

# 酶解糖化滇黄精多糖的结构表征及其免疫活性

黄俊源<sup>1</sup>, 袁晚晴<sup>1</sup>, 苏艺<sup>1</sup>, 杨淑婷<sup>1</sup>, 黎攀<sup>1</sup>, 陈建萍<sup>2</sup>, 杜冰<sup>1\*</sup>

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

(2. 香港大学李嘉诚医学院中医药学院, 中国香港 999077)

**摘要:** 该论文研究了酶解糖化下的滇黄精多糖结构和免疫活性, 以探究酶解糖化下的黄精多糖结构特征及免疫活性的影响。结果表明, 酶解糖化黄精多糖 (SPKP) 的多糖和还原糖含量分别为 94.05%、4.1%。多糖结构分析表明, SPKP 的红外光谱在 1 016~1 147 和 931  $\text{cm}^{-1}$  处有吡喃糖特征吸收峰; 单糖组成及摩尔比为阿拉伯糖:半乳糖:葡萄糖:甘露糖:果糖=0.032:0.117:0.419:0.048:0.383, 重均分子量 ( $M_w$ ) 为 3 820 u。甲基化结果表明 SPKP 主要的糖苷键连接方式为  $\rightarrow 4$ -GlcP-(1 $\rightarrow$ ), 占比 47.1%, 分支度为 34.1%, 结合碘化钾和刚果红实验结果可以推测 SPKP 是一种含有复杂分支的三股螺旋多糖。RAW264.7 细胞实验结果表明, 酶解糖化黄精多糖在比较广的浓度范围内无毒性, 均能促进细胞增殖, 且有较高的细胞吞噬能力和 NO 水平, 因此可以推测 SPKP 具有较好的免疫活性, 且与其多糖结构有一定的关系。该研究可以为多糖与免疫活性的构效关系以及黄精新炮制方法的开发提供一定参考。

**关键词:** 滇黄精; 酶解糖化; 多糖结构; 免疫活性

文章编号: 1673-9078(2024)04-104-112

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.4.0427

## Enzymatic Saccharification of *Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl Polysaccharides: Structural Characterization and Immunological Activity

HUANG Junyuan<sup>1</sup>, YUAN Wanqing<sup>1</sup>, SU Yi<sup>1</sup>, YANG Shuting<sup>1</sup>, LI Pan<sup>1</sup>, CHEN Jianping<sup>2</sup>, DU Bing<sup>1\*</sup>

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

(2. School of Chinese Medicine, LKS Faculty of Medicine, The University of Hong Kong, Hongkong 999077, China)

**Abstract:** The structural characteristics and immunomodulatory activity of *Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl polysaccharides were investigated under conditions of enzymatic saccharification. The results revealed that among the products of enzymatic saccharification in *P. kingianum* (SPKP), the contents of polysaccharides and reducing sugars accounted for 94.05% and 4.1%, respectively. Structural analysis of the polysaccharides using Fourier transform infrared spectroscopy revealed that these had furanose-specific absorption peaks at 1 016~1 147 and 931  $\text{cm}^{-1}$ , whereas the monosaccharide composition and molar ratios were arabinose:galactose:glucose:mannose:fructose (0.032:0.117:0.419:0.048:0.383), and the molecular weight ( $M_w$ ) was 3 820 u. The main type of linkage was  $\rightarrow 4$ -GlcP-1 $\rightarrow$  (47.1%), and the

引文格式:

黄俊源,袁晚晴,苏艺,等.酶解糖化滇黄精多糖的结构表征及其免疫活性[J].现代食品科技,2024,40(4):104-112.

HUANG Junyuan, YUAN Wanqing, SU Yi, et al. Enzymatic saccharification of *Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl polysaccharides: structural characterization and immunological activity [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(4): 104-112.

收稿日期: 2023-04-09

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项目 (CARS-21)

作者简介: 黄俊源 (1998-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品新产品与保健食品, E-mail: pophij459@163.com

通讯作者: 杜冰 (1973-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 中草药炮制及活性成分代谢调控、新资源食品开发和应用, E-mail: dubing@scau.edu.cn

corresponding branching degree was 34.1%. Combined with the results of the iodine-potassium iodide and Congo Red staining experiments, SPKP were inferred to be a three-stranded helical polysaccharides containing complex branches. The findings of RAW264.7 cell experiments indicated that *P. kingianum* polysaccharides are non-toxic within a wide range of concentrations and can promote cell proliferation, phagocytic capacity, and production of NO. Accordingly, it can be speculated that SPKP have good immunomodulatory activities, which are associated with polysaccharide structures. Our findings in this study may provide a reference for determining the structure-function relationships between polysaccharides and immunomodulatory activity, as well as the development of new methods for processing *P. kingianum*.

**Key words:** *Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl; enzymatic saccharification; polysaccharide structure; immunological activity

滇黄精 (*Polygonatum kingianum* Coll, et Hemsl, *P. kingianum*) 是百合科黄精属植物, 主要分布在我国云南<sup>[1]</sup>, 因其营养价值高, 且具有传统的药食同源用途而备受青睐<sup>[2]</sup>。多糖是黄精中的主要活性成分之一, 其免疫调节、防止氧化损伤、抗衰老、抗骨质疏松和抗炎等功能已得到广泛的研究<sup>[3]</sup>。

随着现代社会发展, 人们对健康愈发关注, 消费者和行业都在寻找自然、安全的免疫调节材料<sup>[4]</sup>。多糖被认为在人体内和体外具有增强细胞介导的免疫反应作用, 并逐渐成为生物反应调节剂的一种重要角色<sup>[5]</sup>。研究表明, 黄精多糖对 RAW264.7 细胞具有促增殖作用并对细胞分泌一氧化氮 (NO) 有明显的促进作用<sup>[6]</sup>, 具有成为免疫调节剂的潜力<sup>[7]</sup>。然而, 黄精多糖的结构特征与免疫活性密切相关, 包括单糖组成比例、官能团类型和糖苷键连接方式等, 而不同的加工、炮制和提取方式则会对多糖的结构特征产生显著的影响<sup>[8,9]</sup>。酶解糖化是食品加工的一项常用的技术, 通过酶的催化作用将复杂的碳水化合物分解成简单的单糖, 例如葡萄糖和果糖等<sup>[10]</sup>, 还能给微生物发酵提供大量所需的糖类物质, 促进发酵过程的进行。课题组前期发明了一种新的黄精酶解糖化工艺<sup>[11]</sup>, 但该新工艺下的黄精多糖结构仍鲜有报道。本研究旨在分析酶解糖化黄精多糖 (Enzymatic Saccharify *P. kingianum* Polysaccharide, SPKP) 结构特征, 并通过对免疫活性的研究对其构效关系进行分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

新鲜滇黄精购于云南省普洱市, 经香港大学李嘉诚医学院中医药学院首席讲师陈建萍博士鉴定为4年生百合花滇黄精的干燥根茎, 多糖含量占28.2%, 符合《中华人民共和国药典》2020版的要求。

$\alpha$ -淀粉酶 (耐高温 POWERLIQ 型) A30278G190, 杰能科 (中国) 生物工程有限公司; 高效糖化专用酶 SGA 2.0 S 型, 山东隆科特酶制剂有限公司; 单糖标准品, Sigma-Aldrich; RAW264.7 细胞从中山大学药学院获取; DMEM 培养基、胎牛血清、青霉素链霉素混合液、磷酸盐缓冲溶液 (PBS), Gibco 公司; 细胞增殖-毒性检测试剂盒 CCK8, SEVEN 公司; 一氧化氮 (NO) 检测试剂盒, 上海碧云天生物科技有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 仪器与设备

光栅型酶标仪 VersaMax, 美国 Molecular Devices 公司; 紫外可见分光光度计 Evolution 300, 赛默飞世尔科技有限公司; 冷冻干燥机 ALPHA 2-4 LDplus, 德国 Christ 公司; 傅立叶变换红外光谱仪 Vertex 70, 德国布鲁克公司; 扫描式电子显微镜 EVO MA 15, 德国 ZEISS 公司; 离子色谱仪 ICS5000, ThermoFisher 公司; 气相质谱联用仪 6890-5973, Agilent Technologies 有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 酶解糖化黄精多糖制备

将鲜黄精块茎去除须根后清洗去皮, 称取 200 g 按料液比 1:2 加水混合, 加入 1 mL 质量分数为 37.5% 的  $\text{CaCl}_2$  溶液, 添加 50  $\mu\text{L}$   $\alpha$ -淀粉酶后于 85  $^\circ\text{C}$  下水浴加热 1 h。然后用柠檬酸调节 pH 值至 5.0, 待酶解液降至 60  $^\circ\text{C}$  左右添加 50  $\mu\text{L}$  糖化酶, 于 60  $^\circ\text{C}$  水浴加热 1 h 后立即在 100  $^\circ\text{C}$  水浴加热 5 min (灭酶)。抽滤后取滤液, 通过旋转蒸发器蒸发浓缩, 即得酶解糖化液。加入体积为上述浓缩液 4 倍的无水乙醇, 摇匀, 4  $^\circ\text{C}$  冷藏, 静置过夜, 取出, 以 4 000 r/min 速度离心 20 min, 弃去上清液。得到的沉淀加蒸馏水溶解。将所得溶液置于旋转蒸发器中进行低温减压蒸馏, 除去乙醇, 得粗多糖溶液<sup>[12]</sup>。

采用 Seville 试剂脱蛋白 (Seville 试剂  $V_{\text{三氯甲烷}}:V_{\text{正丁醇}}=4:1$ )，按照多糖溶液: Seville 试剂的体积比为 4:1 加入 50 mL 离心管进行混合，在振荡器中机械振荡 20 min (300 次/min)，随后将混合液以 4 000 r/min 速度离心 5 min，静置，弃去下层有机层和中间的蛋白层，重复操作 6 次以上直至蛋白除尽。最后合并所得的上清液，55 °C 低温减压蒸馏除去氯仿和正丁醇<sup>[13,14]</sup>。将规格为 1 000 u 的透析袋煮开 3~4 min，随后将透析袋一端扎好后，倒入适量浓缩后的多糖溶液，在 4 °C 下用三级水逆流透析，每隔 6 h 换一次三级水，直到所测透析液的电导率接近三级水的电导率 ( $\leq 1.5 \mu\text{s}/\text{cm}$ )<sup>[15]</sup>，得到多糖样品。

### 1.3.2 标准曲线绘制及多糖、还原糖含量测定

以葡萄糖为基准，采用苯酚-硫酸法，在波长 490 nm 处测吸光度，以吸光度为纵坐标，葡萄糖含量为横坐标绘制标准曲线<sup>[14]</sup>并测定多糖含量。

以葡萄糖为基准，采用 DNS 法，在波长 540 nm 处测吸光度，以吸光度为纵坐标，葡萄糖含量为横坐标绘制标准曲线<sup>[16]</sup>并测定还原糖含量。

### 1.3.3 分子量的测定

参考文献<sup>[17]</sup>对 SPKP 的分子量分布采用高效凝胶渗透色谱法 (High Performance Gel Permeation Chromatography, HPGPC) 进行测定。

### 1.3.4 傅里叶变换红外 (Fourier Transform Infrared, FT-IR) 光谱

参考文献<sup>[18]</sup>的方法，利用傅里叶变换红外仪测定两组黄精多糖的红外光谱。

### 1.3.5 单糖组成测定

参考文献<sup>[19]</sup>的方法，进行单糖组成测定。

### 1.3.6 一级分支结构测定

采用碘-碘化钾实验测定一级分支结构<sup>[20]</sup>。

### 1.3.7 甲基化分析

参考文献<sup>[19]</sup>的方法，对多糖进行甲基化分析。

### 1.3.8 三股螺旋结构测定

参考文献<sup>[20]</sup>的方法，采用刚果红实验进行三股螺旋结构测定。

### 1.3.9 扫描电子显微镜测定

将多糖样品置于样品台上，并使用扫描电子显微镜 (Scanning Electron Microscope, SEM) 进行测定。将导电膜粘附在样品架上，然后将少量多糖样品均匀地洒在表面上并通过二次电子信号成像进行观察<sup>[21]</sup>。

### 1.3.10 免疫活性测定

#### 1.3.10.1 RAW264.7 细胞培养

小鼠单核巨噬细胞系 RAW264.7 加入 DMEM 完全培养基 (含 10% 胎牛血清和质量分数为 1% 青霉素-链霉素双抗) 中，置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养，当细胞铺满培养瓶底部 80% 时进行传代<sup>[22]</sup>，将培养至对数生长期的细胞用于后续实验。

#### 1.3.10.2 细胞存活率的测定

RAW264.7 细胞在 96 孔板中培养，接种密度为每孔  $1 \times 10^4$  个。24 h 贴壁后分别加入 25、50、100 和 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 SPKP，每组样品设置 6 个平行。在 37 °C 下孵育 24 h 后每孔加入 10  $\mu\text{L}$  CCK8 试剂，在 37 °C 培养箱内孵育 1 h 后，用酶标仪检测其在 450 nm 波长处的吸光度。各处理组与空白对照组吸光度的比值  $\times 100\%$  即为细胞存活率。

#### 1.3.10.3 RAW264.7 细胞吞噬能力和 NO 浓度测定

参考文献<sup>[23]</sup>的方法，测定 RAW264.7 的吞噬能力以及 NO 含量。

## 1.4 数据处理

采用 Microsoft Excel 2016 软件处理数据，每组实验平行测定 6 次，结果以  $\bar{x} \pm s$  表示；采用 SPSS 26.0 软件进行数据统计学分析，采用方差分析、Duncan 多重范围检验差异显著性分析；使用 Origin 2023 软件进行图表绘制。

## 2 结果与分析

### 2.1 多糖基本成分及分子量分析

多糖的基本成分和分子量结果见表 1，通过苯酚硫酸法绘制的葡萄糖标准曲线为  $Y=0.0054X+0.0015$ ， $R^2$  为 0.9995 有较好的拟程度。测出 SPKP 多糖量为 94.05%。通过 DNS 法绘制的标注曲线为  $Y=0.4314X-0.0113$ ， $R^2$  为 0.9986。为测得还原糖含量为 4.1%。结合前期鉴定结果与 Liang 等<sup>[24]</sup>和 Wang 等<sup>[25]</sup>的研究可知，黄精的多糖含量丰富，容易提取且在醇沉、脱蛋白和透析之后就具有极高含糖量，因此本论文将该 SPKP 样品直接用于后续结构分析和活性实验。

多糖的分子量与其生物活性密切相关<sup>[26]</sup>，SPKP 的 HPGPC 色谱图见图 1。SPKP 的分子量分布范围较窄，且分子量普遍不高。分子量分布结果显示，SPKP 含有一类组分，数均分子量  $M_n$  为 3 156 u，重均分子量  $M_w$  为 3 820 u，多分散性为 1.21。

表 1 SPKP基本成分及分子量

Table 1 Basic composition and molecular weight of SPKP

	多糖含量 /%	还原糖 含量/%	数均分 子量/u	重均分 子量/u
SPKP	94.05 ± 1.4	4.1 ± 0.01	3 156	3 820

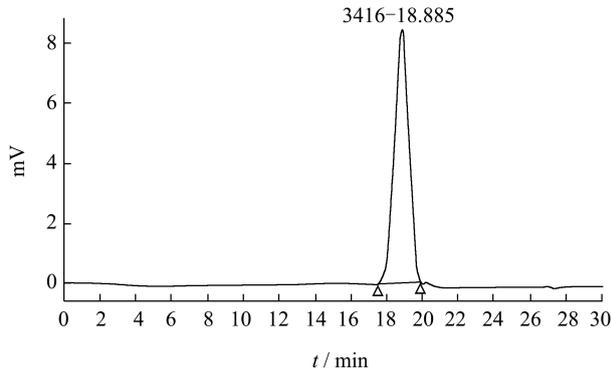


图 1 SPKP的分子量图谱

Fig.1 Molecular weight profile of polysaccharides of saccharify *P. kingianum* polysaccharide

2.2 傅立叶变换红外分析

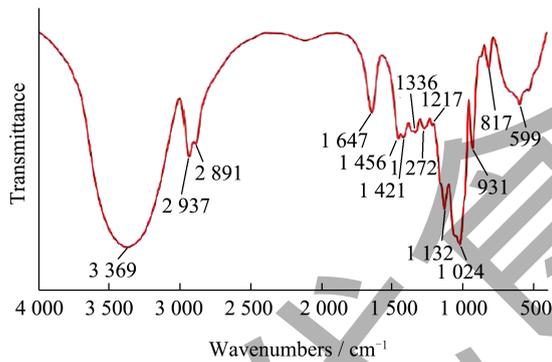


图 2 SPKP多糖的红外谱图

Fig.2 FT-IR spectra of SPKP

如图 2 所示, FT-IR 光谱显示出 4 000~400 cm<sup>-1</sup> 范围内多糖的典型吸收峰。SPKP 在 3 369 cm<sup>-1</sup> 处是 -OH 的特征吸收峰, 2 937 cm<sup>-1</sup> 处的特征吸收峰为 C-H 键, 在 1 016~1 147 cm<sup>-1</sup> 范围内则为吡喃糖单位特征峰, 与万晓莹<sup>[6]</sup>的研究结果相近。931 cm<sup>-1</sup> 处是吡喃糖形式的甘露糖和葡萄糖中 β 主导构型的代表<sup>[27]</sup>, 基于此可以推测 SPKP 中含有较多的甘露糖或葡萄糖。

2.3 单糖组成

如图 3 所示为标准样品离子色谱图, 横坐标为检测的保留时间 (Time, min)。根据单糖标准品的保留时间和峰面积, 可知 SPKP 由 5 种单糖组成的杂多糖, 单糖组成及摩尔比为: 阿拉伯糖:半乳糖:葡萄糖:甘露糖:果糖 = 0.032:0.117:0.419:0.048:0.383, 含

有较多的葡萄糖, 这与 2.2 中推测的结果一致。Li 等<sup>[28]</sup>研究的滇黄精多糖的单糖组成为甘露糖:葡萄糖:半乳糖:葡萄糖醛酸 = 1:7.22:0.16:0.05:0.02 (摩尔比), 与本研究结果有一定区别, 且不含果糖, 这可能是因为在本工艺下的黄精多糖在 α-淀粉酶和糖化酶的作用下进一步导致糖苷键断裂进一步分解转换成了葡萄糖或果糖, 从而导致 SPKP 的单糖组成以葡萄糖和果糖占比为主。

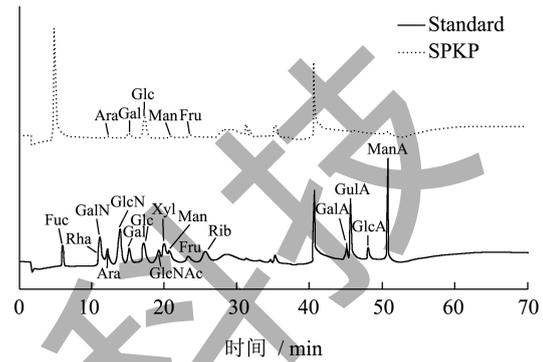


图 3 标准单糖混合物和SPKP多糖的离子色谱图

Fig.3 Ion chromatograms of standard monosaccharide mixtures and SPKP

2.4 一级分支结构分析

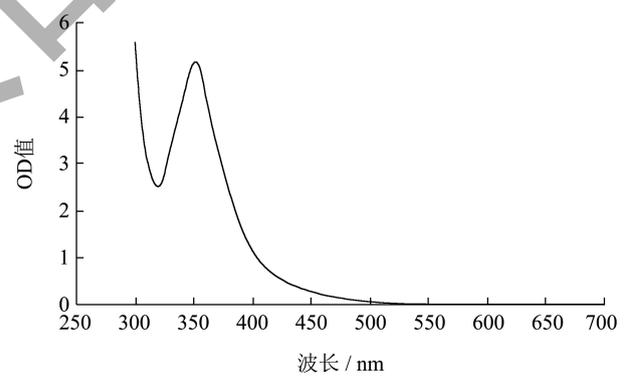


图 4 碘-碘化钾实验结果

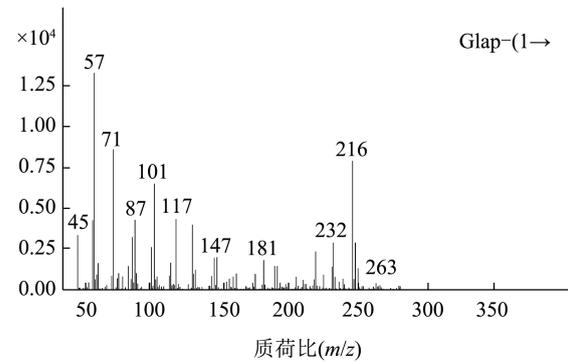
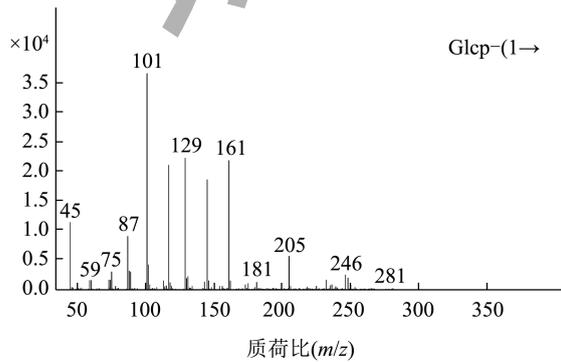
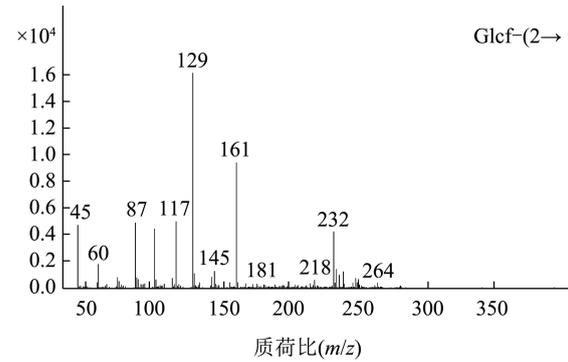
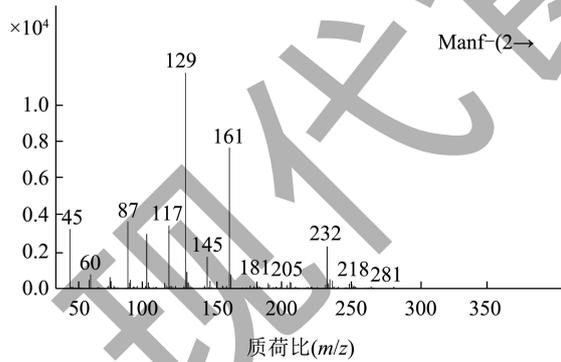
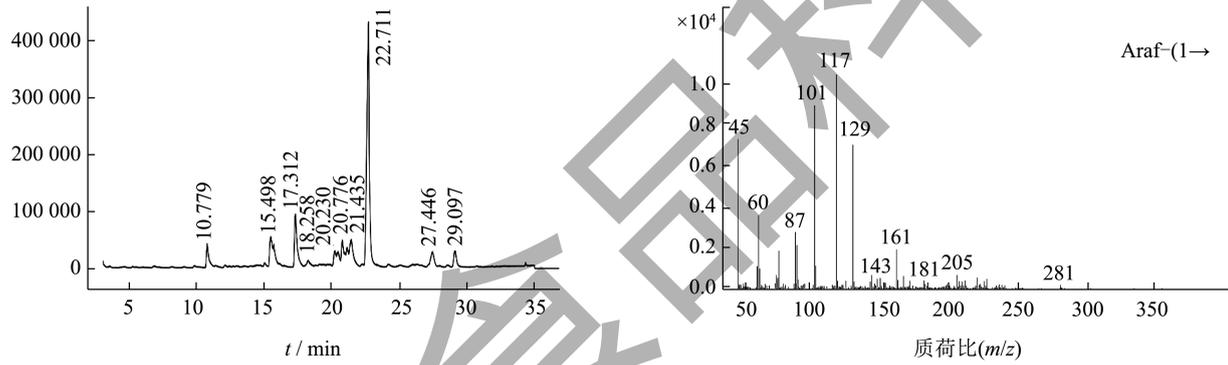
Fig.4 Results of the I<sub>2</sub>-KI experiments

多糖分子中含有许多羟基 (-OH) 官能团, 其中的部分羟基能够与碘化钾反应, 形成一种蓝黑色的多糖-碘络合物, 通过测量多糖-碘络合物的吸光度, 从而可以判断多糖的一级结构<sup>[29]</sup>。本实验中对 SPKP 和碘-碘化钾试剂混合后在 300~700 nm 范围内的扫描光谱进行了测量, 结果如图 4 所示。由图可知, SPKP 与碘-碘化钾试剂的反应液在 350 nm 波长附近处均有强吸收峰; 在 550 nm 处无吸收峰, 这表明 SPKP 可能存在复杂的链状结构, 其侧链较长、支链较多, 与王飞凤<sup>[30]</sup>研究的未酶解糖化的黄精多糖结果相近。

表 2 SPKP甲基化结果

Table 2 Methylation results of polysaccharides from SPKP

保留时间 /min	Methylated sugar	质量碎片 (m/z)	摩尔比	糖苷键类型
10.779	2,3,5-Me <sub>3</sub> -Araf	43,71,87,101,117,129,145,161	0.05	Araf-(1 →
15.498	1,3,4,5-Me <sub>4</sub> -Manf/Glcf	87,101,129,145,161	0.103	Fruf-(2 →
17.312	2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -GlcP	43,71,87,101,117,129,145,161,205	0.111	GlcP-(1 →
18.258	2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -GalP	43,71,87,101,117,129,145,161,205	0.011	GalP-(1 →
20.23	2,4,6-Me <sub>3</sub> -GlcP	43,71,87,99,101,129,145,161,189	0.022	→ 2)-GlcP-(1 →
20.451	3,4,6-Me <sub>3</sub> -ManP	43,87,129,161,189	0.026	→ 2)-ManP-(1 →
20.776	3,4,5-Me <sub>3</sub> -Manf/Glcf	43,71,87,99,101,129,145,161,189	0.069	→ 1)-Fruf-(2 →
21.435	2,3,6-Me <sub>3</sub> -GalP	43,87,99,101,113,117,129,131,161,173,233	0.071	→ 4)-GalP-(1 →
22.71	2,3,6-Me <sub>3</sub> -GlcP	43,87,99,101,113,117,129,131,161,173,233	0.471	→ 4)-GlcP-(1 →
27.446	2,4-Me <sub>2</sub> -GlcP	43,87,117,129,159,189,233	0.035	→ 3,6)-GlcP-(1 →
29.097	2,4-Me <sub>2</sub> -GalP	43,87,117,129,159,189,233	0.031	→ 3,6)-GalP-(1 →



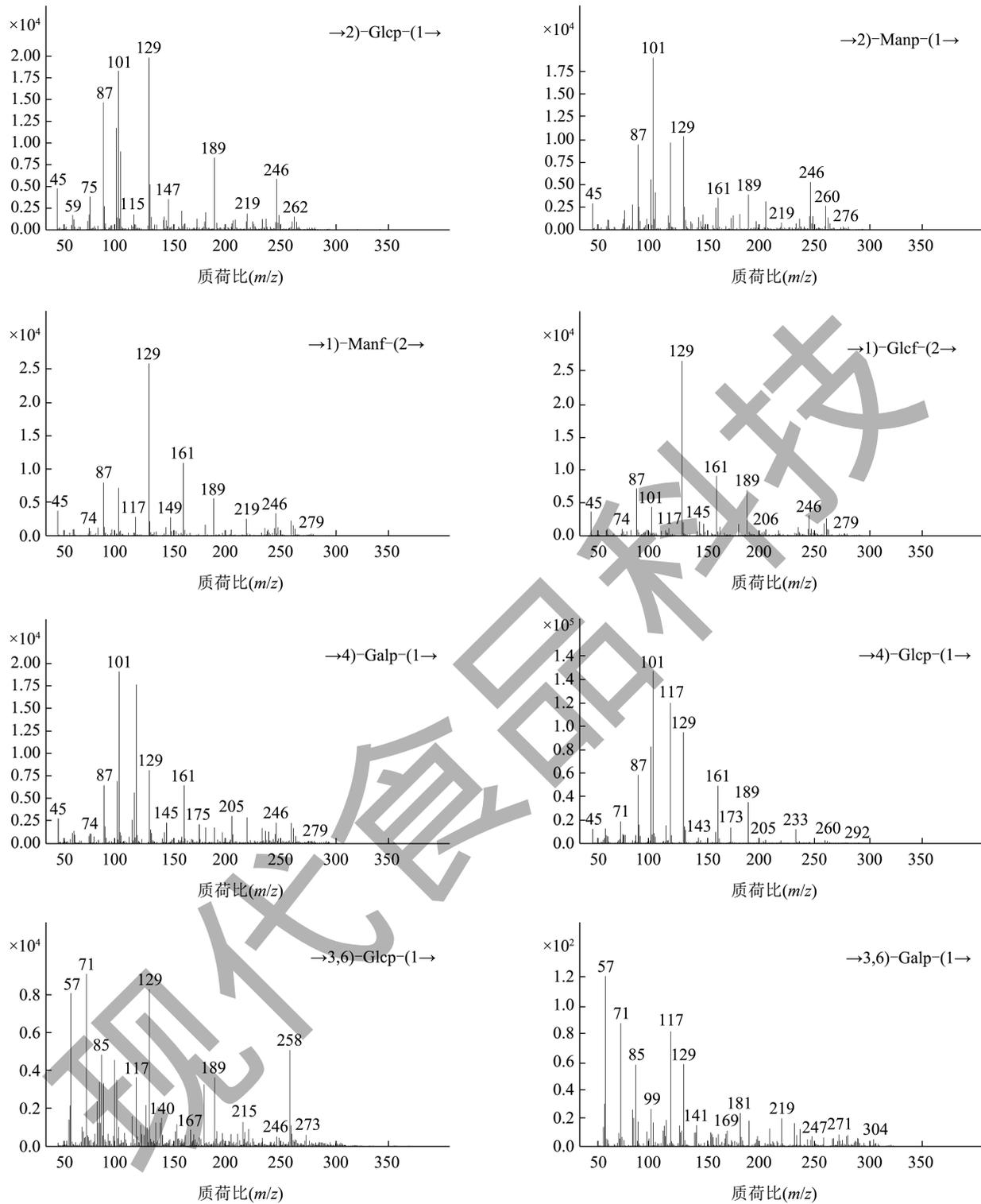


图 5 SPKP甲基化结果

Fig.5 Methylation results of SPKP

### 2.5 甲基化结果分析

将多糖进行甲基化和衍生化后得到糖精乙酸酯衍生物再通过 GC-MS 从而确定其糖苷键的连接方式<sup>[31,32]</sup>。图 5 为 SPKP 的甲基化 GC-MS 图，从单糖组成结果可知 SPKP 含有果糖，由于果糖为酮糖，

在还原过程中会异构化成甘露糖和葡萄糖，得到的甲基糖苷异构化成呋喃环的甘露糖苷和葡萄糖苷。因此，将  $\text{Manf}-(2\rightarrow$ 、 $\text{GlcF}-(2\rightarrow$ 、 $\rightarrow 1)-\text{Manf}-(2\rightarrow$  和  $\rightarrow 1)-\text{GlcF}-(2\rightarrow$  的糖苷键整合得到  $\text{Fruf}-(2\rightarrow$  和  $\rightarrow 1)-\text{Fruf}-(2\rightarrow$ ，结果如表 2 所示。结合表 2

和 2.3 单糖组成的结果可知, SPKP 中的单糖以葡萄糖为主, 所以其主要的糖苷键连接方式为  $\rightarrow 4\text{-GlcP-(1}\rightarrow$  (占 47.1%)。根据 DB (分支度) = (末端残基 + 分支残基) / (末端残基 + 分支残基 + 线性残基) 计算 SPKP 的分支度 (DB) 值分别为 34.1%, 结果表明 SPKP 存在复杂的分支结构, 与 2.4 中推测的结果一致。

### 2.6 三股螺旋结构分析

刚果红是一种生物染色剂, 它能够与多糖中的单股螺旋结构结合成复合物, 使反应溶液的最大吸收波长随着单股螺旋结构浓度的升高而变大。在一定的碱性体系中, 多糖中的三股螺旋结构发生解聚, 使单股螺旋结构的浓度增大, 反应溶液的最大吸收波长也会发生变化<sup>[33]</sup>。对于 SPKP, 图 6 显示它在 NaOH 浓度分别为 0.2-0.3 mol/L 范围时, 表现出紫外最大吸收光的增加, 且发生了明显红移, 表明样品与刚果红发生了络合反应。但随着浓度的继续增加, 在强碱条件下多糖螺旋结构可能解体成无规则的单股线团, 不能与刚果红反应生成络合物, 多糖最大吸光值相应减少, 由此推测 SPKP 存在三螺旋结构。

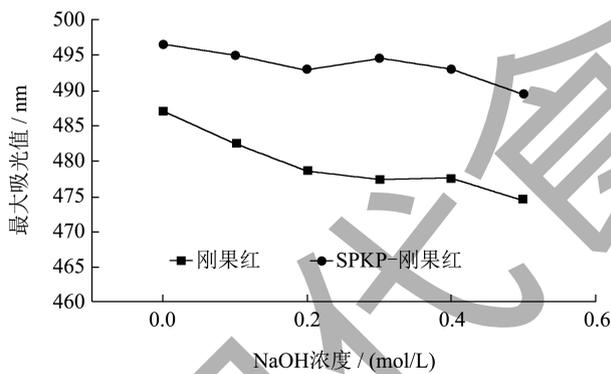


图 6 刚果红实验结果

Fig.6 Results of the Congo red experiment

### 2.7 SEM 分析

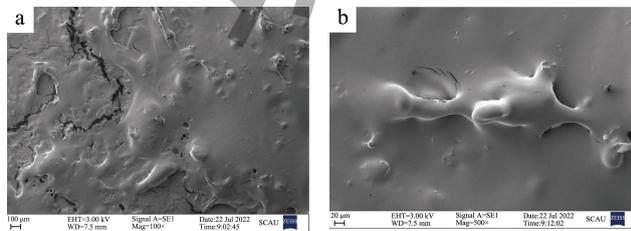


图 7 黄精多糖样品的扫描电镜图

Fig.7 SEM result of the SPKP

注: a、b 分别为 SPKP 在电子显微镜下放大 100 和 500 倍的表面形态图。

SEM 技术通常用于观察多糖的表面形态。如图 7 所示, SPKP 的表面较光滑, 有鼓起部分, 凹凸不平, 与 Liu 等<sup>[34]</sup>的未酶解糖化的黄精多糖结构相比, 无明显结构特征, 方晨璐等<sup>[35]</sup>发现酶的种类、单一与复合作用都会影响到分子表面形态。SPKP 可能其表面结构可能受到了酶解条件的影响。综上, 不同的炮制方法是影响其表面形态的关键因素。

### 2.8 SPKP 对 RAW264.7 免疫细胞活性影响

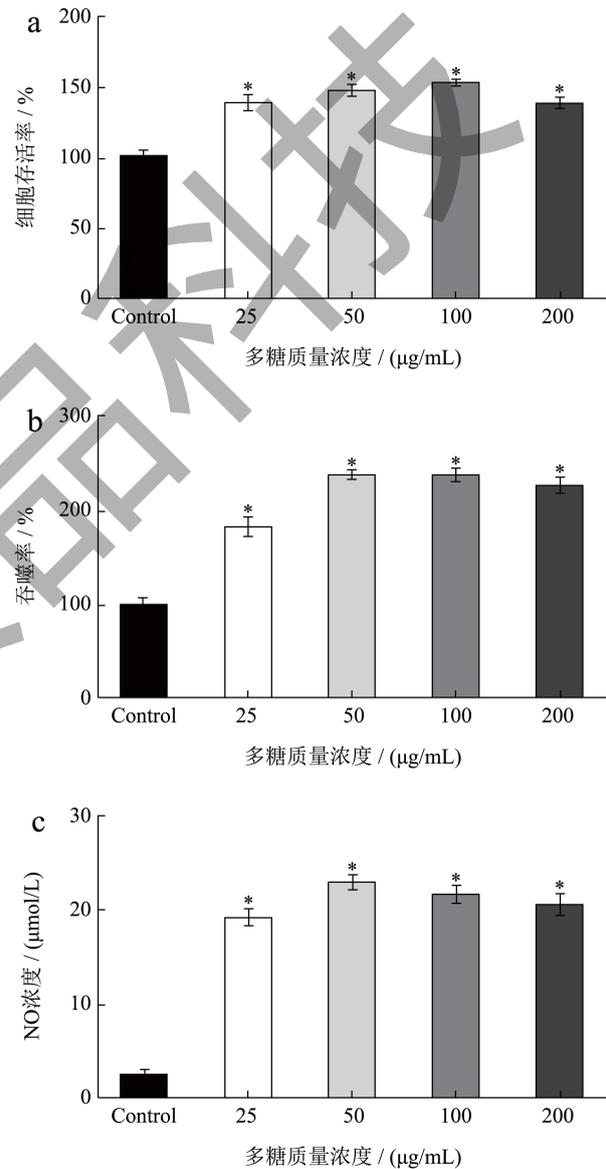


图 8 不同浓度的多糖对细胞增殖 (a)、吞噬能力 (b)、和 NO (c) 的影响

Fig.8 Effect of the polysaccharide on the viability (a), phagocytosis (b), production of NO (c) of RAW264.7 cells with different concentrations.

注: \* 表示与 control 组相比,  $P < 0.05$ 。

如图 8a 所示, 与空白对照组相比 SPKP 能显著促进细胞的增殖 ( $P<0.05$ ), SPKP 在 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时细胞活力最高, 达到 153.77%, 在 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  处均有一定程度下降但仍保持较高的细胞存活率, 说明在一个较广的给药范围内, SPKP 仍未见对细胞存活造成明显影响, 说明本文研究的两种多糖对 RAW264.7 细胞有较优的安全性。

以吞噬形式存在的细胞外物质是巨噬细胞效应或活动的关键指标; 一氧化氮 (NO) 作为一种重要的信号转导介质, 在免疫系统中发挥着重要作用, 当巨噬细胞被激活后, 会产生 NO, 并与超氧阴离子自由基反应形成过氧亚硝基阴离子, 以帮助机体对抗外来抗原, 实现免疫调节作用<sup>[23]</sup>。由图 8b、c 可知, 当质量浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, SPKP 的吞噬率和 NO 水平达到最优效果, 分别为 239.24% 和 22.95  $\mu\text{mol}/\text{L}$ , 但随着质量浓度的提高, 其效果均有所降低。然而, 与正常组相比, SPKP 在各浓度下均能刺激细胞的吞噬活性 ( $P<0.05$ ) 和促进 NO 水平 ( $P<0.05$ )。综上所述, 本研究中 SPKP 具有效果较好的吞噬能力和 NO 分泌能力。

### 2.9 SPKP 对免疫活性的构效关系分析

多糖的免疫活性与其分子量、单糖组成、化学官能团等结构特征密切相关。通常, 多糖的分子量是影响其在水溶液中构型和形态的主要因素之一, 低分子量多糖可以穿越细胞膜进入细胞内从而直接刺激启动免疫应答<sup>[36]</sup>, 因此, 低分子量 SPKP 可能通过直接刺激途径激活 RAW264.7 细胞, 促进其增殖并分泌 NO。有关研究<sup>[37,38]</sup>发现, 含有半乳糖、葡萄糖、阿拉伯糖、甘露糖等的多糖能更好的被巨噬细胞受体识别, 发挥免疫活性, 而 Fu 等<sup>[39]</sup>也发现以 (1 $\rightarrow$ 4) 糖苷键连接甘露糖 (Manp) 和葡萄糖 (Glc) 为主的多糖, 具有良好的免疫调节作用。单糖组成和甲基化的结果表明 SPKP 中葡萄糖和甘露糖的占比较高且主要糖苷键连接类型为  $\rightarrow$  4)-Glc-(1 $\rightarrow$ , 这可能是 SPKP 具有较好免疫功效的原因之一; 同时三股螺旋构象因其丰富的游离羟基和疏水空腔也被认为拥有与巨噬细胞受体相互作用的可能。

## 3 结论

本实验研究了酶解糖化后的滇黄精多糖的结构与免疫活性, 提取到了一种具有复杂分支和三股螺旋结构的葡聚糖 SPKP, 其单糖组成主要为甘露糖

和葡萄糖,  $\rightarrow$  4)-Glc-(1 $\rightarrow$ 糖苷键为主要的连接方式。RAW264.7 细胞实验结果可以推测出 SPKP 有较好明显的免疫功效。这些结果丰富了新炮制方法下黄精多糖结构研究的知识, 为黄精新炮制工艺的研究提供了参考。然而, 对于新炮制方法下的黄精多糖, 我们仍需进一步探索其结构与活性关系以更好地了解其免疫调节机制。

## 参考文献

- [1] 梁泽华,潘颖洁,邱丽媛,等.基于UPLC-Q-TOF-MS/MS分析黄精九蒸九晒炮制过程中化学成分的变化[J].中草药,2022,53(16):4948-4957.
- [2] 张凯,张昭,范永芳,等.药食同源药材黄精玉竹营养及生物活性成分分析[J].中国现代中药,2022,24(8):1463-1472.
- [3] ZHAO X, LI J. Chemical constituents of the genus polygonatum and their role in medicinal treatment [J]. Natural Product Communications, 2015, 10(4): 683-688.
- [4] LU G, SHENG H Z, XIANG L Y, et al. Immunomodulation and antitumor activity by a polysaccharide-protein complex from *Lycium barbarum* [J]. International Immunopharmacology, 2004, 4(4): 563-569.
- [5] OOI V E, LIU F. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes [J]. Current Medicinal Chemistry, 2000, 7(7): 715-729.
- [6] 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.
- [7] LIU N, DONG Z, ZHU X, et al. Characterization and protective effect of *Polygonatum sibiricum* polysaccharide against cyclophosphamide-induced immunosuppression in Balb/c mice [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 107: 796-802.
- [8] 马高兴,王晗,杨文建,等.不同提取工艺对杏鲍菇多糖结构特征及免疫活性的影响[J].食品科学,2022,43(17):42-49.
- [9] 殷红,赵时荆,韩姗姗,等.木耳多糖提取分离纯化、结构表征及生物活性研究进展[J].食品工业,2022,43(8):269-273.
- [10] 王俊英,孔显良. $\alpha$ -淀粉酶、糖化酶在食品工业中应用的现状和展望[J].微生物学通报,1987,3:140-141,35.
- [11] 杜冰,黄俊源,黎攀,等.一种黄精酶解糖化的炮制工艺:中国,CN114601898A [P]. 2022-06-10.
- [12] ZUMAN D, CHUN C, QIANG H, et al. Comparative study on the effect of extraction solvent on the physicochemical properties and bioactivity of blackberry fruit polysaccharides [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 183(31): 1548-1559.
- [13] CHUNFEI Z, TIAN W, HAIMING C, et al. Structural characterization and immunoregulatory activity of

- polysaccharides from *Dendrobium officinale* leaves [J]. Journal of Food Biochemistry, 2022, 46(1): e14023.
- [14] MICHEL D, GILLES K A, HAMILTON J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. Analytical Chemistry, 1956, 28(3): 350-356.
- [15] PING Z, XIA L, YING W, et al. Characterisation and saccharide mapping of polysaccharides from four common *Polygonatum* spp [J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 233(1): 115836.
- [16] 李环,陆佳平,王登进.DNS法测定山楂片中还原糖含量的研究[J].食品工业科技,2013,34(18):75-77.
- [17] LI M, LIU Y, ZHANG H, et al. Anti-cancer potential of polysaccharide extracted from *Polygonatum sibiricum* on HepG2 cells via cell cycle arrest and apoptosis [J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 938290.
- [18] GUO H, SUN M, ZHOU T T. Methods for the determination of fungal polysaccharides content [J]. Advances in Analytical Chemistry, 2017, 7(1): 9-15.
- [19] WU R, LI P, WANG Y, et al. Structural analysis and anti-cancer activity of low-molecular-weight chondroitin sulfate from hybrid sturgeon cartilage [J]. Carbohydrate Polymers, 2022, 275: 118700.
- [20] 曾丽萍.乳酸芽孢杆菌发酵液对山药护色及其对山药多糖结构及活性影响研究[D].广州:华南农业大学,2019.
- [21] WANG S, LI G, ZHANG X, et al. Structural characterization and antioxidant activity of *Polygonatum sibiricum* polysaccharides [J]. Carbohydrate Polymers, 2022, 291: 119524.
- [22] 方瑶,毛旭虎.小鼠巨噬细胞RAW264.7的培养技巧及经验总结[J].现代生物医学进展,2012,12(22):4358-4359.
- [23] 王妍.党参多糖CPC的结构解析及其免疫活性研究[D].太原:山西医科大学,2021.
- [24] LIANG J, XU R J, ZONG K, et al. Structural analysis and anti-obesity effect of *Polygonatum cyrtoneura* polysaccharide against obesity induced by high-fat diet in mice [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2021, 56(9): 4473-4483.
- [25] WANG J, WANG F R, YUAN L X, et al. Blood-enriching effects and immune-regulation mechanism of steam-processed *Polygonatum sibiricum* polysaccharide in blood deficiency syndrome mice [J]. Frontiers in Immunology, 2022, 13: 813176.
- [26] HU D J, CHEONG K L, ZHAO J, et al. Chromatography in characterization of polysaccharides from medicinal plants and fungi [J]. Journal of Separation Science, 2013, 36(1): 1-19.
- [27] TIAN W, LIWEI D, SIMING L, et al. Effect of *Bacillus* sp. DU-106 fermentation on *Dendrobium officinale* polysaccharide: Structure and immunoregulatory activities [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 135(15): 1034-1042.
- [28] LI R, TAO A, YANG R, et al. Structural characterization, hypoglycemic effects and antidiabetic mechanism of a novel polysaccharides from *Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2020, 131: 110687.
- [29] JI X L, HOU C Y, YAN Y Z, et al. Comparison of structural characterization and antioxidant activity of polysaccharides from jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) fruit [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 149: 1008-1018.
- [30] 王飞凤.黄精中性多糖的分离纯化、结构鉴定及其体外活性研究[D].杭州:浙江理工大学,2021.
- [31] 姜浩,高佳宁,李野,等.甲基化分析在6种中药多糖结构表征中的研究进展 [J].中医药学报,2022,50(3):91-96.
- [32] 李娜,李菁,刘雪,等.抗凝血活性海洋硫酸多糖HP1-1的结构研究[J].中国海洋药物,2015,34(5):7-12.
- [33] 杨文丽,杨波,杨光.纳豆多糖的理化性质及结构分析[J].食品与发酵工业,2019,45(20):132-137.
- [34] LIU J, LI T, CHEN H, et al. Structural characterization and osteogenic activity *in vitro* of novel polysaccharides from the rhizome of *Polygonatum sibiricum* [J]. Food & Function, 2021, 12(14): 6626-6636.
- [35] 方晨璐,黄峻榕,任瑞珍,等.酶解薯类淀粉适用于电镜观察其颗粒表面及内部结构[J].农业工程学报,2018,34(22):306-312.
- [36] 仇玉洁.菱角多糖的超声提取、结构表征及其对巨噬细胞免疫激活效应的研究[D].镇江:江苏大学,2022.
- [37] ZENG Y J, YANG H R, OU X Y, et al. Fungal polysaccharide similar with host *Dendrobium officinale* polysaccharide: Preparation, structure characteristics and biological activities [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 141: 460-470.
- [38] 陈诺,席文杰,胡美芬,等.多糖免疫调节作用与结构关系研究进展[J].中国中药杂志,2023,48(10):2667-2678.
- [39] FU Y P, LI C Y, PENG X, et al. Polysaccharides from *Aconitum carmichaelii* leaves: Structure, immunomodulatory and anti-inflammatory activities [J]. Carbohydrate Polymers, 2022, 291: 119655.