

罗汉果根多糖的分离纯化及免疫活性研究

张洁^{1,2}, 张巧玲^{1,2}, 卢凤来², 宋静茹², 刘宏伟^{1*}, 蒋小华^{2*}

1. 沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016

2. 广西植物功能物质与资源持续利用重点实验室, 广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所, 广西 桂林 541006

摘要: 目的 从罗汉果 *Siraitia grosuenorii* 根中分离纯化多糖组分, 初步分析其结构特征并研究其免疫调节作用。方法 干燥罗汉果根经 95%乙醇脱脂, 用 70 °C 水提醇沉得到粗多糖, 再经 Cellulose DE-52 纤维素阴离子交换柱、Sephadex LH-20 凝胶柱分离纯化, 得到均一多糖 LGP-A。采用高效凝胶渗透色谱法 (high performance gel permeation chromatography, HPGPC) 与 PMP 柱前衍生化法测定其相对分子质量和单糖组成; 通过傅里叶红外光谱 (FT-IR)、核磁共振波谱 (NMR)、刚果红实验、扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) 等方法对 LGP-A 的初步结构进行分析。利用 CCK 法、ELISA 试剂盒、中性红实验对 RAW264.7 细胞的增殖、一氧化氮 (NO)、白介素-6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 及吞噬能力进行检测, 评价 LGP-A 的免疫活性。结果 LGP-A 的相对分子质量为 1.83×10^6 , 主要由半乳糖 (Galp, 51.23%) 和阿拉伯糖 (Araf, 44.68%) 组成。红外光谱及核磁共振波谱对其结构分析证明, LGP-A 可能主要含有 T- α -L-Araf(A)、 $\rightarrow$ 3)- α -L-Araf(1 $\rightarrow$ (B)、 $\rightarrow$ 5)- α -L-Araf(1 $\rightarrow$ (C)、 $\rightarrow$ 3,5)- α -L-Araf(1 $\rightarrow$ (D)、 $\rightarrow$ 3)- β -D-Galp(1 $\rightarrow$ (E)、 $\rightarrow$ 3,6)- β -D-Galp(1 $\rightarrow$ (F)、 $\rightarrow$ 6)- β -D-Galp(1 $\rightarrow$ (G) 和 $\rightarrow$ 3)- α -D-Galp(1 $\rightarrow$ (H) 片段。质量浓度在 0.625~5.0 μ g/mL 时, LGP-A 能促进 RAW264.7 细胞的增殖, 并能明显促进细胞分泌 NO、IL-6 和 TNF- α , 提高细胞吞噬率, 表明 LGP-A 具有显著的免疫调节活性。结论 LGP-A 是从罗汉果根中得到的天然均一多糖, 其初步结构和活性的研究为罗汉果根资源的开发提供了一定的依据。

关键词: 罗汉果; 天然多糖; 分离纯化; 单糖组成; 免疫活性

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2024)04-1100-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.04.005

Isolation, purification and immunomodulatory activity of polysaccharides from roots of *Siraitia grosuenorii*

ZHANG Jie^{1,2}, ZHANG Qiaoling^{1,2}, LU Fenglai², SONG Jingru², LIU Hongwei¹, JIANG Xiaohua²

1. School of Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang, 110016, China.

2. Guangxi Key Laboratory of Plant Functional Phytochemicals and Sustainable Utilization, Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, China

Abstract: Objective To isolate and purify the main polysaccharide components from roots of *Siraitia grosuenorii* and preliminarily analyze its structural characteristics and immunomodulatory effects. **Methods** The crude polysaccharides of *S. grosuenorii* roots was degreased with 95% ethanol and extracted by hot water. The Cellulose DE-52 and Sephadex LH-20 columns were used to separate and purify homogeneous polysaccharides (LGP-A). The relative molecular mass and monosaccharide composition were analyzed by high-performance gel permeation chromatography (HPGPC) and PMP pre-column derivatization, and the structures of LGP-A were preliminarily identified by FT-IR, NMR, Congo red test and scanning electron microscope (SEM). The CCK-8, ELISA kit and neutral red colorimetric assay were utilized to determine the proliferation and phagocytic ability and the

收稿日期: 2023-10-12

基金项目: 广西科技重大专项 (桂科 AA23023035); 广西科技重大专项 (桂科 AA22096020); 广西科技基地和人才专项 (桂科 AA21196009); 桂林市创新平台和人才计划 (20210102-3, 20220120-3)

作者简介: 张洁 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向为天然产物研究。E-mail: 2078561998@qq.com

*通信作者: 刘宏伟 (1974—), 男, 研究员, 研究方向为高等真菌及其共寄生真菌活性次级代谢产物高效发现、生物合成和成药性研究。

E-mail: liuhw@im.ac.cn

蒋小华 (1977—), 女, 助理研究员, 研究方向为天然产物研究与开发利用。E-mail: jxh0126@foxmail.com

release levels of IL-6, NO, and TNF- α of RAW 264.7 cells, respectively to evaluate the immunomodulatory activity of LGP-A. **Results** LGP-A, with molecular weight of 1.83×10^6 , was mainly composed of galactose (Galp, 51.23%) and arabinose (Araf, 44.68%). The structure analysis of LGP-A by IR and NMR verified that LGP-A might mainly contained T- α -L-Araf (A), $\rightarrow 3$)- α -L-Araf-(1 $\rightarrow$ (B), $\rightarrow 5$)- α -L-Araf-(1 $\rightarrow$ (C), $\rightarrow 3,5$)- α -L-Araf-(1 $\rightarrow$ (D), $\rightarrow 3$)- β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ (E), $\rightarrow 3,6$)- β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ (F), $\rightarrow 6$)- β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ (G), and $\rightarrow 3$)- α -D-Galp-(1 $\rightarrow$ (H). At the concentration of 0.625—5.0 μ g/mL, LGP-A promoted the proliferation of RAW 264.7 cells, significantly induced the secretion of NO, IL-6 and TNF- α , improved the phagocytic ability, thus exerting significant immunomodulatory effects. **Conclusion** LGP-A is a kind of natural homogeneous polysaccharides isolated from roots of *S. grosvenorii*. Structural characterization and immunomodulatory activity of LGP-A provided the significant reference for the further development of root resources of *S. grosvenorii*.

Key words: *Siraitia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffrey ex A. M. Lu et Z. Y. Zhang; natural polysaccharide; isolation and purification; monosaccharide component; immunomodulatory activity

罗汉果 *Siraitia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffrey ex A. M. Lu et Z. Y. Zhang 为葫芦科罗汉果属藤本植物, 主要分布于我国西南地区, 其果实为广西的道地药材。罗汉果始载于《岭南采药录》, 1987 年被国家卫生部列为首批药食同源中药材, 其果实为常用的药用部位, 具有止咳化痰、润肠通便等功效。罗汉果块根肥大, 味苦、性微寒^[1], 民间用于治顽癣、痈肿、疮疖等, 具有葫芦烷型四环三萜、多糖等活性成分^[2-3]。然而, 有关罗汉果根的化学成分及药理活性研究明显不足, 导致其未得到充分利用, 每年有大量的根被丢弃, 造成极大的资源浪费。

现代研究表明多种植物多糖具有双向调节的免疫作用, 一定浓度范围的多糖可以增强机体的非特异性免疫和特异性免疫^[4]。巨噬细胞是机体非特异性免疫的重要组成部分, 在炎症反应和宿主防御中发挥着重要作用。已有报道表明罗汉果的果实多糖具有抗氧化、保护糖尿病肾病小鼠、增强免疫功能等作用^[3, 5-6], 而对根多糖的研究较少。本课题组前期通过动物实验发现罗汉果根粗多糖可以增加小鼠胸腺器官指数, 推测其具有免疫调节的潜力^[3]。本实验通过提取与分离纯化, 从罗汉果根中获得均一多糖并进行了初步的结构分析, 同时采用巨噬细胞研究其免疫调节活性, 为罗汉果根多糖的开发利用提供了新的研究思路与技术储备。

1 材料

1.1 主要材料与试剂

罗汉果根采自广西壮族自治区桂林市永福县, 经卢凤来副研究员鉴定为葫芦科罗汉果属植物罗汉果 *S. grosvenorii* (Swingle) C. Jeffrey 的块根。对照品 D-无水葡萄糖 (批号 MUST-22030214, 质量分数 > 99%)、D-甘露糖 (批号 MUST-23012802, 质量分数 > 99%)、D-核糖 (批号 MUST-23021307, 质量

分数 > 98%)、D-葡萄糖醛酸 (批号 MUST-23021309, 质量分数 > 98%)、L-鼠李糖 (批号 MUST-22061104, 质量分数 > 99%)、D-半乳糖醛酸 (批号 MUST-23021308, 质量分数 > 98%)、D-半乳糖 (批号 MUST-22061105, 质量分数 > 98%)、DL-阿拉伯糖 (批号 MUST-22022819, 质量分数 > 98%), 购自成都曼斯特生物科技有限公司; 标准品右旋糖酐系列 D0 (批号 140637-201203)、D1 (批号 140638-201203)、D2 (批号 140639-201203)、D3 (批号 140640-201203)、D4 (批号 140641-201203)、D5 (批号 140642-201203)、D6 (批号 140643-201203)、D7 (批号 140644-201203)、D8 (批号 140645-201203)、D2000 (批号 140646-201203), 相对分子质量 (M_w) 分别为 180、2 500、4 600、7 100、 1.0×10^4 、 2.14×10^4 、 4.11×10^4 、 8.44×10^4 、 1.338×10^5 、 2.0×10^6 , 购自中国食品药品检定研究院; CCK-8 检测试剂盒、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 检测试剂盒和白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 检测试剂盒 (Elsabscience 公司); 一氧化氮 (NO) 检测试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司), HPD100 大孔吸附树脂 (赛谱锐思 (北京) 科技有限公司); DEAE-52 纤维素 (上海源叶生物科技有限公司); Sephadex LH-20 凝胶 (美国 GE 公司); MD55 透析袋 [赛谱锐思 (北京) 科技有限公司]; 其他试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器与设备

Waters 515 型液相色谱仪 (配置 Waters 2410 示差检测器, Waters 公司); LC-2030C 型液相色谱仪 (日本岛津公司); Nicolet 傅里叶红外光谱仪 (美国 Thermo Fisher 公司); Bruker Avance500MHz 超导核磁共振波谱仪 (德国 Bruker 公司); ALPHA1-2LD PLU 冷冻干燥机 (北京博励行仪器有限公司);

SP-756P 型紫外可见分光光度计 (美国 Spectrum 公司); Zeiss EVO18 型扫描电子显微镜 (德国 Zeiss 公司); Spark 酶标仪 (瑞士 Tecan 公司); BSP-150 型生化培养箱 (上海博讯医疗生物仪器股份有限公司); 5% CO₂ 细胞培养箱 (美国 Thermo Forma 公司); Dmi1 倒置相差显微镜 (美国徕卡公司)。

2 方法

2.1 罗汉果根多糖的分离纯化

取 500 g 干燥的罗汉果根块粉碎过 20 目筛, 加入 10 倍量的 95%乙醇溶液回流脱脂 (2 h、2 次), 残渣干燥后, 加入 4 倍量的水于 70 °C 水浴中加热回流提取 (4 h、2 次)。提取液滤过后, 合并滤液, 55 °C 真空浓缩至原体积的 1/4, 过 AB-8 大孔树脂脱色, 水洗部分浓缩, 加入 4 倍体积的 95%乙醇溶液进行沉淀, 4 °C 静置 12 h, 4 000 r/min 离心 10 min, 得到粗多糖 LGP。LGP 加水溶解, 采用 Sevage 法^[7]脱蛋白, 重复 5 次, 直至无明显蛋白质为止。脱蛋白后的 LGP 依次用 30%、50%、70%、90%乙醇进行分级醇沉, 分别得到 LGP1~LGP4。将 70%醇沉部位 LGP3 溶解上 DEAE-52 柱 (42 cm×2.1 cm), 依次用水和 0.05、0.1、0.15、0.3、0.5 mol/L 氯化钠梯度洗脱, 体积流量为 1.0 mL/min, 7 min/管收集, 采用苯酚-硫酸法检测吸光度 (*A*) 值, 绘制洗脱曲线, 根据洗脱峰收集组分, 减压浓缩, 透析 (截留相对分子质量 3 000) 后冷冻干燥得粗多糖 LGP3-1~LGP3-6。0.15 mol/L 洗脱组分 LGP3-3 经 Sephadex LH-20 柱 (65 cm×1.4 cm) 纯化, 25%乙醇等度洗脱, 体积流量为 0.5 mL/min。透析后冷冻干燥得罗汉果根多糖 LGP-A。

2.2 LGP-A 结构表征

2.2.1 纯度和相对分子质量的测定 采用紫外全波长扫描的方法检验多糖的纯度。取 2.0 mg 干燥样品溶于纯水中, 配成 0.5 mg/mL 的多糖溶液, 以纯水作为空白对照。在 190~400 nm 进行全波长扫描。

采用高效凝胶色谱法 (high performance gel permeation chromatography, HPGPC) 测定多糖 *M_w*。取干燥 LGP-A、D0、D2、D4、D6、D7、D8、D2000 等葡聚糖标准品, 加水溶解, 配成 1 mg/mL 的溶液, 离心, 液相分析^[8]。HPLC 条件: TSK-gel G5000PW_{XL} 色谱柱 (7.8 mm×30 cm, 10 μm), 流动相为超纯水, 柱温为 30 °C, 体积流量为 0.5 mL/min; RID 10A 型示差检测器, 进样量为 20 μL。以保留时间为横坐标 (*X*), *M_w* 对数为纵坐标 (*Y*) 绘制标准曲线。

计算 LGP-A 的 *M_w*。

2.2.2 单糖组成分析 采用 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (PMP)-柱前衍生 HPLC 测定单糖组成。取多糖样品 1.25 mg, 加 1.25 mL 2 mol/L 的三氟乙酸溶解, 摇匀, 封口, 110 °C 水解 3 h, 冷却后加 2 mL 甲醇, 减压蒸干, 重复 5 次以除去多余的三氟乙酸。取多糖样品和单糖对照品 200 μL, 加 0.5 mol/L 的 PMP-甲醇溶液 200 μL 和 0.3 mol/L 的 NaOH 溶液 200 μL, 于 70 °C 烘箱中避光反应 100 min 进行衍生化。反应结束后, 冷却至室温, 加 0.3 mol/L 盐酸溶液 250 μL, 混匀, 加三氯甲烷萃取 5 次, 弃下层, 除去过量的 PMP, 在 10 000 r/min 离心, 上清液放入 4 °C 保存, 待 HPLC 检测^[9]。

混合单糖对照品溶液制备: 分别吸取已衍生化的 1 mg/mL 的单糖对照品溶液各 10 μL, 混合均匀, 于 4 °C 保存备用。

HPLC 条件: ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-磷酸盐缓冲溶液 (pH 7.2) 15:85; 柱温为 30 °C, 体积流量为 0.8 mL/min, 紫外检测波长为 254 nm, 进样量为 10 μL。

2.2.3 FT-IR 分析 称取干燥 LGP-A 样品 1.5 mg, 干燥溴化钾 150 mg, 于真空干燥器干燥过夜。在红外灯下混合, 研磨均匀, 压片, 在 4 000~400 cm⁻¹ 进行红外扫描。

2.2.4 NMR 分析 取样品 LGP-A 约 25 mg 溶于 0.5 mL D₂O 中, 用 Bruker AVANCE III 500 MHz 超导核磁共振仪测定 1D-NMR (¹H- 和 ¹³C-NMR) 和 2D-NMR (HSQC、¹H-¹H COSY 及 HMBC), 通过 HSQC 对 C-H 进行归属, ¹H-¹H COSY 连接单糖骨架, HMBC 确定糖的连接方式。

2.2.5 刚果红实验 取干燥样品, 加水配成 0.5 mg/mL 的多糖溶液, 与 200 μmol/L 的刚果红溶液混合均匀。加入适量体积 1.0 mol/L 的 NaOH 溶液使其最终浓度分别为 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mol/L。室温避光反应 10 min, 使用紫外分光光度计进行全波长扫描, 以 NaOH 浓度为横坐标 (*X*), 最大吸收波长为纵坐标 (*Y*) 绘制折线图^[10]。

2.2.6 扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) 分析 称取 1.5 mg 干燥样品, 使用热场发射 SEM 来分析 LGP-A 的微观形态。

2.3 LGP-A 对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 免疫作用的影响

2.3.1 RAW264.7 细胞的增殖实验 采用 CCK-8 法

检测多糖对细胞增殖的影响,选取对数生长期的细胞,将其调整为 1×10^5 个/mL 接种于 96 孔板中,在 37°C 、5% CO_2 的条件下培养 24 h。给药组每孔加入不同质量浓度的多糖溶液 (0.625、1.25、2.5、5.0 $\mu\text{g/mL}$)、阳性对照组加入 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 溶液、对照组 (具有细胞) 和背景组 (无细胞) 加入相同体积的完全培养基,每组 3 个复孔,给药后培养 24 h。每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,在 37°C 孵育 45 min,酶标仪 450 nm 下检测 A 值。按下述公式计算细胞增殖率。

$$\text{细胞增殖率} = (A_{\text{给药}} - A_0) / (A_1 - A_0)$$

$A_{\text{给药}}$ 为给药组平均 A 值; A_0 为背景组平均 A 值; A_1 为对照组平均 A 值

2.3.2 RAW264.7 细胞吞噬能力 采用中性红实验检测 RAW264.7 细胞吞噬能力,具体方法参考文献报道^[11],略有改动。

选取对数生长期的细胞,将其调整为 1×10^5 个/mL 接种于 96 孔板中,在 37°C 、5% CO_2 的条件下培养 24 h。给药组每孔加入相同体积不同浓度的多糖溶液 (0.625、1.25、2.5、5 $\mu\text{g/mL}$)、阳性对照组加入 1.0 $\mu\text{g/mL}$ LPS 溶液、对照组加入相同体积的完全培养基,每组 3 个复孔,给药后培养 24 h。弃上清液,磷酸缓冲液 (PBS) 清洗 2 次,每孔加 0.05% 中性红溶液 100 μL 培养 1 h,弃上清液, PBS 清洗 2 次,加细胞裂解液 (冰醋酸-无水乙醇 1:1) 100 μL 室温放置 1 h,酶标仪检测 540 nm 下 A 值。吞噬率采用以下公式进行计算。

$$\text{吞噬率} = A_{\text{给药}} / A_{\text{对照}}$$

2.3.3 RAW264.7 细胞 NO、TNF- α 、IL-6 分泌量 采用 Griess 法检测 LGP-A 对小鼠巨噬细胞 NO 分泌量的影响。细胞培养与给药方法按“2.3.1”项下进行,给药后培养 24 h。取上清液按试剂盒说明书进行操作,采用酶标仪检测 540 nm 下 A 值。

采用 ELISA 法检测 LGP-A 对小鼠巨噬细胞 TNF- α 、IL-6 分泌量的影响。细胞培养、给药方法同上。按试剂盒说明书进行操作,酶标仪检测 450 nm 下 A 值。

3 结果与分析

3.1 LGP-A 分离纯化

罗汉果根干燥粉末经 95% 乙醇脱脂, 70°C 热水提取醇沉、脱蛋白后,浓缩,干燥得罗汉果根粗多糖 LGP,得率为 1.3% (基于罗汉果根原料质量计算)。经不同的乙醇进行分级醇沉,分别得到

LGP1~LGP4。将 70% 醇沉部位 LGP3 上 DEAE-52 纤维离子交换柱,分别用 0.05、0.1、0.15、0.2 和 0.5 mol/L 氯化钠洗脱,采用苯酚-硫酸法检测 A 值并绘制吸收曲线 (图 1-A),得 LGP3-1~LGP3-6。分析后发现 0.15 mol/L 氯化钠洗脱部位 (LGP3-3) 分离度较高,选择该部位继续纯化。经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱进一步纯化,得到 1 个均一的罗汉果根多糖 LGP-A,得率为 0.13% (基于粗多糖质量计算)。

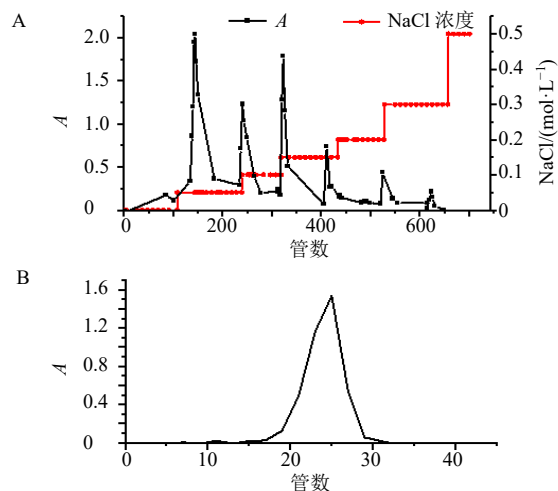


图 1 LGP3 的 DEAE-52 纤维素 (A) 与 Sephadex LH-20 (B) 柱色谱纯化洗脱曲线

Fig. 1 Column chromatography purification elution curves of LGP3 by DEAE-52 (A) and Sephadex LH-20 (B)

3.2 LGP-A 结构表征

3.2.1 纯度和相对分子质量分析 核酸和蛋白质在紫外光谱中的特征吸收峰分别是 260、280 nm,因此通过紫外扫描的方法可以确定多糖中蛋白质、核酸和肽类等杂质的含量。如图 2-A 可看出 LGP-A

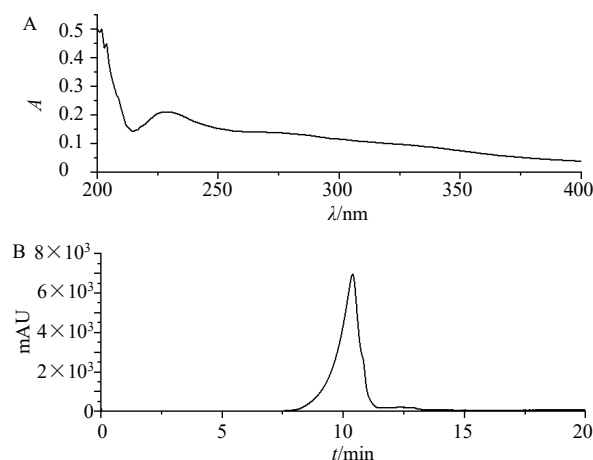
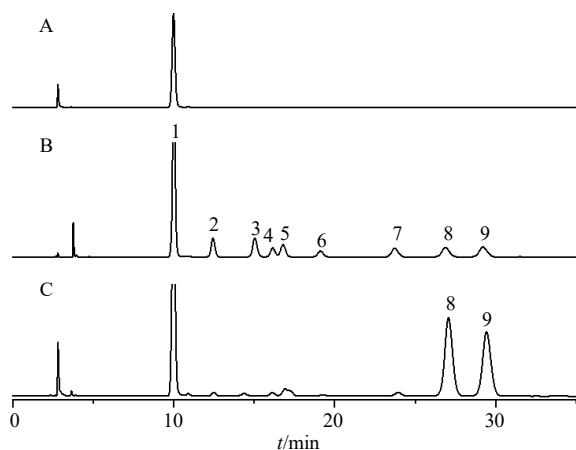


图 2 LGP-A 紫外全波长扫描 (A) 及 M_w 分布 (B)

Fig. 2 UV full wavelength scanning analysis (A) and molecular weight determination of LGP-A (B)

在 230 nm 处存在最大吸收, 在 260~280 nm 未出现明显吸收峰, 表明其不含蛋白质、核酸等杂质。LGP-A 经 HPGPC 法鉴定纯度, 结果显示有一对称性良好的单一色谱峰, 保留时间为 10.386 min (图 2-B), 说明多糖 M_w 分布均一。以已测定 M_w 的葡聚糖对照品保留时间为横坐标 (X), $\lg M_w$ 为纵坐标 (Y), 得葡聚糖对照品回归方程为 $Y = -0.223\ 9\ X + 8.588\ 3$ ($R^2 = 0.978\ 4$), 计算 LGP-A 的 M_w 为 1.83×10^6 。

3.2.2 单糖组成分析 单糖组成分析是多糖的结构表征及生物活性研究必不可少的部分, 对于功能性多糖的质量控制也具有一定的意义。LGP-A 单糖组成分析结果见图 3, 通过与单糖混合对照品进行比较, 推测出 LGP-A 主要由半乳糖、阿拉伯糖组成, 其百分比为 51.23:44.68, 此外还含有微量甘露糖、葡萄糖醛酸等单糖。结果表明, LGP-A 是一种阿拉伯半乳聚糖。



A-空白; B-混合单糖对照品; C-LGP-A; 1-PMP; 2-D-甘露糖; 3-D-核糖; 4-D-葡萄糖醛酸; 5-L-鼠李糖; 6-D-半乳糖醛酸; 7-D-葡萄糖; 8-D-半乳糖; 9-DL-阿拉伯糖。

A-blank; B-mixed standard monosaccharides; C-LGP-A; 1-PMP; 2-D-mannose; 3-D-ribose; 4-D-glucuronic acid; 5-L-rhamnose; 6-D-galacturonic acid; 7-D-glucose; 8-D-galactose; 9-DL-arabinose.

图 3 LGP-A 单糖组成成分分析液相色谱图

Fig. 3 Liquid chromatogram of monosaccharide composition analysis of LGP-A

3.2.3 FT-IR 分析 采用 FT-IR 光谱测定了 LGP-A 在 $4\ 000 \sim 500\ \text{cm}^{-1}$ 的红外吸收光谱, 结果如图 4 所示, 在 $3\ 302.79$ 、 $2\ 929.89\ \text{cm}^{-1}$ 处分别为 O-H 的伸缩振动峰^[12]和 C-H 伸缩振动峰^[13], 是糖类物质的 2 个特征吸收峰; $1\ 645.12\ \text{cm}^{-1}$ 是羧基的 C=O 非对称伸缩振动峰, 说明存在结合水^[14]; $1\ 400 \sim 1\ 200\ \text{cm}^{-1}$ 是 C-H 角变振动峰; $1\ 405\ \text{cm}^{-1}$ 是 C-H 面内弯曲振动峰; $1\ 075$ 、 $1\ 046\ \text{cm}^{-1}$ 是 C-O-C 和 C-O-H 伸缩振

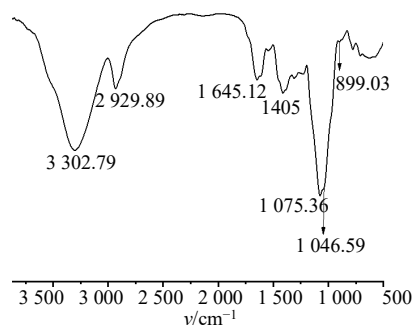


图 4 LGP-A 的 FT-IR 光谱图

Fig. 4 FT-IR spectrum of LGP-A

动和环振动峰重叠而成^[15-16], 说明存在吡喃糖; $899\ \text{cm}^{-1}$ 吸收峰说明存在 β -糖苷键^[17]。

3.2.4 NMR 分析 在 $^1\text{H-NMR}$ 谱中, 通常 α 型糖苷的异头氢化学位移大于 $\delta\ 5.0$, β 型一般小于 $\delta\ 5.0$ ^[18-19], 图 5-a 给出 LGP-A 的 $^1\text{H-NMR}$ 信号, $\delta\ 4.50 \sim 5.39$ 是异头氢信号, 其余的氢信号堆积在 $\delta\ 3.00 \sim 4.30$ 内, 相互交叉重叠。由于存在耦合和裂分, 从 $^1\text{H-NMR}$ 谱中还不能确定异头氢的位置, 需要借助 HSQC 来确定。在 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱中, 糖的异头碳位于较低场, $\delta\ 95 \sim 110$, 此范围内有几个信号, 表示有几种单糖组成, 但是同一种单糖在多糖中的位置比较接近, 几乎重叠^[18,20], 图 5-b 给出 LGP-A 的 $^{13}\text{C-NMR}$, 在 $\delta\ 99 \sim 110$ 是异头碳信号, $\delta\ 84 \sim 60$ 为 LGP-A 单糖残基 $\text{C}_2 \sim \text{C}_6$ 信号位移的重叠。结合 LGP-A 的 HSQC 谱 (图 5-d), 可以清晰地找到 8 个异头氢和异头碳的耦合信号, 分别为 A: $\text{C}_1\text{-H}_1$ ($109.3/5.26$)、B: $\text{C}_1\text{-H}_1$ ($108.0/5.39$)、C: $\text{C}_1\text{-H}_1$ ($107.5/5.09$)、D: $\text{C}_1\text{-H}_1$ ($107.2/5.21$)、E: $\text{C}_1\text{-H}_1$ ($103.7/4.69$)、F: $\text{C}_1\text{-H}_1$ ($103.3/4.52$)、G: $\text{C}_1\text{-H}_1$ ($102.8/4.54$)、H: $\text{C}_1\text{-H}_1$ ($99.5/5.01$)。结合单糖组成分析可以初步判断 LGP-A 中主要以 α 糖苷键连接的呋喃型阿拉伯糖和 β 糖苷键连接的吡喃型半乳糖构成。结合文献报道^[21-23] $\delta\ 109.3/5.26$ 、 $108.0/5.39$ 、 $107.5/5.09$ 、 $107.2/5.21$ 是 $\alpha\text{-L-Araf}$ 的信号; 而 $\delta\ 103.7/4.69$ 、 $103.3/4.52$ 、 $102.8/4.54$ 是 $\beta\text{-D-Galp}$ 的信号, $\delta\ 99.5/5.01$ 是 $\alpha\text{-D-Galp}$ 的信号, 具体数据见表 1。

以残基 A 为例, $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY 谱中显示的相关信号有 $\delta_{\text{H}}\ 5.26/\delta_{\text{H}}\ 4.23$ 、 $\delta_{\text{H}}\ 4.23/\delta_{\text{H}}\ 3.97$ 、 $\delta_{\text{H}}\ 3.97/\delta_{\text{H}}\ 4.14$ 、 $\delta_{\text{H}}\ 4.14/\delta_{\text{H}}\ 3.83$ 、 $\delta_{\text{H}}\ 4.14/\delta_{\text{H}}\ 3.73$, 分别为 A 残基 $\text{H}_1\text{-H}_2$ 、 $\text{H}_2\text{-H}_3$ 、 $\text{H}_3\text{-H}_4$ 、 $\text{H}_4\text{-H}_{5a}$ 、 $\text{H}_4\text{-H}_{5b}$ 的相关信号, 表明 A 残基的 $\text{H}_2 \sim \text{H}_5$ 化学位移分别为 $\delta_{\text{H}}\ 4.23$ 、 3.97 、 4.14 、 3.83 、 3.73 。此外, 根据 HSQC

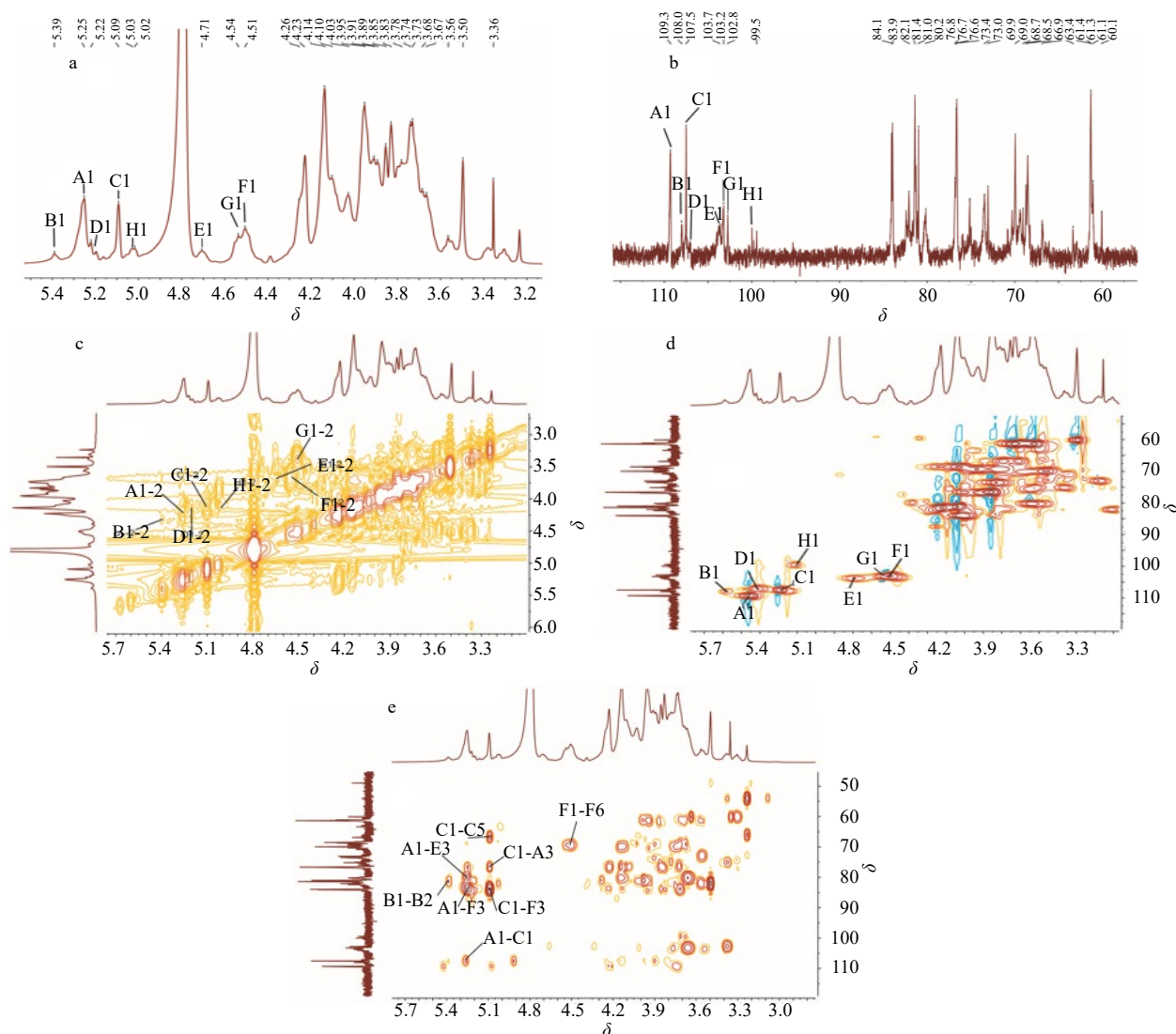


图 5 LGP-A 的 ^1H NMR (a)、 ^{13}C NMR (b)、 ^1H - ^1H COSY (c)、HSQC (d) 和 HMBC (e) 谱
Fig. 5 ^1H -NMR (a), ^{13}C -NMR (b), ^1H - ^1H COSY (c), HSQC (d) and HMBC (e) spectra of LGP-A

表 1 罗汉果根多糖 LGP-A 的核磁数据
Table 1 ^{13}C -NMR and ^1H -NMR data of LGP-A

糖基残基	$\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$					
	C-1/H-1	C-2/H-2	C-3/H-3	C-4/H-4	C-5/H-5a, 5b	C-6/H-6a, 6b
T- α -L-Araf (A)	109.3/5.26	81.4/4.23	76.6/3.97	83.9/4.14	61.4/3.73, 3.83	
$\rightarrow 3$)- α -L-Araf-(1 $\rightarrow$ (B)	108.0/5.39	81.3/4.22	83.9/3.95	82.1/4.25	61.3/3.73, 3.83	
$\rightarrow 5$)- α -L-Araf-(1 $\rightarrow$ (C)	107.5/5.09	81.0/4.14	76.7/3.96	84.1/4.10	66.9/3.80, 3.89	
$\rightarrow 3,5$)- α -L-Araf-(1 $\rightarrow$ (D)	107.2/5.21	81.4/4.14	84.1/4.10	82.1/3.91	66.9/3.81, 3.89	
$\rightarrow 3$)- β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ (E)	103.7/4.69	73.0/3.70	80.2/3.74	69.0/3.90	76.8/3.96	61.3/3.73, 3.83
$\rightarrow 3,6$)- β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ (F)	103.3/4.52	73.0/3.66	83.9/3.95	68.5/4.14	73.5/3.94	69.9/3.66, 3.77
$\rightarrow 6$)- β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ (G)	102.8/4.54	73.0/3.38	73.5/3.90	69.9/3.77	75.3/4.15	69.9/3.66, 3.77
$\rightarrow 3$)- α -D-Galp-(1 $\rightarrow$ (H)	99.5/5.01	68.5/4.13	80.2/3.74	70.3/3.81	73.0/3.67	61.1/3.73, 3.83

谱图可以看到 δ 5.26/109.3、4.23/81.4、3.97/76.6、4.14/83.9、3.83、3.73/61.4 的交叉峰,由此推断出 A 残基的 C₂~C₅ 化学位移分别为 81.4、76.6、83.9、61.4。结合文献报道^[21-22,24]中残基化学位移信息可推断残基 A 为阿拉伯糖残基,其连接方式为 T- α -L-Araf。采用以上方法及参考文献数据^[21-22, 24-27]对其余 7 个糖残基的其余信号进行归属如下: $\rightarrow$ 3)- α -L-Araf-(1 $\rightarrow$ (B)、 $\rightarrow$ 5)- α -L-Araf-(1 $\rightarrow$ (C)、 $\rightarrow$ 3,5)- α -L-Araf-(1 $\rightarrow$ (D)、 $\rightarrow$ 3)- β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ (E)、 $\rightarrow$ 3,6)- β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ (F)、 $\rightarrow$ 6)- β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ (G)、 $\rightarrow$ 3)- α -D-Galp-(1 $\rightarrow$ (H)。8 种残基的化学位移值归纳如表 1 所示。

根据 HMBC 光谱确认相邻糖基残基之间的糖苷键,在 LGP-A 的 HMBC 光谱(图 5-e)中, δ 69.9/4.52 处的交叉峰代表 $\rightarrow$ 3,6)- β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ (F)的 C-6 和 $\rightarrow$ 3,6)- β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ (F)的 H-1 相关; δ 69.9/4.54 处的交叉峰代表 $\rightarrow$ 6)- β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ (G)的 C-6 和 $\rightarrow$ 6)- β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ (G)的 H-1 相关; δ 103.3/3.77、103.3/3.66 处的交叉峰代表 $\rightarrow$ 3,6)- β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ (F)的 C-1 和 $\rightarrow$ 3,6)- β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ (F)的 H-6a、H-6b 相关;以上信息表明 LGP-A 中含有 $\rightarrow$ 3,6)- β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 和 $\rightarrow$ 6)- β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 残基,且多糖中残基 F 的连接以 1, 6 位 C 相连。 δ 83.9/5.26 处的交叉峰代表 $\rightarrow$ 3,6)- β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ (F)的 C-3 与 T- α -L-Araf(A)的 H-1 相关。表明残基 A 的 C-1 与残基 F 的 C-3 相连; δ 107.5/5.26 处的交叉峰表明 $\rightarrow$ 5)- α -L-Araf-(1 $\rightarrow$ (C)的 C-1 和 T- α -L-Araf(A)的 H-1 相关; δ 83.9/5.09 处的交叉峰表明 $\rightarrow$ 3,6)- β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ (F)的 C-3 和 $\rightarrow$ 5)- α -L-Araf-(1 $\rightarrow$ (C)的 H-1 相关; δ 66.9/5.09 处的交叉峰表明 $\rightarrow$ 5)- α -L-Araf-(1 $\rightarrow$ (C)的 C-5 和 $\rightarrow$ 5)- α -L-Araf-(1 $\rightarrow$ (C)的 H-1 相关。 δ 76.6/5.09 处的交叉峰表明 T- α -L-Araf(A)的 C-3 和 $\rightarrow$ 5)- α -L-Araf-(1 $\rightarrow$ (C)的 H-1 相关; δ 84.1/5.26 处的交叉峰表明 T- α -L-Araf(A)的 H-1 和 $\rightarrow$ 3,5)- α -L-Araf-(1 $\rightarrow$ (D)的 C-3 相关;基于上述结果和文献报道^[21-27],推断 LGP-A 是一种阿拉伯半乳聚糖,且主链是 F 的 C-1 与 C-6 相连,另 2 个主要残基 A、C 都是 C-1 与主链中 F 的 C-3 相连。

由于多糖结构复杂,NMR 谱图中信号重叠严重,采用 NMR 分析结构只能初步推测糖残基之间的连接方式,很难准确判断糖苷键连接位点。后续课题组将继续对 LGP-A 的结构进行解析,采用甲基化等分析手段进一步表征多糖结构。

3.2.5 刚果红实验 若 1 个多糖具有三螺旋结构与

刚果红试剂混合后会发生络合反应,混合溶液的最大吸收波长($\lambda_{\max}$)向长波方向移动,即红移。氢氧化钠可以破坏多糖三螺旋结构,因此随着氢氧化钠浓度升高混合溶液 $\lambda_{\max}$ 逐渐减小,即蓝移^[28]。从图 6 中可以看到 LGP-A 与刚果红混合后 $\lambda_{\max}$ 未发生显著性红移,且随氢氧化钠浓度升高,混合溶液与刚果红单一溶液 $\lambda_{\max}$ 变化趋势相似,因此判断 LGP-A 不含三螺旋结构。

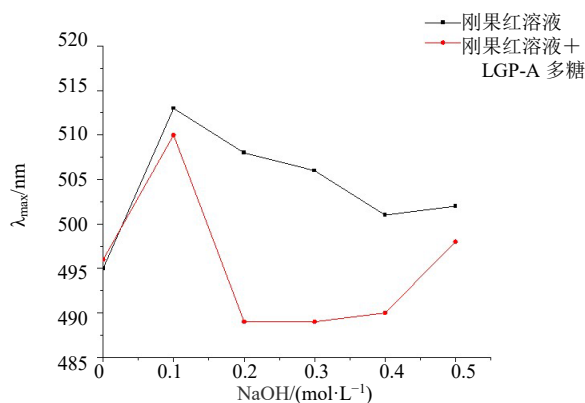
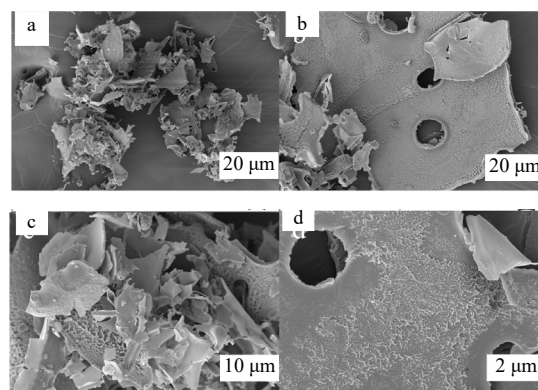


图 6 LGP-A 刚果红实验

Fig. 6 Congo Red experiment of LGP-A

3.2.6 SEM 分析 如图 7 所示, LGP-A 在扫描电镜下呈现出带孔的片状堆叠,表面紧密,说明其分子间及分子链间相互作用较强,其结构有网状结构,另有少量棒状结构,说明 LGP-A 排布不规律,规整性不强,可能为无定型结构。



a×200; b×500; c×1 000; d×2 000

图 7 LGP-A 的 SEM 图

Fig. 7 SEM of LGP-A

3.3 LGP-A 细胞免疫活性

3.3.1 对细胞增殖的影响 用 CCK-8 法检测 LGP-A 对 RAW264.7 细胞增殖率的影响,结果如图 8-A 所示,与对照组相比, LGP-A 质量浓度在 0.625~5.0 μ g/mL 对细胞没有毒性作用,亦未显著

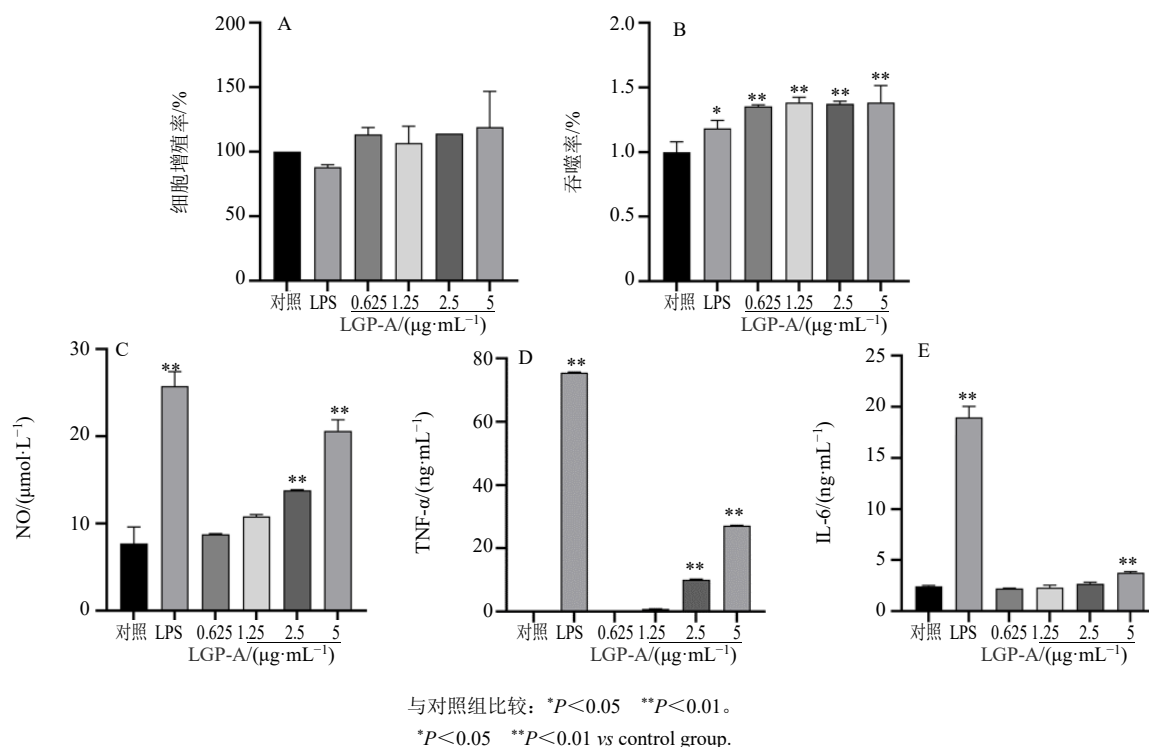


图 8 LGP-A 对 RAW264.7 细胞的增殖活性 (A)、吞噬中性红 (B) 及释放 NO (C)、TNF- α (D) 和 IL-6 (E) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Effects of LGP-A on proliferation (A), phagocytosis of neutral red (B), release of NO (C), TNF- α (D) and IL-6 (E) of RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

促进 RAW264.7 细胞增殖。因此采用 0.625~5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度的多糖溶液进行以下实验。

3.3.2 对细胞吞噬能力的影响 巨噬细胞的吞噬作用是非特异性免疫在病原体入侵时的最初反应,巨噬细胞吞噬病原体后不仅可以激活特异性免疫,对炎症的消退也起到重要作用。因此,巨噬细胞的吞噬能力可以作为机体免疫防御水平的指标之一。有研究表明,中药多糖能够提高巨噬细胞吞噬能力,增强机体免疫调节能力。LGP-A 多糖的结果如图 8-B 所示,以对照组为 100%吞噬率,在 0.625~5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LGP-A 可以显著性增强 RAW264.7 细胞的吞噬能力 ($P < 0.01$),1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 下吞噬率为 138.5%。

3.3.3 对细胞 NO、TNF- α 、IL-6 分泌量的影响 NO 作为细胞产生的一种信号转导介质,可以激活巨噬细胞启动非特异性免疫,促进巨噬细胞代谢,提高巨噬细胞吞噬能力^[26],是评价免疫应答水平的重要指标。细胞因子主要是巨噬细胞在免疫应答过程中的产物,可以参与免疫应答,调节巨噬细胞功能。其中 TNF- α 是一种强促炎因子^[29],参与机体多种生命活动,对肿瘤也有一定的抑制活性。IL-6 可以诱

导机体产生炎症反应,还可以调节代谢及再生^[30]。因此 TNF- α 、IL-6 等细胞因子水平的上升是巨噬细胞激活的标志之一。有研究表明,多糖提高 RAW264.7 细胞 NO、TNF- α 、IL-6 等因子的分泌,且分泌水平低于 LPS 诱导组,以此来评价其免疫调节活性^[31]。

由图 8-C~E 可知,LGP-A 多糖可以促进 RAW264.7 细胞 NO、TNF- α 、IL-6 等细胞因子的分泌,且呈剂量相关性。与对照组相比,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LGP-A 组的 NO、TNF- α 和 IL-6 分泌量均较显著上升,分别为 $(20.64 \pm 1.29) \mu\text{mol}/\text{L}$ 、 $(27.16 \pm 0.17) \text{ng}/\text{mL}$ 和 $(3.77 \pm 0.13) \text{ng}/\text{mL}$,但低于 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 组分泌量 [$(25.79 \pm 1.63) \mu\text{mol}/\text{L}$ 、 $(75.54 \pm 0.23) \text{ng}/\text{mL}$ 、 $(18.97 \pm 0.11) \text{ng}/\text{mL}$]。综合细胞因子与细胞吞噬实验结果,可知 LGP-A 具有一定的免疫调节作用。

4 讨论

目前对罗汉果根多糖的构效关系未有充分研究,但在其他多糖的研究中发现单糖组成是影响多糖生物活性的重要因素,其中半乳糖、阿拉伯糖等

单糖是否存在和含量高低会影响其免疫活性。由阿拉伯糖和半乳糖聚合而成的中性多糖称为阿拉伯半乳聚糖 (AG), 安全无毒, 且具有良好的生物活性。如从落叶松中提取的 AG 能促进 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 等细胞因子, 具有很强的免疫调节活性。在临床试验中发现 AG 可以提高人体对细菌抗原的免疫力, 还可以治疗风寒感冒等呼吸道疾病^[32-33]。除了免疫活性外, AG 在抗肿瘤、抗氧化、抗病毒、维持肠道稳态等方面也有较好的活性。

本研究通过红外光谱、核磁共振波谱、相关参考文献和结合单糖组成分析结果, 对 LGP-A 结构进行初步分析, 推断其是一种阿拉伯半乳聚糖。实验证明 LGP-A 具有较好的免疫活性, 可能与其相对分子质量大小有关。相对分子质量是多糖发挥生物活性的重要影响因素, 多糖需要与受体结合跨越细胞屏障才能进入机体发挥生物活性。多糖相对分子质量过高难以跨越细胞屏障, 相对分子质量过低难以形成活性聚合物结构^[34]。研究发现不同植物多糖发挥免疫活性的最佳相对分子质量范围不同, 如单糖组成、糖链主要结构及官能团基本一致但相对分子质量有明显差异的铁皮石斛多糖在免疫调节活性方面具有显著差异, 在 $1.2 \times 10^5 \sim 5.44 \times 10^5$ 免疫效果强于 3.91×10^4 ^[35], 推测在一定范围内, 多糖相对分子质量越大活性越强。本实验从罗汉果根中分离得到的 LGP-A 多糖, 经 PMP-HPLC 分析后发现与红花多糖 HH1-1 单糖组成^[21]及比例相似, 相对分子质量与草菇多糖相似。研究表明红花多糖 HH1-1 与草菇多糖可以增加巨噬细胞 NO 生成量, 促进细胞因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、iNOS 的分泌及其 mRNA 表达量^[36], 表现出良好的免疫调节能力, 本实验结果与以上研究比较一致。

目前罗汉果栽培方式是一年一栽, 每年产生大量的根资源。但罗汉果根不是传统的药用部位, 尚未得到系统的研究与开发, 从而遭受丢弃造成巨大的资源浪费。本实验以罗汉果根为原料, 通过脱脂、水提醇沉得到罗汉果根粗多糖, 利用 DEAE-52 和 Sephadex LH-20 柱色谱纯化得到 1 个均一性较好的中性多糖 LGP-A, 通过 FT-IR、NMR、SEM 等技术初步表征了其结构, 以细胞实验证明其具有免疫调节活性。今后拟进一步加强对 LGP-A 精细结构的解析, 并开展其体内的免疫活性研究, 为开发罗汉果根多糖的大健康产品奠定基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 陈全斌, 汤桂梅, 徐庆, 等. 罗汉果块根中药用成份提取及其药理作用初探 [J]. 化学世界, 2003, 1: 21-23.
- [2] 孙嘉忆, 孙佳祺, 李和平, 等. 高速逆流色谱法制备罗汉果根中葫芦素类化合物 [J]. 色谱, 2022, 40(4): 364-371.
- [3] 颜小捷, 卢凤来, 陈换莹, 等. 罗汉果根多糖的分离纯化、结构鉴定及抗肿瘤活性研究 [J]. 广西植物, 2012, 32(1): 138-142.
- [4] 林智敏, 肖健. 植物多糖免疫调节作用研究进展 [J]. 标记免疫分析与临床, 2022, 29(7): 1252-1255.
- [5] 崔丹丹. 罗汉果多糖提取分离、结构解析及对糖尿病肾病小鼠保护作用研究 [D]. 西安: 陕西科技大学, 2021.
- [6] 朱永明. 罗汉果果皮多糖的提取、结构及抗氧化活性研究 [D]. 天津: 天津科技大学, 2021.
- [7] 殷洪梅, 尚强, 萧伟. 金银花多糖脱蛋白方法的研究 [J]. 中草药, 2010, 41(4): 584-586.
- [8] 陈小蒙, 刘成梅, 刘伟. 龙牙百合多糖的纯化及其分子量的测定 [J]. 食品科学, 2008, 29(11): 305-307.
- [9] 刘珊珊, 乐胜锋, 马博凯, 等. PMP 柱前衍生反相高效液相色谱—紫外检测法结合离子色谱—脉冲安培法测定不同产地泽泻多糖的单糖组成 [J]. 分析科学学报, 2023, 39(1): 67-72.
- [10] Fatombi J K, Osseni S A, Idohou E A, et al. Characterization and application of alkali-soluble polysaccharide of *Carica papaya* seeds for removal of indigo carmine and Congo red dyes from single and binary solutions [J]. *J Environ Chem Eng*, 2019, 7(5): 103343.
- [11] 王妍. 党参多糖 CPC 的结构解析及其免疫活性研究 [D]. 太原: 山西医科大学, 2021.
- [12] Wang H M, Wang X L, Li Y, et al. Structural properties and *in vitro* and *in vivo* immunomodulatory activity of an arabinofuranan from the fruits of *Akebia quinata* [J]. *Carbohydr Polym*, 2021, 256: 117521.
- [13] Yang B, Wang J S, Zhao M M, et al. Identification of polysaccharides from pericarp tissues of *Litchi* (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit in relation to their antioxidant activities [J]. *Carbohydr Res*, 2006, 341(5): 634-638.
- [14] Zeng Y J, Yang H R, Wu X L, et al. Structure and immunomodulatory activity of polysaccharides from *Fusarium solani* DO7 by solid-state fermentation [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 137: 568-575.
- [15] Zhou Y, Wang S C, Feng W S, et al. Structural characterization and immunomodulatory activities of two polysaccharides from *Rehmanniae Radix* *Præparata* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 186: 385-395.
- [16] Zhou W T, Zhao Y, Yan Y M, et al. Antioxidant and immunomodulatory activities *in vitro* of polysaccharides

- from bee collected pollen of Chinese wolfberry [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 163: 190-199.
- [17] 程雷. 水芹多糖的分离、结构分析及生物活性研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2022.
- [18] 刘玉红, 王凤山. 核磁共振波谱法在多糖结构分析中的应用 [J]. *食品与药品*, 2007, 9(8): 39-43.
- [19] Cantu-Jungles T M, Maria-Ferreira D, da Silva L M, *et al.* Polysaccharides from prunes: Gastroprotective activity and structural elucidation of bioactive pectins [J]. *Food Chem*, 2014, 146: 492-499.
- [20] Yao Y L, Yao J, Du Z Y, *et al.* Structural elucidation and immune-enhancing activity of an arabinogalactan from flowers of *Carthamus tinctorius* L [J]. *Carbohydr Polym*, 2018, 202: 134-142.
- [21] 徐永斌, 冯帅霞, 陈洁, 等. 红花均一多糖的结构表征及抑制 HepG2 增殖活性 [J]. *高等学校化学学报*, 2023, 44(4): 60-69.
- [22] Goellner E M, Utermoehlen J, Kramer R, *et al.* Structure of arabinogalactan from *Larix laricina* and its reactivity with antibodies directed against type-II-arabinogalactans [J]. *Carbohydr Polym*, 2011, 86(4): 1739-1744.
- [23] Leivas C L, Iacomini M, Cordeiro L M C. Structural characterization of a rhamnogalacturonan I-arabinan-type I Arabinogalactan macromolecule from starfruit (*Averrhoa carambola* L.) [J]. *Carbohydr Polym*, 2015, 121: 224-230.
- [24] Wei C Y, Zhang Y, He L, *et al.* Structural characterization and anti-proliferative activities of partially degraded polysaccharides from peach gum [J]. *Carbohydr Polym*, 2019, 203: 193-202.
- [25] Wang P P, Zhang L, Yao J, *et al.* An arabinogalactan from flowers of *Panax notoginseng* inhibits angiogenesis by BMP2/Smad/Id1 signaling [J]. *Carbohydr Polym*, 2015, 121: 328-335.
- [26] Ren Y L, Zheng G Q, You L J, *et al.* Structural characterization and macrophage immunomodulatory activity of a polysaccharide isolated from *Gracilaria lemaneiformis* [J]. *J Funct Foods*, 2017, 33: 286-296.
- [27] Cheng J W, Wei C Y, Li W Q, *et al.* Structural characteristics and enhanced biological activities of partially degraded arabinogalactan from larch sawdust [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 171: 550-559.
- [28] 崔云. 甘薯渣多糖提取纯化、结构鉴定及功能研究 [D]. 太原: 山西大学, 2021.
- [29] Zelová H, Hošek J. TNF- α signalling and inflammation: Interactions between old acquaintances [J]. *Inflamm Res*, 2013, 62(7): 641-651.
- [30] Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, *et al.* The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6 [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1813(5): 878-888.
- [31] Li Y M, Guo X X, Zhong R F, *et al.* Structure characterization and biological activities evaluation of two hetero-polysaccharides from *Lepista nuda*: Cell antioxidant, anticancer and immune-modulatory activities [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 244: 125204.
- [32] Udani J K. Immunomodulatory effects of ResistAid™: A randomized, double-blind, placebo-controlled, multidose study [J]. *J Am Coll Nutr*, 2013, 32(5): 331-338.
- [33] Roxas M, Jurenka J. Colds and influenza: A review of diagnosis and conventional, botanical, and nutritional considerations [J]. *Altern Med Rev*, 2007, 12(1): 25-48.
- [34] 边亮, 陈华国, 周欣. 植物多糖的抗肿瘤活性研究进展 [J]. *食品科学*, 2020, 41(7): 275-282.
- [35] 赵小丹, 刘玉, 陶新玉, 等. 不同相对分子质量的铁皮石斛多糖对细胞免疫活性的影响 [J]. *中国药理学杂志*, 2023, 58(11): 997-1004.
- [36] Cui F J, Jiang L H, Qian L S, *et al.* A macromolecular α -glucan from fruiting bodies of *Volvariella volvacea* activating RAW264.7 macrophages through MAPKs pathway [J]. *Carbohydr Polym*, 2020, 230: 115674.

[责任编辑 王文倩]