

本文引文格式:孙加燕,朱金燕,陈慧芳.玛咖多糖超声提取工艺优化及其对 IEC-6 细胞增殖和迁移的影响[J].右江民族医学院学报,2022,44(2):218-233.

【论著与临床报道】

玛咖多糖超声提取工艺优化及其对 IEC-6 细胞增殖和迁移的影响

孙加燕,朱金燕,陈慧芳

(安庆医药高等专科学校,安徽 安庆 246052)

摘要:目的 优化超声法提取玛咖多糖的工艺,并初步研究玛咖多糖对大鼠小肠上皮细胞(IEC-6)的增殖及其迁移的作用。方法 以水为溶剂,以玛咖多糖得率作为响应指标,以液料比(体积:质量)、超声功率、超声时间以及提取温度为主要因素,采用单因素实验结合响应面分析实验,优化工艺。分别采用 MTT 法、细胞划痕法,初步研究玛咖多糖对 IEC-6 细胞增殖以及迁移的作用。结果 当提取时间 83 min,提取功率 177 W、液料比 40 ml/g、提取温度 63 °C 时,多糖得率最高,平均得率是(75.20±1.21) mg/g。玛咖多糖浓度在 0.1~10 mg/L 范围内,能够促进 IEC-6 细胞增殖,在 10 mg/L 浓度时玛咖多糖促进 IEC-6 细胞迁移。结论 通过响应面优化的超声法提取的玛咖多糖,在一定浓度条件下可以促进 IEC-6 细胞的增殖以及迁移。

关键词:玛咖多糖;响应面分析;IEC-6 细胞

中图分类号:R284

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2022)02-0218-06

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2022.02.015

Optimization of ultrasonic extraction process for Maca polysaccharide and Maca polysaccharide's effect on proliferation and migration of IEC-6 cells

Sun Jiayan, Zhu Jinyan, Chen Huifang

(Anqing Medical College, Anqing 246052, Anhui, China)

Abstract: **Objective** To optimize the ultrasonic extraction process for extracting Maca polysaccharide, and to study the effect of Maca polysaccharide on the proliferation and migration of small intestinal epithelial cells (IEC-6) in rats. **Methods** With water as the solvent, Maca polysaccharide yield as the response index, and liquid-solid ratio (volume: mass), ultrasonic power, ultrasonic time and extraction temperature as the main factors, a single factor experiment combined with response surface analysis experiment was performed to optimize the process. MTT assay and cell scratch assay were adopted to observe the effect of Maca polysaccharide on the proliferation and migration of IEC-6 cell respectively. **Results** When the extraction duration was 83 min, the extraction power was 177 W; the liquid-solid ratio 40 ml/g. When the extraction temperature was 63 °C, the polysaccharide yield was the highest, with an average yield of (75.20±1.21) mg/g. At the concentration of 0.1~10 mg/L, Maca polysaccharide could promote the proliferation of IEC-6 cells. At the concentration of 10 mg/L, Maca polysaccharide could promote the migration of IEC-6 cells. **Conclusion** Maca polysaccharide extracted by response surface optimized ultrasonic extraction can promote the proliferation and migration of IEC-6 cells at certain concentrations.

Key words: Maca polysaccharide; response surface design; IEC-6 cells

基金项目:安徽省高校自然科学研究重点项目(KJ2021A1294)

第一作者简介:孙加燕(1985-),女,硕士,讲师,研究方向:中药药理,E-mail:546823650@qq.com

通讯作者简介:朱金燕(1985-),女,硕士,副教授,研究方向:中药制剂,E-mail:kill_a_2009@126.com

玛咖原产地秘鲁,又名秘鲁参,是南美十字花科,独行菜属,药用部位为根茎。我国首先在云南引种成功,目前主要种植地区集中在西南的一些省份。普遍认为玛咖具有增强性功能、改善生育能力、调节机体免疫力等多重药理学作用。玛咖的活性成分丰富,多糖是其主要的活性成分之一,对于玛咖多糖的生物学活性研究比较多的是调节免疫能力^[1-3]。玛咖的产地、色泽对玛咖多糖的含量影响较大,提取多糖时,所采取的方法工艺对多糖的得率也有较大影响,因此在提取多糖时需对工艺进行优化。目前,玛咖常与人参、枸杞、淫羊藿、红景天等中药材配伍应用于功能性食品。但玛咖为外来植物,中医药性、归经尚未明确,因此与传统的中药配伍使用,缺乏中医药理论支撑。有学者认为玛咖属于甘温健脾中药^[4]。近年来研究表明健脾类中药可以通过调节肠道菌群、肠道黏膜免疫等修复肠黏膜损伤^[5]。植物多糖属于天然生物大分子,研究表明植物多糖可通过作用于不同类型的肠上皮细胞保护肠道黏膜^[6-9]。基于此,本研究选取超声法提取玛咖多糖,通过响应面设计实验,优化玛咖多糖的提取工艺,并采取 MTT 实验、细胞划痕实验,初步研究玛咖多糖对 IEC-6 细胞增殖和迁移作用的影响。从而为玛咖的药效学物质基础、药理作用及其深入开发提供一定参考。

1 材料与方 法

1.1 主要材料和仪器 玛咖干根(秘鲁,购于深圳庄民中药材有限公司); 噻唑蓝(Sigma, 批号: 1003010349); FBS 胎牛血清(GIBCO, 批号: FBS-PA011052); DMEM 培养基(HyClone, 批号: SH30067.01B); 葡萄糖(中国食品药品检定研究院, 批号: 110833-202008)大鼠小肠上皮细胞(通派生物公司); 酶标仪(Thermo 公司); 荧光正置显微镜(Olympus 公司); CO₂ 培养箱(Precision 公司); 其他试剂和仪器包括超声波清洗器、离心机等均为国产。

1.2 实验方法

1.2.1 玛咖总多糖的提取及去蛋白 称取 10 g 干燥的玛咖根茎,切断,过筛粉碎,得到玛咖药材粉末。药材粉末参照药典中枸杞多糖的预处理步骤进行脱脂预处理^[10],以 95%乙醇去低分子糖及色素。预处理后按照实验预先设计的各个条件进行超声提取,反复提取 2~3 次。每次提取后离心,最终合并上清液,真空抽滤,60℃真空浓缩上清液,反复用 seavage 法去蛋白,直到浓缩液中蛋白层不可见为止。浓缩液再次离心,上清以终浓度 80%乙醇沉淀,并于 4~10℃条件下静置过夜。用无水乙醚、丙酮洗涤所得沉淀 3 次,并挥去

有机溶剂,收集洗净后的沉淀,即得灰褐色的玛咖多糖,计算多糖得率。提取过程中每次离心的时间为 5~10 min(5000 r/min)。

1.2.2 玛咖多糖含量的测定

1.2.2.1 葡萄糖标准曲线的拟合 标准曲线的拟合参照药典枸杞子多糖的测定时标准曲线的拟合方法,采用苯酚-硫酸法测多糖浓度^[10],最终葡萄糖浓度系列为 10 μg/ml、20 μg/ml、30 μg/ml、40 μg/ml、50 μg/ml。

1.2.2.2 玛咖多糖含量的测定及多糖得率的计算 精密称取玛咖多糖 0.01 g,加蒸馏水 50 ml,定容,摇匀,取 0.5 ml 至试管中,蒸馏水补齐 2 ml,按苯酚硫酸法做显色反应,于 200~600 nm 处,做全波段扫描,结果样品溶液与葡萄糖标准溶液在 490 nm 处都有最大吸收峰,综合取 490 nm 作为样品检测波长。测 490 nm 处吸光度(A₄₉₀),通过标准曲线方程计算玛咖多糖浓度和多糖得率。多糖得率(R)=玛咖多糖含量/药材质量(mg/g)

1.2.3 玛咖多糖提取工艺的优化

1.2.3.1 玛咖多糖单因素实验 固定超声功率 180 W,料液比 30 ml/g,超声温度 60℃,改变提取时间(20 min、40 min、60 min、80 min、120 min)进行提取时间的单因素实验;固定料液比 30 ml/g,超声温度 60℃,超声时间 60 min,改变超声功率(100 W、140 W、180 W、220 W、260 W、300 W),进行超声功率的单因素实验;固定料液比 30 ml/g,超声温度 60℃,超声时间 60 min,超声功率 180 W,改变提取温度(40℃、50℃、60℃、70℃、80℃)提取,进行提取温度的单因素实验;固定超声温度 60℃,超声时间 60 min,超声功率 180 W,改变料液比(10 ml/g、20 ml/g、30 ml/g、40 ml/g、50 ml/g),进行料液比的单因素实验。

1.2.3.2 超声提取玛咖多糖的响应面设计实验 通过前期的单因素工艺摸索,筛选出对提取率有影响的 4 个因素,分别是提取时间 A、超声功率 B、液料比(体积:质量)C、提取温度 D,以多糖得率为指标,进行响应面设计实验,具体的实验因素及编码,见表 1。

表 1 主要因素水平及编码

编码	提取时间 A/min	超声功率 B/W	液料比 C/ (ml·g ⁻¹)	提取温度 D/℃
-1	60	140	30	50
0	80	180	40	60
1	100	220	50	70

1.2.3.3 最佳工艺的验证 按照上述优化后的最佳

工艺条件,平行提取 3 份玛咖多糖,并测定多糖含量。

1.2.4 玛咖多糖对 IEC-6 细胞增殖和迁移的影响

1.2.4.1 MTT 法检测玛咖多糖对 IEC-6 细胞增殖的影响 根据参考文献,确定药物初筛浓度为 0~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ^[11-12]。以含 10% FBS 的 DMEM 培养基分别配制 0.1 mg/L、1 mg/L、10 mg/L、100 mg/L 的玛咖多糖溶液。取两块 96 孔板,向 96 孔板中加入细胞密度为 2×10^4 个/毫升的细胞悬液 100 μl 。放入细胞培养箱中培养至细胞贴壁,弃去原培养基,加入上述配好的各个浓度的玛咖多糖溶液,每孔加入 200 μl ,以只加培养基的组作为空白对照,继续放入培养箱中培养,两块 96 孔板分别培养 24 h、48 h,到相应的时间节点,取出 96 孔板,按照 MTT 实验操作^[13]。于 570 nm 处测吸光度,每个浓度做 5 个复孔。

1.2.4.2 细胞划痕法检测玛咖多糖对 IEC-6 细胞迁移的影响 用含 2% 血清的培养液分别配制 0.1 mg/L、1 mg/L、10 mg/L、100 mg/L 的玛咖多糖溶液待用。根据细胞划痕法的操作,在 6 孔板背面,划痕标记直线,将对数生长期细胞以 2×10^5 个/孔的细胞密度接种到划横线的培养板中,待显微镜下观察细胞快长满时,换以 2% 血清的培养液继续培养 12 h,使用无菌移液管尖端,在长满细胞的孔中,垂直与直线画划痕标记。刮伤后用 PBS 清洗每个孔,去除残碎的细胞片,并用上述配好待用的含玛咖多糖的培养液替换,注意刮伤后立即在显微镜下观察并拍照,记作 0 h;继续培养 48 h;达到时间后,取出细胞划伤后的 6 孔板,观察细胞迁移情况,并拍照。使用 Image J 软件处理每个时间节点的图片,并计算迁移率。以不加药物的 2% 血清的培养液为对照,每个浓度制作 3 个复孔。迁移率 = (0 h 划痕面积 - 48 h 划痕面积) / 0 h 划痕面积 \times 100%。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 20.0 对数据进行分析,计量资料数据用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,实验组与对照组之间的比较采用 t 检验分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 标准曲线的拟合 标准曲线如图 1, $y = 7.99x + 0.115$; 横坐标葡萄糖浓度 (C_{glu}), 纵坐标 A490, 相关系数 $R^2 = 0.996$, 表明在 10~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之间, 线性关系良好。

2.2 响应面实验结果

2.2.1 单因素实验结果 实验结果发现: 提取时间为 80 min, 提取功率为 180 W, 提取温度为 60 $^{\circ}\text{C}$, 提取液料比为 40 ml/g 时多糖得率为最高, 见图 2。

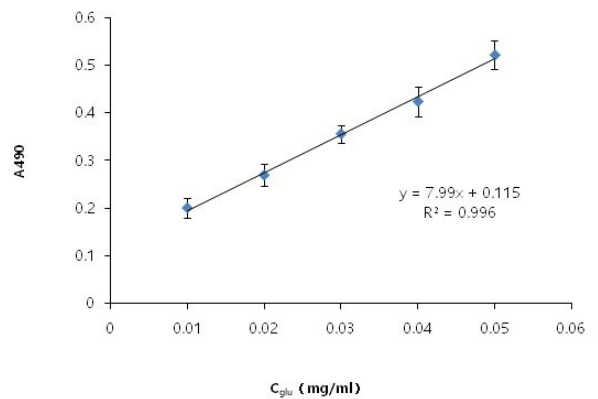


图 1 葡萄糖标准曲线

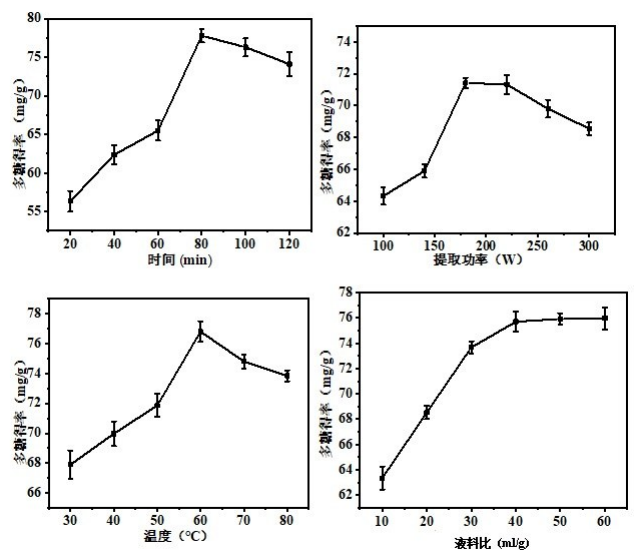


图 2 单因素实验结果

2.2.2 玛咖多糖提取响应面实验结果及方差分析

通过响应面设计,共进行 29 组实验,具体的实验设计及结果如表 2。实验数据分析,得到二次多项回归方程: 提取率 (mg/g) $R = 74.43 + 0.8025A - 0.2317B + 0.52C + 0.7942D - 0.03AB - 1.688AC + 3.025AD + 0.64BC - 0.445BD - 0.2775CD - 5.152A^2 - 2.386B^2 - 1.861C^2 - 2.224D^2$ (编码制)。回归方程方差分析如表 3,模型的 $P < 0.05$,模型的决定系数 R^2 为 0.9711,说明模型具有较高显著性,同时 $R^2_{\text{adj}} = 0.9421$ 与 $\text{Pred } R^2$ 接近,能够解释实验 94.21% 的响应值变异,模型与真实数据能够较好拟合,对实践具有指导意义。而从 F 值的大小得出影响响应值的顺序为 $A > D > C > B$ 。综上可用上述模型分析和预测提取率最佳处理工艺。

表 2 响应面试验设计与结果

序号	A/min	B/W	C/(ml·g ⁻¹)	D/°C	R/(mg·g ⁻¹)
1	0	0	0	0	74.35
2	-1	0	0	1	64.02
3	0	0	-1	-1	68.59
4	0	0	0	0	75.26
5	1	0	-1	0	69.33
6	0	1	1	0	71.67
7	1	1	0	0	66.92
8	0	0	0	0	74.22
9	0	0	0	0	74.33
10	0	-1	0	-1	68.61
11	0	0	1	1	71.54
12	0	0	1	-1	70.75
13	0	0	-1	1	70.49
14	0	-1	0	1	70.52
15	0	1	0	1	69.84
16	-1	0	-1	0	65.33
17	-1	1	0	0	65.50
18	1	0	0	1	72.78
19	0	1	-1	0	68.75
20	1	0	0	-1	64.33
21	0	0	0	0	73.98
22	-1	0	0	-1	67.67
23	0	1	0	-1	69.71
24	-1	0	1	0	68.58
25	0	-1	-1	0	70.27
26	1	-1	0	0	68.34
27	-1	-1	0	0	66.80
28	0	-1	1	0	70.63
29	1	0	1	0	65.83

表 3 回归模型方差分析

方差来源	平方和	自由度	方差	F	P
回归模型	264.64	14	18.90	33.56	< 0.0001
A	7.73	1	7.73	13.72	0.0024
B	0.64	1	0.64	1.14	0.3030
C	3.24	1	3.24	5.76	0.0309
D	7.57	1	7.57	13.44	0.0025
AB	0.0036	1	0.0036	0.006392	0.9374
AC	11.39	1	11.39	20.23	0.0005
AD	36.60	1	36.60	64.99	< 0.0001
BC	1.64	1	2.64	4.91	0.0510
BD	0.79	1	0.79	1.41	0.2554
CD	0.31	1	0.31	0.55	0.4718
A ²	172.17	1	172.17	305.70	< 0.0001
B ²	36.92	1	36.92	65.55	< 0.0001
C ²	22.46	1	22.46	39.87	< 0.0001
D ²	32.10	1	32.10	56.99	< 0.0001
残差	7.88	14	0.56		
失拟项	6.93	10	0.69	2.91	0.1572
纯误差	0.95	4	0.24		
合计	272.53	28			

注： $R^2=0.9711$, $Adj R^2=0.9421$, $Pred R^2=0.8480$ 。

2.2.3 响应面分析 不同工艺条件交互作用对结果的影响如图 3a~图 3f。由图 3a 可知,提取时间-超声

功率交互作用对提取率的影响趋势呈一抛物曲面分布随着提取时间和超声功率的增加,多糖得率先增后减。取适中条件:提取时间 80~90 min、超声功率 160~200 W 水平时,可显著提高产物提取率。由图 3b,交互曲面纵向跨度较大,且等高线呈现显著椭圆形,可知提取时间与液料比相互作用对响应值的影响显著。仅考虑二者影响下的提取率优化工艺条件集中于提取时间 80~90 min,液料比 35~45 ml/g 水平区间组合。图 3c 所示,提取率随提取时间和提取温度增加均呈现先增后减变化。其中,提取率随提取时间的变化趋势更加显著,表明提取时间对提取率的影响较提取温度影响显著。当设置提取时间 70~90 min、提取温度 60~65 °C 水平范围取值时,为二者交互影响下提取率的优化工艺。从图 3d 可知,当超声功率<180 W 时,超声功率与响应值呈正相关关系;而当超声功率>180 W 时,其相关关系发生转折,超声功率在 180 W 附近取值时为提取率的临界最佳工艺参数,同理提取率随液料比变化的临界最佳参数为 40 ml/g 左右。如图 3e 所示,超声功率和提取温度交互作用中提取温度对响应值的贡献更大,是提取率的敏感影响因子。取超声功率水平 160~200 W、提取温度 55~65 °C,利于促进产物提取率提升。图 3f 所示,提取温度对提取率的影响较液料比影响更大,引起曲面较大幅度的先增后减变化,取液料比 35~45 ml/g、提取温度 60~65 °C 水平附近值,可显著提高提取率水平。工艺优化的目的是为了得到最大的响应值,因此必须对各个影响因素全盘考虑,才能得到最理想的结果,根据模型运行结果,最佳的工艺为:提取时间 83.163 min、超声功率 177.131 W、液料比 40.335 ml/g、提取温度 62.919 °C,在此条件下模型预测的响应值为 74.624 mg/g。

2.2.4 最优工艺条件试验验证 根据软件预测结果,结合实际条件的可行性,取提取时间 83 min、超声功率 177 W、液料比 40 ml/g、提取温度 63 °C 为条件进行三次重复试验,平均得率为(75.20±1.21) mg/g,模型预测的结果为 74.624 mg/g,二者接近,表明该响应面模型优化的工艺条件有效可靠。

2.3 MTT 法检测玛咖多糖对 IEC-6 细胞增殖的影响 与不加药物的对照组比较,玛咖多糖在 0.1 mg/L 到 10 mg/L 范围内有利于 IEC-6 细胞的增殖,起促进作用,同时在该范围内表现出量效依赖关系,玛咖多糖 10 mg/L 组与正常组比增殖幅度达 35%,差异有统计学意义($P<0.01$),但 100 mg/L 的玛咖多糖表现出一定的抑制作用,这可能与多糖类物质具有双向免疫调节作用相关^[14],以吸光度作为纵坐标,玛咖多糖浓度作为横坐标,具体结果见图 4。

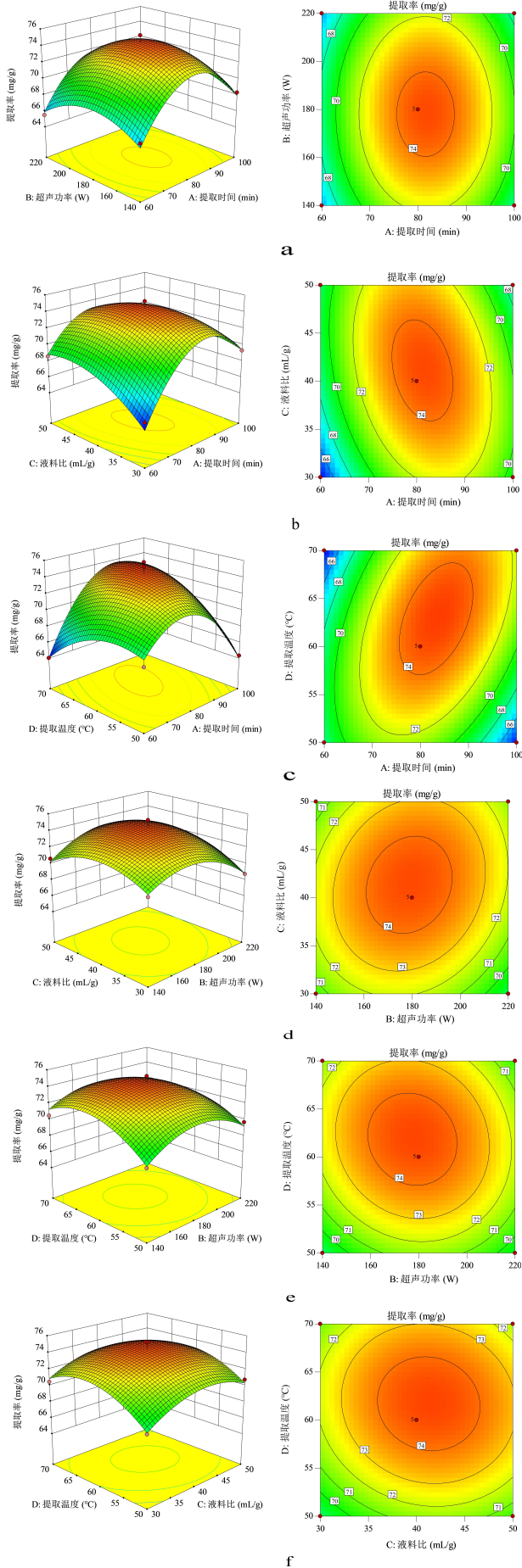
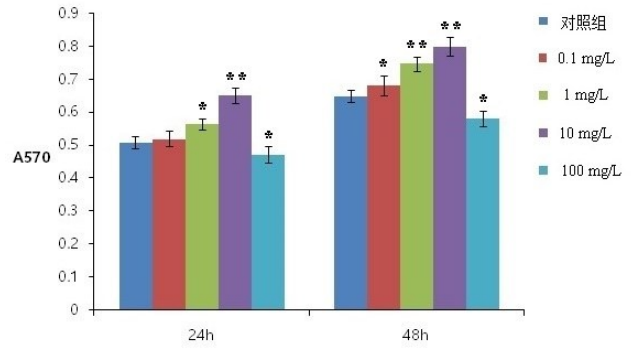


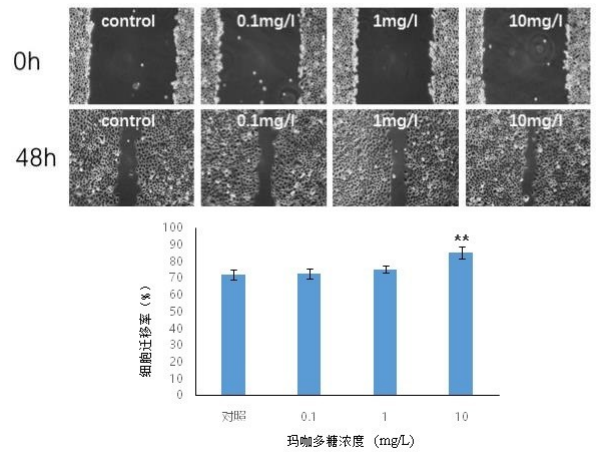
图 3 响应面和等高线



注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图 4 玛咖多糖对 IEC-6 细胞增殖的影响

2.4 不同浓度玛咖多糖对 IEC-6 细胞迁移的影响
 结合 MTT 结果,选择 0.1 mg/L、1 mg/L、10 mg/L 的玛咖多糖,研究玛咖多糖对 IEC-6 细胞迁移的影响。实验结果见图 5,玛咖多糖 10 mg/L 时能够明显促进 IEC-6 细胞的迁移。



注:与正常对照组比较,** $P < 0.01$ 。

图 5 玛咖多糖对 IEC-6 细胞迁移的影响

3 讨论

植物多糖极性大,但是由于分子量大,结构复杂,溶解性差别也较大。植物多糖提取的传统方法是水提醇沉法,一般用于水溶性较大的多糖,但水提醇沉法,由于受热时间较长,往往会破坏多糖的高级结构。目前,酶解法、超声法、微波法用的也比较多^[15]。研究选用超声法提取玛咖多糖,基于前期的单因素实验,筛选出对多糖得率影响比较大的主要因素,在此基础上运用响应面设计实验优化工艺,得出最佳工艺为提取时间 83 min、超声功率 177 W、液料比 40 ml/g、提取温度 63 °C,玛咖多糖平均提取率为(75.20±1.21) mg/g。但是在玛咖多糖的提取过程中,仅对多糖做了初步的脱脂、去色素、脱蛋白处理,而未做分离和纯化。研

究以 IEC-6 细胞作为模型,初步研究玛咖多糖对 IEC-6 细胞的增殖和迁移的影响,研究表明,在一定浓度条件下,玛咖多糖能够促进 IEC-6 细胞的增殖和迁移,从而为玛咖的药性、药效提供一定参考,但没有对玛咖多糖促进 IEC-6 细胞的增殖和迁移的具体机制进行深入的探讨,下一步将对玛咖总多糖进行分离纯化并进一步探讨玛咖多糖促进 IEC-6 细胞增殖和迁移的机制。

参考文献:

- [1] Carvalho FV, Fonseca Santana L, Diogenes A da Silva, et al. Combination of a multiplatform metabolite profiling approach and chemometrics as a powerful strategy to identify bioactive metabolites in *Lepidium meyenii* (Peruvian maca)[J]. *Food Chem*, 2021, 364:130453.
- [2] Chen R, Wei JC, Gao YM. A review of the study of active components and their pharmacology value in *Lepidium meyenii* (Maca)[J]. *Phytother Res*, 2021, 35(12): 6706-6719.
- [3] 严颖,孔娜,沈花,等. 玛咖多糖增强机体免疫状态提高 5-氟尿嘧啶对荷瘤小鼠的疗效[J]. *江苏大学学报(医学版)*, 2019, 29(1): 37-41.
- [4] 费文婷,侯燕,王玉杰,等. 玛咖性温健脾及对脾虚小鼠线粒体能量代谢酶的影响[J]. *北京中医药大学学报*, 2018, 41(7): 559-566.
- [5] 许雅青,吴月滢,李小雅,等. 健脾类中药修复肠黏膜屏障损伤的研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(14): 235-241.
- [6] 杨阳,高迪,薛沾枚,等. 多糖对肠黏膜屏障影响的研究进展[J]. *肠外与肠内营养*, 2021, 28(2): 117-121.
- [7] Maria-Ferreira D, Nascimento AM, Cipriani TR, et al. Rh-
- amnogalacturonan, a chemically-defined polysaccharide, improves intestinal barrier function in DSS-induced colitis in mice and human Caco-2 cells[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 12261.
- [8] Xie SZ, Yang G, Jiang XM, et al. *Polygonatum cyrtoneuma* Hua Polysaccharide Promotes GLP-1 Secretion from Enterendocrine L-Cells through Sweet Taste Receptor-Mediated cAMP Signaling[J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(25): 6864-6872.
- [9] 潘勇,黄永毅,徐灵源,等. 桑枝多糖通过调节肠道菌群降血糖的作用研究[J]. *右江民族医学院学报*, 2020, 42(1): 7-10.
- [10] 国家药典委员会. 中国药典[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 260.
- [11] Sun LX, Chen LH, Lin ZB, et al. Effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on IEC-6 cell proliferation, migration and morphology of differentiation benefiting intestinal epithelium healing in vitro[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2011, 63(12): 1595-1603.
- [12] Go H, Hwang HJ, Nam TJ. Polysaccharides from *Capsosiphon fulvescens* stimulate the growth of IEC-6 Cells by activating the MAPK signaling pathway[J]. *Mar Biotechnol (NY)*, 2011, 13(3): 433-440.
- [13] 牛长敏,夏蒙蒙,钟亚楠,等. 巴戟天多糖和淫羊藿苷促进视磺酸诱导的 P19 细胞增殖和分化[J]. *时珍国医国药*, 2020, 31(12): 2881-2886.
- [14] 徐海军,方予,汪俊涛,等. 霍山石斛多糖对小鼠的双向免疫调节作用[J]. *免疫学杂志*, 2018, 34(8): 731-736.
- [15] 孙启山,唐小牛. 毛蚶多糖提取及脱色工艺的优化[J]. *右江民族医学院学报*, 2019, 41(2): 127-130.

收稿日期: 2021-11-30; 修回日期: 2021-12-22