

银杏叶多糖的制备、结构表征及对小鼠脾 T 细胞活化的调节作用

梁红宝*,袁晓梅,马腾茂,刘晓庆,许梦阳,胡天笑

山东中医药高等专科学校,烟台 264199

摘要:探究银杏(*Ginkgo biloba*)叶新型均一多糖的结构特征及其免疫调节活性。采用水提醇沉、离子交换层析、凝胶柱层析等方法对银杏叶粗多糖(*Ginkgo biloba* leaf polysaccharide, GBP)进行纯化,得到银杏叶均一多糖组分 GBP3-1;系统表征其理化性质与结构特征,并考察其对小鼠脾 T 细胞活化的调节作用。结果显示,GBP3-1 多糖含量为 86.5%,糖醛酸含量为 26.5%,重均分子量为 93 868.17 Da,为多孔非晶态杂合型果胶多糖,主要由 L 鼠李糖、D 半乳糖、L 阿拉伯糖、D 半乳糖醛酸等组成,含 I 型鼠李半乳糖醛酸聚糖(rhamnogalacturonan-I, RGI)结构域,并存在甲酯化与乙酰化修饰。体外实验表明,GBP3-1 在浓度 ≤ 500 $\mu\text{g/mL}$ 时未表现出明显细胞毒性,可显著促进刀豆蛋白 A 诱导的 CD3⁺CD69⁺、CD4⁺CD69⁺、CD8⁺CD69⁺ T 细胞活化,其中以 100 $\mu\text{g/mL}$ 剂量效果最优,且活性显著优于同剂量 GBP。本研究为 GBP3-1 在免疫调节相关产品开发中的应用提供了科学依据。

关键词:银杏叶;多糖;分离纯化;结构表征;T 细胞活化;免疫调节

中图分类号:R943

文献标志码:A

文章编号:1001-6880(2026)9-1903-12

DOI:10.16333/j.1001-6880.2026.9.004

CSTR:32307.14.1001-6880.2026.9.004

Preparation, structural characterization of *Ginkgo biloba* leaf polysaccharide and its regulatory effect on splenic T cell activation in mice

LIANG Hong-bao*, YUAN Xiao-mei, MA Teng-mao, LIU Xiao-qing, XU Meng-yang, HU Tian-xiao

Shandong College of Traditional Chinese Medicine, Yantai 264199, China

Abstract: This study aims to investigate the structural characteristics and immunomodulatory activity of a novel homogeneous polysaccharide from *Ginkgo biloba* leaves. The crude *G. biloba* leaf polysaccharide (GBP) was purified by water extraction-ethanol precipitation, ion-exchange chromatography and gel permeation chromatography, yielding a homogeneous polysaccharide fraction designated GBP3-1. Its physicochemical properties and structural characteristics were systematically characterized, and its regulatory effect on mouse splenic T-cell activation was evaluated. The results showed that GBP3-1 had a polysaccharide content of 86.5%, a uronic acid content of 26.5%, and a weight-average molecular weight of 93 868.17 Da. It was a porous, amorphous hybrid pectic polysaccharide mainly composed of L-rhamnose, D-galactose, L-arabinose and D-galacturonic acid, containing a rhamnogalacturonan-I (RG-I) domain with methylation and acetylation modifications. *In vitro* experiments revealed that GBP3-1 exhibited no obvious cytotoxicity at concentrations ≤ 500 $\mu\text{g/mL}$, and significantly promoted concanavalin A-induced activation of CD3⁺CD69⁺, CD4⁺CD69⁺ and CD8⁺CD69⁺ T cells. The optimal effect was observed at 100 $\mu\text{g/mL}$, and its activity was significantly superior to that of crude GBP at the same dosage. This study provides a scientific basis for the application of GBP3-1 in the development of immunomodulation-related products.

Key words: *Ginkgo biloba* leaf; polysaccharide; isolation and purification; structural characterization; T cell activation; immunoregulation

收稿日期:2026-02-13 接受日期:2026-05-28

基金项目:山东省中医药科技项目(Z20242118);烟台市自然科学基金重点项目(ZR2025Z052);烟台市科技创新发展计划(政策引导类)(2025YD018)

*通信作者 Tel:86-018764932621; E-mail: lianghongbao1985@163.com

银杏(*Ginkgo biloba* L.)为银杏科银杏属落叶乔木,是现存最古老的裸子植物之一,被誉为“活化石”,其叶、果在我国传统医学中应用历史悠久,现代更是广泛用于医药和保健品领域^[1]。银杏叶中黄酮类、萜类内酯等成分已被证实具有抗氧化、抗

炎、神经保护等多种药理活性^[2],近年来,人们对银杏叶多糖的独特结构及生物活性日益关注,发现其具有丰富的单糖组成及显著的抗氧化、抗炎、保肝、生发及降血糖活性^[3-9]。

T 细胞作为机体适应性免疫系统的核心细胞,其活化状态直接决定免疫应答的类型、强度及持久性,在免疫稳态维持中发挥不可替代的关键作用^[10]。分化簇(cluster of differentiation, CD)3 阳性 T 细胞(CD3⁺ T 细胞)为总 T 细胞特异性标志物,CD69 作为 T 细胞早期活化标志性分子,其表达水平直接反映 T 细胞的激活程度;CD4⁺辅助性 T 细胞与 CD8⁺细胞毒性 T 细胞亚群的平衡是免疫功能稳态的核心保障,二者比例失衡或功能异常可诱发多种免疫相关疾病^[11]。近年来,天然多糖在 T 细胞调控领域的应用潜力备受关注。有研究表明,银杏叶粗多糖(*Ginkgo biloba* leaf polysaccharide, GBP)通过增强中性粒细胞吞噬能力、血清补体活性及脾脏 T 淋巴细胞活性发挥免疫刺激活性^[12],但仅限于粗多糖的探索,目前尚未有研究明确银杏叶均一多糖对 T 细胞活化的调控作用研究,且其结构与免疫活性的构效关系仍需系统阐释。

鉴于此,本研究以银杏叶为原料,通过回流提取、二次醇沉及柱层析纯化工艺,获得高纯度均一多糖组分 GBP3-1;采用高效凝胶渗透色谱(high-performance gel permeation chromatography, HPGPC)、傅里叶变换红外光谱(Fourier transform-infrared spectroscopy, FT-IR)、氢核磁共振波谱(proton nuclear magnetic resonance spectroscopy, ¹H NMR)及单糖组成分析等多种现代分析技术,系统表征其分子量、单糖组成及结构特点;并探究 GBP3-1 对 T 细胞活化标志物(CD3⁺CD69⁺、CD4⁺CD69⁺、CD8⁺CD69⁺)表达及活化 T 细胞比例的调控作用,旨在完善银杏叶多糖的基础研究数据,为其在免疫调节相关疾病的防治及功能食品开发中的应用提供实验支撑。

1 材料与方法

1.1 药材与动物

银杏叶(批号:20240701)购自山东晟银药业有限公司,经山东中医药大学中药学专家李峰教授鉴定为银杏科植物银杏 *Ginkgo biloba* L. 的干燥叶。

6 只 SPF 级雄性 BALB/c 小鼠(6~8 周龄,体重 18~22 g)购自济南朋悦实验动物繁育有限公司(合格证号:SCXK(鲁)2022-0006)。实验动物饲养于 12 h 光照/12 h 黑暗的环境中,自由摄食、饮水,在

温度 22 ± 2 °C、相对湿度 30%~70% 的条件下适应性饲养 1 周,符合动物福利与伦理要求。所有动物实验均经滨州医学院动物伦理委员会批准(批准号:动研批第 2025-001),并严格遵循《实验动物护理和使用指南》^[13]及 ARRIVE 指南 2.0^[14]的相关要求开展。

1.2 试剂与仪器

L-鼠李糖(*L*-rhamnose, Rha)、*D*-核糖(*D*-Ribose, Rib)、*D*-甘露糖(*D*-mannose, Man)、*D*-葡萄糖醛酸(*D*-glucuronic acid, GlcA)、*D*-半乳糖醛酸(*D*-galacturonic acid, GalA)、*D*-葡萄糖(*D*-glucose, Glc)、*D*-半乳糖(*D*-galactose, Gal)、*D*-木糖(*D*-xylose, Xyl)对照品(批号分别为:24091415、25041327、25022822、25051215、25032328、25032224、24111114、25010602,中国食品药品检定研究院);*L*-阿拉伯糖(*L*-arabinose, Ara)对照品(批号:G0089586,北京中科质检生物技术有限公司);葡聚糖标准品 GBW(E) 050004~GBW(E) 050008(纯度 ≥ 98%,批号:2309,中国计量科学研究院)、考马斯亮蓝 G-250(批号:B104237,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);DEAE-琼脂糖凝胶(批号:HA-0550,北京瑞达恒辉科技发展有限公司);葡聚糖凝胶 G-100(批号:S623122751,上海士锋生物科技有限公司);1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolinone, PMP)(纯度 ≥ 99%,批号:Q/12KM 3834-2023,上海麦克林生化科技有限公司);青霉素-链霉素双抗(批号:20240112,苏州新赛美生物科技有限公司);刀豆蛋白 A(concanavalin A, ConA)、CD3/CD4/CD8/CD69 表面抗体(批号分别为:24E06、24K12、23F09、24L03、24G05,美国 Gibco 公司)。

1290 Infinity/G6540B 型 UHPLC-QTOF-MS(美国 Agilent 公司);Ultimate 3000 高效液相色谱仪(美国 Thermo Fisher 公司);UltrasphereTM 2000 高效凝胶色谱柱(7.8 mm × 300 mm, 10 μm, 美国 Waters 公司);Empyrean X 射线粉末衍射仪(荷兰 Panalytical 公司);TGA-DSC 同步热分析仪(瑞士 Mettler Toledo 公司);EM-30Plus 扫描电子显微镜(美国 Thermo Fisher 公司);FDU-1100 冷冻干燥机(日本岛津公司);MPAII 傅里叶变换红外光谱仪(德国 Bruker 公司);UV-2600 紫外分光光度计(日本岛津公司);ME204 万分之一天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);PHS-3E pH 计(上海雷磁仪器厂);DC150-2 型氮吹仪(杭州佑宁仪器有限公司);BDFACS Canto II 流式

细胞仪(美国 BD 公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 GBP 的提取

取银杏叶 1 kg,粉碎后过 40 目筛,加入 10 倍量 50% 乙醇水溶液,80 ℃ 回流提取 2 次,每次 2 h,合并提取液,减压浓缩至无醇味。加入 3 倍体积 95% 乙醇,搅拌均匀后 4 ℃ 静置过夜进行醇沉。过滤收集滤饼,用 1 L 热水复溶,4 000 r/min 离心 15 min,取上清液再次加入 3 倍体积 95% 乙醇进行二次醇沉,过夜后过滤,滤饼用无水乙醇洗涤 3 次,冷冻干燥后得 GBP,计算得率。

1.3.2 GBP 的纯化

1.3.2.1 DEAE-52 纤维素柱层析

取 GBP 2 g,加适量蒸馏水溶解,经 0.45 μm 滤膜过滤后,上样至预处理好的 DEAE-52 纤维素柱(2.5 cm × 50 cm)。以 1 mL/min 流速依次用蒸馏水、0.1 mol/L NaCl 溶液、0.3 mol/L NaCl 溶液梯度洗脱,每管收集 10 mL,采用苯酚-硫酸法检测洗脱液中多糖含量,绘制洗脱曲线。合并相同峰的洗脱液,用截留分子量 1 000 Da 的透析袋流水透析 48 h 脱盐,减压浓缩后冷冻干燥,分别得到中性多糖 GBP1 和酸性多糖 GBP2、GBP3。

1.3.2.2 葡聚糖凝胶 G-100 柱层析

取 GBP3 500 mg,加蒸馏水溶解后上样至预处理好的葡聚糖凝胶 G-100 柱(3.5 cm × 80 cm),以蒸馏水为洗脱液,1 mL/min 流速洗脱,每管收集 10 mL,苯酚-硫酸法检测多糖峰。合并单一对称峰的洗脱液,浓缩后冷冻干燥,得精制多糖 GBP3-1。

1.3.2.3 多糖、糖醛酸及蛋白质含量测定

采用苯酚-硫酸法^[15],以 Glc 为对照品,测定不同纯度多糖的含量;采用 3,5-二甲基苯酚法^[16],以 GalA 为对照品,测定其糖醛酸含量;采用考马斯亮蓝 G-250 法^[17]测定多糖样品中的蛋白质含量,以牛血清白蛋白为对照品,均平行测定 3 次。

1.3.3 多糖分子量检测

1.3.3.1 对照溶液和供试品溶液的制备

称取分子量分别为 4.32×10^3 、 1.26×10^4 、 7.08×10^4 、 1.26×10^5 、 2.89×10^5 Da 的一系列葡聚糖标准品,用 0.025 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH = 6.7)配制成每种标样的质量浓度约为 2.0 mg/mL 的系列标准溶液,经 0.22 μm 滤膜过滤后备用。称取适量 GBP3-1,加上述磷酸盐缓冲液溶解,配成浓度约为 2.0 mg/mL 的供试品溶液,经 0.22 μm 滤膜过滤后

备用。

1.3.3.2 色谱条件

采用 HPGPC 检测 GBP3-1 的分子量。取 GBP3-1 适量,用蒸馏水溶解成约 5 mg/mL 的溶液,0.45 μm 滤膜过滤后,利用 Waters Ultrahydrogel™ 2000 (7.8 × 300 mm,10 μm)凝胶色谱柱进行分析。柱温 35 ℃;流速 0.6 mL/min;进样 20 μL,流动相为 0.025 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH = 6.7);示差检测器温度 35 ℃,数据采集频率 10 Hz。分别取对照品溶液和供试品溶液进样分析。通过对照溶液的色谱峰保留时间与其分子量的对数值进行线性回归,根据标准曲线计算 GBP3-1 的重均分子量(weight-average molecular weight, Mw)及多分散指数(polydispersity index, PDI)。

1.3.4 单糖组成分析

1.3.4.1 色谱条件

采用 PMP 衍生法^[18]分析 GBP3-1 的单糖组成。Welch Ultimate LP-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm);柱温 30 ℃,流速 1.0 mL/min,进样量 10 μL;检测波长 254 nm。流动相为磷酸盐缓冲液(pH 6.7)-乙腈 = 83:17,等度洗脱。

1.3.4.2 样品水解及混合对照溶液的配制

精密称取 GBP3-1 25.84 mg,加纯化水 1 mL 溶解。精密吸取 3 份各 100 μL 置具塞的试管中,分别加入 2、3 和 4 mol/L 的三氟乙酸(trifluoroacetic acid, TFA)150 μL,封口,在 110 ℃ 的油浴中分别水解 2、3 和 4 h。冷却至室温后,加甲醇 200 μL,用氮气吹干,再用 50 μL 水溶解,得 GBP3-1 水解液。准确称取 Glc、Rha、Man、GlcA、GalA、Ara、Gal 和 Xyl 对照品,用适量水溶解,配成 0.2 mg/mL 的混合对照品溶液。

1.3.4.3 衍生方法

精密量取混合对照溶液和 GBP3-1 水解液各 25 μL 分别置于 5 mL 的离心管中,加入 0.6 mol/L 的 NaOH 溶液 25 μL,混匀后,再加入 0.4 mol/L 的 PMP 50 μL。在 70 ℃ 水浴条件下,100 min,室温冷却后,加入 0.3 mol/L 的 HCl 50 μL,再加水 600 μL 混匀。加入氯仿 1 mL,旋涡 3 min,在 8 000 r/min 条件下离心 10 min,取水相。自上述“加氯仿 1 mL”起重复 3 次以除去多余 PMP,合并水相即为对照品溶液和供试品溶液,经 0.22 μm 滤膜过滤后上机检测。

1.3.4.4 未知糖定性分析

取水解和衍生后的 GBP3-1 供试品溶液,通过

UHPLC-QTOF-MS 进行定性分析。

色谱条件:YMC Triart C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 150 mm, 1.9 μm); 流速 0.3 mL/min, 柱温 40 °C, 波长 254 nm, 流动相为: 10 mmol/L 乙酸铵(A)-乙腈(B), 梯度如下: 0 ~ 10 min, 15% B → 25% B; 10 ~ 12 min, 25% B → 60% B; 12 ~ 15 min, 60% B; 15 ~ 15.1 min, 60% B → 15% B; 15.1 ~ 18 min, 15% B。

质谱条件: 正离子模式下扫描, 质量范围为 m/z 100 ~ 1 500; 离子源温度 300 °C, 离子源电压 4 kV, 毛细管电压 45 V, 二级碰撞能量为 30 eV。

1.3.5 GBP3-1 的结构表征

1.3.5.1 紫外光谱分析

取 GBP3-1 适量, 加蒸馏水配制成 1 mg/mL 的溶液, 在 200 ~ 800 nm 波长范围内进行全波长扫描, 观察特征吸收峰, 以蒸馏水为空白对照。

1.3.5.2 FT-IR 分析

取干燥后的 GBP3-1 样品 2 mg, 与 400 mg 干燥 KBr 混合研磨均匀, 压片后采用 FT-IR 在 4 000 ~ 400 cm⁻¹ 范围内扫描。

1.3.5.3 扫描电镜分析

取冷冻干燥后的 GBP3-1 样品适量, 用导电胶带固定于样品台上, 经金-钼合金溅射涂层(厚度 10 nm)后, 在扫描电子显微镜(scanning electron microscopy, SEM)下观察其表面形态, 加速电压 20 kV。

1.3.5.4 热重-差示扫描量分析

取 GBP3-1 样品 5 mg, 精密称定, 置于氧化铝坩埚中, 在氮气氛围下(流速 50 mL/min), 以 10 °C/min 速率从 30 °C 升温至 600 °C, 记录热重(thermogravimetric analysis, TGA)和差示扫描量热(differential scanning calorimetry, DSC)曲线, 以空氧化铝坩埚为参比。

1.3.5.5 ¹H NMR 分析

取干燥 GBP3-1 样品 20 mg, 用 D₂O 溶解并经 2 次冷冻干燥进行氘代交换, 再用 0.5 mL D₂O 复溶后转入核磁管中, 以 D₂O 的溶剂峰为内标, 于 80 °C、600 MHz 条件下记录¹H NMR 图谱。

1.3.6 多糖对 T 细胞分化的影响

1.3.6.1 脾细胞制备

脱颈处死 BALB/c 小鼠, 无菌条件下取脾脏, 置于盛有适量预冷 1640 完全培养基(含 10% 胎牛血清、1% 双抗)的无菌培养皿中, 用研磨棒轻轻研磨, 200 目尼龙网过滤获得单细胞悬液。加入红细胞裂

解液室温裂解 5 min, 加入等量 1640 完全培养基终止裂解, 1 500 r/min 离心 5 min, 收集细胞, 用 1640 完全培养基重悬洗涤 2 次, 调整细胞浓度至 1 × 10⁷ 个/mL, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中备用。

1.3.6.2 分组与处理

将细胞悬液接种于 96 孔细胞培养板, 每孔 200 μL, 分为对照组(仅加 1640 完全培养基)、模型组(加入 ConA 使其终浓度 1 μg/mL)、GBP 各剂量组(ConA + GBP, 终浓度分别为 100、250 μg/mL)及 GBP3-1 各剂量组(ConA + GBP3-1, 终浓度分别为 100、250 μg/mL), 每组设 4 个复孔。置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h。

1.3.6.3 流式细胞术检测

培养结束后, 收集各孔细胞, 1 500 r/min 离心 5 min, 用预冷 PBS 洗涤 2 次, 加入 CD3-PC5.5、CD4-FITC、CD8-APC-A750、CD69-PE 抗体混合液, 室温避光孵育 20 min, 加入 1 mL 预冷 PBS 洗涤后离心, 用 200 μL PBS 重悬细胞后, 采用流式细胞仪检测 CD3⁺CD69⁺、CD4⁺CD69⁺ 及 CD8⁺CD69⁺ T 细胞的比例。

1.4 统计学分析

采用 SPSS17.0 软件进行数据分析, 数据以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用单因素方差分析(one-way ANOVA)比较各组间差异, 多重比较采用 Tukey-Kramer 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 银杏叶多糖的提取与纯化

银杏叶经 50% 乙醇提取、两次醇沉及冷冻干燥后, 得 GBP 约 45.2 g, 得率为 4.52%, 经检测其多糖含量为 52.8%, 糖醛酸含量为 15.7%, 蛋白质含量为 3.58%, 杂质成分相对较多。GBP 经 DEAE-52 纤维素柱层析梯度洗脱, 得到 3 个组分(见图 1A), 分别为水洗脱的中性多糖 GBP1(0.870 g)、0.1 mol/L NaCl 洗脱的酸性多糖 GBP2(0.085 g)和 0.3 mol/L NaCl 洗脱的酸性多糖 GBP3(0.510 g)。由于 GBP1 纯度较差, GBP2 收率较低, 故选取 GBP3 采用葡聚糖凝胶 G-100 柱进一步纯化, 得到精制多糖 GBP3-1(240 mg), 经测定其多糖含量为 86.5%, 糖醛酸含量为 26.5%, 蛋白质未检出。G-100 洗脱曲线显示 GBP3-1 为单一对称峰, 表明其为均一多糖组分(见图 1B)。

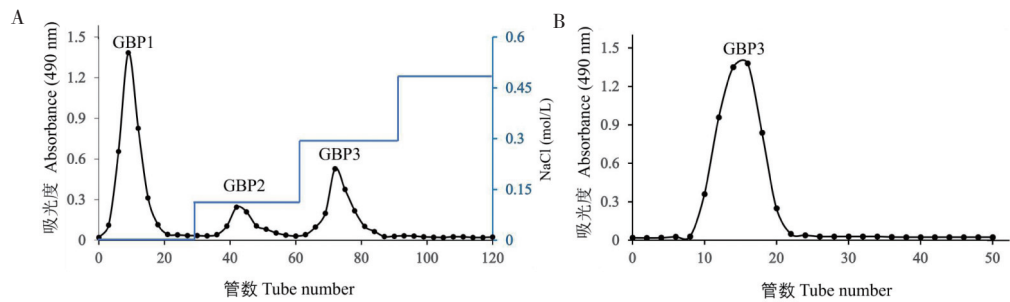


图1 GBP 的 DEAE-52 层析 (A) 和葡聚糖凝胶 G-100(B) 洗脱曲线

Fig. 1 Elution curves of GBP on DEAE-52 chromatography (A) and Sephadex G-100 chromatography (B)

2.2 多糖 GBP3-1 的分子量测定及单糖组成分析

2.2.1 分子量测定

采用 HPGPC 的方法来检测 GBP3-1 的 M_w , 检测结果及拟合曲线如图 2 所示。GBP3-1 为相对单一和对称的峰, 说明 GBP3-1 是均一多糖。回归方

程为: $T = -1.13 \ln(M_w) + 26.07$, $R^2 = 0.9997$, T 为保留时间 (min)。GBP3-1 的保留时间为 13.11 min, 通过回归方程, 计算的 GBP3-1 的 M_w 为 93 868.17 Da, $PDI = 1.07$ 。

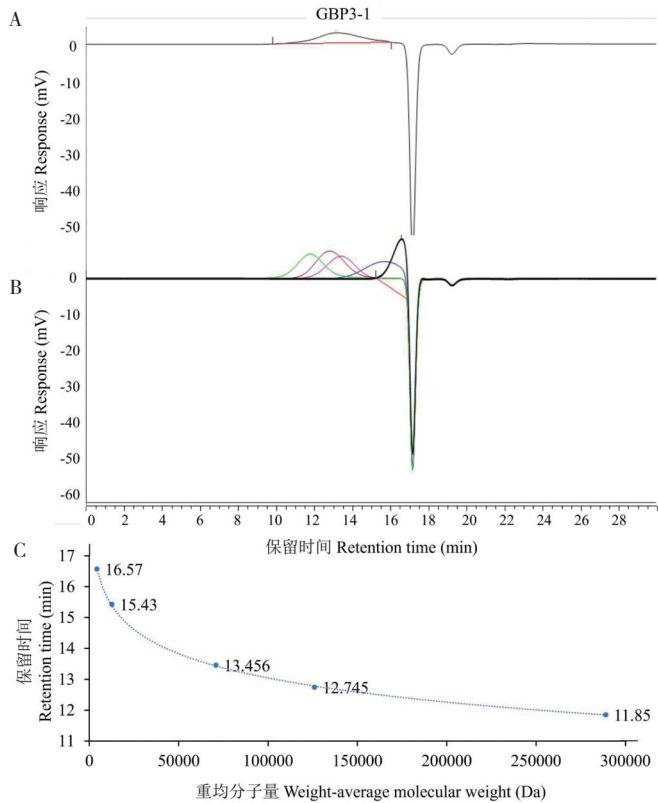


图2 多糖 GBP3-1 的分子量测定

Fig. 2 Molecular weight determination of polysaccharide GBP3-1

注: (A) GBP3-1 的 HPGPC 色谱图; (B) 葡聚糖标准品的 HPGPC 色谱图; (C) 葡聚糖标准品的标准曲线。Note: (A) HPGPC chromatogram of GBP3-1; (B) HPGPC chromatogram of dextran standards; (C) Standard curve of dextran standards.

2.2.2 单糖组成分析

预试验发现 GBP3-1 水解难度较大且单糖组分比较复杂, 因此设计了不同酸浓度、不同时间的梯度

实验, 经 PMP 衍生后进行 HPLC 分析, 结果见图 3。随着 TFA 浓度由 2 mol/L 增大到 4 mol/L, 水解时间由 2 h 提高到 4 h, GBP3-1 的单糖组分种类增加, 相

对比例也在变化。继续延长水解时间,发现水解液变黑,可测组分持续减少,主要源于多糖发生了过度酸解与热降解所致^[19]。因此,选择在 4 mol/L,110 ℃ 条件下水解 4 h 作为水解条件进行后续分析。

经过与单糖对照品比对,发现 GBP3-1 是由

Man、Rha、GlcA、GalA、Glc、Gal、Xyl、Ara 及 1 种未知糖(unknown polysaccharide,UP)组成,已鉴定单糖的摩尔比为 0.8:2.7:0.7:1.7:0.5:2.8:0.5:2.7,其中 Rha、Gal、Ara 和 GalA 为主要单糖成分,占总单糖的 85% 以上。

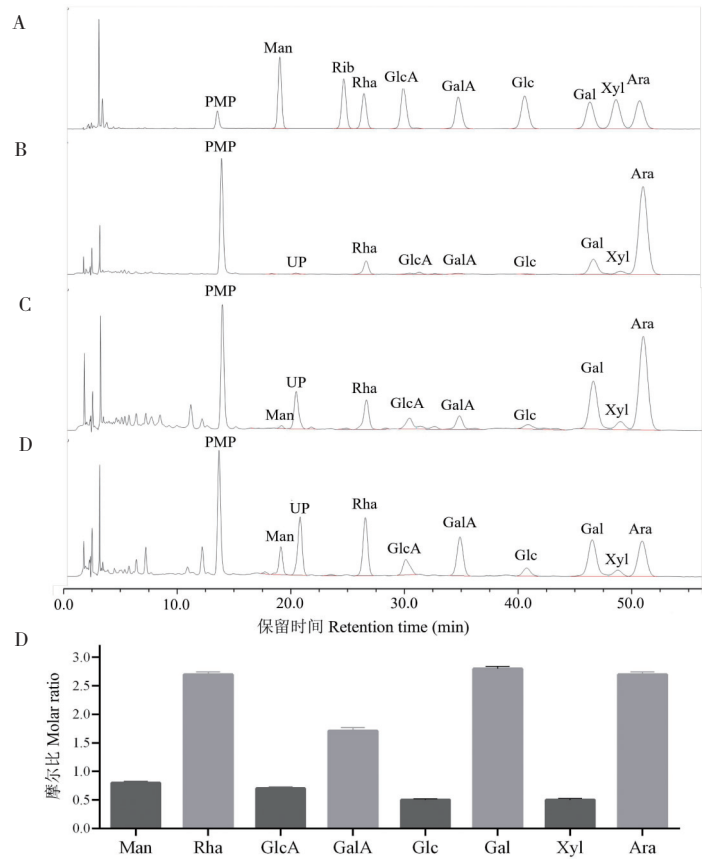


图3 不同水解条件下多糖 GBP3-1 的单糖组成分析

Fig. 3 Analysis of monosaccharide composition of polysaccharide GBP3-1 under different hydrolysis conditions
注:(A)单糖对照品;(B)2 mol/L TFA 水解 2 h;(C)3 mol/L TFA 水解 3 h;(D)4 mol/L TFA 水解 4 h;(E)单糖摩尔比。Note:(A) Monosaccharide reference substances;(B) Hydrolysis with 2 mol/L TFA for 2 h;(C) Hydrolysis with 3 mol/L TFA for 3 h;(D) Hydrolysis with 4 mol/L TFA for 4 h;(E) Monosaccharide molar ratio.

2.2.3 UP 的定性分析

取衍生后的 GBP3-1 供试品进行 LC-MS/MS 分析(见图 4),UP 的准分子离子和主要碎片离子对应的相对分子质量分别为:671.253 9、495.223 3 和 175.086 1。通过仪器自带的数据库和文献检索^[20],推测未知多糖片段为鼠李糖半乳糖醛酸聚糖。其结合了 2 分子的 PMP,[M + H]⁺ 的准分子离子为 m/z 671.256 4(误差: -3.7×10^{-6})。其裂解规律为:在离子源轰击下,鼠李糖和半乳糖醛酸的糖苷键断裂,失去一分子半乳糖醛酸,得到 m/z 495.224 4 [M + H - C₆H₈O₆] 碎片(误差: -2.2×10^{-6});继续裂解失去一分子鼠李糖和一分子 PMP,剩余一分子

PMP,得到 m/z 175.087 1 [M + H - C₆H₈O₆ - C₆H₁₀O₄ - PMP] 碎片(误差: -5.7×10^{-6})。

2.3 GBP3-1 的结构表征

2.3.1 GBP3-1 的紫外光谱分析

GBP3-1 在 200 ~ 800 nm 范围内的全波长扫描结果显示,在 260 nm(核酸特征吸收峰)和 280 nm(蛋白质特征吸收峰)处均无明显吸收,仅在 200 nm 附近出现多糖的特征端基吸收峰,表明 GBP3-1 经纯化后不含核酸和蛋白质杂质,纯度较高。

2.3.2 GBP3-1 的 FT-IR 分析

多糖 GBP3-1 的 FT-IR 光谱分析见图 5,其具有 3 600 ~ 3 000 cm⁻¹、3 000 ~ 2 800 cm⁻¹、1 400 ~ 1 200

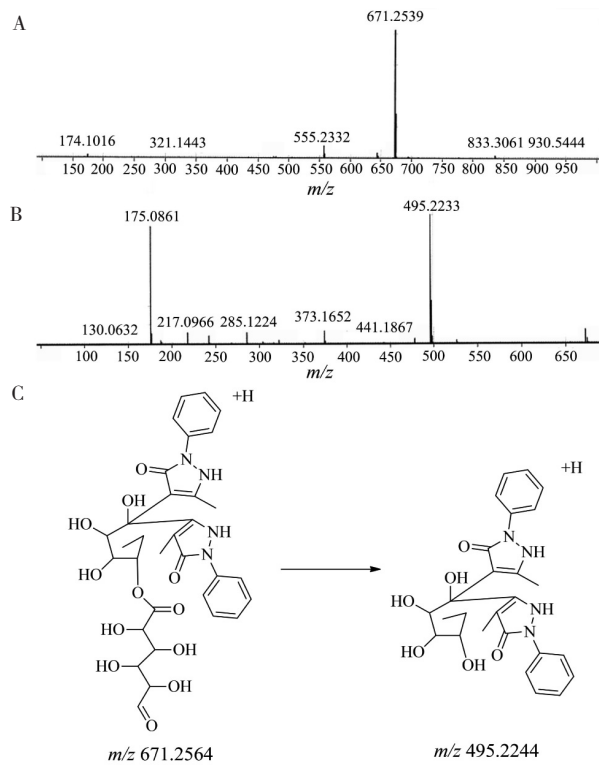


图 4 UP 定性分析

Fig. 4 Qualitative analysis of UP

注:(A)UP 的一级质谱图;(B)UP 的二级质谱图;(C)UP 的裂解途径示意图。Note:(A) MS spectrum of UP;(B) MS2 spectrum of UP;
(C) Schematic diagram of UP cleavage pathway.

cm^{-1} 、 $1\,200 \sim 700\text{ cm}^{-1}$ 的多糖特征吸收峰^[21], $3\,537\text{ cm}^{-1}$ 处的宽峰归属于多糖分子中羟基 (-OH) 的伸缩振动; $2\,928\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰对应糖环上甲基 (-CH-) 和亚甲基 (-CH-) 的 C-H 伸缩振动。 $1\,143$ 、 $1\,017\text{ cm}^{-1}$ 2 个特征吸收峰分属于吡喃环的 C-O-C 反对称

伸缩振动和环上 C-OH 伸缩振动,表明 GBP3-1 含有吡喃糖环。 831 cm^{-1} 特征吸收峰说明 GBP3-1 中存在 α -吡喃糖的 α -糖苷键, 890 cm^{-1} 的特征峰说明其还存在 β -吡喃糖的 β -糖苷键,说明 GBP3-1 为混合型 α/β 吡喃多糖。 $1\,738$ 、 $1\,629\text{ cm}^{-1}$ 处的特征

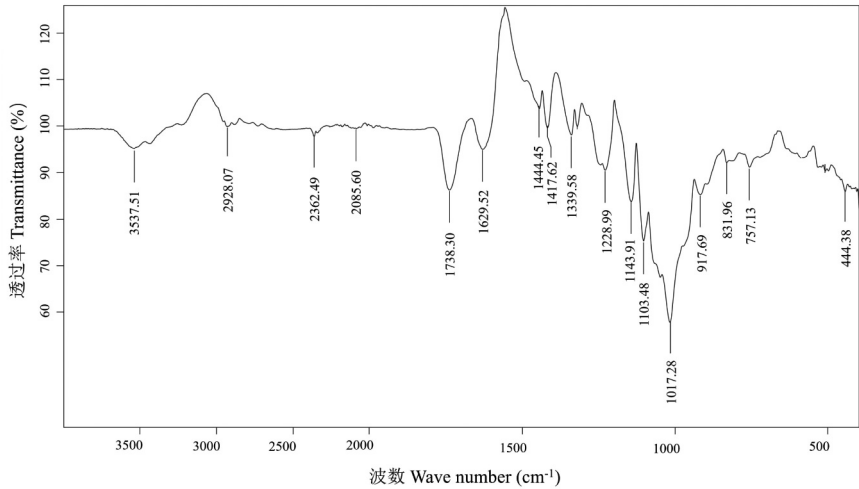


图 5 GBP3-1 的 FTIR 光谱分析

Fig. 5 FTIR spectral analysis of GBP3-1

吸收峰是-COOH 中的 $C=O$ 伸缩振动引起; $1\,444$ 、 $1\,320\text{ cm}^{-1}$ 处的峰为糖环的 C-H 弯曲振动。 $1\,228\text{ cm}^{-1}$ 的吸收峰归属为酯键的 C-O 伸缩振动; $1\,143\text{ cm}^{-1}$ 处的强吸收峰、 $1\,103\text{ cm}^{-1}$ 处的中强吸收峰及 $1\,017\text{ cm}^{-1}$ 处的极强吸收峰是果胶多糖中的 α -GalA 在指纹区的特征吸收峰^[22], 且 $1\,738\text{ cm}^{-1}$ 处强吸收峰为多糖中 α -GalA 上的甲酯基 ($-\text{COOCH}_3$) $C=O$ 的伸缩振动, 说明 GBP3-1 为果胶多糖, 且存在甲酯化修饰。

2.3.3 GBP3-1 的 TGA-DSC 分析

TGA 曲线结果显示 (见图 6), GBP3-1 的热失重过程主要分为 2 个明显阶段: 第一阶段为 $50 \sim 170^\circ\text{C}$, 此温度区间内样品失重率约为 14.1% , 主要为样品中吸附水及结合水的蒸发; 第二阶段为 $216 \sim 388^\circ\text{C}$, 该阶段失重更为显著, 失重率可达 50.9% ,

为 GBP3-1 热降解的主要阶段, 主要伴随多糖分子中 C-O 键、C-C 键的断裂, 降解产物以 CO_2 、 H_2O 等挥发性物质为主。

DSC 曲线对应显示 (见图 6), GBP3-1 存在两个特征吸热峰: 其一为 $35 \sim 255^\circ\text{C}$ 的宽幅强吸热峰, 为样品热行为的主要特征, 对应水分蒸发及早期轻微热降解过程; 其二为 $261 \sim 311^\circ\text{C}$ 的窄幅弱吸热峰, 对应多糖分子局部结构的初步断裂。结合 TGA 与 DSC 曲线的关联性分析可见, DSC 吸热峰主要集中于 $35 \sim 255^\circ\text{C}$ 区间, 且该区间与 TGA 曲线的失重变化呈现良好的对应关系。在此热降解过程中, GBP3-1 的半乳糖醛酸链糖苷键发生断裂, 糖环上的羧酸基团发生脱羧反应, 同时吡喃环中的 C-C 键发生分解, 最终形成固态黑焦物质, 这与已有文献中多糖类物质的热降解规律一致^[23]。

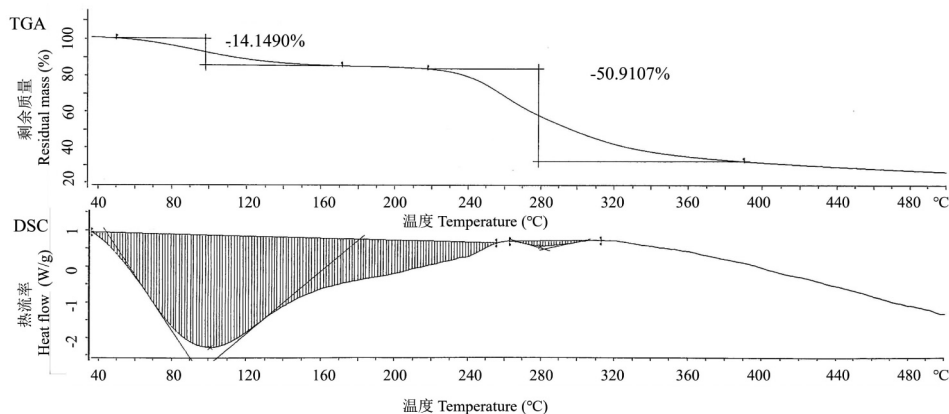


图 6 GBP3-1 的 TGA-DSC 分析

Fig. 6 TGA-DSC analysis of GBP3-1

2.3.4 GBP3-1 的 NMR 分析

图 7 为 GBP3-1 的 ^1H NMR 谱, 化学位移 $\delta\,5.07$ 处的多重峰归属于主链 α -GalAp 的异头氢及侧链 α -Araf 的异头氢, 是果胶多糖主链与阿拉伯糖侧链的典型信号^[24]; $\delta\,4.46$ 处的单峰对应 β -Galp 或 β -GlcAp 的侧链异头氢; $\delta\,3.90$ 处的强单峰为 α -GalAp 残基的甲酯基 ($-\text{COOCH}_3$) 质子共振, 与红外光谱 $1\,738\text{ cm}^{-1}$ 的甲酯基信号相互印证; $\delta\,3.3 \sim 4.2$ 宽峰归属为吡喃环上的非异头质子 (H-2 至 H-6), 为多糖环的特征信号区; $\delta\,2.08$ 处的双二重峰归属于多糖链上乙酰基 ($-\text{COCH}_3$) 的甲基质子, 证实存在乙酰化修饰; $\delta\,1.27$ 处的双峰则为 α -Rhap C6 位甲基质子信号, 提示该果胶多糖含有 RG-I 结构域。以上信号共同表明, 该果胶为含中性糖侧链、兼具甲酯化与乙酰化修饰的杂合型果胶, 单糖构型以 α 型为主,

同时含有 β -Gal、 β -GlcA 等 β 型单糖。

综上所述, 基于 GBP3-1 的单糖组成、FT-IR 及 ^1H NMR 波谱表征结果, 参照果胶多糖经典结构分型特征及相关文献报道^[2,25], 对 GBP3-1 的基础结构特征进行推测, GBP3-1 属于以 RG-I 结构域为主导的酸性杂合果胶多糖, 分子骨架核心主要由 RG-I 构成。在 RG-I 结构域的 Rha 残基位点连接高度分支化的复合侧链, 该侧链以中性糖类为主体, 包含 α -Ara、 β -Gal、Glc、 α -Man 及 Xyl, 同时掺入 β -GlcA 酸性残基修饰。此外, 分子中少量 α -GalA 残基存在甲酯化、乙酰化衍生修饰, 并保留部分游离羧基, 赋予该多糖差异化的理化结构特征与潜在生物活性基础。GBP3-1 可能的化学结构式如图 8 所示, 其复杂多元的单糖组分、 α/β 混合型吡喃糖构型及丰富的酯化修饰特征, 共同构成了该银杏叶果胶多糖发挥

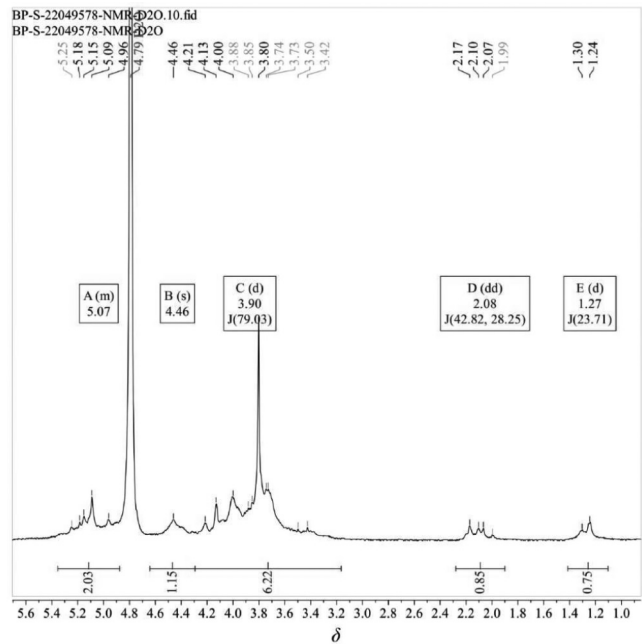


图7 GBP3-1 的¹H NMR 图谱

Fig. 7 The ¹H NMR spectrum of GBP3-1

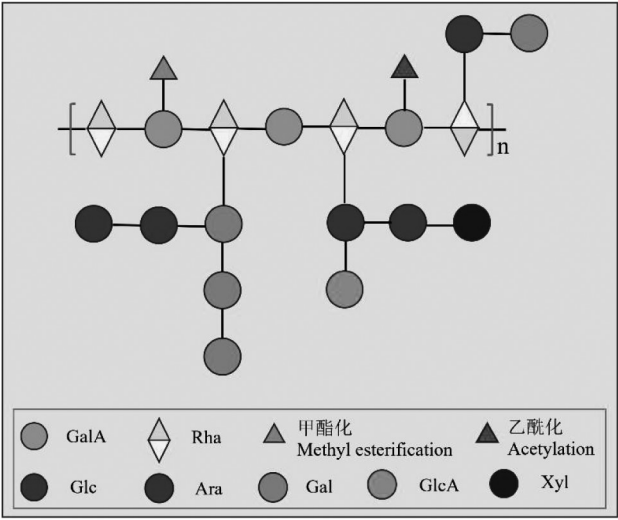


图8 GBP3-1 结构示意图

Fig. 8 Schematic diagram of the structure of GBP31

生理功能与生物活性的物质结构基础。

2.3.5 GBP3-1 的外观形貌及 SEM 微观形貌图

GBP3-1 为类白色棉花状固体(见图 9),SEM 分析结果显示:低倍视野(× 500)可见 GBP3-1 整体呈现疏松多孔结构;高倍放大(× 2 000)可观察其微观局部形貌无规则。样品整体为非晶态特征,该多孔结构可能是由于冷冻干燥过程中多糖水溶液内水分快速升华,溶剂原位脱除而形成。

2.4 银杏叶多糖对 T 细胞分化的影响

2.4.1 细胞毒性预试

预实验结果(见图 10)显示,GBP3 在 250 μg/mL 时开始表现出一定的细胞毒性,且浓度升高后毒性显著增强;而 GBP3-1 在浓度高达 500 μg/mL 时仍无明显细胞毒性,表明 GBP3-1 的生物安全性更高。后续实验选取 100、250 μg/mL 浓度进行干预。

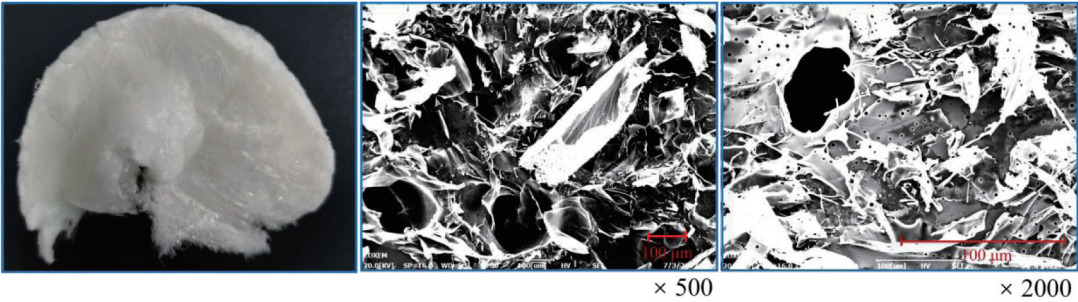


图9 GBP3-1 的外观形貌及 SEM 微观形貌图

Fig. 9 Appearance and SEM micrographs of GBP3-1

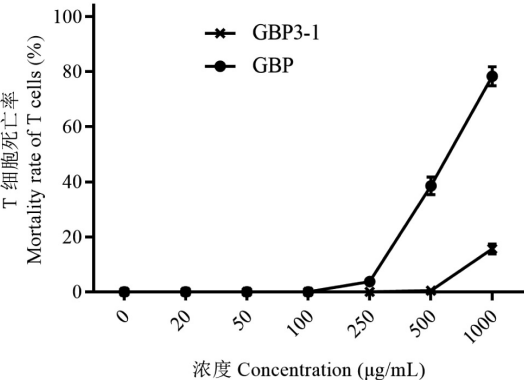


图10 GBP 和 GBP3-1 的细胞毒性预实验结果
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 10 Results of cytotoxicity pre-test for polysaccharides
GBP and GBP3-1 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.4.2 对 T 细胞活化标志物的影响

流式细胞术检测结果显示(见图 11):与对照组相比,模型组的 CD3⁺CD69⁺、CD4⁺CD69⁺ 及 CD8⁺CD69⁺ T 细胞比例均显著升高($P < 0.05$),表明 T 细胞活化模型构建成功。与模型组相比,GBP 低剂量组(100 μg/mL)促活化作用显著,高剂量组(250 μg/mL)可能因存在一定的细胞毒性,促活化效果不增反降,与模型组相比无显著性差异。GBP3-1 各剂量组均表现出更强的促活化作用,其中低剂量组(100 μg/mL)效果最优,其 CD3⁺CD69⁺、CD4⁺CD69⁺ 及 CD8⁺CD69⁺ T 细胞比例分别达 73.50%、76.04% 和 72.05%,显著高于同剂量 GBP 组($P < 0.05$);高剂量组(250 μg/mL)仍保持较强促活化活性,且未观察到明显细胞毒性。

3 讨论与结论

植物多糖的结构与其生物活性密切相关,其分子量、单糖组成、糖苷键类型、空间构象等结构特征直接影响其药理作用^[26]。本研究通过热水提取-醇

沉法结合 DEAE-52 纤维素柱和葡聚糖凝胶 G-100 柱层析,成功从银杏叶中分离纯化得到均一酸性多糖 GBP3-1,其多糖含量达 86.5%,分子量为 93 868.17 Da,分子量分布均一,表明纯化工艺高效可行,能有效去除多糖中的杂质,获得高纯度均一多糖组分。

在对多糖 GBP3-1 进行单糖分析时,发现虽然 4 mol/L 的三氟乙酸酸性很强,经 4 h 的水解,GBP3-1 仍存在鼠李糖半乳糖醛酸聚糖,说明其未完全水解,原因可能是:三氟乙酸对于某些结构复杂或独特的多糖并不敏感,可能需要优化酸性条件;糖苷键的水解难易程度与糖链的单糖种类、糖环构型、糖苷键类型及是否有取代基等有关,通常支链糖苷键较主链更容易水解,与糖醛酸相连的糖苷键较难水解^[27]。本研究未进一步采用甲基化分析、二维核磁共振波谱及高分辨质谱深度解析 GBP3-1 的糖苷键连接方式、糖链分支结构及空间构象,也与该多糖的不完全水解特性直接相关:甲基化分析需基于完全水解的单糖产物以获得准确的糖苷键连接信息,二维 NMR 和高分辨质谱则需要完整且结构均一的糖链作为检测基础,而 GBP3-1 经最优条件水解后仍保留的鼠李糖半乳糖醛酸聚糖片段,会导致甲基化衍生后产物复杂、糖链断裂无规律,无法开展有效的谱图解析和数据解读。后续研究可通过优化水解条件(如复合酸水解、酶解结合酸解)实现 GBP3-1 的完全水解,再结合上述技术完成多糖的深度结构解析。

本研究发现,GBP3-1 能显著促进 ConA 诱导的 CD3⁺CD69⁺ 总 T 细胞活化,并上调 CD4⁺CD69⁺ 和 CD8⁺CD69⁺ T 细胞亚群比例,且在 100 μg/mL 浓度时效果最佳,表明 GBP3-1 具有显著的免疫调节活性,其机制可能与调控 T 细胞早期活化的钙信号通路、NF-κB 通路等相关,需进一步深入研究。与 GBP 相比,GBP3-1 的免疫调节活性更强且细胞毒性更低,这可能归因于纯化后多糖结构更均一,减少了杂

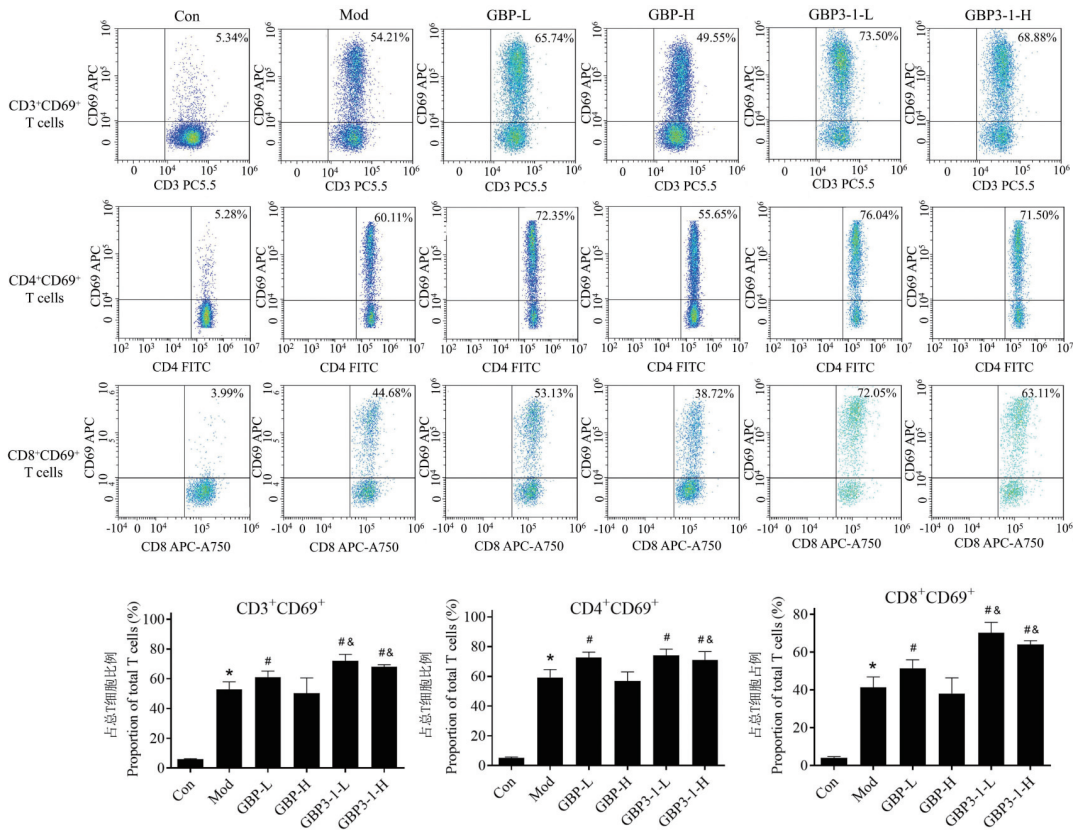


图 11 GBP 和 GBP3-1 对脾脏 T 细胞活化标志物表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 11 Effects of GBP and GBP3-1 on the expression of T cell activation markers($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注:Con,对照组;Mod,模型组;GBP-L,GBP 低剂量组;GBP-H,GBP 高剂量组;GBP3-1-L,GBP3-1 低剂量组;GBP3-1-H,GBP3-1 高剂量组;与对照组相比,* $P < 0.05$,与模型组相比,# $P < 0.05$,与同剂量 GBP 组相比,& $P < 0.05$ 。Note:Con,control group;Mod,model group;GBP-L,low-dose GBP group;GBP-H,high-dose GBP group;GBP3-1-L,low-dose GBP3-1 group;GBP3-1-H,high-dose GBP3-1 group;compared with the control group,* $P < 0.05$;compared with the model group,# $P < 0.05$;compared with the same-dose GBP group,& $P < 0.05$ 。

质成分的干扰,进一步证实了多糖结构与活性的相关性。本研究中 GBP3-1 的糖醛酸含量为 26.5%,较高的糖醛酸(GlcA + GalA)含量可能通过与免疫细胞表面受体结合,激活下游信号通路,从而促进 T 细胞活化。此外,GBP3-1 中含有的鼠李糖半乳糖醛酸聚糖结构,已有研究证实该类结构具有显著的免疫调节潜力^[26,28],可能是 GBP3-1 发挥免疫活性的关键结构单元。

综上,本研究建立了银杏叶多糖的提取纯化工艺,明确了均一多糖 GBP3-1 的结构特征,并证实其具有显著的小鼠脾 T 细胞活化促进作用,且生物安全性优于 GBP,为银杏叶多糖类成分的开发利用提供了实验基础。本研究仍存在一定局限性,仅开展了体外实验,未探究 GBP3-1 调控 T 细胞活化的具体分子机制,其体内免疫调节活性及长期毒理学安全性也未验证。未来可深入探讨 GBP3-1 调控 T 细胞活化的信号通路,开展体内动物实验验证其免疫

调节效果,并进一步研究其结构-活性关系,为其作为免疫调节类功能食品或药物的研发提供更全面的科学依据。

数据可用性声明: 本篇论文的关联数据可在 ScienceDB 数据库 (<https://doi.org/10.57760/sciencedb.nprd.00105>) 中访问获取。

参考文献

- 1 Tian JF, Liu Y, Chen KJ. *Ginkgo biloba* extract in vascular protection: Molecular mechanisms and clinical applications [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2017, 5:532-548.
- 2 Nie SS, Zhang S, Wang YX, et al. Extraction, purification, structural characterization, and bioactivities of *Ginkgo biloba* leave polysaccharides: a review [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 281:136280.
- 3 Ren Q, Chen J, Ding Y, et al. *In vitro* antioxidant and immunostimulating activities of polysaccharides from *Ginkgo biloba* leaves [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 124:972-980.

- 4 Chen P, Hei MF, Kong LL, et al. One water-soluble polysaccharide from *Ginkgo biloba* leaves with antidepressant activities via modulation of the gut microbiome[J]. Food Funct, 2019, 10:8161-8171.
- 5 Yan ZG, Fan RF, Yin SJ, et al. Protective effects of *Ginkgo biloba* leaf polysaccharide on nonalcoholic fatty liver disease and its mechanisms[J]. Int J Biol Macromol, 2015, 80:573-580.
- 6 Zhang CW, Wang CZ, Tao R. Characterization and antioxidant activities of polysaccharides extracted from enzymatic hydrolysate of *Ginkgo biloba* leaves [J]. J Food Biochem, 2017, 41:e12352.
- 7 Li YN, Sheng Y, Liu JY, et al. Hair-growth promoting effect and anti-inflammatory mechanism of *Ginkgo biloba* polysaccharides[J]. Carbohydr Polym, 2022, 278:118811.
- 8 Li JC, Shi HM, Yu J, et al. Extraction and properties of *Ginkgo biloba* leaf polysaccharide and its phosphorylated derivative[J]. Ind Crop Prod, 2022, 189:115822.
- 9 Wang FF, Ye SH, Ding Y, et al. Research on structure and antioxidant activity of polysaccharides from *Ginkgo biloba* leaves[J]. J Mol Struct, 2022, 1252:132185.
- 10 Kared H, Camous X, Larbi A. T cells and their cytokines in persistent stimulation of the immune system[J]. Curr Opin Immunol, 2014, 29:79-85.
- 11 Chen X, Ghanizada M, Mallajosyula V, et al. Differential roles of human CD4⁺ and CD8⁺ regulatory T cells in controlling self-reactive immune responses[J]. Nat Immunol, 2025, 26:230-239.
- 12 H?ncianu M, Pavelescu M, Miron A, et al. Polysaccharides fraction isolated from *Ginkgo biloba* folium; immunopharmacological properties[J]. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi, 2007, 111:1070-1073.
- 13 National Research Council(US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals; 8th Edition [M]. Washington DC:National Academies Press, 2011.
- 14 Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, et al. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research[J]. Br J Pharmacol, 2020, 177:3617-3624.
- 15 Yue FF, Zhang JR, Xu JX, et al. Effects of monosaccharide composition on quantitative analysis of total sugar content by phenol-sulfuric acid method [J]. Front Nutr, 2022, 9:963318.
- 16 Kumar V, Nagar S, Tripathi YC. Do assorted approaches aid in estimation of uronic acids? Case studies on *Tinospora sinensis* polysaccharides[J]. Int J Biol Macromol, 2014, 70:360-363.
- 17 Veena RK, Janardhanan KK. Polysaccharide-protein complex isolated from fruiting bodies and cultured mycelia of *Lingzhi* or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (Agaricomycetes), attenuates doxorubicin-induced oxidative stress and myocardial injury in rats [J]. Int J Med Mushrooms, 2022, 24:31-40.
- 18 Vojvodić Cebin A, Komes D, Ralet MC. Development and validation of HPLC-DAD method with pre-column PMP derivatization for monomeric profile analysis of polysaccharides from agro-industrial wastes [J]. Polymers (Basel), 2022, 14:544.
- 19 Duan YQ, Hu ZY, Jin L, et al. Efficient degradation and enhanced anticomplementary activity of *Belamcanda chinensis* (L.) DC. polysaccharides via trifluoroacetic acid treatment with different degrees [J]. Int J Biol Macromol, 2024, 276:134117.
- 20 Kraus J. Water-soluble polysaccharides from *Ginkgo biloba* leaves[J]. Phytochemistry, 1991, 30:3017-3020.
- 21 Long HR, Gu XY, Zhou N, et al. Physicochemical characterization and bile acid-binding capacity of water extract polysaccharides fractionated by stepwise ethanol precipitation from *Caulerpa lentillifera* [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 150:654-661.
- 22 Hong T, Yin JY, Nie SP, et al. Applications of infrared spectroscopy in polysaccharide structural analysis: Progress, challenge and perspective [J]. Food Chem X, 2021, 12:100168.
- 23 Fatouros A, Einhorn-Stoll U, Kastner H, et al. Influence of the carboxylic function on the degradation of *D*-galacturonic acid and its polymers [J]. J Agric Food Chem, 2021, 69:9376-9382.
- 24 Shi HM, Yu L, Shi Y, et al. Structural characterization of a rhamnogalacturonan I domain from ginseng and its inhibitory effect on galectin-3 [J]. Molecules, 2017, 22:1016.
- 25 Bao S, Ma JC, Li Y, et al. Structural characterization and immunomodulatory activity of pectin polysaccharide from *Urtica macrorhiza* Hand-Mazz [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2025, 37:1449-1459.
- 26 Wang B, Yan LL, Guo SC, et al. Structural elucidation, modification, and structure-activity relationship of polysaccharides in Chinese herbs: a review [J]. Front Nutr, 2022, 9:908175.
- 27 De Ruiter GA, Schols HA, Voragen AG, et al. Carbohydrate analysis of water-soluble uronic acid-containing polysaccharides with high-performance anion-exchange chromatography using methanolysis combined with TFA hydrolysis is superior to four other methods [J]. Anal Biochem, 1992, 207:176-185.
- 28 Tian SS, Mao ZA, Wang YX, et al. Structural characterization and immunomodulatory activity analysis of a novel pectic polysaccharide extracted from *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg and its hydrolysis products [J]. Carbohydr Polym, 2025, 357:123502.