

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.202207042



# 两种石耳科多糖的理化特性 及其抗炎作用

罗 焱 辉

(华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021)

**摘要:** 为研究石耳科多糖的理化特性、微观结构和抗炎作用,从石耳科两个相近物种石耳(*Umbilicaria esculenta*)和胞脐衣(*Lasallia papulosa*)中制备得到多糖 CUEP 和 YUFP,采用高效液相色谱法、红外光谱法和透射电子显微镜分析两种多糖的化学成分和微观结构,利用脂多糖诱导 RAW264.7 细胞产生炎症因子,进而研究多糖对炎症因子 mRNA 相对表达量的影响。结果表明:从 *Umbilicaria esculenta* 和 *Lasallia papulosa* 中分离纯化得到 CUEP 和 YUFP 的得率分别为 25% 和 27%,二者均含有糖类物质的特征官能团,CUEP 由 162~474 u 的多糖链聚合而成,YUFP 由 98 u 单一多糖组成;CUEP 和 YUFP 均由葡萄糖、木糖、半乳糖、甘露糖组成,摩尔比分别为 177.96 : 1.00 : 4.45 : 3.19 和 33.21 : 3.17 : 1.00 : 2.40;CUEP 呈线状,糖链间相互缠绕且聚合度高、不易分散,而 YUFP 则呈蝴蝶结状,更易解聚;75  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  YUFP 能显著地降低 IL-1 $\beta$  的 mRNA 相对表达量,而 75  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  CUEP 则能显著地降低炎症因子 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, COX-2 的 mRNA 相对表达量。

**关键词:** 石耳科; 化学成分; 微观结构; 石耳; 胞脐衣

**中图分类号:** Q 53

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1000-5013(2022)06-0763-06

## Properties and Anti-Inflammatory Effects of Two Polysaccharides From Umbilicariaceae

LUO Dianhui

(College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** In order to study the physicochemical properties, microstructures and anti-inflammatory effects of polysaccharides from Umbilicariaceae, the polysaccharides CUEP and YUFP were prepared from *Umbilicaria esculenta* and *Lasallia papulose* which were two close species from Umbilicariaceae. High performance liquid chromatography, infrared spectroscopy and transmission electron microscopy were used to identify the chemical properties and microstructures of the two polysaccharides. Lipopolysaccharide was used to induce RAW264.7 cells to produce inflammatory cytokines, and then the effect of polysaccharides on the mRNA relative expression of inflammatory cytokines was studied. The results showed that CUEP and YUFP were isolated and purified from *Umbilicaria esculenta* and *Lasallia papulose* with the yields of 25% and 27%, respectively, and both of them contained the characteristic functional groups of polysaccharides. CUEP was composed of 162-474 u polysaccharide chains, and YUFP was composed of 98 u single polysaccharide. Both CUEP and YUFP were composed of glucose, xylose, galactose and mannose, with the molar ratios of 177.96 :

**收稿日期:** 2022-07-30

**通信作者:** 罗焱辉(1977-),男,副教授,博士,主要从事生物大分子结构与活性的研究. E-mail: dianhuiluo@163.com.

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目(31201314)

1.00 : 4.45 : 3.19 and 33.21 : 3.17 : 1.00 : 2.40, respectively. CUEP demonstrated linear structure with entangled chains and its high polymerization degree made it difficult to disperse, while YUFP showed a butterfly shape and was easy to disperse. 75  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  of YUFP could significantly inhibit the mRNA relative expression of IL-1 $\beta$ , while 75  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  of CUEP could significantly suppress the mRNA relative expression of inflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, and COX-2.

**Keywords:** Umbilicariaceae; chemical constituents; microstructure; *Umbilicaria esculenta*; *Lasallia papulose*

石耳科(Umbilicariaceae)物种石耳隶属于真菌界,多生长在岩石上.石耳入药已有悠久的历史,民间常用来消肿、治疗肠炎、鼻出血和痢疾等病症.2015 年,石耳正式被陕西省药材标准收录<sup>[1]</sup>,据记载,石耳无毒,具有消炎和去毒的功效<sup>[2]</sup>.石耳科两个属 *Umbilicaria* 和 *Lasallia* 因其子囊盘盘面平坦光滑,二者形态极其相似,民间并没有区分使用,早年间一直被归为石耳科同属物种<sup>[3]</sup>.

炎症因子的过量表达会引起多种慢性疾病,如导致脑出血患者二次脑损伤.脑出血患者发病后会释放大量的炎症因子,从而增加血脑屏障的通透性,引起脑水肿等脑出血后二次损伤<sup>[4]</sup>.本文以 2 个不同产地石耳科物种石耳(*U. esculenta*)和袍脐衣(*L. papulose*)为研究对象,制备多糖类天然活性成分,以期从理化特性、微观结构和抗炎作用方面对石耳科形态难以区分的两个物种进行深入对比,并为炎症因子过表达引起的相关慢性疾病药物的开发提供方向.

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

两个原材料分别购自重庆市城口县巴山物语农业发展有限公司和江西省宜春市志东贸易销售商行,由华侨大学生物系教研组通过形貌鉴定,并基于 ITS 序列的聚类分析<sup>[5]</sup>,确定其分别隶属于石耳科石耳属常见种 *U. esculenta* 和袍脐衣属物种 *L. papulosa*.

单糖标准品、葡聚糖标准品和脂多糖(美国 Sigma 公司);胎牛血清(德国 PAN-Biotech 公司);DE-AE-Segharose CL-6B 型层析介质(瑞士 Pharmacia 公司);反转录试剂盒和荧光定量 PCR 试剂盒(美国普洛麦格公司);其他试剂均为分析纯.

CKX41 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司);HP1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);4800II 型实时荧光定量 PCR 系统(瑞士 Roche 公司);H-7650 型透射电子显微镜(日本 Hitachi High-Technologies 公司);Forma 3111 型二氧化碳培养箱、Nicolet Nexus 470 型红外光谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司).

### 1.2 实验方法

1.2.1 多糖的制备 将干燥的原材料粉碎,在料液比(g : mL)为 1 : 30,提取温度 90  $^{\circ}\text{C}$ ,提取时间 2 h 的条件下,提取得到多糖粗提液.将所得粗提液过滤,用旋转蒸发仪浓缩至小体积,冷却后加入无水乙醇,获得沉淀.将沉淀溶解后进行反复冻融,使用 Sevag 法脱蛋白,冷冻干燥后得到粗多糖<sup>[6]</sup>,分别命名为 CUE 和 YUF.

取 300 mg 上述粗多糖溶于 20 mL 蒸馏水中,上样于 DEAE-Sephadex CL-6B 型层析柱.首先,用蒸馏水洗脱(流速为 1 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>,每 12 min 收集 1 管),再进行直线梯度洗脱(0~1 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> NaCl 各 600 mL),采用苯酚-硫酸法在波长 490 nm 下检测糖分布<sup>[7]</sup>.从 *U. esculenta* 和 *L. papulosa* 中分别收集到 1 种纯化多糖,经过浓缩、冷冻干燥后,分别命名为 CUEP 和 YUFP.

1.2.2 单一性和分子质量鉴定 采用高效体积排阻色谱(HPSEC)法,使用 SUGAR KS-804 型色谱柱(柱温为 50  $^{\circ}\text{C}$ )和示差折光检测器,鉴定上述纯化多糖的单一性.将超纯水作为流动相(1 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>),根据各葡聚糖标准品的出峰时间,制作分子质量标准曲线,从而分析各多糖的分子质量<sup>[8]</sup>.为了检测样品的纯度,取 1 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 纯化多糖样品液在 190~800 nm 下进行紫外光谱扫描,鉴定样品是否含有核酸及蛋白类物质.

1.2.3 成分分析 采用苯酚-硫酸法测定糖含量(质量分数);取 2 mg 样品进行 KBr 压片后,使用

Nicolet Nexus 470 型红外光谱仪测定纯化产物的特征官能团<sup>[7]</sup>.

1.2.4 单糖组成和微观结构研究 取 30 mg 样品溶于 4 mL 1 mol · L<sup>-1</sup> 硫酸中,100 ℃ 烘箱水解 8 h, 反应液用碳酸钡中和、离心后,取上清液冷冻干燥得水解产物.取 1 mg · mL<sup>-1</sup> 水解产物经 0.22 μm 尼龙膜过滤后,进行高效液相色谱分析(使用 SUGAR SP0810 型色谱柱,超纯水作为流动相,流速为 0.5 mL · min<sup>-1</sup>,柱温为 85 ℃,采用示差折光检测器检测<sup>[9]</sup>).

将 1 mg · mL<sup>-1</sup> 纯化多糖样品液与 1 mg · mL<sup>-1</sup> 的十二烷基硫酸钠(SDS)溶液等体积混合,80 ℃ 温浴后,稀释到适当倍数,取 1 滴稀释液滴加到碳支持膜(200 目)上,干燥 5 h 后,使用透射电子显微镜观察微观结构<sup>[9-10]</sup>.

1.2.5 多糖的抗炎作用 将 RAW264.7 细胞置于 DMEM 完全培养基中培养 48 h 后进行传代,炎症模型的建立通过 1 μg · mL<sup>-1</sup> 脂多糖(LPS)诱导完成,设置空白组、阴性对照组、阳性对照组和样品组进行抗炎实验研究.细胞在 6 孔板中培养 24 h 后,阳性对照组更换 2 mL 含 75 μg · mL<sup>-1</sup> 地塞米松(DXMS)的完全培养基,样品组更换 2 mL 含 75 μg · mL<sup>-1</sup> 纯化多糖样品的完全培养基,继续培养,20 h 后分别在阴性对照组、阳性对照组和样品组中添加 1 μg · mL<sup>-1</sup> LPS 后,继续培养 4 h<sup>[11]</sup>.提取各组细胞内的总 RNA,进行 cDNA 的反转录及实时荧光定量 PCR(qPCR)检测.qPCR 扩增共进行 45 个循环,扩增条件是 95 ℃ 15 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s.以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参基因,使用相对定量方法(2<sup>-ΔΔCT</sup> 法)计算 TNF-α,IL-6,IL-1β,COX-2 的 mRNA 相对表达量<sup>[11-12]</sup>.

## 2 实验结果与分析

### 2.1 CUEP 和 YUFP 的制备

使用热水提取和无水乙醇沉淀后,从两种原材料中提取得到粗多糖 CUE 和 YUF,提取率分别为 15.91%,9.30%.CUE 和 YUF 经冻融和脱蛋白后进行柱层析纯化,得到糖分布曲线,如图 1 所示.图 1

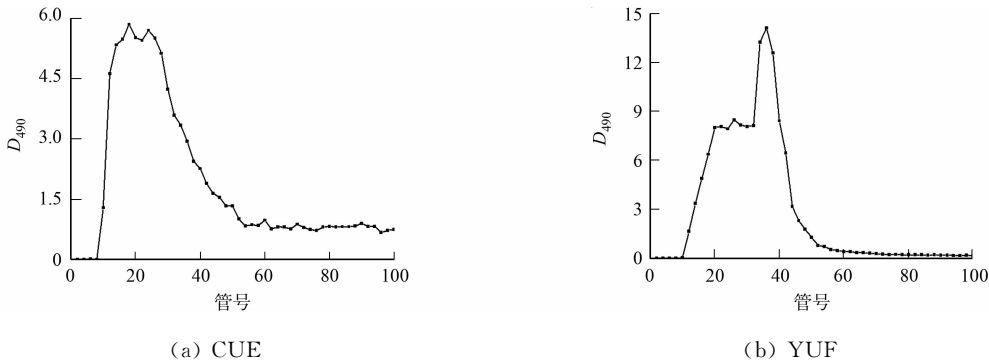


图 1 糖分布曲线图

Fig.1 Sugar distribution curves

中: $D_{490}$  为波长 490 nm 下的吸光值.根据糖分布情况,按照糖主峰收集洗脱液,洗脱液经透析袋(截留相对分子质量 3 500)透析后,得到纯化样品 CUEP 和 YUFP,得率分别为 25%和 27%.

### 2.2 CUEP 和 YUFP 的成分分析

CUEP 和 YUFP 的单一性鉴定结果,如图 2 所示.图 2 中: $t$  为保留时间.由图 2 可知:CUEP 由分子质量为 162~474 u 的多糖链聚合而成,而 YUFP 单一性较好,由分子质量为 98 u 的单一成分组成.

根据葡萄糖标准曲线  $y=0.017\ 4x+0.011\ 45$  ( $R^2=0.999$ ),CUEP 和 YUFP 的糖含量(质量分数)分别为  $(97.00\pm3.03)\%$  和  $(97.00\pm1.72)\%$ .紫外光谱扫描结果显示,CUEP 和 YUFP 均不含有蛋白质和核酸.

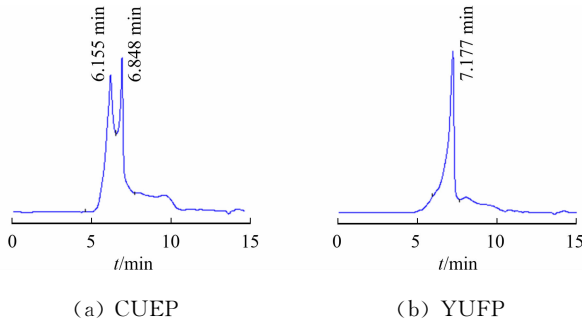
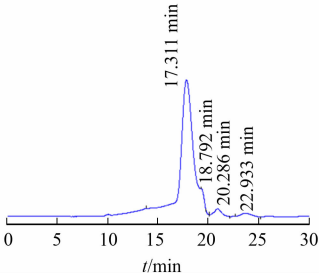


图 2 CUEP 和 YUFP 的单一性鉴定结果

Fig.2 Single identification results of CUEP and YUFP

利用 FTIR 检测 CUEP 和 YUFP 的特征官能团,其红外光谱图如图 3 所示.图 3 中: $\sigma$  为波数.由图 3 可知:CUEP 和 YUFP 在  $3\,410\text{ cm}^{-1}$  处出现的吸收峰是由  $\text{-OH}$  伸缩振动引起, $2\,900\text{ cm}^{-1}$  附近的弱峰是由  $\text{C-H}$  伸缩振动产生, $1\,640\text{ cm}^{-1}$  附近的吸收峰是由  $\text{C=O}$  基引起,而  $1\,050\text{ cm}^{-1}$  处的吸收峰则是由  $\text{C-O-C}$  振动吸收产生的.这 4 处的吸收峰为糖类物质的特征官能团吸收峰,说明 CUEP 和 YUFP 均为糖类物质<sup>[13]</sup>.

使用硫酸将多糖 CUEP 和 YUFP 完全水解为单糖,对水解产物进行高效液相色谱分析,从而确定多糖的单糖组分. CUEP 和 YUFP 的高效液相色谱图,如图 4 所示. 参照标准图谱<sup>[9]</sup> 可知,CUEP 和 YUFP 均由葡萄糖、木糖、半乳糖和甘露糖组成,其摩尔比分别为  $177.96:1.00:4.45:3.19$  和  $33.21:3.17:1.00:2.40$ . 两种多糖主要由葡萄糖组成,但 CUEP 所含的葡萄糖比例是 YUFP 的 5 倍以上.



(a) CUEP

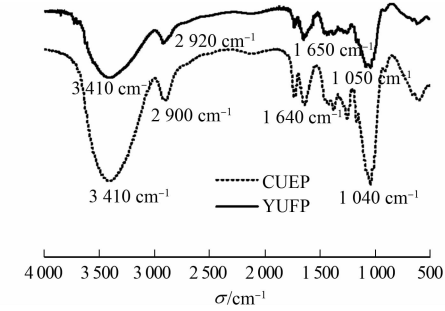
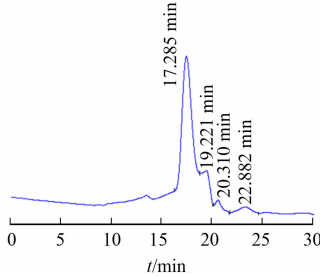


图 3 CUEP 和 YUFP 的红外光谱图  
Fig. 3 FTIR spectra of CUEP and YUFP

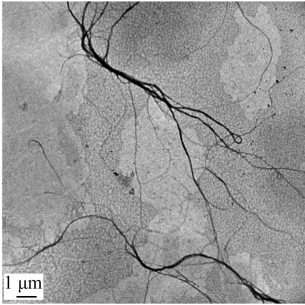


(b) YUFP

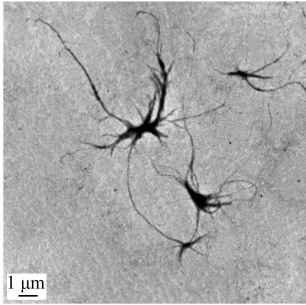
图 4 CUEP 和 YUFP 的高效液相色谱图

Fig. 4 High performance liquid chromatograms of CUEP and YUFP

CUEP 和 YUFP 的透射电镜图,如图 5 所示.由图 5 可知:CUEP 是由长短不一的线状结构组成,各单链之间高度聚集,彼此相互缠绕在一起;YUFP 同样由多股链聚合组成,但形状相对规则,各单链之间相互缠绕组成一个个小的蝴蝶结状结构.相比之下,CUEP 链长且缠绕聚集度高,在相同质量浓度的 SDS 溶液中更不容易解聚分散.



(a) CUEP



(b) YUFP

图 5 CUEP 和 YUFP 的透射电镜图

Fig. 5 Transmission electron microscopy images of CUEP and YUFP

2.3 抗炎症作用

首先,判断 CUEP 和 YUFP 对 RAW264.7 细胞的细胞毒性,以确保后续抗炎症实验是在无细胞毒状态下的进行的.细胞毒性实验结果表明:当 CUEP 或 YUFP 添加剂量为  $75\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时,RAW264.7 细胞生长状态良好,说明该剂量下无细胞毒性.

CUEP 和 YUFP 对 RAW264.7 细胞炎症因子 mRNA 相对表达量的影响,如图 6 所示.图 6 中: $*$  表示  $P<0.05$ ;  $**$  表示  $P<0.000\,1$ .由图 6 可知:与空白组相比,添加 LPS 可显著增加阴性对照组中炎症因子  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-6}$ ,  $\text{COX-2}$  的 mRNA 相对表达量( $P<0.000\,1$ ),说明炎症模型已成功构建.

由图 6(b)可知：与阴性对照组相比，阳性对照组显著降低了 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症因子 IL-1 $\beta$  的 mRNA 相对表达量( $P<0.05$ )，抑制率为 61.60%；添加 75  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  CUEP 或 YUFP 的样品组均能显著降低 IL-1 $\beta$ ( $P<0.0001$ )的 mRNA 相对表达量，抑制率分别为 60.58%和 88.12%，其中，YUFP 样品组的抑制效果显著优于阳性对照组( $P<0.0001$ )。由图 6(c)可知：阳性对照组和 CUEP 样品组均能显著降低炎症因子 IL-6 的 mRNA 相对表达量( $P<0.05$ )，抑制率分别为 76.80%和 66.62%，而 YUFP 样品组无显著抑制效果。由图 6(d)可知：阳性对照组和 CUEP 样品组中 COX-2 的 mRNA 相对表达量显著降低( $P<0.0001$ )，抑制率分别为 83.90%和 66.92%。

综上所述，YUFP 对炎症因子 IL-1 $\beta$  的抑制效果显著优于阳性对照组，CUEP 对 IL-1 $\beta$ 、IL-6、COX-2 的抑制效果与阳性对照组的差异无统计学意义( $P>0.05$ )，其综合抗炎作用更好。

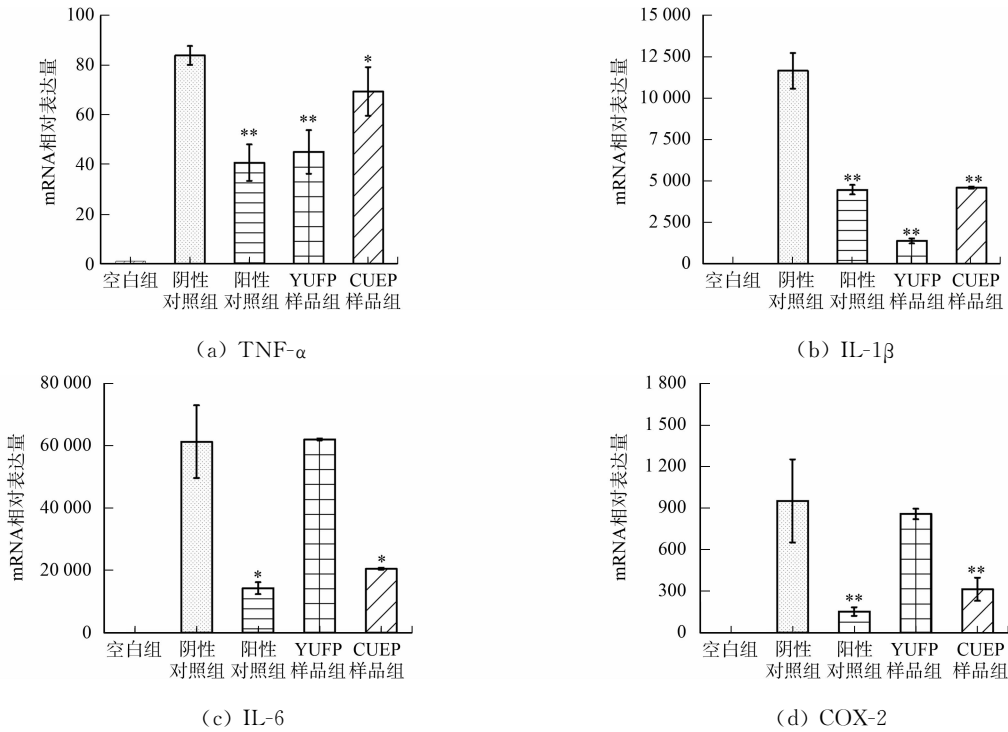


图 6 CUEP 和 YUFP 对 RAW264.7 细胞炎症因子 mRNA 相对表达量的影响

Fig. 6 Effects of CUEP and YUFP on mRNA relative expression of inflammatory cytokines in RAW264.7 cells

3 结论

从石耳科两个相近物种 *U. esculenta* 和 *L. papulosa* 中分离纯化得到多糖 CUEP 和 YUFP。CUEP 是由分子质量为 162~474 u 的多糖链聚合而成，YUFP 则由分子质量为 98 u 的单一多糖组成。二者的单糖组成均为葡萄糖、木糖、半乳糖和甘露糖，但 CUEP 所含葡萄糖比例明显高于 YUFP。CUEP 和 YUFP 具有不同的微观结构，CUEP 呈线状，而 YUFP 呈蝴蝶结状，CUEP 聚合度更高更不易解聚。质量浓度为 75  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 CUEP 和 YUFP 对 RAW264.7 细胞无毒，且能显著降低 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、COX-2 的 mRNA 相对表达量，CUEP 综合效果好，而 YUFP 则主要能显著降低 IL-1 $\beta$  的 mRNA 相对表达量，且优于地塞米松的抑制效果( $P<0.0001$ )。

*U. esculenta* 和 *L. papulosa* 外貌形态极其相似，不易区分，但其主要的多糖类物质在分子质量、单糖组成和微观结构上均有差异，这些特征使它们的生物活性显著不同<sup>[14]</sup>。分子质量高、葡萄糖占比高和螺旋程度高的 CUEP 能更好地抑制炎症因子的过表达。多糖的微观结构对其生物活性影响较大，螺旋缠绕结构的多糖可能具有更好的生物活性<sup>[15-16]</sup>。CUEP 相对螺旋缠绕程度更高更不易解聚，这可能与其拥有更好的抗炎因子过表达能力相关联。炎症因子的过量表达与很多慢性疾病相关，如炎症因子 IL-1 $\beta$  能引起脑水肿，该炎症因子在脑出血急性期会大量表达，是脑出血后炎症反应的重要标志<sup>[4]</sup>。从上述

研究结果看,石耳科多糖能有效抑制炎症细胞中 IL-1 $\beta$  的过量表达,且多糖没有毒副作用,其有效成分结构明确,可用于辅助治疗炎症因子过表达引起的相关慢性病,尤其可作为脑出血患者预防二次脑损伤的辅助药物.

参考文献:

[1] 胡小平,林伟,杨志海,等. 陕西省药材标准[M]. 西安:陕西科学技术出版社,2016.

[2] 赵国平,戴慎,陈仁寿. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社,2006.

[3] 张颖. 石耳目、科、属表基系统生物学及其对普通系统生物学的意义[D]. 泰安:山东农业大学,2012.

[4] 胡瑞,张晓云,晏雪,等. 脑出血后炎性反应机制的研究进展[J]. 中国脑血管病杂志,2015,12(7):370-374. DOI:10.3969/j. issn. 1672-5921. 2015. 07. 009.

[5] 周容,曹森,罗巖辉. 7 种不同产地石耳鉴定及其粗多糖抗氧化和抗炎作用研究[J]. 中国药学杂志,2018,53(19):1632-1637. DOI:10.11669/cpj. 2018. 19. 003.

[6] 王昭晶,曹森. 石耳与黑石耳多糖的抗炎作用研究[J]. 中国药学杂志,2022,7(1):24-29. DOI:10.11669/cpj. 2022. 01. 004.

[7] LUO Dianhui, YUAN Xiumei, ZENG Yawei, *et al.* Structure elucidation of a major fucopyranose-rich heteropolysaccharide (STP- II ) from *Sargassum thunbergii*[J]. Carbohydrate Polymers,2016,143:1-8. DOI:10.1016/j. carbpol. 2016. 01. 049.

[8] WANG Zhanyong, ZHOU Feng, QUAN Yue. Antioxidant and immunological activity *in vitro* of polysaccharides from *Phellinus nigricans mycelia* [J]. International Journal of Biological Macromolecules,2014,64:139-143. DOI:10.1016/j. ijbiomac. 2013. 11. 038.

[9] WANG Zhaojing, ZENG Yawei, LUO Dianhui. Structure elucidation of a non-branched and entangled heteropolysaccharide from *Tremella sanguinea* Peng and its antioxidant activity[J]. Carbohydrate Polymers,2016,152:33-40. DOI:10.1016/j. carbpol. 2016. 06. 094.

[10] CHEN Lei, LIU Jie, ZHANG Yaqiong, *et al.* A novel alkaline hemicellulosic heteroxylan isolated from alfalfa (*Medicago sativa* L.) stem and its thermal and anti-inflammatory properties[J]. Journal of Agricultural Food Chemistry,2015,63:2970-2978. DOI:10.1021/acs. jafc. 5b00063.

[11] 王昭晶,曹森,曾亚威,等. 血耳多糖的提取工艺、微观结构及其抗炎症作用[J]. 中国食品学报,2019,19(1):96-102. DOI:10.16429/j. 1009-7848. 2019. 01. 013.

[12] CHEN Lei, LIU Jie, ZHANG Yaqiong, *et al.* Structural, thermal, and anti-inflammatory properties of a novel pectic polysaccharide from alfalfa (*Medicago sativa* L.) stem[J]. Journal of Agricultural Food Chemistry,2015,63(12):3219-3228. DOI:10.1021/acs. jafc. 5b00494.

[13] JING Yongshuai, ZHU Jianhua, LIU Ting, *et al.* Structural characterization and biological activities of a novel polysaccharide from cultured *Cordyceps militaris* and its sulfated derivative[J]. Journal of Agricultural Food Chemistry,2015,63(13):3464-3471. DOI:10.1021/jf505915t.

[14] LI Zhiming, NIE Kaiying, WANG Zhaojing, *et al.* Quantitative structure activity relationship models for the antioxidant activity of polysaccharides[J]. Plos One,2016,11(9):e163536. DOI:10.1371/journal. pone. 0163536.

[15] WANG Kun, LI Wei, RUI Xin, *et al.* Chemical modification, haracterization and bioactivity of a released exopolysaccharide (r-EPS1) from *Lactobacillus plantarum* 70810[J]. Glycoconjugate Journal,2015,32(1/2):17-27. DOI:10.1007/s10719-014-9567-1.

[16] CHEN Juncheng, ZHANG Xia, HUO Da, *et al.* Preliminary characterization, antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities of polysaccharides from *Mallotus furetianus* [J]. Carbohydrate Polymers,2019,215:307-315. DOI:10.1016/j. carbpol. 2019. 03. 099.

(责任编辑:黄晓楠      英文审校:刘源岗)