

黄芪多糖 APS-I、APS-II 制备及其对溃疡性结肠炎小鼠抗炎活性

文雨薇^{1,2,3}, 李科^{1,2,3,4*}, 吕弯弯^{1,2,3}, 冯仕红^{1,2,3}, 秦雪梅^{1,2,3}, 杜昱光⁴, 李震宇^{1,2,3}

1. 山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

2. 山西大学 化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 山西 太原 030006

3. 地产中药功效物质研究与利用山西省重点实验室, 山西 太原 030006

4. 中国科学院过程工程研究所, 北京 100190

摘要:目的 从黄芪多糖 (*Astragalus polysaccharides*, APS) 中分离制备出 2 种多糖 APS-I (相对分子质量 $>2 \times 10^6$)、APS-II (相对分子质量 1×10^4), 明确 APS、APS-I、APS-II 对葡聚糖硫酸钠 (dextran sulphate sodium, DSS) 诱导的小鼠溃疡性结肠炎的疗效。方法 对 APS-I、APS-II 进行分离制备, 并进行相对分子质量、糖醛酸含量、单糖组成以及糖苷键连接方式测定。建立 BALB/c 小鼠溃疡性结肠炎模型, 分别给予 APS、APS-I、APS-II, 记录小鼠疾病活动指数 (disease activity index, DAI) 评分、结肠长度、脾脏指数、肝脏指数; 采用苏木素-伊红 (HE) 染色观察结肠组织病理变化; 测定结肠组织髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 活性和 Th1 相关细胞因子肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、 γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ) 以及 Th2 相关细胞因子白细胞介素-4 (interleukin-4, IL-4)、IL-10 水平; 采用 qRT-PCR 检测结肠组织 TNF- α 、IFN- γ 、IL-4、IL-10 mRNA 表达; 免疫组化法测定结肠组织 T 细胞特异性转录因子 (transcription factor T-bet, T-bet)、GATA 结合蛋白 3 (GATA binding protein 3, GATA-3) 蛋白表达, 比较 APS、APS-I、APS-II 疗效。结果 APS 中共有 2 个组分 APS-I、APS-II, 其相对分子质量分别为 $>2 \times 10^6$ 、 1×10^4 , 糖醛酸质量分数分别为 26.25%、1.62%。单糖结果显示, APS-I 和 APS-II 均由甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖组成, APS-I 中甘露糖、阿拉伯糖和半乳糖占比均大于 APS-II。糖苷键结果显示, APS-I 以 1,4 连接的葡萄糖和 1,6 连接的半乳糖为主, APS-II 以 1,4 连接的葡萄糖为主。与模型组比较, APS-I 可显著改善结肠长度降低、体质量减轻、DAI 评分增加、脾脏和肝脏指数增加等临床症状 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 减轻结肠组织病理损伤, 降低结肠组织中 MPO 活性及 TNF- α 、IFN- γ 水平 ($P < 0.01$ 、 0.001), 升高结肠组织中 IL-4、IL-10 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 下调结肠组织 TNF- α 、IFN- γ mRNA 表达和 T-bet 蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.001), 上调 IL-4、IL-10 mRNA 表达和 GATA-3 蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.01)。而 APS-II 在 MPO 活性、IFN- γ 水平以及 IL-4、IL-10 mRNA 表达和 T-bet、GATA-3 蛋白表达方面与模型组相比无显著差异。结果表明 APS-I 对溃疡性结肠炎的治疗效果优于 APS-II。结论 APS-I 是 APS 治疗溃疡性结肠炎的主要成分, 其活性可能与其糖醛酸含量、多糖的种类以及糖苷键连接方式有关, APS-I 治疗溃疡性结肠炎可能通过调节 Th1/Th2 免疫平衡实现。

关键词: 黄芪多糖; 黄芪多糖-I; 黄芪多糖-II; 甘露糖; 鼠李糖; 半乳糖醛酸; 葡萄糖; 半乳糖; 阿拉伯糖; 溃疡性结肠炎; Th1/Th2 免疫平衡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)14-4759-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.14.013

Preparation of *Astragalus polysaccharides* APS-I and APS-II and their anti-inflammatory activity in mice with ulcerative colitis

WEN Yuwei^{1,2,3}, LI Ke^{1,2,3,4}, LYU Wanwan^{1,2,3}, FENG Shihong^{1,2,3}, QIN Xuemei^{1,2,3}, DU Yuguang⁴, LI Zhenyu^{1,2,3}

1. Modern Research Center of Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

2. Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering, Ministry of Education, Shanxi University, Taiyuan 030006,

收稿日期: 2024-04-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81872962); 国家博士后科学基金资助项目(2019M650851); 国家重点研发计划项目(2019YFC1710800); 山西省重点研发计划重点项目(201603D311101); 山西省优秀科技人才项目(201605D211030, 201705D211020); 山西省科技创新人才团队专项基金

作者简介: 文雨薇 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药质量控制。E-mail: wenyw1166@163.com

*通信作者: 李科, 男, 教授, 博士生导师, 从事中药质量控制与品质评价、天然药物研发。E-mail: like@sxu.edu.cn

China

3. Shanxi Provincial Key Laboratory of Research and Utilization of Functional Substances in Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030006, China

4. Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

Abstract: Objective To isolate *Astragalus* polysaccharides-I (APS-I) (relative molecular mass $> 2 \times 10^6$) and APS-II (relative molecular mass 1×10^4) from APS, and further clarify the efficacy of APS, APS-I and APS-II on dextran sulphate sodium (DSS)-induced ulcerative colitis in mice. **Methods** APS-I and APS-II were isolated and prepared, relative molecular mass, uronic acid content, monosaccharide composition and glycosidic linkage were determined. The BALB/c mice model of ulcerative colitis was established, APS, APS-I and APS-II were given. The disease activity index (DAI), colon length, spleen index and liver index of mice were measured; Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe pathological changes in colon tissue; The activity of myeloperoxidase (MPO) and levels of Th1 related cytokines tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ), as well as Th2 related cytokines interleukin-4 (IL-4) and IL-10 in colon tissue were measured; qRT-PCR was used to detect the mRNA expressions of TNF- α , IFN- γ , IL-4 and IL-10 in colon tissue; Immunohistochemical method was used to measure the expressions of T cell specific transcription factor T-bet (T-bet) and GATA binding protein 3 (GATA-3) protein in colon tissue. The efficacy of APS, APS-I and APS-II was compared. **Results** APS was composed of two components APS-I and APS-II, with relative molecular weights $> 2 \times 10^6$ and 1×10^4 , respectively; The mass fractions of uronic acid were 26.25% and 1.62%, respectively. The monosaccharide results showed that APS-I and APS-II were both composed of mannose, rhamnose, galacturonic acid, glucose, galactose and arabinose. The proportion of mannose, arabinose and galactose in APS-I was higher than that in APS-II. The glycosidic bond results showed that APS-I was mainly composed of 1,4-linked glucose and 1,6-linked galactose, while APS-II was mainly composed of 1,4-linked glucose. Compared with model group, APS-I could significantly improve clinical symptoms such as decreased colon length, decreased body weight, increased DAI score, increased spleen and liver indexes ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), alleviate pathological damage to colon tissue, reduce MPO activity and levels of TNF- α , IFN- γ in colon tissue ($P < 0.01, 0.001$), increase IL-4 and IL-10 levels in colon tissue ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), down-regulate TNF- α , IFN- γ mRNA expressions and T-bet protein expression in colon tissue ($P < 0.05, 0.001$), up-regulate IL-4, IL-10 mRNA expressions and GATA-3 protein expression ($P < 0.05, 0.01$). However, APS-II showed no significant differences compared to model group in terms of MPO activity, IFN- γ level, expressions of IL-4, IL-10 mRNA and T-bet, GATA-3 protein. The results indicated that APS-I had a better therapeutic effect on ulcerative colitis than APS-II. **Conclusion** APS-I is the main component of APS in the treatment of ulcerative colitis, and its activity may be related to its uronic acid content, type of polysaccharide and glycosidic bond connection mode. APS-I may treat ulcerative colitis by regulating Th1/Th2 immune balance.

Key words: *Astragalus* polysaccharide; *Astragalus* polysaccharide-I; *Astragalus* polysaccharide-II; mannose; rhamnose; galacturonic acid; glucose; galactose; arabinose; ulcerative colitis; Th1/Th2 immune balance

黄芪多糖 (*Astragalus* polysaccharide, APS) 是黄芪中免疫调节活性最强的部分, 同时具有双向调节功能^[1-2], 研究表明黄芪多糖在溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 治疗中具有较好疗效^[3-5]。然而这些研究多是以黄芪总多糖为对象, 究竟哪些相对分子质量的黄芪多糖在起主要作用并不清楚。本课题组前期采用水提醇沉、TSK 凝胶色谱表征, 发现 APS 可以分为 APS-I (相对分子质量 $> 2 \times 10^6$) 和 APS-II (相对分子质量为 1×10^4) 2 个部分, 并采用超滤截留技术将 2 个组分分别制备, 筛选出体内外免疫促进作用最强的组分是 APS-II, 体外抗炎活性最强的是 APS-I^[6-7], 但是并未对 APS-I 和 APS-II 进行抗 UC 活性筛选。这些组分的治疗机制是否一致目前尚未见报道。

本研究将 APS 根据相对分子质量采用超滤截留技术进行分离, 以不同相对分子质量的 APS-I (相对分子质量 $> 2 \times 10^6$) 和 APS-II (相对分子质量为 1×10^4) 为研究对象, 对 UC 小鼠模型进行治疗, 来筛选不同相对分子质量 APS 的抗 UC 活性, 初步探讨 APS、APS-I、APS-II 治疗 UC 可能的作用机制, 并对 APS-I、APS-II 进行结构解析, 探讨结构差异与活性的关系。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 BALB/c 小鼠, 6~8 周龄, 体质量 (20 ± 2) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物许可证号 SCXK (京) 2021-0006。动物饲养于温度 (25 ± 2) °C、相对湿度 (50 ± 10) %、12 h

明暗交替光照的环境中。动物实验经山西大学科学研究伦理审查委员会批准(批准号 SXULL-2018009)。

1.2 药材

黄芪(采收时间为2017年,生长年限为5年)来自山西浑源,经山西大学秦雪梅教授鉴定为蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根。药材样品留存于山西大学中医药现代研究中心样品库。

1.3 药品与试剂

葡萄糖标准品(批号 200-075-1)购自阿拉丁科技股份有限公司;标准品甘露糖(批号 A600554)、鼠李糖(批号 A600804)、阿拉伯糖(批号 A610071)、半乳糖(批号 A600215)、葡萄糖醛酸(批号 A600482)均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;半乳糖醛酸标准品(批号 B21984)购自上海源叶生物科技有限公司,以上单糖标准品质量分数均大于98%;1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone, PMP, 批号 B25309)购自天津市致远化学试剂公司;光谱级溴化钾(批号 P816702)、碘甲烷(批号 C781604)、无水二甲基亚砜(批号 D821476)、硼氢化钠(批号 S832753)、碳二亚胺(批号 N808856)、吗啉乙磺酸(批号 M813436)、强酸性阳离子交换树脂(批号 A824461)、咪唑盐酸盐(批号 I812100)无水吡啶(批号 P816290)均购自上海麦克林生化科技公司;葡聚糖硫酸钠(dextran sulphate sodium, DSS, 批号 MB5535)购自大连美仑生物技术有限公司;美沙拉嗪(批号 IA0250)、无菌无酶水(批号 R1600)购自北京索莱宝科技有限公司;肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 试剂盒、 γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ) 试剂盒、白细胞介素-4(interleukin-4, IL-4) 试剂盒、IL-10 试剂盒、髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO) 试剂盒均购自武汉贝茵莱生物科技有限公司;RNAiso Plus 试剂(批号 9108)、Prime ScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂(批号 RR047A)、TB Green[®] Premix Ex TaqTM II 试剂(批号 RR420A)均购自宝日医生物技术有限公司;通用型组织固定液(中性,批号 G1101)、环保型脱蜡透明液(批号 G1128)、苏木素染液(批号 G1104)、苏木素分化液(批号 G1039)、苏木素返蓝液(批号 G1040)、组化试剂盒 DAB 显色剂(批号 G1212)均购自塞维尔生物科技

有限公司;T 细胞特异性转录因子(transcription factor T-bet, T-bet) 抗体(批号 A00404-1)、GATA 结合蛋白3(GATA binding protein 3, GATA3) 抗体(批号 MA00593)均购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.4 仪器

CPA225D 型万分之一分析天平(德国 Sartorius 公司);RH digital 磁力搅拌器(德国 IKA 公司);RE-52 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);GS-NF500 型膜片式切向流膜分离系统、PES 材质 GS-1wDa 膜(上海顾信生物科技有限公司);FD-1D-80 型真空冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司);infinite M200 型酶标仪(瑞士 Tecan 公司);MH-2 型微型振荡器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);Eclipse Ci-L 型正置白光拍照显微镜(日本 Nikon 公司)。

2 方法

2.1 不同相对分子质量 APS 的制备

参考文献方法^[6],采用水提醇沉方法提取 APS,称取 15 g 黄芪粉末,加入 300 mL 蒸馏水,90 °C 水浴提取 4 h,加入木瓜蛋白酶结合三氯乙酸法除蛋白,高温灭活后加入无水乙醇,乙醇最终体积分数为 90%,静置后离心,收集沉淀并冷冻干燥。将 APS 溶于蒸馏水制成 5 mg/mL 的溶液,通过 1×10^4 的超滤膜将 APS 分为 APS-I、APS-II(在分离过程中大分子糖随溶液切向流经膜表面,而小分子糖则在压力驱动下穿过微孔而进入膜另一侧),截流后将 APS-I、APS-II 冷冻干燥,备用。

2.2 多糖理化性质测定

参考文献方法^[8],采用苯酚-硫酸法、考马斯亮蓝法、间羟基联苯法、高效凝胶渗透色谱法(gel permeation chromatography, HPGPC)分别测定 APS、APS-I、APS-II 的糖含量、蛋白质含量、糖醛酸含量以及相对分子质量。

2.3 单糖组成分析

参考文献方法^[8],称取 10 mg 的 APS-I、APS-II 置于水解管中,加入 6 mL TFA (2 mol/L) 并放入烘箱进行水解,水解温度为 110 °C。水解完成后取出冷却至室温,减压浓缩并反复加入甲醇从而除去残留的三氯乙酸,加入 1 mL 水溶解后备用。配制成 0.6 mL 体系混合(多糖水解液 0.2 mL、0.35 mol/L PMP 0.2 mL、0.3 mol/L NaOH 溶液 0.2 mL),70 °C 反应 30 min 后加入 0.2 mL HCl (0.3 mol/L) 混合均

匀以达到中和的目的。吸取 1 mL 氯仿加入上述混合物中混匀、静置、离心，重复萃取 3 次。取上层水液过膜后采用 HPLC-UV 检测。

色谱条件：Unitary C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），流动相为磷酸二氢钾缓冲液（pH 6.7，50 mmol/L）和乙腈（82：18）；体积流量 1.0 mL/min；柱温 35 °C；检测波长 250 nm；进样量 10 μL。

2.4 甲基化分析

参考文献方法^[9]，由于 APS-I 含有糖醛酸，在甲基化前需要先还原，采用 GC-MS 进行分析。

2.4.1 还原 称取 5 mg APS-I，加入 1 mL 去离子水，随后加入 200 μL 吗啉乙磺酸（0.2 mol/L）、400 μL 碳二亚胺溶液（500 mg/mL），反应 3 h，反应温度为 25 °C。反应结束后向混合物中加入 1 mL 咪唑盐酸（4 mol/L）、600 μL NaBD₄（70 mg/mL），4 °C 反应过夜。反应结束后将混合物置于冰浴中，并加入 500 μL 冰醋酸和 NaBD₄ 使反应停止，然后进行透析除盐后冻干。

2.4.2 甲基化 吸取 500 μL 无水 DMSO 加入还原后的 APS-I 中，在 N₂ 保护下充分溶解。将制备好的 NaOH-DMSO 混悬液抽取 500 μL 加入其中，在 N₂ 保护下混匀。混匀后置于冰浴中，抽取 1 mL CH₃I，避光加入反应液中，反应 30 min，结束后加入 2 mL 蒸馏水使反应停止，透析后冻干。重复甲基化步骤 1 次，结束反应后，加入 4 mL 二氯甲烷萃取 3 次，加入 5 mL 蒸馏水反复萃取 3 次，将有机相吹干后加入 1 mL 去离子水溶解并冻干。进行红外光谱检测，判断是否甲基化完全。若甲基化不完全，则需重复甲基化步骤。

2.4.3 水解和还原 配制 2 mol/L TFA，吸取 1 mL 加入冻干后的样品，在 N₂ 保护下水解 3 h，水解温度为 120 °C。水解完成后，反复加入无水乙醇，在 37 °C 蒸除 TFA。向混合物中加入 30 mg/mL 硼氢化钠溶液 1 mL，缓慢搅拌 12 h，搅拌完成后加入 50% 冰醋酸 500 μL 进行中和处理，直至 pH 为 7，向混合物中加入强酸性阳离子交换树脂，搅拌，滤过，并向滤液中反复加入无水甲醇，37 °C 下蒸除硼酸。

2.4.4 乙酰化 还原反应完成后，吸取乙酸酐、无水吡啶各 500 μL，在 N₂ 保护下反应 2 h，温度为 100 °C。反应完成后置于冰浴中迅速加入 1 mL 去离子水使反应停止。5 min 后，加入 2 mL 二氯甲烷、2 mL 去离子水混匀、静置进行萃取，收集有机相并吹干，加入二氯甲烷溶解后待测。

2.5 动物分组、造模与给药

小鼠适应性饲养 1 周后，随机分为空白组、模型组、美沙拉嗪（200 mg/kg）组及 APS 低、中、高剂量（100、200、400 mg/kg）组，APS-I 低、中、高剂量（40、80、160 mg/kg）组和 APS-II 低、中、高剂量（60、120、240 mg/kg）组，每组 10 只。分别按照 APS-I、APS-II 在黄芪总多糖中的质量分数（APS-I 为 40%、APS-II 为 60%），折算成相当于黄芪总多糖 100、200、400 mg/kg 剂量给药^[6]。除空白组外，其余各组小鼠均自由饮用 3% DSS 水溶液造模 7 d，造模同时各给药组 ig 相应药物（10 mL/kg），空白组和模型组 ig 等体积水^[10]。实验过程中每天观察小鼠的精神、体质量、粪便、活动、存活等情况。

2.6 样本采集

小鼠造模第 7 天禁食不禁水 12 h，第 8 天处死，解剖小鼠并取肛门至回盲部的结肠，每只小鼠在远端结肠取部分组织标本，对结肠组织进行测量并拍照，并分为 3 部分，第 1 部分放入组织固定液，用于病理切片以及免疫组化染色；第 2、3 部分分别用于测定组织中炎症因子水平和 qRT-PCR 实验，暂时存放于液氮中，之后于 -80 °C 冰箱保存。

2.7 小鼠疾病活动指数（disease activity index, DAI）评分

根据评分标准^[11]（表 1）进行 DAI 评分。

$$DAI = (\text{体质量下降率评分} + \text{大便性状评分} + \text{血便评分}) / 3$$

表 1 DAI 评分标准

Table 1 DAI scoring criteria

评分	体质量下降率 (x) / %	大便性状	血便
0	$0 \leq x < 1$	正常	正常
1	$1 \leq x < 5$	—	—
2	$5 \leq x < 10$	软便	中度
3	$10 \leq x < 15$	—	—
4	$x \geq 15$	水样腹泻	大出血

2.8 小鼠结肠长度测量

处死小鼠后，取出结肠进行测量并拍照记录。

2.9 小鼠脾脏、肝脏指数测定

处死小鼠后，摘取小鼠的脾脏、肝脏，称定质量，计算脏器指数。

$$\text{脾脏指数} = \text{脾脏质量} / \text{体质量}$$

$$\text{肝脏指数} = \text{肝脏质量} / \text{体质量}$$

2.10 结肠组织苏木素-伊红（HE）染色

将小鼠结肠放于组织固定液中固定 24 h 以上，进行脱水包埋、切片。将石蜡切片脱蜡至水，将切片放入高清恒染预处理液进行处理，处理完成后，

进行 HE 染色, 脱水封片。于显微镜下观察并拍照。

2.11 结肠组织 MPO 活性和炎性因子水平检测

将-80 °C 冰箱储存的结肠组织匀浆取上清, 按照试剂盒说明书检测 MPO 活性和 TNF- α 、IFN- γ 、IL-4、IL-10 水平。

2.12 qRT-PCR 检测结肠组织 TNF- α 、IFN- γ 、IL-4、IL-10 mRNA 表达

取空白组、模型组、美沙拉嗪组及 APS 高剂量组、APS-I 高剂量组和 APS-II 高剂量组小鼠结肠组织 30 mg, 按照试剂盒说明书提取总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析^[12]。引物序列见表 2。

2.13 免疫组化检测结肠组织 T-bet、GATA-3 蛋白表达

参考文献方法^[13], 对空白组、模型组、美沙拉嗪组及 APS 高剂量组、APS-I 高剂量组和 APS-II 高剂量组小鼠结肠组织切片进行化学组织染色, 染色结果利用 Image J 软件进行分析, 计算平均吸光度 (A) 值。

2.14 统计学分析

采用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析, 计量资料数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 GraphPad Prism 软件进行相关数据处理和图表绘制。

表 2 引物序列

Table 2 Primer sequences

基因	引物序列 (5'-3')
<i>TNF-α</i>	F: ACGCTCTTCTGTCTACTGAACTTCG R: TGGTTTGTGAGTGTGAGGGTCTG
<i>IFN-γ</i>	F: TGGAGGAACTGGCAAAAGGATGG R: ATGACGCTTATGTTGTTGCTGATGG
<i>IL-4</i>	F: GGTCTCAACCCCCAGCTAGT R: GCCGATGATCTCTCTCAAGTGAT
<i>IL-10</i>	F: GGTTGCCAAGCCTTATCGGAAATG R: GCCGCATCCTGAGGGTCTTC
<i>β-actin</i>	F: GTGCTATGTTGCTCTAGACTTCG R: ATGCCACAGGATTCCATACC

3 结果

3.1 不同相对分子质量 APS 的理化性质

经测定, APS、APS-I 和 APS-II 总糖质量分数分别为 85.24%、70.11%、77.35%; 蛋白质质量分数分别为 0.63%、0.72%、1.68%, 糖醛酸质量分数分别为 21.51%、26.25%、1.62%。APS-I 相对分子质量 $>2 \times 10^6$, APS-II 相对分子质量约为 1×10^4 (图 1)。APS-I 占比为 40%, APS-II 占比为 60%。

3.2 不同相对分子质量 APS 的单糖组成

如图 2 所示, 以阿拉伯糖为 1, APS-I 的单糖组

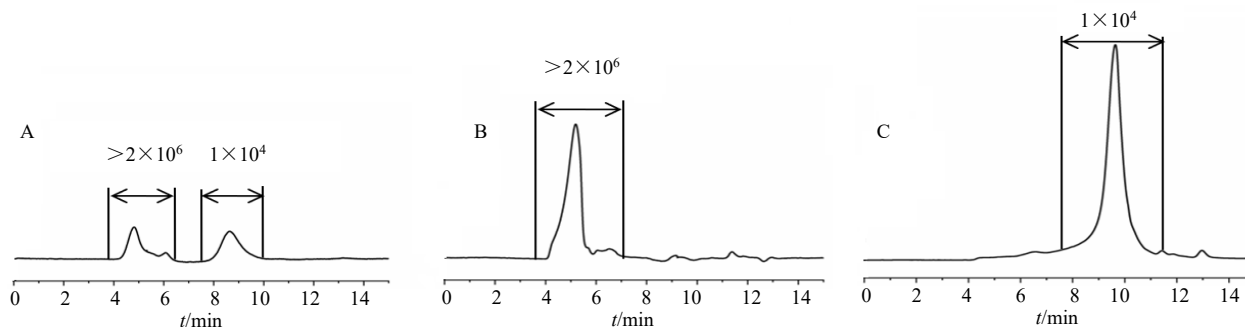
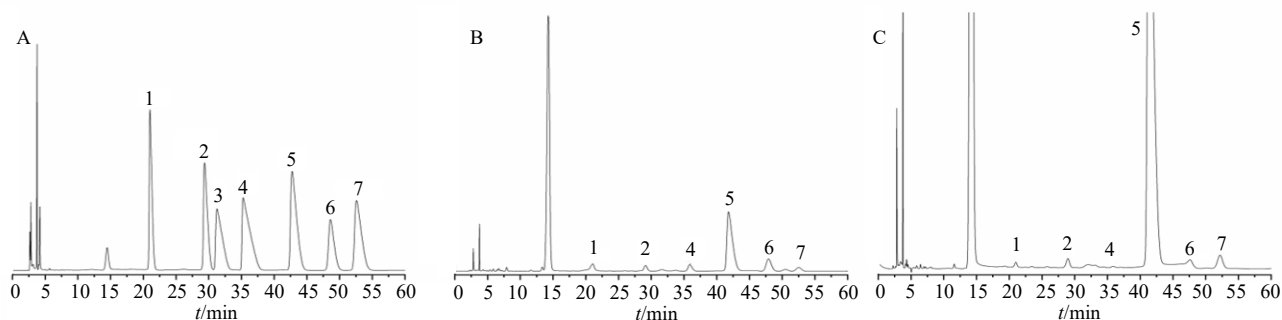


图 1 APS (A)、APS-I (B) 和 APS-II (C) 的 HPGPC 色谱图

Fig. 1 HPGPC chromatograms of APS (A), APS-I (B) and APS-II (C)



1-甘露糖; 2-鼠李糖; 3-葡萄糖醛酸; 4-半乳糖醛酸; 5-葡萄糖; 6-半乳糖; 7-阿拉伯糖。

1-mannose; 2-rhamnose; 3-glucuronic acid; 4-galacturonic acid; 5-glucose; 6-galactose; 7-arabinose.

图 2 单糖标准品 (A)、APS-I (B)、APS-II (C) 的 HPLC-UV 色谱图

Fig. 2 HPLC-UV chromatograms of monosaccharide standards (A), APS-I (B) and APS-II (C)

成物质的量比为甘露糖：鼠李糖：半乳糖醛酸：葡萄糖：半乳糖：阿拉伯糖=1.73：0.94：1.37：17.11：3.36：1.00,其中葡萄糖占比最高,为67.1%;其次是半乳糖和甘露糖,分别为13.2%、6.8%;而半乳糖醛酸、阿拉伯糖、鼠李糖占比分别为5.4%、3.9%、3.7%。APS-II的单糖组成物质的量为甘露糖：鼠李糖：半乳糖醛酸：葡萄糖：半乳糖：阿拉伯糖=0.15：0.46：0.06：44.53：0.53：1.00,其中葡萄糖占比最高,为95.3%;其次是半乳糖和阿拉伯糖,分别为1.1%、2.1%;而鼠李糖、甘露糖、半乳糖醛酸占比分别为1.0%、0.31%、0.13%。综上,APS-I的甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、半乳糖、阿拉伯糖占比均比APS-II高。

3.3 APS-I的甲基化结果

将APS-I碎片离子峰与CCRC在线数据库(<https://www.ccrcc.edu/specdb/ms/pmaa/pframe.html>)进行对比,初步得出糖苷键连接方式为Glc-(1→, →4)-Glc-(1→, →4,6)-Gal-(1→, →2,6)-Gal-(1→, →2,3,4)-Glc-(1→。

3.4 不同相对分子质量APS对UC小鼠结肠长度的影响

DSS诱导的UC小鼠模型结肠缩短,症状越严重,结肠缩短程度越高。如表3所示,与空白组比较,模型组小鼠结肠明显缩短($P<0.001$);与模型组比较,美沙拉嗪组、APS各剂量组、APS-I中、高剂量组和APS-II高剂量组小鼠结肠长度均显著升高($P<0.05$ 、0.01、0.001),其中以APS组改善效果最佳,其次是APS-I组、APS-II组。

表3 各组小鼠结肠长度($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 3 Length of colon in each group of mice ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	结肠长度/cm
空白	—	7.86±0.90
模型	—	5.30±0.86 ^{###}
美沙拉嗪	200	7.21±0.62 ^{**}
APS	100	7.24±1.00 [*]
	200	7.45±0.43 ^{***}
	400	7.90±0.84 ^{***}
APS-I	40	5.76±0.54
	80	6.20±0.73 [*]
	160	6.98±1.02 ^{**}
APS-II	60	5.74±1.17
	120	5.86±0.85
	240	6.34±1.03 [*]

与空白组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ ^{###} $P<0.001$; 与模型组比较: ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ ^{***} $P<0.001$, 下表同。

[#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ ^{###} $P<0.001$ vs blank group; ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ ^{***} $P<0.001$ vs model group, same as below tables.

3.5 不同相对分子质量APS对UC小鼠体质量变化率和DAI评分的影响

如表4所示,造模期间,空白组小鼠体质量逐天增加,精神状态良好,反应迅速,毛发有光泽且柔软,饮食饮水量正常,大便正常无出血;与空白组比较,模型组小鼠体质量逐天降低,精神状态差,反应迟缓,毛发无光泽呈淡黄色,饮食饮水量减少,大便糖稀并出血;与模型组比较,除APS-I低剂量组外,其余各给药组小鼠体质量均有所回升。如表5所示,与空白组比较,模型组小鼠DAI评分逐天增加,具有统计学意义($P<0.05$ 、0.001);与模型组比较,各给药组小鼠DAI评分均有所改善($P<0.01$ 、0.001),且呈剂量相关性,改善效果依次为APS组、APS-I组、APS-II组。

表4 各组小鼠体质量变化率($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 4 Rate of change in body weight of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	体质量变化率/%							
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d
空白	—	0	102.12±3.03	102.76±2.34	102.94±2.70	103.66±3.13	104.39±1.76	104.11±1.95	104.38±2.47
模型	—	0	99.13±1.10 [#]	100.40±2.05 [#]	99.63±1.82 [#]	97.75±2.60 ^{##}	95.19±2.11 ^{###}	93.07±2.41 ^{###}	87.96±3.63 ^{###}
美沙拉嗪	200	0	101.38±1.78 ^{**}	97.38±2.58 [*]	93.53±3.67 ^{***}	94.16±3.10 [*]	97.12±3.12	96.08±4.54	93.82±1.91 [*]
APS	100	0	100.57±1.50 [*]	99.54±1.42	96.96±1.90 [*]	97.50±1.63	95.93±2.34	95.39±2.62	93.24±2.87 [*]
	200	0	100.61±1.86	99.29±1.92	99.01±2.57	97.55±1.95	96.90±1.66	96.03±1.43 ^{**}	94.20±1.86 ^{***}
	400	0	99.80±1.07	98.48±2.56	98.27±1.08	97.88±1.61	96.85±2.07	97.07±2.90 ^{**}	96.34±3.20 ^{***}
APS-I	40	0	100.14±0.94	98.80±2.10	98.05±1.71	97.57±1.60	97.69±2.69	94.79±5.25	91.00±6.47
	80	0	101.83±2.03	100.61±2.22	101.06±2.22	100.73±2.76 [*]	99.60±2.25 ^{**}	98.00±2.03 ^{***}	96.03±3.07 ^{***}
	160	0	100.96±2.03 [*]	100.35±2.05	100.08±2.70	99.51±3.30	98.18±3.49	96.62±3.73 [*]	96.87±3.48 ^{***}
APS-II	60	0	99.34±0.89	97.86±1.63 ^{**}	97.78±2.19	96.69±1.70	96.87±1.85	95.30±2.57	93.19±2.59 [*]
	120	0	99.43±2.65	98.82±2.35	99.06±2.27	98.12±1.95	96.86±2.18	95.53±3.03	93.65±3.85 [*]
	240	0	102.67±2.23 [*]	99.17±6.03	98.99±4.08	97.86±6.00	97.34±4.29	96.27±3.04 [*]	94.34±3.37 ^{**}

表 5 各组小鼠 DAI 评分 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 5 DAI score of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	DAI 评分							
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d
空白	—	0	0	0	0	0	0	0	0
模型	—	0	0.14±0.18 [#]	0.33±0.13 ^{###}	0.24±0.16 ^{###}	0.76±0.32 ^{###}	1.14±0.57 ^{###}	1.62±0.45 ^{###}	2.71±0.49 ^{###}
美沙拉嗪	200	0	0.08±0.15	0.54±0.31	0.88±0.35 ^{***}	1.00±0.31	0.75±0.24	0.83±0.18 ^{***}	1.25±0.53 ^{***}
APS	100	0	0.07±0.15	0.33±0.24	0.41±0.28	0.30±0.20 ^{**}	0.59±0.40 [*]	0.78±0.17 ^{***}	1.04±0.48 ^{***}
	200	0	0.05±0.13	0.52±0.18 [#]	0.19±0.18	0.33±0.19 [*]	0.57±0.25 [*]	0.62±0.23 ^{***}	0.90±0.60 ^{***}
	400	0	0.17±0.18	0.58±0.15 [#]	0.42±0.24	0.37±0.12 ^{**}	0.54±0.17 [*]	0.46±0.35 ^{***}	0.88±0.35 ^{***}
APS-I	40	0	0.08±0.15	0.37±0.21	0.42±0.24	0.50±0.31	0.79±0.43	1.27±1.06 [*]	1.38±0.52 ^{***}
	80	0	0.04±0.12	0.21±0.17	0.21±0.25	0.37±0.33 [*]	0.50±0.36 [*]	1.00±0.78	1.17±0.73 ^{***}
	160	0	0.08±0.15	0.29±0.28	0.33±0.25	0.29±0.28 ^{**}	0.54±0.25 [*]	0.83±0.77 [*]	1.00±0.56 ^{***}
APS-II	60	0	0.08±0.15	0.34±0.25	0.38±0.28	0.58±0.46	0.71±0.38	1.03±0.76 [*]	1.43±0.86 ^{**}
	120	0	0.19±0.18	0.30±0.20	0.26±0.15	0.48±0.34	0.70±0.31	0.97±0.71	1.43±1.00 ^{**}
	240	0	0.15±0.18	0.43±0.26	0.30±0.20	0.41±0.15 ^{**}	0.59±0.40 [*]	0.77±0.45 ^{**}	1.33±0.60 ^{**}

3.6 不同相对分子质量 APS 对 UC 小鼠脾脏指数和肝脏指数的影响

如表 6 所示, 与空白组比较, 模型组小鼠脾脏指数和肝脏指数显著增加 ($P < 0.001$), 表明 DSS 对小鼠的脾脏和肝脏有一定的损伤作用; 与模型组比较, 各给药组小鼠脾脏指数和肝脏指数均显著降低 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), 其中, APS 对脾脏指数、肝脏指数改善效果最佳, APS-I 组和 APS-II 组对脾脏指数、肝脏指数改善效果相当。

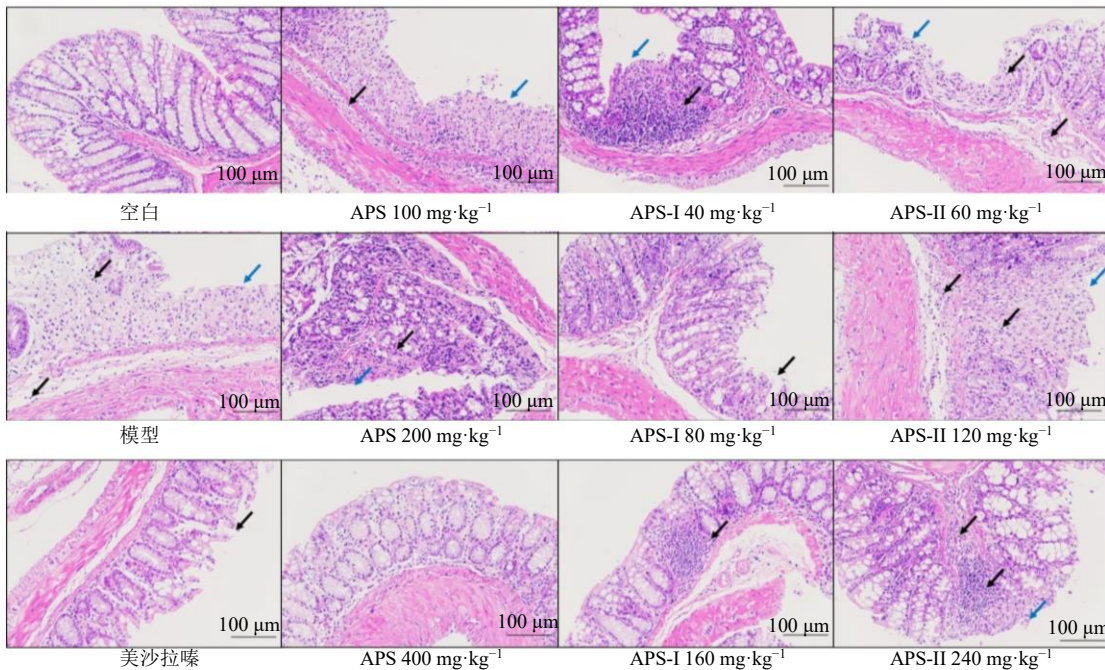
3.7 不同相对分子质量 APS 对 UC 小鼠结肠组织病理变化的影响

如图 3 所示, 空白组小鼠结肠隐窝结构存在,

表 6 各组小鼠脾脏指数和肝脏指数 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 6 Spleen index and liver index of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	脾脏指数/(mg·g ⁻¹)	肝脏指数/(mg·g ⁻¹)
空白	—	3.23±0.19	39.34±1.38
模型	—	4.21±0.25 ^{###}	45.61±1.88 ^{###}
美沙拉嗪	200	3.62±0.39 ^{**}	41.22±1.77 ^{***}
APS	100	3.63±0.25 ^{***}	41.25±1.98 ^{**}
	200	3.50±0.34 ^{***}	41.14±2.19 ^{***}
	400	3.49±0.21 ^{***}	39.55±2.19 ^{***}
APS-I	40	3.80±0.29 ^{**}	41.63±2.34 ^{**}
	80	3.65±0.19 ^{***}	42.26±3.15 [*]
	160	3.52±0.12 ^{***}	40.04±1.89 ^{***}
APS-II	60	3.76±0.33 ^{**}	41.75±1.74 ^{***}
	120	3.69±0.21 ^{***}	41.79±2.67 ^{**}
	240	3.45±0.27 ^{***}	40.80±2.44 ^{***}



黑色箭头指向淋巴细胞浸润, 蓝色箭头指向结肠黏膜上皮脱落。

Black arrows point to lymphocytes infiltration, and blue arrows point to exfoliation of colon mucosal epithelium.

图 3 各组小鼠结肠组织 HE 染色 (×40)

Fig. 3 HE staining of colon tissue of mice in each group (×40)

表面为单层柱状上皮，形态结构正常，肠腺数量丰富，上皮细胞之间有杯状细胞分布；与空白组比较，模型组小鼠隐窝结构被破坏，表面为单层柱状上皮，黏膜层可见大面积溃疡，肠腺坏死缺失，损伤侵及黏膜下层，伴大量淋巴细胞浸润，损伤处黏膜上皮脱落，上皮细胞之间有杯状细胞分布。各给药组小鼠组织病理学均有不同程度的改善，其中 APS 高剂量组对结肠病理损伤表现出了更好的保护作用，结肠组织形态趋于正常。

3.8 不同相对分子质量 APS 对 UC 小鼠结肠组织 MPO 活性的影响

如图 4 所示，与空白组比较，模型组小鼠结肠组织中 MPO 活性显著升高 ($P < 0.001$)；与模型组比较，美沙拉嗪组以及 APS 中、高剂量组和 APS-I 高剂量组 MPO 活性均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。

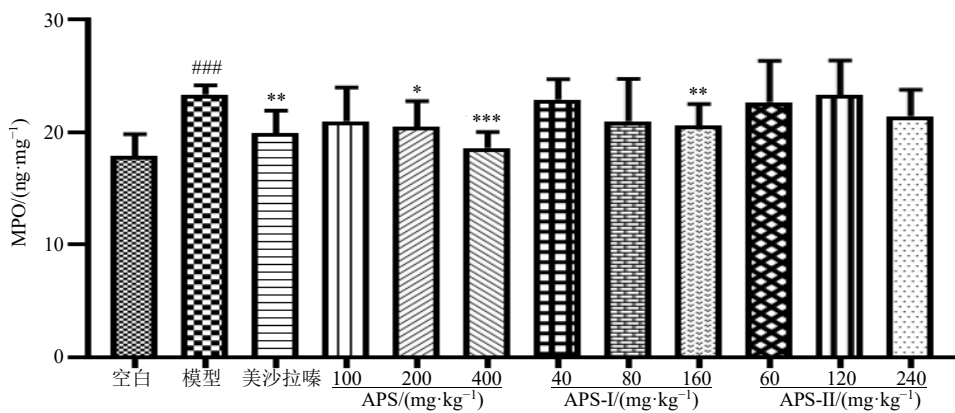
3.9 不同相对分子质量 APS 对 UC 小鼠结肠组织炎症因子水平的影响

如表 7 所示，与空白组比较，模型组小鼠结肠

组织 TNF- α 、IFN- γ 水平显著升高 ($P < 0.001$)，IL-4、IL-10 水平显著降低 ($P < 0.001$)；与模型组比较，美沙拉嗪组以及 APS 中、高剂量组以及 APS-I 各剂量组和 APS-II 中、高剂量组 TNF- α 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)，美沙拉嗪组、APS 各剂量组和 APS-I 高剂量组 IFN- γ 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)，美沙拉嗪组以及 APS 中、高剂量组以及 APS-I 高剂量组和 APS-II 高剂量组 IL-4 水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)，美沙拉嗪组以及 APS 中、高剂量组以及 APS-I 中、高剂量组和 APS-II 各高剂量组 IL-10 水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。说明 APS、APS-I 均可以降低 TNF- α 、IFN- γ 含量，升高 IL-4、IL-10 含量；而 APS-II 可以降低 TNF- α 含量，升高 IL-4、IL-10 含量，但对 IFN- γ 无显著降低作用。

3.10 不同相对分子质量 APS 对 UC 小鼠结肠组织 TNF- α 、IFN- γ 、IL-4、IL-10 mRNA 表达的影响

如图 5 所示，与空白组比较，模型组小鼠结肠



与空白组比较：# $P < 0.05$ ### $P < 0.001$ ；与模型组比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ ，下图同。
$P < 0.05$ ### $P < 0.001$ vs blank group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group, same as below figures.

图 4 各组小鼠结肠组织 MPO 活性 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 4 MPO activity in colon tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

表 7 各组小鼠结肠组织 TNF- α 、IFN- γ 、IL-4、IL-10 含量 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 7 Contents of TNF- α , IFN- γ , IL-4 and IL-10 in colon tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	TNF- α /(pg·mg ⁻¹)	IFN- γ /(pg·mg ⁻¹)	IL-4/(pg·mg ⁻¹)	IL-10/(pg·mg ⁻¹)
空白	—	286.60 ± 32.57	283.70 ± 34.34	174.00 ± 12.03	112.10 ± 9.55
模型	—	393.30 ± 18.98###	392.50 ± 32.77###	146.30 ± 7.79###	86.65 ± 7.72###
美沙拉嗪	200	330.50 ± 51.05*	290.50 ± 39.61***	163.20 ± 16.28*	108.60 ± 6.45***
APS	100	351.20 ± 50.93	313.10 ± 78.25*	147.30 ± 14.57	87.56 ± 8.95
	200	343.70 ± 28.58**	319.00 ± 47.31**	154.30 ± 4.12*	96.32 ± 6.18*
	400	289.60 ± 10.49***	293.90 ± 35.64***	164.00 ± 10.78**	110.40 ± 4.23***
APS-I	40	329.70 ± 29.97**	325.00 ± 70.48	138.30 ± 15.65	90.18 ± 5.25
	80	329.00 ± 24.52***	340.30 ± 74.01	147.90 ± 15.46	104.70 ± 9.80**
	160	322.00 ± 49.84**	307.90 ± 36.26**	160.60 ± 3.00*	109.90 ± 6.15***
APS-II	60	355.50 ± 58.61	352.10 ± 75.74	152.90 ± 15.95	103.10 ± 7.84**
	120	352.90 ± 25.80*	356.50 ± 29.00	156.40 ± 15.21	107.20 ± 10.35**
	240	342.70 ± 44.20*	347.90 ± 40.22	159.90 ± 10.23*	108.90 ± 7.25***

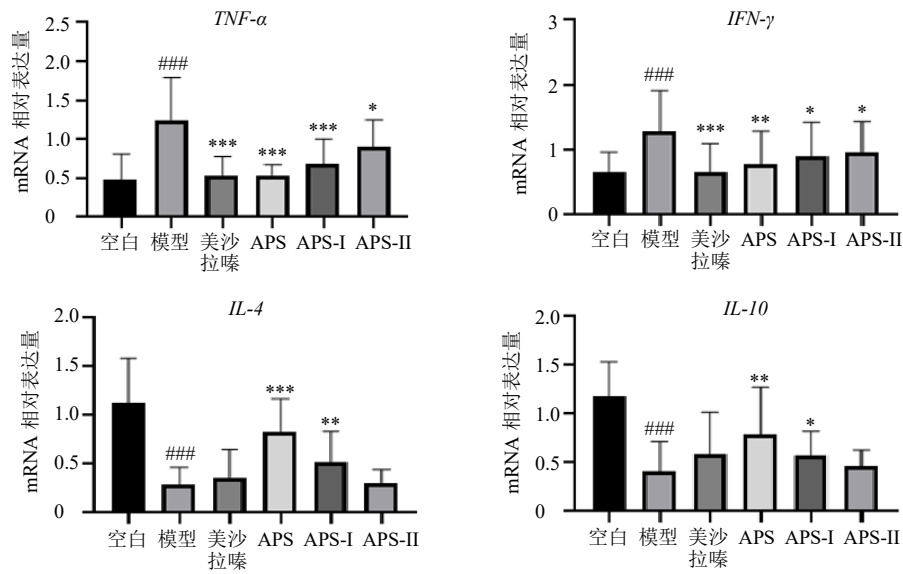


图5 各组小鼠结肠组织 *TNF-α*、*IFN-γ*、*IL-4*、*IL-10* mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 5 Expressions of *TNF-α*, *IFN-γ*, *IL-4* and *IL-10* mRNA in colon tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组织 Th1 细胞因子 *TNF-α*、*IFN-γ* mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.001$), Th2 细胞因子 *IL-4*、*IL-10* mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 各给药组小鼠结肠组织中 *TNF-α*、*IFN-γ* mRNA 表达水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), APS

高剂量组、APS-I 高剂量组 *IL-4*、*IL-10* mRNA 表达水平均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。

3.11 不同相对分子质量 APS 对 UC 小鼠结肠组织 T-bet、GATA-3 蛋白表达的影响

如图 6 所示, 与空白组比较, 模型组小鼠结肠

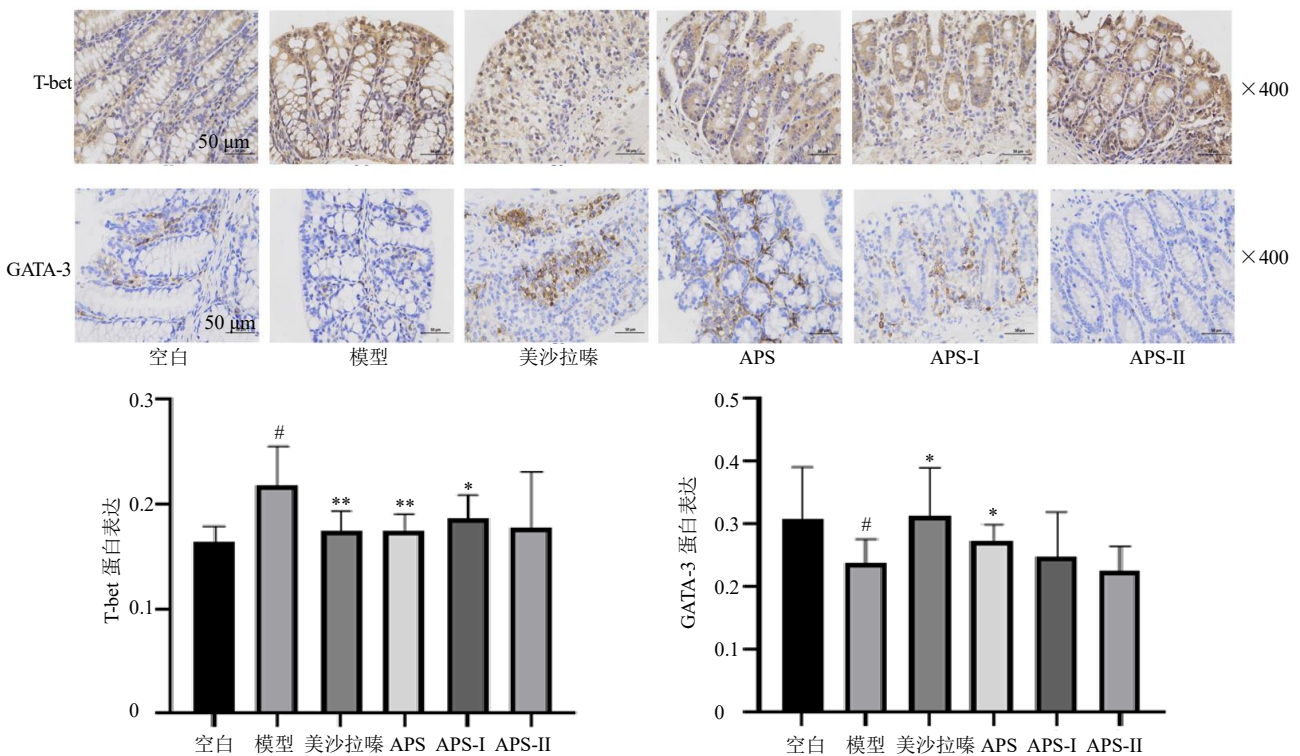


图6 各组小鼠结肠组织 T-bet、GATA-3 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 6 Expressions of T-bet and GATA-3 protein in colon tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组织 T-bet 蛋白表达显著增加 ($P<0.05$), GATA-3 蛋白表达显著减少 ($P<0.05$); 与模型组比较, 美沙拉嗪组、APS 高剂量组和 APS-I 高剂量组 T-bet 蛋白表达显著减少 ($P<0.05$ 、 0.01), 美沙拉嗪组和 APS 高剂量组 GATA-3 蛋白表达显著增加 ($P<0.05$)。

4 讨论

4.1 不同相对分子质量 APS 的抗 UC 活性筛选

黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根, 具有健脾补中、升阳举陷、益卫固表、托毒生肌等功效^[14]。APS 作为其主要成分之一, 具有多种免疫调节活性。余飞浩等^[15]发现 APS 可以抑制磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) /蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 信号通路, 从而抑制小鼠树突状细胞释放促炎因子, 削弱树突状细胞的抗原提呈和炎症损伤作用, 来改善 UC。说明 APS 可以通过免疫调节来改善 UC。

本研究结果显示, 模型组小鼠体质量下降, 结肠长度缩短, DAI 评分显著升高, 脾脏指数和肝脏指数升高, 结肠组织 HE 染色中可见大面积溃疡, 肠腺坏死缺失, 损伤侵及黏膜下层, 伴大量淋巴细胞浸润, 结肠组织 MPO 活性升高, 说明造模成功。结肠组织中 Th1 相关细胞因子 IFN- γ 、TNF- α 水平升高, Th2 相关细胞因子 IL-4、IL-10 水平降低, 与以往的实验结果一致^[16]。综合药效结果, 不同相对分子质量 APS 对 UC 小鼠改善效果依次为 APS、APS-I、APS-II。

Th1/Th2 免疫失衡是导致 UC 的机制之一^[17]。T-bet 是 Th1 细胞特异性转录因子, 而 GATA-3 是 Th2 细胞的特异性转录因子, 因此调节 T-bet、GATA-3 的表达可以恢复 Th1/Th2 免疫平衡^[18-19]。本研究结果显示, 与模型组比较, APS、APS-I 组 T-bet 表达水平显著降低, APS-II 组虽有所改善, 但无统计学意义; APS 组 GATA-3 表达水平显著升高, APS-I、APS-II 组虽有所改善, 但无统计学意义。同时, APS、APS-I、APS-II 均可以降低 UC 小鼠 Th1 相关细胞因子 TNF- α 、IFN- γ mRNA 表达水平, APS、APS-I 均可升高 Th2 相关细胞因子 IL-4、IL-10 mRNA 表达水平。说明 APS、APS-I 可以显著调节 Th1/Th2 相关细胞因子 mRNA 及转录因子, 而 APS-II 对 Th1/Th2 相关转录因子却无显著调节作用。由此推测 APS、APS-I 通过调节细胞因子表达和转录

因子蛋白表达来恢复 Th1/Th2 免疫平衡, 而 APS-II 仅可从细胞因子水平调节 Th1/Th2 免疫平衡, 从而改善 UC。

4.2 APS 结构与其抗 UC 活性的关系

本研究采用超滤截留技术将 APS 分成 APS-I (相对分子质量 $>2\times 10^6$) 和 APS-II (相对分子质量 1×10^4), 并对 APS-I 和 APS-II 进行结构解析。结果显示 APS-I 糖醛酸质量分数为 26.25%, APS-II 糖醛酸质量分数为 1.62%, APS-I 糖醛酸质量分数远远大于 APS-II。单糖结果显示, APS-I 和 APS-II 均由甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖组成, APS-I 中甘露糖、阿拉伯糖和半乳糖占比均大于 APS-II。糖苷键结果显示 APS-I 以 1,4 连接的葡萄糖和 1,6 连接的半乳糖为主, APS-II 以 1,4 连接的葡萄糖为主。

经抗 UC 活性筛选, APS-I 优于 APS-II。而造成 APS-I 和 APS-II 活性差异的原因可能与相对分子质量、糖醛酸含量、单糖组成以及糖苷键连接方式相关。

4.2.1 相对分子质量对 APS-I 和 APS-II 活性的影响 多糖需要合适的相对分子质量才可以有效的发挥活性, 高相对分子质量的多糖可以承载一定的活性基团, 但相对分子质量过高则会导致多糖无法穿透细胞膜从而影响活性, 相对分子质量太小则会导致多糖无法承载活性基团, 从而活性降低^[20]。郑博文^[21]研究发现, 相对分子质量为 2×10^6 的透明质酸钠 (酸性黏多糖) 对 IL-4 水平具有显著调节作用, 对中性粒细胞数量与刺激抑制率更高。王宏雨等^[22]对烘干的广绣球菌多糖 SCG-G (相对分子质量 1.48×10^4) 和冻干的广绣球菌多糖 SCG-D (相对分子质量 2.47×10^5) 进行体外抗炎活性筛选, 结果显示相对分子质量较大的 SCG-D 抗炎活性更强。本研究结果表明, 相对分子质量较大的 APS-I 抗 UC 活性优于相对分子质量较小的 APS-II, 推测相对分子质量是影响其抗 UC 活性的原因之一。

4.2.2 多糖的种类对 APS-I 和 APS-II 活性的影响 多糖分为酸性多糖和中性多糖。根据多糖中相关酸性基团 (糖醛酸、硫酸基团、磷酸基团等) 含量的多少可以将多糖分为酸性多糖和中性多糖, 酸性多糖往往比中性多糖含有更多的酸性基团^[23]。

研究表明, 酸性多糖具有更优的抗炎活性。袁雷等^[24]研究表明血满草酸性多糖 SPS-1 和磷酸化修饰后的 SSP-1 均可以降低促炎因子水平, 升高抗炎

因子水平,说明两者均具有抗炎活性。Shi 等^[25]研究显示,从益智仁多糖 AOP70 中纯化分离出来的酸性杂多糖 AOP70-2-1 可以降低促炎因子水平来发挥神经抗炎活性。而中性多糖的组成和比例也会影响多糖的生物活性。张培等^[26]通过探究不同产地的党参多糖对肝癌细胞的毒活性,发现不同产地的党参多糖活性不同,其根本原因与阿拉伯糖、半乳糖含量较高有关。Gong 等^[27]对枸杞多糖(阿拉伯半乳糖)进行分级纯化得到的 LBGP-I-3,可以增强巨噬细胞的吞噬性活力,促进一氧化氮的释放,增强酸性磷酸酶的活性从而发挥抗炎作用。本研究结果表明,APS-I 糖醛酸含量大于 APS-II,使其呈现出酸性特征,同时 APS-I 阿拉伯糖和半乳糖占比均大于 APS-II,推测酸性多糖与中性多糖的组成与比例共同导致了 APS-I、APS-II 活性上的差异。

4.2.3 糖苷键对 APS-I 和 APS-II 活性的影响 糖苷键是影响多糖活性的重要因素之一。Jen 等^[28]通过研究 5 种不同真菌和植物性多糖的抗炎活性,并对这 5 种多糖进行结构解析,发现含 β -(1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 6) 糖苷键的多糖抗炎活性更强。Liu 等^[29]从秋葵中提取纯化出 AP1-b 多糖,对其进行结构表征和抗炎活性的验证,发现 AP1-b 多糖中 \rightarrow 6-Galp-(1 \rightarrow 占比最高,并且表现出显著的抗炎活性。本实验结果表明 APS-I 以 1,4 连接的葡萄糖和 1,6 连接的半乳糖为主,而在本课题组以往的研究中,APS-II 以 1,4 连接的葡萄糖为主^[30],推测 APS-I 中含有 1,6 连接的半乳糖是导致 APS-I 抗 UC 活性更强的原因之一。

综上,本研究通过比较不同相对分子质量 APS 对 UC 小鼠的治疗效果,发现 APS-I 是 APS 治疗 UC 的主要组分,同时分析了 APS-I、APS-II 体内抗 UC 活性差异的原因,可能是相对分子质量、多糖的种类以及糖苷键均对其抗 UC 活性有影响。本研究对阐明 APS 的药效物质基础具有重要意义。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 王超楠,程东岩,王健,等. 黄芪及复方黄芪制剂双向免疫调节作用研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(5): 126-129.
- [2] 杨乾方,王帆,叶婷,等. 黄芪多糖提取工艺、化学结构及药理作用的研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(12): 4069-4081.
- [3] Lv J, Zhang Y H, Tian Z Q, et al. Astragalus polysaccharides protect against dextran sulfate sodium-induced colitis by inhibiting NF- κ B activation [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 98: 723-729.
- [4] Zhong Y B, Xiao Q P, Kang Z P, et al. Astragalus polysaccharide alleviates ulcerative colitis by regulating the balance of Tfh/Treg cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 111: 109108.
- [5] 鹿秀云,岳海洋,刘億,等. 黄芪多糖对结肠炎小鼠树突状细胞表面共刺激分子表达的调节作用 [J]. 中成药, 2018, 40(10): 2296-2298.
- [6] 曹宇欣. 基于多糖分子量分布和免疫活性比较的黄芪质量研究 [D]. 太原: 山西大学, 2020.
- [7] 范信晖,李科,杨一丹,等. 基于分子量分布的黄芪多糖抗炎活性组分筛选及代谢组学调控机制研究 [J]. 药学报, 2022, 57(3): 783-792.
- [8] 刘磊. 黄芪药渣中半纤维素多糖的提取纯化、结构解析及抗肿瘤、抗菌膜活性物质的筛选 [D]. 太原: 山西大学, 2018.
- [9] 刘盈. 百合和玉竹果胶的结构及抗氧化活性比较分析 [D]. 长春: 东北师范大学, 2022.
- [10] Zhao L H, Ma Z X, Zhu J, et al. Characterization of polysaccharide from *Astragalus radix* as the macrophage stimulator [J]. *Cell Immunol*, 2011, 271(2): 329-334.
- [11] Cooper H S, Murthy S N, Shah R S, et al. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis [J]. *Lab Invest*, 1993, 69(2): 238-249.
- [12] 邹颖. 黄芩汤对 TNBS 诱导的结肠炎大鼠 Th1/Th2 和 Th17/Treg 细胞平衡的影响 [D]. 广州: 南方医科大学, 2012.
- [13] 林丽萍. 粪移植对溃疡性结肠炎小鼠结肠粘膜 Th1/Th2 细胞及其细胞因子表达的影响 [D]. 福州: 福建医科大学, 2017.
- [14] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 315.
- [15] 余飞浩,王海燕,王梦雪,等. 黄芪多糖对结肠炎小鼠树突状细胞亚群的调节作用 [J]. 中国免疫学杂志, 2023, 39(9): 1846-1851.
- [16] 张林. 益生菌对 TNBS 诱导结肠炎大鼠 Th1/Th2 细胞平衡影响的研究 [D]. 泸州: 西南医科大学, 2016.
- [17] Leppkes M, Neurath M F. Cytokines in inflammatory bowel diseases-Update 2020 [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 158: 104835.
- [18] 田亚丽,王芳,田东惠,等. 粪菌移植对坏死性小肠结肠炎新生小鼠肠道菌 Th1/Th2 细胞因子表达的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2022, 38(2): 149-153.
- [19] 洪译,王真权,罗雯鹏. 复方芩柏颗粒对溃疡性结肠炎大鼠 Th1/Th2、Th17/Treg 细胞稳态影响 [J]. 环球中医药, 2024, 17(4): 565-571.
- [20] 焦中高. 红枣多糖的分子修饰与生物活性研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2012.

- [21] 郑博文. 不同分子量透明质酸的抗炎活性及安全性研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2022.
- [22] 王宏雨, 张迪, 罗贝贝, 等. 2种广叶绣球菌多糖分子量分布及抗炎活性比较 [J]. 食品工业, 2023, 44(2): 156-161.
- [23] 吴子锋. 铁皮石斛中性多糖和酸性多糖的分离及其免疫与抗肿瘤活性研究 [D]. 广州: 广东工业大学, 2023.
- [24] 袁雷, 钟政昌, 刘瑜, 等. 血满草酸性多糖分离纯化、硫酸化修饰及抗炎活性研究 [J]. 分析实验室, 2020, 39(6): 649-653.
- [25] Shi W T, Zhong J, Zhang Q, *et al.* Structural characterization and antineuroinflammatory activity of a novel heteropolysaccharide obtained from the fruits of *Alpinia oxyphylla* [J]. *Carbohydr Polym*, 2020, 229: 115405.
- [26] 张培, 郑晓萍, 马玉玲, 等. 党参多糖单糖组成与其对 HepG2 细胞毒活性的相关分析 [J]. 中草药, 2016, 47(15): 2684-2692.
- [27] Gong G P, Dang T T, Deng Y N, *et al.* Physicochemical properties and biological activities of polysaccharides from *Lycium barbarum* prepared by fractional precipitation [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 109: 611-618.
- [28] Jen C I, Su C H, Lai M N, *et al.* Comparative anti-inflammatory characterization of selected fungal and plant water soluble polysaccharides [J]. *Food Sci Technol Res*, 2021, 27(3): 453-462.
- [29] Liu Y, Ye Y F, Hu X B, *et al.* Structural characterization and anti-inflammatory activity of a polysaccharide from the lignified okra [J]. *Carbohydr Polym*, 2021, 265: 118081.
- [30] 李虎峰. 黄芪活性多糖 APS-II 及其 α -1,4 葡聚糖内切酶降解寡糖的结构解析 [D]. 太原: 山西大学, 2023.

[责任编辑 李亚楠]