

紫珠草多糖类物质的初步表征及抗补体活性研究

徐玉洁,王俊儒*

(西北农林科技大学 化学与药学院,陕西 杨陵 712100)

摘 要:采用水提醇沉法制备紫珠草粗多糖,后经活性炭脱色、Sevage 法脱除蛋白质、DEAE-52 (OH⁻)离子交换纤维素分离纯化得到一个紫珠草多糖类物质(ZZC-PC)。对该多糖类物质进行化学测定和光谱分析,应用细胞溶血法进行抗补体活性的研究。结果表明,该物质主要含多糖与木质素,分子量为 65.7 ku,具有明显的多糖特征峰;该物质具有较好的抗补体活性,其对经典途径和旁路途径的 CH₅₀ 为(1.95±0.1) mg·mL⁻¹、AP₅₀ 为(3.3±0.2) mg·mL⁻¹。

关键词:紫珠草;多糖;抗补体活性

中图分类号:S567.19 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2019)02-0194-05

Preliminary Characterization and Anti-complementary Activity of Polysaccharides from *Callicarpa macrophylla*

XU Yu-jie, WANG Jun-ru*

(College of Chemistry and Pharmacy, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China)

Abstract: Crude polysaccharide was obtained from *Callicarpa macrophylla* by water extraction and ethanol precipitation method. Then the crude polysaccharides were purified by active carbon decoloration, sevice deproteinization and DEAE-52 (OH⁻) ion exchange cellulose to prepare the polysaccharide (ZZC-PC). The polysaccharide was characterized by chemical and spectral analysis and its anti-complementary activity was evaluated by the hemolysis assay. The results showed that ZZC-PC was mainly composed of polysaccharides and lignin possessing obvious absorption peaks of polysaccharide, and the molecular weight (MW) was 65.7 ku. It had potent anti-complementary activity, which inhibited complement activation on both the classic and alternative pathways with CH₅₀ value of (1.95±0.1) mg·mL⁻¹ and AP₅₀ value of (3.3±0.2) mg·mL⁻¹, respectively.

Key words: *Callicarpa macrophylla*; polysaccharide; anti-complementary activity

紫珠草(*Callicarpa macrophylla*)为马鞭草科(Verbenaceae)紫珠属(*Callicarpa*)植物,含黄酮类、鞣质类、多糖类、羟基化合物如倍半萜等活性成分,具有止血、散瘀、消炎的功能,用于治疗月经不调、烧伤、痢疾、疮疖、创伤出血、上呼吸道感染、肺炎、支气管炎等疾病^[1-3]。紫珠草的消炎功能,通常可认为能够改善炎症早期的红、水肿、痛、渗出等情况^[4]。

补体系统是人体重要的免疫系统之一,在维持机体内环境稳态中起着非常重要的作用。当因其他条件的影响过度激活补体系统或出现异常调控状态时,人体生理系统会发生紊乱,出现诸如肾脏疾病、老年痴呆、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮等^[5-6]。因此,对紫珠草进行提取得多糖类物质,并对其抗补体活性进行研究,以期为紫珠草资源的进一步开发及找到较好的抗补体天然药物提供参考。

收稿日期:2017-12-05 修回日期:2018-10-15

基金项目:有机枸杞深加工技术研发和服务(K4030217109)。

作者简介:徐玉洁,女,在读硕士,研究方向:药用植物化学成分。E-mail: xuyj8991@163.com

* 通信作者:王俊儒,男,博士,教授,研究方向:植物资源化学和化学生物学。E-mail: wangjr07@163.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

紫珠草购置于广西国药控股广西有限公司, DEAE-52(OH⁻ 型)离子交换纤维素购于 Whatman 公司,苯酚、硫酸、氢氧化钠等购置于国药集团化学试剂公司,葡萄糖标准品、木质素标准品购置于阿拉丁试剂有限公司,2%绵羊红细胞、豚鼠血清均来自于武汉生物制品检定所。

1.2 主要仪器和设备

RE52-AA 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);紫外可见分光光度计 721(上海美谱达仪器有限公司);TENSOR 27 傅里叶红外光谱仪(布鲁克公司);岛津 LC-2010 液相色谱仪(岛津);DNM-9602 酶联免疫检测仪(北京普朗新科技有限公司)。

1.3 紫珠草粗多糖的提取

1 kg 紫珠草地上部分粉碎过筛后用工业乙醇(1:10,*m/v*)浸泡 5 d。收集药材残渣,用蒸馏水(1:10,*m/v*)80℃提取残渣 3 次,每次 2 h。收集提取液浓缩,加入 3 倍体积的无水乙醇,4℃沉淀过夜,3 500 r/min 离心 10 min 弃去上清,沉淀用丙酮和乙醚反复洗涤,40℃干燥。对烘干后的粗多糖依次进行透析、TCA-Sevage 法脱蛋白^[7]和脱色^[8]处理。

1.4 紫珠草粗多糖的精制

称取紫珠草粗多糖 4 g,加入 200 mL 蒸馏水搅拌溶解,离心,取上清,通过 DEAE-52 离子交换纤维素柱分离。依次用蒸馏水、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mol·L⁻¹ NaCl 洗脱,采用硫酸苯酚法^[9]检测并合并糖含量多的洗脱部分(ZZC-PC),冷冻干燥后低温保存。

1.5 ZZC-PC 的分子量测定

测定参考孙长霞^[10]等的方法,适当做了调整。色谱条件:waters515 色谱仪,2414 示差检测器,ultrahydrogelTM(250、1 000、2 000、7.8×300 mm),流动相 0.05% NaN₃-3mMNaAc 溶液,0.5 mL/min,进样量 20 μL。取分子量为 5.2、10、48.6、668、2 000 ku 系列的葡聚糖标准品进行测定,记录对应保留时间,分子量对数值(log*M_w*)为 Y 轴,保留时间 *T* 为 X 轴绘制标准曲线。

取适量的样品(0.1~0.5 mg),用 HPGPC(高效凝胶渗透色谱)流动相溶解后离心取上清 20 μL,用 HPGPC 检测并记录出峰时间,根据标准曲线求得待测多糖样品的平均相对分子质量。

色谱柱多糖保留时间与分子量的关系式:log(*M_w*)=-0.186 9*T*+12.061

1.6 ZZC-PC 组成成分测定

采用硫酸苯酚法^[9],以葡萄糖溶液浓度为 X 轴,490 nm 波长测得吸光度值为 Y 轴绘制葡萄糖标准曲线,并测定样品中的中性糖含量。

采用改良乙酰溴法^[11],以木质素溶液浓度作 X 轴,吸光度(280 nm 波长)值作 Y 轴绘制木质素标准曲线并测定样品中木质素含量。

依照考马斯亮蓝法^[12],以蛋白溶液浓度为 X 轴,吸光度(595 nm 波长)值为 Y 轴绘制牛血清白蛋白标准曲线并测定样品中蛋白含量。

采用四硼酸钠硫酸-间羟联苯法^[13],以半乳糖醛酸的量为 X 轴,吸光度(520 nm 波长)值为 Y 轴绘制糖醛酸标准曲线并测定样品中糖醛酸含量。

1.7 ZZC-PC 的红外光谱分析

将 1.4 得到的 ZZC-PC 样品干燥至恒重,并称取 2 mg 该样品,将 2 mg ZZC-PC 均匀分布在 200 mg 溴化钾中,然后将混合粉末压片,在 4 000~400 cm⁻¹下扫描处理后的该样品,观察扫描到的红外光谱图。

1.8 ZZC-PC 的单糖组成

1.8.1 标品衍生化 称取标准品甘露糖、鼠李糖、阿拉伯糖、葡萄糖、半乳糖、葡萄糖醛酸及半乳糖醛酸各 5 mg,配制成浓度为 0.5 mg/mL 的混标溶液。取 0.1 mL 上述混标,加 0.3 mL 0.6 mol/L NaOH 和 0.4 mL 0.5 mol/L PMP 溶液,70℃反应 100 min,反应完毕后迅速冷却,加 0.6 mL 的 HCl(0.3 mol/L)混匀后,加去离子水至 2 mL,用等体积的氯仿进行萃取 3 次,所得水相过 0.22 μm 滤膜后用高效液相色谱仪测定。

1.8.2 样品的水解及衍生化 称取 4 mg 待测样品置于反应管中,加 2 mol·L⁻¹ TFA 4~6 mL,充 N₂ 后密封,120℃反应 100 min 后,冷却至室温,加入少量甲醇,减压浓缩至干,重复多次至完全除去 TFA。水解后的样品用 0.5 mL 蒸馏水溶解,按上述方法进行衍生化,过 0.22 μm 滤膜,HPLC 测定^[14]。

1.8.3 色谱测定条件 EclipseXDB-C18 柱(4.6×250 mm);磷酸缓冲溶液(0.01 mol·L⁻¹,pH 6.7):乙腈(79:21,*v:v*),流速为 1 mL/min,进样量为 20 μL;SPD-15C 紫外检测器,检测波长 245 nm,柱温 30℃。

1.9 ZZC-PC 的抗补体活性分析

1.9.1 抗补体经典途径 采用细胞溶血法测定 ZZC-PC 经典途径的抗补体活性^[15]。

补体经典溶血系统的建立:取补体(豚鼠血清)按照 1:4、1:8、1:16、1:32、1:64、1:128、1:

256 用巴比妥缓冲液对倍稀释成相对应浓度的溶液。参照文献[16]中方法,筛选达到相似高溶血率的最低补体浓度作为临界补体浓度。

取确定的临界浓度的补体与供试品混匀,37℃水浴 10 min,按表 1 加入对应试剂,37℃水浴 30 min 后离心(4℃,5 000 r·min⁻¹,10 min),移液枪取上清 200 μL 至 96 孔板中,酶标仪设置 405 nm 波长后测其吸光度。同时设置全溶血组、补体组和多糖对照组。GraphPad Prism 软件进行数据处理,作图时将 X 轴表示为供试品浓度,因此相对应的,Y 轴是溶血抑制率,根据该图计算 CH₅₀。

表 1 在经典溶血测定中使用的每种组分的体积

Table 1 Volume of each component used in classical hemolysis assays

分组	补体组	平行试验组	ZZC-PC 测定组	完全溶血组
ZZC-PC	—	0.1	0.1	—
补体	0.1	—	0.1	—
2%SRBC	0.1	—	0.1	0.1
溶血素	0.1	—	0.1	—
BBS	0.3	0.5	0.2	—
三蒸水	—	—	—	0.5

1.9.2 抗补体旁路途径 采用细胞溶血法测定 ZZC-PC 旁路途径的抗补体活性^[17]。

补体旁路溶血系统的建立:用 AP 稀释液将补体(人血清)配制成 1:2 的溶液,然后按 1:4、1:8、1:16、1:32、1:64、1:128 用 BBS 对倍稀释成相应浓度的溶液。参照文献[16]中方法,筛选达到相似高溶血率的最低补体浓度作为临界补体浓度。

取确定临界浓度的补体与供试品混匀,操作同经典途径的抗补体活性测定步骤,按表 2 加入试剂。GraphPad Prism 软件进行数据处理,作图时将 X 轴表示为供试品浓度,而 Y 轴则用浓度相对应的溶血抑制率值,根据该图计算 AP₅₀。

表 2 在旁路途径测定中使用的每种组分的体积

Table 1 Volume of each component used in the alternative pathway assay

分组	补体组	平行试验组	ZZC-PC 测定组	完全溶血组
ZZC-PC	—	0.15	0.15	—
补体	0.15	—	0.15	—
0.5%RE	0.20	—	0.20	0.20
AP 稀释液	0.15	0.35	—	—
三蒸水	—	—	—	0.30

2 结果与分析

2.1 ZZC-PC 的纯化

经 DEAE-52 型离子交换纤维素纯化,在 0.2

mol·L⁻¹ NaCl 浓度条件下洗脱出较多的糖分物质,经 HPGPC 检测,如图 1 所示,出现窄的对称峰,说明为分子量均一的多糖^[18]。

2.2 ZZC-PC 的分子量

由高效凝胶渗透色谱 (HPGPC)测得 ZZC-PC 的出峰时间为 38.754 min,计算得 ZZC-PC 的分子量为 65.7 kDa。

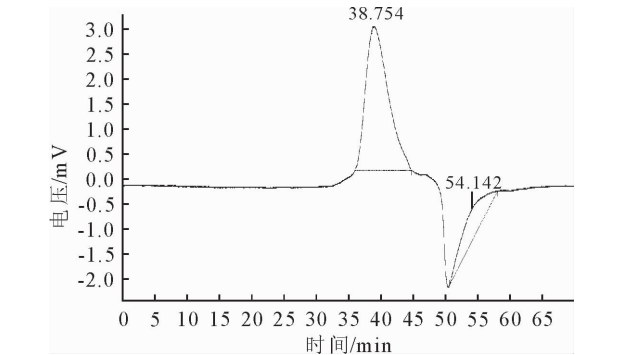


图 1 HPGPC 鉴定 ZZC-PC 图谱

Fig. 1 HPGPC chromatogram of ZZC-PC

2.3 ZZC-PC 的组成成分

对 ZZC-PC 中中性糖、木质素、蛋白质及糖醛酸的含量进行了测定,明确了该多糖物质的组成成分,测定结果如表 3 所示。

表 3 ZZC-PC 的组成测定结果

Table 3 Compound analysis of ZZC-PC

样品	中性糖	木质素	蛋白质	糖醛酸
ZZC-PC	35.6±3.13	56.9±5.69	4.8±1.32	8.2±2.81

2.4 ZZC-PC 的红外分析

由图 2 观察可知,在 1 632 cm⁻¹处可看到 1 个较强的吸收峰,此处是由结构中的 C=O 产生的振动吸收。另外在 3 393 cm⁻¹处可观察到 1 个明显的由羟基(-OH)的伸缩振动而产生的宽的强吸收峰,并且在此吸收峰附近 2 933 cm⁻¹处还可观察到由亚甲基(C-H)而产生吸收峰,说明组分中存在此结构。

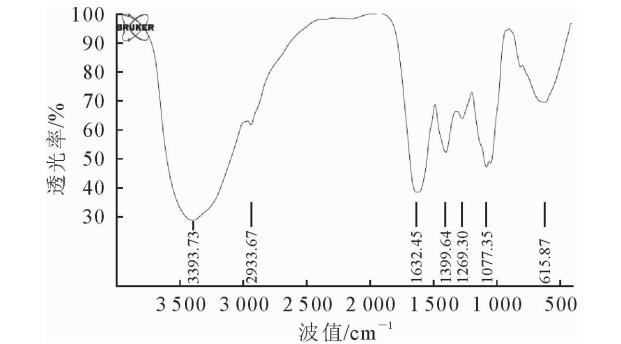
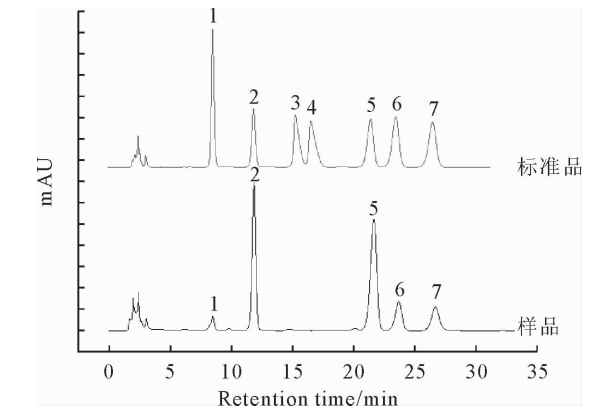


图 2 ZZC-PC 的红外光谱

Fig. 2 IR spectrum of ZZC-PC

2.5 ZZC-PC 的单糖组成

7 种单糖标准品的出峰顺序依次是甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖^[19]。图 3 为标准品与 ZZC-PC 的 HPLC 对比图。通过对比标准品的保留时间和多糖样品的保留时间确定了该样品所含单糖的种类以及比例,结果如表 4 所示,该多糖样品主要含有甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖。



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. 半乳糖、7. 阿拉伯糖。

图 3 单糖的 PMP 衍生物高效液相色谱
Fig. 3 Chromatograms of monosaccharide PMP derivatives

表 4 ZZC-PC 的单糖组成成分				
Table 4 The monosaccharide composition of ZZC-PC %				
Man	Rha	Glc	Gal	Ara
2.25	40.90	38.44	9.31	9.06

2.6 ZZC-PC 的抗补体活性

2.6.1 抗补体经典途径 取补体(豚鼠血清)按照 1 : 4、1 : 8、1 : 16、1 : 32、1 : 64、1 : 128、1 : 256 用巴比妥缓冲液对倍稀释成相对应浓度的溶液,然后将其应用到溶血测定中并观察实验结果(以上所用补体为 5 个批次)。结果可从图 4 数据显示得出,在补体稀释浓度为 1 : 4、1 : 8、1 : 16、1 : 32 时,溶血率的值约为 1,表示此状态下体系可认为已达全溶血。以次为依据确定 1 : 32 的稀释浓度作为该途径的临界补体浓度。其宗旨是确保该系统是可溶血的,并且提高了药物筛选方法的灵敏度。

在临界补体浓度下测定 ZZC-PC 的经典抗补体活性,结果如图 5 所示,ZZC-PC 的经典途径抗补体活性 CH₅₀为(1.95±0.1)mg/mL。

2.6.2 抗补体旁路途径 补体旁路途径溶血效价的评价:用 AP 稀释液将补体(人血清)配制成 1 : 2 的溶液,然后按 1 : 4、1 : 8、1 : 16、1 : 32、1 : 64、1 : 128 用 BBS 对倍稀释成相应浓度的溶液,将其应用到溶血测定中并观察试验结果(以上所用补体为

5 个批次)。如图 6 所示,在 1 : 2、1 : 4、1 : 8 的稀释浓度时,溶血率的值约为 1,可认为体系在此时为完全溶血状态。该系统在实现全溶血的先决条件下,同时提高了药物筛选方法的灵敏度,以此为依据选择稀释浓度 1 : 8 为临界补体浓度。

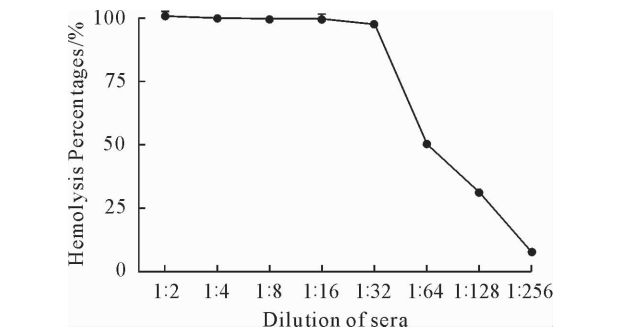


图 4 豚鼠血清在各稀释浓度下经典途径的效价(%,n=5)
Fig. 4 Titer of guinea pig serum in different diluted concentrations by classic pathway(%,n=5)

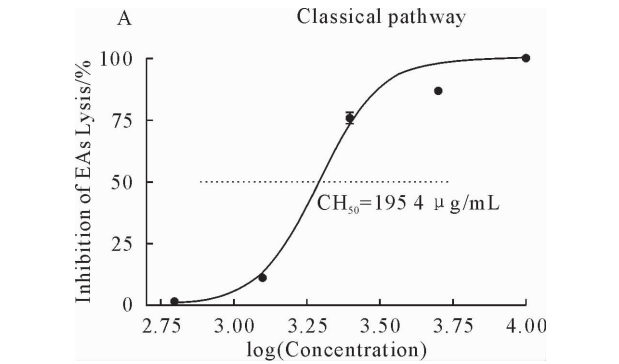


图 5 经典途径下 ZZC-PC 的抗补体活性
Fig. 5 The anticomplement activity of ZZC-PC in the classical approach

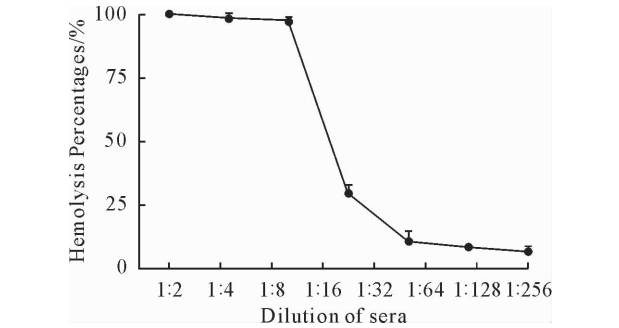


图 6 人血清在各稀释浓度下旁路途径的效价(%,n=5)
Fig. 6 The titer of the bypass pathway of human serum at each diluted concentration(%,n=5)

在临界补体浓度下测定 ZZC-PC 的旁路抗补体活性,结果如图 7 所示,ZZC-PC 的旁路途径抗补体活性 AP₅₀为(3.3±0.2)mg/mL。

3 结论

利用水提醇沉法对紫珠草进行提取,制得有效成分 ZZC-PC,并开展相对应试验对 ZZC-PC 组分进

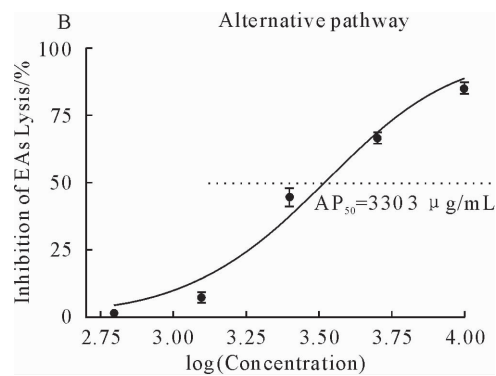


图7 旁路途径下 ZCC-PC 的抗补体活性

Fig. 7 The anticomplement activity of ZCC-PC in bypass pathway 行表征,包括基本结构。活性试验经 2 种途径测定该组分的抗补体活性。对紫珠草粗糖经活性炭吸附法除去色素,Sevage 法脱除蛋白,DEAE-52(OH⁻)离子交换树脂纤维素分离纯化得到纯度较高的紫珠草多糖类物质 ZCC-PC。采用 HPGPC 法测得该物质的相对分子量为 65.7 kDa。分析其红外光谱结果,可观察到多糖特征峰,得出 ZCC-PC 组分具备多糖结构。此外,对 ZCC-PC 组分做了经典和旁路 2 种途径的抗补体活性测试,结果也显示出该物质相当不错的抗补体活性。说明 ZCC-PC 组分,既能有效抑制抗原-抗体复合物激活所引起的补体系统紊乱,也可以在初期的细菌性感染发生时,尚未产生特异性抗体时就发挥重要的抵抗感染功能。这些结果为 ZCC-PC 组分在抗补体药物中的应用提供了基础的科学依据,同时提供了开发紫珠草资源新的途径。

参考文献:

[1] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社,1996.

[2] HU Y, SHEN Y, GAN F, *et al.* Four diterpenes from *Callicarpa pedunculata* [J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2002,30(10):999-1001.

[3] CHEN C X, SHEN Y M, HE H P, *et al.* Two new diterpenoids from *Callicarpa pedunculata* [J]. *Helvetica Chimica Acta*, 2006,89(5):1017-1022.

[4] 李淑兰,李文慧,刘宝生. 大叶紫珠草对肾炎血尿模型大鼠尿红细胞和血清 IL-1 影响[J]. *西部医学*, 2010,22(9):1584-1585, 1589.

LI S L, LI W H, LIU B S. Impact of Zizhi on urine red cells and serum IL-1 in mice[J]. *Medical Journal of West China*, 2010, 22(9):1584-1585, 1589. (in Chinese)

[5] 季鸣,王丽娜,金晶,等. 补体系统药物研究进展[J]. *中国生化药物杂志*, 2016,36(12):7-10.

Ji M, WANG L Y, JIN J, *et al.* Overview of complement-targeted therapy[J]. *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics*, 2016,36(12):7-10. (in Chinese)

[6] 王聪慧,叶波平. 补体与疾病[J]. *药物生物技术*, 2014,21(5): 483-486.

[7] 李娟丽,王冬梅,朱玮,等. 卷叶黄精多糖精制工艺的研究[J]. *西北林学院学报*, 2007,22(4):139-142.

LI J L, WANG D M, ZHU W, *et al.* The study on the refine technology of polysaccharide from *Polygonatum cirrhifolium* root[J]. *Journal of Northwest Forestry Univesity*, 2007, 22 (4):139-142. (in Chinese)

[8] 张丽萍,盛义保,马惠玲,等. 苹果多糖除杂脱色工艺的筛选 [J]. *西北林学院学报*, 2007,22(1):141-144.

ZHANG L P, SHENG Y B, MA H L, *et al.* Deprotein and de-pigment of maluspumila polysaccharides from apple pomace [J]. *Journal of Northwest Forestry Univesity*, 2007, 22 (1): 141-144. (in Chinese)

[9] MASUKO T, MINAMI A, IWASAKI N, *et al.* Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format [J]. *Analytical Biochemistry*, 2005,339(1):69-72.

[10] 孙长霞,苏印泉,张柏林. 不同产地松萝中多糖的分子量分布及活性研究[J]. *西北林学院学报*, 2014,29(1):100-104.

SUN C X, SU Y Q, ZHANG B L. Studies on the molecular weight distribution and biological activities of polysaccharide of *Usneas* from different locations[J]. *Journal of Northwest Forestry Univesity*, 2014,29(1):100-104. (in Chinese)

[11] HIYAMA K, WALLIS A F. Determination of lignin in herba-ceous plants by an improved acetyl bromide procedure[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1990,51(2): 145-161.

[12] 王文平,郭祀远,李琳,等. 考马斯亮蓝法测定野木瓜多糖中蛋白质的含量[J]. *食品研究与开发*, 2008,29(1):115-117.

WANG W P, GUO S Y, LI L, *et al.* The determination of pro-tein content in polysaccharides from stanuntonia chinensis with coomassie brilliant blue method[J]. *Food Research and Developent*, 2008,29(1):115-117. (in Chinese)

[13] IBARZ A, PAGÁN A, TRIBALDO F, *et al.* Improvement in the measurement of spectrophotometric data in the mhydroxydiphenyl pectin determination methods[J]. *Food Control*, 2006, 17(11): 890-893.

[14] 王清洁. 桦褐孔菌多糖类化合物的结构及其生物活性的初步研究[D]. 杨陵:西北农林科技大学, 2015.

[15] SAMUELSEN A, LUND I, DJAHROMI J, *et al.* Structural features and anti-complementary activity of some heteroxylan polysaccharide fractions from the seeds of *Plantago major* L. [J]. *Carbohydrate Polymers*, 1999,38(2):133-143.

[16] 焦杨,邹录惠,邱莉,等. 5 种马鞭草科药用植物的抗补体活性 [J]. *中国药科大学学报*, 2016,47(4):469-473.

JIAO Y, ZHOU L H, QIU L, *et al.* Anticomplementary effects of the extracts of five *Verbenaceae* herbs *in vitro* [J]. *Journal of China Pharmaceutical University*, 2016,47(4):469-473. (in Chinese)

[17] CAI Y, ZHOU X, HAN A, *et al.* In vitro immunological and anti-complementary activities of two water-soluble lignins from *Zizyphus jujube* cv. *Jinchangzao* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017,105:204-212.

[18] 牛红. 三种药用植物多糖的提取分离、结构表征及生物活性的研究[D]. 杨陵:西北农林科技大学, 2017.

[19] 莫开菊,赵娜,朱照武,等. 葛仙米多糖的单糖组成分析[J]. *食品科学*, 2015,36(18):89-92.