

悬钩子木多糖的分离纯化及免疫调节活性研究

刘贝女, 张 屏, 吴迎香, 苏日娜, 赵红梅, 包保全*

内蒙古医科大学药学院, 内蒙古 呼和浩特 010110

摘 要: **目的** 从悬钩子木中分离纯化多糖, 初步分析其结构特征并进行免疫调节活性研究。**方法** 采用热水浸提法提取悬钩子木粗多糖 (*Rubus sachalinensis* polysaccharides, RSP), 再经 Cellulose DE-52 纤维素离子交换柱、Sephadex G-100 凝胶柱色谱进行分离纯化; 利用高效凝胶渗透色谱法 (HPGPC) 鉴定纯度并测定相对分子质量; 采用气相色谱分析其单糖组成; 采用红外光谱和核磁共振波谱对其结构进行初步分析; 采用 CCK-8 法检测其对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响; 利用 ELISA 试剂盒测定其对白细胞介素-2 (IL-2)、 γ -干扰素 (IFN- γ) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 释放能力的影响。**结果** 从悬钩子木中分离纯化得到 RSP1-1 和 RSP1-2 2 种多糖, 相对分子质量分别为 13 227 (多分散指数 1.15) 和 9 343 (多分散指数 1.08); 2 种多糖均主要含阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖, 其物质的量比分别是 RSP1-1 (9.5 : 7.0 : 10.3 : 18.6) 和 RSP1-2 (5.7 : 11.1 : 10.3 : 14.2); 红外光谱及核磁共振波谱对其结构分析证明 RSP1-1 可能主要含有 α -1,3-Ara、 β -1,4-Gal、 β -1,3-Glc、 β -1,3-Man 片段, RSP1-2 可能主要含有 β -1,4-Gal、 β -1,3-Glc、 β -1,3-Man 片段。质量浓度在 5~200 μ g/mL 时, RSP1-1、RSP1-2 和 RSP2 均可刺激小鼠脾淋巴细胞的增殖 ($P < 0.05$), 并且明显促进淋巴细胞分泌 IFN- γ 和 TNF- α ($P < 0.05$), 质量浓度为 5 μ g/mL 时能促进淋巴细胞分泌 IL-2 ($P < 0.05$)。**结论** RSP1-1 和 RSP1-2 均为首次从悬钩子木中分离得到的天然来源的均一多糖。红外光谱及核磁共振波谱进一步表征了其纯度和结构特征。RSP1-1、RSP1-2 和 RSP2 均能不同程度促进脾淋巴细胞的增殖, 促进淋巴细胞分泌 IL-2、IFN- γ 和 TNF- α , 呈现一定的免疫调节活性。

关键词: 蒙药; 悬钩子木; 特征图谱; 天然多糖; 分离纯化; 单糖组成; 免疫活性

中图分类号: R931.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)24-5941-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.24.005

Separation, purification and immunomodulatory activity of polysaccharides from *Rubus sachalinensis*

LIU Bei-nv, ZHANG Ping, WU Ying-xiang, SU Ri-na, ZHAO Hong-mei, BAO Bao-quan

College of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China

Abstract: **Objective** To extract, separate and purify homogeneous polysaccharides from *Rubus sachalinensis* and study on monosaccharide component and immunomodulatory activity. **Methods** The crude polysaccharides of *Rubus sachalinensis* (RSP) were extracted by hot water. The Cellulose DE-52 and Sephadex G-100 columns were used to separate and purify homogeneous polysaccharides. The relative molecular mass was analyzed by high-performance gel permeation chromatography, and the monosaccharide composition and structure were preliminarily identified by GC, IR and NMR. The effects on proliferation function of mice spleen lymphocyte proliferation were determined by CCK-8, and the effects on the release capacity of IL-2, IFN- γ and TNF- α were determined by the ELISA kit. **Results** Two homogeneous polysaccharides, RSP1-1 and RSP1-2, were separated and purified, with molecular weights of 13 227 and 9 343 determined by HPGPC. They mainly contained arabinose, mannose, glucose and galactose, with the mole ratios at 9.5 : 7.0 : 10.3 : 18.6 and 5.7 : 11.1 : 10.3 : 14.2, respectively. The structure of RSP1-1 and RSP1-2 was analyzed by IR and NMR, and RSP1-1 might mainly contain α -1,3-Ara, β -1,4Gal, β -1,6-Glc, β -1,3-Man, and RSP1-2 might mainly contain β -1,4-Gal, β -1,6-Glc, β -1,3-Man. At 5—200 μ g/mL, RSP1-1 and RSP1-2 stimulated proliferation of spleen lymphocytes ($P < 0.05$) and promoted lymphocytes to secrete IFN- γ and TNF- α . At 5 μ g/mL, RSP1-1 and RSP1-2 promoted

收稿日期: 2019-04-11

基金项目: 国家自然科学基金地区项目 (81460651); 内蒙古自治区研究生教育创新计划项目 (S201713202); 自治区级大学生创新创业训练计划项目 (03052074)

作者简介: 刘贝女 (1991—), 女, 在读研究生, 研究方向为蒙药药效物质基础及药用植物资源保护。Tel: 15754931437 E-mail: 2433320635@qq.com

***通信作者** 包保全 (1969—), 男, 硕士生导师, 教授, 研究方向为天然产物化学及蒙药资源研究。Tel: 13614716941 E-mail: baobaoquan123@yeah.net

lymphocytes to secrete IL-2. **Conclusion** RSP1-1 and RSP1-2 are natural homogeneous polysaccharides that are obtained from this plants for the first time. Its purity and structure were further characterized by IR and NMR. These two homogeneous polysaccharides promoted the proliferation of splenic lymphocyte in different degrees and promoted lymphocytes to secrete IL-2, IFN- γ and TNF- α that all possessing immunomodulating activity.

Key words: traditional Mongolian medicine; *Rubus sachalinensis* Lévl.; specific chromatogram; natural polysaccharide; isolation and purification; monosaccharide component; immunomodulatory activity

悬钩子木为蔷薇科悬钩子属植物库页悬钩子 *Rubus sachalinensis* Lévl. 的干燥茎枝; 在蒙医临床中常用, 是蒙药基础方“四味土木香散”的组方药材之一, 其质量标准列于《中国药典》2015 年版一部。本品味甘、微辛, 性软、平, 具有解表、调元、止咳之功效, 用于未熟热、瘟疫、证热、感冒、肺热咳嗽、气喘和赫依热等疾病^[1]。悬钩子木中主要含有三萜苷类、黄酮及其苷类、木脂素类和小分子酚酸类化合物, 部分成分具有抗氧化、抗菌、抗炎、镇痛等活性^[2-4]。本课题组前期研究发现, 悬钩子木水提物具有一定的促小鼠脾淋巴细胞增殖的活性, 而其单体化合物及不同极性溶剂萃取物均无明显促增殖作用, 推测水提物中的多糖可能具有免疫调节活性。本实验首次对悬钩子木中多糖类成分及其免疫活性进行研究, 为阐释蒙药悬钩子木的药效物质基础, 为进一步开发、利用蒙药资源提供科学依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

悬钩子木于 2015 年 10 月采自内蒙古赤峰市赛罕乌拉, 原植物经包保全教授鉴定为蔷薇科悬钩子属植物库页悬钩子 *Rubus Sachalinensis* Lévl. 的茎枝。

健康 BALB/C 鼠 SPF 级雌性小鼠, 体质量 (20±2) g, 购于内蒙古医科大学动物中心, 合格证号为 SCXK (蒙) 2015-0001。

D-无水葡萄糖标准品 (CAS 50-99-7, 批号 110833-201506, 质量分数>98%, 中国食品药品检定研究院); L-鼠李糖 (Rha, 批号 MAYA-CR-51, 质量分数>98%)、L-阿拉伯糖 (Ara, 批号 MAYA-CR-5134, 质量分数>98.5%)、D-木糖 (Xyl, 批号 MAYA-CR-7634, 质量分数>99%)、D-甘露糖 (Man, 批号 MAYA-CR-1648, 质量分数>99%)、D-半乳糖 (Gal, 批号 MAYA-CR-5683, 质量分数>99%)、D-核糖 (Rib, 批号 MAYA-CR-1950, 质量分数>99%)、L-岩藻糖 (Fuc, 批号 MAYA-CR-7722, 质量分数>98%) 均购于玛雅试剂公司; 纤维素 Cellulose DE-52 (美国 Whatman 公司); 葡聚糖凝

胶 Sephadex G-100 (瑞典 Pharmacia 公司); 葡聚糖标准品 [T5.8、T22.8、T100、T380、T788, 凝胶渗透色谱 (GPC) 分析标准] 购于 Sigma 公司; 透析袋 7 000~12 000 (上海新睿生物科技有限公司); 重水 (D₂O, Cambridge Isotope Laboratories Inc); 刀豆蛋白 (ConA, 美国 Sigma 公司); 胎牛血清、RPMI-1640 培养基 (FBS, 美国 Gibco 公司); 小鼠淋巴细胞分离液 (达科为生物技术有限公司); (美国 Gibco 公司); Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 试剂盒 (日本同仁研究院); 小鼠肿瘤坏死因子 (TNF- α) ELISA 检测试剂盒、小鼠白细胞介素-2 (IL-2) ELISA 检测试剂盒和小鼠 γ 干扰素 (IFN- γ) ELISA 检测试剂盒 (达科为生物技术有限公司); 96 孔细胞培养板 (美国 Coning 公司); 醋酸酐 (国药集团化学试剂有限公司); 盐酸羟胺 (常州市诚邦化工有限公司); 肌醇 (郑州化工原料有限公司); 吡啶 (天津市大茂化学试剂厂); 氯仿 (天津永晟精细化工有限公司); 苯酚 (汕头市西陇化工厂有限公司); 浓硫酸 (天津永晟精细化工有限公司); 三氟乙酸 (TFA)、无水乙醇、氯化钠 (天津市津东天正精细化学试剂厂); 氢氧化钠 (天津市化学试剂厂), 蒸馏水均为分析纯。

1.2 仪器

Waters 2410 高效液相色谱仪, Waters 2410 示差折光检测器, Empower 色谱工作站处理数据 (美国 Waters 公司); GC-2014C 气相色谱仪 (日本岛津有限公司); TDZ5-WS 型高速离心机 (湖南赫西仪器装备有限公司); UVmini-1280 型紫外分光光度计、岛津 IRAffinity-1 型傅里叶变换红外光谱仪 (日本岛津公司); Telstar IyoQuest-85 冻干机 (北京博医康实验仪器有限公司); Bruker AVANCE III600 MHz 超导核磁共振仪 (Bruker 公司); AB135-S 电子天平 ($d=0.01$ mg, 瑞士 Metter Toledo 公司); 二氧化碳细胞培养箱 (美国 Heal-Force 公司); 酶联免疫检测仪、SW-CJ-2FD 超净工作台 (美国 Thermo 公司); DFC450C 倒置相差显微镜 (美国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 悬钩子木多糖(RSP)的提取

将悬钩子木干燥茎枝,粉碎,过 40 目筛。取悬钩子木粉末适量,按料液比 1:30,水回流提取 3 次,每次 2 h,滤液浓缩,加入乙醇沉淀(含醇量 80%),离心。沉淀依次用无水乙醇、丙酮分别洗涤,洗涤后的沉淀用蒸馏水复溶,Sevage 法脱蛋白^[5],蒸馏水透析 36 h,透析液浓缩冻干,得 RSP。

2.2 RSP 的 Cellulose DE-52 离子交换柱色谱

Cellulose DE-52 离子交换柱(60 cm×2.5 cm),先用超纯水平衡 24 h。准确称取 100 mg RSP 溶于 10 mL 的超纯水中,4 000 r/min 离心 15 min 后取上清液上柱。依次用超纯水、0.1 及 0.2 mol/L 的 NaCl 溶液,以 2.0 mL/min 的体积流量洗脱,用自动部分收集器收集,每管收集 6 mL。苯酚-硫酸法^[6]跟踪检视 RSP 的洗脱情况,以试管的编号为横坐标,吸光度(*A*)为纵坐标绘制洗脱曲线。根据测定的结果合并多糖溶液,真空浓缩后用蒸馏水透析 36 h,冷冻干燥。主要得到 3 个组分 RSP1~RSP3。

2.3 RSP1 的 Sephadex G-100 凝胶柱色谱^[6]

Sephadex G-100 凝胶柱(80 cm×1.6 cm),用超纯水平衡 24 h。称取 30 mg 的 RSP1 溶于 2 mL 的超纯水中,过 0.45 μm 微孔滤膜后上柱。上样后用超水洗脱,洗脱速率为 0.3 mL/min,用自动部分收集器收集,每管收集 3 mL,苯酚-硫酸法跟踪检视 RSP1 的洗脱情况,以试管的编号为横坐标,*A* 为纵坐标绘制洗脱曲线。收集合并多糖峰,透析、冷冻干燥。得到 2 个多糖 RSP1-1 和 RSP1-2。

2.4 RSP1-1 和 RSP1-2 的纯度鉴定^[7]

2.4.1 HPGPC 色谱条件 采用 Waters 2410 高效液相色谱仪,色谱柱 Ultrahydrogel 500(300 mm×7.8 mm)、Ultrahydrogel 250(300 mm×7.8 mm)串联,排阻范围(100~1×10⁶),以醋酸盐缓冲溶液(pH 4.5)为流动相等度洗脱,体积流量 0.9 mL/min,柱温 45 °C,进样量 20 μL。

2.4.2 标准曲线的绘制 分别称取相对分子质量为 5 800、22 800、100 000、380 000、788 000 的标准葡聚糖样品 7 mg,用 1 mL 缓冲溶液流动相溶解,按“2.4.1”项下色谱条件进样,以保留时间(*t_R*)为横坐标(*X*),相对分子质量的对数值为纵坐标(*Y*),绘制标准曲线,通过标准曲线计算样品的数均相对分子质量。

2.4.3 样品的纯度测定 称取 RSP1-1 和 RSP1-2 各

7 mg,用 1 mL 缓冲溶液流动相溶解,过 0.45 μm 微孔滤膜,按“2.4.1”项进样。记录保留时间,利用标准曲线计算 RSP1-1 和 RSP1-2 的相对分子质量。

2.4.4 紫外光谱扫描 将 RSP1-1 和 RSP1-2 配制成 1 mg/mL 的溶液,以蒸馏水作为空白对照,紫外分光光度计在 200~800 nm 进行全波长扫描。

2.5 GC 法分析单糖组成^[8-9]

2.5.1 标准单糖的衍生化 取鼠李糖、葡萄糖、阿拉伯糖、甘露糖、木糖、半乳糖、核糖、岩藻糖各标准单糖 10.0 mg,精密称定,置具塞试管中,加入 10.0 mg 的盐酸羟胺、5.0 mg 的肌醇及 0.7 mL 的吡啶,混匀后封管,于 90 °C 水浴中反应 30 min,取出冷至室温,再于其中加乙酸酐 0.5 mL,摇匀后封管,于 90 °C 水浴中反应 30 min,待乙酰化反应完成后,减压干燥,用氯仿 1 mL 溶解残渣,进样 1.0 μL。

2.5.2 RSP1-1 和 RSP1-2 的水解和衍生化 取 RSP1-1 和 RSP1-2 各 15.0 mg,精密称定,置具塞试管中,加入 2.0 mol/L 三氟乙酸 2.0 mL,摇匀,110 °C 烘箱中水解 6 h,减压干燥,按“2.5.1”项下标准单糖衍生化的方法将水解产物衍生化,进样 1.0 μL。

2.5.3 气相色谱(GC)检测条件 色谱柱为 PEG-20M 毛细管石英柱(30 mm×0.25 mm,0.25 μm);程序升温为 180 °C(保持 2 min),以 10 °C/min 升至 230 °C(保持 40 min);进样温度 230 °C,分流比 1:10,载气高纯 N₂,体积流量 2 mL/min,氢气体积流量 40 mL/min,空气体积流量 400 mL/min;氢火焰离子化检测器,FID 检测器温度 230 °C;进样量 1 μL。

2.6 红外光谱分析

取多糖样品 2 mg 与干燥的 KBr 粉末 100 mg 混合压片,红外光谱仪在 4 000~400 cm⁻¹ 扫描,记录红外光谱图。

2.7 核磁共振分析

取样品 RSP1-1 和 RSP1-2 各约 20 mg,经 D₂O 交换 3 次后,溶于 0.5 mL D₂O 中,用 Bruker AVANCE III 600 MHz 超导核磁共振仪测定 1D-NMR (¹H- 和 ¹³C-NMR) 和 2D-NMR (HSQC、¹H-¹H COSY 及 HMBC),通过 HSQC 对 C-H 进行归属,¹H-¹H COSY 连接单糖骨架,HMBC 确定糖的连接方式。

2.8 RSP1-1 和 RSP1-2 多糖对机体免疫功能的影响

2.8.1 给药样品配制 将 RSP1-1 和 RSP1-2 称定质

量后溶解在 PBS 中, 配制质量浓度 50.0 mg/mL 的储备液, 用 RPMI 1640 培养基稀释成质量浓度为 200、40、5 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液, 备用。

2.8.2 小鼠脾淋巴细胞悬液制备 脱颈椎处死小鼠, 75% 的酒精浸泡消毒, 无菌条件下取出脾脏, 放入 4~5 mL Mouse 1 $\times$ 淋巴细胞分离液中, 轻研, 200 目尼龙网滤过。立即将含有脾淋巴细胞的分离液转移至离心管中, 覆盖 500~1 000 μL RPMI 1640 培养基, 2 000 r/min 离心 30 min, 吸取淋巴细胞层, 再加入 10 mL RPMI 1640 培养基, 轻轻振摇, 1 000 r/min 离心 10 min, 倾倒上清液, 收集细胞^[10-11]。用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基重悬脾淋巴细胞, 用台盼蓝染色计数, 活细胞数需大于 95%。将细胞浓度调整为 $5 \times 10^6/\text{mL}$, 备用。

2.8.3 小鼠脾淋巴细胞增殖实验 将“2.8.2”项下脾淋巴细胞悬液加入 96 孔细胞培养板, 每孔 100 μL 。实验组分别加入 100 μL 终质量浓度为 200、40、5 $\mu\text{g/mL}$ 的待测药物, 阳性对照组加入 100 μL 终质量浓度为 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 的 ConA, 阴性对照组加入 100 μL RPMI 1640 培养基。以 200 μL RPMI 1640 培养基为空白对照。置 5% CO_2 培养箱 37 $^\circ\text{C}$ 培养 48 h 后, 每孔加入 20 μL CCK-8 溶液, 置 5% CO_2 培养箱中 37 $^\circ\text{C}$ 反应 4 h, 酶标仪检测 450 nm 处测定 A 值。并按照公式计算淋巴细胞增殖率。

$$\text{淋巴细胞增殖率} = (A_s - A_b) / (A_c - A_b)$$

A_s 为实验孔 A 值; A_c 为对照孔 A 值; A_b 为空白孔 A 值

2.8.4 ELISA 法检测 IL-2、IFN- γ 和 TNF- α 水平 将“2.8.2”项下脾淋巴细胞悬液加入 96 孔细胞培养板, 每孔 100 μL 。实验组每孔加入 100 μL 终质量浓度为 200、40、5 $\mu\text{g/mL}$ 的待测药, 阴性对照组加入

100 μL RPMI 1640 培养基。以 200 μL RPMI 1640 培养基为空白对照。置 5% CO_2 培养箱 37 $^\circ\text{C}$ 培养 48 h 后, 2 000 r/min 4 $^\circ\text{C}$ 离心 10 min, 收集上清^[12]。参照 IL-2、IFN- γ 和 TNF- α 检测试剂盒说明书的方法, 检测上清液中各细胞因子的水平。

2.8.5 统计学处理 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 16.0 进行数据处理, 数据的差异统计分析均采用单因素方差分析 (one-way ANOVA)。

3 结果

3.1 多糖的分离纯化

悬钩子木粉末经水提醇沉法获得粗多糖, 收率 2.2%。经 Cellulose DE-52 纤维素离子交换柱分离得到 RSP1~RSP3。RSP1 过 Sephadex G-100 色谱柱分离得到 RSP1-1 和 RSP1-2 相对分子质量分布均一的 2 个多糖, 见图 1。

3.2 纯度鉴定与相对分子质量测定

将 RSP1-1 和 RSP1-2 分别在 200~800 nm 波长扫描后, 发现在 200 nm 波长附近有 1 个较强的吸收峰, 而在 260、280 nm 波长处均无明显吸收峰, 表明其不含核酸和蛋白质等杂质^[13], 结果见图 2。

RSP1-1 和 RSP1-2 经高效凝胶渗透色谱法鉴定纯度, 色谱峰形单一对称, 说明多糖相对分子质量分布均一, 见图 3。根据标准曲线 $\log M_w = -0.295 6t_R + 9.214 9$ ($r^2 = 0.998 2$)。RSP1-1 的重均相对分子质量 (M_w) 为 13 294, 数均相对分子质量 (M_n) 为 11 494, 多分散指数 (M_w/M_n) 为 1.15; RSP1-2 的 M_w 为 9 343, M_n 为 8 598, M_w/M_n 为 1.08。

3.3 RSP1-1 和 RSP1-2 单糖组成分析

根据单糖标准品和多糖样品色谱图谱的出峰时间, 将混合单糖标准品的气相色谱图谱 (图 4-B)

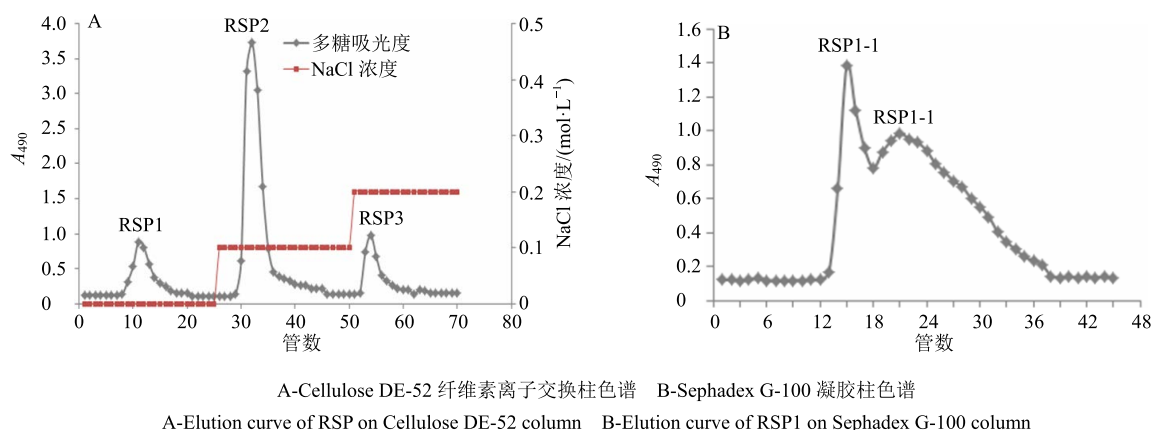


图 1 悬钩子木多糖的柱色谱纯化图

Fig. 1 Column chromatography of polysaccharide of *Rubus Sachalinensis*

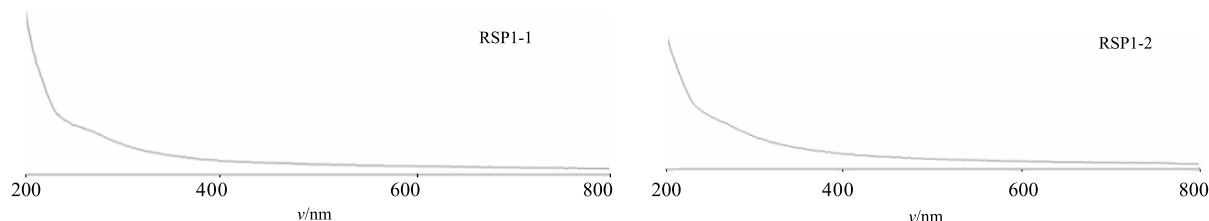


图 2 RSP1-1 和 RSP1-2 紫外光谱图

Fig. 2 UV spectrum of RSP1-1 and RSP1-2 polysaccharide fraction

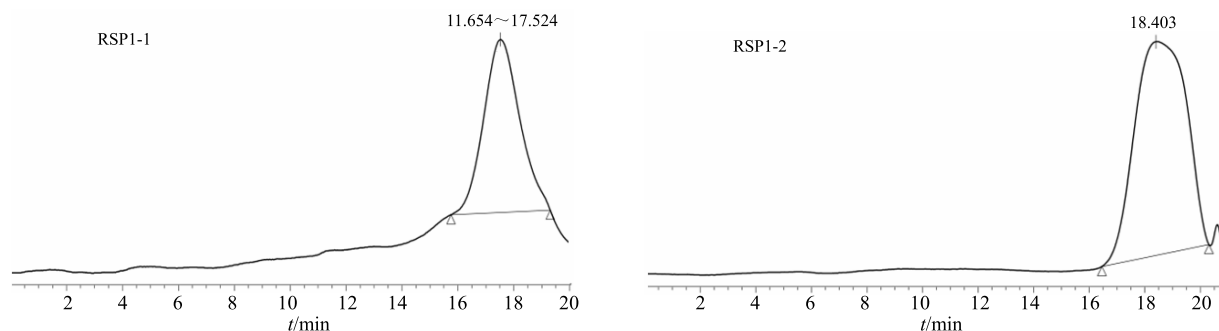
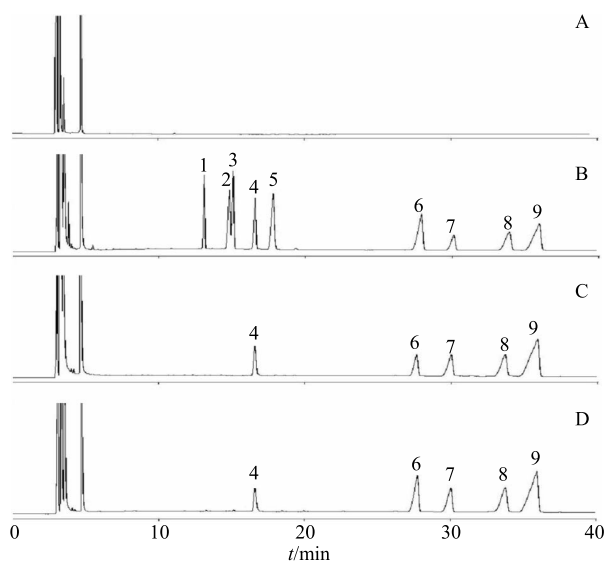


图 3 RSP1-1 和 RSP1-2 HPGPC 色谱图

Fig. 3 HPGPC chromatogram of RSP1-1 and RSP1-2



A-空白 B-混合标准单糖衍生化气相色谱图 C-RSP1-1 水解产物的糖腈乙酰酯衍生化气相色谱图 D-RSP1-2 水解产物的糖腈乙酰酯衍生化气相色谱图 1-鼠李糖 2-核糖 3-岩藻糖 4-阿拉伯糖 5-木糖 6-甘露糖 7-葡萄糖 8-半乳糖 9-肌醇
A-blank B-GC chromatogram of mixed standard monosaccharides C-GC chromatogram of RSP1-1 D-GC chromatogram of RSP1-2 1-rhamnose 2-ribose 3-fucose 4-arabinose 5-xylose 6-mannose 7-glucose 8-galactose 9-inositol

图 4 RSP1-1 和 RSP1-2 单糖组成分析气相色谱图

Fig. 4 GC chromatogram of RSP1-1 and RSP1-2

和多糖 RSP1-1、RSP1-2 水解产物的糖腈乙酰酯衍生化的气相色谱图谱(图 4-C、4-D)进行比对, 鉴

定出相应的单糖峰。以肌醇为内标, 采用内标加校正因子法计算多糖中单糖组成的物质的量比, 分别为 RSP1-1 (9.5 : 7.0 : 10.3 : 18.6) 和 RSP1-2 (5.7 : 11.1 : 10.3 : 14.2)。

3.4 红外光谱分析

FT-IR 对 RSP1-1 和 RSP1-2 的表征显示出多糖的典型吸收带(图 5), 在 $3\ 600\sim3\ 200\ \text{cm}^{-1}$ 、 $3\ 000\sim2\ 800\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1\ 400\sim1\ 200\ \text{cm}^{-1}$ 出现了特征吸收峰^[14-15]。RSP1-1、RSP1-2 的红外吸收峰分别在 $3\ 389.31$ 、 $3\ 389.31\ \text{cm}^{-1}$ 处是一宽而强的吸收峰, 由 O-H 的伸缩振动造成, 说明存在分子内、分子间氢键; $2\ 945.42$ 、 $2\ 951.18\ \text{cm}^{-1}$ 处是一弱的吸收峰, 由 C-H 伸缩振动造成; $1\ 642.36$ 、 $1\ 653.91\ \text{cm}^{-1}$ 是为羰基伸缩振动; $1\ 414.50$ 、 $1\ 423.16\ \text{cm}^{-1}$ 出现的峰为 C-H 的变角振动; RSP1-1 的 $1\ 146.27$ 、 $1\ 082.82$ 、 $1\ 042.44\ \text{cm}^{-1}$ 和 RSP1-2 的 $1\ 152.04$ 、 $1\ 079.94$ 、 $1\ 042.44\ \text{cm}^{-1}$ 是其糖苷键 C-O-C 的伸缩振动峰; 在 892.40 、 $898.23\ \text{cm}^{-1}$ 处有吸收提示可能存在 β -糖苷键。

3.5 核磁共振解析^[16-18]

3.5.1 RSP1-1 的结构解析 在 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O) 中 δ_{H} 5.03、4.58、4.46、4.69 分别为阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖及甘露糖端基氢信号, 其余 δ_{H} 3.2~4.2 为糖连氧碳上氢信号; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O) 中 δ_{C} 107.9、104.6、103.2、100.4 分别为阿拉伯糖、

半乳糖、葡萄糖及甘露糖异头碳信号, δ_{C} 60.90 为半乳糖亚甲基连氧碳信号, δ_{C} 65~85 为糖上次甲基连氧碳信号。通过 HSQC 谱对碳氢信号进行归属。见表 1。

^1H - ^1H COSY 谱中 δ_{H} 4.58 与 δ_{H} 3.62 相关, δ_{H} 4.11 与 δ_{H} 3.71、3.65 相关, 分别为半乳糖 H₁-H₂、H₃-H₄ 和 H₄-H₅ 的相关信号。HMBC 谱中半乳糖端基 δ_{H} 4.58 (Gal-H-1) 与 δ_{C} 73.4 (Gal-C-3)、74.7 (Gal-C-5) 相关, δ_{H} 3.76 (Gal-H-6) 与 δ_{C} 74.7

(Gal-C-5)、77.7 (Gal-C-4) 相关, 至此半乳糖核磁信号完全归位; δ_{H} 4.58 (Gal-H-1) 与 δ_{C} 77.7 (Gal-C-4) 相关, δ_{H} 4.11 (Gal-H-4) 与 δ_{C} 104.3 (Gal-C-1) 相关, 表明半乳糖为 1,4 连接。由于端基氢信号 δ_{H} 4.58 (Gal-H-1), 其数值小于 5, 推测其可能为 β 构型。故由核磁谱推测该多糖含有半乳糖残基, 其连接方式为 β -1,4-Gal。

^1H - ^1H COSY 谱中 δ_{H} 5.03 与 δ_{H} 4.07 相关, δ_{H}

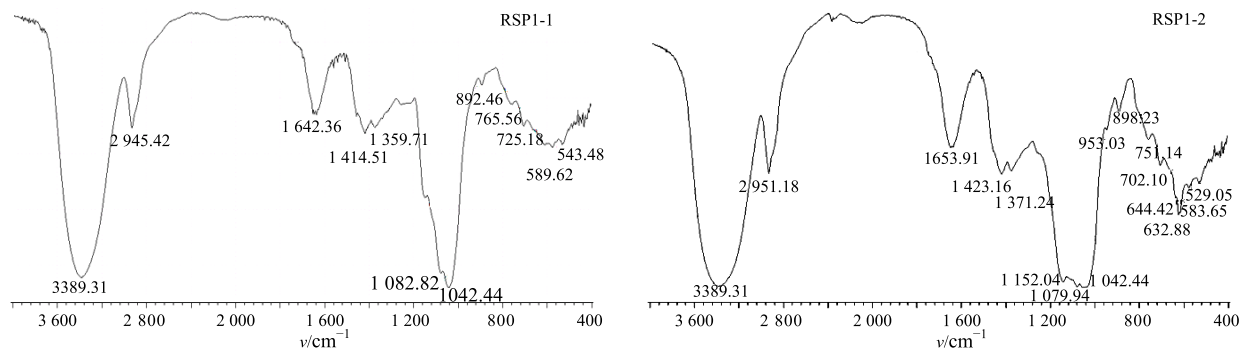


图 5 RSP1-1 和 RSP1-2 红外图谱

Fig. 5 FT-IR spectrum of RSP1-1 and RSP1-2 polysaccharide fraction

表 1 RSP1-1 和 RSP1-2 的 NMR 信号归属

Table 1 ^1H - and ^{13}C -NMR data of RSP1-1 and RSP1-2

	残基	H-1/C-1	H-2/C-2	H-3/C-3	H-4/C-4	H-5a, 5b/C-5	H-6a, 6b/C-6
RSP1-1	β -1,4-Gal	4.58/104.6	3.62/72.0	3.71/73.4	4.11/77.7	3.65/74.7	3.76, 3.66/60.9
	α -1,3-Ara	5.03/107.9	4.07/81.1	4.15/82.4	3.68/73.1	3.82, 3.74/66.5	—
	β -1,3-Man	4.69/100.4	3.64/71.6	4.06/70.2	—	3.96/76.7	—
	β -1,3-Glc	4.46/103.2	3.60/71.8	3.60/77.5	—	—	—
RSP1-2	β -1,4-Gal	4.56/104.7	3.61/72.0	3.71/73.5	4.10/77.8	3.64/74.7	3.74, 3.62/60.9
	β -1,3-Man	4.69/100.4	3.61/71.5	4.08/70.2	3.71/69.7	3.76/76.6	3.58, 3.54/60.7
	β -1,3-Glc	4.45/102.5	3.59/71.2	3.58/77.8	—	—	—

4.07 与 δ_{H} 4.15 相关, δ_{H} 4.15 与 δ_{H} 3.68 相关, δ_{H} 3.68 与 δ_{H} 3.82 相关, δ_{H} 3.68 与 δ_{H} 3.74 相关, 分别为阿拉伯糖 H₁-H₂、H₂-H₃、H₃-H₄、H₄-H_{5a}、H₄-H_{5b} 的相关信号。HMBC 谱中阿拉伯糖端基 δ_{H} 5.03 (Ara-H-1) 与 δ_{C} 81.1 (Ara-C-2)、82.4 (Ara-C-3)、66.5 (Ara-C-5) 相关, δ_{H} 3.82 (Ara-H-5) 与 δ_{C} 107.9 (Ara-C-1)、82.4 (Ara-C-3) 相关, δ_{H} 3.82 (Ara-H-2) 与 δ_{C} 73.13 (Ara-C-4) 相关, 根据化学位移值与相关信号, 上述连接成阿拉伯糖环。 δ_{H} 5.03 (Ara-H-1) 与 δ_{C} 82.4 (Ara-C-3) 相关信号很强, 推测可能为阿拉伯糖的 1,3 连接。由于端基氢信号 δ_{H} 5.03 (Ara-H-1), 其数值大于 5, 推测其可能为 α 构型。故由核磁谱推测该多糖含有阿拉伯糖残基, 其连接方式为 α -1,3-Ara。

^1H - ^1H COSY 谱中 δ_{H} 4.69 与 δ_{H} 3.64 相关, 为甘露糖 H₁-H₂ 的相关信号。HMBC 谱中甘露糖端基 δ_{H} 4.69 (Man-H-1) 与 δ_{C} 71.6 (Man-C-2)、70.2 (Man-C-3)、76.7 (Man-C-5) 相关, δ_{H} 4.06 (Man-H-3) 与 δ_{C} 71.69 (Man-C-2)、76.74 (Man-C-5) 相关, 由于其他相关信号重叠, C₄ 与 C₆ 未能准确归属。根据化学位移值与相关信号, 上述连接为甘露糖环。 δ_{H} 4.69 (Man-H-1) 与 δ_{C} 70.2 (Man-C-3) 相关信号很强, 推测可能为甘露糖的 1,3 连接。由于端基氢信号 δ_{H} 4.69 (Man-H-1), 其数值小于 5, 推测其可能为 β 构型。故由核磁谱推测该多糖含有甘露糖残基, 其连接方式为 β -1,3-Man。

^1H - ^1H COSY 谱中 δ_{H} 4.46 与 δ_{H} 3.60 相关, 为

葡萄糖 H₁-H₂ 的相关信号。HMBC 谱中葡萄糖 δ_{H} 4.46 (Glc-H-1) 与 δ_{C} 77.5 (Glc-C-3) 有相关信号, 推测可能为葡萄糖的 1,3 连接。由于 HMBC 谱中葡萄糖的其他碳氢相关信号较小且多埋于半乳糖的相关信号中, 因此未能对其他信号进行准确归属。由于端基氢信号 δ_{H} 4.46 (Glc-H-1), 其数值小于 5, 推测其可能为 β 构型。故由核磁谱推测该多糖含有葡萄糖残基, 其连接方式为 β -1,3-Glc。

3.5.2 RSP1-2 的结构解析 在 ^1H -NMR (500 MHz, D₂O) 中 δ_{H} 4.56、4.45、4.69 分别为半乳糖、葡萄糖及甘露糖端基氢信号, 其余 δ_{H} 3.20~4.20 为糖连氧碳上氢信号; ^{13}C -NMR (125 MHz, D₂O) 中 δ_{C} 104.7、102.5、100.4 分别为半乳糖、葡萄糖及甘露糖异头碳信号, δ_{C} 60.9 为半乳糖亚甲基连氧碳信号, δ_{C} 65.0~85.0 为糖上次甲基连氧碳信号。通过 HSQC 谱对碳氢信号进行归属。见表 1。

^1H - ^1H COSY 谱中 δ_{H} 4.56 与 δ_{H} 3.61 相关, δ_{H} 3.61 与 δ_{H} 3.71 相关, δ_{H} 3.71 与 δ_{H} 4.10, 分别为半乳糖 H₁-H₂、H₂-H₃ 和 H₃-H₄ 的相关信号。HMBC 谱中半乳糖端基 δ_{H} 4.56 (Gal-H-1) 与 δ_{C} 72.0 (Gal-C-2)、73.5 (Gal-C-3)、74.7 (Gal-C-5) 相关, δ_{H} 3.74 (Gal-H-6) 与 δ_{C} 74.7 (Gal-C-5)、77.8 (Gal-C-4) 相关, 至此半乳糖核磁信号完全归位; δ_{H} 4.56 (Gal-H-1) 与 δ_{C} 77.8 (Gal-C-4) 相关, δ_{H} 4.10 (Gal-H-4) 与 δ_{C} 104.7 (Gal-C-1) 相关, 表明半乳糖为 1,4 连接。由于端基氢信号 δ_{H} 4.56 (Gal-H-1), 其数值小于 5, 推测其可能为 β 构型。故由核磁谱推测该多糖含有半乳糖残基, 其连接方式为 β -1,4-Gal。

^1H - ^1H COSY 谱中 δ_{H} 4.69 与 δ_{H} 3.61 相关, δ_{H} 3.61 与 δ_{H} 4.08 相关, 分别为甘露糖 H₁-H₂、H₁-H₂ 的相关信号。HMBC 谱中甘露糖端基 δ_{H} 4.69 (Man-H-1) 与 δ_{C} 71.5 (Man-C-2)、70.2 (Man-C-3)、76.6 (Man-C-5) 相关, δ_{H} 4.08 (Man-H-3) 与 δ_{C} 100.4 (Man-C-1)、71.5 (Man-C-2)、76.6 (Man-C-5) 相关, δ_{H} 3.76 (Man-H-5) 与 δ_{C} 69.7 (Man-C-4)、60.7 (Man-C-6) 相关。根据化学位移值与相关信号, 上述连接为甘露糖环。 δ_{H} 4.69 (Man-H-1) 与 δ_{C} 70.2 (Man-C-3) 相关信号很强, δ_{H} 4.08 (Man-H-3) 与 δ_{C} 100.4 (Man-C-1) 也有相关, 推测可能为甘露糖的 1,3 连接。由于端基氢信号 δ_{H} 4.69 (Man-H-1), 其数值小于 5, 推测其可能为 β 构型。故由核磁谱推测该多糖含有甘露糖残基, 其连接方式为 β -1,3-Man。

^1H - ^1H COSY 谱中 δ_{H} 4.45 与 δ_{H} 3.59 相关, 为

葡萄糖 H₁-H₂ 的相关信号。HMBC 谱中葡萄糖 δ_{H} 4.45 (Glc-H-1) 与 δ_{C} 77.8 (Glc-C-3) 有相关信号, 推测可能为葡萄糖的 1,3 连接。由于 HMBC 谱中葡萄糖的其他碳氢相关信号较小且多埋于半乳糖的相关信号中, 因此未能对其他信号进行准确归属。由于端基氢信号 δ_{H} 4.45 (Glc-H-1), 其数值小于 5, 推测其可能为 β 构型。故由核磁谱推测该多糖含有葡萄糖残基, 其连接方式为 β -1,3-Glc。

3.6 RSP1-1、RSP1-2 和 RSP2 对脾淋巴细胞增殖及 IL-2、IFN- γ 和 TNF- α 的影响

RSP1-1、RSP1-2 和 RSP2 对小鼠脾淋巴细胞作用 48 h 后加入 CCK-8 溶液, 给药组与阴性对照组比较, *A* 值明显升高, 在 5~200 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度下, RSP1-1、RSP1-2 和 RSP2 均能促进淋巴细胞的增殖。当 RSP1-1 的质量浓度在 40 $\mu\text{g/mL}$ 时, 差异显著 ($P<0.05$); 当 RSP1-2 的质量浓度在 200、40 $\mu\text{g/mL}$ 时, 差异显著 ($P<0.05$); 当 RSP2 的质量浓度在 200 $\mu\text{g/mL}$ 时, 差异极显著 ($P<0.01$), 在 40、5 $\mu\text{g/mL}$ 时, 差异显著 ($P<0.05$)。

RSP1-1、RSP1-2 和 RSP2 均能促进小鼠脾淋巴细胞分泌 IL-2、IFN- γ 和 TNF- α , 但未显示出剂量依赖关系, 结果见表 2。在 5~200 $\mu\text{g/mL}$ 下, RSP1-1 和 RSP1-2 均能显著促进脾淋巴细胞分泌 IFN- γ , 与阴性对照组比较, 差异显著 ($P<0.05$); 在 5~200 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下, RSP2 能显著促进脾淋巴细胞分泌 IFN- γ , 与阴性对照组比较, 差异极显著 ($P<0.01$)。只有在质量浓度均为 5 $\mu\text{g/mL}$ 时, RSP1-1、RSP1-2 和 RSP2 能促进脾淋巴细胞分泌 IL-2, 与阴性对照组比较具有显著性差异 ($P<0.05$), 在中、高浓度下则无明显差异。在 5~200 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下, RSP1-1、RSP1-2 均能促进脾淋巴细胞分泌 TNF- α , 与阴性对照组比较, 差异显著 ($P<0.05$), 在 5~200 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下, RSP2 能促进脾淋巴细胞分泌 TNF- α , 与阴性对照组比较, 差异极显著 ($P<0.01$)。结果见表 2。

4 讨论

本实验对悬钩子木多糖进行分离纯化, 对纯化组分进行了初步结构表征及免疫调节活性研究。结果经 Cellulose DE-52 纤维素离子交换柱色谱得到 3 个多糖组分 (RSP1~RSP3), 经 HPGPC 测定其为非均一性多糖, 将进一步用 Sephadex G-100 色谱柱分离纯化。

RSP1 经 Sephadex G-100 色谱柱分离纯化, 得

表 2 RSP1-1、RSP1-2 和 RSP2 对小鼠脾脏淋巴细胞增殖及分泌 IL-2、IFN- γ 和 TNF- α 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 2 Effects of RSP1-1, RSP1-2, and RSP2 on proliferation of splenic lymphocyte and secretion of IL-2, IFN- γ , and TNF- α ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	小鼠脾淋巴细胞增殖率/%	IFN- γ /($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	IL-2/($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	TNF- α /($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
对照	—	100.000 $\pm$ 2.010	30.630 $\pm$ 2.069	11.496 $\pm$ 0.399	77.116 $\pm$ 0.819
RSP1-1	200	147.311 $\pm$ 4.055	125.714 $\pm$ 5.652*	10.227 $\pm$ 1.097	109.891 $\pm$ 1.904*
	40	264.157 $\pm$ 6.080*	167.409 $\pm$ 5.508**	11.213 $\pm$ 0.501	106.754 $\pm$ 1.687*
	5	140.143 $\pm$ 3.041	191.395 $\pm$ 1.224**	17.958 $\pm$ 0.810*	109.293 $\pm$ 1.057*
RSP1-2	200	201.433 $\pm$ 2.534*	194.871 $\pm$ 2.056**	10.015 $\pm$ 0.796	100.358 $\pm$ 1.048*
	40	225.448 $\pm$ 2.534*	149.959 $\pm$ 3.680*	10.297 $\pm$ 0.398	106.605 $\pm$ 1.476*
	5	158.422 $\pm$ 6.589	153.621 $\pm$ 1.858**	20.249 $\pm$ 0.811*	107.500 $\pm$ 1.900*
RSP2	200	492.473 $\pm$ 5.575**	598.235 $\pm$ 3.994**	11.496 $\pm$ 1.803	329.660 $\pm$ 1.481**
	40	344.802 $\pm$ 7.603*	388.434 $\pm$ 4.700**	15.534 $\pm$ 0.903	331.032 $\pm$ 2.316**
	5	301.792 $\pm$ 8.617*	367.890 $\pm$ 3.278**	18.101 $\pm$ 1.010*	345.433 $\pm$ 1.490**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

到 2 个均一性多糖 RSP1-1 和 RSP1-2, 对其结构采用气相色谱、红外光谱和核磁共振波谱进行了初步的解析, 结果显示 RSP1-1 和 RSP1-2 主要由阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖组成, 推测 RSP1-1 可能主要含有 α -1,3-Ara、 β -1,4-Gal、 β -1,3-Glc、 β -1,3-Man 片段, RSP1-2 可能主要含有 β -1,4-Gal、 β -1,3-Glc、 β -1,3-Man 片段。由于多糖结构复杂, 尤其是结构未知的多糖, 相对分子质量越大, NMR 谱图中峰的重叠越严重, 直接采用 NMR 分析结构只能初步推测糖残基之间的连接方式, 很难准确判断单糖残基类型和糖苷键连接位点。后续课题组将继续对 RSP1-1 和 RSP1-2 的结构进行摸索, 采用甲基化等分析手段进一步表征多糖结构, 验证 NMR 解析结果, 是否与甲基化结果相匹配。

RSP2 为酸性多糖, 经 Sephadex G-100 凝胶柱进一步纯化, HPGPC 检测其 M_w 为 27 796, M_n 为 17 769, M_w/M_n 为 1.56, 显示其相对分子质量分布不均匀, 见图 6。对其进行免疫活性检测, 其脾淋巴细胞增殖率约为阴性对照的 4 倍多, 能促进淋巴细胞大量分泌 IFN- γ 和 TNF- α (表 2), 后续将继续摸索条件对其进行纯化与鉴定。

RSP1-1 和 RSP1-2 和 RSP2 利用小鼠脾淋巴细胞进行免疫活性研究, 发现 RSP1-1 和 RSP1-2 和 RSP2 均能不同程度地促进脾淋巴细胞的增殖和细胞因子 IL-2、IFN- γ 和 TNF- α 的分泌, 呈现一定的免疫调节活性, 其中 RSP2 刺激脾淋巴细胞增殖及分泌 IFN- γ 和 TNF- α 的活性最好。IL-2、IFN- γ 、IFN- α

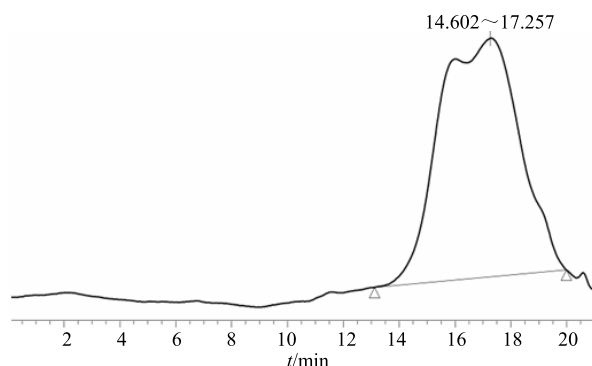


图 6 RSP2 HPGPC 色谱图

Fig. 6 HPGPC chromatogram of RSP2

等细胞因子由 Th1 细胞分泌, 主要介导对抗细胞内细菌和原虫的免疫反应, IL-2 可促进 Th1 等细胞的活化和增殖, 从而放大免疫效应。T 细胞活化过程分为 2 步, 第一步, 分泌少量 IL-2, 表面表达 IL-2 受体, 二者结合后启动下一步, 活化胞内增值相关信号通路, 最终 T 细胞活化后分泌大量细胞因子参与免疫反应^[19]。这提示 RSP1-1 和 RSP1-2 和 RSP2 可能通过先刺激 T 淋巴细胞分泌少量的 IL-2, IL-2 促进 T 细胞活化和增殖后再分泌大量 IFN- γ 、IFN- α 等细胞因子参与免疫调节。

悬钩子木是蒙药治疗瘟疫热症特色药材之一, 应用广泛、历史悠久。前期对其化学成分、药理活性和质量标准的研究, 主要集中在小分子次生代谢产物层面。本实验首次对其多糖类成分进行研究, 发现其多糖具有免疫调节活性, 为科学、全面阐释悬钩子木“解表、调元、止咳”之功效, 及其在“未熟热、瘟疫、

感冒、赫依热”等疾病治疗方面的应用提供依据。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药品标准·蒙药分册 [S]. 1998.
- [2] 任珊珊, 张 屏, 格根塔娜, 等. 蒙药悬钩子木三萜类成分及其生物活性研究 [J]. 中药材, 2017, 40(2): 354-358.
- [3] 任珊珊, 包保全, 格根塔娜, 等. 蒙药悬钩子木黄酮类成分及其生物活性研究 [J]. 中药材, 2016, 39(9): 2019-2023.
- [4] 格根塔娜, 张 屏, 包保全. 蒙药材库页悬钩子木抗菌活性的研究 [J]. 求医问药 (下半月), 2012, 10(3): 198.
- [5] 殷洪梅, 尚 强, 萧 伟. 金银花多糖脱蛋白方法的研究 [J]. 中草药, 2010, 41(4): 584-586.
- [6] Wang X, Zhang Y, Liu Z, *et al.* Purification, characterization, and antioxidant activity of polysaccharides isolated from cortex periplocae [J]. *Molecules*, 2017, doi: 10.3390/molecules22111866.
- [7] Xu D J, Xia Q, Wang J J, *et al.* Molecular weight and monosaccharide composition of *Astragalus polysaccharides* [J]. *Molecules*, 2008, 13(10): 2408-2415.
- [8] Zhang Z P, Shen C C, Gao F L, *et al.* Isolation, purification and structural characterization of two novel water-soluble polysaccharides from *Anredera cordifolia* [J]. *Molecules*, 2017, doi: 10.3390/molecules22081276.
- [9] 周宝珍, 肖娅萍, 牛俊峰. 绞股蓝多糖的分离纯化及红外光谱、气相色谱分析 [J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(1): 100-103.
- [10] 刘 芳, 刘桂友, 周 晶, 等. 冬凌草多糖 RPPSIIa 的分离纯化及其性质研究 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 241-243.
- [11] Cao L Z, Lin Z B. Comparison of the effects of polysaccharides from wood-cultured and bag-cultured *Ganoderma lucidum* on murine spleen lymphocyte proliferation *in vitro* [J]. *Acta Pharm Sin*, 2003, 38(2): 92-97.
- [12] 马玉芳, 郑小香, 衣伟萌, 等. 金线莲多糖对免疫抑制小鼠脾淋巴细胞体外增殖、分泌 NO 及细胞因子的影响 [J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(1): 21-26.
- [13] 任丽靖, 张 静, 刘志存, 等. 党参多糖的分离纯化及其结构研究 [J]. 中草药, 2008, 39(7): 986-989.
- [14] Cai L, Wan D, Yi F, *et al.* Purification, preliminary characterization and hepatoprotective effects of polysaccharides from dandelion root [J]. *Molecules*, 2017, doi: 10.3390/molecules22091409.
- [15] Shen T, Wang G, You L, *et al.* Polysaccharide from wheat bran induces cytokine expression via the toll-like receptor 4-mediated p38 MAPK signaling pathway and prevents cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice [J]. *Food Nutr Res*, 2017, doi: 10.1080/16546628.2017.1344523.
- [16] Bo S, Dan M, Li W, *et al.* Characterizations and immunostimulatory activities of a polysaccharide from *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst. roots[J]. *Inter J Biol Macromolecules*, 2019, 125: 791-799
- [17] Liu C, Sun Y, Mao Q, *et al.* Characteristics and antitumor activity of Morchella esculenta polysaccharide extracted by pulsed electric field [J]. *Inter J Molecular Sci*, 2016, 17(6): 986.
- [18] Goellner E M, Utermoehlen J, Kramer R, *et al.* Structure of arabinogalactan from *Larix laricina* and its reactivity with antibodies directed against type-II-arabinogalactans [J]. *Carbohydr Polym*, 2011, 86(4): 1739-1744.
- [19] Meng F Y, Ning Y L, Qi J, *et al.* Structure and antitumor and immunomodulatory activities of a water-soluble polysaccharide from *Dimocarpus longan* pulp [J]. *Inter J Mol Sci*, 2014, 15(3): 5140-5162.