

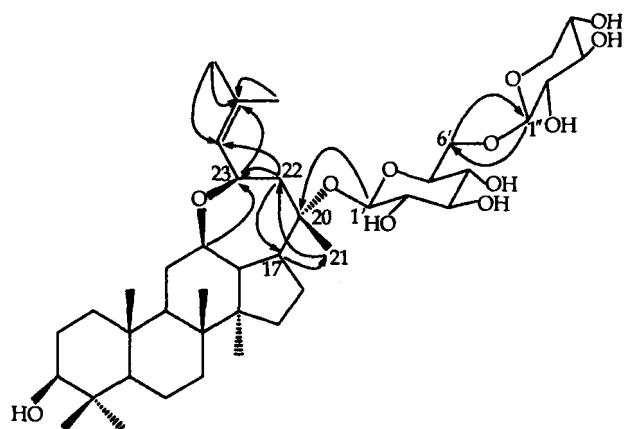


图 1 notoginsenoside-LZ 的化学结构及主要的 HMBC 相关
Fig. 1 Chemical structure and key HMBC correlations of notoginsenoside-LZ

据文献^[4]中所定 H-12 位于 α 位,所以化合物的 H-23 也位于 α 位,而甲基 H₃-12 位于 β 位。由于其 C-17、20、21、22、23、24、25 数据, H-12、22、23 数据及偶合裂分情况与文献中化合物的数据^[4]几乎一致,

说明它们侧链上碳的立体构型应该也是一致的,可知化合物的 20 位手性为 S 构型。

综上所述,根据理化性质及波谱手段解析,推断化合物 notoginsenoside-LZ 的结构为 20(S)-3 β -hydroxy-12 β , 23-epoxy-dammar-24-ene-20-O- β -D-xylopyranosyl(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranoside,是未见文献报道的新化合物,命名为三七皂苷-LZ。

参考文献:

- [1] 韩颖,姜彬慧,胡筱敏,等. *Fusarium sacchari* 转化三七茎叶皂苷的稀有抗肿瘤成分 [J]. 中草药, 2007, 38(6): 830-832.
- [2] Kejiang H E, Liu Y, Yang Y, et al. A dammarane glycoside derived from ginsenoside Rb₃ [J]. *Chem Pharm Bull*, 2005, 53(2): 177-179.
- [3] 陈英杰,张绍林,王站星,等. 人参叶中微量新皂甙 La 的分离与鉴定 [J]. 药学学报, 1990, 25(5): 379-381.
- [4] Dou D Q, Chen Y J, Liang L H, et al. Six new dammarane-type triterpene saponins from the leave of *Panax ginseng* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2001, 49(4): 442-446.

黄芪多糖 MAPS-5 的化学结构及其体外淋巴细胞增殖活性

林梦感,杨义芳*,许海燕

(上海医药工业研究院 中药研究室,上海 200040)

摘要:目的 研究黄芪多糖 MAPS-5 的化学结构及其体外淋巴细胞增殖活性。方法 联用微波辅助提取和膜过滤富集黄芪粗多糖,经 DEAE-Cellulose 弱阴离子交换树脂及 Sephacryl S-400HR 凝胶柱色谱纯化得到一个黄芪均一多糖 MAPS-5。采用酸水解、GC、IR、高碘酸氧化、Smith 降解、甲基化、NMR、刚果红反应、原子力显微镜、电镜扫描等方法对其化学结构进行研究。并利用对刀豆蛋白(Con A)和脂多糖(LPS)诱导小鼠脾脏淋巴细胞增殖的影响,研究 MAPS-5 的免疫调节活性。结果 MAPS-5 是由 α -D-(1-4)GlcP 连接构成主链,且平均约每 15 个糖残基中有 2 个糖残基的 C-6 位被末端葡萄糖取代,其相对分子质量为 1.32×10^4 ;构象研究表明 MAPS-5 的糖链在水溶液中不具备三股螺旋结构。MAPS-5 体外可促进由 Con A 诱导的 T 淋巴细胞增殖($P < 0.01, 0.001$),但对 LPS 诱导的 B 淋巴细胞增殖没有显著影响($P > 0.05$)。结论 MAPS-5 是黄芪中首次分离到的均一葡聚糖,具有促进由 Con A 诱导的 T 淋巴细胞增殖的活性。

关键词:黄芪多糖;黄芪多糖 MAPS-5;淋巴细胞;增殖

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)12-1865-04

黄芪是豆科植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge 或蒙古黄芪 *Amembranaceus* (Fisch.) Bunge var. *mongholicus* (Bunge) Hsiao 的干燥根,是重要的益气中药^[1]。黄芪多糖(*Astragalus polysaccharide*, APS)是黄芪的主要成分之一,自 1982 年以来^[2],从中分离了 10 余个多糖成分,药理研究也表明黄芪多糖具有多种明显的生

物活性,有免疫调节、抗肿瘤、抗辐射、抗缺氧、以及对肝脏和心血管系统的保护作用等功效^[3],但是微波辅助提取的黄芪多糖在化学和免疫活性方面的研究尚未见报道。微波辅助提取可能对多糖的结构和活性造成影响,通过不同工艺的黄芪多糖对环磷酰胺治疗后的 H₂₂ 荷瘤小鼠的免疫功能的影响试验发现:微波提取的黄芪多糖给药组比回流提取的黄芪

收稿日期:2009-03-26

基金项目:国家“重大新药创制”科技重大专项资助(项目编号 2009ZY09301-007)

作者简介:林梦感(1984—),男,硕士,专业方向为生药学。

* 通讯作者 杨义芳 Tel:(021)62473018 E-mail:yangyf4912@163.com

多糖给药组的脾指数和白细胞计数均显著提高($P<0.05$)。因此,本实验对微波辅助提取的黄芪多糖有效部位进行纯化,首次从该植物中分离得到均一的葡聚糖 MAPS-5。通过对多糖 MAPS-5 进行体外淋巴细胞增殖活性的评价,发现 MAPS-5 具有显著促进 T 淋巴细胞增殖活性。有鉴于此,笔者对多糖 MAPS-5 的一级结构进行了系统研究,并对其高级结构作了初步的探讨。

1 实验部分

1.1 材料、试剂和仪器:黄芪药材购于山西浑源县中药饮片厂(生产批号 981101),经杨义芳研究员鉴定为蒙古黄芪的根。

单糖对照品:鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、半乳糖、葡萄糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸为 Fluka 产品。多糖均一性和相对分子质量测定用标准品 Dextran D 系列(中国药品生物制品检定所)。DMSO 系 E. Merck Darmstadt 公司生产,用前以 0.4 nm 分子筛处理。碘甲烷为中国远航试剂厂(上海)生产,AR 级,用前重蒸。其他试剂均为国产 AR 级。

透析袋-34-3 500(进口分装,截留相对分子质量 3500,上海绿鸟科技发展有限公司),DEAE-cellulose DE52(英国 Whatman 公司)生产,Sephacryl S-400 HR(瑞士 Pharmacia 公司)。

ZD-2 型自动电位滴定计为上海雷磁仪器厂生产。UV-2500 PC 型紫外可见分光光度计(日本 Shimadzu 公司);Waters 高效液相色谱系统(美国 Waters 公司);Agilent 6890/5973 N GC-MS 气相色谱-质谱联用仪(美国 Agilent 公司);NEXUS 670FT-IR 傅里叶变换红外光谱仪(美国 Thermo Nicolet 公司);Bruker AVANCE-500 超导傅里叶变换核磁共振波谱仪(瑞士 Bruker 公司)。AJ-VIII 型原子力显微镜(上海爱健纳米公司);JSM-6360LV 型扫描电镜及 Falcon 型能谱仪(JEOL 公司,日本)。

1.2 提取与分离:黄芪根粗粉经微波辅助提取、膜滤过、冻干,制得黄芪精多糖 MAPS^[4]。取精多糖用适量水溶解后透析,取透析袋内液进行浓缩,上 DEAE-纤维素柱色谱,用水洗脱至无糖,再用 0.01 mol/L NaCl 洗脱,分步收集,苯酚-硫酸法检测,主峰多糖组分再经 Sephacryl S-400 HR 柱色谱反复分离纯化,冻干后得白色多糖 MAPS-5。经 HPG-PC 检测表明单一对称峰形,证明为均一组分。

1.3 淋巴细胞增殖实验:用 10% 胎牛血清的 L-DMEM 制备小鼠脾细胞悬液(2×10^6 /mL)。加入 96 孔细胞培养板,每孔 100 μ L,再加入 50 μ L 的

Con A 或 LPS(终质量浓度为 2.5 μ g/mL 或 10 μ g/mL),最后加入不同量的 MAPS-5(终质量浓度为 10、50、100 μ g/mL),每孔培养液补足为 200 μ L。将细胞培养板置于含有 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 培养箱中培养 72 h。按照 MTT 法^[5]测淋巴细胞的增殖活性。

1.4 结构鉴定

1.4.1 相对分子质量测定^[6]:采用高效凝胶渗透色谱(HPGPC)法测定样品(MAPS-5)的相对分子质量,以标准 Dextran D 系列葡聚糖作标准曲线,分析条件:TSK gel GMP_{XL} 300 $\times$ 7.8 mm 凝胶色谱柱,流动相为纯水,体积流量为 0.3 mL/min,柱温为 35 $^\circ\text{C}$,示差折光检测器检测。

1.4.2 单糖组成分析^[7]:取 MAPS-5 3~5 mg,放入 5 mL 安瓿瓶中,加入 2 mol/L 三氟醋酸(TFA)2 mL,充 N_2 后封管,在 110 $^\circ\text{C}$ 油浴下水解 4 h,水解液用甲醇减压共蒸除尽 TFA。完全酸水解产物 NaBH_4 还原,醋酐乙酰化制备阿尔迪醇乙酸酯衍生物,进行 GC 分析。气相条件:HP-5 毛细管色谱柱(30 m $\times$ 0.25 mm),氮气 1 mL/min;升温程序:170 $^\circ\text{C}$ (5 min) $\xrightarrow{3\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}}$ 210 $^\circ\text{C}$ $\xrightarrow{1\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}}$ 215 $^\circ\text{C}$ $\xrightarrow{10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}}$ 250 $^\circ\text{C}$ (5 min)。

1.4.3 高碘酸反应及 Smith 降解:取 MAPS-5 25 mg,加 0.015 mol/L NaIO_4 溶液 25 mL,4 $^\circ\text{C}$ 下于暗处进行氧化反应,紫外光谱(UV)法检测反应过程,反应完全后,按文献方法^[8]处理反应产物,经酸全水解、 NaBH_4 还原及乙酰化后进行 GC 分析。GC 条件同 1.4.2 项。

1.4.4 甲基化分析^[9]:取 P_2O_5 干燥的 MAPS-5 10 mg,按 Hakomori 法甲基化,将甲基化产物以 88% 甲酸解聚 6 h,2 mol/L TFA 110 $^\circ\text{C}$ 水解 4 h, NaBH_4 还原,醋酐乙酰化制备部分甲基化阿尔迪醇乙酸酯衍生物后进行 GC-MS 分析。GC 条件:同 1.4.2 项。MS 条件:EI 离子源,电子能量 70 eV,扫描范围 40~400 m/z,离子源温度 250 $^\circ\text{C}$,接口温度 250 $^\circ\text{C}$ 。

1.4.5 刚果红反应^[10]:取 3 mg 多糖,加 1.2 mL 蒸馏水和 1.2 mL 80 μ mol/L 刚果红试剂,逐渐加 4.0 mol/L NaOH,使溶液中 NaOH 浓度在 0~0.5 mol/L,室温下放置 10 min,在 200~700 nm 扫描,将得到的刚果红最大吸收波长作为纵坐标,NaOH 溶液浓度为横坐标,作关系图。另取 80 μ mol/L 的刚果红溶液与 NaOH 溶液混合,NaOH 终浓度与上述一致,在 200~700 nm 扫描,以作参照。

1.4.6 原子力显微镜观察^[11]:把经纯化后的多糖溶于去离子水中(1 mg/mL),充分溶解后再梯度稀释。通过稀释使样品减少大聚集体的存在,能更清楚地观察多糖的形貌。取样品溶液 5 μL 滴在新鲜解离的云母片上,样片干燥后直接进行原子力显微镜观察。

1.4.7 扫描电镜观察^[12]:取大小厚度适合于样品室要求的干燥的多糖样品粘着于样品台上,置真空镀膜仪内镀一层导电膜(金)后,采用扫描电镜进行观察。

2 结果与讨论

2.1 MAPS-5 的体外淋巴细胞增殖活性:MAPS-5 在体外对小鼠脾脏淋巴细胞转化的影响的结果见表 1。从表 1 中可以看出,MAPS-5 具有显著地促进 T 淋巴细胞增殖活性($P<0.01,0.001$),而对 LPS 诱导小鼠脾脏 B 淋巴细胞增殖反应没有明显影响。这提示 MAPS-5 可能是通过激活 T 淋巴细胞,刺激 T 淋巴细胞增殖,从而发挥其免疫活性。

表 1 MAPS-5 在体外对 Con A 或 LPS 诱导的小鼠脾脏淋巴细胞增殖的影响($\bar{x}\pm s,n=3$)
Table 1 Effects of MAPS-5 on proliferation of T lymphocytes induced by Con A or B lymphocytes induced by LPS in ICR mouse splenocyte in vitro ($\bar{x}\pm s,n=3$)

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	Con A (A_{570})	LPS (A_{570})
对照	—	0.185±0.013	0.196±0.014
MAPS-5	10	0.314±0.009***	0.163±0.030
	50	0.335±0.015***	0.204±0.028
	100	0.281±0.023**	0.190±0.013

与对照组比较:** $P<0.01$ *** $P<0.001$
** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs control group

2.2 MAPS-5 的结构鉴定

2.2.1 MAPS-5 的一级结构:MAPS-5,白色无定形水溶性多糖,经高效凝胶柱色谱证明为均一多糖组分,其重均相对分子质量为 1.32×10^4 。

紫外扫描在 280 nm 和 260 nm 波长处无吸收,说明不含蛋白质和核酸,茚三酮反应呈阴性也证明不含蛋白质。红外光谱在 $1\,730\text{ cm}^{-1}$ 处没有糖醛酸的特征吸收峰,说明不含糖醛酸。

经酸全水解,产物用 GC 分析证明仅含葡萄糖。红外光谱除具有多糖类共同特征吸收峰外,在 848 cm^{-1} 处有吸收峰,示其存在 α -糖苷键。

MAPS-5 经甲基化后,用 90% 甲酸解聚,2 mol/L TFA 全水解,NaBH₄ 还原和醋酐乙酰化制成部分甲基化的阿尔迪醇乙酸酯衍生物,然后进行 GC-MS 分析,通过与标准质谱图对照,结果发现有 2,3,4,6-Me₄-Glc、2,3,6-Me₃-Glc 和 2,3-Me₂-Glc 等衍生物,说明含有末端 Glc 及 1→4 和 1→4,6 连接的 Glc,且三者的摩尔比为 1.0 : 5.6 : 1.0。MAPS-5 的链接片断的结果如图 1 所示。高碘酸氧化和 Smith 降解结果表明,其降解产物为甘油和赤藓醇,这一结果也与甲基化结果一致。

在 MAPS-5 的 ¹H-NMR 谱中,在 $\delta\,4.6\sim 5.5$ 的范围内低场区域是只出现两组异头氢的区域, $\delta\,5.44$ 和 5.40 的强信号为 α -(1→4)-D-Glc 和非还原末端 Glc 的异头氢信号, $\delta\,5.01$ 处的信号为 (1→4,6)- α -D-Glc 异头氢信号^[13]。其他大部分质子共振峰出现在 $\delta\,3.5\sim 4.5$,这部分信号相互重叠,难以分辨。在 ¹³C-NMR 谱中,异头碳区域也出现相对应的信号; $\delta\,102.3\sim 102.4$ 的强信号为 (1→4)- α -D-Glc 和非还原末端 Glc 的 C-1 信号,而 $\delta\,101.1$ 为 (1→4,6)- α -D-Glc 的 C-1 信号。另外,在较高场区的峰 $\delta\,63.18$,应为 C-6 的信号;在较低场区的峰 $\delta\,79.51$,应为 (1→4)-D-Glc 和 (1→4,6)-D-Glc 的 C-4 的信号^[13]。

综合上述分析结果,MAPS-5 的结构特征可以描述为 MAPS-5 是由 D-Glc 组成的葡聚糖,不含蛋白质和核酸,相对分子质量为 1.32×10^4 。它是一个具有分支的 (1→4)- α -葡聚糖,主链上平均约每 15 个糖残基中有 2 个糖残基的 C-6 位被末端葡萄糖取代,其结构如图 1 所示。

2.2.2 MAPS-5 的高级结构:刚果红(Congo Red)可与具有三股螺旋链构象的多糖形成络合物。在一定的 NaOH 浓度范围内(0.15~0.25 mol/L),多糖有序的三股螺旋结构逐渐被破坏,而转变为单螺旋

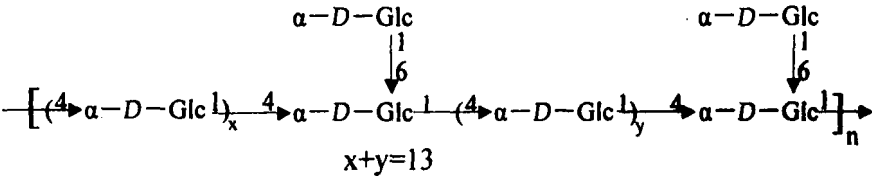


图 1 MAPS-5 可能的结构
Fig. 1 Putative structure of MAPS-5

结构,最大吸收波长也开始急剧下降^[14,15]。MAPS-5的刚果红反应结果表明,MAPS-5在水溶液中不产生该现象,因此推测其糖链在水溶液中是不具备三股螺旋结构的,而可能是以比较低级的单股螺旋形式存在的。

MAPS-5的原子力显微镜照片如图2所示。MAPS-5聚集成大小、高低不等的“屋顶状”小圆球状颗粒,局部有火焰状突起。圆球状颗粒的大小、高低不等,是由于多糖分子间的团聚能力不一。

图3是多糖MAPS-5的扫描电镜照片,经喷金后MAPS-5的表面有的形成“薯片”状,有的形成“蛋卷式”筒状,还有一些形成“花生样”颗粒状,此状态是由许多分子或分子聚合物聚集成不同式样的束造成的;在高倍镜下,表面致密,平整,说明多糖分子间相互作用较强,结合紧密^[16]。

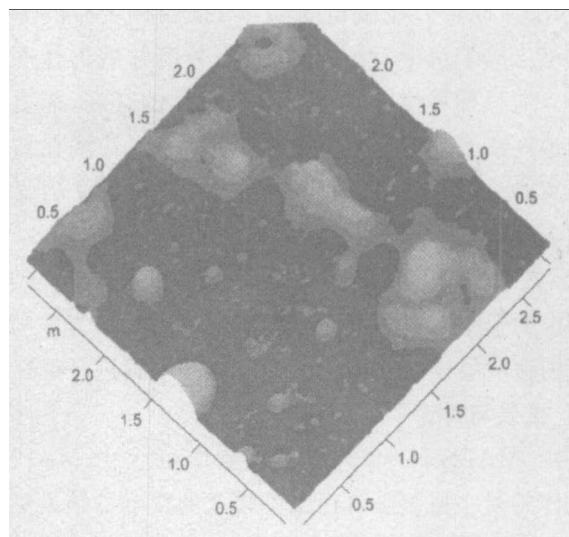


图2 MAPS-5的原子力显微镜照片

Fig. 2 Atomic force microscope photo of MAPS-5

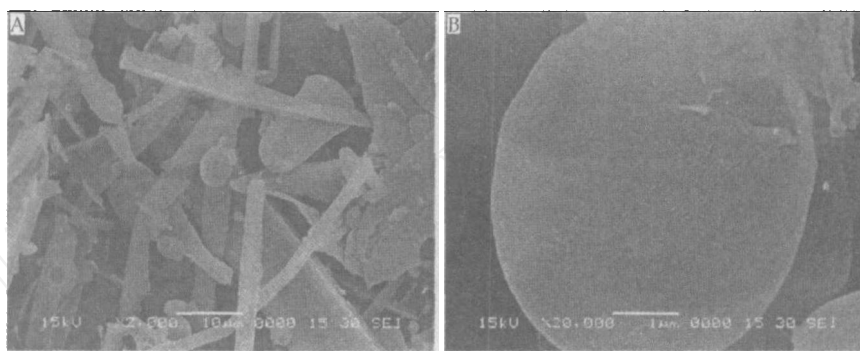


图3 MAPS-5在低倍镜(A)和高倍镜(B)下的扫描电镜照片

Fig. 3 SEM Photos of MAPS-5 observed with low power lens (A) and high power lens (B)

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部, 2005.
- [2] 方圣鼎, 陈燕, 徐小异, 等. 中药黄芪有效成分的研究[J]. 有机化学, 1982(1): 26-29.
- [3] 黄楨. 黄芪多糖的药理研究进展[J]. 中国临床药理学杂志, 2002, 11(5): 315-318.
- [4] 许海燕. 固元多糖苷提取物及其前体脂质体的研究[D]. 上海: 上海医药工业研究院, 2006.
- [5] 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2001.
- [6] Alsop R M, Vlachogiannis G J. Determination of the molecular weight of clinical dextran by gel chromatography on TSK PW TYPE columns[J]. *J Chromatogr*, 1982, 246: 227-240.
- [7] Honda S, Suzuki S, Kakehi K. Analysis of the monosaccharide compositions of total non-dialyzable urinary glycoconjugates by the dithioacetal method[J]. *J Chromatogr*, 1981, 226: 341-350.
- [8] 张惟杰. 复合多糖生化研究技术[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1987.
- [9] Hakomori S. A rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide[J]. *J Biochem*, 1964, 55: 205-208.
- [10] 白日霞. 红海藻多糖的提取和结构研究[J]. 天然产物研究与开发, 1999, 11(4): 45-48.
- [11] 蔡林海, 李萍, 陆阻宏. 原子力显微镜观察虫草多糖的分子结构形貌[J]. 电子显微学报, 1999, 18(1): 103-105.
- [12] 刘如林, 杨春. 小核菌多糖分子形貌的电镜研究[J]. 南开大学学报: 自然科学版, 1995, 28(1): 68-71.
- [13] Shi L, Fu Y L, Chen K S. A novel water-soluble α -(1 $\rightarrow$ 4)-glucan from the root of *Cudrania tricuspidata* [J]. *Fitoterapia*, 2007, 78(4): 298-301.
- [14] Hara C, Kiho T, Ukai S. Anti-inflammatory activity and conformational behavior of a branched (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucan from an alkaline extract of *Dictyophora indusiata* Fisch. [J]. *Carbohydr Res*, 1982, 110(1): 77-87.
- [15] Hara C, Kiho T, Ukai S. Anti-inflammatory (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucan [J]. *Carbohydr Res*, 1983, 117: 201-213.
- [16] 倪德江, 陈玉琼, 谢笔钧, 等. 乌龙茶多糖 OTS 2-1 的光谱特性、形貌特征及热特性研究[J]. 高等学校化学学报, 2004, 25(12): 2263-2268.