

# 通花梗根多糖分离纯化及生物功能研究\*

李云川, 杨亚丽, 邓思兰, 王德祥, 余晓东  
(重庆师范大学 生命科学学院, 重庆 400047)

**摘要:**以通花梗根为实验材料,对通花梗根多糖的分离纯化、含量测定和组分分离进行研究,探讨该多糖对小鼠巨噬细胞吞噬功能的影响。采用正交实验设计选择提取通花梗根多糖的优化条件;采用碳粒廓清实验测定多糖对小鼠巨噬细胞吞噬功能的作用。实验结果显示:①提取通花梗根多糖的优化条件为:料水比为1:30,时间2 h,温度90℃;②乙酸铅用量在0.67%以上,可以除净糖液中的蛋白质,乙酸铅用量在0.31%~0.77%之间时,不仅可以排除蛋白质的干扰,而且不会影响多糖得率;③多糖溶液中含醇量达80%以上时,可以完全沉淀多糖;④乙醇分级沉淀该多糖,通过Sephadex G-100柱进行组分分离,得到7个洗脱峰;⑤通花梗根多糖组的碳粒廓清指数(K)和吞噬指数( $\alpha$ )显著高于模型组。实验结果表明,通花梗根多糖由7种单一多糖组分构成,具有提高小鼠单核巨噬细胞吞噬功能的作用,为进一步阐明通花梗根多糖的药理作用奠定了实验基础。

**关键词:**通花梗根多糖;分离纯化;生物活性;巨噬细胞;碳粒廓清

**中图分类号:**Q949.763.2;Q946.3

**文献标识码:**A

**文章编号:**1672-6693(2008)01-0078-05

活性多糖是一种具有某些特殊生理功能的多糖类高分子化合物,广泛存在于植物、动物和微生物组织中。20世纪60年代后,活性多糖作为广谱免疫促进剂引起了人们极大的兴趣。80年代又发现活性多糖的糖链在分子生物学中具有决定性的作用,能控制细胞分裂和分化,调节细胞的生长和衰老。近年来,多糖结构与功能的关系以及多糖复合物疫苗等研究在国际上受到了较多的关注。多糖类化合物具有免疫增强与调节、抗肿瘤、抗病毒、抗凝血、抗放射、抗衰老等作用<sup>[1-2]</sup>。通花梗(*Engler Abelia*)属于五加科,分布于长江以南各省区和陕西等地,其根是一种含有生物活性多糖的药材。早在《本草纲目》上介绍其具有提高免疫力、治疗胃病、抗炎症、抗痢疾、通乳等药效,但目前在国内外对通花梗的根多糖生理生化性质的研究未见报道。本研究初步确定通花梗根多糖的药理作用,为后期研究和开发利用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂及仪器

通花梗采于重庆沙坪坝虎溪区;小鼠由第三军医大学实验动物中心提供。

实验用Sephadex G-100为Pharmacia公司产品。UV-9100紫外可见分光光度计为北京瑞利分析仪器厂产品。高速冷冻离心机冷冻干燥机为德国进口。

### 1.2 实验方法

(1)通花梗根多糖含量测定:

硫酸-萘酚法测定多糖含量<sup>[3]</sup>

$$\text{多糖得率} = \frac{\text{通花梗根多糖浓度}(\text{mg/mL})}{\text{通花梗根浸提液浓度}(\text{mg/mL})} \times 100\%$$

(2)糖液中蛋白质的除去。乙酸铅法<sup>[4]</sup>:配制2%乙酸铅溶液,在多糖水溶液中逐滴加入2%乙酸铅溶液,混合振荡,4000 rpm离心10 min,除去沉淀的变性蛋白质,直到加最后一滴乙酸铅溶液,无蛋白质沉淀为止。Sevage法<sup>[5]</sup>:按多糖水溶液1/3体积比加入Sevage试剂(氯仿:正丁醇=4:1),混合振荡30 min,静置20 min,除去水层与溶剂层交界处的变性蛋白质,重复3次。

(3)蛋白质含量的测定方法。取样液加2%乙酸铅溶液沉淀蛋白质,滤纸过滤,取滤液加Folin-酚试剂在595 nm处,测定吸光度。

(4)多糖提取条件的正交试验设计。根据影响

\* 收稿日期 2007-03-19 修回日期 2007-09-10

资助项目:重庆师范大学挑战杯基金资助

作者简介:李云川(1985-)男,2004级本科学子,研究方向为生物技术。通讯作者:余晓东, E-mail: yxd@cqnu.edu.cn

多糖提取的主要因素,选择不同的时间、温度、料水比为参试因子,采用  $L_9(3^3)$  正交设计表,对多糖提取工艺条件进行优化,确定通花梗根多糖的最优提取条件。各因子的水平及因素参见表1。

表1  $L_9(3^3)$  正交实验设计表

水平	因素		
	温度/℃	时间/h	加水比
1	80	1.5	1:10
2	90	2	1:20
3	100	2.5	1:30

(5)多糖的乙醇分级沉淀及组分分离<sup>[6-7]</sup>。取粗多糖,加蒸馏水溶解,逐步加入乙醇,使含醇量依次达到60%、80%,分步收集各级组分多糖,将分级沉淀的多糖,在 Sephadex G-100 凝胶柱(2×100 cm)上层析分离,用0.9% NaCl 溶液洗脱,每管收集5 mL,用硫酸-蒽酮法检测,至无糖流出为止。

(6)通花梗多糖对小鼠巨噬细胞吞噬功能的影响<sup>[8-10]</sup>。取24只KM小鼠(体重18~22 g)随机平均分成三组,第一组为实验组,第二组为模型组,第三组为正常对照组。第一组每天注射4 g/L 灭菌的多糖溶液0.5 mL,第一、二组前3天每天注射3 g/L 氯化可的松溶液0.5 mL,第二、三组每天注射灭菌生理盐水0.5 mL,连续给药8 d。小鼠在第8天给药后2 h,将各鼠尾部静脉注射25%印度墨汁10 mL/kg,开始计时,用微量取样器(预先用肝素润湿)分别在第2、10 min 时眼眶取血20 μL,分别加入2 mL 0.1% 碳酸钠溶液中,摇匀,在680 nm 处测定OD值。采血后的小鼠处死取其肝和脾,并称肝和脾的总重量。按下式计算廓清指数K及吞噬指数α。

$$K = \frac{\lg OD_{2 \min} - \lg OD_{10 \min}}{8}$$

$$\alpha = \frac{\text{体重(g)}}{\text{肝脾总重(g)}} \times \sqrt[3]{K}$$

## 2 结果与分析

### 2.1 通花梗根多糖含量测定

2.1.1 乙酸铅加入量对多糖含量测定的影响 试验结果(见图1)表明,乙酸铅用量在浓度为0.31%~0.77%范围内时,既能很好地排除蛋白质干扰,又不会影响多糖的得率。因此,本实验在测定多糖含量时,加入乙酸铅使浓度达到0.31%~0.77%。至于乙酸铅影响多糖含量测定的机理还不很清楚,需要做进一步的研究。

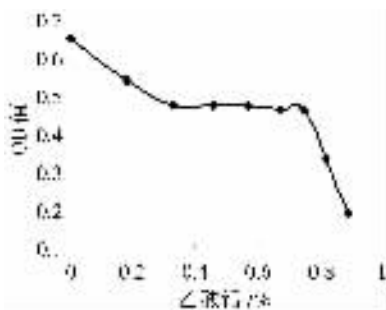


图1 乙酸铅加入量对多糖含量测定的影响

2.1.2 乙酸铅除去蛋白质的效果研究 试验结果(见图2)表明,当样液中乙酸铅浓度为0.67%时,用Folin-酚法测得的吸光度(OD值)为0,这说明糖液中的蛋白质已除净。因此要除净糖液中的蛋白质,排除蛋白质对多糖含量测定的影响,乙酸铅用量要在0.67%以上。

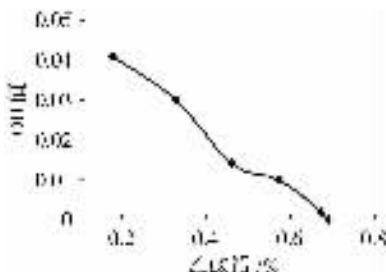


图2 乙酸铅除蛋白质的效果研究

2.1.3 沉淀多糖时乙醇加入量的选择 取多糖溶液各1 mL,分别加无水乙醇2、3、4、5、6、10 mL,测OD值结果如图3。从图中可知,加入4倍乙醇量和加入10倍乙醇量测定的结果基本一致,说明4倍的乙醇加入量已把多糖完全沉淀下来。因此,采用4倍乙醇加入量。

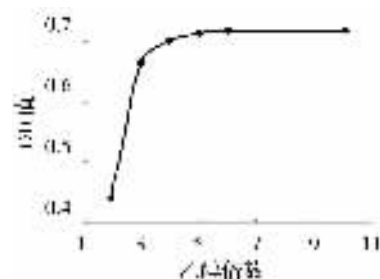


图3 沉淀多糖时乙醇加入量的选择

### 2.2 通花梗根多糖提取条件研究

2.2.1 浸提时间对多糖提取的影响 选取温度90℃,加水比1:10,分别加热1、1.5、2、2.5、3.0 h,取样液2 mL,乙醇沉淀多糖后,测定多糖的含量。结果(见图4)表明:提取时间在1~2.5 h之间,多糖得率是逐渐增大的,继续延长加热时间,多糖得率反而减小,因此选择2.5 h。

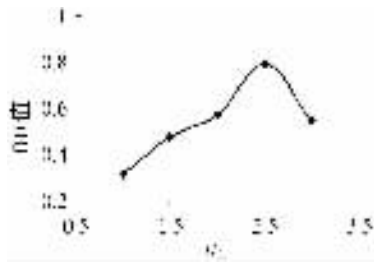


图4 时间对多糖得率的影响

2.2.2 浸提温度对多糖提取的影响 分别在60℃、70℃、80℃、90℃、100℃加热2 h,取样液2 mL,乙醇沉淀多糖后,测定多糖的含量(OD),结果(见图5)表明:浸提温度对多糖得率的影响很大,60℃下得率很低,90℃时得率达到峰值,温度升至100℃时,多糖得率变小。因此,采用90℃作为通花梗根多糖的浸提温度。

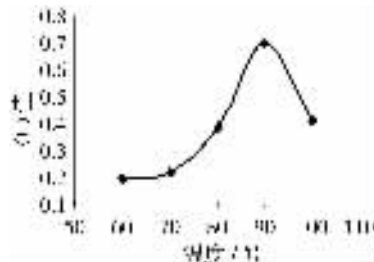


图5 温度对多糖得率的影响

2.2.3 浸提料水比对多糖提取的影响 用料水比为1:10、1:20、1:30、1:40、1:50的多糖溶液,在90℃下加热2 h,取样液2 mL,测定多糖的含量,实验结果如图6。从图中可知,加水比由1:10变为1:20时,多糖得率直线上升,继续增大加水量,多糖的得率变化不大。这样反而会增加下一步浓缩的负担,因此,选用料水比为1:20比较合理。

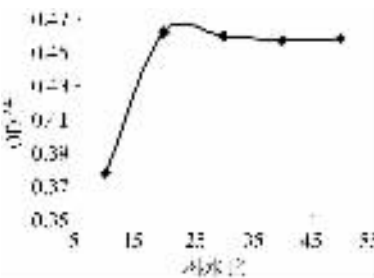


图6 料水比对多糖得率的影响

2.2.4 多糖提取条件正交实验 L<sub>9</sub>(3<sup>3</sup>) 以温度、时间、料水比作为研究对象,以多糖得率为指标,作 L<sub>9</sub>(3<sup>3</sup>)设计的正交实验,结果见表2。从表2中极差R的大小可得出温度、时间、料水比对多糖得率影响的显著性。直观分析表明,料水比是影响多糖得率的

最关键因素,其次是提取时间,在实验范围内,温度的影响最小。各因素的最优水平分别是料水比为1:30、时间2 h、温度90℃。

表2 正交试验结果

No.	温度/℃	时间/h	料水比	多糖得率/%
1	80	1.5	1:10	0.41
2	80	2	1:20	0.67
3	80	2.5	1:30	0.78
4	90	1.5	1:20	0.60
5	90	2	1:30	1.03
6	90	2.5	1:10	0.38
7	100	1.5	1:30	0.69
8	100	2	1:10	0.29
9	100	2.5	1:20	0.74
K <sub>1</sub>	0.62	0.57	0.36	
K <sub>2</sub>	0.67	0.66	0.67	
K <sub>3</sub>	0.57	0.63	0.83	
R	0.10	0.09	0.47	

正交试验的方差分析结果见表3。料水比差异显著( $P < 0.05$ )对通花梗根多糖得率的影响起最主要作用,温度和时间差异不显著,在此实验范围内对测定结果的影响较小。这与直观分析结果是相吻合的。

表3 正交试验结果的方差分析

变异来源	偏差平方和	自由度	均方	F值
温度	0.0026	2	0.0013	0.5000
时间	0.0002	2	0.0001	0.0385
料水比	0.3302	2	0.1651	63.500*
误差	0.0051	2	0.0026	
总变异	0.3381	8		

注:\*为差异显著  $P < 0.05$

### 2.3 多糖的乙醇分级沉淀及组分分离分析

2.3.1 不同乙醇含量沉淀多糖的组分分离 通过Sephadex G-100柱层析,60%乙醇沉淀多糖有4个主要洗脱峰,说明其主要有4个分子量大小不同的多糖组分。而80%乙醇沉淀多糖有3个主要洗脱峰,说明其主要有3个分子量大小不同的多糖组分(见图7、8)。说明通花梗根多糖由7个单一多糖组分构成。

2.3.2 对不同乙醇含量沉淀多糖的鉴定 60%、80%乙醇沉淀多糖都在195 nm附近有多糖的特征吸收峰,而都在280 nm和260 nm附近无蛋白质和核酸的特征吸收峰(见图9、10),茚三酮法检测未见变色,说明多糖溶液中蛋白质和核酸已除净。

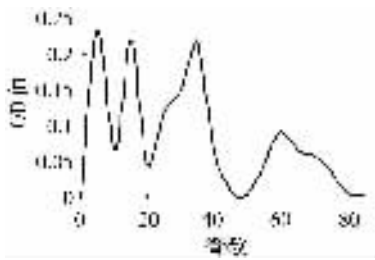


图 7 60% 乙醇沉淀多糖洗脱曲线

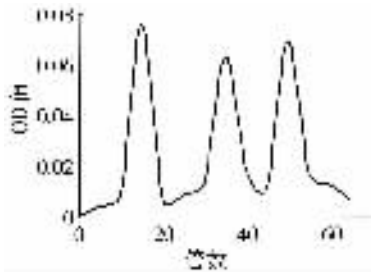


图 8 80% 乙醇沉淀多糖洗脱曲线

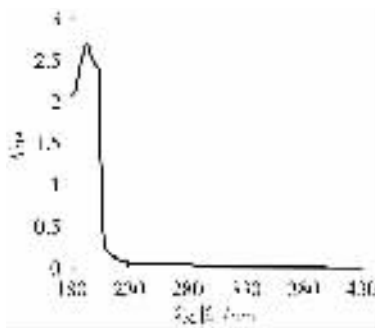


图 9 60% 乙醇沉淀多糖鉴定

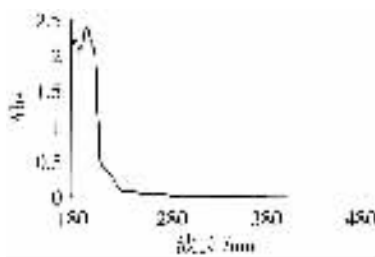


图 10 80% 乙醇沉淀多糖鉴定

## 2.4 通花梗根多糖对小鼠巨噬细胞吞噬功能的影响

吞噬功能试验结果如表 4。组间  $t$  检验表明:模型组小鼠的碳廓清指数和吞噬指数明显降低,与正常对照组相比具有显著性差异,说明造模成功。实验组与模型组相比碳廓清指数和吞噬指数具有显著性差异,表明通花梗根多糖具有提高小鼠单核巨噬细胞吞噬功能的作用。

## 3 讨论

(1)热水浸提法是一种常用的多糖提取方法,其影响因素主要有加热温度、加热时间、料水比等。

表 4 通花梗根多糖对小鼠巨噬细胞吞噬功能的影响( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

组别	$K$	$\alpha$
正常对照组	$0.0359 \pm 0.0121^{**}$	$4.3800 \pm 0.7566^*$
模型组	$0.0194 \pm 0.0037^{\Delta\Delta}$	$3.6409 \pm 0.4673^{\Delta}$
实验组	$0.0402 \pm 0.0063^{**}$	$4.6488 \pm 0.4218^{**}$

注:与模型组比较, $*p < 0.05$ , $**p < 0.01$ ;与正常对照组比较, $\Delta p < 0.05$ , $\Delta\Delta p < 0.01$

从热力学角度上讲,温度越高,加热时间越长,对材料细胞壁的破坏作用越大,多糖得率会越高。但是温度过高,加热时间太长,可能引起多糖结构的变化和破坏<sup>[11]</sup>。从这两方面考虑,在提取多糖时,应选择合适的加热温度和加热时间。本文对温度、时间和料水比,通过正交实验,对通花梗根多糖提取条件进行了优化选择。最优水平分别是料水比 1:30、时间 2 h、温度 90℃。本文只从温度、时间、料水比 3 方面考查对多糖的得率的影响,没有涉及其它因素。为了提高多糖的得率,有必要在此基础上,考查其它因素对多糖得率的影响。

(2)用硫酸-萘酚法测定多糖含量时,蛋白质遇到硫酸有显色反应,单糖、低聚糖和色素也会有显色反应,这些因素都会影响多糖的测定结果。所以在用硫酸-萘酚法测定多糖含量前必须先除去蛋白质和色素等物质的干扰。

(3)本实验用 Sevage 法除去蛋白质 5 次后,仍存在蛋白质,去除蛋白质的效果很不理想,而且糖液的颜色也比较深,因此该法在本实验中不适用。本实验利用重金属沉淀蛋白质的原理,用乙酸铅作蛋白质沉淀剂。在用 Sevage 法除蛋白质 3 次后,再用乙酸铅沉降剩下的蛋白质,当乙酸铅浓度在 0.31%~0.77% 时,不会影响多糖的得率;当乙酸铅浓度在 0.67% 时,既能除净蛋白质,同时色素也被除净。

(4)通花梗根多糖是由分子量大小不同的多糖组分组成,用不同乙醇浓度可将不同分子量大小的多糖分离开来。不同分子量大小的多糖组分通过选用合适的凝胶柱和洗脱液,可以将多糖组分很好地分离开来。每一多糖组分有单一的对称洗脱峰,通过峰的个数可以判断有多少种多糖组分。本实验选用 Sephadex G-100 层析柱,用 0.9% 氯化钠洗脱液来洗脱,得到通花梗根多糖由 7 个单一多糖组分构成。在此基础上,有必要进一步对该多糖的组成成分和结构进行研究。

(5)在影响小鼠非特异性免疫方面,通过免疫低下模型碳廓清实验结果显示,实验组(注射通

花梗根多糖溶液的小鼠)的碳廓清指数和吞噬指数明显增大,与模型组相比具有显著性差异( $p < 0.01$ ),说明该多糖具有提高小鼠单核巨噬细胞吞噬功能的作用。通花梗根多糖具有明显提高机体免疫的作用,可能通花梗根多糖是通花梗根药用的主要活性物质,但这有待于进一步对该多糖的其它生物活性功能进行研究。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 方积年. 多糖的研究现状[ J ]. 药学报, 1986 21( 12 ): 944-949.
- [ 2 ] 方一苇. 具有药理活性多糖的研究现状[ J ]. 分析化学, 1994 22( 9 ) 955-960.
- [ 3 ] 仇萍. 灵芝口服液中灵芝多糖含量测定方法研究[ J ]. 湖南中医药导报, 2000 6( 3 ) 37-38.
- [ 4 ] 何国亮. 灵芝饮品中灵芝肽多糖含量的测定[ J ]. 营养学报, 1998 20( 1 ) :102-104.

- [ 5 ] 张惟杰. 复合多糖系生化研究技术[ M ]. 上海:上海科学技术出版社, 1994.
- [ 6 ] 徐任生. 天然产物化学[ M ]. 北京:科学出版社, 1993.
- [ 7 ] TAICHI U. Isolation and Characterization of Antitumor Active  $\beta$ -D-glucans from the Fruit Bodies of *Ganoderma Applanatum*[ J ]. Carbohydrate Research, 1983, 115-273.
- [ 8 ] 方泰惠. 药理实验方法学[ M ]. 南京:南京中医药大学出版社, 1999. 155-160.
- [ 9 ] 苗明三. 实验动物和动物实验技术[ M ]. 北京:中国中医药出版社, 1997. 130-152.
- [ 10 ] KIM HM, HAN SB, OH GT, et al. Stimulation of Humoral and Cell Mediated Immunity by Polysaccharide from Mushroom *Phellinus Linteus*[ J ]. Int J Immunopharmacol, 1996, 18( 5 ) 295-303.
- [ 11 ] 罗立新, 姚汝华, 周少奇. 灵芝多糖的分离与纯化[ J ]. 食品工业科技, 1998( 3 ) 4-7.

## Studies of the Separation Purification and Biological Function of *Engler Abelia* Polysaccharides

LI Yun-chuan, YANG Ya-li, DENG Si-lan, WANG De-xiang, YU Xiao-dong

( College of Life Science, Chongqing Normal University, Chongqing 400047, China )

**Abstract:** The authors use the root of *Engler Abelia* as experiment material and study the separation purification, content determination and composition separation of polysaccharides in order to investigate the effect of the *Engler Abelia* polysaccharides of macrophage phagocytosis function. Methods: Use the orthogonal experiment; research into polysaccharides extraction conditions; use the carbon clearance experiment; investigate the effect of polysaccharide of macrophage phagocytosis function. Results: ①The optional operation conditions are as follows: temperature 90°C, ratio of water and material 1:30, heating-time 2.0h. ②When the value of lead acetate is over 0.67%, the protein does not exist. When the value was between 0.31% and 0.77%, the polysaccharides content is determined accurately. ③The 80% ethanol concentration may make all the polysaccharides precipitate. ④The polysaccharides component is studied by gel chromatography which contains seven eluting peaks. ⑤The carbon clearance  $Nd(K)$  and phagocytosis  $Nd(\alpha)$  of polysaccharides group increase markedly to model group. Conclusion: The polysaccharides is composed of seven species of the single polysaccharides composition. It could boost the englobement function of macrophage of the mouse. This will lay a foundation for further explaining the pharmacological action of *Engler Abelia* polysaccharides.

**Key words:** *Engler Abelia* polysaccharides; separation purification; biological activity; macrophage; carbon clearance

( 责任编辑 李若溪 )