

铁皮石斛硒多糖制备及免疫活性

周美, 姜阳明, 国光梅, 王道平*, 夏宇, 严艳芳, 胡恩明, 刘翰飞

(贵州省天然产物研究中心, 贵州医科大学省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵州贵阳 550014)

摘要: 为了探究铁皮石斛多糖 (*Dendrobium officinale* Polysaccharide, DOP) 硒化修饰工艺及铁皮石斛硒多糖 (Selenated *Dendrobium officinale* Polysaccharide, SeDOP) 免疫调节活性, 采用单因素结合响应面法优化 SeDOP 制备工艺; 建立 RAW 264.7 细胞增殖模型及环磷酰胺所致的免疫力低下动物模型, 考察 SeDOP 免疫调节活性。结果表明, SeDOP 的最佳制备工艺条件为: 反应温度 72 °C, $m_{\text{Na}_2\text{SeO}_3}:m_{\text{DOP}}=1.1$, 硝酸体积分数为 0.6%, 反应时间 7.2 h, 在此工艺条件下, SeDOP 中硒含量为 1.55 mg/g。细胞增殖试验显示, DOP 与 SeDOP 可剂量依赖促进 RAW 264.7 细胞增殖, 质量浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, DOP 与 SeDOP 促进细胞增殖率分别为 132.93% 和 175.44%。动物试验评价表明, 与模型组相比, DOP 及 SeDOP 组均能增大实验小鼠的免疫脏器指数, 显著提高小鼠血清中 IL-2、TNF- α 和 IFN- γ 水平, DOP 组 IL-2、TNF- α 和 IFN- γ 分别为 155.31、184.26 和 152.91 pg/mL, SeDOP 高剂量组分别为 316.27、385.24 和 208.22 pg/mL。脾脏 H&E 染色结果显示, SeDOP 中、高剂量组能明显改善环磷酰胺所致的脾脏受损。总体而言, SeDOP 具有较好的免疫调节活性, 且效果优于单纯的 DOP, 该研究可为 DOP 硒化修饰及补硒产品的开发应用奠定理论基础。

关键词: 铁皮石斛; 硒多糖; 制备; 免疫活性

文章编号: 1673-9078(2025)02-9-18

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.2.1530

Preparation and Immune Activity of Selenated *Dendrobium officinale* Polysaccharide

ZHOU Mei, JIANG Yangming, GUO Guangmei, WANG Daoping*, XIA Yu, YAN Yanfang,

HU Enming, LIU Hanfei

(Natural Products Research Center of Guizhou Province, State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University, Guiyang 550014, China)

Abstract: The modification of *Dendrobium officinale* polysaccharide (DOP) with selenium and the immune-regulating activity of selenated *Dendrobium officinale* polysaccharide (SeDOP) were investigated. The preparation of SeDOP was optimized using a combination of single-factor experiments and response surface methodology. The immunomodulatory activity of SeDOP was assessed using RAW 264.7 cell proliferation models and immunosuppressed animal models induced by cyclophosphamide. The results indicated that the optimal preparation conditions for SeDOP were as follows: reaction temperature of 72 °C, $m_{\text{Na}_2\text{SeO}_3}:m_{\text{DOP}}=1.1$, the nitric acid volume fraction of 0.6%, and reaction time of 7.2 h, resulting in a selenium

引文格式:

周美,姜阳明,国光梅,等.铁皮石斛硒多糖制备及免疫活性[J].现代食品科技,2025,41(2):9-18.

ZHOU Mei, JIANG Yangming, GUO Guangmei, et al. Preparation and immune activity of selenated *Dendrobium officinale* polysaccharide [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(2): 9-18.

收稿日期: 2023-12-21

基金项目: 贵州省科技支撑计划项目 (黔科合支撑 [2020]4Y068)

作者简介: 周美 (1987-), 女, 博士, 高级实验师, 研究方向: 天然产物、药食用物质研究与开发, E-mail: 1127599776@qq.com

通讯作者: 王道平 (1979-), 男, 副研究员, 研究方向: 中药、民族药开发与利用, E-mail: 84531790@qq.com

content in SeDOP of 1.55 mg/g. Cell proliferation assays demonstrated a dose-dependent enhancement of RAW 264.7 cell proliferation by both DOP and SeDOP at a concentration of 200 $\mu\text{g/mL}$; DOP and SeDOP increased cell proliferation rates by 132.9% and 175.4%, respectively. Animal experiments demonstrated that DOP and SeDOP increased the immune organ index in experimental mice compared to the model group. Serum levels of IL-2, TNF- α , and IFN- γ were significantly elevated in the DOP group, reaching 155.3, 184.2, and 152.9 pg/mL, respectively. In the SeDOP group, the values were 316.2, 385.2, and 208.2 pg/mL. H&E staining of the spleen indicated that SeDOP at medium and high doses significantly alleviated spleen damage induced by cyclophosphamide. Overall, SeDOP exhibited notable immunomodulatory activity, surpassing the effects of pure DOP. This study provides a theoretical foundation for developing and applying selenium-modified DOP and selenium supplements.

Key words: *Dendrobium officinale*; selenium polysaccharide; preparation; immunocompetence

铁皮石斛 (*Dendrobium officinale* Kimura et Migo) 为兰科植物铁皮石斛的茎, 味甘, 微寒, 是我国传统名贵中药材。铁皮石斛主要用于治疗热病津伤, 口干烦躁, 食少干呕, 阴虚火旺, 目暗不明等^[1-4]。传统医学认为铁皮石斛含有丰富的营养物质和功效成分, 主要包括多糖、黄酮类、生物碱类、氨基酸类成分等。现代医学表明, 石斛多糖作为铁皮石斛的主要活性成分, 具有免疫调节、降血糖、抗氧化等生物活性^[5-8]。

硒是机体免疫系统和抗氧化防御系统正常运行的必需微量营养元素, 硒可通过改变硒蛋白的表达从而影响机体的重要生理功能^[7-10], 具有抗氧化、增强免疫、降低金属对机体造成的损伤等活性^[11-14]。与无机硒相比, 有机硒生物活性和安全性更高, 然而, 天然资源中有机硒含量较低。研究发现, 无机硒可与多糖结合转变为有机硒, 硒与多糖结合后的硒化多糖具有更强的免疫活性。如刘思美等^[15]研究发现, 相对于地黄多糖而言, 地黄硒多糖可明显促进小鼠单核巨噬细胞的吞噬能力, 提高小鼠免疫脏器指数, 促进免疫细胞增殖及免疫因子分泌。又如李瑾等^[16]研究发现, 金银花硒多糖能够显著提高小鼠巨噬细胞的增殖, 促进细胞因子分泌, 免疫活性明显高于未硒化的金银花多糖。此外, 硒化修饰已在灵芝、山药、天麻等药材上进行研究, 这些研究促进了相关产业的发展^[17-19]。

据报道, 人体正常代谢需要的硒摄入量为 60 $\mu\text{g/d}$ ^[20], 而我国人均食用低于 45 $\mu\text{g/d}$ ^[21], 缺硒会导致多种疾病, 如克山病、大骨节病、心血管疾病等^[22-26], 因此, 亟需营养补充有机硒。目前关于铁皮石斛多糖硒化修饰的研究尚未见报道, 鉴于铁皮石斛多糖具有天然无毒、生物活性好等优点, 对于研制高效的新型补硒产品有着明显的开发优势, 因

此, 铁皮石斛多糖的硒化研究尤为迫切。本研究探索铁皮石斛多糖硒化修饰工艺条件, 并考察其免疫调节活性, 为开发铁皮石斛多糖相关补硒、免疫产品奠定科学基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞及动物

RAW 264.7 细胞购于上海中科院细胞库, 60 只 8 周龄 SPF 级雄性 KM 小鼠, 由重庆腾鑫科技有限公司提供, 许可证号: SCXK (京) 2019-0008。

1.1.2 试剂

水为超纯水, 亚硒酸钠、氯仿、正丁醇、乙醇、苯酚、高氯酸、硝酸、浓硫酸 (均为分析纯), 天津富宇精细化工有限公司; 葡萄糖对照品、环磷酸胺, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; DMEM 培养基, 美国 Hyclone 公司; CCK-8、TNF- α 、IL-2、IFN- γ 试剂盒, 南京建成生物科技有限公司; 所有其他试剂均为分析级。

1.1.3 主要仪器设备

FEI Nova Nano SEM 450 场发射扫描电镜、Nicolet Is50 红外光谱仪, 美国 Thermo Fisher 公司; VICTOR Nivo 型酶标仪, 美国 PerkinElmer 公司; 密理博明澈 TM-D 24UV 纯水 / 超纯水系统, 德国默克公司; HP-8453 紫外可见分光光度计, 美国 HP 公司。

1.2 方法

1.2.1 铁皮石斛多糖的制备

精密称取铁皮石斛粉末适量, 按固-液比 1:25 (g/mL) 加入蒸馏水, 煮沸提取 2 h, 将上清液浓缩至初始体积的四分之一, 加入 2 倍体积的 Sevag 试剂

($V_{\text{氯仿}}:V_{\text{正丁醇}}=4:1$) 除蛋白质。收集上层溶液, 加入适量无水乙醇至乙醇体积分数为 80%, 置 4 °C 冰箱 24 h, 4 000 r/min 离心 20 min, 沉淀用无水乙醇和丙酮分别洗涤 3 次, 真空冷冻干燥, 即得铁皮石斛粗多糖。再用 DEAE-52 离子交换树脂柱 (3.2 cm×30 cm) 纯化精制, 高效凝胶渗透色谱分析显示, DOP 的平均分子量为 560.3 ku, 高压离子色谱分析表明, 甘露糖与葡萄糖的摩尔比为 7.96:2.04。

1.2.2 铁皮石斛硒多糖的制备

1.2.2.1 单因素试验

参照文献方法^[27]稍作修改, 分别取 0.5 g 铁皮石斛多糖, 精密称定, 置 150 mL 三角瓶中, 加入 50 mL 不同体积分数的硝酸溶液, 以硒含量为指标, 考察以下各因素的影响。

固定反应温度为 60 °C, $m_{\text{Na}_2\text{SeO}_3}:m_{\text{DOP}}$ (g/g) =0.75, 硝酸体积分数为 1.0%, 反应时间 5 h。分别考察反应温度 (50、60、70、80、90 °C)、 $m_{\text{Na}_2\text{SeO}_3}:m_{\text{DOP}}$ (0.50、0.75、1.00、1.25、1.50、1.75)、硝酸体积分数 (0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%、1.2%)、反应时间 (3、4、5、6、7、8 h) 对硒含量的影响。

1.2.2.2 响应面试验

以反应温度 (A)、 $m_{\text{Na}_2\text{SeO}_3}:m_{\text{DOP}}$ (B)、硝酸体积分数 (C)、反应时间 (D) 为自变量, 以硒含量 (Y) 为响应值, 在单因素试验的基础上, 运用 Design Expert 13.0 软件进行四因素三水平试验设计, 通过建立回归方程确定铁皮石斛硒多糖制备的最优工艺条件, 因素与水平见表 1。

表 1 DOP 硒化修饰工艺试验因素与水平

水平	因素			
	A 温度 /°C	B Na_2SeO_3 :DOP (g/g)	C 硝酸体积分数/%	D 反应时间/h
-1	60	0.75:1	0.4	6
0	70	1:1	0.6	7
1	80	1.25:1	0.8	8

1.2.2.3 铁皮石斛硒多糖纯化精制

参考温启华等^[18]的方法, 反应结束后, 待反应液冷却至室温, 用碳酸氢钠调 pH 值至 5~6。反应液 4 000 r/min 离心 5 min, 抽滤, 滤液用纯净水透析。取少量透析液加入抗坏血酸进行检测, 若无红色, 则停止透析。透析液减压浓缩至 20 mL, 冷冻

干燥得到硒化铁皮石斛多糖 (SeDOP)。

1.2.3 硒含量测定

参照文献方法^[18,28], 稍作修改, 用 Na_2SeO_3 分别配制 25 mL 不同质量浓度的硒标准溶液, 分别加入 10 g/L EDTA-2Na 溶液 2 mL, 用 1 mol/L 的盐酸调 pH 值至 2 左右, 加入 10 g/L 邻苯二胺 2.5 mL, 暗处反应 1 h, 再用 10 mL 甲苯萃取, 静置, 取上层甲苯层, 在波长 334 nm 处测定吸光值, 绘制标准曲线。

取 20 mg 硒化铁皮石斛多糖, 精密称定, 依次加入 10 mL HNO_3 、4 mL HClO_4 , 放置 18 h 后加热硝化, 待溶液变至无色, 加入 10 mL 4 mol/L HCl , 继续加热至溶液体积约 10 mL, 冷却, 用去离子水定容至 25 mL, 按标准曲线测定法测定吸光度值, 计算 SeDOP 中硒含量。

$$\omega = \frac{c \times V}{m} \quad (1)$$

式中:

ω ——硒含量, $\mu\text{g/g}$;

c ——根据吸光度值计算出的硒的质量浓度, $\mu\text{g/mL}$;

V ——硝化液定容体积, mL;

m ——硒化铁皮石斛多糖的质量, g。

1.2.4 铁皮石斛硒多糖结构表征

1.2.4.1 红外光谱试验

将冷冻干燥后的片状样品置于红外光谱仪 ATR 附件上, 以空气为空白对照, 于 4 000~400 cm^{-1} 范围内扫描测定。

1.2.4.2 扫描电镜试验

将样品置铝板上, 于真空镀膜仪内镀金, 采用扫描电镜进行扫描。

1.2.5 免疫活性研究

1.2.5.1 RAW 264.7 细胞增殖试验

RAW 264.7 细胞, 加入体积分数为 10% 的胎牛血清、1 mL 胰酶 (0.25% Trypsin-0.53 mmol/L EDTA) 体积分数为 90% 的 DMEM 高糖培养基, 在 37 °C、5% 的 CO_2 培养箱中培养。取对数生长期 RAW 264.7 细胞, 以每毫升 5×10^5 个的细胞密度接种于 96 孔板中, 每孔 100 μL , 分组与给药方式为: (1) 空白对照组; (2) 5 个梯度 (12.5、25、50、100、200 $\mu\text{g/mL}$) 的 DOP 和 SeDOP 处理组, 每孔 20 μL , 每个质量浓度设置 5 个复孔, 空白对照组加入等体积培养基, 置 37 °C、5% 的 CO_2 培养箱中培养 48 h, 弃去上清,

每孔分别加入 20 μL CCK-8 溶液, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中继续孵育 4 h 后取出, 在摇床避光摇匀 5 min, 于 450 nm 下测量吸光度 $A^{[21]}$ 。

$$C_v = \frac{A_s}{A_c} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

C_v —细胞存活率, %;

A_s —给药组的吸光度值;

A_c —对照组的吸光度值。

1.2.5.2 免疫抑制小鼠调节作用试验

动物分组及处理: 60 只雄性 KM 小鼠适应性喂养 3 d 后随机分为 6 组, 每组 10 只, 分别为 SeDOP 低剂量组 (Se-L)、中剂量组 (Se-M)、高剂量组 (Se-H), 灌胃剂量分别为 100、200、400 mg/kg; DOP 组 (Se-N), 400 mg/kg; 模型组 (model); 空白对照组 (blank)。各实验组小鼠连续 10 d 腹腔注射环磷酰胺 (80 mg/kg), 建立免疫抑制模型, 空白对照组小鼠注射等体积的生理盐水。从第 11 天起, DOP 组和 SeDOP 组分别给予不同药物灌胃, 模型组和空白组均灌胃等量 0.9% 生理盐水, 连续 20 d。称重, 摘眼球取血, 室温静置 1 h, 3 500 r/min 离心 20 min, 取上层血清, 置 -20°C 冰箱备用^[29,30]。

免疫脏器指数测定: 取完整的脾脏和胸腺, 称重, 计算免疫脏器指数。

$$D = \frac{M_1}{M_2} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

D —免疫脏器指数 (IOI), mg/g;

M_1 —免疫器官质量, mg;

M_2 —小鼠体质量, g。

细胞因子测定: 按照 ELISA 试剂盒说明书对小鼠血清中的免疫细胞因子 IL-2、TNF- α 、IFN- γ 水平进行测定。

脾脏组织形态学分析: 取小鼠脾脏, 多聚甲醛溶液固定, 石蜡包埋; 提前将组织放置于冰冻切片机的箱体内, 使包埋组织与箱体温度一致, 将组织包埋块固定在刀头上, 切片, 苏木精-伊红 (HE) 染色, 采用 Image J 图像分析软件分析。

1.2.6 统计分析

采用 SPSS 26 进行统计分析, 数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组样本单因素方差分析后, 用 Dunnett's t 检验比较组间差异。

2 结果与讨论

2.1 硒含量标准曲线绘制

以硒的质量浓度为横坐标, 以吸光值为纵坐标绘制标准曲线, 回归方程为: $Y=0.3345X+0.0154$ ($R^2=0.9963$)。

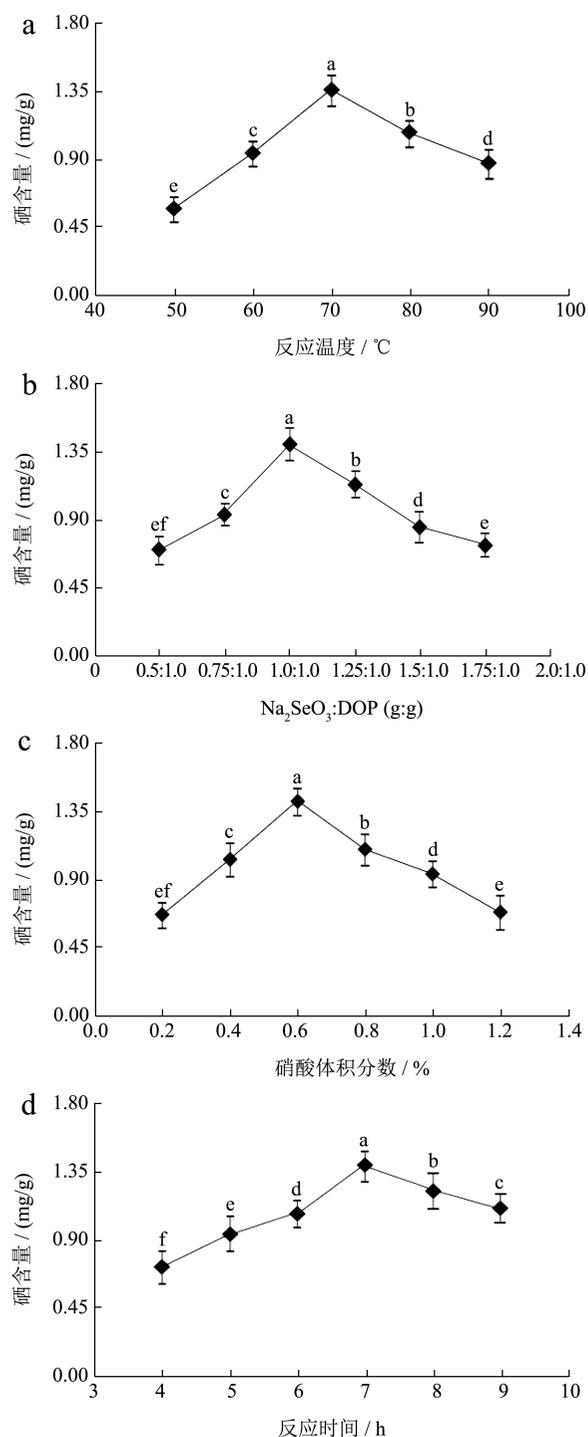


图 1 各单因素对铁皮石斛多糖硒化修饰的影响

Fig.1 Effect of influence factors on selenium content of *Dendrobium officinale* polysaccharides

2.2 单因素试验结果

2.2.1 反应温度对硒化修饰的影响

如图 1a 所示, 铁皮石斛硒多糖中硒含量随着反应温度的增加而增加, 反应温度为 70 °C 时, 硒含量最高, 为 1.35 mg/g, 70 °C 以后随着温度升高硒含量降低, 因此选择反应温度为 70 °C。

2.2.2 亚硒酸钠用量对硒化修饰的影响

如图 1b 所示, 铁皮石斛硒多糖中硒含量随着亚硒酸钠与铁皮石斛多糖质量比值的增加而增加, 二者用量比为 1:1 时, 硒含量达最大值为 1.40 mg/g, 之后随着亚硒酸钠用量增加, 硒含量降低, 可能是因为亚硒酸钠用量的增大破坏了硒与多糖键合的平衡状态, 导致硒含量降低^[31], 因此选择亚硒酸钠与铁皮石斛多糖质量比为 1:1。

2.2.3 硝酸体积分数对硒化修饰的影响

如图 1c 所示, 随着硝酸体积分数增加, 铁皮石斛硒多糖中硒含量逐渐增加, 当硝酸体积分数为 0.6% 时, 硒含量最高, 为 1.42 mg/g, 当硝酸体积分数大于 0.6% 后, 随着硝酸体积分数增大硒含量降低, 可能是因为硝酸体积分数过高导致硒化多糖上 Se-O 键断裂, 导致硒含量下降^[18], 故选择硝酸体积分数为 0.6%。

2.2.4 反应时间对硒化修饰的影响

如图 1d 所示, 随着反应时间的增加, 铁皮石斛硒多糖中硒含量逐渐增加, 反应时间为 7 h 时, 硒含量最高, 为 1.38 mg/g, 超过 7 h 后硒含量下降, 故选择反应时间为 7 h。

2.3 响应面试验结果

2.3.1 回归模型建立及方差分析

利用 Design 13.0 软件对表 2 数据进行多元回归拟合, 得到各因素的影响回归方程为: $Y=+1.54+0.093A+0.10B+0.046C+0.054D+0.000AB+2.5E-003AC+0.022AD+0.000BC+0.000BD+0.030CD-0.27A^2-0.20B^2-0.23C^2-0.17D^2$, 模型决定系数 $R^2=98.63\%$, 说明该模型能较好预测试验结果。预测最佳硒化工艺为温度 72.30 °C, 亚硒酸钠与铁皮石斛多糖质量比 1:1.06, 硝酸体积分数 0.61%, 反应时间 7.24 h, 此条件下铁皮石斛硒多糖中硒含量为 1.56 mg/g。

表 2 铁皮石斛多糖硒化修饰响应面试验结果

Table 2 The response surface test results of selenium *Dendrobium officinale* polysaccharide

序号	A 温度 /°C	B Na ₂ SeO ₃ :DOP (g/g)	C 硝酸体积分数/%	D 反应时间/h	硒含量 / (mg/g)
1	80	1:1	0.8	7	1.18
2	70	1:1	0.6	7	1.52
3	70	1.25:1	0.6	6	1.22
4	70	1:1	0.8	6	1.15
5	70	1:1	0.6	7	1.55
6	80	1:1	0.6	8	1.30
7	60	1:1	0.6	8	1.03
8	70	1:1	0.4	6	1.08
9	70	0.75:1	0.6	8	1.13
10	70	0.75:1	0.6	6	1.02
11	80	0.75:1	0.6	7	1.05
12	60	1:1	0.8	7	0.97
13	70	1.25:1	0.8	7	1.25
14	70	1:1	0.6	7	1.53
15	60	1.25:1	0.6	7	1.10
16	70	1:1	0.6	7	1.52
17	70	0.75:1	0.8	7	1.02
18	70	1.25:1	0.6	8	1.33
19	80	1:1	0.4	7	1.10
20	70	0.75:1	0.4	7	0.95
21	70	1:1	0.6	7	1.55
22	70	1.25:1	0.4	7	1.18
23	60	1:1	0.4	7	0.90
24	70	1:1	0.4	8	1.08
25	80	1:1	0.6	6	1.10
26	70	1:1	0.8	8	1.27
27	60	1:1	0.6	6	0.92
28	80	1.25:1	0.6	7	1.23
29	60	0.75:1	0.6	7	0.92

回归模型方差分析结果见表 3, 从试验结果可知, 所建立的模型高度显著, 失拟项不显著 ($P=0.0864$), 说明实际试验结果与预测值拟合度良好。模型中一次项 A、B、D 及二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 高度显著, A 为极显著。根据 F 值可知, 各因素对铁皮石斛多糖硒化修饰的影响主次为: 反应温度 (A) > Na₂SeO₃ 用量 (B) > 硝酸体积分数 (C) > 反应时间 (D)。

表 3 方差分析

Table 3 Data of variance analysis

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	1.12	14	0.080	72.10	<0.000 1	***
A	0.10	1	0.10	94.45	<0.000 1	***
B	0.12	1	0.12	112.07	<0.000 1	***
C	0.025	1	0.025	22.78	0.000 3	**
D	0.035	1	0.035	31.81	<0.000 1	***
AB	2.220E-016	1	2.220E-016	2.006E-013	1.000 0	
AC	2.500E-005	1	2.500E-005	0.023	0.882 7	
AD	2.025E-003	1	2.500E-005	1.83	0.197 6	
BC	2.220E-016	1	2.220E-016	2.006E-013	1.000 0	
BD	2.220E-016	1	2.220E-016	2.006E-013	1.000 0	
CD	3.600E-003	1	3.600E-003	3.25	0.092 9	
A ²	0.48	1	0.48	431.47	<0.000 1	***
B ²	0.25	1	0.25	225.91	<0.000 1	***
C ²	0.34	1	0.34	310.25	<0.000 1	***
D ²	0.18	1	0.18	164.59	<0.000 1	***
残差	0.015	14	1.107E-003			
失拟项	0.014	10	1.417E-003	4.30	0.086 4	
净误差	1.320E-003	4	3.300E-004			
总和	1.13	28				

注: ** $P < 0.001$, 差异极显著; *** $P < 0.000 1$, 差异高度显著。

2.3.2 响应曲面结果分析

各因素两两交互作用的响应面结果如图 2 所示, 反应温度、亚硒酸钠用量的曲面弯曲程度最大, 其次是硝酸体积分数和反应时间, 说明反应温度和亚硒酸钠用量的交互作用对铁皮石斛多糖硒化修饰的影响较大, 这与表 2 中 F 值判断结果一致。

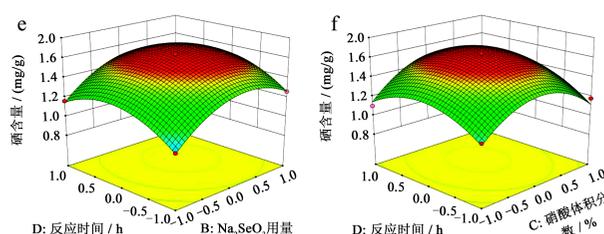
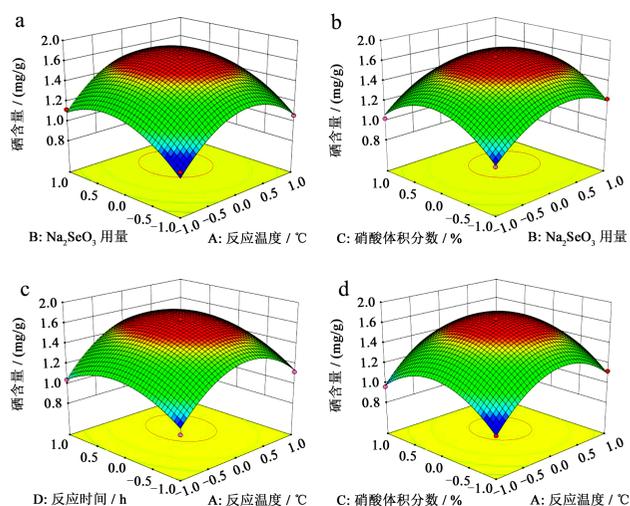


图 2 各因素交互作用的响应面图

Fig.2 Response surface diagram of the interaction of various factors

2.3.3 模型验证

通过响应面软件模型, 预测铁皮石斛多糖最佳硒化工艺为反应温度 72.30 °C, 亚硒酸钠与铁皮石斛多糖质量比 1:1.06, 硝酸体积分数为 0.6%, 反应时间 7.24 h, 此工艺条件下制备的铁皮石斛多糖, 硒含量为 1.56 mg/g。为了实际操作方便, 将所预测的工艺调整为反应温度 72 °C, 亚硒酸钠与铁皮石斛多糖质量比 1:1.1, 硝酸体积分数 0.6%, 反应时间 7.2 h, 重复 3 次试验, 得到硒含量为 1.55 mg/g, 试验结果与预测值接近, 说明模型准确可靠。

2.4 铁皮石斛多糖结构分析

2.4.1 红外图谱分析

图3为红外光谱测定结果,从图3a中可以看出,铁皮石斛多糖在 $3\ 352\ \text{cm}^{-1}$ 处有一个较宽的吸收峰,与-OH的拉伸振动和糖类的特征信号相对应; $2\ 920\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰为C-H的伸缩振动, $1\ 724\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1\ 635\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰为C=O的伸缩振动; $1\ 373\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰为C-H的变形伸缩振动, $1\ 032\sim 1\ 138\ \text{cm}^{-1}$ 附近的吸收为C-O-C的非对称拉伸振动信号, $905\ \text{cm}^{-1}$ 的吸收峰表明存在D-葡萄糖,而 871 和 $809\ \text{cm}^{-1}$ 的吸收峰表明存在 β -糖苷甘露糖残基^[18,32,33]。图3b为铁皮石斛硒多糖的红外图谱,从图中可以看出,其主要特征吸收峰的峰形和强度与铁皮石斛多糖基本一致,区别之处在于铁皮石斛硒多糖在 822 、 $894\ \text{cm}^{-1}$ 处出现两个特征吸收峰, $822\ \text{cm}^{-1}$ 属于Se-O伸缩振动^[34], $894.32\ \text{cm}^{-1}$ 属于Se=O伸缩振动^[35],说明本试验通过硒化修饰得到了铁皮石斛硒多糖。

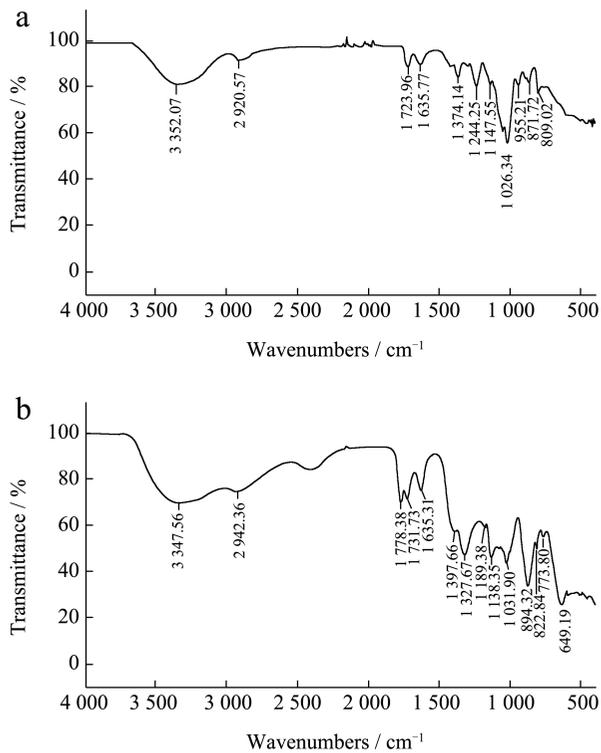


图3 DOP (a) 和 SeDOP (b) 红外光谱图

Fig.3 Infrared spectrum analysis of DOP (a) and SeDOP (b)

2.4.2 扫描电镜分析

如图4所示为扫描电镜测定结果,从图中可以看出,铁皮石斛多糖呈层叠的片状结构(图4a),铁皮石斛硒多糖微观结构发生了较大改变,呈疏松

多孔的网状结构(图4b),这与其他多糖硒化后更疏松、表面分散性更好、粒径变得更小等特征相似^[18,28]。溶解性实验表明,铁皮石斛硒多糖明显比石斛多糖易溶,这可能与其疏松的表面结构有关。

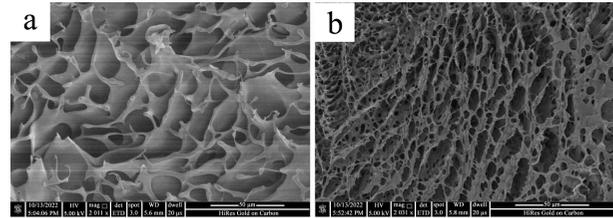


图4 DOP (a) 和 SeDOP (b) 电镜扫描图

Fig.4 SEM images of DOP (a) and SeDOP (b)

2.5 铁皮石斛硒多糖免疫调节活性

2.5.1 RAW 264.7细胞增殖实验结果

利用CCK-8法测定RAW 264.7细胞增殖活性,如图5所示,DOP和SeDOP质量浓度为 $12.5\ \mu\text{g/mL}$ 时,促进细胞增殖效果不明显。质量浓度在 $25\sim 200\ \mu\text{g/mL}$ 时,DOP和SeDOP可剂量依赖促进RAW 264.7细胞增殖,当质量浓度为 $200\ \mu\text{g/mL}$ 时,DOP与SeDOP促进细胞增殖率分别为132.93%和175.44%;DOP和SeDOP促进RAW 264.7细胞增殖率存在组内和组间显著性差异,总体而言,与DOP相比,SeDOP具有更好的增殖活性。

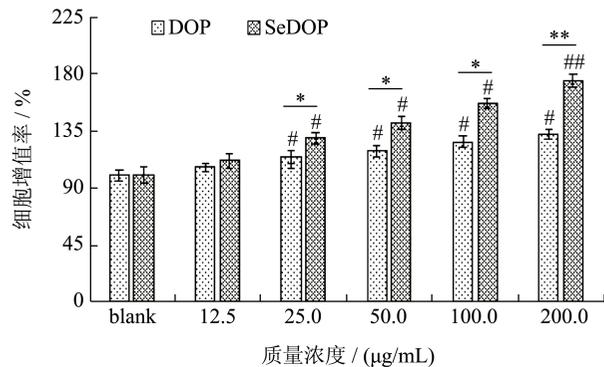


图5 不同质量浓度 DOP、SeDOP 促进细胞增殖图

Fig.5 Relationship of DOP and SeDOP at different concentrations (n=6)

注:组内比较 * $P<0.05$,** $P<0.01$;组间比较 # $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

2.5.2 免疫脏器指数

如图6所示,本试验中,模型组脏器指数和胸腺指数分别为 1.76 和 $0.73\ \text{mg/g}$,空白对照组分别为 3.24 和 $1.62\ \text{mg/g}$,DOP组脏器指数和胸腺指数分别为 2.24 和 $0.92\ \text{mg/g}$,SeDOP组小鼠脏器指数

为 2.26~2.97 mg/g, 胸腺指数为 0.87~1.31 mg/g, 表明各多糖组均能增大实验小鼠的免疫脏器指数。与 DOP 组 (Se-N) 相比, SeDOP 中、高剂量组 (Se-M、Se-H) 能显著提升小鼠免疫脏器指数, 表明 SeDOP 具有较好的免疫调节作用。

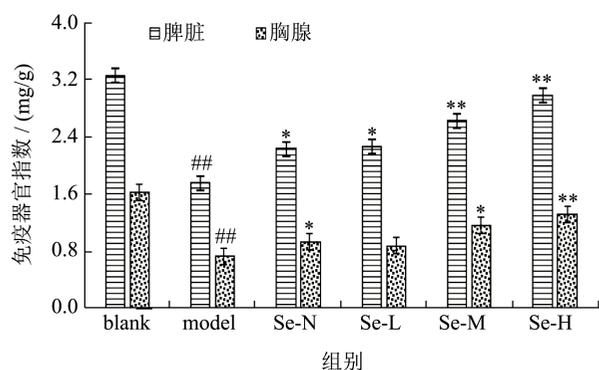


图 6 DOP、SeDOP 对小鼠免疫脏器指数的影响

Fig.6 Effects of DOP and SeDOP on immune organ index in mice

注: 与空白组比较, $^{##}P < 0.01$; 与模型组比较, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ 。

2.5.3 小鼠血清细胞因子

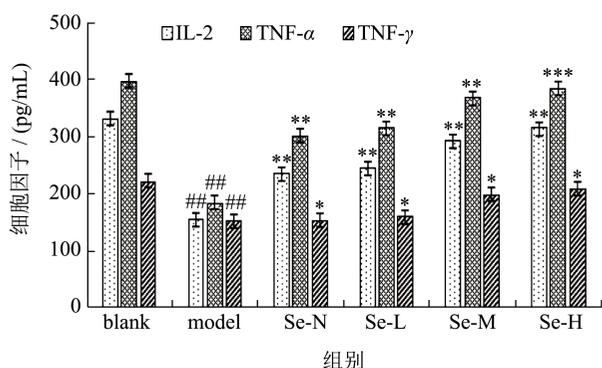


图 7 DOP、SeDOP 对小鼠血清细胞因子的影响

Fig.7 Effects of DOP and SeDOP on serum cytokines in mice

注: 与空白组比较, $^{##}P < 0.01$; 与模型组比较, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.01$ 。

IL-2 具有增强免疫调节的作用, TNF- α 在机体宿主防御和免疫反应中具有重要的作用, IFN- γ 是免疫调节的关键细胞因子。为了探讨 SeDOP 对细胞因子的影响及免疫活性的相关性, 本研究测试了小鼠血清中 IL-2、TNF- α 和 IFN- γ , 模型组 IL-2、TNF- α 和 IFN- γ 分别为 155.31、184.26 和 152.91 pg/mL, DOP 组分别为 236.37、301.82 和 152.26 pg/mL, SeDOP 高剂量组分别为 316.27、385.24 和 208.22 pg/mL; SeDOP 可显著逆转环磷酰胺所致的细胞因子水平降低, 可见 SeDOP 具有较好的免疫调节活性, 且效

果优于 DOP, 实验结果见图 7。

2.5.4 小鼠脾脏组织形态

脾脏切片结果如图 8 所示, 空白对照组白髓和红髓形态完整、边界清晰, 淋巴鞘轮廓清晰; 模型组白髓被破坏严重, 白髓和红髓的边界极度模糊, 动脉周围淋巴鞘也破坏严重, 说明造模成功。在铁皮石斛多糖组 (Se-N) 和铁皮石斛硒多糖低剂量组 (Se-L) 中, 可见与模型组相似的脾脏受损特征, 但 Se-L 组白髓的面积有所增大; 在铁皮石斛硒多糖中、高剂量组 (Se-M、Se-H) 中, 白髓面积的增大更为明显, 特别是 Se-H 组中的白髓和红髓基本上接近正常情况, 表明 SeDOP 对机体具有较好的免疫调节作用。

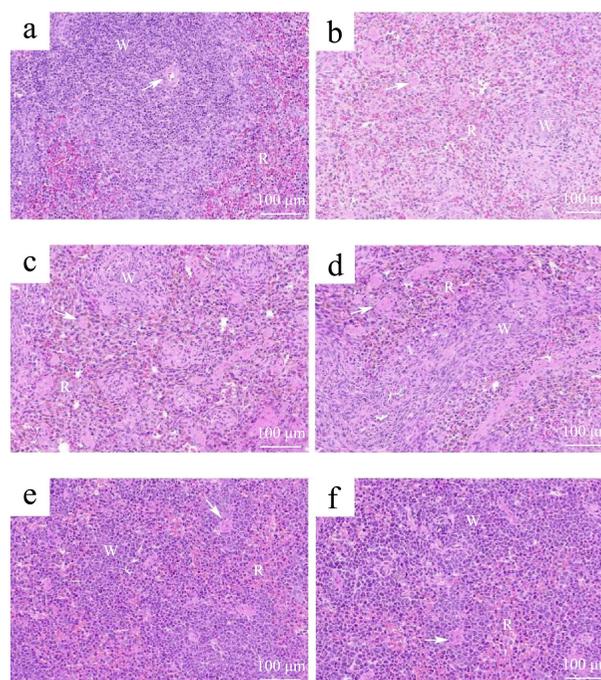


图 8 DOP、SeDOP 对小鼠脾脏病理形态的影响

Fig.8 Effects of DOP and SeDOP on the pathological morphology of mice spleen

注: a 为 blank, b 为 model, c 为 Se-N, d 为 Se-L, e 为 Se-M, f 为 Se-H。W 白髓, R 红髓, \rightarrow 动脉周围淋巴鞘。

3 结论

本研究通过单因素结合响应面优化得到了铁皮石斛硒多糖的最佳制备工艺条件。红外光谱显示, 铁皮石斛硒多糖在 822、894 cm^{-1} 处出现两个特征吸收峰, 822 cm^{-1} 属于 Se-O 伸缩振动, 894.32 cm^{-1} 属于 Se=O 伸缩振动, 说明成功制备了铁皮石斛硒多糖。扫描电镜显示, 硒化修饰后的铁皮石斛多糖微观结构发生了较大改变, 呈疏松多孔的网状结构。

细胞增殖实验结果显示,与DOP相比,SeDOP具有更好的促进RAW 264.7细胞增殖活性。进一步的动物实验评价表明,DOP及SeDOP组均能增大实验小鼠的免疫脏器指数;显著提高小鼠血清免疫因子水平;脾脏组织H&E染色结果表明,SeDOP中、高剂量组能明显改善环磷酰胺所致的脾脏受损。总体而言,SeDOP具有更好的免疫调节活性,说明硒化修饰提高了铁皮石斛多糖的免疫调节活性。

参考文献

- [1] 林华嗣,黄庆,田胜兰,等.乳酸菌发酵前后铁皮石斛汁中功能活性物质与风味成分的比较[J].现代食品科技,2023,39(12):253-261.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[M].北京:中国医药科技出版社,2020.
- [3] HE Y, LI L, CHANG H, et al. Research progress on extraction, purification, structure and biological activity of *Dendrobium officinale* polysaccharides [J]. *Frontiers in Nutrition*, 2022, 18(9): 965073.
- [4] XU L, ZENG X X, LIU Y, et al. Effect of *Dendrobium officinale* polysaccharides on central nervous system disease: Based on gut microbiota [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 240: 124440.
- [5] CHANG J Z, ZHOU Y, CONG G B, et al. *Dendrobium candidum* protects against diabetic kidney lesions through regulating vascular endothelial growth factor, Glucose Transporter 1, and connective tissue growth factor expression in rats [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2019, 120: 13924-13931.
- [6] 王治丹,代云飞,罗尚娟,等.铁皮石斛化学成分及药理作用的研究进展[J].华西药学杂志,2022,37(4):472-476.
- [7] ZENG J, LI D N, LI Z B, et al. *Dendrobium officinale* attenuates myocardial fibrosis via inhibiting EMT signaling pathway in HFD/STZ-induced diabetic mice [J]. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2020, 43, 864-872.
- [8] YANG X, JI W, ZHOU Z, et al. *Dendrobium officinale* polysaccharide regulated hepatic stellate cells activation and liver fibrosis by inhibiting the SMO/Gli 1 pathway[J]. *Journal of Functional Foods*, 2024, 112: 105960.
- [9] LU X M, GUO C H, ZHU Y. Selenium-enriched crude polysaccharide from *Rosa roxburghii* Tratt ameliorates cadmium-induced acute kidney injury in mice by modulating intestinal microorganisms [J]. *Heliyon*, 2023, 9: e19678.
- [10] LU Y, LI Y M, QU W, et al. Systemic subchronic toxicity and comparison of four selenium nutritional supplements by 90-day oral exposure in Sprague-Dawley rats [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2023, 181: 114059.
- [11] 梁欢,黄进,王丽,等.药用植物硒多糖的研究进展[J].中国中药杂志,2018,43(15):3080.
- [12] WANG L B, LI L Y, GAO J Y, et al. Characterization, antioxidant and immunomodulatory effects of selenized polysaccharides from *dandelion* roots [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 260: 117796.
- [13] ZHAO M M, BAI J W, BU X Y, et al. Characterization of selenized polysaccharides from *Ribes nigrum* L. and its inhibitory effects on α -amylase and α -glucosidase [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 259: 117729.
- [14] LI J H, SHI Q, XUE Y, et al. The effects of in ovo feeding of selenized glucose on liver selenium concentration and antioxidant capacity in neonatal broilers [J]. *Chinese Chemical Letters*, 2024, 3: 109239.
- [15] 刘思美,赵鹏,张婷婷,等.地黄硒多糖的合成、表征及免疫活性分析[J].中国中药杂志,2022,47(11):2938-2946.
- [16] 李瑾,刘冲英,张婷婷,等.微波合成金银花硒多糖工艺及免疫活性研究[J].中国中药杂志,2022,47(14):3773-3780.
- [17] 吕亚辉,杨亚萍,刘飞祥,等.灵芝富硒发酵条件优化及硒多糖抗运动疲劳活性研究[J].中国食品添加剂,2023, 1:152-163.
- [18] 刘敏,张岚,王丹,等.山药硒多糖对镉暴露小鼠镉蓄积和氧化应激的缓解作用[J].食品研究与开发,2023,44(21): 51-56.
- [19] 温启华,陆逸昊,杨露芳,等.硒化天麻多糖的制备、结构表征及其抗氧化活性评价[J].食品工业科技,2024,45(3): 18-30.
- [20] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会.中国居民膳食营养素参考摄入量第3部分[M].北京:科学出版社,微量元素(WS/T 578.3-2017),2017.
- [21] 王立平,唐德剑,沈亚美,等.硒的营养缺乏现状及补充方式[J].食品工业,2020,41(1):339-343.
- [22] ZHANG L, ZENG H, CHENG W H. Beneficial and paradoxical roles of selenium at nutritional levels of intake in health plan and longevity [J]. *Journal of Nutrition*, 2018, 148(1): 22-40.
- [23] 余海立,张彦,郑明山,等.缺硒大鼠模型的构建及其在认知功能中应用的研究进展[J].现代预防医学,2022, 49(15):2830-2838.
- [24] WANG X L, LIU W H, LI Y L, et al. Preparation and anti-tumor activity of selenium nanoparticles based on a polysaccharide from *Paeonia lactiflora* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 232: 123261.
- [25] CATCHPOLE A, MAGUIRE D, WADSWORTH J M, et al. The effect of acute and chronic inflammatory response on plasma and erythrocyte selenium concentrations: Implications for assessing selenium nutritional status [J]. *Clinical Nutrition Open Science*, 2024, 59: 387236.
- [26] LIAO Q, YAN C, HUANG N, et al. Progress in selenium

- and genetics associated with Keshan disease [J]. *Journal of Trace Elements and Minerals*, 2024, 7: 100107.
- [27] 胡润锋,李浚哲,李鹏飞,等.响应面法优化硒化桑叶多糖的制备工艺及其体外抗氧化活性[J].*中南林业科技大学学报*,2022,42(8):148-157.
- [28] 李丽彩,王留成,程相林,等.紫外分光光度法测定富硒麦芽中微量元素硒的含量[J].*应用化工*,2016,45(4):771-774.
- [29] 杨许花,郭星辰,陈红,等.柳茶多糖对环磷酰胺诱导的免疫抑制小鼠的免疫调节及抗炎作用[J].*动物营养学报*,2023,35(3):2018-2029.
- [30] LI S X, BAO F Y, CUI Y. Immunoregulatory activities of the selenylated polysaccharides of *Lilium davidii* var. *unicolor* Salisb *in vitro* and *in vivo* [J]. *International Immunopharmacology*, 2021, 94: 107445.
- [31] 李晓娇,闵诗碧,曹凯红,等.龙陵紫皮石斛多糖的硒化修饰及其抗氧化活性[J].*食品研究与开发*,2022,43(20):117-124.
- [32] LI Q, XIE Y, SU J W, et al. Isolation and structural characterization of a neutral polysaccharide from the stems of *Dendrobium densiflorum* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2012, 50: 1207-1211.
- [33] 董慧茹.仪器分析[M].第三版.北京.化学工业出版社,2016.
- [34] 高义霞,周向军,王凤,等.刺槐豆多糖硒酸酯的制备及表征[J].*食品工业科技*,2012,14:288-291.
- [35] 王占一,戴博,张立华,等.石榴皮多糖硒酸酯制备工艺参数优化及其结构分析[J].*食品科学*,2016,37(10):40-46.