

蒲公英总多糖的提取、纯化及其体外抗炎活性分析

肖潮勇, 张宇*, 王宇亮

(佳木斯大学药学院, 黑龙江佳木斯 154007)

[摘要] **目的:**研究蒲公英总多糖组分及其体外抗炎活性作用,筛选得到蒲公英总多糖的抗炎活性成分。**方法:**采用水提醇沉法提取得到蒲公英总多糖,通过二乙氨基乙基纤维素 52(DEAE-52)柱层析进行纯化,得到蒲公英总多糖的3个洗脱部位(水,0.1 mol·L⁻¹氯化钠和0.2 mol·L⁻¹氯化钠洗脱部位分别记为TMP-0, TMP-1, TMP-2)。在体外以脂多糖诱导的RAW264.7细胞模型对蒲公英总多糖的体外抗炎活性进行研究。**结果:**蒲公英总多糖能够降低RAW264.7细胞中炎症因子(环氧合酶-2,肿瘤坏死因子- α ,白细胞介素-6和白细胞介素-1 β)mRNA的表达,且呈一定的剂量依赖性。TMP-0和TMP-1能够抑制上述炎症因子mRNA的表达,具有较好的体外抗炎活性,而TMP-2在中、低剂量下抗炎作用不明显。**结论:**通过体外细胞模型筛选,发现蒲公英总多糖具有较强的抗炎活性,其活性部位主要为TMP-0和TMP-1,为获得具有抗炎活性的均一多糖类成分提供参考。

[关键词] 蒲公英; 总多糖; 二乙氨基乙基; 抗炎活性; RAW264.7细胞; 洗脱部位

[中图分类号] R283.6;R284.2;R284.1;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)11-0025-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016110025

Extraction and Purification of Total Polysaccharides in Taraxaci Herba and Its Anti-inflammatory Activity

XIAO Chao-yong, ZHANG Yu*, WANG Yu-liang

(College of Pharmacy, Jiamusi University, Jiamusi 154007, China)

[Abstract] **Objective:** To study on total polysaccharides in Taraxaci Herba and its *in vitro* anti-inflammatory activity for screening active ingredient of anti-inflammatory. **Method:** Water extract-alcohol precipitation method was adopted to gain total polysaccharides in Taraxaci Herba (TMP), and then it was purified by DEAE cellulose column to get three parts of TMP (TMP-0, TMP-1, TMP-2). Anti-inflammatory activity of TMP on RAW264.7 cells induced by LPS was investigated. **Result:** TMP can significantly reduce the mRNA expression of inflammatory factors [cyclooxygenase-2 (COX-2), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-1 β (IL-1 β)] in RAW264.7 cells with a dose-dependent manner. The two fractions, TMP-0 and TMP-1, can significantly reduce the mRNA of these above inflammatory factors, they showed a good *in vitro* anti-inflammatory activity, while the anti-inflammatory effect of TMP-2 at low and middle doses was not obvious. **Conclusion:** TMP has a strong anti-inflammatory activity, and its main active fractions are TMP-0 and TMP-1.

[Key words] Taraxaci Herba; total polysaccharides; DEAE; anti-inflammatory; RAW264.7 cell; elution fraction

蒲公英别名蒲公英、尿床草、地丁、婆婆丁等,是药食两用的天然绿色植物^[1],功效清热解毒、利尿

通淋和消肿散结。现代药理研究表明蒲公英具有抗病原微生物、抗炎、抗肿瘤、抗氧化等药理活性^[2-3],

[收稿日期] 20150825(016)

[基金项目] 佳木斯大学科技创新团队项目(CXTD-2013-05)

[第一作者] 肖潮勇,在读硕士,从事天然药物有效成分提取研究,E-mail:huanggh2010@163.com

[通讯作者] *张宇,教授,硕士生导师,从事天然药物有效成分的分离及结构研究,Tel:13845475665,E-mail:zhangyu_1964@163.com

其主要有效成分为多糖类、木质素类、有机酸类、黄酮类和甾醇类等^[4-5]。总多糖是蒲公英中非常重要的一类活性成分,目前蒲公英总多糖的提取方法有热水浸提法^[6]、超声波提取法^[7]、微波提取法^[8]等,这类成分具有广泛的药理作用,如抗肿瘤、抗突变、抗氧化、抗疲劳和提高免疫等^[9-11]。关于植物多糖的抗炎活性研究已有文献报道,而有关蒲公英总多糖的抗炎活性却未见报道。本实验拟通过以内毒素或细菌脂多糖诱导的 RAW264.7 炎症模型来考察蒲公英总多糖的抗炎活性,利用活性进行导向分离,从蒲公英中提取得到总多糖并进一步分离纯化,对总多糖洗脱部位进行体外抗炎活性筛选,为该有效部分的合理开发和利用提供参考。

1 材料

LXJ-II 型低速多管离心机(上海安亭科学仪器厂),UV-5500PC 型紫外-可见分光光度计(上海第三分析仪器厂),FA1004 型电子分析天平(上海精天电子仪器厂),BSZ-100 型自动部分收集器(上海沪西分析仪器厂有限公司)。

蒲公英采于黑龙江省佳木斯市,经第二军医大学秦路平教授鉴定为菊科植物 *Taraxacum mongolicum* 的干燥地上部分;葡萄糖对照品[生工生物工程(上海)股份有限公司,批号 3342C086],二乙氨基乙基纤维素 52(DEAE-52,英国 Whatman 公司),DMEM 高糖培养基和胎牛血清[赛默尔飞世尔生物化学制品(北京)有限公司],脂多糖(LPS,美国 Sigma 公司),小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 细胞和相关基因引物均从中国科学院上海细胞库获得,试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 蒲公英总多糖的提取^[6] 称取蒲公英样品 1 kg,粉碎,加 12 倍量水加热回流提取 2 次,每次 3 h,合并滤液,浓缩至 1 L,按三氯乙酸法去蛋白,用终体积分数 80% 的乙醇沉淀 2 次,取沉淀部位干燥,得蒲公英总多糖(TMP)210 g,按照苯酚-硫酸法^[2]测得其总多糖质量分数 31.9%。

2.2 总多糖的含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取适量葡萄糖对照品置于量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,充分混匀,得 9.58 g·L⁻¹ 葡萄糖对照品溶液。

2.2.2 最大吸收波长的确定 取适量葡萄糖对照品溶液,加入 6% 苯酚溶液 1.0 mL,摇匀后迅速垂直滴加浓硫酸 5.0 mL,充分混匀,60 °C 水浴加热显色 15 min,冷却至室温,以水作空白对照,于 200 ~ 600

nm 扫描,结果显示对照品溶液在 490 nm 处有最大吸收。

2.2.3 标准曲线的制备 分别精密移取葡萄糖对照品溶液适量,加水补足至 2.0 mL,以 2.0 mL 水作空白对照,分别精密加入 6% 苯酚 1.0 mL,摇匀后立即加入浓硫酸 5.0 mL,摇匀,70 °C 水浴中加热 20 min,置于冷水中冷却 10 min,在 1 cm 石英吸收池中于 490 nm 处检测吸光度 A。以 A 为纵坐标,葡萄糖质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y = 15.309X - 0.082$ ($r = 0.998$),线性范围 9.58 ~ 57.48 mg·L⁻¹。

2.2.4 精密度试验 取同一 TMP 溶液 6 份,按 2.2.3 项下方法进行样品分析,结果 A 的 RSD 2.2%,表明该方法精密度良好。

2.2.5 稳定性试验 精密移取样品溶液 1.0 mL,按 2.2.3 项下方法处理,分别于制备后 30,45,60,75,90,105,120 min 测定 A,结果 RSD 0.2%,表明同一样品溶液在 2 h 内 A 基本稳定。

2.2.6 重复性试验 取同批次蒲公英药材 6 份,每份 10.0 g,按 2.1 项下条件提取,合并滤液,浓缩至 100 mL,精密移取 2.0 mL 至 100 mL 量瓶中,加水稀释至刻度。摇匀,精密移取 1.0 mL,按 2.2.3 项下方法处理,计算 A 的 RSD 0.5%。

2.2.7 加样回收率试验 精密移取 21.74 mg·L⁻¹ TMP 溶液,在规定的葡萄糖标准曲线范围内,分别 80%,100%,120% 按精密加入已知含量的不同质量浓度的葡萄糖对照品溶液,按 2.2.3 项下方法处理,计算平均回收率 99.46%,RSD 2.6%。

2.3 蒲公英总多糖的分离 取 TMP 2.0 g,加水溶解,经 DEAE 柱层析,分别用水,0.1 mol·L⁻¹ 氯化钠和 0.2 mol·L⁻¹ 氯化钠洗脱,流速 10 mL·h⁻¹,分部收集洗脱液,以苯酚-硫酸法检测总多糖含量,共分成 3 个部位,0.1 mol·L⁻¹ 氯化钠和 0.2 mol·L⁻¹ 氯化钠洗脱部位经透析膜处理后去除其 NaCl,分别记为 TMP-0,TMP-1,TMP-2。

2.4 细胞培养与分组 细胞放入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,放置在 37 °C,5% CO₂ 的培养箱中培养,实验分为正常组,模型组(10 mg·L⁻¹ LPS),2.3 项下 3 个总多糖洗脱部位(TMP-0,TMP-1,TMP-2)分别给予 10 mg·L⁻¹ LPS 刺激,每个洗脱部位分成 3 个不同剂量组(25,50,100 mg·L⁻¹)。

2.5 体外抗炎活性考察 药物干预巨噬细胞 3 h 后,用 Trizol 收集细胞,提取总 RNA,用逆转录酶 M-MLV 进行逆转录合成 cDNA,按照 cDNA 合成试剂盒逆转录,将 mRNA 逆转录为 cDNA,以 cDNA 为

模板进行环氧合酶-2 (COX-2), 肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 白细胞介素-6 (IL-6) 和 IL-1 β mRNA 的基因编码片段。引物基因引物序列为 β -肌动蛋白 (β -actin) 基因引物上游序列 5-CCCTAAGGCCAACCGTGAAAAGATG-3, 下游序列 5-GTCCCGGCCAGCCAGGTCCAG-3; TNF- α 基因引物上游序列 5-GGGGCCACCACGCTCTTCTGTCTA-3, 下游序列 5-CCTCCGCTTGGTGGTTGCTACG-3; IL-6 基因引物上游序列 5-AGCCACTGCCTTCCCTACTT-3, 下游序列 5-GCCATTGCACAACCTCTTTTCTC-3; IL-1 β 基因引物上游序列 5-CCTCTGTGACTCGTGGGATGATG-3, 下游序列 5-CAGGGATTTTGTCTGCTTGTCT-3; COX-2 基因引物上游序列 5-CTGGTCCCGGTCTGATGATGTA-3, 下游序列 5-AGCAGGTGTGGGTCCAACTTGAG-3; IL-6 基因引物上游序列 5-AGCCA CTGCCTTCCCTACTT-3, 下游序列 5-GCCATTGCACA ACTCTTTTCTC-3。

采用实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time-PCR) 检测细胞炎症因子 IL-6, TNF- α , COX-2 和 IL-1 β mRNA 的相对表达量。按照扩增试剂盒的程序 95 $^{\circ}$ C 变性 10 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 共进行 40 个循环。以 β -actin 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算相对基因的表达量。使用 GraphPad Prism 5 软件进行炎症因子释放数据的分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 DEAE 对蒲公英多糖洗脱的影响 采用离子强度逐渐增强的阶段梯度洗脱方式, 利用苯酚-浓硫酸法追踪检测多糖分, 至无糖时更换下一梯度溶液洗脱。蛋白质的去除方法有多种, 其中 Sevag 法中使用了正丁醇和三氯甲烷, 毒性较大, 每次除蛋白效率较低, 要重复除蛋白 7 次左右, 消耗较大。三氯乙酸法 (TCA) 法操作方便简单、除蛋白效果显著。三氯乙酸在总多糖溶液中的质量分数 15%, 搅拌 15 min 后离心 (5 000 $r \cdot \min^{-1}$, 20 min, 下同) 除去沉淀, 加入氢氧化钠中和, 离心以除去不溶物, 透析除去小分子盐。结果 TMP-0, TMP-1, TMP-2 中总多糖质量分数分别为 52.63%, 27.96%, 21.62%。

3.2 蒲公英总多糖及其各洗脱部位对 RAW264.7 细胞模型的影响 为了考察 4 组多糖的安全剂量, 每组设计了 4 个不同质量浓度 (0, 50, 100, 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 用细胞计数台式试剂盒 (CCK-8) 法检测细胞经蒲公英总多糖及其各洗脱部位处理后活力。

结果显示当样品 TMP, TMP-0, TMP-1, TMP-2 的质量浓度为 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 与正常组比较, 细胞活力有所下降但并无统计学差异; 当 TMP, TMP-0, TMP-1, TMP-2 的质量浓度均为 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 与正常组比较, 细胞活力显著减低 ($P < 0.05$), 见表 1, 因此蒲公英多糖 TMP, TMP-0, TMP-1, TMP-2 的安全剂量要低于 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

表 1 不同质量浓度的蒲公英总多糖及其各洗脱部位对 RAW264.7 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effects of total polysaccharides in Taraxaci Herba on normal RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$) %

质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	TMP	TMP-0	TMP-1	TMP-2
0	100.0 \pm 0.2	100.0 \pm 0.2	100.0 \pm 0.2	100.0 \pm 0.2
50	95.2 \pm 9.5	94.3 \pm 8.7	92.1 \pm 3.2	93.7 \pm 9.7
100	90.3 \pm 5.1	89.1 \pm 10.1	91.2 \pm 9.4	91.7 \pm 11.6
200	82.7 \pm 8.5 ¹⁾	81.2 \pm 12.1 ¹⁾	80.7 \pm 13.1 ¹⁾	81.9 \pm 12.8 ¹⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

3.3 Real-time PCR 检测细胞 COX-2, TNF- α , IL-6 和 IL-1 β mRNA 的表达 与正常组比较, 经过 LPS 处理后, 炎症因子 NO, TNF- α 和 IL-1 β mRNA 的表达量明显提高 ($P < 0.01$); 和 LPS 组比较, TMP 能抑制炎症因子 TNF- α , COX-2, IL-6 和 IL-1 β mRNA 的表达, 且呈一定的剂量依赖性; 在经过 DEAE 纯化后, TMP-0 和 TMP-1 均能够抑制炎症因子 TNF- α , COX-2, IL-6 和 IL-1 β mRNA 的表达, 且二者在相同剂量下作用要优于 TMP; 但对于 TMP-2 在高剂量时能够显著抑制 COX-2 和 IL-1 β mRNA 的表达, 在中、低剂量时, 其抗炎效果不明显, 见表 2。

4 讨论

多糖是普遍存在于生物体内且具有重要生物活性的一类生物大分子, 是很多内源性生物活性分子的组成成分^[12]。近年来, 大量具有生物活性的多糖类成分从不同生物体内提取出来, 如增强机体免疫力活性、抗菌活性、抗病毒活性、抗寄生虫活性、抗肿瘤及抗衰老等^[13-18]。研究发现糖类在蒲公英植物中含量很高^[19], 在该植物中已发现的中性糖有葡萄糖、蔗糖、菊糖和果糖等, 占该植物干重 30% ~ 50%^[20]。采用 DEAE-纤维素柱层析法用不同的洗脱溶液可将粗多糖分为中性多糖和酸性多糖。研究结果发现蒲公英总多糖及其各洗脱部位均能够在一定程度上抑制炎症因子 TNF- α , COX-2, IL-6 和 IL-1 β mRNA 的表达, 具有较好的抗炎活性。其中 TMP-0 和 TMP-1 活性最好, 提示蒲公英总多糖的抗炎部位可能集中于这 2 个部位, 为下一步从这 2 个活性部

表 2 蒲公英总多糖及其各洗脱部位对 TNF- α , IL-6, COX-2, IL-1 β mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effects of total polysaccharides in Taraxaci Herba on levels of mRNA production of TNF- α , IL-6, COX-2 and IL-1 β ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	TNF- α / β -actin	IL-6/ β -actin	COX-2/ β -actin	IL-1 β / β -actin
正常	-	4.13 \pm 0.78	1.41 \pm 0.57	1.58 \pm 0.62	1.51 \pm 0.77
模型	-	61.32 \pm 5.73	37.66 \pm 5.12	68.19 \pm 3.89	48.15 \pm 6.18
TMP	25	58.27 \pm 4.17	32.69 \pm 3.81	63.14 \pm 1.87	42.76 \pm 2.78
	50	47.61 \pm 7.39 ¹⁾	21.86 \pm 4.39 ¹⁾	58.41 \pm 3.12	38.61 \pm 4.17
	100	31.28 \pm 8.83 ²⁾	12.74 \pm 5.93 ²⁾	47.93 \pm 10.13 ¹⁾	28.57 \pm 8.12 ¹⁾
TMP-0	25	47.93 \pm 6.13 ¹⁾	21.54 \pm 4.14 ¹⁾	48.13 \pm 4.15 ¹⁾	39.41 \pm 3.17
	50	37.62 \pm 3.88 ²⁾	15.17 \pm 3.12 ²⁾	37.16 \pm 5.16 ²⁾	25.89 \pm 6.01 ¹⁾
	100	21.89 \pm 7.14 ²⁾	8.32 \pm 2.78 ²⁾	22.17 \pm 4.76 ²⁾	23.16 \pm 4.18 ¹⁾
TMP-1	25	48.66 \pm 7.11 ¹⁾	23.16 \pm 3.84 ¹⁾	49.13 \pm 3.73 ¹⁾	27.73 \pm 5.28 ¹⁾
	50	36.84 \pm 5.83 ²⁾	14.38 \pm 4.16 ²⁾	35.36 \pm 5.12 ²⁾	18.38 \pm 3.21 ²⁾
	100	31.69 \pm 6.15 ²⁾	12.32 \pm 1.69 ²⁾	31.74 \pm 3.87 ²⁾	15.17 \pm 2.82 ²⁾
TMP-2	25	62.78 \pm 9.79	38.17 \pm 3.79	62.43 \pm 6.56	45.97 \pm 3.87
	50	58.47 \pm 7.19	31.79 \pm 4.99	52.37 \pm 5.99	35.17 \pm 6.08
	100	53.86 \pm 6.47	28.73 \pm 2.97	47.62 \pm 6.11 ¹⁾	23.51 \pm 3.19 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

位中分离纯化得到具有抗炎活性的均一多糖类成分提供相关的理论基础。

[参考文献]

[1] 杨晓杰,付学鹏,刘泽东. 蒲公英多糖抗疲劳作用研究[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(11): 26-86.

[2] Shi S Y, Zhang Y P, Huang K L, et al. Application of preparative high-speed counter-current chromatography for separation and purification of lignans from *Taraxacum mongolicum*[J]. Food Chem, 2008, 108(1): 402-405.

[3] 姚巍,林文艳,周长,等. 蒙古蒲公英化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(10): 923-926.

[4] 吴小丽,蔡云清,赵岩,等. 蒲公英提取物对小鼠免疫功能的调节作用[J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 2005, 25(3): 163-165.

[5] 付学鹏,杨晓杰,李本丽,等. 蒲公英不同器官多糖含量测定及抗氧化性研究[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(3): 39-42.

[6] 赵京霞,郑玉玺. 蒲公英多糖提取工艺的研究[J]. 广州城市职业学院学报, 2011, 152(2): 60-62.

[7] 宋晓勇,刘强,杨磊,等. 蒲公英多糖提取工艺及其抗菌活性研究[J]. 中国药房, 2010, 21(47): 4453-4455.

[8] 郝艳霜,耿梅英,冯志华,等. 蒲公英多糖微波提取工艺试验[J]. 中国兽医杂志, 2009, 45(9): 62-63.

[9] Shi S Y, Zhao Y, Zhou H H, et al. Identification of antioxidants from *Taraxacum mongolicum* by high-performance liquid chromatography-diode array detection radical-scavenging detection-electrospray ionization mass spectrometry and nuclear magnetic resonance experiments[J]. J Chromatogr A, 2008, 1209(1/2): 145-152.

[10] 陈福星,陈文英,郝艳霜. 蒲公英多糖对小鼠免疫器官的影响[J]. 动物医学进展, 2008, 29(4): 10-12.

[11] 杨晓杰,付学鹏,刘泽东. 蒲公英多糖抗疲劳作用研究[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(11): 1686-1687.

[12] 黄芳,蒙义文. 活性多糖的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 1999(11): 90-98.

[13] 马河,程艳琳,张金杰,等. 白花蛇舌草总多糖的分离纯化、结构鉴定及初步免疫活性分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(22): 37-40.

[14] Chen H L, Li D F, Chang B Y, et al. Effects of Chinese herbal polysaccharides on the immunity and growth performance of young broilers[J]. Poult Sci, 2003, 82(3): 364-370.

[15] Bagni M, Archeui L, Amadori M, et al. Effect of long-term oral administration of an immunostimulant diet on innate immunity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*)[J]. J Vet Med B, 2000, 47(10): 745-751.

[16] Tokunaka K, Ohno N, Adachi Y, et al. Immunopharmacological and immunotoxicological activities of a water-soluble (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan, CSBG from *Candida* spp[J]. Int J Immunopharmacol, 2000, 22(5): 383-394.

[17] 张耀雷,黄立新,张彩虹,等. 红枣多糖的研究进展[J]. 食品工业科技, 2013, 34(23): 349-353.

[18] 蒋俊,杨焱,乔彦茹,等. 猴头菌多糖脱色前后理化性质及生物活性的研究[J]. 菌物学报, 2014, 33(1): 78-86.

[19] Mina T. Inulin in medicinal planta[J]. Shoyakugaku Zaaahi, 1985, 39(2): 154-155.

[20] 栗平. 蒲公英现代药理配伍规律及临床新用[J]. 新中医, 2011, 43(11): 135-136.

[责任编辑 刘德文]