

百合多糖的化学结构表征和生物活性研究进展

白光剑¹, 陈少丹^{1,2}, 张普照¹, 熊诗慧¹, 伍振峰¹, 王雅琪^{1*}

1. 江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

2. 广东省科学院微生物研究所, 广东 广州 510075

摘要: 百合是传统中医药中一味重要的滋阴药, 具有悠久的用药历史, 同时还是一味营养丰富的食材。多糖作为百合中一类重要的活性成分, 具有免疫调节、抗肿瘤、抗氧化、降血糖等多重作用。通过对国内外百合多糖的研究报道进行系统整理, 综述不同来源百合多糖的结构特征、结构修饰与生物学活性, 为百合多糖的研究与开发提供参考与借鉴。

关键词: 百合; 多糖; 结构特征; 结构修饰; 硒化; 硫酸化; 发酵

中图分类号: R284.18 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)20-6583-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.20.030

Research progress on chemical structure characterization and biological activities of *Lilii Bulbus* polysaccharides

BAI Guang-jian¹, CHEN Shao-dan^{1,2}, ZHANG Pu-zhao¹, XIONG Shi-hui¹, WU Zhen-feng¹, WANG Ya-qi¹

1. State Key Laboratory of Innovation Drug and Efficient Energy-Saving Pharmaceutical Equipment, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

2. Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510075, China

Abstract: Baihe (*Lilii Bulbus*) is an important yin nourishing medicine in traditional Chinese medicine. It has a long history of medicine and is also a nutritious food. As an important active ingredient in *Lilii Bulbus*, polysaccharides have multiple functions such as immune regulation, anti-tumor, anti-oxidation, and hypoglycemia. Research reports of *Lilii Bulbus* polysaccharides at home and abroad were systematically organized in this paper, the structural characteristics, structural modifications and biological activities of *Lilii Bulbus* polysaccharides from different sources were summarized, in order to provide reference and reference for research and development of *Lilii Bulbus* polysaccharides.

Key words: *Lilii Bulbus*; polysaccharide; structural characteristics; structural modification; selenization; sulfation; fermentation

药用百合为百合科 (Liliaceae) 百合属 *Lilium* L. 的几个主流品种, 是一味传统中药, 最早见于《神农本草经》, 被列为中品^[1]。中医药理论把百合划分为补益药中的补阴药, 以鳞茎入药, 认为百合甘寒质润, 入肺经, 具有养阴润肺、止咳祛痰、清肺经热之效, 用于肺阴虚证; 入心经能清心安神, 适用于阴虚内热之“百合病”^[2]; 此外亦能入胃经, 具有养胃阴、清胃热之效^[3]。现代研究表明, 百合中含有多糖类、皂苷类、酚类、生物碱类、黄酮类等多种化合物, 具有止咳祛痰、镇静催眠、免疫调节、抗氧化、抗抑郁、抗肿瘤、抗炎、降血糖等生物活性^[4]。

多糖是由 10 个以上的单糖通过糖苷键结合而形成的一类高分子聚合物, 普遍存在于动植物体内。过去人们认为多糖类成分主要是作为动植物的支持组织 (纤维素、甲壳素等) 和养料存贮 (淀粉、糖原等), 不具备生物学活性, 然而随着研究的发展, 发现多糖类成分在抗衰老、抗肿瘤、抗病毒、免疫调节等方面具有显著生物活性, 而且大部分多糖类成分安全无毒, 对机体的损害较小。多糖类成分已经成为天然药物及保健品研发的重要组成部分, 目前已有多个多糖物质处于抗肿瘤、抗艾滋病等疾病治疗的临床试验阶段。

收稿日期: 2022-06-06

基金项目: 国家级大学生创新创业计划项目 (202210412410); 江西省科技厅项目 (20212BCJL23061); 技术开发委托合同 (53521023)

作者简介: 白光剑, 男, 硕士研究生, 研究方向为中药质量分析与控制。Tel: (0791)87118108 E-mail: baiguangjian123@126.com

*通信作者: 王雅琪, 副教授, 研究方向为中药质量分析与控制。Tel: (0791)87118108 E-mail: wangyaqi_3@163.com

多糖类成分是百合的一类主要有效成分, 具有免疫调节、抗衰老、抗氧化、降血糖、抗肿瘤等生物学活性, 在大健康领域有重要价值。多糖的相对分子质量、单糖组成、糖苷键类型、糖苷键连接方式以及某些特殊官能团(硒、硫酸基团)修饰等, 都和多糖的生物活性显著相关。本文从百合的基原、多糖结构特征、结构修饰及其生物活性等方面进行系统梳理, 为百合多糖构效关系研究及相关产品研发提供借鉴与参考。

1 百合基原

《中国药典》2020 年版收载的药用百合来源为卷丹 *Lilium lancifolium* Thunb.、百合 *L. brownii* F. E. Brown ex Mielle var. *viridulum* Baker 以及细叶百合 *L. pumilum* DC. 的干燥肉质鳞叶^[5]。目前, 市面上流

通的中药饮片多以卷丹和百合品种为主。而作为食材的百合, 主要为兰州百合 *L. davidii* var. *unicolor* Cotton, 实则为川百合 *L. davidii* Duchartre 的变种。从植物形态上可以看出, 卷丹、细叶百合、川百合的花色为橘红色, 且花瓣向后反卷, 归属于卷瓣组; 而野百合、百合花色为白色, 花瓣开展不反卷, 归属于百合组^[6]。张卫等^[7]通过历代本草考证, 提出药用百合的正品应为百合科植物野百合 *L. brownii* F. E. Brown ex Mieliez 及其变种百合, 《本草衍义》及明清一些医书将卷丹错误混入正品百合使用, 《日华子本草》将细叶百合作为药用, 但这 2 个品种均不作为药用百合的正品, 王昌华等^[8]也提议野百合变种才是其正品。当前研究较多的几种百合基原之间的形态差异见图 1。

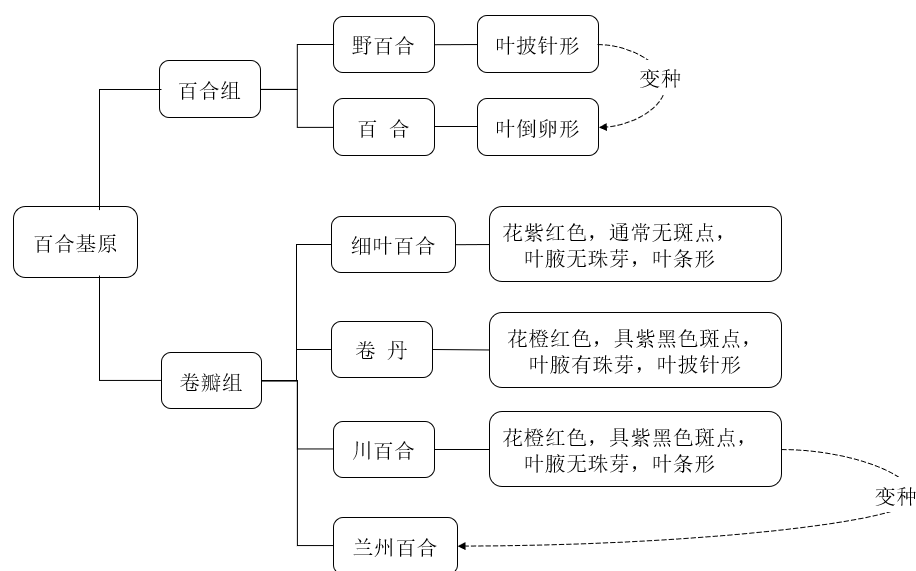


图 1 不同基原的百合形态差异

Fig. 1 Morphological differences of *Lilii Bulbus* from different base sources

2 百合多糖的结构特征

基原的不同导致百合多糖在含量和化学结构特征上存在较大差异。据报道, 不同品种的百合多糖含量不一, 按照含量大小排序为兰州百合>卷丹>川百合>龙牙百合, 其中, 兰州百合的多糖质量分数最高可达 19.42%^[9-10]; 不仅如此, 不同品种百合多糖的相对分子量分布范围、单糖种类、糖苷链类型及其连接方式亦不同, 导致活性存在差异。不同百合多糖的相对分子质量、单糖组成和比例、主要连接方式与生物学活性见表 1。

2.1 百合多糖的相对分子质量

多糖相对分子质量的表述有重均相对分子质量

和数均相对分子质量 2 种表达形式, 一般采用重均相对分子质量。重均相对分子质量与数均相对分子质量的比值可以反映多糖的均一性, 一般比值越小越均一。由表 1 可知, 百合多糖的相对分子质量分布范围广, 大的可达 8.52×10^6 , 小的可到 1553。多糖的生物活性和相对分子质量关系密切, 相对分子质量过大, 不利于多糖的跨膜转运和体内吸收, 疗效难以发挥; 相对分子质量相对小的多糖, 其水溶性更好, 暴露的活性基团更多, 空间位阻小, 更易与物质结合, 发挥作用; 相对分子质量过小, 则难以产生具有活性的聚合结构^[29]。在结构相似的前提下, 只有相对分子质量适合, 才能发挥多糖最佳的药理作用, 如

表 1 不同来源百合多糖类成分及生物活性

Table 1 Composition and biological activities of *Lilii Bulbus* polysaccharides from different sources

名称	相对分子质量	单糖组成及比例	主要糖苷键	生物学活性	文献
LLP-1	11 756	Glu-Man-Ara (18.60 : 25.14 : 1.00)	→4)-α-Glu-(1→、→6)-α-Glu-(1→、→4)-α-Man-(1→、Ara: /	抑制 α-淀粉酶活性; 清除·OH 自由基	11
LLP-2	1 038 773	Gal-Rha-Ara (3.58 : 1.00 : 1.09)	→4)-α-Gal-(1→、→4)-α-Rha-(1→、→4)-α-Ara-(1→	抑制 α-淀粉酶活性; 清除·OH、DPPH·自由基	
LLPS-1	78 610	Man-Glu (1.77 : 1)	/	促进免疫细胞分泌 TNF-α、IL-6、MCP-1 和 IL-1β, 同时上调 mRNA 表达; 以及 TOLL 样受体 4 蛋白的表达, 提高 IKK、IκBα 和 NF-κB/p65 蛋白的磷酸化水平	12
LLPS-2	5360	Man-Glu (1 : 16.06)	/	/	
LLPS-3	4790	Man-Glu (1 : 1.04)	/	/	
LLP-1	2.25 × 10 ⁶	Man-Rha-Glu-Gal-Ara (4.57 : 1.96 : 9.56 : 43.05 : 37.11)	/	清除·OH、DPPH·和超氧阴离子自由基, 对 Fe ²⁺ 具有较强的还原能力和螯合能力	13
LLP-2	2.02 × 10 ⁶	Man-Rha-Glu-Gal-Ara (2.02 : 3.88 : 20.23 : 37.20 : 32.47)	/		
LLP-3	2.08 × 10 ⁶	Man-Rha-Glu-Gal-Ara (3.04 : 4.77 : 68.55 : 11.60 : 8.75)	/		
LLPS-1	3.505 1 × 10 ⁵	Glu-Man (2 : 1), 微量 Ara	→4)-β-Glu-(1→、→3)-β-Glu-(1→、→4)-β-Man-(1→、→3)-β-Man-(1→	显著清除·OH 自由基、H ₂ O ₂ ; 促进小鼠单核巨噬细胞白血病 RAW264.7 细胞增殖、吞噬, 释放 NO, 具有体外免疫调节活性	14-15
LLPS-2	4.032 9 × 10 ⁵	Glu-Man (1 : 1), 微量 Ara	→4)-β-Glu-(1→、→3)-β-Glu-(1→、→4)-β-Man-(1→、→3)-β-Man-(1→		
LLPS-3	1.461 8 × 10 ⁵	Ara-Gal-Glu-Man (2 : 2 : 2 : 1)	→3)-α-Man-(1→、→3)-α-Ara-(1→、→3)-α-Gal-(1→	促进 RAW264.7 细胞增殖、吞噬, 释放 NO	
LTP-1	5314	Glu-Man (28.8 : 71.2)	→4)-α-Man-(1→、→4)-β-Glu-(1→	抑制人非小细胞肺癌 A549 细胞、胃腺癌 BGG-823 细胞的增殖; 降低 BGG-823 细胞的迁移、侵袭、凋亡	16
LTP-2	1 205 508	Rha-Ara-Gal (14.8 : 30.3 : 49.9)	→2,4)-Rha-(1→、→3,5)-α-Rha-(1→、→4)-β-Gal-(1→、→6)-β-Gal-(1→		

续表 1

名称	相对分子质量	单糖组成及比例	主要糖苷键	生物学活性	文献
LLP-1A	7.861×10^4	Man-Glu (1.77 : 1)	/	促进 RAW264.7 吞噬、释放 NO；诱导细胞因子 IL-6、MCP-1、TNF- α 和 IL-1 β 的表达；在分子机制上，增加 IKK、I κ B α 和 NF- κ B/p65 的磷酸化	17
LP2-1	8.52×10^6	Rha-Ara-Glu-Gal (1.88 : 2.13 : 1.00 : 2.5)	/	抗氧化	18
LP	1.10×10^5	Glu	$\rightarrow 6$)- α -Glu-(1 $\rightarrow$	/	19
LTP	3.43×10^4	Glu	$\rightarrow 6$)- α -Glu-(1 $\rightarrow$	/	
LP-W	3915	Glu-Man (1.56 : 1)	$\rightarrow 4$)- α -Man-(1 $\rightarrow$ 、 $\rightarrow 4$)- α -Glu-(1 $\rightarrow$ 、 $\rightarrow 4$)- β -Glu-(1 $\rightarrow$	清除·OH、DPPH·和超氧阴离子自由基	20
LPF-W	1553	Glu	$\rightarrow 4$)- α -Glu-(1 $\rightarrow$ 、 $\rightarrow 4,6$)- α -Glu-(1 $\rightarrow$		
BHP-1	1.93×10^5	Glu-Man (5.9 : 2.0)	/	抗氧化、抑菌	21
BHP-2	3.52×10^4	Glu-Gal-Man-Ara (8.3 : 1.5 : 1.0 : 1.1)	/		
LDP-1	4.9×10^3	Man-Glu (27.8 : 72.2)	$\rightarrow 6$)- α -Man-(1 $\rightarrow$ 、 $\rightarrow 4$)- β -Glu-(1 $\rightarrow$	/	22
LDP-2	6.2×10^4	Xyl-Man-Glu-Gal (6.74 : 6.28 : 76.5 : 10.48)	$\rightarrow 6$)- α -Man-(1 $\rightarrow$ 、 $\rightarrow 4$)- α -Glu-(1 $\rightarrow$ 、 $\rightarrow 3$)- β -Xyl-(1 $\rightarrow$	对肝癌 HepG2 细胞的葡萄糖消耗增加，具有降血糖作用	23
BHP-1	/	Glu-Man (2.5 : 1)	$\rightarrow 4$)- β -Man-(1 $\rightarrow$ 、 $\rightarrow 4$)- α -Glu-(1 $\rightarrow$ 、 $\rightarrow 3$)- β -Glu-(1 $\rightarrow$	/	24
LPR	5.12×10^4	Glu-Man (2.9 : 3.3)	$\rightarrow 4$)- β -Man-(1 $\rightarrow$ 、 $\rightarrow 4$)- β -Glu-(1 $\rightarrow$	抗氧化；延长线虫的生命，机制为降低内源活性氧水平，提高超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性，降低丙二醛水平	25-26
LDP	5.17×10^4	Man-Glu-Gal(10 : 19 : 1)	$\rightarrow 4$)- β -Glu-(1 $\rightarrow$ 、 $\rightarrow 6$)- α -Gal-(1 $\rightarrow$ 、 $\rightarrow 3$)- α -Man-(1 $\rightarrow$ 、 $\rightarrow 3,6$)- α -Man-(1 $\rightarrow$	/	27
LBP-1	3.05×10^4	Glu	/	对 Lewis 肺癌的生长有明显的抑制作用；促进巨噬细胞吞噬、脾细胞增殖和细胞因子 (TNF- α 、IL-2、IL-6、IL-12) 的产生	28

“/”表示未见报道；Glu-葡萄糖 Man-甘露糖 Rha-鼠李糖 Ara-阿拉伯糖 Xyl-木糖 Gal-半乳糖 ·OH-羟基自由基 DPPH·-1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基 TNF- α -肿瘤坏死因子- α IL-6-白细胞介素-6 MCP-1-单核细胞趋化因子-1 IL-1 β -白细胞介素-1 β IKK-抑制因子激酶 I κ B α -核因子- κ B 抑制蛋白 α NF- κ B-核因子- κ B NO-一氧化氮

“/” shows not been reported; Glu-glucose Man-mannose Rha-rhamnose Ara-arabinose Xyl-xylose Gal-galactose ·OH-hydroxyl radical DPPH·-1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical 2,2-diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl) hydrazyl radical TNF- α -tumor necrosis factor- α IL-6-interleukin-6 MCP-1-monocyte chemoattractant protein-1 IL-1 β -interleukin-1 β IKK-inhibitor of κ B kinase I κ B α -inhibitor α of NF- κ B NF- κ B-nuclear factor- κ B NO- nitric oxide

相对分子质量在 $1.0 \times 10^5 \sim 2.0 \times 10^5$ 的葡聚糖活性明显大于相对分子质量在 $0.5 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^5$ 的葡聚糖^[30]。Song 等^[20]通过乳酸菌发酵兰州百合后提取多糖, 得到发酵多糖 LPF-W, 发现与未发酵百合多糖 LP-W 相比, 发酵后的多糖相对分子质量从 3915 变为 1553, 其溶解度增加、黏度和粒径降低, 抗氧化活性也发生了变化。研究发现自由基的产生会引起多糖的降解。如日常膳食中摄入的抗坏血酸, 能够通过芬顿反应, 产生羟基自由基进攻糖链, 引起体内多糖链的解聚, 导致相对分子质量下降, 使其在抗癌、抗凝血、抗氧化等活性显著增强^[31-32]。

2.2 百合多糖的结构表征

2.2.1 单糖组成 百合多糖的单糖组成差异较大, 其原因可能是由于不同的提取、分离方法和检测手段, 导致单糖组成和比例不一致。由表 1 可知, 百合多糖中 Glu 和 Man 的占比最大, 几乎每 1 个多糖组成中都有, 同时还含有少量的 Gal、Ara、Rha、Xyl 等, 以杂多糖居多, 均多糖较少。多糖的单糖组成, 在一定程度上与生物学活性具有一定的关联。研究发现, 葡聚糖、甘露聚糖、果聚糖、果胶等与免疫刺激具有相关性^[33], 能够促进相关炎症因子的释放, 促进巨噬细胞的增值和吞噬。

2.2.2 糖苷键连接方式 多糖结构复杂, 不像小分子化合物经核磁 (nuclear magnetic resonance, NMR) 分析就能得出准确的化学连接顺序, 一般还需综合甲基化分析、Smith 降解、逐步酸水解等先确定糖苷键的类型, 再基于核磁共振波谱技术确定糖苷键的连接方式。李雅琳^[16]从西藏卷丹百合 *L. lancifolium* Thunb. 中分离得到 2 个多糖 LTP-1、LTP-2, 通过甲基化分析和核磁一维、二维谱图, 确定 LTP-1 的主链由 $\rightarrow 4$)- α -D-Man-(1 $\rightarrow$ 、 $\rightarrow 4$)- β -D-Glu-(1 $\rightarrow$ 、 $\rightarrow 4$)- α -D-2-Ac-Man-(1 $\rightarrow$ 残基构成 (图 2); LTP-2 的主链

由 4)-Rha-(1 $\rightarrow$ 、 $\rightarrow 4$)- β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 和 β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 残基组成, 支链由 $\rightarrow 5$)- α -L-Ara-(1 $\rightarrow$ 、 $\rightarrow 3,5$)- α -L-Ara-(1 $\rightarrow$ 、 α -L-Ara-(1 $\rightarrow$ 残基组成。Song 等^[20]从兰州百合中获得一葡甘聚糖 LP-W, 其主链由 $\rightarrow 4$)- α -D-Man-(1 $\rightarrow$ 、 $\rightarrow 4$)- β -D-Glu-(1 $\rightarrow$ 和 $\rightarrow 4$)- α -D-Glu-(1 $\rightarrow$ 残基组成, 支链为 β -D-Glu-(1 $\rightarrow$ 残基。从其乳酸菌发酵液中获得一葡聚糖 LPF-W, 主链由 $\rightarrow 4$)- α -D-Glu-(1 $\rightarrow$ 、 $\rightarrow 4,6$)- α -D-Glu-(1 $\rightarrow$ 残基组成, 支链为 α -D-Glu-(1 $\rightarrow$ 残基, 连接到 $\rightarrow 4,6$)- α -D-Glu-(1 $\rightarrow$ 上的 O-6 位上 (图 3)。Zhang 等^[27]从兰州百合中获得一杂多糖 LDP, 多糖的主链由 $\rightarrow 4$)- β -D-Glu-(1 $\rightarrow$ 、 $\rightarrow 3$)- α -D-Man-(1 $\rightarrow$ 按 2:1 的形式构成, 平均 30 个糖残基中有 1 个 $\rightarrow 3$)- α -D-Man-(1 $\rightarrow$ 或 $\rightarrow 6$)- α -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 在主链 O-6 位的取代, 末端为 β -D-Glu-(1 $\rightarrow$ 。同一团队的 Wang 等^[23]获得另外一种具有降血糖作用的水溶性杂多糖 LDP-2, 主链由 $\rightarrow 4$)- α -D-Glu-(1 $\rightarrow$ 、 $\rightarrow 3$)- α -D-Xyl-(1 $\rightarrow$ 组成, 支链为 $\rightarrow 4$)- α -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 、 $\rightarrow 3,6$)- α -D-Man-(1 $\rightarrow$ 通过 Man 的 O-6 或 O-3 为连接到主链上 (图 3)。Hui 等^[25]获得一种 O-乙酰基葡甘露聚糖 LPR, 主链主要为 $\rightarrow 4$)- β -D-Glu-(1 $\rightarrow$ 和 $\rightarrow 4$)- β -D-Man-(1 $\rightarrow$ 残基, T- α -D-Glu 为末端残基, 乙酰基的取代位置在 Man 的 O-2、O-3 位上, 见图 3。

百合多糖的糖苷键类型复杂多样, 分支广泛。Glu 存在 $\rightarrow 4$)- α -Glu-(1 $\rightarrow$ 、 $\rightarrow 6$)- α -Glu-(1 $\rightarrow$ 、 $\rightarrow 4$)- β -Glu-(1 $\rightarrow$ 的连接, Man 以 $\rightarrow 4$)- α -Glu-(1 $\rightarrow$ 、 $\rightarrow 4$)- β -Glu-(1 $\rightarrow$ 为主, Ara 以 $\rightarrow 5$)- α -Ara-(1 $\rightarrow$ 、 $\rightarrow 3,5$)- α -Glu-(1 $\rightarrow$ 连接为主, 此外还存在其他的连接方式。研究发现以 β -1 $\rightarrow$ 3 连接方式为主的多糖抑制肿瘤的作用最强^[34]。百合多糖中, 主要以 α -1 $\rightarrow$ 4、1 $\rightarrow$ 6、 β -1 $\rightarrow$ 4 的连接为主, 从糖的连接方式来看, 这可能也是百合在直接抑制肿瘤生长作用中效果不明显的的一个原因, 百合发挥抗肿瘤的作用, 主要是基于通过激活

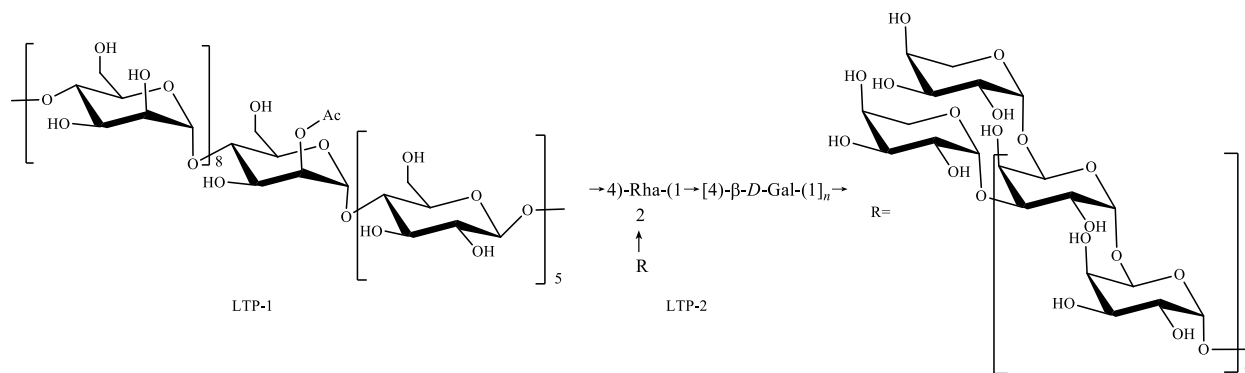


图 2 卷丹百合多糖的重复单元结构

Fig. 2 Repeating unit structures of *L. lancifolium* polysaccharide

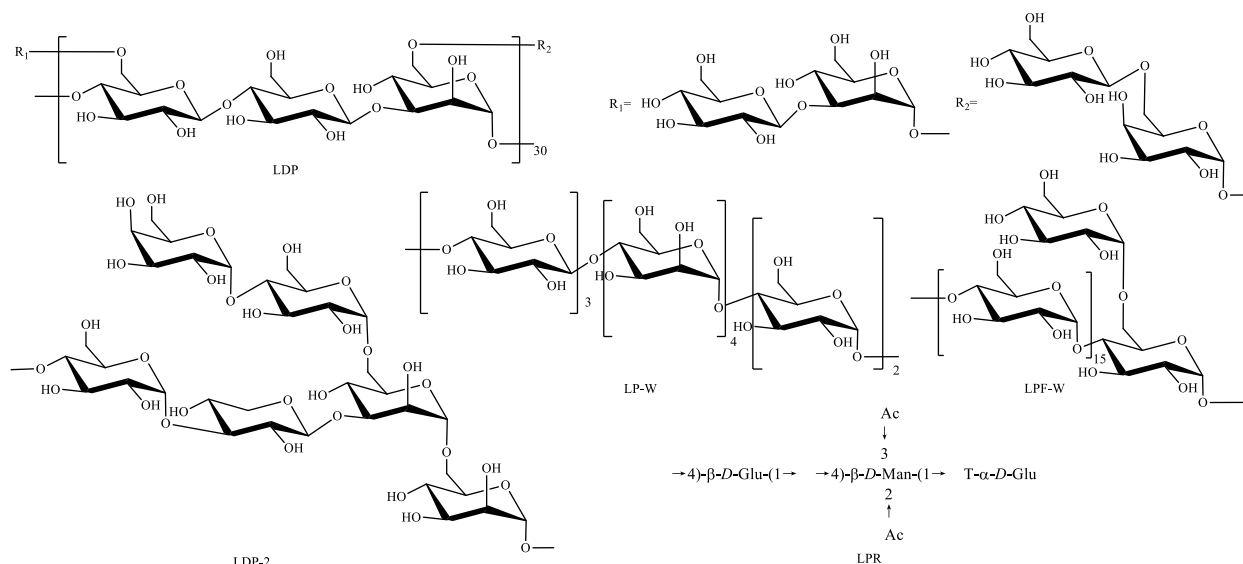


图3 兰州百合多糖重复单元结构

Fig. 3 Polysaccharide repeating unit structure of *L. davidii* var. *unicolor*

免疫细胞发挥杀伤肿瘤的间接作用。百合多糖中分支多见于 *O*-6 位, 且还原末端多为 Glu。多糖的分支度对其活性也有一定的影响, 只有适中的分支度多糖才具有较高的活性, 分支度过高或过低, 对其活性都有影响。通过和表 1 对比发现, 当前对于百合多糖化学表征的研究相对较浅, 只有少部分报道了完整的糖链重复单位结构, 大部分只是对单糖组成和糖苷键构型的测定, 没能将糖链碎片连接起来, 这很难阐明多糖活性和构型之间的关系。此外, 多糖的高级结构, 尤其是其链构象与其生物活性息息相关, 而目前关于百合多糖链构象的报道较少。Zhang 等^[27]使用原子力显微镜, 发现百合多糖 LDP 在水溶液中呈无规则线形。

3 多糖修饰及生物活性

结构修饰引入或去除基团、改变分子构型或构象都可以改变化合物的药效。百合多糖结构改造的研究有硒化、硫酸化、发酵等, 修饰多糖相比天然多糖在某些生物学活性上得以提升, 甚至产生新的生物活性。

3.1 硒化

硒 (Se) 是人体所必需的一种微量元素, 具有调节免疫、抗氧化、抗肿瘤、降血糖、保肝等作用^[35-37]。无机硒可以和糖链上的羟基、氨基等基团以共价键的形式结合成亚硒酸酯或硒酸酯, 制备硒多糖。常用的硒化方法有硝酸-亚硒酸钠法、冰醋酸-亚硒酸钠法和氯化硒法等, 其中硝酸-亚硒酸钠法硒化效率最高, 普遍使用。以 Na_2SeO_3 ^[38] 和 Cl_2OSe ^[39] 为硒试剂, 硒与糖链上 C-6 位的半缩醛羟基以共价键的形式结合, 生成硒酸酯, 见图 4。硒化后的多糖往往在 670、760~860、1030 cm^{-1} 有 Se-O-C、Se=O、O-Se-O 的 IR 特征吸收峰, 且 ^{13}C -NMR 谱图中, 在 δ 62.9 左右出现新的 C-6 位信号峰^[40-41]。由于硒的取代发生在 C-6 位, 当前普遍认为活性多与硒的取代度相关, 硒化的程度与反应时间、温度、酸的用量、糖链结构等有关。此外, 硒化后的多糖往往在单糖组成和相对分子质量上发生很大变化^[39,42], 其原因可能是由于长时间处在酸性、温暖的条件下, 造成糖链的水解。

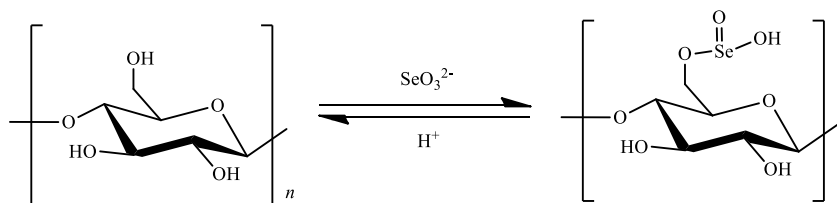


图4 多糖硒酸酯制备的反应式

Fig. 4 Reaction formula for preparation of polysaccharide selenate

Li 等^[43]采用 $\text{HNO}_3\text{-Na}_2\text{SeO}_3$ 法将百合多糖 LP 硒化, 得到含硒量为 37.78 mg/g 的硒化多糖 SLP, 用 LP 和 SLP 分别对 RAW264.7 细胞给药, 进行体外免疫实验。在给药量为 50~6.25 $\mu\text{g/mL}$ 时, SLP 给药组的细胞免疫活性强于 LP 组, 表现在吞噬作用加强, IL-1 β 、IL-6 分泌量增加, CD86、CD80 的表达上升, 酸性磷酸酶的活性增强。用环磷酸腺苷连续注射给药 3 d, 建立免疫抑制小鼠模型, 再用 LP、SLP 干预治疗, 结果表明 SLP 可显著提高小鼠血清中免疫球蛋白 G、免疫球蛋白 M、 γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ)、IL-2 的含量, 促进 B 细胞和 T 细胞的增殖。Hou 等^[44]合成 9 个硒化百合多糖, MTT 法筛查 9 种 SLP 对鸡外周血淋巴细胞增殖活性, 在 6.25~0.391 $\mu\text{g/mL}$ SLP₆ (含硒量为 39.78 mg/g) 的活性最强。同时体外实验显示 SLP₆ 能显著促进鸡外周血淋巴细胞的增殖, IL-2、IL-6、IFN- γ 的 mRNA 表达量显著大于 LP 组。体内选用接种了鸡新城疫疫苗的罗曼白鸡进行实验, 结果显示, SLP₆ 给药后各项检测指标均优于 LP 组。硒多糖的摄入能够有效补充硒元素, 体内外实验均表明硒修饰后的多糖活性高于天然多糖, 能够影响免疫因子表达, 刺激 B 细胞和 T 细胞的增殖和活化, 提高体内免疫蛋白的表达, 发挥免疫保护作用。

3.2 硫酸化

天然硫酸酯化多糖多存在于藻类、海洋无脊椎动物体内, 现代通过化学修饰的手段引入硫酸基团和多糖上的羟基形成硫酸酯, 加强或使原多糖具有抗病毒、抗凝血、提高机体免疫、抗肿瘤、抗氧化等生物活性^[45]。一般采用的合成方法有浓硫酸法、氯磺酸-吡啶法、三氧化硫-吡啶法^[46]等, 硫酸化后的多糖可在 800~860、1240 cm^{-1} 处有 C-O-S、S=O 的红外特征吸收峰^[47]。在硫酸化过程中, 发现硫酸基主要在 C-2、C-3、C-4、C-6 位取代^[45,48-49], C-6 和 C-2 位的硫酸化强度强于其他位置^[50]。多糖属于大分子物质, 且糖链的高级结构复杂, 很难像小分子物质一样实现准确定位修饰, 对于硫酸化多糖, 多考虑取代度、相对分子质量和活性的关系, 一般认为, 在一定范围内, 硫酸基的数量和药理活性成正比, 在平均每单位糖残基含 1.5~2.0 个硫酸根最佳, 过多的硫酸基团会产生抗凝血不良反应。

高清雅^[51]通过超声和酶协同提取获得兰州百合多糖 LPS-CE, 采用氯磺酸-吡啶法修饰, 得到硫酸酯多糖 SLPS-CE。LPS-CE 的单糖组成和比例为

Glu-Man (5.2:4.7), 相对分子质量为 1.195×10^5 , 硫酸化后的单糖比例为 5.14:4.82, 相对分子质量变为了 3.337×10^4 , 这可能是硫酸化过程中, 多糖可能发生了水解, 导致糖苷键断裂相对分子质量变小。在质量浓度 0.2~1 mg/mL 体外实验比较二者的抗氧化活性, 结果显示, 硫酸化后的百合多糖对 DPPH、 $\cdot\text{OH}$ 、 $\cdot\text{O}_2^-$ 自由基清除、 Fe^{2+} 的螯合能力均明显大于天然百合多糖。同样, 黄玉龙等^[52]从兰州百合中获得多糖 LPS, 通过氯磺酸-吡啶法硫酸化, 得到百合硫酸酯多糖 LPS-S。LPS 的单糖组成及比例为 Man-Glu-Gal (17:15:1), LPS-S 的单糖不变, 比例变为 18:14:1。在 0.02~2 mg/mL 对比二者对 DPPH 自由基的清除率, 结果表明, 在相同的浓度范围内硫酸化后的清除率高于原多糖。

硫酸化后抗氧化活性增强的原因可能有: (1) 多糖硫酸化过程中发生水解, 导致糖苷键断裂相对分子质量变小, 多糖空间位阻减小, 增强了多糖与自由基的结合能力; (2) 硫酸酯带有具负电荷的硫酸基团, 对 Fe^{2+} 的结合能力增大, 从而抑制活性氧自由基的生成; (3) 硫酸基团之间的相互排斥作用, 能使糖分子卷曲的构象伸展变得刚性, 暴露出更多的羟基, 提高供氢能力; (4) 硫酸基可能与糖环上的羟基形成氢键, 使糖链局部形成高级螺旋结构, 具有更高的活性。提示, 硫酸化后的百合多糖抗氧化活性明显增强, 有望开发抗氧化产品。

3.3 发酵

发酵历史由来已久, 六神曲由辣蓼、青蒿、杏仁泥、赤小豆、鲜苍耳加入面粉或麸皮后发酵而成。现代通过发酵技术制备发酵虫草菌粉、灵芝菌粉、青霉素、氨基酸等, 可见发酵在制药领域应用广泛。从体内代谢来看, 发酵过程好比化合物在肠道内的代谢, 肠道作为机体最大的代谢器官, 黏膜上定植数以千计的微生物, 化合物通过微生物的代谢, 分解为易被机体吸收的小分子结构, 如糖苷水解为苷元。多聚糖在这一过程中能够水解为相对分子质量更小的不同类型的低聚糖发挥生物活性。

Song 等^[20]通过植物乳酸菌发酵兰州百合获得一发酵多糖 LPF-W, 与未发酵的兰州百合多糖 LP-W 相比, 发酵后 LPF-W 为葡聚糖, 而 LP-W 是杂多糖, 由 Glu 和 Man 按 1.56:1 的比例构成。LPF-W 的相对分子质量由 4334 变为 1684。LP-W 中存在的糖苷键为 β -1 $\rightarrow$ 4 连接的 Glu 和 α -1 $\rightarrow$ 4 连接的 Man, LPF-W 的为 α -1 $\rightarrow$ 4、1 $\rightarrow$ 4,6 连接的 Glu (图 3)。在

生物学活性上,体外对比二者在 0.1~10.0 mg/mL 的抗氧活性。结果显示,LPF-W 对 DPPH 自由基、超氧自由基的清除率大于 LP-W,而对羟基自由基的清除率则弱于 LP-W。

结构的变化导致物理性质和生物学活性上的变化。乳酸菌分泌的葡萄糖苷酶直接导致多糖的降解,乳酸、酒石酸等其他酸性代谢物可能会间接造成多糖的水解,从而导致多糖化学性质的变化。发酵后相对分子质量降低,空间位阻变小,黏度降低,溶解度变大,认为低分子多糖有更多的还原性羟基末端,表现出更强的抗氧活性。对羟基自由基的清除率降低,可能是因为发酵后多糖的供氢作用减弱,多糖链上的氢原子和羟基自由子结合生成水的能力降低。

4 结语与展望

研究百合多糖的化学结构有助于从微观角度阐述此类多糖为什么能发挥作用,不同的结构特征为什么活性不同。多糖的一级结构中相对分子质量、单糖组成以及比例、化学结构都与生物学活性显著相关,链构象的改变必然影响多糖的药效,研究多糖的构效关系具有重要意义,但是目前仍存在些许问题。(1)当前关于百合多糖结构的研究大部分集中于一级和二级结构的研究,对于三、四级高级结构的研究还不够深入。多糖在溶液中的构象是影响活性的重要原因。灵芝中获得的 β -葡聚糖,发现在水溶液中呈三股螺旋刚性链的 GLP20 抗炎活性更高;另一呈无规则弯曲构象的,能够显著增强免疫^[53]。香菇多糖中获得的三螺旋 β -葡聚糖,在溶液中呈现出一种弯曲的蠕虫状构象,能够特异性的和细胞膜上的识别受体 dectin-1 蛋白结合^[54]。当前关于百合多糖构象和活性的关系还未见报道,这极大制约了多糖构效关系的研究,也制约了百合多糖的开发利用。百合多糖高级结构的研究,是未来研究的重点方向。(2)百合多糖结构和药理活性之间关系还不清楚,需要加强构效关系以及作用机制的研究。(3)模型问题。当前百合单一多糖的活性研究多采用体外模型,体内研究较少,体内存在内环境、微生物等多种因素的干扰,体外实验不能准确反应药物对机体的作用。多糖类成分入血困难,研究认为多糖的作用靶点可能为肠道菌群,对于多糖的药效及其作用机制,在传统生物学技术的基础上,可结合代谢组、转录组、肠道微生物组等生物信息学的技术,点面结合从整体观进行较为全面的研究。

硒化多糖作为一种有机硒试剂,有望成为膳食补充剂和免疫增强剂,但是当前关于硒化百合多糖进一步的研究还很少,需要进一步完善。(1)硒化多糖合成过程中,往往采用硒酸盐作为硒元素的来源,寻找一种有机硒载体作为来源,是提高硒化多糖质量的良好设想。(2)传统认为通过有机合成的化合物往往具有一定毒性,且当前关于硒化百合多糖的毒理、作用机制、代谢途径的研究报道尚无,这是当前需要重点解决的一个重点。(3)已有因摄入亚硒酸钠、二氧化硒、四氧硒酸钠、硒酸等无机硒试剂中毒的报道,严重的甚至死亡^[55]。百合多糖已被证实无细胞毒性^[56],但是硒化后的百合多糖高剂量(200~800 μ g/mL)使用具有一定的细胞毒性^[43,57],虽然与有机硒相比无机硒毒性小,其原因可能是多糖本身所具有减毒功效,但是否会存在药效积累产生慢性损伤目前还缺乏相关研究,需要增添安全性评价以及质量控制研究。

硫酸化后的多糖具有显著抗艾滋病作用,是原多糖不具备的,有望成为抗逆转录病毒活性的多糖制剂。此外,硫酸化后的多糖,具有同肝素类似的抗凝血作用,而且没有抗血小板的不良反应,有望成为肝素的替代药。当前硫酸酯化多糖的合成多采用硫酸-吡啶法,吡啶是一种剧毒有机化合物,而且合成过程中存在重复性不高、多糖易降解等问题,需要研发一种高效环保的合成方法。此外,目前关于硫酸化多糖的报道多见于藻类多糖,在百合多糖中的研究较少,尤其还未见在免疫、抗肿瘤和作用机制、体内代谢、生物利用度方面的报道,在未来的研究中,可以朝着硫酸化百合多糖的药理作用、构效和功效之间的联系发展。

通过发酵技术能研究不同的菌种对多糖结构的影响,不同肠道菌群之间的相互作用,以及模拟多糖在肠道内的降解。体外发酵利用微生物的代谢作用,能够提高中药活性成分药性、提高生物利用度、降低毒副作用、为化合物的结构修饰提供新途径,是一种节能环保、高效可持续的制药方法。此外,生物酶具有专一性,能够根据需求改变某些特定结构,生产人们所需要的产物。近年来,发酵百合的报道见于多种益生菌保健食品,关于发酵后对百合多糖结构和活性的影响报道较少,还需要加强对物质基础和作用机制的研究。相信随着绿色生物制造技术的发展,多糖发酵产品会在未来大健康产业中占有重要的一席之地。

百合为中国传统药食两用药材,有悠久的用药历程,并且资源广泛。随着现代技术的发展,百合食补、治病的机制已逐渐被阐明,多糖作为百合中一类重要的活性物质,已经成为研究热点,具有广阔的开发前景。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 唐林, 李莉, 孙贤庆, 等. 百合炮制历史沿革考证及可视化分析 [J]. 时珍国医国药, 2021, 32(11): 2668-2672.
- [2] 周祯祥, 唐德才. 临床中药学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2016: 266-267.
- [3] 张廷模. 临床中药学 [M]. 第 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 320-321.
- [4] 胡兆东, 田硕, 苗艳艳, 等. 百合的现代化学、药理及临床应用研究进展 [J]. 中药药理与临床, 2022, 38(4): 241-246.
- [5] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 137.
- [6] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第十四卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1980: 116-118.
- [7] 张卫, 王嘉伦, 张志杰, 等. 经典名方药用百合本草考证 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(22): 5007-5011.
- [8] 王昌华, 舒抒, 银福军, 等. 药用百合正源考证研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(8): 1732-1736.
- [9] 张晓莉. 不同品种百合及其内外鳞片多糖含量的分析 [J]. 现代食品, 2021(3): 195-197.
- [10] 杨郑州, 韦敏珍, 谢晓娜. 不同品种百合中皂苷和多糖的含量测定 [J]. 轻工科技, 2017, 33(8): 41-42.
- [11] 陈小蒙. 水溶性龙牙百合多糖的纯化、一级结构及其生物活性研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2008.
- [12] 潘桂芳. 卷丹百合多糖的提取纯化、结构分析及其免疫活性研究 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2017.
- [13] Xu Z, Wang H D, Wang B L, *et al.* Characterization and antioxidant activities of polysaccharides from the leaves of *Lilium lancifolium* Thunb [J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 92: 148-155.
- [14] 朱泉. 百合多糖分离纯化、结构鉴定及其生物活性研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- [15] Chen Z G, Zhang D N, Zhu Q, *et al.* Purification, preliminary characterization and *in vitro* immunomodulatory activity of tiger lily polysaccharide [J]. *Carbohydr Polym*, 2014, 106: 217-222.
- [16] 李雅琳. 西藏卷丹多糖分离纯化、结构分析及其活性研究 [D]. 拉萨: 西藏大学, 2021.
- [17] Pan G F, Xie Z W, Huang S X, *et al.* Immune-enhancing effects of polysaccharides extracted from *Lilium lancifolium* Thunb [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 52: 119-126.
- [18] Gao J, Zhang T, Jin Z Y, *et al.* Structural characterisation, physicochemical properties and antioxidant activity of polysaccharide from *Lilium lancifolium* Thunb [J]. *Food Chem*, 2015, 169: 430-438.
- [19] Li W M, Wang Y J, Wei H L, *et al.* Structural characterization of Lanzhou lily (*Lilium davidii* var. *unicolor*) polysaccharides and determination of their associated antioxidant activity [J]. *J Sci Food Agric*, 2020, 100(15): 5603-5616.
- [20] Song S, Liu X Y, Zhao B T, *et al.* Effects of *Lactobacillus plantarum* fermentation on the chemical structure and antioxidant activity of polysaccharides from bulbs of Lanzhou lily [J]. *ACS Omega*, 2021, 6(44): 29839-29851.
- [21] Hui H P, Li X Z, Jin H, *et al.* Structural characterization, antioxidant and antibacterial activities of two heteropolysaccharides purified from the bulbs of *Lilium davidii* var. *unicolor* Cotton [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 133: 306-315.
- [22] 张继. 兰州百合多糖结构及应用研究 [EB/OL]. [2022-04-20]. <http://cnki.scstl.org/KCMS/detail/detail.aspx?filename=SNAD000001469280&dbcode=SNAD>.
- [23] Wang F X, Wang W, Niu X B, *et al.* Isolation and structural characterization of a second polysaccharide from bulbs of Lanzhou lily [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2018, 186(3): 535-546.
- [24] 惠和平, 金辉, 杨晓燕, 等. 兰州百合多糖 BHP-1 的化学结构与形貌分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(8): 170-175.
- [25] Hui H P, Jin H, Li X Z, *et al.* Purification, characterization and antioxidant activities of a polysaccharide from the roots of *Lilium davidii* var. *unicolor* Cotton [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 135: 1208-1216.
- [26] Hui H P, Xin A Y, Cui H Y, *et al.* Anti-aging effects on *Caenorhabditis elegans* of a polysaccharide, O-acetyl glucomannan, from roots of *Lilium davidii* var. *unicolor* Cotton [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 155: 846-852.
- [27] Zhang J, Gao Y X, Zhou X J, *et al.* Chemical characterisation of polysaccharides from *Lilium davidii* [J]. *Nat Prod Res*, 2010, 24(4): 357-369.
- [28] Sun X, Gao R L, Xiong Y K, *et al.* Antitumor and immunomodulatory effects of a water-soluble polysaccharide from *Lilii bulbis* in mice [J]. *Carbohydr Polym*, 2014, 102: 543-549.
- [29] 王兆梅, 李琳, 郭祀远, 蔡妙颜. 活性多糖构效关系研究评述 [J]. 现代化工, 2002, 22(8): 18-21.
- [30] 聂凌鸿, 宁正祥. 活性多糖的构效关系 [J]. 林产化学与工业, 2003, 23(4): 89-94.
- [31] Zou M Y, Nie S P, Yin J Y, *et al.* Ascorbic acid induced degradation of polysaccharide from natural products: A

- review [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 151: 483-491.
- [32] Chen X Y, Sun-Waterhouse D, Yao W Z, *et al.* Free radical-mediated degradation of polysaccharides: Mechanism of free radical formation and degradation, influence factors and product properties [J]. *Food Chem*, 2021, 365: 130524.
- [33] Ferreira S S, Passos C P, Madureira P, *et al.* Structure-function relationships of immunostimulatory polysaccharides: A review [J]. *Carbohydr Polym*, 2015, 132: 378-396.
- [34] 张宗启, 吴天祥, 刘力萍. 灰树花多糖结构特点及其生物活性研究进展 [J]. *中国酿造*, 2018, 37(5): 10-16.
- [35] Fiorito S, Epifano F, Preziuso F, *et al.* Selenylated plant polysaccharides: A survey of their chemical and pharmacological properties [J]. *Phytochemistry*, 2018, 153: 1-10.
- [36] Cheng L Z, Wang Y F, He X X, *et al.* Preparation, structural characterization and bioactivities of Se-containing polysaccharide: A review [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 120(Pt A): 82-92.
- [37] Navarro-Alarcon M, Cabrera-Vique C. Selenium in food and the human body: A review [J]. *Sci Total Environ*, 2008, 400(1/2/3): 115-141.
- [38] 杨文. 三种多糖的硒化修饰、结构表征及体外抑制肿瘤细胞的研究 [D]. 兰州: 西北师范大学, 2017.
- [39] Zhu S Y, Hu J H, Liu S, *et al.* Synthesis of Se-polysaccharide mediated by selenium oxychloride: Structure features and antiproliferative activity [J]. *Carbohydr Polym*, 2020, 246: 116545.
- [40] Wei D F, Chen T, Yan M F, *et al.* Synthesis, characterization, antioxidant activity and neuroprotective effects of selenium polysaccharide from *Radix Hedysari* [J]. *Carbohydr Polym*, 2015, 125: 161-168.
- [41] Yuan B, Yang X Q, Kou M, *et al.* Selenylation of polysaccharide from the sweet potato and evaluation of antioxidant, antitumor, and antidiabetic activities [J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(3): 605-617.
- [42] Zhan Q P, Chen Y, Guo Y F, *et al.* Effects of selenylation modification on the antioxidative and immunoregulatory activities of polysaccharides from the pulp of *Rose laevigata* Michx fruit [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 206: 242-254.
- [43] Li S X, Bao F Y, Cui Y. Immunoregulatory activities of the selenylated polysaccharides of *Lilium davidii* var. *unicolor* Salisb *in vitro* and *in vivo* [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 94: 107445.
- [44] Hou R R, Chen J, Yue C J, *et al.* Modification of lily polysaccharide by selenylation and the immune-enhancing activity [J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 142: 73-81.
- [45] 谢明勇, 王之珺, 谢建华. 多糖的硫酸化修饰及其结构与生物活性关系研究进展 [J]. *中国食品学报*, 2015, 15(2): 1-8.
- [46] 滕浩, 李雪影, 孙卉, 等. 天然多糖的硫酸化修饰对其生物活性影响研究进展 [J]. *食品工业科技*, 2019, 40(6): 298-302.
- [47] 方积年. 硫酸酯化多糖的研究进展 [J]. *中国药理学杂志*, 1993, 28(7): 393-395.
- [48] 卢可可, 张月巧, 袁娅, 等. 硫酸化修饰多糖抗肿瘤活性构效关系及分子机制研究进展 [J]. *食品科学*, 2014, 35(23): 297-302.
- [49] Wang Z J, Xie J H, Shen M Y, *et al.* Sulfated modification of polysaccharides: Synthesis, characterization and bioactivities [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2018, 74: 147-157.
- [50] Bedini E, Laezza A, Parrilli M, *et al.* A review of chemical methods for the selective sulfation and desulfation of polysaccharides [J]. *Carbohydr Polym*, 2017, 174: 1224-1239.
- [51] 高清雅. 兰州百合无硫干制及废弃鳞茎中多糖的提取、硫酸化修饰研究 [D]. 兰州: 西北师范大学, 2015.
- [52] 黄玉龙, 赵保堂, 宋坤, 等. 兰州百合多糖硫酸酯的制备及其抗氧化活性的测定 [J]. *中国酿造*, 2016, 35(6): 122-127.
- [53] 刘艳芳, 唐庆九, 张劲松, 等. 灵芝 β -葡聚糖的分离纯化及结构构象表征和免疫调节活性研究 [A] // 中国食品科学技术学会第十七届年会摘要集 [C]. 西安: 中国食品科学技术学会, 2020: 189-190.
- [54] 吴修聪. 香菇多糖的三螺旋结构及其与 dectin-1 蛋白结合作用的计算机分子动力学模拟及实验验证 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2020.
- [55] Hadrup N, Ravn-Haren G. Acute human toxicity and mortality after selenium ingestion: A review [J]. *J Trace Elem Med Biol*, 2020, 58: 126435.
- [56] 余红钢, 王蓉, 郑耀奇, 等. MTT 法测定百合多糖细胞毒性的研究 [J]. *科技信息*, 2010(36): 1-2.
- [57] 于蕾, 李传迪, 东方, 等. 硒多糖的药理活性研究进展 [J]. *中国医药导报*, 2022, 19(1): 52-55.

[责任编辑 崔艳丽]