

## References:

- [1] Guo C, Zheng Q M, Zheng H C. Study of the chemical constituents of *Hypericum sampsonii* [J]. *Pharm Care Res* (药学服务与研究), 2005, 5(4): 341-344.
- [2] Xu S H, Zeng L M. Study on the chemical constituents of marine sponge *Polymastia sobustia* [J]. *Chin J Org Chem* (有机化学), 2001, 21(1): 45-48.
- [3] Zhou H Y, Zhang H, Li S M. Chemical constituents from *Phyllostachys pubescens* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2005, 30(24): 1933-1934.
- [4] Wang X, Qin M J, Wu G. Chemical constituents of the leaves of *Iris songarica* [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2006, 37(3): 222-225.
- [5] Wang H Y, Xiao L H, Liu L. Studies on chemical constituents of the roots of *Scutellaria viscidula* Bge. [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2003, 20(5): 339-341.
- [6] Shi X H, Liu Y Q, Kong L Y. Studies on the flavones of *Chrozophora sabulosa* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2006, 31(5): 395-397.
- [7] Qiu Y K, Masayoki Y, Li Y H. A study on the chemical constituents of the stems of *Opuntia Dillenii* (Ker-Gawl.) Haw [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2000, 17(4): 267-268.
- [8] Tian J, Zhao Y M, Luan X H. Study on the chemical constituents in herbs of *Verbena officinalis* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2005, 30(4): 268-269.
- [9] Huang S, Zhou X L, Wang H Y. Chemical studies on the flowers of *Tagetes erecta* L. [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2006, 18(suppl): 57-59.
- [10] Ye W C, Zhao S X, Shen Y L. Studies on the chemical constituents of *Anemone anhuiensis* [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1990, 21(3): 139-141.

## 土人参与多糖的分离及诱导 PC12 细胞分化活性

冉 靓<sup>1,2</sup>, 杨小生<sup>1\*</sup>, 朱海燕<sup>1</sup>, 王伯初<sup>2</sup>

(1. 贵州省、中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵州 贵阳 550002; 2. 重庆大学生物工程学院 生物力学与组织工程教育部重点实验室, 重庆 400030)

土人参与为马齿苋科植物栝兰 *Talinum paniculatum* Gaertn. 的根, 又名参草、紫人参、土炕头、福参、申时花等, 生长于田间、路边、墙角石旁、山坡沟边等阴湿处, 分布于四川、贵州、云南、江苏、安徽、浙江、福建等地, 味甘、淡、性平, 有补中益气, 润肺生津之功效, 可用于治疗气虚劳倦, 食少, 泄泻, 肺癆咳血, 眩晕, 潮热, 盗汗, 月经不调, 产妇乳汁不足等症<sup>[1,2]</sup>。近年来, 对多糖的深入研究表明, 多糖具有多种生物活性<sup>[3]</sup>, 其中, 有研究表明夹竹桃多糖<sup>[4]</sup>, 刺梨多糖<sup>[5]</sup>等有促进 PC12 细胞生长和分化作用。笔者在开展贵州民族药的活性物质筛选时发现, 土人参与的水提取物可诱导 PC12 细胞的分化。因此本实验以活性筛选为导向, 对土人参与多糖进行分离、纯化, 找到了活性多糖, 并对其结构进行了初步研究。

## 1 材料、试剂和仪器

1.1 材料: 土人参与产自贵州省安顺市关岭县, 经贵阳中医学院陈德媛教授鉴定为马齿苋科植物栝兰 *T. paniculatum* Gaertn. 的根。

1.2 仪器与试剂: GC-14C 型气相色谱仪(日本岛津公司); Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国);

HP8453 紫外可见分光光度仪(美国惠普公司); VECTOR22 型傅里叶变换红外光谱仪(德国); EYELA FDU-1100 冷冻干燥机(日本); FORMA 3111 水套式 CO<sub>2</sub> 培养箱(美国); 尼康倒置相差显微镜(日本); DEAE-纤维素(上海恒信化学试剂有限公司); Sepharose CL-6B(瑞典 Pharmacia 公司); 多糖分子量标样 Pullulan 系列(日本东京化成公司); 大鼠嗜铬细胞瘤 PC12 细胞株(中国典型培养物保藏中心); 其他试剂均为进口或国产分析纯。

## 2 实验方法

2.1 粗多糖的提取: 干燥土人参与 2.3 kg, 粉碎, 75%乙醇回流脱脂, 每次 2 h, 反复 2 次。药渣挥干溶剂, 加 8 倍水, 煮沸浸提 2 h, 反复 2 次, 合并滤液。减压浓缩至一定体积, 加入工业乙醇, 使含醇量达到 80%, 静置过夜, 抽滤, 依次用 95%乙醇、丙酮洗涤沉淀, 收集沉淀, 于真空干燥箱中 60 °C 干燥得土人参与粗多糖(*T. paniculatum* polysaccharides, TPP)。

## 2.2 粗多糖的纯化

2.2.1 DEAE-纤维素离子交换色谱(OH<sup>-</sup>型): 取土人参与粗多糖 10.0 g 溶于水, 3 000 r/min 下离心

收稿日期: 2006-06-11

基金项目: 国家重大基础研究前期研究专项(2004CCA03800); 贵州省优秀科技人才培养计划项目[黔科合人字(2002)0205号]

作者简介: 冉 靓(1980-), 女, 重庆市人, 硕士研究生, 主要从事活性多糖的分离纯化。

\* 通讯作者 杨小生 Tel: (0851)5380459 E-mail: yang\_xiaosheng@yahoo.com

10 min,以 DEAE-纤维素柱色谱分离,依次用蒸馏水、1.0 mol/L 为上限的 NaCl 溶液,0.2 mol/L 为上限的 NaOH 溶液洗脱,以硫酸-苯酚法跟踪检测。10.0 g TPP 经 DEAE-纤维素柱色谱分离,分别得到 TPP1(180 mg)、TPP2(631 mg)、TPP3(1.625 g)、TPP4(579 mg)、TPP5(467 mg) 5 个组分。根据活性筛选结果,对 TPP3 和 TPP5 两个组分进一步分离纯化。TPP3(400 mg)、TPP5(400 mg) 经 Sepharose CL-6B (100 cm×2.6 cm) 柱色谱分离分别得 1 个主要成分 TPP3a(169 mg)、TPP5b(105 mg)。TPP3a 和 TPP5b 在 Sepharose CL-6B 柱(80 cm×1.6 cm) 上的洗脱峰均呈单一对称峰;2 种多糖在聚丙烯酰胺盘状电泳上均呈单一条带,同时 TPP3a 和 TPP5b 的紫外光谱均显示其在 260 nm 和 280 nm 处未见明显特征吸收峰。

2.2.2 Sepharose CL-6B 凝胶色谱(100 cm×2.6 cm):以 0.2 mol/L NaCl 溶液洗脱,体积流量为 30 mL/h,分部收集,以硫酸-苯酚法跟踪检测多糖峰,合并高峰部分,透析,冷冻干燥。

### 2.3 纯度检测

2.3.1 聚丙烯酰胺盘状电泳<sup>[6]</sup>:聚丙烯酰胺浓度 5%,电泳缓冲液为 0.025 mol/L 硼砂-硼酸缓冲液(pH 9.0),每管 3 mA,电泳 8 h,上样量 50 μL(含糖量 50 μg),阿利新蓝染色。

2.3.2 Sepharose CL-6B 凝胶色谱(80 cm×1.6 cm):以 0.2 mol/L NaCl 溶液洗脱,流速为 30 mL/h,每管收集 3 mL,用硫酸-苯酚法跟踪检测多糖峰。

2.3.3 紫外光谱:多糖样品 1 mg/mL 水溶液,以蒸馏水做空白,进行 200~400 nm 紫外扫描。

2.4 相对分子质量测定:凝胶渗透色谱法测定多糖相对分子质量。色谱柱 Agilent PL aquagel-OH MIXED (300 mm×7.5 mm, 8 μm),流动相为 0.2 mol/L 的 HAC-NaAC 缓冲体系,体积流量 1 mL/min,上样量 50 μL,柱温 30 °C,柱压 39×10<sup>5</sup> Pa。

### 2.5 单糖组成分析

2.5.1 纸色谱:取 TPP3a 和 TPP5b 各 10 mg,加入 2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 各 3 mL,于 100 °C 油浴中水解 10 h,冷却后加入 BaCO<sub>3</sub> 中和至中性,3 000 r/min 下离心除去沉淀,取上清液,点样于新华 1 号滤纸,以醋酸乙酯-醋酸-水(3:1:3)展开,苯胺-邻苯二甲酸喷雾,置 100 °C 加热 5 min,显色。对照单糖为葡萄糖、甘露糖、果糖、半乳糖、木糖、鼠李糖、阿拉伯糖。

2.5.2 气相色谱:取多糖 TPP3a 和 TPP5b 各 10 mg,加入 2 mol/L 三氟醋酸各 3 mL,封管,于 100

°C 下水解 6 h。按文献方法<sup>[7]</sup>制备样品和单糖对照品的糖醇乙酸酯衍生物进行气相分析。色谱条件:色谱柱为 OV-275 石英毛细管柱(30 m×0.32 mm×0.25 μm),柱温以 10 °C/min,从 180 °C 升至 250 °C,保持 5 min,检测器和进样器温度均为 250 °C,氮气作载气,分流比 10:1。根据单糖对照品的保留时间和校正因子,判断单糖组成。

2.6 红外光谱分析:取干燥多糖样品 2 mg 与 KBr 混合研细后,压片,在 400~4 000 cm<sup>-1</sup> 进行红外扫描。

2.7 诱导大鼠嗜铬神经瘤 PC12 细胞分化实验:实验设阳性对照组、空白对照组和样品组 3 个实验组,以神经生长因子(NGF)为阳性对照,生理盐水为空白对照,样品组平行 3 个个。取适量生长良好的 PC12 细胞,以每孔 3×10<sup>3</sup> 个细胞接种于 96 孔酶标板中(培养液为 85%DEME、10%灭活马血清、5%灭活胎牛血清、链霉素 100 μg/mL、青霉素 100 U/mL),然后分别加入 NGF、样品和生理盐水至孔中,使 NGF 和样品质量浓度分别达到 100 ng/mL、20 μg/mL,最后置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养,3~4 d 换 1 次培养液,14 d 后在相差显微镜下观察细胞形态。

## 3 结果

3.1 土人參多糖的分离纯化:2.3 kg 干燥土人參制得土人參粗多糖(TPP)253.563 g。TPP 的紫外光谱显示其在 260 nm 和 280 nm 处无明显特征吸收峰,而且 TPP 的双缩脲反应呈阴性,说明土人參粗多糖中的蛋白质的量较少。硫酸-苯酚法测得 TPP 中总糖的质量分数为 56.82%。

3.2 土人參多糖组分的物理性状:经冷冻干燥后,TPP3a 为白色絮状粉末,TPP5b 为浅褐色絮状粉末;均易溶于水,不溶于高体积分数乙醇、丙酮、醋酸乙酯、正丁醇等有机溶剂;与硫酸-苯酚反应均呈橘黄色;TPP3a 与硫酸呋啉试剂反应呈玫瑰红色,经测定其糖醛酸质量分数为 20.57%,TPP5b 与硫酸呋啉试剂反应为阴性;由凝胶渗透色谱(GPC)检测,TPP3a 的相对分子质量为 1.076×10<sup>5</sup>,TPP5b 的相对分子质量为 8.452×10<sup>3</sup>。

3.3 土人參多糖组分的单糖组成分析:纸色谱结果表明 TPP3a 中含有半乳糖、阿拉伯糖和鼠李糖,而 TPP5b 中含有葡萄糖。根据气相色谱分析结果,TPP3a 由鼠李糖、阿拉伯糖和半乳糖组成,其物质的量比为:0.81:1.04:1.00,而 TPP5b 由甘露糖和葡萄糖组成,其物质的量比为 1.00:4.50。

3.4 土人參多糖组分的红外光谱分析:红外光谱表

明 TPP3a 和 TPP5b 均在  $4\ 000\sim 400\ \text{cm}^{-1}$  具有多糖类物质的一般特性。2 种多糖在  $3\ 400\ \text{cm}^{-1}$  左右的吸收峰是糖类分子间或分子内氢键的伸缩振动峰,  $2\ 930\ \text{cm}^{-1}$  附近的弱吸收峰是 C—H 的伸缩振动峰, 以上两组峰是糖类的特征峰。TPP3a 在  $1\ 612\ \text{cm}^{-1}$ ,  $1\ 424\ \text{cm}^{-1}$  的吸收峰分别是羧基中 C=O 的非对称伸缩振动峰、C—O 的伸缩振动峰, 这与 TPP3a 中含有糖醛酸的结果相吻合; 在  $1\ 100\sim 1\ 010\ \text{cm}^{-1}$  的 3 个吸收峰, 说明 TPP3a 中存在吡喃糖苷, 而其在  $894\ \text{cm}^{-1}$  处的特征吸收峰则是吡喃糖  $\beta$  型 C—H 的变角振动吸收峰。TPP5b 在  $1\ 650\ \text{cm}^{-1}$  附近的吸收峰是酰胺基中 C=O 的伸缩振动峰, 而其在  $1\ 413\ \text{cm}^{-1}$  附近的吸收峰则属酰胺 III 带, 这说明 TPP5b 中存在酰胺基; 此外 TPP5b 在  $1\ 079\ \text{cm}^{-1}$ ,  $1\ 025\ \text{cm}^{-1}$  处的吸收峰, 说明该多糖中存在呋喃糖苷, 而其在  $937\ \text{cm}^{-1}$  处的吸收峰则对应呋喃环的对称伸缩振动。

3.5 诱导大鼠嗜铬神经瘤 PC12 细胞分化实验结果: 在相差显微镜下对细胞形态观察表明, 空白对照组细胞呈球形, 阳性对照组细胞已分化出明显的神经样突触, 含  $20\ \mu\text{g}/\text{mL}$  TPP5b 的样品组细胞有部分已分化出神经样突触, 而其他样品组细胞仍成球形, 无神经样突触产生, 这说明在  $20\ \mu\text{g}/\text{mL}$  质量浓度下, TPP5b 对 PC12 细胞的生长有一定的促分化作用, 具有一定的神经营养活性。

#### 4 讨论

土人參粗多糖中含有大量淀粉, 淀粉成分的存在对活性多糖成分的分离纯化和跟踪造成了一定的干扰, 因此在后续处理过程中反复采用溶解、离心的方法, 达到除去大部分淀粉的目的。土人參粗多糖呈褐色, 颜色较深, 本实验中采用 DEAE-纤维素分离无色多糖和有色多糖, 不仅脱去植物多糖中游离色素, 而且保持了多糖的天然本色, 同时在一定程度上避免了活性炭或双氧水等脱色方法对多糖造成的损失或破坏。

本实验采用糖醇醋酸酯衍生物气相色谱法测定单糖组成, 可避免衍生物异构体的产生, 但该方法不能检出己糖醛酸, 而在糖醛酸的量的测定中, 发现

TPP3a 含糖醛酸为 20.57%, 但究竟是何种糖醛酸有待进一步的证实。对 2 种多糖的红外光谱的分析显示, TPP3a 中含有  $\beta$  型吡喃糖苷, TPP5b 中有呋喃糖苷, 但呋喃糖苷的类型无法从红外光谱上直接识别, 需要通过核磁共振等手段进行鉴定。

从 20 世纪五六十年代起, 人们逐渐发现多糖具有抗肿瘤、抗病毒、抗衰老、抗凝血、抗溃疡、降血糖、降血脂等药理作用, 并开展了广泛的研究, 但是在众多的活性多糖研究中, 多糖对神经系统作用的研究报道相对较少<sup>[8,9]</sup>。然而随着社会的发展, 神经系统退行性疾病的发病率急剧上升, 对神经系统作用的药物研究已成为一项热点<sup>[10]</sup>, 因此在多糖中寻找具有神经营养活性的物质, 是一件有意义的工作。

#### References:

- [1] Editorial Board of China Herbal, State Administration of Traditional Chinese Medicine, China. *China Herbal* (中华本草) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1999.
- [2] Editorial Office of National Chinese Herbal Medicine Collection. *Collection of National Chinese Herbal Medicine* (全国中草药汇编) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1975.
- [3] Ding B J, Jin L Q, Nü J X. The progress on biological activities of polysaccharides [J]. *Chin Pharm J* (中国药学报), 2004, 39(8): 561-564.
- [4] Fang J N, Ding K. The preparation, application of the polysaccharide from *Nerium indicum* Mill and its derivatives [P]. CN: 1301774A, 2001-07-04.
- [5] Yang J, Chen F X, Liang G Y. The protective effect of polysaccharides from *Rosa roxburghii* Tratt on neural stem cells damaged by glutamic acid [J]. *Acta Nutr Sin* (营养学报), 2005, 27(4): 339-341.
- [6] Wu W T, Yu P H, Xia E N, et al. Isolation, purification and identification of three polysaccharides TF-A, TF-B and TF-C from *Tremella fuciformis* Berk [J]. *Acta Biochim Biophys Sin* (生物化学与生物物理学报), 1984, 16(4): 393-397.
- [7] Zhang W J. *Biochemical Techniques in Complex Carbohydrates* (糖复合物生化研究技术) [M]. Hangzhou: Zhejiang University Press, 1994.
- [8] Wang Z, Fang J N. An antioxidant acid polysaccharide from *Cuscuta chinensis* [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 2001, 43(3): 243-248.
- [9] Li S P, Zhao K J, Ji Z N, et al. A polysaccharide isolated from *Cordyceps sinensis*, a traditional Chinese medicine, protects PC12 cells against hydrogen peroxide-induced injury [J]. *Life Sci*, 2003, 73: 2503-2513.
- [10] Yin H, Du G H. Screening of small molecules inducing PC12 cell differentiation [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2004, 21(2): 174-177.