

# 粉葛与葛根多糖对脂多糖诱导 RAW264.7 细胞的抗炎作用

张壮<sup>1</sup>, 李琼<sup>1</sup>, 黄丽萍<sup>2</sup>, 崔玉顺<sup>1</sup>, 刘荣华<sup>2</sup>, 冯育林<sup>1\*</sup>, 欧阳辉<sup>1\*</sup>, 朱卫丰<sup>3</sup>, 杨世林<sup>1</sup>

(1. 江西中医药大学中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西南昌 330006) (2. 江西中医药大学药学院, 江西南昌 330004) (3. 江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室, 江西南昌 330004)

**摘要:** 该研究通过脂多糖诱导 RAW264.7 细胞炎症模型, 对粉葛粗多糖 (FGC)、葛根粗多糖 (GGC) 以及粉葛均一多糖 (FGJ) 的抗炎作用进行比较。用 CCK8 试剂盒检测 FGC、GGC 以及 FGJ 对细胞活力的影响; 相关试剂盒检测细胞产生 NO、TNF- $\alpha$ 、IL-6 的分泌情况; 蛋白印迹法检测 NF- $\kappa$ B、Nrf2/HO-1 通路相关蛋白表达, QPCR 检测 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的 mRNA 表达, 通过流式检测活性氧的产生。结果显示, 在浓度为 10、20、40  $\mu$ g/mL 时, FGC、GGC 以及 FGJ 对细胞均没有毒性 ( $p>0.05$ )。各浓度的 FGC、FGJ 不能抑制 LPS 诱导产生的 NO、TNF- $\alpha$ 、IL-6 ( $p>0.05$ ), GGC 在浓度为 40  $\mu$ g/mL 时, 对 NO、TNF- $\alpha$ 、IL-6 的抑制率达到 38.46%、52.90%、55.87%, 可以抑制细胞内 ROS 释放, 在 10、20、40  $\mu$ g/mL 时抑制率达到 37.28%、41.05%、54.09%, 在浓度为 40  $\mu$ g/mL 时, 对 iNOS、COX-2、p-p65、p-I $\kappa$ B $\alpha$  的抑制率达到 29.27%、95.04%、27.18%、28.45%, 对 Nrf2、HO-1 蛋白的表达有促进作用, 在浓度 40  $\mu$ g/mL 时显著地抑制 IL-6 与 TNF- $\alpha$  的 mRNA 表达, 抑制率达到 57.70%、81.68%。结果证明, GGC 与 FGC、FGJ 相比抗炎活性更加明显, 并且其抗炎作用是通过 NF- $\kappa$ B 与 Nrf2/HO-1 两条通路来实现的。

**关键词:** 粉葛; 葛根; 多糖; RAW264.7 细胞; 抗炎作用; NF- $\kappa$ B 通路

文章编号: 1673-9078(2022)07-1-10

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.7.1267

## Anti-inflammatory Effect of *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi and *P.*

## *thomsonii* Benth. Polysaccharides on LPS-Induced RAW264.7 Cells

ZHANG Zhuang<sup>1</sup>, LI Qiong<sup>1</sup>, HUANG Liping<sup>2</sup>, CUI Yushun<sup>1</sup>, LIU Ronghua<sup>2</sup>, FENG Yulin<sup>1\*</sup>, OUYANG Hui<sup>1\*</sup>, ZHU Weifeng<sup>3</sup>, YANG Shilin<sup>1</sup>

(1.National Engineering Research Center for Manufacturing Technology of Solid Preparations of Traditional Chinese Medicine, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330006, China) (2.School of Pharmacy, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China) (3.Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine Key Laboratory of Modern Preparation of Chinese Medicine, Ministry of Education, Nanchang 330004, China)

**Abstract:** The anti-inflammatory effects of *Pueraria* crude polysaccharide (FGC), *Pueraria* crude polysaccharide (GGC), and *Pueraria* homogenized polysaccharide (FGJ) were compared in an LPS-induced RAW264.7 cell model. The effects of FGC, GGC, and FGJ on cell viability were detected using a CCK8 kit. Secretion of nitric oxide, TNF- $\alpha$ , and IL-6 in cells was detected using their corresponding kits. The expression levels of NF- $\kappa$ B and Nrf2/HO-1 pathway related proteins were detected using western blot, mRNA expression levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 were detected by qPCR, and ROS production was detected using flow cytometry. The results showed that FGC, GGC, and FGJ had no

引文格式:

张壮,李琼,黄丽萍,等.粉葛与葛根多糖对脂多糖诱导 RAW264.7 细胞的抗炎作用[J].现代食品科技,2022,38(7):1-10

ZHANG Zhuang, LI Qiong, HUANG Liping, et al. Anti-inflammatory effect of *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi and *P. thomsonii* Benth. polysaccharides on LPS-induced RAW264.7 cells [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(7): 1-10

收稿日期: 2021-11-11

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2017YFC1702902); 江西省重点研发计划项目 (20203BBG73066); 江西中医药大学 1050 青年拔尖人才项目

作者简介: 张壮 (1994-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 中药药效物质基础, E-mail: 1017597842@qq.com

通讯作者: 冯育林 (1977-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 中药药效物质基础, E-mail: fengyulin2003@126.com; 共同通讯作者: 欧阳辉 (1981-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 中药分析与质量评价, E-mail: huiouyang@163.com

toxicity to cells at concentrations of 10, 20, and 40  $\mu\text{g/mL}$  ( $p>0.05$ ). FGC and FGJ did not inhibit LPS-induced nitric oxide, TNF- $\alpha$ , and IL-6 secretion ( $p>0.05$ ) at any concentration. At 40  $\mu\text{g/mL}$ , GGC inhibited nitric oxide, TNF- $\alpha$ , and IL-6 levels by 38.46%, 52.90%, and 55.87%, respectively, which was able to inhibit intracellular ROS release. Inhibition rates reached 37.28%, 41.05%, and 54.09% at concentrations of 10, 20, and 40  $\mu\text{g/mL}$ . The inhibition rates of iNOS, COX-2, p-p65, and p-I $\kappa$ B $\alpha$  were 29.27%, 95.04%, 27.18%, and 28.45% at 40  $\mu\text{g/mL}$ , which was able to promote the expression of Nrf2 and HO-1 proteins. At 40  $\mu\text{g/mL}$ , mRNA expression levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  were significantly inhibited, with inhibition rates reaching 57.70% and 81.68%, respectively. The results showed that GGC had a more distinct anti-inflammatory activity than FGC and FGJ, and its anti-inflammatory effect was realized through the NF- $\kappa$ B and Nrf2/HO-1 pathways.

**Key words:** *Pueraria thomsonii*; *Pueraria lobata* Ohwi; homogeneous polysaccharide; RAW264.7 cells; anti-inflammatory effect; NF- $\kappa$ B pathway

葛根属豆科,学名 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi, 入药常用其干燥根,有丰富的食用以及药用价值,为我国传统的药食两用植物<sup>[1]</sup>。国内现有葛根品种多样化,葛根的正品为 1977~2000 版《中国药典》记录的 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 和甘葛藤 *P. thomsonii* Benth. 的干燥块根。随着近年来药理研究的不断发展,粉葛被单独列为一个品种,野葛为正品葛根。有研究表明,葛根具有抗糖尿病<sup>[2]</sup>、降血压<sup>[3]</sup>、抗氧化<sup>[4]</sup>、抗骨质疏松<sup>[5]</sup>和调节免疫系统的作用<sup>[6]</sup>。

对葛根生物活性的深入探索表明,葛根多糖具有抗氧化、免疫调节、降血糖的作用<sup>[7,8]</sup>。宋淑珍等<sup>[9]</sup>对不同纯度葛根多糖进行了生物活性比较,结果表明不同提取过程会影响葛根多糖的抗氧化能力及其生物活性。蔡春沉等<sup>[10]</sup>对葛根多糖对 2 型糖尿病大鼠的治疗作用及机制进行了研究,发现葛根多糖可以有效改善 2 型糖尿病大鼠的相关生化指标,具有降血糖和降血脂作用,具有一定的抗氧化能力。杨长友<sup>[11]</sup>采用平板打洞法研究了葛根多糖的抑菌活性,结果表明葛根多糖对供试菌种有明显的抑制作用,其中对枯草芽孢杆菌抑制作用最强。崔恒祥等<sup>[12]</sup>使用阴离子交换和凝胶渗透色谱法从野葛根水提取物中分离出一种水溶性葡聚糖并分析其化学结构,证明该多糖能显著抑制过氧化氢所致的 PC12 细胞损伤。Kim 等<sup>[13]</sup>发现葛根多糖通过 TLR4 膜受体传导信号诱导小鼠脊髓中树突细胞 (DC 细胞) 成熟。

巨噬细胞是参与炎症反应启动的重要炎症细胞,通过分泌大量促炎介质和促炎细胞因子,在众多炎症疾病的发病过程中发挥关键作用。巨噬细胞表面的模式识别受体可以识别并与多糖结合,经各种信号传导通路将信号传入细胞内,使细胞内产生一系列的信号级联反应,从而调控免疫相关基因的表达。植物多糖对巨噬细胞的免疫调节作用主要通过改变其形态、吞噬活性、细胞因子表达量等来实现。现代免疫学认为,天然活性物质具有代替抗生素来提高机体免疫应答的潜能。脂多糖在诱导炎症反应和导致各种炎症疾病中

发挥着重要作用,是革兰氏阴性菌细胞壁的化合物<sup>[14]</sup>。本文从对粉葛、葛根粗多糖以及粉葛均一多糖研究较少的抗炎活性入手,以小鼠 RAW264.7 巨噬细胞为研究对象,以探究其抗炎活性的不同及其可能的机制。首先测定了三种不同多糖对 RAW264.7 细胞的毒性,后面通过脂多糖 (LPS) 诱导炎症,在三种不同多糖作用后检测炎症因子 NO、IL-6 和 TNF- $\alpha$  释放的变化,根据其活性的不同最后对葛根粗多糖发挥抗炎作用的机制进行了探究,为葛根在药用开发领域奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 原料

#### 1.1.1 细胞、药物与试剂

RAW264.7 细胞, ATCC 细胞库; 粉葛粗多糖 (FGC)、葛根粗多糖 (GGC)、粉葛均一多糖 (FGJ), 江西中医药大学课题组自制; 胎牛血清, Gibco 公司; DMEM、PBS, 北京索莱宝科技有限公司; 脂多糖, 美国 Sigma 公司; BCA 蛋白定量试剂盒, 上海雅酶生物医药科技有限公司; ELISA 试剂盒, 北京四正柏生物科技有限公司; iNOS、COX-2, Proteintech 公司、p-p65、p65、I $\kappa$ B $\alpha$ 、p-I $\kappa$ B $\alpha$ 、 $\beta$ -actin 抗体, 美国 CST 公司; 逆转录试剂盒、Syber Green, 翌圣生物科技股份有限公司; AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒, 大连美仑生物技术有限公司。

#### 1.1.2 主要仪器设备

SW-CJ-1FD 超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; JW-3401CO2 培养箱, 江西省立康科技有限公司; TS2 显微镜, Nikon 公司; HH-2 数显恒温水浴锅, 上海力辰邦西仪器科技有限公司; HC-3018R 低温高速离心机, 安徽中科中佳科学仪器有限公司; TD5Z 离心机, 北京市华瑞科学器材有限公司; HX-20G2 恒温金属浴, 上海沪析实业有限公司; Bio-Rad 蛋白电泳仪和转膜仪、Bio-Rad 高灵敏度化学发光成像仪, 伯乐生命医学

产品有限公司; Prism 7500 荧光定量 PCR 仪, 美国 ABI 公司; NanoDrop 微量分光光度计, Thermo Fisher 科技公司; InfiniteM200PRO 酶标仪, 瑞士 TECAN 公司; Gallios 流式细胞仪, 美国 Beckman 公司。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 粗多糖的制备

称取 30.0 g 粉葛(或葛根)于 1000 mL 三颈瓶中, 加入 600 mL 纯净水, 在恒温电热套中进行回流提取, 温度升至 100 °C 开始计时, 提取时间为 120 min, 120 min 后倒出提取液, 加入 600 mL 纯净水, 进行第二次的提取, 将两次提取液合并, 用旋转蒸发器加压浓缩至挂壁, 冷却至室温加入 1:2 体积比的 95%乙醇进行醇沉, 静置过夜, 过滤后将沉淀用纯净水复溶, 离心后上清液进行干燥, 记录粗多糖质量, 粉葛粗多糖含量经苯酚-硫酸法测定为 76.35%, 野葛粗多糖含量经苯酚-硫酸法测定为 70.97%。

### 1.2.2 粉葛均一多糖的制备

称取适量粉葛粗多糖用蒸馏水充分溶解后, 用 HP-20 大孔树脂柱进行脱色除蛋白, 吸附 12 h 后, 用蒸馏水洗脱至多糖全部流出(苯酚-硫酸法监测), 冷冻干燥即得脱色和除蛋白后的粗多糖。称取纯化后的粉葛粗多糖 3 g, 加适量蒸馏水使其充分溶解, 离心取上清后上样到葡聚糖凝胶 G-200 中, 用超纯水洗脱至没有颜色, 取中间段进行含量测定, 得到含量为 94.64%。

### 1.2.3 细胞培养

在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 RAW264.7 细胞。细胞密度达到 80%时, 传代细胞。之后取处于对数生长期的细胞用于后续实验。

### 1.2.4 FGC、GGC 以及 FGJ 的细胞毒性检测

收集细胞沉淀, 稀释细胞使密度为  $1 \times 10^5$  cells/mL, 各取 100  $\mu$ L 细胞悬液加入 96 孔板中过夜使其完全贴壁。分为对照组、加药组。加药组分别加入 FGC、GGC 以及 FGJ (10、20、40  $\mu$ g/mL) 预处理 24 h, 每组重复 6 孔。弃上清, 每孔加 100  $\mu$ L 10% CCK8, 37 °C 孵育 2 h, 酶标仪在 450 nm 处检测其 OD 值。求得细胞存活率。

$$\text{存活率}/\% = (\text{OD}_{\text{给药}} - \text{OD}_{\text{空白}}) / (\text{OD}_{\text{对照}} - \text{OD}_{\text{空白}})$$

### 1.2.5 FGC、GGC 以及 FGJ 对 NO 释放的影响

收集细胞沉淀, 稀释细胞使密度为  $4.0 \times 10^5$  cells/mL, 各取 500  $\mu$ L 细胞悬液加入 24 孔板中过夜使其完全贴壁。分为对照组、模型组、加药组。加药组分别加入 FGC、GGC 以及 FGJ (10、20、40  $\mu$ g/mL) 预给药 4 h, 加入 LPS (1  $\mu$ g/mL) 孵育 24 h。最后, 每组各吸取 50  $\mu$ L 上清转移至 96 孔板中, 然后每孔加入 50  $\mu$ L 的 Griess 试剂 A 和 B, 酶标仪于 540 nm 处检测其 OD 值。

### 1.2.6 FGC、GGC 以及 FGJ 对 TNF- $\alpha$ 、IL-6 炎症因子释放的影响

将 1.2.3 中各组细胞剩余上清液稀释 2 倍, 通过 ELISA 试剂盒检测 FGC、GGC 以及 FGJ 对 TNF- $\alpha$ 、IL-6 产生量的影响。

### 1.2.7 GGC 对 iNOS/COX-2 蛋白表达的影响

收集细胞沉淀, 稀释细胞使密度为  $4.0 \times 10^5$  cells/mL, 各取 2 mL 细胞悬液加入 6 孔板中过夜使其完全贴壁。分为对照组、模型组、加药组。加药组加入 GGC (10、20、40  $\mu$ g/mL) 预给药 4 h, 然后加入 LPS (1  $\mu$ g/mL) 孵育 24 h, 吸净上清, 裂解细胞后分离得到总蛋白, 用 BCA 试剂盒测定各组蛋白浓度, 通过标准曲线计算蛋白上样量用于后续实验。通过 Western blotting 法对 iNOS、COX-2、 $\beta$ -actin 进行检测。

### 1.2.8 GGC 对核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 通路的影响

按 1.2.5 方法接种细胞。加药组加入 GGC (10、20、40  $\mu$ g/mL) 预给药 4 h, 然后加入 LPS (1  $\mu$ g/mL) 孵育 2 h, 吸净上清, 裂解细胞后分离得到总蛋白, 用 BCA 试剂盒测定各组蛋白浓度, 通过标准曲线计算蛋白上样量用于后续实验。通过 Western blotting 法对 p65、p-p65、I $\kappa$ B $\alpha$ 、p-I $\kappa$ B $\alpha$ 、 $\beta$ -actin 进行检测。

### 1.2.9 GGC 对 IL-6、TNF- $\alpha$ 的 mRNA 表达的影响

按 1.2.5 方法接种细胞。加药组加入 GGC (10、20、40  $\mu$ g/mL) 预给药 4 h, 然后加入 LPS (1  $\mu$ g/mL) 孵育 24 h, 吸净上清, 裂解细胞后用 Trizol 提取得到 RNA, 紫外分光检测 RNA 浓度用于后续实验。按反转录试剂盒说明得到 cDNA。最后扩增 cDNA。引物序列如表 1 所示。

表 1 引物序列表

Table 1 Sequences of primers

Genes	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
IL-6	TAGTCCTTCCTACCCCAATTTC	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
TNF- $\alpha$	GACGTGGAAGTGGCAGAAGAG	TTGGTGGTTTGTGAGTGTGAG
GAPDH	AGGTCGGTGTGAACGGATTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

### 1.2.10 GGC 对 ROS 产生的影响

收集细胞沉淀，稀释细胞使密度为  $3 \times 10^5$  cells/mL，各取 2 mL 细胞悬液加入 6 孔板中过夜使其完全贴壁。分为对照组、模型组、加药组。加药组加入 GGC (10、20、400  $\mu\text{g/mL}$ ) 预给药 4 h，加 LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ ) 孵育 24 h。24 h 后，用探针 DCFH<sub>2</sub>-DA (1  $\mu\text{g/mL}$ ) 孵育 40 min。吸净上清，各孔用冷的 PBS 清洗 2 遍，各孔加入 100  $\mu\text{L}$  胰蛋白酶消化 2 min，之后用 500  $\mu\text{L}$  完全培养基停止消化，收集细胞，通过流式细胞仪检测 ROS 含量。

### 1.2.11 GGC 对 Nrf2、HO-1 蛋白表达的影响

按 1.2.5 方法接种细胞。加药组加入 GGC (10、20、40  $\mu\text{g/mL}$ ) 预处理 4 h，然后加入 LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ ) 孵育 24 h，吸净上清，裂解细胞后分离得到总蛋白，用 BCA 试剂盒测定各组蛋白浓度，通过标准曲线计算蛋白上样量用于后续实验。通过 Western blotting 法对 Nrf2、HO-1 进行检测。

### 1.3 统计学分析

数据通过 GraphPad Prism 8.0 进行统计学分析，组间比较通过单因素方差分析的方法进行， $p < 0.05$  认为有显著性差异， $p > 0.05$  则无显著性差异。

## 2 结果与讨论

### 2.1 FGC、GGC 以及 FGJ 对 RAW264.7 细胞活性的影响

活性的影响

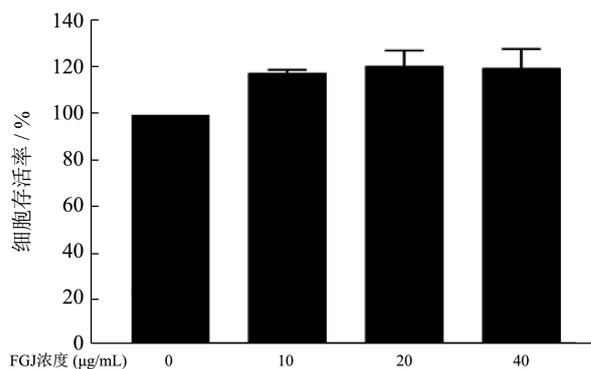
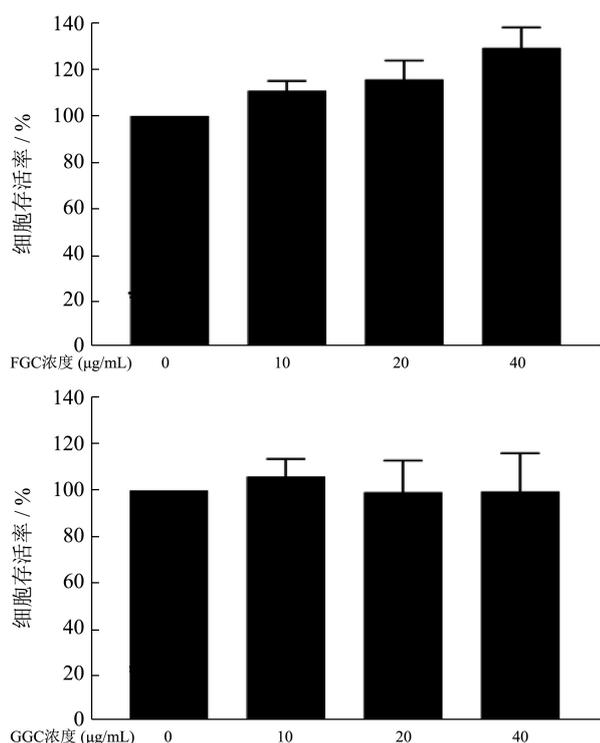


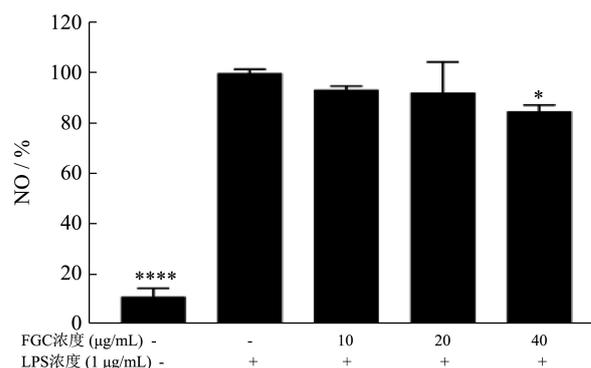
图 1 FGC、GGC 和 FGJ 对细胞存活率的影响

Fig.1 Effects of FGC, GGC and FGJ on cells viability

使用 CCK8 试剂盒检测 FGC、GGC 以及 FGJ 对细胞活力的作用效果，各组分别加入浓度为 10、20、40  $\mu\text{g/mL}$  的 FGC、GGC 以及 FGJ 作用 24 h (图 1)，检测该浓度范围内的细胞存活率，结果显示各组细胞的存活率均与对照组基本一致，对细胞没有明显的毒性作用，且表现出一定的促增殖作用。各组之间没有显著性差异 ( $p > 0.05$ )。说明该浓度范围内不会大幅度改变细胞的增殖，也说明后续实验不会因细胞增殖受到影响。

### 2.2 FGC、GGC 以及 FGJ 对 LPS 诱导的 RAW264.7 释放 NO 的影响

NO 是多种生物功能的重要中介物<sup>[15]</sup>，在炎症细胞模型中，可以通过 NO 释放量减少来判断炎症反应是否得到改善<sup>[16]</sup>。由图 2 可知，模型组 NO 产生量与对照组相比均有大幅的提升 ( $p < 0.0001$ )，已成功诱导炎症模型；在 FGC 实验组内，在浓度为 40  $\mu\text{g/mL}$  时与模型组相比出现显著性差异 ( $p < 0.05$ )，其余两组无显著性差异 ( $p > 0.05$ )。在 FGJ 实验组内，随着多糖含量的增加，各浓度下 NO 的释放量均显著降低，但当 FGJ 浓度升高时，NO 的释放量呈上升趋势，无浓度依赖性。只有在 GGC 实验组内，随着浓度的增加，各浓度下 NO 的释放量与模型组相比均显著减少，抑制率分别为 15.55%、26.45%、38.46%，说明 GGC 具有明显的降低 NO 分泌的作用。



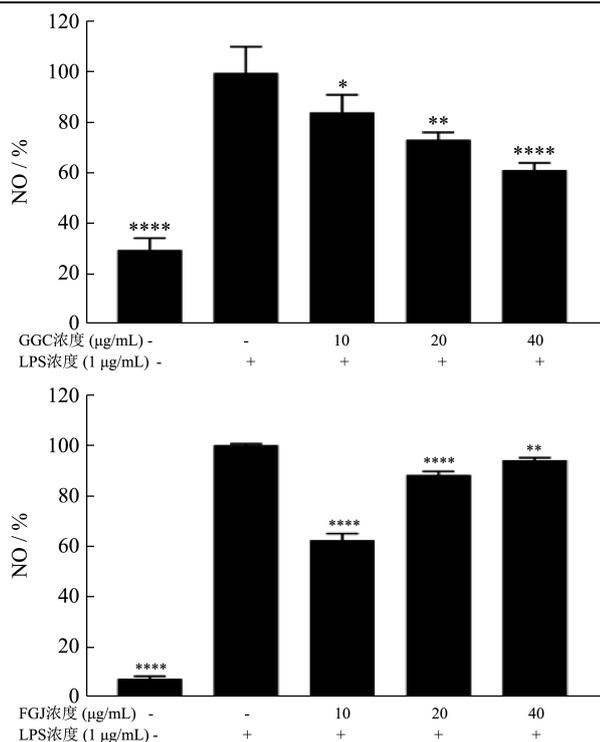


图2 FGC、GGC和FGJ对细胞分泌NO的影响

Fig.2 Effects of FGC, GGC and FGJ on NO secretion

注: 与LPS组比较: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ 。

### 2.3 FGC、GGC 以及 FGJ 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 TNF- $\alpha$ 、IL-6 炎症因子释放的影响

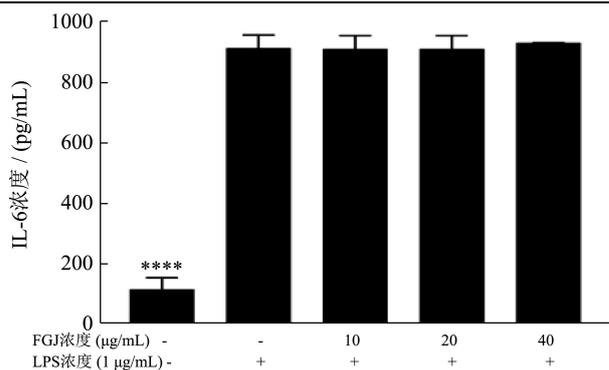
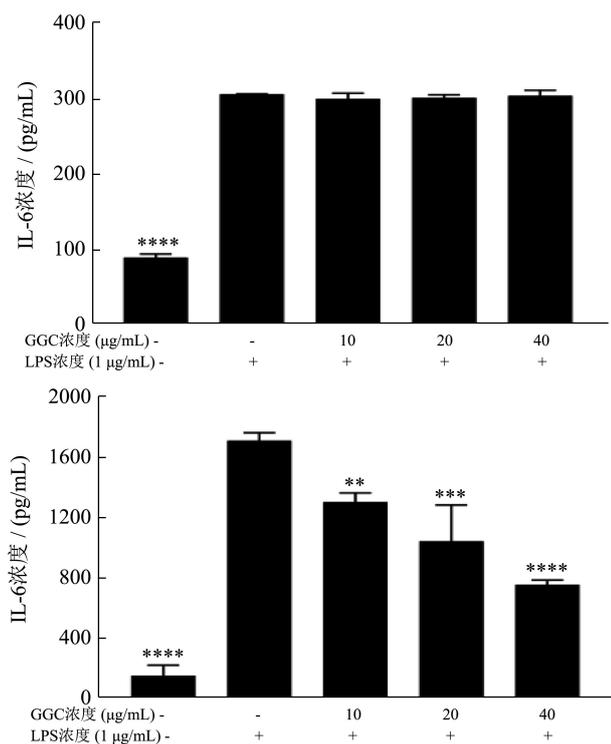


图3 FGC、GGC和FGJ对细胞分泌IL-6的影响

Fig.3 Effects of FGC, GGC and FGJ on IL-6 secretion

注: 与LPS组比较: \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ 。

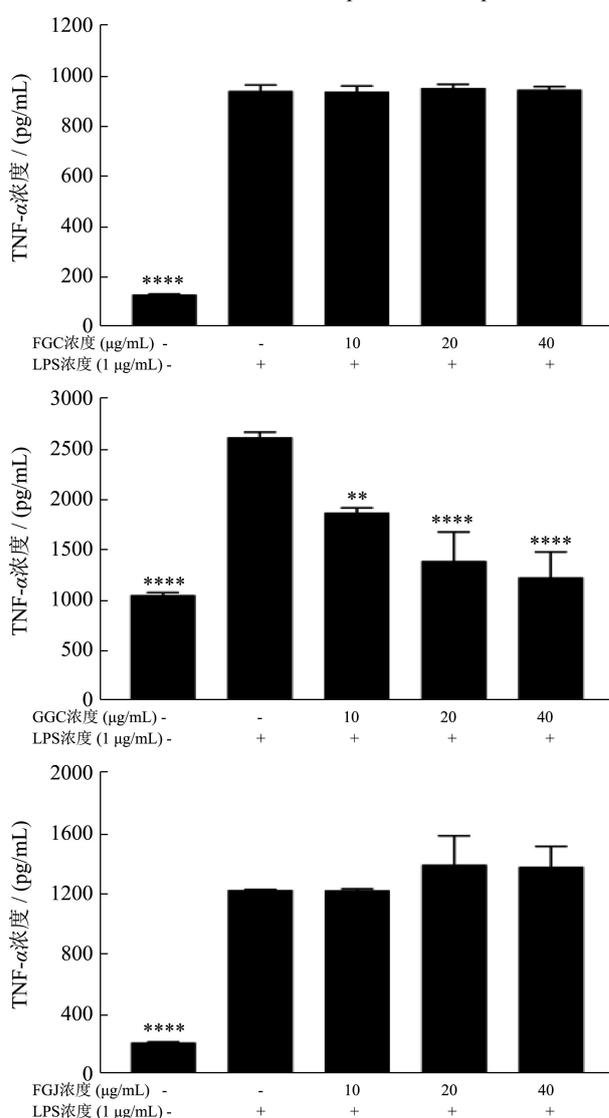


图4 FGC、GGC和FGJ对细胞分泌TNF- $\alpha$ 的影响

Fig.4 Effects of FGC, GGC and FGJ on TNF- $\alpha$  secretion

注: 与LPS组比较: \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ 。

IL-6作为一种重要的炎症介质,可以通过其促炎作用诱发各种炎症反应<sup>[17,18]</sup>。从图3中可知,模型组与对照组的IL-6产生量相比存在显著性差异

( $p < 0.0001$ ), 已成功构建炎症模型; 在 FGC、FGJ 实验组内, 加药组 IL-6 的分泌量与模型组相比均无显著性差异 ( $p > 0.05$ ), 表明对 IL-6 的分泌无抑制效果。而在 GGC 实验组内, 随着多糖浓度的增加, 各浓度下 IL-6 的释放量均显著减少, 抑制率分别为 23.78%、39.00%、55.87%, 说明 GGC 具有明显的降低 IL-6 分泌的作用。

在与炎症相关的多种疾病中, TNF- $\alpha$  水平过高能引发巨噬细胞浸润、释放多种炎症因子、引起氧化应激<sup>[19]</sup>。从图 4 中可以看出, 各实验组内 LPS 诱导 RAW264.7 细胞分泌 TNF- $\alpha$  的结果与诱导分泌 IL-6 的结果一致, 均只在 GGC 实验组内, 随着多糖浓度的增加, 各浓度下 NO 的释放量与模型组相比均显著减少, 抑制率分别为 28.44%、46.69%、52.90%, 说明 GGC 具有明显的降低 TNF- $\alpha$  分泌的作用。

本文中用粉葛与葛根粗多糖针对其特征本课题组已发表一项专利<sup>[20]</sup>, 证明多糖的质量百分含量在 70% 以上, 小分子化合物的质量百分含量为 0.0005%~2.0%, 剩余为淀粉、水分、灰分等物质。且本研究已表明粉葛粗多糖无抗炎活性, 因此认为葛根粗多糖中作为主要成分的多糖在发挥抗炎作用, 其发挥作用的机制将继续深入研究。

## 2.4 GGC 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞

### iNOS、COX-2 蛋白表达的影响

iNOS 在受到炎症刺激时, 会产生过量的 NO 与超氧阴离子, 超氧阴离子与 NO 反应会产生有害的氧化剂损伤机体, 导致各种炎症发生<sup>[21]</sup>。COX 有 COX-1、COX-2、COX-3 共 3 种, 其中 COX-2 为诱导酶, 是可以催化炎症介质的关键酶<sup>[22]</sup>。从图 5 中可知, 在 LPS 作用后, 显著提高了 iNOS、COX-2 蛋白的表达量, 已成功诱导炎症模型。与模型组比较, 不同浓度 GGC 抑制 iNOS、COX-2 的表达, 对 COX-2 蛋白的抑制率分别为 43.50%、77.46%、95.05%, 对 iNOS 蛋白的抑制率分别为 44.37%、28.68%、29.28%, 与 2.2 的研究结果基本一致。说明 GGC 能够降低 iNOS、COX-2 蛋白的表达。

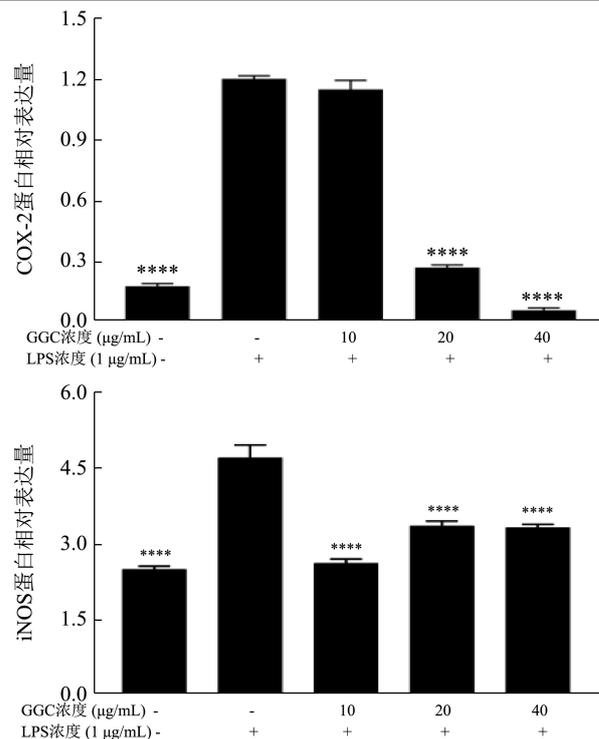
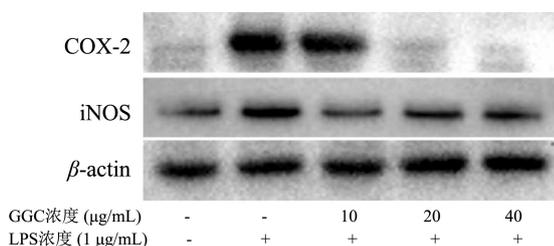


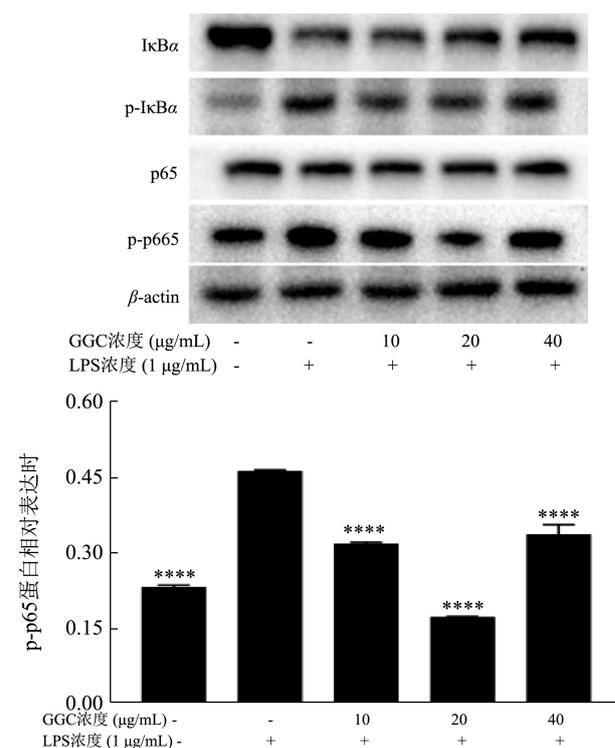
图 5 GGC 对细胞中 iNOS、COX-2 蛋白表达的影响

Fig.5 Effect of GGC on expression of iNOS and COX-2 protein in cells

注: 与 LPS 组比较: \*\*\*\* $p < 0.0001$ 。

## 2.5 GGC 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中

### NF- $\kappa$ B 信号通路的影响



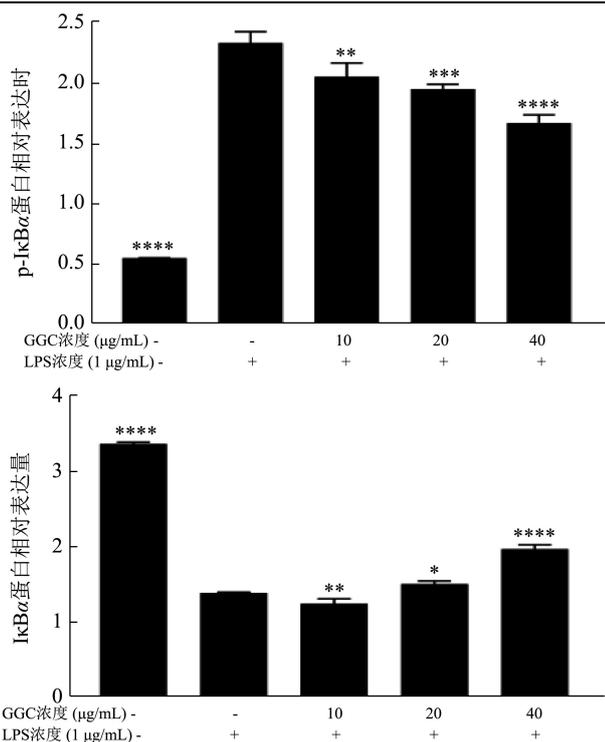


图6 GGC对细胞中p-p65、p-IκBα、IκBα蛋白表达的影响  
Fig.6 Effects of GGC on protein expression of P-P65, P-IκBα and IκBα in cells

注:与LPS组比较: \* $p < 0.05$ ; \*\*、\*\*\* $p < 0.01$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ 。

转录因子 NF-κB 是调节参与不同炎症反应过程的多种基因的关键因子之一,它通过一系列炎症细胞因子和趋化因子的 mRNA 表达控制最终免疫反应<sup>[23]</sup>,从图 6 中知, LPS 作用后,显著提高 p-p65、p-IκBα 蛋白的表达量,不同浓度的 GGC 对 p-p65 蛋白的抑制率分别为 31.22%、62.67%、27.18%,对 p-IκBα 蛋白的抑制率分别为 11.98%、16.37%、28.45%。说明 GGC 能降低 NF-κB 信号通路磷酸化蛋白的水平,而且能够抑制 IκBα 的降解,证明 GGC 是通过作用于 NF-κB 信号通路来发挥抗炎的作用。

## 2.6 GGC 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 IL-6、TNF-α 的 mRNA 表达的影响

如图 7 所示,与模型组相比,细胞中 TNF-α、IL-6 mRNA 的表达呈降低趋势 ( $p < 0.01$ ),各浓度下 NO 的释放量与模型组相比均显著减少,IL-6 抑制率分别为 39.37%、52.60%、57.70%,TNF-α 抑制率分别为 72.94%、73.65%、81.68%。与 2.3 的研究结果一致,说明 GGC 具有明显的降低 IL-6、TNF-α 的 mRNA 表达的作用。

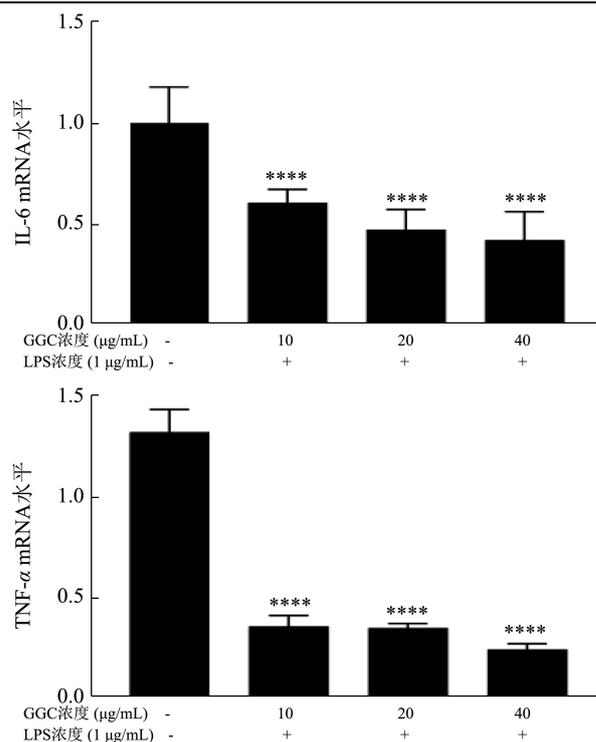


图7 GGC对细胞中TNF-α、IL-6的mRNA表达的影响  
Fig.7 Effects of GGC on mRNA expression of TNF-α and IL-6 in cells

注:与LPS组比较: \*\*\* $p < 0.01$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ 。

## 2.7 GGC 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 Nrf2、HO-1 蛋白表达的影响

HO-1 是 Nrf2 下游基因,氧化应激状态下 Nrf2 被激活进入核后将启动 HO-1 转录表达而催化降解血红素、一氧化碳等,抑制氧化应激损伤<sup>[24]</sup>。Keap1-Nrf2 -ARE 可以分为两部分,一部分在细胞质,一部分在细胞核。通常情况下 Keap1 与 Nrf2 在细胞质中结合,这时是处于未激活状态,如果一直未激活, Nrf2 会被降解;如果受到某种刺激, Keap1-Nrf2 的结合就不稳定, Nrf2 被释放出来,被转移到细胞核,并与 ARE 结合,激活下游基因的转录,进而翻译出一系列相关蛋白,发挥生理功能。氧化应激是炎症反应的一个组成部分,体内氧化与抗氧化作用失衡,倾向于氧化,导致中性粒细胞炎性浸润,蛋白酶分泌增加,产生大量氧化中间产物,这些中间产物如白三烯(LT)、血栓素 A2 (TXA2) 等都是促炎介质。从图 8 中可知, 1 μg/mL 的 LPS 作用后, Nrf2、HO-1 蛋白表达量减少,已构建炎症模型。与模型组比较, GGC 促进 Nrf2、HO-1 蛋白的表达,说明 GGC 通过 Nrf2/HO-1 通路发挥抗炎作用。

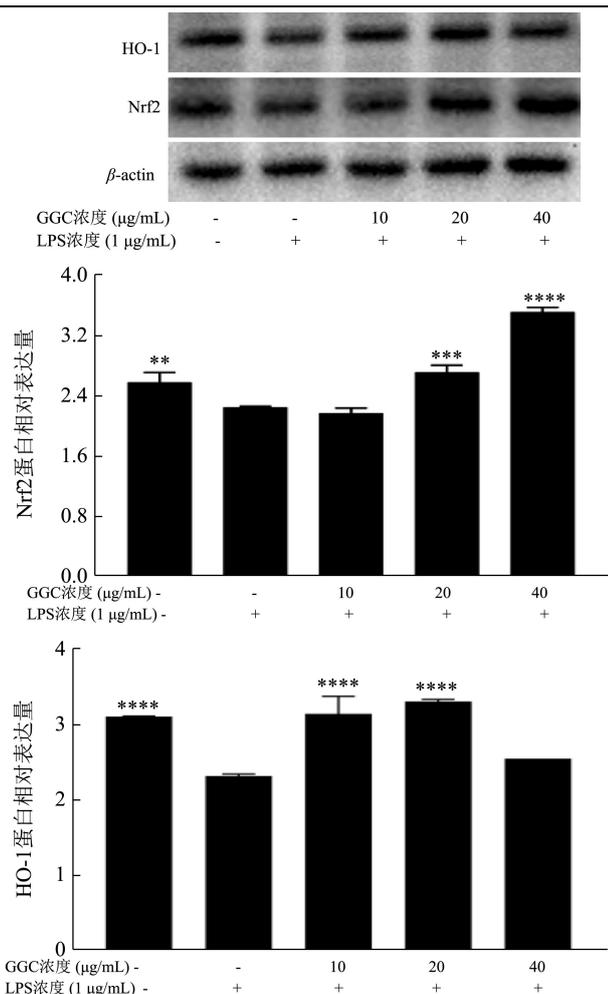


图8 GGC对细胞中Nrf2、HO-1蛋白表达的影响

Fig.8 Effects of GGC on Nrf2 and HO-1 protein expression in cells

注: 与LPS组比较: \*\*、\*\*\* $p < 0.01$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ 。

### 2.8 GGC对LPS诱导的RAW264.7细胞释放ROS的影响

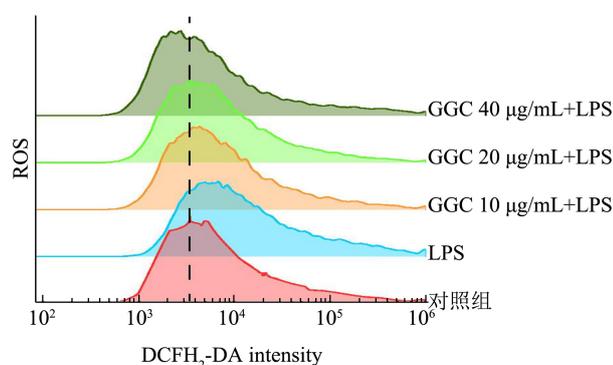


图9 GGC对细胞释放ROS的影响

Fig.9 Effects of GGC on ROS release in cells

Nrf2是一种转录因子,能协调大量细胞保护基因的基础和应激诱导激活,它可以调节下游的抗氧化还

原酶等蛋白的活性来调节机体内ROS的失衡,防止ROS在机体内累积,抑制机体氧化应激<sup>[25]</sup>。从图9中可知,通过流式细胞分析,对照组ROS的释放量低,用1  $\mu\text{g/mL}$ 的LPS作用后,ROS释放量显著提高,已构建炎症模型。GGC均可抑制ROS的增加,抑制率分别为37.29%、41.05%、54.09%,说明GGC能够减少细胞内ROS的产生,与2.7的研究结果基本一致,说明GGC有明显的抗炎作用。

多糖的抗炎作用作为其多种药理活性之一,众多学者已经通过体外和体内实验对多糖的抗炎效果进行了评价。体外炎症主要采用LPS诱导的RAW264.7细胞建立模型,动物实验大部分集中于溃疡性结肠炎模型。研究表明,多糖可以从抗氧化应激、调节细胞因子分泌、调控中性粒细胞、改善肠道菌群和肠黏膜屏障等方面发挥抗炎作用。

正北芪多糖<sup>[26]</sup>可显著提高UC小鼠结肠组织的抗氧化能力,升高模型小鼠体内SOD活力,降低NOS、MDA和NO水平,缓解UC的炎症;枸杞多糖<sup>[27]</sup>可显著降低细胞上清液中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和IL-6的含量;黄芪多糖<sup>[28]</sup>可通过改善巨噬细胞形态,恢复巨噬细胞增殖能力,从而改善肠黏膜的损伤及抑制肠道炎症反应;木枣多糖<sup>[29]</sup>通过增加小鼠粪便中SCFAs的浓度以及双歧杆菌、拟杆菌、乳酸杆菌等益生菌菌群的数量来发挥抗炎抑菌的作用。

本文通过研究葛根多糖下调NF- $\kappa$ B中相关蛋白的磷酸化水平与上调Nrf2/HO-1蛋白的表达量,调控炎症因子基因转录,降低促炎因子分泌以及降低蛋白iNOS和COX-2的表达量从而发挥治疗炎症的作用,与之前的研究结果相互印证。但是,多糖的抗炎机制往往是通过多途径、多靶点等方式来实现,与机体免疫调节和肠道菌群方面密不可分。因此,进一步研究揭示葛根多糖在治疗溃疡性结肠炎结肠炎及调节肠道菌群方面的作用机制具有十分重要的意义。

### 3 结论

3.1 本研究以LPS所诱导的RAW264.7炎症细胞模型来研究粉葛粗多糖(FGC)、葛根粗多糖(GGC)以及粉葛均一多糖(FGJ)对细胞炎症反应的作用。由结果可知,FGC、FGJ不能抑制模型组中NO及TNF- $\alpha$ 、IL-6的产生,而GGC具有与之相反的效果,在浓度为10~40  $\mu\text{g/mL}$ 的浓度范围内,可以有效的抑制炎症的发生。从作用机制来看,GGC能够有效的抑制iNOS和COX-2的表达,且能降低NF- $\kappa$ B磷酸化蛋白的表达水平,提高Nrf2、HO-1蛋白的表达水平,降低ROS的产生,并对TNF- $\alpha$ 、IL-6的mRNA表达有抑制作用。

3.2 本文在前期完成了对粉葛均一多糖与粉葛粗多糖的抗炎活性研究,发现纯化后的多糖并未表现出更好的抗炎活性,因此首先对葛根粗多糖的活性进行研究,证明其有抗炎活性后下一步将对其进行纯化并研究其活性及作用机制。

### 参考文献

- [1] Ka H Wong, George Q Li, Kong M Li, et al. Optimisation of *Pueraria isoflavonoids* by response surface methodology using ultrasonic-assisted extraction [J]. Food Chemistry, 2017, 231: 231-237
- [2] Jeevan K Prasain, Ning Peng, Rajani Rajbhandari, et al. The Chinese pueraria root extract (*Pueraria lobata*) ameliorates impaired glucose and lipid metabolism in obese mice [J]. Phytomedicine, 2012, 20(1): 17-23
- [3] C F Ng, C M Koon, D W S Cheung, et al. The anti-hypertensive effect of Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) and Gegen (*Pueraria lobata*) formula in rats and its underlying mechanisms of vasorelaxation [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2011, 137(3): 1366-1372
- [4] Lidiya Bebrevska, Kenne Foubert, Nina Hermans, et al. *In vivo* antioxidative activity of a quantified *Pueraria lobata* root extract [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2010, 127(1): 112-117
- [5] Teruyoshi Tanaka, Hanjun Tang, Fengnian Yu, et al. Kudzu (*Pueraria lobata*) vine ethanol extracts improve ovariectomy-induced bone loss in female mice [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(24): 13230-13237
- [6] Zhou Dong, Mengmeng Zhang, Huixian Li, et al. Structural characterization and immunomodulatory activity of a novel polysaccharide from *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi root [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 59(24): 1556-1564
- [7] Xuelin Zhou, Wai Ping Lam, Hong Chai Tang, et al. Effects of Gegen (*Puerariae lobatae* Radix) water extract on improving detrusor overactivity in spontaneously hypertensive rats [J]. Phytomedicine, 2016, 23(6): 672-678
- [8] Ka H Wong, Valentina Razmovski-Naumovski, Kong M Li, et al. Comparing morphological, chemical and anti-diabetic characteristics of *Puerariae lobatae* Radix and *Puerariae thomsonii* Radix [J]. Ethnopharmacol, 2015, 164: 53-63
- [9] 宋淑珍,房征宇,田亚平.葛根多糖对 PC12 细胞增殖的损伤作用[J].解放军医学院学报,2004,25(1):18-20  
SONG Shuzhen, FANG Zhengyu, TIAN Yaping. Effects of pueraria polysaccharide on proliferation of PC12 cells [J]. Journal of PLA Medical College, 2004, 25(1): 18-20
- [10] 蔡春沉.葛根多糖对 2 型糖尿病大鼠的治疗作用及机制研究[J].天津中医药,2014,31(2):94-97  
CAI Chunchen. Study on the therapeutic effect and mechanism of pueraria polysaccharide on type 2 diabetes rats [J]. Tianjin Traditional Chinese Medicine, 2014, 31(2): 94-97
- [11] 杨长友.葛根多糖抑菌活性的测定[J].宁德师专学报(自然科学版),2011,2:130-133  
YANG Changyou. Determination of antibacterial activity of pueraria polysaccharide [J]. Journal of Ningde Teachers college (Natural Science Edition), 2011, 2: 130-133
- [12] 崔恒祥.葛根中(1→6)- $\alpha$ -D-葡聚糖的结构,构象及其硫酸化衍生物抗氧化活性[C]//中国药学会全国多糖类药物研究与应用研讨会论文集,2008  
CUI Hengxiang. Structure, conformation and antioxidant activity of (1→6)- $\alpha$ -D-glucan from pueraria I [C]// Proceedings of the Symposium on Research and Application of Polysaccharides, Chinese Pharmaceutical Association, 2008
- [13] Hyung Sook Kim, Bo Ram Shin, Hong Kyung Lee, et al. A polysaccharide isolated from *Pueraria lobata* enhances maturation of murine dendritic cells [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 52(1): 184-191
- [14] Alexander H Sprague, Raouf A Khalil. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease [J]. Biochemical Pharmacology, 2009, 78(6): 539-552
- [15] 王筱婧,左艳敏,王东兴,等.一氧化氮介导的中药及其活性成分的抗炎作用研究进展[J].免疫学杂志,2015,31(5):435-440  
WANG Xiaojing, ZUO Yanmin, WANG Dongxing, et al. Progress in anti-inflammatory action of active ingredient of Chinese drugs mediated by NO [J]. Immunological Journal, 2015, 31(5): 435-440
- [16] 赵洪伟,车楠,黄超,等.Notch1 信号激活核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 参与小鼠 RAW264.7 巨噬细胞炎症介质释放[J].细胞与分子免疫学杂志,2017,33(10):1310-1315  
ZHAO Hongwei, CHE Nan, HUANG Chao, et al. Notch1 signaling participates in the release of inflammatory mediators in mouse RAW264.7 cells via activating NF- $\kappa$ B pathway [J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2017, 33(10): 1310-1315
- [17] 程海燕,陈先国,徐元宏.白细胞介素 6 与自身免疫性疾病关系的研究进展[J].细胞与分子免疫学杂志,2016,32(9):1285-1287  
CHENG Haiyan, CHEN Xianguo, XU Yuanhong. Research

- progress on the relationship between interleukin-6 and autoimmune diseases [J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2016, 32(9): 1285-1287
- [18] 张伟洁,郑宏.IL-6 介导免疫炎性反应作用及其与疾病关系的研究进展[J].细胞与分子免疫学杂志,2017,33(5):699-703  
ZHANG Weijie, ZHENG Hong. Research progress of il-6 - mediated immune inflammatory response and its relationship with disease [J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2017, 33(5): 609-703
- [19] 周平,罗云,邢娜,等.肿瘤坏死因子  $\alpha$  介导动脉粥样硬化发生机制的研究进展[J].世界中医药,2015,10(8):1163-1168  
ZHOU Ping, LUO Yun, XING Na, et al. Research progress of pathogenesis of atherosclerosis induced by tumor necrosis factor  $\alpha$  [J]. World Chinese Medicine, 2015, 10(8): 1163-1168
- [20] 欧阳辉,管咏梅,朱卫丰,等.一种葛根多糖提取物及其提取方法和应用[P].江西省:CN112898446B,2021-11-30  
OUYANG Hui, GUAN Yongmei, ZHU Weifeng, et al. Extraction method and application of pueraria polysaccharide [P]. Jiangxi Province: CN112898446B,2021-11-30
- [21] Chun-Yan Shen, Wen-Li Zhang, Jian-Guo Jiang. Immune-enhancing activity of polysaccharides from *Hibiscus sabdariffa* Linn. via MAPK and NF-kB signaling pathways in RAW264. 7 cells [J]. Journal of Functional Foods, 2017, 34: 118-129
- [22] Morten A Karsdal, Federica Genovese, Emilie A Madsen, et al. Collagen and tissue turnover as a function of age: implications for fibrosis [J]. J Hepatol, 2016, 64(1): 103-109
- [23] Mingzhu Zhang, Xiaohe Tian, Ya Wang, et al. Immunomodulating activity of the polysaccharide TLH-3 from *Tricholoma lobayense* in RAW264.7 macrophages [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 107: 2679-2685
- [24] Huang X T, Liu W, Zhou Y, et al. Dihydroartemisinin attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice by suppressing NF-kB signaling in an Nrf2-dependent manner [J]. International Journal of Molecular Medicine, 2019, 44(6): 2213-2222
- [25] Ki Mo Kim, Deok Rim Heo, Young-A Kim, et al. Coniferaldehyde inhibits LPS-induced apoptosis through the PKC  $\alpha/\beta$  II/Nrf-2/HO-1 dependent pathway in RAW264.7 macrophage cells [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2016, 48: 85-93
- [26] 钟敏,李昕宇,郝佳美,等.正北芪多糖对结肠炎小鼠的抗炎作用研究[J].食品工业科技,2021,42(16):325-330  
ZHONG Min, LI Xinyu, HAO Jiamei, et al. Anti-inflammatory effect of astragalus polysaccharide from astragali radix on mice with ulcerative colitis [J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(16): 325-330
- [27] 罗志锋,陆思名,黎攀,等.遗传算法优化超高压辅助复合酶提取枸杞多糖工艺及其抗炎活性研究[J].粮食与油脂,2021, 34(1):114-122  
LUO Zhifeng, LU Siming, LI Pan, et al. Study on optimization of extraction process of *Lycium barbarum* polysaccharides by ultrahigh-pressure assisted complex enzyme and anti-inflammatory activity [J]. Cereals & Oils, 2021, 34(1): 114-122
- [28] 鹿秀云,岳海洋,刘億,等.黄芪多糖对结肠炎小鼠树突状细胞表面共刺激分子表达的调节作用[J].中成药,2018,40(10): 2296-2298  
LU Xiuyun, YUE Haiyang, LIU Yi, et al. Regulation of astragalus polysaccharides on the expression of costimulatory molecules on dendritic cells of colitis mice [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2018, 40(10): 2296-2298
- [29] Ji Xiaolong, Peng Qiang, Yuan Yuepeng, et al. Extraction and physicochemical properties of polysaccharides from *Ziziphus jujuba* cv. *muzao* by ultrasound-assisted aqueous two-phase extraction [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 108: 541-549

---

(上接第 119 页)

- [42] Liu Z, Gong Y, Guo Y, et al. TMP-SSurface2: A novel deep learning-based surface accessibility predictor for transmembrane protein sequence [J]. Frontiers in Genetics, 2021, 12: 328
- [43] Ravikumar A, Ramakrishnan C, Srinivasan N, et al. Stereochemical assessment of ( $\phi$ ,  $\psi$ ) outliers in protein structures using bond geometry-specific Ramachandran steric-maps [J]. Structure, 2019, 27(12): 1875-1884