

分级醇沉玉竹多糖的结构表征及其抗糖尿病活性研究

杨 桐, 陈 江, 张 雪, 李晓军*

扬州大学医学院, 江苏 扬州 225009

摘要: 目的 系统解析分级醇沉玉竹多糖 (*Polygonatum odoratum* polysaccharides, POPs) 各组分的精细结构, 通过网络药理学预测其治疗糖尿病的作用机制, 并对其抗氧化与 α -葡萄糖苷酶抑制活性进行评价。方法 采用梯度调节乙醇终体积分数 (35%、55%、70%、85%) 分离获得 4 种 POPs 组分 (POP-35、POP-55、POP-70、POP-85), 通过傅里叶变换红外光谱 (fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR)、核磁共振波谱 (nuclear magnetic resonance, NMR)、气相色谱-质谱联用 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)、高效凝胶渗透色谱 (high performance gel permeation chromatography, HPGPC) 和高效阴离子交换色谱 (high performance anion exchange chromatography, HPAEC) 联合表征其理化性质, 解析分子结构; 基于网络药理学和分子对接技术, 预测 POPs 治疗糖尿病的作用机制; 采用 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 自由基清除法、2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸 [2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS] 自由基清除法、 Fe^{3+} 还原力测定法和 α -葡萄糖苷酶抑制试验对 POPs 抗糖尿病活性进行评价; 结果 4 种 POPs 均为低相对分子质量 ($1.8 \times 10^3 \sim 2.4 \times 10^3$) 中性杂多糖, 由果糖 (84%~86%) 与葡萄糖 (14%~16%) 构成。其中均一多糖 POP-55 的结构特征通过 GC-MS 与 NMR 波谱得以明确, 其主链 β -(2 $\rightarrow$ 1)-果糖残基和 α -(1 $\rightarrow$ 6)-葡萄糖残基构成, 侧链含 β -(2 $\rightarrow$ 6)-果糖残基构成分支。网络药理学分析发现 POP-55 抗糖尿病的相关基因显著富集于碳水化合物消化吸收、胰岛素抵抗等信号通路, 在相关基因中通过拓扑学分析筛选出信号转导与转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (Caspase 3, CASP3)、白细胞介素-2 (interleukin-2, IL-2) 等 6 个核心基因, 分子对接证实其都与 POP-55 有较好的结合能力。体外实验表明, 分级醇沉 POPs 具有显著的抗氧化和 α -葡萄糖苷酶抑制活性, 并且具有浓度相关性。结论 分级醇沉 POPs 为菊粉型果聚糖, 其降糖效应可能通过竞争性抑制 α -葡萄糖苷酶活性延缓碳水化合物分解和调控 IL-2 介导的炎症信号减轻胰岛 β 细胞氧化损伤双重途径实现。

关键词: 分级醇沉; 玉竹多糖; 糖尿病; 核磁共振波谱; 网络药理学; 分子对接; α -葡萄糖苷酶; 胰岛 β 细胞

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)17-6121-16

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.17.004

Structural characterization and antidiabetic activity study of polysaccharides from *Polygonatum odoratum* prepared by fractional alcohol precipitation

YANG Tong, CHEN Jiang, ZHANG Xue, LI Xiaojun

School of medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

Abstract: Objective This study systematically elucidates the fine structural characteristics of graded ethanol-precipitated *Polygonatum odoratum* polysaccharides (POPs), predicts their therapeutic mechanisms against diabetes through network pharmacology, and evaluates their antioxidant and α -glucosidase inhibitory activities. **Methods** Four POPs fractions (POP-35, POP-55, POP-70, POP-85) were isolated by gradient ethanol precipitation (35%, 55%, 70%, 85%). Their physicochemical properties and molecular structures were characterized using Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR), gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), nuclear magnetic resonance (NMR), high-performance gel permeation chromatography (HPGPC), and high-performance anion-exchange chromatography (HPAEC). Network pharmacology and molecular docking were employed to predict antidiabetic mechanisms. Antidiabetic activities were assessed via DPPH/ABTS radical scavenging assays, ferric ion reducing power assay, and α -glucosidase inhibition assay. **Results** All four POPs fractions were low-molecular-weight ($1.8 \times 10^3 \sim 2.4 \times 10^3$) neutral

收稿日期: 2025-05-19

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (82304133); 江苏省自然科学基金青年项目 (BK20230590)

作者简介: 杨 桐, 本科生, 研究方向为中药多糖活性研究。E-mail: 1332107311@qq.com

*通信作者: 李晓军, 博士, 讲师, 主要从事中药多糖结构及活性研究。E-mail: juniors_li@163.com

heteropolysaccharides composed of fructose (84%—86%) and glucose (14%—16%). The homogeneous polysaccharide POP-55 exhibited a backbone of $\rightarrow 2$)- β -D-Fruf-(1 $\rightarrow$ glycosidic linkages with minor α -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 6) branched side chains, as confirmed by GC-MS and NMR. Network pharmacology analysis revealed that POP-55-related antidiabetic genes were significantly enriched in pathways such as carbohydrate digestion and absorption, insulin resistance and so on. Topological analysis identified six core targets (STAT3, CASP3, IL2, etc.) among these genes, which were further validated by molecular docking to exhibit strong binding affinities with POP-55. **Conclusion** Graded ethanol-precipitated POPs are inulin-type fructans exerting hypoglycemic effects through dual mechanisms: competitively inhibiting α -glucosidase to delay carbohydrate hydrolysis, and regulating IL2-mediated inflammatory signaling to alleviate oxidative damage in pancreatic β -cells.

Keywords: fractional alcohol precipitation; *Polygonatum odoratum* polysaccharides; diabetes; nuclear magnetic resonance; network pharmacology; molecular docking; α -glucosidase; pancreatic β -cells

糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 是由胰岛素绝对不足或胰岛素抵抗导致的相对缺乏引起的慢性消耗性疾病。发布在 *The Lancet* 上的数据表明, 2021 年全世界糖尿病患者数量约 5.29 亿, 至 2050 年, 全球糖尿病患者将持续上升, 预计可达到 13.1 亿, 其中二型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 大约占有所有病例的 96.0%^[1]。有研究显示 2024 年中国以 1.48 亿成年糖尿病患者的规模位居全球首位, 且这一数字仍在持续增长^[1-2]。长期未受控制的糖尿病会损伤心脑血管、视网膜、肾脏等组织器官, 极大地降低了患者的生活质量, 同时也给社会带来了较大的疾病负担^[3]。目前主流治疗 T2DM 的口服药物主要有钠-葡萄糖协同转运蛋白 2 (sodium-dependent glucose transporters 2, SGLT-2) 抑制剂、双胍类、二肽基肽酶 4 抑制剂等, 但伴随的不良反应限制了其临床应用^[4]。与合成化学物相比, 药用植物在治疗糖尿病方面表现出更好的疗效和更小的药物毒性^[5], 同时也有研究显示植物多糖具有调节机体血糖的功效, 且不良反应较小, 在治疗糖尿病方面潜力巨大^[6]。

玉竹最早在《神农本草经》就有记载, 名为“女萎”, 又名葳蕤、萎蕤, 被列为上品。常用的中药玉竹为多年生草本植物百合科黄精属玉竹 *Polygonatum odoratum* (Mill.) Druce 干燥根茎。质润, 性微寒, 味甘, 归肺、胃经, 可以养阴润燥、生津止渴, 用治燥热干咳、肺胃阴虚。具有提高免疫力和治疗糖尿病、高脂血症、肿瘤等疾病的功效^[7]。玉竹主要含有二肽类和多糖等多种活性成分^[8], 多糖作为其主要活性物质之一具有调节免疫、抗菌、抗氧化^[9]和肝脏保护^[10]等作用。关于 POPs 的抗糖尿病活性, 已有研究表明玉竹的甲醇提取物能降低高血糖小鼠的血糖水平^[11], 此外 Jiang 等^[12]从玉竹中分离出 1 种新型多糖, 并发现其可以降低 T2DM

小鼠空腹血糖和胰岛素水平以及血清总胆固醇 (total cholesterol, TC)、三酰甘油 (triglyceride, TG) 和低密度脂蛋白 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 的浓度, 提高葡萄糖耐受能力。也有研究通过水提醇沉法提取获得精制玉竹多糖, 发现其可显著降低 T2DM 模型大鼠的血糖水平^[13]。

传统 POPs 提取工艺多采用高温水提结合乙醇沉淀法^[14], 但该方法存在提取率低、耗时长且效率不足等缺陷, 难以满足规模化生产需求。研究表明, 乙醇分级沉淀法作为多糖分离纯化的有效手段, 较传统方法具有分离效能显著、成本低廉且易于规模化生产等优势, 且不同乙醇梯度沉淀所得多糖组分呈现差异性生物活性特征^[15-16]。鉴于多糖的构效关系与其生物活性存在显著相关性, 系统解析 POPs 的精细结构对其降血糖活性研究具有重要科学价值。值得注意的是, 迄今尚未见采用分级醇沉技术制备玉竹均一多糖, 并对其进行系统的结构表征及研究其抗糖尿病作用机制的相关报道。

网络药理学作为现代研究工具, 在中药活性成分作用靶点预测方面展现独特优势^[17], 其通过构建分子互作网络可有效阐明药物作用机制^[18-19]。分子对接技术则能从分子层面可视化解析配体-受体相互作用模式, 为新药研发提供关键理论依据^[20]。本研究创新性地将结构表征技术与网络药理学和分子对接技术相结合: 首先通过傅里叶变换红外光谱 (fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR)、核磁共振波谱 (nuclear magnetic resonance, NMR)、气相色谱-质谱联用 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)、高效凝胶渗透色谱 (high performance gel permeation chromatography, HPGPC) 和高效阴离子交换色谱 (high performance anion exchange chromatography, HPAEC) 阐明分级醇沉 POPs 的分子结构特征, 继而结合网络药理学

预测与分子对接验证探究其抗糖尿病机制,最后通过体外抗氧化及 α -葡萄糖苷酶抑制实验多维度验证其抗糖尿病功效。相较于传统网络药理学方法多依赖数据库检索预测中药活性成分,本研究所建立的整合研究策略显著提升了机制研究的科学性与可靠性。

1 试剂、仪器与材料

1.1 材料与试剂

实验用的玉竹干燥根茎饮片购自亳州药材市场,经上海中医药大学曹海峰教授鉴定为百合科黄精属植物玉竹 *P. odoratum* (Mill.) Druce 的干燥根茎,普鲁兰标准品 P5、P20、P50、P100 和 P400 (批号 10202,质量分数 $\geq 97\%$)购自昭和电工株式会社(日本),单糖标准品岩藻糖(fucose, Fuc, 批号 C17D9H77586,质量分数 $\geq 98\%$)、氨基半乳糖盐酸盐(galactosamine hydrochloride, GalN, 批号 B01J8S37079,质量分数 $\geq 98\%$)、鼠李糖(rhamnose, Rha, 批号 H10S9Z69863,质量分数 $\geq 98\%$)、阿拉伯糖(arabinose, Ara, 批号 S15A10G85850,质量分数 $\geq 98\%$)、盐酸氨基葡萄糖(glucosamine hydrochloride, GlcN, 批号 A22S6X3606,质量分数 $\geq 98\%$)、半乳糖(galactose, Gal, 批号 E1927035,质量分数 $\geq 98\%$)、葡萄糖(glucose, Glc, 批号 Q18F10N80946,质量分数 $\geq 99\%$)、*N*-乙酰-*D*-氨基葡萄糖(*N*-acetyl-*D*-glucosamine, GlcNAc, 批号 A21J8X40372,质量分数 $\geq 98\%$)、木糖(xylose, Xyl, 批号 A22S6X3606,质量分数 $\geq 99\%$)、甘露糖(mannose, Man, 批号 C17D9H77586,质量分数 $\geq 98\%$)、果糖(fructose, Fru, 批号 J01J10R89818,质量分数 $\geq 99\%$)、核糖(ribose, Rib, 批号 H26F10Z81556,质量分数 $\geq 99\%$)、半乳糖醛酸(galacturonic acid, GalA, 批号 K02A9B66077,质量分数 $\geq 97\%$)、古罗糖醛酸(guluronic acid, GulA, 批号 S200115AG1,质量分数 $\geq 98\%$)、葡萄糖醛酸(glucuronic acid, GlcA, 批号 K14M10S82777,质量分数 $\geq 98\%$)、甘露糖醛酸(mannuronic acid, ManA, 批号 S200108AM1,质量分数 $\geq 98\%$)购自博睿糖生物技术有限公司(中国),维生素 C (Vc, 批号 A103535)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司,阿卡波糖(批号 R001437,质量分数 $\geq 97\%$)购自上海易恩化学技术有限公司。本研究中使用的所有其他试剂均为分析纯级。

1.2 仪器

BRT105-103-101 型串联凝胶柱(博睿糖生物技

术有限公司)、RI-10A 型高效凝胶色谱仪(株式会社岛津制作所,日本)、ICS5000+ 高效离子交换色谱仪(赛默飞世尔科技公司,美国)、FT-IR 650 红外光谱分析仪(港东科技发展有限公司)、QP 2010 气相质谱仪(株式会社岛津制作所,日本)、Avance Bruker 600 M 核磁共振波谱仪(布鲁克公司,德国)、Multiskan MK3 酶标仪(赛默飞世尔科技公司,美国)。

2 方法

2.1 POPs 的提取与纯化

玉竹干燥根茎饮片洗净晾干称定质量,放入提取罐内,加入 10 倍体积水浸泡过夜,100 $^{\circ}\text{C}$ 提取 3 次,每次 3 h。合并提取液并转入浓缩罐中,75 $^{\circ}\text{C}$ 下浓缩至约 2 L,浓缩液于离心(9 000 r/min、20 min)后取上清液。通过逐步加入无水乙醇,使提取液中的乙醇浓度依次为 35%、55%、70%、85%,搅拌后室温下静置过夜,随后将混合溶液离心(9 000 r/min、20 min),收集沉淀物,将其复溶后,冷冻干燥获得 4 种多糖,分别命名为 POP-35、POP-55、POP-70、POP-85,工艺过程如图 1 所示。

2.2 相对分子质量测定

通过 HPGPC 联合串联凝胶柱(8 $\times$ 300 mm)和示差折光检测器测定多糖样品的平均相对分子质量。流动相为 0.2 mol/L 的 NaCl 溶液,体积流量 0.8 mL/min,柱温为 40 $^{\circ}\text{C}$,每次进样 25 μL ,分析时间为 60 min。根据标准品制备的标准曲线估算样品的相对分子质量,建立 $\lg M_{w-t_R}$ 、 $\lg M_{n-t_R}$ 标准曲线,计算样品重均分子量(M_w)、数均分子量(M_n)和相对分子质量分布指数(M_w/M_n)值^[21]。

2.3 官能团分析

取 POPs 各组分 2 mg 与 156 mg 溴化钾研磨合并压缩成透明薄膜,使用 FT-IR 650 光谱仪对薄膜进行扫描,并以溴化钾压片作为空白对照。采用 4 cm^{-1} 的分辨率,对 4 000~400 cm^{-1} 予以扫描^[22]。原始数据由 FT-IR 650 光谱仪记录。

2.4 单糖组成检测

称量 POPs 样品各 5 mg,分别加入 2 mL 三氟乙酸(TFA, 3 mol/L)于 80 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴上水解 2 h,吸取酸水解溶液转移至玻璃管中氮吹吹干,再加入 5 mL 水涡旋混匀,吸取 150 μL 加入 850 μL 去离子水,经 12 000 r/min 高速离心 5 min 处理,随后吸取上清部分留存备用。采用 HPAEC,配备 Dionex Carbopac PA20 (3 $\times$ 150 mm)柱和电化学检测器进行分析,数据通过 Chromeleon 7.2.9 软件处理。详

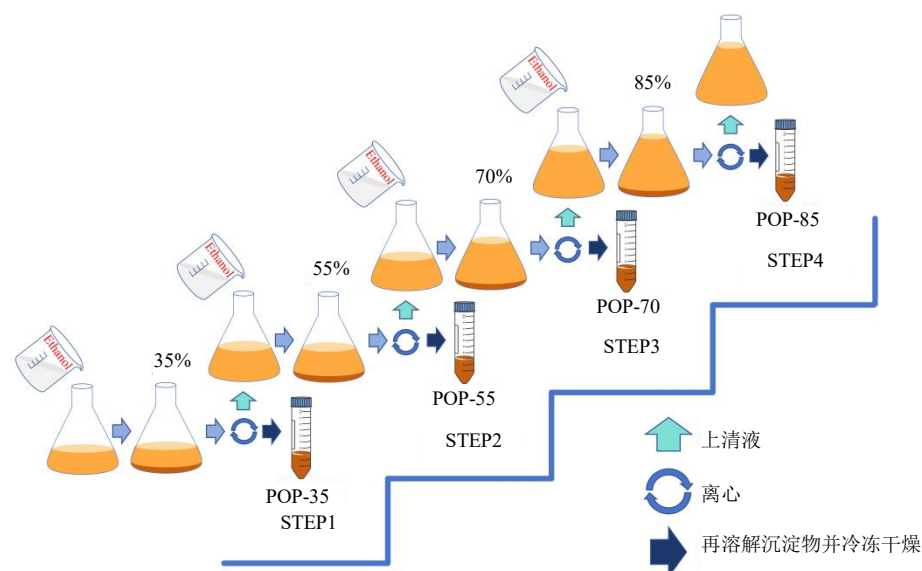


图 1 POPs 分级醇沉流程示意图

Fig. 1 Schematic diagram of POPs fractionation process via alcohol precipitation

细方法参考课题组前期研究报道^[23]。

2.5 糖苷键分析

POPs 样品经甲基化、水解、乙酰化后,将部分甲基化的多糖转化为部分甲基化的醋酸醛糖醇(partially methylated alditol acetates, PMAA)形式^[24-25]。经 GC-MS 系统测定,并与标准质谱图库进行比对,可确定 POPs 的糖苷键类型。依照设定的升温程序操作:初始温度 120 °C,依 3 °C/min 的速度升温至 250 °C 并保温 5 min,且进样口、检测器温度统一设定为 250 °C。色谱柱为 RXI-5 SIL MS (30 m×0.25 mm×0.25 μm),采用氦气作为载气,其体积流量为 1 mL/min^[26]。

2.6 NMR 波谱分析

将 POPs 溶于 99.9% D₂O 中并冻干,重复 2 次以去除活泼氢。然后,将干燥样品溶解在 99.9% D₂O 中,配制成 110 mg/mL 溶液,通过 NMR 波谱仪获得样品的一维和二维图谱^[27],使用 MestRenovaV5.2.5 处理数据,并进行结构分析。

2.7 POP-55 基因靶点预测

基于官能团分析、单糖组成检测、糖苷键分析与 NMR 波谱分析结果,解析 POP-55 的结构式。使用 SwissTargetPrediction 数据库 (<http://swisstargetprediction.ch/>) 查找 POP-55 对应基因靶点的标准名称^[28-29]。采用 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>)^[30]和 DisGeNet 数据库 (<https://www.disgenet.org/>)^[31]进行糖尿病靶点检索,汇总去重,最终确定与糖尿病疾病相关的一系列靶点。

2.8 蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络构建

运用微生信平台 (<https://www.bioinformatics.com.cn/>) 提取 POP-55 基因靶点与糖尿病疾病基因靶点的交集,并导出重合部分的靶点信息,这些靶点构成 POP-55 发挥降血糖作用的全部潜在靶点基因,分析并绘制韦恩图。将交集基因导入 STRING 平台 (<https://cn.string-db.org/>)^[32]的“Multiple Proteins”项下,物种设定为“Homo sapiens”,设定最低相互作用阈值为 0.400,隐藏无相互联系蛋白质后,根据 K-means 聚类分析分为 3 组,搭建 PPI 网络图,并把相应数据结果输入到 Cytoscape 3.10.0 软件平台^[33],利用 cytoNCA 插件结合自由度 (degree)、介度 (betweenness)、紧密度 (closeness) 3 个拓扑参数进行筛选获得核心靶点。

2.9 富集分析

把交集基因靶点相关数据导入至 David 数据库 (<https://davidbioinformatics.nih.gov/>)^[34],以此开启基因本体 (gene ontology, GO) 功能分析和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 信号通路富集分析,选择“OFFICIAL-GENE-SYMBOL”标识符,物种为“Homo sapiens”。保存富集过程,并通过微生信平台进行可视化分析。

2.10 分子对接验证

利用 Chem3D 22.0.0 将 PUP-55 二维结构式转换为三维结构并美化。从 RCSB PDB 数据库

(<https://www.rcsb.org/>) 获取核心靶点的 pdb 格式文件^[35], 利用 PyMOL 软件移除溶剂和小分子进行预处理。将 POP-55 和核心靶点文件导入到 AutoDock Tools 1.5.7 中进行对接, 最后利用 PyMOL 软件对最优构象进行可视化分析。

2.11 ABTS 自由基清除能力

用超纯水配制 7 mmol/L ABTS 溶液, 与浓度为 2.45 mmol/L 的 $K_2S_2O_8$ 溶液 (比例为 2:1) 混合, 在室温下黑暗中反应 12~16 h。称取 POP-35、POP-55、POP-70、POP-85 溶解于 PBS 溶液中, 使样品质量浓度依次为 0.25、0.5、1、2、4、5 mg/mL, 将反应后的 ABTS 溶液与样品液混匀后, 室温避光反应 30 min, 734 nm 测量吸光度 (A) 值, Vc 为阳性对照^[36]。按照公式计算 ABTS 自由基清除率。

$$\text{ABTS 自由基清除率} = 1 - (A_1 - A_2) / A_0$$

A_1 为样品液与 ABTS 溶液混合后所测得 A ; A_2 为样品液与超纯水混合测得 A ; A_0 为超纯水与 ABTS 溶液混合测得 A 。

2.12 DPPH 自由基清除能力

POPs 的 DPPH 自由基清除能力根据文献报道的方法测量^[37-38], 并进行修改。将质量浓度依次为 0.25、0.5、1、2、4、5 mg/mL 的 POP-35、POP-55、POP-70 和 POP-85 样品液分别与 DPPH 混合后于室温下避光反应 30 min, 随后, 517 nm 测量 A 值, Vc 为阳性对照。按照公式计算 DPPH 自由基清除率。

$$\text{DPPH 自由基清除率} = 1 - (A_1 - A_2) / A_0$$

A_1 为样品液与 DPPH 溶液混合后所测得 A ; A_2 为样品液与超纯水混合测得 A ; A_0 为超纯水与 DPPH 溶液混合测得 A 。

2.13 Fe^{3+} 还原能力

在 100 μ L 样品溶液中加入 100 μ L 体积分数为 1% 的铁氰化钾, 置于水浴锅中 50 $^{\circ}$ C 反应 20 min, 待冷却完毕, 加入 100 μ L 体积分数为 10% 的三氯乙酸溶液, 充分混匀后, 以 3 000 r/min 的转速离心 10 min, 随后吸取 100 μ L 上清液转移至 96 孔板, 再加入 10 μ L 体积分数为 0.1% 的氯化铁反应 2 min, 700 nm 测定 A 值^[39]。按照公式计算 Fe^{3+} 还原率。

$$Fe^{3+} \text{ 还原率} = (A_1 - A_2) / A_0$$

A_1 为样品液与铁氰化钾、三氯乙酸和氯化铁混合后所测得 A ; A_2 为样品液与超纯水混合测得 A ; A_0 为所有孔中最大 A 。

2.14 α -葡萄糖苷酶抑制实验

POPs 的 α -葡萄糖苷酶抑制活性测定参考 Pan 等^[40]的方法并进行了修改, 使用 PBS 配制样品和阿卡波糖使质量浓度依次为 0.25、0.5、1、2、4 mg/mL, 将 50 μ L 样品溶液与 100 μ L α -葡萄糖苷酶溶液 (1

U/mL) 混合, 37 $^{\circ}$ C 反应 10 min, 再加入 50 μ L 对硝基苯- β -D-吡喃葡萄糖苷 (p -nitrophenyl- β -D-glucopyranoside, pNPG) 溶液 (7.5 mmol/L), 37 $^{\circ}$ C 反应 25 min, 最后加入碳酸钠溶液终止反应。阿卡波糖为阳性对照, 405 nm 测 A 值。按照公式计算 α -葡萄糖苷酶抑制率。

$$\alpha\text{-葡萄糖苷酶抑制率} = 1 - (A_1 - A_2) / A_0$$

A_1 为样品溶液与 α -葡萄糖苷酶和 pNPG 溶液混合后所测得 A ; A_2 为样品溶液与 PBS 和 pNPG 混合后测得 A ; A_0 为 PBS 与 α -葡萄糖苷酶和 pNPG 溶液混合后测得 A 。

2.15 统计分析

所有实验均重复 3 次, 实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 GraphPad Prism 8 进行数据分析, 统计学分析采用 GraphPad Prism 8 进行单因素方差分析 (ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 相对分子质量测定结果

POP-35、POP-55、POP-70、POP-85 的相对分子质量分布如图 2-A 所示, 其中 39.2 min 处的峰推测为流动相峰, 并未进行分析。根据实验结果, 得出 $\lg M_w - t_R$ 校正曲线方程为 $\lg M_w = -0.205 9 t_R + 11.028$ ($R^2 = 0.999$), 根据各个样品的多糖出峰时间, 可计算出每个样品的 M_w 分别为 2 142、2 632、2 072、1 976。 $\lg M_n - t_R$ 的回归方程为 $\lg M_n = -2.088 t_R + 11.106$ ($R^2 = 0.999$), 可得出 POP-35、POP-55、POP-70、POP-85 的 M_n 依次为 1 997、2 461、1 931、1 840, 说明通过分级醇沉所获得的样品为相对分子质量相对较小的低聚糖。通过 M_w/M_n 计算样品的分散系数均为 1.07 左右, 说明样品分布相对均匀。

3.2 官能团分析

通过红外光谱分析样品的官能团信息见图 2-B。4 个样品红外吸收光谱特征相似, 均在 3 050、2 960、1 060 cm^{-1} 附近有信号峰, 符合多糖的吸收峰特征^[41]。3 050 cm^{-1} 处的峰可能是 O-H 伸缩振动引起的, 2 960 cm^{-1} 处的峰可能是 C-H 伸缩振动引起的, 1 630 cm^{-1} 处的峰可能是 O-H 弯曲振动, 而 1 413、1 255 cm^{-1} 处的峰可能是由 C-H 和 O-H 的剪切振动所引发^[42], 1 050~1 070 cm^{-1} 处的峰可能是由糖环中的 C-O-C 伸缩振动引起的^[43-44]。

3.3 单糖组成检测

POPs 的单糖组成结果见图 2-C, 在此基础上, 对照不同单糖标准品的保留时间, 可得 POPs 主要由 Glc 和 Fru 组成, 物质的量比分别为 0.15:0.85 (POP-35)、

0.14 : 0.86 (POP-55)、0.15 : 0.85 (POP-70)、0.16 : 0.84 (POP-85)。经分级醇沉获得的 POPs 可能具有果聚糖结构, 并且不同乙醇浓度沉淀得到的 POPs 中, Glc 与 Fru 的比例相近, 均为 0.14~0.16 : 0.86~0.84。

3.4 糖苷键分析

由于 POP-35、POP-55、POP-70、POP-85 的单糖组成结果相似, 故进行甲基化分析时, 仅对 POP-55 为代表进行深入分析。如图 3 所示, 从色谱图可

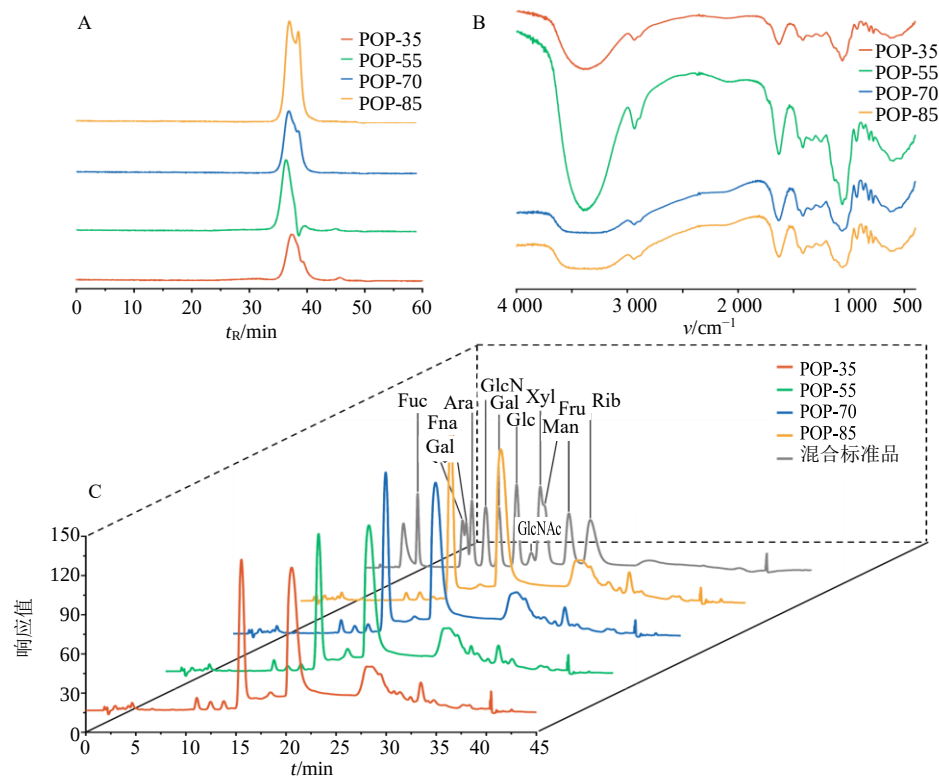


图 2 POPs 相对分子质量分布 (A)、红外光谱 (B) 及单糖组成分析 (C)

Fig. 2 Molecular weight distribution (A), FT-IR spectra (B) and monosaccharide composition analysis of POPs

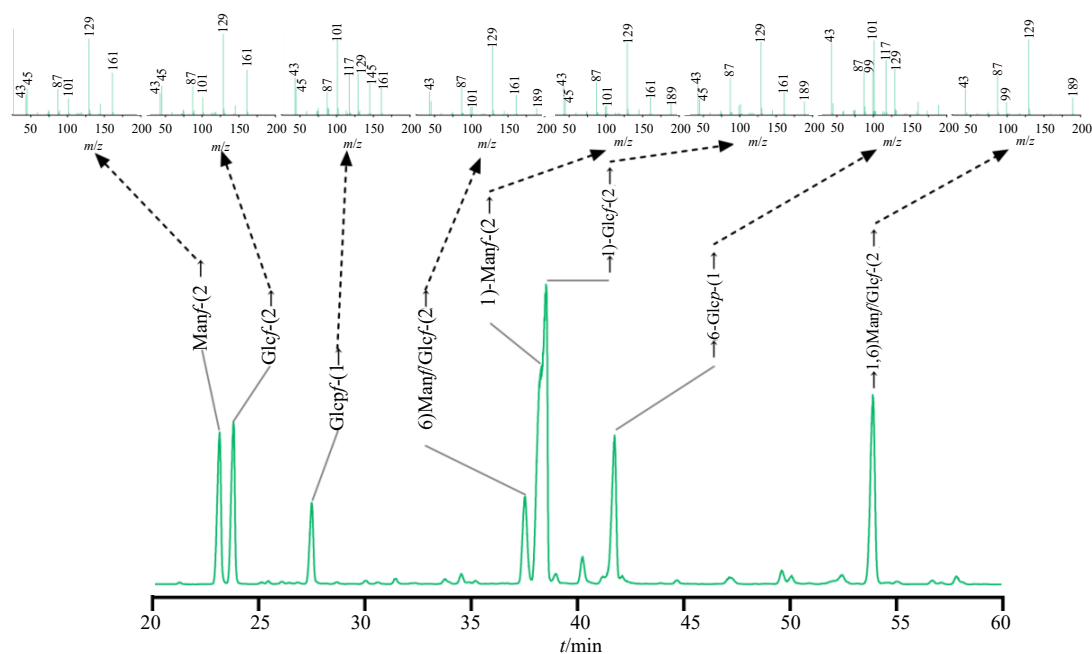


图 3 POP-55 的 PMAA 衍生产品的 GC 色谱图及质谱碎片图

Fig. 3 GC chromatogram and mass spectrometry fragments of POP-55 PMAA derivative

以看出共有 8 种 PMAA 甲基化产物。根据每个 PMAA 产物的质谱碎片图及单糖组成可推断出 POP-55 为果聚糖。由于 Fru 为酮糖结构，在甲基化反应的过程中易被异构化成 Man 和 Glc，故得到的甲基糖苷异构化成呋喃环的甘露糖苷和葡萄糖苷。因此，可推断出 POP-55 主要含有以 Fru 为主的 Fru α -(2 $\rightarrow$ 、 $\rightarrow$ 6)-Fru α -(2 $\rightarrow$ 、 $\rightarrow$ 1)-Fru α -(2 $\rightarrow$ 和 $\rightarrow$ 1,6)-Fru α -(2 $\rightarrow$ 糖苷键，以及以 Glc 为主的 Glc α -(1 $\rightarrow$ 、 $\rightarrow$ 4)-Glc α -(1 $\rightarrow$ 、 $\rightarrow$ 6)-Glc α -(1 $\rightarrow$ 糖苷键（表 1）。

3.5 链接方式分析

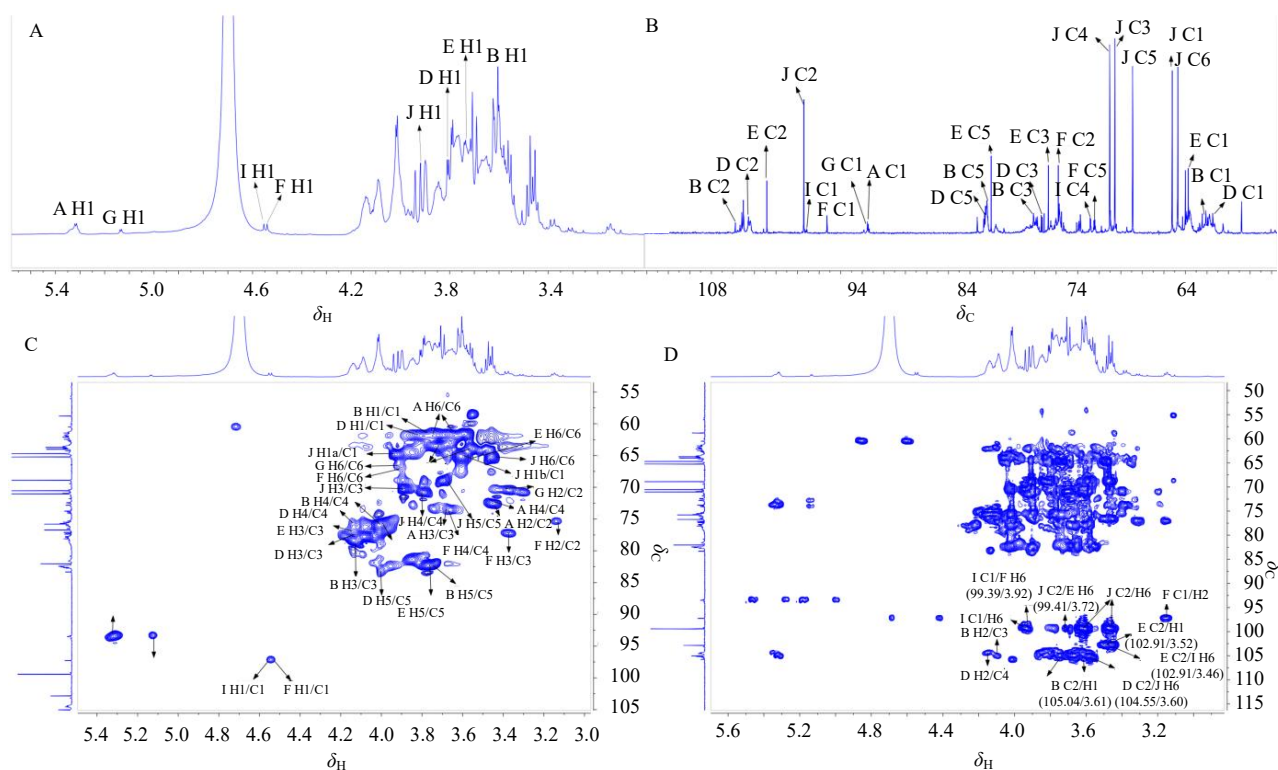
首先，根据核磁共振波谱对各个糖苷键的化学

位移进行归属。如图 ^1H -NMR 谱（图 4）中，在 δ 5.31 有较弱的信号峰，结合甲基化分析结果可知， δ 5.31 可能归属于糖苷键 α -D-Glc α -(1 $\rightarrow$ 的异头氢。而在 δ 3.5~4.2 均存在较强的信号峰，单独根据 ^1H -NMR 谱难以进行归属，将结合其他图谱进行分析并归属。 ^{13}C -NMR 谱的异头区分别有 δ 105.04、104.55、102.91、99.41 信号峰，根据甲基化分析结果可知，在该类信号峰应该归属于果糖残基。在 δ 93.55、93.46、97.26 的信号峰应该属于葡萄糖残基。此外，POP-55 的异头信号发生了明显的向下迁移，表明 POP-55 含有 β 型糖苷键。 ^1H - ^1H COSY 二维图谱中

表 1 POP-55 的糖苷键类型分析

Table 1 Glycosidic bond type analysis of POP-55

tr/min	甲基化糖	质谱碎片 (m/z)	物质的量比	连接类型
23.819	1,3,5,6-Me4-Manf/Glc	87, 101, 129, 145, 161	0.217	Fru α -(2 $\rightarrow$
27.502	2,3,4,6-Me4-Glc	43, 71, 87, 101, 117, 129, 143, 161, 205	0.055	Glc α -(1 $\rightarrow$
37.535	1,3,5-Me2-Manf/Glc	99, 129, 145, 161, 189	0.069	$\rightarrow$ 6)-Fru α -(2 $\rightarrow$
38.515	3,5,6-Me3-Manf/Glc	43, 71, 87, 99, 101, 129, 145, 161, 189	0.399	$\rightarrow$ 1)-Fru α -(2 $\rightarrow$
40.239	2,3,6-Me3-Glc	43, 87, 99, 101, 113, 117, 129, 131, 161, 173, 233	0.020	$\rightarrow$ 4)-Glc α -(1 $\rightarrow$
41.739	2,3,4-Me3-Glc	43, 87, 99, 101, 117, 129, 161, 189, 233	0.105	$\rightarrow$ 6)-Glc α -(1 $\rightarrow$
53.888	3,5-Me2-Manf/Glc	43, 87, 99, 129, 159, 189, 233	0.135	$\rightarrow$ 1,6)-Fru α -(2 $\rightarrow$



A- ^1H 谱图；B- ^{13}C 谱图；C-HSQC 谱图；D-HMBC 谱图。

A- ^1H spectrum; B- ^{13}C spectrum; C-HSQC spectrum; D-HMBC spectrum.

图 4 POP-55 的核磁共振波谱分析

Fig. 4 NMR spectroscopic analysis of POP-55

的 H1-H2、H2-H3、H3-H4 的相关信号峰，可归属得出 H2、H3、H4 的化学位移。根据 ^1H - ^{13}C HSQC 中 H1/C1、H2/C2、H3/C3、H4/C4 的相关峰可推断出 C1、C2、C3、C4 的化学位移依次为 δ 93.55、73.59、73.98 和 72.63。此外，位于 δ 4.10/3.98、 δ

3.98/3.75、 δ 3.79/3.64 处的 3 组化学位移分别代表果糖残基上 H3-H4、H4-H5 和 H5-H6 的相关性。对应的碳信号为 δ 78.39、75.69、82.43。同理可推断得出各个糖苷键的化学位移，并具体归纳如表 2 所示。

表 2 POP-55 各糖苷键的化学移位

Table 2 Chemical shifts of glycosidic bonds in POP-55

糖残基	H1a,b/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6a,b/C6
α -D-Glcp-1 $\rightarrow$ (A)	5.31/93.55	3.45/73.59	3.69/73.98	3.45/72.63	3.76/75.74	3.75, 3.65/61.77
$\rightarrow$ 1- β -D-Fruf-2 $\rightarrow$ (B)	3.61, 3.78/61.86	- /105.04	4.10/78.39	3.98/75.69	3.75/82.43	3.74, 3.64/63.56
β -D-Fruf-2 $\rightarrow$ (D)	3.80, 3.60/61.17	- /104.55	4.11/77.13	4.14/75.98	4.00/82.56	3.76, 3.71/63.56
$\rightarrow$ 1,6- β -D-Fruf-2 $\rightarrow$ (E)	3.73, 3.52/63.76	- /102.91	4.12/76.73	4.00/75.84	3.76/82.03	3.55, 3.72/65.75
$\rightarrow$ 6- β -D-Glcp (F)	4.54/97.26	3.12/75.32	3.35/77.28	3.64/73.45	3.44/72.21	3.92, 3.61/66.04
$\rightarrow$ 6- α -D-Glcp (G)	5.11/93.46	3.41/70.81	3.79/69.11	3.74/73.41	3.77/72.11	3.92, 3.61/66.04
$\rightarrow$ 6- α -D-Glcp-1 $\rightarrow$ (I)	4.57/99.39	3.19/75.56	3.70/77.50	3.65/73.65	3.58/74.99	3.46, 3.62/66.57
$\rightarrow$ 6- β -D-Fruf-2 $\rightarrow$ (J)	3.92, 3.61/65.24	- /99.41	3.89/70.56	3.79/71.01	3.69/68.91	3.60, 3.46/65.24

其次，根据核磁远程相关图谱 ^1H - ^{13}C HMBC 和 NOESY 二维谱图，并参考相关的菊粉文献报道^[45-46]，确定糖链中的糖苷键排列顺序，并对前面已归属的化学位移进行检验。

HMBC 图谱中，糖苷键 $\rightarrow$ 1- β -D-Fruf-2 $\rightarrow$ 的 C2 与自身的 H1 共振区存在一个强烈的交叉峰 C2($\rightarrow$ 1- β -D-Fruf-2 $\rightarrow$)-H1($\rightarrow$ 1- β -D-Fruf-2 $\rightarrow$)，表明存在 $\rightarrow$ 2- β -D-Fruf-1 $\rightarrow$ 2- β -D-Fruf-1 $\rightarrow$ 。

糖苷键 $\rightarrow$ 1- β -D-Fruf-2 $\rightarrow$ 的 C2 与 $\rightarrow$ 1,6- β -D-Fruf-2 $\rightarrow$ 的 H1 共振区存在一个强烈的交叉峰 C2($\rightarrow$ 1- β -D-Fruf-2 $\rightarrow$)-H1($\rightarrow$ 1,6- β -D-Fruf-2 $\rightarrow$)，表明存在 $\rightarrow$ 2- β -D-Fruf-1 $\rightarrow$ 1,6- β -D-Fruf-2 $\rightarrow$ 。

糖苷键 $\rightarrow$ 1,6- β -D-Fruf-2 $\rightarrow$ 的 C2 与 $\rightarrow$ 1,6- β -D-Fruf-2 $\rightarrow$ 的 H1 共振区存在一个强烈的交叉峰 C2($\rightarrow$ 1,6- β -D-Fruf-2 $\rightarrow$)-H1($\rightarrow$ 1,6- β -D-Fruf-2 $\rightarrow$)，表明存在 $\rightarrow$ 1,6- β -D-Fruf-2 $\rightarrow$ 1,6- β -D-Fruf-2 $\rightarrow$ 。

糖苷键 $\rightarrow$ 1,6- β -D-Fruf-2 $\rightarrow$ 的 C2 与 $\rightarrow$ 6- α -D-Glcp-1 $\rightarrow$ 的 H6 共振区存在一个强烈的交叉峰 C2($\rightarrow$ 1,6- β -D-Fruf-2 $\rightarrow$)-H6($\rightarrow$ 6- α -D-Glcp-1 $\rightarrow$)，表明存在 $\rightarrow$ 1,6- β -D-Fruf-2 $\rightarrow$ 6- α -D-Glcp-1 $\rightarrow$ 。

糖苷键 $\rightarrow$ 6- α -D-Glcp-1 $\rightarrow$ 的 C1 与 $\rightarrow$ 6- α - β -D-Glcp 的 H6 共振区存在一个强烈的交叉峰 C1($\rightarrow$ 6- α -D-Glcp-1 $\rightarrow$)-H6($\rightarrow$ 6- α -D-Glcp-1 $\rightarrow$)，表明存在 $\rightarrow$ 6- α -D-Glcp-1 $\rightarrow$ 6- α - β -D-Glcp。

糖苷键 β -D-Fruf-2 $\rightarrow$ 异头质 C2 与 $\rightarrow$ 6- β -D-Fruf-2 $\rightarrow$ 的 H6 共振区存在一个强烈的交叉峰 C2(β -D-Fruf-2 $\rightarrow$)-H6($\rightarrow$ 6- β -D-Fruf-2 $\rightarrow$)，表明存在 β -D-Fruf-

2 $\rightarrow$ 6- β -D-Fruf-2 $\rightarrow$ 。

糖苷键 $\rightarrow$ 6- β -D-Fruf-2 $\rightarrow$ 异头质 C2 与 $\rightarrow$ 1,6- β -D-Fruf-2 $\rightarrow$ 的 H6 共振区存在一个强烈的交叉峰 C2($\rightarrow$ 6- β -D-Fruf-2 $\rightarrow$)-H6($\rightarrow$ 1,6- β -D-Fruf-2 $\rightarrow$)，表明存在 $\rightarrow$ 6- β -D-Fruf-2 $\rightarrow$ 1,6- β -D-Fruf-2 $\rightarrow$ 。

菊粉型果聚糖的 1 个特征就是在其端位存在葡萄糖残基，在 NOESY 图谱中，糖苷键 α -D-Glcp-1 $\rightarrow$ 的异头氢与其 $\rightarrow$ 1- β -D-Fruf-2 $\rightarrow$ 的 H1 有相关峰 (5.31/3.61)，表明存在 α -D-Glcp-1 $\rightarrow$ 1- β -D-Fruf-2 $\rightarrow$ 。

综上所述，该多糖的主链为： $\rightarrow$ 1- β -D-Fruf-2 $\rightarrow$ 1- β -D-Fruf-2 $\rightarrow$ ，并可以推断出该多糖的结构式，见图 5。

3.6 网络药理学分析

3.6.1 基因靶点预测 利用 SwissTargetPrediction 数据库，预测得到 POP-55 的 147 个基因靶点。同时，借助 GeneCards 数据库和 DisGeNET 数据库，检索糖尿病疾病相关基因靶点，在检索结果中，筛选相关性评分 >4 的靶点，合并去重处理后，获取 2 008 个糖尿病疾病基因靶点。

3.6.2 PPI 网络构建和拓扑学分析 对 147 个 POP-55 靶点与 2 008 个糖尿病疾病基因靶点执行交集运算，借助微生信平台绘制韦恩图，最终获得 54 个交集基因，见图 6-A。将 54 个交集基因导入 STRING 网络平台，构建 PPI 网络，该网络涵盖 54 个节点和 165 条边，PPI 网络拓扑学分析结果见图 6-B，节点大小代表中介中心性值（即节点在网络中作为其他节点之间最短路径桥梁的程度），颜色反映其度值

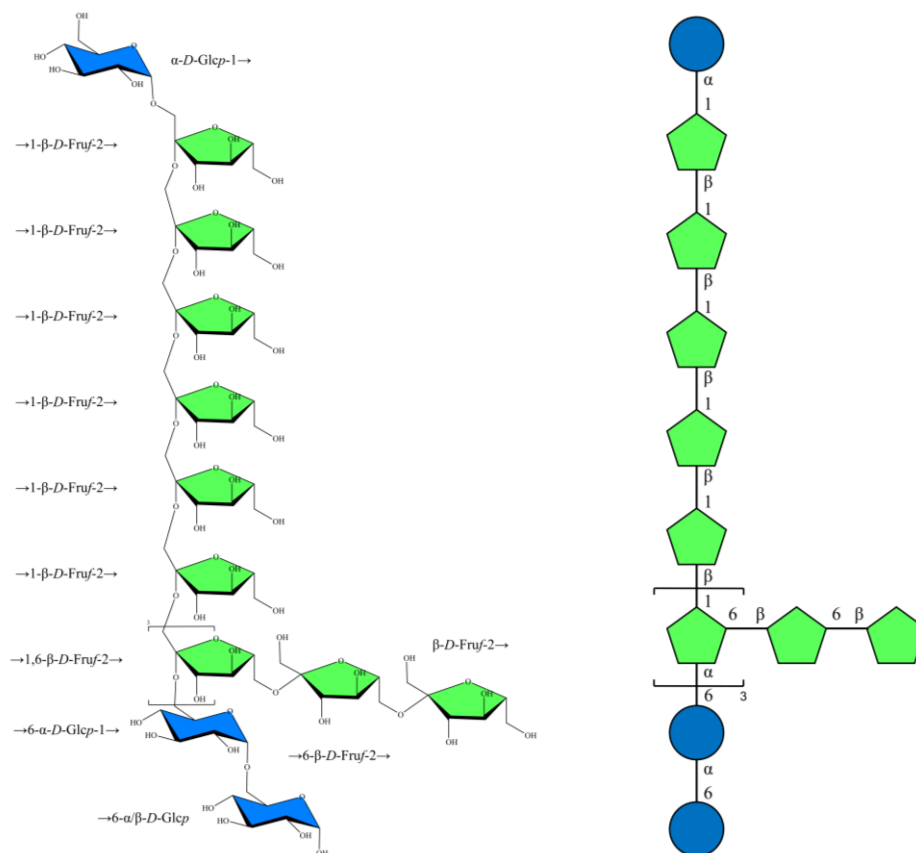


图 5 POP-55 的结构式

Fig. 5 Structural formula of POP-55

(即蛋白质在网络中直接相连的节点数), 节点越大且颜色越深, 表明该靶点在 POP-55 治疗糖尿病机制中发挥核心作用的可能性越高。根据中介中心性、度值和接近中心性筛选出 POP-55 治疗糖尿病的 6 个核心靶点, 如图 6-B 中心环所示。

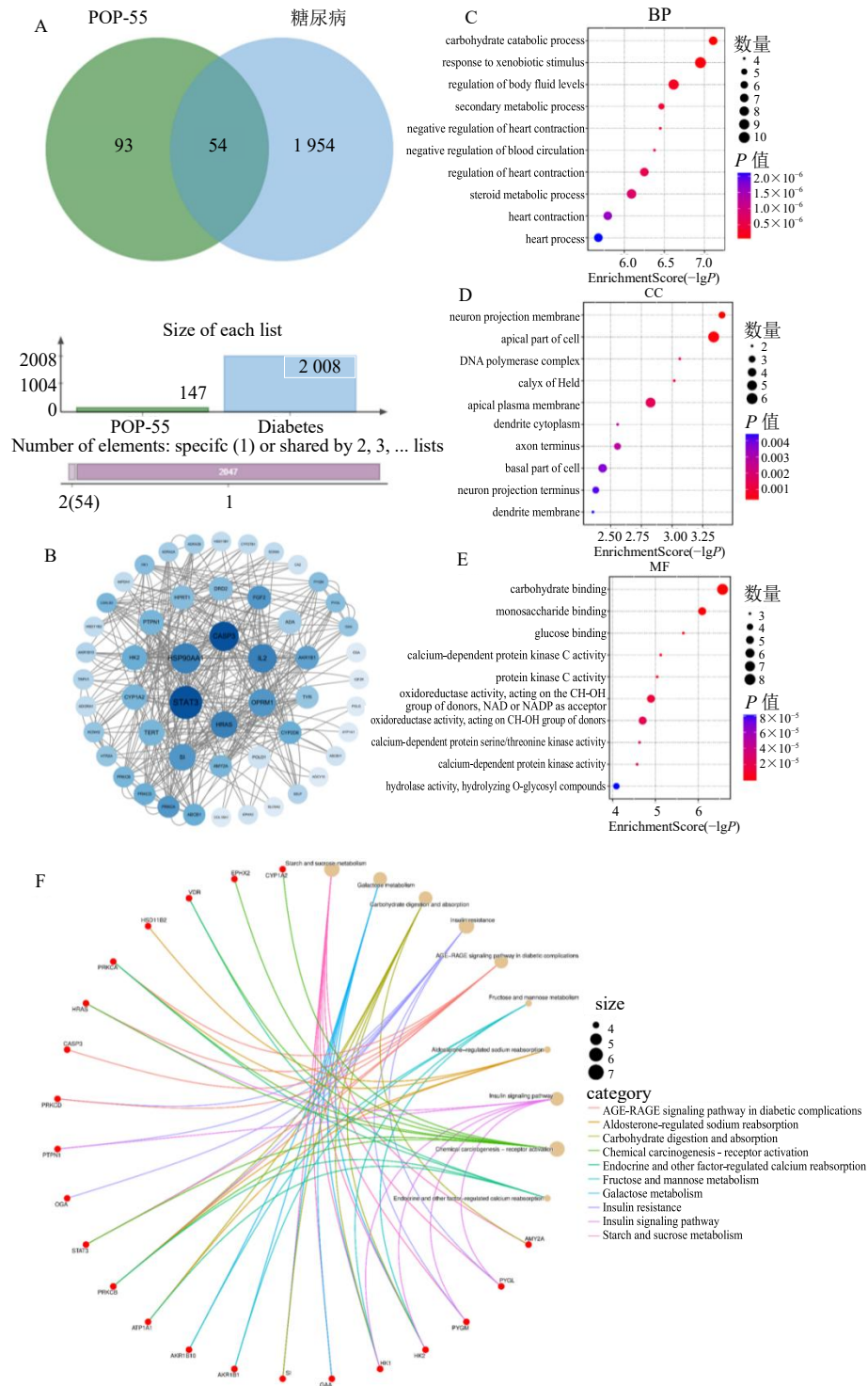
结果表明, POP-55 治疗糖尿病主要涉及信号转导与转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (Caspase 3, CASP3)、白细胞介素-2 (interleukin-2, IL-2) 等多个靶点, 信息见表 3。这些核心靶点在细胞的多种生理过程中发挥重要作用, 且与血糖调节密切相关。以 STAT3 为例, POP-55 与 STAT3 结合后, 可能调节胰岛素信号的传导, 促进细胞摄取和利用葡萄糖, 降低机体血糖水平。而 POP-55 与 CASP3 结合, 则可能通过调节细胞凋亡, 使胰岛 β 细胞的功能保持正常状态, 保障胰岛素实现生理分泌, 从而对血糖调节产生积极的作用效果。

3.6.3 GO 和 KEGG 富集分析 GO 功能注释共获得 1 087 个显著条目, 其中生物学过程 (biological process, BP) 880 项、细胞组分 (cellular component,

CC) 76 项、分子功能 (molecular function, MF) 131 项, 相关结果通过气泡图直观呈现 (图 6-C~E)。BP 分析显示, POP-55 降血糖作用的关键靶点主要富集于碳水化合物分解代谢过程 (carbohydrate catabolic process)、对外源性刺激的应答 (response to exogenous stimulus) 及体液平衡调控 (homeostasis of body fluid) 等生物过程。这表明 POP-55 可能通过促进体内葡萄糖的分解代谢直接降低血糖水平, 同时调控机体对代谢异常产物的应激反应以维持代谢稳态, 并可能通过调节胰岛素分泌及组织间液葡萄糖浓度等体液环境因素间接优化糖代谢。

CC 富集分析显示, 神经元胞体膜 (neuronal cell body membrane) 与轴突终末 (axon terminal) 呈现显著富集特征。这一发现提示 POP-55 可能通过 2 种神经调控机制影响糖代谢: 一方面作用于神经突触结构调节胰岛 β 细胞功能, 另一方面通过调控质膜葡萄糖转运体 (如 GLUT 家族) 的表达与功能增强外周组织葡萄糖摄取能力。

MF 分析表明, POP-55 治疗糖尿病的核心分子功能涉及碳水化合物结合 (carbohydrate binding)、



A-POP-55 和糖尿病交集基因韦恩图; B-交集基因 PPI 网络拓扑分析; C-BP 富集分析气泡图; D-CC 富集分析气泡图; E-MF 富集分析气泡图; F-KEGG 富集分析图。

A-Venn diagram of intersecting genes between POP-55 and diabetes-related genes; B-topological analysis of the PPI network for intersecting genes; C-Bubble diagram of the BP enrichment analysis; D-Bubble diagram of the CC enrichment analysis; E-Bubble diagram of the MF enrichment analysis; F-KEGG enrichment analysis diagram

图 6 网络药理学分析

Fig. 6 Analysis of network pharmacology

单糖结合 (monosaccharide binding) 及葡萄糖结合 (glucose binding) 等分子识别机制。这提示 POP-55 可

能通过直接结合糖类分子调控其分布、转运及代谢过程, 如延缓葡萄糖吸收或促进细胞摄取。同时, 该

表 3 POP-55 治疗糖尿病核心靶点拓扑参数

Table 3 Topological parameters of core targets for POP-55 in diabetes treatment

基因名	中间 中心性	接近中心性	度值	局部平均连接度	网络特性	自图特征值
STAT3	450.01	0.55	34	10.82	18.07	1852.14
CASP3	324.18	0.55	34	11.53	20.68	1921.21
HSP90AA1	352.25	0.52	26	9.54	12.71	1187.52
IL-2	302.50	0.51	26	9.23	13.67	1107.60
OPRM1	262.28	0.46	22	5.09	7.46	535.01
HRAS	228.52	0.48	26	10.15	13.54	1189.85

成分可能通过调节氧化还原稳态改善细胞氧化应激状态,从而增强胰岛素敏感性并保护胰岛 β 细胞功能。

KEGG 通路富集分析共获得 85 条显著通路,相关结果见图 6-F。关键通路包括淀粉与蔗糖代谢(starch and sucrose metabolism)、半乳糖代谢

(galactose metabolism)、碳水化合物消化吸收(carbohydrate digestion and absorbption)及胰岛素抵抗(insulin resistance)等^[47]。在碳水化合物代谢通路中,POP-55 可能通过调控 α -葡萄糖苷酶等关键酶活性,抑制碳水化合物的消化与吸收,进而参与血糖水平的调控,也可能通过抑制肠道葡萄糖转运蛋白功能降低糖类吸收率。针对胰岛素抵抗通路,POP-55 可能通过激活磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B(phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway, PI3K/AKT)信号轴增强胰岛素信号传导效率。值得注意的是,晚期糖基化终产物-晚期糖基化终产物受体(advanced glycation end products-receptor for advanced glycation end products, AGE-RAGE)信号通路的显著富集提示 POP-55 可通过抑制 AGEs 与其受体 RAGE 的相互作用,减轻糖尿病血管及神经并发症。上述代谢通路构成复杂的调控网络,共同维持血糖稳态,其中淀粉-蔗糖代谢通路的靶点预测结果见图 7(深色标注)。

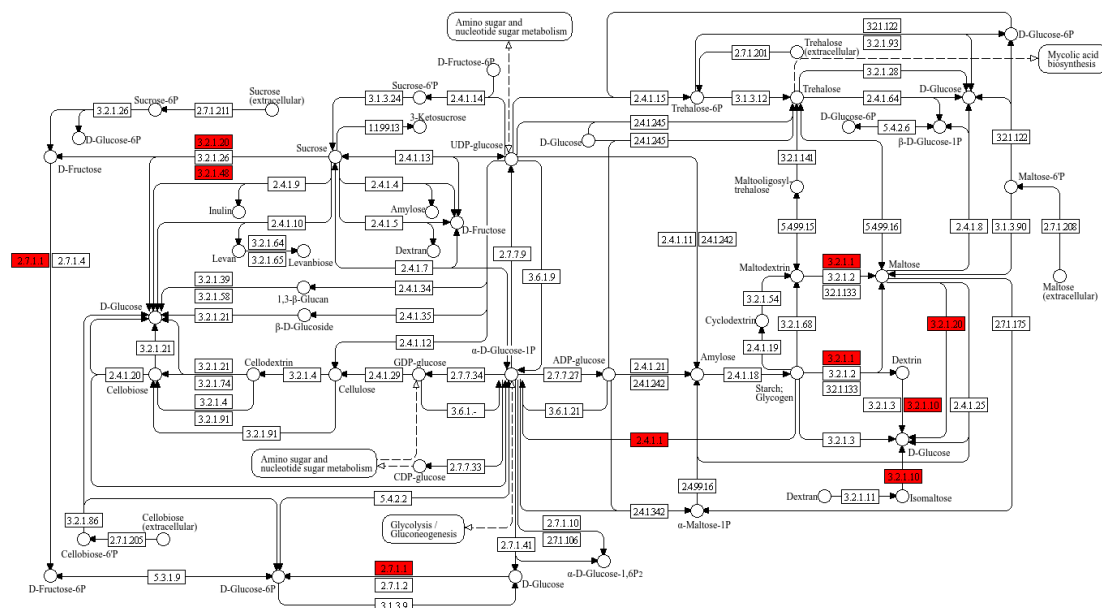


图 7 淀粉与蔗糖代谢通路

Fig. 7 Starch and sucrose metabolism pathway

3.7 分子对接验证

通过分子对接技术对 POP-55 与核心靶点(STAT3、CASP3、HSP90AA1、IL-2、OPRM1、HRAS)的相互作用进行验证,结合能计算结果如图 8 所示。结合能低于 0 kcal/mol (1 cal=4.2 J)标志着配体-受体复合物形成的自发性^[48]。所有靶点与 POP-55 均呈现负结合能,其中 IL-2 展现出最强的结合能力(-6.4 kcal/mol),这可能与其功

能调控效率呈正相关。值得注意的是,IL-2 作为关键的免疫调节因子,通过调控 T 淋巴细胞增殖分化及 B 细胞功能维持免疫稳态。在糖尿病病理状态下,IL-2 表达失调会引发促炎因子(如 TNF- α 、IL-6)的过度释放,加剧胰岛素抵抗与氧化应激损伤。分子对接可视化分析(图 9)显示,POP-55(红色柱状结构)与靶蛋白活性位点(橙色结构)通过分子间相互作用(黄色虚线)形成稳定

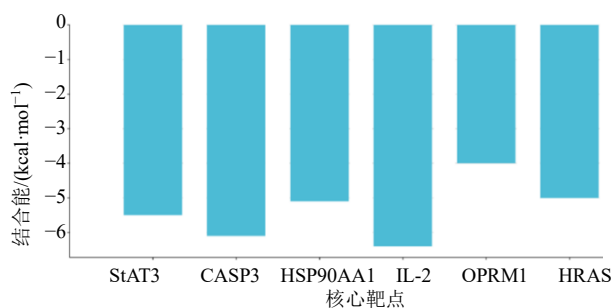


图 8 POP-55 与核心靶点的结合能

Fig. 8 Binding energies between POP-55 and core targets
 的三维构象。这种由疏水作用、氢键网络及盐桥等构成的非共价结合体系，使 POP-55 能够精准调控靶蛋白构象变化，进而干预胰岛素信号通路及糖代谢相关级联反应。

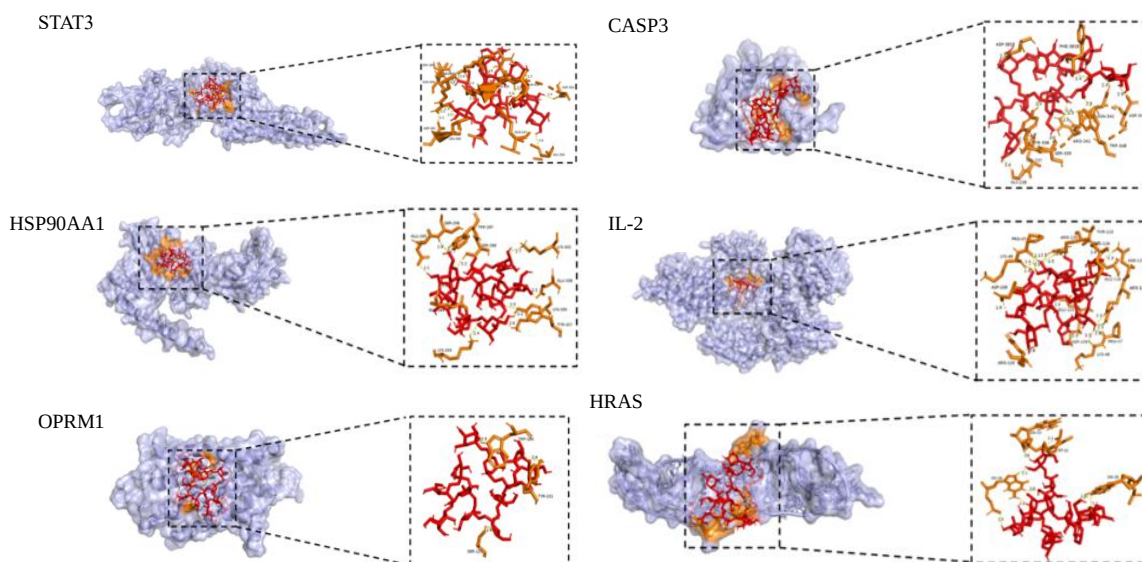


图 9 POP-55 与核心靶点分子对接结果

Fig. 9 Molecular docking results of POP-55 with core targets

抗氧化活性。然而相同浓度下，不同组分 POPs 间吸光度的差异没有统计学意义，这与相对分子质量、单糖组成和官能团分析中发现的 4 种多糖结构相似的结果一致，同时图中仅对不同质量浓度 POP-55 与最低浓度抗氧化差异的显著性进行标识。

3.9 α -葡萄糖苷酶抑制活性

通过测定 405 nm 处的 A 值反映样品的 α -葡萄糖苷酶抑制活性。由图 11 可见，在 0.25~4 mg/mL POPs 各个组分均具有良好的 α -葡萄糖苷酶抑制活性，且具有质量浓度相关性。统计学分析显示实验数据呈现正态分布且方差齐，同一组分不同质量浓度间 A 值相差具有统计学意义，但不同组分 POPs 在相同浓度下的 A 差异没有统计学意义，因此图中

3.8 抗氧化实验

3.8.1 ABTS 自由基清除能力 实验结果显示，在质量浓度 0.25~5 mg/mL，POPs 的 ABTS 自由基清除能力呈现出浓度相关性，且清除能力较强，但仍小于 Vc，见图 10-A。

3.8.2 DPPH 自由基清除能力 实验结果显示，POPs 有较好的 DPPH 自由基清除能力，且呈现浓度相关性上升，见图 10-B。

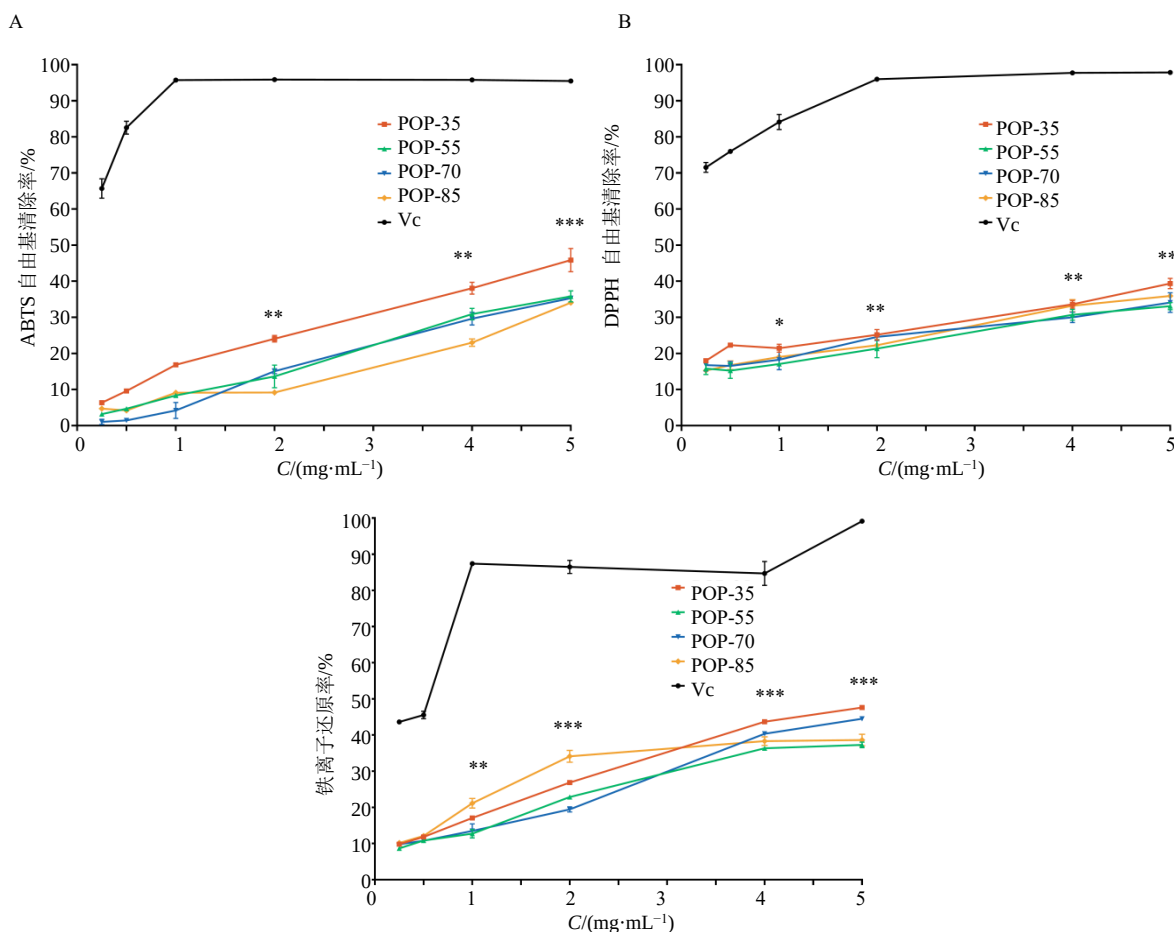
3.8.3 Fe^{3+} 还原能力 实验结果显示，POPs 的铁离子清除能力随样品质量浓度升高而增强，见图 10-C。

统计学分析显示，3 种抗氧化实验结果均符合正态分布且方差齐，ANOVA 分析显示相同组分 POPs 在质量浓度 0.25~5 mg/mL 的 A 值差异显著 ($P < 0.05$)，结合实验结果可见 POPs 具有较强的

仅对不同质量浓度与最低浓度 POP-55 α -葡萄糖苷酶抑制活性差异的显著性进行标识。POPs 良好的 α -葡萄糖苷酶抑制活性与网络药理学分析中相关基因在碳水化合物代谢通路中高度富集的结果一致。

4 讨论

本研究采用分级醇沉法成功分离出 4 种 POPs 组分 (POP-35、POP-55、POP-70、POP-85)，通过系统性结构表征和网络药理学分析揭示其治疗糖尿病的潜在机制，并验证其抗氧化及 α -葡萄糖苷酶抑制活性。结构解析表明，4 种多糖均为低相对分子质量果聚糖 ($1.8 \times 10^3 \sim 2.4 \times 10^3$)，由果糖 (84%~86%) 和葡萄糖 (14%~16%) 构成。官能团分析、单糖组成检测、糖苷键分析与 NMR 波谱



A-ABTS 自由基清除能力; B-DPPH 自由基清除能力; C- Fe^{3+} 还原能力; 与最低药物浓度相比: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 下同。
A-ABTS radical scavenging activity; B-DPPH radical scavenging activity; C- Fe^{3+} reducing power; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs the lowest drug concentration; same as below.

图 10 抗氧化活性结果
Fig. 10 Results of Antioxidation

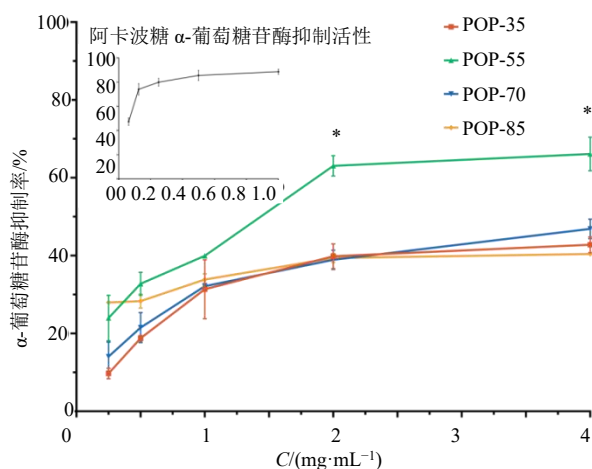


图 11 POPs 的 α -葡萄糖苷酶抑制活性
Fig. 11 α -Glucosidase inhibitory activity of POPs

分析证实, POP-55 主链由 β -(2 $\rightarrow$ 1)-果糖残基和 α -(1 $\rightarrow$ 6)-葡萄糖残基构成, 侧链含 β -(2 $\rightarrow$ 6)-果糖残基构成分支。本研究首次揭示分级醇沉玉竹多糖具有典型菊粉型果聚糖结构特征, 其结构特征与生物活性密切相关。现有研究已证实菊粉型果聚糖具有显著的糖尿病治疗作用^[49-51]。

基于网络药理学预测, POP-55 可能通过靶向 STAT3、CASP3、IL-2 等基因发挥降糖功能。富集分析显示, 这些靶点显著富集于淀粉与蔗糖代谢、碳水化合物消化吸收等通路, 提示 POP-55 可能通过抑制 α -葡萄糖苷酶活性延缓糖类消化吸收。此外, 胰岛素抵抗相关通路的靶点富集现象提示其潜在的胰岛 β 细胞保护及胰岛素增敏作用。分子对接证实 POP-55 与核心靶点具有强结合能 (与 IL-2 结合能最强), 预示其可能通过上调 IL-2 表达抑制 TNF-

α 、IL-6 等炎症因子释放,从而减轻炎症介导的氧化应激损伤,进而发挥改善糖尿病的作用,该发现与课题组的前期研究和临床研究结果一致^[23,52-54]。

体外实验验证表明,POPs 在 0.25~5 mg/mL 呈现浓度相关性的抗氧化能力;在 0.25~4 mg/mL 呈现浓度相关性的 α -葡萄糖苷酶抑制活性。该结果支持 POP-55 通过靶向 IL-2 等靶点改善氧化应激、调控碳水化合物代谢的机制假说。通过网络药理学与体外实验验证,发现 POPs 具备开发为糖尿病干预天然药物或功能性食品成分的潜力。然而,本研究仍存在局限性:(1)需通过糖尿病动物模型开展体内实验验证;(2)分级醇沉获得的多糖组分相对分子质量及单糖组成高度相似,提示需采用离子交换色谱及凝胶渗透色谱等技术实现有效分离。

前期研究中,本课题组采用水/碱萃取、极性分离及凝胶纯化技术从白术中分离纯化 2 种均一多糖,经结构鉴定为菊粉型果聚糖,提示水提法更利于获取富含果聚糖的活性成分,且菊粉型果聚糖可能通过调控 *TNF- α* 和 *IL-1 β* 的 mRNA 表达参与免疫调节过程^[23]。实验结果显示,极性分离获得的水组分多糖占比超过总组分的 95%,且凝胶纯化回收率较高,结合单糖组成分析推测果聚糖类成分主要由中性多糖构成。基于此,在玉竹多糖研究中,通过分级醇沉法获得的 4 种组分经单糖组成分析显示其结构均为果聚糖(本研究以 POP-55 为代表进行结构表征)。尽管 HPGPC 谱图显示色谱峰呈现轻微分叉,但整体对称性良好,满足均一性评价标准。上述证据表明,针对果聚糖类多糖成分,通过优化分级醇沉工艺参数可实现快速高效制备,有效克服了传统极性分离与凝胶纯化技术周期长、得率低的局限性,为中药多糖产业化落地提供了新策略。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] GBD 2021 Diabetes Collaborators. Global, regional, and national burden of diabetes from 1990 to 2021, with projections of prevalence to 2050: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021 [J]. *Lancet*, 2023, 402(10397): 203-234.
- [2] Xu Y, Lu J L, Li M, *et al.* Diabetes in China part 1: Epidemiology and risk factors [J]. *Lancet Public Health*, 2024, 9(12): e1089-e1097.
- [3] Avdagic-Terzic M, Babic Z, Burekovic A. Diabetes mellitus type 2 and cardiovascular diseases-risk assessment [J]. *Mater Sociomed*, 2022, 34(3): 180-183.
- [4] Luan J J, Zheng F, Yang X Y, *et al.* Nanostructured lipid carriers for oral delivery of baicalin: *in vitro* and *in vivo* evaluation [J]. *Colloids Surf A Physicochem Eng Aspects*, 2015, 466: 154-159.
- [5] Arulselvan P, Ghofar H A A, Karthivashan G, *et al.* Antidiabetic therapeutics from natural source: A systematic review [J]. *Biomed Prev Nutr*, 2014, 4(4): 607-617.
- [6] Chen Y Q, Liu Y Y, Sarker M M R, *et al.* Structural characterization and antidiabetic potential of a novel heteropolysaccharide from *Grifola frondosa* via IRS1/PI3K-JNK signaling pathways [J]. *Carbohydr Polym*, 2018, 198: 452-461.
- [7] Lan G S, Chen H X, Wang Z S, *et al.* Extraction of *Polygonatum odoratum* polysaccharides using response surface methodology and preparation of a compound beverage [J]. *Carbohydr Polym*, 2011, 86(3): 1175-1180.
- [8] Liu X, Zhang M S, Guo K, *et al.* Cellulase-assisted extraction, characterization, and bioactivity of polysaccharides from *Polygonatum odoratum* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2015, 75: 258-265.
- [9] Chen Y, Yin L Y, Zhang X J, *et al.* Optimization of alkaline extraction and bioactivities of polysaccharides from rhizome of *Polygonatum odoratum* [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 504896.
- [10] Jiang Q G, Lv Y X, Dai W D, *et al.* Extraction and bioactivity of *Polygonatum* polysaccharides [J]. *Int J Biol Macromol*, 2013, 54: 131-135.
- [11] Kato A, Miura T. Hypoglycemic action of the rhizomes of *Polygonatum officinale* in normal and diabetic mice [J]. *Planta Med*, 1994, 60(3): 201-203.
- [12] Jiang H Y, Xu Y, Sun C Y, *et al.* Physicochemical properties and antidiabetic effects of a polysaccharide obtained from *Polygonatum odoratum* [J]. *Int J Food Sci Tech*, 2018, 53(12): 2810-2822.
- [13] 王世伟, 徐宁. 玉竹多糖对糖尿病大鼠降糖作用及机制研究 [J]. *辽宁中医杂志*, 2017, 44(8): 1739-1741.
- [14] Gong H, Gan X N, Li Y Z, *et al.* Review on the genus *Polygonatum* polysaccharides: Extraction, purification, structural characteristics and bioactivities [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 229: 909-930.
- [15] Zhang F S, Ran C X, Zheng J, *et al.* Polysaccharides obtained from bamboo shoots (*Chimonobambusa quadrangularis*) processing by-products: New insight into ethanol precipitation and characterization [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 112: 951-960.
- [16] Jiang Y P, Qi X H, Gao K, *et al.* Relationship between

- molecular weight, monosaccharide composition and immunobiologic activity of *Astragalus* polysaccharides [J]. *Glycoconj J*, 2016, 33(5): 755-761.
- [17] Yang B, Yang N, Chen Y P, *et al.* An integrated strategy for effective-component discovery of astragali *Radix* in the treatment of lung cancer [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 11: 580978.
- [18] Jiao W Y, Mi S, Sang Y X, *et al.* Integrated network pharmacology and cellular assay for the investigation of an anti-obesity effect of 6-shogaol [J]. *Food Chem*, 2022, 374: 131755.
- [19] Xia Q D, Xun Y, Lu J L, *et al.* Network pharmacology and molecular docking analyses on Lianhua Qingwen capsule indicate Akt1 is a potential target to treat and prevent COVID-19 [J]. *Cell Prolif*, 2020, 53(12): e12949.
- [20] Singh A, Vanga S K, Orsat V, *et al.* Application of molecular dynamic simulation to study food proteins: A review [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2018, 58(16): 2779-2789.
- [21] 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.
- [22] Gong H, Gan X N, Qin B Y, *et al.* Structural characteristics of steamed *Polygonatum cyrtoneura* polysaccharide and its bioactivity on colitis *via* improving the intestinal barrier and modifying the gut microbiota [J]. *Carbohydr Polym*, 2024, 327: 121669.
- [23] Li X J, Xiao S J, Chen J, *et al.* Inulin-type fructans obtained from *Atractylodes Macrocephala* by water/alkali extraction and immunoregulatory evaluation [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 230: 123212.
- [24] Sims I M, Carnachan S M, Bell T J, *et al.* Methylation analysis of polysaccharides: Technical advice [J]. *Carbohydr Polym*, 2018, 188: 1-7.
- [25] Ciucanu I, Kerek F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates [J]. *Carbohydr Res*, 1984, 131(2): 209-217.
- [26] Li X J, Chen J, Yin Y, *et al.* Chemical structure elucidation and functional activities comparison of two polysaccharides purified from *Citrus reticulata* Blanco peels [J]. *Chem Biol Technol Agric*, 2024, 11(1): 37.
- [27] Liu W, Zhang L Z, Wei X, *et al.* Structural characterization of an inulin neoseries-type fructan from *Ophiopogonis Radix* and the therapeutic effect on liver fibrosis *in vivo* [J]. *Carbohydr Polym*, 2024, 327: 121659.
- [28] Gfeller D, Grosdidier A, Wirth M, *et al.* SwissTargetPrediction: A web server for target prediction of bioactive small molecules [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(Web Server issue): W32-W38.
- [29] Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 42717.
- [30] Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, *et al.* The GeneCards suite: From gene data mining to disease genome sequence analyses [J]. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2016, 54: 1.30.1-1.30.1.30.33.
- [31] Piñero J, Queralt-Rosinach N, Bravo À, *et al.* DisGeNET: A discovery platform for the dynamical exploration of human diseases and their genes [J]. *Database*, 2015, 2015: bav028.
- [32] Szklarczyk D, Kirsch R, Koutrouli M, *et al.* The STRING database in 2023: Protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest [J]. *Nucleic Acids Res*, 2023, 51(D1): D638-D646.
- [33] Shannon P, Markiel A, Ozier O, *et al.* Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks [J]. *Genome Res*, 2003, 13(11): 2498-2504.
- [34] Sherman B T, Panzade G, Imamichi T, *et al.* DAVID Ortholog: An integrative tool to enhance functional analysis through orthologs [J]. *Bioinformatics*, 2024, 40(10): btac615.
- [35] Burley S K, Bhikadiya C, Bi C X, *et al.* RCSB protein data bank (RCSB.org): Delivery of experimentally-determined PDB structures alongside one million computed structure models of proteins from artificial intelligence/machine learning [J]. *Nucleic Acids Res*, 2023, 51(D1): D488-D508.
- [36] Chen G J, Wang M J, Xie M H, *et al.* Evaluation of chemical property, cytotoxicity and antioxidant activity *in vitro* and *in vivo* of polysaccharides from Fuzhuan brick teas [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 116: 120-127.
- [37] Yang Y H, Zhou H W, Du Z Z. Effect of drying methods on aroma, taste and antioxidant activity of *Dendrobium officinale* flower tea: A sensomic and metabolomic study [J]. *Food Res Int*, 2024, 187: 114455.
- [38] 刘洋, 殷璐, 龚桂萍, 等. 黑果枸杞叶多糖 LRLP3 的结构、抗氧化活性及免疫活性 [J]. 高等学校化学学报, 2016, 37(2): 261-268.
- [39] 孙婷婷, 刘洋, 魏明, 等. 黄精酒制前后水溶性多糖抗氧化活性研究 [J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(02): 78-84.
- [40] Pan G J, Lu Y T, Wei Z Y, *et al.* A review on the *in vitro* and *in vivo* screening of α -glucosidase inhibitors [J].

- Heliyon*, 2024, 10(18): e37467.
- [41] Long H R, Gu X Y, Zhou N, *et al.* Physicochemical characterization and bile acid-binding capacity of water-extract polysaccharides fractionated by stepwise ethanol precipitation from *Caulerpa lentillifera* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 150: 654-661.
- [42] Fernando I P S, Dias M K H M, Madusanka D M D, *et al.* Step gradient alcohol precipitation for the purification of low molecular weight fucoidan from *Sargassum siliquastrum* and its UVB protective effects [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 163: 26-35.
- [43] Prado-Fernández J, Rodríguez-Vázquez J A, Tojo E, *et al.* Quantitation of κ -, ι - and λ -carrageenans by mid-infrared spectroscopy and PLS regression [J]. *Anal Chim Acta*, 2003, 480(1): 23-37.
- [44] Wang X M, Zhang Z S, Yao Z Y, *et al.* Sulfation, anticoagulant and antioxidant activities of polysaccharide from green algae *Enteromorpha linza* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2013, 58: 225-230.
- [45] Zhao L L, Peng Y B, Huang J, *et al.* Structural characterization of polysaccharides from *Polygonatum Sibiricum* and effect on alleviating hyperlipidemia in egg yolk emulsion-induced mice [J]. *Int J Biol Macromol*, 2025, 296: 139808.
- [46] Xie X F, Gu Y, Liu Y, *et al.* An inulin-type fructan from *Codonopsis pilosula* ameliorates cyclophosphamide-induced immunosuppression and intestinal barrier injury in mice [J]. *Int J Biol Macromol*, 2025, 310(Pt 1): 143312.
- [47] Kanehisa M, Furumichi M, Sato Y, *et al.* KEGG: Biological systems database as a model of the real world [J]. *Nucleic Acids Res*, 2025, 53(D1): D672-D677.
- [48] Zhao J T, Cao Y, Zhang L. Exploring the computational methods for protein-ligand binding site prediction [J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2020, 18: 417-426.
- [49] Tawfick M M, Xie H L, Zhao C, *et al.* Inulin fructans in diet: Role in gut homeostasis, immunity, health outcomes and potential therapeutics [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 208: 948-961.
- [50] Rao M Y, Gao C L, Xu L, *et al.* Effect of inulin-type carbohydrates on insulin resistance in patients with type 2 diabetes and obesity: A systematic review and meta-analysis [J]. *J Diabetes Res*, 2019, 2019: 5101423.
- [51] Lo Conte M, Antonini Cencicchio M, Ulaszewska M, *et al.* A diet enriched in omega-3 PUFA and inulin prevents type 1 diabetes by restoring gut barrier integrity and immune homeostasis in NOD mice [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1089987.
- [52] Dong S, Hiam-Galvez K J, Mowery C T, *et al.* The effect of low-dose IL-2 and Treg adoptive cell therapy in patients with type 1 diabetes [J]. *JCI Insight*, 2021, 6(18): e147474.
- [53] Long S A, Buckner J H, Greenbaum C J. IL-2 therapy in type 1 diabetes: “Trials” and tribulations [J]. *Clin Immunol*, 2013, 149(3): 324-331.
- [54] Rosenzweig M, Salet R, Lorenzon R, *et al.* Low-dose IL-2 in children with recently diagnosed type 1 diabetes: A Phase I/II randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-finding study [J]. *Diabetologia*, 2020, 63(9): 1808-1821.

[责任编辑 王文倩]