

毛尖茶叶多糖的提取分离及其活性测定

曲伟¹, 刘庄¹, 张照康², 程湘懿², 范海涛^{3,4*}

¹北京联合大学校医院, 北京 100101; ²华中师范大学物理科学与技术学院生物物理研究所, 武汉 100191;

³北京电子科技职业学院生物工程学院, 北京 100176; ⁴军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850

摘要:本研究对毛尖茶叶多糖结构分析与活性开展了研究。采用水提醇沉法提取毛尖茶叶粗多糖, 经除蛋白后得到精制多糖(MP), 以柱层析方法对MP进行多次分离纯化, 得到一个均一组分毛尖茶叶多糖(Maojian Tea Polysaccharides, MTP)。采用1,1-二苯基-2-三硝基苯胍[1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical 2,2-diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl)hydrazyl, DPPH]自由基清除、小鼠免疫细胞RAW264.7增殖、吞噬能力和产生NO等试验方法对MTP的活性进行研究。结果显示MTP对浓度0.1 mmol/L DPPH自由基清除率为38.26%, 对小鼠巨噬细胞RAW264.7的增殖、吞噬能力和产生NO的能力均具有促进作用, 与空白对照组有显著性差异($P < 0.01$), 且质量浓度为500 mg/L时, 活性最大。

关键词:毛尖茶叶; 多糖; 活性; 免疫细胞

中图分类号: R917; R931.6

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.8.016

Purification and Activity Determination of Polysaccharides from Maojian Tea

QU Wei¹, LIU Zhuang¹, ZHANG Zhao-kang², CHENG Xiang-yi², FAN Hai-tao^{3,4*}

¹Hospital of Beijing Union University, Beijing 100101, China; ²Department of Physics and Institute of Biophysics, Central China Normal University, Wuhan 100191, China; ³College of Bioengineering, Beijing Polytechnic, Beijing 100176, China;

⁴Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

Abstract: To investigate the structure and activity of polysaccharides (MTP) from Maojian Tea. The polysaccharides were extracted and purified from Maojian Tea to afford a uniform polysaccharide, namely MTP. The effect of MTP on DPPH · scavenging assay, cell viability, phagocytosis capability and NO production of RAW264.7 macrophages were investigated. The results showed that viability, phagocytosis capability and NO production of RAW264.7 macrophages had been stimulated by MTP at the concentration of 500 μg/mL. The presented results confirmed MTP had capacity of eliminating DPPH radicals and cell-stimulating activity.

Key words: Maojian Tea; polysaccharides; activity; macrophages

茶叶在我国资源丰富, 饮用历史悠久, 包括龙井茶、毛尖茶、普洱茶等传统茶种。利用现代化研究手段阐明茶产品的药理作用和保健功效, 对茶叶成分的结构与活性研究对开发利用茶资源至关重要, 有利于使茶叶突破传统的冲泡模式, 推动茶叶的综合利用。

经研究, 多种茶叶成分为其提供了降血糖、降血脂、抗氧化、清除自由基、提高免疫力和抗肿瘤等活性^[1,2]。多糖(polysaccharides)是由单糖连接形成的大分子物质, 文献报道诸多植物来源的多糖具有抗氧化、清除自由基和免疫活性, 是部分天然食品提高

免疫力、发挥保健功能的物质基础之一。茶叶中也含有多糖类成分, 并且针对茶多糖的抗氧化、清除自由基等活性的研究多有报道。Wang Y、Chen X等^[3,4]对粗茶中多糖成分进行了提取分离, 所得多糖表现了明显的抗氧化、清除自由基或保护人血管内皮细胞损伤的作用, 体现了茶叶中多糖成分在调节人体机能方面的重要药理活性, 为研究和理解茶叶成分的药理活性及茶多糖产品的开发提供了可能。毛尖茶叶作为公认的茶业重要品种, 目前研究内容主要集中在多糖的提取工艺、含量测定、抗氧化活性等方面^[5,6], 对毛尖茶叶多糖的免疫活性研究至今未见报道, 限制了这一重要茶种的开发利用, 尤其对均一成分多糖的制备、结构特征描述和活性测定目前国内外均未见报道, 使对毛尖茶叶的深度开

发利用缺乏实验依据。本研究作者通过提取和反复分离纯化,最终从毛尖茶叶中得到一个均一组分 MTP,通过对其分子量分布和单糖组成的测定,对其进行了特征分析,初步确定了其结构特点,为了明确该多糖成分的药理作用,利用小鼠巨噬细胞 Raw264.7 对该多糖的免疫活性进行了测定,实验结果为毛尖茶叶多糖成分的开发利用提供了依据。

1 仪器与材料

1.1 实验仪器

CARY 50 全波长紫外扫描仪(美国 Varian 公司),WZZ-2S 自动旋光仪(上海精密科学仪器有限公司),Agilent 7890A-5975C 气相色谱-质谱联用仪,配 DB-5 色谱柱(30 m × 0.25 mm, 0.25 μm)及质谱检测器,Agilent 1200 高效液相色谱仪,配 G1352A RID 检测器(美国 Agilent 科技有限公司),TSK® G5000PWXL 凝胶色谱柱(300 mm × 7.8 mm)、LABORATA 4000 旋转蒸发仪(德国 Heidolph 公司),AR224CN 电子天平(美国 Ohaus 公司),TD5A-WS 高速离心机(上海安亭科学仪器厂),ZRQ30 冷冻干燥机(天津因赛科技发展有限公司),WF2 UV-2100 紫外可见分光光度计[尤尼柯(上海)仪器有限公司]。

1.2 材料与试剂

毛尖茶叶,购于吴裕泰北京北苑店(产地河南信阳)。留样标本存于北京联合大学校医院实验室标本保存室(编号 20150822-1)。RAW264.7 巨噬细胞由北京大学医学部曾克武老师惠赠。

DMEM 培养基[中科迈晨(北京)科技有限公司],胎牛血清(德国 PAN 优级,北京华美兰博生物科技有限公司),一氧化氮(NO)测定试剂盒(硝酸还原酶法)(南京建成生物工程研究所),1,1-二苯基-2-三硝基苯肼[1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical 2,2-Diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl)hydrazyl,DPPH,美国 Sigma-Aldrich 公司],多糖分子量测定用系列标准品(分子量分别为 12000、25000、50000、80000、270000、410000、670000 Da,美国 Sigma-Aldrich 公司),透析袋(截留分子量 2000 Da,美国 MYM 生物科技有限公司),葡萄糖、木糖、半乳糖、阿拉伯糖、甘露糖、氯化钠、三氯甲烷、正丁醇和无水乙醇等试剂均为分析纯。

2 实验方法

2.1 毛尖茶叶多糖的提取

称取 1250 g 毛尖茶叶,以无水乙醇回流提取 2 次,残渣按照文献^[5]中多糖的提取方法提取毛尖茶叶粗多糖,并以 Sevag 法除蛋白直至全波长紫外扫描 280 nm 处无明显吸收峰,再以无水乙醇、丙酮反复洗涤得到毛尖茶叶精制多糖。

2.2 毛尖茶叶多糖的分离纯化

称取毛尖茶叶精制多糖 12.74 g,用蒸馏水溶解,以 DEAE DE-52 离子交换色谱柱分离,分别采用蒸馏水及 0.2、0.4、0.6 mol/L NaCl 溶液洗脱,每个部位收集约 5.0 L。将用 0.2 mol/L NaCl 洗脱的部分浓缩后置于透析袋中,进行透析,之后以 Sepharose CL-6B 琼脂糖凝胶柱进行分离纯化,以水为流动相进行洗脱,洗脱速度为 1 mL/min,部分收集器收集洗脱部分,每管收集洗脱液约 3 mL,将各管洗脱液以高效液相色谱法检测,合并相同峰的洗脱液,最终得到一个单一对称的毛尖茶叶多糖组分,该组分命名为 MTP(Maojian Tea Polysaccharides)。

2.3 MTP 的特性分析

2.3.1 旋光度测定

精密称定 MTP 10.0 mg 置 25 mL 容量瓶中,水溶解,配制成质量浓度为 0.4 g/L 的多糖溶液。取 20 mL 上述溶液置于旋光管中。以水为空白,用自动旋光仪测量 MTP 旋光度。

2.3.2 分子量分布的测定

以 HPLC 法对系列多糖标准溶液和 MTP 溶液进行测定。色谱柱为 TSK® G5000PWXL(300 mm × 7.8 mm)凝胶色谱柱;柱温 40 °C;流动相为 0.002 mol/L 磷酸二氢钠(含 0.05% NaN₃);流速为 0.8 mL/min;RID 检测器检测。

分别称取适量的分子量为 12000、25000、50000、80000、270000、410000、670000 Da 的 Dextran 标准品,加入去离子水,配成质量浓度约 2 g/L 的对照溶液,并以 0.45 μm 水系滤膜过滤,进行 HPLC 检测,以保留时间(RT)为横坐标 x,分子量的 log₁₀ 值为纵坐标 y,得标准曲线 $y = -0.332x + 10.224$ ($r = 0.9980$)。

称取一定量的 MTP,加入去离子水,配成质量浓度约 2 g/L 的样品溶液,按上述方法进行检测,以 MTP 保留时间依上述标准曲线公式进行计算。

2.3.3 单糖组成的测定

按照文献^[6]所述方法对 MTP 进行全水解还原乙酰基衍生化,以标准单糖为参照,对 MTP 进行单

糖组成的测定。

气相条件为采用 DB-5(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm) 色谱柱;检测器为质谱检测器;进样口温度为 250 °C;检测器温度为 280 °C;氮气流速为 0.6 mL/min;分流比为 20:1;进样量为 5 μL;升温程序为 200 °C 保持 2min,以 3 °C/min 的速率升至 245 °C,再以 10 °C/min 的速率升至 270 °C,保持 2 min。

2.4 MT 的清除 DPPH 自由基活性测定

按照文献^[7]所述方法对 MTP 进行清除自由基活性测定,重复 6 次,以样品对 DPPH 自由基的清除率作为评价指标。

2.5 MTP 对小鼠巨噬细胞增殖的影响

按照文献^[8]所述方法,以 96 孔板测定 MTP 对 RAW264.7 小鼠巨噬细胞增殖能力的影响。组 1 为空白对照组,组 2~7 为给药组,给药组细胞分别给予终浓度为 30、90、150、300、500、800 mg/L 的多糖溶液,组 8 为细菌脂多糖(LPS)阳性对照组,给予终浓度为 10 mg/L 的 LPS。将细胞给药后在 5% CO₂、37 °C 培养箱中培养 24 h 后,吸去培养液,每孔加入 20 μL MTT,上述条件下继续培养 4 h,弃上清,每孔加入 150 μL DMSO,振荡器上震荡 10 min,酶标仪 570 nm 波长检测吸光值,以空白对照组的吸光值为 100%,各给药组与对照组的吸光度比值计算细胞相对增殖率。

2.6 MTP 对小鼠巨噬细胞吞噬能力的影响

按照文献^[9]所述方法,以中性红作为目标异物,以 96 孔板测定 MTP 对 RAW264.7 小鼠巨噬细胞吞噬能力的影响,分组及给药情况同 2.5。将细胞给药后在 5% CO₂、37 °C 培养箱中培养 24 h 后,每孔加浓度为 720 mg/L 的中性红溶液 100 μL,将细胞在 5% CO₂、37 °C 培养箱中继续培养 24 h 后,吸去培养液,每孔加入 50 μL 冰醋酸及 50 μL 乙醇,置于 4 °C 冰箱中 2 h。从冰箱中取出 96 孔板,置于振荡器上震荡 10 min,酶标仪 495 nm 波长检测吸光值,以空白对照组的吸光值为 100%,以各给药组与对照组的吸光度比值计算细胞相对增殖率。

2.7 MTP 对小鼠巨噬细胞产生 NO 的影响

采用硝酸还原酶法测定细胞培养上清液中 NO₂ 间接反映生成 NO 的量,分组及给药情况同 2.5。将细胞给药后在 5% CO₂、37 °C 培养箱中培养 24 h 后,按照 NO 检测试剂盒说明书进行操作,于酶标仪 495 nm 波长检测吸光值,以吸光度值反映细胞产生

NO 的能力。

2.8 数据统计分析

以 Graphpad prism5 软件对数据进行处理和作图,以双侧 T 检验对实验结果进行统计分析,分别以 $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ 作为显著性差异的标准,在图中以星号标注说明。

3 实验结果

3.1 MTP 的旋光度及分子量

经计算,MTP 旋光度为 $[\alpha]_D^{20} = +42.0^\circ$ 。MTP 的 HPLC 色谱图见图 1,经以标准曲线计算,其重均分子量(Molecular Weight, Mw)为 5.5×10^5 Da。

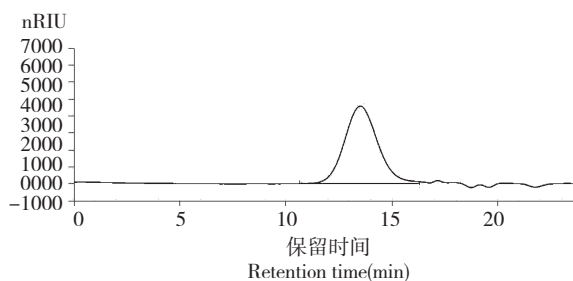


图 1 MTP 的高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of MTP

3.2 MTP 的单糖组成

测得 MTP 由阿拉伯糖、木糖、葡萄糖和半乳糖组成,摩尔比为 2.44:1:6.54:1.28。

3.3 MTP 的清除 DPPH 自由基活性

MTP 对浓度 0.1 mmol/L DPPH 自由基清除率为 38.26% (RSD = 2.28%)。

3.4 MTP 对小鼠巨噬细胞增殖的影响

不同质量浓度给药条件下各孔吸光值的比值结果见图 2。从图 2 可知,不同浓度的 MTP 溶液对细胞的增殖作用影响不同,在 30~500 mg/L 的范围内,多糖给药组与空白对照组有显著性差异,随着浓

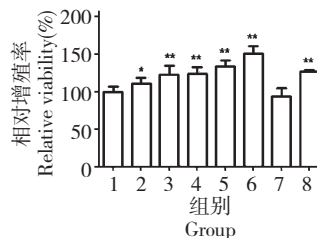


图 2 MTP 对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 增殖的影响

Fig. 2 Effect of MTP on viability of RAW264.7 macrophages

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$;** $P < 0.01$

Note:Compared with control,* $P < 0.05$;** $P < 0.01$

度的增大,对细胞的增殖促进作用逐渐增强,并在质量浓度为 500 mg/L 时达到最大值。

3.5 MTP 对小鼠巨噬细胞吞噬能力的影响

不同质量浓度给药条件下各孔吸光值的比值结果见图 3。从图 3 可知,不同浓度的 MTP 溶液对细胞的吞噬能力影响不同,在 30 ~ 500 mg/L 的范围内,多糖给药组与空白对照组有显著性差异,随着浓度的增大,对细胞的吞噬能力的影响逐渐增强,并在浓度为 500 mg/L 时达到最大值。

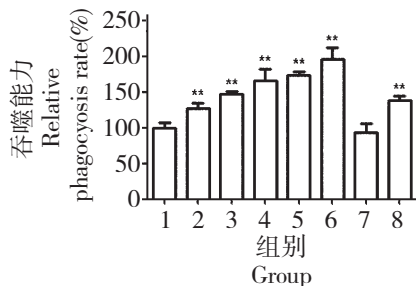


图 3 MTP 对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 吞噬能力的影响

Fig. 3 Effect of MTP on phagocytosis capability of RAW264.7 macrophages

注:与空白对照组比较, ** $P < 0.01$

Note: Compared with control, ** $P < 0.01$

3.6 MTP 对小鼠巨噬细胞产生 NO 的影响

不同质量浓度给药条件下 NO 的产生量结果见图 4。从图 4 可知,不同浓度的 MTP 溶液对细胞产生 NO 的影响不同,在 300 ~ 800 mg/L 的范围内,对细胞产生 NO 的影响与空白对照组有显著性差异,并且在 500 mg/mL 时达到最大。

4 讨论与结论

本研究首次从毛尖茶叶中分离纯化得到一个均一分子量的多糖成分 MTP,并进行了单糖组成与分子量分布的分析,对该多糖成分进行了表征。进一步以不同药理活性检测方法,研究了 MTP 的药理活性,为该多糖及其他毛尖茶叶多糖的开发利用提供了实验依据。药理实验结果表明,MTP 具有一定的清除 DPPH 自由基的能力,可能是毛尖茶叶作为茶饮品产生保健功效的活性来源之一,该结果与作者前期发表的论文结果趋于一致^[5],进一步肯定了毛尖茶叶多糖成分的清除自由基活性。

在以 Raw264.7 细胞为体外药理模型的活性测试中,考察了不同质量浓度 MTP 对小鼠巨噬细胞不同生理指标的影响,30 ~ 500 mg/L 的范围内不同阶

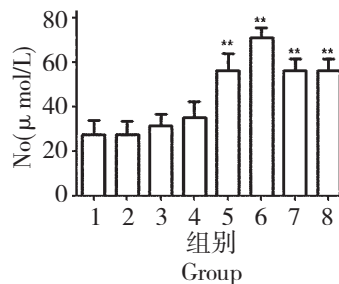


图 4 MTP 对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 产生 NO 能力的影响

Fig. 4 Effect of MTP on NO production of RAW264.7 macrophages

注:与空白对照组比较, ** $P < 0.01$

Note: Compared with control, ** $P < 0.01$

段,随着给药质量浓度的增加,MTP 促进小鼠巨噬细胞增殖的能力、促进细胞吞噬和产生 NO 的能力的作用增强,显示了毛尖茶叶多糖产生的免疫促进作用,为该多糖的进一步深入研究提供了实验参考。考察药物对细胞的免疫作用具有多个模型和不同指标,MTP 对其他模型的影响值得进一步考察研究,以期为正确合理认识毛尖茶叶多糖并加以利用提供更多实验数据。

另外,在药理活性实验结果中,均观察到 MTP 质量浓度过高时,相应以上指标反而出现下降的情况,推测与大剂量 MTP 作用于细胞干扰了细胞代谢或产生了细胞毒作用有关。小剂量浓度 MTP 产生活性的线性趋势及高剂量的异常表现,反映了 MTP 对 Raw264.7 细胞具有明确的作用靶点或者通路,亦应进一步深入研究。本研究对合理开发和使用毛尖茶叶提供了理论依据。

参考文献

- 1 Narotzki B, Reznick AZ, Aizenbud D, *et al.* Green tea: a promising natural product in oral health. *Arch Oral Biol*, 2012, 57:429-435.
- 2 Quan JS(全吉淑), Yin XZ(尹学哲), Jin ZWD(金泽武道). Study of antioxidant activity of tea polysaccharides. *J Chin Med Mater*, 2007, 9:1116-1118.
- 3 Wang Y, Yang Z, Wei X. Antioxidant activities potential of tea polysaccharide fractions obtained by ultra filtration. *Int J Biol Macromol*, 2012, 50:558-564.
- 4 Chen X, Wang Y, Wu Y, *et al.* Green tea polysaccharide-conjugates protect human umbilical vein endothelial cells against impairments triggered by high glucose. *Int J Biol Macromol*, 2011, 49(1): 50-54.