

逍遥散多糖主要富集部位的抗炎活性、结构表征及体内吸收分布特征

虎 静^{1,2}, 关永霞^{3#}, 曾 宇², 李文超², 姚志红², 何亮亮^{2*}, 邸 欣^{1*}

1. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016

2. 暨南大学药学院中药与天然药物研究所, 广东 广州 510632

3. 经方与现代中药融合创新全国重点实验室, 山东 临沂 276000

摘要: 目的 采用分级醇沉技术制备逍遥散多糖不同醇沉部位, 明确其主要富集部位的抗炎活性、结构特征及体内吸收与分布行为。方法 基于水提醇沉工艺制备逍遥散多糖不同醇沉部位(40%、60%、80%), 比较各部位得率以筛选多糖主要富集部位; 基于“炎症-抑郁”相关性, 建立脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的小胶质细胞炎症模型, 通过检测肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)及诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)等炎症相关指标评价其抗炎活性; 采用紫外-可见吸收光谱、傅里叶变换红外光谱与核磁共振波谱等技术对目标多糖的组成与结构特征进行表征; 通过荧光标记构建荧光示踪多糖, 在小鼠体内开展药动学研究, 系统评估其体内暴露水平与组织分布特征。结果 不同醇沉比例获得的多糖部位在得率上存在明显差异, 其中60%醇沉部位(XYSP-60)为多糖主要富集部位, 其提取率为37.50%; 在LPS诱导的小胶质细胞炎症模型中, XYSP-60可显著下调TNF- α 、IL-1 β 、IL-6及iNOS的表达水平, 表现出明确的抗炎活性; 结构表征结果显示, 该多糖主要由半乳糖醛酸、葡萄糖和果糖构成, 整体结构特征较为稳定; 药动学结果表明, XYSP-60在肠道中暴露水平较高, 而进入体循环的比例相对较低。结论 逍遥散多糖60%醇沉为主要富集部位, 具有明确的抗炎作用和稳定的结构特征, 其在体内过程以肠道高暴露、系统吸收有限为主要特征, 可能构成逍遥散发挥抗炎作用的潜在物质基础之一。

关键词: 逍遥散; 多糖; 物质基础; 荧光标记; BV-2细胞

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)11-4112-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.11.004

Anti-inflammatory activity, structural characterization, and *in vivo* absorption and distribution profile of major polysaccharide-enriched fractions from Xiaoyao San

HU Jing^{1,2}, GUAN Yongxia³, ZENG Yu², LI Wenchao², YAO Zhihong², HE Liangliang², DI Xin¹

1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

2. Institute of Traditional Chinese Medicine & Natural Products, College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China

3. State Key Laboratory of Integration and Innovation of Classic Formula and Modern Chinese Medicine, Linyi 276000, China

Abstract: Objective To prepare different polysaccharide fractions of Xiaoyao San (逍遥散, XYS) by graded ethanol precipitation and to clarify the anti-inflammatory activity, structural characteristics, and *in vivo* absorption and distribution behavior of the major enriched fraction. **Methods** Different polysaccharide fractions of XYS (40%, 60%, and 80% ethanol-precipitated fractions) were obtained using a water extraction-ethanol precipitation procedure, and the primary enriched fraction was screened based on yield comparison. Based on the inflammation-depression correlation, an LPS-induced microglial inflammation model was established, and

收稿日期: 2026-02-16

基金项目: 科技部国家重点研发计划(2023YFE0209500); 国家自然科学基金面上项目(82474050); 广东省自然科学基金面上项目(2024A1515011699)

作者简介: 虎 静, 硕士研究生。E-mail: hujing20221225@163.com

#共同第一作者: 关永霞, 高级工程师。E-mail: 13581069215@163.com

*通信作者: 何亮亮, 博士, 副教授, 从事中药及复方药效物质基础研究。E-mail: heliangliang5878@163.com

邸 欣, 博士, 教授, 从事药物分析研究。E-mail: dixin63@hotmail.com

anti-inflammatory activity was evaluated by measuring inflammatory markers including TNF- α , IL-1 β , IL-6, and iNOS. The composition and structural features of the target polysaccharide were characterized using UV-Vis spectroscopy, FT-IR, and NMR analyses. Fluorescently labeled polysaccharides were further prepared for *in vivo* pharmacokinetic studies in mice to systematically assess exposure levels and tissue distribution characteristics. **Results** Significant differences in yield were observed among polysaccharide fractions obtained at different ethanol precipitation ratios. The 60% ethanol fraction (XYSP-60) was identified as the major enriched fraction, with an extraction recovery of 37.5%. In the LPS-induced microglial inflammation model, XYSP-60 significantly downregulated the expression levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6, and iNOS, demonstrating clear anti-inflammatory activity. Structural characterization indicated that the polysaccharide mainly consisted of galacturonic acid, glucose, and fructose, with relatively stable structural features. Pharmacokinetic results showed that XYSP-60 exhibited high exposure in the intestine but limited entry into systemic circulation. **Conclusion** The 60% ethanol-precipitated fraction represents the principal enriched polysaccharide fraction of XYS, with stable structural characteristics and definite anti-inflammatory activity. Its *in vivo* behavior is characterized by high intestinal exposure and limited systemic absorption, suggesting that this fraction may serve as one of the key material bases underlying the anti-inflammatory effects of XYS.

Key words: Xiaoyao San; polysaccharides; material basis; fluorescent labeling; BV-2 cells

逍遥散出自宋代《太平惠民和剂局方》^[1-2],由柴胡、白术、白芍、生姜、甘草、薄荷、茯苓和当归 8 味中药组成,是具有疏肝解郁、健脾养血功效的经典中医方剂^[3]。现代药理研究表明,逍遥散具有抗抑郁、免疫调节及改善胃肠功能等多重作用^[4],临床上广泛用于治疗肝郁脾虚相关的情绪障碍、消化系统疾病及月经失调等慢性病症^[5]。值得注意的是,基于随机对照双盲临床研究,逍遥散抗抑郁疗效已获得充分证据支持,被列入《抑郁症中西医结合诊疗专家共识》及《国际中医临床实践指南(抑郁症)》,显示出重要的临床应用价值。

近年来,随着抑郁症发病机制研究的不断深入,神经炎症假说、肠-脑轴假说等理论体系逐步建立^[6]。在此背景下,逍遥散抗抑郁作用的机制研究亦持续推进。现有研究表明,逍遥散不仅能够调节中枢神经递质功能,还可通过重塑肠道菌群结构及调控炎症因子释放,从而影响肠-脑轴信号传递,发挥抗抑郁效应^[7]。然而,相比机制研究,其药效物质基础的系统阐释仍显不足。多糖作为中药重要的水溶性活性成分,已被证实在调节肠道菌群结构、维持肠黏膜屏障功能及抑制炎症反应等方面发挥关键作用,并可能间接影响情绪与神经功能^[8]。鉴于水溶性多糖在中药煎剂中通常占有较高比例,而经方逍遥散亦以水煎剂形式临床应用,其潜在药效物质基础及作用价值值得重点关注。但目前针对逍遥散多糖的生物活性、组成特征及其体内吸收与分布规律仍缺乏系统研究。

基于此,本研究采用分级醇沉策略对逍遥散水溶性多糖进行富集和结构表征,并基于“炎症-抑郁”

密切的相关性,通过脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的小鼠小胶质细胞(BV-2)炎症模型中评价其的作用,以探讨其潜在的抗神经炎症活性。同时,通过构建荧光标记多糖并开展体内追踪实验,系统分析其组织分布及体内暴露特征。通过整合多糖的生物活性、结构特征与体内行为,本研究为深化逍遥散抗抑郁作用的药效物质基础研究提供了新视角,也为其通过肠-脑轴发挥作用的潜在机制提供实验依据。

1 材料与试剂

1.1 仪器

BSA124S 电子分析天平(德国赛多利斯), IKA RV10 数显型旋转蒸发仪(上海泰坦科技股份有限公司), cence 高速冷冻离心机(CHT210R, 深圳柏莱科技有限公司), FreeZone[®]冷冻干燥机(美国 Labconco 公司), Synergy H4 多功能酶标仪(美国 BioTek 公司), UV-3600 plus 紫外分光光度计(日本 Jasco 公司), Nicolet iS50+iN10 傅里叶变换红外光谱仪(赛默飞世尔科技有限公司), Bruker AvanceIII 500 NMR 波谱仪(瑞士布鲁克), ICS5000 型离子色谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司), TGA/DSC 3+ 热重及同步热分析仪(瑞士 Mettler Toledo), IVIS Lumina Series III 小动物活体光学成像系统(PerkinElmer)。

1.2 材料与试剂

甘草(产地:甘肃,批号 220101)、当归(产地:甘肃,批号 451122011)、茯苓(产地:云南,批号 450722006)、白芍(产地:安徽,批号 59517003)、白术(产地:浙江,批号 457021007)、

柴胡(产地:甘肃,批号 459722011)、薄荷(产地:江苏,批号 452422003)均购自鲁南制药集团股份有限公司,生姜购自广州(产地:山东,批号 202505096)。上述药材经暨南大学张英教授鉴定分别为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.的干燥根茎、伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根、多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核、毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall.的干燥根、菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz.的干燥根茎、伞形科植物北柴胡 *Bupleurum chinense* DC.的干燥根、唇形科植物薄荷 *Mentha haplocalyx* Briq.的干燥全草、姜科植物姜 *Zingiber officinale* Rosc.的新鲜根茎。透析袋(截留相对分子质量 3000)购自上海源叶生物有限公司。分析级试剂,包括乙酸铵(批号 10001228,购自国药化学试剂有限公司);岩藻糖(fucose, Fuc, 批号 X29D7Y27768)、鼠李糖(rhamnose, Rha, 批号 H10S9Z69863)、阿拉伯糖(arabinose, Ara, 批号 S15A10G85850)、半乳糖(galactose, Gal, 批号 E1927035)、葡萄糖(glucose, Glc, 批号 Q18F10N80946)、木糖(xylose, Xyl, 批号 A22S6X3606)、甘露糖(mannose, Man, 批号 C17D9H77586)、果糖(fructose, Fru, 批号 J01J10R89818)、核糖(ribose, Rib, 批号 H26F10Z81556)、半乳糖醛酸(galacturonic acid, GalA, 批号 K02A9B66077)、葡萄糖醛酸(glucuronic acid, GlcA, 批号 K14M10S82777)、氨基半乳糖盐酸盐 [*D*-(+)-galactosamine hydrochloride, GalN, 批号 B01J8S37079]、盐酸氨基葡萄糖(*D*-glucosamine hydrochloride, GlcN, 批号 A22S6X3606)、古罗糖醛酸(guluronic acid, GulA, 批号 S200115AG1)、甘露糖醛酸(mannuronic acid, ManA, 批号 S200108AM1)均购自博睿糖生物技术有限公司(中国);三氟乙酸(trifluoroacetic acid, TFA, 批号 A0356762)购自上海麦克林生化有限公司。本研究过程中使用的其他试剂均为分析级。

BV-2 细胞由艾迪基因公司提供,培养于含 5% 胎牛血清(FBS, Gibco 公司)、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素(Gibco 公司)的 DMEM 培养基中,并于 37 °C、5% CO₂ 的湿润培养箱内进行培养。

1.3 实验动物

健康发育的雄性 C57BL/6 小鼠(6~8 周龄,体质量 20~22 g,购自北京维通利华实验动物科技有

限公司,合格证号 44826500010876)在室温(23±2) °C 和相对湿度(35±5)% 的环境中饲养 7 d 后,随机分组进行实验,所有动物实验方案均按照《暨南大学实验动物护理与使用指南》,伦理申请号为 20240310-5。

2 方法

2.1 逍遥散粗多糖的提取

称取柴胡、白芍、当归、白术、茯苓、生姜各 40.0 g,炙甘草 32.0 g,薄荷 8.0 g。生姜单独煎煮 2 次,每次 20 min,浓缩备用。其余药材粉碎混匀,以 1:10 加入 95% 乙醇,回流脱脂 3 次(每次 2 h),滤取残渣。残渣按 1:10 加水,加入生姜浓缩液,100 °C 煎煮 3 次(每次 2 h),合并滤液。滤液减压浓缩至 1/4 体积,加无水乙醇使体积分数达 80%,4 °C 静置 12 h。抽滤,沉淀复溶,3500 r/min 离心 5 min,取上清。加 1/3 体积的 Sevag 试剂(氯仿-正丁醇 4:1),180 r/min 振荡 25 min 后离心,取上清得多糖溶液,冷冻干燥后即得逍遥散粗多糖部位^[9]。

2.2 逍遥散分级醇沉多糖的制备

称取逍遥散粗多糖 8 g,溶于 320 mL 蒸馏水中,缓慢加入 95% 乙醇使终体积分数为 40%,静置过夜,抽滤。收集沉淀,复溶并冻干,得 40% 醇沉多糖部位(XYSP-40)。保留上清液,继续加乙醇调至体积分数 60%,同法获得 60% 醇沉多糖部位(XYSP-60)。上清液再加乙醇至体积分数 80%,同法得 80% 醇沉多糖部位(XYSP-80)。各组分冻干后按公式计算提取率。

$$\text{提取率} = m/M$$

m 是冷冻干燥后冻干粉的质量; M 是总药材的质量。

2.3 抗炎活性评价

BV-2 细胞培养于 DMEM 完全培养基(含 10% 胎牛血清及 1% 青链霉素),置于 37 °C、5% CO₂ 恒温箱中孵育,传代至对数生长期,备用。

取对数生长期的 BV-2 细胞,以 1×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔板中,培养箱中培养至贴壁。弃原培养基,实验组分别加入含不同质量浓度(0.25~40.00 μg/mL)的多糖新鲜完全培养基,对照组加入不含药物的培养基,每孔 100 μL,并设置不含细胞的培养基孔作为空白组。每组 5 个复孔。继续培养 24 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,于培养箱内避光孵育 2 h。使用酶标仪在 450 nm 波长下测定各孔的吸光度(A)值,计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

将 BV-2 细胞以 5×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板中, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养至贴壁。待细胞贴壁后, 根据实验设计随机分为对照组 (加入等体积培养基)、模型组 (LPS 1 μg/mL)、不同浓度 (0.25、0.50、1.00 μg/mL) 的多糖组, 置培养箱

中孵育 24 h 后收集各组细胞的上清液, 随后严格按照一氧化氮 (NO) 检测试剂盒 (Griess 法) 进行 NO 释放量检测。根据 NO 检测结果, 选定合适多糖浓度进行 qPCR 检测。引物设计及合成委托广州擎科生物科技有限公司合成, 引物信息如表 1 所示。

表 1 RT-qPCR 的引物序列

Table 1 Primer sequences for RT-qPCR

引物名称	正向 (5'→3')	反向 (5'→3')
<i>iNOS</i>	CAGGGAGAACAGTACATGAACAC	TTGGATACACTGCTACAGGGA
<i>IL-6</i>	AGACAAAGCCAGAGTCCTCAGAGA	GGAGAGCATTGGAAATGGGGTAGG
<i>TNF-α</i>	GGTGATCGGTCCCAAAGGGATGA	GTGGTTTGCTACGACGTGGGCT
<i>IL-1β</i>	GCAACTGTTCTGAACTCAACT	ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT
<i>GAPDH</i>	CACCAGCCTTAGTGCAGACAG	GAGGACCACGGTTTCCGTTG

2.4 化学结构表征

2.4.1 糖含量测定

(1) 苯酚硫酸法测定中性糖含量^[10]: 精密吸取 20、40、60、80、100、120 μg/mL 的葡萄糖标准品及待测样品溶液各 40 μL, 依次加入 5% 苯酚 40 μL 与浓硫酸 200 μL, 反应 25 min 后, 于 490 nm 波长下测定吸光度 (A) 值并绘制标准曲线, 计算中性糖含量。

(2) 二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 法测定蛋白质含量^[11]: 精密吸取 0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mg/mL 系列质量浓度的蛋白标准品及待测样品溶液各 10 μL, 加入 BCA 工作液 200 μL, 孵育 25 min 后, 于 562 nm 波长下测定 A 值并绘制标准曲线, 计算多糖的蛋白质含量。

(3) 间羟基联苯法测定糖醛酸含量: 精密吸取 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL 的半乳糖醛酸标准品及待测样品溶液各 250 μL (不足 1 mL 者以水补足), 加入四硼酸钠-硫酸溶液 1.5 mL, 沸水浴加热 5 min, 冷却后加入间羟基联苯溶液 250 μL, 静置 5 min, 于 525 nm 波长下测定 A 值并绘制标准曲线, 计算多糖的糖醛酸含量。

2.4.2 紫外-可见吸收光谱分析 (ultraviolet-visible spectroscopy, UV-Vis) 称取 1 mg 多糖样品, 充分溶解于 2 mL 离心管中, 通过紫外-分光光度计在 800~200 nm 进行全扫描分析。

2.4.3 傅里叶变换红外光谱分析 (fourier transform infrared, FT-IR) 称取 1.0 mg 多糖样品, 与 100.0 mg 干燥溴化钾粉末充分研磨混合后压片, 在 4000~400 cm⁻¹ 进行红外光谱扫描。

2.4.4 单糖组成分析 采用离子色谱法测定单糖

组成^[12]。使用 Dionex ICS-5000+ 系统, 配备 Carbopac™ PA20 (150 mm×2.0 mm) 阴离子交换柱, 电化学检测器, 采用梯度洗脱法。以 15 种常见单糖 (Fuc、Rha、Ara、Gal、Glc、Xyl、Man、Fru、Rib、GalA、GlcA、GalN、GlcN、GulA、ManA) 作为分析标准品。精密称量 5 mg 样品置于安瓿瓶中, 加入 3 mol/L TFA 2 mL, 分别在 120 °C 水解 3 h 和 80 °C 水解 2 h 进行。准确吸取各酸水解溶液转移至 EP 管中氮吹吹干, 加入 5 mL 水涡旋混匀, 吸取 50 μL 加入 950 μL 去离子水, 12000 r/min 离心 5 min, 分别取各自上清进样分析^[13-14]。

2.4.5 热稳定分析 采用热重分析 (thermogravimetric analysis, TGA) ^[15] 方法, 使用 TGA/DSC 3+ 热重分析仪, 精密称取 5 mg 的多糖样品, 设定温度范围 35~600 °C, 升温速率 10 °C/min, 气流保持在 40 mL/min。

2.4.6 NMR 分析 将 25 mg 多糖样品溶解于 1 mL 氘代水 (D₂O) 中, 使用波谱仪对多糖进行 ¹H-和 ¹³C-NMR 分析, ¹H-NMR 谱图在 500.13 MHz 下采集, ¹³C-NMR 谱图在 125.75 MHz 下采集, 实验温度恒定为 25 °C。

2.4.7 扫描电子显微镜分析 使用扫描电子显微镜分析多糖样品的分子形态结构^[16]。将多糖样品于真空条件下喷上薄金层, 并通过 EVO MA 15 扫描电子显微镜 (英国蔡司公司) 拍摄并放大数倍图像进行分析。

2.5 异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 对多糖的标记与结构表征

称取 400 mg 多糖样品, 溶于 150 mL 0.2 mol/L

磷酸盐缓冲液。依次加入 400 mg 酪胺 (TYR) 和 150 mg 氰基硼氢化钠, 在 37 °C 的油浴锅中搅拌反应 96 h 后透析、冻干, 再溶于少量超纯水中, 用 0.5 mol/L 碳酸氢钠溶液调节溶液 pH 值至 8.5, 加入 25 mg FITC 在 37 °C 黑暗条件下孵育 24 h。反应结束后, 加入 4 倍体积的无水乙醇醇沉, 分离沉淀并透析, 冷冻干燥即得 FITC 标记多糖^[17-18]。

2.6 药动学研究

对雄性 C57BL/6 小鼠在实验前禁食 1 d, 给予 FITC 标记多糖, 并在 0、1、2、4、8、12、24 h 用 IVIS Lumina III 成像系统 (PerkinElmer) 采集多糖在小鼠体内分布图像。在相同时间点 ($n=3$) 分别采集离体主要组织图像^[19]和在相同时间 ($n=6$) 采集小鼠血浆, 对其药动学特征进行实时分析。

2.6.1 血浆中 F-XYSP-60 的分析方法构建 为建立小鼠血浆中 F-XYSP-60 的定量方法, 采用 PBS 配制 1 mg/mL F-XYSP-60 储备液并逐级稀释获得 0.25~50 $\mu\text{g/mL}$ 的标准工作液。将标准品加入小鼠空白血浆中, 经涡旋混匀和离心处理后测定 $E_x=495\text{ nm}$ 和 $E_m=516\text{ nm}$ 的荧光强度, 绘制标准曲线。结果显示, F-XYSP-60 在 0.5~50 $\mu\text{g/mL}$ 线性良好 ($Y=57.16X+90.74$, $R^2=0.9961$), 定量下限为 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 。在低、中、高 3 个质量浓度 (0.5、5.0、25.0 $\mu\text{g/mL}$) 下的方法回收率为 96.4%~112.9%, $RSD < 12\%$ 。日内与日间精密度分别为 4.6%~16.8% 与 4.4%~10.5%, 均符合生物样本定量要求。稳定性考察表明, F-XYSP-60 经 3 次冻融循环及 4 °C 放置 24 h 后仍保持良好稳定性 ($RSD < 18\%$, RE 在 $\pm 15\%$ 范围内)。综上, 该方法具备良好的线性、精密度、准确度与稳定性, 可用于 F-XYSP-60 在小鼠体内样本中的可靠定量。

2.6.2 小鼠体内药动学研究 健康雄性 C57BL/6 小鼠 36 只, 随机分为 6 组, 每组 6 只, ig (剂量按生药材计为 147 mg/kg) 给药后, 分别在 0、1、2、4、8、12、24 h 眼眶取血约 0.5 mL, 置于肝素钠浸润的离心管中, 收集所得血样在 4 °C 以 14 000 r/min 离心 10 min 获得血浆样本, 并将其保存于 -80 °C 冰箱中直至分析。按构建的分析方法测试荧光强度, 根据 F-XYSP-60 标准曲线方程, 计算不同时间段小鼠血浆中的 F-XYSP-60 浓度。

2.7 统计分析

使用 GraphPad Prism 8 进行实验数据的统计分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间的差异通过单因素方差

分析 (One-Way ANOVA) 进行比较, Turkey 检验进行多重比较。

3 结果与分析

3.1 逍遥散各部位多糖的提取率

逍遥散复方经水提醇沉得到逍遥散粗多糖, 其收率为总药材的 3.6%。粗多糖经分级醇沉处理, 分别得到 XYSP-40、XYSP-60 和 XYSP-80, 三者提取率分别为 12.75%、37.50% 和 8.25%。鉴于 XYSP-60 的高提取率, 后续研究重点关注 XYSP-60 的生物活性、化学特征及体内吸收与分布特征。

3.2 XYSP-60 对 LPS 诱导的 BV-2 细胞炎症因子表达的影响

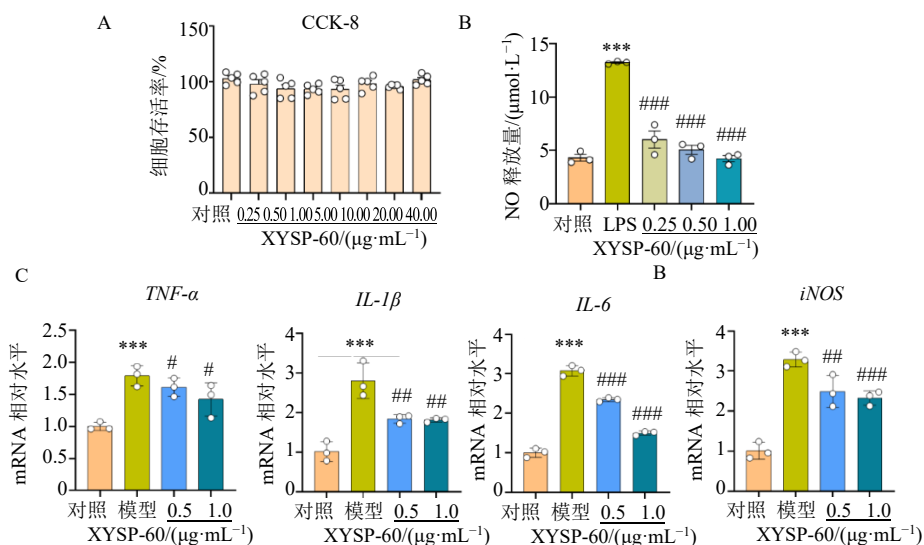
BV-2 细胞是中枢神经系统的免疫细胞, 能在神经损伤或炎症反应中发挥重要作用^[20]。LPS 是一种常用的促炎刺激物, 能够激活 BV-2 细胞, 诱导分泌多种炎症因子, 这些因子的过度表达与神经炎症和多种神经退行性疾病密切相关。因此, 调控 BV-2 细胞的炎症反应被认为是防治神经炎症的关键策略^[21]。

如图 1 所示, 基于 CCK8 实验, 发现 XYSP-60 在 0.25~40.00 $\mu\text{g/mL}$ 无细胞毒性。因此, 进一步采用 NO 评价多糖的抗炎活性, 发现多糖质量浓度在 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 即可显著回调 NO, 但为保证后续效应的稳定性, 并兼顾低、高剂量梯度设置, 最终选择 0.50、1.00 $\mu\text{g/mL}$ 作为后续实验剂量。LPS 刺激显著提升了炎症因子 (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、iNOS) 的表达, 说明 LPS 诱导的细胞炎症模型构建成功。而 XYSP-60 能有效下调这些炎症因子的表达, 证实可缓解 LPS 诱导的炎症反应, 提示 XYSP-60 具有潜在的神经保护作用。

3.3 XYSP-60 初级结构表征

分别采用苯酚-硫酸法、间羟基二苯基法和 BCA 法测定 XYSP-60 的中性糖、糖醛酸和蛋白质的含量。结果表明, XYSP-60 含有 (48.78 \pm 2.65)% 的中性糖、(12.62 \pm 6.42)% 的糖醛酸和 (8.65 \pm 1.55)% 的蛋白质。

XYSP-60 的 UV-Vis 如图 2-A 所示, 在 260、280 nm 处的吸收较小, 说明其不含或含少量核酸和蛋白质^[22]。XYSP-60 的 FI-IR 如图 2-B 所示, 在 3 416.28 cm^{-1} 处出现了 O-H 的伸缩振动峰^[23], 2 933.68 cm^{-1} 出现了 C-H 伸缩振动弱的吸收峰为糖的特征吸收峰^[24]。在 1 714.89 cm^{-1} 出现的峰归属于羧基 C=O 伸缩振动, 1 026.91 cm^{-1} 和 900~1 000 cm^{-1} 形成的吸收峰, 是糖苷键 C-O-C 伸缩振动的特征, 表明可



A-CCK-8 检测细胞活力; B-NO 释放量; C-XYSP-60 对 LPS 诱导的 BV-2 细胞的 *TNF-α*、*IL-1β*、*IL-6* 和 *iNOS* 水平的影响。与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ 。

A-cell viability assay using CCK-8; B-nitric oxide release; C-effect of XYSP-60 on levels of *TNF-α*, *IL-1β*, *IL-6* and *iNOS* in LPS-induced BV-2 cells. *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group.

图 1 XYSP-60 对 LPS 诱导 BV-2 细胞炎症反应的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of XYSP-60 on LPS-induced inflammatory responses in BV-2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

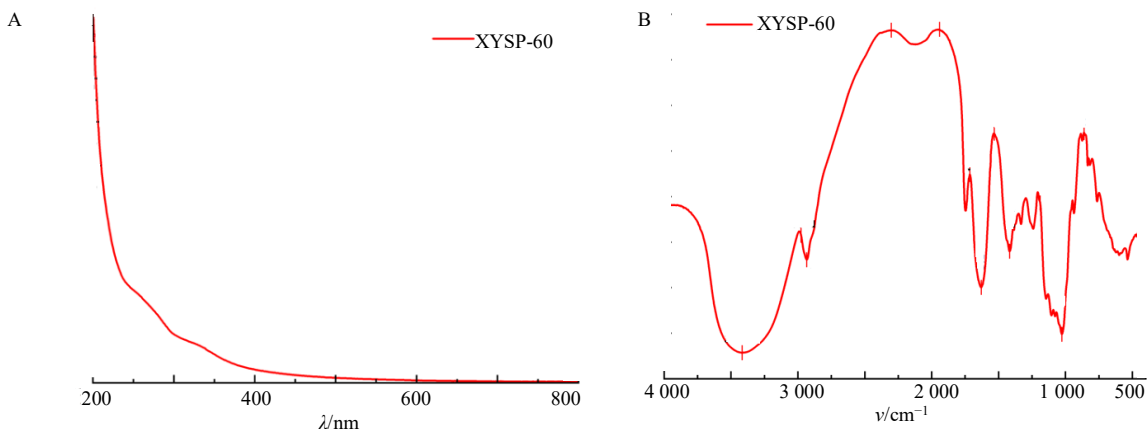


图 2 XYSP-60 紫外-可见光谱 (A) 和傅里叶变换红外光谱 (B)

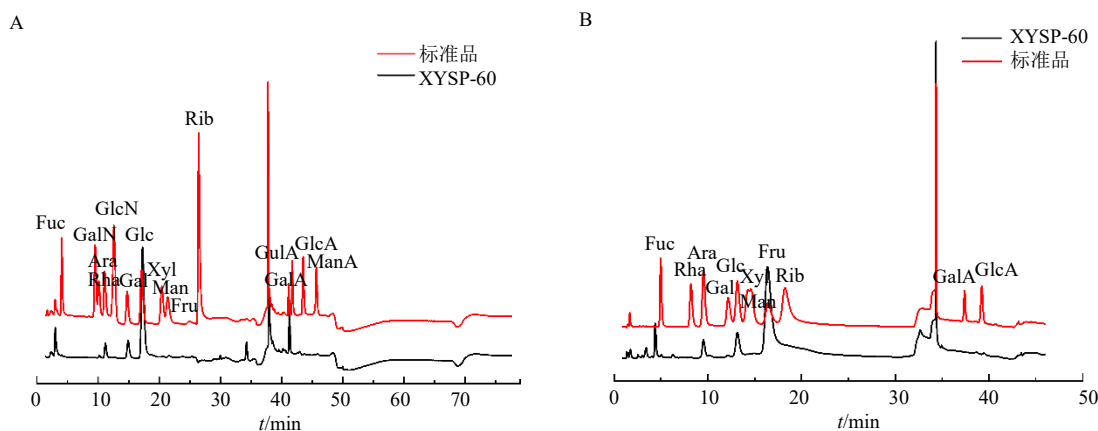
Fig. 2 UV-Vis spectrum (A) and FT-IR (B) of XYSP-60

能存在吡喃糖环,而在 861.06 cm^{-1} 的吸收峰可能与糖单元的 α 构型存在相关^[25]。

由于 XYSP 为 1 个复方多糖,因此可能存在果糖,但 Fru 在长时间高温条件下容易被破坏,其含量测定难以保证准确性;因此,本研究采用 2 种不同方法对单糖组成进行分析^[26]。120 $^{\circ}\text{C}$ 水解 3 h 测定 XYSP-60 单糖组成如图 3-A 所示,结果显示 XYSP-60 主要含有 4 种单糖,分别由阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖和半乳糖醛酸组成。80 $^{\circ}\text{C}$ 水解 2 h 测定 XYSP-60 单糖组成如图 3-B 所示,XYSP-60 含

有 4 种主要单糖,分别为阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖和果糖组成。综合来看,XYSP-60 主要由半乳糖醛酸、葡萄糖和果糖构成。

XYSP-60 的热稳定分析如图 4 所示。样品在升温过程中呈现出典型的 3 阶段失重特征。第 1 阶段发生在 50~150 $^{\circ}\text{C}$ 内,质量缓慢下降,对应 DTG 曲线中出现轻微失重速率峰,主要归因于样品中吸附水及部分结合水的挥发。第 2 阶段为主要失重阶段,出现在 200~300 $^{\circ}\text{C}$,TG 曲线出现明显下降,DTG 曲线在该区间出现显著主峰,表明多糖主链结构发



A-120 °C 下解离 3 h 后的单糖组成; B-80 °C 下解离 2 h 后的单糖组成。

A-monosaccharide composition after 3 h of dissociation at 120 °C; B-monosaccharide composition after 2 h of dissociation at 80 °C.

图 3 不同解离条件下 XYSP-60 的单糖组成分析

Fig. 3 Monosaccharide composition analysis of XYSP-60 under different hydrolysis conditions

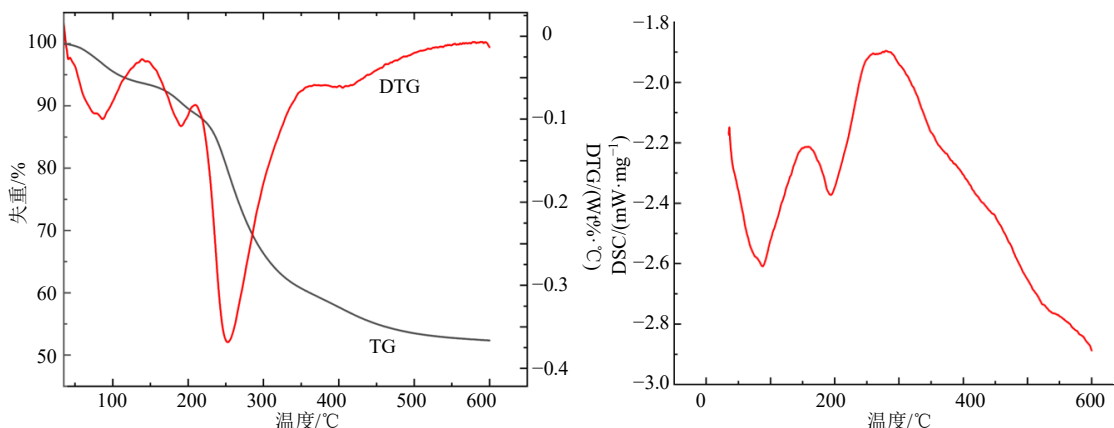


图 4 XYSP-60 的热稳定分析

Fig. 4 Thermal stability analysis of XYSP-60

生热裂解,糖苷键断裂并伴随脱水、脱羧等反应。第 3 阶段位于 350 °C 以上,质量变化趋于平缓,推测与多糖热解后形成的炭化残渣进一步分解或稳定存在有关^[27]。DSC 曲线结果与 TG-DTG 分析相一致。低温区(80~150 °C)出现吸热峰,对应样品中水分的蒸发过程;在 200~300 °C 观察到明显的热效应峰,与多糖主链热分解阶段相吻合,表明该过程为吸热反应。高温区未出现明显特征峰,提示样品在高温条件下主要发生结构重排及炭化过程。综合 TG-DTG 与 DSC 结果表明,该多糖具有一定的热稳定性,其热分解行为与天然多糖材料的典型特征相一致。

在 XYSP-60 的一维核磁共振图谱如图 5 所示,一般而言糖残基中异头氢的化学位移在 δ_H 5.0~5.3 表示存在 α -糖苷键,化学位移在 δ_H 4.3~5.0 表示存在 β -糖苷键^[28]。从 XYSP-60 的 ¹H-NMR 谱图中可

看到位于 δ_H 4.4~5.5 的氢信号,可知 XYSP-60 同时包含 α 和 β 构型的糖苷键。糖残基中异头碳的化学位移在 δ_C 97~101 表示存在 α -糖苷键,化学位移在 δ_C 103~106 表示存在 β -糖苷键^[29]。XYSP-60 的 ¹³C-NMR 谱图中,存在位于 δ_C 90~110 的信号,也进一步说明了 XYSP-60 同时包含 α 和 β 构型的糖苷键。值得注意的是,结合 DEPT-135 谱图分析,在 ¹³C-NMR 谱中 δ_C 103 附近的强信号在 DEPT-135 谱中消失,提示该处为无连氢的季碳。这一特征与酮糖(果糖)的端基碳(C2)信号相吻合,有力地佐证了 XYSP-60 中可能有果糖残基的存在。此外,DEPT-135 谱中 δ_C 60 附近的倒峰(仲碳)通常归属于己糖的 C6 或果糖的 C1/C6 伯醇碳信号。而在 ¹³C-NMR 谱图低场区 δ 170.77 处观察到的羰基碳信号,则说明多糖中存在糖醛酸结构。上述核磁波谱特征

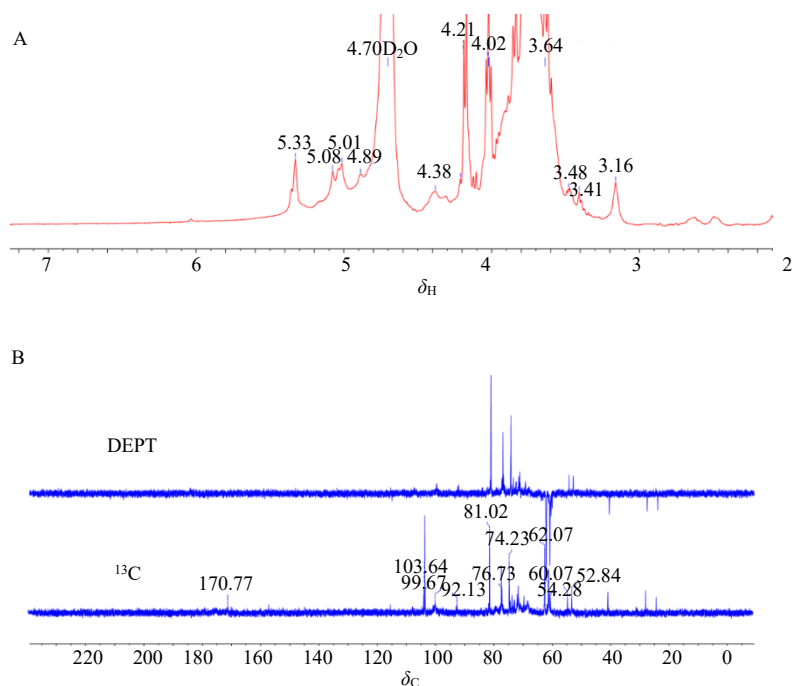


图5 XYSP-60的¹H-NMR谱(A)和¹³C-NMR及DEPT谱(B)

Fig. 5 ¹H NMR spectrum (A), ¹³C NMR and DEPT spectra (B) of XYSP-60

与单糖组成测定结果（主要由半乳糖醛酸、葡萄糖和果糖）基本一致。

扫描电镜结果见图6, XYSP-60在100和1000倍率下表现出表面粗糙, 呈现不规则片状和不规则棒状结构, 属于非晶结构的特点。表明XYSP-60中存在分子聚集和交织现象, 这形貌可能与其相对分子质量分布、电荷及提取工艺有关。

3.4 XYSP-60 荧光标记表征

如图7-A所示, F-XYSP-60在237、492 nm处出现了FITC的特征吸收峰, 表明多糖与FITC成功通过亲核取代反应结合^[30]。

XYSP-60与F-XYSP-60的红外光谱结果如图7-B所示, 标记后的多糖保持了XYSP-60的整体结

构特征, 但在1520 cm⁻¹处出现显著差异, 该吸收峰对应硫代氨基甲酸酯的N-H弯曲振动^[31], 提示FITC与多糖之间形成了共价键连接。

荧光谱分析进一步支持这一结论。FITC标准品的荧光峰位为E_x495 nm/E_m522 nm, 而F-XYSP-60的发射峰蓝移至516 nm, 如图7-C所示, 该峰位变化通常与FITC与多糖之间的共价耦联相关, 表明标记过程成功发生。此外, ¹H-NMR谱图结果显示, F-XYSP-60中出现与FITC相对应的化学位移信号如图7-D进一步证实FITC已通过共价方式成功连接至XYSP-60分子。

通过测定F-XYSP-60的荧光强度并代入标准曲线方程, 计算其FITC取代度约5%, 如图7-E所

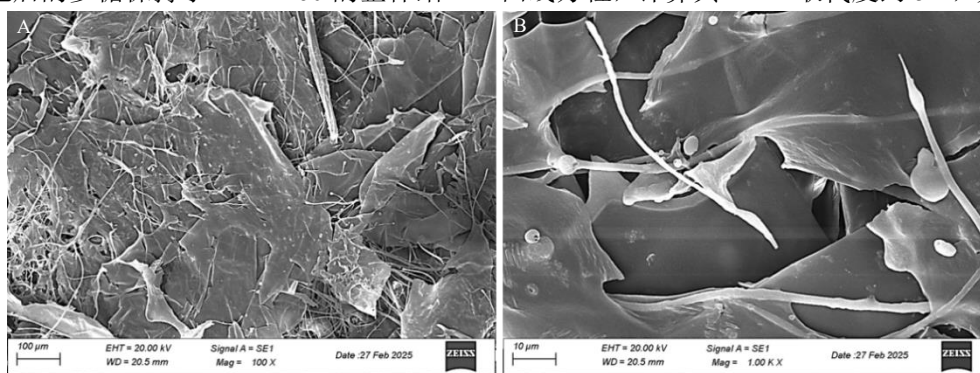
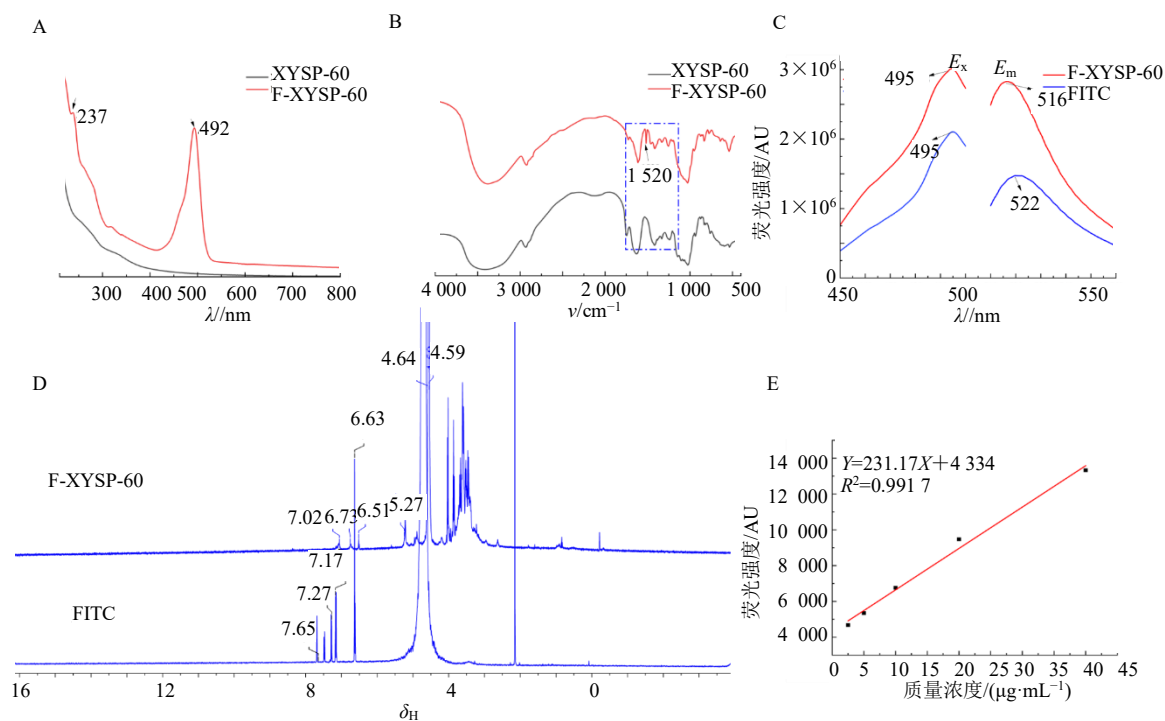


图6 XYSP-60在不同放大倍数下的SEM图像(A: ×100; B: ×1000)

Fig. 6 SEM images of XYSP-60 at different magnifications (A: ×100; B: ×1000)



A-紫外-可见光谱; B-傅里叶变换红外光谱; C-荧光光谱扫描; D-¹H-NMR 谱; E-FITC 线性回归方程。

A-UV spectrum; B-Fourier transform infrared spectrum; C-Fluorescence spectrum scan; D-¹H-NMR spectrum; E-FITC Linear regression equation.

图 7 XYSP-60 荧光标记表征及线性方程

Fig. 7 Characterization and calibration curve equation of fluorescently labeled XYSP-60

示, 说明 F-XYSP-60 中几乎不含游离 FITC。

3.5 F-XYSP-60 在小鼠体内的吸收与分布特征

采用 Phoenix WinNonlin7.0 软件对实验数据进行处理和分析, 计算出血药浓度-时间曲线下面积、半衰期、清除率等药动学参数如表 2 所示。药时曲线如图 8 所示, 结果表明, F-XYSP-60 在体内有一定的吸收, 但在当前研究阶段尚难明确其吸收形式, 即为多糖整体进入体内, 或经降解为片段后吸收。

荧光图像如图 9-A 显示, 小鼠体内的荧光信号强度主要集中在肠道中, 这一结果表明, ig 给药后 F-XYSP-60 主要暴露场所为肠道。离体组织成像如

表 2 小鼠 ig F-XYSP-60 的药动学参数

Table 2 Pharmacokinetic parameters of F-XYSP-60 after intragastric administration in mice

药动学参数	单位	F-XYSP-60
AUC _{0-t}	μg·(mL·h) ⁻¹	99.98±4.24
AUC _{0-∞}	μg·(mL·h) ⁻¹	543.85±207.21
MRT _{0-t}	h	12.23±0.32
MRT _{0-∞}	h	93.21±55.03
t _{1/2z}	h	67.19±35.86
t _{max}	h	10.00±8.20
C _{max}	μg·mL ⁻¹	4.83±0.40

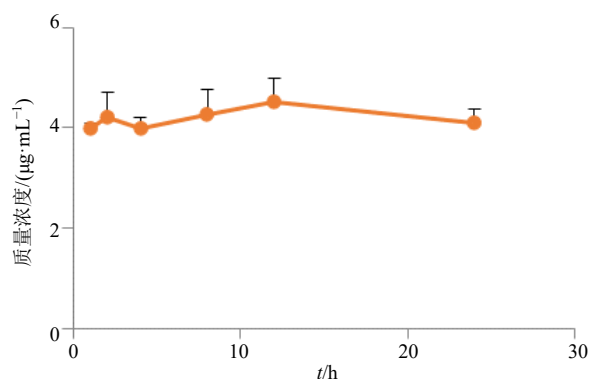


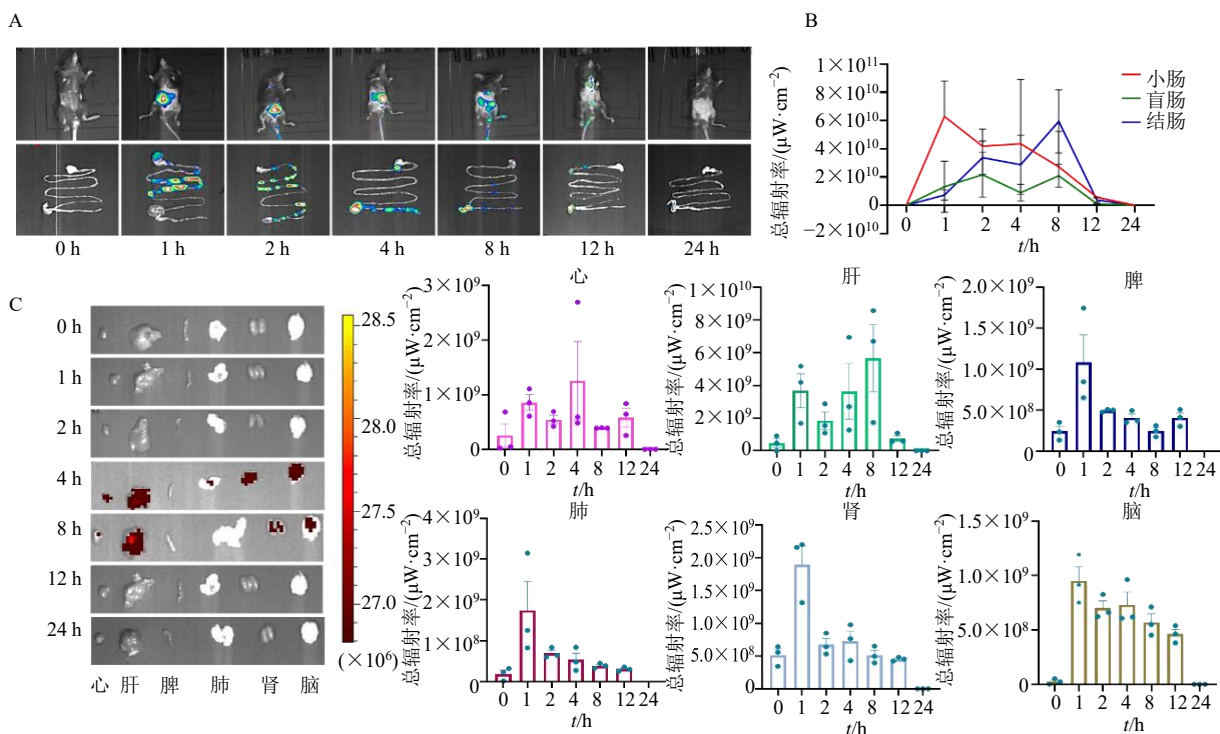
图 8 各组小鼠 ig F-XYSP-60 后的血药浓度-时间曲线

Fig. 8 Plasma concentration-time curves following intragastric administration of F-XYSP-60 in each group of mice

图 9-B 所示, 小肠内信号强度先升高后下降, 1 h 达到峰值。盲肠信号强度分别倾向于 2、8 h 达峰。结肠荧光强度于 8 h 达峰, 随后排出体外, 与活体成像 12 h 后荧光强度减弱或消失相对应。在心、脾脏和肺中未检测到明显的荧光信号, 在肝脏、肾和脑中发现轻微荧光信号见图 9-C。

4 讨论

本研究采用分级醇沉技术制备逍遥散多糖不



A-活体成像及其肠道实时分布; B-肠道荧光吸收; C-小鼠主要器官荧光吸收强度。
A-*in vivo* imaging and real-time distribution within the intestine; B-fluorescence uptake in the intestine; C-fluorescence absorption intensity of major mouse organs.

图9 F-XYSP 体内动态分布
Fig. 9 *In vivo* distribution of F-XYSP

同醇沉部位 (XYSP-40、XYSP-60、XYSP-80), 发现 XYSP-60 为多糖主要富集部位, 并首次揭示了其显著的细胞抗炎活性、化学结构特征及体内吸收分布特征。

本研究测定了 XYSP-60 部位的中性糖、蛋白质和糖醛酸含量, 并采用 UV-Vis、FT-IR 等多种技术对其进行了结构表征。由于 XYSP-60 为 1 个复方多糖, 因此可能存在果糖, 但果糖在长时间高温条件下容易被破坏, 其含量测定难以保证准确性; 因此, 本研究采用 80、120 °C 2 种酸水解温度进行单糖组成分析, 发现 XYSP-60 主要由果糖、葡萄糖和糖醛酸组成。NMR 分析结果表明 XYSP-60 存在 α 和 β 构型的糖苷键, 这与单糖组成相对应。SEM 图像显示多糖呈现弯曲的棒状和片状结构并形成网络, 这种结构可能提供了更大的比表面积, 有利于生物分子 (如受体、酶) 相互作用^[32]。

药动学研究显示, 小鼠经 ig 给药后, F-XYSP-60 达峰时间 (t_{max}) 较长, 消除半衰期 ($t_{1/2}$) 延长, 提示其可能经历缓慢的酶解或依赖肠道菌群的代谢过程。在体内分布方面, F-XYSP-60 在肠道中富

集并滞留时间较长, 从而能够在肠道持续发挥局部药理作用。这一结果与逍遥散调节肠道菌群改善情绪障碍相关文献研究相互印证, 提示其抗抑郁作用可能部分依赖肠-脑轴的调控机制。

本研究仍存在一定的局限性, 虽然基于“炎症-抑郁”相关性, 建立 LPS 诱导的小胶质细胞炎症模型, 验证了 XYSP-60 的抗炎活性, 但缺乏在动物模型上的验证。细胞模型虽然可以提供有关药物作用机制的初步数据, 结果可能与体内实际情况存在差异, 尤其是在药物代谢和全身生物学效应方面。因此, 未来的研究将进一步在动物模型上验证, 以更加全面地评估 XYSP-60 的药效和安全性。另外, 本研究未能深入探讨 XYSP-60 多糖在体内的具体代谢路径及其与肠道微生物群的相互作用。虽然推测 XYSP-60 可能通过调节肠道菌群及免疫细胞的相互作用来发挥药效, 但缺乏相应的实验数据支持这一假设。未来的研究应进一步探索多糖与肠道菌群及免疫系统的关系, 尤其是在动物模型中进行肠道菌群分析和免疫应答评估。

综上, 本研究首次揭示了 XYSP-60 是逍遥散多

糖的主要富集部位,同时阐述了其化学结构和体内处置特征,并发现该多糖部位在抑制炎症因子表达方面具有显著的效果。这一发现为深化著名方剂逍遥散的药效物质基础研究提供了新的视角和实验依据。

参考文献

- [1] Zhou X, Ma Q Y, Yan Z Q, *et al.* Efficacy and safety of Chinese patent medicine Xiao Yao San in polycystic ovary syndrome: A systematic review and Meta-analysis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 313: 116517.
- [2] Wang Y T, Wang X L, Wang Z Z, *et al.* Antidepressant effects of the traditional Chinese herbal formula Xiao-Yao-San and its bioactive ingredients [J]. *Phytomedicine*, 2023, 109: 154558.
- [3] Zhang Y, Li X J, Wang X R, *et al.* Integrating metabolomics and network pharmacology to explore the mechanism of Xiao-Yao-San in the treatment of inflammatory response in CUMS mice [J]. *Pharmaceuticals*, 2023, 16(11): 1607.
- [4] 张娜, 刘扬, 陈小强, 等. 化学修饰植物多糖的生物活性及其在食品领域中的应用研究进展 [J]. *食品工业科技*, 2025, 46(7): 375-384.
- [5] El-Saadony M T, Saad A M, Alkafaas S S, *et al.* Chitosan, derivatives, and its nanoparticles: Preparation, physicochemical properties, biological activities, and biomedical applications—A comprehensive review [J]. *Int J Biol Macromol*, 2025, 313: 142832.
- [6] Winter G, Hart R A, Charlesworth R P G, *et al.* Gut microbiome and depression: What we know and what we need to know [J]. *Rev Neurosci*, 2018, 29(6): 629-643.
- [7] Hao W Z, Ma Q Y, Wang L, *et al.* Gut dysbiosis induces the development of depression-like behavior through abnormal synapse pruning in microglia-mediated by complement C3 [J]. *Microbiome*, 2024, 12(1): 34.
- [8] Chen Y M, Zeng X X, Gong X R, *et al.* *Ganoderma lucidum* polysaccharides target the gut-brain axis: Unveiling a novel mechanism for ameliorating aging-induced cognitive impairment and oxidative stress [J]. *Int J Biol Macromol*, 2026, 337: 149519.
- [9] 多水银, 张兴波, 吴玉辉, 等. 牛大力多糖的荧光标记、鉴定及其体内分布 [J]. *饲料研究*, 2024, 47(8): 88-91.
- [10] Zhu L, Guan L J, Wang K L, *et al.* Recent trends in extraction, purification, structural characterization, and biological activities evaluation of *Perilla frutescens* (L.) Britton polysaccharide [J]. *Front Nutr*, 2024, 11: 1359813.
- [11] Cortés-Ríos J, Zárate A M, Figueroa J D, *et al.* Protein quantification by bicinchoninic acid (BCA) assay follows complex kinetics and can be performed at short incubation times [J]. *Anal Biochem*, 2020, 608: 113904.
- [12] 杨桐, 陈江, 张雪, 等. 分级醇沉玉竹多糖的结构表征及其抗糖尿病活性研究 [J]. *中草药*, 2025, 56(17): 6121-6136.
- [13] Li Z W, Du Z M, Wang Y W, *et al.* Chemical modification, characterization, and activity changes of land plant polysaccharides: A review [J]. *Polymers*, 2022, 14(19): 4161.
- [14] He X R, Wang X X, Fang J C, *et al.* Polysaccharides in *Grifola frondosa* mushroom and their health promoting properties: A review [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 101: 910-921.
- [15] 石云鑫, 杨家, 潘诗琴, 等. 不同方法提取的山茱萸多糖品质特征 [J]. *南方农业学报*, 2024, 55(7): 2031-2043.
- [16] 杨德强, 魏名卓, 杨欣荣, 等. 多糖的高级结构鉴定分析的研究进展 [J]. *化学工程师*, 2023, 37(5): 68-71.
- [17] Li L F, Yao H, Li X J, *et al.* Destiny of *Dendrobium officinale* polysaccharide after oral administration: Indigestible and nonabsorbing, ends in modulating gut microbiota [J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(21): 5968-5977.
- [18] Wang K P, Cheng F, Pan X L, *et al.* Investigation of the transport and absorption of *Angelica sinensis* polysaccharide through gastrointestinal tract both *in vitro* and *in vivo* [J]. *Drug Deliv*, 2017, 24(1): 1360-1371.
- [19] Liu L X, Li H B, Wang Z Z, *et al.* Exploring the anti-migraine effects of Tianshu Capsule: Chemical profile, metabolic behavior, and therapeutic mechanisms [J]. *Phytomedicine*, 2024, 131: 155766.
- [20] 禹恺, 帅哲玮, 黄洪军, 等. 小胶质细胞在中枢神经系统炎症性疾病中的作用和机制研究进展 [J]. *上海交通大学学报: 医学版*, 2025, 45(5): 630-638.
- [21] 赵璐, 杨光路, 贾凯茹, 等. 小胶质细胞的双重作用在神经系统疾病中的研究进展 [J]. *临床医学进展*, 2023(10): 16401-16405.
- [22] Vennapusa A R, Somayanda I M, Doherty C J, *et al.* A universal method for high-quality RNA extraction from plant tissues rich in starch, proteins and fiber [J]. *Sci Rep*, 2020, 10: 16887.
- [23] Gurusaravanan P, Vinoth S, Vasanthkumar R, *et al.* *In vitro* regeneration of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cultivar KC3 with controlled phenolic secretion by using *Kappaphycus alvarezii* sulfated polysaccharide extract and plant growth regulators [J]. *Vitro Cell Dev Biol Plant*, 2024, 60(4): 561-574.

- [24] Vedia G R, de Araújo Morandim-Giannetti A. Production of second-generation ethanol and carboxymethylcellulose from sugarcane bagasse pretreated with low-cost ionic liquids [J]. *Cellulose*, 2023, 30(17): 10767-10781.
- [25] 李学玲, 白琴凡, 孙体杰, 等. 铁皮石斛多糖的结构表征与抗氧化活性研究 [J]. *食品工业科技*, 2024, 45(19): 32-39.
- [26] Wang S Q, Li G, Zhang X F, *et al.* Structural characterization and antioxidant activity of *Polygonatum sibiricum* polysaccharides [J]. *Carbohydr Polym*, 2022, 291: 119524.
- [27] Song Q Q, Jiang L, Yang X Q, *et al.* Physicochemical and functional properties of a water-soluble polysaccharide extracted from Mung bean (*Vigna radiate* L.) and its antioxidant activity [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 138: 874-880.
- [28] Xu Y Y, He F, Jin C, *et al.* Stachyose with effect on anti-angiogenic activity from *Salvia yunnanensis* [J]. *J Funct Foods*, 2024, 112: 105971.
- [29] Speciale I, Notaro A, Garcia-Vello P, *et al.* Liquid-state NMR spectroscopy for complex carbohydrate structural analysis: A hitchhiker's guide [J]. *Carbohydr Polym*, 2022, 277: 118885.
- [30] Zhou W T, Kan X H, Dong W, *et al.* *In vivo* absorption and fecal excretion of polysaccharides from the fruits of *Lycium barbarum* L. in rats through fluorescence labeling [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 278: 134613.
- [31] Mohan T, Kleinschek K S, Kargl R. Polysaccharide peptide conjugates: Chemistry, properties and applications [J]. *Carbohydr Polym*, 2022, 280: 118875.
- [32] Bai J, Ge J, Zhang W, *et al.* Physicochemical, morpho-structural, and biological characterization of polysaccharides from three *Polygonatum* spp [J]. *RSC Advances*, 2021, 11(60): 37952-37965.

[责任编辑 王文倩]