

欧李多糖的制备、结构表征及免疫调节活性研究

冯莹莹¹,王 锐²,董兆斌³,
廖玉美⁴,王国良¹,张润光¹,张有林^{1*}

¹陕西师范大学食品工程与营养科学学院,西安 710119;²陕西省林业技术推广总站,西安 710082;

³陕西省商洛盛大实业股份有限公司,商洛 726000;⁴陕西省城固县农业机械管理站,汉中 723200

摘要:欧李富含钙素,营养丰富,且具有免疫功能,研究欧李多糖的制备、结构及免疫调节活性,可为欧李深加工提供基础。本文以欧李为原料,采用水提醇沉法提取欧李多糖(*Cerasus humilis* polysaccharide, CHP),利用响应面法优化提取工艺。对提取的欧李多糖用 DEAE-52 纤维素层析柱、G-100 葡聚糖凝胶柱纯化。用高效液相色谱、凝胶渗透色谱和红外光谱对欧李多糖结构表征,并测定欧李多糖的免疫调节活性。结果表明,欧李多糖最佳提取工艺条件为提取温度 79 °C,提取时间 2 h,液料比 16:1 (mL/g)。在此条件下,欧李干粉多糖得率为(32.18 ± 0.08)%。纯化后欧李多糖主要有 CHPP-1 和 CHPP-2 两个组分,CHPP-1、CHPP-2 中多糖含量分别为 99.16% 和 99.33%。CHPP-1 的单糖组成及摩尔占比为阿拉伯糖:半乳糖醛酸:葡萄糖=51.4:20.29:17.36,分子量为 47.26 kDa。CHPP-2 的单糖组成及摩尔占比为阿拉伯糖:半乳糖醛酸:葡萄糖=41.81:28.24:11.68,分子量为 22.94 kDa。两个组分均为吡喃环型多糖。CHPP-2 可显著增强巨噬细胞增殖活性,有效刺激细胞释放 NO 和 TNF- α 、IL-6 及 IFN- β 。欧李多糖含量丰富,且具有较强的免疫调节活性。

关键词:欧李;多糖;提取;结构表征;免疫调节活性

中图分类号:TS201

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)5-0739-11

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.5.002

Preparation, structure characterization and immunoregulatory activity of *Cerasus humilis* polysaccharide

FENG Luo-luo¹, WANG Rui², DONG Zhao-bin³,
LIAO Yu-mei⁴, WANG Guo-liang¹, ZHANG Run-guang¹, ZHANG You-lin^{1*}

¹College of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710119, China;

²Shaanxi Forestry Technology Extension Station, Xi'an 710082, China;

³Shaanxi Shangluo Shengda Industrial Corporation Limited, Shangluo 726000, China;

⁴Shaanxi Chenggu County Agricultural Machinery Management Station, Hanzhong 723200, China

Abstract: *Cerasus humilis* is rich in calcium, rich in nutrition, and has immune function. Research on the preparation, structure and immunoregulatory activity of *C. humilis* polysaccharide (CHP) can provide basis for further processing of *C. humilis*. In this paper, the CHP was extracted by water extraction and alcohol precipitation method using *C. humilis* as raw material, and the extraction process was optimized by response surface methodology. The CHP was purified by DEAE-52 cellulose chromatography column and G-100 Sephadex gel column. The structure of CHP was characterized by high performance liquid chromatography, gel permeation chromatography and infrared spectroscopy, and the immunoregulatory activity of CHP was determined. The results showed that the optimal extraction process conditions of CHP were as follows: extraction temperature 79 °C, extraction time 2 h, liquid-solid ratio 16:1 (mL/g). Under these conditions, the polysaccharide yield of dried *C. humilis* powder was (32.18 ± 0.08)%. There were CHPP-1 and CHPP-2 in the purified *C. humilis* polysaccharide. The content of

收稿日期:2021-12-20 接受日期:2022-03-15

基金项目:陕西省农业领域重点产业链项目(2021ZDLNY04-05);陕西省林业科学院科技创新计划(SXLK2021-0232)

*通信作者 Tel:86-013891830608; E-mail:youlinzh@snnu.edu.cn

CHPP-1 and CHPP-2 were 99.16% and 99.33%, respectively. The monosaccharide composition and molar ratio of CHPP-1 were arabinose: galacturonic acid: glucose = 51.4: 20.29: 17.36, molecular weight was 47.26 kDa. The monosaccharide composition and molar ratio of CHPP-2 were arabinose: galacturonic acid: glucose = 41.81: 28.24: 11.68, molecular weight was 22.94 kDa. Both components were pyranoid ring polysaccharides. CHPP-2 can significantly enhance the proliferation of macrophages and effectively stimulate the release of NO, TNF- α , IL-6 and IFN- β . The CHP is rich in content and has strong immunomodulatory activity.

Key words: *Cerasus humilis*; polysaccharide; extraction; structure characterization; immunoregulatory activity

欧李(*Cerasus humilis* (Bge.) Sok.)为蔷薇科櫻桃属落叶小灌木,主要分布在黑龙江、吉林、辽宁等省区,是我国大西北干旱区域造林的先锋树种,也是我国的特有果树^[1]。欧李果实鲜红饱满,果肉具特殊香气,含钙量极高,被誉为“钙果”,是天然钙素来源和保健水果,也是“第三代功能水果”之一^[2]。欧李果实富含多种糖类、有机酸、氨基酸、维生素及矿物质元素,是一种具有较高营养价值的水果^[3]。欧李种仁为药食同源的中药材郁李仁^[4]。多糖是一类大分子聚合物,具有免疫调节^[5]、抗肿瘤^[6]、抗癌、抗菌、抗氧化等多种药理活性。近年来用欧李果实深加工研发的产品有欧李果汁^[7]、果脯^[8]、果酒等,但关于对欧李多糖的研究鲜有报道。本文以陕西榆林沙地栽培的欧李为原料,对其多糖制备、结构特征及其免疫调节活性进行研究,旨在为我国欧李资源开发利用提供理论基础和技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

欧李果实(陕西省榆林市沙漠研究所,果实完熟,批号:202002);RAW 264.7 巨噬细胞(中国热带农业科学院椰子研究所细胞库,批号:20200822);甘露糖、核糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖、岩藻糖均为标准品(上海源叶生物科技有限公司,批号:C11M10H82342、Y27M11C114179、O12A10K95105、R09J11H115178、S12J10I90131、080M00143V、Z22J9H64187、B02M6W1、Z01J9H62701、F05D9Y75981);DMEM 高糖培养基(美国赛默飞世尔科技公司,批号 AF29494674);NO 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号:011020200903);TNF- α 、IL-6、IFN- β 试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号:202101);其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

RE-52AA 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);LGJ-25C 真空冷冻干燥机(北京四环科学仪器厂);Multiskan Go 型全波长酶标仪(美国热电公

司);UV300 型紫外分光光度计(上海仪迈仪器科技有限公司);1260 II 型高效液相色谱仪(美国安捷伦科技公司);ELEOS System 凝胶色谱仪(美国怀雅特技术公司);傅里叶红外变换光谱仪(德国布鲁克公司);CO₂ 恒温培养箱(美国赛默飞世尔科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 欧李多糖的提取

采用传统的水提醇沉法。将欧李鲜果去核晒干粉碎,过 0.25 mm 孔径筛,得欧李干粉。称取欧李干粉 20.0 g,加入适量 95% 乙醇浸泡,去除果粉中多余的还原糖与杂质,过滤后滤渣加适量蒸馏水,用不同温度的热水浸提一段时间,提取液真空抽滤,循环提取 3 次,合并 3 次提取液,减压浓缩至原体积 1/4,然后缓慢加入 4 倍体积的 95% 乙醇,充分混匀,放置于 4 °C 冰箱沉淀 24 h,离心取沉淀物,加入 100 mL 蒸馏水,旋蒸去除乙醇,得到欧李粗多糖溶液。

1.3.2 单因素试验

以蒸馏水为提取溶剂,液料比 20:1 (mL/g),提取时间 2.0 h,设置提取温度分别为 60、70、80、90、100 °C,考察提取温度对欧李多糖得率的影响;以液料比 20:1 (mL/g),提取温度 80 °C,设置提取时间分别为 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h,考察提取时间对欧李多糖得率的影响;以提取时间 2.0 h,提取温度 80 °C,设置液料比分别为 10:1、15:1、20:1、25:1、30:1 (mL/g),考察液料比对欧李多糖得率的影响。

1.3.3 响应面法优化试验

选取提取温度 X_1 、提取时间 X_2 、液料比 X_3 三个因素,以欧李多糖得率为响应值,采用响应面分析法,得到二次回归方程,并找出最佳工艺参数。试验设计如表 1 所示。

1.3.4 欧李多糖得率的测定

采用苯酚-硫酸法^[9]。准确称取适量的葡萄糖,分别配制成浓度为 0、20、40、60、80、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的葡

表 1 响应面设计因素与水平

Table 1 Factors and levels of response surface design

水平 Level	因素 Factor		
	X_1 提取温度 Extraction temperature(°C)	X_2 提取时间 Extraction time(h)	X_3 液料比 Liquid-solid ratio(mL/g)
-1	70	1.5	10
0	80	2.0	15
1	90	2.5	20

葡萄糖标准溶液。各吸取 1.0 mL 溶液,加入 1.0 mL 5% 苯酚和 5.0 mL 浓硫酸,摇晃均匀,30 °C 水浴反应 20 min。冷却后在 490 nm 波长下用分光光度计测定吸光度值。以浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标绘制标准曲线,得到标准曲线方程: $y = 6.1373x + 0.1224$, $R^2 = 0.9997$ 。

取 1.0 mL 欧李多糖溶液,加入 1.0 mL 5% 苯酚和 5.0 mL 浓硫酸,30 °C 水浴反应 20 min,冷却后在 490 nm 波长下测定吸光度值,代入标准曲线,得出多糖浓度。再用公式计算欧李多糖得率(以干粉计)。

$$\text{欧李多糖得率} = \frac{c \times V \times 10^{-3}}{m} \times n \times 100\%$$

式中, c :从标准曲线上查得样品测定液中多糖的浓度,单位为 mg/mL; V :样品定容体积,单位为 mL; m :样品质量,单位为 g; n :稀释倍数。计算结果保留至小数点后两位。

1.3.5 欧李多糖的分离纯化

1.3.5.1 蛋白质、色素脱除

在欧李粗多糖溶液中加入约 1/4 体积的 Sevage 试剂(正丁醇:氯仿 = 1:4),去除沉淀,反复操作约 10 次,直至蛋白质去除完全。用 D-101 大孔树脂脱色 6 h,并用 5 000 Da 截留量的透析袋透析 48 h,去除小分子杂质,冷冻干燥,得到较高纯度的欧李多糖(*Cerasus humilis* polysaccharide, CHP)。

1.3.5.2 DEAE-52 纤维素柱层析

用蒸馏水以 1 mL/min 流速将 DEAE-52 纤维素层析柱(2.6 mm × 30 cm)平衡 12 h,称取适量欧李多糖,充分溶解在蒸馏水中,离心,上清液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,然后上样,用 0、0.1、0.2、0.3、0.5 mol/L 氯化钠溶液梯度洗脱,流速 0.5 mL/min,每管收集 5 mL,采用苯酚-硫酸法测定洗脱液中多糖含量,以收集管号为横坐标,每管洗脱液吸光度为纵坐标,绘制洗脱曲线。合并单个洗脱峰的收集液,浓缩、透析、冻干,得到两个主要组分,分别命名为

CHPP-1 和 CHPP-2。

1.3.5.3 G-100 葡聚糖凝胶柱层析

将 DEAE-52 纤维素柱层析中收集到的 0.1、0.2 mol/L NaCl 洗脱组分分别用 G-100 葡聚糖凝胶柱层析进一步纯化。分别取 20 mg DEAE-52 纤维素柱层析后的欧李多糖样品,溶于 5.0 mL 蒸馏水,溶解完全后离心,取上清液纯化,蒸馏水为洗脱剂,洗脱速度 0.3 mL/min,每 5 min 收集 1 管,测定洗脱液中多糖含量,以收集管号为横坐标,每管洗脱液吸光度为纵坐标,绘制洗脱曲线,收集主峰的洗脱液,浓缩、透析、冻干,备用。

1.3.5.4 紫外光谱分析

准确称取 CHPP-1、CHPP-2 各 10 mg,蒸馏水定容 10 mL,得到浓度 1 mg/mL 的欧李多糖水溶液,以蒸馏水作空白,以 200 ~ 900 nm 为扫描范围,全波长扫描。

1.3.6 欧李多糖单糖组成分析和分子量测定

用 PMP 衍生化单糖,具体操作参考文献,略有修改^[10]。分别取适量 CHPP-1、CHPP-2 于水解管中,加入 4 mol/L 三氟乙酸 1 mL,于 120 °C 烘箱中水解 2 h。取出后氮气吹干;向吹干后的样品中加 1 mL 0.5 mol/L PMP-甲醇溶液以及 0.5 mL 0.3 mol/L NaOH 溶液,70 °C 水浴 60 min,冷却,加 0.5 mL 0.3 mol/L HCl 溶液和 0.5 mL 氯仿,振荡摇匀,静置 20 min,弃去下层,萃取三次,取水层过膜上机。

高效液相色谱测定单糖色谱条件:流速 1.0 mL/min,进样量 10 μL,检测波长 245 nm,柱温 25 °C,洗脱液:流动相 A(0.1 mol/L 磷酸二氢钾, pH 6.8):流动相 B(乙腈) = 82:18。色谱柱:SHISEIDO C₁₈柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。

分子量测定采用凝胶渗透色谱仪,具体操作参考文献,略有修改^[11]。分别精准称取 CHPP-1、CHPP-2 适量,溶于 0.02% NaN₃ 溶液,进样分析。将 Shodex OHpak 色谱柱接入 ELEOS System 凝胶色

谱仪,采用 Waters 515 泵激光检测器分离检测,数据由 ARTRAV 软件自动处理。色谱条件:流动相水 + 0.02% NaN_3 ,流速 1 mL/min,柱温 40 °C,进样量 500 μL 。

1.3.7 欧李多糖的红外光谱分析

分别称取一定质量的 CHPP-1、CHPP-2,加入适量的 KBr 研磨混匀压片,以 KBr 为扫描背景,利用红外光谱仪在 4 000 ~ 400 cm^{-1} 范围扫描。

1.3.8 CHPP-2 对 RAW 264.7 细胞增殖影响试验

细胞培养:将复苏后的 RAW 264.7 接入含 10% 胎牛血清的 DEME 高糖完全培养液中,于二氧化碳培养箱(37 °C,5% CO_2)中培养。

采用 MTT 试验法检测 CHPP-2 对 RAW 264.7 细胞增殖的影响。收集对数生长期的 RAW 264.7 细胞,使细胞繁殖到 5×10^5 个/mL,将 200 μL 细胞悬液接种于 96 孔细胞培养板中孵育 24 h,弃去上层清液。每孔加入 100 μL 不同浓度的 CHPP-2 (20、40、80、160、320、640 $\mu\text{g}/\text{mL}$);阳性对照组加入 100 μL 含有 LPS(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的培养液;空白对照组(control,CT)加入等体积的培养液,每组四个重复。边缘孔用 PBS 填充,避免细胞上清液蒸发。将 96 孔细胞培养板置于培养箱中孵育 24 h,每孔避光加入 10 μL MTT(5 mg/mL),继续培养 4 h。去除原有培养液,每孔加入 100 μL 二甲基亚砜溶液,震荡混合均匀,以充分溶解紫色的甲瓩结晶。10 min 后,在 570 nm 处使用全波长酶标仪测量各孔的吸光值。

1.3.9 CHPP-2 对 RAW 264.7 细胞分泌 NO 和细胞因子影响试验

RAW 264.7 细胞接种于 24 孔板中,使每孔细

胞密度为 2×10^5 个/mL,在二氧化碳培养箱中(37 °C,5% CO_2)孵育。24 h 后倒掉培养液,在 24 孔板中加入不同浓度的 CHPP-2(20、40、80、160、320、640 $\mu\text{g}/\text{mL}$)继续培养 24 h。以 LPS(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)作阳性对照。孵育结束后,用 NO 试剂盒测定 NO 含量,用 Elisa 试剂盒测定上清液中 TNF- α 、IL-6、INF- β 含量。

1.4 数据处理

采用 Origin 2019b 软件作图,利用 DPS 软件方差分析,多重比较采用 Duncan 新复极差测验, $P < 0.01$ 为差异极显著, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 提取温度、提取时间、液料比对欧李多糖得率的影响

由图 1A 看出,提取温度在 60 ~ 80 °C 之间,随温度升高欧李多糖得率显著提高($P < 0.05$)。80 °C 时得率最高,为 30.99%,随后随着提取温度升高,多糖得率显著下降。结果表明,在一定的温度范围内,随着提取温度升高,欧李多糖在萃取体系中的传递阻力减小,溶解度增大。但过高温会破坏多糖的结构,导致欧李多糖降解^[12],最佳提取温度为 80 °C。由图 1B 看出,在 1 ~ 2 h 范围内,随着提取时间的延长,欧李多糖得率略有增加($P > 0.05$),2 h 达到最高,为 26.92%。2 h 后有所下降,2 h 为最佳提取时间。由图 1C 看出,液料比从 10:1 (mL/g) 增加到 15:1 (mL/g),欧李多糖得率显著提高($P < 0.05$),当液料比为 15:1 (mL/g) 时,达到 28.05%,随着液料比继续增大,多糖得率基本不变,最佳液料比为 15:1 (mL/g)。

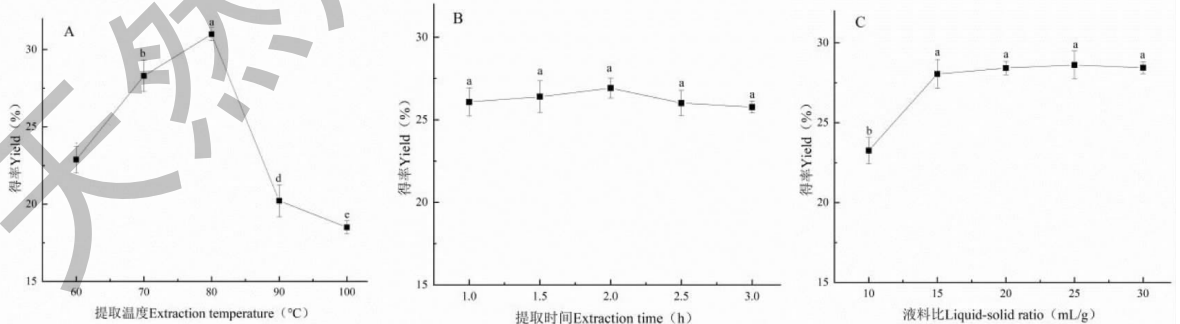


图 1 提取温度、提取时间、液料比对欧李多糖得率的影响

Fig. 1 Effects of extraction temperature, extraction time and liquid-solid ratio on the yield of CHP

2.2 响应面法优化试验结果

对所得的试验结果使用 Design-Expert 8.0.6 进行分析,得到回归方程如下:

$$Y = 32.51 - 0.095X_1 - 0.24X_2 + 1.13X_3 + 0.27X_1X_2 - 1.19X_1X_3 - 0.51X_2X_3 - 1.75X_1^2 - 2.24X_2^2 - 2.99X_3^2$$

式中 X_1 是提取温度, X_2 是提取时间, X_3

是液料比。对回归模型进行方差分析,结果见表2、表3。由表2、表3看出,回归模型具有高度显著性($P < 0.0001$),失拟项具有不显著性($P = 0.1501 > 0.05$),回归模型可靠。回归方程各项方差分析表明,因素 X_3 对欧李多糖得率有极显著影响($P < 0.01$), X_1^2 对欧李多糖得率有显著影响($P < 0.05$),

X_2^2 、 X_3^2 对欧李多糖得率有极显著影响($P < 0.0001$),因子 X_1X_2 、 X_2X_3 对欧李多糖得率影响不显著($P > 0.05$),因子 X_1X_3 对欧李多糖得率影响极显著($P < 0.01$)。各因素对欧李多糖得率的影响依次是 X_3 (液料比) $> X_2$ (提取时间) $> X_1$ (提取温度)。

表2 响应面优化试验结果

Table 2 Results of response surface optimization test

试验号 Test number	X_1 提取温度 Extraction temperature(°C)	X_2 提取时间 Extraction time(h)	X_3 液料比 Liquid-solid ratio(mL/g)	Y 欧李多糖得率 CHP yield(%)
1	-1(70)	-1(1.5)	0(15)	29.50
2	1(90)	-1(1.5)	0(15)	28.03
3	-1(70)	1(2.5)	0(15)	28.46
4	1(90)	1(2.5)	0(15)	28.07
5	-1(70)	0(2.0)	-1(10)	25.37
6	1(90)	0(2.0)	-1(10)	28.30
7	-1(70)	0(2.0)	1(20)	29.61
8	1(90)	0(2.0)	1(20)	27.78
9	0(80)	-1(1.5)	-1(10)	25.67
10	0(80)	1(2.5)	-1(10)	26.22
11	0(80)	-1(1.5)	1(20)	29.34
12	0(80)	1(2.5)	1(20)	27.86
13	0(80)	0(2.0)	0(15)	32.84
14	0(80)	0(2.0)	0(15)	32.61
15	0(80)	0(2.0)	0(15)	32.15
16	0(80)	0(2.0)	0(15)	32.06
17	0(80)	0(2.0)	0(15)	32.90

注:表中欧李多糖得率数据为3组平行试验的平均值。

Note: The data of CHP yield in table were the mean values of three parallel trials.

表3 响应面试验方差分析

Table 3 Analysis of variance of response surface test

来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F值 F value	P值 P value
模型 Model	97.53	9	10.84	37.65	<0.0001**
X_1	0.072	1	0.072	0.25	0.6319
X_2	0.47	1	0.47	1.62	0.2441
X_3	10.19	1	10.19	35.41	0.0006**
X_1X_2	0.29	1	0.29	1.01	0.3477
X_1X_3	5.66	1	5.66	19.68	0.0030**
X_2X_3	1.03	1	1.03	3.58	0.1004
X_1^2	12.93	1	12.93	44.91	0.0003**
X_2^2	21.22	1	21.22	73.71	<0.0001**

续表3 (Continued Tab. 3)

来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 <i>df</i>	均方 Mean square	<i>F</i> 值 <i>F</i> value	<i>P</i> 值 <i>P</i> value
X_3^2	37.76	1	37.76	131.19	<0.000 1**
残差 Residual	2.01	7	0.29		
失拟 Lack of fit	1.41	3	0.47	3.12	0.150 1
纯误差 Pure error	0.60	4	0.15		
合计 Cor total	99.55	16			

注:** 差异极显著($P < 0.01$), * 差异显著($P < 0.05$)。

Note:** Highly significant difference ($P < 0.01$), * Significant difference ($P < 0.05$).

对二次响应方程方差分析结果做响应面图(见图2)。由二次多项式方程得到欧李多糖的最佳提取条件为:提取温度 78.93 °C,提取时间 1.96 h,液料比 16.08:1 (mL/g),在此提取条件下,预测欧李

干粉多糖得率为 32.65%。根据实际情况,调整提取温度为 79 °C,提取时间为 2 h,液料比为 16:1 (mL/g),进行验证实验,欧李干粉多糖得率为(32.18 ± 0.08)% ($n=3$),与预测值无显著性差异($P > 0.05$)。

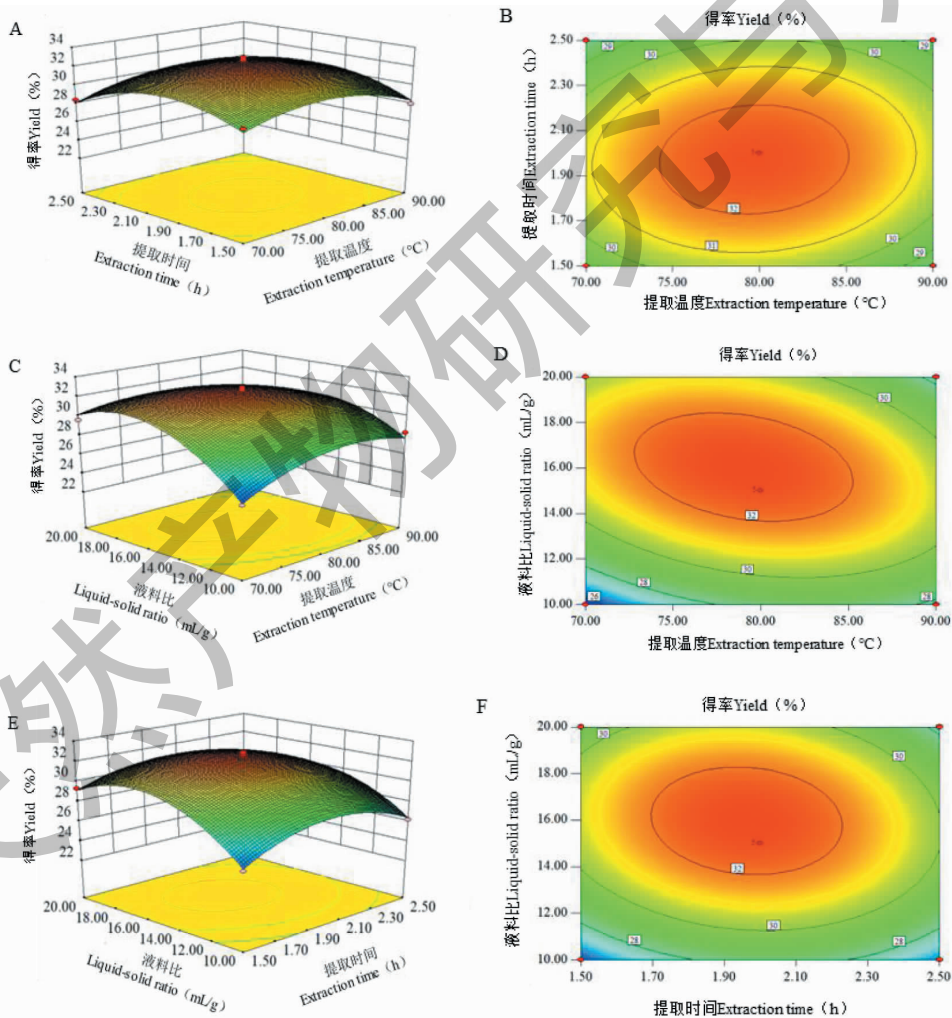


图2 各因素及交互作用对欧李多糖得率的响应面图

Fig. 2 Response surface diagram of various factors and interaction on the yield of CHP

2.3 欧李多糖分离纯化结果

用浓度分别为 0、0.1、0.2、0.3、0.5 mol/L NaCl

溶液梯度洗脱,得到三个单一洗脱峰(见图 3A)。其中 0.1、0.2 mol/L NaCl 溶液为主要洗脱峰,对其

进行 G-100 葡聚糖凝胶柱层析,均得到一个洗脱峰,分别命名为 CHPP-1、CHPP-2(见图 3B、3C)。将其分别收集洗脱液、透析、冷冻干燥备用。经苯酚-硫酸法测得 CHPP-1、CHPP-2 中多糖含量分别为

99.16% 和 99.33%。此外,对 CHP、CHPP-1、CHPP-2 用紫外光谱全波长扫描,结果见图 4,CHPP-1 和 CHPP-2 在 250~300 nm 之间无吸收峰,说明 CHPP-1、CHPP-2 均不含核酸和蛋白质。

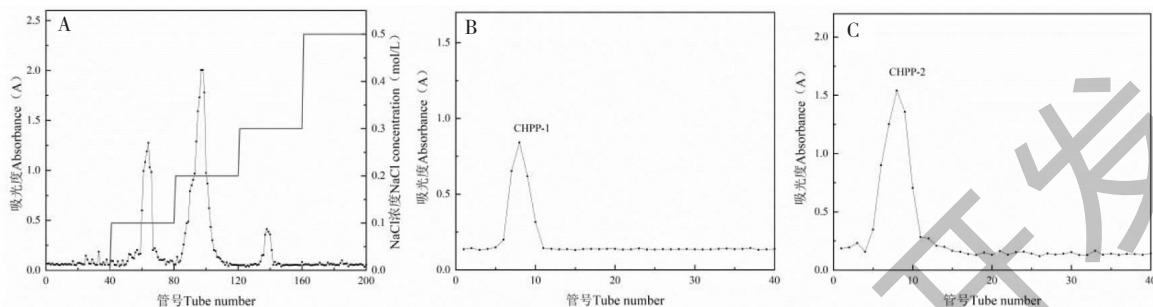


图 3 欧李多糖的纯化洗脱曲线

Fig. 3 Purification elution curves of of CHP

注:(A)欧李多糖的 DEAE-52 纤维素柱层析图;(B)CHPP-1 的 G-100 葡聚糖凝胶柱层析图;(C)CHPP-2 的 G-100 葡聚糖凝胶柱层析图。

Note:(A)DEAE-52 cellulose column chromatography of CHP;(B)G-100 Sephadex column chromatography of CHPP-1;(C)G-100 Sephadex column chromatography of CHPP-2.

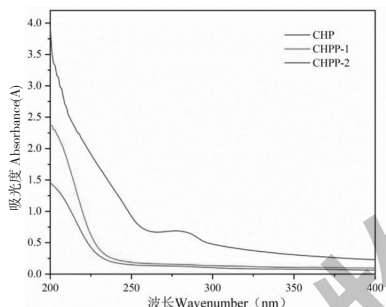


图 4 CHP、CHPP-1、CHPP-2 组分的紫外光谱图

Fig. 4 Ultraviolet spectrum of CHP, CHPP-1 and CHPP-2 components

2.4 欧李多糖的单糖组成和分子量测定

用单糖标准品做对照,用高效液相色谱法测定欧李多糖的单糖组成,结果见图 5。由图 5 看出,

CHPP-1 由十种单糖组成,其相应摩尔占比依次为:甘露糖(1.35%)、核糖(0.11%)、鼠李糖(4.58%)、葡萄糖醛酸(0.10%)、半乳糖醛酸(20.29%)、葡萄糖(1.75%)、半乳糖(17.36%)、木糖(2.71%)、阿拉伯糖(51.40%)、岩藻糖(0.35%);CHPP-2 由九种单糖组成,其相应摩尔占比依次为:甘露糖(0.62%)、鼠李糖(5.68%)、葡萄糖醛酸(0.07%)、半乳糖醛酸(28.24%)、葡萄糖(9.72%)、半乳糖(11.68%)、木糖(1.07%)、阿拉伯糖(41.81%)、岩藻糖(1.11%)(见表 4)。结果可知,欧李多糖组分 CHPP-1 和 CHPP-2 均主要由阿拉伯糖、半乳糖醛酸、半乳糖三种单糖组成。采用凝胶渗透色谱仪测定欧李多糖的分子量,其中 CHPP-1 组分的分子量为 47.26 kDa,CHPP-2 组分的分子量为 22.94 kDa。

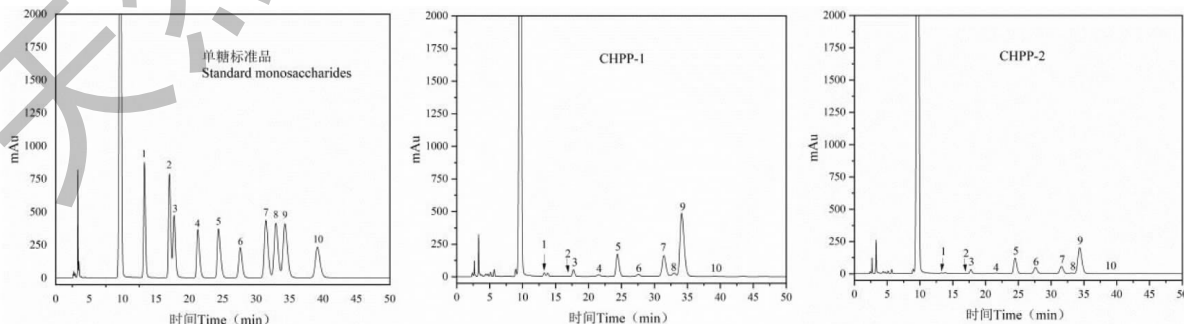


图 5 10 种单糖标准品和欧李多糖的 HPLC 谱图

Fig. 5 HPLC spectrum of 10 standard monosaccharides and CHPP-1 and CHPP-2

注:1:甘露糖;2:核糖;3:鼠李糖;4:葡萄糖醛酸;5:半乳糖醛酸;6:葡萄糖;7:半乳糖;8:木糖;9:阿拉伯糖;10:岩藻糖。Note:1:Mannose;2:Ribose;3:Rhamnose;4:Glucuronic acid;5:Galacturonic acid;6:Glucose;7:Galactose;8:Xylose;9:Arabinose;10:Fucose.

表4 CHPP-1、CHPP-2 的单糖组成及摩尔占比

Table 4 Monosaccharide composition and molar ratio of CHPP-1 and CHPP-2

出峰顺序 Peak order	标准品 Standard	出峰时间 Peak time (min)	CHPP-1 单糖摩尔占比 Monosaccharide molar ratio	CHPP-2 单糖摩尔占比 Monosaccharide molar ratio
1	甘露糖 Mannose	13.27	1.35%	0.62%
2	核糖 Ribose	17.08	0.11%	—
3	鼠李糖 Rhamnose	17.72	4.58%	5.68%
4	葡萄糖醛酸 Glucuronic acid	20.57	0.10%	0.07%
5	半乳糖醛酸 Galacturonic acid	24.38	20.29%	28.24%
6	葡萄糖 Glucose	27.56	1.75%	9.72%
7	半乳糖 Galactose	31.44	17.36%	11.68%
8	木糖 Xylose	32.97	2.71%	1.07%
9	阿拉伯糖 Arabinose	34.14	51.40%	41.81%
10	岩藻糖 Fucose	39.12	0.35%	1.11%

2.5 欧李多糖的红外光谱扫描结果

CHP、CHPP-1、CHPP-2 的红外光谱扫描结果见图6。由图6可知 3442.46 cm^{-1} 附近宽而强的吸收峰属于 O-H 伸缩振动^[13]。在 2794.05 cm^{-1} 附近的吸收峰则是由糖烷基的 C-H 伸缩振动引起^[14]。C=O 的强峰出现在 1593.12 cm^{-1} ，说明存在羧基^[15]。 1366.97 cm^{-1} 处的吸收峰代表了 C-H 的角弯曲^[16]。 $900\sim 1200\text{ cm}^{-1}$ 范围内的吸收峰为 C-O-C 拉伸振动和 C-O-H 弯曲振动峰^[17]。三个组分在 786.95 cm^{-1} 处均出现吸收峰，表明三者均含有 α -糖苷键^[18]。

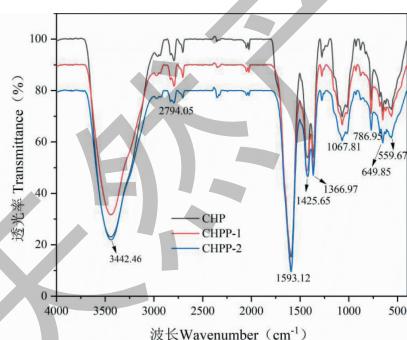


图6 CHP、CHPP-1、CHPP-2 组分的红外光谱图

Fig. 6 Infrared spectrum of CHP, CHPP-1 and CHPP-2 components

2.6 CHPP-2 对 RAW 264.7 细胞增殖的影响

由图7看出，正常状况下，细胞呈圆球形，体积小。不同浓度 CHPP-2 ($20\sim 640\text{ }\mu\text{g/mL}$) 作用于细胞 24 h 后，其体积增大。同时，细胞的密度也呈增

大的趋势。试验结果表明，CHPP-2 对 RAW 264.7 细胞具有一定的活化作用，由此可推测 CHPP-2 具有潜在的免疫调节活性。CHPP-2 对 RAW 264.7 细胞增殖的影响见图8，由图8看出，CHPP-2 在 $20\sim 640\text{ }\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内，均能显著提高巨噬细胞的增殖活性，且有剂量依赖关系，说明 CHPP-2 浓度对巨噬细胞无毒性。

2.7 CHPP-2 对 RAW 264.7 细胞分泌 NO 及 TNF- α 、IL-6、IFN- β 的影响

NO 在机体很多组织中调节多种生理过程，检测在多糖刺激下巨噬细胞上清液中亚硝酸盐浓度即可判断 NO 的产生量^[19]。将不同浓度梯度的 CHPP-2 溶液加入细胞 24 h 后，取上清液测定 NO 含量，结果见图9A。由图9A看出，细胞在不同浓度 ($20\sim 640\text{ }\mu\text{g/mL}$) CHPP-2 的作用下培养 24h 后，与 CT 组相比，NO 释放量增加，且有统计学差异 ($P < 0.05$)。随着溶液浓度的增加，细胞 NO 释放量呈上升趋势，且具有一定的剂量依赖性。试验结果表明，CHPP-2 能够激活 RAW 264.7 细胞，促进 RAW 264.7 细胞分泌 NO。

TNF- α 、IL-6、IFN- β 细胞因子含量在衡量免疫调节作用中起着重要作用。用不同浓度梯度 CHPP-2 加入细胞 24 h 后，取上清液，参照 Elisa 试剂盒说明书测定 TNF- α 、IL-6、IFN- β 含量，结果见图9B、图9C和图9D。结果表明，与 CT 组比较，高、中、低剂量 CHPP-2 呈剂量依赖关系促进细胞分泌 TNF- α 、IL-6、IFN- β ，且有统计学差异 ($P < 0.05$)。CHPP-2 能

激活 RAW 264.7 细胞,促进 RAW 264.7 细胞分泌及释放 TNF- α 、IL-6、IFN- β 。



图7 CHPP-2 对细胞形态的影响

Fig. 7 Effect of CHPP-2 on RAW 264.7 cells morphology

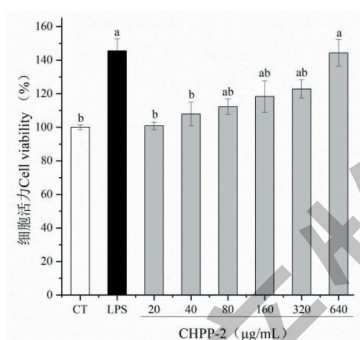


图8 不同浓度 CHPP-2 对 RAW 264.7 细胞增殖的影响

Fig. 8 Effects of different concentrations of CHPP-2 on RAW 264.7 cell proliferation

注:不同小写字母代表在显著差异, $P < 0.05$ 。Note: Different lowercase letters represent significant differences, $P < 0.05$.

3 讨论与结论

巨噬细胞是评估生物活性成分免疫调节功能的重要载体。巨噬细胞通过分泌多种细胞因子如一氧化氮(NO)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、干扰素- β (IFN- β)、白介素-1(IL-1)等来发挥其免疫功能。植物多糖通过调节巨噬细胞中细胞因子的分泌量来调节其免疫功能。NO作为重要的信号分子介导细胞内多种生物学功能,有助于杀死肿瘤细胞和病原微生物^[20]。TNF- α 可由激活的巨噬细胞产生,能直接参与维护免疫内稳态,包括炎症、分化、脂质代谢和凋亡等^[21]。有关研究表明,

IL-6可由多种细胞分泌产生,被认为是在诱导急性期蛋白反应期间与发热有关的最重要的免疫调节介质^[22]。IFN- β 参与抗病毒免疫,减少T细胞增生,诱导树突状细胞生长、成熟及活化,抑制B细胞和T细胞凋亡^[23]。这些细胞因子主要是免疫细胞分泌的一些小分子蛋白质,在机体的免疫和炎症反应中发挥重要作用。Yao等^[19]研究发现绿豆多糖显著增加了巨噬细胞中NO、TNF- α 和IL-6的释放。Du等^[21]研究发现无花果多糖可以显著促进细胞毒性分子(NO)和细胞因子(TNF- α 和IL-6)的分泌以及RAW 264.7巨噬细胞的吞噬作用。Ren等^[24]研究了沙蒿籽多糖对RAW 264.7细胞的影响,发现沙蒿籽多糖能显著促进RAW 264.7细胞中NO、TNF- α 、IL-6和IFN- β 的分泌。这与本实验得出的欧李多糖能显著促进RAW 264.7细胞中NO、TNF- α 、IL-6及IFN- β 细胞因子释放的结果相一致,表明欧李多糖具有免疫调节活性。

采用水提醇沉法提取欧李多糖,得到最佳提取工艺条件为提取温度79℃,提取时间2h,液料比16:1(mL/g),欧李干粉多糖得率为(32.18±0.08)%。CHPP-1、CHPP-2中多糖含量分别为99.16%和99.33%。CHPP-1的主要单糖组成及摩尔比为阿拉伯糖:半乳糖醛酸:半乳糖=51.4:20.29:17.36,分子量为47.26kDa。CHPP-2的主要单糖

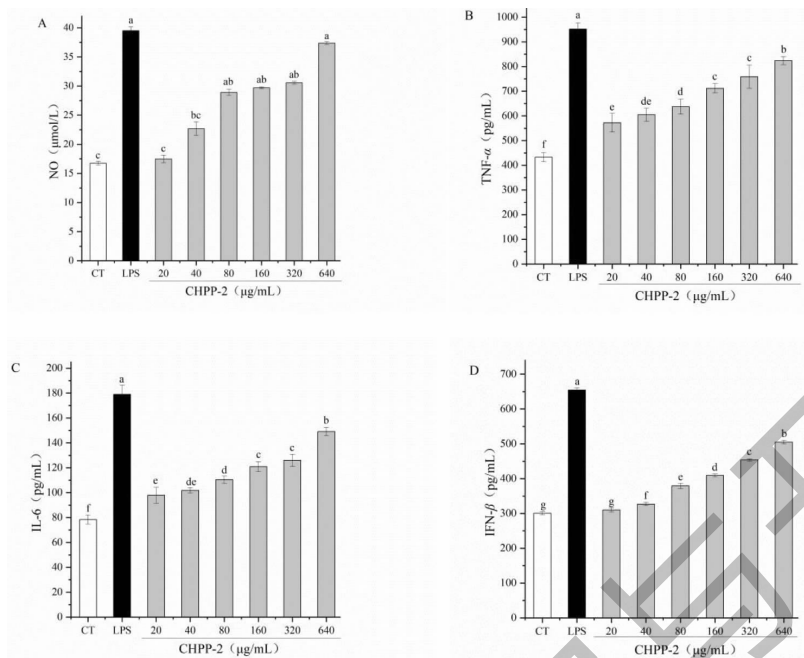


图9 不同浓度 CHPP-2 对 RAW 264.7 细胞分泌 NO 及 TNF- α 、IL-6、IFN- β 的影响

Fig. 9 Effects of different concentrations of CHPP-2 on the secretion of NO, TNF- α , IL-6 and IFN- β by RAW 264.7 cells

组成及摩尔比为阿拉伯糖:半乳糖醛酸:半乳糖 = 41.81:28.24:11.68, 分子量为 22.94 kDa。欧李多糖为吡喃环型多糖。CHPP-2 在 20 ~ 640 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内能激活巨噬细胞, 显著促进 NO、TNF- α 、IL-6 及 IFN- β 细胞因子的释放, 且具有剂量依赖性, 说明欧李多糖有一定的免疫调节活性。

参考文献

- Zhang Q, Song JY, Shao F, et al. Potential suitable distribution area and ecological characteristics of *Cerasus humilis*, an excellent tree species for windproof and sand fixation [J]. J Beijing Forestry Uni (北京林业大学学报), 2018, 40(3): 66-74.
- Li WD, Li Q, He YX, et al. Analysis of nutrient element characteristics of flesh of Chinese dwarf cherry based on total reflection X-ray fluorescence method [J]. Food Sci (食品科学), 2015, 36(4): 164-167.
- Mo C, Li WD, He YX, et al. Variability in the sugar and organic acid composition of the fruit of 57 genotypes of Chinese dwarf cherry [*Cerasus humilis* (Bge.) Sok] [J]. J Horticult Sci Biotechnol, 2015, 90: 419-426.
- Zhou ZH, Wu SH. The development of regulations of Chinese herbal medicines for both medicinal and food uses [J]. Trends Food Sci Technol, 2006, 17: 313-323.
- Lian ZW, Li ZQ, Zhang HY, et al. Isolation of polysaccharides from *Arenaria kansuensis* and evaluation of immunologi-

cal activity [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2019, 31: 572-578.

- Mao GH, Zhang ZH, Fei F, et al. Effect of *Grifola frondosa* polysaccharide on anti-tumor activity in combination with 5-Fu in Heps-bearing mice [J]. Int J Biol Macromol, 2019, 121: 930-935.
- Zhou JH, Lan YP, Yao YW, et al. Study on processing technology of *Prunus humilis* juice [J]. Sci Technol Food Ind (食品工业科技), 2007(8): 146-147.
- Feng YY, Li XD, Sang YX, et al. Technology of sugar permeability with microwave in making low-sugar *prunus humilis* preserved fruit [J]. Food Sci Technol (食品科技), 2015, 40(7): 103-109.
- He YJ, Yang ZB, Peng SM, et al. Response surface methodology for optimization of extraction and antioxidant activity of polysaccharides in purple passionfruit [J]. Food Res Dev (食品研究与开发), 2020, 41(4): 38-44.
- Zhou YQ, Wu GB, Chen FH, et al. Analysis of monosaccharide composition of polysaccharides from okra by precolumn derivatization high performance liquid chromatography [J]. Food Sci (食品科学), 2019, 40(4): 266-271.
- Li SS, Yang G, Yan JM, et al. Polysaccharide structure and immunological relationships of RG-I pectin from the bee pollen of *Nelumbo nucifera* [J]. Int J Biol Macromol, 2018, 111: 660-666.
- Yang HT, Cao XY. Study on ultrasonic wave assisted extrac-

- tion of polysaccharide from *Hovenia dulcis* and its antioxidant activity[J]. *Appl Chem Ind* (应用化工), 2017, 46: 2174-2177.
- 13 Du BX, Fu YP, Wang X, et al. Isolation, purification, structural analysis and biological activities of water-soluble polysaccharide from *Glehniae Radix*[J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 128: 724-731.
- 14 Peng B, Luo YY, Hu XJ, et al. Isolation, structural characterization, and immunostimulatory activity of a new watersoluble polysaccharide and its sulfated derivative from *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 123: 500-511.
- 15 Mei GM, Hao Q, Zhang XJ, et al. Purification and structural analysis of a polysaccharide from *Lentinus edodes* extracted using an acid solution[J]. *Mod Food Sci Technol* (现代食品科技), 2014, 30(9): 79-84.
- 16 Chen GJ, Zhang SQ, Ran CX, et al. Extraction, characterization and antioxidant activity of water-soluble polysaccharides from *Tuber huidongense*[J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 91: 431-442.
- 17 Zha ZQ, Wang SY, Chu WH, et al. Isolation, purification, structural characterization and immunostimulatory activity of water-soluble polysaccharides from *Lepidium meyenii* [J]. *Phytochemistry*, 2018, 147: 184-193.
- 18 Shi L. Bioactivities, isolation and purification methods of polysaccharides from natural products: a review [J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 92: 37-48.
- 19 Yao Y, Zhu YY, Ren GX. Immunoregulatory activities of polysaccharides from mung bean [J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 139: 61-66.
- 20 Wu F, Zhou C, Zhou D, et al. Structure characterization of a novel polysaccharide from *Hericium erinaceus* fruiting bodies and its immunomodulatory activities[J]. *Food Funct*, 2018, 9(1): 294-306.
- 21 Du J, Li J, Zhu J, et al. Structural characterization and immunomodulatory activity of a novel polysaccharide from *Ficus carica*[J]. *Food Funct*, 2018, 9: 3930-3943.
- 22 Wang Y, Zhang Y, Shao J, et al. Study on the immunomodulatory activity of a novel polysaccharide from the lichen *Umbilicaria esculenta* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 121: 846-851.
- 23 Ren DY, Zhao Y, Zheng Q, et al. Immunomodulatory effects of an acidic polysaccharide fraction from herbal *Gynostemma pentaphyllum* tea in RAW 264. 7 cells [J]. *Food Funct*, 2019, 10: 2186-2197.
- 24 Ren DY, Lin DH, Alim A, et al. Chemical characterization of a novel polysaccharide ASKP-1 from *Artemisia sphaerocephala* Krasch seed and its macrophage activation via MAPK, PI3k/Akt and NF- κ B signaling pathways in RAW 264. 7 cells [J]. *Food Funct*, 2017, 8: 1299-1312.
- (上接第 823 页)
- 20 Han YA, Song CW, Koh WS, et al. Anti-inflammatory effects of the *Zingiber officinale* Roscoe constituent 12-dehydrogingerdione in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264. 7 cells [J]. *Phytother Res*, 2013, 27: 1200-1205.
- 21 Yang YQ, Quan YY, Yu LY, et al. Effect of phillygenin on inflammatory response in LPS-induced RAW 264. 7 cells [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2019, 31: 1117-1123.
- 22 Liu Y, Liu JC, Zhang YQ. Research progress on chemical constituents of *Zingiber officinale* Roscoe [J]. *Biomed Res Int*, 2019: 5370823.
- 23 Van Breemen RB, Tao Y, Li W. Cyclooxygenase-2 inhibitors in ginger (*Zingiber officinale*) [J]. *Fitoterapia*, 2011, 82: 38-43.