



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112552424 A

(43) 申请公布日 2021.03.26

(21) 申请号 202011453960.5

(22) 申请日 2020.12.10

(71) 申请人 浙江省林业科学研究院

地址 310023 浙江省杭州市西湖区留和路  
399号

(72) 发明人 贺亮 程俊文 黄旭波 王衍彬  
魏海龙 杨柳 李海波 胡传久

(74) 专利代理机构 杭州星河慧专利代理事务所  
(普通合伙) 33410

代理人 刘晓丹

(51) Int. Cl.

C08B 37/02 (2006.01)

A61K 31/716 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

权利要求书1页 说明书10页 附图10页

(54) 发明名称

一种蝉花子实体多糖及其制备和用途

(57) 摘要

本发明公开了一种蝉花子实体多糖及其制备和用途。该蝉花子实体多糖,包含重量百分含量99%以上的多糖;所述多糖的组成为葡萄糖,多糖的结构以1→4连接的 $\alpha$ -葡萄糖为主链,且每7个 $\alpha$ -葡萄糖组成一个重复单元,每个重复单元中有一个 $\alpha$ -葡萄糖的C6位上被端基 $\alpha$ -葡萄糖取代。其制备方法包括:蝉花子实体热水提取后进行自由基降解,得到蝉花子实体降解后多糖液,经酶-Sevage结合法去蛋白、透析、阴离子交换层析和凝胶过滤层析纯化,真空冷冻干燥分离纯化组分得到蝉花子实体多糖。本发明对纯化后多糖进行组分分析、结构鉴定及免疫功能研究,发现本发明蝉花子实体多糖有较强的免疫调节活性,是潜在的免疫增强物质。

1. 一种蝉花子实体多糖,其特征在于,包含重量百分含量99%以上的多糖;所述多糖的组成为葡萄糖,多糖的结构以1→4连接的 $\alpha$ -葡萄糖为主链,且每7个 $\alpha$ -葡萄糖组成一个重复单元,每个重复单元中有一个 $\alpha$ -葡萄糖的C6位上被端基 $\alpha$ -葡萄糖取代。

2. 根据权利要求1所述的蝉花子实体多糖,其特征在于,所述蝉花子实体多糖的重均分子量为160KDa-180KDa。

3. 根据权利要求1或2所述的蝉花子实体多糖,其特征在于,所述 $\alpha$ -葡萄糖为 $\alpha$ -D-葡萄糖。

4. 根据权利要求1-3任一项所述的蝉花子实体多糖的制备方法,其特征在于,由蝉花子实体经提取、自由基降解和分离得到。

5. 根据权利要求4所述的蝉花子实体多糖的制备方法,其特征在于,包括步骤:

(1) 提取:蝉花子实体经水提取,得到蝉花子实体水提液;

(2) 自由基降解:在蝉花子实体水提液中加入维生素C和 $H_2O_2$ 进行自由基降解反应,降解后经离心除去沉淀物,保留上清液即得到降解产物;

(3) 去蛋白:将降解产物用蛋白酶酶解,灭酶并离心除去变性蛋白和酶,离心所得上清液再用有机溶剂离心除去下层有机相和中间的蛋白层,重复用有机溶剂离心的步骤直至无白色沉淀产生,得到提取液;

(4) 透析:将提取液用孔径为6000Da-8000Da的透析袋在水中透析,收集透析后的提取液,真空冷冻干燥得蝉花子实体粗多糖;

(5) 纯化:将蝉花子实体粗多糖溶于水得到蝉花子实体粗多糖水溶液,经二乙氨基乙基琼脂糖凝胶离子交换层析柱层析,收集的洗脱液用苯酚-硫酸法检测多糖,收集富集多糖的洗脱液经凝胶过滤层析,凝胶过滤层析所收集的洗脱液用苯酚-硫酸法检测多糖,收集含多糖的洗脱液,经浓缩、透析和冻干得到白色疏松絮状的蝉花子实体多糖。

6. 根据权利要求5所述的蝉花子实体多糖的制备方法,其特征在于,步骤(1)中,所述蝉花子实体水提液的制备包括:称取蝉花子实体原料,粉碎,按料液重量比为1:20至1:40加入水,温度控制在85℃-95℃,提取时间1.5h-3h,得到蝉花子实体水提液。

7. 根据权利要求5所述的蝉花子实体多糖的制备方法,其特征在于,步骤(2)中,所述自由基降解反应的温度控制在45℃-55℃,搅拌反应1h-2h。

8. 根据权利要求5所述的蝉花子实体多糖的制备方法,其特征在于,步骤(2)中,所述维生素C和 $H_2O_2$ 以水溶液的形式加入;所述维生素C采用浓度为10mmol/L-20mmol/L的维生素C水溶液;所述 $H_2O_2$ 采用浓度为10mmol/L-25mmol/L的 $H_2O_2$ 水溶液。

9. 根据权利要求1-3任一项所述的蝉花子实体多糖在促进小鼠巨噬细胞株RAW264.7增殖、促进小鼠巨噬细胞株RAW264.7中细胞因子TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6和IL-8的释放中的应用。

10. 根据权利要求1-3任一项所述的蝉花子实体多糖在作为免疫调节剂或者制备免疫调节剂中的应用。

## 一种蝉花子实体多糖及其制备和用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及多糖技术领域,具体涉及一种蝉花子实体多糖及其制备和用途。

### 背景技术

[0002] 蝉花(*Cordyceps cicadae* Shing),又称为金蝉花、蝉草等,属于真菌界、真菌门(Eumycota)、子囊菌亚门(Ascomycotina)、核菌纲(Pyrenomycetes)、麦角菌目(Clavicipitales)、麦角菌科(Clavicipitaceae)、虫草菌属真菌,是蝉若虫被蝉拟青霉菌感染后形成的菌虫复合体。蝉花中含有多球壳菌素、核苷类、麦角固醇、多糖、虫草酸等多种具有药理活性的物质,其中多糖类物质已经被报道具有抗氧化、抗肿瘤、改善肾功能、增强免疫力等诸多生物学功能。因此,蝉花可以作为冬虫夏草的替代物,在保健品及医药领域具有广阔的应用前景。

[0003] 中国专利申请CN202010386370.9(公布号CN111410700A)公开了一种从蝉花孢梗束中提取分离得到一种 $\alpha$ -1,4连接的葡聚糖即蝉花多糖B-I-1,分子量范围为100KD-120KD,以及一种 $\alpha$ -1,4连接的葡聚糖即蝉花多糖B-II-1,分子量范围为110KD-130KD,该蝉花多糖B-I-1对胰腺癌肿瘤有明显的抑制作用,蝉花多糖B-II-1对白血病细胞有明显的抑制作用。中国专利申请CN201610694838.4(公布号CN 106176826 A)公开了一种金蝉花多糖制剂及提取工艺,制剂产品中含由D-甘露糖(D-mannose)和D-半乳糖(D-galactose)以4:3比例组成的多糖组分。中国专利ZL201410232441.4(授权公告号CN 103992416 B)公开了金蝉花多糖及其在制备神经保护和抗衰老药物中的应用,该金蝉花多糖为金蝉花水提醇沉所得沉淀。张安强等人在巴西蘑菇中分离得到一种主链为 $\alpha$ -1,4连接的葡聚糖,6位支链上连接有 $\alpha$ 葡萄糖端基和 $\beta$ -1,6连接的葡萄糖(Zhang et al.,2018)。Shi等人从竹荪中分离到三种 $\alpha$ -1,4连接的葡聚糖,6位支链上连接有 $\alpha$ 葡萄糖端基,但各自的重复单元数不一样,分子量范围为6KD-51KD(Shi et al.,2019)。Zhang等人从芡实种子中获得不同重复单元数的 $\alpha$ -1,4连接葡聚糖,该多糖分子量为8.7KD且具有一定的降糖作用(Zhang et al.,2019)。Wang等人从冬虫夏草中也分离得到一种分子量为970KD的 $\alpha$ -1,4连接葡聚糖,该多糖能刺激巨噬细胞分泌IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 等炎症因子(Wang et al.,2017)。

[0004] 以上可以看出同为 $\alpha$ -1,4连接葡聚糖,分子量、糖苷键连接方式、重复单元数、分支结构等差异会导致多糖的生物活性发生变化,而且越来越多的研究表明多糖重要功能的发挥是由其结构特征决定的,其高级结构(二级及三级结构)更为密切,多糖的生物活性与其分子量、分子链构象(Conformation)紧密相关,了解该糖分子的构象更有助于阐明其生物活性作用机制。所以发现新的多糖组分及活性,对研究开发新药具有非常重要的科学意义。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种从蝉花中分离出的确定化学结构特征的蝉花子实体多糖,该多糖具有免疫调节活性。

[0006] 本发明的另一目的是提供所述蝉花子实体多糖的制备方法,可获得具有免疫调节

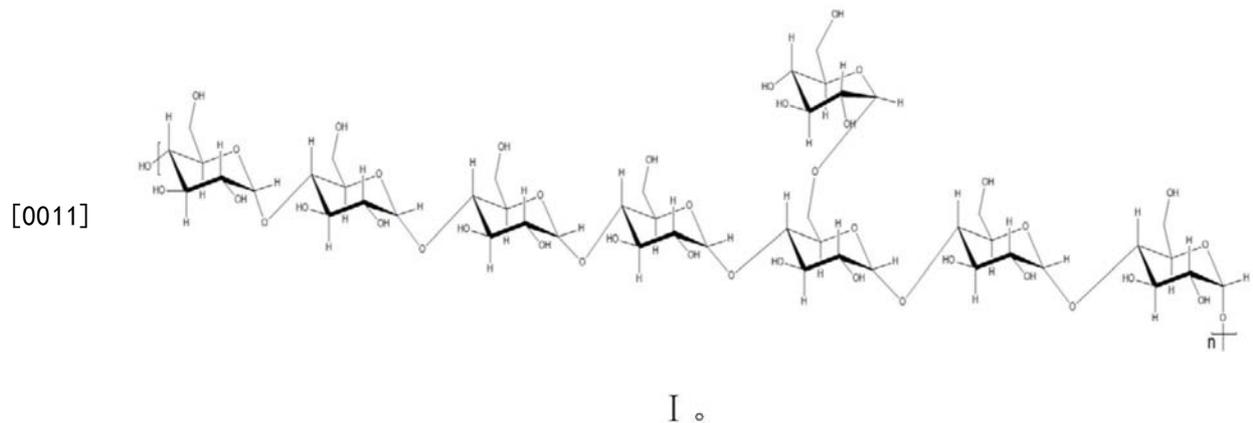
活性的多糖,具有分子量可控、操作简便的优点。

[0007] 本发明还提供了所述蝉花子实体多糖的用途,其可达到免疫调节的作用,可作为免疫调节剂使用,也可用于制备免疫调节剂。

[0008] 本发明解决其技术问题所采用的技术方案是:

[0009] 一种蝉花子实体多糖,包含重量百分含量99%以上的多糖;所述多糖的组成为葡萄糖(Glc),多糖的结构以1→4连接的 $\alpha$ -葡萄糖为主链,且每7个 $\alpha$ -葡萄糖组成一个重复单元,每个重复单元中有一个 $\alpha$ -葡萄糖的C6位上被端基 $\alpha$ -葡萄糖取代。

[0010] 所述多糖的重复单元的结构有多种不同的变化组合,C6位上被端基 $\alpha$ -葡萄糖取代的 $\alpha$ -葡萄糖可以是重复单元中的任意一个 $\alpha$ -葡萄糖,这些多种不同的变化组合均具有免疫调节的作用,例如可具有如结构式I所示结构的重复单元:



[0012] 式I中,n均为正整数;n的数值依据蝉花子实体多糖的重均分子量来确定。

[0013] 可选的,所述蝉花子实体多糖的重均分子量为160KDa-180KDa,KDa为千道尔顿。

[0014] 可选的,所述 $\alpha$ -葡萄糖为 $\alpha$ -D-葡萄糖。

[0015] 所述蝉花子实体多糖由蝉花子实体经提取、自由基降解和分离得到。可选的,蝉花子实体热水提取后进行自由基降解,得到蝉花子实体降解后多糖液,经酶-Sevage结合法去蛋白、透析、阴离子交换层析和凝胶过滤层析纯化,真空冷冻干燥分离纯化组分得到蝉花子实体多糖。具体技术方案如下:

[0016] 一种蝉花子实体多糖的制备方法,包括步骤:

[0017] (1) 提取:蝉花子实体经水提取,得到蝉花子实体水提液;

[0018] (2) 自由基降解:在蝉花子实体水提液中加入维生素C和 $H_2O_2$ 进行自由基降解反应,降解后经离心除去沉淀物,保留上清液即得到降解产物;

[0019] (3) 去蛋白:将降解产物用蛋白酶酶解,灭酶并离心除去变性蛋白和酶,离心所得上清液再用有机溶剂离心除去下层有机相和中间的蛋白层,重复用有机溶剂离心的步骤直至无白色沉淀产生,得到提取液;

[0020] (4) 透析:将提取液用孔径为6000Da-8000Da的透析袋在水中透析,收集透析后的提取液,真空冷冻干燥得蝉花子实体粗多糖;

[0021] (5) 纯化:将蝉花子实体粗多糖溶于水得到蝉花子实体粗多糖水溶液,经二乙氨基乙基琼脂糖凝胶(DEAE Sepharose FF)离子交换层析柱层析,收集的洗脱液用苯酚-硫酸法检测多糖,收集第一洗脱峰(即富集多糖)的洗脱液经凝胶过滤层析,凝胶过滤层析所收集的洗脱液用苯酚-硫酸法检测多糖,收集含多糖的洗脱液,经浓缩、透析和冻干得到白色疏

松絮状的蝉花子实体多糖,命名为CCP。

[0022] 为了达到更好的发明效果,优选:

[0023] 步骤(1)中,所述蝉花子实体水提液的制备可采用本领域常规的水提法,优选采用热水提法,进一步选用以下方法:称取蝉花子实体原料,粉碎(优选过60-100目的粉末),按料液重量比为1:20至1:40加入水,温度控制在85℃-95℃,提取时间1.5h-3h,得到蝉花子实体水提液。进一步可选的,蝉花子实体中加入水后先浸泡0.5-1h,再在85℃-95℃,提取时间1.5h-3h,得到蝉花子实体水提液。水提取的步骤可以重复多次,以避免原料浪费。

[0024] 步骤(2)中,所述自由基降解反应的温度控制在45℃-55℃为宜,搅拌反应1h-2h。

[0025] 可选的,所述维生素C和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>起降解作用,以水溶液的形式加入更利于反应的进行。进一步优选,所述维生素C采用浓度为10mmol/L-20mmol/L的维生素C水溶液。进一步优选,所述H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>采用浓度为10mmol/L-25mmol/L的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>水溶液。可选的,蝉花子实体水提液与维生素C水溶液、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>水溶液的体积比为6:1:1至10:1:1,降解效果更好。

[0026] 步骤(3)中,所述蛋白酶选用胰蛋白酶。

[0027] 可选的,所述蛋白酶的重量为降解产物重量的1%-2%。

[0028] 所述酶解的条件可依据现有蛋白酶酶解的条件。可选的,所述酶解的条件为50℃-55℃水浴2h-2.5h。

[0029] 本发明灭酶的条件采用本领域的常规条件,例如可在100℃-105℃下灭酶15min-20min。

[0030] 可选的,所述有机溶剂选用氯仿和正丁醇,其中氯仿和正丁醇的体积比为4:1。

[0031] 可选的,步骤(4)中,在水中透析的时间优选为80h-100h。

[0032] 步骤(5)中,可选的,所述蝉花子实体粗多糖水溶液的浓度为5mg/mL-30mg/mL,流速为2.0ml/min-4.0ml/min。

[0033] 可选的,所述二乙氨基乙基琼脂糖凝胶离子交换层析柱层析的条件为:采用梯度洗脱,洗脱液为0.1mol/L-0.8mol/L的NaCl水溶液。可选的,所述洗脱液流速为1ml/min-1.5ml/min。

[0034] 可选的,所述凝胶过滤层析的条件为:洗脱液为0.05mol/L磷酸盐缓冲液和0.15mol/L的NaCl水溶液,其中磷酸盐缓冲液与NaCl水溶液的体积比为2-3:1。可选的,所述洗脱液流速为0.5ml/min,

[0035] 所述磷酸盐缓冲液的配制方法按照本领域通用的方法,例如可参照2005年版《中国药典》。

[0036] 可选的,所述凝胶选用聚丙烯酰胺葡聚糖凝胶,例如市售的Sephacryl S系列(Sephacryl S-100)等。

[0037] 本发明所用原料均可采用市售产品,也可采用现有制备方法制备得到。

[0038] 所述蝉花子实体多糖能够促进小鼠巨噬细胞株RAW264.7中一氧化氮(NO)和细胞因子TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-8的释放,可用于促进小鼠巨噬细胞株RAW264.7增殖、促进小鼠巨噬细胞株RAW264.7中细胞因子TNF-α、IL-1β、IL-6和IL-8的释放;并能通过激活NF-κB信号通路达到免疫调节的作用,可直接作为免疫调节剂或者用于制备免疫调节剂。所述蝉花子实体多糖可添加现有的辅料采用现有方法制备免疫调节剂。

[0039] 与现有技术相比,本发明具有如下优点:

[0040] 本发明首次通过自由基降解法制备蝉花子实体多糖,提取分离获得一种具有生物活性蝉花子实体多糖CCP,经检测其多糖重量百分含量在99%以上,经单糖组成鉴定发现该多糖是由葡萄糖组成,是多糖类;分子量检测其重均分子量为160KDa-180KDa;核磁共振图谱显示其为 $\alpha$ 构型,并确定其糖苷键连接方式,多糖的结构以1 $\rightarrow$ 4连接的 $\alpha$ -葡萄糖为主链,且每7个 $\alpha$ -葡萄糖组成一个重复单元,每个重复单元中有一个 $\alpha$ -葡萄糖的C6位上被端基 $\alpha$ -葡萄糖取代。

[0041] 本发明蝉花子实体多糖的制备方法操作简便,易于控制,能够获得具有较高有序性、特定分子量区间、结构明确的大分子,为深入研究其高级结构与功能关系提供研究价值。利用本发明方法制备蝉花子实体多糖,不影响其天然结构和活性,该方法对设备要求较低、成本低,利于工业生产上大规模的推广、开发和使用。

[0042] 本发明蝉花子实体多糖具有明显促进小鼠巨噬细胞株RAW264.7中NO和细胞因子TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8的释放的功能,从而达到免疫调节的作用,可直接作为免疫调节剂或者用于制备免疫调节剂,有利于进一步高效开发该真菌资源。

## 附图说明

[0043] 图1为本发明蝉花子实体粗多糖经DEAE Sepharose FF离子交换层析柱层析收集的洗脱液在490nm的吸光度曲线,Tube number为管数。

[0044] 图2a为1-苯基-3-甲基-5-吡啶啉酮(PMP)衍生化后CCP溶液的HPLC图谱;图2b为1-苯基-3-甲基-5-吡啶啉酮(PMP)衍生化后各种单糖和糖醛酸标准品溶液的HPLC图谱;其中,纵坐标AU为响应值,横坐标Retenion time为保留时间:分钟(min),Man为甘露糖,Rib为核糖,Rham为鼠李糖,GalUA为半乳糖醛酸,Glc为葡萄糖,Gal为半乳糖,Xyl为木糖,Ara为阿拉伯糖,Fuc为岩藻糖。

[0045] 图3a为实施例7中CCP的 $^1\text{H}$ -NMR图谱;图3b为实施例7中CCP的 $^{13}\text{C}$ -NMR图谱;图3c为实施例7中CCP的COSY谱;图3d为实施例7中CCP的HSQC谱。

[0046] 图4为本发明CCP对小鼠巨噬细胞株RAW264.7中NO释放量的影响图;其中,control为阴性对照,LPS为阳性对照,横坐标sample dosage为样品剂量( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。

[0047] 图5a至图5d依次为本发明CCP对小鼠巨噬细胞株RAW264.7细胞因子TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 和IL-8释放量的影响图;其中,control为阴性对照,LPS为阳性对照,横坐标CCP dosage为CCP剂量( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。

[0048] 图6为本发明CCP的激光光散射图;其中,纵坐标Relative Scale为相对比例,横坐标time(min)为时间(分钟)。

## 具体实施方式

[0049] 以下结合附图与实施例对本发明作进一步详细描述,熟悉此技术的技术人员可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本申请的其他优点及功效。

[0050] 为了使本发明的目的、技术特征和有益效果更为明显易懂,下面结合实施例对本发明的具体实施方式做进一步详细描述。所描述的实施例仅仅是本发明可实施方式的一部分,而不是其全部,不应被理解为限于在此阐述的实施方式;相反,提供这些实施方式使得本发明将全面和完整,并将示例实施方式的构思全面地传达给本领域的技术人员。

**[0051] 实施例1**

**[0052]** (1) 原料粉碎及提取制备:称取1g蝉花子实体(已粉碎,过60目),按料液重量比为1:20,加入蒸馏水,温度控制在95℃,提取时间3h,过滤,得到蝉花子实体水提液;

**[0053]** (2) 自由基降解:将步骤(1)中蝉花子实体水提液温度控制在50℃±5℃,加入10mmol/L维生素C水溶液,25mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>水溶液,蝉花子实体水提液与维生素C水溶液和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>水溶液的体积比为6:1:1,搅拌反应2h;离心后,除去沉淀物,得到上清液即为降解产物;

**[0054]** (3) 去蛋白:将步骤(2)所得的降解产物用胰蛋白酶在55℃水浴2h酶解,胰蛋白酶的重量为降解产物重量的1%,105℃灭酶15min并离心除去变性蛋白和酶,离心所得上清液再用有机溶剂氯仿和正丁醇的混合液(其中氯仿与正丁醇的体积比为4:1)离心除去下层有机相和中间的蛋白层,重复用有机溶剂离心的步骤直至无白色沉淀产生,得到提取液;

**[0055]** (4) 透析:步骤(3)所得的提取液用孔径为6000Da的透析袋在去离子水中透析90h,收集透析后的提取液,真空冷冻干燥得蝉花子实体粗多糖;

**[0056]** (5) 纯化:将步骤(4)得到的蝉花子实体粗多糖用去离子水溶解得到20mg/mL蝉花子实体粗多糖水溶液,流速为2.0ml/min,经二乙氨基乙基琼脂糖凝胶(DEAE Sepharose FF)离子交换层析柱层析,洗脱液采用0.1mol/L-0.8mol/L的NaCl水溶液梯度洗脱,洗脱液流速1ml/min,收集的洗脱液用苯酚-硫酸法检测490nm多糖和用lowry法检测蛋白,收集第一洗脱峰(即富集多糖)的洗脱液经聚丙烯酰胺葡聚糖凝胶(Sephacryl S-100)过滤层析,第一洗脱峰的洗脱液经凝胶过滤层析的流速为0.5ml/min,凝胶过滤层析的洗脱液为0.05mol/L磷酸盐缓冲液和0.15mol/L的NaCl水溶液,其中磷酸盐缓冲液与NaCl水溶液的体积比为2:1,洗脱液流速0.5ml/min,凝胶过滤层析所收集的洗脱液用苯酚-硫酸法检测490nm多糖和用lowry法检测蛋白,收集含多糖的洗脱液,经浓缩、1000Da透析和冻干得到白色疏松絮状的特定分子量段蝉花子实体多糖,命名为CCP。

**[0057] 实施例2**

**[0058]** (1) 原料粉碎及提取制备:称取1g蝉花子实体(已粉碎,过60目),按料液重量比为1:30,加入蒸馏水,温度控制在90℃,提取时间2h,过滤,得到蝉花子实体水提液;

**[0059]** (2) 自由基降解:将步骤(1)中蝉花子实体水提液温度控制在50℃±5℃,加入15mmol/L维生素C水溶液,15mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>水溶液,蝉花子实体水提液与维生素C水溶液和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>水溶液的体积比为8:1:1,搅拌反应1.5h;离心后,除去沉淀物,得到上清液即为降解产物;

**[0060]** (3) 去蛋白:将步骤(2)所得的降解产物用胰蛋白酶在50℃水浴2.5h酶解,胰蛋白酶的重量为降解产物重量的2%,100℃灭酶20min并离心除去变性蛋白和酶,离心所得上清液再用有机溶剂氯仿和正丁醇的混合液(其中氯仿与正丁醇的体积比为4:1)离心除去下层有机相和中间的蛋白层,重复用有机溶剂离心的步骤直至无白色沉淀产生,得到提取液;

**[0061]** (4) 透析:步骤(3)所得的提取液用孔径为8000Da的透析袋在去离子水中透析80h,收集透析后的提取液,真空冷冻干燥得蝉花子实体粗多糖;

**[0062]** (5) 纯化:将步骤(4)得到的蝉花子实体粗多糖用去离子水溶解得到30mg/mL蝉花子实体粗多糖水溶液,流速为4.0ml/min,经二乙氨基乙基琼脂糖凝胶(DEAE Sepharose FF)离子交换层析柱层析,洗脱液采用0.1mol/L-0.8mol/L的NaCl水溶液梯度洗脱,洗脱液流速1.5ml/min,收集的洗脱液用苯酚-硫酸法检测490nm多糖和用lowry法检测蛋白,收集

第一洗脱峰(即富集多糖)的洗脱液经聚丙烯酰胺葡聚糖凝胶(Sephacryl S-100)过滤层析,第一洗脱峰的洗脱液经凝胶过滤层析的流速为0.5ml/min,洗脱液为0.05mol/L磷酸盐缓冲液和0.15mol/L的NaCl水溶液,其中磷酸盐缓冲液与NaCl水溶液的体积比为3:1,洗脱液流速0.5ml/min,凝胶过滤层析所收集的洗脱液用苯酚-硫酸法检测490nm多糖和用lowry法检测蛋白,收集含多糖的洗脱液,经浓缩、1000Da透析和冻干得到白色疏松絮状的特定分子量段蝉花子实体多糖,命名为CCP。

[0063] 实施例3

[0064] (1) 原料粉碎及提取制备:称取1g蝉花子实体(已粉碎,过100目),按料液重量比为1:40,加入蒸馏水,温度控制在85℃,提取时间1.5h,过滤,得到蝉花子实体水提液;

[0065] (2) 自由基降解:将步骤(1)中蝉花子实体水提液温度控制在50℃±5℃,加入20mmol/L维生素C水溶液,10mmol/LH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>水溶液,蝉花子实体水提液与维生素C水溶液和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>水溶液的体积比为10:1:1,搅拌反应1h;离心后,除去沉淀物,得到上清液即为降解产物;

[0066] (3) 去蛋白:将步骤(2)所得的降解产物用胰蛋白酶在55℃水浴2h酶解,胰蛋白酶的重量为降解产物重量的1.5%,105℃灭酶15min并离心除去变性蛋白和酶,离心所得上清液再用有机溶剂氯仿和正丁醇的混合液(其中氯仿与正丁醇的体积比为4:1)离心除去下层有机相和中间的蛋白层,重复用有机溶剂离心的步骤直至无白色沉淀产生,得到提取液;

[0067] (4) 透析:步骤(3)所得的提取液用孔径为6000Da的透析袋在去离子水中透析100h,收集透析后的提取液,真空冷冻干燥得蝉花子实体粗多糖;

[0068] (5) 纯化:将步骤(4)得到的蝉花子实体粗多糖用去离子水溶解得到5mg/mL蝉花子实体粗多糖水溶液,流速为3.0ml/min,经二乙氨基乙基琼脂糖凝胶(DEAE Sepharose FF)离子交换层析柱层析,洗脱液采用0.1mol/L-0.8mol/L的NaCl水溶液梯度洗脱,洗脱液流速1ml/min,收集的洗脱液用苯酚-硫酸法检测490nm多糖和用lowry法检测蛋白,收集第一洗脱峰(即富集多糖)的洗脱液经聚丙烯酰胺葡聚糖凝胶(Sephacryl S-100)过滤层析,第一洗脱峰的洗脱液经凝胶过滤层析的流速为0.5ml/min,洗脱液为0.05mol/L磷酸盐缓冲液和0.15mol/L的NaCl水溶液,其中磷酸盐缓冲液与NaCl水溶液的体积比为2:1,洗脱液流速0.5ml/min,凝胶过滤层析所收集的洗脱液用苯酚-硫酸法检测490nm多糖和用lowry法检测蛋白,收集含多糖的洗脱液,经浓缩、1000Da透析和冻干得到白色疏松絮状的特定分子量段蝉花子实体多糖,命名为CCP。

[0069] 下面是对CCP结构鉴定或性能分析的实施例:

[0070] 实施例4:分子量检测

[0071] 具体试验流程:进样量为200μL-300μL(即2-3倍样品环体积),数据收集60min,柱温为室温。配制0.1mol/L NaNO<sub>3</sub>水溶液(含有质量百分浓度0.02%NaN<sub>3</sub>)作为流动相,过0.22μm膜,超声脱气30min。称取3mg样品溶解于1mL 0.1mol/L NaNO<sub>3</sub>水溶液(含有质量百分浓度0.02%NaN<sub>3</sub>)中,磁力搅拌溶解4h,过0.22μm膜。样品采用实施例1中的蝉花子实体多糖CCP,检测结果见图6,从图6看出,样品CCP的保留时间主要分布在12min-18min,RI信号显示多糖呈单一对称的峰形,表明CCP是均一的多糖。此外,纯化后多糖的绝对重均分子量为170KDa。

[0072] 样品采用实施例2和3中的蝉花子实体多糖CCP,重均分子量检测值依次为180KDa、160KDa。

[0073] 实施例5:单糖组成

[0074] 实施例1、实施例2或者实施例3制得的蝉花子实体多糖CCP 5mg,加入2mol/L硫酸水溶液2ml,置于具塞试管中、氮气封口,100℃水解12h,冷却至室温,用硫酸钡中和,离心,上清液冻干得到冻干粉(即CCP水解样品),待衍生化。将各种单糖和糖醛酸标准品溶在0.3M(mol/L)氢氧化钠水溶液中配制每种单糖和糖醛酸浓度为5mmol/L(mM)的单糖和糖醛酸标准品溶液,将多糖CCP水解样品溶在0.3M氢氧化钠水溶液中配制多糖CCP水解样品浓度为5mmol/L的CCP溶液,然后分别取75 $\mu$ l单糖和糖醛酸标准品溶液、取75 $\mu$ l CCP溶液,各加入50 $\mu$ l 0.5M PMP甲醇液,混匀,70℃水浴100min,冷却至室温,加入75 $\mu$ l 0.3M HCl水溶液中和,10000rpm离心3min,将上清液转移至另一干净离心管,加水至1ml,加入等体积氯仿,充分震荡,静置分层后收集水相,为了除去PMP、过剩反应试剂等杂质,收集的水相,重复“加水至1ml,加入等体积氯仿,充分震荡,静置分层”的步骤三次,过0.22 $\mu$ m膜,分别得到PMP衍生化后单糖和糖醛酸标准品溶液和PMP衍生化后CCP溶液,待HPLC检测。

[0075] HPLC条件:柱子Inertsil-ODS-SP(5 $\mu$ m,4.6 $\times$ 250mm),检测波长245nm,流速1.0ml/min,柱温:室温,注入体积:20 $\mu$ l PMP衍生化后单糖和糖醛酸标准品溶液或10 $\mu$ l PMP衍生化后CCP溶液,流动相A(乙腈):流动相B(0.05mol/L磷酸盐缓冲液(PH6.9))=17:83(体积比)。

[0076] 如图2a和图2b,对应单糖和糖醛酸标准品,实施例1CCP包括重量百分含量99%以上的多糖,多糖部分的单糖是由葡聚糖组成;说明CCP是以葡萄糖为主链,并含有分支的多糖。

[0077] 对应单糖和糖醛酸标准品,实施例2CCP包括重量百分含量99%以上的多糖,多糖部分的单糖是由葡聚糖组成;说明CCP是以葡萄糖为主链,并含有分支的多糖。

[0078] 对应单糖和糖醛酸标准品,实施例3CCP包括重量百分含量99%以上的多糖,多糖部分的单糖是由葡聚糖组成;说明CCP是以葡萄糖为主链,并含有分支的多糖。

[0079] 实施例6:甲基化分析

[0080] 取2mg实施例1、实施例2或者实施例3制得的蝉花子实体多糖CCP样品溶于1ml二甲基亚砜(DMSO)中,通氮气密封,超声片刻助溶,然后按照Ciucanu,et al.方法进行甲基化制备(Ciucanu,L.,&Kerek,F..A simple and repid method for permethylation of carbohydrates.Carbohydrate Research,131,209-217)。

[0081] CCP经过三次甲基化后,再经酸水解、还原,乙酰化制备成部分甲基化糖醇乙酸酯衍生物,进行GC-MS分析,结果见表1,其中G1cp为吡喃型葡萄糖。由表1可知:(1)在CCP中1 $\rightarrow$ 4连接为主要键型,非还原端有端基葡萄糖(G1c);(2)该多糖初步结果推断为葡萄糖(G1c)以1 $\rightarrow$ 4,6连接。

[0082] 表1 CCP甲基化分析

甲基化单糖残基	连接方式	摩尔比例	主要碎片峰 (m/z)
2,3,4,6-Me <sub>3</sub> -GlcP	1-linked GlcP	1.10	43,45,59,71,87,101,129,145, 161,162,205
2,3,6-Me <sub>3</sub> -GlcP	1,4-linked GlcP	6.08	43,45,71,87,99,101,113,117, 129,131,173,233
2,3,4-Me <sub>3</sub> -GlcP	1,4,6-linked GlcP	1.00	43,85,101,117,127,159,201, 261

[0083] 实施例7:核磁共振

[0085] 取60mg实施例1、实施例2或者实施例3制得的蝉花子实体多糖CCP溶于1ml氘水中,瑞士Bruker-AVIII500M进行500MHz NMR扫描。

[0086] <sup>1</sup>H-NMR主要用于确定多糖结构中糖苷键构型。<sup>1</sup>H-NMR谱图(见图3a)中,多糖的信号大多数集中在 $\delta$ 3.3-5.5ppm狭小的范围内, $\delta$ 3.5-4.5ppm为糖环质子信号。 $\delta$ 4.7-5.3ppm异头氢的质子峰进一步证实该多糖同时含有 $\alpha$ -、 $\beta$ -糖苷键; $\delta$ 4.91ppm因峰积分值很小,表明其在样品中的含量不多,所以不是CCP的主组分葡萄糖信号,进而可以推断该组分中的葡萄糖以 $\alpha$ 型存在。

[0087] <sup>13</sup>C-NMR可通过异头碳的共振区( $\delta$ 90-110)峰的个数确定糖残基的数量和相对含量。通常, $\alpha$ 型糖苷异头碳化学位移在 $\delta$ 95-103ppm范围内,而多数 $\beta$ 型糖苷异头碳化学位移位于 $\delta$ 103-110ppm。此外,由<sup>13</sup>C-NMR特征信号可以确定某些糖残基或官能团,如糖醛酸的羧酸碳信号或乙酰氨基信号出现在低场区 $\delta$ 170-180ppm;6位脱氧糖的甲基碳信号出现在高场区 $\delta$ 15-20ppm;乙酰基的甲基碳信号出现在较高场区 $\delta$ 22-23.5ppm。从碳谱(见图3b)看出, $\delta$ 101.19ppm为残基(1 $\rightarrow$ 4,6)-linked $\alpha$ -D-吡喃葡聚糖和残基(1 $\rightarrow$ 4)-linked $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖的异头碳信号, $\delta$ 99.88ppm为侧链残基1-linked $\alpha$ -D-葡聚糖的异头碳信号。

[0088] 采用二维核磁谱(COSY、HSQC、HMBC)分析,并归属各糖残基归属的化学位移。

[0089] 糖残基A:根据<sup>1</sup>H NMR确定的糖残基A的1位氢(H-1)化学位移,通过COSY谱明确了H-2、H-3、H-4、H-5和H-6信号,糖残基A的H-2、H-3、H-4、H-5和H-6化学位移分别归属为 $\delta$ 3.53ppm、 $\delta$ 3.91ppm、 $\delta$ 3.59ppm、 $\delta$ 3.78ppm和( $\delta$ 3.71ppm、 $\delta$ 3.80ppm)。在归属完H的化学位移后,可通过HSQC谱归属该糖环上各C的化学位移。根据表2中C和H的化学位移,可确定糖残基A是 $\rightarrow$ 4) $\alpha$ -D-Glcp(1 $\rightarrow$ )。

[0090] 根据上述方法,依次对糖残基B、C中的碳(C)、氢(H)信号化学位移进行归属,全部归属结果见表2。通过比对,确定了糖残基B是 $\rightarrow$ 4,6) $\alpha$ -D-Glcp(1 $\rightarrow$ ,糖残基C是 $\alpha$ -D-Glcp(1 $\rightarrow$ )。

[0091] 综合以上的分析结果,确定CCP的结构是以 $\alpha$ -1,4-连接为主链, $\alpha$ -1,6-连接为支链的葡萄糖,主链上每7个 $\alpha$ -葡萄糖残基组成一个重复单元,每个重复单元中有一个 $\alpha$ -葡萄糖残基的C6位上被端基 $\alpha$ -葡萄糖(terminal- $\alpha$ -葡萄糖)取代。

[0092] 重复单元的结构有多种不同的变化组合,C6位上被端基 $\alpha$ -葡萄糖取代的 $\alpha$ -葡萄糖可以是重复单元中的任意一个 $\alpha$ -葡萄糖,例如可以是结构式I所示结构的一种重复单元,也

可以是重复单元中其它任意一个 $\alpha$ -葡萄糖残基的C6位上被端基 $\alpha$ -葡萄糖取代。

[0093] 表2 CCP化学位移分析

残基 (Residue)	化学位移 (Chemical shifts) (ppm)					
	H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6a, 6b/C6
A: →4) $\alpha$ -D-Glcp (1→	5.32/ 101.31	3.53/ 73.13	3.91/ 74.66	3.59/ 78.91	3.78/ 72.60	3.71, 3.80/ 61.90
B: →4,6) $\alpha$ -D-Glcp (1→	5.28/ 101.31	3.55/ 73.31	3.94/ 74.66	3.59/ 78.91	3.86/ 71.73	3.40/ 70.71
C: $\alpha$ -D-Glcp (1→	4.90/ 99.92	3.52/ 73.13	3.66/ 74.06	3.36/ 70.77	3.60/ 72.85	3.71,3.80/ 61.90

[0095] 实施例8:对CCP的免疫活性评价

[0096] 将实施例1、实施例2或实施例3中制备得到的蝉花子实体多糖CCP对小鼠单核巨噬细胞RAW264.7进行作用,检测CCP对RAW264.7释放NO及细胞因子(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8)的影响。

[0097] 小鼠单核巨噬细胞RAW264.7细胞以DMEM完全培养基(含20 $\mu$ g/ml多粘菌素B,10%胎牛血清,1%双抗)于37 $^{\circ}$ C,5%(体积百分比)CO<sub>2</sub>细胞培养箱中培养,第4~6代指数生长期细胞用于实验。

[0098] 于96孔板中,每孔加入RAW264.7细胞悬液( $3 \times 10^5$ 个/ml,细胞计数板计数,确定细胞存活率在95%以上)100 $\mu$ l,置于37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>培养箱孵育2h,弃去各孔中培养液,加入新鲜DMEM完全培养液100 $\mu$ l/孔(阳性对照脂多糖(LPS)刺激孔加不含PMB的DMEM完全培养液),继续培养24h。吸去培养基上清,然后分别加入DMEM完全培养液、LPS稀释液(1 $\mu$ g/ml)或不同浓度的CCP稀释液(12.5、25、50、100、200 $\mu$ g/ml)各200 $\mu$ l,重复5孔。37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>培养箱中24h,将细胞上清液100 $\mu$ l转移至新的96孔细胞培养板,每孔加入格里斯氏试剂A液(Griess A)和格里斯氏试剂B液(Griess B)的混合试剂(1:1,体积比)100 $\mu$ l,暗处避光反应20min,于540nm处测定OD值,三组平行试验取平均值,检测结果见图4。

[0099] 于24孔细胞培养板中,每孔加入RAW264.7细胞悬液( $2.0 \times 10^5$ 个/ml,细胞计数板计数,确定细胞存活率在95%以上)500 $\mu$ l,置于37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养2h,弃去培养液,加入新鲜DMEM完全培养液500 $\mu$ L(阳性对照LPS刺激孔加不含PMB的DMEM完全培养液),继续培养24h。吸去培养基上清,然后分别加入DMEM完全培养液、LPS稀释液(1 $\mu$ g/ml)或不同浓度的CCP稀释液(12.5、25、50、100、200 $\mu$ g/ml)各500 $\mu$ l,置于37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养24h。收集细胞上清液,依小鼠细胞因子TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8ELISA检测试剂盒说明测定并计算各细胞因子含量,检测结果见图5a、图5b、图5c和图5d。

[0100] 如图4所示,RAW264.7细胞中NO的释放量与细胞的增殖成正比,与阴性对照组相比,浓度为12.5、25、50、100、200 $\mu$ g/ml的CCP均可显著促进RAW264.7细胞中NO的释放( $P < 0.05$ ),显著促进RAW264.7细胞的增殖( $P < 0.05$ ),在50 $\mu$ g/ml时促进作用就已达到高值,浓度增加至100 $\mu$ g/ml、200 $\mu$ g/ml时促进效果与50 $\mu$ g/ml时相差不大,当CCP浓度提高至200 $\mu$ g/ml时显著促进RAW264.7细胞的增殖且对RAW264.7细胞无细胞毒性。所以,确定50 $\mu$ g/ml的作用浓度为CCP的最适作用浓度,为后续实验提供依据。

[0101] 检测CCP是否能促进RAW264.7细胞分泌细胞因子TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8。结果如图5a、图5b、图5c和图5d所示,与阴性对照组相比,在实验质量浓度范围内,CCP均能够明显

刺激RAW264.7细胞分泌细胞因子TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 ( $P < 0.05$ ), 具有剂量依赖性。各实验质量浓度的CCP均能够刺激RAW264.7分泌肿瘤坏死因子TNF- $\alpha$ , 与对照组相比具有极显著差异, 与白介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、白介素-6 (IL-6)、白介素-8 (IL-8) 结果不同的是, 肿瘤坏死因子TNF- $\alpha$ 的分泌量呈现先升高后下降的趋势, 在CCP为100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时达到最高值, 为1578 $\text{pg}/\text{mL}$ , 仅略低于阳性对照; IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8的分泌量呈现随CCP浓度变大而持续升高的趋势。综上所述, CCP对小鼠巨噬细胞RAW264.7具有免疫调节活性, 可直接作为免疫调节剂或者用于制备免疫调节剂。

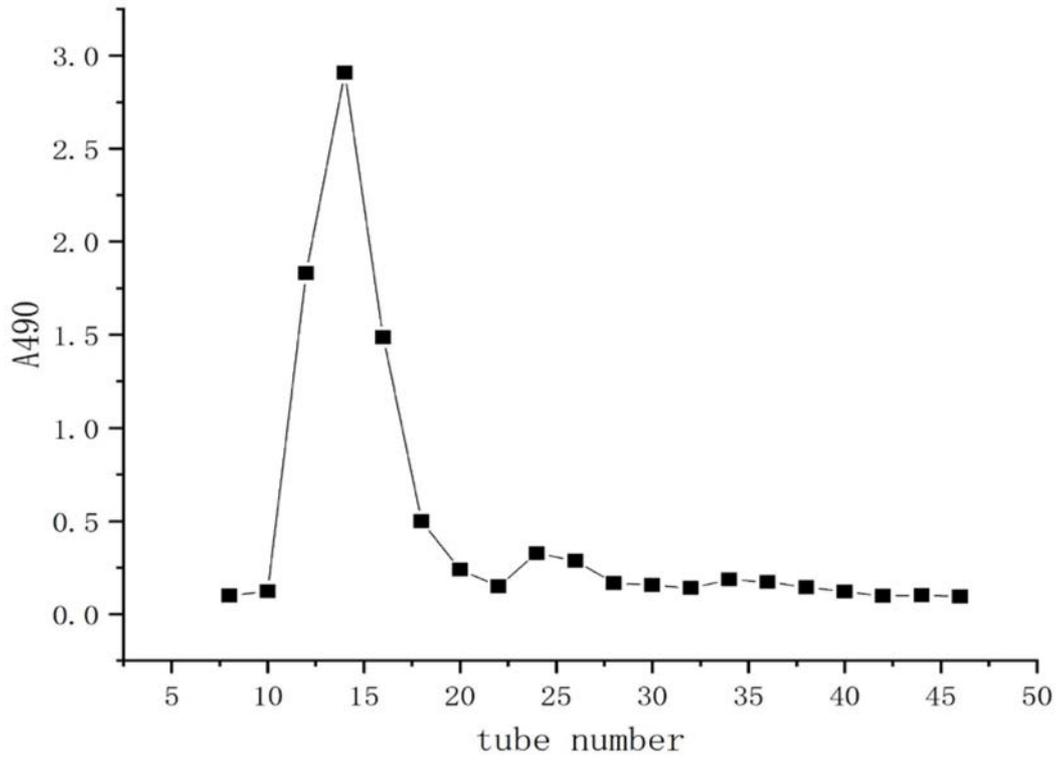


图1

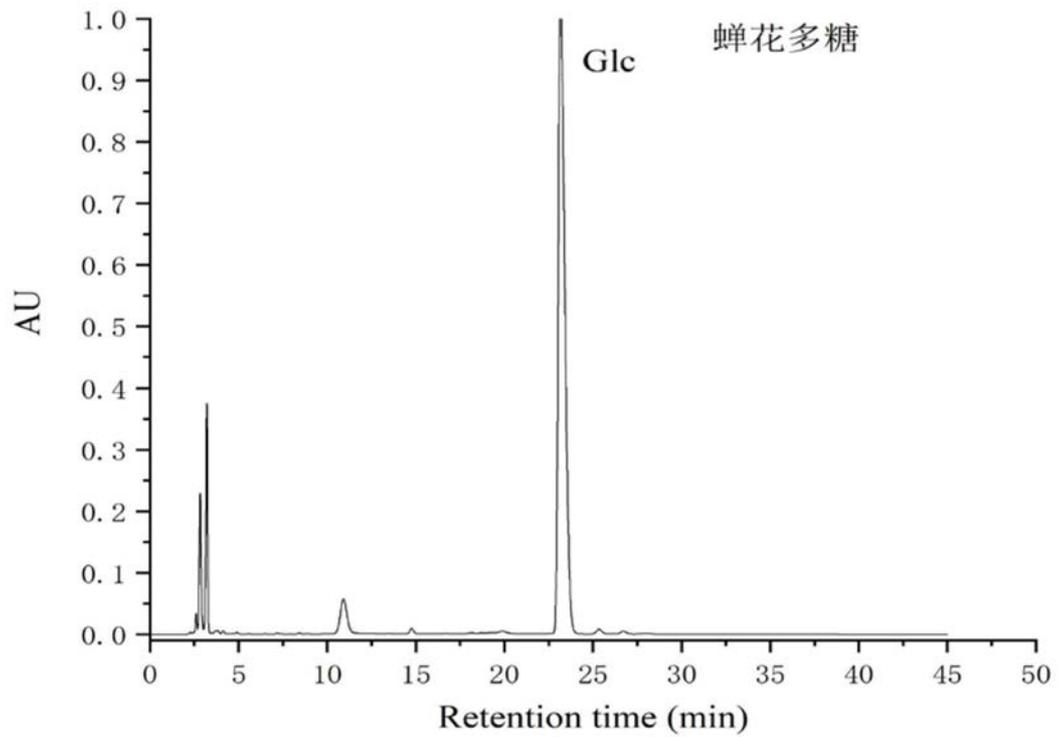


图2a

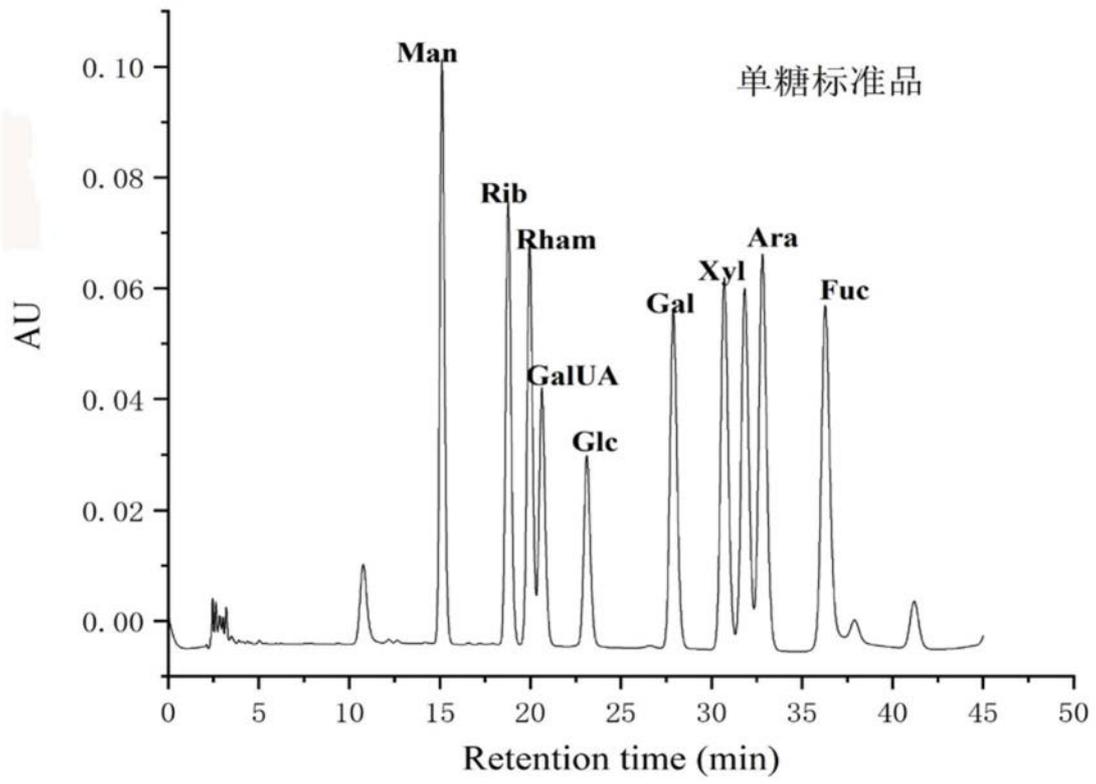


图2b

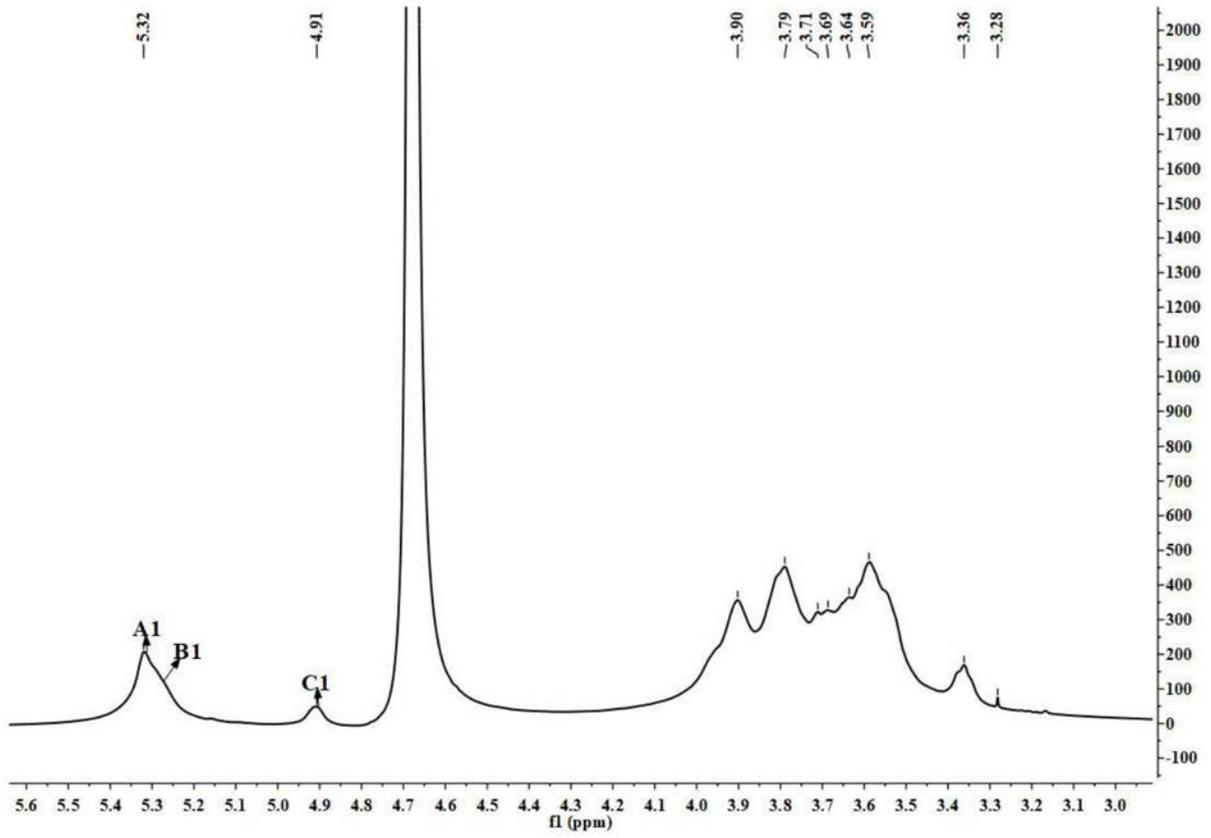


图3a

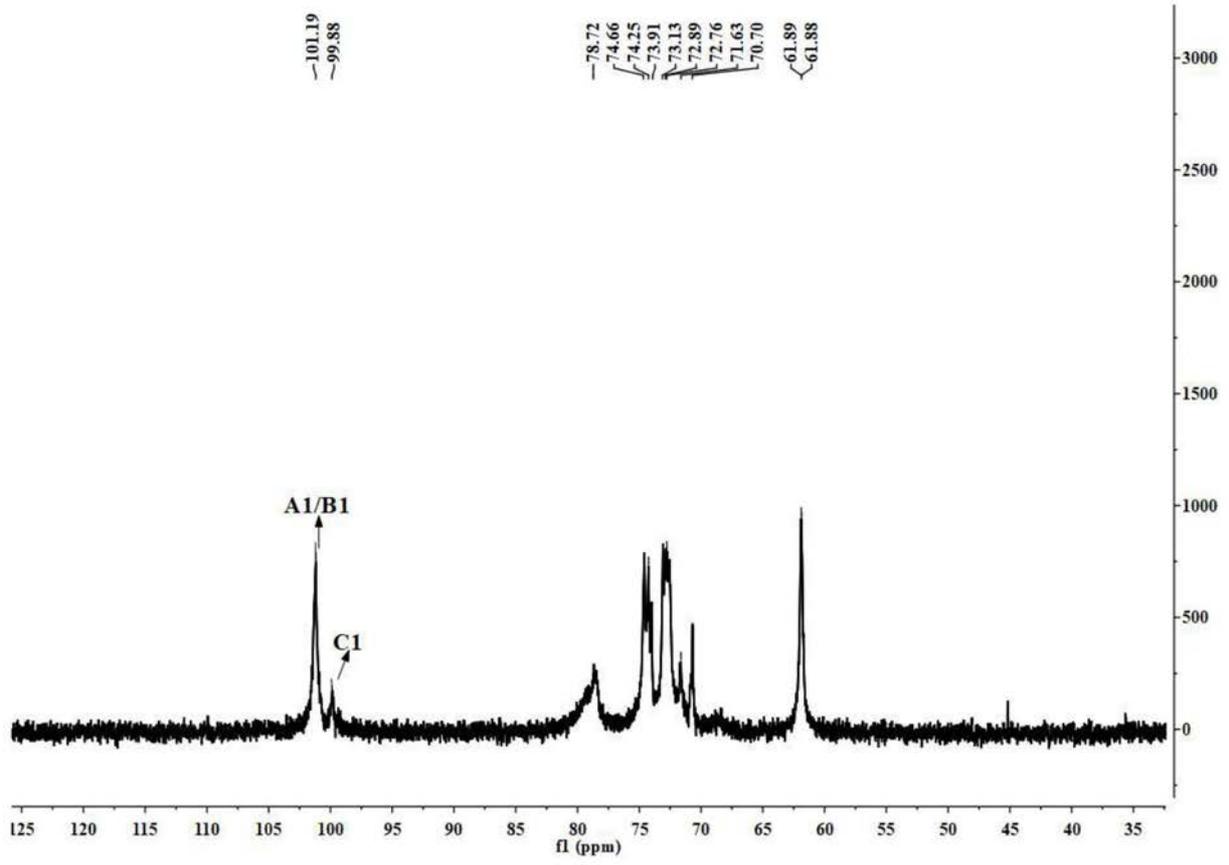


图3b

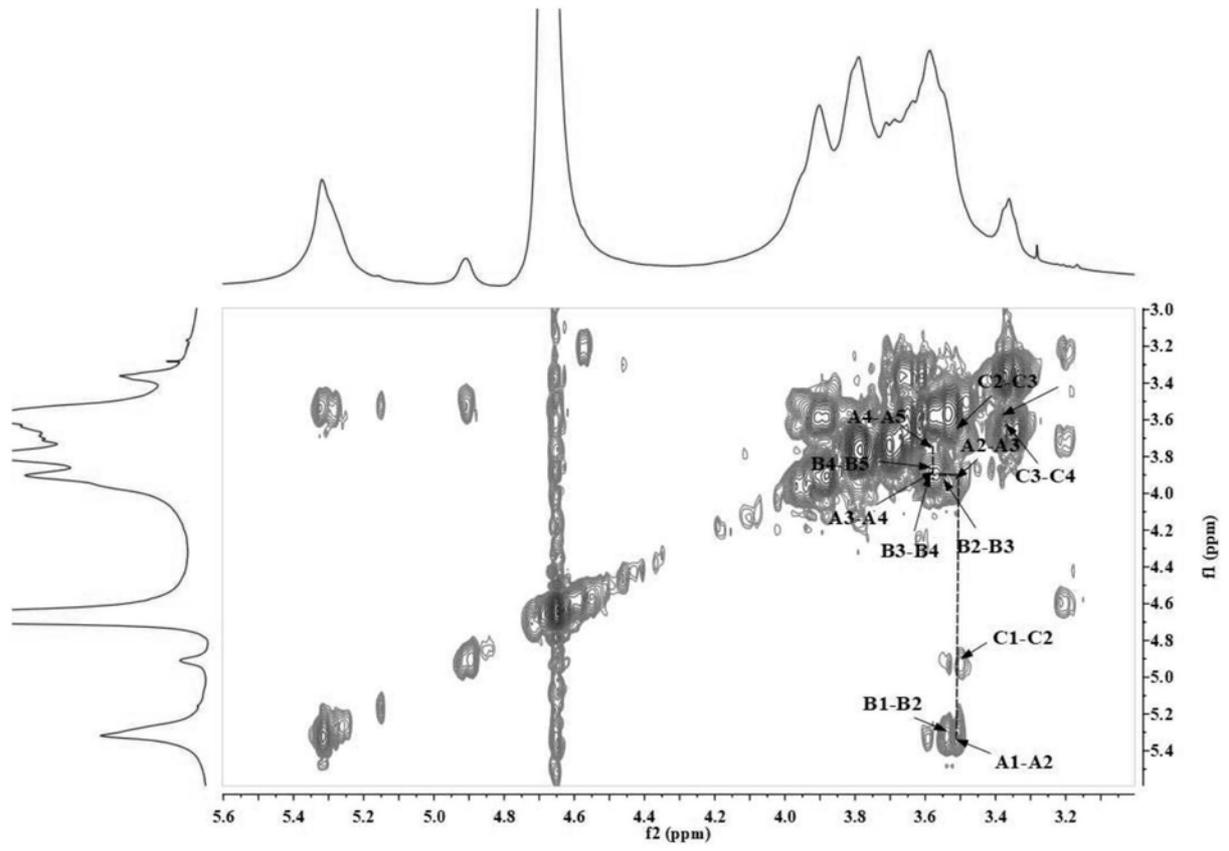


图3c

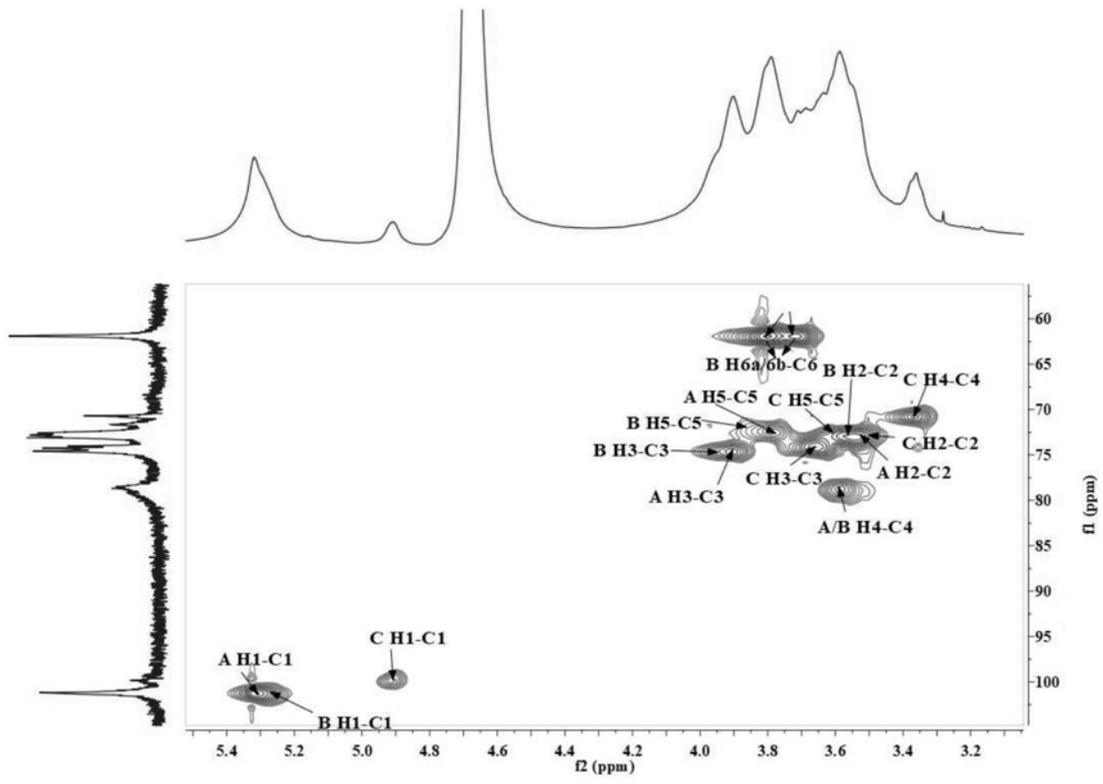


图3d

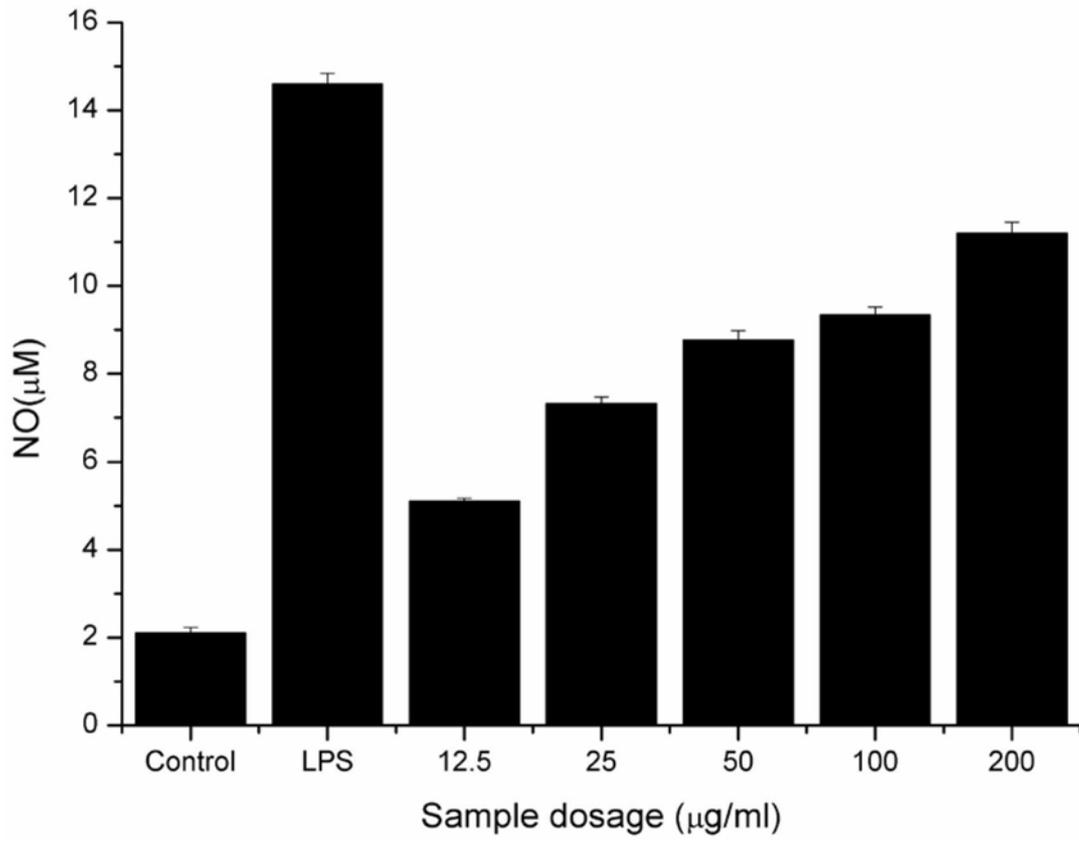


图4

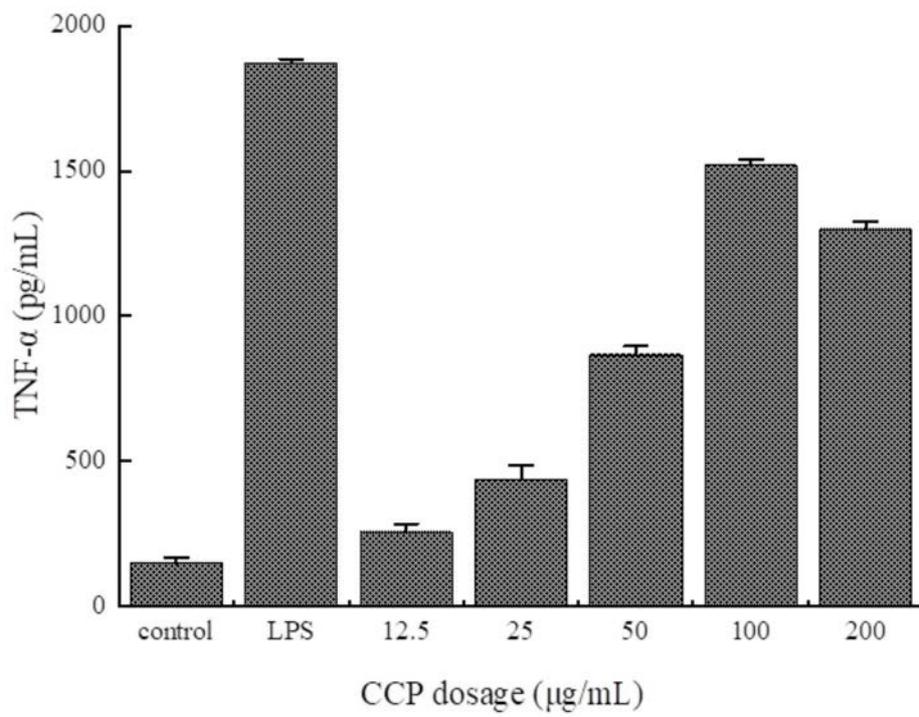


图5a

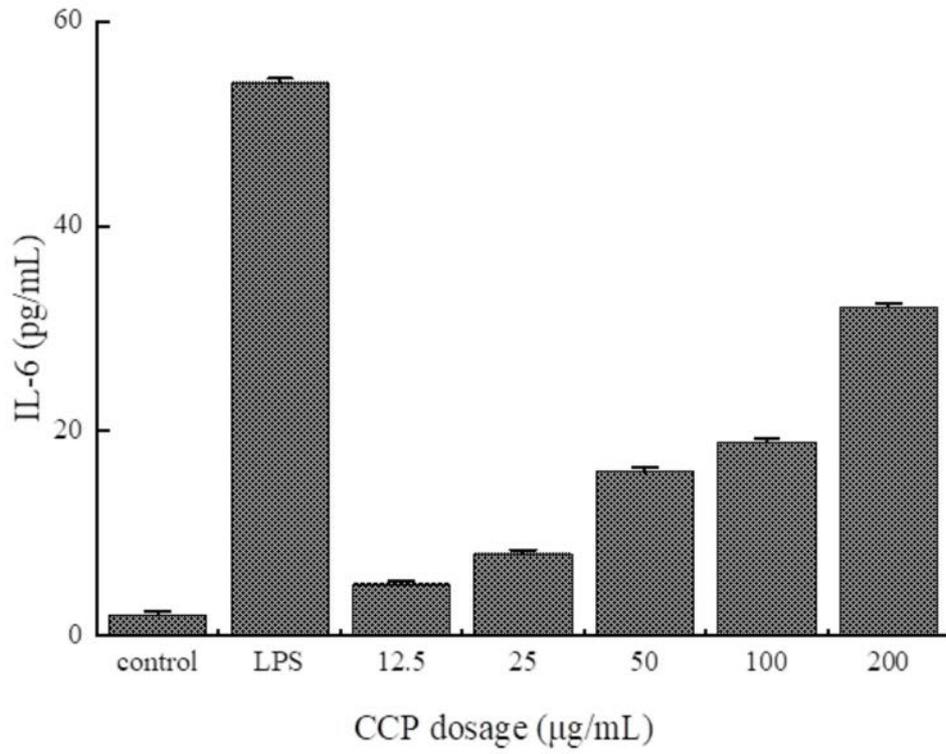


图5b

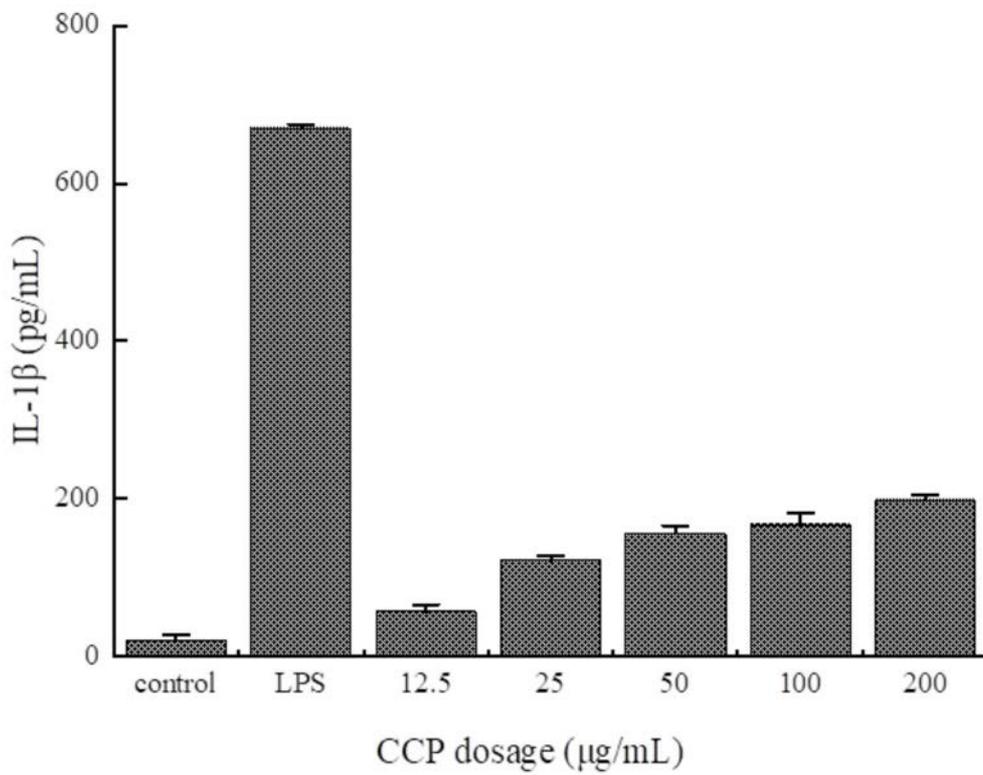


图5c

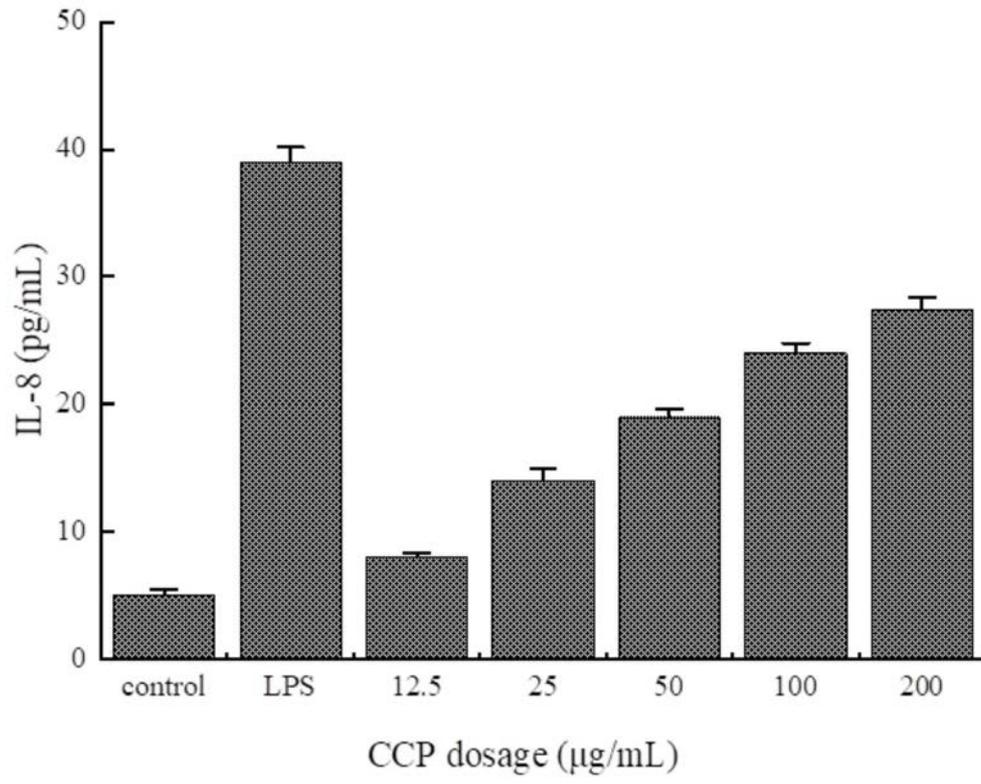


图5d

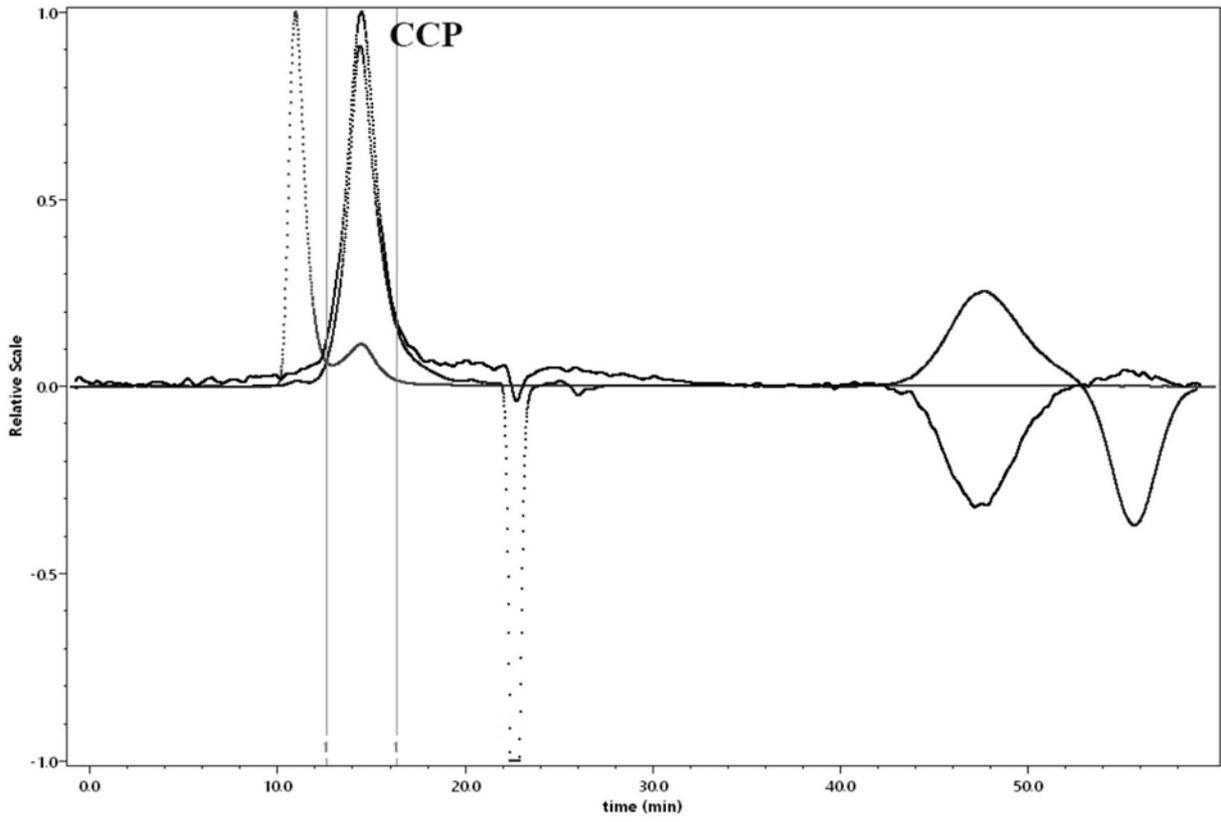


图6