

[ 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-soild 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 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ); comapred 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应用提供依据。

## 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烨市新兴仪器厂；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  $A = 9.872\ 3X + 0.077\ 5$  ( $R^2 = 0.998\ 4$ )，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  $A = 0.006\ 6X + 0.598$  ( $R^2 = 0.994\ 3$ )，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。

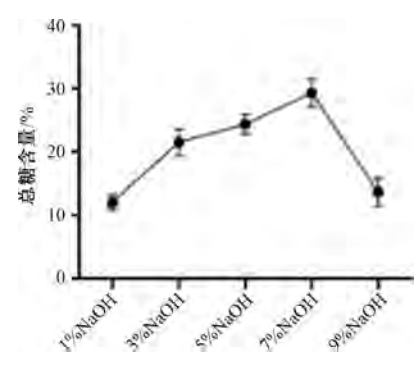


图 1 NaOH 溶液体积分数对总糖含量的影响  
Fig.1 Effect of volume fraction of NaOH solution on total polysaccharides content

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。

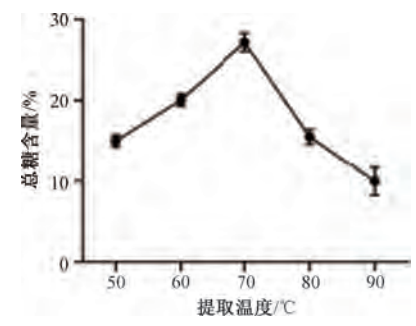


图 2 提取温度对总糖含量的影响  
Fig.2 Effect of extraction temperature on total polysaccharides content

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。

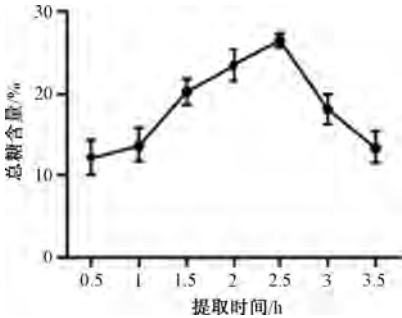


图 3 提取时间对总糖含量的影响

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。

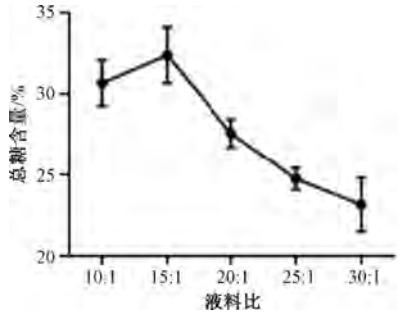


图 4 液料比对总糖含量的影响

Fig. 4 Effect of liquid-soild 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

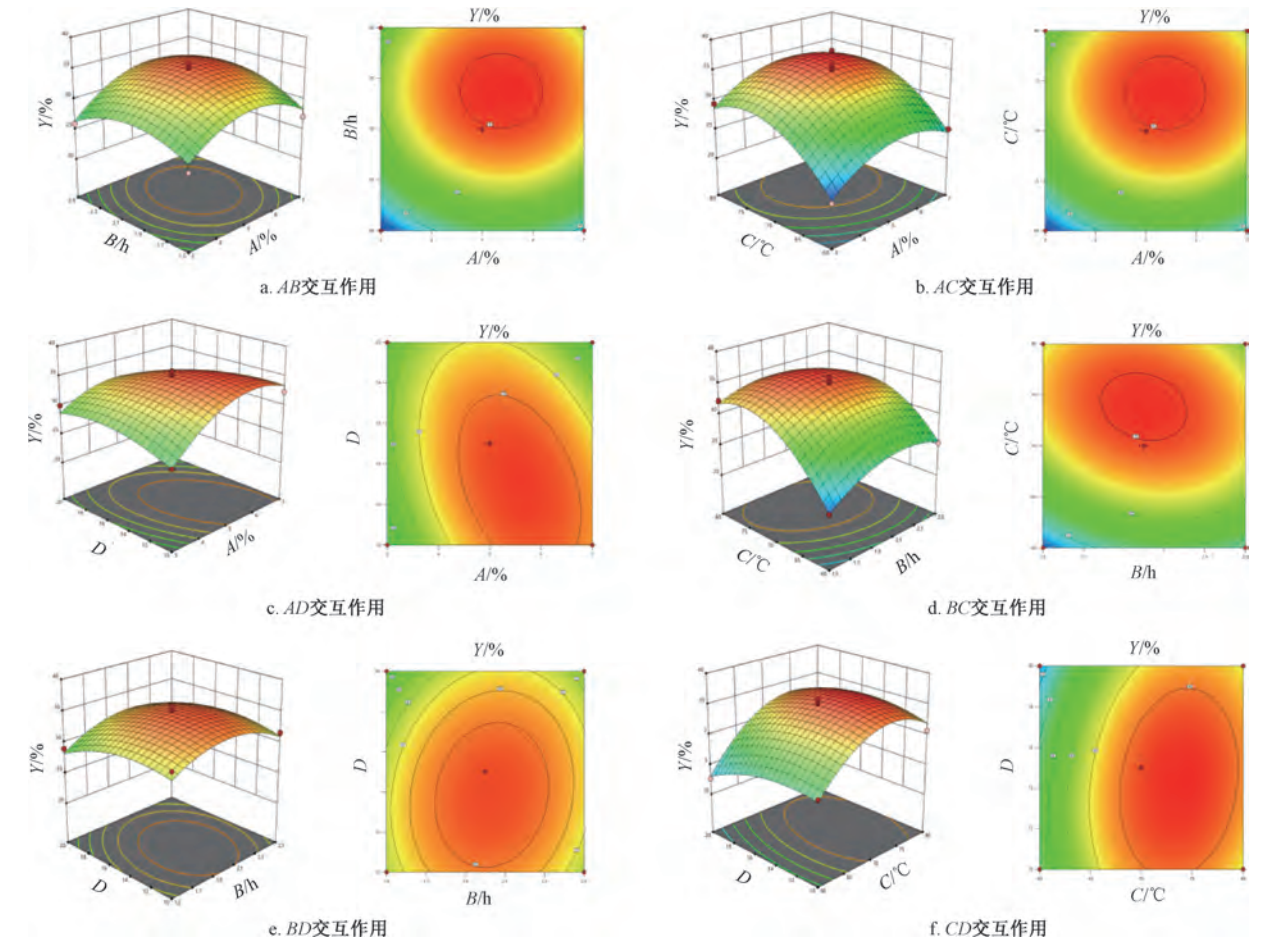
来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	434.02	14	31.00	19.74	<0.000 1
A	26.82	1	26.82	17.07	0.001 0
B	3.01	1	3.01	1.92	0.187 9
C	152.94	1	152.94	97.36	<0.000 1
D	9.17	1	9.17	5.84	0.029 9
AB	2.64	1	2.64	1.68	0.215 8
AC	0.140 6	1	0.140 6	0.089 5	0.769 2
AD	13.91	1	13.91	8.86	0.010 0
BC	7.29	1	7.29	4.64	0.049 1
BD	1.10	1	1.10	0.701 9	0.416 2
CD	3.01	1	3.01	1.92	0.187 9
A <sup>2</sup>	94.51	1	94.51	60.17	<0.000 1
B <sup>2</sup>	52.07	1	52.07	33.15	<0.000 1
C <sup>2</sup>	140.23	1	140.23	89.27	<0.000 1
D <sup>2</sup>	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 ℃，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淀积分数为 80%，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

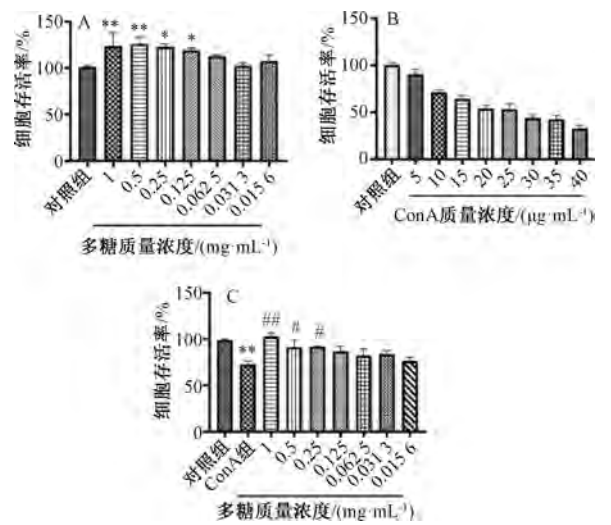
2.8.1 多糖对正常肝细胞的影响 采用含 10% FBS、1% ITS 液体培养基补充剂、40 ng/mL 地塞米松磷酸钠的 DMEM/F-12 培养基，以 80% 的密度培养 AML12 细胞至第 10 代，置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中，取对数生长期者，以 3 000/孔密度接



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 (0.015 6、0.031 3、0.062 5、0.125、0.25、0.5、1 mg/mL) 多糖 24 h, 发现后者不仅对前者没有毒性作用, 而且在 1、0.5、0.25、0.125 mg/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, #  $P<0.05$ , ##  $P<0.01$ 。

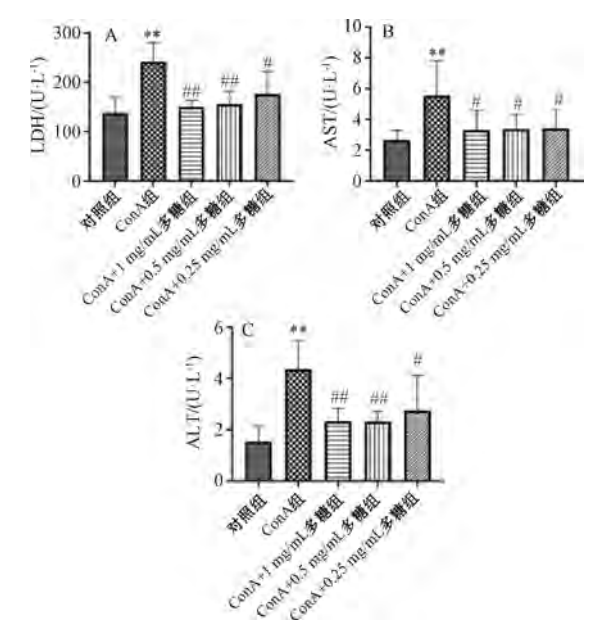
图 6 甘青青兰多糖对 ConA 诱导肝细胞损伤的保护作用  
Fig.6 Protective effects of polysaccharides from *D. tanguticum* against ConA-induced hepatocyte injury

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 12 h, 分别用不同质量浓度 (0、5、10、15、20、25、30、35、40  $\mu$ g/mL) ConA 刺激 24 h, 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 12 h, 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 24 h; 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 3 h 后建立模型; 甘青青兰多糖组分别加入不同质量浓度 (0.015 6、0.031 3、0.062 5、0.125、0.25、0.5、1 mg/mL) 多糖干预 3 h, 以 ConA (10  $\mu$ g/mL) 刺激 24 h 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、0.25 mg/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 2 h, 在酶标仪上于 450 nm 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 12 h, 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+1 mg/mL 多糖、10  $\mu$ g/mL ConA+0.5 mg/mL 多糖、10  $\mu$ g/mL ConA+0.25 mg/mL 多糖), 干预 24 h, 收集细胞上清液至 1.5 mL EP 管中, 4 000 r/min 离心 5 min, 加到新的 1.5 mL 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 24 h 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 30 min, 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。

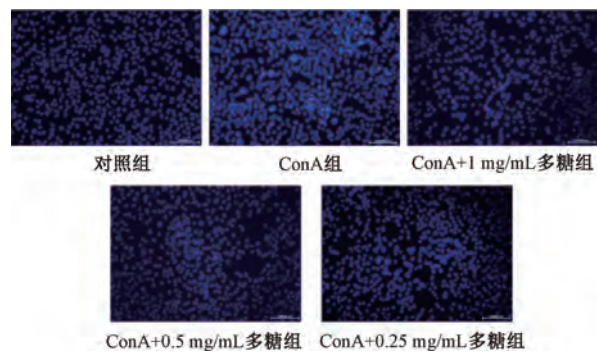


图 8 甘青青兰多糖对肝细胞凋亡的影响 (×100)  
Fig. 8 Effect of polysaccharides from *D. tanguticum* on hepatocyte apoptosis (×100)

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 μL JC-1 染色工作液，轻柔混匀，置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中避光孵育 20 min，其间接按 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 ℃）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>。

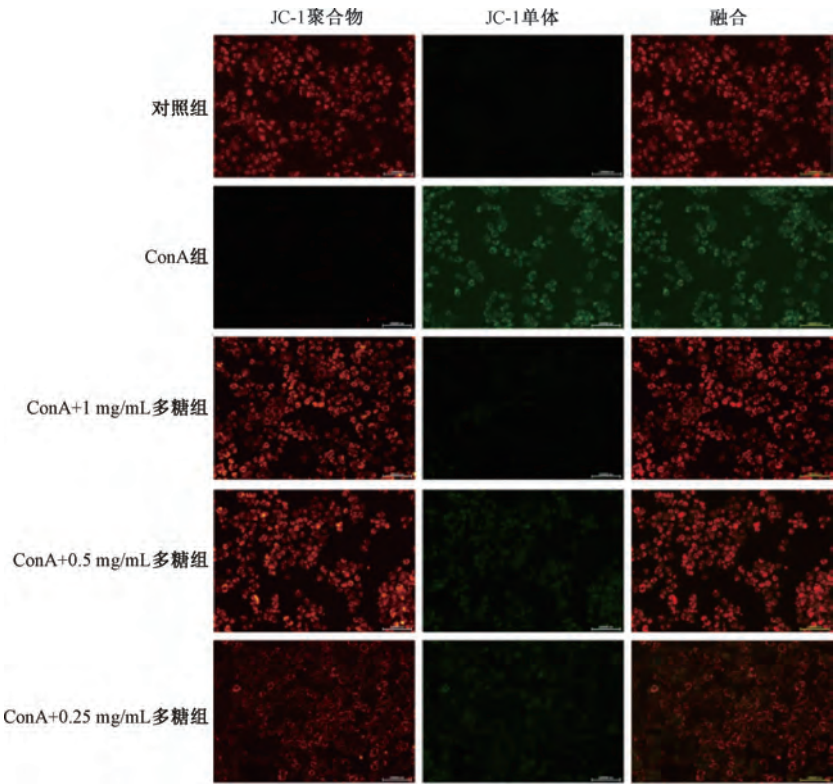


图 9 甘青青兰多糖对肝细胞线粒体膜电位的影响 (×100)  
Fig. 9 Effect of polysaccharides from *D. tanguticum* on mitochondrial membrane potential in hepatocytes (×100)

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]. *Hepato Forum*, 2022, 26, 3( 2 ): 68-70.

[ 2 ] Vergani D, Terziroli 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.