

## 黄精中的多糖组分及其免疫活性

刘 柳, 郑 芸, 董 群\*, 方积年

(中国科学院上海生命科学研究院上海药物研究所, 中国科学院研究生院, 上海 201203)

**摘要:**目的 研究黄精 *Polygonatum sibiricum* 中的多糖组分的结构特征及免疫活性。方法 黄精水提粗多糖用 DEAE-纤维素柱色谱和凝胶过滤色谱进行分离纯化, 用化学及光谱方法分析各多糖组分的结构特征, 并进行免疫活性测试。结果 黄精水提粗多糖经分离纯化, 得到 5 种多糖。PSW1B-b 为中性半乳糖, PSW2A-1 和 PSW3A-1 为酸性多糖, PSW4A 和 PSW5B 为糖蛋白, 其中 PSW3A-1、PSW4A、PSW5B 具有一定免疫活性。结论 5 种多糖为首次从黄精中分得, 并都以半乳糖为主要构成单元, 其中 3 种具有免疫活性。

**关键词:**黄精; 多糖; 免疫作用

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)08-1132-03

### Polysaccharides from *Polygonatum sibiricum* and their immunological activities

LIU Liu, ZHENG Yun, DONG Qun, Fang Ji-nian

(Shanghai Institute of Materia Medica, Shanghai Institute for Biological Science, Chinese Academy of Sciences, Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China)

**Abstract: Objective** To study the characteristics and immunological activities of the polysaccharides from *Polygonatum sibiricum*. **Methods** The polysaccharide fractions from water extract of *P. sibiricum* were isolated and purified using DEAE-cellulose and gel-filtration chromatography. Their structures were investigated using chemical and spectral methods. Their immunological activities were determined. **Results** Five polysaccharides were obtained from the water extract of *P. sibiricum*. PSW1B-b was a neutral galactan. PSW2A-1 and PSW3A-1 were acidic polysaccharides. PSW4A and PSW5B were glycoproteins. PSW3A-1, PSW4A, and PSW5B showed significant immunostimulating activities. **Conclusion** Five polysaccharides are obtained from *P. sibiricum* for the first time and are mainly composed of galactose among which three polysaccharides have the immunological activities.

**Key words:** *Polygonatum sibiricum* Red.; polysaccharide; immunological activities

黄精是百合科黄精属植物黄精 *Polygonatum sibiricum* Red. 的干燥根茎<sup>[1]</sup>。中医常用于治疗肺虚燥咳、头晕、脾胃阴虚、口干食少等。黄精的化学成分有皂苷、醌类、生物碱、氨基酸、糖类等。黄精多糖是黄精主要生物学活性成分之一, 有关药理学研究证明黄精多糖具有增强免疫功能、抗炎、抗病毒等多种作用<sup>[2]</sup>。黄精多糖的初步结构研究已有报道<sup>[3]</sup>, 但进一步的结构及构效关系的研究却未见报道, 本实验研究黄精中分离纯化得到的 5 种均一多糖的结构特征及免疫活性。

### 1 材料

1.1 试剂: 黄精药材购于上海市徐汇区中药饮片厂, 单糖对照品: 葡萄糖、半乳糖、鼠李糖、甘露糖、阿

拉伯糖及木糖为 Fluka 公司出品。测定多糖相对分子质量的标准品 Dextran T 系列为 Pharmacia 公司生产, 其他试剂均为国产 AR 级, 用前未作进一步处理。

1.2 仪器: Waters 高效液相色谱系统: 515 HPLC Pump, 2410 示差检测仪, Ultrahydrogel™ 2000 和 Ultrahydrogel™ 500 串联柱; 日本岛津 GC-14BPF 型气相色谱仪, 色谱柱为 5% OV-225/AW-DMCS-Chromosorb W 玻璃填充柱; WZZ-1S 型数字式自动旋光仪; ZD-2 型自动电位滴定计。

### 2 方法

2.1 提取分离: 取 3 kg 黄精, 以 95% 乙醇浸泡 3 周, 滤过, 药渣室温晾干, 得 2.25 kg。用沸水提取,

收稿日期: 2005-10-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No 30470397)

作者简介: 刘 柳 (1979-), 女, 硕士研究生。

\* 通讯作者 董 群 Tel: (021)50806600-3203 E-mail: dongqun@hotmail.com

每次加蒸馏水 15 L,提取时间为 4 h,共提取 5 次。将滤液合并,浓缩,透析。内液加入乙醇沉淀,沉淀用无水乙醇、丙酮依次洗涤,常温真空干燥,得 133 g 灰白色体 PSW。PSW 用 DEAE-cellulose 柱 (80 cm×6 cm) 进行初步分离,分别用蒸馏水,0.2、0.5、0.8 mol/L NaCl 及 0.1 mol/L NaOH 溶液进行阶梯洗脱,得 PSW-1, PSW-2, PSW-3, PSW-4 和 PSW-5。PSW-1 溶于水中,加入 Feling 试剂至产生沉淀<sup>[4]</sup>,离心,上清液加入 25% 醋酸中和,透析,乙醇沉淀,得 PSW-1B,反复用 G-75 纯化,得均一多糖 PSW1B-b。PSW-2、PSW-3、PSW-4 和 PSW-5 分别用 Sephacryl S-300 柱反复分离纯化,得到 4 个均一多糖组分 PSW2A-1、PSW3A、PSW4A、PSW5B。

2.2 纯度的鉴定和相对分子质量的测定:高效凝胶渗透色谱法 (HPGPC),流动相为 3 mmol/L NaAc,体积流量 0.5 mL/min。标准曲线根据标准葡聚糖 Dextran T-700、580、T-500、T-80、T-70、T-40、T-11 和 T-9.3 的相对分子质量和保留时间制作,然后根据多糖样品在相同色谱条件下的洗脱或保留时间,根据标准曲线由 GPC 软件计算得出该样品的相对分子质量<sup>[5]</sup>。

2.3 比旋光度  $[\alpha]_D^{20}$  的测定:准确称取多糖样品适量,以蒸馏水配成一定浓度的溶液,在  $(20 \pm 0.1)^\circ\text{C}$  于数字式自动旋光仪上测得其旋光度,通过公式计算比旋光度。

2.4 中性糖、糖醛酸和蛋白质的质量分数的测定:分别按照苯酚-硫酸法<sup>[6]</sup>、间苯基苯酚法<sup>[7]</sup>和 Lowry 法<sup>[8]</sup>,测定中性糖、糖醛酸和蛋白质的质量分数。

2.5 糖组分分析:取 3 mg 样品,加入 2 mol/L 三氟乙酸 (TFA) 4~6 mL,充  $\text{N}_2$  封管,110  $^\circ\text{C}$  下水解 2 h,溶液于 40  $^\circ\text{C}$  减压蒸干,反复加甲醇蒸数次以除尽 TFA。蒸干后用 0.5 mL 蒸馏水溶解,取少量在纤维素板上薄层色谱,初步鉴定单糖组成和是否含糖醛酸。水解产物以  $\text{NaBH}_4$  还原、醋酐乙酰化制备阿尔迪醇乙酸酯衍生物后进行 GC 分析<sup>[9]</sup>。

2.6 糖醛酸的还原:取 20 mg 样品,溶于 20 mL 蒸馏水中,室温下搅拌使其完全溶解,然后加入 0.5 g,碳化二亚胺试剂 CMC,于自动电位滴定仪上磁力搅拌反应,设定滴定终点为 pH 值 4.75,至 pH 值不再变动即终止滴定。另配制 2 mol/L  $\text{NaBH}_4$  和 4 mol/L HCl 溶液,设定滴定终点 pH 值为 7.0,磁力搅拌下缓慢滴入 2 mol/L  $\text{NaBH}_4$  溶液进行还原,以 4 mol/L HCl 溶液自动滴定以调节 pH 值在 7.0 左右。反应完毕后,反应液对蒸馏水透析 2 d 左右,冷

冻干燥,干燥后的样品按上述操作再重复还原 2 次<sup>[10]</sup>。

2.7 免疫活性检测:小鼠脾细胞、样品以及 ConA 或 LPS 溶液于 5%  $\text{CO}_2$  及 37  $^\circ\text{C}$  培养箱中培养 48 h,结束前 5 h 加入 MTT,终止培养后加溶解液孵育 6~7 h,用酶标仪于 570 nm 处测定吸光度值<sup>[11]</sup>。

### 3 结果和讨论

3.1 纯度、相对分子质量及比旋光度:PSW1B-b、PSW2A-1、PSW3A、PSW4A、PSW5B 在 HPGPC 上都呈现单一对称峰,可以判定为均一多糖。计算所得相对分子质量和所测比旋光度见表 1。

表 1 黄精中 5 种多糖的相对分子质量和比旋光度  
Table 1 Molecular weights and specific rotations of five polysaccharides in *P. sibiricum*

多糖	相对分子质量	旋光度 $[\alpha]_D^{20}$
PSW1B-b	$2.8 \times 10^4$	+61.03°
PSW2A-1	$3.6 \times 10^5$	+30.93°
PSW3A-1	$2.0 \times 10^5$	+92.0°
PSW4A	$3.2 \times 10^5$	+237.6°
PSW5B	$1.8 \times 10^5$	+195.9°

3.2 中性糖、糖醛酸和蛋白质的质量分数:PSW1B-b 为中性糖,在 280 nm 处无明显吸收,表明不含肽或蛋白质;PSW2A-1 在 280 nm 处无明显吸收,Lowry 法检测结果也表明不含蛋白质;PSW3A-1 糖醛酸的量较高,而 PSW4A-1、PSW5B 含蛋白质的量较高,见表 2。

表 2 黄精多糖的中性糖、糖醛酸和蛋白质的质量分数  
Table 2 Content of sugar, uronic acid, and protein in polysaccharides of *P. sibiricum*

多糖	质量分数/%		
	中性糖	糖醛酸	蛋白质
PSW2A-1	70.5	19.6	/
PSW3A-1	50.1	31.6	17
PSW4A	32.1	22.5	45.9
PSW5B	18.4	11.6	71.4

3.3 糖组成分析结果:PSW2A-1 由 GC 分析可得其组成为鼠李糖、阿拉伯糖和半乳糖,摩尔比为 1.7 : 1 : 4.3,经 CMC- $\text{NaBH}_4$  还原后组成摩尔比为 1.7 : 1 : 5.7,说明 PSW2A-1 组成为鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖和半乳糖醛酸,比例为 1.7 : 1 : 4.3 : 1.4,糖醛酸的量与比色法所测的结果一致。

PSW3A-1 的 GC 分析可得其组成为鼠李糖、阿拉伯糖、木糖和半乳糖,摩尔比为 2.4 : 1.5 : 1 : 4.0,经 CMC- $\text{NaBH}_4$  还原后摩尔比为 4.3 : 1.5 : 1 : 9.0。还原前鼠李糖的量测得结果偏低,这是由于鼠李糖部分连接在半乳糖醛酸上,在水解时难以完全释放所致。所以 PSW3A-1 组成应为鼠李糖、阿拉

伯糖、木糖、半乳糖和半乳糖醛酸, 比例为 4.3 : 1.5 : 1 : 4.0 : 5.0, 糖醛酸的量与比色法所测基本一致。

PSW1B-b 由单一半乳糖组成的半乳聚糖; PSW4A 组成为鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖和半乳糖醛酸, 比例为 1 : 1.4 : 1.9 : 0.8; PSW5B 中性糖组成为鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖和葡萄糖, 比例为 1 : 1.5 : 3.4 : 1.3。

3.4 IR 光谱分析和  $^{13}\text{C}$ -NMR 谱: PSW1B-b, PSW2A-1 和 PSW3A-1 的 IR 谱中都显示了典型的糖环结构, 810、870  $\text{cm}^{-1}$  处没有吸收峰, 表明不含有甘露糖。PSW2A-1 和 PSW3A-1 在 1730  $\text{cm}^{-1}$  左右出现吸收峰, 说明可能含有糖醛。PSW1B-b 的  $^{13}\text{C}$ -NMR 谱中,  $\delta$  106.43~10.66 为  $\beta$ -半乳糖的 C-1 吸收峰。PSW2A-1 的  $^{13}\text{C}$ -NMR 谱中,  $\delta$  176.02 为  $\alpha$ -半乳糖醛酸 6 位羰基碳的吸收峰,  $\delta$  109.8~111.8 为  $\alpha$ -阿拉伯糖的 C-1 信号,  $\delta$  19.18 和 18.93 处的吸收峰为  $\alpha$ -鼠李糖的 C-6 信号。PSW3A-1 在  $\delta$  178.02 出现信号较强的半乳糖醛酸吸收峰, 说明含糖醛酸的量较高,  $\delta$  110.3 处吸收峰为  $\alpha$ -阿拉伯糖产生,  $\delta$  107.4 为  $\beta$ -半乳糖产生,  $\delta$  101.7 处吸收峰则为鼠李糖的异头碳信号, 信号归属参阅文献报道<sup>[12]</sup>。

3.5 药理活性“药理试验结果显示所有样品均无细胞毒性, PSW3A-1、PSW4A、PSW5 具有明显的促进免疫功能活性。

#### 4 结论

实验结果表明黄精水提物中含有中性多糖、酸性多糖和糖蛋白复合物, 其主要特征是均含有较高

量的半乳糖。免疫活性实验结果初步表明酸性多糖 (PSW2A-1、PSW3A-1) 的活性高于中性糖 (PSW 1B-b), 而糖蛋白复合物 (PSW 3A-1、PSW 4A、PSW 5B) 的活性也高于一般多糖 (PSW2A-1、PSW 1B-b), 具体的构效关系待进一步研究。

#### References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol. 1. 1995.
- [2] Shi L, Meng Y W, Li W. Progress of *Polygonatum* and its polysaccharides studies on pharmacology [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 1999, 11(3): 67-71.
- [3] Yang M H, Yu D Q. Study on the polysaccharides and oligosaccharides of *Polygonatum sibiricum* [J]. *Chin Pharm J* (药学通报), 1980, 15(7): 44.
- [4] Whistler R L. *Methods in Carbohydrate Chemistry* [M]. New York: Academic Press Inc, 1965.
- [5] Wei Y A, Fang J N. Determination of homogeneity and molecular weight of polysaccharides by HPGPC [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1989, 24(7): 532-536.
- [6] Zhang W J. *Biochemical Techniques in Complex Carbohydrates* (糖复合物生化研究技术) [M]. Hangzhou: Zhejiang University Publisher, 1999.
- [7] Blumencrantz N, Asoe-Hansen G. New method for quantitative determination of uronic acids [J]. *Anal Biochem*, 1973, 54(2): 484-489.
- [8] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the Folin-phenol reagent [J]. *J Biol Chem*, 1951, 193(1): 265-275.
- [9] Duan J Y, Zhen Y. Structural analysis of a pectic polysaccharide from the leaves of *Diospyros kaki* [J]. *Phytochemistry*, 2004, 65(5): 609-615.
- [10] Taylor R L, Conrad H E. Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimideactivated carboxyl groups [J]. *Biochemistry*, 1972, 11(8): 1383-1388.
- [11] Li X Y, Wang J F, Zhu P P, et al. Immune enhancement of a polysaccharide peptide isolated from *Corioliolus versicolor* [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1990, 11(6): 542-545.
- [12] Wang S X, Dong Q, Zuo J P, et al. Structure and potential immunological activity of a pectin from *Cetella asiatica* (L.) Urban [J]. *Carbohydr Res*, 2003, 338(22): 2393-2402.

## 补中益气汤的 LC-MS 分析及其对免疫抑制小鼠的调节作用

高璟春<sup>1,2</sup>, 张金超<sup>2,3</sup>, 陈 瑶<sup>4</sup>, 柏干荣<sup>2</sup>, 杨梦苏<sup>2\*</sup>, 肖培根<sup>1\*</sup>

(1. 中国医学科学院 中国协和医科大学药用植物研究所, 北京 100094; 2. 香港城市大学 生物及化学系, 香港; 3. 河北大学化学与环境科学学院 化学系, 河北 保定 071002; 4. 香港城市大学深圳研究院, 广东 深圳 518057)

**摘要:**目的 研究补中益气汤的主要化学成分及其对环磷酰胺免疫抑制小鼠的调节作用。方法 采用 LC-MS 方法对补中益气汤进行了液相和质谱分析, 通过 MTT 法测定补中益气汤对环磷酰胺免疫抑制小鼠的 T、B 淋巴细胞增殖和 NK 细胞活性的影响。结果 补中益气汤中主要化学成分是多糖、黄酮类和皂苷类化合物, 能够显著提高环

收稿日期: 2005-11-10

基金项目: 国家“863”计划基金资助项目 (2003AA2Z2052)

作者简介: 高璟春 (1980-), 女, 河北人, 中国医学科学院 中国协和医科大学药用植物研究所 2002 级直博生, 主要从事生药学研究。  
E-mail: gjingchun@hotmail.com

\* 通讯作者 肖培根 E-mail: xiaogp@public.bta.net.cn 杨梦苏 E-mail: BHM YANG@cityu.edu.hk