

巴戟天寡糖提纯工艺及药理作用研究进展

李鑫洁,李玲玲,鲁 艺*

北京中医药大学 中医学院,北京 100029

摘要:现代研究巴戟天寡糖具有抗抑郁、神经保护等功效,且毒副作用较小,然而其在提纯与检测技术上存在一定难度,是现代研究领域的困扰之一。本文通过检索中国知网、百度学术、万方、维普、PubMed、Science 等数据库,归纳整理近年来国内外与巴戟天寡糖相关文献,论述其提纯、成分检测方法以及临床药理作用,为深入探讨巴戟天发挥药效机制、进一步开发巴戟天新药提供科学依据,尽可能提高巴戟天的利用价值。

关键词:巴戟天;寡糖;提纯检测;药理作用;研究进展

中图分类号:R284

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)2-0345-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.2.026

The research of *Morinda officinalis* How's oligosaccharide extraction, purification and pharmacological effects

LI Xin-jie, LI Ling-ling, LU Yi*

School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: *Morinda officinalis* How's Oligosaccharide had the functions of anti-depressant, neuroprotection and so on, but it had some difficulty in purification and detection technology, which was one of the puzzles in modern research field. The author summarized the relevant literatures with oligosaccharides at home and abroad, and discussed their separation, detection methods and clinical pharmacology in recent years, by searching China Knowledge Network, Baidu Academic, Wanfang, Weipu, PubMed, Science and other databases. In order to further explore the mechanism of *Morinda officinalis* and further develop *Morinda officinalis*, this study provided a scientific basis to maximize the use of *Morinda officinalis* value.

Key words: *Morinda officinalis* How; oligosaccharide; purification; pharmacological effects; research progress

巴戟天为茜草科植物巴戟天(*Morinda officinalis* How)的干燥根,在《神农本草经》中被列为上品,和益智仁、砂仁、槟榔统称为著名的“四大南药”。巴戟天可补肾阳、祛风湿、强筋骨,在古代临床运用于阳痿遗精,宫冷不孕,月经不调,少腹冷痛,风湿痹痛,筋骨痿软^[1]。现代化学研究表明,巴戟天中含有环烯醚萜类、无机酸类、糖类、萜醌类等活性成分,临床运用于抑郁、甲状腺功能异常、记忆力减退、生殖损伤、骨质疏松等症^[2-6]。

巴戟天中含糖量较高,包括单糖、寡糖和多糖,其中寡糖也称菊淀粉型低聚糖,有一定的细胞识别

与防御功能^[7],具有一定研究和开发价值。研究表明^[8-12],巴戟天寡糖具有抗应激、抗抑郁、促进精子生成、清除活性氧、抗心肌缺血再灌注等作用。然而,寡糖分子含有大量羟基,化学性质相似,且自身存在多分支、多种连接方式、衍生化、多样立体化等复杂特点,使得寡糖混合物的分离与检测成为一大难点。因此,优化提取分离巴戟天寡糖成分工艺成为当下研究界的热点。本研究归纳总结近年来关于寡糖分离纯化文献中的方法,为寻求新型有效、高效快速的巴戟天寡糖分离方法奠定基础,为从巴戟天寡糖角度探索其抗抑郁机制提供选择。

1 寡糖提取工艺

提取分离巴戟天寡糖的报道并不很普遍。寡糖通常为2~10个单糖通过糖苷键连接而成的低聚糖,多羟基,具有一定程度的亲水性,以乙醇回流最常用,但存在溶媒介质影响等不确定因素,导致提取物

收稿日期:2018-04-10

接受日期:2019-01-03

基金项目:教育部新世纪优秀人才项目(NCET-13-0695);国家自然科学基金(81102623);北京中医药大学科研发展基金(2010072120015);北京中医药新奥奖励基金(1000062720063/007/001);北京市自然科学基金(18G40092)

*通信作者 Tel:86-013910323693;E-mail:luyi@bucm.edu.cn

含量降低,影响临床疗效等;此外,还可以用超声波提取、微波提取、生物提取等现代提取方法^[13,14],也可以利用生化科技及酵素反应,以淀粉及双糖(如蔗糖等)合成寡糖,其中超声提取法已成为许多中药成分分析过程中的重要手段。

周奋进等^[15]以95%乙醇溶液为提取液,液料比为8:1,加热回流提取3次,每次30 min,最终得到桂花寡糖提取率为90.29%,明显比水提取桂花寡糖提取率高。信维平^[16]用乙醇-甲醇和乙醇两种溶剂提取,观察其对提取率的影响,确定最佳提取条件,苯酚-硫酸法测得寡糖提取率达到3.6%。实验

中常用寡糖提取方法为水提醇沉法,用80%乙醇提取使多糖沉淀,以减少多糖的干扰,有利于下一步纯化。

微波提取是利用微波来提高萃取率的新技术,微波辅助提取的研究表明^[17],微波辐射诱导萃取技术在提取过程中药材不凝聚、不糊化,克服了热水提取易凝聚、易糊化的特点。王章存等^[18]通过500W的微波不仅显著提高了大豆寡糖含量,且更易脱盐。邵锦挺^[14]用类芽孢杆菌WL菌株进行琼胶酶发酵,确定琼胶酶降解琼胶得到寡糖的最佳工艺。提取方法比较见表1。

表1 天然寡糖提取方法比较

Table 1 Comparison of extraction methods of natural oligosaccharides

方法 Method	机理 Mechanisation	优点 Merits	缺点 Drawbacks	实例 Example
溶剂提取法 Solvent extraction	相似相溶 Similar phase dissolution	溶出完全、范围广 Complete dissolution, wide range	耗时长、溶剂耗量大 Long time and large solvent consumption	桂花寡糖、巴戟天寡糖 Osmanthus oligosaccharides, <i>Morinda officinalis</i> How's oligosaccharide
超声波提取法 Ultrasonic extraction	空化作用对细胞膜的破坏 Cavitation damage to cell membrane	提取速度快、时间短、 收率高、无须加热 Fast extraction, short time, high yield, no need to heat	需定时维护保养 Regular maintenance	巴戟天寡糖 <i>Morinda officinalis</i> How's oligosaccharide
微波提取法 Microwave extraction	低温穿透性加热 Low temperature penetration heating	选择性高、操作时间短、 溶剂耗量少、有效成分收率高 High selectivity, short operating time, less solvent consumption and high yield of active components	成本较高 Higher cost	大豆寡糖 Soybean oligosaccharide
生物提取法 Biological extraction	酶高度专一性 Enzyme specificity	高度专一性、提取充分 High specificity and sufficient extraction	对反应条件要求高 High demand for reaction conditions	琼胶酶寡糖 Agar oligosaccharide

2 寡糖分离纯化工艺

寡糖的提取液常常伴随着其他化学物质或副产物存在,因此,寡糖的分离纯化工艺是获取寡糖单体的关键步骤,目前,寡糖的分离方法有层析法、亲水作用液相色谱法、电泳法等^[19-22]。

2.1 活性炭柱层析法

色谱法利用组分在固定相和流动相中平衡分配系数不同而使各成分分离,适用于糖类分离的色谱填充材料有:活性炭、铝矾土、石英砂、离子交换树脂等。

活性炭是一种非极性吸附剂,对中药中某些苷类、糖类及氨基酸等具有一定分离效果,适于工厂大量制备型分离。冯峰等^[23]运用活性炭,硅胶等色谱及波谱法,从巴戟天属中分离鉴定6个寡糖类化合物,分别为:耐斯糖、1F-果呋喃糖基耐斯糖、蔗糖、

β -D-果吡喃糖-(2 \rightarrow 1)- β -D-果呋喃糖-(2 \rightarrow 1)- β -D-果呋喃糖、 β -D-果吡喃糖-(2 \rightarrow 1)- β -D-果呋喃糖-(2 \rightarrow 1)- β -D-果呋喃糖-(2 \rightarrow 1)- β -D-果呋喃糖、 β -D-果吡喃糖-(2 \rightarrow 1)- β -D-果呋喃糖-(2 \rightarrow 1)- β -D-果呋喃糖、 β -D-果吡喃糖-(2 \rightarrow 1)- β -D-果呋喃糖-(2 \rightarrow 1)- β -D-果呋喃糖,后三个化合物首次从巴戟天属中分离得到。

此外,邱建国等^[24]分别以活性炭及阳离子-阴离子树脂-活性炭联用两种方法以分离地黄寡糖部分,表明单用活性炭时,甘露三醇为15%乙醇洗脱物中的主要成分;阳离子交换树脂-阴离子交换树脂-活性炭联用时,水苏糖(天然四糖)为10%乙醇脱物中的主要成分。

张安强等^[25]先利用水提醇沉法,除去猴头菌子实体中的杂质多糖得粗寡糖,再经阴离子交换(DEAE-Sepharose FF)和丙烯酰胺凝胶进行分离,得到

盐性寡糖 HEOF-0.1, 水溶性寡糖 HEOF-W-B(由 3 个阿拉伯糖组成)及单糖 HEOF-W-C。但此法耗时长、分离效果不很明显。

2.2 多孔石墨化碳液相色谱法 (PGC)

多孔石墨化碳液相色谱固定相为多孔石墨化碳填料, 流动相可以为水、甲醇或乙腈。Livia Budai 等^[26]通过用 PGC 色谱与质谱联用技术对 AGP 进行了分离及样本分析, 得到 18 种分子量不同的低聚糖, 并且这些低聚糖的同分异构体也被分离出, 证明天然寡糖异构体在 PGC 柱上分离良好, 同时补充了传统质谱的不足之处。

Westphal 等^[27]研究了不同 PH 在 PGC 上保留行为, 结果显示, 中性寡糖 β -(1,4)-葡寡糖和 β -(1,4)-木寡糖的比 α 位的寡糖保留时间更长, 表明寡糖的结构越接近平面, 与 PGC 结合位点越多, 保留时间越长; 同时, 酸性寡糖 α -(1,4)-半乳糖醛酸寡糖与其甲基化做对比, 发现甲基化后的保留时间明显减少, 证明离子强度在 PGC 中的影响。

2.3 高效阴离子交换色谱法 (HPAEC)

高效阴离子交换色谱一般与脉冲安培检测器 (PAD) 联用, 其固定相为阴离子交换树脂, 是寡糖分离与检测的有效手段。仰铁锤等^[8]采用 HPAEC-PAD 技术, 以耐斯糖、1F-果呋喃糖基耐斯糖、蔗果三糖作为指标, 对巴戟天寡糖类成分进行分离检测, 并确定以 Hemilton RCX-10 阴离子交换树脂为色谱柱、流速 0.8 mL/min、柱温 30 °C 为最佳色谱条件。同时发现盐制巴戟天的含糖量相对较高, 而巴戟天茎叶中几乎不含糖。

2.4 高速逆流色谱法 (HSCCC)

高速逆流色谱法是一种连续高效液-液色谱分离技术, 能基本回收全部样本, 很适合天然产物活性成分的分离。HSCCC 与传统色谱法相比^[28,29], 具有样品无损失、无污染等优点, 被广泛应用于成分分离、生物化学、化妆品等领域, 在天然产物领域中已被认为是一种有效的新型分离技术。步知思^[30]利用大孔树脂-高速逆流色谱联用分离纯化地黄中毛蕊花糖苷, 发现通过大孔树脂-高速逆流色谱联用, 并以乙酸乙酯-正丁醇-水 (1:4:5) 组成的两相溶剂体系进行洗脱, 麦角甾苷的纯度高达 96%。

2.5 毛细管电泳法 (CE)

绝大多数糖类化合物极性较大, 大都不带电荷, 一般无法用毛细管电泳法。然而, 可使糖类化合物衍生化的方法使之带上电荷或荧光基团得以分

离^[31]。由于毛细管内径的限制, 检测信号是 CE 系统最突出的问题。紫外可见法 (UV) 是 CE 常用的检测方法, 但是受到仪器、单波长等因素的限制。目前应用最广泛的是二极管阵列检测器 (PDA)。常规的检测器还有灵敏度很高的激光光热 (LIP) 和荧光 (FL) 检测器。MAOW 等^[32]采用 CE 耦合激光诱导荧光分离检测了肝素与寡糖。

2.6 中压液相色谱联用技术

中压液相色谱联用技术属于快速色谱法之一。研究表明^[33,34], 通过与折射率检测器 (RID) 的耦合, 快速色谱可以进一步用于分离植物功能性低分子量碳水化合物。

Xu L^[35]等利用中压液相色谱耦合蒸发光散射检测器 (ELSD) 和二极管阵列检测器 (PDA), 以氨基键合硅胶为色谱柱的填充材料, 从莲子中分离制备出五种寡糖。此方法无需提取等复杂的前期处理工艺, 同时也减弱了极性化合物的过度吸附, 为从天然药用植物中大量获取高纯度低聚糖的制备提供了新的思路和方法。

2.7 亲水作用液相色谱技术 (HILIC)

亲水作用液相色谱也称为“反反相”色谱。华东科技大学^[36]利用亲水作用液相色谱技术分离灵芝中的棉子糖家族寡糖, 分离得到水苏糖、毛蕊花糖和棉子糖。表明通过亲水相互作用液相色谱分离、纯化和定量寡糖是有可能的。Xingchen Zhai 等^[37]研制了一种基于硅胶的 3-氨基苯硼酸亲水作用液相色谱固定相, 通过调整流动相中水分的比例, 设计描述吸附和表面吸附的模型, 用碱基和核苷来评价保留特性, 并探讨保留机理, 在壳寡糖分离中表现出了良好的分离效果, 并优化了色谱柱条件, 得到较好的指纹图谱。结果表明, 该保留机理是分配作用和表面吸附作用相结合的结果, 而氢键似乎是影响保留行为的主要因素。

2.8 膜分离技术

膜分离技术一般分为微滤、超滤和纳滤 3 种类型。可以选用超滤法除去蛋白质等大分子物质, 同时利用纳滤膜除去半乳糖等小分子糖类, 从而获得高纯度的功能寡糖混合物。Karina Altmann 等^[38]在分离牛乳寡糖中发现, 300 Da 的纳滤膜可以有效除去小分子物质, 从而使获得的寡糖的含量比原来高 100 倍。但是想要分离大小相近的寡糖单体, 还需多孔滤膜技术的进一步发展。分离方法比较见表 2。

表2 天然寡糖分离方法比较

Table 2 Comparison of Separation methods of Natural oligosaccharides

方法 Method	机理 Mechanisation	适用范围 Scope of application	优点 Merits	缺点 Drawbacks	常用检测器 Common detector	实例 Example
活性炭柱层析法 Activated carbon column chromatography	吸附作用 Chemisorption	水溶性成分 Water-soluble component	反复使用吸附剂、操作方便、成本较低且无需专门的设备 Repeated use of adsorbent, easy to operate, low cost and no special equipment	分离效率较低、操作复杂、大量使用溶剂 The separation efficiency is low, the operation is complex, and a large number of solvents are used	质谱 Mass spectrum	巴戟天属寡糖、地黄寡糖 Morinda officinalis belongs to oligosaccharide, Rehmannia glutinosa oligosaccharide
石墨化碳液相色谱法 Graphitized carbon liquid chromatography	疏水作用、极性作用及离子相互作用 Hydrophobic, polar and ionic interactions	结构相近、高极性物质 Similar structure, high polarity material	有效区分结构相似、异构体化合物、PH范围广 Effectively distinguish similar structure, isomer compounds, wide PH range	对低极性物质保留能力差 Poor retention of low polar substances	质谱 Mass spectrum	AGP
高效阴离子交换色谱法 High performance anion exchange chromatography	离子交换、可逆交换吸附和解析 Ion exchange, reversible exchange adsorption and analysis	中性、酸性寡糖 Neutral, acidic oligosaccharides	碱性条件下灵敏度较高、操作简单、专一性强 High sensitivity, simple operation and high specificity under alkaline conditions	分离条件苛刻、受洗脱剂等因素影响 The separation condition is harsh and affected by elution agent and other factors	脉冲安培检测器 Pulse ampere detector	巴戟天寡糖 Morinda officinalis oligosaccharide
高速逆流色谱法 High speed countercurrent chromatography	分配系数不同 Different distribution coefficients	中小分子类寡糖 Small and medium molecular oligosaccharides	样品无损失、无污染、高效、快速、大制备量分离、费用低 The sample is no loss, no pollution, high efficiency, fast preparation, large amount of separation and low cost	易受流速、温度、转速等影响 Susceptible to flow rate, temperature, speed and other effects	质谱 Mass spectrum	地黄毛蕊花糖苷 Glycoside of Rehmannia rehmannii
毛细管电泳法 Capillary electrophoresis	带电粒子在电场中的迁移作用 The migration of charged particles in an electric field	不同物理性质(电荷、荧光等) Different physical properties (charge, fluorescence)	操作简单、分离效果好、重现性好 Simple operation, good separation effect and reproducibility	设备要求与条件苛刻、产量低 Equipment requirements and harsh conditions, low output	二极管阵列检测器 Diode array	糖胺聚糖衍生的二糖 A disaccharide derived from a glycosaminoglycan
中压液相色谱联用技术 Medium pressure liquid chromatography combined technology	分配系数不同 Different distribution coefficients	实验室或工厂的生物制品 Laboratory or factory biological products	无需前期处理、大量获取、耐压 No pre-treatment, bulk acquisition, pressure tolerance	操作复杂 Complex operation	蒸发光散射检测器、二极管阵列检测器 Evaporative light scattering detector, Diode array	莲子寡糖 Lotus seed oligosaccharides
亲水作用液相色谱技术 Hydrophilic liquid chromatography	分子间亲和作用 Intermolecular affinity	氢键数量不同的糖分子 Different number of sugar molecules with hydrogen bonds	效率高、操作简单、分离含量较少的寡糖 High efficiency, simple operation and low content of oligosaccharide separation	配基寻找困难 Difficulty finding ligands	质谱 Mass spectrum	棉子糖家族寡糖、壳寡糖 Gossypol family oligosaccharides, chitosan oligosaccharides

续表 2(Continued Tab. 2)

方法 Method	机理 Mechanisation	适用范围 Scope of application	优点 Merits	缺点 Drawbacks	常用检测器 Common detector	实例 Example
膜分离技术 Membrane separation technique	分子量大小 Molecular weight	不同分子量寡糖 Different molecular weight oligosaccharides	获得不同分子量段寡糖、操作简单 Oligosaccharides with different molecular weights were obtained and the operation was simple	膜孔选择困难、易堵塞、不易区分分子量相近寡糖 The membrane pore is difficult to select, easy to block and difficult to distinguish oligosaccharides with similar molecular weight	质谱 Mass spectrum	牛乳寡糖 Milk oligosaccharides

3 寡糖成分检测方法

巴戟天寡糖成分是巴戟天药材发挥其生理作用的主要生物活性成分,其成分的结构分析和含量测定的准确分析能更好的对巴戟天及其相关药材进行质量评价,同时对其药动学和药效学的研究都有很大的影响。基础的检测方法一般有甲基化分析、Smith 降解、核磁共振波谱 (^1H , ^{13}C NMR)、快原子轰击质谱 (FA-BMS) 等方法,其中的物理方法大多都以联用的形式,使分析更简便、准确、高效。

3.1 化学衍生化法

由于巴戟天低聚糖类成分在紫外-可见光范围内无吸收峰及荧光,因此通常采用衍生化后再测定紫外吸收的方法进行检测或直接采用薄层色谱法进行检测。林芳花等^[39]用盐酸先使巴戟天寡糖成分水解为果糖,再生成羟甲基糠醛,采用紫外-可见分光光度法,在 280 nm 处测得不同批次巴戟天药材中低聚糖质量分数在 34.27% ~ 40.48%。但此方法破坏原寡糖成分结构,不适于寡糖成分结构解析,且对盐酸的浓度、量、温度等条件要求较高。

3.2 联用法

郝庆秀等^[22]利用超高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱 (UPLC-Q-TOF-MS ~ E) 的方法,对巴戟天低聚糖成分进行在线快速分析鉴定。以水-乙腈为流动相,梯度洗脱,ESI 正、负离子模式下采集数据,根据其精确相对分子质量、质谱裂解碎片、色谱保留时间、以及已知同类化合物的碎片特征,对未知成分进行结构推测。该实验鉴定了 19 个巴戟天低聚糖成分,为巴戟天药材的创新性开发利用研究提供了科学依据。

邓少东等^[40]利用亲水作用色谱-蒸发光散射检测器联用法同时测定巴戟天中蔗糖,蔗果三糖,耐斯

糖,1F-果呋喃糖基耐斯糖,巴戟甲素这 5 种低聚糖的含量,采用 Waters XBridgeTM Amide(4.6 mm × 150 mm, 3.5 μm) 亲水性作用色谱柱,以乙腈(A)-0.2% 三乙胺溶液(B)为流动相,梯度洗脱,流速 0.8 mL/min,柱温 40 °C,以 ELSD 检测,结果显示 5 种低聚糖线性关系良好,并测定了 13 批次的药材,各组质量分数均在 0.57% ~ 10.1%。

梁达清等^[41]利用 HPLC/ESI-MS 法检测 10 批来源地不同的巴戟天寡糖成分,分析发现不同产地、不同炮制方法对寡糖成分含量均有影响,其中含量最高达 18.90%,含量最低至 2.72%。此外,此实验首次在巴戟天寡糖中发现了二聚糖和三聚糖,为巴戟天药材的研究和开发提供了依据。

液质联用法不仅可以测定巴戟天成分含量,评价巴戟天质量,还能对不同品种巴戟天进行差别鉴定,丁平等^[42]利用 HPLC 电化学法对巴戟天低聚糖类成分的指纹图分析,可用于鉴别巴戟天及其常见混伪品。

4 寡糖成分药理作用

现代研究表明巴戟天在神经系统、免疫系统、内分泌系统及心血管系统都有贡献,其中巴戟天寡糖成分在神经系统中的贡献尤为突出^[43-45],且与传统功效相对应,是目前科研者们所关心的热点之一。

4.1 抗抑郁

崔承彬等^[46]等首次从巴戟天中提取出寡糖成分,分离出的寡糖类成分能在不影响小鼠自发活动的剂量下,显著缩短小鼠悬尾实验的不动时间,初步判定巴戟天寡糖具有一定的抗抑郁作用,这为学者研究抗抑郁药物打开了新世界的大门。

徐德峰等^[9]应用慢性不可预见应激法,建立雄性 SD 大鼠抑郁模型,以巴戟天寡糖和氟西汀作对

照品,通过糖水偏爱测试和强迫游泳实验观察大鼠行为变化,发现巴戟天寡糖能增强大鼠对糖水的偏爱,并显著减少大鼠强迫游泳不动时间,表明巴戟天寡糖具有抗抑郁作用。同时,用蛋白免疫印迹法检测后,发现巴戟天寡糖高剂量组能显著增加模型大鼠海马区 BDNF、Synapsin1 的表达,推测其作用机制可能是调节脑源性神经营养因子通路及突触可塑性。

根据《生命科学周刊》新闻作者关于北京大学的报道^[47],实验先以大鼠蔗糖偏好实验和强迫游泳实验证明巴戟天寡糖能有效改善慢性应激引起的抑郁样行为。再以 LY294002(PI3K 抑制剂)为抑制剂注射于内侧前额叶皮层,用 Western blot 法检测磷酸化 Ser9-糖原合成激酶 3 β -连环蛋白、BDNF 及突触蛋白在内侧前额皮层和眶额皮质的表达。依旧通过观察强迫游泳实验发现巴戟天寡糖抗抑郁作用不明显,表明巴戟天寡糖抗抑郁作用机制可能与位于内侧前额叶皮层的 BDNF-GSK-3 β -连环蛋白有关。

陈云志等^[48]通过文献分析,认为巴戟天寡糖抗抑郁作用可能与维生素 D 缺乏影响维生素 D 轴有关。研究表明^[49,50],给抑郁模型小鼠单用维生素 D 或维生素 D 联用丙咪嗪后,小鼠脑组织的 BDNF 表达显著提高;维生素 D 也干预抑郁小鼠脑中 5-HT 及多巴胺(DA)的表达。因此,巴戟天寡糖可能通过维生素 D 发挥抗抑郁作用。

此外,Qiu ZK 等^[5]使用连续单一应激组(SPS)模型进行评估,结果显示巴戟天菊糖型寡糖可逆转 SPS 处理大鼠的行为缺陷,即减少情境恐惧范式中冻结时间,同时又不影响其开放领域正常活动,其还能增加前额叶皮质、海马及杏仁核中别孕烷醇酮含量,表明巴戟天菊糖型寡糖的抗创伤后应激障碍(PTSD)与别孕烷醇酮合成有关。

4.2 增强记忆力与抗衰老

陈地林等^[43]采用 SD 大鼠双侧海马区注射 A β 25-35 各 10 μ g 制备拟痴呆模型,以安理申(0.125 mg/kg/d)为阳性药组,结果显示与模型组比较,各给药组大鼠组织中 SOD、CAT、GSH-Px 活力均增加,MDA 含量降低($P < 0.01$)。此外,各给药组乙酰胆碱水平升高,乙酰胆碱酯酶水平降低且脑能量代谢水平 Na⁺/K⁺-ATPase 活性升高。提示巴戟天寡糖可通过提高抗氧化能力、激活脑能量代谢、改善胆碱能系统损伤等作用以改善 A β 25-35 致大鼠痴呆症状。同时,水迷宫测试结果显示,模型组

定位航行潜伏期明显长于空白组,其定位航行总路程明显高于空白组,而各给药组潜伏期明显缩短。推测巴戟天寡糖可以明显提高 A β 25-35 致拟痴呆大鼠学习记忆能力。

4.3 改善生殖功能

丁平等^[12]采用以环磷酰胺(CTX)损伤引起雄性小鼠精子减少的模型,以甲睾酮组为阳性药组,巴戟天水提液组、巴戟天 80% 乙醇提取液组及巴戟天寡糖结晶组分别为给药对照组进行实验,给药完毕后检测精子数、精子活动率及精子畸形率,发现与空白组比,模型组小鼠精子数降低 25.8% ($P < 0.05$),精子总活动率降低 33.7% ($P < 0.01$),提示造模成功。三种给药组与模型组相比,精子数及活动率均升高,其强弱顺序为巴戟天结晶、巴戟天 80% 乙醇提取液、巴戟天水提液,推测巴戟天寡糖可能为促进精子生成的基础物质。同时,三组给药组与模型组相比,精子畸形率无显著差异,可初步判定巴戟天寡糖提取物无毒副作用。

赵君等^[51]采用“劳倦过度,房事不节”方法建立阳虚小鼠模型,给药 6 周后,发现高剂量治疗后 FSH、LH、T、GnRH 均明显升高($P < 0.01$),推测巴戟天寡糖可能是通过调节垂体-下丘脑-性腺轴而改善生殖功能。

4.4 抗炎

程亮星等^[52]以大鼠子宫缺血再灌注损伤为炎症模型,巴戟天寡糖液给药,以酶联免疫吸附测定法检测。结果显示,3 组梯度给药组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8 水平均降低,且有统计学差异($P < 0.05$),给药组各两组之间也均有统计学差异($P < 0.05$)。提示巴戟天寡糖能够减轻子宫缺血再灌注损伤后的炎症反应,可保护子宫,减少其缺血再灌注的损伤。

4.5 促进血管生成

冯国清等^[53]在采用鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)模型及大鼠急性心肌梗死(AMI)模型,麝香保心丸为阳性药的实验中发现,巴戟天寡糖含药血清组和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)组中小血管以载体为中心呈辐射状生长显著,且与 AMI 模型组相比,巴戟天寡糖中、大剂量组能显著增加微血管密度(MVD)及血管内皮生长因子(VEGF)、bFGF 光密度值,但作用弱于麝香保心丸组。提示巴戟天寡糖不仅可以促进 CAM 的血管生成,还可促进 AMI 后大鼠缺血心肌的血管生成,改善缺血心肌局部的侧支循环,其机制可能与调节 AMI 后缺血心肌 VEGF、

bFGF 蛋白的表达有关。杨景柯等^[54]也通过实验证明了巴戟天寡糖可促进 CAM 血管生成。

5 总结与展望

近些年抑郁症患者人数增长比率较大,越来越年轻化,研究发现抑郁症不仅和心理因素、压力过大有关,还与脑区前额叶和边缘系统的特异性异常、神经通路受损、单胺代谢、脑源性神经营养因子(BDNF)、下丘脑-垂体-肾上腺轴和去甲肾上腺素功能障碍及分子水平有关,但发病机理仍不很明确,大多机理证明只是初步确定,其发病机制是否是通路受损,代谢异常等复合作用的结果,还需进一步研究证实。

在临床上,刘飞虎等^[55]对 42 例肾虚型抑郁症患者进行巴戟天寡糖胶囊抗抑郁临床观察,发现巴戟天寡糖胶囊对轻、中度抑郁症有较好的疗效。孔庆梅等^[56]自 2007 年 3 月至 2008 年 1 月采用随机、双盲双模拟、安慰剂对照等研究方法,对巴戟天寡糖胶囊在临床上治疗抑郁症的安全性和有效性作评价。中医肾虚证量表结果显示,巴戟天寡糖胶囊有效率高于对照组,且在治疗剂量下,巴戟天寡糖胶囊的不良反应比对照物盐酸氟西汀轻,安全性好,为巴戟天寡糖胶囊推广至临床治疗抑郁症提供依据。

高纯度巴戟天寡糖成分能为更好的深入研究巴戟天寡糖抗抑郁作用机制打下基础,HPAEC、HILIC 等现代技术逐渐发展起来,既保留了传统分离技术的优点又改善其不足之处,但仍存在对于化学成分相似的物质无法精分且检测困难这几大难题,除了对工艺条件的优化,采取各种联用技术等方法,还需探索更多有益、绿色、高效的分离纯化方法,以便优化巴戟天药材低聚糖的分离、分析和鉴定条件,为探究寡糖药理机制奠定基础,发挥巴戟天的最大利用价值。

参考文献

- Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China; Vol I (中华人民共和国药典:第一部)[M]. Beijing:China Medical Science Press,2015:75-76.
- Wang ZB, et al. Protective effect of *Morinda officinalis* polysaccharides on bone degeneration in the aged rats[J]. Int J Phys Sci,2011,6:112-115.
- Zhu MY, et al. Extraction of polysaccharides from *morinda officinalis* by response surface methodology and effect of the polysaccharides on bone-related genes [J]. Carbohydr. Polym,2011,85(1):23-28.
- Song B, et al. Effect of aqueous extract from *morinda officinalis* how on microwave-induced hypothalamic-pituitary-testis axis impairment in male sprague-dawley rats[J]. Evid-based Compl Alt,2015,2015:360730.
- Qiu ZK, et al. The inulin-type oligosaccharides extract from *morinda officinalis*, a traditional Chinese herb, ameliorated behavioral deficits in an animal model of post-traumatic stress disorder[J]. Metab Brain Dis,2016,31(5):1-7.
- Jia M, et al. Potential antiosteoporotic agents from plants: a comprehensive review [J]. Evid-based Compl Alt, 2012, 2012:364604.
- Wang CC, et al. Glycan microarray of Globo H and related structures for quantitative analysis of breast cancer[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2008,105:11661-11666.
- Yang TC, et al. Advances in chemistry and pharmacology of *morinda officinalis*[C]. Ji Nan; Research and application of polysaccharide drugs,2008.
- Xu DF, et al. Study on antidepressant mechanism of *morinda officinalis*[J]. Chin J Clin Pharmacol (中国临床药理学杂志),2015,15:1539-1542.
- Deng S, et al. Effects of *morinda officinalis* oligoseon on plasma levels of BDNF, GDNF, VEGF and IGF-1 in depressed patients[J]. Chin New Drug J(中国新药杂志),2017,20:2454-2458.
- Yang ZM, et al. Isolation of inulin-type oligosaccharides from Chinese traditional medicine: *morinda officinalis* how and their characterization using ESI-MS/MS [J]. J Ssp Sci, 2015,33:120-125.
- Ding P, et al. Study on the effect of *morinda officinalis* on spermatogenesis in mice[J]. Chin Pharm J(中国药学杂志),2008,43:1467-1470.
- Shi RB, et al. On development of chinese medicinal chemistry [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med(北京中医药大学学报),2012,35:153-159.
- Shao JT. Preparation and biological activities of agar oligosaccharides[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology (浙江工业大学),2011.
- Zhou FJ, et al. Optimization of the extraction technology of oligosaccharides from the flowers of *Osmanthus fragrans* by uniform design[J]. West China J Pharm Sci (华西药学杂志),2017,32(1):63-66.
- Xin WP. Study on extraction and application of carrot oligosaccharides[J]. Grain Processing(粮油加工),2009,12:178-180.
- Wu XW, et al. Analysis of the chemical stability of *morinda officinalis* oligosaccharides during extraction[J]. Chin Pharm J(中国药学杂志),2014,49:102-105.

- 18 Wang ZC, et al. Effect of microwave on the extraction of soybean oligosaccharides [J]. Chin Agricultural Sci Bulletin (中国农学通报), 2006, 22: 102-104.
- 19 Duan W, et al. Separation and purification of fructo-oligosaccharide by high-speed counter-current chromatography coupled with precolumn derivatization [J]. Molecules, 2018, 23: 381.
- 20 Jr AW, et al. Chip-based reversed-phase liquid chromatography-mass spectrometry of permethylated N-linked glycans; a potential methodology for cancer-biomarker discovery [J]. Anal Chem, 2010, 82: 5095.
- 21 Harrison SJ, et al. A reverse-phase liquid chromatography/mass spectrometry method for the analysis of high-molecular-weight fructooligosaccharides [J]. Anal Biochem, 2009, 395: 113-115.
- 22 Hao QX, et al. Rapidly identify oligosaccharides in *morinda officinalis* by UPLC-Q-TOF-MSE. [J]. Chin J of Chin Mater Med (中国中药杂志), 2018, 43: 1201.
- 23 Feng F, et al. Study on oligosaccharides from *Morinda officinalis* [J]. Chin Tradit Herbal Drugs (中药材), 2012, 35: 1259-1262.
- 24 Qiu JG, et al. Investigation on separation and extraction of oligosaccharides from *rehmannia glutinosa* by ion exchange resins and activated charcoal [J]. Chin J Hosp Pharm (中国医院药学杂志), 2015, 35: 400-405.
- 25 Zhang AQ, et al. Study on extraction, isolation and structure of oligosaccharides from the fruiting bodies of the fungus *hericium erinaceus* [J]. Food Ferment Ind (食品与发酵工业), 2010, 1: 152-155.
- 26 Budai L, et al. Analysis of complex oligosaccharides using graphitized carbon liquid chromatography/mass spectrometry [J]. Eur J Mass Spectrom, 2008, 14: 419.
- 27 Westphal Y, et al. Introducing porous graphitized carbon liquid chromatography with evaporative light scattering and mass spectrometry detection into cell wall oligosaccharide analysis [J]. J Chromatogr A, 2010, 1217: 689-695.
- 28 Cui HY, et al. Optimization of high-speed counter-current chromatography for separation of polyphenols from the extract of hawthorn (*Crataegus laevigata*) with response surface methodology [J]. Sep Purif Technol, 2011, 77: 269-274.
- 29 Kuang P, et al. Preparative separation and purification of sulfuraphene from radish seeds by high-speed countercurrent chromatography [J]. Food Chem, 2013, 136: 309-315.
- 30 Bu Z, et al. Separation and purification of acteoside from *Rehmannia glutinosa* by combining macroporous resin with high-speed countercurrent chromatography [J]. Se Pu, 2017: 1014-1021.
- 31 Chen FTA, et al. Quantitative analysis of sugar constituents of glycoproteins by capillary electrophoresis [J]. Glycobiology, 1998, 8: 1045.
- 32 Chang Y, et al. Capillary electrophoresis for the analysis of glycosaminoglycan-derived disaccharides [J]. Meth, 2013, 984: 67.
- 33 Li J, et al. Preparation of inulin-type fructooligosaccharides using fast protein liquid chromatography coupled with refractive index detection [J]. J Chromatogr A, 2013, 1308(6): 52-57.
- 34 Challal S, et al. Rational and efficient preparative isolation of natural products by MPLC-UV-ELSD based on HPLC to MPLC gradient transfer [J]. Planta Med, 2015, 81: 1636.
- 35 Xu L, et al. Separation of oligosaccharides from lotus seeds via medium-pressure liquid chromatography coupled with ELSD and DAD [J]. Sci Rep, 2017, 7: 44174.
- 36 Liang T, et al. Hydrophilic interaction liquid chromatography for the separation, purification, and quantification of raffinose family oligosaccharides from *lycopus lucidus turez* [J]. J Sep Sci, 2015, 38: 2607.
- 37 Zhai X, et al. New stationary phase for hydrophilic interaction chromatography to separate chito-oligosaccharides with degree of polymerization 2-6 [J]. J Chromatogr B Anal Tech Biomed Life Sci, 2018, 5: 33.
- 38 Altmann K, et al. Comparison of the efficiency of different NF membranes for the enrichment of milk oligosaccharides from bovine milk [J]. Eur Food Res Tech, 2015, 241: 803-815.
- 39 Lin FH, et al. Determination of oligosaccharides in *morinda officinalis* by ultraviolet spectrophotometry [J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药), 2009, 20: 213-214.
- 40 Deng SD, et al. HILIC-ELSD determination of five oligosaccharides contained in *Morinda officinalis* [J]. Chin J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2012, 37: 3446-3450.
- 41 Liang DQ, et al. Determination of oligosaccharides in *morinda officinalis* by HPLC/ESI-MS [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2009, 21: 456-460.
- 42 Ding P, et al. Study on HPAEC-PAD fingerprint analysis of oligosaccharides from *Morinda officinalis* [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2011, 46: 1707-1710.
- 43 Chen DL, et al. Effect of oligosaccharides from *morinda officinalis* on β -amyloid-induced learning and memory dysfunction in rats [J]. Chin Pharm Bulletin (中国药理学通报), 2013, 29: 271-276.
- 44 Wu ZQ, et al. Effect of bajijiasu isolated from *morinda officinalis* F. C. how on sexual function in male mice and its antioxidant protection of human sperm [J]. J Ethnopharm, 2015, 164: 283-292.

- 45 Ling K, et al. Progress in research on pharmacological effects of *Morinda officinalis* [J]. J Fujian College of Tradit Chin Med(福建中医学院学报), 2007, 17(3):67-69.
- 46 Cui CB. Studies on the antidepressant active constituents in the roots of *Morinda officinalis* how [J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志), 1995, 20(1):36.
- 47 Xu LZ, et al. BDNF-GSK-3 β - β -catenin pathway in the mPFC is involved in antidepressant-like effects of *Morinda officinalis* oligosaccharides in rats [J]. Int J Neuropsychopharmacol, 2017, 20(1):88.
- 48 Chen YZ, et al. The discussion on the anti-depression mechanism of bajitian from vitamin D axis [J]. West J Tradit Chin Med(西部中医药), 2017, 30:128-130.
- 49 Anatoly Kreinin, et al. Blood BDNF level is gender specific in severe depression [J]. Plos One, 2015, 10:127643.
- 50 Liu YH, et al. Protective and therapeutic effects of *Morinda officinalis* polysaccharides on osteoporosis of ovariectomized-rats [J]. Hainan Med(海南医学), 2014, 20:2973-2975.
- 51 Zhao J, et al. Study on oligosaccharide extracted from *Morinda officinalis* improve the reproductive ability of mice [J]. J Yunan College of Tradit Chin Med(云南中医学院学报), 2018, 41:7-10.
- 52 Cheng LX. Anti-inflammatory effects of *Morinda officinalis* on uterine ischemia-reperfusion injury in rats [J]. Tradit Chin Med Res(中医研究), 2018, 31:68-70.
- 53 Feng GQ, et al. Study on the angiogenesis of chicken chorio-allantoic membrane and rat myocardial infarction model induced by *Morinda officinalis* [C]. Urumqi: Conference on Biochemistry and Molecular Pharmacology, 2007.
- 54 Yang JK, et al. Study on the promotion of chicken chorio-allantoic membrane angiogenesis by *Morinda officinalis* [J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2010, 35:360-363.
- 55 Liu FH, et al. Treatment of 42 cases of mild and moderate depression with bayu tianwei sugar capsule [J]. Shanxi Med(陕西中医), 2012, 33:165-167.
- 56 Kong QM, et al. Efficacy and safety of *Morinda officinalis* oligose capsule in the treatment of depression [J]. Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志), 2011, 27:170-173.

(上接第 221 页)

- 8 Selvendiran K, Banu SM, Sakthisekaran D. Protective effect of piperine on benzo(a)pyrene-induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice [J]. Clin Chim Acta, 2004, 350:73.
- 9 Liu P, Suo JX, Yu TF. Research progress of pharmacological effects of piperine [J]. Chin Drug App Monit(中国药物应用与监测), 2007, 4(3):7-9.
- 10 Li XB. The *in vitro* and *in vivo* metabolism studies of F18 in rat liver microsomes and rats [D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine(成都中医药大学), 2016.
- 11 Cohen LH, Remley MJ, Raunig D, et al. *In vitro* drug interactions of cytochrome p450: an evaluation of fluorogenic to conventional substrates [J]. Drug Metab Dispos, 2003, 31:1005.
- 12 Liu ZJ, Fu DX, Tang G. FDA drug interaction research guide (draft) interpretation of 2006 Edition [J]. J Int Pharm Res(国际药学研究杂志), 2008, 35(1):50-58.
- 13 Wu H. CYP3A4 Enzyme-related clinical drug interactions [J]. Chin J Pharmacov(中国药物警戒), 2016, 13:286-290.
- 14 Wang JH. Cytochrome CYP2C9 and clinical rational use [J]. Shandong Med J(山东医药), 2009, 49:111-112.

(上接第 263 页)

- 5 Siskos EP, Mazomenos BE, Konstantopoulou AA. Isolation and identification of insecticidal components from *Citrus aurantium* fruit peel extract [J]. J Agric Food Chem, 2008, 56:5577-5581.
- 6 Zhang C, Xiao YQ, GuKou YY, et al. Studies on chemical constituents from roots of *Peucedanum praeruptorum* II [J]. China J Chin Mat Med(中国中药杂志), 2006, 31:1333.
- 7 Zhang J, Li YB, Qian DW, et al. Chemical constituents from *Chrysanthemum morifolium* ramat [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2006, 18:71-73.
- 8 Yan C, Cheng XY, Sui H, et al. Antioxidant activities and chemical compositions of *Thymus quinquecostatus* Celak [J]. J Beijing Univ TCM(北京中医药大学学报), 2016, 39:383-389.
- 9 Zhao YX. Study about action and mechanism of apigenin on the tumor multidrug resistance cells [D]. Suzhou: Suzhou University(苏州大学), 2017.
- 10 Dong F, Liu HZ, Sun Y, et al. Isolation and identification of bergapten in dry root of *Glehnia littoralis* and preliminary determination of its antitumor activity *in vitro* [J]. J Plant Res Envir(植物资源与环境学报), 2010, 19:95-96.