

雪灵芝多糖的分离纯化及免疫活性评价

连紫宛¹,李占强^{2,3},张海燕⁴,刘瑞欣¹,陈辛玲¹,王刚^{1*}

¹青海大学医学院;²青海大学医学院高原医学研究中心;

³青海省高原医学应用基础重点实验室 青海-犹他高原医学联合重点实验室;

⁴青海省第五人民医院,西宁 810000

摘要:为分离纯化雪灵芝(*Arenaria kansuensis*)多糖,并对纯化组分进行分子量测定、单糖组分分析及免疫活性评价。实验采用水提醇沉法提取雪灵芝粗多糖(*Arenaria kansuensis* crude polysaccharide, AKCP);以 DEAE-52 纤维素柱对 AKCP 进行分离纯化,获得 5 个雪灵芝多糖组分 AKP-1 ~ AKP-5,进一步采用葡聚糖凝胶 G-75 柱对 AKP-2 进行分离纯化获得 AKP-2a 多糖组分。苯酚-硫酸法测定 AKCP、AKP-2 及 AKP-2a 的总糖含量分别为 52%、70% 和 79%;凝胶渗透色谱-十八角度激光光散射(GPC-MALS)法检测 AKP-2a 的重均分子量 M_w 为 2.07×10^5 Da、数均分子量 M_n 为 9.838×10^4 Da;HPLC 法检测 AKP-2a 是由半乳糖醛酸、甘露糖、核糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖、岩藻糖 10 种单糖组成,其摩尔比为 1:0.25:0.01:0.20:0.11:0.25:0.61:0.07:0.21:0.12;以 MTT 法检测体外培养小鼠脾淋巴细胞增殖,AKCP、AKP-2 及 AKP-2a 各浓度组 SI 水平,均明显高于对照组($P < 0.05$)。经 NO 释放实验及 IFN- γ ELISA 检测,AKP-2a 各浓度组小鼠腹腔巨噬细胞培养上清中二者的水平,较对照组呈浓度依赖性增高($P < 0.01$)。综上所述,本研究通过分离纯化,获得了总糖含量较高的雪灵芝多糖 AKP-2a 组分,初步确定其分子量范围及单糖组成,并证实其具有激活淋巴细胞增殖、促进巨噬细胞功能的生物活性。

关键词:雪灵芝;多糖;纯化;免疫激活

中图分类号:R284.2;R965

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)4-0572-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.4.003

Isolation of polysaccharides from *Arenaria kansuensis* and evaluation of immunological activity

LIAN Zi-wan¹, LI Zhan-qiang^{2,3}, ZHANG Hai-yan⁴, LIU Rui-xin¹, CHEN Xin-ling¹, WANG Gang^{1*}

¹Medical College of Qinghai University; ²Research Center for High Altitude Medicine, Qinghai University;

³Key Laboratory of Application and Foundation for High Altitude Medicine Research in Qinghai Province (Qinghai-Utah Joint Research Key Lab for High Altitude Medicine);

⁴The Fifth People's Hospital of Qinghai Province, Xining 810000, China

Abstract: In order to isolate and purify *Arenaria kansuensis* polysaccharide from natural *Arenaria kansuensis*, and study its molecular weight, monosaccharide component and immune activity, *Arenaria kansuensis* crude polysaccharide (AKCP) was extracted by water extraction and alcohol precipitation, and separated and purified into AKP-1-AKP-5 by DEAE cellulose 52 column. AKP-2 was further purified using Sephadex G-75 column and AKP-2a polysaccharide component was obtained. The total sugar content of AKCP, AKP-2 and AKP-2a was measured as 52%, 70% and 79% respectively by phenol-sulfuric acid method. The GPC-MALS was applied to measure the molecular weight of AKP-2a. Results showed that the weight-average molecular weight (M_w) of AKP-2a was 2.07×10^5 Da, and the number-average molecular weight (M_n) was 9.838×10^4 Da. The 10 main monosaccharides in AKP-2a detected by HPLC are galacturonic acid, mannose, ribose, rhamnose, glucuronic acid, glucose, galactose, xylose, arabinose and fucose, the molar ratio of which was 1:0.25:0.01:0.20:0.11:0.25:0.61:0.07:0.21:0.12 respectively. Compared with control group, the AKCP, AKP-2 and AKP-2a treatment groups with high, medi-

收稿日期:2018-09-21 接受日期:2019-03-13

基金项目:青海省科技厅基础研究项目(2016-ZJ-782)

* 通信作者 Tel:86-013519706280; E-mail:wanggangqh@163.com

um and low concentrations had a promoting effect on the proliferation of mice spleen lymphocytes by MTT *in vitro* ($P < 0.05$). By NO release experiment and ELISA detection, AKP-2a showed a concentration dependent activation effect on mice peritoneal macrophages *in vitro* ($P < 0.01$). In conclusion, this study obtained AKP-2a polysaccharide through isolation and purification of *Arenaria kansuensis*, which has a high total sugar content. The multiple monosaccharides and the molecular weight of AKP-2a were identified, and the preliminary results showed that AKP-2a had the biological activities on lymphocyte proliferation and macrophage function.

Key words: *Arenaria kansuensis*; polysaccharide; purification; immune activation

雪灵芝 (*Arenaria kansuensis*) 为生长在海拔 3 500 ~ 5 300 米砾石带的石竹科无心菜属垫状草本植物,其藏药名为阿仲嘎布,《藏药志》中称其“以全草入药,其性味苦寒,有清热、利肺、止咳、散肿等功效”,藏族民间用其水煮液进行药浴治疗关节炎^[1,2]。近年来,随着高原植物药研究的日益深入,有关雪灵芝的药用价值也逐渐被国内研究者重视。在药化研究方面,雪灵芝含有多糖、三萜皂苷、黄酮、生物碱等活性物质;在药效研究方面,雪灵芝提取物具有抗炎、免疫调节及抗肿瘤等相关研究也见于报道^[3]。本课题组前期开展的体内外研究,分别从水溶性提取物、粗多糖层次,证实了雪灵芝具有激活淋巴细胞、巨噬细胞及促进 Th1 型细胞因子水平的生物活性^[4-8],而对雪灵芝多糖进行纯化并追踪其免疫激活活性的研究尚未见报道。本研究采用柱色谱分离法、GPC-RI-MALS 法和 HPLC 法对雪灵芝多糖进行分离纯化、测定纯化组分的分子量和单糖组成,并观察不同分离纯化阶段的雪灵芝多糖对体外培养的脾淋巴细胞增殖、腹腔巨噬细胞功能的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级昆明小鼠,共 12 只,雌雄各半,4 ~ 6 周龄,体重 20 ± 2 g,购自青海省地方病研究所实验动物中心,生产许可证号 SYXK 青 2012-001。

1.2 主要试剂与仪器

甘肃雪灵芝全草购自青海九康医药保健品有限公司,由中国科学院西北高原生物研究所刘增根副研究员鉴定为甘肃雪灵芝 (*Arenaria kansuensis Maxim*)。DEAE Cellulose 52 柱(北京 Solarbio 科技有限公司),Sephadex G-75 柱(北京华迈科生物技术有限责任公司),半乳糖醛酸、甘露糖、核糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、岩藻糖(上海源叶生物科技有限公司),木糖、阿拉伯糖(长春市安谱生物科技有限公司),1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)购自山东西亚化学股份有限公司,NO 试剂盒(南京

建成生物工程研究所),小鼠 IFN- γ ELISA 试剂盒(深圳市达科为生物技术有限公司)。

高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),自动部分收集器(上海嘉鹏科技有限公司),冷冻干燥机(德国 Christ 公司),旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),18 角度激光光散射凝胶渗透色谱仪(美国怀雅特公司),细胞培养箱(美国 Forma 公司),96 孔板离心机(德国 Eppendorf 公司),酶标仪(日本 Bio-rad 公司)。

1.2 雪灵芝多糖的提取及分离纯化

1.2.1 雪灵芝粗多糖的提取

参考文献^[4],采用水提醇沉法提取雪灵芝粗多糖。

1.2.2 雪灵芝多糖分离纯化

1.2.2.1 DEAE Cellulose 52 离子交换柱层析

配制 10 mg/mL 的雪灵芝粗多糖水溶液,充分溶解后 4 000 rpm 离心 10 min,取上清沿柱壁缓慢加入 2.5 cm \times 45 cm 的 DEAE -52 纤维素层析柱,按流速 2 mL/min,以蒸馏水、0.1、0.15、0.2、0.3 mol/L 的 NaCl 溶液进行梯度洗脱。苯酚-硫酸法于 490 nm 检测波长下隔管检测多糖吸光度,直到无多糖组分流。以管数为横坐标,吸光度为纵坐标绘制洗脱曲线。收集浓缩同一峰洗脱液,浓缩,脱盐,冻干,获得 AKP-1 ~ 5 共五个多糖组分。

1.2.2.2 Sephadex G-75 凝胶柱层析

取 AKP-2 多糖样品 0.2 g 溶于 60 mL 去离子水中,充分溶解后,4 000 rpm 离心 10 min,取上清加至 42 cm \times 100 cm 的 Sephadex G-75 凝胶柱,设置流速为 0.5 mL/min,以蒸馏水进行洗脱,以 5 mL/管自动部分收集器收集洗脱液,期间进行苯酚硫酸法检测,直至无多糖流出。以管数为横坐标,吸光度为纵坐标绘制洗脱曲线。收集浓缩同一峰洗脱液、冷冻干燥,得到 AKP-2a 多糖组分。

1.3 苯酚-硫酸法检测雪灵芝多糖的总糖含量

1.3.1 葡萄糖标准曲线的绘制

以葡萄糖为标准品,配制为 1 mg/mL 浓度,分

别吸取标准品液 0.4、0.6、0.8、1.2、1.8 mL,以蒸馏水补足至 2.0 mL,设 2.0 mL 蒸馏水为空白对照。各管加入 6% 苯酚 1.0 mL 及浓硫酸 5.0 mL,摇匀冷却后 40 °C 水浴 15 min,室温下静置 30 min,于 490 nm 处测吸光度值,以吸光度值为纵坐标,葡萄糖浓度为横坐标,绘制标准曲线。

1.3.2 雪灵芝多糖总糖含量测定

配制 0.5 mg/mL 浓度的不同纯化阶段的多糖样品溶液 2 mL,按上步骤操作,在 490 nm 波长处测吸光度值,按葡萄糖标准曲线计算各样品总糖含量。

1.4 雪灵芝多糖 AKP-2a 分子量测定

采用凝胶渗透色谱-十八角激光光散射(GPC-MALS)法测定 AKP-2a 多糖的分子量。液相色谱条件:色谱柱为 ShodexOHpak SB-806HQ/804HQ;流动相:超纯水(0.02% 叠氮钠),PH = 6;流速:1.0 mL/min;柱温为 25 °C;进样量为 100 μ L。样品溶液的处理:称取 2 mg AKP-2a 多糖样品,加流动相 1 mL,0.22 μ m 微孔滤膜过滤后,进行检测。

1.5 AKP-2a 单糖组分测定

1.5.1 单糖标准混合液和 AKP-2a 水解样品的制备

称取 10 种单糖标准品各 10 mg 分别定容至 1 mL,将其等体积混合配成浓度为 1 mg/mL 的单糖标准品液;称取 10 mg AKP-2a 样品,加入 4 mol/L TFA(三氟乙酸)0.5 mL,在 120 °C 条件下水解 2 h,氮气吹干,500 μ L 去离子水溶解样品,0.22 μ m 微孔滤膜过滤后备用。

1.5.2 单糖标准品和 AKP-2a 水解样品衍生化

取雪灵芝多糖 AKP-2a 水解液和单糖标准品混合液各 200 μ L,分别加入 0.3 mol/L NaOH 溶液 500 μ L 和 0.5 mol/L PMP 甲醇溶液 500 μ L,混匀后 70 °C 水浴 60 min,冷却至室温,加 0.3 mol/L HCl 溶液 500 μ L,摇匀后加 500 μ L 氯仿,振荡摇匀后静置 20 min,弃氯仿层,重复 3 次,水层过 0.45 μ m 微孔滤膜备用。

1.5.3 单糖标准曲线的绘制

配制浓度梯度分别为 13.33、10.00、6.67、5.00、2.67 μ g/mL 的单糖混合标准溶液,进行 HPLC 检测,色谱条件:色谱柱 SHISEIDO C₁₈柱(250 \times 4.6 mm,5 μ m);流动相:0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液(pH6.9)-乙腈(v/v = 82:18);流速:1 mL/min;检测波长:245 nm;进样量:10 μ L;柱温:25 °C。按照单糖浓度与峰面积建立回归方程。

1.5.4 单糖标准品和 AKP-2a 样品 HPLC 检测

将衍生化处理的单糖标准品和 AKP-2a 样品,按 1.5.3 的方法进行 HPLC 检测。

1.6 雪灵芝多糖对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响

1.6.1 小鼠脾淋巴细胞悬液制备

实验小鼠 7 只,参照文献^[4]制备小鼠脾淋巴细胞悬液。

1.6.2 MTT 法检测小鼠脾淋巴细胞增殖

小鼠脾淋巴细胞悬液(2×10^6 /mL)按 100 μ L/孔接种于 96 孔细胞培养板。设置空白对照组、香菇多糖(终浓度为 5 μ g/mL)阳性对照组、以及不同纯化阶段的雪灵芝多糖的低、中、高(终浓度为分别为 50、100、200 μ g/mL)处理组,每个样本设 3 复孔对照孔及 3 复孔刺激孔,除空白孔加入 100 μ L 培养液,其余各孔分别加入 100 μ L 培养液溶解的药物。置于 37 °C 5% CO₂ 培养箱 44 h 后,各孔加入 MTT (5 mg/mL)溶液 20 μ L 继续培养 4 h 后,将 96 孔板置于平板离心机,2 000 rpm 离心 5 min,将上清 180 μ L 吸弃,每孔加 150 μ L DMSO,振荡溶解 10 min,酶标仪测定 490 nm 波长处的吸光度。结果以刺激指数(SI)表示:SI = 刺激孔 OD 值/对照孔 OD 值。

1.7 雪灵芝多糖 AKP-2a 对小鼠腹腔巨噬细胞功能的影响

1.7.1 小鼠腹腔巨噬细胞悬液制备及分组

实验小鼠 5 只,参照文献^[4]制备小鼠腹腔巨噬细胞悬液。小鼠腹腔巨噬细胞悬液(1×10^5 /mL)按 180 μ L/孔接种于 96 孔培养板,置于 37 °C,5% CO₂ 培养箱培养 3 h 后吸弃上层培养液,去除未贴壁细胞。设空白对照组,脂多糖(终浓度为 5 μ g/mL)阳性对照组,AKP-2a 低、中、高(终浓度为分别为 25、50、100 μ g/mL)处理组,每样本设 3 个复孔,除空白孔加入 20 μ L 培养液,其余各孔分别加入 20 μ L 培养液溶解的药物,置于 37 °C,5% CO₂ 培养箱,培养 48 h。

1.7.2 小鼠腹腔巨噬细胞 NO 释放水平检测

吸取培养上清,按 NO 一步法试剂盒说明书操作,检测 NO 释放水平。

1.7.3 小鼠腹腔巨噬细胞 IFN- γ 水平检测

吸取培养上清,按双抗体夹心法 ELISA 试剂盒说明书操作,检测 IFN- γ 水平。

1.8 统计学分析

采用 SPSS19.0 统计学软件进行分析,数据以均数 \pm 标准差表示,组间比较采用单因素方差分析,以

LSD 法进行显著性检验。

2 结果

2.1 雪灵芝多糖提取与分离纯化

2.1.1 雪灵芝粗多糖提取

雪灵芝干粉 8 kg 经水提醇沉法,Sevage 法脱蛋白后,共获得 61.8 g 雪灵芝粗多糖,经计算得率为 0.77%。

2.1.2 雪灵芝多糖 DEAE Cellulose 52 离子交换柱层析

雪灵芝粗多糖经 DEAE-52 纤维素柱层析,获得中性多糖 AKP-1 和酸性多糖 AKP-2、AKP-3、AKP-4、AKP-5(见图 1)。

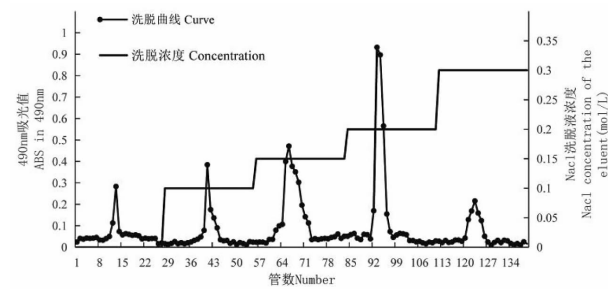


图 1 DEAE-52 纤维素 NaCl 溶液梯度洗脱曲线

Fig. 1 NaCl gradient elution curve with DEAE-52 cellulose column

2.1.3 Sephadex G-75 凝胶柱层析

将 AKP-2 进行 Sephadex G-75 凝胶柱层析,得到单一峰的 AKP-2a 多糖组分(见图 2)。

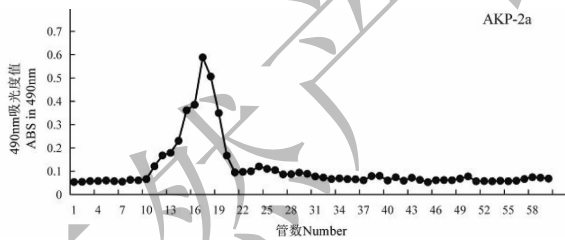


图 2 AKP-2a Sephadex G-75 洗脱曲线

Fig. 2 Elution curve of AKP-2a on Sephadex G-75 column

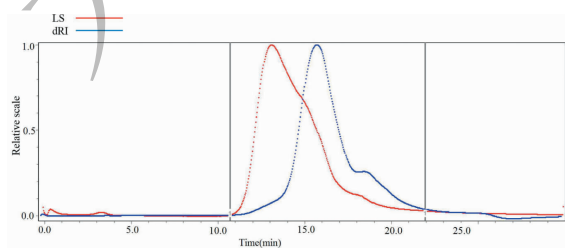


图 3 AKP-2a 的 GPC-MALS 分析

Fig. 3 GPC-MALS analysis of AKP-2a

2.2 不同纯化阶段雪灵芝多糖的总糖含量测定

以苯酚-硫酸法,测得雪灵芝粗多糖 AKCP 的总糖含量为 52%,雪灵芝多糖 AKP-2 的总糖含量为 70%,雪灵芝多糖 AKP-2a 的总糖含量为 79%。

2.3 雪灵芝多糖 AKP-2a 分子量测定

AKP-2a 经 GPC-MALS 检测,AKP-2a 重均分子量 M_w 为 2.07×10^5 Da,数均分子量 M_n 为 9.838×10^4 Da,分散系数(M_w/M_n)为 2.104(见图 3)。

2.4 雪灵芝多糖 AKP-2a 单糖组成分析

对浓度梯度单糖混合标准品溶液进行 HPLC 检测,按各单糖对应的峰面积建立回归方程,结果在 $2.67 \sim 13.33 \mu\text{g/mL}$ 浓度范围内线性良好(见表 1);混合单糖标准品与 AKP-2a 的 HPLC 色谱分析见图 4;AKP-2a 单糖组成为半乳糖醛酸、甘露糖、核糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖及岩藻糖(见表 2)。其摩尔比为:1:0.25:0.01:0.20:0.11:0.25:0.61:0.07:0.21:0.12。

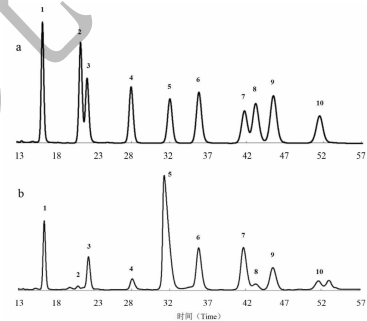


图 4 10 种混合单糖对照品 (a),AKP-2a (b) 的 HPLC 色谱图

Fig. 4 HPLC chromatograms of 10 mixed standard monosaccharides (a) and AKP-2a (b)

注:1. 甘露糖 2. 核糖 3. 鼠李糖 4. 葡萄糖醛酸 5. 半乳糖醛酸 6. 葡萄糖 7. 半乳糖 8. 木糖 9. 阿拉伯糖 10. 岩藻糖。

Note:1. Mannose 2. Ribose 3. Rhamnose 4. Glucturonic acid

5. Galacturonic acid 6. Glucose 7. Galactose

8. Xylose 9. Arabinose 10. Fucose.

2.5 AKCP、AKP-2、AKP-2a 对小鼠脾淋巴细胞体外增殖的影响

MTT 法检测小鼠脾淋巴细胞体外增殖,结果显示,香菇多糖组、AKCP、AKP-2、AKP-2a 各浓度组 SI 均高于空白对照组($P < 0.05$),其中以 AKP-2a 高剂量组刺激作用最为明显,高于香菇多糖组及其它各药物浓度组($P < 0.05$),(见图 5)。

2.6 AKP-2a 对小鼠腹腔巨噬细胞功能的影响

经 NO 释放实验及 ELISA 检测,脂多糖组、AKP-2a 各浓度组小鼠腹腔巨噬细胞培养上清中 NO 水平、IFN- γ 水平,均显著高于空白对照组($P < 0.01$),(见表 3)。

表1 单糖标准曲线

Table 1 Standard curve of monosaccharides

单糖 Monosaccharides	标准曲线 Standard curve		
	线性方程 Linear equation	<i>r</i>	线性范围 Linearity range ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
甘露糖 Mannose	$y = 116.81x - 5.57$	0.999	2.67 ~ 13.33
核糖 Ribose	$y = 127.78x - 7.04$	0.999	2.67 ~ 13.33
鼠李糖 Rhamnose	$y = 98.90x - 8.55$	0.999	2.67 ~ 13.33
葡萄糖醛酸 Gucturonic acid	$y = 110.08x - 39.07$	0.998	2.67 ~ 13.33
半乳糖醛酸 Galacturonic acid	$y = 104.24x - 19.59$	0.999	2.67 ~ 13.33
葡萄糖 Glucose	$y = 111.03x - 44.27$	0.999	2.67 ~ 13.33
半乳糖 Galactose	$y = 117.48x - 18.27$	0.999	2.67 ~ 13.33
木糖 Xylose	$y = 124.69x - 16.61$	0.999	2.67 ~ 13.33
阿拉伯糖 Arabinose	$y = 140.26x - 24.13$	0.999	2.67 ~ 13.33
岩藻糖 Fucose	$y = 101.64x - 29.80$	0.997	2.67 ~ 13.33

表2 AKP-2a 单糖含量测定

Table 2 Determination of AKP-2a monosaccharide content

单糖 Monosaccharides	保留时间 Retention time (min)	峰面积 Peak area	含量 Content (g/kg)
甘露糖 Mannose	16.339	9229.1	15.50
核糖 Ribose	21.453	258.1	0.42
鼠李糖 Rhamnose	22.024	5967.3	11.13
葡萄糖醛酸 Gucturonic acid	27.641	2664.3	5.12
半乳糖醛酸 Galacturonic acid	31.747	35012.7	65.68
葡萄糖 Glucose	36.142	11604.5	18.50
半乳糖 Galactose	41.894	13489.3	37.33
木糖 Xylose	43.449	1836.0	3.49
阿拉伯糖 Arabinose	45.671	7536.6	10.36
岩藻糖 Fucose	51.516	2861.1	6.54

表3 AKP-2a 对小鼠腹腔巨噬细胞功能的影响 ($n=5, \bar{x} \pm s$)Table 3 The effect of AKCP on the function of mice peritoneal macrophages ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别 Group	浓度 Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	一氧化氮 Content of NO ($\mu\text{mol}/\text{L}$)	干扰素 γ IFN- γ (pg/mL)
空白对照 Control	0	1.95 ± 0.63	37.72 ± 27.63
脂多糖 LPS	5	$15.39 \pm 4.13^*$	$117.28 \pm 56.99^*$
AKP-2a 低浓度 AKP-2a-L	25	$6.62 \pm 0.95^*$	$97.50 \pm 23.64^*$
AKP-2a 中浓度 AKP-2a-M	50	$7.35 \pm 2.07^*$	$149.61 \pm 27.14^*$
AKP-2a 高浓度 AKP-2a-H	100	$10.43 \pm 1.10^*$	$186.11 \pm 14.92^*$

注:与空白对照组比较, * $P < 0.01$ 。Note: Compared with control group, * $P < 0.01$.

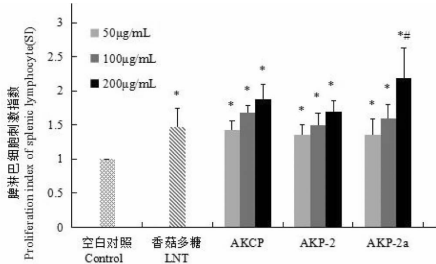


图5 AKCP、AKP-2、AKP-2a 对体外培养小鼠脾淋巴细胞增殖水平的影响 ($n=7, \bar{x} \pm s$)

Fig. 5 Effects of AKCP、AKP-2、AKP-2a on the level of lymphocyte proliferation *in vitro* ($n=7, \bar{x} \pm s$)

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$;与香菇多糖组、AKCP 和 AKP-2 高、中、低浓度组、AKP-2a 中、低浓度组比较, # $P < 0.05$ 。

Note: Compared with control group, * $P < 0.05$; Compared with LNT, AKCP-H, AKCP-M, AKCP-L, AKP-2-H, AKP-2-M, AKP-2-L, AKP-2a-M, AKP-2a-L, # $P < 0.05$.

3 结论

目前,植物来源多糖分离纯化及免疫活性研究日益广泛^[9-11],而有关雪灵芝多糖的分离、纯化及活性研究方面报道较少。国内彭光华等^[12]对西藏来源的雪灵芝提取粗多糖,采用 DEAE-52 离子交换柱进行色谱分离获得 5 个多糖组分,其中蒸馏水洗脱的第 1 峰和 $0.13 \text{ M} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 洗脱的第 4 峰组分,经 2 次葡聚糖凝胶 G-75 柱分离,获得单一对称峰的 MAP1 和 MAP4 组分;通过气相色谱法分析这 2 个组分中的 6 种单糖组成,结果显示以甘露糖、葡萄糖、半乳糖含量较高。

本研究选择青海分布最广、资源量最大的甘肃雪灵芝为原料,水提醇沉法提取雪灵芝粗多糖,经去除蛋白、色素后,采用 DEAE-52 纤维素柱色谱分离到 1 个中性和 4 个酸性多糖组分 (AKP-1 ~ AKP-5) 然而这 5 个多糖组分在洗脱的盐浓度梯度、各峰高度及峰面积方面,与彭光华等人的色谱图有所差异。另外,本研究选择 0.1 mol/L NaCl 洗脱的第 2 峰多糖组分 (AKP-2) 经过 1 次葡聚糖凝胶 G-75 柱色谱分离,获得单一峰 AKP-2a 组分。经高效液相色谱法分析 10 种单糖组成,显示 AKP-2a 以半乳糖糖醛酸含量最高,其次分别为半乳糖、葡萄糖及甘露糖。以上差异,提示不同地区分布的野生雪灵芝种类、种群间多糖的组成可能存在差异,而且不同盐浓度梯度洗脱组分的单糖组成有所不同。本研究通过 DEAE-52 纤维素柱层析、葡聚糖凝胶 G-15 柱脱盐及葡聚糖凝胶 G-75 柱层析,使雪灵芝多糖的总糖含量从

粗多糖 AKCP 的 52%,逐步提高到 AKP-2 的 70% 以及 AKP-2a 的 79%,表明上述方法可有效分离纯化雪灵芝多糖。

脾淋巴细胞增殖是适应性免疫激活的重要环节^[13,14]。本研究结果显示,在 $50 \sim 200 \mu\text{g/mL}$ 浓度范围,AKCP、AKP-2、AKP-2a 均显示出浓度依赖性的促进体外培养小鼠脾淋巴细胞增殖的活性,其中以 AKP-2a 高浓度组最为明显。巨噬细胞是固有性免疫的重要组成,IFN- γ 表达及 NO 释放水平,是其活化的主要标志。本研究结果,在 $25 \sim 100 \mu\text{g/mL}$ 浓度范围,AKP-2a 对于体外培养的小鼠腹腔巨噬细胞中二者的表达,显示出显著的浓度依赖性刺激作用,与我们之前的研究结果^[3]相比,显示出对巨噬细胞更强的激活作用。即 AKP-2a 在 $100 \mu\text{g/mL}$ 浓度下达到的激活效应,与粗多糖在 $200 \mu\text{g/mL}$ 浓度下达到的激活效应相当。上述结果提示,本研究通过分离纯化所获得的雪灵芝多糖 AKP-2a,保持了对适应性、固有性免疫细胞的激活作用并有所增强。这为今后进一步开展雪灵芝多糖的分子结构及免疫激活机制方面的研究打下了一定基础。

参考文献

- 1 Luo DS. Chinese Herbal Medicine(中华藏本草)[M]. Beijing:China National Press,1997:6.
- 2 Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences. Tibetan Medicine(藏药志)[M]. Xining: Qinghai People's Publishing House,1991:449.
- 3 Liu ZG, Kang HL, Cui Y, et al. Research and investigation in germplasm resources of *Kansu sandwort* herbs in Qinghai province[J]. Lishizhen Med Mate Med Res(时珍国医国药),2016,27:2996-2999.
- 4 Gao XX, Wang G, Zhang H, et al. Activation effect of crude polysaccharide from *Arenaria kansuensis* on proliferation and function of murine immunocyte *in vitro*[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2017,29:1188-1192.
- 5 Gao XX, Wang G, Yang XR, et al. Effects of crude polysaccharide from *Arenaria kansuensis* on immune functions of immunosuppression mice induced by cyclophosphamide[J]. Immunol J(免疫学杂志),2017,33:191-196.
- 6 Yang XR, Wang G, Ji LB, et al. Effects of *Arenaria kansuensis* aqueous extract on immune function of H22 tumor-bearing mice[J]. Cancer Res Prev Treat(肿瘤防治研究),2015,42:662-665.
- 7 Wang G, Wang HY, Zhang H, et al. Effects of *Arenaria kansuensis* aqueous extract on lymphocytes proliferation and Th1

- cytokine production[J]. Chin J Immun(中国免疫学杂志), 2013,29:905-909.
- 8 Wang G, Zhang H, Yang XR, et al. Effect of *Arenaria kansuensis* aqueous extract on proliferation and cell cycle of human gastric cancer cell line MGC-803[J]. Cancer Res Prev Treat(肿瘤防治研究), 2013,40:821-825.
- 9 Wang L, Wang C, Gao X, et al. Purification, characterization and anti-aging capacity of mycelia zinc polysaccharide by *Lentinusedodes*, SD-08[J]. BMC Complem Altern M, 2015, 15:111.
- 10 Li Q, Zhao T, Bai S Q, et al. Water-soluble polysaccharides from leaves of *Abelmoschus esculentus*: purification, characterization, and antioxidant activity[J]. Chem Nat Compounds, 2017,53:412-416.
- 11 Liu L, Shang Q, Liu F, et al. Polysaccharides from the leaves of *Lonicera japonica* [J]. Chem Nat Compounds, 2016, 52(2):1-2.
- 12 Peng GH, Zhu Y, Xu QX. Infrared spectrum and gas chromatography analysis of the polysaccharides separation from *Arenaria kansuensis maxim*[J]. China Pharmacist(中国药师), 2009,12:1557-1560.
- 13 Killick J, Morisse G, Sieger D, et al. Complement as a regulator of adaptive immunity[J]. Semin Immunopathol, 2018, 40(1):37-48.
- 14 Wang Y, Qi Q, Li A, et al. Immuno-enhancement effect of Yifei Tongluo Gramules on cyclophosphamide-induced immunosuppression in Balb/c mice[J]. J Ethnopharmacol, 2016, 194:72-82.

《天然产物研究与开发》青年编委会

青年编委(以姓氏笔划为序)

Members

王红兵	戈惠明	尹文兵	尹 胜	吕兆林	刘相国
WANG Hongbing	GE Huiming	YIN Wenbing	YIN Sheng	LV Zhaolin	LIU Xiangguo
孙昊鹏	孙桂波	李良成	李国友	邱 莉	汪海波
SUN Haopeng	SUN Guibo	LI Liangcheng	LI Guoyou	QIU Li	WANG Haibo
沐万孟	张炳火	陈益华	林昌俊	欧阳杰	易华西
MU Wanmeng	ZHANG Binghuo	CHEN Yihua	LIN Changjun	OU Yangjie	YI Huaxi
罗应刚	周 文	胡友财	袁 涛	夏永刚	高慧敏
LUO Yinggang	ZHOU Wen	HU Youcai	YUAN Tao	XIA Yonggang	GAO Huimin
唐金山	黄胜雄	韩秀珍	韩淑燕	曾克武	蓝蔚青
TANG Jinshan	HUANG Shengxiong	HAN Xiuzhen	HAN Shuyan	ZENG Kewu	LAN Weiqing
廖晨钟	薛永波				
LIAO Chenzhong	XUE Yongbo				