

盐制巴戟天多糖结构表征及其免疫活性

赖岚玉¹, 罗志锋¹, 朱思阳², 陶倩³, 黎攀¹, 杜冰^{1*}

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642) (2. 无限极(中国)有限公司, 广东广州 510623)

(3. 花安堂生物科技集团有限公司, 广东广州 511500)

摘要: 该研究采用水提醇沉法从盐制巴戟天中提取粗多糖(SMP), 经 DEAE-52 纤维素柱和葡聚糖凝胶 Sephadex G 100 柱分离纯化得到多糖(SMP-4), 采用红外光谱、高效凝胶渗透凝胶色谱、气相色谱和核磁共振波对 SMP-4 进行结构表征, 并以 RAW264.7 巨噬细胞为模型, 通过测定其细胞增殖活性和细胞因子分泌水平来评价其免疫活性。多糖结构分析表明, SMP-4 是由阿拉伯糖、半乳糖、鼠李糖、核糖、木糖、葡萄糖和甘露糖组成的, 摩尔比例为: 0.55: 0.23: 0.16: 0.03: 0.02: 0.01: 0.01, 分子量为 1.32×10^5 u 的多糖。SMP-4 具有六种糖苷键, 其中 $\rightarrow 3$ -D-Araf-(1 \rightarrow) 占比最高, 为 58.35%。在免疫活性评价分析中表明, 与对照组相比, 在 15.625~500.000 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度范围内不影响 RAW264.7 细胞的增殖, 同时能显著地促进肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白细胞介素-1 β (IL-1 β) 的分泌。SMP-4 质量浓度为 500 $\mu\text{g/mL}$ 时, RAW264.7 细胞分泌的 TNF- α 质量浓度最高, 为 2 100.00 pg/mL ($P < 0.001$); 在 31.25 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度下, RAW264.7 细胞分泌的 IL-1 β 质量浓度最高, 为 14.50 pg/mL ($P < 0.05$)。综上, SMP-4 表现出良好免疫活性, 具有成为一种天然的免疫调节剂的潜力。

关键词: 盐制巴戟天; 分离纯化; 多糖; 结构表征; 免疫活性

文章编号: 1673-9078(2023)02-197-204

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.2.0286

Structure Characterization and Immunological Activity Evaluation of the Polysaccharides from Salt-processed *Morinda officinalis*

LAI Lanyu¹, LUO Zhifeng¹, ZHU Siyang², TAO Qian³, LI Pan¹, DU Bing^{1*}

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China) (2. Infinitus (China) Co. Ltd., Guangzhou 510623, China) (3. Huaantang Biological Technology Group Co. Ltd., Guangzhou 511500, China)

Abstract: In this study the polysaccharides from salt-processed *Morinda officinalis* SMP was extracted by water extraction and ethanol precipitation, and then purified sequentially by DEAE-52 cellulose and Sephadex-G100 columns, to yield a purified polysaccharide (named SMP-4). Fourier transform infrared spectroscopy, high performance gel permeation chromatography, gas chromatography and nuclear magnetic resonance were employed to characterize the structural properties of SMP-4, and its immunomodulatory activities were examined in Macrophage RAW264.7 through determining its cell proliferation activity and levels of secreted cytokines. The polysaccharide structure analysis showed that SMP-4 consisted of arabinose, galactose, rhamnose, ribose, xylose, glucose and mannose in the molar ratio of 0.55:0.23:0.16:0.03:0.02:0.01:0.01, and had a molecular weight of 1.32×10^5 u. SMP-4 had six kinds of glycosidic bonds, with $\rightarrow 3$ -D-linked-Araf-(1 \rightarrow) accounting for the highest proportion (58.35%). The immunological activity analyses showed that the proliferation of RAW264.7 cells was not affected in the concentration range of 15.625~500.000 $\mu\text{g/mL}$ as compared with the control group, whilst the secretions of tumour necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) were significantly promoted. At a SMP-4 concentration of 500 $\mu\text{g/mL}$,

引文格式:

赖岚玉, 罗志锋, 朱思阳, 等. 盐制巴戟天多糖结构表征及其免疫活性[J]. 现代食品科技, 2023, 39(2): 197-204

LAI Lanyu, LUO Zhifeng, ZHU Siyang, et al. Structure characterization and immunological activity evaluation of the polysaccharides from salt-processed *Morinda officinalis* [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(2): 197-204

收稿日期: 2022-03-15

基金项目: 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系资助(CARS-21); 广东省自然科学基金面上项目(2020A151501268); 广东省重点领域研发计划项目(2020B020226008)

作者简介: 赖岚玉(1999-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 功能性食品, E-mail: lailanyu1999@163.com

通讯作者: 杜冰(1973-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 新资源食品与天然功能性原料, E-mail: dubing@scau.edu.cn

the amount of TNF- α secreted by RAW264.7 cells reached the highest level (2 100.00 pg/mL) ($P<0.001$); At a SMP-4 concentration of 31.25 $\mu\text{g/mL}$, RAW264.7 cells secreted the highest amount of IL-1 β (14.50 pg/mL) ($P<0.05$). In conclusion, SMP-4 exhibited a good immune activity and has the potential to be a natural immunomodulator.

Key words: salted *Morinda officinalis*; separation purification; polysaccharides; structural characterization; immunological activities

巴戟天为茜草科植物巴戟天 (*Morinda officinalis* How.) 的干燥根, 全年均可采挖, 其产地主要分布于广东、广西、福建、海南等地。近几年巴戟天作为保健食品原料, 其功能活性物质备受大家关注。在中医理论中认为巴戟天味辛、甘, 性微温, 归肾、肝经, 具祛风湿、强筋骨等功效^[1]。现代科学也证明巴戟天具有广泛的药理和保健功能, 其具有免疫调节^[2]、骨质疏松^[3,4]、抗肿瘤^[5]、抗氧化^[6]和抗抑郁^[7]等多种生物活性, 其中主要活性成分有多糖^[3,4,6]、寡糖^[7]、蒽醌^[8]和环烯醚萜^[9]等, 多糖作为巴戟天中活性成分之一^[10], 是一类具有功能活性的大分子物质。多糖是植物中一种功能活性物质, 具有副作用小, 安全性较高等特点, 是功能性食品及保健食品开发的热点, 近年来备受专家学者们的关注。

盐制巴戟天作为传统炮制加工的一种方式, 早在宋代的《太平惠民和剂局方》中有提及“巴戟盐汤浸”。现在盐制仍然是巴戟天炮制的主要方式, 《中华人民共和国药典(2020)》亦收载有盐制巴戟天^[1]。关于盐制巴戟天多糖的研究还处于提取工艺以及含量测定阶段^[11]。现有的研究已经证实, 多糖结构与其功能活性密切相关^[12]。因此对盐制巴戟天多糖结构表征是研究其功能活性的重要一步。虽然已有人对巴戟天多糖进行结构鉴定^[4,6,13,14], 但是炮制前后得到多糖会有所不同。在万晓莹^[15]的研究中酒制前后黄精多糖有所不同。因此对盐制巴戟天多糖进行结构表征, 对巴戟天多糖结构的研究具有重要意义。

鉴于此, 本研究中采用离子交换纤维素 DEAE-52 和葡聚糖凝胶 Sephadex G100 柱分离纯化得到盐制巴戟天多糖 (Salt-processed *Morinda officinalis* Polysaccharides, SMP) 得到多糖 SMP-4, 测定其分子量, 单糖组成和结构等并研究其免疫活性。探究 SMP 的结构并评价其免疫活性, 为盐制巴戟天多糖的研究奠定理论基础。同时, 巴戟天作为国家卫健委规定可用于保健食品的原料, 对于其活性成分的研究, 为巴戟天在功能性食品方面的进一步开发利用指明方向。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

抽芯巴戟天, 广东省云浮市郁南县大方镇巴戟天

市场; RAW264.7 巨噬细胞, 中山大学细胞库; 离子交换纤维素 DEAE-52 (DE-52)、葡聚糖凝胶 Sephadex G100 等为国产分析纯; 小鼠白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和 CCK-8 ELISA 试剂盒, 欣博盛生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

Vertex 70 傅立叶变换红外光谱仪, 美国布鲁克·道尔顿公司; LC-20A 高效液相色谱仪, 日本岛津公司; Heratherm™ 高端微生物培养箱、Evolution 300 紫外可见分光光度计、Multiskan™ FC 酶标仪、Thermo Scientific™ ISQ™ 7000 GC-MS 单四极杆, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; Hei-VAP 旋转蒸发仪, 德国 Heidolph 公司; SHZ-III 循环水真空泵, 上海亚荣生化仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 盐制巴戟天制备

将巴戟天去除泥土, 用清水洗净, 沥干待用。洗净沥干水分的巴戟天按料液比 1:1 (g/mL) 加入 2% (m/V) 盐水煮 60 min, 捞出沥干。60 °C 热风干燥 24 h, 干燥后粉碎过 24 目筛, 得干燥的盐制巴戟天粉末。

1.3.2 盐制巴戟天粗多糖提取

准确称取盐制巴戟天粉末, 按料液比 1:60 (g/mL) 加入 $\varphi=80\%$ 乙醇, 80 °C 回流两次, 每次 2 h, 过滤后取滤渣。再按料液比 1:100 (g/mL) 加入蒸馏水, 100 °C 回流提取、过滤、减压浓缩, 加入 4 倍体积的 $\varphi=95\%$ 乙醇, 4 °C 静置 12 h。取沉淀加少量 $\varphi=75\%$ 乙醇溶解后, 在 4 000 r/min 离心 10 min, 得到的沉淀用少量水溶解后, 采用 Sevage 法脱蛋白质, 再装入透析袋中, 透析至透析液电导率 $\leq 1.5 \mu\text{S/cm}$ 。透析后的多糖溶液真空冷冻干燥 48 h, 得到盐制巴戟天粗多糖。

1.3.3 盐制巴戟天粗多糖纯化

将盐制巴戟天粗多糖样品配制浓度为 10 mg/mL 的溶液, 用 0.22 μm 滤膜过滤处理后, 上样到 DE-52 交换柱 ($\Phi 1.5 \times 40.0 \text{ cm}$), 流速为 2.0 mL/min, 用 0.00、0.02、0.10、0.30 mol/L 的 NaCl 溶液进行梯度洗脱, 自动收集器收集分离组分 (5 mL/管)。共收集到 4 个不同组分: SP-1、SP-2、SP-3、SP-4, 苯酚-硫酸法测定收集组分的多糖含量。再使用 Sephadex G100 柱对

含量较高的组分 SP-4 ($\Phi 1.5 \times 40$ cm) 进一步纯化, 最后通过减压浓缩、透析脱盐和真空冷冻干燥得到纯化多糖 (SMP-4)。

1.3.4 多糖结构鉴定

1.3.4.1 傅里叶变换红外光谱 (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FT-IR) 检测

在无水的条件下, 将 1 mg 的 SMP-4 粉末与 100 mg KBr 粉末混合, 充分磨成 1 mm 微球, 用压片机压片, 用 Vertex 70 傅立叶变换红外光谱仪在 $4000\sim 400$ cm^{-1} 范围内进行扫描分析 SMP-4。

1.3.4.2 单糖组成检测

参考黄晓兰等^[16]的方法。精确称取 100 mg SMP-4, 加入 8 mL 的 2 mol/L H_2SO_4 , 加热回流 6 h, 冷却后加入饱和 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 溶液中中和至中性, 过滤, 将滤液旋干, 加入 14 mg 盐酸羟胺和 1 mL 吡啶置于 90 °C 水浴加热 1 h, 取出冷却至室温, 加入 5 mL 乙酸酐, 再于 90 °C 水浴加热 1 h, 冷却至室温, 加入 10 mL 蒸馏水破坏乙酸酐。用氯仿对乙酰化产物进行萃取, 经蒸馏水洗涤后, 用无水硫酸钠脱水后氮吹浓缩至 1 mL, 采用气相色谱质谱联用仪 (GC-MS) 分析, 得到 SMP-4 的图谱。采用核糖、鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖的标准品进行 GC-MS 分析, 得到单糖标准品图谱。SMP-4 通过与单糖标准品色谱图的保留时间, 确定单糖组成。

GC-MS 条件: 色谱柱为 SE-30, 柱温初温 100 °C, 以 10 °C/min 升温至 280 °C, 载气为氦气, 柱前压为 70.0 kPa, 分流比为 10:1, 进样量为 1 μL 。

1.3.4.3 相对分子量测定

参考黄晓兰等^[16]的方法。采用高效凝胶渗透色谱 (HPGPC) 分析 SMP-4 的分子量。准确称取 10 mg SMP-4 用 0.050 mol/L 含 0.05% NaN_3 的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲液溶解, 经 0.22 μm 滤膜滤过后进行 HPGPC 分析。根据峰面积归一化求得该多糖的相对质量分数。

HPGPC 条件: 流动相为 0.1 mol/L 磷酸缓冲溶液, 流速为 0.5 mL/min, 进样量为 20 μL 溶液 (质量浓度为 1 g/L), 色谱柱和 RID 的温度均保持在 35.0 °C。

1.3.4.4 甲基化检测

参考郑恒光等^[17]方法, 稍作修改。准确称取 10 mg SMP-4 加入 5 mL 无水二甲基亚砜溶解, 再加入 100 mg NaOH 粉末, 超声处理下直至完全溶解, 冷却至室温, 缓慢加入 2 mL 碘甲烷溶液启动甲基化反应, 避光反应 24 h 后加入 2 mL 蒸馏水终止甲基化反应。再加入

3 mL 氯仿进行萃取, 重复三次, 合并萃取液, 60 °C 减压旋干。加入 10 mL 4 mol/L 三氟乙酸, 100 °C 水解 2 h, 再在 60 °C 减压旋干, 加入 5 mL 乙醇, 减压旋干, 加入 2 mL 蒸馏水溶解, 用 1% NaOH 溶液将 pH 值调至 10, 加入 10 mg NaBH_4 , 再室温反应 6 h。加入冰乙酸溶液将 pH 值调至 5.5, 再 60 °C 减压浓缩, 加入 1 mL 吡啶和 1 mL 乙酸酐 100 °C 反应 1 h 后加入 1 mL 蒸馏水终止反应。加入 2 mL 二氯甲烷萃取, 重复三次, 合并萃取液加入无水硫酸钠干燥过膜备用。

GC-MS 条件: 色谱柱为 HP-5 石英毛细管柱, 柱温初温 150 °C, 以 10 °C/min 升温至 280 °C, 载气为氦气, 分流比为 50:1, 进样量为 1 μL 。

1.3.4.5 核磁共振波谱 (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR) 检测

准确称取 10 mg SMP-4 溶解于 600 μL D_2O , 3000 r/min 离心 10 min, 取上清液于核磁管中, 用 500 Hz 核磁共振波谱仪检测 $^1\text{H-NMR}$ 信号和 $^{13}\text{C-NMR}$ 信号。

1.3.5 巴戟天多糖免疫活性研究

1.3.5.1 细胞培养

参考于弋涵等^[18]方法, 稍作修改。RAW264.7 巨噬细胞采用添加了 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基 (含 0.5% 青链霉素和链霉素) 的中进行培养, 置于 5% CO_2 、37 °C 细胞培养箱中孵育。当细胞铺板率达到培养瓶底面积的 80% 以上时, 用移液枪吸净原培养基并吸取 3 mL PBS 对漂浮的死细胞进行洗涤, 重复 3 次。然后用 2 mL 培养基将细胞吹打至完全脱落, 将细胞悬液浓度为每毫升 1.0×10^4 个, 按每孔加入 100 μL 的细胞悬浮液接种至 96 孔板中, 置于培养箱中孵育 24 h。

1.3.5.2 细胞增殖活性以及细胞因子分泌水平测定

按 1.3.5.1 节对细胞培养完成后, 吸尽培养液并用 PBS 进行洗涤。对照组 (Control 组) 每孔加入 200 μL 完全培养基; 阳性对照组 (LPS 组) 每孔加入 200 μL 含 10 $\mu\text{g/mL}$ LPS 溶液的完全培养基; 实验组每孔加入 200 μL 含不同质量浓度 (15.625、31.25、62.5、125、250 和 500 $\mu\text{g/mL}$) 的 SMP-4 溶液完全培养基, 每组设置 6 个平行, 孵育 24 h。干预完成后, 采用 CCK-8 ELISA 试剂盒测定巨噬细胞 RAW264.7 增殖活性, 采用 ELISA 试剂盒测定 $\text{TNF-}\alpha$ 和 $\text{IL-1}\beta$ 的分泌水平。

1.3.6 数据处理

每项实验进行三次以上重复实验, 收集所有结果, 数据以平均数 \pm 标准差表示。采用 SPSS 26.0 版本的单因素方差分析 (ANOVA) 分析数据的统计学意义。P 值小于 0.05 被认为有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 盐制巴戟天多糖纯化

图 1a 为采用 DEAE-52 柱纯化盐制巴戟天粗多糖得到的洗脱曲线，共得到了 4 个不同的多糖组分，其中 SP-4 组分含量明显高于其他组分，收集 SP-4 组分用于后续的实验。图 1b 为采用 Sephadex G100 柱纯化 SMP-4 得到的洗脱曲线，结果显示得到无拖尾单一峰，说明组分纯度较高，利于后面的实验。SMP-4 得率为 0.085%，纯度为 91.46%。

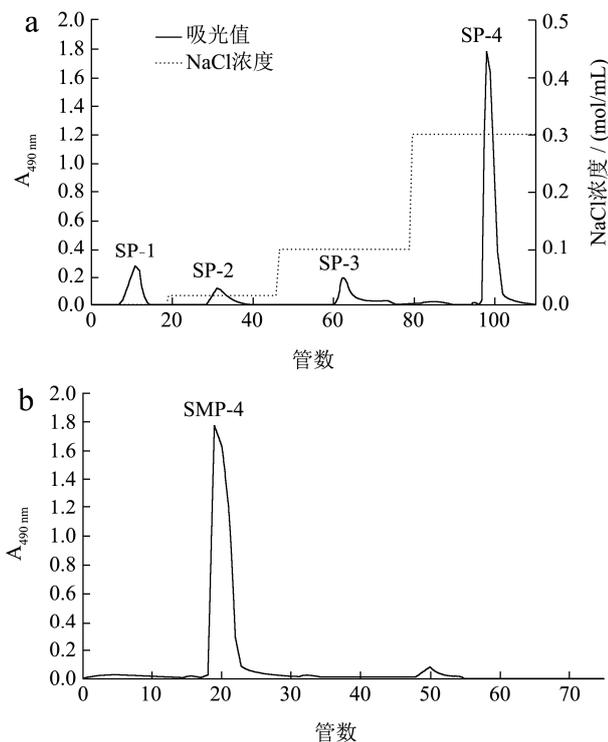


图 1 盐制巴戟天多糖洗脱曲线

Fig.1 Elution curve of polysaccharide from salt-processed *Morinda officinalis*

注：a 图为采用 DEAE-52 柱纯化盐制巴戟天粗多糖得到的洗脱曲线；由去离子水洗脱得到组分命名为 SP-1；由 0.02 mol/L NaCl 液洗脱得到组分命名为 SP-2；由 0.1 mol/L NaCl 液洗脱得到组分命名为 SP-3；由 0.3 mol/L NaCl 液洗脱得到组分命名为 SP-4；b 图采用 Sephadex-G100 纯化 SMP-4 得到的洗脱曲线。

2.2 SMP-4 结构分析

2.2.1 SMP-4 的 FT-IR 谱图分析

SMP-4 的 FT-IR 检测图如图 2 所示，SMP-4 在 4 000~400 cm^{-1} 范围内具有多糖特征峰。如在 3 403 cm^{-1} 处为多糖特征峰，峰型又强又宽是由 O-H 的拉伸振动形成；在 2 932 cm^{-1} 处的吸收峰是由 C-H 的拉伸和弯曲振动形成的^[19]。在 1 240 cm^{-1} 处的吸收峰是吡喃糖的

C-O-H 伸缩振动引起的。1 093 cm^{-1} 和 537 cm^{-1} 处的吸收峰是吡喃糖苷上的 C=O 伸缩振动引起，SMP-4 具有吡喃环糖残基^[20,21]。1 044 cm^{-1} 出现的吸收峰，是由呋喃环 C-O-C 伸缩震动引起的，说明 SMP-4 含有呋喃糖^[22]。SMP-4 同时包含有吡喃糖和呋喃糖。在 639 cm^{-1} 处的吸收峰可能是羰基的 C=O 扭曲振动形成的^[23]。在 1 613 cm^{-1} 吸收峰是由 N-H 弯曲振动引起的^[24]。在 1 750~1 700 cm^{-1} 无吸收峰，表示 SMP-4 中不含有糖醛酸^[25]。

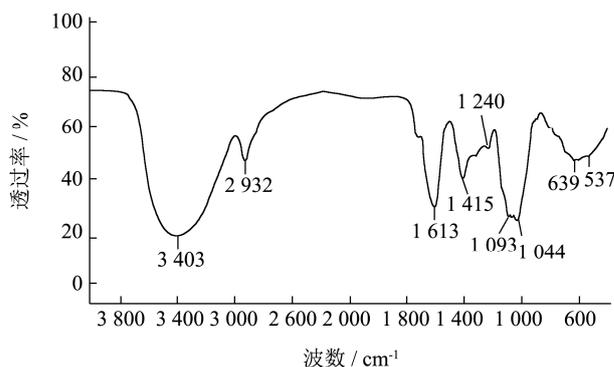


图 2 SMP-4 的 FT-IR 检测图

Fig.2 FT-IR detection figure of SMP-4

2.2.2 SMP-4 的单糖组成分析

多糖是由单糖残基通过糖苷键连接而成的，因此在分析多糖结构中，分析单糖组成是关键性步骤。采用 GC-MS 分析得到单糖标准品和 SMP-4 的结果见图 3。

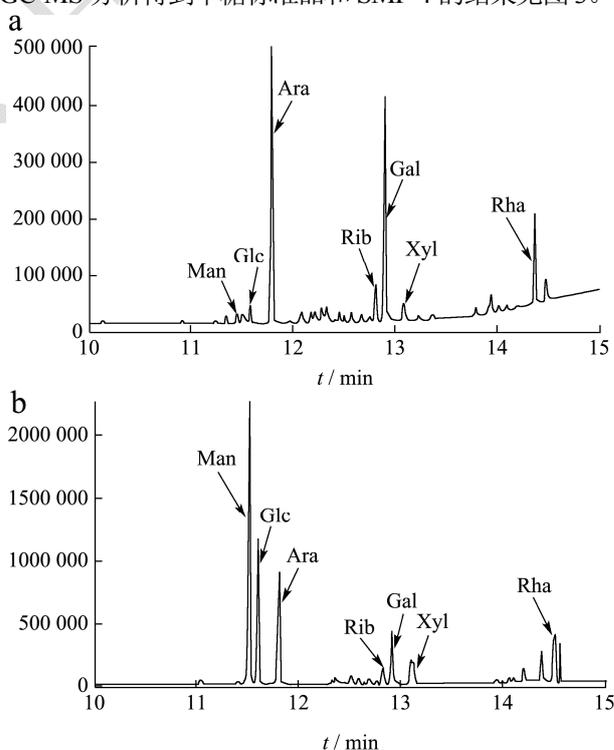


图 3 SMP-4(a) 和单糖标准品(b) 的 GC-MS 谱图

Fig.3 GC-MS profile of SMP-4 (a) and monosaccharide standard (b)

注：a 为 SMP-4 的气相色谱图；b 为单糖标品气相色谱图。

表 1 SMP-4 的单糖组成

Table 1 Monosaccharide composition of SMP-4

单糖名称	质量分数/%
阿拉伯糖 Ara	54.74
半乳糖 Gal	22.58
鼠李糖 Rha	16.00
核糖 Rib	2.86
木糖 Xyl	1.84
葡萄糖 Glc	1.12
甘露糖 Man	0.87

对色谱图分析得到结果如表 1 所示, 结果表明 SMP-4 由核糖、鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖组成, 其中阿拉伯糖含量最高, 达到了 54.74%。其次为半乳糖, 含量达到了 22.58%。这与之前的研究中, 单糖的种类较为一致, 相对摩尔比具有较大的差异。如 Zhang 等^[6]从巴戟天中分离具有抗氧化活性酸性多糖 APMO 由鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖组成, 相对摩尔比为 1:48.58:0.86:1.67:0.74:14.92。何传波等^[13]从巴戟天分离出的一种多糖主要有葡萄糖、阿拉伯糖和半乳糖

构成, 摩尔比为 5.08:2.91:1。何传波等^[14]关于分离纯化巴戟天多糖的研究中, 得到两种多糖 MOHP-I 和 MOHP-III 其单糖组成分别为葡萄糖、果糖和阿拉伯糖、木糖、葡萄糖、果糖以及半乳糖。

2.2.3 SMP-4 的相对分子量分析

多糖的分子量与其免疫活性有着密切的关系。HPGPC 的检测结果如表 2, SMP-4 的相对分子量为 1.32×10^5 u。分布列 (M_w/M_n) 为 $1.41 < 2$, 说明 SMP-4 的有良好的均一性和溶解性, 在水中具有较小的粘度, 能够增大多糖与细胞特定基团的接触面积^[26]。

2.2.4 SMP-4 的甲基化分析

在多糖的研究中, 常采用甲基化分析多糖中单糖残基连接的方式。SMP-4 经 GC-MS 分析, 得到了 SMP-4 的单糖残基组成、单糖残基结构、连接和分支, 对 SMP-4 甲基化分析结果见表 3。SMP-4 主要由 $\rightarrow 3$ -D-Araf-(1 \rightarrow 、 $\rightarrow 6$)-D-Galp-(1 \rightarrow 、和 $\rightarrow 2$)-D-Rhap-(1 \rightarrow 残基组成, 摩尔比分别为 58.35%、23.11%和 12.54%。SMP-4 是以(1 \rightarrow 3)糖苷键为主要糖苷键, $\rightarrow 3$ -D-Araf-(1 \rightarrow 、 $\rightarrow 6$)-D-Galp-(1 \rightarrow 为主要构成的大分子多糖。这与 FT-IR 数据和单糖组成分析的结果一致。

表 2 SMP-4 分子量

Table 2 Molecular weight of SMP-4

样品名称	保留时间/min	数均分子量 M_n/u	重均分子量 M_w/u	分布列(M_w/M_n)
SMP-4	16.3	9.38×10^4	1.32×10^5	1.410

表 3 SMP-4 甲基化分析结果

Table 3 Methylation analysis results of SMP-4

甲基化多糖	质荷比/(m/s)	糖苷键类型	摩尔比含量/%
D-3,4-Me ₂ Rhap	71,88,101,115,130,131,161,190	$\rightarrow 2$ -D-Ribf-(1 \rightarrow	2.44
D-3,5-Me ₂ Ribf	57,73,88,99,115,131,190	$\rightarrow 2$ -D-Rhap-(1 \rightarrow	12.54
D-2,5-Me ₂ Arap	59,71,82,87,99,109,118,129	$\rightarrow 3$ -D-Araf-(1 \rightarrow	58.35
1,2,3,4,5-Penta-O-Acetyl-D-Xylitol	43,57,69,81,85,99,103,115,127	$\rightarrow 2,3,4$ -D-Xylp-(1 \rightarrow	2.11
D-2,3,4-Me ₃ GlcP	43,58,71, 87,101,117,129,145,161,173	$\rightarrow 6$ -GlcP-(1 \rightarrow	1.45
D-2,3,4-Me ₃ Galp	43,58,71,87,101,117,129,143,161,173	$\rightarrow 6$ -D-Galp-(1 \rightarrow	23.11

2.2.5 SMP-4 的 NMR 图谱分析

SMP-4 的 ¹H-NMR 图谱和 ¹³C-NMR 图谱如图 4、图 5 所示。多糖的特征峰^[27]大多集中在 δ_H $3.0 \times 10^{-6} \sim 5.5 \times 10^{-6}$ 和 δ_C $60.0 \times 10^{-6} \sim 100.0 \times 10^{-6}$, 本实验结果中氢谱和碳谱图都符合这一特征。在 δ_H 4.700×10^{-6} 处出现的强烈信号是 D₂O 中的 HDO 所导致的。一般认为 $\delta_H > 5.000 \times 10^{-6}$ 是 α 构型糖苷键氢信号, $\delta_H < 5.00 \times 10^{-6}$ 是 β 构型糖苷键信号^[28]。SMP-4 存在有 δ_H 5.040×10^{-6} 、 5.133×10^{-6} 、 5.692×10^{-6} 异位质子信号表明其存在 α 构型糖苷键。SMP-4 存在有 δ_H 4.688×10^{-6} 、 4.947×10^{-6} 异位质子信号表明其存在 β 构型糖苷键。在 δ_H $3.200 \times 10^{-6} \sim 4.500 \times 10^{-6}$ 环质子区域的信号对应于

糖环中从 C-2 到 C-6 的质子, 而 SMP-4 的 ¹H-NMR 图谱中 δ 值为 $3.200 \times 10^{-6} \sim 4.500 \times 10^{-6}$ 的信号被堆叠, 表明多糖分子量较大, 聚合程度高, 结构复杂导致信号重叠, 较难分辨。在 δ_H $5.500 \times 10^{-6} \sim 5.843 \times 10^{-6}$ (δ_H 5.545×10^{-6} 、 5.685×10^{-6} 、 5.692×10^{-6}) 范围内出现信号峰中说明 SMP-4 存在 α -呋喃糖, 在 δ_H $5.000 \times 10^{-6} \sim 5.500 \times 10^{-6}$ (δ_H 5.040×10^{-6} 、 5.067×10^{-6} 、 5.133×10^{-6} 、 5.307×10^{-6} 、 5.452×10^{-6}) 范围内出现信号说明 SMP-4 存在 α -吡喃糖^[29]。在 δ_C $60 \times 10^{-6} \sim 84 \times 10^{-6}$ (δ_C 76.412×10^{-6} 、 δ_C 81.229×10^{-6}) 范围内出现的信号峰说明 SMP-4 中存在吡喃糖构型^[30]。这与 FT-IR 分析的结果相一致。

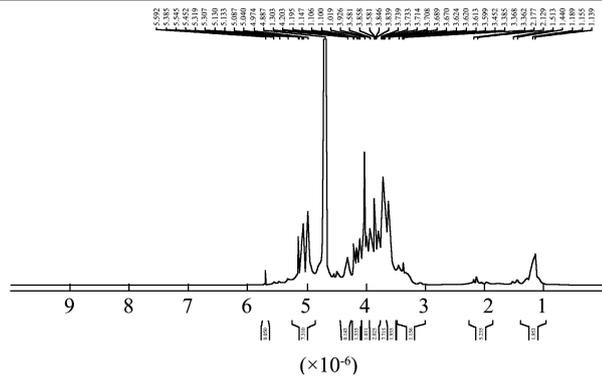


图4 SMP-4 核磁共振氢谱图

Fig.4 NMR hydrogen diagram of SMP-4

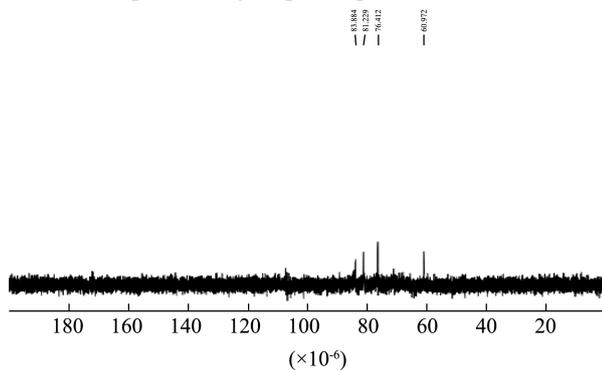


图5 SMP-4 核磁共振碳谱图

Fig.5 NMR carbon diagram of SMP-4

综上所述，SMP-4 是以 $\rightarrow 3$ -D-Araf-(1 \rightarrow 和 $\rightarrow 6$)-D-Galp-(1 \rightarrow 为主要构成的大分子多糖结构。多糖的生物活性与其结构密切相关^[12]。Yan 等^[3]从巴戟天中分离出能够调节靶基因的表达从而改善骨质疏松的多糖，其主要以 $(2\rightarrow 1)$ - β -D-Fruf 为主链，以 $(1\rightarrow)$ - α -D-Galp 和 $(2\rightarrow)$ - β -D-Frup 为侧链的结构。Zhang 等^[4]从巴戟天中分离抗骨质疏松活性多糖 MOP50-2，主要由 α -D-Glcp-(1 \rightarrow 、 $\rightarrow 1$)- β -D-Fruf-(2 \rightarrow 和 β -D-Fruf-(2 \rightarrow 残基的构成。在 Yan 等^[3]和 Zhang 等^[4]的研究中是采用巴戟天干燥处理后直接提取多糖，对比发现与本研究分离出 SMP-4 有所不同，属于不同的多糖。

2.3 SMP-4 免疫活性研究

2.3.1 SMP-4 对细胞增殖活性影响分析

巨噬细胞是机体重要的免疫细胞，在特异性免疫和非特异免疫中都发挥着重要的作用^[31]。本实验中的 SMP-4 对于 RAW264.7 细胞增殖活性实验数据如图 6 所示，与 Control 组相比，不同浓度 SMP-4 对巨噬细胞 RAW264.7 不存在显著差异 ($P > 0.5$)，说明 15.625~500.000 $\mu\text{g/mL}$ SMP-4 不影响巨噬细胞 RAW264.7 增殖活性。在 15.625~500.000 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度范围内，进行 SMP-4 对 RAW264.7 细胞免疫细胞因子分泌水平实验，不受细胞增殖活性的影响。

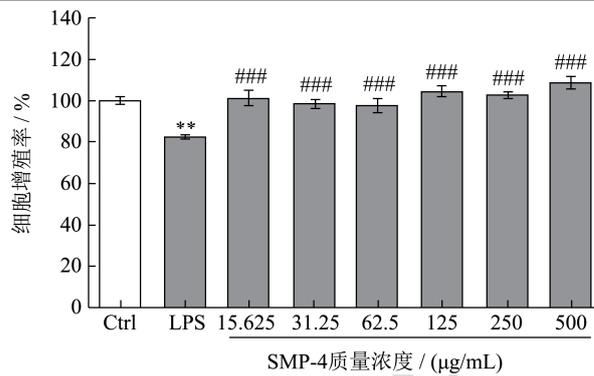


图6 RAW264.7 细胞的增殖活性

Fig.6 Proliferative activity of RAW264.7 macrophages

注：与 Ctrl 组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; SMP 组与 LPS 组比较 # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ 。

2.3.2 SMP-4 对小鼠 RAW264.7 巨噬细胞 TNF- α 和 IL-1 β 分泌水平影响分析

TNF- α 和 IL-1 β 是由巨噬细胞分泌与机体的特异性免疫相关的细胞因子，对于研究各种炎症性和免疫性疾病具有重要意义^[32]。细胞因子在机体内的平衡具有重要意义，现有的研究已证实，虽然机体内炎症因子的升高有利于细胞修复，但是过高的炎症因子水平又会导致炎症损伤。因此炎症相关因子要保持在正常分泌水平以发挥最适作用。图 7 为不同浓度 SMP-4 对 RAW264.7 巨噬细胞分泌免疫细胞因子的影响。与 LPS 组相比，Control 组的 RAW264.7 巨噬细胞相关因子分泌水平显著低于 LPS 组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)，说明 RAW264.7 巨噬细胞炎症造模成功。

TNF- α 是由巨噬细胞分泌的免疫细胞因子，在机体免疫调节中发挥着重要作用^[33]。SMP-4 对 RAW264.7 巨噬细胞分泌细胞因子 TNF- α 的影响如图 7a 所示。与 Control 组相比，在 15.625~500.000 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度范围内 SMP-4 能显著增加 TNF- α 的分泌，并随着 SMP-4 浓度的增大 TNF- α 分泌水平也随之增高，呈浓度依赖性。尤其是在 250 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度下，TNF- α 达到了 2 100 pg/mL ，差异极显著 ($P < 0.001$)。但在 15.625~500.000 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度范围内 SMP-4 促进 TNF- α 分泌水平均低于 LPS 组。这表明在 15.625~500.000 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度范围内能够提高 RAW264.7 细胞的 TNF- α 分泌水平，同时又可以避免过高的分泌水平所导致的炎症。在赵文俊等^[26]从美藤果粕中分离出的植物多糖 SISDF 在质量浓度为 62.5~1 000.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内能够使得 RAW264.7 巨噬细胞分泌的 TNF- α 质量浓度达到 1 400~1 500 pg/mL ，相比之下，62.5~500.0 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度下 SMP-4 也能达到相近的效果且能避免过高分泌水平。

IL-1 β 是由活化的单核巨噬细胞分泌的免疫细胞

因子,在介导 T、B 细胞活化、增殖和分化中起重要作用。SMP-4 对 RAW264.7 巨噬细胞分泌细胞因子 IL-1 β 的影响如图 7b 所示。在 15.625~500.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度范围内 SMP-4 促进 IL-1 β 分泌水平均低于 LPS 组。与 Control 组相比,15.625~31.250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度下 SMP-4 能提高 IL-1 β 的分泌水平($P<0.05$)。在 31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 下 IL-1 β 质量浓度最高,达到了 14.5 pg/mL ,未呈现浓度依赖性。这可能是不同浓度 SMP-4 对 RAW264.7 巨噬细胞的某一通路的刺激程度不一,导致细胞的 IL-1 β 分泌水平有所不同。关于 SMP-4 刺激 RAW264.7 细胞中潜在的信号通路的研究有待进一步探讨。对比 Zhang 等^[34]从罗望子中提取的具有良好免疫活性的植物多糖 TKP-2-1,不同浓度的 TKP-2-1 能够使得 RAW264.7 巨噬细胞分泌的 IL-1 β 质量浓度达到 10~15 pg/mL ,而 SMP-4 质量浓度为 31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,能达到与之相近的分泌水平且不具有计量浓度依赖性。实验结果表明 SMP-4 能够平衡特异性免疫相关因子的分泌水平,能够促进分泌水平升高的同时避免过高的分泌水平,说明 SMP-4 在免疫活性方面的开发具有较大的潜力。

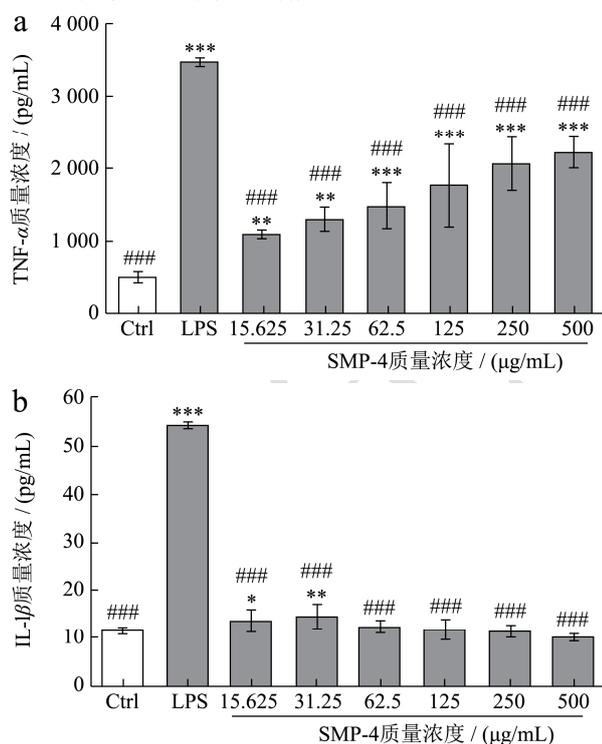


图7 不同浓度 SMP-4 对 RAW264.7 巨噬细胞分泌细胞因子的影响

Fig.7 RAW264.7 macrophage secretion level of related factors

注: a 为与对照组相比不同浓度 SMP-4 对 RAW264.7 巨噬细胞分泌 TNF- α 的影响结果图; b 与对照组相比为不同浓度 SMP-4 对 RAW264.7 巨噬细胞分泌 IL-1 β 的影响结果图; 与 Ctrl 组比较* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; SMP-4 组与 LPS 组比较# $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$ 。

SMP-4 具有良好的免疫活性可能与其多糖结构中存在着一定的联系。SMP-4 是以 $\rightarrow 3$ -D-Araf-(1 \rightarrow 和 $\rightarrow 6$)-D-Galp-(1 \rightarrow 为主要构成的大分子多糖结构。多糖以(1 $\rightarrow 3$)糖苷键为主链的连接方式与其免疫活性有关^[35]。如 Shen 等^[36],从玫瑰茄中分离出的多糖主要的由(1 $\rightarrow 3$)糖苷键相连的 HSP-II,具有良好的免疫活性。在以半乳糖和阿拉伯糖为主要单糖组成的多糖已被证实具有较高的免疫活性^[37]。

3 结论

本研究分析的盐制巴戟天多糖 SMP-4 是以 $\rightarrow 3$ -D-Araf-(1 \rightarrow 和 $\rightarrow 6$)-D-Galp-(1 \rightarrow 为主要糖残基,分子量在 1.32×10^5 Da 的大分子多糖。在免疫活性评价实验中, SMP-4 不影响 RAW264.7 巨噬细胞的增殖,同时能够提高 RAW264.7 巨噬细胞分泌 TNF- α 和 IL-1 β 的水平且避免过高分泌水平导致炎症。SMP-4 可作为一种良好的功能性食品免疫调节剂,应用于保健食品产品开发中。本研究为盐制巴戟天多糖在功能性食品方面的开发提供了理论支撑,这将对巴戟天作为保健食品原料的开发具有积极的意义。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典一部[M].中国医药科技出版社,2020
- [2] 魏晓峰,王佳,任晓航,等.巴戟天生、制品对免疫抑制小鼠免疫功能的影响[J].中药材,2019,42(3):545-548
- [3] YAN Chunyan, HUANG Dong, SHEN Xia, et al. Identification and characterization of a polysaccharide from the roots of *Morinda officinalis*, as an inducer of bone formation by up-regulation of target gene expression [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 446-456
- [4] Zhang D, Zhang S, Jiang K, et al. Bioassay-guided isolation and evaluation of anti-osteoporosis active polysaccharides from *Morinda officinalis* [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2020, 113113
- [5] 李灿涛,卢颖裕,陈勇儿,等.巴戟天对人源结肠癌细胞 HCT-116 移植瘤的抑制作用及机制初步探讨[J].食品工业科技,2022,43(5):356-365
- [6] ZHANG Hualin, LI Jun, XIA Jingmin, et al. Antioxidant activity and physicochemical properties of an acidic polysaccharide from *Morinda officinalis* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 58: 7-12
- [7] DU Yun, ZHENG Qin, OU Zhenghang, et al. Efficacy and safety of *Morinda officinalis* oligosaccharide capsules for depressive disorder: a systematic review and meta-analysis [J].

- Revista Brasileira de Psiquiatria, 2020(AHEAD), 43: 306-313
- [8] LUO Huan, WANG Yi, QIN Qiuyi, et al. Anti-inflammatory naphthoates and anthraquinones from the roots of *Morinda officinalis* [J]. Bioorganic Chemistry, 2021, 104800
- [9] Miaomiao Cai, Mengyun Liu, Pengxiao Chen, et al. Iridoids with anti-inflammatory effect from the aerial parts of *Morinda officinalis* How [J]. Fitoterapia, 2021, 153: 104991
- [10] 沈杰,马恩耀,赵志敏,等.巴戟天多糖的提取、分离及生物活性研究进展[J].中药新药与临床药理,2020,31(2):246-250
- [11] 周灿,杨梓懿,许李,等.不同炮制去心法对巴戟天多糖含量的影响[J].湖南中医药大学学报,2011,31(1):49-51
- [12] ZHANG Wuxia, HU Yihua, ZHAO Jinzhong, et al. Immunoregulation and antioxidant activities of a novel acidic polysaccharide from *Radix paeoniae Alba* [J]. Glycoconjugate Journal, 2020, 37(1)
- [13] 何传波,李琳,汤凤霞,等.巴戟天中一种多糖的分离与结构表征[J].高等学校化学学报,2009,30(12):2391-2395
- [14] 何传波,陈玲,李琳,等.巴戟天多糖的分级纯化及结构分析[J].华南理工大学学报:自然科学版,2005,33(12):5
- [15] 万晓莹.黄精酒制前后多糖初级结构和免疫活性的对比研究[D].北京:中国中医科学院,2021
- [16] 黄晓兰,吴惠勤,王蔚,等.天花粉多糖的单糖组成和相对分子质量的测定[J].中草药,2008,39(12):1810-1812
- [17] 郑恒光,沈恒胜,杨道富,等.杏鲍菇菇头多糖的结构鉴定及生物活性评价[J].食品科学,2019,40(22):7-13
- [18] 于弋涵,杜伟宁,胡秋辉,等.酶法水解猴头菇多肽的生物活性[J].食品科学,2021,42(21):119-127
- [19] YANG Xinhe, HUANG Mingjun, QIN Caiqin, et al. Structural characterization and evaluation of the antioxidant activities of polysaccharides extracted from Qingzhu brick tea [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 101: 768-775
- [20] Shafagh Karimi, Babak Ghanbarzadeh, Leila Roufegarnejad, et al. Polysaccharide extracted from *Althaea officinalis* L. root: new studies of structural, rheological and antioxidant properties [J]. Carbohydrate Research, 2021, 510: 108438
- [21] Chang S C, Hsu B Y, Chen B H. Structural characterization of polysaccharides from *Zizyphus jujuba* and evaluation of antioxidant activity [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2010, 47(4): 445-453
- [22] XU Can, QIN Ningbo, YAN Chunyan, et al. Isolation, purification, characterization and bioactivities of a glucan from the root of *Pueraria lobata* [J]. Food & Function, 2018, 9(5): 2644-2652
- [23] CUI Can, CHEN Song, WANG Xinyu, et al. Characterization of *Moringa oleifera* roots polysaccharide MRP-1 with anti-inflammatory effect [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 132: 844-851
- [24] QIAO Deliang, HU Bing, GAN Dan, et al. Extraction optimized by using response surface methodology, purification and preliminary characterization of polysaccharides from *Hyriopsis cumingii* [J]. Carbohydrate Polymers, 2009, 76(3): 422-429
- [25] DU Xiuju, ZHANG Jingsong, YANG Yan, et al. Structural elucidation and immuno-stimulating activity of an acidic heteropolysaccharide (TAPA1) from *Tremella aurantialba* [J]. Carbohydrate Research, 2009, 344(5): 672-678
- [26] 赵文俊,陆思名,彭东,等.美藤果水溶性膳食纤维的抗氧化及免疫活性评价[J].食品科学,2022,43(13):131-139
- [27] 刘晓飞,马京求,侯艳,等.发芽糙米多糖的结构解析及降糖活性分析[J].中国食品学报,2021,21(8):265-274
- [28] XU Yu, ZHANG Xuan, YAN Xiaohui, et al. Characterization, hypolipidemic and antioxidant activities of degraded polysaccharides from *Ganoderma lucidum* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 135: 706-716
- [29] 杜秀菊,张劲松,潘迎捷.核磁共振技术在食用菌多糖结构分析中的作用[J].中国食用菌,2010,29(1):3-6,19
- [30] 巩晓佩.硫酸化修饰红枣多糖的结构表征及生物活性的研究[D].石河子:石河子大学,2021
- [31] A O Byankina (Barabanova), E V Sokolovaa, S D Anastuyk, et al. Polysaccharide structure of tetrasporic red seaweed *Tichocarpus crinitus* [J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 98(1): 26-35
- [32] Jun Hyeok Lim, Gyoung Su Choi, Chaiwat Monmai, et al. Immunomodulatory activities of *Ammodytes personatus* egg lipid in RAW264.7 cells [J]. Molecules, 2021, 26(19): 6027-6027
- [33] Mza C, Mz A, Yq C, et al. Study on immunostimulatory activity and extraction process optimization of polysaccharides from *Caulerpa lentillifera* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 143: 677-684
- [34] ZHANG Xia, WANG Lun, XIE Fan, et al. A polysaccharide TKP-2-1 from *Tamarindus indica* L.: purification, structural characterization and immunomodulating activity [J]. Journal of Functional Foods, 2021, 78(2): 104384
- [35] ZHANG Mengmeng, WANG Guang, LAI Furao, et al. Structural characterization and immunomodulatory activity of a novel polysaccharide from *Lepidium meyenii* [J]. Agric Food Chem, 2016, 64(9): 1921-1931
- [36] SHEN Chunyan, ZHANG Wenli, JIANG Jianguo. Immune-enhancing activity of polysaccharides from *Hibiscus sabdariffa* Linn. via MAPK and NF- κ B signaling pathways in RAW264.7 cells [J]. Journal of Functional Foods, 2017, 34: 118-129
- [37] Lei Yuan, Zheng-Chang Zhong, Yu Liu, et al. Structures and immunomodulatory activity of one galactose- and arabinose-rich polysaccharide from *Sambucus adnata* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 207: 730-740