

连钱草多糖的结构表征及抗补体活性研究

谭 婷¹, 张 晶¹, 陈 林¹, 冯育林¹, 杨世林¹, 温 泉^{1*}, 罗 云^{2*}

1. 江西中医药大学 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330006

2. 江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

摘要: **目的** 分离纯化具有抗补体活性的连钱草均一多糖并表征其结构。**方法** 水提醇沉得连钱草粗多糖, DEAE-52、Sephadex G-100 柱色谱抗补体活性导向分离得到均一多糖, 采用 HPGPC、IR、GC、甲基化及核磁等方法对均一多糖进行结构表征, 并测定均一多糖的抗补体活性。**结果** 分离所得连钱草均一多糖 GLP-1 和 GLP-2, 相对分子质量分别为 5 370 和 20 040, 均主要由阿拉伯糖和半乳糖组成的杂多糖, 阿拉伯糖和半乳糖的物质的量比分别为 1:6.3 和 1:4.9, GLP-1 和 GLP-2 均具有较强的抗补体活性。**结论** 连钱草均一多糖的结构表征为进一步阐明其抗补体活性的药效物质基础提供了研究基础, 同时也为筛选天然补体抑制剂提供了基础。

关键词: 连钱草; 多糖; 纯化; 结构表征; 抗补体活性

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)19-4916-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.19.010

Structural characterization and anti-complement activity of polysaccharides from *Glechomae Herba*

TAN Ting¹, ZHANG Jing¹, CHEN Lin¹, FENG Yu-lin¹, YANG Shi-lin¹, WEN Quan¹, LUO Yun²

1. National Pharmaceutical Engineering Center (NPEC) for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China

2. Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: **Objective** To isolate and purify the homogeneous polysaccharides from *Glechomae Herba* through the guidance of anti-complement activity, and study their structures. **Methods** Crude polysaccharides from *Glechomae Herba* were extracted by water extraction and alcohol precipitation, then homogeneous polysaccharides were separated by DEAE-52 and Sephadex G-100 column chromatography. The structures of homogeneous polysaccharides were characterized by HPGPC, IR, GC, methylation and NMR, and their anti-complement activities were also determined. **Results** Two homogeneous polysaccharides GLP-1 and GLP-2 were obtained with the molecular weight of 5 370 and 20 040. They were both heteropolysaccharides composed of arabinose and galactose with the ratio of 1:6.3 and 1:4.9, respectively. **Conclusion** The structures of GLP-1 and GLP-2 further elucidate the pharmacodynamic basis of their anti-complement activities and provide basis for screening natural complement inhibitors.

Key words: *Glechomae Herba*; polysaccharide; purification; structural characterization; anti-complement activity

连钱草为唇形科植物活血丹 *Glechoma longituba* (Nakai) Kupr. 的干燥地上部分, 主要在春季至秋季采收, 采收后洗净除去杂质, 晒干后即可入药^[1]。连钱草具有清热解毒、利湿通淋、散瘀消肿之功效,

临床上用于湿热黄疸、跌打损伤、腮腺炎、尿路结石和肾结石等疾病^[2-4]。连钱草虽具有很高的药用价值并且在我国使用也较为普遍, 且近年来对连钱草的化学成分和药理活性研究报道也较多, 但关于连

收稿日期: 2019-09-28

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81603274, 81760711); 江西省自然科学基金资助项目 (20192ACBL21033); 江西省卫生计生委中医药科研项目 (2018A333); 江西中医药大学院士工作站专项 (2016ZR001); 江西中医药大学“1050 青年人才工程”项目 (5141900117)

作者简介: 谭 婷 (1987—), 女, 博士, 讲师, 研究方向为中药药效物质基础与新药研发。Tel: (0791)87119633 E-mail: tanting2009@126.com

***通信作者** 温 泉 (1987—), 男, 博士, 讲师, 研究方向为中药药效物质基础与新药研发。Tel: (0791)87119633 E-mail: 12111030025@fudan.edu.cn

罗 云 (1981—), 男, 博士, 副教授, 研究方向为中药药效物质基础及质量评价。Tel: (0791)87119027 E-mail: luoyunn@163.com

钱草多糖的研究报道却很少。中药大多时候以水煎煮服用来治疗疾病,大多数中药的药效物质可能是水溶性成分如多糖等,并且也有很多文献报道过植物多糖具有丰富的药理活性^[5-7],为了阐明连钱草清热解毒的药效物质,本实验就连钱草的多糖成分进行了研究。

补体系统是人体的重要免疫防御系统,在抗感染、介导炎症介质释放、维持机体平衡和调节免疫等方面起着重要作用^[8]。现代药理研究表明,传统的具有清热解毒和抗炎功效的中药大多具有抗补体活性^[9],连钱草具有清热解毒的功效,连钱草多糖可能是该活性的药效物质,故本实验对连钱草多糖的抗补体活性进行研究,以期能够为筛选天然补体抑制剂提供基础。

1 仪器与材料

BSZ-100 型自动收集仪(沪西分析仪器公司);CHRIST 冻干机(德国 Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen 有限公司);紫外分光光度计(日本岛津公司);HL-2S 型恒流泵(沪西分析仪器公司);原子力显微镜(德国 Bruker 公司);Bruker DRX 400 和 600M 型核磁共振仪(德国 Bruker 公司);QP2010 Ultra 型气质联用仪(日本岛津公司);高效凝胶液相色谱(日本岛津公司)。

DEAE-52 型阴离子交换树脂、葡聚糖凝胶 G-100(上海源叶生物科技有限公司);透析袋(截留相对分子质量为 2 000 以上,上海源聚科技有限公司);鼠李糖(Rhamnose, Rha);葡萄糖(Glucose, Glc);半乳糖(Galactose, Gal);木糖(Xylose, Xyl);甘露糖(Mannose, Man);阿拉伯糖(Arabinose, Ara)均为 Sigma 公司标准品;TSK-GEL G4000PW_{XL} 凝胶柱(300 mm×7.6 mm, 10 μm, TOSOH 公司);考马斯亮蓝 G-250(沃凯进口分装);三氟乙酸、硼氢化钠(国药试剂);碘甲烷(萨恩化学技术有限公司);牛血清蛋白(上海维编科贸有限公司);氯化钠(国药试剂,批号 130415);无水二甲基亚砜(DMSO, Sigma 公司);溶血素(批号 S25861,上海源叶生物科技有限公司);巴比妥缓冲液(×5, pH 7.4, 批号 R20829)(上海源叶生物科技有限公司);致敏羊红细胞(上海源叶生物科技有限公司,批号 R21900);肝素钠(北京索莱宝科技有限公司);甲酸、氢氧化钠、醋酸酐、吡啶、正己烷等试剂均为 AR 级(国药试剂)。

雄性豚鼠,体质量 200 g 左右,购自于北京维

通利华实验动物技术有限公司,动物许可证号 SCXK(京)2016-0011。

连钱草药材购自于湖北省,由江西省南昌市食品药品监督管理局吴蓓副主任药师鉴定为唇形科植物活血丹 *Glechoma longituba* (Nakai) Kupr. 的干燥地上部分。

2 方法与结果

2.1 GLP-1 和 GLP-2 的分离纯化

连钱草(5 kg)加 10 倍量水,80 ℃煎煮 2 次,每次 1 h,合并提取液,浓缩,醇沉,去掉上清液即得粗多糖。粗多糖用水溶解后,加 10%三氟乙酸,沉淀后离心(3 000 r/min, 10 min)取上清液,加碱(NaOH 溶液 1.0 mol/L)进行中和,中和后进行浓缩,再进行透析,最后冻干即得除过蛋白的连钱草粗多糖。

将 15.0 g 连钱草粗多糖溶于适量的蒸馏水中,涡旋(2 000 r/min, 10 min)使其充分溶解,然后离心,将上清液缓慢加入到已经溶胀好的 DEAE-52 阴离子交换纤维素柱中,搅拌均匀,并吸附过夜。先以蒸馏水为洗脱液,然后分别依次用不同浓度的 NaCl 溶液(0.05、0.1、0.2、0.3、0.5 mol/L)洗脱。收集各流分 G1(超纯水洗脱溶液)、G2(0.05 mol/L NaCl 洗脱溶液)、G3(0.1 mol/L NaCl 洗脱溶液)、G4(0.2 mol/L NaCl 洗脱溶液)、G5(0.3 mol/L NaCl 洗脱溶液)和 G6(0.5 mol/L NaCl 洗脱溶液),洗脱的同时用硫酸-苯酚法进行多糖的显色反应进行检测,当没有显色反应时,停止该组分的收集。最后将用 NaCl 溶液洗脱的组分进行透析、浓缩、冻干,即 G2~G6 组分,蒸馏水为洗脱液所得的组分(G1)不需透析,浓缩,冻干即可。

对 DEAE-52 柱色谱分离得到的 6 个流分(G1~G6)冻干的样品进行抗补体活性实验的测定,结果显示, G1 和 G3 组分的抗补体活性较好,明显强于粗多糖。因此,就 G1 和 G3 部位,用葡聚糖凝胶 G-100 再次进行导向分离,取 G1 和 G3 部位各 2.5 g 和 1.8 g,加入蒸馏水 15 mL,涡旋使其完全溶解,然后离心(4 000 r/min, 10 min)取上清液,将其缓慢加入到已装好的葡聚糖凝胶 G-100 中(1.5 m×2 cm);以硫酸-苯酚法隔管显色,测定吸光度(A)值,根据其检测的结果进行组分的合并,最后将分离出的均一多糖冻干,并对抗补体活性进行测定。冷冻干燥后得到具有抗补体活性的 2 个均一多糖,即 GLP-1 和 GLP-2。连钱草总多糖经 DEAE-52 和葡聚糖凝胶 G-100 的洗脱曲线如图 1。

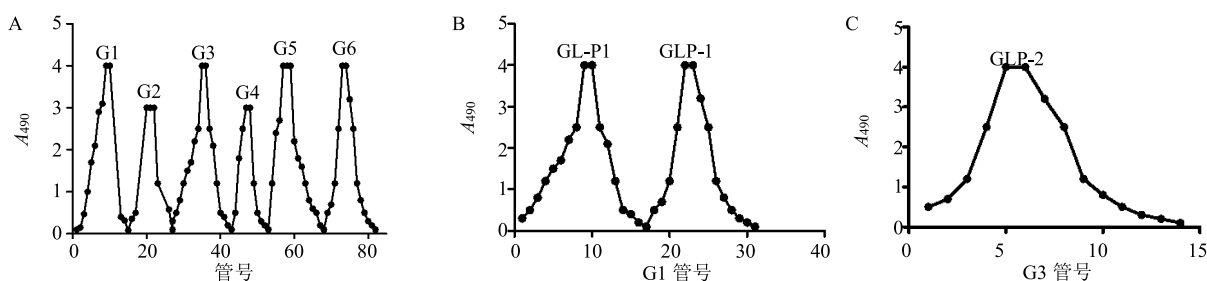


图 1 连钱草总多糖经 DEAE-52 (A) 和 SephadexG-100 (B、C) 柱分离流份图

Fig. 1 Isolation of homogeneous polysaccharide from *Glechomae Herba* by DEAE-52 (A) and SephadexG-100 (B, C) columns

2.2 GLP-1 和 GLP-2 的结构表征

2.2.1 GLP-1 和 GLP-2 的均一性的测定和相对分子质量的测定方法 通过高效凝胶渗透色谱 (HPGPC) 分析测定了 GLP-1 和 GLP-2 的均一性和相对分子质量。色谱条件: TSK-GEL 凝胶色谱柱 (300 mm×7.6 mm, 10 μm, TOSOH 公司); 流动相为 0.1 mol/L NaNO₃ 水溶液; 体积流量 0.8 mL/min; 柱温 30 °C; 进样量 30 μL。参照已知相对分子质量的标准右旋糖酐建立标准曲线, 估算均一多糖 GLP-1 和 GLP-2 相对分子质量。标准右旋糖酐相对分子质量依次为 2 000 000、300 600、135 350、64 650、9 750 和 2 700。

GLP-1 和 GLP-2 的 HPGPC 测定结果见图 2, 可以看出, 2 个多糖的液相图谱对称性很好, 说明 2 个多糖的均一性较好。根据标准右旋糖酐相对分子质量, 得到标准曲线 $Y = -0.5164X + 10.417$, $r^2 = 0.9970$, 计算出 GLP-1 和 GLP-2 相对分子质量分别为 5 370 和 20 040。

2.2.2 GLP-1 和 GLP-2 的蛋白含量的测定方法 根

据蛋白质与考马斯亮蓝 G-250 结合能够显蓝色的原理, 对样品进行处理, 然后在波长为 595 nm 进行紫外测定, 通过绘制标准曲线, 测定均一多糖 GLP-1 和 GLP-2 的蛋白含量, 具体方法参照文献报道^[10]。

根据标准曲线 (考马斯亮蓝法), 得到回归方程 $Y = 1.846X - 0.042$, $r^2 = 0.9990$, 通过线性方程可以得出 GLP-1 和 GLP-2 的蛋白含量分别为 0.94% 和 0.96%, 说明均一多糖 GLP-1 和 GLP-2 的蛋白含量都很低。

2.2.3 均一多糖 GLP-1 和 GLP-2 的单糖组成的测定^[10] 采用气相色谱质谱法测定单糖的组成, 将均一多糖 GLP-1 和 GLP-2 样品 (3 mg) 放置于玻璃管中, 用 2 mol/L 三氟乙酸 (TFA, 2 mL) 在 105 °C 油浴下水解 6 h。在 60 °C 下用旋转式蒸发仪将残余酸蒸干, 并向蒸干的样品中加入 3 mL 的甲醇再次蒸干, 重复 3 次, 将水解的多糖样品溶解于 3 mL 蒸馏水中, 然后再缓慢加入 40 mg NaBH₄, 反应 2 h 后, 加入 20% 冰醋酸, 至不产生气泡为止, 将样品在 60 °C 下蒸干, 并向蒸干的样品中加入 3 mL 的甲醇, 蒸干, 重复 3 次。最后加入 3 mL 醋酸酐-吡啶 (1:1) 在 105 °C 的油浴下反应 1 h, 取溶液经 0.22 μm 的微孔滤膜滤过。取 2 μL 样品进行 GC-MS 分析, 具体条件参数参照相关文献报道^[11]。

GLP-1 和 GLP-2 都是主要由阿拉伯糖和半乳糖组成的杂多糖, GLP-1 中阿拉伯糖和半乳糖的物质的量比为 1:6.3, GLP-2 中阿拉伯糖和半乳糖的物质的量比为 1:4.9, 见图 3。

2.2.4 GLP-1 和 GLP-2 的总糖含量的测定^[11] 称取各单糖对照品 5.0 mg, 参照文献进行均一多糖的糖含量测定。根据 2 个均一多糖的组成, 分别做标准曲线, GLP-1 的标准曲线方程为 $Y = 0.4820X - 0.0121$, $r^2 = 0.9990$, 得出 GLP-1 的总糖含量为 95.8%, GLP-2 的标准曲线方程为 $Y = 0.3869X -$

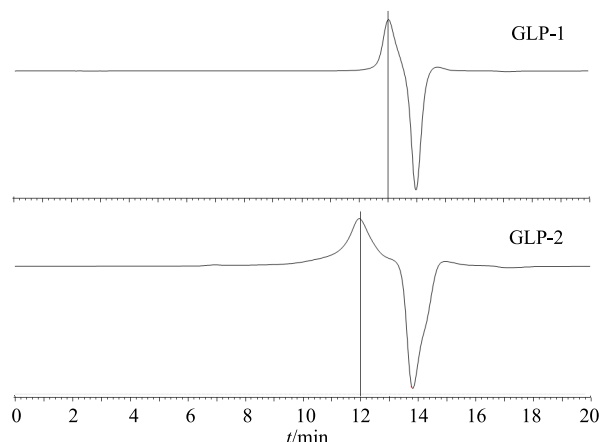
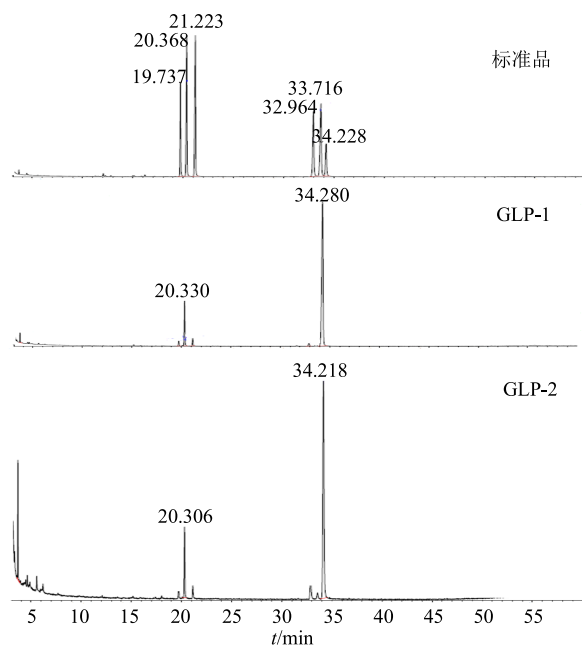


图 2 GLP-1 和 GLP-2 的 HPGPC 色谱图

Fig. 2 HPGPC chromatography of GLP-1 and GLP-2



19.737 min-鼠李糖 20.368 min-阿拉伯糖 21.223 min-木糖
32.964 min-甘露糖 33.716 min-葡萄糖 34.228 min-半乳糖
19.737 min-rhamnose 20.368 min-arabinose 21.223 min-xylose
32.964 min-mannose 33.716 min-glucose 34.228 min-galactose

图 3 GLP-1 和 GLP-2 的单糖组成 TIC 图

Fig. 3 Total ion chromatogram (TIC) of monosaccharide standards of GLP-1 and GLP-2

0.013 2, $r^2=0.999$ 0, 得出 GLP-2 的总糖含量为 93.6%。

2.2.5 均一多糖 GLP-1 和 GLP-2 的红外 (IR) 光谱测定 称取均一多糖 GLP-1 和 GLP-2 各 1 mg, 溴化钾研磨进行压片。多糖含有很多的 C-H 和-OH, 所以在 $3\ 400$ 、 $2\ 900\ \text{cm}^{-1}$ 处会有较强的吸收, 这也说明了多糖的糖含量较高, 同样在是 $3\ 400$ 、 $2\ 900\ \text{cm}^{-1}$ 的吸收峰也是多糖特有的吸收峰^[10]。

GLP-1 和 GLP-2 的 IR 光谱 (图 4) 显示, 在 $3\ 452\ \text{cm}^{-1}$ 附近有典型的羟基吸收峰, $2\ 911\ \text{cm}^{-1}$ 处有弱的 C-H 吸收峰, 表明总糖含量很高, 与糖含量测定结果一致。GLP-1 在 $1\ 630\ \text{cm}^{-1}$ 处表现出较低的吸收, 而 GLP-2 在 $1\ 630\ \text{cm}^{-1}$ 处表现出较强的吸收, 说明 GLP-2 的结构具有羰基部分, 而且 GLP-1 和 GLP-2 在 $1\ 000\sim1\ 100\ \text{cm}^{-1}$ 内表现出峰, 这归因于 C-O-C 基团的拉伸振动和吡喃环的羟基吸收峰, 也说明均一多糖 GLP-1 和 GLP-2 中的单糖的结构大多为吡喃环状结构。

2.2.6 GLP-1 和 GLP-2 的甲基化反应^[12] 甲基亚硫酸甲基钠混悬液 (SM 液) 的制备: 用无水正己烷洗净带油的氢化钠 (NaH) 5 g, 得到无油 NaH。氮

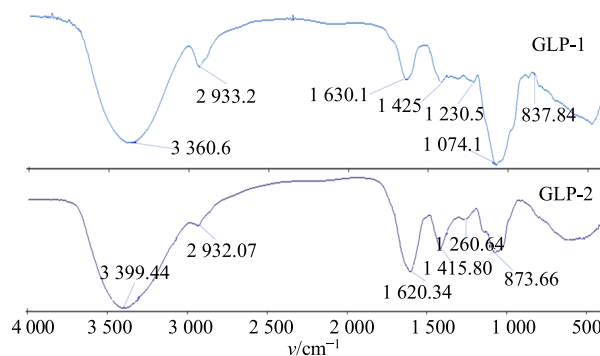


图 4 GLP-1 和 GLP-2 的红外光谱

Fig. 4 IR spectra of GLP-1 and GLP-2

气吹干 NaH 至干燥粉状, 氮气保护下将反应瓶至于超声波浴中, 缓慢注入 DMSO 50 mL, 维持超声波 $50\sim60\ ^\circ\text{C}$, 反应 $4\sim6\ \text{h}$, 无氢气放出为止, 反应液呈草绿色, 表示反应成功。将混悬液分装后, 分装管中充满氮气, 避光保存该试剂于冰箱 $4\ ^\circ\text{C}$ 中。

甲基化反应: 将充分干燥且恒重的多糖约 10 mg, 置于 20 mL 反应瓶中, 注入 DMSO 5 mL, 使其充分溶解, 塞紧橡皮塞, 瓶内氮气保护, 将反应瓶置于超声波浴中, 通过注射针逐滴缓慢地加入 SM 液 2.5 mL, 然后置于超声波浴 $20\sim25\ ^\circ\text{C}$ 反应 30 min, 取出反应瓶, 室温避光过夜, 次日再将反应瓶置于冰浴中, 在超声波冰浴中缓慢地滴加碘甲烷 2.5 mL (约 5 min 加完), 之后, 在常温超声波浴中反应 1 h。打开塞子, 通 N_2 将反应液中剩余的碘甲烷吹尽, 用自来水透析, 冷冻干燥, 即得甲基化样品, 经 IR 分析, 若在 $3\ 400\ \text{cm}^{-1}$ 基本无吸收, 说明甲基化完全, 若没有, 再甲基化 1 次, 直到甲基化完全为止。

甲基化多糖衍生物的制备: 将已完全甲基化的样品, 用约 3 mL 甲酸溶解, 密封。 $100\ ^\circ\text{C}$ 下水浴, 进行解聚反应 (约 6 h), 减压蒸干甲酸, 再加入约 3 mL 甲醇, 蒸干 (此过程重复 3 次以充分除去甲酸)。之后过程同单糖组成分析过程一致, 均用三氟乙酸完全水解后, 再乙酰化。GC-MS 条件也与单糖组成分析一致。

GLP-1 和 GLP-2 经碘甲烷甲基化后, 首先要确保甲基化是否完全, IR 光谱分析如图 5, 可以得知均一多糖 GLP-1 和 GLP-2 的羟基峰基本消失 ($3\ 400\ \text{cm}^{-1}$), 而甲基峰吸收很强 ($2\ 900\ \text{cm}^{-1}$), 说明 2 个均一多糖 GLP-1 和 GLP-2 均甲基化完全, 见图 5。

均一多糖 GLP-1 经完全甲基化后, 进 GC-MS 进行分析, 结果如图 6 所示。

结合 GC-MS 标准图库、保留时间以及质谱碎片表, GLP-1 甲基化产物中主链主要为 1,6-连接 Galp 以及少量的 1,3,6-连接 Galp, 支链连接 1-连接 Arap 终端和 1-连接 Galp 终端, 如表 1。

均一多糖 GLP-2 经完全甲基化后, 进 GC-MS 进行分析, 结果见图 7。结合 GC-MS 标准图库、保留时间以及质谱碎片表, GLP-2 甲基化产物中主链主要为 1,6-连接 Galp 以及少量的 1,4,6-连接 Galp, 支链连接 1-连接 Arap 终端和 1,4-连接 Galp, 结果见表 2。

2.2.7 GLP-1 和 GLP-2 的核磁测定 用重水溶解 2

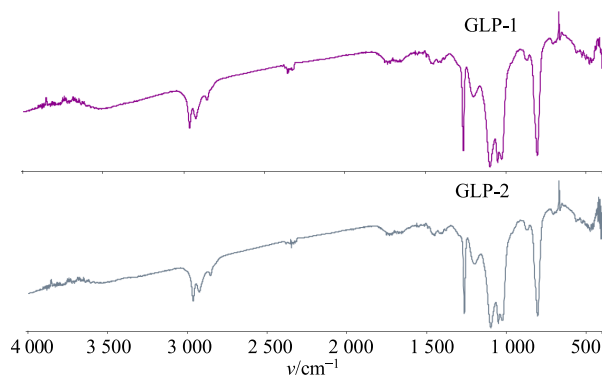


图 5 甲基化 GLP-1 和 GLP-2 的红外光谱

Fig. 5 IR spectra of methylated GLP-1 and GLP-2

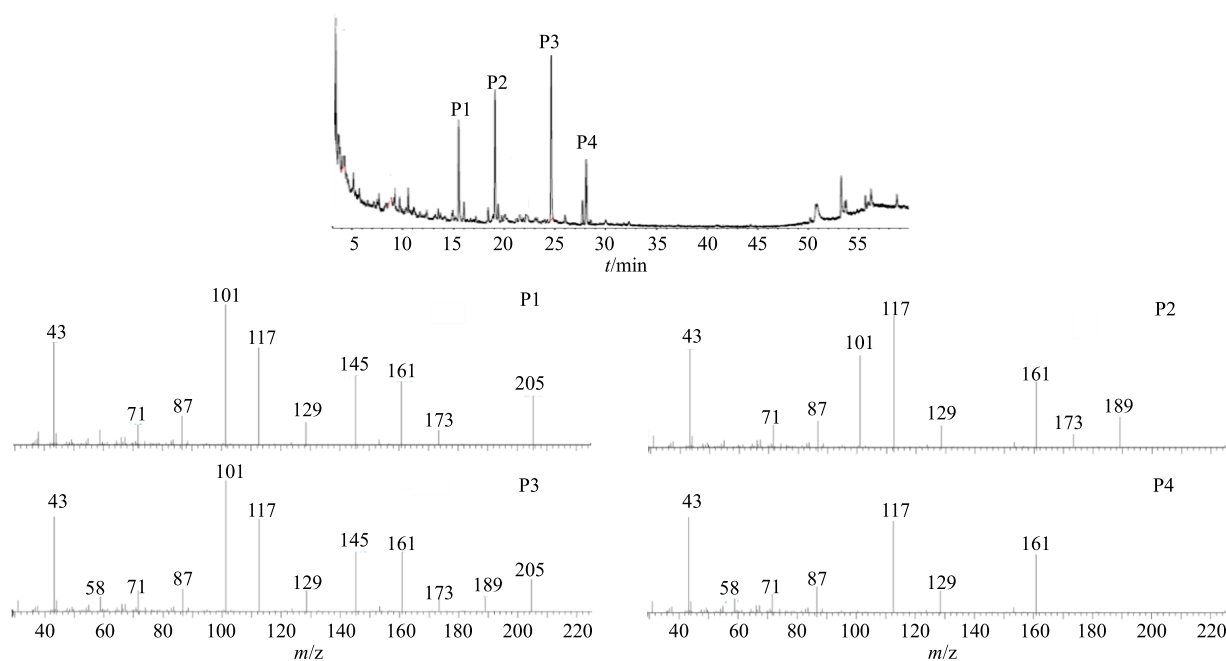


图 6 甲基化 GLP-1 的 TIC 色谱图和 EI-MS 碎片图

Fig. 6 TIC of methylated GLP-1 and its MS spectra

表 1 GLP-1 甲基化产物质谱分析结果

Table 1 Results of methylated sugars from GLP-1 methylated reaction

序号	甲基化糖	连接方式	物质的量比	质谱碎片离子 (m/z)
1	2,3,4-Me ₃ -Ara	1-linked Arap terminal	15.2	43, 71, 87, 101, 117, 129, 161, 205
2	2,4-Me ₂ -Gal	1,3,6-linked Galp	28.2	43, 71, 87, 101, 117, 129, 161, 189
3	2,3,4-Me ₃ -Gal	1,6-linked Galp	43.7	43, 58, 87, 101, 117, 129, 161, 189
4	2,3,4,6-Me ₄ -Gal	1-linked Galp terminal	8.1	43, 58, 71, 87, 117, 129, 161, 189

个均一多糖约 40 mg (达到饱和状态), 放于核磁管中, 进行核磁的测定。

核磁共振数据可以提供许多典型的信号来确定多糖的结构。糖的氢谱特征信号在 δ_H 4.2~5.5, 这个区域是糖端基氢信号, 在 δ_H 4.3~5.0, 大多为 β

构型, 在 δ_H 5.0~5.5, 大多为 α 构型。 δ_C 95~110 的碳大多是端基碳信号, 它可以进一步区分单糖的 α 或 β 构型。同一种单糖的 β 构型相对于 α 构型一般处于较低场。

尽管 GLP-1 和 GLP-2 都主要是由半乳糖和阿拉

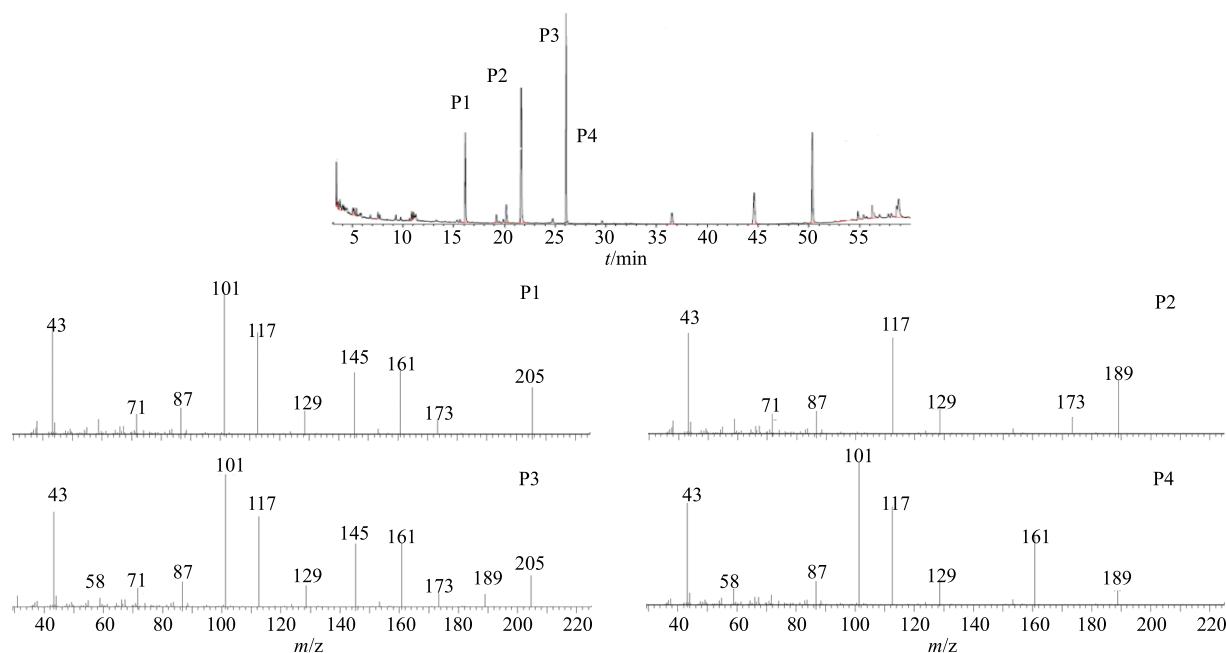


图 7 甲基化 GLP-2 的 TIC 色谱图和 EI-MS 碎片

Fig. 7 TIC of methylated GLP-2 and its MS spectra

表 2 GLP-2 甲基化产物质谱分析结果

Table 2 Results of methylated sugars from GLP-2 methylated reaction

序号	甲基化糖	连接方式	物质的量比	质谱碎片离子 (m/z)
1	2,3,4-Me ₃ -Ara	1-linked Arap terminal	13.2	43, 71, 87, 101, 117, 129, 161, 205
2	2,3-Me ₂ -Gal	1,4,6-linked Galp	23.8	43, 71, 87, 101, 117, 129, 161, 189
3	2,3,4-Me ₃ -Gal	1,6-linked Galp	45.2	43, 58, 87, 101, 117, 129, 161, 189
4	2,3,6-Me ₃ -Gal	1,4-linked Galp	11.6	43, 71, 87, 101, 117, 129, 173, 189

伯糖组成,但其核磁共振波谱有所不同。在 GLP-1 均一多糖的 $^1\text{H-NMR}$ 中, δ_{H} 5.16, $J=3.1$ Hz 是 Ara 端基氢信号,推测 Ara 为 α 构型, δ_{H} 4.90~4.92, $J=8.0$ Hz 是主链 1,6-连接 Gal 和 1,3,6-连接 Gal 的氢信号,推测 Gal 为 β 构型。在 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱中, δ_{C} 103.77 是 1-连接 Ara 终端的碳信号, δ_{C} 96.05, δ_{C} 97.98 是 1,3,6-linked Gal, 1,6-连接 Gal 的碳信号,这与甲基化的结果一致,并且 δ_{C} 170~185 中没有明显的羰基信号,这与 IR 谱中在 1630 cm^{-1} 吸收较低的结果一致。

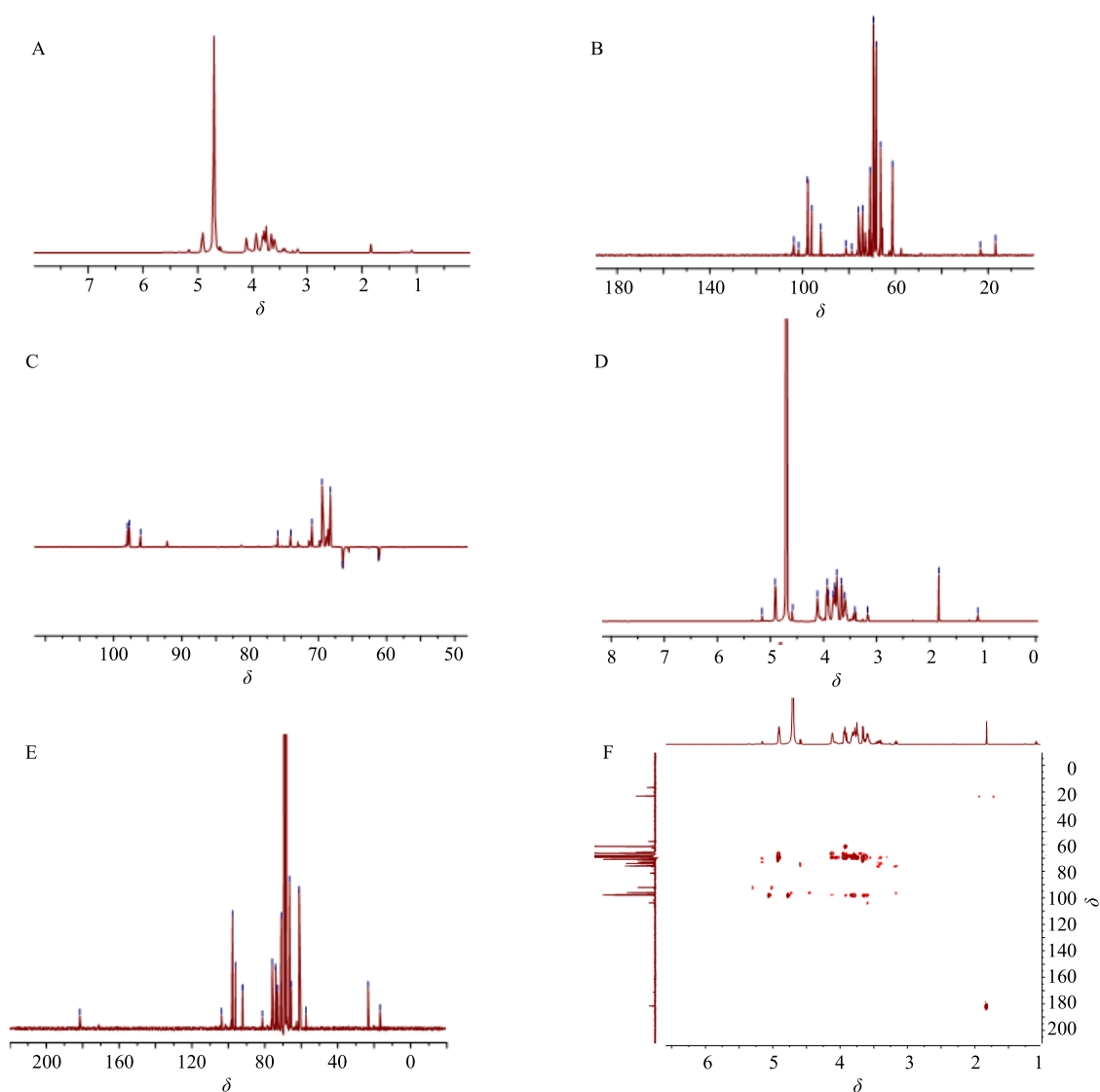
对于 GLP-2, $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱中,类似于 GLP-1, δ_{H} 4.90~4.92, $J=8.0$ Hz 是主链 1,6-连接 Gal 和 1,4,6-连接 Gal 的氢信号。 δ_{C} 96.06, δ_{C} 92.17 和 δ_{C} 96.01 分别是 1,6-连接 Gal, 1,4,6-连接 Gal 和 1-连接 Ara 终端的碳信号。此外, δ_{H} 1.83 (s), δ_{C} 181.5 为乙酰基的特征信号,在 HMBC 谱中 δ_{H} 1.83 与 δ_{C} 181.5 有显著相

关,且 Gal 的 C-4 及 H-4 信号往低场分别移动至 δ_{C} 75.95 和 δ_{H} 4.12,提示有乙酰基连在 C-4。

在 DEPT-135 中, GLP-1 和 GLP-2 在 δ_{C} 66.42 和 δ_{C} 66.53 出现倒峰,表明它们在 Gal 的 C-6 处存在连接,结果分析与甲基化一致。 GLP-1 和 GLP-2 其他的相关连接的核磁信号见表 1 和 2,核磁共振相关的图谱见图 8。

2.2.8 GLP-1 和 GLP-2 的原子力显微镜测试 将 GLP-1 和 GLP-2 溶解于蒸馏水中,终质量浓度分别为 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$,原子力显微镜对 GLP-1 和 GLP-2 进行操作成像。利用 1.40 版 Bruker 分析数据处理软件生成三维图像。

如图 9 所示, GLP-1 的空间结构呈疏松高度螺旋状, GLP-2 的空间结构呈密集支链连接状, GLP-1 和 GLP-2 的空间结构不同,可能与 GLP-2 中存在乙酰基以及它们的支链连接方式不同有关。



A- GLP-1 的 ^1H -NMR 谱 B- GLP-1 的 ^{13}C -NMR 谱 C- GLP-1 的 DEPT-135 谱 D- GLP-2 的 ^1H -NMR 谱 E- GLP-2 的 ^{13}C -NMR 谱 F- GLP-2 的 HMBC 谱

A- ^1H -NMR spectra of GLP-1 B- ^{13}C -NMR spectra of GLP-1 C- DEPT-135 spectra of GLP-1 D- ^1H -NMR spectra of GLP-2 E- ^{13}C -NMR spectra of GLP-2 F- HMBC spectra of GLP-2

图8 相关核磁图谱

Fig. 8 Relevant NMR spectra

2.3 抗补体活性的测定^[13-15]

2.3.1 最大效价补体用量的优化

(1) BBS 缓冲溶液的制备: 巴比妥缓冲液 (5×, pH 7.4) 100 mL, 加入 400 mL 蒸馏水进行混合, 配制所需浓度的巴比妥缓冲液 (BBS)。

(2) 2%绵羊红细胞 (SRBC) 的制备: 取绵羊血 2 mL, 加入 BBS 8 mL 进行洗涤, 然后于 3 000 r/min, 4 °C 的条件下离心 10 min, 重复洗涤 3 次 (洗涤时要小心, 动作轻一些, 以免破坏羊红细胞), 在澄清的洗涤液中加入 BBS 到 10 mL, 小心混匀, 取

出约 500 μL 加到红细胞压积管中, 在 3 000 r/min, 4 °C 的条件下离心 10 min, 最后测定红细胞的体积百分比, 通过百分比, 按比例加入适量的 BBS 配制成 2% 的 SRBC 溶液。

(3) 1 : 3 000 溶血素的制备: 取适量的溶血素, 然后加入 BBS, 充分混匀溶解, 配制成 1 : 3 000 的溶血素溶液。

(4) 补体制备及效价测定: 豚鼠适应性喂养 3 d 后腹腔主动脉取血, 4 °C 放置 1 h 凝固后, 4 °C 条件 3 000 r/min 离心 5 min, 取上清, -20 °C 冷冻

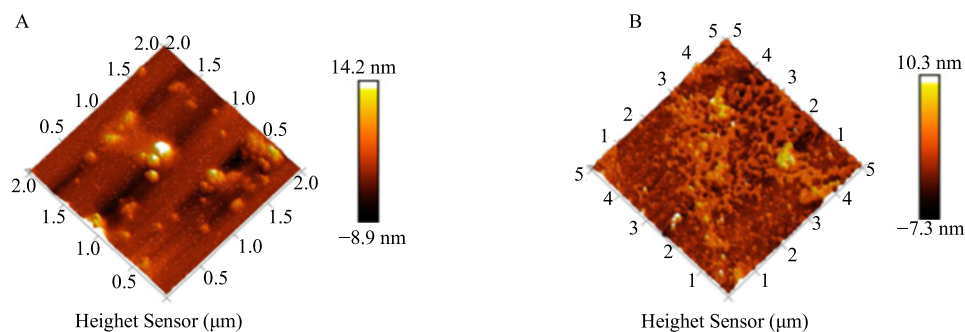


图 9 原子显微镜下的 GLP-1 (A) 和 GLP-2 (B) 的三维图像

Fig. 9 3D pictures of GLP-1 (A) and GLP-2 (B) under atomic force microscope (AFM)

保存备用。取补体 200 μL ，加入 BBS 400 μL 配制 1:2 溶液，然后用 BBS 对倍稀释成 1:4、1:8、1:16、1:32、1:64、1:128、1:256 溶液。依次加入 1:3 000 的溶血素 100 μL 、各浓度的补体 200 μL 、2% SRBC 100 μL 和 200 μL 的 BBS 溶液中，充分混匀，水浴 30 min（温度设置在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下），放于离心机中（3 000 r/min，4 $^{\circ}\text{C}$ ）离心 5 min。然后取上清 100 μL 于 96 孔板中，在 405 nm 的波长下测定吸光度 (A) 值。另外，设置全溶血组（100 μL 2% SRBC 溶于 500 μL 蒸馏水中）。以补体稀释浓度为横坐标，溶血率为纵坐标作图。

结果如图 10 所示，当补体浓度为 1:2~1:32 时，溶血率都很高，基本上达到了 100%。由于 1:32 的溶血率不仅能够保证体系的全溶血，同时该浓度也能提高药物在筛选时的灵敏度。故选择 1:32 的补体浓度。

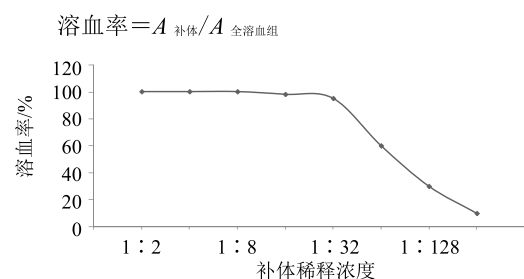


图 10 不同稀释度的补体的效价测定

Fig. 10 Hemolysis rate of complement with different concentrations

2.3.2 样品抗补体活性的测定

(1) 样品溶液的制备：取连钱草粗多糖、G1-G6 组分、GLP-1、GLP-2 和连钱草 75% 醇提物各 2 mg，精密称定，置于试管中，连钱草粗多糖、G1-G6 组分、GLP-1、GLP-2 直接加 BBS 缓冲液 800 μL 配置，连钱草 75% 醇提物先加 30 μL DMSO 溶解后再

加 770 μL BBS 稀释。各母液用 BBS 缓冲液等倍稀释配成 1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64、1:128、1:256，总共得到 8 个浓度的各供试品溶液。

(2) 抗补体活性的测定：实验同时设置实验组（1:32 的补体 200 μL 、1:3 000 的溶血素 100 μL 、2% SRBC 100 μL 、200 μL 不同浓度样品溶液）、空白对照组（200 μL 不同浓度样品溶液和 400 μL BBS 缓冲液）、补体组（1:32 的补体 200 μL 、1:3 000 的溶血素 100 μL 、2% SRBC 100 μL 、200 μL BBS 缓冲液）以及全溶血组（2% SRBC 100 μL 和 500 μL 蒸馏水），然后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下水浴 30 min，再在 3 000 r/min，4 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下离心 10 min，取每管上清液 200 μL 于 96 孔板，用酶标仪测定 405 nm 的波长下 A 值，计算溶血抑制率。以供试品浓度为横坐标，溶血抑制率为纵坐标，作图，计算半数溶血抑制浓度 (CH_{50}) 值。

$$\text{溶血抑制率} = 1 - (A_{\text{实验}} - A_{\text{对照}}) / A_{\text{全溶血}}$$

对连钱草粗多糖、G1-G6 组分、GLP-1、GLP-2 和连钱草 75% 醇提物进行体外抗补体活性测定，结果发现连钱草 75% 醇提物、连钱草粗多糖、G1、G3、GLP-1 和 GLP-2 有抗补体作用，GLP-1 和 GLP-2 抗补体活性最好，实验结果见表 3。

3 讨论

本实验通过抗补体活性为导向的分离纯化方法发现连钱草中 2 个均一多糖 GLP-1 和 GLP-2 有较好的抗补体活性，GLP-1 的抗补体活性较阳性药肝素钠的活性好。本实验对连钱草的抗补体活性成分进行了初步筛选，为深入研究连钱草在治疗补体过度激活相关疾病方面的应用奠定了基础，同时连钱草均一多糖也有望作为天然补体抑制剂去开发。

GLP-1 和 GLP-2 单糖组成相似，说明连钱草均一多糖有抗补体活性可能与其含有半乳糖和阿拉伯

表3 11个样品的抗补体活性测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 3 Anti-complement activities of 11 samples ($\bar{x} \pm s, n=3$)

样品	CH ₅₀ /(mg·mL ⁻¹)
肝素钠	0.041±0.005
连钱草 75%醇提物	0.256±0.003
连钱草粗多糖	0.087±0.011
G1	0.062±0.008
G2	NE
G3	0.072±0.007
G4	NE
G5	NE
G6	NE
GLP-1	0.029±0.004
GLP-2	0.056±0.014

NE 表示无抗补体活性

NE indicated no inhibitory effect

糖有关,但 GLP-1 的抗补体活性较 GLP-2 显著,这可能与 GLP-1 和 GLP-2 的支链连接不同,并且 GLP-2 有乙酰基,可能导致它们的空间连接不同,从而活性也有差异。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 陈利华, 李 欣. 连钱草化学成分及药理作用研究 [J]. 亚太传统医药, 2014, 10(15): 33-35.
- [3] 张 晶, 詹艳芝, 李晓庄, 等. 超高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱结合化学计量学方法评价不同产地连钱草的质量 [J]. 中国药学杂志, 2018, 53(12): 1003-1010.
- [4] Kim J, Song S, Lee I, *et al.* Anti-inflammatory activity of constituents from *Glechoma hederacea* var. *longituba* [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 21(11): 3483-3487.
- [5] 刘 帆, 侯 林, 张晓平, 等. 薏苡仁多糖抗肿瘤作用及免疫作用研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(3): 123-126.
- [6] 王春亮, 齐 鹏, 陈爱荣. 桑叶多糖治疗糖尿病机制的研究进展 [J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(1): 91-95.
- [7] 陈思思, 吴 蓓, 谭 婷, 等. 白及多糖 BSP-1 的分离纯化、结构表征及抗肿瘤活性研究 [J]. 中草药, 2019, 50(8): 1921-1925.
- [8] 倪付勇, 谢 雪, 温建辉, 等. 茯苓非多糖类化学成分抗补体活性 [J]. 中草药, 2019, 50(11): 2529-2533.
- [9] Shen C Y, Jiang J G, Huang C L, *et al.* Polyphenols from blossoms of *Citrus aurantium* L. var. *amara* Engl. show significant anti-complement and anti-inflammatory effects [J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(41): 9061-9068.
- [10] 杜冬生. 夏枯草和紫花地丁的抗补体活性成分 [D]. 上海: 复旦大学, 2012.
- [11] 狄宏晔. 补体抑制活性柴胡多糖的制备、纯化与表征 [D]. 上海: 复旦大学, 2011.
- [12] 倪付勇. 高山红景天抗补体活性成分研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2013.
- [13] Du D S, Cheng Z H, Chen D F. Anti-complement sesquiterpenes from *Viola yedoensis* [J]. *Fitoterapia*, 2015, 101(2): 73-79.
- [14] Mu L H, Li H J, Guo D H, *et al.* Cycloartane-type triterpene glycosides from *Beesia calthaefolia* and their anticomplement activity [J]. *J Nat Med*, 2014, 68(3): 604-609.
- [15] Xu Q M, Shu Z, Zhu W F, *et al.* Lupane-type triterpenoidal saponins from *Pulsatilla chinensis* and their anticomplement activities through the classical pathway [J]. *Planta Med*, 2013, 79(6): 506-512.