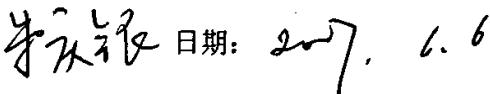


缩略词表

缩略语	英文全称	中文名称
ALT	alanine aminotransferas	谷氨酸氨基转移酶
Ara	Arabinose	阿拉伯糖
CCl ₄	tetrachloride	四氯化碳
FR	Free Radical	自由基
Gal	galactose	半乳糖
Glc	glucose	葡萄糖
AST	glutamic oxaloacetic transaminase	谷草转氨酶
HB	Hepatitis B	乙型病毒性肝炎
HBV	Hepatitis B Virus	乙型肝炎病毒
HPLC	high performance liquid chromatography	高效液相色谱
Man	mannose	甘露糖
MDA	Maleic Dialdehyde	丙二醛
PS	polysaccharides	多糖
Rha	Rhamnose	鼠李糖
SOD	Superoxide Dismutase	超氧化物歧化酶
SWP	<i>Sarcopyramis nepalensis</i>	
	Wall 's Polysaccharides	楮头红总多糖
T-AOC	total anti-oxidative capacity	总抗氧化能力

独创性声明

本人声明，所呈交的学位（毕业）论文，是本人在指导教师的指导下独立完成的研究成果，并且是自己撰写的。尽我所知，除了文中作了标注和致谢中已作了答谢的地方外，论文中不包含其他人发表或撰写过的研究成果。与我一同对本研究做出贡献的同志，都在论文中作了明确的说明并表示了谢意，如被查有侵犯他人知识产权的行为，由本人承担应有的责任。

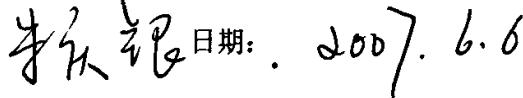
学位（毕业）论文作者亲笔签名:  日期: 2007. 6. 6

论文使用授权的说明

本人完全了解福建农林大学有关保留、使用学位（毕业）论文的规定，即学校有权送交论文的复印件，允许论文被查阅和借阅；学校可以公布论文的全部或部分内容，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文。

保密，在 年后解密可适用本授权书。

不保密，本论文属于不保密。

学位（毕业）论文作者亲笔签名:  日期: 2007. 6. 6

指导教师亲笔签名:  日期: 2007. 6. 6

摘 要

目的:从楮头红全草中分离提取多糖,并优化提取条件;纯化多糖并进行结构分析和体内、体外生物活性研究。为楮头红药材临床应用和楮头红多糖产品的开发提供参考依据。

方法:(1)采用经典的水提醇沉的方法和苯酚-硫酸法测定多糖含量,在单因素分析(提取时间、提取次数、料液比、酒精用量)的基础上进行 $L_9(3^4)$ 正交分析,优化提取条件;

(2)将粗多糖依次通过Sevag法去除蛋白、去色素和DEAE-52柱、sephadexG-200柱纯化分级得一单组分,用HPLC法检测纯度;

(3)结合液相色谱、气相色谱、红外光谱、核磁共振光谱等方法和化学分析法初步鉴定多糖的一级结构及部分理化性能;

(4)通过体外抗氧化试验、体外细胞免疫功能试验,体内保肝(四氯化碳肝损伤模型)试验,分析多糖的抗氧化、保肝护肝和提高免疫力等生物活性。

结果:(1)正交试验结果表明,多糖提取的优化条件为:温度为100℃,固液比1:60,时间2.5h;提取三次,醇沉时加入四倍量乙醇。按此优化条件提取,经测定楮头红中总糖含量为15.9%。

(2)经过两次柱层析分离得到两个单一组分SWPⅠ、SWPⅡ;经HPLC鉴定均为组分相对单一。

(3)SWPⅡ经IR图谱分析和NMR分析显示具有多糖的特征吸收峰,主链以 β -型糖苷键连接为主,少量 α -型糖苷键;经元素分析、红外和紫外综合分析表明SWPⅡ中没有N、S元素存在,应为非氨基糖;经TLC和GC分析其单糖组成为鼠李糖(Rha)葡萄糖(Glc)、半乳糖(Gal),摩尔比为11.6:16.4:28.6;经HPLC法分析其平均相对分子质量为848 180。

(4)体外抗氧化试验表明,楮头红总多糖具有较好的抗氧化作用。在总多糖浓度为3.0mg/mL时,其对羟自由基清除率达39.3%;对超氧阴离子自由基具有一定的清除作用;当纯一多糖(SWPⅡ)浓度为4mg/mL时,对H₂O₂诱导的小鼠红细胞氧化溶血的抑制率可达87.3%;当浓度为1.4mg/mL时对脂质过氧化作用抑制率达到50%;体外细胞培养表明,多糖能够促进脾淋巴

细胞转化, 巨噬细胞吞噬中性红能力和 NO 产生量不同程度的增强; 小鼠体内免疫试验表明多糖对体内相关酶 (IgG、IgM、T-AOC、SOD) 活性具有增强作用, 脾脏指数有所增加。

结论:按正交试验得出多糖提取的优化工艺与条件, 多糖提取率高, 条件温和, 操作简单, 易于实现产业化; 经纯化得到的纯多糖为杂多糖 (Heterosaccharide), 具有抗氧化、保肝和增强免疫力等功能。

关键词:楮头红; 多糖; 纯化; 结构分析; 生物活性

Study on the Extraction,Structure and Biological Activity of Polysaccharides(SWP) from *Sarcopyramis nepalensis* Wall.

Abstract

Objective: Extract and isolate polysaccharides from *Sarcopyramis nepalensis* Wall, seeking optimum conditions of extraction. Study on the purification of polysaccharides, the structure of polysaccharides, and biological activity in vivo and vitro. To elucidate new pharmacological action and new medicinal value, and furnish the theoretical basis for developing and exploiting new drug from *Sarcopyramis nepalensis* Wall.

Methods: (1) Classical hot water extracting and ethanol precipitating method was employed to isolate polysaccharides and the content of total sugar was determined by phenol-sulfuric acid method. Single factor tests were done to analyze the influence of each factor including temperature, extraction time, ratio of material to water, extraction times, and the volume of ethanol. Then the optimum conditions for the extraction were obtained by using orthogonal design $L_9(3^4)$.

(2) After the crude SWP was extracted with hot water and precipitated with ethanol, protein and pigment were also removed. DEAE-cellulose chromatography was used to separate crude SWP, further purification was carried on by SephadexG-200 chromatography. Finally, its homogeneity was proved by HPLC.

(3) The chemical composition of SWP II was analyzed by using TLC, gas chromatography, Uv spectrum, IR spectrum, NMR spectrum. The monosaccharide and linkage of SWP II were investigated through chemical analyzation.

(4) Antioxidant activity of polysaccharides in vitro are determined by cell culturing, liver injury which was induced by carbon retrachloride model, were carried out to examine SWP's anti-oxidation, hepatoprotective, immunostimulating activity.

Results: (1) The results of single factor tests and orthogonal experiments demonstrated that the optimum SWP extraction conditions are as follows: solid-liquid ratio is 1:60, temperature is 100 °C, extraction time is 2.5 hours, the extraction times is

3 and precipitated with four times of alcohol.Under this condition,the content of total sugar is 15.9 %.

(2)The crude polysaccharide was fractionated by column chromatography DEAE -52、Sephadex G-200, and SWP I 、SWP II were obtained. It was proved to be homogeneous polysaccharide on molecular weight.

(3)IR and NMR spectroscopy analysis revealed the main chain of SWP II mostly linked by β -glycosidic bond,rarely linked by α -glycosidic bond;IR,UV and element analysis showed that N and S is absent,it's not a aminosugar.The results of GC and TLC analysis showed the monosaccharide are Rha,Glc and Gal,with the molar ratio of 11.6:16.4:28.6.The average molecular weight of SWP II is 848,180.

(4)The results of the vitro-anti-oxidation suggested that SWP had good anti-oxidation action,with the dosage of 3.0 mg/mL the inhibitory rate on hydroxyl free radical was 39.3%,each dosage could inhibite superoxide anion,with the dosage of 4.0 mg/mL (SWP II) the inhibitory rate on the restraining auto-oxididation of erythrocytes was 87.3%,with the dosage of 1.4 mg/mL the inhibitory rate on lipidperoxidation was 50%.We found that SWP II and crude SWP could increase proliferation index of splenic lymphocyte.SWP could significantly augment the percentage of activated macrophage, phagocytic activity,the amount of NO.Each dose group of SWP could significantly increase the activies of IgG、IgM、T-AOC、SOD ,and can enhance the weight of liver and spleen compared with control group.

Conclusion:By using single factor tests and orthogonal design,we got the optimum conditions for extraction of SWP.Using this method,the extraction yield is high,the reaction conditions are gentle,easy to operate,apt to industrialization.The homogeneous heterosaccharide SWP,obtained by the optimized extraction and purification method,showed a good anti-oxidation and hepatoprotective.activities and also had a strong immunity activities.

Key words: *S.nepalensis* Wall, Polysaccharide, Purification, Structure analysis, biological activities

前 言

1 楮头红

楮头红 (*S.nepalensis* Wall.), 又名肉穗草、风鼓斗草(风柜斗草), 属于野牡丹科 (*Melastomaceae*) 中的肉穗草属 (*Sarcopyramis* Wall.). 直立草本, 高 10~30 cm. 茎脆弱, 有 4 棱, 无毛。叶对生, 卵形或卵状披针形, 长 2~6 cm. 宽 1~3.5 cm, 边缘有细锯齿, 叶面粗糙, 疏生粗毛。叶背隙上有疏毛; 叶柄长 0.5~2 cm. 花数朵簇生枝顶或叶腋, 紫红色; 萼管长 3~6 mm, 先端钝齿; 花瓣 4 片, 卵形, 长 0.7~1 cm; 雄蕊 8 枚, 花药顶端孔裂; 子房半下位。蒴果倒圆锥形。7~10 月开花^[1]。生于林下、沟边阴湿处。主要分布于东南亚和我国的四川、云南、广西、广东、江西、台湾、福建等地。据《中药大词典》记载: 楮头红全草可药用, 具有清热解毒、清肝泻火之效, 是治疗急性肝炎、肺热咳嗽、蛇头疔、无名肿毒、胃肠炎等疾病的珍稀名贵中草药^[2]。对急性肝炎(甲肝、乙肝急性期)疗效最佳, 对慢性肝炎及乙肝病毒携带者有效, 在福建民间已广泛应用, 疗效显著, 安全可靠, 使用方便, 是一种良好的中草药资源, 值得研究开发和推广运用。根据文献记载^[3], 野牡丹科约有 240 属, 3000 多种, 分布于热带和亚热带地区, 尤以美洲最多, 我国有 25 属, 160 种, 其中的大部分植物均具有抗炎、抗菌、抗病毒等功效, 在民间作为中草药治病广为使用。所以开展对楮头红活性成分及其生物学功能的研究可为广泛研究开发野牡丹科天然药用植物资源提供借鉴。

乙型病毒性肝炎 (HB) 是严重危害人民健康的常见传染性疾病, 世界卫生组织估计全球有 3.5 亿人感染了乙型肝炎病毒 (HBV)^[4], 大约 1/4 的 HBV 携带者最终转化为慢性活动性肝炎、肝硬化、肝癌患者。目前我国约有 1.2 亿人为乙肝病毒携带者^[5], 现有乙肝患者达 3 千万人之多, 每年有近 50 万人死于与乙肝有关的疾病, 而且这一数字目前正呈上升趋势。长期以来, 面对这种令人棘手的病症, 人们一直苦于缺少有确定疗效的药物。加强对慢性乙型肝炎药物的研究意义重大。目前世界上还没有专门杀灭乙肝病毒的特效药, 大都通过保肝、提高机体的免疫力来抵抗病毒。近 30 年来, 发现多糖具有复杂的多方面的生物活性和功能, 已成为天然药物及保健品研发的重要组成部分。据文献报道^[6], 已有近 100 余种植物的多糖被分离提取出来。据不完全统计, 2002 年全球糖类药物及保健品销售

额已达到193亿美元,预计到2010年我国保健市场销售额将达到1000亿元人民币,其中植物多糖将是极有应用潜力的资源之一。国内已研制并应用到临床的灵芝多糖、牛膝多糖等产品,已收到较好的经济和社会效益。所以植物多糖作为一种免疫促进剂和抗病毒剂在治疗乙肝方面具有很高的研发价值和广阔的市场前景。

楮头红用于治疗乙肝在民间已广为使用,但药理作用尚不清楚,国内外尚无相关文献报道,据我们初步研究,楮头红含有丰富的多糖,且有抗氧化、抗小鼠肝脂质化和保肝功能,可能是其治疗乙肝的活性物质之一。说明了楮头红被广泛用于治疗乙型肝炎具有一定的药效物质基础,这是本研究立论的基础和依据。开展对楮头红多糖提取分离和成分结构鉴定以及保肝利胆、免疫促进作用等药理活性以及构效关系研究,进而通过构效关系对多糖进行化学修饰与改构,以改进多糖的理化性质和生物活性,为开发治疗乙肝新药提供参考,对多糖药物的药理研究具有很好促进作用。在丰富糖生物学和糖化学研究内容方面具有重要学术意义。楮头红药材人工栽培已成功实现产业化,我国乙肝患者众多,开发该多糖类治疗乙肝药物,具有很好的产业化前景。

2 多糖

2.1 多糖的研究概述

多糖 (polysaccharides, PS) 又称多聚糖,是构成生命的四大基本物质之一,作为高等植物、动物细胞膜和微生物细胞壁中的天然高分子化合物,人们对糖类的早期研究只注意到它作为能源物质的重要性和细胞的组成成分。长期以来,中药化学与药理研究工作多侧重于脂溶性化学成分,而对水溶性中药多糖类有效成分重视不够,多糖在生物体中的作用仅被认作能量资源或结构材料,在天然生物活性成分研究中往往当作杂质被除去。自 20 世纪 70 年代以来^[7]科学家发现多糖及糖复合物在生物体中不仅是作为能量资源和构成材料,更重要的是它存在于一切细胞膜结构中的一类天然大分子化合物。多糖作为药物始于 1943 年,但是,在较长时间内没有得到足够的重视。50 年代,随着化学和生物学的发展和分离技术的提高。人们才开始认识到多糖的结构是非常复杂多样的,其生物学功能也决非仅仅是能量和结构上的功能。60 年代前后,多糖作为广谱免疫促进剂引起人们极大的兴趣,逐渐发现多糖具有复杂的、多方面的生物活性和功能。70 年

代以来，随着免疫物质、生物膜和各种生物活性物质研究进展表明，发现糖类在体内具有各种关键的生物功能。80年代以后，人们得到了有关糖的结构和功能的越来越多的信息。特别是近十年来人们对糖的认识有了质的飞跃，认识到糖是除核酸和蛋白质之外另一重要的生命物质，参与生命现象中细胞的各种活动，具有多种多样的生物学功能，特别是免疫调节作用。

许多中草药的活性与糖有着密切的关系^[8]。从20世纪60年代以来，多种不同结构和组成的糖类不断被发现，对其新功能的认识不断加深，逐渐发现许多对肿瘤、肝炎、心血管、抗衰老等方面有独特的生物活性，且细胞毒性极低。中国在芸芝多糖、银耳多糖、刺五加多糖、竹黄多糖和黄芪多糖等的研究中取得很大的成绩。如今，越来越多的研究表明，多糖有增进机体免疫功能，它不但能治疗机体免疫系统受到的严重损伤的肿瘤，还能治疗多种免疫缺陷疾病，如慢性病毒性肝炎和某些耐药细菌或病毒引起的慢性病。近年来的研究还发现，多糖可作为生命活动中起核心作用的遗传物质，它能控制细胞分裂和分化，调节细胞的生长与衰老。

植物源多糖类化合物由于其独特功能和低毒性，在临床中显示出越来越广阔前景，1997年全球从植物中提取的糖类药物的销售额达73亿美元^[9]。到目前为止，已有300多种多糖类化合物从天然产物中被提取出来，其中从中药中获得的水溶性多糖最为重要，已发现有100多种中药中的多糖类化合物具有免疫促进作用。我国近年来对植物多糖，特别是具有中国特色的中草药多糖的药物活性已有广泛报道，例如：报道降血糖的中草药已达到100余种，其中有显效的也有20种。其它如具有抗肿瘤、抗衰老、抗病毒、抗放射、抗突变、抗遗传损伤、抗凝血、抗血栓等药物活性的报道很多，但弄清结构说明构效关系尚少见。中草药作为药物开发及理论研究，我国已落后于日本、韩国。目前在中草药中的某些品种，特别是生物活性明确的中草药来源的多糖，如何能较快达到符合国际规范的新药是很迫切的任务。

国际上对糖类的研究日新月异，内容包括糖生物学、糖工程等，并且相继多次召开了有关“糖生物学和糖工程”的专题会议，1995年3月，亚洲分子生物学组织(AMBO)还在日本举办了“糖生物学和糖工程”培训班^[10]。目前，日本、美国、及欧盟十分重视糖类的研究^[11]，且在糖的研究与开发处于领先地位，并且提出各

自的重大科研计划.欧盟在1994—1998年的研究计划中启动了“欧洲糖研究与开发平台”,旨在协调欧洲的糖研究与开发,强化在糖的研究成果转化成商品与美国和日本竞争的能力。值得指出的是我国对于糖的研究尚无重大计划。纵观近十年,有关多糖的研究日益增多,到目前为止,虽然只有云芝多糖、猪苓多糖、香菇糖、裂褶多糖、茯苓多糖等少数应用于临床,但它们在抗肿瘤、抗凝血、抗突变、降血脂、抗衰老、抗病毒等疑难病症的治疗方面已显示了诱人的前景。有关专家预言“21世纪将是多糖的时代”预示着多糖研究的广阔前景。

糖化学已有上百年的发展史^[12],多糖以及糖结合物的分离、纯化、组分测定和结构分析也有了长足进步,但由于其结构和立体化学的多样性,仍然是“成熟”了的化学所难于处理的对象,但与蛋白质和核酸的研究相比还有很大差距,还不够深入,主要体现在以下几个方面^[13,14]:1)多糖的结构和功能的关系至今仍然是多糖研究的薄弱环节,大多还是凭科学家的分析和推测,而对多糖的溶液构象和晶体结构的研究几乎还是空白;2)多糖的结构测定方法还远未达到像核酸和蛋白质结构测定那样的自动化、微量量化和标准化。由于糖分子中每个多糖残基都有多个反应点,这使糖苷键具有多种可能性。而构型又有 α 和 β 两种,这使得多糖的结构测定还远比蛋白质和核酸结构测定来得困难。虽然近来有人用质谱和核磁共振以及毛细管电泳等技术来测定多糖的结构,但是局限性也较大。3)多糖的合成(目前实际上只是寡糖的合成)也远比多肽和多聚核酸的合成复杂和困难;4)多糖在体内的作用机制还未十分明了。该领域还有待人们通过大量创新性、探索性工作去进行深入研究。作为重要的植物化学成分,多糖已成为现在科学家研究的重要领域,不断受到人们的关注。多糖正逐渐成为当今新药开发的重要方向之一。

2.2 多糖来源

多糖是自然界中含量最丰富的生物聚合物,几乎存在于所有的生物体中。多糖按来源不同分为四大类:植物多糖、动物多糖、藻类多糖及微生物多糖。其中研究得比较多的是植物多糖和微生物多糖。

2.3 多糖的提取和纯化

2.3.1 多糖的提取、分离

目前常用的提取多糖的方法主要有^[15,16]:

水提醇沉法 多糖常与其它成分共存于中药中，可利用多糖不溶于乙醇的性质在提取液中加乙醇、甲醇或丙酮使多糖从提取液中沉淀出来，达到初步纯化的目的。如岑颖洲等提取羊栖菜多糖^[15]。水提醇沉是现在提取多糖应用最多的一种方法。

碱提取法 多糖的结构不同，可用弱碱性水溶液提取含有糖醛酸的多糖。碱法提取虽然可提高多糖的收率，且可缩短提取时间，但提取液中含有其它杂质，如蛋白质等，粘度过大，过滤困难。

酸提取法 含葡萄糖醛酸等酸性基团的多糖，也可用乙酸或盐酸使成酸性再加乙醇，使多糖沉淀析出，也可加入铜盐等生成不溶性络合物或盐类沉淀而析出。应注意的是在酸性条件下可能引起多糖中糖苷键的断裂，且对容器造成腐蚀，除弱酸外，一般不宜采用。

微波提取法 微波萃取技术作为一种新型的萃取技术，其特点体现在微波的选择性高，萃取时间短，适用于热敏性成分的萃取，可供选择的溶剂较多，同时减少了溶剂的用量。同时还可将其与超临界流体萃取结合运用，解决微波萃取中溶剂残留问题。如王莉等应用微波技术提取板蓝根多糖。

超声法 超声提取一般是在常温条件下进行，避免了高温对有效成分的破坏以除去单糖和低聚糖。如江发寿等研究了超声提取法提取沙枣多糖^[16]，经烘干处理的沙枣。采用超声法提取植物多糖，可避免因结构改变产生错误的结论，造成研究工作的复杂化。但现在超声萃取仍多用于实验室，在生产中很少应用。

酶法 近年来，酶法已经广泛的应用于中药花粉多糖、药用菌胞内多糖及动物药多糖的提取。如李道荣等研究了蒲黄花粉的酶法破壁条件^[16]。酶法作用条件温和，通过酶法破壁去除杂质可以明显提高收率。但该技术同时存在着一定的局限性：酶的最佳温度及最佳pH值往往在一个很小的范围内，为使酶的活性提高到最大值，必须严格控制酶反应时的温度及pH值，反应条件的微小波动，都可能使酶的活性大大降低，因此对实验设备有较高的要求；酶法提取用于工业化的中药提取中还需综合考虑酶浓度、底物浓度、抑制剂和激动剂等对提取物有何影响。

CO₂超临界萃取 超临界流体萃取技术是近年来发展起来的一种新的提取分离技术。如廖周坤等采用超临界CO₂萃取法从藏药雪灵芝中提出了多糖类成

分。由于超临界CO₂具有较好的溶剂特性,对于挥发性较强的成分、热敏性物质和脂溶性成分的提取分离效果明显,具有保持有效成分的活性和无残留溶剂等优点。

超滤法 超滤是一种膜分离技术,其作用原理主要是筛分作用。如念保义等用超滤膜分离装置对香菇多糖浸提液进行了分离、浓缩^[15]。超滤法分离多糖效率极高,很少破坏,且操作简便,只需控制操作压力、流速和滤液浓度即可。这对于分子量相对较大、且分布范围较宽,溶液粘度大且不稳定的多糖来说,是一种极具发展潜力的分离手段。

随着对多糖认识的不断加深,寻找一种有效的提取方法是迫切需要解决的问题。目前提取多糖的方法很多,每种都有其优缺点。要根据提取物的性质、提取成本、工艺设备等选择适合的提取方法,提高多糖类的提取率,减少原材料的消耗。

提取多糖时蛋白质常会一起被提取,且多糖大多因含色素而颜色较深,需加脱色剂除去色素和脱蛋白。目前常用的脱色剂有活性碳、H₂O₂等,常用的脱蛋白方法有Sevag法、三氯乙酸沉淀法、ZnSO₄沉淀法、酶法及鞣酸法等。

2.3.2 多糖的纯化

多糖常用的纯化方法有^[17,18]:

分部沉淀法 不同多糖在不同浓度的低级醇或酮中具有不同溶解度,按比例由小到大加入这些醇或酮(常用甲醇、乙醇和丙酮)分部沉淀。适宜于分离各种溶解度相差较大的多糖。如广西绿茶多糖的分离纯化。

季胺盐沉淀法 酸性多糖能与其成盐形成不溶性化合物,可分离酸性及中性多糖。常用的季胺盐是十六烷基三甲基溴化铵和十六烷基吡啶。

纤维素阴离子交换剂柱层析 常用的交换剂为DEAE-纤维素。常用交换剂为DEAE-纤维素、ECTEOLA-纤维素和羧甲基纤维素。此法适合于分离各种酸性、中性及粘多糖。pH=6时,酸性多糖吸附于交换剂上,中性多糖不吸附,然后用不同离子强度的缓冲液按酸性强弱将各种多糖依次洗脱。洗脱方式可以是阶梯式或梯度式。若pH为碱性,中性多糖也能吸附。中性多糖还能与硼砂形成络合物,若将柱处理成硼砂型后,改变硼砂液浓度也能将不同中性多糖洗脱下来。另外,杂质会吸附于柱上端而达到部分纯化的目的。多糖在柱上的吸附力与其结

构有关。吸附力一般随分子中酸性基团的增加而增大。对于线性分子，分子量大的比小的易吸附，直链多糖比分枝多糖易吸附。此法适合于分离各种酸性、中性多糖和粘多糖。吸附力一般随多糖分子中酸性基团的增加而增加。

凝胶柱层析 根据多糖分子的大小和形状不同进行分离。常用的凝胶有葡萄聚糖凝胶 (Sephadex) 及琼脂糖凝胶 (Sephadex)。也有人用DEAE-Sephadex 分离多糖。

膜分离法 膜分离是近年发展起来的超过滤技术，不需加热和化学物质处理，不仅节约能源、无环境污染，且保留生物活性成分的高效价，因而得到广泛的应用。目前所用超滤膜是高分子材料制成，较多为纤维素膜和聚砜膜。不同的超滤膜具有允许不同分子量和形状的物质通过的性质，多糖溶液通过各种已知的超滤膜就能达到分离。

制备性高压液相色谱 (HPLC) HPLC是在经典柱层析原理的基础上，采用分布窄、粒径细的颗粒作载体，将流动相以高压注入柱内，样品组分迅速而不断地在流动相和固定相之间进行反复多次平衡分配，彼此分离，并向下迁移，迁移速率依赖于各组分与固定相之间的相对亲和力。

2.3.3 纯度检查

比旋度法^[19] 不同的多糖具有不同的比旋度，在不同浓度的乙醇中具有不同溶解度。故多糖水溶液经不同浓度的乙醇沉淀所得沉淀物，若具有相同比旋度，则证明该多糖为均一组分。如沙棘果水溶性多糖的纯度检查。

超离心法 微粒在离心力场中沉降的速度与微粒的密度、大小与形状有关。如果某一多糖在离心力场作用下形成单一区带，说明微粒具有相同沉降速度，表明其分子的密度、大小和形状相似。

高压电泳法 多糖在电场作用下，按其分子大小、形状及其所带电荷的不同而移动的距离不同。在相同电场作用下，某一特定的多糖移动的距离应有一特定值。如采用玻璃纤维纸电泳检测沙棘果水溶性多糖的纯度；采用醋酸纤维薄膜电泳检测鬼白多糖及猴头多糖的纯度；采用琼脂糖凝胶电泳检测西洋参多糖和鬼白多糖的纯度；采用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测西洋参多糖的纯度等。

凝胶过滤法 由于凝胶具有一定大小的孔径，不同形状和大小的多糖分子在凝胶层析柱中移动速度不同，其流出液经示差检测仪检测，如只有一个峰，则表

明为均一组分。凝胶层析法可分为常压凝胶柱层析及高效凝胶柱层析两种。如鬼白多糖的纯度检查。

纸层析法 取多糖水溶液点样于新华中速或慢速滤纸上，在室温下展开，显色，进行纯度检测。如箬叶多糖的纯度检查。

冻融法 取多糖溶液经过反复冻融，应无沉淀析出。如沙棘果水溶性多糖的纯度检查。

2.4 多糖的结构分析

多糖结构分析比蛋白质或核酸要复杂得多^[18]。因为组成多糖的单糖品种繁多，而且即使只有一种单糖组成的多糖，因其连接方式的不同并可能有分支，也有可能得到结构很复杂的多糖。此外，由于多糖结构的微观不均一性，或分子量发散，使多糖结构分析很难得出完全准确的结构式。多糖结构的描述包括单糖组成，单糖间的连接方式、糖苷键构型、分支位点及分支数目，最终确定其重复结构单元。多糖结构分析的手段有物理方法，如红外光谱、核磁共振光谱、质谱等，也可用化学降解法（完全酸水解、部分酸水解、氧化性裂解等），还可用酶降解，免疫化学法等。但目前还没有一种方法可以单独完成其结构分析，必须将多种方法结合使用。

2.4.1 化学分析法

包括水解法、高碘酸氧化、Smith裂解、甲基化反应等，由于该类方法已较成熟，故此不再详述。

2.4.2 仪器分析法

仪器分析法是在化学分析法的基础上更进一步地了解和研究多糖的结构特性^[18,20]。与化学分析法相比，仪器分析法具有快速、准确、灵敏、操作方便等优点，是糖链分析不可缺少的手段。目前，在此方面应用较多的有UV、IR、GC、HPLC、MS、NMR及电泳等。这些现代分析技术的出现和发展以及仪器的联用，大大促进了糖链结构研究工作的发展。

紫外分析法(UV)^[21,23] 在多糖的结构研究中应用较广。如苯酚-硫酸法中测定多糖的含量及糖醛酸含量等测定。此外，还可利用在260 nm、280 nm处观察有无吸收来判断多糖中是否有蛋白质，多肽及核酸。

红外光谱法(IR) 为分析多糖结构非常得力的技术。人们经常以多糖的特征

吸收峰来鉴定多糖。如 840 cm^{-1} 吸收峰可以判别 α 糖苷键的存在, 890 cm^{-1} 吸收峰来判别 β 糖苷键的存在。吡喃糖苷在 $1100\sim1010\text{ cm}^{-1}$ 间应有3个强吸收峰, 而呋喃糖苷在相应区域只有2个峰; 另外, $810, 870\text{ cm}^{-1}$ 是甘露糖的吸收峰, 1260 与 1730 cm^{-1} 是酯基或 O-乙酰基 的特征吸收峰。而酯在 1740 cm^{-1} , 羧酸离子在 1600 cm^{-1} , 1414 cm^{-1} , 酰胺在 1650 cm^{-1} , 1550 cm^{-1} 附近出现振动吸收。

气相色谱法(GC)和高效液相色谱法(HPLC) 主要用于单糖和甲基化单糖的分离和鉴定。使用凝胶柱的水相HPGPC法还可以用来测定样品的分子量。对于GC而言, 需要进行样品的衍生化, 而HPLC则可直接进样。GC的样品可以做成糖醇醋酸酯衍生物, 或进行糖腈乙酰化。

质谱法(MS) 利用MS法研究糖类始于上世纪50年代末。由于MS法在糖链结构分析中具有快速灵敏, 样品用量少、结构信息直观的特点而得到越来越广泛的应用。近年来各种软电离技术的诞生, 如快原子轰击质谱(FAB-MS), 电喷雾质谱(ES-MS), 基质辅助激光解析离子化质谱(MALDI-MS)等使糖结构分析的研究取得了日新月异的发展。

核磁共振法(NMR) 自上世纪70年代NMR被引入多糖结构的研究, 并且发挥着越来越重要的作用, 现已成为多糖研究的常规手段。用NMR技术研究糖链结构的优点是不破坏样品。糖链的结构特征通过化学位移, 偶合常数, 积分面积, NOE及迟豫时间等参数表达。一维的NMR包括 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 。在自然界中, ^{13}C 的天然丰度很低, 使得 $^{13}\text{C-NMR}$ 的灵敏度低于 $^1\text{H-NMR}$, 后来出现的微型计算机脉冲傅利叶转换方式使得 $^{13}\text{C-NMR}$ 能够得到清晰的光谱, 其化学位移范围远较 $^1\text{H-NMR}$ 宽, 达到 200 ppm 。目前, $^{13}\text{C-NMR}$ 在多糖结构分析上的应用有: 解决异头碳的构型问题, 确定多糖残基中取代位置和分支点, 判断多糖中各残基的种类和比例。

2.4.3 新技术的应用

高场核磁共振波谱^[22] 高场核磁共振技术在多糖共价结构, 及其在溶液中或固体状态下的构象和动力学特征的研究方面都是最强有力的工具。特别是对于经典方法难以阐述的多糖, 高场核磁共振技术可以在有或没有背景知识的情况下获得糖类化合物最完全的结构信息及其在溶液或固态的行为, 同时还可通过计算机把样品中的 ^1H 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱数据和数据库信息进行比较来确定糖类化合物的结

构,从而取代耗时又耗样的经典分析方法。

毛细管电泳 用毛细管电泳分析糖类物质是在20世纪90年代发展起来的,它是利用带电粒子在高压电场中不同组分的迁移率不同而达到分离目的的一种新技术。其检测方式有紫外可见检测,激光诱导荧光检测,电化学检测等。目前毛细管电泳对糖的分析集中在单糖和寡糖的分离分析方面。而对多糖的分析主要是建立在对单糖、寡糖毛细管电泳的基础上,先用酶解和化学水解使糖链分解为单糖、寡糖,再对其进行分离分析。因此,对多糖的分析主要是对其所含糖原的分析。

原子力显微镜 由于多糖分子多带有支链,具有分子不均一性和非线性,故原子力显微镜对多糖成像分辨率较差。原子力显微镜主要用于多糖的以下几个方面的研究:(1)观察多糖分子的高级结构;(2)研究多糖凝胶网格结构;(3)直接观察以纤维素微纤维素为主体的植物细胞壁。

2.5 多糖的生物活性

近年来,在对免疫物质以及新药物资源的研究过程中,人们发现糖类参与了生命科学中细胞的各种活动,具有多种多样的生物学功能^[24,25]。多糖及其组合物对多种危害人类健康的疾病,如免疫紊乱、癌症、糖尿病、高血压、肝炎、血栓等,都具有显著的疗效。药用多糖的主要药理作用表现在促进免疫、抗肿瘤、抗突变、降血脂、降血糖、抗病毒等方面。其中最引人注目的是它们的免疫修饰和抗肿瘤活性。因此,多糖的研究与开发已日益引人注目。

2.5.1 多糖的抗氧化作用

自由基(Free Radical, FR)即外层轨道上有不成对电子的原子、原子团或分子的总称^[28,29]。其中95%以上是氧自由基,包括超氧阴离子(O_2^-)、羟自由基($\cdot OH$)、单线态氧(1O_2)、过氧化氢(H_2O_2)、脂质自由基($LO_·$, $LOO_·$, $LOOH$)、氮氧自由基等。人们发现FR与许多疾病密切相关,如中风、肺气肿、炎症、老年性痴呆、帕金森氏病、白内障、糖尿病、动脉粥样硬化等。多糖抗氧化及清除自由基的作用已有研究报道。短裙竹笋多糖对 O_2^- ,抑制率为32~62%,对人红细胞脂质过氧化的抑制率达31~75%。枸杞多糖四种成分均能清除 $\cdot OH$,抑制脂质过氧化。张尔贤等对多种植物多糖清除活性氧的能力进行了系统的比较研究,发现褐藻类中的鼠尾藻对产生 O_2^- 与 $\cdot OH$ 的两个发光体系都有较强的抑制;灵芝多

糖可增强组织SOD活力，降低LPO和OX-LDL含量。猴头菌丝子多糖、子实体多糖、黑木耳多糖和银杏多糖能使小鼠脑和肝脏中的SOD活力增加；魔芋多糖有良好的抗衰老作用，对GSH-PX、CAT、SOD的影响也十分显著。其他还有黄芪多糖、山药多糖、银杏叶多糖等。

关于多糖的抗氧化作用机制尚无定论，一种解释是OH可夺取多糖碳氢链上的氢原子结合成水，而多糖的碳原子上留下单电子可继续氧化形成过氧自由基，后者可进一步分解；另一种解释是多糖环上的羟基可与产生OH等所必需的金属离子结合，从而抑制活性氧自由基的生成，这与多糖化学结构等有关。

2.5.2 多糖免疫调节作用

多糖广泛存在于大自然中^[24,25]，大量的药理试验证明：多糖的生物活性首先表现在对免疫系统有重要的调节作用，多糖不仅能激活巨噬细胞（Mφ）、T淋巴细胞、B淋巴细胞、自然杀伤细胞（NK）、细胞毒T细胞（CTL），淋巴因子激活的杀伤细胞（LAK）等免疫细胞，还能促进细胞因子生成，活化补体，从而在抗肿瘤、抗病毒等方面显示出独特功效。在提高机体免疫的同时，多糖还具有良好的抗病毒活性，并具有低毒和低耐药性等特点。

2.5.2.1 激活免疫细胞

激活巨噬细胞 巨噬细胞在抵御各种感染和抗肿瘤方面起主要作用，因此激活巨噬细胞可提高机体抗病毒及抗肿瘤的能力。如从紫松果菊中分离的多糖与小鼠骨髓中的巨噬细胞共同孵育，则巨噬细胞对肿瘤细胞的毒性被大大激活，这是由于该多糖可促进巨噬细胞产生肿瘤坏死因子 α （TNF- α ）和干扰素 γ （IFN- γ ），从而增强对肿瘤细胞株的细胞毒性。此外，银耳多糖、蜜环菌多糖AP、刺五加多糖、褐藻糖胶（FCD）、云芝多糖、淫羊藿多糖等都能显著增强腹腔巨噬细胞的吞噬功能。

对T淋巴细胞的影响 多种多糖能提高植物血凝素（PHA）或刀豆素A（ConA）刺激的淋巴细胞增殖反应。香菇多糖（LTN）可促进正常小鼠由ConA刺激的脾脏T淋巴细胞增殖反应并纠正由环磷酰胺诱导的免疫亢进或低下状态。仙菜多糖体外对小鼠脾T细胞有明显刺激增殖作用，能对抗HC抑制ConA诱导的脾T细胞增殖，体内对HC诱导的免疫抑小鼠胸腺细胞及脾T、B细胞增殖有明显对抗作用。

多糖对B淋巴细胞和抗体生成的影响 B淋巴细胞能分泌多种抗体,是体液免疫的主要介质。细菌脂多糖(LPS)是B淋巴细胞增殖多克隆化的专一性刺激剂,而对T细胞无作用。红毛五加多糖能明显增加抗体生成细胞量,并能促进血清中IgM、IgG、IgA含量的升高,肯定了它对B淋巴细胞的激活作用,增强了机体的体液免疫功能。

多糖对淋巴因子激活的杀伤细胞(LAK)和自然杀伤细胞(NK)的影响。近年来用LAK/IL-2疗法治疗肿瘤在临幊上取得了显著疗效,但该法需要大量IL-2和LAK细胞,而IL-2的毒性和昂贵的价格限制了其应用。用增强LAK活性,降低IL-2用量而本身无毒性的生物反应修饰剂是改进该疗法的重要措施。研究发现猪苓多糖与IL-2有协同作用,猪苓多糖与IL-2合用组的NK及内源性LAK活性显著提高,而单用猪苓多糖或单用IL-2组增加不明显。灵芝多糖能明显增强人脐血LAK细胞活性,并能协同IL-2提高人脐血LAK细胞表面IL-2受体(IL-2R)的表达。猪苓多糖、香菇多糖和分枝杆菌多糖在一定浓度范围内与IL-2合用能增强LAK细胞活性42%-50.9%,降低IL-2用量50%^[73]。NK细胞是生物体内天然存在的非特异性免疫杀伤细胞,它在宿主的免疫监视功能中与巨噬细胞一起有着重要作用。绞股蓝多糖(50, 100 mg/kg, ip)能明显增强荷肝癌Heps小鼠NK细胞活性,但对肉瘤S180小鼠NK细胞活性无明显影响。

2.5.2.2 多糖与补体的关系

补体是机体非特异性免疫系统的重要组成部分,在宿主防御机制中起着重要作用。许多多糖均有激活补体的作用,它能杀死病原微生物或者协助、配合巨噬细胞来杀灭病原微生物,在机体防御、发炎、及过敏反应中起重要作用。补体蛋白上存在的识别点可识别到多糖的结构。许多实验证明多糖能通过替代和经典途径激活补体,激活宿主非特异性免疫功能。灵芝多糖能激活补体系统,增强特异性血浆蛋白LA、LB、LC的量。黄芪多糖、党参多糖、人参多糖均具有促进补体恢复的功能。红毛五加多糖能促进血清中补体C3、C4含量的显著升高。

2.5.2.3 多糖对细胞因子的影响

促进干扰素(interferons, IFN)生成: Liu等检测口蘑多糖及香菇多糖在小鼠腹膜腔渗出细胞和脾细胞中对白细胞介(IL-1 α 、IL-1 β)、干扰素(IFN- α 、IFN- γ)和集落刺激因子(M-CSF)的基因表达情况,证明多糖在腹膜腔渗出细胞和脾细胞

中均可以诱导并提高在IL-1 β 、INF- α 、INF- γ 和M-CSF的mRNA表达，在腹膜腔渗出细胞中诱导IL-1 α mRNA表达。此外，茯苓多糖、香菇多糖、云芝多糖、猪苓多糖、白术多糖及甘草多糖等均能够不同程度诱导IL-2和IFN的产生。

2.5.3 多糖抗肿瘤作用

恶性肿瘤是一类发病率高、严重威胁人类生命和健康的疾病。就多糖的抗肿瘤作用而言，多糖通过两种途径来抑制肿瘤，一方面多糖的抗肿瘤作用与其提高机体的细胞和体液免疫功能，促进细胞因子的合成和释放密切相关。多糖的免疫抑癌作用是多靶点的，几乎遍及非特异免疫和特异性免疫应答的多个环节，主要包括：激活巨噬细胞、活化淋巴细胞、促进细胞因子分泌、活化补体、参与调节神经-内分泌-免疫网络、抗氧化、清除自由基作用和抗突变等。多糖具有很好的抗肿瘤活性。其抗肿瘤的机理除了与多糖提高机体的免疫能力有关外，还与多糖诱导肿瘤细胞凋亡有关。多糖作为抗癌剂的最大优点是毒副作用小，与化疗药物联用有协同效应。目前已进入临床应用的有香菇多糖、猪苓多糖、人参多糖和灵芝糖肽等。

2.5.4 抗病毒作用

多糖的抗病毒作用包括抗HIV和抗其他病毒的作用^[27]，其中以抗HIV研究较多。天然多糖硫酸化和经人工合成的多糖硫酸酯衍生物在抗HIV病毒方面有特殊的功能且效果明显强于未硫酸化的多糖。陈春英等从箬叶中分离得到2种箬叶多糖，并对其进行了硫酸酯化，结果发现硫酸酯化箬叶多糖比箬叶多糖具有更高的抑制HIV引起的细胞病变作用。李小定等报告灰树花多糖具有直接抑制HIV病毒，改善艾滋病相应症状的功能，将灰树花多糖加入盛有受HIV病毒感染的辅助T淋巴细胞中，发现HIV的活性受到抑制。另外，许多经硫酸酯的多糖如香菇多糖、地衣多糖、右旋多糖酐、裂褶菌多糖，木聚糖等的硫酸酯有明显的抑制HIV-1活性，其作用机理是干扰HIV-1对宿主细胞的粘附作用，抑制转录酶的活性。

多糖的抗病毒性肝炎作用的报道也不少，如香菇多糖、人参多糖、灵芝多糖、猪苓多糖、波叶大黄多糖、枸杞多糖等均能明显地降低肝炎患者的血清谷丙转氨酶(SGPT)，其中有人参多糖与香菇多糖的下降率可高达87.1%和88%。香菇多糖对HBeAg的转阴率为55%，虫草菌丝体多糖转阴率可高达73.6%。除上述几种多糖外，还有黄芪多糖、板兰根多糖等，都能明显改善肝炎患者的各项肝功能指

标, 使病好转或痊愈。云芝多糖适用于胆总管SGPT升高及免疫失调者, 对中医分型为湿热的患者较好, 有效率66.1%~88.3%。

多糖对其他的病毒也有抑制作用, 如单纯疱疹病毒(HSV-1, HSV-2), 巨噬细胞病毒(HLMV)、流感病毒、囊状胃炎病毒、劳斯肉瘤病毒和鸟肉瘤病毒等。张斌等研究发现从红藻中提取的红藻多糖(RP1和RP2)在细胞水平上有明显抑制牛免疫缺陷病毒B IV的生长。卡拉胶是某些红藻的细胞壁多糖, 对HSV-1具有强抑制作用。硫酸酯化及羧甲基化虎奶多糖衍生物通过破坏病毒体的囊膜抗HSV-2病毒活性。

2.5.5 抗炎作用

茯苓多糖对二甲苯所致的小鼠耳肿大剂量组能增强小鼠耳肿胀^[26], 小剂量组则明显抑制小鼠耳肿, 对大鼠慢性皮下肉芽肿生成有一定抑制作用。人工培养虫草多糖CMPS对小鼠耳肿胀及毛细管通透性均有抑制作用。目前国外研究较多的是细菌的夹膜多糖, 其中脆弱类杆菌夹膜多糖的抗感染活性研究较为深入。脆弱类杆菌的夹膜多糖PSA、PSB具有显著的生物活性, 在体外具有T细胞增殖活性, 在体内具有抗脓肿形成作用。PSA还具有促有丝分裂能力。

2.5.6 多糖的其它生物活性

多糖还具有抗衰老、降血糖、降血脂、抗辐射、抗凝血等功效, 如海带多糖、甘蔗多糖等能降血糖血脂。

2.6 多糖的构效关系

活性多糖的化学结构是其生物活性的基础。多糖的构效关系就是指多糖的一级结构和高级结构与其生物活性的关系^[30]。近年来, 由于天然药物化学、药理学研究的不断深入, 分析手段得到突飞猛进的发展, 多糖的构效关系研究引起了国内外学者的极大兴趣, 是当前糖化学和糖生物学共同关注的焦点问题。从总体上看, 对于多糖构效关系的研究很不完善, 这可能是因为多糖的结构过于复杂。目前对多糖构效关系的研究主要集中在多糖的一级结构与生物活性的关系上, 包括糖单元的组成、糖苷键的类型、主链的构型、支链、空间构型、取代基的种类及数量、分子量等与生物活性关系。至今已发现大多数具有抗肿瘤活性的多糖都具有 β -(1→3)-D-葡聚糖的主链结构, 奇果菌属分离出的具抗肿瘤活性的奇果菌多糖(Grifolan), 基本结构是 β -1,3结合的直链葡萄糖, 3分子中有1分子的1,6

侧链葡聚糖。但是，同样具有 β -(1→3)-D-葡聚糖主链结构的 Pachyrman 和 Laminaran 却几乎没有抑瘤活性，这表明主链结构并不是多糖抗肿瘤活性的最根本原因。另据报道 α -(1→3)葡聚糖也具有较强的抗肿瘤活性。另外，多糖的分子量、溶解度、旋光度、粘度、等理化性质也影响其生理功能。如分子量为 90,000 左右的右旋糖具有一定活性，其活性随着大于或小于此分子量而迅速降低。

多糖的高级结构的研究还较少，但科学家已肯定多糖的高级结构对功能的影响比一级结构重要得多。有些多糖具有相同的一级结构，但活性大不相同，这主要是由高级结构的差别引起的。一般高级结构呈螺旋的多糖活性较高，而可拉伸带状或皱纹型带状的活性一般较低甚至没有。例如：X-衍射分析表明，香菇多糖及裂褶多糖均具 B-三股绳状螺旋型立体结构，在香菇多糖加入尿素或二甲亚砜，其活性就丧失，这二者多糖在水溶液的比旋光度不同于在尿素或二甲亚砜中的旋光度，暗示在尿素或二甲亚砜中，多糖立体构型改变了，从而引起活性的丧失。这充分证实立体构型对多糖活性的显著性影响。目前对于这种因细微结构而影响活性的机理，仍不甚了解。总之迄今为止，除了对肝素碎片寡糖的构效关系研究得较详细外，其他多糖（及寡糖）的构效关系研究至今尚不多。且相当不完善，是一个有待加强的研究领域。我国科技工作者在多糖的研究中，特别是真菌多糖和传统的中医药多糖研究中取得可喜的成果。但是，国内多糖的研究一般仅限于分离纯化、化学组成、生物活性和免疫药理研究，糖结构的分析和多糖构效关系研究没有很大突破。而国外^[31]，特别是日本学者加强了对中药多糖活性片段（活性决定簇）的化学结构与功能关系的系统研究，并在柴胡、当归多糖研究方面取得了突破性进展。研究认为多糖像蛋白和酶一样可能在多糖分子中存在一个或几个寡糖片断的“活性中心”，并从大量中药多糖一级结构中探索其活性片段。研究多糖的活性片段及活性片段与多糖之间的关系，不仅有利于研究复杂的多糖结构，且对揭示多糖结构与功能的关系具有重要意义。对阐明多糖在机体内的吸收分布、代谢途径等动态变化以及作用机制都有重要的价值，特别是多糖制品的功效和多糖类药物的质量控制标准的研究都将起到重要促进作用。

3 本论文研究的主要内容

1. 按照多糖提取的经典方法，在单因素试验的基础上进行正交试验优化提

取工艺。

2. 通过膜分离、柱层析等一些列纯化、分级过程得到纯净而均一多糖。
3. 对纯净均一多糖进行结构和相关理化性质的研究。
4. 对多糖进行相关活性研究。主要通过抗氧化、免疫活性和保肝等试验了解楮头红多糖的生物活性，初步掌握楮头红治疗乙肝的活性物质基础。

4 本论文的创新点

1. 楮头红对急慢性病毒性肝炎有很好的临床药用功效^[32]，但楮头红的化学成分研究国内外尚无相关文献报道，药理作用也不清楚。我们在国内外率先开展对其主要药效物质基础研究，可为楮头红的药理研究和临床应用提供重要依据，同时可为寻找乙肝治疗新药提供借鉴，并为楮头红药材质量控制、道地药材鉴别提供参考依据。

2. 用纯净均一的楮头红多糖样品进行结构和活性试验，对多糖的化学结构、生物活性作系统的研究，以期达到多糖有效成分的化学结构“说得清”，在体内的作用机理“道得明”。这是本研究的一大特色。

3. 在国内外首次开展对楮头红多糖化学结构、理化性能、抗肝炎活性研究，了解该多糖药效能并进行构效关系分析，对多糖药物的药理研究具有很好促进作用，在丰富糖生物学和糖化学研究内容方面具有重要学术意义。

第一章 楮头红多糖提取工艺研究

中药多糖的提取常常采用水、盐、酸、碱和酶来提取^[34,35]，得到的提取液用乙醇沉淀回收，在这一过程中一部分杂质（如色素、单糖、寡糖）得以去除，所得多糖再经过去蛋白、脱色可得到粗多糖。影响多糖提取的因素有很多，如提取溶剂、温度、料液比、提取时间、提取次数等。不同的药材提取多糖的工艺大体相似，但影响因子会有所差别，故需要进行提取工艺研究，以获取较高提取率。

本文以楮头红为原料，利用经典水提醇沉的方法，在单因素分析的基础上进行正交试验，优化多糖的提取工艺条件。

1 材料

1.1 仪器

1600 分光光度计（北京瑞利分析仪器厂）；RE-52A 旋转蒸发仪（上海亚荣生化仪器厂）；磁力搅拌器（上海淀久中药机械厂）；BS210S 型微量分析天平（北京塞多利斯天平有限公司）；电热干燥箱（上海阳光实验仪器有限公司）；粉碎机（上海淀久中药机械厂）；HH-2 数显恒温水浴锅（上海国华仪器设备有限公司）；超声清洗仪（昆山市超声仪器有限公司）；高速冷冻离心机（上海安亭仪器厂）；低速大容量离心机（上海安亭仪器厂）；超低温冰箱（Sanyo）；蒸馏水器（上海亚荣生化仪器厂）；冷冻干燥机（北京博医康实验仪器有限公司）。

1.2 主要材料和试剂

楮头红（购自三明和漳州的天然药用植物，经福建中医研究院鉴定）、透析袋（分子截留量 3500）、石油醚（AR，沸程 60~90 °C）、乙醇 95%（AR）、无水乙醇（AR）、乙醚（AR）、丙酮（AR）、98%浓硫酸（AR）、苯酚（AR）、氯仿（AR）、活性炭、三氯乙酸（AR）、正丁醇（AR）、碘（AR）、活性炭、新华中速滤纸（快速）

2 方法

2.1 楮头红多糖提取工艺条件

2.1.1 材料的预处理

楮头红全草蒸馏水洗涤去土^[33]，40 °C低温干燥。称取干燥过的草药 250 g 粉碎，用石油醚 80 °C回流脱脂 2 次，之后用 95%的乙醇回流除小分子单糖，滤渣挥去酒精备用。

2.1.2 提取单因素分析

在提取条件选择中，以多糖得率高低作为衡量指标，多糖含量测定采用硫酸-苯酚法^[18]。

提取时间^[36-42] 固定多糖的提取温度为 80 °C，料液比（即经过前处理的残渣与蒸馏水的质量比）为 1:30，设计提取时间为：1 h、2 h、3 h、4 h、5 h，考察提取时间对楮头红多糖得率的影响，每个提取时间各平行 3 次。

料液比 固定提取温度为 80 °C，提取时间为 4 h，设计提取料液比为：1:30、1:45、1:60、1:75、1:90，各平行 3 次，考察料液比对楮头红多糖得率的影响。

提取温度 固定提取时间为 4 h，料液比为 1:30，以楮头红多糖的得率为指标，设计提取温度为 60 °C、70 °C、80 °C、90 °C、100 °C，各平行 3 次，考察提取温度对楮头红多糖得率的影响。

提取次数 固定提取温度为 80 °C，提取时间为 2 h，提取次数为 1、2、3、4，考察提取次数对楮头红多糖得率的影响。

醇沉酒精用量 取等量的多糖提取液，分别加入 2、3、4、5、6 倍的乙醇，醇沉后放-40 °C冰箱过夜，离心去乙醇后复溶，考察乙醇加入量对多糖得率的影响。

2.1.3 提取工艺多因素分析

根据单因素预试验结果，选取影响的三个主要影响因素作为考察因素，在各因素最佳值附近分别取三个水平，依据 $L_9(3^4)$ 正交试验表进行设计，做三因素三水平正交试验，以确定楮头红多糖提取的最适工艺。采用直观分析方法，根据极差大小和方差分析确定影响提取因素的主次顺序。

2.1.4 除蛋白

用 Sevag 法脱蛋白（氯仿正丁醇 4:1，浓缩液和混合液的体积比为 3:1；或者直接加入 1/25 倍的正丁醇，1/5 倍的氯仿混合搅拌 20~30 min，充分静止分层除去白色沉淀，数次后直至界面无白色沉淀）或者 3%三氯乙酸法（向多糖提取液

中加入 3%的三氯乙酸直至不再继续浑浊为止，离心出去胶状变性蛋白质)。

2.1.5 脱色冷冻除杂

除蛋白后的多糖溶液加入 0.2%的活性炭进行脱色^[44,45]。60 ℃保温 30 min(此过程中不断搅拌)，过滤取滤液；将滤液放入-40 ℃冰箱过夜，第二天取出自然融化后 5000 转离心去除不溶物，将上清液反复冻融直至没有沉淀高出为止。

2.1.6 醇沉洗涤、透析干燥

滤液中加入“2.1.2”中所确定的量的无水乙醇，静止 12 h 后离心(3000 r/min)取沉淀，沉淀依次用 95%的乙醇、无水乙醇、丙酮、乙醚清洗、重复三次。醇沉洗涤后滤渣加适量蒸馏水，充分复溶后透析，透析在磁力搅拌下进行，样品液与透析液(蒸馏水)体积比为 1:20, 4 h 换一次水，透析 48 h。检测透析液中离子浓度，透析完毕后将糖溶液放入冷冻干燥机中干燥，干燥后样品密封保存备用。

2.2 桃头红多糖含量测定方法

2.2.1 苯酚溶液的制备

称取 100 g 苯酚，0.05 g 碳酸氢钠和 0.1 g 铝片，置圆底烧瓶中加热蒸馏，收集 182 ℃的馏分，取馏分 5 g 定容至 100 mL 摆匀即得 5%的苯酚溶液。

2.2.2 供试品溶液制备

精确称取经干燥粉碎后桃头红粉末 10 g，按“2.1”项下方法提取分离得粗多糖样品，溶解后备用。

2.2.3 最大吸收波长的选择

分别吸取“2.2.5”项下葡萄糖标准溶液和样品溶液各 0.3 mL，照“2.1.2”项下测定方法，在 400 ~ 600 nm 波长扫描，两者最大吸收均在 490 nm 处。故选择 490 nm 为最大吸收波长。

2.2.4 标准曲线制作

精密称取 105 ℃干燥至恒重的葡萄糖标准品 20 mg，置 500 mL 容量瓶中加水溶解并稀释至刻度，摇匀，作为葡萄糖标准溶液。分别精密吸取此标准溶液 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8 mL，各以水补至最终体积为 2.0 mL，照“2.1.2”项下测定方法于 490 nm 波长处测定吸光度值，制作标准曲线。

2.2.5 样品含量的测定

将制备好的样品适当稀释后测定吸光值^[47-50]。

2.2.6 方法精密度试验

将样品溶液按含量测定操作步骤测定 5 次, 计算 RSD.

2.2.7 方法稳定性试验

取样品溶液 0.3 mL 照多糖含量测定项下方法操作, 每隔 20 min 测定 1 次吸收度, 测定 3 h 以上。

2.2.8 方法回收率试验

精密吸取已知含量的样品溶液 1 mL, 共 5 份, 分别置于试管中, 再分别精密加入浓度不同的标准葡萄糖溶液 1 mL, 按“2.1.2”项下测定方法, 在 490 nm 波长处测定吸收度。由标准曲线求得其浓度, 计算回收率。

回收率 (%) = $(\text{测得多糖总量} - \text{样品多糖含量}) / \text{葡萄糖加入量} \times 100\%$

2.2.9 多糖提取率

提取率 (%) = 提取的多糖质量/猪头红样品的质量 $\times 100\%$

3 结果与分析

3.1 提取条件对猪头红多糖提取率的影响

3.1.1 单因素试验

提取时间 固定温度和料液比, 提取时间对猪头红多糖提取量的影响规律如图 1-1 所示。提取时间在 0.5~4 h 内, 随着加热时间的增加多糖的含量呈上升趋势, 而 3~4 h 内多糖得率上升趋于平缓, 变化不大, 以后反而稍微有些降低。考虑到节约能源和时间等因素, 提取时间 3 h 左右较适宜。

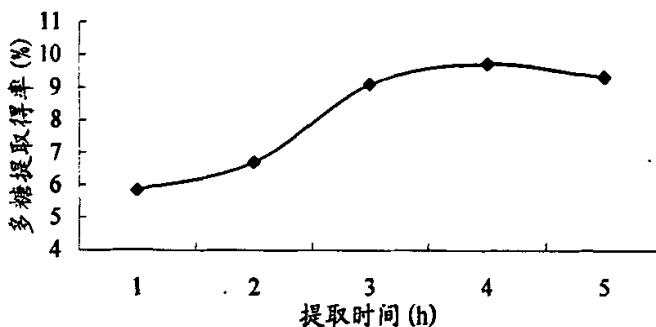


图 1-1 提取时间对多糖提取量的影响

Fig.1-1 Effect of the extract time on the content of polysaccharide

料液比 固定温度和时间, 料液比对楮头红多糖提取量的影响规律如图 1-2 所示,

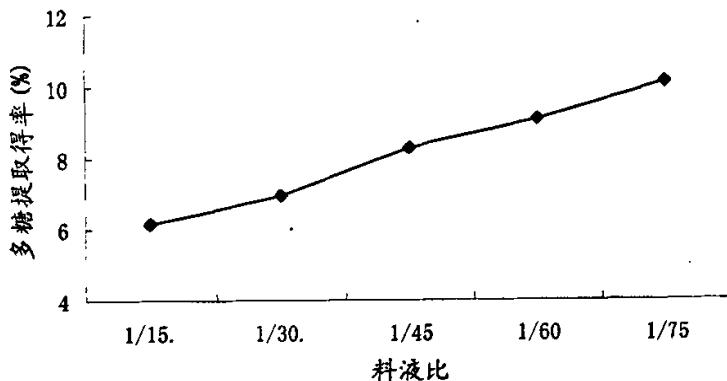


图 1-2 料液比对多糖提取量的影响
Fig.1-2 Effect of the ratio (liquid/solid) on the content of polydaccharide

料液比对多糖提取有很大的影响。在相同的提取条件下对不同的料液比进行提取, 结果如图。由图 1-2 可以看出, 随着料液比的增加, 多糖的溶出量也逐渐增大, 而且一直是递增趋势, 但是考虑到增大料液比给浓缩带来的困难, 我们选定 1:45 为最佳料液比。

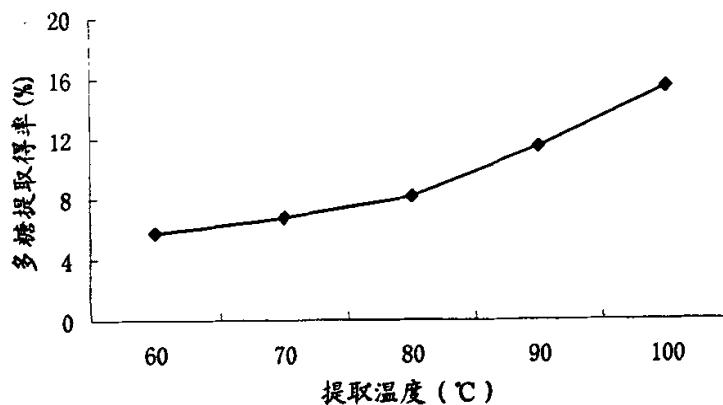


图 1-3 温度对多糖提取的影响
Fig.3 Effect of extract temperature on the content of polysaccharide

提取温度 固定时间和料液比, 温度对楮头红多糖的提取量的影响规律如图 1-3 所示。温度对多糖的提取影响较大, 随温度的升高, 多糖的提取率也逐渐增大。从多糖的活性和经济角度考虑, 选取 90 °C 提取温度较适宜。

乙醇添加量 乙醇添加量对多糖沉淀效果的影响见图1-4。由图1-4可以看出，乙醇的多少对多糖的沉淀影响很大。当加入4倍量乙醇时，多糖得率最高，故醇沉时选择4倍量的乙醇。

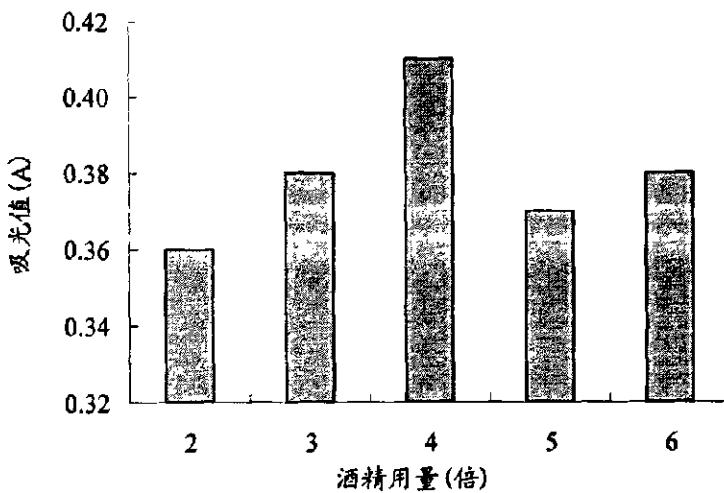


图.1-4 乙醇添加量对多糖沉淀效果的影响

Fig.1-4 Effects of the concentration of ethanol on the content of polysaccharide

提取次数 固定温度、时间、料液比，提取次数对褚头红多糖提取量影响规律如图1-5所示。褚头红多糖的提取量随提取次数的增加而减少，到第四次提取的时候，得率已经很低了，所以考虑到节约时间和材料，提取次数为3次较宜。

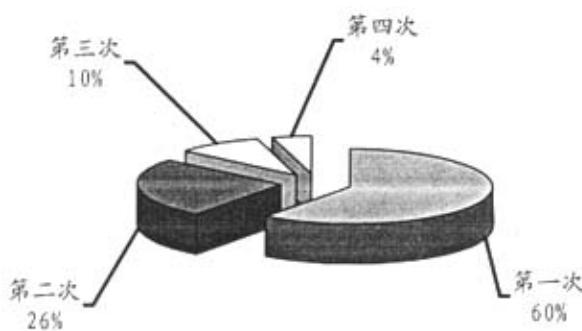


图 1-5 提取次数对总糖提取的影响

Fig1-5 Effect of extract time on the content of polysaccharide

3.1.2 正交试验结果

根据前面单因素试验结果, 确定正交试验的因素和水平如表 1-1 所示。

表 1-1 正交试验的因素及水平
Tab.1-1 Factors and levels of the orthogonal experiment

水平	因素		
	A (料液比)	B (提取时间/h)	C (温度/℃)
A1	1:30	2.5	80
A2	1:45	3.0	90
A3	1:60	3.5	100

根据选择的因素和水平作 $L_9(3^3)$ 正交试验, 对其进行统计学分析, 结果见表 1-2, 方差分析结果见表 1-3。由表 1-2 中的 R 值可以看出, 在影响猪头红多糖提取得率三个因素中, 影响主次关系依次是提取温度 (C) > 料液比 (A) > 提取时间 (B), 其中温度影响最大, 正交优化条件最佳组合为 $C_3B_1A_3$, 即: 温度为 100 ℃, 固液比为 1:60, 时间为 2.5 h。

表 1-2 正交试验结果
Tab.1-2 Result of the orthogonal experiment

处理号	列号			多糖含量 $\mu\text{g/mL}$
	A	B	C	
1	1	1	1	49.46
2	1	2	2	73.51
3	1	3	3	90.58
4	2	1	2	86.97
5	2	2	3	104.63
6	2	3	1	53.96
7	3	1	3	105.96
8	3	2	1	56.35
9	3	3	2	97.65
K1	213.55	242.38	159.77	
K2	245.56	234.49	258.12	
K3	259.96	242.19	301.17	
均值 1	71.18	80.80	53.26	
均值 2	81.85	78.16	86.04	
均值 3	86.65	80.73	100.39	
R	15.47	2.63	47.13	

由表 1-3 的方差分析可以看出, 温度的影响是极为显著的, 料液比和提取时间没有显著差异, 故提取温度对提取率起主导作用, 料液比、提取时间影响较小。

表 1-3 方差分析结果
Table 1-3 The result of variance analysis

方差来源	平方和	自由度	均值	F 值
A	376.20	2	188.10	5.18
B	13.50	2	6.75	0.19
C	3503.18	2	1751.09	48.23 *
误差	72.62	2	36.31	

$F(2,2)0.05=19.00$ $F(2,2)0.01=99.00$ *表示差异显著

3.2 多糖含量测定

3.2.1 最大吸收峰选择

对比样品的最大吸收峰和葡萄糖作为标准的吸收峰发现最大吸收峰相似如图1-6所示, 都在490 nm处, 故多糖含量测定选取波长为490 nm。

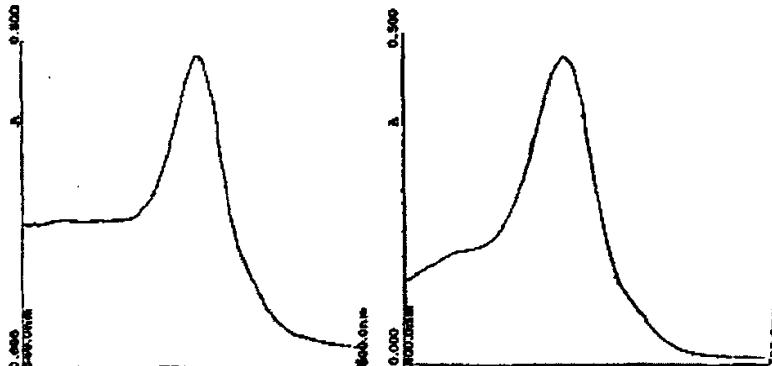


图1-6 样品(左)和葡萄糖(右)最大吸收峰扫描
Fig.1-6 UV Max peak spectrum of Polysaccharides(left) and Glc(right)

3.2.2 标准曲线绘制

用苯酚-硫酸法显色, 测定葡萄糖各浓度的吸光度, 以吸光度为纵坐标, 葡萄糖浓度为纵坐标, 绘制标准曲线, 如图1-7。曲线回归方程: $A = 0.0067C + 0.00433$ (A 为490 nm处的吸光值, C 为标准葡萄糖的浓度, 单位: mg/mL), $R = 0.9992$ 。

3.2.3 方法精密度

平行取5份葡萄糖和楮头红多糖溶液, 苯酚-硫酸法测定吸光度, 结果见表

1-4. 从表中RSD可以看出, 用该法测定楮头红多糖含量时, 其结果重现性良好。

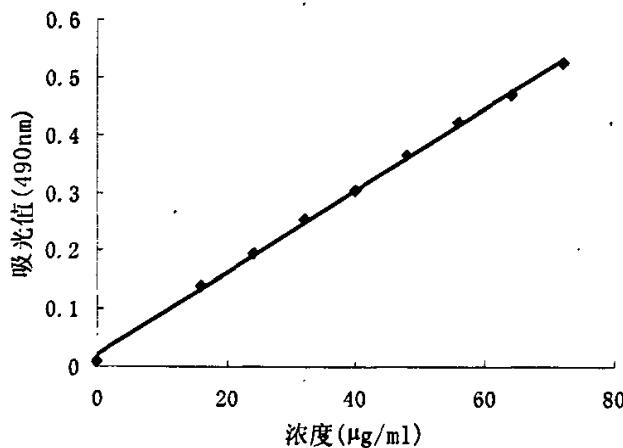


图 1-7 标准曲线及回归方程
Fig.1-7 Standard curve and regression equation

表 1-4 精密度试验结果 (n = 5)

Table 1-4 Results of precision test

n/次数	A/吸光值	RSD
1	0.4498	
2	0.4267	
3	0.4299	2.4238%
4	0.4413	n=5
5	0.4489	

3.2.4 方法稳定性

表 1-5 稳定性试验结果
Table 1-5 Results of stability test

t/时间 (min)	A/吸光值	RSD
20	0.3711	
40	0.3692	
60	0.3685	
80	0.3667	0.6998%
100	0.3657	n=9
120	0.3641	
140	0.3652	
160	0.3639	
180	0.3642	

用苯酚-硫酸法测定含量时, 显色产物的稳定性如表 1-5 所示。从表 1-5 结果可以看出, 在 3 h 内产物稳定性良好。

3.2.5 方法回收率

取多糖样品 5 份, 分别加入不同浓度的标准葡萄糖溶液, 进行回收率试验, 结果如表 1-6。回收率在 98.5% ~ 105.1% 之间。

3.2.6 样品测定

平行测定 4 次, 取平均值, 得样品多糖含量为 15.9 mg/g。

表 1-6 回收率试验结果
Table 1-6 Results of recovery rate test

样品号	1	2	3	4	5
样品含量 (μg)	23.45	23.45	23.45	23.45	23.45
标准加入量 (μg)	8.00	16.00	24.00	32.00	40.00
计算值 (μg)	31.45	39.45	47.45	55.45	63.45
实测值 (μg)	31.33	39.72	48.67	55.28	64.04
回收率 (%)	98.5	101.7	105.1	99.5	101.5
平均回收率 =	101.26%		RSD = 2.50% (n = 5)		

4 讨论

不同的试验材料所得多糖含量结果会有所差异, 这主要和试验材料的采收季节和生产地有关, 本文所用材料取自福建。

苯酚-硫酸法简单、快速、灵敏, 颜色持久。但是文献方法各有差异, 主要不同在于是否加热及加热的温度和时间等。经反复试验证明需要注意一下几点: 苯酚需要经过重蒸, 加入苯酚后需摇匀再加硫酸, 并且每次需垂直悬空加入, 加入硫酸的含水量不能偏高, 反应不需加热。

5 小结

通过单因素试验和正交试验得出提取最佳工艺: 温度为 100 °C, 固液比为 1:60, 时间为 2.5 h; 提取三次, 醇沉时加入四倍量乙醇静置过夜; 采用苯酚-硫酸法进行多糖含量的测定方法可靠稳定, 最终测得猪头红中总糖含量为: 15.9%。

第二章 楠头红多糖的纯化

多糖的纯化方法有许多种,如分级沉淀法、柱层析法、透析超滤及超离心法、区带电泳等等,要根据多糖的性质而定。

本文采用一般经典步骤,用水提醇沉法提出多糖后,将分离的粗多糖经过除蛋白、色素、透析后,用 DEAE-52 阴离子交换和 SephadexG-200 分子筛进一步分离纯化,以苯酚-硫酸法跟踪检测,分别收集相同吸收峰组分。所得多糖纯度运用柱层析和高效液相色谱法鉴定。

1 材料

1.1 仪器

MC99-3 自动液相色谱分离层析仪(上海沪西分析仪器厂有限公司); 1600 分光光度计(北京瑞利分析仪器厂); RE-52A 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂); 磁力搅拌器(上海淀久中药机械厂); 微量分析天平(北京塞多利斯天平有限公司); 电热干燥箱(上海阳光实验仪器有限公司); 高速冷冻离心机(上海安亭仪器厂); 高效液相色谱仪(美国 Agilent 1100series)。

1.2 试剂

DEAE-52 填料(Waterman 进口分装)、SephadexG-200 填料(Pharmacia 进口分装)、透析袋(3500)、98%浓硫酸(AR)、新华中速滤纸、苯酚(AR)、氯化钠(AR)、氢氧化钠(AR)、无水乙醇(AR)、丙酮(AR)

2 方法

2.1 DEAE-52 的预处理

将 DEAE-52 填料用蒸馏水浸泡 1~2 d 后^[51],用 0.5 mol/L 的 NaOH 溶液浸泡 30 min,再用蒸馏水洗至中性,然后用 0.5 mol/L HCl 溶液浸泡 30 min,用蒸馏水洗至中性后,再以 0.5 mol/L NaOH 溶液浸泡 30 min,再以蒸馏水洗至中性,装柱(柱尺寸为 40×2.5 cm),装柱过程中避免气泡产生。装柱完毕后用蒸馏水平衡 48 h 后备用。

2.2 DEAE-52 柱纯化

将水溶性粗多糖溶于少量重蒸水 (5~8 mg/mL) 中^[43,46,54,55,56,57,58,59,60,61]，过 DEAE-52 色谱柱，上样量为交换容量的 10%~20%。用水、0.1 mol/L NaCl、0.5 mol/L NaCl 梯度洗脱，每 15 min 收集一管，每管 5 mL，自动部分收集器收集；硫酸苯酚法检测，收集各主峰组分，将各主峰位分别合并收集，重蒸水透 2 d，冷冻干燥得猪头红多糖，复溶后用 HPLC 检验纯度。

2.3 SephadexG-200 的预处理

将 SephadexG-200 填料加适量蒸馏水浸泡 12 h，之后 100 °C 煮沸 4 h，脱气后装柱，装柱过程中避免气泡产生，用 0.05 mol/L 的 NaCl 平衡 48 h 后备用。

2.4 SephadexG-200 柱纯化

将 2.2 中收集的各组分用 SephadexG-200 进一步纯化，用 0.05 mol/L 的氯化钠洗脱，自动部分收集器收集，每 30 min 收集一管，每管 5 mL，硫酸-苯酚法检测。收集各主峰组分，冷冻干燥。HPLC 法检验多糖的纯度。

2.5 纯度检测 (HPLC 法)

将纯化多糖溶解成合适浓度，过 0.45 μm 的滤膜后进样。高效液相色谱条件：色谱柱：PolySep-SEC 4000；Part No:00H-3144-K0；Column Size:300 × 7.8mm；流动相：双蒸水；流速：0.8 mL/min；检测器：示差检测器；进样量：20 μL；柱温：35 °C。

3 结果分析

3.1 DE-52柱层析结果

利用 DEAE-52 离子交换作用对猪头红多糖进行分离。依次用含有 0~0.5 mol/L 的氯化钠梯度洗脱，苯酚-硫酸法检测试验结果如图 2-1，由图 2-1 可以看出，水洗脱可以得到一个组分，氯化钠梯度洗脱可以得到一个主要组分。本文对含量较大的组分 II (SWP II) 进行了收集冷冻干燥。

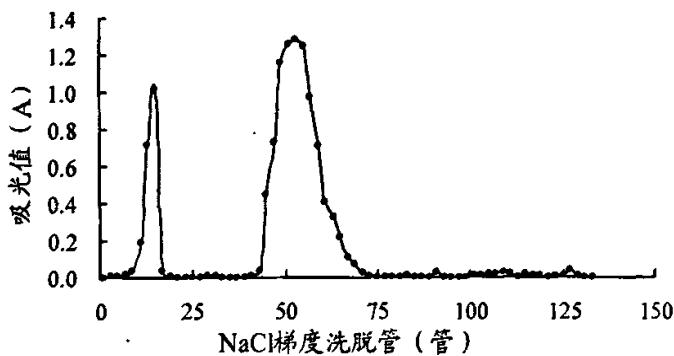


图2-1 多糖梯度洗脱曲线
Fig.2-1. Elution curves of polysaccharide

3.2 SWP II 经 Sephadex G-200柱纯化结果

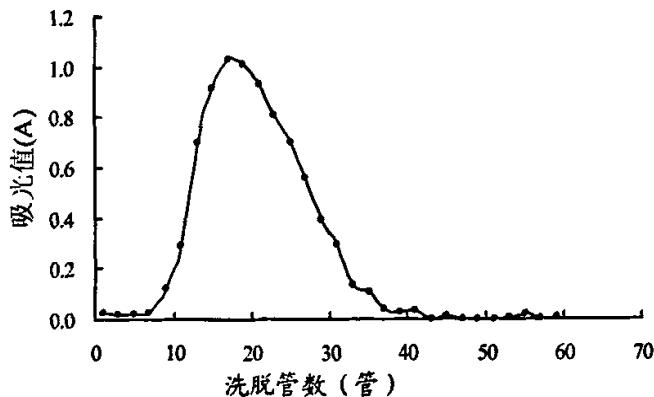


图2-2 组分2在Sephadex G-200柱上的洗脱曲线
Fig.2-2. Elution curves of fraction 2 on Sephadex G-200

由图2-2可以看出, 组分II (SWP II) 经两次过柱后, 可初步判断其为单一组分, 但其纯度还需进一步验证。

3.3 纯度鉴定

从高效图2-3可以看出, 经DEAE-52纤维素柱和SephadexG-200凝胶柱纯化后的多糖组分SWP II有明显一个峰, 峰型比较对称, 与前面常规凝胶色谱图结果相吻合, 说明此组分相对均一, 可以用来做结构鉴定。

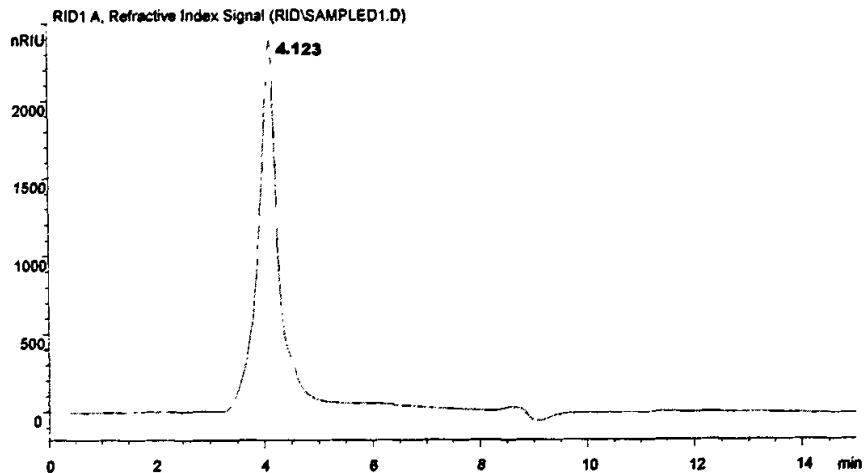


图2-3 猪头红多糖的HPLC图谱
Fig.2-3 HPLC chromatogram of SWP II

4 讨论

在试验过程中，曾尝试不经过除蛋白、脱色素的步骤，水提醇沉的粗多糖透析后直接过离子交换柱和分子筛层析，也能将多糖分离纯化出来，其结果经验证和经过处理的结果基本相吻合。这种方法简化了多糖分离纯化的步骤，在要求纯度不十分高的试验，具有一定的参考价值。

在进行柱层析时，离子交换层析条件的优化很关键。在大样品进样前可先少量进行离子交换层析条件的摸索，如缓冲液pH、洗脱方式、柱交换容量等，然后再做大样品制备可以提高效率。

5 小结

猪头红多糖经过DEAE - 52阴离子交换和SephadexG - 200分子筛进一步分离纯化得到两个相对均一组分，SWP I 和 SWP II，经纯度鉴定证明可以进行结构鉴定。

第三章 楮头红多糖的理化性质和结构表征

多糖是由单糖或其衍生物通过糖苷键连接而成，由于组成和连接方式不同，其理化性能也不同，如溶解度、旋光度、相对分子质量、粘度、特征颜色反应等。多糖的结构表征主要包括多糖一级结构、理化性质和高级结构。多糖一级结构的分析需要多种方式结合才能基本获得，如高碘酸氧化、GC 分析、NMR 等。本文运用研究多糖的经典化学法和现代仪器法对楮头红多糖 SWP II 的理化性质和结构进行初步表征。

1 材料

1.1 仪器

高效液相色谱仪（美国 Waters）；HH-2 数显恒温水浴锅（常州国华仪器厂）；气相色谱仪（美国 Agilent）；微量分析天平（北京塞多利斯天平有限公司）；高速冷冻离心机（上海安亭仪器厂）；1600 分光光度计（北京瑞利分析仪器厂）；Elementar Vario EL III 元素分析仪（德国艾丽曼特公司）；AV-300 型核磁共振光谱仪；AVATAR360 红外光谱仪（美国 Thermo Nicoler）；

1.2 主要材料和试剂

毛细管柱 30.0m×0.20μm×0.25μm（中科院兰州化物所）、多糖标准品（福州大学生物工程学院惠赠）、薄层板、98%浓硫酸、苯酚、氯仿、碘、乙醇、丙酮、乙醚、正丁醇、异丙醇、茚三酮、四硼酸钠、KBr、乙酸乙酯、正丁醇、吡啶、冰乙酸、苯胺、二苯胺、鼠李糖、木糖、半乳糖、葡萄糖、甘露醇、阿拉伯糖、盐酸羟胺、肌醇、乙二醇、高碘酸钠、刚果红（以上试剂均为分析纯）

2 方法

2.1 多糖的理化鉴定

颜色、溶解性试验：将多糖溶于冷热水、乙醇、丙酮、乙醚、正丁醇、异丙醇看其溶解性。

α -萘酚试验（Molish 反应）：取水提取液 1 mL，加入 5% α -萘酚试剂 2~

3滴，摇匀，沿试管壁缓缓加入浓硫酸1mL，如在试液和硫酸界面形成紫色的环；表明含有糖、多糖或甙类。

苯酚-硫酸试验：糖配成溶液后取1mL置于试管中，加入1mL5%的苯酚试液，摇匀，并迅速滴加5mL浓硫酸，静置10min，摇匀，观察颜色变化。

碘反应：将提取多糖配成1mg/mL的溶液，用淀粉配成1mg/mL作阳性对照，看是否会变蓝色。

碘碘化钾反应：将多糖溶于蒸馏水中1mg/mL，于点滴板小孔内加少量碘-碘化钾溶液，以蒸馏水和淀粉溶液作对照，观察颜色变化。

茚三酮反应：分别取1mL浓度为1mg/mL的多糖溶液，加入0.5mL的0.1%茚三酮乙醇溶液，混匀，煮沸1~2min，冷却，观察颜色变化。以蒸馏水作阴性对照，0.5%氨基酸作为阳性对照。

硫酸-咔唑反应：将多糖加四硼酸钠-硫酸溶液5mL，摇匀，置于沸水浴中加热10min，取出，冷却至室温，再另加0.125%咔唑无水乙醇溶液0.1mL，摇匀，再置沸水浴中加热15min，观察颜色变化，如有紫色生成，说明样品中含有糖醛酸。

2.2 多糖分子量的测定

2.2.1 色谱条件的选择^[62,63]

色谱柱：MltrahydralTM linear柱，分子量排阻范围为 $10^3 \sim 10^7$ ；流动相：以超纯水（用前过0.45μm滤膜过滤），作为流动相；柱温：由于检测器检测温度为30℃，为了使样品HPGPC图谱基线稳定，选用柱温30℃；流速：0.8mL/min；进样量：20μL

2.2.2 供试品溶液的制备

样品溶液 将纯化多糖溶于适量的双蒸水，以10000转离心10min，然后过0.45μL一次性滤膜，装入样品瓶后备用。

标准对照溶液 将各种已知分子量的多糖标准品溶于适量的双蒸水，制备方法同样品溶液。

2.2.3 分子量的测定

标准品由小分子到大分子依次进样，最后进样猪头红多糖，每个样品平等进样3次，正确记录各样品相应的保留时间T和色谱图。软件绘制标准曲线。通过回

归方程计算分子量。

2.3 紫外光谱分析

将 SWP II 样品制成 1 mg/mL 的溶液, 蒸馏水作参比, 在紫外分光光谱仪上全波长 (190~800 nm) 扫描, 记录吸收光谱。

2.4 红外光谱分析

取多糖样品 SWP II 1 mg, KBr 压片, 测定 $4000\text{ cm}^{-1} \sim 400\text{ cm}^{-1}$ 的红外吸收光谱。

2.5 元素分析

2.5.1 C、H、N 分析

将 SWP II 置装有五氧化二磷的干燥器中, 抽真空干燥 72 h, 称取 2.693 mg 和 2.596 mg, 用 Elementar Vario EL III 元素分析仪测定 C、H、N 的含量。

2.5.2 $-\text{SO}_4^{2-}$ 基分析

将多糖样品用酸水解, 水解液加入可溶性钡盐生成硫酸钡, 然后用分光光度法测定其含量。

2.6 单糖组成测定

2.6.1 薄层色谱法鉴定单糖组成

多糖水解^[64-66] 称取多糖干品 20 mg, 分别加入 1 mol/L 硫酸溶液 5 mL, 酒精喷灯封管, 在 120 ℃ 的烘箱中水解 4 h, 取出冷却, 加入 BaCO_3 中和至中性, 5000 r/min 离心 5 min, 除去 BaCO_3 沉淀, 上清液减压浓缩蒸干, 得单糖放置于干燥箱中备用。

薄层板的制备 称取硅胶 5 g 于 50 mL 烧杯中, 用 0.3 mol/L NaH_2PO_4 12 mL. 硅胶分散均匀后倾倒在洗净干燥的玻璃板上, 使硅胶浆液均匀地布满板面, 室温晾干。用前 110 ℃ 活化 1 h.

展开剂 正丁醇 - 乙醇 - 0.1% 的磷酸 - 冰乙酸 (7:30:15:1); 乙酸乙酯 - 吡啶 - 水 (8:2:1); 正丁醇 - 乙醇 - 水 (4:1:5); 乙酸乙酯: 甲醇: 乙酸: 水 (12:3:3:2); 乙酸乙酯 - 吡啶 - 乙酸 - 水 (5:5:1:3)。

显色剂 (苯胺 - 二苯胺丙酮溶液) 将 0.5 g 二苯胺、1 mL 苯胺, 5 mL 磷酸 (85%) 混合溶解后, 再用丙酮稀释至 50 mL.

点样展开显色 用毛细管吸取配好糖液点于距薄层板下端 1.5 cm 处, 点样间距 1.5~2 cm, 分次点样, 点样直径不超过 0.3 mm。将点好样的薄层板置于饱和过的层析缸中, 密闭展开, 溶剂距薄层上端约 1 cm 时取出。

显色 将薄层板取出, 自然干燥, 喷上显色剂, 在 110 ℃条件下 10 min 即可显色。

2.6.2 单糖组成的气相色谱分析

标准单糖的衍生化 称取鼠李糖、木糖、半乳糖、葡萄糖、甘露醇、阿拉伯糖各约 10 mg, 分别加入 20 mg 盐酸羟胺, 20 mL 吡啶振荡后, 90 ℃水浴 30 min, 取出冷却后加 2.0 mL 乙酸酐于 90 ℃水浴中酰化 30 min, 得到的产物减压蒸干, 残渣加入 2 mL 氯仿溶解, 直接注入 GC 分析。

样品单糖的衍生化 在水解后单糖 6.0 mg 中加入盐酸羟胺 10.1 mg、吡啶 2.0 mL 振荡后, 90 ℃水浴反应 30 min, 取出冷却后加 2.0 mL 乙酸酐于 90 ℃水浴中酰化 30 min, 得到的产物脱水过滤膜后, 直接注入 GC 分析。

内标肌醇六乙酸酯的制备 称取 3 g 肌醇加入 4.5 g 盐酸羟胺、4.5 mL 醋酸酐和 3 mL 吡啶, 在 90 ℃水浴中加热 2 h 并不断搅拌。将反应液冷却至室温倒入 50 mL 冰水中, 使肌醇六乙酸酯析出。过滤后加 20 mL 水洗涤, 将压干后产物放入 100 ℃烘箱中烘干备用。

气相分析 色谱柱: 中科院兰州化物所 OV1701 (30.0 m×0.32 μ m×0.25 μ m) 毛细管柱; 柱温: 205 ℃; 检测温度: 300 ℃; 程序升温 205 ℃维持 4 min, 以 6 ℃每分钟升至 240 ℃; 汽化温度: 280 ℃ 气体流速: N_2 (载气) 25 mL/min, H_2 30 mL/min 空气 400 mL/min 分流模式。

2.7 糖苷键的位置分析 (高碘酸氧化法)

2.7.1 标准曲线制作

取 6 支干燥试管, 分别加入 0、0.5、1.0、1.5、2.0、4.0 mL 的高碘酸钠, 然后分别一次加入 4.0、3.5、3.0、2.5、2.0、0 mL 的蒸馏水, 摆匀。各取上述溶液 0.1 mL, 分别定容至 25 mL, 即得不同浓度的高碘酸钠标准溶液。用 1600 型分光光度计, 以蒸馏水作空白对照, 在 223 nm 处测定光密度。以横坐标为高碘酸钠毫摩尔数, 纵坐标为光密度值, 绘制标准曲线。

2.7.2 样品测定

准确称取糖样 25 mg, 用少量水溶解于 25 mL 容量瓶中, 然后加入 30 mmol/L NaIO₄ 12.5 mL, 加水定容, 摆匀。室温下放置暗处反应。每间隔时间(0 h、6 h、12 h、24 h、36 h、48 h、60 h)取样 0.1 mL, 用蒸馏水稀释 250 倍, 参照标准曲线制作测定方法, 在 223 nm 波长处测光密度值, 直到光密度值恒定为止, 加乙二醇终止反应。根据测得的光密度恒定值, 通过查标准曲线, 就可计算出高碘酸的消耗量^[67,70]。

2.8 NMR 分析

分析前样品先经二次 D₂O 交换, 再溶于 D₂O 后, 测试。

2.9 多糖的构象分析

刚果红与具有螺旋构象的多糖可形成配合物^[71,72], 主要和单股螺旋部分结合。配合物的最大吸收波长较刚果红的最大吸收波长红移。

在 7 mg 样品中加 3 mL 蒸馏水和 20 mg/L 刚果红试剂 550 μL, 逐渐加 4 mol/L 氢氧化钠, 使溶液碱性由 0→0.50 mol/L, 然后在可见光谱范围进行吸收光谱扫描, 测定各碱性条件下的最大吸收波长。根据最大吸收波长移动情况进行构象分析。

3 结果分析

3.1 SWP II 的理化特征

纯化多糖为白色絮状物; 易溶于热水冷水, 不溶于高浓度的乙醇、丙酮、乙醚、正丁醇、异丙醇; α -萘酚试验呈阳性, 在试液和硫酸的交接面可以看到紫色的环; 硫酸-苯酚法亦成正反应; 碘反应不变蓝, 说明不含淀粉; 碘-碘化钾反应未变蓝; 节三酮反应呈阴性, 说明不含蛋白质; 硫酸-咔唑反应呈阳性, 说明含有糖醛酸。

3.2 SWP II 分子量

多糖分子量的对数与保留时间呈一定的线性关系, 用各已知分子量的多糖制成标准曲线为 $\text{LogM} = -0.4421t + 9.7668$ (lgM 为分子量的对数, t 为保留时间), $R^2 = 0.9926$ 。把样品的保留时间带入标准曲线, 求得样品 SWP II 的分子量为 848 180

表 3-1 SWP II 分子量测定结果

Table 3-1 The result of mean molecular weights of SWP II

名称	Mw	lgMw	t
D5000	5000	3.6989	13.726
D10000	10000	4	12.993
D44000	44000	4.6434	11.755
D50000	50000	4.6990	11.418
D68500	68500	4.8357	11.084
SWP II	848179.9	5.9285	8.682

3.3 SWP II 紫外吸收光谱

猪头红多糖SWP II 紫外吸收光谱如图3-1所示。表明SWP II 在260 nm处无核酸的特征吸收峰，在280 nm处也没有明显的蛋白质的特别吸收峰。

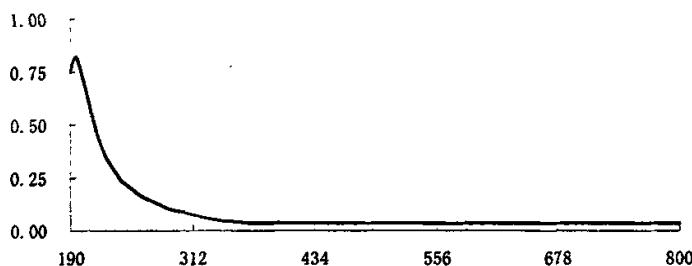


图3-1 SWP II 的紫外吸收图谱
Fig3-1 UV spectrum of refined SWP II

3.4 SWP II 红外光谱分析

表 3-2 SWP II 的红外特征吸收光谱与分析
Table 3-2 FTIR analysis of functional group in SWP II

特征吸收峰	结构特征
810-839 cm^{-1}	a-D-半乳糖非对称伸缩振动
917±13 cm^{-1}	吡喃环非对称伸缩振动
1018, 1102, 1150 cm^{-1}	环上 C-O-C 伸缩振动
1230 - 1320 cm^{-1}	O-H 变角振动
1331 - 1418 cm^{-1}	C-O 伸缩振动
1615 cm^{-1}	羧基伸缩振动
1743 cm^{-1}	糖环外-COOH 中 C=O 伸缩振动
2931 cm^{-1}	C-H 伸缩振动
3396 cm^{-1}	-OH 伸缩振动

SWP II 红外吸收光谱如图 3-2,多糖的各官能团特征吸收分析如表 3-2。

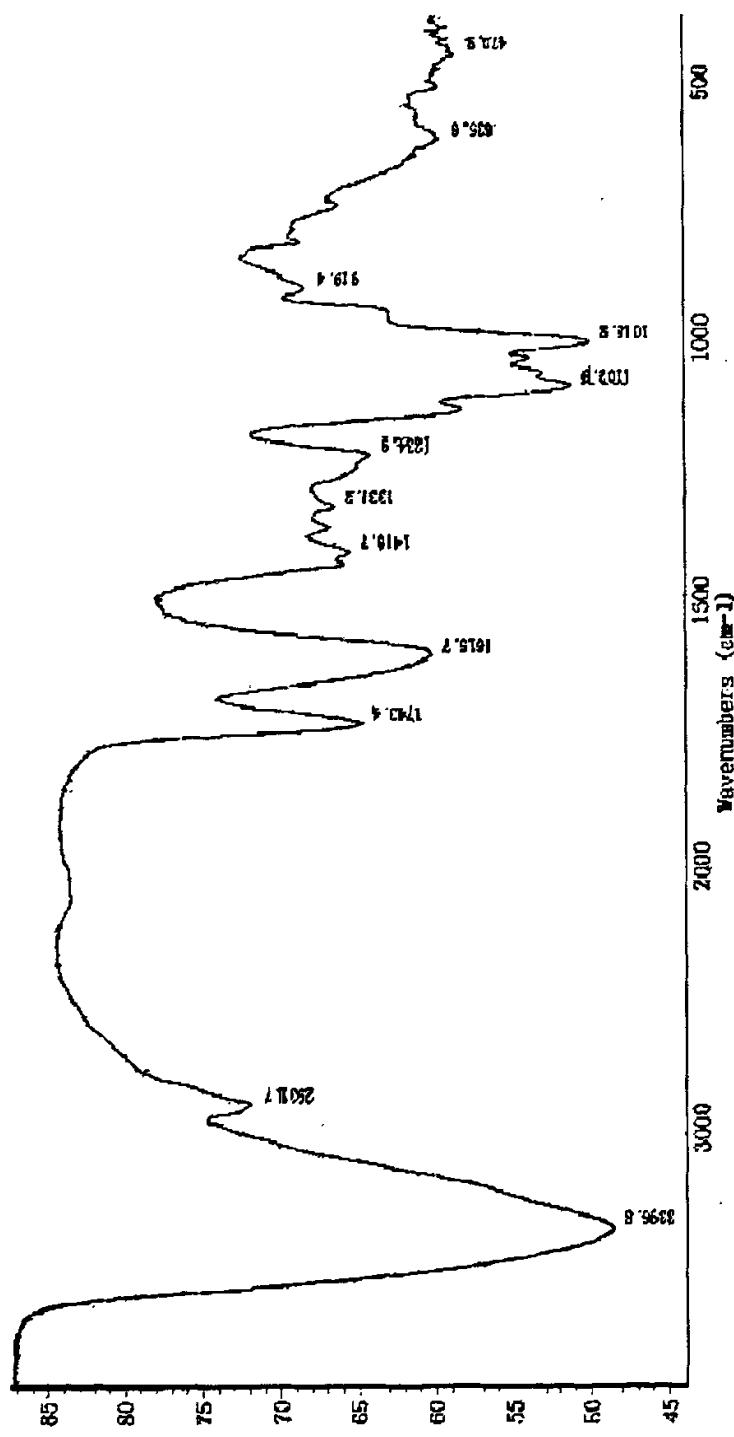


图 3-2 纯化多糖 SWP II 的 IR 谱图
Fig3-2 IR spectrum of SWP II

3.5 元素分析

多糖的元素分析结果如表 3-3。多糖中 N 含量在 0.3% 以下，可说明样品中不含氨基糖。因为如果糖环上含有一个 $-NH_2$ ，则 N 元素的含量应在 7% 以上。结合前面紫外吸收光谱分析可进一步确认 SWP II 不含 N 元素，为非氨基糖。硫酸基分析表明 SWP II 不含硫酸根。

表 3-3 元素分析结果
Table3-3 The result of element analysis

样品重量 (mg)	元素名称	百分含量 (%)
2.693	C	36.80
	N	<0.3
	H	6.16
2.596	C	37.04
	N	<0.3
	H	6.33

3.6 单糖组成分析结果

3.6.1 薄层色谱分析结果

降解 SWP II 通过不同的展开剂展开，其中有两种展开效果较好，如图 3-3 正丁醇：乙醇：0.1% 的磷酸：冰乙酸 (7:30:15:1) R_f 分别为：半乳糖 0.4412，葡萄糖 0.4941。

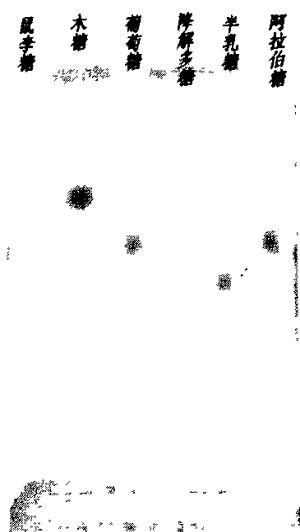


图 3-3 SWP II 的 TLC 图谱
Fig.3-3 TLC Chromatogram of SWP II

3.6.2 气相色谱分析结果

标准单糖和降解SWP II的气相色谱图结果如图3-4、3-5和表3-4所示，通过比较样品的气相色谱图和标准单糖气相色谱图的保留时间可以看出，SWP II气相色谱图中的鼠李糖、葡萄糖和半乳糖的出峰时间与标准色谱图一致，它们的峰面积比通过面积归一化处理为19.022：29.581：51.396。根据峰面积之比即为质量之比可以计算出鼠李糖、葡萄糖、半乳糖的摩尔比为11.6：16.4：28.6。

3.7 糖苷键的位置

高碘酸可以选择性地断裂糖分子中的两个或三个羟基连接处，生成相应的多糖醛、甲醛或甲酸。反应定量进行，每断开一个C-C键消耗一分子高碘酸。通过测定高碘酸消耗量及甲酸的释放量，可以判断糖苷键的位置。高碘酸氧化曲线如图

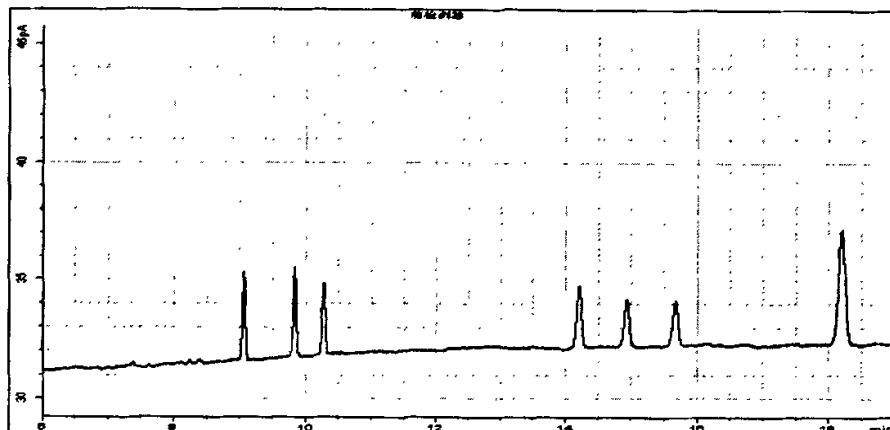


图 3-4 标准混合单糖的气相色谱图

Fig.3-4 Gas Chromatogram of mixed standard monosaccharide

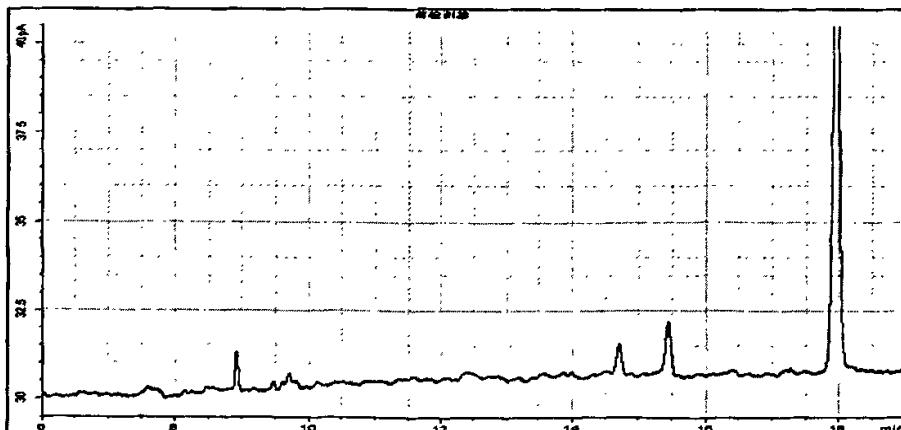


图 3-5 降解 SWP II 的气相色谱图

Fig.3-5 Gas Chromatogram of degraded SWP II

表 3-4 SWP II 的 GC 分析结果
Table3-4 The result of GC analysis

糖样	保留时间(s)	SWP II 的保留时间(s)	面积 (%)
鼠李糖	9.034	8.976	19.022
阿拉伯糖	9.836		
木糖	10.271		
甘露糖	14.203		
葡萄糖	14.734	14.780	29.581
半乳糖	15.530	15.442	51.396
内标肌醇	18.202		

3-6, 回归方程: $y=21.118x-0.0015, R^2=0.9967$ 。把高碘酸氧化的吸光值带入上述方程, 经计算每生成0.1395 mol的甲酸消耗的高碘酸的量为0.2135 mol。由于SWP II经高碘酸氧化后有甲酸生成, 说明可能存在吡喃己糖的1→(不确定), 1→6; 高碘酸的消耗量大于甲酸生成量, 说明存在只消耗高碘酸不生成甲酸的类型, 可能是1→2, 1→2、6, 1→4, 1→4、6。要确定糖苷键的准确位置, 还须结合甲基化试验、Smith降解试验的结果进行综合分析。

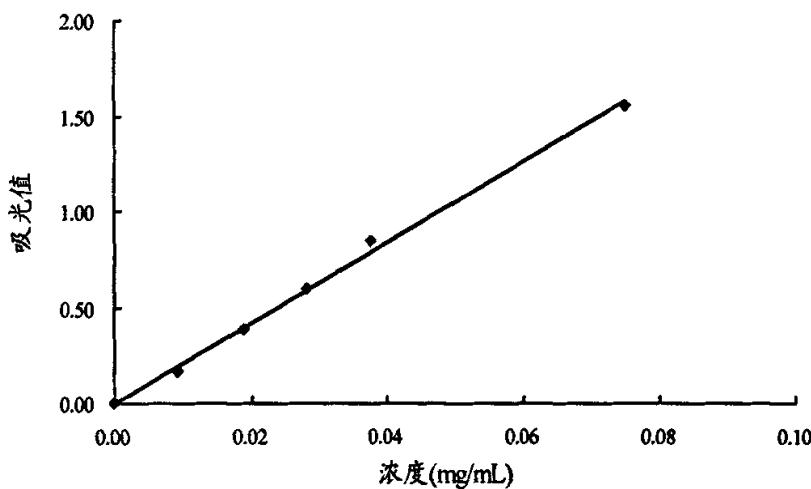


图3-6 SWP II 高碘酸氧化标准曲线
Fig.3-6 Standard curve for determination of NaIO₄

3.8 NMR ¹H 谱和 ¹³C 谱分析结果

猪头红多糖 SWP II 溶于 D₂O 中, 核磁仪测定, 结果见图 3-7,3-8

3.8.1 ¹H 谱

样品做 NMR 时, 用 D₂O 交换 3 次, 基本上没有水峰。在两组异头 H 大于 5

ppm, 可定为 α 构型, 并提示可能存在两种以上不同异头 H. 但大部分异头 H 小于 5 ppm (4.7 ppm) 可定型为 β 构型. 故多糖结构中既存在 α 构型, 也存在 β 构型, 而且主要是 β 构型.

3.8.2 ^{13}C 谱,

173 ppm 处表明糖环上有羧基存在, 这与 IR 分析及元素分析中 C 的含量偏低结果相符, 基本上可确认样品中含糖醛酸, 这是 C₆ 位的吸收峰.

70~80 ppm 有 4 组峰, 它们的定位要视糖苷键的连接方式来确定. 通常连接位置的 C 其化学位移为低场, 例如 1→4 连接, 则 81 ppm 组为 C₄, 72~74 为 C₃C₅, 71~72 为 C₂. 如果不是 1→4 连接, 就要另起分析.

102~103 ppm 为异头炭即 C₁ 的吸收峰, 但是从图谱上看, 至少有两种不同的异头 C, 与 ^1H 谱结果相符.

55 ppm 的尖峰, 尚不能确认是什么基团, 从有关糖类化合物的 NMR 谱查阅, 只有糖环上某一位 C 上的-OH 被醚化为-OCH₃, 则-OCH₃ 上的 C 在 55 ppm 附近, 但是这一点还需要进一步证实.

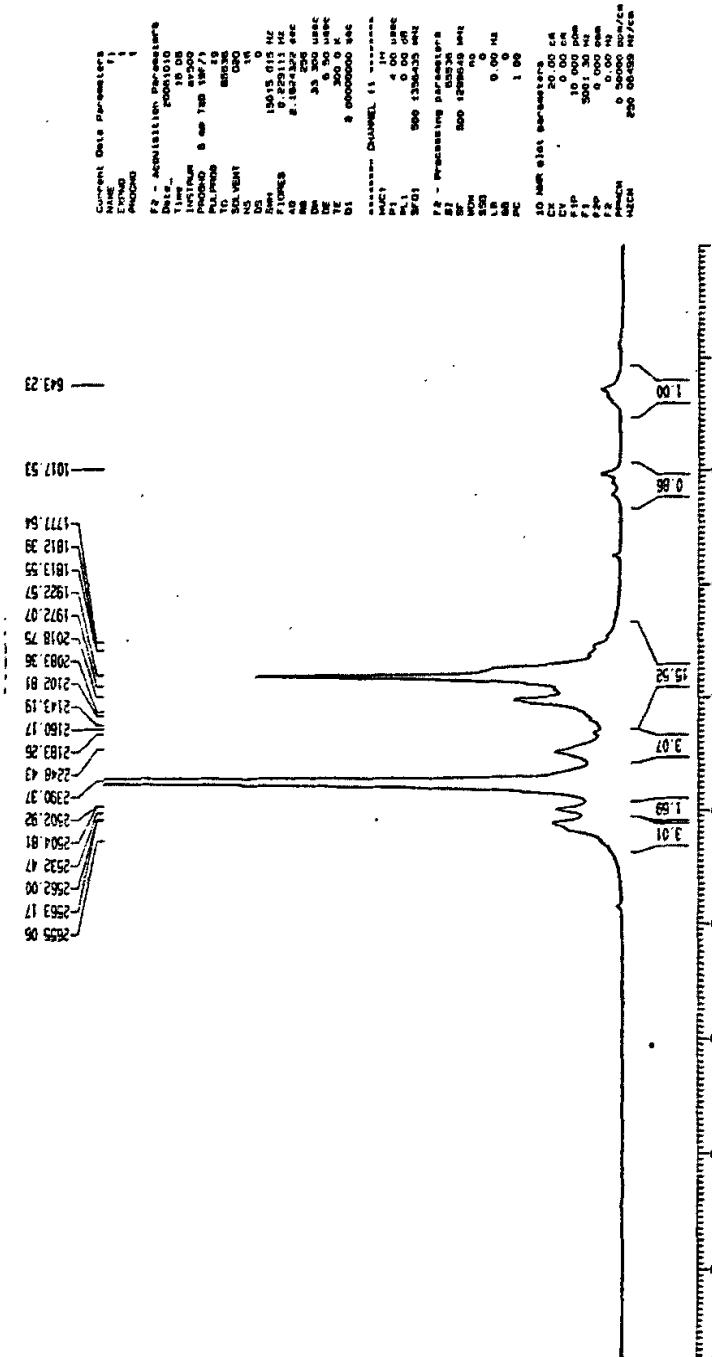


图 3-7 SWP II 的 ^1H -NMR 谱图
Fig.3-7 ^1H -NMR spectrum of SWP II

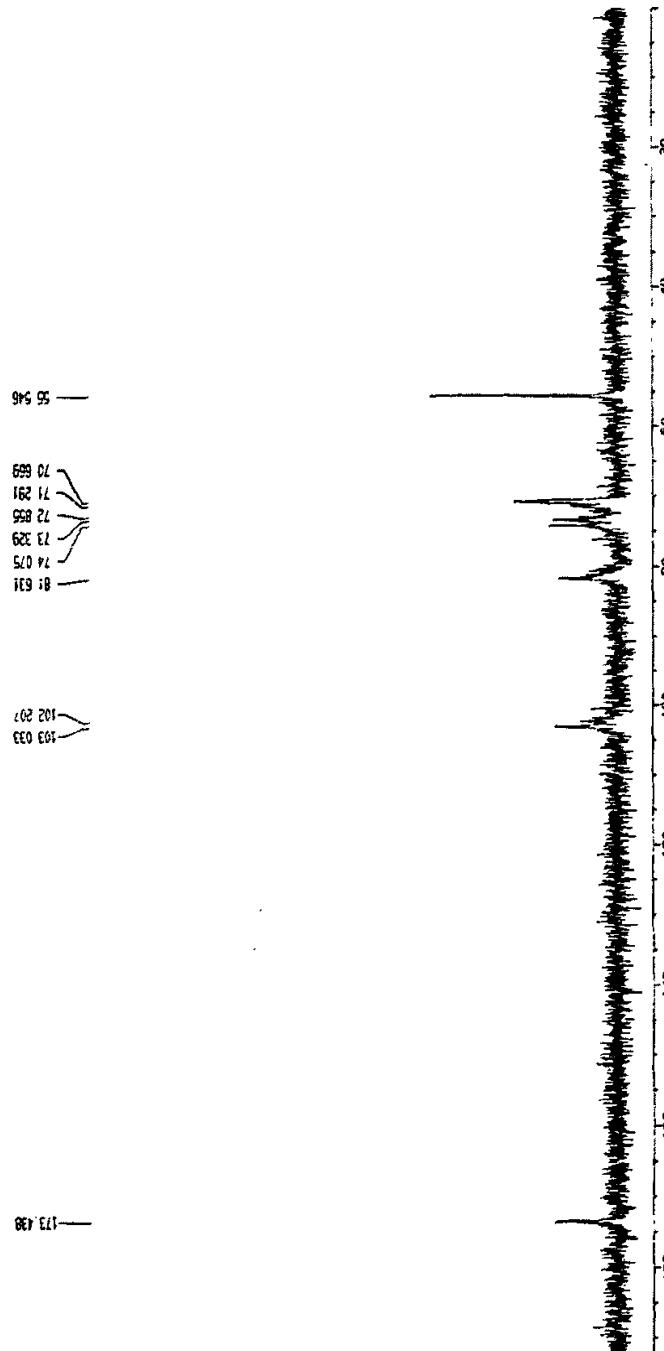


图 3-8 SWP II 的 ¹³C-NMR 谱图
Fig.3-8 ¹³C-NMR spectrum of SWP II

3.9 构象分析结果

刚果红是一种染料，它可与具有多股螺旋构象的多糖形成络合物，络合物的最大吸收波长同刚果红相比发生红移。试验结果表明 SWP II 与刚果红配合物的最大吸收波长 (λ_{max}) 随氢氧化钠浓度的变化而变化 (如图 3-9)。

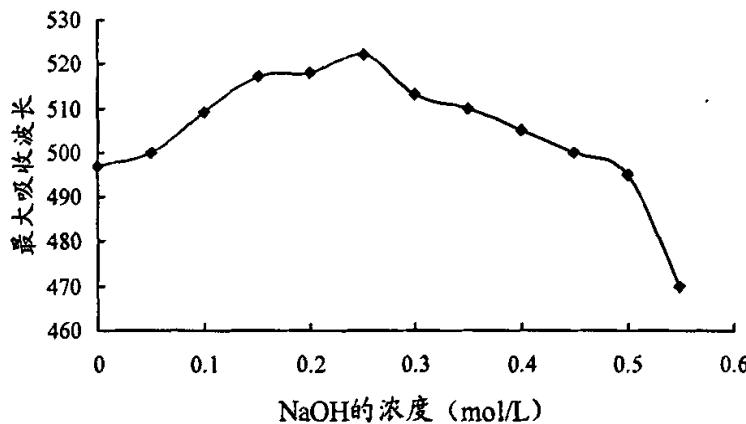


图 3-9 SWP II 与刚果红配合物的 λ_{max} 随氢氧化钠浓度的变化图

Fig3-9 Change of λ_{max} of Congo red-SWP II complex in different concentration of NaOH

氢氧化钠浓度小于 0.25 mol/L，吸收移向长波，表明糖与刚果红形成配合物，SWP II 呈有规则的螺旋构象。氢氧化钠浓度大于 0.25 mol/L，最大吸收波长降至基本与对照相同，螺旋构象解体，变成无规则的线团形式。推测可能是在不同浓度的 NaOH 作用下，使维持他们稳定空间结构的氢键被破坏，使螺旋的结构发生改变。

4 讨论

HPLC 法测定分子量是一种快速和测量精度较高的一种方法，在测定过程中，可以适当提高柱温，尽量采用低粘度的溶剂，来降低柱压，加快分离速度。

经过多次试验筛选两种比较合适的展开剂，能够快速分析降解多糖的单糖组成，但是由于薄层色谱本身的灵敏度低，以及在试验过程中对易见光分解的样品灵敏度更低，分析结果往往会有一定的误差，需要进一步用灵敏度更高的手段来进一步验证。

腈乙酸酯衍生物气相色谱法具有衍生物制备简便、试剂易得等优点，而且每种糖能得到单一的色谱峰。在试验过程中多糖水解是关键的一步，经多次试验硫酸的浓度不宜过高，一般为 1~2 mol/L；在试验过程中应尽量减少样品的水分含量，样品含水量大可以加大醋酸酐的用量；样品进行衍生化时要在密封的条件下进行，防止 90 ℃水浴时水蒸汽进入反应物中，引起分析时峰拖尾和杂峰出现。若样品的含水量偏高，衍生化完毕后可将样品用脱水剂脱水。采用小型反应器，可相应减少样品和试剂的用量。

刚果红试验表明 SWP II 具有螺旋空间结构，但是空间结构与其生物活性的关系还需进一步探讨。

5 小结

IR 图谱显示 SWP II 具有多糖的特征吸收峰，结合 NMR 分析其主链以 β -型糖苷键连接为主，少量 α -型糖苷键。

经元素分析、红外和紫外综合分析表明 SWP II 中没有 N、S 元素存在，硫酸基分析表明不含硫酸根，应为不含硫的非氨基糖。

楮头红多糖 SWP II 经 TLC 和 GC 分析可以判断出其单糖组成为鼠李糖、半乳糖、葡萄糖，摩尔比为 11.6:16.4:28.6。是一种杂多糖。

刚果红试验表明 SWP II 具有螺旋空间结构。

第四章 楚头红多糖的生物活性

近年来许多报道表明^[73,74]，由自由基(Free Radical, FR)引发生物膜的脂质过氧化损伤是许多毒物毒作用的起点，并由此导致多种病理过程如中风、肺气肿、炎症、老年性痴呆、帕金森氏病、白内障、糖尿病、动脉粥样硬化等。其中95%以上是氧自由基，包括超氧阴离子(O_2^-)、羟自由基(OH)、单线态氧(O^1_2)、过氧化氢(H_2O_2)、脂质自由基($LO, LOO, LOOH$)、氮氧自由基等。因此，研究高效低毒的抗氧化剂已成为药物研发的热点。本文主要通过研究楚头红多糖体外清除羟自由基(OH)、超氧阴离子(O_2^-)和体外 H_2O_2 诱导红细胞氧化溶血，抗肝组织自发性脂质过氧化作用的影响，从而评价楚头红多糖的抗氧化活性，以期全面了解楚头红多糖的生物活性。

许多从植物中提取的多糖能明显促进机体特异性免疫和非特异性免疫功能，提高机体的抗病力和抵抗力，可以作为免疫佐剂与疫苗配合应用，显著提高疫苗保护力与机体免疫力。随着我国人们生活水平的不断提高，中草药在免疫调节中的应用愈来愈广泛，中草药特别是中药多糖作为免疫增强剂的研究和应用前景广泛。本文用体外细胞培养和灌胃小白鼠的方法对楚头红多糖的免疫活性进行评价，以期为其治疗乙肝的临床应用和药理研究提供参考依据。

1. 材料

1.1 仪器

1600分光光度计(北京瑞利分析仪器厂)；磁力搅拌器(上海淀久中药机械厂)；微量分析天平(北京塞多利斯天平有限公司)；电热干燥箱(上海阳光实验仪器有限公司)；TGL-16G高速冷冻离心机(上海安亭仪器厂)；MCO-15AC型CO₂培养箱(日本SANYO公司)；AE31倒置显微镜(Motic公司，最大放大倍数600倍)；SB-1超净工作台(上海净化设备厂洁净度等级：100级)；Multiskan；MK酶标仪(Thermo公司)；一次性0.22μm滤膜(爱尔兰Millex公司)；pH计(818,美国奥立龙)；CO₂钢瓶；96孔一次性细胞培养板(美国Costar)；微量移液枪。

1.2 试剂

RPMT1640 干粉 (Gibco)、新生犊牛血清 (杭州四季青生物制品厂)、青霉素、链霉素、台盼蓝 (Sigma)、MTT (Amresco)、SOD、T-AOC、IgA、IgG、IgM、补体 C₃ 试剂盒 (南京建成生物工程研究所)、EDTA、H₂O₂、番红、邻苯三酚、三氯乙酸、硫代巴比妥酸、联苯双酯、四氯化碳、二甲亚砜、肝素钠、中性红、冰乙酸、无水乙醇、NaOH、Na₂HPO₄、KH₂PO₄ 均为国产分析纯。

PBS、Tris-HCl、生理盐水、无 Ca²⁺、Mg²⁺ PBS 溶液、Hank's 液、Tris-NH₄Cl、试剂均按照试验要求配制。

1.3 试验动物

昆明小鼠，体重约为 (18~22g)，购自福建医科大学实验动物中心。

2 方法

2.1 楮头红多糖体外抗氧化活性

2.1.1 对羟基自由基的清除作用

采用 Fe²⁺催化 H₂O₂ 产生羟基自由基 (Fenton 反应) 方法^[75,76]，在各试管 (试验管、未损伤管和损伤管) 中分别加入 2 mL pH7.4 磷酸盐缓冲液，1 mL 0.75 mol/L 邻二氮菲无水乙醇溶液，充分混匀后，加入 1 mL 0.75 mmol/L 硫酸亚铁溶液，加入后立即混匀。然后向各实验管中分别加入 1 mL 一定浓度的多糖溶液，未损伤管和损伤管加 1 mL 蒸馏水，混匀，再向各实验管和损伤管中加入 1 mL 0.01% H₂O₂，未损伤管不加 H₂O₂。于 37 °C 水浴保温 60 min，然后在 510 nm 测定吸光值，重复三次，计算其平均值。

$$\text{OH 清除率 (\%)} = \frac{A_2 - A_1}{A_0 - A_1} \times 100\%$$

式中，A₂—实验管吸光值；A₁—损伤管吸光值；A₀—未损伤管吸光值。

2.1.2 清除超氧阴离子自由基作用 (邻苯三酚自氧化法)

0.05 mmol/L Tris-HCl (pH=8.2) 于 25 °C 水浴保温 10 min^[77,78]，在试管中依次加入 5.0 mL 0.05 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH=8.2)，0.5 mL 2.5 mmol/L 邻苯三酚，1.0 mL 样液，混匀后置于恒温水浴中，25 °C 反应 5 min，立即加 1 mL 8 mol/L HCl 终止反应；空白组加入 1.0 mL 的蒸馏水。于 299 nm 处，测吸光度 (A) 值，空白对照组以相同体积的蒸馏水代替样品，每次重复 3 次，求得平均值；

$$\text{清除率} = (A_{对照} - A_{实验}) / A_{对照} \times 100\%$$

2.1.3 桃头红多糖对 H_2O_2 诱导红细胞氧化溶血作用的影响

小鼠摘眼球取血，制成抗凝血，3000 r/min 离心得到红细胞，冷生理盐水洗涤三次，制成 0.5% 的红细胞悬液。总多糖和纯一多糖分别设为四个浓度梯度，0.5 mg/mL、1 mg/mL、2 mg/mL、4 mg/mL。每个多糖浓度设 3 个平行管，各加入多糖溶液 0.1 mL，红细胞悬液 0.5 mL，对照管以生理盐水代替多糖溶液，混匀，最后加入 0.3% H_2O_2 0.1 mL 启动反应，37 °C 温育 1 h 后，用 4 mL 生理盐水稀释，3000 r/min 离心 5 min，取上清液测定 415 nm 的吸光值，计算抑制率^[79-82]。

$$\text{抑制率} (\%) = (A_0 - A_i) / A_0 \times 100$$

式中， A_0 —表示对照组的吸光值； A_i —表示各实验组的吸光值。

2.1.4 测定桃头红多糖的体外抗肝组织自发脂质过氧化作用

健康小鼠禁食 16 h 后断头处死，迅速取肝置于 4 °C 生理盐水中，洗去表面残血，于冰水浴中制成 10% 的肝匀浆。取肝匀浆 1.5 mL，加入不同浓度的供试样品 0.1 mL，对照组以生理盐水 0.1 mL 代替样品。37 °C 温浴 2.5 h 后，加入 20% 三氯乙酸 1.5 mL，3000 r/min 离心 10 min，取上清液 3 mL，加入 0.67% 的硫代巴比妥酸 1.5 mL，沸水浴加热 15 min，冷却后以蒸馏水调零，在 532 nm 处测吸光值，计算脂质过氧化的清除率^[86]。

$$\text{清除率} (\%) = (A_{对照} - A_{实验}) / A_{对照} \times 100\%$$

2.2 桃头红多糖保肝活性

2.2.1 桃头红总多糖保肝试验

取 50 只昆明种健康小鼠（体重 20~22 g）^[83-85]，由福建医科大学实验动物中心提供。饲养 7 d 供实验用），雌雄各半，随机分为 5 组，每组 10 只。1-2 组为给药高中剂量组（给药按临床成人 50g/50kg 量折算为小鼠给药量约为 320mg/kg，则所设的二组给药量分别为，600 mg/kg 体重，800 mg/kg 体重），3 组为联苯双酯阳性对照组（2 mg/10 g，每只 1.5 mg），4 组为 0.1%-CCl₄ 模型组（0.1 mL/10 g，颈部皮下注射）5 组为空白组（生理盐水 0.3 mL/10 g）。正式试验前，所有动物禁食不禁水 12 h。从第二天开始，每天一次，连续灌药 7 d，空白组和模型组灌 0.6 mL 的生理盐水，模型给药组灌同等体积的药液，在最后一次灌药后 1 h，除空白组外，其余五组皮下注射 0.5% 的四氯化碳-花生油溶液 0.1 mL/10

g, 禁食 12 h 后立即摘除眼球采血。3000 r/min 离心, 取上清液, 测定血清 AST 活力。取肝脏观察肝脏损伤程度。

2.2.2 数据处理 结果以均数±标准差表示, 差异比较用 t 检验。

2.3 桃头红多糖免疫活性作用

2.3.1 小鼠体内免疫活性试验

取 40 只昆明种健康小鼠 (体重 18~22 g, 由福建医科大学实验动物中心提供。饲养 7 d 后供试验用), 雌雄各半, 随机分为 4 组, 每组 10 只。第 1~3 组为给药高中低剂量组 (给药按临床成人 50 g/50 kg 量折算为小鼠给药量约为 320 mg/kg, 则所设的三组给药量分别为总多糖 400 mg/kg 体重, 600 mg/kg 体重, 800 mg/kg 体重), 第 4 组为空白组 (生理盐水 0.3 mL/10 g)。正式试验前, 所有动物禁食不禁水 12 h。从第二天开始, 每天一次, 连续灌药 30 d, 空白组 0.6 mL 的生理盐水, 在最后一次灌药后 1 h, 摘除眼球采血, 待血清分离后, 3000 r/min 离心取上清, 分别按照试剂盒说明书测定 SOD、T-AOC、IgA、IgG、IgM、补体 C₃ 的活性。分离肝脏、脾脏并称重, 计算脾脏、肝脏指数^[87-93]。

2.3.2 脾淋巴细胞转化试验

小鼠脾淋巴细胞的制备^[94,95] 小鼠 (8 周龄, 体重 18~22 g) 断椎处死后, 无菌取出脾, 置消毒平皿中 150 目铜网上剪碎, 以注射器内筒轻磨; 然后以 Hank's 液冲洗 1 次, 用吸管收集冲洗液至离心管, 1500 r/min, 离心 10 min, 弃上清液, 加入 Tris-NH₄Cl (0.15 mol/L NH₄Cl, pH 7.4) 溶解红细胞, 2000 r/min 离心 10 min, 弃上清; 用 Hank's 液洗 2 次 (1500 r/min 离心 5 min), RPMI1640 洗 1 次 (1500 r/min 离心 5 min), 弃上清, 加 RPMI1640 完全培养基混匀即为脾淋巴细胞, 调整细胞浓度至 2×10^6 /mL, 台盼蓝染色, 经测定细胞生存率大于 95%。

小鼠脾淋巴细胞体外增殖试验^[98-100] 取 2×10^6 /mL 脾淋巴细胞加入 96 孔培养板, 调整细胞浓度为每孔 1×10^5 , 除对照空外其他各孔加入不同浓度的桃头红多糖 (桃头红总多糖 50 μg/mL、100 μg/mL、150 μg/mL、200 μg/mL、250 μg/mL、300 μg/mL; 桃头红纯一多糖 100 μg/mL、200 μg/mL、300 μg/mL) 100 μL, 对照组加入同体积的 RPMI 1640 培养液。置 37 °C、5% CO₂ 培养箱孵育 48 h, 加入 20 μL MTT (5 g/L), 继续培养 4 h, 2000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 每孔加入细胞溶解液 (冰乙酸: 乙醇 = 1:1) 100 μL, 静置 10 min 后于 570 nm 酶标仪测定其 OD

值。

2.3.3 对小鼠巨噬细胞 NO 生成量的影响

腹腔巨噬细胞的制备^[96,97,101] 于昆明小鼠腹腔内注射无血清 RPMI-1640 培养液 2~3 mL, 15 min 后颈椎脱臼处死小鼠, 置 75% 酒精中浸泡 15 min, 无菌注射器收集腹腔内液, 1000 r/min, 4 ℃ 离心 5 min, 收集细胞, 加入 D-Hank's 液洗 2 次, 台盼蓝计数活细胞>95%。用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 完全培养液将细胞稀释为 1×10^6 个 /mL 的细胞悬液。取 24 孔培养板每孔加入细胞悬液 1 mL, 置 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养 2 h, 倾去培养液后, 用无酚红 1640 液洗去未贴壁细胞, 培养孔内即为所需巨噬细胞。

NO 生成量的测定 每孔重新加入完全培养液 1 mL, 同时各试验组加待测药物 (楮头红总多糖 50 μg/mL、100 μg/mL、200 μg/mL、300 μg/mL、400 μg/mL、楮头红纯一多糖 50 μg/mL、100 μg/mL、200 μg/mL、300 μg/mL、300 μg/mL) 100 μL, 对照组加培养液 100 μL, 每孔做 3 个复孔, 培养 48 h 后取上清液的 OD 值, 根据 Griess 反应测定细胞上清液的 NO 量间接反应巨噬细胞的 NO 生成量多少。

巨噬细胞吞噬中性红能力 在培养 48 h 后的巨噬细胞中每孔加入 0.1% 中性红生理盐水溶液 100 μL, 继续培养 20 min, 倾去上清液, 用 PBS 洗 3 遍, 每孔加入细胞溶解液 (冰乙酸: 乙醇 = 1:1) 100 μL, 待细胞完全溶解后在酶标仪上测定 570 nm 处的吸光值。

2.3.4 数据处理 结果以均数±标准差表示, 差异比较用 *t* 检验。

3 结果分析

3.1 楮头红多糖抗氧化作用

3.1.1 对羟自由基的清除率

图 4-1 为楮头红多糖对羟自由基的清除作用。可以看出各种浓度的楮头红多糖对羟自由基都有清除作用, 而且楮头红多糖在一定浓度范围内对体外羟自由基的清除呈剂量依赖性, 在多糖浓度为 3.0 mg/mL 时对羟自由基的清除率达到 39.3%。说明楮头红多糖对羟自由基具有一定的清除作用。

3.1.2 清除超氧阴离子自由基作用

楮头红多糖清除超氧阴离子自由基作用如图 4-2。可以看出随着多糖浓度的

增加,多糖对超氧阴离子自由基的清除率没有规律,在多糖浓度为1.0mg/mL时的清除率最高为26.8%,说明楮头红多糖对超氧阴离子自由基有一定的清除作用。

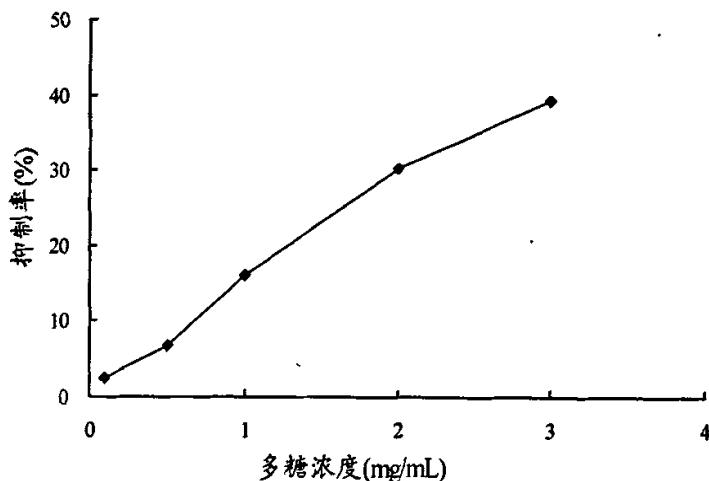


图 4-1 楮头红多糖对·OH 的清除作用

Fig.4-1 Scavenging effect of polysaccharides on hydroxyl free radical

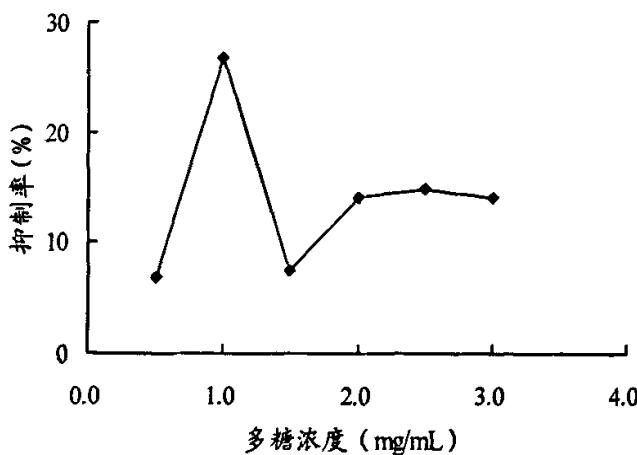


图4-2 楮头红多糖抗超氧阴离子作用

Fig4-2 Effects of polysaccharides on superoxide anion

3.1.3 楮头红多糖对H₂O₂诱导红细胞氧化溶血的影响

机体内的H₂O₂可诱发转变为·OH,这种物质可引发氧化作用,使红细胞损伤,胞内物质外流。楮头红多糖对H₂O₂诱导红细胞氧化溶血的影响如图4-3所示。不同浓度的楮头红总多糖和纯一多糖都能抑制H₂O₂诱导的小鼠红细胞氧化溶血,抑

制率随糖浓度的增加而增加，表现出量效关系，并且纯一多糖抑制效果比总多糖效果明显。在总多糖浓度为4 mg/mL，对H₂O₂诱导的小鼠红细胞氧化溶血的抑制率可在到28.1%，在纯一多糖浓度为4 mg/mL，对H₂O₂诱导的小鼠红细胞氧化溶血的抑制率可在到87.3%。

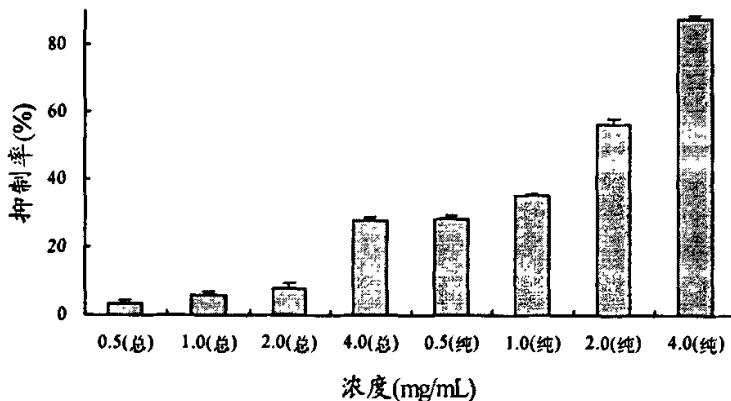


图 4-3 猪头红多糖对 H₂O₂诱导红细胞氧化溶血的影响

Fig.4-3 The effect of polysaccharides on the restraining oxidization of erythrocytes

3.1.4 猪头红多糖的抗脂质过氧化作用

多糖的抗脂质过氧化作用如图4-4所示。可以看出，随着多糖浓度的增加其抗脂质过氧化能力逐渐增强，且在一定浓度范围内呈现剂量效应关系，当多糖浓

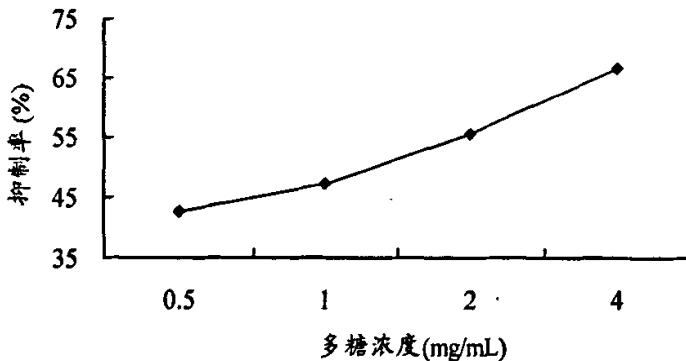


图 4-4 猪头红多糖的抗脂质过氧化作用

Fig.4-4 Polysaccharides inhibiting action on lipidperoxidation

度达到1.4 mg/mL时抑制率达到50%，显示了较强的抗氧化能力，这对于细胞免受过氧化损伤，维持细胞正常生理功能具有积极意义。

3.2 桃头红多糖保肝活性

从表 4-1 可以看出, 桃头红多糖能够显著降低 CCl_4 诱导的肝损伤小鼠中 AST 升高的活性, 其作用可能与抑制膜脂质的过氧化, 维持肝细胞膜的完整性, 从而产生保肝作用有关。对小鼠肝脏组织学观察发现, 桃头红多糖组小鼠肝小叶损伤程度较模型组明显小, 未发现大片坏死区, 肝细胞肿胀程度减少, 炎症浸润区减少, 这可能与多糖参与机体抗氧化等活动, 从而使炎症减轻。

表4-1 桃头红多糖对 CCl_4 肝损伤小鼠AST影响

Table4-1 Influence of polysaccharides on serum AST activities in mice induces by CCl_4

组别	n	剂量/ $mg \cdot kg^{-1}$	AST含量/ $u \cdot mL^{-1}$
正常对照组(A)	10	-	150.0 ± 32.93
CCl_4 组(B)	10	-	$893.0 \pm 214.00^{\Delta}$
联苯双酯对照组(C)	10		$319.0 \pm 69.13^{\bullet}$
多糖低剂量组(D)	10	600	$379.4 \pm 173.41^{\bullet}$
多糖高剂量组(E)	10	800	$321.8 \pm 118.85^{\bullet}$

注: Δ 指与正常对照组比较; \bullet 指与四氯化碳组比较。

3.3 桃头红多糖免疫活性

3.3.1 桃头红多糖对小鼠体内免疫相关指标的影响

1) 对小鼠血清中 C3 活性的影响 试验结果如图 4-6 和表 4-2。桃头红多糖能够显著增加小鼠血清中补体 C3 的含量, 中剂量和高剂量组与对照组相比较差异极显著 ($P<0.01$).

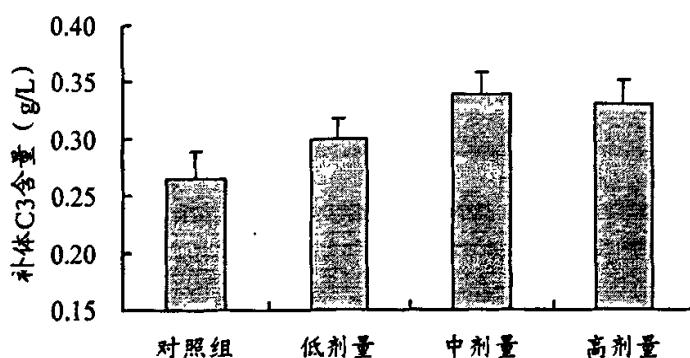


图 4-6 桃头红多糖对小鼠血清中 C3 活性的影响

Fig.4-6 Effect of polysaccharides on the activity of C3 in mice serum

补体是机体非特异性免疫系统的重要组成部分，在宿主防御机制中起着重要作用。推测楮头红多糖可能具有激活补体的作用，配合巨噬细胞来杀灭病原微生物，在机体防御、发炎、及过敏反应中起重要作用。

表 4-2 楮头红多糖对小鼠血清中 C3 活性的影响
Tab.4-2 Effect of polysaccharides on the activity of C3 in mice serum

组别	n	多糖剂量 (μg/mL)	C3 浓度 (g/L)
空白对照	6	0	0.2660±00.0235
低剂量组	6	400	0.2993±00.0182 [*]
中剂量组	6	600	0.3337±00.0205 ^{**}
高剂量组	6	800	0.3292±00.0214 ^{**}

注:^{*}表示 (P<0.05) 与对照组比较差异显著；^{**}表示 (P<0.01) 与对照组比较差异极显著

2) 对小鼠血清中 SOD 活性的影响 楮头红多糖对小鼠血清中 SOD 活性

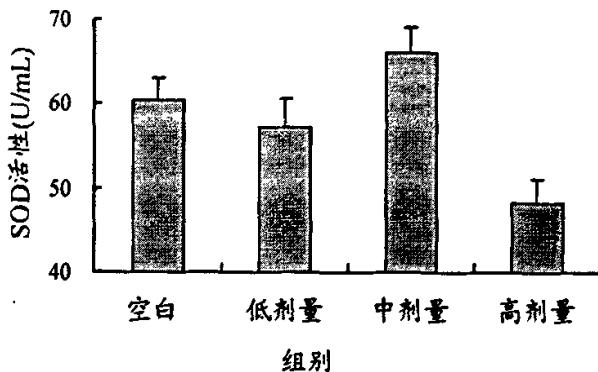


图 4-7 楮头红多糖对小鼠血清中 SOD 活性的影响
Fig.4-7 Effect on the activity of SOD in mice serum

的影响，按照体外抗氧化的结果来推测，SOD 活性应该很高才对，但从图 4-7 和表 4-3 分析可以看出，除了中剂量组外，其它两组反而比空白对照组的活性低，这可能与多糖体内的复杂作用机理有关，具体原因还有待进一步分析。

表 4-3 楮头红多糖对小鼠血清中 SOD 活性的影响
Tab.4-3 Effect on the activity of SOD in mice serum

组别	n	多糖剂量 (μg/mL)	SOD 活力 (U/L)
空白对照	6	0	60.45±2.71
低剂量组	6	400	57.20±3.53
中剂量组	6	600	66.18±3.01 [*]
高剂量组	6	800	48.23±2.90

注:^{*}表示 (P<0.05) 与对照组比较差异显著；^{**}表示 (P<0.01) 与对照组比较差异极显著

3) 对小鼠血清中 T-AOC 活性的影响 从表 4-4 和图 4-8 的结果可以看出各剂量组多糖都能明显提高 T-AOC 的活性, 中、高剂量组与对照组比较差异极显著, 说明多糖在体内起到作用, 使体内抗氧化能力增强。

表 4-4 猪头红多糖对小鼠血清中 T-AOC 活性的影响

Tab.4-4 Effect on the activity of T-AOC in mice serum

组别	n	多糖剂量($\mu\text{g/mL}$)	T-AOC 活力(U/L)
空白对照	6	0	1.2453±0.1487
低剂量组	6	400	1.4734±0.0828*
中剂量组	6	600	2.5924±0.3473**
高剂量组	6	800	2.1945±0.3544**

注: * 表示 ($P<0.05$) 与对照组比较差异显著; ** 表示 ($P<0.01$) 与对照组比较差异极显著

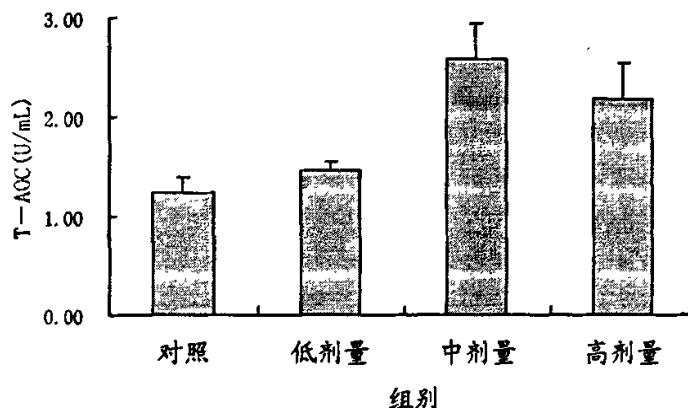


图 4-8 猪头红多糖对小鼠血清中 T-AOC 活性的影响

Fig.4-8 Effect on the activity of T-AOC in mice serum

4) 对小鼠血清中 IgG、IgM、IgA 活性的影响 从图 4-9 和表 4-5 可以看出,

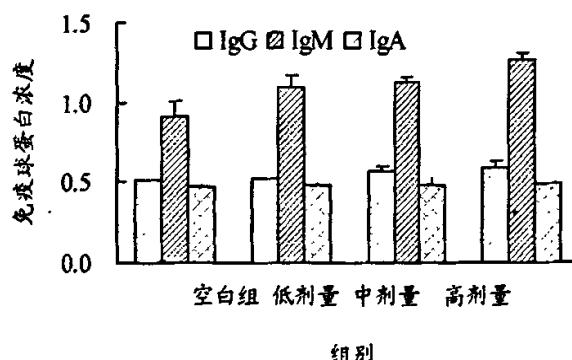


图 4-9 猪头红多糖对小鼠血清中 IgG、IgM、IgA 活性的影响

Tab.4-9 Effect on the activity of IgG, IgM, IgA in mice serum

不同剂量组的多糖对小鼠血清中免疫因子的活性影响不同。对 IgA 活性几乎没有影响，对 IgG 和 IgM 活性都有提高，特别是中剂量组和高剂量组与空白对照组比较差异极显著。这说明不同剂量的多糖对小鼠由 IgG、IgM 引起的体液免疫功能有增强作用。提示多糖对调节机体免疫功能和自身免疫性疾病、肿瘤、恶病质综合征等的辅助治疗有着积极意义。

表 4-5 猪头红多糖对小鼠血清中 IgG、IgM、IgA 活性的影响

Tab.4-5 Effect on the activity of IgG, IgM, IgA in mice serum

组别	n	多糖剂量($\mu\text{g/mL}$)	IgG	IgM	IgA
空白对照	6	0	0.5123 \pm 0.0045	0.9080 \pm 0.09969	0.4738 \pm 0.0119
低剂量组	6	400	0.5212 \pm 0.0045	1.0903 \pm 0.0763 [*]	0.4837 \pm 0.0131
中剂量组	6	600	0.5669 \pm 0.0288 ^{**}	1.1215 \pm 0.0355 ^{**}	0.4867 \pm 0.0333
高剂量组	6	800	0.5932 \pm 0.0381 ^{**}	1.2622 \pm 0.0473 ^{**}	0.4887 \pm 0.0048

注: * 表示 ($P<0.05$) 与对照组比较差异显著; ** 表示 ($P<0.01$) 与对照组比较差异极显著。

IgG、IgM、IgA 是机体主要免疫球蛋白, 对体液免疫起主要作用, 可以和巨噬细胞、中性粒细胞等受体结合, 也能激活补体, 发挥中和、调理作用, 抗体依赖性细胞介导的细胞毒及溶解靶细胞等作用。

3.3.2 对小鼠免疫器官的影响

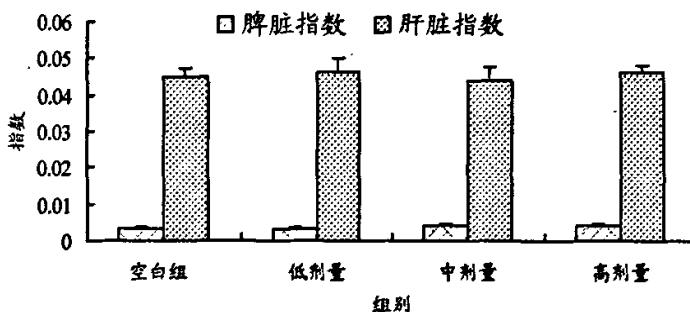


图 4-10 多糖对小鼠免疫器官的影响

Fig.4-10 Effect on the immunity viscera in mouse

1) 小鼠脾脏指数的影响 脾是成熟 T 细胞、B 细胞定居的场所之一, 也是这些细胞受抗原刺激后发生免疫应答的主要部位。脾脏指数和胸腺指数是反映动物机体免疫功能的指标, 被广泛用于评价机体的整体免疫状态。试验结果如图 4-10 和表 4-6。结果表明, 灌胃小白鼠总多糖除低剂量组外都能显著提高小鼠脾脏指数。

2) 对肝脏指数的影响 结果如图 4-10 和表 4-6 所示, 给药组和空白组比较, 除中剂量组外, 其它两组都有差异。

表 4-6 脐头红多糖对小鼠免疫器官的影响
Tab.4-6 Effect on the immunity viscera in mouse

组别	n	多糖剂量($\mu\text{g/mL}$)	脾脏指数	肝脏指数
空白对照	6	0	0.0035 \pm 0.0003	0.0451 \pm 0.0024
低剂量组	6	400	0.0033 \pm 0.0005	0.0464 \pm 0.0035 [*]
中剂量组	6	600	0.0041 \pm 0.0003 [*]	0.0440 \pm 0.0036
高剂量组	6	800	0.0042 \pm 0.0003 [*]	0.0465 \pm 0.0029 [*]

注: *表示 ($P<0.05$) 与对照组比较差异显著; **表示 ($P<0.01$) 与对照组比较差异极显著

3.3.3 脾淋巴细胞淋转试验

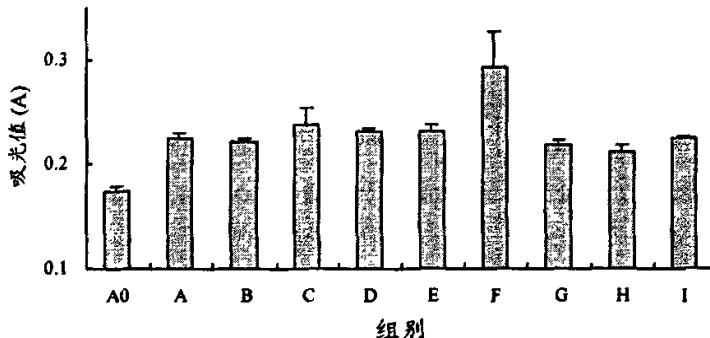


图 4-11 脐头红多糖对小鼠淋巴细胞转化的影响

Fig.4-11 Effect of polysaccharides on lymphocyte proliferation

从表 4-7 和图 4-11 的结果可以看出, 不同浓度的多糖对小鼠脾淋巴细胞有直接的刺激增殖作用, 剂量与作用的关系不太明显, 但总体趋势为剂量越大其增殖作用越强。总之, 脐头红多糖对小鼠淋巴细胞的转化增殖具有促进作用。

表 4-7 脐头红多糖对小鼠淋巴细胞转化的影响

Tab.4-7 Effect of polysaccharides on lymphocyte proliferation

组别	n	多糖剂量($\mu\text{g/mL}$)	OD570	刺激指数
A ₀ 对照组	6	0	0.1237 \pm 0.0040	1.000
A 组(SWP)	6	50	0.1750 \pm 0.0045 ^{**}	1.415
B 组(SWP)	6	100	0.1713 \pm 0.0032 ^{**}	1.385
C 组(SWP)	6	150	0.1870 \pm 0.0167 ^{**}	1.512
D 组(SWP)	6	200	0.1807 \pm 0.0042 ^{**}	1.461
E 组(SWP)	6	250	0.1803 \pm 0.0076 ^{**}	1.158
F 组(SWP)	6	300	0.2423 \pm 0.0356 ^{**}	1.960
G 组(SWP II)	6	100	0.1680 \pm 0.0052 ^{**}	1.358
H 组(SWP II)	6	200	0.1611 \pm 0.0060 ^{**}	1.303
I 组(SWP II)	6	300	0.1737 \pm 0.0021 ^{**}	1.404

注: *表示 ($P<0.05$) 与对照组比较差异显著; **表示 ($P<0.01$) 与对照组比较差异极显著

3.3.4 对小鼠巨噬细胞 NO 生成量的影响

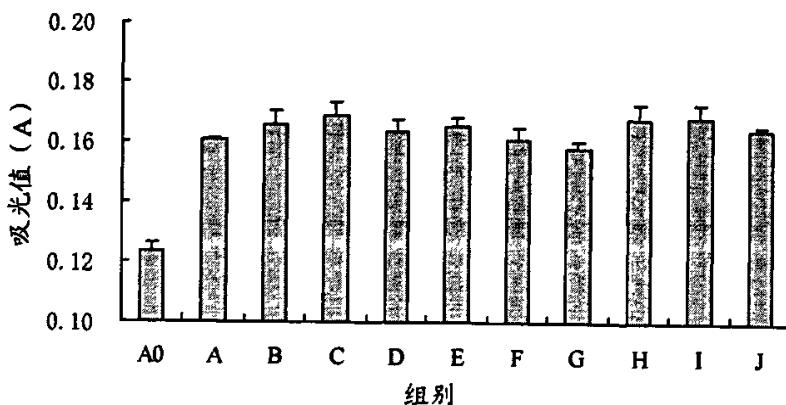


图 4-12 多糖对巨噬细胞 NO 生成能力的影响

Fig.4-12. Effect of polysaccharides on celiac macrophages licking up neutral red

NO 是近年来新发现的一种有重要生物学意义的无机小分子, 参与免疫调节、抗细胞内寄生虫、抗病毒与微生物感染中起重要作用。本研究运用体外细胞水平的检测体系, 探索楮头红总多糖 (SWP) 和纯一多糖 (SWP II) 对腹腔 NO 生成的影响。从图 4-12 和表 4-8 结果表明楮头红总多糖和纯一多糖可促进正常巨噬细胞活化并释放一氧化氮, 则可能与楮头红多糖的免疫调节作用有关。

表 4-8 多糖对巨噬细胞 NO 生成能力的影响

Tab.4-8 Effect of polysaccharides on celiac macrophages licking up neutral red

组别	n	剂量 ($\mu\text{g/mL}$)	吸光值
A ₀ 对照组	6	0	0.1233 \pm 0.0035
A 组(SWP)	6	50	0.1603 \pm 0.0006**
B 组(SWP)	6	100	0.1660 \pm 0.0044**
C 组(SWP)	6	200	0.1683 \pm 0.0046**
D 组(SWP)	6	300	0.1637 \pm 0.0040**
E 组(SWP)	6	400	0.1653 \pm 0.0025**
F 组(SWP II)	6	50	0.1603 \pm 0.0040**
G 组(SWP II)	6	100	0.1580 \pm 0.0017**
H 组(SWP II)	6	200	0.1673 \pm 0.0055**
I 组(SWP II)	6	300	0.1680 \pm 0.0043**
J 组(SWP II)	6	400	0.1640 \pm 0.0010**

注: * 表示 ($P<0.05$) 与对照组比较差异显著; ** 表示 ($P<0.01$) 与对照组比较差异极显著

3.3.5 对小鼠巨噬细胞吞噬中性红的影响

从图 4-13 和表 4-9 可以看出不同剂量的总多糖 (SWP) 和纯一多糖 (SWP

II) 对巨噬细胞吞噬中性红能力都有所加强, 虽然不成明显的剂量关系, 但是也可以看出剂量高的其吞噬能力有所加强。

表 4-9 多糖对巨噬细胞吞噬中性红能力的影响

Tab.4-9 Effect of polysaccharides on celiac macrophages licking up neutral red

组别	n	剂量 ($\mu\text{g/mL}$)	中性红(umol/L)
A ₀ 空白组	6	0	0.0997±0.0108
A 组(SWP)	6	50	0.1210±0.0996
B 组(SWP)	6	100	0.1293±0.0217 [*]
C 组(SWP)	6	200	0.1397±0.0058 ^{**}
D 组(SWP)	6	300	0.0997±0.0155 [*]
E 组(SWP)	6	400	0.1263±0.0133 [*]
F 组(SWP II)	6	50	0.1363±0.0119 ^{**}
G 组(SWP II)	6	100	0.1327±0.0096 [*]
H 组(SWP II)	6	200	0.1213±0.0091
I 组(SWP II)	6	300	0.1330±0.0120 ^{**}
J 组(SWP II)	6	400	0.1337±0.0100 ^{**}

注: *表示 ($P<0.05$) 与对照组比较差异显著; **表示 ($P<0.01$) 与对照组比较差异极显著

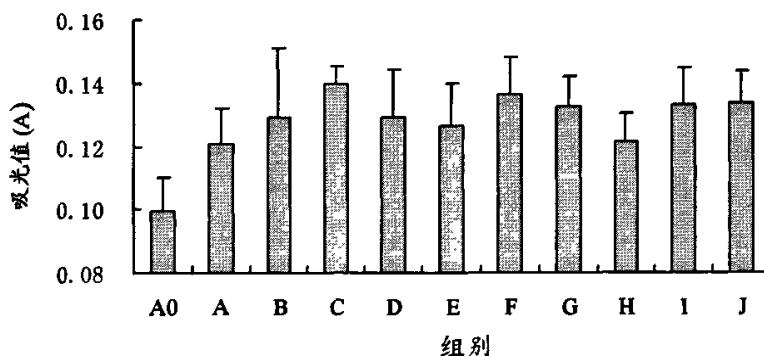


图 4-13 多糖对巨噬细胞吞噬中性红能力的影响

Fig.4-13 Effect of polysaccharides on celiac macrophages licking up neutral red



图 4-14 脾淋巴细胞 (左 400×) 腹腔巨噬细胞 (右 400×)

Fig.4-14 Splenic Lymph Cell(left 400×) Abdominal Macrophage(right 400×)

4 讨论

自由基是指含有未成对电子的原子、原子团或分子，不配对电子的出现使物质具有更高的反应活性，它能与许多生物分子反应并启动一系列破坏反应。它们与若干疾病密切相关，如炎症，缺血再灌注综合症、癌症的诱发等，与病毒性肝炎、药物性肝炎、酒精性肝损伤等有着密切的联系。肝细胞及其细胞器膜富含不饱和脂肪酸，极易受自由基攻击发生脂质过氧化，导致膜流动性降低、通透性大，细胞内渗透压升高，致使细胞肿胀破裂死亡。自由基除了对肝细胞的直接毒性外，还参与肝组织的免疫功能紊乱、肝微循环障碍等一系列病理生理过程。

本文对楮头红总多糖和纯一多糖的抗氧化和保肝作用进行了比较系统的研究表明：楮头红多糖在体内外均表现出较好的抗氧化作用。对CCl₄诱导的肝损伤也具有较好的保护作用。由此我们推断楮头红多糖的抗氧化性和保肝作用具有一致性，它们可能是通过清除自由基、提高体内抗氧化酶活性、抑制脂质过氧化途径来降低或抵御自由基对肝细胞的损伤，从而发挥保肝作用。此外，楮头红多糖的保肝作用还可能与其免疫调节有关。

补体是机体非特异性免疫系统的重要组成部分，在宿主防御机制中起着重要作用。补体蛋白上存在的识别点可识别到多糖的结构。许多多糖均有激活补体的作用，它能杀死病原微生物或者协助、配合噬细胞来杀灭病原微生物，在机体防御、发炎、及过敏反应中起重要作用。

自1987年Palmer等报道NO为内皮细胞松弛因子以来，大量的有关NO的研究相继报道。研究发现，NO除具有扩张血管，松弛平滑肌等血管活性外，还具有信号传递、酶活性调节、免疫调节、抑制血小板聚集及抗氧化损伤等生物学活性，NO的前体物质是左旋精氨酸，NO是亲脂性物质，直接扩散至邻近靶细胞，与其胞内的可溶性鸟苷酸环化酶结合，促使三磷酸鸟苷转化为环磷酸鸟苷(cGMP)，NO还可能通过多种非cGMP依赖性途径影响基因转录，信使核糖核酸翻译和蛋白质翻译后加工，从而发挥生物学作用。炎症过程中巨噬细胞会产生大量NO，它可进行信息传递，调节血管、神经和内分泌系统，更重要的是对外界侵入的细菌、病毒和外界刺激物进行应答，其应答能力可作为免疫细胞功能的生物标志。

脾脏是人体最重要的中枢和外周免疫器官之一，脾脏指数能反映二者的发育和功能状况，间接反映了机体的免疫水平。淋巴细胞转化率可直接反映细胞免疫

功能状态。因此，检测脾脏指数和淋巴细胞转化率，可以了解药物对机体免疫功能特别是细胞免疫的影响，试验表明楮头红多糖能够提高机体的体液免疫和细胞免疫功能，从而达到抗炎、抗病毒等作用。

5 小结

体外抗氧化试验表明，楮头红多糖具有较好的抗氧化作用。特别是抗脂质化作用和对 H_2O_2 诱导的小鼠红细胞氧化溶血的抑制作用。

灌胃小白鼠表明楮头红总多糖对血清内相关酶 (IgG、IgM、T-AOC) 活性具有增强作用，能够增加脾脏指数；

体外细胞培养表明，多糖能够促进脾淋巴细胞转化，提高巨噬细胞吞噬中性红能力和促使 NO 产生量不同程度的增强。

进一步工作设想

1. 楮头红多糖体外抗乙肝病毒试验
2. 楮头红多糖结构的进一步分析
3. 楮头红多糖的构效分析，结构修饰或改良及对活性的影响

参考文献

- [1] 赵秀贞.青草药彩色图谱(精)[M].福建科学技术出版社,1999:632.
- [2] 江苏新医学院.中药大辞典(下册)[M].上海人民出版社,1997:2290.
- [3] 福建师范大学,厦门大学.福建植物志第四卷.福州:福建科学技术出版社,1989:123~124.
- [4] Maddrey,W.C,J Med.Viro],2000,61:362:6.
- [5] 刘崇柏.中国公共卫生[J].1997,13:515.
- [6] Franz G. Polysaccharides in pharmacology. Current application and future concepts[J]. Plant Medica,1998,55:493.
- [7] 马宝瑕,陈新,邓军娥.中药多糖研究进展[J].中国医院药学杂志,2003,23(6):360~361.
- [8] 陈业高.植物化学成分[M].北京:化学工业出版社,2004:240.
- [9] 郭忠武,王来晓.糖化学研究进展[J].化学进展,1995,7(1):10~29.
- [10] 金城,张树政.糖生物学与糖工程的兴起与前景[J].生物工程进展,1995,15(3):12~17.
- [11] 陈惠黎.牛津大学糖生物学研究概况[J].生物工程进展,2000,2:23~25.
- [12] 高锦明.植物化学[M].科学出版社,2003.
- [13] 杨兴斌,赵燕,梅其炳.多糖类新药创制中的瓶颈问题与对策研究[J].中药材,2002,25(11):823~825.
- [14] 王玉华,袁久荣.中药多糖的化学研究概况[J].中成药,2004,26(6):496~498.
- [15] 赵宇,彭晓霞.多糖类化合物提取工艺研究[J].甘肃科技纵横,2006,35(2):223~224.
- [16] 赵博,高文义,冯乾坤,刘大有等.多糖类药物提取分离研究概况[J].长春中医药学院学报,2006,22(1):85~86.
- [17] 刘锐.多糖类物质的研究进展[J].安徽农业科学,2005,33(9):1722~1725.
- [18] 张惟杰.复合多糖生化研究技术[M].北京:科学出版社,1998.
- [19] 陈京,熊耀康.多糖类药物的质量标准研究现状及其进展[J].浙江中医药学院学报,2004:28(3):77~79.
- [20] 吴东儒主编.糖类生物化学[M].北京:高等教育出版社,1987.
- [21] 丰贵鹏.多糖结构的研究方法及其活性的研究进展[J].平原大学学报,2006,23(5):128~130.
- [22] 高小荣,刘培勤.多糖结构分析研究进展[J].天津药学,2003,15(6):67~70.
- [23] 霍光华,李来生,高荫榆.波谱在多糖结构分析上的应用[J].生命的化

- 学, 2002,22(2):194~196.
- [24] 邓小云, 丁登峰, 戴美红, 向大雄. 植物多糖药理作用研究进展[J]. 中医药导报, 2006,12(9):86~88.
- [25] 孙才华, 谷新利, 卢慧. 免疫活性多糖作用机制的研究进展[J]. 中兽医医药杂志, 2006,25(4):19~21.
- [26] H.Yamada.Bioactive plant polysaccharides from Japanese and Chinese traditional herbal medicines[J].Proceedings of the phytochemical society of Europe,2000,44:15~24.
- [27] 邓成华, 杨祥良, 王雁, 等. 硫酸酯化及羧甲基化虎奶多糖衍生物对抗HSV-2病毒作用[J]. 中国地方病学杂志, 2000,19(4):251~253.
- [28] 杨旭辉, 朱敏恒, 吴越. 植物源性天然抗氧化成分研究进展[J]. 农垦医学, 2004,26(4):298~230.
- [29] 胡庭俊, 程富胜, 李倬, 余洪. 天然多糖免疫调节与机体自由基反应的关系研究概况[J]. 中兽医医药杂志, 2003 ,4:21~23.
- [30] 高小荣, 刘培勤. 多糖构效关系研究进展[J]. 中草药, 2004,35(2):229~231.
- [31] 张艺、杨明等. 日本研究多糖的新进展. 国外医学中医中药分册, 1997,3:46~48.
- [32] 陈桂菲, 叶淑玲. 分柜头草药用探讨[J]. 时珍国医国药, 2000,11(2):129.
- [33] 北京医学院, 北京中医学院 主编. 中草药成分化学(第一版) [M]. 人民卫生出版社, 1980.
- [34] 谭仁祥主编. 植物成分分析 [M]. 北京: 科学出版社, 2004.
- [35] 卢艳花主编. 中药有效成分提取分离技术 [M]. 化学工业出版社, 2004,9.
- [36] 游见明, 李光辉. 南瓜多糖的提取工艺研究[J]. 现代食品科技, 2005,21(2):107~109.
- [37] 朱丹, 牛广财, 孟宪军. 马齿苋多糖提取工艺的研究 [J]. 中国农学通报, 2006, 22(8):120~122.
- [38] 刘晔玮, 宋海, 马振远, 焦军红. 甘草多糖提取工艺的研究 [J]. 中成药, 2006,28(5):729~731.
- [39] 张锐, 曾冬云, 龚兴国, 郭建军. 羊栖菜多糖的提取工艺研究 [J]. 中国食品学报, 2006, 6(3):14~18.
- [40] Sutherland I.w.An Introduction to Polysaccharide Biotechnology[J].Biochemical Education, 1998,26(4):332.
- [41] 盛家荣, 曾桂声, 洪艳艳. 均匀设计优选绣花针多糖的提取工艺 [J]. 时珍国医国药, 2006,17(7):1221~1222.

- [42] Honnavally P,Rudrapatnam N.Water-extracted polysaccharides of selected cereals and influence of temperature on the extractability of polysaccharides in sorghum[J].Food Chemistry,1999,64(3):345~350.
- [43] 孔祥辉,张介驰,戴肖东,李景鹏.黑木耳多糖的提取与纯化[J].生物技术,2005,15(1):81~83.
- [44] 郑婷婷,李多伟,张嘉.芦荟中芦荟多糖提取及脱色工艺的研究[J].工艺技术,2005,9:120~121.
- [45] 朱越雄,石亮,曹广力.野生树舌多糖的脱色和脱蛋白[J].氨基酸和生物资源,2005,27(3):1~3.
- [46] 张安强,张劲松,潘迎接.食药用菌多糖的提取、分离纯化与结构鉴定[J].食用菌学报,2005,12(2):62~68.
- [47] 黄瑞松.中草药多糖含量测定方法概述[J].中国药师,2005,8(1):68~70.
- [48] 徐光城,颜军,郭晓强等.硫酸-苯酚定糖法的改进与初步应用[J].食品科学,2005,26(8):342~345.
- [49] 胡居吾,范青生,肖小年.粗多糖测定方法的研究[J].食品科技,2005,6:17~18.
- [50] 马鸿雁,刘小彬,李楠,杨明.附子粗多糖提取工艺的优化[J].时珍国医国药,2005,16(1):22~24.
- [51] 厉朝龙主编.生物化学与分子生物学实验技术[M].杭州:浙江大学出版社,2000,6.
- [52] 朱良,张青,王一飞等.昆布多糖的含量测定[J].中国海洋药物杂志,2005,24(6):47~48.
- [53] Saha S.K.,Brewer C.F.Determination of the concentration of oligosaccharides,complex type carbohydrate, and glycoproteins using the phenol-sulfuric acid method [J].Carbohydrate Research,1994,254:157~167.
- [54] 李建武等.生物化学实验原理和方法[M].北京:北京大学出版社,1994.
- [55] 厉朝龙主编.生物化学与分子生物学实验技术[M].杭州:浙江大学出版社,2000,6.
- [56] 陈留勇,孟宪军,孔秋莲等.黄桃水溶性多糖的提取和分离纯化[J].食品科学,2004,25(1):81~84.
- [57] Zhennai Yang,Eine H,Mikael S.Separation ,purification and characterisation of ectracellular polydacidcarbohydrates produced by slime-forming,acrococcus lactis ssp.cremoris strains[J].International Dairy Journal,1999,9:631~638.
- [58] Chuangguang Qin,Kaixun Huang,Huibing Xu.Isolation and characterization of novel

- polysaccharide from the mucus of loach, *Misgurnus* [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2002, (49): 367~371.
- [59] 吴群媛, 胡盛, 杨光忠, 等. 鳟黄精多糖的分离纯化及结构研究 [J]. 林产化学与工业, 2005, 25(2): 80~82.
- [60] 聂凌鸿, 宁正祥. 广东淮山多糖的纯化及化学结构鉴定研究 [J]. 林产化学与工业, 2004, 24 (增刊): 101~106.
- [61] M.R.S.Melo, J.P.A.Feitosa, A.L.P.Freitas, R.C.M.dePaula, Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria Corea* [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2002, (49): 491~498
- [62] 陈全斌, 陈海燕, 李俊等. HPLC法测定罗汉果多糖的相对分子质量 [J]. 中草药, 2003, 34 (12): 1075~1076.
- [63] 张晓红, 博. 格日勒图, 昭日格图, 娜日苏. 高效液相色谱法对黄精多糖相对分子质量及组成的测定 [J]. 色谱, 2005, 23(4): 394~396.
- [64] 李健, 刘宁, 陈平等. 香菇多糖单糖组成及含量的测定方法研究 [J]. 化学与黏合, 2005, 27(2): 71~73.
- [65] 莎仁, 田福利, 其木格等. 毛细柱气相色谱分析谷物单糖 [J]. 内蒙古教育学院学报(自然科学版) 1999, 12(4): 26~27.
- [66] 王静, 王晴, 向文胜. 色谱法在糖类化合物分析中的应用 [J]. 分析化学, 2001, 29(2): 222~227.
- [67] 付桂明, 刘成梅, 涂宗财. 茶树菇水溶性多糖的分离纯化和化学组成的研究 [J]. 食品科学, 2005, 26(9): 180~183.
- [68] 孙玉军, 陈彦. 茶多糖的分离纯化及其结构分析概述 [J]. 中国茶叶加工, 2004, 4: 38~40.
- [69] 李小定, 吴谋成, 曾晓波, 荣建华. 灰树花多糖的分离、纯化与理化性质 [J]. 华中农业大学学报, 2002, 21(2): 186~188.
- [70] Shida M. The preparation and properties of some polysaccharides from *Canida utilis* fruit body [J]. *Carbohydrate Res*, 1975, 41: 211~214.
- [71] 谢展, 高向东, 王坚, 刘冬. 富锗金针菇多糖空间结构和与生物活性关系的研究 [J]. 中国医科大学学报, 2004, 35(6): 576~580.
- [72] 周义发, 张丽萍, 杨庆尧. 裂褶菌多糖的构象研究 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1995, 22(1): 53~55.

- [73] 陈奇主编.中药药理研究方法学[M].北京:人民卫生出版社,2000.
- [74] Srivastava R,et al.Bioactive polysaccharides from plants[J].Phytochemistry,1989,28(11):2877~2883.
- [75] 边晓丽,丁东宁,张红梅等.长松萝多糖清除氧自由基和抗脂质过氧化反应研究[J].中药材,2002,25(3):188~189.
- [76] Yinrong Li.Yeap F.Antioxidant activities of polyphenols from sage.Food Chemistry, 2001, 75 : 197 ~202
- [77] 刘培勤,高小荣,徐文清.银耳碱提多糖抗氧化活性的研究[J].中国生化药物杂质,2005,26(3):169~170.
- [78] 杨贝,庄延,邵雪玲.仙人掌多糖清除活性氧作用初探[J].武汉植物学研究,2004, 22 (2) : 183~186.
- [79] Magnani L, Gaydou EM, Hubaud JC.Spectrophotometric measurement of antioxidant properties of flavones and flavonols against superoxide anion[J]. Analytica Chimica Acta, 2000, 4(11): 209~216
- [80] Kanner J, Frankel E, Grano R.Natural antioxidants in grapes and wines[J].Agric Food Chem,1994,42:64~68.
- [81] 甄攀,王治宝,张万明,梁惠花.吴茱萸多糖的提取及其抗氧化作用研究[J].中成药, 2005,27(4):491~492.
- [82] 李贵荣,杨胜圆.党参多糖的提取及其对活性氧自由基的清除作用[J].化学世界, 2001,8:421.
- [83] Kutina SN, Zubakhin AA.Liver resistance to CCl4-induced injury after stimulation of macrophages with various preparations.Bull Exp Biol Med ,2000,129(6):524
- [84] 黄宗锈,陈冠敏,黄佳宁等.枸杞粗多糖对化学性肝损伤保护作用[J].预防医学情报杂志,2005,21(1):37~38.
- [85] 宋印利,高普军.五味子粗多糖保肝作用的药理分析[J].齐齐哈尔医学院学报, 2002,23(3):245.
- [86] Placer Z A,Cushman L,Johnson B C.Estimination of product of lipid peroxidation (malonyldiald- ehyde) in biochemical system[J]. Anal Biochem,1966,16:359~364.
- [87] 陈果然,胡庭俊,程富胜,梁纪兰.葛麻多糖的免疫药理实验研究[J].兽药与饲料添加剂, 2005,10(5):1~2.

- [88] 周昌艳, 唐庆九, 贾薇. 不同来源灰树花多糖免疫活性初探[J]. 食用菌学报, 2004, 11(4):13~17.
- [89] 刘源, 陆平成. 中药复方顽疣净对小鼠免疫器官重量和淋巴细胞转化的影响[J]. 湖北中医学院学报, 2006, 8(1):52~54.
- [90] 薛庆善, 肖渝平, 林娟. 体外培养的原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 2001:75~78.
- [91] Tzianabos,A.O.Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents :structural aspects and biologic function[J]. Clin. Microbiol, 2000, 13:523~533
- [92] 吉娜薇, 杜长武, 彭家训, 等. 复方白芍制剂对小鼠免疫功能的影响[J]. 中国运动医学杂志, 2002, 21(5):506~507.
- [93] 倪峰, 洪华炜, 翁华春, 等. 木姜子根多糖对小鼠免疫功能的影响[J]. 中药药理与临床, 2001, 17(5):15~16.
- [94] 杜丽蕊, 何贤辉, 徐丽慧, 等. 小檗碱对小鼠淋巴细胞体外增殖和细胞周期的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2004, 20(10):687~692.
- [95] 乌日琴, 李军, 张培军, 等. 牙鲆淋巴细胞转化和细胞免疫[J]. 水生生物学报, 2003, 27(2):127~131.
- [96] Liu WK. Activation of peritoneal macrophages by polysaccharopeptide from the mushroom, *coriolus versicolor*[J]. Immunopharmacology, 1993, 26(2):139~146.
- [97] Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages[J]. J Immunol, 1988, 141(7):2407.
- [98] 常建军, 孔庆波, 丛丽媛, 等. MTT 法测定猪 TF 对犬淋巴细胞转化增殖的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2005, (7):9~11.
- [99] 吴雄文, 梁智辉, 主编. 实用免疫学实验技术 [M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2002:146~147.
- [100] 沈传来, 王立新, 许靖霞, 等. MTT法在淋转和NK活性检测中的不同适用性[J]. 上海免疫学杂志, 1998, 18(1):50.
- [101] Natban CF, Hbbs JB Jr. Role of nitric oxide synthesis in Macrophage's antimicrobial activity[J]. Curr Opin Immunol, 1991, 3:65

硕士期间发表论文情况

- [1] 朱庆银,何海斌,李清禄,林茹等.药用植物楮头红化学成分初步分析[J]中华实用医药杂志,2005,5(18):1897-1899
- [2] 李清禄,陈强,何海斌,朱庆银等.楮头红提取物的抗氧化和抗菌活性. 第八届全国中药和天然药物学术研讨会论文集. 中国药学会中药和天然药物专业委员会、中国植物学会药用植物及植物药专业委员会, 武汉, 2005,148
- [3] 李清禄,朱庆银,何海斌,林茹等.楮头红多糖的纯化分离及其活性初步研究. 第六届全国药用植物及植物药学术研讨会论文集, 中国植物学会药用植物及植物药专业委员会,长春,2006
- [4] 王长征, 朱庆银, 李清禄等.WLS-2 比较比色仪测定烤烟烟叶不同陈化时间的褐变程度[J]安徽农业科学(已录用)

课题支持

福建省自然科学基金项目 (B0510012)：天然药用植物楮头红生物活性物质研究

致 谢

本论文是在李清禄老师的悉心指导下完成的。三年的学习生涯，从李老师身上学到的不仅仅是渊博的知识，严谨的科研作风，更多的是做科学的研究方法态度和做人的道理，是老师将我引上了科研之路。论文更是倾注了老师心血，从论文的选题、每一项工作的完成到写作的细节都融汇了老师细心的指导。三年的生活是短暂的，导师对我的教诲、帮助和影响是永存的，谢谢导师三年来在生活和学习上的照顾！

本论文在完成过程中还得到其他老师的热情帮助，他们是生科院的甘纯琨教授，林瑞余教授，谢勇平老师，吴琼洁老师。还有动科学院的陈强老师，黄志坚教授，李建生老师，中医学院的王振登研究员。感谢中科院上海有机化学研究所田庚元教授为我们做的结构分析。衷心的感谢他们，感谢他们给予的帮助和指导！

还要感谢一起工作和学习的同学们，他们是林双喜，战经润，刘萍，孙萌，等，他们不仅是探讨学术问题的好战友，而且为我创造了团结奋进、和谐愉快的工作环境。

感谢我的家人，感谢他们三年来对我的支持，如果不是他们在精神和物质上的支持，不会有今天的收获和喜悦，感谢我的女友曹守香对我工作的支持和宽容。

值此论文完成之际，谨向所有帮助、支持过我的老师与同学致以最诚挚的谢意！

朱庆银

2007-4-2