

· 基础研究 ·

金钗石斛多糖的分离纯化及其抗衰老活性研究[△]谢苗苗¹, 肖柳¹, 杨磊², 杨全伟^{3*}

- (1. 武汉市中医医院, 湖北 武汉 430000;
2. 湖南中医药大学附属第一医院, 湖南 长沙 410000;
3. 武汉市第一医院, 湖北 武汉 430000)

[摘要] 目的: 分离纯化得到金钗石斛多糖, 考察其对过氧化氢(H₂O₂)诱导肝癌细胞株(HepG2)细胞损伤模型的抗衰老活性。方法: 以金钗石斛为原料, 经脱脂、提取、浓缩、乙醇沉淀和真空干燥后, 得到金钗石斛多糖, 然后经二乙氨乙基(DEAE-52)纤维素柱水洗纯化获纯化金钗石斛多糖 DNPL。检测金钗石斛多糖 DNPL 的中性糖含量, 应用高效凝胶渗透色谱(HPGPC)对其相对分子质量进行分析, 同时研究了金钗石斛多糖对 H₂O₂ 诱导 HepG2 细胞损伤模型的抗衰老活性。结果: 金钗石斛粗多糖的中性糖含量为 68.58%, 相对分子质量为 2.8 × 10⁴ Da, 金钗石斛多糖(DNPL)对 H₂O₂ 诱导的肝癌细胞有明显的保护作用, 随浓度的升高抗氧化作用增强, 并且在浓度高于 500 μg · mL⁻¹ 后强于阳性参照 CAPE 的抗氧化作用。结论: 选用 H₂O₂ 诱导 HepG2 细胞损伤模型, 结果显示金钗石斛多糖具有较显著的抗细胞衰老作用。

[关键词] 金钗石斛; 多糖; 分离纯化; 抗衰老

Isolation and Purification of Polysaccharide from *Dendrobium nobile* and Study on Anti-aging ActivityXIE Miao-miao¹, XIAO Liu¹, YANG Lei², YANG Quan-wei^{3*}

- (1. Wuhan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430000, China;
2. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410000, China;
3. Wuhan No.1 Hospital, Wuhan 430000, China)

[Abstract] **Objective:** To isolate and purify polysaccharides from *Dendrobium nobile*, and study the effect of H₂O₂ on HepG2 cell injury induced by anti-aging activity. **Methods:** The *D. nobile* polysaccharides were obtained by degreasing, extraction, concentration, ethanol precipitation and vacuum drying. The polysaccharide of *D. obile* were purified by DEAE-52 cellulose column. The neutral sugar content of polysaccharide of *D. nobile* was determined. The relative molecular mass of *D. nobile* polysaccharide was detected by high performance gel permeation chromatography (HPGPC). The anti-aging activity of HepG2 cells induced by hydrogen peroxide was also studied. **Results:** The crude sugar content of *D. nobile* polysaccharide was 68.58% and the relative molecular mass was 2.8 × 10⁴ Da. *D. nobile* polysaccharide has obvious protective effect on hepatoma cells induced by H₂O₂, and the antioxidant effect was enhanced with the increase of concentration, and it was stronger than that of positive reference CAPE after the concentration was higher than 500 μg · mL⁻¹. **Conclusion:** This experiment based on model of HepG2 cells induced by H₂O₂ to study the antioxidant activity of polysaccharides, indicates that *D. nobile* polysaccharide has the obvious resistance to cell aging.

[Keywords] *Dendrobium nobile*; polysaccharide; separation and purification; anti-aging

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20180622003

金钗石斛是宝贵的食药两用药物, 化学成分主要有多糖类、生物碱类和酚类等^[1-2], 其中多糖为主要成分之一^[3-5]。现代科学研究表明, 金钗石斛多糖具有调节免疫、抗疲劳、抗炎和抗氧

[△] [基金项目] 湖北省自然科学基金面上项目(2014CFH396)

* [通信作者] 杨全伟, 主管药师, 研究方向: 中药物质基础研究; E-mail: 553657004@qq.com

化等功能^[6-7],引起了众多专家学者的关注。文中通过研究金钗石斛多糖的分离纯化工艺及抗衰老生物活性,在H₂O₂诱导的细胞损伤中,氧化应激是重要损伤机制。肝细胞受损后产生的过量活性氧自由基,攻击生物膜,引发脂质过氧化,使过氧化物水平增高,引起细胞中毒,导致细胞死亡^[8-9]。利用H₂O₂诱导HepG2细胞损伤,研究多糖的抗衰老作用,为金钗石斛多糖的开发应用提供参考^[10]。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

药材与试剂:金钗石斛 *Dendrobium nobile* 购自北京同仁堂有限公司,葡萄糖标准品(中国食品药品检定研究院,批号:110833-201502),葡聚糖 Dextran T-(末端-)2 000、T-700、T-580、T-500、T-80、T-70、T-40、T-11、T-9.3 和 T-4(瑞典 Pharmacia 公司),二乙氨基纤维素(DEAE-Cellulose),透析袋(分子截留为相对分子质量 3500,上海绿鸟公司),MTT(Sigma 公司);DMEM 培养基(HyClone, Thermo scientific, USA);马血清;新生小牛血清;PBS, CAPE, 30%过氧化氢均等试剂购自国药试剂有限公司,均为分析纯。

仪器与设备:B5-1 磁力搅拌器、BSZ-100 自动部分收集器和 HL-2 恒流泵(上海青浦沪西仪器厂),Beckman 高速离心机(美国 Beckman 公司);752N 紫外可见分光光度计(上海精科仪器有限公司),CO₂ 细胞培养箱(美国 Thermo 公司);倒置显微镜(美国 Thermo 公司);分析天平(上海精科仪器有限公司);全波长酶标仪(美国 Thermo 公司)。Agilent 1260 Series 高效液相系统,SHZ-D(Ⅲ)循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限公司),RE-201D 恒温水浴锅(上海普渡生化科技有限公司),电热鼓风干燥箱(上海智城分析仪器制造有限公司)。

2 方 法

2.1 金钗石斛多糖的制备

金钗石斛药材取 500 g,加入 10 倍体积 95%乙醇脱脂,干燥后用 15 倍体积水回流提取,提取 3 次,每次 2 h,合并提取液,减压浓缩至适量体积后,离

心,上清液用流动水透析 2 d,除去色素和无机盐等。然后将透析袋内液浓缩至约 1 L,离心后取上清液用 3 倍体积 95%乙醇于 4 ℃下进行冷冻沉淀,静置 24 h,离心。沉淀物用无水乙醇洗涤 3 次后,于 60 ℃真空干燥器中干燥,得到金钗石斛水提粗多糖。

2.2 DEAE-52 纤维素柱纯化

2.2.1 多糖纯化 将所得多糖溶于蒸馏水中,制成浓度为 20 mg·mL⁻¹的溶液,利用 DEAE-52 纤维素阴离子交换柱(50 cm×5 cm)进行分离,硫酸-苯酚法 490 nm 处进行紫外检测,合并洗脱液,浓缩至小体积后对去离子水透析,冷冻干燥后得到纯化金钗石斛多糖 DNPL。

2.2.2 多糖纯度检查 取适量经过 DEAE 纤维素柱分离纯化的多糖,配成 1 mg·mL⁻¹的多糖溶液,HPGPC 上样,色谱柱为 Sephadex G-100 凝胶柱,记录出峰的色谱曲线。观察曲线是否为形态对称,单一峰形。

2.2.3 金钗石斛多糖的中性糖含量测定 称取 200 mg 烘至恒重的葡萄糖,蒸馏水定容至 100 mL 为母液,吸取 10 mL 母液定容至 100 mL 为工作液,摇匀,准确吸取工作液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 于 10 mL 具塞试管,用水定容至 1 mL,加入苯酚溶液 0.4 mL,摇匀后再浓硫酸 5 mL,摇匀,冰浴冷却至室温后,沸水浴煮沸 10 min 后,冷至室温,在 490 nm 波长下检测吸光度。再精密称取金钗石斛多糖 50 mg,用蒸馏水溶解,于 50 mL 容量瓶中定容,按标准曲线制作方法,取 1 mL 样液于 10 mL 具塞试管中,加入苯酚溶液 0.4 mL,摇匀后再浓硫酸 5 mL,摇匀,冰浴冷却至室温后,沸水浴煮沸 10 min,再冷却至室温,在 490 nm 波长下检测吸光度。根据标准曲线计算出金钗石斛多糖的中性糖含量。

2.2.4 金钗石斛多糖的相对分子质量测定 采用 HPGPC 法测定金钗石斛多糖的分子量。分别精密称取标准葡聚糖 Dextran T-(末端-)2000、T-700、T-580、T-500、T-80、T-70、T-40、T-11、T-9.3 和 T-4 各 5 mg,用 1 mL 的蒸馏水溶解后,离心,上样,色谱柱为 Sephadex G-100 凝胶柱,流动相为 0.1 mol·L⁻¹ NaNO₃,流速为 1.0 mL·min⁻¹;检测器为示差折光检测器,柱温 40 ℃。另取多

糖样品 5 mg, 加蒸馏水 1 mL(浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)、离心、取上清液, 按上述洗脱条件进行分离, 测定洗脱体积, 根据标准曲线求出多糖组分的相对分子质量。

2.3 多糖的配置

钗石斛多糖用 PBS 缓冲液配置成 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的储存液, 后用完全培养基稀释的工作浓度进行细胞处理。

2.4 HepG2 细胞培养和处理

HepG2 细胞株由 ATCC 所提供, 保存于液氮中, 用含 10% 胎牛清、 $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素、 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 链霉素的 RPMI1640 培养基培养。置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 饱和湿度、含 5% CO_2 和 95% 空气的恒温箱中培养, 直接吹打无需胰蛋白酶消化传代, 待细胞传至 10~20 代时进行试验^[6]。

2.5 MTT 法检测细胞存活力

HepG2 细胞 $1 \times 10^4 \text{ cells/mL}$ 的细胞悬液, 以每孔 $50 \mu\text{L}$ 接种于 96 孔培养板。培养过夜细胞贴壁后, 加入样品继续培养 24 h(浓度分别为 1000、500、250、125、62.5、31.25、 $0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 加入含终浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 MTT 的新鲜培养基培养 4 h, 每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 裂解液, 待结晶完全溶解后, 酶标仪上 570 nm 波长处测定吸光度值。计算细胞生长存活率^[11-13]。

2.6 H_2O_2 诱导肝癌 HepG2 细胞损伤模型的建立

HepG2 细胞以 1.5×10^4 细胞/孔的密度接种于 96 孔板内, 贴壁 24 h 后给予多糖处理, 浓度分别为 1000、500、250、125、62.5、31.25、 $0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 给药 2 h 后给予 $800 \mu\text{M}$ 过氧化氢处理, 处理期间全程给药, 空白对照组比较。设置阳性参照物为 CAPE。

过氧化氢处理 2 h 后, 每孔加入 MTT 后使其终浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 4 h 后, 每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 裂解液, 待结晶完全溶解后, 酶标仪上 570 nm 波长处测定吸光度值。

2.7 倒置显微镜观察细胞形态变化

肝癌 HepG2 细胞以每瓶 $1.6 \times 10^6 \text{ cells}$ 接种于 12 孔板培养过夜, 不同实验浓度的样品溶液处理 24 h 后, 倒置显微镜下观察细胞形态变化并进行

照相。

2.8 统计学处理

采用 SPSS 统计软件进行数据处理, 以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用独立样本 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 金钗石斛多糖的分离纯化

将上述实验所得到金钗石斛多糖, 测得金钗石斛水提粗多糖得率为 8.36%。金钗石斛粗多糖经 DEAE-52 纤维素阴离子交换柱分离纯化后, 根据蒸馏水洗脱所得纯化金钗石斛多糖 DNPL, 得率 5.32%。

3.2 金钗石斛多糖 DNPL 的纯度、中性糖含量和相对分子质量分析

根据图 1 所示金钗石斛粗多糖的 HPGPC 结果, 可观察到多糖组分的洗脱曲线形态对称, 峰形单一, 表明其纯度较好, 纯度达到了 100%, 分子量分布较为均一。

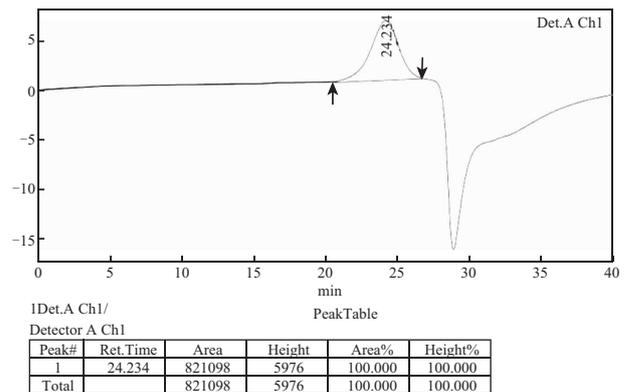


图 1 金钗石斛多糖高效凝胶色谱图

根据作得中性糖标准曲线回归方程 $Y = 13.034 X + 0.1328 (r = 0.9971)$, 其中 Y 为吸光度, X 为浓度 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 根据金钗石斛粗多糖吸光度为 0.912, 计算得金钗石斛多糖 DNPL 中性糖含量为 68.58%

金钗石斛粗多糖的 HPGPC 结果见图 1, 根据所作标准曲线回归方程 $Y = -0.3194 X + 12.189 (r = 0.9969)$, 其中 Y 为相对分子质量取以 10 为底的对数值, X 为保留时间。由于 HPLC 检测使用的是示差检测器, 倒峰为流动相溶剂的峰。根

据金钗石斛粗多糖的保留时间 24.234 min 计算得金钗石斛多糖 DNPL 的平均相对分子质量 2.8×10^4 Da。

3.3 金钗石斛多糖 DNPL 对 H_2O_2 诱导 HepG2 细胞保护作用的影响

过氧化氢 H_2O_2 进入 HepG2 肝癌细胞后可形成高活性的自由基,引起脂质过氧化等反应,破坏细胞结构,引起细胞衰老。结果表明, HepG2 在 H_2O_2 作用下的细胞存活率为 78.30%,与空白对照组比较具有显著性,表明造模成功; DNPL 在浓度 31.25、62.5、500、1000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的作用下,存活率分别为 65.70%、72.40%、74.60%、75.60%、90.70%、107.80%。金钗石斛多糖 DNPL 在浓度为 1000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时对 HepG2 在 H_2O_2 作用下的细胞存活率最大。金钗石斛多糖 DNPL 对 H_2O_2 诱导的肝癌细胞有明显的保护作用,随浓度的升高抗氧化作用增强,并且在浓度高于 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 后强于阳性对照 CAPE 的抗氧化作用,具有显著性,金钗石斛多糖可能具有明显的抗细胞衰老的作用^[8]。

3.4 金钗石斛多糖 DNPL 对 HepG2 细胞生长影响

HepG2 细胞是一种与人正常肝实质细胞具有同源性的肝癌细胞。结果表明(表 1),金钗石斛

多糖直接对肝癌细胞 HepG2 没有明显抑制生长作用,仅在浓度为 1000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时细胞存活率分别为 67.1%,显示其有轻度的抑制肿瘤细胞生长作用。

表 1 MTT 法检测金钗石斛多糖 DNPL 处理的细胞存活力

浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	细胞存活率(%)
0	100 ± 1.8
31	98.6 ± 1.8
63	98.3 ± 3.4
125	97 ± 2.0
250	90.7 ± 2.2
500	80.6 ± 1.6
1000	67.1 ± 1.8

3.5 金钗石斛多糖(DNPL)对 H_2O_2 诱导 HepG2 细胞形态的影响

过氧化氢 H_2O_2 进入 HepG2 肝癌细胞后可形成高活性的自由基,引起 DNA 损伤,脂质过氧化等反应,破坏细胞结构,引起细胞形态变化。试验结果表明(图 2),根据氧自由基清除及抗 H_2O_2 损伤记过对金钗石斛多糖 DNPL 观察对 HepG2 细胞形态变化影响。与正常细胞对照组比,金钗石斛多糖 DNPL 及阳性对照组细胞形态未见明显异常。

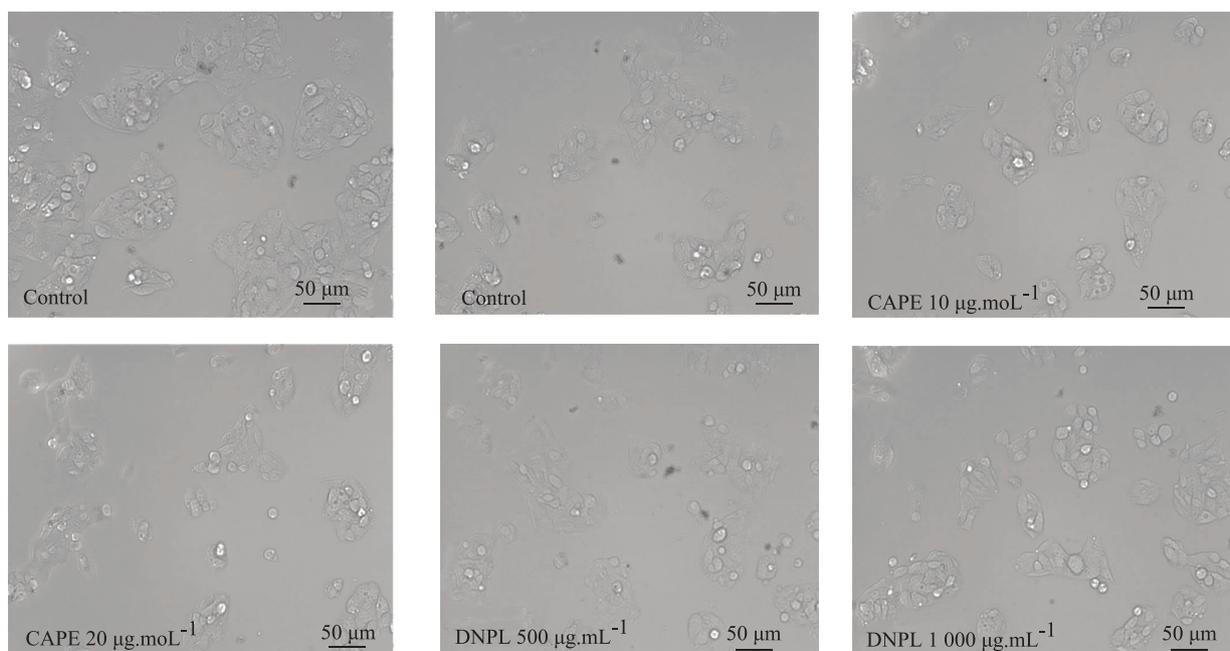


图 2 倒置显微镜观察细胞形态变化(×10倍)

4 讨论

本实验选取金钗石斛为原料,通过水提醇沉获得粗多糖,然后经过 DEAE-52 柱色谱进行分离纯化,蒸馏水洗脱获得纯化金钗石斛多糖 DNPL。对金钗石斛多糖的中性糖含量进行了初步分析,结果表明中金钗石斛粗多糖的中性糖含量为 68.58%,相对分子质量为 2.8×10^4 Da。由于多糖结构的复杂性,尚未对此多糖进一步纯化和对精细结构进行进一步讨论,接下来本课题组拟通过糖组成分析部分酸水解、完全酸水解,酶解,红外和核磁共振等分析方法进行深入研究。

通过对金钗石斛多糖的抗氧化活性进行研究,结果表明金钗石斛多糖 DNPL 在浓度为 $1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时对 HepG2 在 H_2O_2 作用下的细胞存活率最大。随浓度的升高抗氧化作用增强,并且在浓度高于 $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 后强于阳性参照 CAPE 的抗氧化作用,金钗石斛多糖具有明显的抗细胞衰老的作用。

参考文献

- [1] 蒋玉兰,罗建平.药用石斛多糖药理活性及化学结构研究进展[J].时珍国医国药,2011,22(12):2986-2988.
- [2] 梁钧淞,邓业成,玉桂成,等.金钗石斛多糖对小鼠抗疲劳能力的作用[J].食品科学,2012,33(19):282-288.
- [3] 何晓然,张艳磊,刘园园,等.金钗石斛多糖对高糖诱导的大鼠肾系膜细胞 Nrf2 表达的影响[J].时珍国医国药,2013,24(11):2577-2579.
- [4] 张晓敏,孙志蓉,陈龙,等.金钗石斛的化学成分和药理作用研究进展[J].中国现代应用药学,2014,31(7):895-899.
- [5] 李明伟,路军章.衰老机制与中药抗衰老研究进展[J].辽宁中医药大学学报.2016,18(9):215-218.
- [6] 迟慧春.中药多糖类成分抗衰老作用的研究进展[J].黑龙江中医药,2013,42(2):80-81.
- [7] Yuan X, Wang J, Yao H, et al. Free radical-scavenging capacity and inhibitory activity on rat erythrocyte hemolysis of feruloyl oligosaccharides from wheat bran insoluble dietary fiber. [J]. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie, 2005,38(8):877-883.
- [8] 李光,李学兰,孙慧峰,等.响应曲面法优化铁皮石斛多糖提取条件[J].中国现代中药,2011,13(9):29-33.
- [9] 陈祝霞,时雅旻.石斛类药材的红外光谱鉴别研究及其抗氧化活性比较[J].中国现代中药,2007,9(8):22-24.
- [10] 赵菊润,张治国.铁皮石斛产业发展现状与对策[J].中国现代中药,2014,16(4):277-279.
- [11] 汪启兵,许凡萍,魏超贤,等.人体内自由基的研究进展[J].中华流行病学杂志.2016,37(8):1175-1182.
- [12] 杨薇薇,辛浩.金钗石斛化学成分研究[J].分析测试技术与仪器,2006,12(2):98-100.
- [13] Dong Q, Jia L M, Fang J N. A β -D-glucan isolated from the fruiting bodies of *Hericium erinaceus* and its aqueous conformation [J]. Carbohydr Res, 2006, 341(6):791-795.

(收稿日期 2018-06-22)