

蔓三七叶多糖的理化性质及免疫调节活性研究

胡居吾¹, 吴静¹, 吴磊¹, 黄斌华²

(1. 江西省科学院应用化学研究所, 江西南昌 330096) (2. 江西华紫仁农业开发有限公司, 江西赣州 330000)

摘要:以蔓三七叶为实验材料, 采用水提醇沉法获得蔓三七叶多糖(GPLP), 测定了其总糖、糖醛酸、硫酸根以及蛋白质的含量和单糖组成, 并对其抗氧化活性和免疫调节活性进行了研究。采用苯酚-硫酸法测定总糖含量, 硫酸-间羟基苯酚法测定糖醛酸含量, BaCl₂-明胶法测定硫酸根含量, 气相色谱法测定单糖组分和红外光谱测定多糖的结构。通过总抗氧化能力、DPPH 自由基、OH 自由基的清除能力评价 GPLP 的体外抗氧化能力, 并探讨其对脂多糖(LPS)刺激 RAW 264.7 巨噬细胞免疫调节活性。结果表明, 所得 GPLP 的得率为 15.56%, 粗多糖中的总糖含量为 52.32±1.56 g/100 g; 单糖组成为阿拉伯糖、木糖、葡萄糖、半乳糖, 摩尔比为 1.39:8.70:3.17:1。体外抗氧化实验结果表明 GPLP 的总抗氧化能力、DPPH 和 OH 自由基清除效果明显。GPLP 可显著提高 RAW 264.7 细胞内一氧化氮(NO)的浓度, 在给药浓度为 25.0 μg/mL 时, NO 的分泌量达到最大, 为 31.24±2.30 μM。GPLP 可以提高免疫力, 在功能食品的开发中, 可以作为一个潜在的免疫调节剂。

关键词:蔓三七; 多糖; 单糖组成; 自由基清除活性; 免疫调节活性

文章编号: 1673-9078(2019)09-74-80

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.9.008

Physicochemical Characteristics and Immunomodulatory Activity of Polysaccharides from *Gynura procumbens* Leaves

HU Ju-wu¹, WU Jing¹, WU Lei¹, HUANG Bin-hua²

(1. Institute of Applied Chemistry, Jiangxi Academy of Sciences, Nanchang 330096, China)

(2. Jiangxi Huaziren Agricultural Development Co. Ltd., Ganzhou 330000, China)

Abstract: In this study, *Gynura procumbens* leaves were used as the experimental material, and their polysaccharides (GPLP) were obtained by the water extraction method. The total sugar content, uronic acid content, sulfate content, protein content and monosaccharide composition of GPLP were determined, with their antioxidant and immunoregulatory activities also examined. The total sugar content was determined by the phenol-sulfuric acid method, and the uronic acid content was determined by sulfuric acid-m-hydroxyphenol method. The sulfate content was determined by the BaCl₂-gelatin method, while the monosaccharide composition was determined by gas chromatography and the structure of polysaccharide was determined by infrared spectroscopy. The *in vitro* antioxidant capacity of GPLP was evaluated through measuring the total antioxidant activity and DPPH and OH free radicals scavenging capacities. The immunomodulatory activity against lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW 264.7 macrophages was investigated. The results showed that the yield of GPLP was 15.56%, and the total sugar content in the crude polysaccharide was 52.32±1.56 g/100 g with the monosaccharides being arabinose, xylose, glucose and galactose at a molar ratio of 1.39:8.70:3.17:1. The results of *in vitro* antioxidant tests showed significant total antioxidant activity and DPPH and OH free radicals scavenging capacities. GPLP could significantly increase the concentration of nitric oxide (NO) in RAW 264.7 cells, and at the GPLP dose of 25.0 μg/mL, the secretion of NO reached to the maximum values (31.24±2.30 μM). GPLP may improve immunity and can be used as a potential immunomodulator in the development of functional foods.

Key words: *Gynura procumbens* leaf; polysaccharides; monosaccharide compositions; free radical scavenging activity; immunomodulatory

蔓三七, 又名平卧菊三七, 为多年生草本药食两用植物。蔓三七茎叶营养丰富, 富含粗多糖和绿原酸等成分。民间利用其消炎止咳, 通经活络, 消肿止痛, 肺结核, 支气管肺炎等^[1]。现代生物化学和医学研究证明,

收稿日期: 2019-03-05

基金项目: 江西省重大科技支撑项目(20171ACF60009; 20181BBG70051; 20151BBF60024); 江西省科学院重点研发项目(2017-YZD2-18)

作者简介: 胡居吾(1977-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 天然产物化学

通讯作者: 吴静(1985-), 女, 助理研究员, 研究方向: 天然产物化学

蔓三七具有消炎止咳, 散瘀消肿等功效^[2]; 还具有提高人体免疫力、改善机体免疫功能作用^[3]; 具有降血糖、降血压和抑制乙型肝炎的显著效果^[4]。另一方面, 其具有极好的营养价值, 蔓三七是一种药食兼可的独特植物, 它和现在人们食用的木耳菜同属。食味柔滑, 清香可口。可清炒、凉拌、余汤, 其叶也可生吃, 或取鲜叶开水冲泡当茶饮, 是一种高经济价值的“药食两用”植物。

多糖具有复杂的化学结构及丰富的生物活性, 包括抗肿瘤^[5]、抗炎^[6]、抑制血管生成^[7]、抗感染^[8]、改善免

疫功能^[9]、调节血糖血脂^[10]、保肝^[11]等多种功效。本课题组在前期对蔓三七叶化学成分研究过程中,发现多糖类物质为其主要成分之一,截止到目前,关于蔓三七多糖的研究一直处于空白,严重制约了蔓三七这一植物的综合利用。

本实验以水提醇沉法提取蔓三七叶多糖,研究了蔓三七叶多糖的理化性质,首次应用 GC 分析蔓三七叶多糖的单糖组成;评价了蔓三七叶多糖的抗氧化活性(包括总抗氧化能力、DPPH 和 OH 自由基的清除能力);最后,初步探讨了蔓三七叶多糖对细胞的免疫调节活性,旨在为蔓三七叶的综合开发和利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

蔓三七叶,江西华紫仁农业开发有限公司,烘干、粉碎后过 20 目筛备用。

阿拉伯糖、鼠李糖、木糖、甘露糖、半乳糖、葡萄糖均,中国食品药品检定研究院;三氟乙酸、盐酸羟胺、吡啶、醋酸酐(分析纯),肌醇(生化试剂),国药集团;维生素 C (Vc),北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司;总抗氧化能力(T-AOC)测定试剂盒,南京建成生物工程研究所;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH),美国 Sigma 公司;苯酚、抗坏血酸、水杨酸钠、三氟乙酸、甲醇、盐酸羟胺、溴化钾、硫酸亚铁、浓硫酸、葡萄糖(分析纯),绵阳市信捷商贸有限公司。

1.2 仪器与设备

气相色谱仪 GC-2010, SHIMADZU 公司;检测器: FID、色谱柱、WondaCap5 毛细管柱(0.25 mm×30.0 m×0.25 μm)、自动进样器 AOC-20S, SHIMADZU 公司;自动注射器 AOC-20i, SHIMADZU 公司;傅立叶红外光谱仪 FTIR-7600, lambad 公司;压片机 DF-4 型,天津港东科技发展股份有限公司;UV-1800 紫外可见分光光度计,日本岛津仪器有限公司;METTLER-TOLEDOAL104 型电子天平,瑞士梅特勒-托利多公司;Milli-Q 型超纯水制备系统,美国 Millipore 公司;RE-52AA 型旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;DZF-6090Z 型真空干燥箱,上海跃进医疗器械有限公司;TGL-16GA CO₂ 培养箱,美国 Thermo 公司。

1.3 方法

1.3.1 蔓三七叶粗多糖提取工艺流程^[12]

取烘干、粉碎后的蔓三七叶,按料液比 1:15 加入蒸馏水,于 65 °C 恒温水浴 2.5 h,离心、抽滤,滤渣部分

继续用同样方法浸提,上清液合并浓缩后缓慢加入 4 倍体积的无水乙醇沉淀粗多糖,于 4 °C 低温静置 24 h,再以 4800 r/min 离心 10 min,收集下层粗多糖沉淀,最后用无水乙醇洗涤 2 次,沉淀物冷冻干燥得蔓三七叶粗多糖,并测定其得率。

1.3.2 蔓三七叶多糖纯化工艺流程

采用 Sevage 试剂(氯仿:正丁醇=4:1)进行脱蛋白,重复操作 6 次后,于 45 °C 下减压蒸发除去残留的 Sevage 试剂,再配成 10 mg/mL 的多糖溶液,装入截留分子量为 3000 u 的透析袋中透析 24 h,收集透析袋内的多糖溶液,冷冻干燥制得蔓三七叶多糖样品。

1.3.3 蔓三七叶粗多糖总糖含量测定

1.3.3.1 标准曲线的绘制

对照品溶液的制备:称取无水葡萄糖,加超纯水,配制每 1 mL 含 0.2 mg 葡萄糖的对照品溶液;

标准曲线的制备:分别精确量取对照品溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL,置具塞试管中,加超纯水补至 2.0 mL,各管加入 5% 苯酚溶液 1 mL,摇匀,再迅速加入浓硫酸 5 mL,摇匀,静置 10 min,冷却至室温,置 40 °C 水浴中保温 15 min,取出,迅速冷却至室温,空白对照,在 490 nm 波长处测定吸光度,以葡萄糖浓度作为横坐标,以吸光度为纵坐标,绘制标准曲线。

根据不同浓度的葡萄糖标准溶液及其对应的吸光度,得到苯酚-硫酸法的回归方程为 $y=7.55x-0.078$, $R^2=0.9994$,表明总糖在 0.021~0.166 mg/mL 质量浓度范围内与吸光度呈良好的线性关系。

1.3.3.2 粗多糖含量测定

精密称取样品 10 mg,加超纯水定容至 25 mL,即得 0.4 mg/mL 的供试品溶液。取适量样品溶液,平行三份,按 1.3.3.1 的操作方法进行测定样品中的总糖含量。

1.3.4 蔓三七叶粗多糖中糖醛酸含量的测定

1.3.4.1 半乳糖醛酸标准曲线的绘制

称取半乳糖醛酸(纯度 99%) 20 mg,超纯水溶解并定容至 100 mL,制备成 200 μg/mL 的标准溶液。

分别取半乳糖醛酸标准溶液 150、300、450、600、750、1000 μL 置于 2 mL 具塞试管加超纯水稀释至刻度,配制成浓度为 15、30、45、60、75、100 μg/mL 的标准液。具体的操作方法参照董竹平^[13]等的研究方法进行。以半乳糖醛酸浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线,得到回归方程: $Y=0.003X-0.007$ ($R^2=0.997$)。

1.3.4.2 样品测定

称取 60 °C 干燥至恒重的蔓三七叶多糖 25 mg,超纯水溶解并定容至 100 mL,得浓度为 250 μg/mL 的样品溶液,以标准曲线项下的方法操作,根据标准曲线的回归方程,测定半乳糖醛酸含量。

1.3.5 蔓三七叶粗多糖中 SO_4^{2-} 含量的测定

1.3.5.1 硫酸钾溶液标准曲线绘制

首先配制 BaCl_2 -明胶溶液备用,称取 0.50 g 明胶加少量超纯水于 60~90 °C 溶解,定容至 100 mL,4 °C 保存过夜。称取 0.50 g BaCl_2 ,用明胶溶液定容至 50 mL,室温下放置 2~3 h,4 °C 冰箱保存。具体的操作方法参照 Dodgson^[14] 等人的研究方法进行。以 K_2SO_4 浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,制得标准曲线。计算标准曲线的回归方程和 R_2 值: $Y=1.802X+0.033$ ($R^2=0.998$)。

1.3.5.2 样品测定

称取 10 mg 蔓三七叶多糖,加入 5 mL 0.5 mol/L 盐酸,沸水浴水解 5 h。量取 200 μL 经盐酸水解后的蔓三七叶多糖于试管中,以标准曲线项下的方法操作,根据标准曲线的回归方程,计算 SO_4^{2-} 的含量。

1.3.6 蔓三七叶粗多糖中蛋白质含量的测定

蔓三七叶多糖溶解于超纯水中,配成 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 水溶液,采用 BCA 法^[14] 测定蛋白质含量。

1.3.7 单糖组成的测定

1.3.7.1 标准单糖衍生物的制备

精密称取鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖标准单糖各 10 mg 于 10 mL 具塞试管中,加盐酸羟胺 10 mg、内标 8 mg、吡啶 0.5 mL,振荡摇匀,90 °C 水浴中加热反应 30 min。间歇振荡。取出后冷却至室温,加醋酸酐 0.5 mL,90 °C 水浴中继续反应 30 min。70 °C 水浴中将反应产物旋转蒸发至干,加 1 mL 氯仿震荡溶解,取样进行气相色谱分析。

1.3.7.2 多糖的水解和衍生化

多糖的水解:精密称取多糖样品 50 mg 于 50 mL 旋蒸瓶中,加入 4 mol/L 的三氟乙酸溶液 5 mL,加玻璃塞封口。振荡使多糖溶解。在 100 °C 下水解 6 h,取出于 70 °C 温度下旋转蒸发至干。

多糖的衍生化:水解后的多糖,按照“1.3.7.1”项下标准单糖衍生化的方法衍生化。

1.3.7.3 气相色谱分析

气相色谱条件设置:氢气流量 40.0 mL/min,空气流量 400 mL/min,氮气吹尾流量 30.0 mL/min,进样压力 100.0 kPa;进样温度为 240 °C,检测器温度为 260 °C,色谱柱初始温度为 140 °C,维持 3 min,以 10 °C/min 升至 240 °C,维持 15 min,进样体积为 1 μL 。

1.3.7.4 多糖中单糖组成

按下列公式计算多糖中单糖质量,并求得相应单糖的摩尔数。

$$f = \frac{m_r \times A_s}{m_s \times A_r} \quad m_0 = \frac{f \times (A_0 \times m_s)}{A_s}$$

式中: m_0 、 m_r 、 m_s 分别表示待测单糖、单糖标准品和内标物

质的质量, A_0 、 A_r 、 A_s 分别表示待测单糖、单糖标准品和内标物质的峰面积, f 表示相对校正因子。

1.3.8 红外光谱分析^[12]

取少量干燥后的蔓三七叶多糖粉末,往其中加入适量的溴化钾晶体,在红外灯照射下于玛瑙研钵中轻轻研磨,至极细粉末,用压片机压制成透明薄片,经显微红外光谱仪 400 cm^{-1} ~4000 cm^{-1} 中红外区扫描。

1.3.9 蔓三七多糖的抗氧化活性测定^[15]

1.3.9.1 总抗氧化能力的测定

采用总抗氧化能力(T-AOC)测定试剂盒测定蔓三七叶多糖总抗氧化能力。分别准确配制不同浓度的蔓三七叶多糖和抗坏血酸(Vc)溶液样品,按照 T-AOC 测定试剂盒说明书进行操作。在 520 nm 测定管样品吸光度($A_{\text{测定}}$)和对照管吸光度($A_{\text{对照}}$),根据下列公式计算蔓三七多糖及 Vc 的总抗氧化能力($\eta_{\text{总}}$):

$$\eta_{\text{总}} = \frac{(A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \times N \times n}{0.01 \times 30}$$

式中: N -反应体系稀释倍数(反应液总量/取样量); n -样品测试前稀释倍数。

在 37 °C 时,每分钟每毫升样品使反应体系的吸光度值每增加 0.01 时,为一个总抗氧化能力单位。

1.3.9.2 DPPH 自由基清除能力的测定

分别取不同浓度的蔓三七叶多糖和抗坏血酸(Vc)溶液 2 mL 加入等体积的 DPPH 乙醇溶液,混匀,室温放置 30 min 后,测定其在 517 nm 处的吸光度(A_1)。同时测定不加 DPPH 的多糖溶液与乙醇混合后的吸光度(A_2),不加样品的 DPPH 乙醇溶液作为空白对照的吸光度(A_0)。根据公式计算蔓三七多糖及 Vc 的 DPPH 自由基清除率(η_{DPPH}):

$$\eta_{\text{DPPH}} = \frac{[1 - (A_1 - A_2)]}{A_0} \times 100\%$$

1.3.9.3 OH 自由基清除能力的测定

取 2 mmol/L 水杨酸钠-乙醇溶液 0.5 mL,加入 0.5 mL 9 mmol/L 硫酸亚铁溶液,分别加入 1.5 mL 不同浓度多糖和抗坏血酸(Vc)溶液,最后加入 0.5 mL 6 mmol/L 双氧水。37 °C 反应 1 h,在 510 nm 下测定吸光度(A_x)。同时测定用蒸馏水代替硫酸亚铁溶液的吸光度(A_y),蒸馏水代替样品溶液作为空白对照的吸光度(A_0)。根据下列公式计算蔓三七叶多糖及 Vc 的 OH 自由基清除率(η_{OH}):

$$\eta_{\text{OH}} = \frac{1 - (A_x - A_y)}{A_0} \times 100\%$$

1.3.10 细胞培养和药液配制

RAW 264.7 细胞从美国典型培养物保藏中心(ATCC)购得,用 RPMI 1640 培养基(含 10%胎牛血

清、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素) 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养至对数生长期。将 CCFP 溶解于 DMSO 中, 用 RPMI 1640 培养基稀释成供试液浓度, 所配制的药液中 DMSO 含量不能超过 0.1%。

1.3.11 细胞活性检测-MTT 法

采用 MTT 法^[16]检测细胞存活率。选取对数生长期 RAW 264.7 细胞, 按 1×10⁶ 个/mL、100 μL/孔接种于 96 孔板中, 置于 CO₂ 培养箱培养过夜后, 吸取旧培养基, 加入待测药物的新培养基继续培养 24 h, 吸取旧培养基, 于每孔中加入 MTT 工作液 100 μL, 继续孵育 3 h 后每孔加入 MTT 终止液 100 μL 继续培养 16~20 h 后, 用酶标仪在 550 nm 处测定 OD 值, 实验重复 3 次, 计算细胞的相对存活率。

$$\text{相对细胞存活率} = \frac{(\text{实验组孔吸光值} - \text{空白组孔吸光值})}{(\text{对照组孔吸光值} - \text{空白组孔吸光值})} \times 100\%$$

1.3.12 对 RAW264.7 细胞 NO 分泌的影响

将密度为 1×10⁵ 个/mL 细胞接种于 96 孔板中, 每孔 100 μL 置于 CO₂ 培养箱中培养过夜, 洗掉旧培养基, 加入不同浓度供试药物的新培养基继续培养 24 h, 以加入 1 μg/mL LPS 处理的细胞作为阳性对照组。用 Wu 法^[23]检测细胞上清液中 NO 的分泌量, 按 ELISA 检测试剂盒操作方法测定 TNF-α 及 PGE₂ 的分泌量。

1.3.13 数据处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 Origin 8.0 软件作图, SPSS 13.0 软件进行方差分析, $p < 0.05$ 表示组间有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 蔓三七叶多糖糖醛酸、硫酸根、蛋白质含量的测定

通过测定, 蔓三七叶多糖的得率、含量及蔓三七叶多糖中的糖醛酸、硫酸根、蛋白质含量见表 1。

表 1 蔓三七叶多糖的相关基本成分

Table 1 The basic components of polysaccharides from *Gynura procumbens* leaf

序号	项目	结果/%
1	得率	15.56
2	含量	52.32±1.56
3	糖醛酸含量	1.22±0.15
4	硫酸根含量	3.55±0.45
5	蛋白质含量	21.19±0.77

与其他提取多糖方法(如碱提法、酶提法)相比, 水提醇沉法获取的糖醛酸及硫酸根含量较低, 因为, 稀

碱溶液能使蔓三七叶细胞壁致密结构变得疏松, 打断了葡萄糖醛酸与半纤维素或纤维素之间分子间的连接, 从而使糖醛酸溶于稀碱溶液中, 故碱提法得到糖醛酸和硫酸根含量最高。酶提法在一定程度上会破坏纤维素、半纤维素的结构, 减少糖醛酸基团在溶剂中的暴露, 故纤维素酶法得到的糖醛酸含量低于碱法提; 水法提取其中的水溶性多糖, 故糖醛酸和硫酸根含量均较低。蔓三七叶除含有多糖类外, 还含有蛋白质、矿物质、维生素等。

2.2 蔓三七叶多糖的单糖组成

本研究首次采用 GC 分析测定了蔓三七叶多糖中的单糖组成。采用盐酸羟胺肟化和乙酸酐乙酰化衍生法有效克服由于糖的异构化而造成的多峰现象, 每种单糖都能获得单一的色谱峰, 有利于进行气相色谱的定性和定量分析。

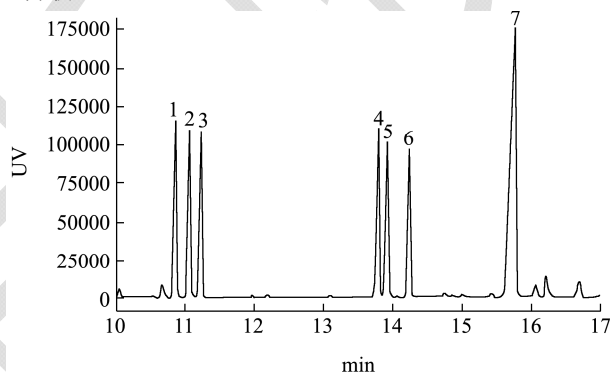


图 1 标准单糖气相色谱图

Fig.1 GC chromatogram of complex monosaccharide derivative

注: 1.鼠李糖; 2.阿拉伯糖; 3.木糖; 4.甘露糖; 5.葡萄糖; 6.半乳糖; 7.肌醇。

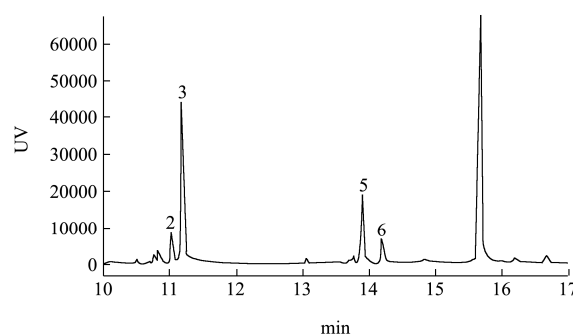


图 2 蔓三七叶多糖气相色谱图

Fig.2 GC chromatogram of polysaccharide from *Gynura procumbens* leaf

注: 2.阿拉伯糖; 3.木糖; 5.葡萄糖; 6.半乳糖。

通过比较图 1 和图 2, 得知蔓三七叶多糖由阿拉伯糖、木糖、葡萄糖、半乳糖四种单糖组成。其中, 木糖含量最大, 葡萄糖和阿拉伯糖次之, 四种单糖的摩尔比为 1.39:8.70:3.17:1。

2.3 光谱分析

红外光谱是研究聚合物结构和化学键,表征或鉴别不同化合物的常用手段之一,具有高度的特征性,一种有效研究分子官能团特征的手段。蔓三七叶多糖的红外光谱图如图3所示。图3结果显示以2975和1439 cm⁻¹为中心的各组吸收峰是糖类的特征峰,且峰型基本一致^[17],1665~1600 cm⁻¹之间应该为糖环的伸缩振动吸收峰^[18],3550~2860 cm⁻¹的宽峰是典型的OH和COOH的吸收峰组合。1614 cm⁻¹处的特征峰表示该糖中存在酰胺基,1800~1500 cm⁻¹之间的一组峰是COOH的羰基和酰胺基RCONHR'的伸缩振动吸收峰。1100~1000 cm⁻¹区有3个强峰是吡喃环糖苷的表达,在925 cm⁻¹处的吸收峰说明该多糖的糖苷键为β构型,1310和2889 cm⁻¹处的吸收峰说明该多糖的糖苷键为β-(1,3)糖苷键。蔓三七叶多糖IR谱图表明蔓三七叶多糖分子结构中包括普通单糖、糖醛酸或氨基酸残基,单糖主要以吡喃环形式存在通过β-(1,3)苷键结合形成一种糖蛋白缀合物^[18]。

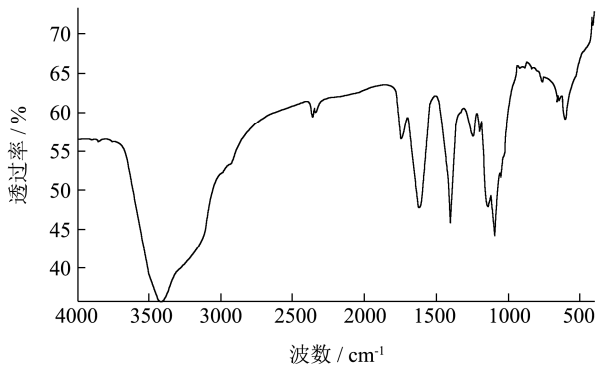


图3 蔓三七叶多糖的红外光谱图

Fig.3 Infrared spectra of polysaccharide from *Gynura procumbens* leaf

2.4 蔓三七叶多糖的抗氧化活性

2.4.1 总抗氧化能力

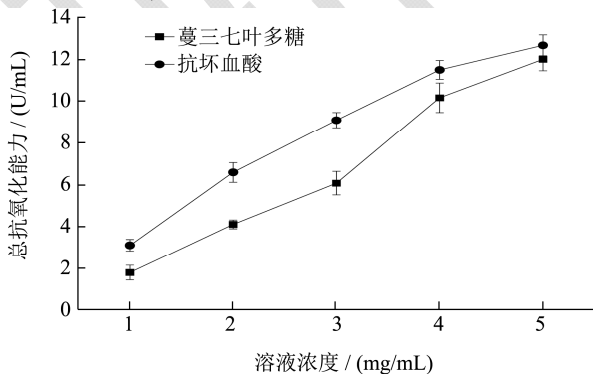


图4 蔓三七叶多糖总抗氧化能力

Fig.4 Total antioxidant capability of polysaccharide from *Gynura procumbens* leaf

不同浓度蔓三七叶多糖总抗氧化能力见图4。蔓三七叶多糖的总抗氧化能力随着溶液浓度增大,抗氧化能力增强,与Vc在不同质量浓度的总抗氧化能力趋势相同。蔓三七多糖溶液浓度为5.00 mg/mL时,总抗氧化能力为(11.98±0.55) U/mL,达到相同溶液浓度的Vc总抗氧化能力(12.65±0.50) U/mL的95.0%以上。可以看出,蔓三七叶多糖总抗氧化能力较强。

2.4.2 对DPPH自由基清除能力

不同浓度蔓三七叶多糖对DPPH自由基清除能力见图5。蔓三七叶多糖与Vc的DPPH自由基清除能力均随着质量浓度增大具有增强趋势。各浓度蔓三七叶多糖对DPPH自由基清除能力稍略于同质量浓度下Vc对DPPH自由基清除能力,但是,各浓度蔓三七叶多糖对DPPH自由基清除效果也很明显,说明蔓三七叶多糖对DPPH自由基清除能力较好。虽然蔓三七叶多糖对DPPH自由基的清除能力低于Vc,但由于其良好的抗氧化活性和较低的副作用,可开发一种天然的抗氧化剂。

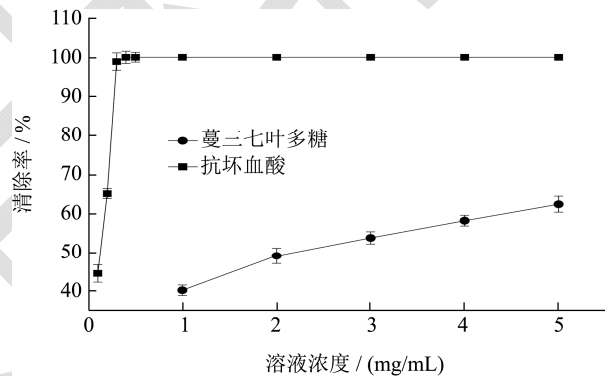


图5 蔓三七叶多糖对DPPH自由基清除能力

Fig.5 The scavenging effect on DPPH free radical of polysaccharide from *Gynura procumbens* leaf

2.4.3 对OH自由基清除能力

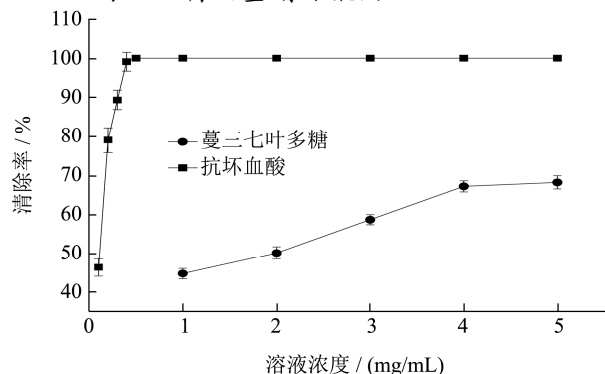


图6 蔓三七叶多糖对OH自由基清除能力

Fig.6 The scavenging effect on OH free radical of polysaccharide from *Gynura procumbens* leaf

不同质量浓度蔓三七叶多糖对OH自由基清除能力见图6。随着蔓三七叶多糖质量浓度的提高,蔓三七叶多糖对OH自由基清除能力均具有增强趋势。在质量浓

度为 5.00 mg/mL 时, 蔓三七叶多糖对 OH 自由基清除率为(68.12±1.12)%, 说明蔓三七叶多糖对 OH 自由基清除效果较好。研究表明相比高分子量的多糖, 中等或低分子量多糖具有较好的抗氧化活性^[19]; 此外, 研究表明多糖的抗氧化活性强弱与其蛋白质、硫酸基和糖醛酸含量相关^[20]。

2.5 对炎症因子释放的影响

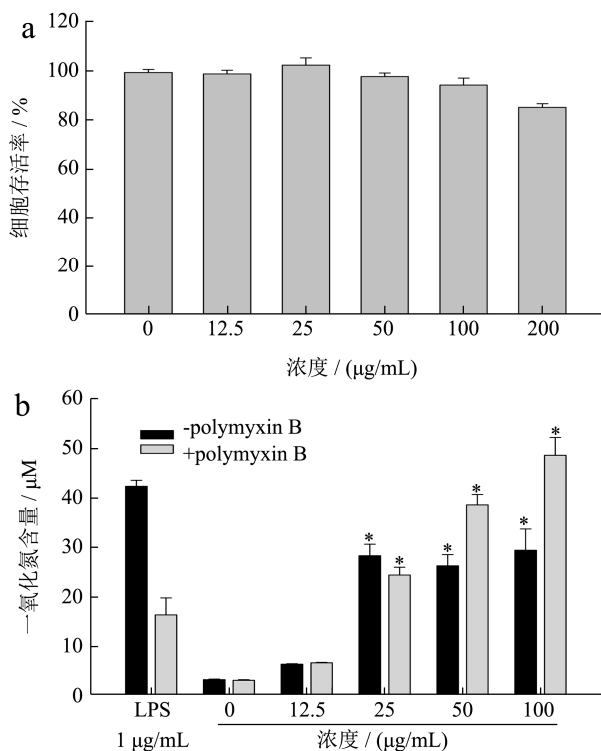


图7 GPLP对RAW 264.7细胞存活率及炎症因子含量的影响

Fig.7 The effects of GPLP on cells viability and the contents of cytokines secretion in RAW 264.7

为了研究蔓三七叶多糖 (GPLP) 对 RAW 264.7 细胞活性的影响, 本实验采用 MTT 法检测 GPLP 一定的浓度范围内细胞的存活率。结果如图 7a 所示, 在给药范围 12.5~100 μg/mL 内, 细胞存活率所呈现的趋势与空白对照组相比基本一致, 这说明 GPLP 在浓度 12.5~100 μg/mL 范围内对 RAW 264.7 细胞并无毒性, 可进行下面的实验研究。但是, 当给药 200 μg/mL 时, 细胞存活率所呈现的下降趋势。

细胞因子是细胞间的信号分子, 由免疫和非免疫细胞分泌, 在免疫反应中起到重要的作用。活化的巨噬细胞能够释放大量的细胞因子(比如 NO)。这些炎症因子在细胞毒性/抑制细胞生长的机制中发挥着重要的作用^[21]。因此, 我们将 NO 的释放水平作为免疫刺激中巨噬细胞活化的指标之一。NO 的含量测定采用 Griess 试剂法, 结果如图 7b 所示, 正常组中 RAW 264.7 细胞只释放少量的 NO (3.01±0.10 μM), 随着给药浓度的增加, RAW

264.7 细胞释放 NO 的含量逐渐增加, 并呈现出浓度依赖性关系。在给药浓度为 25.0 μg/mL 时, NO 的分泌量达到最大 (31.24±2.30 μM)。另一方面, 在给药浓度在 12.5~100 μg/mL 范围时, RAW 264.7 细胞释放 NO 的含量比 LPS 组低, 说明 GPLP 比 LPS 更温和^[22], 适合作为免疫调节剂。

3 结论

3.1 苯酚-硫酸法是常用的测定多糖含量的方法, 结果表明该方法重复性、稳定性好, 测得蔓三七叶粗多糖中的总糖含量为 52.32%±1.56%。多糖经三氟乙酸水解后, 糖腈乙酸酯法进行衍生化, 采用气相色谱法 (GC) 分析测定单糖组成, 实验结果表明, 蔓三七叶粗多糖的单糖组成为阿拉伯糖、木糖、葡萄糖、半乳糖, 摩尔比为 1.39:8.70:3.17:1.00。该方法具有简便灵敏、衍生物杂质少、精密度高、重复性好等优点, 能准确测定出蔓三七叶多糖中单糖的组成, 具有较强的适用性。体外抗氧化活性结果证实蔓三七叶多糖对总抗氧化能力、DPPH 自由基、OH 自由基的清除能力具有较好的清除效果, 并表现出明显的量效关系。

3.2 采用 MTT 法检测研究蔓三七叶多糖 (GPLP) 对 RAW 264.7 细胞活性的影响时, 在给药范围 12.5~100 μg/mL 内, 细胞存活率所呈现的趋势与空白对照组相比基本一致, 这说明 GPLP 在浓度 12.5~100 μg/mL 范围内对 RAW 264.7 细胞并无毒性。总体而言, 蔓三七叶多糖的抗氧化活性和免疫调节较强, 这是否与蔓三七叶多糖的单糖组成丰富相关, 还需要进一步探讨。同时, 下一步的研究工作主要集中在对蔓三七叶粗多糖进行进一步纯化, 再详细探讨其免疫调节机制, 并使蔓三七叶多糖的免疫功效效果得到更详实的数据。

参考文献

- [1] 胡居吾, 付建平, 韩晓丹, 等. 三种植物中绿原酸粗提物的抗菌及抗氧化功效的比较研究[J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(11): 1928-1933
HU Ju-wu, FU Jian-ping, HAN Xiao-dan, et al. Antimicrobial and antioxidant effects of 3 chlorogenic acid extracts [J]. Natural Product Research and Development, 2017, 29(11): 1928-1933
- [2] Mahmood A A, Mariod A A, Albayaty F, et al. Anti-ulcerogenic activity of *Gynura procumbens* leaf extract against experimentally-induced gastric lesions in rats [J]. Journal of Medicinal Plants Research, 2010, 4(8): 685-691
- [3] See-Ziau H, Chen-Neng L, Shiu-Lian M, et al. *Gynura procumbens* Merr. decreases blood pressure in rats by vasodilatation via inhibition of calcium channels [J]. Clinics, 2011,

- 66(1): 143-150
- [4] Hassan Z, Yam M F, Ahmad M, et al. Antidiabetic properties and mechanism of action of *Gymnura procumbens* water extract in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Molecules*, 2010, 15(12): 9008-9023
- [5] 周聪,孙月,李德海,等.柳蘑多糖对肿瘤细胞增殖抑制作用的研究[J].现代食品科技,2017,33(9):56-62
ZHOU Cong, SUN Yue, LI De-hai, et al. Inhibitory effect of polysaccharides from *Pholiota adiposa* on tumor cell proliferation [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2017, 33(9): 56-62
- [6] Hseu Y C, Huang H C, Hsiang C Y. *Antrodia camphorata* suppresses lipopolysaccharide-induced nuclear factor- κ B activation in transgenic mice evaluated by bioluminescence imaging [J]. *Food & Chemical Toxicology*, 2010, 48(8-9): 2319-2325
- [7] 张乔会,逢锦慧,杨喆,等. 响应面法优化杜香多糖提取工艺[J].天然产物研究与开发,2015,27(6):1105-1111
ZHANG Qiao-hui, PANG Jin-hui, YANG Ze, et al. Optimization of extraction conditions of polysaccharide from *Ledum palustre* L. using response surface analysis [J]. *Natural Product Research and Development*, 2015, 27(6): 1105-1111
- [8] Cheng P C, Hsu C Y, Chen C C, et al. *In vivo* immunomodulatory effects of *Antrodia camphorata* polysaccharides in a T1/T2 doubly transgenic mouse model for inhibiting infection of schistosoma mansoni [J]. *Toxicology & Applied Pharmacology*, 2008, 227(2): 291-298
- [9] 王海燕,张隆龙,张凤兰,等.黑松露多糖分离纯化与抗炎活性研究[J].现代食品科技,2017,33(8):31-35
WANG Hai-yan, ZHANG Long-long, ZHANG Feng-lan, et al. Isolation, purification, and characterization of anti-inflammatory activity of truffle polysaccharides [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2017, 33(8): 31-35
- [10] Chang C J, Lu C C, Lin C S, et al. *Antrodia cinnamomea* reduces obesity and modulates the gut microbiota in high-fat diet-fed mice [J]. *International Journal of Obesity*, 2018, 42(2): 231-243
- [11] Li ZW, Kuang Y, Tang SN, et al. Hepatoprotective activities of *Antrodia camphorata* and its triterpenoid compounds against CCl₄-induced liver injury in mice [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2017, 206: 31-39
- [12] 殷玲,吉挺,战旭梅,等.不同分子量段巢脾多糖理化性质及其抗氧化活性分析[J].食品研究与开发,2018,39(4):1-7
YIN Ling, JI Ting, ZHAN Xu-mei, et al. Comparison of physicochemical properties and antioxidant activity of polysaccharides from honeybee comb with different molecular weights[J]. *Food Research and Development*, 2018, 39(4): 1-7
- [13] 董竹平,李超,扶雄.不同品种辣木叶多糖的理化性质和抗氧化活性研究[J].现代食品科技,2018,34(1):38-44
DONG Zhu-ping, LI Chao, FU Xiong. Physicochemical characterization and antioxidant activity of lysaccharides from different varieties of *Moringa oleifera* leaves [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2018, 34(1): 38-44
- [14] Walker J M. The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation [J]. *Methods in molecular biology*, 1994, 32: 5-8
- [15] 李雪,王宏伟,郑东然,等.杜香叶多糖的提取及抗氧化和抗肿瘤活性研究[J].林产化学与工业,2017,3(14):11-17
LI Xue, WANG Hong-wei, ZHENG Dong-ran, et al. Extraction and antioxidant, antiproliferative activities of polysaccharide from *Ledum palustre* L. leaves [J]. *Chemistry and Industry of Forest Products*, 2017, 3(14): 11-17
- [16] 罗海青,吴磊,强倩,等.黑蒜提取物对脂多糖诱导 RAW264.7 细胞炎症因子的影响[J].食品科技,2017,42(8):199-205
LUO Hai-qing, WU Lei, QIANG Qian, et al. The effect of aged black garlic extract on cytokines in LPS-stimulated RAW 264.7 cells [J]. *Food Science and Technology*, 2017, 42(8): 199-205
- [17] Jia X, Zhang C, Qiu J, et al. Purification, structural characterization and anticancer activity of the novel polysaccharides from root [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 132 (5): 67-71
- [18] 李彬,陈向楠,张建法,等.产胞外多糖菌株的筛选及胞外多糖结构分析[J].生物技术通报,2016,32(5):165-171
LI Bin, CHEN Xiang-nan, ZHANG Jian-fa, et al. Screening of exopolysaccharide-producing strains and structural analysis of the exopolysaccharides [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2016, 32(5): 165-171
- [19] Sun L, Wang C, Shi Q, et al. Preparation of different molecular weight polysaccharides from *Porphyridium cruentum* and their antioxidant activities [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2009, 45(1): 42-47
- [20] Ren B, Chen C, Li C, et al. Optimization of microwave-assisted extraction of *Sargassum thunbergii* polysaccharides and its antioxidant and hypoglycemic activities [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 173: 192-201
- [21] Yu J, Hu M, Wang Y, et al. Extraction, partial characterization and bioactivity of polysaccharides from *Senecio scandens* Buch.-Ham [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19: 535-543
- [22] Nie C, Zhu P, Ma S, et al. Purification, characterization and immunomodulatory activity of polysaccharides from stem lettuce [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 188: 236-242

(下转第 257 页)