

- [9] 唐明, 高霞, 耿婷, 等. 基于HPLC-Q-TOF-MS/MS技术的七味通痹口服液化学成分分析[J]. 中草药, 2021, 52(8): 2226-2236.
- [10] 许日明, 周理, 徐明奎, 等. 七味通痹口服液联合甲氨蝶呤治疗类风湿关节炎的疗效观察及其对血清疼痛介质和炎症因子的影响[J]. 药物评价研究, 2021, 44(7): 1468-1472.
- [11] 李利青, 张逢, 彭馥芝, 等. 类风湿关节炎实验性动物模型研究进展[J]. 中国药理学通报, 2021, 37(11): 1492-1497.
- [12] Aletaha D. Precision medicine and management of rheumatoid arthritis[J]. *J Autoimmun*, 2020, 110: 102405.
- [13] Bournia V K, Kitas G, Protoporou A D, et al. Impact of non-steroidal anti-inflammatory drugs on cardiovascular risk: Is it the same in osteoarthritis and rheumatoid arthritis? [J]. *Mod Rheumatol*, 2017, 27(4): 559-569.
- [14] Del Rincón I, Battafarano D F, Restrepo J F, et al. Glucocorticoid dose thresholds associated with all-cause and cardiovascular mortality in rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2014, 66(2): 264-272.
- [15] Law S T, Taylor P C. Role of biological agents in treatment of rheumatoid arthritis[J]. *Pharmacol Res*, 2019, 150: 104497.
- [16] Eickburg P B, Bik E M, Bernstein C N, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora [J]. *Science*, 2005, 308(5728): 1635-1638.
- [17] Vaahtovuo J, Munukka E, Korkeamaki M, et al. Fecal microbiota in early rheumatoid arthritis [J]. *J Rheumatol*, 2008, 35(8): 1500-1505.
- [18] Catrina A I, Deane K D, Scher J U. Gene, environment, microbiome and mucosal immune tolerance in rheumatoid arthritis[J]. *Rheumatology*, 2014(3): 391-402.
- [19] Tuovinen E, Keto J, Nikkilä J, et al. Cytokine response of human mononuclear cells induced by intestinal *Clostridium* species[J]. *Anaerobe*, 2013, 19: 70-76.
- [20] 包东桥, 徐斌, 林超, 等. 基于NF-κB、RANK探讨七味通痹口服液对类风湿关节炎大鼠的影响[J]. 南京中医药大学学报, 2018, 34(3): 287-291.
- [21] Hashida R, Shimozuru Y, Chang J, et al. New studies of pathogenesis of rheumatoid arthritis with collagen-induced and collagen antibody-induced arthritis models: new insight involving bacteria flora[J]. *Autoimmune Dis*, 2021(8): 1-13.
- [22] Liu Z H, Wu Y X, Luo Y B, et al. Self-balance of intestinal flora in spouses of patients with rheumatoid arthritis[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2020, 7: 538.
- [23] Mangalea M R, Paez-Espino D, Kieft K, et al. Individuals at risk for developing rheumatoid arthritis harbor differential intestinal bacteriophage communities with distinct metabolic potential[J]. *Cell Host Microbe*, 2021, 29(5): 726-739.
- [24] Pan H D, Li R Z, Li T, et al. Whether probiotic supplementation benefits rheumatoid arthritis patients: a systematic review and meta-analysis[J]. *Engineering*, 2017, 3(1): 115-121.

血满草酸性多糖的化学修饰及其免疫活性研究

刘瑜, 刘浩博, 钟政昌, 袁雷*

(西藏农牧学院, 食品科学学院, 西藏特色农牧资源省部共建协同创新中心, 生物技术中心, 西藏林芝 860000)

摘要: 目的 探讨化学修饰对血满草酸性多糖免疫活性的影响。方法 以血满草酸性多糖 SPS-1 为原料, 采用氯磺酸-吡啶法、氢氧化钠-氯乙酸法和乙酸-亚硒酸钠法分别制备了 SPS-1 硫酸化、羧甲基化和硒化衍生物, 通过测定硫酸化、羧甲基化的取代度和硒含量以及红外光谱对衍生物进行验证, 采用 HPGPC 分析其均一性和分子量, 采用 MTT 法测定 SPS-1 及其衍生物对小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 细胞增殖的影响, 采用 Griess 法和 ELISA 技术测定细胞释放 NO 和细胞因子的水平。结果 SSPS-1 和 CSPS-1 的取代度分别为 0.624 4 和 0.489 8, SeSPS-1 的硒含量为 1.702 1 μg/mg, 红外光谱表明 3 种修饰方法均可用于 SPS-1 的化学修饰, HPGPC 结果显示化学修饰导致多糖分子量降低, 但分布仍较均一。SPS-1 及其衍生物均可显著促进 RAW264.7 细胞的增殖及分泌 NO、IL-1β、IL-6 和 TNF-α ($P<0.05$, $P<0.01$)。结论 本研究为深入开展多糖结构与功能的关系分析奠定了基础。

关键词: 血满草; 多糖; 化学修饰; 红外光谱; 免疫活性

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)03-1008-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2024.03.047

收稿日期: 2023-05-26

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目 (31560252); 2020 年中央财政支持地方高校改革发展资金-理化分析与生物技术中心公共平台建设项目 (2020-11)

作者简介: 刘瑜 (1987—), 女, 硕士, 助教, 研究方向为天然产物化学。E-mail: 464124137@qq.com

*通信作者: 袁雷 (1982—), 男, 硕士, 副教授, 研究方向为糖生物化学。E-mail: yuanl@xza.edu.cn

多糖是中草药的主要活性成分之一，因其在调节机体免疫^[1]、抗肿瘤^[2]、抗病毒^[3]、降血糖^[4-5]等方面表现出较好的生物功能而备受关注。而多糖的结构修饰对多糖生物活性也会产生重要的影响，通过结构修饰可提高多糖原有的生物活性或产生新的活性^[6-7]。

血满草 *Sambucus adnata* Wall. 又名血莽草、接骨草，为忍冬科接骨木属多年生草本植物^[8]，为我国民间常用药材，在藏族、傣族、彝族、哈尼族等少数民族中有着悠久的用药历史，也是藏药的药源植物之一，其味辛，性温，具有活血、通络的功效，可用于治疗急慢性肾炎、风湿疼痛、风疹瘙痒、慢性腰腿疼、扭伤瘀痛、骨折等^[9]。血满草含有萜类、黄酮类、木质素类等多种化学成分^[10-11]，但对血满草多糖化学修饰方面的相关研究未见报道。本课题组在前期研究过程中，从血满草叶片中纯化出一种均一性酸性多糖 SPS-1^[12]，本实验以 SPS-1 为原料，开展其硫酸化、羧甲基化和硒化修饰，并比较其修饰前后免疫活性的变化情况，为 SPS-1 及其衍生物的深入研究奠定基础。

1 材料

SPS-1 为实验室自制；小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7、MTT 试剂购自武汉普赛诺生命科技有限公司；DMEM 培养基、胎牛血清、青霉素/链霉素双抗购自美国 Gibco 公司；一氧化氮检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所；脂多糖（LPS）购自美国 Sigma 公司；IL-1β、TNF-α、IL-6 ELISA 试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技有限公司；溴化钾（色谱纯）购自天津市光复精细化工研究所；N, N-二甲基甲酰胺、氯磺酸、铬变酸、羟基乙酸、亚硒酸钠等化学试剂均为分析纯。

722N 紫外可见分光光度计（上海奥谱勒仪器有限公司）；LGJ-0.5 冷冻干燥机（北京四环科学仪器厂）；i50 傅里叶变换红外光谱仪、Multiskan MK3 酶标仪（美国 Thermo 公司）；MCO-15AC CO₂ 恒温培养箱（日本 Sanyo 公司）；XS105DU 电子天平（瑞士 Mettler-Toledo 公司）。

2 方法

2.1 硫酸化 SPS-1 (SSPS-1) 制备及其取代度测定 SPS-1 硫酸化修饰产物 SSPS-1 的制备参照袁雷等^[13]的方法进行，1 mol/L HCl 水解 SSPS-1 后，采用氯化钡-明胶法^[14]测定硫酸基含量，并按公式（1）计算取代度 DS。

$$DS = \frac{1.62\%}{32 - 1.02\%} \quad (1)$$

式中：S% 为硫含量。

2.2 羧甲基化 SPS-1 (CSPS-1) 制备及其取代度测定 采用氢氧化钠-氯乙酸法^[15]开展 SPS-1 的羧甲基化修饰。称取 150 mg SPS-1 样品，加入 25 mL 异丙醇，搅拌 30 min 后加入 2.98 g NaOH，搅拌 1 h，缓慢加入 2.51 g 氯乙酸，60 ℃ 反应 4 h，调 pH 至中性，透析浓缩，冷冻干燥得羧甲基化多糖 CSPS-1。由于 SPS-1 为酸性多糖，羧基的存在对羧甲基含量测定有一定影响，因此，用 0.25 mol/L NaOH 分别配制 1 mg/mL SPS-1 和 CSPS-1 溶液，并采用铬变酸法^[16]分

别测定其羧甲基的含量，并按公式（2）计算 DS。

$$DS = \frac{162(A_2 - A_1)}{76 - (59 - 1)(A_2 - A_1)} \quad (2)$$

式中：A₂ 为每克 CSPS-1 样品相当于羟基乙酸的量，A₁ 为每克 SPS-1 样品相当于羟基乙酸的量，76 为羟基乙酸摩尔质量，59 为 CH₃COOH 摩尔质量。

2.3 硒化 SPS-1 (SeSPS-1) 制备及硒含量测定 SPS-1 的硒化修饰参照程爽等^[17]的方法并稍作修改。称取 SPS-1 150 mg 于烧杯中，加入 25 mL 蒸馏水溶解，加入 1 mL 冰醋酸，再加入溶于少量蒸馏水的 150 mg 亚硒酸钠和 0.65 g 氯化钡，60 ℃ 下搅拌反应 6 h。反应结束后，滴加硫酸钠并离心除去多余 Ba²⁺，将上清液透析后浓缩冻干，得硒化多糖 SeSPS-1。SeSPS-1 的硒含量参照李世杰^[18]的方法测定。

2.4 红外光谱分析 溴化钾与适量的 SPS-1、SSPS-1、CSPS-1 和 SeSPS-1 混合后，压片，在 4 000~400 cm⁻¹ 波数范围内测定其红外光谱。

2.5 均一性和分子量测定 采用高效凝胶渗透色谱 (HGPC) 测定 SPS-1、SSPS-1、CSPS-1 和 SeSPS-1 的均一性和分子量。质量浓度 1 mg/mL 的 SPS-1 及其衍生物溶液，经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后进样测定，流动相水；体积流量 1.0 mL/min；温度 25 ℃；进样量 20 μL。

2.6 免疫活性研究

2.6.1 细胞培养 小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 培养于 DMEM 培养基（含有 10% 胎牛血清和 100 U/mL 青霉素-100 μg/mL 链霉素双抗）中，37 ℃、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养。

2.6.2 细胞增殖率测定 采用 MTT 法测定 SPS-1、SSPS-1、CSPS-1、SeSPS-1 对 RAW264.7 细胞增殖的影响。将 RAW264.7 细胞按 5.0×10³ 个/mL 接种于 96 孔细胞培养板中，加入不同质量浓度的 SPS-1、SSPS-1、CSPS-1、SeSPS-1 (12.5、25、50、100、200、400、800、1 600 μg/mL)，用培养基处理的细胞作为空白对照，每组设置 3 个复孔。培养 24 h 后，加入 10 μL MTT，37 ℃ 孵育 4 h，吸出培养基，PBS 润洗 3 遍，加入 150 μL DMSO 振荡 10 min，于 568 nm 波长处检测光密度 (OD) 值。按下式 (3) 计算细胞增殖率。

$$\text{细胞增殖率} = A/B \times 100\% \quad (3)$$

式中：A 为样品处理组的光密度值，B 为空白对照组的光密度值。

2.6.3 NO、IL-6、IL-1β、TNF-α 测定 将 RAW264.7 细胞以 5×10⁵/孔的密度接种于 6 孔板中，加入 200、400、800 μg/mL SPS-1、SSPS-1、CSPS-1、SeSPS-1，以正常细胞为空白对照，1.0 μg/mL LPS 处理组为阳性对照，每组设置 3 个复孔。培养 24 h 后，收集细胞培养液，按照 NO 检测试剂盒说明书检测 NO 水平，按照 ELISA 检测试剂盒提供的方法检测 IL-6、IL-1β、TNF-α 水平。

2.7 数据处理 数据结果以 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用 SPSS 软件进行组间方差同质性检验和单因素 ANOVA 显著性差异分

析, 若方差齐性, 各组间多重比较采用 LSD 法; 若方差不齐, 采用 Welch 稳健估计, 组间两两比较采用 Dunnett's T3 法。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 硫酸基、羧甲基取代度和硒含量测定 以硫酸根离子质量浓度为横坐标 (X), 以硫酸钾-氯化钡-明胶溶液的吸光度与硫酸钾-明胶溶液的吸光度差值为纵坐标 (Y) 进行回归, 得方程为 $Y = 2.8583X - 0.0229$ ($R^2 = 0.9977$), 计算得到样品中硫酸基的质量浓度为 $531.25 \mu\text{g/mL}$, 硫的百分含量为 8.853%, 硫酸基 DS 为 0.6244。

以羟基乙酸的质量浓度为横坐标 (X), 570 nm 处的吸光度为纵坐标 (Y) 进行回归, 得方程为 $Y = 0.0004X - 0.0012$ ($R^2 = 0.9989$), 计算得到 SPS-1 和 CSPS-1 中羧甲基相当于羟基乙酸的含量分别为 238.00 、 430.50 mg/g , 羧甲基 DS 为 0.4898。

以硒质量浓度做横坐标 (X), 340 nm 处的吸光度为纵坐标 (Y) 进行回归, 得方程为 $Y = 0.0141X + 0.019$ ($R^2 = 0.9989$), 计算得到 SeSPS-1 中硒含量为 $1.7021 \mu\text{g/mg}$ 。

3.2 红外光谱分析 SPS-1 及其衍生物的红外光谱图见图 1。由此可知, 在 3405 、 2930 、 1732 、 1613 、 1416 、 1073 cm^{-1} 波数的峰, 为多糖中含有的化学键伸缩、弯曲振动所致, 为多糖常规吸收峰^[13,19], 897 cm^{-1} 附近的峰为 β -糖苷键的特征吸收峰^[20]。

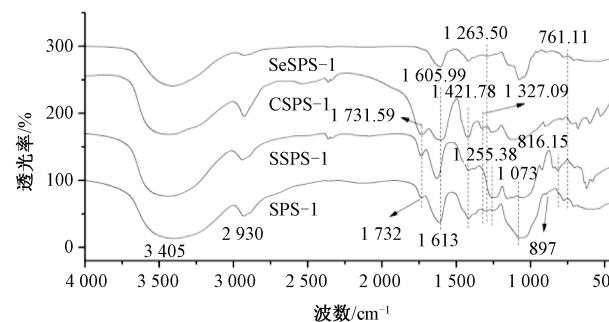


图 1 SPS-1 及其衍生物的红外光谱图

而在 SSPPS-1 谱图中, 1073 cm^{-1} 处的峰减弱, 同时在 1255 和 816 cm^{-1} 附近出现了 $S=O$ 伸缩振动及 $C-O-S$ 拉伸振动吸收峰^[21-22], 说明 SPS-1 的羟基上有硫酸基团, 硫酸化修饰成功。

由于 SPS-1 为酸性多糖, 本身含有羧基, 因此在 1731.59 、 1605.99 、 1421.78 、 1327.09 cm^{-1} 附近均有特征吸收^[23-24], 对羧甲基化衍生物 CSPS-1 的红外光谱分析有一定的干扰, 但是通过对分析 SPS-1 和 CSPS-1 的红外光谱图, 发现这 4 个吸收峰的强度均有所增大^[25-26], 说明 CSPS-1 中含有羧甲基。

由图 1 可知, SPS-1 经硒化修饰后, SeSPS-1 的红外光谱较 SPS-1 有较大变化, 说明硒化修饰对多糖结构影响较大, 而亚硒酸酯的特征吸收峰不明显, 仅在 1263.50 、 761.11 cm^{-1} 附近有较弱的吸收, 说明存在少量 $Se-C$ 和 $Se=O$ ^[27-28], 但硒含量较低。

3.3 均一性和分子量 SPS-1 及其衍生物的均一性和分子量结果见图 2。SPS-1 的分子量为 $1.22 \times 10^5 \text{ Da}$ 。SSPPS-1、CSPS-1、SeSPS-1 的分子量分别降至 8.13×10^4 、 7.82×10^4 、 $8.69 \times 10^4 \text{ Da}$, 表明在化学修饰过程中, 由于修饰试剂的影响, 多糖分子发生了不同程度的降解。由于多糖的降解, SPS-1 及其衍生物的多分散系数也增加, 其中 SSPPS-1 的多分散系数 (PDI) 最大, 达到 1.76, 而 SPS-1、CSPS-1、SeSPS-1 的 PDI 分别为 1.06、1.19、1.08, 结果表明 SPS-1 及其衍生物的分子量分布仍较均匀且集中。

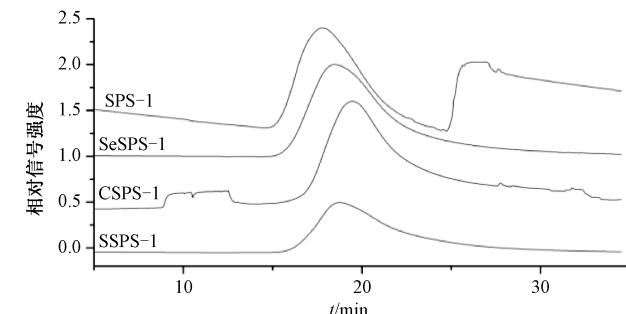
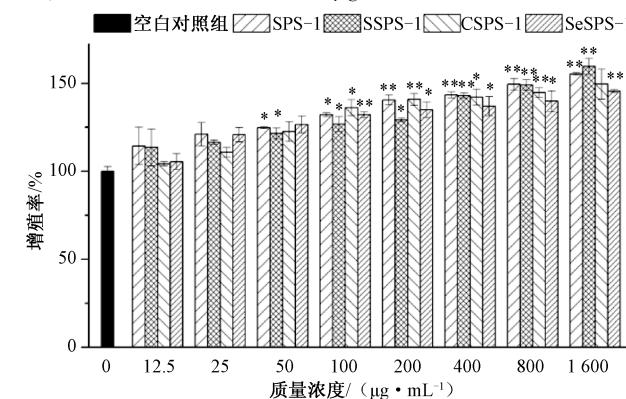


图 2 SPS-1 及其衍生物的 HPGPC 谱图

3.4 免疫活性分析

3.4.1 细胞增殖活性 由图 3 可知, 与空白对照组比较, 不同质量浓度 SPS-1 及其衍生物均可刺激 RAW264.7 细胞的增殖, 且随着质量浓度的增加, 增殖率也随之提高。此外, SPS-1 及其衍生物在 $400 \mu\text{g/mL}$ 时, 细胞增殖效果趋于稳定, 且所选质量浓度对 RAW264.7 细胞均没有细胞毒性, 因此选择 200 、 400 、 800 、 $1600 \mu\text{g/mL}$ 开展后续实验。

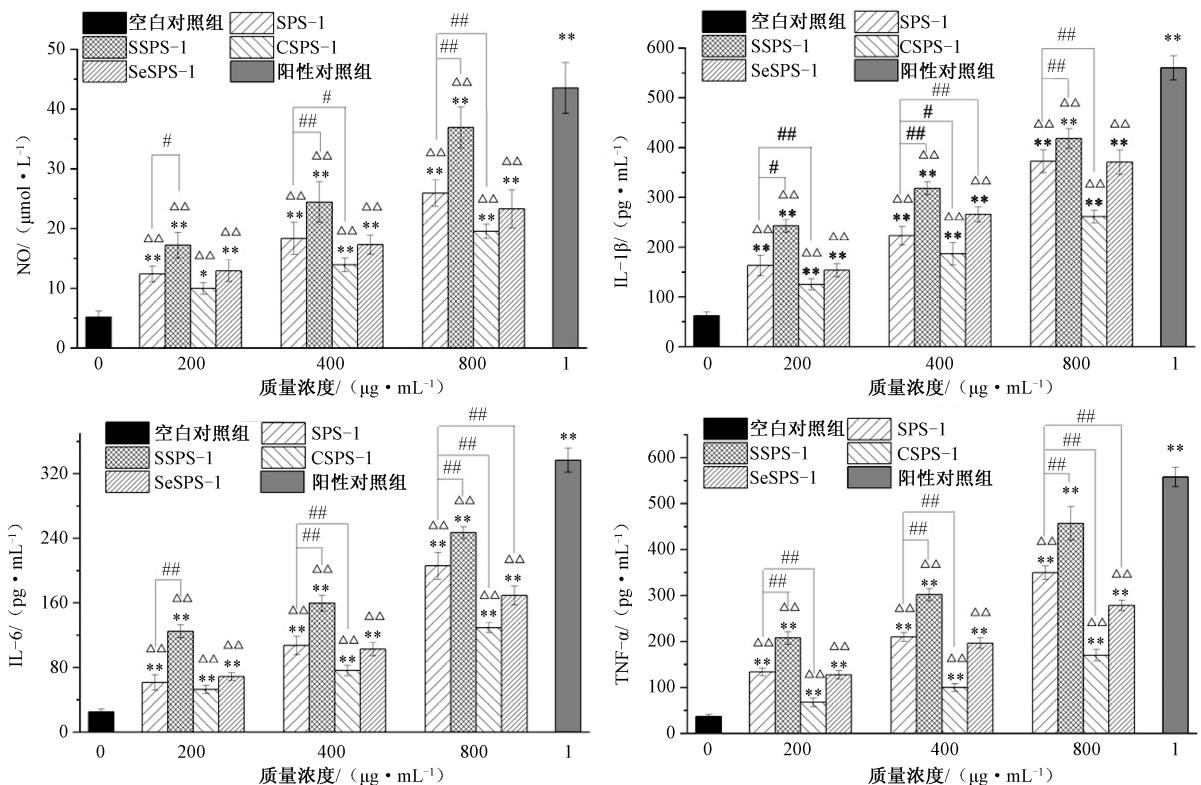


注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 3 SPS-1 及其衍生物对 RAW264.7 细胞增殖的影响

3.4.2 SPS-1 及其衍生物对 RAW264.7 细胞分泌 NO 和细胞因子的影响 由图 4 可知, 与空白对照组比较, SPS-1 及其衍生物均可提高 RAW264.7 细胞 NO 分泌量 ($P < 0.05$), 且有剂量效应。与 SPS-1 相比, SSPPS-1 各质量浓度均可极显著促进 NO 的分泌 ($P < 0.01$)。CSPS-1 对 NO 的促进作用与 SPS-1 相比有所降低, 400 、 $800 \mu\text{g/mL}$ 时, CSPS-1 的降低效果达到了显著水平 ($P < 0.05$)。SeSPS-1 对 NO 的促进作用与 SPS-1 相当, 无显著性差异。

与空白对照组比较, SPS-1 及其衍生物均可提高



注：与空白对照组比较，* $P<0.05$, ** $P<0.01$ ；与阳性对照组比较，△△ $P<0.01$ ；与同质量浓度 SPS-1 比较，# $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

图4 SPS-1及其衍生物对RAW264.7细胞分泌NO、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平的影响

RAW264.7细胞的IL-1 β 、IL-6、TNF- α 分泌量($P<0.01$)，且有剂量效应。与SPS-1比较，各质量浓度SSPS-1均可促进IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的分泌。CSPS-1对IL-1 β 、IL-6和TNF- α 的促进作用与SPS-1相比均有显著降低。SeSPS-1对IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的促进作用与SPS-1基本相当，在200和400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时，可显著促进IL-1 β 的分泌，800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时，可显著降低IL-6和TNF- α 的分泌。

与阳性对照组比较，SPS-1及其衍生物对RAW264.7细胞分泌NO、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 产生显著影响($P<0.01$)，但仍未达到LPS的激活水平。

4 讨论

硫酸化、羧甲基化和硒化修饰是比较常见的多糖化学修饰方法，这3种化学修饰对多糖的结构和免疫活性均产生一定的影响。硫酸化修饰的青钱柳多糖能显著增加RAW264.7细胞TNF- α 、IL-1 β 和IL-6的分泌水平，可显著增强RAW264.7细胞的NO释放和吞噬活性，表明硫酸化修饰可增强多糖的免疫调节作用^[29]。羧甲基修饰的大粒车前子多糖能够使树突状细胞分泌细胞因子IL-12 p70显著增加，表现出更好的体外免疫活性^[30]。通过分析9种硒化太子参多糖(sRPP1、sRPP2、sRPP3、sRPP4、sRPP5、sRPP6、sRPP7、sRPP8和sRPP9)和太子参多糖(RPP)的免疫活性，发现sRPP2、sRPP3、sRPP8和sRPP9对RAW264.7细胞的增殖作用显著高于RPP，其中sRPP8和sRPP9对RAW264.7细胞分泌NO、IL-6和TNF- α 的促进作

用显著高于RPP^[31]。

本实验从血满草酸性多糖SPS-1出发，通过化学修饰合成了SSPS-1、CSSPS-1和SeSPS-1，通过计算硫酸基、羧甲基和硒的含量及其红外光谱特征吸收峰的分析，明确了SSPS-1、CSSPS-1和SeSPS-1中分别含有硫酸基、羧甲基和硒。HPGPC结果显示化学修饰导致多糖产生部分降解，但均一性仍较好。细胞实验结果表明，SPS-1、SSPS-1、CSSPS-1和SeSPS-1均可显著促进RAW264.7细胞的增殖，且可显著促进RAW264.7细胞分泌NO、IL-1 β 、IL-6和TNF- α ，与SPS-1相比，SSPS-1对NO、IL-1 β 、IL-6和TNF- α 释放作用更加明显，SeSPS-1与之基本相当，CSSPS-1对NO、IL-1 β 、IL-6和TNF- α 释放作用显著降低，说明3种化学修饰对SPS-1免疫活性的影响较大。本实验可为多糖的构效关系研究提供参考，并为深入开展血满草多糖及其衍生物的免疫活性研究奠定基础。

参考文献：

- Cárdenas-Reyna T, Angulo C, Gularte C, et al. *In vitro* immunostimulatory potential of fungal β -glucans in pacific red snapper (*Lutjanus peru*) cells[J]. *Dev Comp Immunol*, 2017, 77: 350-358.
- 胡康,罗清,朱晓峰,等.茯苓均一多糖的分离纯化及其硫酸化衍生物对人乳腺癌MDA-MB-231细胞迁移的影响[J].中国中药杂志,2019,44(13):2835-2840.
- 孟庆龙,金莎,刘雅婧,等.植物多糖药理功效研究进展

- [J]. 食品工业科技, 2020, 41(11): 335-341.
- [4] 杨玉洁, 刘静宜, 谭艳, 等. 多糖降血糖活性构效关系及作用机制研究进展[J]. 食品科学, 2021, 42(23): 355-363.
- [5] 金斐, 朱丽云, 高永生, 等. 植物源活性成分降血糖作用及其机理研究进展[J]. 食品科学, 2021, 42(21): 322-330.
- [6] 白艳玲, 尚晓娅, 赵豪宾, 等. 分子修饰对多糖免疫活性影响的研究进展[J]. 食品工业科技, 2014, 35(20): 393-397.
- [7] Xu Y, Wu Y J, Sun P L, et al. Chemically modified polysaccharides: synthesis, characterization, structure activity relationships of action [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 132: 970-977.
- [8] 倪志诚. 西藏经济植物[M]. 北京科学技术出版社, 1990, 626-623.
- [9] Yuan L, Zhong Z C, Liu Y. Structural characterisation and immunomodulatory activity of a neutral polysaccharide from *Sambucus adnata* Wall[J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 154: 1400-1407.
- [10] 刘冬丽, 王葳, 陈飞龙, 等. 血满草化学成分及生物活性的研究进展[J]. 华西药学杂志, 2018, 33(6): 542-545.
- [11] 武海波, 赵奕宁, 李冬梅, 等. 血满草化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(3): 345-348.
- [12] Yuan L, Zhong Z C, Liu Y, et al. Structures and immunomodulatory activity of one galactose- and arabinose-rich polysaccharide from *Sambucus adnata*. [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 207: 730-740.
- [13] 袁雷, 钟政昌, 刘瑜, 等. 血满草酸性多糖分离纯化、硫酸化修饰及抗炎活性研究[J]. 分析试验室, 2020, 39(6): 649-653.
- [14] 颜丽, 刘秀河, 赵方铭, 等. 海茸中L-岩藻糖及硫酸基的测定[J]. 中国调味品, 2020, 45(2): 137-141.
- [15] 陈义勇, 张阳. 杏鲍菇多糖羧甲基化修饰工艺及其抗氧化活性[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(7): 119-127.
- [16] 王警. 乙酰化和羧甲基化龙眼肉多糖的制备及其抗氧化和免疫调节活性的研究[D]. 南宁: 广西医科大学, 2016.
- [17] 程爽, 贺斐, 付龙洋, 等. 冬凌草硒多糖的制备及其抗氧化活性分析[J]. 精细化工, 2021, 38(10): 2064-2071.
- [18] 李世杰. 近江牡蛎多糖的纯化、结构鉴定、硒化及其生物活性研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2017.
- [19] Goyzueta M L D, Noseda M D, Bonatto S J R, et al. Production, characterization, and biological activity of a chitin-like EPS produced by *Mortierella alpina* under submerged fermentation[J]. *Carbohydr Polym*, 2020, 247: 116716.
- [20] 高云霄, 胡小龙, 王月荣, 等. 铁皮石斛多糖的初级结构分析[J]. 高等学校化学学报, 2018, 39(5): 934-940.
- [21] Chen L, Huang G L. Antioxidant activities of sulfated pumpkin polysaccharides[J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 126: 743-746.
- [22] 鲍斌, 王辉俊, 王宏伟, 等. 禹州漏芦均一多糖的结构分析及其硫酸化衍生物的抗补体活性[J]. 高等学校化学学报, 2014, 35(10): 2119-2123.
- [23] 苗晶囡, 邱军强, 李海霞, 等. 一种黑木耳酸性多糖的分离纯化及其结构鉴定[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(6): 1-8.
- [24] 张颖, 曾艳, 邱广君, 等. 刺五加黑木耳酸性多糖化学组成及免疫活性研究[J]. 食品工业科技, 2017, 38(10): 119-123; 128.
- [25] 张遥遥, 张梦, 胡悦, 等. 黄精多糖的提纯、硫酸化和羧甲基化修饰及其抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2019, 40(21): 45-51.
- [26] 孙志涛, 陈芝飞, 郝辉, 等. 羧甲基化黄芪多糖的制备及其保润性能[J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28(9): 1427-1433.
- [27] 葛明明, 胡北, 孙丽娜, 等. 硒化蒲公英多糖的制备工艺及硒含量测定的研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(18): 276-280.
- [28] 商龙臣, 吴少魏, 张驰, 等. 南瓜硒多糖的制备表征及活性分析[J]. 食品科学, 2016, 37(19): 48-53.
- [29] Yu Y, Shen M Y, Wang Z J, et al. Sulfated polysaccharide from *Cyclocarya paliurus* enhances the immunomodulatory activity of macrophages [J]. *Carbohydr Polym*, 2017, 174: 669-676.
- [30] 牛庆川, 李银莉, 李玉萍. 天然多糖羧甲基化对其生物活性影响的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(1): 170-174; 183.
- [31] 吴秀钦, 秦韬, 任喆, 等. 硒化修饰太子参多糖对巨噬细胞免疫活性的影响[J]. 中国兽医学报, 2015, 45(12): 1313-1320.