

野葛根酸性多糖的结构鉴定及免疫活性

董洲¹, 李惠娴¹, 张猛猛¹, 赖富饶¹, 张晓元², 吴晖^{1,2}

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

(2. 韶关市华工高新技术产业研究院, 广东韶关 512027)

摘要: 本文采用离子交换层析结合凝胶渗透色谱技术从野葛根的热热水浸提液中分离纯化得到一种新型酸性多糖, 鉴定了该多糖的结构特征, 并初步探究了其免疫调节活性。结果显示, 该酸性多糖是一种分子量约为 12300 u 且具有一定支链结构的葡聚糖, 不具有三螺旋空间结构, 其糖苷键类型为 α -(1 \rightarrow 4) 和 α -(1 \rightarrow 4, 6)。以小鼠巨噬细胞 RAW264.7 为实验对象, 研究发现该酸性多糖能有效地刺激细胞分泌细胞因子 NO、TNF- α 和 IL-6, 进而体现出较强的免疫调节活性。

关键词: 野葛根; 多糖; 结构; 免疫调节

文章编号: 1673-9078(2018)07-68-75

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.7.011

Identification and Immunomodulatory Activity of a Acidic Polysaccharide from the *Pueraria lobate* (Willd.) Ohwi Root

DONG Zhou¹, LI Hui-xian¹, ZHANG Meng-meng¹, LAI Fu-rao¹, ZHANG Xiao-yuan², WU Hui^{1,2}

(1. College of Food Sciences and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Shaoguan Huagong High-tech Industrial Research Institute, Shaoguan 512027, China)

Abstract: A novel acidic polysaccharide was isolated and purified from the hot-water extract of *Pueraria lobate* (Willd.) Ohwi root, using a sequential ion exchange chromatography and gel-filtration chromatography. The structural features of this acidic polysaccharide were characterized, and its immunomodulatory activity investigated. This acidic polysaccharide is a homogeneous glucon with branched chains, with an average molecular weight of 12300 u, which has no three spiral space conformation. The main linkage types of this polysaccharide were α -(1 \rightarrow 4) and α -(1 \rightarrow 4, 6). Using RAW264.7 cells as the model, this acidic polysaccharide has been confirmed to exhibit an immunomodulatory activity through promoting the secretion of NO, IL-6, and TNF- α .

Key words: *Pueraria lobate* (Willd.) Ohwi root; polysaccharides; structure; immunomodulatory

葛根是豆科葛属多年生落叶藤本植物的块根, 药食同源, 分为粉葛和野葛。粉葛富含淀粉, 是重要的食材及食品添加剂; 野葛为中医中常用的祛风解毒药, 始载于《神农本草经》, 具有解肌退热、生津、透疹和升阳止泻等功效。因富含异黄酮类、多糖类、氨基酸及微量元素等物质, 素有“南方人参”的美誉。现代科学已证明其具有广泛的药理和保健功能, 其有效成分在维持心血管系统稳定性、保护脑神经、抗氧化、防止肝肾损伤、改善代谢与免疫功能等方面均有一定的药理作用, 葛根黄酮具有改善心脑血管血液循环, 扩张冠状动脉, 降血压, 降血糖等作用; 大豆苷元有明显抗心律失常作用, 抑制白血细胞的增殖及黑色素瘤细胞的分化, 具有可观的临床应用前景^[1,2]。

多糖是构成生命的四大基本物质之一, 由多个单糖分子缩合、失水而成, 是一类分子结构复杂且庞大的糖类物质。分子量从几万到几千万, 具有许多生物活性, 包括抗感染、抗肿瘤、增强免疫、降血糖和抗病毒等作用。多糖广泛存在于高等植物、动物细胞膜、微生物细胞壁中, 不但是生物体的重要组成部分还参与多种生理功能^[3-5]。

野葛根多糖是一种天然的高分子聚合物, 安全无毒, 具有显著的生物活性和广泛的药理作用, 是潜在的辅助治疗肿瘤药物以及其它重要保健品的原材料^[6-9]。国内外针对葛根的研究主要集中于其中黄酮类物质的生物活性, 以及葛根多糖的抗氧化性研究, 对于野葛根多糖的免疫活性研究却鲜有报道。

本文以野葛根为原料, 对其多糖进行分离纯化, 结构鉴定, 免疫活性的研究, 为野葛根多糖在食品和医药领域的应用与开发奠定扎实基础, 指明出新的方向。

收稿日期: 2017-11-07

基金项目: 广东省科技计划项目 (2017A020108006、2016B010121014)

作者简介: 董洲 (1993-), 男, 研究生, 硕士, 研究方向: 天然产物的提取

通讯作者: 吴晖 (1967-), 博士, 教授, 研究方向: 天然产物与食品安全

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

野葛根购于广州清平中药材市场；碳酸氢钠、无水乙醇、苯酚、硫酸、氯化钠、氯仿、正丁醇（均为分析纯），广东光华科技股份有限公司；重水分析纯 Damas-beta；刚果红、甲基红、溴甲酚绿（均为分析纯），天津大茂化学试剂厂；PBS 磷酸缓冲液，Gibco 公司；葡聚糖标准品，美国 Sigma 公司；羊血鸿泉生物；小鼠 IL-6 Elisa 试剂盒、小鼠 TNF- α Elisa 试剂盒，欣博盛生物科技有限公司；一氧化氮（NO）测试盒，南京建成生物工程研究所等。

1.2 仪器与设备

JC101 型不锈钢鼓风干燥箱，上海福玛实验设备有限公司；BSZ-160F 自动部份收集器，上海精科实业有限公司；SCIENTZ-18N 低温冷冻干燥机，宁波新芝生物科技股份有限公司；凝胶渗透色谱柱，美国 Waters 公司；气相色谱仪，美国惠普公司；傅里叶变换 VERTEX33 红外光谱仪，Bruker 公司；紫外-可见分光光度计，上海棱光技术有限公司；扫描电子显微镜（Scanning Electron Microscope, SEM）S-3700N，日本日立公司；HP4890D 气相色谱仪，美国惠普公司；600 MHz 核磁共振波谱仪（Nuclear Magnetic Resonance, NMR），Bruker 公司等。

1.3 试验方法

1.3.1 野葛根粗多糖的提取

将野葛根用粉碎机粉碎后过 120 目筛，过筛后加入 80% 的乙醇，85 °C 冷凝回流 2.5 h 进行脱脂处理。称取脱脂后葛根 20 g，按料液比 1:30，在 99 °C 条件下搅拌浸提 2.5 h 后，离心（3000 r/min，10 min），取上清液旋转蒸发浓缩至 1/3~1/5 体积，以 Sevag 法除蛋白，离心（3000 r/min，10 min）去除中间有机相与水相交界处乳化层，合并上清液，加入 4 倍的无水乙醇沉淀多糖，4 °C 条件下静置过夜，离心（3000 r/min，10 min）收集沉淀，收集的沉淀物用蒸馏水复溶，透析 48 h 后冻干得野葛根粗多糖^[10-11]。

1.3.2 野葛根粗多糖的纯化

准确称取 100 mg 上述野葛根粗多糖干品充分溶解于 10 mL 无菌水中，用胶头滴管将配好的粗多糖溶液全部滴加上样至 DEAE-Sephacryl S-200 HR 凝胶柱（1.6 cm×70 cm）中，蒸馏水洗脱，流速 0.4 mL/min，每管 5 mL，苯酚-硫酸法跟踪显色，洗脱液收集，浓缩、透析、干燥得到较纯的野葛根多糖 GE-2。

每管收集 10 mL，苯酚-硫酸法跟踪显色定性，将洗脱液分开收集，浓缩，透析，冷冻得到不同野葛根多糖组分；称取 20 mg 的干品溶于 4 mL 超纯水后，上样至 Sephacryl S-200 HR 凝胶柱（1.6 cm×70 cm）中，蒸馏水洗脱，流速 0.4 mL/min，每管 5 mL，苯酚-硫酸法跟踪显色，洗脱液收集，浓缩、透析、干燥得到较纯的野葛根多糖 GE-2。

1.3.3 GE-2 的分子量及纯度测定^[12]

采用高效凝胶渗透色谱法对 GE-2 的分子量进行测定。样品与不同分子质量的葡聚糖标准品用 0.02 mol/L 的 KH_2PO_4 溶液配制成 1.0 mg/mL 的溶液，过 0.45 μm 滤膜，上样 20 μL ，检测 45 min，色谱条件：TSK G-5000PWXL 凝胶柱（7.8 mm×300 mm）和 TSK G-3000PWXL 凝胶柱（7.8×300 mm）串联，流动相 0.02 mol/L 的 KH_2PO_4 缓冲溶液，pH 6.0，流速 0.6 mL/min，柱温 35 °C，所用检测器为 2414 示差检测器。

1.3.4 电子显微镜扫描（SEM）^[13]

将制得的少量样品 GE-2 分散固定在金属样品台上，清除多余的不能被粘附在样品台上的粉末，使得样品台上保留一层薄薄的待测样品。将黏附有样品的样品台置于镀膜仪中镀金后，在扫描电子显微镜下放大不同的倍数来观察样品的表面结构。

1.3.5 紫外全波段扫描^[14]

称取一定量的野葛根多糖 GE-2，配成浓度为 0.05 mg/mL 的溶液，用 UV2300 紫外可见分光光度计在 190~400 nm 下进行连续扫描，扫描间距为 0.5 nm，以蒸馏水为空白绘制紫外扫描光谱图，并对其进行分析。

1.3.6 红外光谱分析^[15]

称取少量的 GE-2 样品（1~5 mg），与适量的干燥的 KBr 粉末混和，研磨均匀后压片。将制好的压片置于傅里叶变换红外光谱仪中在 4000~400 cm^{-1} 范围内进行红外扫描，对采集到红外吸收图谱进行分析。

1.3.7 单糖组成测定^[16,17]

1.3.7.1 GE-2 水解

称取 10 mg GE-2 于安瓿瓶中，加入 4 mL 2 mol/L 三氟乙酸（TFA），将安瓿瓶封口后置于 110 °C 下反应 6 h。反应完后，冷却至室温，减压旋干 TFA，加入 1 mL 甲醇混合后，继续蒸干，重复 3 次。

1.3.7.2 衍生化反应

向 GE-2 的水解物中加入 1 mL 吡啶和 10 mg 盐酸羟胺，置于 90 °C 下恒温震荡反应 30 min 反应完后冷却，加入 1 mL 醋酸酐，于 90 °C 下进行乙酰化反应 30 min，最终生产糖腈乙酸酯衍生物，冷却过有机膜，转移至进样瓶待测。所有的单糖标准品和混标也按照上述步骤进行衍生化并转移至进样瓶中待测。

1.3.7.3 GC 条件

使用 Agilent HP-5 毛细管柱(30 m×320 μm×0.25 μm); 载气为 N₂, 载气流量为 20.0 mL/min, 进样量为 1.0 μL, 分流比为 10:1。程序升温: 165 °C 后以 0.5 °C/min 变速升至 171 °C, 再以 1 °C/min 速度升温至 180 °C。

1.3.8 三螺旋结构^[20]

5 mg GE-2 加入 2 mL 去离子水和 2 mL 80 μmol/L 刚果红试剂, 逐渐加入 4.0 mol/L NaOH, 使溶液中减浓度在 0~0.5 mol/L, 用 400~600 nm 进行紫外扫描, 测各碱性条件下最大吸收波长。

1.3.9 核磁共振谱分析^[21~23]

称取 50 mg 左右的 GE-2 溶于 600 μL 重水中, 震荡混匀使其完全溶解后转移至核磁管中, 于核磁共振仪上进行一维 ¹H 谱、¹³C 谱测量分析。

1.3.10 GE-2 的免疫调节活性研究^[24]

1.3.10.1 GE-2 溶液的配制

将 GE-2 用 DMEM 培养基溶解后配成 1 mg/mL 的母液, 并等梯度稀释成 1000 μg/mL、500 μg/mL、250 μg/mL、125 μg/mL 和 62.5 μg/mL 五个剂量组。

1.3.10.2 细胞培养

解冻小鼠巨噬细胞 RAW264.7, 迅速将解冻细胞转移到 15 mL 的无菌离心管, 加入 12 mL DMEM 培养基, 混匀后低速离心 (1000 r/min, 5 min)。除去培养基, 加入新鲜的培养基, 将细胞悬浮后转移至细胞培养瓶中。置于 CO₂ 培养箱中培养 (37 °C, 5% CO₂), 每隔两天换一次培养基。

1.3.10.3 GE-2 对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 分泌细胞因子的影响

将处于对数生长期的 RAW264.7 细胞用胰蛋白酶消化后, 配成细胞浓度为 1×10⁶ 个/mL 的细胞悬液, 反复吹打均匀后接种于 96 孔板中(100 μL/孔), 置于 CO₂ 培养箱培养使细胞重新贴壁。24 h 后, 吸去培养基, 加入 100 μL 不同浓度 (1000 μg/mL、500 μg/mL、250 μg/mL、125 μg/mL 和 62.5 μg/mL) 的 GE-2 溶液, 阳性对照组加入 100 μL 脂多糖 (20 μg/mL), 空白组加入 100 μL DMEM 培养基, 每组设 3 个平行孔。将细胞放回 CO₂ 培养箱中培养 24 h, 用一氧化氮检测试剂盒和 Elisa 试剂盒测定细胞上清液中 NO 和细胞因子 (TNF-α 和 IL-6) 的表达量。

1.3.11 数据处理

所有实验平行测定 3 次, 采用 Origin 8 和 SPSS 19.0 软件对实验数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 野葛根多糖离子交换柱层析

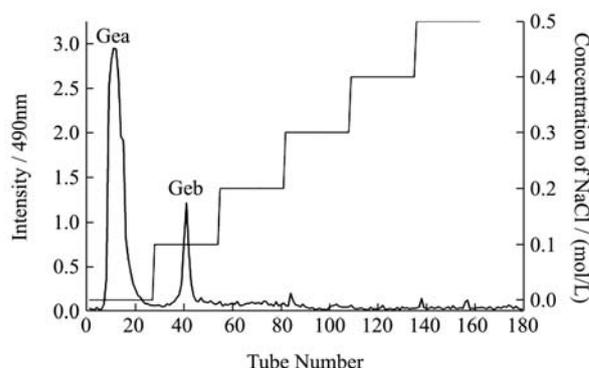


图1 GE 在 DEAE-Sephacryl S-200 HR 阴离子交换柱上的洗脱曲线

Fig.1 Anion-exchange chromatography (DEAE-Sephacryl S-200 HR) of GE

将制得的野葛根粗多糖用 DEAE-Sephacryl S-200 HR 阴离子交换层析进行分离。作为大多数的中性多糖可被蒸馏水顺利洗脱, 而被吸附的酸性多糖则可用不同浓度的 NaCl 溶液洗脱。经过蒸馏水和梯度浓度 (0.1, 0.2, 0.3, 0.5 mol/L) 的 NaCl 洗脱后得到不同的吸收峰, 如图 1 所示, 一共出现两个峰值大于 1.0 的峰, 分别为蒸馏水以及 0.1 mol/L NaCl 的洗脱峰, 命名为 GEa (蒸馏水洗脱组分)、GEb (0.1 mol/L NaCl 洗脱组分) 以及数个峰值小于 0.25 的杂峰。分别收集两个吸收峰对应的收集管中的洗脱液, 经浓缩-透析-真空冷冻干燥后得到较纯的野葛根多糖 GEa 和 GEb 进行下一步研究, GEa 为中性多糖, GEb 为酸性多糖。得率分别为: 12.34% 和 5.68%。由于关于野葛根酸性多糖的研究几乎没有, 本文选择对酸性多糖 GEb 进行研究。

2.2 GEb 的凝胶过滤柱层析

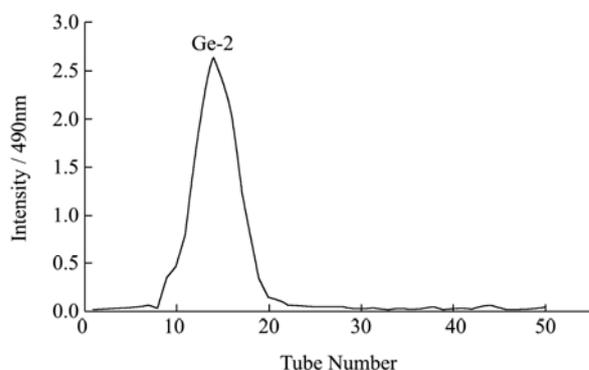


图2 GEb 的 Sephacryl S-200 HR 凝胶层析洗脱图

Fig.2 Elution profile of GEb on Sephacryl S-200 HR column

将制得的 GEb 用 Sephacryl S-200 HR 凝胶柱进一步分离纯化, 如图 2 所示, 只出现一个洗脱峰, 该吸

收峰峰值较高且无杂峰,说明多糖的分离效果较好,纯度较高。收集吸收峰相对应的收集管内的溶液,进一步浓缩、透析、真空冷冻干燥后得到白色絮状固体,命名为 GE-2,经苯酚-硫酸法分析得到 GE-2 的糖含量为 98.3%,经硫酸-咔唑法测定 GE-2 中葡萄糖醛酸含量为 21.65%,将 GE-2 用于后续的结构鉴定。

2.3 GE-2 的分子量及纯度测定

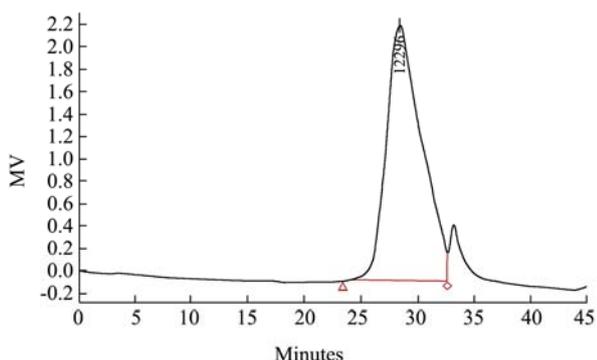


图 3 GE-2 的 GPC 色谱图

Fig.3 Chromatography of GE-2 by GPC

如图 3 所示,在 33 min 前出现样品的单一洗脱峰;在 34 min 出现的为溶剂水的洗脱峰。通过软件计算出 GE-2 数均分子量 M_w 为 12300 u。比起大部分的植物多糖,GE-2 的分子量较小,且该分子量的葛根多糖之前未见报道,证明 GE-2 属于一种新型多糖。

2.4 GE-2 的 SEM 分析

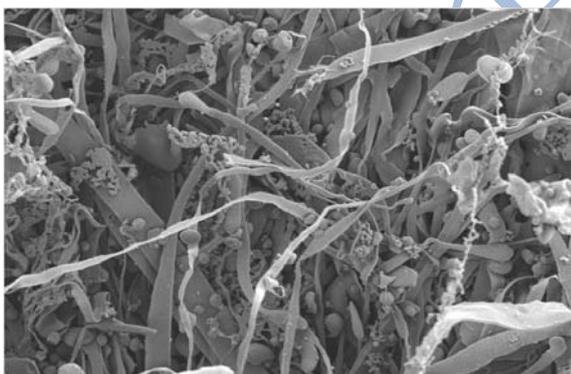


图 4 GE-2 的 SEM 图

Fig.4 SEM images of GE-2

利用扫描电子显微镜 (SEM) 观察葛根多糖 GE-2 的固态表现形貌,图 4 所示是 GE-2 放大 1000 倍的电子显微镜扫描结果,从图中可观察到 GE-2 多糖主要呈条带状,表面光滑,分子间存在大量的无规则交叉结构。局部可观察到聚集态乳状结构,分子的规整性不强,可初步猜测该多糖结构中可能存在支链,且结构中存在较强的分子间相互作用力^[24]。多糖表面均匀,光滑,没有大面积的褶皱出现。

2.5 紫外全波段扫描

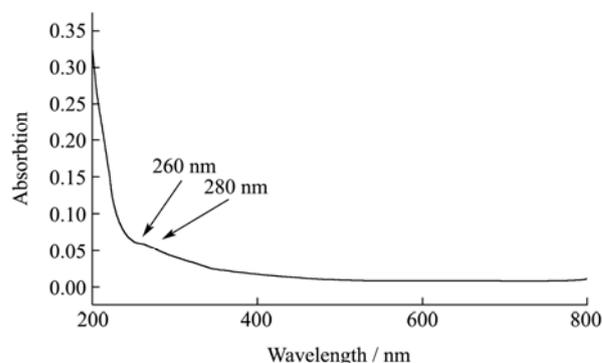


图 5 GE-2 的紫外扫描光谱图

Fig.5 Ultraviolet scanning spectra of GE-2

如图 5 所示 GE-2 在 260 nm 和 280 nm 附近没有出现特征吸收峰,表明分离得到 GE-2 不含多肽、蛋白质和核酸,通过 Seavage 法除蛋白以及经离子柱和凝胶柱分离后得到了纯度较高的多糖。

2.6 红外光谱分析

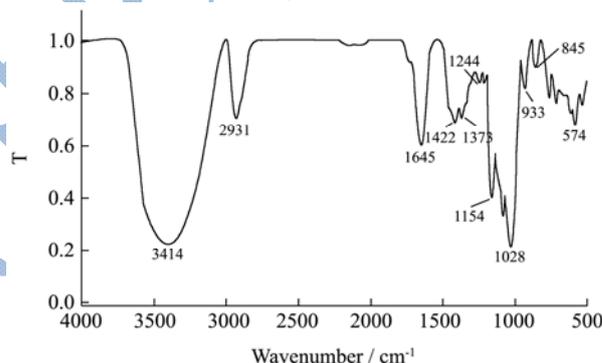


图 6 GE-2 的红外扫描图

Fig.6 FT-IR spectrum of GE-2

红外光谱法是用来研究不同原子之间和极性键间的振动,是糖类物质结构研究的一个重要手段。一般来说,吸收峰出现在 3600~3200 cm^{-1} 区域内的为分子内羟基 O-H 键的伸缩振动。C-H 键的伸缩振动吸收峰出现在 3000~2800 cm^{-1} 范围内,1400~1200 cm^{-1} 区出现的较小的吸收峰为 C-H 的变角振动吸收,这两个区域为判断糖类的特征性吸收峰。全谱中最强的吸收峰出现在 1200~1000 cm^{-1} 区间,由 C-O-H 和糖环 C-O-C 的两种 C-O 键伸缩振动所引起的。1200~800 cm^{-1} 以下为多糖的指纹区,此区域可以判断糖的类型和构型。GE-2 的红外吸收光谱如图 6 所示。

GE-2 在 3414 cm^{-1} 处出现吸收峰,峰型较宽,是由于糖链中非游离 O-H 伸缩振动引起的。2931 cm^{-1} 处的吸收峰是由于 C-H 反对称伸缩振动引起的,这些都证明了 GE-2 为糖类物质。1645 cm^{-1} 为多糖结合水

引起的吸收峰值或者为 C=O 的伸缩振动峰。1417~1245 cm^{-1} 范围出现吸收峰是由于 O-H 变角振动和 C-O 的伸缩振动引起的。图谱在 1245~1022 cm^{-1} 的三个峰值 1154 cm^{-1} 、1084 cm^{-1} 、1028 cm^{-1} 是吡喃环中的伸缩振动引起的, 表明了 GE-2 糖链中含有吡喃型糖环。845 cm^{-1} 处的吸收峰表明 α -葡萄糖吡喃糖存在。764 cm^{-1} 为 D-吡喃环的对称环伸缩振动峰。红外分析表明, 该组分多糖亚基可能是由含有中性单糖的单糖残基组成的聚合物, 单糖残基中存在 α -吡喃糖苷。

2.7 单糖组成分析

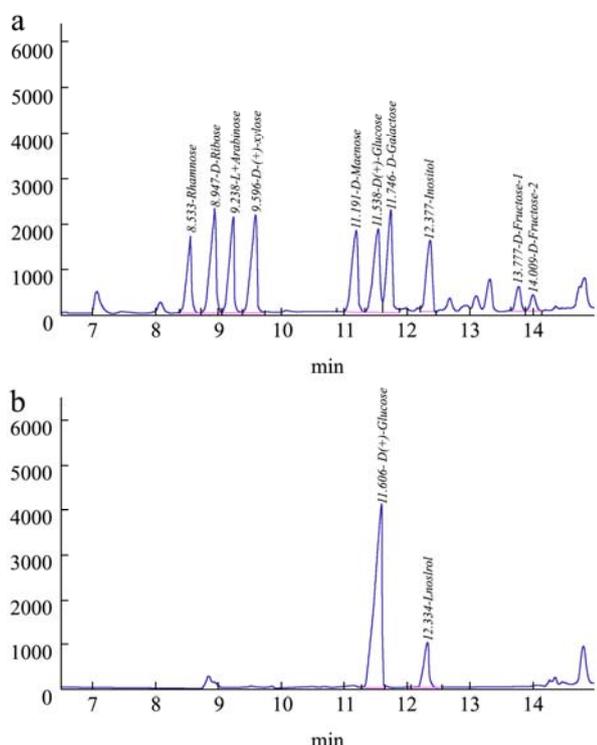


图7 单糖标准品 (a) 和 GE-2 (b) 糖脎乙酸酯的气相色谱图

Fig.7 Ion exchange chromatography of monosaccharides mixture (a), and GE-2 (b)

图 7a 为混标的出峰时间图, 出峰先后顺序为: 鼠李糖, 核糖, 阿拉伯糖, 木糖, 甘露糖, 葡萄糖, 半乳糖醛酸, 果糖, 内标出峰时间为 12.377 min。图 7b 中出现的两个峰分别为葡萄糖以及内标, 且出峰时间与混标相吻合, 因此 GE-2 的单糖组成只含有葡萄糖。王振斌从葛根中提取出三种多糖组分 PS-D1、PS-D2 和 PS-D3。PS-D1 主要含有 D-果糖和 D-葡萄糖, 摩尔比为 1:12.3; PS-D2 主要含有 D-果糖和 D-葡萄糖, 摩尔比为 1:11.4; PS-D3 主要含有 D-果糖、D-葡萄糖、D-阿拉伯糖和 D-半乳糖, 摩尔比为 8.9:22.3:1:1^[25]。显然 GE-2 的单糖组成不同于 PS-D1、PS-D2 和 PS-D3, 这种差异的原因可能是与葛根的种类、产地以及分离纯化方法有关。GE-2 可能为一种新型多糖。

2.8 三螺旋结构

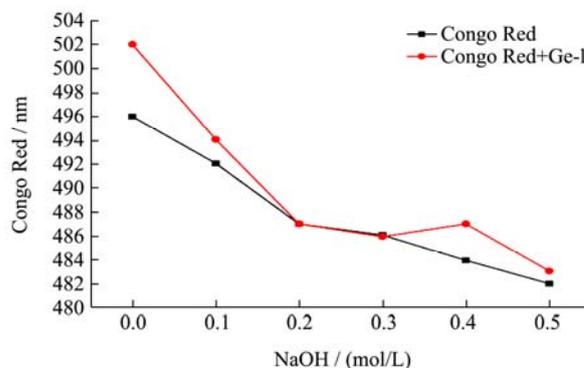


图8 不同碱浓度下刚果红与多糖混合液的波长变化

Fig.8 Absorption wavelength change of Congo Red-polysaccharide complex at different NaOH solutions

刚果红是一种常被用于验证多糖链状结构的染料, 它能与三螺旋构象的多糖形成络合物, 使刚果红的最大吸收波长发生偏移, 在一定的 NaOH 浓度范围内, 其最大波长的特征为颜色由红色变成紫红色, 当 NaOH 浓度超过某一数值后, 多糖三螺旋结构被破坏, 其最大吸收波长急剧下降^[26-27]。

本实验采用刚果红法对 GE-2 是否具有三螺旋结构进行测定和分析。如图 8 所示, GE-2 与刚果红形成络合物, 与刚果红相比最大吸收波长并没有发生红移, 当 NaOH 浓度的不断增大, GE-2 的最大吸收波长也没有发生急剧的下降, 可以判断出 GE-2 不具有三螺旋结构。

2.9 核磁共振谱分析

核磁共振 (NMR) 是分析多糖结构最为精确、高效的方法之一。本文中采用一维核磁共振波谱技术 ^1H 谱, ^{13}C 谱对葛根多糖 GE-2 中糖苷键类型、单糖残基的种类和异头碳等结构特征进行分析。

从一维碳谱图中可以看出, 异头碳的共振峰集中在 δ 60.44~100.13 范围内, α -型糖苷异头碳的化学位移通常在 δ 95~101 范围内, 而多数 β -型糖苷异头碳的化学位移位于 δ 101~105, 由图 9b 可知 GE-2 是以 α -型糖苷构型存在。 ^{13}C 谱在 δ 103~112 以及 δ 82~84 区间均没有信号, 表明 GE-2 不含呋喃糖, 从而也可确定单糖残基为吡喃糖构型。 δ 99.55 和 100.01 处出现的异头碳信号分别代表(1 \rightarrow 4)和(1 \rightarrow 4,6)糖苷键, δ 60.32 为(1 \rightarrow 4)糖苷键中 C \rightarrow 6 的特征峰, δ 73.2、71.49、70.94 和 76.72 处出现的共振峰分别代表(1 \rightarrow 4)糖苷键中 C \rightarrow 3、C \rightarrow 2、C \rightarrow 5 和 C \rightarrow 4。 δ 76.23、72.7、73.24 和 73.38 处出现的共振峰代表(1 \rightarrow 4,6)糖苷键中的 C \rightarrow 3、C \rightarrow 2、C \rightarrow 4 和 C \rightarrow 5。在一维氢谱图中可以看

出, GE-2 的 ¹H 信号大多集中在 δ 3.50~5.50 处, δ 5.28 和 5.12 处出现的异头质子信号代表(1→4)和(1→4,6)糖苷键^[28,29]。在 δ 5.00~5.40、5.04、5.07、5.10、5.15、5.19、5.27、5.28 和 5.32 出现信号峰表明 GE-2 中存在 α-型吡喃糖。这与红外测得的结果相符。δ 3.5~4.50 为 C-2、C-3、C-4 和 C-5 位的氢信号所在的区域, 此区域的氢信号较复杂地重叠在一起。

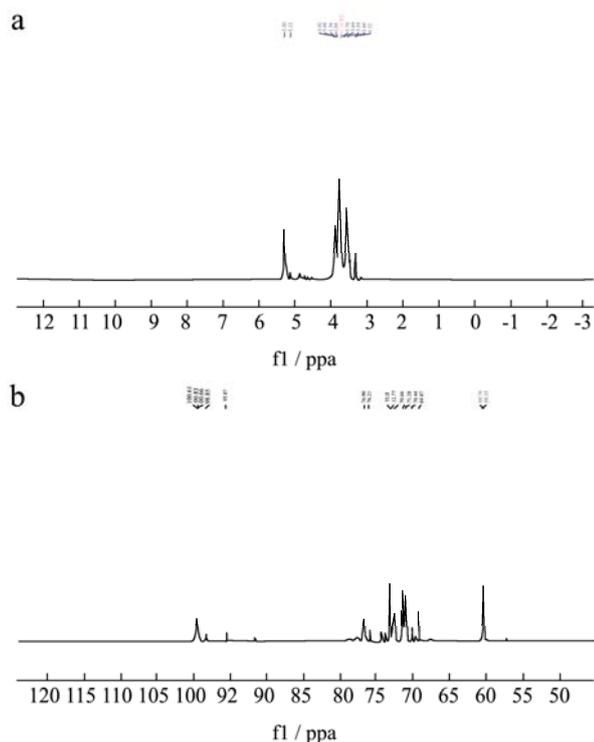


图9 GE-2的核磁共振波谱图

Fig.9 NMR spectrum of GE-2

注: a: 核磁共振氢谱图; b: 核磁共振碳谱图。

2.10 GE-2 的免疫调节活性研究

先天性免疫应答的刺激调节可以增强机体对抗外源病原体的威胁。一般认为, 免疫系统的刺激调节主要是通过激活巨噬细胞系统和补体系统来实现的^[30-32]。

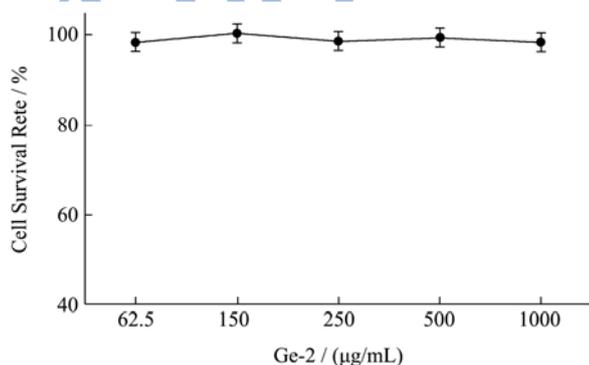


图10 GE-2对小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 的毒性实验

Fig.10 Effect of GE-2 on the viability of RAW 264.7 cells

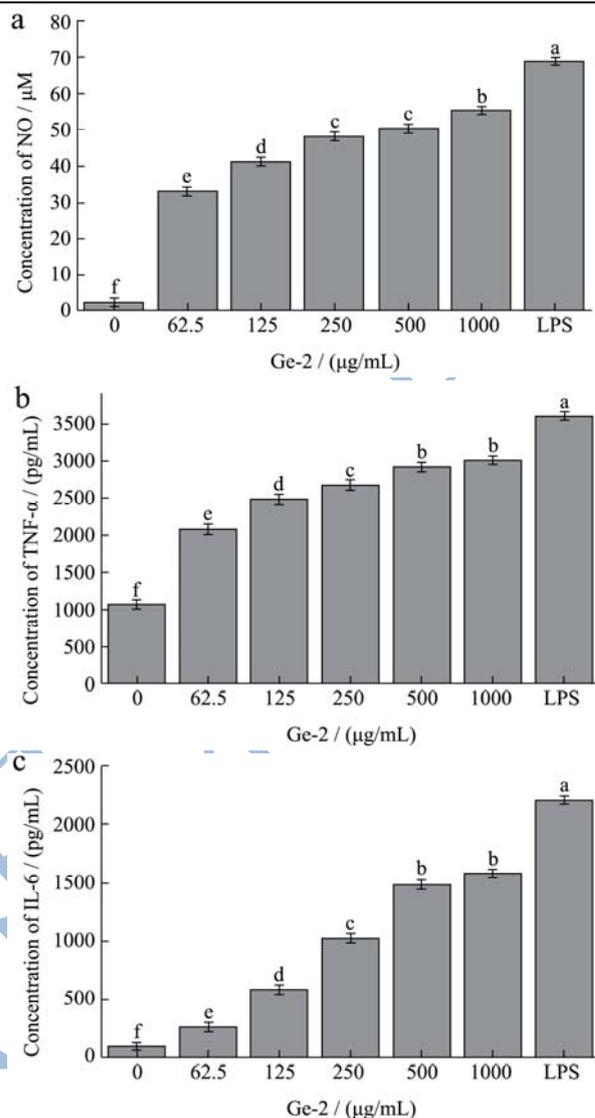


图11 不同浓度的 Ge-2 对小鼠巨噬细胞表达 NO(a)、TNF-α (b) 和 IL-6 (c) 的影响

Fig.11 Effects of different concentrations of GE-2 on macrophage (a) NO, (b) TNF-α and (c) IL-6 secretion

注: 不同小写字母代表显著性差异, $p < 0.09$

本文研究了不同浓度 GE-2 对小鼠巨噬细胞分泌细胞因子 NO、TNF-α 和 IL-6 的影响。如图 10 所示, 随着 GE-2 浓度的上升, 小鼠巨噬细胞存活率稳定在 98%左右, 且不同浓度下得细胞存活率间无显著性差异, 说明 GE-2 的浓度梯度不会对小鼠细胞造成毒害作用。如图 11 所示, 经过 GE-2 处理后, 小鼠巨噬细胞中 NO、TNF-α 和 IL-6 的表达量均显著升高, 且表达量随着 GE-2 浓度的升高而升高, 呈现出明显的剂量效应。图 11a 显示, GE-2 对 NO 的表达在浓度 250 µg/mL 到 500 µg/mL 内上升速度放缓, 在 1000 µg/mL 浓度时 NO 表达量最高。图 11b 显示, TNF-α 的浓度在 GE-2 低浓度时为阴性对照的 2 倍左右, GE-2 浓度在 500 µg/mL 到 1000 µg/mL 范围内时, TNF-α 浓度上

升速度明显放缓, TNF- α 的表达量无明显差异; 经过 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GE-2 处理的细胞其 TNF- α 的表达水平为阴性对照的 3 倍左右。图 11c 显示, GE-2 对 IL-6 的激活表达较为显著, 小鼠巨噬细胞经 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 GE-2 处理后其 IL-6 的表达水平将近是阴性对照组的 40 倍。综合以上指标, 表明 GE-2 具有显著的免疫调节活性。

3 结论与展望

通过热水浸提及离子层析分离从野葛根体粗多糖中分离纯化得均一酸性多糖 GE-2。GPC 测得其分子量为 12300 u。经紫外光谱、FT-IR、SEM、GC、NMR、刚果红分析, 结果显示, Ge-2 的单糖组成为葡萄糖, 含有 α - (1 \rightarrow 4) 和 α - (1 \rightarrow 4,6) 糖苷键, 没有三螺旋结构, 具有无序的空间结构。本文研究不同浓度 GE-2 对小鼠巨噬细胞分泌细胞因子 NO、TNF- α 和 IL-6 的影响, 发现小鼠巨噬细胞中 NO、TNF- α 和 IL-6 的表达量随着 GE-2 浓度的升高而升高, 呈现出明显的剂量效应, 说明其有很强的免疫调节活性。本文的研究结果为野葛根多糖类产品的开发和利用提供了一定的科学证据和研究思路。

参考文献

- [1] 李天星, 李新民. 中药葛根的研究进展[J]. 湖南中医杂志, 2013, 29(8): 151-153
LI Tian-xing, LI Xin-min. Research progress of traditional Chinese medicine Gegen [J]. Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine, 2013, 29(8): 151-153
- [2] 廖洪波. 葛根的研究进展及展望[J]. 食品工业科技, 2003, 2: 81-83
LIAO Hong-bo. Research progress and Prospect of Puerarialobata [J]. Food Industry Science and Technology, 2003, 2: 81-83
- [3] 唐洁. 植物多糖生物活性功能的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(5): 130-132
TANG Jie. Research progress on biological activity of plant polysaccharides [J]. Food Research and Development, 2006, 27(5): 130-132
- [4] 楚纪明, 马树运, 李海峰, 等. 葛根有效成分及其药理作用研究进展[J]. 食品与药品, 2015, 17(2): 142-146
CHU Ji-ming, MA Shu-yun, LI Hai-feng, et al. Progress in studies on effective constituents and pharmacological effects of Puerarialobata [J]. Food and Medicine, 2015, 17(2): 142-146
- [5] 李雅君. 葛根有效成分提取及分离纯化工艺研究[D]. 太原: 山西大学, 2014
LI Ya-jun. Extraction and purification of effective components from Puerarialobata [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2014
- [6] 郑皓, 王晓静. 葛根的药理作用研究概况[J]. 光明中医, 2006, 21(3): 49-51
ZHENG Hao, WANG Xiao-jing. Research progress of pharmacological action of Puerarialobata [J]. Guangming Traditional Chinese Medicine, 2006, 21(3): 49-51
- [7] 尹乐斌, 夏秋良, 赵良忠, 等. 葛根药理作用研究进展[J]. 现代农业科技, 2016, 4: 68-69, 75
YIN Le-bin, XIA Qiu-liang, ZHAO Liang-zhong, et al. Progress in pharmacological effects of Puerarialobata [J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2016, 4: 68-69, 75
- [8] 施燕峰. 葛根的药理作用与临床应用[J]. 健康研究, 2011, 31(5): 386-388
SHI Yan-feng. Pharmacological effects and clinical application of Puerarialobata [J]. Health Research, 2011, 31(5): 386-388
- [9] 宋红普, 贯剑. 葛根的药学研究及其临床应用概况[J]. 上海中医药杂志, 1999, 4: 48-50
SONG Hong-pu, GUAN Jian. Pharmaceutical research and clinical application of Puerarialobata [J]. Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine, 1999, 4: 48-50
- [10] 王蕊霞, 刘晓宇. 不同提取工艺下葛根多糖的比较研究[J]. 食品工业科技, 2008, 4: 191-193
WANG Rui-xia, LIU Xiao-yu. Comparative study on Polysaccharides from Radix Puerariae under different extraction processes [J]. Food Industry Science and Technology, 2008, 4: 191-193
- [11] 林国卫, 周丽明, 张勇, 等. 水溶性葛根多糖提取条件研究[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(11): 285-286
LIN Guo-wei, ZHOU Li-ming, ZHANG Yong, et al. Study on the extraction conditions of water soluble polysaccharides from Puerarialobata [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2012, 40(11): 285-286
- [12] Lee H H, Lee J S, Cho J Y, et al. Structural characteristics of immunostimulating polysaccharides from Lentinusedodes [J]. J Microbiol Biotechnol, 2009, 5: 455-61
- [13] Zhao L Y, Dong Y H, Chen GT, et al. Extraction, purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from Ganoderma lucidum [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80(3): 783-789
- [14] Dai Y C, CAO Y, Zhou L W, et al. Notes on the nomenclature

- of the most widely cultivated *Ganoderma* species in China [J]. *Mycosystema*, 2013, 32: 947-952
- [15] Guo F C, Kwakkel R P, Williams B A, et al. Coccidiosis immunization: effects of mushroom and herb polysaccharides on immune responses of chickens infected with *Eimeriatenella* [J]. *Avian Diseases*, 2005, 49(1): 70-73
- [16] 于华峥,刘艳芳,周帅,等.灵芝子实体、菌丝体及孢子粉中多糖成分差异比较研究[J].菌物学报,2016,35(2):170-177
- YU Hua-zheng, LIU Yan-fang, ZHOU Shuai, et al. Comparison of the polysaccharides from fruiting bodies, mycelia and spore powder of *Ganoderma lingzhi* [J]. *Mycosystema*, 2016, 35(2): 170-177
- [17] SONG Yi, DU Bingdian, ZHOU Ting, et al. Optimization of extraction process by response surface methodology and preliminary structural analysis of polysaccharides from defatted peanut (*Arachis hypogaea*) cakes [J]. *Carbohydrate Research*, 2011, 346: 305-310
- [18] Tian Y, Zeng H, Xu Z, et al. Ultrasonic-assisted extraction and antioxidant activity of polysaccharides recovered from white button mushroom (*Agaricus bisporus*) [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 88(2): 522-529
- [19] Xu X, Yan H, Zhang X. Structure and immuno-stimulating activities of a new heteropolysaccharide from *Lentinula edodes* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(46): 11560-11566
- [20] M Zhang, W Wu, Y Ren, et al. Structural characterization of a novel polysaccharide from *Lepidium meyenii* (Maca) and analysis of its regulatory function in macrophage polarization in vitro [J]. *J Agric. Food Chem.*, 2017, 65(6): 1146-1157
- [21] 刘玉红,王凤山.核磁共振波谱法在多糖结构分析中的应用[J].食品与药品,2007,9(8):39-43
- LIU Yu-hong, WANG Feng-shan. Applications of nuclear magnetic resonance spectroscopy in structural analysis of polysaccharides [J]. *Food and Drug*, 2007, 9(8): 39-43
- [22] 田媛,张尊建.糖类结构的核磁共振波谱及质谱分析[J].药学进展,2003,27(2):78-80
- TIAN Yuan, ZHANG Zun-jian. Analysis of carbohydrate structure by nuclear magnetic resonance spectroscopy and mass spectrometry [J]. *Pharmaceutical Progress*, 2003, 27(2): 78-80
- [23] 刘玉红,王凤山.核磁共振波谱法在多糖结构分析中的应用[J].食品与药品,2007,9(8):39-43
- LIU Yu-hong, WANG Feng-shan. Application of nuclear magnetic resonance spectroscopy in structure analysis of polysaccharides [J]. *Food and Medicine*, 2007, 9(8): 39-43
- [24] 张婷,吴晖,赖富饶,等.紫芝菌丝体多糖的结构鉴定及免疫活性研究[J].现代食品科技,2017,33(4):52-60,228
- ZHANG Ting, WU Hui, LAI Fu-rao, et al. Structure identification and immune activity of *Ganoderma* mycelium polysaccharide [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2017, 33(4): 52-60, 228
- [25] HUANG Shengquan, LI Jinwei, LI Yuqiang, et al. Purification and structural characterization of a new water-soluble neutral polysaccharide GLP-F1-1 from *Ganoderma lucidum* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2011, 48: 165-169
- [26] H Cui, Q Liu, Y Tao, et al. Structure and chain conformation of a (1→6)- α -D-glucan from the root of *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi and the antioxidant activity of its sulfated derivative [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2008, 74(4): 771-778
- [27] 陈兵兵,王振斌.葛根多糖的基本理化特性研究[J].食品研究与开发,2016,37(15):10-13,65
- CHEN Bing-bing, WANG Zhen-bin. The basic physicochemical properties of *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi polysaccharides [J]. *Food Research and Development*, 2016, 37(15): 10-13, 65
- [28] Adrian Wiater, Monika Janczarek, Adam Choma. Water-soluble (1→3),(1→4)- α -D-glucan from mango as a novel inducer of cariogenic biofilm-degrading enzyme [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 58: 199
- [29] Zhao G, Kan J, Li Z, et al. Characterization and immunostimulatory activity of an (1→6)- α -D-glucan from the root of *Ipomoea batatas* [J]. *International Immunopharmacology*, 2005, 5(9): 1436-45
- [30] Jia X, Hu J, He M, et al. α -Glucosidase inhibitory activity and structural characterization of polysaccharide fraction from *Rhynchosia minima*, root [J]. *Journal of Functional Foods*, 2017, 28: 76-82
- [31] Z-B Wang, B-B Chen, L Luo, et al. Fractionation, physicochemical characteristics and biological activities of polysaccharides from *Pueraria lobata* roots [J]. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2016, 67: 54-60
- [32] W Cao, X Q Li, L Liu, et al. Structural analysis of water-soluble glucans from the root of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels [J]. *Carbohydr Res*, 2006, 341(11): 1870-1877
- [33] S S Ferreira, C P Passos, P Madureira, et al. Structure-function relationships of immunostimulatory polysaccharides: A review [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 132: 378-3

现代食品科技