

西藏扁芒菊总多糖的理化性质及免疫增强活性

高慧琴^{1,2#}, 德吉^{3#}, 凌丽君², 张庆琳², 卢燕^{2*}, 陈道峰²

¹山西医科大学药学院, 太原 030001; ²复旦大学药学院, 上海 201203; ³西藏大学理学院, 拉萨 850000

摘要:用水提醇沉法提取了西藏扁芒菊总多糖,并利用一系列物理化学方法对总多糖的组成进行表征,探究其对免疫功能的影响。结果表明:西藏扁芒菊总多糖由半乳糖、阿拉伯糖、葡萄糖、甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、核糖组成,多糖分子量为 1110000。其多糖含量、糖醛酸含量、蛋白含量分别为 63.6%、20.76%、11.24%。进一步研究表明西藏扁芒菊总多糖能够显著增强巨噬细胞 NO 分泌功能,具有免疫增强活性,为西藏扁芒菊多糖的开发利用提供了依据。

关键词:西藏扁芒菊;总多糖;理化性质;免疫增强

中图分类号:S859.79

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.8.025

Physicochemical Property and Immuno-enhancing Activity of Polysaccharides from *Waldheimia glabra* (Decne.) Regel

GAO Hui-qin^{1,2#}, DE Ji^{3#}, LING Li-jun², ZHANG Qing-lin², LU Yan^{2*}, CHEN Dao-feng²

¹College of Pharmacy, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; ²School of Pharmacy,

Fudan University, Shanghai 201203, China; ³College of Science, Xizang University, Lasa 850000, China

Abstract: The crude polysaccharides of *Waldheimia glabra* (Decne.) Regel (*W. glabra*) were extracted by water extraction and ethanol precipitation method and characterized with a series of physical and chemical methods. The effect of the polysaccharides on the immunologic functions was then investigated. The results showed that the polysaccharides were composed of galactose, arabinose, glucose, mannose, rhamose, glucuronic acid, galacturonic acid and ribose and the relative molecular mass was about 1110000. The contents of polysaccharides, uronic acid and protein of the crude polysaccharides were 63.60%, 20.76% and 11.24%, respectively. The in-depth study indicated that the polysaccharides obviously promoted the NO secretion of macrophage and thus enhanced immune activity. This study provided the basis for the development and utilization of polysaccharides from *W. glabra*.

Key words: *Waldheimia glabra* (Decne.) Regel; polysaccharides; physicochemical properties; immuno-enhancing

西藏扁芒菊 [*Waldheimia glabra* (Decne.) Regel] 为菊科扁芒菊属植物,多年生草本,产自我国西藏海拔 4900~5500 m 的高山碎石破石缝中,印度北部、巴基斯坦、阿富汗等地也有分布。藏族群众主要用西藏扁芒菊全草治疗感冒或敷于患处作为抗菌剂加速伤口的愈合。文献报道该植物具有抗菌、抗氧化活性,其中挥发性酚类成分是其主要的抗氧化活性物质^[1]。近年来,随着对植物多糖研究的深入,人们逐渐认识到植物多糖来源的广泛性和生物学功能的多样性^[2],多数植物多糖具有免疫调节作

用^[2,3]。然而民族植物学的研究主要集中在低海拔植物,对于西藏扁芒菊等高海拔地区的植物少有涉及^[4],尚未有学者对西藏扁芒菊多糖进行研究。本研究对西藏扁芒菊总多糖进行了提取纯化和理化性质表征,进一步通过体外试验研究其对免疫系统的作用,为西藏扁芒菊多糖的开发利用奠定基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器与试剂

AB135-S 型电子天平(梅特勒-托利多仪器公司); YP1002N 型电子天平(上海精科仪器有限公司); Multiskan MK3 型酶标仪(Thermo 公司); US10300AH 超声波清洗器(北京优晟联合科技有限公司); ZHBE-50T 型闪式提取器(河南智晶生物科技股份有限公司); N-1100 型旋转蒸发仪(上海爱

收稿日期:2016-03-24 接受日期:2016-06-08

基金项目:西藏自治区科技计划“自然科学基金”(Z2012Z01G03);科技部十二五“重大新药创制”重大科技专项(2012ZX09301001-003)

为共同第一作者

* 通讯作者 Tel:86-21-51980157; E-mail:luyan@fudan.edu.cn

朗仪器有限公司);德国 Martin Christ RLPHR 1-2 LD 型冷冻干燥器(博励行仪器有限公司);UV759S 紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);SHB-III 型循环水式多用真空泵(上海诚献仪器设备有限公司);Agilent 1200 高效液相色谱(安捷伦科技有限公司)。

95%乙醇、三氯乙酸、浓硫酸、NaOH、苯酚均为分析纯 AR 级,PMP(1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮)、LPS(细菌脂多糖)、PB(多粘菌素 B)、考马斯亮蓝、四硼酸钠、亚硝酸钠均购自国药集团化学试剂有限公司;水为哇哈哈饮用纯净水;单糖对照品均由中国食品药品检定研究院提供;间羟联苯(上海源叶生物科技有限公司);牛血清白蛋白(上海维编科贸有限公司)。

1.2 材料准备

西藏扁芒菊药材采收于2014年8月,经复旦大学药学院卢燕副教授鉴定为菊科扁芒菊属西藏扁芒菊[*Waldheimia glabra* (Decne.) Rege]全草,标本存放于复旦大学药学院生药学教研室。

2 实验方法

2.1 西藏扁芒菊总多糖的制备

西藏扁芒菊药材 1.285 kg 中加入 95% 乙醇(1:10 料液比),闪式提取器提取 2 min × 3 次,抽滤并收集滤渣,重复 2 次上述操作除脂。滤渣晾干,加入 5 倍量的水沸水浴回流 30 min 后取上清,浓缩至小体积并加入 4 倍量无水乙醇,4 °C 静置过夜,离心取沉淀晾干后加入适量水复溶,加入等体积 30% 三氯乙酸沉淀 2 h 除蛋白,离心取上清并用 1 mol/L NaOH 调 pH 至中性,于流动自来水中透析 3 d,冻干得西藏扁芒菊粗多糖 4.7 g,提取率为 0.38%。

2.2 多糖结构表征

2.2.1 多糖含量测定^[5]

标准溶液的制备:称取半乳糖单糖对照品 4.0 mg 加水溶解,定容至 25 mL。

回归方程的建立:吸取 1.0 mL 标准溶液于离心管中,倍比稀释得一系列浓度分别为 0.16、0.08、0.04、0.02、0.01、0.005 mg/mL 的标准溶液,将上述 6 个不同浓度的标准溶液分别取 0.5 mL 于磨口试管中,加入 5% 的苯酚溶液 0.5 mL,再加入 2.5 mL 的浓硫酸后剧烈振荡 5 min,放置 15 min,在 490 nm 下测定吸光度值,用蒸馏水同样操作作空白对照。

样品溶液的测定:精密称取干燥至恒重的总多

糖样品 2.70 mg,置于 10 mL 容量瓶中,加水至刻度。吸取样品液体 0.5 mL 于磨口试管中,按以上操作步骤测定吸光度值,通过回归方程求其含量。

2.2.2 糖醛酸含量测定^[6]

标准溶液的配制:称取半乳糖醛酸 1.9 mg,加水溶解,定容至 25 mL。

标准曲线制备:吸取 1.0 mL 标准溶液于离心管中,倍比稀释得一系列浓度分别为 0.076、0.038、0.019、0.0095、0.00475、0.002375 mg/mL 的标准溶液,将上述 6 个不同浓度的标准溶液分别取 0.5 mL 于磨口试管中,冰浴中预冷,加入 3.0 mL 四硼酸钠-硫酸试剂(0.0125 M 四硼酸钠的硫酸溶液),振荡混合,在沸水浴中加热 5 min,以冰浴冷却至室温后,加 50 μL 0.15% 间羟联苯溶液(以 NaOH 配制),摇匀后,在 520 nm 下用分光光度计测其吸收值,绘制标准曲线。

样品溶液的测定:精密称取干燥至恒重的总多糖样品 1.30 mg,置于 10 mL 容量瓶中,加水至刻度。吸取样品液体 0.5 mL 于磨口试管中,按以上操作步骤测其吸收值,通过回归方程求其含量。为避免非糖醛酸成分的干扰,以 NaOH 代替间羟联苯试液作对照,测得光吸收值从样品吸收值中扣除。

2.2.3 蛋白含量测定^[6]

考马斯亮蓝溶液:称取 50.0 mg 考马斯亮蓝 G-250,溶于 25 mL 90% 乙醇中,加入 85% (W/V) 的磷酸 50 mL,最后用蒸馏水定容到 500 mL。

标准溶液的配制:取 25.0 mg 牛血清白蛋白,溶于 25 mL 蒸馏水中,即为 1.0 mg/mL 的蛋白原液。

回归方程的建立:取 1.0 mL 的牛血清白蛋白原液,倍比稀释得一系列浓度分别为 1.0、0.05、0.025、0.0125、0.0065、0.00325 mg/mL 的标准溶液,将上述 6 个不同浓度的标准溶液分别取 0.1 mL 于带塞试管中,以 0.1 mL 水作为空白,加入 5.0 mL 考马斯亮蓝蛋白试剂,盖塞、混匀,放置 5 min 后在 595 nm 下测吸光度,制作标准曲线。

样品溶液的测定:称取样品 1.5 mg 置于 10 mL 容量瓶中,加水至刻度。吸取样品液体 0.1 mL 于磨口试管中,按以上操作步骤测其吸收值,通过回归方程求其含量。

2.2.4 分子量分布测定^[7]

将分子量分别为 25000、410000、110000、2000000 的葡聚糖配成标准品溶液,水为流动相,检测器为蒸发光散射检测器,采用分子排阻色谱法^[7]

测定样品中多糖分子量的分布。

2.2.5 单糖组成测定

取 8 mg 多糖样品,放入试管中,加入 1 mol/L 的三氟醋酸(TFA)2 mL,充 N₂ 后封管,在 110 °C 下水解 5 h。试管内溶液减压蒸干,然后加入甲醇 1 ~ 2 mL 蒸干,重复三次操作,以完全除去 TFA。再向样品中加入 2 mL 左右的水使样品溶解,取 1 mL 加入 1 mL 0.5 mol/L PMP 溶液与 1 mL 0.3 mol/L NaOH,70 °C 加热 2 h。冷却至室温后加入 1 mL 0.3 mol/L HCl 中和,加入氯仿萃取 3 次弃去氯仿层,剩余样品进 HPLC 进行检测分析其单糖组成^[8,9]。

2.3 总多糖对免疫系统的作用^[10]

Balb/c 小鼠实验前 4 d 腹腔注射 5% 硫乙醇酸盐培养基,4 d 后收集小鼠腹腔巨噬细胞,将细胞浓度调整为 5×10^5 /mL 种入 96 孔板中,200 μ L/孔,置于细胞培养箱中贴壁培养 2 h(37 °C,5% CO₂)。按照以下分组加样:(1)空白对照组;(2)多糖单独处理组;(3)经 PB(多粘菌素 B)处理的多糖组;(4) LPS(细菌脂多糖)处理组(LPS 终浓度为 1 μ g/mL);(5)多糖与 LPS 联合处理组;(6)经 PB 处理的多糖与 LPS 联合处理组;(7)阳性药地塞米松与 LPS 联合处理组(DEX),每组四复孔,置于培养箱中培养 24 h。收集上清,采用 Griess 法测定 NO 的水平,取上清液 50 μ L 加入 50 μ L Griess 试剂,混匀后室温放置 10 min,使其充分反应,以 100 μ L Griess 试剂为调零孔,540 nm 检测光吸收值。以亚硝酸钠溶液为标准溶液建立 NO 标准曲线,确定各实验组细胞培养上清中的 NO 水平。

3 结果与讨论

3.1 西藏扁芒菊多糖的结构表征

3.1.1 多糖含量

半乳糖溶液作标准品建立的回归方程为 $A = 5.04626C + 0.07066$, $r = 0.9997$ 根据回归方程求得样品中多糖含量为 63.60%。

3.1.2 糖醛酸含量

半乳糖醛酸溶液作标准品建立的回归方程为 $A = 5.97163C + 0.00068$, $r = 0.9982$ 根据回归方程求得样品中糖醛酸含量为 20.00%。

3.1.3 蛋白含量

牛血清白蛋白溶液作标准品建立的回归方程为 $A = 0.48804C + 0.75162$, $r = 0.9948$ 根据回归方程求得样品中蛋白含量为 11.24%。

3.1.4 分子量分布

测得西藏扁芒菊粗多糖分子量大概为 1110000。

3.1.5 单糖组成

西藏扁芒菊多糖是由半乳糖、阿拉伯糖、葡萄糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、鼠李糖、甘露糖、核糖组成的杂多糖。HPLC 分析结果见图 1,各单糖含量见表 1。

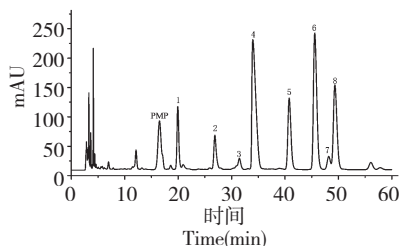


图 1 西藏扁芒菊多糖单糖组成的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of monosaccharide composition of polysaccharide from *W. glabra*

注:1-8:依次为甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、核糖、阿拉伯糖

Note: 1 to 8: mannose, rhamnose, glucuronic acid, galacturonic acid, glucose, galactose, ribose, arabinose

表 1 西藏扁芒菊多糖的几种单糖含量分析

Table 1 Content of monosaccharides in polysaccharide from *W. glabra*

单糖名称 Monosaccharide	含量 Content(%)
甘露糖 mannose	6.37%
鼠李糖 rhamnose	4.40%
葡萄糖醛酸 glucuronic acid	2.22%
半乳糖醛酸 galacturonic acid	28.12%
葡萄糖 glucose	12.05%
半乳糖 galactose	25.10%
核糖 ribose	2.23%
阿拉伯糖 arabinose	17.01%

3.2 西藏扁芒菊多糖的免疫增强活性

NO 是一种由巨噬细胞分泌的生物活性物质,在机体的炎症反应和免疫调节中发挥重要作用^[2]。当巨噬细胞受到相应刺激活化时,释放出的 NO 可以有效杀伤微生物(病毒、真菌、细菌)、寄生虫和肿瘤细胞等,亦可通过诱发炎症反应来保护机体抵御外界有害因素的入侵^[3]。研究表明,植物多糖可以

通过调节巨噬细胞的 NO 等细胞因子的分泌量来调节机体的免疫功能^[3]。

实验数据表明,西藏扁芒菊多糖与经 PB 处理后的多糖单处理均能显著上调巨噬细胞 NO 分泌水平,增强巨噬细胞 NO 的分泌功能,具有免疫增强活性。然而,西藏扁芒菊多糖对 LPS 诱导的腹腔巨噬细胞 NO 分泌并无显著影响,无显著抗炎作用。因此西藏扁芒菊多糖对腹腔巨噬细胞分泌功能仅有增强作用,并无双向调节作用。西藏扁芒菊多糖对巨噬细胞 NO 分泌量的影响如图 2 所示。

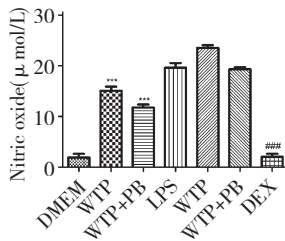


图 2 西藏扁芒菊多糖对巨噬细胞 NO 分泌量的影响

Fig. 2 The effect of polysaccharide from *W. glabra* on the amount of NO released by macrophage

注:*** $P < 0.001$ ($n = 4$), 与空白对照组比较;### $P < 0.001$ ($n = 4$), 与 LPS 处理组比较;WTP: 西藏扁芒菊总多糖

Note:*** $P < 0.001$ ($n = 4$), compared with control;### $P < 0.001$ ($n = 4$), compare with LPS treatment group;WTP: Crude polysaccharides of *W. glabra*

4 结论

本研究采用水提醇沉法对西藏扁芒菊总多糖进行提取并对其多糖进行初步表征,得到总多糖的多糖含量、糖醛酸含量、蛋白含量、分子量分布、单糖组成的信息,并对西藏扁芒菊粗多糖在提高机体免疫功能方面进行了初步探讨,为其开发利用奠定了基础。

NO 的浓度是巨噬细胞活化的重要标志,在机体的炎症反应和免疫调节中发挥重要作用,可以作为免疫作用强弱的一个重要指标^[11]。本论文研究结果表明西藏扁芒菊粗多糖能够提高巨噬细胞 NO 分泌量,提示对于固有免疫系统存在显著增强作用,能促进机体的免疫应答,保护机体抵御外界有害因素的入侵,为后续动物实验中全面深入研究西藏扁芒菊粗多糖免疫增强活性的作用机制及作用靶点提供线索和依据。

参考文献

- Giorgi A, Panseri S, Mattara MS, et al. Secondary metabolites and antioxidant capacities of *Waldheimia glabra* (Decne.) Regel from Nepal. *J Sci Food Agric*, 2013, 93:1026-1034.
- Shang QH (尚庆辉), Jie YH (解玉怀), Zhang GG (张桂国), et al. Immune regulation roles of phytogetic polysaccharides and its mechanisms. *Chin J Animal Nutr* (动物营养学报), 2015, 27:49-58.
- Saifuding A (赛福丁·阿不拉), Wang JM (王君敏), Mikereemu S (米克热木·沙衣布扎提). Progress on antiviral and immune enhancement activities of polysaccharides and sulfated derivatives. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2013, 25:572-575.
- Ghimire SK, Gimenez O, Prade R, et al. Demographic variation and population viability in a threatened Himalayan medicinal and aromatic herb *Nardostachys grandifogli*; matrix modeling of harvesting effects in two contrasting habitats. *J Appl Ecol*, 2008, 45:41-51.
- Zhang JJ (张娟娟). Preparation, purification and characterization of anti-complementary polysaccharide from *Houttuynia cordata* Thurb. Shanghai: Fudan University (复旦大学), MSc. 2012.
- Di HY (狄宏晔). Preparation, purification and characterization of anti-complementary polysaccharide from *Bupleurum*. Shanghai: Fudan University (复旦大学), PhD. 2011.
- Chen QM (陈琴鸣), Liu B (刘斌), Chen WP (陈卫平), et al. Determination of molecular weight and molecular weight distribution of polysaccharide. *Chin Tradit Patent Med* (中成药), 2011, 33:79-81.
- Liu W, Xu JN, Zhu R, et al. Finger printing profile of polysaccharides from *Lycium barbarum* using multiplex approaches and chemometrics. *Int J Biol Macromol*, 2015, 78:230-237.
- Wang YF, Xian JH, Xi XG, et al. Multi-fingerprint and quality control analysis of tea polysaccharides. *Carbohydr Polym*, 2013, 92:583-590.
- Lai XQ, Ye YX, Sun CH, et al. Icaritin exhibits anti-inflammatory effects in the mouse peritoneal macrophages and peritonitis model. *Int Immunopharmacol*, 2013, 16:41-49.
- Rong YG (荣岳光). Effects of polysavone on NO, IL-6, TNF- α production and its mechanism in mouse macrophages. Beijing: Chinses Academy of Agricultural Sciences (中国农业科学院), MSc. 2007.