

· 综述 ·

中药寡糖研究进展[△]李加玲¹, 刘永建¹, 宋金¹, 杨洪柳¹, 王梦丹¹, 彭太昇², 张园园^{1*}, 刘永刚^{1*}

1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 102488;

2. 北京盛妆家化有限公司, 北京 102488

【摘要】近年来, 研究者常从中药药效物质基础这一研究方向出发, 通过提取单一植物、动物、矿物中某一类化学成分进行传统中药创新。寡糖是中药中继苷类、多糖以外的又一类活性成分, 其聚合度低、极性大、异构体多, 分离较困难, 但在疾病防治方面却具有巨大潜力。随着技术方法及科研设备的发展, 对中药中寡糖成分的研究逐渐增多, 其应用范围不断拓展。对近 5 年中药寡糖相关研究进行综述, 主要从其制备方式、纯化分离、药理活性 3 个方面进行总结, 可为中药质量控制和中药创新型新药的开发提供参考。

【关键词】中药; 寡糖; 制备; 提纯分离; 质量控制; 药理活性

【中图分类号】R282 【文献标识码】A 【文章编号】1673-4890(2023)04-0916-14

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20220531001

Oligosaccharides from Chinese Medicinals: A Review

LI Jia-ling¹, LIU Yong-jian¹, SONG Jin¹, YANG Hong-liu¹, WANG Meng-dan¹, PENG Tai-sheng²,
ZHANG Yuan-yuan^{1*}, LIU Yong-gang^{1*}

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China;

2. Beijing Shengzhuang Jiahua Corporation, Beijing 102488, China

【Abstract】Aiming at exploring the pharmacodynamic material basis of Chinese medicinals, researchers tend to extract a certain or a category of chemical components from a single plant, animal or mineral for innovation. Besides glycosides and polysaccharides, oligosaccharides are the major active components in Chinese medicinals. Despite the low polymerization, high polarity, diverse isomers, and difficulty in isolation, oligosaccharides show great potential in disease prevention and treatment. Nowadays, amid the advancement of techniques and equipment, there has been an explosion of research on the oligosaccharides from Chinese medicinals. This paper summarizes the research on oligosaccharides from Chinese medicinals in recent five years, particularly the preparation methods, purification and separation, and pharmacological activities. The application in quality control is summed up for the first time. Therefore, this study is expected to serve as a reference for quality control of Chinese medicinals and development of new Chinese medicine.

【Keywords】Chinese medicinal; oligosaccharides; preparation; purification and separation; quality control; pharmacological activities

中医药是我国特有的医疗卫生资源, 是我国最具原始创新性的科技资源之一。近年来, 在国家政策的推动下, 中药的创新或二次开发受到了高度关注。研究者在中药药效物质基础领域开展了广泛而深入的研究。

糖类是中药中普遍存在的一类成分, 随着研究

的不断深入, 寡糖因其所具有的多种药理活性而受到广泛关注。寡糖是由 2~10 个单糖分子通过脱水缩合形成的糖苷键连接组成的直链或支链碳水化合物, 由于其聚合度低、极性大、结构相似, 混合物较难分离。研究者对寡糖分离进行大量研究, 根据其性质开发了多种分离方法。目前, 市场上多依靠性状

[△] 【基金项目】国家重点研发计划项目 (2018YFC1706505)

* 【通信作者】张园园, 副教授, 研究方向: 天然产物合成与结构修饰; E-mail: choenen@163.com
刘永刚, 研究员, 研究方向: 中药药效物质基础; E-mail: liuyg0228@163.com

判断药材品质,经验难以传承。引入中药药效物质作为质量控制指标,结合性状从定量、定性两方面辨别药材真伪、评价优劣,有利于建立全面的药材质量标准。寡糖的糖苷键在外界条件变化时会发生水解,聚合度随之改变,在高效液相色谱法(HPLC)图上转化为峰数量或峰面积的改变,此种信号容易识别,因此寡糖成分适合作为中药的质量控制指标^[1-2]。

本文通过检索中国知网、万方等数据库中中药寡糖近5年的研究成果,从制备方法、纯化分离、药理活性方面进行梳理,汇总了从中药中得到寡糖的方式,归纳了纯化分离寡糖提取液的方法及应用原理,介绍了寡糖类成分在地黄^[3]、黄芪^[4]、远志^[5-6]、巴戟天^[7]质量控制方面的应用;概述了中药寡糖抗氧化^[8]、双向调节免疫^[9-11]、治疗糖尿病及其并发症^[12-14]、抗阿尔茨海默病(AD)^[15-17]、抗抑郁^[18-19]等药理作用;对中药寡糖的分离和应用进行探讨和展望,以期为其进一步开发提供参考。

1 寡糖制备方式

目前,研究者主要利用3种方式从中药中获取寡糖:1)直接提取法。利用相似相溶原理,直接提取寡糖,但同时会溶出其他极性物质,如多糖、蛋白质。2)降解法。水解多糖得到对应的低聚糖片段,研究者已发现一些中药多糖的药理活性,但是为了解决相对分子质量大带来的溶解性差、生物利用率低的问题,多采用水解多糖以降低其相对分子质量,同时又保留其活性。但由于多糖本身由单糖组成且糖苷键连接方式复杂,再加上分支结构的存在,降解所得到的混合产物的分离过程比较复杂,而且结构分析困难。3)合成法。根据已知结构合成寡糖。目前,寡糖合成难度很大,且中药中寡糖活性实验研究对象往往是寡糖混合物,因此这方面尚待补充。

1.1 直接提取法

根据相似相溶原理,可用水、乙醇、甲醇来提取一些中药中的寡糖,这种直接用溶剂提取寡糖的方法称为溶剂提取法。溶剂提取法操作简单、适用性强,是提取寡糖的常用方法。考虑到传统中药多以水煎剂的方式服用,以及节约成本的原则,多以水为溶剂,水提醇沉法是相应的一种常用提取纯化方案。通常是用热水提取多次后,加乙醇至体积分

数为80%,此时利用溶解度的差异使多糖沉淀得到寡糖溶液^[20]。郝林华等^[21]利用此法从牛蒡根中提出了水溶性的低聚果糖。有研究常直接采用醇提寡糖的方式,从而避免除多糖这一步操作^[22]。

单纯的溶剂提取法一般耗时长、溶剂消耗量大、产率较低。借助超声波、微波可以缩短提取时间,提高效率。超声波可以破坏细胞结构,使其在瞬间破裂释放成分。钱艳艳等^[23]提取鲜地黄中的寡糖,热水法提取2次,每次4h;超声法提取2次,加上停顿时间,每次需要45min。以葡萄糖为标准品,采用苯酚-硫酸法测定2组低聚糖中碳水化合物质量分数分别为948.06、901.39 mg·g⁻¹,且均有抗氧化活性。

1.2 降解法

多糖是由10个以上单糖分子通过脱水缩合形成糖苷键,连接组成的天然直链或支链多聚糖是一些中药的主要活性成分,具有抗氧化、调节免疫、降血糖和改善肠道功能等活性^[24-27]。但多糖的高聚合度和复杂的分支结构限制了其进一步的研究和应用。现在多借鉴蛋白质“自上而下”的研究策略,将多糖水解为结构相对简单的低聚糖,从低聚糖水平阐释其结构特征^[28]。常用的方法有酸降解法和酶降解法。

1.2.1 部分酸降解法 部分酸降解法是将多糖溶于无机酸(盐酸、硫酸、磷酸)和有机酸[三氟乙酸(TFA)]中进行降解。其中,盐酸酸性强、降解速度快,但降解程度难以把控,对环境的污染也比较严重。硫酸降解之后需要加碳酸钡,避免影响质谱信号^[29]。磷酸降解得到的产物均一,相比之下酸性较弱,反应周期长。TFA是常用的1种酸,挥发性好,减压蒸发就可除去。使用TFA降解多糖可以避免中和步骤,不会成盐进而影响质谱信号、干扰结构分析。曹宇欣等^[30]通过正交试验得到了TFA水解黄芪多糖的最佳实验条件,水解完成后直接旋干就可除去TFA,简单易行。

1.2.2 酶降解法 酶降解法是利用多糖降解酶特异性地、选择性地切断多糖内糖苷键,降低多糖聚合度,得到低聚糖的方法。与部分酸降解相比,酶降解反应条件温和、速度快,还克服了化学降解片段相对分子质量分布范围宽、均一性差的缺点。但是,酶本身对周围环境很敏感,反应温度、pH等都能显著地影响酶的活性。李科等^[31]尝试用内切 α -1,4-葡聚

糖酶酶解黄芪多糖,利用单因素试验和正交试验得到了反应过程中酶浓度、反应温度、酶解时间三因素的最佳组合。在体外免疫活性筛查实验中,聚合度为10~18时糖活性表现高于底物黄芪多糖。

1.3 合成法

寡糖分子中有多个羟基,空间构型复杂多样,如何让糖基供体和受体在特定位置形成一定构型的糖苷键就成为了难点。研究者多利用化学法和酶法来合成复杂寡糖,化学法灵活多样,酶法高效。把2种方法结合起来,又是另外一种方法,即化学酶法。

1.3.1 化学法

1.3.1.1 糖基供体 糖基供体一般是在异头位含有1个在糖苷化条件下容易活化的离去基团,在其他位置上羟基均含有保护基的糖基砌块。由于糖结构中存在多个羟基和缩醛结构,反应存在困难,因而通常先用离去基团来活化异头位,制备成糖基供体,如糖基碘化物、糖基硫苷、糖基三氯乙酰亚胺酯、硝基烯糖等,再在促进剂作用下与糖基受体生成糖苷化产物^{[32]25-26,28}。

Koenigs和Knorr把乙酰化葡萄糖与溴化氢反应,在异头碳上引入了1个溴原子。溴原子很容易离去,异头碳变为碳正离子,很容易和其他亲核试剂反应生成糖苷^{[32]36}。之后化学合成法多沿用此思路制备糖基供体。

碘代糖是研究者基于溴代糖或氯代糖的制备方法得到的另一种糖基供体,可以大大提高产物的收率和立体选择性,但是该供体也因活性太高,导致储存不方便。硫代糖苷供体只在促进剂存在时发生反应,活化前非常稳定,并且产物构型灵活,故常用于多种复杂寡糖的合成。三氯乙酰亚胺酯供体是另外一种稳定、产物灵活的供体,制备过程相对简单,在适宜碱存在的条件下,异头位的裸露羟基与三氯乙腈反应即可得到。2位硝基取代的烯糖供体在糖苷化反应中可以得到天然难以得到的 α 构型产物。其他的糖基供体还有很多,不过任何一种供体都不能适用于所有的糖苷化反应,所以糖基供体的研究也一直都是糖化学研究的重点。

1.3.1.2 糖苷化反应 1) Koenigs-Knorr糖苷化法。Koenigs-Knorr糖苷化法是指从 α -卤代糖出发,在银盐的催化下产生 β -苷,某些Lewis酸和相转移催化剂也可催化^[33]。反应产物纯度高、收率高,但

反应条件苛刻,需避光、无水。中间体乙酰溴代糖具有较好的离去性能,同时稳定性很差,极易水解。但该法开辟了化学合成糖苷的先河,在糖化学中占有重要的地位^[34]。2) Fischer糖苷化法。Fischer糖苷化法是低分子糖在酸性条件下与简单醇的反应,反应可逆、操作简单,但糖基供体(游离糖或半缩醛)活性低,因此只可用结构简单的活泼醇作为糖基受体。

1.3.1.3 寡糖合成策略 1个完整的寡糖分子的合成路线往往需要很多步反应。传统的分步法需要反复分离反应中间体,对中间体施加保护基,不仅耗时耗力,收率还很低。“一锅法”在有机合成中应用较多,在合成寡糖时,将反应所需的糖基砌块按照一定的顺序加入1个反应容器中,待前一步糖苷化反应结束后再加入下一步反应的砌块,与前一步反应的产物进行偶联,如此反复进行,直至生成最终产物后进行纯化,得到目标寡糖。反应过程中需要选择合适的中间体来确保反应按照设计路线进行,可以基于化学选择性、正交选择性来合成糖基砌块供体,要求供体之间有足够大的活性梯度差异,或者离去基团不同。而“预活化法”不要求这些,该法在加入糖基受体之前,先用促进剂将容器内的糖基供体或上一步的产物活化,加入受体后就可以立即偶联^{[32]41-44}。

1.3.2 酶法 酶法合成中主要用到糖基转移酶、糖苷酶、糖合成酶3种酶。糖基转移酶中应用较多的是Lelori转移酶,其将核苷酸活化的糖基供体转移到合适的糖基受体上,反应的区域选择性和立体异构性好,但糖基供体较为昂贵。糖苷酶本身可以切割糖苷键,但是在体外,通过控制反应条件,糖苷酶反而可以合成糖苷键。该酶可以通过逆水解和转糖基2种途径,利用游离糖或简单修饰的糖基供体来合成寡糖。逆水解途径中,糖苷酶可以让游离糖和受体羟基直接缩合,但反应的收率比较低。因此转糖基反应在实际中使用较多。同化学合成反应相比,转糖基反应不需加入促进剂,糖苷酶可将经过修饰的糖基供体和受体缩合成苷。但是由于糖苷酶自身潜在的水解活性,有时反应的产率仍然会过低。前2种酶虽是自然界中存在的,但其推广应用都受到了一定的限制,而糖合成酶是利用基因工程和蛋白质工程,对现有的糖苷酶进行改造而来,其糖基转移活性大大提高^{[32]49-53}。

2 寡糖纯化分离工艺

寡糖混合物常利用彼此之间相对分子质量、极性、电荷的差异,通过液相色谱法、电泳法、膜分离法等进行纯化分离,并根据需要选择合适的检测器。寡糖纯化分离方法比较见表1。

2.1 凝胶色谱法

凝胶色谱法中,凝胶在柱中相当于分子筛,起到让大分子组分先流出、小分子组分后流出的作用,因此使用这种填充剂的柱色谱法又被称作分子排阻色谱法或分子筛色谱法,此法常使用的填充材料有聚丙烯酰胺凝胶、葡聚糖凝胶等,以水作洗脱液,操作简便、样品回收率高。聚丙烯酰胺凝胶由单体丙烯酰胺与交联剂甲叉双丙烯酰胺交联而成,具有不同型号的商品。李科等^[31]通过P-2凝胶柱分离黄芪多糖降解产物,可以得到4组寡糖片段,分别为聚合度1~3糖、3~6糖、7~14糖、10~18糖。葡聚糖凝胶也有不同规格,串联使用不同孔径的凝胶色谱柱可以达到更好的分离纯化效果。许定舟等^[35-36]水提醇沉麦冬得寡糖粗液后,先经Sephadex G-75柱色谱脱蛋白,寡糖质量分数为97.64%,样品的颜色也变为纯白色,再采用Sephadex G-15柱色谱对麦冬寡糖进行分级分离,出现2个洗脱峰,最终得到2种相对分子质量的麦冬寡糖。

2.2 亲水作用色谱法(HILIC)

较复杂糖类化合物在传统的反向液相色谱柱上难以保留,也很难实现有效分离。目前主要采用2种策

略:一是对糖类样品进行衍生化,在结构上引入生色团或荧光团,降低寡糖的极性,从而提高分离效率和检测信号;二是使用HILIC,以极性分离材料为固定相、水溶性有机溶剂为流动相,极性越大的物质在色谱柱上的保留越强,流出顺序与传统的正向色谱柱相同,常选择示差折光检测器(RID)或蒸发光散射检测器(ELSD)。

RID通过检测参比池与测量池中折射率之差来检测寡糖含量,不需对寡糖进行衍生化处理,但是对压力、流动相组成及流速的变化都较敏感,因此只能使用等度洗脱,并且该检测器灵敏度不高。邱建国等^[37]利用HPLC-RID测定了水苏糖成分含量。与RID相比,ELSD灵敏度较高^[38],其要求使用具有挥发性的缓冲盐及流动相,可以消除溶剂的干扰,基线稳定、没有折光视差效应、使用梯度洗脱灵敏度更高。孙恬等^[39]考察色谱柱和流动相种类对巴戟天寡糖的分离效果影响时发现,XBridge Amide色谱柱(250 mm×4.6 mm, 3.5 μm),流动相为0.2%三乙胺乙腈溶液(A)-0.2%三乙胺水溶液(B)梯度洗脱时对各成分的分离效果最好。

2.3 高效阴离子交换色谱法(HPAEC)

在碱性条件下,糖链上的羟基可以形成氧负离子。不同寡糖中的羟基的电离常数是有细微差别的,导致阴离子交换树脂和氧负离子的相互作用产生差别。HPAEC根据这种原理,利用强碱洗脱剂导致不同寡糖出现在不同的洗脱位置,从而对其进行分离,一般与脉冲安培检测器(PAD)联用,不需衍生、

表1 寡糖纯化分离方法

方法	适用范围	优点	缺点	参考文献
凝胶色谱法	不同聚合度寡糖	操作简便、样品回收率高	分辨率低、成本高,不适合工业化生产	[31,35-36]
亲水作用色谱法	极性化合物和亲水性化合物	重复性好、样品易浓缩	受到分辨率和载样量的限制	[37-39]
高效阴离子交换色谱法	中性、酸性寡糖	灵敏度较高、操作简单、专一性强	仪器耐碱性要求高,洗脱过程中寡糖易异构化	[40]
毛细管电泳法	有荧光反应、带电荷的样品	非衍生化法操作简单、分离效果高、无需样品衍生化、测定快速	设备要求与条件苛刻、产量低,衍生化法技术要求高、重复性差、耗时	[41]
荧光辅助糖电泳	中性寡糖	直观易读、高灵敏度、高分辨率	不能确定糖的结构,前处理时间长	[4,42]
石墨化碳液相色谱法	强极性、结构相近的物质	可区分结构相似的异构体化合物	对低极性物质保留能力差、成本高	
高速逆流色谱法	在互不相溶的两相溶液中分配系数存在差异的物质	避免了不可逆吸附带来的损失;分离纯化可同步完成、分离效率高、制备量大;大多以水相为流动相,环境污染小	依靠被分离物质在两相溶液中分配系数不同而实现分离,不能对所有的物质实现一次性分离	[43]
膜分离法	不同相对分子质量的寡糖	可根据寡糖相对分子质量进行分离,操作简单	膜孔选择困难、易堵塞、不易区分相对分子质量相近的寡糖	[44]

简便易行、专属性强。由于洗脱剂为强碱,仪器耐碱性要求高。强碱往往会导致糖的异构化,所以需要在短时间内迅速分离来减少对寡糖结构的影响。

马务迢等^[40]为考察巴戟天不同生长期中的寡糖类成分含量变化规律,采用RCX-10色谱柱分离寡糖溶液,柱材料为316L不锈钢和聚醚醚酮,属于耐碱材料,以 $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaOH}$ 溶液作为A液, $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaOH}+500\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaOAc}$ 混合溶液作为B液,组成流动相进行梯度洗脱,满足了HPAEC-PAD对于色谱柱和流动相的要求。色谱图反映葡萄糖、果糖、蔗糖、1-蔗糖三糖、耐斯糖、1F-果呋喃糖基耐斯糖6种寡糖成分与相邻色谱峰之间的分离度均大于1.5,说明分离效果好。

2.4 毛细管电泳法(CE)

CE是以毛细管为分离通道,高压直流电场作为驱动力,具有样品需求量少、灵敏度高、分离效率高的优点,应用于糖类分析的主要有毛细管区带电泳(CZE)、毛细管凝胶电泳(CGE)及胶束电动毛细管电泳(MEKC)。

CZE中寡糖需要带电,方法包括在硼酸盐缓冲液中与硼酸根络合,在强碱缓冲液中电离,进行衍生化,接着带电寡糖在缓冲液中和电场作用下因淌度不同而实现分离。CZE是电泳法中相对简便,应用广泛的一种分离方法。孙燕^[41]在降解褐藻胶时发现,酶降解所得寡糖在非还原端碳4、5位形成双键与碳6位的羧基中的羰基共轭,在235 nm处具有特征紫外吸收,于是不经衍生,直接经高效毛细管电泳-紫外分光检测方法(HPCZE-UV)分离检测了酶降解产物;酸降解所得寡糖无此共轭体系,并没有特征紫外吸收,也没有荧光发光基团,如果直接分析检测就比较困难,便将酸降解寡糖与8-氨基苊-1,3,6-三磺酸钠(APTS)荧光衍生化试剂反应,并优化了衍生化条件和电泳条件,经HPCZE-激光诱导荧光检测法(LIF)实现了高效分离,检测限达到了 $1\times 10^{-17}\text{ mol}$ 水平。

CGE是从区带电泳中派生出来的把凝胶作为毛细管中支持物的电泳方式。一方面,凝胶在管中起到分子筛的作用;另一方面,由于凝胶黏度大,又可以减少溶质的扩散。MEKC是通过在缓冲液中加入表面活性剂,使其形成胶束作为准固定相。中性物质在水相和该相的分配系数不同而得到分离,达到与CZE互补的效果,扩大电泳法的分离范围。

2.5 荧光辅助糖电泳法(FACE)

FACE是通过衍生化反应使糖还原端结合上荧光基团,然后在一定浓度的聚丙烯酰胺凝胶上进行分离的一种分析方法,可以根据电泳条带数量及荧光强度来判断出寡糖的成分及相对含量,直观易读,具有高分辨率和高灵敏度。目前,有若干种衍生方法和相应的衍生试剂,其中8-氨基萘基-1,3,6-三磺酸(ANTS)应用较多,不仅为糖分子提供了荧光基团,还提供了3个负电荷,使原来的中性糖分子带电,有足够的动力在电场力作用下进行电迁移。姚喜梅等^[42]从ANTS、2-氨基苯甲酸(2-AA)和2-氨基吡啶酮(AMAC)中选择葡甘露寡糖的荧光衍生剂时,发现ANTS组条带更加清晰且数量更多,因此确定ANTS为实验荧光衍生剂,并从分离胶浓度、ANTS用量、衍生化反应温度、衍生化反应时间等方面对衍生条件进行了优化。李晓霞等^[4]将黄芪多糖经内切-1,4- β -半乳糖酶降解寡糖同样用ANTS衍生,通过FACE获得糖指纹图谱,结合主成分分析,找出了区分不同种质资源黄芪的差异性糖组分。

2.6 石墨化碳液相色谱法

石墨化碳液相色谱法的固定相是多孔石墨化碳(PGC),PGC是由 sp^2 杂化的碳原子呈六边形排列,通过共价键相连构成层,层间通过范德华引力相互作用结合在一起构成带,石墨带再交织而成。PGC主要是利用分子结构和分子极性的不同进行分离。分子结构越平,其与石墨化碳的结合就越紧密。具有大极性基团的分子可以使石墨化碳表面极化,进而导致两者之间作用力加强,提高分离效率。寡糖分子中具有多个羟基,复杂的寡糖异构体很适合用这种方法分离。

2.7 高速逆流色谱法(HSCCC)

HSCCC是一种高效快速的液-液分配色谱,固定相和流动相都是液体。两相互不相溶,在高效运动的螺旋管内建立了单向性流体动力学平衡。样品中各组分由于在两相中分配系数存在差异而实现分离,在流动相中的分配比例大的组分先被洗脱下来。没有固相载体,避免了不可逆吸附而带来的损失,基本上能回收全部样品。

符颖^[43]先用分析型HSCCC筛选出乙酸乙酯-正丁醇-水(4:1:5)最佳溶剂系统,再放大柱体积,采用制备型HSCCC,重新考察流速、转速等条件,

摸索不同上样量对分离效果的影响,以建立合适的制备方法。最后成功从400 mg远志样品中分离得到3,6'-二芥子酰基蔗糖酯(DISS)和远志蔗糖酯A,HPLC检测纯度分别为93%、95%。

2.8 膜分离法

膜分离法依据相对分子质量截留值分为微滤膜、超滤膜和纳滤膜。超滤膜能够除去蛋白质、多糖等大分子物质,纳滤膜能够除去半乳糖等小分子物质,从而得到高纯度的寡糖混合物,操作比较简单,过程中没有化学变化。杨菁等^[44]用超滤膜除去地黄提取液中相对分子质量>5000的物质,收集超滤液后再利用活性炭脱色。但是一般会使用不同膜分级分离。如果截留值差距较大,得到的以某一相对分子质量范围为主的组分中往往会存在相对分子质量或高或低的组分。

3 寡糖的质量控制应用

寡糖是中药中新发现的成分,其聚合度低、空间结构独特、具有较好的药理活性,为人们寻找新的中药质量指标提供了思路。研究者为此开展了一系列研究工作,试图在中药材种植采收、炮制工艺中找到独特的寡糖成分,以期将其作为中药材质量控制指标。

3.1 地黄

地黄中含有蔗糖、棉子糖、甘露三糖、水苏糖等寡糖成分^[45]。张汝学团队研究地黄多年,优化地黄寡糖提取分离工艺,考虑到生地黄药材传统服药方式,选择水提寡糖,在之后发现不同产地的生地黄和熟地黄寡糖成分类型和含量都存在较大差异^[46-48]。结合HPLC图发现,在蒸法炮制熟地黄的过程中,水苏糖和棉子糖均失去1个果糖而变成相应的甘露三糖和棣二糖。并且蒸制时间达到10 h,达到《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)2010年版规定熟地黄性状要求时,已检测不到水苏糖、棉子糖和梓醇,同时甘露三糖、棣二糖及单糖的含量明显增加^[1]。同样利用HPLC观察另一种炮制方法——酒炖法,依靠传统辨别经验“炖至酒尽”,炖4 h,发现也未达到《中国药典》2010年版规定性状,根据HPLC图显示,水苏糖、棉子糖和梓醇也均没有完全消失,甘露三糖和棣二糖的增幅也不大^[3]。传统炮制依据“蒸治黑润”或“炖至酒

尽”来肉眼判断是否炮制成熟,这种经验不易传授,而且药材质量无可避免地存在差异,会影响临床疗效。如果利用HPLC来指导炮制进程的话,容易判断是否炮制成熟,准确度高。

3.2 黄芪

黄芪是一种传统补益药,本身用量大,加上野生资源枯竭,多地进行人工引种,栽培1年便采收。这种栽培方式得到的黄芪称为速生黄芪,性状与野生黄芪大为不同。关于速生黄芪品质好坏存在很大争议,为找到可以全面准确评价野生黄芪和移栽黄芪品质的指标,“多糖受体”学说推测多糖分子中存在一种或多种寡糖片段的“活性中心”^[49]。李晓霞等^[50]模拟人工胃液条件处理黄芪细胞可溶性多糖及糖缀合物将降解得到不同聚合度的寡糖,证明黄芪多糖经口服后也主要以寡糖形式显效。李晓霞等^[4]继续利用内切-1,4- β -半乳聚糖酶水解了蒙古黄芪(野生芪和移栽芪)与膜荚黄芪(野生芪和移栽芪)的可溶性多糖,通过FACE获得糖指纹图谱,结合主成分分析法,发现酶解产物中的五糖、六糖可以作为区分蒙古黄芪的移栽芪和野生芪的差异性糖片段,而四糖、五糖可以作为区分膜荚黄芪的移栽芪和野生芪的差异性糖片段。王迪等^[51]发现,内切-1,3- β -葡聚糖酶酶解产物寡糖中五糖和六糖可以作为区分膜荚黄芪(野生芪和移栽芪)的差异性糖片段。不过,并未提及差异性糖片段的活性。曹宇欣^[52]通过水提醇沉、超滤截留从山西仿野生黄芪中得到3组不同相对分子质量的多糖,其中,相对分子质量约为10的黄芪多糖APS-II,以葡萄糖作为主要单体,在体内外免疫活性筛选实验中活性最强。李科等^[31]利用内切 α -1,4-葡聚糖酶降解APS-II,得到了免疫活性强于APS-II的聚合度10~18糖混合物。

3.3 远志

远志来源于远志科植物远志的根,其中的寡糖酯类成分是一类主要以蔗糖为共同母核,以不同形式的糖苷键连接葡萄糖或鼠李糖(较少)成为寡糖后,再与有机酸(乙酸、苯甲酸或苯丙烯酸)类成分形成的酯,其是不超过五分子糖的一类化合物^[53],其中,3,6'-二芥子酰基蔗糖是《中国药典》2020年版评价远志药材质量的标志性成分。Wu等^[54]发现可以选择超高效液相色谱-质谱法(UPLC-MS)中鉴定的远志寡糖酯进行质量评价。研究者一般常通过

测定多个而非单一寡糖酯类成分来反映远志药材的内在品质。相关研究比较了远志根皮(生品)与远志木心中西伯利亚远志糖 A_5 、西伯利亚远志糖 A_6 、球腺糖A、远志蔗糖酯B、3,6'-二芥子酰基蔗糖、黄花远志素、远志蔗糖酯A及远志蔗糖酯C的含量^[5-6],发现根皮中该类成分含量均明显高于木心,从而证明了古代远志去木心的科学性。另外,远志经甘草汁煮后,上述寡糖酯除球腺糖A外含量均降低。宋梦晗等^[55]还发现,在此过程中芥子酸、对羟基苯甲酸、对香豆酸、阿魏酸等8种有机酸含量均显著增加。相关研究采用HPLC-飞行时间质谱法(TOF/MS)和已知对照品模拟炮制方法,模拟远志经水煮、甘草汁煮的过程,确证远志中寡糖酯类成分性质不稳定,在甘草水煮制过程中发生了酯键水解和构型改变^[56-57]。考虑到寡糖酯类在对照品药材中含量低、极性大、不易制备,张晓玲等^[58]选用远志中含量高、易制备的DISS作为内参物,引入一测多评法,实现了多种糖酯成分的同步测定,该方法成本低、准确度高。

3.4 巴戟天

巴戟天中低聚糖成分主要为菊粉型低聚糖(GFn),是由(1→2)- β -D-呋喃果糖苷键结合而成的线性直链型低聚糖,其一端是蔗糖,糖链增长基团为 β -呋喃型果糖,末端带有1个葡萄糖残基,聚合度通常为2~60,聚合度虽增加,增长的基团和连接方式不变^[59]。冯峰^[60]从巴戟天中分离得到了3个全由果糖组成的果聚糖。

《中国药典》2020年版规定巴戟天药材里耐斯糖不得低于2.0%^[61]。在传统的中药材交易中,按照“辨状论质”理论,巴戟天以条粗、肉肥厚而色紫蓝、味甜、木心细者质佳^[62]。杨丽等^[63]利用超声醇提法从生巴戟天样品得到低聚糖溶液,经HILIC-ELSD分析发现,巴戟天根直径越小断面越紫、木心越细,蔗果三糖、耐斯糖、蔗果五糖含量越高,与传统理论部分不一致,值得思考。一些研究者注意到巴戟天寡糖的活性,将其作为考察巴戟天药材的栽培年限、储存条件、炮制规范时的指标。杨丽等^[64]继续考察巴戟天生长年限与巴戟天寡糖含量的关系,在广东省德庆县巴戟天规范化种植基地采集样品,发现5年生的巴戟天中耐斯糖与蔗果五糖含量达到最高,4年生蔗果三糖含量最高,考虑到药用价值、种植成本和土地利用效率等因素,建议巴

戟天的最佳栽培年限为4~5年。冼丽铨等^[65]在广东省德庆县使用随机多点采样法,采集了不同生长年限的巴戟天样品,同样发现4年生巴戟天的蔗果三糖含量最高,并且显著高于2年生巴戟天,但4年生与5年生的耐斯糖和蔗果五糖含量无明显差异,因此认为4年生的巴戟天药材质量最佳。孙恬等^[66]继续考察采后储存温度和时间对巴戟天药材中寡糖含量影响,发现在25℃有水分存在的条件下,巴戟天寡糖会发生水解反应,导致GF2、GF3、GF4的减少,而D-果糖、葡萄糖、蔗糖增加,因此建议60℃下烘干或4℃下低温保存药材。相关研究建立了GF2~GF11的含量测定方法^[67-68],比较饮片巴戟天、巴戟肉和盐巴戟天中单糖和低聚糖含量的差异,发现巴戟肉和盐巴戟天中10种低聚糖GF n ($n=2\sim11$)的含量均分别低于饮片巴戟天中相应成分的含量($P<0.01$),其中,多批巴戟肉中耐斯糖含量低于《中国药典》2020年版中限量要求,这为饮片巴戟天、巴戟肉、盐巴戟天的质量标准修订和提升提供了参考。

4 寡糖的药理活性

现代研究表明,中药寡糖在抗氧化、调控免疫系统,治疗生殖障碍、糖尿病、AD和抑郁症(MDD)等方面都有贡献。

4.1 抗氧化

在生理情况下,人体内的自由基处于不断产生与清除的动态平衡中。有时受到来自机体自身活动、情志因素、外界因素干扰,平衡状态遭到破坏。自由基清除不及时,就会使机体组织和细胞受到损害,继而造成多种疾病的发生。中药寡糖具有良好的抗氧化活性,可以直接清除自由基,提高抗氧化酶的活性。

中药寡糖对各种自由基具有清除能力。于冰莉等^[8]发现,甘草地上部分寡糖在体外可剂量依赖性地清除1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基,并可以延长线虫在 H_2O_2 应激环境中的寿命。钱艳艳等^[23]研究不同提取方法对鲜地黄寡糖的影响时发现,超声法和热水提取法2种方式得到的低聚糖片段对超氧阴离子自由基和DPPH自由基均表现出一定的清除能力。金钗石斛低聚糖对2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS $^{+\bullet}$)自由基的清除能力优于对DPPH自由基的清除能力^[69]。一些中药寡糖表现出优于多糖的自由基清除能力。冀建伟等^[70]

以2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT)为阳性对照,发现厚朴花中低聚糖的体外抗氧化活性优于多糖组分,这可能与两者结构差异有关。马铭等^[71]发现,党参中粗低聚糖的抗氧化活性强于多糖,接着用Sephadex G-25柱纯化粗低聚糖,发现在质量浓度均为 $5.00\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,精制党参低聚糖(CPO)的DPPH自由基清除活性强于粗低聚糖。

中药寡糖还可以通过调控机体酶抗氧化系统,增强抗氧化酶活性起到抗氧化作用。抗氧化酶包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽还原酶(GR)及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)。CPO在体外显示出极强的抗氧化活性^[71]。周静^[72]利用D-半乳糖(D-gal)制备大鼠衰老模型进行体内实验发现,CPO可以提高血清中CAT、GSH-Px和SOD活性,并且降低脂质氧化变性后产物丙二醛(MDA)的水平,改善了D-gal诱导的活性氧产生过剩引发的氧化应激。程亮星^[73]发现巴戟天寡糖可以升高抗氧化酶水平,降低MDA和过氧化脂质的水平,发挥抗氧化作用,保护子宫组织。

4.2 调节免疫

人体在免疫低下的状态,如果受到了外界有害因素的侵袭,就容易发生疾病。机体会自发产生炎症免疫反应(IIR),进行自我保护和修复。但是过度的IIR也会损害机体自身。市面上已有的一些抗炎药虽能起到抗炎作用,但同时会产生一系列不良反应,对机体器官造成损伤。研究发现中药寡糖既可以抵抗免疫低下,增强机体免疫能力,又可以控制炎症反应。一方面,中药寡糖可以通过非特异性免疫和特异性免疫2种途径,提高巨噬细胞吞噬功能,促进细胞因子的分泌,加强抗体的生产,起到增强免疫的作用。另一方面,寡糖也能从核转录因子(NF)- κ B和促分裂原活化蛋白激酶(MAPKs)2种途径,通过阻止细胞因子的产生与释放抑制环氧化酶(COX)和一氧化氮合成酶(NOS)等酶活性起到控制IIR的作用。

环磷酰胺是一种烷化类的免疫抑制剂,可杀伤淋巴细胞,抑制特异性抗体反应。刘少芳^[9]利用环磷酰胺制备免疫低下小鼠模型,灌胃牛蒡寡糖(BFO),发现BFO可提高巨噬细胞的吞噬功能,促进脾细胞增殖,显著提高血清溶血素的生成,显著增多B细胞介导的溶血反应,这说明BFO可以增强免疫低下小鼠的非特异性及特异性免疫能力。盛荣

华等^[10]研究发现BFO还可以显著促进正常小鼠脾细胞分泌细胞因子白细胞介素-2(IL-2)和 γ -干扰素(IFN- γ)。

刘晶^[11]用BFO(纯度>95%)粉剂配置成高、中、低剂量组的BFO溶液,利用脂多糖(LPS)诱导小鼠巨噬细胞RAW264.7制备细胞炎症模型,检测细胞因子转录翻译水平,测定NF- κ B和MAPKs通路蛋白磷酸化水平,结果发现BFO可显著抑制LPS上调的IL-6、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)和肿瘤坏死因子(TNF)- α 转录水平和蛋白表达水平,同时抑制诱导型COX-2及一氧化氮合酶(iNOS)的表达,并且抑制NF- κ B p65和 κ B抑制因子(I κ B)磷酸化水平及细胞外信号调节激酶(Erk)、p38、c-Jun氨基末端激酶(JNK)磷酸化水平,因此推测BFO可能是通过抑制模型细胞中NF- κ B和MAPKs通路降低细胞因子的活性,从而发挥抗炎活性。

CPO也具有类似BFO的双向免疫调节、抵抗免疫低下和抗炎作用。马铭^[74]制备环磷酰胺小鼠免疫低下模型,灌胃CPO(50 、 100 、 $150\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),发现CPO可显著提高小鼠巨噬细胞吞噬活性,增强小鼠的迟发型变态反应的耳廓肿胀程度,促进脾淋巴细胞增殖和转化,显著提高细胞因子IL-2和IFN- γ 、NO的分泌水平及血清免疫球蛋白G(IgG)、血清免疫球蛋白M(IgM)的含量,发挥增强免疫的作用,抵抗环磷酰胺导致的免疫低下。周静^[72]制备衰老大鼠模型,增加了给药剂量(230 、 400 、 $700\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),继续研究CPO的免疫活性,发现CPO此时可以阻止衰老大鼠血清炎症因子TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的过度表达,抑制NF- κ B和MAPKs通路的活化,改善D-gal引起的炎症。由于所用动物品种及实验指标不同,尚无法确定CPO的双向调节作用机制。

4.3 调节血糖

糖尿病是全球高发内分泌系统疾病,常累及其他器官,如肝脏和肾脏。随着该疾病的发生,患者体内会出现持续有高血糖及脂质代谢紊乱的状况,包括胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)的增加和高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)的减少。血管内皮生长因子(VEGF)是一种高度特异性的促血管内皮细胞生长因子,可因高血糖引起组织缺氧而被激活表达。脂质代谢紊乱和氧化应激会进一步损伤机体器官,导致并发症的产生。中药寡糖可改善糖尿病的高糖症状,中药寡

糖对糖尿病并发症也有一定的作用。

4.3.1 降血糖 张汝学等^[75-77]对地黄寡糖(RGOS)的降血糖活性进行了系统的研究,发现RGOS不仅可以调节实验性糖尿病的糖代谢紊乱和生理性高血糖状态,还可以逆转去胸腺大鼠和老年大鼠的异常糖代谢,但对正常大鼠无作用。胰岛素抵抗是多种代谢相关疾病的共同病理基础和危险因素,是2型糖尿病发病的中心环节。郭丽民等^[78]采用高胰岛素建立HepG2细胞株胰岛素抵抗模型,发现地黄寡糖可以增加模型对葡萄糖的消耗。

α -葡萄糖苷酶是人体内关键的淀粉消化酶之一,活性物质可通过抑制该酶的活性从而减缓葡萄糖的释放速度,避免血糖大的波动。体外实验表明相对分子质量为500~1500的麦冬寡糖可以显著抑制 α -葡萄糖苷酶活性^[36]。以与人类2型糖尿病发病较为相似的自发性2型糖尿病db/db小鼠为模型,灌胃给予麦冬寡糖,发现麦冬寡糖可以改善小鼠表现的肥胖、高血糖症、血脂异常和肾损伤^[79]。

4.3.2 抗糖尿病肝病、肾病 糖尿病性肾病是糖尿病的主要并发症之一。陈海兰等^[12]利用高脂饲料联合链脲佐菌素(STZ)制备糖尿病大鼠模型,灌胃ROS(200 mg·kg⁻¹) 22 d,观察血脂代谢和肾脏组织中VEGF情况,结果显示,ROS降低了TC和TG水平,升高了HDL-C水平,并且TG降低效应比阳性对照药二甲双胍更明显,一定程度上逆转了糖脂代谢紊乱;其还降低了肾脏质量及肾脏指数,改善了肾脏组织结构,一定程度上修复了肾脏组织,同时减少了VEGF蛋白相对表达量。因此推测ROS改善糖尿病肾病的作用与抑制VEGF的表达有关。

糖尿病性肝病、生殖功能障碍和性功能减退也是糖尿病的常见并发症。持续高血糖及糖脂代谢紊乱会导致脂肪肝和氧化应激的出现与发生,氧化应激又会进一步损伤肝脏组织和睾丸组织。侯庆华等^[13-14]以高脂饲料联合STZ法制备2型糖尿病大鼠模型,灌胃给予昆布寡糖8周,考察其对糖尿病大鼠肝脏和睾丸的保护作用。8周后,糖尿病大鼠血糖水平降低、胰岛素水平升高,表明糖脂代谢紊乱得到逆转;其肝脏中天冬氨酸氨基转移酶(AST)和丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平降低,血清中睾酮含量升高,肝脏和睾丸组织得到修复,且肝脏组织和睾丸组织中MDA含量显著降低,SOD、CAT活性显著升高,表明昆布寡糖在一定程度上抵抗了氧化

应激。因此,昆布寡糖对糖尿病大鼠的肝脏和睾丸具有保护作用。并且,大鼠睾丸组织中VEGF表达减少,推测昆布寡糖对糖尿病睾丸的保护作用可能与抑制VEGF有关。

4.4 改善生殖功能

勃起功能障碍(ED)是临床常见的男性功能障碍疾病,表现为阴茎持续不能达到或维持足够的勃起以完成满意的性生活。中药寡糖,如BFO、巴戟天寡糖,有改善生殖功能的作用。

孟宇等^[80-81]发现,BFO可以促进体外培养的大鼠阴茎海绵体平滑肌细胞增殖,继续通过大鼠双侧髂内动脉结扎术来制备动脉性勃起功能障碍(A-ED)模型,实验结果表明,BFO可以显著上调动脉结扎模型中神经型一氧化氮合酶(nNOS)和内皮型一氧化氮合酶(eNOS)基因的表达,影响NO的合成。NO作为一种神经递质,在平滑肌松弛的信号传导通路中发挥着重要作用。说明BFO通过影响NO的合成,影响NO-环磷酸鸟苷酸(cGMP)通路,介导平滑肌松弛,促使阴茎勃起,来改善ED。赵君等^[82]采用“劳倦过度、房事不节”法制备小鼠肾阳虚模型,发现巴戟天寡糖一边调节垂体-下丘脑-性腺轴从而调节生精过程,一边发挥抗氧化作用,保护睾丸精子免受氧化损伤。

4.5 改善学习记忆能力及抗AD

AD是一种慢性神经退行性疾病,主要临床表现包括记忆力逐渐减退、认知功能发生障碍、行为异常和社交障碍等。病理特征主要为老年斑(SP)、神经元纤维缠结(NFT)及神经元数量减少^[17]。近现代多从胆碱能系统障碍、神经细胞凋亡、氧化应激、神经炎性病变等角度进行研究并寻找有效药物。目前,美国食品药品监督管理局(FDA)批准的5种抗AD药物属于对症治疗,影响AD进程的药物仍处于初步研究阶段。中药在治疗AD疾病方面有着悠久的历史和丰富的经验,近年来国内外众多学者从中药及其有效成分着手,针对治疗AD的天然药物进行了广泛的研究,如人参水溶性寡糖、远志寡糖酯成分。

孙丽丽等^[15-16]采用东莨菪碱(scop)诱导痴呆小鼠,发现水溶性人参寡糖(WGOS)能够改善小鼠模型的空间学习记忆能力,同时能够抑制小鼠海马组织中乙酰胆碱酯酶(AchE)的活性。许婷^[83]试图从炎

症反应角度探讨WGOS的神经保护作用机制,结果再次证实WGOS可显著改善scop诱导痴呆小鼠的学习记忆能力,同时还抑制海马组织及血清中IL-1 β 、TNF- α 的表达和海马组织中星形胶质细胞的激活。因此推测WGOS是通过抑制中枢系统的炎症反应进程,起到抗AD的作用。

远志是一种传统类益智药,具有安神益智、交通心肾、祛痰、消肿的功效,用于心肾不交引起的失眠多梦、健忘惊悸等。远志寡糖酯类成分具有神经保护、抗氧化应激、调整神经递质水平等药理活性,提示这类成分具有抗AD的潜能。研究发现,富含50%寡糖酯类成分的远志醇提物可以减少AD模型小鼠海马区大脑皮层的NFT和SP,促进大脑皮层神经元生长,改善AD药理症状^[17]。相关研究发现,远志寡糖酯可以改善氢溴酸东莨菪碱所诱导的小鼠学习记忆障碍,从 β -淀粉样蛋白(A β)毒性假说角度探讨远志寡糖酯抗AD作用机制,发现其可以对抗A β 25-35诱导的SH-SY5Y细胞损伤,减少细胞凋亡,激活蛋白激酶B/环磷酸腺苷反应元件结合蛋白/脑源性神经营养因子(Akt/CREB/BDNF)信号通路,推测是通过正反馈加强了BDNF的神经保护作用^[84-86]。

4.6 抗抑郁

MDD是现在比较常见的一种心理疾病,以长期连续的情绪低落为主要的临床特征,属中医学“郁证”范畴。传统中医学对郁证有较为系统的理论认识及丰富的诊治经验,在MDD尤其是轻中度抑郁的防治中可以发挥积极作用,寡糖在其中起了重要作用,如远志寡糖酯、巴戟天寡糖。

远志醇提物经大孔吸附树脂上梯度洗脱的过程中,经50%乙醇洗脱得到的活性部位被称为YZ-50。YZ-50中富含寡糖酯类成分,在小鼠强迫游泳实验(FST)和小鼠悬尾实验(TST)中表现出抗抑郁效果。由于经典单胺理论认为,MDD的发生与脑内单胺递质,尤其是去甲肾上腺素(NE)和5-羟色胺(5-HT)功能不足有关,于是进一步从神经递质方面深入研究YZ-50抗抑郁机制,发现其能显著增强育亨宾的毒性,并且抑制阿扑吗啡所引起的小鼠体温下降,由此推测远志通过阻断单胺类递质的重摄取从而发挥抗抑郁效果^[18]。从YZ-50中分离出DISS,发现DISS同样具有抗抑郁活性,可以增强5-HT和NE神经功能^[87]。

结合慢性不可预见性应激和孤养制备大鼠慢性应激抑郁模型,进一步探究YZ-50在神经内分泌、细胞凋亡、神经营养因子方面的作用。下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)是神经内分泌调节的枢纽,起到维持内环境稳定的重要作用,如果持续亢进会引起机体系统功能的紊乱。模型大鼠的HPA功能亢进,对外界的兴奋性、反应性及快感也明显减退,给药YZ-50后,促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)、促肾上腺皮质激素(ACTH)、血清皮质醇(COR)水平降低,说明远志寡糖酯可以抵抗HPA的亢进状态,同时大鼠行为学症状也得到了改善^[88]。YZ-50还可以促进模型大鼠海马CA3区细胞凋亡相关因子B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)的表达、抑制Bcl-2相关X的蛋白质(Bax)蛋白的表达,调控Bcl-2/Bax比例而抑制神经细胞的凋亡,保护神经细胞^[89]。酪氨酸蛋白激酶B(TrkB)是神经营养因子BDNF的一种高亲和力受体。实验结果表明,YZ-50可以提高造模大鼠海马各区的BDNF和TrkB信使核糖核酸(mRNA)的表达。结合前期实验,推测远志寡糖酯通过提高神经营养因子活性促进慢性应激、HPA轴亢进等所造成损伤神经元的恢复,从而改善应激模型大鼠的MDD症状,有效发挥抗抑郁作用^[90]。此外,近期研究结果表明,远志醇提物还可以调节抑郁大鼠肠道内的菌群失调^[91]。

巴戟天寡糖胶囊是推荐使用的抗抑郁中成药之一^[19]。一项临床研究结果显示,巴戟天寡糖胶囊治疗轻中度MDD(肾阳虚证)患者8周,可显著降低汉密尔顿抑郁量表(HAMD)评分、肾阳虚证候评分、汉密尔顿焦虑量表(HAMA)评分,改善MDD状及肾阳虚证候,并且有效率与盐酸帕罗西汀阳性对照组的差异无统计学意义,疗效不亚于盐酸帕罗西汀^[92]。对巴戟天寡糖胶囊治疗MDD的临床随机对照试验进行Meta分析,发现其对于MDD患者临床症状的改善作用与氟西汀相似^[93]。

近年来,研究发现巴戟天寡糖胶囊与西医常用抗抑郁药联合使用疗效较好,并试图从中发现巴戟天寡糖胶囊治疗MDD的机制。曹重阳等^[94]发现,巴戟天寡糖胶囊与帕罗西汀联合用药8周,治疗效果优于单独使用帕罗西汀。一项临床研究显示,巴戟天寡糖胶囊联合阿戈美拉汀,可以显著降低HAMD、HAMA和中医证候量化评分,缓解MDD症状,检测发现患者血清中神经元特异性烯醇化酶

(NSE) 和髓鞘碱性蛋白 (MBP) 水平显著降低, 与单独使用阿戈美拉汀组相比, 巴戟天寡糖胶囊增加了阿戈美拉汀应用于老年 MDD 的治疗效果^[95]。另一项临床研究显示, 巴戟天寡糖胶囊还可以增加文法拉辛治疗 MDD 的效果^[96]。

4.7 其他

中药寡糖主要药理活性见表 2, 除此之外, 其还有抗疲劳、治疗心力衰竭等作用。郭敏等^[97]发现 BFO 具有明显的抗疲劳作用, 其能够提高机体对运动负荷的适应能力, 提高运动耐力, 快速消除代谢废物。还有研究发现, 地黄寡糖可以通过影响干细胞移植来促进受损心肌细胞修复和再生, 以治疗心力衰竭^[98-99]。小型猪脂肪组织间充质干细胞 ADMSCs 可在 5-氮杂胞苷 (5-aza) 诱导下分化为心肌样细胞, 而地黄寡糖可促进第 3 代 ADMSCs 及 5-aza 诱导后 ADMSCs 的增殖^[98]。此外地黄寡糖可减轻 H₂O₂ 诱导的人脂肪源性间充质干细胞凋亡^[99]。

5 问题与展望

寡糖的提取方法有直接提取法、多糖降解法、合成法。前 2 种方法较常使用, 合成法由于技术手段的限制进展很慢。在研究多糖的低聚糖片段活性时, 研究者常用 TFA 降解的方法得到片段。相较于其他酸, TFA 酸性强, 容易挥去, 避免干扰后续实验。相较于酶法, 其对环境条件的要求低, 成本也相对较低。但是, 由于多糖的复杂结构, 其聚合度、单糖组成、连接方式等即使是在同一批药材中也会存在很大差异, 加上无法控制水解位点, 实验中很

难得到固定结构片段。笔者也发现目前关于多糖降解片段的研究多聚焦于聚合度范围较窄的低聚糖混合物, 而非单一寡糖。

在一些中药中, 糖类成分为主要活性成分。研究者利用 HPLC, 以结构相对简单的寡糖的含量为指标, 指导种植、采收、炮制、储存过程, 并试图区分药材的种质资源。寡糖含量的变化为中药质量控制提供了新思路。也有人整合糖组学与代谢组学, 对糖类组分和非糖类小分子组分同时进行系统比较分析, 从整体角度研究不同炮制过程所得饮片的药效物质基础^[100]。因此中药糖类分子在质量控制方面具有较大的潜力。

目前的分离方法虽已经改善了传统分离方法的不足之处, 但仍存在一些问题, 在分离效率上仍然需要提高, 因此还需继续探索有益、高效的分离纯化方法。

中药寡糖在免疫系统、内分泌系统、神经系统等方面都有着不可忽视的药理价值, 为寻找天然且不良反应低的替代药提供了丰厚的资源基础。在 MDD 的治疗中, 巴戟天寡糖胶囊与帕罗西汀或文法拉辛联合用药的临床研究结果提示中西医结合可以协同增效。化学药往往作用机制明确、针对性强, 但是治疗周期长、费用较高、不良反应多; 中医药以辨证论治、整体调节为特点, 作用温和, 不良反应少, 但是诊疗标准不一。因此, 中西医结合可取长补短, 实现优势互补, 达到协同增效的目的。

前期提取分离方法的优化为中药寡糖的含量测定和活性研究提供了便利, 使中药寡糖在医药等领域发挥更加重要的作用。

表 2 中药寡糖主要药理活性

药理活性	机制	来源药材
抗氧化	直接清除自由基, 提高抗氧化酶的活性	甘草 ^[8] 、鲜地黄 ^[23] 、金钗石斛 ^[69] 、厚朴花 ^[70] 、党参 ^[71-72] 、巴戟天 ^[73]
调节免疫	通过非特异性免疫和特异性免疫 2 种途径增强免疫, 通过 NF- κ B 和 MAPKs 2 种途径控制过度炎症反应	牛蒡 ^[9-11] 、党参 ^[72,74]
调节血糖	直接降血糖, 通过抑制 α -葡萄糖苷酶, 减缓葡萄糖的释放速度, 避免血糖大的波动	地黄 ^[75-78] 、麦冬 ^[36,79]
	调节糖脂代谢紊乱, 抵抗氧化应激, 抑制 VEGF 的表达	地黄 ^[12] 、昆布 ^[13-14]
改善生殖功能	促进大鼠阴茎海绵体平滑肌细胞增殖; 提高 NO 的合成, 影响 NO-cGMP 通路, 介导平滑肌松弛, 促使阴茎勃起; 调节 HPA, 抗氧化	牛蒡 ^[80-81] 、巴戟天 ^[82]
改善学习记忆能力及抗 AD	抑制 AchE 活性, 减少细胞凋亡, 抑制中枢系统的炎症反应进程	人参 ^[15-16,83] 、远志 ^[17,84-86]
抗抑郁	增强 5-HT 和 NE 神经功能, 抵抗 HPA 的亢进状态, 减少细胞凋亡, 提高神经影响因子活性	远志 ^[18,87-91] 、巴戟天 ^[19,92-96]

参考文献

- [1] 邱建国,张汝学,贾正平,等. 生地黄不同炮制阶段寡糖和梓醇的变化研究[J]. 中草药,2011,42(12):2434-2437.
- [2] 刁家葳,王幼鹏,张学兰,等. 远志不同炮制品中3种寡糖酯类成分含量比较[J]. 辽宁中医杂志,2018,45(2):346-349.
- [3] 邱建国,王春英,李茂星,等. 酒炙炮制熟地黄不同阶段中寡糖和梓醇的变化研究[J]. 西北国防医学杂志,2021,42(7):610-614.
- [4] 李晓霞,王迪,王桂臻,等. 基于内切-1,4- β -半乳糖苷酶水解的黄芪糖指纹图谱的建立及不同种质资源黄芪的鉴别[J]. 中药材,2018,41(6):1306-1311.
- [5] 孟艳,张学兰,唐玉秋,等. 远志炮制前后5种寡糖酯类成分的变化规律[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(9):10-13.
- [6] 栾茹乔,张学兰,吴鹏,等. HPLC法测定远志及其3种炮制品中3种寡糖酯[J]. 中成药,2017,39(8):1666-1669.
- [7] 刘梦云,秦祎苒,刘秋怡,等. 基于正交试验设计-熵权逼近理想解排序法(TOPSIS)优选巴戟天酒炙工艺及炮制前后药效对比研究[J]. 中草药,2021,52(20):6208-6215.
- [8] 于冰莉,方永晟,庞昕昕,等. 甘草地上部分寡糖富集纯化及其抗衰老活性研究[J]. 中国现代中药,2021,23(11):1889-1896.
- [9] 刘少芳. 牛蒡低聚果糖对小鼠的免疫调控及抗肿瘤作用的研究[D]. 济南:山东大学,2007.
- [10] 盛荣华,陈靠山,孟宇. 牛蒡寡糖对小鼠淋巴细胞增殖和IL-2、IFN- γ 产生的影响[J]. 中国当代医药,2011,18(4):5-6.
- [11] 刘晶. 利用细胞炎症模型研究牛蒡低聚果糖的抗炎作用及相关机制[D]. 济南:山东大学,2013.
- [12] 陈海兰,卢黎明,郭海霞,等. ROS对糖尿病大鼠血脂代谢及肾脏组织中VEGF的影响[J]. 检验医学与临床,2021,18(7):919-922.
- [13] 侯庆华,宋文东. 昆布寡糖对2型糖尿病大鼠肝脏的保护作用[J]. 中国海洋药物,2011,30(3):60-64.
- [14] 侯庆华,宋文东. 昆布寡糖对2型糖尿病大鼠睾丸的保护作用[J]. 中药新药与临床药理,2011,22(2):160-164.
- [15] 孙丽丽,张春娇. 水溶性人参寡糖改善东莨菪碱诱导的学习障碍行为学研究[J]. 黑龙江科技信息,2015(8):25-26.
- [16] 孙丽丽,黎虹颖,姜海威. 水溶性人参寡糖改善东莨菪碱诱导的学习障碍发生机制初探[J]. 科学技术创新,2018(27):52-53.
- [17] 姚允怡,孙黎,薛建红,等. 远志醇提取物改善阿尔茨海默病小鼠病理学的研究[J]. 山东大学学报(医学版),2012,50(11):11-17.
- [18] 黄晓舞,谢婷婷,王东晓,等. 远志醇提物的抗抑郁作用[J]. 中国药物应用与监测,2007,4(4):22-25.
- [19] 过伟峰,曹晓岚,盛蕾,等. 抑郁症中西医结合诊疗专家共识[J]. 中国中西医结合杂志,2020,40(2):141-148.
- [20] 李鑫洁,李玲玲,鲁艺. 巴戟天寡糖提纯工艺及药理作用研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2019,31(2):345-353.
- [21] 郝林华,陈磊,仲娜,等. 牛蒡寡糖的分离纯化及结构研究[J]. 高等学校化学学报,2005,26(7):1242-1247.
- [22] 王彦志,董晶晶,刘富岗,等. 黄精低聚糖的分离纯化及理化性质研究[J]. 中成药,2011,33(10):1831-1833.
- [23] 钱艳艳,王丽,文春南,等. 鲜地黄低聚糖纯化及其理化特性和抗氧化活性研究[J]. 天然产物研究与开发,2021,33(9):1470-1477.
- [24] 张竞男,苑红,马春丽,等. 黄芪多糖通过调节肠道菌群抑制高脂饮食小鼠肠道炎症反应[J]. 食品与生物技术学报,2022,41(4):19-24.
- [25] 刘月新,刘倩倩,廖颖妍,等. 玉竹多糖结构特征及其降糖生物活性研究进展[J]. 现代中药研究与实践,2022,36(1):98-102.
- [26] 易军鹏,王赛,李欣,等. 蒸汽爆破提取牛膝多糖工艺优化及抗氧化性研究[J]. 食品与机械,2018,34(6):145-151.
- [27] 黄家林,张勇. 黄芪多糖抗炎免疫作用机制研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2013,11(11):1374-1376.
- [28] 梁图,傅青,辛华夏,等. 基于部分酸水解-亲水作用色谱-质谱的黄芪多糖结构表征[J]. 色谱,2014,32(12):1306-1312.
- [29] 潘伟,万振江,卢晚霞. 具抗病毒黄精寡糖核心片段的分离纯化与四糖结构[J]. 应用与环境生物学报,2017,23(1):95-99.
- [30] 曹宇欣,李科,秦雪梅,等. 基于部分酸水解寡糖特征图谱及免疫活性评价的不同产地黄芪的品质比较[J]. 中草药,2020,51(21):5598-5606.
- [31] 李科,崔连杰,李晓霞,等. 黄芪活性多糖APS-II酶解方法的建立及其降解寡糖的免疫活性研究[J]. 药理学学报,2021,56(7):1936-1944.
- [32] 王凤山. 糖类药物研究与应用[M]. 北京:人民卫生出版社,2017.
- [33] 李琨. 潜香物质糖苷、糖酯的合成和分析研究[D]. 合肥:中国科学技术大学,2009.
- [34] 张改红,白冰,杨静. 糖苷化学合成研究进展[J]. 化学

- 通报,2014,77(4):306-311.
- [35] 许定舟,苏薇薇,王永刚,等. 麦冬寡糖的提取纯化及抑制 α -葡萄糖苷酶活性的研究[J]. 中国医药导报,2017,14(4):20-22.
- [36] 许定舟,苏薇薇,王永刚,等. 不同分子量麦冬寡糖体外抑制 α -葡萄糖苷酶活性的研究[J]. 中国热带医学,2017,17(2):126-129.
- [37] 邱建国,张汝学,贾正平,等. 地黄中寡糖含量的HPLC法测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(8):8-9.
- [38] 陈琴鸣,刘文英. HPLC-ELSD在中药糖类分析中的应用[J]. 中草药,2008,39(6):955-957.
- [39] 孙恬,刘凤松,冯冲,等. 不同干燥方法对巴戟天寡糖化学成分的影响[J]. 江苏农业科学,2020,48(6):180-183.
- [40] 马务超,刘伟贤,孙恬,等. 利用高效阴离子交换色谱-脉冲安培电化学检测法测定不同生长年限巴戟天中6种寡糖类成分含量[J]. 中国药学杂志,2015,50(21):1912-1916.
- [41] 孙燕. 褐藻胶寡糖的高效毛细管电泳分离分析方法的研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2004.
- [42] 姚喜梅,石波,刘程程,等. 荧光辅助糖电泳检测葡甘露寡糖条件的分析[J]. 中国农业科学,2011,44(15):3206-3213.
- [43] 符颖. 远志抗抑郁活性成分及高速逆流色谱制备远志糖酯和杨梅苷的研究[D]. 北京:中国协和医科大学,2010.
- [44] 杨菁,王洪新,岳春丽. 地黄寡糖及其提取方法:CN1900100A[P]. 2007-01-24.
- [45] 阴健,郭力弓. 中药现代研究与临床应用(I) [M]. 北京:学苑出版社,1994:273.
- [46] 张汝学,樊俊杰,贾正平,等. 地黄中寡糖的提取分离工艺研究[J]. 解放军药学报,2005,21(1):34-37.
- [47] 邱建国,张汝学,贾正平,等. HPLC测定不同产地生地黄中地黄寡糖和梓醇的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(17):110-113.
- [48] 邱建国,贾正平,张汝学,等. 生地与熟地中糖类和梓醇的比较研究[J]. 中草药,2010,41(7):1117-1119.
- [49] 曹宇欣,李科,秦雪梅,等. 基于多糖受体理论的黄芪多糖质量控制研究思路[J]. 中草药,2019,50(9):2201-2209.
- [50] 李晓霞,王迪,王桂臻,等. 基于人工胃酸水解的黄芪糖指纹图谱的建立及不同种质资源黄芪鉴别[J]. 中国现代中药,2018,20(2):152-158.
- [51] 王迪,刘磊,李科,等. 基于内切-1,3- β -葡聚糖酶水解的黄芪糖指纹图谱的建立及不同种质资源黄芪鉴别[J]. 中草药,2018,49(10):2320-2327.
- [52] 曹宇欣. 基于多糖分子量分布和免疫活性比较的黄芪质量研究[D]. 太原:山西大学,2020.
- [53] MIYASE T, IWATA Y, UENO A. Tenuifolioses G-P, oligosaccharide multi-esters from the roots of *Polygala tenuifolia* WILLD [J]. Chem Pharm Bull, 1992, 40(10): 2741-2748.
- [54] WU D, HE J R, JIANG Y M, et al. Quality analysis of *Polygala tenuifolia* root by ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and gas chromatography-mass spectrometry [J]. J Food Drug Anal, 2015, 23(1): 144-151.
- [55] 宋梦晗,吴鹏,张学兰,等. HPLC法比较远志3种炮制品中8种有机酸[J]. 中成药,2016,38(7):1565-1569.
- [56] 徐保鑫,刁家葳,张学兰,等. 远志炮制过程中6种寡糖酯类成分转化机制[J]. 中成药,2018,40(8):1790-1794.
- [57] 曲丛丛,吴鹏,张学兰,等. HPLC-TOF/MS法研究远志炮制过程中寡糖酯和皂苷类成分的转化机制[J]. 中药材,2018,41(3):576-580.
- [58] 张晓玲,周琴芬,雷后亮,等. 一测多评法测定远志药材中6种糖酯类成分的含量[J]. 中国药学杂志,2015,50(9):808-813.
- [59] 郝庆秀,康利平,朱寿东,等. 基于UPLC-Q-TOF-MSE技术的巴戟天低聚糖成分的快速鉴别研究[J]. 中国中药杂志,2018,43(6):1201-1208.
- [60] 冯峰. 巴戟天寡糖成分研究[D]. 广州:广州中医药大学,2011.
- [61] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:83.
- [62] 谢宗万. 中药品种传统经验鉴别“辨状论质”论[J]. 时珍国药研究,1994(3):19-21.
- [63] 杨丽,冯冲,蔡苗苗,等. 基于“辨状论质”的巴戟天药材质量等级评价研究[J]. 中药材,2020,43(3):640-646.
- [64] 杨丽,刘梦云,冯冲,等. 不同栽培年限及采收期的巴戟天寡糖含量动态变化分析[J]. 中药新药与临床药理,2020,31(5):596-599.
- [65] 洗丽铨,吴道铭,隆曼迪,等. 土壤养分、种植年限和种植方式对巴戟天寡糖含量的影响[J]. 华南农业大学学报,2021,42(3):75-85.
- [66] 孙恬,刘凤松,杨丽,等. 巴戟天采后储存温度和时间对寡糖类成分的影响[J]. 中国现代中药,2020,22(1):80-84.
- [67] HAO Q X, NAN T G, ZHOU L, et al. Rapid simultaneous quantification of fructooligosaccharides in *Morinda officinalis* by ultra-high performance liquid chromatography [J]. J Sep Sci, 2019, 42(13): 2222-2230.
- [68] 余意,康利平,郝庆秀,等. 饮片巴戟天、巴戟肉和盐巴戟天主要化学成分的含量差异分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(2):146-152.

- [69] 渠婷. 金钗石斛低聚糖的分离、结构鉴定及其功能性研究[D]. 无锡:江南大学,2017.
- [70] 冀建伟,周宇雪,刘蕾,等. 厚朴花低聚糖、多糖的分离纯化及其体外抗氧化活性研究[J]. 中国药房,2016,27(34):4848-4851.
- [71] 马铭,白瑞斌,刘景龙,等. 3种党参提取物体外抗氧化活性探究[J]. 中成药,2020,42(9):2514-2517.
- [72] 周静. 党参低聚糖抗衰老作用研究及其润肤霜的研发[D]. 兰州:兰州大学,2021.
- [73] 程亮星. 巴戟天寡糖对大鼠子宫缺血再灌注损伤的抗氧化作用[J]. 中医研究,2018,31(7):68-70.
- [74] 马铭. 党参低聚糖的DPPH自由基清除活性及免疫活性研究[D]. 兰州:兰州大学,2019.
- [75] 张汝学,顾国明,张永祥,等. 地黄低聚糖对实验性糖尿病与高血糖大鼠糖代谢的调节作用[J]. 中药药理学与临床,1996,12(1):14-17.
- [76] 张汝学,周金黄,张永祥,等. 去胸腺对大鼠糖代谢的影响及地黄寡糖对其的调节作用[J]. 中国药理学通报,2002,18(2):194-197.
- [77] 张汝学,贾正平,谢景文,等. 老年大鼠糖代谢变化及地黄寡糖对其的改善作用[J]. 中国老年学杂志,2002,22(5):408-409.
- [78] 郭丽氏,张汝学,贾正平,等. 地黄寡糖对HepG2细胞增殖及胰岛素抵抗的作用[J]. 中国中药杂志,2007,32(13):1328-1332.
- [79] 吴万征,苏薇薇,王永刚,等. 麦冬寡糖对自发性2型糖尿病db/db小鼠降血糖的作用[J]. 中山大学学报(自然科学版),2017,56(6):128-133.
- [80] 孟宇,盛荣华,陈靠山. 牛蒡根化学成分对大鼠阴茎海绵体平滑肌细胞增殖的影响[J]. 中国医药导报,2011,8(10):34-36.
- [81] 孟宇,吕俊,凌烈峰,等. 牛蒡低聚果糖对A-ED大鼠组织NOS mRNA表达的影响[J]. 通化师范学院学报,2016,37(8):63-65.
- [82] 赵君,杨欣. 巴戟天低聚糖改善不育症小鼠生殖能力的作用研究[J]. 云南中医学院学报,2018,41(1):7-10.
- [83] 许婷. 水溶性人参寡糖对东莨菪碱诱导的认知障碍和炎症反应的神经保护作用研究[D]. 长春:吉林大学,2014.
- [84] 王冉,裴文慧,方芳. 远志寡糖酯改善东莨菪碱诱导学习记忆获得障碍实验研究[J]. 辽宁中医药大学学报,2016,18(4):10-13.
- [85] 桑旭星,杨依,唐晓丽,等. 远志寡糖酯抗 β 淀粉样蛋白25-35诱导的SH-SY₅Y细胞损伤的作用研究[J]. 中国药理学杂志,2018,53(11):876-881.
- [86] 牛芬溪,桑旭星,杨依,等. 远志寡糖酯对 β 淀粉样蛋白25-35诱导的SH-SY₅Y神经细胞损伤及Akt/CREB/BDNF信号通路的影响[J]. 北京中医药大学学报,2022,45(4):414-420.
- [87] 刘屏,王东晓,郭代红,等. 远志3,6'-二芥子酰基蔗糖在药物诱发抑郁模型上的药效评价[J]. 中国药理学杂志,2008,43(18):1391-1394.
- [88] 谢婷婷,孙艳,王东晓,等. 远志YZ-50对慢性应激抑郁模型大鼠行为学及血清CRH、ACTH和COR的影响[J]. 解放军药理学学报,2008,24(2):95-98.
- [89] 谢婷婷,刘屏,孙艳,等. 远志YZ-50对慢性应激抑郁模型大鼠海马Bax、Bcl-2表达的影响[J]. 中国药物应用与监测,2008,5(6):14-17.
- [90] 孙艳,谢婷婷,王东晓,等. 中药远志对慢性应激抑郁大鼠BDNF及其受体TrkB mRNA表达的影响[J]. 南方医科大学学报,2009,29(6):1199-1203.
- [91] 陈启军,于岚,赵文文,等. 远志提取物对抑郁大鼠肠道菌群的作用研究[J]. 中草药,2021,52(8):2313-2323.
- [92] 刘志慧. 巴戟天寡糖胶囊治疗肾阳亏虚型轻中度抑郁症的临床研究[D]. 太原:山西中医药大学,2018.
- [93] 邓小娟,敖素华. 巴戟天寡糖胶囊治疗抑郁症的Meta分析[J]. 中成药,2020,42(2):541-546.
- [94] 曹重阳,韩露,王克,等. 巴戟天寡糖联合帕罗西汀治疗抑郁症临床评价[J]. 中国药业,2020,29(6):148-150.
- [95] 马敬,岳凌峰,仲照希,等. 巴戟天寡糖胶囊联合阿戈美拉汀应用于老年抑郁症的治疗效果及对血清NSE和MBP水平的影响[J]. 中华中医药学刊,2022,40(2):108-111.
- [96] 余琴. 巴戟天寡糖联合文拉法辛治疗抑郁症的效果观察[J]. 中国继续医学教育,2019,11(26):134-136.
- [97] 郭敏,陈靠山. 牛蒡低聚果糖对小鼠抗疲劳作用的研究[J]. 天然产物研究与开发,2007,19(4):642-644.
- [98] 王磊. 地黄低聚糖对脂肪间充质干细胞移植治疗猪心肌梗死后心力衰竭的实验研究[D]. 北京:中国人民解放军军医进修学院,2008.
- [99] 王玉红. 地黄低聚糖对脂肪组织来源间充质干细胞增殖、抗凋亡及旁分泌作用影响的研究[D]. 北京:中国人民解放军军医进修学院,2008.
- [100] 张晓亚,徐金娣,许军,等. 整合糖组与代谢组学方法比较蒸制和酒炖地黄化学成分[J]. 中草药,2021,52(6):1591-1600.

(收稿日期:2022-05-31 编辑:王笑辉)