

杨玲,陈阳,杨小生,等. 响应面法优化仙茅多糖酶解工艺及体外免疫活性[J]. 江苏农业科学,2020,48(8):229-237.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.08.043

# 响应面法优化仙茅多糖酶解工艺及体外免疫活性

杨玲<sup>1,3</sup>, 陈阳<sup>3</sup>, 杨小生<sup>2,3</sup>, 杨娟<sup>2,3</sup>

(1. 贵州大学药学院, 贵州贵阳 550025; 2. 贵州医科大学省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵州贵阳 550014;  
3. 贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵州贵阳 550014)

**摘要:**采用葡聚糖酶对仙茅多糖 XMP-1 进行酶解, 并利用响应面法对酶解工艺进行合理优化。在单因素试验的基础上, 采用星点设计模拟葡聚糖酶添加量、酶解温度、时间、pH 值等 4 个因素对还原糖生成量综合影响的模型, 得到最佳工艺条件, 并验证模型的可靠性。通过小鼠巨噬细胞(RAW264.7)分析 XMP-1 1~12 h 酶解得到的 12 批产物的体外免疫活性。结果表明, 最佳酶解工艺为酶添加量为 56%, 温度为 52 ℃, 酶解时间为 12 h, pH 值为 6.0, 此时还原糖生成量为 0.201 0 mg/mL。优化结果可靠, 与预测值的相对误差小于 5%。不同时间段酶解产物对细胞无明显毒害作用, 均能诱导 RAW264.7 细胞活化, 释放 TNF- $\alpha$  和 NO, 其中酶解 5 h 的效果最好。该研究可为仙茅多糖酶解片段的制备提供理论基础, 也可作为仙茅多糖在食品领域进一步开发和应用提供科学依据。

**关键词:**仙茅; 多糖; 葡聚糖酶; 酶解工艺; 响应曲面法; 体外免疫诱导活性

**中图分类号:** R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)08-0229-09

仙茅作为石蒜科植物仙茅(*Curculigo orchoides* Gaertn)的根茎, 是临床常用的辛热药之一, 主要用于治疗肾阳不足、虚痹内伤、腰膝冷痛、筋骨痿软等虚寒症状<sup>[1-2]</sup>。它的组成成分主要包括酚性化合物及酚苷、三萜皂苷、植物多糖、木脂素苷类、黄酮类化合物、苯环取代物、挥发油等<sup>[3-4]</sup>。药理研究结果显示, 仙茅具有抗氧化、增强免疫力、延缓生殖系统老化、抗骨质疏松、保肝、保护心血管等作用<sup>[5]</sup>, 仙茅多糖具有免疫调节、对抗肿瘤药氟尿嘧啶减毒增效、加强青蛙心脏的收缩、抗骨质疏松等作用<sup>[6]</sup>。目前对于仙茅多糖成分的研究只有国内外少量文献报道, 且主要研究其药理作用, 而将仙茅多糖酶解为寡糖的研究尚未见报道。

由于多糖是通过其特异性寡聚糖片段与受体相结合而介导免疫反应的, 因此对寡聚糖活性片段进行研究对探讨仙茅多糖作用机制具有关键作用<sup>[7-8]</sup>。降解多糖的方法主要有化学、物理和酶降解法等; 酸降解法和氧化降解法是常用的化学降解

法, 简单易行, 但是对于降解产物的聚合度难以控制, 降解得率低; 目前大多数物理降解方法还处于实验室阶段, 还需要进行更深入的研究; 酶降解法与化学、物理降解法相比, 具有反应条件温和、产物均一性好、聚合度适中、得率高、无污染等优点, 且能最大程度地保护反应底物的活性基团不受破坏<sup>[9-10]</sup>。选择合适的降解酶对多糖进行酶法修饰, 不仅可以更好地探讨多糖的结构与功能关系, 进而探寻多糖的活性中心, 而且可为药物筛选提供各种结构类型的候选化合物<sup>[11]</sup>。另外, 植物多糖虽然来源丰富, 性质稳定, 但其分子量大, 黏度大, 扩散困难, 结构复杂, 导致其的吸收受到阻碍, 进而使其应用范围受到限制。将植物多糖降解成适宜的、较低分子量的寡糖片段, 能够使其结构更为清晰<sup>[12]</sup>。寡糖由于结构相对简单, 有人工合成的可能性, 其溶解性、稳定性和安全性相对较好<sup>[13]</sup>。因此, 对多糖进行酶法修饰已成为多糖构效关系研究的重要手段, 也是发现和研制糖类药物的重要途径。本研究利用响应面法优化仙茅多糖葡聚糖酶酶解工艺, 并用小鼠巨噬细胞 RAW264.7 分析不同时间段酶解产物的体外免疫诱导活性, 以期为仙茅多糖低分子量降解片段的制备提供理论基础, 对深入研究仙茅多糖构效关系及更好地开发利用仙茅多糖具有重要意义。

收稿日期: 2019-03-14

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81460597); 贵州省科技平台及人才团队计划(编号: 黔科合平台人才[2017]5614)。

作者简介: 杨玲(1991—), 女, 贵州毕节人, 硕士研究生, 研究方向为天然药物成分及生理活性。E-mail: 18275269165@163.com。

通信作者: 杨娟, 博士, 研究员, 主要从事多糖及寡糖研究。E-mail: yangxz2002@126.com。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

仙茅,购自贵州省贵阳市万东桥药材市场,经贵阳中医学院孙庆文教授鉴定为仙茅(*Curculigo orchoides* Gaertn)的根,干燥粉碎过 40 目筛。Sephadex G-50 层析柱,美国 Pharmacia Sweden 公司;DEAE 纤维素柱,上海恒信化学试剂有限公司;小鼠巨噬细胞系 RAW264.7,中国科学院典型培养物保藏委员会昆明细胞库;DMWM 培养基、胰酶(HyClone,J140032)、Mouse TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒(DKW12-2012-096)、NO 检测试剂盒(BLUEGENE,E03N0041),北京达科为生物技术有限公司;3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二甲基四氮 D 唑啉蓝(MTT,822A055),北京索莱宝科技有限公司;胎牛血清(FBS,20150914),浙江天杭生物科技股份有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

自动部分收集器(BS-100A),上海精科实业有限公司;紫外可见分光光度计(UV-1800),日本岛津仪器有限公司;旋转蒸发器(Buchi R114),Switzerland 公司;数显恒流泵(HL-2B),上海精科实业有限公司;数显加热磁力搅拌器(C-MAG HS 7),德国 IKA 集团;酶联免疫检测仪(1510)、水套式 CO<sub>2</sub> 培养箱(USA3131),美国热电公司;倒置显微镜(03040108),日本尼康公司。

1.2 试验方法

1.2.1 仙茅粗多糖的提取及分离纯化 用 80% 乙醇回流提取仙茅干药粉 2 次,每次 2 h,除去低聚糖、单糖及脂溶性成分后,按照仙茅干药粉和蒸馏水的料液比为 1 g:35 mL,沸水浴提取 150 min,然后将提取液浓缩至黏稠状,5 倍无水乙醇醇沉,静置过夜,干燥得到仙茅粗多糖。对仙茅粗多糖采用 DEAE-纤维素柱进行层析( $\Phi$ 12.6 cm $\times$ 100 cm),流速为 5 mL/min,40 min/管,用纯净水进行洗脱;再经 Sephadex G-50 凝胶柱层析进行纯化( $\Phi$ 2.6 cm $\times$ 85 cm),流速为 1.2 mL/min,6 min/管,用纯净水进行洗脱。凝胶渗透色谱法:Agilent PL aquagel-OH MIXED 色谱柱(7.5 mm $\times$ 300 mm,8  $\mu$ m),流动相为 0.05 mol/L Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液,流速为 1.0 mL/min,温度为 35  $^{\circ}$ C,进样量为 80  $\mu$ L,检测器为示差折光检测器;用流动相溶解 10 mg 多糖样品于 10 mL 容量瓶中,进行高效液相色谱分析。凝胶渗透色谱法测定结果分析:采用以标准品的相

对分子质量对数与对应的洗脱体积绘制标准曲线,再根据样品洗脱体积求得其相对分子质量<sup>[14]</sup>。对仙茅多糖纯化后样品进行纯度鉴定。

1.2.2 仙茅多糖的酶解工艺及评价指标 取纯化后的仙茅多糖 30 mg 加 5 mL 纯净水 $\rightarrow$ 50  $^{\circ}$ C 下搅拌 30 min 使其充分溶解 $\rightarrow$ 加入 16.8 mg 葡聚糖酶、15 mL pH 值为 6 的 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 缓冲液 $\rightarrow$ 52  $^{\circ}$ C 下反应 12 h $\rightarrow$ 沸水浴 15 min 终止反应 $\rightarrow$ 过滤 $\rightarrow$ 浓缩至 10 mL $\rightarrow$ 酶解产物的混合物。

从酶解产物中分别移取 2 mL 置于 30 mL 具塞试管中,加入 3,5-二硝基水杨酸(DNS)溶液 3 mL,混合均匀后,沸水浴 7 min,急速冷却,补水至 25 mL。以还原糖含量为指标,绘制葡萄糖标准曲线: $y=0.8011x+0.0068(r^2=0.9998)$ ,线性范围为 0.08~0.48 mg/mL,计算酶解产物的还原糖含量。

1.2.3 仙茅多糖酶解工艺的单因素试验 考察酶添加量、温度、时间、pH 值对仙茅纯多糖酶解得到的还原糖含量的影响。在酶解温度为 55  $^{\circ}$ C、时间为 10 h、pH 值为 5.5 条件下,设酶添加量分别为 20%、30%、40%、50%、60%、70%;在酶添加量为 50%、时间为 10 h、pH 值为 5.5 条件下,分别设酶解温度为 10、20、30、40、50、60、70  $^{\circ}$ C;在酶添加量为 50%、温度为 50  $^{\circ}$ C、pH 值为 5.5 条件下,分别设酶解时间为 3、6、9、12、15、18 h;在酶添加量为 50%、温度为 50  $^{\circ}$ C、时间为 12 h 条件下,分别设 pH 值为 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0,对仙茅多糖酶解工艺进行单因素试验。

1.2.4 响应面法优化试验 在单因素考察基础上,以酶添加量(A)、温度(B)、酶解时间(C)、pH 值(D)为自变量,还原糖生成量为响应值。采用 Design Expert 8.05 软件进行 4 因素 5 水平星点设计试验<sup>[15-16]</sup>,具体见表 1。

表 1 响应面试验因素的水平设计

因素水平	A:酶添加量 (%)	B:温度 ( $^{\circ}$ C)	C:酶解时间 (h)	D:pH 值
-1.732	40.00	40.00	10.00	5.00
-1	44.00	44.18	10.84	5.42
0	50.00	50.00	12.00	6.00
1	56.00	55.82	13.16	6.58
1.732	60.00	60.00	14.00	7.00

1.2.5 MTT 法检测各酶解组分对细胞的毒性 在含有 10% 胎牛血清(FBS)、1 mL 10.25% 胰酶的 90% DMEM 培养基接种小鼠巨噬细胞系 RAW

264.7 细胞,在温度为 37 ℃、CO<sub>2</sub> 浓度为 5.0% 的细胞培养箱中进行传代培养<sup>[17]</sup>。在酶添加量为 56%、温度为 52 ℃、pH 值为 6.0 条件下,试验组为 100 mg 仙茅纯多糖酶解 1~12 h,分别得到 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 h 等 12 批酶解产物浓缩干燥,配制成浓度为 31.250、125.000、500.000 μg/mL 溶液;空白组(BC):以 DMEM 培养基作为空白对照;多糖组(XMP-1):将未酶解的浓度为 125.00 μg/mL 的仙茅多糖溶液命名为 XMP-1,作为多糖组。以每孔 10<sup>6</sup> 个细胞的浓度将 RAW264.7 细胞接种于 96 孔(100 μL/孔)细胞培养板中,加入试验组、空白组和多糖组溶液各 100 μL,置于温度为 37 ℃、CO<sub>2</sub> 浓度为 5% 的细胞培养箱中孵育 48 h。细胞孵育完成后,每孔加入 20 μL MTT,继续培育 4 h 后终止培养,吸取上清,每孔加 150 μL 二甲基亚砷 DMSO,低速(100 r/min)摇床 10 min,静置 20 min,待结晶溶解后用酶标仪于 490 nm 处检测吸光度。根据以下公式计算细胞存活率。

$$\text{存活率} = (D_{\text{药物}} - D_{\text{本底}}) / (D_{\text{正常}} - D_{\text{本底}}) \times 100\%$$

1.2.6 RAW264.7 细胞免疫因子 TNF-α 测定 细胞接种同“1.2.5”节。于温度为 37 ℃、CO<sub>2</sub> 浓度为 5.0% 的细胞培养箱中培养 24、36、48 h,细胞孵育完成后,收集细胞培养上清;然后根据小鼠 TNF-α ELISA kit 说明手册中进行操作,最后根据标准曲线( $y = 224.13x - 98.989$ ,  $r^2 = 0.9886$ )计算细胞因

子 TNF-α 的浓度<sup>[18-19]</sup>。

1.2.7 酶解组分诱导 RAW264.7 细胞活化释放免疫因子一氧化氮(NO) 采用 Griess 法测定 RAW264.7 细胞释放的 NO 量<sup>[20]</sup>,细胞接种同“1.2.5”节。于温度为 37 ℃、CO<sub>2</sub> 浓度为 5.0% 的细胞培养箱中分别培养 24、36、48 h 后,加入 100 μL Griess 试剂[含 3 mmol/L 磺胺酸,30 mg/L N-1-(萘基)乙二胺二盐酸盐,质量分数 25% 冰乙酸],室温避光孵育 20 min,离心取细胞上清液,用酶标仪于 450 nm 处测定吸光度,最后根据标准曲线( $y = 73.86x - 3.506$ ,  $r^2 = 0.9882$ )计算 NO 含量。

1.2.8 数据处理及统计 活性试验获得的数据采用 GraphPad Prism 7.00 进行分析,并与空白对照组进行比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 仙茅粗多糖的分离纯化

运用 DEAE 纤维素柱对 20 g 仙茅粗多糖进行初步纯化,用纯净水洗脱自动收集器分部收集,苯酚-硫酸法检测,以洗脱管数为横坐标,吸光值为纵坐标,得到一个单一峰(图 1),收集单一峰对应部分溶液并浓缩,经 Sephadex G-50 凝胶柱进一步纯化,用纯净水洗脱,收集吸光度最大的单一峰对应的物质,浓缩干燥,命名为 XMP-1(图 2);经凝胶渗透色谱分析发现,色谱峰为单一对称峰(图 3),可

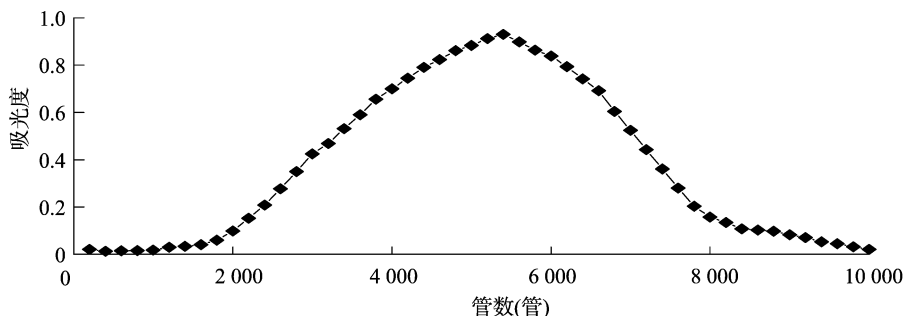


图1 蒸馏水洗脱 DEAE 纤维素柱的洗脱曲线

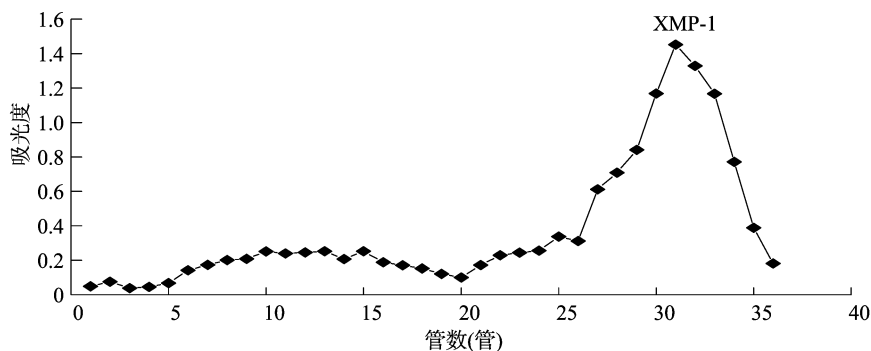


图2 蒸馏水洗脱 Sephadex G-50 凝胶柱的洗脱曲线

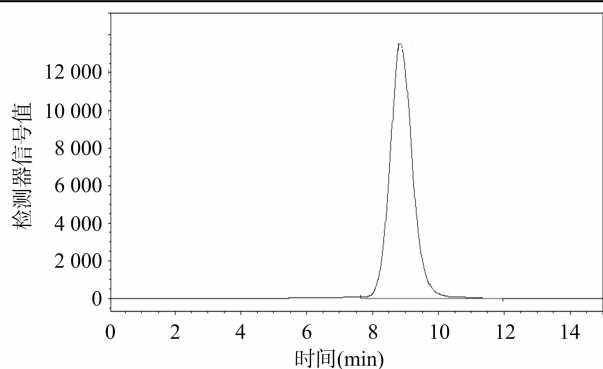


图3 XMP-1 的凝胶渗透色谱

判断所得纯化产物为分子量分布均一的多糖。

## 2.2 单因素试验结果

**2.2.1 酶添加量对还原糖生成量的影响** 由图4可知,在一定范围内还原糖的生成量与酶添加量呈正相关关系,在酶添加量为50%时达到最大值。因此选择50%为酶添加量最佳值。

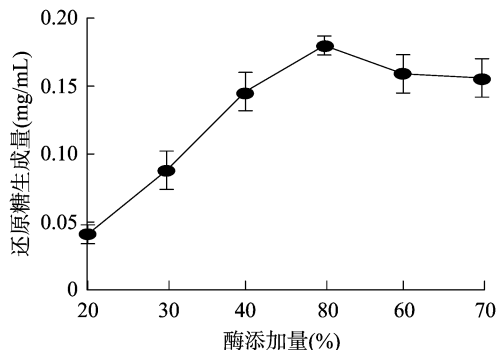


图4 酶添加量对还原糖生成量的影响

**2.2.2 酶解温度对还原糖生成量的影响** 酶活性的发挥存在最适合的温度,低于或超过该值,酶活性的发挥都会受到影响。从图5可以看出,当温度在50℃以下时,温度的增加有利于还原糖的生成。因此选择50℃为酶解温度最佳值。

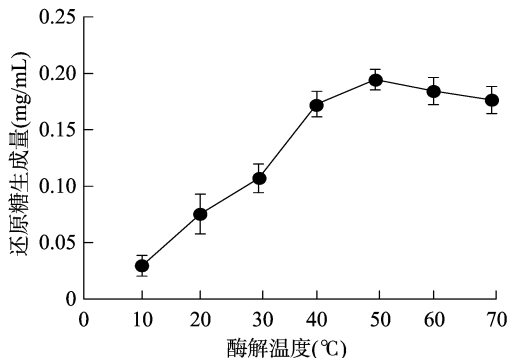


图5 酶解温度对还原糖生成量的影响

**2.2.3 酶解时间对还原糖生成量的影响** 从图6可以看出,在酶解时间为12 h内,还原糖的产生量

随酶解时间的增加迅速增加,说明葡聚糖酶对XMP-1的作用有一个逐渐修饰的过程;在酶解时间为12 h之后,还原糖稍有生产量减少。因此酶解时间为12 h最为合适。

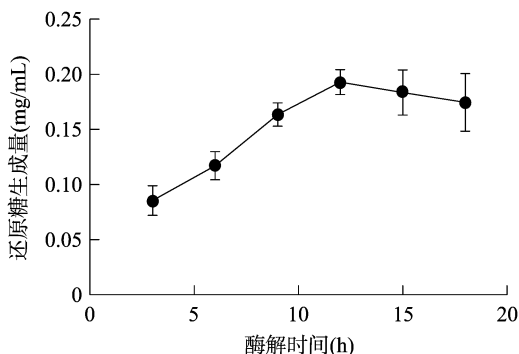


图6 酶解时间对还原糖生成量的影响

**2.2.4 pH 值对还原糖生成量的影响** 从图7可以看出,在pH值为6.0时,还原糖生成量达到极大值,说明葡聚糖酶活性的发挥有最佳的pH值,越接近该pH值,越有利于酶活性的发挥。因此选择6.0为pH值最佳值。

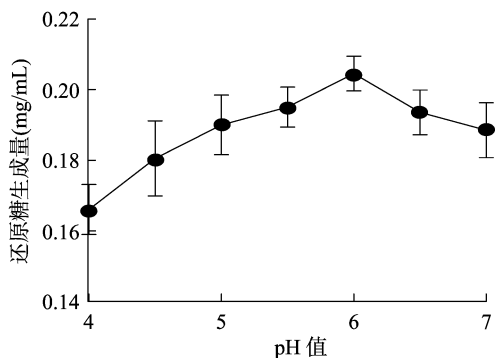


图7 pH 值对还原糖生成量的影响

## 2.3 响应面法优化试验结果

**2.3.1 星点设计试验和结果** 基于单因素考察结果,运用响应面-星点设计法优化仙茅多糖酶解工艺,结果见表2、表3,其中表2为星点设计试验和结果,表3为多糖酶解优化工艺所建立回归方程的方差分析。

**2.3.2 回归方程的建立及显著性检验** 通过Design-Expert 8.0.5b软件对表3中的试验结果进行多元线性回归二项式拟合,得到的方程为  $Y = -0.916\ 05 + 1.554\ 58A + 7.189\ 88 \times 10^{-3}B + 0.065\ 132C + 0.037\ 327D - 1.754\ 21 \times 10^{-3}AB - 3.600\ 74 \times 10^{-3}AC + 6.832\ 17 \times 10^{-3}AD - 1.384\ 90 \times 10^{-5}BC + 3.877\ 72 \times 10^{-5}BD - 3.970\ 04 \times 10^{-4}CD - 1.400\ 70A^2 - 6.006\ 98 \times$

表 2 响应面设计试验与结果

试验号	因素水平				还原糖生成量 (mg/mL)
	A:酶添加量	B:温度	C:酶解时间	D:pH 值	
1	-1	-1	-1	-1	0.179 9
2	1	-1	-1	-1	0.188 5
3	-1	1	-1	-1	0.185 1
4	1	1	-1	-1	0.191 5
5	-1	-1	1	-1	0.186 9
6	1	-1	1	-1	0.194 9
7	-1	1	1	-1	0.191 9
8	1	1	1	-1	0.197 5
9	-1	-1	-1	1	0.181 5
10	1	-1	-1	1	0.191 5
11	-1	1	-1	1	0.187 5
12	1	1	-1	1	0.194 9
13	-1	-1	1	1	0.187 9
14	1	-1	1	1	0.196 5
15	-1	1	1	1	0.193 3
16	1	1	1	1	0.199 6
17	-1.732	0	0	0	0.181 6
18	1.732	0	0	0	0.193 6
19	0	-1.732	0	0	0.191 6
20	0	1.732	0	0	0.199 6
21	0	0	-1.732	0	0.186 6
22	0	0	1.732	0	0.197 4
23	0	0	0	-1.732	0.196 6
24	0	0	0	1.732	0.200 6
25	0	0	0	0	0.201 6
26	0	0	0	0	0.201 9
27	0	0	0	0	0.201 5
28	0	0	0	0	0.201 8
29	0	0	0	0	0.201 2
30	0	0	0	0	0.201 6

$10^{-5}B^2 - 2.401\ 74 \times 10^{-3}C^2 - 3.006\ 98 \times 10^{-3}D^2$ ,  $R^2 = 0.999\ 1$ , 其中  $Y$  为还原糖生长量, 可以看出, 方程可信度较好, 可以较准确地评估多糖的酶解工艺。从表 3 可以看出, 模型的  $P$  值小于 0.000 1, 说明试验因素对试验结果影响极显著, 该模型具有较好的分析预测意义。失拟项的  $P$  值等于 0.343 3, 大于 0.05, 说明它对试验结果影响不显著, 说明方程拟合程度较好, 可用于预测试验结果。各因素方差分析结果显示, 对于一次项和二次方项: 酶添加量、温度、酶解时间、pH 值及其各自二次方项皆对还原糖生成量的影响极显著 ( $P < 0.001$ ); 对于交叉项: 酶添加量和温度的交互作用对还原糖生成量的影响极显著 ( $P < 0.001$ ); 酶添加量和酶解时间的交

互作用、酶添加量和 pH 值的交互作用、酶解时间和 pH 值的交互作用对还原糖生成量的影响高度显著 ( $P < 0.01$ ); 温度和 pH 值的交互作用对还原糖生成量的影响不显著 ( $P > 0.05$ ); 表明各因素与还原糖生成量之间不是简单线性关系。由  $F$  值得, 4 因素对还原糖生成量的影响次序为酶添加量 > 酶解时间 > 温度 > pH 值。最优条件是酶添加量为 56%, 温度为 52.32 ℃, 酶解时间为 12.46 h, pH 值为 6.36, 此时还原糖生成量期望值为 0.201 9 mg/mL。

2.3.3 响应曲面分析 采用软件 Design - Expert 获得响应值的 3D 曲面, 分析各因素对还原糖生成量的影响及各因素间的交互作用, 即当固定酶添加量、温度、酶解时间、pH 值中任意 2 个因素为零水平

表 3 XMP-1 优化工艺所建立回归方程的方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方差	F 值	P 值
模型	0.001 310	14	9.36E-05	1 171.483	<0.000 1
A	0.000 303	1	0.000 303	3 797.605	<0.000 1
B	0.000 103	1	0.000 103	1 286.478	<0.000 1
C	0.000 203	1	0.000 203	2 539.175	<0.000 1
D	$2.49 \times 10^{-5}$	1	$2.49 \times 10^{-5}$	312.200 5	<0.000 1
AB	$5.64 \times 10^{-6}$	1	$5.64 \times 10^{-6}$	70.609 49	<0.000 1
AC	$9.51 \times 10^{-7}$	1	$9.51 \times 10^{-7}$	11.899 95	0.003 6
AD	$8.56 \times 10^{-7}$	1	$8.56 \times 10^{-7}$	10.710 74	0.005 1
BC	$1.41 \times 10^{-7}$	1	$1.41 \times 10^{-7}$	1.760 347	0.204 4
BD	$2.76 \times 10^{-7}$	1	$2.76 \times 10^{-7}$	3.450 281	0.083 0
CD	$1.16 \times 10^{-6}$	1	$1.16 \times 10^{-6}$	14.466 14	0.001 7
A <sup>2</sup>	0.000 392	1	0.000 392	4911.957	<0.000 1
B <sup>2</sup>	$7.22 \times 10^{-5}$	1	$7.22 \times 10^{-5}$	903.394 7	<0.000 1
C <sup>2</sup>	0.000 185	1	0.000 185	2 310.677	<0.000 1
D <sup>2</sup>	$1.81 \times 10^{-5}$	1	$1.81 \times 10^{-5}$	226.373 5	<0.000 1
残差	$1.2 \times 10^{-6}$	15	$7.99 \times 10^{-8}$		
失拟项	$8.98 \times 10^{-3}$	10	$8.98 \times 10^{-8}$	1.497 12	0.343 3
纯误差	$3 \times 10^{-7}$	5	$6 \times 10^{-8}$		
总变量	0.001 311	29			

注:当  $P < 0.05$  时,试验因素对结果的影响显著;当  $P < 0.01$  时,试验因素对结果的影响高度显著;当  $P < 0.001$  时,试验因素对结果的影响极显著。

时,其他 2 个因素间的交互作用对还原糖生成量的影响。从图 8 可以看出,还原糖生成量随其中任意 2 个因素量的增加均呈上升趋势,达到一定值之后,稍下降或趋于平缓。各因素之间具有交互作用。

2.3.4 验证与优化 通过响应面法优化 XMP-1 的最佳酶解条件,结合实际操作,将优化条件调整为酶添加量 56%、温度 52 ℃、酶解时间 12 h、pH 值 6.0,在此条件下进行试验,平行检测 5 次,所测的还原糖生成量为 0.201 0 mg/mL,与期望值的相对误差在 5% 以内,二者较吻合。所以该方法能较好优化 XMP-1 的酶解条件,具有较好的可信度。

2.4 不同时间段酶解产物的体外免疫诱导活性

2.4.1 不同时间段的酶解产物对细胞的毒性作用 不同时间段的酶解产物分别孵育 48 h 后对 RAW264.7 细胞毒性作用见图 9。通过光学显微镜观察 XMP-1 对 RAW264.7 细胞形态的影响,结果发现,XMP-1 对 RAW264.7 细胞的形态没有造成明显的影响。XMP-1 在 31.250~500.000 μg/mL 浓度范围内,孵育 48 h 后对细胞的生长不会造成明显影响。所以浓度在 500.00 μg/mL 以内的 XMP-1 对 RAW264.7 细胞是安全无毒性的,可以作为后续试验的浓度设定上限,这对于各项试验指标的判

断都具有重要的意义。

2.4.2 不同时间段的酶解产物诱导 RAW264.7 细胞活化分泌 TNF-α 的结果 孵育 24、36、48 h 后,不同时间段的酶解产物对 RAW264.7 细胞分泌 TNF-α 的影响见图 10。不同时间段的酶解产物均能诱导 RAW264.7 细胞活化分泌 TNF-α,且诱导活性呈现浓度依赖性。酶解 5 h 的组分诱导 RAW264.7 细胞分泌 TNF-α 的作用,孵育 36 h 和 48 h 时不同浓度的诱导作用均强于多糖组。

2.4.3 不同时间段的酶解产物诱导 RAW264.7 细胞活化释放 NO 的结果 孵育 24、36、48 h 后,不同时间段的酶解产物诱导 RAW264.7 细胞活化释放 NO 的结果见图 11。结果表明,XMP-1 不同时间段的酶解产物均可有效诱导 RAW264.7 细胞活化分泌 NO,孵育 36、48 h 时,酶解 4、5 h 的酶解产物在不同浓度条件下都能较好地促进细胞 NO 的分泌,且都优于多糖组。

3 讨论与结论

运用葡聚糖酶对 XPM-1 进行酶解,在单因素试验的基础上考察了 XMP-1 经葡聚糖酶酶解的最佳条件,运用星点设计法构建了各酶解条件因素对

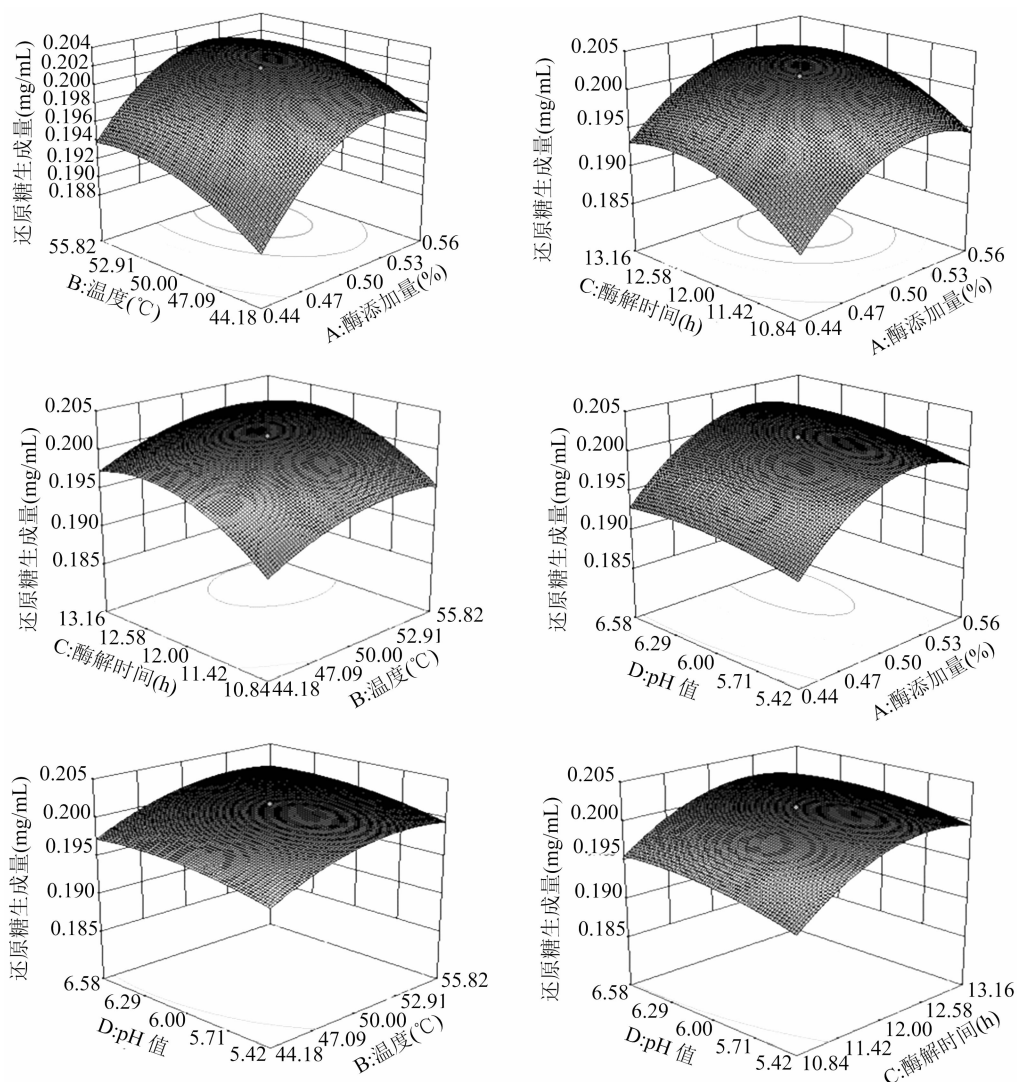


图8 2 因素的交互作用与还原糖生成量的响应面

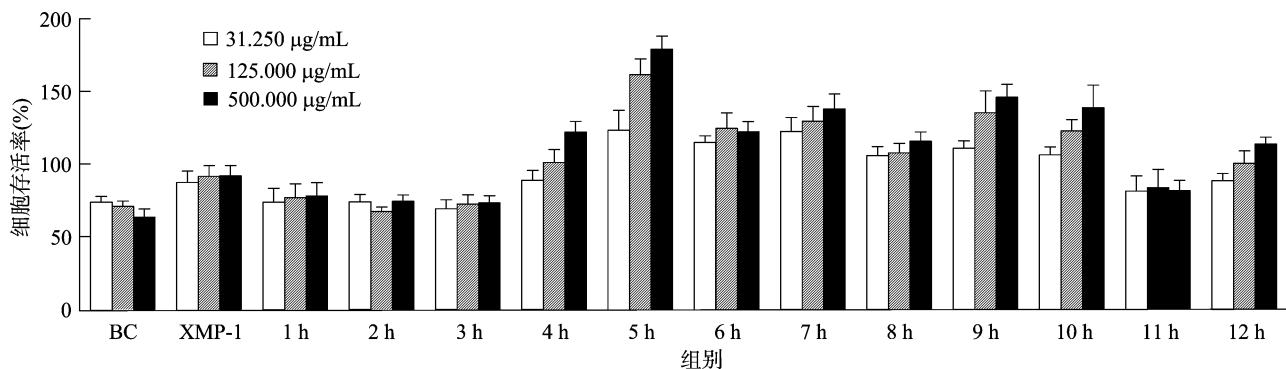
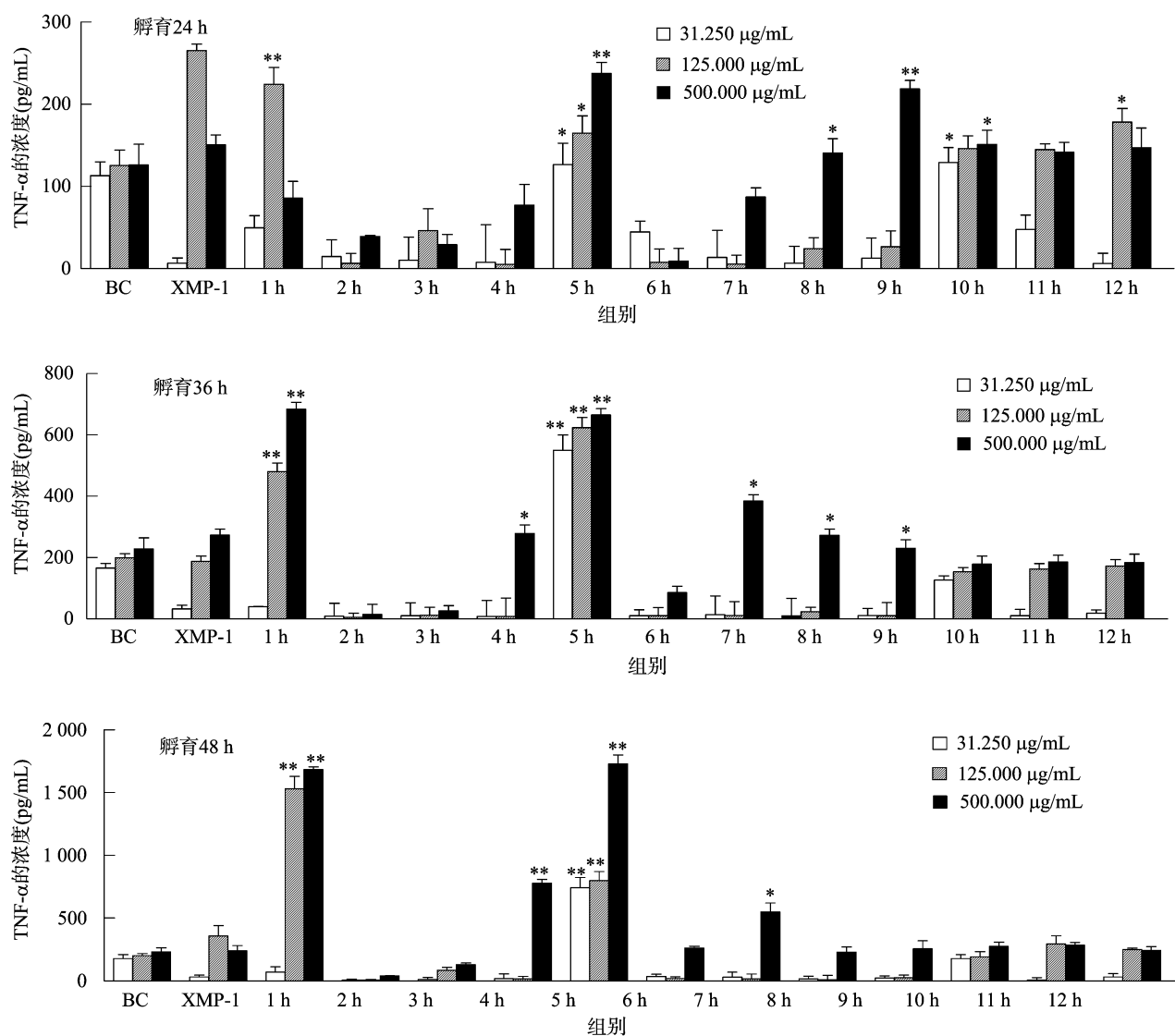


图9 不同浓度的酶解产物对 RAW 264.7 细胞的毒性作用

XMP-1 酶解工艺的影响模型,结果表明,该方法拟合程度较好,模型具有设计意义;酶添加量、酶解时间的适当增加以及适宜的 pH 值和温度都能增加还原糖的生成量;4 因素对还原糖生成量的影响次序为酶添加量 > 酶解时间 > 温度 > pH 值。将优化条

件修正为酶添加量为 56%,温度为 52 °C,酶解时间为 12 h, pH 值为 6.0 后,还原糖量生成量为 0.201 0 mg/mL,与期望值的相对误差在 5% 以内,可信度较高,可用于 XMP-1 酶解工艺的优化。体外免疫诱导活性分析结果表明,浓度为 500 µg/mL



\*, \*\* 分别表示与空白对照组对比在 0.05、0.01 水平上差异显著。图 11 同

图 10 不同浓度的酶解产物诱导 RAW 264.7 细胞分泌 TNF-α 的水平

以下, 孵育时间 48 h 以内, 酶解产物对细胞没有明显的毒害作用; 不同时间段酶解产物均可诱导细胞分泌 TNF-α 和 NO, 其中酶解 5 h 的组分免疫诱导活性较其他时间段效果好。本研究结果可为仙茅在食品和医药领域的开发利用及工艺化生产提供一定的理论指导。

#### 参考文献:

- [1] 杨婉梅, 杨永红. 中国药用植物仙茅开发利用综述[J]. 现代农业科技, 2015(8): 110, 119.
- [2] 杨光义, 叶方, 潘红, 等. 仙茅药理作用和临床应用研究概述[J]. 中国药师, 2011, 14(7): 1039 - 1041.
- [3] 蒋璐璐. 仙茅的化学成分提取分离及其抗肿瘤活性筛选[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2018.
- [4] 曹大鹏, 郑毅男, 韩婷, 等. 仙茅属植物化学成分及生物活性研

究进展[J]. 药学服务与研究, 2008, 8(1): 59 - 62.

- [5] 刘芳, 祝宇, 魏娟, 等. 不同炮制法对仙茅中仙茅苷含量的影响[J]. 中国药师, 2018, 21(12): 2284 - 2286.
- [6] 王雪倩. 仙茅多糖的分离纯化、结构鉴定及抗骨质疏松活性研究[D]. 广州: 广东药科大学, 2017.
- [7] Gantner B N, Simmons R M, Canavera S J, et al. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin - 1 and toll - like receptor 2[J]. The Journal of Experimental Medicine, 2003, 197(9): 1107 - 1117.
- [8] 韩艳萍, 赵鲁杭, 吴海明. 壳寡糖激活巨噬细胞的机制[J]. 浙江大学学报(医学版), 2006, 35(3): 265 - 272.
- [9] 许莉莉. 浒苔多糖酶解产物的分离纯化及活性研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2013.
- [10] Hu T, Li C X, Zhao X, et al. Preparation and characterization of guluronic acid oligosaccharides degraded by a rapid microwave irradiation method[J]. Carbohydrate Research, 2013, 373: 53 - 58.

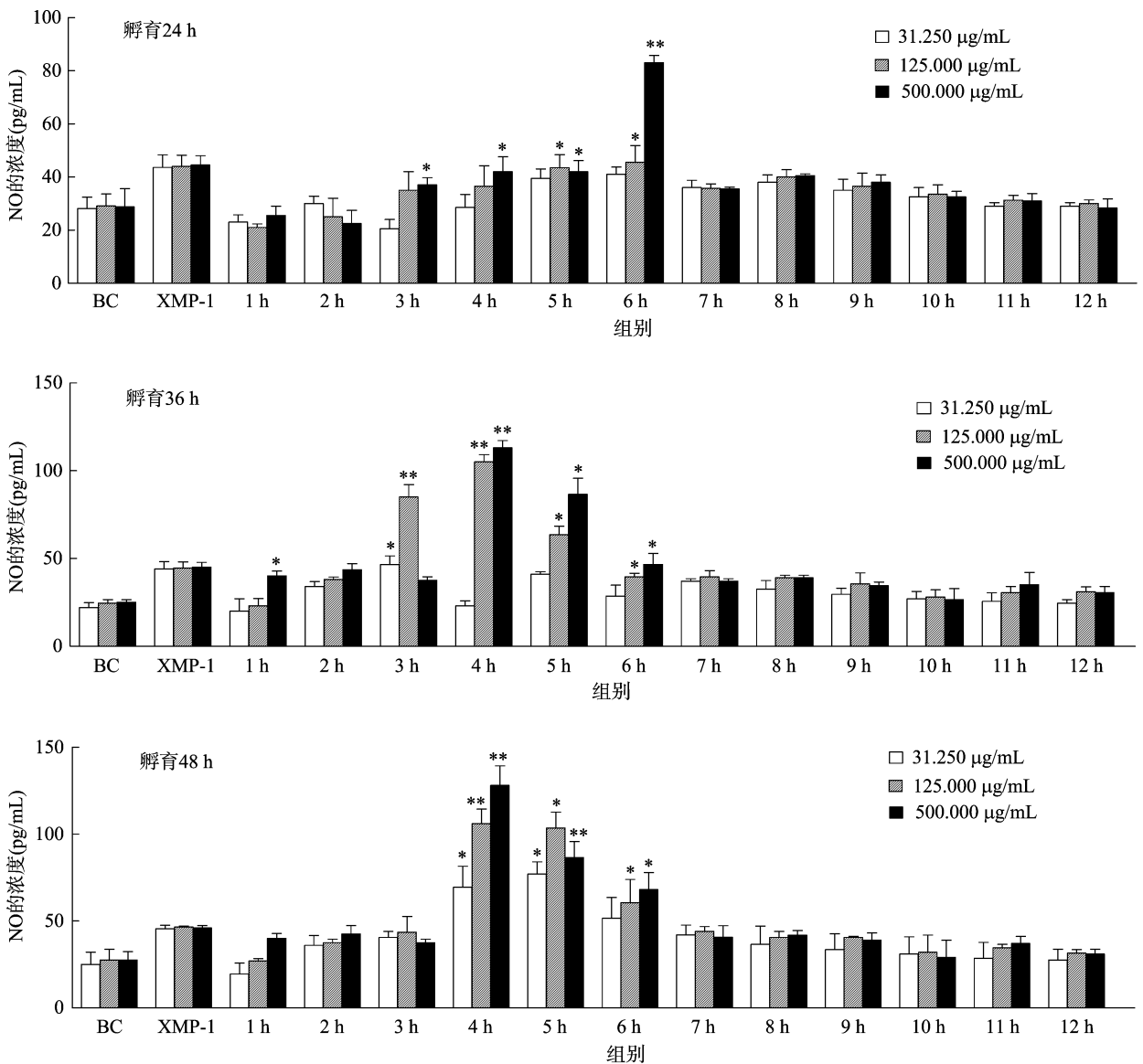


图11 不同浓度的酶解产物诱导 RAW 264.7 细胞分泌 NO 的水平

- [11] Song Y, Du B, Zhou T, et al. Optimization of extraction process by response surface methodology and preliminary structural analysis of polysaccharides from defatted peanut (*Arachis hypogaea*) cakes [J]. Carbohydrate Research, 2011, 346(2): 305–310.
- [12] 黄越燕, 王露露, 季慧. 植物多糖纯化分离方法研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2016, 21(3): 671–674.
- [13] 马莉, 唐健元, 李祖伦, 等. 板蓝根多糖分离纯化及其性质的研究 [J]. 中草药, 2007, 38(8): 1143–1146.
- [14] 赵颖, 宋新波, 张丽娟, 等. 高效凝胶色谱法测定甘草多糖分子量及其分子量分布 [J]. 天津中医药, 2015, 32(1): 46–48.
- [15] 李东东, 放茂良, 刘琼, 等. 星点设计-响应面法优化超声提取青竹标多酚 [J]. 中药材, 2011, 34(1): 129–133.
- [16] 郑思睿, 杨婷, 依木然·马瑞士, 等. 响应面法优化罗布麻多糖提取工艺及抗氧化活性研究 [J]. 食品研究与开发, 2018, 39(16): 93–97.
- [17] Jiang Z, Okimura T, Yamaguchi K, et al. The potent activity of

- sulfated polysaccharide, ascophyllan, isolated from *Ascophyllum nodosum* to induce nitric oxide and cytokine production from mouse macrophage RAW264.7 cells: comparison between ascophyllan and fucoidan [J]. Nitric Oxide – Biology and Chemistry, 2011, 25(4): 407–415.
- [18] Liao X, Yang L, Chen M, et al. The hypoglycemic effect of a polysaccharide (GLP) from *Gracilaria lemaneiformis* and its degradation products in diabetic mice [J]. Food & Function, 2015, 6(8): 2542–2549.
- [19] Akanda M R, Park B Y. Involvement of MAPK/NF-κB signal transduction pathways: *Camellia japonica* mitigates inflammation and gastric ulcer [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017, 95(7): 1139–1146.
- [20] Kim D, Yamasaki Y, Jiang Z, et al. Comparative study on modeccin- and phytohemagglutinin (PHA)-induced secretion of cytokines and nitric oxide (NO) in RAW264.7 cells [J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2011, 43(1): 52–60.