

白及干品与鲜品中白及胶的结构表征及其免疫活性研究

杨益娜^{1,2}, 曾焱^{1,2}, 邵会艳²,

李严朗², 席星雨^{1,2}, 胡江苗^{1,2*}, 杨柳^{2*}

¹安徽中医药大学药学院, 合肥 230012; ²中国科学院昆明植物研究所 植物化学与天然药物重点实验室, 昆明 650201

摘要: 探究干品白及与鲜品白及中的白及胶 (*Bletilla striata* gel, BSG) 的理化性质、流变特性、结构特征以及免疫调节活性区别。通过水提醇沉法得到干品白及中的白及胶 (BSG-1) 和鲜品白及中的白及胶 (BSG-2)。以结构表征和流变特性为主, 结合理化性质阐明 BSG-1 和 BSG-2 的异同点, 并进一步从细胞层面探究了两者的免疫活性差异。实验结果表明, BSG-1 和 BSG-2 的分子量跨度大 ($3.90 \times 10^2 \sim 1.37 \times 10^8$ Da); BSG-2 的得率较高、单糖组成更加丰富, 而 BSG-1 表现出更好的粘度。实验发现, 在不同浓度、温度和 pH 条件下 BSG-1 和 BSG-2 的粘度随温度的下降呈直线下降趋势; 酸碱度对粘度的影响明显, 过酸或过碱均可减小其粘度; 浓度是影响粘度的关键因素之一, 随着 BSG-1 和 BSG-2 浓度的增加其粘度明显上升。值得关注的是, 随着浓度大于 2 mg/mL 或环境 pH > 9, 两者粘度差异显著增大, BSG-1 粘度远高于 BSG-2。从微观角度分析, BSG-2 相较于 BSG-1 表面较光滑、其结构类型更丰富, 并且具有独特的丝状结构和疏松的孔隙网状结构。BSG-1 与 BSG-2 均表现出一定的免疫调节活性, 但在不同浓度下两者表现的免疫活性存在差异性。本研究从多个层面揭示了干品白及与鲜品白及中的白及胶的差异, 可为白及胶在食品、药品、保健品等领域的应用提供理论参考。

关键词: 白及胶; 流变学; 结构表征; 理化性质; 免疫调节

中图分类号: R932

文献标识码: A

Study on structural characteristics and immunomodulatory activity of gel from dried and fresh *Bletilla striata*

YANG Yi-na^{1,2}, ZENG Yi^{1,2}, SHAO Hui-yan²,

LI Yan-lang², XI Xing-yu^{1,2}, HU Jiang-miao^{1,2*}, YANG Liu^{2*}

¹College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; ²Key Laboratory of Phytochemistry and Natural Medicines, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China

Abstract: This study aims to compare the *Bletilla striata* gel (BSG) from fresh and dried from multiple aspects

including physical and chemical properties, rheological properties, structural characterization and immunomodulatory activity. Gel of dried *B. striata* (BSG-1) and gel of fresh *B. striata* (BSG-2) were obtained using water-extraction and alcohol-precipitation method. The similarities and differences between BSG-1 and BSG-2 were primarily clarified through structural characterization and rheological properties, in conjunction with physicochemical properties, while exploring immune activity at the cellular level. BSG-1 and BSG-2 exhibited a wide range of molecular weights (3.90×10^2 - 1.37×10^8 Da). BSG-2 demonstrated a higher yield and richer monosaccharide composition, whereas BSG-1 exhibited better viscosity. Under varying concentrations, temperatures and pH conditions, the viscosity of BSG-1 and BSG-2 decreased with decreasing temperature. Partial acid or alkali treatment significantly reduced viscosity. Concentration emerged as a key factor influencing viscosity, with a notable increase in viscosity corresponding to higher BSG-1 and BSG-2 concentrations. It is noteworthy that when the sample concentration greater than 2 mg/mL or the ambient pH>9, the viscosity of BSG-1 is significantly higher than that of BSG-2 significantly. From a microscopic perspective, BSG-2 featured a smoother surface, a greater variety of structure types, and a unique filamentous and porous network structure compared to BSG-1. In terms of immunomodulatory activity, differences were observed in the activities of BSG-1 and BSG-2 at various concentrations. Research indicates that there are distinct difference in physicochemical properties, structural characterization and immune activity regulation between the gels from fresh and dried *B. striata*, which can provide the theoretical basis for the application of BSG in various fields.

Key words: *B. striata* gel, rheology, structural characteristics, physicochemical properties, immunomodulatory activity.

温带地生型植物中兰科 (Orchidaceae) 白及属 (*Bletilla*) 植物具有颇高的经济价值, 其中白及 (*Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f) 是最为突出的类群之一。白及在我国分布广泛, 如贵州, 云南, 四川等¹, 多生长于较潮湿的地理位置, 环境适应能力强、种植广泛。白及又称连及草、甘根, 最早被收录于《神农百草经》, 性寒, 气微, 味苦、涩, 嚼之有黏性, 其功效为收敛止血、消肿生肌², 也可用于治疗咯血, 吐血, 外伤出血, 疮疡肿毒, 皮肤皲裂等疾病³。白及富含大量的胶质活性物质是主要药用成分之一。因其水溶液具浆胶粘性, 质感粘稠, 常称为“白及胶 (*Bletilla striata* gel, BSG)”。白及胶是经水提纯化得到的大分子量的杂多糖, 干燥后表现为白色粉末。研究发现, 白及胶的构成主要为葡甘聚糖, 由甘露糖和葡萄糖以 1→4 糖苷键键合而成⁴, 分子量为几万甚至几十万⁵, 也有研究发现, 白及胶除甘露糖和葡萄糖外, 还含有少量的半乳糖⁶。但目前对其精确结构尚未阐明。白及胶作为白及的主成分之一, 其生物活性非常广泛, 主要包括促进伤口愈合、止血

抗炎、抗溃疡、免疫调节等。经研究发现相关疾病的病因均与炎症反应有关。白及胶在临床应用中可发挥收敛止血、损伤保护等效果的主要作用机制与免疫调节密不可分，例如，应用白及胶于肾穿刺通道术中止血效果好，并发挥了其特有的免疫调节活性抑制炎症反应促进穿刺通道组织的愈合⁷；白及胶/微米三七膏含药血清可减少巨噬细胞分泌炎症因子，从而改善脂多糖（lipopolysaccharide, LPS）诱导的炎症反应⁸；白及多糖可通过减少炎症因子的表达，对肠黏膜损伤和急性肝损伤产生保护作用⁹。

随着科技的发展，学者们发现愈来愈多白及胶的生物活性，因此其逐步应用于食品药品、工业及日化产业。例如，白及胶通过物理共混的方式制备止血敷料；作为化妆品添加剂，改善皮肤问题；作为食品增稠剂和保鲜剂；作糊料或涂料使用。考虑运输和贮存等因素，市面上的白及大多为干燥饮片，为了尽可能保留白及胶等活性成分许多学者对白及的干燥工艺进行了研究与优化¹⁰。据文献报道¹¹，多种中药的干品和鲜品在化学成分上存在差异，且影响其功效。一些学者研究发现白及经过加工后，对白及胶的得率等方面会有所影响¹²。前者对于白及胶的研究主要集中于它的表观形态，为更全面地阐述白及胶的特征，本文对干品白及与新鲜白及中的白及胶以流变学方法为主进行比较，同时对两者的结构表征及免疫调节活性比较分析。以白及胶为关键点从多个层面揭示干品与鲜品白及之间存在的差异，为干鲜品白及的区别应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜、干燥白及鳞茎由禄劝立云农业科技开发有限公司提供，植物标本由中国科学院昆明植物研究所张石宝研究员鉴定为白及（*Bletilla striata*）的鳞茎。

小鼠单核巨噬细胞 RAW 264.7 和树突状细胞（dendritic cells, DC）购买于中科院上海细胞库。

DEAE-52 纤维素（批号：1124E012，美国 Pharmacia 公司）；葡萄糖（批号：DSTDW000501，成都德思特生物技术有限公司，纯度 $\geq 99\%$ ）；甘露糖、半乳糖、果糖（批号：I1606008、K1714130、F108332，上海阿拉丁生化科技股份有限公司，纯度 $\geq 99\%$ ）；半乳糖醛酸、阿拉伯糖（批号：LK70R87、LD10R89，北京百灵威科技有限公司，纯度 $\geq 99\%$ ）。

蛋白质含量测定试剂盒（批号：20231125，南京建成生物工程研究所）；小鼠白细胞介素-6（interleukin-6, IL-6）ELISA 试剂盒（批号：M01211092 R，武汉菲恩生物科技有限公司）；MTS 细胞增殖与细胞毒性检测试剂盒（批号：609348，美国 Sigma 公司）；

LPS（批号：0000211691，美国 Sigma 公司）；中性红（批号：M0312D，大连美伦生物技术有限公司）；DMEM 高糖培养基（批号：2405066，上海达特希尔生物科技有限公司）；胎牛血清（fetal bovine serum, FBS）（批号：10267490，美国 Sigma 公司）；青霉素-链霉素溶液（批号：BL505A，北京蓝杰柯科技有限公司）。

1.2 仪器与设备

Shimadzu UV2700 型紫外光谱仪（日本 Shimadzu 公司）；Aglient1260 液相色谱（美国 Aglient 公司）；奥泰 6000 蒸发光散射检测器（美国 Alltech 公司）；Perkin Elmer Envision 2104 酶标仪（中国上海珀金埃尔默股份有限公司）；Tensor 27 傅里叶变换红外光谱仪（德国 Bruker 公司）；NDJ-55 粘度计（深圳德卡精容量仪有限公司）；Sigma 300 扫描电子显微镜（scanning electron microscope, SEM）（美国 Sigma 公司）；zetatronix 939SZ 多角度纳米粒度及 zeta 电位分析仪（上海奥谱特科技有限公司）。

1.3 方法

1.3.1 白及胶的分离纯化

将干燥白及片（新鲜白及块茎去根、洗净、切成均匀薄片，平铺于吸水纸上放入 105 °C 烘箱，干燥至恒重）清洗 3 次后放于通风处挥干表面水分，据 Gao 等¹³采用的方法作进一步改善，将干燥白及置于烧杯中，加入 85%乙醇浸提三次（2.5 L/次）进行脱色处理（去除部分醇溶性小分子），用纱布过滤后获得脱色的白及渣。脱色后的白及渣置于室温通风晾干，再进行粉碎处理，然后加入 20 L 蒸馏水，沸水提取 4 h，提取三次（使水溶性多糖充分浸入水提液）。过滤，合并滤液，65 °C 减压浓缩至 10 L，向浓缩液中加入 95%乙醇，慢加快搅，使乙醇终浓度达到 70%，放置过夜（利用相似相溶原理，多糖易溶于水，不溶于醇，会析出从而获得粗多糖沉淀），离心（5 000 r/min，20 min），所得沉淀加 10 L 的热水复溶，离心去除滤渣，上清液用 Sevage 法（氯仿：正丁醇=4：1）除蛋白，共三次，得到的浓缩，冷冻干燥，即得干品白及的白及胶（BSG-1）。新鲜白及假鳞茎去除须根洗净、放于通风处挥干表面水分后切成薄片，同法处理得到新鲜白及的白及胶（BSG-2）。根据公式（1）计算白及胶得率（ R_Y ）。

$$R_Y = M_2 / M_1 \times 100\% \quad (1)$$

式中： M_1 为脱色晾干后白及块茎质量（g）； M_2 为白及胶质量（g）。

1.3.2 分子量测定

联用高效液相色谱-蒸发光散射检测器（HPLC-ELSD）测定白及胶样品分子量分布范围。根据物质分子量（molecular weight, M_w ）不同洗脱时间不同的原理，选择不同分子

量的葡聚糖标准品获得各自的洗脱时间，以保留时间 (t_R) 为 x 轴、分子量对数 ($\log_{10}Mw$) 为 y 轴绘制标准曲线。其色谱条件如下：色谱柱：Shodex KS-804 凝胶色谱柱 (8.0 mm × 300 mm)；柱温：30 °C；进样量：15 μ L；流动相：水；流速：1 mL/min；样品浓度：1 mg/mL 进样分析，蒸发光检测记录信号。

1.3.3 理化性质分析

根据苯酚-硫酸法测定白及胶在 490 nm 波长处的吸光度，以葡萄糖为标准品绘制标准曲线并计算总糖质量分数。根据二喹啉甲酸法，使用蛋白含量测定试剂盒测定蛋白质含量。根据间羟基苯酚法，测定白及胶中的糖醛酸含量，以半乳糖醛酸为标准品绘制标准曲线，计算糖醛酸质量分数。

1.3.4 单糖组成的测定

采用 PMP (1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮) 柱前衍生化法¹⁴测定单糖组成。以果糖 (fructose, Fru)、甘露糖 (mannose, Man)、阿拉伯糖 (arabinose, Ara)、半乳糖醛酸 (galacturonic acid, GalA)、葡萄糖 (glucose, Glc) 等为标准品。精密称定 2 mg BSG-1、BSG-2，加入 2 mol/L 三氟乙酸 4 mL，密封后于 110 °C 水解 6 h。水解产物于 5 000 r/min 离心 10 min，取出上清液，加入 1 mL 甲醇，旋转蒸干，重复 5 次以除去三氟乙酸，蒸干的样品溶于 1 mL 纯水。精密量取 0.4 mL 混合对照品溶液、样品溶液，加入 0.4 mL 0.5 mol/L PMP 试剂和 0.3 mol/L NaOH 溶液，充分混合后，70 °C 反应 40 min，冷却后加入 0.4 mL 0.3 mol/L HCl 溶液。加入 1 mL 氯仿充分混匀后静置 5 min，弃去有机层，重复数次至水相澄清。色谱柱：ZORBAX SB-C₁₈ (5 μ m, 4.6 mm × 250 mm)；流动相条件：流动相 A 为乙腈，流动相 B 为 pH 6.8 磷酸缓冲盐，洗脱梯度：0~22 min, 17%A；23~24 min, 17%→19%A；24~55 min, 19%A；柱温：30 °C；流速：0.8 mL/min；检测波长：360、280、254、245、230 nm；进样体积：10 μ L。

1.3.5 流变学特性

采用单因素试验法使用旋转粘度计分析样品在不同浓度、温度及 pH 环境下的粘度特性。配制 BSG-1、BSG-2 样品：不同浓度的样品 (4、2、1、0.5、0.25、0.125 mg/mL)、不同 pH 的样品 (pH=3、5、7、9、11)、不同温度的样品 (10、20、30、40、50、60 °C)，每组样品体积为 30 mL，转速 60 r/min。

1.3.6 红外光谱测定

将 BSG-1、BSG-2 在真空冷冻干燥机中冻干。分别将约 1 mg 的 BSG-1 和 BSG-2 与 100 mg 溴化钾粉末混合压片。使用傅里叶变换红外分析仪在 4 000~400 cm^{-1} 的范围内获得

所有样品的红外光谱.

1.3.7 紫外光谱测定

准确称取 BSG-1、BSG-2 适量，分别用 UP 水溶解为 1 mg/mL 的溶液，用紫外分析仪在 200~400 cm^{-1} 的范围内测定紫外吸收。

1.3.8 微观结构分析

将 5 mg 样品置于样品台上，于真空溅射涂布机内镀一层导电膜（金），采用扫描电镜观测 BSG-1、BSG-2 样品的微观结构特征。

1.3.9 粒径与 zeta 电位分析

利用动态光散射对 BSG-1 和 BSG-2 的粒径分布与 zeta 电位进行测量。

1.3.10 免疫活性研究

1.3.10.1 细胞培养

冻存的 DC 细胞取出后，迅速放入 37 °C 水浴锅中，快速晃动冻存管使细胞在短时间内解冻。然后，转移至 15 mL 无菌离心管中，1 000 g 离心 5 min，弃上清，加入 10 mL 的完全培养基（10% FBS、1% 青霉素-链霉素溶液），轻轻吹打细胞混匀后转移至细胞培养皿中。置于 37 °C，5% CO_2 的培养箱中培养。每天观察细胞生长状况，并及时更换新鲜的培养基。巨噬细胞 RAW 264.7 按同法培养。

1.3.10.2 细胞毒性实验

在 96 孔板中加入 100 μL DC 细胞（ 1×10^4 个/孔），培养 24 h 后弃去细胞上清液，加入 100 μL 用完全培养基稀释的 BSG-1、BSG-2（400、200、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ），同时设置空白对照组，每组均设置 5 个复孔，于 37 °C 培养。分别于 1、24、48 h 后，吸去孔内培养液，按 MTS 试剂盒说明书步骤进行操作测定吸光度值。根据公式（2）计算细胞存活率（ R_c ）。在巨噬细胞 RAW 264.7 的细胞毒性实验中增加阳性对照组（含 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 的完全培养基），其余操作与前述方法一致。

$$R_c = A_1/A_0 \times 100\% \quad (2)$$

式中， A_1 为样品处理组的吸光值； A_0 为空白对照组的吸光值。

1.3.10.3 细胞因子 IL-6 的分泌水平测定

在 24 孔板中加入 500 μL DC 细胞（ 1×10^5 个/孔），培养 24 h 后弃去上清液，药物组给予用基础培养基稀释的不同浓度的 BSG-1、BSG-2（400、200、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ），每孔加入 100 μL ，同时设置空白对照组，每个组别设置 5 个平行，孵育 24 h 后收集上清液，采用 ELISA 法测定 IL-6，实验步骤严格按照说明书进行。

在 24 孔板中加入 500 μL 巨噬细胞 RAW 264.7 (1×10^5 个/孔)，培养 24 h 后弃去上清液，空白组（无添加培养基孵育 24 h）、药物组（样品孵育 4 h 后加入终浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 孵育 18 h）、模型组（LPS 组）（无添加培养基孵育 4 h 后加入终浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 孵育 18 h），其余操作与样品浓度设置同前述方法一致。

1.3.10.4 巨噬细胞吞噬能力测定

配制 0.075% 中性红溶液和细胞裂解液（无水乙醇与醋酸 1 : 1 等体积混合）。在 96 孔板中加入巨噬细胞 RAW 264.7 (1×10^4 个/孔)，培养 24 h 后弃去上清液，药物组给予不同浓度的 BSG-1、BSG-2 (400、200、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，每孔加入 100 μL ，同时设置空白对照组和阳性对照组（含 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 的基础培养基），每个组别设置 5 个平行。干预 24 h 后，弃去上清液，加入 75 μL 的 0.075% 中性红溶液。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 1 h 后，弃上清液，磷酸盐缓冲液洗涤 2 次，加入 75 μL 的细胞裂解液，避光在多微孔板振荡器上振荡 30 min，酶标仪波长为 540 nm 处测定其吸光值。据公式 (3) 计算吞噬率 (R_p)。

$$R_p = A_1/A_0 \times 100\% \quad (3)$$

式中， A_1 为样品处理组的吸光值； A_0 为空白对照组的吸光值。

1.3.11 统计学处理

采用 GraphPad Prism 8.0、Origin 2019 进行统计学分析，计量资料采用平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两组之间使用 t 检验的方法。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 BSG-1 与 BSG-2 的分离纯化及理化性质

由表 1 可见，BSG-1 和 BSG-2 的白及胶得率、总糖含量、糖醛酸含量均存在差异性。同法操作下 BSG-1 得率 (53.58%) 高于 BSG-2 得率 (47.33%)；而 BSG-2 的总糖含量达 90.40% 高于 BSG-1 的总糖含量 (81.42%)；此外，BSG-2 的糖醛酸含量达 6.11% 高于 BSG-1 (5.83%)。根据实验结果，两者几乎不存在蛋白质。

表 1 BSG-1 和 BSG-2 的得率、总糖含量、蛋白质含量以及糖醛酸含量 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Extraction rate, polysaccharide content, protein and uronic acids contents of BSG-1 and BSG-2 ($\bar{x} \pm s,$

组别 Group	$n = 6$			
	得率 Extraction rate (%)	总糖含量 Polysaccharide content (%)	蛋白含量 Protein content (%)	糖醛酸含量 Uronic acids content (%)
BSG-1	53.58	81.42 \pm 1.46	0.35 \pm 0.011	5.83 \pm 0.108
BSG-2	47.33	90.40 \pm 1.74	0.87 \pm 0.028	6.11 \pm 0.074

2.2 BSG-1 与 BSG-2 的分子量分布范围及单糖构成

采用 HPLC 测定两者的分子量，结果如图 1 所示，BSG-1 和 BSG-2 的出峰时间有明显差异，BSG-1 在保留时间 (t_R) 为 7.6 min 处有明显较高的吸收峰， t_R 为 5.9 min 处有较小吸收峰。相较于 BSG-1，BSG-2 在 t_R 为 8.5 min 处有显著吸收峰且含量较高， t_R 为 10.3 min 处也有一个较小吸收峰。借助于不同分子量的葡聚糖标准品进行相对分子量测定绘制标准曲线，如图 2 所示，由此建立的拟合方程为 $y=-1.259 3x+15.569$ ($R^2=0.998 2$)。计算后可知 BSG 的分子量跨度大、分布广，BSG-1 分子量较大 ($9.96\times 10^5\sim 1.37\times 10^8$ Da)，BSG-2 较小 ($3.90\times 10^2\sim 7.3\times 10^4$ Da)。在构建的 HPLC 色谱条件下各单糖 PMP 衍生物分离度较好，进一步分析 BSG-1 和 BSG-2 的单糖组成，结果如图 3 所示。BSG-1 和 BSG-2 的单糖组成大部分相似。BSG-1 由 Man、GalA、Glc 和 Ara 组成，摩尔比约为 3:0.1:2:0.2。BSG-2 由 Man、GalA、Glc、Ara 和 Fru 组成，摩尔比约为 3:1:1:0.5:0.1。相较于 BSG-1，BSG-2 的单糖组成更丰富且含量更多。

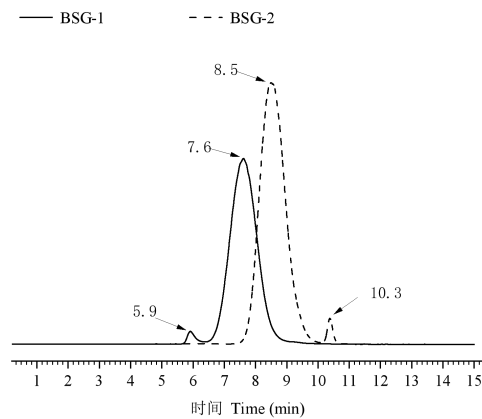


图 1 BSG-1 和 BSG-2 的葡聚糖凝胶色谱图

Fig. 1 Glucan gel chromatogram of BSG-1 and BSG-2

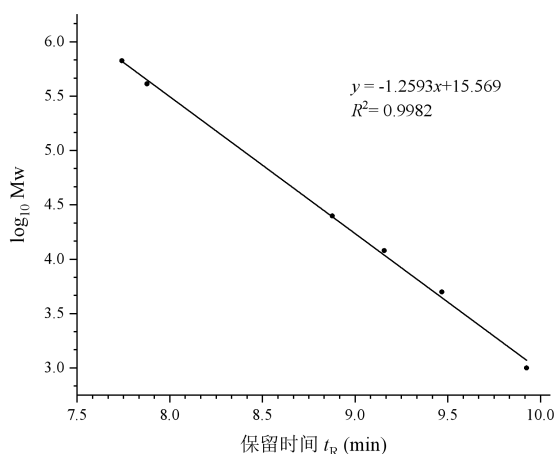


图 2 葡聚糖分子量标准曲线

Fig. 2 Standard curve of glucon molecular weight

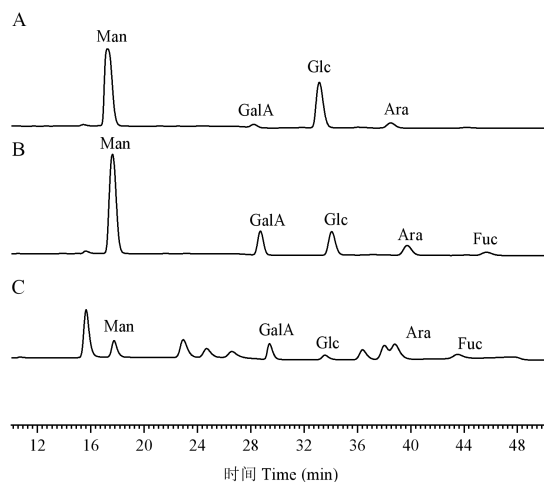


图 3 PMP 衍生后 BSG-1 (A)、BSG-2 (B)、单糖混合标准品 (C) 的 HPLC 图谱

Fig. 3 HPLC chromatograph of BSG-1 (A), BSG-2 (B) and monosaccharide mixed standard (C) after PMP derivation

2.3 BSG-1 与 BSG-2 的紫外图谱及红外图谱比较分析

BSG-1 和 BSG-2 的红外光谱主要特征吸收如图 4 所示， 3431 cm^{-1} 的强宽单峰为糖环醇羟基 O-H 吸收峰； 2889 cm^{-1} 为糖环甲基或亚甲基 C-H 的伸缩振动的吸收峰；在 1737 cm^{-1} 的吸收峰是酯化基团的 C=O 伸缩振动，表明可能存在醛酸¹⁵。 1637 cm^{-1} 为乙酰基或羰基 C=O 的伸缩振动及非对称伸缩振动的吸收峰¹⁶； 1375 cm^{-1} 处的吸收峰为 C-H 振动。 1060 cm^{-1} 为吡喃糖环 C-O-C 的特征吸收峰；此外， 873 和 806 cm^{-1} 是 β 键中 C-H 的典型吸收峰表明有 β -型糖苷键甘露糖残基的存在¹⁷。BSG-1 和 BSG-2 的吸收峰基本相似，而吸收强度有明显差异，表明两者的糖苷键类型和多糖的构型无明显差异，但 BSG-2 的含量显著高于

BSG-1。BSG-1 和 BSG-2 的紫外光谱图结果如图 5，BSG-1 和 BSG-2 在 260 nm 和 280 nm 附近无明显吸收峰表明不含蛋白质和核酸。

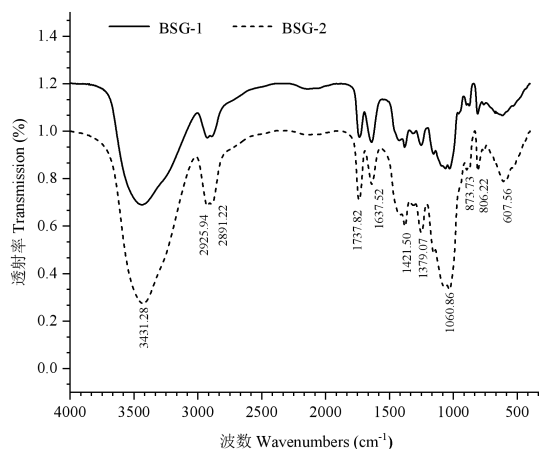


图 4 BSG-1 和 BSG-2 的红外光谱

Fig. 4 FT-IR spectra of BSG-1 and BSG-2

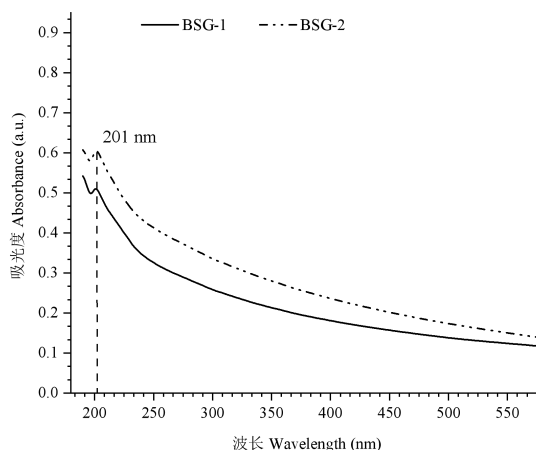


图 5 BSG-1 和 BSG-2 的紫外光谱

Fig. 5 UV spectra of BSG-1 and BSG-2

2.4 BSG-1 与 BSG-2 的流变学特性比较

多糖分子在溶液中以无规则卷曲的形式存在，旋转时分子彼此碰撞缠绕，摩擦力就会增大，同时，一些带电荷的多糖分子由于分子间作用力、链的伸缩也会使粘度发生改变。白及胶以水为溶剂，先溶胀后形成具有一定粘稠度的溶液，粘度的大小受到多糖浓度、温度等因素的影响。如图 6A 所示，随着白及胶浓度的增加，多糖链紧密缠绕形成网络，从而导致粘度特性的增加。当白及胶的浓度小于 1 mg/mL 时，BSG-2 的粘度略微大于 BSG-1，浓度超过 1 mg/mL 后，BSG-1 的粘度急剧增加，在相同浓度下远高于 BSG-2 的粘度。而在

不同温度下，白及胶的粘度随着温度的升高略呈直线下降趋势，如图 6B 所示，不论在何种温度下 BSG-1 的粘度始终大于 BSG-2。当改变白及胶的 pH 时，其粘度变化呈先上升后下降的趋势，在 pH=7 时白及胶的粘度最大，如图 6C 所示，在 pH 为酸性至中性时，白及胶粘度略微上升，BSG-1 和 BSG-2 粘度相差较小；当 pH 从中性调至碱性时，BSG-1 粘度略微下降，但相较于酸性条件仍为上升趋势；BSG-2 粘度则较为明显地下降，与 BSG-2 的粘度形成显著差异。可能的因素为 BSG-1 的多糖链具有较大的 Mw，在相同条件下更易于交织形成网络结构；此外还可能与其多糖链长度有关¹⁸。多糖的浓度、环境的温度和 pH 对多糖链形成稳定的凝胶结构均存在显著的影响；而在一定条件下对 BSG-2 的影响更为显著，使 BSG-2 的稳定结构被破坏。

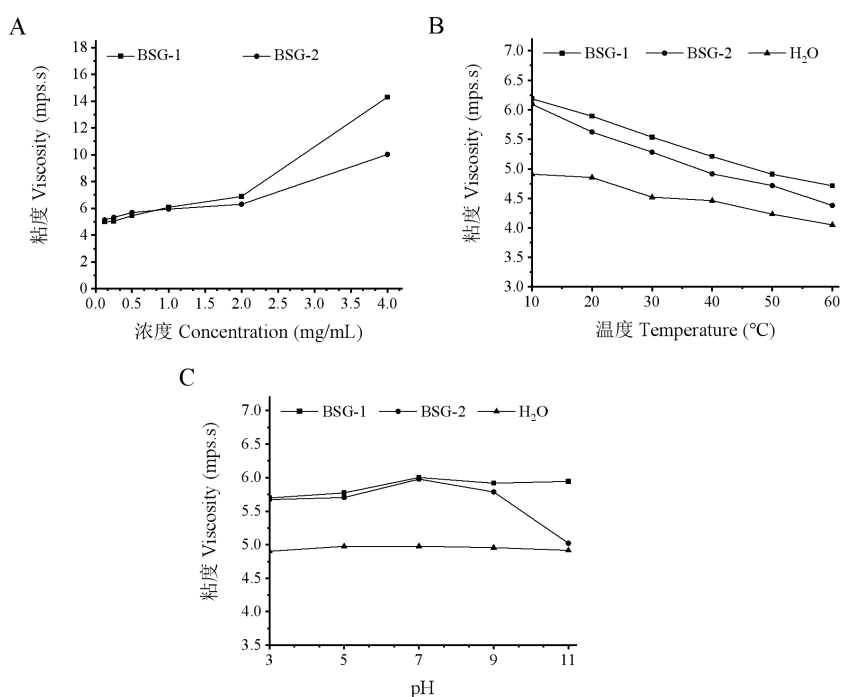


图 6 BSG-1 和 BSG-2 不同浓度 (A)、温度 (B)、pH (C) 对粘度的影响

Fig. 6 Effect of BSG-1 and BSG-2 with different concentration (A), temperature (B) and pH (C) on the viscosity

2.5 BSG-1 与 BSG-2 的粒径与 zeta 电位分布

白及胶的溶液粒径和 zeta 电位的变化可以反映其稳定性。一般来说，粒径越小，zeta 电位绝对值越大的多糖分子，溶解度越高，稳定性越好¹⁹。BSG-1 和 BSG-2 粒径差异较小，如图 7A 所示。而两者的 zeta 电位有显著差异，如图 7B 所示。BSG-2 的 zeta 电位绝对值明显大于 BSG-1，从而判断 BSG-2 的稳定性大于 BSG-1，可能与表面的亲疏水基团数量以及单糖构成等因素有关，由于糖醛酸结构中存在的羧基去质子化，zeta 电位的绝对值随着糖

醛酸含量的升高而逐渐增加²⁰，与 BSG 的糖醛酸含量测定结果基本一致。

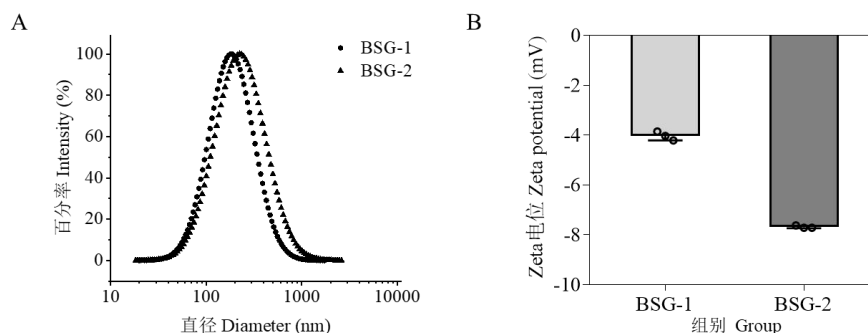


图 7 粒径图 (A) 和 zeta 电位图 (B)

Fig. 7 Pictures of particle size (A) and zeta potentials (B)

2.6 BSG-1 与 BSG-2 的微观结构特征

BSG-1 和 BSG-2 扫描电镜测定结果如图 8 所示，从图中可以看出，两者均具有粗糙的无序片状结构。除此之外，BSG-1 结构更紧密，表面错落分布有突起的棒状结构和少量的丝状结构；BSG-2 的结构更加丰富，表现出伴有缠绕分子链的丝状结构、不规则的层状孔隙结构以及疏松多孔的网状结构。这与两者的流变学特征结果一致，与 BSG-2 疏松的表面结构、粒径更小等特征相符。

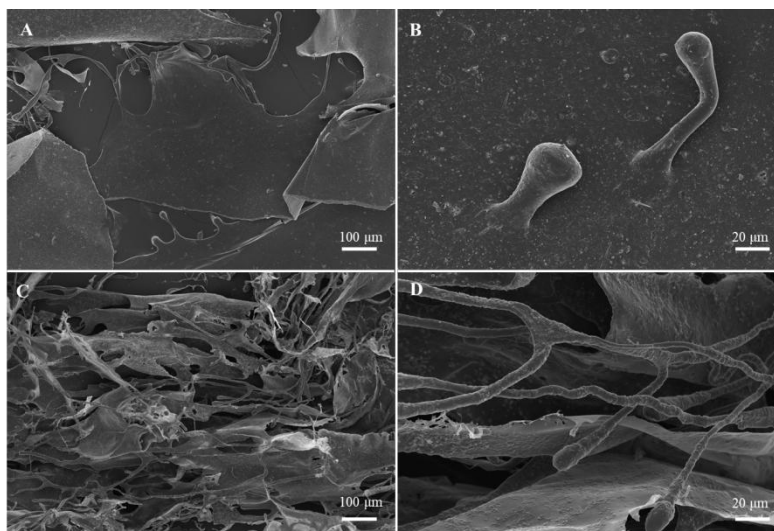


图 8 BSG-1 (A、B) 和 BSG-2 (C、D) 的 SEM 图

Fig. 8 SEM pictures of BSG-1 (A, B) and BSG-2 (C, D)

2.7 免疫活性比较

2.7.1 细胞毒性实验结果

BSG-1 和 BSG-2 对 DC 细胞、巨噬细胞 RAW 264.7 的细胞存活率的影响如图 9 所示，

与空白对照组相比，BSG-1 和 BSG-2 对 DC 细胞、巨噬细胞 RAW 264.7 均没有毒性且能促进 DC 细胞、巨噬细胞 RAW 264.7 的增殖，这表明选择的浓度范围可以进行后续的实验。

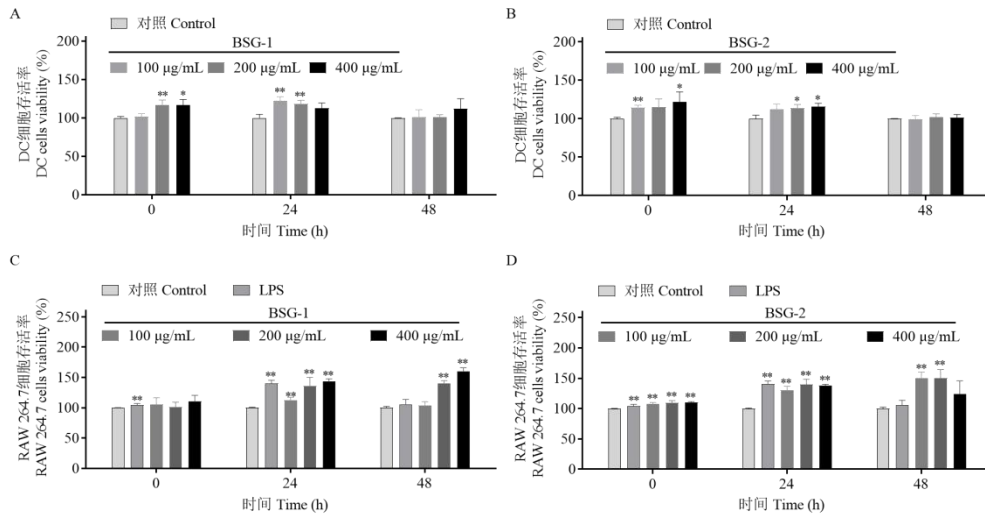


图 9 BSG-1 和 BSG-2 对细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 9 Effect of BSG-1 and BSG-2 on cell viability ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

注：与对照组相比，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

Note: Compare with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.7.2 BSG-1 和 BSG-2 对 DC 细胞、RAW 264.7 细胞 IL-6 分泌量的影响

BSG-1 和 BSG-2 对 DC 细胞 IL-6 分泌量的影响如图 10A 所示，在 BSG-1 和 BSG-2 不同浓度 100、200、400 µg/mL 刺激下与空白对照组比较均有显著差异性。在 BSG-1 刺激下 IL-6 的分泌量与剂量关系呈正态分布，相较于空白组 IL-6 的分泌明显增加，最高分泌量达 196.08 pg/mL。相较于 BSG-1，在 BSG-2 刺激下 IL-6 的分泌显著性下降并存在剂量依赖性，最低分泌量达 17.71 pg/mL。

BSG-1 和 BSG-2 对巨噬细胞 RAW 264.7 分泌 IL-6 的影响如图 10B 所示，模型组 (LPS 组) 与空白对照组相比有显著差异；与模型组相比，BSG-1 和 BSG-2 在 200、400 µg/mL 浓度下具有较明显差异，在 100、200 µg/mL 浓度下 BSG-1 和 BSG-2 表现为抑制 IL-6 分泌，当浓度为 400 µg/mL 时 BSG-1 和 BSG-2 表现为促进 IL-6 分泌。相较于 BSG-1，在 100、200 µg/mL 浓度下 BSG-2 均能更好地抑制 IL-6 分泌；在 400 µg/mL 浓度下 BSG-2 促 IL-6 的分泌程度明显下调。此外，BSG-2 对巨噬细胞 RAW 264.7 分泌 IL-6 的影响存在剂量依赖性，当 BSG-2 浓度为 100 µg/mL 时 IL-6 分泌量最低 (802.61 pg/mL)。

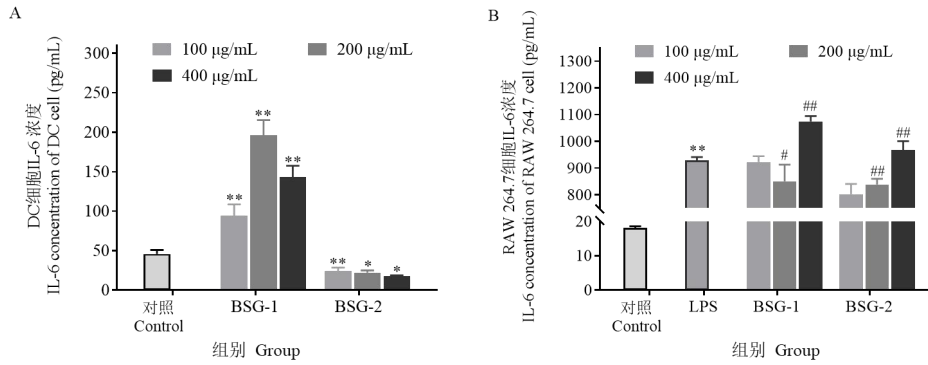


图 10 BSG-1 和 BSG-2 对 DC、RAW 264.7 分泌 IL-6 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 10 Effect of BSG-1 and BSG-2 on IL-6 secretion of DC and RAW 264.7 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

注：与对照组相比，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与模型组（LPS 组）相比，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ 。

Note: Compare with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compare with model group (LPS group), # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

2.7.3 BSG-1 和 BSG-2 对巨噬细胞 RAW 264.7 吞噬作用的影响

经 LPS、BSG-1 和 BSG-2 刺激巨噬细胞 RAW 264.7 后其吞噬中性红的能力均提高，如图 11 所示。与空白对照组相比，不同浓度的 BSG-1 和 BSG-2 的吞噬中性红能力存在显著差异性且存在剂量依赖性。相较于 BSG-1，在 100 µg/mL 和 200 µg/mL 浓度下 BSG-2 的巨噬细胞 RAW 264.7 吞噬中性红能力明显增加。当 BSG-2 浓度为 100 µg/mL 时其吞噬中性红能力达到最大值（192.40%）。以上结果表明，BSG-1 和 BSG-2 均能促进巨噬细胞 RAW 264.7 吞噬中性红，可增强其吞噬能力。

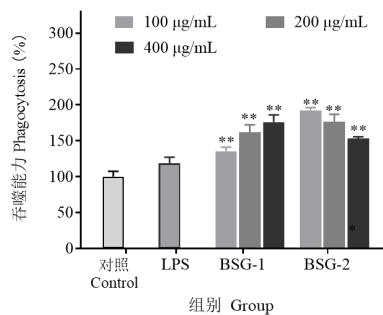


图 11 BSG-1 和 BSG-2 对 RAW 264.7 吞噬能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 11 Effect of BSG-1 and BSG-2 on phagocytosis of RAW 264.7 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

注：与对照组相比，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

Note: Compare with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3 讨论与结论

不同植物多糖的结构存差异而引起其活性差异，可采用红外特征吸收峰、紫外

特征吸收峰以及单糖组成等来鉴定多糖的基本结构。本研究中，单糖组成分析结果表明 BSG-1 大部分为 Man、Glc 组成，而 BSG-2 单糖组成更加丰富包括 Man、GalA、Glc、Ara 和 Fru；紫外检测结果表明，两者几乎不包含核酸和蛋白质而 200 nm 附近存在吸收峰可能是糖环内或糖环间的共轭效应、糖醛酸包含的羰基结构所引起的。从微观结构特征表示，BSG-2 为表面疏松多孔的网状结构，BSG-1 大部分为紧密的片层状结构。对流变学特征进行比较发现在不同浓度、温度和 pH 条件下白及胶的粘度随温度的下降、过酸过碱的 pH 改变、浓度的减小其粘度均明显下降。此外，BSG-1 粘度始终高于 BSG-2 并且随着浓度大于 2 mg/mL 或环境 pH>9，两者粘度差异显著上调，分析原因可能与白及胶的分子量和单糖构成类型密切相关。粒径与 zeta 电位分析结果显示，BSG-2 的粒径、zeta 电位绝对值较大，判断其稳定性大于 BSG-1。这可能是由于两者的 zeta 电位距离-30 mV 均有一定距离，所以更倾向于自组装或与其他分子共组装，分子量较 BSG-1 小的 BSG-2 的单糖组成更为复杂、含有糖醛酸等结构更易发生自组装，导致粒径增大、zeta 电位绝对值上调、稳定性增加。

植物多糖的免疫活性受到了广泛的关注，如刺糖多糖、杏仁多糖等呈现免疫调节活性的探究^[21,22]。树突状细胞和巨噬细胞在免疫调节中从不同途径、时期以及方式发挥着重要作用。树突状细胞在淋巴器官及表皮系统分布较多，如肠道和皮肤。在天然性免疫系统中负责识别病原体，在适应性免疫系统中激活相应免疫细胞，推动免疫效应进程，同时分泌细胞因子增强并调节免疫反应²³。而巨噬细胞具有吞噬作用，是机体感染的第一反应者，在免疫调节中主要参与细胞碎片和病原体的识别、吞噬和降解，并启动适应性免疫反应。本研究免疫活性结果表明，BSG-1 可促进 DC 细胞分泌 IL-6，最高分泌量可达 196.08 pg/mL；而 BSG-2 可抑制 DC 细胞中 IL-6 的分泌，最低分泌量为 17.71 pg/mL。相较于 BSG-1，在相同浓度下 BSG-2 能更好地下调巨噬细胞 RAW 264.7 分泌 IL-6，用 100 μg/mL BSG-2 干预后，其 IL-6 分泌量最低（802.61 pg/mL）。此外，干鲜品白及的白及胶均能促进巨噬细胞 RAW 264.7 吞噬中性红，增强巨噬细胞的吞噬能力。当 BSG-2 浓度为 100 μg/mL 时巨噬细胞 RAW 264.7 吞噬中性红能力最大（192.40%）；在 100、200 μg/mL 浓度下 BSG-2 对巨噬细胞 RAW 264.7 吞噬中性红的影响更大、其吞噬能力提升更显著。两者可能在免疫调节中的不同途径或时期发挥着不同的作用。

综上所述，干品与鲜品白及胶在流变学等结构表征及免疫活性方面均存在着较大的差异。在实际应用中，应根据白及干品和白及鲜品的特性差异而加以区别应用。

参考文献

- 1 Peng Y. Quality Evaluation, Total polyphenols extraction and antioxidant activity of cultivation *Bletilla striata*[D]. Jishou: Jishou University(吉首大学), 2019.
- 2 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I(中华人民共和国药典: 第一部)[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020.
- 3 Zuo SM. Research progress on chemical components and pharmacological action of *Bletilla striata*[J]. China Mod Doc(中国现代医生), 2021, 59(4): 189-192.
- 4 Rui HY, Wu GR, Chen JY, et al. Isolation purification and structural characterization of neutral heteropolysaccharide from *Bletilla striata*[J]. J Anhui Agric Univ(安徽农业大学学报), 2004, 31: 30-33.
- 5 Kong LS, Yu L, Feng T, et al. Physicochemical characterization of the polysaccharide from *Bletilla striata*: effect of drying method[J]. Carbohydr Polym, 2015, 125: 1-8.
- 6 Zhang C, Gao F, Gan S. Chemical characterization and gastroprotective effect of an isolated polysaccharide fraction from *Bletilla striata* against ethanol-induced acute gastric ulcer[J]. Food Chem Toxicol, 2019, 131: 110539.
- 7 Zhao CY. Hemostatic effect of *bletilla* glue, gelatin sponge and MPH in the renal puncture channel and comparative study on the expression of IL-10 and TNF- α [D]. Zunyi: Zunyi Medical College(遵义医学院), 2017.
- 8 Xie Y, Zhang K, Zhang JM, et al. Study on effect of hyacinth *Bletilla*/micron pseudo-ginseng salve drug-containing serum on LPS-induced inflammatory injury model of macrophages by NF- κ B pathway[J]. Chin J Surg Integr Tradit West Med(中国中西医结合外科杂志), 2022, 28: 12-16.
- 9 Qiu B, Zeng YH, Liu JH, et al. Study on protective effect of *Bletilla striata* polysaccharide on intestinal mucosal inflammatory injury in rats with ulcerative colitis based on NF- κ B/NLRP3/caspase-1 pathway[J]. Chin J Immunol(中国免疫学杂志), 2023, 39: 1623-1627.
- 10 Zhang M. Effects of different production modes on quality of *Bletilla striata*[D]. Hangzhou: Zhejiang A&F University(浙江农林大学), 2019.
- 11 Li CL, Jia JW, Li QW, et al. Effect of fresh *Rehmannia*(freeze-dried) on intestinal biological barrier in rats with liver injury[J]. Tianjin J Tradit Chin Med(天津中医药), 2013, 31: 165-167.
- 12 Kong WH, Xu JB, Cui Q, et al. Research progress in chemical components and pharmacological actions of *Bletilla striata* and extraction technology of its polysaccharide[J]. Inf Tradit Chin Med(中医药信息), 2021, 38: 69-78.

- 13 Gao D,Luo C,Zhou K,et al.Optimize the extraction technology of *Bletilla striata* polysaccharide by response surface method[J].Strait Pharm J(海峡药学),2024,36:30-35.
- 14 Dai J,Wu Y,Chen SW,et al.Sugar compositional determination of polysaccharides from *Dunaliella salina* by modified RP-HPLC method of precolumn derivatization with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone[J].Carbohydr Polym,2010,82:629-635.
- 15 Chen HY,Zeng JS,Wang B,et al.Structural characterization and antioxidant activities of *Bletilla striata* polysaccharide extracted by different methods[J].Carbohydr Polym,2021,266:118149.
- 16 Shi M,Zhang Z,Yang Y.Antioxidant and immunoregulatory activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharide(GLP)[J].Carbohydr Polym,2013,95:200-206.
- 17 Li Q,Xie Y,Su J,et al.Isolation and structural characterization of a neutral polysaccharide from the stems of *Dendrobium densiflorum*[J].Int J Biol Macromol,2012,50:1207-1211.
- 18 Guo Y,Zhou JP,Zhang LN.Dynamic viscoelastic properties of cellulose carbamate dissolved in NaOH aqueous solution[J].Biomacromolecules.2011,12:1927-1934.
- 19 Zhang K,Chen C,Huang Q,et al.Preparation and characterization of *Sargassum pallidum* polysaccharide nanoparticles with enhanced antioxidant activity and adsorption capacity[J].Int J Biol Macromol,2022,208:196-207.
- 20 Nuexiati R,Mutailifu P,Lu C,et al.Optimization of alkali extraction,structure,and antioxidant activity of protein-bound polysaccharide from seeds of *Plantago ovata* Forssk[J].Ind.Crop.Prod,2022,183:114920.
- 21 Qu ZZ,Li JF,Li GR,et al.Effect of Alhagi honey polysaccharide on immunosuppressive activity by regulating Toll-like receptor 4[J].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2024,36:1393-1400.
- 22 Peng YQ,Li YS,Pi YZ,et al.Effects of almond(*Armeniaca sibirica* L.Lam) polysaccharides on gut microbiota and anti-inflammatory effects on LPS-induced RAW 264.7 cells[J].Int J Biol Macromol,2024,263:130098.
- 23 Qiao J,Gao ZZ,Zhang C,et al.Structural characterization and immune modulation activities of Chinese *Angelica* polysaccharide(CAP) and selenizing CAP(sCAP) on dendritic cells[J].Int J Biol Macromol,2024,277:132628.

收稿日期: 2024-06-11 接受日期:

基金项目: 云南省科技厅科技计划项目(202401AT070199); 企业合作项目(北京植物医生生物科技有限公司, E0514252C1)

*通信作者 E-mail: yangliu@mail.kib.ac.cn, hujiangmiao@mail.kib.ac.cn