

枸杞糖缀合物及糖链的化学结构与免疫活性

齐春会^{1*}, 黄琳娟², 张永祥¹, 赵修南¹, 田庚元², 茹祥斌¹, 沈倍奋³

(1. 军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850; 2. 中国科学院上海有机化学研究所, 上海 200032; 3. 军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘要: 为研究枸杞多糖的化学结构, 免疫活性并探讨其构效关系, 应用色谱法, 凝胶过滤法和十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)技术从枸杞粗多糖(LBP)中分离纯化了5个组分(LBP1-LBP5), 并进一步从LBP1, LBP3, LBP4中纯化得到组分均一的糖缀合物LbGp1, LbGp3和LbGp4及其糖链LbGp1-OL, LbGp3-OL和LbGp4-OL, 用甲基化, 部分酸水解和核磁共振(NMR)技术基本阐明了其化学性质, 糖组成, 氨基酸组成及主要结构特征, 并用小鼠脾细胞增殖反应研究免疫活性表明, 6个样品均具有直接增强小鼠脾细胞增殖反应的作用。结果提示, 枸杞子中具有免疫活性的有效成分是一类结构复杂的糖缀合物, 其糖链部分可能是其发挥免疫活性的主要活性结构。

关键词: 多糖; 枸杞; 糖缀合物; 糖链; 化学; 药物; 免疫活性

中图分类号: R967

文献标识码: A

文章编号: 1000-300X(2001)03-0185-06

作者已有研究表明, 枸杞粗多糖(*Lycium barbarum* polysaccharides, LBP)对正常及快速老化模型小鼠免疫功能均具有明显的促进作用, 是枸杞子中的免疫活性成分^[1]。为确证多糖成分确实是LBP中影响免疫功能的主要活性成分, 并阐明枸杞多糖的化学结构及构效关系, 作者对LBP进行了进一步的分

离纯化。本文主要研究枸杞糖缀合物的分离纯化, 化学结构及其免疫活性。

1 材料和方法

1.1 动物

LACA小鼠, ♀, 6~8周(20 ± 2)($\bar{x} \pm s$), 购自北京医科大学实验动物中心(动物合格证: 医动字第01-3051号)。

1.2 药物和试剂

LBP从宁夏枸杞子(*Lycium barbarum* L.)中提取, 见文献[2]。标准分子量蛋白和DEAE纤维素为Sigma产品。标准分子量葡聚糖为Fluka产品。Sephadex 4B, CM-Sephadex C-50, Sephadex G-100, Sephadex G-50均为Pharmacia产品。RPMI-1640培养液, Gibco产品, 配制时加入青霉素 $100 \text{ kU} \cdot \text{L}^{-1}$, 链霉素 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, HEPES $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和谷氨酰胺 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 使用时加入10%~15%的胎牛血清; 刀豆蛋白A(Concanavalin A, Con A)为Sigma产品; 氚标记的胸腺嘧啶脱氧核苷($[^3\text{H}]\text{TdR}$): 中国科学院北京原子能研究所, 比活性 $0.74 \text{ PBq} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。其余试剂为国产分析纯。

1.3 仪器

比色用分光光度计, 上海分析仪器三厂; VISTA 402型气相色谱仪, Varian公司; 5989A-INS型质谱-质谱联用仪, 惠普公司; MX-300型核磁共振仪, Bruker公司; 二氧化碳孵箱, 本池理化株式会社; 液体闪烁计数仪, LKB公司。

1.4 方法

1.4.1 糖缀合物的分离纯化

将从宁夏枸杞中提取得到的LBP进行DEAE-纤维素柱色谱(HCO_3^- 型), 依次用 H_2O , 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaHCO_3 洗脱, 隔管检测 $A_{280 \text{ nm}}$ 和 $A_{490 \text{ nm}}$ (硫酸-苯酚法), 分离得到LBP1~LBP5 5个组分。除LBP2, LBP5还未系统研究外,

收稿日期 2000-05-30 接受日期 2000-11-22

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(39600188); 国家自然科学基金重点项目(39730480)

作者简介: 齐春会(1967-), 女, 河北省南宫人, 助理研究员, 主要研究方向中药免疫药理学。张永祥(1957-), 男, 山东青岛人, 博士生导师, 研究员, 主要研究方向中药药理学。

* 联系作者。Tel (010) 66931627, Fax (010) 68211656, E-mail: qich@nic.bmi.ac.cn

LbP1 透析脱盐后,经 Sephadex G-100 纯化得 LbGp1. LbP3 分别经 Sephadex G-100(0.1 mol·L⁻¹ NaCl 洗脱)和 CM-Sephadex C-50(0.2 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液洗脱)柱色谱得 LbGp3,得率为 32.5%. LbP4 经两次 Sephadex G-100(0.1 mol·L⁻¹ NaCl 洗脱)柱色谱得 LbGp4,得率为 40.2%.

1.4.2 糖链的释放与分离

采用碱性水解法,将 LbGp1 和 LbGp4 在 0.1 mol·L⁻¹ NaOH-1.0 mol·L⁻¹ NaBH₄ 中 45℃ 恒温孵育 72 h 后,或将 LbGp3 溶解在 2 mL 反应缓冲液中(0.1 mol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 8.0, 1.0 mmol·L⁻¹ CaCl₂),加入 0.5 mg 蛋白酶 E (proteinase E)于 37℃ 温育 72 h,每 24 h 加入 0.5 mg 蛋白酶 E 一次.然后经 Sephadex G-100 柱层析,用 0.1 mol·L⁻¹ NaCl 以 0.5 mL·min⁻¹ 的流速洗脱,收集含糖组分经 Sephadex G-25 柱层析脱盐后冷冻干燥,得相应的糖链 LbGp-OL.

1.4.3 纯度鉴定

LbGp1 采用 HPLC 法和 SDS-PAGE 电泳法^[3], LbGp3 和 LbGp4 采用 HPLC 和毛细管电泳法^[2]进行纯度鉴定.

1.4.4 糖组成分析

糖样品在 1.0 mol·L⁻¹ H₂SO₄ 溶液中 100℃ 水解 4 h,用 BaCO₃ 中和,离心后按文献^[4]制备成单糖的全乙酰化糖醇衍生物进行气相色谱分析,分析柱为 3% OV-225(0.3 mm×25 mm)毛细管柱.

1.4.5 分子量测定

LbGp1 采用 SDS-PAGE 法测定^[3], LbGp3 和 LbGp4 采用凝胶过滤法测定^[5].

1.4.6 氨基酸组成分析

LbGp1, LbGp3 和 LbGp4 各 1 mg 分别溶于 0.5 mL 6.0 mol·L⁻¹ 的 HCl 溶液,封管后 110℃ 水解 24 h,切开封管,抽干后,进行氨基酸分析.

1.4.7 糖肽键特征分析

参考文献^[6]进行.

1.4.8 糖含量测定^[7]

用硫酸-苯酚法显色,分别以摩尔比相同的混合单糖作标准,在 486 nm 处测定.根据它们的标准曲线回归方程求出样品中总糖的含量.

1.4.9 甲基化分析,部分酸水解及¹H,¹³C NMR 谱图分析

参考文献^[8,9]进行.

1.4.10 小鼠脾细胞增殖反应

[³H]TdR 参入法^[10]. 无菌取脾制成单个细胞悬

液,低渗破坏红细胞,用 RPMI-1640 培养液洗 2 次,稀释成每升 5×10⁹ 细胞,台盼蓝染色证明细胞存活率>90%. 实验孔分别加入不同浓度的药物或(和) Con A,对照孔以培养液代替.结果以每样本 3 复孔平均 cpm 值表示.

2 结果

2.1 糖缀合物的理化性质及糖肽键特征

LbGp1, LbGp3, LbGp4 为白色絮状固体,易溶于水,水溶液呈中性. LbGp1 经 SDS-PAGE 电泳后,分别用考马斯亮蓝 R-250 和 Schiff 试剂染色,均显示一条色带, HPLC 也显示单一对称峰. LbGp3 和 LbGp4 经毛细管电泳和 HPLC 分析均得到单一对称峰,表明其为均一性.经非还原的 β-消除,薄层色谱结果显示其糖链与肽链均是以 O-糖苷键连接的.

对上述 3 个糖缀合物的分子量,氮含量,糖含量及其糖组成,氨基酸组成的分析结果表明: LbGp1, LbGp3, LbGp4 的分子量分别为 9×10⁴, 9×10⁴ 和 21×10⁴, 氮含量分别为 4.6%, 0.8% 和 1.7%, 糖含量分别为 70%, 94% 和 86%. LbGp1 的糖成分由阿拉伯糖,半乳糖和葡萄糖以 2.5:1.0:1.0 的比例组成, LbGp3 的糖成分由阿拉伯糖和半乳糖以 1:1 的比例组成, LbGp4 的糖成分由阿拉伯糖,半乳糖,鼠李糖和木糖以 1.5:2.5:0.43:0.23 的比例组成. 3 个糖缀合物均含有 17 种不同含量的氨基酸(表 1).

2.2 糖链 LbGp1-OL, LbGp3-OL, LbGp4-OL 的主要结构特征

采用碱性水解或通过蛋白酶 E 使糖缀合物中的糖链释放,经 Sephadex G-100 柱层析分离到糖链 LbGp1-OL, LbGp3-OL 和 LbGp4-OL,经 HPLC 和毛细管电泳分析得到单一对称性峰,表明 3 个糖链也具有均一性. LbGp1-OL 分子量为 4.0×10⁴,由等量的阿拉伯糖和半乳糖组成, LbGp1 中的葡萄糖则未检测到. LbGp3-OL 亦由等量的阿拉伯糖和半乳糖组成,元素分析结果为 C:43.3%, H:6.42%, N 未发现. LbGp4-OL 分子量为 18.1×10⁴,糖组成为鼠李糖,阿拉伯糖和半乳糖(比例为 0.05:1.33:1.0),元素分析结果为 C 39.06%, H 5.73%, 不含 N.

用甲基化,部分酸水解及 NMR 技术确定了糖链的主要结构特征(图 1~3).糖链 LbGp1-OL 的主链由 β(1→6)半乳糖组成, LbGp3-OL, LbGp4-OL 的主链由 β(1→4)半乳糖组成.分支糖包括少量 β(1→3)半乳

糖和大量的阿拉伯糖,末端糖均为阿拉伯糖。

2.3 枸杞糖缀合物和糖链的免疫活性

2.3.1 LbGp1 和 LbGp1-OL 对小鼠脾细胞增殖反应的作用

LbGp1 单独使用,在 10 ~ 500 mg·L⁻¹剂量范围内使 [³H]TdR 参入值明显增加,并有明显的剂量效应关系;与 Con A(0.5 mg·L⁻¹)合用,无明显的协同促增殖作用(*P* > 0.05)。LbGp1-OL 的作用与 LbGp1 相似,两者活性强度相似(表 2)。表明 LbGp1 和 LbGp1-OL 均具有直接激活小鼠脾细胞增殖的作用。

Tab 2. Effect of LbGp1 ,LbGp1-OL on splenocyte proliferation in mice *in vitro*

Group	Dose /mg·L ⁻¹	[³ H]TdR incorporation × 10 ⁻³ /cpm	
		Without Con A	With Con A
Control	0	3.0 ± 0.3	51.2 ± 6.0 ^{**}
LbGp1	1	3.0 ± 0.3	50.9 ± 3.8
	10	4.5 ± 0.6 [*]	48.0 ± 6.1
	50	8.7 ± 1.0 ^{**}	42.4 ± 5.4
	100	11.6 ± 1.2 ^{**}	46.0 ± 9.6
	500	14.3 ± 1.1 ^{**}	42.1 ± 2.9
LbGp1-OL	1	4.7 ± 0.3 [*]	47.4 ± 5.0
	10	3.4 ± 0.2	45.7 ± 1.8
	50	9.9 ± 0.3 ^{**}	46.1 ± 2.9
	100	11.7 ± 0.8 ^{**}	48.6 ± 6.4
	500	16.1 ± 1.0 ^{**}	—

Proliferation of splenocytes from LACA mice in response to LbGp1 or LbGp1-OL in the presence or absence of Con A(0.5 mg·L⁻¹) was measured using [³H]TdR incorporation assay. RPMI-1640 medium was used instead of LbGp1 or LbGp1-OL in control group. $\bar{x} \pm s$, *n* = 3. ^{*} *P* < 0.05, ^{**} *P* < 0.01, compared with the control group without Con A by *t* test.

2.3.2 LbGp3 和 LbGp3-OL 对小鼠脾细胞增殖反应的作用

LbGp3 单独使用,在 500 mg·L⁻¹时可直接激活小鼠脾细胞增殖反应。与 Con A 合用,在 100, 500 mg·L⁻¹具有协同促增殖作用。LbGp3-OL 在 50 ~ 500 mg·L⁻¹时,单独应用及与 Con A 合用均明显促进脾细胞增殖反应。相同剂量条件下,LbGp3-OL 体外直接促脾细胞增殖活性明显高于 LbGp3(表 3)。

2.3.3 LbGp4 和 LbGp4-OL 对小鼠脾细胞增殖反应的作用

LbGp4在100,500 mg·L⁻¹时,单独使用及与

Tab 3. Effect of LbGp3 ,LbGp3-OL on splenocyte proliferation in mice *in vitro*

Group	Dose /mg·L ⁻¹	[³ H]TdR incorporation × 10 ⁻³ /cpm	
		Without Con A	With Con A
Control	0	1.5 ± 0.1	6.2 ± 0.9 ^{**}
LbGp3	1	2.0 ± 0.7	6.4 ± 0.6
	10	1.7 ± 0.2	4.7 ± 3.2
	50	1.2 ± 0.0	7.0 ± 2.7
	100	1.2 ± 0.3	8.4 ± 1.5 [#]
	500	4.8 ± 0.1 ^{**}	56.6 ± 21.4 [#]
	500	4.8 ± 0.1 ^{**}	56.6 ± 21.4 [#]
LbGp3-OL	1	2.3 ± 0.1	5.6 ± 1.0
	10	2.1 ± 0.4	6.6 ± 0.9
	50	3.8 ± 0.7 [*]	13.7 ± 0.3 [#]
	100	3.5 ± 1.0 [*]	18.1 ± 0.9 [#]
	500	17.2 ± 3.6 ^{**}	44.4 ± 7.1 [#]
	500	17.2 ± 3.6 ^{**}	44.4 ± 7.1 [#]

Measurement was the same as described in Tab 2. $\bar{x} \pm s$, *n* = 3. ^{*} *P* < 0.05, ^{**} *P* < 0.01, compared with the control group without Con A; [#] *P* < 0.05, ^{##} *P* < 0.01, compared with the control group with Con A(0.5 mg·L⁻¹) by *t* test.

Con A 合用对脾细胞增殖反应均具有明显的促进作用。LbGp4-OL 单独使用,在 10 ~ 500 mg·L⁻¹明显促进脾细胞增殖反应,活性高于 LbGp4,但与 Con A 无协同促增殖作用(*P* > 0.05,表 4)。

Tab 4. Effect of LbGp4 ,LbGp4-OL on splenocyte proliferation in mice *in vitro*

Group	Dose /mg·L ⁻¹	[³ H]TdR incorporation × 10 ⁻³ /cpm	
		Without Con A	With Con A
Control	0	13.6 ± 2.1	51 ± 6 ^{**}
LbGp4	1	14.9 ± 0.8	56 ± 5
	10	15.3 ± 2.3	56 ± 8
	100	28.4 ± 4.9 ^{**}	73 ± 2 [#]
	500	38.8 ± 2.3 ^{**}	66 ± 7 [#]
	500	38.8 ± 2.3 ^{**}	66 ± 7 [#]
LbGp4-OL	1	15.2 ± 3.7	48 ± 11
	10	20.6 ± 1.5 ^{**}	58 ± 9
	100	32.6 ± 6.6 ^{**}	65 ± 13
	500	52.4 ± 1.1 ^{**}	57 ± 9
	500	52.4 ± 1.1 ^{**}	57 ± 9

Measurement was the same as described in Tab 2. $\bar{x} \pm s$, *n* = 3. ^{**} *P* < 0.01, compared with the control group without Con A; [#] *P* < 0.05, ^{##} *P* < 0.01, compared with the control group with Con A(0.5 mg·L⁻¹) by *t* test.

3 讨论

枸杞子的化学成分非常复杂,除了含有多种维生素、甾醇、甜菜碱及脂肪酸外,还含有多种亲水性色素,这给从枸杞子中分离纯化水溶性多糖类化合物带来了许多困难。因此迄今为止,关于多糖分离纯化及结构鉴定仍是一个尚未解决的难题。本研究通过一系列分离纯化步骤,得到了三种组分均一的糖缀合物 LbGp1, LbGp3 和 LbGp4 及其相应的糖链 LbGp1-OL, LbGp3-OL 和 LbGp4-OL, 研究分析了物理化学性质、糖组成、氨基酸组成以及糖链的主要结构特征,并鉴定了它们的免疫活性。这在以往有关植物多糖的研究中尚未见报道。我们从糖缀合物成功地解离下了糖链是本研究中的一项创新性进展。从细胞结构或内源性活性物质如激素等来看,糖缀合物中的糖链部分具有十分重要的生理作用,它能够调节蛋白质的活性,并参与到细胞分子的识别作用之中。因此,这对深入研究枸杞多糖的生物活性及阐明多糖的构效关系具有重要的意义。

鉴于多糖的分离纯化和结构测定尚存在较大难度,目前国内多数关于中药来源多糖药理学研究所使用的样品为粗多糖或含有多糖的混合物,有的则为粗糖蛋白或糖肽^[11,12],因此难以准确阐明纯化多糖的生物学作用并进行结构与功能的分析。对于糖蛋白来讲,关于糖或蛋白(肽)对糖蛋白发挥免疫活性有何关系等问题的研究尚未见报道,然而这一问题是糖蛋白或糖缀合物结构与功能研究的重要组成部分。我们以往研究发现,LBP在体内具有明显的免疫增强作用^[1],本研究发现,从LBP分离纯化得到的糖缀合物 LbGp1, LbGp3, LbGp4 及其相应的糖链 LbGp1-OL, LbGp3-OL, LbGp4-OL 体外单独使用,在 $10 \sim 500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 剂量范围内均具有直接促进小鼠脾细胞增殖反应的作用,而且相同剂量条件下,糖链 LbGp3-OL 的活性甚至是糖缀合物 LbGp3 的 3 倍,表明多糖本身即具有免疫活性,而且糖缀合物中的糖链可能是其发挥免疫药理作用的重要活性基团。

另外,这 3 种糖缀合物及其相应的糖链又具有不同的免疫活性特点,如 LbGp1 与 LbGp1-OL 活性强度大致相似,与 Con A 无明显协同促增殖作用; LbGp3-OL 活性明显高于 LbGp3,与 Con A 合用有明

显的协同促增殖作用; LbGp4-OL 的活性也明显高于 LbGp4,与 Con A 具有明显的协同促增殖作用。由此提示,这 3 种糖缀合物和糖链与脾细胞的作用位点及其作用的靶细胞可能不同,值得进一步深入研究(进行中)。化学研究结果表明,糖链 LbGp1-OL 的主链由 $\beta(1 \rightarrow 6)$ 半乳糖组成, LbGp3-OL 和 LbGp4-OL 的主链由 $\beta(1 \rightarrow 4)$ 半乳糖组成,这种不同的结构特征是否与其作用位点及作用的靶细胞有关尚有待进一步研究。

4 参考文献:

- [1] 齐春会,张永祥,赵修南,黄琳娟,魏昌华,茹祥斌,等. 枸杞粗多糖的免疫活性[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2001, 15(3): 180-184.
- [2] 黄琳娟,林颖,田庚元,计国桢. 枸杞子中免疫活性成分的分离、纯化及物理化学性质的研究[J]. 药学报, 1998, 33(7): 512-516.
- [3] 何忠效,张树政. 电泳[M]. 北京: 科学出版社, 1990. 149-151.
- [4] 张维杰. 复合多糖生化研究技术[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1987. 158-162.
- [5] 田庚元,王晨,冯宇澄. 枸杞子糖蛋白的分离纯化、物化性质及糖肽键特征[J]. 生物化学与生物物理学报, 1995, 27(2): 201-205.
- [6] Chaplin MF, Kennedy JF. Carbohydrate Analysis[M]. Washington DC: IRL Press, 1986, 151-153.
- [7] 林颖,吴毓敏,吴雯. 天然产物中的糖含量测定方法正确性的研究[J]. 天然产物研究与开发, 1996, 8(1): 5-7.
- [8] Agrawal PK. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides[J]. Phytochemistry, 1992, 31(10): 3307-3330.
- [9] Bhandari SPS, Agrawal PK, Garg HS. A triterpenoid saponin from polycarpon loeflingiae[J]. Phytochemistry, 1990, 29(12): 3889-3892.
- [10] 丁雁,邢善田,周金黄. 淫羊藿多糖促进小鼠 T 和 B 细胞 ^3H TdR 参入和诱生干扰素作用的研究[J]. 中国免疫学杂志, 1985, 1(6): 42-46.
- [11] 周勇,马学清. 中药多糖研究概况[A]. 见: 周金黄,王建华,主编. 中药药理与临床研究进展(第三册)[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1995. 41-43.
- [12] 周世文,徐传福. 多糖的免疫药理作用[J]. 中国生化药物杂志, 1994, 15: 143-147.

Chemical structure and immunoactivity of the glycoconjugates and their glycan chains from the fruit of *Lycium barbarum* L.

QI Chun-Hui¹, HUANG Lin-Juan², ZHANG Yong-Xiang¹, ZHAO Xiu-Nan¹,
TIAN Geng-Yuan², RU Xiang-Bin¹, SHEN Bei-Fen³

- (1. Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China ;
2. Shanghai Institute of Organic Chemistry, Academia Sinica, Shanghai 200032, China ; 3. Institute
of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract : In order to explore the chemical structure, immunoactivity and the structure-activity relationship of *Lycium barbarum* polysaccharides, 5 polysaccharide components (LBP1 – LBP5) were separated and purified from the crude *Lycium barbarum* polysaccharides (LBP) with the methods of chromatography, gel filtration and SDS-PAGE electrophoresis, and from LBP1, LBP3, LBP4 the glycoconjugates LbGp1, LbGp3, LbGp4 and their glycan chains LbGp1-OL, LbGp3-OL, LbGp4-OL were also obtained, the chemical characteristics, carbohydrate components, amino acid components and major structure of which were elucidated with methylation, fractional acid hydrolization and NMR techniques. The six samples have direct elevation effect on splenocyte proliferation in mice

and the effects of glycan chains were stronger than that of respective conjugates. These results suggest that the immunoactive components of the fruit of *Lycium barbarum* L. be a kind of carbohydrate conjugates with complex structure. The glycan chains may be the important active structure of carbohydrate conjugates.

Key words : polysaccharides, *Lycium barbarum* L. ; glycoconjugates ; glycan chain ; chemistry, pharmaceutical ; immunocompetence

Foundation item : The project supported by General Program of National Natural Science Foundation of China (39600188) ; Key Program of National Natural Science Foundation of China (39730480)

(本文编辑 周宇红)