

粗茎秦艽多糖 GCP-1 的分离纯化、结构表征及抗炎活性评价

于少朋¹, 曾锐^{2*}, 韩珍¹, 曾元莲¹, 杨玲¹, 瞿燕¹, 秦旭华^{1*}

1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

2. 西南民族大学药学院, 四川 成都 610041

摘要: 目的 从粗茎秦艽 *Gentiana crassicaulis* 中分离纯化多糖, 初步分析其结构特征并研究其体外抗炎活性。方法 采用热水浸提粗茎秦艽粗多糖 (*Gentiana crassicaulis* polysaccharide, GCP), 再经 Cellulose DE-52 纤维素离子交换柱、SephadexG-100 柱进行分离纯化, 得到 GCP-1。采用高效凝胶色谱法 (HPGPC) 鉴定纯度并测定其相对分子质量; 采用高效液相色谱 (HPLC) 测定其单糖组成; 采用红外光谱 (IR)、气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 和核磁共振波谱法对该多糖的结构进行初步分析; 采用 CCK-8 法检测其对小鼠单核巨噬细胞 RAW 264.7 增殖的影响; 利用 ELISA 试剂盒测定其对白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、一氧化碳 (NO) 和肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 释放量的影响。结果 从粗茎秦艽中分离纯化得到 GCP-1 多糖, 相对分子质量为 6.87×10^4 , 由甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖 7 种单糖组成, 其物质的量比为 0.07 : 3.07 : 0.42 : 1.98 : 1.33 : 5.22 : 6.76; IR、GC-MS 和核磁共振波谱分析表明, GCP-1 是一种典型的果胶多糖, 含有 HG 和 RGI 区域及 AGI 和 AGII 侧链; 质量浓度在 10~200 $\mu\text{g/mL}$ 时, GCP-1 能明显促进小鼠单核巨噬细胞 RAW 264.7 的增殖 ($P < 0.05$), 并能明显抑制小鼠单核巨噬细胞 RAW 264.7 分泌 IL-1 β 、NO 和 TNF- α 。结论 GCP-1 为从粗茎秦艽中分离得到的天然来源的均一多糖, 其结构和活性初步研究为秦艽多糖成分的开发提供了一定参考。

关键词: 粗茎秦艽; 多糖; 果胶多糖; 分离纯化; 结构表征; 抗炎

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2021)03-0635-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.03.005

Isolation, purification, structure characterization, and anti-inflammatory activity of *Gentiana crassicaulis* polysaccharides

YU Shao-peng¹, ZENG Rui², HAN Zhen¹, ZENG Yuan-lian¹, YANG Ling¹, QU Yan¹, QIN Xu-hua¹

1. College of pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. College of Pharmacy, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China

Abstract: Objective *Gentiana crassicaulis* polysaccharides (GCP-1) was extracted and purified to study the structural features and anti-inflammatory activity *in vitro*. **Methods** The crude polysaccharides of *Gentiana crassicaulis* (GCP) was extracted by hot water. The Cellulose DE-52 and SephadexG-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 HPLC, IR, GC-MS, and NMR. The effects on proliferation function of RAW 264.7 cells were determined by CCK-8, and the release capacity of IL-1 β , NO, and TNF- α were determined by the ELISA kit. **Results** The molecular weights of the GCP-1 polysaccharides extracted and purified from *G. crassicaulis* was 6.87×10^4 . GCP-1 was consisted of mannose, rhamnose, glucuronic acid, galacturonic acid, glucose, galactose and arabinose. The molar ratios of these monosaccharide were 0.07 : 3.07 : 0.42 : 1.98 : 1.33 : 5.22 : 6.76. The structure of GCP-1 was characterized by IR, GC-MS and NMR, and GCP-1 was a typical pectin polysaccharide, with HG region, RG-I region and AG-I/AG-II side chains. When the concentration was 10~200 $\mu\text{g/mL}$, GCP-1 significantly promoted the proliferation of RAW 264.7 cells ($P < 0.05$) and inhibited the

收稿日期: 2020-08-20

基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFC1700705); 四川省重点研发项目 (2021YFS0043); 四川省留学人员科技活动项目择优资助经费计划 (2018-68)

作者简介: 于少朋 (1992—), 硕士研究生, 主要从事临床中药学研究。Tel: 17748777879 Email: 1178495611@qq.com

*通信作者: 曾锐, 教授, 主要从事药物制剂及民族药学研究。Tel: (028)8552209 E-mail: rzeng@swun.edu.cn

秦旭华, 教授, 主要从事临床中药学研究。Tel: 1398199519 E-mail: tzka123@qq.com

release of IL-1 β , NO, and TNF- α . **Conclusion** GCP-1 is a kind of natural homogeneous polysaccharides. Structural characterization and anti-inflammatory activity of GCP-1 provide the significant reference for the further development and elucidation of *G. crassicaulis* polysaccharides.

Key words: *Gentiana crassicaulis* Duthie ex Burk.; polysaccharide; pectin polysaccharide; isolation and purification; structural characterization; anti-inflammatory activity

秦艽为龙胆科龙胆属 *Gentiana* (Tourn.) L. 秦艽组 (Sect. *Cruciata* Gaudin) 多年生草本植物的干燥根,《中国药典》2020年版规定其法定来源为植物秦艽 *Gentiana macrophylla* Pall.、麻花秦艽 *G. straminea* Maxim.、粗茎秦艽 *G. crassicaulis* Duthie ex Burk. 或小秦艽 *G. dahurica* Fisch.。其中粗茎秦艽主要分布于四川、贵州、云南、西藏等海拔 2700~3800 m 的高山草甸、山坡草地、灌丛及林缘中,为中国西南地区秦艽的代表品种,也是人工种植和市场流通规模较大的品种^[1]。秦艽始载于《神农本草经》列为中品,至今已有 2000 多年的药用历史。秦艽是重要的中药,也是藏、蒙和彝等多民族用药,具有祛风湿、清湿热、止痹痛、退虚热的功效,中医用于治疗风湿痹痛、中风半身不遂、筋脉拘挛,黄疸等证^[2]。目前认为秦艽的抗炎、抗风湿活性成分主要集中在其环烯醚萜类、黄酮类及三萜类等成分,其他成分研究较少。近年来,多项研究表明中药多糖同样具有生物活性,如抗凝血、抗氧化、免疫活性^[3-5]等。目前秦艽多糖的研究甚少,主要有陈克克等^[6]使用 HPLC 测定了秦艽多糖的单糖组成,本课题组前期对粗茎秦艽多糖的提取优化进行了研究,本研究从粗茎秦艽中分离纯化制备多糖,运用光谱、色谱以及核磁共振等方法对其结构进行分析,并使用小鼠单核巨噬细胞 RAW 264.7 模型评价其抗炎活性,为粗茎秦艽多糖的进一步研究奠定基础。

1 材料与仪器

1.1 材料

粗茎秦艽采自四川阿坝州黑水县,经西南民族大学刘圆教授鉴定为粗茎秦艽 *G. crassicaulis* Duthie ex Burk. 的根。对照品 *D*-甘露糖 (批号 140651-201502, 质量分数 99.4%)、*L*-鼠李糖 (批号 111683-201505, 质量分数 99.8%)、*D*-葡萄糖醛酸 (批号 140648-201505, 质量分数 99.8%)、*D*-半乳糖醛酸 (批号 111646-201506, 质量分数 99.8%)、*D*-无水葡萄糖 (批号 110833-201506, 质量分数 99.9%)、*D*-半乳糖 (批号 100226-201506, 质量分

数 99.9%)、*L*-阿拉伯糖 (批号 150624-201507, 质量分数 99.8%)、葡聚糖标准品 (批号 140639-201203), 均购自中国食品药品检定研究院; CCK-8 检测试剂盒、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 检测试剂盒和白细胞介素-1 β (IL-1 β) 检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所); 一氧化氮 (NO) 检测试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司); 碘甲烷 (分析纯, 北京化学试剂公司); DEAE-52 阴离子树脂、SephadexG-100 凝胶 (上海源叶生物化学试剂有限公司); 其他试剂均为分析纯级别。

1.2 仪器

GC-MS-QP2010 型气质联用仪 (日本 Shimadzu 公司); EQUINOX 55 型傅里叶红外光谱仪 (德国 Bruker 公司); Waters 515 液相色谱仪 (配置 Waters 2410 示差检测器, Waters 公司); Agilent1260 型高效液相色谱仪 (安捷伦科技有限公司); 水相凝胶色谱柱 TSK-GelG4000PWXL (300 mm \times 7.5 mm, 10 μ m, 日本 TOSOH 公司); Bruker AVIII-600 NMR 光谱仪 (美国 Bruker 公司); Elx808 型酶标仪 (Bio-Tek 公司)。

2 方法

2.1 GCP-1 的分离和纯化

取干燥粗茎秦艽药材 500 g, 切段并打粉, 过三号筛, 加入 10 倍量石油醚脱脂 (30~60 $^{\circ}$ C, 6 h)。干燥后残留物加 14 倍量水超声辅助热水浸提 (25 $^{\circ}$ C 超声 20 min, 80 $^{\circ}$ C, 1.5 h, 2 次), 提取液经脱脂棉滤过后, 合并滤液, 55 $^{\circ}$ C 真空浓缩至总体积的 1/3; 按 4 倍体积加 20% Sevage 试剂 [二氯甲烷-正丁醇 (4:1)] 除去蛋白质, 重复几次, 直至无明显蛋白质为止。浓缩, 加入 4 倍体积无水乙醇沉淀, 4 $^{\circ}$ C 冷藏 12 h, 再进行离心 (2000 r/min, 15 min), 然后用丙酮、乙醚洗涤, 挥干, 即得粗茎秦艽粗多糖。然后将粗多糖过 DEAE-52 柱依次用蒸馏水和 0.5、1 mol/L NaCl 溶液梯度洗脱, 隔管检测吸光度 (*A*) 值 (硫酸-苯酚法), 收集洗脱的各组分, 洗脱得到 2 个多糖组分, 即水洗脱组分和 0.5 mol/L NaCl 溶液洗脱组分。0.5 mol/L NaCl 溶液洗脱组分经 SephadexG-100 凝胶色谱柱纯化, 用 0.1 mol/L

NaCl 溶液等度洗脱,透析后冷冻干燥得均一多糖 GCP-1。

2.2 GCP-1 的总糖含量测定

通过改良的硫酸-苯酚法对总糖含量进行测定。以 0.5 mg/mL 葡萄糖溶液为标准液,然后分别量取标准液 0、10、20、30、40、50 μL 加双蒸水补足至 100 μL 工作液,向工作液中加入 6% 苯酚溶液 200 μL ,快速加入浓硫酸 1.5 mL,混合均匀。于 100 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴锅中加热 10 min,取出冷却,然后量取 200 μL 加入 96 孔板中,于 490 nm 波长下检测 A 值,以对照品葡萄糖质量浓度为横坐标,A 值为纵坐标绘制标准曲线。

2.3 GCP-1 的纯度和相对分子质量测定

色谱条件:TSK-GelG4000PWXL 凝胶色谱柱(300 mm \times 7.5 mm, 10 μm),流动相为 0.1 mol/L NaNO_3 溶液,进样量 20 μL ,体积流量 0.6 mL/min,柱温与检测器温度均为 40 $^{\circ}\text{C}$ 。

先将不同相对分子质量的葡聚糖标准品(5.0 \times 10⁴、8.0 \times 10⁴、1.5 \times 10⁵、2.7 \times 10⁵、6.7 \times 10⁵、1.4 \times 10⁶、2 \times 10⁶、5.3 \times 10⁶)配成 2 mg/mL 的水溶液,用微孔滤膜(直径 50 mm、孔径 0.45 μm)滤过后进样,然后将样品配成 2 mg/mL 的水溶液,过微孔滤膜(直径 50 mm、孔径 0.45 μm)后进样,测定样品的保留时间,以相对分子质量对数为纵坐标,以对保留时间为横坐标绘制标准曲线,根据线性回归方程计算样品相对分子质量。

2.4 GCP-1 的单糖组成分析

取 2 mg GCP-1,加入 3 mL 2 mol/L 三氟乙酸(TFA),密封,110 $^{\circ}\text{C}$ 水解 6 h。加等体积的甲醇于水解产物中,并在减压情况下旋转蒸发干燥,重复上述过程几次以除去过量的 TFA。取全水解液 100 μL ,碱性条件下进行 PMP 衍生化,衍生后除去多余的 PMP,进行 HPLC 分析。

色谱条件:采用 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (150 mm \times 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱;检测器为紫外检测器;进样量为 10 μL ;在 245 nm 检测波长下,检测温度为 35 $^{\circ}\text{C}$,以 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.7)-乙腈(83:17)为流动相,按体积流量 1 mL/min 进行检测。

2.5 GCP-1 的红外光谱(IR)分析

称取干燥的 GCP-1 样品约 3.0 mg,与适量干燥的 KBr 粉末置于玛瑙研钵中研磨均匀,压片,在 4000~400 cm^{-1} 的范围内进行 IR 扫描。

2.6 GCP-1 的甲基化分析

2.6.1 甲基化实验 称取 GCP-1 样品约 10 mg,通

过碳二亚胺方法^[7]将 GCP-1 羧基还原,通过 IR 确定羧基还原程度;根据文献方法^[8],完全还原后的 GCP-1 进行甲基化,通过 IR 确定甲基化程度,甲基化完成后,进行酸水解和乙酰化衍生,采用气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)进行分析。

2.6.2 质谱条件 连接处温度 250 $^{\circ}\text{C}$;EI 离子源,电子能量 70 eV,离子温度 230 $^{\circ}\text{C}$;DB-5 石英毛细管柱(30 m \times 0.25 mm, 0.25 μm),体积流量 1 mL/min;升温程序为 120 $^{\circ}\text{C}$ 保持 3 min,然后在 8 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 至 250 $^{\circ}\text{C}$ 的温度下保持 10 min;进样量 1 μL 。

2.7 GCP-1 的核磁分析

GCP-1(30 mg)溶解在 1 mL D_2O 中,并在 25 $^{\circ}\text{C}$ 的 Bruker AVIII-600 NMR 光谱仪上进行 ¹H-NMR、¹³C-NMR、¹H-¹³C HSQC 分析。

2.8 GCP-1 对小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 的抗炎活性的影响

2.8.1 小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 的增殖实验 将指数生长期的小鼠单核巨噬细胞 RAW 264.7 以 4.8 \times 10⁵ 个/孔的密度接种在 96 孔板中。加入不同质量浓度(10、50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) GCP-1,每个样品质量浓度设置 3 个平行组。参考文献方法^[9],进行 CCK-8 实验,通过酶标仪在 570 nm 的波长下测量每组的 A 值,以细胞培养液处理细胞作为对照组,按公式计算细胞活力。

$$\text{细胞活力} = A_{570 \text{ 实验}} / A_{570 \text{ 对照}}$$

2.8.2 ELISA 法检测 IL-1 β 、NO 和 TNF- α 的水平 将小鼠单核巨噬细胞 RAW 264.7 (1 \times 10⁵ 个/孔)接种到 24 孔板中,用脂多糖(LPS) 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理 1 h 后,加入不同质量浓度(10、50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 GCP-1。24 h 后,收集培养上清液。每个样品质量浓度设置 3 个平行组,同时以细胞培养液处理细胞作为对照组。根据试剂盒说明书操作,用酶标仪在 540 nm 的波长下测量每组的 A 值。根据 A 值,通过测定得到的标准曲线计算细胞培养上清液中抗炎因子 TNF- α 、IL-1 β 和 NO 水平。

2.8.3 统计学处理 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 21.0 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 结果与分析

3.1 粗茎秦艽多糖的分离纯化

通过超声辅助热水浸提法提取,进行脱蛋白,浓缩,无水乙醇沉淀,然后用丙酮、乙醚洗涤,挥干,得粗茎秦艽粗多糖,得率为 4.32%;粗多糖经

DEAE-cellulose 柱色谱分离得到 2 个组分：水洗脱组分、0.5 mol/L NaCl 洗脱组分，见图 1。因水洗脱组分含量相对较少，故将 0.5 mol/L NaCl 洗脱组分通过 SephadexG-100 柱进一步纯化，得 GCP-1，得率为 3.48%。硫酸-苯酚法测得 GCP-1 总糖质量分数为 84.38%。如图 2 所示，凝胶色谱法测定 GCP-1 相对分子质量为 6.87×10^4 。GCP-1 的峰单一且对称，表明其纯度高且结构均匀，可用于后续的结构分析。

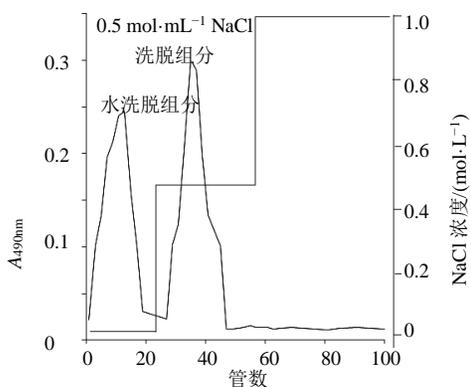
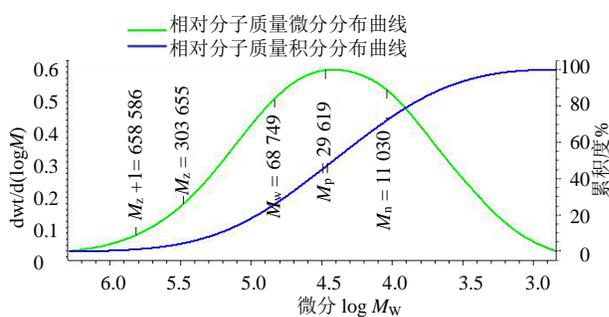


图 1 粗茎秦艽粗多糖经 DEAE-cellulose 柱的分离图
Fig. 1 Elution cruve of *G. crassicaulis* crude polysaccharide on DEAE-cellulose column



M_z -Z 均分子量 M_n -数均分子量 M_p -顶峰处分子量 M_w -重均分子量
 M_z -Z average molecular weight M_n -number average molecular weight M_p -peak molecular weight M_w -weight average molecular weight

图 2 GCP-1 高效凝胶色谱
Fig. 2 HPGPC of GCP-1

3.2 GCP-1 的结构解析

3.2.1 GCP-1 的单糖组成 如图 3 所示，GCP-1 由甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖 7 种单糖组成，其物质的量比为 0.07 : 3.07 : 0.42 : 1.98 : 1.33 : 5.22 : 6.76。

3.2.2 GCP-1 的红外光谱分析 GCP-1 的 IR 光谱中，具有多糖的典型吸收带（图 4）。在 $3600 \sim 3200 \text{ cm}^{-1}$ 、 $3000 \sim 2800 \text{ cm}^{-1}$ 处出现特征吸收峰^[10]。

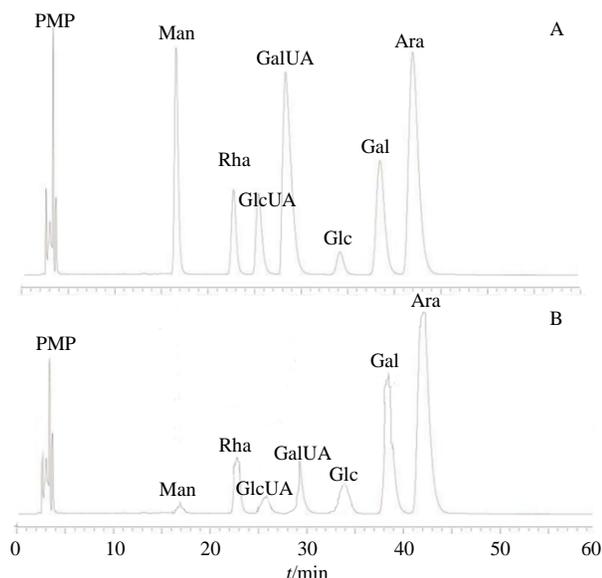


图 3 混合对照品溶液 (A) 和 GCP-1 的单糖组成 (B) 的 HPLC 分析

Fig. 3 Monosaccharide composition analysis of mixed standard and GCP-1 by HPLC

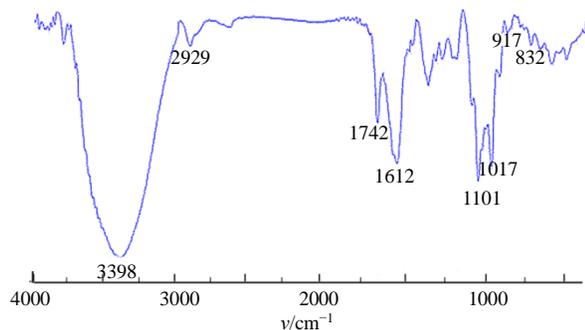


图 4 GCP-1 的红外光谱分析

Fig. 4 FT-IR characterization of GCP-1

GCP-1 在 3398 cm^{-1} 处有一强而宽的吸收峰，该峰是由于羟基的伸缩振动形成，说明存在分子内、分子间氢键。 2929 cm^{-1} 处是一弱的吸收峰，由 C-H 的伸缩振动造成^[10]。 1742 和 1612 cm^{-1} 处的吸收峰由酯羰基 (COOR) 和羧酸酯 (COO⁻) 伸缩振动造成^[11-12]，表明 GCP-1 是酸性多糖。GCP-1 在 1541 cm^{-1} 处没有吸收峰，表明它不含蛋白质^[13]。

3.2.3 GCP-1 的甲基化分析 GCP-1 经过脱羧基、甲基化、酸水解以及乙酰化之后进行 GC-MS 分析，结果见表 1。因为甘露糖和葡萄糖酸的含量低于甲基化分析方法检测限度，因此信号不明显。

3.2.4 GCP-1 的核磁分析 $\rightarrow 2)$ - α -L-Rhap(1 \rightarrow 和 $\rightarrow 2,4)$ - α -L-Rhap(1 \rightarrow 残基的确定：¹³C-NMR 谱（图 5）中

表1 GCP-1的甲基化分析结果
Table 1 Analysis of GCP-1 methylation

部分甲基化的糖基	糖基链接方式	平均质量分数/%	主要离子碎片
2-Me-Araf	1,3,5-Araf	9.23	43, 59, 74, 85, 87, 99, 102, 162, 173, 261
2,3-Me ₂ -Araf	1,5-Araf	15.79	43, 57, 71, 85, 99, 117, 129, 189
2,3,5-Me ₃ -Araf	1-Araf	11.10	43, 59, 74, 85, 87, 99, 102, 162, 173, 261
2, 4, 6-Me ₃ -Galp	1,3-Galp	8.22	43, 71, 87, 101, 118, 129, 161, 234
2,3,6-Me ₃ -Galp	1,4-Galp	7.86	43, 59, 71, 101, 145, 157, 173, 188, 233
2,3,4-Me ₃ -Galp	1,6-Galp	14.13	43, 85, 101, 118, 159, 207, 233, 278
2,4-Me ₃ -Galp	1,3,6-Galp	8.94	43, 85, 104, 118, 129, 207, 223, 278
3-Me-Rhap	1,2,4-Rhap	12.83	43, 59, 88, 117, 130, 161, 190, 203, 233
3,4-Me ₂ -Rhap	1,2-Rhap	4.25	43, 57, 87, 99, 101, 115, 138, 161, 233
2,3,6-Me ₃ -GlcP	1,4-GlcP	7.64	43, 71, 87, 105, 117, 129, 161, 233

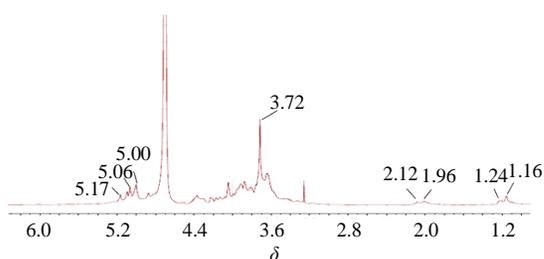


图5 GCP-1的¹H-NMR谱
Fig. 5 ¹H-NMR spectrum of GCP-1

δ 16.5 处的化学位移和¹H-NMR谱(图6)中δ 1.24和1.16处化学位移,以及HSQC谱(图7)上δ 16.8/1.22和16.6/1.16处的化学位移对应于α-L-Rhap的C-6/H-6,结合甲基化分析结果可知,GCP-1含有→2)-α-L-Rhap(1→和→2,4)-α-L-Rhap(1→残基^[14-15];结合文献可知,→2)-α-L-Rhap(1→和→2,4)-α-L-Rhap(1→残基表示GCP-1存在I型鼠李糖半乳糖醛酸聚糖(RGI)区域^[16]。

→4)-α-D-GalpA(1→残基的确定: δ 100.2/4.87, 68.0/3.64, 68.5/3.92, 78.6/4.38, 70.5/5.06处的化学位移(图5、6)分别对应于→4)-α-D-GalpA(1→的C-1/H-1、C-2/H-2、C-3/H-3、C-4/H-4、C-5/H-5^[15]。

结合文献可知,GCP-1存在高半乳糖醛酸聚糖(HG)区域;在¹³C-NMR谱(图5)中,→4)-α-D-GalpA(1→残基酯化和未酯化C-1的化学位移分别为δ 100.0和99.4,对应C-6处化学位移分别为δ 170.6和175.1,分别来自甲酯的羰基碳和羧基碳;酯化的甲基碳在δ 52.8处有信号^[17-18]。HSQC谱(图7)上化学位移δ 20.5/2.09和20.4/2.01是典型乙酰基基团的信号^[9]。综上所述,GCP-1存在高半乳糖醛酸聚糖(HG),并且残基→4)-α-D-GalpA(1→被部分甲基化和乙酰化。

α-L-Araf基团的确定:¹³C-NMR谱(图5)中δ 106.3, 106.8, 107.4处的化学位移均为α-L-Araf基团的信号,结合HSQC谱(图7)可知,δ 106.8/5.16和106.8/5.07处的化学位移分别对应于→3,5)-α-L-Araf(1→和→5)-α-L-Araf(1→的C-1/H-1^[17-18],→3,5)-α-L-Araf(1→和→5)-α-L-Araf(1→的大量存在表明GCP-1存在阿拉伯聚糖^[18,20-22]。

β-D-Galp基团的确定:¹³C-NMR谱(图5)中δ 104.3(C-1), 77.6(取代的C-4), 74.4(C-5), 73.6(C-3), 71.8(C-2)和61.0(C-6)处的化学位移以及HSQC谱(图7)上δ 102.7/4.42、103.9/4.56和

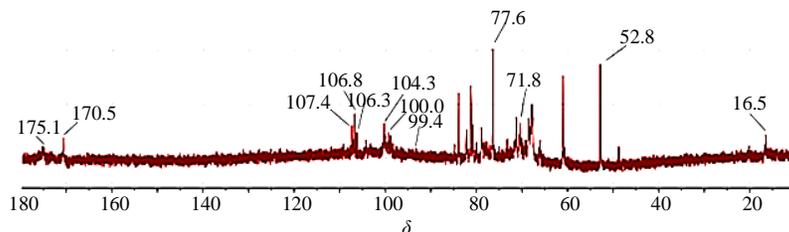


图6 GCP-1的¹³C-NMR谱
Fig. 6 ¹³C-NMR spectrum of GCP-1

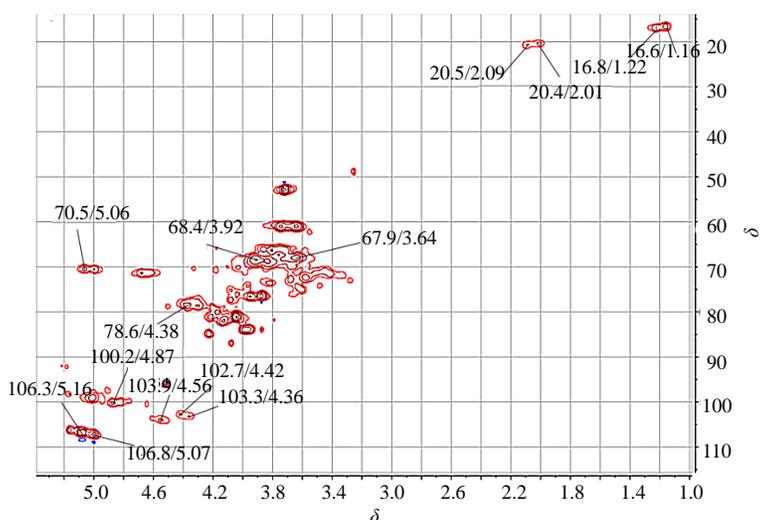


图7 GCP-1的¹H-¹³C HSQC谱
Fig. 7 ¹H-¹³C HSQC spectrum of GCP-1

103.3/4.36 处的化学位移均属于 β-D-Galp 基团, 结合甲基化结果可知, 大量的 β-D-Galp 的存在表明 GCP-1 存在 I 型阿拉伯半乳聚糖 (AGI) 和 II 型阿拉伯半乳聚糖 (AG II), 通常存在于侧链中^[18,20-22]。

综上所述, GCP-1 是一种典型的果胶多糖, 含有 HG 和 RG I 区域及 AG I 和 AG II 侧链。在碳谱中, δ 100.0 和 99.4 处为 →4)-α-D-GalpA-(1→ 酯化和未酯化 C-1 的化学信号值, 对应 C-6 处化学位移分别为 δ 170.6 和 175.1, 酯化羰基的甲基碳在 52.8 处有信号, C-2~5 信号化学位移值依次为 68.0、68.5、78.6、70.5; 这些光谱数据表明存在甲基酯化的 HG^[17]。Vincken 等^[16]研究发现 HG 可能作为 RGI 的侧链存在。结合单糖分析中 GalpA 含量不是很高, 因此推测此多糖含有 HG 区域, 且可能作为 RGI 的侧链存在。

3.3 GCP-1 对小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 细胞增殖及分泌 IL-1β、NO 和 TNF-α 的影响

由图 8 可知, GCP-1 对小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 作用 24 h 后, 与对照组相比, GCP-1 在质量浓度为 10、50、100、200 μg/mL 时均可显著促进小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 细胞的增殖 (P < 0.01)。

由图 9 可知, 与对照组相比, LPS 能显著增加 IL-1β、NO 和 TNF-α 的产生; 由图 9-c 可知, 与 LPS 组相比, GCP-1 在质量浓度为 10、50、100、200 μg/mL 时均可显著抑制 NO 的产生; 如图 9-a、b, 随着 GCP-1 质量浓度的增大, 对 TNF-α 和 IL-1β 的产生抑制越大; 在 GCP-1 质量浓度为 200 μg/mL 时对

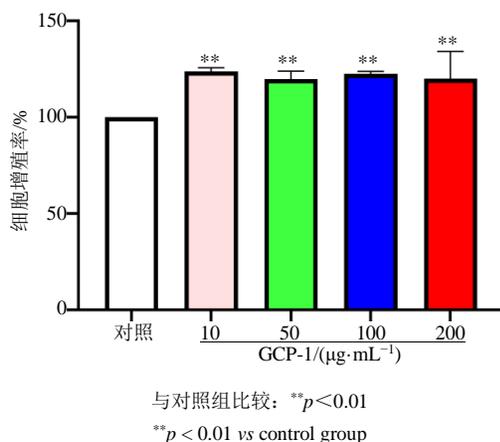
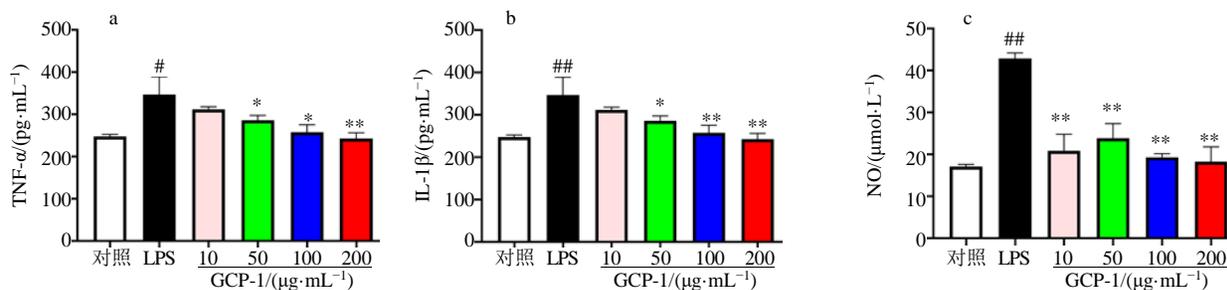


图8 GCP-1 对 RAW264.7 细胞的增殖活性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 8 Effects of GCP-1 on proliferation of RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

IL-1β、NO 和 TNF-α 的抑制作用最大; 说明 GCP-1 通过抑制细胞因子 IL-1β、NO 和 TNF-α 的产生发挥抗炎功能。

4 讨论

GCP-1 经 HPGPC 谱图分析为均一性多糖, 其相对分子质量为 6.87×10^4 ; 由单糖分析表明 GCP-1 由甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖醛酸、半乳糖、葡萄糖和阿拉伯糖 7 种单糖组成, 其物质的量比依次为 0.07 : 3.07 : 0.42 : 1.98 : 1.33 : 5.22 : 6.76; 其中半乳糖醛酸、葡萄糖和阿拉伯糖含量比较高, 甘露糖和葡萄糖醛酸含量较少; 而同时 GC-MS 和 NMR 检测发现其含有由残基 →4)-α-D-GalpA-(1→ 构成的 HG 区域, 但单糖分析中 GalpA 含量不是很高, 推测是该多糖 RGI 的侧链可能含有



与对照组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与LPS组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

$P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs LPS group

图9 GCP-1对RAW264.7细胞释放TNF- α (a)、IL-1 β (b)和NO (c)的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Effects of GCP-1 on TNF- α (a), IL-1 β (b), and NO (c) of RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

HG; 其同时含有由 α -L-Araf 和 β -D-Galp 基团组成的阿拉伯聚糖、AG I 和 AG II 区域; 这些都是典型的果胶多糖所具有的结构。通过体外细胞实验表明 GCP-1 能明显增强 RAW264.7 细胞的增殖, 并能抑制 RAW264.7 细胞 TNF- α 、IL-1 β 和 NO 的产生, 呈现显著的抗炎活性。

GCP-1 结构和抗炎活性的探讨, 对于深入研究粗茎秦艽抗炎作用的物质基础具有重要意义。对中药均一多糖结构的研究, 可为以多糖为主要成分的中药质量控制水平的提升奠定基础, 避免现代标准中多采用的总多糖测定方法存在的抗干扰能力弱的问题。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 聂燕琼, 李海彦, 孙娜, 等. 粗茎秦艽资源研究进展 [J]. 中国现代中药, 2012, 14(5): 37-40.
- [2] Jia N, Li Y W, Wu Y, et al. Comparison of the anti-inflammatory and analgesic effects of *Gentiana macrophylla* Pall. and *Gentiana straminea* Maxim., and identification of their active constituents [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 144(3): 638-645.
- [3] Cai W, Xu H, Xie L, et al. Purification, characterization and *in vitro* anticoagulant activity of polysaccharides from *Gentiana scabra* Bunge roots [J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 140: 308-313.
- [4] Cheng Z, Zhang Y, Song H, et al. Extraction optimization, characterization and antioxidant activity of polysaccharide from *Gentiana scabra* bge [J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 93(pt a): 369-380.
- [5] Cui H Y, Wang C L, Wang Y R, et al. The polysaccharide isolated from *Pleurotus nebrodensis* (PN-S) shows immune-stimulating activity in RAW264.7 macrophages [J]. *Chin J Nat Med*, 2015, 13(5): 355-360.
- [6] 陈克克, 王喆之. HPLC 分析秦艽多糖的单糖组成 [J]. 陕西师范大学学报: 自然科学版, 2010, 38(1): 79-81.
- [7] 刘丽丽. 酸性多糖甲基化分析方法的改进 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014: 24-25.
- [8] Needs P W, Selvendran R R. Avoiding oxidative degradation during sodium hydroxide/methyl iodide-mediated carbohydrate methylation in dimethyl sulfoxide [J]. *Carbohydr Res*, 1993, 245(1):1-10.
- [9] Plaza A, Merino B, del Olmo N, et al. The cholecystokinin receptor agonist, CCK-8, induces adiponectin production in rat white adipose tissue [J]. *Br J Pharmacol*, 2019, 176(15): 2678-2690.
- [10] Chen R Z, Li H P, Li S Z, et al. Extraction optimization, preliminary characterization and immunological activity of polysaccharides from figs [J]. *Int J Biol Macromol*, 2015, 72: 185-194.
- [11] Wang L J, Yu X N, Yang X S, et al. Structural and anti-inflammatory characterization of a novel neutral polysaccharide from North American ginseng (*Panax quinquefolius*) [J]. *Int J Biol Macromol*, 2015, 74: 12-17.
- [12] Zhang F, Lin L H, Xie J H. A mini-review of chemical and biological properties of polysaccharides from *Momordica charantia* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 92: 246-253.
- [13] Zhang Y, Pan X L, Ran S Q, et al. Purification, structural elucidation and anti-inflammatory activity *in vitro* of polysaccharides from *Smilax china* L [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 139(5): 233-243.
- [14] Redgwell R J, Curti D, Wang J K, et al. Cell wall polysaccharides of Chinese Wolfberry (*Lycium barbarum*): Part 2. Characterisation of arabinogalactan-proteins [J]. *Carbohydr Polym*, 2011, 84(3): 1075-1083.
- [15] Steinhorn G, Sims I M, Carnachan S M, et al. Isolation

- and characterisation of Arabinogalactan-proteins from New Zealand kanuka honey [J]. *Food Chem*, 2011, 128(4): 949-956.
- [16] Vincken J P, Schols H A, Oomen Ronald J F J, *et al.* If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture [J]. *Plant Physiol*, 2003,132(4), 1781-1789.
- [17] Cantu-Jungles T M, Maria-Ferreira D, da Silva L M, *et al.* Polysaccharides from prunes: Gastroprotective activity and structural elucidation of bioactive pectins [J]. *Food Chem*, 2014, 146: 492-499.
- [18] Cipriani T R, Mellinger C G, Bertolini M L C, *et al.* Gastroprotective effect of a type I Arabinogalactan from soybean meal [J]. *Food Chem*, 2009, 115(2): 687-690.
- [19] Nascimento A M, de Souza L M, Baggio C H, *et al.* Gastroprotective effect and structure of a rhamnogalacturonan from *Acmella oleracea* [J]. *Phytochemistry*, 2013, 85: 137-142.
- [20] Cordeiro L M C, de Fátima Reinhardt V, Baggio C H, *et al.* Arabinan and Arabinan-rich pectic polysaccharides from quinoa (*Chenopodium quinoa*) seeds: Structure and gastroprotective activity [J]. *Food Chem*, 2012, 130(4): 937-944.
- [21] Leivas C L, Iacomini M, Cordeiro L M C. Structural characterization of a rhamnogalacturonan I-arabinan-type I Arabinogalactan macromolecule from starfruit (*Averrhoa carambola* L.) [J]. *Carbohydr Polym*, 2015, 121: 224-230.
- [22] Corrêa-Ferreira M L, Noletto G R, Oliveira Petkowicz C L. *Artemisia absinthium* and *Artemisia vulgaris*: A comparative study of infusion polysaccharides [J]. *Carbohydr Polym*, 2014, 102: 738-745.

[责任编辑 王文倩]