文章编号:1673-1689(2008)02-0035-05

草本刺嫩芽根多糖 AKSP2 纯化、鉴定及体内抗氧化活性

刘延吉[1]， 田晓艳*[2]， 李 峰[1]， 孙 增[3]

(1. 沈阳农业大学 生物科学技术学院,辽宁 沈阳 110161;2. 辽宁石油化工大学 环境与生物工程学院,辽宁 抚顺 113001;3. 海城市天鹰果业有限责任公司,辽宁 海城 114023)

摘 要: 研究了草本刺嫩芽根可溶性多糖(AKSP)主要的组成及其抗衰老活性。采用 DEAE-纤维素柱对粗提多糖进行分离,Sephadex-G100 层析对 AKSP2 多糖进一步纯化,HPLC 层析确定 AKSP2 组成及组分比例,利用红外光谱鉴定多糖 AKSP2 糖苷键。建立了小鼠衰老模型,对饲喂 AKSP2 多糖小鼠进行抗衰老活性的生物化学指标测定。采用 DEAE-纤维素柱分离多糖,得到 5 种组分分别为 AKSP1、AKSP2、AKSP3、AKSP4、AKSP5。对 AKSP2 进行理化性质研究,HPLC 证实 AKSP2 水解物由木糖、果糖、甘露糖、葡萄糖组成,并且它们之间的摩尔比值为 1∶1.05∶0.89∶1.32。红外光谱确定多糖 AKSP2 为吡喃糖苷,其构型为 β-型糖苷,且糖基中含有乙酰基。草本刺嫩芽根多糖 AKSP2 提高了小鼠肝脏与血清中的 SOD、CAT 值,降低了 MDA 含量。说明 AKSP2 具有抗氧化活性,对衰老有一定的预防作用。

关键词: 草本刺嫩芽;可溶性多糖;鉴定;抗氧化活性;抗衰老

中图分类号:TS 241 **文献标识码**: A

Putification, Identification and Anti-Oxidation Activity of Polysaccharide AKSP2 of Roof of *Aralia continentalis* Kitag

LIU Yan-Ji[1], TIAN Xiao-Yan*[2], LI Feng[1], SU Zeng[3]

(1. College of Biotechnology, Shenyang Agriculture University, Shenyang 110161, China; 2. College of Environmental Technology and Biotechnology College, Liaoning University of Petroleum & Chemical Technology, Liaoning 113001, China; 3. Haicheng Tianying Fruit Industry Ltd, Haicheng 114203, China)

Abstract: The article studies soluble polysaccharide primary composition and antisenescence activity of Aralia continentalis Kitag. Method isolate crude polysaccharide with DEAE-cellulose column, purify AKSP2 with Sephadex-G100, identify hydrolyzate of AKSP2 and composition proportion with HPLC chromatography and identify glycosidic bond of AKSP2 with infrared spectrometer. Establish involution form of mouse, determine physiological indexes about antisenescence activity of mouse feeded by AKSP2 of Aralia continentalis Kitag. Result isolate

收稿日期:2007-03-22.

基金项目:国家 863 计划项目(2004AA247010).

作者简介: 刘延吉(1959-),男,辽宁大连人,农学博士,副教授,主要从事生物技术的研究.
Email:yanjiliu@yahoo.com.cn

*通讯作者:田晓艳(1971-),女,辽宁沈阳人,工学硕士,讲师,主要从事生物技术的研究.
Email:maggietian2002@163.com

万方数据

crude polysaccharide with DEAE-cellulose column and gain five compositions that is AKSP1, AKSP2, AKSP3, AKSP4, AKSP5. Isolate hydrolyzate of AKSP2 with HPLC chromatography to estimate compositions, that is xylose, fructose, mannose, glucose, and molar ratio is 1 : 1.05 : 0.89 : 1.32. AKSP2 is furanose and its configuration is ? -glycoside through determined with infrared spectrometer, and contains acetyl. AKSP2 of Aralia continentalis Kitag increases content of SOD and CAT while decreases content of MDA of liver and blood serum of mouse. Conclusion soluble polysaccharide of Aralia continentalis Kitag is composed of AKSP1、AKSP2、AKSP3、AKSP4、AKSP5. AKSP2 is composed of xylose, fructose, mannose, glucose, and its configuration is furanose β-glycoside. AKSP2 possesses anti-oxidation activity and antisenescence activity.

Key words: *Aralia continentalis* Kitag; soluble polysaccharide; identification; anti-oxidation activity; antisenescence

草本刺嫩芽(*Aralias continentalis* Kitag)又名长白楤木,药名为东北土当归 俗称树头菜、五郎头等。为五加科木属植物,与药王人参同一个科,与传统名菜刺老芽(木本)同科同属,有刺灌木或小乔木之称,高1.5～6 m。长白楤木主要分布于中国东北、朝鲜、俄罗斯、日本等地,生于海拔1000 m以下,有"山菜之王"美誉。草本刺嫩芽是名贵的山野菜,不仅具有很高的营养价值,而且其医疗保健作用也很明显,具有增强机体免疫功能、抗肿瘤、降血糖、抗衰老[1-4]、抗病毒、刺激造血等多种生物学功效,而且对机体几乎没有毒性,久食能减轻糖尿病患者饱食后的重渴现象。

目前对多糖生物学功效的研究愈来愈引起国内外药理学家、生物学家和化学家们的兴趣,它已成为当代生物学的热门领域。20世纪50年代初,从长白楤木根皮中分得皂甙类成分,通过药理实验证明是其有效成分。20世纪60～70年代又分离出楤木皂甙A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K等11种皂甙,其他化学成分还有挥发油、生物碱、醛类物质、氨基酸、无机元素、皂甙脂肪类化合物等,但目前尚无对其根中多糖进行研究的报道。作者对草本刺嫩芽根部分可溶性多糖进行纯化、鉴定及活性研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

草本刺嫩芽根由沈阳农业大学山野菜课题组提供。精制多糖AKSP2由作者所在实验室自行制备。实验用小鼠体重18～22 g,购自中国医科大学实验动物场。

1.2 实验方法

1.2.1 粗多糖的分级纯化 将粗提得到的多糖过OH^-型DEAE-纤维素柱,去离子水洗脱、用硫酸-苯酚法检测流出物,得AKPS1,再分别用0.1,0.2,0.3,0.5 mol/L NaCl进行梯度洗脱,得到AKSP2、AKSP3、AKSP4、AKSP5。

1.2.2 小鼠衰老模型的建立 将体重在18～22 g的昆明种小鼠随机分为对照组(C)、模型组(M)和低剂量给药组(L)、高剂量给药组(H)。模型组和给药组皮下注射D-半乳糖为120 mg/(kg·d)。对照组每日皮下注射等量生理盐水;低剂量给药组、高剂量给药组灌胃草本刺嫩芽根多糖分别为100、200 mg/(kg·d),对照组和模型组每日灌胃等量生理盐水,连续30 d。各组分别在第5、10、15、20、35天准确称重实验动物,30 d后眼眶取血,取肝脏。4 000 r/min离心,于－20 ℃保存备用。

1.2.3 草本刺嫩芽根多糖AKSP2抗衰老活性的生物化学指标测定 超氧化物岐化酶(SOD)含量的测定;过氧化氢酶(CAT)含量的测定;丙二醛(MDA)含量的测定。

2 结果与分析

2.1 草本刺嫩芽根可溶性多糖DEAE-纤维素柱的分级纯化

用梯度NaCl对精制多糖进行洗脱,由图1可以看出,用0.1 mol/LNaCl洗脱得到的多糖峰值最高,峰面积最大,即AKSP2,其次是AKPS1,AKSP5,AKSP3,AKSP4。因此,对AKSP2做进一步的研究。

万方数据

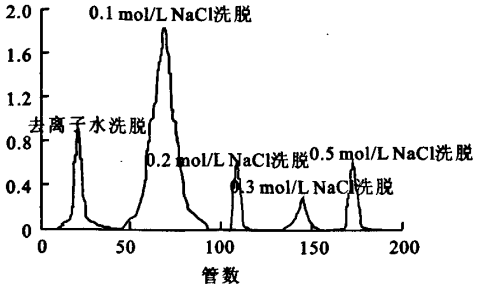

图 1　AKSP 的 DEAE-纤维素柱层析图谱

Fig. 1　Chromatograms of AKSP on DEAE- Cellulose columns

2.2　AKSP2 SephadexG100 检验多糖纯度

AKSP2 在 SephedaxG-100 柱层析的洗脱峰为单一对称峰，说明 AKSP2 是纯长白桤木根多糖，并由 HPLC 层析结果验证，见图 2。

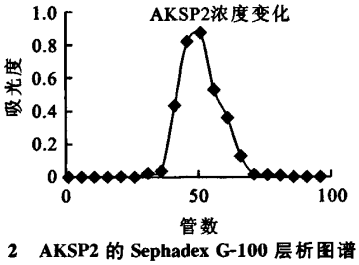

图 2　AKSP2 的 Sephadex G-100 层析图谱

Fig. 2　Chromatograms of AKSP2 on Sephadex G-100

2.3　AKSP2 高效液相色谱(HPLC)层析结果

AKSP2 的 HPLC 层析结果见表 1,2。

表 1　标准单糖保留时间

Tab. 1　Retain time of Standard monose

峰号	峰 名	保留时间
1	鼠李糖	5.882
2	核糖	6.048
3	木糖	6.868
4	果糖	7.982
5	甘露糖	8.498
6	葡萄糖	9.315
7	半乳糖	9.698

表 2　AKSP2 水解产物保留时间及含量

Tab. 2　Retains time and content of AKSP2 hydrolysate

峰号	峰名	保留时间	峰高	峰面积	含量
1	木糖	6.815	66146.602	1369435.250	26.875
2	果糖	7.948	71705.203	1212320.000	23.792
3	甘露糖	8.482	40617.602	1011744.000	19.856
4	葡萄糖	9.248	50818.801	1502006.375	29.477

图 3 为标准单糖高效液相图谱。

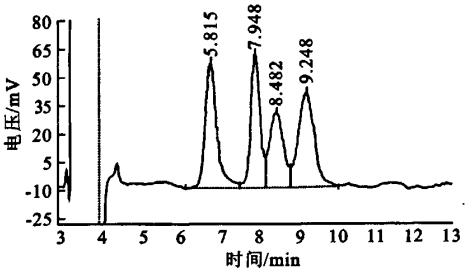

图 3　标准单糖高效液相图谱

Fig. 3　HPLC chromatograms of standard monosaccharides

图 4 为 AKSP2 水解物的 HPLC 图谱。测定结果表明，水解液出峰的保留时间分别与标准样中的木糖、果糖、甘露糖、葡萄糖相对应，说明 AKSP2 中含有这 4 种单糖，其摩尔量比值为 1 ∶ 1.05 ∶ 0.89 ∶ 1.32。

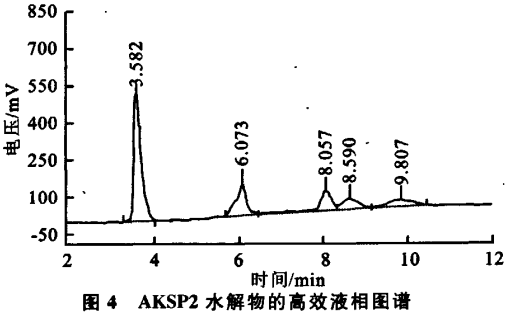

图 4　AKSP2 水解物的高效液相图谱

Fig. 4　HPLC chromatograms of hydrolysates of AKSP

2.4　AKSP2 红外光谱检测结果

AKSP2 红外光谱检测结果见图 5。

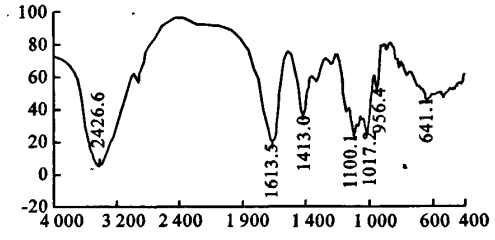

图 5　AKSP2 的红外光谱

Fig. 5　Infrared spectrum of AKSP2

多糖 AKSP2 在 400～4 000 cm^{-1} 范围内的红外光谱，主要强吸收峰为 3426.6、1613.5、1 418.0、1 100.1、1 017.2、955.4、641.1 cm^{-1}。3 600 ～3 200 cm^{-1} 出现一宽峰，是 O-H 的伸缩振动。3 000～2 800 cm^{-1} 之间的一组弱吸收峰，是 C-H 的伸缩振动，是糖类的特征峰；3 600～3 200 cm^{-1} 和 1 100～

万方数据

1 010 cm^{-1}之间的两组峰说明多糖 AKSP2 确实是糖类化合物；1 670～1 630 cm^{-1}处的吸收峰是乙酰基的特征吸收峰，说明构成多糖的糖基中含有乙酰基；1 100～1 010 cm^{-1}之间的两组峰是由糖环的 C-O-C 伸缩振动所产生，表明其为吡喃糖苷；890 cm^{-1}处存在特征吸收峰，表明含 β-型糖苷键；810 cm^{-1}有吸收峰，表明存在甘露糖。

2.5 超氧化物岐化酶(SOD)含量的变化

由表3可以看出，模型组小鼠SOD值显著低于空白组，低剂量给药组肝脏和血清中SOD值与模型组间差异不显著，而高剂量给药组与空白组间差异显著($P<0.05$)，且高于空白组，说明草本刺嫩芽根可溶性多糖 AKSP2 能够促进小鼠体内 SOD 值的升高，提高抗氧化能力。

表3 肝脏与血清中SOD含量

Tab. 3 SOD content in liver and serum

小鼠种类	肝脏SOD质量浓度/(nmol/mg)	血清SOD质量浓度/(nmol/mL)
空白	268.31 ± 0.794^{bA}	101.18 ± 2.102^{bA}
模型	196.70 ± 0.718^{cB}	81.88 ± 1.961^{cB}
低剂量	200.47 ± 5.212^{cB}	89.06 ± 2.061^{cB}
高剂量	276.84 ± 11.504^{aA}	110.96 ± 12.334^{aA}

注：不同大学字母间差异显著 $P<0.05$；不同小写字母间差异极显著 $P<0.01$。

2.6 过氧化氢酶(CAT)含量的变化

由表4可看出，模型组中CAT含量显著低于空白组，但是低剂量组与模型组之间的差异却不明显，而高剂量组显著高于其他各组($P<0.05$，$P<0.01$)。说明草本刺嫩芽根可溶性多糖 AKSP2 能够促进小鼠体内 CAT 值的升高，提高降解过氧化氢的能力。

表4 肝脏与血清中CAT含量

Tab. 4 CAT content in liver and serum

小鼠种类	肝脏SOD含量/(nmol/mg)	血清SOD含量/(nmol/mL)
空白	16.82 ± 0.634^{bA}	27.34 ± 1.551^{bA}
模型	13.37 ± 0.482^{cB}	21.77 ± 1.249^{cB}
低剂量	13.83 ± 0.721^{cB}	22.24 ± 0.728^{cB}
高剂量	18.03 ± 1.010^{aA}	29.50 ± 1.747^{aA}

注：不同大学字母间差异显著 $P<0.05$；不同小写字母间差异极显著 $P<0.01$。

2.7 丙二醛(MDA)含量的变化

丙二醛 MDA 含量的变化见表5。

由表5看出，模型组显著高于空白组，而低剂量给药组与模型组之间的差异并不显著，高剂量给药组却显著低于模型组($P<0.05$，$P<0.01$)。说明草本刺嫩芽根可溶性多糖 AKSP2 降低了小鼠体内脂质过氧化物 MDA 值，保护了细胞的完整性。

表5 肝脏与血清中MDA含量

Tab. 5 MDA content in liver and serum

小鼠种类	肝脏SOD含量/(nmol/mg)	血清SOD含量/(nmol/mL)
空白	16.98 ± 0.311^{aA}	4.30 ± 0.259^{bA}
模型	43.52 ± 1.708^{bB}	7.28 ± 0.196^{cB}
低剂量	42.24 ± 1.199^{bB}	7.03 ± 0.175^{cB}
高剂量	15.58 ± 0.823^{aA}	4.02 ± 0.174^{aA}

注：不同大学字母间差异显著 $P<0.05$；不同小写字母间差异极显著 $P<0.01$。

3 讨 论

动物衰老条件下，会发生膜脂的过氧化作用。丙二醛(MDA)是膜脂过氧化产物之一，它能使蛋白质、核酸、脂类发生交联，使生物膜变性、细胞突变、衰老或死亡，其浓度表示脂质过氧化强度和膜系统伤害程度，所以可用它来表征动物衰老指标。

动物体内经常产生超氧化物阴离子自由基等代谢产物，而过量的氧自由基能直接损伤细胞和组织，在漫长的生物进化过程中，为消除机体过多自由基已经产生了一套完整而精细的防护体系——清除和修复有害氧自由基损伤体系。首要防御体系为生物体内的各种抗氧化酶，主要有超氧化物歧化酶(SOD)，过氧化氢酶(CAT)等，它们能促使超氧化物阴离子变为 H_2O_2 和氧分子，清除氧自由基，保护细胞免受损伤。因此可用超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)浓度高低来反映表征动物抗氧化能力。

作者通过建立小鼠衰老模型，然后饲喂给药，检测 MDA，SOD，CAT 含量来研究多糖的疗效。

试验结果表明，模型组的 SOD、CAT 指数都显著高于空白组($P<0.05$)，MDA 指数显著低于空白组($P<0.05$)，说明造模成功。

通过试验可看出：草本龙芽根多糖 AKSP2 可以提高小鼠肝脏与血清中的 SOD、CAT，同时能够防止脂膜的过氧化，说明草本龙芽根多糖 AKSP2 对衰老有一定的预防作用。

4 结 语

采用 DEAE-纤维素柱对多糖分离，得到5种组分，即 AKSP1、AKSP2、AKSP3、AKSP4、AKSP5。对 AKSP2 进行理化性质研究，HPLC 层析证实

万方数据

AKSP2 是由木糖、果糖、甘露糖、葡萄糖组成。其摩尔比值为 1∶1.05∶0.89∶1.32。对多糖 AKSP2 在 400～4 000 cm^{-1} 范围内的红外光谱分析表明,其为呋喃糖苷,键型为 β-型糖苷键,其中含有乙酰基。

草本龙芽根多糖 AKSP2 提高小鼠肝脏与血清中的 SOD、CAT 值,提高了抗氧化能力;同时降低了 MDA 值,防止了脂膜的过氧化,说明草本龙芽根多糖 AKSP2 对衰老有一定的预防作用。

参考文献(References):

[1] 韩春然,马永强,唐娟. 黑木耳多糖的提取及降血糖作用[J]. 食品与生物技术学报,2006,25(5):111－114.
HAN Chun-ran,MA Yong-qiang,TANG Juan. Extraction of polysaccharide from *Auricularia auricular* and its hypoglycemia activity[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2006,25(5):111－114. (in Chinese)

[2] 张桂和,赵谋明,王炜. 方格星虫多糖分离纯化及性质鉴定[J]. 食品与生物技术学报,2006,25(4):63－66.
ZHANG Gui-he, ZHAO Mou-ming, WANG Wei. Isolation, Purification and property identification of polysaccharide contained in *Sipunculus nudus*[J]. **Journal of food science and biotechnology**,2006,25(4):63－66. (in Chinese)

[3] 凌小曼,丁红,罗顺德,等. 当归多糖对血瘀证动物免疫功能和抗氧化功能的影响[J]. 中国医院药学杂志,2002, 22(10):584－586.
LING Xiao-man,DING Hong,LOU Shun-de, et. al . Study on the pharmacological mechanism of angelica polysaccharide on the immunocompetence and the effects of its antioxidation[J]. **Chin Hosp Pharm J**,2002, 22(10):584－586. (in Chinese)

[4] West M A. Role of cytokines in lenkocyte activation phagocytic cell[M]. San Diego :Academic Press,145－179.

[5] Sol'ya N Senchenkova,Yuriy A Kniel,Alexander S,et al. Structure of the O-polysaccharide of *Erwinia carotovora* ssp. carotovora GDPB436[J]. **Carbohydrate Research**,2003,338:2025－2027.

[6] Nikolay Paramonov,David Bailey,Minnie Rangarajan,et al. Structure analysis of the polysaccharide from the lipopolysaccharide of *Porphyromonas gingivalis* strainW50[J]. **Eur J Biochem**, 2001,268:4698－4707.

[7] Clas landersjo,Andrej Weintraub,Goran Widrnalm. Structural analysis of the O-antigen polysaccharide from the shiga toxin-producing *Escherichia coli* O172[J]. **Eur J Biochem**,2001,268:2239－2245.

(责任编辑:李春丽)

万方数据