

# 铁皮石斛花多糖的结构组成及免疫活性研究

王新婷<sup>1,3</sup>, 王珂<sup>2</sup>, 张志远<sup>2</sup>, 刘鑫澜<sup>1,3</sup>, 向泽敏<sup>1,3\*</sup>, 袁文娟<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>云南农业大学食品科学技术学院;

<sup>2</sup>云南农业大学理学院; <sup>3</sup>云南农业大学普洱茶学教育部重点实验室, 昆明 650201

**摘要:**从铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura & Migo)花中分离纯化多糖组分,初步分析其结构特征并从细胞水平研究其免疫调节作用,为铁皮石斛花多糖的工业化生产与应用提供理论依据和方法参考。本文以铁皮石斛干花为原料,采用水提醇沉得到粗多糖,通过 DEAE-52 纤维素柱和 Sephadex G-100 凝胶柱层析技术分离纯化得到铁皮石斛花多糖,采用高效凝胶渗透色谱法、PMP 柱前衍生生化法、傅里叶红外光谱、紫外吸收光谱等方法对铁皮石斛花多糖进行结构组成鉴定,并测定其免疫调节活性。结果表明,经过分离提纯得到的铁皮石斛花多糖,得率为 0.578%,通过与单糖对照品进行比较,其主要由甘露糖、葡萄糖、微量半乳糖、木糖、阿拉伯糖组成(74.388:22.676:2.171:0.173:0.592),平均分子量为 2 216 Da。在 50~200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围内,铁皮石斛花多糖可显著增强巨噬细胞吞噬活性,有效刺激细胞释放 NO,促进活性氧的产生。研究表明,铁皮石斛花多糖含量丰富,且具有较强的免疫调节活性,其发挥免疫作用可能是通过 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路起作用。

**关键词:**铁皮石斛花多糖;提取分离;结构组成;免疫活性

中图分类号:R284

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2024)12-1999-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2024.12.001

## Structural composition and immunological activity of polysaccharides from *Dendrobium officinale* Kimura & Migo flowers

WANG Xin-ting<sup>1,3</sup>, WANG Ke<sup>2</sup>,  
ZHANG Zhi-yuan<sup>2</sup>, LIU Xin-lan<sup>1,3</sup>, XIANG Ze-min<sup>1,3\*</sup>, YUAN Wen-juan<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University; <sup>2</sup>College of Science, Yunnan Agricultural University;

<sup>3</sup>Key Laboratory of Pu'er Tea, Ministry of Education, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

**Abstract:** The polysaccharide constituents were extracted and purified from the flowers of *Dendrobium officinale* Kimura & Migo. Subsequently, their structural characteristics were analyzed, and their immunomodulatory effects were examined at the cellular level. This study aims to furnish a theoretical foundation and methodological reference for the industrial production and application of polysaccharides derived from the flowers of *D. officinale*. This paper described the extraction of crude polysaccharide from *D. officinale* dried flowers using aqueous alcohol precipitation. The polysaccharide was then purified using DEAE-52 cellulose and Sephadex G-100 gel chromatography. Its structural composition was analyzed through high-performance gel permeation chromatography, PMP pre-column derivatization, Fourier infrared spectroscopy, and ultraviolet absorption spectroscopy. Additionally, the immunomodulatory activity of polysaccharide from *D. officinale* dried flowers was evaluated. The isolated and purified polysaccharide from *D. officinale* dried flowers, with a yield of 0.578%, primarily consisted of mannose, glucose, and small amounts of galactose, xylose, and arabinose in a ratio of 74.388:22.676:2.171:0.173:0.592, and had an average molecular weight of 2 216 Da. At concentrations of 50-200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , polysaccharide from *D. officinale* dried flowers significantly boosted macrophage proliferation, NO release, and ROS production. Research showed that *D. officinale* flowers were rich in polysaccharides and had strong immunomodulatory activity, the function was potentially exerted through the TLR4/NF- $\kappa$ B pathway.

**Key words:** *Dendrobium officinale* flower polysaccharide; extraction and separation; structure composition; immunological activity

铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)是兰科石斛属植物,被称为“药中黄金”,具有固气养元,清热生津的功效,主要用于治疗厌食、恶心、大病后的长期发热、筋骨痿软等<sup>[1]</sup>。研究表明,多糖类、黄酮类、多酚类、挥发性成分、氨基酸等<sup>[2-4]</sup>是铁皮石斛花中的主要营养及活性成分。实验表明,铁皮石斛花具有抗氧化、降血压、抑制肿瘤等生理功能,能减轻衰老大鼠脑老化、提高其空间学习能力,抵消免疫抑制剂环磷酰胺导致的不良反应,并能有效改善机体的免疫功能<sup>[5]</sup>。其中多糖是一类天然高分子碳水化合物<sup>[6,7]</sup>,是铁皮石斛花中主要的活性成分<sup>[8]</sup>。铁皮石斛多糖有降血糖<sup>[9,10]</sup>、增加机体免疫力<sup>[11]</sup>、抑制肿瘤<sup>[12]</sup>、抗氧化<sup>[13]</sup>和扩张血管<sup>[14]</sup>等生物活性。

近年来,国内外研究人员对铁皮石斛多糖的研究主要集中在茎部,而对铁皮石斛花中多糖的研究则较少。随着铁皮石斛的大规模种植,铁皮石斛花的产量也大大增加,而铁皮石斛花一般是制成干花茶食用,冲泡几次便将其丢弃,未能最大程度利用花中的有效成分,造成了极大的资源浪费。越来越多的研究表明,铁皮石斛能显著提高非特异性及特异性免疫活性,而多糖类成分是铁皮石斛发挥免疫活性的重要物质基础<sup>[15]</sup>。免疫功能是指机体对疾病的抵抗力,机体的免疫功能是在淋巴细胞、单核细胞和其他有关细胞及其产物的相互作用下完成的, Toll样受体(Toll-like receptor, TLR)是一种具有跨膜功能的蛋白质,它能够识别多种与病原体相关的分子模式,例如脂多糖、尿酸钠晶体和病毒双链RNA等,从而触发机体的炎症免疫反应。所有的TLR都可以激活MyD88依赖途径,进而激活核因子 $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B),最终导致炎症介质和细胞因子的释放,发挥抗炎和免疫调节的作用<sup>[16]</sup>。

为了充分利用铁皮石斛花资源和扩大其药用部位,本研究对铁皮石斛花多糖进行提取分离纯化并进行结构组成分析,得到纯多糖后探究其在RAW 264.7细胞中的免疫调节作用,为免疫相关疾病的治疗提供新的天然候选药物。同时进一步研究铁皮石斛花的药用潜力,也有助于提升铁皮石斛的总体经济价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

铁皮石斛花从云南省德宏中药材市场购得,经云南省食品药品监督检验研究院的高文分老师鉴定为兰科石斛属植物铁皮石斛(*Dendrobium officinale*

Kimura & Migo)的干花。

RAW 264.7巨噬细胞(云南农业大学普洱茶学教育部重点实验室细胞库);无水乙醇(分析纯,批号:20230701,天津大茂化学试剂厂);正丁醇(分析纯,批号:12802001)、苯酚(分析纯,批号:13300101)、NaCl(分析纯,批号:10101101)(西陇化工股份有限公司);DMEM(批号:MA0545,大连美仑生物技术有限公司);胎牛血清(批号:1010D053,美国赛默飞世尔科技公司);大孔树脂DEAE纤维素DE-52(批号:C8930)、葡聚糖凝胶G-100(批号:S8170)、透析袋MD34(批号:YA1077)、NO试剂盒(批号:BC1475)、磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)(批号:P1003)(北京索莱宝科技有限公司);脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)(批号:S11060,上海源叶生物科技有限公司)。

### 1.2 仪器与设备

NovoCyte D2060R流式细胞仪(美国BD公司);MF53倒置荧光显微镜(德国莱卡公司);UV1800PC紫外可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司);NICOLET iS50R傅里叶变换显微红外光谱仪、戴安U3000高效液相色谱仪(美国赛默飞世尔科技公司);Waters 1515型凝胶色谱仪(美国沃特世科技有限公司)。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 铁皮石斛花多糖的分离纯化

参考文献<sup>[17-19]</sup>的方法并稍作修改对铁皮石斛花多糖进行提取分离纯化。取铁皮石斛干花50 g粉碎过筛,回流提取合并滤液,浓缩至原体积的1/4,脱色脱蛋白后即得粗多糖。然后再依次装入纤维素柱和葡聚糖凝胶柱进行洗脱,通过苯酚硫酸法跟踪检测,根据显色反应结果合并主峰部位,浓缩,冷冻干燥得到纯化铁皮石斛花中性多糖。

#### 1.3.2 铁皮石斛花多糖结构组成分析

##### 1.3.2.1 单糖组成分析

采用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)检测铁皮石斛花多糖的单糖组成。分别取鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、甘露糖、半乳糖醛酸、葡萄糖醛酸、氨基葡萄糖盐、氨基半乳糖盐单糖标准品配制成浓度为0.5 mg/mL的标准母液(岩藻糖1 mg/mL),再依次配制为不同浓度梯度的样品液。取铁皮石斛花多糖5 mg置于色谱瓶中,加入2 mol/L三氟乙酸1 mL,在121 °C条件下水解2 h。通氮气吹干,甲醇清洗吹

干,重复3次,加入5 mL 无菌水溶解待测。进行衍生化后上机检测。采用外标法进行定量,通过配制不同浓度的标样来制定标准曲线。

色谱条件:美国 Thermo 戴安 U3000 液相色谱系统,色谱柱:ZORBAX EclipseXDB-C<sub>18</sub>,流动相为乙腈:PBS(17:83, V/V),流速为0.8 mL/min,柱温30 °C,检测波长250 nm,进样量10 μL。

### 1.3.2.2 铁皮石斛花多糖分子量分析

精密配置0.05 mol/L NaCl 溶液,接着精密称量不同分子量的右旋糖酐标准品(分子量1 000、5 000、12 000、25 000、50 000、80 000、150 000、270 000、410 000、670 000 系列分析标准品),分别加入0.05 mol/L NaCl 溶液配制成5 mol/mL 右旋糖酐的标准溶液,采用高效凝胶渗透色谱法(high performance gel permeation chromatography, HPGPC),建立标准品分子量校正曲线,接着制备5 mg/mL 的铁皮石斛花多糖样品溶液,上机检测,以标准品峰位分子量(Mp)、重均分子量(Mw)、数均分子量(Mn)的对数值为纵坐标,以相应色谱峰的保留时间(T)为横坐标进行线性回归,得到校正曲线: $\log_{10} Mp = -0.1678T + 10.6291 (R^2 = 0.9916)$ ;  $\log_{10} Mw = -0.1761T + 11.0299 (R^2 = 0.9927)$ ;  $\log_{10} Mn = -0.1674T + 10.5361 (R^2 = 0.9937)$ 。

色谱条件:美国 Waters 1515 型凝胶色谱仪,色谱柱为聚合物基质水溶性 SEC(GFC) 色谱柱(8 mm × 300 mm)3 根串联,流动相为0.05 mol/L NaCl 溶液,流速0.65 mL/min,柱温40 °C,进样量30 μL。示差检测器:Waters 2410。

### 1.3.2.3 纯度测定

采用紫外全波长扫描对铁皮石斛花多糖纯度进行测定。取干样2.0 mg 溶解于纯水,配制1 mg/mL 的多糖溶液,纯水为空白对照。利用分光光度计测定该多糖溶液吸光度值。在190~400 nm 的波长范围内执行全波长的扫描操作。

### 1.3.2.4 FT-IR 分析

精确称取完全干燥的多糖样品2 mg,与200 mg KBr 混合磨匀并压片,采用傅里叶变换显微红外光谱仪对多糖样品进行红外扫描,波长范围为4 000~400 cm<sup>-1</sup>,并记录红外光谱图。

## 1.3.3 铁皮石斛花多糖对小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 免疫作用的影响

### 1.3.3.1 细胞培养

将小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 接种于含10% 胎

牛血清和1% 双抗的 DMEM 培养基中,于37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。每隔1~2 d 传代一次,观察不同时间内巨噬细胞形态变化,进行后续实验时将细胞分为正常对照组(control, Con),阳性对照 LPS 处理组和铁皮石斛花多糖剂量(50、100、200 μg/mL)组。

### 1.3.3.2 中性红法测定细胞吞噬活性

选取对数生长期的 RAW 264.7 细胞,按  $1 \times 10^4$  每孔接种于96 孔板中,在37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的条件下培养24 h。多糖组每孔加入相同体积不同浓度的多糖溶液(50、100、200 μg/mL)、阳性对照组加入1 μg/mL LPS 溶液、正常对照组加入相同体积的完全培养基,每组6 个复孔,给药后培养24 h。弃上清液, PBS 清洗3 次,每孔加入200 μL 0.1% 的中性红溶液培养4 h,弃上清液, PBS 清洗3 次,每孔加入200 μL 细胞裂解液,待裂解完全后酶标仪检测540 nm 下吸光度值。

### 1.3.3.3 试剂盒检测细胞 NO 含量

参照“1.3.3.2”的方法于六孔板中给药培养细胞,给药处理24 h 后,用 RIPA 裂解液在冰上裂解不同组的细胞,在裂解液中提取总蛋白,然后使用 BCA 定量。提出蛋白后按试剂盒说明书进行操作,采用酶标仪检测各组的吸光度值。

### 1.3.3.4 倒置荧光显微镜检测细胞活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生

参照“1.3.3.2”的方法于六孔板中给药培养细胞,给药处理24 h 后,弃上清液, PBS 清洗3 次,每孔加入含10 μmol/L DCFH-DA 的 PBS 溶液1 mL,培养30 min,弃上清液, PBS 清洗3 次,荧光显微镜下观察荧光,细胞内的活性氧能够氧化无荧光的 DCFH 生成有荧光的 DCF。绿色荧光强度与活性氧的水平成正比。在最大激发波长480 nm,最大发射波长525 nm 处,检测荧光信号,根据其荧光信号强度,分析活性氧的产生情况。

### 1.3.3.5 流式细胞仪检测细胞 ROS 的产生

参照“1.3.3.4”的方法处理细胞,在流式细胞仪上检测荧光强度。

### 1.3.3.6 Western blot 法检测 TLR4/NF-κB 信号通路相关蛋白的表达

参照“1.3.3.2”的方法于六孔板中给药培养细胞,给药处理24 h 后,用 RIPA 裂解液对冰上不同组别的细胞进行裂解,从裂解液中提取总蛋白后采用 BCA 定量。随后,使用10% 的 SDS-PAGE 电泳技术,进行电泳转膜操作,并采用5% 的脱脂奶粉进行了密封处理。TBST 洗膜后在4 °C 摇床孵出一抗

(NF- $\kappa$ Bp65、NF- $\kappa$ Bp-p65、TLR4、 $\beta$ -tublin) 16 ~ 24 h。TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,随后室温下加入二抗(1:5 000)孵育 1 h。TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,用增强的化学发光底物进行显色处理后采用全自动成像分析系统进行显影。采用  $\beta$ -tublin 作为内参,对相关蛋白的表达程度进行统计分析。

### 1.3.3.7 统计学处理

用软件进行统计学处理分析,计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,多组使用单因素方差分析 (ANOVA), $P < 0.05$  认为差异具有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 铁皮石斛花多糖分离纯化

取 50 g 的铁皮石斛粉末,在 100 °C 热水提取

醇沉、脱蛋白脱色后,浓缩,干燥得铁皮石斛花粗多糖 3.905 g,得率为 7.81%。将粗多糖经纤维素柱初步分离后得到样品 1.068 g,再经过 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱进一步纯化,得到纯化后的铁皮石斛花多糖 0.289 g,得率为 0.578%。

### 2.2 铁皮石斛花多糖结构组成分析

#### 2.2.1 单糖组成分析

单糖组成分析是多糖的结构表征及生物活性研究必不可少的部分,对于功能性多糖的质量控制也具有一定的意义。铁皮石斛花单糖组成分析结果见图 1,通过与单糖对照品进行比较,得出铁皮石斛花多糖主要由甘露糖、葡萄糖及微量半乳糖、木糖、阿拉伯糖组成 (74.388:22.676:2.171:0.173:0.592)。

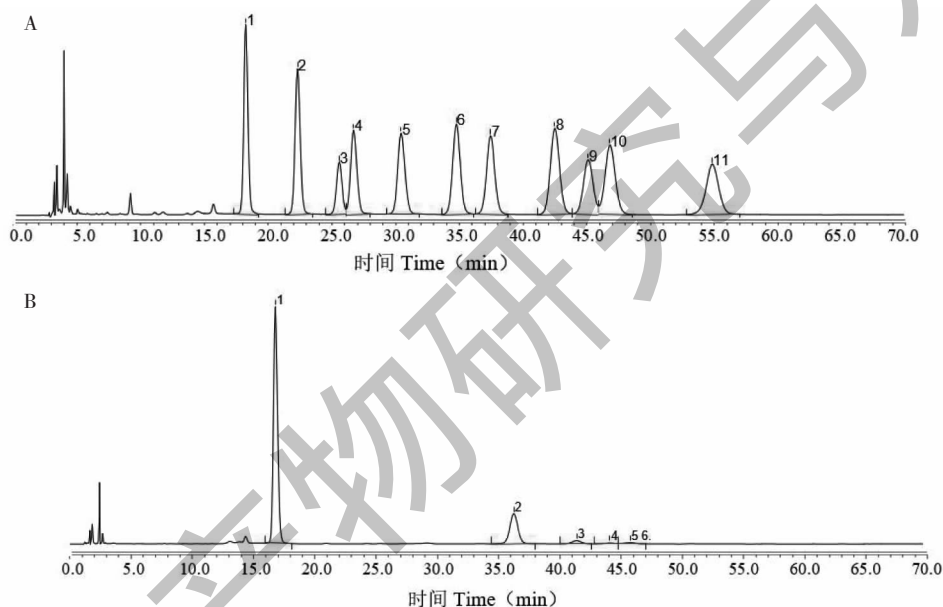


图 1 铁皮石斛花多糖的单糖组成成分分析液相色谱图

Fig. 1 Liquid chromatogram of monosaccharide composition analysis of polysaccharide from flower of *D. officinale*

注:1. 甘露糖;2. 氨基葡萄糖;3. 鼠李糖;4. 葡萄糖醛酸;5. 半乳糖醛酸;6. 氨基半乳糖酸盐;7. 葡萄糖;8. 半乳糖;9. 木糖;10. 阿拉伯糖;11. 岩藻糖。Note:1. Mannose;2. Glucosamine hydrochloride;3. L-Rhamnose monohydrate;4. Glucuronic acid;5. D-Galacturonic acid;6. Galactosamine hydrochloride;7. Glucose;8. Galactose;9. Xylose;10. Arabinose;11. Fucose.

#### 2.2.2 HPGPC 检测铁皮石斛花多糖的分子量

根据标准品分子量大小的对数与出峰时间绘制出的标准曲线并结合铁皮石斛花多糖的 HPGPC 色谱图(见图 2)计算可知,铁皮石斛花多糖分子量分布在 2 216 ~ 3 295 Da,凝胶色谱图表明铁皮石斛花多糖为非均一多糖,分子量分布范围较广,有待进一步进行分离纯化得到均一组分。

#### 2.2.3 铁皮石斛花多糖纯度测定

核酸和蛋白质在紫外光谱中的特征吸收峰分别是 260、280 nm,因此通过紫外扫描的方法可以确定

多糖中蛋白质、核酸和肽类等杂质的含量<sup>[20]</sup>。对多糖溶液进行 190 ~ 400 nm 的紫外扫描,如图 3 可看出铁皮石斛花多糖在 260 ~ 280 nm 未出现明显吸收峰,表明多糖样品中不含或者含有微量的核酸和蛋白质成分。

#### 2.2.4 FT-IR 分析

采用 FT-IR 光谱测定了铁皮石斛花多糖在 4 000 ~ 500  $\text{cm}^{-1}$  的红外吸收光谱,结果如图 4 所示,在 872  $\text{cm}^{-1}$  处有明显的振动吸收峰,表明此多样样品以  $\beta$ -糖苷键为主,在 3388  $\text{cm}^{-1}$  观察到一个宽

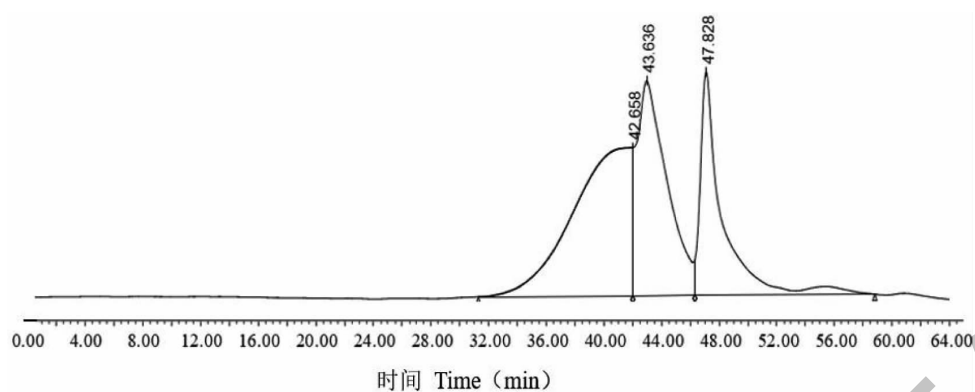


图2 铁皮石斛花多糖的 HPGPC 色谱图

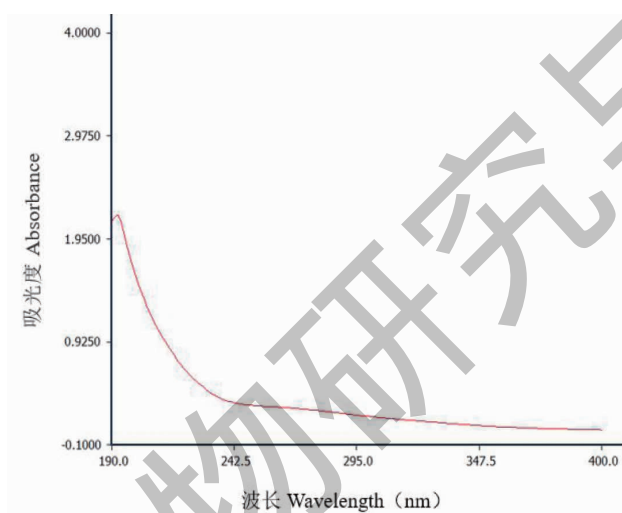
Fig. 2 HPGPC chromatogram of polysaccharide from flower of *D. officinale*

图3 铁皮石斛花多糖的紫外全波长扫描

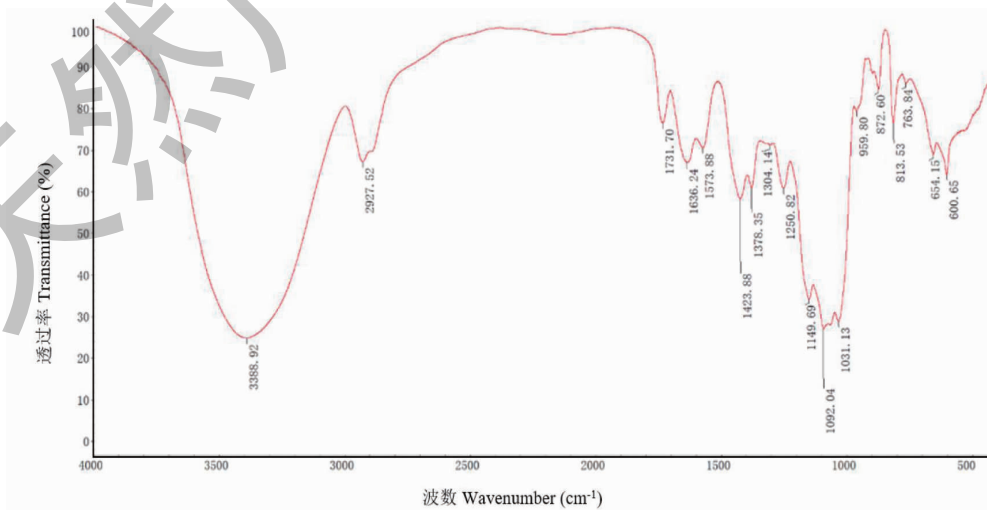
Fig. 3 UV full wavelength scanning analysis of polysaccharide from flower of *D. officinale*

图4 铁皮石斛花多糖的 FT-IR 光谱图

Fig. 4 FT-IR spectrum of polysaccharide from flower of *D. officinale*

峰,这表示多糖分子内部或分子间的 O-H 伸缩振动的吸收。在  $2927\text{ cm}^{-1}$  处检测到的吸收峰,代表糖类 C-H 伸缩振动,这表明该物质很可能是糖类化合物。而在  $1200$  至  $1400\text{ cm}^{-1}$  范围内的吸收峰属于 C-H 的变角振动。在  $1731\text{ cm}^{-1}$  发现的吸收峰表明存在糖醛酸。此外,  $1250\text{ cm}^{-1}$  处的吸收峰是多糖类物质的  $\text{-C}=\text{O}=\text{C}$  或  $\text{-C}=\text{O}$  伸缩振动吸收峰。在  $872\text{ cm}^{-1}$  和  $813\text{ cm}^{-1}$  处同时检测到的吸收峰,可能表明甘露糖的存在。

### 2.3 铁皮石斛花多糖对小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 免疫作用的影响

#### 2.3.1 铁皮石斛花多糖对 RAW 264.7 细胞的吞噬活性的影响

铁皮石斛花多糖作用于 RAW 264.7 细胞的吞噬活性结果如图 5 所示,多糖浓度在  $50\sim 200\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$  范围内,RAW 264.7 细胞的吞噬活性呈剂量依赖型上升,多糖浓度在  $200\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$  时巨噬细胞吞噬活性与  $1\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$  LPS 诱导作用差距较小。这表明铁皮石斛花多糖能够有效激活巨噬细胞,促进其吞噬能力。

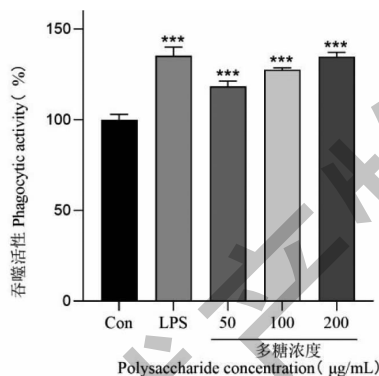


图 5 铁皮石斛花多糖对 RAW 264.7 细胞的吞噬活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 5 Effect of polysaccharide from flower of *D. officinale* on phagocytic activity of RAW 264.7 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

注:与 Con 比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ,下同。

Note: Compared with Con, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , the same below.

#### 2.3.2 铁皮石斛花多糖对 RAW 264.7 细胞的 NO 释放量的影响

采用 NO 试剂盒检测多糖对巨噬细胞产生 NO 的影响。如图 6 所示,多糖可以促进 RAW 264.7 细胞 NO 的分泌,且呈剂量相关性。与对照组相比,铁皮石斛花多糖组的 NO 分泌量随浓度升高而增加,但低于阳性对照 LPS 组的分泌量,由此可知铁皮石

斛花多糖具有一定的免疫调节作用。

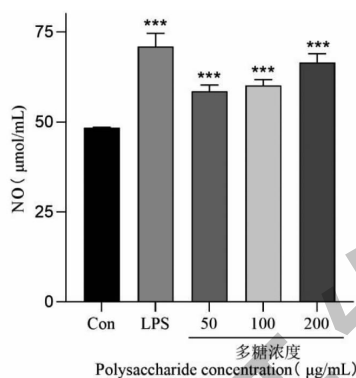


图 6 铁皮石斛花多糖对 RAW 264.7 细胞的 NO 释放量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 6 Effect of polysaccharide from flower of *D. officinale* on NO release in RAW 264.7 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

#### 2.3.3 铁皮石斛花多糖对小鼠巨噬细胞 ROS 生成的影响

与空白对照组相比,阳性对照组 LPS ( $1\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的 ROS 荧光强度更强(见图 7A),表明 ROS 水平较高;而用不同浓度的铁皮石斛花多糖处理后,ROS 荧光强度逐渐增加,表明 ROS 水平随多糖浓度的增加而逐渐升高。流式细胞仪数据也显示出一样的结果(见图 7B),阳性对照组 LPS 的 ROS 含量比对照组多;铁皮石斛花多糖组的 ROS 含量随浓度的增加而增多,  $200\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度时 ROS 含量接近阳性对照组。这表明铁皮石斛花多糖可以诱导的 ROS 生成。

#### 2.3.4 铁皮石斛花多糖对 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路相关蛋白表达的影响

为了进一步研究多糖诱导的免疫调节机制,检测了与免疫应答相关的蛋白表达水平。结果显示在不同浓度多糖处理下的细胞中,TLR4 蛋白的表达以剂量依赖的方式增加, p-NF- $\kappa$ B 表达也以剂量依赖性增加(图 8)。结果表明铁皮石斛花多糖发挥免疫作用可能是通过 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路起作用。

### 3 讨论与结论

铁皮石斛是我国传统名贵药材与食材,是《中国植物红皮书》收录的保护物种和国家重点二级保护濒危植物<sup>[21]</sup>。尽管铁皮石斛主要用于药用的部分是其茎,但随着石斛制品种类的增多,铁皮石斛的叶片、花朵等非药用部分的活性成分及其加工应用也日益受到重视,然而这些部分的开发和利用仍显不足。本文以铁皮石斛花多糖为研究对象,对铁皮

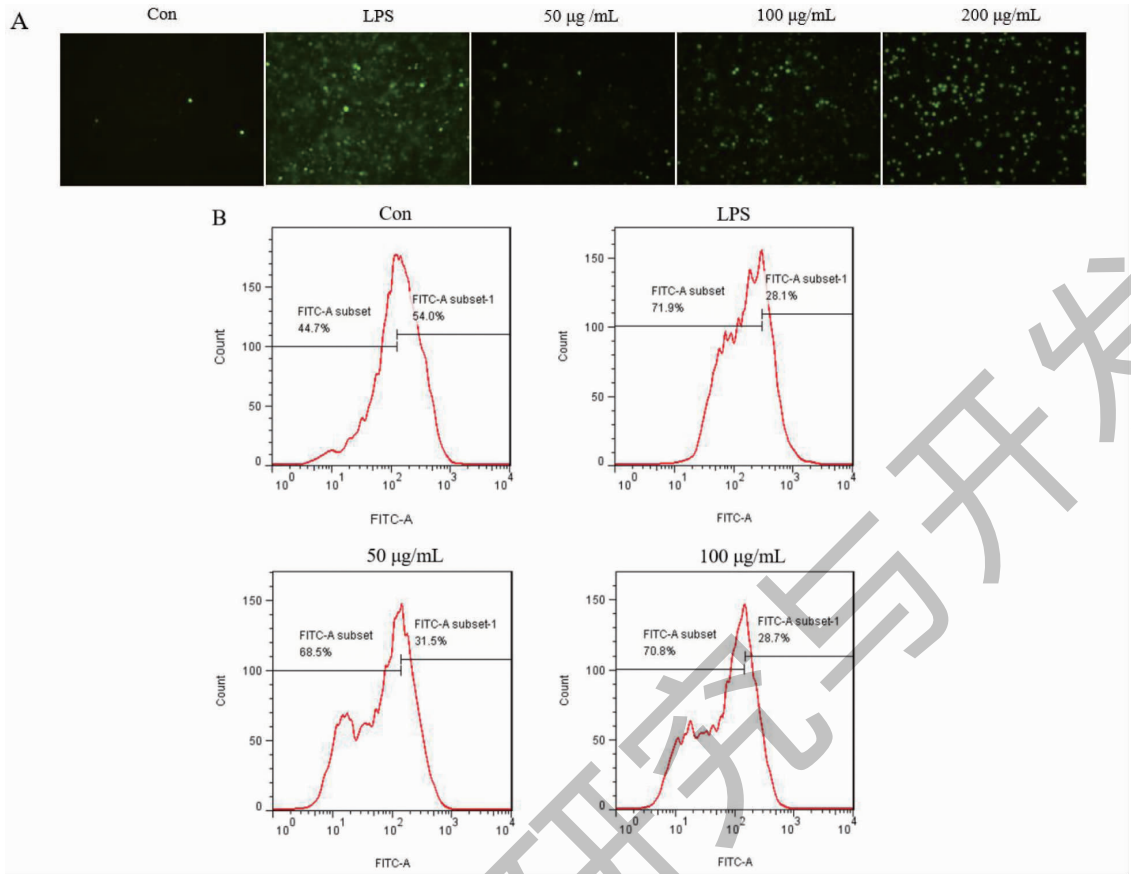


图7 铁皮石斛花多糖对 RAW 264.7 细胞 ROS 生成的影响

Fig. 7 Effect of polysaccharide from flower of *D. officinale* on ROS generation in RAW 264.7 cells

注:A. 倒置荧光显微镜检测;B. 流式细胞仪检测。Note:A. Inverted fluorescence microscope inspection;B. Flow cytometry test.

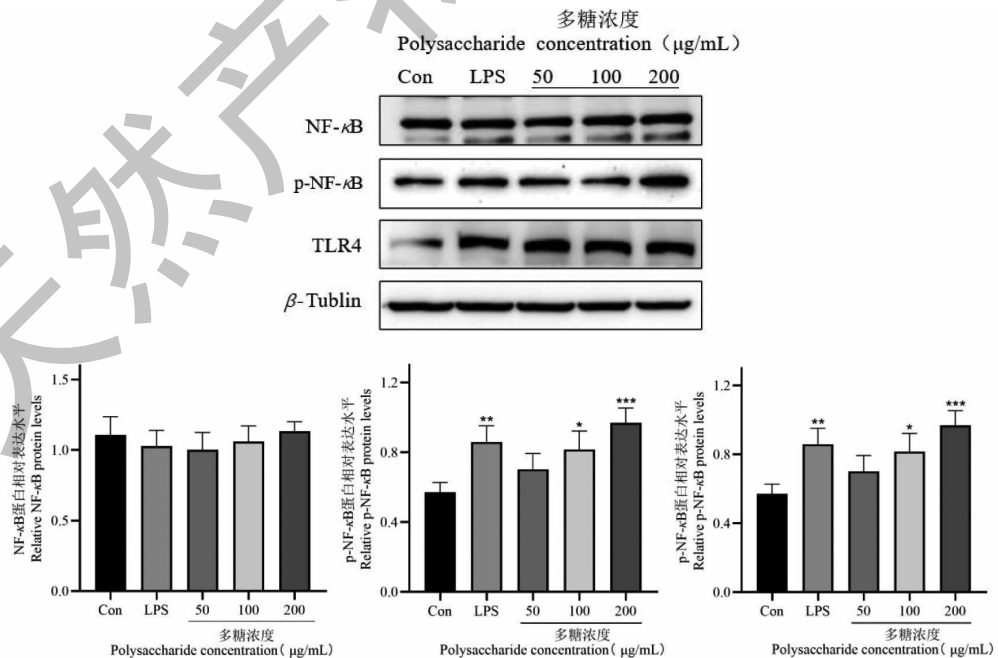


图8 铁皮石斛花多糖对 TLR4/NF-κB 信号通路相关蛋白表达的影响

Fig. 8 Effect of polysaccharide from flower of *D. officinale* on the expression of proteins related to the TLR4/NF-κB signaling pathway

石斛干花进行提取、分离、纯化,得到了铁皮石斛花多糖,其得率为0.578%,采用HPLC检测铁皮石斛花多糖的单糖组成,用HPGPC检测分子量,结果表明其主要由甘露糖、葡萄糖组成,此外还有微量半乳糖、木糖、阿拉伯糖,这与文献报道<sup>[22]</sup>的研究结果一致。然后建立了LPS诱导的RAW 264.7细胞损伤模型,采用吞噬活性检测、试剂盒法、免疫荧光和Western blot等技术,评价了铁皮石斛花多糖对LPS诱导的免疫应答因子分泌水平和相关信号通路激活的情况。结果表明,铁皮石斛花多糖能够有效激活巨噬细胞,促进其吞噬能力,在50~200 μg/mL浓度范围内,RAW 264.7细胞的吞噬活性呈剂量依赖型上升,多糖还促进了RAW 264.7细胞NO的分泌,与对照组相比,多糖处理组的NO分泌量随浓度升高而增加。免疫荧光检测的结果也是一致的,铁皮石斛花多糖可以诱导的ROS生成,与对照组相比,多糖处理组的ROS生成量随处理浓度的增加而增多,200 μg/mL浓度时ROS含量接近LPS诱导组。Western blot实验结果也表明,多糖预处理的RAW 264.7细胞中免疫应答因子p-NF-κB和TLR4被激活,一系列的结果都表明,铁皮石斛花多糖具有免疫调节作用,其机制可能与TLR4/NF-κB信号通路活化有关。结构特征决定并影响多糖的生物活性,其中单糖是多糖的基本单位,甘露糖显著影响多糖的免疫调节活性<sup>[23]</sup>,而铁皮石斛花多糖中的主要单糖也是甘露糖,因此在进行单糖组成、分子量测定后,我们就对铁皮石斛花多糖的免疫调节作用进行深入探究。本研究可为开发铁皮石斛花多糖的大健康产品奠定基础。同时铁皮石斛花是食药同源的一种健康食品,开展其功能研究符合国家重视食药同源与营养健康产业发展的要求,也顺应了健康绿色发展的趋势。

#### 参考文献

- Long CX, He L, Guo YF, et al. Effects of *Dendrobium candidum* polysaccharide on immunity, intestinal microbiota and enzyme activity in mice with spleen deficiency constipation [J]. Res Dev Nat Prod(天然产物研究与开发), 2017, 29: 1020-1024.
- Chan CF, Wu CT, Huang WY, et al. Antioxidation and melanogenesis inhibition of various *Dendrobium tosaense* extracts [J]. Molecules, 2018, 23: 1810.
- Zhou C, Xie Z, Lei Z, et al. Simultaneous identification and determination of flavonoids in *Dendrobium officinale* Kimura & Migo [J]. Chem Cent J, 2018, 12: 40.
- Liu ZP, Guo YY, Liu JJ, et al. Effect of strains and parts on amino acids of *Dendrobium officinale* [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2015, 40: 1468-1472.
- Ying Y, Hao W. Immunomodulatory function and anti-tumor mechanism of natural polysaccharides: a review [J]. Front Immunol, 2023, 14: 1147641.
- Mohan K, Muralisankar T, Uthayakumar V, et al. Trends in the extraction, purification, characterisation and biological activities of polysaccharides from tropical and subtropical fruits: A comprehensive review [J]. Carbohydr Polym, 2020; 238: 116185.
- Liu Y. Isolation, purification, structural elucidation and the applied research of polysaccharides from *Wedlia prostrata* [D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology(浙江工业大学), 2014.
- Zhang Y, Gao F, Wang XJ, et al. Review on main chemical constituents and biological activity in *Dendrobium officinale* [J]. Pharm Biotechnol(药物生物技术), 2015, 22: 557-561.
- Zhao Y, Son YO, Kim SS, et al. Antioxidant and anti-hyperglycemic activity of polysaccharide isolated from *Dendrobium chrysotoxum* Lindl [J]. Biochem Mol Biol, 2007, 40: 670-677.
- Wang K, Wang H, Liu Y, et al. Cao P, et al. *Dendrobium officinale* Kimura & Migo polysaccharide attenuates type 2 diabetes mellitus via the regulation of PI3K/Akt mediated glycogen synthesis and glucose metabolism [J]. J Funct, 2018, 40: 261-271.
- Jun X, Quan BH, Song LL, et al. Chemistry, bioactivity and quality control of *Dendrobium*, a commonly used tonic herb in traditional Chinese medicine [J]. Phytochem Rev, 2013, 12: 341-367.
- Wei Y, Wang L, Wang, D. et al. Characterization and anti-tumor activity of a polysaccharide isolated from *Dendrobium officinale* Kimura & Migo grown in the Huoshan County [J]. Chin Med, 2018, 13: 47.
- Liang J, Zeng YJ, Wang HF, et al. Extraction, purification and antioxidant activity of novel polysaccharides from *Dendrobium officinale* Kimura & Migo by deep eutectic solvents [J]. Nat Prod Res 2019, 33: 3248-3253.
- Chen RC. Extraction, isolation, purification, structure and bio-activity of the polysaccharide from *Dendrobium candidum* [D]. Fuzhou: Fujian Normal University(福建师范大学), 2015.
- Zhao XD, Liu Y, Tao XY, et al. Cellular immune activity of *Dendrobium officinale* polysaccharide with different molecular



- weight[J]. J Chin Pharm Sci (中国药学杂志), 2023, 58: 997-1004.
- 16 Shan JL, Cheng HY, Wen L, et al. Advances in research of TLR/MyD88/NF- $\kappa$ B signaling pathway in different diseases [J]. Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报), 2019, 35: 451-455.
- 17 Shang XL, Liu CY, Dong HY, et al. Extraction, purification, structural characterization, and antioxidant activity of polysaccharides from Wheat Bran[J]. J Mol Struct, 2021, 1233: 130096.
- 18 Wang N, Zhang X, Wang S, et al. Structural characterisation and immunomodulatory activity of polysaccharides from white asparagus skin[J]. Carbohydr Polym, 2020, 227: 115314.
- 19 Wei Y, Wang LW, Wang DJ, et al. Characterization and antitumor activity of a polysaccharide isolated from *Dendrobium officinale* Kimura & Migo grown in the Huoshan County[J]. Chinese Med, 2018, 13: 47.
- 20 Zhang J, Zhang QL, Lu FL, et al. Isolation, purification and structural characterization of polysaccharides from dried *Siraitia grosvenorii* fruit and their immunodulatory activity *in vitro* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2024, 55: 1100-1109.
- 21 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [M]. Beijing: China Medical Technology Press, 2020.
- 22 Sun SJ, Deng P, Peng CE, et al. Extraction, structure and immunoregulatory activity of low molecular weight polysaccharide from *Dendrobium officinale* [J]. Polymers (Basel), 2022, 14: 2899.
- 23 Wang Z, Zheng Y, Lai Z, et al. Effect of monosaccharide composition and proportion on the bioactivity of polysaccharides: a review [J]. Int J Biol Macromol, 2024, 254: 127955.
- 
- (上接第 2015 页)
- 14 Wang TT, Ye X, Bian W, et al. Allopregnanolone modulates GABAAR-dependent CaMKII $\delta$ 3 and BDNF to protect SH-SY5Y cells against 6-OHDA-induced damage[J]. Front Cell Neurosci, 2022, 16: 882351.
- 15 Li T, Ye W, Huang B, et al. Determination and pharmacokinetic study of echinatin by UPLC-MS/MS in rat plasma[J]. JPharmaceut Biomed, 2019, 168: 133-137.
- 16 Liu J, Zhu ZA, Yang YH, et al. Preparation, characterization, pharmacokinetics, and antirenal injury activity studies of flicofalcone A-loaded liposomes [J]. J Food Biochem, 2022, 46: e14007.