

# 卷丹多糖的结构表征及其对 PM<sub>2.5</sub> 暴露致小鼠急性肺损伤的影响

柯益鑫,王子林,李卓远,陈雅茜,陶琳,井山林\*,李俊松\*

南京中医药大学药学院,南京 210023

**摘要:**对卷丹多糖(Lilii Lancifolii Bulbus polysaccharide, LP)的结构进行表征,并考察卷丹水提液(Lilii Lancifolii Bulbus water extract, LW)及其多糖部位对 PM<sub>2.5</sub>暴露致小鼠急性肺损伤的保护作用。采用水提醇沉法得到 LP 并利用苯酚-硫酸法测定其总糖含量,利用纤维素层析法对其进行分离纯化,采用凝胶渗透色谱以及 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone, PMP)柱前衍生化法对 LP 结构进行分析,并考察了 LW 和 LP 对 PM<sub>2.5</sub>暴露致小鼠急性肺损伤的影响。结果测得 LP 的总糖含量为(70.98 ± 2.36)%,分离纯化得到 LP 主要成分 LP-1 的相对分子量为 5 906 Da,主要由甘露糖和葡萄糖组成,摩尔比为 1.00:2.01。与空白组相比较,模型组小鼠体重增势缓慢( $P < 0.01$ ),肺组织损伤严重,肺指数以及肺组织中的炎症因子平增加( $P < 0.01$ )。与模型组相比较,阳性药(地塞米松)组以及 LW 和 LP 组小鼠体重显著增长( $P < 0.01$ ),肺组织结构均相对完整,肺指数、肺组织病理评分、炎症因子水平显著降低( $P < 0.05$ )。并且,相同给药剂量下, LW 与 LP 组之间的疗效基本一致,表明卷丹多糖可能是卷丹有效改善肺损伤小鼠的肺部组织形态,减少肺部炎症因子表达,发挥 PM<sub>2.5</sub>暴露致急性肺损伤疗效的重要药效物质基础。

**关键词:**卷丹;多糖;PM<sub>2.5</sub>;急性肺损伤;药效物质基础

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2024)8-1385-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2024.8.012

## Structural characterization of polysaccharide from Lilii Lancifolii Bulbus and its effect on acute lung injury in mice induced by PM<sub>2.5</sub> exposure

KE Yi-xin, WANG Zi-lin, LI Zhuo-yuan,

CHEN Ya-xi, TAO Lin, JING Shan-lin\*, LI Jun-song\*

College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

**Abstract:** This study aims to characterize the structure of Lilii Lancifolii Bulbus polysaccharide (LP) and investigate the protective effect of the Lilii Lancifolii Bulbus water extract (LW) and LP on acute lung injury induced by PM<sub>2.5</sub> exposure in mice. LP was obtained by water-extraction and alcohol-precipitation method. The LP was separated and purified by cellulose chromatography, and its structure was analyzed by gel permeation chromatography and 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) pre-column derivatization. More to the point, the effects of LW and LP on acute lung injury induced by PM<sub>2.5</sub> exposure in mice were investigated. The results show that total sugar content of LP was (70.98 ± 2.36)% by phenol-sulfuric acid method, and the relative molecular weight of LP-1 was 5 906 Da, consisting of mannose and glucose in a molar ratio of 1.00:2.01. In the pharmacodynamic study, compared with the control group, the weight increase of the model group was slow ( $P < 0.01$ ), the lung tissue damage was serious, the lung index and the level of inflammatory factors in the lung tissue were increased ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, the body weight of the mice in the positive drug (dexamethasone) group and the LW and LP groups increased significantly ( $P < 0.01$ ), the lung tissue structure was relatively intact, and the lung index, lung tissue pathological score and inflammatory factor levels were significantly reduced ( $P < 0.05$ ). In addition, at the same dose, the efficacy of LW and LP group were basically the same, indicating that the polysaccharide may be an important medicinal substances basis for Lilii Lancifolii Bulbus to effectively improve the lung tissue morphology of mice with

lung injury, reduce the expression of inflammatory factors in lung, and play an important role in the therapeutic effect of acute lung injury induced by PM<sub>2.5</sub> exposure.

**Key words:** Lili *Lancifolii* Bulbus; polysaccharide; PM<sub>2.5</sub>; acute lung injury; medicinal substances basis

近年来,空气污染依然是广受重视的环境问题。相关研究表明,雾霾天气中高浓度的 PM<sub>2.5</sub> (particulate matters 2.5) 吸入人体后,易于沉积在肺泡细胞中,被巨噬细胞吞噬并释放细胞因子趋化免疫细胞、炎症细胞,从而刺激上皮细胞等相关因子致使炎症发生,持续的炎症反应导致肺组织功能减退,促炎性因子的释放诱导炎症级联反应,从而引发肺组织损伤<sup>[1-3]</sup>,严重影响着人们的身体健康。

卷丹 (*Lili Lancifolii* Bulbus) 为百合科植物卷丹 *Lilium lancifolium* Thunb. 的干燥肉质鳞叶,是《中华人民共和国药典》中规定正品百合品种之一<sup>[4]</sup>,其味甘、寒,归心、肺经,具有养阴润肺,清心安神之功效,临床广泛应用于慢性支气管炎、气胸、肺结核等多种呼吸道和肺部疾病。已有研究表明,百合甲醇提取物<sup>[5]</sup>、百合水提液<sup>[6,7]</sup>、百合复方(百合固金汤<sup>[8]</sup>)、百合相关保健品(LBN 糖浆<sup>[9]</sup>)等可以通过抑制小鼠肺组织中的炎症因子的释放,减轻慢性炎症反应,改善小鼠机体的免疫失衡,促进肺组织的损伤修复等,对脂多糖、麻黄素以及香烟烟雾致小鼠急性肺损伤表现出治疗效果,其相关的作用机制可能同样体现在对 PM<sub>2.5</sub> 暴露致小鼠急性肺损伤的治疗中。此外,百合多糖是百合主要活性成分之一,具有抗炎、抗氧化以及免疫调节<sup>[10]</sup>等众多药理活性,但并无文献证明百合多糖在百合发挥肺损伤疗效中的重要性,且未有研究证明卷丹是否与其他百合品种一样对于 PM<sub>2.5</sub> 暴露致急性肺损伤具有治疗效果。

本实验对卷丹中的多糖部位进行提取分离,鉴定其结构,并采用鼻腔滴注 PM<sub>2.5</sub> 混悬液的方式,建立 PM<sub>2.5</sub> 暴露致小鼠急性肺损伤模型,开展卷丹水提液及其多糖部位抗 PM<sub>2.5</sub> 暴露致小鼠急性肺损伤的药效学研究。为卷丹治疗急性肺损伤的疗效及其药效物质基础提供更多的实验理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

SPF 级 ICR 小鼠,雄性,体重 18.0 ~ 22.0 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,许可证号为 SCXK(沪)2022-0004,饲养于南京中医药大学实验动物中心 SPF 级实验室,环境条件:相对温度(23 ± 2) °C,相对湿度 45% ~ 65%,饲料为不含卵蛋白的

常规饲料。动物可自由进食、进水,实验方案设计经南京中医药大学实验动物伦理委员会批准(202209A071)。

### 1.2 药物及试剂

卷丹购自安徽普仁中药饮片有限公司(批号 20210708),经南京中医药大学中药鉴定专家刘训红教授鉴定为百合科(*Liliaceae*)百合属(*Lilium*)卷丹(*Lilium lancifolium* Thunb.) 的肉质鳞茎。

葡萄糖(批号 RH353051,上海易恩化学技术有限公司,纯度 ≥ 98%);甘露糖、鼠李糖、阿拉伯糖、果糖(批号 JBZ-0437、JBZ-1102、JBZ-0012、JBZ-0451,南京金益柏生物科技有限公司,纯度均 ≥ 98%);DEAE-52 纤维素(批号 20180308,北京索莱宝科技有限公司);地塞米松(批号 Y24011G128470,上海源叶生物科技有限公司,纯度 ≥ 99%);苯酚(批号 RH378961,上海易恩化学技术有限公司,分析纯);4% 多聚甲醛(批号 21342511,南京邦汇诚生物科技有限公司);α 肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor-α, TNF-α)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-1β(interleukin-1β, IL-1β) ELISA 试剂盒(批号均为 Nov 2022,南京建成生物工程研究所)。

### 1.3 仪器

E2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);AKTA Pure 型蛋白纯化仪(美国 GE 公司);TECAN 酶标仪(南京科麟得科学仪器有限公司);JB-L5 型包埋机(武汉俊杰电子有限公司);RM2016 型病理切片仪(上海徠卡仪器有限公司);LABCONCO 6L 型真空冷冻干燥机(美国 LABCONCO 公司);KZ-III-F 型高速低温组织研磨仪(武汉赛维尔生物科技有限公司);TD6002C 型电子天平(天津天马衡基仪器有限公司)。

### 1.4 卷丹多糖的提取、纯化

称取干燥的卷丹饮片 200 g,加 10 倍量水,浸泡 30 min,回流提取 2 次,每次 1 h,200 目筛网过滤并合并滤液,60 °C 减压浓缩至 400 mL,随后缓慢加入 3.5 倍量的 95% 乙醇并不停搅拌,4 °C 下,静置 12 h,过滤,重复醇沉 2 次,将沉淀物冷冻干燥,得卷丹多糖(*Lili Lancifolii* Bulbus polysaccharide, LP)。此

外,同法制备 400 mL 卷丹浓缩液,冷冻干燥,得卷丹水提液(Lilii Lancifolii Bulbus water extract, LW)冻干粉。

精密称取 100 mg 卷丹多糖,溶于 10 mL 去离子水中,过 0.45 μm 滤膜,结合 AKTA Purifier 生物大分子纯化系统,采用 DEAE-52 纤维素层析柱,以 0、0.1、0.2、0.4、0.6、1.0 mol/L 的梯度 NaCl 溶液洗脱,采用苯酚-硫酸法测定吸光度值,以管数为  $X$ ,吸光度值为  $Y$ ,绘制 LP 的纤维素层析柱洗脱曲线,收集洗脱峰部分,将其进行透析(3 000 kDa)、浓缩、醇沉,冷冻干燥处理,得纯化 LP。

### 1.5 卷丹多糖的总糖含量测定

采用苯酚-硫酸法测定,具体操作方法参考 Tian 等<sup>[11]</sup>的报道。

### 1.6 卷丹多糖的分子量测定

对分子量(molecular weight, Mw)为 3 000、10 000、70 000、100 000、500 000 的葡聚糖对照品进行 HPLC 分析(Waters e2695 高效液相色谱仪,配置蒸发光散射检测器,TSK-GEL G4000PWXL 凝胶色谱柱(300 mm × 7.8 mm),流动相:含 0.5 mol/L 乙酸钠的超纯水,流速:0.5 mL/min,进样量:20 μL,柱温:35 °C,喷雾器温度:30 °C,漂移管温度:115 °C,氮气压力:2.3 SLM),以分子量对数(Log Mw)为横坐标,保留时间( $t_R$ )为纵坐标,绘制标准曲线。配制浓度为 1.0 mL/min 的多糖样品溶液,滤膜过滤后同样采用 HPLC 进行分析,记录多糖保留时间( $t_R$ ),根据标准曲线和多糖保留时间计算 LP 的平均相对分子量。

### 1.7 卷丹多糖的单糖组成分析

用 PMP 柱前衍生化-高效液相色谱法分析 LP 的单糖组成<sup>[12]</sup>。分别配制浓度为 1.0 mg/mL 的各单糖标准品溶液和单糖混合标准品溶液。精密称取 20 mg 卷丹纯化多糖于安瓿瓶中,加入 2 mL 的 2 mol/L 三氟乙酸溶解,摇匀,封口,110 °C 水解 4 h,冷却后加 2 mL 甲醇,减压蒸干,重复 3 次以除去多余的三氟乙酸,采用蒸馏水配置成适当浓度的 LP 酸水解溶液。精密吸取 200 μL LP 酸水解溶液、各单糖标准溶液、单糖混合标准溶液于具塞试管中,分别加入 200 μL 的 0.3 mol/L NaOH 溶液、160 μL 的 0.5 mol/L PMP 甲醇溶液,混匀,70 °C 水浴加热 30 min,冷却至室温,加入 200 μL 的 0.3 mol/L HCl 溶液中和,分别加入 2 mL 水和氯仿进行萃取,强烈振荡,3 500 r/min 离心 5 min,弃去氯仿层,重复萃取 3

次,过滤后,上清液采用 HPLC 进样分析(Hedera C<sub>18</sub> 5 μm 色谱柱(250 mm × 4.6 mm)),流动相 A:0.1 mol/L 的磷酸二氢钾缓冲盐-水溶液(pH 6.7),流动相 B:乙腈,梯度洗脱:0~3 min,87% A;3~8 min,84% A;8~45 min,77% A;洗脱时间:45 min,流速:1.0 mL/min,进样量:10 μL,柱温:30 °C,检测波长:250 nm)。

通过下式计算多糖水解液中单糖组成的摩尔比:

$$\frac{m_a}{m_r_a} : \frac{m_b}{m_r_b} = \frac{w_a \times V}{m_r_a} : \frac{w_b \times V}{m_r_b} = \frac{w_a}{m_r_a} : \frac{w_b}{m_r_b}$$

式中  $m_a$ 、 $m_b$  为多糖水解液中各单糖的质量; $w_a$ 、 $w_b$  为多糖水解液中各单糖平均浓度; $V$  为多糖水解液的体积; $M_{r_a}$ 、 $M_{r_b}$  为多糖水解液中各单糖相应的摩尔质量。

### 1.8 卷丹多糖对 PM<sub>2.5</sub> 暴露致大鼠急性肺损伤的保护作用

#### 1.8.1 动物分组与造模

将 70 只 ICR 小鼠随机分为空白组(control group, Con)、模型组(model group, Mod)、地塞米松阳性药组<sup>[7]</sup>(positive drug group, Pos)、LW 低剂量组(LW-low dose group, LW-L)、LW 高剂量组(LW-high dose group, LW-H)、LP 低剂量组(LP-low dose group, LP-L)、LP 高剂量组(LP-high dose group, LP-H),每组 10 只。

采用智能中流 PM<sub>2.5</sub> 环境采样器于南京市收集制备 PM<sub>2.5</sub> 颗粒物,用生理盐水配制浓度为 6 mg/mL 的 PM<sub>2.5</sub> 混悬液,充分涡旋混匀。造模前将各组小鼠分别称重记录,空白组小鼠分别于模型建立的第 1、3、5、7 d 经单侧鼻腔滴入生理盐水(1.0 μL/kg);模型组小鼠分别于同一天经鼻腔滴入 PM<sub>2.5</sub> 混悬液(浓度 6.0 mg/mL,造模剂量为每次 6.0 mg/kg)<sup>[13,14]</sup>。阳性药组、LW 和 LP 组模型建立方法同模型组。

#### 1.8.2 给药方法

空白组、模型组小鼠自造模第 9 d 起,经口灌胃生理盐水 0.5 mL/d;阳性药组小鼠自造模第 9 d 起,经口灌胃浓度为 0.06 mg/mL 地塞米松溶液 0.5 mL/d,给药剂量为 1.0 mg/kg<sup>[7]</sup>;LW 低、高剂量组小鼠自造模第 9 d 起,经口灌胃浓度分别为 54.60、218.40 mg/mL LW 0.5 mL/d,给药剂量分别为 0.91、3.64 g/kg(相当于药典中卷丹饮片人日用剂量的 0.5、2 倍);LP 低、高剂量组小鼠自造模第 9 d

起,经口灌胃浓度分别为 10.16、40.64 mg/mL LP 溶液 0.5 mL/d,给药剂量分别为 0.17、0.68 g/kg。所有组别均持续灌胃给药 14 d。

### 1.8.3 各阶段体重变化

分别于动物模型建立的第 1 d(模型建立前)、第 8 d(模型建立完成后/给药前)、第 22 d(给药 14 d 完成后)记录各组小鼠各阶段的体重变化。

### 1.8.4 肺指数考察

小鼠末次给药 24 h 后处死,取材前对小鼠进行称重记录,打开胸腔摘取完整双肺,用 4 °C 生理盐水洗去残留血液,滤纸擦干。称取小鼠肺组织重量,按照公式计算肺指数<sup>[15]</sup>:肺指数 = 肺组织重(g)/体重(g) × 100%。

### 1.8.5 肺组织病理变化

取小鼠左侧肺组织,4% 多聚甲醛溶液中固定 48 h 后送样进行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色,病理切片在光学显微镜下放大 200 倍视野,观察肺组织结构变化和炎症浸润情况,并采用美国胸科协会(American Thoracic Society)的评分标准<sup>[16]</sup>,依据病情轻重对肺损伤情况进行定量分析。

### 1.8.6 肺组织中炎症因子含量水平

取各组小鼠右侧肺组织 50 mg,加入生理盐水制备 10% 的肺组织匀浆,离心取上清,采用 ELISA 试剂盒测定其中炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  的含量水平<sup>[17,18]</sup>,实验严格按照 ELISA 试剂盒说明书操作。

## 1.9 数据处理

实验数据采用 Excel 2021 软件处理分析,用 Graph pad Prism 8.0 软件作图,数值用平均值  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 SPSS 统计分析软件进行 t-test 统计分析,当  $P < 0.05$  时认为差异有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 LP 提取、纯化结果

200 g 卷丹饮片经水提醇沉法,制得 LP 36.97 g,得率为 18.49%。100 mg LP 经 DEAE-52 纤维素层析柱分离,去离子水和 0.4 mol/L 的 NaCl 溶液洗脱部位得到 2 个多糖组分,分别将其命名为 LP-1 和 LP-2(见图 1),其中制得 LP-1 87.24 mg,得率为 87.24%;制得 LP-2 4.32mg,得率为 4.32%。由于 LP-2 含量过低,不利于后续实验,所以选择 LP-1 进一步对其进行结构研究。

### 2.2 LP 纯化前后的多糖含量

采用苯酚-硫酸法测定总糖含量,以葡萄糖为对

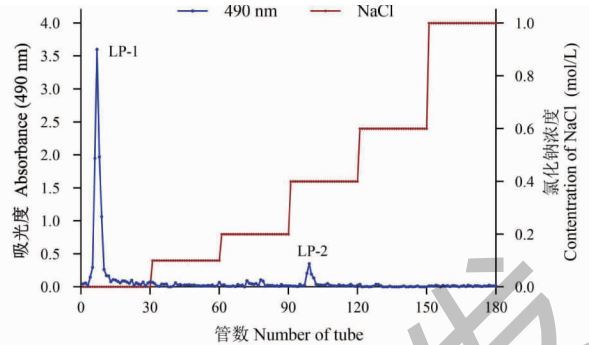


图 1 DEAE-52 纤维素柱洗脱曲线

Fig. 1 DEAE-52 cellulose column elution curve

照品,标准曲线为  $Y = 7.8473X + 0.0543$  ( $R^2 = 0.9992$ )。计算得到 LP 的总糖含量为  $(70.98 \pm 2.36)\%$ ,纯化后多糖组分 LP-1 的总糖含量为  $(95.20 \pm 2.90)\%$ ,可以进行进一步结构表征。

### 2.3 LP 的相对分子质量

以不同分子量的葡聚糖为对照品,HPLC 分析得到标准曲线为  $Y = -0.3624X + 10.5540$  ( $R^2 = 0.9938$ )。LP-1 的葡聚糖凝胶色谱图如图 2 所示,确定为单一组分, $T_R$  为 18.761 min,代入标准曲线,计算得到 LP-1 的相对分子量为 5906 Da。

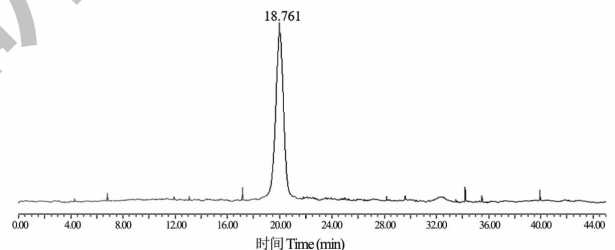


图 2 LP-1 的葡聚糖凝胶色谱图

Fig. 2 Glucan gel chromatogram of LP-1

### 2.4 卷丹多糖的单糖组成分析结果

如图 3 所示,按照单糖 PMP 衍生物保留时间先后指认出甘露糖(mannose, Man)、鼠李糖(rhamnose, Rha)、葡萄糖(glucose, Glc)、半乳糖(galactose, Gal)。随后,对 LP-1 酸水解产物 PMP 衍生物进样分析,指认出其单糖组成为 Man、Glc。甘露糖、葡萄糖在 50 ~ 500  $\mu\text{g/mL}$  浓度范围内样品浓度  $X$  与峰面积线性  $Y$  良好( $Y = 7051.4X - 18653$ ,  $R^2 = 0.9997$ ;  $Y = 4941.4X - 34991$ ,  $R^2 = 0.9989$ )。通过单糖标准曲线以及摩尔比的计算方法,得到 LP-1 的单糖组成为甘露糖和葡糖,二者的摩尔比为 1.00:2.01。LP-1 与 Song 等<sup>[19]</sup>从兰州百合中提取的多糖 LP-W 的单糖组成一致。

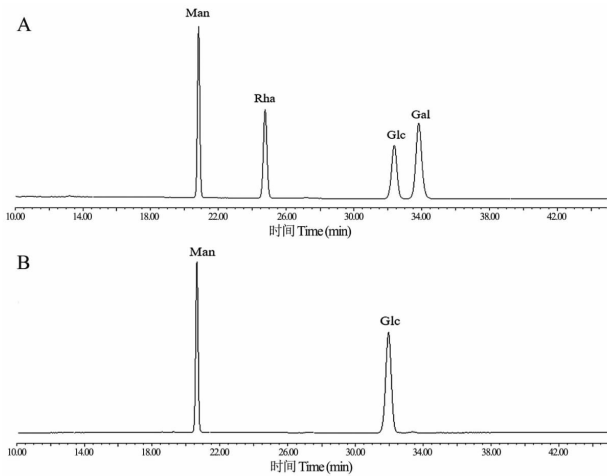


图3 单糖混合标准品酸水解衍生物(A)以及LP-1酸水解衍生物(B)的HPLC图谱

Fig. 3 HPLC chromatograph of monosaccharide mixed standard acid hydrolysis derivatives (A) and LP-1 acid hydrolysis derivatives (B)

## 2.5 LP对PM<sub>2.5</sub>暴露致大鼠急性肺损伤的保护作用

### 2.5.1 阶段体重变化情况

各组别小鼠各阶段体重变化如表1所示。第1d(造模前),各组间小鼠体重均无显著性差异( $P > 0.05$ ),个体健康程度良好。第8d(造模完成后,给药前),模型组、阳性药组、LW组与LP组体重显著低于空白组( $P < 0.01$ ),表明在造模8d过程中,肺损伤影响小鼠精神活动,饮水、进食量等,导致小鼠体重减小。第22d(给药后),模型组小鼠体重增势缓慢,与空白组相比,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ ),表明肺损伤病情持续延长加重,影响小鼠体重增长。阳性药组小鼠体重增势缓慢,可能因为地塞米松为糖皮质激素药物,对体重方面存在一定负面影响<sup>[20]</sup>。LW与LP低、高剂量组小鼠体重与空白组相比无明显差异( $P > 0.05$ ),与模型组和阳性药组相比均显著增长( $P < 0.01, P < 0.01$ )。

表1 小鼠各阶段体重变化( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 Weight changes of mice at different stages( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别 Group	造模前 Before molding	造模完成后 After molding	给药后 After administration
Con	26.40 ± 1.23	33.05 ± 2.37	36.94 ± 2.90
Mod	26.32 ± 1.96	28.16 ± 1.92 **	30.21 ± 1.32 **
Pos	26.26 ± 1.00	27.65 ± 1.66 **	30.87 ± 2.15 **
LW-L	26.33 ± 1.26	28.53 ± 1.58 **	33.96 ± 2.08 ###&
LW-H	26.26 ± 1.00	28.16 ± 1.12 **	34.17 ± 1.56 ###&
LP-L	26.29 ± 1.74	28.40 ± 2.08 **	35.29 ± 2.72 ###&
LP-H	25.98 ± 1.09	27.89 ± 1.16 **	33.44 ± 1.61 ###&

注:与Con比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与Mod比较,# $P < 0.05$ ,### $P < 0.01$ ;与Pos比较,& $P < 0.05$ ,&& $P < 0.01$ ;与相同给药剂量的LW-L或LW-H比较, $\Delta P < 0.05$ , $\Delta\Delta P < 0.01$ ;下同。

Note:Compared with Con,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;Compared with Mod,# $P < 0.05$ ,### $P < 0.01$ ;Compared with Pos,& $P < 0.05$ ,&& $P < 0.01$ ;Compared with LW-L or LW-H at the same dose, $\Delta P < 0.05$ , $\Delta\Delta P < 0.01$ ;The same below.

### 2.5.2 肺指数考察结果

各组别小鼠的肺指数情况如表2所示。模型组小鼠的肺指数与空白组相比明显增高( $P < 0.01$ ),表明PM<sub>2.5</sub>导致小鼠的肺组织受到损伤,表现出病理变化;阳性药组、LW与LP低、高剂量组小鼠的肺指数与模型组相比明显降低( $P < 0.01, P < 0.05, P < 0.01, P < 0.05, P < 0.01$ );LW、LP低剂量组与阳性药组相比无显著性差异,而二者高剂量组与阳性组相比均显著降低( $P < 0.01, P < 0.05$ )。

### 2.5.3 肺组织病理变化及评分结果

小鼠肺组织病理切片结果分别如图4所示,空

表2 小鼠肺指数变化( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Changes of lung index in mice( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别 Group	肺指数 Lung coefficient (%)
Con	0.4987 ± 0.0467
Mod	0.5644 ± 0.0477 **
Pos	0.4930 ± 0.0602 ##
LW-L	0.5086 ± 0.0211 #
LW-H	0.4771 ± 0.0445 ###&
LP-L	0.5016 ± 0.0458 #
LP-H	0.4798 ± 0.0337 ###&

白组(见图 4A)肺泡结构完整。而模型组(见图 4B)肺组织损害严重,大量炎症细胞渗出、充血和水肿,无完整肺泡结构,支气管管壁充血、增厚。阳性药组(见图 4C)肺组织损伤情况较弱,肺组织可见较完整肺泡结构,仅出现少量炎症细胞浸润,部分肺间质充血及炎症细胞渗出,支气管管壁轻度增厚。LW 低(见图 4D)、高(见图 4E)剂量组和 LP 低(见图 4F)、高(见图 4G)剂量组肺组织结构均相对完整,同样仅存在少量肺泡腔塌陷或膨胀,肺泡壁少许水肿、断裂和增厚,肺间质少量炎症细胞浸润,支气管

管壁未见明显充血、狭窄。

从表 3 的病理评分结果可以看出,相比于空白组,模型组小鼠的肺组织经  $PM_{2.5}$  滴鼻后病理损伤程度明显加重( $P < 0.01$ )。与模型组相比较,阳性药组、LW 以及 LP 低、高剂量组评分均显著降低( $P < 0.01$ ),但卷丹各治疗组的治疗效果还是略低于具有强效抗炎作用的地塞米松阳性药( $P < 0.01$ )。此外,LW 组、LP 组小鼠的肺组织病理损伤程度随给药剂量的递增而减轻,LW 高剂量组与 LP 低剂量组病理评分无显著性差异。

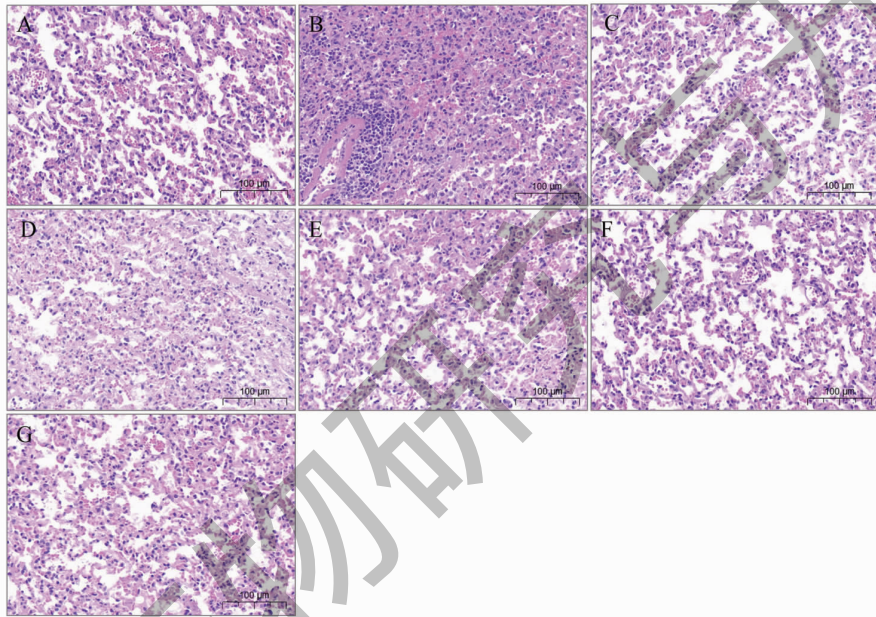


图 4 小鼠肺组织病理切片(HE,  $\times 200$ )

Fig. 4 Pathological section of lung tissue in mice (HE,  $\times 200$ )

注:A. Con; B. Mod; C. Pos; D. LW-L; E. LW-H; F. LP-L; G. LP-H。

表 3 小鼠肺组织切片病理评分( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 3 Lung tissue sections pathological scores of mice( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别 Group	病理评分 Pathological evaluation
Con	0.46 $\pm$ 0.08
Mod	2.58 $\pm$ 0.19 **
Pos	0.88 $\pm$ 0.06 ##
LW-L	1.64 $\pm$ 0.13 ##&&
LW-H	1.39 $\pm$ 0.12 ##&&
LP-L	1.86 $\pm$ 0.18 ##&& $\Delta$
LP-H	1.41 $\pm$ 0.09 ##&&

#### 2.5.4 肺组织中炎症因子含量

各组别小鼠的肺组织中炎症因子含量情况如表 4 所示。模型组小鼠肺组织中的炎症因子(TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ )含量相比于空白组明显增高( $P < 0.01$ ),证明经  $PM_{2.5}$  滴鼻后的肺组织病理持续损伤,产生大量炎症因子;阳性药组、LW 以及 LP 低、高剂量组小鼠的肺组织中的炎症因子含量相比于模型组显著降低( $P < 0.01, P < 0.05, P < 0.01, P < 0.05, P < 0.01$ ),表明 LW、LP 与地塞米松相似,均可以通过调控细胞因子分泌,达到降低  $PM_{2.5}$  致肺损伤小鼠体内炎症水平的目的。其中,在等效剂量下, LW 和 LP 组小鼠肺组织中炎症因子的含量水平无显著性差异,但均随给药剂量的递增而降低。

表4 小鼠肺匀浆中炎症因子含量( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )Table 4 The content of inflammatory factors in mouse lung homogenate( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别 Group	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	IL-6(pg/mL)	IL-1 $\beta$ (pg/mL)
Con	188.77 $\pm$ 11.03	43.29 $\pm$ 2.38	27.75 $\pm$ 2.64
Mod	279.99 $\pm$ 12.23 <sup>**</sup>	62.89 $\pm$ 2.14 <sup>**</sup>	42.58 $\pm$ 2.28 <sup>**</sup>
Pos	195.10 $\pm$ 10.72 <sup>##</sup>	41.51 $\pm$ 2.53 <sup>##</sup>	31.61 $\pm$ 1.72 <sup>##</sup>
LW-L	235.36 $\pm$ 31.14 <sup>##&amp;&amp;</sup>	52.67 $\pm$ 5.05 <sup>##&amp;&amp;</sup>	38.89 $\pm$ 3.80 <sup>##&amp;&amp;</sup>
LW-H	214.59 $\pm$ 20.53 <sup>##&amp;&amp;</sup>	46.49 $\pm$ 7.44 <sup>##&amp;&amp;</sup>	33.97 $\pm$ 3.10 <sup>##&amp;&amp;</sup>
LP-L	251.61 $\pm$ 26.47 <sup>##&amp;&amp;</sup>	56.05 $\pm$ 4.82 <sup>##&amp;&amp;</sup>	38.97 $\pm$ 2.93 <sup>##&amp;&amp;</sup>
LP-H	218.57 $\pm$ 17.79 <sup>##&amp;&amp;</sup>	46.90 $\pm$ 6.08 <sup>##&amp;&amp;</sup>	35.38 $\pm$ 2.75 <sup>##&amp;&amp;</sup>

### 3 讨论与结论

百合多糖因具有多种生物活性而越来越受到天然产物研究者的关注,并逐渐在药物、食品、保健品、绿色产品等领域上扮演着重要角色<sup>[21]</sup>。然而,药材基原的不同导致百合多糖在含量和化学结构特征上存在较大差异。不仅如此,不同品种百合多糖的相对分子量分布范围、单糖种类亦不同,这可能导致百合多糖的活性存在差异<sup>[22]</sup>。基于此,本研究以卷丹为研究对象,对其水提液中的卷丹多糖结构特征进行了分析。利用水提醇沉法及进行多糖提取,卷丹多糖得率为18.49%,采用苯酚-硫酸法测得总糖含量为(70.98  $\pm$  2.36)%。随后,利用纤维素层析法对其进行分离纯化,卷丹多糖的主成分LP-1得率为87.24%。对已报道的测定百合多糖的分子量文献进行总结<sup>[22]</sup>,发现百合多糖分子量在4 790 ~ 8.52  $\times 10^6$  Da不等,本研究采用葡聚糖凝胶色谱法测定得到LP-1分子量为5 906 Da。此外,采用PMP柱前衍生化测定得到卷丹多糖的单糖组成为甘露糖和葡萄糖,二者的摩尔比为1.00:2.01。但其单糖支链连接方式有待进一步深入研究。

为了探究卷丹在治疗急性肺损伤方面的药效物质基础,本研究以PM<sub>2.5</sub>暴露致急性肺损伤为疾病模型,开展了卷丹水提液及其多糖部位抗急性肺损伤的药效学研究。结果发现,与空白组相比较,模型组小鼠体重增势缓慢( $P < 0.01$ ),肺组织损伤严重,肺指数以及肺组织中的炎症因子水平增加( $P < 0.01$ )。与模型组相比较,卷丹水提液与多糖组小鼠体重显著增长( $P < 0.01$ ),阳性药(地塞米松)组以及卷丹水提液与多糖组小鼠肺组织结构均相对完整,肺指数、肺组织病理评分显著降低( $P < 0.05$ )。现有研究发现,巨噬细胞分泌的炎性细胞因子,特别

是TNF- $\alpha$ ,可诱导细胞的病理性内质网应激,而葡聚糖、甘露糖等可通过降低甘油醛3-磷酸水平直接抑制巨噬细胞TNF- $\alpha$ 的产生,从而使细胞内异常的免疫代谢正常化<sup>[22,23]</sup>。因此,为进一步验证PM<sub>2.5</sub>暴露造成的肺损伤情况以及卷丹多糖的干预作用,测定了小鼠肺组织匀浆中的炎症因子含量。结果发现卷丹水提液与多糖各剂量治疗组均能有效抑制小鼠肺部的炎症反应,显著降低TNF- $\alpha$ 、IL-6以及IL-1 $\beta$ 的含量,相比于模型组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),且卷丹水提液与多糖组小鼠肺组织中炎症因子的含量水平无显著性差异,表明多糖是卷丹水提液降低肺组织中的炎症反应,发挥抗炎活性,改善PM<sub>2.5</sub>暴露造成的肺损伤病情的重要药效物质基础。其详细的作用机制可能与卷丹中的甘露糖、葡萄糖含量有关。此外,实验还发现,卷丹水提液与多糖组小鼠的肺组织病理损伤程度及炎症因子含量随给药剂量的递增而减轻,表明二者在保护PM<sub>2.5</sub>暴露致急性肺损伤方面的治疗效果呈剂量依赖型。

综上所述,卷丹多糖的单糖组成为甘露糖:葡萄糖(1:2),分子量为5 906 Da,并且卷丹多糖有利于恢复PM<sub>2.5</sub>暴露致急性肺损伤小鼠的肺部功能,抑制肺部炎症反应,表明卷丹多糖可能是卷丹发挥肺损伤治疗效果的重要药效物质基础。

### 参考文献

- Delfino RJ, Staimer N, Tjoa T, et al. Associations of primary and secondary organic aerosols with airway and systemic inflammation in an elderly panel cohort [J]. *Epidemiology*, 2010, 21: 892-902.
- Xing YF, Xu YH, Shi MH, et al. The impact of PM<sub>2.5</sub> on the human respiratory system [J]. *J Thorac Dis*, 2016, 8: E69-

- E74.
- 3 Zhang J, Zeng X, Li Y, et al. Exposure to ambient particles alters the evolution of macrophage phenotype and amplifies the inducible release of eotaxin-1 in allergen-sensitized mice [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2019, 15:382-395.
  - 4 Pan W, Shi H, Zang Z, et al. Research progress on classical traditional Chinese medicine formula Baihe Zhimu (*Lilium lancifolium* bulb and *Anemarrhena asphodeloides* rhizome) decoction in the treatment of depression [J]. *Heliyon*, 2024, 10:e25171.
  - 5 Kwon OK, Lee MY, Yuk JE, et al. Anti-inflammatory effects of methanol extracts of the root of *Lilium lancifolium* on LPS-stimulated RAW264. 7 cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 130:28-34.
  - 6 Li CY, Peng J, Yu SY. Effects of liliu soup on lung histological structure in mice injured by ephedrine [J]. *Acta Anat Sin (解剖学报)*, 2017, 48:746-752.
  - 7 Lee E, Yun N, Jang YP, et al. *Lilium lancifolium* Thunb. extract attenuates pulmonary inflammation and air space enlargement in a cigarette smoke-exposed mouse model [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 149:148-156.
  - 8 Zhang M, Xu CC, Xu TZ, et al. Effect of Baihe Gujin Tang on LPS-induced acute lung injury in mice based on Nrf2/Keap1/p62 signaling pathway [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志)*, 2019, 25:77-82.
  - 9 Wong H, Zou S, Li J, et al. Lily bulb nectar produces expectorant and anti-tussive activities, and suppresses cigarette smoke-induced inflammatory response in the respiratory tract in mice [J]. *Chin Med*, 2015, 6:136.
  - 10 Hu ZD, Tian S, Miao YY, et al. Chemical composition, pharmacological research, and clinical application of Baihe [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med (中药药理与临床)*, 2022, 38:241-246.
  - 11 Cha SN, Su RN, Qi HRM, et al. Immunomodulatory effect of polysaccharides from *Rosa davurica* roots on immunosuppressed mice induced by cyclophosphamide [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2024, 36:196-205.
  - 12 Zhang J, Zhang QL, Lu FL, et al. Isolation, purification and immunomodulatory activity of polysaccharides from roots of *Siraitia grosvenorii* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2024, 55:1100-1109.
  - 13 Zhang SJ. Study on the protective mechanism of Hongjingqing-fei decoction on PM<sub>2.5</sub>-induced acute lung injury in mice based on energy metabolism [D]. Changchun: Changchun University of Chinese Medicine (长春中医药大学), 2023.
  - 14 Ai XF. Effect of Hongjingqingfei decoction on IL-1, IL-8 and SOD in lung tissue homogenate of ALI mice induced by PM<sub>2.5</sub> [D]. Changchun: Changchun University of Chinese Medicine (长春中医药大学), 2020.
  - 15 Yang Y, Shao JJ, Xu JK et al. Study on the active components and mechanism of *Callicarpa nudiflora* against H1N1 based on UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS, network pharmacology and experimental validation [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2024, 36:279-292.
  - 16 Izrael M, Molakandov K, Revel A, et al. Astrocytes downregulate inflammation in lipopolysaccharide-induced acute respiratory distress syndrome: applicability to COVID-19 [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2021, 8:740071.
  - 17 Pan G, Xie Z, Huang S, et al. Immune-enhancing effects of polysaccharides extracted from *Lilium lancifolium* Thunb. [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 52:119-126.
  - 18 Chen Z G, Zhang DN, Zhu Q, et al. Purification, preliminary characterization and *in vitro* immunomodulatory activity of tiger lily polysaccharide [J]. *Carbohydr Polym*, 2014, 106:217-222.
  - 19 Song S, Liu X, Zhao B, et al. Effects of *Lactobacillus plantarum* fermentation on the chemical structure and antioxidant activity of polysaccharides from bulbs of Lanzhou Lily [J]. *ACS Omega*, 2021, 6:29839-29851.
  - 20 Zhou Y. Preventive and therapeutic effect of the Deng-Shi-Qing-Mai Decoction on lung injury induced by PM<sub>2.5</sub> and its mechanism [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine (广州中医药大学), 2021.
  - 21 Liu WJ, Ma SB, Lu WF et al. Isolation and purification of Qi-Gui polysaccharides and their *in vitro* inhibitory activity on tumor cell proliferation [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2023, 35:1651-1658.
  - 22 Bai GJ, Chen SD, Zhang PZ et al. Research progress on chemical structure characterization and biological activities of Lili Bulbus polysaccharides [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2022, 53:6583-6592.
  - 23 Xiao P, Hu Z, Lang J, et al. Mannose metabolism normalizes gut homeostasis by blocking the TNF- $\alpha$ -mediated proinflammatory circuit [J]. *Cell Mol Immunol*, 2023, 20:119-130.