

返魂草多糖中免疫增强活性有效组分的筛选及表征[△]

周婷婷^{1*}, 朱迪夫¹, 纪圣君², 王春驰¹, 贾东旭¹, 李艳茹², 唐 燕^{1#}(1. 吉林省吉测检测技术有限公司, 长春 130117; 2. 吉林益民堂制药有限公司, 吉林 四平 136001)

中图分类号 R932;R392.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)04-0523-05
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.04.18

摘要 目的: 筛选并表征返魂草多糖组分中具有免疫增强活性的有效组分。方法: 通过水提醇沉法提取返魂草浸膏(SCHE)多糖并制得50%醇沉样品(SCHE-1)和80%醇沉样品(SCHE-2)。将小鼠单核巨噬细胞系RAW264.7细胞分为空白组(不含血清培养基)、阴性对照组(含血清培养基)、脂多糖组(LPS, 阳性对照, 1 μg/mL)以及SCHE-1、SCHE-2低、高剂量(0.5、1 mg/mL)组。采用四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测RAW264.7细胞的细胞活性, 采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测RAW264.7细胞中白介素1β(IL-1β)、IL-6、肿瘤坏死因子α(TNF-α)水平, 以考察SCHE-1和SCHE-2对RAW264.7细胞的免疫增强活性。采用分子排阻色谱法测定SCHE-1的分子量及其分布; 采用高效液相色谱(HPLC)柱前衍生生化法测定SCHE-1的单糖组成。采用NaOH法对SCHE-1进行甲基化分析。结果: 与阴性对照组比较, LPS组及SCHE-1各剂量组均可显著增强RAW264.7细胞的活性并显著提高细胞中IL-1β、IL-6、TNF-α的水平($P < 0.01$), SCHE-1是具有免疫增强活性的有效组分。SCHE-1含中性糖40.05%、糖醛酸35.62%、蛋白质8.89%; SCHE-1为混合物, 分子量范围为62~6 119 Da, 单糖组成主要为半乳糖醛酸、阿拉伯糖和半乳糖; SCHE-1的中性糖连接方式以半乳糖的1→3、1→4和1→6连接为主, 在1→3连接的O-6位上有分支, 非还原末端主要为阿拉伯糖。结论: SCHE-1可能是返魂草免疫增强活性的有效组分, 其主要由多糖类成分组成; SCHE-1可能通过激活巨噬细胞释放IL-1β、IL-6、TNF-α而发挥调节机体免疫功能的作用。

关键词 返魂草; 多糖; 免疫增强活性; 筛选; 表征

Screening and Characterization of Effective Components of Immunopotentiating Activity in *Senecionis cannabifolii* Herba

ZHOU Tingting¹, ZHU Difu¹, JI Shengjun², WANG Chunchi¹, JIA Dongxu¹, LI Yanru², TANG Yan¹(1. Jilin Jice Detective Technical Co., Ltd., Chuangchun 130117, China; 2. Jilin Yimintang Pharmaceutical Co., Ltd., Jilin Siping 136001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To screen and characterize effective components of immunopotentiating activity in *Senecionis cannabifolii* Herba. METHODS: The polysaccharide components were obtained by water extraction and alcohol precipitation method to yield 50% alcohol precipitation sample (SCHE-1) and 80% alcohol precipitation sample (SCHE-2). The cells from mice mononuclear macrophage line RAW264.7 were divided into blank group (medium without serum), negative control group (medium with serum), lipopolysaccharide group (LPS, positive control drug, 1 μg/mL), SCHE-1 and SCHE-2 low-dose and high-dose groups (0.5, 1 mg/mL). The cell viability of RAW264.7 cells was detected by MTT assay. The levels of IL-1β, IL-6 and TNF-α in RAW264.7 were detected by ELISA. These were used to investigate the effects of SCHE-1 and SCHE-2 on the immunological enhancing activity of RAW264.7 cells. The molecular weight and distribution of SCHE-1 were determined by size exclusion chromatography; the monosaccharide composition of SCHE-1 was determined by HPLC pre-column derivatization. Methylation analysis of SCHE-1 was conducted by NaOH method. RESULTS: Compared with negative control group, the activity of RAW264.7 cells was enhanced significantly in SCHE-1 groups and LPS group, which also significantly increased the levels of IL-1β, IL-6 and TNF-α in cell culture fluids ($P < 0.01$). SCHE-1 was an effective component with immunopotentiating activity. The neutral sugar content of SCHE-1 was 40.05%, the uronic acid was 35.62%, and the protein was 8.89%. SCHE-1 was a mixture, molecular weight of which was 62-6 119 Da; monosaccharide was mainly composed of galacturonic acid, arabinose (Ara) and galactose (Gal). The results of methylation analysis showed that the backbone was composed of 1→3, 1→4 and 1→6 linked Gal, and branches were on the O-6 position of the 1→3 linked Gal, and the non-reducing terminals were Ara. CONCLUSIONS:

[△] 基金项目: 吉林省科技发展计划项目(No.20180201020YY、20180623037TC)

* 主管药师, 硕士。研究方向: 中药新剂型与新技术。电话: 0431-86172337。E-mail: zhoutingt2008@163.com

通信作者: 主管药师。研究方向: 中药活性成分与质量控制。电话: 0431-86172337。E-mail: tangyan790601@126.com

SCHE-1 may be the effective component of immunopotentiating activity, and main component of SCHE-1 is polysaccharide. SCHE-1 may regulate the immune function by activating macrophages to release IL-1β, IL-6 and TNF-α.

KEYWORDS *Senecionis cannabifolii* Herba; Polysaccharides; Immunopotentiating activity; Screening; Characterization

返魂草(*Senecionis cannabifolii* Herba, SCH)为我国东北地区的一种特色药材资源,其为菊科千里光属植物返魂草的干燥全草,具有理气化痰、镇咳平喘等功效^[1]。以返魂草为原料的单方制剂如返魂草颗粒、肺宁口服液等已广泛用于慢性支气管炎、肺内感染等疾病的治疗^[2-4]。目前,对返魂草活性成分的研究主要针对的是酚酸类和黄酮类成分^[5-6],而对其多糖组分的研究尚未见报道。鉴于多糖组分具有增强机体免疫力的作用,而免疫系统紊乱是机体炎症反应发生、发展的主要诱因^[7],因此多糖组分应作为返魂草抗炎作用不可缺少的物质基础之一,对其进行研究具有重要意义。为此,本研究对返魂草的多糖组分进行分离,并筛选及表征其中具有免疫增强活性的有效组分,以期明确返魂草中的免疫增强活性物质提供参考。

1 材料

1.1 仪器

UV-5100型紫外可见分光光度计(上海元析仪器有限公司);BSA224S-CW型电子分析天平(德国Sartorius公司);LC-2010型高效液相色谱(HPLC)仪,包括示差折光检测器、LabSolutions 1.0.0.1凝胶渗透色谱软件(日本Shimadzu公司);TSQ8000型气质联用(GC-MS)仪(美国Thermo Fisher Scientific公司);GZX-9076MBE型电热鼓风干燥箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);NDK200-2型氮吹仪(杭州米欧仪器有限公司);TD5A-WS型离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);MCO-230AICU-VL-PC型CO₂培养箱(日本Panasonic公司);iMark型酶标仪(美国Bio-Rad公司)。

1.2 药品与试剂

返魂草浸膏(SCHE,吉林益民堂制药有限公司,批号:20170709,纯度:60.87%);葡萄糖醛酸对照品(批号:K14J759017,纯度:98%)、岩藻糖对照品(批号:X16N8Y48166,纯度:98%)、阿拉伯糖对照品(批号:Z29O7H23894,纯度:98%)、木糖对照品(批号:B02M6W1,纯度:98%)、甘露糖对照品(批号:C16J8H28561,纯度:98%)、半乳糖对照品(批号:Z20O7H23186,纯度:98%)、半乳糖醛酸对照品(批号:S29J8I40844,纯度:98%)、葡萄糖对照品(批号:S08J6G1,纯度:98%)、鼠李糖对照品(批号:SJ0715GA13,纯度:98%)均购自上海源叶生物科技有限公司;牛血清白蛋白(BSA,中国计量科学研究院,批号:161205,纯度:100%);葡聚糖(分子量:1 000 Da,批号:BCBS5664V,纯度:98%)、葡聚糖(分子量:5 000 Da,批号:BCBS8248V,纯度:98%)、葡聚糖(分子量:12 000 Da,批号:BCBR5837V,纯度:98%)、1-苯基-3-甲基-5-吡啶酮(PMP,批号:M30938,纯度:99%)、三氟乙酸(TFA,批号:O47864,纯度:99%)均购自国药集团化学试剂有限公司;D101大孔吸附树脂(粒

径:0.3~1.25 mm,沧州宝恩吸附材料科技有限公司,批号:091011);DMEM培养基(批号:8117021)、胎牛血清(批号:1808455)均购自美国Gibco公司;磷酸盐缓冲液(PBS,中国Biosharp公司,批号:170663);脂多糖(LPS,批号:095m4164V,纯度:≥99%)、四甲基偶氮唑盐(MTT,批号:MKBN7264V,纯度:98%)均购自美国Sigma公司;白细胞介素1β(IL-1β,批号:180122)、IL-6(批号:171229)、肿瘤坏死因子α(TNF-α,批号:180122)ELISA(酶联免疫吸附法)检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司;乙腈为色谱纯,二甲基亚砜(DMSO)等试剂均为分析纯,水为超纯水。

1.3 细胞

小鼠单核巨噬细胞系RAW264.7细胞株由中国科学院上海细胞库提供。

2 方法与结果

2.1 多糖组分提取

取SCHE 200 g,加适量水溶解,经D101大孔吸附树脂柱,以水洗脱;收集水洗液,加95%乙醇使含醇比例分别至50%和80%进行醇沉;以3 000 r/min离心10 min,沉淀加适量水溶解,冻干,分别得50%醇沉样品(SCHE-1)和80%醇沉样品(SCHE-2),收率分别为10.14%和7.21%(收率=醇沉样品质量/浸膏质量×100%)。

2.2 免疫增强活性组分筛选

2.2.1 MTT法检测细胞活性 取处于对数生长期的RAW264.7细胞,以 1×10^4 个/mL的密度接种于96孔板,每孔100 μL,置于37℃、5%CO₂培养箱中培养过夜后,将其分为空白组、阴性对照组(含血清培养基)、LPS组(阳性对照,1 μg/mL)及SCHE-1、SCHE-2低、高剂量组(0.5、1 mg/mL,均以醇沉样品计)。各给药组剂量根据本课题组前期预试验结果设置(下同),每组设置5个复孔。吸弃各孔上清液,空白组加不含血清DMEM培养基100 μL,阴性对照组加含血清DMEM培养基100 μL,各给药组加含相应剂量药物的DMEM培养基100 μL,置于37℃、5%CO₂培养箱中培养24 h后,每孔加5 mg/mL的MTT溶液(溶剂为pH 7.4的PBS)10 μL,置于37℃、5%CO₂培养箱中培养4 h。弃去上清液,各孔加DMSO 150 μL,振荡10 min后,使用酶标仪于490 nm波长处测定吸光度(A),计算细胞活性[细胞活性=(A_{给药组}-A_{空白组})/(A_{阴性对照组}-A_{空白组})×100%]。采用SPSS 13.0软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。不同剂量SCHE对RAW264.7细胞活性的影响见表1。

由表1可知,与阴性对照组比较,LPS组及SCHE-1各剂量组均可显著增强RAW264.7细胞的细胞活性($P < 0.01$),而SCHE-2各剂量组未表现出明显影响($P >$

0.05),提示 SCHE-1 可能为返魂草免疫增强活性的有效组分。

表 1 不同剂量 SCHE 对 RAW264.7 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 1 Effects of different dose of SCHE on RAW264.7 cell activity ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	细胞活性, %	组别	细胞活性, %
阴性对照组	100	SCHE-1 高剂量组	163.38 ± 29.18**
LPS 组	168.54 ± 40.48**	SCHE-2 低剂量组	111.27 ± 8.36
SCHE-1 低剂量组	149.11 ± 27.11**	SCHE-2 高剂量组	112.36 ± 14.67

注:与阴性对照组比较, ** $P < 0.01$

Note: vs. negative control group, ** $P < 0.01$

2.2.2 ELISA 法检测 RAW264.7 细胞中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平 取处于对数生长期的 RAW264.7 细胞,以 1×10^5 个/mL 的密度接种于 12 孔板上,每孔 1 mL,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养过夜后,将其分为阴性对照组、LPS 组及 SCHE-1、SCHE-2 低、高剂量组,每组设置 5 个复孔,分别加入培养基、LPS 和相应浓度的样品后,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h,吸取各组细胞培养液,以 3 000 r/min 离心 5 min,取上清液,采用相应试剂盒测定 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平。采用 SPSS 13.0 软件对数据进行统计分析,统计学方法同“2.2.1”项下方法。不同剂量 SCHE 对 RAW264.7 细胞中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平的影响见表 2。

表 2 不同剂量 SCHE 对 RAW264.7 细胞中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5, \text{pg/mL}$)

Tab 2 Effects of different dose of SCHE on the levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n=5, \text{pg/mL}$)

组别	IL-1 β	IL-6	TNF- α
阴性对照组	33.67 ± 9.09	17.85 ± 6.69	167.65 ± 6.91**
LPS 组	68.39 ± 4.93**	92.55 ± 15.54**	1 814.41 ± 65.53**
SCHE-1 低剂量组	57.28 ± 6.70**	35.42 ± 5.57**	1 069.41 ± 92.86**
SCHE-1 高剂量组	55.61 ± 4.26**	40.35 ± 7.49**	1 362.21 ± 110.52**
SCHE-2 低剂量组	45.89 ± 4.48	20.80 ± 12.84	846.03 ± 42.11**
SCHE-2 高剂量组	43.11 ± 7.93	19.89 ± 9.70	886.03 ± 132.22**

注:与阴性对照组比较, ** $P < 0.01$

Note: vs. negative control group, ** $P < 0.01$

由表 2 可知,与阴性对照组比较,LPS 组及 SCHE-1 低、高剂量组均可显著提高 RAW264.7 细胞中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平 ($P < 0.01$); SCHE-2 低、高剂量组均可显著提高 TNF- α 水平 ($P < 0.01$),而对 IL-1 β 、IL-6 水平则无显著影响 ($P > 0.05$),提示 SCHE-1 是返魂草免疫增强活性的有效组分。

2.3 SCHE-1 理化性质考察

根据“2.2”项下研究结果,SCHE-1 是返魂草的免疫增强活性组分,故对其组成进行进一步研究。采用苯酚-硫酸法,以葡萄糖为对照品,采用紫外可见分光光度计测定吸光度并计算中性糖含量^[8];采用间羟基联苯法,

以葡萄糖醛酸为对照品,采用紫外可见分光光度计测定吸光度并计算糖醛酸含量^[9];采用 Lowry 法,以牛血清白蛋白为对照品,采用紫外可见分光光度计测定吸光度并计算蛋白质含量^[10]。结果显示,SCHE-1 含中性糖 40.05%、糖醛酸 35.62%、蛋白质 8.89%。因蛋白质含量远低于中性糖和糖醛酸,故 SCHE-1 主要由中性糖和糖醛酸组成。

2.4 SCHE-1 的分子量测定

2.4.1 色谱条件 色谱柱: Sepax SRT SEC-100 HPLC 凝胶分析柱 (300 mm \times 7.8 mm, 5 μm); 流动相: 0.7% 硫酸钠溶液; 流速: 0.5 mL/min; 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$; 检测器: 示差折光检测器; 进样量: 10 μL 。

2.4.2 标准曲线的绘制 分别称取分子量为 12 000、5 000、1 000 Da 的葡聚糖和葡萄糖对照品,加流动相溶解,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,制得质量浓度为 10 mg/mL 的对照品溶液,备用。取上述对照品溶液 10 μL ,按“2.4.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱峰的保留时间。以色谱峰的保留时间 (x , min) 为横坐标、对照品分子量的对数值 (y) 为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程为 $y = -0.005 4x^3 + 0.207x^2 - 3.808 0x + 24.747 9$ ($r = 0.999 9$)。

2.4.3 供试品溶液的制备 称取 SCHE-1 样品适量,加流动相溶解,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,制得质量浓度为 5 mg/mL 的供试品溶液。

2.4.4 方法学考察 (1) 精密度试验。取“2.4.2”项下对照品溶液适量,按“2.4.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次,记录分子量。结果,重均分子量的 RSD 为 1.01% ($n=6$),表明仪器精密度良好。(2) 稳定性试验。取“2.4.3”项下供试品溶液 (批号: 20170715) 适量,分别于室温下放置 0、30、60、90、120、150 min 时按“2.4.1”项下色谱条件进样测定,记录分子量。结果,重均分子量的 RSD 为 1.98% ($n=6$),表明供试品溶液于室温下放置 150 min 内基本稳定。(3) 重复性试验。取 SCHE-1 样品适量,共 6 份,按“2.4.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.4.1”项下色谱条件进样测定,记录分子量。结果,重均分子量的 RSD 为 1.51% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.4.5 分子量的测定 “按 2.4.2”“2.4.3”项下方法分别制备对照品溶液和供试品溶液,再按“2.4.1”项下色谱条件进样测定,并利用 GPC 软件计算其分子量^[11]。SCHE-1 分子量测定结果见图 1。由图 1 可见,SCHE-1 的 HPLC 图显示有多个峰,提示 SCHE-1 是由不同分子量物质组成的混合物,其分子量范围为 62~6 119 Da,重均分子量为 5 864 Da。

2.5 SCHE-1 的单糖组成分析

2.5.1 色谱条件 色谱柱: Diamonsil C₁₈ (250 mm \times 4.6

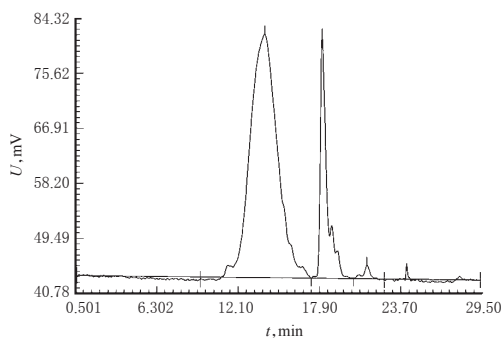


图1 SCHE-1的HPLC图

Fig1 HPLC chromatograms of SCHE-1

mm, 5 μm); 流动相A: pH 6.8的PBS-乙腈(85:15, V/V); 流动相B: pH 6.8的PBS-乙腈(60:40, V/V); 流速: 0.9 mL/min; 检测波长: 250 nm; 柱温: 40 °C; 进样量: 10 μL。

2.5.2 对照品溶液的制备 取甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、岩藻糖、阿拉伯糖、木糖、半乳糖、半乳糖醛酸、葡萄糖对照品适量, 分别加水溶解制得单一对照品贮备液。取上述贮备液各 5 mL, 分别置于螺帽试管中, 加 0.5 mol/L PMP 甲醇溶液 6 mL、0.3 mol/L 氢氧化钠溶液 5 mL, 在 70 °C 水浴反应 1 h; 加 0.3 mol/L 盐酸溶液 5 mL 中和, 用等体积三氯甲烷萃取 3 次; 取水层, 放置过夜, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 得各对照品的 PMP 衍生物溶液, 浓度为 2 mmol/L, 作为单一对照品溶液。

2.5.3 供试品溶液的制备 精密称取 SCHE-1 样品 20 mg, 加 2 mol/L TFA 于 100 °C 水解 8 h, 衍生化方法同“2.5.2”项下“加 0.5 mol/L PMP 甲醇溶液 6 mL……经 0.45 μm 微孔滤膜滤过”, 即得供试品的 PMP 衍生物溶液, 作为供试品溶液。

2.5.4 方法学考察 (1) 精密度试验。取“2.5.2”项下各对照品溶液适量, 按“2.5.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次, 记录峰面积。结果, 甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖峰面积的 RSD 分别为 1.23%、0.88%、0.73%、1.46%、0.74%、1.11% (n=6), 其余 3 种成分未检出, 表明仪器精密度良好。(2) 稳定性试验。取“2.5.3”项下供试品溶液适量, 分别于室温下放置 0、6、12、18、24、30 h 时按“2.5.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖峰面积的 RSD 分别为 0.74%、1.22%、1.77%、0.51%、1.94%、1.36% (n=6), 其余 3 种成分未检出, 表明供试品溶液于室温下放置 30 h 内基本稳定。(3) 重复性试验。取 SCHE-1 样品适量, 共 6 份, 按“2.5.3”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.5.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖峰面积的 RSD 分别为 0.99%、1.56%、1.59%、1.98%、1.11%、1.73% (n=6), 其余 3 种成分未检出, 表明本方法重复性良好。

2.5.5 SCHE-1 中单糖组分的分析 分别吸取上述对照

品溶液、供试品溶液各 10 μL, 按“2.5.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱峰的保留时间, 进行 SCHE-1 单糖组分的分析, 结果见图 2。由图 2 可知, SCHE-1 是由甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖组成, 其摩尔比为 0.171:0.099:1.000:0.218:1.166:0.920, 提示 SCHE-1 主要由半乳糖醛酸、半乳糖和阿拉伯糖组成, 因 SCHE-1 组分中含有阿拉伯糖和少量的鼠李糖, 说明 SCHE-1 组分可能主要为果胶类多糖。

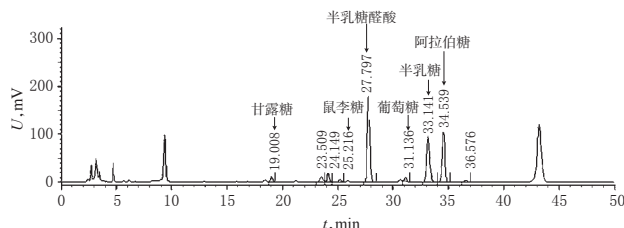


图2 SCHE-1中单糖组分的HPLC图

Fig2 HPLC chromatogram of monosaccharide composition of SCHE-1

2.6 SCHE-1的甲基化分析

2.6.1 GC-MS 分析条件 色谱条件: DB-1 MS 石英毛细管柱 (30 m × 0.32 mm, 0.33 μm), 进样口温度为 250 °C; 升温程序为起始温度 140 °C, 保持 7.5 min, 以 2 °C/min 升至 250 °C, 保持 20 min; 载气为氮气, 流速为 1 mL/min, 进样量为 1 μL, 分流比为 50:1。质谱条件: 电喷雾离子源, 喷雾电压为 4 kV, 壳气为 60 arb, 辅助气 (N₂) 为 10 arb, 金属毛细管温度为 280 °C, 质荷比 (m/z) 为 35~550。

2.6.2 供试品的制备 精密称取 SCHE-1 样品 20 mg, 置于螺帽试管中, 加脱水 DMSO 0.5 mL, 密封搅拌过夜; 加 NaOH-DMSO 混悬液 0.4 mL, 密封搅拌 30 min, 再加碘甲烷 0.3 mL、水 2 mL 终止反应; 加三氯甲烷 3 mL 萃取, 取三氯甲烷层吹干, 制得甲基化衍生物, 再经水解、还原、乙酰化, 即得。

2.6.3 方法学考察 (1) 精密度试验。取“2.6.2”项下供试品溶液适量, 按“2.6.1”项下试验条件连续进样测定 6 次, 记录阿拉伯糖的保留时间。结果, 阿拉伯糖保留时间的 RSD 为 0.67% (n=6), 表明方法精密度良好。(2) 稳定性试验。取“2.6.2”项下供试品溶液 (批号: 20170715) 适量, 分别于室温下放置 0、6、12、18、24、30 h 时按“2.6.1”项下试验条件进样测定, 记录阿拉伯糖的保留时间。结果, 阿拉伯糖保留时间的 RSD 为 1.91% (n=6), 表明供试品溶液于室温下放置 30 h 内基本稳定。(3) 重复性试验。取 SCHE-1 样品适量, 共 6 份, 按“2.6.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.6.1”项下试验条件进样测定, 记录阿拉伯糖的保留时间。结果, 阿拉伯糖保留时间的 RSD 为 1.44% (n=6), 表明本方法重复性良好。

2.6.4 SCHE-1 的甲基化分析 甲基化分析是测定多糖糖链各糖残基连接方式的重要手段之一。其原理是将

多糖中的羟基完全甲基化后,经水解、还原、乙酰化,再通过GC-MS分析测得部分甲基化糖醇乙酸酯,而未甲基化的位点则为单糖残基的连接点,由此可推断多糖化学结构中的糖苷键类型^[12]。SCHE-1的甲基化分析结果见表3。

表3 SCHE-1的甲基化分析结果

Tab 3 Methylation analysis result of SCHE-1

保留时间, min	单糖残基	甲基化产物	连接方式
17.06	阿拉伯糖	2,3,5-Me ₃	1→
18.48	半乳糖	2,4,6-Me ₃	1→3
18.70	半乳糖	2,3,6-Me ₃	1→4
19.98	半乳糖	2,3,4-Me ₃	1→6
21.58	半乳糖	2,4-Me ₂	1→3,1→6

由表3可知,SCHE-1的中性糖连接方式以半乳糖的1→3、1→4和1→6连接为主,在1→3连接的O-6位上有分支,非还原末端主要为阿拉伯糖。

3 讨论

巨噬细胞是机体重要的免疫细胞之一,具有吞噬、抗原提呈以及分泌多种生物活性物质的功能。IL-1 β 、IL-6、TNF- α 为巨噬细胞分泌的几种主要细胞因子之一,是巨噬细胞发挥免疫功能的重要生物活性蛋白质分子^[13-14]。通过细胞活性试验可确定受试样品能否激活巨噬细胞,促进IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的释放,从而证实受试样品具有调节免疫功能的作用。本研究通过大孔树脂将返魂草浸膏进行分离得到SCHE-1和SCHE-2组分。进一步研究发现,SCHE-1能显著增强巨噬细胞的活性,并显著提高IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的水平($P < 0.01$),表明SCHE-1可能是返魂草免疫增强活性的有效组分,因此对其进行进一步分析。

本研究结果显示,SCHE-1主要由多糖类成分组成,包括中性糖(40.05%)、糖醛酸(35.62%);纯度和分子量测定结果表明其为混合物,其分子量为62~6119 Da,单糖组成主要为半乳糖醛酸、阿拉伯糖和半乳糖;甲基化结果显示,SCHE-1的中性糖连接方式以半乳糖的1→3、1→4和1→6连接为主,在1→3连接的O-6位上有分支,非还原末端主要为阿拉伯糖。有研究显示,多数植物多糖都具有免疫增强活性,如大枣多糖、竹叶多糖、虫草多糖等均有提高机体免疫力的功能^[15]。其可通过与免疫细胞表面的多种受体结合、激活不同的信号通路来调控动物机体的免疫系统,包括促进抗体的分泌、激活补体系统等^[16]。SCHE-1可与哪些受体结合、激活哪些信号通路从而达到免疫调节的作用,尚有待相关研究进一步探讨。

本研究从返魂草药材中分离得到了返魂草多糖SCHE-1并对其进行了表征,结果表明SCHE-1主要由半乳糖醛酸、半乳糖和阿拉伯糖组成,并确定了SCHE-1的

分子量及其分布,甲基化结果明确了糖苷键的连接方式。本研究证实,返魂草多糖SCHE-1是通过激活巨噬细胞释放IL-1 β 、IL-6、TNF- α 来发挥调节机体免疫功能的作用,因此推测SCHE-1是返魂草作为抗炎治疗药物的物质基础之一,但其具体作用机制还有待后续研究深入探讨。

参考文献

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草:7册[M].上海:上海科学技术出版社,1999:943.
- [2] 赵春芳,李庆杰,王莲萍,等.返魂草的高效液相色谱法指纹图谱研究及成分分析[J].分析化学研究简报,2013,41(1):133-136.
- [3] 张宏梅,崔佰吉,李景华,等.大孔吸附树脂分离、纯化返魂草有效成分的工艺研究[J].中国药房,2015,26(31):4402-4405.
- [4] 吴一飞,巩江,令恒莉,等.返魂草的药学研究进展[J].山东中医杂志,2009,28(6):436-437.
- [5] 赵赫,王晓波,王媛媛,等.HPLC法同时测定返魂草药材及其颗粒中四种酚酸类成分含量[J].亚太传统医药,2017,13(6):29-32.
- [6] 马鸿雁,杨莉,王长虹,等.HPLC法同时测定返魂草颗粒中6种活性成分[J].中成药,2012,34(8):1496-1500.
- [7] 李明娟,谭英雄.天然多糖抗炎活性及其应用的研究进展[J].邵阳学院学报(自然科学版),2017,14(4):102-106.
- [8] 张伟杰,王鹏,林茜,等.3种中药多糖的提取工艺[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(16):19-23.
- [9] 姜瑞芝,王颖,陈英红,等.猴头菌寡糖的化学研究[J].中国药理学杂志,2008,43(5):341-344.
- [10] 吕京南,罗浩铭,陈英红,等.人参非皂苷成分中具有治疗老年痴呆作用的活性成分筛选及其结构表征[J].时珍国医国药,2015,26(11):2561-2563.
- [11] 王颖,高其品,李桂荣,等.人参糖肽PG-g的分离纯化与结构分析[J].天然产物研究与开发,2010,22(6):1053-1056.
- [12] 姜瑞芝,姜翔之,曹传英,等.东北红豆杉多糖的化学研究[J].天然产物研究与开发,2012,24(4):440-443.
- [13] 艾雪,鞠成国,贾坤静,等.仙茅不同炮制品对巨噬细胞免疫活性的影响[J].中成药,2017,39(3):616-620.
- [14] 武俊华,罗成.Viili多糖对巨噬细胞RAW264.7激活及分泌细胞因子的影响[J].现代免疫学,2013,33(2):113-118.
- [15] 谢燕霞,安利国,杨桂文.植物多糖对巨噬细胞的免疫调节作用[J].中国生物化学与分子生物学报,2008,24(4):307-314.
- [16] 尚庆辉,解玉怀,张桂国,等.植物多糖的免疫调节作用及其机制研究进展[J].动物营养学报,2015,27(1):49-58.

(收稿日期:2018-07-06 修回日期:2018-12-06)

(编辑:余庆华)