

II 型鼠李半乳糖醛酸聚糖的制备方法和结构表征的研究进展

刘育朋^{1#}, 施松善^{1#}, 步盈萱¹, 龚欢¹, 王辉俊^{1,2*}, 王顺春^{1,2**}

(¹上海中医药大学中药研究所, 上海 201203; ²中药标准化教育部重点实验室, 上海 201203)

摘要 II 型鼠李半乳糖醛酸聚糖 (RG-II) 是果胶结构域中的一种, 其结构在不同物种之间具有高度的保守性。RG-II 的主链由约 9 个半乳糖醛酸经 α -1,4 糖苷键连接而成, 并被 6 个 (A–F) 明确定义的侧链取代。其中二糖侧链 C、D 和单糖侧链 E、F 的结构在不同来源的 RG-II 中基本保持相同。寡糖侧链 A 和 B 则存在轻微的变异性。通过相对分子质量、单糖组成和质谱分析等手段可实现 RG-II 的结构表征。中药中含有 RG-II 结构域的多糖具有很高的药用价值, 使用内切多聚半乳糖醛酸酶 (Endo-PG) 和草酸青霉可将 RG-II 从中药中分离并对其在多糖中的含量进行测定。从葡萄酒中可快速制备大量 RG-II 标准品用于新定量方法的开发, 实现对中药活性多糖的质量控制, 推动中药多糖的研究进程。

关键词 果胶; II 型鼠李半乳糖醛酸聚糖; RG-II; 内切多聚半乳糖醛酸酶; 草酸青霉; 葡萄酒

中图分类号 R932 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2024)04-0432-11

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.2024040202

引用本文 刘育朋, 施松善, 步盈萱, 等. II 型鼠李半乳糖醛酸聚糖的制备方法和结构表征的研究进展 [J]. 中国药科大学学报, 2024, 55(4): 432–442.

Cite this article as: LIU Yupeng, SHI Songshan, BU Yingxuan, *et al.* Advances in the preparation and structural characterization of rhamnogalacturonan II[J]. *J China Pharm Univ*, 2024, 55(4): 432–442.

Advances in the preparation and structural characterization of rhamnogalacturonan II

LIU Yupeng^{1#}, SHI Songshan^{1#}, BU Yingxuan¹, GONG Huan¹, WANG Huijun^{1,2*}, WANG Shunchun^{1,2**}

¹Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203; ²Key Laboratory of Chinese Medicine Standardization, Ministry of Education, Shanghai 201203, China

Abstract Rhamnogalacturonan II (RG-II) is one of the structural domains of pectin whose structure is highly conserved among species. The main chain of RG-II consists of approximately nine galacturonic acids linked by α -1,4 glycosidic bonds, with six well-defined side chains replacing them (A–F). The structures of the disaccharide side chains C and D and the monosaccharide side chains E and F in RG-II from different sources remain essentially the same. In contrast, the oligosaccharide side chains A and B showed slight variability. Structural characterization of RG-II can be achieved by molecular weight, monosaccharide composition, and mass spectrometry. The polysaccharides containing RG-II structural domains in traditional Chinese medicines (TCMs) have high medicinal value. Isolation of RG-II can be achieved using endo-polygalacturonase (Endo-PG) and *Penicillium oxalicum*. A substantial number of RG-II standards can be rapidly prepared from red wine for the development of new quantitative methods to realize the quality control of active polysaccharides from traditional Chinese medicines and to promote the research process of polysaccharides from traditional Chinese medicines.

Key words pectin; rhamnogalacturonan II; RG-II; endo-polygalacturonase; penicillium oxalate; red wine

收稿日期 2024-04-02 通信作者 *Tel: 021-51322496 E-mail: wanghj@shutcm.edu.cn

**Tel: 021-51322512 E-mail: shunchunwang@126.com

基金项目 上海市自然科学基金项目 (No.21ZR1462900), 国家自然科学基金项目 (No.82274078, No.U23A20512), 上海市东方英才计划青年项目

[#]刘育朋和施松善为共同第一作者

This study was supported by the Natural Science Foundation of Shanghai(No.21ZR1462900),the National Natural Science Foundation of China(No.82274078, No.U23A20512), and Shanghai Oriental Talent Program for Youth

[#]LIU Yupeng and SHI Songshan contributed equally to this work

多糖是植物体内和蛋白质, 核酸, 脂质一样重要的生物大分子, 具有多种生物活性, 如抗炎^[1]、抗氧化^[2]、抗菌^[3]、抗糖尿病^[4]、免疫调节^[5]等。果胶作为一种酸性杂多糖, 具有很好的活性, 例如腐婢果胶可以有效抑制脂多糖(LPS)刺激的 RAW 264.7 巨噬细胞中活性氧和丙二醛的产生, 并相应地缓解炎症细胞因子^[6]; 獐牙菜果胶 WSMP-A2b 由 I 型鼠李半乳糖醛酸聚糖(RG-I)、II 型鼠李半乳糖醛酸聚糖(RG-II)和同聚半乳糖醛酸(HG)结构域组成, 在体外显示出很强的抗氧化活性^[7]。RG-II 是果胶多糖的一部分, 最初通过内切多聚半乳糖醛酸酶(Endo-PG)的作用从悬浮培养的梧桐细胞的初生细胞壁中分离出来^[8]。按质量计算, RG-II 占维管束植物初生细胞壁多糖的 1%~5%^[9-10], 它对植物的生长具有重要作用。植物细胞壁中的大多数 RG-II 都以“硼桥”连接的二聚体形式存在, 其中硼原子与形成二聚体的 RG-II 结构域中的侧链“A”中的芹糖残基形成硼酸二酯^[11]。二聚体 RG-II (dRG-II) 对果胶网络的稳定性极其重要^[12], 如果植物体内缺乏硼元素或 RG-II 侧链 A 的结构发生突变而无法形成“硼桥”, 会导致细胞生长缺陷和细胞壁孔隙率变化。目前针对中药中 RG-II 的研究十分热门, 发现其具有非常好的药用活性。例如乌头 RG-II 果胶 KMPS 对饮食诱导的肥胖小鼠有很好的降血糖作用^[13]。绿茶成熟叶子中的 RG-II 果胶 GTE-II 可以通过激活巨噬细胞和 NK 细胞从而实现抑制肿瘤转移的作用^[14]。柑橘皮 RG-II 二聚体 CPE-II 对癌症转移具有相当高的抑制作用^[15]。为了进一步探索中药 RG-II 和含有 RG-II 结构域的均一果胶的药效和作用机制, 对它的分离纯化和结构研究成为了目前的热门。

1 RG-II 结构的保守性和变异性

果胶的“平滑区和毛发区”模型是目前最为认可的模型(图 1-A), 该模型的光滑区由 α -1,4-糖苷键连接的 GalA 构成的线性 HG 组成, 约占植物果胶的 65%。RG-I、RG-II 和木糖半乳糖醛酸聚糖

(XGA)通过共价键连接形成果胶模型的毛发区, RG-I 占果胶的 20%~35%, RG-II 和 XGA 的含量一般低于 10%^[8], 其中以 HG、RG-I 和 RG-II 为果胶的主要结构域^[16]。RG-II 是植物界中结构最为复杂的多糖^[17], 其结构域含有 13 种不同的糖基和 21 种不同的糖苷键, 相对分子质量约为 5000。RG-II 在植物细胞壁中经常以二聚体的形式存在, 相对分子质量约为 10000, 二聚体 RG-II 可以在酸性条件下转变为单体 RG-II。在对不同来源的 RG-II 进行研究时发现其具有高度的结构保守性(图 1-B)^[18]。在 RG-II 结构域中, 有约 12 个 D-半乳糖醛酸(D-GalA)、5 个 L-鼠李糖(L-Rha)、4 个 L-阿拉伯呋喃糖(L-Araf)、2 个 D-芹糖(D-Api), 以及 L-阿拉伯吡喃糖(L-Arap)、L-岩藻糖(L-Fuc)、2-O-甲基-L-岩藻糖、2-O-甲基-D-木糖、D-槭树酸(D-AceA)、D-葡萄糖醛酸(D-GlcA)、D-半乳糖(D-Gal)、L-半乳糖(L-Gal)、2-酮-3-脱氧-D-甘露醇辛酮酸糖(Kdo)和 3-脱氧-D-来苏-庚二酸(Dha)各 1 个^[19-20]。RG-II 有 6 个特有的糖基, 分别为: AceA、Kdo、Dha、3-C-羟甲基- β -D-赤藓糖、2-O-甲基-D-果糖和 2-O-甲基-D-木糖^[21]。RG-II 的主链骨架由大约 9 个 α -1,4 糖苷键连接的 GalA 残基构成, 与 HG 相同, 但其主链上连有 6 个侧链(A-F), F 由 1 个 Araf 组成, 与主链 GalA 残基的 O-3 相连, 该残基的 O-2 连有侧链 A, 侧链 E 同样由 1 个 Araf 组成, 与主链 GalA 残基的 O-3 相连, 但该 Araf 残基与侧链 E 中的 Araf 残基所处的环境差异较大, 将二者从主链断裂下来需要使用不同的肠道细菌^[15]。侧链 C 和侧链 D 均含有两个糖基, 侧链 C 含有稀有糖基 Kdo, 侧链 D 含有稀有糖基 Dha^[22]。RG-II 结构域的侧链 A 和 B 会发生轻微的变异^[23], 例如不同葡萄酒 RG-II 的侧链 A 均含有 8 个糖基, 变异性主要体现在部分糖基中羟基的甲基化和果糖残基可被氧化为半乳糖残基。拟南芥和梧桐 RG-II 中侧链 B 含有 7 个糖基, 而葡萄酒 RG-II 侧链 B 含有 9 个糖基, 它的聚合度取决于 L-Rha 残基上的取代情况(图 1-D)^[24]。目前已发现的 RG-II 侧链 B 的聚合度范围为 5~9(图 1-C)。

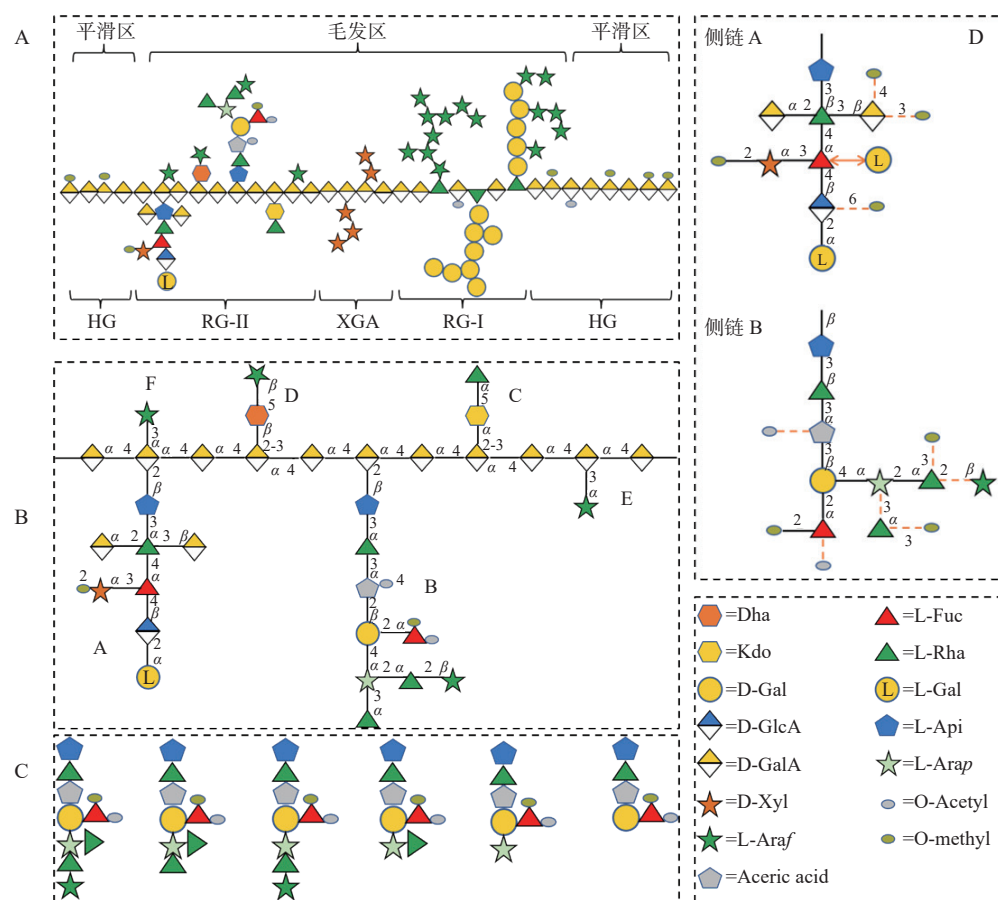


图 1 果胶结构模型和 RG-II 结构域的结构信息

A: 果胶的“平滑区和毛发区”模型; B: RG-II 的保守结构; C: RG-II 侧链 B 的变异结构; D: RG-II 的侧链 A 和侧链 B (其中---代表可变部位, ↔代表可以互变)

且从同一 RG-II 中分离出来的侧链 B 具有不同的聚合度, 存在酸水解导致高聚合度侧链降解为低聚合度侧链的可能, 尤其是聚合度为 5 的侧链 B, 只存在于极小部分植物中, 且在该植物的 RG-II 中占比很低, 为降解产物的可能性较大^[25]。在对 RG-II 结构研究时发现其单糖的组成比例无论在同一物种之间还是不同物种之间都十分接近, 更能说明 RG-II 结构的保守性(表 1)。

2 RG-II 的制备

在对中药多糖进行研究时, 需要先提取总多糖并对其进行分离纯化。当以多糖的药理活性为重点研究对象时, 可直接利用总多糖作为药效物质进行研究, 或通过阴离子交换色谱法(DEAE-纤维素柱等)对总多糖进行分离, 得到中性多糖和酸性果胶后, 再进行药理活性研究^[26-27]。当以多糖的化学结构为主要研究对象时, 需要将中性多糖或酸性果

胶进一步分离纯化, 可以分为生物和化学手段。化学手段主要借助阴离子交换色谱法和分子排阻色谱法, 得到同一相对分子质量范围内的均一多糖, 再进行结构和活性研究^[28-33]。生物手段主要借助于酶类生物试剂, 将中性多糖和酸性多糖酶解成 RG-I, RG-II, HG 等类型多糖和一些寡糖片段, 比如通过内切聚半乳糖醛酸酶 M2、内切-1,4-β-半乳糖酶和内切-1,5-α-L-阿拉伯聚糖酶的酶解作用可将东北土当归中的多糖 WACP(S)-A-c 酶解为 HG 和 RG-II 片段^[34]。常见的果胶酶有聚甲基半乳糖醛酸酶(Endo/Exo-PMG), 聚半乳糖醛酸酶(Endo/Exo-PG), 聚甲基半乳糖醛酸裂解酶(Endo/Exo-PMGL)和聚半乳糖醛酸裂解酶(Endo/Exo-PGL)等^[35]。Endo-PG 与阴离子交换色谱法和尺寸排阻色谱法结合的方法广泛应用于从中药中制备 RG-II, 也有较少的研究使用到了草酸青霉。葡萄酒中富含 RG-II, 可以实现 RG-II 的快速制备。

表 1 同一物种和不同物种中的 RG-II 的单糖组成比例

单糖	拟南芥1 ^a	拟南芥2 ^b	拟南芥3 ^b	豌豆 ^b	梧桐 ^a	甜根菜 ^c	苹果 ^d	胡萝卜 ^c	番茄 ^c	物质的量分数/%
Gal	9.0	9.0	7.0	8.0	9.0	11.8	6.4	7.8	8.1	6.4~11.8
Ara	17.0	13.0	13.0	10.0	10.0	12.8	16.8	14.0	12.4	10.0~17.0
Rha	10.0	14.0	14.0	11.0	12.0	14.2	17.4	14.3	11.6	10.0~17.4
Glc	2.0	ND	ND	ND	2.0	ND	ND	ND	ND	0.0~2.0
GalA	44.0	40.0	42.0	51.0	31.0	37.4	33.0	28.3	35.5	28.3~51.0
GlcA	2.0	4.0	6.0	3.0	3.0	5.5	2.8	2.7	4.4	2.0~6.0
Xyl	3.0	ND	ND	ND	2.0	ND	ND	ND	ND	0.0~3.0
Fuc	3.0	3.0	4.0	2.0	4.0	2.2	5.5	4.7	4.0	2.0~5.5
2Me-Fuc	1.0	3.0	2.0	3.0	4.0	3.9	4.8	5.0	4.4	1.0~5.0
2Me-Xyl	2.0	3.0	4.0	3.0	5.0	3.4	2.9	4.0	3.3	2.0~5.0
Api	3.0	ND	ND	ND	6.0	8.5	5.4	9.1	7.0	0.0~9.1
AceA	1.0	2.0	1.0	1.0	3.0	ND	1.5	3.5	2.3	0.0~3.5
Kdo	3.0	2.0	2.0	3.0	4.0	ND	1.1	2.3	4.0	0.0~4.0
Dha	ND	2.0	2.0	2.0	4.0	ND	2.5	4.6	3.0	0.0~4.6

ND: 未检测到
a: [36]; b: [37]; c: [38]; d: [39]

2.1 使用内切多聚半乳糖醛酸酶提取 RG-II

该方法需先对中药材进行水提醇沉得到粗多糖, 后用阴离子交换色谱法 (DEAE-纤维素等) 对其分离, 弃去蒸馏水洗脱的中性多糖, 再使用 0.5 mol/L NaCl 溶液洗脱, 得到酸性多糖。继续通过阴离子交换色谱法 (DEAE-纤维素等) 对酸性多糖进行分离, 分别使用蒸馏水、0.1、0.2、0.3 和 0.5 mol/L 等不同浓度 NaCl 溶液进行洗脱, 或直接使用蒸馏水和不同浓度的 NaCl 溶液进行洗脱, 再对合适的洗脱部位进行透析、冷冻干燥得到部位多糖。接着使用尺寸排阻色谱法 (Sephacrose CL-6B 等) 对部位多糖进一步分离, 对合适的级分进行透析、冷冻干燥得到均一多糖 (液相色谱图为单一对称峰)。前文已经提过, 果胶主要由 HG、RG-I 和 RG-II 结构域构成, 且 HG 中一些 GalA 残基会发生甲基化和乙酰化。在对 RG-II 进行分离时, 多使用内切多聚半乳糖醛酸酶 (Endo-PG)^[40], 该酶作用于连续 4 个未酯化的 D-半乳糖醛酸的 α -1, 4-糖苷键^[41-42], 将 HG、RG-I 和 RG-II 从果胶中释放出来。在对果胶进行酶解前, 需先对其进行脱酯处理, 保证 Endo-PG 作用位点的裸露, 一般使用 0.5 倍的 0.1 mol/L NaOH 在低温 (4 ℃) 下搅拌下 4 h 或静置过夜, 用 10% 的乙酸溶液进行中和, 然后通过水透析或者脱盐柱 (Sephadex G-10 等) 脱去盐分, 冷冻干燥后得到脱酯果胶。使用红外光谱对脱酯状况进行监控, 或者使用二硝基水杨酸法测定还原末端基

团, 当基团的增加停止时, 脱酯完成^[43]。将脱酯后的均一多糖 (10 mg/mL) 溶于 HAc-NaAc 缓冲溶液 (50 mmol/L, pH 4.5) 中, 加入 Endo-PG (2U), 在 40 ℃ 下培养 24 h。酶解液在 100 ℃ 下反应 10 min, 离心弃去 Endo-PG。使用高效凝胶渗透色谱法 (HPGPC) 监测酶解反应的进程^[44-45]。或将溶于 NaOH 溶液中的脱酯均一多糖用 10% 冰醋酸溶液调节 pH 至 5.0, 加入 Endo-PG 进行酶解^[46]。酶解产物通过尺寸排阻色谱法 (Sephadex G-50、G-75、G-100 等) 分离, 对合适的级分透析、冷冻干燥得到 RG-II。或在得到 0.5 mol/L NaCl 溶液洗脱的酸性多糖后, 直接进行脱酯、酶解, 产物经尺寸排阻色谱法 (Sephadex G-25 等) 分离, 得到高聚级分和低聚级分。高聚级分再经阴离子交换色谱法 (DEAE-Sephacrose Fast Flow 等) 分离得到合适级分, 最后通过尺寸排阻色谱法 (Sephadex G-75 等) 进一步纯化, 对合适的级分进行透析、冷冻干燥得到 RG-II。无论在哪一步进行酶解反应, 均需要借助阴离子交换色谱法和尺寸排阻色谱法进行分离纯化, 顺序有差异, 但是整个实验流程大同小异。

忍冬^[44]、山豆根^[46]、三七^[45]、蚊母草^[47]、人参^[48]、菰蓝^[49] (大青叶和板蓝根) 6 种中药中的 10 种利用 Endo-PG 法制备的 RG-II 多糖见表 2。人参 RG-II 是通过酶解 0.5 mol/L NaCl 溶液洗脱的酸性多糖得到的, 其他 RG-II 均是将 0.5 mol/L NaCl 溶液洗脱的酸性多糖进一步纯化后得到均一多糖后再酶解

表 2 使用 Endo-PG 法制备的 RG-Ⅱ 的单糖组成比例

单糖	忍冬	山豆根		三七			蚊母草		人参	菰蓝		物质的量分数/%
	多糖1	多糖1	多糖2	多糖1	多糖2	多糖3	多糖1	多糖2	多糖1	大青叶	板蓝根	
Man	0.9	1.8	2.4	2.7	ND	1.8	0.8	1.0	0.6	2.9	1.5	0.0~2.9
Gal	4.6	13.4	13.6	34.3	11.5	11.1	11.9	20.5	11.4	14.5	8.7	4.6~34.3
Ara	10.7	9.7	9.8	16.7	11.0	11.5	16.7	23.6	20.3	9.9	11.9	9.7~23.6
Rha	9.4	28.4	18.9	12.9	10.5	10.4	19.8	16.0	13.4	28.9	10.2	9.4~28.9
Glc	2.2	1.1	2.7	3.6	ND	2.8	1.9	3.4	4.0	3.6	0.9	0.0~4.0
GalA	70.8	38.5	43.2	22.2	60.8	57.4	39.1	27.4	47.9	36.1	56.6	22.2~70.8
GlcA	1.4	3.4	6.0	5.1	3.9	2.8	4.0	6.3	2.4	2.1	2.2	1.4~6.3
Xyl	ND	1.8	1.4	ND	ND	ND	5.8	1.8	ND	1.2	4.7	0.0~5.8
Fuc	ND	ND	ND	2.5	2.3	2.2	ND	ND	ND	ND	ND	0.0~2.5
得率/%	20.8	9.6	2.1	0.4	0.9	0.3	4.9	1.0	0.2	2.1	1.4	0.2~20.8
相对分子质量(kD)	14.1	6.4/10.4	6.6/12.7	6.0	5.8	5.6	5.4/9.7	6.4/10.4	3.7	16.0	13.6	m:3.7~16.0 d:9.7~12.7

ND: 未检测到

得到的。表格中列举了相对分子质量,得率和单糖组成等。其中,山豆根、三七、蚊母草和人参中的 8 种 RG-Ⅱ 的单体相对分子质量在 5.4 kD~6.6 kD 范围内,二聚体相对分子质量在 9.7 kD~12.7 kD 范围内,均属于 RG-Ⅱ 相对分子质量的一般范围内。但是忍冬和菰蓝(大青叶、板蓝根)中的 3 种 RG-Ⅱ 的相对分子质量 ≥ 13.6 kD,较为特殊。山豆根、三七、蚊母草、人参和菰蓝中的 10 种 RG-Ⅱ 得率为 0.4%~9.6%,属于正常范围,忍冬 RG-Ⅱ 的得率为 20.8%,较为特殊。忍冬 RG-Ⅱ 的相对分子质量和得率都不满足 RG-Ⅱ 的一般要求,无法得知是多糖的特殊性还是酶解反应的不完全性导致的该结果,具体原因还待探究。通过该法可获得中药均一多糖中 HG、RG-Ⅰ 和 RG-Ⅱ 的质量比(表 3),实现多糖的质量控制,且可通过“拼接法”完成均一多糖的结构表征,降低表征难度。

表 3 均一多糖中 HG、RG-Ⅰ 和 RG-Ⅱ 的质量占比

中药	RG-Ⅱ 名称	$m(\text{HG}):m(\text{RG-Ⅰ}):m(\text{RG-Ⅱ})$
忍冬	忍冬RG-Ⅱ	43.0:7.6:20.8
山豆根	山豆根RG-Ⅱ-a	24.0:49.0:27.0
	山豆根RG-Ⅱ-b	38.0:46.0:16.0
三七	三七RG-Ⅱ-a	67.2:6.8:26.7
	三七RG-Ⅱ-b	63.7:10.8:25.5
	三七RG-Ⅱ-c	70.7:17.3:11.9
蚊母草	蚊母草RG-Ⅱ-a	36.4:46.2:17.2
	蚊母草RG-Ⅱ-b	41.8:50.2:10.8
大青叶	大青叶RG-Ⅱ	9.7:27.4:41.8
板蓝根	板蓝根RG-Ⅱ	42.5:24.6:8.3

2.2 使用草酸青霉提取 RG-Ⅱ

果胶酶主要由微生物和植物合成,微生物中的真菌、放线菌和细菌都能产生果胶酶的相关酶系^[50]。Endo-PG 就是由国际公认的安全菌株-黑曲霉产生的。草酸青霉是一种无性型丝状真菌,广泛应用于农业,分布在土壤、根际、食物及动植物体内,具有多种作用^[51]。经过研究发现,草酸青霉也可以产生果胶酶^[52],从而实现 RG-Ⅱ 的制备。因为反应条件存在较大差异,对 RG-Ⅱ 的分离会有较大影响,所以将该方法与酶解法分开讨论。在使用草酸青霉制备 RG-Ⅱ 时,同样需先对中药进行水提醇沉得到粗多糖,后通过阴离子交换色谱法(DEAE-纤维素等)对粗多糖纯化,将蒸馏水洗脱的中性多糖弃去,回收 0.5 mol/L NaCl 溶液洗脱的酸性多糖,透析,冷冻干燥后得到的果胶为实验材料。将草酸青霉培养在自制 Czapek Dox 培养基(含 0.3% NaNO₃、0.05% KCl、0.05% MgSO₄·7H₂O、0.1% K₂HPO₄ 和 0.001% FeSO₄·7H₂O)中,并加入果胶,在 28 ℃、140 r/min 的条件下培养 4 d。每日取培养基上清液,通过 HPGPC 监测果胶降解情况。用尼龙布过滤发酵液,离心去除菌丝,上清液中加入乙醇进行沉淀,再经过透析、冷冻干燥后得到果胶降解产物。产物再次通过阴离子交换色谱法(DEAE-纤维素等)进行分离,分别使用蒸馏水,0.1、0.2 和 0.3 mol/L NaCl 溶液进行洗脱,通过尺寸排阻色谱法(Sephadex G-50、G-75 等)对合适的洗脱多糖进一步纯化,得到纯化的 RG-Ⅱ 结构域^[53]。本研究总结了通过草酸

青霉从党参、罗布麻、高丽参、玄参、槲寄生、向日葵和藜芦中制备的 RG-Ⅱ, 同时存在单体 RG-Ⅱ(mRG-Ⅱ)和二聚体 RG-Ⅱ(dRG-Ⅱ), 单体的相对分子质量分布在 3.7 kD~7.6 kD, 二聚体的相对分子质量为 9.3 kD~11.5 kD, 符合 RG-Ⅱ的一般相对分子质量范围。得率分布在 0.4%~4.8%, 符合 RG-Ⅱ在果胶中的一般含量区间(表 4)。从党参中分出的两种 RG-Ⅱ的糖组成分别为 GalA-Rha-Gal-Ara-Glc-Fuc(54.0:8.8:14.5:12.9:3.7:5.9)和 GalA-Rha-Gal-Ara-Glc-Fuc(44.7:24.7:7.9:10.1:5.2:6.7), 二者均在 RG-Ⅱ单糖组成的正常范围内, 说明该方法制备的 RG-Ⅱ的纯度较高。目前利用该方法制备 RG-Ⅱ的研究较少, 可能是由于草酸青霉的价格略高。但该方法分离效果好, 可以准确定量多糖中的 RG-Ⅱ, 实现以 RG-Ⅱ为药效物质的中药的质量控制。后续可使用酶解法和草酸青霉法处理同一种果胶, 对 RG-Ⅱ的得率和单糖组成进行比较, 更直观评价两种方法分离 RG-Ⅱ的优先性。

表 4 使用草酸青霉法制备的 RG-Ⅱ的相对分子质量和得率

中药	RG-Ⅱ相对分子质量/kD	得率(占酸性果胶)/%
党参	党参RG-Ⅱ-1: 5.1	党参RG-Ⅱ-1: 3.3
	党参RG-Ⅱ-2: 6.2	党参RG-Ⅱ-2: 0.8
罗布麻	罗布麻RG-Ⅱ-1: 4.1	罗布麻RG-Ⅱ-1: 2.4
	罗布麻RG-Ⅱ-2: 5.6	罗布麻RG-Ⅱ-2: 4.4
	罗布麻RG-Ⅱ-3: 7.6/11.5	罗布麻RG-Ⅱ-3: 0.4
高丽参	高丽参RG-Ⅱ-1: 5.6	高丽参RG-Ⅱ-1: 3.4
	高丽参RG-Ⅱ-2: 6.2/9.3	高丽参RG-Ⅱ-2: 1.4
玄参	玄参RG-Ⅱ-1: 6.2	玄参RG-Ⅱ-1: 3.7
	玄参RG-Ⅱ-2: 5.1/9.3	玄参RG-Ⅱ-2: 1.6
槲寄生	槲寄生RG-Ⅱ-1: 3.7	槲寄生RG-Ⅱ-1: 0.4
	槲寄生RG-Ⅱ-2: 4.6	槲寄生RG-Ⅱ-2: 4.0
	槲寄生RG-Ⅱ-3: 5.6/9.3	槲寄生RG-Ⅱ-3: 4.0
向日葵	向日葵RG-Ⅱ-1: 5.1	向日葵RG-Ⅱ-1: 4.8
	向日葵RG-Ⅱ-2: 6.2/10.3	向日葵RG-Ⅱ-2: 0.6
藜芦	藜芦RG-Ⅱ-1: 4.6	藜芦RG-Ⅱ-1: 3.0
	藜芦RG-Ⅱ-2: 5.1	藜芦RG-Ⅱ-2: 1.6
范围	单体RG-Ⅱ: 3.7~7.6	0.4~4.8
	二聚体RG-Ⅱ: 9.3~11.5	

2.3 从葡萄酒中提取 RG-Ⅱ

多糖是葡萄、葡萄汁和葡萄酒中的主要大分子之一。在酿酒的最初阶段, 葡萄细胞壁降解产生多糖, 由于参加发酵的酵母无法分解 RG-Ⅱ, 导致葡萄酒中含有丰富的该组分, 约 100 mg/L^[23, 54]。可从

葡萄酒中快速制备大量 RG-Ⅱ, 作为标准品, 为开发新的定量方法提供充足的物质基础。有多种从葡萄酒中分离 RG-Ⅱ的方法, 本研究主要介绍了 3 种。

第 1 种需将葡萄酒用截留相对分子质量为 20 kD 的超滤膜进行超滤, 浓缩后加入乙醇进行沉淀, 透析和冷冻干燥得到葡萄酒总多糖, 得率约为 500 mg/L。将粗多糖溶于柠檬酸缓冲液, 经阳离子交换色谱法进行纯化, 将未结合的部分进行透析和冷冻干燥, 用作分离 RG-Ⅱ的起始原料, 得率为 88.3%^[55]。将起始原料溶于水中, 与 1 倍体积的强阳离子交换树脂(IR-120 等)混合, 室温下过夜。将未结合的部分与×0.5 体积强阳离子交换凝胶(Sephacryl SP Fast Flow)混合, 室温静置 4 h。再将未结合的部分与强阴离子交换树脂(IRA-958 等)混合, 室温过夜。最后将未结合的部分透析、冻干得葡萄酒粗多糖, 得率为 78.7%。将粗多糖溶于乙酸钠溶液, 由乙酸钠溶液平衡的阴离子交换色谱柱(DEAE-Sephacryl SP Fast Flow 等)进行分离, 弃去洗脱液, 再使用 0.05~0.25 mol/L NaCl 溶液洗脱, 收集 0.25 mol/L NaCl 洗脱的多糖, 透析、冻干后得到 RG-Ⅱ粗多糖。最后把 RG-Ⅱ粗多糖溶于乙酸钠溶液中, 使用尺寸排阻色谱法(Sephacryl-S400 HR 等)进行分离, 收集合适的级分, 透析、冻干得纯 RG-Ⅱ, 得率为 17.0%^[24]。该方法的总体得率为 60 mg/L。

第 2 种方法是需要先将葡萄酒样品脱醇, 用吸附色谱法(聚苯乙烯/二乙烯基苯树脂等)进行分离, 蒸馏水洗脱产物弃去; 再用 20% 乙醇洗脱得到 RG-Ⅱ粗多糖^[56]。然后用带有预柱(RI 101 等)的尺寸排阻色谱柱(Superdex-75 HR 等)纯化 RG-Ⅱ粗产物, 用甲酸铵进行洗脱, RG-Ⅱ部分在 65~75 min 之间洗脱, 冷冻干燥, 重新溶于水并再次冷冻干燥 3 次以去除铵盐, 得到纯 RG-Ⅱ^[57]。

第 3 种是将葡萄酒在 37 ℃ 下浓缩至 1/6 体积, 搅拌下加入乙醇(至 80%)进行沉淀, 混合物在 4 ℃ 下放置过夜。收集沉淀物, 溶于水, 加入乙醇(至 75%)进行第 2 次沉淀。对沉淀物进行透析(截留相对分子质量 3 500 D), 并冷冻干燥得到葡萄酒总多糖, 得率为 1 940 mg/L。将该多糖(50 mg/mL)溶于 NaOAc 溶液(50 mmol/L, pH 5)中, 用 0.45 μm 的尼龙过滤器过滤, 然后使用制备型 Sephadex G-75 色谱柱, 以 1 mL/min 的速度用 NaOAc(50 mmol/L,

pH 5) 溶液进行洗脱, 收集 RG-Ⅱ 洗脱液, 用去离子水透析(截留相对分子质量 3 500 D), 然后冷冻干燥, 得到 RG-Ⅱ^[23]。

方法 1 得到的 RG-Ⅱ 其侧链 B 的聚合度为 9, 2-*O*-Me- α -d-Fucp 残基上被单乙酰化。还检测到微量的非乙酰化侧链 B 和双乙酰化侧链 B 以及聚合度为 7~8 的单乙酰化侧链 B, 且 Ndeh 等^[19]利用肠道菌群解析了该方法分离得到的 RG-Ⅱ 的详细结构, 与 RG-Ⅱ 标准结构基本吻合。方法 2 得到的 RG-Ⅱ 目前缺乏结构信息, 还待探索。方法 3 得到的 RG-Ⅱ 其单糖组成比例为 2MeFuc:Rha:Fuc:2MeXyl:Ara:Api:AceA:Gal:Glc:GalA:GlcA=2.9:16.3:1.8:2.9:17.6:3.6:1.2:17.9:1.4:29.2:5.2, 相对分子质量为 4 971, 侧链结构与 RG-Ⅱ 标准结构基本吻合。方法 1 和方法 3 都可从葡萄酒中成功提取出纯度较高的 RG-Ⅱ, 方法 1 分离步骤繁琐, 成本较高, 方法 3 步骤简短, 成本略低, 所以可以通过方法 3 快速、大量制备 RG-Ⅱ。

3 RG-Ⅱ 的结构表征方法

RG-Ⅱ 的相对分子质量和单糖比例分布都具有明确的范围, 制备得到 RG-Ⅱ 后, 首先需对这些信息进行测定, 大致推断出产物的纯度。由于利用 Endo-PG 和草酸青霉制备得到的 RG-Ⅱ 其分子质量和单糖组成彼此间存在轻微差异, 需进一步探索其结构, 可通过连续梯度酸水解得到 RG-Ⅱ 各支链产物, 利用甲基化分析、质谱分析等方法得到其准确的结构信息。

3.1 分子质量分析

RG-Ⅱ 的相对分子质量约为 5 000, 对其进行分子质量测定可初步判断该 RG-Ⅱ 是否只含有一类型结构域。多糖的分子质量和均一性可以通过高效凝胶渗透色谱法(HPGPC)等进行测量^[28]。Barnes 等^[23]利用高效尺寸排阻色谱法(HPSEC)/多角度光散射(MALS)/示差折光检测器(RID)技术测得芹菜和葡萄酒 RG-Ⅱ 的分子质量分别为 4 606 和 4 971, 二者都接近于 5 000, 而二者的差异是由于芹菜 RG-Ⅱ 较葡萄酒 RG-Ⅱ 缺少侧链 B 中 Arap 上连接的两个 Rha, 导致 B 侧链只含有 6 个糖基^[25]。因此也可以根据相对分子质量对 RG-Ⅱ 的 B 链聚合度进行初步的判断。

3.2 单糖组成分析

RG-Ⅱ 中各单糖的分布比例也有明确范围(表 1)。

该实验需要将 RG-Ⅱ 在高温、酸性条件下进行水解, 然后对产物进行衍生化, 再使用高效液相色谱法(HPLC)或者气相色谱法(GC)进行测定。一般使用 2 mol/L 的三氟乙酸(TFA)在 120 °C 下水解样品(2 mg/mL) 2 h, 水解产物经 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)衍生化, 使用高效液相色谱(HPLC)进行单糖组成分析, 实现对中性糖(Man、Glc、Gal、Xyl、Ara、Rha、Fuc)和酸性糖(GlcA、GalA)的同时测定^[58-60]。也可使用三(三甲基硅基)硅烷(TMS)进行柱前衍生化或将水解产物制备成糖醇乙酸酯衍生物, 使用气-质连用色谱法(GC-MS)测定^[31]。一些稀有糖基的标准品价格昂贵且购买渠道较少, 需利用质谱信息对 GC 图中的峰进行定性。甲基化后经 TMS 衍生的 Dha 经 GLC-EI-MS 分析, 其特征离子碎片的质荷比为 394、349、227、277、169 等; Kdo 的特征离子碎片的质荷比为 495、451、315、273 等; AceA 的特征离子碎片的质荷比为 335、306、275、231、173、143 等; 2MeFuc 的特征离子碎片的质荷比为 305、261、245、146 等; 2MeXyl 的特征离子碎片的质荷比为 291、202、146、116、101 等; Api 的特征离子碎片的质荷比为 3 277、191、103 等^[23]。RG-Ⅱ 因其糖基的多样性和复杂性, 导致无法使用单一的方法准确的测定其单糖组成。因此, 可以通过对 RG-Ⅱ 连续水解中每一个产物进行单糖组成分析, 最后经过组合法计算出 RG-Ⅱ 的单糖组成^[61]。若对结构信息要求较低, 则仅对含量较高的一些单糖(表 2)进行测定也可判断其是否满足 RG-Ⅱ 的单糖比例分布范围。

3.3 侧链的分离

在对 RG-Ⅱ 进行结构表征时, 需要通过梯度连续酸水解选择性的释放不同侧链, 通过“整体-局部-整体”的策略完成表征。侧链 A、B、C、D 在酸性环境中稳定性有较大差异, 其中 A>B>C≈D。侧链 C 和 D 用 0.1 mol/L TFA 在 40 °C 下反应 6 h 即可分离^[62]。链 B 则需要将反应时间延长至 16 h^[63], 或者升高温度至 80~100 °C, 则可以把反应时间缩短至 1 h^[20, 64], 但因为较低的温度可以最大限度地减少了酸不稳定的 Arap 残基的水解, 且可以避免侧链 A 的分离^[24], 所以建议通过延长反应时间分离侧链 B。侧链 A 在 50 °C 下水解 24 h 可以释放^[65], 或者升高温度至 80~100 °C, 则可以把反应时间缩短至 1 h, 因为其他侧链都已经被释放, 所以可以使用较为剧烈的条件进行侧链 A 的分离^[64]。每一步水解产物的分离方式选择较多, 尺寸排阻色谱法已广泛应用

于水解产物中侧链 B 的分离,也可以使用阴离子交换色谱法根据水解产物的电荷来分离水解产物^[65],多孔石墨化碳液相色谱也可以很好地分离水解产物^[20]。该步骤条件选择较多,可以根据具体的 RG-II 自主探索水解的温度和时间。Park 等^[61]利用三步连续梯度酸水解和一步酶解对 RG-II 的支链进行了分离。每一步均选择分子质量大的馏分进行下一步水解。第一步酸水解使用 0.1 mol/L 三氟乙酸(TFA)在 60 °C 下反应 30 min;第二步酸水解使用 0.1 mol/L TFA 在 50 °C 下反应 24 h;第三步酸水解使用 0.1 mol/L TFA 在 40 °C 下反应 84 h;最后一步使用 Endo-PG(2U)在 0.05 mol/L 醋酸缓冲液(pH 5.5)中于 40 °C 下反应 3 d。每一步产物的分离方法一致,均使用 1 mol/L NaOH 对水解液中和,然后利用与高效液相色谱-折射率检测器(HPLC-RID)相连的色谱柱进行分馏,并进行脱盐、冻干。第一步酸水解得到的小相对分子质量馏分中包括大量侧链 C 和少量侧链 D;第二步水解得到两个小相对分子质量馏分,第一个富含侧链 B,第二个以侧链 D 为主;第三步水解也得到了两个小相对分子质量馏分:一个含有侧链 C 和 D,另一个富含侧链 A。因为 RG-II 对 Endo-PG 有抗性,但 Endo-PG 可以成功地降解第三步水解生成的主产物(RG-II 主链),可以说明支链基本水解完全。Ndeh 等^[19]利用肠道菌群选择性地断裂了 RG-II 中 21 类糖苷键中的 20 类,该方法较弱酸水解具有更强的选择性,但该方法需要的菌种较难获得,不适用于常规结构解析。

3.4 侧链的结构表征

质谱法广泛应用于 RG-II 侧链的表征中,可使用 ESI-MS/MS 和 Q-TOF 技术对部分弱酸水解得到的寡糖片段进行分析。柑橘果皮 RG-II 的甲基化侧链 C 中拥有质荷比(m/z)为 308、162 和 189 的特征碎片离子,分别归属于 Kdo、5-Kdo 和 Rha。侧链 D 中拥有质荷比(m/z)为 278、162 和 175 的碎片离子,分别归属于 Dha、5-Dha 和 Ara,并且单糖组成比例 Kdo:Rha $\approx$ Dha: Ara $\approx$ 1:1。单乙酰化的侧链 B 中(9 糖),存在 1375、1243(1375-Api)、1097(1243-Rha)、937(1097-AceA)、615(937-2MeFuc-Gal)和 469(615-Rha)的特征离子碎片。双乙酰化的侧链 B 中,存在质荷比为 1417、1285(1417-Api)、1139(1285-Rha)、615(1139-AceA-2MeFuc-Gal-Ac)和 469(615-Rha)的特征离子碎片。一个乙酰基可能与 AceA、2-MeFuc 或 Gal 连接,而另一个乙酰基团可能与末端 Rha、末端 Ara 或 Ara 相连。侧链 A

存在质荷比为 1277、1101(1277-GalA)、939(1101-Gal)、763(939-GlcA)、587(763-GalA)和 486(587-Gal)的特征离子碎片,或者质荷比为 1277、1131(1277-2MeXyl)、955(1131-GalA)、649(955-GalA-Ara)、587(649-Gal)和 486(587-Gal)的特征峰^[61]。侧链 A 和 B 因为糖苷键的复杂种类、乙酰基的数量和取代位点的差异,在进行质谱分析时会产生不同质荷比的离子碎片,上述特征离子碎片在不同来源 RG-II 中会存在细微的差异。比如葡萄酒 RG-II 中单乙酰基取代的侧链 B(9 糖)的特征离子碎片的质荷比为 1399、1267、1103、971、679 和 503 等^[23]。在侧链表征中,还需要结合单糖组成和甲基化分析手段实现更为准确的结构推断。

4 总结与展望

多糖作为中药的重要药效物质,其结构、活性和质量研究是目前热门。对含有多类结构域的均一多糖进行结构表征存在较大难度,使用 Endo-PG 酶解均一多糖,可将 RG-I、RG-II 和 HG 等结构域从果胶中分离,进行片段表征,然后通过“拼接法”实现均一多糖的结构表征,降低表征难度。RG-II 的结构变异性对其活性的影响尚不明确,可以针对含有不同侧链 B 的 RG-II 和具有不同乙酰化程度的 RG-II 进行构效关系的研究,推动 RG-II 作用机制的探索。为了保证中药多糖的药用活性,对其进行质量控制是当务之急。目前中药多糖的质量控制指标包括总糖含量、分子量分布范围和单糖组成比例等^[66-67],或使用果胶酶和弱酸对多糖进行降解,比较寡糖产物的差异^[68]。但利用多糖中各结构域的比例进行质量控制的方法尚且空白。Endo-PG 法可实现多糖中各结构域的定量,草酸青霉法可以更加准确的定量 RG-II,为促进以 RG-II 为药效物质的中药的质量控制提供了新的思路。RG-II 作为一类结构高度保守的多糖,应该充分利用该特性加深对 RG-II 的研究,可将其作为标准品,开发出新的定量方法。从葡萄酒中制备 RG-II 可以为其深层研究提供充分的物质基础,促进 RG-II 的研究,推动中药多糖的发展。

References

- [1] Yuan D, Li C, Huang Q, *et al.* Current advances in the anti-inflammatory effects and mechanisms of natural polysaccharides[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2023, 63(22): 5890-5910.

- [2] Zeng FS, Yao YF, Wang LF, *et al.* Polysaccharides as antioxidants and prooxidants in managing the double-edged sword of reactive oxygen species[J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2023, **159**: 114221.
- [3] Khan S, Hussain A, Attar F, *et al.* A review of the berberine natural polysaccharide nanostructures as potential anticancer and antibacterial agents[J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2022, **146**: 112531.
- [4] Liu XF, Luo DH, Guan JJ, *et al.* Mushroom polysaccharides with potential in anti-diabetes: biological mechanisms, extraction, and future perspectives: a review[J]. *Front Nutr*, 2022, **9**: 1087826.
- [5] Zhao DP, Chen XH, Wang LY, *et al.* Bidirectional and persistent immunomodulation of *Astragalus* polysaccharide as an adjuvant of influenza and recombinant SARS-CoV-2 vaccine[J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, **234**: 123635.
- [6] Li X, Wei ZL, Wang XY, *et al.* *Premna microphylla* Turcz leaf pectin exhibited antioxidant and anti-inflammatory activities in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages[J]. *Food Chem*, 2021, **349**: 129164.
- [7] Pak U, Cheng H, Liu XB, *et al.* Structural characterization and anti-oxidation activity of pectic polysaccharides from *Swertia mileensis*[J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, **248**: 125896.
- [8] Darvill AG, McNeil M, Albersheim P. Structure of plant cell walls: VIII. A new pectic polysaccharide[J]. *Plant Physiol*, 1978, **62**(3): 418-422.
- [9] O'Neill MA, Ishii T, Albersheim P, *et al.* Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide[J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2004, **55**: 109-139.
- [10] Pérez S, Rodríguez-Carvajal MA, Doco T. A complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function[J]. *Biochimie*, 2003, **85**(1/2): 109-121.
- [11] Atmodjo MA, Hao ZY, Mohnen D. Evolving views of pectin biosynthesis[J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2013, **64**: 747-779.
- [12] Begum RA, Fry SC. Boron bridging of rhamnogalacturonan-II in *Rosa* and *Arabidopsis* cell cultures occurs mainly in the endomembrane system and continues at a reduced rate after secretion[J]. *Ann Bot*, 2022, **130**(5): 703-715.
- [13] Su J, Liu XY, Li HQ, *et al.* Hypoglycaemic effect and mechanism of an RG-II type polysaccharide purified from *Aconitum coreanum* in diet-induced obese mice[J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, **149**: 359-370.
- [14] Park HR, Hwang D, Suh HJ, *et al.* Antitumor and antimetastatic activities of rhamnogalacturonan-II-type polysaccharide isolated from mature leaves of green tea via activation of macrophages and natural killer cells[J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, **99**: 179-186.
- [15] Park HR, Park SB, Hong HD, *et al.* Structural elucidation of anti-metastatic rhamnogalacturonan II from the pectinase digest of *Citrus* peels (*Citrus unshiu*)[J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, **94**(Pt A): 161-169.
- [16] Zhao XH, Ebert B, Zhang BC, *et al.* UDP-Api/UDP-Xyl synthases affect plant development by controlling the content of UDP-Api to regulate the RG-II-borate complex[J]. *Plant J*, 2020, **104**(1): 252-267.
- [17] Begum RA, Fry SC. Arabinogalactan-proteins as boron-acting enzymes, cross-linking the rhamnogalacturonan-II domains of pectin[J]. *Plants*, 2023, **12**(23): 3921.
- [18] Matsunaga T, Ishii T, Matsumoto S, *et al.* Occurrence of the primary cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II in pteridophytes, lycophytes, and bryophytes. Implications for the evolution of vascular plants[J]. *Plant Physiol*, 2004, **134**(1): 339-351.
- [19] Ndeh D, Rogowski A, Cartmell A, *et al.* Complex pectin metabolism by gut bacteria reveals novel catalytic functions[J]. *Nature*, 2017, **544**(7648): 65-70.
- [20] Pabst M, Fischl RM, Brecker L, *et al.* Rhamnogalacturonan II structure shows variation in the side chains monosaccharide composition and methylation status within and across different plant species[J]. *Plant J*, 2013, **76**(1): 61-72.
- [21] O'Neill MA, Eberhard S, Albersheim P, *et al.* Requirement of borate cross-linking of cell wall rhamnogalacturonan II for *Arabidopsis* growth[J]. *Science*, 2001, **294**(5543): 846-849.
- [22] Ishii T, Matsunaga T, Pellerin P, *et al.* The plant cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II self-assembles into a covalently cross-linked dimer[J]. *J Biol Chem*, 1999, **274**(19): 13098-13104.
- [23] Barnes WJ, Koj S, Black IM, *et al.* Protocols for isolating and characterizing polysaccharides from plant cell walls: a case study using rhamnogalacturonan-II[J]. *Biotechnol Biofuels*, 2021, **14**(1): 142.
- [24] Buffetto F, Ropartz D, Zhang XJ, *et al.* Recovery and fine structure variability of RGII sub-domains in wine (*Vitis vinifera* Merlot)[J]. *Ann Bot*, 2014, **114**(6): 1327-1337.
- [25] O'Neill MA, Black I, Urbanowicz B, *et al.* Locating methyl-etherified and methyl-esterified uronic acids in the plant cell wall pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II[J]. *SLAS Technol*, 2020, **25**(4): 329-344.
- [26] Gao HS, Ding LL, Liu R, *et al.* Characterization of *Anoec-tochilus roxburghii* polysaccharide and its therapeutic effect on type 2 diabetic mice[J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, **179**: 259-269.
- [27] Li X, Wei J, Lin LZ, *et al.* Structural characterization, antioxidant and antimicrobial activities of polysaccharide from *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz stem[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2023, **231**: 113573.
- [28] Xu YB, Wang Q, Chen J, *et al.* An Arabinogalactan isolated from Pollen Typhae induces the apoptosis of RKO cells by promoting macrophage polarization[J]. *Carbohydr Polym*, 2023, **299**: 120216.
- [29] Zhang WX, Hu YH, He JQ, *et al.* Structural characterization and immunomodulatory activity of a novel polysaccharide from lycopi herba[J]. *Front Pharmacol*, 2021, **12**: 691995.

- [30] Wu JJ, Xu YB, Liu XY, *et al.* Isolation and structural characterization of a non-competitive α -glucosidase inhibitory polysaccharide from the seeds of *Litchi chinensis* Sonn[J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, **154**: 1105-1115.
- [31] Xu YB, Chen J, Shi SS, *et al.* Structure characterization of pectin from the pollen of *Typha angustifolia* L. and the inhibition activity of lipid accumulation in oleic acid induced L02 cells[J]. *Carbohydr Polym*, 2023, **303**: 120452.
- [32] Ni JH, Chen H, Zhang CL, *et al.* Characterization of *Alpinia officinarum* Hance polysaccharide and its immune modulatory activity in mice[J]. *Food Funct*, 2022, **13**(4): 2228-2237.
- [33] Yang XH, Liu HH, Yang JT, *et al.* Purification, structural characterization and immunological activity of *Sibiraea laexigata* (L.) Maxim polysaccharide[J]. *Front Nutr*, 2022, **9**: 1013020.
- [34] Hu YB, Hong HL, Liu LY, *et al.* Analysis of structure and antioxidant activity of polysaccharides from *Aralia continentalis*[J]. *Pharmaceuticals*, 2022, **15**(12): 1545.
- [35] Liu JM, Chang WH, Chen ZM, *et al.* Research progress of pectin and its microbial degradation[J]. *Acta Vet Zootechnica Sin* (畜牧兽医学报), 2023, **54**(7): 2723-2731.
- [36] Zablackis E, Huang J, Müller B, *et al.* Characterization of the cell-wall polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* leaves[J]. *Plant Physiol*, 1995, **107**(4): 1129-1138.
- [37] O'Neill MA, Warrenfeltz D, Kates K, *et al.* Rhamnogalacturonan-II, a pectic polysaccharide in the walls of growing plant cell, forms a dimer that is covalently cross-linked by a borate ester. *In vitro* conditions for the formation and hydrolysis of the dimer[J]. *J Biol Chem*, 1996, **271**(37): 22923-22930.
- [38] Strasser G. Pectic substances from red beet (*Beta vulgaris* L. var. conditiva). Part II. Structural characterisation of rhamnogalacturonan II[J]. *Carbohydr Polym*, 2002, **48**(3): 263-269.
- [39] Doco T, Williams P, Vidal S, *et al.* Rhamnogalacturonan II, a dominant polysaccharide in juices produced by enzymic liquefaction of fruits and vegetables[J]. *Carbohydr Res*, 1997, **297**(2): 181-186.
- [40] Paniagua C, Kirby AR, Gunning AP, *et al.* Unravelling the nanostructure of strawberry fruit pectins by endo-polygalacturonase digestion and atomic force microscopy[J]. *Food Chem*, 2017, **224**: 270-279.
- [41] Sénéchal F, Wattier C, Rustérucci C, *et al.* Homogalacturonan-modifying enzymes: structure, expression, and roles in plants[J]. *J Exp Bot*, 2014, **65**(18): 5125-5160.
- [42] Chen E. Nature of sites hydrolyzable by endopolygalacturonase in partially-esterified homogalacturonans[J]. *Carbohydr Polym*, 1996, **29**(2): 129-136.
- [43] Ho GT, Zou YF, Wangenstein H, *et al.* RG-I regions from elderflower pectins substituted on GalA are strong immunomodulators[J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, **92**: 731-738.
- [44] Qi XD, Yu Y, Wang XY, *et al.* Structural characterization and anti-oxidation activity evaluation of pectin from *Lonicera japonica* Thunb[J]. *Front Nutr*, 2022, **9**: 998462.
- [45] Chan MK, Yu Y, Wulamu S, *et al.* Structural analysis of water-soluble polysaccharides isolated from *Panax notoginseng*[J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, **155**: 376-385.
- [46] Ning X, Liu Y, Jia MD, *et al.* Pectic polysaccharides from *Radix Sophorae Tonkinensis* exhibit significant antioxidant effects[J]. *Carbohydr Polym*, 2021, **262**: 117925.
- [47] Yan S, Liu XB, Wang YW, *et al.* Structural characterization and antioxidant activity of pectic polysaccharides from *Veronica peregrina* L[J]. *Front Nutr*, 2023, **10**: 1217862.
- [48] Sun L, Ropartz D, Cui LN, *et al.* Structural characterization of rhamnogalacturonan domains from *Panax ginseng* C. A. Meyer[J]. *Carbohydr Polym*, 2019, **203**: 119-127.
- [49] Pak U, Yu Y, Ning X, *et al.* Comparative study of water-soluble polysaccharides isolated from leaves and roots of *Isatis indigotica* Fort[J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, **206**: 642-652.
- [50] Soares MMCN, Da Silva R, Carmona EC, *et al.* Pectinolytic enzyme production by *Bacillus* species and their potential application on juice extraction[J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2001, **17**(1): 79-82.
- [51] Zhang HX, Jiang XL, Mou HJ, *et al.* Progress in the study of microbial pectinases [J]. *Biotechnology*(生物技术), 2005, (5): 92-95.
- [52] Lan LJ, Zhou Q, Cai QM, *et al.* Screening and identification of a high-yield pectinase penicillium strain[J]. *J Zhejiang Normal Univ (Nat Sci)* [浙江师范大学学报(自然科学版)], 2011, **34**(4): 452-456.
- [53] Wu D, Cui LN, Yang G, *et al.* Preparing rhamnogalacturonan II domains from seven plant pectins using *Penicillium oxalicum* degradation and their structural comparison[J]. *Carbohydr Polym*, 2018, **180**: 209-215.
- [54] Pellerin P, Doco T, Vidal S, *et al.* Structural characterization of red wine rhamnogalacturonan II[J]. *Carbohydr Res*, 1996, **290**(2): 183-197.
- [55] Vidal S, Williams P, Doco T, *et al.* The polysaccharides of red wine: total fractionation and characterization[J]. *Carbohydr Polym*, 2003, **54**(4): 439-447.
- [56] Lei XQ, Wang SN, Zhao PT, *et al.* Mannoproteins, arabino-galactan protein, rhamnogalacturonan II and their pairwise combinations regulating wine astringency induced by the interaction of proanthocyanidins and proteins[J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, **224**: 950-957.
- [57] Brandão E, Silva MS, García-Estévez I, *et al.* The role of wine polysaccharides on salivary protein-tannin interaction: a molecular approach[J]. *Carbohydr Polym*, 2017, **177**: 77-85.
- [58] Chen GM, Jiang N, Zheng JP, *et al.* Structural characterization and anti-inflammatory activity of polysaccharides from *Astragalus membranaceus*[J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, **241**: 124386.
- [59] Zhang X, Yu L, Bi HT, *et al.* Total fractionation and characterization of the water-soluble polysaccharides isolated from *Panax ginseng* C. A. Meyer[J]. *Carbohydr Polym*, 2009, **77**(3): 544-

- 552.
- [60] Zhao XL, Meng Y, Liu Y, *et al.* Pectic polysaccharides from *Lilium brownii* and *Polygonatum odoratum* exhibit significant antioxidant effects *in vitro*[J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 257(Pt 2): 128830.
- [61] Park HR, Shin KS. Structural elucidation of an anti-metastatic polysaccharide from the peels of Korean citrus Hallabong[J]. *Carbohydr Polym*, 2019, 225: 115222.
- [62] York WS, Darvill AG, McNeil M, *et al.* 3-Deoxy-d-manno-2-octulosonic acid (KDO) is a component of rhamnogalacturonan II, a pectic polysaccharide in the primary cell walls of plants[J]. *Carbohydr Res*, 1985, 138(1): 109-126.
- [63] Spellman MW, McNeil M, Darvill AG, *et al.* Characterization of a structurally complex heptasaccharide isolated from the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II[J]. *Carbohydr Res*, 1983, 122(1): 131-153.
- [64] Séveno M, Voxeur A, Rihouey C, *et al.* Structural characterisation of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II using an acidic fingerprinting methodology[J]. *Planta*, 2009, 230(5): 947-957.
- [65] Thomas JR, Darvill AG, Albersheim P. Isolation and structural characterization of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II from walls of suspension-cultured rice cells[J]. *Carbohydr Res*, 1989, 185(2): 261-277.
- [66] Liu W, Xu JN, Zhu R, *et al.* Fingerprinting profile of polysaccharides from *Lycium barbarum* using multiplex approaches and chemometrics[J]. *Int J Biol Macromol*, 2015, 78: 230-237.
- [67] He L, Yan XT, Liang J, *et al.* Comparison of different extraction methods for polysaccharides from *Dendrobium officinale* stem[J]. *Carbohydr Polym*, 2018, 198: 101-108.
- [68] Wu DT, Cheong KL, Deng Y, *et al.* Characterization and comparison of polysaccharides from *Lycium barbarum* in China using saccharide mapping based on PACE and HPTLC[J]. *Carbohydr Polym*, 2015, 134: 12-19.

· 校园信息 ·

孔令义/夏元铮/王凯波团队在 *Advanced Science* 发表中药活性成分黄连碱稳定 ATF4 启动子 G-四链体克服癌症持久性细胞的最新研究成果

7月12日,我校孔令义(本刊副主编)/夏元铮/王凯波团队在学科顶尖期刊 *Advanced Science* 在线发表题为“**Overcoming Cancer Persister Cells by Stabilizing the ATF4 Promoter G-quadruplex**”的最新研究成果。我校2021级博士生肖成梅、2022级博士生李意普、刘玉霜副教授为本文共同第一作者,孔令义教授、夏元铮副教授和王凯波教授为本文共同通信作者,中国药科大学为本文唯一通信单位。

在癌症治疗中,持久性细胞(PS)已被公认为是耐药恶性肿瘤发展的重要贡献者,并最终导致癌症不可预测地进展。在原发性实体瘤中谷氨酰胺常被观察为“耗竭”,该团队发现施加谷氨酰胺限制诱导了PS的产生,通过激活整合应激反应启动GCN2-ATF4-ASCT2轴,增强了治疗抵抗,这种现象的核心是应激诱导的ATF4翻译重编程。因此,在谷氨酰胺营养限制性治疗的背景下,ATF4的抑制将是阻碍癌症持续表型的潜在治疗策略。然而,由于ATF4蛋白特殊的结构,直接靶向ATF4筛选小分子抑制剂被认为是巨大的挑战。鉴于ATF4蛋白的“不可成药”特性,以及目前G-四链体靶向药物在临床试验中的良好结果,该团队明确了ATF4启动子区域可以形成G-四链体结构(ATF4-G4),筛选及确定中药活性成分黄连碱(Coptisine, COP)是一种与ATF4-G4相互作用并稳定其特殊结构的强效稳定剂,首次解析了COP-ATF4-G4复合物的高分辨率结构。此外,在谷氨酰胺限制性治疗中观察到黄连碱的独特代谢特征,通过全面筛选发现了转录因子TFAP2A与ATF4的转录激活关系。

这些开创性的发现强调了靶向ATF4是逆转谷氨酰胺限制治疗诱导的肿瘤适应性生存现象的关键,揭示了ATF4-G4的结构特征,并发现中药活性成分黄连碱干预并打破癌症持久性细胞对治疗的耐受性,填补了目前谷氨酰胺限制疗法领域的空白,并为中药活性成分的深入研究与合理应用提供了新思路。

该研究工作获得国家自然科学优秀青年科学基金和面上基金(82322065、81973524);江苏省自然科学基金(BK20221039)等项目的资助。

文章链接: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/adv.202401748>

(供稿单位: 中药学院)