

## [制剂工艺]

## 甘青青兰多糖提取工艺优化及其对ConA诱导肝细胞损伤的保护作用

孙雪婷<sup>1,2</sup>, 郭敏<sup>1,2,3</sup>, 程标标<sup>1,2</sup>, 周珂雯<sup>1,2</sup>, 王艳霞<sup>1,2</sup>, 李晓东<sup>1,2,3\*</sup>(1. 甘肃中医药大学药学院, 甘肃兰州 730000; 2. 甘肃省中医院中药研究所, 甘肃兰州 730050;  
3. 甘肃省中医药研究院, 陇药大品种二次开发及临床疗效评价行业技术中心, 甘肃兰州 730050)

**摘要:** 目的 优化甘青青兰多糖提取工艺, 并评价其对刀豆蛋白 A (ConA) 诱导肝细胞损伤的保护作用。方法 在单因素试验基础上, 以 NaOH 溶液体积分数、提取时间、提取温度、液料比为影响因素, 总糖含量为评价指标, 响应面法优化提取工艺。CCK-8 法检测多糖对 AML12 细胞活性的影响, Hoechst 染色检测细胞凋亡, JC-1 染色评估线粒体膜电位, 检测细胞上清液 LDH、AST、ALT 水平。结果 最佳条件为 NaOH 溶液体积分数 5.52%, 提取时间 2 h, 提取温度 73 ℃, 液料比 14:1, 总糖含量为 32.95%。与对照组比较, 1、0.5、0.25 mg/mL 多糖组细胞存活率升高 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ); 与模型组比较, 1、0.5、0.25 mg/mL 多糖组 LDH、AST、ALT 水平降低 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。多糖干预后, 凋亡细胞数减少, 线粒体膜电位改善。结论 该方法稳定可靠, 可提取对 ConA 诱导肝细胞损伤有较强保护作用的甘青青兰多糖。

**关键词:** 甘青青兰; 多糖; 提取工艺; 响应面法; 刀豆蛋白 A (ConA); AML12 细胞; 肝细胞损伤**中图分类号:** R284.2      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1001-1528(2025)12-3915-08**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.12.005

## Optimization of extraction process for polysaccharides from *Dracocephalum tanguticum* and its protective effects against ConA-induced hepatocyte injury

SUN Xue-ting<sup>1,2</sup>, GUO Min<sup>1,2,3</sup>, CHENG Biao-biao<sup>1,2</sup>, ZHOU Ke-wen<sup>1,2</sup>, WANG Yan-xia<sup>1,2</sup>, LI Xiao-dong<sup>1,2,3\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2. Institute of Chinese Materia Medica, Gansu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730050, China; 3. Professional Tech-Center for Secondary Development and Clinical Evaluation of Major Varieties of Gansu Medicinal Products, Gansu Academy of Chinese Medicine, Lanzhou 730050, China)

**ABSTRACT: AIM** To optimize the extraction process for polysaccharides from *Dracocephalum tanguticum* Maxim. and to evaluate its protective effects against concanavalin A (ConA)-induced hepatocyte injury.

**METHODS** On the basis of single factor test, volume fraction of NaOH solution, extraction time, extraction temperature and liquid-solid ratio as influencing factors, total polysaccharides content as an evaluation indice, the extraction process was optimized by response surface method. CCK-8 assay was applied to detecting the effects of polysaccharides on AML12 cell viability, Hoechst staining was adopted in the detection of cell apoptosis, JC-1 staining was used for assessing mitochondrial membrane potential, after which LDH, AST and ALT levels in the cell supernatants were detected. **RESULTS** The optimal conditions were determined to be 5.52% for volume fraction of NaOH solution, 2 h for extraction time, 73 ℃ for extraction temperature, and 14:1 for liquid-solid ratio, the total polysaccharides content was 32.95%. Compared with the control group, the 1, 0.5, 0.25 mg/mL polysaccharides groups demonstrated increased cell survival rate ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ); compared with the model group, the 1, 0.5, 0.25 mg/mL polysaccharides groups exhibited decreased LDH, AST, ALT levels ( $P<0.05$ ,

**收稿日期:** 2025-08-13**基金项目:** 国家自然科学基金项目(82160818); 甘肃省自然科学基金项目(22JR5RA622); 兰州市科技计划项目(2025-2-146)**作者简介:** 孙雪婷(1998—), 女, 硕士, 研究方向为中药功效及其安全性评价。Tel: 18795191546, E-mail: sunxueting1003@163.com**\*通信作者:** 李晓东(1979—), 男, 博士, 研究员, 从事中藏药及其制剂临床前证候性效评价、作用机制研究。Tel: 15002532268,

E-mail: li\_xd2005@126.com

$P<0.01$ ). After the intervention of polysaccharides, reduced cell apoptosis count and improved mitochondrial membrane potential were observable. **CONCLUSION** This stable and reliable method can be used for the extraction of polysaccharides from *D. tanguticum* with strong protective effects against ConA-induced hepatocyte injury.

**KEY WORDS:** *Dracocephalum tanguticum* Maxim.; polysaccharides; extraction process; response surface method; concanavalin A (ConA); AML12 cells; hepatocyte injury

自身免疫性肝炎是一种罕见的免疫介导肝脏炎症性疾病，患者大多需终身治疗<sup>[1]</sup>，目前临床上主要采用激素类药物和硫唑嘌呤干预，但大约10%~20%的患者无法缓解，甚至会出现严重副作用<sup>[2]</sup>。现代研究证实，多糖对肝损伤具有预防、治疗作用，可通过减轻脂肪堆积变性、调节肠道菌群、抗氧化、促进肝细胞增殖等来发挥保肝功效<sup>[3-6]</sup>。

甘青青兰 *Dracocephalum tanguticum* Maxim. 为青藏地区特有的药用植物，《中华人民共和国卫生部药品标准（藏药）》第一册中载有200个相关藏药制剂<sup>[7]</sup>。它作为藏族常用药材<sup>[3]</sup>，功效清肝热、干黄水、愈疮、止血等<sup>[8-10]</sup>，主要用于治疗胃炎、肝炎、愈疮、关节炎等疾病<sup>[11]</sup>，含有黄酮苷、多糖、挥发油、氨基酸等成分，其中多糖具有调节人体免疫力、抗肿瘤、降血脂、保肝等活性<sup>[12-13]</sup>。

研究表明，碱提法可有效提取多糖<sup>[14-15]</sup>，显著提高其含量。因此，本实验采用碱提法提取甘青青兰多糖，响应面法对其进行优化，并探讨该成分对肝损伤的保护作用，以期为其进一步开发利用提供依据。

## 1 材料

1.1 试剂 *D*-无水葡萄糖对照品(批号080M00143V)购自上海源叶生物科技有限公司。硫酸(批号2021110502)购自成都市科隆化学品有限公司；苯酚(分析纯，批号20180315)购自天津市大茂化学试剂厂；NaOH(分析纯，批号20240527)、冰醋酸(分析纯，批号20241213)、石油醚(分析纯，批号20240223)、无水乙醇(分析纯，批号20250214)均购自国药集团化学试剂有限公司；牛血清白蛋白(批号54240408008)、线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1，批号2500030003)、透析袋MD44(截留分子量3 500 Da，批号2540702001)、考马斯亮蓝G-250(批号34240720022)均购自北京索莱宝科技有限公司；刀豆蛋白A(ConA)(货号C2010)购自美国Sigma公司；CCK-8高灵敏快速检测试剂盒(批号CR2411097)、0.25%胰蛋白酶消化液(批号GA2410020)、DMEM/F-12(批号

GP2409003)、ITS液体培养基补充剂(批号GP2411029)、胎牛血清(批号SO20240807)均购自武汉赛维尔生物科技有限公司；地塞米松磷酸钠注射液(国药准字H12020515)购自津药和平(天津)制药有限公司；AST试剂盒(批号20250328)、ALT试剂盒(批号20250328)、LDH乳酸脱氢酶试剂盒(批号20250325)均购自南京建成生物工程研究所。

1.2 仪器 3-18KS高速冷冻离心机购自美国Sigma公司；UV-1800紫外分光光度计购自日本岛津公司；DZKW-4电子恒温水浴锅购自黄骅市新兴仪器厂；Scientz-18N冷冻干燥机购自宁波新芝生物科技股份有限公司；HZQ-FX恒温摇床购自上海晶柱仪器制造有限公司；MCO-18AIC CO<sub>2</sub>培养箱、细胞计数仪均购自美国Thermo公司；NW20VF纯水机购自力新仪器上海有限公司；SW-CJ-2FD洁净工作台购自苏净集团苏州安泰空气技术有限公司；Sunrise酶标仪购自帝肯贸易有限公司；Olympus CKX41荧光倒置显微镜购自甘肃嘉瑞贸易有限责任公司。

1.3 药材 甘青青兰(批号GQQL-240501)购自甘肃省众翔生物科技有限公司，经甘肃省药品检验研究院宋平顺主任药师鉴定为正品。

1.4 细胞 AML12细胞(批号202312016)购自武汉赛维尔生物科技有限公司。

## 2 方法与结果

2.1 总糖含量测定 采用苯酚-硫酸法<sup>[16]</sup>。

2.1.1 对照品溶液制备 精密称取葡萄糖对照品10.00 mg，置于100 mL量瓶中，制成0.1 mg/mL的溶液，即得。

2.1.2 供试品溶液制备 精密称取多糖10.00 mg，置于100 mL量瓶中，制成0.1 mg/mL的溶液，即得。

2.1.3 线性关系考察 分别精密吸取对照品溶液0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 mL，蒸馏水补足至1 mL，加入1 mL 5%苯酚溶液，摇匀，迅速加入5 mL浓硫酸，静置10 min，

混合均匀，在60℃恒温水浴锅中水浴15 min，取出，冷却至室温，在490 nm波长处测定吸光度。分别以葡萄糖含量、吸光度为横坐标(X)、纵坐标(A)进行回归，得方程为 $A = 9.8723X + 0.0775$  ( $R^2 = 0.9984$ )，在0~0.09 mg/mL范围内线性关系良好。

**2.1.4 精密度试验** 精密吸取供试品溶液1 mL，按“2.1.3”项下方法测定6次吸光度，测得其RSD为0.52%，表明仪器精密度良好。

**2.1.5 稳定性试验** 精密吸取供试品溶液1 mL，于0、2、4、6、8、10 h按“2.1.3”项下方法测定吸光度，测得其RSD为2.14%，表明溶液在10 h内稳定性良好。

**2.1.6 重复性试验** 精密称取多糖6份，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.1.3”项下方法测定吸光度，测得其RSD为2.27%，表明该方法重复性良好。

**2.1.7 加样回收率试验** 精密称取含量已知的多糖6份，按100%水平精密加入对照品溶液，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.1.3”项下方法测定吸光度，测得其平均加样回收率为99.27%，RSD为0.83%。

**2.2 总蛋白含量测定** 采用考马斯亮蓝法<sup>[17]</sup>。以牛血清白蛋白含量为横坐标(X)，吸光度为纵坐标(A)进行回归，得方程为 $A = 0.0066X + 0.598$  ( $R^2 = 0.9943$ )，在0~100 μg范围内线性关系良好。

**2.3 药材预处理** 药材粉碎后过60目筛，石油醚(30~60℃，料液比1:5)脱脂，室温摇床3次，每次2 h，再加入95%乙醇(料液比1:4)，室温摇床3次，每次2 h，真空抽滤，收集残渣，自然风干，以除去脂质、色素、单糖、低聚糖和其他小分子量杂质，保存。

**2.4 多糖提取** 将预处理后的药材粉末用碱液提取2次，过滤，收集滤液，40%醋酸调pH至中性，溶液浓缩到原始体积的1/3，加4倍量无水乙醇混合，在4℃下保存过夜，5 000 r/min离心5 min，收集沉淀，挥去醇味，冷冻干燥，即得粗多糖。

## 2.5 单因素试验

**2.5.1 NaOH溶液体积分数** 固定提取温度70℃，提取时间1.5 h，液料比20:1，提取次数2次，分别考察1%、3%、5%、7%、9%NaOH溶液对总糖含量的影响，结果见图1。由此可知，随着NaOH溶液体积分数增加，总糖含量呈现先升高后

降低的趋势，为7%时达到最大值。综合考虑，选择3%、5%、7%作为响应面法因素水平。

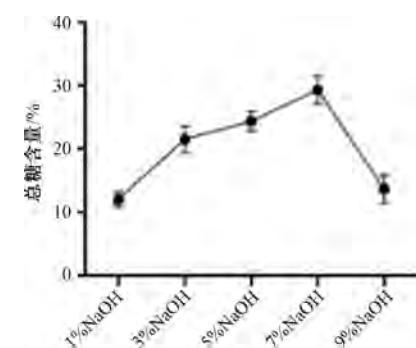


图1 NaOH溶液体积分数对总糖含量的影响

Fig. 1 Effect of volume fraction of NaOH solution on total polysaccharides content

**2.5.2 提取温度** 固定NaOH溶液体积分数7%，提取时间1.5 h，液料比20:1，提取次数2次，分别考察在50、60、70、80、90℃下提取对总糖含量的影响，结果见图2。由此可知，提取温度为50~70℃时，总糖含量呈升高趋势，但为70~90℃时反而降低，其原因可能为温度增加时可提高多糖溶解度，加快后者分子运动，从而使其更快地溶出，但过高时其分子结构可能会被破坏，导致含量降低。综合考虑，选择60、70、80℃作为响应面法因素水平。

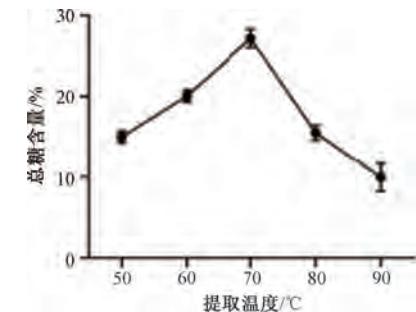


图2 提取温度对总糖含量的影响

Fig. 2 Effect of extraction temperature on total polysaccharides content

**2.5.3 提取时间** 固定NaOH溶液体积分数7%，提取温度70℃，液料比20:1，提取次数2次，分别考察提取0.5、1、1.5、2、2.5 h时对总糖含量的影响，结果见图3。由此可知，随着提取时间延长，总糖含量呈现先升高后降低的趋势，为2.5 h时达到最大值，其原因可能是提取时间延长有助于多糖溶出，但过长时会使其他杂质溶出，导致该类成分含量降低。综合考虑，选择1.5、2、2.5 h作为响应面法因素水平。

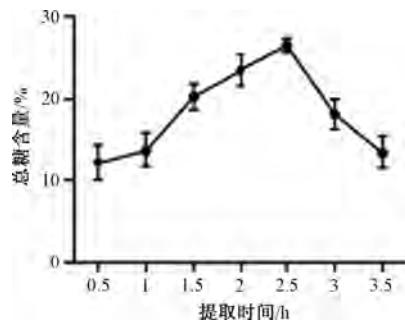


图3 提取时间对总糖含量的影响

Fig.3 Effect of extraction time on total polysaccharides content

2.5.4 液料比 固定NaOH溶液体积分数7%，提取时间2.5 h，提取温度70 ℃，提取次数2次，分别考察液料比10:1、15:1、20:1、25:1、30:1对总糖含量的影响，结果见图4。由此可知，随着液料比增加，总糖含量呈现先升高后降低的趋势，为20:1时达到最大值，其原因可能是随着溶剂体积增加料液混合更充分，两者接触面积变大，加速目标物质传质，有助于多糖溶出；但液料比继续升高时，过多的溶剂可能会导致其他水溶性杂质溶出增加，使得该类成分含量降低。综合考虑，选择10:1、15:1、20:1作为响应面法因素水平。

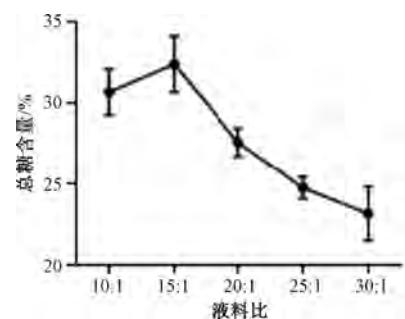


图4 液料比对总糖含量的影响

Fig.4 Effect of liquid-solid ratio on total polysaccharides content

2.6 响应面法 在单因素试验基础上，以NaOH溶液体积分数(A)、提取时间(B)、提取温度(C)、液料比(D)为影响因素，总糖含量(Y)为评价指标，采用Design-expert 13.0软件设计，因素水平见表1，结果见表2。

采用Design-Expert 13.0软件对表2数据进行拟合，得方程为 $Y=34.81+1.49A+0.5008B+3.57C-0.8742D+0.8125AB-0.1875AC-1.87AD-1.35BC+0.5250BD+0.8675CD-3.82A^2-2.83B^2-4.65C^2-1.81D^2$ ，方差分析见表3。由此可知，模型 $P<0.01$ ，具有高度显著性；失拟项 $P>0.05$ ，表示模

表1 响应面法因素水平

Tab.1 Factors and levels for response surface method

因素	水平		
	-1	0	1
A NaOH溶液体积分数/%	3	5	7
B 提取时间/h	1.5	2	2.5
C 提取温度/℃	60	70	80
D 液料比	10:1	15:1	20:1

表2 响应面法设计及结果

Tab.2 Design and results for response surface method

试验号	A NaOH溶液 体积分数/%	B 提取 时间/h	C 提取 温度/℃	D 液料比	Y 总糖 含量/%
1	3	1.5	70	15:1	25.68
2	7	1.5	70	15:1	27.15
3	3	2.5	70	15:1	25.97
4	7	2.5	70	15:1	30.69
5	5	2	60	10:1	26.93
6	5	2	80	10:1	30.74
7	5	2	60	20:1	22.66
8	5	2	80	20:1	29.94
9	3	2	70	10:1	26.72
10	7	2	70	10:1	32.34
11	3	2	70	20:1	30.01
12	7	2	70	20:1	28.17
13	5	1.5	60	15:1	21.93
14	5	2.5	60	15:1	25.41
15	5	1.5	80	15:1	32.19
16	5	2.5	80	15:1	30.27
17	3	2	60	15:1	20.67
18	7	2	60	15:1	25.03
19	3	2	80	15:1	29.36
20	7	2	80	15:1	32.97
21	5	1.5	70	10:1	32.34
22	5	2.5	70	10:1	31.60
23	5	1.5	70	20:1	29.02
24	5	2.5	70	20:1	30.38
25	5	2	70	15:1	35.16
26	5	2	70	15:1	33.82
27	5	2	70	15:1	35.26
28	5	2	70	15:1	33.96
29	5	2	70	15:1	35.85

型拟合度良好<sup>[18]</sup>；相关系数 $R^2=0.9518$ ，变异系数 $CV=4.26\%$ ，表明模型拟合情况理想，可用于预测分析；因素D、AD、BC具有显著影响( $P<0.05$ )，A、C、 $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$ 、 $D^2$ 具有极显著影响( $P<0.01$ )；各因素影响程度依次为 $C>A>D>B$ 。

响应面分析<sup>[19]</sup>见图5，可知各交互因素的影响程度依次为 $AD>BC>CD>AB>BD>AC$ 。

采用Design-Expert 13.0软件确定最优工艺为NaOH溶液体积分数5.52%，提取温度73.49 ℃，提取时间2.01 h，液料比13.55:1，总糖含量为35.75%，根据实际操作可行性，将其修正为NaOH

表3 方差分析结果

Tab. 3 Results for analysis of variance

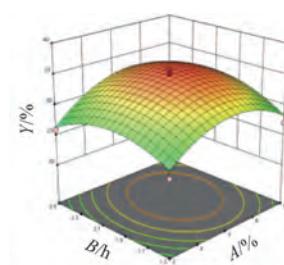
来源	离均差平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	434.02	14	31.00	19.74	<0.000 1
A	26.82	1	26.82	17.07	0.001 0
B	3.01	1	3.01	1.92	0.187 9
C	152.94	1	152.94	97.36	<0.000 1
D	9.17	1	9.17	5.84	0.029 9
AB	2.64	1	2.64	1.68	0.215 8
AC	0.140 6	1	0.140 6	0.089 5	0.769 2
AD	13.91	1	13.91	8.86	0.010 0
BC	7.29	1	7.29	4.64	0.049 1
BD	1.10	1	1.10	0.701 9	0.416 2
CD	3.01	1	3.01	1.92	0.187 9
$A^2$	94.51	1	94.51	60.17	<0.000 1
$B^2$	52.07	1	52.07	33.15	<0.000 1
$C^2$	140.23	1	140.23	89.27	<0.000 1
$D^2$	21.15	1	21.15	13.47	0.002 5
残差	21.99	14	1.57	—	—
失拟项	18.88	10	1.89	2.43	0.203 5
纯误差	3.11	4	0.777 3	—	—
总差	456.01	28	—	—	—

溶液体积分数 5.52%，提取时间 2 h，提取温度 73 °C，液料比 14 : 1。按上述优化工艺进行 5 批验证试验，测得总糖平均含量为 32.95%，与预测值 35.75% 接近，表明该模型可用于预测实际数据。

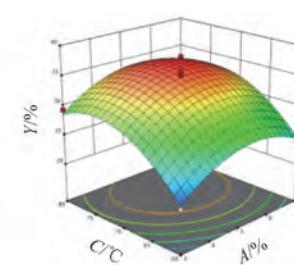
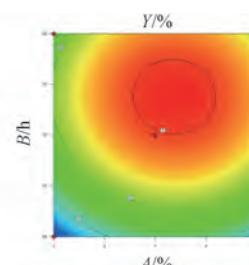
**2.7 多糖纯化** 按“2.6”项下最优工艺提取多糖 2 次，合并滤液，40% 醋酸调 pH 至中性，浓缩至原始体积的 1/3，加 4 倍量无水乙醇至醇沉体积分数为 80%，在 4 °C 下保存过夜，5 000 r/min 离心 5 min，收集沉淀，挥去醇味，冷冻干燥得粗多糖，透析 48 h，冷冻干燥，测得总糖含量为 54.32%，但蛋白质含量仅为 2.15%。

**2.8 多糖对 ConA 诱导肝细胞损伤的保护作用研究**

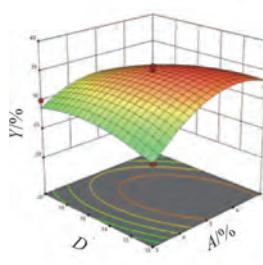
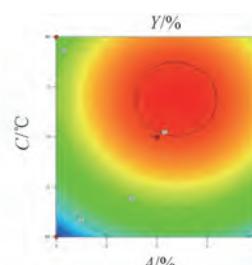
**2.8.1 多糖对正常肝细胞的影响** 采用含 10% FBS、1% ITS 液体培养基补充剂、40 ng/mL 地塞米松磷酸钠的 DMEM/F-12 培养基，以 80% 的密度培养 AML12 细胞至第 10 代，置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中，取对数生长期者，以 3 000/孔密度接



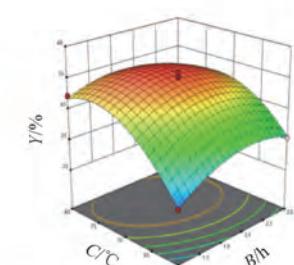
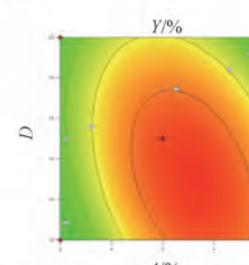
a. AB 交互作用



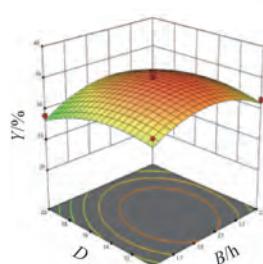
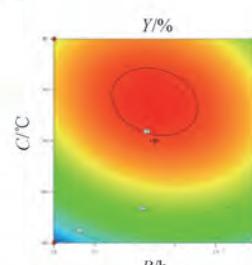
b. AC 交互作用



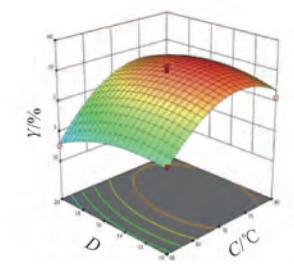
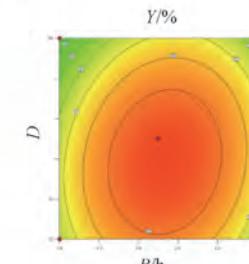
c. AD 交互作用



d. BC 交互作用



e. BD 交互作用



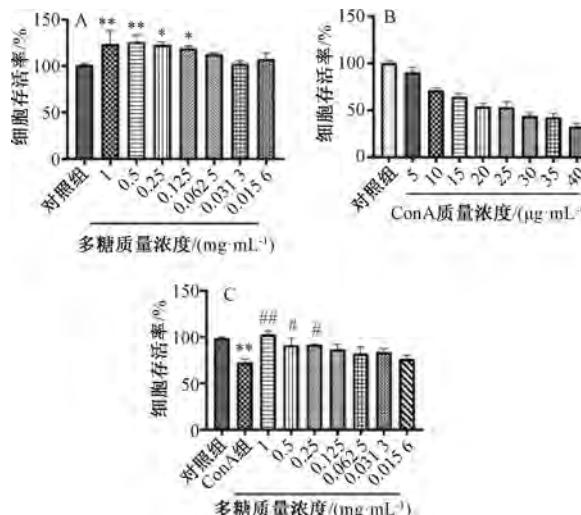
f. CD 交互作用

注：A、B、C、D、Y 分别为 NaOH 溶液体积分数、提取时间、提取温度、液料比、总糖含量。各小图中，左边为三维曲面图，右边为等高线图。

图 5 各因素响应面图

Fig. 5 Response surface plots for various factors

种在96孔板中。再将细胞分别接触不同质量浓度(0.0156、0.0313、0.0625、0.125、0.25、0.5、1mg/mL)多糖24h，发现后者不仅对前者没有毒性作用，而且在1、0.5、0.25、0.125mg/mL下有显著促增殖作用( $P<0.05$ )，见图6A。



注：与对照组比较，\* $P<0.05$ ，\*\* $P<0.01$ ；与ConA组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。

图6 甘青青兰多糖对ConA诱导肝细胞损伤的保护作用

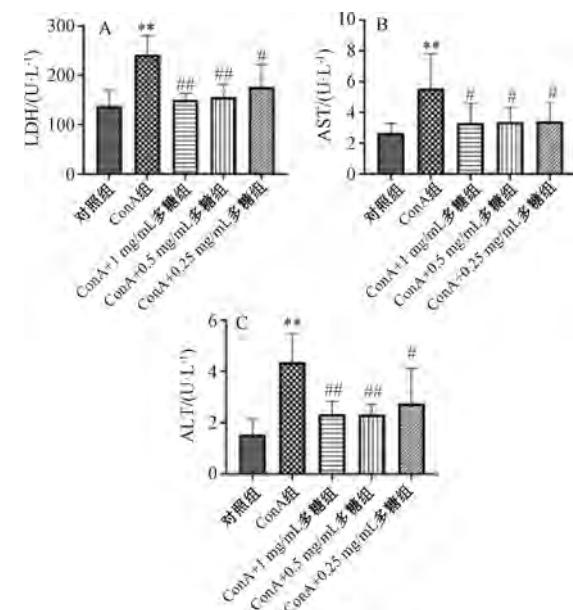
Fig. 6 Protective effects of polysaccharides from *D. tanguticum* against ConA-induced hepatocyte injury

2.8.2 肝细胞损伤模型建立 取对数生长期AML12细胞，以 $1.0\times10^4$ /孔密度接种于96孔板中，每孔100 $\mu$ L，置于CO<sub>2</sub>培养箱中孵育12h，分别用不同质量浓度(0、5、10、15、20、25、30、35、40 $\mu$ g/mL)ConA刺激24h，结果见图6B。由此可知，细胞存活率随着ConA质量浓度增加而逐渐降低，表明模型建立成功，最终确定为10 $\mu$ g/mL。

2.8.3 多糖对ConA损伤肝细胞的影响 取对数生长期AML12细胞，以 $1.0\times10^4$ 个/孔密度接种于96孔板中，每孔100 $\mu$ L，置于CO<sub>2</sub>培养箱中孵育12h，对照组采用不含多糖的完全培养基，置于CO<sub>2</sub>培养箱中培养24h；ConA组采用不含多糖的完全培养基，置于CO<sub>2</sub>培养箱中培养3h后建立模型；甘青青兰多糖组分别加入不同质量浓度(0.0156、0.0313、0.0625、0.125、0.25、0.5、1mg/mL)多糖干预3h，以ConA(10 $\mu$ g/mL)刺激24h后收集细胞，结果见图6C。由此可知，细胞存活率随着多糖质量浓度增加而升高，并呈剂量依赖性，在1、0.5、0.25mg/mL下更明显( $P<0.05$ )。

2.8.4 细胞存活率检测 细胞培养结束后，在各孔中加入10 $\mu$ L CCK-8，静置2h，在酶标仪上于450nm波长处测定吸光度。

2.8.5 细胞上清液LDH、AST、ALT水平检测 取对数生长期AML12细胞，以 $5\times10^4$ /孔密度接种于24孔培养板中，每孔500 $\mu$ L，置于CO<sub>2</sub>培养箱中孵育12h，分为正常组(正常培养细胞)、ConA组(10 $\mu$ g/mL ConA)、甘青青兰多糖组(10 $\mu$ g/mL ConA+1mg/mL多糖、10 $\mu$ g/mL ConA+0.5mg/mL多糖、10 $\mu$ g/mL ConA+0.25mg/mL多糖)，干预24h，收集细胞上清液至1.5mL EP管中，4000r/min离心5min，加到新的1.5mL EP管中，采用相应试剂盒检测ALT、AST、LDH水平，结果见图7。由此可知，与对照组比较，ConA组细胞上清液LDH水平升高( $P<0.01$ )，而多糖干预后降低( $P<0.05$ )；ConA组细胞上清液AST、ALT水平高于对照组( $P<0.01$ )，而多糖干预后降低( $P<0.05$ )。



注：与对照组比较，\*\* $P<0.01$ ；与ConA组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。

图7 甘青青兰多糖对细胞上清液LDH、AST、ALT水平的影响

Fig. 7 Effects of polysaccharides from *D. tanguticum* on LDH, AST and ALT levels in cell supernatant

2.8.6 多糖对肝细胞凋亡的影响 按“2.8.5”项下方法处理细胞24h后，吸除培养液，PBS缓冲液洗涤3次，每孔加入200 $\mu$ L Hoechst 33258染色液并确保完全覆盖细胞单层，置于CO<sub>2</sub>培养箱中避光孵育30min，吸去染色液，预冷PBS缓冲液洗涤2次，在荧光显微镜下对细胞核形态进行观

察,结果见图8。由此可知,正常组细胞蓝色荧光非常微弱,表明细胞核结构正常;ConA组细胞呈现亮蓝色碎片或不规则状细胞核;多糖干预后亮蓝色细胞核减少,表明凋亡细胞减少。

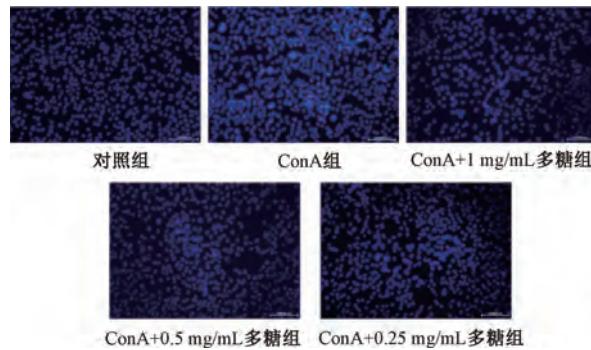


图8 甘青青兰多糖对肝细胞凋亡的影响 ( $\times 100$ )

Fig. 8 Effect of polysaccharides from *D. tanguticum* on hepatocyte apoptosis ( $\times 100$ )

2.8.7 多糖对肝细胞线粒体膜电位的影响 按“2.8.5”项下方法处理细胞,干预24 h后吸除培养液,PBS洗涤2次,每孔加入200  $\mu$ L JC-1染色工作液,轻柔混匀,置于37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中避光孵育20 min,其间按1:4比例稀释染色缓冲液(5x)作为1x工作液,冰上预冷,孵育结束后吸弃染色液,预冷(4  $^{\circ}$ C)染色缓冲液(1x)洗涤2次,立即在荧光显微镜下观察并拍照,结果见图9。由此可知,与对照组比较,ConA组细胞表现出明显的红色荧光减弱和绿色荧光增强,表明JC-1主要以单体形式存在,无法在线粒体基质中形成聚合物,即线粒体膜电位显著降低;与ConA组比较,多糖干预后细胞红色荧光增强而绿色荧光减弱,表明JC-1主要以聚合物形式聚集在线粒体基质中,即线粒体膜电位部分恢复,提示多糖可能通过调控线粒体介导的凋亡途径发挥作用<sup>[20]</sup>。

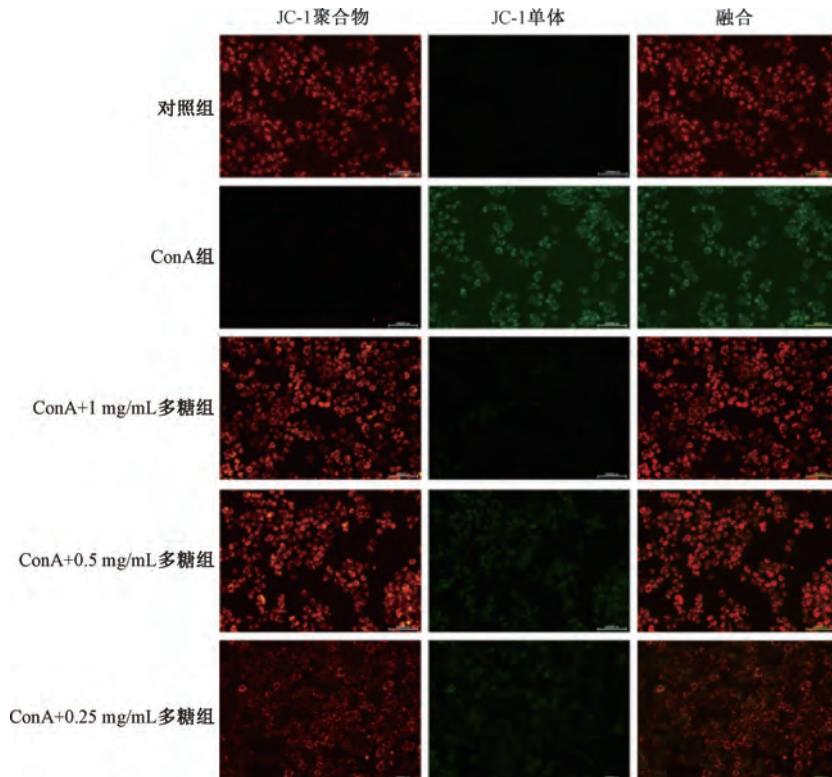


图9 甘青青兰多糖对肝细胞线粒体膜电位的影响 ( $\times 100$ )

Fig. 9 Effect of polysaccharides from *D. tanguticum* on mitochondrial membrane potential in hepatocytes ( $\times 100$ )

### 3 讨论

在自身免疫性肝炎发生过程中,肝细胞是受损靶细胞,免疫细胞激活可导致其凋亡,故减轻肝细胞凋亡、抑制免疫应答细胞功能是本病治疗思路。另外,细胞凋亡的失调可能是自身免疫性肝炎发生发展的关键因素<sup>[21]</sup>,涉及外源性、内源性途径,

其中肝细胞表面死亡受体激活导致外源途径肝细胞凋亡,而线粒体受到刺激后引起内源性凋亡<sup>[22]</sup>。

本实验建立ConA诱导的肝细胞损伤模型,发现甘青青兰多糖可促进AML12细胞增殖,即对肝损伤具有保护作用,其机制可能为抗炎和调节免疫。另外,Hoechst染色显示,甘青青兰多糖可减

少凋亡细胞比例；JC-1染色显示，该成分可使线粒体膜电位升高，可能与线粒体介导的凋亡有关。因此，上述结果可为甘青青兰多糖开发应用提供理论依据和技术支持。

## 参考文献：

- [1] Nur Dagli S, Efe C. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) in autoimmune hepatitis[J]. *Hepatol Forum*, 2022, 26, 3(2): 68-70.
- [2] Vergani D, Terzioli Beretta-Piccoli B, Mieli-Vergani G. A reasoned approach to the treatment of autoimmune hepatitis[J]. *Dig Liver Dis*, 2021, 53(11): 1381-1393.
- [3] 安拉太, 张思德, 秀老, 等. 含甘青青兰藏药方剂的配伍规律及临床用药研究[J]. 中医药导报, 2022, 28(12): 148-152.
- [4] 韩琳. 大豆种皮多糖对肝损伤防护的机制研究[D]. 锦州: 渤海大学, 2021.
- [5] Fan J L, Wu Z W, Zhao T H, et al. Characterization, antioxidant and hepatoprotective activities of polysaccharides from *Ilex latifolia* Thunb[J]. *Carbohydr Polym*, 2014, 101: 990-997.
- [6] Wu Q W, Liu C, Zhang J, et al. Schisandra chinensis polysaccharide protects against cyclosporin A-induced liver injury by promoting hepatocyte proliferation[J]. *J Funct Foods*, 2021, 87: 104799.
- [7] 次旦南卓, 米玛, 侯豹, 等. 甘青青兰多糖对脂多糖诱导小鼠脓毒症心肌损伤的保护作用[J]. 华西药学杂志, 2024, 39(3): 279-284.
- [8] 扎西次仁, 次旦, 赵翔, 等. 藏药材甘青青兰的本草考证[J]. 中国民族医药杂志, 2022, 28(1): 43-46.
- [9] 占堆, 巴桑, 何军伟. 藏药甘青青兰乙酸乙酯部位化学成分研究[J]. 中药材, 2020, 43(11): 2688-2691.
- [10] 高生英, 叶菊, 才让南加, 等. 藏药甘青青兰多糖提取工艺优化及含量测定[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(2): 892-895.
- [11] 邱艳, 李立敬, 邓翔, 等. 甘青青兰多糖的抗炎、抗应激及镇痛的药效学研究[J]. 甘肃医药, 2021, 40(1): 5-8.
- [12] 李晓东, 谷丽维, 黄聪琳, 等. 唐古特青兰及其复方制剂效用物质研究进展[J]. 西部中医药, 2019, 32(9): 139-144.
- [13] 刘建英, 刘玉梅. 青兰属植物的化学成分及药理作用研究进展[J]. 食品科学, 2012, 33(13): 314-319.
- [14] Chen H, Sun J, Liu J Y, et al. Structural characterization and anti-inflammatory activity of alkali-soluble polysaccharides from purple sweet potato[J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 131: 484-494.
- [15] Zhang N, Chen H X, Ma L S, et al. Physical modifications of polysaccharide from *Inonotus obliquus* and the antioxidant properties[J]. *Int J Biol Macromol*, 2013, 54: 209-215.
- [16] 陈文博. 西藏绵头雪莲花多糖的结构鉴定及生物活性的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2020.
- [17] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254.
- [18] 李海燕, 范明辉, 时薛丽, 等. 响应面法优化当归多糖超声提取工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(12): 159-163.
- [19] Li P Q, Zhou L G, Mou Y, et al. Extraction optimization of polysaccharide from *Zanthoxylum bungeanum* using RSM and its antioxidant activity[J]. *Int J Biol Macromol*, 2015, 72: 19-27.
- [20] 沈梦益. 白芍总苷干预自身免疫性肝炎的机制研究[D]. 成都: 四川大学, 2021.
- [21] Pang Q, Jin H, Ke X Q, et al. The role of serotonin in concanavalin A-induced liver injury in mice[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 7504521.
- [22] Choi J G, Choi G H, Lee D B, et al. Long-term clinical outcomes in patients with autoimmune hepatitis according to treatment response in Asian country[J]. *Liver Int*, 2019, 39(5): 985-994.