

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2024.06.012

## 三棱多糖 RSB-4 结构表征及抗炎活性研究

张宁<sup>1,2</sup>, 刘咏<sup>1,2</sup>, 张超<sup>2</sup>, 王军辉<sup>1,2</sup>

(1. 合肥工业大学 农产品生物化工教育部工程研究中心, 安徽 合肥 230601; 2. 合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601)

**摘要:**三棱是一种常见的草本植物, 用作中药具有破血行气、消积止痛等功效。文章采用热水提取法从三棱根茎中提取出多糖 RSB, 再通过 DEAE-Cellulose 阴离子交换层析柱进一步分离纯化得到三棱多糖 RSB-4; 并对 RSB-4 结构进行表征, 结果表明, 三棱多糖 RSB-4 的平均分子量大小为  $9.32 \times 10^5$  Da, 单糖主要由葡萄糖组成, 是一种葡聚糖。结合甲基化和核磁共振谱(nuclear magnetic resonance, NMR)分析结果可知, 三棱多糖 RSB-4 的主链由(1→3)- $\alpha$ -D-GlcP 组成, 在(1→3)- $\alpha$ -D-GlcP 的 O-6 位连有支链 T- $\beta$ -D-GlcP 和(1→6)- $\alpha$ -D-GlcP。免疫活性研究表明, 三棱多糖 RSB-4 显著提高了巨噬细胞 RAW264.7 的增殖活性并促进 NO 的释放。研究结果为三棱多糖在功能性食品、抗炎药物上的开发和应用提供了理论基础。

**关键词:**三棱; 多糖; 理化性质; 结构表征; 抗炎活性

中图分类号: TS201.2

文献标志码: A

文章编号: 1003-5060(2024)06-0796-07

### Structural characterization and anti-inflammatory activity of polysaccharide RSB-4 from *Sparganium stoloniferum*

ZHANG Ning<sup>1,2</sup>, LIU Yong<sup>1,2</sup>, ZHANG Chao<sup>2</sup>, WANG Junhui<sup>1,2</sup>

(1. Engineering Research Center of Bio-process of Ministry of Education, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China; 2. School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China)

**Abstract:** *Sparganium stoloniferum* is a common herb, which has the effects of promoting blood circulation and relieving pain in traditional Chinese medicine. In this paper, polysaccharide RSB was obtained by hot water extraction from the rootstock of *Sparganium stoloniferum*. Then, polysaccharide RSB-4 was further purified by DEAE-Cellulose anion exchange chromatography. The structural characterization of RSB-4 was analyzed. The results showed that average molecular weight of polysaccharide RSB-4 was  $9.32 \times 10^5$  Da, and monosaccharides consist mainly of glucose, which showed that RSB-4 is a type of glucan. Combined the results of methylation with nuclear magnetic resonance (NMR) analysis, the main chain of RSB-4 consisted of (1→3)- $\alpha$ -D-GlcP, with branched T- $\beta$ -D-GlcP and (1→6)- $\alpha$ -D-GlcP attached to the O-6 position of (1→3)- $\alpha$ -D-GlcP. Anti-inflammatory activity studies showed that polysaccharide RSB-4 significantly increased the proliferative activity of macrophage RAW264.7 and promoted the release of NO. The results provide a theoretical basis for the development and application of *Sparganium stoloniferum* polysaccharides in functional foods and anti-inflammatory drugs.

**Key words:** *Sparganium stoloniferum*; polysaccharide; physicochemical property; structural characterization; anti-inflammatory activity

收稿日期: 2023-03-23; 修回日期: 2023-04-14

基金项目: 安徽省重点研究与开发计划资助项目(2023n06020034)

作者简介: 张宁(1998—), 男, 安徽安庆人, 合肥工业大学硕士生;

刘咏(1968—), 女, 安徽凤阳人, 合肥工业大学教授, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: liuyong@hfut.edu.cn;

王军辉(1976—), 男, 广西陆川人, 博士, 合肥工业大学教授, 硕士生导师。

## 0 引 言

多糖是一种重要的活性大分子<sup>[1]</sup>,具有多种显著的生理功能,包括抗肿瘤<sup>[2-3]</sup>、抗氧化<sup>[4]</sup>、抗炎<sup>[5]</sup>、免疫调节<sup>[6]</sup>等。

三棱(*Sparganium stoloniferum*)是常用的一味中药<sup>[7]</sup>,其味辛、苦,性平,具有显著的抗凝血、抗血栓以及镇痛效果<sup>[8]</sup>。有研究表明,三棱中的化学成分对肿瘤细胞生长具有显著的抑制作用<sup>[9]</sup>。三棱多糖也被证实具有良好的抗氧化活性<sup>[10]</sup>,除此之外,对三棱多糖其他活性的研究较少。因此,对三棱多糖进行结构和活性研究具有重要意义。

本文对三棱多糖进行分离和纯化,在此基础上研究了纯化多糖的理化性质、结构特征以及抗炎活性,包括对巨噬细胞增殖、NO 释放的影响等。对三棱多糖的研究为进一步深入阐明其活性机制、相关功能性食品和药物的开发提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料及仪器

三棱根茎购自河北省同源堂,使用高速药物粉碎机粉碎后在干燥环境下保存备用;小鼠巨噬细胞 RAW264.7 细胞系由合肥工业大学刘健教授实验室提供。

实验所用仪器有:旋转蒸发仪;冷冻干燥机;高速离心机;酶标仪;CO<sub>2</sub> 培养箱;超净工作台。

### 1.2 三棱多糖的提取

三棱根茎经冷冻干燥后,使用高速粉碎机粉碎,过 200 目筛后置于索氏提取器中在 90 °C 无水乙醇脱色脱脂 24 h,烘干备用。

取 150 g 经乙醇脱色脱脂后的三棱粉末,用热水以 1:30 的料液比提取 2.5 h,重复提取 3 次。提取液经 4 层纱布过滤后,浓缩、离心、取上清,用 80% 乙醇醇沉,得到沉淀复溶于蒸馏水,再用 Sevag 试剂(V(正丁醇):V(三氯甲烷)为 1:4~1:5)脱蛋白,重复数次,分液漏斗中去除下层蛋白质,上层溶液浓缩。用截留分子量 3 500 Da 透析袋自来水透析 3 d,去离子水透析 2 d。透析液于 -20 °C 下冷冻 24 h,室温下解冻,离心去除不溶物,冷冻干燥得到三棱热水提多糖,命名为 RSB。

取 110 mg 三棱粗多糖 RSB 溶于 10 mL 水中,并于 3 500 r/min 下离心 10 min。取上清液缓慢滴加到 DEAE-Cellulose 阴离子交换层析柱(1.6 cm×40 cm)中。依次采用去离子水、0.2、

0.3、0.4 mol/L NaCl 溶液对层析柱中粗多糖 RSB 进行洗脱,用数控自动部分收集器收集(6 min/管),流速设定为 2.0 mL/min。收集洗脱液浓缩、透析、离心、冷冻干燥后得到纯化三棱多糖,命名为 RSB-4(0.4 mol/L NaCl)。

### 1.3 三棱多糖的理化性质测定

#### 1.3.1 总糖质量分数的测定

以葡萄糖为标准品,准确配制 0、0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、5.0 μg/mL 不同质量浓度的标准溶液。采用苯酚-硫酸法测定每个质量浓度梯度的标准溶液,并于酶标仪下测定溶液在波长为 490 nm 处的吸光度 A。以标准品质量浓度为 X 轴,A 值为 Y 轴绘制标准曲线。称取三棱多糖样品并配置适当质量浓度的多糖溶液,苯酚-硫酸法测定样品溶液的 A 值,多糖中总碳水化合物质量分数利用标准曲线计算得出。

#### 1.3.2 蛋白质质量分数的测定

配制质量浓度为 1 mg/mL 的牛血清蛋白标准溶液。依次加入 0、20、40、60、80、100 μL 的蛋白标准溶液于试管中,并向试管中加入去离子水至 1 mL 配制成不同质量浓度梯度的标准溶液。用考马斯亮蓝法测定每个质量浓度梯度的标准溶液,并于酶标仪下测定溶液在波长为 595 nm 处的 A 值。根据不同质量浓度的吸光度值绘制标准曲线,计算回归方程。多糖溶液以上述方法进行相同处理,测定其在 595 nm 处吸光度值,利用标准曲线计算出多糖中蛋白质质量分数。

#### 1.3.3 糖醛酸质量分数的测定

以半乳糖醛酸作为标准品,准确配制 0、10、20、30、40、50、60、70、80 μg/mL 不同质量浓度的标准溶液,用间羟基联苯法测定每个质量浓度梯度的标准溶液,并于酶标仪下测定溶液在波长为 520 nm 处的 A 值。根据不同质量浓度的吸光度值绘制标准曲线,计算回归方程。多糖溶液以上述方法进行相同处理,测定其在 520 nm 处吸光度值,利用标准曲线计算出多糖中糖醛酸质量分数。

#### 1.3.4 分子量测定

采用高效凝胶渗透色谱法(high-performance gel permeation chromatography, HPGPC)测定多糖的平均分子量及均一性。称取 2 mg 多糖样品,溶于 2 mL 超纯水中,充分溶解后用无机滤膜(孔径为 0.22 μm)过滤,并将滤液装入样品瓶中待用。用进样器取 10 μL 样品溶液用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)

检测,流动相为超纯水,流速为 0.5 mL/min。系统为 Waters 公司 E2695 系统,检测器为 2424 蒸发光散射检测器(ELSD),色谱柱为 UltrahydrogelTM 2000 (7.8 mm×300 mm)和 UltrahydrogelTM 500 (7.8 mm×300 mm)串联线性柱。通过 Detran 系列标准品葡萄糖绘制分子量标准曲线。

### 1.3.5 紫外光谱测定

用去离子水准确配制质量浓度为 0.5 mg/mL 的多糖溶液,并在扫描波长范围为 200~400 nm 的条件下于紫外扫描光谱仪中进行检测,并记录紫外光谱值。

## 1.4 三棱多糖的化学结构测定

### 1.4.1 单糖组成测定

参考文献[11]所述方法,称取 8 mg 待测干燥样品置于规格为 10 mL 的安培管中,加入 4 mL 浓度为 2 mol/L 的三氟乙酸,并于 120 °C 条件下水解 4 h 后减压蒸干。向样品中加入 NaBH<sub>4</sub> 水溶液还原 3 h,用 25% 乙酸溶液中和过量的 NaBH<sub>4</sub> 于旋转蒸发仪上减压蒸干,并置于烘箱中 120 °C 条件下干燥 25 min。依次向样品中加入 3 mL 乙酸酐和吡啶并于烘箱中 100 °C 下作用 1 h。加入 3 mL 甲苯减压蒸干,用氯仿和去离子水复溶后,萃取数次并除去上清液。用无水硫酸钠除去有机相中水分,过有机滤膜(孔径为 0.22 μm)后将样品溶液装入瓶中于气相色谱仪中进行检测。根据标准品的出峰时间判定多糖中的单糖成分,以峰面积计算单糖的摩尔分数。

### 1.4.2 红外光谱测定

称取多糖样品 5~8 mg,将样品按压后用傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared, FTIR)仪于波数为 4 000~400 cm<sup>-1</sup> 条件下进行测定,记录光谱值后将样品回收。

### 1.4.3 甲基化分析

根据文献[12]方法对多糖进行甲基化处理,并稍作修改。将多糖置于真空干燥箱中 50 °C 条件下干燥 3~4 h 至样品烘干;称取约 30~35 mg 多糖样品于反应管中,并向管中加入约 5 mL 无水二甲基亚砜,氮气条件下磁力搅拌 0.5 h 溶解;向管中加入无油氢化钠,并立即塞紧瓶塞,同样在氮气条件下搅拌 8~10 h 至溶液呈墨绿色;避光条件下,向反应管中缓慢滴加约 2 mL CH<sub>3</sub>I 于多糖溶液中,并在温度为 30 °C 的油浴锅中磁力搅拌过夜。用氮气吹出管中易挥发溶剂,并将反应结束后的多糖溶液透析后冻干,红外光谱检测甲基化

后的多糖样品的羟基吸收峰是否已去除。称取 8 mg 已完全甲基化多糖样品置于容量为 10 mL 的安培管中,并向管中加入 4 mL 体积分数为 88% 的甲酸水解,封管后于 100 °C 条件下作用 6 h,反应结束后将溶液减压蒸干。按照上述单糖组成样品处理步骤将多糖衍生化为糖醇乙酸酯后进行气相色谱质谱联用仪(gas chromatography mass spectrometry, GC-MS)分析。

### 1.4.4 核磁共振光谱分析

称取 50 mg 样品于真空干燥箱中干燥 6 h,再溶于 99.9% 的重水(D<sub>2</sub>O)中至溶液呈饱和状。并用核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)仪对其进行<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR、HSQC 和 HMBC 波谱测定。

## 1.5 三棱多糖的抗炎活性研究

小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 细胞于 DMEM 培养基(10% 小牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素)中,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱条件下培养。

采用 MTT 法测定三棱多糖对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 增殖活性的影响<sup>[13-14]</sup>。用 DMEM 培养基溶液将细胞密度稀释为 1.0×10<sup>5</sup> 个/mL,等量接种 150 μL 细胞液于 96 孔板中,孵育 24 h。向孔板中加入 50 μL 多糖溶液(质量浓度梯度依次为 20、50、100、200、500 μg/mL),反应 48 h 后加入 20 μL 质量浓度为 5 mg/mL 的 MTT 试剂,继续培养 4 h 后去细胞上清,等量加入 200 μL DMSO,振荡反应 10 min 后使用酶标仪在 570 nm 处测定 A 值。空白组为 DMEM 高糖培养基,脂多糖(LPS)为正对照组。

增殖指数反映多糖对巨噬细胞的增殖作用,其计算公式为  $A_{\text{sample}}/A_{\text{control}}$ 。用 DMEM 培养基溶液将细胞密度稀释为 1.0×10<sup>5</sup> 个/mL,等量接种 150 μL 细胞液于 96 孔板中,孵育 24 h。分别加入不同质量浓度的多糖溶液,使其终质量浓度依次为 20、50、100、200、500 μg/mL,培养 2 h 后加入 LPS(终质量浓度为 1.0 μg/mL)于 96 孔板中,继续培养 24 h 后吸取 50 μL 细胞液于新板中,并向板中加入 Griess 试剂,作用 10 min 后在波长为 540 nm 下用酶标仪测定其 A 值。空白对照组为 DMEM 高糖培养基, LPS 为正对照组。根据标准品 NaNO<sub>2</sub> 绘制的标准曲线计算 NO 释放量。

## 1.6 数据处理

实验数据以(平均值±标准差)的形式表示,

采用 Origin 9.0 软件绘制图表,采用 SPSS 17.0 软件进行数据统计处理,应用 One-way ANOVA 方法分析比较各组实验数据间显著性关系。\* 表示  $P < 0.05$  差异显著, \*\* 表示  $P < 0.01$  差异极显著。

## 2 结果分析

### 2.1 三棱多糖的分离纯化分析

三棱根茎粉未经脱色脱脂后,热水提取 3 次,提取液经浓缩、脱蛋白、脱色、透析后得到三棱热水提多糖(RSB)。RSB 经过 DEAE-Cellulose 阴离子交换层析柱(1.6 cm×40 cm)进行分离纯化,经 0、0.2、0.3、0.4 mol/L NaCl 溶液洗脱,浓缩、透析和冷冻干燥后,得到纯化三棱多糖 RSB-4 (0.4 mol/L NaCl),洗脱曲线如图 1 所示。

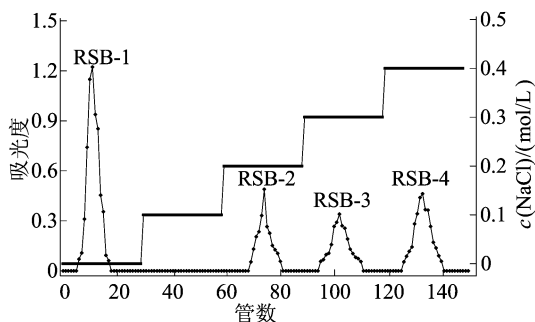


图1 多糖 RSB 的 DEAE-Cellulose 离子交换层析柱洗脱曲线

### 2.2 三棱多糖 RSB-4 的化学组成分析

三棱多糖分级组分 RSB-4 的化学成分分析结果表明,RSB-4 的总碳水化合物质量分数为 93.14%,糖醛酸质量分数为 0.75%,蛋白质质量分数为 0.51%。

### 2.3 三棱多糖 RSB-4 分子量的测定结果

三棱多糖分级组分 RSB-4 的 HPGPC 检测结果如图 2 所示。

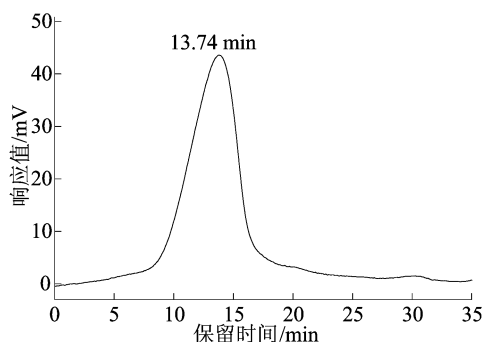


图2 三棱多糖分级组分 RSB-4 的 HPLC 谱图

从图 2 可以看出,三棱多糖 RSB-4 的 HPGPC 结果显示单一且对称的吸收峰,说明三棱多糖 RSB-4 为均一组分。根据吸收峰的出峰时间及多糖分子量标准曲线,估算出三棱多糖 RSB-4 的平均分子量大小为  $9.32 \times 10^5$  Da。

### 2.4 三棱多糖 RSB-4 的紫外光谱分析

三棱多糖 RSB-4 的紫外光谱检测结果如图 3 所示。从图 3 可以看出,RSB-4 在波长 260、280 nm 处显示微弱的吸收峰,表明三棱多糖 RSB-4 中含有少量的核酸或蛋白质。

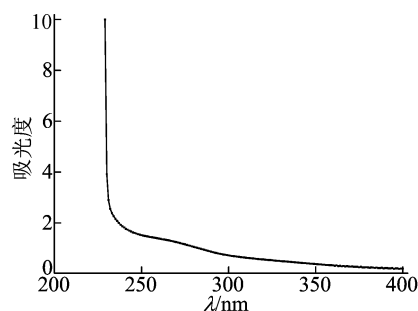


图3 三棱多糖 RSB-4 的紫外光谱检测结果

### 2.5 三棱多糖 RSB-4 的单糖组成

单糖标准品和三棱多糖 RSB-4 的 GC-MS 分析结果如图 4 所示。

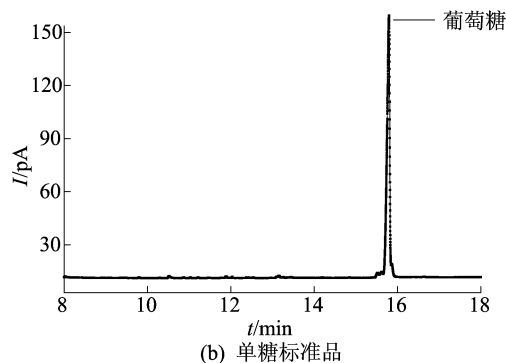
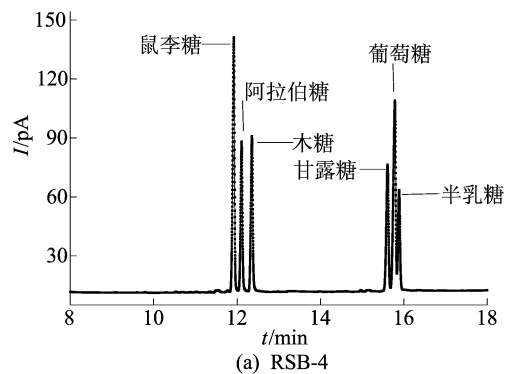


图4 三棱多糖 RSB-4 的 GC-MS 分析结果

通过与单糖标准品各吸收峰进行比对可得三棱多糖 RSB-4 的单糖主要由葡萄糖组成,因此三

棱多糖 RSB-4 是葡聚糖。

## 2.6 三棱多糖 RSB-4 的 FTIR 和甲基化分析

三棱多糖 RSB-4 的 FTIR 谱图如图 5a 所示。从图 5a 可以看出 RSB-4 具有典型的多糖结构。

将三棱多糖 RSB-4 进行甲基化处理,其 FTIR 谱图如图 5b 所示。由图 5b 可知,在  $3\,374\text{ cm}^{-1}$  处的 O—H 特征吸收峰消失,同时由于三棱多糖 RSB-4 经甲基化处理后引入新的甲基,使得  $2\,928\text{ cm}^{-1}$  处的 C—H 键吸收峰有了极大的增强,以上结果表明

三棱多糖 RSB-4 已完全甲基化。

将已完全甲基化的三棱多糖 RSB-4 经一系列化学方法处理后获得糖醇乙酰酯并进行 GC-MS 分析,结果见表 1 所列。

从表 1 可以看出,三棱多糖 RSB-4 糖链中主要存在 1-Linked-Glc $p$ 、1,6-Linked-Glc $p$  和 1,3,6-Linked-Glc $p$  共 3 种糖残基连接方式,三者的摩尔比为 0.9 : 1.1 : 1.8,总末端残基大约等于总分支点残基。

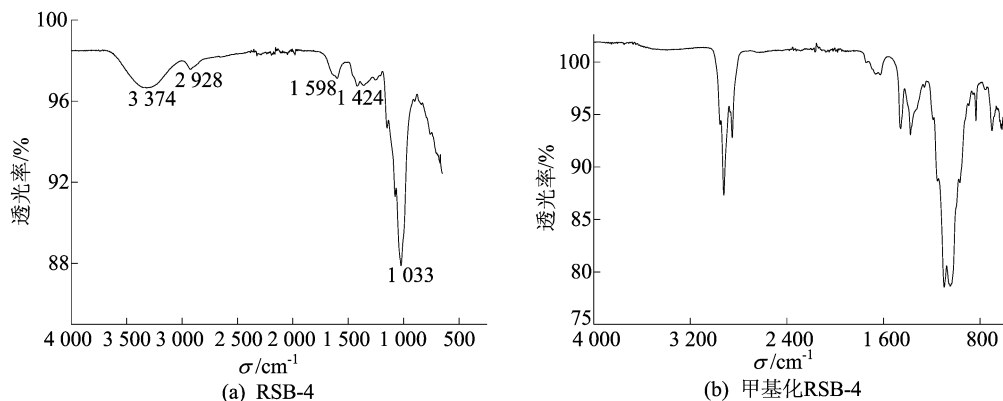


图 5 三棱多糖 RSB-4 的 FTIR 谱图

表 1 三棱多糖 RSB-4 的甲基化分析

甲基化衍生物	连接方式	质子碎片质荷比
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glc $p$	1-Linked-Glc $p$	87,102,118,129,145,162,205
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Glc $p$	1,6-Linked-Glc $p$	43,58,71,87,99,101,117,129,169,170,189
2,4-Me <sub>2</sub> -Glc $p$	1,3,6-Linked-Glc $p$	43,85,87,101,117,130,145,161,206

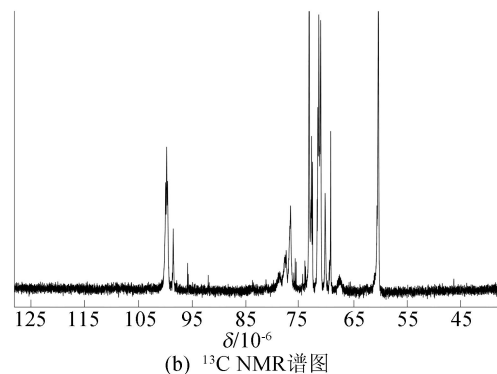
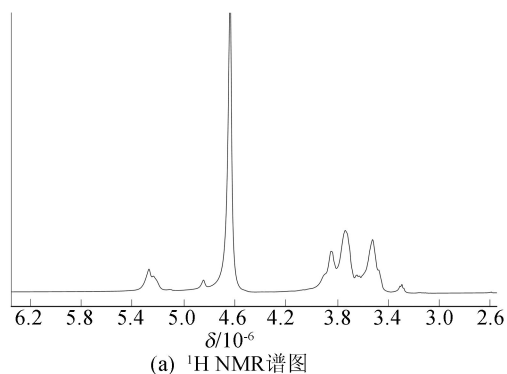
## 2.7 三棱多糖 RSB-4 NMR 分析结果

为进一步研究三棱多糖 RSB-4 中的糖残基种类、连接位点及构型,对三棱多糖 RSB-4 进行核磁共振分析。三棱多糖 RSB-4 的核磁共振 ( $^1\text{H}$  NMR、 $^{13}\text{C}$  NMR、HSQC 和 HMBC) 图如图 6 所示。

结合甲基化分析结果以及相关文献报

道<sup>[15-16]</sup>,对三棱多糖 RSB-4 的糖残基异头氢进行了化学位移归属,见表 2 所列。

由图 6a 可知, $\delta$  位于  $5.27 \times 10^{-6}$  处的信号峰归属于 1,3,6-Linked-Glc $p$  的 H1, $\delta$  位于  $4.85 \times 10^{-6}$  处的信号峰归属于 1-Linked-Glc $p$  的 H1, $\delta$  位于  $5.24 \times 10^{-6}$  处的信号峰归属于 1,6-Linked-Glc $p$  的 H1。



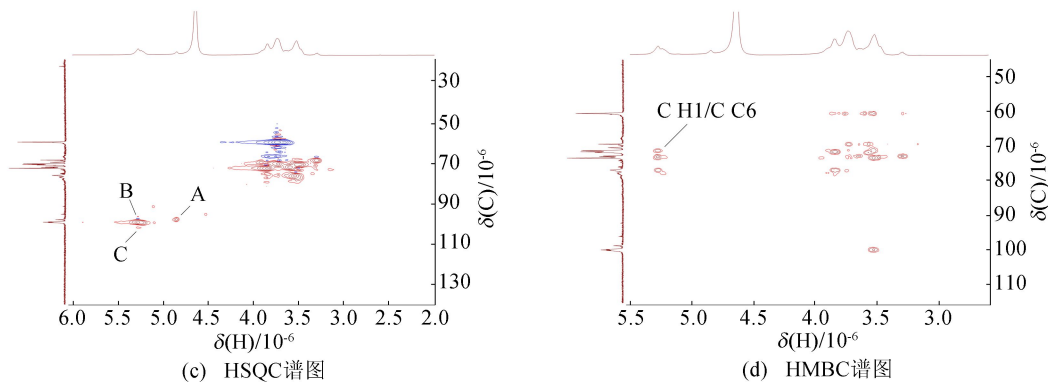


图 6 三棱多糖 RSB-4 的核磁共振谱图

表 2 三棱多糖 RSB-4 糖残基化学位移归属

交叉峰	糖残基	H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6/C6
A	$\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$	4.85/98.42	3.72/70.95	3.76/74.36	3.52/71.53	3.48/72.42	3.30/61.38
B	$\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$	5.24/95.91	3.48/73.85	3.68/75.27	3.57/73.53	3.43/72.86	3.74/63.17
C	$\rightarrow$ 3,6)- $\alpha$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$	5.27/99.73	3.47/72.79	3.85/77.02	3.85/71.63	3.54/73.45	3.30/69.40

由图 6b 可知,  $\delta$  位于  $99.73 \times 10^{-6}$ 、 $98.42 \times 10^{-6}$ 、 $95.91 \times 10^{-6}$  处的信号峰分别归属于 1,3,6-Linked-Glcp、1-Linked-Glcp 和 1,6-Linked-Glcp 的 C1, 且 RSB-4 的糖残基存在  $\alpha$  和  $\beta$  2 种不同构型。结合图 6c, 可以确定异头碳和异头氢的交叉峰 A (4.85/98.42)、B (5.24/95.91)、C (5.27/99.73)。从 GC-MS 分析结果中可以推断出, 1,3,6-Linked-Glcp 是 RSB-4 中最主要的连接方式, HMBC 谱图(图 6d)有很明显的交叉峰 C H1/C C6 验证上述分析结果。

综合以上单糖组成、甲基化以及 NMR 分析结果可以推断出, 三棱多糖 RSB-4 的主链由 (1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-Glcp 组成, 在 (1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-Glcp 的 O-6 位连有支链 T- $\beta$ -D-Glcp 和 (1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-Glcp。

### 2.8 三棱多糖 RSB-4 的抗炎活性分析

三棱多糖 RSB-4 对巨噬细胞增殖活性的影响如图 7 所示, 从图 7 可以看出, 三棱多糖 RSB-4 在实验质量浓度范围内无细胞毒性, 且表现为促进巨噬细胞增殖的作用。在实验质量浓度为 20~200  $\mu$ g/mL 范围内, 多糖组 RSB-4 的巨噬细胞增长趋势呈现出剂量依赖性。随着多糖质量浓度的增加, RSB-4 的增殖指数增强, 当多糖质量浓度为 200  $\mu$ g/mL 时, 增殖指数达到最大值 1.46, 相较于空白对照组, 三棱多糖 RSB-4 对巨噬细胞 RAW264.7 的增殖率提升了约 46.4%。

RSB-4 的部分酸水解组分 RSB-4S 对巨噬细胞活力的影响如图 7 所示。RSB-4S 组分对 RAW264.7 细胞增殖活性的影响随着质量浓度

的增大而增大, 在质量浓度为 500  $\mu$ g/mL 时, 增殖指数最高, 达到 1.48。从总体上看, RSB-4S 组细胞活力相较于组分 RSB-4 略微提高, 这说明多糖支链的缺失及分子量的减小促进了三棱多糖 RSB-4 对巨噬细胞活力的影响。

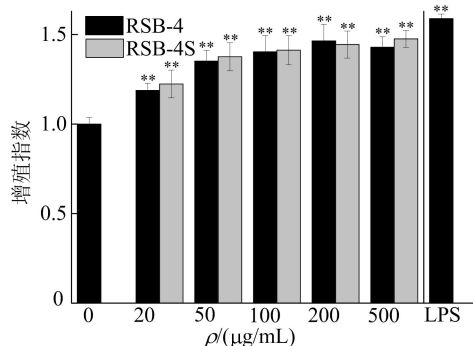


图 7 三棱多糖 RSB-4 和 RSB-4S 对巨噬细胞增殖活性的影响

一氧化氮(NO)作为一种炎症介质是评估体内炎症疾病严重程度的重要指标, 同时也是判断有机体或细胞内炎症是否发生的依据。三棱多糖 RSB-4 对巨噬细胞 NO 释放量的影响如图 8 所示。从图 8 可以看出, 与空白对照组相比, 正对照组经 LPS 刺激后其 NO 释放量大量增加。三棱多糖 RSB-4 在各质量浓度条件下刺激巨噬细胞 RAW264.7 的 NO 释放量与空白对照组相比均显示出极显著差异 ( $P < 0.01$ ), 在三棱多糖质量浓度为 20~500  $\mu$ g/mL 的范围内, RSB-4 对 LPS 诱导的 NO 的产生具有一定的抑制作用。在实验质量浓度范围内, 多糖组抑制巨噬细胞 NO 的生

成与多糖质量浓度呈现出剂量依赖性。当质量浓度为 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,抑制率达到最高,约为 23.74%。

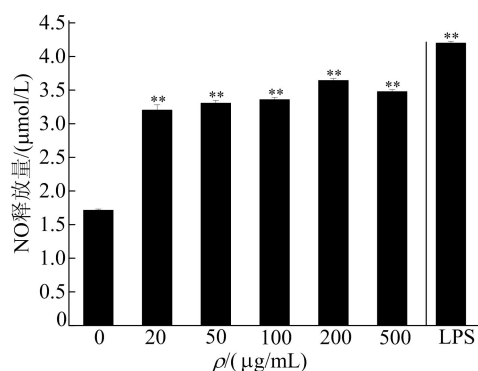


图 8 三棱多糖 RSB-4 对巨噬细胞 NO 释放量的影响

### 3 结 论

本文对三棱热水提取多糖 RSB 进一步分离纯化,对获得的分级组分 RSB-4 进行结构表征和抗炎活性的研究。单糖组成分析结果显示 RSB-4 是一种葡聚糖,平均分子量大小为  $9.32 \times 10^5$  Da。结合甲基化和 NMR 分析的结果,推测 RSB-4 的主链由  $(1 \rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-GlcP}$  组成,在  $(1 \rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-GlcP}$  的 O-6 位连有支链  $\text{T-}\beta\text{-D-GlcP}$  和  $(1 \rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-GlcP}$ 。在体外抗炎活性实验中,RSB-4 显著提高了巨噬细胞 RAW264.7 的增殖活性并促进 NO 的释放。RSB-4 表现出较好的抗炎活性可能与其单糖组成中含有大量的葡萄糖有关。

本研究结果为三棱多糖 RSB-4 在功能性食品和抗炎药物等方面的开发和应用提供了理论基础。同时,三棱多糖 RSB-4 抗炎活性的具体机制以及结构与活性的关系还需进一步研究。

### [参 考 文 献]

- [1] SONG Q, GU L, WU H, et al. Chemical structure and ACE inhibitory activity of polysaccharide from *Artemisia vulgaris* L. [J]. Journal of Molecular Structure, 2022, 1250(3): 131896.
- [2] FANG J, WANG Z, WANG P, et al. Extraction, structure and bioactivities of the polysaccharides from *Ginkgo biloba*: a review [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 162: 1897-1905.
- [3] ZHANG S, LI Y, LI Z, et al. Structure, anti-tumor activity, and potential anti-tumor mechanism of a fungus polysaccharide from *Fomes officinalis* [J]. Carbohydrate Polymers, 2022, 295: 119794.
- [4] 江和栋,牛仙,万仁口,等.灵芝孢子多糖的提取工艺优化及单糖组成、抗氧化活性分析 [J]. 中国食品学报, 2021, 21(4): 159-167.
- [5] LIU Y, YE Y, HU X, et al. Structural characterization and anti-inflammatory activity of a polysaccharide from the lignified okra [J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 265: 118081.
- [6] 牧丹,萨仁高娃,包良,等.天冬多糖的结构、免疫调节活性及体外抗氧化活性 [J]. 中国食品学报, 2022, 22(8): 51-60.
- [7] 王新胜,吴启南,陈广云,等.三棱化学成分与质量评价的研究进展 [J]. 中国药房, 2013, 24(15): 1417-1420.
- [8] 胡旭光,邓小慧,李淑贤,等.不同三棱提取物药理活性的比较研究 [J]. 陕西中医, 2009, 30(8): 1091-1093.
- [9] 袁涛. 中药三棱化学成分的研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2007.
- [10] WANG X, WU Y, WU Q, et al. Antioxidant activities *in vitro* and *in vivo* of water-soluble polysaccharide isolated from *Sparganium stoloniferum* Buch.-Ham [J]. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 2015, 28(1): 147-151.
- [11] WANG J H, ZHANG B W, SUN Y H, et al. Structure of polysaccharide DIPS-2 from *Doctyophora indusiata* and its anti-fatigue activities [J]. Current Topics in Nutraceutical Research, 2015, 13(4): 213-219.
- [12] HAKOMORI S. Rapid permethylation of glycolipids and polysaccharides by methylsulfinyl cabanion in dimethyl sulfoxide [J]. Journal of Biochemistry, 1964, 55(2): 205-208.
- [13] CHEN H, JIAO H, CHENG Y, et al. *In vitro* and *in vivo* immunomodulatory activity of okra (*Abelmoschus esculentus* L.) polysaccharides [J]. Journal of Medicinal Food, 2016, 19(3): 253-265.
- [14] WANG H, DENG X, ZHOU T, et al. The *in vitro* immunomodulatory activity of a polysaccharide isolated from *Kadsura marmorata* [J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 97(2): 710-715.
- [15] ZHANG B, LEUNG W K, ZOU Y, et al. Immunomodulating polysaccharides from *Lessertia frutescens* leaves: isolation, characterization and structure activity relationship [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2014, 152(2): 340-348.
- [16] CHEN Y, ZHANG H, WANG Y, et al. Sulfated modification of the polysaccharides from *Ganoderma atrum* and their antioxidant and immunomodulating activities [J]. Food Chemistry, 2015, 186(3): 231-238.

(责任编辑 闫杏丽)