

叉分蓼多糖结构表征及其对脂多糖诱导RAW264.7细胞炎症的抑制作用

崔艳艳¹, 袁永旭¹, 郭明坤¹, 何文兵¹, 李 明¹, 裴世春^{1,2,*}, 李大军^{3,*}

(1. 通化师范学院食品科学与工程学院, 长白山食用植物资源开发工程中心, 抗体开发吉林省校企联合技术创新实验室, 吉林 通化 134002; 2. 吉林双正医疗科技有限公司, 吉林双正诊断用单克隆抗体科学家工作室, 吉林 通化 134001; 3. 吉林农业大学食品科学与工程学院, 吉林 长春 130118)

摘 要: 目的: 探究叉分蓼多糖 (*Polygonum divaricatum* L. polysaccharides, PSPDL) 体外抗炎活性及其作用机制。方法: 从叉分蓼中提取多糖, 采用高效凝胶渗透色谱、高效液相色谱、傅里叶变换红外光谱、X射线衍射、核磁共振波谱技术对其结构进行表征, 并通过脂多糖诱导RAW264.7细胞炎症模型评估其体外抗炎活性及其作用机制。结果: PSPDL的重均分子质量为59.475 kDa, 主要由甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖组成, 其物质的量比为1.69:4.95:1.04:21.79:19.01:31.68:19.84, 是含有(1→4)- α -D-Glcp的 α -吡喃型多糖; 能够抑制炎症因子的释放及其相关mRNA的表达, 改善氧化应激, 下调p38、p-p38、IkB- α 、p65和p-p65蛋白的表达水平。结论: PSPDL具有抗炎活性, 其作用机制可能与调节炎症相关mRNA表达, 调控丝裂原活化蛋白激酶/核转录因子 κ B信号通路相关, 本研究结果可为PSPDL资源的开发与应用提供科学依据。

关键词: 叉分蓼多糖; 脂多糖; RAW264.7细胞; 炎症; 丝裂原活化蛋白激酶/核转录因子 κ B信号通路

Structural Characterization of *Polygonum divaricatum* L. Polysaccharide and Its Inhibitory Effect on Lipopolysaccharide-Induced Inflammation in RAW264.7 Cells

CUI Yanyan¹, YUAN Yongxu¹, GUO Mingkun¹, HE Wenbing¹, LI Ming¹, PEI Shichun^{1,2,*}, LI Dajun^{3,*}

(1. Changbai Mountain Edible Plant Resources Development Engineering Center, Antibody Development Jilin Province University-Enterprise Joint Technology Innovation Labs, Food Science and Engineering, Tonghua Normal University, Tonghua 134002, China; 2. Jilin Shuangzheng Diagnostic Monoclonal Antibody Scientist Studio, Jilin Surge Medical Technology Co. Ltd., Tonghua 134001, China; 3. School of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: Objective: To explore the *in vitro* anti-inflammatory activity and action mechanism of a polysaccharide extracted from *Polygonum divaricatum* L. (PSPDL). Methods: The structure of PSPDL was characterized using high-performance gel permeation chromatography (HPGPC), high-performance liquid chromatography (HPLC), Fourier transform-infrared spectroscopy (FT-IR), X-ray diffraction (XRD), and nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR). The *in vitro* anti-inflammatory activity and action mechanism of PSPDL were investigated in lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW264.7 cells. Results: PSPDL had a relative molecular mass of 59.475 kDa and consisted mainly of mannose (Man), rhamnose (Rha), glucuronic acid (GlcA), galacturonic acid (GalA), glucose (Glc), galactose (Gal), and arabinose (Ara), with a molar ratio of 1.69:4.95:1.04:21.79:19.01:31.68:19.84. PSPDL was an α -pyran polysaccharide containing (1→4)- α -D-Glcp linkage. PSPDL inhibited the release of inflammatory factors and related gene mRNA expression, ameliorated oxidative stress, down-regulated the protein expression levels of p38, p-p38, IkB- α , p65, and p-p65. Conclusion: PSPDL exhibited

收稿日期: 2024-04-17

基金项目: “十三五”国家重点研发计划“科技助力经济2020”重点专项(SQ2020YFF0407692-2020);

吉林省科技厅项目(YDZL202201ZYTS664); 吉林省教育厅科学研究项目(JJKH20230594)

第一作者简介: 崔艳艳(1993—)(ORCID: 0009-0001-2848-0128), 女, 实验师, 硕士, 研究方向为天然活性成分的提取与应用。E-mail: 1830574266@qq.com

*通信作者简介: 裴世春(1966—)(ORCID: 0009-0001-0509-9826), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品卫生与安全。

E-mail: peishichun@thnu.edu.cn

李大军(1967—)(ORCID: 0009-0007-5188-4343), 男, 教授, 博士, 研究方向为真菌多糖、氨基葡聚糖的抗感染、保健、养颜功能。E-mail: lidajunfeed@sina.com

anti-inflammatory activity, perhaps by regulating inflammatory mRNA expression and modulating the mitogen-activated protein kinases/nuclear factor kappa B (MAPK/NF- κ B) signaling pathway. This finding provides a scientific basis for the development and utilization of PSPDL resources.

Keywords: *Polygonum divaricatum* L. polysaccharide; lipopolysaccharide; RAW264.7 cells; inflammation; mitogen-activated protein kinases/nuclear factor kappa B signaling pathway

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240417-166

中图分类号: TS201.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2024) 24-0128-11

引文格式:

崔艳艳, 袁永旭, 郭明坤, 等. 叉分蓼多糖结构表征及其对脂多糖诱导RAW264.7细胞炎症的抑制作用[J]. 食品科学, 2024, 45(24): 128-138. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240417-166. <http://www.spkx.net.cn>

CUI Yanyan, YUAN Yongxu, GUO Mingkun, et al. Structural characterization of *Polygonum divaricatum* L. polysaccharide and its inhibitory effect on lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW264.7 cells[J]. Food Science, 2024, 45(24): 128-138. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240417-166. <http://www.spkx.net.cn>

叉分蓼 (*Polygonum divaricatum* L.) 属于蓼科 (Polygonaceae) 蓼属 (*Polygonum*) 草本植物, 别称酸不溜、酸(姜)浆、叉枝蓼、分枝蓼、泥阿劳、大骨节蓼吊等, 遍布我国各地, 资源极其丰富^[1]。其嫩茎味甘微酸, 是民间喜食的一种野菜, 干燥全草可入药, 具有温肾、消积、清热止血、止泻等功效, 常被用来治疗肠炎、痢疾、腹泻等疾病, 是蒙古族常用药材^[2-3]。先前的研究已评估了叉分蓼的体内安全性, 未见急性毒性与短期毒性, 从内蒙古地区叉分蓼全草中分离鉴定出25种单体化合物, 主要为酚酸类化合物和黄酮类化合物^[4-5]; 段超慧^[6]利用人乳腺癌MDA-MB-231细胞模型证实了叉分蓼总黄酮具有较好的体外抗肿瘤活性; 董丽华^[7]通过2,4,6-三硝基苯磺酸/乙醇诱导大鼠溃疡性结肠炎模型阐明了叉分蓼总提取物对溃疡性结肠炎的治疗作用机制。综上, 叉分蓼作为不同疾病的替代性和补充性治疗药用植物, 已经引起了科研工作者的极大兴趣。

炎症是免疫系统的一种适应性反应, 可由病原体、受损细胞和外源性刺激等多种因素触发, 在宿主防御系统中起核心作用, 能够平衡体内稳态^[8]。然而, 过度的炎症会对机体产生负面影响, 甚至介导癌症、动脉粥样硬化、哮喘、糖尿病等众多疾病的恶化^[9]。多糖作为构成生命的四大基本物质之一, 参与众多重要的生命过程。近年来, 多糖在抗炎作用方面发挥显著功效的相关研究时有报道: Huang Yaoguang等^[10]从土茯苓中提取多糖, 通过核转录因子 κ B (nuclear factor kappa B, NF- κ B) 信号通路调控减轻脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 刺激RAW264.7细胞的炎症损伤; 郑雅君等^[11]研究发现琼胶寡糖能够抑制LPS诱导RAW264.7炎症反应。鉴于多糖潜在的营养和药理益处, 本实验以叉分蓼为原料, 提取纯化制得叉分蓼多糖 (*Polygonum divaricatum* L. polysaccharide, PSPDL), 通过高效凝胶渗透色谱 (high

performance gel-permeation chromatography, HPGPC)、高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC)、X射线衍射 (X-ray diffraction, XRD)、核磁共振波谱 (nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR) 仪对其结构进行表征, 利用LPS诱导RAW264.7细胞炎症模型探究其体外抗炎活性, 并从基因和蛋白调控水平探讨其作用机制, 以期为PSPDL功能食品及药物的开发与利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

野生叉分蓼全草采摘自吉林通化市地区 (东经125°10'~126°44', 北纬40°52'~43°3'), 经通化师范学院植物学教师确认后, 清洗、晾干、粉碎成粉, 备用。

三氟乙酸 (trifluoroacetic acid, TFA) (色谱级) 国药集团化学试剂有限公司; 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS)、DMEM高糖培养基、胎牛血清、0.25%胰酶-乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) 美国Gibco公司; LPS、噻唑蓝 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)、二甲基亚砷 (dimethylsulfoxide, DMSO) 北京索莱宝科技有限公司; NO、诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS)、环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 南京建成生物工程研究所; 白细胞介素1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor, TNF- α) 测定试剂盒 上海酶联生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

LC-1260型HPLC仪 美国Agilent公司; XRD-7000型XRD仪 日本Shimadzu公司; AVANCE III NMR仪

德国Bruker公司; 3111型CO₂培养箱、NanoDrop2000超微量分光光度计、全波长酶标仪 美国Thermo Fisher Scientific公司; HR30-IIA2生物安全柜 海尔智家股份有限公司; Infinite F200 PRO荧光酶标仪 瑞士Tecan公司; CFX荧光定量聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)仪 美国Bio-Rad公司; CKX41荧光倒置显微镜 奥林巴斯(中国)有限公司。

1.3 方法

1.3.1 PSPDL制备

按照本课题组前期研究的方法^[12]提取PSPDL。利用大孔吸附树脂脱色, 采用Sevag法脱蛋白, DEAE-52和Sephadex G-100柱层析分离纯化, 通过透析袋除盐、核酸以及小分子糖类, 浓缩冻干。

1.3.2 PSPDL结构表征

1.3.2.1 分子质量测定

采用HPGPC技术测定PSPDL的分子质量^[13]。分别将系列葡聚糖标准品和PSPDL溶解于蒸馏水中配制成质量浓度为5 mg/mL的溶液, 经0.22 μm滤膜过滤, 利用配备Ultrasphere色谱柱(300 mm×7.8 mm, 6 μm)和2414示差折光检测器的HPLC系统进行测定。流动相为0.02 mol/L KH₂PO₄溶液, 流速为0.6 mL/min, 柱温设置为40 ℃。

1.3.2.2 单糖组成测定

参照文献[14]采用1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone, PMP)衍生HPLC法测定单糖组成。多糖的水解: 称取10~20 mg PSPDL加入2 mol/L TFA溶液, 于100 ℃烘箱中水解2 h, 冷却后取1 mL加入少量甲醇, 70 ℃水浴条件下用氮气吹干, 重复2次以去除TFA, 最后加入1 mL 0.3 mol/L NaOH溶液使其完全溶解。衍生化: 将400 μL的混合单糖标准液或多糖水溶液与等体积PMP-甲醇溶液混匀, 置于70 ℃热水中反应2 h, 冷却后加入400 μL 0.3 mol/L HCl溶液中和(pH 6~7), 加水1.2 mL, 再加等体积的三氯甲烷, 漩涡混匀静置, 弃去有机相, 萃取2次, 经0.45 μm水系微孔膜过滤后供配备GraceSmart RP18色谱柱的HPLC仪进行分析。通过保留时间定性, 确定单糖成分; 根据校准曲线与峰面积计算单糖含量。

1.3.2.3 傅里叶变换红外光谱(Fourier transform-infrared spectroscopy, FT-IR)测定

将1~2 mg PSPDL样品和100 mg 溴化钾混合研磨。碾磨充分后压片放入样品槽, 用FT-IR仪在4 000~400 cm⁻¹波数范围内进行扫描分析。

1.3.2.4 XRD测定

参照Jiang Lian等^[15]的方法。采用XRD仪在室温条件

下测定5°~70°(2θ)范围内PSPDL的晶体结构, Cu-Kα辐射波长为0.154 06 nm, 步长和速率分别为0.01°和1°/min。

1.3.2.5 NMR谱图测定

将50 mg PSPDL溶解于1.0 mL D₂O中, 用NMR仪对其进行¹H和¹³C谱分析。

1.3.3 细胞培养与传代

将复苏好的RAW264.7细胞装入无菌培养瓶中, 加入含有10%胎牛血清和1%双抗(链霉素和青霉素)的DMEM高糖培养基, 置于含5% CO₂的37 ℃细胞培养箱中培养, 定期更换培养液, 观察细胞生长情况。当细胞生长至一定时间吸出原培养液, 用0.25%胰蛋白酶和0.01% EDTA消化, 在显微镜下观察细胞的消化状态, 然后加入PBS洗涤, 离心后弃上清液, 最后接种到培养皿中继续培养, 取对数生长期细胞进行实验。

1.3.4 细胞活力测定

为了评估PSPDL的细胞毒性并确定其后续作用细胞的浓度, 将RAW264.7细胞(10⁵个/孔)接种到96孔板中, 并在37 ℃、含5% CO₂环境中培养24 h。然后, 加入不同质量浓度的PSPDL溶液(3.125、6.25、12.5、25、50、100、200、400、800 μg/mL)处理24 h。最后, 加入5 mg/mL MTT再孵育4 h。孵育后去除培养基并将DMSO添加到每个孔中, 混合均匀并使用酶标仪在490 nm波长处测量吸光度, 以未加PSPDL溶液的细胞为对照组, 计算细胞存活率。

参考Sun Yani等^[16]的方法, 通过MTT法评估了不同质量浓度PSPDL对LPS诱导细胞炎症的抑制作用。RAW264.7细胞在96孔板中孵育24 h后, 依次用不同质量浓度的PSPDL(3.125~800 μg/mL)和LPS(1 μg/mL)作用24 h。然后加入MTT(5 mg/mL)再孵育4 h。孵育后去除培养基, 并将DMSO添加到每个孔中, 混合均匀并在490 nm波长处测量每个孔的吸光度, 以未加PSPDL和LPS的细胞为对照组, 计算细胞存活率。

1.3.5 炎症相关因子的测定

将RAW264.7细胞在6孔板(10⁵个细胞/mL)中孵育24 h, 再分别用12.5、50、200 μg/mL PSPDL作用24 h, 吸出原始培养基, 用LPS(1 μg/mL)诱导24 h。收集细胞与细胞上清液, 按照试剂盒说明书检测细胞上清液的NO含量和细胞中IL-1β、IL-6、TNF-α含量。细胞中*iNOS*、*COX-2*、*IL-1β*、*IL-6*和*TNF-α* mRNA的表达水平由SYBR Green荧光定量PCR仪进行测定, mRNA相对表达量利用2^{-ΔΔCt}法计算, 所用引物由武汉赛维尔生物科技有限公司提供, 详细引物序列见表1。

表 1 荧光定量PCR引物序列		
Table 1 Primer sequences used for qPCR		
基因	引物序列 (5'-3')	长度/bp
<i>iNOS</i>	F: CAACAGGAACCTACCAGUTCACCT	253
	R: AGUCTGAAGTCATGTTTGUCG	
<i>COX-2</i>	F: GAAATATCAGGTCATTGGTGAGAGA	205
	R: ATGUTCCTGUTTGAGTATGTCG	
<i>IL-1β</i>	F: AGGUTCCGAGATGAACAACAAA	206
	R: GTGUCGTCCTTCATTACACAGGA	
<i>IL-6</i>	F: CCCCAATTTCGAATGUTCTCC	141
	R: CGUACTAGGTTTGUCGAGTA	
<i>TNF-α</i>	F: CTCTTCTGTCTACTGAACTTCGGG	112
	R: GGTGGTTTGTGAGTGTGAGGGT	
<i>GAPDH</i>	F: CCTCGTCCCGTAGACAAAATG	133
	R: TGAGGTCAATGAAGGGGTCGT	

1.3.6 氧化应激水平的测定

细胞孵育与处理同1.3.4节，利用荧光倒置显微镜观察不同质量浓度PSPDL处理的细胞内活性氧（reactive oxygen species, ROS）荧光图像，探究其对细胞内ROS的清除能力，此外，采用荧光酶标仪测定细胞中ROS水平，按照试剂盒说明书检测细胞中超氧化物歧化酶（superoxide dismutase, SOD）、谷胱甘肽（glutathione, GSH）、丙二醛（malondialdehyde, MDA）以及细胞上清液乳酸脱氢酶（lactatedehydrogenase, LDH）的水平。

1.3.7 炎症相关蛋白表达水平测定

采用蛋白免疫印迹法检测NF-κB信号通路相关蛋白p38、p-p38、p65、p-p65和IκB-α的表达水平。使用含有蛋白酶抑制剂的RIPA裂解物在冰上裂解细胞30 min。完全裂解后在4℃、12 000 r/min条件下离心10 min，收集上清液，即得细胞的总蛋白溶液。用BCA蛋白检测试剂盒测定总蛋白质量浓度后，通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白样品并转移到0.45 μm聚偏二氟乙烯膜上。将膜置于含有脱脂奶的孵育槽中，室温密封30 min。根据抗体说明书将一级抗体在4℃摇床中孵育过夜，并将辣根过氧化物酶标记的二级抗体孵育30 min。最后用含Tween-20的Tris缓冲液洗涤3次，使用ECL检测试剂盒进行测定和凝胶成像分析。

1.4 数据统计分析

所有测试重复3次，数据结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用GraphPad Prism 8.02软件中的One-way ANOVA对数据进行统计比较，同时用该软件绘图。

2 结果与分析

2.1 PSPDL提取与纯化

采用水提醇沉法从叉分蓼中提取得到粗多糖，总糖质量分数为（20.24±1.05）%。经脱色和除蛋

白等杂质后，通过DEAE-52柱纯化获得3个多糖级分，分别为P-1、P-2和P-3（图1A），其总糖质量分数分别为（56.71±2.18）%、（15.88±0.63）%和（13.47±0.62）%。将P-1组分再用Sephadex G-100柱纯化，洗脱曲线见图1B，其总糖质量分数为（80.32±2.60）%，进一步透析冻干得到PSPDL。

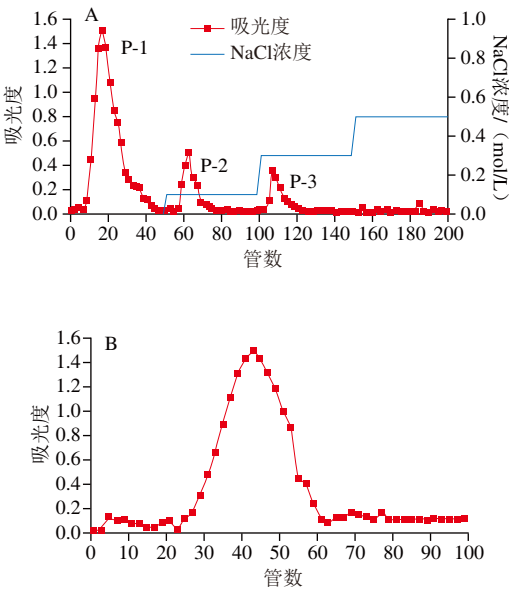


图 1 粗多糖在DEAE-52柱上的梯度洗脱曲线（A）以及P-1级分在Sephadex G-100柱上的洗脱曲线（B）

Fig. 1 Gradient elution curve of crude polysaccharides on DEAE-52 cellulose column (A) and elution curve of fraction P-1 on Sephadex G-100 column (B)

2.2 PSPDL结构表征

2.2.1 分子质量

图2A显示了唯一的对称峰，表明PSPDL是一种均匀的多糖，重均分子质量为59.475 kDa，数均分子质量为124.649 kDa，峰值分子质量为102.006 kDa，多分散系数约为2.10。虎杖、何首乌与叉分蓼同属于蓼科植物，具有重要的研究与应用价值，晏红^[17]从虎杖中提取酸性多糖，其重均分子质量为134.45 kDa；Fan Jing等^[18]从何首乌中分离出的多糖重均分子质量为245.30 kDa。分子质量作为多糖的一个重要特征指标与其生物活性紧密相关，分子质量较高的多糖水溶性较差，形成的溶液黏度较高，不利于体内吸收利用，限制其生物活性发挥^[19]；而多糖分子质量较低时分子内氢键作用较弱，会有更多的游离氨基和羟基，有利于发挥活性作用^[20-21]。Zheng Qiaoran等^[22]研究证实，分子质量较小的氧化魔芋葡甘露聚糖对LPS诱导的RAW264.7细胞表现出较强的抗炎作用。

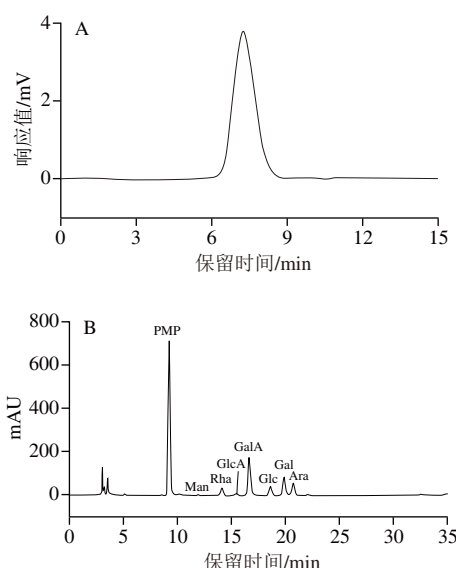


图2 PSPDL的相对分子质量(A)与单糖组成(B)
Fig. 2 Relative molecular mass (A) and monosaccharide composition (B) of PSPDL

2.2.2 单糖组成

如图2B所示, PSPDL单糖组成包括甘露糖(mannose, Man)、鼠李糖(rhamnose, Rha)、葡萄糖醛酸(glucuronic acid, GlcA)、半乳糖醛酸(galacturonic acid, GalA)、葡萄糖(glucose, Glc)、半乳糖(galactose, Gal)、阿拉伯糖(arabinose, Ara), 物质的量比为1.69:4.95:1.04:21.79:19.01:31.68:19.84。单糖组成的种类及含量是表征多糖结构的重要参数, 不同植物多糖的单糖组成、含量不同。叉分蓼同属植物辣蓼由Man、Rha、GlcA、Gal、Glc、Ara 6种单糖组成^[23]; Gou Yan等^[24]的研究表明何首乌多糖单糖组成包括Man、Rha、GalA、Glc、Gal、Ara; 虎杖多糖由Rha、GlcA、GalA、Glc、Gal、Ara多种单糖组成^[17]。一般而言, GalA含量越高, 多糖的生物活性越强^[25]。

2.2.3 FT-IR和XRD分析

如图3A所示, PSPDL在3 200~3 400 cm^{-1} 范围内出现一个强吸收峰, 它是由分子间或分子内氢键—OH引起的吸收峰; 2 900 cm^{-1} 附近出现的吸收峰是由游离糖C—H伸缩振动引起^[26], 1 713 cm^{-1} 处的峰为—COOH伸缩振动吸收峰, 1 641 cm^{-1} 是由C=O反对称伸缩振动引起的吸收峰; 1 300~1 400 cm^{-1} 处为C—H弯曲振动吸收峰^[27]; 1 000~1 200 cm^{-1} 区域的吸收峰为多糖C—OH与C—O—C的特征峰^[28]; 844 cm^{-1} 处的吸收峰说明单糖分子间存在 α -糖苷键^[29]。如图3B所示, 在20°和30° (2 θ)附近显示出不同的尖锐和窄峰, 而在其他2 θ 范围内未观察到峰, 这表明PSPDL结构中存在无定形和结晶区域(半结晶结构), 其溶解度和吸水率较高, 是可溶性支链聚合物^[30]。

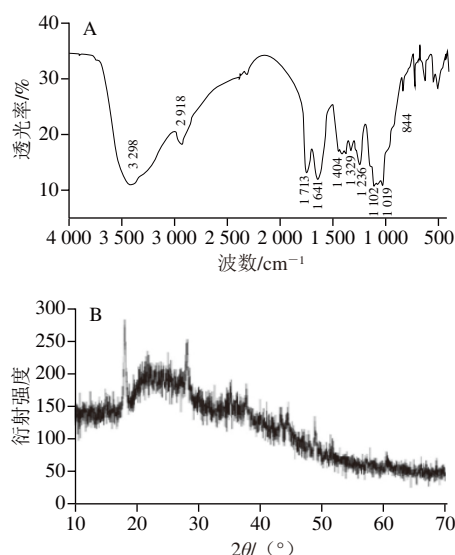
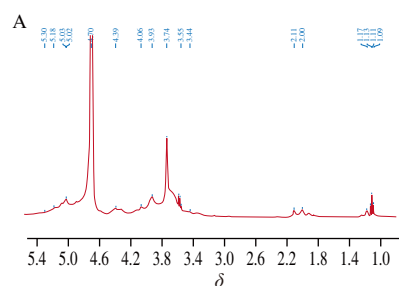
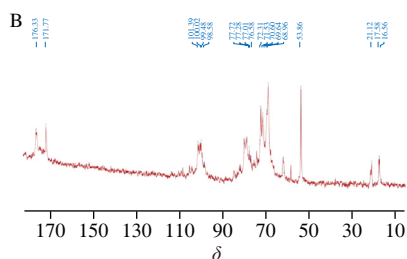


图3 PSPDL的FT-IR (A)与XRD (B)分析
Fig. 3 FT-IR (A) and XRD (B) spectra of PSPDL

2.2.4 NMR分析

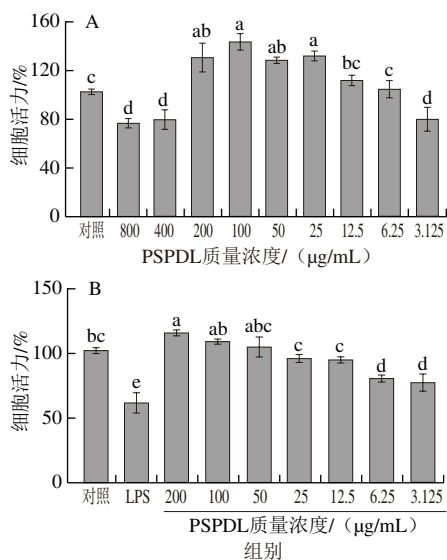
如图4A所示, δ 4.70处的最强信号是由溶剂 D_2O 引起, δ 5.4附近没有信号, 说明PSPDL是一种吡喃多糖^[31]; δ 5.30和 δ 5.18处的信号推测分别为GlcA和 α -D-Manp的异头氢信号^[32]; δ 5.03处的信号对应 α -D-GlcA的末端氢^[31-33]; δ 5.02处的信号表示Manp存在^[34]; δ 4.39处的信号推测是Galp的异头氢信号^[27,32]。 δ 4.06~3.61和 δ 3.44处的信号分别分配给GlcA的H-2、H-3、H-4、H-5和H-6特征峰^[29]。与之对应的 ^{13}C NMR谱中 δ 76.58、 δ 73.4~69.4以及 δ 16.56处的峰分别为GlcA的C-2、C-3、C-5、C-6信号峰^[29,33,35]。 δ 3.74的强信号来自 β -GalAp中与—COOH结合的一 CH_3 ^[27], δ 1.17和 δ 1.1附近的峰来自Rha α 中— CH_3 的质子共振, ^{13}C NMR谱中相应共振峰在 δ 17.58处。 ^{13}C NMR谱中 δ 171.77的信号来自GlcA中与— CH_3 结合的C-6羧基碳^[27]; δ 101.59的信号推测是 α -D-Galp或 α -D-Manp中的C-1信号^[27,33,36]; δ 82~88范围内未显示碳信号, 表明PSPDL的糖残基为吡喃型^[27,32]; δ 77.7、 δ 77.1和 δ 76.9处的信号被分配给GlcA的糖苷, 可能是C-3或C-4糖苷^[35], 此外, δ 100.0和 δ 99.6处存在典型(1 \rightarrow 4)- α -D-GlcA的末端碳信号^[35], 以及 δ 98.6分配给 α -D-GlcA的末端碳信号^[34], 证实了(1 \rightarrow 4)- α -D-GlcA的存在。



图4 PSPDL的¹H NMR谱图 (A) 和¹³C NMR谱图 (B)Fig. 4 ¹H NMR (A) and ¹³C NMR (B) spectra of PSPDL

2.3 PSPDL对RAW264.7细胞活力影响

如图5A所示, 与对照组相比, PSPDL质量浓度低于400 μg/mL时, RAW264.7细胞活力较高, 当PSPDL质量浓度为400、800 μg/mL时, RAW264.7细胞活力显著降低 ($P<0.05$)。如图5B所示, 加入LPS共同作用后, LPS组的RAW264.7细胞活力明显低于空白组 ($P<0.05$), 说明LPS成功诱导了细胞炎症。与LPS组相比, PSPDL组细胞活力显著升高 ($P<0.05$), 说明不同质量浓度 (3.125~200 μg/mL) PSPDL对RAW264.7细胞具有良好的保护作用。因此, 选择12.5、50、200 μg/mL质量浓度的PSPDL进行后续细胞实验。



A. PSPDL对RAW264.7细胞的毒性; B. PSPDL对LPS诱导细胞炎症的抑制作用。不同字母表示组间差异显著 ($P<0.05$), 图6~8同。

图5 PSPDL对RAW264.7细胞活力的影响

Fig. 5 Effect of PSPDL on RAW264.7 cell viability

2.4 PSPDL对RAW264.7细胞炎症因子的影响

2.4.1 炎症因子含量

如图6所示, 与对照组相比, LPS组中的NO、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平显著增加 ($P<0.05$)。相反, 与LPS组相比, 12.5、50、200 μg/mL PSPDL显著降低了细胞中NO、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平 ($P<0.05$)。说明PSPDL预处理可以抑制LPS诱导的RAW264.7细胞中NO、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的分泌。

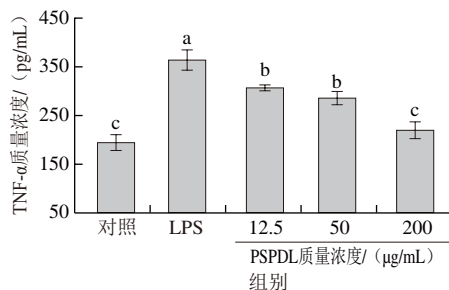
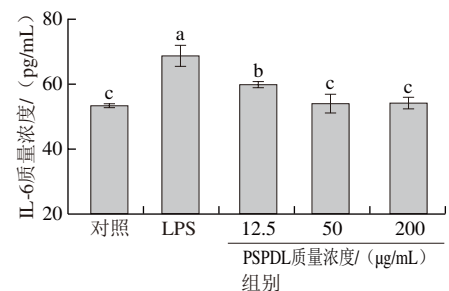
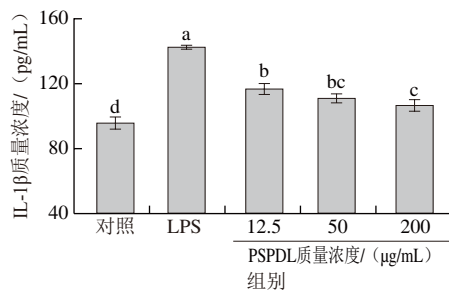
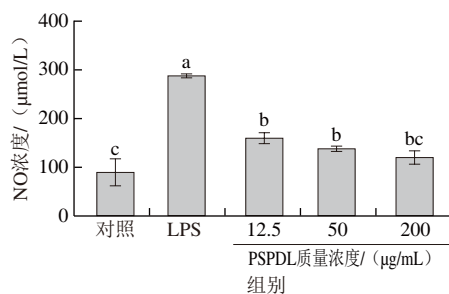
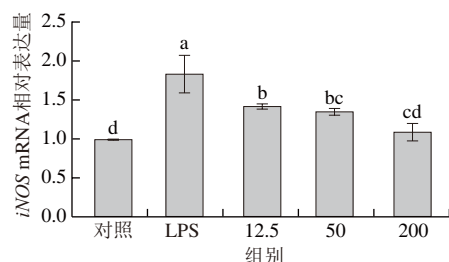


图6 PSPDL对RAW264.7细胞炎症因子的影响

Fig. 6 Effect of PSPDL on NO and inflammatory cytokines in RAW264.7 cells

2.4.2 细胞炎症相关mRNA表达水平

如图7所示, 与对照组相比, LPS能显著提高RAW264.7细胞中*iNOS*、*COX-2*、*IL-1 β* 、*IL-6*以及*TNF- α* 的mRNA相对表达水平 ($P<0.05$); 与LPS组相比, PSPDL能降低这些炎症相关基因的表达水平。



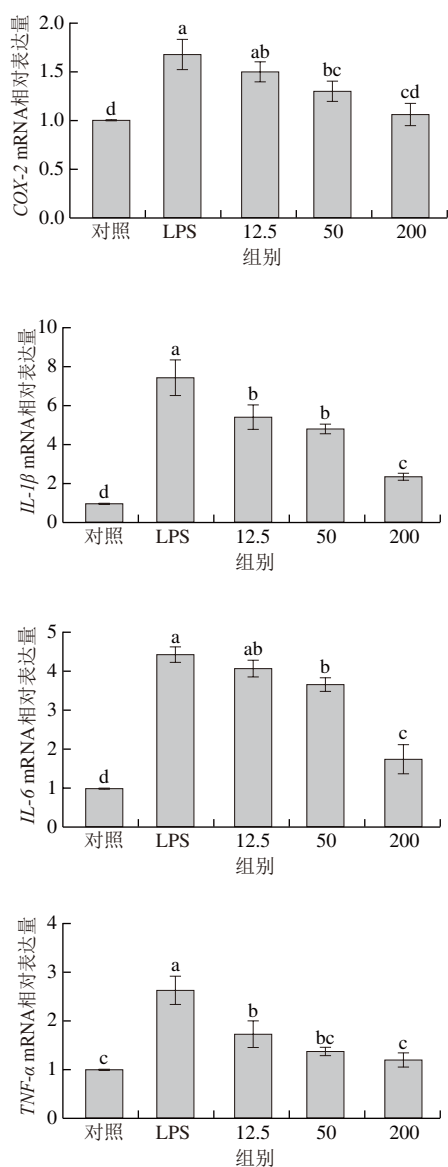


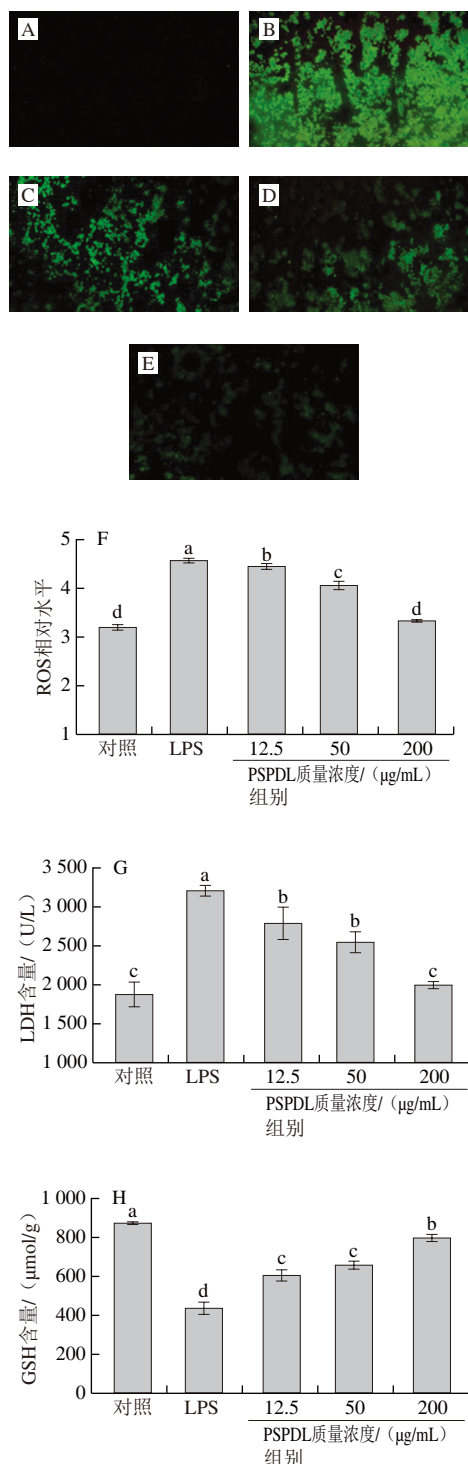
图7 PSPDL对RAW264.7细胞炎症相关基因表达水平的影响

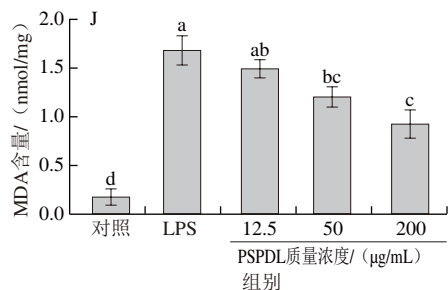
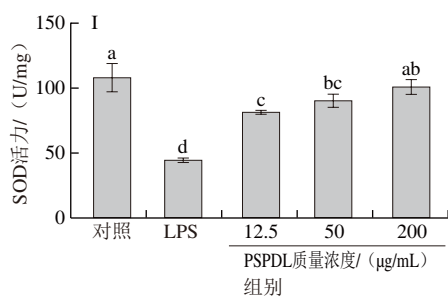
Fig. 7 Effect of PSPDL on the expression of inflammation-related genes in RAW264.7 cells

2.5 PSPDL对RAW264.7细胞氧化应激相关指标影响

炎症和氧化应激是互相影响的，炎症促进ROS的产生，细胞中ROS的异常产生进一步导致氧化应激，进而加剧炎症反应。上述结果表明LPS诱导RAW264.7细胞产生了炎症反应，相应的氧化应激结果如图8所示。图8A~E细胞内ROS荧光图像显示，PSPDL能有效清除细胞内ROS。如图8F所示，与对照组相比，LPS诱导细胞ROS水平显著升高 ($P < 0.05$)，不同质量浓度 (12.5、50、200 $\mu\text{g/mL}$) PSPDL均能显著降低ROS水平 ($P < 0.05$)，且呈剂量依赖性。如图8G所示，与对照组相比，LPS诱导细胞损伤产生大量LDH；与LPS组相比，PSPDL可以抑制细胞中LDH的产生 ($P < 0.05$)。

如图8H、I所示，与对照组相比，LPS诱导可显著降低细胞中GSH和SOD水平 ($P < 0.05$)，而PSPDL能够抑制GSH和SOD水平的下降趋势，尤其是200 $\mu\text{g/mL}$ 的PSPDL，与LPS组相比显著增加了细胞中GSH和SOD含量 ($P < 0.05$)。如图8J所示，PSPDL对RAW264.7细胞中MDA含量的影响趋势同ROS一致，LPS作用可显著促进细胞中MDA的生成 ($P < 0.05$)，而PSPDL呈剂量依赖性抑制MDA的生成。





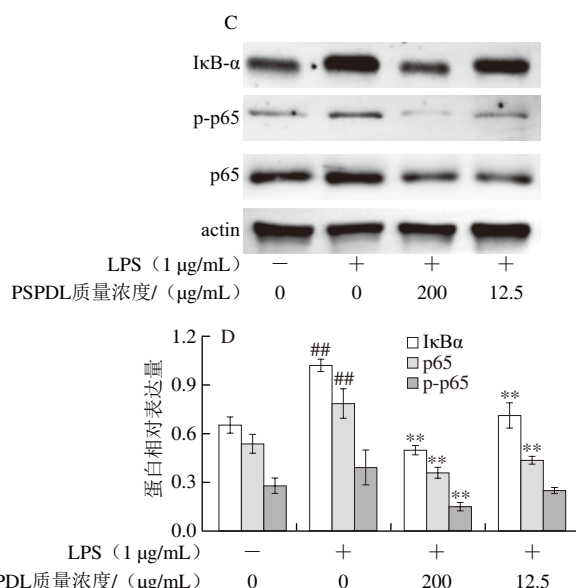
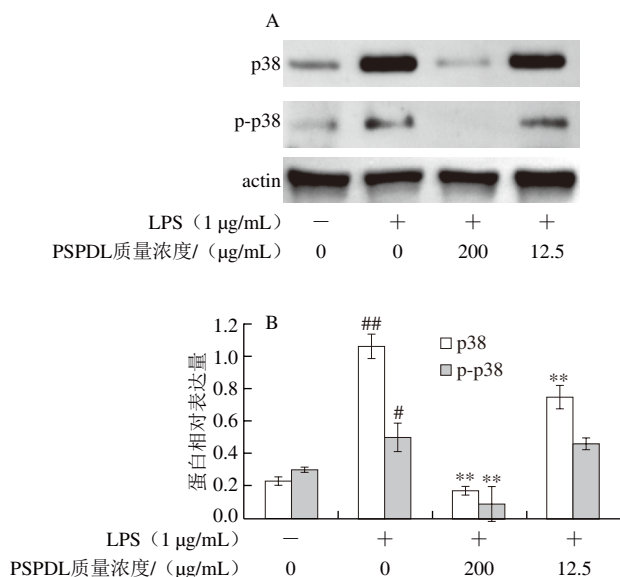
A~E. 分别为对照组、LPS组、12.5 $\mu\text{g/mL}$ PSPDL组、50 $\mu\text{g/mL}$ PSPDL组、200 $\mu\text{g/mL}$ PSPDL组细胞内ROS荧光图像；F~J. 分别为ROS、LDH、GSH、SOD、MDA水平。

图8 PSPDL对RAW264.7细胞氧化应激相关指标的影响

Fig. 8 Effect of PSPDL on oxidative stress-related indexes in RAW264.7 cells

2.6 PSPDL对RAW264.7细胞丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)/NF- κ B信号通路相关蛋白表达影响

胞中MAPK/NF- κ B信号通路相关蛋白(p38、p-p38、p-I κ B- α 、p65、p-p65)的表达水平测定结果如图9所示。与对照组相比，LPS处理可导致除p-p65外的蛋白表达水平显著升高($P<0.05$)，而PSPDL则调节蛋白表达水平下降，其中200 $\mu\text{g/mL}$ PSPDL的抑制效果尤为显著。



A、B. 分别为MAPK信号通路相关蛋白条带及其表达水平图；C、D. 分别为NF- κ B信号通路相关蛋白条带及其表达水平图。#、##. 分别为与对照组相比，差异显著($P<0.05$)、差异极显著($P<0.01$)；*、**. 分别为与LPS组相比，差异显著($P<0.05$)、差异极显著($P<0.01$)。

图9 PSPDL对RAW264.7细胞MAPK/NF- κ B信号通路相关蛋白表达水平的影响

Fig. 9 Effect of PSPDL on the expression of MAPK/NF- κ B signaling pathway-related proteins in RAW264.7 cells

3 讨论

本研究旨在揭示PSPDL对LPS诱导的RAW264.7细胞炎症反应的抑制作用，测定了LPS刺激的RAW264.7细胞中炎症因子含量、炎症相关基因表达水平、氧化应激指标变化水平以及MAPK/NF- κ B信号通路相关蛋白的表达水平。炎症是生物体抵抗有害刺激的防御反应，RAW264.7细胞被广泛用作抗炎功效的体外模型^[37]。据报道，LPS刺激的RAW264.7细胞分泌大量NO、细胞因子(例如IL-1 β 、IL-6和TNF- α)和其他介质，这些介质抵抗感染性病原体的入侵以抑制炎症。NO、IL-1 β 、IL-6和TNF- α 广泛存在于生物体各种组织和器官中，可以在细胞内或细胞间传递信息，是一种新型的生物信使分子，在机体的各种生理、病理活动中发挥着不可替代的作用^[38]。LPS刺激RAW264.7细胞产生的IL-1 β 、IL-6和TNF- α 被认为是促进炎症反应最重要的细胞因子，可导致急性炎症性疾病和组织损伤^[39]。因此，抑制促炎细胞因子IL-1 β 、IL-6和TNF- α 的表达可以减轻炎症反应，也是预防或治疗炎症相关疾病的重要策略^[40-41]。另一方面，细胞培养基中NO的产生被认为是评估细胞活化最可靠的方法之一，活化细胞中*iNOS* mRNA的表达会促使NO过度产生，从而导致多种炎症性免疫疾病，包括败血症和关节炎^[42]。同时，当细胞受到炎症等刺激时，原本正常细

胞中活性极低的COX-2 mRNA表达水平上升,加重炎症反应和组织损伤。重要的是,NF- κ B是调控炎症介质的因子,其转位参与iNOS和COX-2的表达^[43]。因此,上述炎症因子通常被用作炎症标志物反映测试样品的抗炎作用。研究发现,PSPDL可通过抑制RAW264.7细胞中iNOS、COX-2、IL-1 β 、IL-6以及TNF- α mRNA的表达降低NO、IL-1 β 、IL-6和TNF- α 的产生,从而缓解LPS诱导的炎症反应。

此外,ROS是生物系统中氧代谢所产生的化学活性含氧分子,主要包括超氧阴离子、羟自由基、过氧化氢等,也可以通过调控促炎因子基因组表达刺激炎症反应^[44]。ROS的积累会导致氧化应激,从而使细胞主要成分(脂质、蛋白质和DNA)衰老^[45],MDA是脂质过氧化的典型反映指标。抗氧化防御系统通过限制ROS的破坏作用为生物系统提供关键防御,例如抗氧化酶SOD^[46]。另外,酶促抗氧化剂GSH在维持正常ROS水平方面也起着重要作用^[47]。因此,过度的ROS产生可能是导致炎症反应的主要因素之一,而适当清除ROS则有利于缓解炎症反应。本研究结果表明,PSPDL降低了ROS、LDH及MDA的产生,提高了GSH与SOD的水平,抑制氧化应激,缓解炎症反应。

MAPK/NF- κ B信号通路是炎症调节的重要控制中心,也是治疗各种炎症疾病的重要靶点。MAPKs(JNK1/2、ERK1/2和p38MAPK)在调节细胞对细胞因子的反应中发挥着关键作用。Chu Qiang等^[29]研究表明,LPS对MAPKs的磷酸化与iNOS和COX-2以及炎症介质、促炎细胞因子的激活有关,MAPK/NF- κ B信号通路的抑制减轻了LPS诱导的RAW264.7细胞炎症。此外,氧化应激可介导I κ B- α 磷酸化和降解并导致NF- κ B异二聚体(p65)的磷酸化,进而导致核易位活性增强。NF- κ B易位到细胞核中触发促炎细胞因子(如TNF- α 和IL-6)和酶(如iNOS和COX-2)的转录激活,从而诱导炎症^[48]。研究表明,PSPDL预处理能够下调p38、p-p38、p-I κ B- α 、p65、p-p65的蛋白表达水平。

多糖的复杂结构与生物活性联系密切,其单糖组成种类及物质的量比例、相对分子质量、糖苷键类型均对生物活性有不同程度的影响^[49]。研究表明,单糖组成中糖醛酸有利于多糖结构中的寡糖片段形成“活性中心”,能明显影响多糖的活性^[25,50]。糖醛酸含量较高的铁皮石斛多糖发挥出较强的抗氧化活性^[51]。Wang Xilai等^[52]从铁皮石斛中分离出的多糖组分含有(1 \rightarrow 4)- α -D-Glcp结构发挥出较好的抗炎活性作用。此外,具有合适相对分子质量的多糖发挥活性作用最强,相对分子质量越大,活性位点越多,活性可能越强,但也伴随着较大的跨膜阻力,不利于多糖的吸收,活性发挥受阻;相反,相对分子质量太小,无法形成活性结构,活性降低^[53]。

唐军等^[54]综述了相对分子质量较大的附子多糖不利于穿透细胞膜,并且具有更强的细胞毒性。鲍素华等^[55]研究发现,相对分子质量较小的铁皮石斛多糖总抗氧化能力较强。本研究发现,PSPDL重均分子质量为59.475 kDa,单糖组成中含有一定的糖醛酸,存在(1 \rightarrow 4)- α -D-Glcp结构,与其抗炎活性的发挥具有一定关系,这为进一步深入研究PSPDL的高级结构及其构效关系提供了重要参考依据。

4 结 论

本研究结果显示PSPDL重均分子质量为59.475 kDa,主要由Man、Rha、GlcA、GalA、Glc、Gal、Ara组成,是含有(1 \rightarrow 4)- α -D-Glcp的 α -吡喃型多糖,具有较好的吸水性;对LPS诱导的RAW264.7细胞的抗炎活性作用机制可能与阻碍p38 MAPK激活和NF- κ B易位,抑制iNOS、COX-2、IL-1 β 、IL-6以及TNF- α 的mRNA表达,抑制炎症介质NO和促炎细胞因子IL-1 β 、IL-6和TNF- α 的产生,改善氧化应激相关。本实验表征了又分蓼中多糖成分的结构,进一步阐释了其LPS诱导RAW264.7细胞模型的抗炎作用机制,可为今后拓宽又分蓼的应用范围、提高其利用价值奠定理论基础。

参考文献:

- [1] 段超慧,李洋,杨桂娥,等.基于UPLC-MS/MS技术同时测定蒙药材又分蓼中多种活性成分[J].中药材,2018,41(10):2381-2385. DOI:10.13863/j.issn1001-4454.2018.10.025.
- [2] SHEN B B, YANG Y P, YASAMIN S, et al. Analysis of the phytochemistry and bioactivity of the genus *Polygonum* of Polygonaceae[J]. Digital Chinese Medicine, 2018, 1(1): 19-36. DOI:10.1016/S2589-3777(19)30005-9.
- [3] 董丽华,朱玉野,葛菲,等.又分蓼黄酮类化学成分研究[J].中药材,2019,42(3):567-569. DOI:10.13863/j.issn1001-4454.2019.03.019.
- [4] 李洋.又分蓼总黄酮提取分离鉴定及安全性初步评价[D].哈尔滨:黑龙江中医药大学,2019. DOI:10.27127/d.cnki.ghlzu.2019.000276.
- [5] 董丽华,朱玉野,张忠立,等.又分蓼全草化学成分研究[J].中药材,2019,42(5):1059-1061. DOI:10.13863/j.issn1001-4454.2019.05.021.
- [6] 段超慧.蒙药材又分蓼黄酮类化合物分离鉴定及抗肿瘤作用机制研究[D].哈尔滨:黑龙江中医药大学,2019. DOI:10.27127/d.cnki.ghlzu.2019.000016.
- [7] 董丽华.又分蓼抗溃疡性结肠炎的物质基础与作用机制研究[D].南昌:江西中医药大学,2019. DOI:10.27180/d.cnki.gjxzc.2019.000007.
- [8] FLÓREZ-FERNÁNDEZ N, RODRÍGUEZ-COELLO A, LATIRE T, et al. Anti-inflammatory potential of ulvan[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 253: 126936. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2023.126936.
- [9] KO E Y, HEO S J, CHO S H, et al. 3-Bromo-5-(ethoxymethyl)-1,2-benzenediol inhibits LPS-induced pro-inflammatory responses by preventing ROS production and downregulating NF- κ B *in vitro* and in a zebrafish model[J]. International Immunopharmacology, 2019, 67: 98-105. DOI:10.1016/j.intimp.2018.11.021.
- [10] HUANG Y G, YE Y L, XU D P, et al. Structural characterization and anti-inflammatory activity of a novel neutral polysaccharide isolated from *Smilax glabra* Roxb[J]. International Journal of

- Biological Macromolecules, 2023, 234: 123559. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2023.123559.
- [11] 郑雅君, 李美秀, 姜泽东, 等. 琼胶寡糖对脂多糖诱导的巨噬细胞RAW264.7炎症反应的抑制作用[J]. 中国食品学报, 2022, 22(6): 72-82. DOI:10.16429/j.1009-7848.2022.06.008.
- [12] 崔艳艳, 贡永鹏, 袁永旭, 等. 响应面法优化叉分蓼多糖的提取及其结构分析[J]. 粮食与油脂, 2024, 37(4): 89-94; 114. DOI:10.3969/j.issn.1008-9578.2024.04.019.
- [13] WANG C S, ZHANG D W, ZHANG M L, et al. Structural characterization of a novel oligosaccharide from *Achyranthes bidentata* and its anti-osteoporosis activities[J]. Industrial Crops and Products, 2017, 108: 458-469. DOI:10.1016/j.indcrop.2017.07.018.
- [14] MA L P, JIAO K P, LUO L, et al. Characterization and macrophage immunomodulatory activity of two polysaccharides from the flowers of *Paenonia suffruticosa* Andr.[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 124: 955-962. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2018.12.035.
- [15] JIANG L, WANG W J, WEN P W, et al. Two water-soluble polysaccharides from mung bean skin: physicochemical characterization, antioxidant and antibacterial activities[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 100: 105412. DOI:10.1016/j.foodhyd.2019.105412.
- [16] SUN Y N, LIU R, SHANG Y Y, et al. *In vitro* and *in vivo* relaxation and anti-inflammation of natural flavonoids from *Elaeagnus pungens* leaf via L-type calcium channel and targeting MAPK signal pathway[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2021, 275: 114071. DOI:10.1016/j.jep.2021.114071.
- [17] 晏红. 虎杖酸性多糖对小鼠溃疡性结肠炎的疗效观察[D]. 雅安: 四川农业大学, 2023. DOI:10.27345/d.cnki.gsnyu.2023.000358.
- [18] FAN J, WANG Y, YANG J B, et al. Anti-aging activities of neutral and acidic polysaccharides from *Polygonum multiflorum* Thunb in *Caenorhabditis elegans*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 257: 128724. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2023.128724.
- [19] 周雪艳, 常贺, 苟海芹, 等. 分子量影响多糖生物活性的研究进展[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2024, 45(1): 124-132. DOI:10.16433/j.1673-2383.2024.01.016.
- [20] LI X, PENG B, CHEUNG P C K, et al. Depolymerized non-digestible sulfated algal polysaccharides produced by hydrothermal treatment with enhanced bacterial fermentation characteristics[J]. Food Hydrocolloids, 2022, 130: 107687. DOI:10.1016/j.foodhyd.2022.107687.
- [21] ZHU B W, NI F, XIONG Q, et al. Marine oligosaccharides originated from seaweeds: source, preparation, structure, physiological activity and applications[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2021, 61(1): 60-74. DOI:10.1080/10408398.2020.1716207.
- [22] ZHENG Q R, LI W F, LIANG S, et al. Effects of ultrasonic treatment on the molecular weight and anti-inflammatory activity of oxidized konjac glucomannan[J]. CyTA-Journal of Food, 2019, 17(1): 1-10. DOI:10.1080/19476337.2018.1541195.
- [23] 朱瑜丹. 辣蓼多糖的化学表征和免疫调节活性研究[D]. 昆明: 昆明医科大学, 2020. DOI:10.27202/d.cnki.gkmyc.2020.000293.
- [24] GOU Y, GU D L, FAN J, et al. Purification and structural characterization of polysaccharides from *Polygonum multiflorum* Thunb. and their immunostimulatory activity in RAW264.7 cells[J]. Foods, 2024, 13(6): 932. DOI:10.3390/foods13060932.
- [25] WANG Y, LI X, ZHAO P, et al. Physicochemical characterizations of polysaccharides from *Angelica sinensis* Radix under different drying methods for various applications[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 121: 381-389. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2018.10.035.
- [26] CHEN F, HUANG G L, YANG Z Y, et al. Antioxidant activity of *Momordica charantia* polysaccharide and its derivatives[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 138: 673-680. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2019.07.129.
- [27] 贾若一. 三叶青藤多糖分离鉴定及其对氨基甲酸乙酯毒性的缓解作用[D]. 杭州: 浙江大学, 2021. DOI:10.27461/d.cnki.gzjdx.2021.001422.
- [28] 唐梦婷. 灰树花多糖的提取分离、对肠道菌群的影响及应用[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2023. DOI:10.27462/d.cnki.ghzhc.2023.001039.
- [29] CHU Q, ZHANG S, YU L S, et al. *Apios americana* Medikus tuber polysaccharide exerts anti-inflammatory effects by activating autophagy[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 130: 892-902. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2019.03.012.
- [30] ARAB K, GHANBARZADEH B, AYASEH A, et al. Extraction, purification, physicochemical properties and antioxidant activity of a new polysaccharide from *Ocimum album* L. seed[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 180: 643-653. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2021.03.088.
- [31] REN Y P, LIU S X. Effects of separation and purification on structural characteristics of polysaccharide from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd)[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2020, 522(2): 286-291. DOI:10.1016/j.bbrc.2019.10.030.
- [32] YIN J Y, WANG J Q, LIN H X, et al. Fractionation, physicochemical properties and structural features of non-arabinoxylan polysaccharide from the seeds of *Plantago asiatica* L.[J]. Food Hydrocolloids, 2016, 55: 128-135. DOI:10.1016/j.foodhyd.2015.11.011.
- [33] FAN Y J, LIN M C, LUO A S, et al. Characterization and antitumor activity of a polysaccharide from *Sarcodia ceylonensis*[J]. Molecules, 2014, 19(8): 10863-10876. DOI:10.3390/molecules190810863.
- [34] RU Y, CHEN X, WANG J, et al. Polysaccharides from *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg: extraction optimization, structural characterizations, antioxidant and antihyperlipidemic activities in hyperlipidemic mice[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 125: 1033-1041. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2018.11.236.
- [35] SVENSSON M V, WEINTRAUB A, WIDMALM G. Structural elucidation of the O-antigenic polysaccharide from *Escherichia coli* O175[J]. Carbohydrate Research, 2011, 346(3): 449-453. DOI:10.1016/j.carres.2010.12.005.
- [36] YUAN Y F, WANG Y B, JIANG Y M, et al. Structure identification of a polysaccharide purified from *Lycium barbarum* fruit[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 82: 696-701. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2015.10.069.
- [37] XIANG X W, WANG R, YAO L W, et al. Anti-inflammatory effects of *Mytilus coruscus* polysaccharide on RAW264.7 cells and DSS-induced colitis in mice[J]. Marine Drugs, 2021, 19(8): 468. DOI:10.3390/md19080468.
- [38] WEN Z S, XIANG X W, JIN H X, et al. Composition and anti-inflammatory effect of polysaccharides from *Sargassum horneri* in RAW264.7 macrophages[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 88: 403-413. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2016.02.025.
- [39] XU J J, GONG L L, LI Y Y, et al. Anti-inflammatory effect of a polysaccharide fraction from *Craterellus cornucopioides* in LPS-stimulated macrophages[J]. Journal of Food Biochemistry, 2021, 45(8): e13842. DOI:10.1111/jfbc.13842.

- [40] HAN X Z, MA R, CHEN Q, et al. Anti-inflammatory action of *Athyrium multidentatum* extract suppresses the LPS-induced TLR4 signaling pathway[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2018, 217: 220-227. DOI:10.1016/j.jep.2018.02.031.
- [41] CHEN G M, JIANG N, ZHENG J P, et al. Structural characterization and anti-inflammatory activity of polysaccharides from *Astragalus membranaceus*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 241: 124386. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2023.124386.
- [42] XIONG L, OUYANG K H, JIANG Y, et al. Chemical composition of *Cyclocarya paliurus* polysaccharide and inflammatory effects in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophage[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 107: 1898-1907. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2017.10.055.
- [43] 陈舒桐, 周庆玲, 杨睿宇, 等. 两种马尾藻岩藻多糖的理化性质、结构表征及其增强免疫和降血糖活性[J]. 食品科学, 2024, 45(1): 15-22. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230202-015.
- [44] ANDRADE B, JARA-GUTIÉRREZ C, PAZ-ARAOS M, et al. The relationship between reactive oxygen species and the cGAS/STING signaling pathway in the inflammaging process[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(23): 15182. DOI:10.3390/ijms232315182.
- [45] FENG A Q, ZHAO Z W, LIU C F, et al. Study on characterization of *Bupleurum chinense* polysaccharides with antioxidant mechanisms focus on ROS relative signaling pathways and anti-aging evaluation *in vivo* model[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 266: 131171. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2024.131171.
- [46] 王琪文, 罗青, 徐洋洋, 等. 刺梨果多糖对异丙肾上腺素诱导的心肌缺血小鼠保护作用及机制[J]. 食品科学, 2024, 45(5): 78-85. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230823-171.
- [47] ZENG F S, YAO Y F, WANG L F, et al. Polysaccharides as antioxidants and prooxidants in managing the double-edged sword of reactive oxygen species[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2023, 159: 114221. DOI:10.1016/j.biopha.2023.114221.
- [48] XIN Y, YUAN Q, LIU C Q, et al. MiR-155/GSK-3 β mediates anti-inflammatory effect of chikusetsusaponin IVa by inhibiting NF- κ B signaling pathway in LPS-induced RAW264.7 cell[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 18303. DOI:10.1038/s41598-020-75358-1.
- [49] 陶新磊, 刘丹华, 田旭, 等. 黄芪多糖诱导SOCS3表达对鸡巨噬细胞炎症反应的抑制作用[J]. 中国畜牧兽医, 2021, 48(11): 4284-4291. DOI:10.16431/j.cnki.1671-7236.2021.11.038.
- [50] CHEN Y N, LI H F, LI M F, et al. *Salvia miltiorrhiza* polysaccharide activates T lymphocytes of cancer patients through activation of TLRs mediated-MAPK and -NF- κ B signaling pathways[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2017, 200: 165-173. DOI:10.1016/j.jep.2017.02.029.
- [51] 罗昭勇, 姜艳, 余晓历, 等. 石斛多糖的结构特征、生物活性、构效关系及产品开发进展[J]. 食品工业科技, 2024, 45(15): 429-442. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2023090148.
- [52] WANG X L, ZHOU X, WANG K, et al. Structural characterisation and bioactivity of polysaccharides isolated from fermented *Dendrobium officinale*[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2022, 102(1): 280-290. DOI:10.1002/jsfa.11356.
- [53] YING M X, YU Q, ZHENG B, et al. Cultured *Cordyceps sinensis* polysaccharides modulate intestinal mucosal immunity and gut microbiota in cyclophosphamide-treated mice[J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 235: 115957. DOI:10.1016/j.carbpol.2020.115957.
- [54] 唐军, 杨欣, 杨鑫, 等. 附子多糖的结构、构效关系与生物活性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(20): 5410-5418. DOI:10.19540/j.cnki.cjcmm.20230516.301.
- [55] 鲍素华, 查学强, 郝杰, 等. 不同分子量铁皮石斛多糖体外抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2009, 30(21): 123-127. DOI:10.3321/j.issn:1002-6630.2009.21.029.