杨智艳, 王宇帆, 阿依左克拉木·牙森, 等. 中亚白及中性多糖的结构解析及抗炎活性研究 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(8): 100−108. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025040212

YANG Zhiyan, WANG Yufan, AYZUKRAM Yasen, et al. Structural Elucidation and Anti-inflammatory Activity of Neutral Polysaccharide from *Orchis chusua* D. Don[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(8): 100−108. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025040212

· 研究与探讨 ·

中亚白及中性多糖的结构解析及抗炎活性研究

杨智艳[1], 王宇帆[1], 阿依左克拉木·牙森[1,2], 王艳丽[1], 魏瑞杰[1], 顾雨露[1], 热合巴提·努尔夏提[1,2,*], 胡尔西丹·伊麻木[3,*]

(1.伊犁师范大学化学化工学院, 新疆生物质资源清洁转化与高值利用重点实验室, 新疆伊宁 835000;
2.伊犁师范大学化学化工学院, 新疆维吾尔自治区教育厅天然产物化学与应用重点实验室, 新疆伊宁 835000;
3.新疆维吾尔自治区新疆医科大学, 新疆乌鲁木齐 830017)

摘　要: 本研究以药食同源植物中亚白及为对象，旨在系统研究中亚白及中性多糖（USP-N）的结构特征与抗炎活性。通过部分酸水解、Smith 降解、甲基化及二维核磁共振（2D-NMR）技术系统解析其精细结构，并基于斑马鱼炎症模型评价了其抗炎活性。结构分析表明，USP-N 主链由 β-1,4 连接的葡萄糖（38.5%）和甘露糖（33.8%）交替构成，形成葡甘聚糖骨架，侧链含少量鼠李糖、阿拉伯糖及半乳糖，部分甘露糖残基存在 2-O-乙酰化基团。生物活性实验显示，USP-N 处理抑制了脂多糖（LPS）诱导的相关一氧化氮（NO）的释放（P<0.0001）及斑马鱼体内中性粒细胞向尾部的迁移（P<0.0001）。同时，也减少了机械损伤后中性粒细胞和巨噬细胞向尾部的募集，且呈现剂量依赖性。综上，该研究为中亚白及多糖在功能性食品和药品开发中的应用提供了理论依据。

关键词: 中亚白及, 多糖, 甲基化, 二维核磁, 抗炎活性

中图分类号: TS255.1　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)08−0100−09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025040212　　本文网刊:

Structural Elucidation and Anti-inflammatory Activity of Neutral Polysaccharide from *Orchis chusua* D. Don

YANG Zhiyan[1], WANG Yufan[1], AYZUKRAM Yasen[1,2], WANG Yanli[1], WEI Ruijie[1], GU Yulu[1], REHEBATI Nuerxiati[1,2,*], HULSIDAN Inumu[3,*]

(1.Xinjiang Key Laboratory of Clean Conversion and High Value Utilization of Biomass Resources, School of Chemistry and Chemical Engineering, Yili Normal University, Yining 835000, China;
2.Key Laboratory of Natural Product Chemistry and Application, Department of Education, Xinjiang Uygur Autonomous Region, School of Chemistry and Chemical Engineering, Yili Normal University, Yining 835000, China;
3.Xinjiang Uygur Autonomous Region, Xinjiang Medical University, Urumqi 830017, China)

Abstract: To systematically investigate the structural features and anti-inflammatory activity of neutral polysaccharide (USP-N) from *Orchis chusua* D. Don, a medicinal and edible plant was selected. The structure of USP-N was comprehensively elucidated through partial acid hydrolysis, Smith degradation, methylation analysis, and 2D-NMR

收稿日期: 2025−04−17

基金项目: 中央引导地方科技发展资金项目（ZYYD2025CG18）; 新疆维吾尔自治区“天池英才”引进计划（2023TCYCQNBS03）; 棉籽残渣多糖的活性成分研究（S202410764029）。

作者简介: 杨智艳（1999−）, 女, 硕士, 研究方向: 天然药物化学, E-mail: 2908261537@qq.com。

*** 通信作者:** 热合巴提·努尔夏提（1993−）, 男, 博士, 副教授, 研究方向: 天然药物化学, E-mail: rehebatinuerxiati17@mails.ucas.ac.cn。
胡尔西丹·伊麻木（1971−）女, 博士, 副教授, 研究方向: 中药学, E-mail: 13699985912@163.com。

spectroscopy. Its anti-inflammatory effects were evaluated using a zebrafish inflammation model. Structural analysis revealed that the main chain of USP-N was composed of alternating β-1,4-linked glucose (38.5%) and mannose (33.8%), forming a glucomannan backbone. The side chains contained small amounts of rhamnose, arabinose, and galactose, with some mannose residues featuring 2-O-acetyl groups. Bioactivity assays demonstrated that USP-N treatment significantly suppressed LPS-induced nitric oxide (NO) release (P<0.0001) and inhibited neutrophil migration to the tail injury site in zebrafish (P<0.0001). Furthermore, dose-dependent reductions in neutrophil and macrophage recruitment to the caudal region following mechanical injury were observed. This study provides a theoretical foundation for applying *Orchis chusua* D. Don polysaccharides in functional foods and pharmaceutical development.

Key words: *Orchis chusua* D. Don; polysaccharide; methylation; 2D NMR; anti-inflammatory activity

中亚白及为兰科植物广布红门兰(*Orchis chusua* D. Don), 又称欧白及、苏拉普等[1], 生长在潮湿地带, 在我国主要分布于新疆、吉林、黑龙江, 国外分布于中亚、伊朗、埃及、巴尔干等地[1−3]。中亚白及是一种药食同源植物[4], 将其加至牛奶或热水中便可作为咖啡和酒的替代饮品[5], 此外, 还可以作为增稠剂和稳定剂添加到饮料和冰淇淋中[5−7]。《中国药典维吾尔药分册》记载中亚白及具有壮阳生精、养心生血的功效,《维吾尔药志》中记载中亚白及主要功效为强筋骨、去痛止血,《中华本草-维吾尔药卷》记载中亚白及为温肾壮阳、生湿生热。现代医学研究表明中亚白及用于治疗结核病、温肾壮阳、降血脂、免疫调节、胃疾病、关节炎、肿瘤及炎症等[2,8]。主要成分碳水化合物的研究也较多, 据Şen 等[5] 报道, 中亚白及碳水化合物占据 7%~61%, 不同来源的中亚白及碳水化合物中淀粉含量差别较大, 其中 *Orchis* 和 *Anacamptis* spp 属中葡甘聚糖含量较高。但是, 中亚白及结构尚未被明确, 而白及多糖被鉴定为主要由 β-1,4-连接的甘露糖、β-1,4-连接的葡萄糖构成[9−11], 且经研究发现, 白及多糖具备抗炎、抗氧化、抗病毒、抗内毒素、降血脂、降血糖和改善肠道微生物环境的作用[12]。本课题组前期研究发现, 中亚白及中性多糖 USP-N 具有良好的体外抗炎活性[13], 但是其体内抗炎活性及结构尚未被确定。

因此, 本研究拟对 USP-N 开展“部分酸水解-甲基化-二维核磁”为核心手段的结构解析, 再经脂多糖(LPS)诱导及机械损伤的斑马鱼双炎症模型评价其抗炎活性, 以期为中亚白及的功能性食品及药物的开发与利用提供理论基础。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

中亚白及　由新疆恩萨尔药业提供, 经中科院新疆生态所冯缨研究员鉴定; 透析袋(3500 Da)　北京瑞达恒辉科技发展有限公司; 转基因斑马鱼品系 Tg(lyz:EGFP/mpeg1:EGFP)　国家斑马鱼资源中心; 无水 DMSO、碘甲烷　分析纯, 北京索莱宝科技有限公司; 赤藓醇、丙三醇　北京酷来搏科技有限公司; 吲哚美辛、LPS　上海泰坦科技股份有限公司; DEAE-52、Sephadex G-100　北京索拉生物公司; 其余试剂均为国产分析纯。

PR124ZH/E 电子分析天平　上海舜宇恒平科学仪器有限公司; LC-101 干燥箱、CENCE-H1850 离心机　上海力辰邦西仪器科技有限公司; D-8PC 紫外分光光度计　让奇仪器科技有限公司; GC-2014C 气相色谱仪　日本岛津公司; BSZ-100 自动收集器　上海嘉鹏科技有限公司; WH240-HT 磁力搅拌器　德国海道尔夫公司; JHD-001 氮吹仪　上海极恒电机有限公司; Vnmrs 600 核磁共振仪　美国 Varian 医疗系统公司; MSD 体式荧光显微镜　迈时迪(东莞)科技有限公司; 7890A-5975C 气质　安捷伦科技有限公司; RE-201 旋转蒸发仪　郑州科达机械仪器设备有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　USP-N 多糖的制备　USP-N 经课题组前期研究方法制备[13], 具体如下: 中亚白及经石油醚脱脂、乙醇脱色素、水提醇沉、DEAE-52 阴离子交换树脂及 Sephadex G-100 凝胶柱分离纯化获得。

1.2.2　USP-N 的结构表征

1.2.2.1　USP-N 的部分酸水解　水解: 取 200 mg USP-N, 先用 20 mL, 0.01 mol/L 三氟乙酸于 100 ℃ 水解 1 h, 透析 2 d。透析袋外溶液经浓缩、冷冻干燥得 0.01 mol/L 外样品; 将透析袋内液体冷冻干燥, 继续用 0.03 mol/L 三氟乙酸同等条件下水解, 透析袋透析, 收集袋外样品, 并冷冻干燥得 0.03 mol/L 袋外样品; 袋内样品冷冻干燥后, 继续用 0.05 mol/L 三氟乙酸同等条件下水解, 并同上面处理。最终分别得到 0.01、0.03、0.05 mol/L 袋外样品及 0.05 mol/L 袋内样品。样品经 2 mol/L TFA 于 115 ℃ 水解 6 h。水解产物溶于甲醇后蒸发除酸, 再与盐酸羟胺/吡啶在 90 ℃ 反应 30 min 进行衍生化。冷却后, 加入乙酸酐并于 90 ℃ 反应 30 min 乙酰化。产物经氮吹浓缩, 复溶于二氯甲烷供气相色谱(GC)分析, 气相分析参考文献 [14] 的方法。

1.2.2.2　USP-N 的高碘酸氧化-Smith 降解分析　取 20 mg 的多糖样品溶于 20 mL, 0.015 mol/L 高碘酸钠中, 在黑暗中氧化反应 7 d。随后, 加入 2 mL 乙二醇终止反应, 透析 48 h。透析液浓缩至 5 mL 左右, 加入 50 mg 硼氢化钠还原反应 4 h, 然后用 36% 的乙酸中和, 再次彻底透析, 冷冻干燥, 得到 Smith 降解产物。参考文献 [14] 对所得样品进行气相色谱分析,

与单糖标准品、丙三醇、赤藓醇对比，得出降解组分。

1.2.2.3 USP-N 的糖苷键连接方式分析 甲基化衍生：10 mg 多糖样品于湿度为 0 的防潮柜中干燥 7 d，将干燥后样品充分溶解于 2 mL 无水二甲基亚砜中，加入 200 mg NaOH 粉，在氮气保护下反应 4 h。之后同样在氮气保护下，于冰水浴中缓慢加入 1 mL 碘甲烷（约 35 min 内完成），并在黑暗处反应 3 h。反应结束后，加少量水停止反应，用旋转蒸发仪除去剩余的碘甲烷。随后，用二氯甲烷萃取 3~5 次，减压浓缩除去溶剂，加入 5 mL 三氟乙酸于 100 ℃ 水解 6 h。水解液加入甲醇反复蒸干，加入 500 μL 氨水（2 mol/L）和 500 μL 硼氢化钠（1 mol/L）还原 3 h，用 25% 乙酸中和反应，再次加入甲醇反复蒸干。最后，加入 2.5 mL 乙酸酐，充分混匀，于 100 ℃ 反应 2.5 h。反应停止后用二氯甲烷萃取 3~5 次，过滤头，供气相 GC-MS 分析。GC-MS 条件：HP-5 MS 柱（30 m×250 μm 0.25 μm）。温度程序：初温 140 ℃，保持 2 min，然后以 3 ℃/min 上升到 230 ℃，并保持 2 min。质谱结果与 PMAA 数据库及文献 [15] 对比，归属糖残基，其相对含量之比为 GC 峰面积之比。

1.2.2.4 USP-N 的核磁分析 取 30 mg 多糖样品经弱酸（0.05 mol/L，90 ℃，1 h）水解后溶解在 0.5 mL 的 D_2O（纯度为 99.9%）中，置于核磁管中，然后加入 300 μL TMS 内标备用。^{1}H NMR、^{13}C NMR、HSQC、COSY、HSQC-TOCSY、HMBC 和 NOESY 光谱分别在 600 MHz 和 150 MHz 的核磁共振仪上分析。

1.2.3 生物活性评价

1.2.3.1 斑马鱼胚胎的准备 参照文献 [16] 的方法，实验选用 Tg(lyz:EGFP)/Tg(mpeg1:EGFP)转基因斑马鱼成体（Danio rerio），饲养于循环水养殖系统，水质参数严格调控（温度：28±0.5 ℃；pH：6.8±0.5；光周期：14 h 光照/10 h 黑暗）。选择性成熟健康个体（雌雄比 1∶2）置于交配缸内，通过分隔板隔离预适应 24 h。次日光周期启动时移除分隔板，诱导自然交配行为，并于产卵后 1~3 h 内收集受精卵至 Φ50 mm 培养皿中。胚胎经 3×E3 胚胎培养液（5 mmol/L NaCl，0.17 mmol/L KCl，0.33 mmol/L $CaCl_2$，0.33 mmol/L $MgSO_4$）清洗后，转移至 28±0.5 ℃ 恒温培养箱进行标准化发育培养。

1.2.3.2 斑马鱼毒性实验 参照文献 [17] 的方法选取 Tg(lyz:EGFP)转基因斑马鱼配对产卵后获得健康胚胎，经无水乙醇预消毒的 6 孔板中每孔植入 30 枚同步化至 8 hpf（hours post fertilization）的发育正常胚胎，以 Danieau's 缓冲液为暴露体系，设置空白对照组及 5 个浓度梯度实验组（4、2、1、0.5、0.25 mg/mL），每组 3 个平行孔。将母液按预设浓度梯度稀释后加入对应孔中，终体积为 3 mL/孔，于 28±0.5 ℃ 恒温培养箱中连续暴露 72 h。暴露期间每日观察胚胎存活率、畸形表型及发育阻滞情况，通过死亡终点法统计累积死亡率，采用概率单位回归法计算半数致死浓度（EC_{50}），评估 USP-N 急性毒性效应。

1.2.3.3 基于 LPS 诱导斑马鱼炎症模型的抗炎活性评价 本研究以 3 日龄（3 dpf）斑马鱼胚胎为模型，通过 LPS 诱导构建炎症体系：将 1 mg/mL LPS 母液稀释至 1 μg/mL，处理自然破膜后的正常胚胎（30 尾/孔）1 h 建立炎症模型，随后分别给予阳性药吲哚美辛（0.5 mmol/L）及 USP-N 梯度浓度（1、0.5、0.25 mg/mL）干预 2 h。通过体式荧光显微成像定量分析斑马鱼尾部中性粒细胞迁移数量，并采用 Griess 试剂法检测胚胎匀浆上清中一氧化氮（NO）含量。实验全程于 28±0.5 ℃ 恒温条件下进行，每组设置 3 个生物学重复[18]。

1.2.3.4 USP-N 对机械损伤斑马鱼尾鳍的治疗 参考文献 [19] 的试验方法，选用健康 Tg(lyz:EGFP)/Tg(mpeg1∶EGFP)双转基因斑马鱼（雌雄比 1∶2 交配产卵），筛选 3 dpf 发育正常幼鱼随机分配至 24 孔板（10 尾/孔）。实验分为空白对照组（未处理）、炎症模型组（尾鳍截断术诱导局部炎症）、阳性对照组（0.5 mmol/L 吲哚美辛）及中亚白及中性多糖高、中、低剂量组（高：1 mg/mL、中：0.5 mg/mL、低：0.25 mg/mL）。各组幼鱼经显微操作平台（40×物镜）下实施标准化尾鳍机械损伤后静置 2 h，随后分别加入 1 mL 对应浓度干预溶液，持续暴露 2 h。干预后 0、1、2 h 通过体式荧光显微镜（488 nm 激发波长）动态追踪中性粒细胞（lyz:EGFP+）与巨噬细胞（mpeg1:EGFP+）向损伤部位的迁移行为，采用 ImageJ 软件定量分析荧光强度时空分布特征，构建 USP-N 抑制免疫细胞趋化的时效关系曲线。实验全程于 28±0.5 ℃ 恒温条件下进行，每组设置 3 个生物学重复。

1.3 数据处理

本研究使用 Excel 2016、Origin 2024 和 GraphPad Prism 10 软件，对平行三组实验数据进行分析和绘图。数据以平均值±标准偏差（$\bar{x}$±SD）表示，组间显著性差异采用单因素方差分析（One-way ANOVA）结合 Tukey 事后检验（P<0.05）进行判定。

2 结果与分析

2.1 部分酸水解分析

部分酸水解常被应用于剖析植物多糖骨架以及支链的单糖构成情况。多糖的主链相较于支链而言，具备更高的稳定性；同时，吡喃糖在稳定性方面要优于呋喃糖。基于此特性，本文采用逐级酸水解的方式来展开研究。对水解部分与未水解部分分别实施单糖分析，以此获取关于支链以及主链的单糖组成信息[20]。对 USP-N 进行部分酸水解实验，来推断出主链及侧链主要的单糖组成，结果如图 1（USP-N）。从结果中可以推断出对于中性多糖，当水解浓度为 0.01 mol/L 时，袋外单糖组成为鼠李糖、阿拉伯糖、

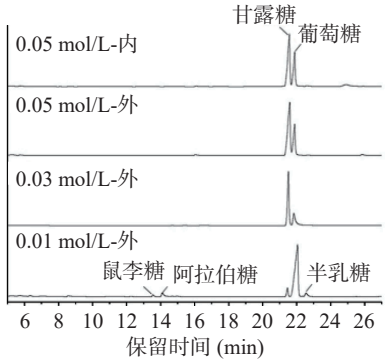


图 1　USP-N 的部分酸水解气相色谱图

Fig.1　GC chromatogram of partial acid hydrolysis of USP-N

半乳糖和葡萄糖，推断出鼠李糖、阿拉伯糖和半乳糖分布在侧链上，而当水解浓度为 0.03 mol/L 和 0.05 mol/L 时，葡萄糖和甘露糖均存在，且比例变化不大，因此推断出葡萄糖和甘露糖较均匀地分布在主链上，且在 0.05 mol/L 袋内未发现鼠李糖、阿拉伯糖和半乳糖。综上，鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖只存在于支链中，而主链中只有葡萄糖和甘露糖。

2.2　Smith 降解分析

如图 2 所示，中亚白及中性多糖 Smith 降解产物均主要含有赤藓醇，表明 USP-N 主要以 1→4 连接的方式存在。不同的是，在前期研究中发现酸性中亚白及多糖还检测到了少量的葡萄糖和甘露糖，表明还含有少量的未被高碘酸氧化的糖苷键，如 1→3、1→3,6、1→2,3、1→2,4、1→3,4、1→2,3,4 连接[21]。

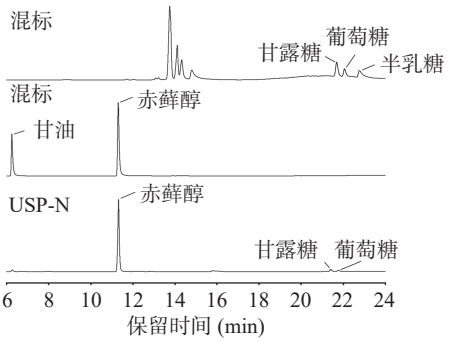


图 2　USP-N 的 Smith 降解气相色谱图

Fig.2　Gas chromatogram of Smith degradation products of USP-N

2.3　甲基化分析

中亚白及中性多糖的甲基化分析结果如图 3 和表 1 所示，中亚白及均一中性多糖经甲基化分析共得到 6 种单糖连接方式，其中主要是 1→4 连接的葡萄糖（23.14%）和甘露糖（59.23%）。除此之外，还存在少量的 T→甘露糖（11.29%）、1→2,4 甘露糖（0.41%）、1→4,6 葡萄糖（0.66%）。此结果与前期实验，单糖分子，Smith 降解结果一致[13]。

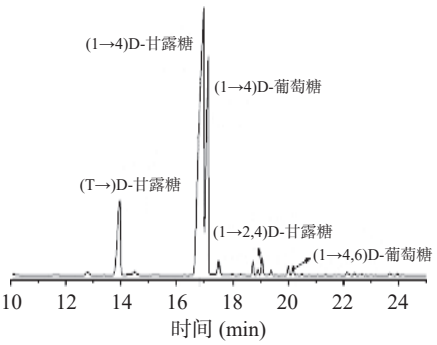


图 3　USP-N 的甲基化分析气相色谱图

Fig.3　GC chromatogram of USP-N methylation analysis

2.4　核磁解析

核磁共振波谱是复杂多糖结构分析中最有效的技术。USP-N 的一维及二维核磁图谱如图 4 所示，氢谱中化学位移 4.79 ppm 处出现的强信号是由 HDO 引起的，可以作为其他峰的参考。^{13}C 核磁共振波谱中化学位移在 96~103 ppm 处的信号与端基碳有关，而化学位移在 62~81 ppm 附近的密集峰则与糖苷其他碳相对应。端基质子信号分布于 4.4~5.5 ppm，提示 USP-N 既存在 α 型糖苷键也存在 β 型糖苷键。在碳谱端基区域主要出现 3 个端基碳，分别位于 102.84、103.01 和 105.38 ppm 处，分别标记为残基 A，残基 B 和残基 C。此外，在图 4a 氢谱中 2.19 ppm 处和图 4b 碳谱中 23.42 ppm 处存在相关 6 去氧残基，结合单糖分析及甲基化结果，推断可能是由于残留的乙醇造成的[22]。

对于残基 A（105.38 ppm），经 HSQC 找到相对应的端基 H 的化学位移为 4.53 ppm，表明残基 C 也为 β 型糖苷键；利用 HSQC-TOCSY 谱，找到于 4.53 ppm 相对应的信号分别为 75.69、76.77、81.44、74.41 ppm；这些碳信号利用 HSQC 找到相对应的 H 的化学位移，结果经 TOCSY 谱验证。推断出 C1-C5 的化学位移分别为 105.38、75.69、76.77、81.44、74.41、和 63.27 ppm。根据四位碳信号的低场移动

表 1　USP-N 的甲基化 GC-MS 分析结果

Table 1　GC-MS analysis results of methylated USP-N

糖残基	连接方式	碎片离子	峰面积(%)
1,5-二-O-乙酰基-1-氢-2,3,4,6-四-O-甲基-D-甘露醇	T链接的吡喃型甘露糖	129, 161, 117, 101	11.29
1,5,6-三-O-乙酰基-1-氢-2,3,4-三-O-甲基-D-半乳糖醇	1,6链接的吡喃型半乳糖	131, 117, 101, 87	0.89
1,4,5-三-O-乙酰基-1-氢-2,3,6-三-O-甲基-D-甘露醇	1,4链接的吡喃型甘露糖	233, 117, 113, 101	59.23
1,4,5-三-O-乙酰基-1-氢-2,3,6-三-O-甲基-D-葡糖醇	1,4链接的吡喃型葡萄糖	233, 117, 113, 101	23.14
1,2,4,5-四-O-乙酰基-1-氢-3,6-二-O-甲基-D-甘露醇	1,2,4链接的吡喃型甘露糖	189, 129, 113, 87	0.41
1,4,5,6-四-O-乙酰基-1-氢-2,3-二-O-甲基-D-葡糖醇	1,4,6链接的吡喃型葡萄糖	127, 117, 101, 85	0.66

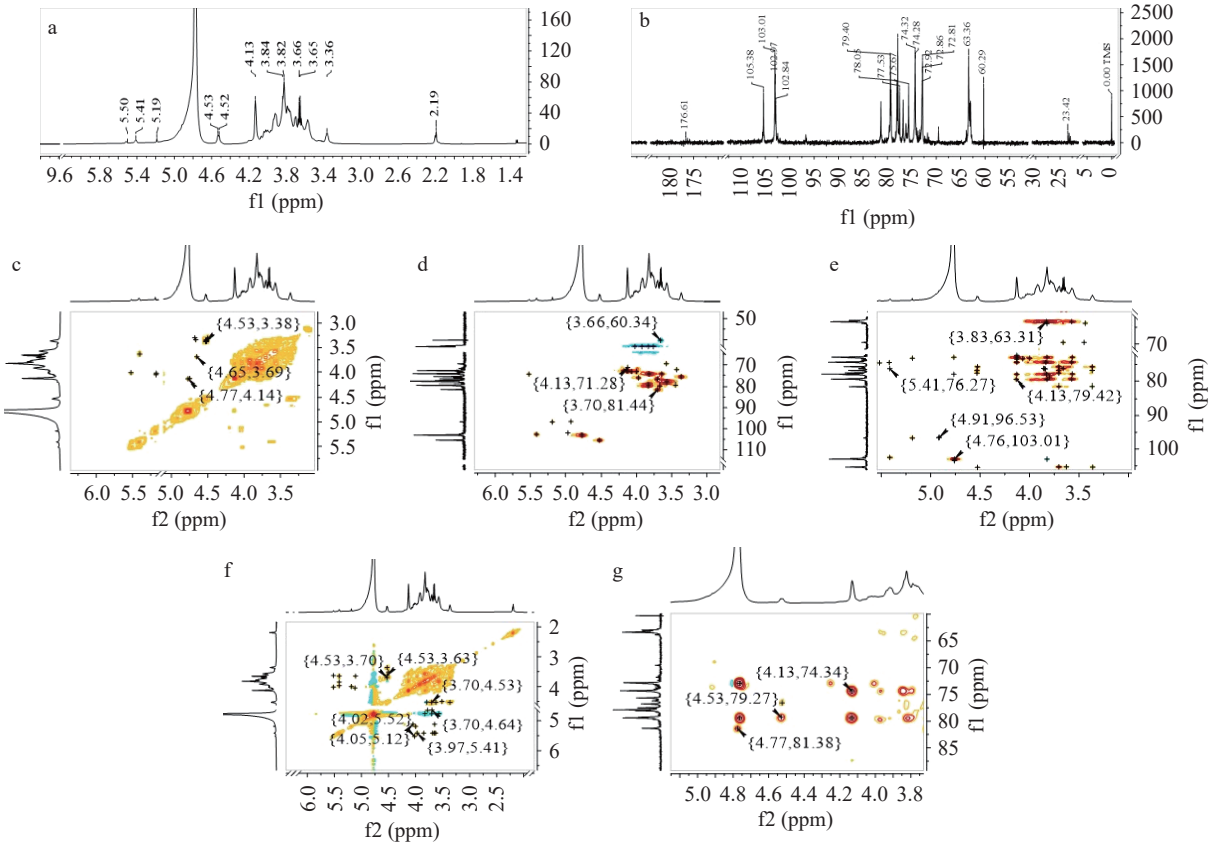


图 4　USP-N 的核磁图谱

Fig.4　NMR spectrum of USP-N

注: a: ^{1}H; b: ^{13}C; c: $^{1}H^{1}H$COSY; d: $^{1}H^{13}C$, HSQC-EDITED; e: $^{1}H^{13}C$, HSQC-TOCSY; f: $^{1}H^{1}H$, TOCSY; g: $^{1}H^{13}C$, HMBC。

表 2　USP-N 的主要糖残基化学位移归属结果

Table 2　Assignment results of major sugar residues in USP-N

H1/C1(ppm)	H2/C2(ppm)	H3/C3(ppm)	H4/C4(ppm)	H5/C5(ppm)	H6/C6(ppm)	糖残基
4.53/4.52 105.38	3.36 75.69	3.70 76.77	3.70 81.44	3.63 74.41	3.93/3.76 63.27	→4)-*β*-Glc*p*-(1→
4.76 103.01	4.13 72.94	3.82 74.41	3.83 79.26	3.57 78.02	3.83/4.02 63.36	→4)-*β*-Man*p*-(1→
5.41 102.84	5.52 74.50	4.01 73.23	3.85 79.49	3.98 76.26	3.65 60.34	→4)-*α*-Man*p*-(1→2-OAC

文献 [22–23], 推导出残基 A 为 *β* 构型的 1→4 葡萄糖, 归属结果如表 2 所示。

对于残基 B(103.01 ppm), 通过 HSQC 找到异头氢为 4.76 ppm, 表明为 *β* 构型。在 HSQC-TOCSY 谱中, 4.76 ppm 对应的相关碳信号为 72.94、74.41、78.02、79.49 ppm; 经 HSQC 找到相对应的 H 的信号分别为 4.13、3.82、3.57 及 3.83 ppm, 此结果也得到 TOCSY 的验证; 结果与 COSY 谱, 甲基化结果及文献 [22–23] 相结合, 推断出 C1~C6 的化学位移分别为 103.01、72.94、74.41、79.49、78.02、63.36 ppm。根据 4 位碳信号的低场移动及文献 [22–23], 推导出残基 B 为 *β* 构型的 1→4 甘露糖, 归属结果如表 2 所示。

对于残基 C(102.84 ppm), 于 HSQC 上出现交叉峰 5.41 ppm, 归属为 H-1, 表明为 *α* 构型; 利用 COSY 找到 H-2 的化学位移信号值为 5.52 ppm, 在 HSQC 上对应的 C-2 为 74.50 ppm; 5.52 在 COSY 谱上于 4.01 ppm 处现交叉峰; 此结果结合氢谱中 2.19 ppm 处和碳谱中 23.42、176.61 ppm 处的乙酰基信号, 再结合文献 [22], 推断出残基 A 归属为 2-O-乙酰化的甘露糖, 然后利用 TOCSY 和 COSY 推导得 H-4、H-5 及 H-6 化学位移信号值分别为 3.85、3.98 和 3.65 ppm 并通过 HSQC 推导出相对应的 C-4, C-5 和 C-6 的化学位移信号值, 分别为 79.49、76.26 和 60.34 ppm。根据 4 位碳的低场移动, 并结合文献 [22–23], 推导出残基 C 为 O-2 乙酰化的 *α* 构型的 1→4 甘露糖, 归属结果如表 2 所示。

HMBC 把 H 核与长程耦合的 C 核关联起来, 能提供多糖的骨架信息。对于残基 A, 即对于 1→4 葡萄糖, 其端基质子(4.53 ppm)与 79.49 ppm(1→4 甘露糖的第四个碳)有较强的交联信号, 表明 1→4 葡萄糖的端基氢连接与 1→4 甘露糖的四位碳。对于残基 B, 即对于 1→4 甘露糖, 其端基质子(4.76 ppm)

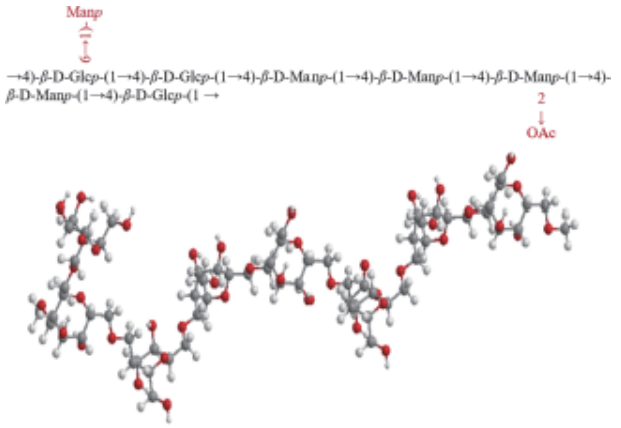


图 5　USP-N 可能的结构重复片段

Fig.5　Possible structural repeats of USP-N

与 79.49 ppm(残基 B 的第四个碳、残基 C 的第四个碳)和 81.38 ppm(残基 A 的第四个碳)有较强烈的交联信号，表明 1→4 甘露糖与 1→4 甘露糖、O-2 乙酰化的 1→4 甘露糖以及 1→4 葡萄糖均有通过 O-4 连接。对于残基 C，即 O-2 乙酰化的 1→4 甘露糖的端基质子在 HMBC 谱中没有发现交联信号。此结果经借鉴文献 [22,24−28]，并与单糖分析、Smith 降解、部分酸水解及多糖甲基化 GC-MS 分析等结合，推断出 USP-N 多糖可能的主要重复片段如图 5 所示。

2.5　斑马鱼毒性实验结果分析

如图 6 所示，实验结果表明，USP-N 对斑马鱼胚胎的毒性效应呈现显著浓度依赖性：暴露 72 h 后，当药物浓度≥2 mg/mL 时，胚胎累积死亡率达 100%；而浓度≤1 mg/mL 时，存活率维持 100%，据此确定其安全阈值为≤1 mg/mL。基于此，实验设计以 4 mg/mL 为最高浓度，按 2 倍梯度稀释法设置 5 组浓度梯度(4、2、1、0.5、0.25 mg/mL)，每组 3 个生物学重复(30 胚胎/组)，半数致死浓度(EC_{50})为 1.90845 mg/mL。

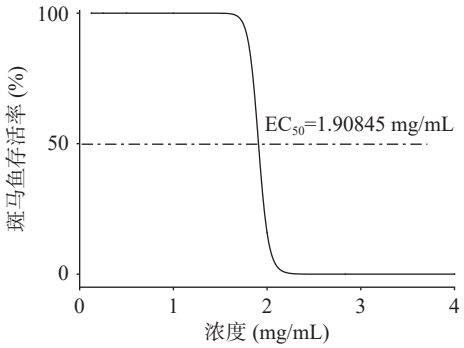


图 6　USP-N 对斑马鱼的毒性实验

Fig.6　Toxicity experiment of USP-N on zebrafish

2.6　LPS 诱导斑马鱼炎症模型的抗炎活性

中性粒细胞与巨噬细胞作为固有免疫系统的重要组成部分，参与机体内各种炎症反应、预防和修复，在免疫系统里有着不可或缺的地位[29−32]。二者均是存在于血液里的细胞，人体一旦产生炎症，这两种细胞会随着血液流动到达病灶。作为内源性气体信号分子，一氧化氮(NO)在炎症调控网络中具有双重调节作用[25]。研究表明，NO 能够通过抑制炎症细胞的活化和迁移，减少炎症因子的产生，从而有效缓解炎症症状[33]。临床应用中，NO 供体药物已被用于治疗多种炎症性疾病，显示出良好的抗炎效果和安全性[34]。

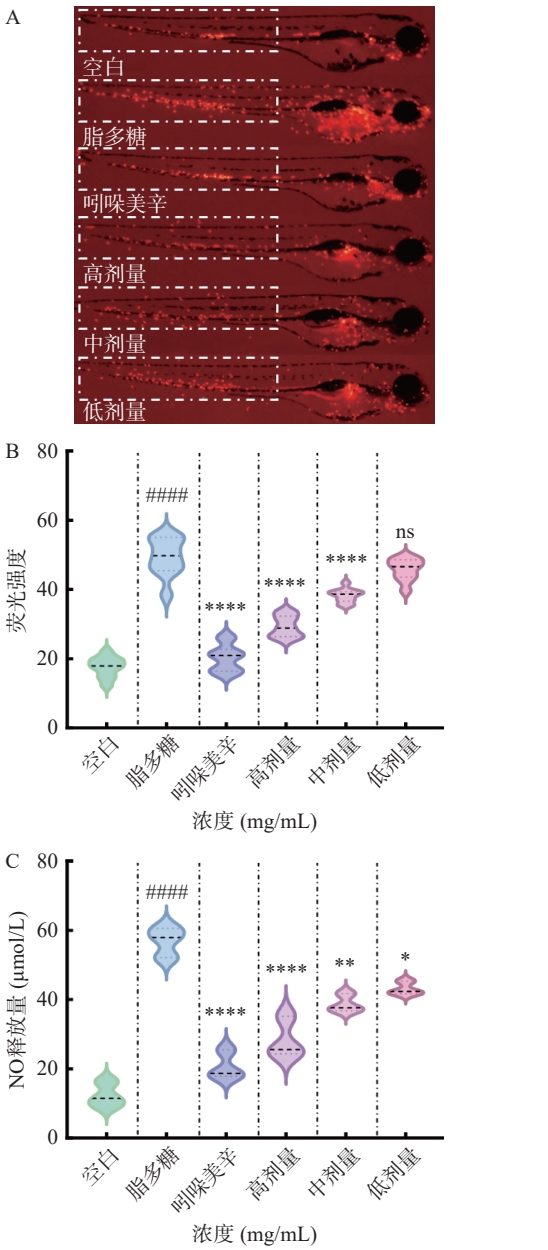


图 7　USP-N 对斑马鱼体内中性粒细胞的迁移

Fig.7　USP-N migration of neutrophils in zebrafish

注：A 图代表斑马鱼体内中性粒细胞的迁移；B 图是斑马鱼体内中性粒细胞数量迁移后荧光强度的量化；C 图是斑马鱼体内 NO 的释放；高、中、低：1、0.5、0.25 mg/mL；脂多糖：1 μg/mL；#表示与空白组相比，模型组差异显著，P<0.05；####表示 P<0.0001；*表示与模型组相比，数据差异显著，P<0.05；****表示 P<0.0001、***表示 P<0.001、**表示 P<0.01；ns 表示数据没有显著性差异；图 8 同。

本研究结果显示，LPS 刺激可显著诱导斑马鱼中性粒细胞浸润(图 7A 和图 7B)，同时伴随体内一氧化氮(NO)水平异常升高(图 7C)，通过抑制诱导型

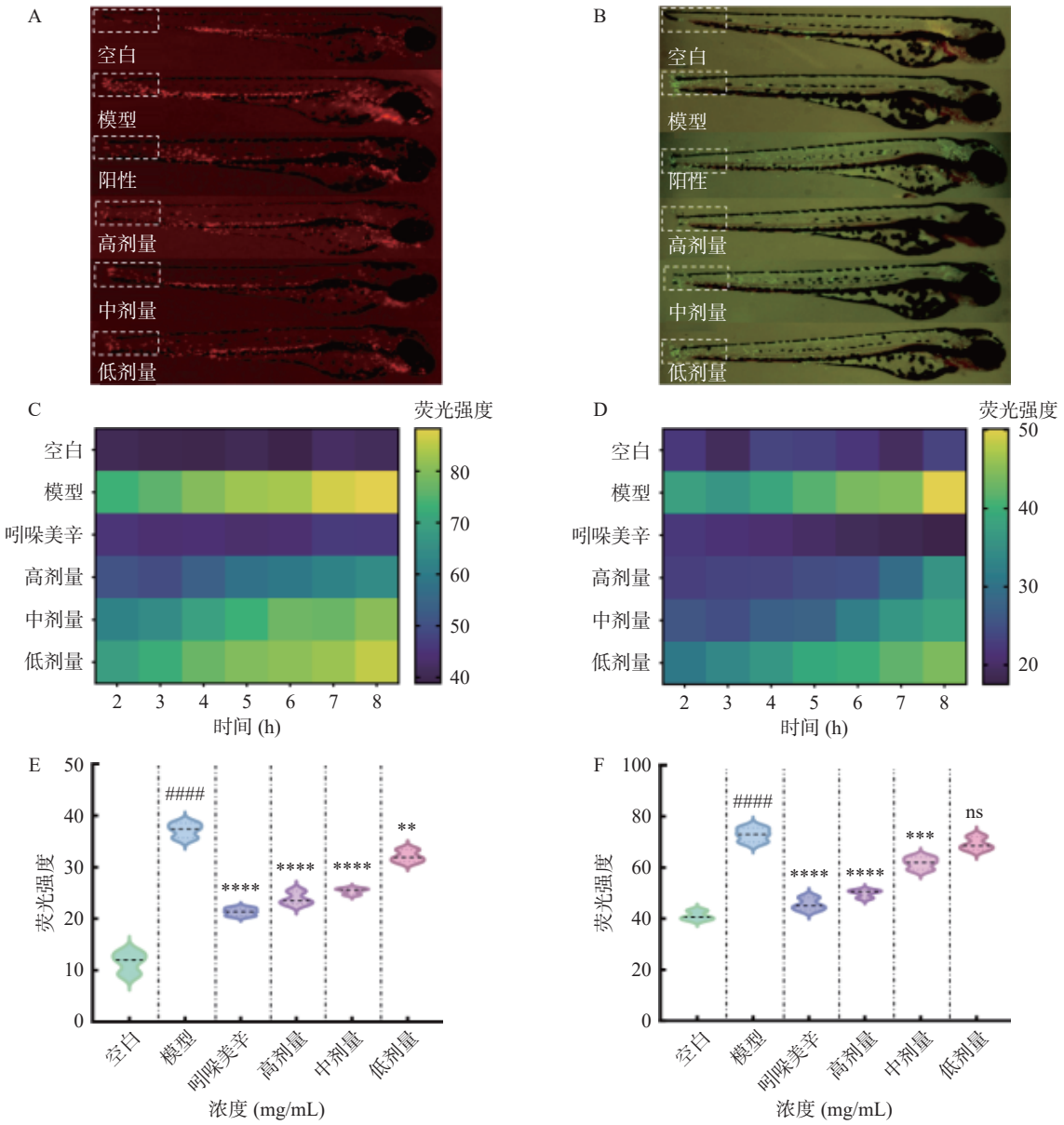


图 8　USP-N 对断尾的斑马鱼体内中性粒细胞和巨噬细胞的迁移

Fig.8　USP-N migration of neutrophils and macrophages in zebrafish with docked tails

注: A 代表斑马鱼断尾后体内中性粒细胞的迁移; B 代表斑马鱼断尾后体内巨噬细胞的迁移; C 为斑马鱼体内中性粒细胞数量迁移后荧光强度的量化; D 为斑马鱼体内巨噬细胞数量迁移后荧光强度的量化; E 为 USP-N 对斑马鱼体内中性粒细胞数量迁移时效关系; F 为 USP-N 对斑马鱼体内巨噬细胞数量迁移时效关系。

一氧化氮合酶(iNOS)介导的 NO 过量生成, 阻断炎症信号级联反应, 证实其系统性炎症模型的有效性。经 USP-N 干预后, 中性粒细胞向损伤部位的趋化行为及 NO 释放水平呈现显著剂量依赖性抑制: 高剂量组(1 mg/mL)可分别减少中性粒细胞募集和降低 NO 含量, 其效应强度与阳性对照药吲哚美辛无统计学差异(P>0.05)。推测 USP-N 的药理效应可能与其特有的乙酰化修饰分子构象密切相关[35−38], 上述结果为阐明中亚白及中性多糖的抗炎作用提供了关键实验基础, 并为其在炎症性疾病治疗中的应用提供了科学依据。

2.7　USP-N 对斑马鱼断尾后体内中性粒细胞及巨噬细胞迁移的影响

通过机械损伤斑马鱼尾鳍构建炎症模型的研究表明, 在断尾术后 2 h, 转基因荧光标记技术(图 8A 和图 8B)可实时示踪中性粒细胞与巨噬细胞向损伤部位的显著聚集现象。在维持斑马鱼存活的前提下, 采用间隔 1 h 的连续影像记录模式进行 8 h 动态监测(图 8C 和图 8D, 进一步建立时效关系。经定量分析(图 8E 和图 8F), USP-N 表现出剂量依赖性的抗炎活性, 高剂量显著降低炎症细胞浸润水平。结果表明, USP-N 的最佳干预时间为给药后 2~3 h, 超逾 3 h 后, 药效消失并伴随荧光强度反弹, 表示其抗炎作用具有严格的时间敏感性。USP-N 可通过调节中性粒细胞与巨噬细胞的迁移, 有效抑制斑马鱼炎症反应。

乙酰基化在抗炎方面具有多种机制和广泛的临床应用前景, 乙酰基化可以有效减轻炎症反应[39], 肖玉立[40] 研究发现不同浓度的乙酰化金针菇子实体多

糖对高脂饮食诱导的高血脂小鼠的血脂异常、抗炎症、抗氧化和脂肪堆积情况的影响；Tang 等[41] 研究发现羊肚菌多糖经乙酰化修饰之后，其抗氧化活性及肝癌细胞抑制率增加，此外，研究发现油茶籽粕、香菇柄多糖、松树蕈多糖等经乙酰化修饰后，抗氧化活性均增强[42−44]。为此，USP-N 的药理效应可能与其特有的乙酰化基团密切相关。

3　结论

本研究系统解析了中亚白及中性多糖（USP-N）的精细结构特征，其在斑马鱼双炎症模型（LPS 刺激与机械损伤）中展现出显著抗炎活性。结构表征表明，USP-N 以 1→4-β-D-葡甘聚糖为主链骨架（葡萄糖与甘露糖摩尔比≈1.14∶1），侧链含少量鼠李糖、阿拉伯糖及半乳糖；功能研究证实其可剂量依赖性抑制炎症介质 NO 释放（P<0.0001），并通过双重调控中性粒细胞与巨噬细胞的趋化迁移，显著降低损伤部位炎症细胞浸润密度（P<0.0001）。不同于传统 β-葡聚糖或甘露聚糖，USP-N 独特的葡-甘露聚糖杂化骨架及高乙酰化构成其创新性结构基础，在斑马鱼模型中揭示乙酰化多糖通过免疫细胞迁移实现抗炎。由此，1→4 链接的葡甘聚糖主链与乙酰化基团的协同效应可能是 USP-N 抗炎活性的核心活性部位。该发现为以后深入研究中亚白及多糖抗炎构效关系提供思路，未来研究还需深入解析 USP-N 与特定受体的结合模式及下游信号通路，量化乙酰化位点与取代度对抗炎活性的影响，并在哺乳动物模型中验证其转化潜力。

© The Author(s) 2026. 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］ 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 维吾尔药卷[M]. 上海：上海科学技术出版社, 2005. ［Editorial Board of Chinese Materia Medica, State Administration of Traditional Chinese Medicine. Chinese materia medica, Uyghur medicine volume [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2025.］

［2］ HOSSAIN M M. Therapeutic orchids: Traditional uses and recent advances-An overview[J]. Fitoterapia, 2011, 82(2): 102−140.

［3］ 中华人民共和国卫生部药典委员会.《药品标准 维吾尔药分册》[M]. 乌鲁木齐：新疆科技卫生出版社, 1999. ［Pharmacopoeia Commission of the Ministry of Health of the People's Republic of China. Uygur medicine fascicle[M]. Urumqi: Xinjiang Science and Technology Health Press, 1999.］

［4］ 杨建波, 于新兰, 刘欣欣, 等. 新疆维吾尔药材质量标准研究现状与建议[J]. 药物评价研究, 2023, 46(4): 693−703. ［YANG Jianbo, YU Xinlan, LIU Xinxin, et al. Research status and suggestions on quality standards for Uygur medicinal materials in Xinjiang[J]. Drug Evaluation Studies, 2023, 46(4): 693−703.］

［5］ ŞEN M A, PALABIYIK I, KURULTAY Ş. Composition, viscosity and solubility of saleps from twenty different orchid (Orchidaceae) species[J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2018, 12(2): 1334−1339.

［6］ KURT A, KAHYAOGLU T. Gelation and structural characteristics of deacetylated salep glucomannan[J]. Food Hydrocolloids, 2017, 69: 255−263.

［7］ KAYA S T A R. The effect of salep content on the rheological characteristics of a typical ice-cream mix[J]. Journal of Food Engineering, 2001, 47(1): 59−62.

［8］ 买买提祖农·买苏尔, 古丽沙依拉·队三拜, 张盼盼, 等. 异常黏液质型阳痿病证大鼠生精细胞凋亡及伊木萨克片干预研究[J]. 新疆医科大学学报, 2016, 39(5): 542−545. ［MAIMAITIZUNON Maisur, GULSHAYLA Team Sanbai, ZHANG Panpan, et al. Apoptosis of spermatogenic cells in rats with abnormal mucinous impotence syndrome and the intervention of Imusak tablets[J]. Journal of Xinjiang Medical University, 2016, 39(5): 542−545.］

［9］ 汪琪琪. 发酵白及多糖制备、结构表征及益生元活性研究[D]. 武汉：湖北中医大学, 2024. ［WANG Qiqi. Study on preparation, structural characterization and prebiotic activity of fermented *Bletilla* polysaccharides[D]. Wuhan: Hubei University of Chinese Medicine, 2024.］

［10］ 贾园林. 白及多糖结构表征及促进糖尿病大鼠伤口愈合的作用研究[D]. 北京：北京中医药大学, 2024. ［JIA Yuanlin. Structural characterization of bletilla striata polysaccharides and study on their effect in promoting wound healing in diabetic rats[J]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2024.］

［11］ 沈晓静, 秦宇, 华宗, 等. 白及多糖的提取纯化、结构鉴定及生物活性研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2024, 42(5): 225−232. ［SHEN Xiaojing, QIN Yu, HUA Zong, et al. Research progress on extraction and purification, structural identification, and biological activities of *Bletilla striata* polysaccharides[J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2024, 42(5): 225−232.］

［12］ 李成慰, 宋沁洁, 杨新荣, 等. 板蓝根多糖抗病毒作用及其机制研究进展[J]. 中草药, 2022, 53(19): 6227−6233. ［LI Xianwei, SONG Qinjie, YANG Xinrong, et al. Research progress on antiviral effects and mechanisms of *Isatis indigotica* root polysaccharides[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2022, 53(19): 6227−6233.］

［13］ NUERXIATI R, ABUDUWAILI A, MUTAILIFU P, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction, characterization and biological activities of polysaccharides from *Orchis chusua* D. Don (Salep)[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 141: 431−443.

［14］ NUERXIATI R, MUTAILIFU P, LU C, et al. Optimization of alkali extraction, structure, and antioxidant activity of protein-bound polysaccharide from seeds of *Plantago ovata* Forssk[J]. Industrial Crops and Products, 2022, 183: 114920.

［15］ BJöRNDAL H, LINDBERG B, SVENSSON S. Mass spectrometry of partially methylated alditol acetates[J]. Carbohydrate Research, 1967, 5(4): 433−440.

［16］ 刘矿, 袁驰, 颜家员. 白皮杉醇缓解斑马鱼炎症反应的作用机制研究[J]. 中国生物工程杂志, 2024, 44(11): 11−19. ［LIU Kuang, YUAN Chi, YAN Jiayuan. Mechanism of action of piciataxel in alleviating inflammatory response in zebrafish[J]. Chinese Journal of Bioengineering, 2024, 44(11): 11−19.］

［17］ PLANCHART A. Advancing toxicology research using *in vivo* high throughput toxicology with small fish models[J]. Altex, 2016, 33(4): 435−452.

［18］ 钟晨晨, 何冬晴, 林创伟, 等. 川芎提取物抗炎抗氧化和抗衰活性研究[J]. 轻工科技, 2025, 41(2): 43−49. ［ZHONG Chenchen, HE Dongqing, LIN Chuangwei, et al. Study on the anti-inflammatory, antioxidant and anti-ageing activities of *Ligusticum* Chuanxiong extracts[J]. Light Industry Science and Technology, 2025, 41(2): 43−49.］

[19] ZHONG X, WEI C, CHEN J, et al. Study on the anti-inflammatory activity of chaga mushroom aqueous extract-alcohol precipitate[J]. Journal of Holistic Integrative Pharmacy, 2021, 2(2): 135−144.
[20] ABUDUWAILI A, ROZI P, MUTAILIFU P, et al. Effects of different extraction techniques on physicochemical properties and biological activities of polysaccharides from *Fritillaria pallidiflora* Schrenk[J]. Process Biochemistry, 2019, 83: 189−197.
[21] NUERXIATI R, WEI L, MUTAILIFU P, et al. The structural characteristic of acidic-degraded polysaccharides from seeds of *Plantago ovata* Forssk and its biological activity [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 262, Article 129494.
[22] YE G, LI J, ZHANG J, et al. Structural characterization and antitumor activity of a polysaccharide from *Dendrobium wardianum*[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 269: 118323.
[23] YUAN Q, ZHANG J, XIAO C, et al. Structural characterization of a low-molecular-weight polysaccharide from Angelica pubescens Maxim. f. biserrata Shan et Yuan root and evaluation of its antioxidant activity[J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 236: 118123.
[24] ZHANG T, YE J, XUE C, et al. Structural characteristics and bioactive properties of a novel polysaccharide from *Flammulina velutipes*[J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 197: 147−156.
[25] WANG Y, HAN S, LI R, et al. Structural characterization and immunological activity of polysaccharides from the tuber of *Bletilla striata*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 122: 628−635.
[26] CHEN Z, CHENG L, HE Y, et al. Extraction, characterization, utilization as wound dressing and drug delivery of *Bletilla striata* polysaccharide: A review[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 120: 2076−2085.
[27] NIU J, WANG S, WANG B, et al. Structure and anti-tumor activity of a polysaccharide from Bletilla ochracea Schltr[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 154: 1548−1555.
[28] PENG Q, LI M, XUE F, et al. Structure and immunobiological activity of a new polysaccharide from *Bletilla striata*[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 107: 119−123.
[29] 万成. 山药多糖的提取、纯化、理化特性分析及其抗炎作用机制的研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2024. [Wan Cheng. Extraction, purification, physicochemical characteristics of yam polysaccharides and their anti-inflammatory mechanism[D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2024.]
[30] 王英南. 基于临床特征、转录组测序及免疫细胞浸润揭示年轻胃癌患者 PD-1 抑制剂治疗反应不佳的研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2024. [WANG Yingnan. A study on the poor response of PD-1 inhibitors in young gastric cancer patients based on clinical features, transcriptome sequencing and immune cell invasion[D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2024.]
[31] 缪玉敏. 基于生物信息学和细胞实验探究杜仲治疗结直肠癌的作用机制[D]. 北京: 北京化工大学, 2024. [MI Yumin. Exploring the mechanism of Eucommia ulmoides in the treatment of colorectal cancer based on bioinformatics and cell experiments[D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2024.]
[32] 秦宇. 急性髓系细胞白血病患者黏膜相关恒定 T 细胞数量和功能异常及影响因素研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2024. [QIN Yu. Study on mucosa-related constant T cell number a nd function abnormalities and influencing factors in patients with acute myeloid cell leukemia[D]. Hefei: Anhui Medical University, 2024.]
[33] LIAO Z, ZENG R, HU L, et al. Polysaccharides from tubers of *Bletilla striata*: Physicochemical characterization, formulation of buccoadhesive wafers and preliminary study on treating oral ulcer [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 122: 1035−1045.
[34] ZHANG J, ZHONG C, CHEN L, et al. *Bletilla striata* polysaccharide-mediated trained immunity drives the hematopoietic progenitors' expansion and myelopoiesis[J]. International Immunopharmacology, 2025, 146: 109177.
[35] GUAN H, YIN W, ZHANG X, et al. Optimization of the process of acetylation and carboxymethylation for a polysaccharide from *Gastrodia elata* and antioxidant and immunomodulatory activities test[J]. Scientific Reports, 2025, 15(1): 12345.
[36] LI H, WANG Y, ZHAO P, et al. Naturally and chemically acetylated polysaccharides: Structural characteristics, synthesis, activities, and applications in the delivery system: A review[J]. Carbohydrate Polymers, 2023, 313: 120986.
[37] WANG X, ZHANG Z, WU Y, et al. Synthesized sulfated and acetylated derivatives of polysaccharide extracted from *Gracilariopsis lemaneiformis* and their potential antioxidant and immunological activity[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 124: 568−572.
[38] CHEN Y, ZHANG H, WANG Y, et al. Acetylation and carboxymethylation of the polysaccharide from Ganoderma atrum and their antioxidant and immunomodulating activities[J]. Food Chemistry, 2014, 156: 279−288.
[39] SHANG S, LIU J, HUA F. Protein acylation: Mechanisms, biological functions and therapeutic targets[J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2022, 7(1): 396.
[40] 肖玉立. 乙酰化金针菇子实体多糖的抗氧化和降血脂活性分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2024. [XIAO Yuli. Analysis of antioxidant and hypolipidemic activities of acetylated polysaccharides from *Flammulina velutipes* fruiting bodies[J]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2024.]
[41] TANG Y, CHEN J, LI F, et al. Antioxidant and antiproliferative activities of modified polysaccharides originally isolated from *Morchella angusticepes* peck[J]. Journal of Food Science, 2019, 84(3): 448−456.
[42] 李顺峰, 许方方, 崔国梅, 等. 香菇柄多糖乙酰化修饰及其抗氧化活性[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(3): 130−134. [LI Shunfeng, XU Fangfang, CUI Guomei, et al. Acetylation modification and antioxidant activity of lentinula edodes stem polysaccharides [J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(3): 130−134.]
[43] 徐田甜, 陈义勇. 松树蕈多糖乙酰化修饰工艺及其抗氧化活性[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(4): 164−170. [XU Tiantian, CHEN Yiyong. Acetylation modification and optimization of tricholoma matsutake polysaccharides and their antioxidant activity [J]. Food and Fermentation Industries, 2017, 43(4): 164−170.]
[44] 杨建安, 张超, 文焱炳, 等. 油茶籽粕多糖不同分子修饰产物的抗氧化活性[J]. 中国油脂, 2022, 47(10): 143−148. [YANG Jian'an, ZHANG Chao, WEN Yanbing, et al. Antioxidant activity of molecular modification products of *Camellia oleifera* seed meal polysaccharides[J]. China Oils and Fats, 2022, 47(10): 143−148.]