

基于响应面法优化牛蒡子多糖提取工艺及对细胞抗炎作用研究

潘博雅,孟宪群,康廷国,尹海波,许亮,王丹*

辽宁中医药大学药学院,大连 116600

摘要:为了确定提取牛蒡子多糖的最佳工艺条件,并探究其抗炎作用。通过响应面法考察不同料液比,提取时间和提取温度对牛蒡子多糖提取率的影响;使用 ELISA 试剂盒测定不同 RAW 264.7 细胞处理组肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和白介素-6(IL-6)的水平;经 Western blot 法检测髓样分化因子 88(MyD88)、Toll 样受体 4(TLR4)和核转录因子- κ B(NF- κ B)的蛋白表达水平。结果显示牛蒡子多糖最优提取工艺条件为料液比 1:15(g/mL)、提取时间 3 h、提取温度 80 $^{\circ}$ C,此时提取率为 7.19%;牛蒡子多糖组对 TNF- α 和 IL-6 的分泌均有抑制作用并通过调控相关通路上的蛋白表达,起到免疫调控作用。该研究可为牛蒡子新药成分的開發和应用奠定基础。

关键词:牛蒡子多糖;响应面法;提取工艺;RAW 264.7 细胞;抗炎

中图分类号:R932

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2024)1-0102-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2024.1.012

Optimization of extraction process of Arctii Fructus polysaccharide based on response surface method and its anti-inflammatory effect on cells

PAN Bo-ya, MENG Xian-qun, KANG Ting-guo, YIN Hai-bo, XU Liang, WANG Dan*

College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China

Abstract: The aim of this paper was to determine the optimum extraction conditions of Arctii Fructus polysaccharide and to explore the anti-inflammatory effect of its solution. The effects of different solid-liquid ratio, extraction time and extraction temperature on the extraction yield of Arctii Fructus polysaccharide were investigated by response surface method. The levels of tumor necrosis factor α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in different RAW 264.7 cell treatment groups were determined by ELISA kit. The protein expression levels of myeloid differentiation factor 88 (MyD88), Toll-like receptor 4 (TLR4) and nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B) were detected by Western blot. The results showed that the optimal extraction conditions were solid-liquid ratio 1:15 (g/mL), extraction time 3 h, extraction temperature 80 $^{\circ}$ C, and the extraction yield was 7.19%. Arctii Fructus polysaccharide groups inhibited the secretion of TNF- α and IL-6, and played an immunoregulatory role by regulating the expression of proteins in related pathways. This study can lay a foundation for the development and application of new drug ingredients of Arctii Fructus.

Key words: Arctii Fructus polysaccharides; response surface methodology; extraction process; RAW 264.7 cells; anti-inflammatory

牛蒡子为菊科植物牛蒡(*Arctium lappa* L.)成熟的干燥果实,收录于 2020 版《中国药典》中。现代研究表明,牛蒡子因其具有多种药理活性,例如抗炎、抗肿瘤、抗糖尿病肾病、调节免疫力、抗病毒、降血糖、利尿及泻下等功效^[1-3]而被广泛研究。但目前

关于牛蒡子活性成分的研究主要集中在木脂素类成分^[4],而其中的多糖作为果实类中药中富含的主要成分之一^[5]在牛蒡子中却研究较少。炎症是机体免疫系统的第一道防线,是机体的一种自然保护性反应,但长时间的、慢性的炎症可导致疾病的发生,如发烧、哮喘、动脉粥样硬化、关节炎、神经退行性疾病甚至癌症。目前对于炎症的治疗主要集中在类固醇和非类固醇抗炎药物,但因其能够引起高血压、骨质疏松、免疫抑制、出血性胃炎、上消化道溃疡、肝毒性、过敏等副作用,不能长期使用。因此亟待开发出

收稿日期:2023-06-15 接受日期:2023-11-15

基金项目:国家自然科学基金(81874338);沙河口区、望花区中药资源普查基金(2019008);2021年辽宁中医药大学大学生创新创业训练计划(X202110162027)

*通信作者 Tel:86-411-85890148;E-mail:dadanzi2007@163.com

一类安全、有效的的新药源^[6]。近年来,天然多糖因其安全性、易得性和良好的抗炎活性而受到广泛关注^[7]。

因此,本研究在考察单因素条件的基础上,采用响应面中的 Box-Behnken 方法,进行三因素三水平实验设计。以牛蒡子多糖提取率为参考依据,构建牛蒡子多糖提取工艺最佳组配。通过建立以脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)为诱导条件的 RAW 246.7 细胞炎症模型,对牛蒡子多糖的相关抗炎机制进行初步研究,为开发新抗炎药物和综合利用牛蒡子多糖提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

牛蒡子(江苏省徐州丰县有限公司),经辽宁中医药大学康廷国教授鉴定为牛蒡(*Arctium lappa* L.)干燥成熟果实。

1.2 试剂与设备

无水葡萄糖对照品(批号:M11bv141284,纯度 $\geq 98\%$,北京索莱宝科技有限公司);CCK8 试剂盒(批号:MA0218-Oct-171,北京博奥森生物技术有限公司);IL-6、TNF- α ELISA 试剂盒(批号:AD202112、AD202203,上海研谨科技有限公司);蒸馏水(杭州娃哈哈集团有限公司)。UV-5100 型紫外可见分光光度计(上海元析仪器有限公司);FA210SL 型电子天平(华质电子科技有限公司);HH-ZK6 型数显式电热恒温水浴锅、LY15-101-1 型电热恒温干燥箱(上海龙跃仪器设备有限公司);TDZ4-WS 型低速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)。

1.3 牛蒡子多糖的提取研究

1.3.1 多糖的提取

称牛蒡子干燥粉末 10 g,加甲醇(20 mL)进行热回流提取。去除甲醇提取液,将药渣挥干后,用 1.5 倍体积的蒸馏水加热提取 3 次,每次 2.5 h,将 3 次提取的水提液合并,用乙醇进行醇沉,测定乙醇终浓度为 80%,醇沉过夜。将醇沉后的样品通过丙酮淋溶后进行抽滤,将抽滤沉淀中的有机溶剂挥干,取适当沉淀物根据苯酚浓硫酸法,当反应液颜色为棕褐色,多次测量反应液的吸光度值趋于稳定时,即为纯度较为稳定的牛蒡子粗多糖。

1.3.2 多糖纯度的测定

采用高效凝胶渗透色谱(high performance gel permeation chromatography, HPGPC)法测量多糖纯度。精密称取样品 5 mg,溶解于 1 mL 的流动相溶

液(0.05 mol/L NaCl 溶液)中,配制成 5 mg/mL 溶液,超声 10 min 后,12 000 r/min 离心 10 min。吸取上清液,用 0.22 μm 的水系微孔滤膜过滤备用。色谱方法为流动相:0.05 M NaCl 溶液;色谱柱:BRT105-103-101 串联凝胶柱(8 mm \times 300 mm);流速:0.8 mL/min;柱温:40 $^{\circ}\text{C}$;进样量:25 μL ;检测器:示差检测器 RID-20A;分析时间:60 min。

1.3.3 单因素考察

称牛蒡子干燥粉末 10 g,对提取多糖过程中涉及的 3 个因素(料液比、提取时间、提取温度)进行实验设计。以牛蒡子多糖提取率为参考响应值,测定不同料液比(1:10、1:15、1:20、1:25、1:30 g/mL)、提取时间(2、3、4、5、6 h)和提取温度(60、70、80、90、100 $^{\circ}\text{C}$)对多糖提取的影响,确定各提取因素的最佳范围。

1.3.4 响应面试验设计

通过单因素实验确定提取范围之后,采取 Box-Behnken 设计方法,对确定范围下的料液比、提取时间和提取温度进行试验组配,以多糖提取率为响应值指标,通过对不同组配的多糖提取,得到数据并进行分析,建立三个影响因素与响应值之间的拟合方程,生成响应图,并利用软件预测最佳工艺条件^[8]。

1.4 牛蒡子多糖提取率的测定

取牛蒡子多糖样品 1 mL,使用修改的苯酚-浓硫酸法^[9],以葡萄糖标准曲线为参考,测定牛蒡子多糖样品在 490 nm 处吸光度值,通过标准曲线得到多糖浓度,并根据公式(1)计算其提取率。

$$\text{多糖提取率} = \frac{cV}{m} \times 100\% \quad (1)$$

式中: c (g/mL)代表牛蒡子多糖溶液浓度, V (mL)代表牛蒡子多糖溶液体积, m (g)代表牛蒡子用量。

1.5 RAW 246.7 细胞培养

向 DMEM 高糖培养液中加入含 10% 的新生小牛血清及 100 U/mL 青霉素、链霉素,对 RAW 264.7 细胞进行培养。培养条件:5% CO_2 ,温度 37 $^{\circ}\text{C}$,隔天换新培养液。每天观察细胞的生长状态。

1.6 CCK8 法检测细胞活力

取生长至 70% ~ 80% 融合程度的 RAW 264.7 细胞,用 0.25% 胰蛋白酶消化。当细胞密度达到 5×10^3 个/mL 时,接种到 96 孔板中,培养 24 h。设置 7 个牛蒡子多糖质量浓度组(0、10、20、40、80、160、320 $\mu\text{g}/\text{mL}$),每组 4 个复孔。当细胞充分贴壁

后,将孔内液体弃置,各组加入 200 μL 培养液,其中含有相应质量浓度的药物,培养 24 h 弃掉孔内液体,每孔加入 180 μL 的完全培养基和 20 μL 的 CCK8 溶液,培养 3 h,用酶标仪检测各孔光密度(OD)值,计算各组细胞的相对存活率^[10]。

1.7 牛蒡子多糖对 RAW 264.7 细胞增殖的影响

将 RAW 264.7 细胞随机分成空白组,LPS 模型组(1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$),牛蒡子多糖低、中、高剂量浓度组(20、40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$),每组设置 3 个复孔。用无血清培养液培养空白组细胞 24 h,之后换新培养基继续培养 1 h,LPS 模型组细胞在无血清培养液培养 24 h 后,加入含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS 培养基继续培养 1 h,牛蒡子多糖组分别换入含 20、40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 牛蒡子多糖的培养基培养 24 h,之后加入含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS 培养基继续培养 1 h。于波长 450 nm 处测定吸光度(OD)值,并计算细胞的生长抑制率。

1.8 RAW 246.7 细胞上清液中 TNF- α 、IL-6 水平检测

收集不同处理组的 RAW 264.7 细胞上清液(3 000 r/min 离心 15 min),参照 ELISA 试剂盒说明书,检测不同处理组细胞上清液中 TNF- α 和 IL-6 水平。

1.9 Western blot 法检测 TLR4、MyD88 和 NF- κB p65 的蛋白表达水平

收集每组细胞上清液,3 000 r/min 离心 15 min,取上清液,采用 Western blot 将蛋白质样品通过 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,将所得蛋白质转移到聚偏二氟乙烯上,并在 5% 脱脂奶粉(磷酸盐缓冲液,0.1% 吐温)中孵育。在所分析的检测液中,检测 TLR4、MyD88 和 NF- κB p65 的蛋白表达水平,通过分析着色位置和着色深度来判断。

1.10 数据统计分析

Box-Behnken 设计采用 Design-Expert Software 12.0 软件对响应面实验数据进行二次多项回归拟合方差分析。方差分析使用 One-Way ANOVA 检验其显著性, $P < 0.05$ 代表差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 多糖纯度测定

采用 HPGPC 对牛蒡子粗多糖进行纯度鉴定(见图 1)。通过已知分子量的标准葡聚糖作为标准品,根据葡聚糖凝胶标准曲线的测算,牛蒡子粗多糖的纯度为 80.73%。

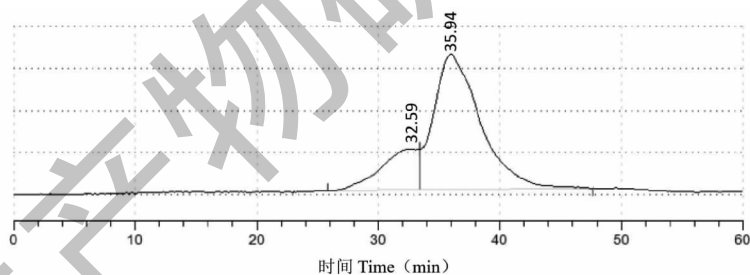


图 1 牛蒡子粗多糖 HPGPC 图

Fig. 1 HPGPC diagram of burdock seed crude polysaccharide

2.2 单因素实验优化结果

2.2.1 提取料液比的影响

通过对牛蒡子多糖提取过程中不同料液比这一因素的研究,发现在 1:10、1:15、1:20、1:25、1:30 g/mL 这 5 个料液比条件下,牛蒡子多糖提取率会随着提取液占比的升高,出现增高趋势(见图 2),当料液比为 1:15 g/mL 时,牛蒡子多糖的提取率最高为 7.03%。当继续提高提取液比例,牛蒡子多糖的提取率又呈现下降的趋势,这可能是由于过大的溶剂和溶质之间的浓度差,反而影响了牛蒡子多糖在水中的溶解度,进而影响了多糖的提取率。

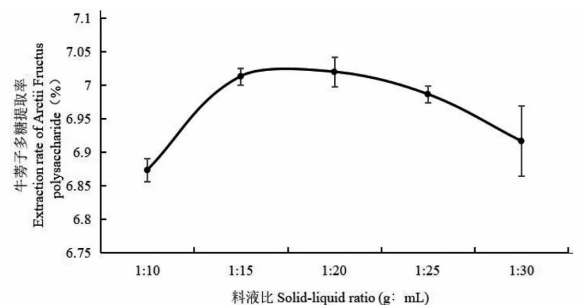


图 2 不同料液比对牛蒡子多糖提取率的影响

Fig. 2 Effect of different solid-liquid ratio on extraction rate of Arctii Fructus polysaccharide

2.2.2 提取时间的影响

通过对牛蒡子多糖提取过程中不同提取时间这一因素的研究,发现在2、3、4、5、6 h这5个提取时间条件下,牛蒡子多糖的提取率在3 h时达到最大值,为7.11%。之后随着提取时间的继续增加,多糖提取率呈现下降趋势(见图3)。可能是在多糖的提取过程中,提取时间过长会一定程度上破坏多糖结构,影响最终的多糖提取率。

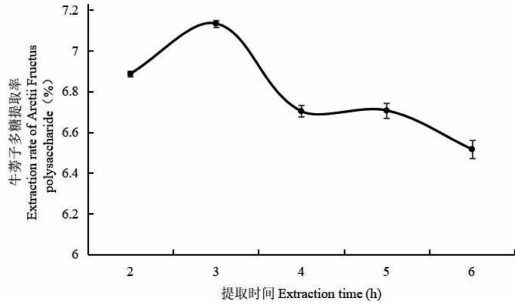


图3 不同提取时间对牛蒡子多糖提取率的影响

Fig. 3 Effect of different extraction time on extraction rate of Arctii Fructus polysaccharide

2.2.3 提取温度的影响

通过对牛蒡子多糖提取过程中不同提取温度这

一因素的研究,发现在60、70、80、90、100 °C这5个提取温度条件下,在60~80 °C温度范围内,多糖提取率随着提取温度的升高而增加。在80 °C条件下,多糖提取率最高,为7.14% (见图4)。当温度继续升高时,多糖提取率反而呈现下降趋势,可能是过高的提取温度会使多糖结构遭到一定程度的破坏,影响最终的多糖提取率。

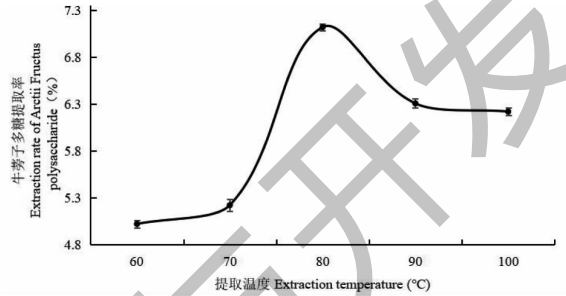


图4 不同提取温度对牛蒡子多糖提取率的影响

Fig. 4 Effect of different extraction temperature on extraction rate of Arctii Fructus polysaccharide

2.3 响应面优化牛蒡子多糖的提取工艺组配结果

通过对上述三因素(料液比、提取温度、提取时间)提取条件范围的确定,基于Box-Behnken设计方法进行响应面实验(见表1)。

表1 牛蒡子多糖提取条件响应面实验设计及结果

Table 1 Response surface experimental design and results table of extraction conditions of Arctii Fructus polysaccharides

实验号 No.	料液比 Solid-liquid ratio (g/mL)	提取温度 Extraction temperature (°C)	提取时间 Extraction time (h)	提取率 Extraction ratio (%)
1	1:15	60	4	6.89
2	1:15	70	3	7.01
3	1:15	60	2	6.75
4	1:20	60	3	6.73
5	1:15	80	2	7.15
6	1:15	80	4	7.08
7	1:10	70	4	6.38
8	1:20	70	4	6.57
9	1:10	70	2	6.11
10	1:10	60	3	6.19
11	1:15	80	3	7.27
12	1:15	70	3	7.14
13	1:20	80	3	6.92
14	1:20	70	2	6.73
15	1:10	80	3	6.49
16	1:15	70	3	7.19
17	1:15	80	3	7.29

根据 Design expert 软件, 获得提取率对以上三个因素的拟合回归方程为: 多糖提取率 = $7.19 + 0.1506A + 0.1138B + 0.1800C - 0.1000A \times B - 0.0025A \times C - 0.0075B \times C - 0.0319A^2 - 0.2056B^2 - 0.4831C^2$, 式中 A 代表料液比, B 代表提取温度, C 代表提取时间。分析模型应用方差的结果表明: 回归方

程具有较高的拟合度和可信度, 获得的实验方案可靠。回归系数 $R^2 > 0.9$, 说明自变量与响应值间含有线性关系, 它的回归方程可以进行最佳提取工艺条件优化。通过回归方程进行响应面图和等高线图的绘制(图5)。

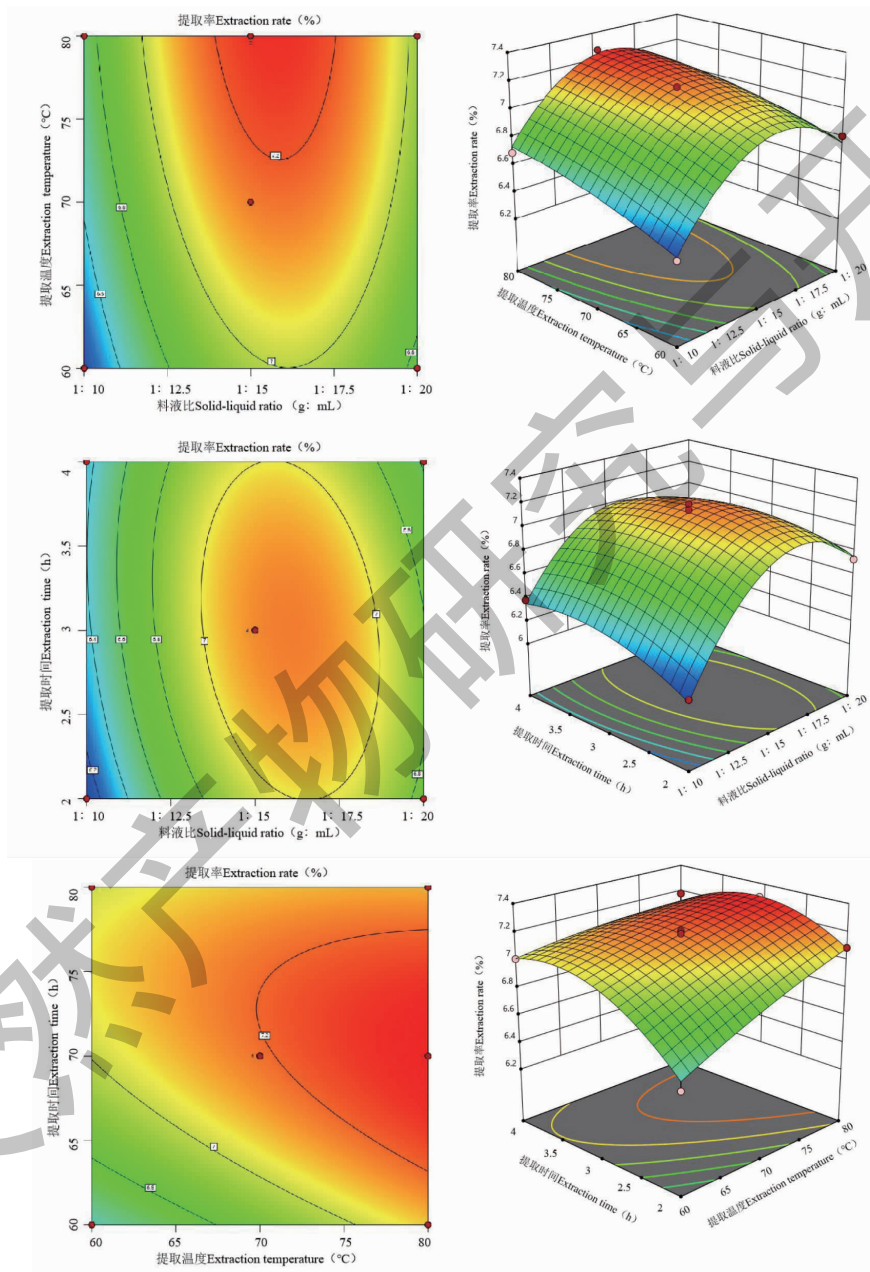


图5 响应面试验优化牛蒡子多糖提取率

Fig. 5 Response surface test to optimize the extraction rate of Arctii Fructus polysaccharide

通过 Box-Behnken 设计 17 组不同的提取方式组配, 并根据多糖提取率判定, 预测牛蒡子多糖最佳的提取条件组合为: 料液比为 1:15 g/mL, 提取温度

为 80 °C, 提取时间为 3 h, 在此组合下的多糖提取率可达 7.29%。为了进一步验证实验结果, 在此预测组配下进行 3 次平行实验, 得到的牛蒡子多糖提取

率平均值为 7.19%,基本符合预期结果。

2.4 RAW 246.7 细胞培养

通过传代的 RAW 246.7 细胞在光镜下显示其状态生长旺盛,细胞透亮,核仁清晰,细胞碎片少(见图 6)。

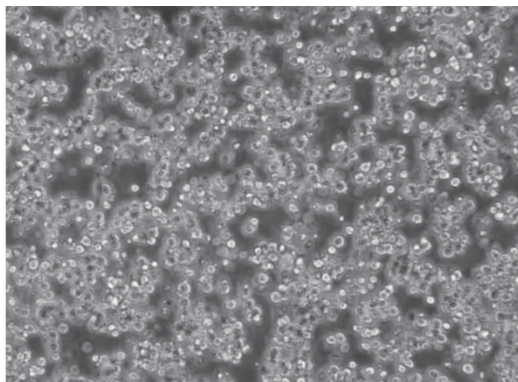


图 6 传代的 RAW 246.7 细胞生长情况

Fig. 6 The growth situation of passage RAW 246.7 cells

2.5 牛蒡子多糖对 RAW 246.7 细胞的毒性检测

牛蒡子多糖对 RAW 246.7 细胞的毒性检测结果见图 7。牛蒡子多糖浓度为 10 ~ 320 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, RAW 246.7 细胞存活率均高于 90%, 可视为无细胞毒性。当牛蒡子多糖浓度为 20、40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 细胞活力显著提高($P < 0.01$)。因此,本研究选择细胞活性较高的 20、40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 牛蒡子多糖浓度组,进行后续实验研究。

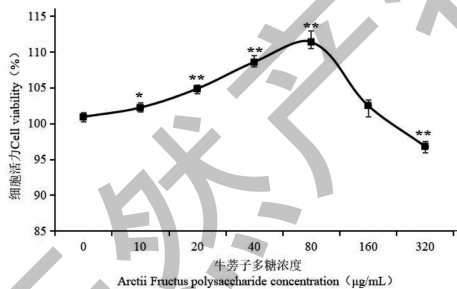


图 7 不同牛蒡子多糖浓度对 RAW 246.7 细胞生长活力的影响

Fig. 7 Effects of different concentrations of Arctii Fructus polysaccharide on the growth activity of RAW 246.7 cells

注:与 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 牛蒡子多糖浓度组相比, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ 。

Note: Compared with 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Arctii Fructus polysaccharide concentration group, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ 。

2.6 不同处理组对 LPS 诱导的 RAW 246.7 细胞炎症因子分泌的影响

通过检测 RAW 246.7 细胞炎症因子 TNF- α 和

IL-6 分泌情况发现, LPS 模型组较空白组显著升高 ($P < 0.01$); 与 LPS 模型组比较, 40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的牛蒡子多糖组 TNF- α 和 IL-6 分泌显著降低 ($P < 0.05$), 且整体呈剂量依赖趋势, 而 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的牛蒡子多糖组差异不显著(见图 8)。许多文献研究表明, 多糖浓度在一定范围内与抗炎活性呈一定的剂量依赖关系^[11-14], 但是对于多糖纯度与抗炎活性的关系研究并未见报道, 可以在后续的进一步研究中进行补充。

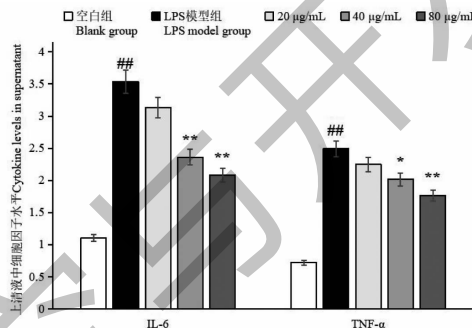


图 8 不同牛蒡子多糖浓度对 RAW 246.7 细胞炎症因子的影响

Fig. 8 Effects of different concentrations of Arctii Fructus polysaccharide on the inflammatory factors of RAW 246.7 cells

注:与空白组相比, ## $P < 0.01$; 与 LPS 模型组相比, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ 。Note: Compared with blank group, ## $P < 0.01$;

Compared with LPS model group, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

2.7 不同处理组对 LPS 诱导的 RAW 246.7 细胞 TLR4、MyD88 及 NF- κ Bp65 蛋白表达的影响

通过对不同处理组细胞中 TLR4、MyD88 及 NF- κ Bp65 蛋白表达水平的检测发现, 与空白组相比, LPS 模型组中蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$); 与 LPS 模型组比较, 20、40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的牛蒡子多糖组细胞 TLR4、和 NF- κ Bp65 表达显著降低 ($P < 0.05$), 并且呈一定的剂量依赖作用。对于 MyD88 蛋白表达水平, 与 LPS 模型组相比, 不同浓度的牛蒡子多糖组均存在一定的抑制作用, 其中 40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的牛蒡子多糖组抑制作用显著 ($P < 0.05$) (见图 9)。

3 结论

本文通过对牛蒡子多糖提取过程中的三个因素(料液比、时间和温度)进行范围确定研究, 并在此基础上, 通过 Box-Behnken 进行三因素组配实验设计, 根据实际牛蒡子多糖提取率, 得到牛蒡子多糖最佳提取工艺条件(料液比 = 1:15 g/mL 、提取时间

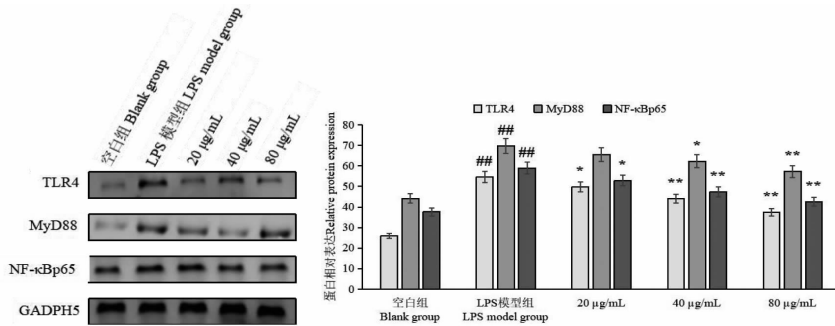


图9 不同牛蒡子多糖浓度对LPS诱导的RAW 246.7细胞TLR4、MyD88及NF-κBp65蛋白表达水平的影响

Fig. 9 Effects of different concentrations of Arctii Fructus polysaccharide on the expression levels of TLR4, MyD88 and NF-κBp65 proteins in LPS-induced RAW 246.7 cells

注:与空白组相比,^{##} $P < 0.01$;与LPS模型组相比,^{**} $P < 0.01$,^{*} $P < 0.05$ 。Note:Compared with blank group,^{##} $P < 0.01$;Compared with LPS model group,^{**} $P < 0.01$,^{*} $P < 0.05$

3 h、提取温度 80 °C)。通过研究不同浓度的牛蒡子多糖在细胞炎症中的作用机制,发现牛蒡子多糖能够抑制由LPS诱导的RAW 246.7细胞上清液中TNF-α和IL-6的分泌,并且能够通过调控TLR4/MyD88/NF-κB通路上的相关蛋白起到免疫调控作用,该研究可为牛蒡子多糖的开发和应用奠定科学基础,为牛蒡在抗炎作用方面的开发应用提供技术参考。

参考文献

- Zhang DX, Zhang CQ, Liu QD, et al. Research progress on anti-cancer active components and action mechanism of Arctii Fructus[J]. Mod Chin Med(中国现代中药), 2012, 14: 12-17.
- Ma ST, Lim DT, Deng JJ, et al. Effect of arctiin on glomerular filtration barrier damage in STZ induced diabetic nephropathy rats[J]. Phytother Res, 2013, 27: 147-148.
- Zang ZX, Liu ZQ, Liang QC. Effect of fructus compound preparation on expression of caspase-3 following focal cerebral ischemia-reperfusion in rats[J]. Heilongjiang Med J(黑龙江医药), 2010, 13: 22-27.
- Wu QJ. Chemical Lignans of Modern Chinese Herbal Medicine(现代中草药成分化学木脂素)[M]. Beijing: The Medicine Science and Technology Press of China, 2002: 293-294.
- Liu S, Zhang HY, Dong HJ. Research Progress on the chemical structure and pharmacological effects of polysaccharides from medicinal and edible plants of fruits[J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med(辽宁中医药大学学报), 2022, 24: 107-113.
- Hou C, Chen L, Yang L, et al. An insight into anti-inflamma-

tory effects of natural polysaccharides[J]. Int J Biol Macromol, 2020, 153: 248-255.

- Guo L, Ma R, Sun H, et al. Anti-inflammatory activities and related mechanism of polysaccharides isolated from *Sargento-doxa cuneata*[J]. Chem Biodivers, 2018, 15: e1800343.
- Zhang L, Fan JL, Zhu WX, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from Radix Glycyrrhiza using response surface analysis[J]. Food Sci(食品科学), 2013, 31: 67-71.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, et al. Colorimetric method for determination of sugar and related substances[J]. Anal Chem, 1956, 28: 250-256.
- Wang Q, Ye C, Sun S, et al. Curcumin attenuates collagen-induced rat arthritis via anti-inflammatory and apoptotic effects[J]. Int Immunopharmacol, 2019, 72: 292-300.
- Zhao QQ. A Preliminary study of anti-inflammation activity and their impact on mouse immunity of polysaccharides isolated from *Poria cocos sclerotium*[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology(华中科技大学), 2010.
- Wang QB. Extraction and anti-inflammatory and antioxidant-properties study of polysaccharides from meat-like *Ganoderma lucidum*[D]. Changchun: Changchun University of Technology(长春工业大学), 2022.
- Cheng XF, Zhang JC, Zhao Q, et al. Component analysis and evaluation of anti-inflammatory effect of crude polysaccharide from Tibetan *Opuntia ficus-indica* stems[J]. Sci Technol Food Ind(食品工业科技), 2022, 43: 356-362.
- Husien MH, Peng WL, Liu MJ, et al. Protective effects and mechanism of *Moringa oleifera* leaf polysaccharide on ulcerative colitis in mice[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2023, 35: 1659-1668.