

# 霍山石斛多糖的分离鉴定及药理活性研究进展

司华阳<sup>1,2,3</sup>, 陈乃东<sup>1,3</sup>, 陈乃富<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> 皖西学院生物与制药工程学院, 六安 237012, <sup>2</sup> 安徽中医药大学, 合肥 230032;

<sup>3</sup> 安徽省省级 2011 协同创新——霍山石斛产业化开发协同创新中心, 六安 237012

**摘要:** 霍山石斛是我国传统医药中的一种名贵中药材, 拥有中华九大仙草之首的美誉, 明确收录于《本草纲目拾遗》, 其干燥茎和鲜品均可入药, 具有悠久的药用历史和良好的药用价值。近年来, 国内外学者对霍山石斛多糖的结构分析和药理活性等方面进行了大量深入研究, 为霍山石斛资源的开发利用提供了理论依据, 通过相关文献查阅, 本文主要就霍山石斛多糖的分离鉴定及药理活性相关研究进展进行概述, 为霍山石斛多糖的进一步研究奠定基础。

**关键词:** 霍山石斛; 多糖; 分离鉴定; 药理活性

中图分类号: R284

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.3.027

## Review on Isolation and Pharmacological Activities of Polysaccharides from *Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng

SI Hua-yang<sup>1,2,3</sup>, CHEN Nai-dong<sup>1,3</sup>, CHEN Nai-fu<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, West Anhui University, Lu'an City 237012, China;

<sup>2</sup> School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032, China; <sup>3</sup> The Provincial 2011 Collaborative Innovation Center of Anhui-Dendrobium Huoshanense Industrialization Exploitation Collaborative Innovation Center, Lu'an City 237012, China

**Abstract:** *Dendrobium huoshanense* is a valuable medicinal plant in China and is called the head of nine immortal of China, which explicitly included in the Supplement to Compendium of Materia Medica. The dry or fresh stems of the plant has long been used as medicine in China. In order to provide some theoretical basis for exploration and utilization of *D. huoshanense*, this paper reviewed literatures on the isolation and pharmacological activities of polysaccharides from *D. huoshanense*.

**Key words:** *Dendrobium huoshanense*; polysaccharide; isolation; pharmacological activity

霍山石斛(*Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng), 俗称“米斛”, 为兰科石斛属多年生草本植物, 作为安徽省道地药材之一, 主要产于安徽霍山地区, 是药用石斛中的珍品, 享有中华仙草的美誉<sup>[1]</sup>, 具有益胃生津、抗肿瘤、抗癌、抗白内障、抗氧化、保肝等<sup>[2]</sup>功效。植物化学研究表明, 石斛属植物中的主要含有生物碱、菲类、联苕类、苋酮、香豆素、倍半萜、多糖及挥发油等有效成分<sup>[3]</sup>。多糖是机体内天然大分子之一, 由多个相同或不同的单糖以糖苷键相连而形成, 多具有抗肿瘤、抗氧化、抗衰

老、抗菌、抗病毒、降血糖、降血脂、抗辐射、抗凝血等生物活性作用<sup>[4]</sup>, 且药物毒性极小。多糖作为石斛的主要活性成分, 已成为石斛类药物药效物质基础研究的热点。本文拟对霍山石斛多糖的分离鉴定及其药理活性进行综述, 为霍山石斛资源开发利用提供依据。

### 1 霍山石斛多糖的分离鉴定

多糖的生物活性与其结构密切相关<sup>[5]</sup>, 因此对霍山石斛多糖的分离鉴定的研究对于揭示霍山石斛药理作用机制具有重要意义。

查学强等<sup>[6]</sup>采用 DEAE-纤维素离子交换色谱、Sephacryl S-200、Sephadex G-75 和 Sephadex G-100 等凝胶渗透色谱分离方法从霍山石斛类原球茎的水溶性多糖中首次分离到一种分子量为 22 kDa 的均一性多糖 HPS-1B23 (表 1), 全水解分析表明, 此多糖由葡萄糖、甘露糖和半乳糖组成, 各单糖摩尔比为

收稿日期: 2015-10-27 接受日期: 2016-01-20

基金项目: 安徽高校省级科学研究重大项目 (KJ2015ZD43); 国家自然科学基金 (NSFC81274021, NSFC20153536); 安徽省自然科学基金面上项目 (1608085MH221); 中国博士后研究面上项目 (2014M551791); 安徽省省级高校自然科学研究重点项目 (KJ2016A886)

\* 通讯作者 E-mail: naifuchen1962@163.com

31:10:8,联合运用高碘酸氧化、Smith降解和甲基化等研究发现 HPS-1B23 分子由 $[\rightarrow 1)-\alpha\text{-D-Glcp}-(6\rightarrow)]$ 、 $[\rightarrow 1,3)-\alpha\text{-D-Manp}-(6\rightarrow)]$ 、 $[\rightarrow 1)-\alpha\text{-D-Glcp}-(4\rightarrow)]$ 和 $[\rightarrow 1)-3\text{-OAc-}\alpha\text{-D-Glcp}-(6\rightarrow)]$ 糖残基链接构成的重复结构单元, $[\rightarrow 1)-\alpha\text{-D-Galp}$ 以支链形式连接在 $[\rightarrow 1,3)-\alpha\text{-D-Manp}-(6\rightarrow)]$ 的 C-3 位上,这五种糖残基的分子摩尔比为 4:2.2:2.1:2.2;李小龙等<sup>[7]</sup>在查学强等的研究基础上<sup>[8]</sup>,从霍山石斛原球茎粗多糖中分离得到一种相对分子质量  $8.09 \times 10^6$  Da,主链主要由 $(1\rightarrow 5)-\alpha\text{-L-Araf}$ 、 $(1\rightarrow 6)-\beta\text{-D-Glap}$ 、 $(1\rightarrow 4)-\beta\text{-D-Glcp}$ 、 $(1\rightarrow 3,6)-\beta\text{-D-Galp}$ 和 $\beta\text{-D-Galp}$ 以及 $\alpha\text{-D-Xylp}$ 、 $\beta\text{-D-Manp}$ 末端残基组成的多糖 DHPD<sub>2</sub>(表 1),单糖组成分析表明,DHPD<sub>2</sub>主要由半乳糖、葡萄糖和阿拉伯糖按摩尔比 0.896:0.723:0.2 组成。李凡等<sup>[9]</sup>从霍山石斛类原球茎粗多糖中经阴离子交换色谱和凝胶渗透色谱分离纯化得到一种相对分子质量为  $2.32 \times 10^5$  Da 单一多糖组分 DHP-4A,单糖组分分析显示 DHPD-4A 葡萄糖、阿拉伯糖、甘露糖和鼠李糖按摩尔比 13.8:3.0:6.1:2.1 组成,主链由 $(1\rightarrow 6)-\text{Glc}$ 、 $(1\rightarrow 6)-\text{Man}$ 和 $(1\rightarrow 3,6)-\text{Man}$ 组成, $\beta\text{-L-Rhap}-(1\rightarrow 2)-\beta\text{-L-Rhap}-(1\rightarrow 4)-\beta\text{-D-Manp}-(1\rightarrow)$ 和 $\alpha\text{-L-Araf}-(1\rightarrow 3)-\alpha\text{-L-Araf}-(1\rightarrow 3)-\alpha\text{-L-Araf}-(1\rightarrow)$ 连接在主链中 $(1\rightarrow 6)-\text{Man}$ 的 C-3 位置上。钱兴平等<sup>[10]</sup>从霍山石斛原球茎中分离得到一种相对分子质量为  $3.2 \times 10^3$  Da 的石斛多糖 DH-

PD<sub>1</sub>,研究发现其主要由葡萄糖,阿拉伯糖,半乳糖按 1.023:0.023:0.021 摩尔比和少量甘露糖和木糖组成。田长城等<sup>[11]</sup>通过阴离子交换色谱和凝胶渗透色谱从霍山石斛原球茎中得到一种相对分子质量为  $6.7 \times 10^3$  Da 石斛多糖 DHP1A,其主要由甘露糖,葡萄糖和少量的半乳糖按 2.5:16.0:1 摩尔比组成,主链由 $(1\rightarrow 4)-\alpha\text{-D-Glcp}$ 、 $(1\rightarrow 6)-\alpha\text{-D-Glcp}$ 和 $(1\rightarrow 4)-\beta\text{-D-Manp}$ ,与终端一个分支的 $\beta\text{-D-Galp}$ 组成。潘利华等<sup>[12]</sup>利用 DEAE-纤维素离子交换树脂、Sephacryl S-200 从组培霍山石斛茎中分离纯化得到一单一多糖组分 DHP-W2,结构研究表明,多糖 DHP-W2 的分子量为  $7.3 \times 10^4$  Da,由葡萄糖、木糖、半乳糖按分子摩尔比 1.1:1.0:0.5 及少量半乳糖醛酸组成的杂多糖,主链由 1,6-D-Glcp、1,4-D-Glcp 和 1,4,6-D-Glcp 所组成,分支点位于 O-4/6,支链由 1,2,4-D-Xylp、1,4-D-Xylp、1-D-Xylp、1-D-Galp 和 1-D-GalpA 等糖残基组成。Hsieh 等<sup>[13]</sup>从霍山石斛叶和茎的细胞壁和黏液中分离得到一种分子量为  $9.7 \times 10^3$  Da 的多糖 HPSEC,研究发现,其主要由木糖、阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖和半乳糖醛酸,同时伴随着少量的鼠李糖,岩藻糖,葡萄糖醛酸和 4-O-甲基化的半乳糖醛酸组成,GC-MS 分析得出甘露糖:葡萄糖为 10:1。主链包含 $\beta\text{-(1}\rightarrow 4)\text{-D-Glcp}$ 和 $\beta\text{-(1}\rightarrow 4)\text{-D-Manp}$ 聚合的葡聚甘露糖,部分乙酰化的甘露糖苷连接在 2-和 3-位置。

表 1 霍山石斛多糖的名称、分子量、单糖摩尔比及药理活性

Table 1 The denomination, molecular weight, monosaccharide molar ratio and pharmacological activities of *D. huoshanense*

多糖 Polysaccharide	分子量 Molecular weight	单糖摩尔比 Monosaccharide molar ratio	药理活性 Pharmacological activities
DHP-1B23 <sup>[6]</sup>	$2.2 \times 10^4$	葡萄糖:甘露糖:半乳糖 = 31:10:8	提高免疫
DHPD <sub>2</sub> <sup>[7]</sup>	$8.09 \times 10^6$	半乳糖:葡萄糖:阿拉伯糖 = 0.896:0.723:0.2	抗糖基化
DHP-4A <sup>[9]</sup>	$2.32 \times 10^5$	葡萄糖:阿拉伯糖:甘露糖:鼠李糖 = 13.8:3.0:6.1:2.1	提高免疫
DHPD <sub>1</sub> <sup>[10]</sup>	$3.2 \times 10^3$	葡萄糖:阿拉伯糖:半乳糖 = 1.023:0.023:0.021	抗糖基化
DHP1A <sup>[11]</sup>	$6.7 \times 10^3$	甘露糖:葡萄糖:半乳糖 = 2.5:16.0:1	抗氧化基化
DHP-W2 <sup>[12]</sup>	$7.3 \times 10^4$	葡萄糖:木糖:半乳糖 = 1.1:1.0:0.5	抗糖基化
HPSEC <sup>[13]</sup>	$9.7 \times 10^3$	甘露糖:葡萄糖 = 10:1	提高免疫

## 2 霍山石斛多糖的药理作用

大量药理研究表明,霍山石斛多糖具有广泛的生物活性,包括:抗肿瘤、抗氧化、降血糖、调节免疫力等药理作用。

### 2.1 抗氧化

现代药理研究表明,霍山石斛多糖具有较为显

著的抗氧化活性。查学强等<sup>[14]</sup>研究表明,霍山石斛和铁皮石斛总多糖提取物对超氧阴离子、羟基自由基具有较强的清除作用,对烷基自由基引发的亚油酸氧化体系有显著的抑制作用。汪曙等<sup>[15]</sup>采用 Fenton、邻苯三酚、TBA 法分别测定霍山石斛总多糖对 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 MDA 的抑制作用,结果表明霍山石斛多糖对 $\cdot\text{OH}$ 的半数清除浓度为 6.79 mg/mL,对

O<sub>2</sub><sup>·-</sup> 的半数抑制浓度为 3.04 mg/mL, 对体外温和 Vc-Fe<sup>2+</sup> 诱导的肝匀浆脂质过氧化有一定抑制作用, 并可减轻 Vc-Fe<sup>2+</sup> 系统诱导所致小鼠肝线粒体氧化损伤程度。郝杰等<sup>[16]</sup> 等认为霍山石斛多糖的抗氧化能力与其相对分子质量大小有关, 分子量越大的多糖组分对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、·OH 的清除作用越强。田长城等<sup>[11]</sup> 体外抗氧化评估显示, 霍山石斛多糖 DHP1A 能够显著地抑制氯化亚铁诱导的脂质过氧化作用, 是一个潜在的抗氧化剂。

## 2.2 免疫调节

多糖类成分是霍山石斛发挥免疫活性作用的重要物质基础之一。李胜立等<sup>[17]</sup> 检测了霍山石斛类原球茎冷冻干燥物、醇提物、水提物、醇溶物、醇沉物、多糖等对 ConA 诱导的小鼠淋巴细胞增殖反应及免疫器官指数的影响, 研究发现, 水提物、醇沉物和多糖的各剂量组均可以促进 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞增殖反应和免疫器官指数的增加, 且具有浓度依赖性, 其中, 多糖的促进作用最强。郝冉等<sup>[18]</sup> 通过溴化氰活化法对 DHP 进行荧光标记, 检测荧光标记前后的肠黏膜免疫调节活性, 在质量浓度为 25、50、100 μg/mL 和 200 μg/mL 时, 其肠黏膜免疫调节活性分别提高到对照组的 112.8%、131.1%、137.6% 和 160.5%。李凡等<sup>[9]</sup> 研究发现, 霍山石斛多糖 DHP-4A 可以通过激活 p38、ERK、JNK 和 NF-κB 的核易位显著地刺激 RAW264.7 巨噬细胞分泌 NO、TNF-α、IL-6 和 IL-10, 表明这种多糖具有良好免疫调节活性。Lin JW 等<sup>[19]</sup> 研究发现, 霍山石斛多糖诱导的 IL-1 受体拮抗剂产生的信号通路与 ERK/ELK、p38 蛋白、PI3K 和 NF-κB 相关, 表明霍山石斛多糖可能具有用于改善 IL-1 的致病条件的应用潜力。查学强<sup>[6]</sup> 体外实验表明, 霍山石斛多糖 HPS-1B23 能够显著地刺激脾细胞和巨噬细胞分泌 IFN-γ 和 TNF-α 能力, 具有提高免疫活性。此外, 进一步研究表明, IFN-γ 和 TNF-α 的释放归因于 HPS 在细胞中相应基因表达的上调作用增强<sup>[20]</sup>, 在评价霍山石斛多糖对肠道、脾脏和肝脏的免疫反应研究中发现, 口服的霍山石斛多糖在小肠免疫系统和全身免疫系统均具有免疫调节作用<sup>[21]</sup>。陈程等<sup>[22]</sup> 研究发现, 霍山石斛不同发育阶段培养物多糖具有相似的促进小鼠脾细胞产生 IFN-γ 和 TNF-α 的作用。Hsieh 等<sup>[13]</sup> 研究表明, 霍山石斛水溶性多糖 HPSEC 具有促进小鼠巨噬细胞和脾细胞释放 TNF-α、IFN-γ、IL-10 等细胞因子和 GM-CSF 等

造血生长因子的功能, 并通过分离纯化、结构表征和构效关系的研究表明石斛多糖发挥免疫增强活性需要适度的乙酰化。

## 2.3 降血糖

霍山石斛多糖可降低糖尿病小鼠体内的血糖含量。潘利华等<sup>[23]</sup> 等以四氧嘧啶为诱导剂建立糖尿病小鼠模型, 比较研究了霍山石斛、铁皮石斛、金钗石斛、和鼓槌石斛多糖的降血糖和抗氧化活性, 空腹血糖, 糖化血清蛋白和血清胰岛素水平, 结果表明, 霍山石斛、铁皮石斛和鼓槌石斛均具有降血糖作用, 霍山石斛降血糖作用最为显著。

## 2.4 保肝

黄静等<sup>[24]</sup> 研究发现, 霍山石斛多糖能降低 CCl<sub>4</sub> 致小鼠急性肝损伤血清谷丙转氨酶 (ALT), 谷草转氨酶 (AST) 的升高, 降低肝匀浆中丙二醛 (MDA) 含量, 增强超氧化物歧化酶 (SOD) 的活性, 抑制肝细胞中 TNF-α 表达, 减轻 CCl<sub>4</sub> 对肝组织的病理损伤。田长城等<sup>[25]</sup> 比较了从霍山石斛圆球茎中分离出的 4 种多糖组分对 CCl<sub>4</sub> 肝毒性的保护作用, 结果表明, 多糖 DHP1 可能是霍山石斛中一种潜在的保肝多糖成分。潘利华等<sup>[26]</sup> 研究发现, 从霍山石斛中分离得到的半乳甘露聚糖 (GGM) 能够有效地减轻或预防小鼠的肝损伤和肝纤维化, 可开发成一种新型的抗纤维化剂预防肝损伤和肝纤维化。王晓玉等<sup>[27,28]</sup> 从蛋白组学和代谢组学两方面对霍山石斛多糖保肝活性的研究表明, 霍山石斛多糖通过多靶点对亚急性酒精性肝损伤进行干预, 其中包括对 MG 途径和甲硫氨酸途径的调节, 代谢组学研究揭示霍山石斛多糖主要在脂肪酸代谢途径、甘油磷脂代谢途径、氨基酸代谢途径、细胞色素 P450 代谢途径上调节亚急性酒精性肝损伤小鼠血清和肝脏组织中的小分子代谢物变化, 以防止酒精性肝损伤的进展。

## 2.5 延缓白内障

石斛多糖的抗氧化作用还也用于白内障的治疗, 李秀芳等<sup>[29]</sup> 采用链脲佐菌素对 SD 大鼠腹腔注射制造糖尿病性大鼠白内障模型, 酶法测定各组大鼠眼球晶状体组织的谷胱甘肽 (GSH)、丙二醛 (MDA)、蛋白质羰基化产物的含有量以及谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX)、谷胱甘肽还原酶 (GR)、谷胱甘肽-S-转移酶 (GST)、过氧化氢酶 (CAT)、超氧化物歧化酶 (SOD) 的酶活力。研究发现, 霍山石斛多糖能够显著增加糖尿病性白内障大鼠晶状体组织中 GSH 水平、降低 MDA 及羰基的含有量, 提高其

GSH-PX、GR、GST、SOD、CAT 酶活力,延缓糖尿病性白内障的发展。罗建平等<sup>[30]</sup>研究发现霍山石斛多糖 HPS 能从下调一氧化氮合酶基因表达和上调谷胱甘肽家族抗氧化酶活性两方面协同抑制晶状体蛋白的糖基化交联变性,进而抑制晶状体的浑浊进程,延缓白内障的发生。

## 2.6 抗肿瘤、抗癌

多糖抗肿瘤作用显著并且对人体毒副作用小,是目前抗肿瘤药物研究领域的热点。张丹丹等<sup>[31]</sup>研究发现,霍山石斛多糖 DHP-2 处理过的胃癌细胞形态固缩,凋亡显著,不仅能明显下调原癌基因 c-myc 的表达,其表达仅为对照的 42.34%,而且能显著提高抑制癌基因野生型 p53 的表达,其表达比对照高 1.04 倍。黄森<sup>[32]</sup>研究表明,霍山石斛多糖组分 HDP-2 能明显下调 SGC-7901 细胞中原癌基因 c-myc 的表达,为原表达率的 42.34%,同时大幅度提高肿瘤抑制基因野生型 p53 的表达,为原表达率的 2.042 倍。鲍丽娟<sup>[33]</sup>研究发现,霍山石斛多糖 HelaS3 人宫颈癌细胞和 HepG2 人肝癌细胞均具有良好的细胞毒性作用,在试验浓度范围内呈剂量依赖性。

## 3 展望

霍山石斛历史悠久,药效显著,是国家珍稀名贵中药材和历代本草中明确记载的四种药用石斛之一。多年来,药用霍山石斛来源以采集野生为主,导致资源急剧减少,野生资源已濒临灭绝,市场价达每公斤 30~40 万元,且往往有价无市,对其药效物质基础的研究因缺乏实验材料尚处于起始阶段。当前,针对霍山石斛多糖活性的研究已成为研究热点,然而,这些研究主要是基于霍山石斛悬浮细胞培养体系及圆球茎产生的多糖展开的,对于霍山石斛原药材中多糖的研究,目前尚停留在提取及含量测定阶段,很少有关于霍山石斛原药材的多糖分离、鉴定等报道,研究报道所用的来源于实验室培养的原球茎多糖的结构与活性是否能够代表原药材仍需要进一步的研究确定。

### 参考文献

- Bao XS(包雪声), et al. Chinese Medicinal *Dendrobium* (中国药用石斛). Shanghai: Fudan University Publishing House, 2001. 75.
- Song GQ(宋广青), et al. Research progress on pharmacological activities of medical plants from *Dendrobium Sw. China Tradit Herb Drugs* (中草药), 2014, 45: 2576-2580.
- Zhang GN(张光浓), et al. Advances in studies on chemical constituents from plant of *Dendrobium Sw. China Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34: 5-7.
- Xue D(薛丹), et al. Advances in extraction and purification of plant polysaccharides. *J Chin Med Mater* (中药材), 2014, 37: 157-161.
- Huang F(黄芳), et al. Research progress of active polysaccharides. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 1999, 11: 90-98.
- Zha XQ, et al. Structure identification of a new immunostimulating polysaccharide from the stems of *Dendrobium huoshanense*. *Carbohydr Polym*, 2007, 69: 86-93.
- Li XL, et al. Structural identification and sulfated modification of an antiglycation *Dendrobium huoshanense* polysaccharide. *Carbohydr Polym*, 2014, 106: 247-254.
- Zha XQ, et al. Production stability of active polysaccharides of *Dendrobium huoshanense* using long-term cultures of protocorm-like bodies. *Planta Med*, 2008, 74: 90-93.
- Li F, et al. Structure and bioactivity of a polysaccharide extracted from protocorm-like bodies of *Dendrobium huoshanense*. *Int J Biol Macromol*, 2015, 71: 664-672.
- Qian XP, et al. Sulfated modification can enhance antiglycation abilities of polysaccharides from *Dendrobium huoshanense*. *Carbohydr Polym*, 2014, 101: 982-989.
- Tian CC, et al. Structural characterization and antioxidant activity of a low-molecular polysaccharide from *Dendrobium huoshanense*. *Fitoterapia*, 2013, 91: 247-255.
- Pan LH, et al. Structural characterization and anti-glycation activity *in vitro* of a water-soluble polysaccharide from *Dendrobium huoshanense*. *J Food Biochem*, 2013, 37: 313-321.
- Hsieh, et al. Structure and bioactivity of the polysaccharides in medicinal plant *Dendrobium huoshanense*. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16: 6054-6068.
- Zha XQ(查学强), et al. Study on antioxidant activity of polysaccharides from *Dendrobium Sw. Food Sci* (食品科学), 2007, 28(10): 90-93.
- Wang S, et al. Anti-oxidation activity *in vitro* of polysaccharides of *Dendrobium huoshanense* and *Dendrobium moniliforme*. *Med Plants Tobacco Seric*, 2009, 10: 121-124.
- Hao J(郝杰), et al. *In vitro* antioxidant activities of polysaccharides with different molecular mass from seedlings of *Dendrobium huoshanense*. *Food Sci* (食品科学), 2009, 30(15): 94-98.