

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

黄琳娟 林颖 田庚元 计国帧

(中科院上海有机化学研究所, 上海 200032)

摘要 从宁夏枸杞子提取得到的糖缀合物 LBP 经 DEAE-cellulose 柱色谱得到 5 个组分, 其中 Lbp3, Lbp4 和 Lbp5 分别经 CM-Sephadex C-50, Sephadex G-100, Sephadex G-50 柱色谱得到均一组分 LbGp3, LbGp4 和 LbGp5。N 含量: LbGp3 0.83%, LbGp4 1.72%, LbGp5 9.58%。总糖含量: LbGp3 93.6%, LbGp4 85.6%, LbGp5 8.6%。分子量: LbGp3 9.25×10^4 , LbGp4 21.48×10^4 , LbGp5 2.37×10^4 。糖组成为: LbGp3: Ara:Glc=1:1, LbGp4: Ara:Gal:Rha:Glc=1.5:2.5:0.43:0.23, LbGp5: Rha:Ara:Xyl:Gal:Man:Glc=0.33:0.52:0.42:0.94:0.85:1。初步分析表明 LbGp4 是 O-连接的糖蛋白。

关键词 枸杞子; 糖缀合物; 多糖

枸杞子(*Lycium bararum* L.)是我国一种传统中药,有“补肾益精,养肝明目”的功效,民间多用来作为延年益寿的补品。近年来证实枸杞子的粗多糖-蛋白复合物为其有效成分之一。但目前这方面的工作主要偏重于药理作用的探讨^[1~3],化学工作,如组分的纯化,结构研究等报道很少。田庚元等^[4,5]曾从宁夏枸杞子中得到 1 个有免疫活性的糖蛋白 LbGp。我们对枸杞子中的免疫活性成分进行较系统的研究,分离得到 Lbp1~Lbp5 5 个组份,并对其进行小鼠体内免疫活性试验,发现这 5 个组份均可提高腹腔巨噬细胞吞噬百分率及体内淋巴细胞转化率。其中对 Lbp3, Lbp4 和 Lbp5 分别进行纯化,得到 LbGp3, LbGp4 和 LbGp5,并对这些糖缀合物进行物理化学性质的研究。

材 料 和 方 法

材料与仪器 722 型,754 型分光光度计为上海第三分析仪器厂产品,红外光谱为 Bio-Rad FTS185,气相色谱仪为 Varian VISTA6000,液相色谱仪为 Shimadzu 10AD,电泳仪为 Bio-Rad

的 Mini-ProteanR II Electrophoresis cell,毛细管电泳仪为 Water Quanta 4000E,紫外吸收测定仪为 Perkin Elmer。

标准蛋白分子量与 DEAE-cellulose 为 Sigma 产品, Sepharose 4B, CM-Sephadex C-50, Sephadex G-100 和 Sephadex G-50 为 Pharmacia 产品。标准葡聚糖分子量为 Fluka 试剂。其余试剂为国产分析纯。

枸杞子为宁夏产品。

糖缀合物的分离、纯化 生药枸杞子 500 g 粉碎后,在室温下用 3 倍体积 H₂O 浸泡 24 h,双层纱布过滤,残渣再次用 1.5 倍体积 H₂O 浸泡 6 h,合并滤液。旋转蒸发浓缩(T<40℃)。离心,上清液用 4 倍体积无水 EtOH 沉淀。沉淀经少量水溶解后,用 1/5 体积 Savage 试剂(CHCl₃-n-BuOH 4:1)去游离蛋白(7次)。对水透析 2 d,冷冻干燥,得粗多糖缀合物 LBP 4.0 g。

LBP 进行 DEAE-cellulose 柱色谱(HCO₃⁻¹型),依次用 H₂O, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 mol·L⁻¹ NaHCO₃ 洗脱,隔管检测 A₂₈₀ 和 A₄₉₀(硫酸-苯酚法),分离得到 Lbp1, Lbp2, Lbp3, Lbp4 和 Lbp5 5 个组分(图 1)。除 Lbp2 因量少还未研究外, Lbp1 透析脱盐后,经 Sephadex G-100 纯

化得 LbGp^[1,2]。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 磷酸缓冲液洗脱)柱色谱得 LbGp3, 得率为 32.5%。Lbp4 经 2 次 Sephadex G-100 (0.1 mol·L⁻¹ NaCl 洗脱)柱色谱得 LbGp4, 得率为 40.2%。Lbp5 经 Sephadex G-100(0.1 mol·L⁻¹ NaCl 洗脱)和 Sephadex G-50 (0.1 mol·L⁻¹ NaCl 洗脱)柱色谱得 LbGp5, 得率为 20.1%。

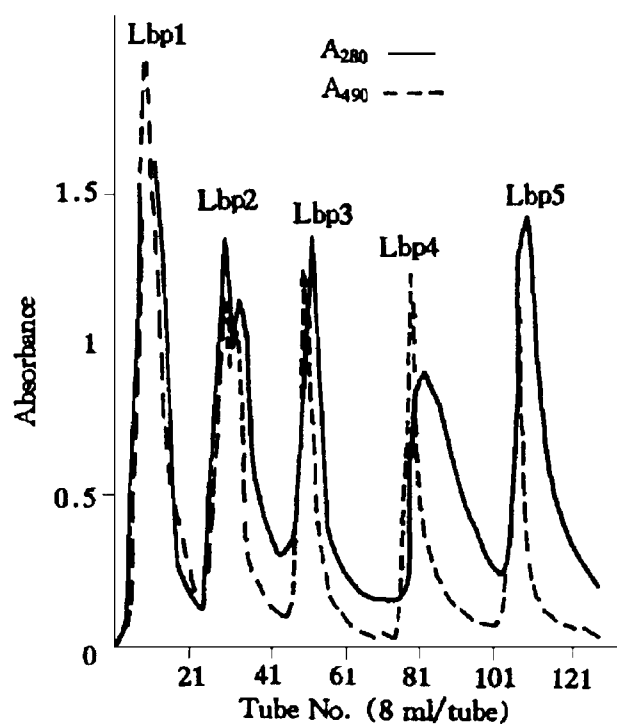


Fig 1 Elution pattern of Lbp on DEAE-cellulose column(2 cm×40 cm). Eluent: H₂O, 0.05~0.50 mol·L⁻¹ NaHCO₃; Flow rate: 0.5 ml·min⁻¹.

纯度鉴定 HPLC 法: 分析柱为 TSK-2000SW, 洗脱液为 NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ 缓冲液 (50 mmol·L⁻¹, pH 7.0), 流速 1.0 ml·min⁻¹。紫外检测波长为 254 nm。毛细管电泳法: 电泳液为 100 mmol·L⁻¹ H₃BO₃-KOH 缓冲液 (pH 10)。紫外检测波长 254 nm。SDS-PAGE 电泳法^[6]: 用 1.5 mol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.8) 缓冲液, 分离胶浓度 15%, 考马斯亮蓝 R-250 染色。

糖组成分析 纸色谱: 样品加 1 mol·L⁻¹ H₂SO₄ 2 ml, 充 N₂, 封管, 100℃ 水解 4 h 后用

BaCO₃ 中和进行纸色谱。展开剂为 *n*-BuOH—C₅H₅N—H₂O (6:4:2), 显色剂为苯胺-邻苯二甲酸。HPLC 法: 纸色谱证实已水解完全后, 作 HPLC 分析。分析柱为 Carbohydrate analysis, 流动相为乙腈—水 (85:15), 流速 1.0 ml·min⁻¹, 示差检测。气相色谱法: 将完全酸水解样品, 按文献^[7]方法制成相应的糖醇乙酸酯衍生物, 用少量氯仿溶解后进行气相色谱分析, 分析柱 3% OV-225 毛细管柱 (25 m×0.3 mm), 程序升温 180℃ (5 min) $\xrightarrow{2^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}}$ 200℃ (30 min)。

分子量测定 LbGp3 和 LbGp4 的分子量测定: 采用凝胶过滤法测定分子量。Sephacrose 4B 柱 (2 cm×50 cm) 用 0.1 mol·L⁻¹ KCl 按恒定流速 (10 ml·h⁻¹) 平衡 24 h。将分子量分别为 25000, 80000, 270000, 670000 的 Dextran 标准品相继上柱 (每管收集 4.4 ml), 苯酚-硫酸法测定洗脱峰, 测得洗脱体积 V_e。用蓝色葡聚糖 (分子量 200 万) 求得外水体积 V₀。用线性回归法得出回归方程 $y = -2.5903 + 3.1021(\gamma = -0.9977)$ 。按同样条件对待测样品进行柱色谱, 由回归方程求得其分子量。LbGp5 的分子量测定: 用 SDS-PAGE 电泳法测定其分子量 (条件同 SDS-PAGE 电泳法)。以牛血清白蛋白、鸡白蛋白、胰凝乳蛋白酶原、β-乳球蛋白和溶菌酶作分子量标准。溴酚兰为指示剂, 定其迁移率为 1.0, 以各蛋白质相对迁移率对分子量对数作出标准曲线, 根据样品的相对迁移率可求得其分子量。

LbGp4 糖肽键特征^[8] 先将样品置 0.1 mol·L⁻¹ NaOH—1.0 mol·L⁻¹ NaBH₄ 溶液中, 40℃~45℃ 反应 24 h, 然后取样品作薄层色谱。茚三酮显色。

糖含量测定^[9] 用硫酸-苯酚法显色, 分别以 LbGp3, LbGp4 和 LbGp5 中摩尔比相同的混合单糖作标准, 在 486 nm 处测定。根据它们的标准系列回归方程求出样品中总糖的含量。

UV 和 IR 分析 样品溶于水, 浓度 1.0

mg·ml⁻¹, 于 200 nm 至 600 nm 之间进行紫外扫描。测红外光谱时, 样品用 KBr 压片。

结 果

LbGp3 和 LbGp4 为白色絮状固体, LbGp5 为灰白色固体。LbGp3, LbGp4 在紫外 200 nm 处左右有强吸收, 而在 280 nm 处吸收很弱。LbGp5 在 200 nm 和 280 nm 处紫外均有较强吸收。红外光谱分析, LbGp3 的吸收谱带: 1648 cm⁻¹ (酰胺键特征吸收, 弱), 1075 cm⁻¹

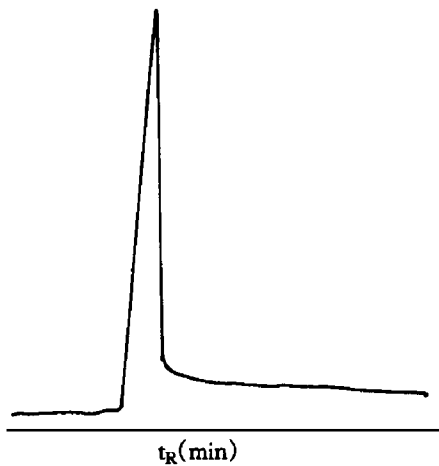


Fig 2 Elution of LbGp3 on CZE. Voltage: 20 V, UV 254 nm; Eluent: 100 mmol · L⁻¹ H₃BO₃-KOH, pH 7.0.

纸色谱和非衍生化的 HPLC 分析表明 LbGp3 含有 Ara 和 Gal, LbGp4 含有 Ara, Gal 和微量的 Glc, LbGp5 用此法未检测到单糖。

糖醇乙酸酯衍生化气相色谱(图 6)表明 LbGp3 含有 Ara, Gal, 摩尔比为 1:1, LbGp4 含有 Ara, Gal, Rha 和 Glc, 其摩尔比为 1.5:2.5:0.43:0.23。LbGp5 含有 Rha, Ara, Xyl, Gal,

(糖环特征吸收, 强)。LbGp4 的吸收谱带: 1645 cm⁻¹ (中), 1098 cm⁻¹ (强)。LbGp5 的吸收谱带: 1651 cm⁻¹ (强), 1098 cm⁻¹ (弱)。N 元素分析结果: LbGp3 为 0.83%, LbGp4 为 1.72%, LbGp5 为 9.58%。

LbGp3 和 LbGp4 经毛细管电泳和 HPLC (图 2, 3) 分析得到单一对称峰, 表明其为均一性。LbGp5 经 HPLC 和 SDS-PAGE 电泳分析亦表明其有均一性(图 4), SDS-PAGE 电泳测得其分子量为 2.37 × 10⁴ (图 5)。凝胶过滤法测得 LbGp3 和 LbGp4 的分子量分别为 9.25 × 10⁴, 21.48 × 10⁴。

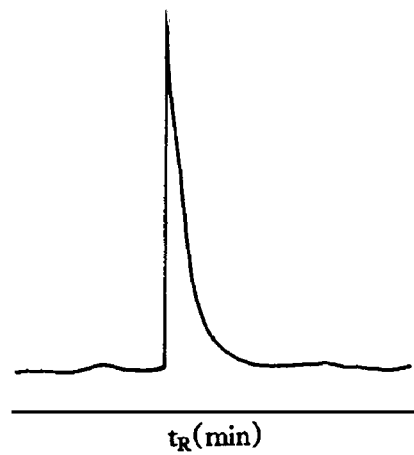


Fig 3 Elution of LbGp4 on TSK 2000SW. Flow rate: 1.0 ml · min⁻¹; Detection: RI; Elution: 50 mmol · L⁻¹ NaH₂PO₄-Na₂HPO₄, pH 7.0.

Man 和 Glc, 其摩尔比为 0.33:0.52:0.42:0.94:0.85:1。

LbGp4 经 β-消除, 薄层色谱结果显示其糖链与肽链是以 O-糖苷键连接的。

总糖含量测定结果表明 LbGp3 为 93.6%, LbGp4 为 85.6%, LbGp5 为 8.6%。

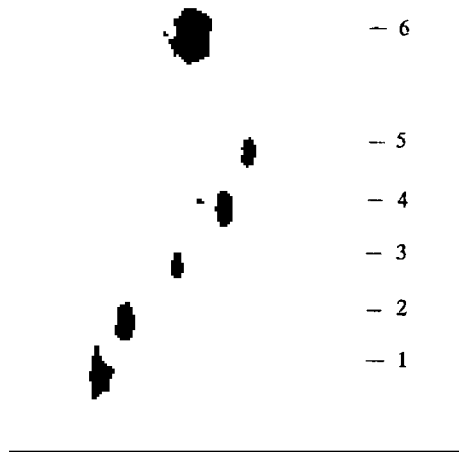


Fig 4 Photograph of LbGp5 on SDS-PAGE. Line 1. Albumin, bovine (66000); Line 2. Albumin, egg (45000); Line 3. Trypsingen (24000); Line 4. β -Lactoglobulin(18400); Line 5. Lysozyme(14300); Line 6. LbGp5.

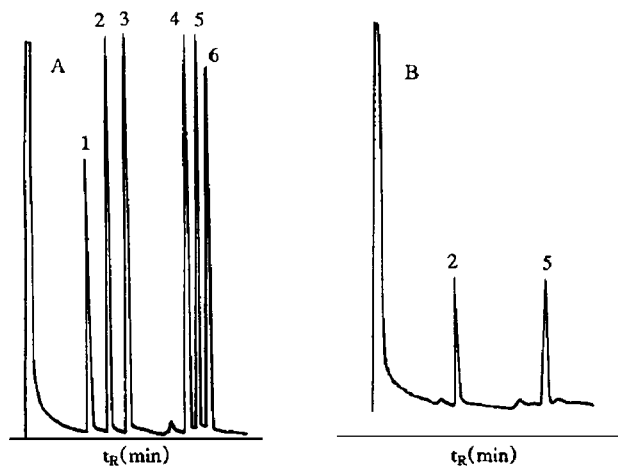


Fig 6 GLC of alditol acetate derivatives of carbohydrates on 3% OV-225 column(0.3 mm \times 25 m). Temp: 180 $^{\circ}$ C (5 min) $\xrightarrow{2^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}}$ 200 $^{\circ}$ C (30 min); A. Standard sampe: 1. Rha; 2. Ara; 3. Xyl; 4. Man; 5. Gal; 6. Glc. B. Hydrolyzate of LbGp3.

讨 论

试验结果表明,枸杞子中具免疫活性的有效成分是一类结构复杂的糖缀合物。除LbGp5外,都是一些高糖含量的糖蛋白,其中LbGp3的糖含量高达93.6%,这在植物糖蛋白

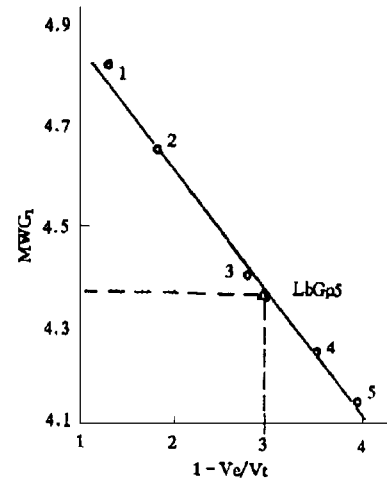


Fig 5 Plot of migration rates(MR) of standard protein samples and LbGp5 on SDS-PAGE against their IgMW. Line 1. ALbumin, bovine (66000); Line 2. Albumin, egg(45000); Line 3. Trypsingen (24000); Line 4. β -lactogloblin (18400); Line 5. Lysozyme(14300).

中是极为罕见的。

我们^[1]原有的提取分离路线中分别用乙醚和丙酮脱脂和去色素。在试验过程中发现回收溶剂后所得脂类和色素残渣很少,因此省去脱脂、去色素及溶剂回收步骤,并不影响样品纯度,且粗多糖的提取率由0.4%提高到0.8%。

用非衍生化的HPLC和纸色谱对LbGp5进行糖组成分析均未检测到单糖,而用糖醇乙酰化的气相色谱对其进行分析,发现有少量Rha, Ara, Xyl, Gal, Man和Glc。

硫酸-苯酚法测糖含量时,发现用与样品中摩尔比相同的混合单糖溶液作标准是必要的,否则糖含量的测定将出现较大的差异。

此外, Lbp1, Lbp2, Lbp3, Lbp4和Lbp5均有明显的细胞免疫活性,纯化后的LbGp3, LbGp4和LbGp5的活性测定工作正在进行中。

参 考 文 献

- 1 Geng CS, Wang ST, Zhou JH, *et al.* Enhancing effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on the interleukin-2 activity in mice. 中国药理学与毒理学杂志, 1989, 3:175
- 2 陶茂萱, 赵忠良. 枸杞多糖对两种化合物体外诱发

- 遗传损伤的保护作用. 中国药理学与毒理学杂志, 1992, 6:136
- 3 周志文, 周金黄, 邢善田. 枸杞多糖对小鼠骨髓造血干细胞, 粒单系祖细胞增殖分化的影响. 中国药理学与毒理学杂志, 1991, 5:44
 - 4 田庚元, 王晨, 冯宇澄. 枸杞子糖蛋白的分离纯化, 物理化学性质及糖肽键特征. 生物化学与生物物理学报, 1995, 27:201
 - 5 田庚元, 王晨. 枸杞子糖蛋白一条高分子量糖链的结构测定. 生物化学与生物物理学报, 1995, 27:493
 - 6 何忠效, 张树政. 电泳. 北京科学出版社, 1990:149
 - 7 张维杰主编. 复合多糖生化研究技术. 上海科学技术出版社, 1987:158
 - 8 Chaplin MF, Kennedy JF. *Carbohydrate Analysis*. Washington DC: IRL Press, 1986:151
 - 9 林颖, 吴毓敏, 吴雯, 等. 天然产物中的糖含量测定方法正确性的研究. 天然产物研究与开发, 1996, 8:5

ISOLATION, PURIFICATION AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF IMMUNOACTIVE CONSTITUENTS FROM THE FRUIT OF *LYCIUM BARBARUM* L.

Huang Linjuan(Huang LJ), Lin Ying(Lin Y), Tian Gengyuan(Tian GY) and Ji Guozheng(Ji GZ)

(Shanghai Institute of Organic Chemistry, Academia Sinica, Shanghai 200032)

ABSTRACT Three glycoconjugates, LbGp3, LbGp4 and LbGp5, were isolated from the fruit of *Lycium barbarum* L. Molecular weights of LbGp3, LbGp4 and LbGp5 were 9.25×10^4 , 21.48×10^4 and 2.37×10^4 , respectively. Carbohydrate contents of LbGp3, LbGp4 and LbGp5 were 93.6%, 85.6%, 8.6%, respectively. LbGp3 was composed of Ara and Gal in a molar ratio of 1:1. LbGp4 was composed of Ara, Gal, Rha and Glc in a molar ratio of 1.5:2.5:0.43:0.23. LbGp5 was composed of Rha, Ara, Xyl, Gal, Man and Glc in a molar ratio of 0.33:0.52:0.42:0.94:0.85:1. Elemental analysis of N contents: LbGp3 0.83%, LbGp4 1.72%, LbGp5 9.58%. The linkage between the glycan and protein may be of O-linkage in LbGp4.

KEY WORDS *Lycium barbarum* L.; Glycoconjugate; Polysaccharides