

一种芪归均一多糖的结构表征及抗溃疡性结肠炎作用评价

刘文娟¹, 马善波², 卜莹³, 马涛⁴, 石小鹏^{2*}, 唐于平^{1*}

(1. 陕西中医药大学药学院, 陕西省中医药管理局中药配伍重点实验室, 陕西 咸阳 712046;

2. 中国人民解放军空军军医大学第一附属医院, 西安 710032;

3. 中国人民解放军海军军医大学第三附属医院, 上海 200433;

4. 中国人民解放军联勤保障部队第九六八医院, 辽宁 锦州 121000)

[摘要] 目的:探讨芪归多糖对脂多糖(LPS)诱导RAW264.7巨噬细胞的免疫调节作用,并对活性组分芪归均一多糖AAPS-4a进行结构表征及溃疡性结肠炎(UC)保护作用评价。方法:采用细胞增殖与活性检测(CCK-8)法检测6种芪归多糖(0.01~100 mg·L⁻¹)对RAW264.7细胞增殖的影响。采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)考察6种芪归多糖(3、10 mg·L⁻¹)对LPS诱导RAW264.7细胞分泌肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、 β 干扰素(IFN- β)及一氧化氮(NO)水平的影响。筛选出活性多糖后,采用高效尺寸排阻色谱法(HPSEC)测定其均一性和相对分子质量,利用傅里叶变换红外光谱法(FT-IR)鉴定特征官能团,通过高效液相色谱法(HPLC)分析单糖组成,结合气相色谱-质谱法(GC-MS)分析糖残基类型及连接方式,运用一维和二维核磁共振法(NMR)确定糖残基组成及构型。实验动物分正常组、模型组、AAPS-4a低剂量组(50 mg·kg⁻¹)、AAPS-4a高剂量组(100 mg·kg⁻¹)和柳氮磺吡啶(SASP)组(75 mg·kg⁻¹),除正常组外采用3.5%葡聚糖硫酸钠盐(DSS)诱导急性UC小鼠模型。各给药组按相应剂量连续灌胃给药7 d,记录小鼠体质量变化。给药结束后,计算脾脏指数和疾病活动指数(DAI)评分,ELISA检测血清TNF- α 和白细胞介素-6(IL-6)水平,苏木素-伊红(HE)染色观察结肠组织进行病理变化。结果:在细胞水平上,AAPS-4a可呈剂量依赖性抑制LPS诱导的TNF- α 、IFN- β 、NO水平升高($P<0.01$)。对AAPS-4a进行结构表征显示,AAPS-4a为相对分子质量 7.6×10^3 Da的均一多糖,结构包含甘露糖(Man)、葡萄糖(Glc)和半乳糖(Gal),摩尔比为1.3:23.9:1.0,主要由1,6- α -D-Glcp、T- α -D-Glcp、1,3- β -D-Galp、1,4- α -D-Manp和1,2- α -D-Galp 5种糖残基组成。体内实验显示,与正常组比较,模型组小鼠DAI评分和脾脏指数显著升高,结肠长度显著缩短,炎症因子TNF- α 和IL-6水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,AAPS-4a高剂量组可降低DAI评分和脾脏指数,以及TNF- α 、IL-6水平,改善结肠萎缩($P<0.05$, $P<0.01$)。病理观察显示,AAPS-4a可明显抑制结肠组织炎症细胞浸润,减轻其病理损伤。结论:AAPS-4a是由1,6- α -D-Glcp、T- α -D-Glcp、1,3- β -D-Galp、1,4- α -D-Manp和1,2- α -D-Galp组成的中性均一多糖,为芪归药对中发挥抗UC作用的关键活性组分,具有潜在的临床应用价值。

[关键词] 黄芪-当归药对; 多糖; 高效液相色谱法(HPLC); 气相色谱-质谱法(GC-MS); 核磁共振法(NMR); 免疫调节; 溃疡性结肠炎(UC)

[中图分类号] R242;R931;O657 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2025)20-0204-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20251766

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20250703.1435.001>

[网络出版日期] 2025-07-03 15:51:59

[增强出版附件] 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>



Structural Characterization and Evaluation of Anti-ulcerative Colitis Activity of Homogeneous Polysaccharide from Astragali Radix-Angelicae Sinensis Radix Herb Pair

LIU Wenjuan¹, MA Shanbo², BU Ying³, MA Tao⁴, SHI Xiaopeng^{2*}, TANG Yuping^{1*}

(1. College of Pharmacy, Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine (TCM) Compatibility of Shaanxi Administration of TCM, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China;

[收稿日期] 2025-03-19

[基金项目] 陕西省教育厅专项科研项目(23JK0403);秦创原中医药产业创新聚集区项目(L2024-QCY-ZYYJJQ-X54);三秦英才特殊支持计划创新创业团队项目(2023)

[第一作者] 刘文娟,博士,讲师,从事中药多糖的结构和作用机制研究,Tel:029-38185165,E-mail:2051139@sntcm.edu.cn

[通信作者] *唐于平,博士,教授,从事中药配伍机制及物质基础研究,Tel:029-38185000,E-mail:yupingtang@sntcm.edu.cn;

*石小鹏,硕士,副主任药师,从事中药新药研发和药效物质筛选研究,Tel:029-84775471,E-mail:shixiaopeng775471@163.com

2. The First Affiliated Hospital of Air Force Medical University, Xi'an 710032, China;
3. Third Affiliated Hospital of Naval Medical University, Shanghai 200433, China; 4. The 968th Hospital of Joint Logistics Support Force of the Chinese People's Liberation Army, Jinzhou 121000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the immunomodulatory effect of polysaccharides from Astragali Radix-Angelicae Sinensis Radix herb pair (Qi-gui polysaccharides) on lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW264.7 macrophages and to characterize the structure of the active component Qi-gui homogeneous polysaccharide (AAPS-4a), and evaluate its protective effect on ulcerative colitis (UC). **Methods:** The effects of six Qi-gui polysaccharides (0.01-100 mg·L⁻¹) on the proliferation of RAW264.7 cells were assessed by cell proliferation and activity assay (CCK-8), and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to investigate the effects of the six polysaccharides (3, 10 mg·L⁻¹) on the secretion levels of tumor necrosis factor (TNF)- α , interferon (IFN)- β , and nitric oxide (NO) in LPS-induced RAW264.7 cells. After screening for active polysaccharides, high-performance size-exclusion chromatography (HPSEC) was used to determine its homogeneity and relative molecular weight, then its characteristic functional groups were identified by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), monosaccharide composition was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC), methylation analysis combined with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was performed to determine the types and linkage modes of sugar residues, and one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance (NMR) were used to identify the sugar residue composition and configuration of the active polysaccharide. Finally, experimental animals were divided into the normal group, model group, AAPS-4a low-dose group (50 mg·kg⁻¹), AAPS-4a high-dose group (100 mg·kg⁻¹), and sulfasalazine (SASP) group (75 mg·kg⁻¹). Except for the normal group, the acute UC mouse model was induced using 3.5% dextran sulfate sodium salt (DSS). Each treatment group was administered the corresponding dose via oral gavage for 7 days, and changes in body weight were recorded. After treatment, the spleen index and disease activity index (DAI) score were calculated, TNF- α and interleukin-6 (IL-6) levels in the serum were detected by ELISA, and histopathological changes in colon tissue were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. **Results:** At the cellular level, AAPS-4a exhibited a dose-dependent inhibition of LPS-induced increases in TNF- α , IFN- β , and NO levels ($P < 0.01$). Structural characterization of AAPS-4a revealed that it was a homogeneous polysaccharide with a relative molecular weight of 7.6×10^3 Da, consisting of mannose (Man), glucose (Glc), and galactose (Gal) in a molar ratio of 1.3:23.9:1.0. It was primarily composed of five sugar residues of 1,6- α -D-Glcp, T- α -D-Glcp, 1,3- β -D-Galp, 1,4- α -D-Manp, and 1,2- α -D-Galp. *In vivo* experiments showed that compared with the normal group, the model group demonstrated markedly increased DAI score and spleen index, significantly reduced colon length, and significantly elevated levels of TNF- α and IL-6 ($P < 0.01$). Compared with the model group, the AAPS-4a high-dose group significantly reduced the DAI score and spleen index, as well as TNF- α and IL-6 levels, and improved colonic atrophy ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Pathological observations showed that AAPS-4a significantly inhibited inflammatory cell infiltration in colon tissue and alleviated pathological damage. **Conclusion:** AAPS-4a, a neutral homogeneous polysaccharide composed of 1,6- α -D-Glcp, T- α -D-Glcp, 1,3- β -D-Galp, 1,4- α -D-Manp and 1,2- α -D-Galp, is identified as a key bioactive component contributing to the anti-UC effect of the Qi-gui herb pair. Its immunoregulatory and anti-UC properties suggest its potential as a therapeutic agent for UC.

[Keywords] Astragali Radix-Angelicae Sinensis Radix herb pair; polysaccharides; high performance liquid chromatography (HPLC); gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); nuclear magnetic resonance (NMR); immunoregulation; ulcerative colitis (UC)

溃疡性结肠炎(UC)是一种累及结直肠黏膜的慢性复发性炎症性疾病,其典型病理特征为连续性、弥漫性炎症浸润及隐窝脓肿形成^[1]。流行病学数据显示,我国UC年发病率已攀升至11.60/10万,居亚洲首位,其中15%~25%患者进展为重症UC,临床表现为持续性血便、肠黏膜溃疡及结肠缩短,部分病例可并发中毒性巨结肠甚至癌变^[2]。UC现行治疗方案以氨基水杨酸制剂、糖皮质激素及抗肿瘤坏死因子- α (TNF- α)生物制剂(如英夫利昔单抗)为主,但存在治疗应答率低(<60%)、复发率高(年复发率>30%)及长期应用易诱发机会性感染等局限性^[3]。因此,亟需深入研究UC发病机制并开发更安

全、高效、可负担的UC治疗策略。

中医药在UC治疗中展现出独特优势,其通过多靶点调控免疫稳态和肠道微生态的特点备受关注。参苓白术散、青紫止痛汤、溃结元汤、葛根芩连汤等被发现能通过调控Janus激酶2(JAK2)/信号传导及转录激活蛋白3(STAT3)、磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)通路调节炎症,修复受损肠黏膜,进而抑制UC的发生发展^[4]。黄芪-当归药对为补气生血经典配伍,最早见于李东垣《内外伤辨惑论》。黄芪和当归以5:1配伍形成经典方剂当归补血汤,主治“疮疡溃后气血两虚证”,可通过补气养血、扶正托毒,促进溃疡疮口愈合,具有潜在的抗

UC研究价值^[5-6]。作为中医临床实践的核心载体,深入阐明中药复方药效物质基础及其作用机制,是解锁中医药临床价值并推动其现代化进程的核心课题。前期研究通过整合网络药理学与体内实验证据,发现当归补血汤可通过调控PI3K/Akt通路,改善葡聚糖硫酸钠盐(DSS)诱导的UC小鼠肠道炎症,有效维持肠上皮屏障完整性。其中,槲皮素、异黄酮苷等小分子成分被鉴定为其发挥抗UC作用的关键活性物质^[7]。然而,作为芪归药对中重要的水溶性大分子组分,多糖在抗UC中的结构基础及作用机制仍缺乏系统研究。

多糖是芪归药对水煎液中含有最丰富的水溶性活性物质之一,其免疫调节作用在黄芪和当归单味药的研究中已得到广泛证实。黄芪多糖可通过调节T细胞增殖与活化、调控核转录因子- κ B(NF- κ B)、p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)等炎症相关信号通路、激活白细胞介素-2(IL-2)、白细胞介素-6(IL-6)、 γ 干扰素(IFN- γ)等细胞因子及一氧化氮(NO)的分泌,从而增强机体免疫功能调节机体免疫。而当归多糖APS-2I则可与Toll样受体4(TLR4)结合,抑制其与髓样分化蛋白-2(MD-2)形成复合物,进而下调Toll/IL-1受体(TIR)接头蛋白的表达,阻断脂多糖(LPS)诱导的TLR4下游信号通路激活^[8-10]。此外,黄芪与当归多糖联合应用可通过JAK2/STAT5通路,协同调控造血干细胞的增殖与分化^[11]。近年研究发现,复方中药煎煮过程中可能发生多糖糖链重构,从而产生具有协同增效作用的新型活性糖链。例如,四君子汤提取得到的复方多糖,其免疫调节活性显著优于四味药单独提取后复配的多糖^[12]。AAP-2A是早期从芪归药对中分离得到的均一多糖,其相对分子质量为 6.7×10^5 Da,主要由鼠李糖,半乳糖,阿拉伯糖和葡萄糖组成,具有显著的抗氧化活性^[13]。本团队前期从芪归总多糖(AAPS)中分离纯化获得6种芪归多糖,其中AAPS-1a和AAPS-3a显示出显著的抗肿瘤活性,能够有效抑制肿瘤细胞增殖并诱导其凋亡^[14]。然而,现有研究主要集中于单味药多糖的药理活性,关于芪归药对中多糖成分在抗UC中的结构基础和作用机制,尚缺乏系统性研究与报道。

本研究围绕芪归多糖的抗UC活性展开系统筛选,并对筛选所得的活性多糖进行了结构与功能的深入研究。采用高效尺寸排阻色谱法(HPSEC)、傅里叶变换红外光谱法(FT-IR)、气相色谱-质谱联用(GC-MS)及核磁共振波谱(NMR)等手段对活性多

糖初级结构进行了系统表征。通过DSS诱导的急性UC模型,评估其在修复肠上皮屏障、抑制炎症细胞浸润等方面的作用效果。本研究不仅为阐明芪归药对抗UC的药效物质基础提供了重要的实验依据,也为基于芪归多糖开发功能性食品或天然药物提供了理论支撑和技术参考。

1 材料

SENSOR 27型红外光谱仪、FD5-3型冷冻干燥机(德国布鲁克科技有限公司),Waters 2414型示差折光检测器和Waters Alliance 2695型高效液相色谱仪(美国沃特世科技有限公司),Ultimate 3000型光电二极管阵列检测器(美国赛默飞世尔科技公司),Bruker Avance III型核磁共振波谱仪(德国布鲁克科技有限公司),TQ8050NX型气相色谱-质谱联用仪(日本岛津公司),MCO-50AICL-PC型CO₂细胞培养箱(上海普和希健康医疗器械有限公司),Synergy H4 Hybrid型多功能酶标仪(美国腾仪器有限公司)。

黄芪饮片(批号20220502)、当归饮片(批号20220001)购于陕西兴盛德药业有限公司,经陕西中医药大学胡本祥教授鉴定,符合2025年版《中华人民共和国药典》中的相关质量要求。甘露糖(Man,货号04870942)、鼠李糖(Rha,货号04871923)、葡萄糖醛酸(GlcA,货号04869332)、半乳糖醛酸(GalA,货号04237345)、葡萄糖(Glc,货号04931548)、半乳糖(Gal,货号04871138)、阿拉伯糖(Ara,货号04979621)、岩藻糖(Fuc,货号04236851)对照品,以及葡聚糖分子量对照品T-3(货号SM9500)、T-10(货号SM9510)、T-50(货号SM9520)、T-120(货号SM9530)、T-150(货号SM9430)、LPS(批号818E035)、青-链霉素混合液(批号20200726)购自索莱宝生物科技有限公司,各对照品纯度均 $\geq 98\%$ 。蓝色葡聚糖(美国西格玛奥德里奇贸易有限公司,货号S14096),柳氮磺吡啶肠溶胶囊(广东强基药业有限公司,批号H20051173),DMEM高糖基础培养液、胰蛋白酶(含EDTA)(武汉塞维尔生物科技有限公司,批号分别为G4510、CR2110038),胎牛血清(美国Gibco公司,批号42G6185K),细胞增殖与活力检测(CCK-8)试剂盒、小鼠NO ELISA试剂盒(上海碧云天生物科技有限公司,批号分别为1755C459、S0021S),TNF- α 、 β 干扰素(IFN- β)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒、苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,批号分别为E-EL-M3063、E-EL-M0033、G1005-100mL),甲醇和

乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

小鼠巨噬细胞RAW264.7购自中国科学院细胞库(货号SCSP-5036),购买初始为4代,实验时传至12代。SPF级雄性C57BL/6J小鼠40只,6~8周龄,体质量20~24 g,由空军军医大学实验动物中心提供,合格证号SCXK(陕)2024-005,温度(22±2)℃,湿度(55±5)%,适应性饲养7 d。实验方案经空军军医大学动物伦理委员会批准,批号IACUC-20240076。

2 方法

2.1 AAPS的提取 黄芪饮片与酒当归饮片按质量比5:1混合,加入4倍体积无水乙醇回流脱脂,挥干溶剂,加入6倍体积去离子水,80℃煎煮2次(每次1 h),合并提取液浓缩至原体积1/5,加入4倍体积95%乙醇,4℃静置12 h,离心收集沉淀,复溶后获得芪归粗多糖。粗多糖依次经Sevage试剂(三氯甲烷-正丁醇5:1)结合反复冻融脱除蛋白质,继而采用3% H₂O₂溶液(料液比1:10)在pH 8.0、50℃避光条件下脱色2 h。反应液经0.45 μm微孔滤膜过滤后冻干,得AAPS,得率为6.3%,密封贮存于-80℃备用。

2.2 AAPS的分离和纯化 将AAPS溶于超纯水,经DEAE Sephadex A-25柱(5 cm×100 cm,40~120 μm)进行阶段洗脱,依次采用超纯水、0.5、1.0、2.0 mol·L⁻¹ NaCl溶液梯度洗脱,流速1.5 mL·min⁻¹,获得4个亚组分AAPS-1~AAPS-4。各亚组分进一步通过Sephadex G-100柱(5 cm×100 cm,40~120 μm)进行分离纯化,以0.1 mol·L⁻¹ NaCl溶液等度洗脱,结合苯酚-硫酸法监测收集主峰。收集液经1 000 Da截留分子量透析膜纯化48 h,减压浓缩后冻干,最终获得6种精制多糖组分,分别为AAPS-1a、AAPS-1b、AAPS-2a、AAPS-2b、AAPS-3a、AAPS-4a,其得率分别为(20.3±1.8)%、(15.6±1.2)%、(21.5±2.1)%、(13.4±1.1)%、(12.7±1.2)%和(13.5±1.4)% (以AAPS质量计)。

2.3 HPSEC检测AAPS-4a均一性和相对分子量^[15] 样品和葡聚糖对照品(T-3、T-10、T-50、T-120、T-150)溶于水,配制成质量浓度为1 g·L⁻¹的溶液,离心取上清液200 μL备用。采用Waters Alliance 2695型高效液相色谱仪,Waters 2414型示差折光检测器,TOSOH TSK-GEL G4000 PW_{XL}色谱柱(7.8 mm×300 mm,10 μm),以流动相为0.05 mol·L⁻¹ Na₂SO₄水溶液等度洗脱30 min,进样量10 μL,流速0.5 mL·min⁻¹,柱温25℃。按上述条件取对照品和样

品进样检测,以对照品保留时间的对数值为横坐标,以分子量的对数值为纵坐标,绘制标准曲线,将样品峰保留时间带入回归方程计算相对分子量。

2.4 FT-IR检测AAPS-4a官能团和糖苷键构型 取AAPS-4a 2 mg,与溴化钾研磨混匀,压片,红外光谱仪测定波数范围4 000~400 cm⁻¹的光谱,确定糖分子中主要官能团和吡喃糖的糖苷键构型。

2.5 HPLC检测AAPS-4a的单糖组成^[16] 取各单糖对照品5.0 mg,加蒸馏水500 μL溶解,取400 μL依次加入0.3 mol·L⁻¹氢氧化钠溶液200 μL,0.5 mol·L⁻¹ 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)甲醇溶液400 μL,70℃衍生化反应30 min,加0.3 mol·L⁻¹ HCl中和至pH 7.0。三氯甲烷萃取3次去除游离PMP,水相合并得单糖衍生物,取各衍生物200 μL混合为混合对照品。取AAPS-4a样品5 mg加入2 mol·L⁻¹ 三氟乙酸4 mL,100℃水解8 h,氮吹除酸,超纯水复溶后同法衍生化。采用Waters Alliance 2695型高效液相色谱仪,Ultimate 3000型光电二极管阵列检测器,Accliam™ 120 C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),以乙酸铵(100 mmol·L⁻¹)-四氢呋喃-乙腈(81:2:17)为流动相等度洗脱60 min,流速1.0 mL·min⁻¹,柱温25℃,进样量10 μL。根据各单糖标准品的峰面积计算样品中各单糖含量,再根据各单糖分子量进行归一化处理,最终得到样品中单糖的摩尔比。

2.6 GC-MS结合NMR分析AAPS-4a的糖残基类型

2.6.1 样品预处理 取AAPS-4a多糖样品20 mg,加无水二甲基亚砜(DMSO)4 mL溶解,氮气吹扫5 min除氧后搅拌12 h活化。加入1 mol·L⁻¹的NaOH-DMSO溶液4 mL,氮气保护下搅拌反应3 h,冰浴滴加碘甲烷3.6 mL,避光反应7 min后室温继续反应12 h。反应液经1 000 Da透析袋超纯水透析24 h(换液3次),冻干得全甲基化产物。依次用90%甲酸(100℃、4 h)和2 mol·L⁻¹三氟乙酸(100℃、8 h)分步水解,氮吹除酸后溶于超纯水2 mL,加入硼氟化钠60 mg,室温还原24 h,经JK008氢型树脂脱盐并冻干。取干燥产物加入吡啶-乙酸酐(1:2)1 mL,100℃乙酰化2 h,乙醇共沸去残留试剂,三氯甲烷复溶浓缩至100 μL。

2.6.2 GC-MS检测糖残基连接方式 色谱条件为Agilent DB-1毛细管柱(0.25 mm×30 m,0.15 μm),载气为氦气,流速1.0 mL·min⁻¹,进样口温度220℃,分流比10:1,程序升温(45℃保持5 min;以10℃·min⁻¹升温至140℃,保持5 min;以0.5℃·min⁻¹升温至170℃,保持1 min,以15℃·min⁻¹升温至

280 °C, 保持 5 min)。质谱条件为电子轰击离子源(EI), 离子源温度 280 °C, 碰撞能量 70 eV, 扫描范围 m/z 50~600。

2.6.3 NMR 检测糖残基构型及连接方式 AAPS-4a 多糖样品重水(D₂O)置换 3 次, 置于 D₂O 500 μL 中。用 Bruker Avance III 型核磁共振波谱仪检测一维核磁共振谱(1D NMR), 即 ¹H NMR、¹³C NMR; 以及二维核磁共振谱(2D NMR), 即异核单量子相干谱(HSQC)、氢-氢相关谱(¹H-¹H COSY)、异核多键相关谱(HMBC)与核奥弗豪泽效应谱(NOESY)。

2.7 小鼠 RAW264.7 细胞培养 细胞接种于 T75 培养瓶(初始密度 1×10⁵ 个/mL), 使用含 10% 胎牛血清、1% 青-链霉素的 DMEM 高糖培养基, 于 37 °C、5%CO₂ 培养箱中培养。

2.8 CCK-8 检测细胞增殖活性 RAW264.7 细胞以 5×10⁴ 个/mL 接种于 96 孔板, 过夜贴壁, 给予终质量浓度为 0、0.1~100 mg·L⁻¹ 的 AAPS-4a 溶液, 每组设 6 个复孔, 孵育 48 h 后, 每孔加入 CCK-8 溶液 10 μL, 37 °C 反应 2 h, 测定 490 nm 处吸光度 A , 计算细胞活力。细胞活力=($A_{\text{实验孔}}-A_{\text{空白孔}}$)/($A_{\text{对照孔}}-A_{\text{空白孔}}$)×100%。

2.9 ELISA 检测细胞 TNF-α、IFN-β 和 NO 含量 细胞以 2×10⁵ 个/mL 接种于 6 孔板, 过夜贴壁, 正常组加入培养液, LPS 组加入 5 mg·L⁻¹ 的 LPS, 样品组加入对应浓度多糖溶液。培养 48 h 后, 取各组上清液, 按照 ELISA 试剂盒说明书, 测定上清液中 TNF-α、IFN-β 和 NO 水平。

2.10 UC 小鼠分组、造模及给药^[7] 动物随机分为正常组, 模型组, 阳性药组(SASP 组), AAPS-4a 低、高剂量组。正常组常规喂养, 其余各组给予 3.5% DSS 溶液自由饮水 7 d 诱导急性 UC。造模成功后, 参考文献报道, 阳性药组给予 SASP 75 mg·kg⁻¹[7], 根据预实验结果, AAPS-4a 低、高剂量组分别给予 AAPS-4a 50、100 mg·kg⁻¹, 正常组和模型组给予等体积生理盐水, 所有动物灌胃给药, 连续 7 d, 记录小鼠体质量。

2.11 动物样本取材 实验结束后处死小鼠, 经眼眶后静脉丛采集全血于离心管中, 室温静置 30 min 使血液凝固。随后于 4 °C、3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min (离心半径 10 cm), 取上层血清。取结肠并记录长度值, 一部分结肠 4% 多聚甲醛固定, 一部分同血清保存于 -80 °C 冰箱用于后续分析; 取脾脏计算脾脏指数=脾脏质量(mg)/体质量(g)。

2.12 一般行为学观察 监测小鼠体质量变化、粪便性状及便血程度, 依据参考评分标准对各组小鼠

进行疾病活动指数(DAI)评估^[17]。

2.13 HE 染色观察结肠组织病理变化 结肠组织石蜡切片经脱蜡水化, 依次进行苏木素染色 5 min, 1% 盐酸乙醇分化 30 s, 伊红复染 2 min; 随后切片经乙醇梯度脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封固。采用光学显微镜观察结肠黏膜结构完整性、炎性细胞浸润及隐窝形态改变, NIS-Elements D 4.30 图像采集系统记录病理特征。

2.14 ELISA 检测小鼠血清 TNF-α、IL-6 含量 按 ELISA 试剂盒说明书步骤操作, 检测各组小鼠血清中炎症因子 TNF-α、IL-6 表达差异。

2.15 数据统计 采用 SPSS 27.0 软件对实验数据进行统计学分析, 计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 两组间比较采用 t 检验, 多组间比较若符合正态分布和方差均匀性, 则采用单因素方差分析和 Tukey 法多重比较分析, 多组间若不满足正态分布或方差均匀性, 则使用 Games-Howell 检验或 Dunnett 检验, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 6 种芪归多糖对 RAW264.7 细胞增殖活性的影响 与正常组比较, 在 0.01~10 mg·L⁻¹ 内, 6 种芪归多糖对细胞增殖均无明显影响, 而 AAPS-1a 和 AAPS-1b 在质量浓度为 30 mg·L⁻¹ 和 100 mg·L⁻¹ 表现出明显抑制 ($P<0.05$, $P<0.01$); AAPS-2a 和 AAPS-2b 在 10 mg·L⁻¹ 和 3 mg·L⁻¹ 下对细胞增殖有促进作用。此外, AAPS-3a 和 AAPS-4a 仅在 100 mg·L⁻¹ 下对细胞增殖有抑制作用 ($P<0.05$)。综合以上结果, 选择 3、10 mg·L⁻¹ 作为后续免疫调节活性评价给药浓度。见表 1。

3.2 6 种芪归多糖对 RAW264.7 细胞的免疫调节作用比较 与正常组比较, 模型组细胞分泌 TNF-α、IFN-β 和 NO 水平显著升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 仅 AAPS-4a(10 mg·L⁻¹) 可明显抑制 LPS 诱导巨噬细胞分泌 TNF-α、IFN-β 和 NO 水平 ($P<0.05$, $P<0.01$), 且呈剂量依赖性。初步推断其为芪归药对发挥抗 UC 作用的关键活性组分, 故对其进行后构鉴定与体内药效评价。见表 2、表 3。

3.3 AAPS-4a 相对分子质量的确定 AAPS-4a 色谱峰呈单一对称形, 表明其相对分子质量分布均一。参照葡聚糖标准品建立的标准曲线 ($Y=-3.776 8X+6.880 8$, $R^2=0.999$), 计算其相对分子质量为 7.6×10³ Da, 见增强出版附加材料。

3.4 AAPS-4a 的 FT-IR 分析 AAPS-4a 的 FT-IR 谱显示典型多糖特征吸收峰。其中, 3 396.71 cm⁻¹ 处为

表1 6种芪归多糖对RAW264.7细胞增殖活性的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 1 Effect of six Astragali Radix-Angelicae Sinensis Radix (Qi-gui) polysaccharides on proliferation activity of RAW264.7 cells($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	增殖率/%	组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	增殖率/%	组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	增殖率/%
AAPS-1a	0	100.00±4.67	AAPS-1b	0	100.00±5.66	AAPS-2a	0	100.00±8.17
	0.01	103.27±8.56		0.01	101.28±2.77		0.01	111.19±4.81
	0.03	101.04±4.63		0.03	102.57±2.98		0.03	112.55±9.74
	0.1	99.79±5.45		0.1	113.38±2.28		0.1	114.12±5.76
	0.3	99.10±4.03		0.3	115.15±4.31		0.3	116.08±9.00
	1	100.98±1.01		1	115.09±2.01		1	117.56±3.81
	3	101.01±7.86		3	114.80±4.37		3	117.80±1.67
	10	95.90±3.47		10	106.00±8.48		10	119.94±1.00 ²⁾
	30	81.99±1.67 ¹⁾		30	89.19±6.61 ¹⁾		30	118.46±5.27
	100	54.22±1.01 ²⁾		100	65.97±8.58 ²⁾		100	93.97±6.06
AAPS-2b	0	100.00±2.24	AAPS-3a	0	100.00±6.62	AAPS-4a	0	100.00±6.17
	0.01	99.77±6.36		0.01	96.23±3.32		0.01	106.66±6.49
	0.03	99.35±2.65		0.03	97.55±1.76		0.03	109.68±7.87
	0.1	100.39±3.65		0.1	94.43±2.98		0.1	114.25±7.43
	0.3	105.36±8.81		0.3	93.57±3.16		0.3	115.39±1.04
	1	106.65±4.01		1	93.42±5.15		1	114.91±2.21
	3	112.35±2.03		3	92.78±6.08		3	115.80±7.18
	10	115.87±6.33 ¹⁾		10	92.40±8.11		10	106.18±6.72
	30	99.77±7.38		30	90.27±7.46		30	103.13±6.30
	100	89.00±3.71		100	82.94±5.90 ¹⁾		100	85.08±8.79 ¹⁾

注:与正常组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01

表2 芪归多糖对LPS诱导RAW264.7细胞炎症因子和NO水平的影响($\bar{x}\pm s, n=4$)

Table 2 Effect of Qi-gui polysaccharides on levels of inflammatory factors and NO in LPS-induced RAW264.7 cells

($\bar{x}\pm s, n=4$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	TNF- α /ng·L ⁻¹	IFN- β /ng·L ⁻¹	NO/ μ mol·L ⁻¹
正常组		74.41±9.92	7.57±1.11	29.75±0.35
模型组		339.45±8.27 ²⁾	16.71±1.08 ²⁾	94.35±1.26 ²⁾
AAPS-1a组	3	265.86±23.97	20.92±1.07 ³⁾	94.71±2.52
	10	231.50±8.03 ³⁾	13.60±0.59	91.74±0.75
AAPS-1b组	3	286.54±8.79	20.91±0.98 ³⁾	90.78±7.57
	10	296.93±7.08	25.23±1.07 ⁴⁾	92.22±0.25 ³⁾
AAPS-2a组	3	270.47±11.34	15.89±0.53	93.71±5.20
	10	183.07±10.39 ³⁾	13.92±1.07	75.33±0.50
AAPS-2b组	3	325.51±9.57	15.93±1.09	101.85±1.51
	10	306.32±9.92	15.40±0.45	99.25±2.02
AAPS-3a组	3	513.54±42.41 ⁴⁾	24.95±0.55 ⁴⁾	95.78±0.75
	10	158.03±8.54 ³⁾	15.45±0.64	97.31±0.25
AAPS-4a组	3	285.12±9.21 ³⁾	14.67±1.09	85.71±2.02
	10	132.12±7.07 ⁴⁾	10.20±0.97 ³⁾	69.08±0.75 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与模型组比较³⁾P<0.05,⁴⁾P<0.01(表3、表5同)

表3 不同浓度AAPS-4a对LPS诱导RAW264.7细胞炎症因子和NO水平的影响($\bar{x}\pm s, n=4$)

Table 3 Effect of AAPS-4a with different concentrations on levels of inflammatory factors and NO in LPS-induced RAW264.7 cells

($\bar{x}\pm s, n=4$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	TNF- α /ng·L ⁻¹	IFN- β /ng·L ⁻¹	NO/ μ mol·L ⁻¹
正常组		93.55±6.05	7.43±0.81	58.43±4.82
模型组		294.33±12.69 ²⁾	21.30±1.41 ²⁾	89.36±5.91 ²⁾
AAPS-4a组	1	269.86±19.49	19.93±1.32	79.70±4.54
	3	251.82±16.23	19.99±1.30	70.06±6.39
	10	191.35±17.72 ³⁾	16.50±1.16 ³⁾	58.03±2.45 ³⁾
	30	114.21±13.18 ⁴⁾	11.43±1.09 ⁴⁾	55.69±4.41 ⁴⁾

O-H键伸缩振动信号^[18]。2 934.55 cm⁻¹和1 416.32 cm⁻¹处分别为C-H键的对称拉伸振动和不对称拉伸振动信号^[19]。1 568.21 cm⁻¹处为C=O键的拉伸振动信号。此外,在916.2~199 cm⁻¹区间观察到吡喃糖环特征吸收带,其主峰位于1 043.91 cm⁻¹(C-O-C不对称伸缩振动),肩峰为1 052.04 cm⁻¹(C-O-H弯曲振动),双峰分裂模式与文献报道的 α -吡喃葡萄糖特征一致^[20-21]。见增强出版附加材料。

3.5 AAPS-4a的HPLC分析 经HPLC法测定,

AAPS-4a 由 Man、Glc 和 Gal 组成，摩尔比为 1.3:23.9:1.0, 见增强出版附加材料。

3.6 AAPS-4a 的 GC-MS 分析 GC-MS 分析显示, AAPS-4a 具有 5 个特征峰, 各差向异构体通过保留时间差异 ($\Delta RR T \geq 0.2$ min)。所有质谱数据经复杂碳水化合物研究中心 (CCRC) 标准数据库 ([https://](https://www.ccrcc.uga.edu/specdb/ms/)

www.ccrcc.uga.edu/specdb/ms/) 及内部保留时间-碎片离子对应表双重验证。结合 AAPS-4a 的单糖组成, 确定 5 种糖残基, 分别为 T-葡萄糖 (T-Glcp)、1, 2-半乳糖 (1, 2-Galp)、1, 3-半乳糖 (1, 3-Galp)、1, 4-甘露糖 (1, 4-Manp) 及 1, 6-葡萄糖 (1, 6-Glcp), 见表 4。

表 4 AAPS-4a 糖残基类型的 GC-MS 分析

Table 4 GC-MS analysis of sugar residue type of AAPS-4a

连接类型	t_R /min	摩尔比	占比/%	部分甲基化醛糖醇乙酸酯(PMAAs)	碎片离子
T-Glcp	23.365	3.9	5.9	1, 5-di-O-乙酰基-2, 3, 4, 6-四-O-甲基-D-葡萄糖醇	45, 118, 161, 162, 205
1, 2-Galp	28.695	1.2	1.7	1, 2, 5-tri-O-乙酰基-3, 4, 6-三-O-甲基-D-半乳糖醇	45, 161, 190, 234
1, 3-Galp	34.249	1.6	2.2	1, 3, 5-tri-O-乙酰基-2, 4, 6-三-O-甲基-D-半乳糖醇	45, 118, 161, 234, 277
1, 4-Manp	34.866	1.0	1.4	1, 4, 5-tri-O-乙酰基-2, 3, 6-三-O-甲基-D-甘露糖醇	45, 118, 162, 233
1, 6-Glcp	41.522	61.3	88.8	1, 5, 6-tri-O-乙酰基-2, 3, 4-三-O-甲基-D-葡萄糖醇	118, 162, 189, 233

3.7 AAPS-4a 的 1D NMR 分析 1H NMR 谱中, 4.30~5.50 ppm 为多糖异头质子 (H-1) 信号区域^[22]。AAPS-4a 的 1H NMR 谱中显示, δ 4.91 处有一强 H-1 信号, 以及 δ 4.61、5.10、5.26 处有 3 个弱 H-1 信号。其中 δ 4.61 处为 β 构型糖残基的 H-1 特征信号^[23]; δ 4.91 处为 α -Glcp 的 H-1 特征信号^[24], δ 5.26 处为 α -Manp 的 H-1 特征信号^[25]。 δ 5.10 处可能为 Rhap 或 Galp, 结合 HPLC 结果, 初步判断其为 α -Galp。 ^{13}C NMR 谱中, δ 95.0~110.0 为多糖的异头碳 (C-1) 信号区域^[26]。AAPS-4a 的 ^{13}C NMR 谱在 δ 97.67 处显示 1 个强 C-1 信号, 在 δ 95.68、99.39、104.12 处显示 3 个弱 C-1 信号。 δ 104.12 ppm 处为 β 构型糖残基的 C-1 特征信号, 这与 δ 4.61 处的 H-1 信号对应。 δ 99.39 处为 α -Manp 的 C-1 特征信号, δ 97.67 处为 α -Glcp 的 C-1 特征信号, 与 δ 4.91 处 C-1 对应。以上结果提示, AAPS-4a 结构中主要含有 4 种糖残基, 其中以 α -葡萄糖残基 (α -Glcp) 为主。具体谱图见增强出版附加材料。

3.8 AAPS-4a 的 2D NMR 分析 为明确 AAPS-4a 中糖残基的连接方式及构型, 对其进行了 2D NMR (HSQC、 1H - 1H COSY、HMBC 和 NOESY) 分析。HSQC 谱中, δ 4.91/97.67 归属为 α -Glcp 的 H-1/C-1 信号。根据 COSY 中的 δ 4.91/3.51、 δ 3.51/3.65、 δ 3.65/3.45、 δ 3.45/3.84 4 个相关信号, 确定了该残基的 H-2 (3.51)、H-3 (3.65)、H-4 (3.45) 和 H-5 (3.84)。结合 HSQC, 确定该残基的 C-2 (71.43)、C-3 (73.34)、C-4 (69.54) 和 C-5 (70.13)。HMBC 谱中 δ 4.91/65.47 信号提示该残基 H-1 (δ 4.91) 与 C-6 (δ 65.47) 存在三键远程相关^[27], 确定了该 α -Glcp 的 C-6 (65.47)。甲

基化分析 (1, 6-Glcp 占比 88.8%) 及 ^{13}C NMR 数据 (C-6 δ 65.47) 与文献报道的 1, 6- α -D-Glcp 特征信号完全吻合^[21]。此外, COSY 中 δ 3.51/3.65、 δ 3.65/3.37、 δ 3.37/3.91、 δ 3.77/3.91 4 个交叉信号得到另一种 Glcp 的 H-3 (3.65)、H-4 (3.37)、H-5 (3.91) 和 H-6 (3.77)。结合 HSQC 中 δ 3.65/71.38、 δ 3.37/69.48、 δ 3.91/70.28、 δ 3.71/60.47、 δ 3.77/60.47 的 5 个信号和 HMBC 中 δ 3.37/60.47 信号, 得到该 α -Glcp 的 C-1 (97.67)、C-2 (73.35)、C-3 (71.38)、C-4 (69.48)、C-5 (70.28) 和 C-6 (60.47), 最终确定该残基为 T- α -D-Glcp。具体谱图见增强出版附加材料。

δ 4.61/104.12 为 β -Galp 的 H-1/C-1 信号。COSY 中 δ 4.61/3.18、 δ 3.18/3.43 和 δ 3.43/3.64 3 个信号确定该 β -Galp 的 H-1 (4.61)、H-2 (3.18)、H-3 (3.43) 和 H-4 (3.64)。根据 HSQC 中 δ 3.18/74.04、 δ 3.43/75.88 和 δ 3.64/69.51 3 个信号, 确定了该残基的 C-2 (74.04)、C-3 (75.88) 和 C-4 (69.51)。该残基的 C-3 明显向低场移动, 且 HSQC 谱中其余 C-6 信号均低于 63.0 ppm, 因此确定该残基为 1, 3- β -D-Galp。此外, δ 5.26/99.39 为 α -Manp 的 H-1/C-1 特征信号。根据 COSY 中 δ 5.26/3.51、 δ 3.51/3.96 和 δ 3.96/3.76, 得到了该残基的 H-1 (5.26)、H-2 (3.51)、H-3 (3.96) 和 H-4 (3.76)。根据 HSQC 中 δ 3.51/73.03、 δ 3.96/69.99、 δ 3.76/80.56, 确定了该残基的 C-1 (99.39)、C-2 (73.03)、C-3 (69.99) 和 C-4 (80.56)。该残基的 C-4 明显向低场移动, 因此确定该残基为 1, 4- α -D-Manp。结合 HPLC 和 1D NMR 结果, 将 δ 5.10/95.68 归属为 α -D-Galp 的 H-1/C-1 信号。COSY 中 δ 5.10/3.37、 δ 3.37/3.93 和 δ 3.93/3.71 确定该 α -D-

Galp 的 H-1 (5.10)、H-2 (3.37)、H-3 (3.93) 和 H-4 (3.71)。HSQC 中 δ 3.37/79.69、 δ 3.93/69.71、 δ 3.71/69.79, 确定该 α -D-Galp 的 C-2 (79.69), C-3 (69.71) 和 C-4 (69.79)。其 C-2 化学位移明显向低场移动, 因此确定该残基为 1,2- α -D-Galp。最终确定 AAPS-4a 中 5 种糖残基分别为 1,6- α -D-Glcp、T- α -D-Glcp、1,3- β -D-Galp、1,4- α -D-Manp 和 1,2- α -D-Galp。具体谱图见增强出版附加材料。

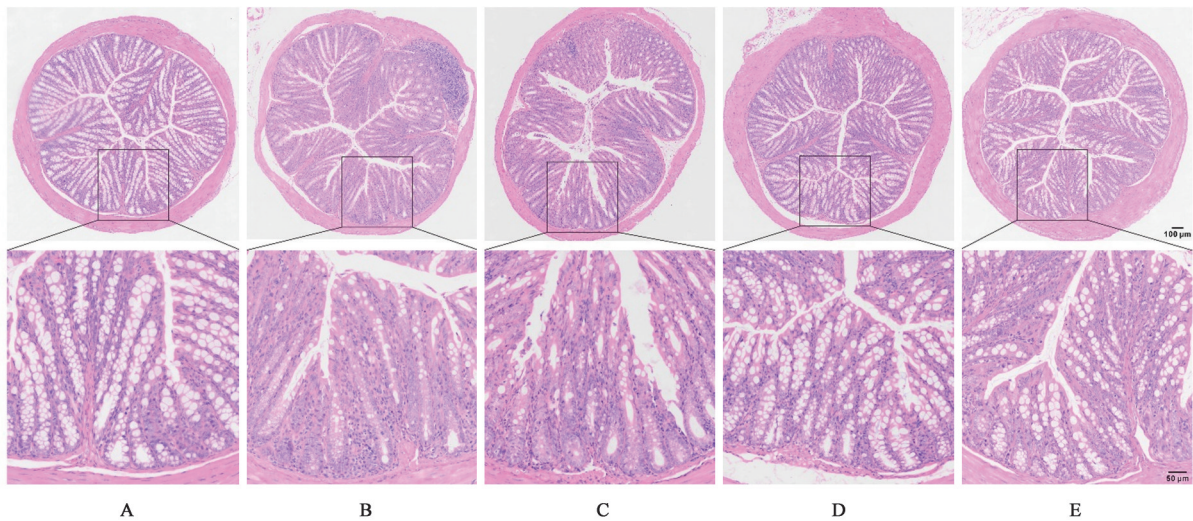
3.9 AAPS-4a 的体内抗 UC 作用评价 与正常组比较, 模型组小鼠体质量显著减轻, DAI 评分和脾脏指数显著升高, 结肠长度显著缩短, 血清中 TNF- α 和 IL-6 水平均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, AAPS-4a 高剂量组体质量显著升高 ($P < 0.01$), DAI 评

分和脾脏指数明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), 结肠长度明显延长, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 血清 TNF- α 、IL-6 水平显著下降, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。见增强出版附加材料及表 5。结肠 HE 染色结果显示, 正常组肠黏膜结构完整连续, 隐窝形态正常, 未见炎性细胞浸润。与正常组比较, 模型组肠上皮细胞大面积剥脱, 固有层大量中性粒细胞及淋巴细胞浸润, 隐窝结构严重破坏, 部分区域隐窝完全消失。与模型组比较, AAPS-4a 低剂量组肠上皮部分修复, 炎性细胞浸润减轻, AAPS-4a 高剂量组肠上皮连续性基本恢复, 炎性细胞浸润显著减少, 隐窝结构呈完整形态。AAPS-4a 对 UC 结肠损伤改善程度呈剂量依赖性, 高剂量组效果与 SASP 组相近。见图 1。

表 5 AAPS-4a 对 UC 小鼠各项药效指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 5 Effect of AAPS-4a on pharmacodynamic indexes of UC mice ($\bar{x} \pm s, n=8$)

分组	剂量/mg·kg ⁻¹	DAI 评分/分	结肠长度/cm	脾脏指数/mg·g ⁻¹	TNF- α /ng·L ⁻¹	IL-6/ng·L ⁻¹
正常组		0.24±0.19	7.85±0.32	0.45±0.01	56.14±11.17	8.14±1.90
模型组		3.45±0.31 ²⁾	5.45±0.43 ²⁾	0.57±0.01 ²⁾	216.69±25.50 ²⁾	57.17±6.78 ²⁾
AAPS-4a 低剂量组	50	2.76±0.42	5.99±0.60	0.49±0.05	193.78±14.35	53.36±4.28
AAPS-4a 高剂量组	100	1.50±0.27 ⁴⁾	6.78±0.36 ³⁾	0.46±0.02 ³⁾	155.50±15.44 ⁴⁾	41.16±2.13 ⁴⁾
SASP	75	1.11±0.36 ⁴⁾	7.33±0.50 ⁴⁾	0.41±0.03 ⁴⁾	163.36±14.28 ⁴⁾	39.03±2.90 ³⁾



注: A. 正常组; B. 模型组; C. AAPS-4a 低剂量组; D. AAPS-4a 高剂量组; E. SASP 组

图 1 AAPS-4a 对 DSS 诱导 UC 小鼠结肠组织病理学的影响 (HE, $\times 40, \times 100$)

Fig. 1 Effect of AAPS-4a on histopathology of colon tissue in DSS-induced UC mice (HE, $\times 40, \times 100$)

4 讨论

多糖是芪归药对主要活性成分之一, 具有促进造血、调节免疫、抗肿瘤等药理作用^[28]。目前, 国内外学者对黄芪、当归单味药中多糖成分进行了广泛研究, 但对芪归药对多糖的相关研究报道甚少^[29-30]。本研究从芪归药对中分离获得具有显著抗 UC 作用

的中性均一多糖 AAPS-4a, 并对其一级结构进行了系统解析。AAPS-4a 可剂量依赖性抑制 LPS 诱导 RAW264.7 细胞中 TNF- α 、IFN- β 和 NO 的过度分泌, 并显著降低 DSS 诱导 UC 模型小鼠的 DAI 评分、脾脏指数及炎症因子水平 (TNF- α 、IL-6), 缓解结肠缩短, 修复结肠组织病理损伤。结构解析显示,

AAPS-4a 由 1, 6- α -D-Glcp、T-Glcp、1, 3- β -D-Galp、1, 4- α -D-Manp 和 1, 2- α -D-Galp 组成, 以此结构特征在聚糖结构数据库 GlyTouCan 进行查询, 发现其糖残基类型与比例在 GlyTouCan 数据库中未见匹配, 提示其为一种具有新型结构特征的活性多糖。AAP-2A 是 2016 年报道的一种芪归均一多糖, 其相对分子质量为 6.7×10^5 Da, 主要由 Rha, GalA, Ara 和 Glc 组成, 其表现为 α -葡聚糖主导的抗氧化活性^[13]。而 AAPS-4a 中 1, 3- β -D-Galp 的引入可能与其免疫调节功能密切相关。已有研究表明, β -糖苷键的构型可通过 TLR4/NF- κ B 通路调控巨噬细胞极化, 从而抑制炎症因子释放^[31-32]。此外, AAPS-4a 的线性杂多糖结构可能源于复方煎煮过程中黄芪与当归多糖的糖链重构, 这为“芪归配伍增效”假说提供了分子层面的直接证据, 弥补了复方多糖配伍机制研究的空白。

尽管取得上述进展, 本研究仍存在一定的不足和局限性。首先, 当前二维 NMR (包括 HMBC 谱) 提供的信息尚不足以完整解析 AAPS-4a 的糖残基连接顺序, 因此其精确的构象和骨架结构仍需进一步深入研究。其次, 本研究中关于其抗 UC 作用的体内评价数据相对有限, 还未能开展更系统的剂量-反应关系和机制研究。因此, 尚无法对芪归配伍多糖的抗炎活性进行全面系统的评估, 也难以明确其抗 UC 活性的结构-效应关系。未来研究可在此基础上进一步展开。一方面, 比较芪归复方多糖与黄芪、当归单味药多糖在抗炎活性方面的差异, 明确复方多糖成分间的协同或增效机制; 另一方面, 可结合糖谱学、分子模拟等手段, 深入探讨其空间构象与免疫调节、抗 UC 活性之间的关系。通过更多体内外实验系统评价 AAPS-4a 在不同剂量和不同模型下的生物活性, 将有助于阐明其作用机制并指导临床应用。

综上, AAPS-4a 的发现不仅为芪归药对抗 UC 作用提供了关键物质基础, 也为中药复方多糖的“结构-功能-配伍”一体化研究奠定了理论依据。其新型杂多糖结构特征提示, 复方煎煮可能通过糖链重构产生独特药理活性, 这为中药配伍理论的现代化阐释开辟了新视角。

[利益冲突] 唐于平为本刊编委, 未参与本文的审校与编辑; 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] LE BERRE C, HONAP S, PEYRIN-BIROULET L. Ulcerative colitis[J]. Lancet, 2023, 402(10401): 571-584.
- [2] WANG Y, LI S, GONG J, CAO L, et al. Perceived stigma and self-efficacy of patients with inflammatory bowel disease-related

stoma in China: A cross-sectional study[J]. Front Med, 2022, 9: 813367.

- [3] 王木源, 韩啸, 毛堂友, 等. 《溃疡性结肠炎中医诊疗指南(2023)》解读[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2024, 32(12): 1087-1092.
- WANG M Y, HAN X, MAO T Y, et al. Interpretation of the guide lines for diagnosis and treatment of ulcerative colitis in traditional chinese medicine (2023)[J]. Chin J Integr Tradit West Med Dig, 2024, 32(12): 1087-1092.
- [4] 杨红娟, 李彦龙, 田旭东, 等. 中医药治疗溃疡性结肠炎的信号通路研究进展[J]. 中药新药与临床药理, 2025, 36(2): 299-306.
- YANG H J, LI Y L, TIAN X D, et al. Research progress on the signaling pathway of traditional chinese medicine in the treatment of ulcerative colitis [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2025, 36(2): 299-306.
- [5] 胡静, 李科, 李爱平, 等. 当归补血汤物质基础研究进展[J]. 中草药, 2020, 51(21): 5658-5663.
- HU J, LI K, LI A P, et al. Research progress on material basis of Danggui Buxue decoction[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(21): 5658-5663.
- [6] 靳如娜, 齐晓甜, 孙蓉, 等. 经典名方当归补血汤的药效物质基础和质量控制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(16): 220-228.
- JIN R N, QI X T, SUN R, et al. Research progress on pharmacodynamic material basis and quality control of Danggui Buxue Tang [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2019, 25(16): 220-228.
- [7] LIU W J, MA S B, LI J X, et al. Explore the key targets and mechanism of Danggui Buxue decoction against ulcerative colitis: Network pharmacology and experimental validation[J]. J Ethnopharmacol, 2025, 344: 119580.
- [8] JIN M L, ZHAO K, HUANG Q S, et al. Structural features and biological activities of the polysaccharides from Astragalus membranaceus[J]. Int J Biol Macromol, 2014, 64: 257-266.
- [9] NAI J, ZHANG C, SHAO H, et al. Extraction, structure, pharmacological activities and drug carrier applications of *Angelica sinensis* polysaccharide[J]. Int J Biol Macromol, 2021, 183: 2337-2353.
- [10] 刘文娟. 当归多糖的结构及其抑制 LPS 诱导巨噬细胞激活的作用机制研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2022.
- LIU W J. The study on the structures of polysaccharides from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels and their inhibiting mechanism on LPS-induced inflammatory response [D]. Xianyang: Northwest A&F University, 2022.
- [11] 李秀. 当归多糖与黄芪多糖配伍对腹腔注射环磷酰胺小鼠骨髓造血干细胞影响的研究[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2017.
- LI X. Study on the effects of the combination of *angelica sinensis* polysaccharide and *astragalus* polysaccharide on bone marrow hematopoietic stem cells in mice treated with intraperitoneal cyclophosphamide injection [D]. Shenyang: Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2017.
- [12] 周钰龙, 黄晓君, 聂少平. 两种方式制备的四君子汤多糖对免疫低下小鼠的免疫调节作用探究[C]//中国食品科学技术学会.

- 中国食品科学技术学会第二十一届中国食品科学大会论文集. 南昌:南昌大学食品科学与资源挖掘全国重点实验室, 2024:313-314.
- ZHOU Y L, HUANG X J, NIE S P. Study on the immunomodulatory effects of sijnzi decoction polysaccharides prepared by two different methods in immunocompromised mice [C]//Chinese Society of Food Science and Technology. Abstracts of papers of the 21st annual meeting of Chinese Society of Food Science and Technology. Nanchang: Nanchang University National Key Laboratory of Food Science and Resource Mining, 2024:313-314.
- [13] PU X Y, MA X L, LIU L, et al. Structural characterization and antioxidant activity *in vitro* of polysaccharides from angelica and astragalus[J]. Carbohydr Polym, 2016, 137: 154-164.
- [14] 刘文娟, 马善波, 鹿纹菲, 等. 芪归多糖的分离纯化及体外抑制肿瘤细胞增殖研究[J]. 天然产物研究与开发, 2023, 35(10): 1651-1658.
- LIU W J, MA S B, LU W F, et al. Isolation, purification and *in vitro* suppression of tumor cell proliferation by Qi-Gui polysaccharides[J]. Nat Prod Res Dev, 2023, 35(10): 1651-1658.
- [15] ZENG F K, CHEN W B, HE P, et al. Structural characterization of polysaccharides with potential antioxidant and immunomodulatory activities from Chinese water chestnut peels [J]. Carbohydr Polym, 2020, 246: 116551.
- [16] AHMAD I, AKHTER S, ANWAR M, et al. Supercritical anti-solvent technique assisted synthesis of thymoquinone liposomes for radioprotection: Formulation optimization, *in-vitro* and *in-vivo* studies[J]. Int J Pharm, 2017, 523(1): 398-409.
- [17] SIVIGNON A, YU S Y, BALLETT N, et al. Heteropolysaccharides from *S. cerevisiae* show anti-adhesive properties against *E. coli* associated with Crohn's disease[J]. Carbohydr Polym, 2021, 271: 118415.
- [18] TAHMASBI B, NIKOORAZM M, MORADI P, et al. A Schiff base complex of lanthanum on modified MCM-41 as a reusable nanocatalyst in the homoselective synthesis of 5-substituted ¹H-tetrazoles[J]. RSC Adv, 2022, 12(53): 34303-34317.
- [19] LIU L, JING Y, GUO A L, et al. Biosynthesis of platinum nanoparticles with cordyceps flower extract: Characterization, antioxidant activity and antibacterial activity[J]. Nanomaterials (Basel), 2022, 12(11): 1904.
- [20] LIU W J, LI Z Z, FENG C Y, et al. The structures of two polysaccharides from *Angelica sinensis* and their effects on hepatic insulin resistance through blocking RAGE[J]. Carbohydr Polym, 2022, 280: 119001.
- [21] JAHANBIN K, ABBASIAN A, AHANG M. Isolation, purification and structural characterization of a new water-soluble polysaccharide from *Eremurus stenophyllus* (boiss. & buhse) baker roots[J]. Carbohydr Polym, 2017, 178: 386-393.
- [22] KING-MORRIS M J, SERIANNI S A. Carbon-13 NMR studies of [1-13C]aldoses: Empirical rules correlating pyranose ring configuration and conformation with carbon-13 chemical shifts and carbon-13/carbon-13 spin couplings[J]. J Am Chem Soc, 1987, 109(12): 3501-3508.
- [23] SHIBATA N, OKAWA Y. Chemical structure of beta-galactofuranose-containing polysaccharide and O-linked oligosaccharides obtained from the cell wall of pathogenic dematiaceous fungus *Fonsecaea pedrosoi* [J]. Glycobiology, 2011, 21(1): 69-81.
- [24] LU L, LIU Q, JIN L, et al. Enzymatic synthesis of rhamnose containing chemicals by reverse hydrolysis[J]. PLoS One, 2015, 10(10): e0140531.
- [25] RU Y, CHEN X, WANG J, et al. Polysaccharides from *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg: Extraction optimization, structural characterizations, antioxidant and antihyperlipidemic activities in hyperlipidemic mice[J]. Int J Biol Macromol, 2019, 125: 1033-1041.
- [26] BOCK K, PEDERSEN C. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of monosaccharides [J]. Adv Carbohydr Chem Biochem, 1983, 41: 27-66.
- [27] SHOKOOHINIA Y, RASHIDI M, HOSSEINZADEH L, et al. Quercetin-3-O-β-D-glucopyranoside, a dietary flavonoid, protects PC12 cells from H₂O₂-induced cytotoxicity through inhibition of reactive oxygen species[J]. Food Chem, 2015, 167: 162-167.
- [28] WANG P, ZHOU W, LIU J, et al. Modulome-Fangjiome Association Study (MoFAS) reveals differential target distribution among four similar fangjis (formulas) [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 279: 113822.
- [29] WANG J, GE B, LI Z, et al. Structural analysis and immunoregulation activity comparison of five polysaccharides from *Angelica sinensis* [J]. Carbohydr Polym, 2016, 140: 6-12.
- [30] YANG X, JI H, FENG Y, et al. Novel compound polysaccharides from Chinese herbal medicines: Purification, characterization, and antioxidant activities[J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 9973419.
- [31] ZHANG T, LIU W J, FU C Y, et al. Structures and anti-melanoma activities of two polysaccharides from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels [J]. Int J Biol Macromol, 2021, 183: 972-981.
- [32] WANG M, GAO Y, XU D, et al. A polysaccharide from cultured mycelium of *Hericiium erinaceus* and its anti-chronic atrophic gastritis activity[J]. Int J Biol Macromol, 2015, 81: 656-661.

[责任编辑 李嘉麟]