

党参多糖不同组分的抗炎活性及机制研究[△]

孟燕^{1*},徐玉洁¹,张宝徽¹,常聪¹,郑国华²,吴勇^{1#}(1.湖北中医药大学药学院,武汉 430065;2.湖北中医药大学中药资源与中药复方教育部重点实验室,武汉 430065)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)11-1348-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.11.11

摘要 目的:筛选出党参多糖中具有较好抗炎效果的组分,并探索其抗炎机制。方法:以党参药材为样品,采用水提醇沉法得党参粗多糖(CP)。将CP通过DEAE Sepharose Fast Flow、SephadexG-150等凝胶柱分离纯化后得到组分CP1-2-1、CP3-1-1,并对其进行表征。采用MTT法测定0.01、0.1、1、10、100 μg/mL的CP、CP1-2-1、CP3-1-1分别对小鼠腹腔巨噬细胞RAW264.7作用24、48 h后的细胞存活率。然后将细胞分为空白组(空白培养基)、模型组[1 μg/mL脂多糖(LPS)]和3种多糖的低、中、高质量浓度组(1 μg/mL LPS+25、50、100 μg/mL CP、CP1-2-1、CP3-1-1),加药培养24 h。分别测定细胞培养液中一氧化氮(NO)含量以及细胞中Toll样受体4(TLR4)、白细胞介素6(IL-6)、核因子-κB(NF-κB)、肿瘤坏死因子α(TNF-α)mRNA表达水平。结果:CP的糖含量高达(92.20±0.73)%;CP1-2-1是由果糖组成的单一中性多糖,相对分子量为25.8 kDa;CP3-1-1是由阿拉伯糖、鼠李糖、半乳糖以及半乳糖醛酸等组成的酸性杂多糖,相对分子量为49.5 kDa。3种多糖分别作用24、48 h后,细胞的存活率均大于99%。与空白组比较,模型组细胞培养液中NO含量以及细胞中TLR4、IL-6、NF-κB、TNF-α mRNA表达水平均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较,各给药组细胞培养液中NO含量均显著降低;50、100 μg/mL CP组细胞中TLR4、NF-κB、TNF-α、IL-6 mRNA表达水平均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),25 μg/mL CP1-2-1组细胞中TLR4、NF-κB mRNA表达水平以及50、100 μg/mL CP1-2-1组细胞中TLR4、NF-κB、TNF-α、IL-6 mRNA表达水平均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),25 μg/mL CP3-1-1组细胞中IL-6 mRNA表达水平和50 μg/mL CP3-1-1组细胞中NF-κB、TNF-α、IL-6 mRNA表达水平以及100 μg/mL CP3-1-1组细胞中TLR4、NF-κB、TNF-α、IL-6 mRNA表达水平均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:党参CP与均一多糖组分CP1-2-1、CP3-1-1均具有一定的抗炎活性;其机制可能与抑制TLR4/NF-κB途径的活化来抑制TNF-α、IL-6等炎症因子的生成与释放有关。

关键词 党参多糖;粗多糖;多糖组分;抗炎活性;机制

Study on the Anti-inflammatory Activity and Mechanism of Different Components from Codonopsis Radix Polysaccharides

MENG Yan¹, XU Yujie¹, ZHANG Baohui¹, CHANG Cong¹, ZHENG Guohua², WU Yong¹(1.College of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China; 2.Key Laboratory of Chinese Medicine Resource and Compound Prescription, Ministry of Education, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To screen the components with better anti-inflammatory effect from Codonopsis Radix polysaccharide and explore the anti-inflammatory mechanism. METHODS: Using Codonopsis Radix as sample, the crude polysaccharide (CP) was obtained by water extraction and alcohol precipitation. After CP was separated and purified by Fast Flow DEAE Sepharose, SephadexG-150 gel column and so on, the components CP1-2-1 and CP3-1-1 were obtained and then characterized. The survival rate of RAW264.7 cell was determined by MTT method after cultured with CP, CP1-2-1 and CP3-1-1 (0.01, 0.1, 1, 10, 100 μg/mL) for 24 and 48 h respectively. The cells were divided into blank group (blank culture medium), model group (1 μg/mL LPS) and low-, medium- and high-concentration groups of 3 kinds of Codonopsis Radix polysaccharide (1 μg/mL LPS+25, 50, 100 μg/mL CP, CP1-2-1, CP3-1-1 solution). After cultured for 24 h, NO content in cell culture solution, mRNA expressions of TLR4, IL-6, NF-κB and TNF-α in cells were determined. RESULTS: The sugar content of CP reached (92.20±0.73)%. CP1-2-1 was a single neutral polysaccharide composed of fructose with a relative molecular weight of 25.8 kDa. CP3-1-1 was an acidic heteropolysaccharide composed of arabinose, rhamnose, galactose and galacturonic acid and so on, with a relative molecular weight of 49.5 kDa. Cell survival rates were higher than 99%, after cultured with 3 kinds of polysaccharide for 24 and 48 h. Compared with blank group, NO content in cell culture solution and mRNA expressions of TLR4, IL-6, NF-κB and TNF-α in cells were increased significantly in model group ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with model group, NO content in cell culture solution of each administration group was significantly reduced, mRNA expressions of TLR4, NF-κB, TNF-α, IL-6 in cells in 50, 100 μg/mL CP group were significantly decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$); mRNA expressions of TLR4, NF-κB

[△] 基金项目:湖北省知识创新专项(自然科学基金)项目(No. 2016CFB412)

* 讲师,博士。研究方向:中药新制剂与新剂型。E-mail:yanmeng2016@126.com

通信作者:副教授,博士。研究方向:中药药理学。E-mail:wuyong1991@163.com

in cells in 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CP1-2-1 group and mRNA expressions of TLR4, NF- κB , TNF- α , IL-6 in cells in 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CP1-2-1 group were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); mRNA expressions of IL-6 in cells in 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CP3-1-1 group, mRNA expressions of NF- κB , TNF- α , IL-6 in cells in 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CP3-1-1 group and mRNA expressions of TLR4, NF- κB , TNF- α , IL-6 in cells in 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CP3-1-1 group were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). CONCLUSIONS: CP, CP 1-2-1 and CP 3-1-1 all have certain anti-inflammatory activities. The mechanism may be related to inhibiting the generation and releasing of inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-6 by inhibiting the activation of TLR4/NF- κB pathway.

KEYWORDS Codonopsis Radix polysaccharides; Crude polysaccharide; Polysaccharide component; Anti-inflammatory activity; Mechanism

多糖是继核酸和蛋白质之后的第三大类生物大分子。近年,随着糖组学、糖生物学的飞速发展,已有越来越多的传统中药多糖(如枸杞多糖、当归多糖、黄芪多糖、灵芝多糖等)被证实具有诸如抗氧化、调节免疫、抗肿瘤以及降血糖等多种生物活性^[1]。党参为桔梗科植物党参 [*Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf.]、素花党参 [*Codonopsis pilosula* Nannf. var. *modesta* (Nannf.) L.T. Shen]或川党参 (*Codonopsis tangshen* Oliv.)的干燥根,是我国常用的传统中药,具有健脾益肺、补中益气以及调理胃肠运动的效用^[2-3]。目前,已有许多研究从党参中提取到党参多糖,并证实了其具有多种生物活性,其中就包括了抗炎活性^[4-6]。本课题组前期研究发现,党参粗多糖对溃疡性结肠炎模型大鼠有防治作用^[7],然而其中具有抗炎活性的有效组分并不明确。鉴于此,本研究拟对党参粗多糖进行进一步的分离纯化,筛选其中具有抗炎作用的有效组分,并探索其抗炎机制,以期明确党参多糖中的抗炎活性物质提供参考。

1 材料

1.1 仪器

UV-2550型紫外分光光度计(日本Shimadzu公司); 2F1-I型多功能紫外分析仪(上海嘉鹏科技有限公司); 1100LC/MSD Trap型二维液相色谱仪(美国Agilent公司); RE-2010型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); FDU-2110型冷冻干燥机(日本Eylea东京理化器械株式会社); MCO-230AICU-VL-PC型CO₂培养箱(日本Panasonic公司); iMark型酶标仪(美国Bio-Rad公司)。

1.2 药品与试剂

党参药材购自九州通医药集团股份有限公司(产地:湖北恩施板桥镇,批号:181103,规格:500 g),经湖北中医药大学药学院陈科力教授鉴定为桔梗科植物川党参 (*C. tangshen* Oliv.)的干燥根茎; DEAE Sepharose Fast Flow凝胶、Sephadex G-150葡聚糖凝胶、G-100葡聚糖凝胶(美国通用电气医疗生物科学有限公司,规格:500 g); 分子量分别为2 000、500、70、40、10、3 kDa的葡聚糖标准品(批号:S14118、S14116、S14112、S14110、S14107、S14101)以及葡萄糖(批号:B21882)、甘露糖(批号:B21895)、半乳糖(批号:JG155275)、阿拉伯糖(批号:B25848)、鼠李糖(批号:B21931)、木糖(批号:B21155)、

果糖(批号:B21896)、半乳糖醛酸(批号:YY11147)等单糖标准品均购自上海源叶生物科技有限公司,纯度均为98%; 脂多糖(LPS,美国Sigma公司,批号:L2630); 一氧化氮(NO)检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号:20170211); Azfresh™总RNA小量/微量提取试剂盒(批号:A06110014)、AZpolaris™ cDNA Synthesis提取试剂盒(批号:A0610105)、AZpolaris™实时荧光定量-聚合酶链式反应(qPCR)试剂盒 MasterMix (SYBR Green)(批号:A1127110)均购自瑞典Azanno公司; 白细胞介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、核因子- κB (NF- κB) mRNA引物均由上海Invitrogen公司合成及检验; 二甲基亚砜(DMSO)等试剂均为市售分析纯,水为超纯水。

1.3 细胞

小鼠腹腔巨噬细胞系RAW264.7购于武汉普诺赛生命科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 党参多糖不同组分的分离纯化

按照本课题组前期报道方法^[8]进行党参粗多糖的制备:取500 g党参药材,采用水提醇沉法得棕黄色粉末状粗多糖(记为CP)46.6 g,得率为9.3%。CP的分离纯化:将CP溶于水中,制成20 mg/mL的溶液。取200 mL上述溶液,经0.45 μm 微孔滤膜过滤后,上DEAE Sepharose Fast Flow凝胶柱(20 cm \times 2.6 cm),以2 mL/min的流速依次用水和0.1、0.25 mol/L的氯化钠溶液进行洗脱,按10 mL/管收集洗脱液,采用苯酚-硫酸法隔管检测,直至紫外分光光度计测定无多糖吸收峰为止(最后用0.5 mol/L氯化钠溶液冲柱)。将收集得到的3种溶液洗脱部分透析冻干,得淡黄色粉末,分别命名为CP1、CP2、CP3,得率分别为54.9%、9.9%、22.8%。取100 mg各洗脱部分粉末,分别加4 mL相应洗脱液溶解后,继续上Sephadex-G-150葡聚糖凝胶柱(90 cm \times 2.0 cm)进行纯化,然后以0.5 mL/min的流速分别用相应洗脱液进行洗脱,按5 mL/管收集洗脱液,将所有洗脱剂的洗脱组分分别透析冻干,分别命名为CP1-1(得率为5.7%)、CP1-2(得率为36.1%)、CP2-1(得率为1.5%)、CP2-2(得率为1.7%)、CP3-1(得率为14.2%)。取其中得率较高的CP1-2、CP3-1各50 mg,分别加2 mL水、0.25 mol/L氯化钠溶液溶解后,上Sephadex-G-100柱(70 cm \times 1.5 cm)进行分离

(分别用对应溶剂进行洗脱,流速为0.25 mL/min,按4 mL/管进行收集),最终得2个多糖组分,透析冻干后,分别命名为CP1-2-1、CP3-1-1,得率分别为28.9%、9.3%。

2.2 党参多糖的表征

2.2.1 党参多糖的糖含量和糖醛酸含量 采用苯酚-硫酸法^[9]测定CP中糖含量:将CP制备成质量浓度为0.2 mg/mL的水溶液,以葡萄糖为对照品,采用紫外可见分光光度计进行测定。采用间羟基联苯法^[10]测定CP1-2-1、CP3-1-1中糖醛酸含量:将样品制成1 mg/mL的水溶液,以葡萄糖醛酸为对照品,采用紫外可见分光光度计进行测定。结果显示,CP的糖含量高达(92.20±0.73)%,表明所提取的产物几乎均为多糖,可以用于后续试验。组分CP1-2-1中几乎不含有糖醛酸(含量接近0),是一种中性多糖;而组分CP3-1-1中糖醛酸的含量高达(76.3±0.71)%,表明CP3-1-1可能是一种富含糖醛酸的酸性多糖。

2.2.2 组分CP1-2-1、CP3-1-1的相对分子量 采用高效凝胶渗透色谱法(HPGPC)^[11]进行测定。色谱柱为TSK-GEL,检测器为示差折光检测器,进样量为50 μL,流动相为水,流速为0.95 mL/min,柱温为40℃。取不同分子量(2 000、500、70、40、10、3 kDa)的葡聚糖标准品,加水制成质量浓度均为1 mg/mL的标准溶液,按上述色谱条件进行测定,记录色谱图。运用EZ Chrom Elite Compact软件对测得的洗脱体积(V_p)与标准品分子量(M_p)进行拟合,得到标准曲线方程为 $\lg M_p = -0.6 \times 10^{-10} V_p^3 + 1.365 \times 10^{-5} V_p^2 - 0.1089 V_p + 295.5 (R=0.9991)$ 。然后,取组分CP1-2-1、CP3-1-1适量,用水制备成质量浓度为1 mg/mL的样品溶液,按上述色谱条件进样测定,记录色谱图,详见图1。结果显示,组分CP1-2-1、CP3-1-1的色谱图中均显示为单一对称峰,说明这2种组分是均一多糖。测得两种组分的洗脱体积分别为8 514.21、7 901.32 mL,根据标准曲线方程计算得组分CP1-2-1、CP3-1-1的相对分子量分别为25.8、49.5 kDa。

2.2.3 组分CP1-2-1和CP3-1-1的单糖组成 采用完全酸水解法联合薄层色谱(TLC)法^[12]进行分析。取各单糖(葡萄糖、甘露糖、半乳糖、阿拉伯糖、鼠李糖、木糖、果糖、半乳糖醛酸)对照品适量,用水制备成质量浓度均为10 mg/mL的单糖标准溶液,备用。将组分CP1-2-1在0.2 mol/L硫酸、60℃条件下水解40 min,将组分CP3-1-1在2 mol/L盐酸、110℃条件下水解2 h,待完全酸水解后,取产物适量分别加水溶解,制成质量浓度均为10 mg/mL的样品溶液。分别取单糖标准溶液和样品溶液点样于薄层纤维素板(20 cm×10 cm)上,点样量均为10 μL。以正丁醇-乙酸乙酯-异丙醇-甲酸-水-吡啶(3.5:10:6:3.5:3:3, V/V/V/V/V)为展开剂,展开。以苯胺-邻苯二甲酸为显色剂进行显色(110℃、10 min)后,分别在可

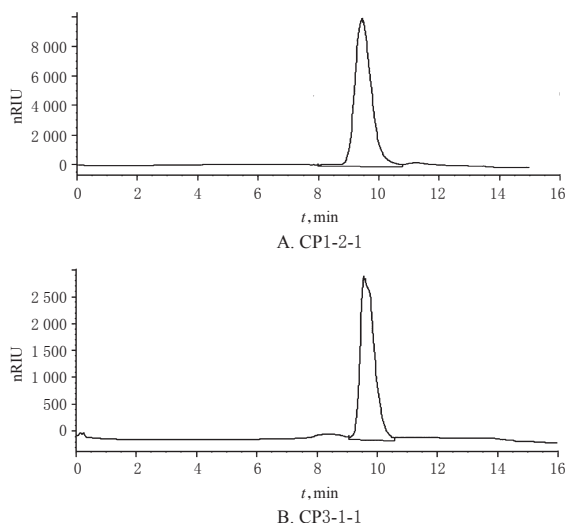


图1 组分CP1-2-1和CP3-1-1的HPGPC色谱图
Fig 1 HPGPC chromatograms of component CP1-2-1 and CP3-1-1

见光、紫外灯下(波长范围为260~280 nm)观察,详见图2。结果显示,组分CP1-2-1中只含有果糖,是一种单一组成的多糖;而组分CP3-1-1则由阿拉伯糖、鼠李糖、半乳糖以及半乳糖醛酸等单糖组成,是一种酸性杂多糖。

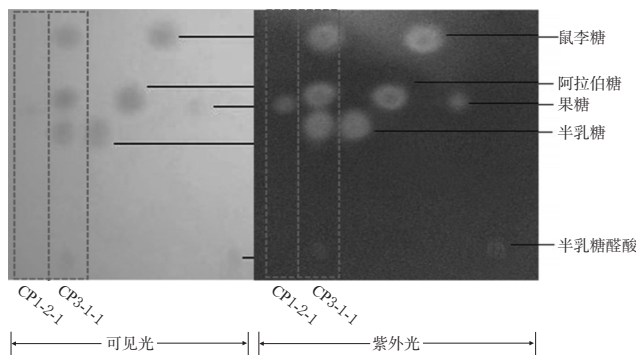


图2 组分CP1-2-1和CP3-1-1的TLC图
Fig 2 TLC chromatograms of component CP1-2-1 and CP3-1-1

2.3 3种多糖的抗炎活性评价及机制研究

2.3.1 3种多糖的细胞毒性考察 取处于对数生长期的RAW264.7细胞,以 5×10^3 个/孔接种于96孔板中(取3块板,分别考察CP、CP1-2-1、CP3-1-1这3种多糖的细胞毒性),每孔100 μL。将细胞分为空白组、对照组和不同质量浓度多糖组,每组设6个复孔。将细胞置于37℃、5% CO₂培养箱中,待细胞培养24 h贴壁良好后,空白组加入培养基,对照组加入磷酸盐缓冲液(PBS),多糖组分别加入不同质量浓度的多糖PBS溶液(0.01、0.1、1、10、100 μg/mL),每孔200 μL。分别将各组细胞置于37℃、5% CO₂条件下继续培养24、48 h后,吸弃培养基,加20 μL MTT溶液,在37℃下继续培养4 h,吸弃培养基;每孔中加入150 μL的DMSO溶液,摇匀,采用酶标仪在490 nm

波长处测定其吸光度(OD),并计算各多糖组细胞的存活率。各多糖组的细胞存活率= $[(OD_{多糖组} - OD_{空白组}) / (OD_{对照组} - OD_{空白组})] \times 100\%$ 。试验重复3次。3种多糖作用24、48 h后的细胞存活率测定结果见表1。

表1 3种多糖作用24、48 h后的细胞存活率测定结果($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

Tab 1 Survival rate of cells cultured with 3 kinds of polysaccharide for 24, 48 h($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

质量浓度, μg/mL	CP组		CP1-2-1组		CP3-1-1组	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
0.01	101.12±2.11	99.01±0.99	102.13±0.85	99.12±2.19	103.45±1.00	99.03±2.11
0.1	103.72±2.82	99.01±2.17	103.54±1.66	100.00±4.43	105.58±1.78	100.21±0.88
1	111.63±3.01	100.00±6.41	115.30±4.87	102.10±2.77	113.52±12.00	100.21±2.73
10	115.01±8.99	103.54±8.01	115.00±1.01	106.00±7.23	119.51±7.89	106.84±4.99
100	119.80±9.90	105.51±2.78	124.30±3.14	114.00±1.99	119.33±10.09	107.63±4.48

结果显示,0.01~100 μg/mL的3种多糖在作用24、48 h后,对细胞均无细胞毒性(细胞存活率均大于99%),甚至还有一定的促细胞增殖作用。这提示党参多糖是一种天然无毒的生物大分子,可用于后续试验。

2.3.2 党参多糖对LPS诱导细胞炎症的影响 取处于对数生长期的RAW264.7细胞,以 5×10^3 个/孔接种于96孔板中(每种多糖单独使用一块板),每孔100 μL。将细胞分为空白组(空白培养基)、模型组(1 μg/mL LPS)和多糖低、中、高质量浓度组(1 μg/mL LPS+25、50、100 μg/mL多糖溶液,多糖用PBS溶解),每组设4个复孔。加药后,将细胞置于37 ℃、5% CO₂培养箱中培养24 h,收集细胞培养液,按照试剂盒说明书操作测定NO含量。试验重复3次。采用SPSS 19.0软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用t检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。各组细胞培养液中NO含量测定结果见表2。

表2 各组细胞培养液中NO含量测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 2 Contents of NO in cell culture solution in each group($\bar{x} \pm s, n=3$)

多糖	空白组	模型组	25 μg/mL组	50 μg/mL组	100 μg/mL组
CP	101.36±19.21	389.46±14.56**	354.55±13.09 [#]	346.82±14.80 [#]	322.18±17.11 [#]
CP1-2-1	104.44±22.20	393.37±18.09**	327.78±10.89 [#]	293.33±23.93 [#]	273.34±12.34 [#]
CP3-1-1	100.00±10.09	397.73±23.99**	351.36±15.11 [#]	331.18±12.90 [#]	290.10±24.67 [#]

注:与空白组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$,[#] $P < 0.01$

Note: vs. blank group, ** $P < 0.01$; vs. model group, [#] $P < 0.05$, [#] $P < 0.01$

0.01

结果显示,与空白组比较,模型组细胞培养液中NO含量显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,3种多糖组细胞培养液中NO含量均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.3.3 3种多糖的抗炎机制研究 按“2.3.2”项下方法进行细胞接种、分组和给药。然后将细胞置于37 ℃、5% CO₂培养箱中培养24 h,用PBS快速清洗细胞,加入

Trizol试剂,反复吹打,使细胞充分裂解,按照试剂盒说明书操作提取总mRNA。采用分光光度计测定总mRNA在260、280 nm波长处的吸光度(OD),根据OD₂₆₀/OD₂₈₀评价其纯度。然后取mRNA反转录合成cDNA后,在Mini Opticon™检测系统上进行PCR扩增。扩增体系(20 μL):qPCR试剂10 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各0.5 μL,双蒸水5.0 μL,cDNA模板4.0 μL。扩增条件:95 ℃预变性2 min;95 ℃变性10 s,62 ℃退火30 s,72 ℃延伸15 s,共40个循环。以β-actin为内参,采用2^{-ΔΔC_t}法计算目的基因的表达水平。试验重复3次。按照“2.3.2”项下方法进行统计分析。PCR引物序列和扩增产物长度见表3,各组细胞中TLR-4、NF-κB、IL-6、TNF-α mRNA表达水平测定结果见表4。

表3 PCR引物序列和扩增产物长度

Tab 3 PCR primer sequence and amplified product length

基因	引物序列(5'→3')	产物长度, bp
β-actin	上游:CGTTGACATCCGTAAGACCTC	110
	下游:TAGGAGCCAGGGCAGTAATCT	
TLR4	上游:TGACTCCATTCAAGCCCAA	137
	下游:CCAAGATCAACCGATGGAC	
NF-κB	上游:CACCAAAGACCCCACTCACC	239
	下游:CCGCATTCAAGTCATAGTCCC	
IL-6	上游:AGCCAGAGTCATTAGAGCAAT	214
	下游:CCGAGTAGACCTCATAGTGACCTTT	
TNF-α	上游:TCAGCCTCTTCTCATTCTGTC	212
	下游:CTCCTCCGCTTGGTGGTTT	

表4 各组细胞中TLR-4、NF-κB、IL-6、TNF-α mRNA表达水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 4 mRNA expressions of TLR-4, NF-κ B, IL-6 and TNF-α in cells in each group($\bar{x} \pm s, n=3$)

考察样品	组别	TLR4	NF-κ B	IL-6	TNF-α
CP	空白组	1.01±0.16	1.02±0.10	1.00±0.10	1.02±0.08
	模型组	1.58±0.10**	2.42±0.13**	1.50±0.08**	1.63±0.02**
	25 μg/mL组	1.30±0.15	2.06±0.22	1.32±0.18	1.40±0.03
	50 μg/mL组	1.21±0.04 [#]	1.52±0.08 [#]	1.18±0.12 [#]	1.21±0.05 [#]
	100 μg/mL组	1.10±0.10 [#]	1.29±0.14 [#]	1.09±0.07 [#]	1.12±0.12 [#]
CP1-2-1	空白组	0.95±0.07	1.03±0.05	1.00±0.03	1.01±0.14
	模型组	1.38±0.07**	1.42±0.06**	1.36±0.09**	1.39±0.13*
	25 μg/mL组	1.12±0.06 [#]	1.19±0.03 [#]	1.26±0.04	1.19±0.08
	50 μg/mL组	1.09±0.06 [#]	1.17±0.05 [#]	1.18±0.02 [#]	1.15±0.03 [#]
	100 μg/mL组	0.98±0.01 [#]	1.12±0.05 [#]	1.07±0.08 [#]	1.06±0.04 [#]
CP3-1-1	空白组	0.97±0.05	1.02±0.13	1.03±0.12	1.04±0.14
	模型组	1.40±0.16*	1.40±0.12*	1.40±0.07**	1.40±0.13*
	25 μg/mL组	1.21±0.07	1.22±0.06	1.19±0.10 [#]	1.21±0.09
	50 μg/mL组	1.12±0.11	1.13±0.11 [#]	1.11±0.10 [#]	1.14±0.06 [#]
	100 μg/mL组	1.08±0.06 [#]	1.10±0.11 [#]	1.06±0.08 [#]	1.08±0.10 [#]

注:与空白组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$,[#] $P < 0.01$

Note: vs. blank group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. model group, [#] $P < 0.05$, [#] $P < 0.01$

结果显示,与空白组比较,模型组细胞中TLR4、NF-κB、TNF-α、IL-6 mRNA表达水平均显著升高($P <$

0.05 或 $P < 0.01$)。与模型组比较, 50、100 $\mu\text{g/mL}$ CP 组细胞中 TLR4、NF- κ B、TNF- α 、IL-6 mRNA 表达水平均显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 25 $\mu\text{g/mL}$ CP1-2-1 组细胞中 TLR4、NF- κ B mRNA 表达水平以及 50、100 $\mu\text{g/mL}$ CP1-2-1 组细胞中 TLR4、NF- κ B、TNF- α 、IL-6 mRNA 表达水平均显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 25 $\mu\text{g/mL}$ CP3-1-1 组细胞中 IL-6 mRNA 表达水平和 50 $\mu\text{g/mL}$ CP3-1-1 组细胞中 NF- κ B、TNF- α 、IL-6 mRNA 表达水平以及 100 $\mu\text{g/mL}$ CP3-1-1 组细胞中 TLR4、NF- κ B、TNF- α 、IL-6 mRNA 表达水平均显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3 讨论

目前, 国内外已有许多文献报道从党参中提取的多糖具有多种生物活性^[4-6], 但这些多糖大多数是粗多糖, 而关于党参多糖具体哪个组分影响了其生物活性的报道较为少见。本研究将 CP 通过色谱柱分离纯化后, 最终获得 2 种均一的党参多糖组分 (CP1-2-1、CP3-1-1)。通过初步表征发现, 组分 CP1-2-1 是一种只含有果糖的中性多糖, 而组分 CP3-1-1 是由一种由阿拉伯糖、鼠李糖、半乳糖以及半乳糖醛酸等组成的酸性杂多糖。

巨噬细胞是机体重要的免疫细胞之一, 具有吞噬、抗原提呈以及分泌多种生物活性物质的功能^[13]。通常情况下, 急性炎症反应发生时, 巨噬细胞内会产生大量的 NO, 造成细胞损伤, 而通过测定细胞培养液中 NO 的含量, 可以反映炎症的病变程度^[13]。本研究通过考察 CP、CP1-2-1、CP3-1-1 对炎症模型细胞 NO 释放量的影响, 发现三者均可抑制细胞中 NO 的释放, 均有较好的抗炎效果。Toll 样受体 (TLRs) 是一种重要的炎性受体, 其与配体结合可开启信号传递途径; NF- κ B 对参与免疫反应各阶段的许多分子都具有调控作用; TLR4/NF- κ B 是一种常见的信号通路, 可调控炎性介质的合成和释放来介导炎性损伤^[13-15]。在 LPS 炎症模型中, 巨噬细胞受到 LPS 的诱导刺激后, 其模式识别受体 TLR4 会与配体 LPS 结合, 从而刺激巨噬细胞炎症通路 TLR4/NF- κ B 的激活, 以此增加炎性因子 mRNA 的转录, 使细胞分泌更多炎性因子 (如 TNF- α 、IL-6 等), 从而导致炎症的发生^[16]。因此, 通过探究细胞中各炎症因子的 mRNA 表达情况, 可初步探究党参多糖的抗炎机制。本研究结果显示, 3 种多糖组分均能降低炎症模型细胞中 TLR4、NF- κ B、TNF- α 和 IL-6 的 mRNA 表达水平。

综上所述, 3 种多糖组分均具有一定的抗炎活性, 其抗炎机制可能与抑制 TLR4/NF- κ B 通路的活化, 从而抑制如 TNF- α 、IL-6 等炎症因子的生成与释放有关。

参考文献

[1] CHEN Y, DONG Y, WANG H, et al. The research prog-

ress in immune regulation of polysaccharides of traditional Chinese medicine[J]. *Int J Tradit Chin Med*, 2017, 38(9):855-858.

- [2] 周荣荣, 张萌, 朱彦, 等. 含党参方剂的数据挖掘及防治胃肠道疾病的分子机制[J]. *药学学报*, 2018, 53(9):1422-1428.
- [3] HE J, MA N, ZHU S, et al. The genus *Codonopsis* (Campanulaceae): a review of phytochemistry, bioactivity and quality control[J]. *J Nat Med*, 2015, 69(1):1-21.
- [4] SUN Y, LIU J. Structural characterization of a water-soluble polysaccharide from the roots of *Codonopsis pilosula* and its immunity activity[J]. *Int J Biol Macromol*, 2008. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2008.06.009.
- [5] 黄圆圆, 张元, 康利平, 等. 党参属植物化学成分及药理活性研究进展[J]. *中草药*, 2018, 49(1):239-250.
- [6] 许建安. 恩施地区板桥党参抗炎和免疫作用实验研究[J]. *亚太传统医药*, 2011, 4(9):11-12.
- [7] 赵晓芳. 板党多糖对溃疡性结肠炎大鼠的防治作用及机制研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2016.
- [8] 张骏, 要辉, 张崇, 等. 板桥党参多糖提取工艺优化及对肝癌细胞 HepG2 的抑制[J]. *生物资源*, 2018, 40(3):246-251.
- [9] 杨勇杰, 姜瑞芝, 陈英红, 等. 苯酚-硫酸法测定杂多糖含量的研究[J]. *中成药*, 2005, 27(6):706-708.
- [10] 陈巧巧, 万琴, 王振中, 等. 人参多糖中糖醛酸含量测定方法的建立[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(8):121-124.
- [11] 刘玉明, 李家春, 钱甜甜, 等. 方格星虫多糖分子量的高效凝胶渗透色谱法测定[J]. *时珍国医国药*, 2013, 24(12):2857-2858.
- [12] 陈橙, 丛媛媛, 热米拉·米吉提. 薄层色谱法和气相色谱法分析 2 种侧耳多糖的单糖组成[J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(1):256-260.
- [13] LIU F, ZHANG X, LING P, et al. Immunomodulatory effects of xanthan gum in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages[J]. *Carbohydr Polym*, 2017. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.04.003.
- [14] LI D, REN Y, FAN H. The classification of macrophages and their regulatory functions[J]. *Chin Bull Life Sci*, 2011, 23(3):249-254.
- [15] ABDALLAH HM, ABDEL-NAIM AB, ASHOUR OM, et al. Anti-inflammatory activity of selected plants from Saudi Arabia[J]. *Z Naturforsch C*, 2014, 69(1/2):1-9.
- [16] 周卫东, 项磊, 卢汉琪, 等. 党参多糖改善 5-氟尿嘧啶诱导小肠黏膜炎的实验研究[J]. *辽宁中医杂志*, 2016, 43(7):1495-1498.

(收稿日期:2019-11-06 修回日期:2020-04-16)

(编辑:林 静)