

· 药学基础 ·

## 花椒多糖抗阿尔茨海默病作用及其糖谱法结构特征分析

胡美变, 孟祥龙, 王璞, 张朔生, 刘玉杰\*

(山西中医药大学 中药与食品工程学院, 中药炮制山西省重点实验室, 山西 晋中 030619)

**[摘要]** 目的:建立阿尔茨海默病(AD)小鼠模型,评价花椒多糖对AD的治疗作用并采用糖谱法分析其结构特征。方法:采用腹腔注射D-半乳糖联合灌胃三氯化铝建立快速衰老的AD小鼠模型,通过Morris水迷宫实验评价小鼠的学习记忆能力,苏木素-伊红(HE)染色和尼氏染色观察小鼠脑组织病理学状况和神经元损伤情况。对花椒多糖进行酸水解和不同糖苷酶水解后,采用高效薄层色谱法(HPTLC)和荧光辅助凝胶电泳法(PACE)分析水解产物的结构特征。HPTLC色谱条件为采用硅胶60高效薄层色谱板,点样量5  $\mu\text{L}$ ,展开剂乙酸乙酯-冰乙酸-水(2:2:1),展开2次,苯胺-二苯胺-磷酸溶液显色,在105  $^{\circ}\text{C}$ 加热10 min后日光下检视。PACE检测条件为34%分离胶和8%浓缩胶,电泳缓冲液为0.1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 三羟甲基氨基甲烷(Tris)-硼酸缓冲液(pH 8.2),电泳在0  $^{\circ}\text{C}$ 环境下进行,上样量3~6  $\mu\text{L}$ ,用15 mA恒流跑至样品达凝胶前端,紫外灯365 nm下检视。结果:Morris水迷宫实验结果表明,花椒多糖明显改善了AD模型小鼠的学习和记忆能力,逃避潜伏期缩短,穿梭平台次数和目标象限停留时间明显增加。组织病理学实验结果表明,花椒多糖能改善AD小鼠海马组织CA1、CA3区的病理情况和神经元的损伤,且尼氏小体数量明显增加。糖谱法分析结果表明,HPTLC和PACE分析结果基本一致,花椒多糖主要能被纤维素酶和果胶酶催化酶解成小分子糖类,表明其主要含有 $\beta$ -1,4-葡萄糖苷键和 $\alpha$ -1,4-半乳糖醛酸苷键,能被葡聚糖酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶和 $\beta$ -甘露糖酶少量酶解,表明其含有少量 $\alpha$ -1,6-葡萄糖苷键、 $\beta$ -吡喃半乳糖苷键和 $\beta$ -1,4-甘露糖苷键。结论:花椒多糖对AD小鼠有明显治疗作用,其结构中主要含有 $\beta$ -1,4-葡萄糖苷键和 $\alpha$ -1,4-半乳糖醛酸苷键,可为中药多糖的结构解析提供有益借鉴。

**[关键词]** 花椒多糖; 阿尔茨海默病(AD); 糖谱法; 糖苷酶; 高效薄层色谱法(HPTLC); 荧光辅助凝胶电泳法(PACE)

**[中图分类号]** R22;R28;R96;O657 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)10-0174-09

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20220947

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220907.1109.001.html>

**[网络出版日期]** 2022-09-08 09:33:53

## Anti-Alzheimer's Disease Effect of Polysaccharides from Zanthoxyli Pericarpium and Analysis of Its Structural Characteristics by Sugar Spectrum

HU Meibian, MENG Xianglong, WANG Pu, ZAHNG Shuosheng, LIU Yujie\*

(College of Traditional Chinese Medicine (TCM) and Food Engineering, Shanxi Provincial Key Laboratory of TCM Processing, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China)

**[Abstract]** **Objective:** The therapeutic effect of polysaccharides from Zanthoxyli Pericarpium on Alzheimer's disease (AD) was evaluated through establishing a mouse model of AD, and the structural characteristics of the polysaccharides was analyzed by sugar spectrum. **Method:** The AD model of mice with rapid aging was established by intraperitoneal injection of D-galactose combined with gavage of aluminum trichloride, and the learning and memory ability of mice was evaluated by Morris water maze test, the histopathological status of brain and neuronal damage were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining and

**[收稿日期]** 2022-06-17

**[基金项目]** 山西中医药大学科技创新能力培育计划基础研究专项(2021PY-JC-12);国家自然科学基金青年科学基金项目(82104547);山西省科技厅基础研究计划项目(20210302124278);山西省高等学校科技创新项目(2021L358);山西中医药大学博士科研启动基金项目(2022BK09);山西中医药大学优秀博士毕业生来晋工作奖励经费科研启动基金项目(2022BKS06)

**[第一作者]** 胡美变,博士,讲师,从事中药炮制原理及药效物质基础研究,E-mail:hmbcdtcm@163.com

**[通信作者]** \*刘玉杰,博士,讲师,从事中药炮制原理及药效物质基础研究,Tel:0351-3179908,E-mail:liu-1567@163.com

Nissl staining. After hydrolysis of polysaccharides from *Zanthoxyli Pericarpium* with acid and different glycosidases, the characteristics of hydrolysates were analyzed by high performance thin layer chromatography (HPTLC) and fluorescence assisted carbohydrate gel electrophoresis (PACE). HPTLC chromatography was performed on a silica gel 60 plate with sampling volume of 5  $\mu\text{L}$ , developing solvent of ethyl acetate-glacial acetic acid-water (2:2:1), developing twice, aniline-diphenylamine-phosphoric acid solution as chromogenic agent, and heating at 105  $^{\circ}\text{C}$  for 10 min, and then observed under sunlight. PACE experimental conditions were 34% separation gel and 8% concentration gel, electrophoresis buffer was 0.1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris)-boric acid buffer (pH 8.2). Electrophoresis was carried out at 0  $^{\circ}\text{C}$  and the loading amount was 3-6  $\mu\text{L}$ . The sample ran to the front of the gel with a constant current of 15 mA, and imaged under ultraviolet 365 nm. **Result:** The results of Morris water maze test showed that polysaccharides from *Zanthoxyli Pericarpium* significantly improved the learning and memory ability of AD model mice, shortened the escape latency, and significantly increased the number of crossing and the residence time in the target quadrant. The results of histopathological experiments showed that polysaccharides from *Zanthoxyli Pericarpium* could improve the pathological conditions and neuronal damage in the CA1 and CA3 regions of hippocampus of AD mice, and the number of Nissl corpuscles was significantly increased. The results of sugar spectrum analysis showed that the results of HPTLC and PACE analysis were basically consistent, polysaccharides from *Zanthoxyli Pericarpium* could be mainly hydrolyzed into small molecular sugars by cellulase and pectinase, indicating that they mainly contained  $\beta$ -1,4-glucosidic bond and  $\alpha$ -1,4-galacturonic acid glycosidic bond, and could be slightly hydrolyzed by glucanase,  $\beta$ -galactosidase and  $\beta$ -mannase, indicating that they contained only a small amount of  $\alpha$ -1,6-glucosidic bond,  $\beta$ -galactosidic bond,  $\beta$ -1,4-mannosidic bond. **Conclusion:** Polysaccharides from *Zanthoxyli Pericarpium* has obvious therapeutic effect on AD mice, and its structure mainly contains  $\beta$ -1,4-glucosidic bond and  $\alpha$ -1,4-galacturonic acid glycosidic bond, which can provide a reference for the structural analysis of traditional Chinese medicine polysaccharides.

**[Keywords]** polysaccharides from *Zanthoxyli Pericarpium*; Alzheimer's disease (AD); sugar spectrum method; glycosidase; high performance thin layer chromatography (HPTLC); fluorescence assisted carbohydrate gel electrophoresis (PACE)

阿尔茨海默病(AD)是一种发病率较高的神经退行性疾病。随着人口老龄化的发展,其发病率和死亡率逐渐增加,当前我国AD患者已突破1 000万人<sup>[1]</sup>。然而,AD病因尚不完全明确,用于治疗AD的药物极为有限,且难以从根本上逆转其病理过程<sup>[2]</sup>。因此,迫切需要发现新的更为有效的治疗药物。中药中许多成分被发现具有治疗AD的作用,其中多糖是近年来研究较多的成分。据报道,多糖可以从多靶点来防治AD,具有抗氧化应激、抗一氧化氮诱导的神经毒性、抑制神经细胞凋亡等作用<sup>[3]</sup>。

花椒为芸香科花椒属植物花椒 *Zanthoxylum bungeanum* 的干燥成熟果皮,在我国药用历史悠久,具有温中散寒、除湿、止痛、杀虫等功效<sup>[4]</sup>。临床上多用于止痛,回乳,治疗胆道蛔虫症、鳞虫病和血吸虫病等<sup>[5]</sup>。据报道,花椒中的化学成分除了酰胺类、生物碱类、挥发油和香豆素类等,还含有多糖类成分<sup>[6-7]</sup>。药理实验研究发现,花椒对心血管系统、消

化系统、免疫系统、凝血功能等均有明显作用,且具有较好的抗AD活性<sup>[8-9]</sup>。酰胺类成分山椒素是花椒的主要麻味物质,其能够与多种受体和离子通道结合,发挥广泛的药理作用<sup>[10]</sup>。本课题组前期研究发现,花椒中代表性酰胺类成分羟基- $\alpha$ -山椒素具有明显抗AD的作用,并初步阐明了其作用机制<sup>[11]</sup>。但目前关于花椒多糖类成分研究较少,仅对其提取工艺和体外抗氧化活性进行了初步研究<sup>[12]</sup>。本课题组前期对花椒多糖的超声提取工艺进行了优化,并对其单糖组成、相对分子量分布和红外光谱等结构特征进行了研究,发现其对双氧水诱导的PC12细胞氧化应激损伤具有明显保护作用,具有潜在的抗AD作用<sup>[13]</sup>。因此,本研究拟通过建立动物实验模型对花椒多糖的抗AD作用进行进一步评价。此外,中药多糖结构复杂,分离纯化和结构鉴定的难度大,且结构鉴定一般仅针对部分纯化出来的多糖,并不能从整体上分析多糖的结构特征;而一般

的多糖分析方法如单糖组成、红外光谱分析等又不能获得其糖苷键类型等信息<sup>[14]</sup>。因此,本研究采用特异性糖苷酶酶解结合高效薄层色谱法(HPTLC)和荧光辅助凝胶电泳法(PACE)的糖谱法新技术对花椒多糖的整体结构特征进行研究,以明确其糖苷键类型,为中药多糖的结构解析研究提供借鉴。

## 1 材料

SP-Ⅲ型电动薄层点样器(上海科哲生化科技有限公司),DYY-6C型电泳仪电源(北京六一仪器厂),Mini-P4型垂直电泳槽(济南君意生物科技有限公司),ZF1-Ⅱ型紫外分析仪(上海嘉鹏科技有限公司),Morris水迷宫视频分析系统(成都泰盟软件有限公司),BYDCY-12S型水浴氮吹仪(上海秉越电子仪器有限公司)。

花椒药材的产地为四川省汉源县,购买于当地市场,经成都中医药大学吴纯洁教授鉴定为芸香科植物花椒 *Z. bungeanum* 的干燥成熟果皮;8-氨基萘-1,3,6-三磺酸(ANTS,上海迈瑞尔化学技术有限公司,批号77967084),氰基硼氢化钠[NaCNBH<sub>3</sub>,西亚化学科技(山东)有限公司,批号20210816],40%丙烯酰胺-甲叉丙烯酰胺(19:1)溶液(北京兰杰柯科技有限公司,批号21355670),硅胶60薄层板(德国默克公司,批号1.05626),葡萄糖对照品(四川省维克奇生物科技有限公司,批号wkq21011805,纯度≥98%),麦芽糖、麦芽三糖、麦芽四糖、麦芽五糖对照品(批号分别为428E022、0910E022、301G021、324E021,纯度分别为≥98%、≥98%、≥97%、≥97%)和3 U·mg<sup>-1</sup>纤维素酶、40 U·mg<sup>-1</sup>果胶酶、3 300 U·mg<sup>-1</sup>葡聚糖酶、60 U·g<sup>-1</sup>β-甘露糖酶(批号分别为618L027、115D0212、918P021、617K021)均购自北京索莱宝科技有限公司,三氟乙酸(TFA,上海麦克林生化科技有限公司,批号C12188857),苏木素染液、伊红染液(武汉赛维尔生物技术有限公司,批号分别为C191204、G1001),110 U·mg<sup>-1</sup>β-半乳糖苷酶(上海源叶生物科技有限公司,批号P19M9B56169),甲苯胺蓝(上海如吉科技发展有限公司,批号190410),D-半乳糖、三氯化铝(AlCl<sub>3</sub>)[西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司,批号分别为G0750、237051],水为超纯水,试剂均为分析纯。

SPF级雄性ICR小鼠,体质量(20±2)g,购自成都达硕实验动物有限责任公司,实验动物生产许可证号SCXK(川)2015-030。实验动物饲养于每12h明暗交替的动物房内,控制室内温度(23.0±2.0)℃和相对湿度(50±10)%,并给予标准饲料和饮用水。

本研究涉及的动物实验经山西中医药大学实验动物伦理委员会批准,批准号2021DW093。

## 2 方法

**2.1 花椒多糖的提取与精制<sup>[13]</sup>** 取干燥花椒粉末(过三号筛)20g,加20倍量95%乙醇回流2h除去油脂与色素,滤过,滤渣自然晾干,加入30倍量水于60℃超声提取40min(240W,40kHz);提取液滤过,减压浓缩至20mL,加入4倍量95%乙醇沉淀,置于4℃冷藏过夜;减压抽滤,沉淀经无水乙醇、乙醚和丙酮各洗涤3次,每次20mL,经冷冻干燥得到花椒多糖样品,计算得率2.6%。取花椒多糖适量,加水使溶解,制成质量浓度为5g·L<sup>-1</sup>的溶液用于结构特征分析。

### 2.2 花椒多糖抗AD作用研究

**2.2.1 AD模型的建立与给药** 小鼠随机分为5组,即空白组、模型组及花椒多糖低、中、高剂量组(100、200、400mg·kg<sup>-1</sup>),每组12只。采用腹腔注射D-半乳糖联合灌胃AlCl<sub>3</sub>建立快速衰老的AD小鼠模型。将D-半乳糖溶于灭菌的生理盐水中,得到12g·L<sup>-1</sup>溶液,按剂量60mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>腹腔注射,造成急速衰老模型。将AlCl<sub>3</sub>溶于灭菌的生理盐水中,得20g·L<sup>-1</sup>AlCl<sub>3</sub>溶液,按剂量100mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>灌胃给药,造模时间持续8周。造模4周后,开始灌胃给予花椒多糖,每日1次,持续4周。空白组腹腔注射和灌胃相同体积生理盐水。

**2.2.2 Morris水迷宫实验<sup>[15]</sup>** 将水迷宫等分为4个象限,随机取4个象限之一作为小鼠入水位置,平台置于其中1个象限中水平面下1cm。记录小鼠找到水下平台的时间(s),即逃避潜伏期。如果小鼠在120s内未找到平台,则由实验者牵引其至平台上,停留10s,逃避潜伏期记为120s。每只动物每天训练4次,连续训练5d。将平台撤除,开始120s的空间探索实验,将小鼠由原先平台象限的对侧放入水中。记录动物在目标象限(原先放置平台的象限)所花的时间和进入该象限的次数,作为空间记忆的检测指标。

**2.2.3 脑组织病理学和神经元损伤检查** Morris水迷宫实验结束后,处死小鼠,取脑组织,用4%多聚甲醛固定48h后,经组织脱水、透明、浸蜡、包埋、切片后进行常规苏木素-伊红(HE)染色和尼氏染色(甲苯胺蓝)。采集图像进行观察和分析,尼氏小体采用Image-Pro Plus 6.0软件进行计数。

### 2.3 花椒多糖特征性糖谱构建

**2.3.1 花椒多糖的部分酸水解** 取花椒多糖溶液

0.5 mL,加入 TFA 至其浓度为  $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (总体积为 1 mL),置  $80\text{ }^\circ\text{C}$  水浴恒温水解 5 h,反应结束后蒸干溶剂,残渣加甲醇洗涤 3 次以除去 TFA,用 60% 乙醇 0.5 mL 使溶解后用于 HPTLC 分析。以花椒多糖溶液不进行酸水解而直接溶于 60% 乙醇作为阴性对照。另取葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖、麦芽四糖、麦芽五糖对照品适量溶于 60% 乙醇作为对照品溶液。

**2.3.2 花椒多糖的酶解** 取花椒多糖溶液 0.5 mL,分别加入终浓度为  $20 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$  果胶酶、 $10 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$  纤维素酶、 $10 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$   $\beta$ -半乳糖苷酶、 $10 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$  葡聚糖酶和  $20 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$   $\beta$ -甘露糖酶(加入量均为 0.1 mL),随后将混合液置于  $37\text{ }^\circ\text{C}$  保温 16 h。利用  $80\text{ }^\circ\text{C}$  加热 10 min 使酶失活,于  $1219\times\text{g}$  离心 10 min,除去糖苷酶。上清液用氮吹仪吹干,得多糖酶解产物。以不加糖苷酶酶解的花椒多糖为阴性对照。酶解产物加 60% 乙醇 0.5 mL 使溶解后用于 HPTLC 分析。

**2.3.3 多糖酸水解和酶解产物的 ANTS 衍生化** 多糖酸水解或酶解产物经 ANTS 衍生化后用于 PACE 分析。ANTS 用乙酸-水(3:17)溶液配制成浓度为  $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的溶液。 $\text{NaCNBH}_3$  用二甲基亚砜(DMSO)溶解成浓度为  $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的溶液。酸水解、酶解产物或对照品中加入 ANTS 溶液和  $\text{NaCNBH}_3$  溶液各  $125 \mu\text{L}$ ,混匀,于  $1905\times\text{g}$  离心 10 min,除去沉淀, $37\text{ }^\circ\text{C}$  孵育 17 h, $35\text{ }^\circ\text{C}$  氮吹仪吹干。残渣加 25% 甘油  $500 \mu\text{L}$  使溶解,分装后  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  储存备用。另取葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖、麦芽四糖和麦芽五糖对照品适量,按上述处理方法制备对照品溶液。

**2.3.4 花椒多糖 HPTLC 特征性糖谱构建** 采用硅胶 60 高效薄层板,多糖酸水解和酶解产物样品溶液点样量  $5 \mu\text{L}$ ,展开剂乙酸乙酯-冰乙酸-水(2:2:1),展距 90 mm,晾干后用相同展开剂再次展开 95 mm,

采用苯胺-二苯胺-磷酸溶液(将苯胺 0.4 mL、二苯胺 0.4 g 和磷酸 2 mL 溶于 20 mL 丙酮中)显色,于  $105\text{ }^\circ\text{C}$  加热 10 min 后日光下检视。

**2.3.5 花椒多糖 PACE 特征性糖谱的构建<sup>[16]</sup>** 采用三羟甲基氨基甲烷(Tris,  $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )-硼酸缓冲液(pH 8.2)配制 34% 分离胶和 8% 浓缩胶(聚丙烯酰胺凝胶)。电泳缓冲液为  $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-硼酸缓冲液(pH 8.2),在  $0\text{ }^\circ\text{C}$  环境下进行,电泳缓冲液于  $0\text{ }^\circ\text{C}$  预冷后使用。对照品和样品上样量根据预试验确定(3~6  $\mu\text{L}$ ),电泳采用 15 mA 恒流至样品到凝胶前端(用 365 nm 紫外灯检视)。所有样品均至少重复电泳分析 3 次。凝胶在 365 nm 条件下成像,采用相机拍摄并分析。

**2.4 统计分析** 实验数据以  $\bar{x}\pm s$  表示。采用 GraphPad Prism 7 进行数据分析,组间差异比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), $P<0.05$  表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 花椒多糖对 AD 小鼠行为学的影响** 由表 1 可知,与空白组比较,从第 2 天起,模型组小鼠寻找到平台所需时间显著增加( $P<0.01$ ),表明 AD 模型成功建立。给予不同剂量花椒多糖后能明显减少 AD 小鼠寻找到平台所需时间,即逃避潜伏期随着训练时间的延长而明显缩短;第 2 天仅花椒多糖高剂量组与模型组比较,差异具有统计学意义( $P<0.05$ ),而从第 3 天起花椒多糖各剂量组与模型组比较,差异均具有统计学意义( $P<0.01$ )。同时,与模型组比较,花椒多糖中、高剂量组的小鼠穿梭平台次数明显增加( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),目标象限停留时间显著增加( $P<0.01$ )。以上实验结果表明花椒多糖可明显改善 AD 模型小鼠的学习和记忆能力。

表 1 花椒多糖对 AD 小鼠逃避潜伏期和空间探索能力的影响( $\bar{x}\pm s$ , $n=12$ )

Table 1 Effect of polysaccharides from Zanthoxyli Pericarpium on escape latency and spatial exploration ability of AD mice ( $\bar{x}\pm s$ , $n=12$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	逃避潜伏期/s					穿越平台数 /次	目标象限停留 时间/s
		第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天		
空白组		64.08±3.94	44.42±3.23	27.33±2.67	24.00±2.66	17.67±3.28	3.67±0.78	16.75±1.48
模型组		67.25±2.77	62.58±3.03 <sup>1)</sup>	55.00±3.10 <sup>1)</sup>	48.08±2.50 <sup>1)</sup>	43.33±4.25 <sup>1)</sup>	1.33±0.65 <sup>1)</sup>	7.83±1.53 <sup>1)</sup>
花椒多糖低剂量组	100	65.33±2.06	60.42±3.29	45.67±3.03 <sup>3)</sup>	40.67±3.52 <sup>3)</sup>	34.58±2.81 <sup>3)</sup>	1.42±0.51	8.83±1.47
花椒多糖中剂量组	200	65.17±3.27	59.17±4.22	40.42±4.34 <sup>3)</sup>	35.17±2.79 <sup>3)</sup>	32.33±3.17 <sup>3)</sup>	2.08±0.79 <sup>2)</sup>	12.75±1.54 <sup>3)</sup>
花椒多糖高剂量组	400	64.33±3.58	58.25±4.77 <sup>2)</sup>	39.33±2.90 <sup>3)</sup>	32.83±2.55 <sup>3)</sup>	26.75±1.91 <sup>3)</sup>	2.50±0.67 <sup>3)</sup>	14.83±1.53 <sup>3)</sup>

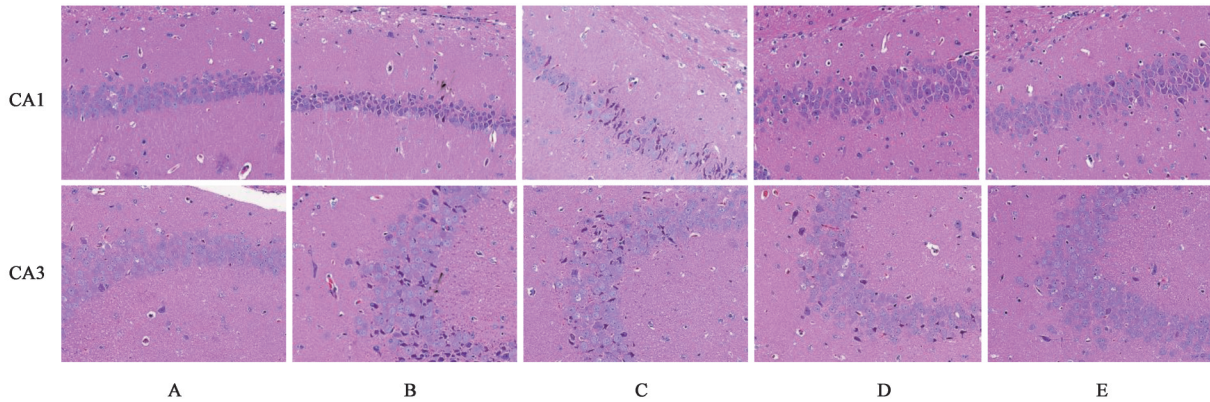
注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P<0.05$ ,<sup>3)</sup> $P<0.01$ (表 2 同)

**3.2 花椒多糖对 AD 小鼠海马组织病理情况的影响** 由图 1 可知,空白组小鼠海马 CA1 和 CA3 区神

经元有完整的结构、整齐的排列和清晰的层次,而模型组小鼠的海马神经元显示出皱缩变形、细胞核

固缩、染色加深和异常排列等病理现象。给予不同剂量花椒多糖后,小鼠海马CA1、CA3区神经元的

排列较为整齐,神经元收缩、畸形等现象得到明显缓解。



注:A.空白组;B.模型组;C.花椒多糖低剂量组;D.花椒多糖中剂量组;E.花椒多糖高剂量组(图2同)

图1 花椒多糖对AD小鼠海马组织病理情况的影响(HE,×40)

Fig. 1 Effect of polysaccharides from Zanthoxyli Pericarpium on hippocampus pathological changes of AD mice(HE,×40)

**3.3 花椒多糖对AD小鼠神经元的保护作用** 小鼠海马组织尼氏染色结果见图2和表2。结果与空白组比较,模型组海马组织CA1和CA3区尼氏小体数量显著降低( $P<0.01$ ),表明模型组小鼠脑海马组织

CA1、CA3区神经元明显损伤。与模型组比较,花椒多糖中、高剂量组的CA1和CA3区尼氏小体数量显著增加( $P<0.01$ ),提示花椒多糖可明显减轻AD小鼠脑海马组织的神经元损伤。

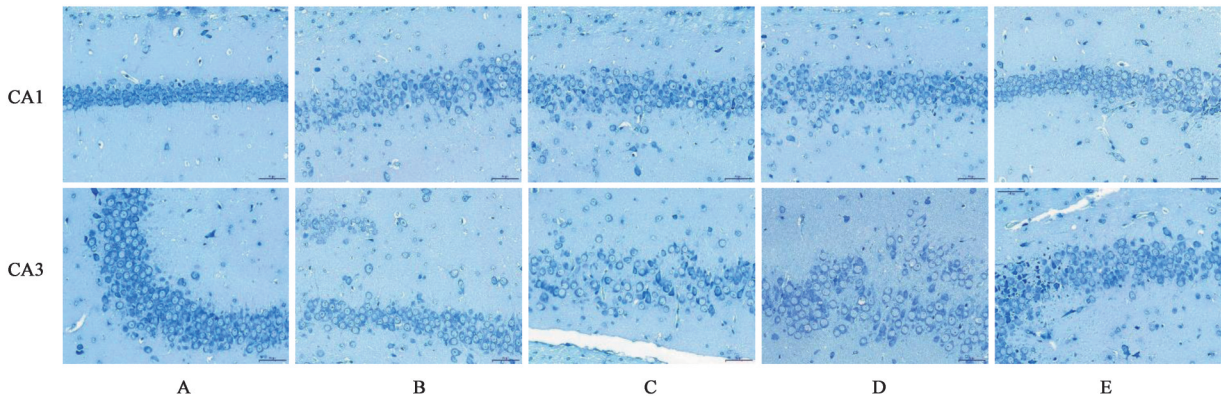


图2 花椒多糖对AD小鼠神经元的保护作用(Nissl,×40)

Fig. 2 Protective effect of polysaccharides from Zanthoxyli Pericarpium on neurons of AD mice (Nissl,×40)

表2 各组小鼠海马组织切片的尼氏小体数分析( $\bar{x}\pm s, n=12$ )

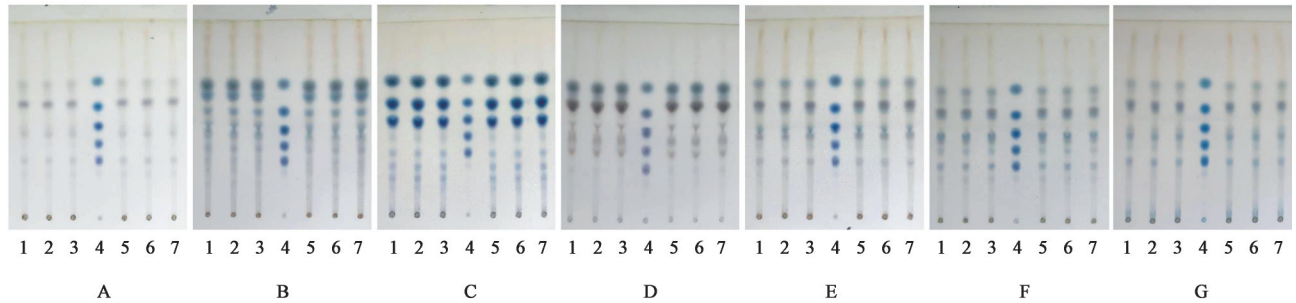
Table 2 Number of Nissl corpuscles in hippocampal slices of mice from each group ( $\bar{x}\pm s, n=12$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	尼氏小体数量/个	
		CA1区	CA3区
空白组		134.17±22.83	93.50±16.19
模型组		31.33±8.15 <sup>1)</sup>	44.25±18.87 <sup>1)</sup>
花椒多糖低剂量组	100	44.17±11.71	55.33±14.22
花椒多糖中剂量组	200	70.33±17.05 <sup>3)</sup>	69.25±11.67 <sup>3)</sup>
花椒多糖高剂量组	400	89.67±13.01 <sup>3)</sup>	76.42±10.18 <sup>3)</sup>

**3.4 花椒多糖HPTLC特征性糖谱分析** 由图3A可知,未水解花椒多糖中含有少量小分子糖类。如图3B所示,花椒多糖经部分酸水解后得到不同寡糖

片段,斑点颜色深度、数量与未水解花椒多糖比较有明显差异。与寡糖对照品比较可知,寡糖片段主要由1~4个单糖组成。由图3C-图3E可知,花椒多糖可被纤维素酶和果胶酶酶解,酶解后与未水解的花椒多糖比较差异明显。通过与寡糖对照品比较可知,纤维素酶酶解的样品中有超过5个单糖组成的寡糖。从斑点颜色深浅可知,花椒多糖中含有能被纤维素酶和果胶酶酶解的糖苷键,酶解生成的寡糖片段较多;而葡聚糖酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶和 $\beta$ -甘露糖酶酶解的花椒多糖之间差异较小,与未水解的花椒多糖比较差异也较小,说明花椒多糖可能不含能被这3个糖苷酶酶解的糖苷键或相关成分含量较少。不同样品的HPTLC特征性糖谱差异见图4,通过

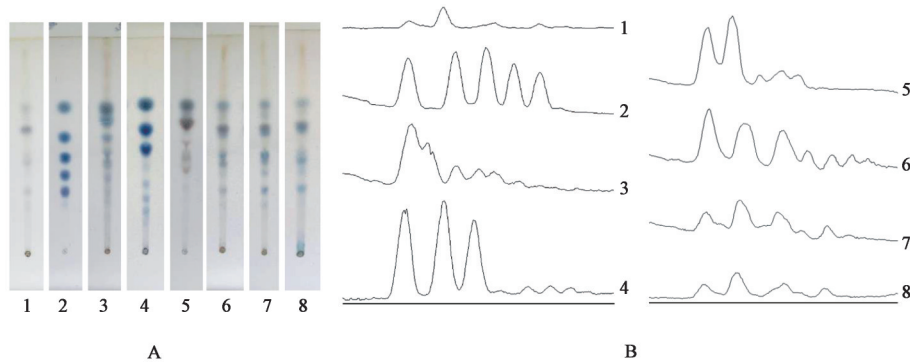
ImageJ 1.51j8 软件分析得到的色谱图可以清晰地比较不同水解样品间的差异。



注:A.未水解;B.酸水解;C.纤维素酶酶解;D.果胶酶酶解;E.葡聚糖酶酶解;F.β-半乳糖苷酶酶解;G.β-甘露糖酶酶解;4.寡糖对照品(从上到下依次为葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖、麦芽四糖和麦芽五糖);1~3,5~7.供试品(图5同)

图3 花椒多糖不同水解方式样品的HPTLC特征性糖谱

Fig. 3 HPTLC characteristic sugar spectrum of polysaccharides from Zanthoxyli Pericarpium by different hydrolysis methods



注:A.花椒多糖不同水解方式特征性图谱;B.斑点或条带分析色谱图;1.未水解样品;2.寡糖对照品;3.酸水解样品;4.纤维素酶酶解样品;5.果胶酶酶解样品;6.葡聚糖酶酶解样品;7.β-半乳糖苷酶酶解样品;8.β-甘露糖酶酶解样品(图6同)

图4 不同水解方式花椒多糖的HPTLC特征性糖谱比较

Fig. 4 Comparison of characteristic sugar spectrum of polysaccharides from Zanthoxyli Pericarpium by different hydrolysis methods

3.5 花椒多糖 PACE 特征性糖谱分析 由图 5 可知,PACE 分析结果与 HPTLC 分析结果一致,且 PACE 分析灵敏度更高,条带数量多于 HPTLC 斑点且分离效果更好。酸水解花椒多糖条带与 HPTLC 分析结果比较,分离度和清晰度明显提高。由图 6 可知,花椒多糖主要含有能被纤维素酶和果胶酶酶解的多糖,通过与寡糖对照品比较,被这 2 种

糖苷酶酶解后所得片段均有超过 5 个单糖组成的寡糖,且条带明显。与 HPTLC 分析结果比较,PACE 分析发现葡聚糖酶、β-半乳糖苷酶和 β-甘露糖酶酶解样品之间有一定差异,与未水解样品比较也差异明显,但条带亮度较低,说明花椒多糖含有能被上述 3 种酶酶解的多糖,但酶解得到的寡糖片段较少。

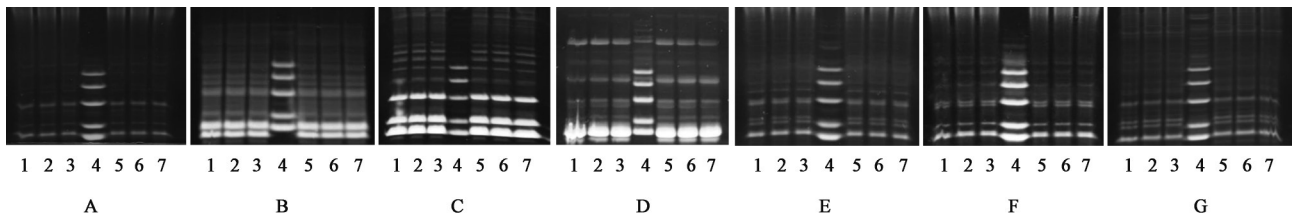


图5 花椒多糖不同水解方式样品的PACE特征性糖谱

Fig. 5 PACE characteristic sugar spectrum of polysaccharides from Zanthoxyli Pericarpium by different hydrolysis methods

#### 4 讨论

本文研究发现花椒多糖对腹腔注射 D-半乳糖联合灌胃 AlCl<sub>3</sub> 诱导的 AD 模型小鼠具有明显的治疗作用,能够改善 AD 小鼠的学习记忆能力,缩短逃

避潜伏期,增加穿梭平台次数和目标象限停留时间,改善海马组织病理情况和神经元的损伤。糖谱法分析发现花椒多糖主要含有 β-1,4-葡萄糖苷键和 α-1,4-半乳糖醛酸苷键,仅含少量 α-1,6-葡萄糖苷

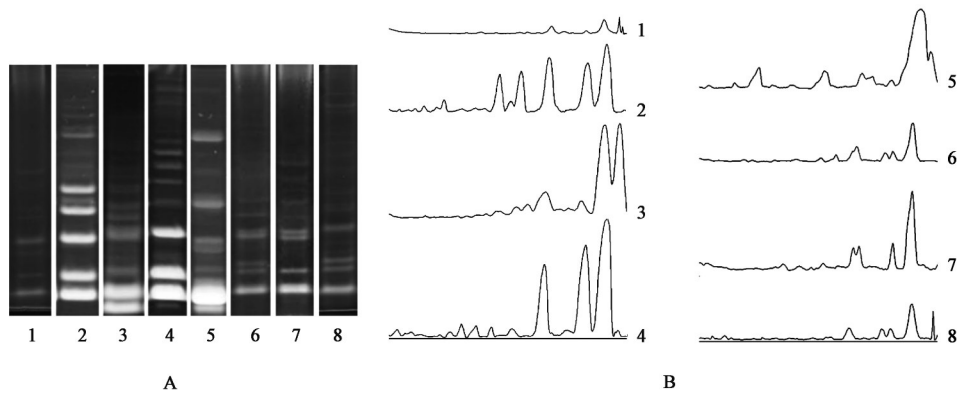


图6 不同水解方式花椒多糖的PACE特征性糖谱比较

Fig. 6 Comparison of characteristic sugar spectrum of polysaccharides from *Zanthoxyl Pericarpium* by different hydrolysis methods

键、 $\beta$ -吡喃半乳糖苷键和 $\beta$ -1,4-甘露糖苷键。以上实验结果表明,花椒多糖对AD小鼠具有明显治疗作用,该作用与其多糖结构特征密切相关,而糖谱法能有效地分析并获取多糖所含的糖苷键类型。

AD的病因及发病机制较为复杂,研究所用动物模型的制备方法较多,如转基因动物模型、*D*-半乳糖造模、自然衰老模型、胆碱能系统损伤模型等<sup>[17]</sup>。通过腹腔注射*D*-半乳糖联合灌胃 $\text{AlCl}_3$ 制备的AD小鼠模型是国内外广泛认可的研究AD常用模型之一<sup>[17-19]</sup>。Al是导致AD发病的原因之一,可以干扰脑细胞的正常活动,破坏神经元结构,形成神经纤维缠结,导致中枢神经系统功能障碍<sup>[20]</sup>。此外, $\text{Al}^{3+}$ 能够促进脂质过氧化,导致炎症反应,使神经细胞损伤,也可以诱导 $\alpha$ -分泌酶和 $\beta$ -分泌酶活性不均衡<sup>[21]</sup>。*D*-半乳糖的代谢产物半乳糖醇不能被机体代谢而堆积在细胞内,导致细胞内代谢功能紊乱,活性氧增多,产生氧化损伤,造成神经元结构和功能的变化,导致AD模型形成<sup>[22-23]</sup>。*D*-半乳糖和 $\text{AlCl}_3$ 致AD模型在神经原纤维缠结、老年斑及对胆碱能系统的损伤等方面与AD的病理改变极为相似,能较好地模拟AD发病机制。相较于其他模型制备方法,具有价格低、操作简单、重复性较高等特点<sup>[17]</sup>。本研究通过腹腔注射*D*-半乳糖同时灌胃 $\text{AlCl}_3$ 成功复制了快速衰老的AD小鼠模型,并对花椒多糖的抗AD作用进行了研究,结果发现花椒多糖能改善AD小鼠的学习记忆能力,减轻模型小鼠大脑海马组织病理状态和神经元损伤。

多糖是自然界中重要的活性生物大分子,与中药的功效密切相关,近年来已有不少研究报道了中药多糖对AD有显著治疗作用<sup>[24-26]</sup>。然而,多糖结构鉴定难度较大,且在分离纯化过程中易发生结构变化而使多糖活性消失。传统的结构鉴定多针对

部分纯化得到的多糖,难以从整体上分析多糖的结构特征<sup>[27]</sup>。糖谱法是近年来提出的研究多糖质量控制的新方法,是通过酶切技术(或酸水解)联用各种色谱或波谱分析技术,结合多糖活性评价实现基于活性结构特征的多糖定性、定量分析的新技术<sup>[28]</sup>。其是针对多糖结构特征的代表方法,具有特异性强、选择性高的特点,尤其是联用PACE分析具有高效分离能力和高通量处理能力等优势,灵敏度明显优于常用的示差折光检测器和蒸发光散射检测器<sup>[29]</sup>。本课题组前期已对花椒多糖的提取工艺、单糖组成、相对分子量分布及红外光谱等进行了研究<sup>[13]</sup>,在此基础上,本研究进一步采用5种特异性糖苷酶酶解花椒多糖,并结合HPTLC和PACE分析花椒多糖的结构特征,获取其所含糖苷键类型。

本研究采用纤维素酶、果胶酶、葡聚糖酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶和 $\beta$ -甘露糖酶5种特异性糖苷酶对花椒多糖进行酶解和结构分析。纤维素酶是可降解纤维素的一类复杂酶系的总称,在细菌、真菌、放线菌中都有大量的分布,能作用于纤维素中的 $\beta$ -1,4-葡萄糖苷键<sup>[30]</sup>。果胶酶是指所有能催化分解果胶质的一类酶的总称,能催化果胶和其他半乳糖醛酸中的 $\alpha$ -1,4-半乳糖醛酸苷键随机水解<sup>[31-32]</sup>。葡聚糖酶,又称右旋糖酐酶,能选择性水解葡聚糖中 $\alpha$ -1,6-糖苷键产生异麦芽寡糖,已被广泛应用于食品、化工和医药行业<sup>[33-34]</sup>。 $\beta$ -半乳糖苷酶广泛存在于微生物、植物、动物等的细胞中,能够从 $\beta$ -*D*-半乳糖或寡聚糖支链非还原末端切除 $\beta$ -*D*-半乳糖残基<sup>[35-36]</sup>。 $\beta$ -甘露糖酶能够随机催化甘露聚糖、半乳糖甘露聚糖、葡甘聚糖和半乳糖甘露聚糖的 $\beta$ -1,4-甘露糖苷键水解的半纤维素酶类<sup>[37-38]</sup>。本文研究结果表明,花椒多糖主要能够被纤维素酶、果胶酶催化水解成小分子糖类化合物,并且能被 $\beta$ -半乳糖苷酶、 $\beta$ -甘露糖酶、

葡聚糖酶少量水解,说明花椒多糖主要含有 $\beta$ -1,4-葡萄糖苷键和 $\alpha$ -1,4-半乳糖醛酸苷键,仅含有少量 $\alpha$ -1,6-葡萄糖苷键、 $\beta$ -吡喃半乳糖苷键和 $\beta$ -1,4-甘露糖苷键等。

综上所述,本研究通过动物实验进一步明确了花椒多糖对AD的治疗作用,并通过酸水解、特异性糖苷酶酶解结合HPTLC、PACE分析了花椒多糖的结构特征,初步明确了其所含糖苷键类型。但花椒多糖抗AD的作用机制尚不明确,后续将从动物、细胞、分子水平展开相关实验研究,同时,花椒多糖与其抗AD作用之间的构效关系也需要进一步研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] 曹鑫馨,董秤均,杨燕,等. 黄连解毒汤对 $A\beta_{1-42}$ 诱导AD大鼠学习记忆能力及胆碱能系统的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(10): 23-30.
- [2] 王虎平,米彩云. 基于“三阴并调”探析黑逍遥散调控肠道菌群TMA/FMO3/TMAO代谢通路防治AD的思路与策略[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(8): 248-254.
- [3] 王非凡,张丹参,景永帅. 生物活性多糖在防治阿尔茨海默病中的作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2019, 33(6): 471.
- [4] 张萌萌,李朝敏,吴博,等. 花椒HPLC指纹图谱建立及指标性成分的测定[J]. 中国调味品, 2019, 44(3): 152-155, 184.
- [5] 李春丽,孟宪华,尚贤毅,等. 花椒化学成分及其抗氧化活性[J]. 中草药, 2021, 52(10): 2869-2875.
- [6] 吴妍,杨秀芳,曹晓晖,等. 大红袍花椒化学成分的研究[J]. 中成药, 2018, 40(2): 379-382.
- [7] 席少阳,郭延秀,马晓辉,等. 花椒化学成分及药理作用的研究进展[J]. 华西药学杂志, 2021, 36(6): 717-722.
- [8] 张红,杨庆,陈颖,等. 中药花椒化学成分及其防治神经精神疾病的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2021, 33(11): 1969-1981.
- [9] 许静. 传统香辛料中抑制乙酰胆碱酯酶活性成分的分选纯化研究[D]. 上海:上海应用技术大学, 2019.
- [10] 李焰梅,郝丹,蒋献. 山椒素药理学研究进展[J]. 中国药理学通报, 2019, 35(2): 172-175.
- [11] LIU Y J, MENG X L, SUN L, et al. Protective effects of hydroxy- $\alpha$ -sanshool from the pericarp of *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. on D-galactose/ $AlCl_3$ -induced Alzheimer's disease-like mice via Nrf2/HO-1 signaling pathways[J]. Eur J Pharmacol, 2022, 914: 174691.
- [12] 李谷才,袁立华,张儒,等. 花椒水溶性多糖的提取及其体外抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2011, 32(8): 258-260.
- [13] CHEN L, HU M B, CHEN Z Y, et al. Preparation, structural characterization and neuroprotective effects of polysaccharides from the pericarp of *Zanthoxylum bungeanum* Maxim against  $H_2O_2$ -induced oxidative damage in PC12 cells [J]. S Afr J Bot, 2021, 142: 165-174.
- [14] 万晓莹,刘振丽,宋志前,等. 中药多糖定性鉴别与糖谱的研究进展[J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27(5): 876-881.
- [15] ZHANG M M, XIE M G, WEI D N, et al. Hydroxy- $\alpha$ -sanshool isolated from *Zanthoxylum bungeanum* attenuates learning and memory impairments in scopolamine-treated mice [J]. Food Funct, 2019, 10(11): 7315-7324.
- [16] 韩邦兴,陈凌霄,邓勇,等. 糖谱法结合多元色谱分析比较铁皮石斛功能性多糖结构特征[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(1): 41-49.
- [17] 陈建国,江祺川,温博,等. Deoxygedunin对D-半乳糖联合 $AlCl_3$ 诱导大鼠阿尔茨海默病病理改变的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2018, 34(6): 496-500, 561, 582.
- [18] 罗雅琪,郭志清,戴瑛,等. 四氢姜黄素固体分散体对D-半乳糖联合三氯化铝致小鼠学习记忆障碍的作用研究[J]. 中药药理与临床, 2018, 34(6): 38-42.
- [19] CHIROMA S M, BAHARULDIN M T H, TAIB C N M, et al. *Centella asiatica* protects D-galactose/ $AlCl_3$  mediated Alzheimer's disease-like rats via PP2A/GSK-3 $\beta$  signaling pathway in their hippocampus [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(8): 1871.
- [20] 谭银丰,李永辉,张俊清,等. 咖啡渣提取物对老年痴呆模型小鼠学习记忆能力的影响[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(18): 5175-5176.
- [21] 罗晓敏,张博宇,丁翼,等. 二十五味珊瑚丸调控Akt/mTOR/GSK-3 $\beta$ 信号通路改善阿尔茨海默病小鼠的作用机制[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(8): 2074-2081.
- [22] 马赫佟,祝洪艳,郜玉钢,等. 人参茎叶三醇组皂苷酶解产物对三氯化铝/D-半乳糖诱导的阿尔茨海默症小鼠治疗作用的研究[J]. 中药材, 2019, 42(6): 1380-1386.
- [23] 方佳慧,刘嘉玮,姜郁昕,等. 五味子根、茎、叶、果多糖对D-半乳糖致衰老小鼠运动耐力的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(11): 102-109.
- [24] ZHOU X B, ZHANG Y X, JIANG Y Q, et al. *Poria cocos* polysaccharide attenuates damage of nervus in

- Alzheimer's disease rat model induced by *D*-galactose and aluminum trichloride [J]. *Neuroreport*, 2021, 32(8): 727-737.
- [25] 凌军军. 红芪多糖通过 PRKCB/ERK 通路对  $A\beta_{25-35}$  致 PC12 细胞凋亡的保护作用[D]. 广州: 南方医科大学, 2018.
- [26] 王爱梅, 陈亚奇, 李旻, 等. 山茱萸多糖对衰老模型大鼠学习记忆能力及海马突触可塑性的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(13): 131-136.
- [27] 王莹, 金红宇, 丁侃, 等. 中药多糖质量控制体系初探[J]. *药物分析杂志*, 2021, 41(10): 1670-1680.
- [28] 李绍平, 吴定涛, 赵静. 糖谱及其在中药多糖质量控制中的应用[J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(17): 3505-3513.
- [29] ZHU B J, YAN Z Y, HONG L, et al. Quality evaluation of *Salvia miltiorrhiza* from different geographical origins in China based on qualitative and quantitative saccharide mapping and chemometrics[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, 191: 113583.
- [30] 王丰园, 金海炎, 丁凌飞, 等. 纤维素酶及其活性提升研究进展[J]. *现代农村科技*, 2022(3): 65-68.
- [31] 田英华, 刘晓兰, 郑喜群, 等. 果胶酶及其在食品加工中的应用研究进展[J]. *中国酿造*, 2017, 36(3): 10-13.
- [32] CHENG F S, SHENG J P, CAI T, et al. A protease-insensitive feruloyl esterase from China Holstein cow rumen metagenomic library: Expression, characterization, and utilization in ferulic acid release from wheat straw [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(10): 2546-2553.
- [33] 刘乐, 丁一, 王紫玄, 等. 海洋氧化节杆菌 KQ11 右旋糖苷酶催化位点关键氨基酸[J]. *食品科学*, 2019, 40(6): 113-120.
- [34] GONG G H, ZHENG Z M, LIU H, et al. Purification and characterization of a  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus niger* and its application in the hydrolysis of geniposide to genipin [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2014, 24(6): 788-794.
- [35] 吴昊, 齐崑, 尤生萍, 等. 基于  $\beta$ -半乳糖苷酶的低聚半乳糖制备研究进展[J]. *中国食品学报*, 2022, 22(3): 329-341.
- [36] 李军玲, 闫双勇, 张融雪, 等. 植物  $\beta$ -半乳糖苷酶研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2020, 48(1): 15-18.
- [37] 赵文鹏, 李浩, 王筱兰. 豆豉中  $\beta$ -甘露聚糖酶高产菌的分离、鉴定及其酶学性质[J]. *江西师范大学学报: 自然科学版*, 2020, 44(2): 196-201.
- [38] BEHERA S, DEV M J, SINGHAL R S. Cross-linked  $\beta$ -mannanase aggregates: Preparation, characterization, and application for producing partially hydrolyzed guar gum [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2022, 194(5): 1981-2004.

[责任编辑 刘德文]