

• 综 述 •

基于多糖受体理论的黄芪多糖质量控制研究思路

曹宇欣¹, 李 科^{1,2*}, 秦雪梅^{1*}, 焦思明², 杜昱光², 李先荣³

1. 山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

2. 中国科学院过程工程研究所, 北京 100190

3. 山西健硕食品药品研究院有限公司, 山西 太原 030000

摘 要: 黄芪是我国常用的大宗中药材, 具有很高的药用及食用价值。其化学成分主要包括皂苷类、黄酮类、多糖类及氨基酸类等。其中黄芪多糖(*Astragalus polysaccharide*, APS)作为黄芪的主要活性成分因其非专属性和可控性不强等问题, 未能作为质控指标评价黄芪种质资源。多糖受体理论的提出和应用为解决多糖类药品质控的国际性难题提供了新思路。综述了近年来黄芪多糖质量控制与多糖受体理论的研究进展, 并提出了黄芪寡糖活性中心的质控研究思路。

关键词: 黄芪多糖; 构效关系; 质量控制; 多糖受体理论; 多糖活性中心

中图分类号: R284; R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)09-2201-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.09.028

Research approach on quality control of *Astragalus polysaccharides* based on polysaccharide receptor theoryCAO Yu-xin¹, LI Ke^{1,2}, QIN Xue-mei¹, JIAO Si-ming², DU Yu-guang², LI Xian-rong³

1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

2. Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

3. Shanxi Jianshuo Food and Drug Research Institute Co., Ltd., Taiyuan 030000, China

Abstract: *Astragali Radix* is a commonly used staple Chinese herbal medicine with high medicinal and edible value. Its chemical composition mainly contains saponins, flavonoids, polysaccharides, and amino acids. Among them, *Astragalus polysaccharides* (APS), as the main active component of *Astragali Radix*, failed to be used as a quality control index to evaluate germplasm resources due to its non-specificity and weaker controllability. The proposal and application of polysaccharide receptor theory provides a new way to solve the international problem of quality control of polysaccharide drugs. In this paper, several related research literatures on the quality control of polysaccharides from *Astragali Radix* and polysaccharide receptor theory in recent years were reviewed, and the research ideas of quality control of *Astragalus oligosaccharide* active center were proposed.

Key words: *Astragalus polysaccharides*; structure-activity relationship; quality control; polysaccharide receptor theory; polysaccharide active center

黄芪 *Astragali Radix* 是豆科植物蒙古黄芪 *membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根。其味甘, 性微温, 归肺、脾经, 具有补气升阳、益卫固表、利尿消肿、生津养血、托毒排脓、敛疮生肌等功效, *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *A.*

收稿日期: 2019-01-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81872962); 山西省优秀人才科技创新项目 (201605D211030); 山西省优秀人才科技创新项目 (201705D211020); 山西省重点研发计划重点项目 (201603D311101); 国家中药标准化项目 (ZYBZH-Y-JIN-34); 山西省科技攻关项目 (20150313004-5)

作者简介: 曹宇欣 (1994—), 女, 硕士在读, 研究方向为中药质量控制。Tel: 18835196398 E-mail: 18835196398@163.com

***通信作者** 秦雪梅, 女, 博士, 博士生导师, 研究方向为中药质量控制与活性成分研究及中医药代谢组学研究。

Tel/Fax: (0351)7018379 E-mail: qinxm@sxu.edu.cn

李 科, 男, 博士, 硕士生导师, 研究方向为中药质量控制及创新药物研发。Tel/Fax: (0351)7019297 E-mail: like@sxu.edu.cn

临床上用于气虚乏力、食少便溏、中气下陷、久泻脱肛、便血崩漏、表虚自汗、气虚水肿、痈疽难溃、久溃不敛、血虚痿黄、内热消渴等证^[1]。黄芪中主要含有皂苷类、黄酮类、多糖类、氨基酸及微量元素等多种化学成分。黄芪多糖是黄芪药材中含量最多、免疫活性最强的一类物质^[2]，具有免疫调节、抗肿瘤、降血糖、抗衰老等多重功效^[3-7]，故应将其作为含量测定指标用于黄芪的质量评控，但由于多糖存在专属性及可控性差等方面问题，不具备质量标志物条件而未能建立专属性含量测定项目，进一步限制了大多数含黄芪中成药的质控与中药多糖的新药研发。本文首先分析了多糖类成分的结构复杂性与活性的关系及其对质量控制的挑战，其次对黄芪多糖质量控制研究进展进行归纳总结，在此基础上，综述多糖受体理论的研究进展，提出以活性寡糖为指标的黄芪多糖质控策略。

1 黄芪多糖构效关系的复杂性

多糖的化学结构是其发挥生物活性的基础。但由于多糖结构的复杂性和研究手段的局限性，多糖的研究始终滞后于蛋白质和核酸。将多糖作为质控的指标成分进行研究，需要解决多糖化学结构测定不准确、提取分离难度大、质量控制困难以及药效机制难以阐明等诸多问题，所以明确多糖的构效关系是多糖质量控制的前提。多糖的构效关系是指多糖一级结构和高级结构以及理化性质与其生物活性的关系，是糖化学和糖生物学共同关注的焦点问题。

1.1 黄芪多糖一级结构与生物活性的关系

多糖的一级结构包括单糖组成、连接方式、糖苷键类型、分支度等，每一因素对多糖的生物活性都有不同程度的影响^[8]。黄芪多糖是从黄芪中分离提取的有效成分，主要为葡聚糖和杂多糖。近年来多种结构的黄芪多糖成分陆续从不同基原黄芪中被分离纯化，显示了黄芪多糖结构的多样性，为分析其生物活性提供了物质基础。

1.1.1 主链结构与生物活性的关系 有研究表明，单糖的组成对多糖活性的影响远远小于糖苷键和单糖连接方式。Li 等^[9]研究指出，黄芪多糖的免疫调节活性主要与其结构 α -(1 $\rightarrow$ 4)-D-葡聚糖有关，该结构的存在能够显著增强胃癌大鼠的免疫力，该研究为黄芪多糖用于胃癌的治疗提供了一定依据。

1.1.2 侧链基团与生物活性的关系 一些多糖的生物活性与其中是否含有某些化学基团密切相关。Kiyohara 等^[10]从蒙古黄芪的地上部分分离得到了

13 种多糖，这些多糖均表现出免疫调节活性。其活性与结构相关，9 个活性多糖由阿拉伯半乳聚糖、含有果胶的阿拉伯半乳聚糖或果胶组成，而阿拉伯半乳聚糖、含有果胶的阿拉伯半乳聚糖的活性与带有 8 个聚合度的 β -D-1,6-半乳寡聚糖侧链的 β -D-1,3-半乳聚糖基团相关。研究发现不同侧链对集合淋巴结的免疫调节贡献不同，同时半乳糖基侧链的降解还会降低多糖免疫调节活性。

1.1.3 分支度与生物活性的关系 分支度大小与多糖生物活性也紧密相关，去分支后多糖的活性明显下降。但是，并不是分支越少活性越弱，分支数适中的多糖往往具有较强的活性，分支的长度对多糖的活性也有影响^[3]。Bohn 等^[11]对几十种葡聚糖的分支度与其抗肿瘤活性进行了比较，认为分支度在 0.20~0.33 的 β -1,3-D-多聚糖具有更高的生物活性。由此可见，分支度大小与多糖生物活性紧密相关，分支度过大或过小都无法使多糖生物活性达到理想状态。

1.2 黄芪多糖高级结构与生物活性的关系

随着对多糖化学结构与生物活性关系的深入研究，发现二者不仅是建立在多糖分子的一级结构基础上，而且还与多糖分子的高级结构即空间构象有关。由于受到多糖空间结构测试手段的限制，多糖的高级结构与其生物活性的关系至今还不十分明确^[12-13]。有些多糖具有相同的一级结构，但活性迥异，这主要是由其高级结构的差异引起的。

1.3 黄芪多糖理化性质与生物活性的关系

1.3.1 水溶性与生物活性的关系 经大量实验证明，多糖的侧链基团与其生物活性密切相关。对于具有螺旋结构的多糖来说，一方面侧链可以使螺旋结构更加稳定，另一方面分布于螺旋结构周围的亲水基团对于维持多糖的生物活性是极其重要的。水溶性 D-葡聚糖是一种有抗肿瘤活性、无过长支链、不易被人体内 D-葡聚糖酶很快水解的多糖；而水溶性多糖，如糖原、淀粉、糊精无活性，可能与它们有过长的支链、易被酶解有很大关系。将 β -1,3-葡聚糖侧链上的葡萄糖基转化成 3,6-脱羟基衍生物，则其抑瘤活性消失；而将 β -1,3-葡聚糖支链糖基转化成多元醇，可提高其活性。由此说明提高水溶性能增强多糖的生物活性^[11]。

1.3.2 相对分子质量与生物活性的关系 多糖的生物活性很大程度上取决于相对分子质量的大小。相对分子质量在 $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$ 的葡聚糖活性比较

强,而相对分子质量为 $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ 的相同来源的多糖却没有活性^[14]。张恩户等^[15]将相对分子质量在 $2.1 \times 10^4 \sim 4.1 \times 10^4$ 的黄芪多糖与其水解产物(相对分子质量在 $1.0 \times 10^4 \sim 2.1 \times 10^4$) 进行比较,结果显示水解后的低相对分子质量的多糖产物在提高免疫低下小鼠淋巴细胞增殖和血清溶血素水平方面效果更加显著,从而推测降解后的黄芪寡糖的活性要强于大分子的黄芪多糖。

综上,黄芪多糖结构的多样性和复杂性及其与生物活性的关系一直是其质量控制分析的难点。但是,目前对于黄芪多糖构效关系的研究较少,尤其是其高级结构与生物活性的关系很少有文献报道。因此,比较研究黄芪多糖结构特征与生物活性的关系,建立基于结构特征的多糖质量控制方法,对于保证黄芪多糖的安全有效至关重要,是黄芪多糖质量控制的基础。

2 黄芪多糖质量控制现状与挑战性

中药多糖的质量控制包括 2 方面内容:定性分析和定量检测,由于多糖的复杂性,建立简便快速、准确性好、特异性高的定性定量方法多年来一直是中药多糖质量控制的关键与瓶颈。目前,总多糖含量测定是其主要分析方法。

2.1 黄芪多糖中总糖含量测定方法

多糖的总糖含量决定了其纯度,是多糖药物质量控制最基本的问题。黄芪多糖总糖含量测定一般利用单糖的缩合反应进行显色后用比色法测定,常用方法有苯酚-硫酸法、蒽酮-硫酸法、3,5-二硝基水杨酸(DNS)比色法和间接碘量法等。也有直接采用高效液相色谱法(HPLC)测定多糖含量^[16],但由于缺少对照品和有效检测手段,该方法并未得到广泛认同。张艳贺等^[17]采用苯酚-硫酸法结合紫外分光光度法测定不同产地黄芪中黄芪多糖的含量,对不同产地黄芪多糖含量进行比较,评价不同产地黄芪的优劣。

2.2 黄芪多糖相对分子质量大小和分布测定方法

天然多糖质量控制的一个重要方面是相对分子质量大小及其分布,多糖在不同的环境介质中相对分子质量可能相差很大,从而影响多糖的生物活性^[18]。多糖的相对分子质量有重均相对分子质量(M_w)、数均相对分子质量(M_n)和黏均相对分子质量(M_η)等。目前常用体积排阻色谱法(包括凝胶渗透色谱法和高效凝胶渗透色谱法)测定多糖相对分子质量和分布。闫巧娟等^[19]通过分级醇沉、分步醇沉和超滤方法研究黄芪多糖的相对分子质量分

布,发现其分布很不均匀,相对分子质量偏大或偏小的多糖较多,而 $3.0 \times 10^3 \sim 1.5 \times 10^5$ 这一段的多糖仅占总多糖的 13.2%。但多糖相对分子质量为一相对概念,不同检测方法测定结果存在差异^[20]。来源近似的不同多糖在进行相对分子质量分布测定时,几乎难以区分,因而对质量控制的作用十分有限^[21]。

2.3 黄芪多糖的单糖组成分析

天然药物中的多糖一般不是由一种单糖构成的,而是由多种比例固定的单糖组成,由此对多糖单糖种类的鉴定和单糖物质的量比的分析做出相应规定,就能在一定程度上对多糖质量进行有效控制。黄芪多糖的单糖组成分析有气相色谱法、液相色谱法、薄层色谱法(TLC)、高效毛细管电泳法(HPCE)等。陈艳蕊等^[22]采用闪式提取、乙醇沉淀法从黄芪根部提取多种多糖,经水解、乙酰化后利用气相色谱-质谱法分析黄芪水溶性多糖中单糖组成、结构及其比例,并将同样的方法应用到 8 个不同产地或不同级别的黄芪样品中,得到不同黄芪样品中黄芪多糖的单糖种类及含量有较大差别。但其鉴别的过程比较复杂,该方法对质量控制的适用性尚需进一步研究。

2.4 黄芪多糖中杂质的检测

天然药物提取得到的多糖中常常含有蛋白质、核酸、单糖、色素、无机盐等杂质,将多糖中的杂质进行含量限定对多糖质量控制有重要意义。制定满足质量标准的杂质限量可在实际生产中指导黄芪多糖的提取纯化工艺,如除脂、除蛋白、脱色、柱分离等。黄芪多糖中的杂质如蛋白质在 280 nm 处有明显的紫外吸收,可利用紫外分光光度法对蛋白杂质进行定性鉴别,同时可用比色法测定这类杂质的含量。闫巧娟等^[23]采用考马斯亮蓝 G-250 染色法检测黄芪多糖中蛋白质含量,探讨了 5 种蛋白酶对黄芪多糖中蛋白质的脱除效果,并与传统的 Sevag 法进行对比,结果显示应用酶法脱除黄芪多糖中的蛋白质明显优于 Sevag 法。

2.5 糖谱法的应用

用于多糖定性分析和定量检测的糖谱法通过系列定位酶切技术联用各种色谱分析,结合多糖活性评价^[24-25],可实现基于活性结构特征的多糖定性、定量分析,并成功应用于多种中药多糖及其产品的质量控制。与多糖其他定性定量方法相比,糖谱法以酶催化水解,具有选择性好、特异性高、反应条件温和、产物稳定等优点,是一种高效特异的多糖质量控制策略^[26]。基于多糖对不同酶定位水解的响

应差异及水解产物的色谱特征,可实现不同来源多糖的鉴别分析,根据分离技术的不同,目前糖谱法分别有基于荧光辅助凝胶电泳(PACE)、高效薄层色谱(HPTLC)和HPLC的糖谱法。高凡茸^[27]建立了基于可溶性糖类成分三氟乙酸(TFA)水解技术的糖谱分析方法,并据此寻找不同栽培方式、不同种属黄芪中差异性的糖片段,筛选差异糖片段作为潜在的质量评价指标。郝霞^[28]利用糖谱技术,建立黄芪细胞壁结构多糖的糖谱组,从中找出不同种、不同生长方式黄芪的差异多糖组分,并将该组分作为鉴别和评价黄芪的质控指标。李晓霞等^[29]模拟人工胃液条件处理不同种质资源蒙古黄芪(移栽芪和野生芪)和膜荚黄芪(移栽芪和野生芪)细胞可溶性多糖及糖缀合物,获得一系列PACE糖指纹图谱,用于黄芪的种质资源鉴别和评价。

2.6 黄芪多糖质量控制的挑战性

在黄芪的研究中,建立以多糖成分为质控指标的质量标准主要存在以下问题^[30-33]:①检测指标及方法无专属性。虽然《中国药典》2015年版共收录了包括动物多糖类、微生物多糖类和植物多糖类药品标准71个,检测方法有紫外检测法(玉竹)、滴定法(注射用香菇多糖)、旋光度法(右旋糖酐类),但是这些方法均是缺乏专属性的总多糖测定方法^[34]。国内学者曾以总多糖含量、单糖组成、糖苷键类型、红外光谱比较不同黄芪,然而因这些指标及方法缺乏专属性而未收录入药典。②缺乏高纯度多糖对照品。由于提取的多糖往往是混合物,且聚合度不均一,受多糖分离纯化技术制约,难以制备高纯度单体作为对照品。目前,缺乏可用于质量控制的黄芪多糖对照品是推进其质量标准提升缓慢的一大瓶颈。③相对分子质量分布广且结构可控性差。黄芪粗多糖相对分子质量分布广($8.7 \times 10^3 \sim 4.8 \times 10^5$),难以精确阐述生物活性与相对分子质量及其范围的相关性,且支链结构分布不均一,尚无适宜方法对其精准测定,只能得到统计性结构,而这些支链结构往往对活性具有重要作用^[35]。对于多糖相对分子质量和分布研究,其影响因素较多,所建立的方法专属性和重现性较差,既难以确定相对分子质量分布与多糖纯度相关性,又无法说明多糖的植物或动物来源。④生物效价评价应用受限。生物效价法对于活性明确且方法敏感的药物如抗凝血肝素类药物比较适用,然而根据相关法规和指南要求^[36],生物效价法的选择应与药品的功能主治、作用机制相关,

还要符合准确度、精密度、专属性、线性范围等要求。黄芪多糖功能广泛,由于结构复杂及体内代谢分析检测困难,其分子作用机制尚不明确^[2]。此外,由于多糖单体的分离和合成均较困难,其对照品(阳性对照)尚属空白,所以效价法尚无法应用于黄芪多糖的研究。

综上,因为现有的方法用于控制黄芪多糖质量均存在一定的缺陷,目前多糖药物的质量控制需要2种或多种方法的相互结合,但也只是对于药物总多糖而言,且方法并无专属性。所以更加准确有效、更具有专属性的多糖质量控制方法有待进一步探寻。

3 多糖受体理论与多糖质量控制

3.1 多糖受体理论

近年来,多糖作用的受体是研究的热点,并取得了一定的进展。随着科学技术的发展和对多糖作用的深入认识,人们已经发现体内多糖受体的存在。多糖受体理论研究结果表明,具有免疫调节活性的多糖,有类似糖蛋白结构上的糖链,可与细胞表面模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)结合,活化胞内信号通路,促进细胞因子等免疫物质基因表达,进而激活免疫系统(图1)^[37-39]。

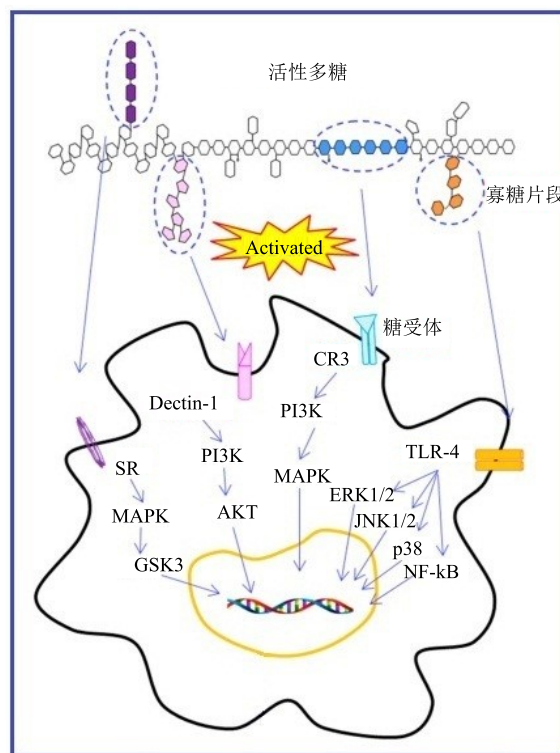


图1 多糖与受体结合示意图

Fig. 1 Schematic diagram of polysaccharide-receptor binding

目前,有研究显示多糖抑制肿瘤细胞生长的作用机制也与受体有关:①多糖或其寡糖片段通过与免疫细胞表面的受体(Dectin-1、CR3、TLR-2/6等)结合,激活免疫系统并释放细胞因子吞噬或杀伤肿瘤细胞^[40-41];②多糖或其寡糖片段通过与细胞生长因子(EGF、bFGF等)或相关酶(磷脂酰肌醇-3-激酶、磷酸化激酶等)结合,抑制肿瘤细胞的生长^[42-43];③多糖或其寡糖片段与促血管生成因子和促血管生成因子受体相结合,调节miRNAs阻断血管生成,杀死肿瘤细胞,抑制肿瘤细胞生长或诱导肿瘤细胞凋亡^[44-47]。

目前发现的受体主要包括Toll样受体(TLR)、甘露糖受体、Dectin-1、Dectin-2、清道夫受体、补体受体3(CR3)和Lactosylceramide受体(CDw17)。如细菌脂多糖(LPS)的受体为TLR-2和TLR-4;甘露聚糖受体是C型凝集素、甘露糖结合凝集素(MBL)和TLR-4等^[48-49]。β-葡聚糖受体则包括CR3、乳糖神经酰胺、清道夫受体和Dectin-1^[50-51]。虽然从目前研究进展看,有关多糖受体只有以上几种,但是由于多糖结构的多样性和复杂性,可以预测,今后还会有更多的多糖受体被揭示。

3.1.1 TLR TLR广泛表达于免疫系统中,是一类I型跨膜糖蛋白,由胞外区、跨膜区和胞质区组成。TLRs作为典型的模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)可以识别病原相关的分子模式^[52]。TLR在固有免疫和引导适应性免疫中扮演着重要的角色。至今至少有10种人类Toll的同源物和13种鼠类的TLR相继被鉴定,对相关的分子结构及其特异性配体、受体与配体之间的识别,以及信号转导通路均有了不同程度地了解^[53-55]。研究表明天然来源的多糖可以通过TLR4、TLR2介导多种免疫细胞激活细胞内信号通路,活化转录,促进细胞因子的释放,从而发挥免疫调节作用^[56]。

3.1.2 C型凝集素受体 C型凝集素受体是模式识别受体中一类重要的家族,具有1个或多个C型凝集素样结构域(C-type lectinlike domains, CTLDs),也位于C型凝集素受体上,含有序列同源的碳水化合物识别域(carbohydrate recognition domain, CRD)^[57]。目前与多糖相互作用的C型凝集素受体主要是甘露糖受体及Dectin-1和Dectin-2。甘露糖受体属于多凝集素受体,是一种相对分子质量为 1.8×10^5 的I型跨膜糖蛋白,表达于大部分组织巨噬细胞、内皮细胞和树突状细胞,可识别存在于细胞表面或病原

体细胞壁上的多种糖分子,主要通过参与受体介导的内吞作用和吞噬作用,维护机体内环境的稳定,并将非特异性免疫与特异性免疫联系起来,组成机体的一种免疫防御系统^[58]。Dectin-1是一种模式识别受体,在抗真菌天然免疫中发挥着重要作用。Dectin-1是吞噬细胞表面对β-葡聚糖特异性的受体,树突状细胞、单核细胞、巨噬细胞(如肺泡巨噬细胞和炎症巨噬细胞)、中性粒细胞均能广泛表达β-葡聚糖受体^[59]。Dectin-2分子含有一个EPN序列(Glu-ProAsn)和一个钙离子依赖性CRD,能够识别甘露糖结构的碳水化合物,其特异性配体是高甘露糖结构^[60]。

3.1.3 清道夫受体 清道夫受体是表达于巨噬细胞表面的一类模式识别受体,能识别细菌和真菌细胞壁多糖和脂质,介导吞噬作用,分为多种类型,主要为SRA和SRB,还包括SRC等。

3.1.4 CR3 CR3又称Mac-1、αMβ2整合蛋白CD11b/CD18,是白细胞黏附受体组的重要成员,其可促使效应细胞与靶细胞之间的接触,增强吞噬作用,因而在免疫调节中具有重要作用。CR3的配体主要是iC3b,有文献报道β-葡聚糖的受体也为CR3^[61]。

3.1.5 Lactosylceramide受体 CDw17是中性粒细胞上一个主要的神经鞘糖脂膜成分,已被确定为β-葡聚糖的受体,但其介导β-葡聚糖的反应机制不是很明确^[62]。Wakshull等^[63]报道CDw17的特异性单克隆抗体能够抑制PGG-葡聚糖[一种β(13)葡聚糖]激活核转录因子-κB(NF-κB)而进行核转移,表明CDw17是PGG-葡聚糖的受体。

综上,多糖在免疫细胞表面的受体不是单一的,这与组成多糖的单糖序列及空间结构的差异有关。

3.2 基于受体的多糖活性中心发现研究

目前研究表明,多糖在与这些蛋白受体结合时,仅是多糖分子中的寡糖片段(寡糖一般为2~10个单糖聚合而成)与受体相结合,这与酶作用过程相似,可能在多糖分子中也存在一种或多种寡糖片段的“活性中心”,这是由其特殊化学结构决定的。当多糖与受体作用时,往往只是其中具有特异性的“活性中心”起作用。

受“多糖受体”思路与方法的启示,有学者^[64-65]在对中药多糖活性决定部位研究的基础上进行归纳总结发现,具有抗补体活性的甘草多糖、柴胡多糖、当归多糖的活性部分都表现出含半乳糖醛酸聚糖区

和带中性糖侧链的鼠李半乳糖醛酸中心 (ramified) 区, 且分支区与抗补体作用、促进有丝分裂和调节巨噬细胞 Fc 受体兴奋性的活性有关。当这些活性中心被替代或受到空间阻碍时, 多糖的生物活性受到很大影响。如从当归中获得的主要由 6-半乳糖 (Gal) 组成的寡糖醇片段有抗补体作用, 但用相应标准寡糖代替则不具备生物活性。不少研究表明, 降低多糖相对分子质量后仍保持活性或活性更强, 如肝素抗凝血活性, 只需 5 个寡糖片段, 这 5 个寡糖片段可能就是肝素保持抗凝血活性所必须的活性中心部位^[66]。从茅苍术根茎中分离的有刺激肠免疫系统的活性多糖, 用结合有抗原的凝胶柱分析发现, 该多糖含有 Ara-3,6-Gal 元件和大量抗高碘酸钠氧化的 3-Gal 侧枝, 这些结构为活性所需^[67]。研究表明, 黄芪多糖 (APS) 包括 3 个亚型: APSI、APSII 及 APSIII。APSI 由 D-葡萄糖、D-半乳糖及 L-阿拉伯糖以物质的量比 1.75:1.63:1 构成, 其平均相对分子质量为 3.63×10^4 。APSII 和 APSIII 均为葡聚糖, 多以 α -(1→4) 键连接, 少数以 α -(1→6) 键连接。在构成 APS 的单糖中, 甘露糖是其主要成分, 其次是葡萄糖^[68]。当 APS 与免疫细胞受体结合时, 只有分子中的少数寡糖片断、化学键及相对分子质量等起关键作用, 如 CR3 受体、甘露糖受体 (TLR、MR), 以及 β -D(1→3)、 α -9(1→4) 化学键等。因此, 将多糖降解为寡糖, 从寡糖水平研究多糖的活性中心 (避免分析复杂的多糖结构), 从而实现研究聚糖与蛋白之间的作用机制与构效关系, 为突破多糖结构研究技术瓶颈提供了新策略。

3.3 基于多糖活性中心的黄芪多糖质量控制研究思路

3.3.1 对黄芪多糖活性中心的初步研究 根据以上研究思路, 本课题组已经按照《中国药典》方法采用体外模拟人工胃酸对从药材中提取的黄芪多糖处理后, 检测发现黄芪多糖已降解为不同相对分子质量的寡糖^[29], 证明黄芪多糖经口服后, 主要以寡糖形式显效。提示应该将黄芪多糖按照降解后的寡糖形式研究其活性。目前已上市的注射用黄芪多糖是 20 世纪 90 年代初山西省中医药研究院根据山西省黄芪资源现状研发的中药静脉用粉针剂。该药能明显促进造血细胞再生和调节免疫功能, 是当时国内首个全面改善放化疗病人血象、提高肿瘤患者生存质量的中成药。该药的成功上市不仅促进了多糖成为国内研究的热点, 而且也引发了世界各大植物

药研究机构的竞相研究^[69]。但是随着近年来中药注射剂用量的迅速增长, 该剂型所致的不良反应也迅速增加。国家食品药品监督管理局将注射用黄芪多糖列为较高风险品种^[70-71]。注射用黄芪多糖不仅具有中药注射液 3 方面特殊性, 而且复杂的多糖大分子增加了其使用的风险。因此, 本课题组目前正在研究将用于化疗后升高白细胞的注射用黄芪多糖 (相对分子质量以 1×10^4 左右为主) 降解为小分子寡糖混合物, 通过小鼠白细胞减少症模型探讨寡糖的升高白细胞效果, 从而证明存在寡糖“活性中心”。

3.3.2 研究思路与技术路线 筛选并确证黄芪多糖中的活性寡糖片段成为构建黄芪多糖含量测定方法的关键科学问题。本课题组提出以下科学假说:

①黄芪多糖包含不同专属性结构的活性中心 (寡糖片段), 这些活性中心可以与相应受体结合, 激活信号通路, 进而发挥药效; ②不同多糖包含活性中心数量可能不同, 导致其活性高低有差异。因此, 黄芪中活性多糖含量应与活性中心数目呈线性关系, 即活性越高, 多糖及活性中心 (寡糖片段) 含量越高, 因此可通过多糖降解获得带有活性中心寡糖片段, 通过药理模型及量效关系筛选验证活性, 同时通过对比其他物种多糖降解片段, 验证其结构专属性, 最后测定活性中心寡糖片段含量即可代表活性多糖含量。以此为依据, 建立黄芪多糖专属性含量测定方法。

3.3.3 技术难点与关键技术 验证以上科学假说存在以下几方面技术挑战: ①定向的多糖降解方法的确立, 以保障获取寡糖活性中心 (降解片段的结构多样性要高) 且每次获得的寡糖组分一致; ②寡糖成分的分离制备; ③寡糖的结构解析; ④黄芪多糖代表性药理模型的筛选及质量标志物筛选, 完成以上工作, 不仅要有先进技术做保障, 还要有大量的前期研究做支撑。

目前已有多种先进技术及黄芪多糖大量免疫功能研究为筛选活性寡糖提供了保障。对于黄芪降解寡糖的获取, 首先要将多糖混合物分离纯化为不同性质的多糖, 然后通过活性筛选和降解获得。其中关键技术之一是多糖的定向降解。近年来建立的分步可控式酸解法、氧化降解法与酶解法共用技术, 不仅可分别获得多糖主链、侧链结构域水解产物, 而且多技术联用具有结构表征全面、降解区域有序、差异片段多样等特点, 改变了多糖降解无可控性的传统观念^[72-73], 为寡糖获取提供了保障。在分离制

备及结构鉴定方面,基于中性酰胺键合相、两性离子键合相等亲水作用填料的发现及多维色谱的应用,可以较好地分离聚合度 2~50 的多糖类化合物有效分离制备^[74-76]。高分辨及多级质谱(MALDI-TOF-MS、ESI-CID-MS/MS)可以提供寡糖序列、连接方式、还原端、分支序列和硫酸根位置信息^[77-80]。在判断糖苷键连接方式方面,目前已总结出的不同断裂碎片与糖苷键类型之间的规律(糖苷键的断裂与糖环内断裂等),为寡糖的结构解析及定量测定提供了有力的依据^[81-84]。在活性筛选方面,已有大量研究报道,黄芪多糖对固有免疫和适应性免疫方面均有较强调节作用,具有抗肿瘤、抗炎、抗病毒、抗衰老等多种药理活性,然而这些差异功能均是其固有免疫调节为基础实现的^[2]。因此,针对黄芪多糖的免疫功能对寡糖进行筛选,通过测定固有免疫、体液免疫、细胞免疫相关指标对寡糖活性进行筛选,并通过正常小鼠和环磷酰胺免疫抑制小鼠模型进行活性验证。此模型及药理指标评价方法比较成熟,易于开展,相关的药理机制研究也有较多报道,为活性寡糖的筛选提供了保障。

4 结语

多糖是诸多中药材中含量丰富、免疫活性较强的一类物质,具有免疫调节、抗肿瘤、降血糖、抗衰老等多重功效。应将其作为含量测定指标用于药材的质量评控,但由于多糖存在专属性及可控性差等方面的问题,不具备质量标志物条件而未能建立专属性含量测定项目,进一步限制了大多数含多糖中药的质控与中药多糖的新药研发。鉴于多糖复杂的构效关系以及专属性和可控性难题,本课题组提出了多糖受体理论研究思路,以期通过分离活性免疫功能多糖,制备寡糖片段,构建结构清楚的寡糖化合物库,并筛选出活性寡糖,同时对比不同种属药用植物多糖降解的寡糖片段结构验证其专属性,以寡糖为指标建立黄芪多糖类成分专属性含量测定方法,来评价不同商品黄芪。为阐明黄芪多糖药效物质基础、丰富多糖受体理论提供了依据,并且为黄芪质量控制提供了新的标准,为解决多糖药品质量控制的国际性难题提供方案,同时还将为未来多糖类化合物的深入开发及战略资源的储备奠定物质基础,促进多糖类药物的研发。

参考文献

- [1] 中国药典[S].一部.2010.
- [2] 李 钦,胡继宏,高 博,等.黄芪多糖在免疫调节方

- 面的最新研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(2):199-206.
- [3] 张 莹,王 蕾,杜梦楠.注射用黄芪多糖治疗肿瘤的临床研究进展[J].药物评价研究,2016,39(6):1092-1094.
- [4] Cho W C, Leng K N. *In vitro* and *in vivo* immune modulating and immune restorative effects of *Astragalus membranaceus* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2007, 113(1): 132-141.
- [5] Li R, Chen W, Wang W, *et al.* Extraction, characterization of *Astragalus* polysaccharides and its immune modulating activities in rats with gastric cancer [J]. *Carbohydr Polymers*, 2009, 78(4): 738-742.
- [6] Liu J, Zhao Z Z, Chen H B. Review of *Astragali Radix* [J]. *Chin Herb Med*, 2011, 3(2): 90-105.
- [7] Yuan Y, Sun M, Li K S. *Astragalus mongholicus* polysaccharide inhibits lipopolysaccharide-induced production of TNF- α and interleukin-8 [J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(29): 3676-3680.
- [8] 聂凌鸿,宁正祥.活性多糖的构效关系[J].林产化学与工业,2003,24(4):89-94.
- [9] Li R, Chen W C, Wang W P, *et al.* Extraction, characterization of *Astragalus* polysaccharides and its immune modulating activities in rats with gastric cancer [J]. *Carbohydr Polymers*, 2009, 78(4): 738-742.
- [10] Kiyohara H, Uchida T, Takakiwa M, *et al.* Different contributions of side-chains in β -D-(1 $\rightarrow$ 3,6)-galactans on intestinal Peyer's patch-immunomodulation by polysaccharides from *Astragalus mongholicus* Bunge [J]. *Phytochemistry*, 2009, 71(2/3): 280-293.
- [11] Bohn J A, Be Miller J N. (1 $\rightarrow$ 3)- β -Glucans as biological response modifiers: A review of structure-functional activity relationships [J]. *Carbohydr Polymers*, 1995, 28(1): 3-14.
- [12] 黄 芳,蒙义文.活性多糖的研究进展[J].天然产物研究与开发,1999,11(5):90-98.
- [13] 陈惠黎,王克夷.糖复合物的结构与功能[M].上海:上海医科大学出版社,1997.
- [14] 屈 静.低分子量黄芪多糖的分离纯化和结构分析[D].长春:东北师范大学,2010.
- [15] 张恩户,王瑞县,岳 明.不同分子量的黄芪多糖对免疫低下小鼠淋巴细胞转化和血清溶血素的影响[J].陕西中医学院学报,2010,33(3):75-76.
- [16] 鲁 萍,任 莉,许爱华,等. HPLC 测定银杏外种皮多糖的分子质量及含量[J].中国中药杂志,2005,30(22):1749-1749.
- [17] 张艳贺,张雷鸣,刘秀波,等.不同产地黄芪中黄芪多糖的含量测定[J].中医药信息,2013,30(5):69-71.
- [18] 郑园园,童珊珊,徐希明,等.药物分析技术在天然多糖质量控制中的应用[J].江苏大学学报:医学版,2017,27(4):363-368.
- [19] 闫巧娟,韩鲁佳,江正强,等.黄芪多糖的分子量分布[J].食品科学,2004,25(8):27-30.
- [20] 陈琴鸣,刘 斌,陈卫平. HPLC-ELSD 法测定固元胶囊中多糖的分子量及其分布[J].中成药,2011,

- 33(1): 79-81.
- [21] 陈春锋, 杨晓彤, 李绪全, 等. 5 个不同灵芝种菌株多糖理化性质及免疫活性研究 [J]. 微生物学报, 2007, 47(4): 628-633.
- [22] 陈艳蕊, 毛欣月, 金文闻, 等. 黄芪多糖结构及其单糖组成的气相色谱-质谱研究 [J]. 现代生物医学进展, 2011, 23(23): 4632-4635.
- [23] 闫巧娟, 韩鲁佳, 江正强. 酶法脱除黄芪多糖中的蛋白质 [J]. 食品科技, 2004(6): 23-26.
- [24] Lin P C, Wu D T, Xie J, *et al.* Characterization and comparison of bioactive polysaccharides from the tubers of *Gymnadenia conopsea* [J]. *Food Hydrocoll*, 2015, 43: 199-206.
- [25] Wu D T, Xie J, Wang L Y, *et al.* Characterization of bioactive polysaccharides from *Cordyceps militaris* produced in China using saccharide mapping [J]. *J Funct Foods*, 2014, 9(1): 315-323.
- [26] 李绍平, 吴定涛, 赵 静. 糖谱及其在中药多糖质量控制中的应用 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(17): 3505-3513.
- [27] 高凡茸. 黄芪药材甜味与品质关联性研究及黄芪糖谱分析方法的建立 [D]. 太原: 山西大学, 2015.
- [28] 郝 霞. 基于细胞壁多糖糖谱的黄芪种质资源鉴别及阿拉伯木聚糖制备研究 [D]. 太原: 山西大学, 2016.
- [29] 李晓霞, 王 迪, 王桂臻, 等. 基于人工胃酸水解的黄芪糖指纹图谱的建立及不同种质资源黄芪鉴别 [J]. 中国现代中药, 2018, 20(2): 152-158.
- [30] 王 莹, 王 赵, 安锦华, 等. 黄芪多糖对照品标准化方法研究 [J]. 中草药, 2017, 48(23): 4897-4903.
- [31] 范慧红. 2010 年版《中国药典》中多糖类药物标准的修订 [J]. 中国药学杂志, 2010, 45(17): 1294-1297.
- [32] 郭志烨, 韩 丽, 杨 明, 等. 中药多糖定量测定方法的探讨 [J]. 中成药, 2014, 36(10): 2172-2174.
- [33] 高怡婷, 柳文媛. 多糖的制备工艺与质量控制研究进展 [J]. 药学进展, 2016, 40(3): 205-211.
- [34] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [35] 谭 西, 周 欣, 陈华国, 等. 植物多糖构效关系研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(21): 4104-4109.
- [36] 孙婷婷, 马晓慧, 李欣欣, 等. 中药生物效价研究现状及开发思路探讨 [J]. 中草药, 2017, 48(9): 1906-1911.
- [37] Jiang M H, Zhu L, Jiang J G. Immunoregulatory actions of polysaccharides from Chinese herbal medicine [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2010, 14(12): 1367-1402.
- [38] 苗 月, 任桂红, 金周雨, 等. 巨噬细胞真菌多糖受体研究进展 [J]. 中国细胞生物学学报, 2017, 39(5): 675-680.
- [39] Pu X Y, Ma X L, Liu L, *et al.* Structural characterization and antioxidant activity *in vitro* of polysaccharides from *Angelica* and *Astragalus* [J]. *Carbohydr Polymers*, 2016, 137(10): 154-164.
- [40] Chan G C F, Chan W K, Sze D M Y. The effects of beta-glucan on human immune and cancer cells [J]. *J Hematol Oncol*, 2009, 2(1): 25-35.
- [41] Schwartz B, Hadar Y. Possible mechanisms of action of mushroom-derived glucans on inflammatory bowel disease and associated cancer [J]. *Ann Transl Med*, 2014, 2(2): 19-29.
- [42] Liu H L, Zhou L, Shi S S, *et al.* Oligosaccharide G19 inhibits U-87 MG human glioma cells growth *in vitro* and *in vivo* by targeting epidermal growth factor (EGF) and activating p53/p21 signaling [J]. *Glycobiology*, 2014, 24(8): 748-765.
- [43] Zhao H J, Liu H Y, Chen Y, *et al.* Oligomannurinate sulfate, a novel heparanase inhibitor simultaneously targeting basic fibroblast growth factor, combats tumor angiogenesis and metastasis [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(17): 8779-8787.
- [44] Qiu H, Yang B, Pei Z C, *et al.* WSS25 inhibits growth of xenografted hepatocellular cancer cells in nude mice by disrupting angiogenesis via blocking bone morphogenetic protein (BMP)/Smad/Id1 signaling [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(42): 32638-32642.
- [45] Xiao F, Qiu H, Zhou L, *et al.* WSS25 inhibits dicer, downregulating micro RNA-210, which targets ephrin-A3, to suppress human microvascular endothelial cell (HMEC-1) tube formation [J]. *Glycobiology*, 2013, 23(5): 524-535.
- [46] Xiao F, Qiu H, Cui H, *et al.* MicroRNA-885-3p inhibits the growth of HT-29 colon cancer cell xenografts by disrupting angiogenesis via targeting BMPRI1A and blocking BMP/Smad/Id1 signaling [J]. *Oncogene*, 2015, 34(15): 1968-1978.
- [47] Shen X K, Fang J P, Lv X F, *et al.* Heparin impairs angiogenesis through inhibition of micro RNA-10b [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(30): 26616-26627.
- [48] Rudd P M, Wormald M R, Stanfield R L, *et al.* Roles for glycosylation of cell surface receptors involved in cellular immune recognition [J]. *J Mol Biol*, 1999, 293(2): 351-366.
- [49] Wang J. Protein recognition by cell surface receptors: Physiological receptors versus virus interactions [J]. *Trends Biochem Sci*, 2002, 27(3): 122-126.
- [50] Akramiene D, Kondrotas A, Didziapetriene J, *et al.* Effects of beta-glucans on the immune system [J]. *Medicina (Kaunas)*, 2007, 43(8): 597-606.
- [51] Chen J, Seviour R. Medicinal importance of fungal beta-(1→3),(1→6)-glucans [J]. *Mycol Res*, 2007, 111: 635-652.
- [52] Kawai T, Akira S. TLR signaling [J]. *Cell Death Differ*, 2006, 13(5): 816-825.
- [53] Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity [J]. *Cell*, 2006, 124(4): 783-801.
- [54] Beutler B, Eidenschenk C, Crozat K, *et al.* Genetic analysis of resistance to viral infection [J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7(10): 753-766.
- [55] Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response [J]. *Nature*, 2007, 449(7164): 819-826.
- [56] Lin K I, Kao Y Y, Kuo H K, *et al.* Reishi polysaccharides induce immunoglobulin production through the

- TLR4/TLR2-mediated induction of transcription factor Blimp-1 [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(34): 24111-24123.
- [57] Weis W I, Taylor M E, Drickamer K. The C-type lectin superfamily in the immune system [J]. *Immunol Rev*, 1998, 163(1): 19-34.
- [58] Zelensky A N, Gready J E. The C-type lectin-like domain superfamily [J]. *FEBS J*, 2005, 272(24): 6179-6217.
- [59] Brown G D, Herre J, Williams D L, *et al*. Dectin-1 mediates the biological effects of betaglucons [J]. *J Exp Med*, 2003, 197(9): 1119-1124.
- [60] Sato K, Yang X L, Yudate T, *et al*. Dectin-2 is a pattern recognition receptor for fungi that couples with the Fc receptor gamma chain to induce innate immune responses [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(50): 38854-38866.
- [61] Yan J, Vetvicka V, Xia Y, *et al*. Beta-glucan, a "specific" biologic response modifier that uses antibodies to target tumors for cytotoxic recognition by leukocyte complement receptor type 3 (CD11b/CD18) [J]. *J Immunol*, 1999, 163(6): 3045-3052.
- [62] Zimmerman J W, Linderthuth J, Fish P A, *et al*. A novel carbohydrate-glycosphingolipid interaction between a β (1-3)-glucan immunomodulator, PGG-glucan, and lactosylceramide of human leukocytes [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(34): 22014-22020.
- [63] Wakshull E, Brunke-Reese D, Linderthuth J, *et al*. PGGGlucan, a soluble β -(1,3)-glucan, enhances the oxidative burst response, microbicidal activity, and activates an NF- κ B-like factor in human PMN: Evidence for a glycosphingolipid β -(1,3)-glucan receptor [J]. *Immunopharmacology*, 1999, 41(2): 89-107.
- [64] Zhao J F, Hiroak O K, Haruk I Y. Hetero geneity and characterization of mitogenic and anti-complementary pectic polysaccharides from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch et D. C. [J]. *Carbohydr Res*, 1991, 219: 149-172.
- [65] Kiyohara H, Takemoto N, Zhao J F, *et al*. Pectic polysaccharide from roots of *Glycyrrhiza uralensis*: Possible contribution of neutral oligosaccharides in the galacturonase-resistant region to anti-complementary and mitogenic activities [J]. *Planta Med*, 1996, 62(1): 14-19.
- [66] 张翼伸. 怎样研究植物多糖 [J]. 生命的化学, 1999, 19(6): 296-297.
- [67] Yu K W, Kiyohara H, Matsumoto T, *et al*. Intestinal immune system modulating polysaccharides from rhizomes of *Atractylodes iancea* [J]. *Planta Med*, 1998, 64(8): 714-719.
- [68] Yan H, Xie Y P, Sun S G, *et al*. Chemical analysis of *Astragalus mongholicus* polysaccharides and antioxidant activity of the polysaccharides [J]. *Carbohydr Polymers*, 2010, 82(3): 636-640.
- [69] 肖 宇, 宋壁伶, 张弘毅. 现代科技创造黄芪真正价值—中药二类新药注射用黄芪多糖 [J]. 天津药学, 2007, 19(1): 77-78.
- [70] 尹 婕, 金少鸿. 中药注射剂不良反应现状及风险控制措施浅析 [J]. 中国药事, 2013, 27(9): 989-993.
- [71] 国家食品药品监督管理局. 国家食品药品监督管理局发布 2010 年药品不良反应报告 [EB/OL]. (2010-04-25) <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL0051/60952html>.
- [72] 于广利. 系列硫酸寡糖的制备及其结构与序列分析 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2004.
- [73] 吕友晶. 不同来源果胶多糖的结构解析及抗肿瘤活性研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2015.
- [74] Rice P J, Adams E L, Ozment-Skelton T, *et al*. Oral delivery and gastrointestinal absorption of soluble glucans stimulate increased resistance to infectious challenge [J]. *J Pharmacol Exper Ther*, 2005, 314(3): 1079-1086.
- [75] 傅 青, 王 军, 梁 图, 等. 糖类化合物亲水作用色谱保留行为评价 [J]. 色谱, 2013, 31(11): 1051-1056.
- [76] Fu Q, Guo Z M, Liang T, *et al*. Chemically bonded maltose via click chemistry as stationary phase for HILIC [J]. *Anal Methods*, 2010, 2(3): 217-224.
- [77] Garthoff J A, Heemskerk S, Hempenius R A, *et al*. Safety evaluation of pectin-derived acidic oligosaccharides (pAOS): Genotoxicity and subchronic studies [J]. *Regult Toxicol Pharmacol*, 2010, 57(1): 31-42.
- [78] Kailemia M J, Ruhaak L R, Lebrilla C B, *et al*. Oligosaccharide analysis by massspectrometry: A review of recent developments [J]. *Anal Chem*, 2014, 86(1): 196-212.
- [79] Yu G, Zhao X, Yang B, *et al*. Sequence determination of sulfated carrageenan-derived oligosaccharides by high-sensitivity negative-ion electrospray tandem mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2006, 78(24): 9499-9505.
- [80] Konda C, Bendiak B, Xia Y. Linkage determination of linear oligosaccharides by MS ($n > 2$) collision induced dissociation of Zl ions in the negative ion mode [J]. *J Am Soc Mass Spectr*, 2014, 25(2): 248-257.
- [81] Wang P, Zhao X, Lv Y, *et al*. Analysis of structural heterogeneity of fucoidan from *Hizikia fusiformis* by ES-CID-MS/MS [J]. *Carbohydr Polymer*, 2012, 90(1): 602-607.
- [82] Everest-Dass A V, Abrahams J L, Kolarich D, *et al*. Structural feature ions for distinguishing N- and O-linked glycan isomers by LC-ESI-IT MS/MS [J]. *J Am Soc Mass Spectr*, 2013, 24(6): 895-906.
- [83] Quemener B, Vigouroux J, Rathahao E, *et al*. Negative electrospray ionization massspectrometry: A method for sequencing and determining linkage position in oligosaccharides from branched hemicelluloses [J]. *J Mass Spectr*, 2015, 50(1): 247-264.
- [84] Maina N H, Juvonen M, Domingues R M, *et al*. Structural analysis of linear mixed-linkage oligosaccharides by tandem mass spectrometry [J]. *Food Chem*, 2013, 136(3/4): 1496-1507.