

## 天冬多糖的结构、免疫调节活性及体外抗氧化活性

牧丹<sup>1</sup>, 萨仁高娃<sup>1</sup>, 包良<sup>1</sup>, 陈永福<sup>2</sup>, 苏日娜<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>内蒙古医科大学 呼和浩特 010010)

<sup>2</sup>内蒙古农业大学 呼和浩特 010010)

**摘要** 目的:探究天冬多糖的结构特征、免疫调节活性和体外抗氧化活性,为后续天冬多糖研究提供依据。方法:采用水提醇沉法提取天冬粗多糖,Sevage 法脱蛋白和分级醇沉法对脱蛋白后的多组分多糖进行分离,苯酚-浓硫酸法测定其糖含量;采用高效凝胶渗透色谱法测定其相对分子质量,高效离子色谱法测定其单糖组成;采用红外光谱法分析其结构;对于均一分子质量的 80%醇沉多糖分级产物(以下简称 TD-80),采用小鼠脾淋巴细胞和巨噬细胞 RAW264.7 评价 TD-80 的免疫调节活性及其相关细胞因子的分泌情况。通过测定 DPPH 自由基清除能力、超氧阴离子清除能力评价其体外抗氧化活性。结果:天冬粗多糖糖含量为 63.13%,天冬脱蛋白冻干粉糖含量达 73.98%。不同体积分数乙醇分级醇沉后,80%醇沉产物均为均一分子质量的多糖产物 TD-80( $M_w = 7.3 \text{ ku}$ ,  $M_w/M_n = 2.68$ )。TD-80 主要含有 7 种单糖组成,其中以半乳糖和半乳糖醛酸为主,属于酸性杂多糖。TD-80 能促进脾淋巴细胞的增殖,并呈质量浓度依赖关系,对相关细胞因子(TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  和 IL-6)的分泌有一定的刺激作用,呈现一定的免疫调节活性和抗氧化活性。结论:本方法具有操作简便、结果准确等优点,可为天冬及其它类似药材中多糖的提取、纯化及药理活性研究提供参考。

**关键词** 天冬; 多糖; 结构; 免疫调节活性; 抗氧化活性

文章编号 1009-7848(2022)08-0051-10 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2022.08.006

天冬 (*Radix asparagi*) 为百合科植物天门冬 [*Asparagus cochinchinensis* (Lour.) Merr.] 的干燥块根, 是国家卫生部公布的第三批药食两用资源之一<sup>[1]</sup>, 是一种既可食用也可药用的珍品, 经济价值较高。其味甘、苦, 性寒, 归肺肾经, 具有养阴润燥、清肺生津的功效, 用于肺燥干咳、顿咳痰黏、咽干口渴、肠燥便秘等症<sup>[2]</sup>。根据《现在蒙医药学》的记录, 天冬、喜马拉雅紫茉莉、黄精与玉竹并列在蒙医药四大传统的根类补益药材之中, 并具有滋补、固精、祛协日乌苏、镇赫依(指各生理功能的动力)等功效<sup>[3-4]</sup>, 主治协日乌苏病, 身体虚弱、头晕、妇赫依症、肾寒、遗精、阳痿、阴伏热、陈热等病症<sup>[5]</sup>。《名医别录》载“去寒热, 养肌肤, 益气力”, 《月华于本草》载“镇心, 润五脏, 益皮肤, 悦颜色”, 能使肌肤艳丽, 保持青春活力<sup>[6]</sup>。由此可见, 天冬滋养肌肤的功能明显, 民间有采用“天冬煮猪蹄”“天冬煮火腿”“天冬炖母鸡”制作的食谱, 极大地丰富了人们

的养生美食范围<sup>[7]</sup>。常食天冬能够改善肌肤的血液循环, 增强代谢功能, 具有抗衰老的作用, 尤其适合爱美人士食用。据研究报道, 天冬主要化学成分包括 19 种氨基酸、多糖与其它活性小分子化合物, 如  $\beta$ -谷甾醇、胡萝卜甾醇、9-二十七烷、异菝菹皂甙元、薯蓣皂甙元、洋菝菹皂甙元-3-O- $\beta$ -D-糖苷-脘蚜胺及甾体皂苷等。其中, 多糖是天冬较为重要的组成, 具有多种治疗特性, 包括抗氧化<sup>[8]</sup>、抗菌及抗炎<sup>[9-12]</sup>、抗肿瘤<sup>[13-14]</sup>、降血糖<sup>[15]</sup>、抗疲劳<sup>[16]</sup>及止咳等功效<sup>[17]</sup>。多糖作为非特异性免疫增强化合物, 能提高机体的免疫功能<sup>[18-20]</sup>。我国十分重视糖类药物的开发, 国家科技部已将“糖生物学与重大疾病发生、发展的机制研究”列入未来十年对生物经济起引导作用的重大生命科学的应用基础研究课题<sup>[21-23]</sup>。近年来研究表明, 天冬的抗肿瘤活性、免疫增强作用、清除自由基和抗脂质过氧化活性等主要的药理作用均与天冬的多糖成分有着密切的关系<sup>[24]</sup>, 对天冬多糖的研究具有重要意义。本文研究了天冬多糖的提取、纯化、结构解析、免疫调节及抗氧化活性, 为今后天冬多糖的开发利用奠定试验依据。

收稿日期: 2021-08-31

基金项目: 内蒙古自然科学基金项目(2019LH02002); 国家自然科学基金项目(22167019)

作者简介: 牧丹(1979—), 女, 硕士, 讲师

通信作者: 苏日娜 E-mail: surinabai@126.com

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料与试剂

天冬药材、无水乙醇、蒸馏水、氯仿、正丁醇、超纯水、浓硫酸、苯酚、无水葡萄糖标准品(GZDD-0114),中国食品药品检定研究院;不同分子质量葡聚糖标准品(5 800,11 800,47 300,100 000,380 000,788 000 u,批号 90601),日本昭和电工公司;无水乙酸钠(分析纯级)、冰醋酸(分析纯级)、三氟乙酸、50%氢氧化钠溶液、醋酸钠、甘露糖标准品、鼠李糖标准品、半乳糖醛酸标准品、半乳糖标准品、葡萄糖标准品、葡萄糖醛酸标准品、阿拉伯糖标准品、葡萄糖胺标准品、岩藻糖标准品, Sigma chemical 公司; $\gamma$ 干扰素(IFN- $\gamma$ )、白介素-2(IL-2)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )和白介素-6(IL-6)酶联免疫吸附试验试剂盒(ELISA 试剂盒),深圳市达科为生物技术股份有限公司。

### 1.2 仪器与设备

JA5003N 电子天平,上海菁海仪器有限公司;R-1001N 旋转蒸发仪,郑州长城科工贸有限公司;电热鼓风干燥箱,上海一恒科学仪器有限公司;BFX5-320 型低速自动平衡离心机,白洋离心机厂;透析袋,和光纯药工业株式会社;78-1 磁力加热搅拌器,常州国华电器有限公司;Telstar lyoQuest-85 冻干机(西班牙);IRAffinity-1 红外分光光度计,日本岛津公司;ICS5000 离子色谱仪, ThermoFisher 公司;UGC-24M 氮吹仪,上海力辰科技有限公司;MAPADA-P9 双光束紫外-可见分光光度计,上海美谱达仪器有限公司;515 高效液相色谱仪、2410 示差折光检测器、Empower2 色谱工作站,Waters 公司。

### 1.3 试验方法

1.3.1 天冬粗多糖的提取 将天冬药材粉碎过筛(40目),称取100g置于圆底烧瓶中,加入500mL蒸馏水,加热回流3次,每次1h,放冷后抽滤。将3次滤液合并浓缩至约100mL。加无水乙醇,调节至最终乙醇体积分数达80%,冷藏静置,密封醇沉1夜。将醇沉物抽滤,收集固体烘干后得棕色粗多糖粉末。

#### 1.3.2 粗多糖的分离纯化以及含量测定

1.3.2.1 纯化 称取1g天冬粗多糖粉末,加100

mL蒸馏水溶解。将溶液置于分液漏斗中,加入Sevage试剂( $V_{\text{氯仿}}:V_{\text{正丁醇}}=4:1$ )25mL,强烈振荡20min后离心,收集上层液体,再次分液,重复上述脱蛋白操作,直至无蛋白层出现。将脱蛋白后的水溶液置于透析袋内透析2~3d。收集透析后的溶液浓缩后冻干,得白色天冬脱蛋白多糖冻干粉。

#### 1.3.2.2 苯酚-硫酸法测定糖含量测定

1) 绘制标准曲线 精密称取0.0250g无水葡萄糖标准品于100mL容量瓶中,用超纯水定容,振荡摇匀,得0.25mg/mL无水葡萄糖标准溶液。精密吸取上述标准溶液0.20,0.40,0.60,0.80,1.00,1.20mL,分别置于10mL容量瓶中,加入超纯水补至2.0mL,分别加入6%的苯酚试剂1.0mL,振荡摇匀,用浓硫酸定容至刻度线,振荡摇匀,静置5min后40℃水浴30min,取出。另取超纯水2.00mL置于10mL容量瓶内,同上述操作制得空白对照溶液。用紫外-可见分光光度法在波长490nm处检测其吸光度值。以吸光度值为纵坐标,葡萄糖的质量浓度为横坐标绘制标准曲线。

2) 供试品溶液的制备 精密称取天冬粗多糖粉末与天冬脱蛋白冻干粉各10mg于10mL容量瓶中,加入超纯水使其溶解并定容至刻度线,振荡摇匀、备用。分别精密吸取以上溶液0.2mL,置于10mL容量瓶中,同标准品溶液制备方法制备供试品溶液,在波长490nm处测定其吸光度值,根据标准曲线计算样品中多糖含量。

1.3.3 脱蛋白多糖的分级醇沉 称取1.45g天冬脱蛋白冻干粉,置于烧杯中,加入150mL蒸馏水溶解,分别用30%,60%,80%质量分数的乙醇分级醇沉。每级醇沉物离心后所得沉淀用适量蒸馏水溶解,透析、冻干后进行凝胶渗透色谱(GPC)测定。离心后剩余液体继续进行醇沉操作,最后得30%醇沉物73mg,60%醇沉物365mg及80%醇沉物80mg,用于结构表征及活性测定。

1.3.4 TD-80 红外光谱检测 取适量溴化钾,烘干后置于研钵内研磨至粉末状,加入1~2mg TD-80冻干粉,混合后研磨均匀,压片,用红外光谱仪,在4000~400 $\text{cm}^{-1}$ 范围测定TD-80多糖的红外光谱。

1.3.5 天冬多糖的分子质量的测定 采用凝胶渗透色谱(GPC)-示差检测器法对天冬脱蛋白多糖

及不同分级醇沉多糖进行分子质量测定。色谱条件:Ultrahydrogel 500 和 Ultrahydrogel 250 (7.8 mm×300 mm)连用;排阻范围(0.1~1 000 ku);流动相为醋酸盐缓冲溶液(pH 4.5);流速:0.9 mL/min;柱温:45 ℃。分别称取分子质量为 5 800, 11 800, 47 300, 100 000, 380 000, 788 000 u 的标准葡聚糖样品各 7 mg, 用 1 mL 流动相溶解, 待用。吸取不同分子质量的对照品溶液, 分别进样 20 μL, 以保留时间(RT)为横坐标(*x* 轴), 分子质量的对数值为纵坐标(*y* 轴), 绘制标准曲线, 采用 Empower 2 色谱工作站计算得到回归方程。根据标准曲线回归方程, 计算样品的数均分子质量。

1.3.6 TD-80 单糖组成分析 采用离子色谱-安培检测法, 色谱条件: 色谱柱: Dionex CarboPac™-PA20 (3 mm×150 mm); 流动相: A: H<sub>2</sub>O; B: 250 mmol/L NaOAc、50 mmol/L NaOH 和 500 mmol/L NaOAc; 流速: 0.3 mL/min; 进样量: 5 μL; 柱温: 30 ℃; 检测器: 安培检测器。

单糖标准品(岩藻糖、鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、甘露糖、果糖、半乳糖醛酸、葡萄糖醛酸、盐酸氨基葡萄糖、*N*-乙酰-*D* 氨基葡萄糖、核糖)配成约 10 mg/mL 标准溶液。取各单糖标准溶液精密配制 1, 5, 10, 20, 50, 80, 100 mg/L 梯度质量浓度的标准品。根据绝对定量方法, 测定不同单糖质量。

取多糖 TD-80 样品 4 mg 于安瓿瓶中, 加入 2 mol/L 三氟乙酸(TFA)1 mL, 120 ℃水解 3 h。准确吸取 200 μL 酸水解溶液转移至 1.5 mL EP 管中, 氮吹吹干, 加入 1 mL 水涡旋混匀, 12 000 r/min 离心 5 min。取上清进行离子色谱分析。

### 1.3.7 免疫调节活性试验

1.3.7.1 TD-80 对脾淋巴细胞免疫增殖活性的测定 评价天冬的 80% 分级醇沉后得的均一多糖(TD-80)对脾淋巴细胞的增值活性, 细胞存活率计算公式如下:

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{\text{OD}_{\text{试验组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}}{\text{OD}_{\text{空白组}}} \times 100 \quad (1)$$

小鼠断颈处死, 乙醇浸泡后剪开腹腔, 取出脾脏, 加分离液, 研磨脾脏, 单细胞透过尼龙网进入分离液中, 分离液转至离心管, 培养基离心 30 min, 分离出淋巴细胞层。淋巴细胞分离完成后, 进

行细胞计数。向 96 孔板中加入 100 μL 5×10<sup>6</sup> 个/mL 细胞悬液。阳性对照组加入 100 μL 终质量浓度为 2.5 μg/mL 甾毒素(ConA), 试验组加入终质量浓度分别为 200, 40, 5 μg/mL 的多糖溶液, 每孔终体积为 200 μL, 设置细胞对照。在 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 48 h 后, 加入 CCK-8 在波长 450 nm 处测定 OD 值。

1.3.7.2 TD-80 对 IFN-γ 和 IL-2 细胞因子分泌的影响 如 1.3.7.1 节所述, 制备淋巴细胞悬液, 加入 96 孔细胞培养板, 每孔 100 μL。试验组每孔加入 100 μL 质量浓度为 200, 40, 5 μg/mL 多糖样品, 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 48 h, 2 000 r/min、4 ℃离心 10 min, 收集上清。使用双抗体夹心法, 参照 IFN-γ 和 IL-2 ELISA 检测试剂盒说明书评估其细胞因子水平。将细胞因子标准品连续稀释至 500, 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6 pg/mL 和 7.8 pg/mL。

1.3.7.3 TD-80 对 TNF-α, IL-1β 和 IL-6 细胞因子分泌的影响 RAW264.7 细胞是一种巨噬细胞样细胞系(从中国科学院的细胞库中获得), 在含有 10% 热灭活胎牛血清的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基(Invitrogen)中保存。RAW264.7 细胞在 96 孔板(1×10<sup>6</sup> 细胞/孔)中培养, 与不同质量浓度(5, 40 μg/mL 和 200 μg/mL) 的 TD-80 多糖在 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下共培养 48 h。以 2.5 μg/mL 脂多糖(LPS)为阳性对照。除去上清液后, 保存在-20 ℃。参照 TNF-α, IL-1β 和 IL-6 ELISA 试剂盒说明书的方法评估其细胞因子水平。

### 1.3.8 体外抗氧化活性的测定

1.3.8.1 超氧阴离子清除能力测定 AP-TEMED 系统产生超氧阴离子, 与盐酸羟胺反应生成 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 与对氨基苯磺酸和 α-萘胺作用生成红色的偶氮化合物, 在波长 530 nm 处有特征吸收峰。样品对超氧阴离子的清除能力与在波长 530 nm 处的吸光值呈负相关。采用超氧化物阴离子清除试剂盒使用说明书——微量法检测超氧阴离子自由基的清除活性。简而言之, 将 10 μL Tris-HCl 溶液(TEMED)和 40 μL 过硫酸铵加到对照管和样品管中, 仅将 25 μL H<sub>2</sub>O 添加到对照管中, 在 25 ℃ 下混合反应 1 min。将 25 μL 多糖 TD-80 溶液和阳性对照溶液抗坏血酸(ASA)(0.01~0.1 mg/mL) 添加到样品管中, 然后将 50 μL 盐酸羟胺溶液添加

到两个管中,在 37 ℃下反应 30 min。最后,将 50  $\mu\text{L}$  对氨基苯磺酸和  $\alpha$ -萘胺在乙酸溶液中混合后加入到上述混合物中,在 37 ℃下显色反应 20 min,在波长 530 nm 处测量吸光度  $A$ 。计算超氧化物自由基清除活性。

$$\text{超氧阴离子清除率}(\%) = \frac{A_{\text{对照管}} - A_{\text{样品管}}}{A_{\text{对照管}}} \times 100 \quad (2)$$

1.3.8.2 羟自由基清除能力  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$  通过 Fenton 反应产生羟自由基,将邻二氮菲- $\text{Fe}^{2+}$  水溶液中  $\text{Fe}^{2+}$  氧化为  $\text{Fe}^{3+}$ ,导致波长 536 nm 处吸光度下降,样品对 536 nm 处吸光度下降速率的抑制程度,反映样品清除羟自由基的能力。采用超氧化物阴离子清除试剂盒使用说明书——微量法检测羟自由基的清除活性。简而言之,在空白管、对照管及样品管中分别加入 250  $\mu\text{L}$  工作液 ( $V_{\text{邻二氮菲-无水乙醇}} : V_{\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} - \text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}} : V_{\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}} = 100 : 50 : 100$ ),空白管加入 100  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$ ;对照管加入 50  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  和 50  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ;样品管中加入 50  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  和 50  $\mu\text{L}$  不同质量浓度的多糖及阳性对照 ASA,混匀,37 ℃保温 60 min,8 000 $\times$ g、25 ℃离心 5 min。吸取 200  $\mu\text{L}$  上清液,于 96 孔板中测定波长 536 nm 处的吸光值,空白管、对照管和测定管的吸光值分别记为  $A_{\text{空}}$ 、 $A_{\text{对}}$  和  $A_{\text{测}}$ 。

$$\text{羟自由基清除率}(\%) = \frac{A_{\text{测}} - A_{\text{对}}}{A_{\text{空}} - A_{\text{对}}} \times 100 \quad (3)$$

1.3.8.3 DPPH 自由基清除率的测定 配制质量浓度为  $1 \times 10^{-5}$  g/mL 的 DPPH-乙醇溶液和 0.2 mg/mL 天冬多糖溶液。分别取不同体积的多糖溶液 200, 400, 600, 800, 1 000, 1 500, 2 000  $\mu\text{L}$ , 补足乙

醇溶液至 2 mL,用移液枪分别加入 DPPH-乙醇溶液。混匀后置无光环境中反应 30 min,于波长 517 nm 处测定吸光度。以乙醇作为空白,按式(4)计算天冬多糖对 DPPH 自由基的清除率。每份样品平行操作 3 次,取平均值。

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{样品}}} \times 100 \quad (4)$$

式中,  $A_{\text{对照}}$ ——DPPH 本身在测定波长处的吸光度;  $A_{\text{样品}}$ ——样品对 DPPH 作用后的吸光度数值(除去样品自身吸收)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 多糖糖含量

苯酚-硫酸法含量测定结果表明,葡萄糖质量浓度在 0.00~1.588  $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围呈线性关系,线性回归方程为  $y = 0.0796x - 0.3613$ ,相关系数  $R^2 = 0.9945$ 。粗多糖中糖含量为 63.13%,脱蛋白冻干粉中糖含量为 73.98%。

### 2.2 TD-80 红外光谱检测

粗多糖 80% 醇沉物红外光谱扫描结果见图 1。3 428.01  $\text{cm}^{-1}$  处的强吸收峰是糖分子中 O-H 键的伸缩振动吸收,2 936.59  $\text{cm}^{-1}$  处的峰是 C-H 键的伸缩振动吸收,1 630.16  $\text{cm}^{-1}$  处的峰是糖结合水的吸收峰,1 442.34  $\text{cm}^{-1}$  的峰是糖分子中 C-H 键的变角振动吸收,1 020.49  $\text{cm}^{-1}$  处的峰是吡喃环醚键 C-O 键的变型振动吸收。另外,在 1 745.73  $\text{cm}^{-1}$  附近有酯羰基对应的强吸收峰,表明该糖含有糖醛酸,是酸性多糖。916.47  $\text{cm}^{-1}$  的峰是吡喃糖  $\beta$  型 C-H 变形振动的吸收峰,760.44  $\text{cm}^{-1}$  的峰是  $\alpha$ -构

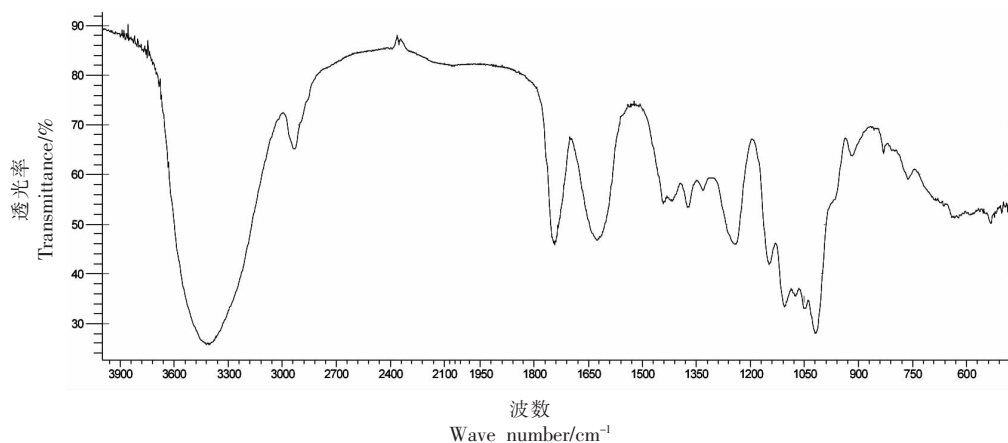


图 1 TD-80 红外光谱图

Fig.1 FT-IR spectrum of TD-80

型吡喃环的对称振动,说明天冬的 80%醇沉多糖是含有  $\alpha$ / $\beta$  两种构型的酸性吡喃多糖。

### 2.3 分子质量的测定

经 GPC 法测定脱蛋白天冬多糖和 80%醇沉产物 TD-80 的分子质量。图 2a 为脱蛋白后天冬多糖的色谱图,其显示天冬脱蛋白多糖由两个分子质量的多糖组成,保留时间 11.51 min 的峰的重均分子质量为 59.4 ku,保留时间 16.29 min 的峰

的分子质量为 3.9 ku。图 2b 显示一个色谱峰,峰型对称,说明 TD-80 多糖相对分子质量分布均一。根据葡聚糖标准曲线,线性回归方程为  $y = -0.3079x + 5.9129$ ,相关系数  $R^2 = 0.9992$ 。TD-80 的重均分子质量  $M_w$  为 6.8 ku,多分散指数为 2.48。其余醇沉产物未得到单一组分多糖,文中未提供 GPC 图谱。

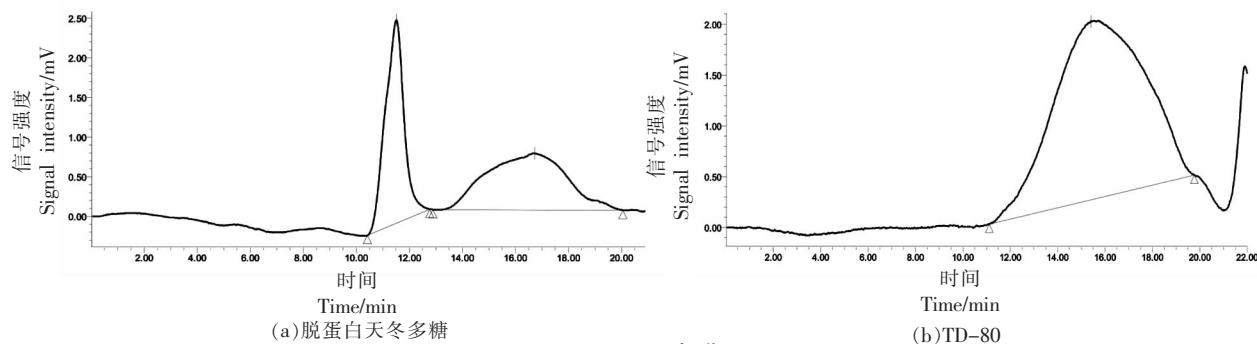


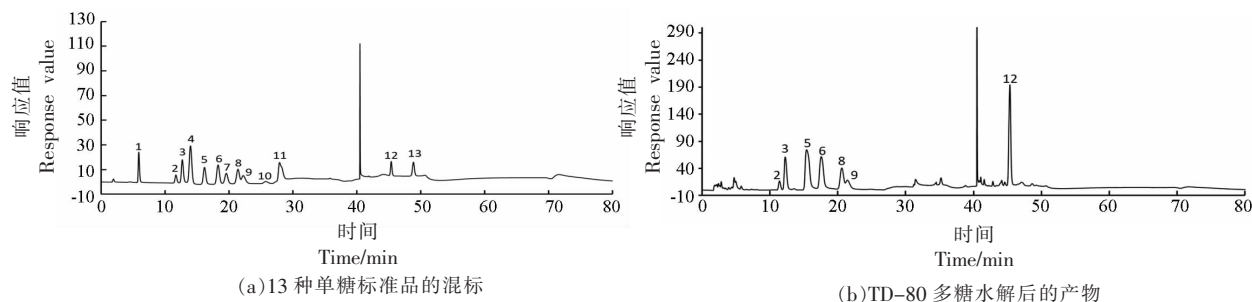
图 2 GPC 色谱图

Fig.2 GPC chromatogram

### 2.4 单糖组成分析

采用离子色谱仪,以 13 种单糖标准品为标准,测定水解后 TD-80 多糖的单糖组成。根据单糖标准品和多糖样品色谱图谱的出峰时间,鉴定

样品中相应的单糖峰。结果表明:样品 TD-80 多糖中鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、甘露糖、半乳糖醛酸物质的量比为 0.048:0.102:0.316:0.157:0.101:0.017:0.259,结果见图 3。



注:1. 岩藻糖;2. 鼠李糖;3. 阿拉伯糖;4. 盐酸氨基葡萄糖;5. 半乳糖;6. 葡萄糖;7. *N*-乙酰-*D* 氨基葡萄糖;8. 木糖;9. 甘露糖;10. 果糖;11. 核糖;12. 半乳糖醛酸;13. 葡萄糖醛酸。

图 3 离子色谱图

Fig.3 Ion chromatogram

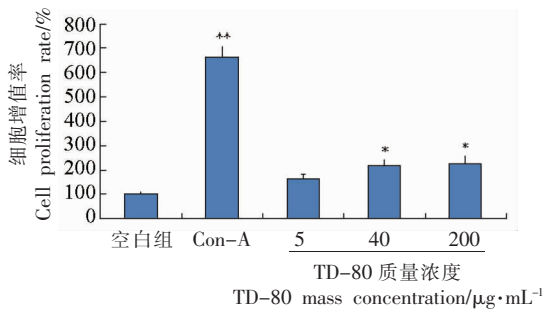
### 2.5 TD-80 多糖免疫调节作用

#### 2.5.1 TD-80 多糖对脾淋巴细胞增殖活性的影响

结果表明(图 4、表 1),试验组  $OD_{450nm}$  值与空白组比较均增大,表明 TD-80 多糖组和 Con-A 阳性对照组均不同程度地促进小鼠脾淋巴细胞的增殖作用,其中 TD-80 多糖组在 5~200 g/mL 质量浓

度下,显示质量浓度依赖关系;当 TD-80 质量浓度在 40  $\mu$ g/mL 和 200  $\mu$ g/mL 时,差异显著 ( $P < 0.05$ )。

2.5.2 TD-80 多糖对 IFN- $\gamma$  和 IL-2 细胞因子分泌的影响 3 个质量浓度的 TD-80 多糖对小鼠脾淋巴细胞中 IFN- $\gamma$  的分泌具有极显著的影响 ( $P <$

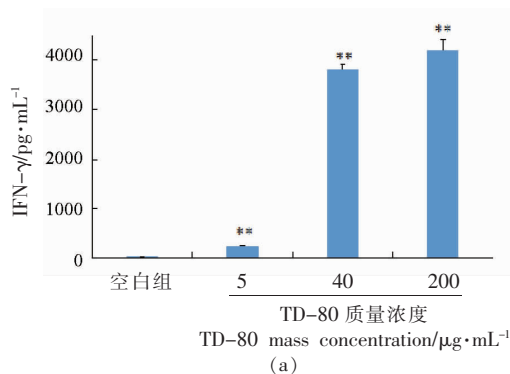


注:\*表示显著性差异( $P<0.05$ ),\*\*表示极显著性差异( $P<0.01$ )。

图4 TD-80对正常小鼠的脾淋巴细胞增殖反应的影响

Fig.4 Effect of TD-80 on proliferation of splenic lymphocytes in normal mice

0.01),并具有质量浓度依赖性。当TD-80多糖质量浓度大于 $40\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,与细胞空白比较IFN- $\gamma$ 的分泌达到300多倍,表明TD-80多糖对IFN- $\gamma$



注:\*\*表示极显著性差异( $P<0.01$ )。

图5 TD-80多糖对IFN- $\gamma$ 和IL-2细胞因子的分泌影响

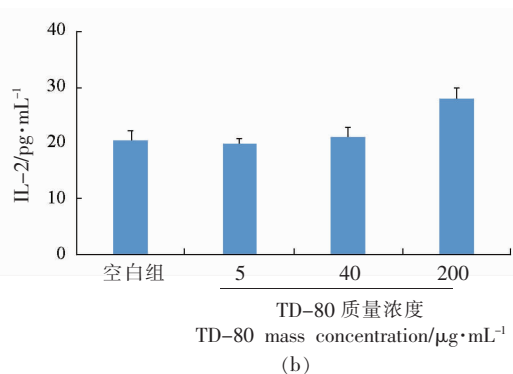
Fig.5 The effect of TD-80 polysaccharide on the secretion of IFN- $\gamma$  and IL-2 cytokines

2.5.3 TD-80多糖对TNF- $\alpha$ ,IL-6和NO细胞因子分泌的影响 测定TD-80对小鼠巨噬细胞系RAW264.7细胞相关细胞因子分泌的影响,研究TD-80多糖的免疫调节活性。如图6所示,将质量浓度5~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的TD-80多糖与RAW264.7细胞共培养48h,发现TD-80能促进TNF- $\alpha$ (图6a),IL-6(图6b)和NO(图6c)细胞因子的分泌。其中TD-80的3个质量浓度组(5~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )与空白细胞组相比,均极显著地增加肿瘤坏死因子 $\alpha$ 的分泌( $P<0.01$ )(图6a),且具有质量浓度依赖关系。TD-80多糖同时对白介素-6的分泌也有质量浓度依赖性的影响,与空白细胞相比,高质量浓

表1 TD-80对正常小鼠的脾淋巴细胞增殖反应的影响  
Table 1 Effect of TD-80 on proliferation of splenic lymphocytes in normal mice

分组	质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	OD <sub>450nm</sub>	细胞存活率/%
空白组	-	$0.57 \pm 0.02$	100.00
Con-A 阳性对照组	2.50	$1.70 \pm 0.01$	664.20
TD-80	5.00	$0.96 \pm 0.03$	162.74
	40.00	$1.01 \pm 0.05$	217.60
	200.00	$1.17 \pm 0.01$	223.88

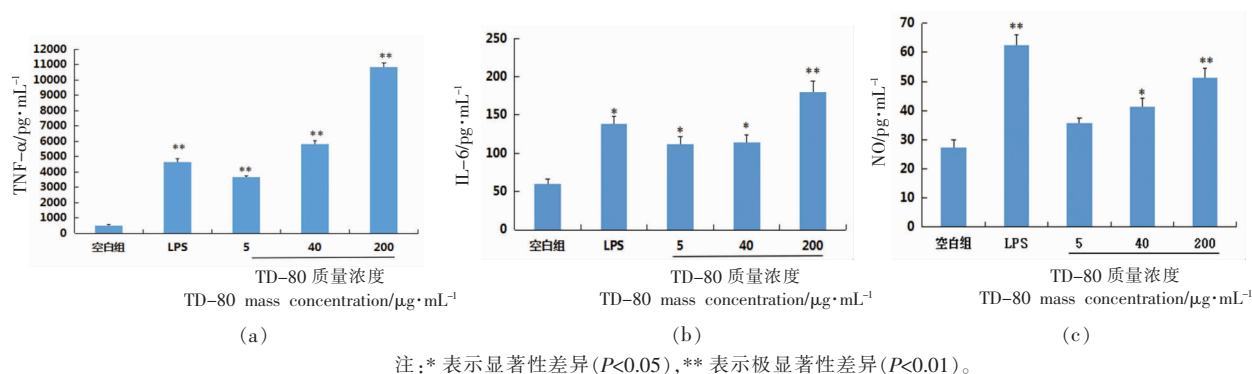
的分泌影响极大。与细胞空白比较TD-80多糖对IL-2分泌的影响不显著(结果见图5)。



度多糖组具有极显著差异( $P<0.01$ ),阳性对照组LPS和中浓度多糖组具有显著性差异( $P<0.05$ )(图6b)。在NO细胞因子的分泌影响中,TD-80的2个质量浓度组(40,200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )和LPS与空白细胞组相比,均显著地增加NO的分泌( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )(图6c),且具有质量浓度依赖关系。

## 2.6 体外抗氧化活性

活性氧(ROS)主要由羟自由基和过氧化氢组成,过量的ROS产生与细菌感染期间肝脏和肾脏的氧化损伤有关,这可能有助于了解疾病的发病机理和死亡率<sup>[25]</sup>。如今,合成抗氧化剂在食品工业中得到广泛使用,然而,这些合成物质的毒性和致



注: \* 表示显著性差异 ( $P < 0.05$ ), \*\* 表示极显著性差异 ( $P < 0.01$ )。

图 6 TD-80 多糖对 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 NO 细胞因子的分泌影响

Fig.6 The effect of TD-80 polysaccharide on the secretion of TNF- $\alpha$ , IL-6 and NO cytokines

癌作用令人担忧<sup>[26]</sup>。解决该问题途径之一是使用天然抗氧化剂。

在活性氧中,羟自由基是反应性最高的一种,可以攻击生物分子,例如 DNA 和蛋白质<sup>[27]</sup>。从天冬分离的多糖在 4~10 mg/mL 质量浓度范围具有清除羟自由基的能力(图 7a),两种样品的活性均以质量浓度依赖性方式增加。此外,TD-80 的清除活性随着质量浓度的增大而增大,特别是在高剂量(10 mg/mL)下,TD-80 表现出非常高的自由基清除活性(45.12%),与阳性对照比较  $P < 0.05$ 。在低剂量(4~7.5 mg/mL)时,TD-80 的自由基清除活性低,这说明多糖 TD-80 在高剂量下具有较强的抗氧化活性。

与抗坏血酸(ASA)相比,TD-80 清除超氧阴离子活性如图 7b 所示。样品以质量浓度依赖性方式表现出明显的清除超氧阴离子的活性。TD-80 多糖在质量浓度 0.01~0.1 mg/mL 范围具有清除超氧阴离子的能力。与维生素 C 比较,在质量浓度 0.1 mg/mL 下,TD-80 具有显著的清除超氧阴离子活性(60.72%,  $P < 0.05$ )。这些结果表明 TD-80 具有清除超氧阴离子的抗氧化能力。

DPPH 通常用作评估抗氧化剂活性的化合物,在波长 517 nm 处表现出特征吸收,通常被认为是具有稳定自由基的化合物之一。本研究用比色法检测纯化的多糖 TD-80 对 DPPH 自由基的清除能力,结果如图 7c 所示。在质量浓度 0.02~0.2 mg/mL 范围,阳性对照组 ASA 的 DPPH 清除率为 100%;TD-80 多糖组具有质量浓度依赖的 DPPH 自由基清除能力,在最高质量浓度下,其

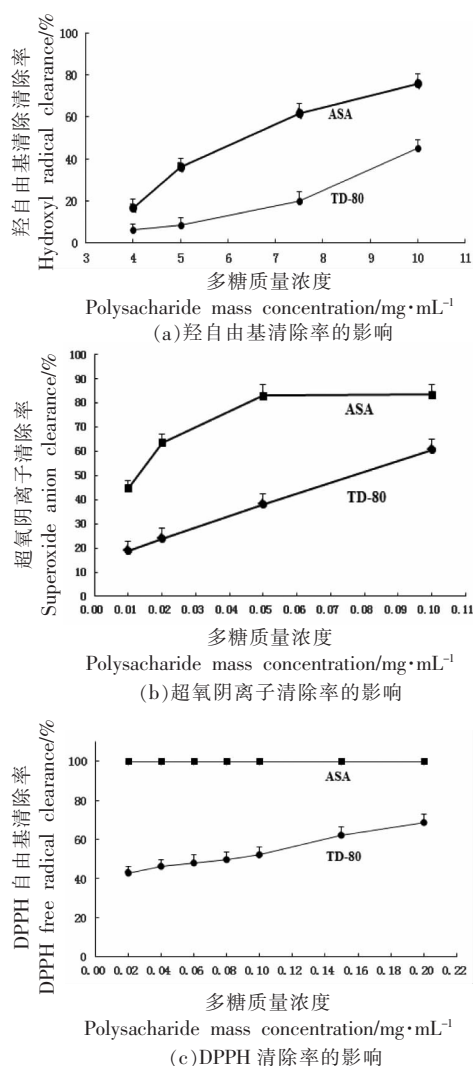


图 7 TD-80 的体外抗氧化活性

Fig.7 Antioxidant activity of TD-80 *in vitro*

DPPH 自由基的清除率达到 68.8%。以上羟自由基清除能力、超氧阴离子清除能力、DPPH 自由基清

除能力等3种抗氧化活性的测定仅在体外化学系统中建立。需进行体内动物实验或细胞试验以进一步验证其抗氧化活性。

### 3 结论

从天冬中提取多糖,分离纯化后分析结构特征,研究其免疫调节活性和体外抗氧化活性。结果表明:天冬粗多糖中糖含量为63.13%,脱蛋白冻干粉中糖含量为73.98%。根据红外检测结果,天冬的80%醇沉多糖(TD-80)是含有 $\alpha$ 、 $\beta$ 两种构型的酸性吡喃多糖。GPC法测定结果表明:TD-80的重均分子量 $M_w$ 为6.8 ku,多分散指数为2.48。天冬的80%醇沉多糖(TD-80)由鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、甘露糖、半乳糖醛酸等单糖组成。体外活性试验表明,TD-80能促进脾淋巴细胞增殖,对相关细胞因子(TNF- $\alpha$ ,IL-1 $\beta$ 和IL-6)的分泌有一定的刺激作用,呈现一定的免疫调节活性和抗氧化活性。

### 参 考 文 献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 3部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 58.  
Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of People's Republic of China: Part 3[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2010: 58.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 1部[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 37.  
Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of People's Republic of China: Part 1[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 37.
- [3] 罗布森. 蒙药学[M]. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 2006: 298.  
LUO B S. Mongolian medicine theory[M]. Hohhot: Inner Mongolian People's Publishing House, 2006: 298.
- [4] 那生桑. 现代蒙药学[M]. 呼和浩特: 内蒙古大学出版社, 2011: 102-103.  
NA S S. Modern Mongolian medicine theory[M]. Hohhot: Inner Mongolia University Press, 2011: 102-103.
- [5] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草·蒙药卷[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2004: 102-103.
- [6] 杨桂萍, 刘忠颖. 天冬的经济价值及栽培技术[J]. 农技服务, 2020, 38(19): 31-32.  
YANG G P, LIU Z Y. The economic value and cultivation techniques of *Asparagus cochinchinensis* (Lour.) Merr.[J]. Agricultural Technology Service, 2020, 38(19): 31-32.
- [7] 伍仕强, 姜朝林. 天门冬的药用价值及栽培技术初探[J]. 农技服务, 2017, 35(23): 50-51.  
WU S Q, JIANG Z L. Medicinal value and cultivation techniques of asparagus[J]. Agricultural Technology Service, 2017, 35(23): 50-51.
- [8] 何坤明, 王国锭, 白新鹏, 等. 山茱萸籽多糖分离纯化、结构表征及抗氧化活性[J]. 食品科学, (2021-01-18)[2021-04-02]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.ts.20210115.1608.036.html>.  
HE K M, WANG G D, BAI X P, et al. Isolation, purification, structure characterization and antioxidant activity of *Cornus officinalis* seeds polysaccharides[J]. Food Science, (2021-01-18)[2021-04-02]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.ts.20210115.1608.036.html>.
- [9] 李敏, 费曜, 王家葵, 等. 天冬药材药理实验研究[J]. 时珍国医国药, 2005(7): 580-582.  
LI M, F Y, WANG J K, et al. Studies on pharmacologic effects of *Radix asparagi* [J]. LiShiZhen Medicine and Materia Medica Research, 2005(7): 580-582.
- [10] 曲凤玉, 魏晓东, 李士莉, 等. 天门冬醇提取液对衰老模型小鼠抗衰老作用的实验研究[J]. 中医学报, 1999(2): 68-70.  
QU F Y, WEI X D, LI S L, et al. Experimental study of *Asparagus cochinchinensis* delay aging[J]. Acta Chin Med Pharm, 1999(2): 68-70.
- [11] 赵玉佳, 孟祥丽, 李秀玲, 等. 天门冬水提液及其纳米中药对衰老模型小鼠 NOS、NO、LPF 的影响[J]. 中国野生植物资源, 2005(3): 49-51.  
ZHAO Y J, MENG X L, LI X L, et al. Influence of *Radix asparagi* nano-pharmaceutics on NOS, NO, LPF of aging mice[J]. Chin Wild Plant Resour, 2005(3): 49-51.



- [12] 温晶媛, 李颖, 丁声颂, 等. 中国百合科天门冬属九种药用植物的药理作用筛选[J]. 上海医科大学学报, 1993, 20: 107-111.  
WEN J Y, LI Y, DING S S, et al. Screening of pharmacological actions of nine medicinal plants of Liliaceae *Asparagus* in China[J]. Journal of Shanghai Medical College of Fudan University, 1993, 20: 107-111.
- [13] LUO J, LONG Q, LI C, et al. Inhibitory effects of ALWB and ACM on mice bearing tumor [J]. J GuiYang Med Coll, 2000, 25: 15-16.
- [14] KOO H N, JEONG H J, CHOI J Y, et al. Inhibition of tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis by *Asparagus cochinchinensis* in HepG2 cells[J]. J Ethnopharmacol, 2000, 73: 137-143.
- [15] 徐雅琴, 杨海红, 李大龙, 等. 黑加仑果实降解多糖理化特性、结构及体外降血糖活性[J]. 食品科学, (2020-11-23) [2021-04-02]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.ts.20201120.1501.071.html>.  
XU Y Q, YANG H H, LI D L, et al. The physicochemical properties, structural characterization and hypoglycemic activity *in vitro* of degraded polysaccharides from blackcurrant[J]. Food Science, (2020-11-23) [2021-04-02]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.ts.20201120.1501.071.html>.
- [16] 董碧莲, 蔡延渠, 吕莉, 等. 中药多糖增强免疫、抗疲劳作用的研究进展[J]. 中成药, 2019, 41(5): 1119-1124.  
DONG B L, CAI Y Q, LÜ L, et al. Research progress of traditional Chinese medicine polysaccharides on enhancing immunity and anti fatigue [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2019, 41(5): 1119-1124.
- [17] 杨大俏, 王锦旭, 李来好, 等. 近江牡蛎多糖的结构鉴定及免疫调节能力分析[J]. 食品科学, 2020, 41(10): 38-46.  
YANG D Q, WANG J X, LI L H, et al. Structural analysis and immunoregulatory activity of polysaccharides from *Crassostrea rivularis* [J]. Food Science, 2020, 41(10): 38-46.
- [18] 于悦, 陈卓, 王亚非, 等. 蛹虫草胞外多糖的制备、结构分析及其免疫活性[J]. 食品科学, (2021-01-15) [2021-04-02]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.ts.20210115.1127.018.html>.  
YU Y, CHEN Z, WANG Y F, et al. Preparation, structure and immune activity of exopolysaccharide from *Cordyceps militaris* [J]. Food Science, (2021-01-15) [2021-04-02]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.ts.20210115.1127.018.html>.
- [19] 朱沛沛, 李涛涛, 赵伟龙, 等. 紫草多糖的提取、纯化及药理作用研究进展[J]. 杭州化工, 2014, 44(1): 9-12, 26.  
ZHU P P, LI T T, ZHAO W L, et al. Research progress on extraction, purification and pharmacological action of polysaccharides from *Lithospermum erythrorhizon* [J]. Hangzhou Chemical, 2014, 44(1): 9-12, 26.
- [20] 吴静, 胡居吾, 熊伟, 等. 樟树果实多糖对巨噬细胞 RAW264.7 的免疫调节作用[J]. 现代食品科技, 2018, 34(9): 12-18.  
WU J, HU J W, XIONG W, et al. Immunomodulatory effect of polysaccharide isolated from *Cinamomum camphora* fruits on macrophage RAW264.7 [J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(9): 12-18.
- [21] 余刚, 蔡薇, 宋田源, 等. 红毛藻多糖的化学组成及其体外免疫诱导活性研究[J]. 中国食品学报, 2020, 20(6): 37-47.  
YU G, CAI W, SONG T Y, et al. Studies on composition, *in vitro* immune-induced activities of polysaccharides isolated from *Bangia fusco-purpure* [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(6): 37-47.
- [22] 张琴, 李美东, 罗凯, 等. 植物多糖生物活性功能研究进展[J]. 湖北农业科学, 2020, 59(24): 5-8, 15.  
ZHANG Q, LI M D, LUO K, et al. Research progress on the biological activity and function of plant polysaccharides [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2020, 59(24): 5-8, 15.
- [23] 李晨旭, 张才. 中药多糖生物活性及在动物生产中应用的研究进展[J]. 饲料研究, 2021(1): 136-138.  
LI C X, ZHANG C. Research progress of bioactivity and application in animal production of polysaccharides from traditional Chinese medicine [J]. Feed Research, 2021(1): 136-138.
- [24] 杨颖, 魏梦昕, 伍耀业, 等. 白术多糖提取分离、化学组成和药理作用的研究进展[J]. 中草药, 2021, 52(2): 578-584.  
YANG Y, WEI M X, WU Y Y, et al. Research progress on extraction separation, chemical constitution and pharmacological activities of polysaccharide

- extracted from *Atractylodes macrocephala*[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2021, 52(2): 578–584.
- [25] CARINE D F S, BALDISSERA M D, VERDI C M, et al. Oxidative stress and antioxidant responses in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* experimentally infected by *Providencia rettgeri*[J]. Microb Pathogenesis, 2019, 131: 164–169.
- [26] ESMAEILI H, KARAMI A, HADIAN J, et al. Variation in the phytochemical contents and antioxidant activity of *Glycyrrhiza glabra* populations collected in Iran[J]. Ind Crop Prod, 2019, 137: 248–259.
- [27] SUN Y J, HOU S T, SONG S, et al. Impact of acidic, water and alkaline extraction on structural features, antioxidant activities of *Laminaria japonica* polysaccharides[J]. Int J Biol Macromol, 2018, 112: 985–995.

### Structure, Immunomodulatory and Antioxidant Activities *in Vitro* of Polysaccharides from *Radix asparagi*

Mu Dan<sup>1</sup>, Saren Gaowa<sup>1</sup>, Bao Liang<sup>1</sup>, Chen Yongfu<sup>2</sup>, Su Rina<sup>\*</sup>

<sup>1</sup>Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010010

<sup>2</sup>Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010010

**Abstract** Objective: To explore the structure, immunomodulatory activity and antioxidant activity *in vitro* of polysaccharides from *Radix asparagi*. This study will provide a basis for subsequent research on *Radix asparagi* polysaccharides. Methods: The polysaccharide of *Radix asparagi* was extracted and purified by the methods of water extraction and alcohol precipitation and Sevage. The scavenging ability of DPPH free radical, superoxide anion and hydroxyl free radical were determined. Results: The content of crude polysaccharide was 63.13% and that of freeze-dried powder was 73.98%. When the concentration of ethanol reached 80%, the polysaccharide with small molecular weight could be separated. This product contained rhamnose, arabinose, galactose, glucose, xylose, mannose, galacturonic acid. It had no obvious effect on the proliferation and immunity of spleen lymph. The antioxidant capacity was weak. Conclusion: The method used in this study was simple and accurate, which could provide reference for the extraction, purification and *in vitro* antioxidant activity of polysaccharides from *Radix asparagi* and other similar medicinal materials. To understand the monosaccharide composition of *Radix asparagi* polysaccharide. However, the antioxidant capacity of 80% alcohol precipitated polysaccharide is not obvious, which needs further study.

**Keywords** *Radix asparagi*; polysaccharide; structure; immunomodulatory activity; antioxidant activity