

## 卓尼柴胡多糖的理化特性分析及其降血糖潜力研究

潘立超<sup>1,2,3</sup>, 吴若冰<sup>1,3</sup>, 赵晶<sup>1,3</sup>, 刘婷<sup>1,3</sup>, 王彦蕊<sup>1</sup>, 任海伟<sup>1,3\*</sup>, 罗光宏<sup>2</sup>, 杨生辉<sup>2</sup>, 李晓明<sup>4</sup>

1. 兰州理工大学生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730050
2. 甘肃凯源生物技术开发中心有限责任公司, 甘肃 张掖 734000
3. 甘肃省食药资源开发与生物制造行业技术中心, 甘肃 兰州 730050
4. 浙江五养堂药业有限公司, 浙江 丽水 323000

**摘要:** 目的 探索卓尼柴胡多糖 (*Zhuoni Radix Bupleuri* polysaccharide, ZRBP) 的理化特性和降血糖潜力, 为卓尼柴胡的精深开发提供一定的研究基础和理论支撑。方法 经水提醇沉、Sevag 法除蛋白后得到卓尼柴胡粗多糖 (crude *Zhuoni Radix Bupleuri* polysaccharide, C-ZRBP), Sephadex G-200 柱色谱分离后得到卓尼柴胡多糖 (*Zhuoni Radix Bupleuri* polysaccharide, ZRBP); 并通过 HPLC、FT-IR、单糖组成分析、甲基化实验、刚果红实验、扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM)、热重分析 (thermogravimetric analysis, TGA) 对 ZRBP 的理化特性进行研究; 通过  $\alpha$ -淀粉酶和  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制实验及 HepG2-IR 模型对 ZRBP 降血糖潜力进行评价。结果 ZRBP 的平均相对分子质量为  $1.52 \times 10^6$ , 糖质量分数为 (95.87 ± 0.26)%; 主要单糖组成为甘露糖: 鼠李糖: 半乳糖醛酸: 葡萄糖: 半乳糖: 阿拉伯糖 (3.43 : 1.37 : 1.62 : 79.77 : 7.90 : 4.97); 其骨架结构主要由 →5)-Araf-(1→、→4)-GlcP-(1→、→6)-ManP-(1→、→6)-GalP-(1→和 →3)-Rhap-(1→组成; 可能有螺旋结构, 表观形貌呈多网孔片状, 热稳定性良好。ZRBP 对  $\alpha$ -淀粉酶和  $\alpha$ -葡萄糖苷酶均有抑制作用, 抑制效果与质量浓度成正相关, 半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>) 分别为 19.825、1.064 mg/mL; 当 ZRBP 质量浓度达到 75 μg/mL 时, 对 HepG2-IR 模型的胰岛素抵抗具有显著的改善作用 ( $P < 0.05$ ), 且改善效果显著优于其他浓度 ( $P < 0.05$ )。

**结论** ZRBP 具有降血糖活性开发的潜力, 为卓尼柴胡及其多糖资源的开发利用提供参考和研究基础。

**关键词:** 柴胡; 卓尼柴胡; 多糖; 分离纯化; 理化特性; 降血糖活性

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)24-8907-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.24.005

## Physicochemical characterization and hypoglycemic potential of polysaccharides from *Zhuoni Radix Bupleuri*

PAN Lichao<sup>1, 2, 3</sup>, WU Ruobing<sup>1, 3</sup>, ZHAO Jing<sup>1, 3</sup>, LIU Ting<sup>1, 3</sup>, WANG Yanrui<sup>1</sup>, REN Haiwei<sup>1, 3</sup>, LUO Guanghong<sup>2</sup>, YANG Shenghui<sup>2</sup>, LI Xiaoming<sup>4</sup>

1. School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China
2. Gansu Kaiyuan Biotechnology Development Center Co., Ltd., Zhangye 734000, China
3. Gansu Industrial Technology Center for Food and Pharmaceutical Resources Development and Biomanufacturing, Lanzhou 730050, China
4. Zhejiang WuYangTang Pharmaceutical Co., Ltd., Lishui 323000, China

**Abstract: Objective** To explore the physicochemical properties and hypoglycemic potential of *Zhuoni Radix Bupleuri* polysaccharide (ZRBP), providing a research foundation and theoretical support for the in-depth development and utilization of *Zhuoni Radix Bupleuri*.

**Methods** Crude *Zhuoni Radix Bupleuri* polysaccharide (C-ZRBP) was obtained via water extraction, alcohol precipitation, and protein removal using the Sevag method. ZRBP was isolated via Sephadex G-200 column chromatography. The physicochemical properties of ZRBP were analyzed using HPLC, FT-IR, monosaccharide composition analysis, methylation analysis, Congo red assay,

收稿日期: 2025-10-09

基金项目: 甘肃凯源生物技术开发中心有限责任公司博士后项目 (24KYBH001); 甘肃省高等学校产业支撑计划项目 (2023CYZC-23); 兰州市青年科技人才创新项目 (2024-QN-192)

作者简介: 潘立超, 硕士生导师, 研究方向为多糖的分离纯化、结构鉴定及活性研究。E-mail: 3053581403@qq.com

\*通信作者: 任海伟, 男, 博士, 博士生导师, 从事地理标志农产品资源深度开发与功能评价研究。E-mail: rhw52571119@163.com

scanning electron microscope (SEM), and thermogravimetric analysis (TGA). The hypoglycemic potential was evaluated through  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibition assays, as well as an insulin-resistant HepG2 (HepG2-IR) cell model experiment. **Results** The average molecular weight of ZRBP is  $1.52 \times 10^6$ , with a carbohydrate content of  $(95.87 \pm 0.26)\%$ . Its monosaccharide composition ratio was determined as mannose-rhamnose-galacturonic acid-glucose-galactose-arabinose  $3.43 : 1.37 : 1.62 : 79.77 : 7.90 : 4.97$ . The backbone structure of ZRBP was mainly composed of  $\rightarrow 5\text{-Araf(1}\rightarrow,\rightarrow 4\text{-GlcP(1}\rightarrow,\rightarrow 6\text{-ManP(1}\rightarrow,\rightarrow 6\text{-GalP(1}\rightarrow,\text{and}\rightarrow 3\text{-Rhap(1}\rightarrow$ . ZRBP exhibited a helical structure, a porous flake-like morphology, and good thermal stability. It inhibited both  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase in a concentration-dependent manner, with half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) values of  $19.825 \text{ mg/mL}$  and  $1.064 \text{ mg/mL}$ , respectively. At  $75 \mu\text{g/mL}$ , ZRBP significantly ameliorated insulin resistance in the HepG2-IR model ( $P < 0.05$ ), and the effect was significantly better than other concentrations ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** ZRBP demonstrates promising hypoglycemic activity and development potential, offering valuable insights and a foundational basis for the exploitation of *Zhuoni Radix Bupleuri* and its polysaccharide resources.

**Key words:** *Bupleurum chinense* DC.; *Zhuoni Radix Bupleuri*; polysaccharide; isolation and purification; physicochemical characterization; hypoglycemic activity

柴胡 *Radix Bupleuri* 为伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 或狭叶柴胡 *B. scorzonerifolium* Willd. 的干燥根。柴胡属植物种类繁多、分布广泛，在我国已有 2 000 多年的应用历史，涉及 1 900 多种处方<sup>[1]</sup>。柴胡根据产地的不同有南、北之分，北柴胡因其突出的品质和药理活性成为药用主流。柴胡药用价值极高，具有解热、抗菌、增强免疫力、抗抑郁、抗癌、糖尿病治疗等多种功效<sup>[2-3]</sup>。柴胡多糖作为主要的功能成分，在糖代谢调节和降血糖等方面表现出一定的生物活性<sup>[4-6]</sup>。大量研究表明，多糖可以通过调节关键代谢酶的活性和胰岛素信号通路来改善糖代谢紊乱和降低胰岛素抵抗<sup>[7]</sup>。多糖可对  $\alpha$ -淀粉酶和  $\alpha$ -葡萄糖苷酶产生抑制活性，可能与多糖分子中的羧酸基团及羟基有关，这些基团可与消化酶相互作用，改变酶的极性和分子构象，最终导致酶活性丧失<sup>[8]</sup>。Song 等<sup>[9]</sup>对乌头多糖的研究显示，经小鼠口服淀粉耐受性试验验证，乌头多糖可显著提高淀粉耐受性，这一结果表明乌头多糖可抑制  $\alpha$ -糖苷酶的活性。此外，多糖还可通过上调磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 信号通路 (phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B, PI3K/Akt) 信号通路中的葡萄糖转运蛋白 4 (glucose transporter 4, GLUT4) 蛋白的表达量，来增加葡萄糖的摄取，进而发挥多糖的降血糖潜力<sup>[10-11]</sup>。多糖也可以调节丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路，抑制胰腺细胞凋亡，提高胰岛素水平<sup>[12]</sup>。有研究表明，桑葚多糖可通过下调 MAPK 信号通路中的磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶 (phosphorylated c-Jun N-terminal kinase, p-JNK)、磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白激酶

(phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase, p-p38) 和半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶 3 (cysteine-dependent aspartate-specific protease-3, Caspase-3) 蛋白的表达水平来抑制胰岛细胞凋亡，进而发挥降糖功效。卓尼柴胡 *Zhuoni Radix Bupleuri* 因其产地地理位置优越，有效成分含量高，历史人文底蕴深厚，2021 年入选国家地理标志农产品（证书编号 AGI103440，质量控制技术规范编号 AGI2021-01-3440），是“北柴胡”中的佳品，陇原大地上孕育出的瑰宝<sup>[13]</sup>。目前关于柴胡多糖降血糖、抗糖尿病活性的系统性研究还不充足<sup>[14]</sup>，而对卓尼柴胡多糖降血糖潜力研究及开发应用的相关报道更为稀少。因此，本实验以卓尼柴胡根部为原料，制备卓尼柴胡多糖，并对其理化特性及其降血糖活性潜力进行综合评价，以期为卓尼柴胡及其多糖的深加工探索新方向，为卓尼柴胡资源的充分开发利用提供研究基础和理论支持。

## 1 材料与仪器

### 1.1 材料

卓尼柴胡经兰州理工大学生命科学与工程学院李善家教授鉴定为柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 的根；无水乙醇分析纯，国药集团化学试剂有限公司；浓硫酸分析纯，白银良友化学试剂有限公司；Sephadex-G200、半乳糖醛酸（批号 G8120，质量分数 97.00%）、葡萄糖（批号 G8150，质量分数  $\geq 99.80\%$ ）、半乳糖（批号 IG0540，质量分数  $\geq 98.00\%$ ）、甘露糖（批号 G8370，质量分数  $\geq 99.00\%$ ）、鼠李糖（批号 G8560，质量分数  $\geq 98.00\%$ ）、木糖（批号 G8360，质量分数  $\geq 99.00\%$ ）、阿拉伯糖（批号 D8120，质量分数  $\geq 99.00\%$ ）、岩藻

糖(批号F8410,质量分数≥98.00%)、PMP(批号P9930,质量分数≥99.00%)、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶(批号G8823,100U)、葡萄糖检测试剂盒(批号BC8322),北京索莱宝科技有限公司;刚果红(优级纯),上海中秦化学试剂有限公司;三氟乙酸(trifluoroacetic acid,TFA,批号T6508,质量分数≥99.00%)、1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one,PMP,批号M70800,质量分数≥99.00%),默克西格玛奥德里奇上海贸易有限公司;盐酸二甲双胍(批号M813341,质量分数≥97.00%),上海麦克林生化科技有限公司。

## 1.2 仪器

T2602型双光束紫外可见分光光度计上海佑科仪器仪表有限公司;FlexA-200HT型酶联免疫分析仪杭州奥盛仪器有限公司;K2025型高效液相色谱仪山东悟空仪器有限公司;Spectrum 100型傅里叶变换红外光谱仪珀金埃尔默企业管理(上海)有限公司;EM-30AX型扫描电子显微镜库塞姆中国;TGA 1000型热重分析仪北京精微高博仪器有限公司。

## 2 方法

### 2.1 卓尼柴胡粗多糖(*crude Zhuoni Radix Bupleuri polysaccharide, C-ZRBP*)制备

取新采收的卓尼柴胡根部,经干燥、粉碎、过100目筛后备用。水提法制备粗多糖,以1:25的料液比于85℃恒温磁力搅拌水浴锅内浸提1 h,提取3次。将多糖提取液减压浓缩后加入4倍体积的无水乙醇,4℃静置24 h后3 900 r/min离心15 min获得粗多糖沉淀,冷冻干燥后得到C-ZRBP。

### 2.2 C-ZRBP纯化

C-ZRBP加适量蒸馏水复溶后转移至分液漏斗,加入4倍体积的Sevag试剂并剧烈振荡30 min,静置等待蛋白变性沉淀,从分液漏斗底出口放出蛋白沉淀。多次重复上述工作,直至多糖溶液的全波长(190~400 nm)扫描图谱中260、280 nm处无吸收,且考马斯亮蓝染色法检测蛋白含量为0或极少量(待测粗多糖溶液需稀释后检测,并根据稀释倍数计算原溶液中蛋白含量)。将除蛋白后的粗多糖冷冻干燥,采用葡聚糖凝胶Sephadex G-200进行柱色谱分离纯化,苯酚-硫酸法测定收集器各收集管中洗脱液中糖含量,并以管号为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制洗脱曲线。根据洗脱曲线收集洗脱液,冷冻干燥后得到卓尼柴胡多糖(*Zhuoni Radix Bupleuri polysaccharide, ZRBP*)。

### 2.3 ZRBP的纯度鉴定及相对分子质量测定

精确称取制备的ZRBP配制成5.0 mg/mL水溶液备用。以梯度质量浓度的葡萄糖溶液为标准溶液,ZRBP溶液(5.0 mg/mL)为待测样品,采用苯酚-硫酸法测定ZRBP的糖含量。精确称取制备的ZRBP配制成1.0 mg/mL水溶液备用。以梯度浓度的半乳糖醛酸溶液为标准溶液,ZRBP溶液(1.0 mg/mL)为待测样品,采用间羟基联苯法测定ZRBP的糖醛酸含量。

ZRBP溶液(5.0 mg/mL)过0.22 μm滤膜后用于HPLC分析(TSK-gel G4000-PWXI, 300 mm×7.8 mm; 样品质量浓度范围1~5 mg/mL; 进样量20 μL; 柱温30℃; 检测器: 示差折光检测器, 检测温度35℃; 流动相水),以葡聚糖T-10、T-40、T-70、T-110、T-500和T-2000为标准品,根据标品的保留时间,绘制相对分子质量对数(lgM<sub>w</sub>)-保留时间(t<sub>R</sub>)的标准曲线。根据ZRBP的糖含量结合液相图谱进行纯度鉴定,根据ZRBP的出峰时间和lgM<sub>w</sub>-t<sub>R</sub>标准曲线计算相对分子质量。

### 2.4 ZRBP的理化特性分析

**2.4.1 单糖组成分析** 参照颜军等<sup>[15]</sup>方法进行PMP衍生化。取10 mg/mL ZRBP溶液1 mL于玻璃螺口螺口尖底离心管内,加入4 mol/L TFA 1 mL,封口后110℃水解8 h。冷却后转移至25 mL旋蒸瓶,加入400 μL甲醇使之溶解,减压旋蒸至干,反复加入甲醇旋蒸6次以除尽TFA残留。加入1 mL蒸馏水,溶解后得到ZRBP水解液备用。

样品衍生化:分别吸取10 mg/mL混合单糖标准品溶液50 μL和ZRBP水解液于具塞试管中,各加入1.2 mol/L NaOH溶液50 μL,混匀,再加入0.5 mol/L PMP甲醇溶液100 μL,混匀。70℃反应100 min后冷却至室温,加入0.3 mol/L HCl 100 μL,补水1.7 mL(终体积为2 mL),再加入2 mL氯仿萃取,取上层水相,反复萃取至下层有机相为澄清透明,取上层水相,过0.22 μm微孔滤膜后进行HPLC分析[色谱柱: Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>18</sub>, 250 mm×4.6 mm, 5 μm; 流动相为0.02 mol/L磷酸盐缓冲液(pH 6.7)-乙腈(83:17); 检测波长250 nm; 进样体积10 μL; 柱温30℃; 流动相体积流量1 mL/min]。

**2.4.2 甲基化分析** 取10 mg完全干燥的ZRBP溶解于2 mL DMSO。在氮气的保护下,加入25 mg NaH,于18~20℃的黑暗条件下超声反应30 min

后加入1mL碘甲烷作为甲基供体，在相同条件下甲基化反应1h。加入0.5mL水结束甲基化反应，加入2mL氯仿萃取甲基化产物。吸取氯仿层，氮气吹干后，重复上述甲基化过程5次以上。然后将甲基化样品于2mLTFA(2mol/L)中110℃水解3h。水解完成后，N<sub>2</sub>吹干，样品经甲醇重溶后再次用N<sub>2</sub>吹干，与25mgNaBH<sub>4</sub>混合后加入2mL去离子水溶解，在室温下反应2h后用乙酸调节pH为5.0，N<sub>2</sub>吹干得到反应物。反应物中加入3mL甲醇和1滴乙酸进行溶解，溶解后再次氮气吹干。重复该溶解-吹干的实验操作5次，最后2次只用甲醇溶解不加乙酸，最终氮气吹干的样品用于乙酰化反应。吡啶-乙酸酐(1:1)的混合溶液作为乙酰化试剂。于上述氮气吹干的产物中加入2mL的乙酰化试剂，100℃油浴反应1h后，反应样品氮气吹干，加氯仿溶解，过膜后用于GC-MS分析(色谱柱：HP-5MS，30m×0.25mm×0.25μm；程序升温：初始100℃，保持2min，然后以5℃/min升到240℃，保持2min，再以10℃/min升到320℃，保持2min；载气为He气，纯度99.999%；传输线温度280℃，离子阱温度220℃；扫描方式全扫描；扫描范围m/z 43~500；检索谱库：NIST05)。

**2.4.3 傅里叶变换红外光谱分析** 采用溴化钾压片法进行傅里叶变换红外光谱(FT-IR)实验<sup>[16]</sup>。将1mg的ZRBPs与150mg溴化钾混合、研磨、压片后进行红外吸收光谱4000~400cm<sup>-1</sup>扫描，分辨率4cm<sup>-1</sup>。

**2.4.4 刚果红实验** 取2mL1mg/mL的ZRBPs溶液与2mL80μmol/L的刚果红溶液充分的混合，加入适量1mol/LNaOH，调节溶液的氢氧化钠终浓度分别为0.0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5mol/L。混匀后静置10min，400~600nm内扫描，以最大吸收波长作为纵坐标(Y)，NaOH溶液的终浓度为横坐标(X)，绘制曲线。用蒸馏水代替多糖溶液作为空白对照。

**2.4.5 扫描电子显微镜分析** 取适量ZRBPs样品粘着于样品台上，样品台置于离子溅射仪中镀上一层导电金粉。分别选用200、1000、2000、5000倍观察、拍照，每个样品拍照重复3次，排除样品干扰及系统误差<sup>[17]</sup>。

**2.4.6 热重分析** 参照Kumar等<sup>[18]</sup>的方法对ZRBPs进行热重分析，待测样品用量5mg，氮气体积流量50mL/min，升温速率10℃/min，温度范围30~

600℃，扫描速度1℃/min。

## 2.5 ZRBPs的降血糖潜力研究

**2.5.1 ZRBPs对α-淀粉酶和α-葡萄糖苷酶的抑制率测定**

(1) ZRBPs对α-淀粉酶抑制率测定：采用DNS法<sup>[19]</sup>，蒸馏水配制5、10、15、20、25mg/mL的ZRBPs溶液备用；以磷酸盐缓冲液(0.2mol/L，pH 6.5)配制2U/mL的α-淀粉酶溶液和5%的可溶性淀粉溶液备用。分别取不同浓度的0.3mL ZRBPs溶液和0.3mL α-淀粉酶溶液于试管内，37℃反应15min后加入0.3mL可溶性淀粉溶液，37℃反应15min后加入1mL DNS试剂终止反应，100℃煮沸15min，冷却，定容至10mL，于540nm波长处测量吸光度A<sub>1</sub>；以蒸馏水代替ZRBPs溶液，重复上述实验，测得的吸光度记为A<sub>0</sub>；以磷酸钠缓冲液代替α-葡萄糖苷酶溶液，重复上述实验，测得的吸光度记为A<sub>2</sub>；以蒸馏水和磷酸钠缓冲液分别取代ZRBPs和α-葡萄糖苷酶溶液，重复上述实验，测得的吸光度记为A<sub>3</sub>；阿卡波糖作阳性对照，每个浓度设置3组平行，根据公式计算ZRBPs对α-淀粉酶的抑制率。

$$\text{抑制率} = 1 - (A_1 - A_2) / (A_0 - A_3)$$

(2) ZRBPs对α-葡萄糖苷酶抑制率测定：基于4-硝基苯基-α-D-吡喃葡萄糖苷(4-nitrophenyl-alpha-D-glucopyranoside，PNPG)和α-葡萄糖苷酶建立酶抑制剂的筛选模型<sup>[20]</sup>。配制0.125、0.250、0.500、1.000、2.000、4.000mg/mL的ZRBPs溶液备用；用磷酸盐缓冲液(0.1mol/L，pH 6.8)配制5mmol/L的PNPG溶液和0.1U/mL的α-葡萄糖苷酶溶液备用。分别取梯度浓度的ZRBPs溶液20μL和40μL α-葡萄糖苷酶溶液混合于96孔板，37℃恒温孵育10min，加入40μL的PNPG溶液引发反应后37℃孵育30min，加入0.2mol/L100μL碳酸钠终止反应，410nm波长下测定吸光度值A<sub>1'</sub>；以蒸馏水代替ZRBPs溶液，重复上述实验，测定的吸光度记为A<sub>0'</sub>；以磷酸钠缓冲液代替α-葡萄糖苷酶溶液，重复上述实验，测定的吸光度记为A<sub>2'</sub>；以蒸馏水和磷酸钠缓冲液分别取代ZRBPs和α-葡萄糖苷酶溶液，重复上述实验，测定的吸光度记为A<sub>3'</sub>；阿卡波糖作阳性对照，每个质量浓度设置3组平行，根据公式计算ZRBPs对α-葡萄糖苷酶的抑制率。

$$\text{抑制率} = 1 - (A_{1'} - A_{2'}) / (A_{0'} - A_{3'})$$

**2.5.2 ZRBPs对HepG2-IR模型细胞葡萄糖消耗量的影响** 将实验用的HepG2细胞复苏、传代培养

后, 取对数生长期细胞用于后续实验。

(1) CCK-8 法检测细胞活力: 取对数期 HepG2 接种于 96 孔板中, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 细胞贴壁后, 加入 100  $\mu\text{L}$  ZRBP 溶液 (0、62.5、125.0、250.0、500.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 进行干预, 在培养箱中分别孵育 12、24、36、48 h, 后将培养液倒掉, 每孔加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 检测液, 37  $^{\circ}\text{C}$  避光反应 2 h 后轻轻混合 1 min, 使用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度值<sup>[21]</sup>。空白(无细胞组)吸光度值记为  $A_0$ ; 含有 HepG2 细胞和被测样品组吸光度值记为  $A_1$ ; 对照(只含有 HepG2 细胞)组的吸光度值记为  $A_2$ 。同样的方法, 取对数期 HepG2 接种于 96 孔板中, 待细胞贴壁后, 加入 100  $\mu\text{L}$  棕榈酸 (0、0.2、0.4、0.6、0.8 mmol/L) 处理 24 h, 根据公式计算不同浓度棕榈酸对 HepG2 细胞存活率的影响。

$$\text{细胞存活率} = (A_1 - A_0) / (A_2 - A_0)$$

(2) HepG2-IR 模型构建: 选择处于对数生长期的 HepG2 细胞, 参照张伟<sup>[22]</sup>的实验方法构建 HepG2-IR 模型。取对数期 HepG2 接种于 96 孔板中, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 细胞贴壁后, 移除培养液, 生理盐水洗涤 2~3 次, 分别加入含 0、0.2、0.4、0.6、0.8 mmol/L 棕榈酸的培养液, 每组设置 3 组平行, 分别培养 12、24、36、48 h。按试剂盒说明书, 以葡萄糖消耗量为指标, 计算各组在不同培养时间的葡萄糖消耗量, 确定棕榈酸造模的最佳诱导浓度和时间。

(3) ZRBP 对 HepG2-IR 模型细胞葡萄糖消耗量的影响: 在建好的 HepG2-IR 模型基础上, 将含棕榈酸培养液弃掉, 生理盐水洗涤 2 次后, 分别加入 200  $\mu\text{L}$  含 ZRBP (25、50、75、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的培养液作为给药组; 加入 200  $\mu\text{L}$  (1 mg/mL) 含盐酸二甲双胍培养液作为阳性对照组; 加入 200  $\mu\text{L}$  普通培养液作为模型组; 正常培养的 HepG2 细胞作为对照组; 培养 24 h 后测定各组的葡萄糖消耗量。

## 2.6 数据分析

每组实验重复 3 次, 实验数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示。实验数据处理使用 IBM SPSS Statistics 27.0.1 统计分析, 用方差分析和邓肯多极差检验 ( $P < 0.05$ ) 进行显著性检验, 使用 OriginPro 2021 软件和 Design Expert12 绘图。

## 3 结果与分析

### 3.1 ZRBP 的分离纯化

C-ZRBP 的全波长扫描图谱见图 1, C-ZRBP 在

260、280 nm 处没有吸收峰, 表明 C-ZRBP 中没有蛋白、多肽及核酸存在; 且考马斯亮蓝染色结果表明 C-ZRBP 中蛋白质量分数为 (0.83 ± 0.12) %, 几乎不含蛋白, 除蛋白外。C-ZRBP 经 Sephadex G-200 色谱柱分离为 2 个组分, 如图 2 所示, 有 A、B 2 个组分, 根据在研究初期对 2 个主要组分进行了初步的糖苷酶抑制活性分析, 结果显示组分 A 的活性更好, 故选择 A 组分多糖作为研究对象, 记为卓尼柴胡多糖 (Zhuoni Radix Bupleuri polysaccharide, ZRBP)。

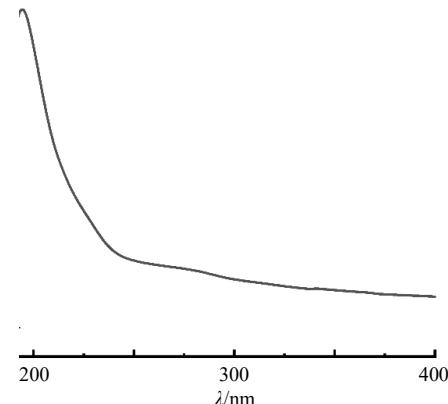
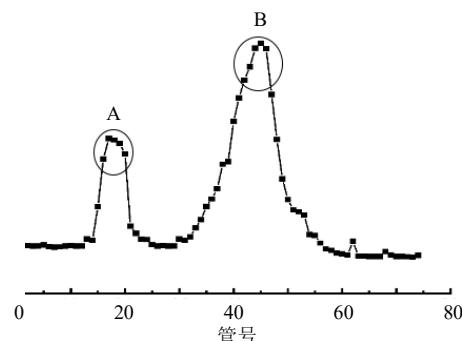


图 1 C-ZRBP 的全波长扫描图谱

Fig. 1 Full-wavelength scan spectrum of C-ZRBP



A-ZRBP; B-非课题研究物质。

A-ZRBP; B-substance not involved in this project.

图 2 C-ZRBP 柱色谱洗脱曲线

Fig. 2 Elution profile of C-ZRBP column chromatography

### 3.2 ZRBP 纯度鉴定

以干燥至恒定质量的葡萄糖为标准物质, 通过苯酚-硫酸法绘制的糖含量-吸光度标准曲线为  $y = 10.563x + 0.1321$ ,  $R^2 = 0.9994$ 。根据样品吸光度和糖含量标准曲线计算 ZRBP 糖质量分数为 (95.87 ± 0.26) %。以干燥至恒定质量的半乳糖醛酸为标准物质, 通过间羟基联苯法绘制的糖醛酸含量-吸光度标准曲线为  $y = 8.7196x - 0.0097$ ,  $R^2 = 0.9982$ 。根据样品吸光度和糖醛酸质量分数标准曲线计算 ZRBP

糖醛酸质量分数为  $(2.52 \pm 0.15)\%$ 。如图 3 所示, ZRBP 液相图谱呈单一峰, 表明 ZRBP 为相对分子质量分布较为均一的多糖。综上所述, ZRBP 为相对分子质量分布较为均一的酸性杂多糖。根据葡萄糖标品的相对分子质量对数 ( $\lg M_w$ ) 和保留时间 ( $t$ ) 绘制的标准曲线为  $\lg M_w = -0.2969 t + 8.8994$ ,  $R^2 = 0.9942$ 。由图 3 可知 ZRBP 的保留时间为 9.157 min, 计算 ZRBP 的平均相对分子质量为  $1.52 \times 10^6$ , 该结果与文献报道相符合<sup>[23-25]</sup>。

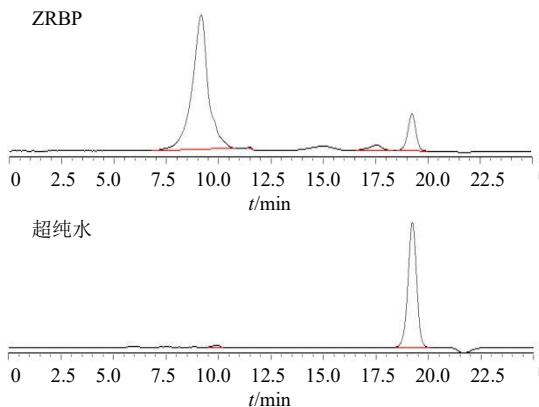


图 3 ZRBP 的 HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC chromatogram of ZRBP

果与文献报道相符合<sup>[23-25]</sup>。

### 3.3 ZRBP 的理化特性分析

**3.3.1 单糖组成分析** 由图 4 可知, ZRBP 的单糖组成为甘露糖:鼠李糖:半乳糖醛酸:葡萄糖:半乳糖:阿拉伯糖 = 3.43 : 1.37 : 1.62 : 79.77 : 7.90 : 4.97。与红外光谱分析结果 ZRBP 是包含糖醛酸的酸性杂多糖相符合。

**3.3.2 甲基化分析** 甲基化的分析结果如表 1 所示, GC-MS 的分析结果表明从甲基化处理后的 ZRBP 水解产物中找到了 11 种甲基化糖, 分别是 2,3,5-Me<sub>3</sub>-Araf、2,3,5-Me<sub>2</sub>-Araf、2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-GlcP、2,3,6-Me<sub>3</sub>-GlcP、2,3,6-Me<sub>3</sub>-GlcP、2,3-Me<sub>2</sub>-GlcP、2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-GalP、2,3,6-Me<sub>3</sub>-GalP、2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-ManP、2,4-Me<sub>2</sub>-ManP、2,4-Me<sub>2</sub>-Rhap, 对应的 ZRBP 中糖残基的连接方式分别为 Araf-(1→、→5)-Araf-(1→、GlcP-(1→、→4)-GlcP-(1→、→6)-GlcP-(1→、→4,6)-GlcP-(1→、GalP-(1→、→6)-GalP-(1→、ManP-(1→、→3,6)-ManP-(1→、→3)-Rhap-(1→) 即 ZRBP 的骨架结构主要由 →5)-Araf-(1→、→4)-GlcP-(1→、→6)-ManP-(1→、→6)-GalP-(1→和 →3-Rhap-(1→组成, 在 Glc 的 C6 和 Man 的 C6 上存在分支点, 存在 Ara、Glc、Gal、

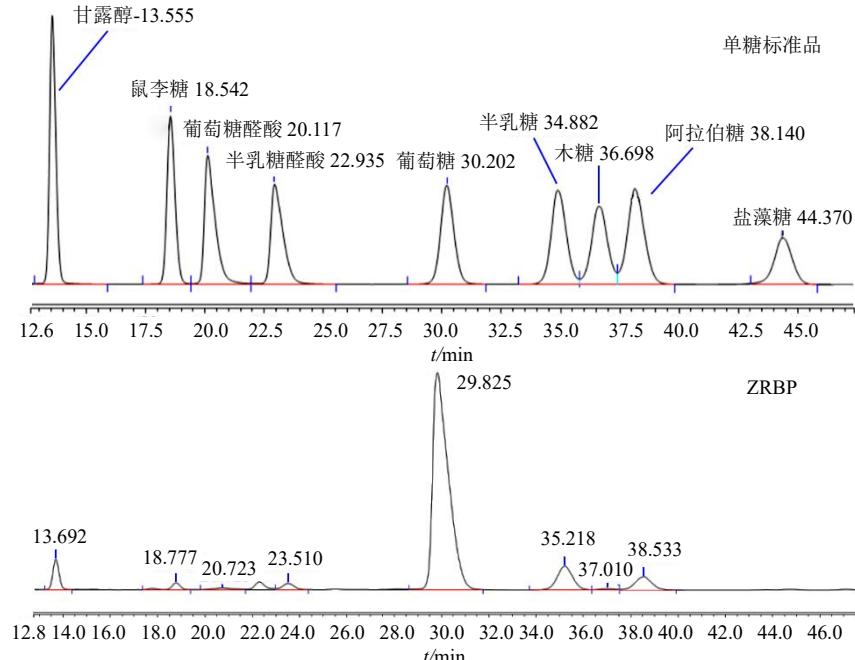


图 4 ZRBP 的单糖组成分析

Fig. 4 Monosaccharide composition analysis of ZRBP

Man 的 T 末端。

**3.3.3 傅里叶变换红外光谱分析** ZRBP 的红外光谱如图 5 所示。3 349 cm<sup>-1</sup> 处的特征吸收峰是由 O-

H 拉伸振动引起的。2 934 cm<sup>-1</sup> 处特征吸收峰是由 C-H 伸缩振动引起的<sup>[26]</sup>。这 2 种类型的化学键广泛存在于碳水化合物中, 由此可以确定 ZRBP 为糖类

表 1 ZRBP 的甲基化分析结果

Table 1 Results of methylation analysis of ZRBP

tr/min	甲基化糖	连接方式
20.648	2,3,5-Me <sub>3</sub> -Araf	Araf-(1→
21.450	2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -GlcP	GlcP-(1→
22.012	2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -GalP	GalP-(1→
22.209	2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -ManP	ManP-(1→
23.205	2,3,5-Me <sub>2</sub> -Araf	→5)-Araf-(1→
24.234	2,4-Me <sub>2</sub> -Rhap	→3)-Rhap-(1→
24.834	2,3,6-Me <sub>3</sub> -GlcP	→4)-GlcP-(1→
25.208	2,3,6-Me <sub>3</sub> -GlcP	→6)-GlcP-(1→
25.232	2,3,6-Me <sub>3</sub> -GalP	→6)-GalP-(1→
27.188	2,4-Me <sub>2</sub> -ManP	→3,6)-ManP-(1→
28.176	2,3-Me <sub>2</sub> -GlcP	→4,6)-GlcP-(1→

2,3,5-Me<sub>3</sub>-Araf-1,4-di-O-acetyl-1-2,3,5-tri-O-methyl-arabitol, 其他甲基化糖采用同样的书写规则。

2,3,5-Me<sub>3</sub>-Araf-1,4-di-O-acetyl-1-2,3,5-tri-O-methyl-arabitol, other methylated sugars follow the same writing rules.

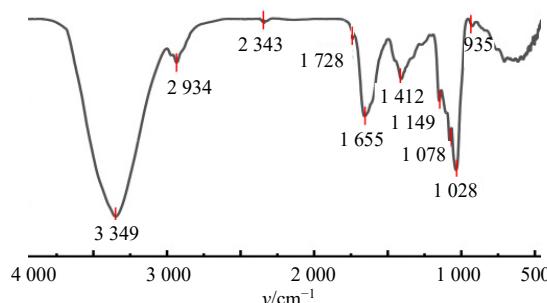


图 5 ZRBP 红外光谱图

Fig. 5 ZRBP infrared spectrum

化合物。1 728、1 655  $\text{cm}^{-1}$  处特征吸收峰是由羧基和半缩醛引起的。1 412  $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰是由 C-H 伸缩振动或 C-OH 的弯曲振动引起<sup>[27]</sup>。1 149  $\text{cm}^{-1}$  为吡喃环上 C-O-C 和 C-O-H 的伸缩振动，表明存在吡喃糖苷。1 078、1 028  $\text{cm}^{-1}$  附近相邻的 2 个吸收信号是吡喃糖环上 C-O 键的特征吸收峰，表明 ZRBP 中存在吡喃糖基团<sup>[28]</sup>。在 935  $\text{cm}^{-1}$  处，1 个较弱但可识别的信号对应于 3,6-无水半乳糖单元<sup>[29]</sup>。由此可见，ZRBP 为酸性杂多糖。

**3.3.4 刚果红实验** 多糖是一种有着复杂结构的大分子，它们表现出不同的链状结构，如单螺旋、双螺旋、蠕虫状和三股螺旋，多糖活性与其螺旋结构关系密切<sup>[30]</sup>。刚果红是一种酸性染料，可以形成具有多链螺旋构象的复杂多糖，具有螺旋结构的多糖与刚果红形成的络合物会使其最大吸收波长 ( $\lambda_{\max}$ ) 红移<sup>[31]</sup>。如图 6 所示，与空白组相比，ZRBP

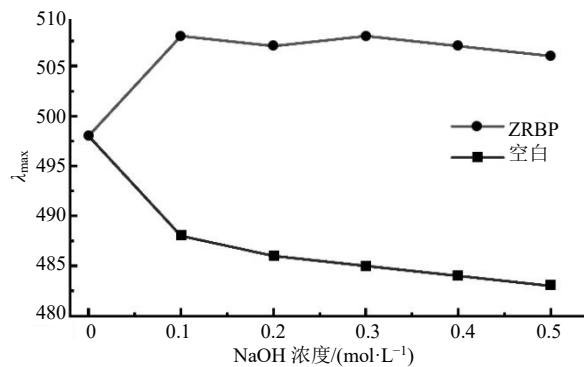


图 6 刚果红实验

Fig. 6 Congo red experiments

呈红移，具有螺旋结构的多糖在碱性条件下螺旋卷曲变换，能够使得其最大吸收波长发生红移或蓝移<sup>[32]</sup>。ZRBP 的  $\lambda_{\max}$  随着 NaOH 浓度增加而降低，推测 ZRBP 可能具有螺旋结构。

**3.3.5 扫描电子显微镜分析** 多糖的微观形态可能是由物理化学性质的差异引起的，这代表了多糖的特性之一<sup>[33]</sup>。此外，样品的制备方法对多糖的表面形态和结构也有影响<sup>[34]</sup>。如图 7 所示，ZRBP 呈现多网孔片状结构，薄片的表面较为光滑，上面分布着很多不规则的网孔。

**3.3.6 热重分析** ZRBP 的 TG-DTG 曲线如图 8 所示。热分解稳定性是决定多糖应用的重要理化性质，多糖中存在大量的亲水基团，可以吸附一定量的水分，温度升高时水分蒸发，使得多糖样品质量有所减小。当温度从 30 °C 升至 90 °C 时，ZRBP 样品的质量缓慢减小，可能与多糖吸附水分的蒸发有关；当温度从 90 °C 升至 200 °C 时，ZRBP 样品质量维持在稳定水平，此时热稳定性良好；当温度从 200 °C 升至 350 °C 时，ZRBP 样品的质量显著减小，

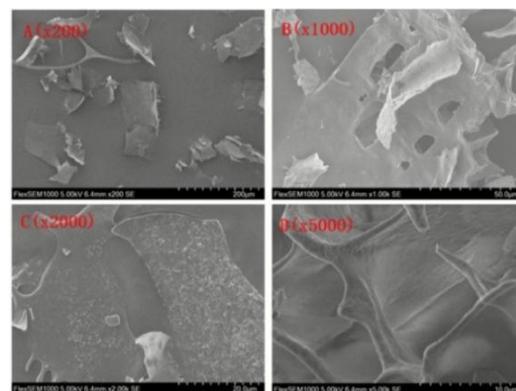


图 7 ZRBP 扫描电镜图

Fig. 7 ZRBP scanning electron microscope

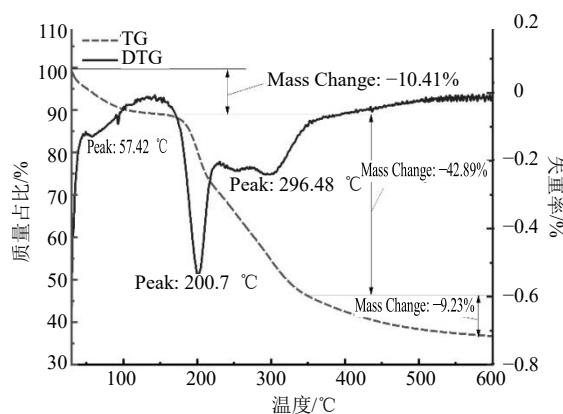


图 8 热重分析曲线

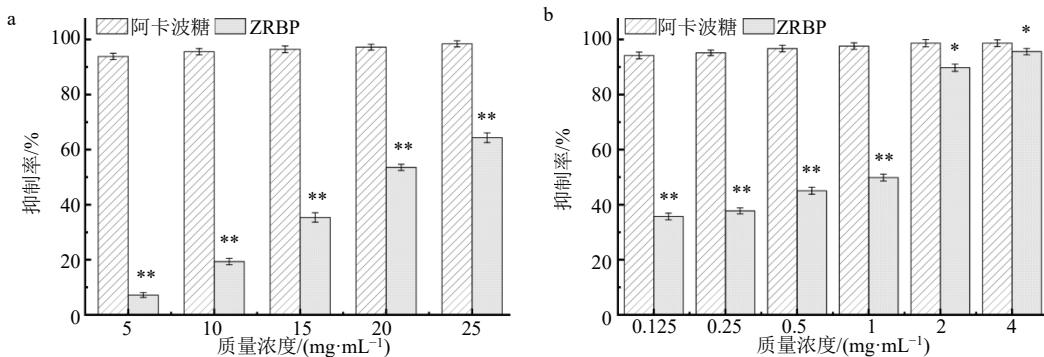
Fig. 8 Thermogravimetric analysis curve

损失率约为 42.89%，可能是高温使得多糖的分子发生了剧烈的解聚和分解作用，导致大量多糖分子在分解成寡糖、单糖后，又进一步裂解产生 CO<sub>2</sub>、水蒸气等逸出；当温度从 400 °C 升至 600 °C 时，ZRPB

的质量减少速度变慢，可能是因为大多数多糖经过高温处理后已经成为碳化结构；剩余的少数多糖热稳定性较高。一阶导数曲线可以较直观反映 ZRPB 损失率与温度变化的关系。根据 DTG 曲线可知，ZRPB 损失率在 200~350 °C 时最大，出现 2 个峰值；在 90~200 °C 时和 400~600 °C 时最小。

### 3.4 ZRPB 降血糖潜力研究

**3.4.1 ZRPB 对 α-淀粉酶和 α-葡萄糖苷酶抑制** 体外 α-淀粉酶抑制活性实验结果如图 9-a 所示。ZRPB 对 α-淀粉酶的抑制效果与浓度呈正相关，IC<sub>50</sub> 值为 19.825 mg/mL。当质量浓度达到 25 mg/mL 时，ZRPB 抑制率达到 62%。体外 α-葡萄糖苷酶抑制活性实验结果如图 9-b 所示。在实验浓度范围内，随着 ZRPB 浓度的升高，其对 α-葡萄糖苷酶的抑制效果也逐渐增强，呈正相关关系。ZRPB 的 IC<sub>50</sub> 值为 1.064 mg/mL，在 4 mg/mL 的浓度下，ZRPB 的 α-葡萄糖苷酶抑制率达 (95.22±0.15)%。



与相同质量浓度的阿卡波糖相比：\*P<0.05 \*\*P<0.01。

\*P<0.05 \*\*P<0.01 vs acarbose at same concentration.

图 9 α-淀粉酶 (a) 和 α-葡萄糖苷酶 (b) 抑制活性筛选 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )Fig. 9 Screening of α-amylase inhibitory activity (a) and α-glucosidase inhibitory activity (b) ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

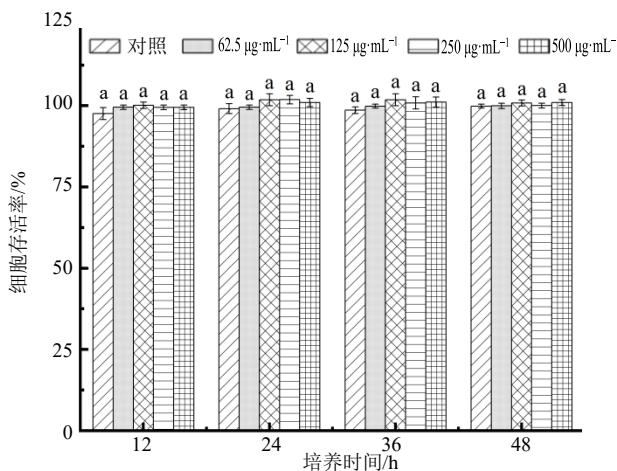
### 3.4.2 细胞实验

**(1) ZRPB 对 HepG2 细胞活力的影响：**将对照组的细胞存活率作为 100%，对比分析 ZRPB 对 HepG2 细胞活力的影响。如图 10 所示，同一浓度不同时间培养的 ZRPB 处理的 HepG2 细胞存活率未出现明显差异；而在同一时间不同浓度的 ZRPB 处理后的 HepG2 细胞存活率仍未表现出明显差异，表明当 ZRPB 质量浓度低于 500 μg/mL 时，对 HepG2 细胞的正常生长和增殖没有明显的促进或抑制作用，即未发现细胞毒性。

**(2) HepG2-IR 模型的建立：**不同浓度的棕榈酸对 HepG2 细胞存活率影响的实验结果见图 11-a。当

棕榈酸浓度低于 0.4 mmol/L 时，HepG2 细胞活力无显著变化；当棕榈酸浓度达到 0.6~0.8 mmol/L 时，HepG2 细胞活力极显著降低 (P<0.01)，且细胞活力降低水平与棕榈酸浓度呈正相关。

不同浓度的棕榈酸诱导 HepG2-IR 模型的实验结果见图 11-b，对照组（棕榈酸浓度为 0 mmol/L）中，葡萄糖消耗量随时间延长而增加；随着棕榈酸浓度提高，棕榈酸诱导组中（浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8 mmol/L）葡萄糖消耗量出现显著变化，各培养阶段葡萄糖消耗量均低于对照组；表明这些剂量诱导下的细胞均产生不同程度的胰岛素抵抗，且胰岛素抵抗程度随着棕榈酸浓度的提高而提高，随培养时间的增



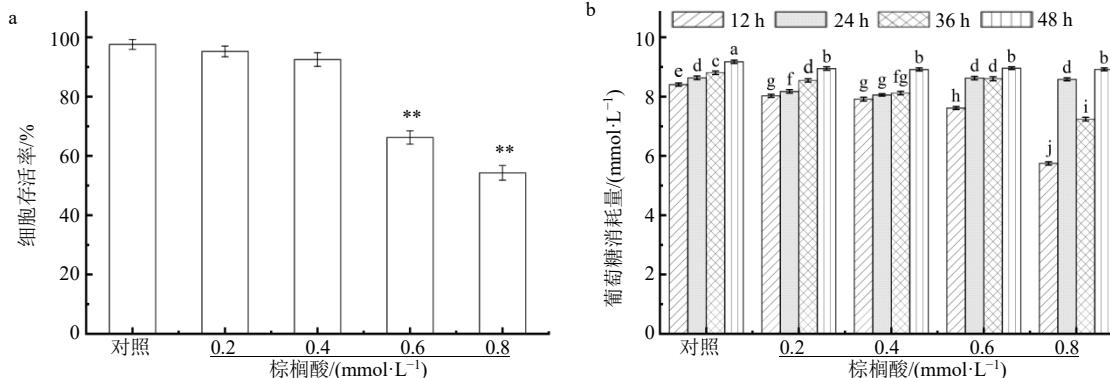
不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )，下图同。

Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ), same as Fig. below.

**图 10 ZRBP 对 HepG2 细胞活力影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )**  
**Fig. 10 Effects of ZRBP on HepG2 cell viability ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )**

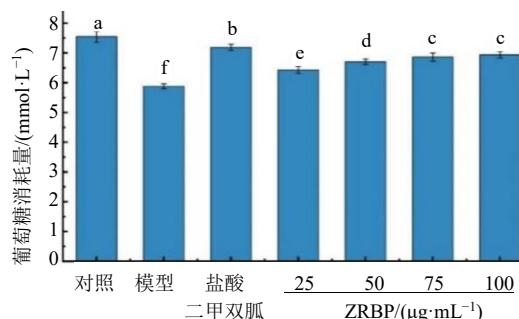
加而出现不同程度的弱化。细胞在 0.4 mmol/L 棕榈酸诱导下，36 h 内葡萄糖消耗量都维持相对平衡的状态，且与对照组相比有显著性差异 ( $P < 0.05$ )，即该条件下胰岛素抵抗模型较为稳定。综合考虑棕榈酸浓度对 HepG2 细胞存活率和 HepG2-IR 模型的建模效果影响，最终的建模条件为棕榈酸浓度 0.4 mmol/L、诱导时间 24 h，用于后续实验研究。

**(3) ZRBP 对 HepG2-IR 模型细胞葡萄糖消耗量的影响：**如图 12 所示，与对照组相比，模型组的葡萄糖消耗量显著降低 ( $P < 0.05$ )，表明造模成功。与模型组相比，ZRBP 给药组的葡萄糖消耗量与模型组均存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )，主要表现为随着 ZRBP 浓度的提高，葡萄糖消耗量呈缓慢上升趋势，表明 ZRBP 对 HepG2-IR 模型细胞的胰岛素抵抗具有改善作用，改善程度与糖质量浓度呈正相关性。尽管改善效果弱于二甲双胍，但有研究表明，



a-不同浓度棕榈酸对 HepG2 细胞存活率的影响；b-HepG2-IR 模型持续时间的测定；与对照组比较：\*\* $P < 0.01$   
a-effects of palmitic acid concentration on survival rate of HepG2 cells; b-determination of duration of HepG2-IR model; \*\* $P < 0.01$  vs control group.

**图 11 HepG2-IR 模型构建条件优化 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )**  
**Fig. 11 Optimization of construction conditions for HepG2-IR model ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )**



**图 12 ZRBP 对 HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )**  
**Fig. 12 Effects of ZRBP on glucose consumption in HepG2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )**

天然植物多糖比化学药物毒性更小，不良反应也更少，仍具有降血糖开发的潜力<sup>[35]</sup>。

#### 4 讨论

经水提醇沉获得的 C-ZRBP 中不仅含有多种糖类物质，还含有蛋白、核酸等非糖物质，为获得高纯度的均一多糖，需进行除蛋白以及柱色谱进行分离纯化。目前，除蛋白质常用的方法有 Sevag 法、三氟三氯乙烷法、三氯乙酸法、酶法等<sup>[24]</sup>，其中 Sevag 法条件温和且能有效保持多糖分子的键合结构及理化特性<sup>[36]</sup>。经除蛋白质后的多糖依旧是多种糖类的混合物，需进一步通过柱色谱进行最终的分离纯化。多糖纯化常用的柱色谱手段有阴离子交换

色谱法、大孔树脂法、凝胶色谱法等<sup>[37]</sup>，其中凝胶滤过色谱（即分子排阻色谱）利用分子筛作用而进行分离，大分子先洗脱，小分子由于运动路径长而后洗脱出来，可以选择不同凝胶填料从而分离不同相对分子质量的多糖，该方法具有分离效果好、条件温和的特点。故本研究选择该 Sevag 法除蛋白结合 Sephadex G-200 柱色谱进行 C-ZRBP 的分离纯化，获得纯化多糖 ZRBP。采用紫外-可见分光光度法和考马斯亮蓝法检测除蛋白效果<sup>[38]</sup>，洗脱曲线法分析柱色谱分离纯化效果，最终通过液相色谱法结合糖含量测定结果进行均一性分析，结果表明 ZRBP 是一种平均相对分子质量在  $1.52 \times 10^6$  的多糖，糖质量分数达  $(95.87 \pm 0.26)\%$ 。

多糖的生物活性与其相对分子质量、单糖组成、糖苷键组成和高级构象表征密切相关<sup>[39]</sup>。本研究通过 PMP 衍生法、甲基化实验、FT-IR、刚果红实验、SEM 等方法对 ZRBP 的结构进行分析。由于糖化合物无法吸收紫外线，使得其检测变得复杂<sup>[40]</sup>，因此，单糖分析采用特异性衍生化，例如 PMP 衍生化，在温和的反应条件下从减糖端进行，1 个 PMP 分子与 1 个醛基反应形成衍生物，这导致强烈的紫外线吸收<sup>[41]</sup>，并通过 HPLC 分析多糖的组成成分。PMP 衍生法单糖组分分析结果表明 ZRBP 主要由葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖组成，其中葡萄糖含量最高。这与 Feng 等<sup>[25]</sup>的研究结果一致。多糖甲基化是多糖结构表征的核心技术之一，可以确定多糖中各单糖残基的连接位点、连接方式及糖苷键构型，是解析多糖一级结构（骨架与侧链连接）的关键方法。甲基化实验结果表明 ZRBP 骨架结构主要由  $\rightarrow 5\text{-Araf-(1}\rightarrow,\rightarrow 4\text{-GlcP-(1}\rightarrow,\rightarrow 6\text{-ManP-(1}\rightarrow,\rightarrow 6\text{-GalP-(1}\rightarrow\text{和}\rightarrow 3\text{-Rhap-(1}\rightarrow$  组成，在 Glc 的 C6 和 Man 的 C6 上存在分支点，存在 Ara、Glc、Gal、Man 的 T 末端。FT-IR 是通过干涉仪将红外光的频率信息转化为干涉图，再经傅里叶变换得到样品的红外吸收光谱<sup>[42]</sup>。FT-IR 谱图表明 ZRBP 具有典型的多糖特征吸收峰，尤其使吡喃糖环上 C-O 键的特征峰，证实了 ZRBP 中存在吡喃糖基团。赵小亮等<sup>[43]</sup>对柴胡多糖的红外光谱分析结果也表明，柴胡多糖中一般含有一定量的糖醛酸，并存在吡喃糖残基糖环。此外，刚果红实验及 SEM 观察结果显示，ZRBP 是可能具有三螺旋结构的网孔片状结构，与 Wang 等<sup>[44]</sup>发现的柴胡多糖形成不规则的聚集体，如球状体、片状和树状大分子的结果相似。这表明

柴胡多糖具有灵活的链构象，可能与高纯度、碳水化合物链的大小和较强的分子间相互作用有关。

柴胡多糖具有免疫调节、抗氧化、抗肿瘤、抗糖尿病、抗衰老和保护胃气的作用等多种生物活性<sup>[23,45-49]</sup>。本研究聚焦于 ZRBP 的降血糖潜力，通过  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制、 $\alpha$ -淀粉酶抑制实验以及 HepG2-IR 实验对其进行评价。对碳水化合物水解酶类的抑制实验是一种简单、可行、有效的评价是否能够降低餐后血糖的方法。 $\alpha$ -淀粉酶是 1 种分解长链碳水化合物的酶，最终从直链淀粉中产生麦芽三糖和麦芽糖，从支链淀粉中产生葡萄糖和限制糊精<sup>[50]</sup>，因此，抑制  $\alpha$ -淀粉酶的活性可以延迟葡萄糖向血糖的转化，控制糖尿病中的血糖水平<sup>[51]</sup>； $\alpha$ -葡萄糖苷酶位于肠道细胞的刷状边界表面膜中，将低聚糖降解为单糖，被肠上皮吸收，从而导致血糖水平升高<sup>[52]</sup>。抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶可以降低餐后血糖水平，这是预防或治疗糖尿病和边缘性患者血糖水平的重要策略。已有研究显示，HepG2-IR 细胞已被广泛的选为评估多糖体外降糖活性的理想模型<sup>[53-54]</sup>。这是由于 HepG2 来源于人类肝细胞癌，保留了正常肝细胞的许多功能特性，例如糖原合成、葡萄糖代谢等，能够模拟人体肝脏在血糖调节中的关键作用<sup>[55]</sup>。结果表明，ZRBP 对  $\alpha$ -淀粉酶 ( $IC_{50}=19.825 \text{ mg/mL}$ ) 和  $\alpha$ -葡萄糖苷酶 ( $IC_{50}=1.064 \text{ mg/mL}$ ) 具有抑制效应。且 ZRBP 对  $\alpha$ -淀粉酶的抑制率随其的浓度的增加而升高，可能是 ZRBP 作为复杂碳水化合物，含多个羧基、羟基、糖苷键等官能团。随浓度的升高，ZRBP 与  $\alpha$ -淀粉酶分子间作用增强，改变了  $\alpha$ -淀粉酶的空间构象，进而使  $\alpha$ -淀粉酶失活，从而减少了与淀粉的结合<sup>[56]</sup>，抑制率随之提升。ZRBP 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制率随其浓度变化，先呈缓慢上升趋势，后显著提高并趋于平缓。当 ZRBP 质量浓度为  $2 \text{ mg/mL}$  时，抑制率显著提高，可能是多糖结合后导致酶构象发生改变，降低其与底物亲和力<sup>[57]</sup>。最后结合位点饱和，抑制率无明显变化。本研究使用盐酸二甲双胍作为阳性对照，用盐酸二甲双胍和不同质量浓度 ZRBP 处理后，HepG2-IR 细胞的葡萄糖消耗量显著增加 ( $P<0.05$ )，葡萄糖消耗量和 ZRBP 浓度之间存在剂量相关性效应，这与 Cao 等<sup>[58]</sup>、Ren 等<sup>[59]</sup>的研究一致，反映了多糖在促进葡萄糖消耗以降低血糖水平方面的潜力。Pan 等<sup>[60]</sup>研究也发现，柴胡多糖对糖尿病有积极影响。此外，Liu 等<sup>[48]</sup>研究发现柴胡多糖可以显著下调肿瘤坏死因子- $\alpha$

(tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、Toll样受体4 (Toll-like receptor 4, TLR4)、高迁移率组蛋白B1 (high mobility group box 1, HMGB1) 和核因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)，表达这表明其抗糖尿病机制可能与抑制 HMGB1-TLR4 通路的中断有关。

结构是影响多糖降血糖活性的 1 个关键因素。ZRBp 可能具有螺旋结构，在水溶液中表现出有序结构，该结构可能是抑制  $\alpha$ -淀粉酶和  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的重要因素之一。Feng 等<sup>[61]</sup>研究显示莼菜多糖 BSP-U100 组分具有螺旋结构，在水溶液中呈有序构象，对  $\alpha$ -淀粉酶和  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制活性均高于其他 2 种无明确三螺旋结构的多糖；Cao 等<sup>[58]</sup>研究发现海蒿子多糖 SPP-1 具有分支缠绕结构及三螺旋构象，而 SPP-2 无三螺旋构象，酶抑制活性测定结果显示 SPP-1 对  $\alpha$ -淀粉酶和  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用强于 SPP-2，且能显著提高胰岛素抵抗型 HepG2 细胞 (HepG2-IR) 的葡萄糖消耗量与细胞增殖能力；推测 ZRBp 降血糖活性可能与其螺旋结构相关。ZRBp 的单糖组成主要由葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖组成，其中葡萄糖含量最高，且含有少量糖醛酸。单糖组成作为多糖的重要结构特征，与其空间构象形成及生物靶点的特异性结合密切相关，进而影响药理活性<sup>[62]</sup>。Li 等<sup>[63]</sup>研究发现，滇黄精多糖 PKPs-1 的单糖组成为葡萄糖为主要成分，同时含有半乳糖、阿拉伯糖等单糖，且 PKPs-1 能显著上调胰岛素受体底物 1 (insulin receptor substrate 1, IRS-1)、磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K) 和蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 的表达水平，激活 PI3K/Akt 信号通路调控葡萄糖代谢，对糖尿病小鼠表现出显著的抗高血糖活性。ZRBp 与 PKPs-1 的单糖组成较为相似，均为葡萄糖为主要成分，同时含有半乳糖、阿拉伯糖等单糖，推测 ZRBp 可能也有调节 IRS/PI3K/Akt 信号通路的作用。此外，糖醛酸中羧基的存在可能通过氢键增强多糖与消化酶 (如  $\alpha$  淀粉酶和  $\alpha$ -葡萄糖苷酶) 的相互作用，从而更高效地抑制酶活性<sup>[64]</sup>，有研究报告显示，酸性多糖表现出强于其中性多糖组分的降血糖和抗糖尿病活性<sup>[65-66]</sup>。李红钰<sup>[67]</sup>研究发现，太子参多糖 PHP-1 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶表现出强烈的抑制作用，可能与其相对较高的葡萄糖含量有关，其作用机制可能是多糖分子中大量的葡萄糖残基可模拟  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的天然底物，与酶活性中心特异

性结合，形成竞争性抑制作用。ZRBp 以葡萄糖为主要单糖组分，这一结构特征与 PHP-1 相似，推测葡萄糖可能是 ZRBp 发挥  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制作用的重要结构基础。越来越多的研究表明，大多数具有降血糖活性的多糖拥有 1→3、1→4 和 1→6 个糖苷键<sup>[68-69]</sup>。Liu 等<sup>[70]</sup>从草珊瑚残渣中提取的多糖 SERP1，其结构中含有 →5)-Araf-(1→、→3)-Galp-(1→、→4)-GlcP-(1→、→6)-GlcP-(1→、→4,6)-GlcP-(1→、→2)-Rhap-(1→，该多糖可有效抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性和降低血糖水平。ZRBp 连接方式与之相似，推测这种骨架连接方式、分支特征、末端残基类型通过影响多糖与酶、细胞受体或信号通路关键蛋白的相互作用进行血糖调节。综上所述，ZRBp 在降血糖活性方面具有一定的潜力。

综合糖苷酶抑制实验和 HepG2-IR 细胞模型实验的结果，初步探索发现 ZRBp 具有降血糖的潜力，不可否认的是体外活性评价在生物活性研究上具有一定的缺陷。因此，要进行 ZRBp 降血糖活性的深度挖掘和探究还需要进行相关的动物实验，从整体生理功能到分子机制层面验证其降血糖机制，为更好的开发柴胡多糖提供更充足的理论基础和支撑。本研究初步探索了 ZRBp 在降血糖上的应用潜力，相关成果对于深入阐明其生物活性及作用机制、推动其在功能性食品领域的开发研究具有重要的理论与实践意义。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] Kang Y, Gao Y, Li X M, et al. *Bupleurum chinense* exerts a mild antipyretic effect on LPS-induced pyrexia rats involving inhibition of peripheral TNF- $\alpha$  production [J]. *Ethnopharmacol*, 2023, 310: 116375.
- [2] 颜美玲, 杨柳, 侯阿娇, 等. 柴胡化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中医药信息, 2018, 35(5): 103-109.
- [3] 李月阳, 雷根平, 董盛, 等. 柴胡的现代药理作用研究进展 [J]. 海南医学院学报, 2022, 28(22): 1748-1754.
- [4] 席啸虎, 夏召弟, 王世伟, 等. 藏柴胡和北柴胡定性及 3 种成分定量的近红外光谱技术快速分析 [J]. 时珍国医国药, 2022, 33(2): 382-386.
- [5] Zhang G X, Wang H, Jiang J M, et al. The complete chloroplast genome of *Bupleurum marginatum* var. *stenophyllum* (H. Wolff) Shan & Yin Li (Apiaceae), a new substitution for Chinese medicinal material, *Bupleuri Radix* (Chai Hu) [J]. *Mitochondrial DNA B Resour*, 2021, 6(2): 441-443.

- [6] 邓寒霜, 杨丽娜. 响应面法优化柴胡多糖提取工艺 [J]. 中国现代中药, 2018, 20(6): 742-747.
- [7] Hsu M F, Bettaieb A, Ito Y, et al. Protein tyrosine phosphatase Shp2 deficiency in podocytes attenuates lipopolysaccharide-induced proteinuria [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 461.
- [8] Naveen J, Baskaran V. Antidiabetic plant-derived nutraceuticals: A critical review [J]. *Eur J Nutr*, 2018, 57(4): 1275-1299.
- [9] Song J X, Wu Y, Ma X J, et al. Structural characterization and  $\alpha$ -glycosidase inhibitory activity of a novel polysaccharide fraction from *Aconitum coreanum* [J]. *Carbohydr Polym*, 2020, 230: 115586.
- [10] Wu G J, Bai Z Y, Wan Y J, et al. Antidiabetic effects of polysaccharide from azuki bean (*Vigna angularis*) in type 2 diabetic rats via insulin/PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Food Hydrocoll*, 2020, 101: 105456.
- [11] Wang K P, Wang H X, Liu Y G, et al. *Dendrobium officinale* polysaccharide attenuates type 2 diabetes mellitus via the regulation of PI3K/Akt-mediated glycogen synthesis and glucose metabolism [J]. *J Funct Foods*, 2018, 40: 261-271.
- [12] Hong Z, Hong Z Y, Wu D L, et al. Specific MAPK inhibitors prevent hyperglycemia-induced renal diseases in type 1 diabetic mouse model [J]. *Mol Cell Biochem*, 2016, 419(1/2): 1-9.
- [13] 马玉芳. 阜宁高海拔地区柴胡种植技术 [J]. 农业技术与装备, 2021(5): 165-166.
- [14] 蒋凡, 郑连军, 付然, 等. 柴胡药物化学成分提取及活性成分质量分数测定 [J]. 当代化工, 2023, 52(2): 321-325.
- [15] 颜军, 刘嵬, 邬晓勇, 等. 柴胡多糖的分子量测定及单糖组成分析 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(9): 4550-4552.
- [16] He N W, Zhai X C, Zhang X B, et al. Extraction, purification and characterization of water-soluble polysaccharides from green walnut husk with anti-oxidant and anti-proliferative capacities [J]. *Process Biochem*, 2020, 88: 170-179.
- [17] 张淑杰, 权威, 姜宏伟, 等. 不同纯化程度豌豆水溶性多糖的电镜扫描分析 [J]. 农业生物技术学报, 2019, 27(10): 1822-1830.
- [18] Kumar Varma C A, Jayaram Kumar K. Structural, functional and pH sensitive release characteristics of water-soluble polysaccharide from the seeds of *Albizia lebbeck* L [J]. *Carbohydr Polym*, 2017, 175: 502-508.
- [19] 汤陈鹏, 吕峰, 王蓉琳. 孔石莼多糖锌结构表征与体外降血糖活性 [J]. 食品科学, 2020, 41(7): 52-58.
- [20] 张梦晴. 羊栖菜  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的分离纯化及特性研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2020.
- [21] 尹琪琪. 灵芝多糖对 HepG2 细胞胰岛素抵抗的改善作用及其机制研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2021.
- [22] 张伟. 甘草次酸的提取、结构修饰及降血糖活性研究 [D]. 天津: 天津科技大学, 2020.
- [23] Yu X Y, Miao Z, Zhang L Z, et al. Extraction, purification, structure characteristics, biological activities and pharmaceutical application of *Bupleuri Radix* polysaccharide: A review [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 237: 124146.
- [24] Di H Y, Zhang Y Y, Chen D F. An anti-complementary polysaccharide from the roots of *Bupleurum chinense* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2013, 58: 179-185.
- [25] Feng S H, Li K, Lv W W, et al. Extraction, characterization, antioxidation and anti-inflammatory activity of polysaccharides from *Bupleurum chinense* based on different molecular weights [J]. *Nat Prod Res*, 2025, 39(20): 5832-5842.
- [26] Mitić Ž, Nikolić G S, Cakić M, et al. FTIR spectroscopic characterization of Cu (II) coordination compounds with exopolysaccharide pullulan and its derivatives [J]. *J Mol Struct*, 2009, 924: 264-273.
- [27] López-Legarda X, Rostro-Alanis M, Parra-Saldivar R, et al. Submerged cultivation, characterization and *in vitro* antitumor activity of polysaccharides from *Schizophyllum radiatum* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 186: 919-932.
- [28] Yang X, Zhou S W, Li H, et al. Structural characterization of *Alpiniae oxyphyllae* Fructus polysaccharide 2 and its activation effects on RAW264.7 macrophages [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 97: 107708.
- [29] Zhang W J, Jin W H, Duan D L, et al. Structural analysis and anti-complement activity of polysaccharides extracted from *Grateloupea livida* (Harv.) Yamada [J]. *J Oceanol Limnol*, 2019, 37(3): 806-814.
- [30] Meng Y, Lyu F Z, Xu X J, et al. Recent advances in chain conformation and bioactivities of triple-helix polysaccharides [J]. *Biomacromolecules*, 2020, 21(5): 1653-1677.
- [31] 宰清勇, 陈华国, 谢文, 等. 不同提取方法对宁夏枸杞多糖化学组成及生物活性的影响研究 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48(1): 60-70.
- [32] Nie C, Zhu P L, Ma S P, et al. Purification, characterization and immunomodulatory activity of polysaccharides from stem lettuce [J]. *Carbohydr Polym*, 2018, 188: 236-242.
- [33] Jeong H K, Lee D, Kim H P, et al. Structure analysis and antioxidant activities of an amylopectin-type polysaccharide isolated from dried fruits of *Terminalia chebula* [J]. *Carbohydr Polym*, 2019, 211: 100-108.
- [34] Qian J Y, Chen W, Zhang W M, et al. Adulteration

- identification of some fungal polysaccharides with SEM, XRD, IR and optical rotation: A primary approach [J]. *Carbohydr Polym*, 2009, 78(3): 620-625.
- [35] Li T T, Wang Z B, Li Y, et al. The mechanisms of traditional Chinese medicine underlying the prevention and treatment of atherosclerosis [J]. *Chin J Nat Med*, 2019, 17(6): 401-412.
- [36] Zhou B F, Jiang J M, Huo Y, et al. Extraction, purification and antioxidant activity of *Chlorella* polysaccharide [J]. *Algal Res*, 2025, 89: 104077.
- [37] 王文丽, 张金玲, 魏亚宁, 等. 天然多糖提取、纯化及生物活性研究进展 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(22): 470-480.
- [38] Song X F, Ren T, Zheng Z, et al. Anti-tumor and immunomodulatory activities induced by an alkali-extracted polysaccharide BCAP-1 from *Bupleurum chinense* via NF-κB signaling pathway [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 95: 357-362.
- [39] Wu D T, He Y, Yuan Q, et al. Effects of molecular weight and degree of branching on microbial fermentation characteristics of okra pectic-polysaccharide and its selective impact on gut microbial composition [J]. *Food Hydrocoll*, 2022, 132: 107897.
- [40] Tu X Y, Wang Y Y, Liu J W, et al. Determination of the composition and monosaccharide content of *Atractylodes* polysaccharides using pre-column derivatization and a quantitative analysis of multicomponents by a single marker method [J]. *J Chromatogr Open*, 2025, 7: 100224.
- [41] Heo J H, Je J G, Sim J H, et al. Quantitative analysis of fucose in fucoidans from *Sargassum* spp. in Jeju Island, South Korea using 3-methyl-1-phenyl-5-pyrazolone derivatization and RP-HPLC-UV method [J]. *Algal Res*, 2024, 79: 103441.
- [42] Zhong R F, Liu C J, Hao K X, et al. Polysaccharides from *Flos Sophorae Immaturus* ameliorates insulin resistance in IR-HepG2 cells by co-regulating signaling pathways of AMPK and IRS-1/PI3K/AKT [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 280: 136088.
- [43] 赵小亮, 王宝忠, 康兴兴, 等. 藏柴胡多糖提取工艺优化、结构表征及其药理活性研究 [J]. 中成药, 2024, 46(6): 1985-1990.
- [44] Wang X S, Zhao Y, Wu Y Y, et al. Size, surface charge and flexibility of vinegar-baked *Radix Bupleuri* polysaccharide affecting the immune response [J]. *Arab J Chem*, 2022, 15(8): 104008.
- [45] Sun L W, Feng K, Jiang R, et al. Water-soluble polysaccharide from *Bupleurum chinense* DC: Isolation, structural features and antioxidant activity [J]. *Carbohydr Polym*, 2010, 79(1): 180-183.
- [46] Xu M R, Sun S Y, Ge J H, et al. *Bupleurum chinense* polysaccharide improves LPS-induced senescence of RAW264.7 cells by regulating the NF-κB signaling pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 7060812.
- [47] Tong H B, Jiang G Q, Qi D K, et al. *Bupleurum chinense* polysaccharide inhibit adhesion of human melanoma cells via blocking β1 integrin function [J]. *Carbohydr Polym*, 2017, 156: 244-252.
- [48] Liu Z Z, Weng H B, Zhang L J, et al. *Bupleurum* polysaccharides ameliorated renal injury in diabetic mice associated with suppression of HMGB1-TLR4 signaling [J]. *Chin J Nat Med*, 2019, 17(9): 641-649.
- [49] Matsumoto T, Sun X B, Hanawa T, et al. Effect of the antiulcer polysaccharide fraction from *Bupleurum falcatum* L. on the healing of gastric ulcer induced by acetic acid in rats [J]. *Phytother Res*, 2002, 16(1): 91-93.
- [50] Kandra L. α-Amylases of medical and industrial importance [J]. *J Mol Struct Theochem*, 2003, 666: 487-498.
- [51] Wu J J, Shi S S, Wang H J, et al. Mechanisms underlying the effect of polysaccharides in the treatment of type 2 diabetes: A review [J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 144: 474-494.
- [52] Kim K Y, Nguyen T H, Kurihara H, et al. Alpha-glucosidase inhibitory activity of bromophenol purified from the red Alga *Polyopha lancifolia* [J]. *J Food Sci*, 2010, 75(5): H145-H150.
- [53] Nolan C J, Ruderman N B, Kahn S E, et al. Insulin resistance as a physiological defense against metabolic stress: Implications for the management of subsets of type 2 diabetes [J]. *Diabetes*, 2015, 64(3): 673-686.
- [54] Ma X L, Zhou F C, Chen Y Y, et al. A polysaccharide from *Grifola frondosa* relieves insulin resistance of HepG2 cell by Akt-GSK-3 pathway [J]. *Glycoconj J*, 2014, 31(5): 355-363.
- [55] Zhu J, Liu W, Yu J P, et al. Characterization and hypoglycemic effect of a polysaccharide extracted from the fruit of *Lycium barbarum* L [J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 98(1): 8-16.
- [56] Dai Y M, He Y J, Ma Y, et al. Purification, structural analysis, and hypoglycemic activity of *Auricularia auricula-judae* polysaccharides extracted with natural deep eutectic solvents [J]. *J Funct Foods*, 2024, 122: 106524.
- [57] Wang M T, Guo W W, Lv J M, et al. Interaction mechanisms between α-glucosidase and procyanidin

- dimers with different galloyl moiety: Multi-spectral analysis and molecular dynamics simulation [J]. *Bioorg Chem*, 2025, 160: 108476.
- [58] Cao C L, Li C, Chen Q, et al. Physicochemical characterization, potential antioxidant and hypoglycemic activity of polysaccharide from *Sargassum pallidum* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 139: 1009-1017.
- [59] Ren B B, Chen C, Li C, et al. Optimization of microwave-assisted extraction of *Sargassum thunbergii* polysaccharides and its antioxidant and hypoglycemic activities [J]. *Carbohydr Polym*, 2017, 173: 192-201.
- [60] Pan L Y, Weng H B, Li H, et al. Therapeutic effects of *Bupleurum* polysaccharides in streptozotocin induced diabetic mice [J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0133212.
- [61] Feng S M, Luan D, Ning K, et al. Ultrafiltration isolation, hypoglycemic activity analysis and structural characterization of polysaccharides from *Brasenia schreberi* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 135: 141-151.
- [62] Wang Z C, Zheng Y, Lai Z R, et al. Effect of monosaccharide composition and proportion on the bioactivity of polysaccharides: A review [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 254(Pt 2): 127955.
- [63] Li R S, Tao A E, Yang R M, et al. Structural characterization, hypoglycemic effects and antidiabetic mechanism of a novel polysaccharides from *Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 131: 110687.
- [64] Lv T T, Liu X, Tao J, et al. Ultrasound-assisted enzymatic extraction of polysaccharides from *Paulownia* flowers: Process optimization, structural characterization, antioxidant and hypoglycemic activities [J]. *Microchem J*, 2024, 199: 109940.
- [65] Md Yusoff M H, Shafie M H. A review of *in vitro* antioxidant and antidiabetic polysaccharides: Extraction methods, physicochemical and structure-activity relationships [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 282(Pt 4): 137143.
- [66] Yang Y M, Qiu Z C, Li L Y, et al. Structural characterization and antioxidant activities of one neutral polysaccharide and three acid polysaccharides from *Ziziphus jujuba* cv. *hamidazao*: A comparison [J]. *Carbohydr Polym*, 2021, 261: 117879.
- [67] 李红钰. 不同产地太子参多糖特征分析及其对糖尿病模型鼠创面修复能力的评价 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2024.
- [68] Liu Y T, Chen D, You Y X, et al. Structural characterization and antidiabetic activity of a glucopyranose-rich heteropolysaccharide from *Catathelasma ventricosum* [J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 149: 399-407.
- [69] Chen J C, Li L, Zhou X, et al. Structural characterization and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of polysaccharides extracted from Chinese traditional medicine Huidouba [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 117: 815-819.
- [70] Liu W, Lu W S, Chai Y, et al. Preliminary structural characterization and hypoglycemic effects of an acidic polysaccharide SERP1 from the residue of *Sarcandra glabra* [J]. *Carbohydr Polym*, 2017, 176: 140-151.

[责任编辑 王文倩]