

枳壳均一多糖 CALB-2 结构表征及生物活性

王武静¹, 杨燕妮², 丁子禾², 钟仁兴², 夏天乙², 李书渊², 王毅², 李盛青¹, 舒尊鹏²

(1. 广州中医药大学 中药学院, 广州 510006;

2. 广东药科大学 中药学院 广东省中药饮片规范化炮制工程技术研究中心, 广州 510006)

[摘要] 目的:从枳壳中分离纯化枳壳均一多糖 CALB-2,并对其进行结构分析、形态表征及生物活性的研究。方法:采用热水提取法从中药枳壳中提取枳壳粗多糖(CALB),经阴阳离子交换树脂、离子交换琼脂糖凝胶以及丙烯葡聚糖凝胶等分离纯化技术得到枳壳均一多糖 CALB-2;利用高效液相色谱法(HPLC)测定 CALB-2 的相对分子质量,采用甲基化分析和 Smith 降解对 CALB-2 进行单糖组成分析,通过红外光谱扫描(IR)分析和电镜扫描技术(SEM)对 CALB-2 进行结构分析及形态表征,并通过 H₂O₂ 诱导心肌细胞氧化损伤模型对 CALB-2 抗氧化活性进行研究。结果:经 HPLC 测定 CALB-2 为均一多糖,其相对分子质量为 3.57×10⁷ Da。综合运用 IR 光谱分析、甲基化分析和 Smith 降解得到 CALB-2 为多支结构的酸性多糖,且主要以 1→3,4 键型存在。分子形态考察结果显示 CALB-2 为非晶态固体。体外活性结果表明 CALB-2 可明显减缓 H₂O₂ 所致心肌细胞的氧化损伤作用。结论:枳壳多糖 CALB-2 为多支结构的均一酸性多糖,且具有一定抗心肌细胞氧化损伤的作用,以上发现为枳壳多糖进一步地深入研究奠定了理论基础。

[关键词] 中药枳壳; 多糖 CALB-2; 分离纯化; 结构表征; 抗心肌损伤

[中图分类号] R284.2; R289; R22; R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)16-0154-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201714

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200708.1517.003.html>

[网络出版日期] 2020-7-8 16:03

Structures Characteristics and Bioactivity of Polysaccharide CALB-2 from Aurantii Fructus

WANG Wu-jing¹, YANG Yan-ni², DING Zi-he², ZHONG Ren-xing², XIA Tian-yi², LI Shu-yuan²,
WANG Yi², LI Sheng-qing¹, SHU Zun-peng²

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China; 2. Guangdong Standardized Processing Engineering Technology Research Center of Traditional Chinese Medicine (TCM), School of TCM, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To isolate and purify a polysaccharide CALB-2 fraction from Aurantii Fructus, and analyze its basic chemical structure, morphological characteristics and bioactivity. **Method:** A refined CALB-2 was obtained from Aurantii Fructus by hot water extraction, then separated and purified by ion exchange resin, ion exchange agarose gel and propylene dextran gel to obtain homogeneous polysaccharide CALB-2. The molecular mass of CALB-2 was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). Monosaccharide composition analysis of CALB-2 was conducted by methylation analysis and Smith degradation. Structural analysis and morphological characterization were conducted by infrared scanning (IR) and scanning electron microscopy (SEM) analysis. Antioxidant activity of CALB-2 was studied by using H₂O₂-

[收稿日期] 20190927(016)

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81603366);中国博士后基金面上项目(2017M610816)

[第一作者] 王武静,在读硕士, E-mail: 1737471344@qq.com

[通信作者] *舒尊鹏,副教授,硕士生导师,从事中药及复方药效物质基础及作用机制研究, Tel: 020-39353119, E-mail: shuzunpeng2010@163.com; *李盛青,教授,硕士生导师,从事中药学及中药药理研究工作, E-mail: 020330@gzucm.edu.cn

induced cardiomyocyte oxidative damage model. **Result:** CALB-2 was a homogeneous polysaccharide and the molecular weight of CALB-2 was estimated to be 3.57×10^7 Da, which was proved to be a kind of highly branched acidic polysaccharides in IR analysis, methylation analysis and Smith degradation, mainly present in form of 1→3,4 bonds. Through SEM observations, we indicated that the molecular morphology of CALB-2 was amorphous solid. The *in vitro* activity test showed that CALB-2 had obvious protective effects on injury of H9c2 myocardial cells induced by H_2O_2 . **Conclusion:** CALB-2 is a kind of homogeneous polysaccharide extracted from *Aurantii Fructus*, with an anti-cardiomyocyte oxidative damage effect, laying a theoretical foundation for further study of *Aurantii Fructus* polysaccharides.

[Key words] *Aurantii Fructus*; polysaccharides CALB-2; separation and purification; structure characterization; antimyocardial injury

枳壳为芸香科柑橘属植物酸橙及其栽培变种或甜橙的干燥未成熟果实,味辛、苦、酸,性微寒,归脾、胃、大肠经,始载于《神农本草经》,具有理气宽中,行滞消胀的功效,主产于四川、江西、湖南、福建等地^[1-2]。临床上,枳壳多用于复方中治疗冠心病^[3],如宣痹舒心汤^[4]、枳实薤白桂枝汤^[5]及行气化痰饮^[6]等。枳壳主要含有黄酮类、挥发油类、香豆素类、生物碱、三萜内酯类及维生素类化学成分^[7],具有调节胃肠运动、降血脂、抗肿瘤、免疫调节等作用^[8]。植物多糖是指一类由10个以上单糖以肽苷键相连形式组成的聚合物,广泛存在于植物体内,是维持生命活动正常运转的基本物质之一。相关实验证明多糖具有抗氧化、免疫调节、抗肿瘤和抗病毒等多种功能^[9]。目前对枳壳的化学成分和生物活性研究主要集中在黄酮、生物碱类成分,对多糖类成分研究较少,故本课题组针对枳壳多糖进行实验研究。课题组前期通过冷浸法得到枳壳粗多糖(CALA),冷浸后的药渣用热水提取进而得到枳壳粗多糖(CALB),热提后的药渣用碱水浸提法则得到枳壳粗多糖(CALC),并对这3种多糖进行了体内外抗氧化活性研究。3种枳壳粗多糖均显示出良好的体外抗氧化活性,并且在一定范围内其抗氧化能力与多糖浓度成正相关性,其中CALB清除自由基的能力最强^[10]。此外,体内的抗氧化实验表明CALA, CALB, CALC 3种粗多糖中, CALB可明显升高小鼠血清中过氧化氢酶(CAT),超氧化物歧化酶(SOD),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性,降低丙二醛(MDA)水平,增强小鼠抗氧化能力^[11]。因此对枳壳粗多糖CALB继续进行分离纯化得到了4种均一多糖,分别为CALB-1, CALB-2, CALB-3和CALB-4,其中CALB-1和CALB-4具有较强的免疫调节作用^[12],而CALB-3则具有较强抗氧化能力,且与其相关的研究我们已进行了报导, CALB-2也有

抗氧化活性,且其抗氧化能力与维生素C相当^[10],但并未对CALB-2进行结构表征及药理活性的探究,故本实验采用高效液相色谱(HPLC),红外光谱扫描(IR)分析,甲基化分析和Smith降解,电镜扫描(SEM)等技术对CALB-2进行深入的结构分析,并对其抗心肌细胞氧化损伤的活性进行初步研究,该研究可为日后临床应用与新药开发提供有利的理论基础。

1 材料

FPA90-CI型弱阴性阴离子交换树脂, FPC 3500型弱阳性阳离子交换树脂(德国Amberlite公司); Sphacyr IS-400型丙烯葡聚糖凝胶, Dextrna型标准葡聚糖, DEAE-Sephrose F.F型离子交换琼脂糖凝胶(美国Pharmacia公司); Shodex sugar KS-805型糖柱(日本Shodex公司); MWCO 3500型透析袋(美国Sigma公司); Dextrna T4000, Dextran T500, Dextran T70, Dextran T40, Dextran T10标准葡聚糖[美国Pharmacia Co.(Swede)公司,批号分别为17-0330-01, 17-0320-01, 17-0280-01, 17-0270-01, 17-0250-01]; 15% H_2O_2 溶液(上海阿拉丁试剂有限公司); DMEM高糖培养基,青霉素Penicillin-链霉素streptomycin,血清, PBS磷酸盐缓冲液(美国Gibco公司,批号分别为8118119, 1881450, 42F9470K, 8118044); 噻唑蓝(MTT,德国BioFRoxx公司,批号176451); 二甲基亚砜(DMSO,广州瑞舒生物科技有限公司,批号20171201-1); 高碘酸钠、乙酸、甲醇等试剂均为分析级(天津化学试剂一厂); 实验用水为超纯水。

BS-100N型自动部分收集器, HL-2型恒流泵(上海青浦沪仪器厂); CA-1111型冷却水循环, N-1100型旋转蒸发仪, 1000135型真空泵, OSB-2100型油浴锅(日本东京理化器械株式会社); TGL-16C型高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂); 764型

紫外-可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司); FTIR-8400S型红外光谱仪(日本岛津有限公司); R404A/R508型低温冷冻干燥机(北京思达兴业仪器有限公司); GENLVS型离心机(长沙市鑫奥仪器仪表有限公司); ELSD-3000型蒸发光检测器(美国Alltech公司); FA2104型1/1万电子分析天平(上海天平厂); Agilent7890-5973型气质联用仪色谱(美国Agilent公司); 2695型高效液相色谱仪(美国Waters公司); 扫描式电子显微镜(美国FEI公司)。

枳壳购于哈尔滨松鹤堂药材公司,原产地为江西新干,经广东药科大学药学实验室李书渊教授鉴定为芸香科柑橘属植物酸橙 *Citrus aurantium* 的干燥未成熟果实,与2015年版《中国药典》规定标准相符合。标本保存于广东药科大学中药学院(20150018)。

2 方法

2.1 枳壳粗多糖的提取方法 取药材枳壳800 g,粉碎,过1号筛,乙醇浸泡提取24 h后,加热回流提取3次,每次2 h,过滤,晾干药渣后,常温下用蒸馏水浸泡药渣3次,每次12 h,滤过、浓缩、醇沉、透析及冷冻干燥得枳壳粗多糖(CALA),收集上述滤过的药渣,将其继续用热水煎煮3次,每次3 h,冷却至室温后过滤、合并滤液。滤液通过浓缩、除杂、透析、冷冻干燥即得枳壳热提粗多糖CALB。

2.2 CALB-2的分离与纯化 取CALB 25 g,加蒸馏水溶解成终质量分数为5%的糖溶液,离心取上清液,经过Amberlite FPA90-Cl⁻(7.5 cm×80 cm)+Amberlite FPC3500(7.5 cm×80 cm)阴阳离子串联树脂柱。先以蒸馏水作为洗脱液,流速10 mL·min⁻¹,苯酚-硫酸法检测,至无糖组分流出时,改用0.5 mol·L⁻¹ NaCl洗脱,流速10 mL·min⁻¹,苯酚-硫酸法检测,至无糖组分流出为止,再用1 mol·L⁻¹ NaCl洗脱,流速10 mL·min⁻¹,苯酚-硫酸法检测,至无糖组分流出为止,分别得到3个组分,收集洗脱液。将3个组分分别装入透析袋中以蒸馏水透析,透析袋内液减压浓缩,冷冻干燥,分别得到水,0.5 mol·L⁻¹ NaCl和1 mol·L⁻¹ NaCl洗脱部位Fr.B-1, Fr.B-2和Fr.B-3。将上述冻干后的枳壳多糖0.5 mol·L⁻¹ NaCl洗脱组分Fr.B-2用双蒸水配成5%的糖溶液,离心、取上清液,经DEAE-Sephrose F.F(3.5 cm×75 cm)凝胶色谱柱,依次用双蒸水,0.2 mol·L⁻¹, 0.3 mol·L⁻¹, 2.0 mol·L⁻¹ NaCl进行梯度洗脱,流速2 mol·L⁻¹,每管收集10 mL,采用苯酚硫酸法追踪检测洗脱液,绘制洗脱管数-光密度值的曲线,将相同峰位的组分合

并,通过透析、浓缩、干燥后,取0.3 mol·L⁻¹ NaCl的洗脱部位,经Sephacryl S-400凝胶色谱柱(1.6 cm×75 cm)继续分离,用水洗脱,流速0.5 mL·min⁻¹,每管收集10 mL,采用苯酚硫酸法检测,绘制洗脱管数-光密度值的曲线,将相同峰位的组分合并,浓缩、干燥后即得CALB-2。

2.3 CALB-2的相对分子质量测定 用高效液相色谱法测定CALB-2相对分子质量,色谱条件采用Waters高效液相色谱,Shodex KS-805色谱柱,流速0.5 mL·min⁻¹,柱温25 °C,流动相超纯水。精密称取标准葡聚糖Dextran T4000, Dextran T500, Dextran T70, Dextran T40, Dextran T10及CALB-2样品,用流动相配制成质量浓度均为2 g·L⁻¹的葡聚糖对照溶液及样品溶液,0.22 μm微孔滤膜过滤,进样量为20 μL。以相对分子质量的lg值对色谱峰的保留时间t_R绘制标准曲线,并根据标准曲线方程计算CALB-2样品的相对分子质量。

2.4 IR光谱的测定 称取CALB-2样品4 mg,干燥的KBr粉末200 mg,在干燥条件下均匀研磨,并压制成片,在4 000~400 cm⁻¹扫描,得样品IR光谱图。

2.5 高碘酸氧化和Smith降解 精密称取CALB-2样品25 mg,按文献[13]的高碘酸氧化和Smith降解方法进行实验,计算甲酸的生成量和每摩尔糖残基中高碘酸的消耗量,采用HPLC对水解所得多元醇和被破坏的多糖或寡糖片段进行定性分析。

2.6 甲基化分析 按改良后的文献[14]方法进行甲基化反应。将完全甲基化后的样品,置于100 °C的90%甲酸中,封闭水解6 h,减压蒸干后,先与乙酸反应,直到样品溶液中无气泡产生后,与乙酸酐反应,生成完全甲基化的糖醇乙酸酯,用GC-MS进行分析。

GC-MS检测条件:Agilent 7890-5973气质联用仪系统,DB-5毛细管柱(0.25 mm×0.25 μm,30 m),程序升温,柱温80 °C,持续1 min,以10 °C·min⁻¹至270 °C,以2 °C·min⁻¹至220 °C,以5 °C·min⁻¹至200 °C,保持1 min,氦气作载气,分流比1:42,进样口温度250 °C,柱流速1.2 mL·min⁻¹。EI(70 eV),离子源温度250 °C,扫描速率2.5 scan·s⁻¹,扫描范围m/z 43~500,接口温度为250 °C。

2.7 CALB-2的透射电镜扫描 称取CALB-2样品适量,减压、冷冻干燥除尽样品中水分,在CALB-2表面喷镀Pt膜导电层,将其制备成厚度为5~10 nm的导电薄膜,调整扫描的衬度、试样的距离,然后在

10 kV电压下进行扫描电子显微镜(SEM)扫描。

2.8 CALB-2对H₂O₂致H9c2细胞氧化损伤的保护作用

2.8.1 H9c2心肌细胞培养 用含10%胎牛血清和1%青链霉素(100 U·μL⁻¹青霉素,100 g·L⁻¹链霉素)的高糖DMEM培养液,在37℃,5% CO₂条件下培养H9c2心肌细胞。待细胞长满培养瓶后,胰酶消化传代,用于后续试验研究。

2.8.2 CALB-2对H9c2心肌细胞的影响 取对数生长期细胞,调整细胞数,使其为1×10⁵个/mL,混匀,以每孔150 μL接种于96孔板中,待细胞贴壁后,按药物的不同浓度随机分9组,每组设4个复孔,正常组加入无血清高糖DMEM培养基20 μL,其他组分别加入1,2,4,8,16,32,64,128 mg·L⁻¹ CALB-2药液20 μL,作用48 h;另外按药物不同作用时间分8组,每组设4个复孔,正常组加入无血清高糖DMEM培养基20 μL,其他组加入等体积的64 mg·L⁻¹ CALB-2药液,作用时间分别为0,1,2,4,8,12,24,48 h;按所设置的不同条件培养后,换用含10%MTT的培养基培养4 h,弃去原培养液,每孔使用DMSO 150 μL终止实验,振荡混匀10 min,酶标仪在波长490 nm处检测各组吸光度(A),计算其细胞活力。

2.8.3 CALB-2对H₂O₂诱导H9c2细胞损伤模型的保护 取对数生长期的H9c2细胞接种于96孔细胞培养板中,24 h后备用,设空白组,模型组,CALB-2低、中、高剂量组(10,20,40 mg·L⁻¹)。空白组换用新鲜培养基培养;模型组换用含200 μmol·L⁻¹的H₂O₂培养基;给CALB-2组分别在细胞培养基中加入终质量浓度为10,20,40 mg·L⁻¹ CALB-2溶液,孵育8 h后,加入200 μmol·L⁻¹的H₂O₂培养基继续培养^[15]。上述组别培养6 h后,换用含10%MTT的培养基培养4 h,弃去原培养液,每孔使用DMSO 150 μL终止实验,振荡混匀10 min,酶标仪在波长490 nm处检测各组吸光度A。

2.8.4 统计学处理 每项实验至少重复3次,数据表示为 $\bar{x} \pm s$,应用SPSS 22.0软件分析结果的相关性和显著性,t检验法进行组间比较,采用Prism 8软件作图。

3 结果

3.1 CALB-2的相对分子质量确定 以lgM为纵坐标,对保留时间t_r做标准曲线,建立lgM与t_r的线性回归方程为Y=14.01-0.4393X(R²=0.998 9),计算得多糖样品的相对分子质量,CALB-2的保留时间

为14.689 min,将其代入标准回归方程,得CALB-2的平均相对分子质量为3.57×10⁷ Da。

3.2 IR光谱测定结果 CALB-2的红外光谱中3 400 cm⁻¹左右可见1个较强的宽吸收峰,为O-H的伸缩振动,提示CALB-2存在分子内或分子间氢键;3 000~2 810 cm⁻¹有1个弱吸收峰,为不对称C-H伸缩振动,是糖类成分的特征性吸收峰;1 620,1 420,1 330 cm⁻¹以及1 240 cm⁻¹处的吸收峰均为-COOH,表明CALB-2中有-COOH存在。另外,有3个强吸收峰出现在1 110~1 010 cm⁻¹,表明为吡喃型的糖环构型;960~950 cm⁻¹出现的吸收峰可能是呋喃糖的骨架振动;880~900 cm⁻¹处和860 cm⁻¹左右的吸收峰分别为β-端基和α-端基差向异构的C-H变角振动峰;765 cm⁻¹处的吸收峰为D-吡喃环。以上分析表明CALB-2可能是一种多支链结构的酸性多糖。见图1。

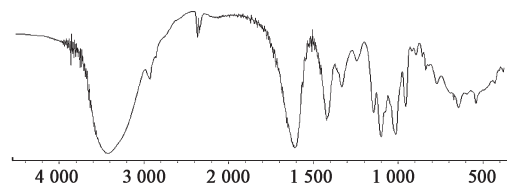


图1 CALB-2的IR光谱

Fig. 1 Infrared spectrograph of CALB-2

3.3 高碘酸氧化和Smith降解结果 CALB-2样品经高碘酸氧化后,平均每摩尔糖残基消耗高碘酸0.121 9 mmol,并生成甲酸0.027 5 mmol,此过程中有产生甲酸,表明存在1→6或1→键型,且高碘酸消耗量大于甲酸生成量的2倍,说明存在1→2,1→4,1→2,6或1→4,6键型。高碘酸氧化后的样品经过完全酸水解、乙酰化后进行GC-MS分析。高碘酸氧化后进行完全酸水解,检出阿拉伯糖和半乳糖,说明这两2个单糖可能存在不被高碘酸氧化的1→2,3;1→2,3,4;1→3,4;1→3,6;1→3等中的某些键型;同时检出赤藓醇和甘油,表明分别存在1→4;1→4,6;1→;1→2;1→6以及1→2,6等键型中的某些键型。见表1。

CALB-2部分酸水解后,可在透析袋外部分及袋内上清液中,检出阿拉伯糖、鼠李糖和半乳糖,说明这些糖位于多糖的支链或主链末端或者是存在不被高碘酸氧化的键型;透析袋外还检测出赤藓醇和甘油,表明含有能被高碘酸氧化的1→,1→6,1→2和1→2,6等中的某些键型,这些键型位于多糖的支链或主链末端。透析袋内沉淀中检出了半乳糖

表1 CALB-2的Smith降解

Table 1 Results from Smith degradation fractions of CALB-2.

多糖片段	完全酸水解	部分酸水解		
		透析袋外部分	透析袋内沉淀	透析袋内上清液
木糖	-	-	-	-
阿拉伯糖	+	+	-	+
鼠李糖	-	+	-	-
葡萄糖	-	-	-	-
甘露糖	-	-	-	-
半乳糖	+	+	+	+
甘油	+	+	+	+
赤藓醇	+	+	-	-

注：“+”代表含有，“-”代表不含有。

和甘油,表明半乳糖以不被高碘酸氧化的键型形式存在,可能存在1→3;1→3,6;1→3,4;1→2,3;1→2,3,4等中某一种或几种键型,并且存在于主链中;有甘油检测出,说明主链中存在可被高碘酸氧化的1→,1→2,1→6,1→2,6等的某些键型。

3.4 甲基化分析 完全甲基化的样品经过还原、水解和乙酰化后,采用气质联用仪分析。CALB-2的甲基化分析结果显示,半乳糖主要以1→,1→6,1→3,4,1→3键型存在,阿拉伯糖主要以1→3,4,1→2,4键型存在,鼠李糖主要以1→,1→4,1→3,4键型存在。见表2。

3.5 CALB-2的SEM分析 SEM扫描结果见图2。CALB-2是一种表面粗糙、大小不一的非晶型固体,多呈团块聚集,颗粒呈不规则形状相互黏结,放大10 000倍可看见团块之间具有空隙,这可能是因为CALB-2是一种具有黏性多支链的大分子。

3.6 CALB-2抗H₂O₂致H9c2心肌细胞氧化损伤作用

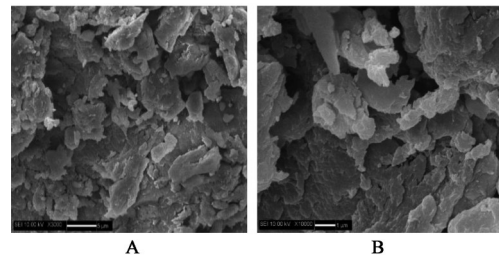
3.6.1 CALB-2对H9c2细胞增殖的影响 CALB-2在0~128 mg·L⁻¹,0~48 h作用于H9c2细胞,细胞增殖稍有变化,但与空白组相比无统计学意义,由此可说明在该浓度和时间范围内CALB-2对H9c2心肌细胞增殖没有明显影响。见表3,4。

3.6.2 CALB-2对H₂O₂诱导H9c2细胞损伤模型的保护 经H₂O₂诱导后,H9c2细胞活力减弱至63.85%,与空白组相比出现显著性差异;与模型组比较,CALB-2高、中剂量组(40,20 mg·L⁻¹)处理后心肌细胞活力分别达到84.61%和77.41%,说明CALB-2能显著抑制H₂O₂对心肌细胞的损伤作用(P<0.01),CALB-2低剂量组则无显著性差异,说明

表2 CALB-2的甲基化分析

Table 2 Sugar linkage analysis of CALB-2

糖衍类生物	连接方式
1,2,4-3-O-乙酰基-3,5-2-O-甲基-阿拉伯糖醇	→2,4)-α-阿拉伯糖-(1→
1,3,4-3-O-乙酰基-2,5-2-O-甲基-阿拉伯糖醇	→3,4)-α-阿拉伯糖(1→
1,5-2-O-乙酰基-2,3,4,6-4-O-甲基-d半乳糖醇	半乳糖-(1→
1,5,6-3-O-乙酰基-2,3,4-3-O-甲基-d半乳糖醇	→6)-半乳糖-(1→
1,3,4,5-4-O-乙酰基-2,6-2-O-甲基-d半乳糖醇	→3,4)-半乳糖-(1→
1,3,5-3-O-乙酰基-2,4,6-3-O-甲基-d半乳糖醇	→3)-半乳糖-(1→
1,4,5-3-O-乙酰基-2,3-2-O-甲基-鼠李糖醇	→4)-α-鼠李糖-(1→
1,3,4-3-O-乙酰基-2,5-2-O-甲基-鼠李糖醇	→3,4)-α-鼠李糖-(1→
1,5-2-O-乙酰基-2,3,6-3-O-甲基-鼠李糖醇	α-鼠李糖-(1→



A.×3 000;B.×10 000

图2 CALB-2的分子形态图像

Fig. 2 Molecular morphorlogy graphics of CALB-2

表3 不同浓度下CALB-2对H9c2细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 3 Effects of CALB-2 on the proliferation of H9c2 cells at different concentrations($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	细胞存活率/%
空白	-	98.84±1.34
CALB-2	1	99.51±4.58
	2	98.72±5.30
	4	99.64±4.08
	8	98.76±2.96
	16	101.24±4.65
	32	99.89±3.04
	64	100.38±3.70
	128	99.34±5.58

CALB-2可有效减缓H₂O₂对心肌细胞造成的氧化损伤,并呈剂量依赖性。见表5。

表4 不同时间下CALB-2对H9c2细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 4 Effect of CALB-2 on proliferation of H9c2 cells at different time($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	t/h	细胞存活率/%
空白	-	102.28±4.40
CALB-2	1	100.85±3.63
	2	102.05±5.26
	4	100.14±3.68
	8	98.39±6.13
	12	97.73±2.30
	24	102.00±2.50
	48	100.40±4.85

表5 CALB-2对H₂O₂诱导损伤中的H9c2细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 5 Effect of CALB-2 on survival rate of H₂O₂-induced H9c2 cells($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	细胞存活率/%
空白	-	101.5±3.41
模型	-	63.85±4.73 ¹⁾
CALB-2	10	63.99±3.98
	20	77.41±2.91 ²⁾
	40	84.61±2.37 ²⁾

注:与对照组比较¹⁾P<0.05;与模型组比较²⁾P<0.01。

4 讨论

本课题组前期通过枳壳中药药性理论研究发现其多糖具有较好的抗氧化作用,三种粗多糖中CALB(即热提粗多糖)的抗氧化活性最好,为了深入研究CALB-2的结构特征,本文采用了一系列的化学及光谱分析方法,表征CALB-2的结构组成,发现CALB-2是一种含有糖醛酸的多支链大分子多糖,主要以1→3,4键型存在的非晶型固体。根据文献报道,多糖中糖醛酸含量越高则激活异头上氢原子与氧自由基发生氧化还原反应的能力越强,糖醛酸是抗氧化的主要基团,其含量的高低与自由基清除能力和抗氧化活性有直接关系^[16],因此CALB-2显示出良好抗氧化活性。

氧化损伤与许多人类疾病密切相关^[17],氧化损伤可影响心肌细胞受损导致心脏疾病的发生。大量实验证明机体产生过量的H₂O₂可诱导心肌细胞发生氧化应激反应,造成心肌细胞凋亡现象的发生,H₂O₂诱导体外心肌细胞氧化损伤可作为心肌损伤的实验模型来进行实验研究^[18-22]。本研究采用大鼠H9c2细胞建立H₂O₂诱导心肌损伤模型,以浓度200 μmol·L⁻¹ H₂O₂作用6 h为诱导H9c2氧化应激模

型的最优条件,CALB-2预处理可使H₂O₂诱导的H9c2细胞活力显著恢复,证明CALB-2可明显减缓H₂O₂所致H9c2细胞的氧化损伤作用,以上发现可对中药枳壳的临床应用及新药开发奠定理论基础。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社. 2015:171-172.
- [2] 李仪奎,姜名瑛. 中药药理学[M]. 北京:中国中医药出版社. 1992:116-118.
- [3] 万小松,魏莹,程训江,等. 枳实、枳壳用于复方治疗冠心病的临床疗效观察[J]. 广东微量元素科学, 2017,24(04):30-33.
- [4] 刘宝海. 宣痹舒心汤治疗冠心病稳定型心绞痛(痰瘀痹阻型)的临床研究[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学,2008.
- [5] 程奇武. 桃红四物汤合枳实薤白桂枝汤加减治疗慢性冠心病心肌缺血192例临床效果观察[J]. 世界最新医学信息文摘,2019,19(74):176,178.
- [6] 王智慧. 行气化痰饮对冠心病—稳定型心绞痛(气滞血瘀证)的临床研究[D]. 长春:长春中医药大学,2012.
- [7] 祝婧,叶喜德,吴江峰,等. 枳壳炮制历史沿革及炮制品现代研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(20):191-199.
- [8] 龚斌,李琴,胡小红,等. 枳壳化学成分及药理作用研究进展[J]. 南方林业科学,2019,47(3):40-45.
- [9] 安晓娟,冯琳,宋红平,等. 植物多糖的结构分析及药理活性研究进展[J]. 中国药学杂志,2012,47(16):1271-1275.
- [10] WANG Q H, SHU Z P, XU B Q, et al. Structural characterization and antioxidant activities of polysaccharides from *Citrus aurantium* L[J]. Int J Biol Macromol,2014,67(6):112-123.
- [11] 舒尊鹏,杨燕妮,王毅,等. 枳壳化学拆分组分的性味药理学评价——化学拆分组分的制备及其对胃肠功能作用的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(20):14-19.
- [12] SHU Z, YANG Y, XING N, et al. Structural characterization and immunomodulatory activity of pectic polysaccharide (CALB-4) from, Fructus Aurantii[J]. Int J Biol Macromol,2018,116:831-839.
- [13] 冉靛,张桂玲,杨小生,等. 鸡矢藤多糖的分离纯化及体内抗菌活性[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(8):59-63.
- [14] 邢娜,舒尊鹏,徐炳清,等. 枳壳多糖CALB-1的提取、分离纯化及免疫调节活性研究[J]. 中草药,2015,46(5):639-644.

- [15] 王媛媛,彭洋,张琦,等. ERK1/2 信号通路对黄芪苷 IV 抗 H₂O₂ 诱导 H9c2 细胞氧化损伤的作用[J]. 中国应用生理学杂志,2011,27(3):363-367.
- [16] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 2版. 杭州:浙江大学出版社,2003:36.
- [17] 吴雅清,冷小鹏. 多糖体外抗氧化作用及其影响因素[J]. 广州化工,2018,46(4):4-9,16.
- [18] 陆定艳,李靖,孙佳,等. 参芎葡萄糖注射液通过激活 PI3K/AKT 通路拮抗 H₂O₂ 诱导 H9c2 细胞凋亡[J]. 中国中药杂志,2019,44(17):3773-3779.
- [19] 吴琼,刘香香,陆定艳,等. 荳蔻花提取物对 H₂O₂ 诱导的 HUVEC 细胞氧化损伤的保护作用研究[J]. 中国中药杂志,2018,43(5):1008-1013.
- [20] BORCHI E, BARGELLI V, STILLITANO F, et al. Enhanced ROS production by NADPH oxidase is correlated to changes in antioxidant enzyme activity in human heart failure [J]. BBA-Mole Basis Dis, 2009, 1802(3):331-338.
- [21] YASUDA J, OKADA M, YAMAWAKI H. T3 peptide, an active fragment of tumstatin, inhibits H₂O₂-induced apoptosis in H9c2 cardiomyoblasts [J]. EUR J PHARMACOL, 2017, 807.
- [22] 杨洋,刘亭,王文华,等. 参芎葡萄糖注射液对 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞氧化损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(8):153-158.
- [责任编辑 顾雪竹]