

两种方法提取琉璃苣叶多糖的理化性质及生理活性

张喜峰^{1,2}, 南艳¹, 李雪茹¹, 何立杰¹, 刘霞^{1,2}, 罗光宏^{3*}

(1. 河西学院 生命科学与工程学院, 甘肃 张掖 734000; 2. 甘肃省河西走廊特色资源利用重点实验室, 甘肃 张掖 734000; 3. 河西学院 甘肃省微藻技术创新中心, 甘肃 张掖 734000)

摘要: 分别采用纤维素酶辅助和微波辅助两种方法提取琉璃苣叶多糖, 得到的多糖分别记为 BLP-1 和 BLP-2。采用高效凝胶渗透色谱仪、FTIR、SEM 及 TGA 对 BLP-1 和 BLP-2 进行了表征, 通过 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的抑制效果评价样品的体外降血糖活性, 通过检测对人肝癌细胞 HepG2、人乳腺癌细胞 MX-1 和人肺腺癌细胞 A549 的抑制率评价了样品的抗癌活性, 通过检测小鼠巨噬细胞 RAW246.7 的免疫因子分泌评价样品免疫活性。结果表明, BLP-1 和 BLP-2 具有不同的多糖和蛋白质质量分数。BLP-1 和 BLP-2 由 L-阿拉伯糖、D-半乳糖、葡萄糖、木糖组成, 但摩尔分数不同, 其相对分子质量分别为 20103 和 22652。BLP-2 比 BLP-1 具有更稳定的结构。这两种多糖具有抑制 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶活性、抑制上述 3 种癌细胞增殖以及激活小鼠巨噬细胞 RAW246.7 细胞分泌免疫细胞因子以介导细胞免疫反应的潜力。

关键词: 琉璃苣; 多糖; 理化性质; 生理活性; 生物工程

中图分类号: R284.2; R285 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214(2022)11-2297-08

Physicochemical properties and physiological activities of polysaccharides extracted from Borage leaves by two methods

ZHANG Xifeng^{1,2}, NAN Yan¹, LI Xueru¹, HE Lijie¹, LIU Xia^{1,2}, LUO Guanghong^{3*}

(1. School of Life Science and Engineering, Hexi University, Zhangye 734000, Gansu, China; 2. Key Laboratory of Hexi Corridor Resources Utilization of Gansu, Zhangye 734000, Gansu, China; 3. Microalgae Technology Innovation Center of Gansu Province, Hexi University, Zhangye 734000, Gansu, China)

Abstract: Borage leaf polysaccharides, obtained by cellulose enzyme assisted extraction and microwave assisted extraction, were named as BLP-1 and BLP-2, respectively, and then characterized by high performance gel permeation chromatography, FTIR, SEM and TGA. Furthermore, the *in vitro* hypoglycemic, anti-cancer and immune activities of BLP-1 and BLP-2 was evaluated by the inhibitory effect of α -glucosidase and α -amylase, inhibition rate of HepG2 human hepatoma cells, MX-1 human breast cancer cells and A549 human lung adenocarcinoma cells, and immune factor secretion detection in mouse macrophages RAW246.7, respectively. The results showed that the sugar and protein contents in BLP-1 and BLP-2 were different. Though both of BLP-1 and BLP-2 were composed of L-arabinose, D-galactose, glucose, and xylose, their molar fraction was different with corresponding relative molecular mass of 20103 and 22652, respectively. Meanwhile, BLP-2 exhibited a more stable structure than BLP-1. The two polysaccharides showed potential in inhibiting α -glucosidase and α -amylase activities, suppressing the above cancer cells proliferation, and activating mouse macrophages RAW246.7 cells to secrete immune cytokines for cellular immune response mediation.

Key words: *Borago officinalis* L.; polysaccharides; physicochemical properties; physiological activities; biological engineering

收稿日期: 2022-01-25; 定用日期: 2022-06-09; DOI: 10.13550/j.jxhg.20220107

基金项目: 甘肃省科技计划项目(18JR2JG001); 甘肃省高等学校创新基金项目(2021B-222); 教育部产学研合作协同育人项目(202102462031)

作者简介: 张喜峰(1982—), 男, 副教授, E-mail: curiouslysxd@163.com。联系人: 罗光宏(1965—), 男, 教授, E-mail: luoguanghong@163.com。

琉璃苣 (*Borago officinalis* L.) 是紫草科琉璃苣属一年生草本植物, 稍具黄瓜香味, 其分布广泛, 具有悠久的食用和药用历史。鲜叶及干叶可用于炖菜、炖汤以及饮料的调味。然而, 大部分通常被当作废物丢弃, 造成一定的浪费, 附加值较低。开展琉璃苣叶多糖结构和活性研究具有重要意义。

目前, 琉璃苣研究主要集中在油脂提取、脂肪酸成分分析及产品开发等方面。例如: 任飞等^[1]采用超临界 CO₂ 流体优化了萃取琉璃苣籽油工艺条件, 采用气相色谱法确定了其富含油酸、亚油酸和 γ -亚油酸; 李童^[2]采用响应面法优化了索氏提取法提取琉璃苣籽油脂工艺条件, 所得油脂具有较好抗氧化效果, 能延长野生型秀丽隐杆线虫的寿命, 采用乙醇注入-超声波法制备的油脂脂质体形态稳定、贮藏时间较长。近年来, 从植物中提取的多糖在癌症、炎症、细菌感染和免疫调节等方面表现出临床积极作用^[3-9]。不同的提取方法会影响多糖的化学结构和性质。其中, 热水提取法是应用最广的方法, 但其耗时、能耗高、杂质含量高、提取效率有限; 超临界 CO₂ 萃取技术具有操作参数易于控制、萃取时间短等优点。然而, 超临界 CO₂ 是一种非极性溶剂, 对极性大、相对分子质量大的天然物质的萃取率低^[10]。酶辅助提取法具有提取率高、投资成本低、能耗低、技术环保、操作简单等优点, 可在温和的处理条件下进行, 易于实现工业化^[11]。微波辅助提取法可提高系统内部温度, 改善溶剂在固体基质中的扩散, 从而增强了目标物质的提取效果^[12]。

本研究拟分别采用纤维素酶辅助和微波辅助提取法来提取琉璃苣叶多糖, 并对其理化性质进行分析。通过分析 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的抑制效果来评价其降血糖活性, 通过检测人肝癌细胞 HepG2、人乳腺癌细胞 MX-1 和人肺腺癌细胞 A549 细胞的抑制率来评价其抗癌活性, 通过检测 RAW246.7 的免疫因子分泌来评价免疫活性, 为研究多糖结构和生物活性的相关性提供理论依据, 以期为多糖的进一步利用提供参考。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

琉璃苣叶, 由甘肃高台县西北琉璃苣农民专业合作社提供, 清洗、50 °C 干燥后粉碎, 获得的粉末储存在玻璃干燥器中; 纤维素酶 (5×10^4 U/g)、NO 检测试剂盒、TNF- α 免疫应答试剂盒、IL-6 免疫应答试剂盒、DMEM 培养基, 北京索莱宝科技有限公司; 牛血清白蛋白 (BSA)、抗坏血酸、单糖标准品 [L-岩藻糖 (Fuc)、L-鼠李糖 (Rha)、L-阿拉伯糖

(Ara)、D-甘露糖 (Man)、D-半乳糖 (Gal)、D-葡萄糖 (Glc)、D-木糖 (Xyl)、D-半乳糖醛酸 (GalA)、D-葡萄糖醛酸 (GlcA)]、对硝基苯- β -D-吡喃半乳糖苷 (PNPG)、三氟乙酸 (TFA), AR, 成都德思特生物技术有限公司; 脂多糖 (LPS)、果糖 (Fru)、标准品, 透析袋 (截留相对分子质量为 3000), 上海源叶生物科技有限公司; 其他化学品均为市售分析纯。

Nicolet iS5 型傅里叶变换红外光谱仪、Dionex ICS-1100 离子色谱仪 (配有电化学检测器), 美国 Thermo Scientific 公司; Q5000IR 热重分析仪, 美国 TA 仪器公司; RT6100 酶标仪, 上海涵飞医疗器械有限公司; UV2150 可见分光光度计, 尤尼柯 (上海) 仪器有限公司; PHS-3C 型 pH 计, 上海精密科学仪器有限公司; XO-SM400 超声微波化学反应器, 南京先欧仪器制造有限公司; DL6M 大容量冷冻离心机, 湖南凯达科学仪器有限公司; LGJ-12 立式真空冷冻干燥机, 北京松源华兴生物技术有限公司; Synergy Neo HTS 微孔板检测仪, 美国 Biotek 公司; FEIQuanta450 场发射环境扫描电子显微镜, 美国 FEI 公司; BK-SY96A 酶标仪, 山东博科仪器有限公司; Agilent1260 凝胶渗透色谱仪 (HPGPC) (配 G1362A 示差折光检测器), 荷兰 Agilent 公司。

1.2 方法

1.2.1 纤维素酶辅助和微波辅助提取法提取琉璃苣叶多糖

将琉璃苣叶粉末在室温下用石油醚 (沸点为 30~60 °C) 脱脂脱色 3 次, 8 h/次, 然后在室温下用体积分数为 95% 乙醇室温浸泡 12 h 以去除小分子物质, 对预处理后的残留物进行过滤, 40 °C 下风干。

纤维素酶辅助提取法提取琉璃苣叶多糖: 首先, 将 2 g 纤维素酶溶解在 98 g 去离子水中, 并在 40 °C 下活化 30 min, 得到质量分数为 2% 的纤维素酶活化液; 然后, 按料液比为 1 : 20 (g : mL, 下同) 将预处理后的琉璃苣叶粉末加入上述纤维素酶活化液中, 并用 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲溶液 (PBS 溶液, pH 2.5) 调节 pH 为 4.8, 在 55 °C 下提取 3 h; 然后, 加热至 95 °C 再持续 30 min 以使纤维素酶失活。

微波辅助提取法提取琉璃苣叶多糖: 将 10 g 预处理后的琉璃苣叶粉末按料液比 1 : 20 在微波功率 300 W、80 °C 提取 15 min, 获得多糖粗提液。

上述两种方法粗提液以 5000 r/min 离心 10 min 后, 添加 3 倍体积的无水乙醇, 4 °C 静置 12 h, 得多糖沉淀物, 将其倒入去离子水中, 重新溶解后与 Sevag 试剂 [V(氯仿) : V(正丁醇) = 4 : 1] 等体积混合以去除相关蛋白质。Sevag 法处理后, 上层液体用流动的自来水透析 (截留相对分子质量为 3000)

处理 3 d, 30 °C 真空冷冻干燥 24 h 获得 2 种多糖(纤维素酶辅助提取法和微波辅助提取法提取的多糖分别记为 BLP-1、BLP-2), 备用。

1.3 多糖理化性质测定、结构表征和性能测试

1.3.1 成分分析

采用苯酚-硫酸比色法^[13], 以 D-葡萄糖为标准品, 在 490 nm 处测定糖含量。蛋白质含量在 595 nm 处通过考马斯亮蓝 G-250 法^[14]以牛血清白蛋白为标准品进行比色测定。

1.3.2 相对分子质量和单糖组成测定

BLP-1 和 BLP-2 的均一性和相对分子质量通过配备折射率检测器的高效凝胶渗透色谱仪 (HPGPC) 进行检测, 流动相为 0.02 mol/L 磷酸二氢钾, 流速为 0.8 mL/min。

准确称取 5 mg 多糖粉末, 加入 2 mL 2 mol/L TFA 在 121 °C 加热水解 2 h, 减压蒸干, 加入 3 mL 甲醇蒸干, 重复操作 2~3 次, 以完全除去 TFA, 去离子水溶解后, 采用液相色谱柱, 进样量为 20 μL。采用体积比 39:1 的去离子水和 100 mmol/L NaOH 水溶液洗脱 60 min, 柱温为 30 °C, 利用电化学检测器对单糖组分进行分析检测。

1.3.3 结构表征和性能测试

FTIR 测试: 将干燥的多糖与 KBr 粉末混合并压制成 2 mm 厚的薄片进行 FTIR 测试, 波数范围为 4000~500 cm⁻¹。SEM 测试: 将冷冻干燥的样品放置于导电胶样品处理片中, 用吸耳球吹掉未黏着的样品, 喷金后置于场发射环境扫描电子显微镜中观察。TGA 测试: 取 2~5 mg 冻干样品, 采用热重分析仪在 25~750 °C 下进行测试, N₂ 作为加热介质, 流速为 10 mL/min。

1.4 体外降血糖活性

1.4.1 α-葡萄糖苷酶活性抑制实验

α-葡萄糖苷酶活性抑制实验参照文献^[15]的方法略作改动。将 96 μL 0.1 mol/L PBS 溶液 (pH=6.8)、20 μL 酶活力为 2 U/mL α-葡萄糖苷酶溶液和 10 μL 不同质量浓度多糖 (0.025、0.05、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2 g/L) 的混合溶液加入 96 孔板中, 在 37 °C 下培养 30 min; 然后, 添加 50 μL 10 mmol/L 对硝基苯-β-D-吡喃半乳糖苷溶液, 反应 90 min, 通过添加 100 μL 1 mol/L 碳酸钠终止反应; 最后, 采用酶标仪在 405 nm 处测其吸光度。以阿卡波糖为阳性对照, 通过式 (1) 计算抑制率:

$$\text{抑制率}/\% = \left(1 - \frac{A_1 - A_x}{A_2} \right) \times 100 \quad (1)$$

式中: A_1 、 A_x 和 A_2 分别为样品组 (多糖样品或含酶的阳性对照)、对照组 (不含酶的多糖样品或阳性对照) 和空白组 (仅适用于含酶的 PBS 溶液) 的吸光度。

1.4.2 α-淀粉酶活性抑制实验

α-淀粉酶活性抑制作用参照文献^[16]的方法略作改动。简言之, 将 100 μL α-淀粉酶 (5 U/mL) 溶液和 50 μL 不同质量浓度多糖溶液 (0.025、0.05、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2 g/L) 添加到 96 孔板中。在 25 °C 孵育 10 min 后, 添加 50 μL 质量分数为 1% 的淀粉溶液并培养 10 min, 加入 100 μL 质量浓度为 10 g/L 的 3,5-二硝基水杨酸终止反应, 沸水浴 10 min 后, 采用酶标仪在 540 nm 处测其吸光度, 根据式 (1) 计算抑制率。

1.4.3 抗肿瘤活性测定

1.4.3.1 细胞培养

人肝癌细胞 HepG-2 和人肺腺癌细胞 A549 在 DMEM 完全培养基 (体积分数 10% 胎牛血清+体积分数 1% 青霉素-链霉素+体积分数 89% DMEM 基本培养基) 中培养, 人乳腺癌细胞 MX-1 在 RPMI-1640 完全培养基 (体积分数 10% 胎牛血清+体积分数 1% 青霉素-链霉素+体积分数 89% RPMI-1640 基本培养基) 中培养。所有细胞均在 37 °C、体积分数为 5% 的 CO₂ 的培养箱中培养。

1.4.3.2 抗癌能力测试

将细胞密度为 2×10^4 细胞/孔的 96 孔培养板置于 37 °C、体积分数为 5% 的 CO₂ 孵育箱中培养 6 h。通过亚甲基蓝比色法测定多糖对 HepG-2 细胞、A549 细胞和 MX-1 细胞的抑制率^[17]。在去除培养液后, 用 100 μL 0.1 mol/L PBS 溶液 (pH=6.8) 清洗孔。然后分别添加不同质量浓度 (300、500、700、900、1100 mg/L) 的 BLP-1 和 BLP-2 多糖溶液培养 72 h 后, 取出培养液, 用 100 μL 0.1 mol/L PBS 溶液清洗孔加入 50 μL 质量浓度 10 g/L 的亚甲基蓝染色液培养 1 h, 用清水冲洗, 在 96 孔板中加入 100 μL 洗脱缓冲液 (体积分数为 49% PBS 溶液+体积分数为 50% 乙醇水溶液+体积分数 1% 乙酸水溶液)。最后, 在每个孔完全洗脱后, 采用酶标仪在 570 nm 处测量每孔吸光度。阳性对照为 5-氟尿嘧啶 (5-Fu) 溶液 (质量浓度为 400 mg/L), 多糖对不同细胞抑制率按式 (2) 进行计算:

$$\text{抑制率}/\% = \left(1 - \frac{A_{\text{样品}}}{A_{\text{空白}}} \right) \times 100 \quad (2)$$

式中: $A_{\text{样品}}$ 为与多糖或 5-Fu 孵育的细胞溶液的吸光度; $A_{\text{空白}}$ 为与培养基孵育的细胞溶液的吸光度。

1.4.4 免疫活性测定

1.4.4.1 多糖对巨噬细胞的毒性

小鼠巨噬细胞 RAW264.7 在 DMEM 完全培养基中置于 37 °C、体积分数为 5% CO₂ 培养箱培养 24 h, 96 孔板细胞密度为 1×10^5 细胞/孔。然后, 以质量浓

度为 1 mg/L LPS 溶液作为阳性对照,采用酶标仪在 550 nm 处测量每孔吸光度 (A),按式 (3) 计算细胞增殖率,测定多糖对巨噬细胞的毒性:

$$\text{细胞增殖率}/\% = \frac{A_{\text{实验组}}}{A_{\text{阳性对照}}} \times 100 \quad (3)$$

1.4.4.2 中性红 RAW264.7 的吞噬作用

将对数期的细胞以 1×10^5 (细胞/孔) 的密度接种在 96 孔板中并培养 24 h。在去除培养基后,用 0.1 mol/L PBS 溶液 (pH 6.8) 清洗 2 次孔。然后,分别加入质量浓度为 100、300、500、700、900 mg/L 的多糖溶液 (100 μ L) 并培养 24 h。阳性对照组和空白对照组分别为 100 μ L 质量浓度为 1 mg/L 的 LPS 水溶液和 100 μ L 空白培养基。孵育后,用 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 溶液洗涤平板 2 次,并用 150 μ L 中性红试剂孵育 1 h 后,去除上清液,并向孵育液中添加 150 μ L 裂解液 [V(冰醋酸):V(无水乙醇)=1:1],再孵育 2 h。采用酶标仪在 550 nm 处测量每孔吸光度 (A),研究 BLP-1 和 BLP-2 对巨噬细胞的吞噬作用。

1.4.4.3 NO、IL-6 和 TNF- α 分泌

小鼠巨噬细胞 RAW264.7 细胞以 1×10^5 细胞/孔的密度置于 96 孔板中,培养 24 h。然后,去除先前的培养基,并用 0.1 mol/L PBS 溶液 (pH 6.8) 冲洗 2 次孔后,在 96 孔板中分别添加 100 μ L 不同质量浓度 (100、300、500、700、900 mg/L) 的多糖溶液、阳性对照和空白对照。NO、IL-6 和 TNF- α 的分泌量分别按照 NO 检测试剂盒、TNF- α 免疫应答试剂盒和 IL-6 免疫应答试剂盒的说明进行检测。

1.5 数据统计

采用 SPSS statistics 19.0 对实验数据进行统计分析,采用单因素方差分析 (ANOVA) 和 Duncan 多范围检验分析显著性水平和组间差异。所有实验均重复 3 次,用“平均值 \pm 标准方差 (SD)”表示。

2 结果与讨论

2.1 两种方法制备的多糖化学成分分析

表 1 总结了 BLP-1 和 BLP-2 的得率、多糖和蛋白质质量分数。

表 1 两种方法制备的琉璃苣叶多糖的化学组成
Table 1 Yield and physicochemical properties of polysaccharides

样品	得率 ^① /%	多糖质量 分数/%	蛋白质质量 分数/%	单糖摩尔分数/%			
				Ara	Gal	Glc	Xyl
BLP-1	6.45	80.16	3.26	14.0	6.1	72.7	7.2
BLP-2	5.97	82.48	3.11	23.9	12.3	58.4	5.4

①制备的多糖样品的质量占琉璃苣叶粉末质量的百分数。

由表 1 可知, BLP-1 和 BLP-2 得率分别为 6.45%

和 5.97%。BLP-1 和 BLP-2 的多糖质量分数分别为 80.16% 和 82.48%; 蛋白质质量分数分别为 3.26% 和 3.11%。说明提取方式的不同影响多糖得率; 采用纤维素酶降解细胞壁中纤维素, 加速多糖从细胞中释放到溶剂中, 说明其能够准确、快速和有效地提取多糖, 提高多糖制备效率; 蛋白质与半纤维素之间的共价键结合紧密, 在提取过程中一并溶出。

2.2 相对分子质量和单糖组成测定

采用 HPGPC 测定了 BLP-1 和 BLP-2 两种多糖的相对分子质量, 结果见图 1。

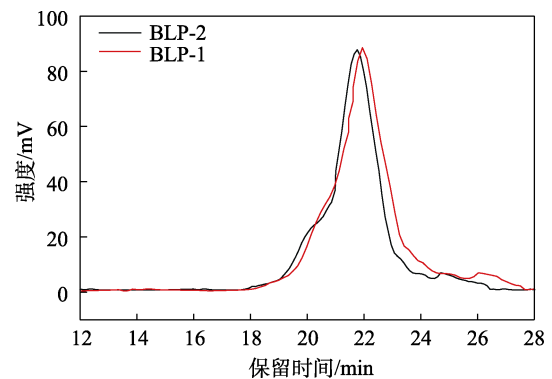
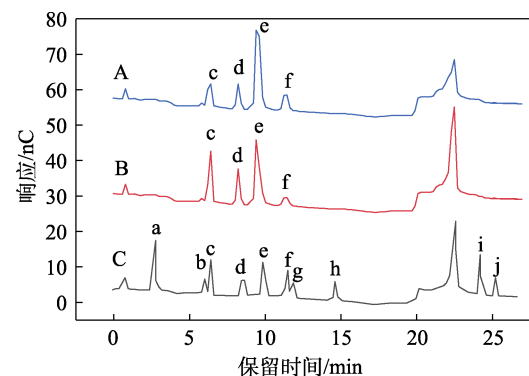


图 1 BLP-1 和 BLP-2 的相对分子质量分布
Fig. 1 Relative molecular mass distribution of BLP-1 and BLP-2

由图 1 可观察到, BLP-1 和 BLP-2 的相对分子质量分布相对狭窄且呈尖锐的对称峰, 保留时间约为 21.94 和 21.76 min。根据获得的校准曲线, BLP-1 和 BLP-2 的相对分子质量分别为 20103 和 22652。

通过对两种多糖组分进行分析检测, 并与标准单糖的色谱图比较, 确定了 BLP-1 和 BLP-2 的单糖成分, 结果见图 2。



a—Fuc; b—Rha; c—Ara; d—Gal; e—Glc; f—Xyl; g—Man; h—Fru; i—GalA; j—GlcA

图 2 BLP-1 (A)、BLP-2 (B) 和标准单糖 (C) 成分离子色谱图

Fig. 2 Ion chromatogram profiles of monosaccharide composition of BLP-1 (A), BLP-2 (B) and standard monosaccharide (C)

采用不同浓度的混合标准品进行定量分析, 并

根据检测和单糖相对分子质量计算每个单糖的摩尔分数(表 1)。结果表明, BLP-1 和 BLP-2 均富含 Ara、Glc, 表明 Ara、Glc 是构成 BLP-1 和 BLP-2 骨架的主要单糖。BLP-1 中的 Glc 摩尔分数高于 BLP-2, 而 BLP-2 中的 Ara 摩尔分数较高, 可能是提取方法不同所致。

2.3 结构表征和性能测试

BLP-1 和 BLP-2 的 FTIR 谱图如图 3 所示。

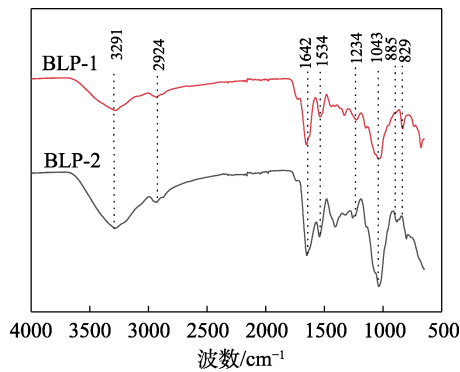


图 3 BLP-1 和 BLP-2 的 FTIR 谱图
Fig. 3 FTIR spectra of BLP-1 and BLP-2

由图 3 可知, 3291 cm^{-1} 处较强的吸收峰归属于 O—H 键的伸缩振动; 2924 cm^{-1} 处吸收峰为 C—H 键的伸缩振动; 1642 cm^{-1} 处为 C=O 键的不对称伸缩振动吸收峰; $1400\sim 1200\text{ cm}^{-1}$ 处吸收峰归属于 C—H 键的弯曲振动或—COO 中 C—O 键的对称伸缩振动; $1200\sim 1000\text{ cm}^{-1}$ 处主要为 C—O—C 键的伸缩振动重叠吸收峰; 885 cm^{-1} 附近出现的吸收峰为单糖以 β -糖苷键连接。

多糖的立体形状通常比核酸和蛋白质的立体形状更复杂。采用 SEM 观察了 BLP-1 和 BLP-2 微观形状, 结果如图 4 所示。

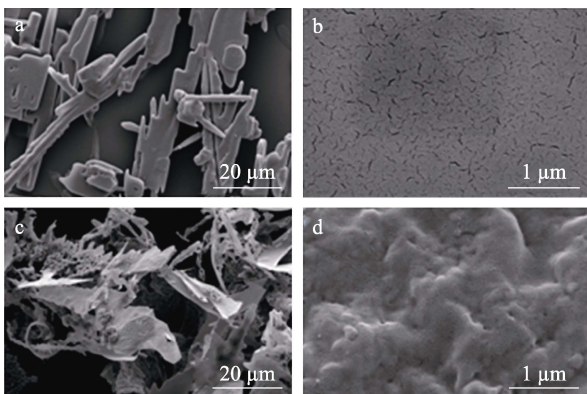


图 4 BLP-1 (a, b) 和 BLP-2 (c, d) 的 SEM 图
Fig. 4 SEM images of BLP-1 (a, b) and BLP-2 (c, d)

由图 4 可知, BLP-1 具有不规则、片状和光滑的表面; BLP-2 碎片上有颗粒状聚集, 说明处理方式不同及多糖链内与链间氢键破坏程度的不同都会导致多糖微观结构的差异。

BLP-1 和 BLP-2 的 TGA 曲线以及对应的 DTG 曲线如图 5 所示。由图 5a 可知, 在 $54\sim 141\text{ }^{\circ}\text{C}$ 范围内, 由于水分蒸发, 两种多糖质量均发生微小变化; BLP-1 和 BLP-2 在 $230\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右开始分解, 其质量保留率在 $250\sim 350\text{ }^{\circ}\text{C}$ 之间急剧下降到 46.41% 和 42.51%。由图 5b 可知, DTG 曲线中两种多糖最小降解温度 (T_d) 分别为 247 和 $269\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。此外, BLP-2 的高相对分子质量可能被认为是导致分解温度差异的原因之一。此结果与 SHI 等^[18]研究相对分子质量为 41180 的龙竹多糖组分 H6 热稳定性高于相对分子质量为 19730 的多糖组分 H2 结论一致。因此, BLP-2 比 BLP-1 具有更稳定的结构。

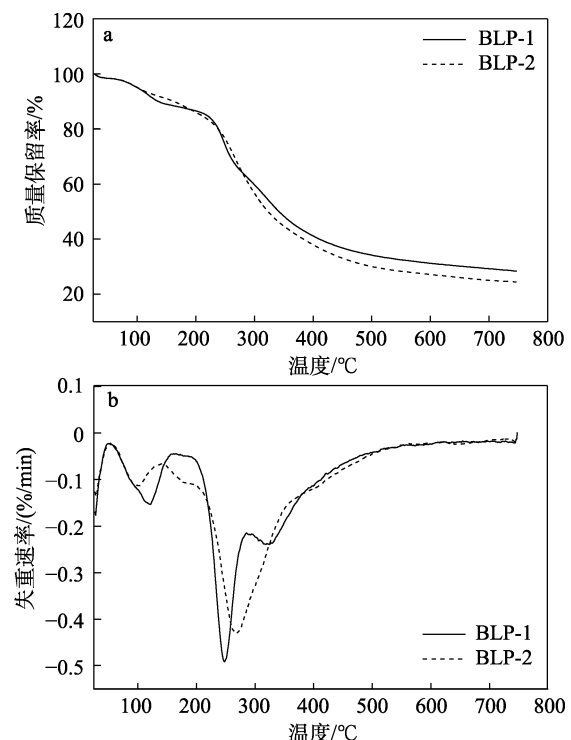
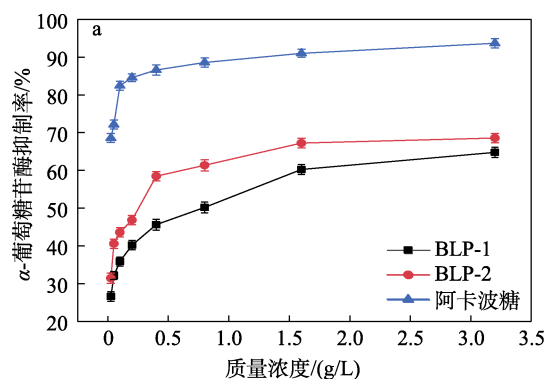


图 5 BLP-1 和 BLP-2 的 TGA (a) 以及 DTG (b) 曲线
Fig. 5 TGA (a) and DTG (b) curves of BLP-1 and BLP-2

2.4 琉璃苣叶多糖的生理活性

2.4.1 降血糖活性

琉璃苣叶多糖对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶抑制活性如图 6 所示。



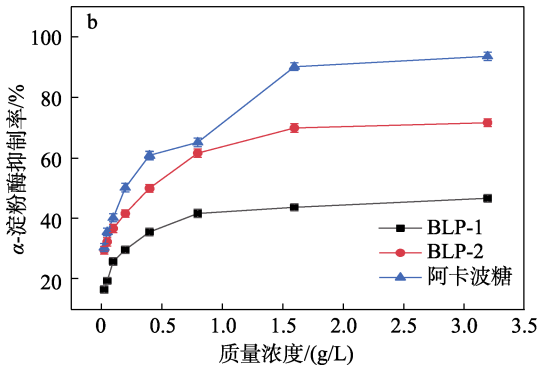


图 6 琉璃苣叶多糖抑制 α -葡萄糖苷酶 (a) 和 α -淀粉酶 (b) 活性
Fig. 6 Inhibition activities of polysaccharides from borage leaves for α -glucosidase (a) and α -amylase (b)

如图 6 所示, BLP-1 和 BLP-2 在质量浓度为 0.025~3.2 g/L 下, 对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶抑制作用具有质量浓度依赖性。由图 6a 可知, 在质量浓度为 0.025~0.2 g/L 下, BLP-1 和 BLP-2 对 α -葡萄糖苷酶的抑制率随样品质量浓度的增加而迅速增加, 此后, 抑制率在质量浓度为 0.2~3.2 g/L 时缓慢增加。此外, BLP-1 在质量浓度为 3.2 g/L 时, 抑制率为 64.32%, 表现出与 BLP-2 相似的 α -葡萄糖苷酶抑制率 (68.53%), 比阳性对照约低 28%。如图 6b 所示, BLP-2 对 α -淀粉酶抑制率在质量浓度为 0.025~0.5 g/L 的范围内与阳性对照相当。总之, 在质量浓度为 3.2 g/L 下, 具有较高相对分子质量的 BLP-2 对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶有较好的抑制作用, 此结论与 GIAVASIS^[19]报道的结果一致。可能机制是多糖的复杂结构和不消化特性干扰酶的活性, 减缓葡萄糖的吸收或调节碳水化合物代谢和胰岛素合成而显示出降血糖作用。黄芪多糖 (APS) 已证实通过对胰岛 β 细胞的保护作用增加胰岛素分泌, 从而改善 T2DM 大鼠的葡萄糖和脂质代谢^[20]。因此, BLP-2 对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的抑制作用优于 BLP-1, 可能与其结构组成和较高的相对分子质量有关^[21-22]。结果表明, BLP-2 可能是 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的潜在抑制剂, 从而拓宽了其在食品工业中的应用。

2.4.2 抗癌活性

琉璃苣叶多糖的抗癌活性如图 7 所示。

由图 7 可知, 随着 BLP-1 和 BLP-2 质量浓度的逐渐增加, HepG-2、MX-1 和 A549 细胞生长抑制率呈剂量依赖性增加。低质量浓度的 BLP-2 (300~900 mg/L) 对 A549、MX-1 和 HepG-2 细胞生长抑制率高于 BLP-1, 而在质量浓度为 1100 mg/L 时 BLP-1 对 MX-1 和 A549 细胞生长抑制率高于

BLP-2; BLP-1 和 BLP-2 对 MX-1 细胞的增殖具有明显抑制作用。XU 等^[23]发现, 真菌灵芝多糖对细胞的增殖和迁移具有时间-剂量依赖性的抑制作用, 在质量浓度为 500 mg/L 时, 最大抑制率达到 50.2%, 与 BLP-1 变化趋势基本一致。大多数具有抗癌活性的多糖含有 4~6 种不同的单糖, 其中大多数含有不同摩尔分数的甘露糖、木糖、岩藻糖、鼠李糖和核糖^[24-25], 一些还含有糖醛酸、蛋白质等, 这与 BLP-1 和 BLP-2 的化学组成基本一致。研究表明, 各种多糖的共同抗癌机制是细胞周期阻滞、线粒体膜去极化、NO 途径和免疫调节^[26]。然而, BLP-1 和 BLP-2 抗癌活性的具体机制还有待于进一步研究。

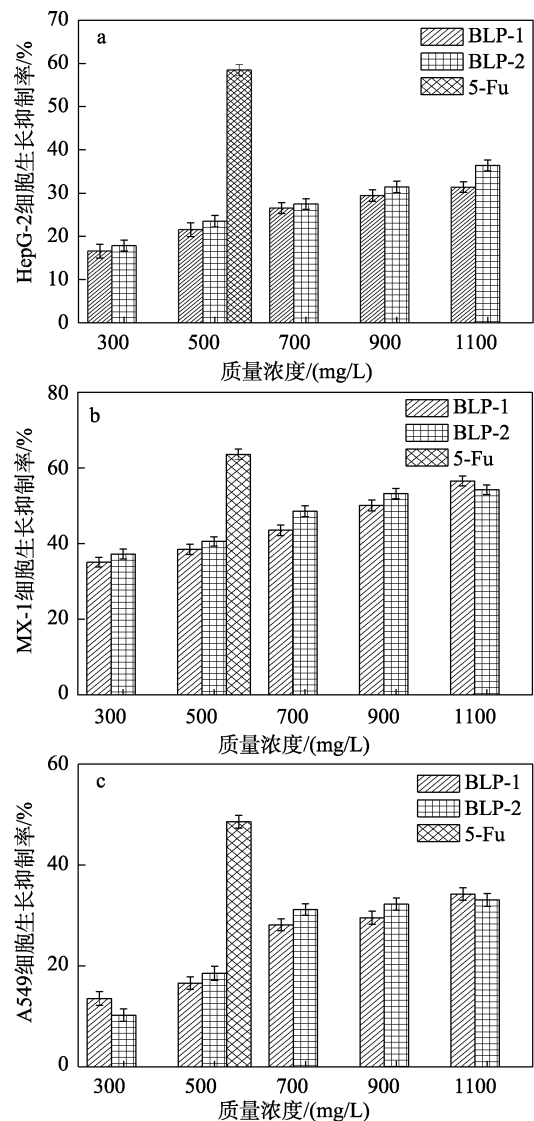


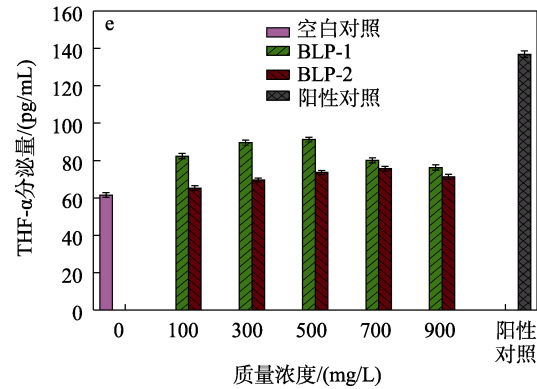
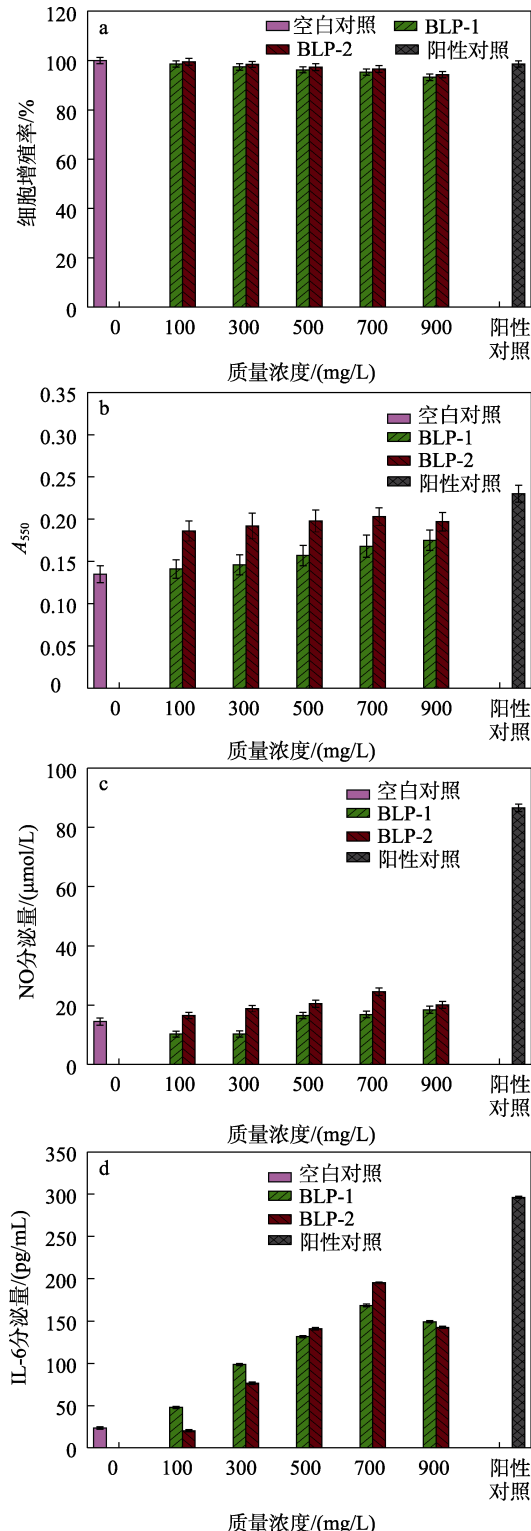
图 7 琉璃苣叶多糖的抗癌活性
Fig. 7 Anticancer activities of polysaccharides from borage leaves

2.4.3 免疫活性

细胞毒性实验结果 (图 8a) 显示质量浓度为

1 mg/L LPS 溶液 (阳性对照) 和质量浓度为 100~900 mg/L 琉璃苣叶多糖对 RAW264.7 细胞几乎没有影响。细胞增殖率均>90%, 表明在此质量浓度范围可用于后续实验。

中性红是一种大分子, 可通过内吞作用被巨噬细胞吸收到细胞中, 因此, 可用于测定巨噬细胞的吞噬作用。图 8b 表明, 琉璃苣叶多糖可显著促进巨噬细胞的吞噬能力, 质量浓度为 700 mg/L BLP-2 可最大限度地促进免疫细胞的吞噬能力。



a—琉璃苣叶多糖对 RAW264.7 的细胞毒性; b—巨噬细胞吞噬中性红的能力; c—NO 的分泌; d—IL-6 的分泌; e—TNF- α 的分泌

图 8 琉璃苣叶多糖的免疫活性

Fig. 8 Immune activities of polysaccharides from borage leaves

巨噬细胞在通过表面受体蛋白吞噬入侵者的过程中, 可产生一些活性氮介质、白细胞介素物质和肿瘤坏死因子, 促进血小板的生成, 刺激 B 淋巴细胞的增殖, 并促进骨髓巨核细胞的分化和成熟。因此, 将 RAW264.7 细胞分泌 NO、IL-6 和 TNF- α 用于评价 BLP-1 和 BLP-2 的免疫调节活性。结果表明, 具有较高相对分子质量 BLP-2 能显著促进免疫细胞分泌 NO (图 8c)。圆柏多糖已证实通过诱导 NO 合酶直接刺激 NO 的产生, 并通过调节单核细胞/巨噬细胞的免疫功能诱导巨噬细胞分泌炎症和抗炎细胞因子 (IL-10) [27]。

除质量浓度为 100 mg/L BLP-2 外, 所有实验组都对 IL-6 的分泌有显著影响 (图 8d), 质量浓度为 700 mg/L BLP-2 对免疫细胞分泌 IL-6 的影响最大。与 BLP-1 相比, BLP-2 在较高质量浓度范围内对 TNF- α 影响更大 (图 8e)。多糖的免疫活性与结构特性密切相关, 如单糖和糖苷链的组成以及相对分子质量等 [28-29]。USOLTSEVA 等 [30] 研究表明, 由 Glc、Gal 和 Fuc 组成的蘑菇杂多糖对 HeLa 细胞系具有免疫增强和细胞毒性作用。本研究结果与上述一致, 推测 BLP-2 较强的免疫增强作用可能与 Gal 和 Glc 的存在及其含量有关。

总之, 与空白对照组相比, 质量浓度为 100~900 mg/L 的多糖对损坏巨噬细胞免疫活性物质的分泌有一定的促进作用。BLP-1 和 BLP-2 在一定质量浓度范围内的免疫活性呈剂量依赖性, 可能与细胞凋亡或高质量浓度多糖处理巨噬细胞的免疫调节有关。与 LPS (阳性对照) 组相比, 在 RAW264.7 细胞中, 多糖对吞噬中性红和 IL-6 分泌的影响优于 NO 和 TNF- α 分泌。由此可见, 多糖主要通过控制免疫细胞分泌 IL-6 发挥免疫活性。

3 结论

(1) 采用纤维素酶辅助和微波辅助提取法提取的琉璃苣叶多糖 BLP-1 和 BLP-2 理化性质不同, 其对应的相对分子质量分别为 20103 和 22652。BLP-1 和 BLP-2 主要由 Ara、Gal、Glc、Xyl 组成, 但其摩尔分数不同; 其最小降解温度分别为 247 和 269 °C

(2) BLP-2 对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的抑制作用强于 BLP-1; 低质量浓度的 BLP-2 (300~900 mg/L) 对 A549、MX-1 和 HepG-2 细胞的抑制率高于 BLP-1; BLP-1 和 BLP-2 可通过增强免疫细胞吞噬大分子、分泌 NO 及 IL-6 细胞因子的能力来刺激免疫调节活性。

(3) 有关 BLP-1 和 BLP-2 结构表征、BLP 的体内降糖活性和抗癌机制有待进一步研究, 开发天然低价的降血糖药物, 有利于琉璃苣叶资源的综合开发利用。

两种多糖可作为新功能食品和医药产品中的生物活性成分, 为进一步研究两种多糖的构效关系提供了理论依据。

参考文献:

- REN F (任飞), HAN F (韩发), SHI L N (石丽娜), *et al.* Supercritical CO₂ fluid extraction of borage seed oil and its fatty acid composition analysis[J]. *China Oils and Fats (中国油脂)*, 2010, 35(8): 15-18.
- LI T (李童). Study on the extraction process and the antioxidant activity of borage seed oil and its product development[D]. Yangzhou: Yangzhou University (扬州大学), 2017.
- ZHU K X, ZHANG Y J, NIE S P, *et al.* Physicochemical properties and *in vitro* antioxidant activities of polysaccharide from *Artocarpus heterophyllus* Lam. pulp[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 155: 354-361.
- HU J L, NIE S P, XIE M Y. Antidiabetic mechanism of dietary polysaccharides based on their gastrointestinal functions[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(19): 4781-4786.
- LI C, LI X S, YOU L J, *et al.* Fractionation, preliminary structural characterization and bioactivities of polysaccharides from *Sargassum pallidum*[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 155: 261-270.
- LIU Y L, YIN R Q, LIANG S S, *et al.* Effect of dietary *Lycium barbarum* polysaccharide on growth performance and immune function of broilers[J]. *Journal of Applied Poultry Research*, 2017, 26(2): 200-208.
- CHEN B C, MCCLEMENTS D J, DECKER E A. Role of continuous phase anionic polysaccharides on the oxidative stability of menhaden oil-in-water emulsions[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(6): 3779-3784.
- CHEN L, GE M D, ZHU Y J, *et al.* Structure, bioactivity and applications of natural hyperbranched polysaccharides[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2019, 223: 115076.
- WU G H, HU T, HUANG Z L, *et al.* Characterization of water and alkali-soluble polysaccharides from *Pleurotus tuber-regium* sclerotia[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 96(1): 284-290.
- SOVOVÁ H, STATEVA R P, GALUSHKO A A. Solubility of β -carotene in supercritical CO₂ and the effect of entrainers[J]. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2001, 21(3): 195-203.
- HU Z Y, ZHOU H L, ZHAO J L, *et al.* Microwave-assisted extraction, characterization and immunomodulatory activity on RAW264.7 cells of polysaccharides from *Trichosanthes kirilowii* Maxim seeds[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 164: 2861-2872.
- SONG Y R, HAN A R, PARK S G, *et al.* Effect of enzyme-assisted extraction on the physicochemical properties and bioactive potential of lotus leaf polysaccharides[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 153: 169-179.
- DUBOIS M, GILLES K A, HAMILTON J K, *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. *Analytical Chemistry*, 1956, 28(3): 350-356.
- BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1/2): 248-254.
- LIU X, ZHU L C, TAN J, *et al.* Glucosidase inhibitory activity and antioxidant activity of flavonoid compound and triterpenoid compound from *Agrimonia pilosa* Ledeb[J]. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 14(1): 1-10.
- AKHTAR H M S, ABDIN M, HAMED Y S, *et al.* Physicochemical, functional, structural, thermal characterization and α -amylase inhibition of polysaccharides from chickpea (*Cicer arietinum* L.) hulls[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2019, 113: 108265.
- FELICE D L, SUN J, LIU R H. A modified methylene blue assay for accurate cell counting[J]. *Journal of Functional Foods*, 2009, 1(1): 109-118.
- SHI Z J, XIAO L P, DENG J, *et al.* Isolation and characterization of soluble polysaccharides of *Dendrocalamus brandisii*[J]. *BioResources*, 2011, 6(4): 5151-5166.
- GIAVASIS I. Bioactive fungal polysaccharides as potential functional ingredients in food and nutraceuticals[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2014, 26: 162-173.
- TANG S M. Astragalus polysaccharide improves type 2 diabetes mellitus in rats by protecting islet β cells[J]. *Academic Journal of Second Military Medical University*, 2017, 38(4): 482-487.
- LIU Y T, CHEN D, YOU Y X, *et al.* Structural characterization and antidiabetic activity of a glucopyranose-rich heteropolysaccharide from *Catathelasma ventricosum*[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 149: 399-407.
- CHENG S (程爽), HE F (贺斐), ZHANG Y D (章亚东), *et al.* Preparation of selenium polysaccharide from *Rabdosia rubescens* and analysis of its antioxidant activity[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2021, 38(10): 2064-2071.
- XU H Y, LIU L Y, MIAO D, *et al.* Effect of *Ganoderma applanatum* polysaccharides on MAPK/ERK pathway affecting autophagy in breast cancer MCF-7 cells[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 146: 353-362.
- ZHANG Y, ZHANG Y N, GAO W H, *et al.* A novel antitumor protein from the mushroom *Pholiota nameko* induces apoptosis of human breast adenocarcinoma MCF-7 cells *in vivo* and modulates cytokine secretion in mice bearing MCF-7 xenografts[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 164: 3171-3178.
- MA Q, JIANG J G, YUAN X H, *et al.* Comparative antitumor and anti-inflammatory effects of flavonoids, saponins, polysaccharides, essential oil, coumarin and alkaloids from *Cirsium japonicum* DC[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2019, 125: 422-429.
- KHAN T, DATE A, CHAWDA H, *et al.* Polysaccharides as potential anticancer agents—A review of their progress[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2019, 210: 412-428.
- SCHPETKIN I A, FAULKNER C L, NELSON-OVERTON L K, *et al.* Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Juniperus scopolorum*[J]. *International Immunopharmacology*, 2005, 5(13/14): 1783-1799.
- CHEN Y H, WAN X Z, WU D S, *et al.* Characterization of the structure and analysis of the anti-oxidant effect of microalga *Spirulina platensis* polysaccharide on *Caenorhabditis elegans* mediated by modulating microRNAs and gut microbiota[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 163: 2295-2305.
- LIU W J, LI W Y, SUI Y, *et al.* Structure characterization and anti-leukemia activity of a novel polysaccharide from *Angelica sinensis* (Oliv.) diels[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 121: 161-172.
- USOLTSEVA R V, ANASTYUK S D, SHEVCHENKO N M, *et al.* Polysaccharides from brown algae *Sargassum duplicatum*: The structure and anticancer activity *in vitro*[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 175: 547-556.