

东革阿里多糖对红细胞氧化溶血的保护作用

贺萍¹, 王倩¹, 张猛猛¹, 詹麒平¹, 赖富饶¹, 闵甜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: 采用超声结合水提的方法提取东革阿里的多糖, 通过 $L_9(3^4)$ 正交试验确定最佳提取条件。利用柱层析纯化得到一种含糖醛酸的新型多糖组分 Ali-1; 通过分子量检测和单糖组成分析对 Ali-1 进行基本结构表征; 采用氧自由基吸收能力(ORAC)和人血红细胞溶血模型测定多糖的抗氧化活性, 并同时测定红细胞内活性氧物质(ROS)、丙二醛(MDA)水平和过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)抗氧化酶活力的变化。结果表明: 东革阿里多糖最佳提取条件为料液比 1:40、浸提温度 95 °C、超声波破碎功率 300 W、浸提时间 2 h, 最适条件下东革阿里的粗多糖得率为 10.09%; Ali-1 的平均分子量为 14.3 ku, 主要由木糖、阿拉伯糖、葡萄糖醛酸和半乳糖醛酸组成, 其摩尔比为: 4.43:1.10:1:1.14; Ali-1 的 QRAC 值为 $302.48 \pm 2.71 \mu\text{mol Trolox/g}$, 且 Ali-1 的预处理使得 AAPH 损伤的人血红细胞内的 ROS 和 MDA 水平降低, 使红细胞恢复到正常状态; 虽 SOD、GSH-Px 和 CAT 平均酶活力降低, 但结果表明较弱的红细胞也受到了保护。综上所述, 经分离纯化后的东革阿里多糖组分 Ali-1 可以保护人血红细胞免受 AAPH 的损伤, 具有较好的抗氧化活性。

关键词: 多糖; 东革阿里; 分离纯化; 氧化溶血

文章编号: 1673-9078(2019)06-30-38

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.6.005

Protective Effects of a Polysaccharide from *Eurycoma longifolia* against Oxidative Stress-induced Erythrocyte Hemolysis

HE Ping¹, WANG Qian¹, ZHANG Meng-meng¹, ZHAN Qi-ping¹, LAI Fu-rao¹, MIN Tian¹, ZHANG Xiao-yuan², WU Hui^{1,2}

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

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

Abstract: A crude polysaccharide extract was obtained from *Eurycoma longifolia* via ultrasound-assisted water extraction, and the optimal extraction conditions were determined by the $L_9(3^4)$ orthogonal test. A novel polysaccharide component containing uronic acid, Ali-1, was obtained through purification by column chromatography. The basic structure of Ali-1 was determined through analyses of its molecular weight and monosaccharide composition. The antioxidant activity of Ali-1 was evaluated based on the oxygen radical absorption capacity (ORAC), as well as the changes in the levels of reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA) and catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) of red blood cells in the human erythrocyte hemolysis model. The results showed that the optimal extraction conditions for the crude polysaccharide were: ratio of material to liquid 1:40, extraction temperature 95 °C, ultrasonic power 300 W, extraction time 2 h. The yield of the crude polysaccharide from *Eurycoma longifolia* was 10.09% under the optimum conditions. Ali-1 had an average molecular weight of 14.3 ku and was mainly composed of xylose, arabinose, glucuronic acid and galacturonic acid at a molar ratio of 4.43:1.10:1:1.14. The ORAC value of Ali-1 was $302.48 \pm 2.71 \mu\text{mol Trolox equivalents/g}$. Pretreating with Ali-1 could effectively reduce the levels of MDA and ROS in the 2-2'-azo-bis-(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)-injured erythrocytes, restore the erythrocytes to the normal state, and protect the weak erythrocytes (even though their average SOD, GSH-Px and CAT activities decreased). In summary, the isolated and purified polysaccharide Ali-1 from *Eurycoma longifolia* can protect human red blood cells against AAPH-induced injury and exhibit good antioxidant activity.

收稿日期: 2018-11-07

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

作者简介: 贺萍 (1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 天然产物化学

通讯作者: 吴晖 (1967-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品安全与天然产物化学

Key words: polysaccharide; *Eurycoma longifolia*; isolation and purification; oxidative stress-induced hemolysis

东革阿里(*Eurycoma longifolia*)为苦木科东革阿里属植物,主要分布于东南亚国家,与燕窝、锡器一起并称为马来西亚三大国宝,有“马来西亚人参”之称^[1]。作为东南亚地区著名的传统草药,全株均可入药但常以根为主要药用部分,具有催情、改善男性性功能障碍、抗疟疾等功效。由于其特殊的作用,近年来对东革阿里的研究,特别是对东革阿里中活性物质的结构和功能的研究日益增加。据报道,东革阿里根提取物主要用于治疗性功能勃起障碍,疟疾,还能提升人体机能、抗焦虑、抗骨质疏松、镇痛抗炎抗菌、抗寄生虫、及治疗糖尿病等^[2-5],其还具有丰富的生物活性成分,如生物碱,苦木素二萜类和联二苯类等化合物^[6,7]。

目前国内外研究认为,东革阿里的抗癌和催情功能的主要活性物质来源于宽缙酮^[8]。然而癌症,生殖健康和人体免疫是相互关联的,植物多糖被认为是具有较强免疫调节活性的天然产物^[9],因此多糖类组分也可能是东革阿里中发挥功效的生物活性成分之一。多糖是具有特殊生理活性的植物提取物,然而,关于东革阿里的多糖及其活性的报道很少,目前尚没有关于其活性的相关研究。此外,多糖的各种生理活性往往与其是否含糖醛酸、糖苷键类型、空间结构有关^[9],故多糖结构表征对于解释多糖的生理活性的机制特别重要。目前,东革阿里多糖组分的分子量,单糖组成,糖苷键类型和其他基本结构信息仍然未知。

在过去关于植物多糖抗氧化活性的文献中,主要以清除自由基和测定还原能力等来评估抗氧化能力。然而此类方法具有较大的检测局限性,比如不能评价样品对机体的内毒性及抗氧化功效,测定不同类自由基反应体系会让抗氧化活性结果出现较大差异。故以机体细胞为承载体的体外细胞模型评价的方法拥有更完整的活性作用网络,且结果的认可度相对较高^[10]。据报道,机体的红细胞有典型生物体的细胞膜结构,偶氮引发剂 2,2'-偶氮(二异丁基脒)二盐酸盐(AAPH)在体外诱导的氧化应激环境会使它发生氧化溶血,因红细胞本身不含有细胞核和复杂的代谢途径,可排除了自身的干扰因素,是目前评价抗氧化活性的理想模型^[11,12]。而且 AAPH 受热分解后生成相对稳定的过氧自由基,引发自由基链式反应,产生更多种类的自由基,更接近于机体内的情况。因此,本文在测定 ORAC 指标的基础上,以人红细胞为模型,研究在 AAPH 诱导产生的自由基的损伤下, Ali-1 的抗氧化活性。

本研究中,从东革阿里中提取并纯化了一种新型的多糖组分 Ali-1,对 Ali-1 进行了基本的结构表征,

并采用人血红细胞溶血模型评估了 Ali-1 的抗氧化活性,实验结果为未来的探索东革阿里此类中草药类来品提供研究新方向,并为东革阿里多糖在食品和医药领域的应用与开发提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

东革阿里树根(产自马来西亚),粉碎过筛,密封干燥备用,购于浙江宁波立华植物提取技术有限公司。

DEAE-Sepharose Fast Flow 填料购自上海源叶生物科技有限公司; Sephadex G-50 购自广州昂飞有限公司; 人血细胞,广州鸿泉生物科技有限公司; 2,2'-偶氮(二异丁基脒二盐酸盐) AAPH,上海麦克林生化科技有限公司; PBS,美国 Hyclone 公司; 总蛋白(CBA)、MDA、SOD、CAT、GSH-Px 等试剂盒购自南京建成生物科技有限公司; 其余试剂均为分析纯。

标准品:标准单糖(木糖,鼠李糖,岩藻糖,甘露糖,阿拉伯糖,葡萄糖,半乳糖,半乳糖醛酸和葡萄糖醛酸)购自 Sigma 公司。

1.2 仪器与设备

SCIENTZ-18N 低温冷冻干燥机,宁波新芝生物科技股份有限公司; 6CE-60F-717P 型高效液相色谱仪,美国 Waters 公司; 752s 型紫外-可见分光光度计,上海凌光技术有限公司; 1420 多微孔板检测器-酶标仪,美国 Perkin Elmer 公司; 凝胶渗透色谱仪和液相色谱仪,美国 Waters 公司等。

1.3 试验方法

1.3.1 试验流程

东革阿里根→粉碎过筛→回流脱脂→超声辅助热水浸提→Sevage 法除蛋白→吸取水相提取液→离心取上清液→醇沉→离心取沉淀→复溶透析→冷冻干燥→粗多糖

粗多糖→离子交换柱层析→凝胶柱层析→苯酚硫酸法追踪含量→收集洗脱组分→冷冻干燥→Ali-1→纯度鉴定→紫外全波段扫描→分子量鉴定→单糖组成分析

Ali-1→氧自由基吸收能力(ORAC)测定→抗 AAPH 诱导红细胞氧化溶血检测→细胞内 ROS 水平、MDA 含量、CAT、SOD 和 GSH-Px 活力检测

1.3.2 东革阿里多糖提取优化试验

选取物料比(1:10、1:20、1:30、1:40、1:50)、浸提温度(55、65、75、85、95 °C)、超声强度(150、300、

450、600、750 W)、浸提时间(1、2、3、4、5 h)为四因素并设置相关水平参数进行单因素试验,结合粗多糖得率和经济效率的角度,选取四因素最优的三水平。在单因素试验基础上,根据表1进行东革阿里多糖提取的 $L_9(3^4)$ 正交试验,同样以粗多糖得率为参考指标,按公式(1)计算,优化提取条件,最后得到一条经济适用且多糖得率高的东革阿里多糖提取工艺。

粗多糖得率/%=冻干后粗多糖质量(g)/东革阿里样品质量(g) (1)

表1 $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels in the $L_9(3^4)$ orthogonal array design

水平	A 物料比 (W/W)	B 浸提 温度/°C	C 超声 强度/W	D 浸提 时间/h
1	1:20	75	150	2
2	1:30	85	300	3
3	1:40	95	450	4

1.3.3 东革阿里粗多糖分离

将干燥的东革阿里树根粉碎过筛后,加入75%乙醇,冷凝回流2 h进行脱脂、脱色素处理。按正交试验优化的最佳工艺条件:料液比1:40,在超声功率为300 w,温度为95 °C水中浸提2 h,离心后收集上清液,在60 °C减压下真空浓缩;用Sevag法除去蛋白质,去除中间有机相与水相交界面乳化层,合并上清液;接着用乙醇(1:4, V/V)醇沉8 h,离心后取沉淀物,用蒸馏水复溶,透析48 h后冻干得东革阿里粗多糖。

1.3.4 东革阿里粗多糖纯化

将粗多糖与水一起配制成溶液(10 mg/mL),并以1 mL/min的流速载入DEAE-Sepharose Fast Flow(3.6 cm×20 cm)纤维素阴离子交换层析柱中,分别用蒸馏水和0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 M NaCl溶液梯度洗脱,每管收集10 mL,通过苯酚硫酸法测定每管洗脱组分的多糖含量,在490 nm采用酶标仪检测的吸光值。将收集的组分进行旋转蒸发并透析48 h后冷冻干燥,收集干燥多糖粉末。

为了获得更高纯度的多糖,继续使用Sephadex G-50柱(1.6×85 cm),使用蒸馏水以0.3 mL/min的流速将该上步骤纯化粉末(10 mg)进一步加载到柱中,苯酚-硫酸法跟踪显色,将收集的组分进行旋转蒸发并透析48 h后冷冻干燥,得到东革阿里多糖组分Ali-1。

1.3.5 分子量测定

采用高效凝胶渗透色谱法^[13]对Ali-1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 水相滤膜,上样20 μL ,检测45 min,色谱条件:TSK G-5000PWXL凝胶柱(7.8 nm×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。

1.3.6 单糖组成测定

由于样品中糖醛酸存在,单糖组成分析使用PMP-HPLC法^[14]进行。使用安瓿瓶将样品(10 mg)溶解在4 mL 2 mol/L三氟乙酸(105 °C, 4 h)中,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次以完全去除残留的TFA。

将酸水解产物与PMP进行衍生化反应,置于95 °C下恒温震荡反应30 min反应完后冷却,最终生产PMP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使用液相色谱进行检测。

操作条件如下:氨基柱(4.6×250 mm, 5 μm),速度为1.0 mL/min,进样体积为10 μL 。木糖,鼠李糖,岩藻糖,甘露糖,阿拉伯糖,葡萄糖,半乳糖,半乳糖醛酸和葡萄糖醛酸用作单糖标准品。

1.3.7 氧自由基吸收能力(ORAC)测定

ORAC的评价方法参考Lin等^[15]的方法,并加以改进。以用PBS梯度稀释水溶性维生素E Trolox为标准品,建立标准曲线,Trolox的浓度梯度为0、20、40、60、80、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 。在洁净的96孔板的微孔中分别加入一定浓度的东革阿里多糖样品20 μL ,加入75 mmol/L pH=7.4的磷酸盐缓冲液20 μL ,以及浓度为70 nmol/L的荧光素钠溶液20 μL ,将96孔板放在酶标仪中,37 °C下保温15 min,加入140 mmol/L 140 μL AAPH后,开始计时反应并读数(f_0),设定激发波长为485 nm、发射波长为538 nm,每1 min读一次数(f_1, f_2, \dots, f_{100}),共读101次数(测定100 min)。将记录的各微孔不同时间点的绝对荧光强度数据 f_i 与初始荧光强度 f_0 作比折算成相对荧光强度,根据公式(2)统计荧光熄灭曲线下面积AUC值,然后根据公式(3)计算样品的Net AUC值。

$$\text{AUC}=0.5(f_0+f_{100})+(f_1+f_2+\dots+f_{99}) \quad (2)$$

$$\text{Net AUC}=\text{AUC}_{\text{sample}}-\text{AUC}_{\text{blank}} \quad (3)$$

Trolox浓度与其Net AUC成正比,根据Trolox标准曲线,将样品Net AUC代入,根据其线性回归方程计算东革阿里多糖对氧自由基吸收能力的ORAC值,即:每g样品相当于Trolox的量($\mu\text{mol Trolox/g}$)。

1.3.8 Ali-1对红细胞的氧化溶血率测定

1.3.8.1 实验组设计

参考文献^[16]报道的方法稍作修改,取含肝素抗凝剂的人全血10 mL在4 °C、1200 g离心10 min,使红细胞和血浆分离;加入适量pH 7.4的PBS缓冲液清洗

红细胞沉淀至上清液澄清透明。吸取一定量红细胞沉淀，用 PBS 缓冲液稀释成约为 20% 红细胞悬液。

将实验设计为以下五组进行对应指标的测定，培养条件均为 37 °C 摇床，200 r/min，避光振荡预培养 30 min:

阴性对照 A 组: 加入 0.2 mL 红细胞悬液和 0.2 mL PBS→培养→加入 0.4 mL PBS;

阳性对照 B 组: 加入 0.2 mL 红细胞悬液和 0.2 mL PBS→培养→加入 0.4 mL AAPH;

样品保护 C 组: 加入 0.2 mL 红细胞悬液和 0.2 mL 不同浓度样品溶液→培养→加入 0.4 mL AAPH;

毒性对照 D 组: 加入 0.2 mL 红细胞悬液和 0.2 mL 样品溶液→培养→加入 0.4 mL PBS;

全溶血 E 组: 加入 0.2 mL 红细胞悬液和 0.2 mL 蒸馏水→培养→加入 0.4 mL 蒸馏水。

1.3.8.2 红细胞溶血率测定

将上述 1.3.8.2 中所有实验组置于 37 °C 摇床 180 r/min 振荡反应 2 h，加入 5 mL PBS 进行稀释，离心后吸取 200 μL 上清液至酶标板中，540 nm 处检测其吸光值分别为 A_a 、 A_b 、 A_c 、 A_d 和 A_e 。红细胞溶血率的计算公式(4~7)分别为:

$$\text{样品保护组溶血率}\% = A_c/A_e \times 100 \quad (4)$$

$$\text{阳性对照组溶血率}\% = A_b/A_e \times 100 \quad (5)$$

$$\text{阴性对照组溶血率}\% = A_a/A_e \times 100 \quad (6)$$

$$\text{毒性对照组溶血率}\% = A_d/A_e \times 100 \quad (7)$$

1.3.9 红细胞内总蛋白、ROS、MDA 含量及抗氧化酶活力变化的测定

将经 1.3.9 处理后的红细胞用 PBS 洗涤 2~3 次，加入约 4 倍体积超纯水裂解细胞，冰浴 10 min 后于 4 °C、1200 g 离心 5 min，上清液-80 °C 冰箱保存备用，用 BCA 蛋白浓度测试盒测定样品的总蛋白含量；用活性氧(ROS)测试盒测定红细胞内 ROS 水平的变化；用丙二醛(MDA)测试盒对红细胞中脂质过氧化产物 MDA 进行测定；

红细胞内主要抗氧化酶活力测定如下：用谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)测试盒测定红细胞内 GSH-PX 的变化、过氧化氢酶(CAT)测试盒测定红细胞内 CAT 的变化、用超氧化物歧化酶(SOD)测试盒测定红细胞内 SOD 活力的变化。其中酶活力单位定义如下，SOD: 在该反应体系中 SOD 抑制百分率达到 50% 时，反应体系中的 SOD 酶活力为一个酶活力单位；CAT: 每秒钟分解 1 μmol 的 H_2O_2 的量为一个酶活力单位；GSH-Px: 5 min 内使 GSH 浓度降低 1 μmol 为一个酶活力单位。

1.4 数据处理

所有试验均做 3 组平行，结果以平均值±标准方差(mean±SD)表示。Origin 8.5.1 作图，采用 SPSS 17.0 统计软件的单因素方差分析(one-way ANOVA)和 Duncan's multiple range test 方法进行数据统计。

表 2 正交试验结果与分析

Table 2 Orthogonal test results and analysis

编号	因素				粗多糖得率/%
	A 物料比 (W/V)	B 浸提温度/°C	C 超声功率/W	D 浸提时间/h	
1	1	1	1	1	7.71
2	1	2	2	2	8.85
3	1	3	3	3	9.30
4	2	1	2	3	7.95
5	2	2	3	1	7.98
6	2	3	1	2	8.92
7	3	1	3	2	8.86
8	3	2	1	3	8.43
9	3	3	2	1	10.09
K_1	25.86	24.52	25.06	25.78	
K_2	24.85	25.26	26.89	26.63	
K_3	27.38	28.31	26.14	25.68	
\bar{k}_1	8.62	8.17	8.35	8.59	
\bar{k}_2	8.28	8.42	8.96	8.88	
\bar{k}_3	9.13	9.44	8.71	8.56	
R	0.85	1.27	0.61	0.32	

2 结果与分析

2.1 东革阿里多糖的提取工艺正交优化试验

在单因素实验的基础上,分别选取物料比(1:20、1:30、1:40)、浸提温度(75、85、95℃)、超声强度(150、300、450W)、浸提时间(2、3、4h)为最优水平组合进行 $L_9(3^4)$ 正交实验,以粗多糖得率确定最佳的工艺提取条件。正交试验因素水平设计见表1,正交试验结果见表2。通过正交试验结果的极差分析可知,4个因素对粗多糖得率影响的主次顺序为浸提温度>物料比>超声功率>浸提时间。通过极差分析得到最佳配方为 $A_3B_3C_2D_1$,此提取工艺的东革阿里粗多糖得率为10.09%,即料液比1:40、浸提温度95℃、超声波破碎功率300W、浸提时间2h。因此在后续粗多糖提取中采用此工艺进行。

2.2 东革阿里多糖的纯化

将通过水提醇沉的东革阿里粗多糖用DEAE-Sephrose Fast Flow阴离子交换层析进行分离。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,在蒸馏水洗脱下得到高而尖的独立峰以及2个峰值小于0.25的杂峰。收集该吸收峰对应的试管中的洗脱液,经浓缩-透析-真空冷冻干燥后得到较纯的东革阿里多糖。继续通过Sephadex G-50柱完成进一步的分离和纯化,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,得到较纯多糖组分并命名为Ali-1。冷冻干燥后经苯酚硫酸法检测总糖含量达95.40%,可用于后续的结构表征。

2.3 Ali-1的分子量检测

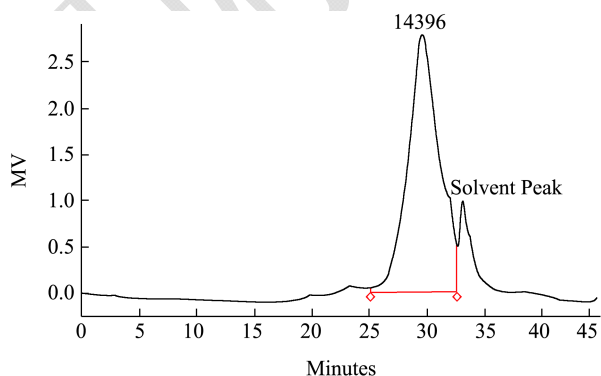


图1 Ali-1的GPC色谱图

Fig.1 Chromatography of Ali-1 by GPC

Ali-1的分子量检测结果如图1所示,尖而高的峰形表明Ali-1是高度纯化的多糖, Ali-1的分子量为14.3ku,可见Ali-1是一种低分子量的植物多糖。一般来说,具有高分子量的多糖倾向于具有更好的生物活性,同样它可能伴随着许多局限性的问题,如表观密度和粘度更高,溶解性更差,吸湿性更强等^[17,18]。低分子量多糖也可能具有更好的生物活性, Bondu Stephanie等人^[19]报道从红藻中提取植物多糖的角叉菜胶,低分子量角叉菜胶(当分子量<20ku时)对人类Burkitt淋巴瘤细胞没有直接细胞毒性,并且显示出比高分子量角叉菜胶更强的免疫刺激性。实际上,在其他植物中也发现了具有低分子量的植物多糖,例如玛咖^[20],土茯苓^[21]和蛹虫草^[22]。尽管Ali-1具有低分子量,但它仍可具有良好的生物活性。

2.4 单糖组成分析

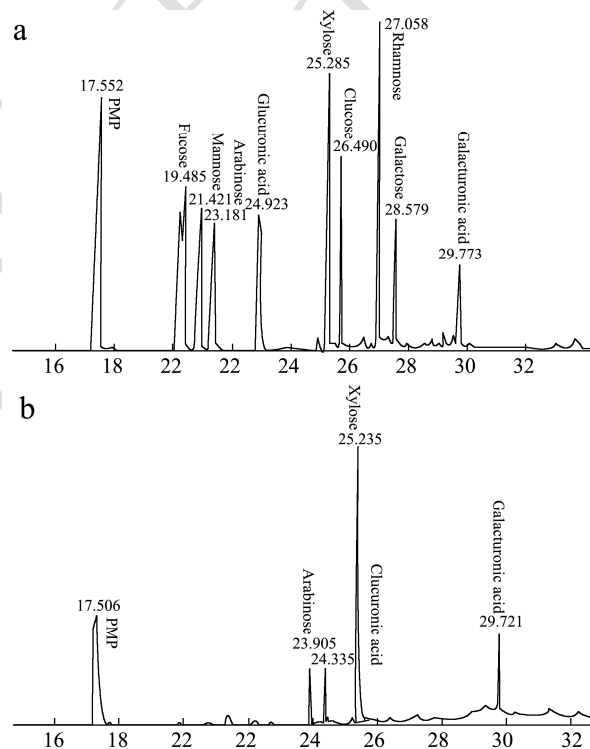


图2 混标和水解衍生样品液相色谱图

Fig.2 HPLC chromatogram of the monosaccharide mixture and Ali-1 sample

图2为混标和样品的出峰时间图,通过样品与混标的出峰时间对比来区分四种单糖,即阿拉伯糖,木糖,半乳糖醛酸和葡萄糖醛酸。Ali-1中木糖、阿拉伯糖、葡萄糖醛酸和半乳糖醛酸的摩尔比为4.43:1.10:1:1.14。这表明Ali-1是一种杂多糖,而木糖是其主要成分之一。

据报道,糖醛酸的含量与抗氧化活性正相关,并且抗氧化活性是其他生理活动的基础,例如抗炎和抗

菌活性等。由于 Ali-1 存在大量的糖醛酸 (27.89%), 它可能使 Ali-1 更突出的功能活性。

2.5 东革阿里多糖的氧自由基吸收能力 (ORAC)

表3 东革阿里多糖 ORAC 值

Table 3 The ORAC value of polysaccharide from *Eurycoma longifolia*

多糖组分	多糖纯度/%	ORAC 值/($\mu\text{mol Trolox/g}$)
粗多糖	82.36 \pm 3.80 ^a	329.67 \pm 13.26 ^a
过离子柱多糖	91.07 \pm 2.02 ^b	297.16 \pm 10.84 ^b
Ali-1	96.59 \pm 3.56 ^c	302.48 \pm 2.71 ^b

注: 同列中标注不同小写字母表示具有显著性差异 ($p < 0.05$)。

如表3所示, 东革阿里多糖分离纯化前后的所有样品的 ORAC 值从强到弱, 依次为: 粗多糖>过离子柱多糖>Ali-1。粗多糖总糖含量较低但同时含有黄酮类化合物等其他杂质, 导致其 ORAC 值较偏高, 过完离子柱和 Ali-1 (过完凝胶柱) 的多糖纯度虽有显著性差异, 但是 ORAC 值不存在显著性差异。相对于文献报道^[23,24]的山苦茶多糖 (271.67 \pm 11.23 $\mu\text{mol Trolox/g}$)、食用菌菌糠多糖 (290 $\mu\text{mol Trolox/g}$) 的 ORAC 值, 东革阿里多糖的 ORAC 值 (302.48 \pm 2.71 $\mu\text{mol Trolox/g}$) 相对偏高, ORAC 值直接反应物质的抗氧化能力, 糖醛酸关联抗氧化活性, 因此含糖醛酸的东革阿里多糖能够表现出具有更高的 ORAC 值。

2.6 Ali-1 对红细胞 AAPH 氧化溶血的保护作用

红细胞在 AAPH 作用下产生大量的自由基, 其细胞膜表面含有多不饱和脂肪酸, 极易诱导发生脂质过氧化现象, 使其细胞膜完整性受到损害导致溶血现象, 一些抗氧化剂如植物多糖可以保护红细胞膜不受损害, 抑制溶血现象产生^[25]。故采用红细胞的溶血抑制率来评价东革阿里多糖 Ali-1 对红细胞的保护作用及其抗氧化活性。如图3所示, 空白组的红细胞溶血率为 8.52%, 而毒性对照组中, 未加 AAPH 且加入 2000 $\mu\text{g/mL}$ 的 Ali-1 时的红细胞溶血率为 8.79%, 两者显示无显著性差异, 表明浓度在 2000 $\mu\text{g/mL}$ 及以下的 Ali-1 样品对人红细胞无毒害作用。

加入 AAPH 后的对照组, 其溶血率为 62.51%, 在 Ali-1 样品加入后溶血现象得到抑制, 并呈剂量效应关系, 对红细胞的保护功效也上升。当 Ali-1 样品

的终浓度达到 2000 $\mu\text{g/mL}$ 时, 其溶血率降低到 9.15%, 与空白组显示无显著性差异, 结果显示 Ali-1 样品对抑制 AAPH 诱导的红细胞氧化性溶血具有较好的保护作用。张婷等^[14]对紫芝菌丝体中的多糖进行了羊血红细胞的抗 AAPH 氧化溶血的测定, 其多糖样品表现出较好的细胞抗氧化活性。一般的植物多糖的抗氧化活性普遍较弱, 如石斛^[26]多糖等, 与东革阿里多糖相比, Ali-1 样品含糖醛酸且分子量相对较低。有研究表明, 富含糖醛酸和低分子量的多糖具有更好的生物活性, 这可能会赋予 Ali-1 更好的抗氧化活性。

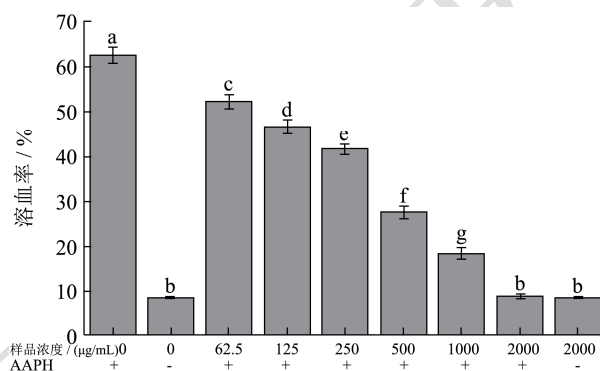


图3 Ali-1 对 AAPH 诱导的红细胞溶血的抑制作用

Fig.3 Inhibitory activity of Ali-1 on AAPH-induced erythrocyte hemolysis

注: 采用 Duncan's multiple range test 进行分析。同一组数据中, 小写字母完全不同时, 表示存在显著性差异 ($p < 0.05$), 下同。

2.7 Ali-1 处理红细胞后 ROS、MDA 水平变化

当红细胞在 AAPH 诱导下会产生大量的 ROS, 使细胞内的氧化平衡动态失衡。图4表明, 只加 AAPH 组的红细胞内 ROS 的水平是未加 AAPH 组的 8 倍, 验证了 AAPH 确实在红细胞内诱导产生并积累大量 ROS。加入 AAPH 且组合不同浓度的 Ali-1 样品保护后, 红细胞内 ROS 水平大幅度下降, 且伴随着剂量效应。当 Ali-1 样品浓度为 2000 $\mu\text{g/mL}$ 时 ROS 水平降低到与空白对照组接近一致, 图中数据表明不存在显著差异, 这很好的说明 Ali-1 能有效清除由 AAPH 诱导红细胞氧化溶血过程中产生的 ROS, 维持细胞内氧化和抗氧化的动态平衡, 保护红细胞免受损伤、发生溶血。故东革阿里中植物多糖组分的抗氧化活性机理可能直接与清除胞内多余自由基有关, 通过降低自由基水平对机体产生一定程度的保护作用, 这与山苦茶^[23]、海带^[27]多糖的抗氧化机理报道一致。

红细胞膜上含有丰富的不饱和脂肪酸 (LH), 在 AAPH 诱导下产生大量 ROS 诱导自由基链式反应, 会迅速进攻细胞膜上的 LH 进而诱导细胞膜中的磷脂层

发生脂质过氧化反应产生丙二醛 (MDA) 并积累, 同时与细胞膜中的蛋白游离氨基发生交联现象, 逐步破坏细胞膜的结构和功能, 引起细胞代谢紊乱及功能障碍最终导致细胞凋亡^[28], 故防止细胞内 MDA 水平上升可一定程度上保护细胞膜免受自由基攻击。

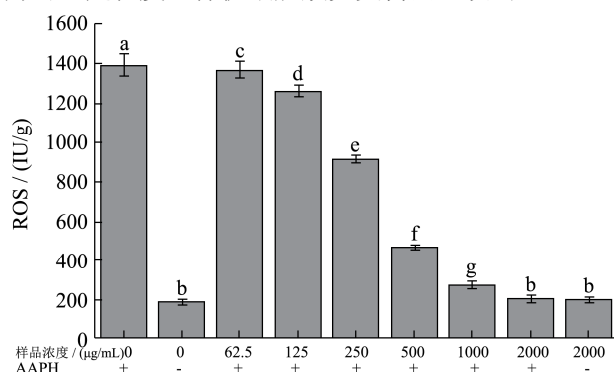


图4 Ali-1 处理后红细胞 SOD 含量的变化

Fig.4 Changes in the SOD content of erythrocytes after the treatment with Ali-1

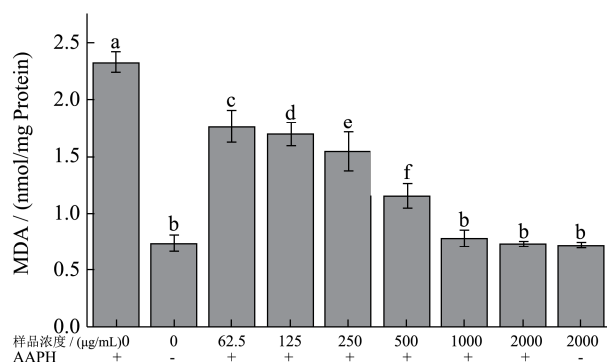


图5 Ali-1 处理后红细胞 MDA 含量的变化

Fig.5 Changes in the MDA content of erythrocytes after the treatment with Ali-1

通过测定红细胞内 MDA 含量的变化探讨 Ali-1 对红细胞内自由基链式反应引起的脂质过氧化反应的作用。如图 5 所示, 只加 AAPH 组红细胞内 MDA 的水平达到 2.31 nmol/mg Protein, 是未加 AAPH 组的 3 倍, 这验证了加入 AAPH 后, 红细胞内产生了明显的脂质过氧化反应。随着不同浓度的 Ali-1 样品的加入, 红细胞内 MDA 水平不断下降, 且浓度达到 2000 µg/mL 时, MDA 的水平仅为 0.73 nmol/mg Protein, 与未加 AAPH 的对照组不存在显著性差异, 说明了此种红细胞状态下其中脂质过氧化反应程度处于较低水平, 细胞膜得到有效保护从而导致溶血率低, 这与 2.6 溶血率的测定结果一致。说明东革阿里多糖 Ali-1 能够抑制 AAPH 诱导的红细胞膜脂质过氧化反应, 从而一定程度上减少胞内 MDA 含量的上升。

2.8 Ali-1 处理红细胞后抗氧化物酶 (CAT、

SOD、GSH-Px) 活力变化

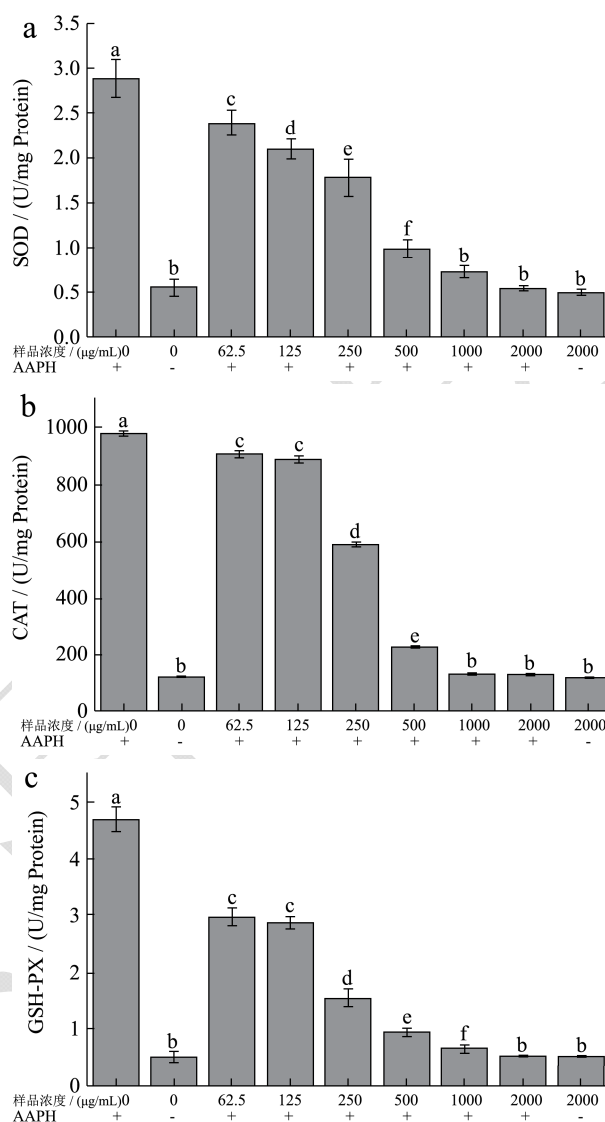


图6 Ali-1 处理后红细胞平均抗氧化物酶活力 SOD、CAT 和 GSH-Px 的变化

Fig.6 Changes of average activity of antioxidant enzymes SOD, CAT, GSH-Px in erythrocytes after the treatment with Ali-1

从上述实验结果可知, 红细胞受到 AAPH 的诱导后, ROS 含量迅速上升, 打破胞内的氧化动态平衡, 故会引起红细胞内发生氧化应激反应, 启动一系列相关的应激防御系统^[29]。此过程涉及一系列的酶的参与, 最基本的是由谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、过氧化氢酶 (CAT)、超氧化物歧化酶 (SOD) 所构成胞内酶应激防御系统, 分别利用不同的酶促反应消除 ROS, 进行体内抗氧化物质的循环代谢, 从而保护细胞免受损害。因此可以通过测定细胞内 GSH-Px、CAT、SOD 酶活力的变化, 来判断细胞内的氧化应激防御水平。

众所周知, 成熟期的红细胞无细胞核, 且无线粒

体、核蛋白体等一系列细胞器,故不能正常运作生命大分子物质核酸和蛋白质的合成,其存活靠成熟期之前合成的酶来进行正常的运转,在应激中抗氧化酶活力高的红细胞更有机会存活下来。结合理论分析与2.6溶血率的实验趋势变化,溶血率越低代表细胞内氧化应激水平越低,其氧化应激防御水平应该越高,酶活力的水平也对应提高。但是本实验设计测定指标的是AAPH损伤后存活红细胞中的抗氧化酶的平均酶活力,越多的酶活力低的红细胞因受到样品保护而存活,因此测得的平均酶活力则更低。从图6可以看出,AAPH损伤的阳性对照组的存活的红细胞中SOD、CAT和GSH-Px平均酶活力分别为2.89、976.91和4.69 U/mg Protein,比阴性对照组的平均酶活力0.55、121.86和0.52 U/mg Protein要高,而加入不同浓度的东革阿里多糖样品Ali-1的预处理后,保护了很多红细胞不受自由基的攻击,部分过氧化物酶酶活力较低的红细胞因受保护而存活下来。

3 结论

通过正交试验优化得到的东革阿里粗多糖提取工艺,其条件料液比1:40、浸提温度95℃、超声波破碎功率300W、浸提时间2h,最适条件下东革阿里的粗多糖提取量为10.09%。采用水提醇沉、DEAE-Sephacrose Fast Flow阴离子交换柱和Sephadex G50凝胶层析柱进行分离纯化,能得到纯度较高的多糖Ali-1。Ali-1的平均分子量为14.3 ku,主要由木糖、阿拉伯糖、葡萄糖醛酸和半乳糖醛酸组成,其摩尔比为:4.43:1.10:1:1.14。该组分具有较强ORAC值,在一定的样品浓度范围内,Ali-1可以保护人血红细胞免受AAPH的损伤,具有较好的抗氧化活性。本实验为东革阿里的深加工和保健食品的开发利用提供了基础资料和理论依据,有关东革阿里多糖的结构信息和更多的活性与机理有待进一步研究。

参考文献

- [1] Rehman S U, K Choe, H H Yoo. Review on a traditional herbal medicine, *Eurycoma longifolia* Jack (*Tongkat Ali*): Its traditional uses, chemistry, evidence-based pharmacology and toxicology [J]. *Molecules*, 2016, 21(3): 331
- [2] Low B S, Das P K, Chan K L. Standardized quassinoid-rich *Eurycoma longifolia* extract improved spermatogenesis and fertility in male rats via the hypothalamic-pituitary-gonadal axis [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2013, 145(3): 706-714
- [3] 李红亮,于秀颖,马崇鸣,等.东革阿里中活性成分宽缕酮的

提取及纯化工艺研究[J].*中国药学杂志*,2016,51(14):1169-1175

- LI Hong-liang, YU Xiu-ying, MA Chong-ming, et al. Extraction and purification process of the active ingredient eurycomanone from *Eurycoma longifolia* [J]. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 2016, 51(14): 1169-1175
- [4] Low B S, Teh C H, Yuen K H, et al. Physico-chemical effects of the major quassinoids in a standardized *Eurycoma longifolia* extract (Fr 2) on the bioavailability and pharmacokinetic properties, and their implications for oral antimalarial activity [J]. *Natural Product Communications*, 2011, 6(3): 337-341
- [5] Tong K L, Chan K L, Abubakar S, et al. The *in vitro* and *in vivo* anti-cancer activities of a standardized quassinoids composition from *Eurycoma longifolia* on LNCaP human prostate cancer cells [J]. *Plos One*, 2015, 10(3): 1-21
- [6] Hajjouli S, Chateauvieux S, Teiten M H, et al. Eurycomanone and eurycomanol from *Eurycoma longifolia* Jack as regulators of signaling pathways involved in proliferation, cell death and inflammation [J]. *Molecules*, 2014, 19(9): 14649-14666
- [7] Ang H H, Cheang H S. Studies on the anxiolytic activity of *Eurycoma longifolia* Jack roots in mice [J]. *Jpn J Pharmacol*, 1999, 79(4): 497-500
- [8] Talbott S M, Talbott J A, Annie G, et al. Effect of *Tongkat Ali* on stress hormones and psychological mood state in moderately stressed subjects [J]. *J Int Soc Sports Nutr*, 2013, 10(1): 28
- [9] 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*,2006,5:130-132
TANG Jie. Research progress on biological activity of plant polysaccharides [J]. *Food Research and Development*, 2006, 5: 130-132
- [10] Burdette A, Garner P L, Mayer E P, et al. Anti-inflammatory activity of select sorghum (*Sorghum bicolor*) brans [J]. *Journal of Medicinal Food*, 2010, 13(4): 879-87
- [11] 杜小燕.泡盛曲霉发酵麦麸过程中酚类物质含量的变化与生物活性的相关性研究[D].广州:华南理工大学,2014
DU Xiao-yan. Study on correlations between contents of phenolic compounds of wheat bran fermented by *Aspergillus awamori* and activities of three types of enzyme and biological activities [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2014
- [12] 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]. *Mycosystem*, 2016, 35(2): 170-177
- [13] 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
- [14] 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
- [15] Lin L, Zhuang M, Zou L, et al. Structural characteristics of water-soluble polysaccharides from *rabdosiaserra* (MAXIM.) HARA leaf and stem and their antioxidant capacities [J]. *Food Chemistry*, 2012, 135(2): 730-737
- [16] 张虹,张猛猛,赖富饶,等.甜菜碱保护细胞免受 AAPH 损伤的研究[J].现代食品科技,2016,32(6):18-23
ZHANG Hong, ZHANG Meng-meng, LAI Fu-rao, et al. Protective effects of betaine on 2,2-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)-induced oxidative stress in cells [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2016, 32(6): 18-23
- [17] Lemmon H R, Sham J, Chau L A, et al. High molecular weight polysaccharides are key immunomodulators in North American ginseng extracts: Characterization of the ginseng genetic signature in primary human immune cells [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2012, 142(1): 1-13
- [18] Zhu Z Y, Guo M Z, Liu F, et al. Preparation and inhibition on α -d-glucosidase of low molecular weight polysaccharide from *Cordyceps militaris* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 93(Pt A): 27-33
- [19] Bondu S, Deslandes E, Fabre M S, et al. Carrageenan from *Solieriachordalis* (*Gigartinales*): Structural analysis and immunological activities of the low molecular weight fractions [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2010, 81(2): 448-460
- [20] Zhang M, Wang G, Lai F, et al. Structural characterization and immunomodulatory activity of a novel polysaccharide from *Lepidiummeyanii* [J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(9): 1921-1931
- [21] Wang M, Yang X B, Zhao J W, et al. Structural characterization and macrophage immunomodulatory activity of a novel polysaccharide from *Smilax glabra* Roxb. [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 156: 390-402
- [22] Bondu S, Deslandes E, Fabre M S, et al. Carrageenan from *Solieriachordalis* (*Gigartinales*): Structural analysis and immunological activities of the low molecular weight fractions [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2010, 81(2): 448-460
- [23] 赵谋明,刘敏,林恋竹,等.山苦茶多糖结构表征及抗氧化活性研究[J].现代食品科技,2015,7:61-66
ZHAO Mou-ming, LIU Min, LIN Lian-zhu, et al. Structural characteristics and antioxidant activity of polysaccharides from *Mallotus oblongifolius* [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2015, 7: 61-66
- [24] 张颖,曾艳,张丽姣,等.不同食用菌菌糠多糖的组分分析与抗氧化活性评价[J].食品科学,2015,36(5):18-23
ZHANG Ying, ZENG Yan, ZHANG Li-jiao, et al. Monosaccharide composition and antioxidant activity of polysaccharides from different spent mushroom substrates [J]. *Food Science*, 2015, 36(5): 18-23
- [25] 何佳易.红细胞氧化模型评价抗氧化活性的方法学研究[D].扬州:扬州大学,2013
HE Jia-yi. Methodological study on evaluation of antioxidant activity by hemolysis model [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2013
- [26] 鲍素华,查学强,郝杰,等.不同分子量铁皮石斛多糖体外抗氧化活性研究[J].食品科学,2009,30(21):123-127
BAO Su-hua, ZHA Xue-qiang, HAO Jie, et al. Antioxidant activity of polysaccharides with different molecular weights from *Dendrobium candidum in vitro* [J]. *Food Science*, 2009, 30(21): 123-127
- [27] 卢苙虹,林宗毅,崔春,等.响应面优化柠檬酸提取海带抗氧化多糖的研究[J].食品工业科技,2012,33(15):224-228
LU Jiang-hong, LIN Zong-yi, CUI Chun, et al. Optimization of citric acid extraction of polysaccharides with antioxidant activities from *Laminaria japonica* [J]. *Food Science*, 2012, 33(15): 224-228
- [28] 申迎宾.四种谷物多酚抗氧化、降血脂作用评价研究[D].无锡:江南大学,2016
SHEN Ying-bin. Antioxidant activity and hypolipidemic effects of polyphenol extracted from four grains [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2016
- [29] 陈彩薇.脱脂米糠中不同存在形态酚类物质的抑菌和抗氧化活性研究[D].广州:华南理工大学,2016
CHEN Cai-wei. Antibacterial activity and antioxidant activity of different form phenolics from defatted rice bran [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2016

现代食品科技