

白鲜皮多糖硫酸酯化修饰及抗银屑病作用研究[△]

张凯^{1*}, 张宇¹, 王丽红¹, 张义秀¹, 王宇亮¹, 赵统超¹, 赵宏^{1,2#}, 王瑞瑞³(1.佳木斯大学药学院, 黑龙江佳木斯 154007; 2.黑龙江中医药大学中药学教育部重点实验室, 哈尔滨 150040; 3.佳木斯市中心医院内分泌科, 黑龙江佳木斯 154002)

中图分类号 R284.2; R285.5; R758.63 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)08-1049-08

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.08.08

摘要 目的:对白鲜皮精制多糖(DDP-III)进行硫酸酯化修饰,并比较其酯化修饰前后的结构特征及抗银屑病作用。方法:采用DEAE-52阴离子交换纤维素柱、Sephadex G-100葡聚糖凝胶柱等对白鲜皮多糖(DDP)进行分离纯化,得DDP-III;用1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮衍生化后,采用高效液相色谱法测定其单糖组成。用酯化试剂(无水吡啶+氯磺酸)对DDP-III进行硫酸酯化修饰,得SDDP-III;采用氯化钡-明胶浊度法测定其硫酸根取代度,并通过红外光谱、拉曼光谱、扫描电镜比较修饰前后的结构特征。将雄性ICR小鼠随机分为正常组、模型组、阳性组(雷公藤多苷, 20 mg/kg)和DDP-III/SDDP-III低、中、高剂量组(均分别为56、112、224 mg/kg)。除正常组小鼠外敷凡士林外,其余各组小鼠均外敷咪喹莫特乳膏复制银屑病模型。各给药组小鼠灌胃相应药物溶液0.4 mL,正常组与模型组小鼠灌胃等体积水,每天1次,连续14 d。末次给药2 h后,采用酶联免疫吸附测定法检测各组小鼠血清白细胞介素17(IL-17)、IL-23含量,采用苏木精-伊红染色法观察其近尾部皮肤鳞片,并记录有颗粒层鳞片数。结果:DDP-III由甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖组成。SDDP-III的硫酸根取代度为0.65。红外光谱、拉曼光谱分析结果显示,除与DDP-III有相同的特征吸收峰外,SDDP-III分别在1 255、823 cm⁻¹和1 240、815 cm⁻¹处有硫酸根基团的特征吸收峰。扫描电镜分析结果显示,DDP-III呈片状,表面光滑、平整,排列紧密;SDDP-III呈块状或颗粒状,有孔洞结构,排列疏松。动物实验结果显示,与正常组比较,模型组小鼠皮损表皮明显增厚,颗粒层明显减少,其血清IL-17、IL-23含量均显著升高,有颗粒层鳞片数显著减少($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与模型组比较,各给药组小鼠上述症状均有不同程度的改善,阳性组、DDP-III高剂量组以及SDDP-III中、高剂量组小鼠血清IL-17、IL-23含量均显著下降,有颗粒层鳞片数均显著升高,且SDDP-III中、高剂量组上述指标均显著优于DDP-III同剂量组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论:DDP-III含有甘露糖等5种单糖成分。DDP-III、SDDP-III均具有一定的抗银屑病作用,且经硫酸酯化修饰的SDDP-III的作用更强;这种作用可能与抑制IL-23/IL-17信号通路有关。

关键词 白鲜皮;多糖;硫酸酯化修饰;银屑病;炎症因子;信号通路

Study on Sulfated Modification and Anti-psoriasis Activity of Polysaccharide from *Dictamnus dasycarpus*

ZHANG Kai¹, ZHANG Yu¹, WANG Lihong¹, ZHANG Yixiu¹, WANG Yuliang¹, ZHAO Tongchao¹, ZHAO Hong^{1,2}, WANG Ruirui³(1. College of Pharmacy, Jiamusi University, Heilongjiang Jiamusi 154007, China; 2. Key Lab for Chinese Materia Medica, Heilongjiang University of TCM, Ministry of Education, Harbin 150040, China; 3. Dept. of Endocrinology, Jiamusi Central Hospital, Heilongjiang Jiamusi 154002, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To conduct sulfated modification of polysaccharide from *Dictamnus dasycarpus* (DDP-III), and to compare structure characteristics and anti-psoriasis activity of DDP-III before and after sulfated modification. METHODS: DDP-III was separated and purified with DEAE-52 anion exchange cellulose column and Sephadex G-100 column. After derived with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone, HPLC was used to determine the composition of its monosaccharide. SDDP-III was synthesized using esterification reagent (anhydrous pyridine+chlorosulfonic acid) to modify DDP-III. The degree of sulfate substitution was determined by barium chloride-gelatin turbidimetric method. The structures were compared by IR, Raman spectrum and SEM before and after modification. The male ICR mice were randomly divided into normal group, model group, positive group (tripterygium glycosides, 20 mg/kg) and DDP-III/SDDP-III low-dose, medium-dose and high-dose groups (56, 112, 224 mg/kg). Except that normal group was given vaseline for external use, and other groups were given Imiquimod cream for external use to

[△] 基金项目:黑龙江省科学基金项目(No.QC2018119);中国博士后科学基金资助项目(No.2015M571454);黑龙江省博士后资助项目(No.LBH-Z14204);黑龙江省教育厅青年人才创新计划项目(No.UN-PYSCT-2016095);佳木斯大学青年创新人才培养计划项目(No.22Zq-201501);北药与功能食品特色学科建设项目

* 硕士研究生。研究方向:白鲜皮多糖分离纯化及药理活性。电话:0454-861665。E-mail:zhangkai930222@163.com

通信作者:副教授,硕士生导师。研究方向:天然产物结构及药理活性。电话:0454-8699383。E-mail:0316zh@163.com

induce psoriasis model. At the same time, administration groups were given relevant medicine intragastrically 0.4 mL, and both normal group and model group were given constant volume of water intragastrically, once a day, for consecutive 14 d. Two hours after last medication, the serum contents of IL-17 and IL-23 were determined by ELISA. The skin scales near the tail were observed by HE staining, and the number of scales with granular layer was recorded. RESULTS: DDP-III was composed of mannose, rhamnose, glucuronic acid,

galacturonic acid and glucose. The degree of sulfate substitution was 0.65 for SDDP-Ⅲ. IR and Raman spectrum showed that the characteristic absorption peaks of sulfate radical group appeared near $1\ 255\ \text{cm}^{-1}$ and $823\ \text{cm}^{-1}$, $1\ 240\ \text{cm}^{-1}$ and $815\ \text{cm}^{-1}$ for SDDP-Ⅲ, except for some characteristic absorption peak as DDP-Ⅲ. SEM analysis showed that DDP-Ⅲ was flaky, smooth and tightly arranged; SDDP-Ⅲ was massive or granular with porous structure and loose arrangement. Animal experiment showed that compared with normal group, the epidermis of skin lesion was significantly thickened and the granular layer was significantly reduced; serum contents of IL-17 and IL-23 were increased significantly, while the number of scales with granular layer was decreased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with model group, above symptoms of administration groups were improved to different extent, and serum contents of IL-17 and IL-23 in positive group, DDP-Ⅲ high-dose groups, SDDP-Ⅲ medium-dose and high-dose groups were decreased significantly; the number of scales with granular layer was increased significantly, and above indexes of SDDP-Ⅲ medium-dose and high-dose groups were significantly better than corresponding DDP-Ⅲ group ($P<0.05$ or $P<0.01$). CONCLUSIONS: DDP-Ⅲ contains five monosaccharide components such as mannose, etc. Both DDP-Ⅲ and SDDP-Ⅲ possess anti-psoriasis effects, and SDDP-Ⅲ exhibits stronger anti-psoriasis effect than DDP-Ⅲ. Its mechanism may be associated with inhibiting IL-23/IL-17 signaling pathway.

KEYWORDS *Dictamnus dasycarpus*; Polysaccharides; Sulfated modification; Psoriasis; Inflammatory factor; Signaling pathway

银屑病是一种以T淋巴细胞异常活化和浸润为主要特征的慢性炎症性皮肤病,目前临床主要采用局部药物治疗、物理疗法、系统药物治疗等方法进行治疗,上述疗法虽可使大部分银屑病患者的病情得以缓解,但仍无法根治,且存在易复发、长期使用不良反应大等缺点,严重影响患者预后^[1]。

天然药物活性成分及其衍生物具有高效、低毒、不良反应少的特点,为治疗银屑病创新药物的研发提供了新的契机^[2]。白鲜皮为芸香科植物白鲜(*Dictamnus dasycarpus* Turcz.)的干燥根皮,含多糖、生物碱、黄酮、甾体类化合物等成分,具有清热燥湿、祛风解毒、湿热疮毒之功效,可用于治疗足癣、皮肤瘙痒、荨麻疹、湿疹等皮肤病,具有较强的抗过敏及止痒作用^[3-4]。中药多糖具有促进免疫调节、抗炎、抗肿瘤、抗病毒、抗氧化等多种生物活性,且活性高低与其结构密切相关,可通过化学修饰来获取活性更高、功能更强的多糖衍生物^[5]。其中,硫酸酯化结构修饰可显著提高多糖促进免疫调节、抗肿瘤、抗氧化的活性,是目前用以提高多糖生物活性的重要手段之一^[5-6]。由于白鲜皮多糖(DDP)结构中不含硫酸基团,故其溶解度欠佳、生物利用度低^[3]。为此,本研究以白鲜皮精制多糖(DDP-Ⅲ)为对象,采用氯磺酸-吡啶法对其进行硫酸酯化,并对DDP-Ⅲ及其衍生物的抗银屑病作用进行初步探讨,以期对中药多糖类抗银屑病的研发提供参考。

1 材料

1.1 仪器

FA-2004型电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司);DF-101S型恒温磁力搅拌器(郑州长城科工贸有限公司);FDU-1200型冷冻干燥机、WFO-420W型定温干燥箱(日本Eyela公司);DL-5-B型高速离心机(上海安亭科学仪器厂);765型紫外-可见分光光度计(上海光谱仪器厂);LC-5510型高效液相色谱(HPLC)仪(北京东

西分析仪器有限公司);FTIR-8400S型红外光谱仪(日本Shimadzu公司);LabRAM00型拉曼光谱仪(法国Dilor公司);Prox型扫描电镜(荷兰Phenom公司);Leica DM4000B型智能生物显微镜(北京中显恒业仪器仪表有限公司);FC型酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司)。

1.2 药材、药品与试剂

白鲜皮药材(批号:170608)购于佳木斯百草堂药店,外表面灰白色,具细纵皱纹;内表面白色,质脆;有羊膻气,味微苦;性状及外观符合2015年版《中国药典》(一部)^[7]规定,经佳木斯大学药学院张宇教授鉴定为芸香科植物白鲜(*Dictamnus dasycarpus* Turcz.)的干燥根皮。标本保存于佳木斯大学药学院(编号:171406)。

咪喹莫特乳膏(四川明欣药业有限责任公司,批号:101112,规格:250 mg:12.5 mg);雷公藤多苷片(阳性对照,浙江得恩德制药有限公司,批号:130619,规格:10 mg);凡士林(上海麦克林生化科技有限公司,批号:140721,规格:500 g);白细胞介素17(IL-17)、IL-23酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为20180620、20180413);DEAE-52阴离子交换纤维素(50 μm ,北京华夏远洋科技有限公司,批号:R08A9D57975);Sephadex G-100葡聚糖凝胶(40~120 μm ,北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司,批号:Q13J5S8672);MW3500透析袋(截留分子量:3 500 Da,上海源叶生物科技有限公司);1-苯基-3-甲基-5-吡啶啉酮(PMP,国药集团化学试剂有限公司,批号:C1822095,纯度:99.5%);甘露糖(批号:140651-201504,纯度:99.5%)、鼠李糖(批号:111683-201502,纯度:99.5%)、葡萄糖醛酸(批号:140648-201804,纯度:99.5%)、半乳糖醛酸(批号:111646-201702,纯度:99.5%)、葡萄糖(批号:110833-201707,纯度:99.5%)、木糖(批号:111508-201605,纯度:99.5%)、半乳糖(批号:100226-201506,纯

度:99.5%)、阿拉伯糖(批号:111506-200202,纯度:99.5%)对照品均购自中国食品药品检定研究院;氯磺酸(批号:201506015)、吡啶(批号:100109-201102)、无水 N,N -二甲基甲酰胺(批号:20150608)均购自阿拉丁试剂(上海)有限公司;硫酸钠(批号:20141103)、三氯乙酸(批号:20170726)、氯化钡(批号:20160911)、明胶(批号:20160119)均购自天津市凯通化学试剂有限公司;苏木精、伊红染料(北京润泽康生物科技有限公司,批号分别为160706、150215);乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为双蒸水。

1.3 动物

SPF级雄性ICR小鼠90只,6~8周龄,体质量18~20 g,由黑龙江中医药大学动物实验中心提供[动物生产合格证号为SYXK(黑)2013-004,实验动物审查批准编号为DWLL20171011006]。所有小鼠均常规饲养于SPF级动物室。

2 方法与结果

2.1 DDP的提取与精制纯化

2.1.1 DDP的提取 取干燥白鲜皮药材1.0 kg,用4倍量(kg/L)的95%乙醇回流提取,用纱布滤过,除去部分小分子化合物和脂肪油;药渣阴干后用8倍量(kg/L)的水回流提取3次,用绢布滤过;合并滤液,减压浓缩,加入乙醇使其终体积分数为80%,于4℃静置24 h后,以3 500 r/min离心20 min,收集沉淀;采用Sevage法^[6]除去蛋白后,冷冻干燥,即得DDP,得率为14.3%(即DDP与白鲜皮药材的质量百分比)。

2.1.2 DDP-III的分离与纯化 取“2.1.1”项下DDP 10 g,经DEAE-52阴离子交换纤维素柱,依次用水及0.1、0.3、0.5、0.7 mol/L氯化钠溶液以1 mL/min的流速进行梯度洗脱,每梯度收集30管,每管10 mL。采用硫酸苯酚法^[9]以紫外-可见分光光度计于490 nm波长处检测每管吸光度($A_{490\text{nm}}$)。以各管编号为横坐标, $A_{490\text{nm}}$ 值为纵坐标绘制洗脱曲线(见图1A)。合并同梯度洗脱液,经减压浓缩、透析脱盐、冷冻干燥后,得两个组分即DDP-I(水洗脱部分)和DDP-II(0.3 mol/L氯化钠溶液洗脱部分),得率分别为43.6%和12.2%(即DDP-I、DDP-II与DDP的质量百分比)。

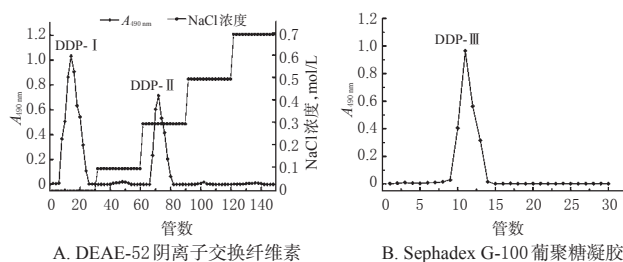


图1 洗脱曲线

Fig 1 Elution curves

取收率较高的DDP-I适量,经Sephadex G-100葡聚糖凝胶柱,用水以0.5 mL/min的流速洗脱,自动收集

洗脱液,每管10 mL。按上述硫酸苯酚法^[9]检测每管的 $A_{490\text{nm}}$ 值,并同法绘制洗脱曲线(见图1B)。合并 $A_{490\text{nm}}$ 值较高的洗脱液,经减压浓缩、透析、冷冻干燥后,得DDP-III,得率为56.4%(即DDP-III与DDP-I的质量百分比)。

2.2 柱前衍生化HPLC法测定DDP-III单糖组分的含量

2.2.1 色谱条件 色谱柱:Diamondsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);柱温:30℃;流动相:0.1 mol/L磷酸盐缓冲液(pH 6.7)-乙腈(83:17, V/V);检测波长:250 nm;流速:1.0 mL/min;进样量:10 μL。

2.2.2 混合单糖对照品及其衍生化样品溶液的制备

精密称取甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、木糖、半乳糖、阿拉伯糖对照品各适量,置于同一量瓶中,加水稀释,制成浓度均约为1 mmol/L的混合单糖对照品溶液。精密吸取上述混合单糖对照品溶液400 μL,置于10 mL试管中,依次加入0.5 mol/L PMP-甲醇溶液600 μL、0.3 mol/L氢氧化钠溶液300 μL,涡旋混合2 min,于70℃水浴中反应60 min,冷却至室温。随后加入0.3 mol/L盐酸溶液300 μL中和,用等体积氯仿重复萃取3次,合并上层水相,经0.45 μm滤膜滤过后,取续滤液适量,即得混合单糖衍生化样品溶液,备用^[10]。

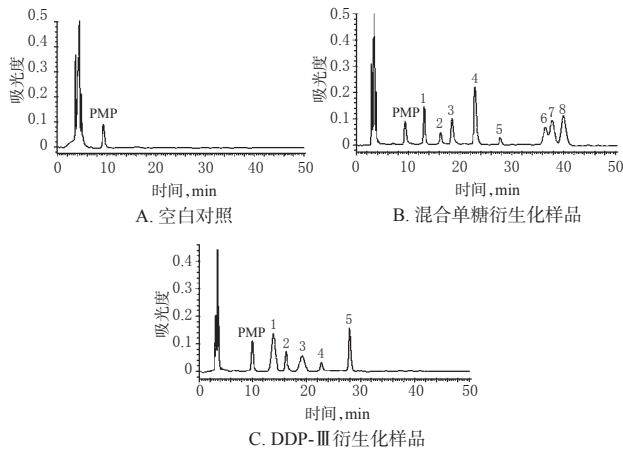
2.2.3 DDP-III衍生化样品溶液的制备 精密称取“2.1.2”项下DDP-III 10 mg,置于安瓿中,加入2 mol/L三氟乙酸溶液2 mL,充入氮气后封管,于120℃水解6 h;减压蒸馏除去剩余三氟乙酸,加水2 mL,按“2.2.2”项下方法进行衍生化反应,即得DDP-III衍生化样品溶液,备用。

2.2.4 空白对照溶液的制备 以400 μL水代替混合单糖对照品溶液按“2.2.2”项下方法进行衍生化,即得空白对照溶液,备用。

2.2.5 系统适用性试验 取“2.2.2”“2.2.3”“2.2.4”项下各样品溶液适量,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,详见图2。由图2可知,DDP-III由甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖等5种单糖组成,其理论板数均大于6 000,保留时间分别约为13、16、19、23、28 min,分离度均良好。

2.2.6 线性关系考察 取“2.2.2”项下经处理的混合单糖衍生化样品溶液适量,按“2.2.1”项下色谱条件分别进样10、15、20、25、30、50 μL,记录峰面积。以各待测物的浓度为横坐标(x, mmol/L)、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,详见表1。

2.2.7 定量限与检测限考察 取“2.2.2”项下经处理的混合单糖衍生化样品溶液适量,用水为溶剂倍比稀释,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以信噪比分别为10:1、3:1计算定量限、检测限。结果,甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、木糖、半乳糖、阿拉伯糖的定量限分别为0.016 8、0.025 1、0.026 6、0.018 9、0.031 6、0.028 7、0.019 3、0.030 2 mmol/L,检测限分别为0.005 8、0.006 3、0.007 6、0.007 6、0.006 6、0.008 7、0.007 3、0.009 6 mmol/L。



注:1.甘露糖;2.鼠李糖;3.葡萄糖醛酸;4.半乳糖醛酸;5.葡萄糖;6.木糖;7.半乳糖;8.阿拉伯糖

Note:1. mannose; 2. rhamnose; 3. glucuronic acid; 4. galacturonic acid; 5. glucose; 6. xylose; 7. galactose; 8. arabinose

图2 高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms

表1 各待测物的保留时间、回归方程及线性范围

Tab 1 Retention time, regression equation and linear range of each analyte

待测物	保留时间, min	回归方程	r	线性范围, mmol/L
甘露糖	13.288	$y=3\ 561x+2\ 458$	0.993 4	0.079 4~0.602 3
鼠李糖	16.157	$y=4\ 592x+3\ 698$	0.991 2	0.076 5~0.585 6
葡萄糖醛酸	18.325	$y=12\ 305x-1\ 250$	0.993 1	0.077 8~0.583 2
半乳糖醛酸	23.178	$y=4\ 528x+2\ 107$	0.988 9	0.078 4~0.591 8
葡萄糖	27.865	$y=5\ 603x+4\ 102$	0.992 7	0.076 3~0.578 9
木糖	35.794	$y=5\ 688x+1\ 489$	0.993 0	0.079 6~0.601 8
半乳糖	37.237	$y=9\ 876x-1\ 230$	0.997 2	0.079 0~0.582 8
阿拉伯糖	39.452	$y=4\ 692x+3\ 504$	0.995 4	0.078 3~0.598 8

2.2.8 精密性试验 取“2.2.2”项下经处理的混合单糖衍生化样品溶液适量,按“2.2.1”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、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、木糖、半乳糖、阿拉伯糖峰面积的RSD分别为0.15%、0.21%、0.26%、0.18%、0.31%、0.19%、0.28%、0.42%($n=6$),表明仪器精密性良好。

2.2.9 稳定性试验 取“2.2.3”项下DDP-III衍生化样品溶液适量,分别于室温下放置0、4、8、12、16、24 h时按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖峰面积的RSD分别为1.89%、2.01%、1.56%、2.19%、1.31%($n=6$),表明其在室温下放置24 h内基本稳定。

2.2.10 重复性试验 精密称取DDP-III,共6份,每份约10 mg,按“2.2.3”项下方法进行衍生化处理后,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖峰面积的RSD分别为0.79%、1.08%、0.56%、1.09%、0.81%($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.2.11 加样回收率试验 精密称取DDP-III,共6份,每份约10 mg,加入已知质量浓度的混合单糖对照品溶

液各适量,按“2.2.3”项下方法进行衍生化处理后,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率。结果,甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、木糖、半乳糖、阿拉伯糖的平均加样回收率分别为99.39%、98.56%、99.13%、99.71%、98.76%、98.94%、99.27%、99.82%,RSD分别为1.79%、1.38%、1.56%、1.49%、0.83%、1.75%、1.55%、0.87%($n=6$),表明本方法准确度较高。

2.3 硫酸酯化白鲜皮多糖(SDDP-III)的制备

在干燥三颈瓶中加入无水吡啶10 mL,置于冰浴中,在磁力搅拌条件下缓慢加入氯磺酸2.5 mL,制得淡黄色固体酯化试剂(共12.5 mL),于-20 ℃冷冻保存,备用。精密称取“2.1.2”项下DDP-III 200 mg,于无水N,N-二甲基甲酰胺30 mL中溶解后加至上述酯化试剂中,在磁力搅拌条件下于60 ℃反应3 h;反应结束后冷却至室温,用4 mol/L氢氧化钠调至中性,用4倍体积无水乙醇醇沉24 h;以4 000 r/min离心15 min,收集沉淀,加水适量,于透析袋中透析72 h后,冷冻干燥,即得SDDP-III,得率为103.6%(即SDDP-III与DDP-III的质量百分比)^[11]。

2.4 氯化钡-明胶浊度法测定SDDP-III的含量

2.4.1 线性关系考察 精密移取1.0 mg/mL硫酸钠标准溶液(以水配制)0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 mL于试管中,分别用1 mol/L盐酸溶液补至5 mL,加入0.8%三氯乙酸溶液3.5 mL及氯化钡-明胶溶液(含氯化钡1.0%、明胶5.0%,以水配制)1.5 mL,摇匀,静置15 min。以1 mmol/L盐酸5 mL作为空白,用紫外-可见分光光度计于360 nm波长处测定 $A_{360\text{ nm}}$ 值,以硫酸根质量浓度(x , mg/mL)为横坐标、 $A_{360\text{ nm}}$ 值为纵坐标(y)进行线性回归^[12]。精密称取“2.3”项下SDDP-III 10 mg,置于10 mL量瓶中,加入1 mol/L盐酸溶液至刻度后水解;取该水解液5 mL,按上述方法处理后,测定 $A_{360\text{ nm}}$ 值,代入硫酸根回归方程,计算SDDP-III中硫酸根的含量,并换算其取代度(DS)[$DS=1.62S\%/ (32-1.02S\%)$];式中, $S\%$ 为样本中硫酸根的质量分数]。结果,硫酸根回归方程为 $y=3.792\ 8x+0.018\ 9$ ($R^2=0.997\ 5$),硫酸根检测浓度的线性范围为0.05~0.4 mg/mL;SDDP-III中硫酸根的质量分数为9.11%,DS为0.65。

2.4.2 精密性试验 取“2.4.1”项下硫酸钠标准溶液(1.0 mg/mL)6份,每份2.0 mL,按“2.4.1”项下方法处理后于360 nm波长处连续测定6次,记录 $A_{360\text{ nm}}$ 值。结果,上述样品 $A_{360\text{ nm}}$ 值的RSD为0.23%($n=6$),表明仪器精密性良好。

2.4.3 稳定性试验 取“2.4.1”项下SDDP-III水解液分别于室温放置0、4、8、12、16、24 h时量取2.5 mL,同法处理后于360 nm波长处测定 $A_{360\text{ nm}}$ 值。结果,上述样品 $A_{360\text{ nm}}$ 值的RSD为0.23%($n=6$),表明上述水解液于24 h内基

本稳定。

2.4.4 重复性试验 取“2.4.1”项下 SDDP-III 水解液 6 份,每份 2.5 mL,同法处理后于 360 nm 波长处测定 $A_{360\text{ nm}}$ 值。结果,上述样品 $A_{360\text{ nm}}$ 值的 RSD 为 0.34% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.4.5 加样回收率试验 精密称取“2.3”项下 SDDP-III 9 份,每份约 10 mg,置于 10 mL 量瓶中,分别加入 1 mol/L 盐酸溶液至刻度后水解。取水解液 2.5 mL,分别加入硫酸钠标准溶液 1.0、2.0、3.0 mL (各 3 份),同法处理后于 360 nm 波长处测定 $A_{360\text{ nm}}$ 值,并计算加样回收率。结果,上述样品的平均加样回收率分别为 97.6%、96.8%、98.3%,RSD 分别为 1.58%、1.93%、1.36% ($n=3$),表明本方法准确度较高。

2.5 DDP-III 与 SDDP-III 的结构表征

2.5.1 红外光谱分析 精密称取 DDP-III 和 SDDP-III 各 5.0 mg,与干燥溴化钾粉末 200 mg 混匀、研磨、压片后,使用红外光谱仪进行红外光谱扫描,扫描范围为 500~4 000 cm^{-1} 。结果,DDP-III 在 3 406 cm^{-1} 处有 O-H 伸缩振动吸收峰,在 2 929 cm^{-1} 处有 C-H 伸缩振动吸收峰,在 1 635 cm^{-1} 处有 C=O 伸缩振动吸收峰,在 1 425、1 321 cm^{-1} 处有 C-H 变角振动吸收峰,在 1 093 cm^{-1} 处有吡喃糖环 C-O-H 伸缩振动吸收峰,详见图 3A。上述特征吸收峰均表明 DDP-III 为多糖化合物。而 SDDP-III 除在 3 439、2 952、1 637、1 020 cm^{-1} 处有 DDP-III 母体特征吸收峰外,还在 1 255 cm^{-1} 处出现硫酸根的 S=O 伸缩振动吸收峰,在 823 cm^{-1} 处出现了 C-O-S 拉伸振动吸收峰,详见图 3B。这表明硫酸基以酯键的形式连接在 DDP-III 分子上,提示 DDP-III 酯化成功。

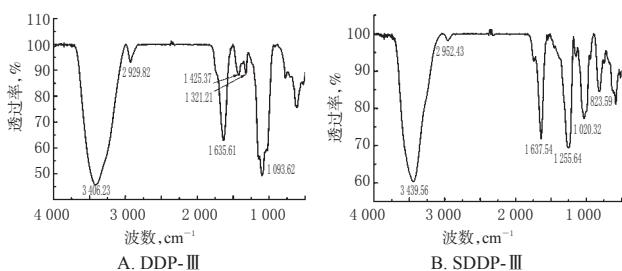


图3 DDP-III 和 SDDP-III 的红外光谱图

Fig 3 IR spectrums of DDP-III and SDDP-III

2.5.2 拉曼光谱分析 精密称取 DDP-III 和 SDDP-III 各 5.0 mg,使用拉曼光谱仪进行拉曼光谱分析。激发光源为氦氖(He-Ne)激光,激发波长为 1 064 nm,每 10 s 积分 1 次;拉曼数据采集范围为 500~3 500 cm^{-1} 。结果,DDP-III 在 2 920 cm^{-1} 处有 C-H 伸缩振动吸收峰,在 1 620 cm^{-1} 处有 C=O 伸缩振动吸收峰,在 1 075 cm^{-1} 有 C-O 伸缩振动吸收峰,详见图 4A。上述特征吸收峰均表明 DDP-III 为多糖化合物。而 SDDP-III 在 2 915 cm^{-1} 处有 C-H 伸缩振动吸收峰,在 1 617 cm^{-1} 处有 C=O 伸

缩振动吸收峰,在 1 240 cm^{-1} 处有 S=O 伸缩振动吸收峰,在 815 cm^{-1} 处有 C-O-SO₃H 基团的特征吸收峰,且硫酸基在糖的 C₂ 或 C₃ 位上取代,详见图 4B。上述特征吸收峰均表明 SDDP-III 为含有硫酸基团的多糖硫酸酯类化合物。

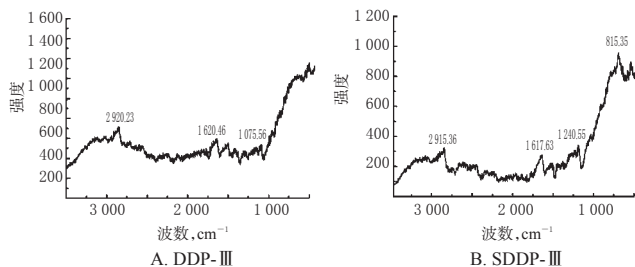


图4 DDP-III 和 SDDP-III 的拉曼光谱图

Fig 4 Raman spectrums of DDP-III and SDDP-III

2.5.3 扫描电镜分析 称取 DDP-III 与 SDDP-III 适量,使用扫描电镜分析两者形态结构,加速电压为 15 kV。结果,DDP-III 与 SDDP-III 表面立体形态存在显著差异:DDP-III 呈片状,表面光滑、平整,排列紧密;SDDP-III 呈块状或颗粒状,具有孔洞结构,且排列较疏松,提示其空间结构已发生明显改变,详见图 5。

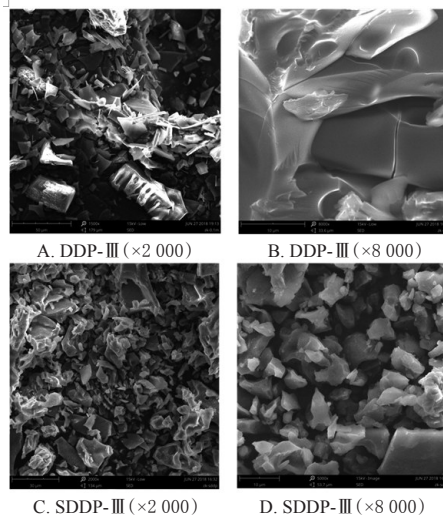


图5 DDP-III 与 SDDP-III 的扫描电镜图

Fig 5 SEM photographs of DDP-III and SDDP-III

2.6 DDP-III 与 SDDP-III 抗银屑病作用考察

2.6.1 分组、造模与给药 所有小鼠背部脱毛后随机分为 9 组,即正常组、模型组(咪喹莫特)、阳性组(雷公藤多苷 20 mg/kg,以水为溶剂;参考本课题组前期预实验结果并按体表面积法换算而得,与 70 kg 成人等效剂量相同^[13])以及 DDP-III 和 SDDP-III 低、中、高剂量组(均分别为 56、112、224 mg/kg,按 DDP-III、SDDP-III 质量计,以水为溶剂;根据 70 kg 成人等效剂量的 0.5、1、2 倍换算而得^[14]),每组 10 只。除正常组小鼠涂抹凡士林外,其余各组小鼠均按 50 mg/cm² 剂量涂抹咪喹莫特乳膏,每日 1 次,连续 14 d,复制银屑病模型。与此同时,各给药组小鼠均灌胃相应药物溶液 0.4 mL,正常组和模型组小鼠均

灌胃等体积水,每日1次,连续14 d。

2.6.2 小鼠血清IL-17、IL-23含量测定 小鼠末次给药2 h后,于眼部取血适量,以4 000 r/min离心15 min,取上层血清,采用ELISA法以酶标仪检测各组小鼠血清中IL-17和IL-23含量,严格按照相应试剂盒说明书操作。使用SPSS 19.0软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用LSD法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果显示,与正常组比较,模型组小鼠血清IL-17、IL-23含量均显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,阳性组、DDP-III高剂量组以及SDDP-III中、高剂量组小鼠血清IL-17、IL-23含量均显著降低,且SDDP-III中、高剂量组均显著低于DDP-III同剂量组,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),详见表2。

表2 DDP-III和SDDP-III对银屑病模型小鼠血清IL-17、IL-23含量和近尾部皮肤中有颗粒层鳞皮数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 2 Effects of DDP-III and SDDP-III on serum contents of IL-17 and IL-23 and the number of scales with granular layer near the tail ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	IL-17, pg/L	IL-23, ng/L	有颗粒层鳞皮数,个
正常组	29.85 ± 1.34	30.65 ± 2.53	7.27 ± 0.93
模型组	38.23 ± 2.29*	37.48 ± 4.27*	4.53 ± 0.58**
阳性组	29.48 ± 0.86 [#]	31.36 ± 1.75 [#]	10.88 ± 0.86 ^{***}
DDP-III低剂量组	37.16 ± 3.91	37.53 ± 5.86	5.03 ± 6.33
DDP-III中剂量组	35.32 ± 4.08	36.82 ± 2.59	7.03 ± 4.4
DDP-III高剂量组	31.56 ± 3.71 [#]	32.16 ± 2.61 [#]	8.66 ± 0.75 [#]
SDDP-III低剂量组	37.24 ± 5.22	36.43 ± 6.34	6.53 ± 1.26
SDDP-III中剂量组	31.28 ± 2.86 ^Δ	32.17 ± 3.55 ^Δ	9.08 ± 1.05 ^Δ
SDDP-III高剂量组	30.16 ± 2.20 ^Δ	31.73 ± 2.08 ^Δ	11.06 ± 0.86 ^{***Δ}

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$,[#] $P < 0.01$;与DDP-III同剂量组比较,^Δ $P < 0.05$,^Δ $P < 0.01$

Note: vs. normal group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. model group, [#] $P < 0.05$, [#] $P < 0.01$; vs. corresponding DDP-III group, ^Δ $P < 0.05$, ^Δ $P < 0.01$

2.6.3 小鼠皮肤病理学观察 取血后颈椎脱臼处死小鼠,取近尾部的背部皮肤一块(约1.0 cm×0.2 cm),于10%甲醛溶液固定24 h,石蜡包埋,切片(厚度约3~7 μm),经苏木精-伊红(HE)染色后,于生物显微镜下观察小鼠皮肤鳞片,计算每100个鳞片中有颗粒层鳞片数(凡两个毛囊口之间的鳞片表皮有排列成行的颗粒层者,即为“有颗粒层鳞片”)。统计学方法同“2.6.2”项。

结果显示,正常组小鼠皮肤表皮较薄、未见炎症细胞浸润,颗粒层密集。与正常组比较,模型组小鼠皮损表皮明显增厚,表皮内炎症细胞数量明显增多,颗粒层明显减少;其有颗粒层鳞片数显著减少,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,各给药组小鼠皮损表皮均有不同程度的改善,颗粒层有所增加;阳性组、

DDP-III高剂量组以及SDDP-III中、高剂量组小鼠有颗粒层鳞片数均显著增加,且SDDP-III中、高剂量组均显著多于DDP-III同剂量组,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),详见图6(图中箭头处即为“颗粒层”)、表2。

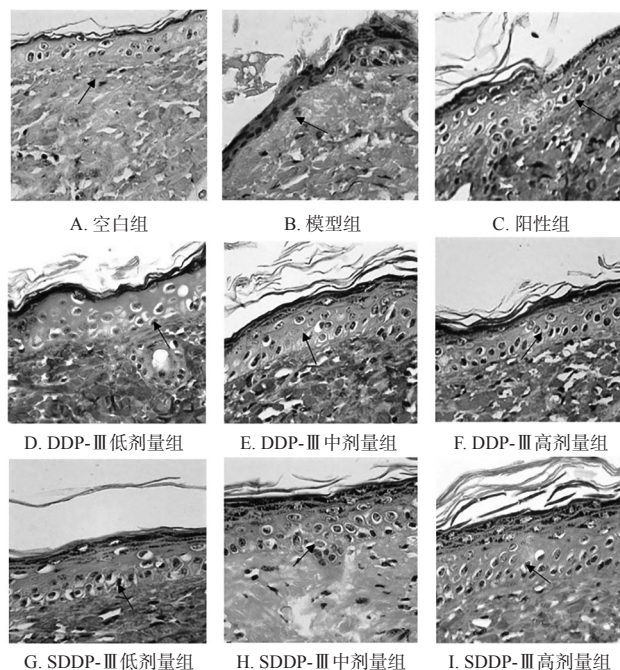


图6 各小鼠近尾部皮肤中有颗粒层鳞片显微图(HE染色,×200)

Fig 6 Micrographs of granular layer near the tail of mice in each group (HE staining, ×200)

3 讨论

DDP具有良好的抗氧化及免疫调节作用,但其水溶性欠佳阻碍了其生物活性的发挥,因此对DDP进行结构修饰,对提高其水溶性和生物利用度具有重要意义。硫酸酯化是较为常见的多糖结构修饰方式之一,多糖经硫酸酯化后,其糖链连接方式发生了改变,糖链排列会更加有序,其结构的优化可显著提高多糖的水溶性,并提高其与细胞膜受体蛋白的亲合性,最终提高其生物利用度^[15]。基于此,本研究对DDP进行精制,并对精制品DDP-III进行硫酸酯化修饰后制得SDDP-III。在考察其结构变化的基础上,观察并比较了DDP-III和SDDP-III抗银屑病的作用,以期为后续研究提供参考。

本研究采用水提醇沉法分离DDP后,通过DE-AE-52阴离子交换纤维素柱分离纯化得到DDP-I和DDP-II(得率分别为43.6%、12.2%);其中DDP-I经Sephadex G-100葡聚糖凝胶柱分离纯化得DDP-III(得率为56.4%)。随后,本研究采用柱前衍生化HPLC法对DDP-III的组成进行了初步分析。由于多糖缺少共轭结构,在紫外下无特征吸收,因此需要对其进行PMP衍生化,以提高其紫外吸收。结果显示,DDP-III主要由甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖等5种单糖

组成。

为提高DDP的生物利用度,本研究对DDP-Ⅲ进行硫酸酯化结构修饰,制得SDDP-Ⅲ(得率为103.6%),DS为0.65。硫酸酯化反应中的关键因素为酯化试剂的比例和反应时间;酯化试剂过多或反应时间过长均可导致多糖水解程度过高,使得原有结构受到破坏;反之则会导致硫酸酯化反应不完全^[16]。本研究结合前期预试验结果,将酯化试剂的加入量确定为12.5 mL(无水吡啶10 mL+氯磺酸2.5 mL),反应时间确定为3 h。然后采用红外、拉曼光谱及扫描电镜对DDP-Ⅲ、SDDP-Ⅲ的结构表征进行了比较。结果显示,除与DDP-Ⅲ有相似的特征吸收峰外,SDDP-Ⅲ分别在1 255、823 cm^{-1} (红外光谱)处出现了S=O伸缩振动吸收峰和C—O—S拉伸振动吸收峰,在1 240、815 cm^{-1} (拉曼光谱)处出现了S=O伸缩振动吸收峰和C—O—SO₃H基团的特征吸收峰。此外,扫描电镜显示,经硫酸酯化后,DDP-Ⅲ结构由光滑的片状结构变为具有孔洞的块状颗粒结构。这提示,DDP-Ⅲ经硫酸酯化修饰后,分子结构发生了明显改变。笔者分析可能是一O—SO₃H基团可与糖环中的一OH形成分子间或分子内氢键,改变糖分子的链接方式;同时在酸性条件下,糖分子中糖苷键更易断裂,且硫酸基的引入会导致正负电荷相互吸引并聚集成团,因此形成具有孔洞的块状颗粒结构^[17]。

银屑病的临床症状为大小不一的红色斑块,且表面覆盖多层银白色鳞屑并伴有不同程度的瘙痒,患者在发病过程中会出现表皮颗粒层减少、过度增殖、角质化不全以及真皮淋巴细胞浸润等病理现象。目前银屑病的发病机制尚未完全阐明,但普遍认为与IL-23/IL-17信号通路有关^[18]。初始T细胞在转化生长因子β(TGF-β)和IL-6的共同作用下促使CD4⁺效应T细胞向Th17细胞分化,并促进IL-23受体的表达,IL-23与其受体结合后激活下游非受体酪氨酸蛋白激酶(JAKs),并使受体胞内区的信号转导和转录激活因子3(STAT3)结合位点磷酸化,磷酸化的STAT3二聚体入核,诱导下游靶基因(IL-17A、IL-17F、IL-22)mRNA的转录、表达;IL-17A、IL-17F、IL-22可募集及活化中性粒细胞,诱导上皮细胞角质层异常增殖,最终导致银屑病的发生^[19-20]。本研究结果显示,与模型组比较,阳性组、DDP-Ⅲ高剂量组以及SDDP-Ⅲ中、高剂量组小鼠血清IL-17、IL-23含量均显著降低,皮肤有颗粒层鳞片数均显著上升,且SDDP-Ⅲ中、高剂量组上述指标均显著优于DDP-Ⅲ同剂量组。这提示DDP-Ⅲ和SDDP-Ⅲ均具有不同程度的抗银屑病作用,且SDDP-Ⅲ的作用更强。笔者分析两者抗银屑病作用的发挥可能与抑制IL-23/IL-17信号通路有关。此外,由于SDDP-Ⅲ中的一O—SO₃H的亲水性比DDP-Ⅲ中的一OH更强,且具有孔洞结构,使得SDDP-Ⅲ的亲水性得以提高,与相关信号因子的接触面积得以

增大,从而使其更易通过细胞膜的磷脂双分子层以发挥抗银屑病作用^[21]。

综上所述,DDP-Ⅲ和SDDP-Ⅲ均具有一定的抗银屑病作用,且经硫酸酯化修饰后的SDDP-Ⅲ的作用更强,其机制可能与抑制IL-23/IL-17信号通路有关。但其具体构效关系以及对IL-23/IL-17信号通路的上游信号和下游炎症因子表达的影响仍有待后续深入研究。

参考文献

- [1] 陈明,钟杰敏,刘冠萍,等.银屑病治疗靶点及其药物研发进展[J].中国医院药学杂志,2015,35(9):846-850.
- [2] 杨益平.银屑病治疗用抗体药物研发近况[J].药学进展,2017,41(1):71-76.
- [3] 刘雷,郭丽娜,于春磊,等.白鲜皮化学成分及药理活性研究进展[J].中成药,2016,38(12):2657-2665.
- [4] 周晓鹰,陈洁,金柳,等.白鲜皮的药理作用及抗炎活性成分研究进展[J].常州大学学报(自然科学版),2018,30(1):82-86.
- [5] 郭浩杰,杨严格,安乐,等.中药多糖的分子修饰及其药理活性研究进展[J].中草药,2015,46(7):1074-1080.
- [6] 刘军,白云凤,宫凯敏.猪苓多糖硫酸酯的制备及活性测定[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(14):64-66.
- [7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:110-111.
- [8] 景永帅,张丹参,吴兰芳,等.远志多糖的分离纯化、结构特征及生物活性[J].食品科学,2017,38(17):126-131.
- [9] 赵幻希,修洋,焦丽丽,等.生晒参、红参中中性多糖的分级及体外抗氧化活性研究[J].中国药房,2017,28(7):943-947.
- [10] 曾荣香,张清华,管咏梅,等.柱前衍生化高效液相色谱法测定地稔多糖中单糖组成[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(10):73-76.
- [11] 谢明勇,王之珺,谢建华.多糖的硫酸化修饰及其结构与生物活性关系研究进展[J].中国食品学报,2015,15(2):1-8.
- [12] KRICHEN F, KARAOUD W, SAYARI N, et al. Sulfated polysaccharides from tunisian fish skins: antioxidant, DNA damage protective effect and antihypertensive activities[J]. *J Polym Environ*, 2016, 24(2): 166-175.
- [13] 底婷婷,赵京霞,王燕,等.凉血活血胶囊对咪喹莫特诱导小鼠银屑病样皮损的干预作用[J].中国病理生理杂志,2012,28(4):718-722.
- [14] 刘秀卿,李卓成,吴文中.雷公藤多苷对咪喹莫特诱导银屑病样小鼠 Wnt/Frizzled 信号传导通路的影响[J].海南医学院学报,2016,22(11):1044-1047.
- [15] WANG Z, XIE J, SHEN M, et al. Sulfated modification of polysaccharides: synthesis, characterization and bioactivities[J]. *Trends Food Sci Technol*, 2018. DOI: 10.1016/j.tifs.2018.02.010.
- [16] 程晓强,申鹏飞,李胜男,等.胡桃楸种仁壳多糖的分子修饰研究[J].食品科技,2017,42(9):196-201.

岗梅根和茎超临界CO₂萃取物中低极性挥发性成分比较及其对IEC-6细胞增殖活性的影响^Δ

马洪艳*,汪天呈,李武国,刘嘉炜*(广州中医药大学中药资源科学与工程研究中心/岭南中药资源教育部重点实验室/国家中成药工程技术研究中心南药研发实验室,广州 510006)

中图分类号 R917;S481⁺.9 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)08-1056-05
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.08.09

摘要 目的:比较岗梅根和茎的超临界CO₂萃取物中的低极性挥发性化学成分及其体外对大鼠小肠隐窝上皮细胞IEC-6增殖活性的影响,为充分利用岗梅野生资源和扩大其药用部位提供参考。方法:采用超临界CO₂萃取法提取岗梅根和茎中的低极性挥发性化学成分,通过气质联用法(GC-MS)分析其化学成分组成。以IEC-6细胞为对象,采用不同质量浓度的岗梅根或茎超临界CO₂萃取物(0、1、5、10、20、40、60、80、100 μg/mL)处理细胞,以MTT法检测细胞相对活力,绘制细胞增殖曲线图并计算各萃取物的半数有效浓度(EC₅₀)。结果:通过GC-MS分析技术从岗梅根和茎超临界CO₂萃取物中分别鉴定出62、46个低极性挥发性化学成分,其中共有成分24个,主要为壬酸(根、茎中分别含14.18%、6.14%)、辛酸(根、茎中分别含10.59%、4.35%)、己酸(根、茎中分别含8.63%、10.86%)、丹皮酚(根、茎中分别含7.79%、6.00%)、2-甲基-3-苯基-丙醇(根、茎中分别含6.30%、0.58%)、乙酸(根、茎中分别含1.72%、33.77%)等。细胞体外试验结果显示,岗梅根和茎超临界CO₂萃取物质量浓度较低(≤60 μg/mL)时,能显著促进IEC-6细胞增殖,EC₅₀分别为16.35、20.20 μg/mL;而当质量浓度较高(≥80 μg/mL)时,则表现出细胞毒活性,对IEC-6细胞增殖呈抑制作用。结论:岗梅根和茎中的低极性挥发性化学成分种类相似,其萃取物对IEC-6细胞的体外生物活性也相似;短链脂肪酸很可能是其促进细胞增殖的活性成分,而丹皮酚则可能是其细胞毒活性成分。

关键词 岗梅;根;茎;低极性;挥发性成分;超临界CO₂萃取;气质联用;IEC-6细胞;细胞增殖

Comparison of Low-polarity Volatile Constituents in Supercritical CO₂ Extract from the Roots and Stem of *Ilex asprella* and Its Effects on the Proliferation of IEC-6 Cells

MA Hongyan, WANG Tiancheng, LI Wuguo, LIU Jiawei (Research Center of Chinese Herbal Resource Science and Engineering, Guangzhou University of TCM/Key Lab of Chinese Medicinal Resource from Lingnan/Lingnan Pharmaceutical Research and Development Laboratory, National Center for Engineering and Technology of Chinese Patent Medicine, Guangzhou 510006, China)

[17] WANG J, BAO A, MENG X, et al. An efficient approach to prepare sulfated polysaccharide and evaluation of anti-tumor activities in vitro[J]. *Carbohydr Polym*, 2018. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.12.065.

[18] GRINE L, DEJAGER L, LIBERT C, et al. An inflammatory triangle in psoriasis: TNF, type I IFNs and IL-17[J].

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81373432);广东省教育厅特色创新类项目(自然科学)(No.2017KTSCX044)

* 硕士研究生。研究方向:天然药物化学、抗肿瘤创新药物。E-mail:mahongyan2019@163.com

通信作者:研究员,博士生导师,博士。研究方向:天然药物化学、抗肿瘤创新药物。电话:020-39358547。E-mail:jiawei.liu@ymail.com

Cytokine Growth Factor Rev, 2015, 26(1):25-33.

[19] 赵京霞,底婷婷,王燕,等. IL-23/IL-17 炎症轴在咪喹莫特诱导的小鼠银屑病样皮肤损害中的作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2013, 29(6):1086-1094.

[20] 宋红霞,薛晓东.消银汤联合窄谱中波紫外线治疗寻常型银屑病血热证疗效及其对外周血IL-17、IL-23、IL-6水平的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(5):192-196.

[21] 刘铭,李娜娜,耿越.硫酸酯化马尾松花粉多糖对小鼠脾脏B淋巴细胞免疫调节作用的研究[J]. *中国细胞生物学学报*, 2014, 36(4):461-469.

(收稿日期:2018-07-29 修回日期:2018-12-14)

(编辑:张元媛)