

- C virus core antigen. Hybridoma, 1994, **13** (1): 9~ 13
- 16 Simmonds P, Rose K A, Graham S, *et al.* Mapping of serotype-specific, immunodominant epitopes in the NS-4 region of hepatitis C virus (HCV): use of type-specific peptides to serologically differentiate infections with HCV types 1, 2, and 3. J Clin Microbiol, 1993, **31** (6): 1493~ 1503
 - 17 Ferroni P, Mascolo G, Zaninetti M, *et al.* Identification of four epitopes in hepatitis C virus core protein. J Clin Microbiol, 1993, **31** (6): 1586~ 1591
 - 18 Akatsuka T, Donets M, Scaglione L, *et al.* B-cell epitopes on the hepatitis C virus nucleocapsid protein determined by human monospecific antibodies. Hepatology, 1993, **18** (3): 504~ 510
 - 19 Kurokohchi K, Akatsuka T, Pendleton C D, *et al.* Use of recombinant protein to identify a motif-negative human cytotoxic T-cell epitope presented by HLA-A2 in the hepatitis C virus NS3 region. J Virol, 1996, **70** (1): 232~ 240
 - 20 Cerny A, McHutchison J G, Pasquinelli C, *et al.* Cytotoxic T lymphocyte response to hepatitis C virus-derived peptides containing the HLA-A2. I binding motif. J Clin Invest, 1995, **95** (2): 521~ 530
 - 21 Weiner A, Erickson A L, Kansopon J, *et al.* Persistent hepatitis C virus infection in chimpanzee is associated with emergence of a cytotoxic T lymphocyte escape variant. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, **92** (7): 2755~ 2759
 - 22 Shirai M, Arichi T, Nishioka M, *et al.* CTL response of HLA-A2. I-transgenic mice specific for hepatitis C viral peptides predict epitopes for CTL of humans carrying HLA-A2. I. J Immunol, 1995, **154** (6): 2733~ 2742
 - 23 Battegay M, Fikes J, Bisceglie A M, *et al.* Patients with chronic hepatitis C have circulating cytotoxic T cells which recognize hepatitis C virus encoded peptides binding to HLA-A2. I molecules. J Virol, 1995, **69** (4): 2462~ 2470
 - 24 Khudyakov Y E, Khudyakova N S, Jue D L, *et al.* Linear B-cell epitopes of the NS3-NS4-NS5 proteins of the hepatitis C virus as model with synthetic peptides. Virology, 1995, **206**: 666~ 672
 - 25 Shirai M, Okada H, Nishioka M, *et al.* An epitope in hepatitis C virus core region recognized by cytotoxic T cells in mice and humans. J Virol, 1994, **68** (5): 3334~ 3342

- 26 Erickson A L, Houghton M, Choo Q L, *et al.* Hepatitis C virus specific CTL response in the liver of Chimpanzees with acute and chronic hepatitis C. J Immunol, 1993, **151** (8): 4189~ 4199
- 27 Kita H, Moriyama T, Kaneko T, *et al.* HLA-B44-restricted cytotoxic T lymphocytes recognizing an epitope on hepatitis C virus nucleocapsid protein. Hepatology, 1993, **18** (5): 1039~ 1043
- 28 Koziel M J, Dudley D, Wong J T, *et al.* Intrahepatic cytotoxic T lymphocytes specific for hepatitis C virus in persons with chronic hepatitis. J Immunol, 1992, **149** (10): 3339~ 3344

Genetic Variation and Conserved Epitopes of Hepatitis C Virus. HUANG Jian-Sheng, XIE Yong-Mei, REN Da-Ming (State Key Laboratory of Genetic Engineering, Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai 200433, China).

Abstract Hepatitis C virus has four chief genotypes HCV I、II、III and IV, whose homology of amino acids and nucleic acids is less than 80% each other. The variation rates of HCV proteins are core 8%, E1 35%, E2/NS1 53%, NS3 27%, NS4 35%, NS5 39%, respectively. According to the characters of conservation, hydrophilicity, antigenicity and conformation, a series of highly conserved T cell and B cell epitopes are identified from the HCV expressed products, which might be beneficial to the prevention and treatment of hepatitis C. In general, B epitope is about 12~ 40 peptides and T epitope 7~ 9 peptides.

Key words hepatitis C virus (HCV), genetic variation, conserved epitopes

碱液提取箬叶多糖的纯化及其结构性质的研究

陈春英¹⁾ 丁玉强²⁾ E. A. ELMAHADI 周井炎 李 焰 徐辉碧

(华中理工大学化学系, 武汉 430074)

摘要 通过高碘酸氧化、Smith降解、部分酸水解分析、NMR分析等多种方法对以不同浓度的NaOH溶液箬叶中提取的两种多糖F IIIa及F IV-a进行了研究, 结果表明二者均具有多分枝结构, F IIIa主链以 α (1→3)连接的木糖为主, 分子侧链由半乳糖、阿拉伯糖、葡萄糖醛酸构成, 葡萄糖醛酸主要位于分子的末端; F IV-a主链由 α (1→3)木糖和 β (1→6)半乳糖构成, 以阿拉伯糖、葡萄糖醛酸组成侧链, 葡萄糖醛酸主要位于分子的末端。

关键词 箬叶多糖, 纯化, 结构分析

学科分类号 Q53

箬叶是禾本科植物箬竹 (*Indocalamus tessellatus*) 的叶。其功用主治清热止血, 解毒消肿。箬竹主要分布于长江流域等地, 《本草纲目》记载: 箬叶“甘, 寒, 无毒”, “治男女吐血、衄血、呕血、

咯血、下血。又通小便, 利肺气, 喉痹, 消痈肿”。

¹⁾ 中国科学院高能物理研究所核技术应用研究部, 2732信箱, 北京 100080.

²⁾ 南阳理工大学化学系, 南阳 473066.

收稿日期: 1997-09-11, 修回日期: 1998-04-09

日本民间亦用竹 (*Sasa albomarginata*) 叶作汉方药。药理实验表明, 竹叶多糖提取液具有良好的抗肿瘤、抗炎症、抗溃疡等作用^[1,2]。我们曾采用不同的方法从鄂西恩施地区野生箬叶中提取了八种多糖成分^[3], 它们对四氯化碳致小鼠肝损伤有着不同的抑制作用^[4]。在体外培养人 T 淋巴细胞株 MT4 实验中^[5]发现, 由 5% 和 20% NaOH 溶液提取的多糖 FⅢ-a、FⅣ-a 的细胞毒性浓度分别为 5 g/L、>5 g/L, 对细胞毒性较低。FⅢ-a 及 FⅣ-a 在较高浓度即 0.32 g/L 及 1.25 g/L 可抑制 HIV 导致的细胞病变性, FⅢ-a 比 FⅣ-a 效果要好。国内外对其化学成分的研究较少。本文通过红外光谱 (IR), NMR, 色谱分析, 部分酸水解, Smith 降解, 高碘酸氧化等方法研究了这两种多糖的组成、结构和性质。

1 实验部分

1.1 碱液提取箬叶多糖的分离纯化

碱液提取箬叶多糖 FⅢ-a 及 FⅣ-a 的分离纯化见文献 [3]。进一步纯化是将其再溶于少量水, 进行 Sephadex G-200 柱层析、水洗脱、苯酚-硫酸法检测、收集主要洗脱峰, 透析, 浓缩, 冷冻干燥, 得纯化多糖。

1.2 箬叶多糖的理化性质

红外光谱仪为日本 Shimadzu IR-435 型, KBr 压片, 4 000~400 cm^{-1} 扫描。 ^1H 、 ^{13}C -NMR 谱用 UNITY plus-400 型, 溶剂分别为 DMSO- D_6 (^1H)、 D_2O (^{13}C)。 ^{13}C 共振频率为 100.600 MHz, ^1H 共振频率为 400.045 MHz, 温度 308 K, 累加次数 6570。

单糖组成采用完全酸水解, 多糖水解物糖腈乙酸酯衍生物气相色谱分析^[6]。仪器为 SC-7 气相色谱仪 (四川分析仪器厂), 色谱柱为石英毛细管柱 28 m $\times$ 0.25 mm, 固定相为武汉大学分析教研室研制的开链冠醚, 检测器为 FID, 柱温 205 $^{\circ}\text{C}$, 汽化室温度 290 $^{\circ}\text{C}$, 氢火焰温度为 220 $^{\circ}\text{C}$, 载气 N_2 , 进样量为 0.2~0.4 μl 。标准单糖采用葡萄糖 (Glc)、甘露糖 (Man)、半乳糖 (Gal), 鼠李糖 (Rham), 木糖 (Xyl)、阿拉伯糖 (Ara)、岩藻糖 (Fuc) 和葡萄糖醛酸 (GlcUA) 共六种。硫酸-苯酚法测定多糖含量^[7], 硫酸-咔唑法测定糖醛酸含量^[8]。

1.3 箬叶多糖的结构分析

a. 高碘酸氧化^[9]: 称取 10.0 mg 多糖, 加入 10 ml 0.015 mol/L 高碘酸钠中, 避光置于室温暗处反应, 测定在 223 nm 处不同时间间隔 (4 h, 24 h, 48 h, 72 h……) 反应液的吸光度, 直至达

一稳定值。计算高碘酸的消耗量。另取 5 ml 反应液, 加乙二醇 1 ml, 10 min 后以 0.01 mol/L NaOH 滴定甲酸的释放量。

b. Smith 降解^[9]: 取经高碘酸氧化完全的多糖溶液 10 ml, 加入 0.2 ml 乙二醇, 对蒸馏水透析 48 h 后, 用 8 mg NaBH_4 于室温暗处还原 12 h。用 0.1 mol/L CH_3COOH 调节 pH=5.0, 对蒸馏水透析 24 h 后冷冻干燥。进行完全酸水解, 纸层析鉴定产物, 展开系统为正丁醇: 吡啶: 水 (3:1:1, 体积比), 硝酸银显色。判断甘油、赤藓醇、游离单糖等是否存在。标准赤藓醇为 Sigma 公司产品。

c. 部分酸水解^[9]: 取 80 mg 多糖, 加入 0.05 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 三氟乙酸 5 ml, 95 $^{\circ}\text{C}$ 封管水解 2 h, 透析 3 d, 分袋内 (未透过部分)、袋外 (透过部分) 分别作完全酸水解, 气相色谱分析其单糖组成。

2 结果与讨论

2.1 箬叶多糖的组成分析

FⅢ-a 及 FⅣ-a 两多糖分别经 Sephadex G200 柱色谱分级纯化均得到三个组分 (图 1), FⅢ-a 以中间的组分为主, FⅣ-a 则以第三组分为主。收集主要组分进行下一步的结构分析。

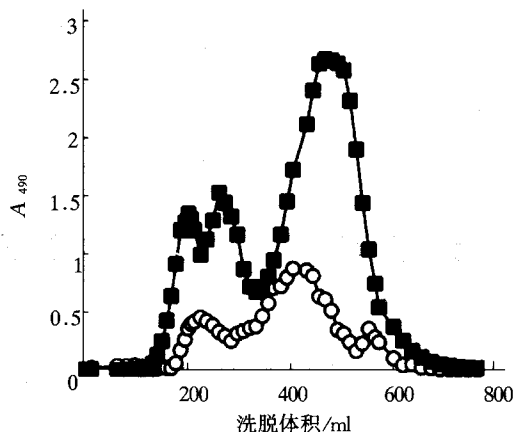


图 1 箬叶多糖 FⅢ-a 和 FⅣ-a 经 Sephadex G200 柱色谱分离纯化结果

○—○: FⅢ-a; ■—■: FⅣ-a.

部分酸水解 GC 分析结果见表 1, 部分酸水解产物可透析部分主要为小分子, 为多糖链上较易水解, 处于外缘或分枝、侧链的部分; 而非透析部分即袋内物多数位于分子内部, 属于分子内部或主链结构。FⅢ-a 和 FⅣ-a 分子组成以木糖、阿拉伯糖及半乳糖为主, 其中 FⅢ-a 主链以木糖为主要成分, 这与 Blacke 归纳的半纤维素多糖的类型基本

一致^[10]. 单子叶、双子叶中的半纤维素多糖多为 D-木聚糖或 L-阿拉伯-D-半乳聚糖. 非透析部分均不含葡萄糖醛酸.

2.2 箬叶多糖的结构分析

红外光谱图(图 2)表明,FⅢ-a 和 FⅣ-a 均在

3 350(O—H) , 2 900(C—H) , 1 635(C=O) , 1 400(C—O) , 1 010 ~ 1 075(C—O) cm^{-1} 等处有多糖的特征吸收峰,在 897, 980 cm^{-1} 处有吸收峰,提示可能存在吡喃糖苷键.

表 1 气相色谱测定箬叶多糖经完全和部分酸水解后的单糖组成(摩尔比)

多糖组分	酸水解	阿拉伯糖	木糖	葡萄糖醛酸	甘露糖	葡萄糖	半乳糖
FⅢ-a	完全	3.00	7.81	1.00			1.82
	透析液 ¹⁾	1.78		1.00			
	未透析部分 ²⁾	1.00	24.60				6.71
FⅣ-a	完全	1.01	1.00	0.67			0.45
	透析液 ¹⁾	7.23	1.00	0.94			
	未透析部分 ²⁾	0.65	1.00				0.44

¹⁾经部分酸水解后可透过部分的单糖组成, ²⁾未透过部分的单糖组成.

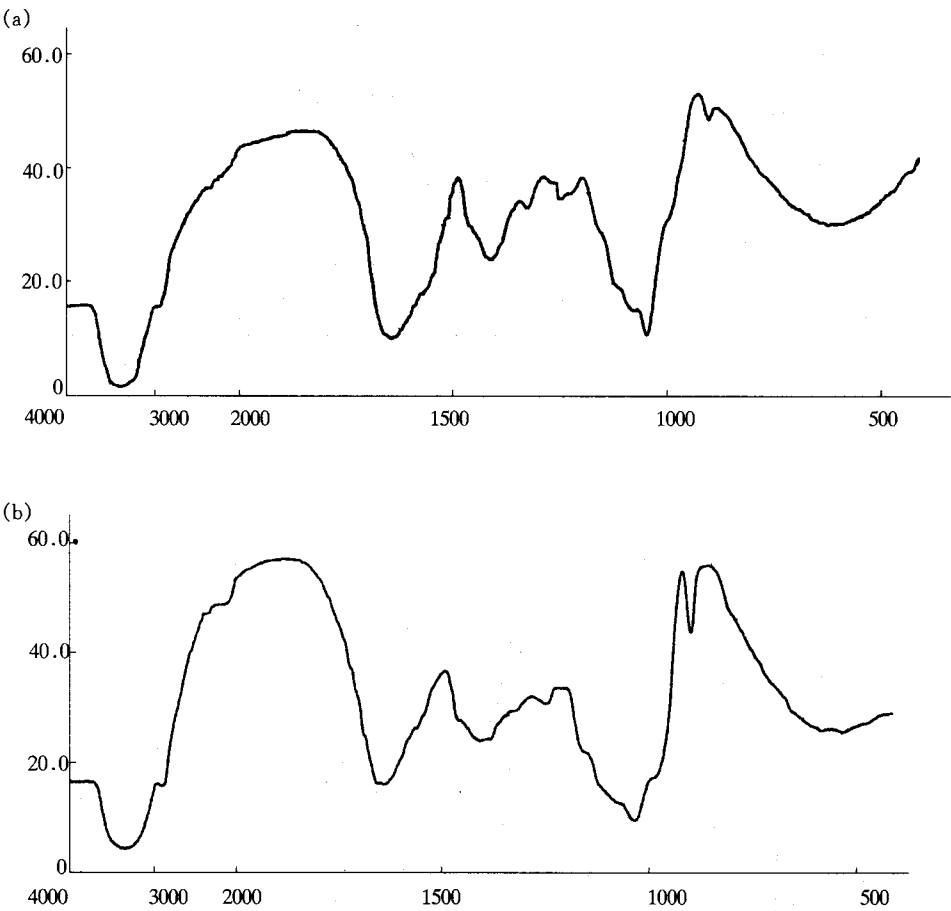


图 2 FⅢ-a 和 FⅣ-a 的红外光谱
(a) FⅢ-a; (b) FⅣ-a.

箬叶多糖经高碘酸盐氧化, 5~7 d 可反应完全, 高碘酸消耗达到稳定, 计算平均每摩尔己糖残基 ($Fr=162.5$) 消耗高碘酸量及释放甲酸量, 数据见表 2. Smith 降解是将高碘酸氧化产物还原后

进行酸水解, 由降解产物可以推断糖苷键的位置^[10], 纸色谱结果见表 2. FⅢ-a 以 1→3, 1→6 (3 :1) 为主要连接方式, FⅣ-a 以 1→3, 1→6, 1→2 (2.5:1:0.36) 为主要连接方式.

表 2 Smith 降解和高碘酸氧化结果

多糖组分	高碘酸氧化 消耗的高碘酸 (mol/mol)	产生的甲酸 (mol/mol)	Smith 降解 产物	糖链连接方式
FⅢ-a	0.575	0.218	Xyl, Gly ¹⁾	1→3:1→6=3:1
FⅣ-a	0.608	0.257	Xyl, Gal, Gly ¹⁾	1→3:1→6:1→2=2.5:1:0.36

¹⁾Gly: 甘油

近年来,核磁共振波谱仪的迅速发展,使其在多糖结构分析上的作用越来越大.因而对 FⅢ-a 和 FⅣ-a 还进行了¹H、¹³C-NMR 分析, FⅢ-a 的¹H 和¹³C-NMR 谱图表明, FⅢ-a 存在 α、β 两种甙键构型;在糖异头碳 C1 区有 2 个峰,表明 FⅢ-a 主要由两种多糖残基组成,但是 GC 分析 FⅢ-a 由四种

单糖组成,由于 GlcUA, Gal 残基含量较低,导致在 NMR 不能出现共振信号. δ178.5 为 GlcUA 的 C6 的化学位移,未记录在图内,如图 3a 所示. 木糖中各个碳的化学位移为 δC1 (101.784), δC3 (84.858, 80.865), δC6 (61.44, 63.096), 推测以 α (1→3) 连接. 半乳糖为 δC1 (107.792), δC6

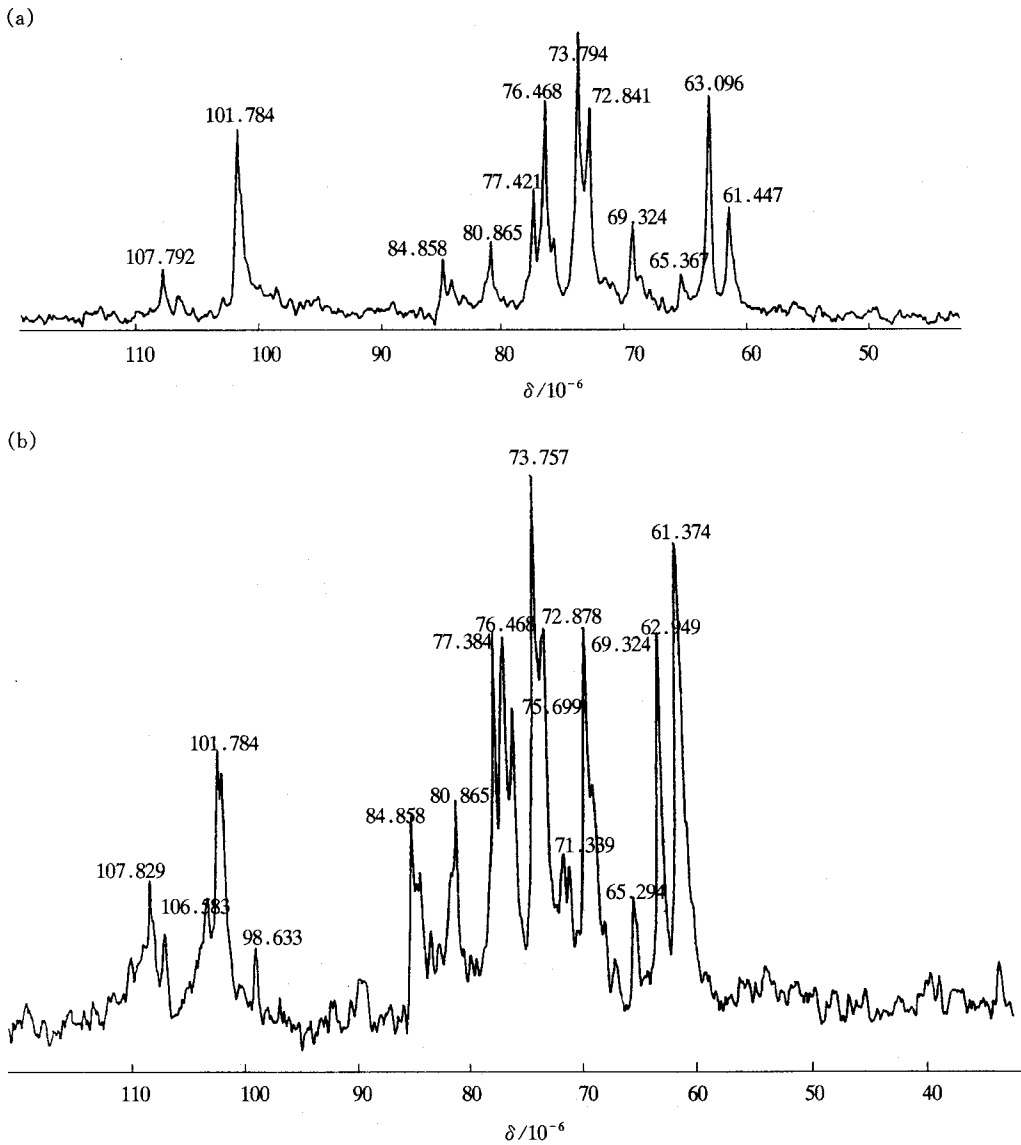


图 3 FⅢ-a 和 FⅣ-a 的¹³C-NMR 谱
(a) FⅢ-a; (b) FⅣ-a.

(65.367, 69.324), 推测其以 β (1 $\rightarrow$ 6) 连接. δ (72.841), δ (73.794), δ (76.468), δ (77.421) 为非连接碳 C2, C3, C4 的化学位移值. 同时还测定了 α (1 $\rightarrow$ 3) C1 与 β (1 $\rightarrow$ 6) C1 的相对峰高度, 得到 β (1 $\rightarrow$ 6) 与 α (1 $\rightarrow$ 3) 甙键糖基组成约为 1: 3.7, 与高碘酸氧化结果基本一致.

F IV-a 的 ^1H 、 ^{13}C -NMR 谱图 (图 3b) 表明: F IV-a 亦存在 α 、 β 两种甙键构型, 在糖异头碳 C1 区有 4 个峰, 表明 F IV-a 可由四种残基组成, 测定其相对峰高度, 四个峰的比值为 2.13: 1.27: 6.7: 1 (根据化学位移值大小顺序). 根据单糖组成分析可推测 δ (107.828) 为 β (1 $\rightarrow$ 6) -D-Gal 的 C1, δC6 为 69.324, 65.294, δ (106.583) 为 β (1 $\rightarrow$ 3) -D-Ara 的 C1; δ (101.784) 为 α (1 $\rightarrow$ 3) -Xyl 的 C1, δC3 为 (84.858, 80.865); δ (98.633) 为 α (1 $\rightarrow$ 2) -D-GlcUA 的 C1, δC2 为 75.699, 其余化学位移值 65~80 为非连接碳 C2, C3, C4, C6 的化学位移值.

综上所述, F III-a 的化学结构可表征为: 其主体结构为 α (1 $\rightarrow$ 3) -D-Xyl 构成, 分枝点在 C6 位, 以 β (1 $\rightarrow$ 6) 甙键与 Gal 相连, 分子侧链主要由 Gal, Ara, GlcUA 组成, 其中 GlcUA 构成分子的末端基. F IV-a 的化学结构可表征为: 其主体结构由 α (1 $\rightarrow$ 3) -D-Xyl 和 β (1 $\rightarrow$ 6) -D-Gal 构成, 具有大量分枝结构, 以 β (1 $\rightarrow$ 3) 甙键与 Ara 相连接, 以 α (1 $\rightarrow$ 2) 甙键与 GlcUA 相连接, 末端糖基主要由 GlcUA 构成. F IV-a 为多分枝, 结构复杂的酸性杂多糖. 因此, 虽然两种多糖都来自箬叶, 但其结构组成不完全一致, 对其生物活性影响也较大.

参 考 文 献

- 1 Kuboyama N, Fuji A, Tamura T. Antitumor activities of bamboo leaf extracts (BLE) and its lignin (BLL). *Folia Pharmacol Japan*, 1981, **77** (3): 579~596
- 2 Shibata M, Yamatake Y, Sakamoto M, *et al.* Pharmacological studies on bamboo grass (1): acute toxicities, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of water-soluble fraction (Folin) extracted from *Sasa albomarginata* Makino et Shibata. *Folia pharmacol Japan*, 1975, **71** (3): 481~490
- 3 陈春英, 丁玉强, Elmahadi E A, 等 (Chen C Y, Ding Y Q, Elmahadi E A, *et al.*). 箬叶多糖的分离纯化及其理化性质的研究. *中国生物化学与分子生物学报* (Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology), 1998, **14** (4): 422~426
- 4 陈春英, 丁玉强, Elmahadi E A, 等 (Chen C Y, Ding Y Q, Elmahadi E A, *et al.*). 箬叶多糖对小鼠实验性四氯化碳致肝损伤的作用. *中国药理学与毒理学杂志* (Chinese Journal of

Pharmacology and Toxicology), 1996, **10** (3): 237~238

- 5 陈春英, 黄雪华, 孙定一, 等 (Chen C Y, Huang X H, Sun D Y, *et al.*). 硫酸酯化箬叶多糖的合成及其抗艾滋病病毒作用. *药学报* (Acta Pharmaceutica Sinica), 1998, **33** (4): 264~268
- 6 张翼仲 (Zhang Y S). 多糖的结构测定. *生物化学与生物物理进展* (Prog Biochem Biophys), 1983, **10** (5): 18~23
- 7 司世麟 (Si S L). 苯酚一硫酸比色定糖法的应用. *生物化学与生物物理进展* (Prog Biochem Biophys), 1986, **13** (5): 68~69
- 8 Bitter T, Muir H M. A modified uronic acid carbazole reaction. *Analytical Biochem*, 1962, **4**: 330~334
- 9 张惟杰 (Zhang W J) 主编. 复合多糖生化研究技术. 上海: 上海科技出版社 (Biochemical Techniques on Study of Complex-polysaccharides. Shanghai: Shanghai Academic and Technology Press), 1987. 5~6; 108~110; 163~166
- 10 吴东儒 (Wu D R) 主编. 糖类的生物化学. 北京: 科学技术出版社 (Biochemistry of Sugars. Beijing: Academic and Technology Press), 1985. 364~365
- 11 Philip A J. ^{13}C NMR of polysaccharide In: *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*, America: Academic Press Inc, 1981, **38**: 13~28

Study on the Isolation, Purification and Structural Property of Polysacchrides from Ruoye (*Indocalamus tessellatus*). CHEN Chun-Ying¹⁾, DING Yu-Qiang²⁾, E. A. ELMAHADI, ZHOU Jing-Yan, LI Yan, XU Hui-Bi (Department of Chemistry, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074; ¹⁾ Institute of High Energy Physics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080; ²⁾ Department of Chemistry, Nanyang Institute of Science and Technology, Nanyang 473066, China).

Abstract Two polysaccharides which were prepared from Chinese traditional medicine Ruoye (*Indocalamus tessellatus*), a kind of bamboo leaves by alkaline extraction were studied. Their physicochemical properties and structural feature were elucidated by modern analytical technique such as IR, NMR, GC, partial acid hydrolysis, periodate oxidation and Smith degradation. The typical absorptions of these polysaccharides were shown in IR spectra. The main structure was examined: F III-a, (1 $\rightarrow$ 6) - β -D-galactosyl branched (1 $\rightarrow$ 3) - α -D-Xylan and F IV-a, (1 $\rightarrow$ 6) - β -D-galactosyl (1 $\rightarrow$ 3) - α -D-Xylan with arabinose branches at C-6 position.

Key words *Indocalamus tessellatus* polysaccharides, purification, structural analysis