

國立臺灣海洋大學食品科學系

碩士班專題討論書面報告

木棗多醣的結構分析及對於抗氧化活性和免疫
調節之作用

Structural analysis and effects of polysaccharides
from *Ziziphus Jujuba* cv. Muzao on antioxidative
activities and immunoregulation

授課老師：黃崇雄 老師

林詠凱 老師

指導老師：黃崇雄 老師

學 號：11142005

學 生：林育雯

報告日期：111 年 12 月 10 日

內 容 40%	時間掌控 10%	表達能力 30%	投影片 10%	書面資料 10%

木棗多醣的結構分析及對於抗氧化活性和免疫調節之作用

41142005 林育雯

12/10/2022

大綱

1. 前言
2. 木棗多糖的分離、純化及抗氧化活性
3. 木棗多糖增強小腸屏障的功能及改善敗血症小鼠的存活率
4. 結論

摘要

紅棗 (*Ziziphus jujuba*) 的果實從古至今被廣泛用於食品、藥膳及中藥方劑中，許多研究顯示，從紅棗果實中萃取之多醣具有抗氧化、抗菌、抗發炎及調節免疫之作用。木棗為目前市面常見之紅棗品種之一，本次報告主要探討木棗多醣純化方式、結構分析、抗氧化活性及調節免疫之作用。利用蒸餾水先製備粗多醣 (*Ziziphus jujuba* cv. Muzao polysacchrides; ZMP)，再以陰離子交換層析法及凝膠過濾層析法進一步純化，獲得均質的多醣 (purification of ZMPs by Sephadex G-100 column; GZMP)。分析木棗多醣的結構與抗氧化活性後，發現 ZMP 比 GZMP 具有較高的 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 自由基及羥基自由基清除活性，此結果與多醣分子量、單醣組成、半乳糖醛酸含量及包含其他化學物質有關。通過盲腸結紮和穿刺 (cecal ligation and puncture; CLP) 手術建立敗血症的小鼠模型，藉此探討木棗多醣對於減少腸黏膜屏障破壞、降低發炎反應及細胞凋亡之作用。作者藉由試探性實驗發現，以 1000 mg/kg 的木棗多醣進行預處理，敗血症小鼠有較高存活率，故以此濃度之木棗多醣進行後續實驗。實驗結果發現，木棗多醣可減少腸黏膜屏障緊密連結蛋白的減少，並藉由調節細胞凋亡相關蛋白及抑制促發炎細胞激素和 TLR-4/NF- κ B 發炎路徑，減緩敗血症小鼠因併發症引發之死亡率。木棗多醣具有抗氧化活性及調節免疫機制之作用，可作為紅棗多醣發展為功能性食品之參考依據。

一、前言

紅棗 (*Ziziphus jujuba*) 的果實在全世界被廣泛用於保健品或草藥 (He, Z. *et al.*, 2019; Ji, Zhang, *et al.*, 2019)，在各種紅棗品種中，木棗 (*Ziziphus jujuba* cv. Muzao) 是紅棗的主要品種之一，幾千年來持續被應用於食療 (Du, L. J. *et al.*, 2013)。許多研究證實，從木棗中提取的木棗多糖具有抗氧化 (Chen, J., Li, Z. *et al.*, 2013; Wang, B., 2011)、抗癌 (Ji, Hou, *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2019)、抗菌、抗發炎 (Li, Ai, *et al.*, 2014; Periasamy *et al.*, 2020)、降血脂 (Ji *et al.*, 2018)、免疫調節 (Chi *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2017)、保肝 (Liu, G. *et al.*, 2015) 和保護腸道 (Ji, Hou, *et al.*, 2019; Ji, Zhang, *et al.*, 2019) 等多種生物活性。

1,1-二苯-2-三硝苯肼 (DPPH) 是一種以氮為中心的穩定自由基，是活性自由基的捕獲劑之一。DPPH 自由基漂白是一種快速測定草藥提取物抗氧化活性的方法 (Elboutachfaiti *et al.*, 2011)。羥基自由基可以與大部分生物大分子發生反應，並在相鄰的生物分子中引起嚴重的氧化損傷 (Xie, Shen, *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2015)。因此，消除羥基自由基是保健和防病的關鍵。

敗血症是一種由微生物感染引發的發炎性疾病，與全身性發炎反應和多重器官衰竭有關 (Hattori *et al.*, 2017; van der Poll *et al.*, 2017)。敗血症時，腸道血管運送氧氣量不足會導致腸黏膜損傷，並促進腸上皮細胞凋亡，進而導致腸道屏障損傷和通透性增加，細菌和有毒物質從腸道轉移到腸黏膜的固有層會刺激全身性發炎反應 (Cabrera-Perez *et al.*, 2017; Mittal & Coopersmith, 2014)，而腸道上皮屏障受損可能導致敗血症患者多重器官衰竭並最終死亡 (Lu *et al.*, 2019; Vandenbroucke *et al.*, 2013)。腸道屏障全部的功能依賴於細胞間連接 (He, Y. *et al.*, 2018)。緊密連接 (tight junctions; TJs) 主要由 occludin、tricellulin 和 claudin 組成 (Bucker *et al.*, 2011; Gu *et al.*, 2011) 並調節附著狀況，這些蛋白質附著在下面的蛋白質上，例如與皮質細胞骨架緊密相連的 zonula occludens (ZO-1, 2, 3) (Bucker *et al.*, 2011)。敗血症的主要進展包括腸道黏膜結構破壞和 TJs 蛋白的減少。類鐸受體 (Toll-like receptor, TLR) 藉由識別病原體相關分子來調節發炎反應 (Yang *et al.*, 2017)。TLR 可以通過細胞內訊號激活下游 NF- κ B，進而刺激促發炎細胞激素釋放，且 TLR-4 是一種非常重要的參與發炎訊號傳導的受體 (Haussner *et al.*, 2019)，在受損的腸道中，TLR-4 的異常表達會導致發炎反應。最近的研究表示，TLR-4 可以調節 NF- κ B 活化並促進發炎反應 (Han, J., Liu, L. *et al.*, 2016)。TLR-4 在正常組織中的表現量較低，在敗血症時上升，TLR-4 可以調節 NF- κ B 路徑 (Li, Wang, *et al.*, 2015)。NF- κ B 路徑在調節促發炎基因和促發炎反應過程中非常重要 (Goto *et al.*, 2020; Ramakrishnan *et al.*, 2019)。NF- κ B 是由 p65 和 p50 組成的異二聚體。敗血症時，由於抑制因子 κ B (I κ B) 的降解，NF- κ B 的 p65 會從細胞質轉移到細胞核。

本報告探討木棗多糖的抗氧化活性及對於發炎反應的免疫調節。

二、木棗多糖的分離、純化及抗氧化活性

從紅棗果實中分離出的多糖具有多項生物活性，包含抗氧化、免疫調節、

1 抗病毒、抗腫瘤和抗癌作用 (Li, Liu, *et al.*, 2011; Ji *et al.*, 2017; Wang, Zhao, *et*
2 *al.*, 2012; Xie, Tang, *et al.*, 2016)。部分研究已經描述從木棗提取的多醣活性和結
3 構特徵 (Wang, Liu, *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2017)，然而關於木棗多醣分離方
4 式、純化、特性分析和抗氧化活性的訊息很少，故本篇研究將對於木棗多醣進
5 行相關分析。

6 Ji 等人將木棗去除種子後，在溫度 50°C 下進行乾燥 48 小時，乾燥後的木
7 棗利用 60 目 (篩孔尺寸：0.25mm) 的篩網磨碎，將乾燥的棗粉與 80%乙醇在
8 85°C 的水浴槽中回流兩次，每次 3 小時，去除可溶性色素和脂質。乾燥的殘留
9 物在最適條件下用蒸餾水萃取兩次，收集上清液、合併、濃縮，並與其 4 倍體
10 積的乙醇混合，沉澱粗多醣。收集蒸餾水中再懸浮的顆粒，用 Sevag 試劑去蛋
11 白質，並以過氧化氫溶液脫色，透析且濃縮後，用乙醇進行 2 次沉降，得到總
12 產率為 4.31% 的淡黃色粗多醣 (polysacchrides of *Ziziphus Jujuba* cv. Muzao;
13 ZMP) (Qu *et al.*, 2013)。

14 為提高純度並獲得勻相的多醣產物，ZMP 經二乙胺乙 (DEAE-52) 纖維素
15 柱(2.6 cm × 40 cm)陰離子交換層析法進行純化，並在 1.0 mL/min 的流速下，用
16 去離子水、0.05、0.1 和 0.3 M 氯化鈉 (NaCl) 水溶液進行逐次沖提 (8 mL/管)，
17 並以酚-硫酸法用 490 nm 測定每管分餾液的吸光度，取相對吸光度較高的 4 管
18 分餾液，命名為 ZMP-1、ZMP-2、ZMP-3 和 ZMP-4 (Fig. 1)。用去離子水進行沖
19 提的 ZMP-1 可能是中性多醣，分別用 0.05、0.10 和 0.30 mol/L NaCl 水溶液進
20 行沖提的 ZMP-2、ZMP-3 和 ZMP-4 是酸性多醣。

21 經過透析、濃縮和冷凍乾燥後，ZMP-1、ZMP-2、ZMP-3 和 ZMP-4 分別用
22 Sephadex G-100 柱(1.6 cm × 60 cm)凝膠過濾層析法進一步純化，並用蒸餾水以
23 0.3 mL/min 流速進行沖提(8 mL/管)，在 490 nm 測定每管分餾液的吸光度，取相
24 對吸光度較高的 4 管分餾液，以產生 GZMP-1、GZMP-2、GZMP-3 和 GZMP-4
25 純化分餾液 (Fig. 2)。根據 ZMP 的原始量，4 種分餾液的回收率分別為
26 0.209%、0.093%、0.418% 和 0.255%，且都有一個對稱、單一的峰值，此實驗
27 結果顯示所有純化產物都是均質的多醣。最後，在進一步研究前將 4 個樣品進
28 行以冷凍乾燥機進行乾燥 (-50°C，30Pa，24h)。

29 Ji 等人利用 HPLC 測定分子量，用 Bradford 法測定蛋白質含量(Bradford,
30 1976; Wang, Chen, *et al.*, 2014)，並通過間位羥基聯苯法測定半乳糖醛酸含量
31 (Chang *et al.*, 2010)，單醣組成以配備高性能毛細管柱的氣相層析法 (gas
32 chromatography; GC) 進行分析 (Wang, Lü, *et al.*, 2014; Wang, Zhang, *et al.*, 2017)
33 (Table 1)。實驗結果顯示，GZMP-1、GZMP-2、GZMP-3 和 GZMP-4 的分子量
34 分別為 111.2、95.1、84.2 和 571.4 kDa，高於 Chang 等人 (2010) 的實驗結果，
35 表示在不同的大棗果實品種和實驗條件下，可觀察到 10-10³ kDa 範圍內不同的
36 分子量。較低分子量和較高負電荷的多醣在水溶液中產生延伸的構形和較高的
37 流體動力學體積，可能表現出更顯著的生物活性 (Zhang *et al.*, 2017)。4 個
38 GZMP 樣品的蛋白質含量約為 2%，因純化過程中以 Sevag 方法去除游離蛋白

質，故被測量出的蛋白質很可能是結合多醣的蛋白質。GZMP-3 和 GZMP-4 中的半乳糖醛酸含量相對高於 GZMP-1 和 GZMP-2，GZMP-2 和 GZMP-3 均顯示由鼠李糖、阿拉伯糖和半乳糖組成，且阿拉伯糖是主要的單醣，而 GZMP-1 由四種單醣組成，即鼠李糖、阿拉伯糖、葡萄糖和半乳糖，莫耳分率分別為 0.59 : 72.80 : 0.26 : 7.48，在 GZMP-4 中僅檢測到鼠李糖和阿拉伯糖。單醣組成分析結果顯示，4 個 GZMP 分餾液主要由鼠李糖和阿拉伯糖組成，此與 Wang 等人 (2015) 的結果相似，組成的差異可能由於品種、栽培地區和提取方法不同造成。

為了解多醣樣品結構的官能基，將乾燥後的樣品與 KBr 粉末一起研磨並壓製成顆粒，在 $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ 的頻率範圍以傅立葉轉換紅外光譜儀 (Fourier transform infrared spectroscopy ; FTIR) 進行檢測 (Sun *et al.*, 2014) (Fig. 3)。實驗結果顯示，多醣樣品在 $3500\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ 處皆有一個強而寬的吸收波峰，主因於 O-H 基團伸縮振動，在 $3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ 處也皆有一個 C-H 基團伸縮振動的吸收波峰，此結果說明 ZMP、GZMP-1、GZMP-2、GZMP-3、GZMP-4 均為多醣 (Liu, C. H. *et al.*, 2008)。此外，在 1641 cm^{-1} 的吸收波峰歸因於多醣與水結合，而 $1200\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ 處的吸收波峰表示單醣具有吡喃糖環 (Li, Zhao, *et al.*, 2014)。 1631 和 1426 cm^{-1} 處的兩個吸收波峰代表一個羧基，表示 GZMP-1、GZMP-2、GZMP-3 和 GZMP-4 中存在糖醛酸。GZMP-1 和 ZMP 的光譜中， 860 cm^{-1} 附近的吸收波峰表示存在 α 型糖苷鍵 (Manrique *et al.*, 2002)。在 $612\text{--}631\text{ cm}^{-1}$ 處一個明顯吸收波峰表示所有樣品中的 C-H 面外彎曲振動。以上結果表示，多醣樣品結構的有機基團與 Table 1 檢測的結果一致。

有關多醣聚合物的表面形態，Ji 等人利用掃描式電子顯微鏡 (scanning electron microscopy ; SEM) 將樣品放大 20000 倍 (Romdhane *et al.*, 2017) (Fig. 4)。顯微鏡照片顯示，表面光滑且緊密，此顯示分子間有很強的作用力，而 GZMP-3 比其他多醣呈現更多的折疊 (Fig. 4c)。此外，顯微鏡照片也顯示在掃描過程中，由於高能量的電子束導致樣品表面形成了裂紋。以上結果與 Cui 等人 (2014) 的發現不同，可能因使用不同的提取、純化和製備方法 (Cui *et al.*, 2014)。

酸性紅棗多醣對於清除螯合自由基的活性較中性紅棗多醣更加有效 (Ji *et al.*, 2017)。Ji 等人以 1,1-二苯-2-三硝苯肼 (DPPH) 自由基及羥基自由基的清除率作為判斷木棗多醣在體外進行抗氧化的活性。將不同濃度 ($0.5\text{--}2.5\text{ mg/mL}$) 的 ZMP、GZMP-1、GZMP-2、GZMP-3 和 GZMP-4 各 2 mL，分別與 4 mL、0.1 mM DPPH 自由基乙醇溶液，及 2.0 mL FeSO_4 、2.0 mL 水楊酸-乙醇溶液和 2.0 mL H_2O_2 進行混合。含 DPPH 自由基的溶液在黑暗中靜置 30 分鐘，然後測定 517 nm 的吸光度；含羥基自由基的溶液在 37°C 的水浴槽中進行反應 60 分鐘，然後測定 510 nm 的吸光度 (Lin *et al.*, 2009; Wang, Zhao, *et al.*, 2012)。清除活性可用以下公式計算：

$$1 \quad \text{自由基清除活性}(\%) = \left(1 - \frac{\text{含多醣溶液的吸光度} - \text{不含多醣溶液的吸光度}}{\text{去離子水的吸光度}}\right) \times 100\%$$

2 實驗結果顯示，對於 DPPH 自由基，所有多醣樣品在 0.5 mg/mL 濃度時顯示低
 3 清除效果，其中，ZMP 表現出 18.18% 的最強清除活性，而 GZMP-1 的清除活
 4 性 1.56% 最弱，此清除活性排序與半乳糖醛酸含量排序一致，表示較高的半乳
 5 糖醛酸含量是木槲多醣抗氧化能力的明顯指標。此外，除 GZMP-1 和 GZMP-2
 6 外，其他多醣的清除活性在濃度範圍 1.5-2.0 mg/mL，隨著樣品濃度增加而顯著
 7 增加 (Fig. 5a)，此結果顯示具有活性羥基的單醣可以為自由基提供氫或電子，
 8 形成可以終止自由基連鎖反應的穩定自由基 (Xie, Shen, *et al.*, 2011)。對於羥基
 9 自由基，木槲多醣對 OH 自由基的清除活性隨著濃度的增加而增加至 2.5
 10 mg/mL。在 2.5 mg/mL 時，ZMP、GZMP-4、GZMP-3、GZMP-2 和 GZMP-1 的
 11 羥基自由基清除活性分別為 67.05%、49.38%、36.94%、44.77% 和 26.03% (Fig.
 12 5b)。此結果顯示，GZMP 的抗氧化能力相對於 ZMP 顯著降低，可能為沒有其
 13 他植物化學物質輔助，如酚類化合物、維他命 E 或色素 (Tsiapali *et al.*, 2001)。
 14 此結果顯示較高的半乳糖醛酸含量和較小的木槲多醣分子量可能對清除羥基自
 15 由基的作用更顯著 (Chen, H. X. *et al.*, 2008; Tsiapali *et al.*, 2001)，羥基自由基清
 16 除活性也與多醣中的變旋異構氫有關。

17 綜上所述，ZMP 和 GZMP-4 具有顯著的抗氧化活性，而 GZMP-1、
 18 GZMP-2 和 GZMP-3 具有中等的 DPPH 自由基和 OH 自由基清除活性，此結果
 19 可能與木槲多醣的結構特徵，如分子量、單醣組成和半乳糖醛酸含量有相關
 20 性。

21 三、木槲多糖增強小腸屏障的功能及改善敗血症小鼠的存活率

22 敗血症及其相關併發症導致大量的全球死亡率不斷增加的經濟負擔
 23 (Dickson, 2016)，早期預防性治療對於正常生理功能和預防疾病至關重要。經研
 24 究顯示，木槲多醣 (*Ziziphus jujuba* cv. Muzao polysacchrides; ZJPs) 可抑制 NF-
 25 κ B 和細胞激素 IL-1 β 和 IL-6 的活性 (Chen, J., Du, C. Y. *et al.*, 2014)，並激活
 26 AMPK 信號改善腸道屏障，及控制促發炎細胞激素和 MPO 的活性來抑制發炎
 27 反應 (Yue *et al.*, 2015)。故本篇研究目的為探討 ZJPs 是否可以通過調節促發炎
 28 細胞激素的釋放，及藉由影響敗血症小鼠的 TLR-4/NF- κ B 通路抑制細胞凋
 29 亡，進而減輕盲腸結紮和穿刺 (cecal ligation and puncture; CLP) 誘導的腸道損
 30 傷。

31 採用水萃取並經乙醇沉澱獲得純度為 95% 的木槲多醣，成分分析顯示由甘
 32 露糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖組成，莫耳分率為 3.23 : 5.91 :
 33 11.25 : 23.01 : 49.22。

34 為了解腸道損傷小鼠經 ZJPs 預處理後的臨床症狀及生存時間，Zhou 等人
 35 將 50 隻小鼠隨機分為 5 個組別：對照組、實驗 I 組 (NS+CLP)、實驗 II 組 (ZJPs
 36 200+CLP)、實驗 III 組 (ZJPs 500+CLP) 和實驗組 IV (ZJPs 1000+CLP)。II-IV 組
 37 小鼠在進行 CLP 手術前每天分別用 200 mg/kg、500 mg/kg 和 1000 mg/kg 劑量

1 的 ZJPs 溶於生理鹽水溶液進行胃管灌食法 2 週，對照組和實驗 I 組小鼠則給予
2 等體積的生理鹽水。50 隻小鼠由 CLP 建立敗血症模型後，開始監測其存活時間
3 (h)，直到動物死亡，並由三名獨立研究人員每天根據臨床評分系統 (Table 2)
4 對於臨床症狀進行 7 天分析 (Fig. 6a)。實驗結果顯示，用 500 和 1000 mg/kg
5 ZJPs 進行預處理的小鼠臨床評分顯著提高。NS+CLP 組和 ZJPs 200+CLP 組的
6 臨床症狀評分相似，兩組的評分均顯著下降，而用 1000 mg/kg ZJPs 進行預處理
7 的小鼠臨床症狀評分顯著較提高 330.0% (Fig. 7a)。CLP 手術後 7 天觀察 5 組的
8 生存時間，結果顯示存活率隨著 ZJPs 劑量增加而增加，對照組所有小鼠皆存
9 活，而 ZJPs 1000+CLP 組的存活率達到 56%，存活時間明顯高於其他實驗組
10 (Fig. 7b)。以上結果顯示，用 1000 mg/kg ZJPs 進行預處理可顯著提高 CLP 誘導
11 敗血症小鼠的臨床症狀評分和存活時間，因此，Zhou 等人選擇 1000 mg/kg ZJPs
12 的劑量作為後續實驗的劑量。

13 Zhou 等人另外將 60 隻小鼠隨機分為三組：A 組 (對照組)、B 組 (NS+CLP)
14 和 C 組 (ZJPs+CLP)。C 組小鼠在 CLP 手術前 2 週每天以胃管灌食法給予高劑
15 量 1000 mg/kg ZJPs，A 組和 B 組的小鼠則給予等體積的生理食鹽水。為了測定
16 腸道通透性，在 CLP 手術後 6 小時，Zhou 等人從每組隨機選擇 5 隻小鼠，以
17 胃管灌食法餵食 600 mg/kg 螢光異硫氰酸鹽葡聚糖 (fluorescein isothiocyanate-
18 dextran; FITC-D)，5 小時後通過心臟穿刺採血並離心獲得血漿，以儀器測量
19 FITC-D 在血漿中的濃度。與對照組相比，NS+CLP 組的 FITC-D 濃度明顯升
20 高，然而以 1000 mg/kg ZJPs 進行預處理降低了 FITC-D 的濃度 (Fig. 8)。以上述
21 結果顯示，用 ZJPs 進行預處理減輕敗血症小鼠腸道通透性增加的問題。

22 腸黏膜屏障損傷被認為是敗血症的基本病理變化，伴隨腸道通透性增加和
23 絨毛結構改變 (Hausner *et al.*, 2019; Ji, Hou, *et al.*, 2019)。3 組小鼠經 CLP 手術
24 後 12 小時，在麻醉下進行剖腹手術，取出迴腸末端的兩個 3 公分段落 (約 6 至
25 9 公分和 12 至 15 公分處) 以進行進一步分析 (Fig. 6b)。迴腸樣本用 10% 福爾
26 馬林溶液固定，然後用石蠟包埋，Zhou 等人將迴腸組織切成 5 μ m 的薄片，進
27 行脫蠟後，將組織切片復水，並以蘇木精及伊紅進行染色 (hematoxylin and
28 eosin stain; H&E 染色)，染色後的組織切片由 3 位經驗豐富且對於誘導損傷程
29 度不知情的病理學家，藉由用於評估小腸樣本損傷的 Chiu 評分分類 (Chiu *et*
30 *al.*, 1970; Table 3) 進行評分，並請對組織切片樣品不知情的檢查員使用
31 CaseViewer 2.0 軟體測量從絨毛到腸壁肌肉層的絨毛長度。觀察結果顯示，對
32 照組的迴腸組織切片可見完整的絨毛和排列整齊的上皮細胞 (Fig. 9a)，然而在
33 NS+CLP 組中，腸黏膜的微絨毛結構明顯受損，微絨毛結構喪失且萎縮 (Fig.
34 9b)，但是在 ZJPs+CLP 預處理組中，絨毛受到輕微損傷，顯示維持的頂端和發
35 達的上皮下空間 (Fig. 9c)。此外，Zhou 等人觀察到與 NS+CLP 組相比，用
36 ZJPs 進行預處理的小鼠水腫較少且腸壁較厚。NS+CLP 組的腸道組織學評分高
37 於 ZJPs+CLP 組 (Fig. 9d)。NS+CLP 組的絨毛長度明顯短於 ZJPs+CLP 組 (Fig.
38 9e)。以上述結果顯示，用 1000 mg/kg ZJPs 進行預處理可以預防腸黏膜損傷。

在 CLP 小鼠模型中，血清中 IL-1 β 和 TNF- α 濃度顯著增加 (Hu *et al.*, 2019; Mori *et al.*, 2011)。Zhou 等人測定血清中促發炎細胞激素和雙胺氧化酶 (diamine oxidase; DAO) 的濃度。與 NS+CLP 組相比，ZJPs+CLP 預處理組的 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平顯著降低 (Fig. 10a-c)。DAO 是腸黏膜絨毛中的一種高活性細胞內酵素，是腸屏障受損程度的標誌，在敗血症中明顯升高 (Zhan *et al.*, 2018)，此研究結果顯示，與 NS+CLP 組相比，ZJPs 治療降低了血清中 DAO 的濃度 (Fig. 10d)。以上結果顯示，以 ZJPs 進行預處理減少促發炎細胞激素和 DAO 的釋放，進而減少發炎和腸黏膜損傷。

腸黏膜損傷和通透性改變主要伴隨著緊密連接蛋白的減少 (Han, C. *et al.*, 2020)。Zhou 等人以免疫組織化學染色法(IHC)及西方點墨法檢測腸道組織中 TJs 蛋白的狀況。實驗結果顯示，ZJPs+CLP 組腸道黏膜中 Claudin-1 (Fig. 11a-d)、Occludin (Fig. 11e-h) 和 ZO-1 (Fig. 11i-l)的表現量高於 NS+CLP 組。西方點墨法檢測的結果 (Fig. 11m-p) 與 IHC 測定一致。以上結果顯示，藉由 ZJPs 進行預處理，CLP 誘導的敗血症小鼠腸道組織中 TJs 蛋白的表現量顯著上調。

細胞凋亡是一種嚴格調節細胞自殺的過程，可維持體內平衡，並由幾種抗凋亡和促凋亡蛋白進行調節。實驗結果顯示，腸道黏膜中 Bcl-2 的表現量在 ZJPs+CLP 組中上升，但在 NS+CLP 組中下降 (Fig. 12a-d)。腸道黏膜中 Bax (Fig. 12e-h) 和 Caspase-3 (Fig. 12i-l) 的表現量在 ZJPs+CLP 組中相對降低，但在 NS+CLP 組中顯著升高。對照組與 ZJPs+CLP 組 Caspase-3 和 Bax 的表現量無太大差異。以上結果顯示，以 ZJPs 進行預處理可以抑制 CLP 誘導的敗血症小鼠腸道黏膜凋亡，因此，Zhou 等人假設 ZJPs 可以通過降低 Bax 和 Caspase-3 蛋白表現量以及增加 Bcl-2 蛋白表現量來部分預防敗血症腸黏膜中的細胞凋亡。

類鐸受體-4 (Toll-like receptor; TLR-4) 是參與發炎信號傳導非常重要的受體，也是 TLR 中參與敗血症發炎反應的受體 (Haussner *et al.*, 2019)。Zhou 等人以西方點墨法顯示腸道黏膜中 TLR-4 和 p65 蛋白表現量的變化 (Fig. 13a)，並計算相對表現量 (Fig. 13b-c)，另外也通過 RT-PCR 檢測 TLR-4/NF- κ B 表現量。實驗結果顯示，NS+CLP 組 TLR-4 和 p65 蛋白表達顯著增加，ZJPs+CLP 預處理組中 p65 和 TLR-4 的表現量顯著下降，部分阻止 CLP 誘導的 TLR4/NF- κ B 表現量增加 (Fig. 13d-e)。以上結果顯示，在 CLP 誘導的敗血症小鼠中，用 ZJPs 進行預處理減弱用於調節 DNA 發炎細胞激素表現的 NF- κ B 轉錄因子。

綜上所述，ZJPs 可以改善 CLP 誘導敗血症小鼠的預後，減少腸黏膜屏障破壞，並減少敗血症小鼠的發炎反應，可能的機制與抑制 TLR-4/NF- κ B 路徑和細胞凋亡有關。

四、結論

木槲多醣主要由鼠李糖、阿拉伯糖、葡萄糖、半乳糖和半乳糖醛酸組成，木槲多醣的結構特徵使其具有抗氧化活性，且可減少腸黏膜屏障破壞，並藉由抑制 TLR4/NF- κ B 路徑與細胞凋亡，減少發炎反應。

五、参考文献

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Cabrera-Perez, J., Badovinac, V. P., & Griffith, T. S. (2017). Enteric immunity, the gut microbiome, and sepsis: Rethinking the germ theory of disease. *Experimental Biology and Medicine* (Maywood), 242(2), 127–139.
- Chang, S. C.; Hsu, B. Y.; Chen, B. H. (2010). Structural characterization of polysaccharides from *Zizyphus jujuba* and evaluation of antioxidant activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 47, 445–453.
- Chen, H. X.; Zhang, M.; Qu, Z. S.; Xie, B. J. (2008). Antioxidant activities of different fractions of polysaccharide conjugates from green tea (*Camellia sinensis*). *Food Chemistry*, 106, 559–563.
- Chen, J., Du, C. Y., Lam, K. Y., Zhang, W. L., Lam, C. T., Yan, A. L., & Tsim, K. W. (2014). The standardized extract of *Ziziphus jujuba* fruit (jujube) regulates pro-inflammatory cytokine expression in cultured murine macrophages: Suppression of lipopolysaccharide-stimulated NF-kappaB activity. *Phytotherapy Research*, 28(10), 1527–1532.
- Chen, J., Li, Z., Maiwulanjiang, M., Zhang, W. L., Zhan, J. Y., Lam, C. T., & Tsim, K. W. (2013). Chemical and biological assessment of *Ziziphus jujuba* fruits from China: Different geographical sources and developmental stages. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 61(30), 7315–7324.
- Chi, A., Kang, C., Zhang, Y., Tang, L., Guo, H., Li, H., & Zhang, K. (2015). Immunomodulating and antioxidant effects of polysaccharide conjugates from the fruits of *Ziziphus jujube* on chronic fatigue syndrome rats. *Carbohydrate Polymers*, 122, 189–196.
- Chiu, C. J., McArdle, A. H., Brown, R., Scott, H. J., Gurd, F. N. (1970). Intestinal mucosal lesion in low-flow states. *Archives of Surgery*, 101, 478–483.
- Cui, G. T.; Zhang, W. X.; Wang, Q. J.; Zhang, A. M.; Mu, H. B.; Bai, H. J.; et al. (2014). Extraction optimization, characterization and immunity activity of polysaccharides from *Fructus jujubae*. *Carbohydrate Polymers*, 111, 245–255.
- Dickson, R. P. (2016). The microbiome and critical illness. *The Lancet Respiratory Medicine*, 4(1), 59–72.
- Du, L. J.; Gao, Q. H.; Ji, X. L.; Ma, Y. J.; Xu, F. Y.; Wang, M. (2013). Comparison of flavonoids, phenolic acids, and antioxidant activity of explosion-puffed and sun-dried jujubes (*Ziziphus jujuba* Mill.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 11840–11847.
- Elboutachfai, R.; Delattre, C.; Petit, E.; Michaud, P. (2011). Polyglucuronic acids:

1 Structures, functions and degrading enzymes. *Carbohydrate Polymers*, 84, 1–13.

2 Gao, J.; Zhang, T.; Jin, Z. Y.; Xu, X. M.; Wang, J. H.; Zha, X. Q.; et al. (2015).

3 Structural characterisation, physicochemical properties and antioxidant activity of

4 polysaccharide from *Lilium lancifolium* Thunb. *Food Chemistry*, 169, 430–438.

5 Goto, A., Okado, K., Martins, N., Cai, H., Barbier, V., Lamiable, O., & Imler, J. L.

6 (2020). The kinase IKKbeta regulates a STING-and NF-kappaB-dependent

7 antiviral response pathway in *Drosophila*. *Immunity*, 52(1), 200.

8 Gu, L., Li, N., Gong, J., Li, Q., Zhu, W., & Li, J. (2011). Berberine ameliorates

9 intestinal epithelial tight-junction damage and down-regulates myosin light chain

10 kinase pathways in a mouse model of endotoxemia. *Journal of Infectious*

11 *Diseases*, 203(11), 1602–1612.

12 Han, C., Guo, L., Sheng, Y., Yang, Y., Wang, J., Gu, Y., & Jiao, Q. (2020). FoxO1

13 regulates TLR4/MyD88/MD2-NF-kappaB inflammatory signalling in mucosal

14 barrier injury of inflammatory bowel disease. *Journal of Cellular and Molecular*

15 *Medicine*, 24(6), 3712–3723.

16 Han, J., Liu, L., Yu, N., Chen, J., Liu, B., Yang, D., & Shen, G. (2016).

17 Polysaccharides from *Acanthopanax senticosus* enhances intestinal integrity

18 through inhibiting TLR4/NF-kappaB signaling pathways in lipopolysaccharide-

19 challenged mice. *Animal Science Journal*, 87(8), 1011–1018.

20 Hattori, Y., Hattori, K., Suzuki, T., & Matsuda, N. (2017). Recent advances in the

21 pathophysiology and molecular basis of sepsis-associated organ dysfunction:

22 Novel therapeutic implications and challenges. *Pharmacology & Therapeutics*,

23 177, 56–66.

24 Haussner, F., Chakraborty, S., Halbgebauer, R., & Huber-Lang, M. (2019). Challenge

25 to the intestinal mucosa during sepsis. *Frontiers in Immunology*, 10, 891.

26 He, Y., Yuan, X., Zuo, H., Sun, Y., & Feng, A. (2018). Berberine exerts a protective

27 effect on gut-vascular barrier via the modulation of the Wnt/ beta-catenin

28 signaling pathway during sepsis. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 49(4),

29 1342–1351.

30 He, Z., Zhu, Y., Bao, X., Zhang, L., Li, N., Jiang, G., & Peng, Q. (2019). Optimization

31 of alkali extraction and properties of polysaccharides from *Ziziphus jujuba* cv

32 *Residue*. *Molecules*, 24(12), 2221.

33 Hu, Q., Ren, H., Li, G., Wang, D., Zhou, Q., Wu, J., Zheng, J., Huang, J., Slade, D. A.,

34 Wu, X., & Ren, J. (2019). STING-mediated intestinal barrier dysfunction

35 contributes to lethal sepsis. *EBioMedicine*, 41, 497–508.

36 Ji, X. L.; Peng, Q.; Yuan, Y. P.; Shen, J.; Xie, X. Y.; Wang, M. (2017). Isolation,

37 structures and bioactivities of the polysaccharides from jujube Fruit (*Ziziphus*

38 *jujuba* Mill.): A Review. *Food Chemistry*, 227, 349–357.

- 1 Ji, X., Liu, F., Ullah, N., Wang, M. (2018). Isolation, purification, and antioxidant
2 activities of polysaccharides from *Ziziphus Jujuba* cv. Muzao. International
3 Journal of Food Properties, 21(1), 1-11.
- 4 Ji, X., Liu, F., Peng, Q., & Wang, M. (2018). Purification, structural characterization,
5 and hypolipidemic effects of a neutral polysaccharide from *Ziziphus Jujuba* cv.
6 Muzao. Food Chemistry, 245, 1124–1130.
- 7 Li, G. X., Wang, X. M., Jiang, T., Gong, J. F., Niu, L. Y., & Li, N. (2015). Berberine
8 prevents intestinal mucosal barrier damage during early phase of sepsis in rat
9 through the toll-like receptors signaling pathway. The Korean Journal of
10 Physiology & Pharmacology, 19(1), 1–7.
- 11 Li, J. W.; Liu, Y. F.; Fan, L. P.; Ai, L. Z.; Shan, L. Z. (2011). Antioxidant activities of
12 polysaccharides from the fruiting bodies of *Zizyphus jujuba* cv. carbohydrate
13 polymers, 84, 390–394.
- 14 Li, J., Ai, L., Hang, F., Ding, S., & Liu, Y. (2014). Composition and antioxidant
15 activity of polysaccharides from jujuba by classical and ultrasound extraction.
16 International Journal of Biological Macromolecules, 63, 150–153.
- 17 Li, X.; Zhao, L.; Zhang, Q.; Xiong, Q. P.; Jiang, C. X. (2014). Purification,
18 characterization and bioactivity of polysaccharides from *Glossaulax didyma*.
19 Carbohydrate Polymers, 102, 912–919.
- 20 Lin, C. L.; Wang, C. C.; Chang, S. C.; Inbaraj, B. S.; Chen, B. H. (2009).
21 Antioxidative activity of polysaccharide fractions isolated from *Lycium barbarum*
22 Linnaeus. International Journal of Biological Macromolecules, 45, 146–151.
- 23 Liu, C. H.; Li, X. D.; Li, Y. H.; Feng, Y.; Zhou, S.; Wang, F. S. (2008). Structural
24 characterisation and antimutagenic activity of a novel polysaccharide isolated
25 from *Sepiella maindroni* ink. Food Chemistry, 110, 807–813.
- 26 Liu, G., Liu, X., Zhang, Y., Zhang, F., Wei, T., Yang, M., Wang, K., Wang, Y., Liu, N.
27 A., Cheng, H., & Zhao, Z. (2015). Hepatoprotective effects of polysaccharides
28 extracted from *Zizyphus jujube* cv. Huanghetanzao. International Journal of
29 Biological Macromolecules, 76, 169–175.
- 30 Manrique, G. D.; Lajolo, F. M. (2002). FT-IR spectroscopy as a tool for measuring
31 degree of methyl esterification in pectins isolated from ripening papaya fruit.
32 Postharvest Biology and Technology, 25, 99–107.
- 33 Mittal, R., & Coopersmith, C. M. (2014). Redefining the gut as the motor of critical
34 illness. Trends in Molecular Medicine, 20(4), 214–223.
- 35 Mori, K., Morisaki, H., Yajima, S., Suzuki, T., Ishikawa, A., Nakamura, N., Innami,
36 Y., & Takeda, J. (2011). Beta-1 blocker improves survival of septic rats through
37 preservation of gut barrier function. Intensive Care Medicine, 37(11), 1849–1856.
- 38 Periasamy, S., Wu, W. H., Chien, S. P., Liu, C. T., & Liu, M. Y. (2020). Dietary

1 *Ziziphus jujuba* fruit attenuates colitis-associated tumorigenesis: A pivotal role of
2 the NF-kappaB/IL-6/JAK1/STAT3 pathway. *Nutrition and Cancer*, 72(1), 120–
3 132.

4 Qu, C. L.; Yu, S. C.; Jin, H. L.; Wang, J. S.; Luo, L. (2013). The Pretreatment effects
5 on the antioxidant activity of jujuba polysaccharides. *Spectrochimica Acta Part A:*
6 *Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 114, 339–343.

7 Ramakrishnan, S. K., Zhang, H., Ma, X., Jung, I., Schwartz, A. J., Triner, D., & Shah,
8 Y. M. (2019). Intestinal non-canonical NFkappaB signaling shapes the local and
9 systemic immune response. *Nature Communications*, 10(1), 660.

10 Romdhane, M. B.; Haddar, A.; Ghazala, I.; Jeddou, K. B.; Helbert, C. B.; Ellouz-
11 Chaabouni, S. (2017). Optimization of polysaccharides extraction from
12 watermelon rinds: Structure, functional and biological activities. *Food Chemistry*,
13 216, 355–364.

14 Sun, L. Q.; Wang, L.; Li, J.; Liu, H. H. (2014). Characterization and antioxidant
15 activities of degraded polysaccharides from two marine Chrysophyta. *Food*
16 *Chemistry*, 160, 1–7.

17 Tsiapali, E.; Whaley, S.; Kalbfleisch, J.; Ensley, H. E.; Browder, I. W.; Williams, D. L.
18 (2001). Glucans exhibit weak antioxidant activity, but stimulate macrophage free
19 radical activity. *Free Radical Biology and Medicine*, 30, 393–402.

20 van der Poll, T., van de Veerdonk, F. L., Scicluna, B. P., & Netea, M. G. (2017). The
21 immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. *Nature Reviews*
22 *Immunology*, 17(7), 407–420.

23 Vandenbroucke, R. E., Dejonckheere, E., Van Hauwermeiren, F., Lodens, S., De
24 Rycke, R., Van Wonterghem, E., Staes, A. N., Gevaert, K., López-Otin, C., &
25 Libert, C. (2013). Matrix metalloproteinase 13 modulates intestinal epithelial
26 barrier integrity in inflammatory diseases by activating TNF. *EMBO Molecular*
27 *Medicine*, 5(7), 1000–1016.

28 Wang, B. (2011). Chemical characterization and Ameliorating effect of polysaccharide
29 from Chinese jujube on intestine oxidative injury by ischemia and reperfusion.
30 *International Journal of Biological Macromolecules*, 48(3), 386–391.

31 Wang, D. Y.; Zhao, Y.; Jiao, Y. D.; Yu, L. H.; Yang, S.; Yang, X. B. (2012).
32 Antioxidative and hepatoprotective effects of the polysaccharides from *Zizyphus*
33 *jujuba* cv. Shaanbeitanzao. *Carbohydrate Polymers*, 88, 1453–1459.

34 Wang, X.; Chen, Q. R.; Lü, X. (2014). Pectin extracted from apple pomace and citrus
35 peel by subcritical water. *Food Hydrocolloids*, 38, 129–137.

36 Wang, X.; Lü, X. (2014). Characterization of pectic polysaccharides extracted from
37 apple pomace by hot-compressed water. *Carbohydrate Polymers.*, 102, 174–184.

38 Wang, X.; Zhang, L. H.; Wu, J. L.; Wang, X. Q.; Lü, X. (2017). Improvement of

simultaneous determination of neutral monosaccharides and uronic acids by gas chromatography. *Food Chemistry*, 220, 198–207.

Wang, Y. J.; Liu, X. Q.; Zhang, J. Z.; Liu, G. P.; Liu, Y.; Wang, K. M; et al. (2015). Structural characterization and in vitro antitumor activity of polysaccharides from *Zizyphus jujuba* cv. Muzao. *RSC Advances*, 5, 7860–7867.

Wu, Z., Li, H., Wang, Y., Yang, D., Tan, H., Zhan, Y., Yang, Y., Luo, Y., & Chen, G. (2019). Optimization extraction, structural features and antitumor activity of polysaccharides from *Z. jujuba* cv. Ruoqiangzao seeds. *International Journal of Biological Macromolecules*, 135, 1151–1161.

Xie, J. H.; Shen, M. Y.; Xie, M. Y.; Nie, S. P.; Chen, Y.; Li, C.; et al. (2011). Ultrasonic-assisted extraction, antimicrobial and antioxidant activities of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 89, 177–184.

Xie, J. H.; Tang, W.; Jin, M. L.; Li, J. E.; Xie, M. Y. (2016). Recent advances in bioactive polysaccharides from *Lycium barbarum* L., *Zizyphus jujuba* Mill, *Plantago* spp., and *Morus* spp.: Structures and functionalities. *Food Hydrocolloids*, 60, 148–160.

Yang, Q., Liu, T.-T., Lin, H., Zhang, M., Wei, J., Luo, W.-W., Hu, Y.-H., Zhong, B. O., Hu, M.-M., & Shu, H.-B. (2017). TRIM32-TAX1BP1-dependent selective autophagic degradation of TRIF negatively regulates TLR3/4-mediated innate immune responses. *PLoS Pathogens*, 13(9), e1006600.

Yue, Y., Wu, S., Li, Z., Li, J., Li, X., Xiang, J., & Ding, H. (2015). Wild jujube polysaccharides protect against experimental inflammatory bowel disease by enabling enhanced intestinal barrier function. *Food & Function*, 6(8), 2568–2577.

Zhan, C. Y., Chen, D., Luo, J. L., Shi, Y. H., & Zhang, Y. P. (2018). Protective role of down-regulated microRNA-31 on intestinal barrier dysfunction through inhibition of NF-kappaB/HIF-1alpha pathway by binding to HMOX1 in rats with sepsis. *Molecular Medicine*, 24(1), 55.

Zhang, L., Liu, X., Wang, Y., Liu, G., Zhang, Z., Zhao, Z., & Cheng, H. (2017). In vitro antioxidative and immunological activities of polysaccharides from *Zizyphus jujuba* cv. Muzao. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 1119–1125.

Zhou, H., Guo, C., Yu, W., Yan, X., Long, J., Liu, Z., Liang, X., Liu, H. (2021). *Zizyphus jujuba* cv. Muzao polysaccharides enhance intestinal barrier function and improve the survival of septic mice. *Journal of Food Biochemistry*, 45(5).

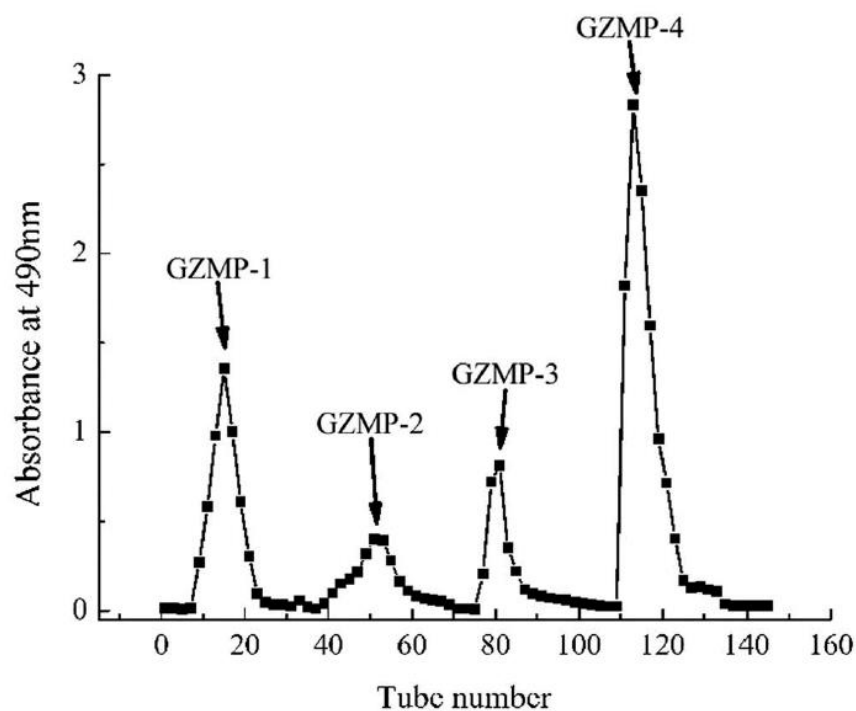


Fig. 1. Anion-exchange chromatogram of ZMP on the DEAE cellulose-52 column.

The ZMP solution was applied to the DEAE cellulose-52 column (2.6 cm × 40 cm) and eluted with distilled water, followed by 0.05, 0.10, and 0.30 M NaCl, sequentially, at a flow rate of 10 mL/min.

(Xiaolong *et al.*, 2018)

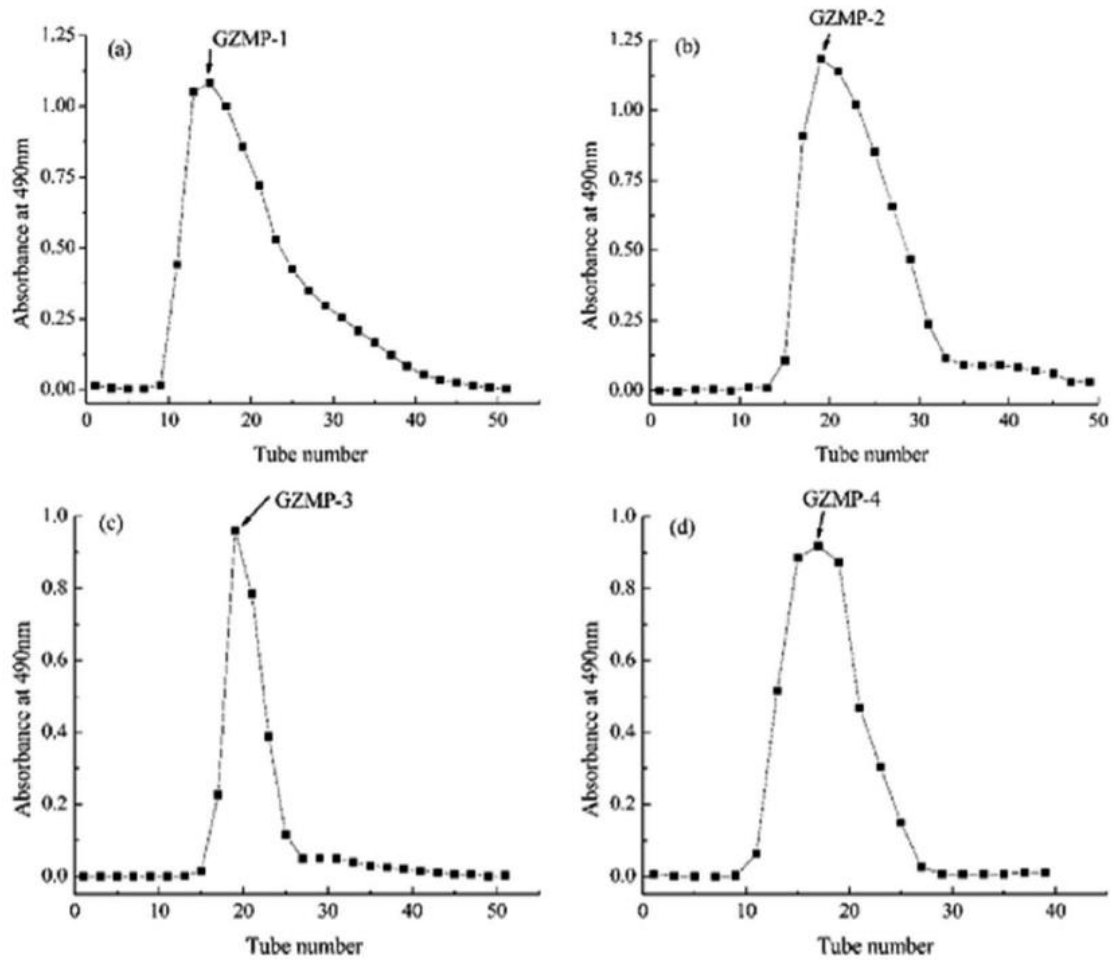


Fig. 2. Gel filtration chromatogram of the ZMP fraction on a Sephadex G-100 column. Four polysaccharide fraction ZMP-1, ZMP-2, ZMP-3, and ZMP-4, were applied to Sephadex G-100 column (1.6 cm × 60 cm) and distilled water at a flow rate of 0.3 mL/min.

(Xiaolong *et al.*, 2018)

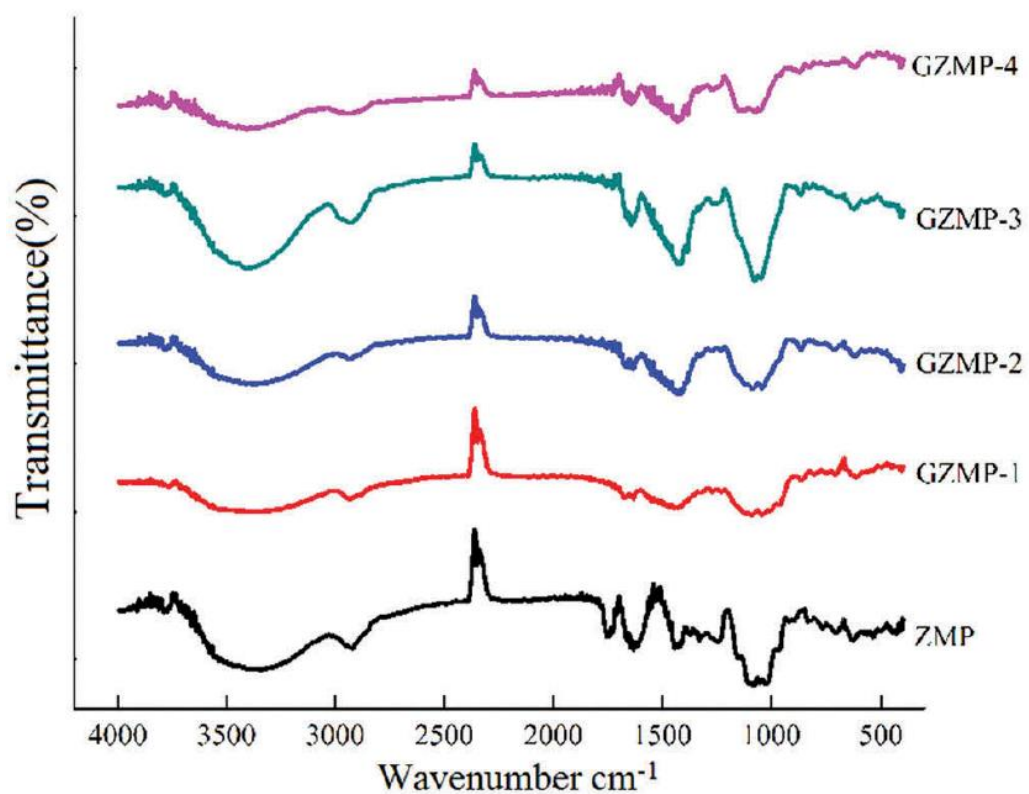


Fig. 3. The FTIR spectra of ZMP, GZMP-1, GZMP-2, GZMP-3, and GZMP-4.
(Xiaolong *et al.*, 2018)

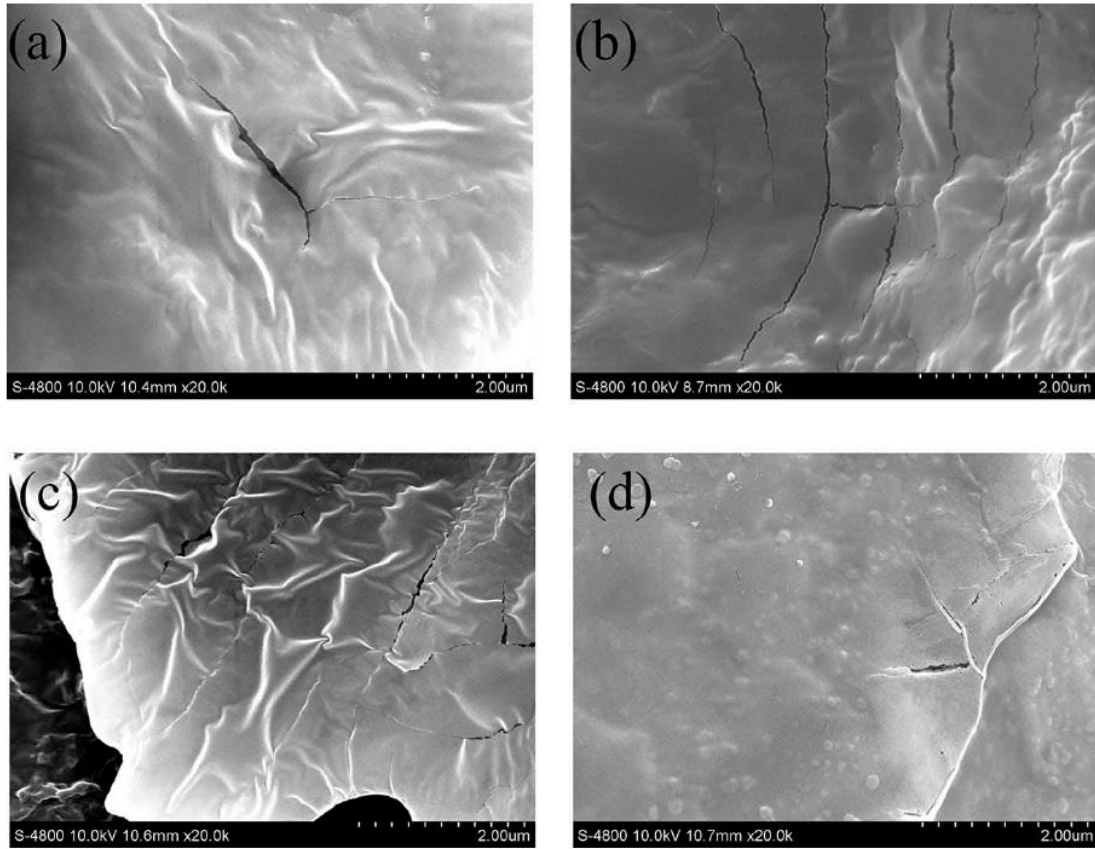


Fig. 4. The SEM photographs of the (a) GZMP-1, (b) GZMP-2, (c) GZMP-3, and (d) GZMP-4 fraction.

(Xiaolong *et al.*, 2018)

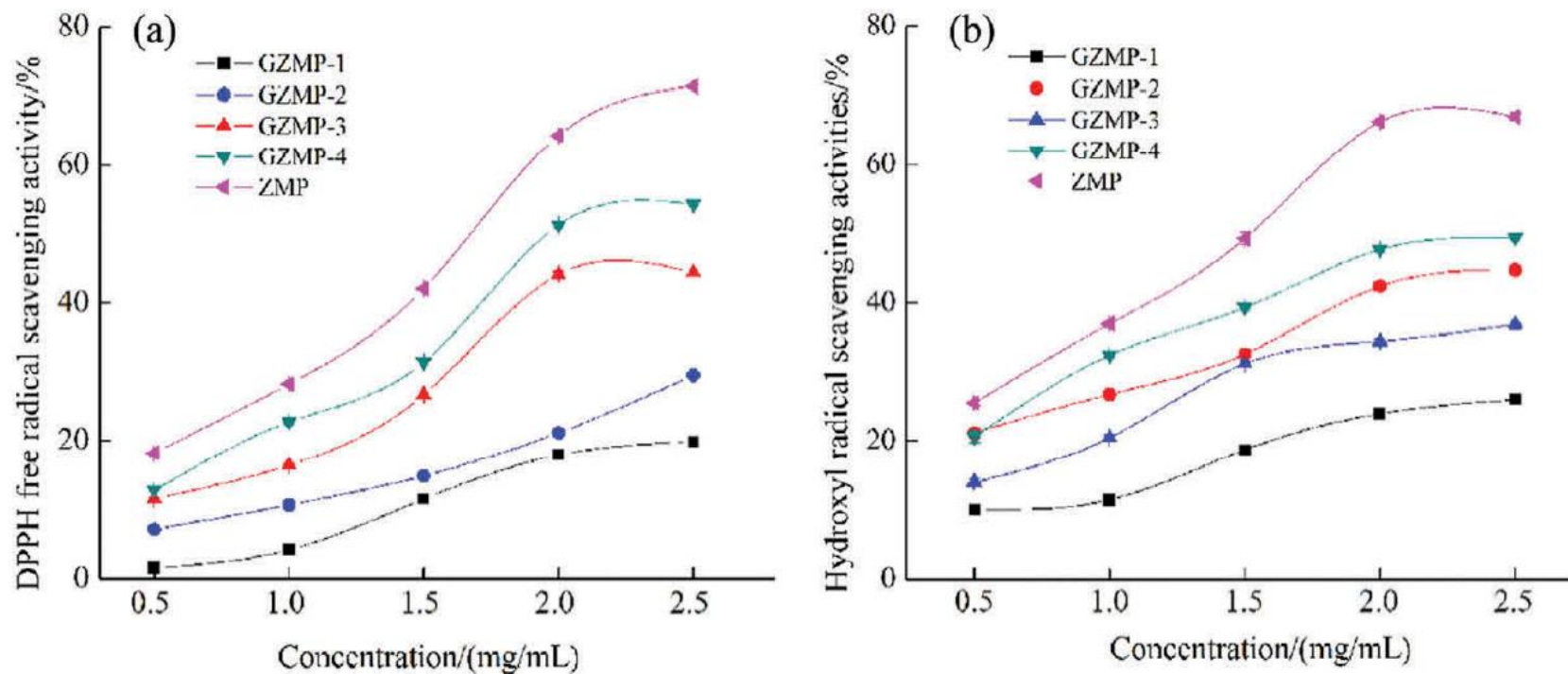


Fig. 5. Scavenging effects of ZMP, GZMP-1, GZMP-2, GZMP-3, and GZMP-4 on (a) the DPPH radical and (b) the hydroxyl radical.

(Xiaolong *et al.*, 2018)

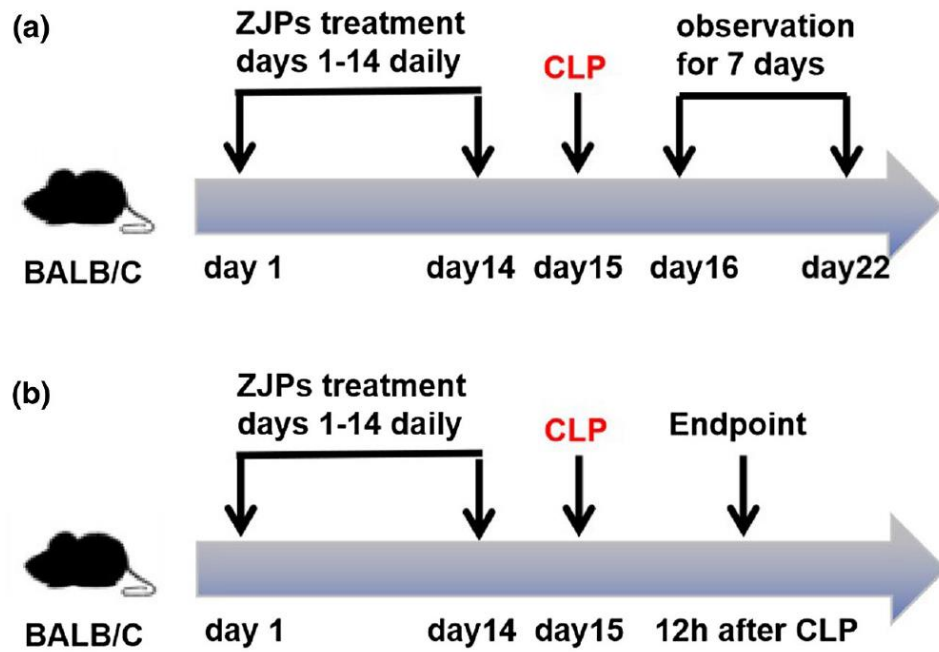


Fig. 6. The time frame of the experiments. (a) The time frame of the Study protocol 1. (b) The time frame of the Study protocol 2.

(Hai-Cun *et al.*, 2021)

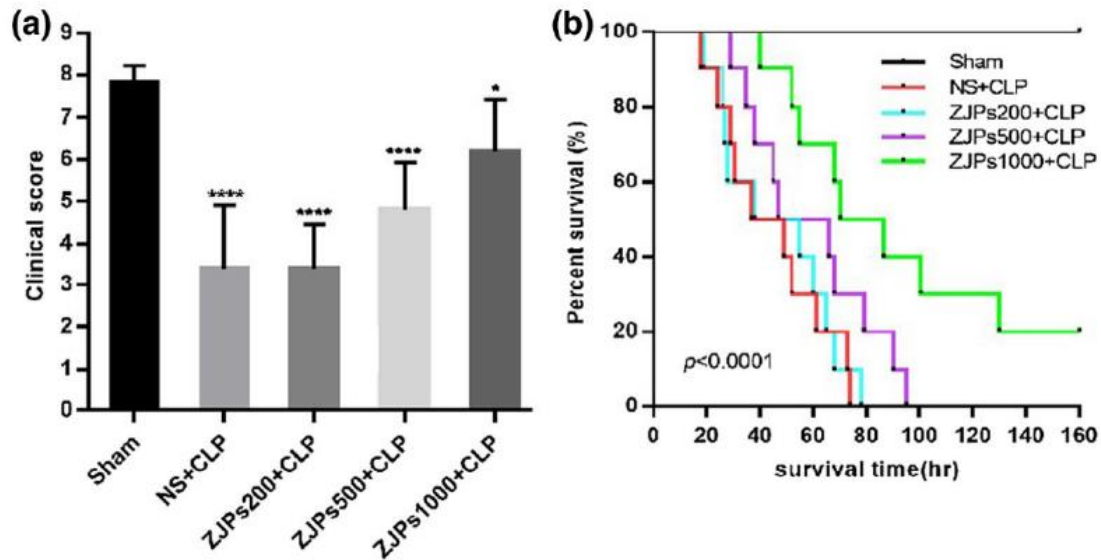


Fig. 7. Effects of ZJPs on clinical score and survival time in CLP-induced septic mice. (a) Mice were assessed for clinical score at designated time points after CLP challenge in sham-operated group, NS+CLP, ZJPs 200+CLP, ZJPs 500+CLP and ZJPs 1000+CLP group. (b) The survival time of five groups was observed for 7 days after CLP challenge. * $p < 0.05$, ** $p < 0.0001$ versus sham-operated group. ##### $p < 0.0001$ versus NS+CLP group (Hai-Cun *et al.*, 2021)**

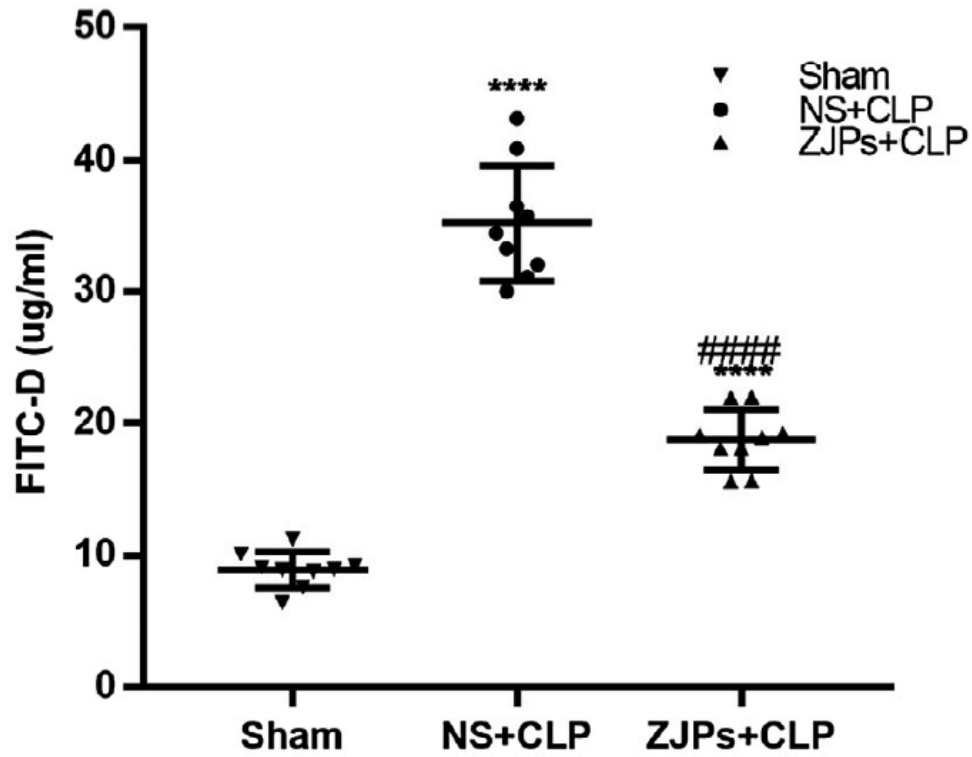


Fig. 8. Intestinal mucosal permeability in CLP-induced septic mice in the sham-operated group, NS+CLP and ZJPs+CLP group, respectively. * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$ versus sham-operated group. ##### $p < 0.0001$ versus NS+CLP group

(Hai-Cun *et al.*, 2021)

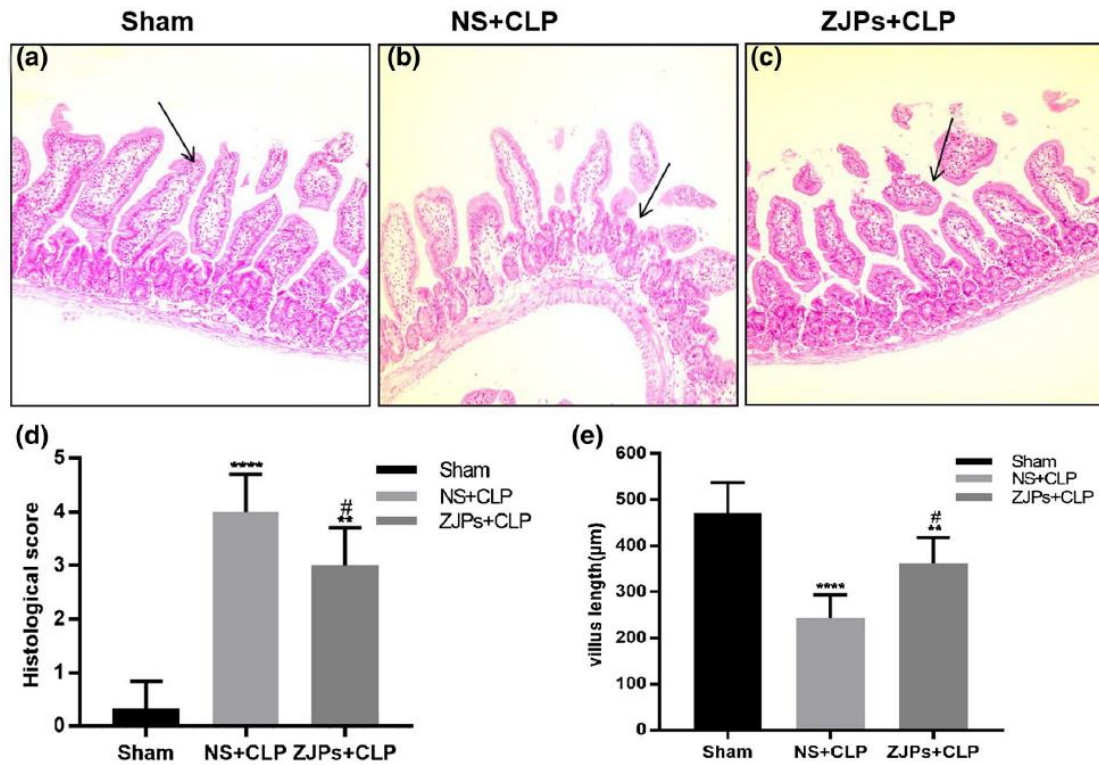


Fig. 9. Effects of ZJPs on CLP-induced intestinal morphological features and histopathologic changes. (a-c) The representative photomicrographs of ileal segments stained with HE at 200× magnification of sham group(A), NS+CLP group(B), ZJPs+CLP group(C). (d) Intestinal histopathologic score of gut mucosa using Chiu's method in the sham-operated group, NS+CLP and ZJPs+CLP group. (e) The villus length of gut mucosa in the sham-operated group, NS+CLP and ZJPs+CLP group. **p < 0.01, **p < 0.0001 versus sham-operated group. #p < 0.05 versus NS+CLP group**

(Hai-Cun *et al.*, 2021)

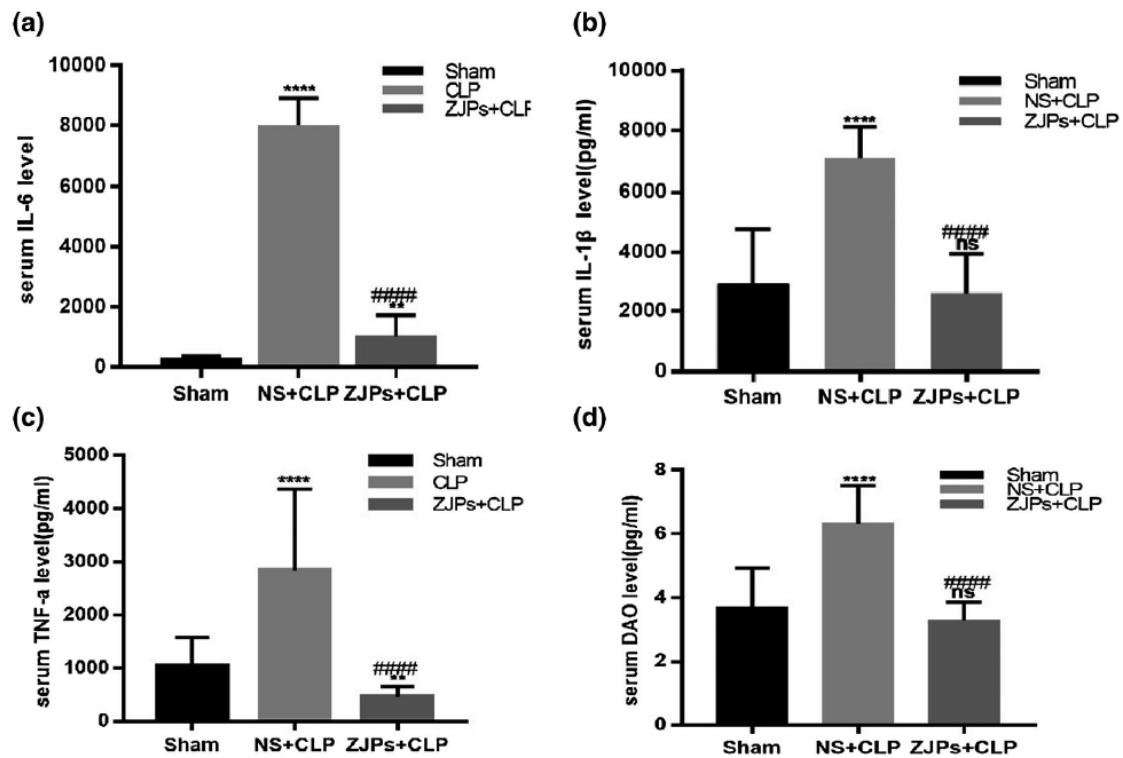


Fig. 10. Effects of ZJPs on the expression of serum TNF- α , IL-6, IL-1 β and DAO concentrations in septic mice. (a-c) The level of serum TNF- α (A), IL-6(B), IL-1 β (C) concentration in the sham-operated group, NS+CLP and ZJPs+CLP group. (d) The level of serum DAO concentration in the sham-operated group, NS+CLP and ZJPs+CLP group. ** $p < 0.01$, ** $p < 0.0001$, ^{ns} $p > 0.05$ versus sham-operated group. ##### $p < 0.0001$, versus NS+CLP group**

(Hai-Cun *et al.*, 2021)

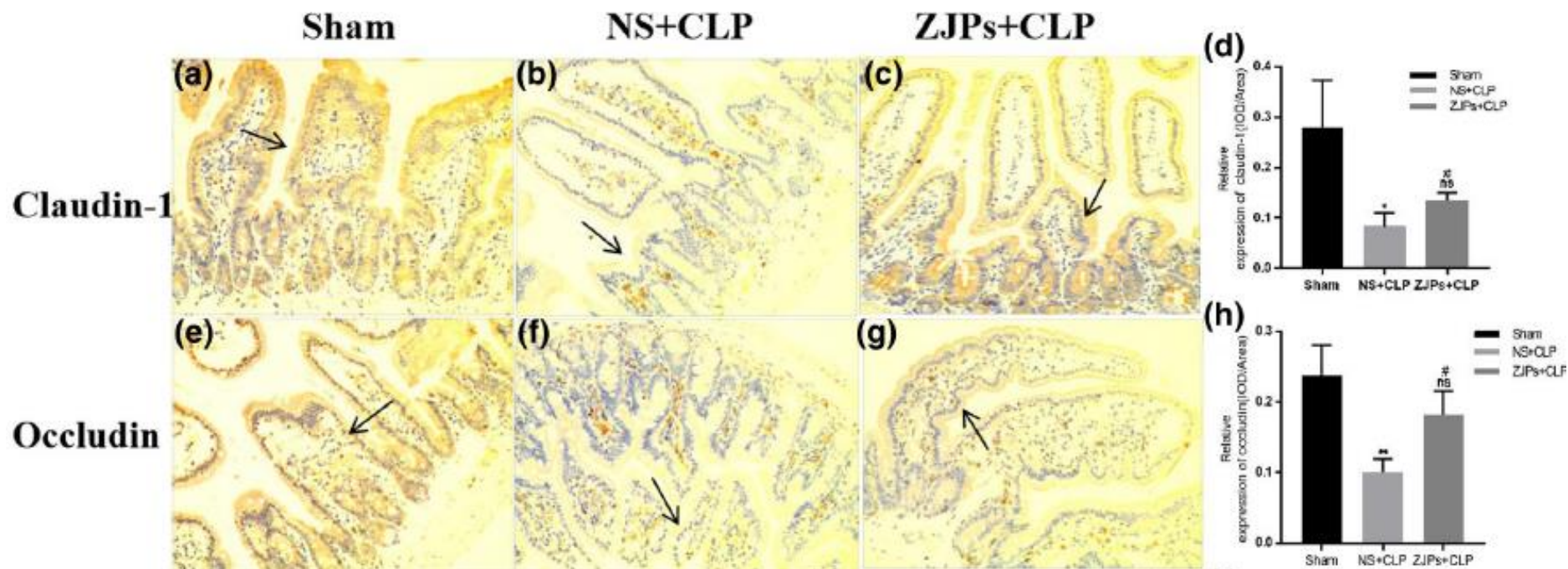


Fig. 11. Effects of ZJPs on the expression of tight junction proteins in intestinal tissue of septic mice. (a-c) The expression of Claudin-1 in sham-operated group, NS+CLP and ZJPs+CLP group by immunohistochemistry (IHC). (d) Relative expression of Claudin-1 in sham-operated group, NS+CLP and ZJPs+CLP group. (e-g) The expression of Occludin in sham-operated group, NS+CLP and ZJPs+CLP group by immunohistochemistry (IHC). (h) Relative expression of Occludin in sham-operated group, NS+CLP and ZJPs+CLP group. (i-k) The expression of ZO-1 in sham-operated group, NS+CLP and ZJPs+CLP group by immunohistochemistry (IHC). (l) Relative expression of ZO-1 in sham-operated group, NS+CLP and ZJPs+CLP group. (m) Western blot assay for tight junction proteins in sham-operated group, NS+CLP and ZJPs+CLP group. (n-p) The relative density of tight junction proteins for Claudin-1(N), Occludin(O), ZO-1(P). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.0001, ^{ns}p > 0.05 versus sham-operated group. #p < 0.05, #####p < 0.0001 versus NS+CLP group (Hai-Cun *et al.*, 2021)

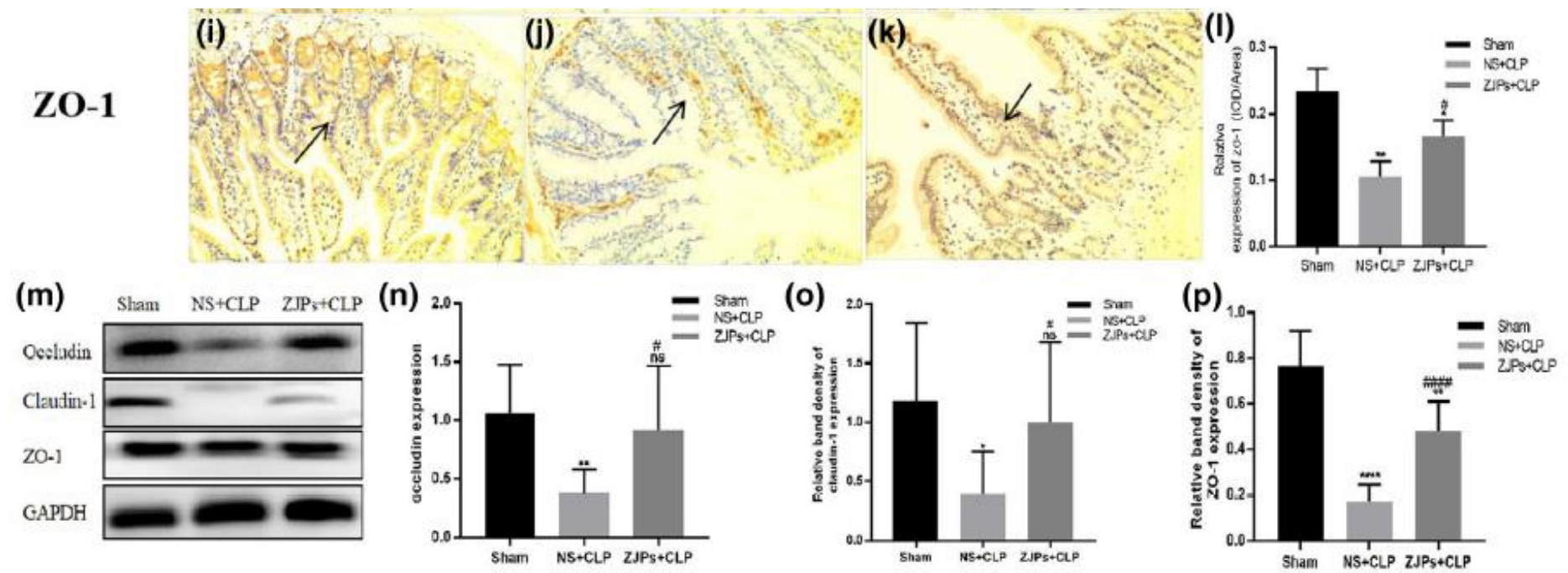


Fig. 11. (Continued).

(Hai-Cun *et al.*, 2021)

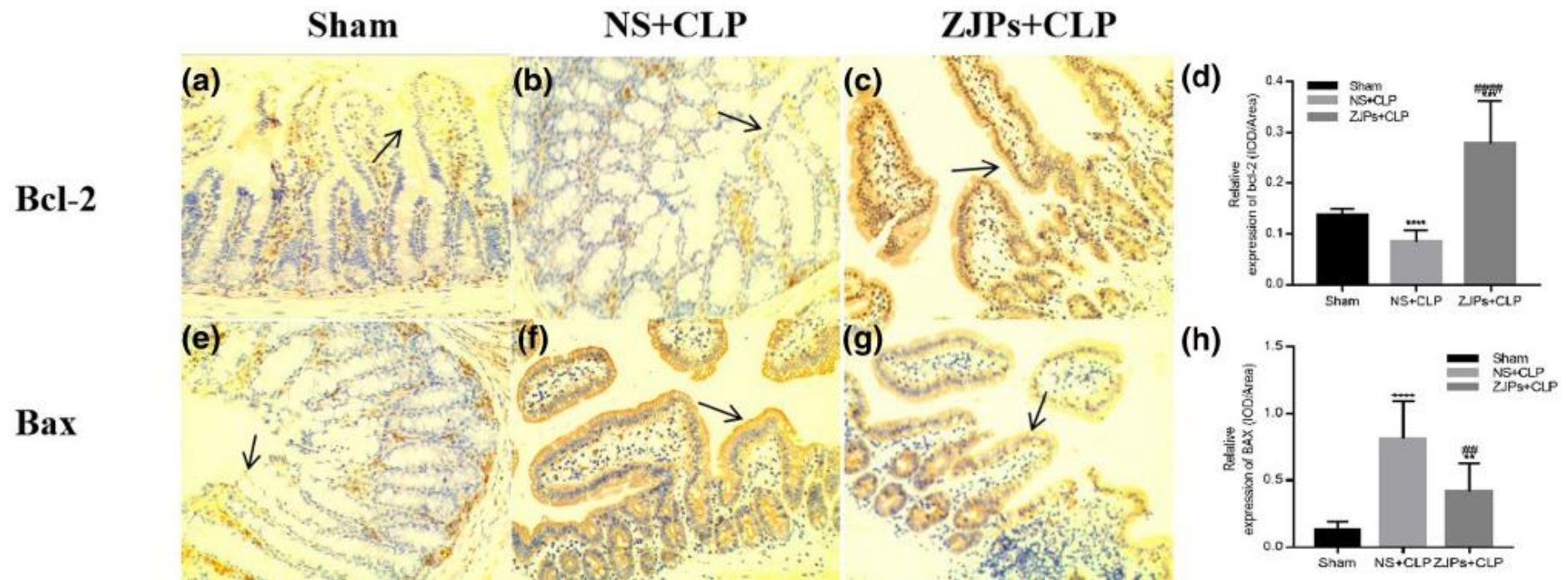
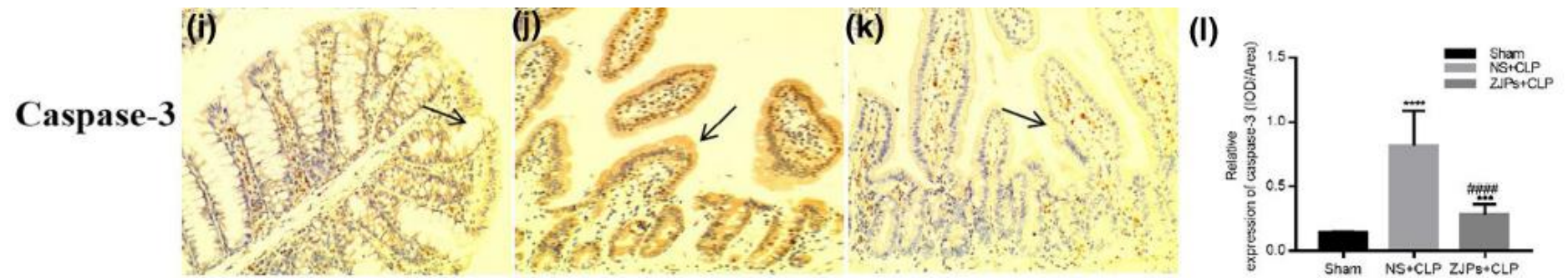


Fig. 12. Effects of ZJPs on the expression of apoptosis-related proteins in intestinal tissue of septic mice. (a-c) The expression of Bcl-2 in sham-operated group, NS+CLP and ZJPs+CLP group by immunohistochemistry (IHC). (d) Relative expression of Bcl-2 in sham-operated group, NS+CLP and ZJPs+CLP group. (e-g) The expression of Bax in sham-operated group, NS+CLP and ZJPs+CLP group by immunohistochemistry (IHC). (h) Relative expression of Bax in sham-operated group, NS+CLP and ZJPs+CLP group. (i-k) The expression of Caspase-3 in sham, NS+CLP and ZJPs+CLP group by immunohistochemistry (IHC). (l) Relative expression of Caspase-3 in sham-operated group, NS+CLP and ZJPs+CLP group. ** $p < 0.01$, * $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ versus sham-operated group. ## $p < 0.01$, #### $p < 0.0001$ versus NS+CLP group**

(Hai-Cun *et al.*, 2021)



(Hai-Cun *et al.*, 2021)

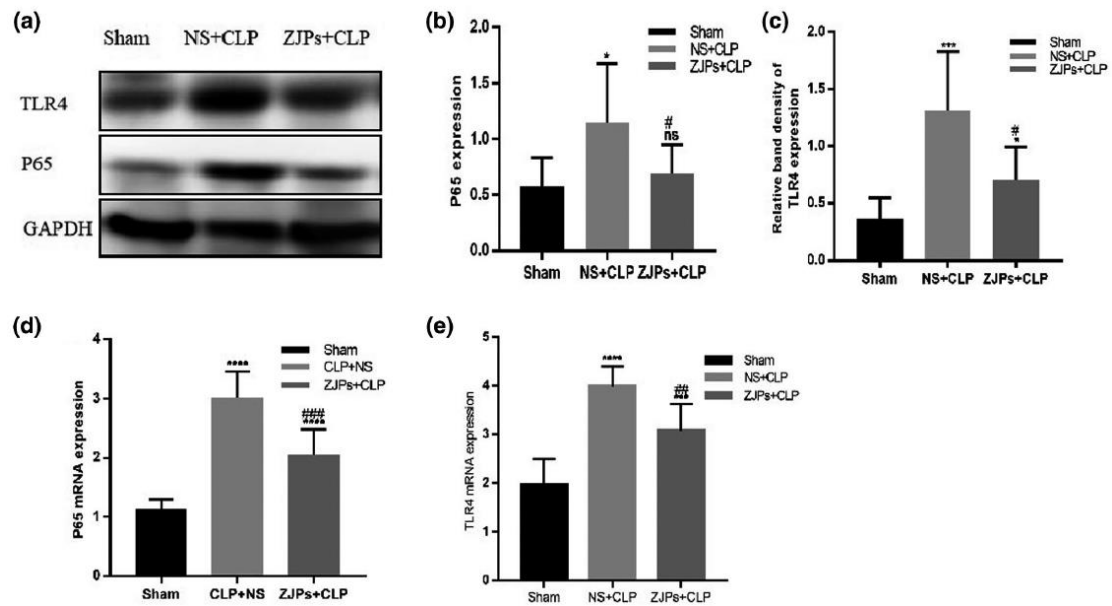


Fig. 13. Effects of ZJPs on the expression of TLR4 and NF-κB p65 in intestinal tissue of septic mice. (a) Western blot assay for TLR4, p65 and GAPDH protein in sham-operated group, NS+CLP and ZJPs+CLP group. (b, c) The relative density of TLR4 and p65. (d, e) The mRNA expression of NF-κB p65 and TLR4 in intestinal tissue by RT-PCR. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, $^{ns}p > 0.05$ versus sham-operated group. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ versus NS+CLP group**

(Hai-Cun *et al.*, 2021)

1 **Table 1. Molecular weight, monosaccharides composition, protein and galacturonic acid contents of four ZMP purified fractions.**

Sample	Molecular weight (kDa)	Protein (%)	Gal A (%)	Neutral sugar composition (%)					
				Rha	Ara	Xyl	Man	Glu	Gal
GZMP-1	111.2	0.88 ± 0.10 ^d	6.24 ± 0.75 ^d	0.59 ± 0.05 ^b	72.80 ± 0.23 ^a	nd	nd	0.26 ± 0.05	7.48 ± 0.50 ^b
GZMP-2	95.1	1.02 ± 0.05 ^c	17.75 ± 0.85 ^c	1.57 ± 0.10 ^a	29.85 ± 1.03 ^c	nd	nd	nd	17.05 ± 0.22 ^a
GZMP-3	84.2	2.45 ± 0.08 ^a	27.41 ± 2.84 ^b	1.68 ± 0.05 ^a	33.70 ± 1.12 ^b	nd	nd	nd	5.58 ± 0.50 ^c
GZMP-4	571.4	2.13 ± 0.10 ^b	40.81 ± 1.05 ^a	0.59 ± 0.11 ^b	2.05 ± 0.07 ^d	nd	nd	nd	nd ^d

2 Values in a row with different letters (a–d) are significantly different at $p < 0.05$. nd: not detected.

3

1 **Table 2. Clinical scoring system**

Variables	Score		
	0	1	2
Conjunctivitis	Eyes closed or bleared with serious discharge	Eyes opened with moderate discharge	Normal, no Conjunctivitis
Stool consistency	Diarrhea	Loose stool	Normal stool
Fur appearance	Rough and dull fur, ungroomed	Reduced grooming fur	Smooth and shiny fur
Activity upon moderate stimulation	Lethargic, only lifting head after moderate stimulation	Inactive, less alert, <2 steps after moderate stimulation	Normal action and reaction, >2 steps after moderate stimulation

2

3

1 **Table 3. Intestinal mucosal damage grading score**

Grade	Histological characteristics
0	Normal mucosal villi without damage
1	Well-constituted villousities, no cellular lysis or inflammatory process, only broadened subepithelial Gruenhagen's space at villous tip
2	Presence of cellular lysis, further extension of subepithelial space from the epithelial layer to the lamina propria
3	Detachment of less than half of the villous epithelium, presence of dilated capillaries and inflamed cells
4	Detachment of more than half of the villous epithelium and exposed villi with lamina propria, formed by inflamed cells and necrotic material, with hemorrhage and basal glandular ulceration
5	Disintegration and detachment of the lamina propria, no glandular structure can be seen, only the amorphous material laying on the sub-mucosa tissue

2

3

1 六、問題討論

2 (一)有無辦法知道 GZMP 1-4 的化學結構？

3 Ji 等人對於 GZMP 1-4 已分別檢測出分子量、單糖組成及官能基分析，
4 若要確認 GZMP 多糖之結構，可進一步利用質譜儀協助分析單糖組合排列
5 方式。

6 (二)為什麼測半乳糖醛酸？

7 酸性紅棗多醣對於清除螯合自由基的活性較中性紅棗多醣更加有效，
8 除單醣外，半乳糖醛酸的存在應有助於多醣組分的酸性 (Ji *et al.*, 2017)，且
9 依 Ji 等人之參考資料，半乳糖醛酸經研究顯示具有抗氧化活性，故檢測半
10 乳糖醛酸之含量，並藉此推測其是否對於紅棗多醣之抗氧化活性有相關影
11 響。

12 (三)Fig. 5 沒有 error bar？

13 清除自由基活性為利用公式計算出百分比，故呈現之曲線圖無 error bar
14 顯示。

15 (四)半乳糖醛酸的抗氧化活性已知？

16 半乳糖醛酸的結構具有活性的羥基，可以提供氫或電子，使自由基形
17 成可以終止自由基連鎖反應的穩定自由基 (Xie, Shen, *et al.*, 2011)。

18 (五)兩篇參考資料之紅棗來源差異

19 Ji 等人之紅棗原料為陝北黃土高原成熟期木棗；Zhou 等人由山西先鋒
20 生物科技有限公司購買木棗之萃取多醣化合物，無說明木棗之產地。

21 (六)市面是否有紅棗的功能性食品？

22 目前市面上含有紅棗之功能性食品，紅棗主要作為風味添加物，非做
23 為主要功能開發之食品。

24 (七)作者對於紅棗其他物質的檢測？

25 Ji 等人及 Zhou 等人皆未對於木棗其他物質進行檢測，此兩篇文獻皆主
26 要探討紅棗多醣之功能。

27 (八)實驗中以 1000mg/kg 作為動物實驗劑量，此劑量偏高，是否有對於人類之 28 相關研究？

29 目前未有紅棗多醣對於免疫反應之臨床試驗，僅有動物實驗，故可做
30 為未來紅棗萃取物之研究方向。