



# 树莓多糖组分 RPP-6 的分离、结构表征及其体外免疫和抗氧化活性研究

陆杰<sup>1</sup>, 杨永晶<sup>1</sup>, 尹星星<sup>1</sup>, 王学红<sup>1</sup>, 晁沐<sup>2</sup>

(1. 青海大学生态环境工程学院, 西宁 810016; 2. 青海树莓农业产业化有限公司, 西宁 812100)

**摘要** 旨在对从树莓粗多糖中分离纯化出的树莓多糖组分 RPP-6 进行结构表征及体外免疫活性和抗氧化活性研究。采用 DEAE-Sephrose Fast Flow 和 Sephadex G-200 对树莓粗多糖进行分离纯化。结合高效凝胶渗透色谱法 (High-Performance Gel Permeation Chromatography, HPGPC)、傅里叶红外光谱法 (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FT-IR)、气相色谱-质谱联用 (Gas Chromatography and Mass Spectrometry, GC-MS) 和甲基化等方法对 RPP-6 的结构进行表征。利用小鼠巨噬细胞 RAW264.7 和自由基清除试验研究 RPP-6 的体外免疫与抗氧化活性。结果表明, RPP-6 是一种酸性杂多糖, 由阿拉伯糖、葡萄糖、半乳糖、鼠李糖和甘露糖组成, 摩尔比为 37.8 : 30.8 : 21.4 : 6.0 : 3.9。RPP-6 的峰位分子质量为 7.645 ku, 重均分子质量为 7.769 ku, 数均分子质量为 6.310 ku。RPP-6 中存在 15 种单糖连接方式, 其中 Ara<sub>f</sub>-(1→, →4, 6)-Glc<sub>p</sub>-(1→, →4)-Gal<sub>p</sub>-(1→和→4)-Xyl<sub>p</sub>-(1→为主要连接方式, 含量分别为 20.64%、8.59%、24.04% 和 16.92%。RPP-6 能明显提高小鼠巨噬细胞 RAW264.7 的活力和吞噬能力, 并促进细胞中 TNF-α (Tumor Necrosis Factor, TNF)、IL-6 (Interleukin-6, IL-6)、IL-1β (Interleukin-1β, IL-1β) 和 NO (Nitric Oxide, NO) 释放。RPP-6 对 ABTS·<sup>+</sup> 具有较高的清除作用, 对 DPPH· 的清除作用不明显。表明 RPP-6 是一种多支链的均一酸性杂多糖, 具有显著的免疫增强活性和一定的抗氧化活性。

**关键词** 树莓; 结构表征; 免疫活性; 抗氧化活性

树莓 (*Rubus idaeus* L.) 是蔷薇科悬钩子属植物, 又名悬钩子、覆盆子、三月泡、山莓等, 在中国东北、甘肃、青海、新疆和西藏等地均有分布<sup>[1-2]</sup>。树莓为药食同源植物, 其果实鲜嫩多汁, 酸甜可口, 具有很高的营养价值和药用价值以及悠久的用药历史<sup>[3]</sup>。古籍中记载覆盆子为“金玉之品”, 味甘性平、无毒, 具有益气轻身、益肾固精、补肝明目和缩尿等功效<sup>[4]</sup>。现代药理学研究发现, 树莓包含多种营养成分, 如多糖、氨基酸、黄酮类、蛋白质、维生素等, 具有补肾、保肝、抗肿瘤、降血压、抗衰老等药理活性, 被誉为“黄金水果”<sup>[5]</sup>。研究表明, 树莓果实能够制作成乳酸菌发酵饮料、葡萄酒饮品、果冻和糖果等食品; 其叶细胞提取物还能够通过改善皮肤的粗糙度和抑制皱纹的产生达到抗衰老和美白的效果<sup>[6-7]</sup>。可见, 树莓不仅能够加工制成各种食品, 在医药、保健品、化妆品等

领域也有广泛的开发利用前景。

多糖是生物体中必不可缺的物质之一, 是由多个单糖分子缩合、失水形成的一类高分子碳水化合物<sup>[8]</sup>。天然多糖广泛存在于植物、动物和微生物中。其中, 植物是天然多糖的重要来源<sup>[9]</sup>。研究表明, 植物多糖毒副作用低, 具有免疫调节、抗氧化、抗肿瘤、抗疲劳、降血糖、抗菌等诸多活性, 其中免疫调节和抗氧化活性尤为显著<sup>[10-13]</sup>。植物多糖能够激活免疫系统中的 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、巨噬细胞和自然杀伤细胞等各类免疫细胞, 促进细胞因子的分泌, 从多方面调节免疫<sup>[14]</sup>。例如, 构树叶多糖能够提高环磷酰胺诱导的雌性小鼠 ICR 的脾脏系数、白细胞数量、血清蛋白和血清抗体水平, 修复肠道及脾脏组织损伤, 从而提高小鼠的免疫功能<sup>[15]</sup>。黄芪多糖通过提高小鼠巨噬细胞 RAW264.7 的吞噬能力, 促进一

收稿日期: 2022-07-20 修回日期: 2022-09-17

基金项目: 国家自然科学基金 (81860619); 青海省科技厅基础科研项目 (2019-ZJ-953Q)。

第一作者: 陆杰, 女, 硕士研究生, 研究方向为分子作用靶点预测与筛选。E-mail: lj15256857695@163.com

通信作者: 杨永晶, 女, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为植物学。E-mail: yongjing223@163.com

氧化氮 (Nitric Oxide, NO)、肿瘤坏死因子 (Tumour Necrosis Factor, TNF)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (Granulocyte-macrophage Colony-stimulating Factor, GM-CSF)、白介素-6 (Interleukin-6, IL-6) 以及白介素-1 $\beta$  (Interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 的分泌, 表现出显著的免疫增强活性<sup>[16]</sup>。此外, 植物多糖还可以有效地清除各类自由基<sup>[12]</sup>。研究表明, 艾叶粗多糖能够有效清除羟基自由基 (Hydroxyl Radical,  $\cdot$ OH) 和超氧阴离子自由基 (Superoxide Radical,  $O_2^{\cdot-}$ ), 具有显著的抗氧化活性<sup>[17]</sup>。苦瓜粗多糖清除  $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot$ OH 和 DPPH 自由基 (1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Radical, DPPH $\cdot$ ), 具有较好的抗氧化作用<sup>[18]</sup>。由此可见, 植物多糖可以作为天然的免疫调节剂和抗氧化剂, 有巨大的开发潜力。

多糖是树莓的主要活性物质之一, 也是树莓含量较高的营养成分<sup>[5]</sup>。徐丽萍等<sup>[19]</sup>通过响应面法优化红树莓多糖提取工艺, 多糖产率可以达到 10.69%。前期研究发现, 栽培于青藏高原的红树莓中多糖提取率高达 11.75%<sup>[20]</sup>。可见, 树莓是多糖的理想来源材料。近年来, 一些学者发现树莓多糖具有抗肿瘤、抗炎、降血糖、抗氧化、降血压、抗衰老等多种功能<sup>[3, 5, 21]</sup>。如 Zhang 等<sup>[22]</sup>从悬钩子果实和叶子中提取的粗多糖, 能够清除 DPPH $\cdot$ , 表现出良好的抗氧化活性; 从树莓果肉中提取的树莓粗多糖 RPP, 能够提高荷瘤小鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、干扰素- $\gamma$  (Interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ) 和白介素-2 (Interleukin-2, IL-2) 的浓度, 具有显著的免疫增强活性<sup>[23]</sup>。随着树莓多糖研究的逐渐深入, 一些具有生物活性的多糖组分不断从树莓粗多糖中分离纯化出来。例如, 悬钩子果胶粗多糖经 DEAE cellulose-52 纤维柱和 Sephacryl S300 凝胶柱分离纯化得到的果胶多糖组分 RCHP-S 在小鼠巨噬细胞 RAW264.7 中对 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  的 mRNA 水平有显著抑制作用, 表现出明显的免疫增强活性<sup>[24]</sup>; 采用 D4020 树脂柱和 Sephadex G-100 葡聚糖凝胶柱分离纯化得到的树莓多糖组分 RCP-I 和 RCP-II, 能够显著地清除 DPPH $\cdot$  和  $\cdot$ OH, 体现出较强的体外抗氧化作用<sup>[25]</sup>。综上所述, 树莓多糖在免疫调节剂和抗氧化剂的开发和应用方面具有极大的前景。

本研究对树莓粗多糖进行分离纯化, 获得多糖组分 RPP-6 并研究其结构特征。通过小鼠巨噬细胞 RAW264.7 模型和自由基清除试验研究

RPP-6 的体外免疫调节和体外抗氧化活性, 以期作为树莓多糖组分的进一步研究奠定试验基础, 也为树莓多糖的开发和利用提供一定的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

树莓冷冻果购自青海树莓农业产业化有限公司 (青海湟源); 小鼠巨噬细胞 RAW264.7 购自中国科学院细胞库; RAW264.7 细胞专用培养基购自武汉普诺赛生命科技有限公司; 单糖标准品: 鼠李糖、岩藻糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖购自上海西格玛奥德里奇贸易有限公司; 氯化钠、三氟乙酸、乙酸均购自赛默飞世尔科技公司; 硼酸钠、高氯酸、甲醇均购自默克生命科学有限公司; 乙酸酐、醋酐、氢氧化钠均购自上海沪试实验器材股份有限公司; 碘甲烷、二甲基亚砜、氯化钠均购自上海阿达玛斯试剂有限公司; 乙酸乙酯购自北京沃凯生物科技有限公司; 磷酸缓冲液 (PBS) 购自青海莱茵尔生物科技有限责任公司; DEAE-琼脂糖凝胶 (DEAE-Sepharose Fast Flow), 葡聚糖凝胶 Superdex G-200, 甲基化试剂盒均购自扬州博瑞糖生物技术有限公司; CCK-8 试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司; TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  酶联免疫吸附测定 (Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay, ELISA) 试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司; NO 测定试剂盒购自武汉生物技术有限公司; Phagocytosis Assay Kit (IgG FITC) 购自 Cayman 化工公司; 过硫酸钾购自上海广诺化学科技有限公司; 抗坏血酸 ( $V_c$ ) 购自上海展云化工有限公司; DPPH、ABTS 购自北京索莱宝科技有限公司。

### 1.2 设备与仪器

HF100 三气培养箱 (上海力申科学仪器有限公司), AC2-4S8-CN 生物安全柜 (太仓艺思高医疗器械科技有限公司), Multiskan MK3 酶标仪和 D-37520 离心机 (中国赛默飞世尔科技公司), CPA225D 电子天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公司), R-1001VN 旋转蒸发器 (郑州长城科工贸有限公司), UGC-24M 氮吹仪和 101-1BS 真空干燥箱 (力辰科技有限公司), MS7-H550-Pro 磁力搅拌器 (无锡德凡仪器有限公司), RI-502 SHOD-EX 示差折光检测器 (日本昭和电工集团), RID-10A FRC-10A 高效液相色谱仪和 GCMS-QP201 气相质谱联用仪 (日本岛津公司), BSZ-100 自动

收集器、BRT105-104-102 串联凝胶柱和多糖凝胶纯化系统(扬州博瑞糖生物技术有限公司), FT-IR650 傅里叶变换红外光谱仪(天津港东科技发展有限公司), SYNERGY LX 多功能酶标仪(美国伯腾仪器有限公司)。

### 1.3 树莓多糖的分离纯化

1.3.1 树莓粗多糖的提取 采用水提醇沉法制备树莓粗多糖<sup>[26]</sup>。树莓冷冻果置于 55 °C 干燥箱中除去水分, 将其粉碎并筛除形状完好的树莓籽, 得到树莓果粉。称取 100 g 树莓果粉, 加入石油醚( $m:V=1:4$ ), 并置于磁力搅拌器中搅拌除脂。收集并风干滤渣, 加入 80% 乙醇( $m:V=1:4$ ), 于 60 °C 加热回流除去色素、单糖和寡糖, 重复 2 次。风干滤渣后, 加入水( $m:V=1:5$ ), 于 60 °C 超声提取 1 h。离心取上清, 利用 Sevag 法除蛋白<sup>[27]</sup>, 此操作重复 3 次。收集除去蛋白的提取液, 60 °C 条件下经旋转蒸发浓缩至原体积的 1/4 后加入 4 倍体积 95% 乙醇, 4 °C 过夜后离心获得沉淀, 冷冻干燥后获得淡粉色粉末即为树莓粗多糖。

1.3.2 多糖分离纯化 利用 DEAE-Sephrose Fast Flow 对树莓粗多糖进行极性分离<sup>[28]</sup>。称取 1 g 树莓粗多糖溶于蒸馏水配置成 100 mg/mL 的树莓粗多糖溶液, 经 DEAE-Sephrose Fast Flow(7.5 cm × 60 cm) 柱层析时分别采用蒸馏水以及不同浓度(0.2 mol/L、0.4 mol/L、0.8 mol/L、1.5 mol/L、2.0 mol/L)的氯化钠溶液作为洗脱液, 流速为 15 mL/min, 每个浓度冲洗 3~4 个柱体积。按 5 mL/管收集洗脱液, 并采用苯酚硫酸法检测多糖含量<sup>[29]</sup>。收集洗脱组分, 冷冻干燥后配置成 100 mg/mL 的多糖水溶液。采用配有 Sephadex G-200 葡聚糖凝胶层析柱(2.6 cm × 60 cm)的多糖凝胶纯化系统进一步纯化, 以 0.5 mL/min 流速的蒸馏水洗脱, 结合 RI-502 示差折光检测器在线检测多糖含量, 将收集到的馏分浓缩、冷冻干燥后用于后续研究。

### 1.4 树莓多糖组分 RPP-6 结构表征

1.4.1 分子质量测定 采用高效凝胶渗透色谱(High-Performance Gel Permeation Chromatography, HPGPC)法检测树莓多糖组分的纯度并测定其分子质量<sup>[30]</sup>。将树莓多糖组分配制成 5 mg/mL 溶液, 12 000 r/min 离心 10 min, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后使用配有 BRT105-104-102 串联凝胶柱(8 mm × 300 mm)和 RI-502 示差折

光检测器的 LC-10A HPLC 系统测定 RPP-6 的分子质量。将柱温维持在 40 °C, 以 0.6 mL/min 的 0.05 mol/L 氯化钠溶液作为流动相。以不同分子质量的右旋糖酐(5、11.6、23.8、48.6、80.9、148、273、409.8 和 670 ku)作为标准品绘制标准曲线, 并根据校准曲线计算树莓多糖组分的分子质量。

1.4.2 单糖组成分析 采用高效阴离子交换色谱法(High-performance anion exchange chromatography, HPAEC)分析多糖样品的单糖组成<sup>[30]</sup>。将树莓多糖组分和单糖标准品乙酰化, 具体方法如下: 取 2 mg 多糖, 加入 1 mL 2 mol/L 三氟乙酸, 120 °C 下水解 90 min。使用旋转蒸发器蒸干后加入 2 mL 双蒸水, 用 100 mg 硼氢化钠还原, 加入冰醋酸中和, 旋蒸, 110 °C 烘干。再加入 1 mL 乙酸酐于 100 °C 反应 1 h, 冷却后加入 3 mL 甲苯, 减压浓缩蒸干。重复以上步骤 4~5 次以除去多余的乙酸酐, 获得乙酰化衍生物。使用配有 CarboPacTMPA-20 分析柱(3 mm × 150 mm)和脉冲电流检测器的 Dionex ICS-5000 系统测定乙酰化衍生产物。采用等体积的 250 mmol/L 氢氧化钠溶液洗脱 10 min, 再用 500 mmol/L 含有 50 mmol/L 氢氧化钠的醋酸钠洗脱 30 min, 流速为 0.3 mL/min, 洗脱温度为 30 °C。通过与各标准品的保留时间和峰面积对比最终确定树莓多糖组分的单糖组成。

1.4.3 FT-IR 分析 取样品 2 mg 和溴化钾 200 mg, 混合后压成粉末, 置于 FT-IR650 傅里叶变换红外光谱仪进行扫描记录, 扫描波长为 400~4 000 cm<sup>-1</sup>。

1.4.4 甲基化分析 称取 2 mg 树莓多糖组分, 加入 1 mL 无水二甲基亚砜, 快速加入甲基化试剂 A 液, 封闭, 经超声溶解后, 再加入甲基化试剂 B 液, 在水浴 30 °C 的条件下反应 60 min, 最后加入 2 mL 超纯水终止甲基化反应。甲基化产物加入 1 mL 2 mol/L 的三氟乙酸水解 90 min, 然后采用 60 mg 硼氢化钠还原水解物 8 h, 加入冰醋酸中和, 旋蒸, 101 °C 烘箱烘干, 再加入 1 mL 乙酸酐于 100 °C 反应 1 h, 冷却后加入甲苯减压浓缩蒸干。重复上述步骤 4~5 次, 除去多余的乙酸酐, 获得乙酰化产物。将乙酰化产物用 3 mL 二氯甲烷进行萃取, 二氯甲烷层以适量的无水硫酸钠干燥。采用配有 RXI-5 SIL MS 色谱柱(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm)的 GC-MS 测定乙酰化产



物。GC-MS 条件如下:起始温度为 120 °C,以 3 °C/min 升温至 250 °C,保持 5 min;以氦气为载气,流速为 1 mL/min;进样口温度为 250 °C,检测器温度为 250 °C。

### 1.5 树莓多糖组分 RPP-6 的体外免疫活性

1.5.1 RAW264.7 细胞培养 将 RAW264.7 巨噬细胞用含 15% FBS 的 RAW264.7 细胞专用培养基于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的三气培养箱中培养,定期更换培养基。

1.5.2 RAW264.7 细胞活力 待细胞密度为 80%左右时,将 RAW264.7 细胞以  $1.0 \times 10^4$  个/孔的浓度接种至 96 孔板中。在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 三气培养箱中培养 12 h,弃去旧培养液,加入不同质量浓度的树莓多糖组分溶液(20、40、80、160 μg/mL)和 5 μg/mL 的阳性对照脂多糖(Lipopopolysaccharide, LPS)溶液,以不含树莓多糖组分和 LPS 的孔作为空白对照组,每个浓度设置 6 个复孔,于三气培养箱中培养 24 h 后每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 三气培养箱孵育 1 h,使用酶标仪于 450 nm 处测定吸光值。

1.5.3 RAW264.7 细胞吞噬能力鉴定 RAW264.7 细胞培养及处理同“1.5.2”,在每孔细胞中加入 0.2 μL Latex Beads-Rabbit IgG-FITC Complex,于 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 的三气培养箱中培养 4 h 后,每孔加入 10 μL 的台盼蓝溶液(1×)固定 1~2 min,经缓冲溶液清洗后,使用荧光酶标仪在 ex/em 485 nm/535 nm 处测定荧光强度,评估 RAW264.7 细胞的吞噬能力。

1.5.4 NO、TNF-α、IL-6 和 IL-1β 含量测定 RAW264.7 细胞培养及处理同“1.5.2”,收集细胞培养上清液。根据 NO 测定试剂盒和 ELISA 试剂盒说明书测定 RAW264.7 细胞上清液中 NO、TNF-α、IL-6 和 IL-1β 的含量。

### 1.6 树莓多糖组分的体外抗氧化活性

1.6.1 DPPH· 自由基清除能力测定 配置不同质量浓度的树莓多糖组分样品溶液(5、10、20、40、80、160、320 μg/mL),分别取 2 mL 置于试管中,随后加入 2 mL 浓度为 0.2 mmol/L 的 DPPH-乙醇溶液,摇匀,于 37 °C 避光反应 30 min,在 517 nm 处测定吸光度,并按照以下公式计算 DPPH· 清除率<sup>[31]</sup>。以抗坏血酸(V<sub>C</sub>)作为阳性对照。

$$\text{DPPH} \cdot \text{清除率} = [A_0 - (A_1 - A_2)] / A_0 \times 100\%$$

式中:A<sub>0</sub> 为 2 mL DPPH-乙醇与 2 mL 无水

乙醇混合溶液的吸光值;A<sub>1</sub> 为 2 mL 树莓多糖组分样品与 2 mL 无水乙醇混合溶液的吸光值;A<sub>2</sub> 为 2 mL 树莓多糖组分样品与 2 mL DPPH-乙醇混合溶液的吸光值。

1.6.2 ABTS·<sup>+</sup> 自由基清除能力测定 将 5 mL 浓度为 7 mmol/L 的 ABTS·<sup>+</sup> 溶液与等体积浓度为 2.45 mmol/L 过硫酸钾溶液混合,4 °C 避光保存 16 h,用无水乙醇稀释,使其在 734 nm 处吸光值为 0.70±0.02。取不同浓度的多糖溶液与 ABTS·<sup>+</sup> 工作液各 1.5 mL,充分混匀后,避光反应 6 min 后于 734 nm 处测定吸光度,以 V<sub>C</sub> 为阳性对照,计算 ABTS·<sup>+</sup> 清除率<sup>[32]</sup>。

$$\text{ABTS} \cdot ^+ \text{清除率} = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100\%$$

式中:A<sub>0</sub> 为空白(无水乙醇)的吸光值;A<sub>1</sub> 为 RPP-6 样品的吸光值。

### 1.7 数据分析

对数据采用 IBM SPSS 统计软件(第 26 版)进行统计学分析。试验数据均以“平均值±标准偏差”表示,采用 ANOVA 单因素方差分析进行组间比较。 $P < 0.05$  为显著性差异, $P < 0.01$  为极显著差异。

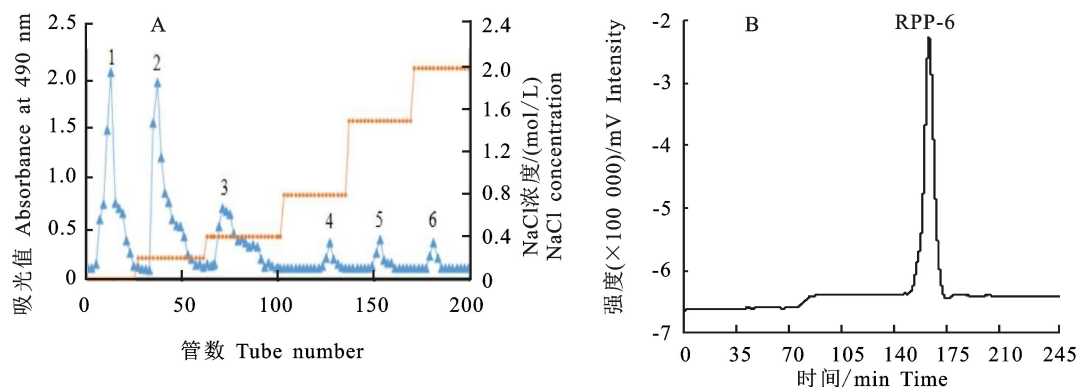
## 2 结果与分析

### 2.1 多糖的分离与纯化

如图 1-A 所示,在 DEAE-Sepharose Fast Flow 离子交换层析柱上经不同浓度氯化钠(0 mol/L、0.2 mol/L、0.4 mol/L、0.8 mol/L、1.5 mol/L、2.0 mol/L)溶液洗脱后获得 6 种组分,分别命名为组分 1、组分 2、组分 3、组分 4、组分 5 和组分 6。其中,组分 1 为中性多糖,组分 2~6 均为酸性多糖。收集组分 6(2.0 mol/L 氯化钠洗脱),利用 Sephadex G-200 葡聚糖凝胶柱进一步纯化。由图 1-B 可知,经水洗脱后在 163.447 min 只出现一个对称峰,说明该组分具有较好的分子质量均一性,并命名为 RPP-6。

### 2.2 RPP-6 的结构特性分析

2.2.1 RPP-6 的分子质量分析 树莓多糖组分 RPP-6 的 HPGPC 色谱图如图 2 所示,由图可知,在保留时间为 43.315 min 处出现一个对称多糖峰(保留时间为 46.708 min 处为流动相峰),由此也可以看出 RPP-6 是分子质量均一的多糖组分。根据标准品校准曲线,得出 RPP-6 的峰位分子质量为 7.645 ku、重均分子质量为 7.769 ku、数均分子质量为 6.310 ku。



A. 树莓粗多糖的 DEAE-Sepharose Fast Flow 色谱柱洗脱曲线; B. 树莓多糖组分 RPP-6 凝胶纯化图

A. DEAE-Sepharose Fast Flow column elution curve of crude raspberry polysaccharide; B. RPP-6 gel purification of raspberry polysaccharide fraction

图 1 RPP-6 的分离纯化

Fig. 1 Separation and purification of RPP-6

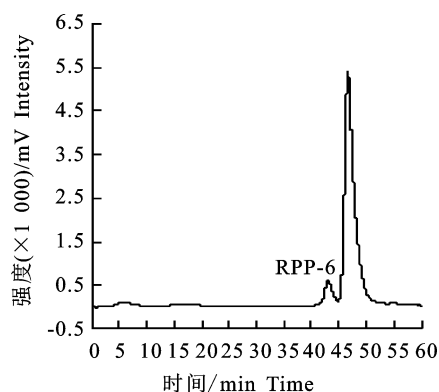
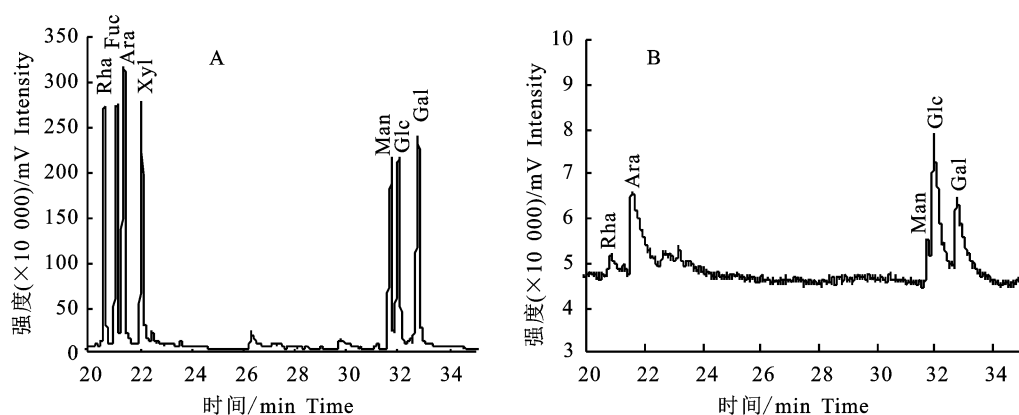


图 2 RPP-6 的分子质量图

Fig. 2 Molecular mass diagram of RPP-6

2.2.2 RPP-6 的单糖组成分析 利用 GC-MS 分析各单糖标准品及树莓多糖组分 RPP-6 的乙酰化衍生物,根据保留时间确定 RPP-6 的单糖种类,通过峰面积计算得出各单糖的摩尔百分比。由图 3 可见,RPP-6 由阿拉伯糖(Ara)、葡萄糖(Glc)、半乳糖(Gal)、鼠李糖(Rha)和甘露糖(Man)组成,摩尔比为 37.8 : 30.8 : 21.4 : 6.0 : 3.9。其中,阿拉伯糖、葡萄糖和半乳糖的含量较高。

2.2.3 RPP-6 的红外光谱分析 如图 4 所示,在红外光谱中吸收带为  $3\ 600\sim 3\ 200\ \text{cm}^{-1}$  是-OH 的伸缩振动吸收峰,这个区域的吸收峰是糖类的



A. 混合单糖标准品 GC-MS 图谱; B. RPP-6 GC-MS 图谱

A. GC-MS spectrum of mixed monosaccharide standard; B. GC-MS spectrum of RPP-6

图 3 7 种单糖标准品和 RPP-6 图谱

Fig. 3 Seven monosaccharide standards and RPP-6 profiles

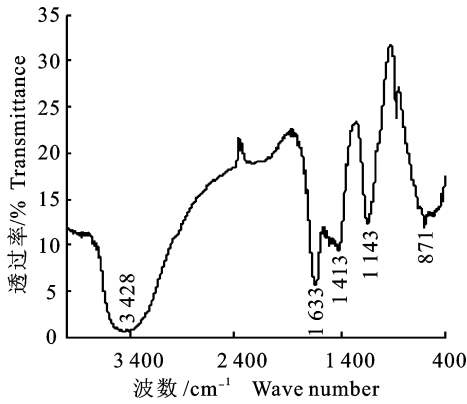


图4 RPP-6的红外光谱分析图

Fig. 4 FT-IR spectrum of RPP-6

特征峰<sup>[33]</sup>。具体如下:3 428  $\text{cm}^{-1}$  是 O-H 的伸缩振动吸收峰,是糖类的特征峰<sup>[34]</sup>;在 1 633  $\text{cm}^{-1}$  处有一个吸收峰,归属于结合水<sup>[35]</sup>;1 413  $\text{cm}^{-1}$  有吸收峰,归属于 C-O 伸缩振动<sup>[36]</sup>;1 143  $\text{cm}^{-1}$  处为 C-O 的伸缩振动峰<sup>[37]</sup>;在 871  $\text{cm}^{-1}$  处有特征峰,可能为端基差向异构 C-H 以外的赤道键的 C-H 变角振动<sup>[38]</sup>。

2.2.4 RPP-6 的甲基化分析 将 RPP-6 的乙酰化产物经过 GC-MS 分析,得出如图 5 所示 15 个主峰,根据 Complex Carbohydrate Structure Database(<https://www.ccr.c.uga.edu/specdb/ms/pmaa/pframe>)数据库分析得出 RPP-6 中糖残基的 15 种连接方式,见表 1。其中,阿拉伯糖存在 5 种甲基化产物,即 2,3,5-Me<sub>3</sub>-Araf、2,3,4-Me<sub>3</sub>-Arap、2,5-Me<sub>2</sub>-Araf、2,3-Me<sub>2</sub>-Araf 和 2,4-Me<sub>2</sub>-Arap,呋喃型阿拉伯糖占 26.98%,吡喃型阿拉伯糖占 4.37%。表明 RPP-6 中阿拉伯糖主

要以呋喃环的形式存在,其连接方式以 Araf-(1→,→5)-Araf-(1→)为主,分别约占 20.64%和 5.31%;葡萄糖存在 5 种甲基化产物,均以吡喃环的形式存在,即 2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Glc<sub>p</sub>、2,3,6-Me<sub>3</sub>-Glc<sub>p</sub>、2,6-Me<sub>2</sub>-Glc<sub>p</sub>、4,6-Me<sub>2</sub>-Glc<sub>p</sub> 和 2,3-Me<sub>2</sub>-Glc<sub>p</sub>,这些糖残基的连接方式主要为 →4,6)-Glc<sub>p</sub>-(1→、→4)-Glc<sub>p</sub>-(1→,→3 和 4)-Glc<sub>p</sub>-(1→,占比约为 8.59%、4.41%和 4.31%;半乳糖存在 4 种甲基化产物,分别为 2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Gal<sub>p</sub>、2,3,6-Me<sub>3</sub>-Gal<sub>p</sub>、2,4,6-Me<sub>3</sub>-Gal<sub>p</sub> 和 2,4-Me<sub>2</sub>-Gal<sub>p</sub>,这些糖残基表明 RPP-6 中半乳糖以吡喃环的形式存在,其连接方式主要由 →4)-Gal<sub>p</sub>-(1→和 →3,6)-Gal<sub>p</sub>-(1→组成,分别约占 24.04%和 3.77%;木糖只出现 1 种以吡喃环的甲基化产物,即 2,3-Me<sub>2</sub>-Xyl<sub>p</sub>,其连接方式为 →4)-Xyl<sub>p</sub>-(1→,约占 16.92%。以上结果表明,RPP-6 是具有多支链结构的杂多糖。

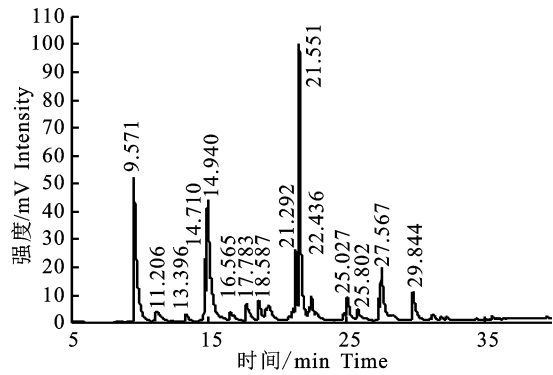


图5 RPP-6(PMAA)的 GC-MS 色谱图

Fig. 5 GC-MS chromatogram of PMAAs in RPP-6

表 1 RPP-6 的 GC-MS 分析  
Table 1 GC-MS analysis of RPP-6

保留时间/min Retention time	多糖甲基化 糖醇乙酰酯 Methylated sugar	质荷比/(m/z) Mass-charge ratio	占比/% Area	连接方式 Type of linkage
9.571	2,3,5-Me <sub>3</sub> -Araf	43,71,87,101,117,129,145,161	20.64	Araf-(1→
11.206	2,3,4-Me <sub>3</sub> -Arap	43,89,101,117,131,161	2.17	Arap-(1→
13.396	2,5-Me <sub>2</sub> -Araf	43,71,87,99,101,117,129,159,173*,201,233*	1.03	→3)-Araf-(1→
14.710	2,3-Me <sub>2</sub> -Araf	43,87,99,101,117,129,161,173,189	5.31	→5)-Araf-(1→
14.940	2,3-Me <sub>2</sub> -Xyl <sub>p</sub>	43,87,101,117,129,161,189	16.92	→4)-Xyl <sub>p</sub> -(1→
16.565	2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glc <sub>p</sub>	43,71,87,101,117,129,145,161,205	1.26	Glc <sub>p</sub> -(1→
17.783	2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Gal <sub>p</sub>	43,71,87,101,117,129,145,161,205	2.34	Gal <sub>p</sub> -(1→
18.587	2,4-Me <sub>2</sub> -Arap	43,85,99,117,127,159,201	2.20	→3)-Arap-(1→
21.292	2,3,6-Me <sub>3</sub> -Glc <sub>p</sub>	43,71,87,99,101,113,117,129,131,161,173,233	4.41	→4)-Glc <sub>p</sub> -(1→
21.551	2,3,6-Me <sub>3</sub> -Gal <sub>p</sub>	43,71,87,99,101,113,117,129,131,161,173,233	24.04	→4)-Gal <sub>p</sub> -(1→
22.436	2,4,6-Me <sub>3</sub> -Gal <sub>p</sub>	43,87,99,101,117,129,161,201,233	1.92	→3)-Gal <sub>p</sub> -(1→
25.027	2,6-Me <sub>2</sub> -Glc <sub>p</sub>	43,87,97,117,129,143,159,185	4.31	→3,4)-Glc <sub>p</sub> -(1→
25.802	4,6-Me <sub>2</sub> -Glc <sub>p</sub>	43,85,87,99,101,127,129,161,201,216	1.09	→2,3)-Glc <sub>p</sub> -(1→
27.567	2,3-Me <sub>2</sub> -Glc <sub>p</sub>	43,85,99,101,117,127,142,201,261	8.59	→4,6)-Glc <sub>p</sub> -(1→
29.844	2,4-Me <sub>2</sub> -Gal <sub>p</sub>	43,87,99,101,117,129,139,159,173,189,233	3.77	→3,6)-Gal <sub>p</sub> -(1→

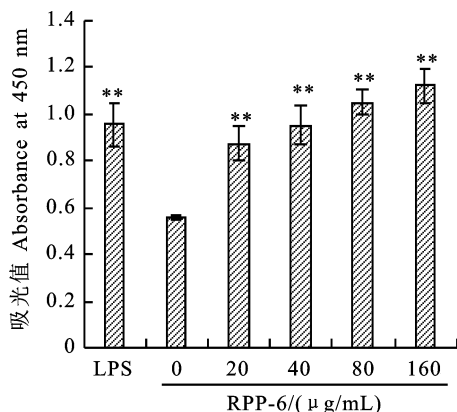
注: \* 代表非整数。

Note: \* represents a non-integer.

## 2.3 RPP-6 的免疫调节活性

### 2.3.1 RPP-6 对 RAW264.7 细胞活力的影响

如图 6 所示,与空白对照组(图中用 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  表示)相比,RPP-6 在 20~160  $\mu\text{g}/\text{mL}$  极显著增强 RAW264.7 细胞的细胞活力( $P < 0.01$ ),且具有明显的剂量依赖性。



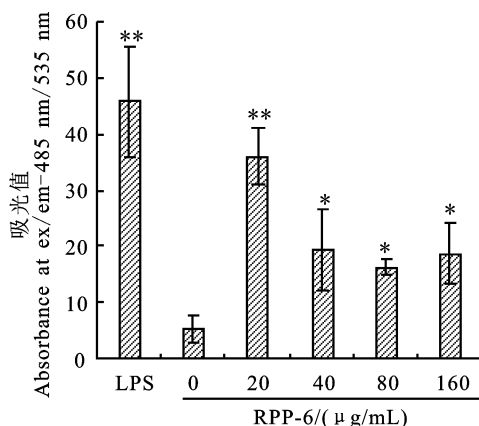
\*\* 代表与空白对照组相比具有极显著差异,  $P < 0.01$

Compared to blank control group, \*\*  $P < 0.01$

图 6 RPP-6 对 RAW264.7 的细胞活力

Fig. 6 Proliferation ability of RAW264.7 cells under effect of RPP-6

2.3.2 RPP-6 对 RAW264.7 细胞吞噬能力的影响 如图 7 所示,与空白对照组(图中用 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  表示)相比,经 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  RPP-6 处理后,RAW264.7 细胞的吸光值极显著升高( $P < 0.01$ );RPP-6 为 40~160  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,RAW264.7



\* 代表与空白对照组相比具有显著差异,  $P < 0.05$ ; \*\* 代表与空白对照组相比具有极显著差异,  $P < 0.01$ 。下同

Compared to blank control group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ . The same below

图 7 RPP-6 处理后 RAW264.7 细胞的吞噬能力

Fig. 7 Phagocytic ability of RAW264.7 cells under effect of RPP-6

细胞的吸光值显著升高( $P < 0.05$ ),说明 RPP-6 能够明显增强 RAW264.7 细胞的吞噬能力。

2.3.3 RPP-6 对 RAW264.7 细胞产生 NO、TNF- $\alpha$ 、IL-6 以及 IL-1 $\beta$  的影响 如图 8-A 和 8-B 所示,经 20~160  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 RPP-6 处理后,与空白对照组(图中用 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  表示)相比,RAW264.7 细胞中 NO 和 TNF- $\alpha$  的含量均极显著升高( $P < 0.01$ ),并呈现出明显的剂量依赖性;图 8-C 结果显示,当 RPP-6 为 40~160  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,与空白对照组相比,RAW264.7 细胞中 IL-6 的含量均极显著升高( $P < 0.01$ );图 8-D 所示,RAW264.7 细胞经 40~160  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 RPP-6 处理后,其 IL-1 $\beta$  的含量与空白对照组相比显著升高,当 RPP-6 为 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,RAW264.7 细胞的 IL-1 $\beta$  含量极显著升高( $P < 0.01$ )。因此,RPP-6 可以明显刺激巨噬细胞产生 NO,并分泌 TNF- $\alpha$ 、IL-6 以及 IL-1 $\beta$ 。

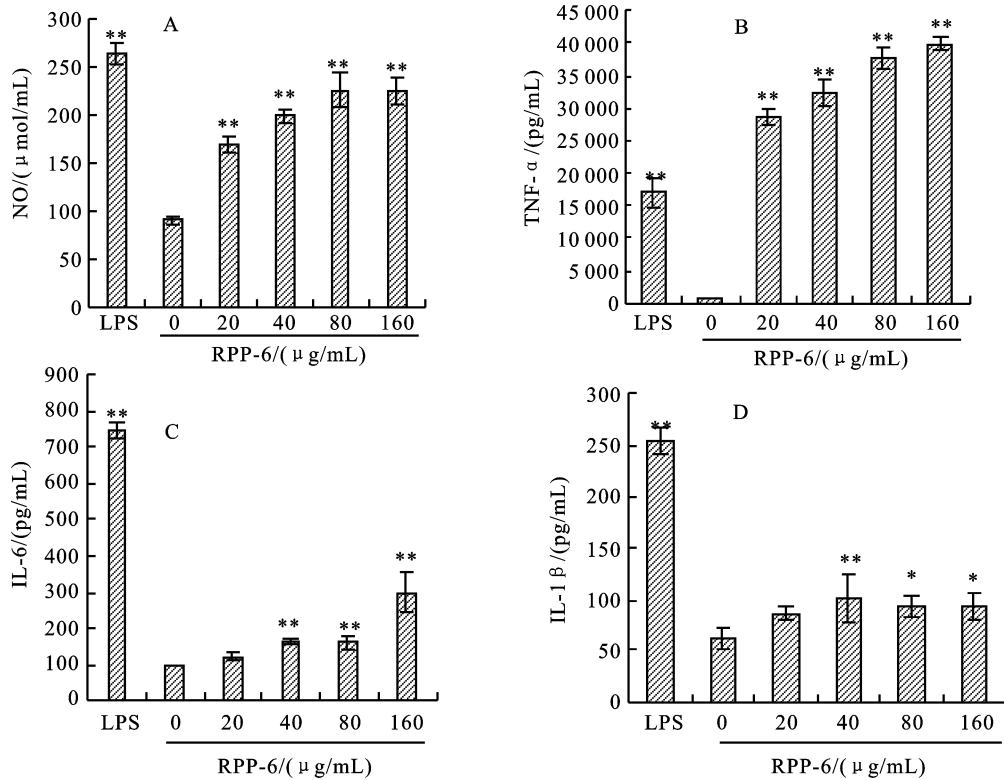
## 2.4 RPP-6 的体外抗氧化活性

如图 9-A 所示,阳性对照  $V_c$  为 20~320  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时对 DPPH·清除率均在 96%左右。树莓多糖组分 RPP-6 的质量浓度大于 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,随着其质量浓度升高,DPPH·清除率逐渐增强,当 RPP-6 为 320  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,DPPH·清除率为 36%。

图 9-B 结果显示, $V_c$  为 10~320  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时 ABTS· $^+$ 清除率均维持在 90%左右,RPP-6 对 ABTS· $^+$ 的清除能力与其质量浓度呈正相关,随着质量浓度增大,清除自由基能力越强,且当 RPP-6 为 320  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,ABTS· $^+$ 清除率达到 86%,与  $V_c$  在此质量浓度下的清除率接近,说明 RPP-6 具有较强的清除 ABTS· $^+$ 能力。

## 3 讨论与结论

本研究对树莓多糖组分 RPP-6 进行分子质量、单糖组成、傅里叶红外光谱和甲基化分析,其结构特征如下:由阿拉伯糖、葡萄糖、半乳糖、鼠李糖和甘露糖 5 种单糖组成,摩尔比为 37.8 : 30.8 : 21.4 : 6.0 : 3.9;峰位分子质量为 7.645 ku、重均分子质量为 7.769 ku、数均分子质量为 6.310 ku;糖链中共含有 15 种糖残基的连接方式,其中 Araf-(1 $\rightarrow$ , $\rightarrow$ 4,6)-GlcP-(1 $\rightarrow$ , $\rightarrow$ 4)-Galp-(1 $\rightarrow$ 和 $\rightarrow$ 4)-Xylp-(1 $\rightarrow$ 为其主要的单糖连接方式。研究表明,来源于东北农业大学园艺站的树莓果实粗多糖经 D4020 树脂柱和 Sephadex

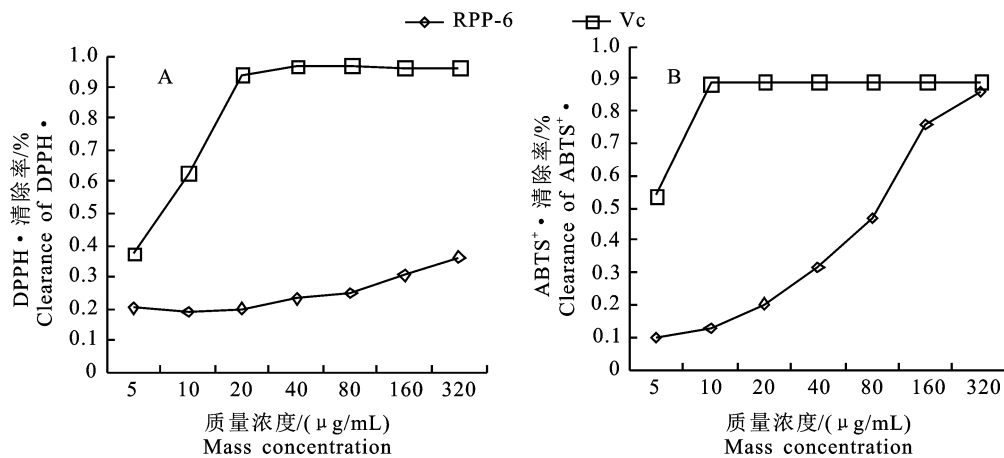


A. RPP-6 促进 RAW264.7 细胞产生 NO; B. RPP-6 促进 RAW264.7 细胞产生 TNF- $\alpha$ ; C. RPP-6 促进 RAW264.7 细胞产生 IL-6; D. RPP-6 促进 RAW264.7 细胞产生 IL-1 $\beta$ 。与空白对照组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

A. Results of RPP-6 promoting NO production in RAW264.7 cells; B. Results of RPP-6 promoting TNF- $\alpha$  production in RAW264.7 cells; C. Results of RPP-6 promoting IL-6 production in RAW264.7 cells. D. Results of RPP-6 promoting IL-6 in RAW264.7 cells. Compared to blank control group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

图 8 RPP-6 处理后 RAW264.7 细胞产生 NO、TNF- $\alpha$ 、IL-6 及 IL-1 $\beta$

Fig. 8 NO, TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  production in RAW264.7 cells under effect of RPP-6



A. RPP-6 对 DPPH· 的清除效果; B. RPP-6 对 ABTS·+ 的清除效果

A. The scavenging effect of RPP-6 on DPPH·; B. The scavenging effect of RPP-6 on ABTS·+

图 9 RPP-6 的抗氧化活性

Fig. 9 Antioxidant activity of RPP-6

G-100 葡聚糖凝胶柱分离纯化后获得多糖组分 RCP II。RCP II 的分子质量为 3.9 ku, 由鼠李

糖、阿拉伯糖、木糖、葡萄糖和半乳糖组成, 其摩尔比为 1 : 2.07 : 0.72 : 0.85 : 3.54<sup>[25]</sup>。Sahra-



gard 等<sup>[24]</sup>从树莓根部提取并分离纯化得到一种杂多糖 RAPS-1,由葡萄糖、半乳糖和葡萄糖醛酸组成,摩尔比为 6.2 : 1.0 : 1.2,分子质量为 7.9 ku。RAPS-1 的主链由  $\rightarrow 4$ -Glc $p$ -(1 $\rightarrow$ 构成,分支由  $\alpha$ -D-Gal $p$ -(1 $\rightarrow$ 和  $\alpha$ -D-GlcA $p$  构成。Yu 等<sup>[39]</sup>利用 D4020 柱和 Sephadex G-100 柱纯化得到的树莓多糖组分 RCP-II 由半乳糖醛酸、鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、葡萄糖和半乳糖组成,摩尔比为 1.00 : 0.55 : 1.19 : 0.52 : 0.44 : 1.90,分子质量为 4.013 ku。本研究采用的树莓冷冻果源自青海湟源,经 DEAE-Sepharose Fast Flow 和 Sephadex G-200 凝胶柱分离纯化得到的树莓多糖组分 RPP-6 的分子质量、单糖组成以及连接方式与上述其他多糖相比存在一定的差异。可见,不同的树莓品种、提取部位、提取方式和条件可能是造成树莓多糖结构差异的主要原因<sup>[30, 39-40]</sup>。

多糖的生物活性与其结构特征密切相关,如分子质量、单糖组成以及连接方式的特征等<sup>[41]</sup>。研究发现,无论是低分子质量多糖还是高分子质量多糖均具有不同的免疫调节作用<sup>[30]</sup>。低分子质量的多糖结构简单,跨膜阻力小,有利于其免疫活性的发挥<sup>[42]</sup>。相比之下,一些高分子质量的多糖由于存在更多的受体,也显示出较强的免疫调节作用<sup>[43]</sup>。本研究结果显示,RPP-6 的峰位分子质量为 7.645 ku、重均分子质量为 7.769 ku、数均分子质量为 6.310 ku,其分子质量介于低分子质量与高分子质量之间,利于其免疫增强活性的发挥。除分子质量外,单糖组成也是影响多糖免疫活性的重要因素。研究表明,阿拉伯糖、半乳糖、木糖和甘露糖的含量越高,多糖增强巨噬细胞免疫活性的能力越强<sup>[44]</sup>。例如,牵牛子多糖组分 PNP-5 能够抑制小鼠脾淋巴细胞增殖能力,具有免疫增强活性,PNP-5 主要由鼠李糖、葡萄糖醛酸、木糖、阿拉伯糖、甘露糖和半乳糖构成,其摩尔百分比为 32.3%、17.4%、13.7%、13.7%、9.9% 和 5.3%<sup>[45]</sup>。单糖组成对抗氧化活性也有一定影响。茯苓多糖由葡萄糖、半乳糖、葡萄糖醛酸组成,其摩尔百分比为 99.24%、0.41% 和 0.35%,其中葡萄糖的含量最高,具有一定的抗氧化活性<sup>[46]</sup>。RPP-6 中阿拉伯糖、葡萄糖和半乳糖含量较高,提示 RPP-6 可能具有较强的免疫增强活性和抗氧化活性。此外,连接方式也是影响多糖生物活性的因素之一。胀果甘草酸性多糖具有免疫增强活性,其多糖组分 Gi P-B1 的主要连接方式

由 1,5-Araf、1,4-Gal $p$ A、1-Araf 和 1,3-Gal $p$  构成<sup>[47]</sup>。孙延平等<sup>[45]</sup>发现牵牛子多糖组分 PNP-5 具有显著的抗氧化能力,其糖残基连接方式主要为 1,2-Rhap、1,4,6-Man $p$  和 1,3,6-Gal $p$ 。本研究中,RPP-6 也存在 1,4-Gal $p$ 、1-Araf、1,5-Araf、1,3,6-Gal $p$  和 1,3-Gal $p$ ,说明 RPP-6 可能具有增强免疫和抗氧化作用。

巨噬细胞是趋化因子、基质金属蛋白酶和其他炎症介质的重要来源,在免疫调节中发挥着吞噬细菌、识别病原体、激活其他免疫细胞等作用<sup>[48]</sup>。TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  等细胞因子和 NO 在炎症反应和免疫反应的调节中也发挥重要作用<sup>[49]</sup>。TNF- $\alpha$  主要由激活的单核巨噬细胞产生,可以通过激活中心粒细胞和淋巴细胞,促使其他细胞因子的合成和释放,同时,TNF- $\alpha$  还可以诱导巨噬细胞纤维化,促进组织修复<sup>[50]</sup>;IL-1 $\beta$  是由炎症小体介导激活的细胞因子,能够激活中心粒细胞和巨噬细胞吞噬病原体,在免疫反应中至关重要<sup>[51]</sup>;IL-6 是由巨噬细胞产生的关键细胞因子之一,与免疫细胞的调节、增殖和分化等密切相关<sup>[52]</sup>;NO 是参与免疫反应和炎症反应的重要物质,具有促进巨噬细胞免疫调节活性的作用<sup>[53]</sup>。研究发现,很多植物多糖是通过影响巨噬细胞的功能来发挥其免疫调节作用<sup>[54]</sup>。本研究通过巨噬细胞 RAW264.7 的细胞活力和吞噬能力以及细胞中 NO 和相关细胞因子的分泌来评估 RPP-6 的免疫调节活性。结果表明,RPP-6 能够明显提高 RAW264.7 细胞的活力和吞噬能力,并促进细胞中 NO 和细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  的产生,说明 RPP-6 具有显著的免疫增强活性。自由基是外部轨道中含有一个或多个不成对电子的化学物质,可以作为分子信号激活有益的应激反应,但过量的自由基会引起组织的氧化损伤和功能障碍<sup>[55]</sup>。DPPH $\cdot$  和 ABTS $\cdot^+$  自由基是评估抗氧化活性最常用的指标之一,它们已广泛应用于天然产物的清除活性研究中<sup>[32, 56]</sup>。体外抗氧化试验结果表明,RPP-6 清除 DPPH $\cdot$  能力不强,但对 ABTS $\cdot^+$  清除率高达 86%,说明 RPP-6 可能通过清除 ABTS $\cdot^+$  发挥其抗氧化活性。

综上所述,树莓多糖组分 RPP-6 是由阿拉伯糖、葡萄糖、半乳糖、鼠李糖和甘露糖组成的一种多支链的酸性杂多糖,具有显著的免疫增强活性和一定的抗氧化活性,在功能性食品、化妆品、食品添加等方面有广泛的开发前景。

## 参考文献 Reference:

- [1] 周双,孙兰英,杨光,等. 20个品种树莓果实品质评价[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(2): 171-176.  
ZHOU SH, SUN L Y, YANG G, *et al.* Evaluation of fruit quality of twenty varieties of raspberry[J]. *Food Research and Development*, 2022, 43(2): 171-176.
- [2] 黄永桥,高亮,张群英,等. 树莓中氨基酸、矿物元素及维生素含量分析与营养评价[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(15): 295-302.  
HUANG Y Q, GAO L, ZHANG Q Y, *et al.* Quantitative analysis and nutritional evaluation of amino acids, mineral elements and vitamins in raspberry[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2022, 48(15): 295-302.
- [3] 石永芳. 覆盆子的营养成分和药理作用的研究进展[J]. 山东化工, 2017, 46(6): 71-72.  
SHI Y F. Raspberry research progress of nutritional ingredients and pharmacological effects[J]. *Shandong Chemical Industry*, 2017, 46(6): 71-72.
- [4] 廖天月,詹志来,徐瑾,等. 覆盆子本草考证[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(10): 2607-2616.  
LIAO T Y, ZHAN ZH L, XU J, *et al.* Herbal textual research on *Rubi Fructus*[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2021, 46(10): 2607-2616.
- [5] 尹蓉,霍辰思,张倩茹,等. 树莓的功能性成分及其影响因素[J]. 中国果菜, 2020, 40(5): 65-70.  
YIN R, HUO CH S, ZHANG Q R, *et al.* Functional components and influencing factors of raspberry[J]. *China Fruit & Vegetable*, 2020, 40(5): 65-70.
- [6] 尹蓉,张倩茹,茹建生,等. 红树莓山楂复合乳酸菌发酵饮料的工艺[J]. 食品工业, 2022, 43(1): 117-121.  
YIN R, ZHANG Q R, RU J SH, *et al.* Process on red raspberry and hawthorn compounded lactobacillus fermented beverage[J]. *The Food Industry*, 2022, 43(1): 117-121.
- [7] RATTANAWIWATPONG P, WANITPHAKDEDEDECHA R, BUMRUNGPART A, *et al.* Anti-aging and brightening effects of a topical treatment containing vitamin C, vitamin E, and raspberry leaf cell culture extract: a split-face, randomized controlled trial[J]. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 2020, 19(3): 671-676.
- [8] SU X H, DUAN R, SUN Y Y, *et al.* Cardiovascular effects of ethanol extract of *Rubus chingii* Hu (Rosaceae) in rats: an in vivo and in vitro approach[J]. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 2014, 65(3): 417-24.
- [9] HUANG G, MEI X, HU J. The antioxidant activities of natural polysaccharides[J]. *Current Drug Targets*, 2017, 18(11): 1296-1300.
- [10] YANG W, ZHAO P, LI X, *et al.* The potential roles of natural plant polysaccharides in inflammatory bowel disease: a review[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2022, 277: 118821.
- [11] LIU C, CUI Y, PI F, *et al.* Extraction, purification, structural characteristics, biological activities and pharmacological applications of acemannan, a polysaccharide from *aloe vera*: a review[J]. *Molecules*, 2019, 24(8): 1554.
- [12] MU S, YANG W, HUANG G. Antioxidant activities and mechanisms of polysaccharides[J]. *Chemical Biology & Drug Design*, 2021, 97(3): 628-632.
- [13] 安乐,赵秋云,覃裴溪,等. 太白蓼多糖的硫酸化修饰及其体外抑菌活性分析[J]. 西北农业学报, 2016, 25(10): 1541-1547.  
AN L, ZHAO Q Y, TAN P X, *et al.* Sulfate modification of polygonum taipashanease kung polysaccharide and antibacterial activity of modified products in vitro[J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2016, 25(10): 1541-1547.
- [14] MIAO Y, YING Z, HUA L. Advances in research on immunoregulation of macrophages by plant polysaccharides[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 145.
- [15] 徐光沛,蒋平,何燕飞,等. 构树叶粗多糖对环磷酰胺诱导免疫抑制小鼠免疫功能的影响[J]. 西北农业学报, 2022, 37(7): 1-8.  
XU G P, JIANG P, HE Y F, *et al.* Effect of crude polysaccharide from *broussonetia papyrifera* leaves on immune function of immunosuppressed mice induced by cyclophosphamide[J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2022, 31(7): 1-8.
- [16] 刘倩,郭志廷,张康,等. 黄芪多糖对巨噬细胞天然免疫调节的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2022, 49(5): 1746-1756.  
LIU Q, GUO ZH T, ZHANG K, *et al.* Research progress on *Astragalus polysaccharide* on innate immunoregulation of macrophage [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2022, 49(5): 1746-1756.
- [17] LIU Y, HUANG G. Extraction and derivatisation of active polysaccharides[J]. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2019, 34(1): 1690-1696.
- [18] CHEN F, HUANG G, YANG Z, *et al.* Antioxidant activity of *Momordica charantia* polysaccharide and its derivatives[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 138: 673-680.
- [19] 徐丽萍,吴媛媛,王鑫,等. 响应曲面法优化红树莓多糖提取工艺[J]. 中国食品添加剂, 2017(9): 182-187.  
XU L P, WU Y Y, WANG X, *et al.* Optimization of red raspberry polysaccharide extraction process by response surface methodology[J]. *China Food Additives*, 2017(9): 182-187.
- [20] 吴云,陈薇,田文慧,等. 树莓果肉多糖超声提取工艺优化及其抗疲劳作用[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(12): 2081-2093.
- [21] BABY B, ANTONY P, VIJAYAN R. Antioxidant and an-

- ticancer properties of berries[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2018, 58(15): 2491-2507.
- [22] ZHANG T T, LU C L, JIANG J G, *et al.* Bioactivities and extraction optimization of crude polysaccharides from the fruits and leaves of *Rubus chingii* Hu[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 130: 307-315.
- [23] YANG Y J, XU H M, SUO Y R. Raspberry pulp polysaccharides inhibit tumor growth via immunopotential and enhance docetaxel chemotherapy against malignant melanoma in vivo[J]. *Food & Function*, 2015, 6(9): 3022-3034.
- [24] KONG Y, HU Y, LI J, *et al.* Anti-inflammatory effect of a novel pectin polysaccharide from *Rubus chingii* Hu on colitis mice[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2022, 9: 868657.
- [25] 滕 歆. 树莓果实多糖的提取纯化、结构鉴定及生物活性的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2014.
- TENG X. Studies on extraction, purification, structure analysis and biological activity of polysaccharides in raspberry fruit[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2014.
- [26] 杨永晶, 韩丽娟, 索有瑞. 树莓多糖中单糖组成的 GC-MS 分析[J]. *分析实验室*, 2015, 34(6): 688-691.
- YANG Y J, HAN L J, SUO Y R. Analysis the monosaccharide composition in raspberry polysaccharides by gas chromatography mass spectrometry[J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2015, 34(6): 688-691.
- [27] 刘玉佳, 孔繁东, 刘兆芳, 等. 桔梗多糖 Sevag 法除蛋白工艺的研究[J]. *中国调味品*, 2014, 39(4): 5-7.
- LIU Y J, KONG F D, LIU ZH F, *et al.* Research on technology of deproteinization from polysaccharide of *Platycodon grandiflorum* by Sevag method[J]. *China Condiment*, 2014, 39(4): 5-7.
- [28] ZHANG X, WANG L, XIE F, *et al.* A polysaccharide TKP-2-1 from *Tamarindus indica* L: purification, structural characterization and immunomodulating activity[J]. *Journal of Functional Foods*, 2021, 78(2): 104384.
- [29] ZAVREL T, OČENÁOVŠ P, SINETOVA M A, *et al.* Determination of storage (starch/glycogen) and total saccharides content in algae and cyanobacteria by a phenol-sulfuric acid method[J]. *Bio-protocol*, 2018, 8(15): e2966.
- [30] YANG Y, YIN X, ZHANG D, *et al.* Isolation, structural characterization and macrophage activation activity of an acidic polysaccharide from raspberry pulp[J]. *Molecules*, 2022, 27(5): 1674.
- [31] 张子木, 黄秀芳, 张 琴, 等. 壶瓶碎米茅多糖硫酸化结构修饰及抗氧化活性研究[J]. *中国粮油学报*, 2021, 36(12): 28-33.
- ZHANG Z M, HUANG X F, ZHANG Q, *et al.* Sulfated structure modification and antioxidant activity of *Cardamine Hupingshanensis* polysaccharide[J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils*, 2021, 36(12): 28-33.
- [32] 韦 志, 阮心眉, 戴涛涛, 等. 碱提砂仁多糖的结构表征及其抗氧化活性研究[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(24): 87-93.
- WEI ZH, RUAN X M, DAI T T, *et al.* Structure characterization and antioxidant activity of polysaccharides from amomum villosum extracted with alkaline solution[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(24): 87-93.
- [33] 高 涛, 唐华丽, 罗振宇, 等. 川明参粗多糖初级结构解析及其体外抗氧化活性[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(8): 275-282.
- GAO T, TANG H L, LUO ZH Y, *et al.* Primary structure analysis and antioxidant activity in vitro of crude polysaccharide from *Chuanminshen violaceum* [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2021, 21(8): 275-282.
- [34] LIYASKINA E V, RAKOVA N A, KITYKINA A A, *et al.* Production and characterization of the exopolysaccharide from strain *Paenibacillus polymyxa* 2020[J]. *PLoS One*, 2021, 16(7): e0253482.
- [35] LIU Y, HEE-JIN K. Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and simple algorithm analysis for rapid and non-destructive assessment of developmental cotton fibers [J]. *Sensors*, 2017, 17(7): 1469.
- [36] AIPIRE A, YUAN P, AIMAIER A, *et al.* Preparation, characterization, and immuno-enhancing activity of polysaccharides from *Glycyrrhiza uralensis* [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(1): 159.
- [37] LI C Y, LIU L, ZHAO Y W, *et al.* Inhibition of calcium oxalate formation and antioxidant activity of carboxymethylated poria cocos polysaccharides[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 2021: 1-19.
- [38] ZHOU Y, QIAN C, YANG D, *et al.* Purification, structural characterization and immunomodulatory effects of polysaccharides from *Amomum villosum* Lour. on RAW 264. 7 macrophages[J]. *Molecules*, 2021, 26(9): 2672.
- [39] YU Z, LIU L, XU Y, *et al.* Characterization and biological activities of a novel polysaccharide isolated from raspberry (*Rubus idaeus* L.) fruits [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 132: 180-186.
- [40] SAHRAGARD N, JAHANBIN K. Structural elucidation of the main water-soluble polysaccharide from rubus anatolicus roots [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 175: 610-617.
- [41] XU S Y, HUANG X, KIT-LEONG C. Recent advances in marine algae polysaccharides: isolation, structure, and activities [J]. *Marine Drugs*, 2017, 15(12): 388.
- [42] SUN Y, ZHANG Z, CHENG L, *et al.* Polysaccharides confer benefits in immune regulation and multiple sclerosis by interacting with gut microbiota [J]. *Food Research International*, 2021, 149: 110675.
- [43] XIN M, LIANG H, LUO L. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on the structural characteris-

- tics, antitumor mechanisms and immunomodulating activities[J]. *Carbohydrate Research*, 2016, 424:30-41.
- [44] LO T, YI H J, CHAO A, *et al.* Use of statistical methods to find the polysaccharide structural characteristics and the relationships between monosaccharide composition ratio and macrophage stimulatory activity of regionally different strains of *Lentinula edodes*[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2007, 584(1):50-56.
- [45] 孙延平, 王博讓, 刘 艳, 等. 牵牛子多糖 PNP-5 的结构表征及体外生物活性研究[J]. 中医药学报, 2021, 49(8):42-48.
- SUN Y P, WANG B X, LIU Y, *et al.* Structure characterization and in vitro bioactivities of polysaccharide PNP-5 from pharbitis nil[J]. *Acta Chinese Medicine and Pharmacology*, 2021, 49(8):42-48.
- [46] 王 帅, 赵冬雪, 韩成凤, 等. 6 种活性多糖的结构、性质及其抗氧化活性的比较研究[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(16):7-15.
- WANG SH, ZHAO D X, HAN CH F, *et al.* A comparative study on the structure, properties and antioxidant activity of six active polysaccharides[J]. *Food Research and Development*, 2021, 42(16):7-15.
- [47] 陈 橙, 帕丽达·阿不力孜, 米仁沙·牙库甫, 等. 胀果甘草酸性多糖的分离纯化、结构分析及免疫活性测定[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(12):4651-4658.
- CHEN CH, PALIDA·ABULIZI, MIRENSHA·YAKU-PU, *et al.* Isolation, purification, structural analysis and immune activity determination of acid polysaccharides from *Glycyrrhiza inflata* Bat. [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2017, 8(12):4651-4658.
- [48] WYNN T A, VANNELLA K M. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis[J]. *Immunity*, 2016, 44(3):450-462.
- [49] CHENG X Q, LI H, YUE X L, *et al.* Macrophage immunomodulatory activity of the polysaccharides from the roots of *Bupleurum smithii* var. *parvifolium*[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2010, 130(2):363-368.
- [50] SHIN M S, PARK S B, SHIN K S. Molecular mechanisms of immunomodulatory activity by polysaccharide isolated from the peels of citrus unshiu[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 112:576-583.
- [51] LOPEZ-CASTEJON G, BROUGH. Understanding the mechanism of IL-1 $\beta$  secretion[J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2011, 22(4):189-195.
- [52] RIDKER P M, RANE M. Interleukin-6 signaling and anti-interleukin-6 therapeutics in cardiovascular disease[J]. *Circulation Research*, 2021, 128(11):1728-1746.
- [53] ZHAO X, LI J, LIU Y, *et al.* Structural characterization and immunomodulatory activity of a water soluble polysaccharide isolated from *botrychium ternatum*[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 171:136-142.
- [54] KOUAKOU K, SCHEPETKIN I A, YAPI A, *et al.* Immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *alchornea cordifolia*[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2013, 146(1):232-242.
- [55] MEO S D, VENDITTI P. Evolution of the knowledge of free radicals and other oxidants[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 2020(3):1-32.
- [56] PAN Y, CHEN Y, LI Q, *et al.* The synthesis and evaluation of novel hydroxyl substituted chalcone analogs with in vitro anti-free radicals pharmacological activity and in vivo anti-oxidation activity in a free radical-injury alzheimer's model[J]. *Molecules*, 2013, 18(2):1693-1703.



## Isolation, Structural Characterization, Immunoregulatory and Antioxidant Activity of Raspberry Polysaccharide RPP-6 in Vitro

LU Jie<sup>1</sup>, YANG Yongjing<sup>1</sup>, YIN Xingxing<sup>1</sup>, WANG Xuehong<sup>1</sup> and CHAO Mu<sup>2</sup>

(1. School of Ecological and Environmental Engineering, Qinghai University, Xining 810016, China;

2. Qinghai Raspberry Agricultural Industrialization Co., Ltd., Xining 812100, China)

**Abstract** In the present study, the raspberry polysaccharide RPP-6 was isolated from raspberry pulp, and its structural characteristics, immunomodulatory and antioxidant activities were studied in vitro. RPP-6 was isolated and purified by DEAE-Sepharose Fast Flow and Sephadex G-200 chromatography and the structural characteristics of RPP-6 were studied by high-performance gel permeation chromatography (HPGPC), Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR), gas chromatography-mass spectroscopy (GC-MS) and methylation. RAW264.7 macrophages and free radical scavenging tests were conducted to evaluate the immunomodulatory and antioxidant activities of RPP-6. The results showed that RPP-6 was composed of arabinose, glucose, galactose, rhamnose and mannose at a molar ratios of 37.8 : 30.8 : 21.4 : 6.0 : 3.9, respectively. The peak molecular mass, average molecular mass and number average molecular mass were 7.645 ku, 7.769 ku, and 6.310 ku, respectively. RPP-6 was composed of 15 glycosyl linkages patterns, among which Ara $f$ -(1 $\rightarrow$ ,  $\rightarrow$ 4,6)-Glc $p$ -(1 $\rightarrow$ ,  $\rightarrow$ 4)-Gal $p$ -(1 $\rightarrow$  and  $\rightarrow$ 4)-Xyl $p$ -(1 $\rightarrow$  were the main connection modes of sugar residues, accounting for about 20.64%, 8.59%, 24.04%, and 16.92%, respectively. RPP-6 significantly promoted the proliferation and phagocytosis of RAW264.7 cells and increased the release of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-6, IL-1 $\beta$ , and nitric oxide (NO) in RAW264.7 cells. RPP-6 exhibited strong ABTS $\cdot^+$  radical scavenging ability, but exhibited no DPPH $\cdot$  free radical scavenging ability. In conclusion, RPP-6 is a homogeneous acidic heteropolysaccharide with a complex multi-branched structure, and has significant immune-enhancing activity and certain antioxidant activity.

**Key words** Raspberry polysaccharide; Structural characterization; Immune activity; Antioxidant activity

**Received** 2022-07-20

**Returned** 2022-09-17

**Foundation item** National Natural Science Foundation of China (No. 81860619); Basic Research Project of Department of Science and Technology of Qinghai Province (No. 2019-ZJ-953Q).

**First author** LU Jie, female, master student. Research area: target prediction and screening of molecular action. E-mail: lj15256857695@163.com

**Corresponding author** YANG Yongjing, female, associate professor, master tutor. Research area: botany. E-mail: yongjing223@163.com

(责任编辑:顾玉兰 Responsible editor: GU Yulan)