

## 牛蒡多糖特性分析及对脂多糖诱导巨噬细胞炎症的调节作用

朱姗姗, 张斌, 朱文卿, 陈铨, 张超杰, 郑振佳

### Analysis of Properties of Burdock Polysaccharide and Its Regulatory Effect on Lipopolysaccharide-induced Macrophage Inflammation

ZHU Shanshan, ZHANG Bin, ZHU Wenqing, CHEN Qiang, ZHANG Chaojie, and ZHENG Zhenjia

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021100247>

## 您可能感兴趣的其他文章

### Articles you may be interested in

#### 牛蒡不同部位多糖的抗氧化与抗凝血活性研究

Antioxidant and Anticoagulant Activities of Polysaccharides Extracted from Different Parts of *Arctium lappa* L.

食品工业科技. 2020, 41(6): 305-310

#### 酶解前后鹿筋体外抗炎活性与其氨基酸组成的相关性

Correlation between *in Vitro* Anti-inflammatory Activity and Amino Acid Composition of Deer Sinew before and after Enzymolysis

食品工业科技. 2021, 42(17): 8-15

#### 玉米芯多糖的微生物发酵工艺及其单糖组成和体外益生活性研究

Study on Microbial Fermentation Technology of Corn Cob Polysaccharide and Its Monosaccharide Composition and Prebiotic Activity *in Vitro*

食品工业科技. 2020, 41(5): 107-112

#### 典型甜菊糖苷的抗氧化和抗炎活性

Anti-inflammatory and Antioxidant Activities of Steviol Glycosides

食品工业科技. 2019, 40(8): 260-265,271

#### 蒙自蹄盖蕨醇提物的不同萃取物的抗氧化、降血糖及抗炎活性

Antioxidant, Hypoglycemic and Anti-inflammatory Activities of Different Parts Partitioned from the Ethanol Extracts of *Athyrium Mengzeense* Hieron

食品工业科技. 2019, 40(14): 62-67

#### 一种姬松茸多糖的纯度鉴定与单糖组成分析

Purity Identification and Monosaccharide Composition Analysis of a Polysaccharide Derived from *Agaricus brasiliensis*

食品工业科技. 2018, 39(13): 94-97,267



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

朱姗姗, 张斌, 朱文卿, 等. 牛蒡多糖特性分析及对脂多糖诱导巨噬细胞炎症的调节作用 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(15): 272-278. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100247

ZHU Shanshan, ZHANG Bin, ZHU Wenqing, et al. Analysis of Properties of Burdock Polysaccharide and Its Regulatory Effect on Lipopolysaccharide-induced Macrophage Inflammation[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(15): 272-278. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100247

· 分析检测 ·

# 牛蒡多糖特性分析及对脂多糖诱导巨噬细胞炎症的调节作用

朱姗姗<sup>1</sup>, 张斌<sup>1</sup>, 朱文卿<sup>1</sup>, 陈铨<sup>2</sup>, 张超杰<sup>2</sup>, 郑振佳<sup>1,\*</sup>

(1. 山东农业大学食品科学与工程学院, 山东省高校食品加工技术与质量控制重点实验室, 山东泰安 271018;

2. 山东博德医药研究院有限公司, 山东德州 253084)

**摘要:** 为探究牛蒡多糖的单糖组成、体外消化特性及其在脂多糖诱导的细胞模型中的抗炎作用, 本研究通过紫外光谱、红外光谱以及离子色谱等进行分析, 并探究了多糖在胃肠液中的消化特性、物理稳定性及其抗炎活性。结果显示, 牛蒡多糖的总糖含量为 83.07%, 分子量为 2902 Da, 单糖组成为果糖:葡萄糖:阿拉伯糖:半乳糖=13.6:2.5:1.6:1; 在胃肠道消化过程中还原糖含量升高, 且经胃、肠分别消化 6 h 后, 水解度分别为 11.66% 和 9.12%; 在细胞模型中有明显的抗炎效果, 可明显降低细胞模型中一氧化氮 (NO) 的含量, 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  剂量时 NO 的含量较模型组下降 48.66%。结果表明, 牛蒡多糖具有一定的抗炎活性, 研究结果可为天然抗炎功能食品和药物的开发提供理论依据。

**关键词:** 牛蒡多糖, 单糖组成, 体外消化, 抗炎活性

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)15-0272-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100247



本文网刊:

## Analysis of Properties of Burdock Polysaccharide and Its Regulatory Effect on Lipopolysaccharide-induced Macrophage Inflammation

ZHU Shanshan<sup>1</sup>, ZHANG Bin<sup>1</sup>, ZHU Wenqing<sup>1</sup>, CHEN Qiang<sup>2</sup>, ZHANG Chaojie<sup>2</sup>, ZHENG Zhenjia<sup>1,\*</sup>

(1. School of Food Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Shandong Provincial Key Laboratory of Food Processing Technology and Quality Control, Taian 271018, China;

2. Shandong Burdock Medical Research Institute Co., Ltd., Dezhou 253084, China)

**Abstract:** In order to explore the monosaccharide composition, *in vitro* digestion characteristics of burdock polysaccharide and its anti-inflammatory effect in lipopolysaccharide-induced cell model, this study was analyzed by ultraviolet spectroscopy, infrared spectroscopy and ion chromatography, and explored the digestive properties of polysaccharides in gastrointestinal fluid, physical stability and anti-inflammatory activity. The results showed that the total sugar content of burdock polysaccharide was 83.07%, the molecular weight was 2902 Da, and the monosaccharide composition was fructose:glucose:arabinose:galactose=13.6:2.5:1.6:1. The degree of hydrolysis was 11.66% and 9.12%, respectively, after being digested in the stomach and intestine for 6 h. It had obvious anti-inflammatory effect in the cell model, and could significantly reduce the content of nitric oxide (NO) in the cell model. Compared with the model group, the content of NO decreased by 48.66% at the dose of 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The results showed that burdock polysaccharide had certain anti-inflammatory activity, and the research results could provide a theoretical basis for the development of natural anti-inflammatory functional foods and drugs.

收稿日期: 2021-10-25

基金项目: 山东省自然科学基金 (ZR2019BC100); 山东省高等学校青创人才引进计划; 2021 年度山东省重点扶持区域引进急需紧缺人才项目。

作者简介: 朱姗姗 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 果蔬加工与功能食品, E-mail: zhushan2019@163.com。

\* 通信作者: 郑振佳 (1985-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 果蔬加工与功能食品, E-mail: pengyou-jia@163.com。

**Key words:** burdock polysaccharide; monosaccharide composition; *in vitro* digestion; anti-inflammatory activity

牛蒡(*Arctium lappa* L.)为药食同源的两年生菊科植物,作为食用蔬菜被广泛种植<sup>[1-2]</sup>。目前种植的主要品种有:东京理想、东京白肌、柳川理想、白肌大长以及地皇早生等,牛蒡中含有多糖、萜酸、酚类、蛋白质以及黄酮类等多种活性成分<sup>[3-5]</sup>,具有抗炎、抗氧化、免疫调节和抗肿瘤等多种生物学和药理学活性<sup>[6-8]</sup>。多糖是牛蒡中含量较高的成分,具有多种生物活性如抗炎、抗氧化以及降血糖等<sup>[9]</sup>。

炎症是由多种促炎细胞因子和介质诱导的复杂病理现象,是机体对于组织损伤或致病因子侵入做出的一种防御反应<sup>[10]</sup>。研究表明,炎症因子异常激活将引发各种疾病<sup>[11]</sup>,其中,NO、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和NF- $\kappa$ B2等作为重要的炎症因子,在调节多种生理功能方面起到重要作用<sup>[12]</sup>。合成的抗炎药物通常具有一定的副作用,因此,开发基于食物来源的低副作用抗炎药物十分必要,牛蒡多糖具有一定的抗炎效果,但其特性及体外消化情况研究较少。

本实验以柳川理想牛蒡为研究对象,采用热水回流法提取多糖,通过紫外光谱、红外光谱以及离子色谱进行分析,研究了其单糖组成及体外消化特性并利用细胞抗炎模型对牛蒡多糖的抗炎活性进行评价,以期对牛蒡资源的合理开发提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

牛蒡干切片 江苏沛县轶伟有限公司,品种为柳川理想牛蒡;胎牛血清 美国 Sigma 公司;双抗索莱宝科技有限公司;DMEM 高糖培养基、PBS 大连美仑生物技术有限公司;一氧化氮(NO)试剂盒 中国南京建成生物工程研究所(A012-1-2);脂多糖(LPS) 北京索莱宝科技有限公司;胃液、肠液、葡聚糖(180、342、1000、2000、3000、5000、7000、9000 Da)以及单糖标准品(岩藻糖、鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖、木糖、果糖、半乳糖醛酸以及葡萄糖醛酸) 上海源叶生物科技有限公司;RAW.264.7 细胞 美国模式培养物集存库;氯化钠(NaCl) 天津市凯通化学试剂有限公司;氢氧化钠(NaOH) 天津市巴斯夫化工有限公司;盐酸(HCl) 莱阳市康德化工有限公司。

IE204E 型电子分析天平 梅特勒-托利多仪器有限公司;ICS-5000 离子色谱仪、CO<sub>2</sub> 恒温培养箱 美国赛默飞世尔科技有限公司;酶标仪 美国伯腾仪器有限公司;SCIENTZ-18ND 真空冷冻干燥机 宁波新芝生物科技股份有限公司;水浴锅 江苏金怡仪器科技有限公司;Zetasizer-Nano-ZS 激光纳米粒度分析仪 英国 Malvern 公司;LC-20A 高效液相色谱仪 日本岛津仪器有限公司;ST 2100 酸度计 常州奥豪斯仪器有限公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 牛蒡多糖的提取与纯化

1.2.1.1 牛蒡多糖的提取 采用热水回流法从牛蒡中提取多糖<sup>[13-14]</sup>。牛蒡粉碎后过 60 目筛,80 °C 水提(10:1, v/w)两次,每次 1.5 h,将合并的上清液于 55 °C 下用旋转蒸发器浓缩至体积的 1/3。

1.2.1.2 牛蒡多糖的纯化 多糖提取液经等体积的石油醚萃取脱脂,水相再经乙酸乙酯对多酚等组分进行脱除,最后采用 Sevag 法脱除水相中的蛋白质,以糖溶液:氯仿-正丁醇(4:1)为 1:4 混合,充分振摇后离心(3000 r/min, 15 min),弃去下层不溶性物质,重复萃取 5~7 次,直至无变性蛋白层,将上清液浓缩至 1/3 体积,加入 4 倍体积的无水乙醇沉淀 24 h,将沉淀部分复溶,浓缩至 1/3 体积后进行透析(截取 30 cm 长度透析袋,用蒸馏水煮沸 5 min 后,用 60 °C 蒸馏水洗冲 2 min,置 4 °C 蒸馏水中待用,将浓缩后的多糖样品溶液放入截留分子量为 500 Da 的透析袋中,透析 48 h,每 4 h 更换一次蒸馏水),将透析后溶液放于-18 °C 保存后冷冻干燥 48 h,得牛蒡多糖(苯酚硫酸法<sup>[15]</sup>测得糖含量为 83.07%)。

1.2.2 紫外光谱分析 配制牛蒡多糖(1 mg/mL)溶液,进行紫外-可见全波长扫描<sup>[16]</sup>。

1.2.3 多糖分子量的测定 采用高效液相色谱法分析消化过程中多糖分子量,色谱柱为 Shodex OHpak SB-802 HQ、802.5 HQ 和 803 HQ 串联,以 0.3 mol/L NaNO<sub>3</sub> 为流动相,0.3 mL/min 为流速,进样量 20  $\mu$ L,柱温为 30 °C,以系列葡聚糖标准品进行校准。配制 5 mg/mL 的牛蒡多糖样品,用 0.22  $\mu$ m 的水系滤头过滤,实验重复三次。

1.2.4 红外光谱分析 采用傅里叶红外光谱(FTIR)对多糖进行分析<sup>[11]</sup>。扫描范围为 4000~500 cm<sup>-1</sup>,分辨率为 4 cm<sup>-1</sup>,重复三次。

1.2.5 单糖组成的测定 采用高效阴离子交换色谱-脉冲安培法对牛蒡多糖进行测定,分别用不同浓度的单糖标准品绘制标准曲线,对牛蒡多糖中单糖组成进行定性及定量分析<sup>[17]</sup>。在含有 2 mL 三氟乙酸(TFA)的试管中在 80 °C 下水解 10 mg 多糖粉末 6 h,然后旋转蒸发用于去除残留的 TFA。用超纯水将样品体积调节至 10 mL 后,在 Supelclean™ ENVI-18 SPE 管(30 mg/mL)和 0.22  $\mu$ m 微孔过滤器上进行纯化。使用 Dionex™ AminoPac™ PA10 IC 柱(Dionex, 3 mm $\times$ 250 mm)进行分析,使用 0.20 mol/L NaOH 溶液和 1.00 mol/L 醋酸钠溶液作为流动相,柱温设置为 30 °C,最小流量设置为 0.25 mL。

#### 1.2.6 牛蒡多糖的物理稳定性

1.2.6.1 pH 对多糖稳定性的影响 通过添加不同量的 0.5 mol/L HCl 或 NaOH 将制备的多糖溶液调节



至所需的 pH(2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0), 4 ℃ 条件下储存 24 h 后对其粒径进行测量<sup>[18]</sup>。

1.2.6.2 NaCl 浓度对多糖稳定性的影响 通过添加不同质量的 NaCl 以获得具有不同浓度(0、50、100、150 和 200 mmol/L)的多糖溶液。4 ℃ 条件下储存 24 h 后对其粒径进行测量<sup>[18]</sup>。

1.2.6.3 温度对多糖稳定性的影响 将新制备的多糖溶液分别放置于 30、40、50、60、70、80 和 90 ℃ 环境条件中 1 h 后取出放凉至室温, 分别取 1 mL 溶液放入马尔文激光粒度仪进行粒径的测定<sup>[18]</sup>。

1.2.7 体外模拟胃肠道消化 参考文献 [19] 报道的体外消化方法稍作修改。

胃液消化: 将牛蒡多糖(10 mg/mL)的浓度和模拟人工胃液以 1:1(v/v)的比例加入离心管中, 使用 0.5 mol/L 的 HCl 和 NaOH 将混合物的 pH 调节至 2.0。在 37 ℃ 的恒温水浴摇床中孵育(150 r/min), 模拟胃部消化; 随后分别在 1、2、6 h 时取样 2 mL, 将混合物 pH 调至 7.0, 沸水浴 5 min 终止反应。

肠道消化: 将胃部消化的混合物和模拟人工肠液以 10:3(v/v)的比例加入离心管中, 使用 0.5 mol/L 的 HCl 和 NaCl 将混合物的 pH 调节至 7.0。在 37 ℃ 的恒温水浴摇床中孵育(150 r/min), 模拟肠道消化; 分别在 1、2、6 h 时取样 2 mL, 沸水浴 5 min 终止反应。

对体外消化过程中不同阶段取得的样本的还原糖含量进行检测并计算牛蒡多糖在胃肠道内的水解度。采用苯酚硫酸法测定总糖含量, 使用 2,5-二硝基水杨酸测定还原糖含量。多糖水解度计算公式为:

$$\text{水解度}(\%) = \frac{R_t - R_0}{T_s - R_0} \times 100$$

公式中:  $R_t$ —样品溶液在各测试时间点的还原糖含量(mg/mL,  $t=1、2、6$  h);  $R_0$ —样品溶液的初始还原糖含量(mg/mL);  $T_s$ —样品溶液中的总糖含量(mg/mL)。

## 1.2.8 细胞模型抗炎活性评价

1.2.8.1 RAW264.7 细胞培养 将巨噬细胞 RAW 264.7 接种在含有 10%FBS 胎牛血清、1% 双抗(链霉素 100 mg/mL、青霉素 100 U/mL)和 90% DMEM 完全培养基的 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶中, 于恒温培养箱(37 ℃、5% CO<sub>2</sub>)中培养, 24~36 h 后对细胞进行换液。当细胞生长到培养瓶的 70%~80% 时, 对细胞进行传代培养。

1.2.8.2 RAW264.7 细胞活力测试 在 96 孔板中加入  $8 \times 10^4$  个/mL 的对数生长期的 RAW264.7 细胞于培养箱中孵育 24 h, 设置实验组和正常对照组, 于培养箱处理 12 h, 实验组即加入不同浓度的多糖溶液(以 PBS 溶液配制 200 mg/mL 的母液, 用培养基稀释成 50、100、250、500、1000 μg/mL)。随后每孔加入 100 μL CCK-8(Cell Counting Kit-8 细胞计数试剂), 培养箱内避光孵育 2 h 后, 于 450 nm 测定吸光度(A), 实验进行三次重复, 细胞活力计算如下:

$$\text{细胞活力}(\%) = \frac{A_{\text{不同浓度的实验组}}}{A_{\text{对照组}}} \times 100$$

1.2.8.3 RAW264.7 细胞炎症模型的建立 收集对数生长期的 RAW 264.7 细胞沉淀, 并将细胞沉淀制成含  $8 \times 10^4$  个/mL 的单细胞悬液, 接种于 96 孔细胞培养板。空白组加入 100 μL DMEM 高糖培养基; 对照组中每孔加入 100 μL 细胞悬液和 100 μL 完全培养基, 在培养箱中孵育 24 h 后, 弃去培养基, 用 PBS 洗两遍, 再加入 100 μL 完全培养基; 实验组中每孔加入 100 μL 细胞悬液和 100 μL 完全培养基, 在培养箱中孵育 24 h 后, 弃去培养基, 加入 100 μL 不同浓度的 LPS 溶液(0.1、0.2、0.5、1、2 μg/mL)。最后各组均在培养箱中孵育 24 h 后, 收集细胞上清液测定 NO 含量, 以此来筛选 LPS 浓度进行后续实验。

1.2.8.4 多糖对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 含量的影响 在 96 孔板中加入 100 μL  $8 \times 10^4$  个/mL 对数期生长的 RAW 264.7 细胞和 100 μL 完全培养基, 培养箱中孵育 24 h 后去除培养基, 然后加入不同浓度(50、100、250、500 μg/mL)的多糖溶液 100 μL 孵育 12 h, 再加入筛选后的 LPS 溶液(LPS, 1 μg/mL) 100 μL 处理 24 h, 同时设置空白组(只加培养基)和对照组(不加样品干预处理)。培养结束后收集上清液, 参照 NO 试剂盒说明书推算各组细胞培养液中 NO 的含量。

## 1.3 数据处理

实验采用 Origin 9.1 和 GraphPad Prism 8 软件作图, 结果以平均值±标准差表示, 重复三次, 通过 SPSS 软件进行 t 检验分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 紫外光谱分析

牛蒡粗多糖的紫外光谱图如图 1 所示, 在波长 260、280 nm 下没有明显吸收峰, 说明该牛蒡粗多糖组分中几乎不含核酸和蛋白质。

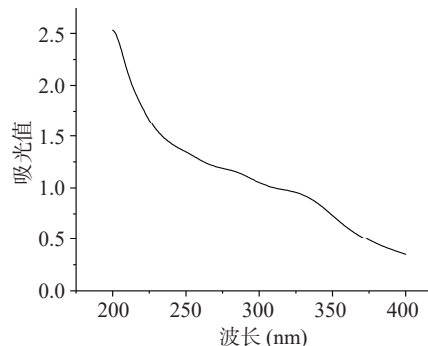


图1 牛蒡多糖的紫外光谱分析

Fig.1 Ultraviolet spectrum analysis of burdock polysaccharide

### 2.2 分子量测定

采用高效液相色谱法对牛蒡多糖进行分子量测定(如图 2), 以标准品相对分子质量对数值为纵坐标, 保留时间为横坐标, 进行标准曲线的拟合, 标准曲线为:  $Y = -3.145826e^{-005}X^3 + 0.007674452X^2 - 0.6716573X +$

23.53052,  $R^2=0.9900413$ 。通过标准曲线计算多糖样品的分子量, 结果显示其重均分子量为 2902 Da, 占比 98.68%, 通过分析图可以发现牛蒡多糖中杂质较少。

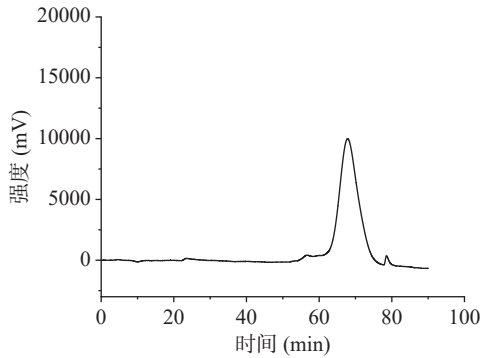


图 2 牛蒡多糖的分子量测定图  
Fig.2 Diagram of molecular weight determination of burdock polysaccharide

### 2.3 红外光谱分析

图 3 显示了牛蒡多糖的典型红外谱图: 其中,  $3290\text{ cm}^{-1}$  处的峰属于 O-H 的伸缩振动,  $2930\text{ cm}^{-1}$  处的吸收峰属于包括 -CH、-CH<sub>2</sub> 和 -CH<sub>3</sub> 基团在内的 C-H 的伸缩振动,  $1630\text{ cm}^{-1}$  和  $1420\text{ cm}^{-1}$  的峰分别对应于对称的 C=O 伸缩振动以及不对称的 C=O 的伸缩振动和 C-H 的弯曲振动<sup>[20]</sup>。C-O-H 和 C-O-C 的伸缩振动引起从  $1200\text{ cm}^{-1}$  到  $1000\text{ cm}^{-1}$  处的吸收<sup>[21]</sup>,  $1000\sim 800\text{ cm}^{-1}$  处的吸收带为呋喃糖残留物的特征峰, 其中,  $933\text{ cm}^{-1}$  处的吸收峰对应于呋喃糖环对称伸缩振动,  $819\text{ cm}^{-1}$  处的吸收峰为糖分子中呋喃环的 C-H 键的变角振动吸收, 说明该牛蒡多糖为含有呋喃环的糖<sup>[22-24]</sup>。该研究结果与李丹丹<sup>[25]</sup>所制备的牛蒡菊糖红外光谱结果相一致, 均为含有呋喃环的多糖。

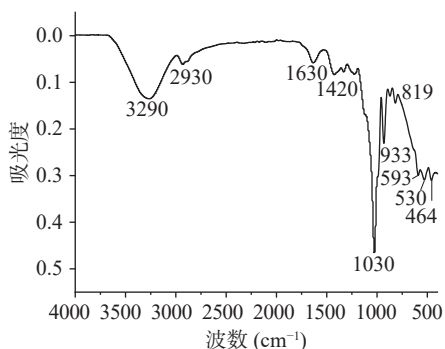


图 3 牛蒡多糖的红外光谱分析图  
Fig.3 Infrared spectrum analysis chart of burdock polysaccharide

### 2.4 单糖组成测定

从图 4 中可以看出牛蒡粗多糖中果糖含量最高, 且果糖:葡萄糖:阿拉伯糖:半乳糖=13.6:2.5:1.6:1, 不含有糖醛酸, 该结果与红外光谱中不含糖醛酸特征峰结果一致。此外, 单糖结果显示果糖为牛蒡多糖中的主要单糖。Jiang 等<sup>[26]</sup>对牛蒡多糖进行分

析发现, 其单糖组成主要由甘露糖、葡萄糖、果糖和半乳糖组成, 但三种纯化多糖组分(对应分子量分别为 218、178 和 60 kDa)之间单糖所占比例不同。图中保留时间为 6 min 附近的峰在岩藻糖、鼠李糖、甘露糖、木糖、半乳糖醛酸以及葡萄糖醛酸 6 种单糖标准品中均未有对应, 有待进一步分析验证。

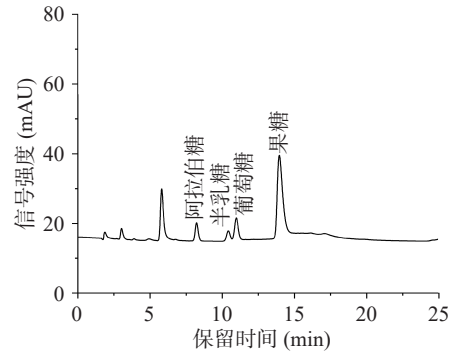
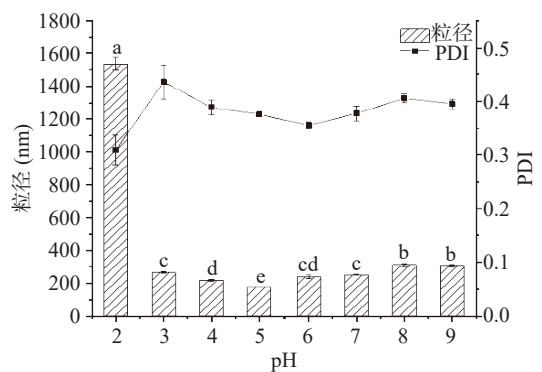
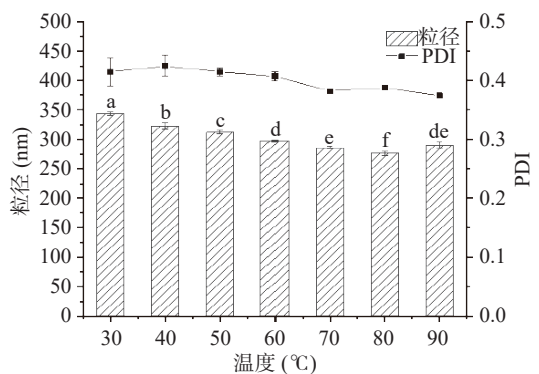


图 4 牛蒡多糖的单糖组成  
Fig.4 The monosaccharide composition of burdock polysaccharide

### 2.5 物理稳定性评价

粒径是依据 Stoke's 定律评估体系稳定性的常用方法, 体系中颗粒的平均粒径越大, 体系越不稳定<sup>[27]</sup>。由图可知, 不同的温度条件(30、40、50、60、70、80、90 °C)对多糖的粒径及聚合物分散性指数(PDI)影响结果见图 5, 均在 277~343 nm 及 0.374~0.425 范围内。多糖在 pH 为 2 时, 粒径极大, 此时多糖溶液处于不稳定状态。当 pH 为 3~9 时, 粒径范围在 174~319 nm 之间, PDI 在 0.353~0.473 之间, 变化较小。多糖在 NaCl 浓度为 0~50 mmol/L 时, 粒径变化不大; 而当 NaCl 浓度高于 100 mmol/L 时粒径达到



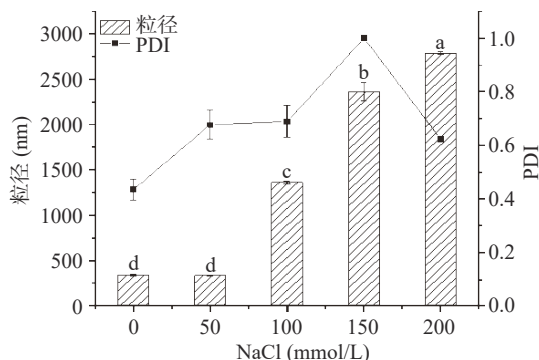


图5 牛蒡多糖物理稳定性评价

Fig.5 Physical stability evaluation of burdock polysaccharide 注:不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

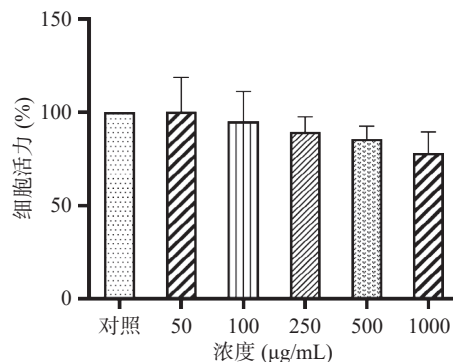


图7 不同浓度的多糖细胞活力

Fig.7 Cell viability of different concentrations of polysaccharides

1200 nm 以上, PDI 值大于 0.6, 该结果可能是因为 NaCl 的加入减弱了静电斥力, 导致粒径增加<sup>[28]</sup>。

### 2.6 体外消化

由图6可知, 牛蒡多糖经胃肠道消化后随着消化时间增加其水解度在逐步增加, 其中, 整个胃部消化(6 h)水解度为 11.66%, 还原糖含量增加, 这可能与胃液的酸性环境使糖苷键断裂或共价键的破坏导致还原末端的形成有关<sup>[29-32]</sup>。肠道消化阶段多糖水解度继续增加可能与小肠液中含有胰腺和肝脏分泌的胰酶和胆汁酸以及糖苷酶将多糖水解成单糖有关, 但肠消化较胃消化阶段水解度下降, 肠消化水解度为 9.12%, 可能与肠液的稀释有关<sup>[33]</sup>。

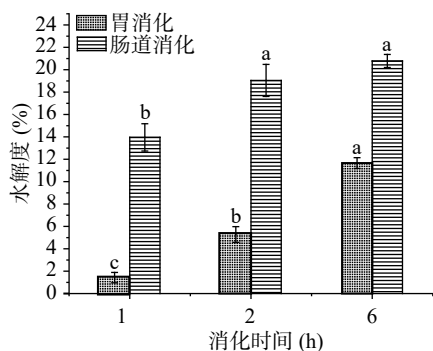


图6 牛蒡多糖体外消化水解度变化

Fig.6 Changes in the degree of digestion and hydrolysis of burdock polysaccharides *in vitro*

注: 不同小写字母表示同一消化处理下不同时间差异显著 ( $P<0.05$ )。

### 2.7 体外抗炎活性评价

2.7.1 细胞活力实验 由图7可知, 不同浓度(50、100、250、500、1000 μg/mL)的多糖作用于 RAW264.7 细胞后, 对照组和不同浓度的多糖组细胞存活率分别为: 100%、100.22%、95.26%、89.41%、85.85% 以及 78.36%, 与对照组相比不同浓度的多糖组对细胞存活率没有明显的抑制效果, 表明牛蒡多糖对细胞几乎没有毒性。其中, 多糖浓度为 1000 μg/mL 时细胞存活率低于 80%, 不适合作为评价浓度, 因此, 选取 50~500 μg/mL 无毒浓度作为后续实验的浓度梯度。

2.7.2 LPS 诱导 RAW264.7 细胞炎症模型 LPS 浓度对 NO 含量的影响如图8所示, 经过不同实验浓度(0.1、0.2、0.5、1、2 μg/mL) LPS 处理后, 均导致了 NO 含量增加, 且在 0.1~1 μg/mL 范围内 NO 含量随 LPS 诱导浓度的上升而增加, 该结果表明在 0.1~1 μg/mL 范围内 LPS 浓度越高对细胞造成的炎症越明显。其中, LPS 浓度在 0.1 和 0.2 μg/mL 时, NO 含量与对照组无显著性差异 ( $P>0.05$ ); 而当浓度高于 0.5 μg/mL 时, 模型组 NO 的含量与对照组表现出显著性差异 ( $P<0.05$ ), 在高浓度(1 μg/mL)时, 实验组 NO 的含量高于对照组 88.72%, 但当 LPS 的浓度为 2 μg/mL 时 NO 的含量与 1 μg/mL 时无显著性差异 ( $P>0.05$ ), 因此选择 LPS 终浓度为 1 μg/mL 进行后续实验。

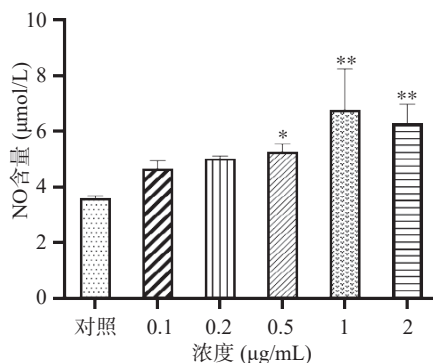


图8 LPS 诱导 RAW264.7 细胞炎症模型

Fig.8 LPS-induced inflammation model of RAW264.7 cells 注: 与空白组相比, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ 。

2.7.3 多糖对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 的影响 NO 含量的升高是 RAW 264.7 细胞出现炎症反应的标志之一, 因此研究不同浓度的多糖溶液对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞上清液中 NO 含量的影响, 可以作为评价药物抗炎活性的指标。由图9可知, 与对照组相比, LPS(1 μg/mL)可以显著增加 RAW 264.7 细胞中的 NO 含量 ( $P<0.0001$ ), NO 含量从 3.75 μmol/L 增加至 12.70 μmol/L, 而与模型组相比, 不同浓度的多糖可以显著降低 NO 的产生 ( $P<0.05$ ), 使 NO 的含量下降 19.37%~48.66%, 于



250  $\mu\text{g/mL}$  时 NO 的含量达到最低为 6.52  $\mu\text{mol/L}$ , 效果明显, 而 500  $\mu\text{g/mL}$  时 NO 的含量出现轻微上升, 可能是由于化合物活性与剂量的作用关系一般是抛物线型, 因此高浓度(500  $\mu\text{g/mL}$ )的多糖溶液的抗炎作用减弱, 以上结果均证明了牛蒡多糖的抗炎效果。

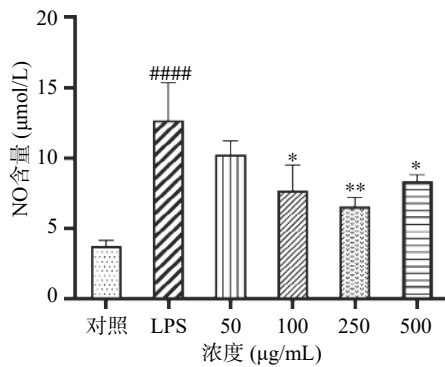


图 9 多糖对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 的影响

Fig.9 The effect of polysaccharides on NO in RAW264.7 cells induced by LPS

注: \* $P < 0.05$  和 \*\* $P < 0.01$  与模型组相比; 与对照组相比, #### $P < 0.0001$ 。

### 3 结论

牛蒡多糖的总糖含量为 83.07%, 分子量为 2902 Da, 单糖组成为果糖:葡萄糖:阿拉伯糖:半乳糖=13.6:2.5:1.6:1, 结合红外光谱分析牛蒡多糖为含有呋喃环的多糖。该多糖受温度及 pH(3~9)影响较小, 但高盐离子浓度会破坏其稳定性。消化过程中还原糖含量增加, 经胃肠各消化 6 h 后水解度为 20.78%。由 LPS 诱导 RAW264.7 细胞炎症模型中可以看出牛蒡多糖可以显著降低 NO 的水平( $P < 0.05$ ), 250  $\mu\text{g/mL}$  时 NO 的含量达到最低为 6.52  $\mu\text{mol/L}$ , 较模型组下降 48.66%。综上所述, 本研究基于体内外两种模型同时证明了牛蒡多糖的抗炎效果, 为天然抗炎产品的开发提供理论依据, 有利于牛蒡资源的进一步开发和利用。

### 参考文献

[1] 李玲玉, 邱志常, 朱姗姗, 等. 响应面法优化牛蒡多糖超声辅助提取工艺与抗氧化活性评价[J]. 食品科技, 2020, 45(11): 197-204, 211. [LI L Y, QIU Z C, ZHU S S, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction process and antioxidant activity evaluation of burdock polysaccharide by response surface methodology [J]. Food Science and Technology, 2020, 45(11): 197-204, 211.]

[2] 张晓晓, 柴智, 冯进, 等. 牛蒡多糖的提取及生物活性研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(6): 280-288. [ZHANG X X, CHAI Z, FENG J, et al. Research progress on extraction and biological activity of burdock polysaccharides[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(6): 280-288.]

[3] ZHANG X, ZHANG N, KAN J, et al. Anti-inflammatory activity of alkali-soluble polysaccharides from *Arctium lappa* L. and its effect on gut microbiota of mice with inflammation[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 154: 773-787.

[4] 巫永华, 陆文静, 刘梦虎, 等. 响应面优化超声波辅助双水相提取牛蒡多糖及抗氧化分析[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(5): 215-223. [WU Y H, LU W J, LIU M H, et al. Response surface optimization of ultrasonic-assisted two-phase extraction of burdock polysaccharides and antioxidant analysis[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(5): 215-223.]

[5] 宋子敬, 张春风. 牛蒡多糖对免疫低下小鼠增强免疫及抗氧化作用研究[J]. 海峡药学, 2016, 28(5): 25-27. [SONG Z J, ZHANG C F. Study on the effects of burdock polysaccharides on immunity enhancement and anti-oxidation in immunocompromised mice[J]. Strait Pharmacy, 2016, 28(5): 25-27.]

[6] ZHANG N F, WANG Y, KAN J, et al. In vivo and in vitro anti-inflammatory effects of water-soluble polysaccharide from *Arctium lappa* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 135: 717-724.

[7] 李卷梅. 牛蒡根多糖提取和结构特征[D]. 南昌: 南昌大学, 2019. [LI J M. Extraction and structural characteristics of polysaccharides from burdock root[D]. Nanchang: Nanchang University, 2019.]

[8] 胡建. 牛蒡多糖的提取纯化及其抗氧化性研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2011. [HU J. Extraction and purification of burdock polysaccharide and its antioxidant activity[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2011.]

[9] 刘闯, 吴现华, 刘静, 等. 植物多糖抗炎活性机制及其构效关系研究进展[J]. 食品工业科技, 2022, 43(11): 415-425. [LIU C, WU X H, LIU J, et al. Research progress on the anti-inflammatory activity mechanism and structure-activity relationship of plant polysaccharides[J]. Food Industry Science and Technology, 2022, 43(11): 415-425.]

[10] YAO Y F, WANG L F, CHEN S M, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of ethanol-soluble acidic component from *Ganoderma atrum* by suppressing mannose receptor[J]. Journal of Functional Foods, 2022, 89: 104915.

[11] GUZIK T J, KORBUT R, ADAMEK-GUZIK T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation[J]. Journal of Physiology and Pharmacology, 2003, 54(4): 469-487.

[12] RANKIN J A. Biological mediators of acute inflammation [J]. AACN Clinical Issues, 2004, 15(1): 3-17.

[13] 陈树俊, 李佳益, 王翠莲, 等. 黄梨渣多糖的提取、分离纯化和结构鉴定[J]. 食品科学, 2018, 39(20): 278-286. [CHEN S J, LI J Y, WANG C L, et al. Extraction, isolation and purification and structure identification of polysaccharides from yellow pear residue[J]. Food Science, 2018, 39(20): 278-286.]

[14] 王彦平, 姜芳慧, 陈月英, 等. 苯酚-硫酸法测定紫山药多糖含量的条件优化[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(4): 170-174. [WANG Y P, LOU F H, CHEN Y Y, et al. Optimization of conditions for determination of polysaccharide content in purple yam by phenol-sulfuric acid method[J]. Food Research and Development, 2021, 42(4): 170-174.]

[15] 李晶晶, 刘欣鑫, 薛阳, 等. 碱蓬多糖 SSP1-1 的分离纯化及其抗肿瘤活性[J]. 食品工业科技, 2020, 41(20): 314-319. [LI J J, LIU X X, XUE Y, et al. Isolation and purification of *Suaeda salsa* polysaccharide SSP1-1 and its anti-tumor activity[J]. Science and

- Technology of Food Industry, 2020, 41(20): 314-319. ]
- [ 16 ] 杨燕敏, 郑振佳, 高琳, 等. 红枣多糖超声波提取、结构表征及抗氧化活性评价[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(5): 120-126. [ YANG Y M, ZHENG Z J, GAO L, et al. Ultrasonic extraction, structure characterization and antioxidant activity evaluation of jujube polysaccharides[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(5): 120-126. ]
- [ 17 ] YANG Y, QIU Z, LI L, et al. Structural characterization and antioxidant activities of one neutral polysaccharide and three acid polysaccharides from *Ziziphus jujuba* cv. Hamidazao: A comparison[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 261: 117879.
- [ 18 ] 王玮琛. 姜黄素分离与纳米颗粒制备及对疲劳应激损伤的修复作用[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2020. [ WANG W C. Curcumin isolation and nanoparticle preparation and its repairing effect on fatigue stress injury[D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2020. ]
- [ 19 ] 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]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 238: 116183.
- [ 20 ] LI L Y, QIU Z C, DONG H J, et al. Structural characterization and antioxidant activities of one neutral polysaccharide and three acid polysaccharides from the roots of *Arctium lappa* L.: A comparison[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 182(14): 187-196.
- [ 21 ] 田有秋, 贾金霞, 束旭, 等. 淡红侧耳子实体多糖的分离纯化及结构探析[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(12): 66-72. [ TIAN Y Q, JIA J X, SHU X, et al. Isolation, purification and structure analysis of polysaccharides from *Pleurotus ostreatus* fruiting bodies[J]. Food and Fermentation Industries, 2018, 44(12): 66-72. ]
- [ 22 ] JING Y, HUANG L, LÜ W, et al. Structural characterization of a novel polysaccharide from pulp tissues of *Litchi chinensis* and its immunomodulatory activity[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(4): 902-911.
- [ 23 ] XU L, LU Y, CONG Y, et al. Polysaccharide produced by *Bacillus subtilis* using burdock oligo fructose as carbon source[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 206: 811-819.
- [ 24 ] TU W, ZHU J, BI S, et al. Isolation, characterization and bioactivities of a new polysaccharide from *Annona squamosa* and its sulfated derivative[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 152: 287-296.
- [ 25 ] 李丹丹. 牛蒡菊糖的制备、对双歧杆菌的增殖及应用研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008. [ LI D D. Preparation of burdock inulin, proliferation and application of *Bifidobacterium*[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2008. ]
- [ 26 ] JIANG Y, YU J, LI Y, et al. Extraction and antioxidant activities of polysaccharides from roots of *Arctium lappa* L.[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 123: 531-538.
- [ 27 ] 田浩. 可溶性大豆多糖在酸性条件下稳定不同乳蛋白的影响因素研究[D]. 无锡: 江南大学, 2021. [ TIAN H. Influencing factors of soluble soybean polysaccharides in the stabilization of different milk proteins under acidic conditions[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021. ]
- [ 28 ] WANG X, LI M, LIU F, et al. Fabrication and characterization of zein-tea polyphenols-pectin ternary complex nanoparticles as an effective hyperoside delivery system: Formation mechanism, physicochemical stability, and *in vitro* release property[J]. *Food Chemistry*, 2021, 364: 130335.
- [ 29 ] 龚雯, 唐婕, 韦雅渊, 等. 金花茶多糖的体外消化及酵解特性研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(24): 31-39. [ GONG W, TANG J, WEI Y Y, et al. Study on the *in vitro* digestion and glycolysis characteristics of *Camellia sinensis* polysaccharides[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(24): 31-39. ]
- [ 30 ] 高涛, 罗黄洋, 吴韧, 等. 川明参多糖在体外模拟消化过程中的结构变化及对消化酶活性的影响[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(23): 98-105. [ GAO T, LUO H Y, WU R, et al. Structural changes of Chuanmingshen polysaccharide in simulated digestion process *in vitro* and its effect on digestive enzyme activity[J]. Food and Fermentation Industry, 2021, 47(23): 98-105. ]
- [ 31 ] 于海芬. 铁棍山药多糖的纯化、结构及胃肠调节活性研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2019. [ YU H F. Study on the purification, structure and gastrointestinal regulating activity of polysaccharides of iron stick yam[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2019. ]
- [ 32 ] LI H L, LIU S, LIU Y, et al. Effects of *in vitro* digestion and fermentation of *Nostoc commune* Vauch. polysaccharides on properties and gut microbiota[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2022, 281: 119055.
- [ 33 ] DI T, CHEN G, 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]. *Journal of Functional Foods*, 2018, 40: 18-27.