

亚高山绣球菌多糖的提取优化、结构表征和抗炎作用

罗巅辉*, 张泽彤

华侨大学生物工程与技术系, 厦门 361021

摘要: 研究亚高山绣球菌多糖的提取纯化、结构表征及抗炎作用。采用响应曲面法优化提取工艺, 柱层析等方法纯化亚高山绣球菌多糖 (*Sparassis subalpina* polysaccharide, SSP); 采用气相色谱、核磁共振谱和电子显微镜等表征结构, 实时荧光定量 PCR 等分析抗炎活性。结果显示, 在最佳提取条件 (液料比 80 mL/g, 提取时间 60 min, 提取温度 70 °C) 下, 总糖提取率为 (18.21 ± 0.68)%。SSP 重均分子质量是 50 kDa, 由葡萄糖、甘露糖、半乳糖和阿拉伯糖组成 (6.5:1.3:1:1), 重复结构单位是 $\rightarrow 3$)- α -D-Galp-(1 \rightarrow 2)- β -D-Glup-(1 \rightarrow 3)- β -L-Araf-(1 \rightarrow 3)- α -D-Manp-(1 \rightarrow), 呈无分支的网状结构。SSP 对炎症细胞中 TNF- α 、COX-2 和 iNOS 的表达均有显著抑制作用 ($P < 0.05$)。结果表明无分支网状结构 SSP 具有抗炎作用。

关键词: 亚高山绣球菌; 微观结构; 抗炎作用

中图分类号: Q53

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2022)7-1110-09

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2022.7.003

Extraction optimization, structure characterization and anti-inflammatory activity of polysaccharides from *Sparassis subalpina*

LUO Dian-hui*, ZHANG Ze-tong

Department of Bioengineering and Biotechnology, Huaqiao University, Xiamen 361021, China

Abstract: To study the isolation, purification, structure properties and anti-inflammatory activities of polysaccharides from *Sparassis subalpina*. Response surface methodology was used to obtain the optimal processing conditions of total sugar from *S. subalpina* and the method of column chromatography was used for the purification of a *S. subalpina* polysaccharide (SSP). Using gas chromatography, NMR spectroscopy and electron microscopies, the structure was studied. Anti-inflammatory activity was determined using RT-qPCR, et al. The results showed that the experimental yield was (18.21 ± 0.68)% under the optimal processing conditions (liquid to solid ratio 80 mL/g, extraction time 60 min, extraction temperature 70 °C). The average molecular weight of SSP was calculated to be 50 kDa and SSP consisted of glucose, mannose, galactose and arabinose with a molar ratio of 6.5:1.3:1:1. The repeated unit in SSP was determined as $\rightarrow 3$)- α -D-Galp-(1 \rightarrow 2)- β -D-Glup-(1 \rightarrow 3)- β -L-Araf-(1 \rightarrow 3)- α -D-Manp-(1 \rightarrow), and SSP showed a non-branched and netted state. SSP demonstrated significant inhibitory effects on the gene expressions of TNF- α , COX-2 and iNOS in LPS-stimulated RAW 264.7 cells ($P < 0.05$). The results evidenced the potential effects of SSP with the non-branched and netted state on anti-inflammatory activities.

Key words: *Sparassis subalpina*; microstructure; anti-inflammatory activity

绣球菌属 (*Sparassis*) 物种肉质鲜嫩, 是营养丰富的食用真菌。绣球菌属有 10 个小种^[1], 目前关于绣球菌多糖的研究主要集中在两个种, 分别是绣球菌 (*Sparassis crispa*) 和广叶绣球菌 (*Sparassis latifolia*)。绣球菌中多糖含量丰富, 是其主要生物活性物质, 研究表明绣球菌多糖具有抗肿瘤作用^[2,3], 肠道免疫调节功能^[4,6] 和

抗氧化作用^[6,7]。多糖的结构是其发挥生物活性的基础, 据报道 *S. crispa* 的主要多糖是有分支结构的 β -(1 \rightarrow 3)-D-葡聚糖, 但其分子量 (200 kDa) 较大难溶于水^[8,9]。*S. latifolia* 中分离出的多糖主要由葡萄糖、甘露糖、半乳糖、木糖、和果糖构成, 空间结构研究表明该多糖为网状结构, 其化学结构不明确^[6]。本课题以亚高山绣球菌 (*S. subalpina*) 为原料, 详细表征其主要多糖的化学结构和空间结构, 并对其抗炎活性进行研究, 相较于绣球菌属其他小种, 目前国内外未见相关报道。绣球菌野生资源稀缺, 更多小种的研究能够帮助挖掘

收稿日期: 2022-03-15 接受日期: 2022-05-09

基金项目: 国家自然科学基金 (31201314)

* 通信作者 Tel: 86-592-6162300; E-mail: dianhuiluo@163.com

其应用潜力,以期更好地开发应用。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

亚高山绣球菌,云南野生采摘,由华侨大学生物学教研室鉴定为绣球菌属亚高山绣球菌(*Sparassis subalpina*)。所有试剂均为分析纯,主要试剂包括:葡聚糖标准品(美国 Sigma 公司, T10 货号: D9260, T40 货号: 31389, T70 货号: 31390, T500 货号: 31392); DEAE Sepharose-CL 6B(瑞士 Pharmacia 公司, 货号: 17-0710-01); DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司, 货号: SH30022-01B); 脂多糖(美国 Sigma 公司, 货号: L2880); 胎牛血清(德国 PAN-Biotech 公司, 货号: P40-37500); 总 RNA 提取试剂盒(美国 Promega 公司, 货号: LS1040); 反转录试剂盒(美国 Promega 公司, 货号: A5001); qPCR Master Mix 试剂盒(美国 Promega 公司, 货号: A6001)。

主要仪器: MC 99-2 自动蛋白分离层析仪(上海沪西仪器厂); 型号 HP 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); 7890 B 高效气相色谱仪(美国 Agilent 公司); Forma 3111 二氧化碳培养箱(美国 Thermo 公司); CKX 41 倒置显微镜(日本 OLYMPUS 公司); AVANCE-500 MHz 核磁共振仪(德国 Bruker 公司); H-7650 透射电子显微镜(日本 Hitachi High-Technologies 公司); 4800 II 实时荧光定量 PCR 系统(瑞士 Roche 公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 提取优化方法

单因素试验设计主要考察液料比、提取时间和提取温度对总糖提取率的影响^[10]。液料比研究按质量比 20:1、50:1、80:1、120:1 和 150:1 分别加入相应体积的蒸馏水, 80 °C 水浴锅中水浴 60 min。提取时间研究选取 20、60、100、140 和 180 min 为考察时间, 液料比为 50:1, 提取温度为 80 °C。提取温度研究选取 30、50、65、80 和 100 °C, 液料比为 50:1, 提取时间为 60 min。每次实验称取干燥的亚高山绣球菌 1 g, 按照不同提取条件提取得到水溶性提取液, 3 500 r/min 离心 10 min, 取上清液进行苯酚-硫酸法检测, 3 次平行试验计算总糖提取率。

$$\text{提取率} = (W_{\text{提取液糖含量}} / W_{\text{样品质量}}) \times 100\%$$

根据单因素试验确定各因素试验水平, 安排响应曲面试验。使用 Design-Expert (Version 11, Stat-Ease Inc, USA) 软件, Box-Behnken Design (BBD) 设计法安排 3 因素 3 水平试验方案。以液料比(X_1), 提取时间(X_2)和提取温度(X_3)为变量, 总糖含量作为响应值, 优化亚高山绣球菌总糖提取工艺条件^[11]。

1.2.2 分离纯化方法

称取干燥的绣球菌 100 g, 按照“1.2.1”所得最佳提取条件提取得到粗提液, 将粗提液用旋转蒸发仪浓缩 40~50 倍, 加入 4 倍体积乙醇过夜, 3 500 r/min 离心 10 min 得沉淀, 冷冻干燥后得粗多糖。取 500 mg 粗多糖配制质量分数为 2%~3% 粗糖水溶液, 使用 Sevag 法反复脱蛋白直至无固体蛋白层为止。将脱蛋白后的糖液上 DEAE Sepharose-CL 6B 柱(直径 4.6 cm × 高 36 cm), 上样量 20 mL, 流速为 1 mL/min, 12 min/管, 使用 0~1 mol/L NaCl 进行洗脱, 收集洗脱液, OD₂₈₀ 下检测洗脱液的蛋白质分布, 苯酚硫酸法检测洗脱液的糖分布。按照糖及蛋白质分布情况收集洗脱液, 使用 3 500 截留分子量的透析袋蒸馏水透析 48 h, 浓缩透析液, 冷冻干燥得到纯化的亚高山绣球菌多糖(*Sparassis subalpina* polysaccharide, SSP), 按如下公式计算得率。

$$\text{得率} = (W_{\text{纯化糖质量}} / W_{\text{样品质量}}) \times 100\%$$

1.2.3 均一性及特性研究方法

采用高效凝胶排阻色谱法(HPSEC)鉴定 SSP 的均一性, 色谱柱为日本昭和 SUGAR KS-804 柱, 色谱柱温度是 50 °C, 流动相为超纯水(流速 1 mL/min), 检测器为示差折光检测器。重均分子量鉴定采用 HPSEC 方法, 根据葡聚糖标准品(T10、T40、T70、T500)和葡萄糖的保留时间, 以 lgMw 对 Kav 作图, 绘制分子量标准曲线^[12]。

采用苯酚-硫酸法^[13]测定糖含量, 紫外吸收光谱检测蛋白质及核酸, 红外光谱法(FTIR)分析特征官能团^[14]。单糖组成分析采用气相色谱法, 取 20 mg 干燥多糖溶解于 1 mol/L 硫酸中, 100 °C 水解 8 h, 水解液中加入碳酸钡中和至 pH 值中性, 过滤后的滤液冷冻干燥得水解产物。将水解产物溶解于 0.5 mL 无水吡啶, 加入 2 mg 甘露醇, 70 °C 水浴 30 min, 冷却后加入 0.2 mL 六甲基二硅胺烷和 0.1 mL 三甲基氯硅烷进行衍生化。衍生产物用气相色谱法鉴定, 色谱柱是 HP-5 毛细管色谱柱, 柱温为程序升温, 160 °C 升到 180 °C (20 °C/min), 180 °C 升到 220 °C (8 °C/min, 保持 2 min), 250 °C (保持 2 min)。检测器是氢火焰检测器, 检测器温度为 280 °C^[15]。为了研究多糖的热稳定性, 取干燥的多糖样品放入 70 μL 氧化铝坩埚中, 氮气作为载气, 以 10 K/min 的升温速度, 在 50~600 °C 内使用同步热分析仪检测。

1.2.4 化学结构和微观结构分析方法

化学结构研究采用核磁共振, 20 mg 纯化后的干燥多糖溶于 2 mL 重水, 搅拌使其充分溶解后冷冻干燥,

如此反复重复3次,检测前将其溶解于1 mL 重水,转入核磁管进行NMR分析。使用500 MHz核磁共振仪,使用标准Bruker程序,试验包括氢谱(^1H NMR)、碳谱(^{13}C NMR)、异核单量子相干谱(HSQC)、同核化学位移相关谱(^1H - ^1H COSY)、全相关谱(TOCSY)和二维NOE谱(NOESY)。

使用扫描电子显微镜(SEM)和透射电子显微镜(TEM)观察多糖微观结构。SEM制样在金属桩,表面镀铂。TEM观察,将样品配制成1 mg/mL溶液,加入等质量比的1 mg/mL SDS溶液,80 °C水浴2 h后稀释至5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,继续水浴2 h,滴加1滴样品液到200目铜网碳膜上,室温干燥,80 kV电压下观察。

1.2.5 抗炎试验方法

抗炎实验主要包括RAW 264.7细胞培养,总RNA的提取,反转录cDNA和实时荧光定量PCR检测(RT-qPCR),包含空白组,阴性对照组(添加1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 脂多糖),阳性对照组(添加1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 脂多糖和75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 地塞米松)和样品组(添加1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 脂多糖和不同浓度多糖SSP)。

RAW 264.7细胞的培养使用DMEM培养基(含10%血清和1%双抗),37 °C,5%二氧化碳培养箱培养48 h。总RNA的提取和反转录cDNA均采用试剂盒方

法,反转录程序为42 °C 60 min,70 °C 15 min。RT-qPCR检测采用SYBR Green染料法,按照试剂盒说明书操作,反应体系包括2 \times Mix,上下游引物^[16]和cDNA,共进行45个循环,扩增条件为95 °C(15 s) \rightarrow 60 °C(30 s) \rightarrow 72 °C(30 s)。每个实验包括3个平行样,以GAPDH为内参基因,按照 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算各炎症因子mRNA的相对表达量^[15,16]。

2 结果与分析

2.1 亚高山绣球菌总糖提取优化

2.1.1 单因素试验结果

各单因素对亚高山绣球菌总糖提取率的影响如图1所示。在固定两个因素条件下,只考察一个因素对提取率的影响。随液料比增加提取率增大,当液料比达到50:1时提取率最大,随后陡然下降。随提取时间的改变,总糖提取率呈现逐渐上升趋势,提取时间100 min时提取率最高,随后降低,整体趋势变化较小。随提取温度升高提取率逐渐增加,提取温度达到50 °C以上,提取率相差幅度在4%以内,变化不明显。为保证原材料中的总糖能够充分提取出来,不造成多糖的断裂而降低其生物活性,同时减少操作工作量,选用液料比20:1,50:1,80:1,提取时间60、100、140 min,提取温度65、80、95 °C作为后续优化工艺试验条件。

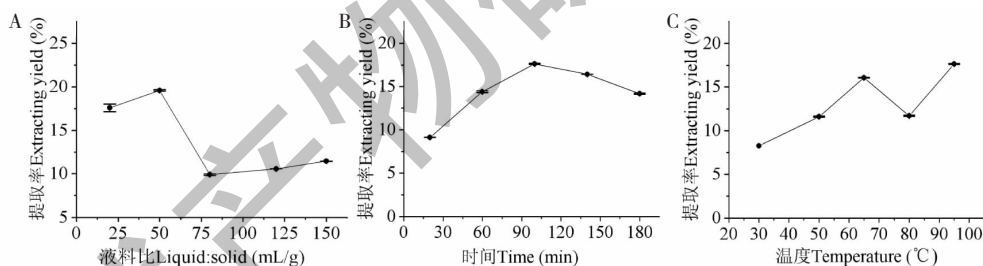


图1 液料比(A)、提取时间(B)和提取温度(C)对亚高山绣球菌总糖提取率的影响

Fig. 1 Effects of liquid:solid (A), extraction time (B) and extraction temperature (C) on the yields of total sugar from *S. subalpina*

2.1.2 响应面试验结果

响应面试验采用Design-Expert软件设计,BBD试验设计和结果见表1。试验所用3个因素的试验水平根据单因素结果选取,具体如下,液料比(X_1)为20:1、50:1和80:1,提取时间(X_2)为60、100、140 min,提取温度(X_3)为65、80、95 °C。

用Design-Expert软件进行分析,得到回归方程如下: $Y = 14.84 + 2.29X_1 + 0.14X_2 - 0.59X_3 - 2.54X_1X_2 - 0.10X_1X_3 + 0.80X_2X_3 - 1.52X_1^2 + 0.01X_2^2 - 1.08X_3^2$ 。模型的 P 值为0.0016,相关系数 $R^2 = 0.91$,校正决定系数 R^2 (0.80)与预测 R^2 (0.66)相差小于0.2,说明实测值与

该模型预测值具有很好的拟合度,模型符合统计学意义。模型失拟项为0.86(> 0.05),进一步说明拟合模型误差与纯误差相比不显著,在试验变量范围内,回归模型预测结果可靠。在模型预测的最优提取条件下($X_1 = 80 \text{ mL/g}$, $X_2 = 60 \text{ min}$, $X_3 = 70 \text{ °C}$),亚高山绣球菌总糖提取率的预测值18.54%和实际试验值(18.21 \pm 0.68)%相差不显著,该模型可以很好地用于亚高山绣球菌总糖的提取工艺。根据模型的回归系数显著性检验结果,液料比对亚高山绣球菌总糖的提取率影响最显著($P = 0.0007$),与单因素试验结果吻合,因此,在实际提取工艺中应着重注意对液料比的选取。

表1 亚高山绣球菌总糖提取率 BBD 设计及试验结果

Table 1 BBD design and results for extraction yields of total sugar from *S. subalpina*

组别 Group	因素 Factor			提取率 Extraction yield (%)
	X_1 (mL/g)	X_2 (min)	X_3 (°C)	
1	-1(20:1)	-1(60)	0(80)	8.256
2	1(80:1)	-1(60)	0(80)	18.171
3	-1(20:1)	1(140)	0(80)	13.571
4	1(80:1)	1(140)	0(80)	13.314
5	-1(20:1)	0(100)	-1(65)	10.957
6	1(80:1)	0(100)	-1(65)	15.486
7	-1(20:1)	0(100)	1(95)	9.200
8	1(80:1)	0(100)	1(95)	13.314
9	0(50:1)	-1(60)	-1(65)	14.607
10	0(50:1)	1(140)	-1(65)	13.321
11	0(50:1)	-1(60)	1(95)	12.607
12	0(50:1)	1(140)	1(95)	14.536
13	0(50:1)	0(100)	0(80)	14.393
14	0(50:1)	0(100)	0(80)	14.000
15	0(50:1)	0(100)	0(80)	13.321
16	0(50:1)	0(100)	0(80)	16.571
17	0(50:1)	0(100)	0(80)	15.893

2.2 多糖 SSP 的纯化与特性分析

按照响应面试验得出的最佳提取工艺提取得到粗提液,对所得粗提液进行浓缩、醇沉后冷冻干燥,得到粗多糖,得率为 25.60%。将粗多糖经 Sevag 法脱蛋白,

脱蛋白后的糖液经 DEAE Sepharose CL-6B 柱层析纯化,苯酚-硫酸法 (OD_{490}) 检测糖分布, OD_{280} 下检测蛋白质分布,结果如图 2A。

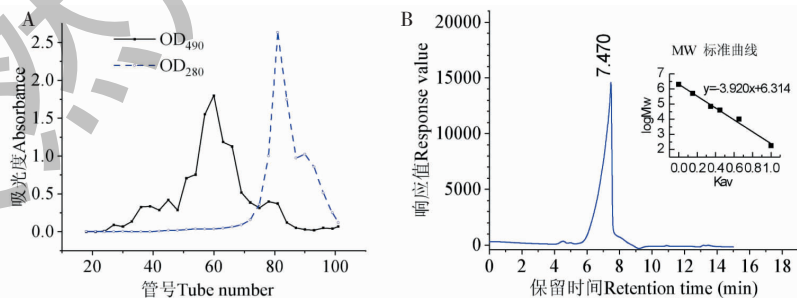


图2 SSP 的 DEAE-Sepharose CL-6B 层析图 (A) 和高效凝胶排阻色谱图 (B)

Fig. 2 DEAE-Sepharose CL-6B chromatogram (A) and HPSEC profile (B) of SSP

在 50~70 管之间有一个较大的糖洗脱峰,且与蛋白质洗脱峰不重叠,收集该部分洗脱液,用截留分子量 3 500 的透析袋透析,透析液浓缩后冷冻干燥得到 SSP,

得率为 10.50%。SSP 的均一性鉴定采用高效凝胶排阻色谱法,结果如图 2B 所示,图中只有一个对称峰,说明 SSP 的均一性好。

参照葡萄糖标准曲线 $y = 0.014x - 0.006$ ($R^2 = 0.999$), 测得 SSP 的糖含量为 99.30%。紫外吸收光谱显示 SSP 不含有核酸及蛋白质等杂质。

SSP 的 FTIR 结果如图 3A 所示, 在 3424 cm^{-1} (O-H 伸缩振动峰), 2926 cm^{-1} (C-H 特征吸收峰), 1640 cm^{-1} (C=O 伸缩振动峰), 1408 cm^{-1} (C-H 变角振动峰) 和 $1000 \sim 1200\text{ cm}^{-1}$ (C-O 伸缩振动峰) 均出现糖类物质的特征吸收峰, 表明 SSP 为糖类化合物。

SSP 的热重分析曲线 (TG) 及一阶微商曲线 (DTG) 如图 3B 所示。在 $65 \sim 116\text{ }^\circ\text{C}$ 之间出现第一个失重台

阶, 此部分失重主要是样品吸附水的蒸发。第二个较大失重台阶出现在 $258 \sim 408\text{ }^\circ\text{C}$ 范围内, SSP 在这个温度范围内结构发生了剧烈的分解。SSP 的热重分析只出现 1 个大的失重, 也进一步验证了 SSP 物质成分单一, 纯度较好。

根据标准葡聚糖的 HPSEC 保留时间, 计算得到回归方程为 $y = -3.92x + 6.31$ ($R^2 = 0.990$, 图 2B), 将 SSP 在 HPSEC 试验中的保留时间 7.47 min 代入方程, 计算得出 SSP 的重均分子量 (Mw) 为 50 kDa 。

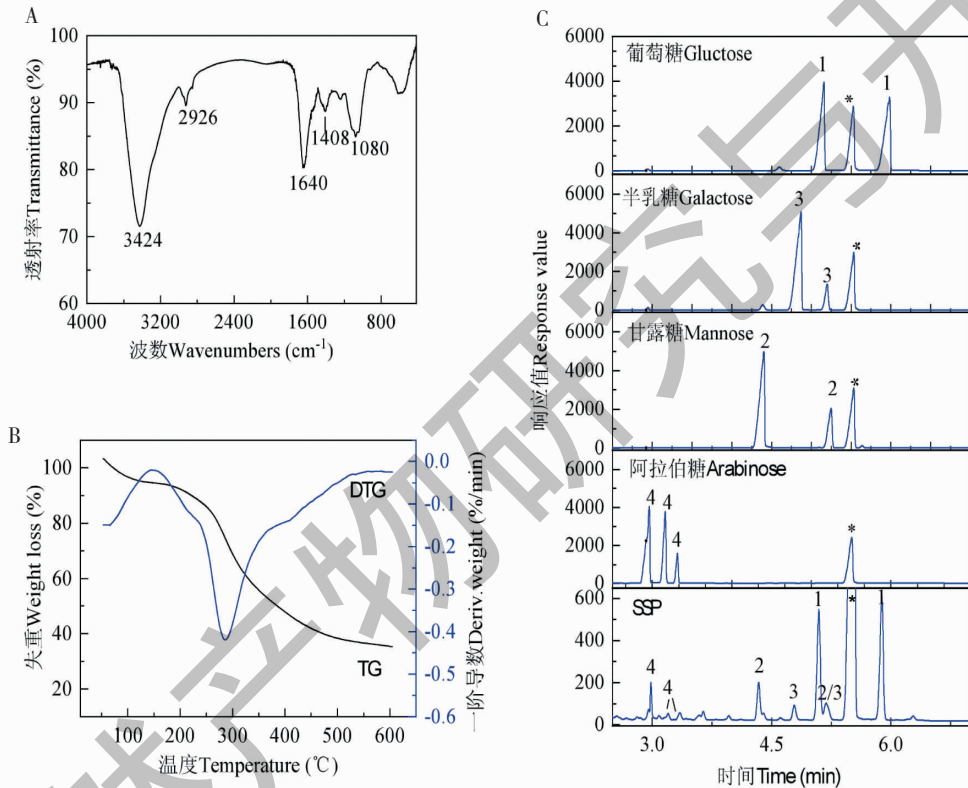


图 3 SSP 的红外光谱图 (A)、热重分析图 (B) 和气相色谱图 (C)

Fig. 3 FTIR spectrum (A), thermal decomposition analysis curves (B) and GC profiles of SSP (C)

注: * 内标甘露醇; 1~4 分别代表葡萄糖、半乳糖、甘露糖和阿拉伯糖的衍生物。Note: * Mannitol; 1-4 refer to derivatives of glucose, galactose, mannose and arabinose.

将完全水解后的多糖 SSP 衍生化, 衍生产物用 GC 法检测, 结果如图 3C 所示。对照标准单糖衍生化后的 GC 图 3C, 可以得出 SSP 由葡萄糖, 甘露糖, 半乳糖和阿拉伯糖组成, 各单糖摩尔质量比为 $6.5:1.3:1:1$ 。

2.3 SSP 的结构表征

SSP 的 1D 和 2D NMR 结果如图 4 所示。根据 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 和 HSQC, 检测出 4 个异头质子, 化学位移是 $\delta 4.58$ (1H, d, $J = 7.9\text{ Hz}$)、 4.86 (1H, s)、 4.99

(1H, s) 和 5.24 ppm (1H, s), 对应 ^{13}C NMR 的化学位移分别是 103.10 、 102.01 、 103.10 和 101.73 ppm 。按照异头质子化学位移从高场到低场, 依次将其命名为糖残基 A~D, 各糖残基的摩尔比为 $6:1.2:1:1$, 与单糖组成结果相吻合。从异头质子出发, 通过 COSY 和 TOCSY 谱得到糖残基中氢的化学位移, 根据氢的化学位移通过 HSQC 谱得出相对应的 ^{13}C NMR 化学位移, 糖残基 A~D 的 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 化学位移如表 2 所示。

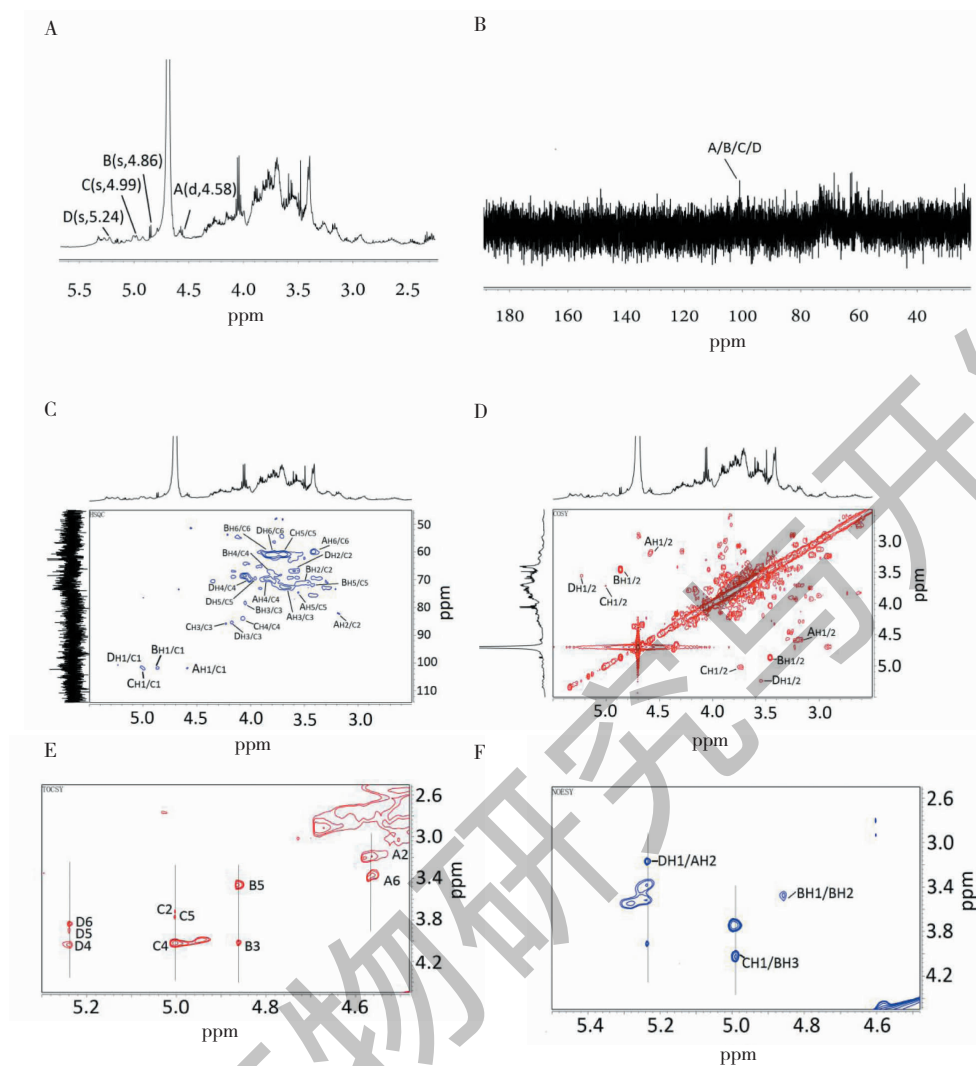


图4 SSP的 ^1H NMR(A)、 ^{13}C NMR(B)、HSQC(C)、COSY(D)、TOCSY(E)和NOESY谱(F)

Fig.4 ^1H NMR (A), ^{13}C NMR (B), HSQC (C), COSY (D), TOCSY (E) and NOESY (F) spectra of SSP

表2 SSP的 ^1H NMR和 ^{13}C NMR数据

Table 2 ^1H NMR and ^{13}C NMR data of SSP

标记 Label	糖残基 Sugar residue	化学位移 chemical shift (δ)							
		1	2	3	4	5	6a	6b	
A	$\rightarrow 2$)- β -D-Glup-(1 \rightarrow	H	4.58	3.2	3.69	3.88	3.55	3.43	-
		C	103.1	82.98	73.61	70.91	75.22	61.02	-
B	$\rightarrow 3$)- α -D-Manp-(1 \rightarrow	H	4.86	3.48	4.04	3.82	3.46	3.9	-
		C	102.01	71.41	79.27	68.05	72.79	62.01	-
C	$\rightarrow 3$)- β -L-Araf-(1 \rightarrow	H	4.99	3.74	4.24	4.07	3.78	-	-
		C	103.1	74.31	86.84	83.87	62.41	-	-
D	$\rightarrow 3$)- α -D-Galp-(1 \rightarrow	H	5.24	3.55	4.18	4.02	3.9	3.87	-
		C	101.73	67.78	86.41	70.81	71.01	62.02	-

SSP 的单糖组成分析显示葡萄糖占比最多, NMR 显示糖残基 A 摩尔比例最高, 且 H2 化学位移在高场区, 说明 A 是葡萄糖构型。糖残基 A 的 H1 在 4.4 ~ 4.8 ppm 之间, 且 $J_{H1, H2}$ (7.9 Hz) 在 6 ~ 8 之间, 说明糖残基 A 为 β 构型。糖残基 C 的异头氢小于 5.4 ppm, $J_{H1, H2} < 2$ Hz, C4 在 82 ~ 84 ppm, 说明糖残基 C 是呋喃阿拉伯糖, 异头碳在 103 ppm, 进一步说明其为 β 构型。糖残基 D 在 COSY 谱中只有 H1 ~ H3 的化学位移, 其他质子化学位移由 TOCSY 谱获得, 其异头质子化学位移 (5.4 ppm) 大于 5.0 ppm, $J_{H1, H2} < 3$ Hz, 说明糖残基 D 是 α -半乳糖构型。根据糖残基 B 的 ^{13}C 化学位移, 其为甘露糖, 由于 $J_{H1, H2}$ 很小, 无法判断构型, 但其 NOESY 谱中 H1 和 H2 有交叉峰, 说明为 α 构型。根据表 2 中 ^{13}C NMR 化学位移, 对照标准化学位移表, ^{13}C NMR 化学位移向低场区有较大迁移, 则该位置发生取代。糖残基 A ~ D 分别是 $\rightarrow 2$)- β -D-Glucp-(1 \rightarrow , $\rightarrow 3$)- α -

D -Manp-(1 \rightarrow , $\rightarrow 3$)- β -L-Araf-(1 \rightarrow 和 $\rightarrow 3$)- α -D-Galp-(1 \rightarrow 。

NOESY 谱中观察到糖残基 D 的 H1 与糖残基 A 的 H2 有 NOE 效应, 说明糖残基 D 与糖残基 A 相连接, 即 $\rightarrow 3$)- α -D-Galp-(1 $\rightarrow 2$)- β -D-Glucp-(1 \rightarrow 。糖残基 C 的 H1 与糖残基 B 的 H3 有 NOE 效应, 说明糖残基 C 与糖残基 B 相连接, 即 $\rightarrow 3$)- β -L-Araf-(1 $\rightarrow 3$)- α -D-Manp-(1 \rightarrow 。综上所述, SSP 的重复结构单位是 $\rightarrow 3$)- α -D-Galp-(1 $\rightarrow 2$)- β -D-Glucp-(1 $\rightarrow 3$)- β -L-Araf-(1 $\rightarrow 3$)- α -D-Manp-(1 \rightarrow 。

采用 SEM 和 TEM 观察 SSP 的微观结构, 结果见图 5。SEM 显示 SSP 是片状结构, 表面无孔, 说明没有分支结构。高放大倍数 SEM 下可见 SSP 表面粗糙, 说明糖链之间互相交叠或缠绕, 且凸起呈网状交织样。TEM 显示 SSP 无分支, 为多个糖链相互交织在一起的网状结构, 与上述 NMR 和 SEM 分析的结构吻合。

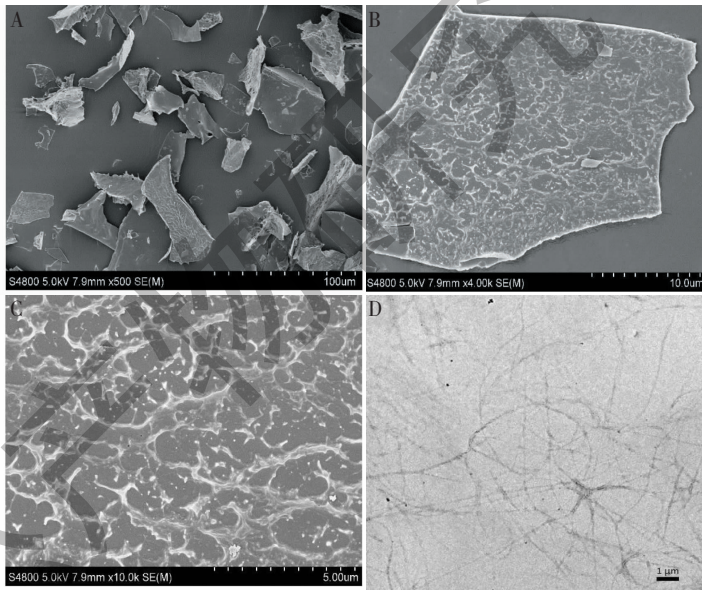


图 5 SSP 的扫描电镜图 (A ~ C, 500 ~ 10 000 \times) 和透射电镜图 (D, 5 000 \times)

Fig. 5 SEM (A-C, 500-10 000 \times) and TEM images (D, 5 000 \times) of SSP

2.4 SSP 的抗炎作用

为了选择安全无毒的 SSP 添加量, 首先对 SSP 进行细胞毒研究, 试验结果如图 6A。显著性分析结果表明, 添加 25 或 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 SSP 对 RAW 264.7 细胞增长没有细胞毒性, 因此选择这两个浓度进行抗炎试验。对各组细胞提取总 RNA, 反转录得到 cDNA, 采用相应的引物进行 RT-qPCR。RT-qPCR 结果显示扩增曲线均呈现 S 型, 说明所得 CT 值可信度高, 熔解曲线均

呈现单一对称峰, 进一步说明引物特异性高, 获得目标扩增基因。根据所得 CT 值, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算各 mRNA 相对内参基因 GAPDH 的表达量, 结果如图 6 所示。为了诱导 RAW 264.7 细胞产生炎症模型, 阴性组添加了 LPS, 相较于空白组, 阴性组 TNF- α 、COX-2 和 iNOS 的 mRNA 表达量都极显著增加 ($P < 0.001$), 说明炎症模型构建成功。

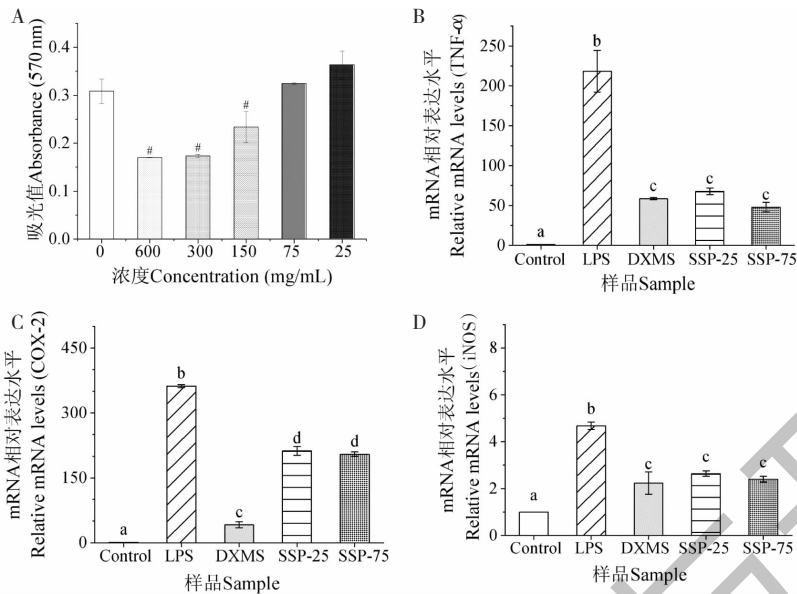


图6 SSP对RAW 264.7的细胞毒作用(A)以及对TNF- α (B)、COX-2(C)和iNOS(D)mRNA表达的影响

Fig. 6 Cytotoxicity of SSP on RAW 264.7 cells (A), and effects on TNF- α (B), COX-2 (C) and iNOS (D) mRNA expression

注:与空白组比较, # $P < 0.05$; 不同小写字母表示差异显著, $P < 0.05$ 。Note: Compared with control, # $P < 0.05$; Different lowercase letter refer to significant differences ($P < 0.05$).

RAW 264.7 细胞中添加 LPS 后,添加地塞米松作为阳性对照组,不同浓度 SSP 作为两个样品组。从图 6 可以看出,与阴性组相比,阳性对照组和两个样品组的 TNF- α 、COX-2 和 iNOS 表达量均显著降低 ($P < 0.05$),说明均具有抗炎作用。两个不同浓度样品组对 TNF- α 、COX-2 和 iNOS 基因表达影响差异不显著 ($P > 0.05$),说明 SSP 的抗炎作用并不呈现剂量效应。在 25 或 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 不同质量浓度下,SSP 对 TNF- α 表达的抑制率分别是 69.0% 和 78.2%,对 COX-2 表达抑制率分别是 41.4% 和 43.5%,对 iNOS 基因表达抑制率分别是 43.5% 和 47.7%。显著性分析结果显示,SSP 对 TNF- α 和 iNOS 表达抑制作用与阳性对照组无显著差异 ($P > 0.05$),说明 SSP 的部分抗炎作用与地塞米松相当。

3 结论

获得亚高山绣球菌总糖提取工艺模型 $Y = 14.84 + 2.29X_1 + 0.14X_2 - 0.59X_3 - 2.54X_1X_2 - 0.10X_1X_3 + 0.80X_2X_3 - 1.52X_1^2 + 0.01X_2^2 - 1.08X_3^2$, 得到最佳提取条件(液料比 = 80 mL/g, 提取时间 = 60 min, 提取温度 = 70 $^{\circ}\text{C}$), 该条件下提取率为 $(18.21 \pm 0.68)\%$ 。从亚高山绣球菌中分离纯化得到 1 个水溶性多糖 SSP, 得率为 10.50%。SSP 组分均一, 含有糖类物质的特征官能团, 糖含量为 99.30%, 不含有蛋白质和核酸, 在 258 ~ 408

$^{\circ}\text{C}$ 范围内发生物质分解, 重均分子质量是 50 kDa, 由葡萄糖, 甘露糖, 半乳糖和阿拉伯糖组成, 各单糖摩尔质量比为 6.5:1.3:1:1。SSP 是无分支结构的多糖, 其化学结构的重复单位是 $\rightarrow 3)-\alpha-D-\text{Galp}-(1\rightarrow 2)-\beta-D-\text{Glup}-(1\rightarrow 3)-\beta-L-\text{Araf}-(1\rightarrow 3)-\alpha-D-\text{Manp}-(1\rightarrow$, 空间结构表现为多糖链交织的网状结构。成功建立炎症模型, 25 或 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 多糖 SSP 对炎症细胞 RAW 264.7 中 TNF- α 、COX-2 和 iNOS 的表达均有显著抑制作用 ($P < 0.05$), 且 SSP 对 TNF- α 和 iNOS 表达抑制作用与阳性对照组无差异 ($P > 0.05$)。

据报道, 脑出血病人和阿尔茨海默病 (AD) 患者体内趋化因子 (TNF- α) 含量明显增多^[17], TNF- α 能增加斑块沉积, 具有神经毒性, 会进一步激活 iNOS 基因过表达, 从而造成神经元细胞损伤和凋亡^[18]。亚高山绣球菌多糖能有效抑制 TNF- α 和 iNOS 的过量表达, 作为结构明确的天然食用菌, 对中枢系统疾病具有良好的保健作用。

参考文献

- 1 Zhao Q, Feng B, Yang ZL, et al. New species and distinctive geographical divergences of the genus *Sparassis* (Basidiomycota): evidence from morphological and molecular data [J]. Mycol Prog, 2013, 12:445-454.

- 2 Nameda S, Harada T, Miura NN, et al. Enhanced cytokine synthesis of leukocytes by a β -glucan preparation, SCG, extracted from a medicinal mushroom, *Sparassis crispa* [J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2003, 25: 321-335.
- 3 Zhao H, Lu W, Xu L, et al. The study of the function of polysaccharide from *Sparassis crispa* (SCP) in inducing apoptosis in K562, THP-1 cells [J]. Chin Agr Sci Bull (中国农学通报), 2013, 29(21): 149-153.
- 4 Hao CY, Cheng YF, Xu LJ, et al. Regulatory effects of *Sparassis latifolia* polysaccharide on intestinal immune function in immunosuppressed mice [J]. Mycosystema (菌物学报), 2020, 39: 1380-1390.
- 5 Zhang X, Yan M, Li D, et al. Characteristics and *in vitro* dectin-1 receptor activation effect of cell wall polysaccharides of *Sparassis latifolia* fruiting body [J]. Acta Edulis Fungi (食用菌学报), 2020, 27(1): 85-91.
- 6 Wang MH, Hao ZQ, Chang MC, et al. Characterization, antioxidant and immunity activities of *Sparassis latifolia* polysaccharides [J]. Mycosystema (菌物学报), 2019, 38: 707-716.
- 7 Yang Y, Hao Z, Chang M, et al. Isolation, purification, structural identification and antioxidant activity of acidic polysaccharide in *Sparassis crispa* [J]. Acta Edulis Fungi (食用菌学报), 2019, 26(3): 105-112.
- 8 Kim HS, Kim JY, Ryu HS, et al. Induction of dendritic cell maturation by beta-glucan isolated from *Sparassis crispa* [J]. Int Immunopharmacol, 2010, 10: 1284-1294.
- 9 Tada R, Harada T, Nagi-Miura N, et al. NMR characterization of the structure of a beta-(1-3)-D-glucan isolate from cultured fruit bodies of *Sparassis crispa* [J]. Carbohydr Res, 2007, 342: 2611-2618.
- 10 Luo D. Optimization of total polysaccharide extraction from *Dioscorea nipponica* Makino using response surface methodology and uniform design [J]. Carbohydr Polym, 2012, 90(1): 284-288.
- 11 Yuan X, Zeng Y, Nie K, et al. Extraction optimization, characterization and bioactivities of a major polysaccharide from *Sargassum thunbergii* [J]. PLoS One, 2015, 10(12): e144773.
- 12 Luo D, Yuan X, Zeng Y, et al. Structure elucidation of a major fucopyranose-rich heteropolysaccharide (STP-II) from *Sargassum thunbergii* [J]. Carbohydr Polym, 2016, 143: 1-8.
- 13 Dubois M, Gilles K, Hamilton JK, et al. A colorimetric method for the determination of sugars [J]. Nature, 1951, 168(4265): 167.
- 14 Cao S, Zhou R, Nie K, et al. Structural characterization of a heteropolysaccharide from *Sargassum thunbergii* and its antioxidant and anti-colon cancer cells proliferation activity [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2017, 29: 1635-1641.
- 15 Luo D, Wang Z, Zhou R, et al. A polysaccharide from *Umbilicaria yunnanensis*; structural characterization and anti-inflammation effects [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 151: 870-877.
- 16 Wang Z, Cao S, Zeng Y, et al. Extraction optimization, microstructure and anti-inflammatory properties of a polysaccharide from *Tremella sanguinea* Peng [J]. J Chin Inst Food Sci Technol (中国食品学报), 2019, 19(1): 96-102.
- 17 Fang HY, Ko WJ, L CY. Inducible heat shock protein 70, interleukin-18, and tumor necrosis factor alpha correlate with outcomes in spontaneous intracerebral hemorrhage [J]. J Clin Neurosci, 2007, 14: 435-441.
- 18 Brown GC. Mechanisms of inflammatory neurodegeneration; iNOS and NADPH oxidase [J]. Biochem Soc Trans, 2007, 35: 1119-1121.