

铁皮石斛多糖的提取工艺及对小鼠急性肺损伤改善作用的研究^Δ

刘子菁*,从静文,程卓,牟琳,吴汐柔,王子豪,杨俊颜,信小兵[#](新疆第二医学院药学院,新疆克拉玛依 834000)

中图分类号 R965;R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2023)22-2745-05
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2023.22.10



摘要 目的 优化铁皮石斛多糖的提取工艺,初步研究其对小鼠急性肺损伤(ALI)的改善作用。方法 以铁皮石斛为原料,采用超声辅助热水浸渍法提取铁皮石斛多糖;以铁皮石斛多糖提取率为响应值,通过单因素实验和Box-Behnken响应面法优化料液比、提取时间、提取温度。通过脂多糖诱导建立ALI小鼠模型,以醋酸泼尼松(5 mg/kg)为阳性对照,考察低、中、高剂量铁皮石斛多糖(50、100、200 mg/kg)对模型小鼠肺湿/干重比和肺组织病理形态(苏木精-伊红染色、Masson染色)的影响。结果 铁皮石斛多糖的最优提取工艺为料液比1:25(g/mL),提取时间1 h,提取温度58℃;该工艺所得铁皮石斛多糖的平均提取率为37.75%(RSD=1.12%, $n=3$),与预测值(38.63%)的相对误差为2.28%。与模型组比较,阳性对照组和铁皮石斛多糖各剂量组小鼠的肺湿/干重比均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),肺组织病理变化(肺泡结构严重破坏,肺泡间隔明显增宽,大量炎症细胞浸润及成纤维细胞增生)均有不同程度缓解。结论 优化的铁皮石斛多糖提取工艺可行,且所得的铁皮石斛多糖对小鼠ALI有一定的改善作用。
关键词 铁皮石斛多糖;提取工艺;Box-Behnken响应面法;脂多糖;急性肺损伤

Study on the extraction of polysaccharides from *Dendrobium officinale* and its improvement effect on acute lung injury in mice

LIU Zijing, CONG Jingwen, CHENG Zhuo, MU Lin, WU Xirou, WANG Zihao, YANG Junyan, XIN Xiaobing
(School of Pharmacy, Xinjiang Second Medical College, Xinjiang Karamay 834000, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To optimize the extraction process of polysaccharides from *Dendrobium officinale*, and preliminarily study its effect on acute lung injury (ALI) in mice. **METHODS** Using *D. officinale* as raw material, the polysaccharides were extracted from *D. officinale* by ultrasonic-assisted hot water immersion. Using the extraction rate of *D. officinale* polysaccharides as response value, the single-factor experiments and Box-Behnken response surface method were used to optimize the ratio of material to liquid, extraction time and extraction temperature. ALI mice were induced by lipopolysaccharide. Using prednisone acetate (5 mg/kg) as the positive control, the effects on the mass ratio of wet and dry lung and pathological changes of lung tissue (HE staining and Masson staining) of low-dose, medium-dose and high-dose *D. officinale* polysaccharides (50, 100, 200 mg/kg) were investigated. **RESULTS** The optimal extraction technology of *D. officinale* polysaccharides was as follows: the ratio of material to liquid was 1:25 (g/mL), the extracting time was 1 h, and the extracting temperature was 58℃. Under these conditions, the average extraction rate of *D. officinale* polysaccharides was 37.75% (RSD=1.12%, $n=3$), the relative error of which with predicted value (38.63%) was 2.28%. Compared with the model group, the ratios of wet and dry lung in the positive control group and *D. officinale* polysaccharides groups were all decreased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$), and the pathological changes in lung tissue (severe destruction of alveolar structure, significant widening of alveolar septa, extensive infiltration of inflammatory cells and proliferation of fibroblasts) were alleviated to varying degrees. **CONCLUSIONS** The optimal extraction process of *D. officinale* polysaccharides is feasible; the obtained polysaccharide extract has a certain improvement effect on ALI in mice.
KEYWORDS polysaccharides from *Dendrobium officinale*; extraction technology; Box-Behnken response surface method; lipopolysaccharide; acute lung injury

铁皮石斛为兰科植物铁皮石斛 *Dendrobium offici-*

^Δ基金项目 新疆维吾尔自治区区级大学生创新创业训练计划项目(No.S202113560005);克拉玛依市创新环境建设计划(创新人才)项目(No.2022hjxcrc0058)

* 第一作者 药师。研究方向:天然产物活性成分。E-mail: 932242219@qq.com

[#]通信作者 讲师,硕士。研究方向:天然产物活性成分。E-mail: 18699300391@163.com

nale Kimura et Migo的干燥茎,主要分布在我国安徽、四川、浙江、云南、江西等地。该药主要含有多糖、生物碱、氨基酸和微量元素等化学成分,具有抗肿瘤、抗衰老、抗急性肺损伤(acute lung injury, ALI)、扩张血管和抗血小板凝集等多种药理作用^[1]。目前,国内外多糖的提取方法很多,主要包括浸渍法、回流法、超声法、微波法、酶解法、闪式提取法、冻融提取法等,但单一提取法存在提取率低、工艺复杂、提取物杂质多等弊端^[2]。

ALI是一种由各种肺内(吸入、注射、感染及创伤等)或肺外(休克、脓毒症等)致病因素导致肺泡结构受损而引发肺部弥漫性炎症和水肿反应的呼吸系统疾病。目前,临床尚无治疗ALI的特效药物,故其病死率维持在较高水平,整体病死率高达40%^[2]。现代医学认为,ALI的病理学机制主要与肺组织局部过度的氧化应激和炎症反应有关^[3-4]。多糖作为铁皮石斛的主要活性成分,具有抗炎、抗氧化作用,且毒性极低^[5-6]。基于此,本研究以铁皮石斛为原料,采用超声辅助热水浸渍法提取铁皮石斛多糖,通过单因素实验和Box-Behnken响应面法优化提取工艺,并考察铁皮石斛多糖对小鼠ALI的影响,为铁皮石斛多糖的提取及药效研究提供理论依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括UV1802G型紫外-可见分光光度计(天津冠泽科技有限公司)、FW135型粉碎机(北京市永光明医疗仪器有限公司)、LEICARM2245型石蜡切片机(常州市雅博电子设备有限公司)、Axio-ImagerA2型蔡司正置荧光显微镜(北京博瑞斯科技有限公司)等。

1.2 主要药品与试剂

铁皮石斛药材购自南宁市药材市场,经广西中医药大学药学院谭勇教授鉴定为兰科植物铁皮石斛*D. officinale* Kimura et Migo的干燥茎;醋酸泼尼松片(批号20220313,规格5 mg)购自上海金不换兰考制药有限公司;浓硫酸(批号20190301)购自新疆德瑞生物有限公司;苯酚(分析纯)购自天津市风船化学世纪科技有限公司;D(+)-无水葡萄糖对照品(批号110833-201906,纯度≥98%)和脂多糖对照品(批号20220208,纯度≥98%)均购自北京索莱宝科技有限公司;苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(批号20190608)、Masson染色试剂盒(批号20180302)均购自南京建成生物工程研究所。

1.3 实验动物

昆明小鼠90只,雄性,SPF级,体重20~22 g,购自河南斯克贝斯生物科技股份有限公司,生产许可证号为SCXK(豫)2020-0005。本实验方案经新疆医科大学实验动物伦理委员会审批,伦理审批号为IACUC-20220728-10。

2 方法与结果

2.1 铁皮石斛多糖的提取

称取铁皮石斛药材5 g,水洗后置于60℃烘箱中烘干至恒重,粉碎,过40目筛;粗粉加入10倍量水,于70℃下以700 W功率超声浸提,抽滤,滤液浓缩至原液的1/3,再加入3倍量的无水乙醇,于4℃下静置12 h后滤过,收集沉淀,置于50℃烘箱中烘干,得多糖粉末并按下式计算铁皮石斛多糖得率:多糖得率(%)=多糖粉末质量/铁皮石斛质量×100%。

2.2 铁皮石斛多糖含量和提取率测定

2.2.1 多糖含量

采用苯酚-硫酸法进行测定^[7]。精确称取D(+)-无水葡萄糖对照品50 mg,加水定容至50 mL容量瓶中,得1 mg/mL的无水葡萄糖标准溶液。分别准确量取上述标准溶液0.01、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10 mL于试管中,加水定容至2 mL。吸取5%苯酚溶液1 mL,分别加到6只试管中,摇匀,迅速加入浓硫酸5 mL,摇匀,静置5 min,于沸水中加热15 min,取出冷却至室温。采用紫外-可见分光光度计于490 nm波长处测定吸光度(A)值。以无水葡萄糖质量浓度(c)为横坐标、吸光度(A)为纵坐标,绘制无水葡萄糖标准曲线,得标准曲线方程为 $A=14.707c+0.0287$ ($R^2=0.9992$)。方法学考察符合2020年版《中国药典》(四部)的相关要求。

2.2.2 多糖提取率

精确称取铁皮石斛多糖粉末2.0 g,加水定容至100 mL容量瓶中,摇匀,准确量取该多糖待检测溶液1.0 mL,加水定容至2 mL,加入5%苯酚溶液1 mL,摇匀,迅速加入浓硫酸5 mL,摇匀,静置5 min,于沸水中加热15 min,取出冷却至室温。采用紫外-可见分光光度计于490 nm波长处测定A值,代入“2.2.1”项下标准曲线方程计算多糖质量浓度,并按下式计算铁皮石斛多糖提取率:多糖提取率=提取液中多糖质量浓度×提取体积/铁皮石斛多糖粉末质量×100%。

2.3 铁皮石斛多糖提取工艺优化

2.3.1 单因素实验

前期预实验结果表明,料液比、提取时间、提取温度均能显著影响铁皮石斛多糖的提取率,因此本研究选择料液比、提取时间、提取温度为因素进行单因素实验。分别称取铁皮石斛药材0.2 g,共5份,按“2.1”项下方法操作。其中,料液比单因素实验条件如下:以700 W功率超声15 min,提取温度为70℃,提取2次,提取时间为2 h,设置料液比(g/mL,下同)分别为1:20、1:25、1:30、1:35、1:40;提取时间单因素实验条件如下:以700 W功率超声15 min,提取温度为70℃,提取2次,料液比为1:30,设置提取时间分别为1、2、3、4、5 h;提取温度单因素实验条件如下:以700 W功率超声15 min,提取时间为2 h,提取2次,料液比为1:30,设置提取温度分别为50、60、70、80、90℃。考察各因素对铁皮石斛多糖提取率的影响,结果见图1。

由图1A可以看出,铁皮石斛多糖提取率随料液比的改变呈现波浪形变化,当料液比为1:30时,铁皮石斛多糖提取率达到最大值;由图1B可以看出,铁皮石斛多糖提取率随提取时间的延长先升高后降低,当提取时间为2 h时,铁皮石斛提取率达到最大值;由图1C可以看出,铁皮石斛多糖提取率随提取温度的升高先升高后降低,当提取温度为60℃时,铁皮石斛多糖提取率达到最大值。

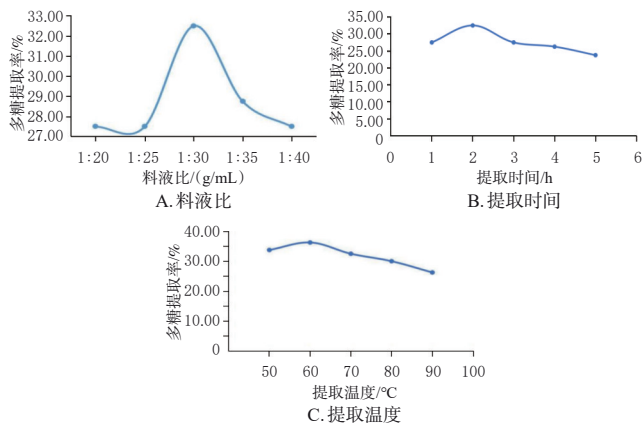


图1 料液比、提取时间、提取温度对铁皮石斛多糖提取率的影响

2.3.2 Box-Behnken响应面实验

基于单因素实验结果,根据Box-Behnken实验设计原理,以提取温度(*A*)、料液比(*B*)、提取时间(*C*)为考察因素,铁皮石斛多糖提取率(*Y*)为响应值,设计3因素3水平的提取工艺优化实验。Box-Behnken响应面实验因素与水平见表1,设计方案与结果见表2。

表1 Box-Behnken响应面实验因素与水平

水平	提取温度(<i>A</i>)/°C	料液比(<i>B</i>)/(g/mL)	提取时间(<i>C</i>)/h
-1	50	1:25	1
0	60	1:30	2
1	70	1:35	3

表2 Box-Behnken响应面实验设计方案与结果

实验号	因素			铁皮石斛多糖提取率/%	
	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	实测值	预测值
1	0	-1	1	29.50	29.91
2	1	-1	0	35.00	34.91
3	0	1	-1	33.25	32.84
4	0	0	0	33.75	34.00
5	0	0	0	33.75	34.00
6	-1	0	1	21.50	21.00
7	0	0	0	33.75	34.00
8	-1	1	0	32.50	32.59
9	0	-1	-1	38.75	38.34
10	-1	0	-1	32.50	32.81
11	0	1	1	32.50	32.91
12	0	0	0	32.50	34.00
13	-1	-1	0	31.25	31.34
14	1	1	0	31.25	31.16
15	1	0	-1	25.75	26.25
16	1	0	1	30.00	29.69
17	0	0	0	36.25	34.00

应用Design-Expert 12软件对表2数据进行回归拟合,得到回归方程为 $Y=34.00+0.53A-0.63B-2.90C-1.25AB+3.81AC+2.13BC-3.78A^2+2.28B^2-2.78C^2$ 。对回归方程进行方差分析,结果见表3。由表3显示,该模型的 F 值为20.66, $P<0.01$,表明该回归方程的拟合度较好;失拟项 $P>0.05$,表明该模型成立;模型的相关系数 R^2 为0.963 7,表明96.37%的多糖提取率变化可用该模型解释;此外,各因素响应值的影响大小排序为 C (提取时间) $>B$ (料液比) $>A$ (提取温度)。

表3 Box-Behnken响应面实验回归方程的方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	236.17	9	26.24	20.66	0.000 3
<i>A</i>	2.26	1	2.26	1.78	0.224 2
<i>B</i>	3.13	1	3.13	2.46	0.160 7
<i>C</i>	35.07	1	35.07	27.61	0.001 2
<i>AB</i>	6.25	1	6.25	4.92	0.062 0
<i>AC</i>	58.14	1	58.14	45.78	0.000 3
<i>BC</i>	18.06	1	18.06	14.22	0.007 0
A^2	60.20	1	60.20	47.40	0.000 2
B^2	21.91	1	21.91	17.25	0.004 3
C^2	32.57	1	32.57	25.64	0.001 5
残差	8.89	7	1.27		
失拟项	1.39	3	0.46	0.25	0.859 9
纯误差	7.50	4	1.87		
总误差	245.06	16			

运用Design-Expert 12软件绘制各因素交互作用的响应面图和等高线图(图2)。响应面图的陡峭程度以及等高线图的形状可以直观反映出各影响因素之间的交互作用对响应值影响的强弱:响应面图越陡峭,说明两因素交互作用对响应值的影响越显著,响应面图越平缓则两因素交互作用的影响越不显著;等高线呈椭圆形或马鞍形,表示两因素交互作用的影响显著,若呈圆形则表示两因素交互作用的影响不显著。

由图2可以看出,提取温度和提取时间两因素之间的响应面陡峭,等高线趋于椭圆,说明两因素交互作用对响应值的影响显著;但提取温度和料液比以及料液比和提取时间的响应面坡度变化不明显,等高线不呈椭圆形,说明两因素交互作用的影响不显著,与回归模型分析结果一致。

通过Design-Expert 12软件求解回归方程,得到最优提取工艺因素为料液比1:25,提取时间1.087 h,提取温度57.76 °C,铁皮石斛多糖提取率的预测值为38.63%。考虑到实际生产的可操作性,本研究将最优提取工艺修正为料液比1:25,提取时间1 h,提取温度58 °C。对此优化条件进行3次重复验证实验,结果显示,铁皮石斛多糖提取率的平均实测值为37.75%($RSD=1.12\%$),与预测值的相对误差为2.28%,表明所得工艺可行。

2.4 铁皮石斛多糖对小鼠ALI的影响

2.4.1 分组、给药、造模与取样

将昆明小鼠随机分为空白对照组、模型组、阳性对照组(醋酸泼尼松)和铁皮石斛多糖低、中、高剂量组,每组15只。铁皮石斛多糖低、中、高剂量组小鼠的给药剂量根据本课题组前期预实验结果分别设置为50、100、200 mg/kg(以铁皮石斛多糖粉末质量计),阳性对照组小鼠的给药剂量根据参考文献设置为5 mg/kg^[8-9],空白对照组和模型组小鼠给予等体积生理盐水,每天灌胃1次,连续7 d。末次给药1 h后,除空白对照组小鼠于气管内滴注等体积生理盐水外,其余各组小鼠均于气管内滴注脂多糖10 mg/kg以复制ALI模型。24 h后,处死各组小鼠,取其肺脏,备用。

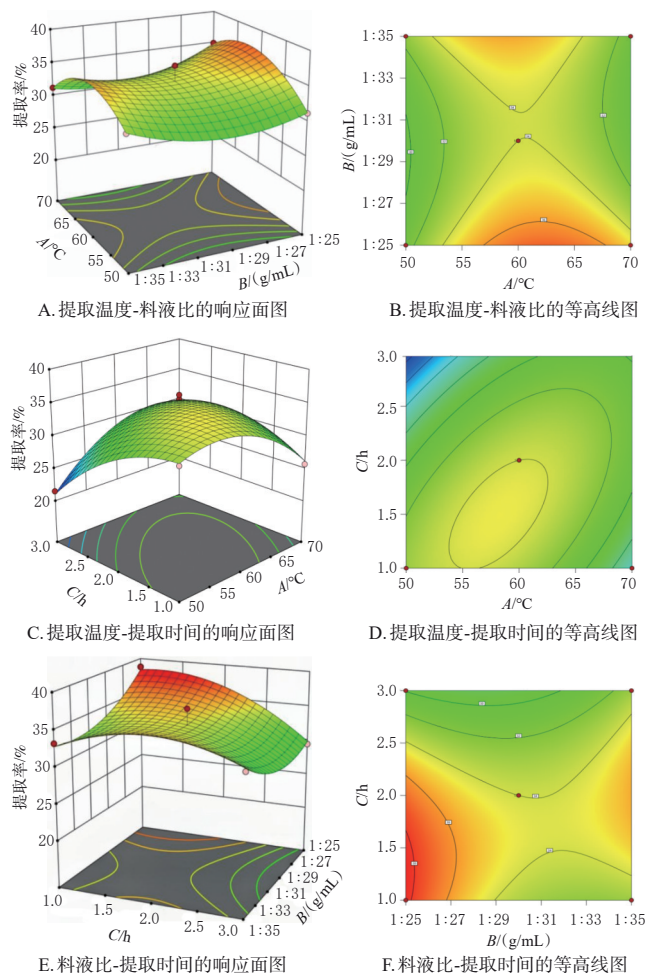


图2 各因素交互作用对铁皮石斛多糖提取率影响的响应面图和等高线图

2.4.2 铁皮石斛多糖对ALI模型小鼠肺湿/干重比的影响

取各组小鼠右肺下叶,用预冷的生理盐水洗净表面血渍,用滤纸吸干称重(湿重)后,放入70℃烘箱中烘烤72 h,再次称重(干重)并计算肺湿/干重比:肺湿/干重比=肺湿重/肺干重。

2.4.3 铁皮石斛多糖对ALI模型小鼠肺组织病理形态的影响

取各组小鼠右肺组织,放入4%中性福尔马林中固定24 h,再经梯度乙醇脱水、石蜡包埋后切片,分别进行HE和Masson染色,观察肺组织病理形态学改变。

2.4.4 数据处理

采用SPSS17.0软件对数据进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2.4.5 结果

与空白对照组(8.38 ± 1.25)比较,模型组小鼠肺湿/干重比(16.90 ± 2.19)显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,阳性对照组(9.83 ± 1.29)和铁皮石斛多糖低、中、高剂量组(14.85 ± 2.08 、 11.80 ± 1.82 、 10.43 ± 1.14)小鼠肺湿/干重比均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

空白对照组小鼠肺组织结构完整清晰,无水肿现

象,肺泡间隔未见增厚;与空白对照组比较,模型组小鼠肺泡结构严重受损,肺泡间隔明显增宽,大量炎症细胞浸润及成纤维细胞增生;与模型组比较,阳性对照组和铁皮石斛多糖低、中、高剂量组小鼠肺损伤情况均有不同程度缓解,其中阳性对照组和铁皮石斛多糖高剂量组缓解效果更好。结果见图3、图4。

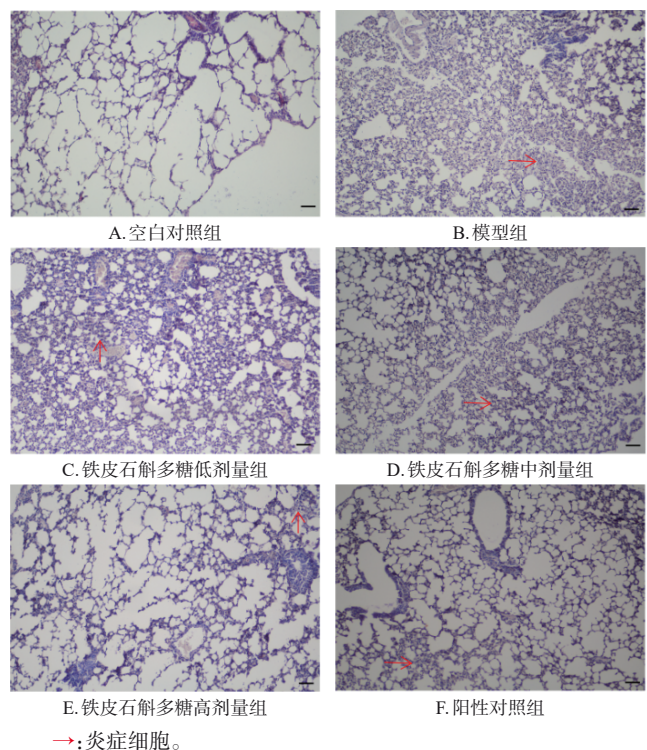


图3 各组小鼠肺组织的HE染色显微图(标尺=50 μm)

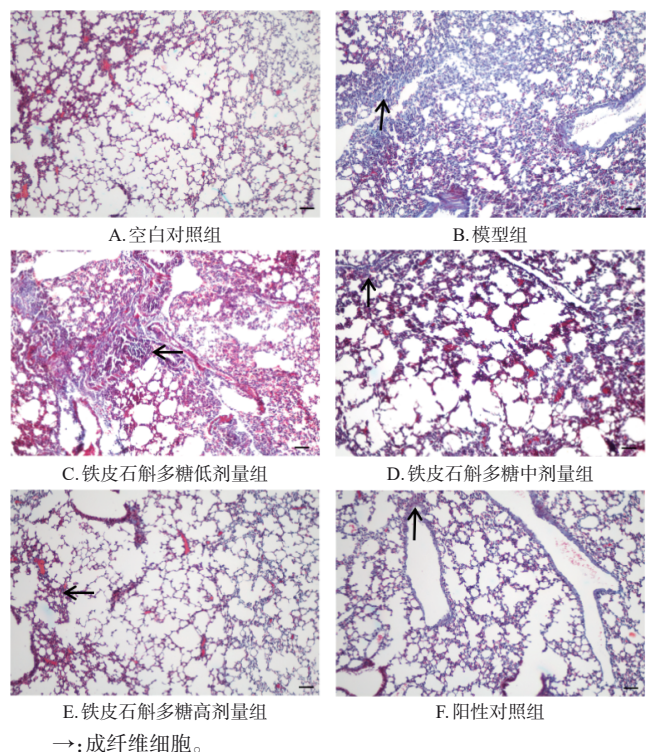


图4 各组小鼠肺组织的Masson染色显微图(标尺=50 μm)

3 讨论

Box-Behnken响应面法可研究多个影响因素之间的交互作用,并可结合回归分析对工艺条件进行合理优化。传统的正交实验仅能处理离散的水平值,无法获得整个区域中设定影响因素的最优组合和响应值的最优值,而Box-Behnken响应面法可以克服上述缺陷。该法通过理论分析和模拟验证,评价提取工艺的影响因素,进而优化提取工艺参数。本研究通过单因素实验和Box-Behnken响应面法优化得铁皮石斛多糖的最优提取工艺为:料液比1:25,提取时间1 h,提取温度58℃。该工艺所得铁皮石斛多糖的平均提取率为37.75%($n=3$),与预测值(38.63%)接近。

ALI是各种直接和间接致伤因素导致的肺泡上皮细胞及毛细血管内皮细胞损伤,造成肺水肿,从而引发急性低氧呼吸功能不全的临床综合征^[10]。脂多糖是革兰氏阴性菌细胞壁的主要成分,是一种内毒素,可以刺激炎症因子和炎性介质的产生,引发机体炎症反应。本研究采用气管滴注脂多糖的方式诱导建立小鼠ALI模型,探讨铁皮石斛多糖对小鼠ALI的影响。结果显示,与空白对照组比较,模型组小鼠肺湿/干重比显著升高,肺组织可见肺泡结构严重受损、肺泡间隔明显增宽、大量炎症细胞浸润及成纤维细胞增生等ALI病理特征,表明ALI模型复制成功。与模型组比较,阳性对照组和铁皮石斛多糖低、中、高剂量组小鼠肺湿/干重比均显著降低,上述病理改变均有所缓解,可见铁皮石斛多糖对脂多糖诱导的小鼠ALI有改善作用。

综上所述,本研究优化的铁皮石斛多糖提取工艺可行,且所得多糖对小鼠ALI有一定的改善作用。

参考文献

- [1] 蔡琳,彭鹏.名贵中药铁皮石斛化学成分及其药理作用浅述[J].安徽化工,2021,47(1):24-25.
CAI L, PENG P. A brief introduction on the chemical constituents and pharmacological action of rare Chinese medicine *Dendrobium officinale*[J]. Anhui Chem Ind, 2021, 47(1):24-25.
- [2] DIKMEN N, CELLAT M, ETYEMEZ M, et al. Ameliorative effects of deuropein on lipopolysaccharide-induced acute lung injury model in rats[J]. Inflammation, 2021, 44(6):2246-2259.
- [3] 邱爱珠,徐晔青,欧阳翌国,等.清肺排毒汤对脂多糖诱导急性肺损伤小鼠的作用机制研究[J].湖南中医杂志,2022,38(12):142-146.
QIU A Z, XU Y Q, OUYANG Y G, et al. Mechanism of action of Qingfei paidu decoction on mice with acute lung injury induced by lipopolysaccharide[J]. Hunan J Tradit Chin Med, 2022, 38(12):142-146.

- [4] MO M, LI S Y, DONG Z H, et al. S-allylmercaptocysteine ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice by inhibiting inflammation and oxidative stress via nuclear factor kappa B and Keap1/Nrf2 pathways[J]. Int Immunopharmacol, 2020, 81:106273.
- [5] 窦玉玉,郭建宏,陆青兰,等.铁皮石斛多糖对矽肺纤维化小鼠的抗炎作用及对Notch1/Hes1通路、凋亡相关蛋白的影响[J].中药新药与临床药理,2022,33(10):1307-1314.
DOU Y Y, GUO J H, LU Q L, et al. Anti-inflammatory effects of *Dendrobium officinale* polysaccharide on mice with silicosis fibrosis and its effects on Notch1/Hes1 pathway and apoptosis-related proteins[J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2022, 33(10):1307-1314.
- [6] 张思雨,白雪媛,乔巨慧,等.铁皮石斛多糖调控线虫寿命及抗氧化作用的研究[J].食品安全质量检测学报,2022,13(14):4689-4697.
ZHANG S Y, BAI X Y, QIAO J H, et al. Study on the lifespan and antioxidant effects of *Dendrobium officinale* polysaccharides on *Caenorhabditis elegans*[J]. J Food Saf Qual, 2022, 13(14):4689-4697.
- [7] 唐林,赵洪庆,杨蕙,等.百合地黄汤多糖提取工艺优化及抗焦虑抑郁药效评价[J].中国药房,2023,34(8):923-928.
TANG L, ZHAO H Q, YANG H, et al. Optimization of extraction process of polysaccharide from Baihe dihuang decoction and study on its antianxiety and anti-depression efficacy[J]. China Pharm, 2023, 34(8):923-928.
- [8] 刘云涛,张瞳,朱伟,等.扶正解毒颗粒对脂多糖致急性肺损伤小鼠的保护作用与机制研究[J].中药新药与临床药理,2022,33(5):588-592.
LIU Y T, ZHANG T, ZHU W, et al. Protective effect and mechanism of Fuzheng jiedu granules on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice[J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2022, 33(5):588-592.
- [9] 苏祖清.松萝酸对小鼠急性肺损伤以及肺纤维化的保护作用[D].广州:广州中医药大学,2015.
SU Z Q. The protective effects of usnic acid on lipopolysaccharide-induced acute lung injury and bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice[D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2015.
- [10] FAN E, BRODIE D, SLUTSKY A S. Acute respiratory distress syndrome: advances in diagnosis and treatment[J]. JAMA, 2018, 319(7):698-710.

(收稿日期:2023-05-10 修回日期:2023-10-16)

(编辑:邹丽娟)