normal human plasma — derived chondroitin sulfate. *Biochemical Journal*, 1999, **125**(2): 297.

## 编辑部公告

### 关于《微生物学通报》专题刊申请的通知

当前, 随着生物技术的飞速发展, 微生物学涵盖的领域越来越广, 交叉学科的研究也越来越受到关注。除了已有的微生物学、病毒学、基因工程、细胞工程、酶工程、发酵工程之外, 基因组学、代谢工程、纳米科学、生物炼制、生物质能等也逐步成为微生物学研究的热门领域。为了更加系统、集中地反映各个领域的研究成果, 以及该领域学科的热点难点问题, 充分发挥《微生物学通报》的学科引领和导向作用, 促进学科发展, 为某个领域的科研人员提供一个交流的平台, 《微生物学通报》编委会决定自 2008 年起, 每年出版一定数量的专题刊。专题刊将系统地反映微生物学相关领域或新学科生长点的最新进展, 及时介绍国内外微生物相关前沿领域的突破性成果, 以及面向国家和社会发展需要并具有重大应用前景的研究成果。真诚欢迎本领域各学科的学术带头人, 申请并组织专题刊。申请得到编委会批准后, 申请人将被邀请担任本专题刊的特邀编辑, 负责组织稿件、确定审稿专家, 并撰写专题刊序言。

根据专刊工作计划, 现将有关事项通知如下:

1. 专刊申请的有关规定附在通知的下面, 请申请者仔细阅读;
2. 提交形式: 请到我刊主页(<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>)的“下载专区”下载专题刊申请表; 填写好之后, 以 E-mail 附件的形式发送到编辑部邮箱: [tongbao@im.ac.cn](mailto:tongbao@im.ac.cn), 请在邮件主题中注明“专题刊申请”字样;
3. 申请者如有疑问, 请咨询编辑部, 联系方式: 邮箱 [tongbao@im.ac.cn](mailto:tongbao@im.ac.cn) 或电话 010-64807511