

冬凌草多糖 RPPSIIa 的分离纯化及其性质研究

刘芳^{1,2}, 刘桂友¹, 周晶^{1*}, 车宪平³, 韩瑞发⁴

1. 天津医科大学药学院, 天津 300070

2. 天津医学高等专科学校, 天津 300222

3. 海南省农垦总局医院 泌尿外科, 海南 海口 570311

4. 天津医科大学第二医院 泌尿外科, 天津市泌尿外科研究所, 天津 300211

摘要: 目的 从冬凌草 *Rabdosia rubescens* 中提取分离获得多糖组分 RPPSIIa, 并分析其结构性质和探讨免疫活性, 为冬凌草临床应用与进一步开发利用提供参考。方法 主要采用水提醇沉透析得冬凌草多糖, 经分级醇沉, Sephadex G-100 凝胶色谱柱纯化得 RPPSIIa, 应用 HPLC、IR、LC、UV 等方法对冬凌草多糖进行组成结构分析及理化性质研究, 通过 MTT 比色法观察该组分在体外对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响。结果 冬凌草多糖 RPPSIIa 为均一组分, 其单糖组成为鼠李糖、葡萄糖, 二者比为 7:93, RPPSIIa 具有典型的多糖吸收峰, 其结构中存在 α -型糖苷键; RPPSIIa 在 5~100 $\mu\text{g/mL}$ 能有效刺激小鼠脾淋巴细胞增殖, 5、50 $\mu\text{g/mL}$ 均能有效增强刀豆蛋白 A (ConA) 诱导的淋巴细胞增殖反应。结论 多糖 RPPSIIa 是由冬凌草中提取的均一葡聚糖, 具有较强的免疫生物活性。

关键词: 冬凌草; 多糖; 免疫活性; 冬凌草多糖 RPPSIIa; 葡聚糖

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)02-0241-03

Isolation and purification of polysaccharide RPPSIIa from *Rabdosia rubescens* and its activity

LIU Fang^{1,2}, LIU Gui-you¹, ZHOU Jing¹, CHE Xian-ping³, HAN Rui-fa⁴

1. College of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

2. Tianjin Medical College, Tianjin 300222, China

3. Department of Urology, Second Hospital, Hainan Provincial Nongken Hospital, Haikou 570311, China

4. Department of Urology, Tianjin Institute of Urology, Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China

Key words: *Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara; polysaccharide; immunological activity; RPPSIIa; dextran

冬凌草 *Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara, 又名冰凌草, 别名碎米桠、雪花草, 系唇形科香茶菜属多年生草本植物^[1-2]。目前研究多集中在其二萜类等脂溶性成分上^[3], 从民间用其水煎液治病来看, 其药效学物质基础除了脂溶性成分之外, 也包括水溶性成分。本实验选用水热提、乙醇沉淀和乙醇分级沉淀方法, 从经 95%乙醇脱脂除杂的冬凌草药渣中分离得到冬凌草多糖 (RPPS) 4 个组分, 通过 MTT 比色法观察比较各组分在体外对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响, 优选得到活性较强的 RPPSIIa, 并利用纸色谱和高效液相色谱法, 确定该多糖的单糖组成, 同时根据其红外光谱推断该多糖组分的结构特征, 为进一步研究其构-效关系提供依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

野生冬凌草购自河南省济原市愚公家珍冬凌草有限公司, 经河南中医学院屈淼林教授鉴定为 *Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara。取适量冬凌草干燥样品经粉碎过 20 目筛, 加入 5 倍体积 95%乙醇回流 3 次, 每次 2 h, 倾出上层液。将药渣置于 45 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱烘干, 备用。

清洁级 (II 级) 昆明种雄性小鼠 (8~12 周龄, 体质量 18~22 g) 10 只, 由天津利居生物用品供应中心提供。

1.2 主要试剂与仪器

标准单糖、考马斯亮蓝 G-250、牛血清白蛋白、

收稿日期: 2010-04-03

作者简介: 刘芳 (1981—), 女, 讲师, 从事天然产物化学和药学教育研究。E-mail: gangnag@yahoo.cn

*通讯作者 周晶 E-mail: zhoujing@tjmu.edu.cn Tel: 13920680193

胎牛血清 (FBS) 为北京鼎国生物技术有限公司进口分装, Sephacryl S-200 (Amersham Biosciences 公司), Sephdex G-100 (Pharmacia 公司)。乙腈、甲醇均为色谱纯, 水为双蒸水。其余试剂均为国产分析纯。

U—3310 紫外可见分光光度计, 日本日立; 380 型傅里叶变换红外光谱仪, 美国尼高力公司; WZZ—2S 自动数显旋光仪, 上海浦东物理光学仪器厂; 100 蒸发光检测器, CoM6000 泵, 美国 SOFTA; SW-CJ-IF 净化工作台, 苏净集团苏州安泰空气技术有限公司; CK40 型倒置显微镜, Olymups; 550 型酶标仪, 美国 Bio-RAD 公司。

2 方法与结果

2.1 RPPSIIa 的提取分离和纯化

取冬凌草干燥药渣, 以 15 倍量水加热提取 2 次, 每次 1 h, 滤过, 滤液离心, 上清液浓缩, 以 95% 乙醇调含醇量为 80%, 4 °C 静置过夜, 离心, 沉淀依次用无水乙醇、丙酮、乙醚反复洗数次, 抽滤, 真空干燥, 得冬凌草多糖 (RPPS), 经三氯乙酸法脱蛋白, 活性炭脱色。10% RPPS 水溶液进行乙醇分级沉淀, 收集 60%~70% 乙醇沉淀物, 即得 RPPSII。用 Sephdex G-100 凝胶色谱柱分离, 双蒸水洗脱, 蒽酮-硫酸法、考马斯亮蓝 G-250 染色法跟踪检测, 收集 1~15 管合并相同组分, 减压浓缩至约 10 mL, 经冷冻干燥得 RPPSIIa 干燥粉末。

2.2 鉴定

2.2.1 纸色谱法^[4] 取 0.1 mg/mL 的 RPPSIIa 样品溶液 50.0 μ L, 点样于圆形新华中速滤纸距圆点 1 cm 处的中部, 以正丁醇-浓氨水-水 (40:50:5) 为展开剂, 滤纸于色谱缸内以展开剂蒸气饱和 2 h 以上, 在室温下展开, 取出挥散溶剂, 用 0.5% 甲苯胺蓝液染色, 立即用 95% 乙醇漂洗至背景褪色。结果 RPPSIIa 只有一个单一染色斑点, 且 R_f 值一致, 可说明 RPPSIIa 为纸色谱纯。

2.2.2 Sephacryl S-200 丙烯葡聚糖凝胶过滤法 将少量 RPPSIIa 溶于少量双蒸水中, 上 Sephacryl S-200 凝胶柱 (35 cm×2.8 cm), 双蒸水洗脱, 体积流量为 15 mL/h, 部分收集体积为每管 5.0 mL, 以蒽酮-硫酸法跟踪检测, 绘制收集体积与水解样品紫外最大吸收波长下 A_{580} 之间的关系曲线。结果 RPPSIIa 多糖溶液过 Sephacryl S-200 后蒽酮-硫酸法跟踪检测, 色谱图中只有一个单一峰, 进一步说明 RPPSIIa 为均一组分, 为较纯净多糖。

2.3 单糖组成分析

取冬凌草多糖 20 mg 加 2% 硫酸 5 mL 置于安瓿瓶封口, 微沸 3 h, 放冷, 加碳酸钡细粉中和, 4 000 r/min 离心, 取上清液。色谱条件: 色谱柱为 KromasilNH₂ (250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈-水 (75:25); 体积流量为 1.0 mL/min; 蒸发光检测器, 漂移管温度为 70 °C, 雾化室温度 30 °C, 气压 3.445×10^4 Pa; 进样量 20 μ L。由图 1 中样品的保留时间和峰面积可得出, RPPSIIa 是由鼠李糖、葡萄糖两种单糖组成, 峰面积归一化法测得二者比为 7:93, 可见 RPPSIIa 为一葡聚糖。

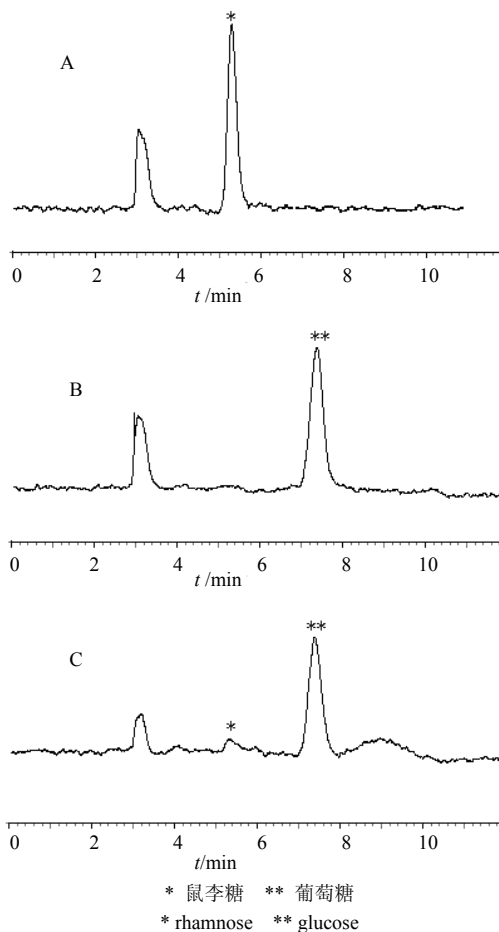


图 1 鼠李糖 (A)、葡萄糖对照品 (B) 及 RPPSIIa 水解样品 (C) 的 ELSD 色谱图

Fig. 1 ELSD chromatograms of rhamnose (A), glucose reference substance (B) and hydrolysis sample (C) of RPPSIIa

2.4 理化性质鉴别

RPPSIIa 为白色粉末状固体, 易溶于热水, 不溶于高浓度的甲醇、乙醇、丙酮、醋酸乙酯等有机溶剂。其水溶液呈透明黏状, pH 弱酸性, Molish 反应呈阳性, 与苯酚-浓硫酸反应呈黄棕色, 蒽酮-

浓硫酸反应呈蓝绿色, 与碘-碘化钾反应不显色, Fehling 试剂反应呈阴性。实验现象表明, RPPSIIa 可能为含有还原性单糖组分的非淀粉类多糖。比旋光度 $[\alpha]_D^{20} -412.16^\circ$ 。

2.5 光谱分析

2.5.1 紫外光谱分析 将 RPPSIIa 以双蒸水配成水溶液 (0.05 mg/mL), 采用紫外可见光谱仪扫描 (200~400 nm) 进行观察。紫外扫描在 200 nm 处有多糖特征峰, 未观察到蛋白质 (280 nm)、核酸 (260 nm) 吸收峰^[5]及色素 (600 nm) 等杂质峰。

2.5.2 红外光谱分析^[6] 取干燥后的 RPPSIIa 采用 KBr 压片, 在 4 000~400 cm^{-1} 内进行扫描。RPPSIIa 红外光谱图中, 3 424 cm^{-1} 附近为多聚体羟基峰, 1 200~1 030 cm^{-1} 附近为 $\nu_{\text{C-O}}$, 分裂成多个峰。918 cm^{-1} 附近为 α -D-吡喃葡萄糖环的振动, 854 cm^{-1} 附近为 α -D-吡喃葡萄糖环 $\nu_{\text{C-O}}$ 峰, 764 cm^{-1} 附近为 α -D-吡喃葡萄糖环扩张运动的峰。

2.6 免疫活性初探

通过噻唑兰比色法 (MTT 法)^[7]观察冬凌草多糖 RPPSIIa 在体外对小鼠脾淋巴细胞增殖的直接促进作用, 及对有丝分裂原刀豆蛋白 (ConA) 诱导的小鼠脾淋巴细胞增殖的协同作用。

由表 1 可知, RPPSIIa 在 5~100 $\mu\text{g/mL}$ 与对照组比较, A_{570} 值明显增加, 表现出不规则剂量依赖性趋势, 表明该质量浓度范围内能有效刺激小鼠脾淋巴细胞的增殖。由表 2 可知, 5~100 $\mu\text{g/mL}$ RPPSIIa 加 ConA 模型组与对照组比较, 5、50 $\mu\text{g/mL}$ 组 A_{570} 值明显增加, 表现出不规则剂量依赖性趋势, 表明上述条件下均能有效增强 ConA 诱导的淋巴细

表 1 RPPSIIa 对小鼠脾 T 淋巴细胞的刺激作用
($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Stimulation of RPPSIIa on splenic T lymphocyte of mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	$\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	A_{570}
对照	—	0.239 $\pm$ 0.013
模型	—	0.670 $\pm$ 0.041
RPPSIIa	5	0.600 $\pm$ 0.093**
	10	0.732 $\pm$ 0.091**
	50	0.571 $\pm$ 0.087**
	100	0.732 $\pm$ 0.102**

与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

表 2 RPPSIIa 对 ConA 诱导 T 淋巴细胞增殖反应的影响
($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effects of RPPSIIa on ConA-induced T lymphocyte proliferation ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	$\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	A_{570}
对照	—	0.239 $\pm$ 0.013
模型	—	0.670 $\pm$ 0.041
RPPSIIa	5	0.960 $\pm$ 0.014**
	10	0.696 $\pm$ 0.028
	50	0.859 $\pm$ 0.063*
	100	0.732 $\pm$ 0.104

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

胞增殖反应。

3 讨论

凝胶柱色谱法的跟踪检测, 实验采用蒽酮-硫酸法、考马斯亮蓝 G-250 染色法同时跟踪检测 RPPSIIa 溶液过 Sephadex-G100 柱的洗脱液, 有效地检测了 Sephadex-G100 柱对多糖组分、蛋白质组分分离情况, 为冬凌草多糖分离纯化研究提供了较多的信息。

冬凌草多糖分离组分 RPPSIIa 对 ConA 诱导小鼠 T 淋巴细胞增殖反应的体外免疫实验表明, 其对细胞免疫具有增强作用。有必要进一步研究冬凌草多糖对免疫功能的调节, 从而有助于探讨冬凌草的抗肿瘤机制及新药的研究开发。

参考文献

- [1] 刘 净, 魏秀丽, 杨 函, 等. 冬凌草化学成分研究 [J]. 中国天然药物, 2004, 2(5): 276-279.
- [2] 吕 芳, 徐筱杰. 冬凌草化学成分研究 [J]. 中草药. 2008, 39(9): 1340-1343.
- [3] 车宪平, 韩瑞发, 周 晶, 等. 冬凌草甲素诱导膀胱癌 MB49 细胞凋亡及机制研究 [J]. 中草药, 2008, 39(8): 1219-1222.
- [4] 罗娅君, 肖新峰, 王照丽. 大叶金花草多糖的提取、分离纯化及结构分析 [J]. 林产化学与工业, 2009, 29(1): 68-72.
- [5] 陈小强, 叶 阳, 成 浩, 等. 不同方法提制的茶叶粗多糖的光谱分析 [J]. 光谱学与光谱分析, 2009, 29(4): 1083-1087.
- [6] 谢晶曦, 常俊标, 王绪明, 等. 红外光谱在有机化学和药物化学中的应用 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [7] 徐淑云, 卞如濂, 陈 修. 药理学实验方法 [M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003.