

• 论 著 •

PSP-1-A 的体外抗氧化研究

李舒婕¹, 林海桢², 彭雪雪¹, 冯焕村^{1△}

(1. 南方医科大学第三附属医院, 广州 510665; 2. 南方医科大学珠江医院, 广州 510282)

摘要:目的 对分离纯化得到的制黄精多糖 PSP-1-A 进行体外抗氧化活性测试。方法 制黄精经分离纯化后得到制黄精粗多糖(PSP)及 PSP-1-A, 采用体外抗氧化实验法测定 PSP 及 PSP-1-A 清除 2,2-二苯基-1-苦肟基(DPPH)自由基、对羟基自由基的能力及总抗氧化能力。结果 测得 PSP 及 PSP-1-A 在体外均能明显清除 DPPH 自由基、对羟基自由基和 ABTS⁺ 自由基, 且其体外抗氧化功能在一定范围内随浓度的增大而增大。结论 PSP 及 PSP-1-A 在一定浓度下均具有明显的体外抗氧化作用。

关键词:黄精; 多糖; 抗氧化

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.06.012 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2017)06-0776-03

Study on in vitro anti-oxidation of PSP-1-A

LI Shujie¹, LIN Haizhen², PENG Xuexue¹, FENG Huancun^{1△}

(1. Third Affiliated Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510665, China;

2. Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510282, China)

Abstract: Objective To research the in vitro antioxidative effect of separated and purified polysaccharide PSP-1-A from *Polygonatum Sibiricum* Redoute. **Methods** The polysaccharide PSP-1-A was obtained from *Polygonatum Sibiricum* Redoute by separation and purification. The in vitro antioxidative experimental method was adopted to determine the ability of PSP and PSP-1-A for clearing DPPH free radical and hydroxyl free radical, and total antioxidant capability. **Results** It was detected that PSP and PSP-1-A could obviously clear in vitro DPPH free radical, hydroxyl radical and ABTS⁺ radical, moreover its in vitro anti-oxidative effect was increased with its concentration increase in some range. **Conclusion** PSP and PSP-1-A have significant antioxidative activity in vitro under a certain concentration.

Key words: *Polygonatum Sibiricum* Redoute; polysaccharide; anti-oxidation

中药黄精是一种常用的补益类中药, 为百合科黄精属植物的干燥根茎, 在我国有悠久的历史, 具有抗肿瘤、抗氧化、降血糖、降血脂及提高免疫力等活性。据报道, 黄精中含有黄精多糖、低聚糖、皂苷、氨基酸及黄酮等活性成分, 具有提高免疫力, 降血糖, 降血脂及保护心脑血管系统等多种生理活性; 其中, 主要活性成分为黄精多糖^[1-5]。目前关于制黄精多糖的研究尚不多见, 多集中在对未炮制黄精的研究, 而对炮制前后黄精的多糖结构及抗氧化药理活性比较的研究更少。本研究前期采用热水提取制黄精粗多糖(PSP)并进行分离纯化, 得到相对分子质量均一的多糖 PSP-1-A, GC-MS 测得 PSP-1-A 的单糖主要由半乳糖组成^[6]。本研究选用 3 种国内外常用的抗氧化评价方法[对羟基自由基、2,2-二苯基-1-苦肟基(DPPH)自由基的清除作用, 以及总抗氧化能力(ABTS 法), 以抗坏血酸作为阳性对照]共同来评价 PSP-1-A 的体外抗氧化活性, 为 PSP-1-A 的体内抗氧化活性的进一步研究及制黄精相关保健品的研制提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 制黄精购自南方医科大学珠江医院, 产自云南华翔药业。PSP 为制黄精的水提醇沉后的粗多糖; PSP-1-A 为 PSP 中的 50% 醇沉部位经凝胶色谱分离纯化后的 A 部位多糖。羟自由基测定试剂盒及总抗氧化能力测试试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.2 方法

1.2.1 对 DPPH 自由基清除作用的测定 参照文献[7-9]方法并做改进, 称取 DPPH 4.5 g, 加无水乙醇溶解并定容至 100 mL 棕色瓶中, 得到浓度为 0.08 mol/L 的 DPPH 溶液, 避光保存、备用。分别称取不同浓度的各样品溶液(质量浓度分别为 1、2、4、6、8 mg/mL) 2 mL, 置于 10 mL 离心管中, 各加入 DPPH 溶液 2 mL。室温避光保存, 反应 30 min。517 nm 处测吸光值, 按下列公式计算 DPPH 自由基清除率, 实验重复 3 次。DPPH 自由基清除率(%) = $[A_0 - (A_s - A_c)] / A_0 \times 100\%$ 。其中 A_0 为 2 mL DPPH 无水乙醇混合液 + 2 mL 蒸馏水的吸光度, A_s 为 2 mL 样品溶液 + 2 mL DPPH 无水乙醇混合液的吸光度, A_c 为 2 mL 样品溶液 + 2 mL 无水乙醇的吸光度。

1.2.2 对羟基自由基清除作用的测定 按照说明书描述的实验步骤进行操作, 以 Vc 为阳性对照, 以蒸馏水为空白对照, 清除率计算公式: 羟基自由基清除率(%) = $(A_0 - A_s) / (A_0 - A_c) \times 100\%$ 。其中 A_0 为对照管的吸光度, A_s 为样品管的吸光度, A_c 为空白管的吸光度。

1.2.3 ABTS 法测定总抗氧化能力 首先分别配制不同浓度的各黄精多糖样品溶液(质量浓度分别为 1、2、4、6、8 mg/mL)。取 2.85 mL ABTS+测定液, 加入 0.15 mL 样品待测液, 准确混合振荡 30 s, 10 min 后 734 nm 波长处测吸光度^[10-11]。以 Vc 为阳性对照(质量浓度分别为 1、2、4、6、8

mg/mL),以蒸馏水为空白对照,清除率计算公式:ABTS⁺ 自由基清除率(%)=(A₀-A_s)/A₀×100%。其中 A₀ 为空白对照管的吸光度值,A_s 为样品管的吸光度值。

2 结 果

2.1 PSP 及 PSP-1-A 的组成 PSP 经乙醇分级沉淀后,得到的 50%醇沉物再经 DEAE-cellulose 52 柱分离后,再经 Sephadex-G200 柱反复分离得到的多糖,经高效液相凝胶色谱法判断 PSP-1-A 为均一多糖,数均分子量 Mn 为 1 410,重均分子量 Mw 为 8 640,分布宽度为 6.12。气质联用测得 PSP-1-A 单糖主要由半乳糖组成,另外含有少量葡萄糖、鼠李糖、木糖、阿拉伯糖及甘露糖,其摩尔比分别为 93.8:1.4:1.3:1.5:1.1:0.9。红外及核磁结构分析证明 PSP-1-A 是由 β-1,4-半乳糖和 β-T-半乳糖构成的线性多糖。因此收集 PSP-1-A 纯品与粗多糖 PSP 用于下一步体外抗氧化活性分析。

2.2 PSP 及 PSP-1-A 对 DPPH 自由基的清除作用 DPPH 在有机溶剂中是一种稳定的自由基,常用于抗氧化成分的体外抗氧化性能评价。PSP 及 PSP-1-A 对 DPPH 自由基的清除作用在一定浓度范围内(1~8 mg/mL)随浓度的增加而逐渐增强,最高可达 91.51%、88.89%,相同浓度的 Vc 清除率为 95.68%。可见 PSP 及 PSP-1-A 对 DPPH 自由基有显著的清除作用。对应的 50% DPPH 清除率(IC₅₀)时的浓度分别为 1.81、2.48 mg/mL。可见 PSP 的清除作用大于 PSP-1-A。见图 1。

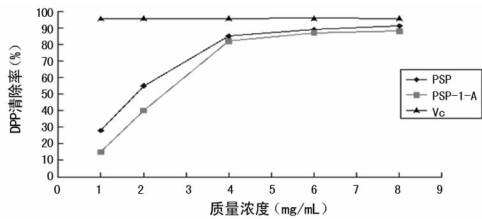


图 1 PSP 及 PSP-1-A 对 DPPH 的清除作用

2.3 PSP 及 PSP-1-A 对羟基自由基的清除作用 羟基自由基化学性质非常活泼,可对人体内多种大分子(蛋白质、核酸等)造成损伤,尤其是对脂质的过氧化作用,可导致对人体的损伤。PSP 及 PSP-1-A 对羟基自由基有一定的清除作用,在质量浓度 1~8 mg/mL,PSP 及 PSP-1-A 对羟基自由基的清除作用随着浓度的增加而增强,最高时达 68.56%和 65.78%。因此可推断 PSP 及 PSP-1-A 对羟基自由基有明显的清除作用。对应的 50%羟基自由基清除率(IC₅₀)时的浓度分别为 2.10、3.95 mg/mL。见图 2。

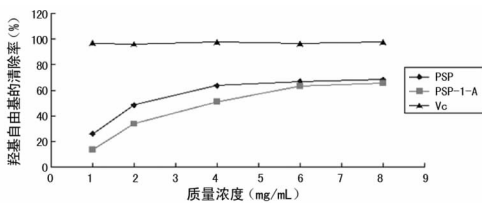


图 2 PSP 及 PSP-1-A 对羟基自由基的清除作用

2.4 PSP 及 PSP-1-A 的总抗氧化能力(ABTS 法) 从图 3 中可看出,PSP 及 PSP-1-A 在一定浓度范围(1~8 mg/mL)内对 ABTS⁺ 自由基具有较好的清除作用,并且其清除 ABTS⁺ 自由基的能力随浓度的升高而增强,当质量浓度达到 8 mg/mL 时,

PSP 及 PSP-1-A 清除自由基的能力分别达到 63.13%、71.05%,这说明 PSP 及 PSP-1-A 均具有较好的抗氧化能力。

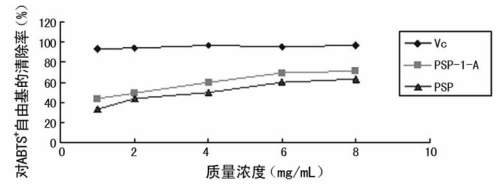


图 3 PSP 及 PSP-1-A 的总抗氧化能力

3 讨 论

随着对黄精研究的深入,黄精的现代临床应用得到了很大发展。以黄精为主药的现代复方制剂目前已有多种,如滋肾补肾丸、益精注射液、参黄冲剂、珍珠康乐寿口服液、消糖灵胶囊等。黄精复方制剂的临床应用研究热点主要集中在糖尿病、白细胞减少症、高血脂及冠心病几个方面。黄精的活性成分主要由皂苷、多糖等成分组成。在黄精的各种有效成分中,关于多糖的研究较多,药理活性包括降血糖、降血脂、抗动脉粥样硬化、抗疲劳、抗氧化、抗肿瘤、抗炎及抗病毒作用。关于黄精多糖的提取分离研究始于 20 世纪 80 年代,到目前为止,研究多数还集中在对黄精粗多糖提取分离的研究,关于分离纯化及结构解析较少见报道。由于多糖的化学成分复杂且原料来源产地及品种不统一,报道中多糖的含量、相对分子质量、单糖组成及结构表征差异较大。目前分离得到的黄精单一多糖的单糖组成包括葡萄糖、果糖及中性半乳糖等,相对分子质量大小在(70~90)×10³。黄精一般是炮制后才入药的,而目前分离纯化研究中采用的原料多为炮制前的黄精,分离得到的成分并不能代表入药黄精。本研究采用制黄精为原料,分离得到的成分 PSP 及 PSP-1-A 相比较而言更有资格作为入药黄精的代表成分。本研究仅测试了 PSP 及 PSP-1-A 的抗氧化作用,后续将进一步测试其降血糖、降血脂、抗肿瘤等方面的作用,为黄精在药品领域及保健品领域的开发与利用提供科学依据。

本研究对 PSP 及 PSP-1-A 进行的体外抗氧化实验证明,PSP 及 PSP-1-A 有较显著的抗氧化活性,抗氧化活性随多糖质量浓度的增加而增强,且 PSP 的活性强于 PSP-1-A,这可能与 PSP 中含有如低聚糖、糖蛋白、黄酮类等其他成分有关,而这些成分对多糖的抗氧化活性起协同增效作用。

综上所述,PSP-1-A 是一种主要由半乳糖组成的新发现的多糖,重均分子量为 8 640,且具有明显的抗氧化活性,这与其他报道的从未炮制黄精中相同部位提取分离出的均一多糖 PSP I 明显不同,PSP I 主要由葡萄糖组成^[12]。

参考文献

- [1] 江华. 黄精多糖的抗肿瘤活性研究[J]. 南京中医药大学学报,2010,26(6):479-480.
- [2] 高英,叶小利,李学刚,等. 黄精多糖的提取及其对 α-葡萄糖苷酶抑制作用[J]. 中成药,2010,32(12):2133-2137.
- [3] 公惠玲,李卫平,尹艳艳,等. 黄精多糖对链脲菌素糖尿病大鼠降血糖作用及其机制探讨[J]. 中国中药杂志,2009,34(9):1149-1154.
- [4] 张静,张艳贞,陈文,等. 四产地黄精中多糖含量及抗氧化活性比较[J]. 食品工业科技,2013,34(2):(下转第 780 页)

未见有新生血管复发病例;且术后各时段患者眼压均显著低于手术前。雷珠单抗注射后明显抑制了新生血管,此后再行手术治疗,避免术中出血等并发症,为手术治疗提供了一个清晰、理想的手术视野。黎晓新^[14]报道称抗 VEGF 药物虽然能够降低眼压,但是难以完全控制眼压,但为后续手术提供了重要的时间窗。本研究中发现,术后 3 周,1、3、6 个月视力均显著高于术前,提示抗 VEGF 联合 Ex-press 可以基本控制眼压,部分恢复有用视力。本研究依然有部分病例长期丧失视力,已无光感,对于此类病例,治疗的重点在于改善生活质量,降低痛苦。本研究中术后有 6 例出现浅前房,这与术后早期滤过过强有关,加压包扎 1 周后明显好转。另外亦有 3 例患者术后第 2~3 天前房出现少量出血,查阅病历资料后发现这 5 例患者在新生血管并未完全消退即行 Ex-press 植入术,导致术后前房有少量出血,但未影响手术疗效。

综上所述,玻璃体内注射雷珠单抗后联合 Ex-press 植入术能够有效控制 NVG 患者眼压,改善患者视功能,且进一步减少术中并发症发生率,是一种安全有效的治疗方案。然而本研究随访时间仅半年,其远期安全性尚需要进一步验证。

参考文献

[1] Mishra KK, Daftari IK, Weinberg V, et al. Risk factors for neovascular glaucoma after proton beam therapy of uveal melanoma: a detailed analysis of tumor and dose-volume parameters[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2013, 87(2): 330-336.

[2] Toyama S, Tsuji H, Mizoguchi N, et al. Long-term results of Carbon ion radiation therapy for locally advanced or unfavorably located choroidal melanoma: usefulness of CT-based 2-port orthogonal therapy for reducing the incidence of neovascular glaucoma[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2013, 86(2): 270-276.

[3] Sasamoto Y, Oshima Y, Miki A, et al. Clinical outcomes and changes in aqueous vascular endothelial growth factor levels after intravitreal bevacizumab for iris neovascularization and neovascular glaucoma: a retrospective two-dose comparative study[J]. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2012,

28(1): 41-48.

[4] 周鸿雁, 马庆杰, 郝继龙, 等. 电离辐射对角膜新生血管形成的抑制作用[J]. *中华实验眼科杂志*, 2012, 30(8): 686-691.

[5] 黄萍, 王雯倩, 石砚, 等. 贝伐单抗联合小梁切除术或睫状体光凝术治疗晚期新生血管性青光眼疗效比较[J]. *中华实验眼科杂志*, 2015, 33(4): 362-366.

[6] 贾旭, 段宣初. 抗血管内皮生长因子类药物在新生血管性青光眼及滤过手术抗瘢痕治疗中的应用[J]. *中华眼科杂志*, 2015, 51(4): 314-318.

[7] Zhou M, Chen S, Wang W, et al. Levels of erythropoietin and vascular endothelial growth factor in surgery-required advanced neovascular glaucoma eyes before and after intravitreal injection of bevacizumab[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54(6): 3874-3879.

[8] 杨智, 王昕华, 李若溪. 新生血管性青光眼不同治疗方法疗效对比分析[J]. *国际眼科杂志*, 2012, 12(1): 104-106.

[9] Mizote M, Baba T, Hirooka K, et al. Vascular endothelial growth factor concentrations in aqueous humor before and after subconjunctival injection of bevacizumab for neovascular glaucoma[J]. *Jpn J Ophthalmol*, 2010, 54(3): 242-244.

[10] 白惠玲, 刘勤, 马建军. 玻璃体内注射雷珠单抗联合引流器植入治疗新生血管性青光眼[J]. *中华眼外伤职业眼病杂志*, 2015, 37(3): 180-183.

[11] 李军, 祝莹, 徐少凯. 多种方法联合治疗新生血管性青光眼的疗效[J]. *国际眼科杂志*, 2015, 15(4): 704-706.

[12] Waisbourd M, Shemesh G, Kurtz S, et al. Topical bevacizumab for neovascular glaucoma: a pilot study[J]. *Pharmacology*, 2014, 93(3/4): 108-112.

[13] 蒋磊. 抗 VEGF 药物在视网膜血管性疾病围手术期的应用[J]. *中华实验眼科杂志*, 2014, 32(3): 274-277.

[14] 黎晓新. 眼内抗血管生成药物临床应用的利与弊[J]. *中华眼科杂志*, 2012, 48(10): 870-873.

(收稿日期: 2016-09-04 修回日期: 2016-11-25)

(上接第 777 页)

147-148, 152.

[5] 石娟, 赵煜, 雷杨, 等. 黄精粗多糖抗疲劳抗氧化作用的研究[J]. *时珍国医国药*, 2011, 22(6): 1409-1410.

[6] 李舒婕, 林海桢, 施胜英, 等. 黄精多糖 PSP-1-A 的分离纯化及结构解析[J]. *河南中医*, 2015, 35(6): 1441-1445.

[7] 许海顺, 蒋剑平, 徐攀, 等. 红参多糖抗氧化活性的研究[J]. *浙江中医药大学学报*, 2011, 35(6): 909-912.

[8] 蒋剑平, 徐敏, 卢烨琳, 等. 白花蛇舌草多糖的抗氧化活性研究[J]. *中华中医药学刊*, 2012, 29(5): 1076-1078.

[9] 许海顺, 吴学谦, 熊科辉, 等. 三叶青不同洗脱组分的抗氧化活性研究[J]. *中华中医药学刊*, 2015, 33(8): 1968-1971.

[10] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay[J]. *Free Radic Biol Med*, 1999, 26(9/10): 1231-1237.

[11] 邱金东, 汤昆. DPPH 和 ABTS 法测定核桃仁的体外抗氧化活性[J]. *中成药*, 2008, 30(8): 1215-1216.

[12] Li XJ, Jiang JY, Shi SS, et al. A RG- II type polysaccharide purified from aconitum coreanum alleviates Lipopolysaccharide-Induced inflammation by inhibiting the NF-kappa B signal pathway [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e99697.

(收稿日期: 2016-09-11 修回日期: 2016-12-18)