枳壳多糖 CALB-1 的提取、分离纯化及免疫调节活性研究

邢 娜[1]，舒尊鹏[1]，徐炳清[2]，焦文娟[3]，王秋红[1]，匡海学[1*]

1. 黑龙江中医药大学 教育部北药基础与应用研究重点实验室，黑龙江中药及天然药物药效物质基础研究重点实验室，黑龙江 哈尔滨 150040
2. 齐齐哈尔市中医医院，黑龙江 齐齐哈尔 161000
3. 江苏康缘药业股份有限公司，江苏 连云港 222000

摘 要：目的 从枳壳粗多糖中分离纯化得到精制枳壳多糖（CALB-1），并对其结构和免疫调节活性进行研究。**方法** 采用热水提取法提取获得枳壳粗多糖（CALB），通过阴阳离子交换树脂、离子交换琼脂糖凝胶等方法对 CALB 进行分离纯化，得到 CALB-1。采用高效液相色谱法（HPLC）测定 CALB-1 的相对分子质量。综合运用红外（IR）光谱、高碘酸氧化、Smith 氧化降解、甲基化、扫描式电子显微镜（SEM）和原子力显微镜（AFM）等方法考察 CALB-1 的结构及分子形态。采用体外脾细胞增殖实验及在体对小鼠单核细胞吞噬作用的影响实验测定 CALB-1 的免疫调节活性。**结果** 经 HPLC 测定 CALB-1 为均一多糖，其相对分子质量为 3.28×10^7。综合化学手段和 IR 光谱分析得到 CALB-1 为多支结构的酸性多糖，其主链主要由阿拉伯糖（Ara）、甘露糖（Man）和半乳糖（Gal）构成，且主要以 1→、1→4 键型存在。分子形态考察结果显示 CALB-1 为非晶态固体。CALB-1 具有促进小鼠脾细胞增殖的作用，并可提高免疫低下模型小鼠的廓清指数（K）值和吞噬指数（α）。**结论** CALB-1 为多支结构的均一相对分子质量的酸性多糖，且具有较好的免疫调节作用，为枳壳多糖进一步的深入研究奠定了理论基础。

关键词： 枳壳；多糖；分离纯化；结构鉴定；免疫调节活性

中图分类号： R284.1 **文献标志码：** A **文章编号：** 0253 - 2670(2015)05 - 0639 - 06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.05.005

Isolation, purification, and structural elucidation of polysaccharide CALB-1 from *Aurantii Fructus* and study on its immunoregulatory activity

XING Na[1], SHU Zun-peng[1], XU Bing-qing[2], JIAO Wen-juan[3], WANG Qiu-hong[1], KUANG Hai-xue[1]

1. Key Laboratory of Chinese Materia Medica, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Ministry of Education, Key Laboratory of TCM Pharmacodynamic Material Base, Harbin 150040, China
2. Qiqihaer City Hospital of Traditional Chinese Medicine, Qiqihaer 161000, China
3. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222000, China

Abstract: Objective To separate and purify the crude polysaccharide from *Aurantii Fructus* to obtain CALB-1 and to study the structure of CALB-1 and immunoregulatory activity. **Methods** A refined CALB-1 was obtained from *F. aurantii* by hot water extraction, then separated and purified by ion exchange resin and ion exchange agarose gel. The molecular weight of CALB-1 was measured by HPLC. The chemical structure and molecular morphology of CALB-1 were determined by IR, periodate oxidation, methylation analysis, scanning electron microscopy (SEM), and atomic force microscope (AFM). The immunoregulatory activity of CALB-1 was evaluated by splenocyte proliferation and mononuclear-macrophage phagocytic function in hypo-immunologic mice. **Results** CALB-1 was a homogeneous polysaccharide measured by HPLC and the molecular weight of CALB-1 was estimated to be 3.28×10^7. Chemical and spectroscopic analyses illustrated that CALB-1 was highly branched acidic polysaccharides, contained Ara, Man, and Gal as monosaccharide constitutes, and it consisted of backbone chain of 1→ and 1→4 linkages. Through SEM and AFM observations, we indicated that the molecular morphology of CALB-1 was amorphous solid. Besides, CALB-1 significantly stimulated the splenocyte proliferation *in vitro* and improved the K value of expurgation index and α value of phagocytic index in

收稿日期：2014-11-29

基金项目：国家重点基础研究发展计划“973”项目（2013CB531800）；国家自然科学基金资助项目（81473351）；黑龙江教育厅科学技术研究项目（12521516）；黑龙江中医药大学优秀创新人才支撑计划

作者简介：邢 娜（1990—），女，硕士研究生。E-mail: nanaxing90@163.com

*通信作者 匡海学，教授，博士生导师。Tel: (0451)82193001 E-mail: hxkuang@hotmail.com

hypo-immunologic mice. **Conclusion** CALB-1 is highly branched acidic polysaccharides and uniform relative molecular mass. Moreover, CALB-1 could present the certain immune regulation *in vivo* and *in vitro*. Our study provides a theoretical basis for the development and utilization of CALB-1.

Key words: *Aurantii Fructus*; polysaccharides; separation and purification; structure identification; immunoregulatory activity

枳壳 *Aurantii Fructus* 为芸香科柑橘属植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种的干燥未成熟果实，性微寒，味苦、辛、酸，归脾、胃、大肠经[1]，主产于四川、江西、湖南、福建等地。本品具有理气宽中、行滞消胀之功效，主治胸胁气滞、食积不化、胀满疼痛、痰饮内停、脏器脱垂等证[2]，始载于《神农本草经》[3]，被列为木部中品。《新修本草》中记载“枳壳生河内川泽，九、十月采，阴干”。其主要栽培于江西、浙江、四川、湖南等省，在我国长江流域和南方各省资源最丰富。宿树兰[4]论述了枳壳商品药材主要包括酸橙枳壳、香圆枳壳、绿衣枳壳、蟹橙枳壳、甜橙枳壳、宜昌橙枳壳、柚枳壳、红河橙枳壳、桔柑枳壳、大麦柑枳壳等。另外，枸橼 *C. medica* L. 未成熟果实在云南也作枳壳用。枳壳的化学成分较多，包括黄酮类、生物碱类、挥发油类、多糖等。

多糖是一类由醛糖或酮糖通过糖苷键连接成的天然大分子多聚物，是中药中主要药效物质基础之一[5]。多糖具有复杂的生物活性与功能，如抗氧化作用、抗辐射作用、抗突变作用、抗病毒及抗肿瘤作用等，而且对正常细胞的毒副作用极小。因此，植物多糖越来越受到关注[6]。本实验以枳壳作为研究对象，提取分离枳壳中的多糖成分，并对其进行初步研究。

1 仪器与材料

HL-2 恒流泵、BS-100N 自动部分收集器（上海青浦沪西仪器厂）；R404A/R508 低温冷冻干燥机（北京思达兴业仪器有限公司）；TGL-16C 高速台式离心机（上海安亭科学仪器厂）；GENLVS 离心机（长沙市鑫奥仪器仪表有限公司）；752 型紫外可见分光光度计（上海光谱仪器有限公司）；FA2104 电子分析天平（上海天平厂）；ELSD-2000 蒸发光检测器（Alltech 公司）；2695 高效液相色谱仪（Waters 公司）；Agillent7890-5973 气质联用仪（Agillent 公司）；扫描式电子显微镜（FEI 公司）；FTIR-8400S 红外光谱仪、原子力显微镜（日本岛津公司）；倒置显微镜（Olympus 公司）；超净工作台（上海智城分析仪器制造有限公司）；酶标仪（Bio-Tek 公司）；二氧化碳培养箱（Thermo Scientific 公司）。

弱阴性阴离子交换树脂 FPA90-Cl⁻、弱阳性阳离子交换树脂 FPC3500（Amberlite 公司）；离子交换琼脂糖凝胶 DEAE-SepharoseF. F、丙烯葡聚糖凝胶 Sephacyrl S-400、标准葡聚糖 Dexrtna（Pharmacia Co. 公司）；糖柱 Shodex sugar KS-805（Shodex 公司）；考马斯亮蓝 G-250（Amresco 公司）；牛血清白蛋白、咔唑、GalUA、RPMI 1640 细胞培养液、小牛血清、四氮唑蓝、二甲基亚砜、印度墨汁（Sigma 公司）；高碘酸钠、乙醇、苯酚、硫酸、甲酸等试剂（天津市化学试剂一厂）均为分析纯；实验用水为 Millipore 超纯水。

BALB/c 小鼠，雌雄各半，体质量（20±2）g，由北京维通利华生物科技公司提供，许可证号 SCXK（京）2012-0001。

枳壳采购于哈尔滨松鹤堂药材公司，产地为江西新干。经黑龙江中医药大学中药资源学教研室王振月教授鉴定为芸香科柑橘属植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 的干燥未成熟果实，符合《中国药典》2010 年版相关质量标准。

2 方法

2.1 枳壳多糖的提取、分离与纯化

2.1.1 枳壳粗多糖的制备 称取枳壳药材 0.8 kg，粗粉碎后加 95%乙醇浸泡过夜，加热回流提取 3 次，每次 3 h，提取后的药渣晾干用 95%乙醇脱脂，室温下用蒸馏水浸泡 3 次，每次 12 h，滤过后收集药渣，用热水煎煮 3 次，每次 3 h，冷却后滤过、合并收集滤液，减压浓缩，经醇沉、透析、冷冻干燥得枳壳热提粗多糖（CALB）。

2.1.2 CALB 的理化性质 对 CALB 的理化性质进行初步研究，分别采用苯酚-硫酸比色法[7]测定其总糖质量分数，采用考马斯亮蓝比色法[8]测定其蛋白量，采用硫酸-咔唑法[9]测定其糖醛酸量。

2.1.3 CALB-1 的分离及纯化 取 CALB 5 g 溶于适量纯化水，先用弱阴性阴离子交换树脂 FPA90-Cl⁻、弱阳性阳离子交换树脂 FPC3500 进行纯水洗脱，体积流量 10 mL/min，苯酚-硫酸法检测，至无糖组分流出时，收集洗脱液，透析，冷冻干燥。

冻干后的组分用 DEAE-Sepharose F.F 凝胶色谱柱（75 cm×3.5 cm）进行初步分离，0.2 mol/L NaCl 作为洗脱液，体积流量 2 mL/min，收集合并相同组分。再用 Sephacryl S-400（75 cm×1.6 cm）凝胶色谱柱进一步分离，双蒸水作为洗脱液，体积流量 0.5 mL/min，收集合并相同组分，透析，冷冻干燥，得到精制枳壳多糖，并命名为 CALB-1。

2.1.4 CALB-1 纯度的鉴定 取适量 CALB-1 样品配制成 2 mg/mL 的溶液，0.22 μm 微孔滤膜滤过，用 HPLC 检测其纯度，进样量 20 μL。检测条件：Waters 高效液相色谱系统（2996 泵，Alltech ELSD2000，Shodex sugar KS-805＋KS-G），流动相为超纯水，柱温 25 ℃，体积流量 0.8 mL/min。

2.1.5 CALB-1 的相对分子质量（*M*）测定 采用 HPLC 色谱法测定 CALB-1 的 *M*。以标准品葡聚糖 Dextran 系列制作标准曲线。取适量 CALB-1 样品配制成质量浓度为 2 mg/mL 的溶液，0.22 μm 微孔滤膜滤过，按照色谱条件：Waters 高效液相色谱系统（2996 泵，Alltech ELSD2000，Shodex sugar KS-805＋KS-G），流动相为超纯水，柱温 25 ℃，体积流量 0.5 mL/min，进行检测，计算其 *M*。

2.2 CALB-1 的结构分析

2.2.1 红外光谱（IR）测定 称取 CALB-1 样品适量，按质量比 1∶50 分别与干燥的 KBr 粉末研磨压片，采用红外光谱仪在 4 000～400 cm^{-1} 测定 IR 光谱图。

2.2.2 高碘酸氧化和 Smith 降解 准确称取 CALB-1 样品 25 mg，加少量双蒸水溶解后于 25 mL 容量瓶中，然后加入 30 mmol/L $NaIO_4$ 12.5 mL 定容，室温下于暗处反应，间隔 6 h 取样用 752 型紫外可见分光光度计检测反应过程，直到吸光度（*A*）值恒定为止。加 1.5 mL 乙二醇，磁力搅拌 30 min 终止反应，测定 $NaIO_4$ 的消耗量和甲酸的生成量。经过酸水解、$NaBH_4$ 还原及乙酰化后进行 GC-MS 分析。

GC-MS 分析条件：实验使用 Agillent7890-5973 气相色谱仪，氢离子火焰检测器（FID），配备 HP-5 毛细管色谱柱（30 m×320 mm，0.25 mm），N_2 为载气，体积流量 1 mL/min，程序升温：100 ℃保持 3 min，以 3 ℃/min 速度升温至 220 ℃，保持 4 min，进样口温度 260 ℃，检测器温度 280 ℃。

2.2.3 甲基化分析 采用改良的 Hakomori 法[10]进行甲基化。将甲基化样品先用 90%甲酸于 100 ℃封闭水解 6 h，减压蒸干后先与 1 mol/L 醋酸反应，再与醋酸酐反应，得全甲基化糖醇乙酸酯，最后进行 GC-MS 分析。

GC-MS 分析条件：采用 Agillent7890-5973 气质联用仪，配备 DB-5 毛细管柱（30 m×0.25 mm，0.25 μm），程序升温，柱温 80 ℃，保持 1 min，以 5 ℃/min 至 200 ℃，以 2 ℃/min 至 220 ℃，以 10 ℃/min 至 270 ℃，保持 1 min，氦气作载气，进样口温度 250 ℃，分流比 1∶42，柱体积流量 1.2 mL/min。EI（70 eV），接口温度 250 ℃，离子源温度 250 ℃，扫描范围 *m*/*z* 43～500，扫描速率 2.5 scan/s。

2.3 CALB-1 的形态观察

2.3.1 扫描式电子显微镜（SEM）分析[11] 取 CALB-1 适量，减压冷冻干燥彻底去除样品中的水分。将 CALB-1 涂上一层薄薄的金粉，制备成厚度为 5～10 nm 的导电薄膜，然后用导电胶固定试样于载物台上，放好试样后进行抽真空，调整试样的距离、扫描的衬度，在 10 kV 电压下进行 SEM 扫描，图像的放大倍数为 1 000 和 3 000 倍。

2.3.2 原子力显微镜（AFM）分析[12] 将 CALB-1 样品配制成 100 μg/mL 的溶液，磁力搅拌器搅拌 24 h，再稀释成 10 μg/mL 的多糖溶液，用微量移液枪吸取 5 μL 滴在新解离的云母表面，空气中干燥后置于 AFM 上观测。图像均在 Tapping 模式下获得，湿度为 50%～60%，探针为 SiN_4，微悬臂长 200 μm，弹性常数 0.12 N/m。

2.4 CALB-1 的免疫调节活性研究

2.4.1 CALB-1 对免疫低下小鼠单核细胞吞噬功能的影响 BALB/c 小鼠雌雄各半，体质量（20±2）g，随机分为 5 组，每组 10 只，分别为对照组、模型组和 CALB-1 高、中、低剂量（400、200、100 mg/kg）组。每日 ig 给药不同剂量 CALB-1 的水溶液 1 次，连续 10 d，对照组和模型组给予同体积蒸馏水。于实验第 1、4、8 天，模型组和各给药组小鼠 sc 环磷酰胺 80 mg/kg（10 mL/kg）进行造模。末次给药后 24 h，按 10 mL/kg 尾 iv 稀释的印度墨汁（1%明胶稀释 4 倍），即可计时，于注入墨汁后 2 min（t_1）和 10 min（t_2）时分别从眼静脉丛取血 20 μL，立即加入装有 2 mL 0.1% Na_2CO_3 的试管中摇匀，以 0.1% Na_2CO_3 溶液作空白对照，于 680 nm 处测定吸光度（*A*）值，测毕，颈椎脱臼处死小鼠，取肝脏及脾脏分别称质量，计算廓清指数（*K*）和吞噬指数（α）。

$$K=(\lg A_1-\lg A_2)/(t_2-t_1)$$

$$\alpha=K^{1/3}\times 体质量/(肝质量+脾质量)$$

2.4.2　CALB-1 对小鼠脾细胞增殖的影响　取 BALB/c 小鼠颈椎脱臼处死，眼球放血，75%酒精消毒。无菌取脾脏，制备单个脾细胞悬液。用 RPMI 1640 培养液清洗 2～3 次，再用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液调细胞浓度至 1×10^8 个/mL。

将上述脾细胞悬液接种于 96 孔培养板中，每孔加细胞悬液 100 μL，随机分为 4 组：对照组，CALB-1 高、中、低剂量（100、50、25 mg/L）组，每孔加药体积为 100 μL，使 CALB-1 终质量浓度分别为 0.1、0.05、0.025 μg/μL，每组设 6 个复孔，置 5% CO_2 培养箱中 37 ℃培养 4 h。每孔加入 5 mg/mL MTT 10 μL，继续培养 4 h，再加入二甲基亚砜 100 μL，于微量振荡器上缓慢作用 3 min，在酶标仪上于 492 nm 处测定 *A* 值。

2.4.3　统计学方法　采用 SPSS 11.5 软件进行统计学处理，所得数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间差异采用单因素方差分析（One-way ANOVA）。

3　结果

3.1　枳壳多糖的提取、分离与纯化

3.1.1　CALB 的理化性质　通过热提法提取枳壳粗多糖，可获得 117 g CALB，其出膏率为 14.625%。经过测定得出 CALB 的总糖量为 81.35%，糖醛酸量为 48.76%，蛋白量为 17.01%。

3.1.2　CALB-1 的纯度鉴定　由 HPLC 分析（图 1）得出，CALB-1 为单一对称峰，表示此种多糖为均一多糖。

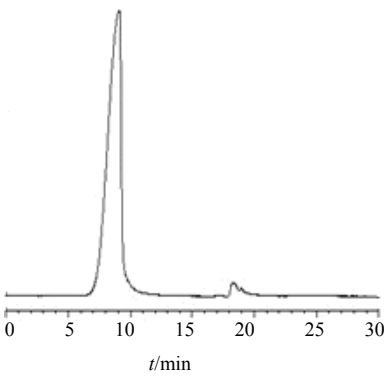


图 1　CALB-1 的 HPLC 色谱图

Fig. 1　HPLC of CALB-1

3.1.3　CALB-1 的 *M* 测定　根据标准品葡聚糖 Dextran 系列制作标准曲线，以 lg*M* 值为纵坐标（*Y*），保留时间（t_R）为横坐标（*X*）作标准曲线，建立 lg*M* 与 t_R 的线性回归方程为 $Y=-0.439\ 3\ X+14.01$（$R^2=0.998\ 9$）。根据该方程可计算出 CALB-1 的 *M* 为 3.28×10^7。

3.2　CALB-1 的结构分析

3.2.1　IR 光谱测定　CALB-1 的 IR 光谱图见图 2，3 500～3 300 cm^{-1} 有 1 个宽峰，为 O-H 的伸缩振动，表明多糖存在分子间或分子内的氢键；3 000～2 800 cm^{-1} 出现 1 个小峰，是 C-H 伸缩振动吸收峰，为糖类的特征峰；1 620 cm^{-1} 为-CHO 的伸缩振动吸收峰；1 420 cm^{-1} 为-COOH 的 C-O 伸缩振动引起的吸收峰，1 330 cm^{-1} 处为-COOH 的 C=O 对称伸缩振动的吸收峰和 1 240 cm^{-1} 处的-COOH 的 C-H 变角振动，这些吸收峰均表明 CALB-1 样品中有-COOH，是酸性多糖；在 1 110～1 000 cm^{-1} 有 3 个强吸收峰，表明糖环构型为吡喃型；956 cm^{-1} 可能是呋喃糖的骨架振动；890 cm^{-1} 处有弱吸收峰为 β-糖苷键的吸收峰，860 cm^{-1} 左右的峰表明为 α-端基差向异构体的 C-H 变角振动峰；765 cm^{-1} 为 *D*-吡喃环的对称环伸缩振动峰。以上表明该多糖组分为多支链结构的酸性多糖。

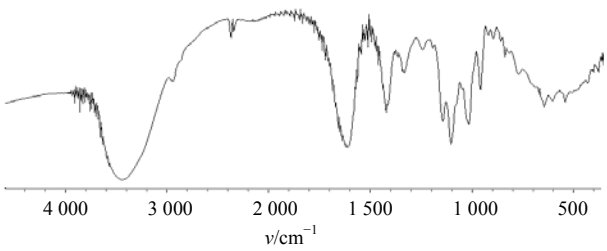


图 2　CALB-1 的 IR 光谱图

Fig. 2　IR spectrum of CALB-1

3.2.2　高碘酸氧化和 Smith 降解　CALB-1 经高碘酸氧化得出 1 个糖残基分子消耗高碘酸量为 103.1 μmol，同时生成甲酸量为 22.5 μmol，说明存在 1→或 1→6 键型，而且高碘酸消耗量大于甲酸生成量的 2 倍，说明存在 1→2、1→2, 6 或 1→4、1→4, 6 键型。

高碘酸氧化后的样品经过完全酸水解、$NaBH_4$ 还原、乙酰化后进行 GC-MS 分析，得到 Smith 降解结果，见表 1。（1）高碘酸氧化后进行完全酸水解，检出阿拉伯糖（Ara）、甘露糖（Man）、半乳糖（Gal），说明 Ara、Man 和 Gal 存在不被高碘酸氧化的键型，即 1→3、1→2, 3、1→3, 4、1→3, 6、1→2, 3, 4 等键型中的某些键型；同时检出甘油（Gly），表明存在 1→、1→2、1→6 和 1→2, 6 等键型中的某些键型；检出赤藓醇（Ery），表明糖链中还存在 1→4、1→4, 6 等键型中的某些键型。（2）部分酸水解后，透析袋

表 1 CALB-1 的 Smith 降解结果

Table 1 Smith degradation results of CALB-1

多糖片段	完全酸水解	部分酸水解		
		透析袋外部分	透析袋内上清液	透析袋内沉淀
Xyl	−	−	−	−
Ara	+	+	+	+
Rha	−	+	−	−
Glc	−	−	−	−
Man	+	+	+	+
Gal	+	+	+	+
Gly	+	+	+	−
Ery	+	+	−	−

“+”-含有，“−”-不含

“+”-contained, “−”-non-contained

外部分及袋内上清液中，能够检出 Ara、鼠李糖（Rha）、Man 和 Gal，说明 Ara、Rha、Man 和 Gal 存在不被高碘酸氧化的键型或是位于支链或主链末端。透析袋内上清液中同时检出了 Gly，说明侧链或主链末端含有可被高碘酸氧化的 1→、1→2、1→6、1→2, 6 等键型中的某些键型。透析袋内沉淀中检出 Ara、Man 和 Gal，表明主链中存在 3 种单糖 Ara、Man 和 Gal，并且这 3 种糖以不被高碘酸氧化的 1→3、1→2, 3、1→3, 4、1→3, 6、1→2, 3, 4 等键型中的某些键型的形式存在。

3.2.3 甲基化分析 CALB-1 经糖醛酸还原、甲基化后进行 IR 光谱检测，结果显示 3 400 cm^{-1} 处无吸收，说明甲基化完全。完全甲基化的样品经水解、还原和乙酰化后进行 GC-MS 分析。CALB-1 的甲基化结果见表 2。分析表明，Ara 主要以 1→、1→4 键型存在，Gal 主要以 1→4, 6、1→3、1→6 键型存在，Man 主要以 1→4, 6、1→6、1→3, 6 键型存在，Rha 主要以 1→4 键型存在。

表 2 CALB-1 的甲基化分析

Table 2 Methylation analysis of CALB-1

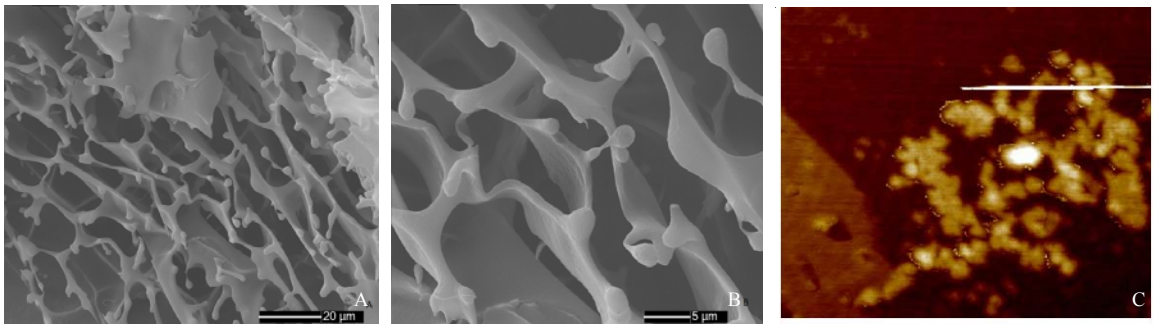
糖类衍生物	连接方式
1,4,5-tri-*O*-acetyl-2,3-di-*O*-methyl-arabinitol	→4)-α-Araf-(1→
1,5-di-acetyl-3,2,4-tri-*O*-methy-*D*-arabitol	α-Araf-(1→
1,4,6-tri-*O*-acetyl-2,3,5-tri-*O*-methyl-*D*-galactitol	→4,6)-Galp-(1→
1,3,5-tri-*O*-acetyl-2,4,6-tri-*O*-methyl-*D*-galactitol	→3)-Galp-(1→
1,5,6-tri-*O*-acetyl-2,3,4-tri-*O*-methyl-*D*-galactitol	→6)-Galp-(1→
1,4,6-tri-*O*-acetyl-2,3,5-tri-*O*-methyl-*D*-mannitol	→4, 6)-Man-(1→
1,6-di-*O*-acetyl-2,3,4,5-tetra-*O*-methyl-*D*-mannitol	→6)-Man-(1→
1,3,6-di-*O*-acetyl-2,4,5-tri-*O*-methyl-*D*-mannitol	→3,6)-Man-(1→
1,3,5,6-tetra-*O*-acetyl-2,4-di-*O*-methyl-*D*-mannitol	→3,6)-Man-(1→
1,4-di-*O*-acetyl-2,3,5-tri-*O*-methyl-rhamnitol	→4)-α-Rhap-(1→

3.3 CALB-1 的分子形态分析

CALB-1 的分子形态分析结果见图 3。综合分析得出 CALB-1 样品表面粗糙呈不规则的链状多分支结构，松散且伴有卷曲的聚合状，不规则组织可证明 CALB-1 是一种非晶态固体，且 CALB-1 在水溶液中分布不均匀，出现团聚现象。

3.4 CALB-1 的免疫调节活性

3.4.1 CALB-1 对免疫低下小鼠单核细胞吞噬功能的影响 由表 3 可知，与对照组相比，模型组 *K* 值和 α 值均明显下降，说明免疫低下小鼠模型制备成功；CALB-1 的低剂量给药组与模型组相比，*K* 值和 α 值无明显变化；而 CALB-1 中、高剂量组与模型组比较，*K* 值和 α 值均明显上升，并呈现显著性差异（$P<0.01$）。结果表明，枳壳均一多糖 CALB-1 有提高免疫低下模型小鼠的 *K* 值和 α 值的作用，因



A-SEM 的×1 000 倍照片 B-SEM 的×3 000 倍照片 C-AFM 照片

A-×1 000 image of SEM B-×3 000 image of SEM C-AFM image

图 3 CALB-1 的分子形态图像

Fig. 3 Molecular morphorlogy images of CALB-1

此具有体内免疫增强作用。

3.4.2 CALB-1 对小鼠脾细胞增殖的影响 由表 4 可知，CALB-1 高剂量组有促进小鼠脾细胞增殖的作用，并呈现显著性差异（$P<0.01$）。而 CALB-1 低、中剂量未表现出统计学意义。此实验结果说明，枳壳均一多糖 CALB-1 具有体外免疫增强作用。

表 3 CALB-1 对免疫低下小鼠单核细胞吞噬功能的影响 ($\bar{x}\pm s$, n = 10)

Table 3 Effect of CALB-1 on mononuclear-macrophage phagocytic function in hypo-immunologic mice ($\bar{x}\pm s$, n = 10)

组别	剂量/(mg·kg^{-1})	K	α
对照	—	0.051±0.005	6.175±0.312
模型	—	0.031±0.002$^{\#\#}$	4.603±0.283$^{\#\#}$
CALB-1	400	0.042±0.003**	5.633±0.356**
	200	0.039±0.002**	5.439±0.376**
	100	0.033±0.005	4.801±0.677

与对照组比较：$^{\#\#}P<0.01$；与模型组比较：$^{**}P<0.01$

$^{\#\#}P<0.01$ *vs* control group; $^{**}P<0.01$ *vs* model group

表 4 CALB-1 对小鼠脾细胞增殖活性的影响 ($\bar{x}\pm s$, n = 10)

Table 4 Effect of CALB-1 on splenocyte proliferation of mice ($\bar{x}\pm s$, n = 10)

组别	ρ/(μg·μL^{-1})	A
对照	—	0.416±0.028
CALB-1	0.1	0.487±0.021**
	0.05	0.426±0.052
	0.025	0.413±0.049

与对照组比较：$^{**}P<0.01$

$^{**}P<0.01$ *vs* control group

4 结论

采用色谱法对 CALB 进行分离纯化，获得 CALB-1，并经过 HPLC 分析得出 CALB-1 为均一多糖并确定其 M 为 3.28×10^7。运用 IR 光谱、高碘酸氧化[13]、甲基化分析[14-15]等分析方法对 CALB-1 的初级结构进行分析，得出 CALB-1 为多支结构的酸性多糖，其主链主要由 Ara、Man 和 Gal 构成，且主要以 1→、1→4 键型存在。SEM 和 AFM 是高级结构的研究工具，Ludwing 等[16]利用 AFM 研究了多糖及超分子结构，因此选用 SEM 和 AFM 对 CALB-1 的高级结构进行简单分析，得出 CALB-1 为非晶态固体。

根据文献记载，多糖具有一定的免疫调节作用，是许多中药的主要活性成分，具有调节机体免疫、抗肿瘤、抗病毒、抗氧化等功效[17]。因此选用脾细胞增殖实验及环磷酰胺致免疫低下小鼠单核细胞吞噬作用的影响实验[18]对 CALB-1 的免疫调节作用进行初步研究，研究结果表明 CALB-1 具有一定的免疫增强活性，这为枳壳多糖的深入研究奠定了一定的理论基础。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.

[2] 李仪奎, 姜名瑛. 中药药理学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 1992.

[3] 清•孙墨衍, 孙冯冀辑. 神农本草经 (拍印本) [M]. 北京: 商务印书馆, 1984.

[4] 宿树兰. 枳壳的研究进展 [J]. 中药材, 2001, 24(3): 222-224.

[5] 宁书年, 张 桂. 生物多糖类物质对人体的作用 [J]. 食品科学, 2005, 26(9): 613-614.

[6] Marx J L. Oxygen free radicals linked to many diseases [J]. *Science*, 1987, 235(4788): 529.

[7] 王松柏. 防风多糖的分离纯化及结构分析 [D]. 太原: 山西大学, 2006.

[8] 杨建雄. 生物化学与分子生物学实验技术教程 [M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 2009.

[9] 张泽庆. 防风多糖的提纯、结构分析及生物活性研究 [D]. 西安: 陕西师范大学, 2008.

[10] Mizuno T. The extraction and development of antitumor active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan [J]. *Int J Med Mushrooms*, 1999, 1(1): 9-29.

[11] 林梦感, 杨义芳, 许海燕. 黄芪多糖 MAPS-5 的化学结构及其体外淋巴细胞增殖活性 [J]. 中草药, 2009, 40(12): 1865-1868.

[12] 孙润广, 张 静. 甘草多糖螺旋结构的原子力显微镜研究 [J]. 化学学报, 2006, 64(24): 2467-2472.

[13] 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.

[14] Silveira M L, Smiderle F R, Moraes C P, *et al*. Structure characterization and anti-inflammatory activity of a linear β-*D*-glucan isolated from *Pleurotus sajor-caju* [J]. *Carbohydr Polym*, 2014, 113(26): 588-596.

[15] Deng P, Linqiang W, Congheng C, *et al*. Structure characterization of a novel neutral polysaccharide isolated from *Ganoderma lucidum* fruiting bodies [J]. *Food Chem*, 2012, 135(3): 1097-1103.

[16] Ludwing M, Rief M A. A tool for single-molecule experiment [J]. *Appl Phys B*, 1999, 68(2): 173-184.

[17] 丁一芳, 李连闯, 赵 玺. 多糖的研究进展 [J]. 黑龙江医药, 2008, 19(2): 123-126.

[18] 王思芦, 汪开毓, 赵 玲, 等. 鸡枞菌多糖对免疫抑制小鼠免疫功能的影响 [J]. 中国药理学通报, 2013, 29(1): 59-63.