

彭松, 卢炫圻, 林芳竹, 等. 金樱子多糖、车前子多糖和冬葵果多糖体内外抗炎效果比较 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (4): 117-124.

PENG S, LU X Q, LIN F Z, et al. Comparison of the *in vivo* and *in vitro* anti-inflammatory effects of *Rosa laevigata Michx* polysaccharide, *Plantaginis Semen Growth* polysaccharide and *Fructus Malvae polysaccharide* [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (4): 117-124.

金樱子多糖、车前子多糖和冬葵果多糖体内外抗炎效果比较

彭松¹, 卢炫圻¹, 林芳竹¹, 毛宁宁¹, 于亚明¹,
于琳¹, 施宗傲², 王德云^{1*}

(1. 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095;

2. 南京中兽医研究中心, 江苏 南京 210018)

摘要: 旨在对比金樱子多糖、冬葵果多糖、车前子多糖的体内外抗炎活性。体外试验用脂多糖 (LPS) 诱导小鼠 RAW264.7 细胞构建炎症模型, 分别加入金樱子多糖、车前子多糖、冬葵果多糖, 以 MTT 法检测其对 RAW264.7 细胞活力的影响, Griess 法检测 LPS 诱导的细胞上清液中 NO 含量, ELISA 检测白细胞介素 6 (IL-6)、白细胞介素 1 β (IL-1 β) 和 α 肿瘤坏死因子 (TNF- α) 含量, RT-PCR 法检测炎症细胞因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的 mRNA 表达量; 体内试验用葡聚糖硫酸钠 (DSS) 构建小鼠溃疡性结肠炎模型, 同时多糖组和阳性药组的小鼠分别灌服多糖 (200 mg/kg) 和 5-氨基水杨酸 (200 mg/kg), 空白组和 DSS 组灌服生理盐水, 采用 ELISA 检测结肠组织中炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的浓度, 以结肠长度、组织病理学评分比较结肠组织病理变化。体外试验结果发现: 在同一浓度下, 与模型组 (LPS) 相比, 对炎症介质 (NO、TNF- α 、IL-6、IL-1 β) 含量和促炎细胞因子 (TNF- α 、IL-6、IL-1 β) 的 mRNA 表达量抑制作用以金樱子多糖组最高, 车前子多糖组次之, 而冬葵果多糖组抑制作用不明显; 体内试验结果发现: 与 DSS 组相比, 金樱子多糖组的疾病活动指数 (DAI) 显著降低 ($P < 0.05$), 结肠长度极显著增加 ($P < 0.01$), 组织病理学评分和结肠组织中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平极显著降低 ($P < 0.001$), 结肠组织中 IL-10 水平极显著升高 ($P < 0.001$), 其次是车前子多糖组的结肠长度显著增加 ($P < 0.05$), 组织病理学评分和结肠组织中 TNF- α 、IL-1 β 水平显著降低 ($P < 0.05$), 结肠组织中 IL-6 水平极显著降低以及 IL-10 水平极显著升高 ($P < 0.01$), 而冬葵果多糖组的指标变化不明显。试验结果表明, 与车前子多糖和冬葵果多糖相比, 金樱子多糖在体内外外的抗炎效果最佳, 可以作为多糖类抗炎剂的候选药。

关键词: 金樱子多糖; 冬葵果多糖; 车前子多糖; 炎症因子; 抗炎

中图分类号: S853.7 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)04-0117-08

Comparison of the *in vivo* and *in vitro* anti-inflammatory effects of *Rosa laevigata Michx* polysaccharide, *Plantaginis Semen Growth* polysaccharide and *Fructus Malvae polysaccharide*

PENG Song¹, LU Xuanqi¹, LIN Fangzhu¹, MAO Ningning¹, YU Yaming¹,
YU Lin¹, SHI Zongao², WANG Deyun^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. Nanjing Traditional Chinese Veterinary Medicine Research Center, Nanjing 210018, China)

Abstract: This study aimed to compare anti-inflammatory activities of *Rosa laevigata Michx* polysaccharide, *Plantaginis Semen Growth polysaccharide*, and *Fructus Malvae polysaccharide* *in vivo* and *in vitro*. Firstly, a RAW264.7 cell model was established using lipopolysaccharide (LPS) for estimation of inflammation indicators *in vitro*, which were treated with *Rosa laevigata Michx* polysaccharide, *Plantaginis Semen Growth* polysaccharide, and *Fructus Malvae polysaccharide*, respectively. Subsequently, RAW264.7 cell viability was detected by MTT assay. The level of nitric oxide (NO) was tested by Griess assay. The content of interleukin 6 (IL-6), interleukin 1 β (IL-1 β), and α -tumor necrosis factor (TNF- α) in supernatants were tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The mRNA expression of TNF- α , IL-6, and IL-1 β was tested by RT-PCR assay. Secondly, a DSS-induced ulcerative colitis mouse model was used in experiments *in vivo*. Polysaccharides (200 mg/kg), 5-aminosalicylic acid (200 mg/kg), and saline were given to the polysaccharides group, the posi-

收稿日期: 2023-08-11; 修回日期: 2024-01-26

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2022YFD1801103); 中央高校基本科研业务费专项 (KYCXJC2023003)

第一作者: 彭松, 男, 博士研究生

* 通信作者: 王德云, 博士, 教授, 研究方向为临床兽医学, E-mail: dywang@njau.edu.cn.

tive drug groups, the normal group, and the model group (DSS), respectively, by gavage. TNF- α , IL-6, and IL-1 β levels in colonic tissues were determined using ELISA. Histopathologic change in the colon was analyzed by measuring colon length and calculating histopathologic scores. *In vitro*, the *Rosa laevigata Michx* polysaccharide group had the most effective inhibitory effect on the content of NO, TNF- α , IL-6, and IL-1 β and the mRNA expression of pro-inflammatory factors (TNF- α , IL-6, IL-1 β), followed by the *Plantaginis Semen Growth* polysaccharide group, whereas the *Fructus Malvae* polysaccharide group had no significant effect in inhibiting the growth of inflammatory mediators, compared with the model group (LPS) at the same concentrations. *In vivo*, compared with the model group (DSS), the disease activity index (DAI) score ($P < 0.05$), histopathological score ($P < 0.001$), and levels of TNF- α , IL-6, and IL-1 β ($P < 0.001$) in the colon tissues were alleviated, and the colon length and the level of IL-10 ($P < 0.01$) were modified in the *Rosa laevigata Michx* polysaccharide group. Notably, the *Plantaginis Semen Growth* polysaccharide group had a similar result which included the histopathological score ($P < 0.05$), the levels of TNF- α , IL-6, and IL-1 β ($P < 0.05$) in colon tissues, which could be alleviated. The colon length ($P < 0.05$) and the level of IL-10 ($P < 0.01$) were modified. However, the *Fructus Malvae* polysaccharide group showed no effect in relieving colitis. In summary, compared with *Plantaginis Semen Growth* polysaccharide and *Fructus Malvae* polysaccharide, *Rosa laevigata Michx* polysaccharide had the best anti-inflammatory effects and could be a candidate drug of polysaccharide anti-inflammatory agents.

Keywords: *Rosa laevigata Michx* polysaccharide; *Plantaginis Semen Growth* polysaccharide; *Fructus Malvae* polysaccharide; inflammatory factors; anti-inflammation

炎症是一种适应性反应,由有害刺激和条件触发,如果急性炎症无法调节,则会导致慢性炎症、自身免疫和过度组织损伤。在一些疾病的临床治疗过程中,往往需要通过抗炎类药物来阻止炎症所带来的损伤^[1]。中药抗炎在近年来已成为一个重要的研究领域,针对一些炎症疾病,传统中药制剂在临床治疗以及试验研究中均表现出了良好的抗炎功效^[2]。多糖作为大多数中药的主要成分,由重复单糖残基通过糖苷键聚合而成,具有丰富的生物活性,其中多糖抗炎活性研究引起越来越多人的关注^[3]。

金樱子 (*Rosa laevigata Michx*) 多糖是从蔷薇科蔷薇属金樱子的干燥果实中提取的一种酸性杂多糖,具有抗氧化、降血脂、抗肿瘤和抑菌抗炎等作用^[4];冬葵果 (*Fructus Malvae polysaccharide*) 多糖从锦葵科植物冬葵的干燥成熟果实中提取,含有中性多糖、酸性多糖、肽聚糖和低聚糖,具有清除自由基和抑制脂质过氧化的作用^[5];车前子 (*Plantaginis Semen Growth*) 多糖是从车前子中提取的一种酸性杂多糖,具有整肠通便、调节血糖、降低血脂、抗氧化、抗炎及防治动脉粥样硬化的作用^[6]。因此,本试验以细胞炎症模型和小鼠肠道炎症模型为研究对象,探讨金樱子多糖、车前子多糖和冬葵果多糖的抗炎作用,筛选出抗炎效果最好的多糖,以期有多糖类抗炎剂的研发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验药物

5-氨基水杨酸购于上海毕得医药科技股份有限公司;金樱子、车前子、冬葵果药材购于南京大华中药店。

1.1.2 细胞系和实验动物

RAW264.7 细胞购于上海纪宁生物科技有限公司。8 周龄 ICR 小鼠购自扬州大学比较医学中心,在试验前适应性饲养 7 d。所有动物相关试验均严格按照试验动物福利伦理的要求及南京农业大学 IACUC 实验动物护理和使用指南进行。

1.1.3 主要试剂

脂多糖 (LPS, 美国 Sigma 公司); DMEM 培养基、胎牛血清、青霉素-链霉素双抗 (美国 Gibco 公司); 小鼠肿瘤坏死因子 (TNF- α)、白细胞介素 1 β (IL-1 β)、白细胞介素 10 (IL-10)、白细胞介素 6 (IL-6) ELISA 试剂盒 (杭州联科生物技术有限公司); RNA 反转录试剂盒 (南京诺唯赞生物有限公司); 葡聚糖硫酸钠 (DSS, 分子量 36~50 kDa, 美国 MP 公司); 磷酸盐缓冲液 (PBS, 南京奥青生物技术有限公司); 10 \times PBS 缓冲液 (北京索莱宝科技有限公司); D-无水葡萄糖 (分析纯, 中国药品生物制品检定所); 其余试剂均为分析纯。

1.1.4 试验仪器

旋转蒸发器 SY-5000 (上海亚荣生化仪器厂); 冷冻干燥机 (宁波新芝生物科技股份有限公司); 离心机 (美国 Thermo 公司); Multiskan FC 酶标仪 (赛默飞世尔上海仪器有限公司)

1.2 多糖的提取及含量测定

金樱子多糖的提取:将干燥的去核金樱子果肉粉末按质量比 1:5 加入 95% 的乙醇,80 $^{\circ}$ C 冷凝回流脱除脂质,烘干,加入质量 20 倍的蒸馏水,95 $^{\circ}$ C 提取 2.5 h,重复 3 次,收集滤液浓缩,按体积比 1:4 与 100% 乙醇混合,静置过夜后 4 000 g 离心 10 min,收集沉淀,Sevage 法除蛋白 (氯仿:正丁醇=4:1) 重复 10 次。把沉淀加蒸馏水重新溶解后,透析,冻干,

获得金樱子多糖。

冬葵果多糖的提取：将冬葵果粉末，按药材：石油醚=1：3（体积比），60℃水浴加热，回流脱脂；过滤，按滤渣：乙醇=1：3（体积比），80℃水浴加热，回流除醇溶物；过滤，按滤渣：水=1：9（体积比），80℃提取2h，提取3次，合并滤液，浓缩至原来体积的1/4。在滤液中加入一定量无水乙醇至最终醇浓度为80%，进行醇沉，收集沉淀，挥发有机溶剂，蒸馏水溶解，按Sevage试剂：多糖溶液=1：3（体积比），除蛋白，重复10次，离心取水相，透析，冻干，得到冬葵果多糖。

车前子多糖的提取：将干燥的车前子用80%乙醇浸泡24h，滤渣乙醇。干燥后，加入10倍体积蒸馏水，沸水浴回流提取3h，重复3次，离心，合并滤液，浓缩至滤液体积的1/5。浓缩液中加入无水乙醇，使乙醇终浓度达80%，4℃醇沉过夜，收集沉淀，依次用无水乙醇、丙酮、乙醚各洗2次，蒸馏水溶解，Sevage法除蛋白，重复10次，透析，醇沉，冻干，得精制车前子多糖。

所有多糖均采用硫酸-苯酚法测定多糖含量，以葡萄糖为基准物质，校正系数为0.9997。测得金樱子多糖含量为78.9%，车前子多糖含量为68.1%，冬葵果多糖含量为77.4%。

1.3 RAW264.7 细胞存活率的测定

取处于对数生长期的RAW264.7细胞，接种到96孔板中，每孔100μL，细胞密度约为 5×10^5 个/mL，在37℃和5%的CO₂条件下培养12h。在处

理组中加入不同浓度的多糖溶液（31.25、62.5、125、250、500、1000、2000、4000μg/mL），培养24h，加入MTT溶液（5mg/mL），培养4h，在490nm处测量吸光度。细胞存活率=药物组OD值/空白组OD值×100%。

1.4 细胞上清液中NO、IL-6、TNF-α、IL-1β含量的测定

取处于对数生长期的RAW264.7细胞，接种到24孔板中，每孔1mL，细胞密度约为 5×10^5 个/mL，在培养箱中培养过夜。加入不同浓度的多糖溶液（500、250、125μg/mL），2h后，加入LPS（1μg/mL）培养24h。收集细胞上清液，用Griess方法测量上清液中的NO含量。根据ELISA试剂盒说明书，测定细胞上清液中IL-6、TNF-α、IL-1β的含量。

1.5 细胞因子mRNA表达量的测定

同1.3方法处理细胞后，根据试剂盒说明书提取总RNA，逆转录成cDNA，在NCBI数据库中检索相关基因序列，使用Primer 6.0设计引物（引物由北京擎科生物技术有限公司合成），基因引物如表1。配置10μL体系，包括2×ChamQ SYBR qPCR Master Mix 5μL、前引物0.4μL、后引物0.4μL、50×ROX Reference Dye2为0.4μL、cDNA模板1μL，无菌双蒸水7.8μL。反应程序为：95℃30s；95℃10s，60℃30s，40个循环；95℃15s，60℃60s，95℃15s，4℃终止反应。以β-actin为内参基因，采用2^{-ΔΔCt}计算基因表达的相对量。

表1 相关基因引物

基因	上游引物序列 (5'→3')	下游引物序列 (5'→3')
IL-6	CCAAGAGGTGAGTCTTCCC	CTGTTGTTTCAGACTCTCTCCCT
IL-1β	GCAACTGTTCTGAACTCAACT	ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT
TNF-α	CAGGCGGTGCCTATGTCTC	CGATCACCCGAAGTTCAGTAG
β-actin	GTGACGTTGACATCCGTAAGA	GCCGGACTCATCGTACTCC

1.6 动物模型构建及分组

ICR小鼠适应性饲养1周后，平均分为6组，每组6只，分别为空白对照组，模型组（葡聚糖硫酸钠，DSS），阳性药组（5-氨基水杨酸），金樱子多糖组，车前子多糖组和冬葵果多糖组。试验期间除空白对照组给予蒸馏水外，其余各试验组均给予5%（重量/体积），DSS饮水，连续饮用7d。同时各治疗组每天分别灌服5-氨基水杨酸（200mg/kg）或某种多糖（200mg/kg），空白组与模型组灌服等量生理盐水，持续7d。

1.7 疾病活动指数（DAI）评分和结肠长度测定

参考文献[7]进行DAI评分。评分标准包括：体重减轻评分，粪便成型程度和粪便隐血程度。具体来说，体重无明显减轻计为0分；减轻1%~5%计为1分；减轻5%~10%计为2分；减轻10%~15%计为3分；减轻15%以上计为4分。粪便呈正常颗粒状计为0分；当粪便稍松软时计为1分；粪便呈中度松软时计为2分；当粪便不成形时计为3分；呈水样粪便时则计为4分。通过粪便潜血试验检测，当粪便潜血试验为阴性时计0分；粪便检测弱阳性时计1分；当粪便呈隐血阳性时计2分；粪便隐血试验检测结果

呈强阳性时计 3 分；若肉眼可见小鼠明显血便则计 4 分。三者相加即为 DAI 评分。

末次给药后，禁食不禁水 24 h，麻醉小鼠后采集全段结直肠，测量结直肠长度。

1.8 结肠病理组织学观察

采集小鼠结肠组织置于 4% 多聚甲醛固定，用石蜡包埋并切片，HE 染色，显微镜下观察并拍照。组织病理学评分则通过评价炎症、黏膜损伤和腺体损伤程度进行评分，三者评分之和进行计算。具体评分细则如下：炎症程度不明显计为 0 分；轻度计为 1 分；中度计为 2 分；重度计为 3 分。黏膜损伤程度不明显计为 0 分；损伤在黏膜层计为 1 分；损伤到达黏膜下层计为 2 分；损伤到达肌层和浆膜层计为 3 分。腺体损伤程度不明显计为 0 分；少量腺体扩张计为 1 分；多灶性腺体扩张计为 2 分；部分腺体消失计为 3 分。

1.9 结肠组织中炎性细胞因子的检测

称取结肠组织，加入 5 倍体积 PBS（含 1%

PMSF），充分研磨，离心，收集上清液， $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。根据 ELISA 试剂盒说明书，测定结肠组织中 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、IL-10 的浓度。

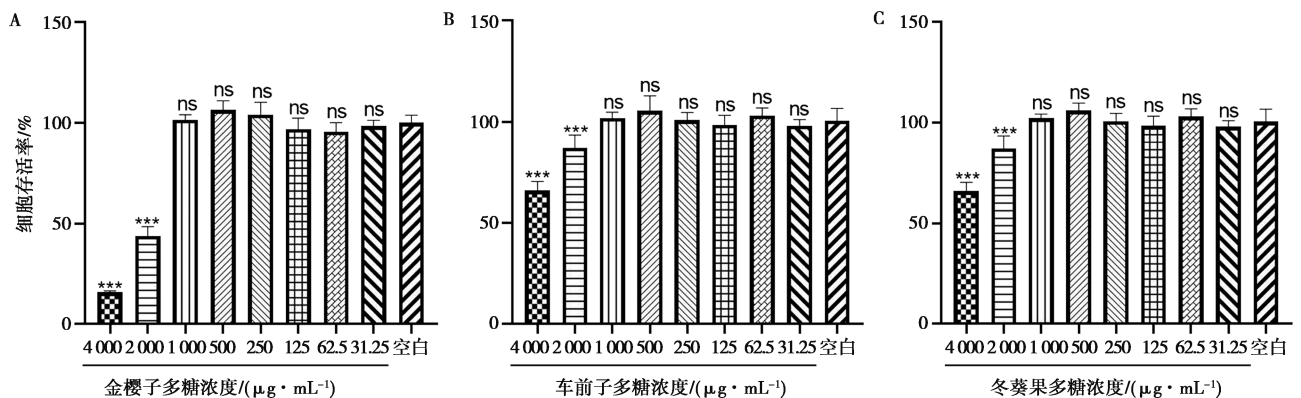
1.10 数据统计与分析

试验数据用 Excel 初步整理计算，用 SPASS 18.0 进行分析，设定 $P < 0.05$ 为有显著性差异， $P < 0.01$ 为有极显著性差异，用 GraphPad Prism 9.0 软件作图，结果均以“平均数 \pm 标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 多糖对 RAW264.7 细胞存活率的影响

如图 1 所示，当 3 种多糖浓度 $\leq 1\text{ mg/mL}$ 时，各组细胞存活率与空白组无显著性差异 ($P > 0.05$)，安全性好。可以看出在 $500\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时均有增殖趋势，故 3 种多糖均选择浓度为 500 、 250 和 $125\text{ }\mu\text{g/mL}$ 进行后续细胞试验。



注：与空白组相比，***表示 $P < 0.001$ ；ns 表示差异不显著 ($P > 0.05$)。

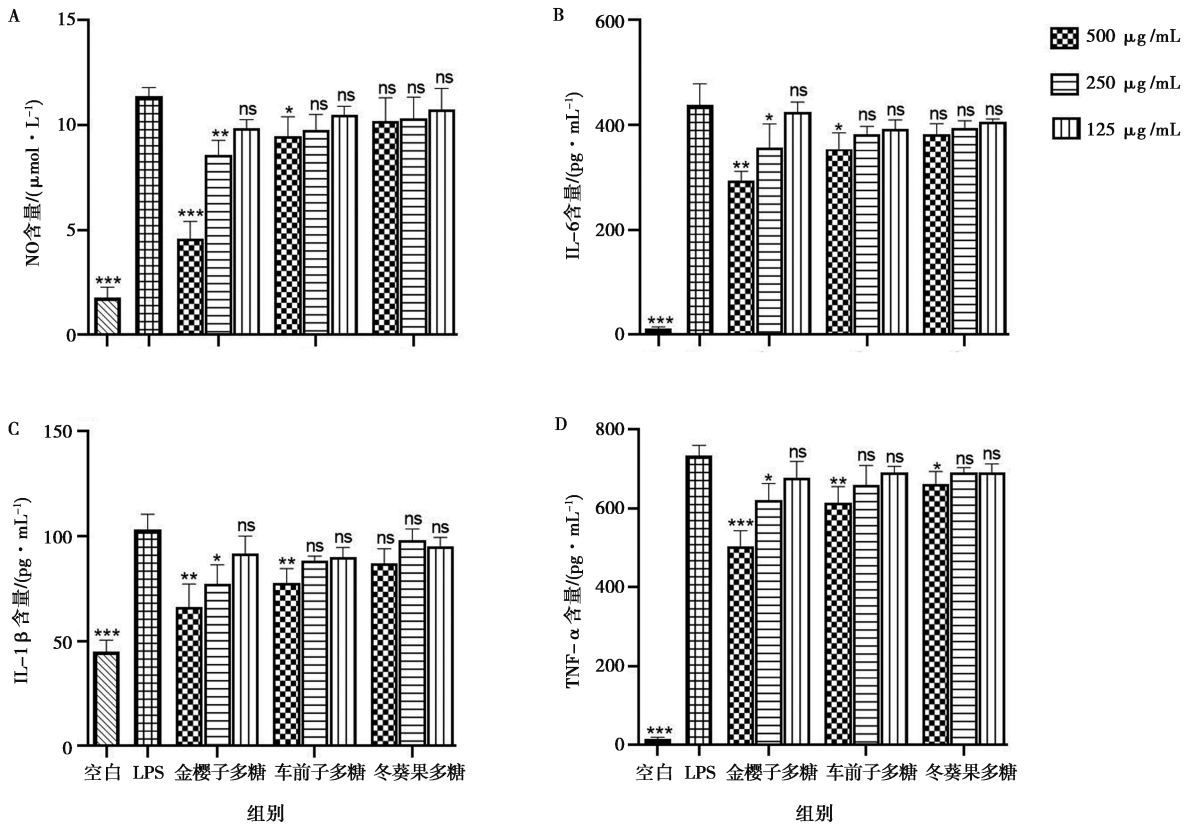
图 1 3 种多糖对 RAW264.7 细胞存活率的影响

2.2 多糖对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞上清液中炎性介质含量的影响

如图 2 所示，与空白组相比，LPS 组 NO、IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 含量极显著增高 ($P < 0.001$)；与 LPS 组相比，金樱子多糖组在浓度为 $500\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时，可极显著降低 NO、IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 的含量 ($P < 0.01$)， $250\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时可显著降低 NO、IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 的含量 ($P < 0.05$)；车前子多糖组在浓度为 $500\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时，可显著降低 NO、IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 的含量 ($P < 0.05$)；冬葵果多糖不同剂量组有降低趋势，但与 LPS 组相比无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.3 多糖对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞分泌细胞因子 mRNA 含量的影响

如图 3 所示，与空白组相比，LPS 组显著提高了炎性细胞因子 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 的 mRNA 的表达量 ($P < 0.001$)。与 LPS 组相比，3 种多糖都不同程度地抑制了促炎细胞因子的表达。金樱子多糖组在浓度为 $500\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时，能够极显著抑制促炎细胞因子 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 的 mRNA 表达量 ($P < 0.001$)，在浓度为 $250\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时，能够极显著抑制促炎细胞因子 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 的 mRNA 表达量 ($P < 0.01$)；车前子多糖组在浓度为 $500\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时，能够显著抑制促炎细胞因子 IL-6、TNF- α 的 mRNA 的表达量 ($P < 0.05$)；冬葵果多糖不同剂量组有抑制促炎细胞因子 mRNA 表达的趋势，但与 LPS 组相比均无显著性差异 ($P > 0.05$)。



注：与 LPS 组相比，* 表示 $P < 0.05$ ，** 表示 $P < 0.01$ ，*** 表示 $P < 0.001$ 。下同。

图 2 多糖对炎症介质含量的影响

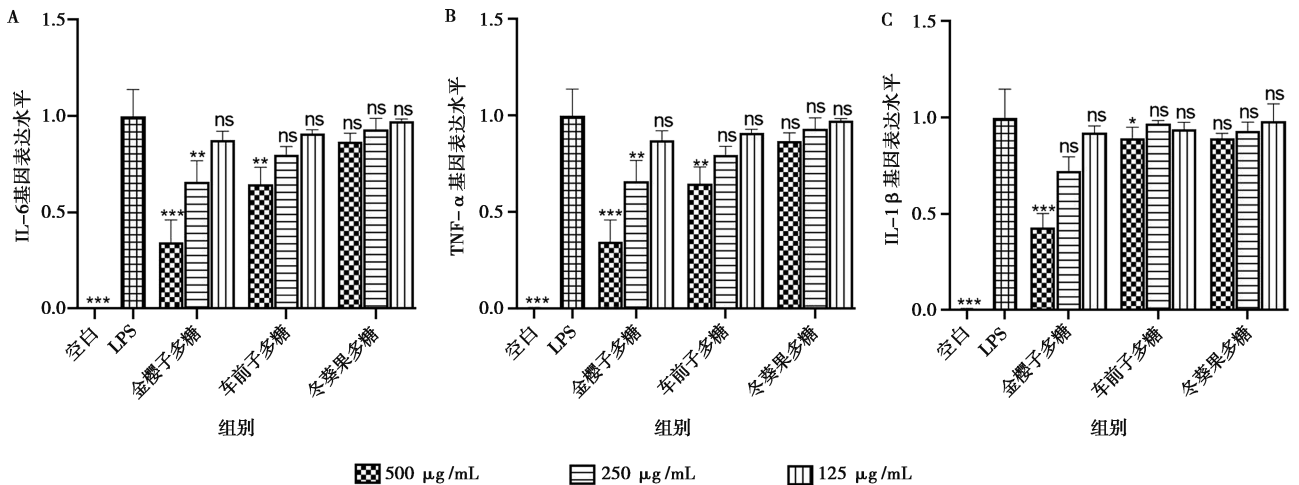


图 3 多糖对细胞因子 IL-6 (A)、TNF-α (B) 和 IL-1β (C) 基因 mRNA 表达水平的影响

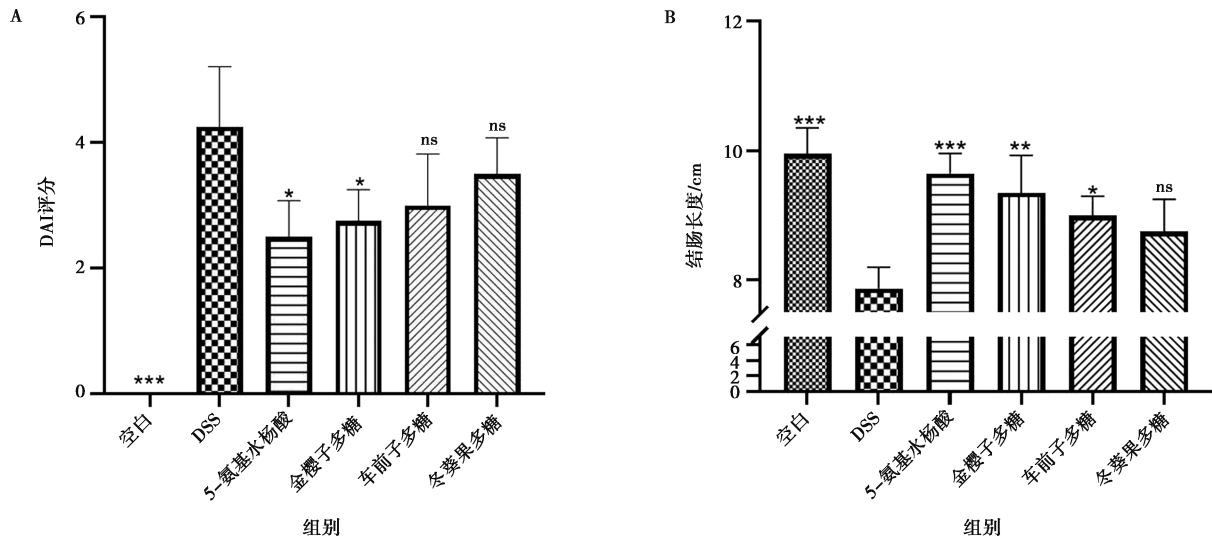
2.4 多糖对 DSS 诱导的溃疡性结肠炎小鼠 DAI 评分和结肠长度的影响

试验期间通过检测小鼠体重变化、粪便性状、便血情况对各组小鼠进行疾病活动指数评分。结果表明，从造模第 4 天开始，除空白组外，其余试验组小鼠体重下降、便血，至第 7 天，DSS 组仍有明显便血，而使用 5-氨基水杨酸和 3 种多糖治疗后，便血

情况有不同程度的缓解，以此进行 DAI 评分。如图 4 A 所示，与空白组小鼠相比，DSS 组小鼠 DAI 评分在试验期间升高。与 DSS 组相比，金樱子多糖组和阳性药组的 DAI 评分显著下降 ($P < 0.05$)，而车前子多糖组和冬葵果多糖组呈下降趋势，但无显著性差异 ($P > 0.05$)。如图 4B 所示，与空白组相比，DSS 组小鼠的结肠长度显著缩短 ($P < 0.001$)，而金樱子多糖

和阳性药治疗后可极显著缓解 DSS 引起的结肠长度缩短 ($P<0.01$), 车前子多糖可显著缓解 DSS 引起

的结肠长度缩短 ($P<0.05$), 冬葵果多糖有缓解趋势, 但无显著性差异 ($P>0.05$)。



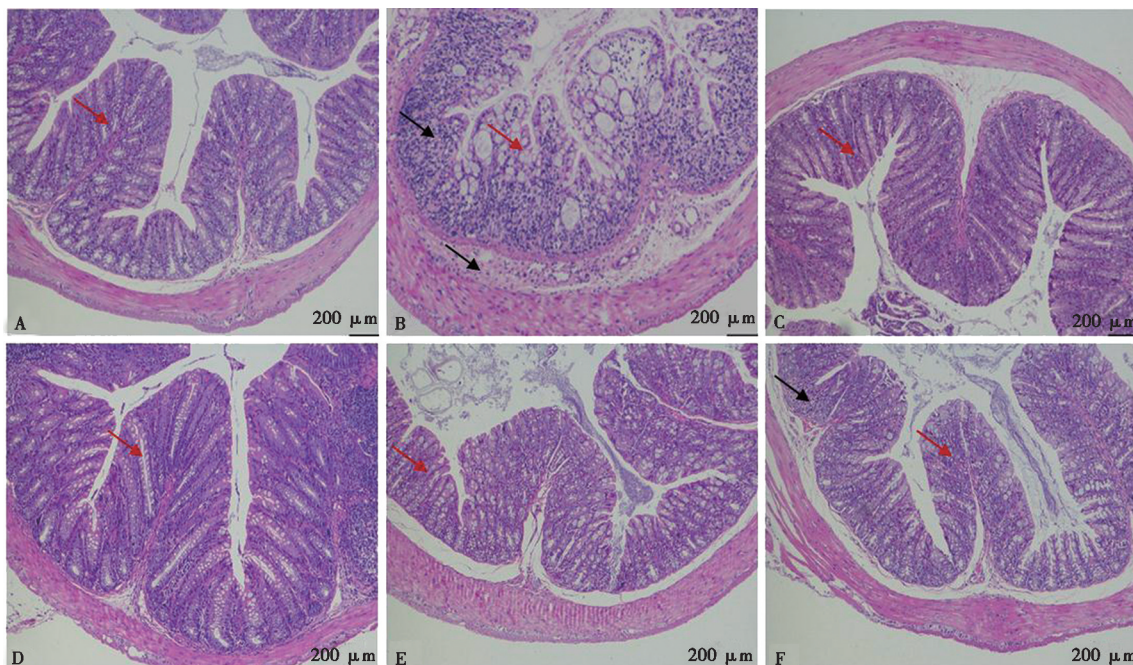
注: 与 DSS 组相比, * 表示 $P<0.05$, ** 表示 $P<0.01$, *** 表示 $P<0.001$ 。下同。

图 4 多糖对小鼠 DAI 评分 (A) 和结肠长度 (B) 的影响

2.5 多糖对 DSS 诱导的溃疡性结肠炎小鼠结肠病理组织学评分的影响

如图 5 所示, 与空白组小鼠相比, DSS 组小鼠结肠黏膜上皮破损严重, 腺体排列不规则甚至消失, 炎性细胞浸润和隐窝大量缺失, 组织病理学评分显著升高。与 DSS 组相比, 多糖组和阳性药组的小鼠结肠组织整体结构较正常, 黏膜下层水肿和炎性细胞浸润

减少, 肠黏膜和腺体更清晰。如图 6 所示, 与 DSS 组相比, 金樱子多糖组和阳性药组的结肠病理组织学评分极显著降低 ($P<0.001$), 车前子多糖组的结肠病理组织学评分显著降低 ($P<0.05$), 而冬葵果多糖组的结肠病理组织学评分有降低趋势, 但无显著性差异 ($P>0.05$)。



A. 空白组; B. 模型组; C. 阳性药组; D. 金樱子多糖组; E. 车前子多糖组; F. 冬葵果多糖组; 黑色箭头代表炎性细胞浸润, 红色箭头代表隐窝。

图 5 多糖对溃疡性结肠炎小鼠结肠病理组织学的影响 (HE 染色, 标尺 = 200 μm)

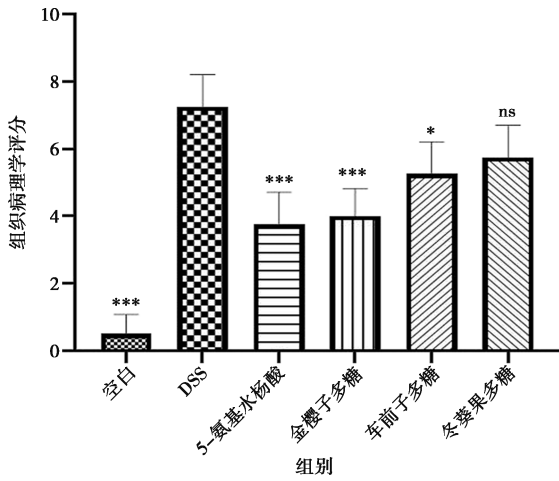


图6 小鼠结肠组织病理学评分

2.6 多糖对DSS诱导的溃疡性结肠炎小鼠结肠细胞因子分泌的影响

如图7所示,与空白组相比,DSS组小鼠结肠组织中IL-6、TNF- α 及IL-1 β 的含量极显著升高($P < 0.001$),IL-10显著降低($P < 0.05$)。与DSS组小鼠相比,金樱子多糖组和阳性药组IL-6、TNF- α 、IL-1 β 及IL-10含量均表现出极显著差异($P < 0.001$);车前子多糖组的IL-6和IL-10含量表现出极显著性差异($P < 0.01$),TNF- α 和IL-1 β 含量表现出显著性差异($P < 0.05$)。冬葵果多糖组的细胞因子含量与DSS组相比表现出差异,但差异不显著性($P > 0.05$)。

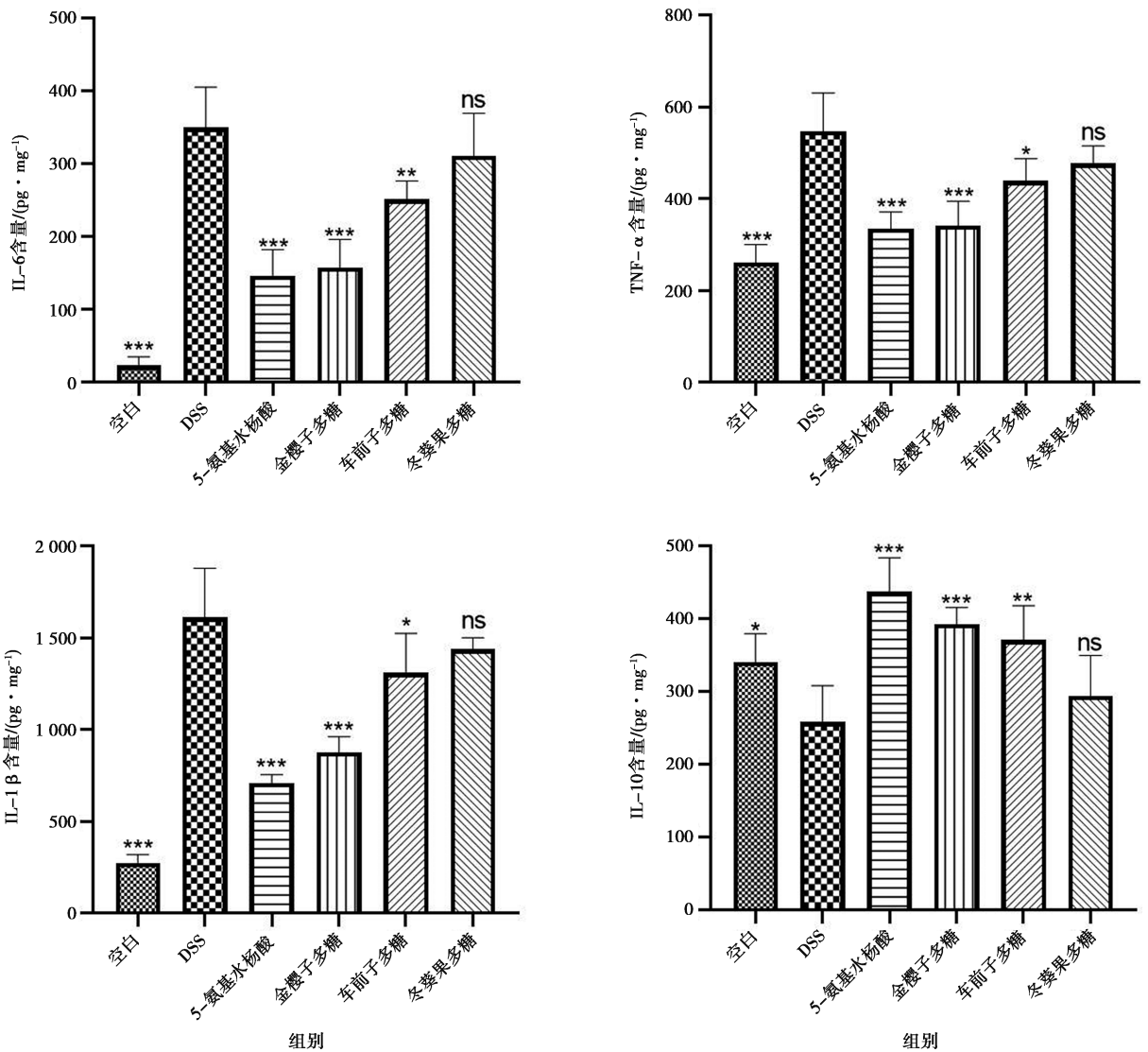


图7 多糖对溃疡性结肠炎小鼠结肠组织细胞因子分泌的影响

3 讨论

炎症是一种复杂的免疫反应,可保护器官免受感

染和组织损伤。受控的炎症反应对宿主有益,可清除宿主组织中免疫刺激并恢复正常生理功能。然而,细胞因子IL-6、TNF- α 和IL-1 β 的上调可诱导血管内

皮细胞外的黏附因子表达, 导致中性粒细胞、单核细胞和淋巴细胞募集, 然后从血管中移出到损伤组织, 促进炎症的发生^[8]。IL-10 可以阻止活化的巨噬细胞释放炎症介质, 从而缓解炎症^[9]。

多糖是许多植物的主要成分之一, 已被证实具有免疫增强、抗炎、抗肿瘤和神经保护活性。金樱子多糖是从中药金樱子(性平, 味酸、甘、涩, 归肾经、膀胱经、大肠经)中提取, 由阿拉伯糖(26.5%)、鼠李糖(7.6%)、木糖(3.5%)、甘露糖(0.9%)、半乳糖(31.9%)、葡萄糖(5.7%)和半乳糖醛酸(23.9%)组成^[10]; 冬葵果多糖是从蒙药冬葵果(性凉, 味甘、涩, 归大肠经、小肠经、膀胱经)中提取, 主要由阿拉伯糖(18.75%)、半乳糖(37.5%)和葡萄糖(43.75%)组成^[11]; 车前子多糖是从中药车前子(性寒, 味甘, 归肾经、肝经、肺经、小肠经)中提取, 主要由木糖(56.7%)、阿拉伯糖(21.6%)、半乳糖(3%)、葡萄糖和半乳糖醛酸(18.4%)等组成的酸性杂多糖^[12]。研究表明^[13], 植物多糖可以用作天然抗炎药, 其通过对趋化因子、黏附因子表达和相关酶活性的抑制, 调节细胞因子的生成, 从而影响白细胞向炎症部位的募集、黏附以及渗出, 达到抗炎效果。

本研究的体外试验通过 MTT 法确定 3 种多糖的安全浓度范围 (≤ 1 mg/mL), 并选择细胞最佳生长浓度, 在 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症模型中进行体外抗炎作用的探讨。结果表明, LPS 可显著提高 NO、IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 的含量以及促炎细胞因子 mRNA 的表达, 说明体外炎症模型成功。同时, 在多糖浓度为 500 μ g/mL, 金樱子多糖对炎症介质表达的抑制作用强于车前子多糖和冬葵果多糖; 在多糖浓度为 250 μ g/mL 时, 只有金樱子多糖有显著抑制炎症介质表达, 提示金樱子多糖的体外抗炎效果优于车前子多糖和冬葵果多糖。体内试验基于中药的归经, 选择 DSS 诱导的溃疡性结肠炎模型探讨 3 种多糖的体内抗炎作用, 结果表明, 以相同浓度的 3 种多糖干预小鼠溃疡性结肠炎模型后, 相较于车前子多糖和冬葵果多糖, 金樱子多糖可明显提高结肠长度, IL-10 含量, 降低 DAI 评分, 促炎细胞因子 (IL-6、IL-1 β 、TNF- α) 含量, 保护结肠组织完整性。提示金樱子多糖有最佳的抑制炎症发生的效果, 改善结肠炎状况。据报道^[14], 糖醛酸的含量对多糖的抗炎活性有很大的影响, 高糖醛酸含量的多糖具有更强的抗炎活性。金樱子多糖中的糖醛酸含量占比高于车前子多糖和冬葵果多糖, 推测金樱子多糖的抗炎活性强于车前子多糖和冬葵果多糖可能与其高糖醛酸含量有关, 此论点需进一步试验验证。

综上所述, 本研究提取了 3 种植物多糖, 借助体内、体外炎症模型初步探讨并对比了其抗炎作用。结果表明, 金樱子多糖能通过下调体内外模型炎症介质的水平发挥较好的抗炎作用, 为多糖类抗炎剂的研发和防治溃疡性结肠炎的发生提供了试验依据。

参考文献:

- [1] TASNEEM S, LIU B, LI B, et al. Molecular pharmacology of inflammation: medicinal plants as anti-inflammatory agents [J]. *Pharmacol Res*, 2019, 139: 126-140.
- [2] 段秀英, 马瑞娇, 张云, 等. 斑马鱼炎症模型及其在中药抗炎领域的应用 [J]. *药物评价研究*, 2021, 44 (8): 1573-1580.
- [3] HOU C, CHEN L, YANG L, et al. An insight into anti-inflammatory effects of natural polysaccharides [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 153: 248-255.
- [4] 曾凡珂, 李伟, 曹庸, 等. 金樱子多糖提取、纯化及生理活性研究进展 [J]. *食品工业科技*, 2019, 40 (7): 307-312.
- [5] 乌兰格日乐, 赵杰, 巴虎山. 冬葵果多糖的抗氧化作用研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 2012, 24 (4): 536-538.
- [6] 冯娜. 车前子多糖的抗炎和抗肿瘤作用研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2012.
- [7] XIONG T, ZHENG X, ZHANG K, et al. Ganluyin ameliorates DSS-induced ulcerative colitis by inhibiting the enteric-origin LPS/TLR4/NF- κ B pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 289: 115001.
- [8] LEE M H, CHAO C H, HSU Y C, et al. Production, characterization, and functions of sulfated polysaccharides from zinc sulfate enriched cultivation of *Antrodia cinnamomea* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 159: 1013-1021.
- [9] 王吉. MicroRNA-149-3p 和 5p 对巨噬细胞 Raw264.7 的 M1/M2 极化作用 [D]. 北京: 北京化工大学, 2021.
- [10] ZHAN Q, WANG Q, LIN R, et al. Structural characterization and immunomodulatory activity of a novel acid polysaccharide isolated from the pulp of *Rosa laevigata Michx* fruit [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 145: 1080-1090.
- [11] SHIMIZU N, ASAHARA H, TOMODA M, et al. Constituents of seed of *Malva verticillata*. VII. Structural features and reticuloendothelial system-potentiating activity of MVS-I, the major neutral polysaccharide [J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 1991, 39 (10): 2630-2632.
- [12] ZHANG J, WEN C, ZHANG H, et al. Review of isolation, structural properties, chain conformation, and bioactivities of psyllium polysaccharides [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 139: 409-420.
- [13] LIU Y, YE Y, HU X, et al. Structural characterization and anti-inflammatory activity of a polysaccharide from the lignified okra [J]. *Carbohydr Polym*, 2021, 265: 118081.
- [14] ZHENG Q, CHEN J, YUAN Y, et al. Structural characterization, antioxidant, and anti-inflammatory activity of polysaccharides from *Plumula Nelumbinis* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 212: 111-122.