

纳溪特早茶‘乌牛早’茶多糖提取纯化及免疫活性研究

赖玲, 杨潇, 尹琳, 陈小雨, 阳辉蓉, 彭取敏, 刘军, 曾英杰

Extraction, Purification and Immune Activity of Polysaccharide from Naxi Wuniu Tea

LAI Ling, YANG Xiao, YIN Lin, CHEN Xiaoyu, YANG Huirong, PENG Qumin, LIU Jun, and ZENG Yingjie

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024030456>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

蕨菜多糖的提取、纯化、结构表征与抗氧化活性研究

Extraction, Purification, Structural Characterization and Antioxidant Activity of Polysaccharides from Bracken

食品工业科技. 2023, 44(17): 51-58 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022090327>

金花葵多糖提取工艺优化及结构表征和抗氧化性研究

Optimization of Extraction Technology, Structure Characterization and Antioxidant Activity of Polysaccharide from *Hibiscus manihot* L.

食品工业科技. 2023, 44(8): 236-243 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022070030>

碱提砂仁多糖的结构表征及其抗氧化活性研究

Structure Characterization and Antioxidant Activity of Polysaccharides from *Amomum villosum* Extracted with Alkaline Solution

食品工业科技. 2021, 42(24): 87-93 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021040255>

信阳毛尖茶末多糖的分离纯化和体外抗氧化活性研究

Isolation, Purification and *in Vitro* Antioxidant Activity of Tea Dust Polysaccharide from Xinyangmaojian

食品工业科技. 2020, 41(13): 181-186 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.13.029>

绿茶多糖提取工艺优化及其抗氧化活性分析

Extraction Process Optimization and Antioxidant Activity of Green Tea Polysaccharides

食品工业科技. 2022, 43(20): 220-227 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021120287>

铁观音茶末多糖的分离纯化和抗氧化活性

Isolation, Purification and Antioxidant Activity of Polysaccharide from Tieguanyin Tea Dust

食品工业科技. 2020, 41(11): 66-71 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.11.010>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

赖玲, 杨潇, 尹琳, 等. 纳溪特早茶‘乌牛早’茶多糖提取纯化及免疫活性研究 [J]. 食品工业科技, 2025, 46(6): 231–241. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024030456

LAI Ling, YANG Xiao, YIN Lin, et al. Extraction, Purification and Immune Activity of Polysaccharide from Naxi Wuniu Tea[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(6): 231–241. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024030456

· 工艺技术 ·

纳溪特早茶‘乌牛早’茶多糖提取纯化及免疫活性研究

赖 玲¹, 杨 潇¹, 尹 琳¹, 陈小雨¹, 阳辉蓉¹, 彭取敏², 刘 军³, 曾英杰^{1,*}

(1.西南民族大学食品科学与技术学院, 四川成都 610041;

2.泸州市纳溪区大渡口镇, 四川泸州 646329;

3.四川大里特早茶有限公司, 四川泸州 646318)

摘要: 目的: 本研究旨在对纳溪乌牛特早茶多糖进行分离纯化, 并进一步研究其抗氧化和免疫活性。方法: 首先, 采用热水浸提法获取乌牛茶多糖, 采用 DEAE-52 和葡聚糖凝胶 G200 进一步纯化乌牛茶多糖。然后, 对所获取多糖的基本理化性质进行研究; 并通过检测乌牛茶多糖的 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH) 自由基清除能力、2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸 (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS) 阳离子自由基清除能力、氧化自由基吸收能力 (oxygen radical absorbance capacity, ORAC) 评价其抗氧化活性。接着, 对乌牛茶多糖的安全性进行分析检测, 具体包括: 内毒素检测, 小鼠巨噬细胞 RAW264.7 细胞和人胚胎肾细胞 293 (人胚胎肾细胞 293, HEK293) 毒性检测。最后, 评价乌牛茶多糖对 RAW264.7 细胞因子 (白细胞介素 6, Interleukin-6, IL6; 肿瘤坏死因子 α , tumor necrosis factor α , TNF- α ; NO) 释放及对应 mRNA 分泌水平的影响, 进而获取乌牛茶多糖免疫增强活性。结果: 采用 DEAE-52 阴离子交换树脂和葡聚糖凝胶 Sephadex G-200 从纳溪乌牛早茶中分离得到纯化后乌牛茶多糖 (WNp); 理化分析表明 WNp 纯度为 90.26%, 蛋白质含量为 1.37%, 且不具有三螺旋结构; WNp 由摩尔比为 0.4:32.6:2.3:4.7:8.7:0.3:40.3 的葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖、甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸和半乳糖醛酸组成的分子量为 82.61 kDa 的多糖; WNp 对 DPPH 和 ABTS⁺自由基具有显著的清除能力并具有较高的 ORAC 值, 即具有较好的抗氧化性; 最后, WNp 可上调细胞因子 (IL-6、TNF- α) 分泌和 NO 释放的 mRNA 的表达量, 从而促进细胞因子 (IL-6、TNF- α) 分泌和 NO 释放, 进而激活 RAW264.7 细胞的初始免疫应答反应, 达到增强免疫的效果。结论: 研究结果为纳溪乌牛茶源的精深加工利用提供科学依据。

关键词: 纳溪乌牛特早茶, 多糖, 结构, 抗氧化性, 免疫活性

中图分类号: TS209

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2025)06-0231-11

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024030456

本文网刊:



Extraction, Purification and Immune Activity of Polysaccharide from Naxi Wuniu Tea

LAI Ling¹, YANG Xiao¹, YIN Lin¹, CHEN Xiaoyu¹, YANG Huirong¹, PENG Qumin², LIU Jun³,
ZENG Yingjie^{1,*}

(1. College of Food Science and Technology, Xianan Minzu University, Chengdu 610041, China;

2. Dadukou Town, Naxi District, Luzhou 646329, China;

3. Sichuan Dalit Morning Tea Co., Ltd., Luzhou 646318, China)

收稿日期: 2024-03-29

基金项目: 西南民族大学研究生创新型科研项目 (ZD2023050); 四川省自然科学基金项目 (2023NSFSC1200); 四川省天府峨眉计划青年科技人才项目 (川峨眉第 2260 号); 攀西特色作物研究与利用四川省重点实验室资助课题 (ZYN2023037)。

作者简介: 赖玲 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: 15881627263@163.com。

* 通信作者: 曾英杰 (1987-), ORCID: 0000-0003-3329-946X, 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 天然产物与食品营养, E-mail: phhzyj@163.com。

Abstract: Objective: The aim of this study was to isolate and purify the polysaccharide from Naxi Wuniu special morning tea, and the antioxidant and immune activities were further investigated. Methods: Firstly, the tea polysaccharides were extracted by hot water extraction method, and further purified by DEAE-52 and dextran gel G200. Then, the basic physicochemical properties of polysaccharide were studied. And the antioxidant activities were evaluated by determined the 1,1 Diphenyl-2-trinitrobenzene hydrazine (DPPH) free radical scavenging capacity, 2,2'-diazob-di-3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid (ABTS) cationic free radical scavenging capacity, and oxygen radical absorbance capacity (ORAC). Then, the safeties of tea polysaccharide were analyzed, including endotoxin detection, RAW264.7 cells and human embryonic kidney cell 293 (HEK293) toxicity detection. Finally, the effects of tea polysaccharide on RAW264.7 cytokines (interleukin-6, IL6, tumor necrosis factor α , TNF- α , NO) release and the corresponding mRNA secretion levels, in order to obtain the immune-enhancing activity of tea polysaccharide. Results: A purified polysaccharide fraction WNp was obtained from Naxi Wuniu morning tea by using DEAE-52 anion exchange resin and Sephadex G-200. Physicochemical analysis showed that the purity of WNp was 90.26%, the protein content of WNp was 1.37%, and WNp did not contain triple helix structure. WNp was composed of glucose (Glc), galactose (Gal), arabinose (Ara), mannose (Man), rhamnose (Rha), glucuronic acid (GlcA) and galacturonic acid (GalA) at the mole ratio of 0.4:32.6:2.3:4.7:8.7:0.3:40.3, respectively. The molecular weight of WNp was 82.61 kDa. WNp showed significant scavenging abilities on DPPH and ABTS⁺ free radicals and a high ORAC value, that was, it had good antioxidant activities. Finally, WNp could up-regulate the mRNA expression of cytokines (IL-6, TNF- α) and NO, thereby promoting cytokine secretion (IL-6, TNF- α) and NO release, and then activate the initial immune response of RAW264.7 cells, which achieved the immuno-enhancing activity. Conclusion: The research results provide scientific basis for the deep processing and utilization of Naxi Wulu tea source.

Key words: Naxi Wuniu special morning tea; polysaccharides; structure; antioxidant activity; immuno-enhancing activity

我国是绿茶生产大国,据澎湃新闻《2023年中国茶产业数据分析简报》报道,2021年我国绿茶产量达217.36万吨,占全国茶产量的68.7%(2022年及之后各细分品类数据未完全发布,不具备同质可比性)^[1]。茶因其优良的抗氧化、抗癌、抗炎、免疫调节和降糖功效等健康促进作用而越来越受欢迎^[2]。纳溪特早茶,属于绿茶的一种,是四川省泸州市纳溪区特产,全国农产品地理标志。纳溪特早茶的品种繁多,各种品种的纳溪特早茶在口感、色泽、香气等特性方面也各有所长,让每一位品茗人都能感受到不同的早春气息^[3-4]。乌牛早茶是中国茶类中特早发芽的品种,采用乌牛早制成的纳溪特早茶,外形扁平光滑,挺秀匀齐,芽峰显露,微显毫,色泽嫩绿光润;内质香气高鲜,滋味甘醇爽口,汤色清澈明亮。经过现代科学的分离和鉴定,茶叶中含有机化学成分达四百种,无机矿物元素达四十多种。茶叶中的有机化学成分和无机矿物元素含有许多营养成分和药效成分,有机化学成分主要有:茶多酚类、植物碱、蛋白质、氨基酸、多糖、糖类等^[5]。

功能因子的生物活性由其结构所决定,多糖作为一种生物活性成分,其生物活性的呈现与提取工艺息息相关^[6],如热水提取法中液料比、提取温度、提取时间和提取次数等因素均是影响多糖的提取率产率关键因素^[7]。另外,茶叶产地不同,茶多糖显示的生物性会呈现一定的差别,如免疫调节、抗疲劳、抗氧化、降血糖活性等^[8-11]。

目前,很多研究表明茶多糖具有降血糖、降血脂、增强免疫、抗氧化、抗肿瘤等功效^[12]。而且,随着茶多糖研究的深入,其在生物、医疗、食品、保健品等领域的应用越来越多,具有广泛的应用前景,其

保健功能也逐渐受到人们的青睐,这不但能促进茶叶资源的精深加工利用,促进经济社会发展,也提升人们健康生活质量。然而,针对乌牛茶多糖及其生物活性的研究鲜见报道,未能为乌牛茶后续开发利用提供较全面系统的科学依据。因此,为加快促进乌牛茶多糖在食品、药品及保健品等行业的高值化应用,本研究拟对乌牛茶多糖进行分离纯化,结构解析;评价乌牛茶多糖抗氧化活性,对小鼠巨噬细胞系RAW264.7及人胚肾细胞HEK293细胞的细胞毒性及免疫调节活性。通过上述乌牛茶多糖结构及生物活性的研究,为纳溪乌牛茶相关精深加工产品的开发提供科学依据和理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

小鼠巨噬细胞系RAW264.7、人胚肾细胞HEK293细胞 青旗(上海)生物技术发展有限公司;AB-8大孔吸附树脂 上海源叶生物科技有限公司;DEAE-52阴离子交换树脂 北京索莱宝科技有限公司;达尔伯克(氏)改良伊格尔(氏)(dulbecco's modified eagle medium, DMEM)高糖培养基、磷酸盐缓冲液(pH7.4)、胰蛋白酶-EDTA(0.25%,含酚红)、青霉素与链霉素混合液×100、胎牛血清(FBS)

美国Gibco公司;噻唑蓝(MTT) 美国Sigma-Aldrich公司;小鼠ELISA白细胞介素6(Interleukin-6, IL6)试剂盒、小鼠ELISA肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)试剂盒 深圳欣博盛生物科技有限公司;NO测定试剂盒 南京建成生物工程研究所; Vybrant Phagocytosis Assay Kit 美国Thermo Fisher Scientific公司;内毒素检测试剂盒(鲎试剂显色法,即Chromogenic LAL Endotoxin Assay

Kit, C-LAL-EAK) 上海碧云天生物技术有限公司; 其他所有试剂均为国产分析纯。

Sigma 3K15 高速冷冻离心机 美国 Sigma 公司; Christ 防爆型冻干机、Alpha3-4 LSC basic 博励行仪器有限公司; VICTORX 酶标仪 美国 PerkinElmer 公司; ABI 7500 荧光定量基因扩增仪、Heracell 150i GP CO₂ 培养箱 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; UV2550 紫外可见分光光度仪 日本岛津公司; HT-SN3400 扫描电子显微镜 日立高新技术公司; Bruker VERTEX 33 红外光谱仪 德国布鲁克(BRUKER)公司; EYELAN-1100 旋转蒸发仪 德祥科技有限公司; Waters 1525 高效液相色谱仪 美国 Water 公司; Agilent 7890A 气相色谱仪 美国安捷伦科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 乌牛茶多糖的分离与纯化 乌牛早茶粉碎后经 60 目筛, 100 ℃ 浸提 6 h, 过滤, 重复浸提操作 3 次。合并收集所得滤液, 减压浓缩后, 5000 r/min 离心 15 min 去除沉淀。对除杂后的浓缩液于 4 ℃ 静置 12 h 醇沉处理, 收集离心后的沉淀, 分别用无水乙醇、丙酮、石油醚冲洗, 除去多余的水分和杂质; 鼓风干燥至有机试剂完全挥发, 将沉淀溶于蒸馏水后流水透析(截留分子量 3500 Da)72 h, 浓缩后冷冻干燥, 得到粗多糖的干燥样品。

采用 AB-8 大孔吸附树脂与 Sevag 溶剂结合对收集的粗多糖进行脱色和脱蛋白处理^[12], 通过紫外可见分光光度计扫描确认 260 nm 和 280 nm 处有无吸收峰, 判断蛋白和色素去除效果。

采用 DEAE-52 纤维素阴离子交换树脂和葡聚糖凝胶 Sephadex G-200 根据已报道方法^[13-15] 对经脱色和脱蛋白处理的粗多糖进行纯化, 收集洗脱组分, 干燥后即为纯化乌牛茶多糖组分。

1.2.2 乌牛茶多糖化学组成和三螺旋结构分析 根据苯酚-硫酸法对纯化后的乌牛茶多糖组分进行纯度测定; 采用明胶-氯化钡比浊法^[16] 测定其硫酸基含量; 基于刚果红法测定乌牛茶多糖组分的构象结构^[17]。

1.2.3 乌牛茶多糖单糖组成及糖醛酸含量测定

1.2.3.1 单糖组成分析 采用气相色谱法(Gas chromatography, GC)对乌牛茶多糖的单糖组成进行分析测定^[18]。首先, 用三氟乙酸(TFA)水解得到单糖; 然后, 将单糖衍生成乙酰化的醛糖基。同时, 以木糖、阿拉伯糖、葡萄糖、半乳糖、甘露糖、岩藻糖和鼠李糖为标准品, 以乙酰肌醇为内标。具体操作如下: 称取 5 mg 纯化多糖于安培管中, 加入 4 mL 4 mol/L TFA 充分溶解, 密封后于 100 ℃ 油浴反应 4 h, 然后浓缩除去 TFA, 加入 2 mL 甲醇溶解, 再次浓缩, 重复上述操作 5 次, 即得水解多糖样品; 在浓缩旋干的水解样品中加入 10 mg 盐酸羟胺、1 mg 肌醇、1 mL 吡啶, 振荡混合均匀后, 封口, 90 ℃ 水浴反应 30 min,

冰浴冷却后, 加入 1.0 mL 醋酸酐继续于 90 ℃ 反应 30 min, 加入 2 mL 蒸馏水终止反应, 得到多糖衍生化样品; 在衍生化样品中加入 4 mL CH₂Cl₂ 萃取乙酰化衍生物, 并对 CH₂Cl₂ 萃取层用无水硫酸钠除去多余的水分; 乙酰化衍生物经 0.22 μm 有机滤膜过滤后使用 GC 分析。

GC 分析条件: 安捷伦 Agilent 7890A 气相色谱仪, 配备有 TR-5MS 毛细管色谱柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm), FID 检测器; 温度程序设置如下: 柱子初始温度为 100 ℃, 保温 2 min, 5 ℃/min 时升至 280 ℃, 280 ℃ 保温 5 min; N₂ 载气流速为 1 mL/min, 注射温度为 250 ℃, 进样量 1 μL, 分流比为 10:1。

1.2.3.2 糖醛酸的组成分析 采用离子色谱法(Ion chromatography, IC)法分析乌牛茶多糖中糖醛酸的组成^[19]。

多糖的水解: 多糖的水解方法同上述 1.2.3.1 单糖组成分析中描述水解方法。

进样前处理: 将水解完蒸干的反应残留物用超纯水溶解, 使用碳酸钙溶液将溶液 pH 调至 7, 过 0.22 μm 的滤膜后, 转移至色谱瓶中。在相同条件下, 准确称量葡萄糖醛酸和半乳糖醛酸的标准品, 按照一定的比例稀释成不同浓度, 根据离子色谱图的峰面积和浓度, 绘制标准曲线。将样品的色谱图与标准品进行对比, 根据出峰时间和峰面积得出多糖中酸性糖的种类和比例。

色谱条件: 色谱柱 Carbopac PAI(250×4 mm), 柱温 30 ℃, 流速 1.0 mL/min, 采用梯度洗脱的方法: 0~25 min, 1% NaOH; 25~40 min, NaOH 浓度从 1% 变化到 100%; 40~50 min, 100% NaOH。

1.2.4 乌牛茶多糖分子量测定 采用 Waters HPLC 系统通过 HPGPC 对乌牛茶多糖的分子量进行检测, 具体操作按以下步骤进行。

分子量标曲制作: 以一系列具有不同分子量的葡聚糖(5.0、11.6、23.8、48.6、80.9、148.0、273.0、409.0、667.0 kDa)作为标品, 溶解于 0.05 mol/L 氯化钠流动相中, 配制成 5 mg/mL 的标准工作液, 12000 r/min 离心 10 min, 上清液用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤, 然后将样品转置于 1.8 mL 进样瓶后上机。色谱柱为: BRT105-104-102 串联凝胶柱(8×300 mm), 检测器为示差检测器 RI-10A。流动相为 0.05 mol/L 氯化钠溶液, 设置流动相流速为 0.6 mL/min, 柱温为 40 ℃, 进样量为 20 μL。将各标准品分子量的对数设置为纵坐标, 洗脱体积设置为横坐标, 采用 Breeze GPC 数据处理软件进行回归拟合建立标准曲线。

样品检测: 按照同样的方法对乌牛茶多糖样品进行测定, 根据标准曲线计算乌牛茶多糖的分子量。

1.2.5 乌牛茶多糖抗氧化活性分析

1.2.5.1 乌牛茶多糖溶液 DPPH 自由基清除能力测定 根据赵冰怡等^[20] 描述方法测定乌牛茶多糖的

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH)自由基清除能力,具体操作如下。

分别吸取 2 mL 不同浓度乌牛茶多糖溶液(0.005、0.01、0.015、0.02、0.025、0.03、0.035 和 0.04 mg/mL),各加入0.2 mmol/L DPPH 溶液 2 mL, 涡旋混匀后避光反应 30 min, 于 517 nm 处测得吸光值记为 A_s ; 蒸馏水代替多糖样品溶液, 加入 2 mL 0.2 mmol/L DPPH 溶液, 测得吸光度记为 A_b ; 加入不同浓度乌牛茶多糖样品溶液 2 mL, 各加入 2 mL 无水乙醇, 测得吸光度记为 A_c , 以 V_C 为阳性对照。计算公式如下所示:

$$\text{DPPH自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_s - A_c}{A_b}\right) \times 100 \quad \text{式 (1)}$$

1.2.5.2 乌牛茶多糖溶液 ABTS 自由基清除能力测定 根据游丽君等^[21]描述方法评价乌牛茶多糖对 2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS)阳离子自由基清除能力,具体操作如下。

试验前,采用 50%(v/v)乙醇溶液对 ABTS 储备液(14 mmol/L ABTS 和 4.9 mmol/L $K_2S_2O_8$)稀释至 734 nm 处吸光值为 0.70±0.02, 即为 ABTS⁺自由基测定液。

添加 0.1 mL 多糖样品溶液至 2.9 mL 的 ABTS 测定液, 30 s 振荡后, 于 734 nm 处测定反应 20 min 的吸光度 A_i ; 选取 2.9 mL 的 50% 乙醇溶液作为空白对照, 添加 0.1 mL 的多糖样品于同样条件下测定其吸光值 A_0 , 阳性对照为维生素 C(V_C)。ABTS⁺自由基清除能力计算公式如下所示:

$$\text{ABTS}^+ \text{自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_i}{A_0}\right) \times 100 \quad \text{式 (2)}$$

1.2.5.3 乌牛茶多糖溶液 ORAC 能力测定 基于 Huang 等^[22]描述方法测定乌牛茶多糖的氧化自由基吸收能力(oxygen radical absorbance capacity, ORAC),具体操作如下。

分别添加 20 μL 抗氧化剂(10~20 $\mu\text{mol/L}$ Trolox 标准溶液、0.2 mg/mL 的乌牛茶多糖溶液、0.2 mg/mL 的谷胱甘肽 GSH)、20 μL 75 mmol/L pH7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS)和 20 μL 70 mmol/L 9'[9H]-xanthen]-3-one (FL)溶液于 96 孔板中, 37 °C 孵育 15 min, 然后快速添加 140 μL 12.8 mmol/L 自由基产生剂 2,2'-azo-bis-2-amidinopropane-dihydrochloride(AAPH)溶液, 振板 10 min 确保溶液充分混合, 每隔 2 min 读数 1 次, 3 平行实验/样品。根据以下公式计算荧光熄灭曲线净面积(NetAUC):

$$\text{AUC} = 1 + \sum_{i=1}^{i=60} f_i/f_0 \quad \text{式 (3)}$$

$$\text{NetAUC} = \text{AUC}_{\text{sample}} - \text{AUC}_{\text{blank}} \quad \text{式 (4)}$$

式中, f_0 : 初始吸光值; f_i : 间隔 2 min 测得吸光

值; $\text{AUC}_{\text{sample}}$: 荧光熄灭曲线面积; $\text{AUC}_{\text{blank}}$: 无抗氧化剂时曲线面积。

然后, 以 NetAUC 和 Trolox 绘制标曲为:

$$y = 0.333x + 4.175 (R^2 = 0.9905)$$

根据上述标曲计算多糖的 ORAC 清除能力, 单位为 $\mu\text{mol Trolox/g}$, 阳性对照组为 GSH。

1.2.6 乌牛茶多糖安全性评价

1.2.6.1 乌牛茶多糖内毒素含量分析 内毒素亦称脂多糖(LPS), 可通过释放内源活性因子刺激机体免疫细胞, 迫使免疫细胞在短时间内产生一系列的免疫反应。因此, 为了避免免疫反应是由 LPS 干扰导致, 采用 C-LAL-EAK 试剂盒对乌牛茶多糖样品中的内毒素浓度根据试剂盒描述进行检测。

1.2.6.2 乌牛茶多糖对 RAW264.7 细胞存活率的影响 采用四唑盐(MTT)比色法^[12]评价乌牛茶多糖(31.25、62.5、125、250 和 500 $\mu\text{g/mL}$)对 RAW264.7 细胞存活率的影响, 具体操作如下。

取对数期的 RAW264.7 细胞, 调整细胞密度为 5×10^5 个/mL, 混匀后, 接种到 96 孔板, 每孔 100 μL , 置于 5% CO_2 培养箱 37 °C 培养 24 h。然后按照预先设置的分组进行处理: 空白组在弃去上清后加入不含血清的 DMEM 培养基; 实验组分别添加 31.25、62.5、125、250、500 $\mu\text{g/mL}$ 的乌牛茶多糖溶液, 继续培养 24 h 后, 每孔添加 20 μL PBS 配制并分装的 5 mg/mL 的噻唑蓝 MTT 溶液, 培养 4 h。吸出每孔上清液后, 添加 100 μL DMSO, 37 °C 振荡培养 10 min, 于 570 nm 处测定 OD 值。测定调零组不接种细胞, 其他操作与上述操作相同, 5 平行/每组。存活率计算按照如下公式进行:

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{A - C}{B - C} \times 100 \quad \text{式 (5)}$$

式中, A: 样品组 OD 值; B: Control 组 OD 值; C: 调零组 OD 值。

1.2.6.3 乌牛茶多糖对 HEK293 细胞存活率的影响

采用 MTT 比色法^[12]评价乌牛茶多糖(31.25、62.5、125、250 和 500 $\mu\text{g/mL}$)对 HEK293 细胞存活率的影响, 具体操作如下。

收集消化后细胞汇合度达到 80%~90% 的 HEK293 细胞, 调整细胞浓度后, 接种 100 μL 共 3×10^4 个/孔至 96 孔细胞培养板中, 于 5% CO_2 培养箱内 37 °C 过夜培养, 待细胞贴壁后, 添加浓度为 31.25、62.5、125、250、500 $\mu\text{g/mL}$ 的乌牛茶多糖溶液后继续培养一段时间。在终止培养前每孔加入 20 μL 浓度为 5 mg/mL 的 MTT 溶液于 5% CO_2 培养箱内 37 °C 培养 4 h 后, 移除培养基, 添加 150 μL DMSO 于样品孔中, 轻微振荡 5 min 待紫色结晶彻底溶解后, 采用酶标仪测定每孔于 570 nm 处的吸光值(OD 值), 按公式(6)计算存活率:

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{\text{实验组OD值}}{\text{对照组OD值}} \times 100 \quad \text{式 (6)}$$

1.2.6.4 乌牛茶多糖对 RAW264.7 细胞吞噬活性的影响 基于分子量为 12 kDa 的葡聚糖具有免疫原性低及抗分裂能力强的特点, 采用异硫氰酸酯荧光素标记的葡聚糖评价乌牛茶多糖处理后 RAW264.7 细胞的吞噬活性^[23]。

接种 100 μL 密度为 5×10^6 个/ mL 的 RAW264.7 细胞于 12 孔细胞培养板中, 在 5% CO_2 培养箱中 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h, 待细胞贴壁后, 移除上清, 空白对照组添加 100 μL 新鲜 DMEM 基础培养基、阳性对照组为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 DMEM 基础培养基配制的 LPS 和 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 DMEM 基础培养基配制的 LPS+poly myxin B(poly B)混合液、样品组为不同浓度(31.25、62.5、125、250、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的乌牛茶多糖溶液, 每组 3 个平行对照, 干预培养 24 h 后, 移除上清, 添加 100 μL FTIC-标记葡聚糖溶液(1 mg/mL)培养 60 min, 移除上清液, 采用已于 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 PBS 缓冲液冲洗细胞 4 次, 然后采用流式细胞仪分析荧光细胞数目。

1.2.7 乌牛茶多糖对 RAW264.7 细胞分泌 IL-6、TNF- α 和 NO 的影响 接种 1 mL 1×10^6 个/ mL 的 RAW264.7 细胞于 24 孔细胞板, 于 5% CO_2 培养箱中 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h, 吸去上清液。分别在不同的孔中加入 1 mL DMEM 培养基和不同浓度(31.25、62.5、125、250 和 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的乌牛茶多糖溶液, 继续于 5% CO_2 培养箱中 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后, 收集上清液于 1.5 mL 离心管, 分别采用 NO 试剂盒与 ELISA 试剂盒检测上清液中 NO、IL-6 和 TNF- α 的含量。

1.2.8 乌牛茶多糖对 RAW264.7 细胞 IL-6、TNF- α 和 iNOs mRNA 表达的影响 接种 1.5 mL 密度为 1×10^6 个/ mL 的对数期 RAW264.7 细胞于 6 孔细胞培养板中, 于 5% CO_2 培养箱 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h, 去除上清, 分别在每孔加入 1.5 mL 新鲜 DMEM 培养基、不同浓度(31.25、62.5、125、250、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的乌牛茶多糖溶液、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS, 经 24 h 培养后, 吸去上清, 采用 PBS 缓冲液冲洗细胞 2 次, 添加 1 mL Trizol 后, 移液枪轻吹混匀, 确保细胞裂解充分。

采用 RNA 提取试剂盒提取 RAW264.7 细胞裂解液中总 RNA, 再经 RNA 逆转录试剂盒进行逆转录和扩增。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法进行样品的目的基因的相对定量结果分析^[24]。

1.3 数据处理

所有结果测试三次以上, 表示为平均值 \pm 标准差。由 SPSS 23 进行数据分析, 采用 SPSS 23 软件中的单因素 ANOVA 检验中的 Duncan's post-hoc 检测对数据间的差异显著性进行评价($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 乌牛茶多糖的分离纯化及组成分析

脱蛋白、脱色处理的乌牛茶粗多糖采用 DEAE-

52 离子交换色谱柱分离后, 分别采用去离子水和 NaCl 溶液(0.2~0.6 mol/L)洗脱后得到 1 个洗脱多糖组分, 如图 1 所示, 命名为 WNp(图 1a)。再经 Sephadex G-200 进一步纯化, 去离子水洗脱表明 WNp 为均一多糖(图 1b)。脱蛋白、脱色处理的 WNp 的纯度为 90.26%, 蛋白质含量为 1.37%, 硫酸基含量为 5.29%(表 1)。UV 扫描显示多糖组分 WNp 在 260 和 280 nm 处无吸收峰, 表明经 AB-8 和 Sevag 溶剂处理后 WNp 中蛋白和色素含量较低, 低于仪器检测阈值(图 1c)。

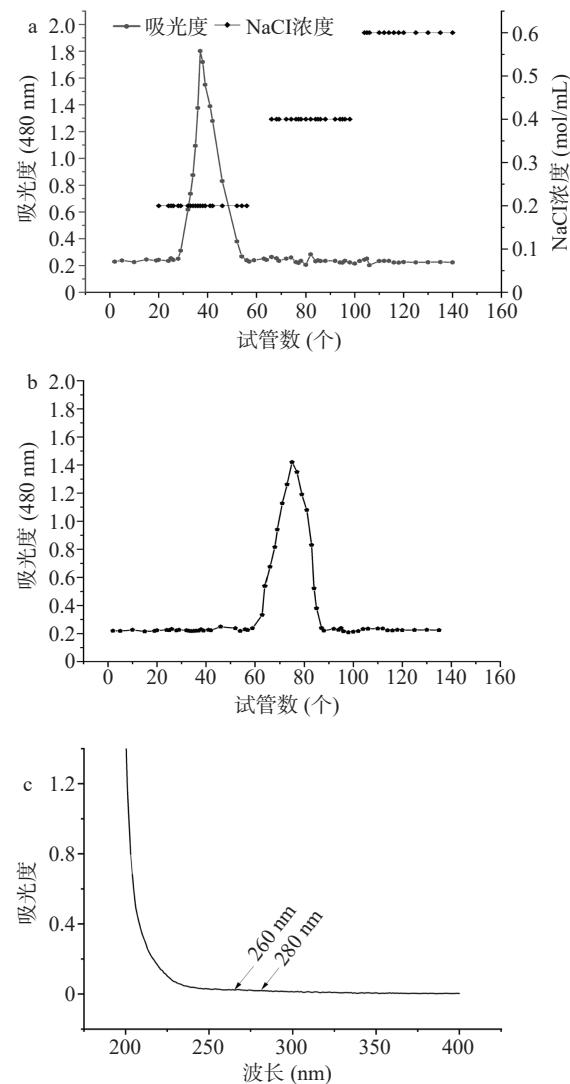


图 1 乌牛茶多糖经 DEAE-52 洗脱曲线(a)、Sephadex G-200 柱层析洗脱图(b)与 UV 扫描图(c)

Fig.1 Elution curve of DEAE-52(a) and Sephadex G-200 (b) chromatography and UV spectrum (c) of tea polysaccharide

表 1 乌牛茶多糖纯化组分的纯度及组成成分

Table 1 Purity and composition determination of purified polysaccharides of tea polysaccharide

| 成分 | 含量(%, w/w) |
|-----|------------------|
| 多糖 | 90.26 \pm 1.31 |
| 蛋白 | 1.37 \pm 0.09 |
| 硫酸基 | 5.29 \pm 0.39 |

基团,研究表明多糖中硫酸基含量与其抗氧化性、抗肿瘤活性等密切相关^[13-14]。

2.2 乌牛茶多糖三螺旋结构分析

多糖若具有三螺旋结构,就可与酸性染料刚果红在配位键作用下结合形成络合物,且所形成络合物的最大吸收波长随着NaOH浓度在一定范围内增加而增加。WNp与刚果红在一定NaOH浓度范围内的反应结果如图2所示。由图可知,WNp与刚果红在不同NaOH浓度下反应趋势不一致。对WNp与刚果红的络合反应,随着NaOH浓度的增加而增加,其 λ_{max} 在470~500 nm范围内急剧降低,这表明WNp与刚果红不能形成稳定的络合物^[15],WNp的准确构型有待进一步研究。

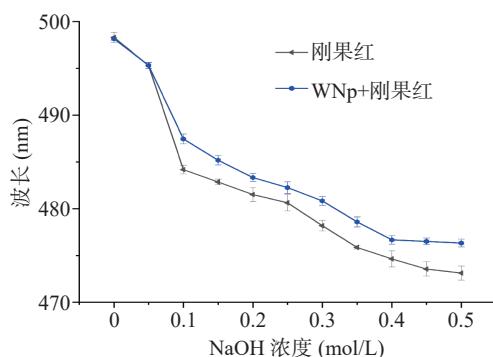


图2 乌牛茶多糖WNp的三螺旋构象分析

Fig.2 Triple helix conformation of polysaccharide WNp from Wuniu Tea

2.3 乌牛茶多糖单糖组成、糖醛酸组成及分子量分析

WNp经GC和IC分析所得单糖与糖醛酸组成

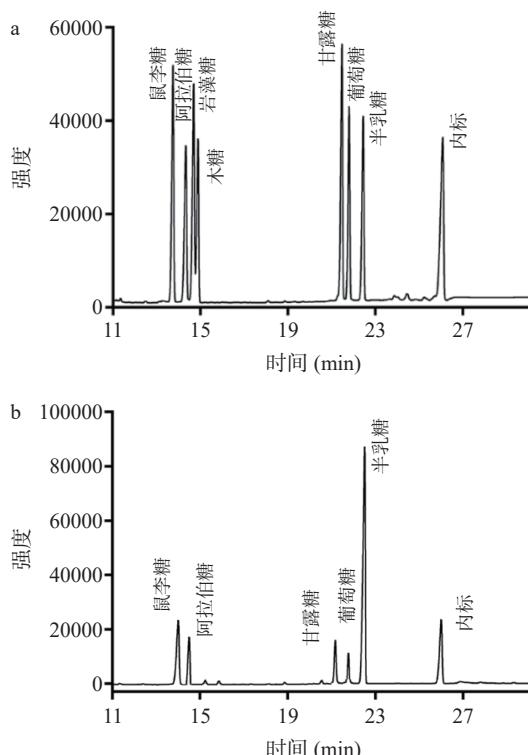


图3 单糖标准品(a)和WNp(b)的单糖GC图

Fig.3 GC of standard monosaccharides (a) and WNp (b)

如图3与图4所示。WNp由摩尔比为0.4:32.6:2.3:4.7:8.7:0.3:40.3的葡萄糖(Glucose, Glc)、半乳糖(Galactose, Gal)、阿拉伯糖(Arabinose, Ara)、甘露糖(Mannose, Man)、鼠李糖(Rhamnose, Rha)、葡萄糖醛酸(Glucuronic acid, GlcA)和半乳糖醛酸(Galacturonic acid, GalA)组成,即WNp为酸性多糖。WNp的单糖与糖醛酸组成与已报道的绿茶多糖存在显著差异,单糖组成和摩尔比的差异可引起相应的生物活性差异^[16]。

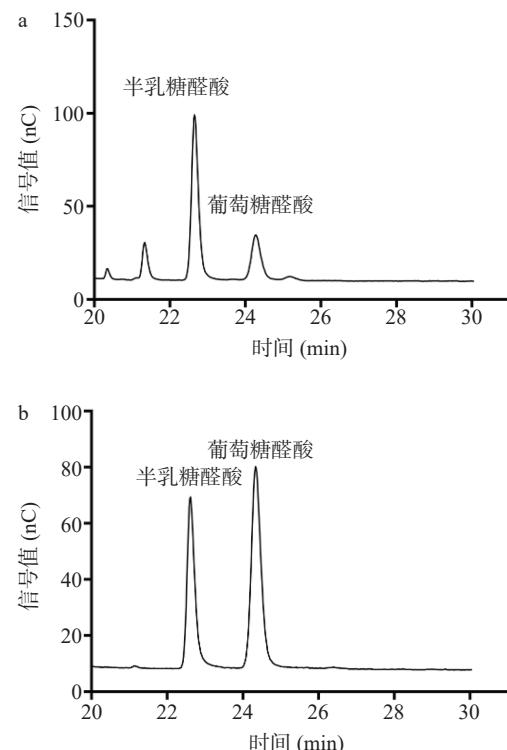


图4 糖醛酸标准品(a)与多糖WNp(b)的IC图

Fig.4 IC of uronic acid standard (a) and WNp (b)

多糖分子量(Mw)由HPGPC测定。HPGPC测定生物大分子的原理是根据其不同多孔性凝胶或微球填料的孔径大小与待分离大分子粒径尺寸相关性,生物大分子的分子量与其保留时间负相关,即出峰时间越早,分子量越大。如图5所示,多糖组分WNp的HPGPC分子量测定图为单一一对称峰。根据软件

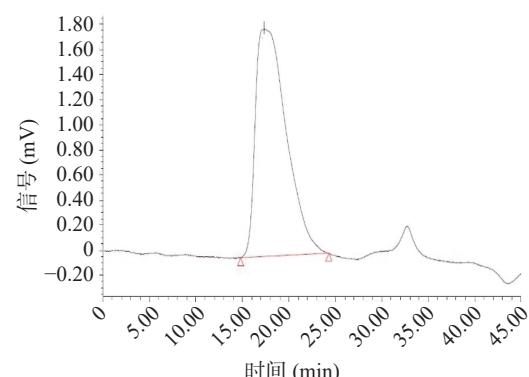


图5 WNp分子量分布图

Fig.5 HPGPC of WNp

模拟回归方程, 计算得到多糖组分 WNp 的 M_w 为 82.61 kDa。

本研究利用大孔吸附树脂 AB-8 和 Sevag 试剂对乌牛茶粗多糖进行脱色、脱蛋白处理, 再经纤维素阴离子交换树脂 DEAE-52 和葡聚糖凝胶 Sepharose G-200 分离纯化后得到多糖组分 WNp, 多糖纯度(或质量分数)明显提升, 超过 90%, 与张铁斌等^[2]从绿茶中提取多糖的纯度接近, 但多糖组成有一定的差异。

2.4 乌牛茶多糖抗氧化活性分析

根据 DPPH 的醇溶液的颜色及相应的吸光值变化可判断多糖清除 DPPH 自由基量, 即吸光度变化与自由基清除量呈正相关, 而自由基清除率又表明多糖的抗氧化强弱^[17]。图 6a 和图 6b 展示了乌牛茶多糖 WNp 和 V_C 浓度与 DPPH 自由基清除率关系。由图可知, V_C 与 WNp 对 DPPH 自由基清除率均随其浓度的升高而增加; 当 WNp 对应浓度分别为 0.01、0.025 和 0.03 mg/mL 时, 其对 DPPH 自由基的清除率逐渐升至最大值, 分别为 15.3%、43.7 和 50.5%。因多糖中硫酸基含量与其抗氧化性密切相关, 所以 WNp 对 DPPH 自由基清除率的差距可能与 WNp 中硫酸基含量相对较高有关。

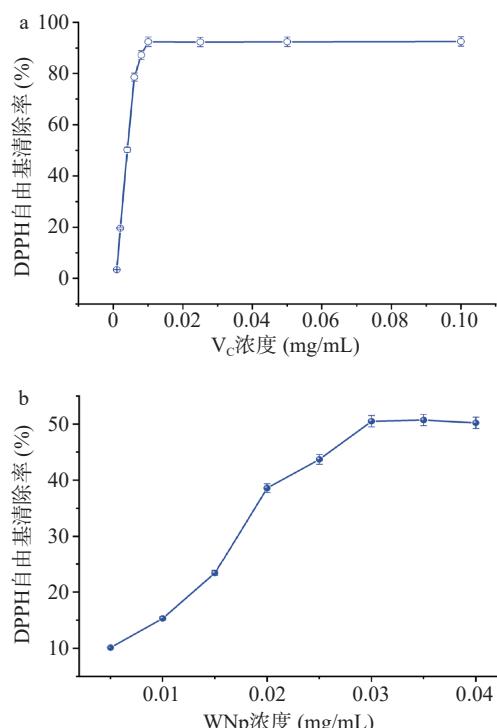


图 6 抗氧化剂 V_C 与多糖 WNp 的 DPPH 自由基清除率

Fig.6 Scavenging effects of V_C (a) and WNp (b) on DPPH free radical

ABTS⁺自由基清除能力测定可用于水溶性体系又可用于脂溶性体系的抗氧化活性的评价方法, 故其可较全面的评价多糖样品的抗氧化活性^[18]。多糖对 ABTS⁺自由基清除能力结果如图 7b 所示。与对照

组 V_C (图 7a)的 ABTS⁺自由基清除能力相比, WNp 具有一定的 ABTS⁺自由基清除能力, 但均明显弱于 V_C 。同时, WNp 对 ABTS⁺清除能力呈现剂量依赖性, 均随着多糖浓度的升高而增强。

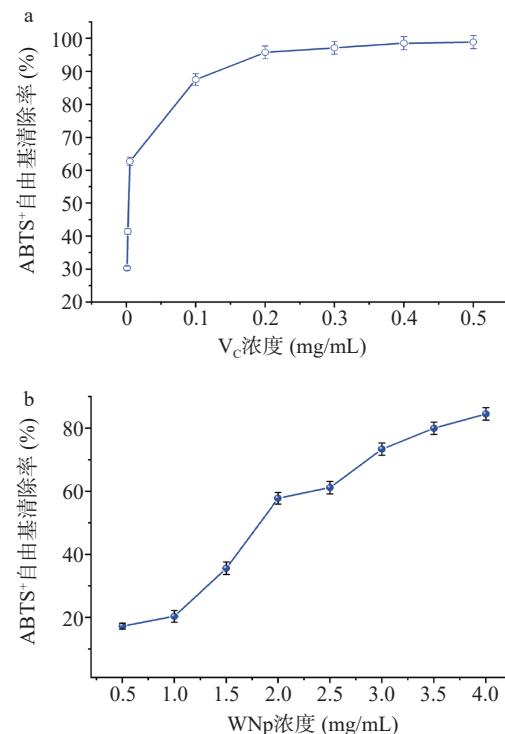


图 7 抗氧化剂 V_C 与多糖 WNp 的 ABTS⁺自由基清除率

Fig.7 Scavenging effects of V_C (a) and WNp (b) on ABTS⁺ free radical

乌牛茶多糖 WNp 的 ORAC 如图 8 所示。作为一种常见的抗氧化剂, 对照组谷胱甘肽 GSH 的 ORAC 值为 $1343.14 \pm 26.53 \mu\text{mol Trolox/g}$ 。而多糖 WNp 的 ORAC 值为 $268.31 \pm 12.75 \mu\text{mol Trolox/g}$, 约相当于 GSH 的 ORAC 值的 1/5。活性氧自由基可直接或间接导致生物体细胞内的 DNA 和蛋白质氧化损伤, 进而引起其他机体疾病。因此, ORAC 值的测定对评价生物活性成分的抗氧化性具有重要的意义。上述结果表明 WNp 相对具有较强的氧自由基清除能力。这与 ABTS⁺自由基清除能力评价结果相似, 即 WNp 可作为一种纯天然的抗氧化成分, 用

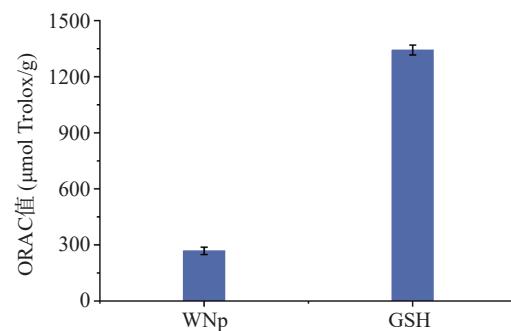


图 8 GSH 与多糖 WNp 的 ORAC 自由基清除能力

Fig.8 Free radical scavenging of ORAC by GSH and WNp

于替代一些常用但具有毒性的合成抗氧化剂。

2.5 乌牛茶多糖内毒素含量分析

为了排除内毒素对多糖 WNP 的免疫反应的影响,采用 CE-TAL 试剂对样品中内毒性含量进行体外定量检测,结果表明,1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 WNP 内毒素含量为 $0.52\pm0.05 \text{ EU}/\text{mL}$;而 $0.01 \mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 的内毒素含量就达到了 $1.59\pm0.04 \text{ EU}/\text{mL}$ (图 9),为 $1000 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的 WNP 中内毒素含量的 3.06 倍,但 WNP 的浓度是 LPS 浓度的 $1/100000$ 。上述结果说明,WNP 未受到毒素污染,RAW264.7 细胞所产生的免疫反应是由 WNP 的添加引起。

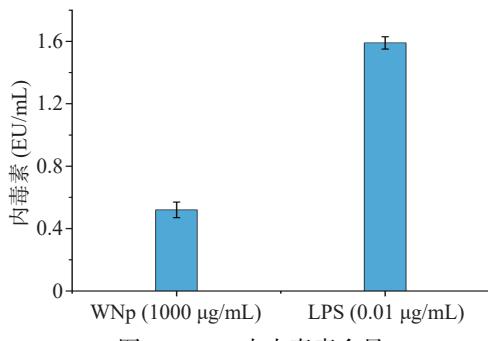


Fig.9 Endotoxin contents of WNP

2.6 乌牛茶多糖对 HEK293 细胞与 RAW264.7 细胞的毒性作用

通过 MTT 法评价不同浓度 WNP(31.25、62.5、125、250 和 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)对 RAW264.7 细胞的毒性

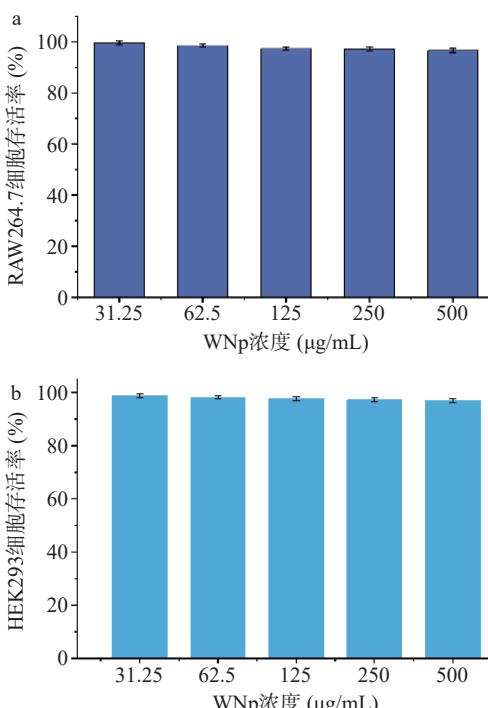


图 10 WNP 对 RAW264.7(a) 和 HEK293(b) 细胞活力的影响

Fig.10 Cytotoxic effect of different concentrations of WNP on RAW264.7 (a) and HEK293 (b) cells

作用。如图 10a 所示,RAW264.7 细胞经浓度为 31.25、62.5、125、250 和 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 WNP 处理后,细胞存活率高于 96%,表明 WNP 对 RAW264.7 细胞的生存能力未产生明显的影响。同时,上述结果也说明低于 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 WNP 对 RAW264.7 细胞无细胞毒性。因此,后续实验中 WNP 的浓度不高于 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

WNP 对 HEK293 细胞的细胞毒性进行了评估(图 10b)。正常 HEK293 细胞被 0、31.25、62.5、125、250 和 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 WNP 处理后,HEK293 细胞的存活率均高于 95%。WNP 处理组与对照组的存活率无显著性差异($P>0.05$),说明 WNP 对 HEK293 细胞无明显的细胞毒性作用。

2.7 乌牛茶多糖对细胞吞噬 FTIC-标记大肠杆菌的影响

此外,进一步评价 WNP 对 RAW264.7 细胞吞噬能力的影响(图 11)。与空白对照组(WNP 添加量为 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)相比,阳性对照组 LPS(2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)可以极显著提高 RAW264.7 细胞的吞噬率($P<0.01$),而多粘菌素 B(poly B)则对 RAW264.7 细胞的吞噬活性显示出抑制作用($P<0.05$)。同时,采用 WNP 处理 RAW264.7 细胞后,其作用效果与 LPS 组相似,即 RAW264.7 细胞吞噬能力随 WNP 浓度的增加而增强,且呈剂量依赖性关系。WNP 可以显著提高 RAW264.7 细胞的吞噬率,WNP 可促进 RAW264.7 细胞的吞噬率从 $11.26\pm0.57\%$ (31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $P<0.05$)至 $29.39\pm0.75\%$ (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $P<0.01$)。

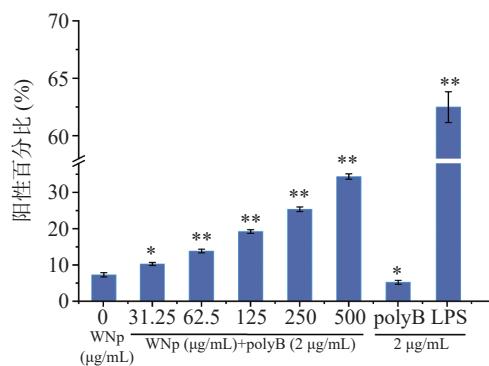


图 11 WNP 对 RAW264.7 细胞吞噬活性的影响

Fig.11 Effect of WNP on phagocytosis activity of RAW 264.7 cells

注: *代表差异显著, $P<0.05$; **代表差异极显著, $P<0.01$, 图 12~图 13 同。

2.8 乌牛茶多糖对 RAW264.7 细胞分泌 IL-6、TNF- α 和 NO 的影响

在巨噬细胞被激活后,RAW264.7 细胞主要的细胞因子(IL-6、TNF- α 及 NO)产量可明显升高^[19]。由于 WNP 可明显促进 RAW264.7 细胞的吞噬作用,故测定其对 RAW264.7 细胞 IL-6、TNF- α 和 NO 含量的影响。如图 12 所示,与空白对照组相比,WNP 可显著促进巨噬细胞细胞因子及 NO 分泌。

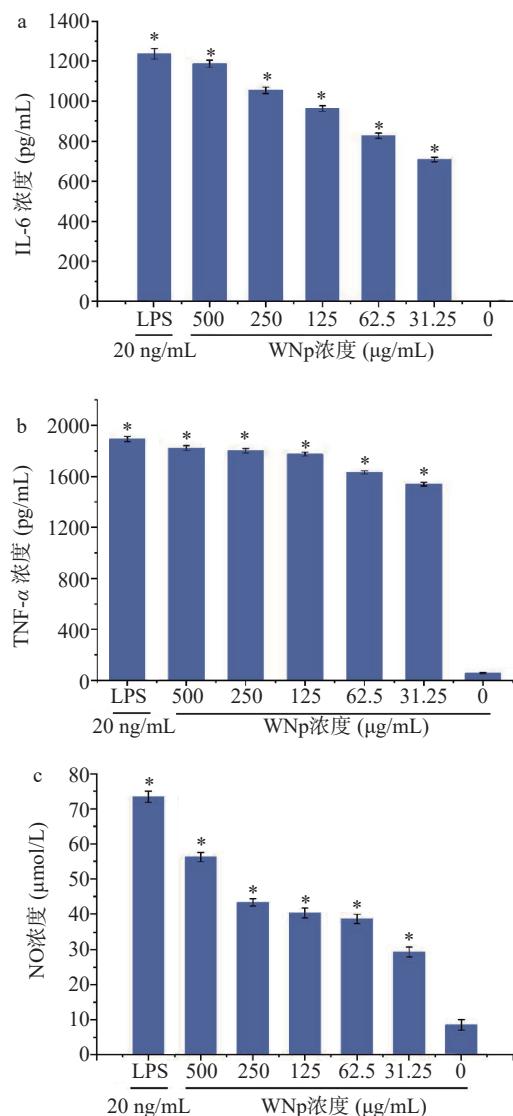


图 12 WNp 对 RAW264.7 细胞因子 IL-6(a)、TNF- α (b) 和 NO(c) 含量的影响

Fig.12 Effects of WNp on secretion levels of IL-6 (a), TNF- α (b) and NO (c) in RAW264.7 cells

即使 RAW264.7 细胞经低浓度的 WNp (31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 处理, IL-6、TNF- α 和 NO 也可迅速增加至 708.52 pg/mL、1540.14 pg/mL 和 29.36 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 远高于空白对照组的细胞因子分泌量。另外, WNp 对 IL-6、TNF- α 和 NO 分泌量的促进作用呈现剂量依赖性。

多糖的免疫活性与分子量与单糖组成、糖醛酸等密切相关^[20-23], 而且具有高含量 Gal 和 Man 的多糖较易与巨噬细胞甘露糖受体结合, 进一步激活免疫应答反应^[24-25]。此外, 多糖的分子量也影响其免疫活性^[26-27]。这也解释了 WNp 具有较高免疫增强活性的原因。虽然构象分析表明 WNp 不具有三螺旋结构, 但其亦具有较强的免疫调节活性, 究其原因可能是多糖的免疫活性是多种结构特征共同作用的结果, 而不是仅仅依赖于多糖的某一结构特征。

巨噬细胞作为宿主防御的第一道防线负责抗原呈递, 也是多糖的关键靶细胞^[19]。因此, 巨噬细胞的

主要特征是吞噬、抗原处理和细胞因子产生等免疫功能, 但这些功能只有在被免疫增强因子激活后才能发挥^[28]。巨噬细胞吞噬活性的增加是巨噬细胞活化的重要标志, 是免疫防御系统的关键步骤。本研究中 WNp 可以提高巨噬细胞的吞噬活性, 能够启动对外来病原体和肿瘤的免疫反应。即使 WNp 浓度高达 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 对 RAW264.7 细胞也显示较低的毒性。此外, 具有吞噬能力和细胞因子分泌能力的激活态巨噬细胞在抗肿瘤作用中具有重要的作用。该研究的结果表明, 乌牛茶多糖 WNp 可通过上调巨噬细胞中的细胞因子分泌介导免疫应答反应。

2.9 乌牛茶多糖对 RAW264.7 细胞 IL-6、TNF- α 和 iNOs mRNA 表达的影响

巨噬细胞被激活后, 其免疫因子产生的相关基因表达会发生变化^[29]。因此, 针对不同浓度的 WNp 添加后的 RAW264.4 细胞 IL-6、TNF- α 和 iNOs mRNA 表达的变化进行研究。如图 13 所示, 与空白

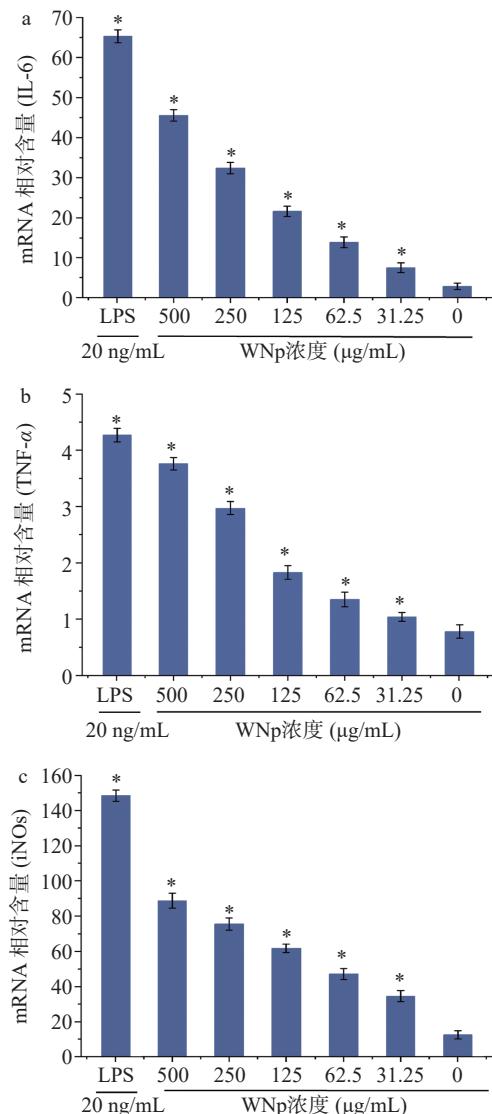


图 13 WNp 对 RAW264.7 细胞 IL-6 (a)、TNF- α (b) 和 iNOs (c) mRNA 表达的影响

Fig.13 Effects of WNp on the mRNA levels of IL-6 (a), TNF- α (b) and iNOs (c) in RAW 264.7 cells

对照组相比,乌牛茶多糖WNp添加可刺激IL-6、TNF- α 和iNOs mRNA表达量明显提高($P<0.05$),且具有明显的浓度依赖现象。上述结果表明乌牛茶多糖WNp能够通过上调小鼠巨噬细胞相关基因IL-6、TNF- α 和iNOs mRNA的表达,分泌细胞因子和产生效应因子NO,从而激活初始免疫应答反应,达到增强免疫的效果。

3 结论

本研究在对纳溪特早茶—乌牛早茶多糖进行分离纯化,并对获取的纯度为90.26%的乌牛茶多糖进行初步构鉴定,结果表明WNp由摩尔比为0.4:32.6:2.3:4.7:8.7:0.3:40.3的Glc、Gal、Ara、Man、Rha、GlcA和GalA组成的分子量为82.61 kDa的多糖。同时,WNp可有效完成对DPPH和ABTS⁺自由基的清除,并具有较高的ORAC值;安全性分析结果显示WNp不含内毒素,并对RAW264.7细胞和HEK293细胞无细胞毒作用,即可认定WNp具备进行细胞实验的安全性。免疫分析结果表明:WNp可提升调控IL-6、TNF- α 和NO分泌释放的mRNA的表达水平,促进L-6、TNF- α 和NO的释放,起到免疫增强的作用。本研究为进一步探索乌牛茶多糖的免疫调节机制及其相关茶产品的开发提供科学依据。

© The Author(s) 2025. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] 农小峰. 2023年中国茶叶产业数据分析报告[N]. 澎湃新闻, 2024-3-13. [NONG Xiaofeng. Data analysis report of China tea industry in 2023[N]. Thepaper, 2024-3-13.]
- [2] 张轶斌, 刘鹏, 纪海玉, 等. 绿茶多糖提取工艺优化及其抗氧化活性分析[J]. 食品工业科技, 2022, 43(20): 220-227. [ZHANG Yibin, LIU Peng, JI Haiyu, et al. Extraction process optimization and antioxidant activity of green tea polysaccharides[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(20): 220-227.]
- [3] 范芮菱. 科技助力品牌赋能赶出“纳溪特早茶”[N]. 四川日报, 2023-08-03. [FAN Ruiling. Technology helps the brand to drive out "Naxi special morning tea"[N]. Sichuan Daily, 2023-08-03.]
- [4] 王金臣. 泸州纳溪区做好“茶产业、茶科技、茶文化”大文章[N]. 中国食品报, 2024-03-07. [WANG Jinchen. Luzhou Naxi District to do "tea industry, tea technology, tea culture" big article[N]. China Food News, 2024-03-07.]
- [5] 乐建盛. 乌牛早茶的加工工艺及贮藏条件对茶叶品质的影响[J]. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2007, 1: 108-110. [LE Jiansheng. The influence of the process work craft and holding conditions of wuniu early tea on the quality of tea leaf[J]. Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science), 2007, 1: 108-110.]
- [6] YANG W, HUANG G. Extraction methods and activities of natural glucans[J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 112: 50-57.
- [7] 孙苏军, 纪海玉, 白云, 等. 坦洋工夫红茶多糖提取工艺优化及其抑制肿瘤活性分析[J]. 食品科学, 2018, 39(4): 254-260. [SUN Sujun, JI Haiyu, BAI Yun, et al. Optimization of extraction and antitumor activity of polysaccharide from Tanyang congou black tea[J]. Food Science, 2018, 39(4): 254-260.]
- [8] PARK H R, HWANG D, SUH H J, et al. Antitumor and antimetastatic activities of rhamnogalacturonan-II-type polysaccharide isolated from mature leaves of green tea via activation of macrophages and natural killer cells[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 99: 179-186.
- [9] LI S, CHEN H, WANG J, et al. Involvement of the PI3K/Akt signal pathway in the hypoglycemic effects of tea polysaccharides on diabetic mice[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 81: 967-974.
- [10] CHI A, LI H, KANG C, et al. Anti-fatigue activity of a novel polysaccharide conjugates from Ziyang green tea[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 80: 566-572.
- [11] XU P, WU J, ZHANG Y, et al. Physicochemical characterization of puerh tea polysaccharides and their antioxidant and α -glycosidase inhibition[J]. Journal of Functional Foods, 2014, 6: 545-554.
- [12] WONG H S, BENOIT B, BRAND M D. Mitochondrial and cytosolic sources of hydrogen peroxide in resting C₂C₁ myoblasts[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2019, 130: 140-150.
- [13] WANG J, ZHANG Q, ZHANG Z, et al. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2008, 42(2): 127-32.
- [14] ZHANG Q B, YU P Z, LI Z, et al. Antioxidant activities of sulfated polysaccharide fractions from *Porphyra haitanensis*[J]. Journal of Applied Phycology, 2003, 15(4): 305-310.
- [15] ZENG Y J, YANG H R, OU X Y, et al. Fungal polysaccharide similar with host *Dendrobium officinale* polysaccharide: Preparation, structure characteristics and biological activities[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 141: 460-470.
- [16] 廖敏, 王维民, 谌素华, 等. 马尾藻岩藻聚糖硫酸酯组分分析及抗血栓活性评价[J]. 食品科学, 2017, 17: 195-200. [LIAO M, WANG W M, CHEN S H, et al. Composition analysis and antithrombotic activity of fucoidan from *Sargassum henslowianum* C. Agardh[J]. Food Science, 2017, 17: 195-200.]
- [17] SHEN C Y, JIANG J G, LI M Q, et al. Structural characterization and immunomodulatory activity of novel polysaccharides from *Citrus aurantium* Linn. variant amara Engl [J]. Journal of Functional Foods, 2017, 35: 352-362.
- [18] CHEN Y, MAO W, TAO H, et al. Structural characterization and antioxidant properties of an exopolysaccharide produced by the mangrove endophytic fungus *Aspergillus* sp. Y16 [J]. Bioresource Technology, 2011, 102(17): 8179-8184.
- [19] 陈春. 桑葚多糖的结构鉴定、活性评价及其体外消化酶解[J]. 广州: 华南理工大学, 2018. [CHEN C. Structural identification, biological activities evaluation, digestion and fermentation *in vitro* of polysaccharides from *Fructus Mori*[J]. Guangzhou: South China University of Technology, 2018.]
- [20] 赵冰怡. 深度共溶剂的制备、性质及其应用于芦丁萃取的研究[J]. 广州: 华南理工大学, 2016. [ZHAO B Y. Study on the preparation, properties of deep eutectic solvents and its application to the extraction of rutin[J]. Guangzhou: South China University of Technology, 2016.]
- [21] 游丽君. 泥鳅蛋白抗氧化肽的分离纯化及抗疲劳、抗癌功效研究[J]. 广州: 华南理工大学, 2010. [YOU L J. Study in the

- purification of antioxidant peptide from loach protein and its antifatigue and anticancer activities[J]. Guangzhou: South China University of Technology, 2010.]
- [22] HUANG W Y, MAJUMDER K, WU J. Oxygen radical absorbance capacity of peptides from egg white protein ovotransferrin and their interaction with phytochemicals[J]. Food Chemistry, 2010, 123(3): 635–641.
- [23] ZHANG M, WANG G, LAI F, et al. Structural characterization and immunomodulatory activity of a novel polysaccharide from *Lepidium meyenii*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(9): 1921–1931.
- [24] FIGUEIREDO R T, BITTENCOURT V C B, LOPES L C L, et al. Toll-like receptors (TLR2 and TLR4) recognize polysaccharides of *Pseudallescheria boydii* cell wall[J]. *Carbohydrate Research*, 2012, 356: 260–264.
- [25] M Y K L, C L, L F Z, et al. Chemical and biological characterization of a polysaccharide biological response modifier from *Aloe vera* L. var. chinensis (Haw.) Berg[J]. *Glycobiology*, 2004, 14(6): 501.
- [26] DEVI K S P, ROY B, PATRA P, et al. Characterization and lectin microarray of an immunomodulatory heteroglucan from *Pleurotus ostreatus* mycelia[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 94(2): 857–865.
- [27] SATITMANIWAT S, RATANAKHANOKCHAI K, LAOHAKUNJIT N, et al. Improved purity and immunostimulatory activity of β -(1→3)(1→6)-Glucan from *Pleurotus sajor-caju* using cell wall-degrading enzymes[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(21): 5423–5430.
- [28] ELHELU M A. The role of macrophages in immunology[J]. *Journal of the National Medical Association*, 1983, 75(3): 314.
- [29] WANG L, NIE Z K, ZHOU Q, et al. Antitumor efficacy in H22 tumor bearing mice and immunoregulatory activity on RAW264.7 macrophages of polysaccharides from *Talinum triangulare*[J]. *Food & Function*, 2014, 5(9): 2183–2193.