

玉米须生物活性成分的初步研究

——玉米须多糖及其免疫增强作用

汤鲁宏 丁霄霖 尤丽芬 顾巍慧 俞富荣

(无锡轻工大学)

(南京医科大学)

摘要 经过系统的筛选首次从玉米须中分离提取了具有免疫增强作用的生物活性成分。运用离子交换、分级沉淀、Sephrose 柱层析等手段对此成分进行了进一步的分离和纯化。初步的结构研究结果表明,此成分属多糖类化合物。

主题词 玉米须;多糖(PS);干扰素(IFN)

中图分类号 R932.12

玉米须(Corn Silk)是指在玉米成熟收获季节采集的,已经变褐并干枯了的禾本科农作物玉米(Corn, Zea Mays)的雌花花柱(stigma, style)。在玉米的生长过程中,作为传粉受精的通道,玉米须具有相当重要的植物生理生化功能^[1]。玉米须是一种传统的中草药材,《中药大辞典》、《全国中草药汇编》、《中药药理与应用》等当代中医药典籍中均有有关玉米须的药用记载^[2~4]。但有关的免疫、药理及化学等基础研究方面却十分贫乏。我们采用化学研究与免疫学研究、药理研究相结合的方法对玉米须的免疫增强、降压等作用进行了研究。本文报道的是玉米须多糖及其免疫增强作用。

1 实验材料与方法

1.1 玉米须水提取液免疫增强活性成分筛选与分离、纯化的实验材料与方法

1.1.1 初级筛选 以已经过超滤浓缩的玉米须水提取液为实验材料。其固形物含量为3.65%,高分子物质含量为2.51%,正丁醇可抽提物含量为0.88%。化学试剂均为分析纯。筛选方案见图1。

1.1.2 次级筛选——离子交换分离 以CSPS1为实验材料。阴离子交换树脂(717型)和阳离子交换树脂(732型)均为徐州试剂厂分装。离子交换柱为 $\varnothing 40 \times 600$ mm,缓冲体系为0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH=6.85),洗脱液为0.5 mol/L HCl, 0.5 mol/L NaOH。化学试剂均为分析纯。筛选方案见图2。蛋白质的测定:紫外分光光度法^[5]。糖类的测定:苯酚—硫

收稿日期:1995-05-20

酸法^[6]。

1.1.3 进一步的分离和纯化 以 CSPS1a 为实验材料。化学试剂均为分析纯。

实验方法：

1) 将 CSPS1a 溶于水,配成浓度为 5% 的溶液,然后向溶液中加入二倍体积的 95% 乙醇,静置 30min,待沉淀完全后在 3000r/min 下离心 10min,所得沉淀物用 65% 乙醇洗涤,得组分 CSPS1a-1。洗涤液并入上清液;

2) 向上清液中再加入 95% 乙醇至原溶液体积的三倍,静置 30min,待沉淀完全后在 3000r/min 下离心 10min,所得沉淀物用 95% 乙醇、无水乙醇依次洗涤,得另一组分 CSPS1a-2。

3) 分别将 CSPS1a-1 和 CSPS1a-2 溶于洗脱液,配成浓度为 5% 的溶液,然后在 Sephrose 凝胶柱上层析,用分部收集器收集流出液,并逐管对糖进行检测;

4) 将相对集中的部位合并,室温下对流动自来水透析 48h,对去离子水透析 24h,然后冷冻干燥,得 CSPS1a-1A、CSPS1a-1B、CSPS1a-2A、CSPS1a-2B 四种组分。

糖类的测定:苯酚-硫酸法^[6]

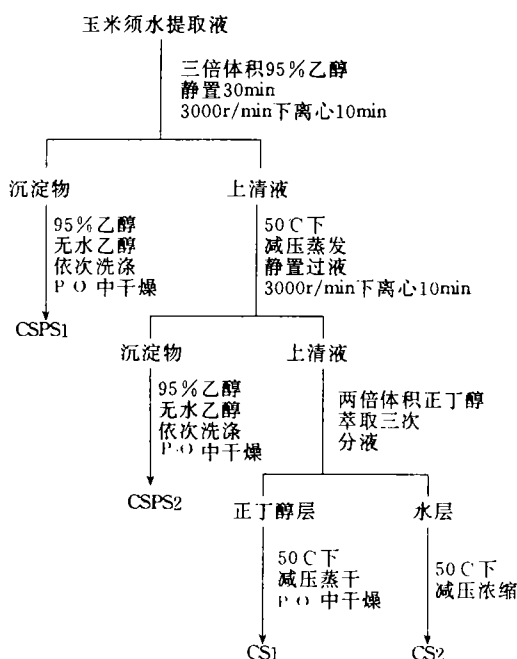


图1 玉米须水提取液的初级筛选分离流程示意图

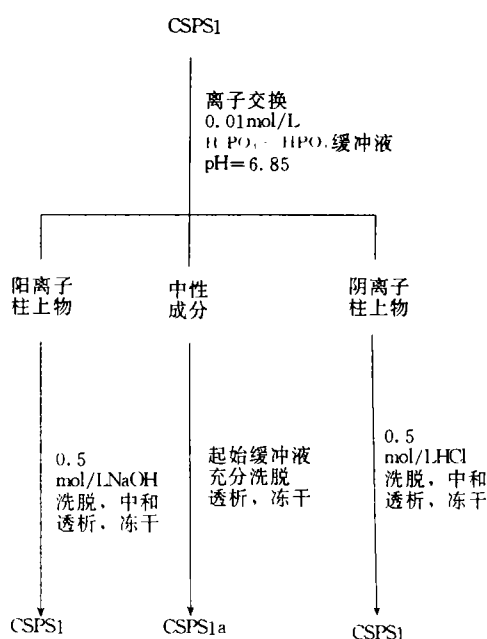


图2 CSPS1的离子交换分离流程示意图

1.2 玉米须水提取液免疫增强活性成分免疫增强活性测定的实验材料与方法

1.2.1 干扰素(IFN α)的诱生和促诱生试验^[7,8] 分离人外周血淋巴细胞(PBL) 1×10^7 /ml + CSPS $\pm$ 新城鸡瘟病毒(NDV),置 37℃ 新鼓印子箱培养 20~22h,离心取上清液;调节 pH 值 = 2.0~3.0,4℃ 冰箱中放置 3~5d,调节 pH 值至中性,置 -20℃ 冰箱中保存,待测 IFN 滴度。同时设常规 NDV 诱生 IFN α 对照组。

1.2.2 γ 干扰素(IFN γ)的诱生和促诱生试验 分离人外周血淋巴细胞(PBL) 1×10^7 /ml + CSPS $\pm$ 植物血凝素(PHA)100 μ g,置 37℃ 新鼓印子箱培养 72h,离心取上清液,置 -20℃ 冰箱中保存,待测 IFN 滴度。同时设常规 PHA 诱生 IFN γ 对照组。

1.2.3 干扰素效价的测定 用 wish 细胞种板,卡成单层后,用待测 IFN 样品倍量稀释,次日用 VSV(100TCID₅₀)攻毒;用细胞病变抑制法判定 IFN 效价或滴度。以抑制 50%细胞病变的最高稀释度的倒数作为实验室干扰素效价。

1.2.4 巨噬细胞吞噬功能的测定 用微量比色法^[9]测定样品对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬指数的影响。用 DG3022 型酶联免疫检测仪于 410nm 波长处测定 A 值。

计算公式:

$$\text{总活性指数或吞噬指数} = (1 - A_E/A_{EA}) \times 100$$

总活性指数是指表面结合的和吞入内部的 SRDC 的 H_0 值;吞噬指数仅指吞入内部的 SRDC 的 H_0 值。

1.3 玉米须水提取液免疫增强活性成分结构研究的实验材料与方法

1.3.1 实验材料 四种 CSPA1a 组分 CSPA1a-1A、CSPA1a-1B、CSPA1a-2A 和 CSPA1a-2B。

1.3.2 四种 CSPA1a 组分的聚丙烯酰胺凝胶电泳 北京六一仪器厂生产 DYY-Ⅲ 4 型稳压稳流电泳仪,电泳平板为 200×200×1.5mm,具体实验方法参照文献[10]中有关方法进行。

1.3.3 四种 CSPA1a 组分单糖组成的测定 分别称取 10mgPS1a-1A,PS1a-1B,PS1a-2A 和 PS1a-2B,加入 1ml70% H₂SO₄,室温下放置 30min 后,加入 6ml 去离子水,置 100℃水浴中保温水解 16h。取出水解液,待冷却至室温后用 BaCO₃ 中和,过滤,滤液置 50℃下减压蒸干。用 0.5ml 吡啶洗涤溶解水解后所生成的单糖,制备糖腈乙酸酯衍生物,用 GC 法进行测定。糖腈乙酸酯衍生物的制备参照文献[11]中有关方法进行。

1.3.4 四种 CSPA1a 组分分子量的测定 采用光散射方法进行。装置:He-Ne 激光散射仪;5mWHe-Ne 光源,波长 633nm,孔径 400,温度 25℃,粘度 0.8923,折光率 1.330,角度 90°。

2 实验结果

2.1 玉米须水提取液初级筛选产物(CSPA1,CSPA2)对干扰素(IFN)的诱生和促诱生作用

初级筛选方案示于图 1,实验结果列于表 1。

实验结果表明,玉米须水提取液中的确存在有免疫增强作用的生物活性成分。经筛选得到的 CSPA1 和 CSPA2 均可低滴度的诱生干扰素,并且 CSPA1 优于 CSPA2;经酸化(pH=2)处理干扰素的滴度无明显下降,提示干扰素的性质属 α 干扰素;在常规用新城鸡瘟病毒(NDV)或用植物血凝素(PHA)诱生 γ 干扰素(IFN_γ)时,分别加入 CSPA1 和 CSPA2,观察对 α 干扰素或 γ 干扰素的促诱生效应,结

表 1 不同浓度下的 CSPA1,CSPA2 对干扰素的诱生和促诱生作用

		诱生干扰素的滴度			
		pH=7	pH=2	+NDV	+PHA
CSPA1(μg/ml)	0	/	/	5120	64
	20	32	32	3840	64
	100	128	128	10240	128
	500	128	128	10240	128
	1000	48	/	7680	/
CSPA2(μg/ml)	0	/	/	5120	64
	20	12	12	640	12
	100	16	16	640	24
	500	20	16	5120	40
	1000	36	16	5120	/

果显示 CSPS1 有轻度的促诱生 α 干扰素和 γ 干扰素作用;诱生最佳浓度范围为 100~500 $\mu\text{g/ml}$. 而 CSPS2 对干扰素的促诱生作用不明显。

2.2 玉米须水提取液次级筛选产物对小鼠腹腔巨噬细胞(MPM)吞噬指数的影响

次级筛选方案示于图 2. 实验结果列于表 2.

表 2 不同浓度下的次级筛选产物对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬指数的影响

		总活性指数	吞噬指数
EA 对照		76.40 $\pm$ 11.17	46.96 $\pm$ 17.06
	500	60.03 $\pm$ 30.32	19.18 $\pm$ 22.62
CSPS1a($\mu\text{g/ml}$)	100	74.09 $\pm$ 12.09	27.59 $\pm$ 26.45
	20	78.33 $\pm$ 9.88	39.91 $\pm$ 18.67
	10	85.26 $\pm$ 6.04	53.82 $\pm$ 17.89
	1	86.15 $\pm$ 5.08**	60.46 $\pm$ 13.36**
CSPS1+($\mu\text{g/ml}$)	500	69.60 $\pm$ 27.25	41.14 $\pm$ 35.49
	100	67.52 $\pm$ 24.84	40.12 $\pm$ 35.13
	20	72.85 $\pm$ 18.92	50.58 $\pm$ 31.60
	10	74.59 $\pm$ 11.30	50.74 $\pm$ 28.84
	1	75.43 $\pm$ 11.27	47.76 $\pm$ 31.42
CSPS1-($\mu\text{g/ml}$)	500	63.76 $\pm$ 31.88	45.19 $\pm$ 36.50
	100	70.87 $\pm$ 19.44	45.20 $\pm$ 30.65
	20	70.43 $\pm$ 25.85	51.32 $\pm$ 21.86
	10	75.05 $\pm$ 14.92	54.86 $\pm$ 19.12
	1	70.25 $\pm$ 23.55	54.31 $\pm$ 21.75
CSPS1($\mu\text{g/ml}$)	500	51.98 $\pm$ 38.03	22.94 $\pm$ 30.76
	100	71.45 $\pm$ 16.56	15.51 $\pm$ 27.24
	20	78.46 $\pm$ 8.55	25.75 $\pm$ 22.89
	10	75.02 $\pm$ 13.94	35.58 $\pm$ 17.89
	1	80.69 $\pm$ 6.48	47.02 $\pm$ 8.78
CSPS2($\mu\text{g/ml}$)	500	79.22 $\pm$ 6.18	27.85 $\pm$ 30.19
	100	79.02 $\pm$ 7.82	33.34 $\pm$ 30.97
	20	81.66 $\pm$ 7.98	49.16 $\pm$ 27.09
	10	86.03 $\pm$ 8.68***	59.79 $\pm$ 16.27
	1	71.99 $\pm$ 28.94	59.68 $\pm$ 17.00

$n=7$ ** $P<0.05$ *** $P<0.01$

实验结果表明,CSPS1 经离子交换层析分离后,所含免疫增强活性成分被有效的浓缩于 CSPS1a 中。在低浓度下(1 $\mu\text{g/ml}$)CSPS1a 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬致敏羊红细胞的总活性指数和吞噬指数均明显增加($P<0.05$);而 CSPS1 本身各个浓度对吞噬指数的影响却并无显著性意义;自离子交换柱上洗脱的 CSPS1+和 CSPS1-两个组分,对吞噬指数亦无明显促进作用。CSPS2(10 $\mu\text{g/ml}$)对吞噬总活性指数也有明显增加($P<0.01$)。

2.3 CSPS1a 的进一步分离和纯化

经过上述两轮实验筛选,具有免疫增强活性的成分被富集于 CSPS1a 中,并且该成分在中性条件下基本保持电中性。为了对其化学组成与性质等做进一步的研究,运用有机溶剂分级沉淀、Sephrose 凝胶柱层析等方法对 CSPS1a 进行进一步的精制和纯化。有关的凝胶色谱曲线绘于图 3,4。观察凝胶色谱曲线可知,CSPS1a-1A,CSPS1a-1B,CSPS1a-2A,CSPS1a-

2B 四种组分在 Sephrose 凝胶柱上的分布曲线基本呈一单一、对称的峰,表明 CSPA1a-1A, CSPA1a-1B, CSPA1a-2A, CSPA1a-2B 四种组分已经达到了一定的纯度。

2.4 四种 CSPA1a 组分的聚丙烯酰胺凝胶电泳

为了确定四种 CSPA1a 组分的物质类型——糖蛋白还是多糖,进行了聚丙烯酰胺凝胶电泳实验。结果表明均属多糖类物质,只能被高碘酸-席夫氏试剂染色,而不能被考马斯亮蓝染色。

2.5 四种 CSPA1a 组分单糖组成的测定

采用酸水解、糖腈乙酸酯衍生化,然后用 GC 测定的方法测定了单糖组成,实验结果列于表 3。

2.6 四种 CSPA1a 组分分子量的测定

采用光散射方法测定组分的平均分子量、粒子大小及扩散系数。结果列于表 4。

表 3 四种 CSPA1a 组分的单糖组成

组 分	各种单糖的相对比例					
	Glu.	Man.	Gla.	Xyl.	Ara.	Pha.
PS1a-1A	1	3	1			
PS1a-2A		1		4	5	
PS1a-1B	20	3	14	1	1	1
PS1a-2B	20	4	6	1	2	2

注:Glu. 表示葡萄糖;Man. 表示甘露糖;Gla. 表示半乳糖;
Xyl. 表示木糖;Ara. 表示阿拉伯糖;Pha. 表示鼠李糖。

表 4 四种 CSPA1a 组分的分子量分布、
粒子大小及扩散系数

组 分	平均分子量	粒子大小 (nm)	扩散系数
PS1a-1A	2.16×10^6	375	1.30×10^{-6}
PS1a-2A	1.37×10^6	265	1.84×10^{-6}
PS1a-1B	9.95×10^5	208	2.35×10^{-5}
PS1a-2B	1.25×10^4	7.5	6.55×10^{-5}

3 讨论和结论

研究中草药材中所含成分的方法一般有两种:一种是以化学成分的研究为主的方法。即以具有某种特定化学性质或结构的成分为研究目标,将之分离提取并加以纯化,然后进行若干生物活性指标的检测,以确定这类成分特定生物活性的有无,可称之为先分离后药检法。这种方法难度小,省时省力,但容易造成有效成分的丢失,成功率不高,常常会得不到可靠的结论,一般只用于已知化学结构的特定成分的调查;另一种是化学成分的研究与生物活性指标的检测相配合,以生物活性指标为指针的方法。即分离提取工作跟着药理检验工作走,逐步分离,逐步检验,检验一步,进一步分离一次,以渐渐逼近的方式获得有关的生物活性成分。本研究即按此方式获得有关生物活性成分的思路,尽可能只对原体系进行分离,而不作任何的破坏,建立了一套包括超滤、离子交换分离、凝胶色谱分离等技术在内的中草药材所含生物活性成分的系统分离方案,可以防止可能发生的遗漏,确保所得结论的正确性。初步的实验结果表明,玉米须水提取液中含有具有免疫增强活性的成分。这些活性成分具有诱导 α 干扰素(IFN α)、轻度促诱导 α 干扰素(IFN α)和 γ 干扰素(IFN γ)以及促进小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能等生物活性,可以作为保健食品或保健食品专用添加剂予以开发利用。如欲作为药品在临床治疗上加以应用,尚需进一步的免疫、药理等方面的实验与研究。

有关的结构研究结果表明,这些活性成分均属于杂多糖类物质,其中的 CSPA1a-1A 组分为一甘露、葡萄、半乳聚糖,它的组成可近似表示为 Man. : Glu. : Gla. = 3 : 1 : 1, Z 均

分子量为 2.16×10^6 ; 其中的 CSPS1a-2A 组分为一木糖、阿拉伯、甘露聚糖, 它的组成可近似表示为 $\text{Man.} : \text{Xyl.} : \text{Arab.} = 1 : 4 : 5$, 它的 Z 均分子量为 1.37×10^6 ; 其中的 CSPS1a-1B 组分为一葡萄糖、半乳、甘露聚糖, 同时也存在少量的木糖、阿拉伯及鼠李糖, 它的组成可近似表示为 $\text{Glu.} : \text{Gla.} : \text{Man.} : \text{Xyl.} : \text{Arab.} : \text{Phan.} = 20 : 14 : 3 : 1 : 1 : 1$, Z 均分子量为 9.95×10^5 ; 其中的 CSPS1a-B 组分也是一种葡萄糖、半乳、甘露聚糖, 也同时存在少量的木糖、阿拉伯及鼠李糖, 它的组成可近似表示为 $\text{Glu.} : \text{Gla.} : \text{Man.} : \text{Xyl.} : \text{Arab.} : \text{Phan.} = 20 : 6 : 4 : 1 : 2 : 2$, Z 均分子量为 1.25×10^4 .

参 考 文 献

- 1 李扬汉. 植物学(第二版,上册). 高等教育出版社,1958
- 2 江苏新医学院. 中药大辞典(上册). 人民卫生出版社,1980
- 3 王浴生. 中药药理与应用. 人民卫生出版社,1980
- 4 全国中草药汇编. 编写组. 全国中草药汇编(下册). 人民卫生出版社,1980
- 5 刘福岭,戴行钧. 食品物理与化学分析方法. 轻工业出版社,1987
- 6 张惟杰. 复合多糖生化研究技术. 上海科学技术出版社,1987
- 7 杨吉成等. 中国免疫学杂志. 1986,2(4):229
- 8 侯云德. 干扰素及其临床应用. 江苏科学技术出版社,1980
- 9 俞富荣等. 临床检验杂志. 1992,10(4):P177
- 10 Alan Johnstone etc. Immunochemistry in Practice. 童明庆,孙南雄译. 南京出版社,1990
- 11 张惟杰. 复合多糖生化研究技术. 上海科学技术出版社,1987

Bio-active Substances from Corn Silk

— Corn silk polysaccharide (CSPS) and its immunological enhancing function

Tang Luhong Ding Xiaolin You Lifan Gu Weier Yu Furong
(WuXi University of Light Industry) (NanJing Medical University)

Abstract For the first time, some bio-active substances with immunological enhancement function have been separated from corn silk. It has been further purified by ion-exchange, precipitation classify and Sepharose chromatography. The imital result indicates that such the substannnces belong to nonstarch polysaccharide.

Subject-words Stigma maydis; Polysaccharide(PS); Interferon(IFN)