

文章编号: 1674-5566(2024)06-1439-12

DOI: 10.12024/jsou.20231204381

芦根多糖的提取、结构表征及对巨噬细胞免疫抑制作用研究

崔明晓¹, 方舟², 官霞¹, 黄玥¹, 周睿美³, 刘克海², 白晨¹

(1. 上海商学院 食品系, 上海 200235; 2. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 3. 同济大学 医学院, 上海 200092)

摘要: 基于微波辅助提取法提取芦根多糖, 表征其结构、评价其体外免疫抑制功效。采用响应面法优化芦根多糖的提取条件, 获得最佳分离条件为微波功率572 W、微波时间22 min、液料比15 mL/g, 芦根多糖得率为1.61%。芦根多糖的单糖组成为阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖, 摩尔比为3.03:0.52:6.46。红外分析发现芦根多糖中可能含有糖醛酸及硫酸基团。芦根多糖溶液为无色透明液体。扫描电镜发现芦根多糖表面光滑且结构致密, 呈不规则且厚度不均匀的片状结构。细胞试验分析发现25~300 $\mu\text{g/mL}$ 芦根多糖能够显著提高巨噬细胞的细胞活性, 该多糖组与空白组无显著性差异。5~200 $\mu\text{g/mL}$ 芦根多糖能够显著抑制脂多糖刺激导致的巨噬细胞中一氧化氮的产生。100 $\mu\text{g/mL}$ 芦根多糖能显著抑制脂多糖刺激导致的巨噬细胞中肿瘤坏死因子 α 及白细胞介素6的产生。因此, 芦根多糖可能具有良好的免疫抑制功效。

关键词: 芦根多糖; 多糖得率; 响应优化; 结构表征; 免疫抑制

中图分类号: R 284 **文献标志码:** A

免疫是机体对于刺激的一种防御反应, 而免疫过度会引发机体炎症, 主要表现为红、肿、热、痛及部分功能障碍。巨噬细胞是重要的免疫细胞, 是机体针对有害刺激的重要防线。持续激活的巨噬细胞能够释放过量的一氧化氮(NO), 环氧合酶2, 单核细胞趋化蛋白1, 肿瘤坏死因子(TNF)- α 和白介素(IL)-6等, 引发机体过度免疫反应^[1]。许多天然化合物在高效调控过度免疫反应方面有重要潜力。比如, 桑黄多糖可通过抑制核因子 κB 核转移下调脂多糖(LPS)诱导的过度免疫反应, 从而调节炎症因子和细胞因子的平衡^[2]。

植物多糖是由 α 和 β 两种构型糖残基连接而成的一类大分子化合物, 分子量范围在万到百万之间, 这决定了其物理、化学特征的复杂性(例如溶液黏度、生物活性)^[3-5]。大部分植物多糖具有良好的生物相容性、生物降解性且毒性较低。据预测, 水溶性较强的多糖分子量较小, 且具有更强的生物活性^[6]。部分分子量较低的植物多糖通

过抑制趋化因子和黏附因子表达, 促进并诱导细胞因子合成, 发挥免疫抑制功效。据报道, 菊花非药用部位的多糖能够显著抑制结肠细胞损伤模型中炎症因子TNF- α , γ 干扰素、IL-17、IL-6、IL-1 β 和IL-23的产生, 提升细胞因子IL-10、IL-13和IL-4的水平^[7]。方竹笋多糖也能调控TNF- α 、IL-1 β 、IL-6和IL-18的表达, 抑制葡聚糖硫酸钠诱导的炎症反应, 维持机体细胞因子平衡^[8]。

芦苇分布于世界各地的河流、湖泊、池塘两岸和低湿地, 能有效维持湿地生态系统平衡及物种多样性, 是一种常见的水产植物^[9-10]。芦苇(*Phragmites australis*)含有许多营养素和生物活性物质, 如维生素、碳水化合物、脂肪、天冬酰胺、蛋白质、脂肪酸、氨基酸、生育酚等^[11]。芦苇中酮类化合物能够通过下调NO和前列腺素E2等因子有效抑制内毒素引起的巨噬细胞炎症, 并能够抵抗多种抗癌药物的毒性, 如紫杉醇^[12-13]。芦苇中多糖含量丰富, 且大部分集中在芦根(*Phragmites rhizoma*), 多糖是芦根中重要的生物

收稿日期: 2023-12-25 修回日期: 2024-06-05

基金项目: 国家自然科学基金(82172796); 2022年度上海高校市级重点课程“食品营养学”建设项目(2436611006)

作者简介: 崔明晓(1992—), 女, 讲师, 博士, 研究方向为功能性多糖。E-mail: 18616829327@163.com

通信作者: 白晨, E-mail: baichen_sh@163.com

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

活性成分之一。芦根常被用于汤、粥、凉茶的制作,发挥清热滋补、降火解热功效。目前芦根多糖的报道较少。本研究通过响应面法优化微波辅助提取芦根多糖的条件,并表征芦根多糖的结构。基于LPS诱导的巨噬细胞(RAW246.7)炎症模型探究芦根多糖(PRCP)的免疫抑制功效。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜芦根在秋季采集于广东省汕头市。RAW246.7细胞,上海中科院细胞库;胎牛血清、3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)、LPS,美国默克公司;DMEM培养基、磷酸盐缓冲盐水(PBS),上海生工生物工程有限公司。NO试剂盒,上海碧云天生物技术有限公司;TNF- α (ml002095)、IL-1 β (ml301814)、IL-2(ml002295)酶联免疫吸附剂测定试剂盒,上海酶联生物科技有限公司;其他,国药集团化学试剂有限公司。

1.2 实验仪器

TU-1810紫外分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;RE5203旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器有限公司;NicoletIS20傅里叶红外光谱仪、Multiskan SkyHigh酶标仪、ICS5000离子色谱仪,赛默飞世尔科技有限公司;UGC-24M氮吹仪,上海力辰仪器科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 PRCP的提取

新鲜芦根洗净、切块,置于搅拌机中,加入一定体积去离子水,粉碎芦根^[14]。微波辅助提取芦根多糖3次,三层纱布过滤芦根溶液,收集滤液。6 000 r/min离心10 min,收集上清液。60℃旋蒸浓缩至一定体积,加入3倍体积无水乙醇沉淀多糖,静置过夜。离心取沉淀,重溶于水,加入终浓度为3%的三氯乙酸,静置过夜。离心取上清液,透析,冷冻干燥后即得芦根多糖PRCP。

以葡萄糖制备标准溶液,采用苯酚-硫酸法测定并计算PRCP得率,公式^[15]:

$$Z=(C \times V \times n) / M \times 100\% \quad (1)$$

式中:Z代表PRCP得率,%;C代表吸光值计算的溶液质量浓度,mg/mL;V代表提取液体积,mL;n代表稀释倍数;M代表芦根粉质量,mg。

1.3.2 不同提取条件对PRCP得率的影响

称取芦根5 g,设置微波功率500 W,微波时

间6 min,考察不同液料比(5:1、10:1、15:1、20:1、25:1)对PRCP得率的影响;称取相同质量的芦根,设置微波功率500 W,液料比10:1,考察不同微波时间(6、12、18、24、30 min)对PRCP得率的影响;称取相同质量的芦根,设置微波时间18 min,液料比10:1 mL/g,考察不同微波功率(300、400、500、600、700 W)对PRCP得率的影响。

1.3.3 响应面分析PRCP最佳提取条件

通过对PRCP提取过程的探究,初步优化了影响提取率的重要因素(微波功率、微波时间、液料比)。在此基础上,以PRCP得率为响应值,通过响应面试验对影响PRCP得率的三因素进一步优化,具体设计如表1^[16]。利用Design-Expert 8.0.6响应面分析软件,明确PRCP分离的最佳条件。

表1 响应面试验设计
Tab. 1 Design of response surface tests

水平 Level	因素 Factor		
	A 微波功率 Microwave power/W	B 微波时间 Microwave time/ min	C 液料比 Liquid-solid ratio/(mL/g)
-1	400	12	5
0	500	18	10
1	600	24	15

1.3.4 PRCP的单糖组成、糖醛酸及硫酸根测定

5 mg PRCP及2 mL TFA(3 mol/L)置于安瓿瓶中,PRCP样品置于120℃恒温鼓风干燥箱水解3 h^[17]。氮吹仪吹干酸水解溶液并与水(5 mL)混匀,10 000 r/min离心,上清用于上机分析。选择D-果糖(Fru)、岩藻糖(Fuc)、葡萄糖(Glc)、阿拉伯糖(Ara)、甘露糖(Man)、D-核糖(Rib)、半乳糖(Gal)、木糖(Xyl)、鼠李糖(Rha)为单糖标准品。PRCP单糖组成检测委托博睿糖生物技术有限公司测定。采用硫酸味唑法及硫酸钡比浊法分别检测PRCP中糖醛酸及硫酸根的含量^[18]。

1.3.5 PRCP的红外分析

将冷冻干燥后的PRCP(5 mg)与溴化钾研磨混合,压片后放入红外光谱仪扫描分析,获得PRCP于4 000~400 cm⁻¹条件下的红外光谱^[19]。

1.3.6 PRCP的宏观及微观观察

将10 mg PRCP溶于蒸馏水中,通过数码相机拍摄记录PRCP的状态。取少量PRCP冻干粉未放于载物台的铜导电胶上,喷金后,扫描电镜记

录PRCP的微观特征^[20]。

1.3.7 PRCP对LPS诱导巨噬细胞的保护作用

将 1×10^5 个/mL的巨噬细胞(RAW264.7)分成8组于96孔板中培养12 h,弃上清。空白(Con)组加入200 μ L DMEM培养基;LPS组加入含有1 μ g/mL LPS的DMEM;PRCP组(P5、P25、P50、P100、P200、P300组)分别加入含有不同浓度PRCP的DMEM培养基预先培养1 h,继续加入含LPS的DMEM培养基,各组LPS终浓度为1 μ g/mL,PRCP终浓度分别为5、25、50、100、200和300 μ g/mL。培养1 d,PBS清洗细胞后,加入20 μ L 5 mg/mL MTT溶液及180 μ L DMEM,混匀^[21]。3 h后,弃上清,加入160 μ L二甲基亚砷,490 nm酶标仪记录并分析各组细胞存活情况。

1.3.8 PRCP对LPS诱导巨噬细胞炎症因子抑制作用

按照1.3.7节培养细胞,巨噬细胞密度选择 3×10^5 个/mL,PRCP组(P1、P5、P25、P50、P100、P200组)包含的LPS终浓度为1 μ g/mL,并且PRCP终浓度分别为1、5、25、50、100和200 μ g/mL。吸取部分上清液用于巨噬细胞NO产生量的检测。此外,Con组、LPS组、PRCP组(P5、P100)部分上清液用于巨噬细胞TNF- α 及IL-6产生量的检测^[22]。

1.3.9 数据处理

利用Design-Expert 8.0.6软件进行响应面数据分析。采用SPSS 17.0进行数据差异性分析,数据以平均值 \pm 标准差表示。经单因素方差分析,组间采用Duncan's统计分析, $P < 0.05$ 代表差异显著。试验取3次或5次(细胞实验)平行。

2 结果与分析

2.1 不同分离条件对PRCP得率的影响

图1a显示,微波分离PRCP的功率为500 W,时间为6 min,液料比由5 mL/g增加至10 mL/g时,PRCP得率增加了33.78%。而液料比由10 mL/g增加至25 mL/g时,PRCP得率增加缓慢,仅增加13.13%。因此,选择液料比为10 mL/g,用于后续PRCP分离条件的研究。

图1b显示,微波分离PRCP的功率为500 W,

液料比为10 mL/g时,PRCP得率随微波时间的增加呈明显增加的趋势。微波时间由6 min增加至12 min,PRCP得率增加了30.53%,微波时间由12 min增加至18 min,PRCP得率增加了15.32%,而微波时间由18 min增加至24 min,PRCP得率仅增加了2.80%。微波时间超过18 min,PRCP得率仅轻微增加,因此选择微波时间18 min,用于后续分离条件研究。

图1c显示,微波分离PRCP的微波时间为18 min,液料比为10 mL/g,PRCP得率随微波功率的增加明显增加。当微波功率300 W增加至500 W时,PRCP得率分别增加了57.69%、71.95%,而微波功率500 W增加至700 W时,PRCP得率仅分别增加了12.06%、1.90%,因此选择微波功率500 W,用于后续响应面条件研究。

2.2 响应面优化PRCP分离条件

通过单因素试验初步摸索得到PRCP的分离条件为液料比10 mL/g、微波时间18 min、微波功率500 W。以液料比、微波时间、微波功率为自变量,以PRCP得率为响应值,设计并进行17组试验获得PRCP得率(表2),进一步通过响应面分析预测PRCP得率最高时的提取条件。借助Design-Expert 8.0.6对表2数据进行回归拟合及分析,获得回归方程 $Z = 1.44 + 0.34A + 0.14B + 0.062C - 0.015AB + 0.028AC - 0.037BC - 0.25A^2 - 0.061B^2 - 0.029C^2$ 。表3为回归模型的方差分析。模型 $P = 0.0004 < 0.001$,差异性分析为极显著。失拟项 $P = 0.8839 > 0.05$,差异性分析为不显著,即模型不失拟。模型相关系数 $R^2 = 1.41/1.47 = 0.9591$,显示模型可靠。综上表明该回归模型拟合良好,合理可行,可用于分析和预测微波辅助分离PRCP工艺条件研究。微波功率 $P < 0.0001$,表明该回归模型中微波功率对PRCP得率的影响极显著;微波时间 $P = 0.0041 < 0.01$,表明该回归模型中微波时间对PRCP得率的影响极显著;液料比 $P = 0.0965 > 0.05$,表明液料比对PRCP得率的影响不显著。因此,对比可知微波功率、微波时间、液料比对PRCP得率的影响依次变小。通过显著性及回归模型分析,可知PRCP最佳分离条件为微波功率572.47 W、微波时间22.38 min、液料比14.82 mL/g,对应PRCP得率为1.65%。

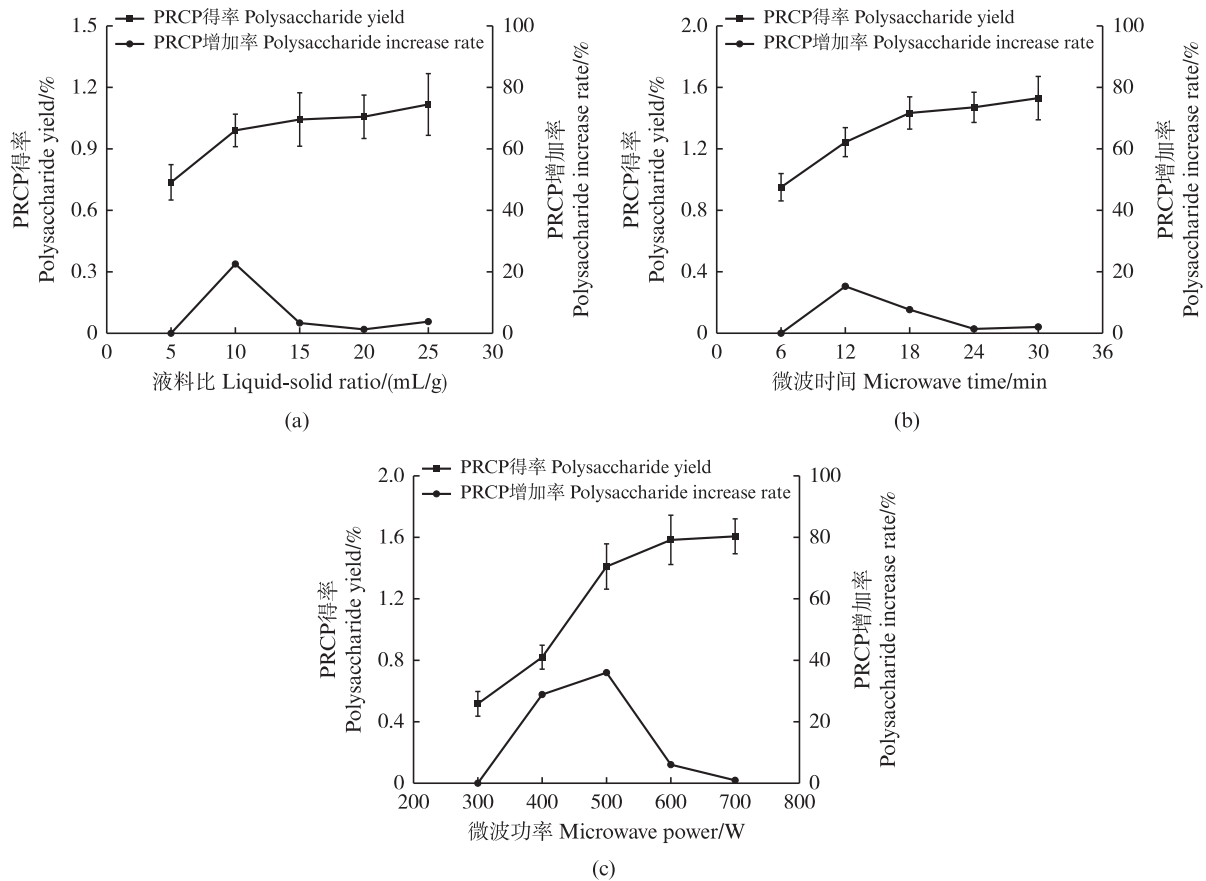


图1 液料比、微波时间、微波功率对PRCP得率及增加率的影响

Fig. 1 Effects of liquid–solid ratio, microwave time and microwave power on PRCP yield and increase rate

表2 响应面设计微波提取PRCP及其得率

Tab. 2 Response surface design microwave extraction of PRCP and its yield

试验号 Number	A 微波功率 Microwave power/W	B 微波时间 Microwave time/min	C 液料比 Liquid–solid ratio/(mL/g)	Z 得率 Polysaccharide yield/%
1	400	12	10	0.68
2	600	12	10	1.33
3	400	24	10	0.97
4	600	24	10	1.56
5	400	18	5	0.76
6	600	18	5	1.45
7	400	18	15	0.83
8	600	18	15	1.63
9	500	12	5	1.11
10	500	24	5	1.47
11	500	12	15	1.31
12	500	24	15	1.52
13	500	18	10	1.32
14	500	18	10	1.58
15	500	18	10	1.33
16	500	18	10	1.48
17	500	18	10	1.50

表 3 回归模型的方差分析
Tab. 3 Analysis of variance of regression model

来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F F	P P	差异性 Difference
模型 Model	1.410	9	0.160	18.430	0.000 4	***
A	0.930	1	0.930	109.780	<0.000 1	***
B	0.150	1	0.150	17.500	0.004 1	**
C	0.031	1	0.031	3.680	0.096 5	
AB	9.000×10 ⁻⁴	1	9.000×10 ⁻⁴	0.110	0.754 2	
AC	3.025×10 ⁻³	1	3.025×10 ⁻³	0.360	0.569 2	
BC	5.625×10 ⁻³	1	5.625×10 ⁻³	0.660	0.442 4	
A ²	0.250	1	0.250	30.020	0.000 9	**
B ²	0.016	1	0.016	1.850	0.216 4	
C ²	3.420×10 ⁻³	1	3.420×10 ⁻³	0.400	0.545 7	
残差 Residual	0.059	7	8.486×10 ⁻³			
失拟 Lack of fit	8.125×10 ⁻³	3	2.708×10 ⁻³	0.210	0.883 9	×
误差 Error	0.051	4	0.310			
总和 Sum	1.470	16				

注:** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ×代表不显著。

Notes: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, × means not significant.

2.3 响应面交互分析及模型验证

图 2 显示两因素交互作用对 PRCP 得率的影响。固定微波功率,随微波时间增加,PRCP 得率增加的幅度由大到逐渐趋于平缓。这可能由于微波时间过短时,PRCP 没有完全溶出,随着时间的延长,PRCP 溶出率逐渐增加,当 PRCP 接近完全溶出时,微波时间增加不能明显增加 PRCP 得率,从而 PRCP 得率增加的幅度趋于平缓。固定微波时间,微波功率的增加能够提升 RCP 得率,最终 RCP 得率增加的幅度也趋于平缓。这是由于微波功率会影响到食品中水分子间的运动,摩擦增加,使得水温升高,而当 PRCP 完全溶出时,水温的升高将不能继续影响 PRCP 得率。固定微波功率,液料比的增加能够提高 PRCP 得率,这是由于较低液料比的体系中多糖溶出量有限,而随着液料比的增加,体系中溶液的占比增加,因此会有更高比率的多糖溶出,从而促进 PRCP 得率提升。当 PRCP 接近完全溶出时,液料比的大幅增加不能明显提高 PRCP 得率。通过图 2 对比而言,两因素交互作用对 PRCP 得率的影响由大到小顺序为微波功率及微波时间交互、微波功率及液料比交互、微波时间及液料比交互。

综合单因素和响应面分析,可知 PRCP 最佳分离条件为微波功率 572.47 W、微波时间

22.38 min、料液比 14.82 mL/g,对应 PRCP 得率为 1.65%。基于实际操作的条件控制,将 PRCP 最佳分离条件修正为微波功率 572 W、微波时间 22 min、料液比 15 mL/g,于该条件下进行验证试验获得 PRCP 得率为 1.61%。实际 PRCP 得率与模型中得率相近,印证了该条件的可行性。

2.4 PRCP 的单糖组成分析

图 3 显示为单糖标准品吸收峰及 PRCP 单糖组成吸收峰。通过对比分析,结果表明,PRCP 的单糖组成主要为阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖,摩尔比为 3.03:0.52:6.46。经硫酸咔唑法及硫酸钡比浊法分别测得 PRCP 中糖醛酸及硫酸根含量为 3.64% 和 5.52%。

2.5 PRCP 的红外分析

图 4 及表 4 分别为 PRCP 的红外光谱及分析结果。3 300 cm^{-1} 和 2 923 cm^{-1} 处的吸收峰为 PRCP 的 O-H 和 C-H 伸缩振动峰。1 646 cm^{-1} 处 C=O 伸缩振动峰表明 PRCP 可能含糖醛酸。1 273 cm^{-1} 处 S=O 伸缩振动峰表明 PRCP 可能含有硫酸酯^[23]。1 200~1 000 cm^{-1} 吸收峰为 PRCP 中吡喃糖环 C-O-C 及 C-O-H 中 C-O 伸缩振动^[24-25]。916 cm^{-1} 和 845 cm^{-1} 处 C-H 变角振动分别归属于 PRCP 中的 β 和 α 型糖苷键。

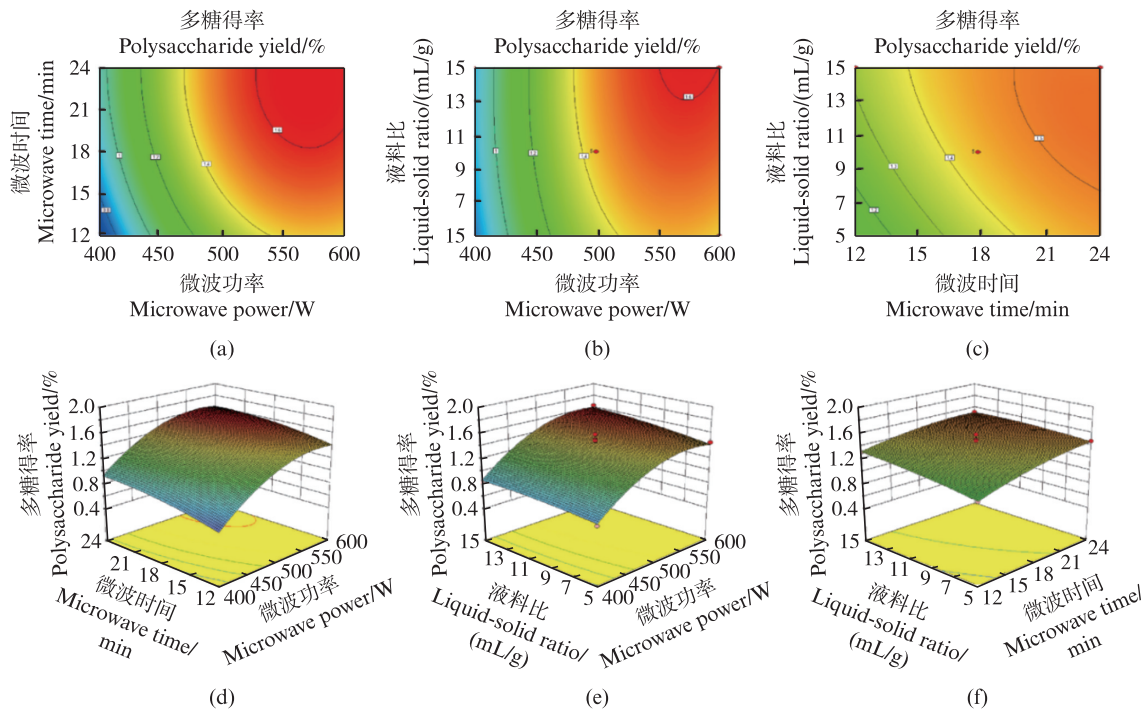


图2 微波功率及微波时间、微波功率及液料比、微波时间及液料比交互对PRCP得率的影响

Fig. 2 Effects of microwave power and time, microwave power and liquid-solid ratio, microwave time and solid-liquid ratio on PRCP yield

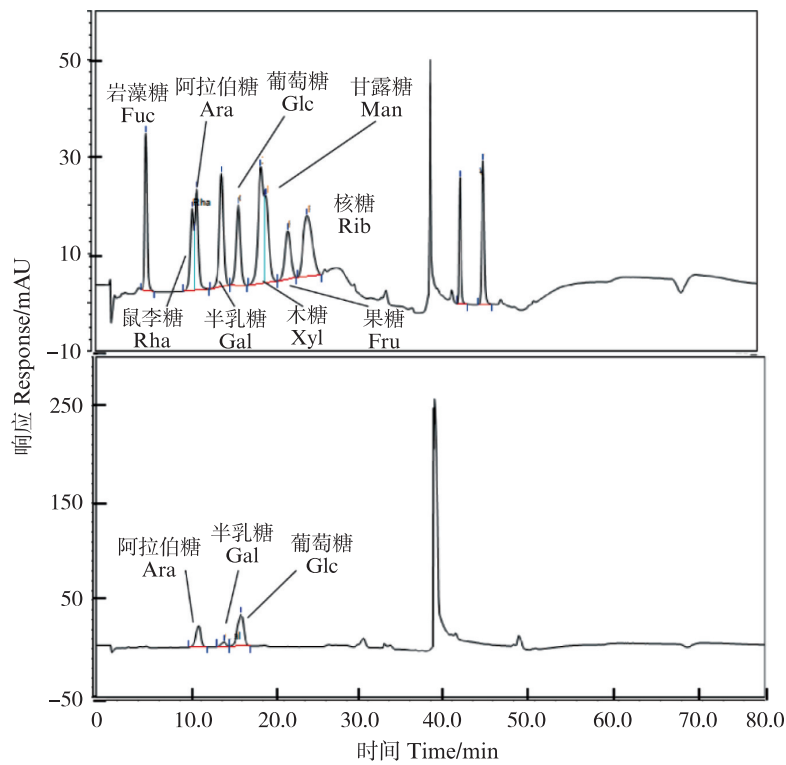


图3 PRCP的单糖组成

Fig. 3 Monosaccharide composition of PRCP

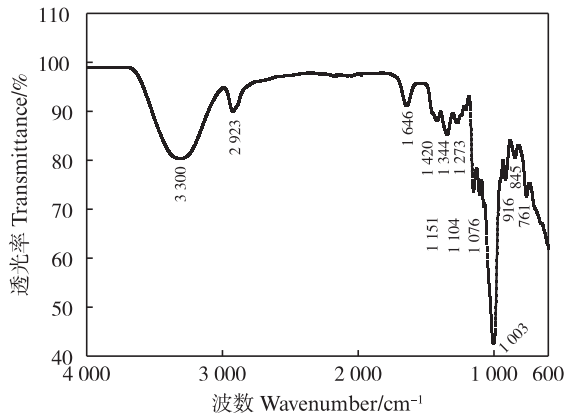


图4 PRCP的红外光谱

Fig. 4 Infrared spectrum of PRCP

2.6 PRCP的宏观及微观观察

图5a显示冷冻干燥后PRCP溶解于蒸馏水中的宏观状态。PRCP能够完全溶解,且该多糖溶液为透明状,有轻微的浑浊。图5b和5c为扫描电镜下PRCP的微观图像。放大500倍的PRCP呈明显不规则且厚度不均匀的片状结构(图5b),

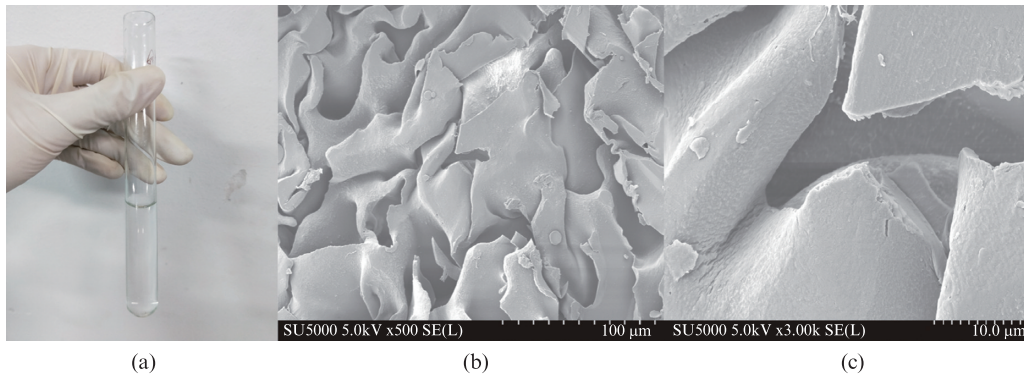


图5 PRCP的宏观及微观特征

Fig. 5 Macroscopic and microscopic characteristics of PRCP

2.7 PRCP对LPS诱导巨噬细胞的保护作用

图6显示,与对照组对比,LPS组巨噬细胞的细胞活性显著降低($P < 0.05$)。随着PRCP对巨噬细胞孵育浓度的增强,LPS诱导巨噬细胞的细胞活性逐渐增加。 $5 \mu\text{g/mL}$ PRCP能够一定程度上帮助巨噬细胞抵抗LPS诱导产生的细胞毒性,提高巨噬细胞活性。当PRCP浓度为 $25 \sim 300 \mu\text{g/mL}$ 时,PRCP组巨噬细胞活性与正常组没有显著性差异,这表明PRCP有助于巨噬细胞完全抵抗LPS诱导产生的细胞毒性,促进巨噬细胞活性恢复。因此,PRCP可能对LPS刺激的巨噬细胞有良好的保护作用。

而放大3 000倍的PRCP清晰地展现出光滑且结构致密的表面,并伴随少量的碎片(图5c)。

表4 PRCP的红外分析
Tab. 4 Infrared analysis of PRCP

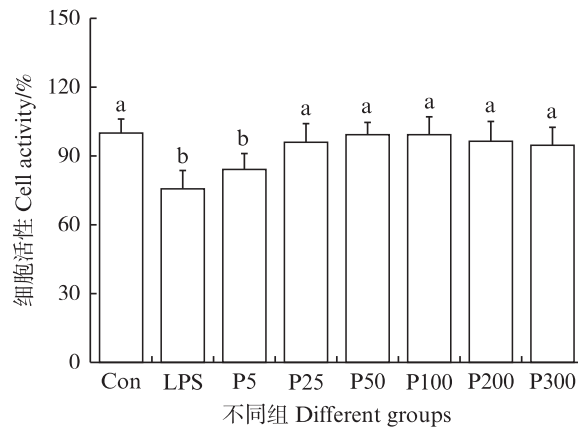
吸收峰 Absorption peak	振动类型 Vibration type	官能团 Functional groups
3 300	O-H 伸缩振动	-OH
2 923	C-H 伸缩振动	-CH ₂ -
1 646	C=O 伸缩振动	-COOH
1 420	C-H 变角振动	-CH ₂ -
1 344	C=O 对称伸缩振动	C=O
1 273	S=O 伸缩振动	-OSO ₃ ⁻
1 151	C-O-C 伸缩振动	C-O-C
1 104	C-O-C 伸缩振动	C-O-C
1 076	C-O-H 中 C-O 伸缩振动	C-OH
1 003	C-O-H 中 C-O 伸缩振动	C-OH
916	C-H 变角振动	β型糖苷键
845	C-H 变角振动	α型糖苷键

2.8 PRCP对LPS诱导巨噬细胞炎症因子抑制作用

图7a-c显示,LPS激活了巨噬细胞并显著提高了巨噬细胞炎症介质NO及炎症因子TNF- α 、IL-6的分泌,这也可能是导致巨噬细胞活性下降的重要原因。图7a显示PRCP的孵育能够帮助巨噬细胞抑制NO的产生,且随着PRCP浓度($1 \sim 200 \mu\text{g/mL}$)的增加,抑制NO的效果更加明显。当PRCP浓度为 $25 \sim 200 \mu\text{g/mL}$ 时,PRCP能够显著抑制LPS刺激导致的巨噬细胞NO产生量的提升($P < 0.05$)。当PRCP浓度为 $100 \sim 200 \mu\text{g/mL}$ 时,PRCP对NO的抑制效果最好并且趋于稳定,因此选择 $100 \mu\text{g/mL}$ PRCP用于后续炎症因子的检测。图7b和7c显示PRCP抑制了LPS诱导的巨噬细胞

胞中 TNF- α 和 IL-6 的产生。100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PRCP 能够显著抑制 LPS 诱导的巨噬细胞中 TNF- α 和 IL-

6 的分泌 ($P < 0.05$), 表明 PRCP 可能具有良好的免疫抑制功效。

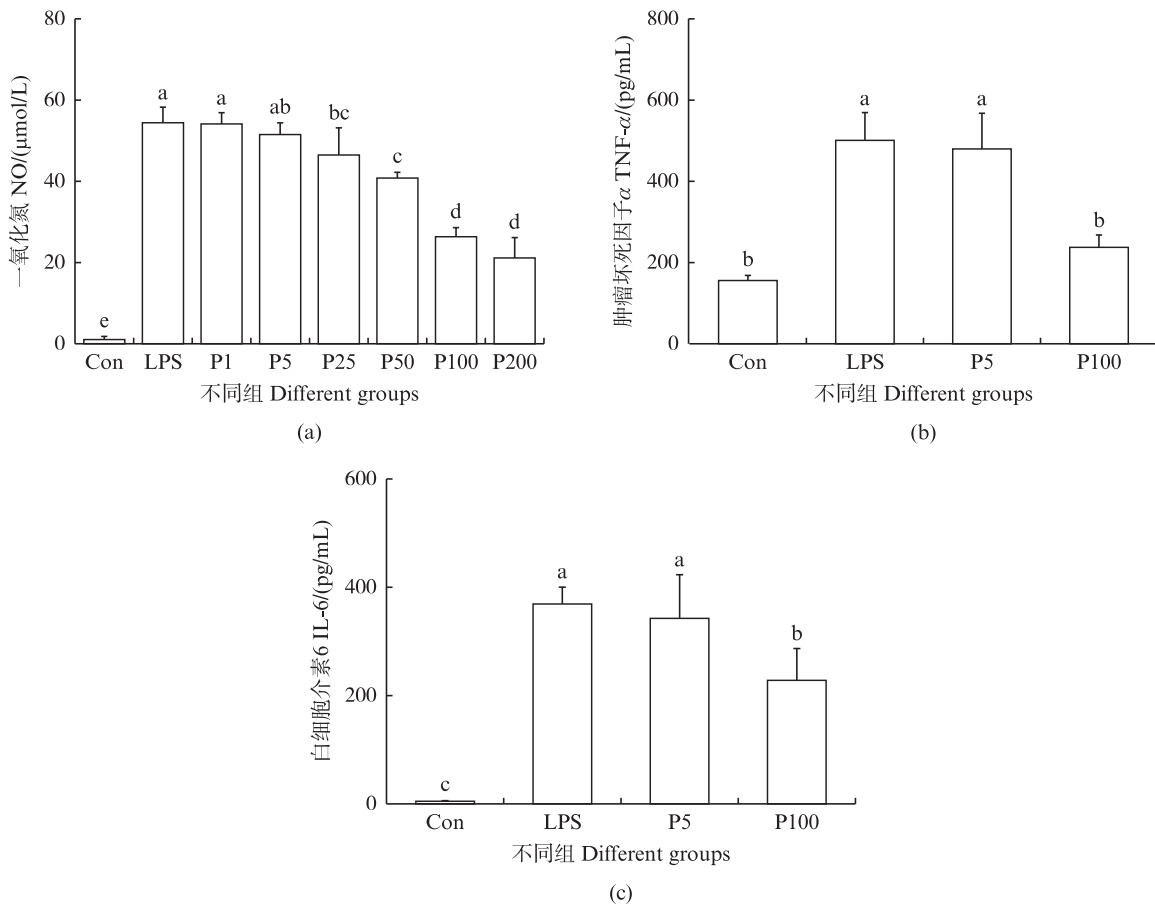


柱状图上方不同小写字母代表两组间有显著性差异 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters at the top of the bar represent significant differences between the two groups ($P < 0.05$).

图6 PRCP 对 LPS 诱导巨噬细胞活性的促进作用

Fig. 6 Promoting effects of PRCP on LPS-induced macrophage activity



柱状图上方不同小写字母代表两组间有显著性差异 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters at the top of the bar represent significant differences between the two groups ($P < 0.05$).

图7 PRCP 对 LPS 诱导的巨噬细胞中 NO 及 TNF- α 、IL-6 的抑制作用

Fig. 7 Inhibitory effects of PRCP on NO, TNF- α and IL-6 in LPS-induced macrophages

3 讨论

多糖提取的方法主要有热水提取法、微波辅助提取法、超声辅助提取法、酶辅助提取法及联合辅助提取法。本研究采用微波辅助提取法提取PRCP,通过单因素及响应面试验优化了PRCP的分离条件,得到最佳分离条件为微波功率572 W、微波时间22 min、料液比15 mL/g,芦根多糖得率为1.61%。据报道,袁洪水^[26]采用4种提取技术(热水浸提法、纤维素酶辅助热水浸提法、超声波辅助热水浸提法、纤维素酶和超声波联合辅助热水浸提法)提取芦根多糖并采用正交试验优化了其提取条件。4种技术获得的芦根多糖得率分别为1.41%、1.63%、1.69%和1.75%,然而对应的提取时间分别为260、195、130和130 min。对比而言,本研究采用的微波辅助提取法获得的芦根多糖得率明显高于热水浸提法,仅略低于纤维素酶辅助热水浸提法、超声波辅助热水浸提法、纤维素酶和超声波联合辅助热水浸提法,但该方法极大地缩短了提取时间。此外,本研究首次采用响应面试验优化了PRCP的提取条件,为PRCP工业化生产及应用提供参考。本研究发现PRCP单糖组成主要为阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖,摩尔比为3.03:0.52:6.46。此外,硫酸呋啉法、硫酸钡比浊法及红外光谱结果相互印证了PRCP中含有糖醛酸及硫酸基团。ZHOU等^[14]采用超声辅助提取、纤维素离子交换及葡聚糖凝胶柱层析分离芦根多糖,其中糖醛酸及硫酸根含量分别为7.51%及9.38%,略高于本方法提取的PRCP中糖醛酸及硫酸根的含量,这可能与分离方法及进一步纯化密切相关^[27]。宏观观察结果显示PRCP呈无色透明液体。微观观察结果显示PRCP表面光滑且结构致密,存在少量的碎片,可能为紧密构型多糖。据报道紧密构型多糖比非紧密构型多糖有更强的分子间相互作用力,对PRCP的物理性能有重要影响,如其可能有更高的保水能力和黏度^[28]。研究发现,微波辅助提取的芦根多糖具有多种的生理活性。晁若瑜等^[29]采用微波辅助提取法提取及葡聚糖凝胶G100层析柱纯化的芦根多糖能够显著抑制Hela细胞和B16细胞生长,展现出明显的抗肿瘤作用。沈蔚等^[30]采用微波辅助提取法提取的芦根多糖具有抗氧化活性,尤其在还原能力方面接近维生素C。

本研究基于LPS诱导的RAW246.7细胞模型,进一步探究PRCP的细胞毒性及免疫抑制功效。LPS又被称为内毒素,与临床上的毒素血症密切相关,也能显著降低巨噬细胞的细胞活性^[31]。1 $\mu\text{g/mL}$ LPS显著降低了巨噬细胞的细胞活性,表明该方法成功建立炎症细胞模型。PRCP能显著提高RAW246.7细胞的细胞活性,对细胞有良好的保护作用。其他提取方法获得的芦根多糖是否具有相应的活性及是否存在差异有待进一步研究。

LPS能够激活巨噬细胞,通过TLR4信号通路介导巨噬细胞信号转导,促进细胞因子的合成和释放,激活免疫反应^[32]。TLR4信号通路一定程度上的激活能够有助于机体抵抗病原菌侵染,而过度的激活将使机体产生炎症反应,不利于机体健康。PRCP能够帮助巨噬细胞抑制NO、TNF- α 和IL-6的分泌,表明其具有免疫抑制功效。PRCP对LPS诱导的巨噬细胞中NO、TNF- α 和IL-6合成及释放的干预可能与TLR2及TLR4信号通路密切相关。YANG等^[33]发现酸浆多糖能够通过调控TLR2和TLR4引起巨噬细胞中丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)和核因子- κB (NF- κB)活化,调控NO、活性氧、TNF- α 、IL-6的分泌,但TLR2和TLR4可能不是酸浆多糖唯一的受体。JAYAWARDENA等^[34]发现马尾藻岩藻糖胶能够作用于诱导型一氧化氮合酶、环氧化酶-2、TNF- α 、IL-6和IL-1 β ,剂量依赖性下调NO产生量,这主要是由于该岩藻糖胶能够抑制TLR2和TLR4介导的髓样分化因子88及I κB 激酶复合物激活,最终阻碍NF- κB 和MAPK通路信号传导,从而下调下游细胞因子的产生。具有免疫调控功效的PRCP可能与巨噬细胞表面的TLR4及TLR2结合,通过MAPK及NF- κB 介导的信号通路,进一步调控下游炎症介质及炎症因子的分泌,如NO、TNF- α 、IL-6,这与图7结果一致。少量报道显示天然多糖能够通过调控TLR4-pi3kplc-IP3R信号通路调控免疫反应。GENG等^[35]和CUI等^[36]研究发现马尾松花粉硫酸化多糖通过与巨噬细胞表面的TLR4结合,激活TLR4-PI3K-PLC-IP3R信号通路,激活钙通道增加胞浆内钙离子浓度,激活巨噬细胞调控免疫过程。

参考文献:

- [1] KONSTANTIN R, AYALA W, MICHAELLA B S, et al.

- Anti-inflammatory effects of sarcopoterium spinosum extract [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2020, 249: 112391. DOI: 10.1016/j.jep.2019.112391.
- [2] XIE Z L, WANG Y, HUANG J Q, et al. Anti-inflammatory activity of polysaccharides from *Phellinus linteus* by regulating the NF- κ B translocation in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 129: 61-67. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.02.023.
- [3] LIU Y, SUN Y Y, HUANG G L. Preparation and antioxidant activities of important traditional plant polysaccharides [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 111: 780-786. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.01.086.
- [4] SHORTRIDGE P G, HARRIS P J, BRADSHAW D J, et al. The effect of chemical composition and molecular weight of polysaccharide depressants on the flotation of talc [J]. *International Journal of Mineral Processing*, 2000, 59(3): 215-224. DOI: 10.1016/s0301-7516(99)00077-0.
- [5] ZHOU C S, YU X J, ZHANG Y Z, et al. Ultrasonic degradation, purification and analysis of structure and antioxidant activity of polysaccharide from *Porphyra yezoensis* Ueda [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 87(3): 2046-2051. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.10.026.
- [6] DOU Z M, CHEN C, FU X. Digestive property and bioactivity of blackberry polysaccharides with different molecular weights [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019(45): 12428-12440. DOI: 10.1021/acs.jafc.9b03505.
- [7] 陶金华. 菊非药用部位多糖类物质干预炎症性肠病的效应机制研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2017.
- TAO J H. Study on the effect mechanism of polysaccharide from non-medicinal parts of *Chrysanthemum* on inflammatory bowel disease [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2017.
- [8] 陈光静. 方竹笋的加工废笋渣中多糖的分离纯化和结构解析及其生物活性研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2019.
- CHEN G J. Separation, purification, structure analysis and bioactivity of polysaccharides from waste *Chimonobambusa quadrangularis* residues [D]. Chongqing: Southwest University, 2019.
- [9] ALLINSON G. Effect of increasing salinity on development of giant reed (*Arundo donax*) from rhizome and culms [J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2017, 99(6): 737-747. DOI: 10.1007/s00128-017-2197-0.
- [10] LIU L D, JIE D M, LIU H Y, et al. Response of phytoliths in *Phragmites communis* to humidity in NE China [J]. *Quaternary International*, 2013, 304: 193-199. DOI: 10.1016/j.quaint.2013.03.020.
- [11] CHEN Y, LI L, JIANG L R, et al. Alkaloids constituents from the roots of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud. with their cytotoxic activities [J]. *Natural Product Research*, 2022, 36(6): 1454-1459. DOI: 10.1080/14786419.2021.1888291.
- [12] PARK S J, KIM M K, PARK S H, et al. Anti-inflammatory steroid from *Phragmites rhizoma* modulates LPS-mediated signaling through inhibition of NF- κ B pathway [J]. *Inflammation*, 2016, 39(2): 727-734. DOI: 10.1007/s10753-015-0299-6.
- [13] 邵荣, 郭海滨, 许伟, 等. 芦苇中活性物质研究进展 [J]. *中国生化药物杂志*, 2011, 32(2): 167-169.
- SHAO R, GUO H B, XU W, et al. Research progress of active substances in reed [J]. *Chinese Journal of Biochemical Drugs*, 2011, 32(2): 167-169.
- [14] ZHOU R M, CUI M X, WANG Y, et al. Isolation, structure identification and anti-inflammatory activity of a polysaccharide from *Phragmites rhizome* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 161: 810-817. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.124.
- [15] 崔明晓, 王晓晨, 王玉, 等. 超声辅助提取大石花菜多糖及其抗氧化研究 [J]. *上海海洋大学学报*, 2018, 27(5): 797-804.
- CUI M X, WANG X C, WANG Y, et al. Ultrasonic-assisted extraction and anti-oxidation of polysaccharides from *Gelidium pacificum* Okam [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2018, 27(5): 797-804.
- [16] 魏磊, 王伟, 谢晓阳, 等. 响应面优化博爱赤松茸多糖提取工艺及其抑菌和抗氧化活性研究 [J]. *食品工业科技*, 2023, 44(15): 213-220.
- WEI L, WANG W, XIE X Y, et al. Study on response surface optimization of polysaccharide extraction process and its antibacterial and antioxidant activities of velvet antler [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2023, 44(15): 213-220.
- [17] 芮光伟, 李维, 蒙英. 川芎多糖提取及GC-MS法测定其单糖含量及结构分析 [J]. *食品科技*, 2013, 38(9): 150-152.
- RUI G W, LI W, MENG Y. Extraction of polysaccharide from *Ligusticum Chuanxiong* and determination of monosaccharides content and structure analysis by GC-MS [J]. *Food Science and Technology*, 2013, 38(9): 150-152.
- [18] 崔明晓. 大石花菜多糖的分离、结构表征及其抗炎活性研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2019.
- CUI M X. Isolation, characterization and anti-inflammatory activity of *Gelidium pacificum* Okamura polysaccharide [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2019.
- [19] ZHOU S Y, HUANG G L, CHEN G Y. Extraction, structural analysis, derivatization and antioxidant activity of polysaccharide from Chinese yam [J]. *Food Chemistry*,

- 2021, 361: 130089. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.130089.
- [20] HE Y F, PENG H X, ZHANG H F, et al. Structural characteristics and immunopotential activity of two polysaccharides from the petal of *Crocus sativus* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 180:129-142. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.03.006.
- [21] CUI M X, FANG Z, SONG M, et al. *Phragmites rhizoma* polysaccharide-based nanocarriers for synergistic treatment of ulcerative colitis [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 220: 22-32. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.07.245.
- [22] SHI Y, YE Y F, ZHANG B W, et al. Purification, structural characterization and immunostimulatory activity of polysaccharides from *Umbilicaria esculenta* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 181:743-751. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.03.176.
- [23] 杨洁. 仿刺参多糖的提取分离及初步结构分析 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.
Yang J. Extraction, separation and preliminary structure analysis of polysaccharide from *Apostichopus japonicus* [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012.
- [24] 孙怡. 冬青苦丁茶多酚和多糖的提取、分离纯化、结构与抗氧化活性研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2010.
SUN Y. Study on the extraction, purification, structure and antioxidant activity of polyphenols and polysaccharides from Holly Kudingcha [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2010.
- [25] 于广利, 胡艳南, 杨波, 等. 海萝藻(*Gloiopeltis furcata*) 多糖的提取分离及其结构表征 [J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2009, 39(5): 925-929.
YU G L, HU Y N, YANG B, et al. Extraction, separation and structural characterization of polysaccharides from *Gloiopeltis furcata* [J]. Periodical of Ocean University of China, 2009, 39(05): 925-929.
- [26] 袁洪水. 芦根多糖的提取技术和免疫调节作用研究 [D]. 河北: 河北大学, 2013.
YUAN H S. Study on extraction technique and immunomodulatory effects of polysaccharide from *Phragmites rhizome* [D]. Hebei: Hebei University, 2013.
- [27] ZHOU R M, CUI M X, WANG Y, et al. Isolation, structure identification and anti-inflammatory activity of a polysaccharide from *Phragmites rhizome* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 161: 810-817. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.124.
- [28] 刘玉婷. 羊肚菌胞外多糖结构、模拟消化及免疫活性探究 [D]. 合肥: 合肥工业大学, 2021.
LIU Y T. Structure, simulated digestion and immune activity of *Morchella* exopolysaccharides [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2021.
- [29] 晁若瑜, 杨靖亚, 蔡晓晔, 等. 芦根多糖的分离纯化和体外抗肿瘤研究 [J]. 食品工业科技, 2011, 32(12): 284-286.
CHAO R Y, YANG J Y, CAI X Y, et al. Extraction, purification and anti-tumor activity of Reed Rhizome polysaccharide [J]. Science and Technology of Food Industry, 2011, 32(12): 284-286.
- [30] 沈蔚, 任晓婷, 张建, 等. 芦根多糖的提取及其抗氧化活性的研究 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(5): 1078-1080.
SHEN W, REN X T, ZHANG J, et al. Study on extraction and anti-oxidation of polysaccharides from Reed Rhizome [J]. Li Shizhen Medicine and Materiamedicine Research, 2010, 21(5): 1078-1080.
- [31] 张晓音, 吴旻, 李雨萌, 等. 脂多糖的效应及其机理研究进展 [J]. 动物医学进展, 2015, 36(12): 133-136.
ZHANG X Y, WU M, LI Y M, et al. Research progress on the effect and mechanism of lipopolysaccharide [J]. Advances in Veterinary Medicine, 2015, 36(12): 133-136.
- [32] LU Y C, YEH W C, OHASHI P S. LPS/TLR4 signal transduction pathway [J]. Cytokine, 2008, 42(2): 145-151. DOI: 10.1016/j.cyto.2008.01.006.
- [33] XU Z C, LIN R Y, HOU XN. Immunomodulatory mechanism of a purified polysaccharide isolated from *Isaria cicadae* Miquel on RAW264.7 cells via activating TLR4-MAPK-NF- κ B signaling pathway [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 164(1): 4329-4338. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.09.035.
- [34] JAYAWARDENA T U, SANJEEWA K K A, NAGAHAWATTA D P, et al. Anti-inflammatory effects of sulfated polysaccharide from *Sargassum swartzii* in macrophages via blocking TLR/NF-Kb signal transduction [J]. Marine Drugs, 2020, 18(12): 601. DOI: 10.3390/md18120601.
- [35] GENG Y, XING L, SUN M M, et al. Immunomodulatory effects of sulfated polysaccharides of pine pollen on mouse macrophages [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 91: 846-855. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.06.021.
- [36] CUI M X, ZHANG M, LIU K H. Colon-targeted drug delivery of polysaccharide-based nanocarriers for synergistic treatment of inflammatory bowel disease: A review [J]. Carbohydrate polymers, 2021, 272: 118530. DOI: 10.1016/j.carbpol.2021.118530.

Extraction, structural characterization and immunosuppression on macrophages of polysaccharides from *Phragmites rhizome*

CUI Mingxiao¹, FANG Zhou², GONG Xia¹, HUANG Yue¹, ZHOU Ruimei³, LIU Kehai², BAI Chen¹

(1. Department of Food Science, Shanghai Business School, Shanghai 200235, China; 2. College of Food Sciences and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. School of Medicine, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract: In this study, microwave-assisted extraction was used for the isolation of *Phragmites rhizoma* polysaccharide, its structure was characterized and its immunosuppressive effects in vitro were evaluated. The response surface method was used to optimize the extraction of polysaccharide. The optimal separation conditions of *Phragmites rhizoma* polysaccharide were microwave power 572 W, microwave time 22 min, liquid-solid ratio 15 mL/g, and the yield of *Phragmites rhizoma* polysaccharide was 1.61%. The monosaccharide composition of *Phragmites rhizoma* polysaccharide was arabinose, galactose and glucose, with a molar ratio of 3.03:0.52:6.46. Infrared analysis showed that *Phragmites rhizoma* polysaccharide may contain uronic acid and sulfuric acid groups. *Phragmites rhizoma* polysaccharide solution is colorless and transparent liquid. Scanning electron microscopy showed that *Phragmites rhizoma* polysaccharide was smooth and compact, with irregular sheet structure and uneven thickness. Cell analysis showed that 25–300 µg/mL *Phragmites rhizoma* polysaccharide could significantly improve the cell activity of macrophages and there was no significant difference between the polysaccharide groups and the blank group. 5–200 µg/mL *Phragmites rhizoma* polysaccharide significantly inhibited nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. 100 µg/mL *Phragmites rhizoma* polysaccharide significantly inhibited the production of inflammatory cytokines tumor necrosis factor α and interleukin 6 in macrophages stimulated by lipopolysaccharide. Therefore, *Phragmites rhizoma* polysaccharide may have good immunosuppressive effects.

Key words: *Phragmites rhizoma* polysaccharide; polysaccharide yield; response optimization; structural characterization; immunosuppression