

吴春璇, 刘城志, 程楸琪, 等. 铁皮石斛多糖的提取工艺优化及其对环磷酰胺诱导的免疫抑制小鼠的调节作用 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (11): 37-45.

WU C X, LIU C Z, CHENG Q Q, et al. Optimization of the extraction process of *Dendrobium officinale* polysaccharide and its modulating effect on cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (11): 37-45.

铁皮石斛多糖的提取工艺优化及其对环磷酰胺诱导的免疫抑制小鼠的调节作用

吴春璇^{1#}, 刘城志^{1#}, 程楸琪¹, 曾庆蔓¹, 覃幼珍¹, 蔡亿隆¹, 梁正敏^{1,2}, 何家康^{1,2*}

(1. 广西大学动物科学技术学院, 广西南宁 530003;

2. 广西兽用生物制品工程研究中心, 广西南宁 530003)

摘要: 旨在探究广西道地药材铁皮石斛多糖对环磷酰胺诱导的免疫抑制小鼠的调节作用。采用超声辅助法提取铁皮石斛多糖, 以料液比、提取时间、提取温度、超声功率为考察因素, 通过单因素和响应面优化试验得到铁皮石斛多糖的最佳提取工艺; 基于环磷酰胺诱导的免疫抑制小鼠模型, 使用制备的铁皮石斛多糖进行预防, 检测小鼠脾脏指数、胸腺指数和血清中免疫球蛋白 (Ig) A、IgG 含量并观察脾脏和胸腺病理变化。结果: 铁皮石斛多糖最佳提取工艺条件, 料液比为 1 : 65, 提取时间 40 min, 提取温度 30 °C, 超声功率 100%, 测得多糖提取率为 38.56%; 口服铁皮石斛多糖后, 可以降低环磷酰胺对小鼠脾脏、胸腺的病理损伤, 给药剂量为 100 mg/kg 时血清中的 IgA、IgG 含量极显著升高 ($P < 0.01$)。结论: 本研究所采用的铁皮石斛多糖提取工艺可行, 所制备的铁皮石斛多糖对环磷酰胺诱导的免疫抑制小鼠具有良好的保护作用, 为铁皮石斛在临床的进一步开发提供参考。

关键词: 铁皮石斛多糖; 提取工艺; 响应面法; 环磷酰胺; 免疫调节

中图分类号: S859.5 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)11-0037-09

Optimization of the extraction process of *Dendrobium officinale* polysaccharide and its modulating effect on cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice

WU Chunxuan^{1#}, LIU Chengzhi^{1#}, CHENG Qiuqi¹, ZENG Qingman¹, QIN Youzhen¹, CAI Yilong¹,

LIANG Zhengmin^{1,2}, HE Jiakang^{1,2*}

(1. College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530003, China;

2. Guangxi Zhuang Autonomous Region Engineering Research Center of Veterinary Biologics, Nanning 530003, China)

Abstract: The aim of this study was to investigate the regulatory effects of *Dendrobium officinale* polysaccharides on cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice. Ultrasound-assisted extraction was used to extract *Dendrobium officinale* polysaccharides, with factors such as solid-to-liquid ratio, extraction time, extraction temperature, and ultrasound power being examined. Single-factor and response surface optimization experiments were conducted to determine the optimal process for extraction of *Dendrobium officinale* polysaccharides. With a cyclophosphamide-induced immunosuppressed mouse model, the prepared *Dendrobium officinale* polysaccharides were administered for prevention. Then, the spleen and thymus indices, as well as serum immunoglobulin IgA and IgG levels, were measured, and pathological changes in the spleen and thymus were observed. The results were as follows: The optimal extraction conditions for *Dendrobium officinale* polysaccharides were a solid-to-liquid ratio of 1 : 65, extraction duration of 40 minutes, extraction temperature of 30 °C, and ultrasonic power of 100%, with a polysaccharide extraction rate of 38.56%. Oral administration of *Dendrobium officinale* polysaccharides reduced the pathological damage caused by cyclophosphamide to the spleen and thymus of the mice. At the dose of 100 mg/kg, the serum levels of IgA and IgG were significantly increased ($P < 0.01$) in the rodents. In conclusion, the polysaccharide extraction process used in this study was

收稿日期: 2025-01-05; 修回日期: 2025-08-23

基金项目: 大学生创新创业训练计划项目 (202210593097); 广西重点研发计划项目 (桂科 AB23026082)

第一作者: 吴春璇, 女, 硕士研究生; 刘城志, 男, 博士。[#]共同第一作者

* 通信作者: 何家康, 壮族, 教授, 研究方向为兽医药理与毒理学, E-mail: jkhe@gxu.edu.cn.

feasible, and the prepared *Dendrobium officinale* polysaccharides exhibited good protective effects against cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice; which could serve as a reference for further clinical development of *Dendrobium officinale*.

Keywords: *Dendrobium officinale* polysaccharide; extraction process; response surface method; cyclophosphamide; immunomodulation

铁皮石斛 (*Dendrobium officinale*) 是广西的一种道地药材, 大多分布在西林、隆林、东兰、南丹、巴马等地。铁皮石斛的药用部分主要是鲜茎和干茎, 性味甘微寒, 归属于胃经、肾经^[1]。采收时间为 11 月至次年 3 月, 去除杂质, 切去多余须根后晒干, 或切段后晒干, 或低温干燥^[2]。

铁皮石斛有效成分主要包括多糖、黄酮、生物碱、微量元素、氨基酸、芪类等^[3]。多糖包括含有葡萄糖、半乳糖、甘露糖等单糖的中性多糖和含有中性单糖及糖醛酸等酸性基团的酸性多糖^[4]。不同地区的气候、土壤等环境条件不同, 会影响铁皮石斛中多糖的含量。例如, 云南、浙江等地是铁皮石斛的主产区, 该地的铁皮石斛多糖含量均可达到 25% 以上^[5]。在林下仿野生、石头仿野生栽培方式下, 铁皮石斛的多糖含量显著高于大棚、岩壁、活树和死树等仿野生栽培方式产出的多糖含量^[6-7]。多糖的定量分析方法有苯酚-硫酸法、蒽酮-硫酸法和高效液相色谱法 (HPLC) 等^[8-9]。研究表明, 铁皮石斛中多糖含量较高, 含量大致为 20%~60%, 主要提取方法有水浸提法、超声波辅助提取法、酶提取法、微波辅助提取法等^[10-11]。这些提取方法各有优缺点, 其中超声辅助提取法较符合在实际生产中应用, 该法是利用超声波的机械效应、空化效应及热效应破坏植物细胞膜, 在一定的工艺条件下达到提取植物中有效成分的目的^[12]。研究显示, 铁皮石斛多糖具有调节免疫、抗氧化、抗肿瘤、抗炎和降低血糖等多种生理功能^[13]。Sun 等^[14]研究显示铁皮石斛多糖能增强与免疫相关的淋巴细胞活性, 提高肿瘤抗原特异性血清抗体含量, 具有调节免疫和抗肿瘤作用。本研究选用单因素和响应面优化试验对铁皮石斛多糖进行超声辅助提取工艺的优化研究, 考察铁皮石斛多糖对免疫抑制小鼠的免疫调节作用, 旨在降低提取铁皮石斛多糖在实际生产中的成本, 为其在调节免疫方面的应用提供参考, 给铁皮石斛的进一步开发利用提供基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

铁皮石斛鲜条购于广西来宾瑶山情土特产店, 洗净, 剪成小段后烘干, 用粉碎机粉碎后过 50 目筛, 装入密封袋, 存放于电子干燥机备用。

D (+) -无水葡萄糖对照品 (≥99.9%), 购自中国食品药品检定研究院; 环磷酰胺 (≥99.8%),

购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 黄芪多糖提取物 (≥75%), 购自四川省三星堆植物化工有限公司; 免疫球蛋白 (Ig) A、IgG 含量检测试剂盒 (免疫比浊法), 购自苏州格锐思生物科技有限公司; 其余试剂均为分析纯。

1.2 实验动物

60 只 6 周龄 SPF 级 BALB/c 小鼠, 体重为 16~18 g, 雌雄各半, 购自南宁市研成生物科技有限公司。将小鼠饲养于洁净的鼠房中, 给予适宜的温度和湿度条件, 充足的双蒸水, 饲养 7 d 使小鼠充分适应环境。所有实验动物饲养及操作均在广西大学动物研究伦理委员会的批准和支持下进行, 符合动物福利要求, 动物试验伦理编号: GXU-2023-0243。

1.3 提取工艺的优化

1.3.1 铁皮石斛多糖的制备及测定

称取 1 g 铁皮石斛根茎粉末, 按照规定的料液比加入相应量的蒸馏水, 于特定的温度和时间条件下按照规定的功率用超声法提取, 将提取液定容至 100 mL, 即得样品溶液。静置, 精确吸取上层液体 2 mL 置于 15 mL 离心管中, 加入 10 mL 无水乙醇, 充分混匀, 冷藏过夜, 在 4 000 r/min 的速度下进行离心处理 20 min, 弃去上清液, 加入 8 mL 80% 乙醇, 洗涤 2 次, 倒掉上清液, 加入 10 mL 蒸馏水, 置热水浴中加速溶解, 摇匀, 即得供试品溶液。待其冷却至室温, 取 1 mL 供试品溶液, 置于 10 mL 具塞试管中, 准确加入 1 mL 5% 苯酚溶液 (现用现配), 充分混合后再准确加入 5 mL 硫酸, 摇匀, 加热沸腾 20 min, 取出后立刻置于冰水浴冷却 5 min, 在选定的最大吸收波长处 (488 nm) 测定吸光度值。利用标准曲线计算得出供试品中无水葡萄糖的含量。

$$Y = \frac{C \times n \times V}{m} \times 100\%$$

式中, *Y* 表示铁皮石斛多糖提取率 (%); *C* 表示铁皮石斛多糖溶液浓度 (μg/mL); *n* 表示样品溶液稀释的倍数; *V* 表示定容体积 (mL); *m* 表示铁皮石斛根茎粉末质量 (g)。

1.3.2 单因素试验

在提取温度 60 ℃, 超声功率 100%, 提取时间 30 min 的条件下, 考察不同料液比 (1:30、1:40、1:50、1:60、1:70、1:80) 对铁皮石斛多糖提取率的影响; 在提取温度 60 ℃, 超声功率 100%, 料液比 1:40 条件下, 考察不同提取时间 (10、20、30、

40、50、60 min) 对铁皮石斛多糖提取率的影响; 在提取时间 50 min, 超声功率 100%, 料液比 1:40 条件下, 考察不同提取温度 (30、40、50、60、70 ℃) 对铁皮石斛多糖提取率的影响; 在提取温度 40 ℃, 提取时间 50 min, 料液比 1:40 条件下, 考察超声功率 (60%、70%、80%、90%、100%) 对铁皮石斛多糖提取率的影响。本试验所用超声仪器在超声功率 100% 时, 功率为 250 W。

1.3.3 响应面优化提取工艺

根据 1.3.2 项单因素试验, 选取提取时间 (A)、料液比 (B)、提取温度 (C) 进行响应面提取工艺优化。表 1 为详细的试验因素水平设计。

表 1 响应面优化超声辅助提取试验因素水平设计

水平	因素		
	A/min	B/(g·mL ⁻¹)	C/℃
-1	20	1:30	30
0	40	1:50	40
1	60	1:70	50

1.4 铁皮石斛多糖的免疫调节活性研究

1.4.1 小鼠分组及处理

将 60 只 BALB/c 小鼠划分为空白组、模型组、药物对照组以及铁皮石斛多糖不同剂量的给药组 (低剂量组、中剂量组和高剂量组, 剂量浓度分别为 50、100 和 150 mg/kg), 共 6 组, 每组 10 只, 雌雄各半。适应性饲养 1 周后, 第 1~7 天, 空白组与模型组给予无菌生理盐水灌胃, 药物对照组则给予 100 mg/kg 黄芪多糖灌胃处理; 每日配制不同浓度的铁皮石斛多糖溶液, 按照相应浓度对给药组进行灌胃处理; 各组给药容积均为每 10 g 体重给药 0.1 mL。在

最后一次药物给予后 4 h, 空白组小鼠腹腔内注射无菌生理盐水, 其他组小鼠则腹腔内注射剂量为 200 mg/kg 的环磷酰胺, 以诱导小鼠免疫抑制模型。在最后一次给药后 24 h, 测量并记录小鼠体重, 通过眼球采血方式收集血液样本, 采用颈椎脱臼法处死小鼠, 迅速采集其脾脏和胸腺并清除周围结缔组织, 保留一部分脾脏和胸腺立即放于含有 4% 多聚甲醛固定液中, 而剩余样品则迅速转移至离心管中, 存放于 -80 ℃ 冰箱冻存备用。

1.4.2 小鼠脏器指数的测定

分离出小鼠脾脏和胸腺并清除周围结缔组织后, 生理盐水浸泡片刻, 用滤纸将器官组织表面液体吸干。记录脾脏和胸腺的脏器重量, 分别计算小鼠脾脏和胸腺的脏器指数。

1.4.3 小鼠血清中免疫球蛋白的含量检测

将通过眼球采血收集到的小鼠全血放置于离心管中, 在 4 ℃ 下 3 000 r/min 离心 15 min, 以分离出血清为样本。按照免疫球蛋白含量检测试剂盒的操作说明, 检测血清中 IgA 及 IgG 的含量。

1.5 数据统计与分析

通过 SPSS 软件执行单因素方差分析 (ANOVA) 进行统计学分析, 并通过 GraphPad Prism 9 绘制图表。 $P < 0.05$ 表示有统计学差异。试验数据采用“平均值±标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 最大检测波长的选择及标准曲线的绘制

图 1A 所示, 488 nm 为最大吸收波长, 因此后续试验选择 488 nm 测定吸光度值。图 1B 所示, 标准曲线的线性回归方程: $y = 0.0087x - 0.0036$, 相关系数: $R^2 = 0.9995$ 。

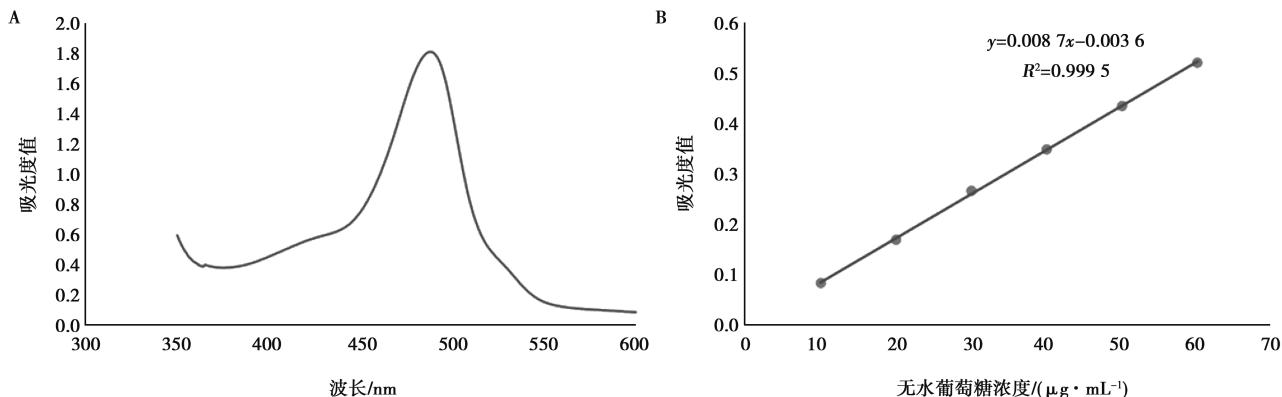


图 1 D (+) - 无水葡萄糖对照品紫外光谱 (A) 及标准曲线 (B)

2.2 提取工艺的优化

2.2.1 单因素试验

图 2A 结果表明, 在料液比 1 : 30~1 : 80 范围内, 多糖提取率先升高后下降, 当料液比达到 1 : 50 时, 多糖提取率最高达 35.65%。因此, 选择料液比 1 : 50 为铁皮石斛多糖提取的最佳料液比。

图 2B 结果表明, 随着提取时间的增多, 铁皮石斛多糖提取率逐渐升高, 在提取时间为 50 min 时, 多糖提取率最高达 37.03%, 提取时间超过 50 min 后, 多糖提取率变化平缓。因此, 选择 50 min 为铁

皮石斛多糖的最佳提取时间。

图 2C 结果表明, 在提取温度 30~80 °C 范围内, 多糖提取率先上升后下降, 当提取温度为 40 °C 时, 多糖提取率最高达 38.96%, 提取温度超过 50 °C 后, 多糖提取率变化趋于平缓。因此, 选择 40 °C 为铁皮石斛多糖的最佳提取温度。

图 2D 结果表明, 随着超声功率提高, 多糖提取率不断升高, 超声功率 100% 时, 多糖提取率最高达 33.80%。根据实验室超声仪器最大功率, 选择 100% 为铁皮石斛多糖的最佳提取功率。

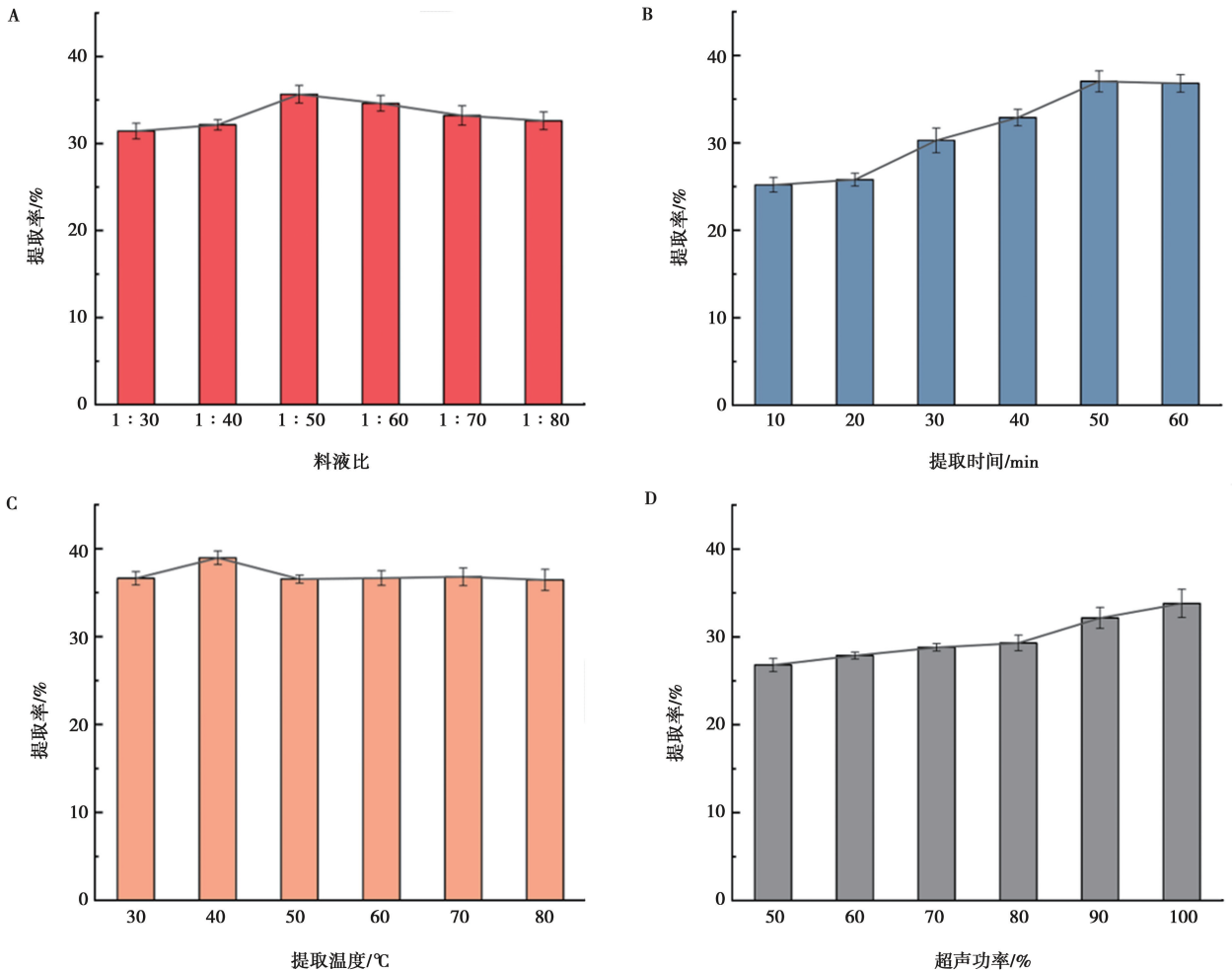


图 2 4 种因素对铁皮石斛多糖提取率的影响

2.2.2 响应面优化提取试验

2.2.2.1 响应面优化超声辅助提取试验因素水平设计

根据单因素试验, 以料液比、提取时间、提取温度、超声功率为铁皮石斛多糖提取率的影响因素。根据试验结果 (见表 2), 选取提取时间 (A)、料液比 (B)、提取温度 (C) 作为响应面优化提取试验的因素, 预测最优提取工艺条件。

为探究提取时间 (A)、料液比 (B)、提取温度 (C) 对铁皮石斛多糖提取率的影响, 并寻找最优提取条件, 采用 Design Expert 13.0 软件对表 2 的数据进行统计分析, 得到以提取时间 (A)、料液比 (B)、提取温度 (C) 为自变量, 以铁皮石斛多糖提取率 (Y) 为响应值的二次多项方程作为拟合模型。

$$Y = 48.81 + 0.655A + 4.48B - 4.34C - 0.175AB + 2.07AC - 3.35BC - 1.65A^2 - 6.95B^2 - 2.88C^2.$$

表2 响应面优化超声辅助提取试验因素水平设计结果

序号	因素			Y/%
	A/min	B/(g·mL ⁻¹)	C/℃	
1	0	0	0	40.12
2	0	1	-1	42.04
3	1	1	0	35.67
4	1	0	-1	35.83
5	1	-1	0	27.78
6	-1	1	0	32.99
7	0	-1	-1	25.65
8	0	0	0	37.38
9	-1	0	1	28.61
10	0	0	0	39.6
11	0	-1	1	22.63
12	-1	-1	0	24.4
13	0	0	0	37.21
14	0	1	1	25.62
15	0	0	0	39.46
16	1	0	1	32.33
17	-1	0	-1	40.37

注：响应面优化超声辅助提取试验因素水平设计中-1、0、1分别代表提取时间为20、40、60 min，料液比为1:30、1:50、1:70，提取温度为30、40、50℃。

2.2.2.2 响应面优化超声辅助提取试验方差分析

对拟合方程和试验数据进行方差分析（见表3），可以明确得到该模型 $F = 30.41$ ，且 P 值远远小于0.01，失拟项 $F = 1.64$ ， $P = 0.3139$ ($P > 0.05$)，表明该模型差异极显著，试验方法可行。根据该模型回归检验分析结果可知，影响铁皮石斛多糖提取率的主要因素按重要性依次为：料液比（ B ）最关键，其次是提取温度（ C ），提取时间（ A ）影响较小。

2.2.3 验证性试验

通过单因素试验及响应面优化试验，得到铁皮石斛多糖的最佳提取工艺条件：时间40.21 min，料液比1:65.28，温度30.4℃，功率100%，预测多糖提取率为38.75%。综合考虑实际操作的可行性与效率后，调整并确定了最佳提取工艺条件：时间40 min，料液比1:65，温度30℃，功率100%。利用修正后的提取条件进行3次平行试验，得到的多糖提取率为39.21%、37.91%和38.57%，多糖平均提取率为38.56%，符合预测值，所以该模型优化提取工艺参数有效。

表3 响应面回归模型方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	642.12	9	71.35	30.41	< 0.000 1
A	3.47	1	3.47	1.48	0.263 2
B	160.74	1	160.74	68.52	< 0.000 1
C	150.77	1	150.77	64.27	< 0.000 1
AB	0.122 5	1	0.122 5	0.052 2	0.825 8
AC	16.93	1	16.93	7.22	0.031 2
BC	44.89	1	44.89	19.14	0.003 3
A^2	11.03	1	11.03	4.70	0.066 8
B^2	201.96	1	201.96	86.09	< 0.000 1
C^2	34.04	1	34.04	14.51	0.006 6
残差	16.42	7	2.35		
失拟项	9.07	3	3.02	1.64	0.313 9
纯误差	7.35	4	1.84		
总和	658.54	16			
变异系数 (CV) /%	4.59				
决定系数 (R^2)	0.975 1				
调整决定系数 (Adj R^2)	0.943 0				
预测决定系数 (Pre R^2)	0.762 2				
充分性精度 (Adeq Precision)	15.022 9				

2.2.4 铁皮石斛多糖对免疫抑制小鼠脏器指数的影响

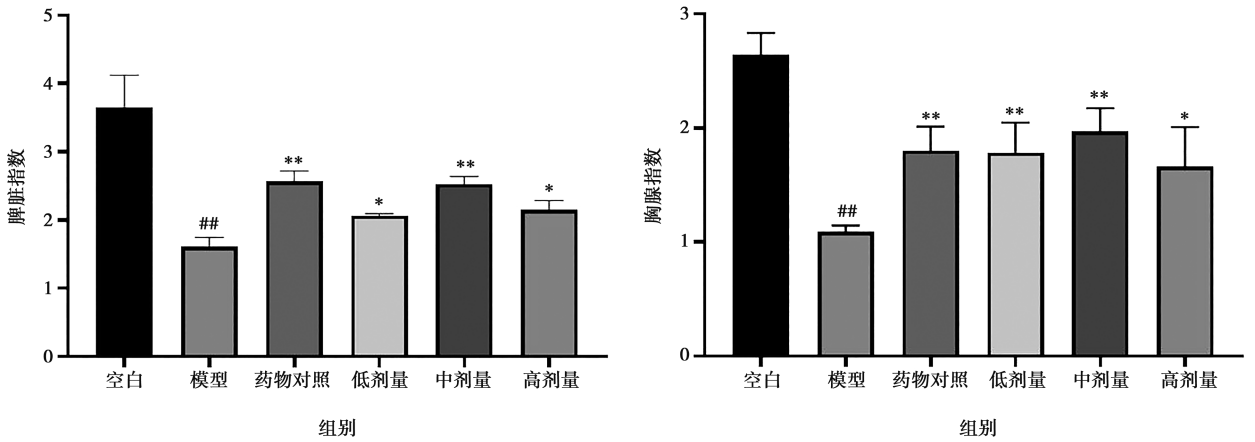
如图3所示，相较于空白组，模型组小鼠的脾脏指数与胸腺指数均极显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较，药物对照组、中剂量组小鼠脾脏指数极显著升高 ($P < 0.01$)，低、高剂量组显著升高 ($P < 0.05$)；与模型组比较，药物对照组和低、中剂量组胸腺指数极显著升高 ($P < 0.01$)，高剂量组显著升高 ($P < 0.05$)。

2.2.5 铁皮石斛多糖对免疫抑制小鼠脾脏和胸腺病理变化的影响

如图4A所示，空白组小鼠脾脏组织结构清晰可辨，红髓和白髓界限清晰，可见不规则分布的脾小梁结构，白髓区域内存在明显的中央动脉。如图4B所示，模型组免疫抑制小鼠脾脏组织内红髓和白髓界限模糊不清，整体结构呈现紊乱状态，且脾小梁分布不规则，但白髓中未观察到中央动脉。如图4C所示，药物对照组免疫抑制小鼠脾脏组织内白髓和红髓界限清晰可辨，可观察到脾小梁和中央动脉的存在，但白髓颜色较空白组小鼠略浅，白髓由淋巴细胞积聚而成，说明100 mg/kg 黄芪多糖对免疫抑制的小鼠有免

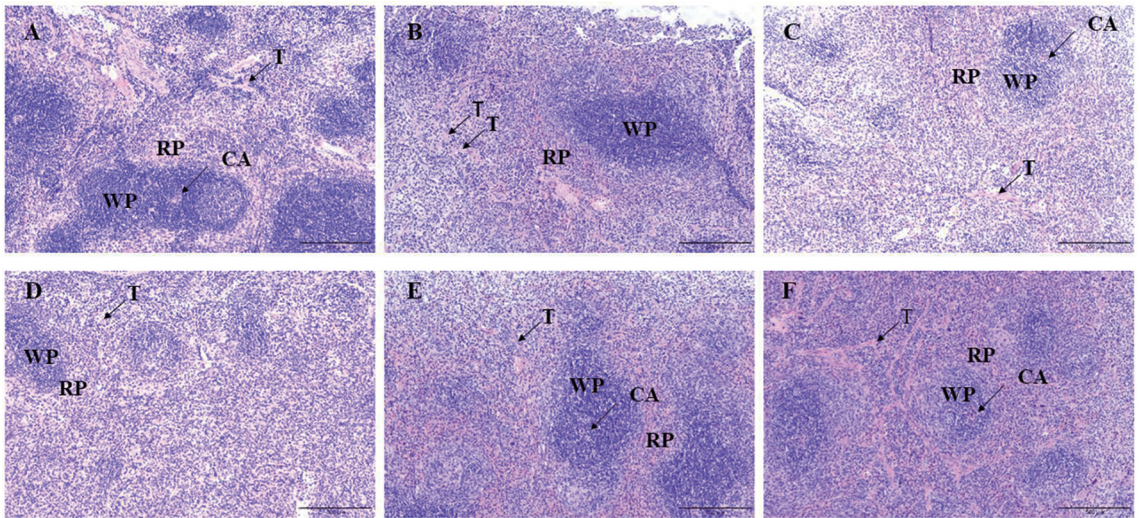
疫调节作用，但无法恢复到正常状态。如图 4D 所示，铁皮石斛多糖低剂量组免疫抑制小鼠红髓和白髓界限变清晰，可见脾小梁，在白髓中未见中央动脉，白髓面积较空白组和药物对照组略小，说明淋巴细胞数量较少。如图 4E 所示，铁皮石斛多糖中剂量组免疫抑制小鼠红髓和白髓的界限较其他组小鼠最清晰，可见不规则分布的脾小梁，在白髓中可见中央动脉，

白髓面积和颜色变大且变深，说明淋巴细胞数量增多。如图 4F 所示，铁皮石斛多糖高剂量组免疫抑制小鼠红髓和白髓的界限清晰，但清晰度较铁皮石斛多糖中剂量组略低，可见中央动脉和不规则分布的脾小梁。上述试验结果表明，在该试验条件下，剂量为 100 mg/kg 的铁皮石斛多糖对免疫抑制小鼠脾脏的免疫调节作用效果最好。



与空白组比较，##表示差异极显著 ($P < 0.01$)；与模型组比较，*表示差异显著 ($P < 0.05$)，**表示差异极显著 ($P < 0.01$)。下同。

图 3 铁皮石斛多糖对免疫抑制小鼠脏器指数的影响



A. 空白组；B. 模型组；C. 药物对照组；D. 铁皮石斛多糖低剂量组；E. 铁皮石斛多糖中剂量组；F. 铁皮石斛多糖高剂量组。CA. 中央动脉；WP. 白髓；RP. 红髓；T. 脾小梁。

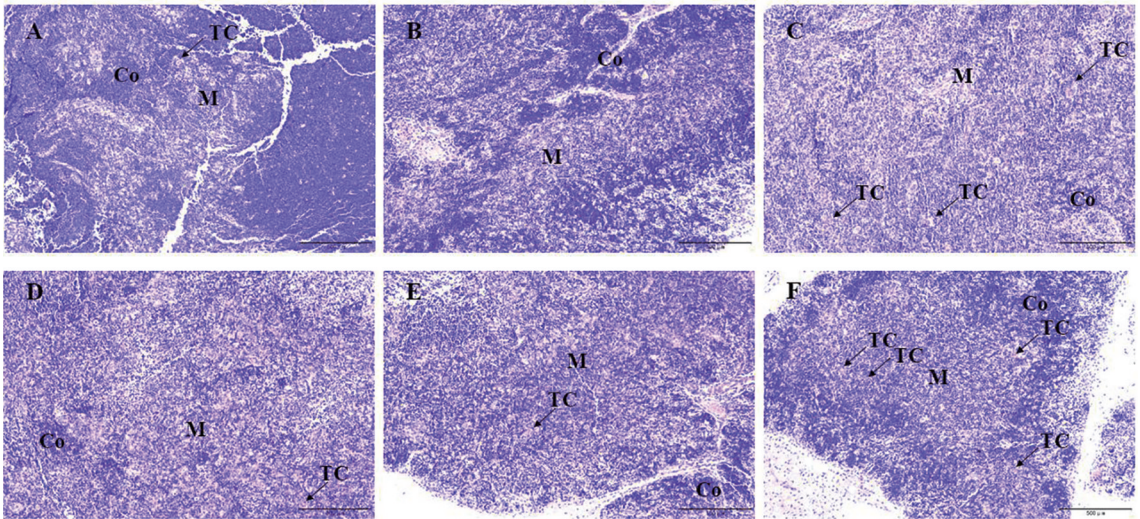
图 4 HE 染色观察铁皮石斛多糖对免疫抑制小鼠脾脏病理变化的影响 (标尺 = 500 μm)

如图 5A 所示，空白组小鼠胸腺结构分明，皮质与髓质界限清楚，胸腺小体清晰可见，未见异常病理变化。如图 5B 所示，模型组免疫抑制小鼠胸腺组织内皮质和髓质界限不清晰，未见胸腺小体，这表明了利用环磷酸胺成功构建了免疫抑制小鼠模型。如图

5C 所示，药物对照组免疫抑制小鼠胸腺组织内的胸腺小体清晰可见，皮质和髓质界限仍不清晰，说明 100 mg/kg 黄芪多糖对免疫抑制的小鼠有免疫调节作用，但无法恢复到正常状态。如图 5D 所示，铁皮石斛多糖低剂量组免疫抑制小鼠胸腺组织内皮质和髓质

界限变清晰,可见胸腺小体。如图 5E 所示,铁皮石斛多糖中剂量组免疫抑制小鼠胸腺组织内皮质和髓质的界限变清晰,髓质面积增大,可见胸腺小体。如图 5F 所示,相较于其他试验组小鼠,铁皮石斛多糖高剂量组免疫抑制小鼠胸腺组织内皮质和髓质界限最清

晰,髓质面积最大,可见明显的胸腺小体。上述试验结果表明,在该试验条件下,剂量为 150 mg/kg 的铁皮石斛多糖对免疫抑制小鼠胸腺的免疫调节作用效果最好,铁皮石斛多糖对免疫抑制小鼠胸腺的免疫调节效果随着浓度的增加而增加。



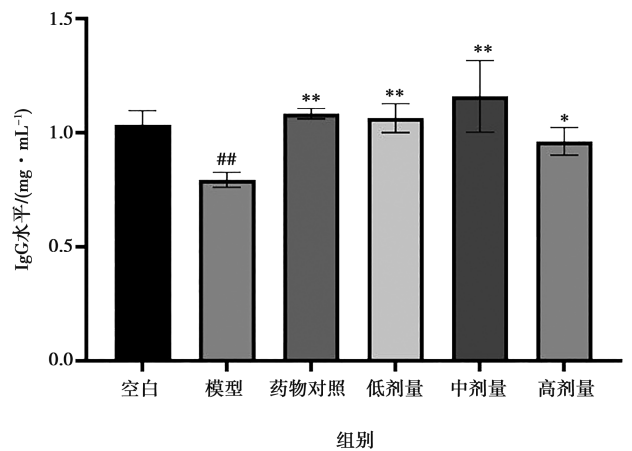
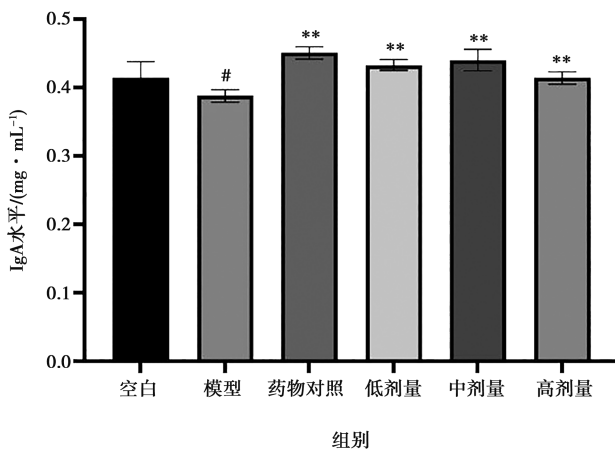
A. 空白组; B. 模型组; C. 药物对照组; D. 铁皮石斛多糖低剂量组; E. 铁皮石斛多糖中剂量组; F. 铁皮石斛多糖高剂量组。Co. 皮质; M. 髓质; TC. 胸腺小体。

图 5 HE 染色观察铁皮石斛多糖对免疫抑制小鼠胸腺病理变化的影响 (标尺=500 μm)

2.2.6 铁皮石斛多糖对免疫抑制小鼠血清中免疫球蛋白的影响

如图 6 所示,小鼠腹腔注射环磷酰胺后,药物对照组和铁皮石斛多糖低、中、高剂量给药组与模型组相比,小鼠血清中 IgA 的含量均呈现极显著上升 ($P < 0.01$)。药物对照组和铁皮石斛多糖低、中剂量

组与模型组相比,小鼠血清中 IgG 的含量均呈现极显著上升 ($P < 0.01$),高剂量组呈现显著上升 ($P < 0.05$)。结果说明,铁皮石斛多糖和黄芪多糖均可促进小鼠分泌 IgA 和 IgG,且 100 mg/kg 为铁皮石斛多糖最佳灌胃给药剂量。



与空白组比较, #表示差异显著 ($P < 0.05$)。

图 6 铁皮石斛多糖对免疫抑制小鼠分泌 IgA 和 IgG 的影响

3 讨论

石斛多糖是石斛中最重要的活性成分之一，是评价石斛质量的重要指标^[5]。虽然热水浸提法是提取植物多糖的有效方法，但是利用该法提取铁皮石斛多糖的工艺过程烦琐，需反复浸提，提取温度较高，耗能大，不利于应用于实际生产中^[15]。目前探究超声辅助提取法、微波辅助提取法、酶辅助提取法、超高压提取法等方法提取植物多糖的研究日益增多，这些方法得到的提取率更高。本研究选用简单、经济、实用的超声辅助法进行铁皮石斛多糖的提取工艺研究，通过单因素试验、响应面法考察料液比、提取时间、提取温度和超声功率对铁皮石斛多糖提取工艺的影响，结果显示料液比是影响铁皮石斛多糖提取率的主要因素，最终选择提取时间 40 min，料液比 1 : 65，提取温度 30 ℃，超声功率 100%，进行提取更符合实际生产条件。此条件下，多糖平均提取率为 38.56%，与预测值 38.75% 相近，验证性试验表明该模型优化提取工艺参数有效。与李程程等^[16]采用传统热水浸提法提取铁皮石斛多糖相比，多糖提取率提高了 13.96%，提取操作便捷，耗能小，成本低。

在单因素试验中，随着料液比增加，多糖提取率增加是由于溶剂增加，多糖扩散速度变快，提取率增高^[17]。而随着料液比超过 1 : 50 后，多糖提取率降低，可能是因为多糖提取已基本完全，继续增加溶剂量会造成单位提取液中多糖浓度的降低，也会增加后续浓缩时提取物的损失与延长浓缩时间^[18]。料液比过高也会损失混合提取液体系内部的超声能量，导致多糖提取率降低。随着提取时间的增多，铁皮石斛多糖提取率逐渐升高，原因是铁皮石斛的细胞壁及细胞膜受损程度增加，使得多糖能充分溶出，提高其提取率。提取时间超过 50 min 后，多糖提取率下降，原因可能是提取时间过长，产生超声热效应，多糖中不稳定的结构发生改变，导致多糖提取率下降。另外，提取时间过长可能会促使溶剂中溶解额外杂质，从而降低所得多糖的纯度^[19-21]。提取温度的变化对多糖提取率变化幅度影响较小，可能原因是本研究先优化了多糖提取时间条件，选择 50 min 的最优提取时间足够长，多糖已完全提取出来，故提取温度对其提取率影响不大。提取温度的升高使得提取液分子运动增强，促进多糖溶解到溶剂中，增加多糖的提取率^[22]，但应注意控制提取温度不宜过高，否则高温容易破坏多糖的分子结构^[23]。随着超声功率的提高，机械力不断增大，植物细胞裂解程度越大，多糖提取率也逐渐提高^[24]。王锋等^[25]研究表明，超声波的功率过大时，温度升高可能会导致多糖分子内的糖苷键发生裂

解，造成多糖提取率下降，故超声提取功率不宜过大。根据实验室超声仪器功率范围，选择 100% 为铁皮石斛多糖的最佳提取功率。

胸腺和脾脏是重要的免疫器官，与机体的免疫功能密切相关^[26]。在免疫学研究中，脾脏指数和胸腺指数能直观反映植物多糖等生物活性物质对免疫系统的保护作用，也是判断免疫抑制小鼠模型构建是否成功的重要依据^[27]。研究结果显示，模型组小鼠经腹腔注射环磷酰胺后，脾脏指数和胸腺指数都呈现极显著下降，脾脏切片呈现红髓与白髓结构不清晰，胸腺切片呈现皮质与髓质界限不明显等病理变化，表明成功构建免疫抑制小鼠模型。本研究中的铁皮石斛多糖可以显著提高脾脏指数和胸腺指数，对脾脏和胸腺具有保护作用。这与房悦等^[28]研究得出的茯苓多糖能提高环磷酰胺诱导的免疫抑制小鼠的脾脏指数和胸腺指数，对脾脏和胸腺的损伤有保护与改善作用结论相似，表明铁皮石斛多糖对免疫器官的恢复和功能有促进效果，为其在免疫保护方面的研究奠定基础。

IgA 和 IgG 是机体主要的抗体类别，对于抵御病原微生物和维持免疫平衡起着重要作用^[29]。本研究结果显示，模型组小鼠血清中 IgA 和 IgG 含量均显著下降，试验组小鼠血清中 IgA 和 IgG 含量均显著上升。这与黎欣欣^[30]研究得出的大球盖菇多糖能提高环磷酰胺诱导的免疫抑制小鼠血清中 IgA、IgG 含量结果相似，表明铁皮石斛多糖能促进 IgA 和 IgG 的产生和释放，从而增强机体免疫应答能力。

4 结论

本研究以铁皮石斛多糖提取率为指标，使用单因素试验结合响应面试验优化铁皮石斛多糖的超声法提取工艺，以促进广西道地药材铁皮石斛的进一步开发利用。此外，通过建立环磷酰胺小鼠免疫抑制模型研究铁皮石斛多糖的免疫调节作用，结果表明铁皮石斛多糖能够缓解胸腺和脾脏病理损伤、提高脾脏和胸腺的脏器指数以及增高血清中 IgA 和 IgG 含量，具有一定的免疫调节作用。然而，这方面的研究还需要进一步深入和确证，包括更多的体内外试验和临床研究，以验证其安全性和疗效，并明确其作用机制和适用范围。

参考文献：

- [1] 刘舒萍, 蓝绮倩, 胡莉, 等. 韶关丹霞地貌铁皮石斛野生资源调查与生境分析 [J]. 中国现代中药, 2024, 26 (7): 1127-1133.
- [2] LIANG Z, WU L, DENG X, et al. The antioxidant rosmarinic acid ameliorates oxidative lung damage in experimental allergic asthma via

- modulation of NADPH oxidases and antioxidant enzymes [J]. *Inflammation*, 2020, 43 (5): 1902-1912.
- [3] 张小辉. 铁皮石斛多糖的纯化工艺及免疫活性研究 [D]. 广州: 广东工业大学, 2021.
- [4] 罗昭勇, 姜艳, 余晓历, 等. 石斛多糖的结构特征、生物活性、构效关系及产品开发展进 [J]. *食品工业科技*, 2024, 45 (15): 429-442.
- [5] 龚庆芳, 周浩, 王新桂, 等. 7种石斛多糖质量分数的测定及单糖组成分析 [J]. *食品科技*, 2013, 38 (3): 172-175.
- [6] 汪群红, 何贤君, 鲍珍贝, 等. 不同来源铁皮石斛中多糖、氨基酸和生物碱含量比较 [J]. *中药材*, 2014, 37 (5): 773-775.
- [7] 徐丽红, 周鑫, 郑蔚然, 等. 不同仿野生栽培铁皮石斛多品质指标的比较 [J]. *浙江农业科学*, 2018, 59 (7): 1253-1257.
- [8] 李计萍. 中药新药研究中多糖含量测定方法探讨 [J]. *中国中药杂志*, 2014, 39 (17): 3392-3394.
- [9] 杨勤, 谷文超, 周浓, 等. 苯酚-硫酸法与蒽酮-硫酸法测定地参多糖的比较研究 [J]. *食品科技*, 2020, 45 (1): 343-350.
- [10] 冯柳娟, 刘凯月, 全海倩. 铁皮石斛主要成分及其含量检测方法的研究 [J]. *农产品加工*, 2023 (6): 85-87.
- [11] 单政欣. 铁皮石斛多糖基于小鼠免疫调节功能的构效机制研究 [D]. 天津: 天津科技大学, 2022.
- [12] 刘杰, 胡志平, 邓莹. 超声波提取总黄酮的工艺研究现状 [J]. *黔南民族医学学报*, 2016, 29 (4): 308-309.
- [13] 喻明军, 向敏, 夏勇, 等. 铁皮石斛多糖的提取工艺及对生物活性影响研究进展 [J]. *农产品加工*, 2021 (9): 79-82, 88.
- [14] SUN C, ZHANG N, XU G, et al. Anti-tumor and immunomodulation activity of polysaccharides from *Dendrobium officinale* in S180 tumor-bearing mice [J]. *J Funct Foods*, 2022, 94: 105105.
- [15] 张属民, 丁海军, 李凤玲, 等. 中药多糖的制备及生物活性研究进展 [J]. *临床合理用药*, 2025, 18 (14): 177-180.
- [16] 李程程, 丁长春. 水提法优化广南铁皮石斛多糖的提取工艺 [J]. *文山学院学报*, 2015, 28 (3): 8-10, 14.
- [17] 谭婉, 卫阳飞, 李枫林, 等. 黑果枸杞果实多糖的超声辅助双水相萃取工艺优化、单糖组成分析及胰脂肪酶抑制活性评价 [J]. *食品工业科技*, 2024, 45 (22): 158-168.
- [18] 康桥, 孙越, 刘梦瑶, 等. 金铃子果皮多糖超声辅助提取工艺优化及其抗氧化和降糖活性研究 [J]. *食品工业科技*, 2024, 45 (21): 164-173.
- [19] 戴颖, 戴薇, 李翔, 等. 超声辅助酶法优化鸡骨草多糖提取工艺与抗炎研究 [J]. *甘肃医药*, 2024, 43 (3): 193-197, 212.
- [20] 王秋红, 陶娟, 宋萍. 藏药鬼箭锦鸡儿中多糖提取工艺的响应面法优化 [J]. *甘肃医药*, 2024, 43 (1): 30-32, 36.
- [21] 李磊, 柴慧芳, 魏晴, 等. 响应面法优化艾纳香多糖的超声提取工艺 [J]. *化学工程师*, 2024, 38 (3): 82-87.
- [22] 张一文, 刘晓庆, 沈伟. 响应面优化提取玄参碱溶性多糖及对高血压小鼠视网膜的影响 [J]. *中国食品添加剂*, 2024, 35 (4): 208-218.
- [23] 玉澜, 肖云, 陈燕萌, 等. Box-Behnken 响应面优化超声波辅助双水相提取枇杷叶多糖及其抗氧化活性研究 [J]. *饲料研究*, 2024, 47 (7): 94-99.
- [24] 木慧, 杨申明, 王映, 等. 番荔枝多糖的超声波辅助提取工艺优化及抗氧化活性分析 [J]. *保鲜与加工*, 2024, 24 (9): 72-79.
- [25] 王锋, 刘晓鹏, 王应玲, 等. 猴头菇菌丝体多糖的超声辅助提取工艺研究 [J]. *化学研究与应用*, 2020, 32 (11): 1984-1990.
- [26] ZHOU X, DONG Q, KAN X, et al. Immunomodulatory activity of a novel polysaccharide from *Lonicera japonica* in immunosuppressed mice induced by cyclophosphamide [J]. *PLoS One*, 2018, 13 (10): e0204152.
- [27] 于悦, 陈卓, 王亚非, 等. 蛹虫草胞外多糖的制备、结构分析及其免疫活性 [J]. *食品科学*, 2021, 42 (23): 106-113.
- [28] 房悦, 黄佳静, 张越, 等. 基于 BTLA/HVEM 通路研究茯苓多糖对免疫抑制小鼠的免疫调节作用 [J]. *中南药学*, 2025, 23 (5): 1183-1189.
- [29] 王禹心, 李雅鑫, 肖俊宇. 免疫球蛋白 IgM 和 IgA 的分子机制研究进展 [J]. *中国科学 (生命科学)*, 2025, 55 (5): 932-947.
- [30] 黎欣欣. 基于三相法的大球盖菇多糖提取方法优化及抗氧化和免疫调节活性研究 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2023.