

细柱五加茎多糖闪式提取工艺优化及其免疫活性研究

谢霞^{1,2}, 李芝^{1,2}, 黄玮超^{1,2}, 叶惠煊^{1,2}, 戴玲^{1,2}, 刘向前^{1,2*}

1. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208

2. 湖南省中药现代化研究重点实验室, 湖南 长沙 410208

摘要: 目的 优化细柱五加茎多糖的闪式提取工艺, 并研究其细胞毒性和免疫活性。方法 运用球面对称设计试验, 综合考虑料液比、提取温度、提取时间 3 因素, 优化细柱五加茎多糖的闪式提取工艺; 对闪式提取法与回流、超声 2 种传统提取方法进行比较。通过体外试验对提取所得多糖的细胞毒性和免疫活性进行初步研究。结果 细柱五加茎多糖闪式提取最佳工艺为料液比 1 : 13.2, 提取温度 80 ℃, 提取时间 420 s。在此条件下, 细柱五加茎中多糖提取率为 0.78%, 且优于回流和超声法提取所得多糖提取率。体外活性实验结果显示, 细柱五加茎多糖质量浓度在 10~20 μg/mL 对 RAW 264.7 细胞无明显毒性, 在 10~40 μg/mL 能够促进 RAW 264.7 细胞 NO 的分泌。结论 建立了稳定、简便的细柱五加茎多糖的闪式提取工艺方法, 初步研究了其多糖的免疫活性, 为合理的开发细柱五加资源提供理论依据。

关键词: 细柱五加; 多糖; 闪式提取法; 球面对称设计; 免疫活性

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)20-2859-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.20.013

Smashing tissue extraction technology optimization for polysaccharides from stems of *Acanthopanax gracilistylus* and their *in vitro* immunological activities

XIE Xia^{1,2}, LI Zhi^{1,2}, HUANG Wei-chao^{1,2}, YE Hui-xuan^{1,2}, DAI Ling^{1,2}, LIU Xiang-qian^{1,2}

1. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. Hunan Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Modernization, Changsha 410208, China

Abstract: **Objective** To optimize the extraction process for polysaccharides from the stems of *Acanthopanax gracilistylus* by smashing tissue extraction (STE) and to further investigate their cytotoxicity and immunological activities. **Methods** Extraction process for the polysaccharides from the stems of *A. gracilistylus* was optimized by using the spherical symmetrical design test, and three factors were considered (material-liquid ratio, extraction temperature, and extraction time). The test compared STE with two traditional extraction methods, reflux extraction and ultrasonic extraction. The bioassay tests of cytotoxicity and immunological activities on polysaccharides extracted were studied *in vitro*. **Results** The optimal extraction conditions for polysaccharides from the stems of *A. gracilistylus* were as follows: material-liquid ratio was 1 : 13.2, the extraction temperature was 80 ℃, and the extraction time was 420 s. With the best extraction conditions, the yield of polysaccharides from the stems of *A. gracilistylus* was 0.78%. The yield by STE was higher than those by reflux extraction and ultrasonic extraction in this research. In addition, the bioassay results showed the polysaccharides had no significant toxicity on RAW 264.7 cells at the dose of 10—20 μg/mL and facilitated the secretion of nitric oxide (NO) in the cells supernatant at the dose of 10—40 μg/mL *in vitro*. **Conclusion** These results establish a steady and convenient extraction technology for polysaccharides from the stems of *A. gracilistylus* using STE method, indicating the polysaccharides have immunological activity to some extent, which provides a theoretical basis for the reasonable development of *A. gracilistylus* resources.

Key words: *Acanthopanax gracilistylus* W. W. Smith; polysaccharides; smashing tissue extraction; spherical symmetrical design; immunological activity

收稿日期: 2013-06-05

基金项目: 湖南省自然科学基金重点项目 (11JJ2042); 湖南中医药大学药物分析学“十二五”校级重点学科建设项目

作者简介: 谢霞 (1985—), 女, 湖南长沙人, 湖南中医药大学药学院天然药物化学方向研究生。Tel: 13787288563 E-mail: 329988803@qq.com

*通信作者 刘向前, 男, 教授, 硕士研究生导师。E-mail: lxq0001cn@163.com

《中国药典》2010年版收载的五加皮为五加科五加属植物细柱五加 *Acanthopanax gracilistylus* W. W. Smith 的干燥根皮, 具有祛风除湿、补益肝肾、强筋壮骨、利水消肿的功效。现代药理研究表明五加属植物细柱五加和刺五加的根皮多糖、红毛五加的茎皮多糖具有抗癌活性, 无梗五加果多糖具有抗疲劳活性等^[1]。NO 作为细胞间和细胞内重要的信使分子, 起着免疫效应分子和免疫调节剂的作用。因此, NO 的分泌是巨噬细胞被激活的重要标志, 是巨噬细胞产生免疫效应的重要步骤。通过体外刺激巨噬细胞产生 NO 可以判别多糖的体外免疫活性^[2]。

细柱五加作为正品五加皮的原植物, 使用历史悠久^[3], 应用广泛。但对细柱五加茎多糖的研究几乎未见报道。作为系统研究细柱五加的一部分^[4], 本研究采用球面对称设计法^[5]优化细柱五加茎多糖的闪式提取工艺^[6-7], 并采用 MTT 法测定多糖对 RAW 264.7 细胞毒性, 以及观察其对脂多糖 (LPS) 诱导的 RAW 264.7 小鼠巨噬细胞 NO 分泌的影响。

1 仪器与材料

JHBE—20A 型闪式提取器 (北京金鼎科技有限公司); UV—1750 紫外可见分光光度计 (日本岛津公司); 高速冷冻离心机 (德国 Beckman 公司); AUW220D 分析天平 (日本岛津公司); AS 3120A 型超声波清洗仪 (天津奥特赛恩斯仪器有限公司); 透析袋 MD7044 (上海源叶生物科技有限公司); 超净工作台 (美国 LABCONCO 公司); 二氧化碳培养箱、-70 °C 超低温冰箱 (美国 Thermo 公司); Olympus 显微镜 (日本理光集团); 96 孔板 (美国 Corning 公司); 予华 HH—S 型水浴锅 (巩义市英峪予华仪器厂)。

细柱五加茎于2012年8月采自湖南省长沙市近郊, 经湖南中医药大学药学院刘向前教授鉴定为细柱五加 *Acanthopanax gracilistylus* W. W. Smith 茎, 自然干燥后, 粉碎成粗粉 (过 24 目筛) 备用。标本 (标本号为 120815) 保存于湖南省重点实验室中药新药研究与开发实验室。葡萄糖对照品 (中国药品生物制品检定所, AR 级, 批号 150623-200901, 质量分数 ≥ 98%); 所用其他试剂均为国产分析纯; 蒸馏水自制。RAW 264.7 巨噬细胞株由韩国细胞株银行供应; DMEM 培养基、新生牛血清 (FCS, 美国 Invitrogen 公司); 青链霉素、胰酶、MTT 细胞毒性分析试剂盒 (美国 Life Technologies, Grand Island 公司), Griess 试剂 (美国 Sigma 公司)。

2 方法与结果

2.1 细柱五加茎多糖提取工艺

称取一定量的细柱五加茎粗粉 (过 24 目筛), 加蒸馏水适量, 一定条件下闪式提取 2 次, 离心, 得上清液, 浓缩成浸膏。浸膏加水充分溶解, 离心除去不溶物, 上清液加乙醇至乙醇体积分数为 80%, 静置 24 h, 离心分离。醇沉物加水复溶, 加入等体积的 Savage 试剂 (氯仿-正丁醇 3:1) 除蛋白。向除完蛋白后的溶液中加入 3% 质量浓度的 H₂O₂ (比例为 4:1) 脱色, 然后溶液装入透析袋流水透析除去小分子物质。最后醇沉得到醇沉物, 用无水乙醇、丙酮、乙醚依次洗涤, 低温真空干燥得到细柱五加茎多糖粉末。

2.2 多糖提取率的测定^[8]

2.2.1 对照品溶液的配制 葡萄糖对照品 105 °C 恒温干燥到恒定质量, 精密称取 125.1 mg, 配成 100 mL 溶液, 即得质量浓度为 1.251 mg/mL 葡萄糖对照品溶液, 备用。

2.2.2 线性关系考察 分别取葡萄糖对照品溶液 1.00、2.00、3.00、4.00、5.00、6.00 mL 置 100 mL 量瓶中, 分别定容至刻度, 摇匀。上述溶液分别取 2.00 mL, 置于具塞试管中, 加入 1.00 mL 5% 的苯酚溶液中, 再快速加入 5.00 mL 浓硫酸。室温静置 5 min, 40 °C 水浴中加热 30 min, 取出, 冰水浴至室温。于葡萄糖最大吸收波长 490 nm 处测吸光度 (*A*) 值, 蒸馏水做空白试验。以 *A* 值为纵坐标 (*Y*), 质量浓度为横坐标 (*X*), 进行线性回归, 得出回归方程 $Y = 12.762X + 0.0068$, $R^2 = 0.9994$, 线性范围 12.5 ~ 75.1 μg/mL ($r = 0.9997$)。

2.2.3 多糖提取率的测定 精密称取干燥至恒定质量的细柱五加茎多糖 100 mg, 置 250 mL 量瓶中, 蒸馏水溶解并定容。从中移取 1.00 mL 置 100 mL 量瓶中, 蒸馏水定容, 取 2.00 mL 溶液置于具塞试管中, 按“2.2.2”项中方法操作, 490 nm 处测定 *A* 值, 根据回归方程计算多糖液中葡萄糖的质量浓度。再按如下公式计算细柱五加茎多糖提取率 [多糖提取率 = $CDM / (WM_0)$], 其中 *C* 为溶液中葡萄糖的质量浓度 (mg/mL), *D* 为稀释倍数, *W* 为称取的多糖质量 (mg), *M* 为每一份药材所提取到的粗多糖粉末质量 (g), *M*₀ 为药材质量 (g)。

2.3 球面对称法设计试验与结果

通过参考相关文献报道^[9]和预试验, 选取料液比 (*X*₁)、提取温度 (*X*₂)、提取时间 (*X*₃) 为考察

因素,以细柱五加茎多糖提取率(Y)为考察指标,设计球面对称试验。由于提取次数只能是整数,球面对称设计方法无法将提取次数作为考察因素,参考孟庆艳等^[10]筛选红毛五加茎多糖提取工艺的最佳提取次数2次。因此本试验中每份药材提取次数固定为2次。

取细柱五加茎药材粗粉(过24目筛)50 g,精密称定,按球面对称试验设计方法和“2.1”中操作制备多糖。因素水平见表1,球面对称试验设计见表2。

使用DPS 7.55软件拟合回归方程,将求得的系数代入细柱五加茎多糖提取率(Y)与料液比(X_1)、提取温度(X_2)、提取时间(X_3)之间的二项关系式

表1 因素水平表
Table 1 Factors and levels

水平	因素		
	$X_1 / (\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	$X_2 / ^\circ\text{C}$	X_3 / s
$-\sqrt{3}$	1:6	20	60
-1	1:7.7	33	138
0	1:10	50	240
1	1:12.3	67	342
$\sqrt{3}$	1:14	80	420

表2 球面对称试验设计及试验值与拟合值的比较 ($n=3$)

Table 2 Spherical symmetric design and comparison between test values and fitting values ($n=3$)

试验号	X_1	X_2	X_3	提取率 / %	拟合值 / %	拟合误差 / %
1	-1	-1	-1	0.08	0.08	0
2	-1	-1	1	0.15	0.15	0
3	-1	1	-1	0.26	0.27	-0.01
4	-1	1	1	0.33	0.40	-0.07
5	1	-1	-1	0.17	0.17	0
6	1	-1	1	0.21	0.23	-0.02
7	1	1	-1	0.36	0.42	-0.06
8	1	1	1	0.46	0.51	-0.05
9	$-\sqrt{3}$	0	0	0.16	0.15	0.01
10	$\sqrt{3}$	0	0	0.35	0.32	0.03
11	0	$-\sqrt{3}$	0	0.18	0.21	-0.03
12	0	$\sqrt{3}$	0	0.59	0.59	0
13	0	0	$-\sqrt{3}$	0.11	0.10	0.01
14	0	0	$\sqrt{3}$	0.28	0.25	0.03
15	0	0	0	0.19	0.21	-0.02

中,得 $Y=0.513\ 476\ 87-0.037\ 106\ 66\ X_1-0.021\ 212\ 89\ X_2+5.460\ 3\times 10^{-4}\ X_3+2.195\ 20\times 10^{-3}\ X_1^2+2.363\ 5\times 10^{-4}\ X_2^2-6.6\times 10^{-7}\ X_3^2+3.295\ 8\times 10^{-4}\ X_1X_2-4.82\times 10^{-6}\ X_1X_3+4.61\times 10^{-6}\ X_2X_3$; $r=0.978\ 867$, $F=12.729\ 0$, $P=0.006\ 0$, $S_{\text{余}}=0.049\ 453\ 13$, $F^*(9, 5)=4.77$ ($*P<0.05$)。显然,试验拟合方程的 $F>F^*$,因此拟合回归方程是成立的。考察指标多糖提取率值与拟合值比较见表2。数据表明试验值与拟合值非常接近,球面对称设计模型对评价指标的拟合较为成功。

当料液比 $1:14\leq X_1\leq 1:6$,提取温度 $20\leq X_2\leq 80$,提取时间 $60\leq X_3\leq 420$ 时,根据上述拟合回归方程计算出优化条件:料液比为1:13.2,提取温度为80℃,提取时间为420 s。理论上在此优化条件下,细柱五加茎多糖提取率为0.81%。

为验证球面对称设计试验优化结果的准确性,取细柱五加茎药材粗粉(过24目筛)50 g,精密称定,按细柱五加茎最佳闪式提取工艺进行3次验证试验,同时通过回流提取法^[10]和超声提取法^[11]提取细柱五加茎多糖进行对比试验。回流提取料液比为1:14,提取温度为90℃,提取2次,每次120 min。超声提取料液比为1:14,提取温度为60℃,提取2次,每次90 min。其余操作同“2.1”项,结果见表3。闪式提取法、回流提取法、超声提取法多糖平均提取率分别为0.78%、0.26%、0.36%。其中闪式提取法提取多糖提取率与理论拟合值相比相对误差为3.85%,可认为理论值与试验值近似相等。闪式提取420 s(7 min)明显比回流提取120 min、超声提取90 min的多糖提取率分别高出200%、117%,且重现性良好。

2.4 细胞毒性与体外免疫活性

取上述细柱五加茎多糖,测定其对RAW 264.7细胞毒性作用和对LPS诱导的RAW 264.7小鼠巨噬

表3 验证试验结果

Table 3 Results of verification test

试验次数	各提取方法提取率 / %		
	闪式	回流	超声
1	0.77	0.26	0.37
2	0.75	0.26	0.35
3	0.79	0.25	0.36
平均提取率 / %	0.78	0.26	0.36
RSD / %	1.97	2.25	2.78

细胞中 NO 分泌量的影响^[12]。

2.4.1 细胞毒性实验 按 MTT 细胞毒性检测试剂盒操作。取生长状态良好的 RAW 264.7 细胞接种于 96 孔板中,按梯度浓度将细柱五加茎多糖分别加入 96 孔板中(复孔, $n=3$),使目标化合物的最终质量浓度分别为 10、20、40 $\mu\text{g/mL}$,同时设置空白组和调零组。24 h 后,每孔加入 10 μL MTT 溶液(5 mg/mL),在细胞培养箱内继续孵育 4 h,然后每孔加入 100 μL DMSO 溶解液,直至 DMSO 全部溶解,终止培养,震荡反应 10 min。在 570 nm 波长处测定各孔 A 值^[13]。实验重复 3 次,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 DPS 7.55 软件对试验结果进行单因素方差分析比较, $P < 0.05$ 为有统计学意义。如图 1-A 所示,10~20 $\mu\text{g/mL}$ 的细柱五加茎多糖处理 RAW 264.7 细胞 24 h 后,与空白组相比,10 $\mu\text{g/mL}$ 组细胞存活率具有显著差异($P < 0.05$),且 10 $\mu\text{g/mL}$ 的细柱五加茎多糖可促进细胞生长;细柱五加茎多糖质量浓度在 40 $\mu\text{g/mL}$ 对 RAW 264.7 细胞具有一定的细胞毒性作用。

2.4.2 免疫活性实验 取生长状态良好的 RAW 264.7 细胞接种于 96 孔板中,按梯度质量浓度将细柱五加茎多糖分别加入 96 孔板中(复孔, $n=3$),使目标化合物的最终质量浓度分别为 10、20、40 $\mu\text{g/mL}$,1 h 后,每孔加入 10 μL LPS 溶液(0.5 $\mu\text{g/mL}$);同时设置空白组和对照组。空白组既不使用多糖处理,也不添加 LPS 溶液刺激;对照组不使用多糖处理,加同样剂量的 LPS 进行诱导。孵育 24 h 后,收集各组细胞培养上清液 100 μL ,加入 Griess 试剂,室温避光孵育 10 min,在 540 nm 下测量其 A 值,检测 NO 的量^[14-15]。实验重复 3 次,试验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 DPS 7.55 软件对试验结果进行单因素方差分析比较, $P < 0.05$ 为有统计学意义。如图 1-B 所示,对照组产生的 NO 的量与空白组比较显著提高($P < 0.05$),细柱五加茎多糖在 10、20、40 $\mu\text{g/mL}$ 时使 NO 分泌量分别比对照组高出 11.93%、12.76%、9.83%,从不同程度上促进了 NO 的分泌,提示细柱五加茎多糖对巨噬细胞的免疫功能具有一定的激活作用。

3 讨论

通过优化和验证性试验确定了最佳闪式提取工艺为料液比 1:13.2,提取温度 80 $^{\circ}\text{C}$,提取时间 420 s,在此条件下多糖的提取率为 0.78%;另外,通过与传统提取方法比较,表明闪式提取法不仅节

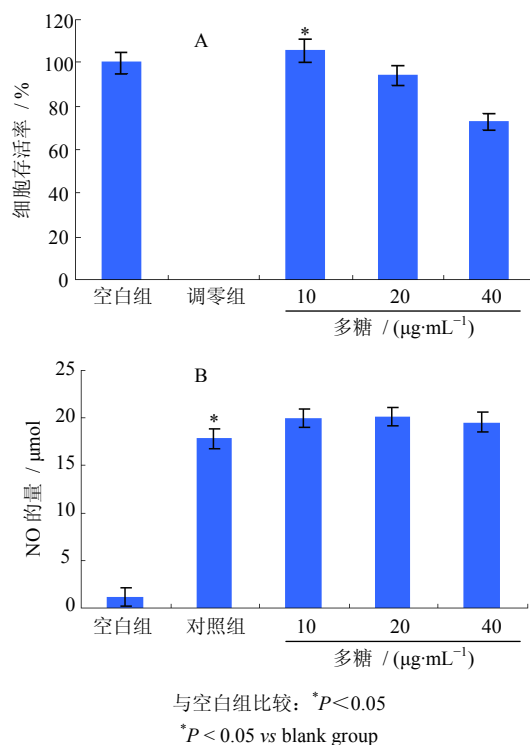


图1 细柱五加茎多糖对细胞活力 (A) 和 NO 分泌量 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 1 Influence of polysaccharides from stems of *A. gracilistylus* on cell viability (A) and NO secretory amount (B) ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

约时间和能源,而且在多糖提取率上也优于回流提取法和超声提取法。体外实验结果提示细柱五加茎多糖在 10~20 $\mu\text{g/mL}$ 几乎无细胞毒性,在 40 $\mu\text{g/mL}$ 浓度时具有一定的细胞毒性;且在 10~40 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内不同程度上促进 NO 的分泌,浓度在 20 $\mu\text{g/mL}$ 时作用最强。实验结果提示细柱五加茎多糖能刺激巨噬细胞释放 NO,具有一定的体外免疫活性,但在使用上应考虑细胞毒性问题,其作用机制有待进一步深入研究。

闪式提取的原理是高速机械剪切力和超速动态分子渗透作用,在一定的温度和溶剂条件下,将药材破碎成微粒,使多糖成分迅速达到微粒组织的内外平衡,具有快速高效、操作方便、节能降耗等很多优点^[16]。但若使用时间过长易导致电机过热烧坏,本实验中闪式提取器每工作 30 s 停机休息 30 s。机器高速转动产生一定的热量,尤其是静止时,贴近破碎提取刀头的溶液温度有些许上升。为保证在提取的过程中提取容器内整体溶液温度尽可能稳定,本实验将提取溶液温度调节到试验所需温度,并将提取容器置于恒温水浴中,使溶液温度基本控

制在 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 内。

由于闪式提取法提取快速,而多糖为大分子物质,不容易被提取完全,若在闪式提取前用提取溶剂浸泡药材30~60 min,提取多糖的效率应该更高。

参考文献

- [1] 谢霞,刘向前.五加属植物多糖的研究进展 [A]//第三届中国中药商品学术年会暨首届中药葛根国际产业发展研讨会论文集 [C].长沙:中国商品学会中药商品专业委员会,2012.
- [2] 范精华,刘康,刘保林.NO在炎症及免疫应答中的调节作用 [J].中外医疗,2009(25):163.
- [3] 何晓丽,王德群.中药五加皮药材辨析 [J].安徽中医学院学报,2008,27(3):51-52.
- [4] 邹亲朋.两种五加属植物叶中抗HMGB1三萜活性成分研究 [D].长沙:中南大学,2012.
- [5] Valiyev K F, Kraiko A N. Cylindrically and spherically symmetrical rapid intense compression of an ideal perfect gas with adiabatic exponents from 1.001 to 3 [J]. *J Appl Math Mech*, 2011, 75(2): 218-226.
- [6] 刘向前,郑礼胜,翁柳娜,等.细柱五加叶中抗HMGB1总三萜活性物质的闪式提取工艺 [J].中南大学学报:自然科学版,2011,42(7):1890-1898.
- [7] 苏柘瑾,刘英,徐佳丽,等.应用Box-Behnken设计优化地榆皂苷的闪式提取工艺研究 [J].中草药,2012,43(3):501-504.
- [8] 石凤敏,佟曦然,丁自勉,等.灵芝-淫羊藿菌质总多糖量动态变化的初步研究 [J].中草药,2013,44(11):1486-1489.
- [9] 陈艳蕊,金文闻,罗晓捷,等.黄芪多糖的闪式提取技术研究 [J].现代生物医学进展,2010,10(17):3322-3325.
- [10] 孟庆艳,刘圆,彭镰心,等.正交试验法筛选藏药红毛五加多糖的提取分离工艺 [J].西南大学学报:自然科学版,2007,29(1):122-125.
- [11] 孟繁磊,陈瑞战,张敏,等.刺五加多糖的提取工艺及抗氧化活性研究 [J].食品科学,2010(10):168-174.
- [12] 李文,杨焱,周帅,等.八种食用菌水溶性粗多糖的 β -葡聚糖含量与体外免疫活性研究 [J].食用菌学报,2012(1):65-69.
- [13] Langdon S P. *Cancer Cell Culture Methods and Protocols* [M]. New Jersey: Humana Press, 2011.
- [14] Wang Q S, Xiang Y Z, Cui Y L, et al. Dietary blue pigments derived from genipin, attenuate inflammation by inhibiting LPS-induced iNOS and COX-2 expression via the NF- κ B inactivation [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(3): e34122. doi: 10.1371/journal.pone.0034122.
- [15] Pangestuti R, Kim S K. Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae [J]. *J Funct Foods*, 2011, 3(4): 255-266.
- [16] Shi S M, Liu Y Z, Tai W, et al. Smashing tissue extraction and HPLC determination of active saponins from different parts of *Panax notoginseng* [J]. *Chin Herb Med*, 2012, 4(4): 341-345.