

板蓝根多糖酶法脱蛋白工艺、组成分析与免疫调节活性研究

赖梦亭, 麦提敏·麦提萨伍尔, 李彤, 肖平, 宿树兰, 段金康

(南京中医药大学江苏省中药资源产业化过程协同创新中心/中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程研究中心/国家中医药管理局中药资源循环利用重点实验室, 江苏 南京 210023)

摘要:目的 优化板蓝根多糖脱蛋白工艺, 并进一步探讨其免疫调节活性, 为板蓝根多糖的开发利用提供科学依据。方法 通过单因素结合 Box-Behnken 响应面法优化酶法脱蛋白的最佳工艺条件; 利用紫外可见光谱、傅里叶变换红外光谱、高效凝胶渗透色谱、高效液相色谱和扫描电镜等方法对板蓝根多糖化学组成与结构特征进行分析; 采用斑马鱼免疫低下模型探讨脱蛋白板蓝根多糖对斑马鱼体内中性粒细胞、巨噬细胞、IL-1 β 和 IL-6 含量的影响。结果 酶法脱蛋白最佳工艺为: 胰蛋白酶 500 U \cdot mL $^{-1}$ 、pH 8.0、酶解时间 5 h、酶解温度 37 $^{\circ}$ C, 脱蛋白率为 (86.39 \pm 0.07)% , 综合评分 (91.15 \pm 0.37)%。紫外、红外光谱扫描和电镜扫描显示酶法可以除去粗多糖中含有的蛋白质, 脱蛋白后相对分子量在 5.82~60.26 kDa 之间, 单糖摩尔组成为甘露糖:鼠李糖:半乳糖醛酸:葡萄糖:半乳糖:阿拉伯糖=2.17:0.96:2.90:83.25:4.88:5.84。免疫活性评价结果表明, 脱蛋白后的板蓝根多糖浓度在 50~300 μ g \cdot mL $^{-1}$ 时, 能显著增加斑马鱼免疫细胞密度, 增加巨噬细胞增殖, 降低免疫低下斑马鱼体内 IL-1 β 和 IL-6 含量, 从而发挥免疫调节作用。结论 酶法可以有效去除板蓝根粗多糖中的蛋白质, 脱蛋白后的板蓝根多糖具有一定的免疫调节作用。

关键词:板蓝根多糖; 酶法除蛋白; 多糖结构; 免疫调节; 斑马鱼

中图分类号: R283

文献标志码: A

文章编号: 1672-0482(2024)04-0379-12

DOI: 10.14148/j.issn.1672-0482.2024.0379

引文格式: 赖梦亭, 麦提敏·麦提萨伍尔, 李彤, 等. 板蓝根多糖酶法脱蛋白工艺、组成分析与免疫调节活性研究[J]. 南京中医药大学学报, 2024, 40(4): 379-390.

Study on the Enzymatic Deproteinization Technology, Composition Analysis and Immunomodulatory Activity of Isatidis Radix Polysaccharides

LAI Mengting, Memitimim Metsawur, LI Tong, XIAO Ping, SU Shulan, DUAN Jiniao

(Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, National and Local Collaborative Engineering Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine, Key Laboratory of Chinese Medicinal Resources Recycling Utilization, National Administration of Traditional Chinese Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize the deproteinization process of Isatidis Radix polysaccharides and further explore its immunomodulatory activity, and to provide a scientific basis for the development and utilization of it. **METHODS** The optimum conditions of enzymatic deproteinization were optimized by a single factor combined with the Box-Behnken response surface method. The chemical composition and structural characteristics of deproteinized Isatidis Radix polysaccharides were analyzed by UV-visible spectrum, Fourier transform-infrared spectroscopy, high-performance gel permeation chromatography, high-performance liquid chromatography and scanning electron microscopy. The effects of deproteinized Isatidis Radix Polysaccharide on neutrophils, macrophages, IL-1 β and IL-6 in zebrafish were investigated by using a zebrafish immunocompromised model. **RESULTS** The optimal enzymatic deproteinization process was as follows: trypsin 500 U \cdot mL $^{-1}$, pH 8.0, enzymatic hydrolysis time 5 h, enzymatic hydrolysis temperature 37 $^{\circ}$ C. The deproteinization rate was (86.39 \pm 0.07)% , and the comprehensive score was (91.15 \pm 0.37)% . Ultraviolet, infrared spectroscopy scanning and scanning electron microscopy showed that the protein contained in the crude polysaccharide could be removed by enzymat-

收稿日期: 2024-01-09

基金项目: 江苏省中医药科技发展计划项目 (MS2021004); 中央本级重大增减支项目 (2060302); 国家中医药管理局中医药创新团队及人才支持计划项目 (ZYXCXTD-D-202005); 国家中医药管理局高水平中医药重点学科建设项目-中药资源化学 (ZYZZDXK-2023083); 南京中医药大学自然科学基金青年项目 (NZY81703642); 康缘中药学院创新创业重点项目 (kxyxsc08); 宁夏回族自治区重点研发计划重点项目 (2020BFH02013)

第一作者: 赖梦亭, 女, 硕士研究生, E-mail: laimengting@163.com

通信作者: 肖平, 男, 副教授, 主要从事中药资源化学与中药药效物质基础研究, E-mail: xiaoping@njucm.edu.cn;

宿树兰, 女, 研究员, 博士生导师, 主要从事中药资源化学与方剂功效物质及其作用机制研究, E-mail: sushulan@njucm.edu.cn

ic method. The relative molecular weight of the polysaccharides were between 5.82 and 60.26 kDa. The monosaccharide mole composition was mannose : rhamnose : galacturonic acid : glucose : galactose : arabinose = 2.17 : 0.96 : 2.90 : 83.25 : 4.88 : 5.84. The results of immune activity evaluation showed that when the concentration of deproteinized Radix Isatidis polysaccharides was 50 ~ 300 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, it could significantly increase the density of zebrafish immune cells, increase the number of macrophages, and reduce the content of IL-1 β and IL-6 in immunocompromised zebrafish, thus exerting immunomodulatory effects. **CONCLUSION** The enzymatic method can effectively remove the proteins contained in the crude polysaccharides of Isatidis Radix, and the deproteinized Isatidis Radix polysaccharides have certain immunomodulatory effects.

KEYWORDS: Isatidis Radix polysaccharide; protein removal by enzymatic method; polysaccharide structure; immune regulation; zebrafish

中药多糖因其资源丰富、来源天然、生物活性好、毒副作用小等优势成为近年来天然药物的研究热点^[1]。研究发现中药多糖具有免疫调节作用,临床常用作免疫调节剂^[2-3],如香菇多糖具有显著的抗肿瘤活性,在临床上被用作抗肿瘤的佐剂,配合化疗药物使用可以起到增强机体免疫力、减轻不良反应的作用^[4]。多糖类成分是板蓝根的主要活性成分之一,具有显著的免疫调节作用^[5-7],但未经脱蛋白的板蓝根多糖中含有大量的蛋白质杂质,难以实现质量控制,与多糖结合的蛋白会干扰多糖结构分析和生物活性研究,甚至影响多糖生物活性的发挥,因此对多糖进行脱蛋白处理是探究多糖结构及生物活性的重要内容。常用的脱蛋白方法有 Sevage 法、三氯乙酸法和大孔树脂分离法等,但上述方法存在操作过程繁琐、脱蛋白效率低、有机溶剂用量大且不易去除等缺点,而酶法具有不破坏多糖原有结构、脱蛋白效率高、经济环保等优点^[8]。

斑马鱼的基因序列与人类基因有 87% 相似度,免疫系统、心血管系统、代谢系统的生理结构与哺乳动物高度类似^[9]。斑马鱼幼鱼主要依赖固有免疫,免疫细胞类型包括巨噬细胞和中性粒细胞,斑马鱼体型小、胚胎及幼鱼透明、繁殖能力强、发育迅速,借助化学染色手段以及免疫细胞荧光标记转基因品系斑马鱼,在高分辨显微镜下可以实现斑马鱼活体成像、细胞追踪和器官观察^[10]。

本研究以多糖保留率和蛋白脱除率的综合评分为指标,通过单因素实验和 Box-Behnken 响应面法筛选酶种类和酶解条件,确定最佳酶法除蛋白工艺。并对脱蛋白前后的板蓝根多糖进行了紫外扫描、红外光谱、分子量测定,测定了脱蛋白板蓝根多糖的单糖组成。进一步评价脱蛋白后的板蓝根多糖对免疫低下斑马鱼免疫细胞、免疫因子的影响,以期对板蓝根多糖的开发利用与质量控制提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

ENSPiRE 多功能酶标仪(美国 PerkinElmer 公

司);Z323K 低温高速离心机(德国 Beckman 公司);G-9 双光路紫外扫描仪(南京菲勒仪器有限公司);FT-IR 傅里叶变换红外光谱仪(美国 PerkinElmer 公司);Waters2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);ESEN-AW-RC2-SS 小型水体循环单元(北京爱生科技发展有限公司);BSG-300 光照培养箱(博迅生物仪器);DFC17000T 体式荧光显微镜(Leica Microsystems 公司)。

1.2 动物

中性粒细胞荧光标记的转基因 Tg(lyz;DsRed) 系斑马鱼和野生型 AB 系斑马鱼均购自南京尧顺禹生物技术有限公司。饲养环境按照明暗 14 h/10 h 控光,水温(28 \pm 0.5) $^{\circ}\text{C}$,每天喂食新鲜丰年虾 2 次。斑马鱼前一天晚上按照雌雄比例 1:2 于产卵缸中配对产卵,次日上午 8:00 抽板,2 h 后收取受精卵培养成幼鱼用于后续试验。

1.3 试剂与药物

板蓝根购自亳州紫瑞药业(批号:248210808),经南京中医药大学段金廛教授鉴定为十字花科菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的干燥根。牛血清白蛋白标准品(北京索莱宝科技有限公司,货号:128K053);考马斯亮蓝 G-250(Biosharp 公司,货号:21260625)、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶(上海源叶生物科技有限公司,批号:L22A8Y34505, M05GS140428, P09N11B130551);胃蛋白酶(国药集团化学试剂有限公司,批号:20211103);D-无水葡萄糖标准品、DL-阿拉伯糖、D-甘露糖(成都乐美天医药科有限公司,货号:DSTDW000501, DSTDA003801, DSTDG004701);D-半乳糖醛酸、D-葡萄糖醛酸、鼠李糖(上海源叶生物科技有限公司,货号:K07J12B133073, 27GB155998, O27GS165538);1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(Solarbio 公司,货号:1029D022);三氟乙酸、中性红(上海麦克林生化科技有限公司,货号:C10672531, C11611183);三氯甲烷(国药集团化学试剂有限公司,批号:20210507);盐酸左旋咪唑、氯霉素、羧甲基纤维素钠、苯基硫脲

(上海源叶生物科技有限公司,货号:N16HS201037、M23HS179080、J14HS173796、S26GS160906);IL-6、IL-1 β 试剂盒(湖南艾方生物科技有限公司,批号:AF20230907、AF20230910)。

2 方法

2.1 板蓝根多糖提取

取板蓝根饮片 200 g,加入 8 倍量去离子水浸泡 1 h,回流提取 3 h,以 100 目尼龙筛三叠之后过滤煎液,滤渣与去离子水比例为 1:4 ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),第 2 次回流 1 h,过滤后合并 2 次水煎液。 $4\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 去除沉淀,上清液备用。

2.2 综合评分计算方法

以苯酚硫酸法测定多糖保留率,考马斯亮蓝法测定蛋白质脱除率,参考文献采取加权算法,引入综合评分的概念^[11],多糖保留率赋分 40%,蛋白脱除率赋分 60%,计算公式如下。

多糖保留率(Y_1)=脱蛋白后多糖含量/脱蛋白前多糖含量 $\times 100\%$;

蛋白脱除率(Y_2)=(脱蛋白前蛋白含量-脱蛋白后蛋白含量)/脱蛋白前蛋白含量 $\times 100\%$;

综合评分 $Y=(Y_1 \times 40\% + Y_2 \times 60\%) \times 100\%$ 。

2.3 单因素试验

对酶种类(木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、胰蛋白酶、胃蛋白酶)、酶活(100、200、30、400、500、600 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)、pH(7.0、7.5、8.0、8.5、9、9.5)、温度(30、35、40、45、50、55 $^{\circ}\text{C}$)和酶解时间(1、2、3、4、5、6 h)进行单因素考察。在考察某一因素时,固定其他因素为前一次试验的最佳试验结果,酶种类考察时确定所有酶的酶活为 200 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$,其余条件为该酶最适条件。平行 3 次试验。酶解后立刻转移到 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅水浴 30 min 灭酶, $4\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min 去除加入的蛋白酶,取上清液测定多糖和蛋白质含量,根据“2.2”项下方法计算综合评分。

2.4 响应面优化酶法脱蛋白工艺

实验因素和水平见表 1。

表 1 Box-Behnken 实验设计

Table 1 Box-Behnken experimental design

因素	水平		
	-1	0	1
A(酶活/ U)	400	500	600
B(酶解时间/ h)	3	4	5
C(pH)	7.5	8.0	8.5

基于单因素实验结果,采用 Design-Expert

V8.0.6 软件的 Box-Behnken 进行响应面设计,以综合评分为响应值。

2.5 板蓝根多糖理化性质和结构表征

2.5.1 IRPS 制备和成分测定 水提液经 80% 醇沉淀过夜得板蓝根粗多糖,而后按照酶法脱蛋白最佳工艺处理得到脱蛋白多糖命名为 IRPS(Isatidis radix polysaccharides, IRPS)。采用苯酚硫酸法测定总糖含量,采用间羟基联苯法测定糖醛酸含量。

2.5.2 紫外-可见光扫描 称取脱蛋白前后的多糖样品溶于水配成 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,纯水作为空白,采用紫外扫描仪进行 200~800 nm 全波长扫描。

2.5.3 傅里叶红外光谱分析 称取脱蛋白前后的多糖样品与 KBr 按照 1:100 的比例研磨制片,用傅里叶变换红外光谱仪扫描,光谱范围为中红外 $4\,000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$ 。

2.5.4 扫描电镜分析 取少量脱蛋白前后多糖,喷金处理后,用热场发射扫描电镜在 100、500 和 5 000 倍镜下观察二者的表面微观结构。

2.5.5 分子量测定 采用高效凝胶渗透色谱法测定 2 种多糖的分子质量。检测器为 Waters2414 型示差折光光检测器(Refractive index detector, RID);色谱柱为凝胶柱 TSK-gel G5000PW 串联 TSK-gel G3000PW($8.0 \text{ mm} \times 300 \text{ mm}$, $6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$);流动相: $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硝酸钠;流速为 $0.4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;柱温 $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$;进样体积为 $10 \mu\text{L}$ 。

取已知分子量的葡聚糖系列标准品(0.1、2.7、5.25、9.75、13.05、36.8、64.65、135.3、300.6 kDa),分别用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硝酸配制成浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准溶液,经 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,进行高效凝胶渗透色谱分析,以葡聚糖标准品相对分子质量对数值($\lg M_w$)为纵坐标,保留时间(t)为横坐标,绘制标准曲线,建立回归方程,以此计算 IRPS 的分子质量。

2.5.6 IRPS 单糖组成

2.5.6.1 IRPS 的 PMP 衍生化 精密称取 IRPS 样品 10 mg 至安瓿瓶内,加入 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的三氟乙酸(Trifluoroacetic acid, TFA),用酒精喷灯熔封,于 $110 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘箱反应 4 h,旋蒸去除 TFA,加入 1 mL 甲醇复溶,旋蒸至 TFA 挥干,加入 1 mL 超纯水复溶。

精密称取甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸标准品各 1 mg 于 1 mL 容量瓶,用超纯水定容至 1 mL,配制成

1 mg · mL⁻¹ 的单糖溶液和混合对照品溶液备用。

取单糖混合溶液、单糖溶液、样品溶液 500 μL, 加入 0.3 mol · L⁻¹ 的 NaOH 溶液 75 μL, 在加入 10%PMP 甲醇溶液 150 μL, 涡旋混匀, 于 70 °C 水浴 1 h, 冷却至室温, 加入 0.3 mol · L⁻¹ 的 HCl 溶液 75 μL 中和 pH, 振摇后加入氯仿萃取 3 次, 取上清液, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 备用。

2.5.6.2 色谱条件 色谱柱为 Alltima™ C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.1 mol · L⁻¹ 磷酸盐缓冲液 (pH 6.8) - 乙腈 (83:17), 等度洗脱; 柱温 30 °C; 体积流量 1.0 mL · min⁻¹; 进样体积 10 μL, 检测波长 245 nm。

2.6 板蓝根多糖免疫调节作用评价

2.6.1 给药剂量考察 随机选择发育至 3 dpf (Day post fertilization) 的健康幼鱼, 以每孔 10 条的密度置于 12 孔板, 设置 IRPS 浓度梯度为 0、15.62、31.25、62.5、125、250、500、1 000 μg · mL⁻¹, 每个浓度组设置 3 个复孔, 给药 24 h 后观察幼鱼死亡数和畸形情况。

2.6.2 斑马鱼分组及给药 随机选择发育至 3 dpf 的健康幼鱼, 设置空白组, 模型组, 阳性药组及 50、100、200、300 μg · mL⁻¹ 的 IRPS 给药组于 12 孔板, 每孔放入 10 条幼鱼。空白对照组每孔给予 4 mL 胚胎培养水, 模型组给予 150 μg · mL⁻¹ 的氯霉素 (Chloramphenicol, CAP) 溶液, 阳性药组给予 100 μg · mL⁻¹ 盐酸左旋咪唑 (Levamisole hydrochloride, LH), 每孔终体积为 4 mL。除空白组外, 其余各组均加入 CAP 使终浓度为 150 μg · mL⁻¹。每个浓度设置 3 个复孔, 在 28 °C 恒温培养箱中培养。

2.6.3 免疫细胞密度 依照“2.6.2”项下方法, 给药 24 h 后吸尽药液, 用胚胎养鱼水补上, 于冰上麻醉, 将斑马鱼侧体位置于载玻片上, 3% 羧甲基纤维素钠固定, 在体式荧光显微镜下每组随机采集 10 条斑马鱼的荧光显微照片, 用 Image-Pro Plus 6.0 软件处理后得的荧光强度来表示免疫细胞密度。

2.6.4 巨噬细胞数目 将胚胎收集到含 200 μmol · L⁻¹ 苯基硫脲的胚胎养鱼水中发育至 3 dpf。依照“2.6.2”项下方法给药, 于给药 24 h 后

吸尽药液, 加入含中性红染液浓度为 3 μg · mL⁻¹ 的胚胎养鱼水, 避光染色 30 min, 洗净表面染色液, 用体式显微拍照统计斑马鱼头部巨噬细胞数目。

2.6.5 IL-6、IL-1β 含量 依照“2.6.2”项下方法配置给药浓度, 随机挑选 40 条鱼于 6 孔板, 复 6 孔, 给药 24 h 后吸弃药液, 用超纯水清洗 3 次, 收集于离心管中, 加入 0.5 mL 生理盐水, 破碎匀浆, 15 000 r · min⁻¹ 离心 15 min, 分离出上清液, 使用 BCA 法检测其蛋白含量, 按照 ELISA 试剂盒的说明书测量斑马鱼体内的 IL-1β 和 IL-6 含量。

2.7 统计学分析

所有实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 GraphPad Prism 8.0.2 软件进行统计学处理以及图形绘制, 采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

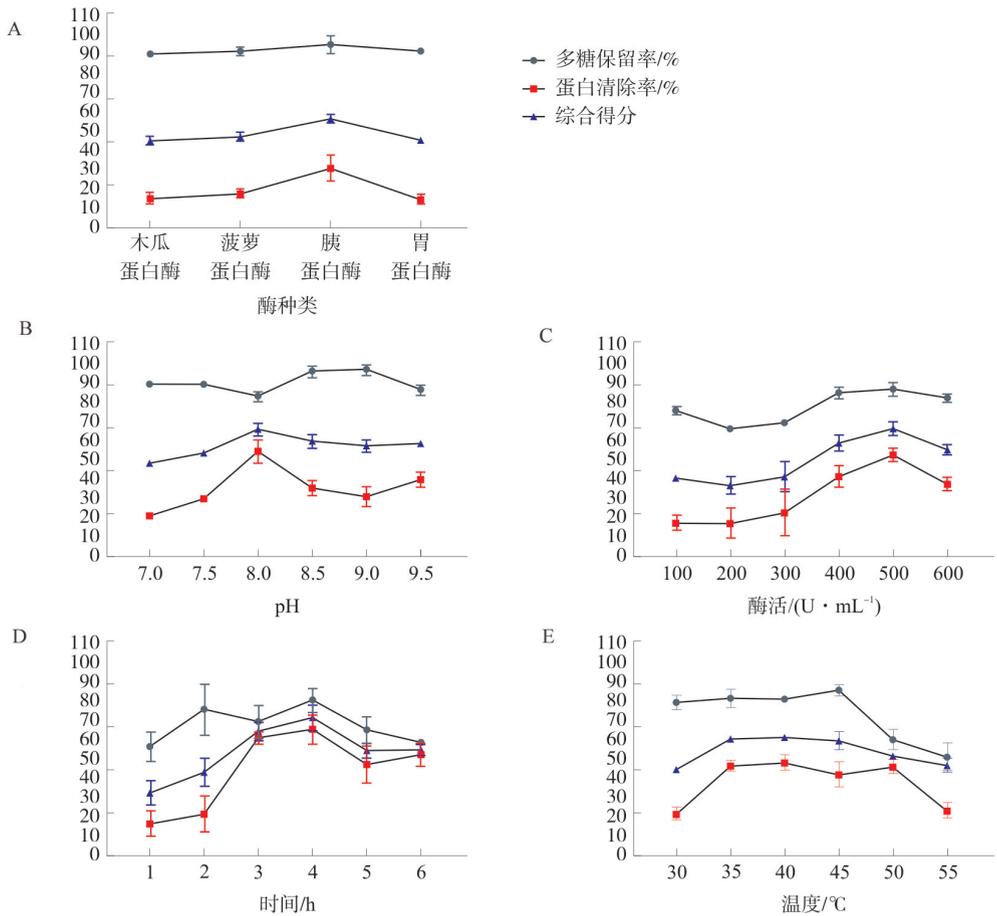
3 结果

3.1 单因素试验结果

单因素试验结果如图 1A, 以综合评分为筛选依据, 胰蛋白酶综合评分最高, 菠萝蛋白酶次之, 但菠萝蛋白酶最适反应温度为 60 °C, 而胰蛋白酶为 37 °C, 从节能角度考虑, 本实验选定对胰蛋白酶脱蛋白工艺进行优化。对胰蛋白酶的 pH、酶活、酶解时间考察结果如图 1B~D, 选取综合评分最高点及左右两点即 pH 7.5~8.0, 酶活 400~600 U · mL⁻¹, 酶解时间 3~5 h, 进行响应面优化。如图 1E, 温度在 35 °C 和 40 °C 时, 综合评分趋于稳定, 45 °C 以后, 综合评分下降可能与胰蛋白酶变性失活有关, 而 35~40 °C 胰蛋白酶最适酶解温度为 37 °C^[12]。

3.2 响应面优化 IRPS 酶法脱蛋白工艺

3.2.1 回归模型分析 采用 Design-Expert V 8.0.6 软件进行响应面设计, 以综合评分为响应值, 响应面实验设计及结果如表 2。对试验结果进行多元线性回归和二项式拟合, 得到回归方程: $Y = 89.13 + 2.54A + 1.79B - 5.88C - 3.60AB - 1.52AC - 0.13BC - 14.70A^2 + 1.50B^2 - 19.27C^2$, $R^2 = 0.946$ 说明该模型拟合度良好, 能较准确地预测本实验的脱蛋白综合性能。



注:A. 单因素试验结果;B. pH 考察;C. 酶活考察;D. 时间考察;E. 温度考察

图 1 单因素试验结果

Fig. 1 The results of single factor test

表 2 Box-Behnken 响应面实验结果

Table 2 Box-Behnken response surface experiment result

实验号	A(酶活/U · mL ⁻¹)	B(时间/h)	C(pH)	蛋白清除率/%	多糖保留率/%	综合评分
1	400	5	8.0	82.44	76.72	80.15
2	500	5	8.5	67.41	83.15	64.68
3	500	4	8.0	96.79	87.44	93.05
4	500	4	8.0	89.20	81.59	86.15
5	400	4	8.5	34.02	72.34	49.35
6	500	4	8.0	85.82	93.77	89.00
7	500	4	8.0	80.18	93.57	85.54
8	600	4	8.5	44.18	73.02	55.71
9	600	3	8.0	49.95	85.10	78.92
10	600	3	8.0	32.92	79.55	70.95
11	400	4	7.5	62.36	83.83	51.57
12	500	3	7.5	75.13	81.79	77.79
13	600	4	7.5	66.59	97.42	64.01
14	500	3	8.5	76.53	93.18	59.79
15	500	5	7.5	45.58	81.10	83.19
16	600	5	8.0	55.68	78.18	73.71
17	500	4	8.0	87.51	98.54	91.92

方差分析和显著性检验如表 3。模型中 F 值为 13.70, 模型 $P=0.0012 < 0.05$, 表示回归模型所得的二次方程极其显著, 失拟项 $P=0.1167 > 0.05$, 表示失拟项没有显著性差异, 实际值与预测值不拟合发生的概率低, $R^2_{Adj} = 0.8772$, 表明该模型可以解释 87.72% 响应值的变化, 信噪比 = 10.763 (> 4), 表明该回归方程精度和可信性比较高。表明用该模型优

化板蓝根粗多糖脱蛋白方法是合理的, 对各实验指标进行显著性分析, 其结果可以用 F 值来表示。其中 C 具有极显著性 ($P < 0.05$), A^2 、 C^2 具有显著性 ($P < 0.01$), 根据 F 值越大, 影响越大, 所以影响因素排序为 $C(\text{pH}) > A(\text{酶活}) > B(\text{时间})$ 。交互作用主次顺序为: $AB > AC > BC$ 。

表 3 方差分析结果

Table 3 Variance analysis results

变异源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	3 021.91	9	335.77	13.70	0.001 2	significant
A (酶活)	51.66	1	51.66	2.11	0.189 9	
B (时间)	25.49	1	25.49	1.04	0.341 8	
C (pH)	276.48	1	276.48	11.28	0.012 1	*
AB	51.91	1	51.91	2.12	0.189 0	
AC	9.24	1	9.24	0.38	0.558 7	
BC	0.065	1	0.065	0.002 6	0.960 4	
A^2	909.98	1	909.98	37.12	0.000 5	**
B^2	9.49	1	9.49	0.39	0.553 5	
C^2	1 563.67	1	1563.67	63.78	<0.000 1	**
残差	171.61	7	24.52			
拟失项	126.68	3	42.23	3.76	0.1167	not significant
纯误差	44.94	4	11.23			
总和	3 193.52	16				
Std. Dev.	4.92		R^2	0.946 3		
Mean	73.85		Adj R^2	0.877 2		
C. V. %	6.70		Pred R^2	0.343 3		
PRESS	2 097.06		信噪比	10.763 0		

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Design-Expert V 8.0.6 软件绘制酶活、酶解时间、pH 对板蓝根多糖脱蛋白影响的响应面图和二维等高线图见图 2, 通过响应面 3D 图和等高线图能直观地反映各因素交互作用的影响。在三维图中, 曲面越陡表明该因素对综合评分的影响越大, 反之则表明影响越小。等高线图中, 若中心是圆形则表明因素交互作用不显著, 若为椭圆形则表明交互作用显著。pH 和酶活的响应面曲线较陡峭, 对综合评分影响较大, 而酶解时间对综合评分的影响较小。

3.2.2 最佳工艺预测和验证 通过 Design-Expert V 8.0.6 软件设计得到板蓝根多糖脱蛋白最佳工艺

条件: 选用胰蛋白酶, 酶活 $497.14 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 酶解 pH = 7.92, 酶解时间 5 h, 预测综合指标可达到 92.90%。根据影响因素排列: $C(\text{pH}) > A(\text{酶活}) > B(\text{时间})$, 结合实际试验的情况, 该条件修正为: 取胰蛋白酶酶活为 $500 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, pH = 7.9、8.0、8.1, 酶解时间为 5 h, 酶解温度 $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 每个条件重复 3 次实验, 实验结果如图 3, 当 pH 为 8.0 时, 脱蛋白效果最好, 3 次实验综合指标为 $(91.15 \pm 0.37)\%$, 与预测值相接近, 表明优化的试验条件较为可信, 具有实际应用价值。

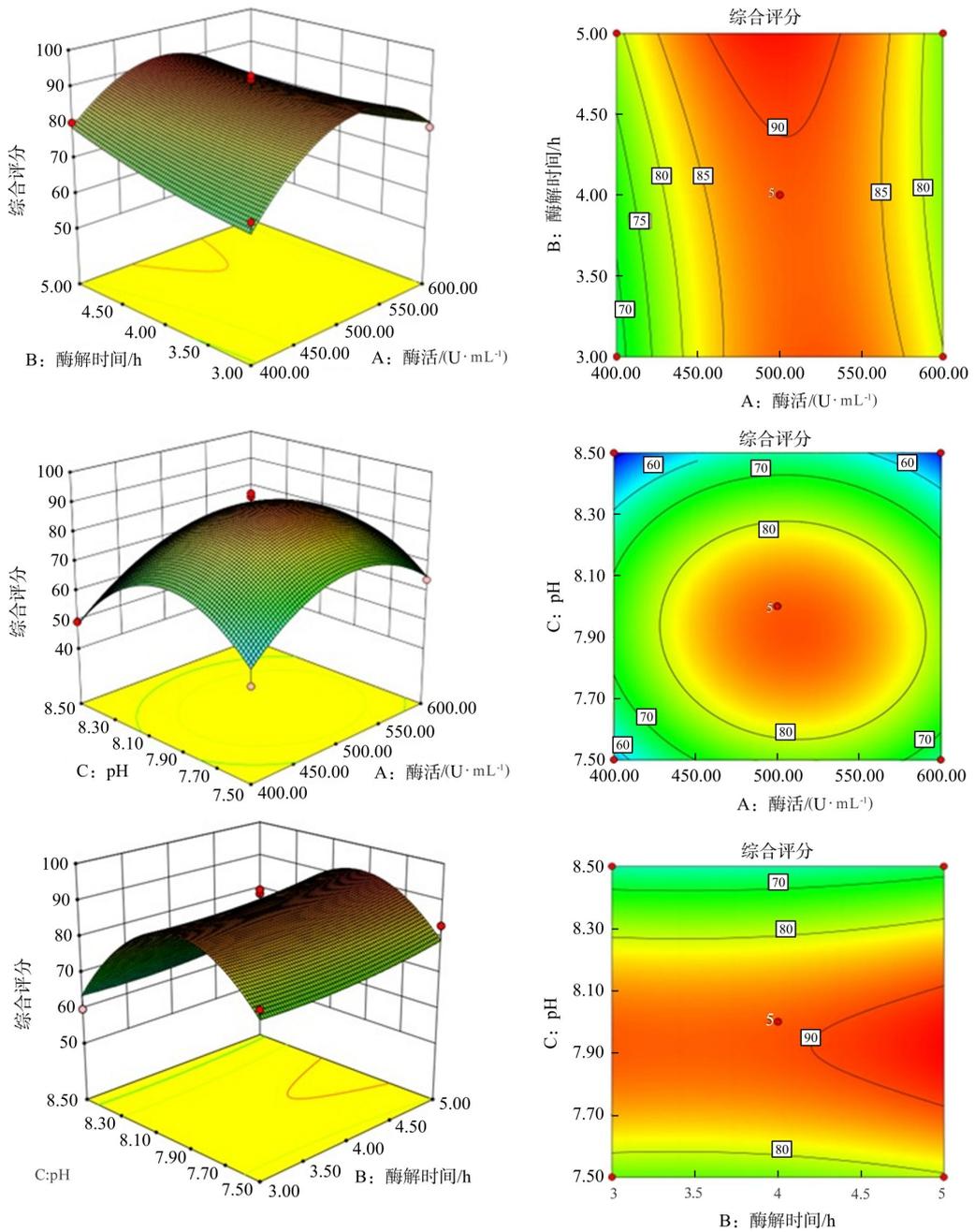


图2 各因素对除蛋白影响的响应面图和等高线图

Fig. 2 Response surface and contour maps of the effects of various factors on protein removal

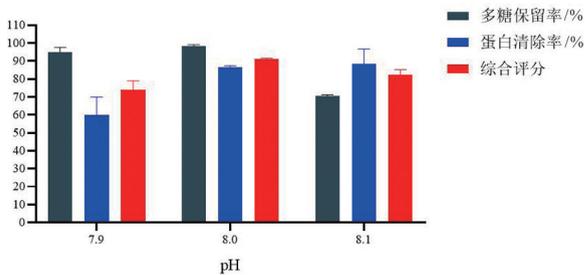
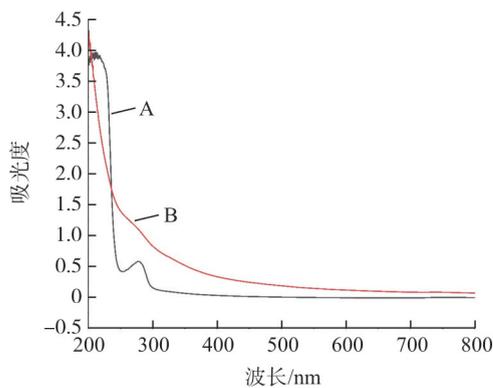


图3 响应面验证

Fig. 3 Response surface verification

3.3 IRPS 的结构表征

3.3.1 多糖组成 板蓝根饮片经过热水回流提取、酶法脱蛋白、冻干后得到 IRPS,得率为 3.88% (以饮片计)。经测定 IRPS 总糖含量为 80.59%,糖醛酸含量为 18.34%。紫外-可见分光光度计对酶解前后的多糖进行 200~800 nm 全波长扫描,结果如图 4,酶解前 (A) 在 280 nm 处有蛋白吸收,而酶解后 (B) 在 260 nm 与 280 nm 处均无吸收,表明酶解法脱蛋白效果明显,IRPS 不含蛋白质和核酸。



注:A. 酶解前;B. 酶解后

图 4 脱蛋白前后板蓝根多糖紫外光谱图

Fig. 4 Ultraviolet spectra of *Isatidis Radix* polysaccharides before and after deproteinization

3.3.2 FT-IR 分析 IRPS 的 FT-IR 图谱如图 5 所示,在 $3\ 405.36\ \text{cm}^{-1}$ 处的强吸收峰为氢键-OH 伸缩振动引起的, $2\ 932.74\ \text{cm}^{-1}$ 处为 $-\text{CH}_2-$ 伸缩振动造成。 $1\ 744.25\ \text{cm}^{-1}$ 处的是 C=O 双键伸缩振动强吸收峰, $1\ 400\sim 1\ 200\ \text{cm}^{-1}$ 之间的两个吸收峰由 C—H 变角振动引起。 $1\ 200\sim 1\ 100\ \text{cm}^{-1}$ 的两个特征吸收峰为吡喃糖的 C—O—C 和 C—O—H 中的 C—O 振动吸收,在 $829.18\ \text{cm}^{-1}$ 处有吸收峰,这是 α -吡喃糖苷键的特征吸收峰, $762.41\ \text{cm}^{-1}$ 的吸收峰是为 β -吡喃糖苷键的特征吸收峰,据此推测 IRPS 中含有 α 和 β 两种构型的糖苷键。

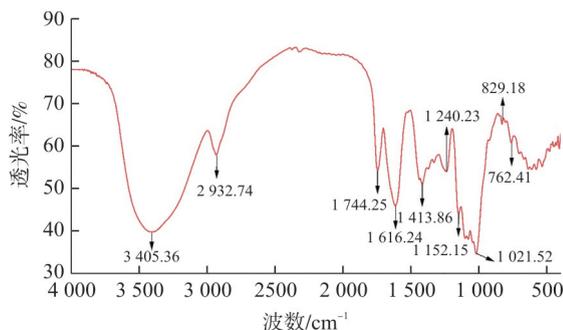
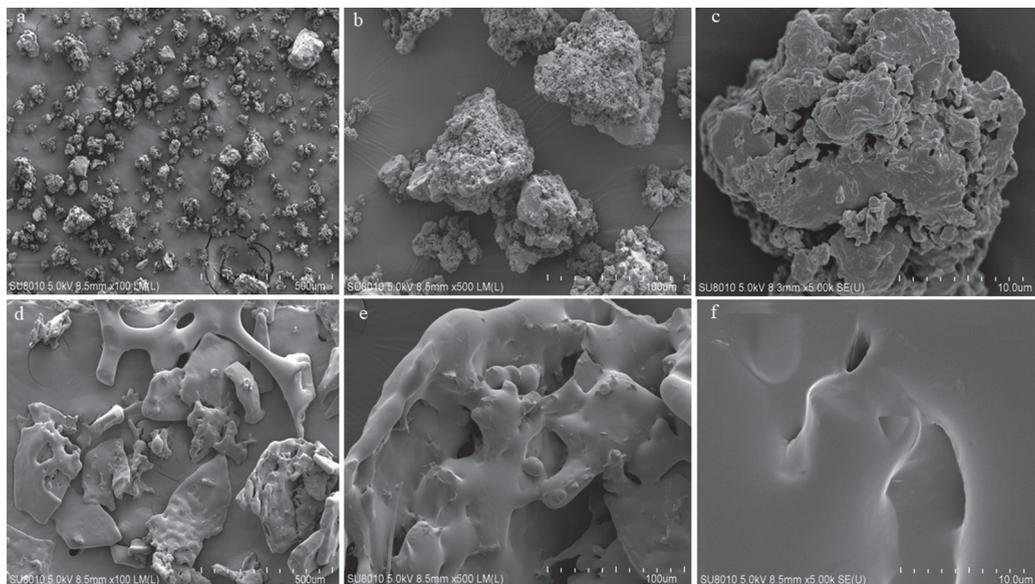


图 5 IRPS 的傅里叶红外光谱图

Fig. 5 FT-IR spectrum of IRPS

3.3.3 电镜 采用 SEM 对脱蛋白前后板蓝根多糖的形态特征进行观察,实验结果如图 6 所示。图 6a~c 为脱蛋白前的粗多糖,100 倍镜下观察脱蛋白前板蓝根粗多糖呈颗粒状,500 倍镜和 5 000 倍镜下可看见脱蛋白前多糖颗粒表面有凹凸不平的微孔,是蛋白和多糖聚集的结果。同倍数下视野内的颗粒越少说明颗粒越大,分子间范德华力的作用使蛋白和多糖紧密黏合,所以图 6a 视野内可见颗粒更多,图 6d 脱蛋白后 IRPS 颗粒变大,可能是 IRPS 经过高温酶解膨胀、反复冻融和冻干的原因。图 6d~f 为脱蛋白后 IRPS,100 倍镜下脱蛋白后多糖呈颗粒状,表面光滑是表面蛋白被脱除的结果,500 倍镜和 5 000 倍镜下可看见颗粒内孔洞变大,这是因为多糖内部结合的蛋白被酶解。



注:a~c. 酶解前;d~f. 酶解后。从左到右依次为 $\times 100$ 、 $\times 500$ 、 $\times 5\ 000$ 。

图 6 脱蛋白前后板蓝根多糖扫描电镜图

Fig. 6 SEM images of *Isatidis Radix* polysaccharides before and after deproteinization

3.3.4 分子量测定 采用高效凝胶渗透色谱测定 脱蛋白前后分子量结果如图 7 所示,A 为酶法脱蛋

白前,B为酶法脱蛋白后。脱蛋白前后分子量图谱呈现多个峰,且每个峰保留时间基本不变,表明板蓝根多糖脱蛋白前后分子量没有明显变化。IRPS为非均一分子量多糖,根据标准曲线 $Y = -0.1832X + 11.731$ ($R^2 = 0.9902$, X 为标准品的保留时间, Y 为分子质量的对数值),计算得到 IRPS 的相对分子质量分布在 5.82~60.26 kDa。

3.3.5 单糖组成 IRPS 的单糖组成如图 8 所示,主要由葡萄糖构成、半乳糖和阿拉伯糖构成,还有少量的甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸。它们的摩尔质量比为甘露糖:鼠李糖:半乳糖醛酸:葡萄糖:半乳糖:阿拉伯糖 = 2.17 : 0.96 : 2.90 : 83.25 : 4.88 : 5.84。

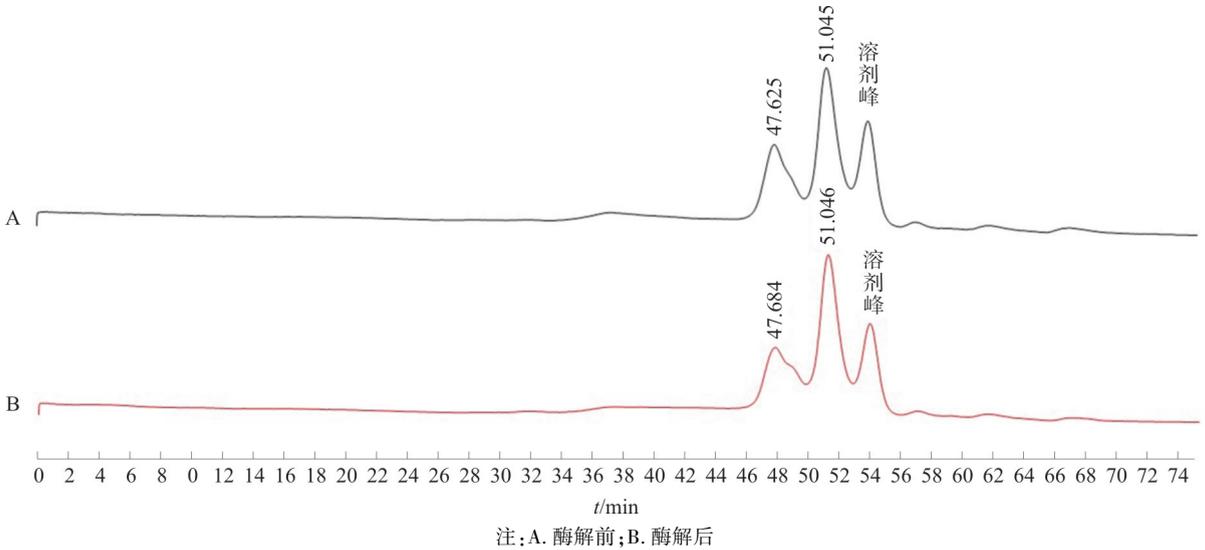


图 7 脱蛋白前后板蓝根多糖分子量图

Fig. 7 Molecular weight map of Isatis Radix polysaccharides before and after deproteinization

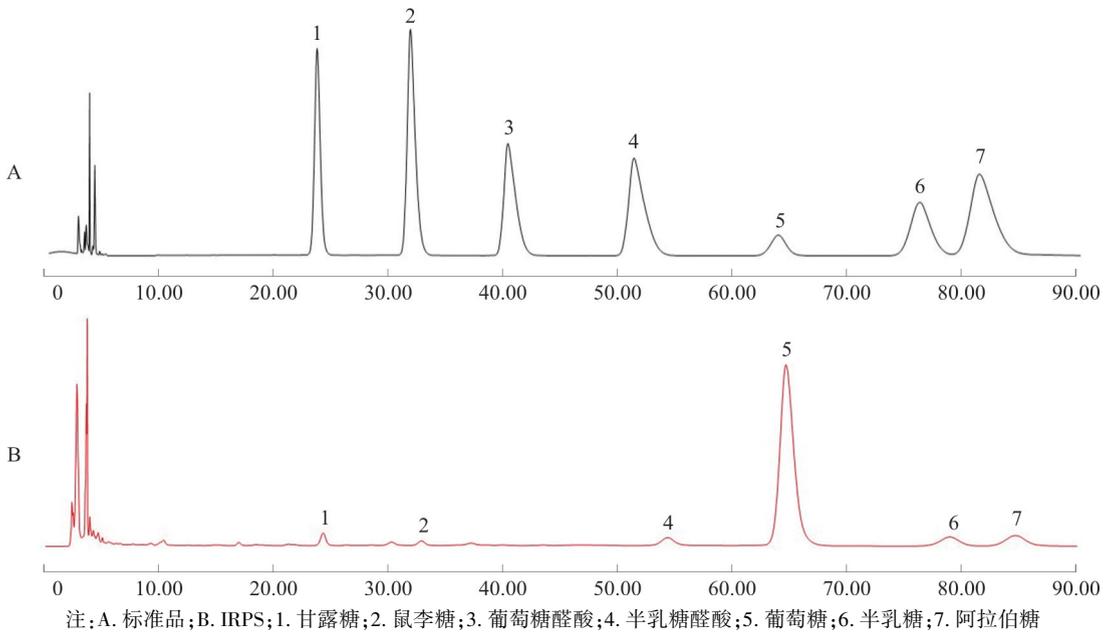


图 8 IRPS 的单糖组成 HPLC 谱图

Fig. 8 HPLC chromatogram of monosaccharide composition of IRPS

3.4 板蓝根多糖免疫调节作用评价

3.4.1 给药剂量筛选 将浓度和死亡数输入至 SPSS26.0 分析得到 IRPS 的 $LD_{50} = 377.238 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,

最终确定其给药浓度为 50、100、200、300 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。见图 9。

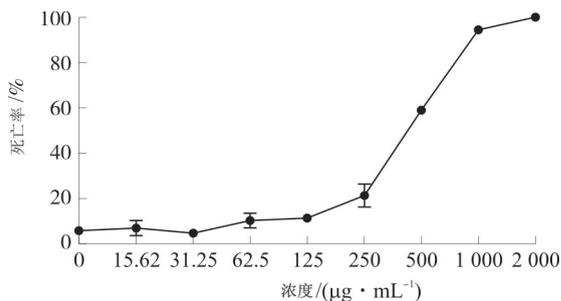


图 9 IRPS 给药剂量筛选 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

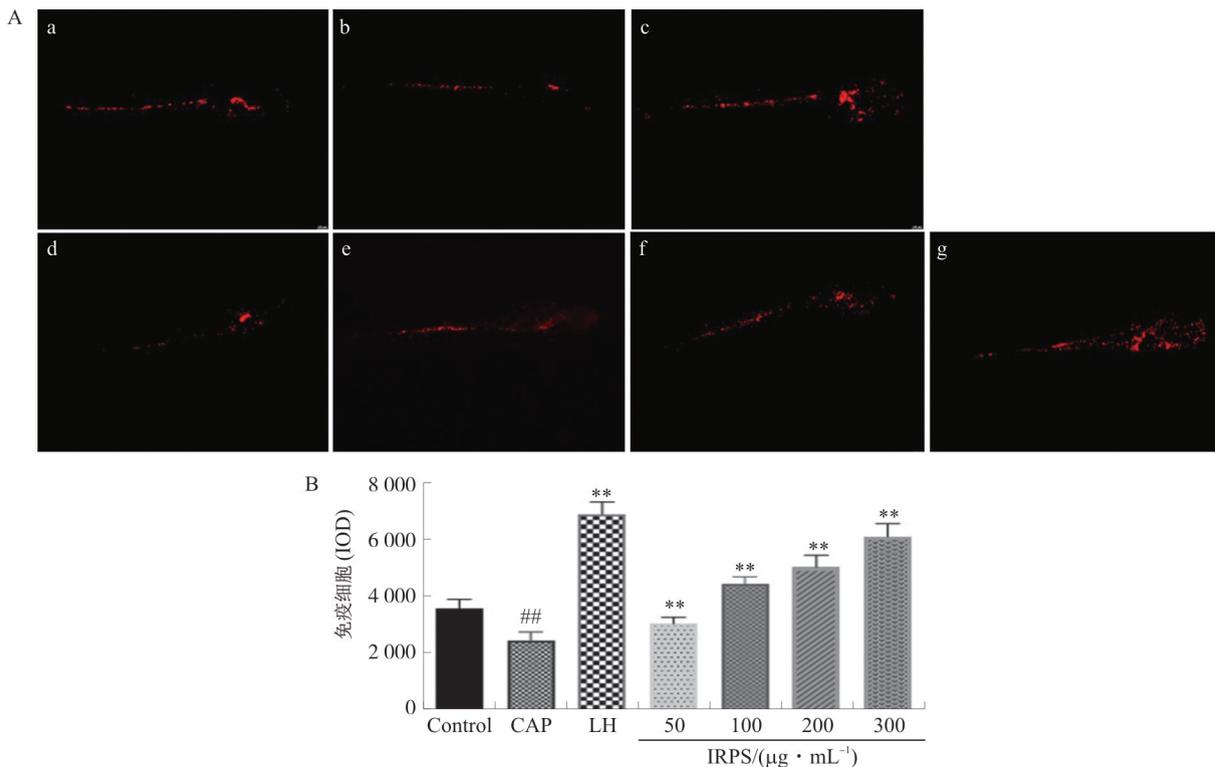
Fig. 9 IRPS administration dose screening ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.4.2 免疫细胞密度 如图 10A 所示,模型组与空白组相比,斑马鱼免疫细胞荧光强度显著降低,说明 CAP 给药后斑马鱼幼鱼形成了免疫抑制模型;如图 10B,与模型组相比,IRPS 在 $50 \sim 300 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 免疫细胞密度升高,且 IRPS 浓度越高,荧光强度越大,呈现剂量依赖性,表明 IRPS 可以增加免疫低下

的斑马鱼免疫细胞数目。

3.4.3 巨噬细胞数目 如图 11A 所示,模型组与空白组相比,斑马鱼头部巨噬细胞数目明显减少,为模型组的 56.55%;与模型组相比, $50 \sim 300 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ IRPS 均能使斑马鱼头部巨噬细胞数目增加,且呈现剂量依赖性。

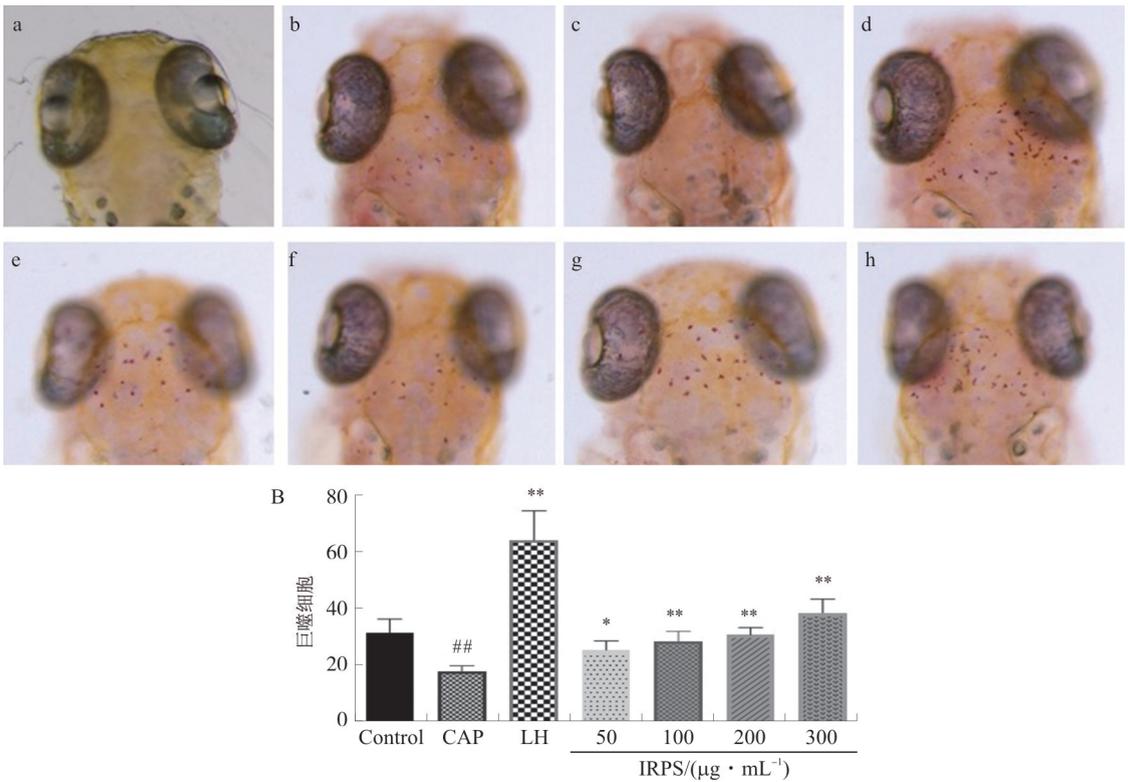
3.4.4 IL-6、IL-1 β 含量 IL-1 β 和 IL-6 是由巨噬细胞、淋巴细胞等免疫细胞分泌的炎症因子,机体受到外界病原体入侵或是免疫系统受到损伤都能导致炎症因子水平提高^[13]。如图 12, CAP 造模后,斑马鱼体内 IL-6 和 IL-1 β 含量显著升高 ($P < 0.01$);与模型组相比,IRPS 给药浓度为 $50 \sim 300 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,IL-6 和 IL-1 β 含量显著下降 ($P < 0.05, P < 0.01$);表明 IRPS 可以显著降低斑马鱼体内 IL-6 和 IL-1 β 含量,具有一定免疫调节作用。



注:A. 荧光斑马鱼显微图像;B. 荧光强度统计图。a. 空白对照 (Control) 组;b. 模型 (CAP) 组;c. 阳性药 (LH) 组; d~g. $50, 100, 200, 300 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ IRPS 组。与空白对照组比较, ## $P < 0.01$;与模型组比较, ** $P < 0.01$ 。 $\bar{x} \pm s, n=10$ 。

图 10 IRPS 对斑马鱼免疫细胞密度的影响

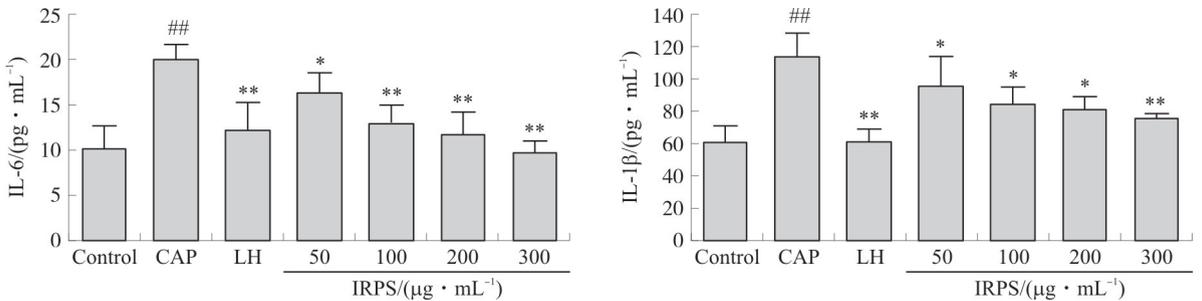
Fig. 10 Effect of IRPS on the density of zebrafish immune cells



注:A. 斑马鱼头部显微图像;B. 巨噬细胞数目统计图。a. 未染色正常斑马鱼头部;b. 空白对照 (Control) 组;c. 模型 (CAP) 组;d. 阳性药 (LH) 组;e~h. 50、100、200、300 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ IRPS 组。与空白对照组比较, $^{##}P < 0.01$; 与模型组比较, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ 。 $\bar{x} \pm s$, $n = 10$ 。

图 11 IRPS 对斑马鱼巨噬细胞影响

Fig. 11 Effect of RIPS on the number of macrophages of zebrafish



注:与空白对照 (Control) 组比较, $^{##}P < 0.01$; 与模型 (CAP) 组比较, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ 。 $\bar{x} \pm s$, $n = 6$ 。

图 12 IRPS 对斑马鱼 IL-6、IL-1 β 含量的影响

Fig. 12 Effects of IRPS on the contents of IL-6 and IL-1 β in zebrafish

4 讨论

多糖常与多肽/蛋白形成糖肽或者糖蛋白,这种组合会影响多糖的水溶性、结构研究和生物活性评价,多糖脱蛋白是研究其结构、药理活性和构效关系的首要 and 关键的步骤^[14]。本研究筛选了不同的酶对板蓝根多糖脱蛋白的能力,通过响应面试验得到了 IRPS 脱蛋白的最佳工艺参数为胰蛋白酶,酶活 $500 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、pH 8.0、酶解时间为 5 h、酶解温度 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 。结构分析表明,酶法脱蛋白对板蓝根多糖分子量基本没有影响,其分子在 5.82~60.26 kDa 之

间,IRPS 主要含甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖醛酸、半乳糖、阿拉伯糖。研究表明,多糖的分子量、单糖组成和糖苷键连接方式都会影响其免疫活性^[15]。

斑马鱼实验周期短、重复性好、操作简单,既有细胞实验的便捷直观,也有小鼠实验的整体性^[16]。有研究利用 AB 斑马鱼和化学染色法证明了防风多糖可以增加巨噬细胞和中性粒细胞数目,降低 IL-6 和 IL-1 β 含量^[17]。利用 Tg (lyz:DsRED2) 中性粒细胞转基因品系斑马鱼证明了多花黄精多糖能使中性粒细胞数目增加^[18],利用斑马鱼模型发现褐藻多

糖能够促进 NO 分泌、激活 NF- κ B 信号通路^[19]。广谱抗生素 CAP 具有免疫毒性,其副作用为降低中性粒细胞数目,造成免疫抑制,以 $150 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 CAP 成功建立了斑马鱼免疫损伤模型,其表现为中性粒细胞和巨噬细胞数目减少,孵化率和心率降低^[20]。本研究采用 CAP 建立斑马鱼免疫低下模型对 IRPS 的免疫调节活性进行评价,发现 IRPS 浓度为 $50 \sim 300 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 能够使免疫抑制斑马鱼的中性粒细胞和巨噬细胞数目增多,组织中的 IL-6 和 IL-1 β 含量降低,具有较好的剂量依赖关系。IRPS 的免疫调节作用可能是通过影响免疫细胞在生物体内的分布,降低炎症因子的含量发挥的。本研究采用绿色环保的酶解法去除板蓝根多糖中的蛋白质,并基于斑马鱼模型评价了板蓝根多糖的免疫调节活性,研究结果为板蓝根多糖进一步深入研究及开发利用提供了科学依据与有益参考。

参考文献:

- [1] YE D, ZHAO Q, DING D, et al. Preclinical pharmacokinetics-related pharmacological effects of orally administered polysaccharides from traditional Chinese medicines; A review[J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 252: 126484.
- [2] WANG D Y, LIU Y H, ZHAO W. The adjuvant effects on vaccine and the immunomodulatory mechanisms of polysaccharides from traditional Chinese medicine [J]. *Front Mol Biosci*, 2021, 8: 655570.
- [3] ZHAO Y, YAN B C, WANG Z Y, et al. Natural polysaccharides with immunomodulatory activities[J]. *Mini Rev Med Chem*, 2020, 20(2): 96–106.
- [4] YU Y, SHEN M Y, SONG Q Q, et al. Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: A review[J]. *Carbohydr Polym*, 2018, 183: 91–101.
- [5] XIANG X L, LYU J D, DONG M Y, et al. *Radix Isatidis* polysaccharide (RIP) resists the infection of QX-type infectious bronchitis virus via the MDA5/TLR3/IRF7 signaling pathway[J]. *Poult Sci*, 2023, 102(4): 102534.
- [6] TAO W, FU T, HE Z J, et al. Immunomodulatory effects of *Radix isatidis* polysaccharides *in vitro* and *in vivo* [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(6): 1405.
- [7] 李海霞, 刘坤璐, 贾培媛, 等. 板蓝根多糖 IIP-A-1 和 IIP-2 作为疫苗佐剂的免疫原性[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2019, 33(1): 22–29.
LI H X, LIU K L, JIA P Y, et al. Immunogenicity of polysaccharides IIP-A-1 and IIP-2 from *Isatis indigotica* as vaccine adjuvants [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 2019, 33(1): 22–29.
- [8] ZENG X T, LI P Y, CHEN X, et al. Effects of deproteinization methods on primary structure and antioxidant activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharides [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 126: 867–876.
- [9] YAN C, BRUNSON D C, TANG Q, et al. Visualizing engrafted hu-

- man cancer and therapy responses in immunodeficient zebrafish [J]. *Cell*, 2019, 177(7): 1903–1914. e14.
- [10] 李懿, 刘夏进, 宿树兰, 等. 模式生物斑马鱼在中药活性筛选和毒性评价中的应用进展与展望[J]. *南京中医药大学学报*, 2020, 36(5): 715–720.
LI Y, LIU X J, SU S L, et al. Application progress and prospect of model organism zebrafish in activity screening and toxicity evaluation of traditional Chinese medicine [J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med*, 2020, 36(5): 715–720.
- [11] 宁奇, 孙培冬, 曹光群, 等. 山药黏液质多糖的酶法脱蛋白工艺及其性能研究[J]. *食品与生物技术学报*, 2019, 38(9): 118–124.
NING Q, SUN P D, CAO G Q, et al. Deproteinization technology by enzymic method of polysaccharide from yam mucilage and its performance study [J]. *J Food Sci Biotechnol*, 2019, 38(9): 118–124.
- [12] 郭庆晖, 张琨霖, 司茜媛, 等. 红甜菜多糖提取条件优化的研究[J]. *中国糖料*, 2022, 44(2): 75–79.
GUO Q H, ZHANG K L, SI X Y, et al. Study on optimization of extraction conditions of red beet polysaccharide [J]. *Sugar Crops China*, 2022, 44(2): 75–79.
- [13] LORD J M, MIDWINTER M J, CHEN Y F, et al. The systemic immune response to trauma: An overview of pathophysiology and treatment [J]. *Lancet*, 2014, 384(9952): 1455–1465.
- [14] ZENG X T, LI P Y, CHEN X, et al. Effects of deproteinization methods on primary structure and antioxidant activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharides [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 126: 867–876.
- [15] LI M Z, WEN J J, HUANG X J, et al. Interaction between polysaccharides and toll-like receptor 4: Primary structural role, immune balance perspective, and 3D interaction model hypothesis [J]. *Food Chem*, 2022, 374: 131586.
- [16] HOWE K, CLARK M D, TORROJA C F, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome [J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 498–503.
- [17] 孙萌, 王文地, 丽妍, 等. 基于斑马鱼模型的防风多糖调节免疫作用机制研究[J]. *中国中药杂志*, 2023, 48(7): 1916–1926.
SUN M, WANG W D, LI Y, et al. Immune regulation mechanism of *Saposhnikovia Radix* polysaccharide based on zebrafish model [J]. *China J Chin Mater Med*, 2023, 48(7): 1916–1926.
- [18] 张雪, 赵苑伶, 陈林珍, 等. 基于斑马鱼模型探究多花黄精多糖的免疫调节作用[J]. *世界中医药*, 2023, 18(6): 761–765, 772.
ZHANG X, ZHAO Y L, CHEN L Z, et al. Immune function regulation of *Polygonatum cyrtoneuma Hua* polysaccharides based on zebrafish model [J]. *World Chin Med*, 2023, 18(6): 761–765, 772.
- [19] YANG F Q, NAGAHAWATTA D P, YANG H W, et al. *In vitro* and *in vivo* immuno-enhancing effect of fucoidan isolated from non-edible brown seaweed *Sargassum thunbergii* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 253(Pt 5): 127212.
- [20] ZHANG N N, MA H, ZHANG Z F, et al. Characterization and immunomodulatory effect of an alkali-extracted galactomannan from *Morchella esculenta* [J]. *Carbohydr Polym*, 2022, 278: 118960.

(编辑:董宇)