DOI:10.16016/j.2097-0927.202307103

18 种中药多糖与 Siglec-9 的亲和力测试及其抗炎作用研究

刘瑶瑶,刘娟娟,秦怡玉,李 瑾,刘红梅,贾 乙 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)药学与检验医学系

[摘要] **目的** 比较 18 种中药多糖与唾液酸特异性 Ig 样凝集素-9(sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectin, Siglec-9)的亲和力以及抗炎能力,探讨中药多糖发挥抗炎作用的新机制。**方法** 选择 18 种不同药性的中药用水提醇沉法提取多糖,苯酚硫酸法检测多糖含量,高效液相色谱法检测多糖的单糖组成,红外光谱法检测中药多糖结构。通过竞争性 ELISA 法检测多糖与 Siglec-9 的亲和力,并研究中药多糖对 LPS 诱导巨噬细胞炎症反应以及 R848 诱导中性粒细胞 NETosis 的影响,利用髓系细胞特异性敲除 Siglec-E(Lyz2-cre:Siglec-E$^{flox/flox}$)小鼠来源的原代巨噬细胞和腹腔中性粒细胞进一步明确多糖结合 Siglec-9 产生抗炎作用的机制。**结果** 中药多糖的糖含量均在 55%以上,主要由甘露糖、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖、葡萄糖醛酸等组成,但单糖构成比各不相同。红外光谱检测 4 种代表性中药多糖均有典型的多糖吸收峰,柴胡和蒲公英多糖具有葡萄糖醛酸结构。枸杞和黄芪多糖与 Siglec-9 的亲和力,对 LPS 诱导的巨噬细胞炎症反应和 R848 诱导的中性粒细胞 NETosis 反应无显著抑制作用。柴胡和蒲公英多糖与 Siglec-9 亲和力较强($P<0.01$),能够显著抑制上述炎症反应,但其抗炎作用在髓系细胞特异性敲除 Siglec-E 基因小鼠来源的巨噬细胞和中性粒细胞中消失。**结论** 中药多糖与 Siglec-9 的亲和力有潜力成为研究中药抗炎作用的新的现代药理学机制。

[关键词] 中药多糖;Siglec-9;抗炎;NETosis

[中图法分类号] R285.5; R392.11; R364.5 [文献标志码] A

Affinity test of 18 traditional Chinese medicine polysaccharides with Siglec-9 and their anti-inflammatory effects

LIU Yaoyao, LIU Juanjuan, QIN Yiyu, LI Jin, LIU Hongmei, JIA Yi Faculty of Pharmacy and Laboratory Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To compare the affinity with sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin-9 (Siglec-9) and anti-inflammatory effects of 18 traditional Chinese medicine polysaccharides in order to explore a new mechanism for the anti-inflammatory effects of these polysaccharides. **Methods** Aqueous alcohol precipitation was used to extract polysaccharides from 18 traditional Chinese medicines with different medicinal properties. Phenol sulfuric acid method was employed to detect the content of the polysaccharides, high performance liquid chromatography (HPLC) was utilized to measure the monosaccharide composition of the polysaccharides, and infrared spectroscopy was applied to detect the structure of the polysaccharides of Chinese medicines. The affinity of polysaccharide to Siglec-9 was detected by competitive ELISA, and the effects of the polysaccharides on LPS-induced inflammatory responses in macrophages and R848-induced NETosis in neutrophils were investigated. Primary cultured macrophages and neutrophils derived from myeloid-specific Siglec-E knockout mice (Lyz2-cre: Siglec-E$^{flox/flox}$) were used to further clarify the mechanism of the anti-inflammation of the polysaccharides. **Results** All these 18 traditional Chinese medicines had the content

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81973319);重庆市自然科学基金面上项目(cstc2019jcyj-msxmX0372)

[通信作者] 贾 乙,E-mail: jy@tmmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

of polysaccharide over 55%, and mainly composed of mannose, glucose, galactose, arabinose and glucuronic acid, with different composition ratio of monosaccharide separately. Infrared spectroscopy revealed that there were typical polysaccharide absorption peaks in all 4 representative polysaccharides, and the polysaccharides from *Bupleurum chinense* and *Dandelion* had glucuronic acid structures. The affinities with Siglec-9 in the polysaccharides from *Lycium barbarum* and *Astragalus* showed no inhibitory effect on LPS-induced inflammatory responses in macrophages and R848-induced NETosis in neutrophils. While, *Bupleurum chinense* and *dandelion* polysaccharides presented strong affinities with Siglec-9 ($P<0.01$), and exerted obvious inhibitory effect on above inflammatory reactions, but the anti-inflammatory effects were lost disappeared in the macrophages and neutrophils derived from Siglec-E conditional knockout mice. **Conclusion** The affinity between Chinese herbal polysaccharide and Siglec-9 has a possibility to be a potential novel pharmacological mechanism of the anti-inflammatory effects of traditional Chinese medicine.

[**Key words**] traditional Chinese medicine polysaccharide; Siglec-9; anti-inflammation; NETosis

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81973319) and the General Program of Natural Science Foundation of Chongqing (cstc2019jcyj-msxmX0372). Corresponding author: JIA Yi, E-mail: jy@tmmu.edu.cn

多糖是很多动物细胞膜、植物细胞壁以及微生物细胞壁的组成成分之一,是一类高分子化合物。中药多糖是中药的主要成分之一,在中药成分中占比很高。近年研究发现其具有重要的生物活性,包括抗炎、抗肿瘤、抗氧化、抗糖尿病、辐射防护、免疫调节等,并且具有低毒性和低副作用的优点[1-6]。炎症作为机体的一种防御反应,中医理论认为是邪气入侵时体内正气抵御,维护机体的表里调和、阴阳平衡的临床病症的变化[7-8]。自古以来,中药就被用于治疗炎症和相关疾病,并根据其作用分为"寒""热"等药性。中药传统的用药方法是水煎汤剂,多糖是该剂型中的主要成分[3]。尽管既往大量研究表明中药多糖具有抗炎等广泛的生物活性[9],但是尚缺乏联系多糖和抗炎作用的明确分子靶点。

唾液酸特异性 Ig 样凝集素-9(sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectin-9,Siglec-9)是一种识别多糖进而产生抑炎作用的膜蛋白,主要表达于人单核/巨噬细胞、中性粒细胞和树突状细胞等免疫细胞中[10-12],Siglec-E 是 Siglec-9 在小鼠体内的同系物[13],可识别聚糖配体。研究证实不仅内源性 Siglec-9 聚糖配体能够在维持免疫稳态中起重要作用[14-15],DELAVERIS 等[16]报道合成的外源性聚糖配体也能够通过激活 Siglec-9 显著抑制中性粒细胞炎症反应降低 COVID-19 导致的肺部炎症。另外,以多糖为主要成分的清肺排毒汤同样具有降低 COVID-19 患者肺部炎症反应的效果[17],提示植物多糖可能具有通过激活 Siglec-9 通路产生抗炎活性的潜力,但目前植物多糖与 Siglec-9 之间的关系尚不清楚。故本研究选择中医辨证理论确定药性的中药为研究对象,从中药中提取其多糖组分,探讨中药多糖和 Siglec-9 结合力与抗炎的相关性,为中药多糖抗炎靶点研究提供可借鉴的现代药理学新机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

重组 Human Siglec-9 Fc 蛋白(R&D systems,1139-SL-050),重组 Mouse Siglec-E Fc 蛋白(R&D systems,5806-SL-050),GT1b(Millipore,345744),R848(Med Chem Express,S28463),SYTOX™ Green(Thermo Fisher Scientific,S7020),Phosphatidylcholine(AbMole,8002-43-5),RPMI1640 培养基无酚红(Hyclone,SH30605.01),辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)(上海碧云天生物技术有限公司,A0216),再生纤维素透析袋(上海源叶生物科技有限公司,SP132638),磷酸氢二钠(百灵威,947717),三氟乙酸(阿拉丁,T281759),1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)(麦克林,P816062),5×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(上海碧云天生物技术有限公司,P0015),RIPA 裂解液(上海碧云天生物技术有限公司,P0013B),BCA 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,P0012)。

1.2 中药

本课题组筛选并采购了中国药典无争议且药性明确的中药饮片 18 种(表 1),经陆军军医大学生药学与中药学教研室主任李鹏教授鉴定均为道地药材。

1.3 仪器

高效液相色谱仪(岛津,LC-1200),真空旋转蒸发仪(亚荣仪器有限公司,2X98-2L),低温高速离心机(Eppendorf,22331),冷冻干燥仪(齐强仪器制造有限公司,QS-10N),傅里叶变换红外光谱仪(珀金埃尔默

股份有限公司,Spectrum 100),二氧化碳细胞培养箱(益世科生物,CLM-170B-8-CN),酶标仪(瑞士帝肯贸易有限公司,INFINITE 200 PRO),倒置荧光显微镜(日本尼康株式会社,TI-U)。

表 1 中药饮片

名称	药性	产地	名称	药性	产地
柴胡	寒	河南	何首乌	温	陕西
蒲公英	寒	山东	麻黄	温	辽宁
金银花	寒	山东	荆芥	温	安徽
连翘	寒	河北	防风	温	辽宁
龙胆	寒	吉林	熟地	温	辽宁
牛蒡子	寒	浙江	黄芪	温	内蒙古
玄参	寒	浙江	枸杞	热	宁夏
桑叶	寒	浙江	白芷	热	浙江
石斛	寒	浙江	干姜	热	四川

1.4 多糖提取以及含量测定

取干燥中药材 100 g,打粉并加入 10 倍量的 80% 乙醇(60 ℃,2 h)回流提取,药渣抽滤晾干后加入 10 倍量的水浸泡并加热超声提取(80 ℃,1.5 h,2 次)。抽滤提取液浓缩至原体积的 1/8,加入 4 倍体积的无水乙醇醇沉 24 h,沉淀物分别用丙酮、乙醚清洗并在通风橱中挥干。溶解沉淀物后用 20% Sevage 试剂除去蛋白质,取上层水相,经 1 000 Da 透析后冻干即为粗多糖。苯酚硫酸法检测多糖含量,灼烧法进行灰分分析。

1.5 多糖提取物的单糖组成测定

称取 2 mg 多糖样品加入 1 mL 2 mol/L 盐酸-甲醇溶液充 N_2 管,80 ℃水解 6 h 后用氮吹仪吹干,再加入 1 mL 2 mol/L 三氟乙酸,120 ℃氮气封管水解 1 h,冷却后加入甲醇 3~5 次除去多余的三氟乙酸。随后加入 1 mL 水溶液溶解均匀,从溶解后的样品中取出 200 μL,加入 400 μL 0.3 mol/L NaOH 水溶液和 400 μL PMP 试剂,剧烈涡旋混合均匀,于 70 ℃水浴反应 1 h。冷却至室温后 10 000 r/min 离心 5 min,除去沉淀。用 0.2 mol/L 盐酸调整 pH 值至 7.0~7.1,加入 2 mL 二氯甲烷吹打均匀,4 500 r/min 离心 5 min,重复该操作 3~5 次,直到下层二氯甲烷层颜色为白色为止。水相单糖衍生物氮吹至无氯仿味道,过 0.45 μm 滤膜,运用 HPLC 进行分析。高效液相色谱分析条件:C18 柱;35 ℃;流动相:82.8% 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH=7.0),17.2%乙腈;流速:1.0 mL/min;检测波长:254 nm。

1.6 多糖提取物竞争性抑制 Siglec-9 与 GT1b 结合实验

稀释 Siglec-9-Fc 至 1 μg/mL,分别与等体积的浓度为 2 mg/mL 的多糖溶液、单糖混合液以及溶剂室温预混 1 h[18]。预混好的混合溶液加入到固定有 GT1b(100 pmol/孔)的酶标板中,室温孵育 90 min 后洗涤 3 次。每孔加入 100 μL 辣根过氧化物酶标记的山羊抗人二抗(1∶6 000),室温孵育 45 min。洗涤 3 次后加入 TMB 显色液避光显色 10 min,终止反应后将板置于酶标仪上,在 450 nm 处检测光密度值。计算多糖对 GT1b 与 Siglec-9 结合的抑制率。

$$抑制率=(1-\frac{A_{样品}-A_{空白}}{A_{对照}-A_{空白}})\times 100\%$$

$A_{样品}$是指加入多糖与 Siglec-9 预混的样本后检测的光密度值;$A_{对照}$是指加入 Siglec-9 样本后检测的光密度值;$A_{空白}$是指 DPBS 与辣根过氧化物酶标记二抗的检测光密度值。

1.7 多糖提取物的红外光谱分析

多糖粉末置于 40 ℃烘箱烘干过筛,调整旋钮使样品粉末平铺于 FT-IR 光谱测定窗口,测力值稳定后检测红外吸收光谱,光谱波数的范围设置为 4 000~250 cm^{-1} 并在同样测力值下扫描 5 次得到红外原始谱图。

1.8 多糖提取物体外抗氧化活性实验

选择与 Siglec-9 亲和力较好的柴胡多糖和蒲公英多糖,亲和力较弱的黄芪多糖和枸杞多糖,稀释为 50、25 μg/mL。维生素 C 稀释为 50、25 μg/mL。分别检测多糖 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基清除能力和 2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)自由基清除能力[19]。清除率计算公式:

$$K=(\frac{A_{对照}-A_{样品}}{A_{对照}-A_{空白}})\times 100\%$$

1.9 多糖提取物的抗炎活性

1.9.1 多糖提取物抑制巨噬细胞炎症反应实验

用含佛波酯(Phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)(100 μg/L)的 RPMI1640 培养基处理 THP-1 细胞,使其分化成巨噬细胞(THP-Ms)后洗去 PMA,以 1×10^5/mL 的细胞密度接种在 24 孔板。除对照组外,各组中均加入 LPS(1 μg/mL)以及不同的多糖溶液(0.1、0.3、1.0 mg/mL)刺激 5 h,分组为 Control 组、LPS 组、LPS+GT1b 组、LPS+柴胡多糖组(1.0、0.3、0.1 mg/mL)、LPS+蒲公英多糖组(1.0、0.3、0.1 mg/mL)、LPS+黄芪多糖组(1.0、0.3、0.1 mg/mL)、LPS+枸杞多糖组(1.0、0.3、0.1 mg/mL);而后加入终浓度为 5 mmol/L 的 ATP 刺激 30 min,ELISA 法检测细胞上清中 IL-1β 和 TNF-α 蛋白的表达水平。将从 Siglec-$E^{flox/flox}$ 小鼠和 Lyz2-cre:Siglec-$E^{flox/flox}$ 小鼠中提取的腹腔巨噬细胞以 1×10^5/mL 的密度接种在 24 孔板中。分组和指标检测同 THP-Ms 细胞。

1.9.2 多糖提取物抑制中性粒细胞胞外捕获网(neutrophil extracellular traps, NETs)实验 小鼠腹

腔注射4%巯基乙酸盐培养基4 h后提取腹腔中性粒细胞[20],瑞氏-姬姆萨染色确定中性粒细胞纯度。细胞重悬于无血清不含酚红的RPMI1640中,除Control组外,各组均加入TLR-7/8激动剂(R848),以及不同的多糖溶液(0.3 mg/mL),分组为Control组、R848组、R848+GT1b组、R848+柴胡多糖组、R848+蒲公英多糖组、R848+黄芪多糖组、R848+枸杞多糖组;并置于细胞培养箱中6 h。洗涤细胞,按说明书加入SYTOX™ Green染色30 min后,DAPI染色细胞核10 min,低速短暂离心沉淀细胞后,荧光显微镜下观察细胞染色并统计NETs阳性细胞比率。

1.10 统计学分析

实验结果以$\bar{x}\pm s$表示,应用GraphPad Prism 7进行数据处理,多组间数据统计分析采用单因素方差分析,2组间数据差异分析采用Student's t检验。检验水准为$\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 多糖含量

中药多糖提取物中冻干粉得率(冻干粉质量/生药质量)见表2,冻干粉中多糖含量均不一样,但都在55%以上,部分多糖含有糖醛酸。

表2 中药多糖提取率

中药	得率/%(冻干粉/生药)	总糖含量/%	糖醛酸含量/%
柴胡	5.3	82.4	3.1
蒲公英	6.7	72.1	3.4
金银花	5.8	71.4	2.8
连翘	5.6	72.4	4.2
龙胆草	2.4	67.0	3.9
牛蒡子	5.4	66.8	1.9
玄参	7.1	74.4	4.0
桑叶	7.0	56.0	2.5
石斛	2.1	63.7	2.0
何首乌	6.8	67	4.7
麻黄	7.5	85.1	3.6
荆芥	6.6	66.2	2.7
防风	7.4	74.2	2.3
熟地	6.8	68.5	4.2
黄芪	14.7	85.5	2.3
枸杞	5.2	81.4	1.3
白芷	7.5	71.7	-
干姜	3.4	66.4	1.5

2.2 多糖提取物单糖组成

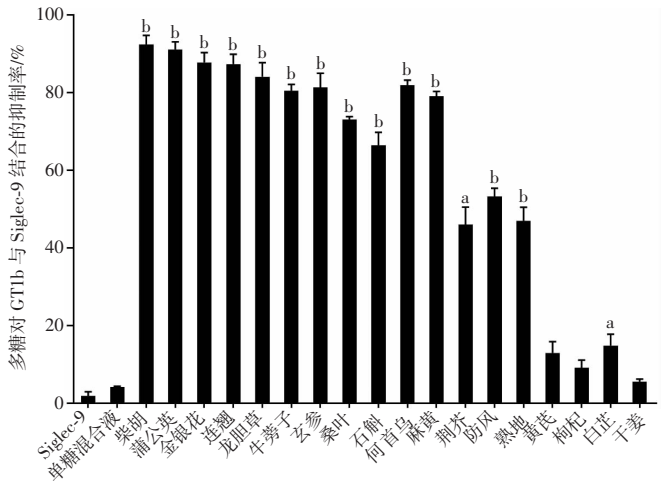
18种中药多糖主要由甘露糖、葡萄糖、半乳糖、糖醛酸组成,除此之外还含有少量的阿拉伯糖等。寒性中药多糖单糖组成多数有较多半乳糖醛酸,见表3。

表3 HPLC分析各中药多糖提取物的单糖组成

中药	单糖质量分数					
	甘露糖	葡萄糖醛酸	半乳糖醛酸	葡萄糖	半乳糖	阿拉伯糖
柴胡	10.2	-	32.7	15.2	33.1	5.9
蒲公英	12.0	4.5	25.2	16.9	25.5	12.8
金银花	20.1	6.9	-	34.5	25.7	8.1
连翘	7.4	6.3	23.4	20	21.7	13.7
龙胆草	5.9	43.2	-	19.4	-	2.9
牛蒡子	13.0	4.3	4.3	13.0	32.6	30.4
玄参	1.8	1.8	44.4	-	51.0	-
桑叶	9.8	32.0	-	33.3	8.6	9.8
石斛	21.8	-	-	72.8	3.3	-
何首乌	8.3	2.7	27.7	30.5	16.6	-
麻黄	13.0	17.3	-	21.7	30.4	-
荆芥	8.4	-	12.0	26.5	38.5	7.2
防风	5.1	9.0	-	49.3	20.7	15.5
熟地	2.2	5.3	-	21.7	65.6	4.1
黄芪	2.7	2.7	-	78.3	10.8	3.6
枸杞	4.7	-	-	78.6	6.6	7.1
白芷	3.9	-	-	92.5	3.2	-
干姜	7.1	-	-	31.9	27.8	16.9

2.3 寒性中药的多糖提取物对GT1b与Siglec-9的结合具有显著抑制作用

竞争性结合实验证实,柴胡多糖等寒性中药多糖与Siglec-9的亲和力较强,从而竞争性抑制GT1b与Siglec-9的结合,抑制率比较高($P<0.01$)。温热性中药相比寒性中药多糖对Siglec-9和GT1b结合的抑制作用较弱,如枸杞和黄芪的多糖($P<0.05$),见图1。单糖混合液对GT1b与Siglec-9结合没有显著抑制作用。



a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, 与Siglec-9比较

图1 中药多糖提取物对GT1b和Sigelc-9结合的竞争性抑制率的影响($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

2.4 多糖提取物的红外(IR)光谱测定

红外光谱图显示,代表性植物多糖,柴胡、蒲公英、枸杞以及黄芪多糖均在 3 452 cm^{-1} 处均具有较强的羟基吸收峰,2 990 cm^{-1} 处有弱的 C-H 吸收峰,表明总糖含量高,与糖含量测定结果一致。黄芪和枸杞多糖在 1 730~1 637 cm^{-1} 处表现出较低的吸收,而柴胡和蒲公英多糖在 1 730~1 637 cm^{-1} 处表现出较强的吸收,说明柴胡和蒲公英多糖的结构具有糖醛酸结构。4 种多糖在 1 455、1 402 cm^{-1} 处均有吸收峰,提示存在 C-H 的弯曲振动。1 200~1 000 cm^{-1} 处均具有吸收峰,说明多糖存在 C-O 伸缩的吡喃环振动,见图 2。以上结果显示,4 种代表性中药多糖均有典型的多糖结构,柴胡和蒲公英多糖中有糖醛酸结构。

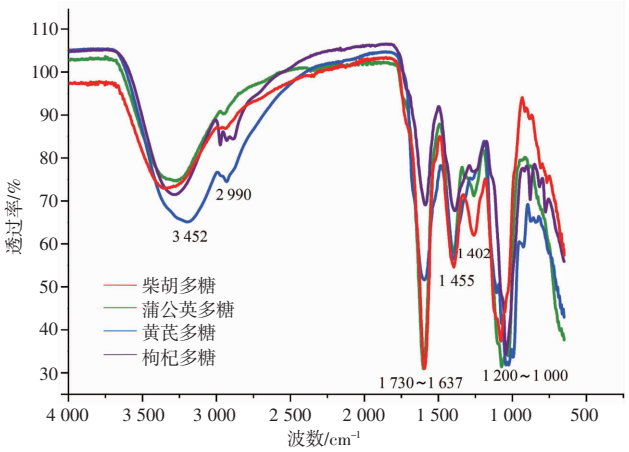


图 2 中药多糖提取物红外光谱图

2.5 多糖提取物的抗氧化活性

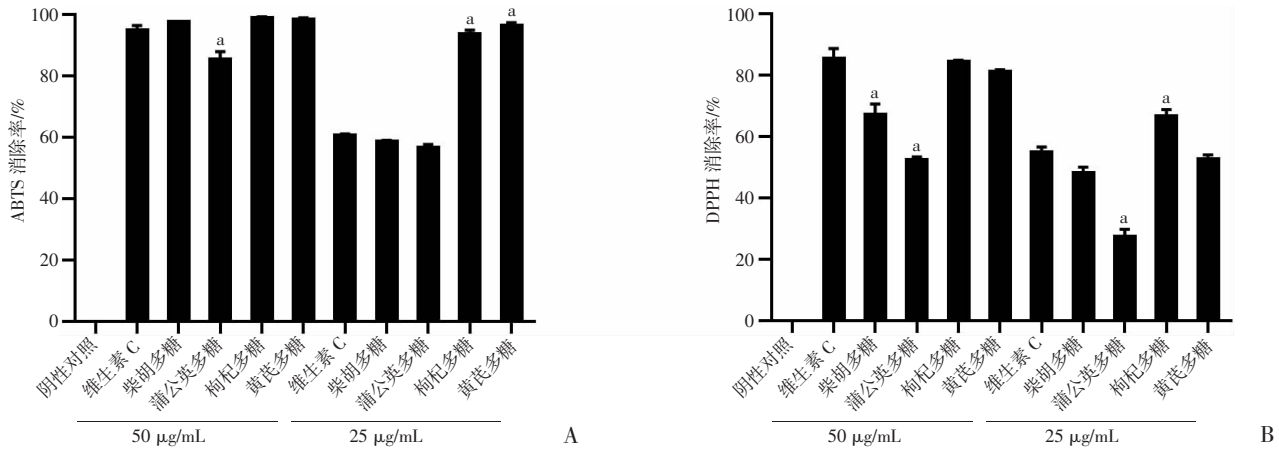
4 种中药多糖提取物对 DPPH 和 ABTS 自由基均有明显的清除作用(P<0.01,图 3)。其中枸杞多糖和黄芪多糖在相同浓度下清除自由基的能力强于柴胡多糖和蒲公英多糖,并且和维生素 C 相当。

2.6 多糖提取物对巨噬细胞炎症反应的影响

与 LPS 组相比,GT1b、柴胡多糖和蒲公英多糖均显著抑制 THP-1 来源巨噬细胞中 TNF-α 和 IL-1β 的产生,并具有浓度依赖性(P<0.01,图 4),黄芪多糖和枸杞多糖对细胞炎症因子的分泌无显著影响。利用基因鉴定及 RT-PCR 技术对 Siglec-E 髓系敲除小鼠中 Siglec-E 的表达进行鉴定,结果如图 5 所示。在 Siglec-$E^{flox/flox}$ 小鼠来源的原代巨噬细胞中的结果与 THP-1 来源巨噬细胞结果一致(P<0.05,图 6)。而柴胡多糖、蒲公英多糖和 GT1b 的抗炎效果在 Lyz2-cre:Siglec-$E^{flox/flox}$ 小鼠来源的巨噬细胞中消失,枸杞多糖和黄芪多糖的结果仍显示为阴性,提示其抗炎机制与 Siglec-E 信号通路相关。

2.7 多糖提取物对中性粒细胞 NETosis 反应的影响

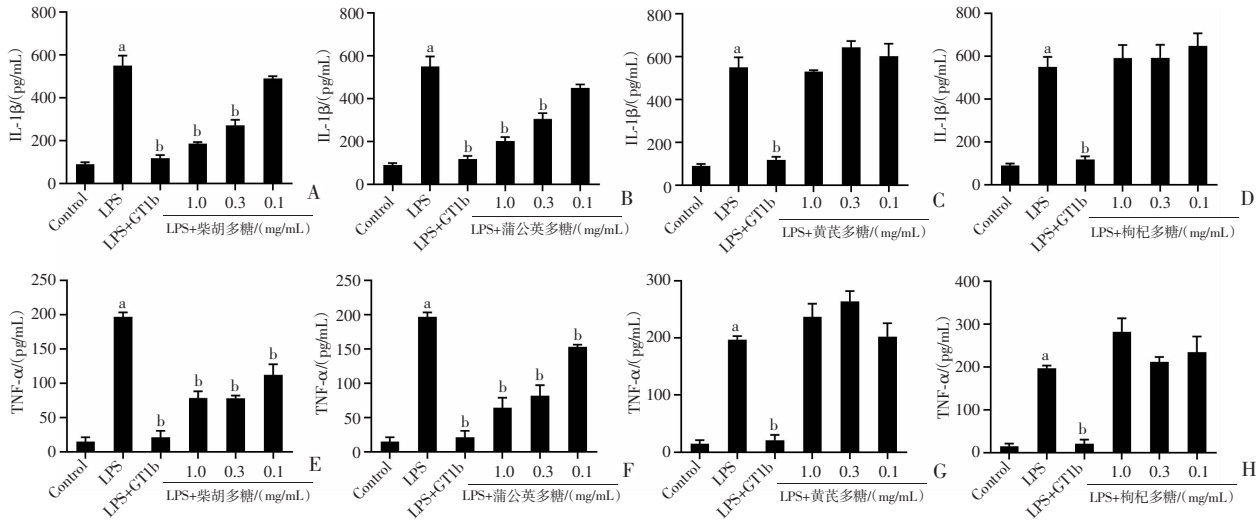
TLR-7/8 激动剂 R848 可在体外诱导中性粒细胞出现 NETosis。GT1b、柴胡多糖和蒲公英多糖显著抑制野生型小鼠腹腔中性粒细胞的 NETosis,而黄芪多糖和枸杞多糖无效。在髓系敲除来源的小鼠腹腔中性粒细胞中,GT1b、柴胡多糖和蒲公英多糖对中性粒细胞 NETosis 的抑制作用消失(P<0.01, 图 7)。提示柴胡多糖和蒲公英多糖对 NETosis 的抑制与 Siglec-9/E 信号通路相关。



a:P<0.01,与相对应浓度的维生素 C 组比较

A:中药多糖对 ABTS 自由基的清除作用;B:中药多糖对 DPPH 自由基的清除作用

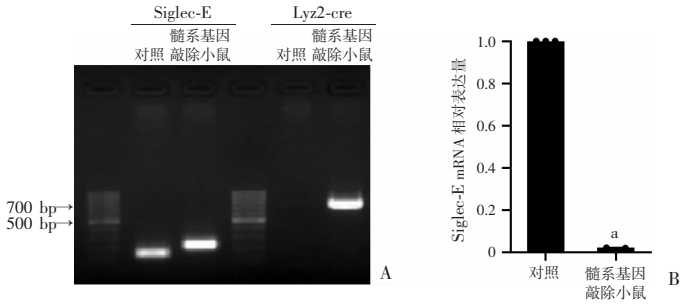
图 3 中药多糖提取物对 DPPH 和 ABTS 自由基的清除作用(n=3, $\bar{x}\pm s$)



a:$P<0.01$,与 Control 组比较;b:$P<0.01$,与 LPS 组比较

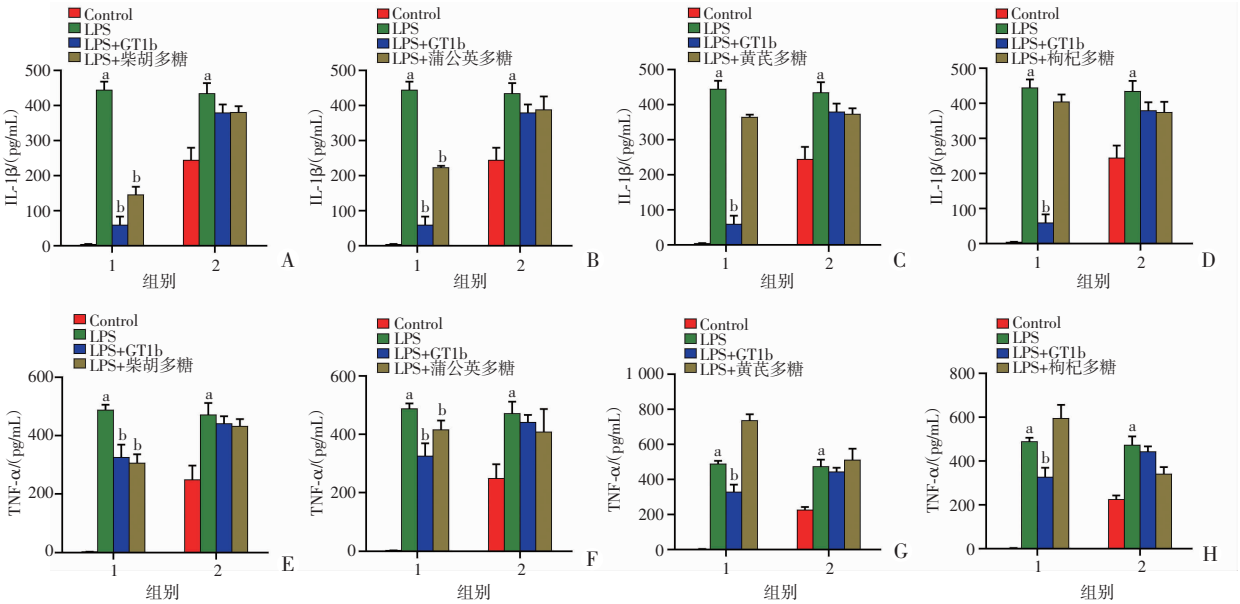
A~D:ELISA 检测不同给药组 IL-1β 蛋白表达;E~H:ELISA 检测不同给药组 TNF-α 蛋白表达

图 4　中药多糖提取物对 LPS 诱导的 THP-1 源性巨噬细胞炎症反应的作用($n=3$, $\bar{x}\pm s$)



A:正常小鼠和髓系敲除小鼠中 Siglec-E 和 lyz2-cre 的基因鉴定;B:RT-PCR 技术评估正常全血样本和髓系敲除小鼠全血样本中 Siglec-E mRNA 的表达　a:$P<0.01$,与对照比较

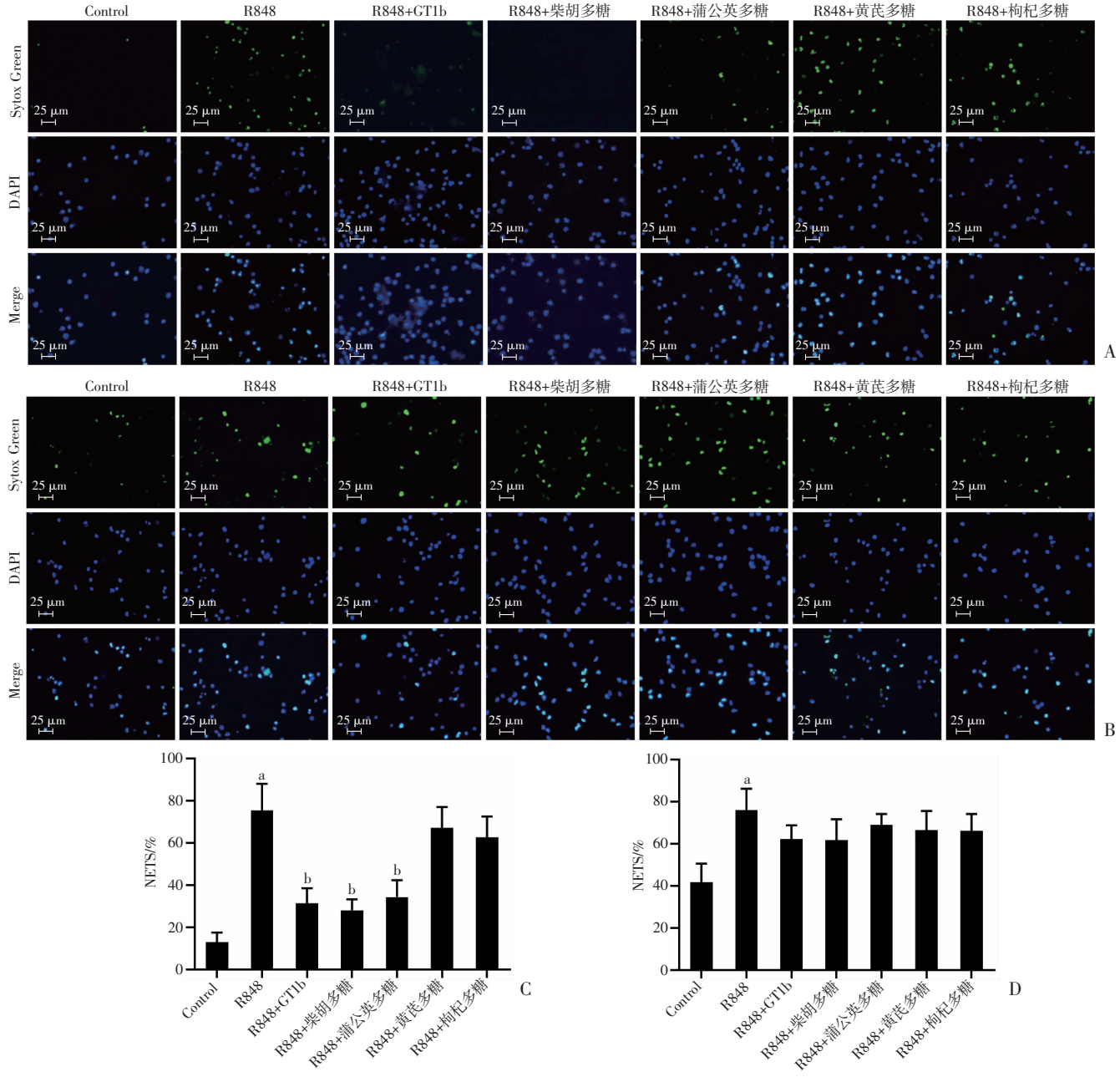
图 5　髓系敲除小鼠的基因鉴定($n=3$, $\bar{x}\pm s$)



1:Siglec-$E^{flox/flox}$ 小鼠组;2:Lyz2-cre:Siglec-$E^{flox/flox}$ 小鼠组;a:$P<0.01$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,与 LPS 组比较

A~D:ELISA 检测不同给药组 IL-1β 蛋白表达;E~H:ELISA 检测不同给药组 TNF-α 蛋白表达

图 6　中药多糖对 LPS 诱导小鼠腹腔原代巨噬细胞炎症反应的作用($n=3$, $\bar{x}\pm s$)



a:$P<0.01$,与 Control 组比较;b:$P<0.01$,与 R848 组比较

A:野生型小鼠腹腔中性粒细胞免疫荧光染色 NETs 形成情况;B:髓系敲除小鼠腹腔中性粒细胞免疫荧光染色 NETs 形成情况;C:野生型小鼠腹腔中性粒细胞免疫荧光染色统计分析;D:髓系敲除小鼠腹腔中性粒细胞免疫荧光染色统计分析

图 7 中药多糖提取物对 R848 诱导的中性粒细胞 NETosis 反应的作用($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

3 讨论

中药多糖是中药发挥药效的主要物质基础,目前中药多糖的研究主要以药效研究为主,集中在对炎症相关信号通路的影响,对其直接作用靶点的现代药理学机制研究尚不够深入。本研究拟基于 Siglec-9 这一抗炎新靶点,探索中药多糖提取物与 Siglec-9 结合能力强弱进而导致抗炎能力的差异。结果发现不同中药的多糖提取物和 Siglec-9 的亲和力显著不同,其中发现解表药和清热药多糖提取物的亲和力较好,优于补益类中药多糖。在此基础上,根据中药多糖与 Siglec-9 的不同程度亲和力,对其中代表性植物多糖柴胡、蒲公英、枸杞和黄芪多糖进行红外光谱测定,皆存在典型多糖结构,而柴胡多糖和蒲公英多糖具有糖醛酸结构,判

断这种亲和力的差异与多糖提取物的单糖组成也具有一定的相关性,即亲和力较强的多糖提取物单糖组成中多数有半乳糖醛酸,提示与 Siglec-9 的结合可能是酸性多糖。人体内多种细胞上生理性 Siglec-9 的激动剂为具有唾液酸末端的特异性 Lewis X 聚糖结构[20-21],但上述中药多糖提取物中并未发现唾液酸,说明植物多糖与 Siglec-9 的结合并不依赖唾液酸末端,而可能是葡萄糖醛酸等其他酸性多糖。有研究表明由葡萄糖醛酸和 N-乙酰葡糖胺聚合而成的高分子量透明质酸同样具有结合并激活 Siglec-9 的作用[22],与本研究结果一致。在后续的实验中将进一步研究确定多糖结合 Siglec-9 的末端结构和多糖的空间结构。

为证实 Siglec-9 是否为多糖提取物抗炎活性的靶点,本研究选择不同亲和力的代表性中药多糖提取物进行抗炎活性实验。结果显示与 Siglec-9 亲和力高的中药多糖(柴胡多糖和蒲公英多糖),对人源性巨噬细胞(THP-1 Ms)和鼠源性原代腹腔巨噬细胞具有较好的抗炎能力,同时对中性粒细胞 NETosis 炎症反应也有显著的抑制作用,高浓度多糖的抑制效果与 GT1b(Siglec-9 配体)相当。而亲和力较低的黄芪和枸杞多糖无显著影响。为排除多糖本身还原性导致的抗炎作用影响,本研究进行了多糖的自由基清除实验。结果证实代表性中药多糖提取物均具有清除自由基的作用,说明本实验中多糖提取物的抗炎作用与其清除自由基的作用无关。

为了进一步验证多糖提取物的抗炎作用是否和 Siglec-9 相关,本研究制备了髓系细胞特异性敲除 Siglec-E 的 Lyz2-cre:Siglec-E$^{flox/flox}$ 小鼠。发现亲和力较好的中药多糖提取物的抗炎作用在无 Siglec-E 表达的巨噬细胞和中性粒细胞中均消失,强烈提示亲和力较好的中药多糖(柴胡多糖和蒲公英多糖)提取物的抗炎作用是通过 Siglec-9/E 通路实现的。

综上所述,本研究证实部分中药多糖与 Siglec-9 具有较强的亲和力,并且可能与其中含有的糖醛酸有关,进而发挥抗炎活性。因此,有理由认为,Siglec-9 是联系具有抗炎活性的中药多糖和其抗炎作用的全新药理学靶点,有潜力成为研究中药多糖抗炎的新的现代药理学机制。

参考文献:

[1] HOU C Y, CHEN L L, YANG L Z, *et al*. An insight into anti-inflammatory effects of natural polysaccharides[J]. Int J Biol Macromol, 2020, 153: 248-255. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.02.315.

[2] 舒任庚, 蒋跃平, 蔡永红. 植物多糖的提取分离方法探讨[J]. 中国药房, 2011, 22(11): 1052-1055.
SHU R G, JIANG Y P, CAI Y H. Exploration of extraction and isolation method of plant polysaccharides[J]. China Pharm, 2011, 22(11): 1052-1055.

[3] YU Y, SHEN M Y, SONG Q Q, *et al*. Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: a review[J]. Carbohydr Polym, 2018, 183: 91-101. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.12.009.

[4] JIANG P, JI X, XIA J, *et al*. Structure and potential anti-fatigue mechanism of polysaccharides from *Bupleurum chinense* DC[J]. Carbohydr Polym, 2023, 306: 120608. DOI: 10.1016/j.carbpol.2023.120608.

[5] GAO W D, FENG Z J, ZHANG S L, *et al*. Anti-inflammatory and antioxidant effect of *Eucommia ulmoides* polysaccharide in hepatic ischemia-reperfusion injury by regulating ROS and the TLR-4-NF-κB pathway[J]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 1860637. DOI: 10.1155/2020/1860637.

[6] GAO Q H, FU X Y, ZHANG R, *et al*. Neuroprotective effects of plant polysaccharides: a review of the mechanisms[J]. Int J Biol Macromol, 2018, 106: 749-754. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.08.075.

[7] 王青, 苏聪平, 张惠敏, 等. 从炎性反应角度探讨清热解毒药的作用机制[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(18): 3787-3794. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcmm.20180611.012.
WANG Q, SU C P, ZHANG H M, *et al*. Anti-inflammatory mechanism of heat-clearing and detoxifying Chinese herbs[J]. China J Chin Mater Med, 2018, 43(18): 3787-3794. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcmm.20180611.012.

[8] 蒋毅萍. 清热药物的清热、解毒、抗炎作用的探讨[D]. 广州: 南方医科大学, 2012.
JIANG Y P. Discussion on heat-clearing, detoxification and anti-inflammatory effects of heat-clearing drugs[D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2012.

[9] ZENG P J, LI J, CHEN Y L, *et al*. The structures and biological functions of polysaccharides from traditional Chinese herbs[J]. Prog Mol Biol Transl Sci, 2019, 163: 423-444. DOI: 10.1016/bs.pmbts.2019.03.003.

[10] SMITH B A H, BERTOZZI C R. The clinical impact of glycobiology: targeting selectins, Siglecs and mammalian glycans[J]. Nat Rev Drug Discov, 2021, 20(3): 217-243. DOI: 10.1038/s41573-020-00093-1.

[11] MURUGESAN G, WEIGLE B, CROCKER P R. Siglec and anti-siglec therapies[J]. Curr Opin Chem Biol, 2021, 62: 34-42. DOI: 10.1016/j.cbpa.2021.01.001.

[12] LIZCANO A, SECUNDINO I, DÖHRMANN S, *et al*. Erythrocyte sialoglycoproteins engage Siglec-9 on neutrophils to suppress activation[J]. Blood, 2017, 129(23): 3100-3110. DOI: 10.1182/blood-2016-11-751636.

[13] HSU Y W, HSU F F, CHIANG M T, *et al*. Siglec-E retards atherosclerosis by inhibiting CD36-mediated foam cell formation[J]. J Biomed Sci, 2021, 28(1): 5. DOI: 10.1186/s12929-020-00698-z.

[14] SIDDIQUI S, SCHWARZ F, SPRINGER S, *et al*. Studies on the detection, expression, glycosylation, dimerization, and ligand binding properties of mouse siglec-E[J]. J Biol Chem, 2017, 292(3): 1029-1037. DOI: 10.1074/jbc.M116.738351.

[15] THIESLER H, BEIMDIEK J, HILDEBRANDT H. Polysialic acid and Siglec-E orchestrate negative feedback regulation of microglia activation[J]. Cell Mol Life Sci, 2021, 78(4): 1637-1653. DOI: 10.1007/s00018-020-03601-z.

[16] DELAVERIS C S, WILK A J, RILEY N M, *et al*. Synthetic siglec-9 agonists inhibit neutrophil activation associated with COVID-19[J]. ACS Cent Sci, 2021, 7(4): 650-657. DOI: 10.1021/acscentsci.0c01669.

[17] CAO P, WU S L, WU T T, *et al*. The important role of polysaccharides from a traditional Chinese medicine-Lung Cleansing and Detoxifying Decoction against the COVID-19 pandemic[J]. Carbohydr Polym, 2020, 240: 116346. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.116346.

[18] SECUNDINO I, LIZCANO A, ROUPÉ K M, *et al*. Host and pathogen hyaluronan signal through human siglec-9 to suppress neutrophil activation[J]. J Mol Med, 2016, 94(2): 219-233. DOI: 10.1007/s00109-015-1341-8.

[19] 曾小燕, 李鸿霞, 梁纪强, 等. 中药多糖体外抗氧化作用研究进展[J]. 亚太传统医药, 2020, 16(7): 181-188. DOI: 10.11954/ytctyy.202007060.
ZENG X Y, LI H X, LIANG J Q, *et al*. Research progress on polysaccharide of traditional Chinese medicine antioxidant *in vitro* experiments[J]. Asia Pac Tradit Med, 2020, 16(7): 181-188. DOI: 10.11954/ytctyy.202007060.

[20] 摄渊婷, 曾东风, 刘红梅, 等. 缺氧下调血小板表面Siglec-9聚糖配体导致血小板功能异常活化[J]. 第三军医大学学报, 2022, 44(6): 541-548. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202111025.
SHE Y T, ZENG D F, LIU H M, et al. Hypoxia-downregulated Siglec-9 glycan ligands induce abnormal activation of platelet[J]. J Third Mil Med Univ, 2022, 44(6): 541-548. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202111025.

[21] LIU H M, ZHENG Y, ZHANG Y X, *et al*. Immunosuppressive Siglec-E ligands on mouse aorta are up-regulated by LPS *via* NF-κB pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 122: 109760. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109760.

[22] MIRALDA I, SAMANAS N B, SEO A J, *et al*. Siglec-9 is an inhibitory receptor on human mast cells *in vitro*[J]. J Allergy Clin Immunol, 2023, 152(3): 711-724. e14. DOI: 10.1016/j.jaci.2023.04.007.

(**收稿**:2023-07-19;**修回**:2023-08-30)

(编辑 张 维)