

# 牛蒡低聚果糖的羧甲基化修饰及对 RAW264.7 细胞免疫活性提升

赵志刚<sup>1,2</sup>, 金丹<sup>1</sup>, 黄慧丹<sup>1</sup>, 李贵文<sup>1,2</sup>, 单振伟<sup>1</sup>

(1. 皖南医学院 药学院, 安徽 芜湖 241002; 2. 安徽省多糖药物工程技术研究中心, 安徽 芜湖 241002)

**摘要:** 采用水媒法对牛蒡低聚果糖 (BFO) 进行了羧甲基化修饰, 制备了不同羧甲基化取代度 (DS) 的修饰产物 (CM-BFO), 通过单因素和响应面实验考察了反应条件对 DS 的影响, 以及各因素的交互作用。采用 GC、FTIR、<sup>1</sup>HNMR、<sup>13</sup>CNMR 对 BFO 及 CM-BFO 的结构进行了表征, 以 RAW264.7 细胞为模型测试了不同 DS 的 CM-BFO 体外细胞实验的免疫活性。结果表明, 0.5 g BFO 用 30 mL 质量分数为 20% 的 NaOH 水溶液碱化处理 1 h, 以 30 mL 质量分数为 2.5% 的氯乙酸水溶液为羧甲基化试剂, 在反应温度 65 °C、反应时间 3.3 h 的最佳条件下, BFO 的 DS 最高, 为 1.06。BFO 和 CM-BFO 均能提升 RAW264.7 细胞的免疫活性, 3 种 DS 为 0.82、0.93 和 0.96 的 CM-BFO 免疫活性较 BFO 明显提升, 而低 DS (0.73) 和高 DS (1.06) 的 CM-BFO 则影响较小。CM-BFO 的免疫活性在一定范围内随其 DS 的升高呈先增强后减弱的趋势。

**关键词:** 牛蒡低聚果糖; 羧甲基化修饰; 取代度; 免疫活性; 中药现代化技术

中图分类号: R285 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2024) 07-1542-08

## Carboxymethylation modification of fructooligosaccharide from burdock and its enhancement on immune activity of RAW264.7 cells

ZHAO Zhigang<sup>1,2</sup>, JIN Dan<sup>1</sup>, HUANG Huidan<sup>1</sup>, LI Guiwen<sup>1,2</sup>, SHAN Zhenwei<sup>1</sup>

(1. School of Pharmacy, Wannan Medical College, Wuhu 241002, Anhui, China; 2. Anhui Provincial Engineering Research Center for Polysaccharide Drugs, Wuhu 241002, Anhui, China)

**Abstract:** Carboxymethylated burdock fructooligosaccharide (CM-BFO) with different degrees of carboxymethyl substitution (DS) was prepared by aqueous method. BFO and CM-BFO characterized by GC, FTIR, <sup>1</sup>HNMR, and <sup>13</sup>CNMR. The effect of reaction conditions on DS and the interaction between each factor were analyzed by single factor and response surface experiments, while the influence of CM-BFO with different DS on cell immunity were further evaluated using RAW264.7 cells as model *in vitro*. The results showed that, under the optimal conditions of 0.5 g BFO alkalinized in 30 mL mass fraction of 20% NaOH aqueous solution for 1 h, using 30 mL mass fraction of 2.5% chloroacetic acid aqueous solution as carboxymethylation reagent, reaction temperature 65 °C, and reaction time 3.3 h, BFO obtained the highest DS degree of 1.06. Moreover, both BFO and CM-BFO exhibited enhancement on the immune activity of RAW264.7 cells *in vitro*. CM-BFO with DS of 0.82, 0.93 and 0.96 displayed significant improvement on the cell immune activity compared with BFO, while the ones with low DS (0.73) and high DS (1.06) only showed slight enhancement. The immune activity increased first and then decreased with the increase of DS in a certain range.

**Key words:** burdock fructooligosaccharide; carboxymethylation modification; degree of substitution; immune activity; modernization technology of traditional Chinese medicine

收稿日期: 2023-09-20; 定用日期: 2023-10-30; DOI: 10.13550/j.jxhg.20230789

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目 (82204238); 安徽省大学生创新训练项目 (S202210368067、S202210368073); 皖南医学院重点项目科研基金 (WK2021Z03)

作者简介: 赵志刚 (1981—), 男, 讲师, E-mail: 627424886@qq.com.

牛蒡 (*Arctium lappa* L.) 原产于中国, 是菊科牛蒡属二年生草本植物, 有“东洋人参”、“大力子”的美称<sup>[1-2]</sup>, 具有被普遍认可的保健价值。牛蒡低聚果糖 (BFO) 是牛蒡根的一种水溶性提取物, 为菊糖型低聚果糖<sup>[3-5]</sup>。

YIN 等<sup>[6]</sup>研究表明, BFO 对植物具有保护作用, 其机理与疫苗对人和动物的保护相似; GUO 等<sup>[7]</sup>研究表明, BFO 是一种新的潜在激发因子, 能诱导植物各种防御反应; BFO 还可诱导气孔关闭来限制细菌入侵, 进而提升植物的抗病虫害能力<sup>[8-10]</sup>。此外, BFO 还具有水果保鲜作用, 机制与 BFO 诱导水杨酸依赖性信号通路<sup>[11]</sup>、抑制蔗糖转运<sup>[12]</sup>、抑制花青素的合成<sup>[13]</sup>有关。在医学领域, BFO 近年也产生了很多研究成果: DING 等<sup>[3]</sup>和 YUAN 等<sup>[14]</sup>的研究表明, BFO 在显著降低糖尿病小鼠的血糖血脂水平的同时, 还能减少胰腺、肝脏和肾脏的损伤; 此外, BFO 还具有抗病毒、消炎、免疫调节等作用<sup>[15-16]</sup>。因此, BFO 在农业和医学领域具有重要的研究应用价值。

现有的研究表明, 多糖的生物活性主要取决于其化学结构, 如单糖组成、局部官能团结构和溶液构象等<sup>[17]</sup>。多糖经化学修饰后结构多样性会得到显著增加, 有可能增强生物活性或诱导出新的活性, 所以多糖的化学修饰成为了近年来的研究热点<sup>[18]</sup>, 常见的化学修饰方法有羧甲基化<sup>[19-20]</sup>、硫酸化<sup>[21]</sup>、乙酰化<sup>[18,22]</sup>或磷酸化<sup>[23]</sup>等。与其他修饰方法相比, 多糖的羧甲基化具有成本较低、操作简单、反应过程易控、修饰产物无毒等优势, 已成为多糖化学修饰常用的方法。多糖的羧甲基化是指通过化学反应用羧甲基取代原多糖残糖基上的醇羟基, 羧基团的引入会提升多糖的水溶性, 并改变多糖的局部构象, 因而有可能提升其原有的生物活性或赋予其新的活性<sup>[24]</sup>。目前, BFO 的研究主要集中在其生物活性的探索方面, 在其羧甲基化修饰方面的研究鲜见报道。

本文拟对 BFO 进行羧甲基化修饰, 得到不同羧甲基化取代度的牛蒡低聚果糖 (CM-BFO), 对这些多糖衍生物进行定性定量分析、免疫活性的初步测试, 力求从中筛选出免疫活性得到提升的 CM-BFO, 并明确取代度与免疫活性的关系, 丰富 BFO 的研究内容, 以期对 BFO 的进一步开发利用提供理论基础和数据支撑。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

NaOH、冰乙酸、无水乙醇、体积分数 95% 乙醇、乙醚、溴化钾、正丁醇、三氯乙酸、丙酮、氯

乙酸、盐酸、酚酞, AR, 国药集团化学试剂有限公司; 牛蒡根, 安徽老百姓大药房; D<sub>2</sub>O, AR, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 木瓜蛋白酶 (BR)、中性红 (BS)、葡萄糖标准品 (HPLC 纯度 ≥ 98%)、果糖标准品 (HPLC 纯度 ≥ 98%)、Sephadex G-50 葡聚糖凝胶 (CP)、NO 试剂盒 (有效成分质量分数 98%)、RAW264.7 巨噬细胞, 合肥博美生物科技有限责任公司。

Multiskan SkyHigh 全波长酶标仪、Nicolet iS5 傅里叶变换红外光谱仪 (FTIR), 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; Avance NEO 600 MHz 核磁共振波谱仪 (NMR), 德国 Bruker 公司; G2350A 气相色谱仪 (GC), 美国 Agilent 公司; YTLG-10A 冷冻干燥机, 上海叶拓科技有限公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 BFO 的提取、纯化

按照文献[21]的方法, 用 80℃ 的热水完成 BFO 粗品提取, 并运用 Sephadex G-50 层析柱对粗多糖进行纯化, 得到纯品 BFO (HPLC 纯度 > 98%)。

#### 1.2.2 BFO 的羧甲基化修饰

参照文献[24-25]水媒法并稍作修改: 将 0.5 g BFO 置于三口烧瓶中, 加入 30 mL (质量分数为 10%、15%、20%、25%、30%) NaOH 水溶液常温搅拌反应 1 h 完成多糖的碱化处理, 然后滴加 30 mL (质量分数为 2.0%、2.5%、3.0%) 氯乙酸水溶液, 升高至设定温度 (60、65、70 °C) 反应一定时间 (3.0、3.5、4.0 h), 停止反应, 冷却至室温, 用乙酸调节溶液 pH 至中性, 过滤, 滤液用截留相对分子质量 2000 的透析袋透析 96 h, 于 -40 °C 冷冻干燥 24 h, 得 0.18 g 白色絮状羧甲基化 BFO (CM-BFO)。

### 1.3 表征方法

#### 1.3.1 BFO 的单糖组成

按照文献[26]的 GC 分析方法, 先将 BFO 水解成单糖并干燥, 然后将 10 mg 水解单糖及标准品 (葡萄糖和果糖各 10 mg) 分别衍生化后注入 GC 分析, 通过保留时间的对比分析 BFO 的单糖组成。

#### 1.3.2 FTIR 测试

分别称取 3 mg BFO 和 CM-BFO, 加入 KBr 进行压片, 扫描范围 4000~400 cm<sup>-1</sup>。

#### 1.3.3 NMR 测试

分别称取 20 mg BFO 和 CM-BFO, 充分溶解于 0.5 mL D<sub>2</sub>O 中, 转至核磁管中, 于 25 °C 下进行 <sup>1</sup>H NMR 和 <sup>13</sup>C NMR 测试。

#### 1.3.4 羧甲基化取代度的测定与计算

羧甲基化取代度 (DS) 的高低是衡量多糖化学修饰成功与否的重要指标, 采用文献[25]方法对 CM-BFO 的 DS 进行测定与计算。方法如下: 准确

称取 10 mg CM-BFO，置于 100 °C 真空干燥箱中干燥 1 h 后移入锥形瓶，再加入 10 mL 0.01 mol/L 的 NaOH 水溶液搅拌溶解，酚酞为指示剂，用 0.01 mol/L 的盐酸滴定至红色消失，且 30 s 不变色。根据滴定所用盐酸的体积，按式 (1) 计算单位质量 CM-BFO 中羧甲基的物质的量 ( $n$ , mmol/g)：

$$n = (c_1V_1 - c_2V_2) / m \quad (1)$$

式中： $c_1$  为 NaOH 水溶液浓度，10 mmol/L； $V_1$  为 NaOH 水溶液体积，0.01 L； $c_2$  为盐酸浓度，10 mmol/L； $V_2$  为滴定所用盐酸体积，L； $m$  为 CM-BFO 的质量，0.01 g。然后，按式 (2) 计算 DS：

$$DS = 0.162n / (1 - 0.058n) \quad (2)$$

式中：0.162 为 1 mmol 葡萄糖失水后的质量，g/mmol；0.058 为 1 mmol 葡萄糖中的一个羟基被羧甲基取代后增加的质量，g/mmol。

### 1.4 羧甲基化工艺的优化

#### 1.4.1 单因素实验

多糖羧甲基化修饰前要用 NaOH 水溶液进行碱化处理，NaOH 质量分数决定了反应溶液的酸碱度，从而影响 DS<sup>[19]</sup>。在氯乙酸质量分数为 3.0%、羧甲基化反应温度 60 °C、反应时间 4.0 h 的条件下，考察 DS 与 NaOH 质量分数的关系。

#### 1.4.2 响应面实验

运用响应面实验 (Design-Expert 13 设计并实施)，根据单因素实验结果，以氯乙酸质量分数 ( $A$ )、反应温度 ( $B$ )、反应时间 ( $C$ ) 为自变量，DS 为评价指标，对 3 个因素分别设置 3 个水平，用“-1、0、+1”，考察 3 个反应条件对 DS 的交互影响，通过拟合预测最佳的工艺条件，并进行实验验证。

### 1.5 免疫活性测试

以小鼠单核巨噬细胞系 RAW264.7 为模型，对 BFO 及不同 DS 的 CM-BFO 进行免疫活性测试。

#### 1.5.1 RAW264.7 细胞培养

参照文献[27]方法对小鼠单核巨噬细胞系 RAW264.7 进行培养、传代，适当调整细胞密度，培养 24 h 后进行实验。

#### 1.5.2 测试分组与处理方法

测试中分组给药情况如表 1 所示。

表 1 测试分组与处理方法

Table 1 Test grouping and processing methods

分组	给药种类	给药质量浓度/(mg/L)
空白组	—	—
阳性对照组	脂多糖 (LPS)	1
实验组	BFO 和不同 DS 的 CM-BFO	100、200、400、600、800

注：“—”表示无内容。

#### 1.5.3 RAW264.7 细胞增殖活力检测

参照文献[28]采用 CCK-8 法检测 BFO 及

CM-BFO 对细胞增殖的影响，阳性对照组细胞用 LPS 处理，实验分组与处理方法见表 1，细胞活力按式 (3) 进行计算：

$$X/\% = A_s / A_b \times 100 \quad (3)$$

式中： $X$  为细胞活力，%； $A_s$  为阳性对照组或实验组的吸光度； $A_b$  为空白组吸光度。

#### 1.5.4 RAW264.7 细胞吞噬能力和 NO 浓度测定

参照文献[28]采用中性红法检测 RAW264.7 细胞吞噬能力，吞噬指数按式 (4) 进行计算：

$$Y/\% = A_c / A_b \times 100 \quad (4)$$

式中： $Y$  为吞噬指数，%； $A_c$  为实验组的吸光度； $A_b$  为空白组吸光度。

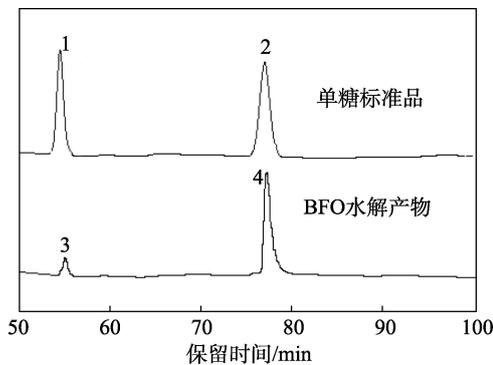
采用 Griess 法检测 RAW264.7 细胞释放的 NO 含量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 产品的表征

#### 2.1.1 BFO 的单糖组成分析

图 1 为 BFO 水解产物的 GC 谱图。因为样品和标准品在保留时间 0~50 min 无任何信号峰，所以图中的保留时间从 50 min 开始。



1—葡萄糖；2—果糖

图 1 BFO 水解产物的 GC 谱图

Fig. 1 GC spectrum of BFO hydrolysates

从图 1 可以看出，葡萄糖 (1 号) 和果糖 (2 号) 标准品的保留时间分别为 54.12 和 77.07 min。BFO 水解产物 (3 号和 4 号) 的保留时间分别为 54.48 和 77.41 min，与标准品极度接近，可以确定 3 号和 4 号分别对应葡萄糖和果糖的吸收峰，其他保留时间并无吸收峰出现，说明 BFO 由葡萄糖和果糖两种单糖组成，通过 GC 面积归一法得 3 号峰与 4 号峰的面积比为 1 : 12.13，说明 BFO 水解产物中，葡萄糖和果糖的物质的量比为 1 : 12，这些均与文献[5,21]报道相符，即 BFO 的单糖组成为果糖和葡萄糖，二者物质的量比为 12 : 1。通过以上两点可以初步确认，本文获取的 BFO 与文献[5,21]中所报道的多糖为

同一产物。

2.1.2 FTIR 分析

图 2 为 BFO 和 CM-BFO 的 FTIR 谱图。

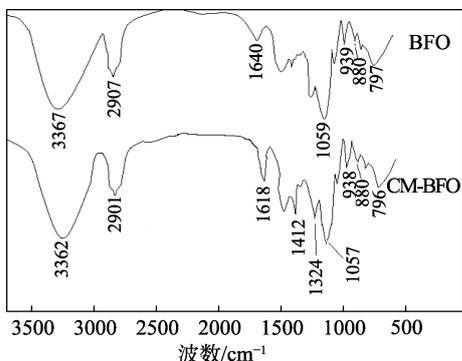


图 2 BFO 和 CM-BFO 的 FTIR 谱图  
Fig. 2 FTIR spectra of BFO and CM-BFO

从图 2 可以看出, 在 BFO 的谱图中, 3367 cm<sup>-1</sup> 处为 BFO 中多糖分子 O—H 的伸缩振动吸收峰, 2907 cm<sup>-1</sup> 处为 C—H 的伸缩振动吸收峰, 1640 cm<sup>-1</sup> 处为 C—O 的伸缩振动吸收峰, 1059 cm<sup>-1</sup> 处为 C—O—H 的变角振动吸收峰, 以上均为多糖特征吸收峰<sup>[5]</sup>; 939、880 和 797 cm<sup>-1</sup> 处分别为呋喃糖环的伸缩振动吸收峰、呋喃糖分子中—CH<sub>2</sub>—的横向振动吸收峰和 β 型单糖中—CH—直立键的变角振动吸收峰<sup>[21]</sup>, 结合 2.1.1 节 BFO 的单糖组成分析, 说明 BFO 中的果糖为 β-呋喃果糖, 即 BFO 是由 β-呋喃果糖和葡萄糖按物质的量比为 12 : 1 连接而成, 这与文献[5,21]报道完全吻合。

在 CM-BFO 的 FTIR 谱图中, 其吸收峰与 BFO 大体一致, 但其在 1618、1412 和 1324 cm<sup>-1</sup> 处出现了较强的吸收峰, 1618 cm<sup>-1</sup> 处为羧甲基中—COO—的伸缩振动吸收峰, 1412 cm<sup>-1</sup> 处为羧甲基中 C—H 的变角振动吸收峰, 1324 cm<sup>-1</sup> 处为羧甲基中 C=O 的对称伸缩增强吸收峰<sup>[19-20]</sup>, 以上分析说明, BFO 的羧甲基化修饰成功。

2.1.3 NMR 分析

文献[5,21]报道 BFO 分子结构为 GF<sub>12</sub> 型 (G 代表葡萄糖; F 代表果糖), 聚合度为 13, 即由 1 分子吡喃型的葡萄糖和 12 分子呋喃型的果糖聚合而成, 结构式如下:

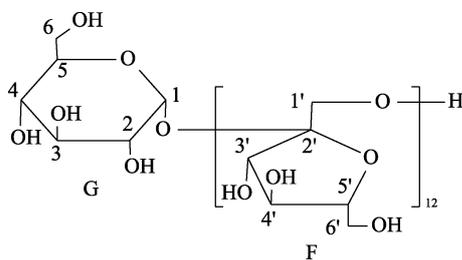


图 3 为 BFO 和 CM-BFO 的 <sup>1</sup>HNMR 谱图。

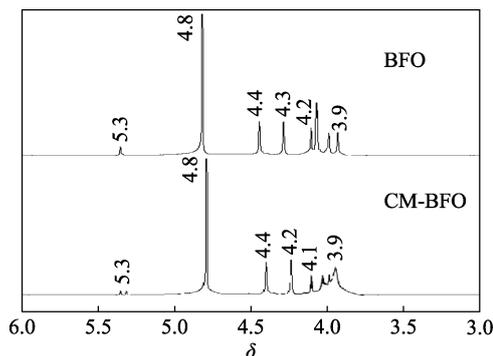


图 3 BFO 和 CM-BFO 的 <sup>1</sup>HNMR 图  
Fig. 3 <sup>1</sup>HNMR spectra of BFO and CM-BFO

从图 3 可以看出, BFO 中 δ 5.3 处的信号峰为葡萄糖分子中的 H-1 (定义其峰面积积分为 1.000), δ 4.3、4.4 处为果糖分子中的 H-3' (峰面积积分为 12.105)、H-4' (峰面积积分为 11.836) 的信号峰, 这两处峰面积积分值与葡萄糖分子中的 H-1 的峰面积积分的比值均接近于 12 : 1, 说明 BFO 中果糖残基的聚合度为 12, 再一次验证了 BFO 中果糖和葡萄糖的物质的量比为 12 : 1, 这与前面的 GC 和 FTIR 分析结果一致; δ 3.9~4.2 处的信号峰推断为葡萄糖和果糖分子中的其他质子信号峰, 可能有信号重叠; 以上与文献[5,21]中关于 BFO 的 <sup>1</sup>HNMR 表征结果一致, 说明所获取多糖即为文献报道的多糖。

CM-BFO 的 <sup>1</sup>HNMR 谱图显示其发生的化学位移与 BFO 大体相同, 说明 BFO 羧甲基化修饰过程中保留了 BFO 的基本结构, δ 5.3 附近和 δ 3.9~4.1 处均出现新峰, 分析原因可能是多糖羧甲基化过程中醇羟基被—CH<sub>2</sub>COOH 取代所致, 说明羧甲基化修饰成功。

图 4 为 BFO 的 <sup>13</sup>CNMR 谱图。

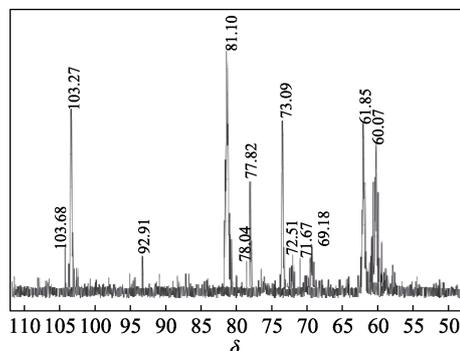


图 4 BFO 的 <sup>13</sup>CNMR 图  
Fig. 4 <sup>13</sup>CNMR spectrum of BFO

从图 4 可以看出, BFO 的信号峰主要集中于 δ 55~110 之间: δ 103.27~103.68 处的信号峰归属于果

糖分子中的 C-1';  $\delta$  92.91 处的信号峰归属于葡萄糖分子中的 C-1;  $\delta$  73.09~81.10 处的信号峰归属于果糖分子中的 C-3'、C-4'、C-5';  $\delta$  69.18~72.51 处的信号峰归属于葡萄糖分子中的 C-2、C-3、C-4、C-5;  $\delta$  61.85 处的信号峰归属于果糖分子中的 C-6';  $\delta$  60.07 处的信号峰呈裂分状, 部分归属于葡萄糖分子中的 C-6, 部分归属其他信号峰的重叠。以上与文献[5,21]表征结果一致, 说明获得的多糖即为文献报道的多糖。

图 5 为 CM-BFO 的  $^{13}\text{C}$ NMR 谱图。从图 5 可以看出, 在  $\delta$  55~110 之间 CM-BFO 的信号峰位置、强度与 BFO 大体一致, 不同的是 CM-BFO 在  $\delta$  176.93、47.08 处有较强信号峰, 前者归属于乙酸分子中的 C=O, 后者归属于乙酸分子中的亚甲基 ( $\text{CH}_2$ -), 说明羧甲基化修饰成功。

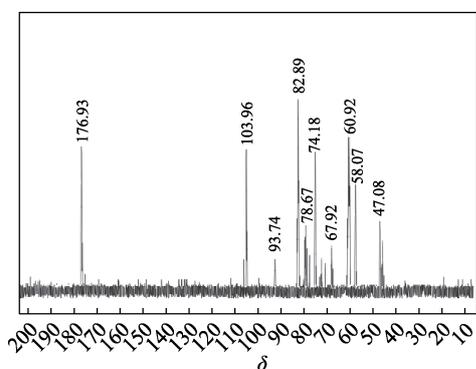


图 5 CM-BFO 的  $^{13}\text{C}$ NMR 图  
Fig. 5  $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of CM-BFO

综上所述, 可以确认实验所获取多糖即为文献[5,21]所报道多糖; FTIR、 $^1\text{H}$ NMR 和  $^{13}\text{C}$ NMR 结果表明, BFO 已成功羧甲基化修饰。

## 2.2 羧甲基化反应优化分析

### 2.2.1 NaOH 质量分数对 DS 的影响

图 6 为对 NaOH 质量分数单因素考察结果。

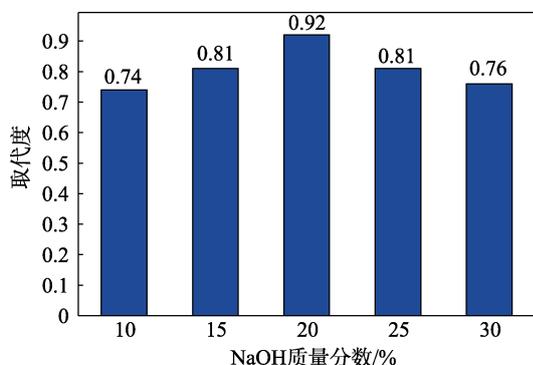


图 6 NaOH 质量分数对取代度的影响  
Fig. 6 Effect of NaOH mass fraction on degree of substitution

从图 6 可以看出, DS 随着 NaOH 质量分数的增加先升高后下降, 原因在于, 适量的 NaOH 可以有

效中和羧甲基化取代过程中释放出的酸性物质 (盐酸), 提高醚化反应的能力, 进而提升 DS; 但过量的 NaOH 会对氯乙酸的质量分数产生影响, 因而降低 DS<sup>[19]</sup>。当 NaOH 质量分数为 20% 时, DS 最高, 为 0.92。因此, 选择 NaOH 质量分数 20% 进行后续研究。

### 2.2.2 响应面实验结果分析

采用 Design-Expert 13 对表 2 中的数据进行二项式拟合, 并对模型进行方差分析, 得到的二项式拟合方程为:  $Y=1.05-0.0200A+0.0263B-0.0362C+0.0225AB+0.0275AC+0.0200BC-0.1680A^2-0.0905B^2-0.0455C^2$  [ $P<0.0001$ , 相关系数 ( $R^2$ )=0.9941]。对表 2 中的实验数据采用 ANOVA 模块进行多元化回归分析, 所得数据见表 3。

表 2 响应面优化实验结果

Table 2 Experimental results of response surface methodology

序号	编码值			实际值			DS
	A	B	C	氯乙酸质量分数/%	反应温度/°C	反应时间/h	
1	0	1	1	2.5	70	4.0	0.93
2	1	-1	0	3.0	60	3.5	0.73
3	1	0	1	3.0	65	4.0	0.80
4	0	-1	-1	2.5	60	3.0	0.93
5	0	0	0	2.5	65	3.5	1.04
6	-1	1	0	2.0	70	3.5	0.80
7	-1	0	-1	2.0	65	3.0	0.92
8	0	-1	1	2.5	60	4.0	0.82
9	-1	-1	0	2.0	60	3.5	0.81
10	0	0	0	2.5	65	3.5	1.05
11	0	0	0	2.5	65	3.5	1.04
12	1	1	0	3.0	70	3.5	0.81
13	0	1	-1	2.5	70	3.0	0.96
14	0	0	0	2.5	65	3.5	1.05
15	1	0	-1	3.0	65	3.0	0.82
16	0	0	0	2.5	65	3.5	1.05
17	-1	0	1	2.0	65	4.0	0.79

表 3 方差分析结果

Table 3 Results of variance analysis

变异来源	平方和	自由度	均方差	F 值	P 值	显著性
模型	0.2016	9	0.0224	131.19	<0.0001	**
A	0.0032	1	0.0032	18.74	0.0034	**
B	0.0055	1	0.0055	32.29	0.0007	**
C	0.0105	1	0.0105	61.58	0.0001	**
AB	0.0020	1	0.0020	11.86	0.0108	*
AC	0.0030	1	0.0030	17.72	0.0040	**
BC	0.0016	1	0.0016	9.37	0.0183	*
A <sup>2</sup>	0.1188	1	0.1188	696.12	<0.0001	**
B <sup>2</sup>	0.0345	1	0.0345	202.01	<0.0001	**
C <sup>2</sup>	0.0087	1	0.0087	51.06	0.0002	**
残差	0.0012	7	0.0002			
失拟误差	0.0007	3	0.0002	1.73	0.2984	不显著
纯误差	0.0005	4	0.0001			
总和	0.2028	16				

注: \*\*表示因素影响极显著 ( $P<0.01$ ); \*表示因素影响显著 ( $P<0.05$ )。

从表 3 可以看出, 模型  $F$  值较大 (131.19),  $P$  值较小 ( $<0.0001$ ), 说明该回归模型极显著; 失拟误差 ( $P=0.2984$ ) 不显著, 说明其他实验因素干扰小, 回归模型对因素考察适合度高。此外, 从表 3 还可以看出, 一次项因素  $A$ 、 $B$ 、 $C$ , 二次项因素  $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$ , 以及交互项  $AC$  均对  $DS$  有极显著影响, 交互项  $AB$  和  $BC$  则对  $DS$  有显著影响, 从交互项  $F$  值可以看出, 交互因素对  $DS$  的影响程度从大到小顺序为:  $AC > AB > BC$ 。比较  $A$ 、 $B$ 、 $C$  的  $F$  值能得到 3 个因素对  $DS$  的影响程度从大到小顺序为:  $C > B > A$ 。

图 7 为各因素交互对 BFO 羧甲基化取代度的影响。从图 7 可以看出,  $AC$  交互的 2D 图中等高线更接近椭圆, 对应的 3D 图中曲面倾斜度最大, 说明  $AC$  交互对  $DS$  影响最大,  $AB$  次之,  $BC$  影响最小, 后两者差别不大。

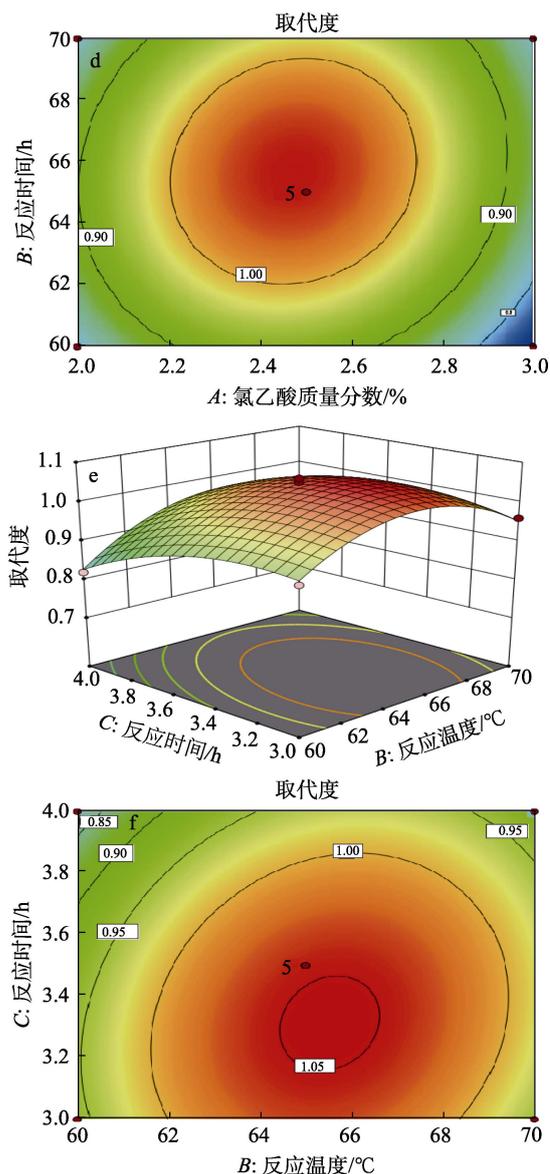
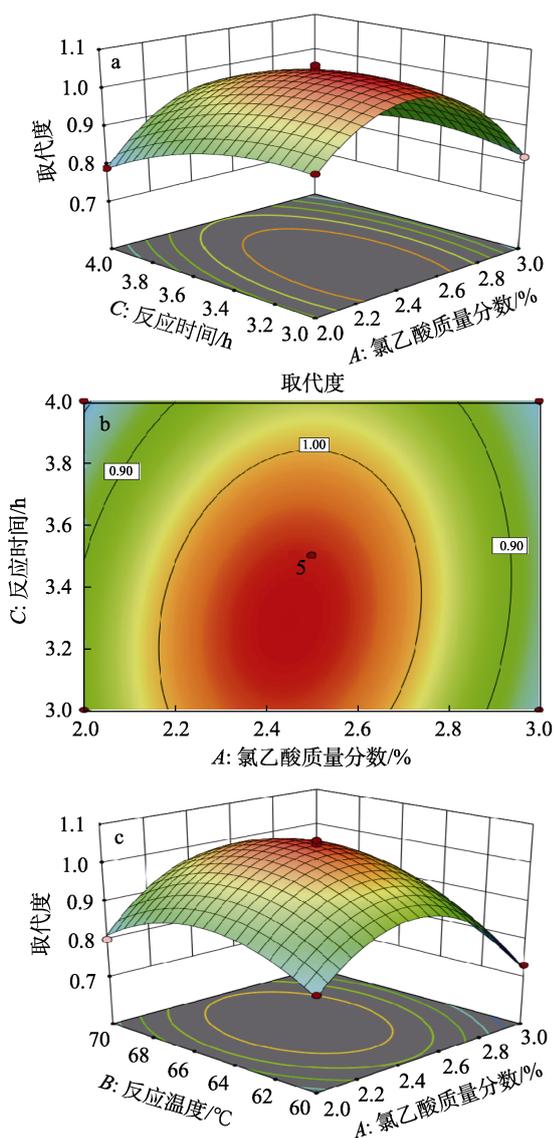


图 7 交互因素响应面图

Fig. 7 Response surface diagrams of the interaction of various factors

通过 Design-Expert 13 中的优化模块预测了 BFO 羧甲基化修饰的最佳反应条件为: 氯乙酸质量分数为 2.5%, 反应温度 65 °C, 反应时间 3.3 h。此时羧甲基化取代度最高, 为 1.06。在此条件下重复实验 3 次, 得 BFO 的羧甲基化取代度分别为 1.06、1.05、1.06, 平均值为 1.06, 与预测值基本一致, 说明预测方程准确度高。

### 2.3 免疫活性分析

多糖经羧甲基化修饰后的免疫活性大小与  $DS$  的关系并非简单的正相关或负相关<sup>[29]</sup>。通过羧甲基化修饰得到了 12 种不同  $DS$  (0.73、0.74、0.76、0.80、0.81、0.82、0.92、0.93、0.96、1.04、1.05 和 1.06) 的 CM-BFO。为了使免疫活性的研究更准确和具体, 以 RAW264.7 细胞为模型, 对  $DS$  分别为 0.73 (最低、

命名为 CM-BFO-1)、0.82(中度, CM-BFO-2)、0.93(中度, CM-BFO-3)、0.96(中度, CM-BFO-4)、1.06(高度, CM-BFO-5)的 5 种有代表性的 CM-BFO 进行了免疫活性测试,将测试数据与 BFO 进行了对比,力求从中筛选出免疫活性得到明显提升的 CM-BFO,并得出 BFO 羧甲基化取代度与免疫活性的关系。

2.3.1 CM-BFO 对 RAW264.7 细胞活性的影响

图 8 为 BFO 和 CM-BFO 对 RAW264.7 细胞活性的影响,其中,阳性对照组和空白组的细胞活力分别为 195.3%和 100%。

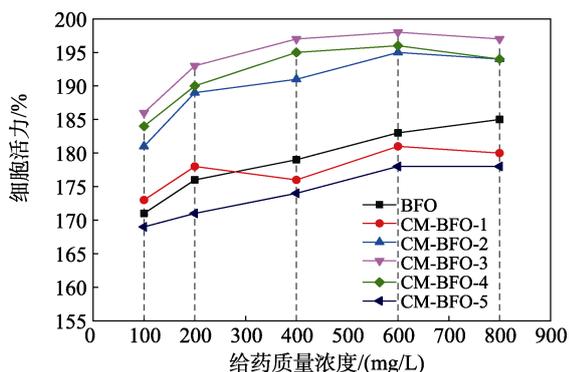


图 8 BFO 及 CM-BFO 对 RAW264.7 细胞活性的影响  
Fig. 8 Effects of BFO and CM-BFO on activity of RAW264.7 cells

从图 8 可以看出,实验组给药质量浓度在 100~800 mg/L 范围内, BFO 及 5 种 CM-BFO 均能明显提升 RAW264.7 细胞活力,有质量浓度依赖性但不明显; CM-BFO-2、CM-BFO-3、CM-BFO-4 提升细胞活力的能力比 BFO 更加明显,其中 CM-BFO-3 最优;而 CM-BFO-1、CM-BFO-5 提升细胞活力的能力不明显,说明随着 DS 的升高,CM-BFO 提升 RAW264.7 细胞活力的能力呈先增强后减弱的趋势。

2.3.2 CM-BFO 对 RAW264.7 细胞吞噬能力的影响

图 9 为 BFO 和 CM-BFO 对 RAW264.7 细胞吞噬中性红能力的影响,其中,阳性对照组和空白组的吞噬指数分别为 162.6%和 100%。

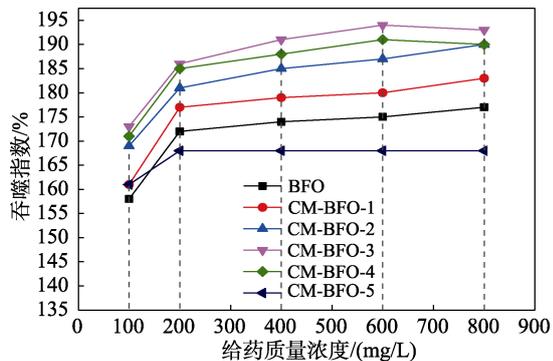


图 9 BFO 及 CM-BFO 对 RAW264.7 细胞吞噬能力的影响  
Fig. 9 Effects of BFO and CM-BFO on phagocytic ability of RAW264.7 cells

从图 9 可以看出,实验组均能明显提升细胞吞噬指数,有质量浓度依赖性但不明显,而吞噬能力提升是巨噬细胞发挥免疫调节作用的第一防御机制<sup>[28,30]</sup>。结果表明, BFO 及 CM-BFO 有可能通过提升巨噬细胞吞噬能力来发挥免疫调节作用。5 种 CM-BFO 中, CM-BFO-1、CM-BFO-2、CM-BFO-3、CM-BFO-4 提升细胞吞噬指数的能力均优于 BFO,其中 CM-BFO-3 最优,CM-BFO-5 略逊色于 BFO。随着 DS 的升高,CM-BFO 对 RAW264.7 细胞吞噬能力的提升呈先上升后下降的趋势。

2.3.3 BFO 及 CM-BFO 对 RAW264.7 细胞生成 NO 的影响

NO 是一种重要的信号转导分子,是免疫系统中重要的宿主防御效应物,在免疫调节过程中发挥重要作用,也是多糖免疫活性研究的重要指标<sup>[28]</sup>。图 10 为 BFO 及 CM-BFO 对 RAW264.7 细胞生成 NO 的影响,其中阳性对照组和空白组生成的 NO 浓度分别为 33.5、2.4 μmol/L。

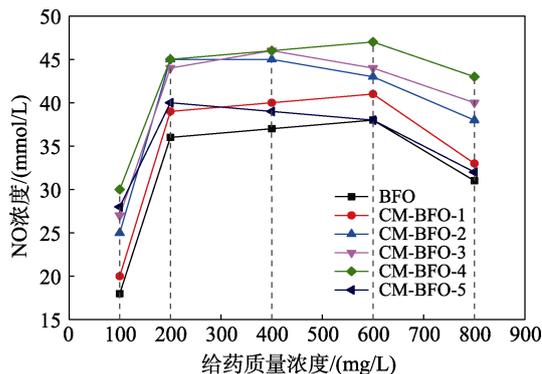


图 10 BFO 及 CM-BFO 对 RAW264.7 细胞生成 NO 的影响  
Fig. 10 Effects of BFO and CM-BFO on NO production in RAW264.7 cells

从图 10 可以看出,实验组均能明显提升 RAW264.7 细胞生成 NO,且 NO 浓度随给药质量浓度的增加均先增加后减少,说明 BFO 及 CM-BFO 生成有可能通过提升 RAW264.7 细胞生成 NO,进而发挥免疫调节作用。5 种 CM-BFO 提升 NO 生成能力均优于 BFO。其中,CM-BFO-2、CM-BFO-3、CM-BFO-4 改善较明显,CM-BFO-1、CM-BFO-5 的改善程度不太明显,随着 DS 的升高,CM-BFO 对 RAW264.7 细胞生成 NO 的提升同样呈先上升后下降的趋势。

以上研究表明, BFO 和 CM-BFO 均能明显增强 RAW264.7 细胞的免疫活性;与 BFO 对 RAW264.7 细胞的免疫活性相比,中度 DS 的 3 种 CM-BFO(DS 分别为 0.82、0.93 和 0.96)对 RAW264.7 细胞的免疫活性比 BFO 明显提升,而低 DS(0.73)和高 DS

(1.06) 的 CM-BFO 对 RAW264.7 细胞的免疫活性影响较小,说明多糖的生物活性与 DS 并非简单的正相关或者负相关的关系<sup>[30]</sup>,而是 CM-BFO 的免疫活性在一定范围内随着 DS 的升高呈先增强后减弱的趋势。

### 3 结论

(1) 采用水媒法对 BFO 进行羧甲基化化学修饰,反应条件不同得到的 CM-BFO 的 DS 也会有所不同,单因素和响应面实验结果显示,0.5 g BFO 用 30 mL 质量分数为 20% 的 NaOH 水溶液预先常温碱化处理 1 h,反应过程中氯乙酸的质量分数为 2.5% (30 mL)、反应温度 65 °C,反应时间 3.3 h,此时 DS 最高,为 1.06。FTIR、<sup>1</sup>HNMR 和 <sup>13</sup>CNMR 结果证实,BFO 的羧甲基化修饰成功。

(2) BFO 及不同 DS 的 CM-BFO 不仅均能明显提升 RAW264.7 细胞活性和吞噬能力,还能提升 RAW264.7 细胞生成 NO,说明 BFO 及其羧甲基化衍生物具有潜在的免疫活性,有进一步研究和开发的價值。

(3) 与 BFO 对 RAW264.7 细胞免疫活性相比,中度 DS (0.82、0.93 和 0.96) 的 3 种 CM-BFO 明显提升,而低 DS (0.73) 和高 DS (1.06) 的 CM-BFO 对 RAW264.7 细胞免疫活性影响较小,CM-BFO 的免疫活性在一定范围内随着 DS 的升高先增强后减弱。

### 参考文献:

- [1] LIU J Q, CHEN S M, ZHANG C M, *et al.* Abundant and diverse endophytic bacteria associated with medicinal plant *Arctium lappa* L. and their potential for host plant growth promoting[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiol*, 2022, 115(12): 1405-1420.
- [2] YUAN P C (袁平川), CHEN K S (陈靠山), LIU C Y (柳春燕), *et al.* On the extraction process and stability of burdock oligosaccharide[J]. *Journal of Wannan Medical College (皖南医学院学报)*, 2017, 36(5): 424-427.
- [3] DING M R, TANG Z Y, LIU W, *et al.* Burdock fructooligosaccharide attenuates high glucose-induced apoptosis and oxidative stress injury in renal tubular epithelial cells[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 12: 1-10.
- [4] ZHU L L (朱莉莉). The fresh-keeping mechanisms of plant-derived products burdock fructooligosaccharide (BFO) and *trans*-2-hexenal (E2H) on 'crimson seedless' grape (*Vitis vinifera* L.)[D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University (江西农业大学), 2013.
- [5] HAO L H (郝林华), CHEN L (陈磊), ZHONG N (仲娜), *et al.* Separation, purification and structure of burdock oligosaccharide[J]. *Journal of Chemistry in Colleges and Universities (高等学校化学学报)*, 2005, 26(7): 1242-1247.
- [6] YIN H, ZHAO X M, DU Y G. Oligochitosan: A plant diseases vaccine-A review[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2010, 82(1): 1-8.
- [7] GUO M R, CHEN K S, ZHANG P Y. Transcriptome profile analysis of resistance induced by burdock fructooligosaccharide in tobacco[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2012, 169(15): 1511-1519.
- [8] GUO Y L, GUO M R, ZHAO W L, *et al.* Burdock fructooligosaccharide induces stomatal closure in *Pisum sativum*[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 97(2): 731-735.
- [9] ZHANG P Y, WANG J C, LIU S H, *et al.* A novel burdock fructooligosaccharide induces changes in the production of salicylates, activates defence enzymes and induces systemic acquired resistance to *Colletotrichum orbiculare* in cucumber seedlings[J]. *Journal of Phytopathology*, 2009, 1574: 201-207.
- [10] WANG F D, FENG G H, CHEN K S. Burdock fructooligosaccharide induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco seedlings[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2010, 74(1): 34-40.
- [11] SUN F, ZHANG P Y, GUO M R, *et al.* Burdock fructooligosaccharide induces fungal resistance in postharvest Kyoho grapes by activating the salicylic acid-dependent pathway and inhibiting browning[J]. *Food Chemistry*, 2013, 138(1): 539-546.
- [12] SUN F, ZHU L L, WANG X C, *et al.* Sucrose transportation control mediates the fresh-keeping effects of burdock fructooligosaccharide in 'Crimson Seedless' grapes[J]. *Food Chemistry*, 2020, 332: 127437.
- [13] YANG Y X, WANG X, TAN F, *et al.* Burdock fructooligosaccharides inhibits postharvest colour development in grape skins by altering phenylpropanoid fluxes from anthocyanin to the resistance-related phenolic substances[J]. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 2019, 25(3): 307-315.
- [14] YUAN P C, SHAO T L, HAN J, *et al.* Burdock fructooligosaccharide as an  $\alpha$ -glucosidase inhibitor and its antidiabetic effect on high-fat diet and streptozotocin-induced diabetic mice[J]. *Journal of Functional Foods*, 2021, 86(12): 104703.
- [15] ZHANG X J, LIU S F, LU Y, *et al.* Immunomodulatory activity of a fructooligosaccharide isolated from burdock roots[J]. *RSC Advances*, 2019, 9(20): 11092-11100.
- [16] MONDAL S C, EUN J B. Mechanistic insights on burdock (*Arctium lappa* L.) extract effects on diabetes mellitus[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2022, 31(8): 999-1008.
- [17] XU Y, WU Y J, SUN P L, *et al.* Chemically modified polysaccharides: Synthesis, characterization, structure activity relationships of action [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 132: 970-977.
- [18] LIU X, XIE J H, JIA S, *et al.* Immunomodulatory effects of an acetylated *Cyclocarya paliurus* polysaccharide on murine macrophages RAW264.7[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 98: 576-581.
- [19] MA Y Q (马永强), ZHANG Y P (张一鹏), WANG X (王鑫), *et al.* Carboxymethylation modification of polygonatum polysaccharide and its antioxidant activity[J]. *China Food Additives (中国食品添加剂)*, 2023(6): 38-47.
- [20] YAO Q P (姚秋萍), WEI Y L (卫亚丽), YANG Q (杨琼), *et al.* Carboxymethylated modification and antioxidant activity of rape pollen polysaccharides[J]. *Food Research and Development (食品研究与开发)*, 2017, 38(17): 26-30.
- [21] ZHAO J Z (赵建志). Studies on the modification of Burdock oligosaccharide and biological activity[D]. Jinan: Shandong Institute of Light Industry (山东轻工业学院), 2011.
- [22] XU Y Q (徐雅琴), FU X T (付雪婷), WANG L B (王丽波), *et al.* Effects of acetylation modification on structural characteristics and bioactivities of polysaccharides from black currant[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2019, 36(12): 2467-2475.
- [23] RAO M R, WARRIER D U, GAIKWAD S R, *et al.* Phosphorylation of psyllium seed polysaccharide and its characterization[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 85: 317-326.
- [24] LIU Y T, YOU Y X, LI Y W, *et al.* Characterization of carboxymethylated polysaccharides from *Catathelasma ventricosum* and their antioxidant and antibacterial activities[J]. *Journal of Functional Foods*, 2017, 38: 355-362.