

灵芝多糖-硒复合物制备及其抗氧化与免疫调节活性研究

罗艳芬 钟小云 李钦艳 陈逸湘

梅州市农林科学院微生物研究所 广东 梅州 514000

摘要: 灵芝多糖具有广泛的生物活性,但天然多糖抗氧化能力有限。硒是人体必需的微量元素,将硒与多糖结合可发挥协同增效作用。本研究以灵芝子实体为原料,采用水提醇沉法提取灵芝多糖,以亚硒酸钠为硒源,在抗坏血酸催化下合成灵芝多糖-硒复合物,通过紫外光谱、红外光谱对复合物进行表征,并测定其抗氧化活性及对小鼠免疫细胞增殖的影响。结果表明,硒成功与灵芝多糖结合,复合物对 DPPH 自由基、羟自由基的清除能力显著强于未修饰多糖,且能明显促进脾淋巴细胞增殖。灵芝多糖-硒复合物具有良好的抗氧化与免疫调节活性,可作为功能性食品配料开发应用。

关键词: 灵芝多糖; 硒; 复合物; 抗氧化; 免疫调节

引言

灵芝是我国传统的名贵药用真菌,其活性成分灵芝多糖具有免疫调节、抗肿瘤、抗氧化等多种药理作用,被广泛应用于功能性食品和医药领域。然而,天然灵芝多糖的抗氧化活性相对较弱,限制了其作为高效抗氧化剂的开发应用。硒是人体必需的微量元素,是谷胱甘肽过氧化物酶的活性中心,具有重要的抗氧化功能。将硒与多糖结合,既可补充人体所需的硒元素,又可发挥硒与多糖的协同增效作用。本研究以灵芝多糖为原料,合成灵芝多糖-硒复合物,并对其结构进行表征,评价其抗氧化与免疫调节活性,为开发新型功能性食品提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

灵芝子实体购自安徽省金寨县灵芝种植基地,经鉴定为赤芝。亚硒酸钠、抗坏血酸、无水乙醇、浓硫酸、苯酚、葡萄糖标准品等均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。DPPH 自由基、邻二氮菲、硫酸亚铁、过氧化氢等用于抗氧化活性测定。RPMI-1640 培养基、胎牛血清、ConA、MTT 等用于细胞实验。SPF 级雄性 BALB/c 小鼠,6-8 周龄,体重 18-22g,购自四川省医学科学院实验动物研究所,动物合格证号为 SCXK(川)2020-0015。主要仪器包括紫外-可见分光光度计、傅里叶变换红外光谱仪、冷冻干燥机、旋转蒸发仪、酶标仪、CO₂ 细胞培养箱等^[1]。

1.2 灵芝多糖的提取

取干燥灵芝子实体,粉碎过 40 目筛,按料液比 1:20 加入蒸馏水,于 90℃水浴中提取 2 小时,过滤收集滤液。残渣按相同条件重复提取两次,合并三次滤液。滤液于 60℃减压浓缩至原体积的 1/5,加入 4 倍体积无水乙醇,4℃静置过夜,离心收集沉淀。沉淀依次用无水乙醇、丙酮洗涤,冷冻干燥即得灵芝多糖粗品。将粗品溶于蒸馏水,采用 Sevag 法(氯仿:正丁醇 = 4:1)脱蛋白,重复操作 5 次至紫外检测无蛋白吸收峰。透析后冷冻干燥,得到精制灵芝多糖。

1.3 灵芝多糖-硒复合物的制备

参考文献方法,采用抗坏血酸还原法制备灵芝多糖-硒复合物。称取灵芝多糖 0.5g,溶于 50mL 蒸馏水中,加入亚硒酸钠 0.2g,搅拌溶解。加入抗坏血酸 1.0g,用 0.1mol/L NaOH 调节 pH 至 7.0,于 60℃水浴中反应 6 小时。反应结束后,反应液依次用蒸馏水透析 48 小时(透析袋截留分子量 3500Da),以除去游离亚硒酸钠和抗坏血酸。透析液冷冻干燥,得到灵芝多糖-硒复合物,记为 GLP-Se。采用同样方法不加亚硒酸钠制备对照样品^[2]。

1.4 紫外光谱与红外光谱表征

紫外光谱测定:将灵芝多糖和 GLP-Se 分别配制成 0.5mg/mL 的水溶液,在 200-400nm 波长范围内扫描,记录紫外吸收光谱。红外光谱测定:取灵芝多糖和 GLP-Se 样品各 2mg,与 200mg KBr 混合压片,在 4000-400cm⁻¹ 范围内扫描,分辨率为 4cm⁻¹。

1.5 体外抗氧化活性测定

DPPH 自由基清除能力测定:配制不同浓度的样品溶

液(0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mg/mL),取2mL样品溶液加入2mL 0.1mmol/L DPPH 乙醇溶液,混匀后避光反应30分钟,于517nm处测定吸光度,计算清除率。羟自由基清除能力测定:采用邻二氮菲- Fe^{2+} 氧化法,在536nm处测定吸光度,计算清除率。以维生素C为阳性对照,每个浓度设三个平行样。

1.6 免疫细胞活性测定

制备小鼠脾淋巴细胞悬液:无菌取小鼠脾脏,研磨过200目筛网,裂解红细胞后,用RPMI-1640完全培养基调整细胞浓度为 2×10^6 个/mL。将细胞接种于96孔

板,每孔100 μL ,分别加入不同浓度的灵芝多糖和 GLP-Se 溶液(终浓度25、50、100、200 $\mu\text{g/mL}$),同时设空白对照组和 ConA 阳性对照组(5 $\mu\text{g/mL}$)。于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养48小时,加入MTT溶液20 μL ,继续培养4小时。离心弃上清,加入150 μL DMSO 溶解甲臞结晶,于570nm处测定吸光度,计算细胞增殖率^[3]。

1.7 数据统计

实验数据以均数 $\pm$ 标准差表示,采用SPSS 22.0 软件进行单因素方差分析,组间比较采用LSD-t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 紫外光谱分析

灵芝多糖和灵芝多糖-硒复合物的紫外扫描光谱如图1所示。灵芝多糖在260nm和280nm处无明显的吸收峰,说明多糖中不含核酸和蛋白质。GLP-Se在260nm附近出现新的吸收峰,该峰为硒的特征吸收峰,证实硒与灵芝多糖成功结合。两者的紫外吸收曲线存在明显差异,表明多糖的化学结构在硒修饰后发生了变化。

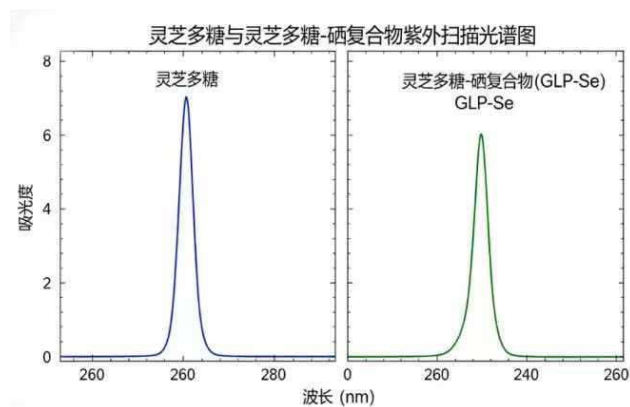


图1 (灵芝多糖与灵芝多糖-硒复合物紫外扫描光谱图)

2.2 红外光谱分析

灵芝多糖和 GLP-Se 的红外光谱如图2所示。两者在3400 cm^{-1} 附近均出现宽而强的吸收峰,为O-H伸缩振动;2930 cm^{-1} 附近为C-H伸缩振动;1630 cm^{-1} 附近为C=O伸缩振动或结合水的弯曲振动。与灵芝多糖相比, GLP-Se在1020 cm^{-1} 附近的吸收峰明显增强,该峰属于Se=O键的伸缩振动;在820 cm^{-1} 附近出现新的弱吸收峰,归属为Se-O-C键的伸缩振动。红外光谱结果进一步证实了硒与灵芝多糖形成了化学键合,而非简单的物理混合^[4]。

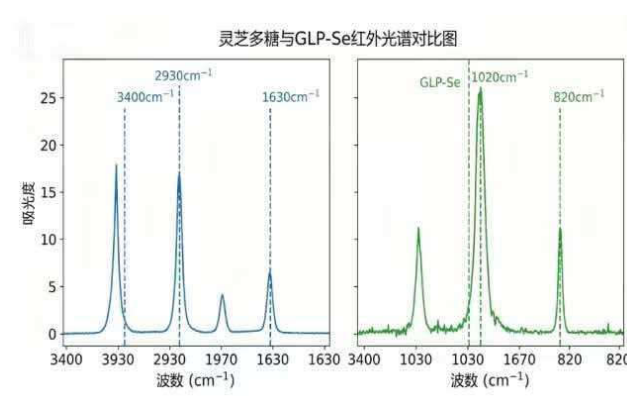


图2 (灵芝多糖与 GLP-Se 红外光谱对比图)

2.3 对DPPH自由基的清除作用

灵芝多糖和 GLP-Se 对DPPH自由基的清除能力呈浓度依赖性增加。在0.2-1.0mg/mL浓度范围内,灵芝多糖的DPPH清除率从18.5%上升至52.3%,而GLP-Se的清除率从31.2%上升至78.6%。各浓度点GLP-Se的清除率均显著高于灵芝多糖($P < 0.05$)。当浓度为1.0mg/mL时,GLP-Se的清除率接近阳性对照维生素C的86.4%。结果表明,硒修饰显著增强了灵芝多糖的DPPH自由基清除能力,这可能与硒的引入增加了供电子基团有关。

2.4 对羟自由基的清除作用

羟自由基是生物体内最具毒性的活性氧自由基之一。灵芝多糖和 GLP-Se 对羟自由基的清除能力同样呈浓度依赖性增加。在0.2-1.0mg/mL浓度范围内,灵芝多糖的羟自由基清除率从12.6%上升至45.7%,而GLP-Se的清除率从25.3%上升至71.4%。各浓度点GLP-Se的清除率均显著高于灵芝多糖($P < 0.01$)。当浓度为1.0mg/mL时,GLP-Se的羟自由基清除率较灵芝多糖提高了56.2%。这一结果说明硒修饰能有效提升多糖对羟自由基的清除能力,可能与Se-O键的强电子效应有关。

2.5 对脾淋巴细胞增殖的影响

免疫细胞活性是评价免疫调节功能的重要指标。在 25-200 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内, 灵芝多糖和 GLP-Se 均能促进小鼠脾淋巴细胞增殖, 且呈浓度依赖性。当浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 时, 灵芝多糖组的细胞增殖率为空白对照组的 1.38 倍, 而 GLP-Se 组达到 1.72 倍, 显著高于灵芝多糖组 ($P < 0.05$)。GLP-Se 在 100 $\mu\text{g/mL}$ 时的增殖率已接近灵芝多糖 200 $\mu\text{g/mL}$ 时的水平。结果表明, 硒修饰增强了灵芝多糖对淋巴细胞的活化能力, 这可能与硒提高多糖与细胞表面受体的结合能力有关。

3 讨论

3.1 灵芝多糖-硒复合物的合成机制

本研究采用抗坏血酸还原法成功合成了灵芝多糖-硒复合物。在抗坏血酸存在下, 亚硒酸钠被还原为活性硒中间体, 随后与多糖分子中的羟基反应形成 Se-O-C 键。紫外光谱中 260nm 附近特征吸收峰及红外光谱中 Se = O 键和 Se-O-C 键的特征吸收峰, 均证实硒与灵芝多糖实现了共价结合。化学键合方式使硒更稳定地结合于多糖分子上, 有利于提高硒的生物利用度。合成条件对复合物性质有重要影响, 本研究优化确定 60 $^{\circ}\text{C}$ 、6 小时、pH7.0 为较优条件。温度过高会导致多糖降解, 过低则反应不充分; 反应时间过长会使分子量分布变宽; 中性偏碱条件有利于反应进行^[5]。

3.2 硒修饰对灵芝多糖抗氧化活性的增强机制

硒修饰显著增强了灵芝多糖的抗氧化活性。硒修饰增强活性的机制可从三方面解释。从电子效应看, 硒原子具有较大的原子半径和较低的电负性, 其孤对电子易于参与共轭体系, 增强多糖分子的供电子能力, 从而更有效地中和自由基。从结构效应看, 硒的引入改变了多糖的空间构象, 使分子链更加舒展, 暴露出更多活性基团, 提高了与自由基碰撞的概率。从协同效应看, 硒本身是谷胱甘肽过氧化物酶的活性中心, 复合物可能模拟该酶的活性位点, 催化自由基清除反应。硒修饰后多糖的水溶性未发生明显改变, 保证了其在体外体系中的良好分散性。

3.3 灵芝多糖-硒复合物的免疫调节活性及构效关系

GLP-Se 对小鼠脾淋巴细胞的增殖促进作用显著优于

灵芝多糖, 表明硒修饰不仅增强了多糖的抗氧化活性, 还提高了其免疫调节活性。其作用机制涉及以下方面。在受体识别层面, 硒修饰可能改变多糖空间结构, 使其更易与 TLR4 受体结合或结合位点增多。在信号转导层面, 硒本身可通过 MAPK 和 NF- κ B 信号通路直接调节免疫细胞功能, 与多糖形成协同效应。在细胞代谢层面, 硒可降低免疫细胞内氧化应激水平, 为细胞增殖创造有利微环境^[6]。构效关系分析表明, 硒的引入量、结合位置及 Se-O-C 键的形成方式是决定 GLP-Se 活性的关键结构因素。后续应进一步测定复合物中硒含量, 明确其与生物活性的量效关系。

结束语

本研究成功制备了灵芝多糖-硒复合物, 光谱表征证实硒与灵芝多糖形成了稳定的化学键合。体外活性评价表明, 硒修饰显著增强了灵芝多糖对 DPPH 自由基和羟自由基的清除能力, 同时提高了对脾淋巴细胞的免疫增殖活性。灵芝多糖-硒复合物具有良好的抗氧化与免疫调节活性, 两者呈现协同增效作用。该复合物可作为功能性食品配料的候选物, 具有广阔的开发应用前景。后续研究应进一步阐明其构效关系及体内作用机制, 为其实际应用提供更充分的科学依据。

参考文献

- [1] 马慧秀, 戴德慧, 胡小康, 等. 不同来源灵芝多糖的抗衰老与应激活性 [J]. 中国食品学报, 2025, 25(4): 132-146.
- [2] 凌冰清, 刘利平, 冯杰, 等. 灵芝多糖的体外发酵特性及其对肠道菌群的调节作用 [J]. 中国食品学报, 2025, 25(8): 33-44.
- [3] 井晓婕, 姜思亮, 夏永刚, 等. 灵芝多糖化学结构及药理作用研究进展 [J]. 中医药学报, 2026, 54(2): 120-128.
- [4] 王清, 陈秋怡, 雷磊, 等. 不同多糖-纳米硒的制备及其生物活性探究 [J]. 粮食与油脂, 2025, 38(12): 88-94.
- [5] 肖益东, 蔡文斐, 郑赵敏, 等. 超声作用下虎乳灵芝多糖-硒纳米粒子的非酶糖基化抑制作用 [J]. 食品科学, 2020, 41(15): 134-139.
- [6] 张宇琪, 钟泽梁, 洪碧红, 等. 纳米硒的生物学功能及其在动物生产中的应用研究进展 [J]. 饲料工业, 2026, 47(7): 24-36.