

红豆杉多糖的生物活性及其提取纯化研究进展

叶佐武¹, 杨秀丽¹, 石佳娜¹, 黄萍^{1,2*} (1.浙江省立同德医院药剂科, 杭州 310012; 2.浙江省中医药研究院, 杭州 310007)

摘要: 目的 介绍红豆杉多糖的生物活性及其提取纯化研究进展, 为红豆杉资源的进一步利用提供依据。方法 通过查阅近 10 年的国内外文献, 对红豆杉多糖的生物活性及其提取纯化进行概述。结果 红豆杉多糖具有免疫调节、抗肿瘤、减轻缺血再灌注导致的心肌损伤等作用; 红豆杉多糖提取纯化工艺取得一定的进展, 可采用组织破碎提取法、超声波提取等方法进行提取, 并利用树脂法、双氧水法等方法进行纯化。结论 红豆杉多糖的研究和开发利用具有广阔的前景, 但其提取、分离和纯化技术有待进一步研究。

关键词: 红豆杉多糖; 生物活性; 纯化

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2013)05-0549-04

The Development of Biological Activity and Study on Extraction and Purification for Taxus Polysaccharides

YE Zuowu¹, YANG Xiuli¹, SHI Jiana¹, HUANG Ping^{1,2*} (1. Tongde Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou 310012, China; 2. Traditional Chinese Medicine Research Institute of Zhejiang Province, Hangzhou 310007, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To review the development of study on biological activity, extraction and purification for Taxus polysaccharides. **METHODS** To summarize the biological activity and the technique of extraction and purification of Taxus polysaccharides by reviewing the domestic and foreign articles in the past ten years. **RESULTS** There are multiple functions for Taxus polysaccharides such as adjusting immunity, anti tumor, alleviating ischemia reperfusion injury on myocardium, and so on. A certain development has been approached on the technique of extraction and purification for Taxus polysaccharides. The extraction methods of tissue crush and ultrasonic wave are recommended. And purification ways of peucine and hydrogen peroxide are selectable. **CONCLUSION** There are broad prospects on the study and exploitation of Taxus polysaccharides. The techniques of extraction, separation and purification, however, are worth further research.

KEY WORDS: Taxus polysaccharides; biological activity; purification

多糖是广泛存在于有机体内的一种重要的信号或信息分子的受体, 它参与分子识别、细胞粘附以及机体防御等过程的调节, 表现出多样的生物活性, 如免疫调节、抗肿瘤、抗病毒、降血糖、降血脂、抗衰老和保护肝脏等^[1]。

近年来, 由于从红豆杉科红豆杉属植物中发现了紫杉醇这一著名的抗肿瘤天然产物, 红豆杉属植物成为近 30 年的研究热点^[2-3]。研究者从红豆杉叶中发现并分离纯化得到一种大分子生物活性物质——红豆杉多糖, 实验明确了该多糖具有抗肿瘤和提高免疫力等方面作用, 本文对红豆杉多糖的生物活性及其提取纯化进展进行综述。

1 红豆杉多糖生物活性研究

1.1 免疫调节作用

植物多糖最重要的药理作用是免疫促进功能^[4-6]。李循等^[7]通过对小鼠 T 淋巴细胞转化及 B 淋巴细胞转化测定、巨噬细胞吞噬功能测定、T 细胞亚群 CD3、CD4、CD8 和 NK 细胞活性测定等方式, 证实了红豆杉多糖可以提高荷瘤小鼠的免疫细胞功能, 能够明显提高 CTX 所减低的小鼠 T、B 淋巴细胞转化功能和巨噬细胞吞噬作用, 表明了红豆杉多糖是对免疫功能有较好的促进作用。免疫调节作用使红豆杉多糖表现出一定的抗肿瘤作用, 在促进巨噬细胞吞噬功能的非特异性免疫活性的基础上, 使巨噬细胞处理和传递抗原的能力增强, 提高了抗体的水平。

1.2 抗肿瘤作用

多糖的抗肿瘤作用主要是提高宿主的免疫功

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(Y2110933)

作者简介: 叶佐武, 男, 主管药师 Tel: (0571)89972238
Tel: (0571)89972233 E-mail: huangpwly@sina.com

E-mail: yezuowu@126.com

*通信作者: 黄萍, 女, 硕士, 主任药师, 硕

能、改变细胞膜生化特性和诱导肿瘤细胞凋亡等因素,同时多糖类药物用于抗肿瘤,可以克服化疗、放疗过程中对正常细胞的损伤。

吴绵斌等^[8]从南方红豆杉中提取出多糖组分,进行了相关的结构鉴定,并通过体外和体内试验研究了其抗肿瘤效果,实验证实了红豆杉多糖对 S180 肉瘤、HepA 肺癌和 Lewis 肺癌具有一定的抑制作用,可以提高荷瘤小鼠的生命延长率,明显提高整体动物的机体耐受力以及延长动物常压缺氧的存活时间;实验表明红豆杉多糖和紫杉醇、巴卡亭等有效组分进行合理的配伍,可以大幅度提高紫杉醇的抗肿瘤效果,这为开发新型的多组分天然红豆杉抗肿瘤制剂打下了坚实的基础。

张贵明等^[9]在红豆杉多糖抗肿瘤方面进行了相关研究,结果表明,红豆杉多糖在治疗肿瘤时,不像一般化疗药物直接杀死生长的肿瘤细胞,而是促进细胞体液免疫反应,如激活巨噬细胞,对正常细胞影响很小。多糖应用于治疗代谢、感染及癌症等方面的例子不断增加。多糖类抗肿瘤药物,不仅价格低廉,而且安全无毒,服用方便,需求量和应用范围都将会超过紫杉醇^[10]。

Yuan 等^[11]在红豆杉中分离得到两个精多糖 TMP90W 和 TMP90S,活性测试结果表明,TMP90W 对人乳腺癌细胞 MCF-7 和人肺癌细胞 A549 均具有一定的抑制作用,且为浓度依赖性。红豆杉多糖 TMP90W 作为抗肿瘤或辅助抗肿瘤候选药物具有很大的潜力。

1.3 对心肌缺血再灌注损伤的影响

心肌缺血再灌注损伤(myocardium ischemia-reperfusion injury, MIRI)导致的心律失常、心肌顿抑等是临床心脏病患者猝死的常见原因。红豆杉多糖可以减轻缺血再灌注导致的心肌损伤,这将为开发红豆杉多糖为主要原料的天然心脏保护药物打下坚实的基础。

朱天民等^[12]观察了红豆杉多糖对 MIRI 导致的左室舒张功能及心肌梗死质量的影响。首次证实红豆杉多糖对 MIRI 导致的心肌舒张功能障碍及心肌损伤具有保护作用。提出了红豆杉多糖可能通过降低心肌组织 NADPH 氧化酶 NCF-47K mRNA 表达,升高 SOD 活性,减少 O_2^+ 等氧自由基对心肌细胞的损伤,减轻缺血再灌注导致的心肌损伤^[13]。同时,该课题组通过进一步实验,明确红豆杉多糖可抑制缺血再灌注导致的心肌细胞

凋亡,其机制可能与降低心肌组织 MCP-1 蛋白表达及 NO 水平以及抑制 Fas mRNA 及蛋白表达有关^[14-15]。

李辉等^[16]将比格犬随机分组建立 MIRI 模型,观察红豆杉多糖对犬 MIRI 模型心肌组织损伤及超微结构变化的影响,光镜观察心肌组织损伤病理改变,日立 H-600IV 型透射电子显微镜观察心肌细胞超微结构的改变。光镜及透射电镜均证实红豆杉多糖具有减轻 MIRI 的作用,该作用可能与其保护线粒体、胞核、肌丝及抑制心肌细胞凋亡有关。

2 红豆杉多糖提取纯化研究进展

2.1 红豆杉多糖含量研究

南方红豆杉提取紫杉醇后基本被废弃,既浪费资源,又污染环境。南方红豆杉中富含活性多糖。吴绵斌等^[17]采用水提醇沉法从南方红豆杉枝叶中得到红豆杉总多糖,经 DEAE-Sephrose FF 阴离子交换色谱分离得到 3 种酸性多糖,分别命名为红豆杉多糖-1(PTM-1)、红豆杉多糖-2(PTM-2)和红豆杉多糖-3(PTM-3)。早前有研究者探究过红豆杉种子的成分,其干重种子粗蛋白、粗脂肪、淀粉、可溶性糖的含量分别为 9.92%, 72.86%, 4.15%, 0.38%, 氨基酸含量为 9.10%, 种子脂肪酸组成以不饱和的油酸和亚油酸为主,其相对含量为 48.4% 和 42.2%^[18]。

金莉莉^[19]对同一批次的延边红豆杉树皮进行了多糖含量测定,观察多糖提取中 SEVAG 法、TCA 除蛋白质的效果,应用苯酚-硫酸法测定多糖的含量,测定波长为 490 nm。测得样品中粗多糖的产率为 25.9%, 2 种除蛋白质的方法中 TCA 法可达到较高的脱蛋白率,精制多糖的含量为 76.0%。

江蕾等^[20]采用红外光谱进行分析,表明红豆杉多糖为吡喃型的酸性杂多糖,通过密度梯度超速离心分离发现它有明显的 4 个条带,大致认为是 4 个不同的多糖组分。收集得到组分 TM-1。测得其比旋光度为 +65.3°;经 HPLC 凝胶色谱,显示它是单一组分,其分子量约为 317 000;完全酸水解后 HPLC 分析表明 TM-1 主要由 D-岩藻糖、D-葡萄糖、鼠李糖、D-木糖、D-甘露糖、D-半乳糖和 L(+)-阿拉伯糖等七种单糖组成,其中 D-木糖最多,占 41.47%, D-半乳糖次之,占 19.77%。

另有研究报道^[21],对红豆杉枝叶初步处理后,用热水浸提后,透析纯化得到的粗糖,得到 T1 多糖,分子量在 344 万道尔顿, T1 多糖包括 2,4-二

甲基甘露糖、鼠李糖、树胶醛糖、木糖、半乳糖、甘露糖、半乳糖醛酸和葡萄糖醛酸，它们的比例是 2:5:24:9:3:46:1:10，乙酰基的含量大概在 2.1%。

2.2 红豆杉多糖浸提工艺研究

粗糖提取的方法目前主要是：煎煮法、回流法、浸渍法、蒸馏法、渗漉法、连续回流法、超临界萃取技术、超声提取技术、微波萃取技术、破碎提取法。以上各种传统的提取方法都有一定的利弊。“组织破碎提取法”是刘延泽教授^[22]在国内率先提出的用于中草药化学成分提取的一种新方法；与传统方法相比，它具有高效、快速、不需加热、不破坏成分、适宜多数溶剂等突出优势，值得推广运用。

江蕾等^[20]的研究指出，将多糖的浸提过程分为三个阶段：起始阶段，饱和扩散阶段，不饱和扩散阶段。第一和第三阶段影响很小，对第二阶段根据物料衡算建立了动力学模型为： $\ln[C_k/(C_k-c)]=k_1(t-t_1)$ 模型计算值与实验数据吻合良好。在采用热水浸提中，对浸提效果影响大小的顺序为：料水比>浸提温度>浸提时间。在综合正交试验以及充分考虑经济因素的情况下，最终确定了红豆杉多糖在二次水提法的最佳工艺条件为：料液比 1:25，浸提温度 90℃，浸提时间 150 min，多糖提取率约为 11.9%。

张贵明^[9]的研究中，尝试采用超声波法对红豆杉多糖进行提取，并对脱蛋白、脱色多糖纯化方法进行研究，即传统的纯化方法与现代的树脂纯化方法进行比较，优选和确定了多糖纯化的工艺条件：正交实验所得最佳组合为超声提取的最优组合，即料液比 1:20，浸提温度 50℃，浸提时间 20 min。首次利用超声提取和树脂纯化对红豆杉多糖进行富集、纯化和分离，避免和解决了传统制备方法造成的环境污染和溶剂浪费，为制备方法的现代化、产物(品)的标准化提供有利条件。

粗糖脱蛋白有多种方法，比如 Sevege 法除蛋白，TCA 法除蛋白，树脂法。常用的脱色方法有：离子交换法、氧化法、金属络合物法、吸附法(纤维素、硅藻土、活性炭等)。

大孔吸附树脂是近年来新发展起来的一种有机高分子聚合物吸附剂，其应用日趋广泛，特别是在天然产物的分离纯化方面逐渐显示出其优越性^[23]。张贵明^[9]的研究中，大孔吸附树脂需先进行

预处理，用水除去水溶性杂质，用有机溶剂除去脂溶性杂质，再用吸附介质除去残留的其他溶剂。然后用不同型号的大孔吸附树脂分别对红豆杉多糖进行脱蛋白、脱色纯化，蛋白脱除率为 97.42%，脱色率为 58.53%，取得比较满意的效果。

吴绵斌^[17,21]研究报道，通过对红豆杉粗多糖纯化工艺的实验研究，建立了一套完整的纯化技术方案，利用双氧水进行脱色效果可达 60.4%，糖保留率 84.7%，比活性炭和树脂都要好，但同时由于其具有比较强的氧化性，可能对多糖结构有一定的影响，有待进一步研究。

3 总结与展望

红豆杉(*Taxus mairei*)是古老树种，不仅是重要的用材树种及观赏树种，更是珍贵的药用植物^[24]。在 20 世纪 90 年代，美国肿瘤研究所已发现从红豆杉根、皮、枝、叶中提取的紫杉醇可治疗癌症、白血病及艾滋病^[25]。由美国施贵宝公司开发的紫杉醇原料为太平洋紫杉的树皮，是细胞抑制剂类抗肿瘤药物，可干扰癌细胞的微蛋白合成从而发挥抑癌作用^[26]。目前关于红豆杉抗肿瘤的研究主要集中在紫杉烷类化合物，特别是紫杉醇方面。红豆杉在世界范围内不仅含量少，而且生长缓慢，而红豆杉在被提取紫杉醇后基本被废弃，既浪费了资源又污染了环境。

目前红豆杉多糖的应用价值和经济价值已经崭露头角，但是由于红豆杉多糖结构及构效关系复杂，给进一步研究带来困难，随着分离和分析技术的改进，结合深入的基础实验和临床研究，相信对红豆杉多糖的研究和开发利用具有广阔的前景。

REFERENCES

- [1] TAO J, CHENG J M. Mechanism of anti-tumor effect of polysaccharides [J]. Jiangsu J Tradit Chin Med(江苏中医药), 2003, 24(6): 47-49.
- [2] KOBAYASHI I, SHIGEMORI H. Bioactive taxoids from the Japanese yew *Taxus cuspidate* [J]. Med Res Rev, 2002, 22(3): 305-328.
- [3] DING J. New reseach approaches in anti-tumor drug [J]. Chin New Drugs J (中国新药杂志), 2000, 9(3): 149-154.
- [4] PAN K, JIANG Q, LIU G, et al. Optimization extraction of *Ganoderma lucidum* polysaccharides and its immunity and antioxidant activities [J]. Int J Biol Macromol, in press (doi: 10.1016/j.ijbiomac. 2013. 01. 022).
- [5] MAKARENKOVA I D, SEMENOVA I B, AKHMATOVA N K, et al. Effect of sulfated polysaccharides from brown algae on proliferative and cytotoxic activity of mice splenocytes [J]. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol, 2012, (6): 68-75.
- [6] SHARMA U, BALA M, SAINI R, et al. Polysaccharide

- enriched immunomodulatory fractions from *Tinospora cordifolia* (Willd) miers ax hook. f. & Thoms [J]. *Indian J Exp Biol*, 2012, 50(9): 612-617.
- [7] LI X, AO L, ZHU W P. Effects of the polysaccharides from *taxus* on immune functions of tumor-bearing mice [J]. *J Jiaying Univ*(嘉兴学院学报), 2010, 22(6): 26-28.
- [8] HAN F F, WU M B. Purification structural investigation and antitumor effect of polysaccharide from *taxus chinensis* var. *mairei* [D]. Hangzhou: Zhejiang Univ, 2006.
- [9] ZHANG G M, ZHAO Y Q. The pharmaceutical research on active polysaccharide from the Bark of *T. chinensis* [D]. Shenyang: Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2008.
- [10] FENG Y, WANG F S, ZHANG T M, et al. Research advances of polysaccharide drugs [J]. *Chin J Biochem Pharm*(中国生化药物杂志), 2008, 29(2): 129-133.
- [11] YUAN F, SONG L Y, YU R M. The purification and characterization of polysaccharides isolated from *Taxus chinensis* and their antitumor activities *in vitro* [J]. *Chin J Biochem Pharm*(中国生化药物杂志), 2011, 32(1): 41-43.
- [12] ZHU T M, LI H. The preliminary study of the impact of on left ventricular diastolic function and the degree of myocardial infarction *taxus* polysaccharide in miri model of beagle dogs [J]. *J Chin Microcirc*(中国微循环), 2009, 13(5): 370-373.
- [13] ZHU H M, LI H, ZHU T M, et al. Effects of *Taxus* polysaccharide on myocardial NADPH oxidase mRNA, and SOD, and MDA in myocardial ischemia-reperfusion injury model of beagle's dogs [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2011, 42(5): 935-939.
- [14] ZHU T M, ZHU H M, LI H. Influence of *taxus* polysaccharide on cardiomyocyte apoptosis and and monocyte chemotactic protein-1 and no expression in MIRI model of beagle dog [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2010, 41(5): 778-781.
- [15] LI H, ZHU S, ZHU H M, et al. Influence of *taxus* polysaccharide on cardiomyocyte apoptosis and fas mRNA and protein expression in MIRI model of beagle dog [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*(中华中医药杂志), 2011, 26(9): 2083-2086.
- [16] LI H, SHI H, ZHU T M, et al. Impact of *taxus* polysaccharide on cardiac pathological damage and ultrastructure of the myocardial ischemia-reperfusion injury model in beagle [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm* (中华中医药杂志), 2012, 27(1): 219-223
- [17] WU M B, ZHENG B H. Isolation and purification of bio-active polysaccharides from leaves of *Taxus mairei* [J]. *J Zhejiang Univ*(Engineering Sci), 2007, 41(4): 696-699.
- [18] HUANG R Z, FANG X T, GUO X Q, et al. Analysis of chemical composition in the seed of *taxus chinensis* var. *mairei* [J]. *Chin J Appl Environ Biol*(应用与环境生物学报), 2002, 8(4): 392-394.
- [19] JIN L L. Determination of crude polysaccharide content in the *Taxus mairei* Bark [J]. *J Med Sci Yanbian Univ* (延边大学医学学报), 2010, 12(33): 271-273.
- [20] JIANG L, ZHANG C H. Separation, purification of polysaccharides from *taxus mairei* and its extraction kinetics [D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2007.
- [21] WU M B, WU Y L, ZHOU J, et al. Structural characterization of a water-soluble polysaccharide with high branches from the leaves of *Taxus chinensis* var. *mairei* [J]. *Food Chemistry*, 2009, 113(4): 1020-1024.
- [22] LI J Y, LIU Y Z. Progress of smashing tissue extraction in research of Chinese material medica [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2011, 10(42): 2145-2149.
- [23] AI X L, WANG H X, ZHU S, et al. Study on the adsorption and separation of tobacco chlorogenic acid by macroporous resins [J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2008, 20(1): 161-164.
- [24] FENG N, LIU Z M. Yew: The plant of gold [J]. *Shanxi J Forestry*(山西林业), 2007, (1): 32.
- [25] WANG W B, JIANG Y B. The medicinal value of *taxus* and the development and utilization of *taxol* raw materials sources [J]. *J China Forestry Industry*(中国林业产业), 2006, 3(10): 42-45.
- [26] XU Z K. Market prospect analysis of *taxol* bulk drug at home and abroad [J]. *Chin Pharm Inf* (中国制药信息), 2008, 24(4): 37.

收稿日期: 2012-12-06

具抗病毒活性的金刚烷胺衍生物的研究进展

辛建创, 刘丹*, 王赓 (沈阳化工大学制药工程教研室, 沈阳 110142)

摘要: 目的 介绍 M2 离子通道抑制剂金刚烷胺衍生物的研究进展, 为设计新的抗流感病毒药物提供相关依据和信息。
方法 对近年来关具抗流感病毒活性金刚烷胺衍生物、类似物的相关文献进行综述。**结果** 国内外课题组主要集中在金刚烷的 1 位和 2 位修饰, 合成一系列金刚烷胺衍生物或结构类似物, 并进行抗流感病毒活性测试。**结论** 部分金刚烷胺衍生物具有较好的抗流感病毒活性, 其中一些化合物的活性优于金刚烷胺和金刚乙胺, 这些结果对设计新的抗流感病毒药物具有较好的参考价值。

关键词: 金刚烷胺衍生物; 流感病毒; M2 离子通道抑制剂

中图分类号: R961 **文献标志码:** A **文章编号:** 1007-7693(2013)05-0552-07

作者简介: 辛建创, 男, 硕士生 Tel: (024)89383903 E-mail: xjc1333399@163.com *通信作者: 刘丹, 女, 博士, 副教授 Tel: (024)89383903 E-mail: liudan20040318@163.com