

# 超声波对密花石斛多糖理化性质及免疫调节活性的影响

汪鹤, 洪胜, 潘利华, 查学强, 罗建平\*

(合肥工业大学生物与食品工程学院中草药与功能食品研究所, 安徽 合肥 230009)

**摘要:** 本文从超声波处理前后密花石斛多糖的分子量分布、特性黏度、荧光辅助糖电泳、溶液构象及免疫调节活性的变化角度, 探讨超声波对多糖理化性质及与生物活性的改变。结果表明: 超声波处理不仅降低密花石斛多糖高分子量组分的分子量和特性黏度, 使多糖的溶液空间构象由大的纺锤体状聚集体解聚分散成小的结构紧密的聚集体, 而且可显著提高多糖促进脾细胞增殖的活性, 提示超声处理可改变多糖的理化性质并影响其生物活性。

**关键词:** 超声波; 多糖降解; 微结构; 免疫活性

## Effect of ultrasonic treatment on the physicochemical properties and immunoregulatory activity of polysaccharides from *Dendrobium densiflorum*

WANG He, HONG Sheng, PAN Li-hua, ZHA Xue-qiang, LUO Jian-ping\*

(Institute of TCM and Functional Foods, School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

**Abstract:** The ultrasonic treatment has been widely used to assistantly extract polysaccharides from food resources although there is rarely reports on its effects on the physicochemical properties and biological activities of polysaccharides. In this study, the polysaccharides from *Dendrobium densiflorum* were used to investigate the changes in molecular distribution, intrinsic viscosity, solution conformation and immunoregulatory activity after ultrasonic treatment. High performance gel permeation chromatography indicated that the molecular weight of the polysaccharide was significantly decreased by ultrasonic treatment, which led to a drop in intrinsic viscosity. Atomic force microscope showed that with ultrasonic treatment, the conformation of *D. densiflorum* polysaccharides was changed into the dispersed state from the large spindle-shaped state. Using in vitro splenic cell proliferation experiment, the immunoregulatory activity of the polysaccharides was enhanced by ultrasonic treatment. These results suggested that the physicochemical properties and biological activities of *D. densiflorum* polysaccharides could be changed by the ultrasonic treatment, which should be applied to the extraction of natural polysaccharides with caution.

**Key words:** Ultrasound; Polysaccharide degradation; Micro-structure; Immune activity

中图分类号: TS20

文献标志码: A

文章编号:

石斛是一类药食两用草本植物, 其活性成分石斛多糖具有增强免疫、保肝、抗肿瘤等生物活性<sup>[1]</sup>。超声波因具有空化作用、热效应和机械作用特性, 可以提高有效成分的提取效率, 已被广泛用于包括石斛多糖在内的多种食品多糖的提取<sup>[2]</sup>。一些研究表明, 超声波在提高多糖提取率的同时, 亦会影响多糖的分子量以及抗氧化等生物活性<sup>[3-5]</sup>。但超声波处理是否会改变石斛多糖的理化性质和生物活性, 目前未见报道。本文以密花石斛 (*Dendrobium densiflorum*) 多糖为材料, 通过测定超声波处理前后多糖的分子量分布、特性黏度、荧光辅助糖电泳、溶液构象及免疫调节活性的变化, 分析超声波处理后

收稿日期: 2013-07-29 \* 通讯联系人

作者简介: 汪鹤(1988-), 男, 硕士, 研究方向为中草药与功能食品。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (NO. 20872024; NO. 21006019)

密花石斛多糖理化性质及与生物活性的变化,为石斛多糖的超声波辅助提取工艺优化及产品开发提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

密花石斛 (*Dendrobium densiflorum*), 采自云南省西双版纳。

DEAE-纤维素离子交换树脂、DMSO、台盼兰、LPS (脂多糖)、L(-)-Glucose、D-(+)-Galactose 美国 Sigma 公司; L(-)-Mannose Alfa Aesar 公司; RPMI-1640 Auckland 公司; 其它试剂均为国产分析纯。

SY-1000E 多用途恒温超声提取机 北京泓祥隆生物技术开发有限公司; Waters 2695 型高效液相色谱仪 美国 Waters 公司; TSK-gel G 4000PWxl、TSK-gel G 5000PWxl 色谱柱 日本 Tosoh Bioscience 公司; MCO-17AIC 型 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱 日本 SANYO 公司; Model 680 型酶标仪 美国 BIO-RAD 公司; 稳压稳流电泳仪 北京市六一仪器厂; 凝胶成像仪 上海天龙科技有限公司; CSPM-4000 型扫描探针显微镜 北京本原纳米仪器有限公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 密花石斛多糖的超声波处理

参考文献[6], 采用水提醇沉法制备密花石斛总多糖, 采用 DEAE-纤维素离子交换色谱柱洗脱。取 3 份水洗组分, 分别于超声功率为 0、300、600W, 温度为 50℃ 的条件下处理 60min, 冷冻干燥, 得到不同超声功率处理 3 种密花石斛多糖组分。

#### 1.2.2 多糖特性黏度及分子量分布分析

参考文献[7], 采用乌氏黏度计测定多糖样品的特性黏度。

采用高效凝胶过滤色谱法测定多糖的相对分子质量。色谱条件: 检测器 示差检测器 Waters-2410; 色谱柱 TSKG4000PWxl (7.8mm × 300mm) 和 TSKG5000PWxl (7.8 mm × 300mm) 串联柱; 柱温 40℃; 流动相双蒸水; 流速 0.6mL/min; 进样量 20μL; 样品浓度为 10mg/mL。标准品 DextranT-670000、T-420000、T-150000、T-80000、T-25000 和 T-5000。

#### 1.2.3 多糖荧光辅助糖电泳 (FACE) 分析

参考文献[8]方法, 用盐酸对 DextranT-40000 液进行控制性水解, 建立系列寡糖标尺样品, 将寡糖标尺样品、葡萄糖标准品及密花石斛多糖样品以荧光试剂 ANDS 标记后, 在聚丙烯酰胺凝胶上进行 FACE 分析。电泳条件: 分离胶由 9mL40% 的凝胶贮液 (39g 丙烯酰胺和 1g 双叉丙烯酰胺加双蒸水定容于 100mL 容量瓶中, 混匀)、3mL0.1mol/L 的 Tris-硼酸缓冲液、15μL10% 过硫酸铵溶液和 6μL 四甲基乙二胺组成; 浓缩胶由 0.8mL40% 的凝胶贮液、1mL0.1mol/L 的 Tris-硼酸缓冲液、2.2mL 双蒸水、20μL10% 过硫酸铵和 5μL 四甲基乙二胺组成; 电极缓冲液为 0.1mol/L、pH8.2 的 Tris-硼酸溶液; 15mA 恒定电流、20℃ 下, 电泳 3h。电泳结束后, 采用凝胶成像仪 360nm 下分析。

#### 1.2.4 多糖构象分析

准确配制 1mg/mL 多糖溶液并稀释至  $1.0 \times 10^{-2}$  mg/mL, 取 2.5μL 溶液滴在新鲜解离的氟晶云母片上自然干燥, 无水乙醇固定后用 CSPM-4000 型原子力显微镜观察<sup>[9]</sup>。

#### 1.2.5 多糖免疫调节活性测定

取两只 ICR 小鼠, 颈椎脱臼法处死后按文献[10]方法制备脾细胞悬浮液, 并调整细胞浓度为  $1 \times 10^5$  个/mL。取 96 孔培养板, 选择 33 孔, 分为 11 组, 每组 3 孔, 每孔加脾细胞悬液 100μL, 阴性对照组加入 100μL 培养基; 阳性对照组加入 100μLLPS 溶液并使终浓度为 12.5mg/L; 实验组分别加入不同超声功率处理的密花石斛多糖溶液并使其终浓度分别为 100、200、400mg/L; 将培养板置于 37℃ 含 5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养 24h, 培养时间结束前 4h 向每孔中加入 50μL 的 MTT, 继续培养 4h 后 3000r/min 离心 10min, 弃上清, 离心管底部的蓝色沉淀用 100μL 的 DMSO 充分振荡溶解后于酶标仪 570nm 处测定其吸光度并计算脾细胞增殖活性。

$$\text{脾细胞增殖率} / \% = \left( \frac{\text{样品孔吸光值}}{\text{空白孔吸光值}} - 1 \right) \times 100$$

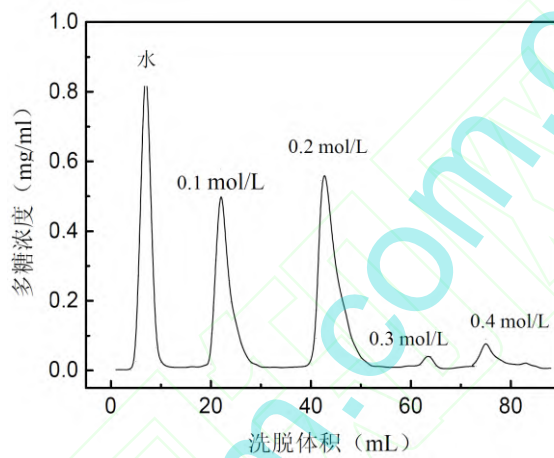


图 1 密花石斛总多糖 DEAE-纤维素离子交换色谱图

Fig.1 DEAE-Cellulose column chromatogram of *Dendrobium densiflorum* polysaccharide by NaCl gradient elution

## 2 结果与分析

### 2.1 DEAE-纤维素柱分离密花石斛总多糖

密花石斛总多糖溶液经 DEAE-纤维素离子交换色谱柱分离，依次采用双蒸水及不同浓度浓度的 NaCl 水溶液进行梯度洗脱，获得五个组分，其洗脱曲线如图 1 所示。

### 2.2 超声波处理对密花石斛多糖分子量分布及特性黏度的影响

表 1 不同功率超声波处理后密花石斛多糖的特性黏度及分子量分布

Table 1 Intrinsic viscosity and molecular weight distribution of *Dendrobium densiflorum* polysaccharide after treatment of different ultrasonic power

超声功率 /W	特性黏度 /[η]/(dL/g)	峰比例/(%)			分子量/M <sub>w</sub> (ku)/M <sub>n</sub> (ku)		
		1	2	3	1	2	3
0	259.05±0.0030	6.32	47.20	46.49	646.6/621.3	5.269/4.821	0.600/0.587
300	174.32±0.0073	8.05	48.70	43.24	211.1/207.8	5.009/4.518	0.606/0.592
600	154.86±0.0064	7.15	50.55	42.30	174.9/172.0	5.220/4.686	0.652/0.637

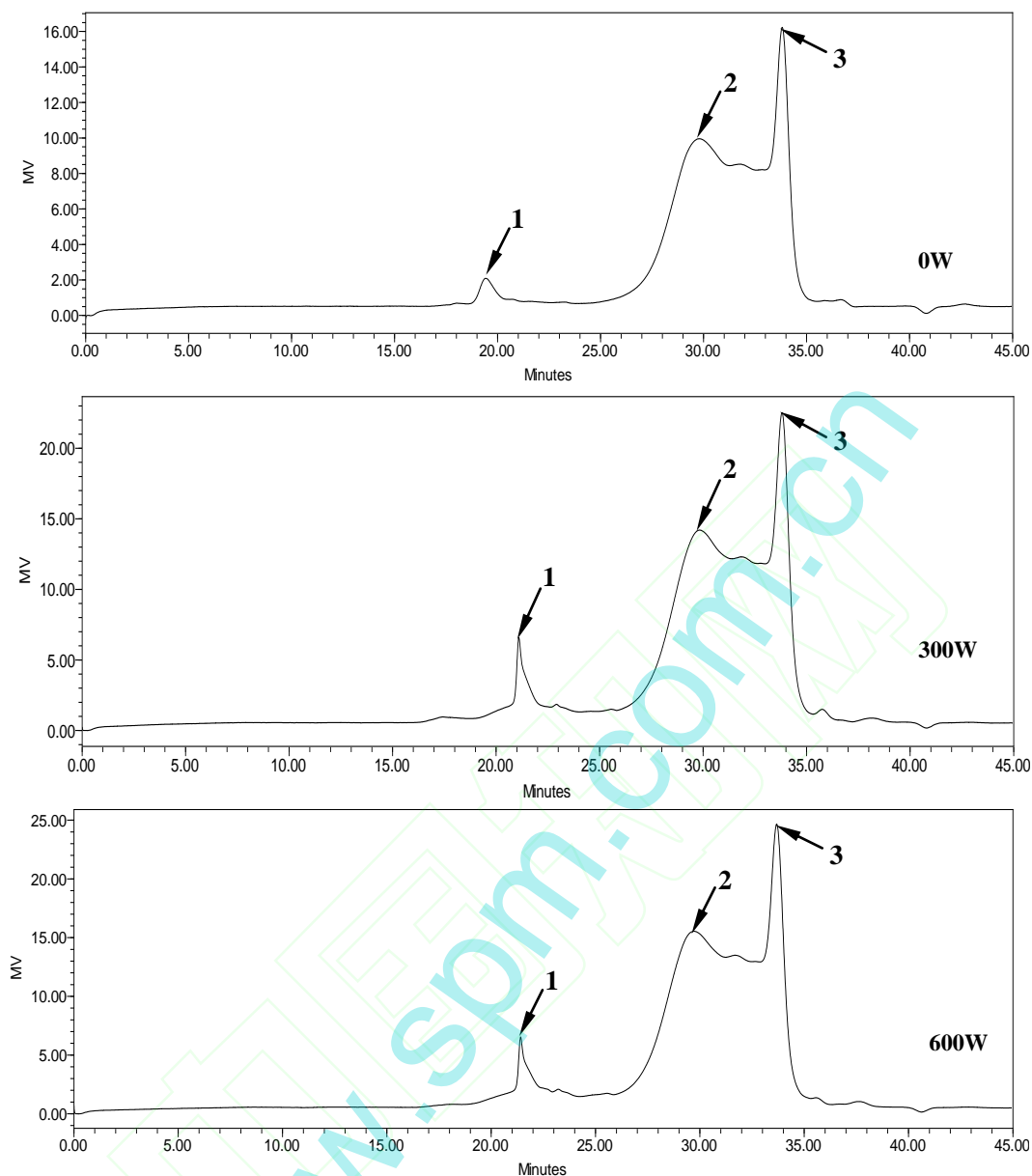


图 2 不同功率超声波处理后密花石斛多糖的凝胶透过滤色谱图

Fig.2 Gel permeation chromatogram of *Dendrobium densiflorum* polysaccharide after treatment of different ultrasonic power

HPGPC 分析表明 (表 1 和图 2), 密花石斛多糖由分子量不同的三个组分组成, 其中组分 1 为高分子量组分、组分 2 和 3 为低分子量组分。用 300W 和 600W 超声处理密花石斛多糖能显著降低组分 1 的相对分子量 ( $M_w$ ) 及数均分子量 ( $M_n$ ), 但组分 2 和 3 的分子量无明显变化。同时, 超声处理后密花石斛多糖的特性黏度也呈下降趋势, 并与超声功率呈正相关。由于多糖的特性粘度与多糖的分子量有关, 分子量较大的多糖具有更高的特性粘度<sup>[11]</sup>。因此, 可以推断超声处理能导致密花石斛多糖高分子量组分的降解, 进而引起密花石斛多糖特性黏度的下降。

### 2.3 超声波处理后密花石斛多糖的荧光辅助糖电泳分析

FACE 检测结果显示 (图 3), 与未经超声波处理组相比, 经过 300W 和 600W 超声波处理的密花石斛多糖, 电泳条带的数目、位置基本相同, 但条带亮度随着超声功率的增加而增强, 这可能是由于超声波处理使多糖链发生解聚, 高分子量组分降解产生大量小分子寡糖所致, 这与多糖的 HPGPC 结果 (图 2) 一致。

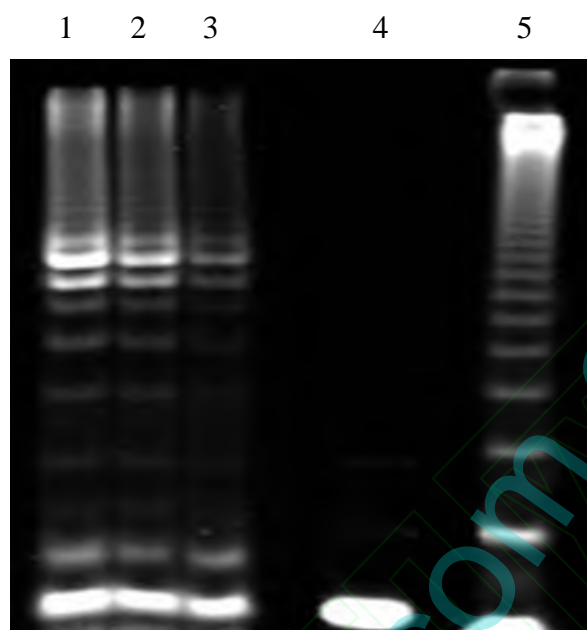


图 3 不同功率超声波处理后密花石斛多糖的荧光辅助糖电泳

Fig. 3 Fluorescence assisted carbohydrate electrophoresis of *Dendrobium densiflorum* polysaccharide after treatment of different ultrasonic power

注: 1:600W;2:300W;3:0W;4:L-Glucose;5:经酸解的葡聚糖。

#### 2.4 超声波处理对密花石斛多糖的构象的影响

原子力显微镜观察结果表明 (图 4), 未经超声波处理的多糖呈纺锤状聚集体分布, 且存在部分聚集体相互重叠的现象, 聚集体的长轴、短轴长度以及聚集体中心点高度分别为 2428.92、1254.78、197.45nm。而经过 300W 低功率超声波处理的多糖, 其聚集体分散非常均匀, 呈一定规则结构紧密的纺锤体状, 聚集体之间没有重叠现象, 聚集体长轴、短轴长度以及中心点高度分别为 1329.45、790.3、60.43nm。继续增加功率至 600W, 多糖聚集体更加分散, 大小不一, 呈“三角形”状, 有明显的多糖碎片, 聚集体长轴、短轴长度及中心点高度分别为 377.4、724.35、68.61nm。由此可以推断, 超声波处理会使密花石斛多糖的空间构象发生改变, 大纺锤体状会解聚为尺寸更小、形状相似、结构紧密的小聚集体及多糖碎片, 且大聚集体的解聚程度与超声功率正相关。

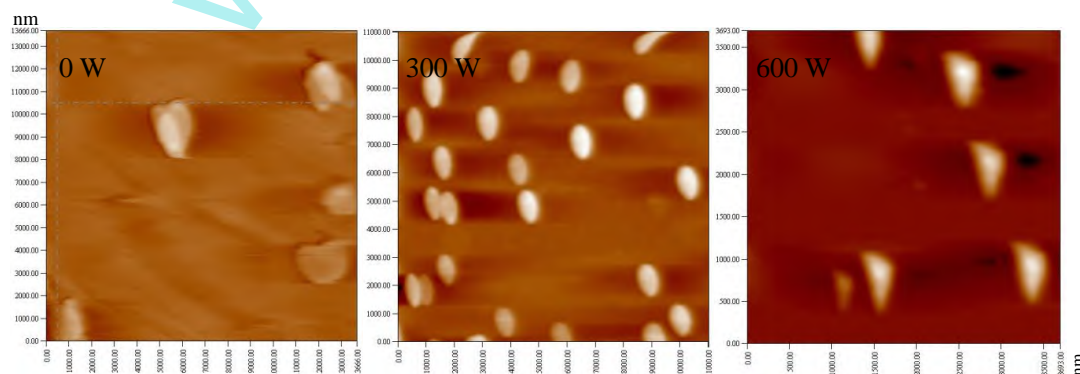


图 4 不同功率超声波处理后的密花石斛多糖构象

Fig. 4 Conformation of *Dendrobium densiflorum* polysaccharide under different ultrasonic power

### 2.5 超声波处理对密花石斛多糖免疫调节活性的影响

密花石斛多糖的免疫调节活性以其促进小鼠脾细胞增殖活性的大小表征。如图 5 所示，各实验组对小鼠脾细胞增殖活性促进作用均显著高于 LPS 的效果，且表现出剂量依赖效应。与未经超声波处理组相比，300W 超声处理后的多糖活性明显升高，这可能是因为超声处理使多糖的大聚集体解聚成小的多糖碎片，使其更易进入细胞发挥生物学效应；当继续增加超声功率时，其活性反而有所降低，这说明过高超声功率处理可能会破坏多糖特定的活性结构，导致多糖活性下降<sup>[12]</sup>。

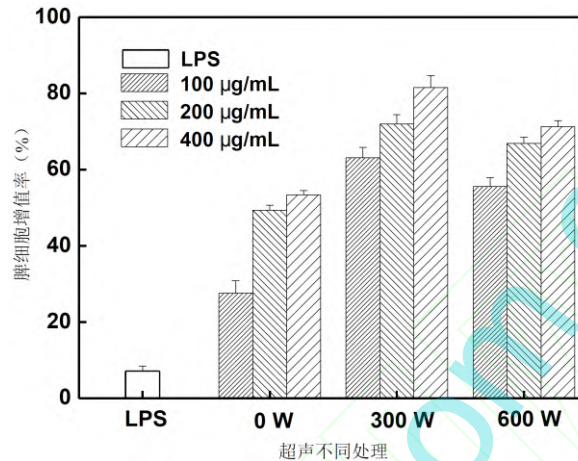


图 5 不同功率超声波处理的密花石斛多糖的脾细胞增殖性活

Fig. 5 Activity of spleen cell proliferation of *Dendrobium densiflorum* polysaccharide under different ultrasonic power

### 3 结论

本实验以密花石斛多糖为研究对象，探讨超声波处理对其理化性质和免疫活性的影响。结果表明：超声处理不仅能显著降低密花石斛多糖的高分子量组分分子量大小及其特性黏度，而且能造成大聚集体多糖解聚成小聚集体，使其构象发生改变。同时，通过对不同功率超声处理的多糖进行脾细胞增殖活性测定表明，多糖免疫活性与超声功率的大小密切相关，一定功率的超声处理能显著增加多糖的活性，但当功率过高时，多糖的活性反而会随着功率的增加而降低。

## 参考文献:

- [1] 包雪生, 顺庆生, 陈立钻. 中国药用石斛[M]. 上海:复旦大学出版社, 2001: 1-75.
- [2] Zhong K, Wang Q. Optimization of ultrasonic extraction of polysaccharide from dried longan pulp using response surface methodology[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80: 19-25.
- [3] Mohammadifar M A, Musavi S M, Kiumarsi A, et al. Solution properties of targacanthin (water-soluble part of gum tragacanth exudate from *Astragalus gossypinus*)[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2006, 38: 31-39.
- [4] Zhou C S, Ma H L. Ultrasonic degradation of polysaccharide from a Red Algae (*Porphyra yezoensis*)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 4(6): 2223-2228.
- [5] Zhang M, Zhang L N, Cheung P C K, et al. Molecular weight and anti-tumor activity of the water-soluble polysaccharides isolated by hot water and ultrasonic treatment from the sclerotia and mycelia of *Pleurotus tuber-regium* [J]. Carbohydrate Polymers, 2004, 56 (2): 123-128.
- [6] 黄森, 查学强, 罗建平, 等. Box-Behnken 法优化提取霍山石斛活性多糖的研究[J]. 中药材, 2007, 30(5): 591-594.
- [7] Shroff R N. Single-point determination of intrinsic viscosity[J]. Journal of Applied Polymer Science, 2003, 9(4): 1547-1551.
- [8] Zha X Q, Pan L H, Luo J P, et, al. Enzymatic fingerprints of polysaccharide of *Dendrobium officinale* and their application in identification of *Dendrobium* species[J]. Journal Natural Science, Biology and Medicine, 2012, 66: 525-534.
- [9] 张泽生, 史坤, 赵娟娟, 等. 甘草多糖 GPS-3a 微观形态的原子力显微观察[J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(3): 518-520.
- [10] Zha X Q, Luo J P, Luo S Z, et al. Structure identification of a new immunostimulating polysaccharide from the stems of *Dendrobium huoshanense*[J]. Carbohydrate Polymers, 2007, 69: 86-93.
- [11] Wang Z M, Cheung Y C, Leung P H, et al. Ultrasonic treatment for improved solution properties of a high-molecular weight exopolysaccharide produced by a medicinal fungus [J]. Bioresource Technology, 2010, 101(14): 5517-5522.
- [12] Yang B, Zhao M M, Yang N, et al. Effect of ultrasonic treatment on the recovery and DPPH radical scavenging activity of polysaccharides from longan fruit pericarp[J]. Food Chemistry, 2008, 106: 685-690.