

体外模拟消化对黄芪多糖 APS-II 结构和免疫活性的影响

冯仕红^{1,2,3}, 李晓飞⁴, 李科^{1,2,3,5*}, 吕弯弯^{1,2,3}, 文雨薇^{1,2,3}, 秦雪梅^{1,2,3}, 杜昱光⁵, 李震宇^{1,2,3}

1. 山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

2. 山西大学 化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 山西 太原 030006

3. 地产中药功效物质研究与利用山西省重点实验室, 山西 太原 030006

4. 山西省农产品质量安全中心, 山西 太原 030006

5. 中国科学院过程工程研究所, 北京 100190

摘要: 目的 从黄芪多糖 (*Astragalus polysaccharides*, APS) 中分离制备 APS-II, 探究其体外消化后产物的结构和免疫活性的变化。方法 采用体外模拟唾液、胃液和肠液模型研究 APS-II 经唾液、胃液和小肠液消化后的相对分子质量分布、单糖组成、还原糖含量、官能团和表面形态的变化, 同时进行体外免疫活性实验, 比较 APS-II 经体外消化以后的形式及活性的变化。结果 唾液对 APS-II 无明显影响; 而在胃消化 0~6 h 的过程中, 多糖的相对分子质量从 5.956×10^3 降至 3.745×10^3 , 还原糖含量从 0.333 mg/mL 增加至 0.348 mg/mL, 红外光谱显示在 $1\ 649 \sim 1\ 029\text{ cm}^{-1}$ 吸收峰强度不同, 游离单糖半乳糖醛酸 (galacturonic acid, GalA) 被释放; 甲基化结果显示发现 APS-II 经唾液、胃液消化后, 糖苷键以 1,4 葡萄糖连接为主; 肠液消化产物中糖苷键存在 1,3 半乳糖连接。体外免疫活性实验表明, 肠液消化产物促进 RAW264.7 巨噬细胞吞噬活力以及释放一氧化氮 (nitric oxide, NO)、白细胞介素-10 (interleukin-10, IL-10)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 的能力较强。结论 APS-II 在胃肠道中可以被消化, 且经胃肠液消化后免疫活性增强, 推测与其相对分子质量、单糖组成和糖苷键连接方式相关。

关键词: 黄芪多糖; APS-II; 体外消化; 结构变化; 免疫活性

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)16-5514-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.16.014

Effect of *in vitro* simulated digestion on structure and immune activity of *Astragalus polysaccharides* APS-II

FENG Shihong^{1,2,3}, LI Xiaofei⁴, LI Ke^{1,2,3,5}, LYU Wanwan^{1,2,3}, WEN Yuwei^{1,2,3}, QIN Xuemei^{1,2,3}, DU Yuguang⁵, LI Zhenyu^{1,2,3}

1. Modern Research Center of Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

2. Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering, Ministry of Education, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

3. Shanxi Provincial Key Laboratory of Research and Utilization of Functional Substances in Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030006, China

4. Shanxi Agricultural Products Quality and Safety Center, Taiyuan 030006, China

5. Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

Abstract: Objective *Astragalus polysaccharides* (APS)-II was isolated and prepared from APS, and to investigate the changes in structure and immune activity of its products after *in vitro* digestion. **Methods** The changes of molecular weight distribution, monosaccharide composition, reducing sugar content, functional groups and surface morphology of APS-II after digestion in saliva,

收稿日期: 2024-04-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81872962); 国家博士后科学基金资助项目(2019M650851); 国家重点研发计划项目(2019YFC1710800); 山西省重点研发计划重点项目(201603D311101); 山西省优秀人才科技创新项目(201605D211030, 201705D211020); 山西省科技创新人才团队专项基金

作者简介: 冯仕红 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药质量控制。E-mail: 18434766631@163.com

***通信作者:** 李科, 男, 教授, 博士生导师, 从事中药质量控制与品质评价、天然药物研发。E-mail: like@sxu.edu.cn

gastric juice and small intestinal juice were studied by *in vitro* simulated saliva, gastric juice and intestinal model. At the same time, the *in vitro* immune activity experiment was carried out to compare the changes of form and activity of APS-II after *in vitro* digestion.

Results Saliva had no significant effect on APS-II. In the process of gastric digestion for 0—6 h, the molecular weight of polysaccharide decreased from 5.956×10^3 to 3.745×10^3 , the content of reducing sugar increased from 0.333 mg/mL to 0.348 mg/mL, and the infrared spectrum showed that in the range of 1 649—1 029 cm^{-1} , the absorption peak intensity was different, and the free monosaccharide galacturonic acid (GalA) was released. In addition, the methylation results showed that the glycosidic bonds were mainly 1,4-glucose linkages after digestion with saliva and gastric juice; The glycosidic bonds in the digestive products of intestinal fluid were connected by 1,3 galactose. *In vitro* immune activity experiments showed that the intestinal digestion product had a strong ability to promote the phagocytic activity of RAW264.7 cells and the release of nitric oxide (NO), interleukin-10 (IL-10) and tumor necrosis factor- α (TNF- α). **Conclusion** APS-II can be digested in the gastrointestinal tract, and the immune activity is enhanced after digestion in the gastrointestinal fluid, which is speculated to be related to its molecular weight, monosaccharide composition and glycosidic bond connection.

Key words: *Astragalus* polysaccharides; APS-II; *in vitro* digestion; structural change; immune activity

多糖是广泛存在于自然界的一类大分子物质,对维持正常生命活动有着重要作用,具有降血糖、抗肿瘤、调节免疫等生物活性^[1]。随着荧光和同位素标记技术的改进,越来越多的报道证实香菇聚糖^[2]、枸杞多糖^[3]、当归多糖^[4]、南瓜多糖^[5]等多糖经口服给药后可以被吸收和利用。研究表明,经口服给药后的多糖在胃肠道内的酸碱值、消化酶以及胆盐的作用下可能会发生降解,结构形式发生改变^[6]。虽然目前荧光和同位素标记已作为研究多糖药动力学的有效手段,但是其并不能区分多糖在体内胃肠道中的变化情况^[7]。而体外消化模型作为一种简便、经济且重复性好的工具,被广泛应用于研究模拟胃肠道条件下多糖的结构形式和生物活性的变化。

黄芪多糖(*Astragalus* polysaccharides, APS)是黄芪中含量丰富的物质之一,具有抗氧化、抗病毒、抗肿瘤及调节免疫等功能^[8]。近年来,多数研究者认为多糖可以作为益生元调控肠道微生物组成来发挥免疫功效,但是关于多糖是否能被肠道降解吸收、在体内经胃肠道代谢存在的主要形式以及哪些结构可以通过肠道直接吸收从而调节机体免疫是目前多糖药动力学研究的热点和重点。Zhang 等^[9]通过研究黄芪超支化异聚糖 RAP (相对分子质量为 1.334×10^6) 发现, RAP 在 1 h 内迅速进入 Peyer 斑块,直接靶向滤泡树突状细胞并启动抗肿瘤免疫反应,激活丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)和核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)信号通路;通过免疫荧光染色测定法发现, RAP 可以通过淋巴系统进一步转运到淋巴管,且这种淋巴途径独立于肠道微生物群,表明其调节免疫并不仅是通过肠道菌群来发挥作用;采用高效凝胶

渗透色谱结合荧光检测器分析发现 RAP 在小肠中未被降解。然而,高效凝胶渗透色谱法中的 TSK 色谱柱表征范围宽,经过降解后的相对分子质量接近或有差异的多糖,保留时间也会重叠,因此需要更加细致的分析,包括降解后的单糖、寡糖、多糖等。课题组前期研究发现 APS 包括 APS-I (相对分子质量 $>2 \times 10^6$) 和 APS-II (相对分子质量 1×10^4) 2 种组分^[10],随后将不同相对分子质量的 APS 分别作用于小鼠免疫细胞和环磷酸腺苷抑制小鼠模型实验发现, APS-II 为免疫促进最强组分^[11],但是并未对 APS-II 在体内的变化形式及经体内消化后活性是否发生变化进行研究。

多糖在体内的存在形式有降解的单糖、寡糖和未被降解的原型以及短链脂肪酸等。因此,本研究通过体外模拟消化,对 APS-II 经体外消化后的变化形式进行表征,并利用 RAW264.7 巨噬细胞评估 APS-II 消化前后的免疫活性,以期后续阐明 APS 降解后的主要活性及结构形式奠定基础。

1 材料

1.1 药材

黄芪来自山西浑源,经山西大学秦雪梅教授鉴定为蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根。

1.2 药品与试剂

分析级 NaCl (批号 S805275)、KCl (批号 P816348)、 NaHCO_3 (批号 S818079)、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (批号 C804986)、 CH_3COONa (批号 S817484)、胆盐 (批号 B822609)、胰酶 (批号 P4370)、胃蛋白酶 (批号 P816236)、酸性脂肪酶 (批号 S26851) 均购自上海麦克林公司;小鼠白细胞介素-10(interleukin-

10, IL-10) ELISA 试剂盒(批号 LV30274)、小鼠肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA 试剂盒(批号 LV30536)购自武汉博士德生物工程有限公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, 批号 11011-8611)、DMEM 高糖培养基(批号 11995)、胰蛋白酶(批号 T1300)、青链霉素混合液(批号 P1400)、脂多糖(lipopolysaccharides, LPS, 批号 L8880)、PBS 缓冲液(批号 P1020)、MTT(批号 M8180)均购自北京索莱宝科技有限公司;一氧化氮(nitric oxide, NO)检测试剂盒(批号 S0021S)购自碧云天生物技术;葡萄糖(glucose, Glu)标准品(批号 200-075-1)购自阿拉丁科技股份有限公司;标准品甘露糖(mannose, Man, 批号 A600554)、鼠李糖(rhamnose, Rha, 批号 A600804)、阿拉伯糖(arabinose, Ara, 批号 A610071)、半乳糖(galactose, Gal, 批号 A600215)、葡萄糖醛酸(glucuronic acid, GlcA, 批号 A600482)均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;半乳糖醛酸(galacturonic acid, GalA)标准品(批号 B21984)购自上海源叶生物科技有限公司,以上单糖标准品质量分数均大于 98%。

1.3 仪器

Shodex R1-201H 型示差折光检测器(力森诺科学仪器有限公司);1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);ELSD-UM5800 型检测器(上海通威分析技术有限公司);TENSOR27 型傅立叶变换红外光谱(德国布鲁克公司);CPA225D 型万分之一电子天平(德国 Sartorius 公司);SC-3610 型低速离心机(安徽中科生科学仪器有限公司);Infinite M200 Pro 型多功能酶标仪(瑞士 Tean 公司);SCIENTZ-12N 型真空冷冻干燥机(上海知信实验仪器技术有限公司);扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)、气相色谱-质谱联用(GC-MS)仪(塞维尔生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 多糖消化产物的制备

人体的消化管从口腔开始,经过咽喉、食道、胃、小肠、大肠等。为了更好地研究 APS 在体内的变化形式及生物活性,采用连续模拟唾液、胃肠消化的方法,对经消化前后的原型和代谢产物进行结构和活性研究。

2.1.1 体外模拟唾液消化 参考文献方法^[12],称取 1.126 g KCl、0.12 g NaCl、1.143 g NaHCO₃ 和 0.167 g

CaCl₂·2H₂O,溶于 1 L 蒸馏水中,加适量 α -淀粉酶(150 U/mL),用 0.1 mol/L HCl 调节 pH 至 7.0,制备模拟唾液。按照文献方法^[13],分离制备 APS-II。取 20 mL APS-II (4 mol/L)与 20 mL 模拟唾液混合,并将混合液分装于 4 个不同的离心管中,于 37 °C 水浴模拟唾液消化过程,分别在反应 0、2、4、10 min 时取出离心管,沸水浴灭活 10 min,冷却至室温,收集上清液。不同消化时间的一部分上清液用于相对分子质量及还原糖含量的测定,另一部分上清液采用 Sevage 法(氯仿-正丁醇 4:1)除去蛋白质,3 500 r/min 离心 3 min,透析 48 h 后,冷冻干燥,并将经过唾液消化 10 min 后的样品命名为唾液消化产物 APS-II-S,用于后续实验。

2.1.2 体外模拟唾液-胃消化 参考文献方法^[14],称取 0.62 g NaCl、0.22 g KCl、30 mg CaCl₂·2H₂O 和 0.112 g NaHCO₃ 于 200 mL 蒸馏水中制备胃电解质溶液,并用 0.1 mol/L HCl 调节 pH 至 2.0。取 150 mL 胃电解质溶液,加入 36 mg 胃蛋白酶、38 mg 胃脂肪酶和 0.3 mL CH₃COONa 溶液(1 mol/L, pH 5.0),并用 0.1 mol/L HCl 调 pH 至 2.0,制得模拟胃液。将 20 mL 唾液消化产物 APS-II-S 与模拟胃液按 1:1 的比例混合,分装于 5 个 15 mL 的离心管中,37 °C 模拟消化。分别在 0、1、2、4、6 h 取出离心管,并于 100 °C 灭活 10 min,收集上清液,将一部分上清液用于相对分子质量及还原糖含量的测定,其余上清液与 Sevage 试剂(三氯甲烷-正丁醇 4:1)按 1:2 的比例混合,3 500 r/min 离心 3 min,重复操作 2 次,收集上清液,透析 48 h 后,冷冻干燥。并将唾液-胃液消化 6 h 的样品命名为胃液消化产物 APS-II-G,用于后续分析。

2.1.3 体外唾液-胃-肠消化 称取 1.35 g NaCl、162.5 mg KCl、82.5 mg CaCl₂·2H₂O,溶于 250 mL 超纯水中,用 0.1 mol/L NaHCO₃ 溶液调节 pH 至 7,获得小肠电解质溶液。取小肠电解质溶液 200 mL、7%胰酶溶液 200 mL、4%胆盐溶液 400 mL 和胰蛋白酶 26 mg 混合均匀,调 pH 至 7.0,制得模拟肠液。将胃液消化产物 APS-II-G 与模拟肠液按 10:3 的比例混合均匀,分装于 4 个离心管中,置于 37 °C 模拟消化,分别于 0、2、4、6 h 各取出 1 个离心管,并立即于 100 °C 煮沸 10 min,冷却至室温。收集上清液。不同消化时间的一部分上清液用于相对分子质量及还原糖含量的测定,其余部分与 Sevage 试剂(三氯甲烷-正丁醇 4:1)按 1:2 的比例混合,充

分振摇 10 min 后, 3 500 r/min 离心 3 min, 收集水相, 重复上述操作 2 次。在去离子水中(透析膜相对分子质量为 100)透析 48 h 后, 冷冻干燥, 并将经唾液-胃肠消化 6 h 后的样品命名为小肠消化产物 APS-II-I。

2.2 化学表征

参考文献方法^[13], 使用高效凝胶色谱柱和 PMP 衍生化的方法对消化产物的相对分子质量和单糖组成进行测定; 采用 3,5-二硝基水杨酸的方法测定不同消化酵解时间点的还原糖含量^[15]; 对消化后的产物进行 GC-MS 分析^[11]。

2.3 红外光谱(FT-IR)分析

将不同消化阶段下的不同消化产物 1.0 mg 与干燥过的溴化钾 100 mg 研磨混合, 压成薄片后, 用 FT-IR 进行分析。

2.4 SEM 分析

将 APS-II 及其消化产物 APS-II-S、APS-II-G、APS-II-I 样品喷金后, 通过 SEM 于 200 倍镜下观察样品表面形态^[16]。

2.5 多糖消化产物的免疫活性分析

2.5.1 细胞培养 RAW264.7 细胞用含 10% FBS 和 1% 青链霉素混合液的 DMEM 培养基, 于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养。

2.5.2 多糖消化产物对 RAW264.7 细胞增殖的影响 采用 MTT 法测定 APS-II、APS-II-S、APS-II-G、APS-II-I 对 RAW264.7 细胞活力的影响。取对数生长期的 RAW264.7 细胞, 以 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板中, 于 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h 后, 弃去培养基, 分别加入不同质量浓度(10、25、50、100、200 μg/mL)的 APS-II、APS-II-S、APS-II-G 和 APS-II-I 溶液 100 μL, 另设置对照组(加入不含药物、无血清的 DMEM 培养基)和空白孔(不接种细胞不给药), 培养 24 h 后加入 10 μL MTT (5 mg/mL) 培养 4 h, 弃去上清液, 加入 100 μL DMSO 溶液, 采用酶标仪于 490 nm 下测定吸光度(A)值, 计算细胞增殖率。

$$\text{细胞增殖率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.5.3 多糖消化产物对 RAW264.7 细胞吞噬活性的影响 采用中性红方法测定 APS-II 消化及发酵前后对 RAW264.7 细胞的吞噬活性。取对数生长期的 RAW264.7 细胞, 以 2×10^4 个/孔接种于 96 孔板中, 于 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h 后, 弃去培养基, 设置对照组、LPS 组和各给药组, 对照组加

入不含药物、无血清的 DMEM 培养基, LPS 组加入 1 μg/mL LPS 溶液, 各给药组分别加入不同质量浓度(25、50、100、150 μg/mL)的 APS-II、APS-II-S、APS-II-G、APS-II-I 溶液 100 μL, 设置 3 个复孔, 培养 24 h 后弃去培养基, PBS 洗涤 2 次, 加入 0.75 μg/mL 中性红染液 100 μL, 孵育 2 h 后, 弃去上清液, PBS 清洗 2 遍, 加入 200 μL 细胞裂解液(乙醇-醋酸 1:1), 室温放置 2 h 后于 540 nm 处测定 A 值, 计算吞噬率。

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

2.5.4 多糖消化产物对 RAW264.7 细胞上清液中 NO、IL-10 和 TNF-α 水平的影响 按“2.5.3”项下方法分组和给药, 培养 24 h 后, 收集上清液, 采用 Griess 法检测 NO 水平, 按照 ELISA 试剂盒说明书测定上清液中 TNF-α 和 IL-10 水平。

2.6 统计学分析

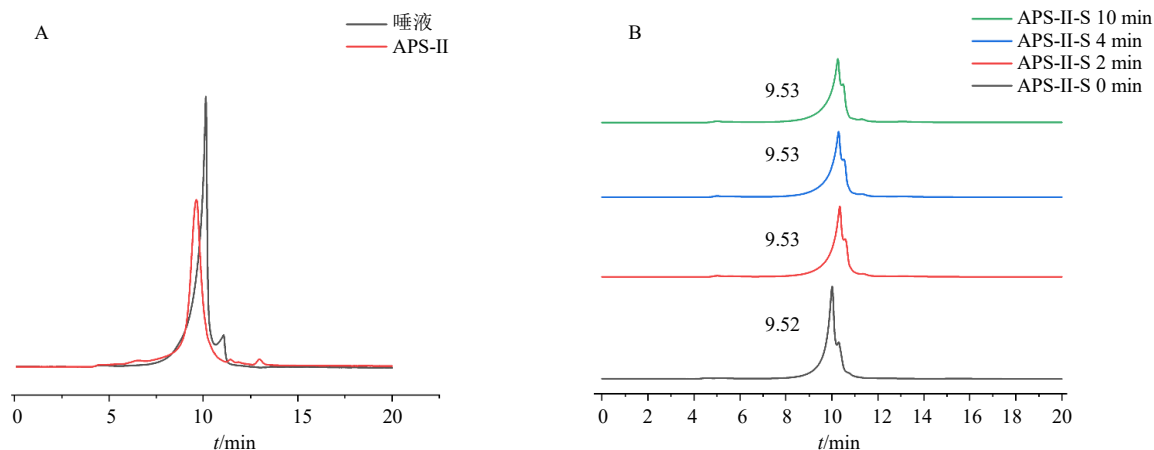
数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组之间用单因素方差及 *t* 检验分析。

3 结果

3.1 相对分子质量及还原糖变化

3.1.1 唾液消化下 APS-II 的相对分子质量变化 口腔作为人体消化的第一道防线, 唾液淀粉酶是唾液消化过程中分解多糖的主要因素, 对直链、支链淀粉和糖原均有显著影响。图 1-A、B 表示在唾液消化 10 min 内不同时间点中 APS-II 和唾液空白培养基相对分子质量的变化, 由图 1-A 可知, 唾液空白培养基中添加物质的保留时间和 APS-II 的保留时间大体一致, APS-II 经唾液消化后保留时间无明显变化(图 1-B), 表明经唾液消化后 APS-II 没有被降解。

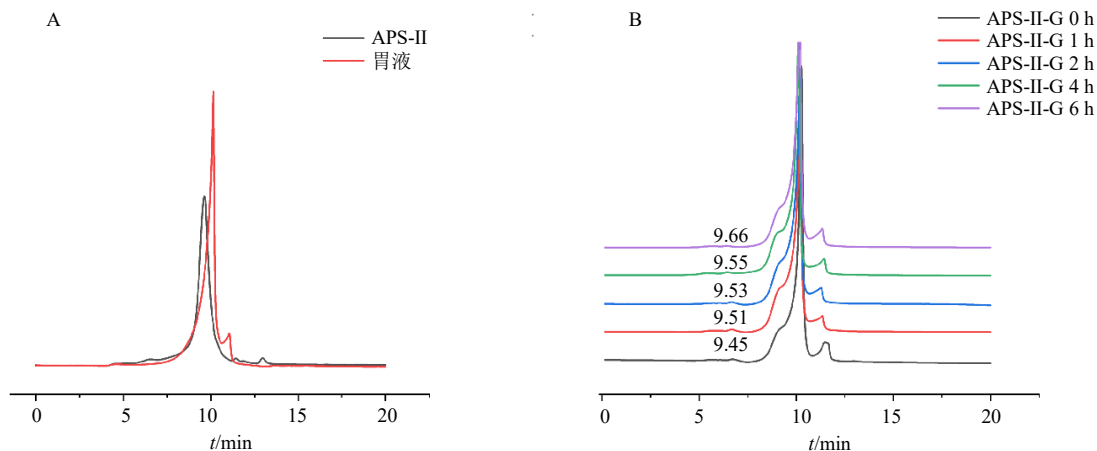
3.1.2 唾液-胃液消化下 APS-II 的相对分子质量变化 研究表明多糖在酸性环境及多种酶的存在下易被降解, 因此, 当胃消化开始时更容易产生相对分子质量的损失, 图 2-A、B 表示在 6 h 内不同时间点 APS-II 和胃液空白培养基在模拟胃液消化中相对分子质量变化。由图 2-A 可知, APS-II 的保留时间比胃培养基中添加的物质的保留时间较早, 因此, 胃培养基中的物质不会影响相对分子质量的测定。如图 2-B 所示, 相对分子质量在胃消化过程中峰形和保留时间均发生了变化, 且随着消化时间的延长, 多糖的洗脱体积也伴随着延迟, 表明在胃消化过程中相对分子质量降低, 以保留时间(*x*)为横坐标, log 相对分子质量(*y*)为纵坐标, 得到相对分子质



A-唾液空白培养基; B-唾液消化。
A-saliva blank medium; B-saliva digestion.

图1 APS-II 经体外模拟唾液消化后不同时间点相对分子质量的 HPGPC 色谱图

Fig. 1 HPGPC chromatograms of APS-II molecular weight at different time points after simulated saliva digestion *in vitro*



A-胃液空白培养基; B-胃液消化。
A-gastric juice blank medium; B-gastric juice digestion.

图2 APS-II 经模拟胃液消化后不同时间点相对分子质量的 HPGPC 色谱图

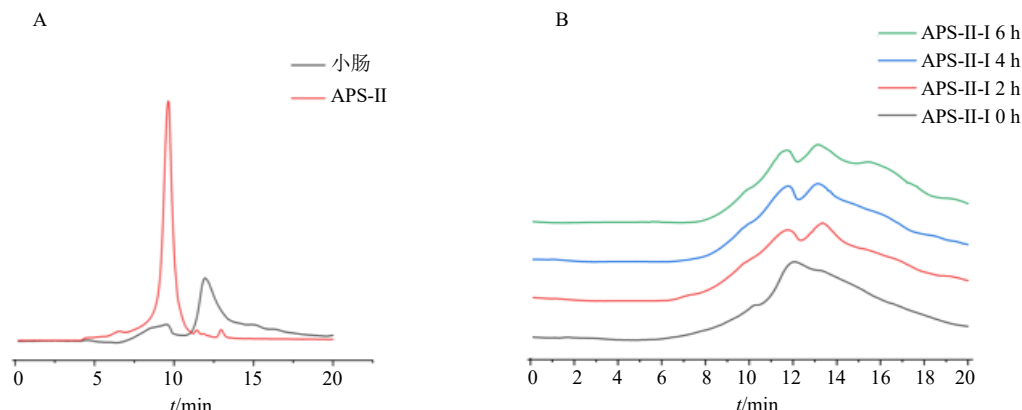
Fig. 2 HPGPC chromatograms of molecular weight of APS-II at different time points after simulated gastric juice digestion

量的标准曲线 $y = -1.1004x + 14.181$ ($R^2 = 0.9984$), 平均相对分子质量从 5.956×10^3 降至 5.115×10^3 、 4.783×10^3 、 4.549×10^3 、 3.745×10^3 , 其中相对分子质量在 1 h 内迅速下降。

3.1.3 唾液-胃-肠液消化下 APS-II 的相对分子质量变化 在肠道消化过程中也可以观察到相对分子质量的变化, 图 3-A、B 表示在 6 h 内不同时间点经小肠处理和对照中 APS-II 的相对分子质量的变化, 如图 3-B 所示, APS-II 在模拟小肠消化不同时间段下, 出峰时间及峰形没有明显变化, 表明其相对分子质量没有发生变化。

由于多糖易于在溶液中形成聚集体的趋势, 导

致很难确定其变化是由于糖苷键的断裂, 还是聚集体的破坏。而糖苷键的断链会导致还原糖含量的增加。因此, 分析了在体外消化期间 APS-II 释放的还原糖含量。如表 1 所示, 唾液消化过程中, 还原糖含量无明显变化, 这与 APS-II 在唾液消化下相对分子质量的变化保持一致。APS-II 经胃消化 1 h 后, 还原糖质量浓度从 0.333 mg/mL 增加到 0.342 mg/mL , 在胃消化 2~6 h 的过程中, 还原糖质量浓度增加至 0.348 mg/mL , 表明多糖的相对分子质量降低是由于糖苷键的断链, 从而增加了还原糖的含量。此外, 在肠消化过程中, 还原糖含量明显升高, 但是不及胃液明显, 而在小肠消化的过程中未观察



A-小肠空白培养基; B-小肠消化。
A-blank medium of small intestine; B-small intestine digestion.

图 3 APS-II 经模拟肠道消化后不同时间点相对分子质量的 HPGPC 色谱图

Fig. 3 HPGPC chromatograms of molecular weight of APS-II at different time points after simulated intestinal digestion

表 1 APS-II 经唾液、胃和小肠消化后不同时间点还原糖含量变化

Table 1 Changes in reducing sugar content of APS-II at different time points after digestion in saliva, stomach and small intestine

消化阶段	消化时间	还原糖/(mg·mL ⁻¹)
唾液消化	0 min	0.221±0.001 ^a
	2 min	0.215±0.002 ^a
	4 min	0.223±0.001 ^a
	10 min	0.221±0.004 ^a
唾-胃消化	0 h	0.333±0.007 ^b
	1 h	0.342±0.006 ^c
	2 h	0.346±0.008 ^b
	4 h	0.347±0.007 ^b
	6 h	0.348±0.005 ^c
唾-胃-小肠消化	0 h	0.344±0.006 ^c
	2 h	0.356±0.008 ^d
	4 h	0.357±0.002 ^d
	6 h	0.354±0.007 ^d

相同消化阶段比较, 不同字母代表显著性差异 ($P<0.05$)。

Compared with same digestion stage, different letters represent significant differences ($P<0.05$).

到相对分子质量的变化, 可能是因为凝胶色谱柱宽分布的特点。

3.2 体外消化过程中游离单糖的变化

研究表明, 多糖在体外模拟消化过程中可能会产生游离的单糖。因此, 本研究探讨了 APS-II 经体外模拟消化后是否产生了游离的单糖。图 4 为 APS-II 经体外模拟消化后游离单糖的高效液相色谱图。其中图 4-A、C 表示的是 APS-II 经唾液和小肠模拟后单糖的变化, 由图 4-A 对照组可知, 唾液中不含任何单糖组分, 由图 5 可知, APS-II 在唾液消化 0

min 时检测到 Rha、GalA 和 Glc, 这和课题组前期研究 APS-II 单糖组成的结果一致, 而随着唾液消化时间的延长, 单糖的种类和含量并未有明显的变化。在小肠模拟消化中, 多糖经小肠消化后的 HPLC-UV 色谱图没有任何区别, 说明 APS-II 经唾液和小肠消化过程中没有游离单糖的产生。

如图 4-B 所示, APS-II 在胃液消化 0 h 时也产生了以上 3 种单糖, 但是在胃液模拟消化 1 h 后产生了 Rha。不仅如此, 在胃液模拟 6 h 后 APS-II-G 中 Glc 的含量明显增加, 表明 APS-II 经胃液消化后产生了游离单糖, APS-II 经胃肠消化后产生了游离单糖 Glc 和 GalA, 说明其可以被小肠吸收。由图 5 可知, APS-II 经胃肠液消化后 Glc 变化明显, 推测胃蛋白酶中存在 Glc。

3.3 体外消化产物的甲基化分析

由于 APS-II 经胃肠消化后产生了单糖, 为了确定单糖的连接方式, 采用甲基化的方法、GC-MS 的分析手段推测 APS-II 经体外唾液、胃、肠消化后, APS-II-S、APS-II-G、APS-II-I 的糖苷键连接方式。将 4 种消化降解产物通过 GC-MS 甲基化分析的质谱碎片离子峰与 CCRC 数据库 (<https://glygen.ccrcc.uga.edu/ccrc/specdb/ms/pmaa/pframe.html>) 中的质谱图进行比较。表 2~4 分别总结了 APS-II-S、APS-II-G、APS-II-I 的糖苷键连接方式。在唾液消化产物 APS-II-S 中的连接方式及占比如下: →2,3)-Gal-(1→ (9.04%), Glc-(1→ (12.12%), →4,6)-Rha-(1→ (3.66%), →6)-Gal-(1→ (2.97%), →4)-Glc-(1→ (48%), →2)-Gal-(1→ (24.21%); 胃液消化产物

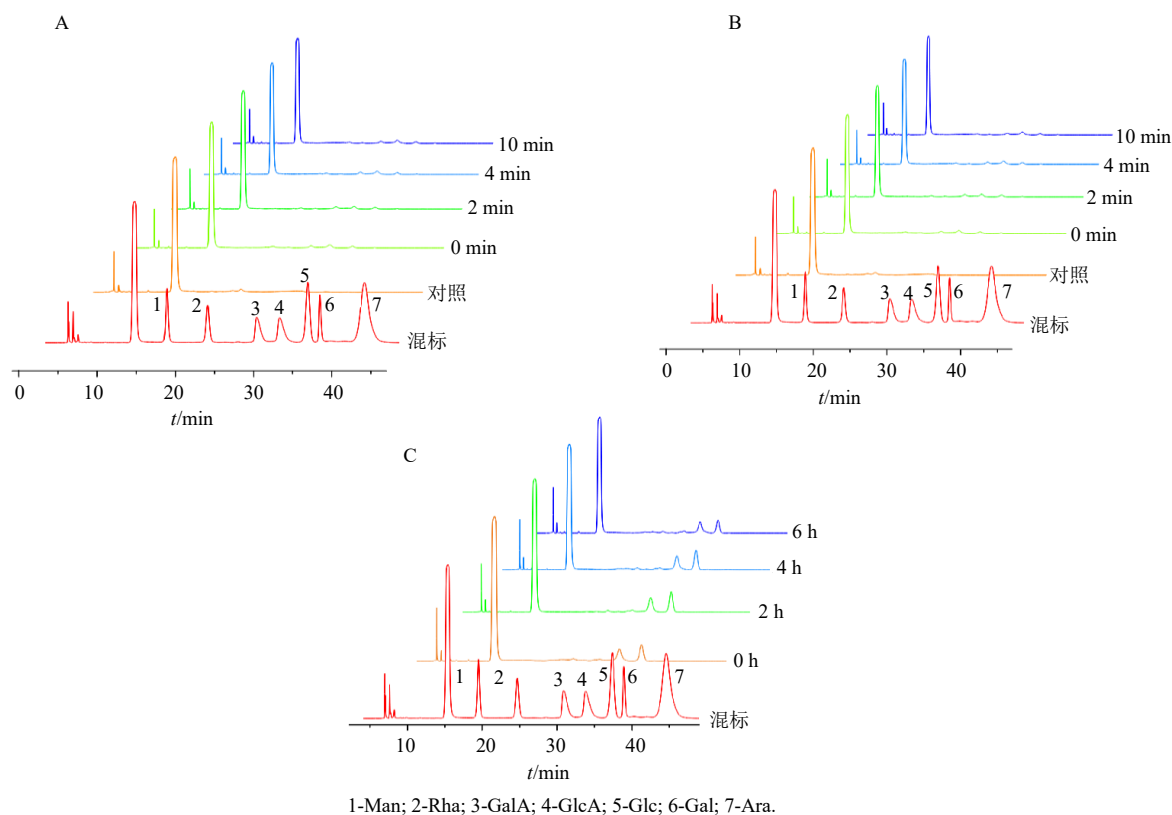


图4 APS-II经唾液(A)、胃(B)、小肠(C)消化后不同时间点游离单糖的HPLC-UV色谱图

Fig. 4 HPLC-UV chromatograms of free monosaccharides at different time points after digestion of APS-II by saliva (A), stomach (B) and small intestine (C)

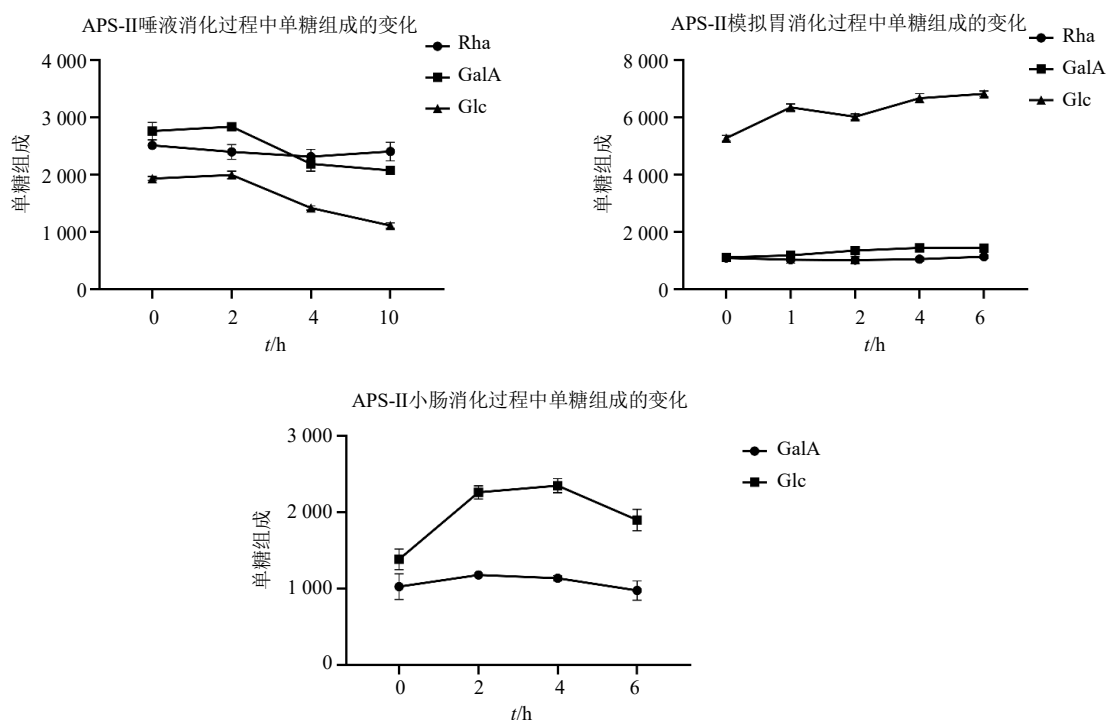


图5 APS-II经唾液、胃、小肠消化后不同时间点单糖的变化

Fig. 5 Changes in monosaccharide composition of APS-II after digestion in saliva, stomach and small intestine

表 2 唾液消化产物 APS-II-S 甲基化分析结果

Table 2 Results of APS-II-S methylation analysis of saliva digestion products

序号	t_R/min	甲基化糖	物质的量比/%	质量碎片 (m/z)	连接方式
1	7.51	4,6-Me ₃ -Gal	9.04	59, 71, 86, 101, 112, 129, 143, 161, 172	→2,3)-Gal(1→
2	9.89	2,3,4,6-Me ₄ -Glc	12.12	58, 71, 87, 118, 129, 145, 163, 205	Glc(1→
3	10.06	2,3-Me ₂ -Rha	3.66	59, 74, 87, 101, 113, 129, 143, 162, 173, 187	→4,6)-Rha-(1→
4	17.50	2,3,4-Me ₃ -Rha	2.97	59, 71, 87, 99, 118, 129, 143, 159, 173, 189	→6)-Gal-(1→
5	18.47	2,3,6-Me ₃ -Glc	48.00	58, 71, 85, 87, 99, 113, 118, 129, 141, 151	→4)-Glc-(1→
6	23.06	3,4,6-Me ₃ -Gal	24.21	59, 71, 88, 100, 113, 119, 145, 161, 190, 205	→2)-Gal-(1→

表 3 胃液消化产物 APS-II-G 甲基化分析结果

Table 3 Results of methylation analysis of APS-II-G in gastric digestion products

序号	t_R/min	甲基化糖	物质的量比/%	质量碎片 (m/z)	连接方式
1	10.95	3,4-Me ₃ -Gal	4.78	60, 74, 87, 100, 130, 143, 159, 174, 190	→2,6)-Gal-(1→
2	13.65	3,6-Me ₃ -Gal	3.68	59, 74, 88, 99, 113, 130, 143, 158, 190, 233	→2,4)-Gal-(1→
3	18.47	2,3,4,6-Me ₄ -Glc	43.62	58, 71, 87, 118, 129, 145, 163, 205	Glc-(1→
4	21.50	2,3,6-Me ₃ -Glc	45.57	58, 71, 85, 87, 99, 113, 118, 129, 141, 151	→4)-Glc-(1→
5	23.07	2,3-Me ₂ -Rha	2.35	59, 74, 87, 101, 118, 129, 143, 161, 174, 202	→3)-Gal-(1→

表 4 小肠消化产物 APS-II-I 甲基化分析结果

Table 4 Methylation analysis results of APS-II-I in intestinal digestion products

序号	t_R/min	甲基化糖	物质的量比/%	质量碎片 (m/z)	连接方式
1	10.74	3,4,6-Me ₃ -Gal	3.16	59, 71, 88, 100, 113, 119, 145, 161, 190, 205	→3)-Gal-(1→
2	11.81	2,4,6-Me ₃ -Gal	2.18	59, 74, 87, 101, 118, 129, 143, 161, 174, 202, 217, 234	→2)-Gal-(1→
3	18.84	2,3,4,6-Me ₄ -Glc	4.81	58, 71, 87, 118, 129, 145, 163, 205	Glc-(1→
4	21.19	2,3,6-Me ₃ -Glc	89.85	59, 71, 87, 99, 118, 131, 142, 157, 173	→4)-Glc-(1→

APS-II-G 的单糖连接方式为：→2,6)-Gal(1→ (4.78%)，→2,4)-Gal(1→ (3.68%)，Glc(1→ (43.62%)，→4)-Glc(1→ (45.57%)，→3)-Gal(1→ (2.35%)；小肠消化产物 APS-II-I 的连接方式主要为→3)-Gal(1→ (3.16%)，→2)-Gal(1→ (2.18%)，Glc(1→ (4.81%)，→4)-Glc(1→ (89.85%)。

3.4 体外消化过程中 APS-II 的 FT-IR 光谱变化

采用 FT-IR 研究体外消化对 APS-II 官能团结构的影响。如图 6 所示，APS-II 经上消化道消化后，

其红外光谱特征峰未消失。其中 3 200~3 600 cm⁻¹ 表示的是-OH 的伸缩振动，2 900 cm⁻¹ 附近是由-CH 振动引起的，1 640 cm⁻¹ 左右的吸收峰是由-COO 的伸缩振动引起的^[17]，而体外消化道不同消化阶段的消化产物在 1 649~1 029 cm⁻¹，吸收峰强度不同，推测可能是由于消化前后发生降解，导致单糖组成不同所引起的。

3.5 体外消化过程中 APS-II 表面形态变化

SEM 被广泛用于观察物质的表面超微结构的形态和组成。APS-II、APS-II-S、APS-II-G、APS-II-I 的 SEM 图见图 7，未经消化的 APS-II 呈多边形，边缘整齐，表面光滑。APS-II-S 表现出大量碎石状的颗粒，外观粗糙。胃消化后 APS-II-G 表面有颗粒的碎石状。在肠道消化 6 h 后，表面呈现出光滑的片状结构，排列较疏松。表明 APS-II 经体外消化后表面形态发生了变化，研究表明，多糖的形态会影响其生物活性^[18]，APS-II 经胃消化后增加了多糖的比表面积，推测其活性发生了变化。

3.6 多糖消化产物的免疫活性

3.6.1 APS-II 体外消化产物对 RAW264.7 细胞增殖的影响 多糖结构的变化可能导致其生物活性的差异。RAW264.7 细胞在机体发挥免疫中扮演重要角

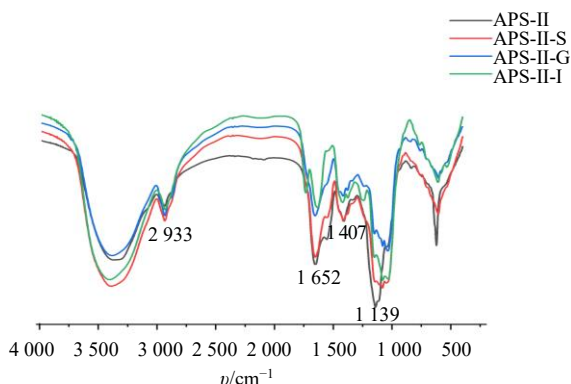


图 6 APS-II 经唾液、胃、小肠消化后的 FT-IR 图
Fig. 6 FT-IR spectra of APS-II digested by saliva, stomach and small intestine

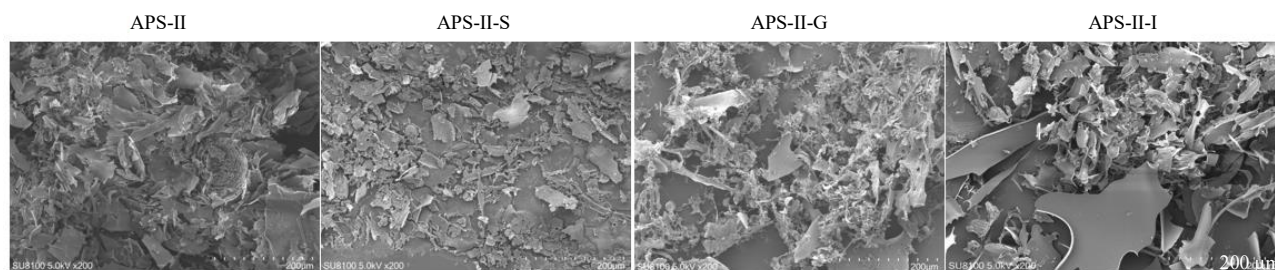
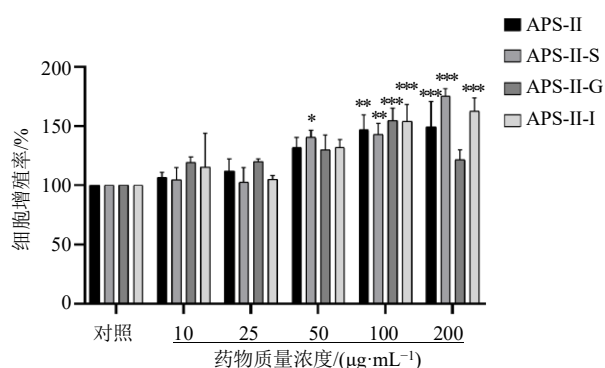


图 7 APS-II 经唾液、胃、小肠消化后的 SEM 图 (×200)

Fig. 7 SEM images of APS-II digested by saliva, stomach and small intestine (× 200)

色,也是探究多糖对免疫调节作用的常用细胞。如图 8 所示,APS-II 体外消化产物 APS-II-S、APS-II-G、APS-II-I 在 10~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 可以促进 RAW264.7 细胞的增殖。



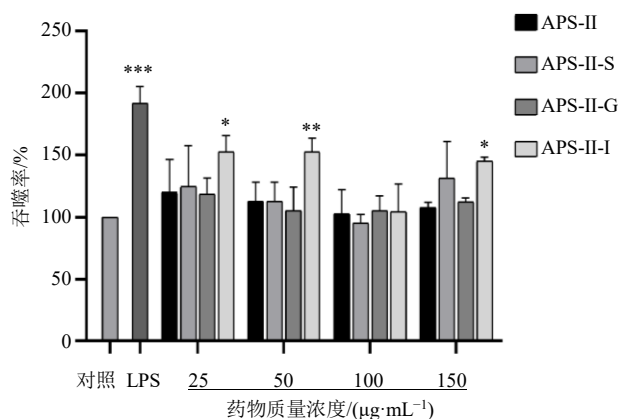
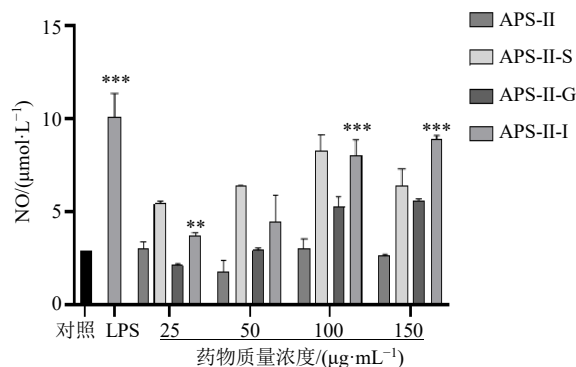
与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下图同。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group, same as below figures.

图 8 APS-II 体外消化产物对 RAW264.7 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 8 Effects of *in vitro* digestion products of APS-II on proliferation of RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.6.2 APS-II 体外消化产物对 RAW264.7 细胞吞噬的影响 巨噬细胞是先天免疫的关键细胞,通过吞噬作用发挥免疫调节功能。中性红由于其相对分子质量大的特点,通过吞噬作用进入细胞。因此,RAW264.7 的吞噬能力通常以中性红摄取量确定。如图 9 所示,给药 24 h 后,与对照组比较,APS-II 及体外消化产物均可以促进 RAW264.7 细胞的吞噬活性,且在相同质量浓度下,经小肠消化后的 APS-II-I 的吞噬活性最强。

3.6.3 APS-II 体外消化产物对 RAW264.7 细胞分泌 NO 的影响 NO 与巨噬细胞对多种病原体的细胞溶解有关,NO 水平的升高可以促进机体的免疫功能。如图 10 所示,给药培养 24 h 后,与对照组比

图 9 APS-II 体外消化产物对 RAW264.7 细胞吞噬活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 9 Effects of *in vitro* digestion products of APS-II on devouring vitality of RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)图 10 APS-II 体外消化产物对 RAW264.7 细胞上清液中 NO 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 10 Effects of *in vitro* digestion products of APS-II on NO level in supernatant of RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

较,APS-II-S、APS-II-G、APS-II-I 在 100、150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 均可以增强 NO 的释放量。且 APS-II 经小肠消化后 APS-II-I 的高浓度处理组几乎接近 LPS 阳性对照组中 NO 的释放量,因此,与 APS-II 及 APS-II-S 和 APS-II-G 相比,APS-II-I 促进 RAW264.7 细胞分泌与释放 NO 的能力更强。

3.6.4 APS-II 体外消化产物对 RAW264.7 细胞分泌细胞因子的影响 IL-10 和 TNF- α 能够增强巨噬细胞的活性和杀伤功能,从而增强巨噬细胞促进免疫应答的能力。如图 11 所示,与对照组比较,25~150 $\mu\text{g/mL}$ APS-II、APS-II-S、APS-II-G、APS-II-I 作用于 RAW264.7 细胞 24 h 后,均可以促进 RAW264.7

细胞释放 TNF- α 和 IL-10。其中小肠消化产物 APS-II-I 对 TNF- α 和 IL-10 分泌的促进作用呈剂量相关性,且 150 $\mu\text{g/mL}$ APS-II-I 对 IL-10 的促进作用与阳性对照组 LPS 作用相当,而未经消化的 APS-II 对 RAW264.7 细胞释放 IL-10 的作用较弱,推测与其单糖组成及相对分子质量有关。

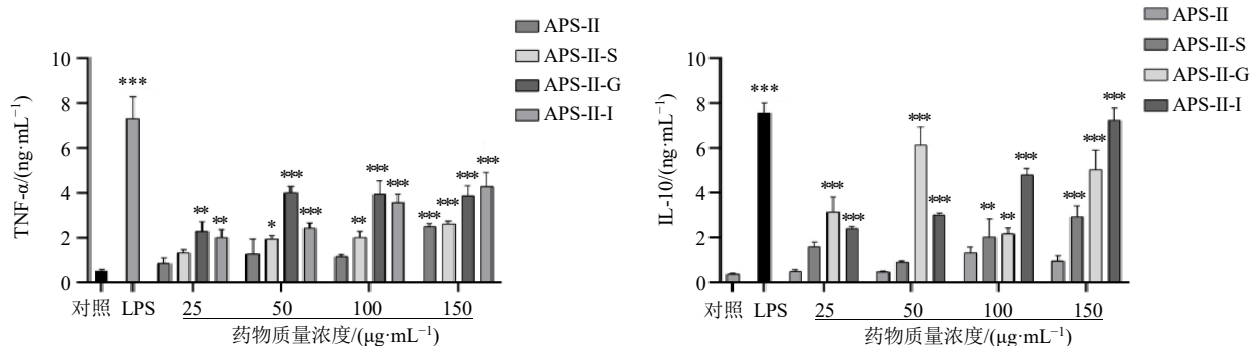


图 11 APS-II 体外消化产物对 RAW264.7 细胞上清液中 TNF- α 和 IL-10 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 11 Effects of *in vitro* digestion products of APS-II on TNF- α and IL-10 levels in supernatant of RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

4 讨论

本研究结果显示,APS-II 的相对分子质量分布和还原糖含量在唾液消化前后无显著性变化;经胃肠消化后相对分子质量降低,产生了游离单糖,还原糖含量升高,表面形态发生了改变,说明 APS-II 在胃肠道中可以被部分消化,这一结论与桔梗多糖^[19]、龙眼肉多糖^[20]、黄秋葵多糖^[21]等研究结果相似,表明多糖不仅可以作为益生元还可以在消化过程中被降解吸收,从而对机体发挥作用。研究表明,当多糖主链上具有 1,4 糖苷键时在消化过程中容易被降解吸收,且在呈酸性的胃液环境下,多糖的 α 构型糖苷键比 β 构型糖苷键容易断裂。课题组前期研究发现,APS-II 主要由 α -(1 $\rightarrow$ 4)糖苷键连接。因此推断 APS-II 在胃肠道中被消化降解与其糖苷键构型有关。

本研究采用体外免疫活性实验比较 APS-II 经唾液、胃、肠消化后的免疫活性,结果显示 APS-II 经胃肠模拟消化后免疫活性强于未经消化的 APS-II。推测与其相对分子质量、单糖组成及糖苷键的连接方式有关。低相对分子质量的多糖在免疫方面的作用优于高相对分子质量的多糖。Li 等^[22]采用超滤法从党参中提取分离出 2 种不同相对分子质量的多糖,通过体外和体内免疫活性筛选实验发现,低相对分子质量的党参多糖表现出的活性强。本研究结果表明,APS-II 经体外胃肠液消化后,相对分子质

量降低,推测相对分子质量是影响其免疫活性的因素之一。

研究表明,单糖组成中含有较高含量的 GalA 和 Rha 的多糖免疫活性强。莫洛希亚多糖中含有 22.4% Rha 和 22.1% GalA,是其发挥活性的成分,具有肠道免疫增强活性,可提高骨髓细胞的增殖活性,促进免疫球蛋白 A 和细胞因子的产生^[23]。本研究结果显示,APS-II 经胃肠消化后,产生了 GalA,易于被小肠吸收,从而发挥免疫活性;经唾液消化后,未观察到游离单糖的产生,由此推测游离单糖 GalA 是导致 APS-II 消化前后免疫活性差异的因素之一。

糖苷键是影响多糖活性的重要因素之一。Wu 等^[24]研究发现,甘草多糖以 4 $\rightarrow$ -D-GalpA-(1 $\rightarrow$ 为骨架,可以促进小鼠 γ 干扰素和 IL-4 的分泌,调节多种信号通路来刺激免疫系统。Lim 等^[25]研究发现半乳聚糖结构的 $\rightarrow$ 3)-Gal(1 $\rightarrow$ 及 $\rightarrow$ 6)-Gal(1 $\rightarrow$ 连接的黄芪多糖结构可以促进免疫活性。本研究对 APS-II 消化后的糖苷键连接方式进行研究,发现其经唾液消化后 APS-II-S 中糖苷键以 1,4 葡萄糖连接为主;胃液消化产物 APS-II-G 中糖苷键以 1,4 葡萄糖和 1,2 半乳糖连接为主;肠液消化产物 APS-II-I 中糖苷键以 1,4 葡萄糖和 1,3 半乳糖连接为主。推测 APS-II 经肠液消化后免疫活性增强与其糖苷键连接方式有关。

综上,本研究通过采用体外模拟消化的方法,对

APS-II 在体内的变化形式进行研究, 并比较经唾液、胃液和小肠消化后的免疫活性, 结果显示, APS-II 在胃肠道中可以被消化, 且免疫活性增强。推测与其相对分子质量、单糖组成和糖苷键连接方式有关。本研究为进一步探究 APS 经肠道吸收后的显效形式奠定了基础, 也为研究其药动学提供了指导作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Sabourian P, Tavakolian M, Yazdani H, *et al.* Stimuli-responsive chitosan as an advantageous platform for efficient delivery of bioactive agents [J]. *J Control Release*, 2020, 317: 216-231.
- [2] Zheng Z M, Pan X L, Wang H Y, *et al.* Mechanism of lentinan intestinal absorption: Clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis [J]. *J Agric Food Chem*, 2021, 69(26): 7344-7352.
- [3] Feng L, Xiao X, Liu J, *et al.* Immunomodulatory effects of *Lycium barbarum* polysaccharide extract and its uptake behaviors at the cellular level [J]. *Molecules*, 2020, 25(6): 1351.
- [4] Wang K P, Cheng F, Pan X L, *et al.* Investigation of the transport and absorption of *Angelica sinensis* polysaccharide through gastrointestinal tract both *in vitro* and *in vivo* [J]. *Drug Deliv*, 2017, 24(1): 1360-1371.
- [5] Han Q B. Critical problems stalling progress in natural bioactive polysaccharide research and development [J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(18): 4581-4583.
- [6] Di T, Chen G J, Sun Y, *et al.* *In vitro* digestion by saliva, simulated gastric and small intestinal juices and fermentation by human fecal microbiota of sulfated polysaccharides from *Gracilaria rubra* [J]. *J Funct Foods*, 2018, 40: 18-27.
- [7] 郑子明, 张玉, 张琪琳, 等. 多糖放射性同位素标记及其体内药动学应用的研究进展 [J]. *中国药理学杂志*, 2022, 57(8): 599-604.
- [8] 胡妮娜, 张晓娟. 黄芪的化学成分及药理作用研究进展 [J]. *中医药信息*, 2021, 38(1): 76-82.
- [9] Zhang Q W, Hao S, Li L F, *et al.* M cells of mouse and human Peyer's patches mediate the lymphatic absorption of an *Astragalus* hyperbranched heteroglycan [J]. *Carbohydr Polym*, 2022, 296: 119952.
- [10] 文雨薇, 李科, 吕弯弯, 等. 黄芪多糖 APS-I、APS-II 制备及其对溃疡性结肠炎小鼠抗炎活性 [J]. *中草药*, 2024, 55(14): 4759-4770.
- [11] 曹宇欣. 基于多糖分子量分布和免疫活性比较的黄芪质量研究 [D]. 太原: 山西大学, 2020.
- [12] Lucas-González R, Viuda-Martos M, Pérez-Alvarez J A, *et al.* *In vitro* digestion models suitable for foods: Opportunities for new fields of application and challenges [J]. *Food Res Int*, 2018, 107: 423-436.
- [13] 崔连杰. 黄芪活性多糖 APS-II 免疫调控机制及其酶解寡糖片段的结构和活性研究 [D]. 太原: 山西大学, 2021.
- [14] Guo Y X, Chen X F, Gong P, *et al.* Advances in the *in vitro* digestion and fermentation of polysaccharides [J]. *Int J Food Sci Technol*, 2021, 56(10): 4970-4982.
- [15] 高文军, 李卫红, 王喜明, 等. 3,5-二硝基水杨酸法测定蔓菁中还原糖和总糖含量 [J]. *中国药业*, 2020, 29(9): 113-116.
- [16] 王珊珊, 孙敏, 王永霞, 等. 鸡腿蘑胞外多糖的形貌结构及分子量动态变化与抗氧化的相关性研究 [J]. *生物技术通报*, 2021, 37(2): 129-137.
- [17] Wu D T, Yuan Q, Guo H, *et al.* Dynamic changes of structural characteristics of snow chrysanthemum polysaccharides during *in vitro* digestion and fecal fermentation and related impacts on gut microbiota [J]. *Food Res Int*, 2021, 141: 109888.
- [18] Minekus M, Alminger M, Alvito P, *et al.* A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food-an international consensus [J]. *Food Funct*, 2014, 5(6): 1113-1124.
- [19] Zhu K X, Yao S W, Zhang Y J, *et al.* Effects of *in vitro* saliva, gastric and intestinal digestion on the chemical properties, antioxidant activity of polysaccharide from *Artocarpus heterophyllus* Lam. (Jackfruit) Pulp [J]. *Food Hydrocoll*, 2019, 87: 952-959.
- [20] Huang F, Hong R Y, Yi Y, *et al.* *In vitro* digestion and human gut microbiota fermentation of Longan pulp polysaccharides as affected by *Lactobacillus fermentum* fermentation [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 147: 363-368.
- [21] Yuan Q, He Y, Xiang P Y, *et al.* Effects of simulated saliva-gastrointestinal digestion on the physicochemical properties and bioactivities of okra polysaccharides [J]. *Carbohydr Polym*, 2020, 238: 116183.
- [22] Li G X, Ju Y H, Wen Y W, *et al.* Screening of *Codonopsis Radix* polysaccharides with different molecular weights and evaluation of their immunomodulatory activity *in vitro* and *in vivo* [J]. *Molecules*, 2022, 27(17): 5454.
- [23] Lee H B, Son S U, Lee J E, *et al.* Characterization, prebiotic and immune-enhancing activities of rhamnogalacturonan-I-rich polysaccharide fraction from molokhia leaves [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 175: 443-450.
- [24] Wu Y, Zhou H, Wei K H, *et al.* Structure of a new glycyrrhiza polysaccharide and its immunomodulatory activity [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1007186.
- [25] Lim J D, Yu C Y, Kim S H, *et al.* Structural characterization of an intestinal immune system-modulating arabino-3,6-galactan-like polysaccharide from the above-ground part of *Astragalus membranaceus* (Bunge) [J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 136: 1265-1272.

[责任编辑 李亚楠]