

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2021.05.029

白莲莲房多糖分离纯化、结构表征及 抗氧化与免疫活性

Purification, antioxidant and immunomodulatory activities of
polysaccharides from a white lotus seedpod

马广强¹ 李国群^{1,2} 吴静² 熊伟^{1,2} 吴磊^{1,2}

MA Guang-qiang¹ LI Guo-qun^{1,2} WU Jing² XIONG Wei^{1,2} WU Lei^{1,2}

(1. 江西中医药大学生命科学院, 江西 南昌 330004; 2. 江西省科学院应用化学研究所, 江西 南昌 330096)
(1. Life Sciences College, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang, Jiangxi 330004, China; 2. Institute of Applied Chemistry, Jiangxi Academy of Science, Nanchang, Jiangxi 330096, China)

摘要:以白莲莲房为原料,采用水提醇沉法获得白莲莲房粗多糖,再采用 Sevage 试剂脱蛋白、联合脱色和透析法对白莲莲房粗多糖进行纯化,得到白莲莲房多糖。采用红外光谱以及气相色谱对莲房多糖的理化性质进行了研究。通过还原能力测定、DPPH 自由基和羟基自由基的清除能力评价白莲莲房多糖的体外抗氧化能力;以小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 为模型,考察白莲莲房多糖对细胞的免疫调节活性。结果表明,所得白莲莲房多糖的得率为 5.29%,多糖质量分数为 84.58%;白莲莲房多糖单糖组成分析表明,白莲莲房多糖是一个杂多糖,由鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖组成,其摩尔比为 1.28 : 2.10 : 1.00 : 2.20 : 2.42 : 4.76。红外光谱分析表明白莲莲房多糖呈现出多糖类物质的典型特征吸收峰。体外抗氧化试验结果表明,白莲莲房多糖具有良好的还原能力和清除 DPPH、羟基自由基的能力。免疫活性结果表明白莲莲房多糖显著促进巨噬细胞一氧化氮和炎症因子(TNF- α 、IL-6、IL-1 β)的分泌,在安全浓度范围内,白莲莲房多糖质量浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,NO、TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的分泌量达到了最大值,与空白组相比,NO、TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的分泌量分别增加了 29.89 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、84.24 ng/mL 、33.89 ng/mL 和 45.96 ng/mL 。白莲莲房多糖可作为一种潜在的功能性食品免疫调节剂

或补充剂。

关键词:白莲;莲房;多糖;分离纯化;结构表征;抗氧化;免疫调节

Abstract: In order to study the physicochemical properties and evaluate the biological activity of polysaccharides from white lotus receptacle, the crude polysaccharides (WLRCP) were obtained by water extraction and alcohol precipitation method, and then purified by Sevage reagent deproteinization, combined decolorization and dialysis, and then the white lotus receptacle polysaccharide (WLRP) was obtained. The physicochemical properties were determined and analyzed by infrared spectroscopy and gas chromatography. The antioxidant capacity of WLRP *in vitro* was evaluated by reducing capacity, scavenging ability of DPPH and OH radicals, and its immunomodulatory activities on Macrophage RAW 264.7 of WLRP were investigated. The results showed that the content of WLRP was 84.58 g/100 g with the yield of 5.29%. Monosaccharide composition analysis revealed that WLRP was a homogeneous heteropolysaccharide including rhamnose, arabinose, xylose, mannose, glucose, and galactose in a molar ratio of 1.28 : 2.10 : 1.00 : 2.20 : 2.42 : 4.76, respectively. Infrared (IR) spectroscopy analysis showed that WLRP exhibited typical absorption peaks of polysaccharides. The results of *in vitro* antioxidant test showed that WLRP showed a good reducing power and scavenging activities on DPPH radical and hydroxyl radical. In addition, an immunological activity assay indicated that WLRP significantly promoted the production of nitric oxide, cytokines (TNF- α , IL-6, IL-1 β), when treated with then the appropriate concentrations of WLRP. 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ WLRP could induce the secretion of NO, TNF- α , IL-6 and IL-1 β to the maximum value. Compared with the blank group, the secretion of NO, TNF- α , IL-6 and IL-1 β increased by 29.89 $\mu\text{mol}/\text{L}$,

基金项目:江西省杰出青年人才资助计划(编号:20192BCB23027);江西省重点研发计划项目(编号:20192BBF60041,20202BBFL63035);江西省科学院重大科研开发专项项目(编号:2020-YZZD-1)

作者简介:马广强,男,江西中医药大学副教授,博士。

通信作者:吴磊(1985—),男,江西省科学院应用化学研究所副研究员,博士。E-mail: wulei858196@163.com

收稿日期:2021-01-08

84.24 ng/mL, 33.89 ng/mL and 45.96 ng/mL, respectively. The results showed that WLRP might have potential application as an immunomodulator or supplement in functional food to enhance immunity, and this study provided theoretical basis for the development of white lotus receptacle resources.

Keywords: white lotus; lotus seedpod; polysaccharide; separation and purification; structural characterization; antioxidant activity; immunomodulatory activity

植物多糖是一类重要的天然生物大分子。天然植物源多糖具有抗氧化、抗病毒、抗肿瘤、抗菌、调节免疫等多种生物活性^[1-2],近年来,许多多糖已被广泛地研究和应用于生物化学以及医疗行业,植物源多糖被公认为安全、高度稳定和毒副作用小等优点应用在医药和食品领域。

莲(*Nelumbo nuafera* Gaertn)属睡莲科莲属,为多年生宿根水生草本植物^[3]。目前,中国拥有的莲品种多达800个以上,主要分布于福建、浙江、湖北、湖南、江苏、安徽以及江西等地^[4]。莲富含生物碱、黄酮、糖苷、萜类、类固醇、脂肪酸、蛋白质、矿物质和维生素等化学成分,具有抗氧化、消炎、抗菌、抗心律失常、降血糖、止泻、免疫调控等生理活性^[5-9]。广昌白莲,中国国家地理标志产品。广昌县自古以来就被称为“莲乡”,历来被称为“贡莲”,为“莲中珍品”,一直畅销海内外。目前市面上出现了许多以荷叶、莲子以及莲子心为原料的产品,但是,在加工这些产品的过程中,会产生大量的下脚料——莲蓬壳,目前只是作为废弃物被丢弃,造成了极大的浪费。国内外目前对莲蓬壳中化学成分及其药用作用的相关研究鲜有报道,一直未得到重视。

课题组^[10-11]前期曾对莲房乙醇提取物化学成分及活性进行了研究。但是对莲房多糖的研究仍处于空白。试验拟通过水提醇沉法从白莲莲房中提取多糖,并对纯化后的多糖理化性质进行分析,研究纯化多糖的抗氧化与免疫调节活性,以期莲蓬壳废弃物的高附加值开发与利用提供理论支撑。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

莲房:广昌县白莲科学研究所提供,由江西省科学院应用化学研究所徐刚研究员鉴定为白莲的莲房,样本编号为LP-201708,已存放在江西省科学院应用化学研究所天然产物研究室的植物标本室;

RAW 264.7 细胞:美国典型培养物保藏中心(ATCC);

单糖标准品[D-葡萄糖(Glc, 110833-201707)、D-半乳糖(Gal, 100226-201506)、L-鼠李糖(Rha, 111683-201502)、D-木糖(Xyl, 111508-201605)和D-甘露糖

(Man, 140651-201504)];中国食品药品检定研究院;

L(+)-阿拉伯糖(Ara, 1506-200202):中国药品生物制品检定所;

1640 培养基、胰蛋白酶和胎牛血清:美国 Gibco 公司;

二甲基亚砜(DMSO)、脂多糖(LPS)、维生素 C(V_C)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)以及 2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS):美国 Sigma 公司;

肿瘤坏死因子(TNF- α)、白细胞介素 1 β (IL-1 β)、白细胞介素 6(IL-6)ELISA 试剂盒:南京建成生物工程研究所;

乙醇、氯仿、正丁醇:分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

台式高速冷冻离心机:H1850 型,厦门森杰仪器仪表有限公司;

冷冻干燥机:FDU-1200 型,东京理化器械株式会社;

电子天平:ML203 型,梅特勒—托利多(上海)仪器有限公司;

酶标仪:Tecan Infinite 200 PRO M Nano 型,瑞士帝肯公司;

超声波清洗器:KQ-500B 型,昆山市超声仪器有限公司;

二氧化碳培养箱:CLM-170B-8-NF 型,新加坡 ESCO 公司;

奥林巴斯倒置显微镜:CKX53 型,日本奥林巴斯公司;

傅立叶红外光谱仪:FTIR-7600 型,美国 Lambda 公司;

高效液相色谱仪(S-3250 示差检测器):SYKAM S501 Series 型,德国赛卡姆公司;

气相色谱仪:GC-2010 型,日本岛津公司;

气相色谱检测器:FID 型,日本岛津公司;

色谱柱:WondaCap5 型毛细管柱(0.25 mm \times 30.0 m \times 0.25 μ m),日本岛津公司;

自动进样器:AOC-20S 型,日本岛津公司;

自动注射器:AOC-20i 型,日本岛津公司;

压片机:DF-4 型,天津港东科技发展股份有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 莲房粗多糖的提取 将阴干的莲房粉碎(500.00 g),用 95%乙醇在 80 $^{\circ}$ C 下热回流提取 6 h 以去除脂类、色素、单糖和小分子化合物。残渣在 50 $^{\circ}$ C 的烘箱中干燥以获得脱脂的莲房粉。称取 100.00 g 脱脂粉末,以蒸馏水为提取溶剂,料液比($m_{\text{脱脂粉末}} : V_{\text{蒸馏水}}$)为 1 : 30 (g/mL),在 90 $^{\circ}$ C 下的热回流提取 3 次,每次提取 3.5 h。提取液在转速为 4 000 r/min 离心 10 min、过滤,

使用真空旋转蒸发器浓缩至体积约为 300 mL,加入 4 倍体积的无水乙醇混合,置于 4 °C 冰箱过夜,12 000 r/min 离心 10 min,通过冷冻干燥(-50 °C,20 Pa,24 h)获得白莲莲房粗多糖。

1.2.2 莲房多糖的纯化 根据文献[12]并修改,称取白莲莲房粗多糖(1.00 g)加热水 10 mL 溶解,然后加入 Sevage 试剂($V_{\text{正丁醇}}:V_{\text{氯仿}}=1:4$)充分震荡,在分液漏斗中静置,此步骤重复 3 次去除蛋白质,合并上层液体,用旋转蒸发器浓缩去除有机溶剂残留。并加入粗多糖质量 10% 的活性炭,60 °C、150 r/min 搅拌 3 h,抽滤,浓缩(60 °C,-0.1 MPa)。浓缩液装入截留分子量为 3 000 U 的透析袋中用自来水透析 48 h,蒸馏水透析 48 h 以去除小分子化合物,将透析后的多糖溶液经冷冻干燥得到纯化莲房多糖。

1.2.3 莲房多糖质量分数测定 根据文献[13]并修改,使用葡萄糖为标准品,配置成质量浓度为 1 mg/mL 母液,用蒸馏水稀释成不同的标准浓度,加入苯酚硫酸反应后,吸取反应液 200 μL 至 96 孔板中,用酶标仪检测吸光度,以葡萄糖浓度为横坐标(X),吸光值为纵坐标(Y)绘制标准曲线,回归方程: $Y=0.0031X+0.0182$, $R^2=0.9993$ 。粗多糖与纯化多糖含量经苯酚—硫酸法测得梯度葡萄糖的吸光值,代入标准曲线计算多糖含量,按式(1)计算多糖的质量分数。

$$Y_1 = \frac{C \times V}{m}, \quad (1)$$

式中:

Y_1 ——多糖的质量分数,%;

C ——多糖配制液中多糖质量浓度,mg/mL;

V ——配制液体积,mL。

m ——莲房质量,g。

1.2.4 多糖结构表征

(1) 红外光谱分析:纯化的多糖与 KBr 粉末混合后研磨,然后压制成透明薄片,采用傅里叶变换红外光谱仪(FT-IR)在 400~4 000 cm^{-1} 的范围内进行扫描。

(2) 分子量测定:采用 SYKAM S501 Series 高效液相色谱仪测定纯化的莲房多糖分子量大小。使用 5 种葡聚糖标准分子量(M_w) (分别为 10 000,40 000,70 000,200 000,375 500 Da) 进行液相色谱分析。将标准品配制 2 mg/mL 的标准溶液,通过 0.22 μm 微孔膜,在以下条件下进行高效液相色谱分析,以色谱峰保留时间(T_R)为横坐标,葡萄糖标准品的平均分子量($\lg M_w$)为纵坐标,绘制线性回归方程。液相色谱条件:TSKG5000 色谱柱;流动相 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 7.2);流速 0.5 mL/min,柱温 30 °C,进样量 20 μL ,运行时间 20 min。将白莲莲房多糖样品配成 10 mg/mL 的白莲莲房多糖溶液,用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤后进行高效液相色谱

分析。

(3) 单糖组分测定:对白莲莲房多糖的单糖组成进行分析,主要包括多糖的水解和乙酰化两个步骤,根据文献[14]并修改,精密称取白莲莲房多糖(10.0 mg)放入密封管中,然后加入 2 mol/L 三氟乙酸 2 mL,在 100 °C 下水解 6 h 以完全水解糖苷键。水解后,用甲醇共蒸馏去除多余的酸。水解物中加入 0.5 mL 吡啶使其溶解,加入 10 mg 盐酸羟胺,在水浴 90 °C 下孵育 30 min 后,添加 0.5 mL 醋酸酐并通过涡流震荡彻底混合,继续在水浴 90 °C 下孵育 30 min,反应完成后,取下密封管,放置在氮吹仪下将反应液吹至干,加入 2 mL 氯仿溶解乙酰化衍生物,过 0.22 μm 有机膜至进样瓶中。单糖标准品(单标与混标)与内标按照多糖的乙酰化步骤进行操作。色谱条件:载气(氮气)体积流量 30 mL/min;进样温度 235 °C;检测器温度 260 °C;分流比 10:1;柱色谱升温程序:140 °C 保持 3 min,以 10 °C/min 温度至 240 °C,并保持 15 min;运行时间 28 min,进样体积 1 μL 。

1.2.5 抗氧化活性

(1) DPPH 自由基清除活性测定:根据文献[15]并修改。将 3 mL 的新鲜配置浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 DPPH 溶液作为自由基的母液分别加到不同浓度的样品溶液中,样品溶液质量浓度分别为 0.025,0.050,0.100,0.200,0.400 mg/mL,所需样品体积为 1 mL。溶液快速摇动混合,并在 25 °C 下反应 25 min。吸取反应液 200 μL 至 96 孔板中,在 517 nm 处用酶标仪测定吸光度。将维生素 C 用作阳性对照。按式(2)计算 DPPH 自由基清除率。

$$S_1 = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

S_1 ——DPPH 自由基清除率,%;

A_1 ——对照品溶液(无样品)的吸光度;

A_2 ——样品溶液的吸光度。

(2) 羟基自由基(OH 自由基)清除活性测定:根据文献[15]并修改。将 1 mL 不同质量浓度的多糖溶液(0.025,0.050,0.100,0.200,0.400 mg/mL)、1 mL 硫酸亚铁溶液(6 mmol/L)和 1 mL 水杨酸—乙醇溶液(6 mmol/L)混合。用 1 mL 的 0.1% 过氧化氢摇匀,在 37 °C 下黑暗反应 30 min。取反应液 200 μL 转移至 96 孔板中,用酶标仪在 510 nm 下测定吸光度。以维生素 C 为阳性对照。根据式(3)计算白莲莲房多糖及维生素 C 的 OH 自由基清除率。

$$S_2 = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

S_2 ——OH 自由基清除率,%;

A_0 ——蒸馏水代替样品溶液作为空白对照的吸

光度;

A——样品吸光度。

(3) Fe^{3+} 还原能力测定:根据文献[16]并修改,将 0.8 mL 样品(0.025,0.050,0.100,0.200,0.400 mg/mL)与 0.4 mL 磷酸盐缓冲液(pH 6.6,0.2 mol/L)和 0.4 mL 1% 铁氰化钾溶液混合,并在 50 °C 下反应 20 min,然后再将 0.4 mL 10% 三氯乙酸溶液加入混合体系中。静置 10 min,加入 1.6 mL 蒸馏水和 0.4 mL 0.1% 氯化铁溶液,室温下静置 10 min 后,于 700 nm 处测定样品的吸光度。以维生素 C 为阳性对照。

1.2.6 免疫活性

(1) 细胞培养与模型建立:RAW 264.7 细胞用 RPMI 1640 培养基(培养基中含有 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素)于 37 °C、5% CO_2 培养箱中进行培养,培养基每 2~3 d 更换一次。当融合率达 80% 时,进行传代培养,传代好的细胞分为以下 3 组,① 空白对照组:正常细胞,不加任何药物;② 阳性对照组:培养基中加入 1 μ g/mL 的 LPS 进行干预;③ 试验组:加入不同质量浓度的 WLRP 进行预孵。

(2) 对 RAW 264.7 细胞活力的影响:细胞活性检测采用 MTT 法[17],取对数生长期细胞以 1×10^6 个细胞/孔接种于 96 孔板中。置于 CO_2 培养箱中培养 18 h 后,向细胞悬浮液中加入不同质量浓度(12.5,25.0,50.0,100.0,200.0 μ g/mL)的白莲莲房多糖,继续孵育 24 h,吸取上清液,加入 100 μ L MTT 溶液(0.5 mg/mL),继续培养 4 h,每孔加入 100 μ L MTT 停止液。继续培养 16~20 h 后,在 550 nm 处用酶标仪测量吸光度,试验重复 3 次。按式(4) 计算细胞存活率。

$$S_3 = \frac{A_1 - A_2}{A_3 - A_2} \times 100\%, \quad (4)$$

式中:

S_3 ——相对细胞存活率,%;

A_1 ——试验组孔吸光值;

A_2 ——空白组孔吸光值;

A_3 ——对照组孔吸光值。

(3) 对细胞因子分泌量的影响:将 RAW 264.7 巨噬细胞(1×10^5 个/mL)接种于 48 孔板中,置于 CO_2 培养箱中培养 24 h,吸去旧培养基,向 48 孔板中加入不同质量浓度(0.0,12.5,25.0,50.0,100.0 μ g/mL)的白莲莲房多糖和 1 μ g/mL LPS(阳性对照),在 37 °C 下继续培养 24 h,NO 的分泌量采用 Griess 法[17] 进行检测,以亚硝酸钠为标品,配置不同浓度的亚硝酸钠溶液,加入 Griess 试剂反应测其吸光度,绘制标准曲线。TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的分泌量采用 ELISA 试剂盒测定。

1.2.7 数据分析 试验数据处理和作图软件采用 Excel 2013 及 Sigmaplot 10.0 软件,数据以平均值 \pm 标准差

(SD)表示。单因素方差分析用于确定平均值之间的显著性差异。95% 的置信水平($P < 0.05$)被认为具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 白莲莲房多糖的提取与纯化

按照方法步骤 1.2.1 与 1.2.2 所得白莲莲房粗多糖和纯化多糖的质量分别为 9.45 g 和 0.56 g,经计算粗多糖与纯化多糖的得率分别为 9.45% 和 5.29%,粗多糖与纯化多糖质量分数分别为 32.34% 和 84.58%。

2.2 红外光谱分析

图 1 显示了白莲莲房多糖在 4 000~400 cm^{-1} 范围内的 FT-IR 光谱,白莲莲房多糖在 3 426 cm^{-1} 附近有一个宽而强的吸收峰,是由糖中 O—H 键伸缩振动引起的。同时,白莲莲房多糖在 2 977 cm^{-1} 附近也有一个较弱的吸收峰,是由糖类化合物中 C—H 键的伸缩振动引起的[18],这两个吸收峰是糖类化合物的特征吸收峰。信号在 1 614 cm^{-1} 处的特征吸收峰是糖类化合物结合水引起的[19];在 1 400 cm^{-1} 处的吸收峰归因于 C=C 的拉伸振动和 C—H 的变形振动[20];在 1 049 cm^{-1} 处的吸收峰可能是白莲莲房多糖中是 C—O—H 中 O—H 的变角振动所引起的,推测为吡喃糖形式的糖[21]。上述结果表明,白莲莲房多糖具有典型多糖的特征性吸收。

2.3 单糖组成及其分子量分析

对 6 种标准单糖和莲房多糖样品先后进行气相色谱分析。由图 2(a)可知,6 种单糖标准品在此色谱下分离完全。莲房多糖单糖组成如图 2(b)所示,13.35 min 处的单糖由于缺少相应单糖标品,暂未分析出来。莲房多糖主要由鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖 6 种单糖组成,其摩尔比为 1.28 : 2.10 : 1.00 : 2.20 : 2.42 : 4.76,其中半乳糖占比最大,为 34.59%,葡萄糖和甘露糖次之。刘恩超等[22-23] 研究发现莲藕渣多糖主要由半乳糖和阿拉伯糖组成,其中半乳糖占比最高,为 25.98%,邓添华等[24] 研究表明莲子多糖中半乳糖的占比最高,与试

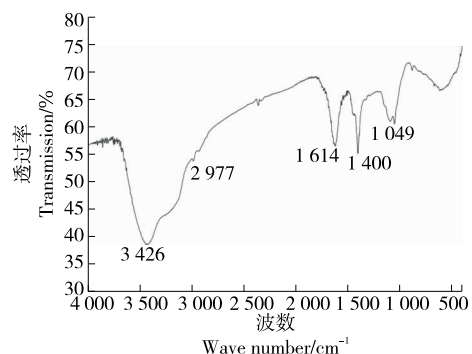
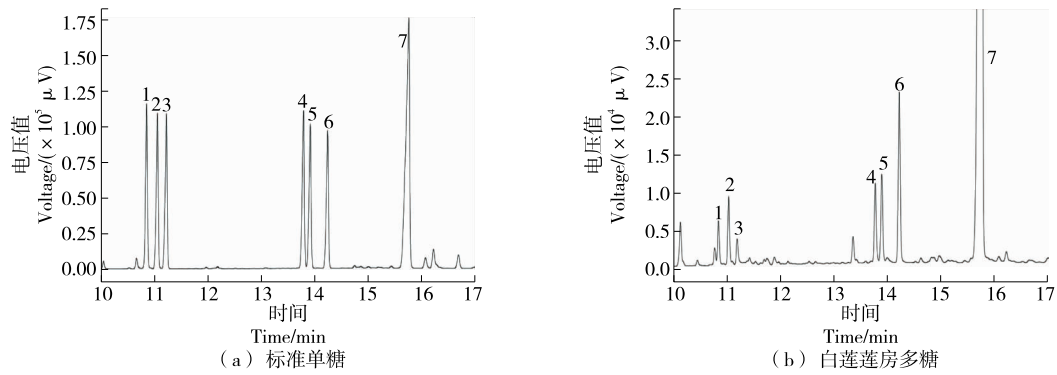


图 1 白莲莲房多糖的红外光谱图

Figure 1 IR spectra of polysaccharide of white lotus receptacle



1. 鼠李糖 2. 阿拉伯糖 3. 木糖 4. 甘露糖 5. 葡萄糖 6. 半乳糖 7. 肌醇

图 2 标准单糖与白莲莲房多糖的气相色谱图

Figure 2 GC chromatogram of complex monosaccharide derivative

验结果一致,推测半乳糖是莲多糖中占比最高的单糖。

多糖的分子量具有相对性,代表相似链长的平均分布,通常用统计平均值来表示所测定的多糖分子量大小^[25]。采用高效液相色谱法测定不同标准品分子量。以标准品的保留时间(T_R)为横坐标,标准品的分子量平均值取对数($\lg M_w$)为纵坐标,根据标准曲线 $\lg M_w = 9.6167 - 0.2897T_R$ ($R^2 = 0.9967$) 测得白莲莲房多糖相对分子量为 3.22×10^5 kDa。此外,多糖(三螺旋)的有序结构对免疫调节活性至关重要。有研究^[26]表明,只有多糖分子量 $> 9 \times 10^4$ Da,才能形成三重螺旋结构。

2.4 白莲莲房多糖的体外抗氧化活性

2.4.1 DPPH 自由基清除能力 如图 3 所示,莲房多糖对 DPPH 自由基的清除率与其质量浓度呈剂量依赖性增加。在质量浓度为 $0.025 \sim 0.200$ mg/mL 时对 DPPH 自由基的清除作用增强较快,后趋于平缓,在 $0.200, 0.400$ mg/mL 时,其清除率分别为 $(43.76 \pm 3.26)\%$ 和 $(43.57 \pm 3.75)\%$,但均低于同浓度维生素 C 的。

2.4.2 OH 自由基清除能力 如图 4 所示,莲房多糖对 OH 自由基的清除率随其质量浓度的增加而增加,但是整体清除率比维生素 C 低。在给药浓度范围内,莲房多

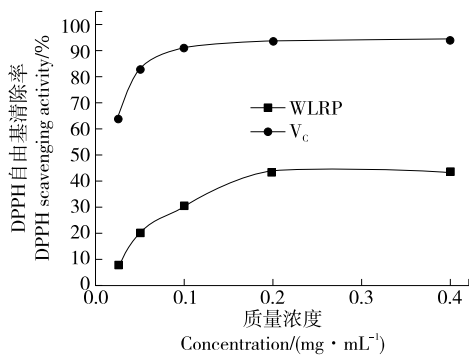


图 3 白莲莲房多糖对 DPPH 的清除能力的影响
Figure 3 The effect of WLRP on DPPH radical scavenging ability ($n=3$)

糖对 OH 自由基的清除率在其质量浓度为 0.400 mg/mL 时达到最大,为 $(58.79 \pm 3.75)\%$ 。

2.4.3 Fe^{3+} 还原力 如图 5 所示,莲房多糖的 Fe^{3+} 还原能力虽然随着给药浓度的增加而有所增强,但增加幅度偏小且整体弱于维生素 C。在给药浓度范围内,莲房多糖在质量浓度为 0.4 mg/mL 时 Fe^{3+} 还原能力达到最大,为 0.44 。

白莲莲房多糖在还原力、清除 DPPH 自由基和 OH 自由基等方面均表现出一定的作用,但是整体作用要弱

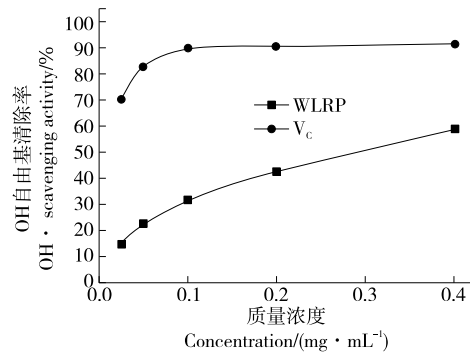


图 4 白莲莲房多糖对 OH 自由基清除能力
Figure 4 The scavenging ability of WLRP to hydroxyl radicals ($n=3$)

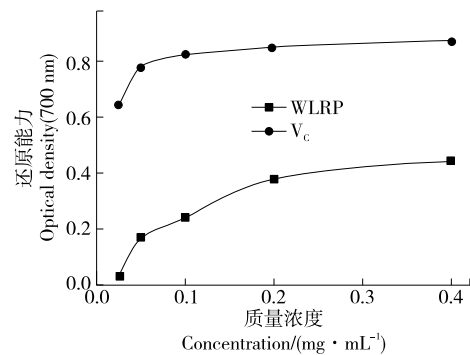


图 5 莲房多糖的还原能力
Figure 5 Reducing power ability of polysaccharide ($n=3$)

于维生素 C,可能由于抗氧化作用机制不同所引起的,维生素 C 能通过逐级供给电子而实现清除活性氧自由基的作用,而白莲莲房多糖的抗氧化作用与分子上含有的醇羟基等活性基团有关^[27]。

2.5 白莲莲房多糖的免疫活性

2.5.1 对细胞存活率的影响 如图 6 所示,白莲莲房多糖质量浓度为 200.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,细胞存活率为 $(85.36 \pm 4.77)\%$ ($P < 0.05$),与正常组相比,显示对细胞有毒性,而

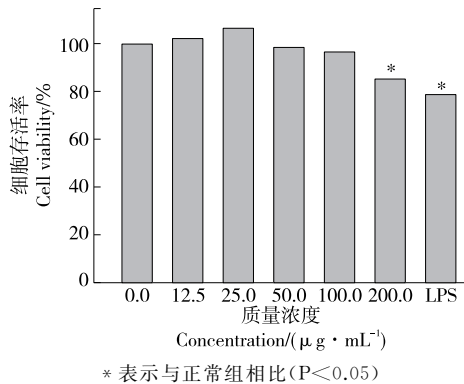


图 6 白莲莲房多糖对 RAW 264.7 细胞存活率的影响
Figure 6 Effect of WLRP on the viability of RAW 264.7 cells ($n = 3$)

多糖质量浓度为 100.0,50.0,25.0,12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,细胞存活率分别为 $(96.77 \pm 4.52)\%$, $(98.53 \pm 3.78)\%$, $(106.46 \pm 5.23)\%$, $(102.45 \pm 4.65)\%$,说明 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下的白莲莲房多糖对细胞是安全的,因此以 0 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 白莲莲房多糖进行后续试验。

2.5.2 对 RAW 264.7 细胞 NO、TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 分泌的影响 研究观察了白莲莲房多糖对 NO、细胞因子 (TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β) 的影响。正常组中 RAW 264.7 细胞只释放少量的 NO $[(3.12 \pm 0.12) \mu\text{mol}/\text{L}]$ 、TNF- α $[(5.52 \pm 0.11) \text{ng}/\text{mL}]$ 、IL-6 $[(8.43 \pm 1.02) \text{ng}/\text{mL}]$ 和 IL-1 β $[(27.56 \pm 1.22) \text{ng}/\text{mL}]$,如图 7 所示,与正常组相比,白莲莲房多糖 (25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 处理能显著促进 NO、TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的分泌,呈剂量依赖性。在白莲莲房多糖质量浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,NO、TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的分泌量达到了最大值,与空白组相比,NO、TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的分泌量分别增加了 29.89 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、84.24 ng/mL 、33.89 ng/mL 和 45.96 ng/mL 。然而,用白莲莲房多糖 (50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 处理后 NO、TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的分泌缓慢增加。说明白莲莲房多糖对巨噬细胞的激活是有限的,过度激活巨噬细胞将会导致炎症。基于试验中莲房多糖与 LPS 对炎症因子的释放情况,白莲莲房多糖对巨噬细胞的作用远小于 LPS。

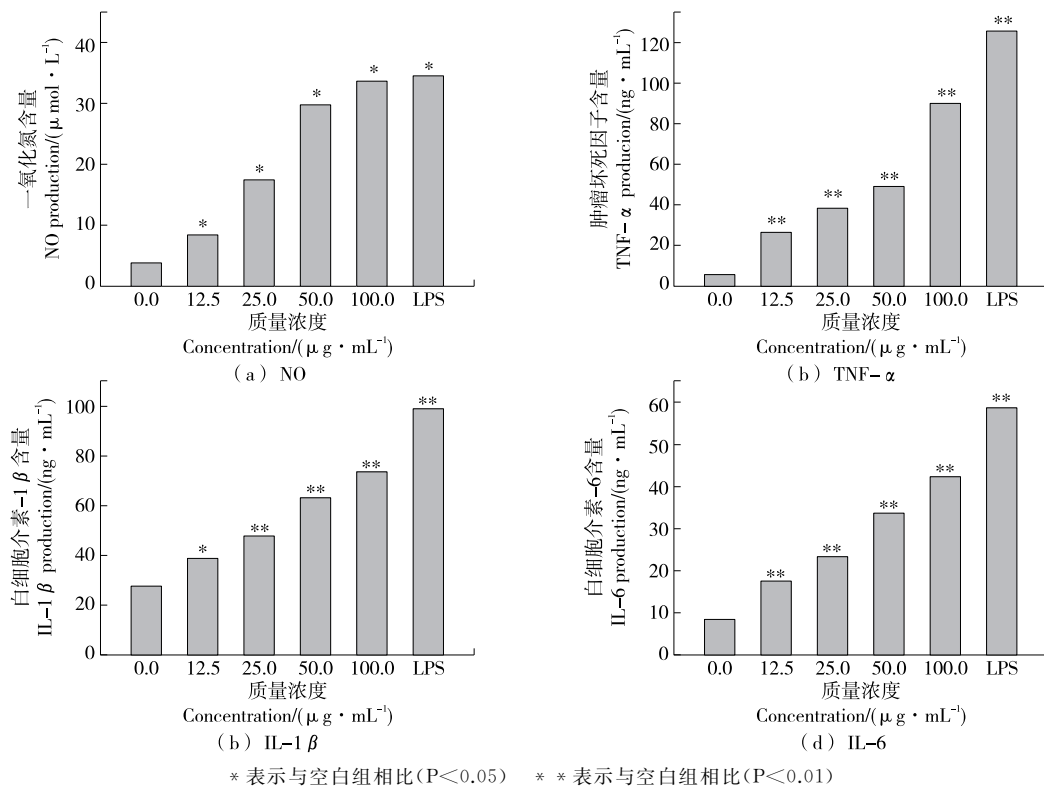


图 7 白莲莲房多糖对 NO、细胞因子 (TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β) 的影响

Figure 7 Effects of WLRP treatment on the secretion of NO, cytokine (TNF- α , IL-6 and IL-1 β) in RAW 264.7 cells ($n = 3$)

3 结论

白莲莲房多糖是一种杂多糖,主要由鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖组成,其中半乳糖质量分数最大,为 34.59%;白莲莲房多糖相对分子量为 3.22×10^5 kDa;另外,红外光谱分析表明白莲莲房多糖呈现出多糖类物质的典型特征吸收峰。莲房多糖作为新发现的天然多糖之一,试验表明,莲房多糖具有较强的 DPPH、羟基自由基清除活性和还原能力,可以作为一种潜在的自然抗氧化剂资源,此外,白莲莲房多糖可通过刺激巨噬细胞释放 NO 和细胞因子(TNF- α 、IL-6、IL-1 β)来增强免疫调节活性而且对 RAW 264.7 细胞无毒性,可作为一种新型的功能性食品免疫调节剂。后续可对白莲莲房多糖的免疫调节活性的分子作用机制以及蛋白信号通路进行研究。

参考文献

[1] HAN Pei-pei, YAO Shun-yu, GUO Rong-jun, et al. The relationship between monosaccharide composition of extracellular polysaccharide and activities of related enzymes in *Nostoc flagelliforme* under different culture conditions[J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 174: 111-119.

[2] 吴静, 胡居吾, 熊伟, 等. 樟树不同器官多糖中单糖组成分析[J]. 生物化工, 2020, 6(6): 69-71, 81.

[3] 李珊珊, 吴倩, 袁茹玉, 等. 莲属植物类黄酮代谢产物的研究进展[J]. 植物学报, 2014, 49(6): 738-750.

[4] WU Yan-bin, ZHENG Li-jun, YI Jun, et al. A comparative study on antioxidant activity of ten different parts of *Nelumbo nucifera* Gaertn[J]. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2011, 5(22): 2 454-2 461.

[5] 赵芹, 吴修, 李效尊, 等. 莲(*Nelumbo nucifera*)不同部位活性物质及其药理作用研究进展[J]. 分子植物育种, 2016, 14(7): 1 864-1 874.

[6] ZHENG Li-jun, WU Yan-bin, WU Jian-Guo, et al. Antioxidant activity of lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) receptacles of eleven cultivars grown in China[J]. Journal of Medicinal Plants Research, 2012, 6(10): 1 902-1 911.

[7] HU Wei-cheng, WANG Gong-cheng, SHEN Ting, et al. Chemical composition, antioxidant and cytoprotective activities of lotus receptacle[J]. Horticulture, Environment, and Biotechnology, 2015, 56(5): 712-720.

[8] 黄秀琼, 卿志星, 曾建国. 莲不同部位化学成分及药理作用研究进展[J]. 中草药, 2019, 50(24): 6 162-6 180.

[9] WU Yan-bin, ZHENG Li-jun, WU Jian-guo, et al. Antioxidant activities of extract and fractions from receptaculum nelumbinis and related flavonol glycosides[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2012, 13(6): 7 163-7 173.

[10] WU Jing, XU Jian-guo, FU Jian-ping, et al. Characterization of Tyrosinase Inhibitors from White Lotus Receptacle[J]. Chem Nat

Compd, 2019, 55: 929-931.

[11] 何静, 吴磊, 李鹏霞, 等. 莲蓬壳提取物不同极性部位的生物活性[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(3): 679-684.

[12] 吴静, 胡居吾, 熊伟, 等. 樟树果实多糖对巨噬细胞 RAW264.7 的免疫调节作用[J]. 现代食品科技, 2018, 34(9): 12-18, 309.

[13] 邢颖, 景艳芳. 提取方法对荷叶多糖得率及抗氧化活性的影响[J]. 食品与机械, 2020, 36(6): 166-169, 175.

[14] 胡居吾, 罗斌, 吴磊, 等. 蔓三七茎多糖理化性质及抗氧化和免疫调节研究[J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(8): 1 299-1 306.

[15] 张莲姬, 南昌希, 张丽霞. 桔梗多糖的提取及其抗氧化作用研究[J]. 食品与机械, 2008, 24(3): 60-63.

[16] 吴静, 胡居吾, 熊伟, 等. 樟树不同器官中多糖抗氧化、免疫调节活性的研究[J]. 江西农业大学学报, 2019, 41(4): 804-813.

[17] 吴磊, 吴静, 李子江, 等. 樟树抗炎活性及作用机制研究[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(9): 1 515-1 520.

[18] ZHANG Tian-tian, YE Ju-feng, XUE Chang-hu, et al. Structural characteristics and bioactive properties of a novel polysaccharide from *Flammulina velutipes*[J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 197: 147-156.

[19] ZHANG Ji-xian, CHEN Meng, WEN Chao-ting, et al. Structural characterization and immunostimulatory activity of a novel polysaccharide isolated with subcritical water from *Sagittaria sagittifolia* L.[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 133: 11-20.

[20] ZHANG Meng-meng, WANG Guang, LAI Fu-rao, et al. Structural characterization and immunomodulatory activity of a novel polysaccharide from *Lepidium meyenii* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(9): 1 921-1 931.

[21] HUANG Kai-wei, LI Yun-rong, TAO Sheng-chang, et al. Purification, Characterization and biological activity of polysaccharides from *Dendrobium officinale*[J]. Molecules, 2016, 21: 701.

[22] 刘恩超, 黄晓芸, 孙杰, 等. 莲藕多糖的单糖组成分析方法优化[J]. 食品科技, 2018, 43(6): 292-296.

[23] 孙丰婷, 孙风光, 李威. 莲藕渣多糖的单糖组分测定[J]. 中国调味品, 2018, 43(9): 144-146.

[24] 邓添华, 张静, 黄达彬, 等. 莲子多糖的结构分析及抗氧化活性[J]. 生物加工过程, 2012, 10(6): 47-50.

[25] 李子江, 刘慰, 吴磊, 等. 偃松塔塔多糖的单糖组成分析及活性研究[J]. 林产化学与工业, 2020, 40(1): 37-44.

[26] ZHENG Ting-ting, GU Da-hai, WANG Xue-feng, et al. Purification, characterization and immunomodulatory activity of polysaccharides from *Leccinum crocipodium* (Letellier.) Watliag[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 148(22): 647-656.

[27] 刘晓慧, 孟庆, 李伟, 等. 茶多酚类化合物与维生素协同抗氧化机理研究进展[J]. 热带作物学报, 2012, 33(12): 2 305-2 310.