

# 白鲜皮多糖纯化、结构表征以及抗过敏研究

刘冬<sup>1\*</sup>, 韩吉欣<sup>2</sup>, 张云<sup>1,2</sup>, 刘娟<sup>2</sup>, 向育铭<sup>2</sup>, 曹玉华<sup>2</sup>

<sup>1</sup>绿叶日用品有限公司, 苏州 215151; <sup>2</sup>江南大学化学与材料工程学院, 无锡 214122

**摘要:**从白鲜皮(*Cortex Dictamni*)中分离纯化获得的白鲜皮多糖(*Cortex Dictamni polysaccharides*, CDPS), 并经 DEAE 柱分离得到两个多糖组分 CDPS-1 和 CDPS-2, 对其进行结构表征, 同时考察 CDPS 的抗过敏活性。采用高效凝胶过滤色谱(GFC)、离子色谱(IC)、红外光谱(IR)对 CDPS-1 的分子质量, 单糖组成和糖苷键类型进行分析。采用 CCK-8 法检测 CDPS 对 RBL-2H3 细胞的毒性; 以 C48/80 诱导 RBL-2H3 细胞发生脱粒释放  $\beta$  氨基己糖苷酶( $\beta$ -HEX) 为指标, 通过测定 CDPS 抑制 C48/80 诱导的 RBL-2H3 脱颗粒, 检测 CDPS 抗过敏活性; 通过改良的红细胞溶血实验, 检测 CDPS 对细胞膜的保护性能; 通过 DPPH 自由基清除实验, 检测 CDPS 抗氧化能力。结果显示: CDPS-1 以  $\alpha$ -糖苷键为主, 由岩藻糖、葡萄糖、木糖、鼠李糖、半乳糖组成, 摩尔比为 0.41:1.38:3.15:15.4:79.61, 分子质量为 2 577 Da; 当 CDPS-1 给药浓度为 1 mg/mL 时, 对 RBL-2H3 细胞活化脱粒释放  $\beta$ -HEX 的抑制率达 28.54%; 在浓度为 5 mg/mL 的浓度下, CDPS 保护下的 RBC 溶血抑制率达到 62.1%; 浓度为 10 mg/mL 的条件下, CDPS 对 DPPH 的清除率达到 40.06%。证明 CDPS 具有抗敏能力, 有一定的抗敏应用价值。

**关键词:**白鲜皮多糖; 分离纯化; 结构; 抗过敏

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021)10-1627-08

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.10.001

## Purification, structure characterization and antiallergic activity of *Cortex Dictamni* polysaccharides

LIU Dong<sup>1\*</sup>, HAN Ji-xin<sup>2</sup>, ZHANG Yun<sup>1,2</sup>, LIU Juan<sup>2</sup>, XIANG Yu-ming<sup>2</sup>, CAO Yu-hua<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Green Leaf Daily Necessities Co., Ltd., Suzhou 215151, China;

<sup>2</sup>School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

**Abstract:** *Cortex Dictamni* polysaccharides (CDPS) was isolated from *Cortex Dictamni*, and was purified through DEAE column to obtain two kinds of polysaccharides (CDPS-1 and CDPS-2). The molecular structure of CDPS was characterized, and the anti-allergic activity was investigated. The molecular weight, monosaccharide composition and glycosidic bond type of CDPS-1 were analyzed by high performance gel filtration chromatography (GFC), ion chromatography (IC) and infrared spectroscopy (IR). CCK-8 was used to evaluate the toxicity of CDPS to RBL-2H3 cells. C48/80 as an irritant induces RBL-2H3 cells to degranulate and release  $\beta$ -hexosidase ( $\beta$ -HEX). So, the anti-allergic activity of CDPS can be evaluated by inhibiting the release of  $\beta$ -HEX from RBL-2H3 cells induced by C48/80. The protective effect of CDPS on cell membrane was assessed by improved erythrocyte hemolysis test. The CDPS anti-oxidation was investigated through scavenging DPPH free radical. The results showed that CDPS-1 was mainly composed of fucose, glucose, xylose, rhamnose and galactose with the molar ratio was 0.41:1.38:3.15:15.4:79.61. The relative molecular weight of CDPS-1 was 2 577 Da. When the concentration of CDPS-1 was 1 mg/mL, the inhibition rate of CDPS-1 on  $\beta$ -HEX release from RBL-2H3 cells was 28.54%. At the concentration of 5 mg/mL, the hemolysis inhibition rate of red blood cell (RBC) under the protection of CDPS was 62.1%. When the concentration was 10 mg/mL, the scavenging rate of CDPS to DPPH was 40.06%. The results show that CDPS has an anti-allergy ability and has potential application in cosmetics.

**Key words:** *Cortex Dictamni* polysaccharides; isolation and purification; structure; anti-allergy

收稿日期: 2020-12-24 接受日期: 2021-08-17

基金项目: 国家自然科学基金(51903108)

\* 通信作者 Tel: 86-512-81880888; E-mail: daniel.liu@szgreenleaf.com

白鲜皮为芸香科植物白鲜(*Dictamnus dasycarpus* Turcz.) 的干燥根皮, 含多糖、黄酮、生物碱、

甾体类化合物等成分,具有清热燥湿、湿热疮毒、祛风解毒等功效,可用于治疗足癣、荨麻疹、皮肤疹痒、湿疹等皮肤病,具有较强的抗过敏及止痒作用<sup>[1]</sup>。中草药中提取的多糖种类繁多,结构复杂,且很大一部分具有促进免疫调节、抗氧化、抗炎、抗病毒、抗肿瘤等多种生物活性<sup>[2-4]</sup>。

化妆品引起的皮肤过敏是近年来消费者主要关心的安全性问题<sup>[5]</sup>。引起皮肤过敏的主要原因是IgE介导的I型超敏反应,经过过敏源致敏、肥大细胞激活脱粒、免疫细胞应答等一系列复杂过程,最终导致过敏反应的发生<sup>[6]</sup>。肥大细胞是过敏反应中的效应细胞,在过敏性皮肤病以及炎症过程中发挥着重要作用<sup>[7]</sup>。皮肤过敏还与皮肤的屏障功能、神经因素以及炎症反应有着密不可分的联系<sup>[8]</sup>。

大鼠嗜碱性白血病粒细胞 RBL-2H3 (rat basophilic leukemia cells, RBL-2H3) 是大鼠嗜碱性粒细胞肿瘤株的一个亚系,细胞表面富含大量 IgE 高亲和力受体,具有肥大细胞的多种生物学特性,是公认的能够传代培养的肥大细胞体外替代模型。 $\beta$ -氨基己糖苷酶( $\beta$ -HEX)是肥大细胞的标志性颗粒,也是肥大细胞脱颗粒研究中的主要的介质<sup>[9,10]</sup>,肥大细胞在被人工合成的多胺类化合物刺激剂 C48/80 (Compound 48/80)<sup>[11]</sup> 刺激后会脱颗粒,在此期间 $\beta$ -HEX 的释放水平与肥大细胞脱颗粒的程度一致,与组胺释放呈正相关,因此其常检测作为肥大细胞脱颗粒的指标<sup>[12-15]</sup>。细胞膜是皮肤屏障作用的重要部分,改进后的红细胞(red blood cell, RBC)溶血实验可以通过红细胞中漏出的血红蛋白的量来判断抗敏活性物质对细胞膜的保护功能<sup>[8,16,17]</sup>。另外人体内的自由基会攻击细胞膜和蛋白质从而导致细胞衰老死亡,抑制自由基的活性可有效缓解由自由基引起的细胞老化,维护皮肤屏障作用<sup>[18]</sup>。

Zhao 等<sup>[19]</sup>发现白鲜皮粗提物抑制 C48/80 诱导肥大细胞脱颗粒,减少组胺及 $\beta$ -HEX 释放,具有抗敏功效;Zhang 等<sup>[20]</sup>分离出一种纯净的白鲜皮多糖,并在硫酸酯化修饰后验证其具有抗银屑病的功效;Shi 等<sup>[21]</sup>通过小鼠耳廓肿胀实验和小鼠毛细血管通透性实验验证了其抗炎活性;Cong 等<sup>[22]</sup>验证了白鲜皮水提物可抑制 DNCB 诱导的小鼠迟发型变态反应(DTH),且具有抑制小鼠特异性细胞免疫的功能。截止到目前,对于白鲜皮粗提物的抗敏作用虽然有了一些研究进展,但还未有研究验证白鲜皮水提物中的主要成分——白鲜皮多糖的抗敏功效。

所以本实验对白鲜皮多糖进行提取分离,并对其成分进行了理化分析;以抗敏功效为研究目的进行了抑制 RBL-2H3 肥大细胞脱颗粒实验等检测分析,为研究白鲜皮多糖作为抗敏物质提供了理论基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料

白鲜皮(北京同仁堂,批号 202009);填料 DE-AE Fast Flow(博格隆生物技术有限公司,编号 A10032);木瓜蛋白酶(上海蓝季科技发展有限公司,批号 131025);RBL-2H3 细胞(北纳创联生物技术有限公司,批号 100222);MEN-EBSS 培养基(Hyclone,批号 AF29496678);胎牛血清(gibco,批号 FBS-PA011019);PBS 缓冲溶液(Cytiva,批号 AF29561133);Compound 48/80(Sigma,批号 0000101308);对硝基苯-N-乙酰- $\beta$ -D-氨基葡萄糖苷(Sigma,批号 SLBR7548V);新鲜兔血(江南大学实验动物中心);十二烷基磺酸钠 SDS(国药集团化学试剂有限公司,批号 20171116);其他试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与amp;设备

Waters 1525EF 高效液相色谱仪(美国沃特世公司);ICS5000 离子色谱仪(美国戴安公司);Nicolet 6700 全反射傅里叶红外光谱仪(美国赛默飞世尔科技有限公司);全波长酶标仪(美国赛默飞世尔科技有限公司)

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 白鲜皮多糖的提取、分离、纯化

取白鲜皮 50 g,研磨,过 20 目筛后石油醚超声 30 min 去脂。待石油醚自然挥发后将粉末浸泡于 60% 乙醇溶液中过夜,采取料液比 1:15 于 95 °C 冷凝回流 2 h,过滤,重复以上步骤 2 次,合并滤液,减压浓缩。在浓缩液中分三次加入蒸馏水 100 mL,离心抽滤,加入 5 倍体积乙醇醇沉。沉淀复溶于去离子水中,按 1.5 g/L 的比例加入木瓜蛋白酶,60 °C 水浴 2 h 后,于 95 °C 下灭酶活 30 min,然后用 Savage 法去蛋白,其中 V(氯仿):V(正丁醇) = 4:1, V(Savage 试剂):V(样液) = 5:1,充分振荡后离心,小心取上清液,重复操作直至中间无蛋白层出现。再次加入 5 倍体积乙醇醇沉,沉淀依次用丙酮和无水乙醇洗涤 2 次,复溶于去离子水中,透析一周,冻干得白鲜皮多糖(Cortex Dictamni polysaccharides, CDPS)

称取 50 mg CDPS,溶于 10 mL 去离子水中,过

0.45  $\mu\text{m}$  滤膜后经 DEAE Fast Flow (50 cm  $\times$  1 cm) 离子交换柱纯化,超纯水洗脱,每管收集 5 mL 洗脱液,并利用苯酚硫酸法测定每管的吸光度 A<sub>490</sub>,绘制洗脱曲线。收集主要洗脱组分,冻干得白鲜皮多糖 CDPS-1 和 CDPS-2。

### 1.3.2 白鲜皮多糖的总糖和蛋白含量测定

分别利用苯酚硫酸法<sup>[23]</sup>和考马斯亮蓝 G-250 法<sup>[24]</sup>测定总糖和蛋白含量。得率按公式(1)计算,总糖和蛋白含量按公式(2)计算:

$$\text{白鲜皮多糖} = m_1/m_2 \times 100\% \quad (1)$$

式中: $m_1$ :提取液中总糖质量或 CDPS-1、CDPS-2 的质量(g); $m_2$ :白鲜皮的质量(g)。

$$\text{总糖或总蛋白含量} = m_1/m_2 \times 100\% \quad (2)$$

式中: $m_1$ :测定的 CDPS、CDPS-1、CDPS-2 中的总糖或蛋白的质量(g); $m_2$ :CDPS、CDPS-1、CDPS-2 的质量(g)。

### 1.3.3 白鲜皮多糖的相对分子量和单糖组成分析

利用高效凝胶过滤色谱(high performance size exclusion chromatography, HPGFC)法测定白鲜皮多糖样品的分子量,由葡聚糖标准品(Mw:0.18、2.7、

9.75、13.5、30 和 200 kDa) 得到标准曲线。色谱条件如下:Waters 1525EF 高效液相色谱仪;2410 示差折光检测器;Empower 工作站;Ultrasphere<sup>TM</sup> Linear 300 mm  $\times$  7.8 mm 色谱柱;流动相 0.1 mol/L NaNO<sub>3</sub> 水溶液;流速 0.8 mL/min;柱温 40  $^{\circ}\text{C}$ ;进样量 50  $\mu\text{L}$ 。

称取 5 mg 白鲜皮多糖样品,分别加入 2 mol/L 三氟乙酸 300  $\mu\text{L}$ ,100  $^{\circ}\text{C}$  下降解 12 h,氮气吹干,加入 200  $\mu\text{L}$  甲醇,吹干,重复操作 3 次以除去三氟乙酸,然后定容至 25 mL。使用离子色谱仪(脉冲安培检测器)进行色谱分析,色谱条件如下:赛默飞戴安 ICS-5000 + 高压离子色谱仪(采用 Dionex Carbo<sup>TM</sup> PA20 3  $\times$  150 mm 色谱柱,柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ ,流速:0.5 mL/min,进样量:20  $\mu\text{L}$ )洗脱程序如表 1 所示。分别配制单糖混合标准溶液 1 mg/mL(岩藻糖、鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、甘露糖、果糖、半乳糖醛酸、葡萄糖醛酸),按照上述离子色谱方法进行色谱分析,根据标准品的保留时间和峰面积,可以确定多糖样品中的单糖组成和摩尔百分比。

表 1 离子色谱洗脱程序

Table 1 The elution program of ion chromatography

时间 Time(min)	H <sub>2</sub> O(%)	NaOH(%)	NaAc(%)
0.0	97.8	2.2	0.0
13.0	97.8	2.2	0.0
13.1	92.8	2.2	5.0
20.0	78.8	2.2	20.0
21.0	20.0	80.0	0.0
30.0	20.0	80.0	0.0

注:NaOH 和 NaAc 的浓度分别为 250 mmol/L 和 1 mol/L。

Note:The concentrations of NaOH and NaAc were 250 mmol/L and 1 mol/L, respectively.

### 1.3.4 白鲜皮多糖的 FT-IR 分析

取干燥的白鲜皮多糖样品 1~2 mg,在 600~4000  $\text{cm}^{-1}$  内进行全反射傅里叶红外检测。

### 1.3.5 RBL-2H3 细胞培养

取 RBL-2H3 细胞(购于北纳创联生物技术研究院),37  $^{\circ}\text{C}$  解冻,将其完全置于培养基中(含 10% 胎牛血清的 MEM-EBSS),37  $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养,每 2 天进行一次传代。

### 1.3.6 RBL-2H3 细胞活性的检测

采用 CCK-8 细胞活力检测试剂盒检测。取出处于对数生长周期的 RBL-2H3 细胞,消化制备成细胞悬液,用完全培养基将细胞浓度调整至  $2.0 \times 10^5$

个/mL,每孔 100  $\mu\text{L}$  加入到 96 孔板中,37  $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中贴壁 12 h。弃上清,分别加入用 MEM-EBSS 培养基稀释的不同浓度的 CDPS 样品 100  $\mu\text{L}$  (10、5、1、0.5、0.1 mg/mL),每组设置 3 复孔。设置对照组(不加入 CDPS 的细胞孔)和空白组(不接种细胞的空白组)。37  $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 24 h 后各孔中加入含 10% 的 CCK-8 培养基溶液 100  $\mu\text{L}$  (上海碧云天生物技术有限公司),恒温箱避光孵育 2 h,经轻微震荡,于酶标仪检测波长 450 nm 测定各孔 OD 值。细胞活性通过公式(3)计算得到。

细胞活性 =

$$(OD_{CDPS} - OD_{空白}) / (OD_{对照} - OD_{空白}) \times 100\% \quad (3)$$

### 1.3.7 RBL-2H3 细胞活化脱颗粒 $\beta$ -HEX 的检测

取出处于对数生长周期的 RBL-2H3 细胞,消化制备成细胞悬液,用完全培养基将细胞浓度调整至  $2.0 \times 10^5$  个/mL,接种至 24 孔板中,每孔 1 000  $\mu$ L,置于培养箱培养 12 h 后,弃上清,PBS 缓冲液清洗两次。分别加入用 MEM-EBSS 培养基稀释的不同浓度的 CDPS 样品 1 000  $\mu$ L (10、5、1、0.5、0.1 mg/mL),同时设置 3 个复孔,并命名为给药组;设置对照组和空白组(不加入 CDPS 样品的细胞孔)。37  $^{\circ}$ C,5%  $CO_2$  培养箱中孵育 2 h。弃上清,PBS 缓冲液清洗两次,给药组及模型组每孔加入 1 000  $\mu$ L 浓度为 100  $\mu$ L/mL 的 Compound 48/80 培养基溶液,空白组用等量培养基替代,置于培养箱中孵育 40 min 后,冰水浴 10 min。收集各组上清液,每孔取 50  $\mu$ L 加入 96 孔板,加入 50  $\mu$ L 显色液(含 1 mmol/L 对硝基苯-*N*-乙酰- $\beta$ -D-氨基葡萄糖苷的柠檬酸/柠檬酸钠缓冲溶液),37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后,加入 200  $\mu$ L 终止液( $Na_2CO_3$ - $NaHCO_3$  缓冲溶液)终止反应,于酶标仪检测波长 405 nm 下测定各孔 OD 值。通过公式(4)计算得到  $\beta$ -HEX 释放抑制率。

$\beta$ -HEX 释放抑制率 =

$$[1 - (OD_{给药} - OD_{空白}) / (OD_{对照} - OD_{空白})] \times 100\% \quad (4)$$

### 1.3.8 RBC 溶血实验

采集新鲜兔血,用 PBS 多次混洗离心去上清后,将沉淀部分稀释至 50%,用含 0.1% SDS 的 PBS 溶液将其稀释至不同浓度(0.5% ~ 5%),室温下 180 rpm 摇床孵育 10 min,11 180 g 离心 1 min,取出 200  $\mu$ L 上清液于 530 nm 处检测 OD 值。选择 OD 值在 2 ~ 2.5 范围内的 RBC 浓度,分别加入不同浓度 SDS 的 PBS 溶液(0.01% ~ 0.1%),设置阳性对照组和阴性对照组,重复上述步骤,检测 SDS 浓度对细胞溶血的影响。溶血率计通过公式(5)计算得到。

$$\text{溶血率} = (OD_{实验} - OD_{阴性对照}) / (OD_{阳性对照} - OD_{阴性对照}) \times 100\% \quad (5)$$

选取溶血率 50% ~ 70% 范围内 SDS 刺激浓度,OD 值在 2 ~ 2.5 范围内的 RBC 浓度,加入不同浓度 CDPS 样品溶液(10 ~ 0.1 mg/mL),设置阳性对照组和阴性对照组,重复上述步骤,测定样品于 SDS 共同作用后的红细胞溶血率。红细胞的抑制率通过公式(6)计算得到。

抑制率 = (1 - CDPS 保护溶血率 /

$$\text{实验浓度 SDS 刺激溶血率}) \times 100\% \quad (6)$$

### 1.3.9 DPPH 清除实验

配置不同浓度的 CDPS 样品水溶液和维生素 C 溶液(0.1 ~ 10 mg/mL),将 100  $\mu$ L 样品溶液加入 96 孔板中,加入 0.1 mmol/L 的 DPPH 乙醇溶液 100  $\mu$ L,同时设置 3 个复孔,命名为给药组;设置对照组和空白组,对照组加入 100  $\mu$ L 水 + 100  $\mu$ L DPPH 乙醇溶液,空白加入 100  $\mu$ L 的样品溶液 + 100  $\mu$ L 的无水乙醇,同时设置 3 个复孔;室温避光显色 30 min,517 nm 处检测 OD 值。

## 1.4 数据分析

所有实验均重复 3 次,结果表示为平均值  $\pm$  标准偏差( $\bar{x} \pm s$ )。采用 SPSS 软件进行单因素方差分析(ANOVA), $P < 0.05$  表示差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 白鲜皮多糖纯化和结构表征

#### 2.1.1 白鲜皮多糖的分离

白鲜皮多糖 CDPS 经过离子交换层析(DEAE Fast Flow)用水和 0.1 mol/L 的氯化钠洗脱,洗脱曲线见图 1,洗脱后得两个吸光度值较高的洗脱峰,分别命名为 CDPS-1 和 CDPS-2,冻干备用。

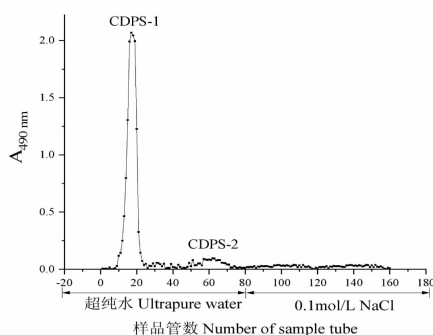


图 1 DEAE Fast Flow 色谱柱洗脱曲线

Fig. 1 Elution curve of DEAE Fast Flow column

#### 2.1.2 白鲜皮多糖的总糖和总蛋白含量测定

根据苯酚硫酸法和考马斯亮蓝 G-250 法分别测得 CDPS、CDPS-1、CDPS-2 的总糖和总蛋白含量。结果如表 2 所示,CDPS 和 CDPS-1 的总糖含量超过 99%,蛋白含量均低于 0.05%;CDPS-2 得率低于 0.05%。

#### 2.1.3 白鲜皮多糖 CDPS-1 的分子质量和单糖组成分析

对含量较高的 CDPS-1 进行了表征。HPGFC 测定结果如图 2 和表 3 所示,色谱图出现一个单峰,确

表 2 白鲜皮多糖的得率、总糖和蛋白含量

Table 2 Yield, total sugar and protein content of CDPS

多糖样品 Polysaccharide sample	得率 Yield (%)	总糖含量 Total sugar (%)	蛋白含量 Protein content (%)
CDPS	7.33 ± 0.24	99.3 ± 0.24	0.49 ± 0.07
CDPS-1	3.54 ± 0.18	99.7 ± 0.11	0.00 ± 0.10
CDPS-2	≤ 0.05	-	-

认 CDPS-1 为单一组分, 分子量为 2 577 Da。单糖组成的结果如表 4 所示, CDPS-1 主要由岩藻糖, 葡萄糖、木糖、鼠李糖、半乳糖组成, 摩尔比为 0.41: 1.38: 3.15: 15.4: 79.61。

#### 2.1.4 白鲜皮多糖的 FT-IR 分析

由图 3 可知, CDPS-1 在 3 313  $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰属于 -OH 的伸缩振动, 在 2 925  $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰是 C-H 的伸缩振动, 1 639  $\text{cm}^{-1}$  的吸收峰归因于羧基的 C=O 键的振动, 1 410 和 1 341  $\text{cm}^{-1}$  的吸收峰属于  $\delta$ -CH<sub>2</sub> 的弯曲振动, 1 147 和 1 076  $\text{cm}^{-1}$  的吸收峰归

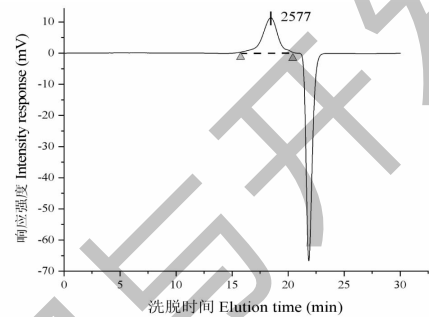


图 2 CDPS-1 的 HPGFC 色谱图

Fig. 2 HPGFC chromatogram of CDPS-1

表 3 CDPS-1 的 HPGFC 测定结果

Table 3 HPGFC determination of CDPS-1

样品名称 Sample name	保留时间 Retention time (min)	Mp	Mw	Mn	多分散性 Polydispersity
CDPS-1	18.46	2 577	5 756	2 052	2.81

表 4 CDPS-1 单糖组成离子色谱分析结果

Table 4 Analysis of monosaccharide composition of CDPS-1 with ion chromatography

组别 Group	标准品 Standard		相对校正因子 Relative correction factor	CDPS-1 样品 CDPS-1 sample		摩尔百分比 Molar percentage (%)	
	摩尔浓度 Molarity ( $\mu\text{mol/L}$ )	保留时间 Retention time (min)		峰面积 Peak area (%)	保留时间 Retention time (min)		峰面积 Peak area (%)
岩藻糖 Fucose	3.00	2.88	9.55	5.65	2.83	0.36	0.41
鼠李糖 Rhamnose	3.00	5.70	4.90	2.90	5.23	6.89	15.4
阿拉伯 Arabinose	3.30	5.82	11.1	7.20	-	-	-
半乳糖 Galactose	2.70	7.28	11.0	5.85	7.22	88.5	79.6
葡萄糖 Glucose	2.70	8.35	6.57	3.50	8.33	0.92	1.38
木糖 Xylose	3.00	9.76	11.6	6.89	9.56	3.34	3.15
甘露糖 Seminose	2.70	10.0	6.13	3.26	-	-	-
果糖 Fructose	2.70	11.5	4.58	2.44	-	-	-
半乳糖醛酸 Galacturonic acid	2.60	19.0	1.95	1.00	-	-	-
葡萄糖醛酸 Glucuronic acid	2.60	19.7	2.05	1.05	-	-	-

由于 C-O-C 和 C-O 的伸缩振动,  $1\ 011\ \text{cm}^{-1}$  的吸收峰表明存在吡喃糖环,  $922$  和  $846\ \text{cm}^{-1}$  的吸收峰属于  $\alpha$  型糖苷键, 上述特征表明 CDPS-1 是以  $\alpha$  型糖苷键为主的多糖化合物。

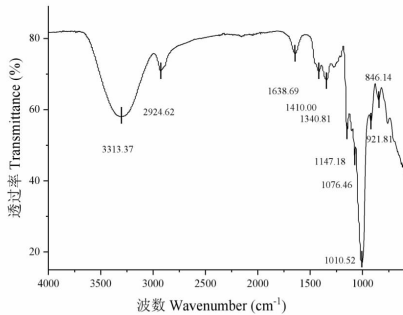


图3 CDPS-1 的红外光谱图

Fig. 3 Infrared spectrum of CDPS-1

## 2.2 白鲜皮多糖抗过敏性能研究

### 2.2.1 CDPS 对 RBL-2H3 细胞脱颗粒释放 $\beta$ -HEX 的抑制作用

#### 2.2.1.1 细胞活性检测

CDPS 对 RBL-2H3 细胞活性的影响如图 4 所示, RBL-2H3 细胞与浓度范围在  $0.1 \sim 10\ \text{mg/mL}$  的 CDPS 共培养 24 h 后, 细胞活性均高于 95%, 证明在此浓度范围内 CDPS 样品对细胞无毒性影响, 可用于后续实验中。

#### 2.2.1.2 CDPS 对 RBL-2H3 细胞脱颗粒释放 $\beta$ -HEX 的抑制作用

肥大细胞是 I 型变态反应炎症反应的核心效应细胞。RBL-2H3 具有与肥大细胞相似的细胞结构, 细胞表面具有和肥大细胞相同的高亲和力  $\text{Fc}\epsilon\text{R}1$  受体, 并且其能模拟肥大细胞的多种功能(如脱颗粒), 且具有可传代培养和性状稳定等优点, 是研究与肥大细胞相关的生理、病理和药物作用机制的理想替代模型。 $\beta$ -HEX 是 RBL-2H3 细胞脱颗粒的主

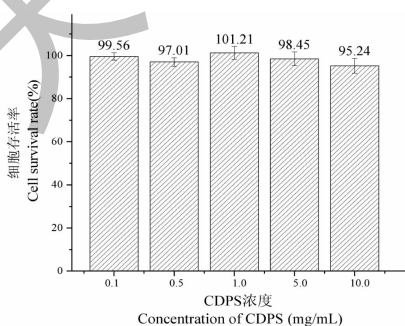


图4 CDPS 对 RBL-2H3 细胞存活率的影响

Fig. 4 Effect of CDPS on cell viability of RBL-2H3

要研究介质。当 RBL-2H3 细胞受到刺激后脱颗粒释放的  $\beta$ -HEX 会分解对硝基苯-N-乙酰- $\beta$ -D-氨基葡萄糖苷, 在  $405\ \text{nm}$  处出现吸光度峰值, 以此来监测  $\beta$ -HEX 的释放率。在 CDPS 与 RBL-2H3 细胞共培养后刺激脱粒, 计算可得 CDPS 对 RBL-2H3 细胞脱颗粒释放  $\beta$ -HEX 的抑制作用, 如图 5 所示, CDPS 样品在  $0.1 \sim 10\ \text{mg/mL}$  的浓度范围内对  $\beta$ -HEX 的释放均有抑制作用; 在  $0.1 \sim 1.0\ \text{mg/mL}$  的浓度范围内, 抑制率呈上升趋势; 在  $1 \sim 10\ \text{mg/mL}$  的浓度范围内, 抑制率呈下降趋势; 在  $1\ \text{mg/mL}$  的浓度下抑制率达到峰值, 为 15.54%。CDPS-1 在  $0.1 \sim 1.0\ \text{mg/mL}$  的浓度范围内对  $\beta$ -HEX 的释放均有抑制作用, 且抑制率呈上升趋势; 在  $1\ \text{mg/mL}$  的浓度下抑制率达到 28.54%, 约为 CDPS 的两倍。实验证明 CDPS 和 CDPS-1 均有良好的抗敏效果, 且在  $1\ \text{mg/mL}$  的给药浓度下抑制率达到峰值。

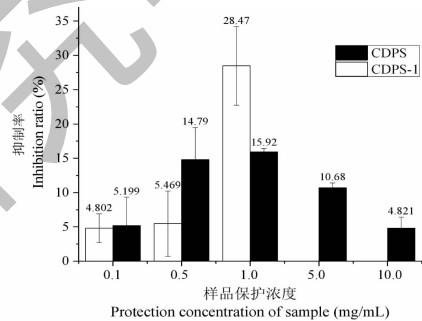


图5 CDPS 和 CDPS-1 对刺激剂诱导 RBL-2H3 细胞释放  $\beta$ -HEX 的影响

Fig. 5 Effects of CDPS and CDPS-1 on the release of  $\beta$ -HEX in RBL-2H3 cells induced by stimulants

### 2.2.2 白鲜皮多糖抑制红细胞溶血

#### 2.2.2.1 不同浓度白鲜皮多糖 CDPS 的红细胞溶血率

白鲜皮样品 CDPS 对 RBC 毒性可通过溶血率进行判断, 实验结果如图 6 所示。实验结果可以看出, 白鲜皮样品 CDPS 在  $0.1 \sim 10\ \text{mg/mL}$  范围内几乎没有溶血 ( $< 2\%$ ), 即对细胞膜没有损伤。

#### 2.2.2.2 不同浓度刺激物作用下红细胞溶血效果

SDS 是 RBC 溶血实验的阳性对照物, 通常实验浓度为  $0.2\%$ , 即  $0.2\%$  SDS 可以达到  $100\%$  的 RBC 溶血率。通过测定  $0.2\%$  以下不同浓度梯度的 SDS 的 RBC 溶血率, 筛选出特定细胞溶血率的 SDS 浓度, 进行 RBC 溶血抑制实验。实验结果如图 7 所示, 在  $0.01\% \sim 0.04\%$  浓度范围内, RBC 溶血率逐

渐提升,在 0.05% ~ 0.2% 浓度范围内,RBC 溶血率  
达到 90% 以上。拟选取 0.02% SDS 作为实验浓度,  
此时 RBC 溶血率为 55.42%。

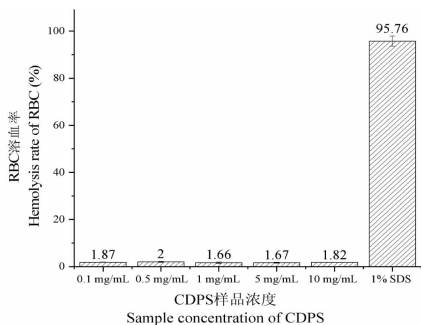


图 6 CDPS 的 RBC 溶血率比较

Fig. 6 Comparison of RBC hemolysis rate of CDPS

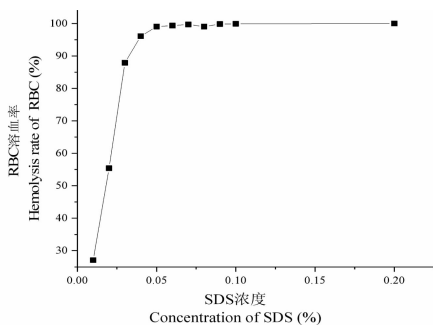


图 7 SDS 的 RBC 溶血率

Fig. 7 The hemolysis rate of red blood cells by different concentration of SDS

2.2.2.3 白鲜皮多糖红细胞溶血抑制性能

在 RBC 中先加入不同浓度的 CDPS,再加入浓度为 0.02% 的 SDS,测定溶血率,与未经 CDPS 处理直接加入 SDS 的 RBC 溶血率比较,即可评价 CDPS 是否具有保护细胞膜,使之免受刺激物损伤的作用。实验结果如图 8 所示,在 CDPS 给药浓度在 0.1 ~ 5 mg/mL 范围内,RBC 溶血率逐渐降低,溶血抑制率

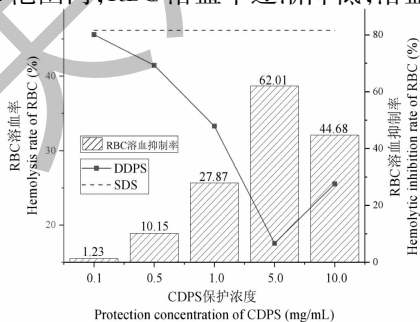


图 8 CDPS 与 SDS 共同作用后红细胞的溶血率和抑制率

Fig. 8 The hemolysis rate and hemolytic inhibition rate of RBC treated with CDPS and SDS

逐渐升高;在 5 ~ 10 mg/mL 范围内,RBC 溶血率逐渐升高,溶血抑制率逐渐降低;在 5 mg/mL 时达到最优值,溶血率为 17.54%,溶血抑制率为 62%。由此可见,CDPS 对细胞膜有良好的保护作用,且在浓度为 5 mg/mL 的浓度下,RBC 溶血抑制率超过 60%,具有较好的抗 SDS 刺激效果。

2.2.3 白鲜皮多糖抗氧化性

白鲜皮多糖 CDPS 的 DPPH 清除率如图 9 所示,在 0.1 ~ 1 mg/mL 的浓度范围内,CDPS 浓度对 DPPH 清除率没有显著变化;在 1 ~ 10 mg/mL 的浓度范围内,随着 CDPS 浓度的升高,对 DPPH 的清除率呈缓慢上升趋势。在浓度为 10 mg/mL 的条件下 DPPH 清除率超过 40%,说明白鲜皮多糖 CDPS 有一定的抗氧化作用。

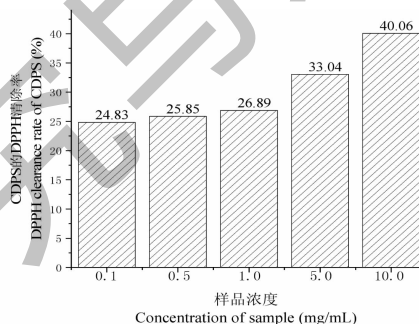


图 9 CDPS 的 DPPH 自由基清除率

Fig. 9 DPPH radical scavenging rate of CDPS

3 结论

本研究对白鲜皮进行提取分离,获得白鲜皮多糖 CDPS,并对其进一步纯化获得白鲜皮多糖 CDPS-1。利用 GFC、IC 和 FT-IR 等方法对 CDPS-1 进行表征,CDPS-1 主要以  $\alpha$  型糖苷键为主,分子量为 2 577 Da,主要由岩藻糖,葡萄糖、木糖、鼠李糖、半乳糖组成,摩尔比为 0.41:1.38:3.15:15.4:79.61。测定了 CDPS 对 RBL-2H3 细胞脱颗粒释放  $\beta$ -HEX 的抑制率、RBC 溶血抑制率和 DPPH 清除率,结果显示在 0.5 ~ 1.0 mg/mL 的浓度范围内 CDPS 对  $\beta$ -HEX 的释放抑制率和 RBC 细胞膜保护效果较好,峰值分别达到了 28.54% 和 62.1%,且对 DPPH 有超过 25% 的清除率。本实验提取的白鲜皮多糖有良好的抗敏功效,推测其对细胞膜的保护能力和抗氧化能力为抗敏机制起到一定的作用。

参考文献

1 Liu L, Ma YK, Sun Y, et al. Simultaneous determination of

- three compounds in Dictamni Cortex by UPLC[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2019,31:10-14.
- 2 Zhang K,Zhao H,Zhang Y, et al. Purification, characterization and anti-psoriasis effects of polysaccharides from *Dictamnus dasycarpus*[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志),2020,9:157-166.
  - 3 Cao RA,Li LY,Lin J, et al. Extraction and molecular characterization research of the polysaccharide from *Dictamnus dasycarpus* Turcz[J]. J Heilongjiang Bayi Agr Univ(黑龙江八一农垦大学学报),2016,28:65-71.
  - 4 Zhao QQ. Isolation and structural identification of chemical constituents from Cortex Dictamni[D]. Xi'an:Northwest University(西北大学),2015.
  - 5 Wang L. Study on the preparation technology, anti-allergic itching effect and pathway of the combination extracts[D]. Harbin:Northeast Forestry University(东北农业大学),2015.
  - 6 Liu ZC,Liu SF,Li F, et al. Study on degranulation model of RBL-2H3 cells[J]. J Hebei Univ(河北大学学报),2018,38:159-167.
  - 7 Yang YP. Effects of neohesperidin in degranulation of RBL-2H3 Cells and allergic asthma disease induced by OVA[D]. Changchun:Jilin University(吉林大学),2018.
  - 8 Fan LN. Research on characteristics indices of sensitive skin and evaluation methods of anti-sensitivity activity[D]. Beijing:Beijing Technology and Business University(北京工商大学),2016.
  - 9 Sun N,Zhou C,Zhou X, et al. Use of a rat basophil leukemia (RBL) cell-based immunological assay for allergen identification,clinical diagnosis of allergy, and identification of anti-allergy agents for use in immunotherapy[J]. J Immunotoxicol,2015,12:199-205.
  - 10 Lfarrugia B,Mwhitelock J,Ogrady R, et al. Mast cells produce a unique chondroitin sulfate epitope[J]. J Histochem Cytochem,2016,64:85-98.
  - 11 Devavani C,Abigail W,Madison M, et al. Mast cell degranulation mediates compound 48/80-induced hyperalgesia in mice[J]. Biochem Biophys Res Commun,2012,425:237-243.
  - 12 Mmiescher S,Vogel M. Molecular aspects of allergy[J]. Mol Aspects Med,2002,23:413-462.
  - 13 Sun RS,Liu RQ. Markers of mast cell degranulation[J]. Int J Lab Med(国际检验医学杂志),2001,22:100-101.
  - 14 Aabassi Y, Annjackson J, Zhu J, et al. Label-free, real-time monitoring of IgE-mediated mast cell activation on microelectronic cell sensor arrays[J]. J Immunol Methods,2004,292:195-205.
  - 15 Aketani S,Teshima R,Umezawa Y, et al. Correlation between cytosolic calcium concentration and degranulation in RBL-2H3 cells in the presence of various concentrations of antigen-specific IgEs[J]. Immunol Lett,2001,75:185-189.
  - 16 Liao Y,Wang X,Zhang LS, et al. Study on using haemolysis test as an alternative method of draize eye irritation test[J]. Mod Prevent Med(现代预防医学),2002,29:593-595.
  - 17 Lu ZA,Zheng SH, Ma LJ, et al. Haemolysis test of sheep red blood cell for the evaluation of eye irritation of cosmetic products[J]. Detergent Cosmet(日用化学品科学),2013,36:23-27.
  - 18 Li JX,Yang ZQ,Wang XZ. Biological function of reactive oxygen free radicals in animals[J]. Prog Vet Med(动物医学进展),2006,27:33-36.
  - 19 Zhao X, Ma XC. Study on anti-allergic reaction of densefruit pittany root-bark[J]. Acta Chin Med(中医学报),2019,34:568-571.
  - 20 Zhang K,Zhang Y,Wang LH, et al. Study on sulfated modification and anti-psoriasis activity of polysaccharide from *Dictamnus dasycarpus*[J]. China Pharm(中国药房),2019,30:1049-1056.
  - 21 Shi DF,Zheng MZ,Zhao LC, et al. Isolation and anti-inflammatory effect of dictamnine extracted from Dictamni Cortex[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志),2012,18:128-131.
  - 22 Cong H,Liu JC,Cui HX, et al. Effect of Cortex Dictamni on delayed type hypersensitivity in mice[J]. J Qiqihar Univ Med(齐齐哈尔医学院学报),2016,37:3741-3742.
  - 23 Tang YW,Zhang Y,Wang YL, et al. Isolation and structure feature analysis of *Astragalus* polysaccharides[J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药),2014,25:1097-1100.
  - 24 Xia Q,Liu G,Ge CL, et al. Removal of proteins from crude *Astragalus* polysaccharides by sevag method[J]. Anhui Med Pharm J(安徽医药),2007,11:1069-1071.