

# 芜菁多糖除蛋白及抑制 RAW264.7 巨噬细胞焦亡作用研究

古丽米拉·卡德尔<sup>#</sup>, 阿吉然姆·阿布拉<sup>#</sup>, 任国瑞, 海力茜·陶尔大洪<sup>\*</sup>, 杨飞<sup>\*</sup>  
(新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011)

**摘要: 目的** 考察芜菁多糖两种方法除蛋白效果, 并探讨其对 RAW264.7 巨噬细胞焦亡的抑制作用。**方法** 采用 AB-8 大孔吸附树脂法、Savage 法去除蛋白, 苯酚-硫酸法测定多糖含量, 采用脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 及三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 建立细胞焦亡模型, 细胞毒性检测试剂盒 (cell counting kit-8, CCK8) 检测芜菁多糖对 RAW264.7 细胞增殖率的影响, 免疫印迹实验 (Western-Blot, WB) 检测消皮素 D (gasdermin D, GSDMD) 相对表达量, 酶联免疫吸附测定法检测白细胞介素-18 (interleukin18, IL-18)、IL-1 $\beta$ 、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、IL-6 水平。**结果** AB-8 大孔吸附树脂除蛋白, 多糖保留率为 85.9%, 蛋白去除率为 91.0%; Savage 法多糖保留率为 77.6%, 蛋白去除率为 72.8%, 精密度、稳定性、重复性和加样回收率的相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 均小于 2.0%。与模型组相比, 芜菁多糖各剂量能显著下调 GSDMD 的表达 ( $P < 0.05$ ), 减少 LPS/ATP 诱导的 RAW264.7 细胞炎性因子 IL-18、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6 的释放 ( $P < 0.05$ )。**结论** AB-8 大孔吸附树脂法较 Savage 法, 蛋白去除率及多糖保留率更高; 芜菁多糖对 LPS/ATP 诱导的 RAW264.7 细胞焦亡具有抑制作用, 能在一定程度上减轻细胞损伤, 这可能与抑制 LPS/ATP 诱导焦亡过程中的炎症反应和调控 GSDMD 蛋白的表达有关。

**关键词:** 芜菁; 多糖; 细胞焦亡; 除蛋白

## Study on the deproteinization and inhibitory effects on the pyroptosis of RAW264.7 macrophages of *Brassica rapa* L. polysaccharide

GULIMILA Ka-De-Er<sup>#</sup>, AJIRANMU A-Bu-La<sup>#</sup>, REN Guo-Rui,  
HAILIQIAN Tao-Er-Da-Hong<sup>\*</sup>, YANG Fei<sup>\*</sup>

(School of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

**ABSTRACT: Objective** To observe the deproteinizing effects of *Brassica rapa* L. polysaccharide by 2 kinds of methods, and explore the inhibitory effects on pyroptosis of RAW264.7 macrophages. **Methods** The protein was removed by AB-8 macroporous adsorption resin method and Savage method. The content of *Brassica rapa* L.

基金项目: 国家自然科学基金项目(81960765)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (81960765)

#古丽米拉·卡德尔、阿吉然姆·阿布拉为共同第一作者

#GULIMILA K-De-Er and AJIRANMU A-Bu-La are Co-first Authors

\*通信作者: 海力茜·陶尔大洪, 教授, 主要研究方向为天然药物化学。E-mail: hailiqian2471@sina.com

杨飞, 博士研究生, 主要研究方向为天然药物化学。E-mail: 279533257@qq.com

\*Corresponding author: HAILIQIAN Tao-Er-Da-Hong, Professor, Xinjiang Medical University, Xinyi Road, Urumqi 830011, China. E-mail: hailiqian2471@sina.com

YANG Fei, Doctor Student, Xinjiang Medical University, Xinyi Road, Urumqi 830011, China. E-mail: 279533257@qq.com

polysaccharide was determined by phenol-sulfuric acid method. The pyroptosis model was established with lipopolysaccharide (LPS) and adenosine triphosphate (ATP), and the cell counting kit-8 (CCK8) was used to detect the effect of turnip polysaccharide on the proliferation rate of RAW264.7 cells. The influence of *Brassica rapa* L. polysaccharide on the expression of gasdermin D (GSDMD) was detected by Western-Blot (WB). The levels of interleukin-18 (IL-18)、IL-1 $\beta$ 、tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), and IL-6 were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** AB-8 macroporous adsorption resin was used to remove protein, and the polysaccharide retention rate and protein removal rate were 85.9% and 91.0%, respectively, the polysaccharide retention rate and protein removal rate of Savage method were 77.6% and 72.8%, respectively. The relative standard deviation (RSDs) of precision, stability, repeatability and recovery were all less than 2.0%. Compared with the model group, each dose of *Brassica rapa* L. polysaccharide could significantly decrease the expression of GSDMD ( $P < 0.05$ ), and reduce the release of LPS/ATP-induced inflammatory factors IL-18、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ , and IL-6 in RAW264.7 cells ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** AB-8 macroporous adsorption resin method has higher protein removal rate and polysaccharide retention rate than Savage method. *Brassica rapa* L. polysaccharide can inhibit pyroptosis of RAW264.7 cells induced by LPS/ATP, and can alleviate cell damage to a certain extent, which may be related to the inhibition of inflammatory response during LPS/ATP-induced pyroptosis as well as the regulation of the expression of GSDMD protein.

**KEY WORDS:** *Brassica rapa* L.; polysaccharide; pyroptosis; deproteinization

## 0 引言

芜菁(*Brassica rapa* L.)是十字花科(Cruciferae)芸苔属(*Brassica*)的一种传统的药食同源植物,又名扁萝卜、恰玛古<sup>[1]</sup>等。《本草纲目》中记载芜菁“辛、苦、平,无毒,可升可降,能汗能吐,下能利小便,其效甚伟”<sup>[2]</sup>。现代药理学研究表明,芜菁含有多种氨基酸、糖类、维生素和人体所需的微量元素,具有抗氧化<sup>[3-4]</sup>、抗衰老<sup>[5]</sup>、抗肿瘤<sup>[6]</sup>、抗疲劳<sup>[7-8]</sup>等作用,其中,多糖是天然产物中含量比较丰富的物质,具备抗氧化<sup>[9]</sup>、抗癌症<sup>[10]</sup>、免疫机制调节<sup>[11]</sup>、抗炎<sup>[12]</sup>、抗菌、保护肝脏等功能。色素和蛋白是多糖的主要杂质,制约着多糖的结构分析<sup>[13]</sup>,由于不同植物中粗多糖、蛋白质的结构和性质不同,纯化粗多糖及去除蛋白质的方法也存在差异,目前主要有沉淀法、酶法及物理法等<sup>[14]</sup>。物理法除蛋白对多糖破坏程度低,且绿色环保,其中,大孔吸附树脂具有较好的吸附性和筛选性、洗脱容易、适用范围广、受外界条件影响小<sup>[15]</sup>。目前,芜菁多糖以往使用的 Savage 法多糖保留率较低,蛋白去除率不佳,样品损失大<sup>[16-17]</sup>,以大孔吸附树脂法除蛋白有关内容未见报道。

COOKSON 等<sup>[18]</sup>最早在 2000 年报道了细胞焦亡,染色质的浓缩、DNA 的断裂和细胞膜形成大量坏死性孔洞结构是细胞焦亡的主要特征<sup>[19-20]</sup>,由于这些现象发生导致细胞膜不完整,使得细胞外的钙离子和水进入细胞内<sup>[21-24]</sup>,细胞内大量的内含物和炎性因子向外流出[如白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、IL-18 等],最终使细胞开裂发生焦亡<sup>[25]</sup>。在经典的信号通路中,在病原体、细菌等信号的刺激下,病原体相关分子和损伤相关分子[如三磷酸腺苷

(adenosine triphosphate, ATP)和脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)等]激活核苷酸寡聚化结构域(nucleotide oligomerization domain, NOD)样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor pyrin domain containing 3, NLRP3)炎性小体,通过衔接蛋白凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)与含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 1 前体(pro-cysteiny l aspartate specific proteinase 1, pro-caspase-1)结合,激活 caspase-1。活化的 caspase-1 一方面切割消皮素 D (gasdermin D, GSDMD),形成 GSDMD 氮端和碳端<sup>[26-27]</sup>, GSDMD 氮端就会和细胞膜上的磷脂蛋白结合,形成孔洞,释放内容物,诱导焦亡发生;另一方面,活化的 caspase-1 对 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的前体进行切割<sup>[27]</sup>,形成有活性的 IL-1 $\beta$  和 IL-18,并释放到细胞外,造成炎症反应;GSDMD 蛋白是引起细胞焦亡的关键蛋白,IL-1 $\beta$  和 IL-18 是其特征炎症因子。细胞焦亡属于严重的炎症反应,而多糖类物质具有抗炎作用和免疫调节活性,许多研究发现,植物多糖可通过调节细胞焦亡信号通路中关键靶蛋白,如 NLRP3、TOLL 样受体 4 等,减轻炎症损伤<sup>[24-25]</sup>,但关于芜菁多糖抗细胞焦亡作用,未见文献报道。

本研究以 AB-8 大孔吸附树脂法及 Savage 法对芜菁粗多糖除蛋白,苯酚-硫酸法测多糖含量,紫外可见-分光光度法测蛋白含量,比较了两种方法的蛋白去除效果,同时采用 LPS 及 ATP 干预 RAW264.7 巨噬细胞诱导细胞焦亡,探究芜菁多糖对 RAW264.7 巨噬细胞焦亡关键蛋白 GSDMD 的影响,从细胞焦亡角度寻找芜菁多糖抗炎作用的具体机制,考察芜菁多糖是否能通过抑制细胞焦亡,减轻细胞损伤,发挥抗炎作用,以期为低毒有效去除芜菁多

糖杂质蛋白提供数据参考, 同时为芜菁资源作为食品、保健品或药物开发利用提供支撑。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

芜菁, 采自阿克苏柯坪县。

苯酚、三氯甲烷、正丁醇(纯度 99%, 天津北联精细化工有限公司); 浓硫酸(纯度 98%, 河南升宏化工产品公司); 葡萄糖标准品(纯度 99.7%, 北京普天同创生物科技有限公司); 乙醇、盐酸、氢氧化钠(分析纯, 上海麦克林生化科技公司); 二喹啉甲酸(bicinchoninic acid assay, BCA)蛋白浓度检测试剂盒(No.23235, 美国赛默飞世尔科技公司); ATP、LPS(分析纯, 北京索莱宝科技有限公司); AB-8 大孔吸附树脂、RAW264.7 巨噬细胞及其专用培养基、1×磷酸缓冲液(武汉普诺赛生命科技有限公司); 凝胶快速配制试剂盒(No.G2043-50T, 武汉赛维尔生物科技有限公司); IL-18 酶联免疫吸附(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测试剂盒(No.ml063133)、IL-1 $\beta$  ELISA 检测试剂盒(No.ml063131)(上海酶联生物科技有限公司); 肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) ELISA 检测试剂盒(No.E04071, 中国武汉博士德生物公司); IL-6 ELISA 检测试剂盒(No.ab100713)、GSDMD 抗体(1 mg/mL)(英国 Abcam 公司); 细胞毒性检测试剂盒(cell counting kit-8, CCK8)(NO.BA00208, 武汉博士德生物有限公司);  $\beta$ -actin 抗体(1 mg/mL)、辣根过氧化物酶标记抗体(1 mg/mL)、化学发光底物试剂盒(No.BL523A)(广州硕普生物有限公司)。

HERA cell 150 恒温培养箱、SW-CJ-2F 生物安全操作台、IX71-12FL/PH 倒置显微镜(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 5424R 离心机(德国 Eppendorf 公司); HWS11 电热恒温水浴锅(上海尚昂实业有限公司); FA2204B 万分之一电子天平(济南欧莱博科学仪器有限公司); NDO-601SD 烘箱(日本 Eyela 公司); 1645050-OG 电泳仪(美国 Bio-Rad 公司); Azure600 凝胶成像仪(美国 Azure biosystems 公司); WD-9405B 摇床(北京六一生物科技有限公司)。

### 1.2 多糖除蛋白及含量测定

#### 1.2.1 芜菁粗多糖的提取

将芜菁切成薄片, 自然风干, 粉碎干燥的芜菁块根薄片呈粉末状, 用 95%乙醇浸泡脱脂 2 h, 晾干。按芜菁粉末: 超纯水=1:30 (V:V)的比例, 90℃回流提取 2 h, 取其上清液, 重复两次回流提取, 合并上清液, 进行减压浓缩, 得到黏稠浓缩液。在浓缩液中加入无水乙醇至乙醇终浓度为 80%, 置于 4℃冰箱过夜, 弃去上清液, 晾干沉淀至无醇味, 放入 7000 Da 分子量的透析袋中透析 48 h 后再次减压浓缩, 冷冻干燥, 得到芜菁粗多糖。准确称取 3 g 干燥的芜菁粗多

糖, 加蒸馏水 300 mL 溶解完全, 2390×g 4℃离心 15 min, 吸取上清液备用。

#### 1.2.2 AB-8 大孔吸附树脂除蛋白

AB-8 大孔吸附树脂前处理: 将树脂用蒸馏水进行反复冲洗后, 用 9%乙醇溶液浸泡 24 h 并滤出树脂, 再用蒸馏水反复冲洗至洗出液为无色, 用 5%盐酸浸泡 3 h 后, 蒸馏水冲洗至中性, 2%氢氧化钠浸泡 3 h, 蒸馏水冲洗至中性, 备用。

芜菁粗多糖除蛋白: AB-8 大孔吸附树脂湿法装柱(柱床体积 700 mL), 吸取处理完成的芜菁粗多糖上清液缓慢上样, 静态吸附 15 min, 控制流速为 2 mL/min, 收集流出液, 用 7000 Da 的透析袋透析, 浓缩, 冷冻干燥保存, 得到芜菁多糖(*Brassica rapa* L. polysaccharide, BRP)用于后续实验。

#### 1.2.3 Savage 法除蛋白

氯仿具有极强的破坏作用, 可以使蛋白质急剧变性, 正丁醇可以溶解变性蛋白形成凝胶体体系利于分层<sup>[28]</sup>。取芜菁多糖浓缩液 50 mL, 加入 1/5 体积的三氯甲烷-正丁醇(4:1, V:V)混合溶液, 振荡 30 min 后在 2390×g 4℃的条件下离心 10 min, 分去水层和溶液层交界处的变性蛋白, 测定溶液中蛋白质和多糖的含量, 计算蛋白去除率和多糖保留率。

#### 1.2.4 芜菁多糖含量测定

葡萄糖标准溶液的配制: 配制 0.1 mg/mL 的葡萄糖标准溶液, 由低到高分别将: 0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8 mL 葡萄糖标准溶液放入具塞试管中, 蒸馏水补足至 2 mL, 加入 1 mL 5%苯酚摇匀, 再加 5 mL 浓硫酸, 室温放置 30 min。空白溶液将试样用 2 mL 蒸馏水代替, 加入 5%苯酚和硫酸溶液, 在 490 nm 处测吸光度, 纵坐标为吸光度 Y, 葡萄糖质量浓度 X 为横坐标, 进行回归分析, 绘制标准曲线。

测定芜菁多糖含量: 将提前处理好的芜菁粗多糖溶液和过柱后除蛋白的芜菁粗多糖溶液准确量取 2 mL, 置于试管中, 加入 1 mL 5%苯酚以及 5 mL 浓硫酸, 摇匀, 在室温下放置 30 min; 以含有蒸馏水, 5%苯酚和浓硫酸的溶液作为空白对照。在 490 nm 处测定吸光度, 将所得吸光度值带入标准曲线公式中测得多糖含量。

#### 1.2.5 蛋白含量测定

分别取过柱前后的芜菁多糖溶液, 照《中国药典》中蛋白质含量测定方法, 用紫外-可见分光光度法分别在 280 和 260 nm 的波长处测定吸光度, 分别通过公式(1)和(2)计算芜菁多糖溶液中蛋白质含量以及蛋白去除率。

$$\text{蛋白质含量}(\text{mg/mL})=1.45 \times A_{280 \text{ nm}} - 0.74 \times A_{260 \text{ nm}} \quad (1)$$

$$\text{蛋白去除率}/\% = \frac{(\text{蛋白含量}_{\text{过柱前}} - \text{蛋白含量}_{\text{过柱后}})}{\text{蛋白含量}_{\text{过柱前}}} \times 100\% \quad (2)$$

## 1.3 细胞焦亡实验方法

### 1.3.1 细胞培养及给药浓度筛选

细胞培养: 将 RAW264.7 巨噬细胞细胞株复苏, 用 RAW264.7 细胞专用培养基进行细胞培养, 放入 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱中培养。

细胞给药浓度筛选: 细胞以浓度为  $5 \times 10^4$  个/mL, 每孔 100  $\mu\text{L}$  接种于 96 孔板, 每组 6 个复孔共设 10 组(空白组: 含培养基组, 对照组: 含细胞培养基组、给药组: 芜菁多糖质量浓度为 1、10、100、1000、2000、3000、40000、5000  $\mu\text{g/mL}$ ), 于  $37^\circ\text{C}$ 、含 5%  $\text{CO}_2$  的培养箱培养。给药培养 24 h 后, 加入 110  $\mu\text{L}$ /孔的 CCK-8 试剂, 并控制温度在  $37^\circ\text{C}$ 、含 5%  $\text{CO}_2$  的培养箱孵育。2 h 过后, 在酶标仪内于波长 450 nm 处, 检测 OD 值, 给药组和对照组减去空白组的比值为细胞增殖率。

### 1.3.2 芜菁多糖对细胞焦亡的影响

筛选焦亡模型建立的最佳条件: 细胞的浓度为  $1 \times 10^5$  个/mL, 每孔 100  $\mu\text{L}$  接种于 96 孔板, 每组 6 个复孔共设 3 组(5 mmol/L ATP+0.5、1.0、2.0  $\mu\text{g/mL}$  LPS, 每组重复 3 次), 观察不同条件下 LPS 及 ATP 对 RAW264.7 细胞的影响, 选择最佳造模条件。

CCK-8 实验: 细胞以  $5 \times 10^4$  个/mL 的浓度, 每孔 100  $\mu\text{L}$  接种于 96 孔板, 每组 6 复孔共设 10 组(空白组、对照组、不同浓度给药组), 5 mmol/L ATP 和 0.5  $\mu\text{g/mL}$  LPS 干预细胞 12 h, 250、500、1000  $\mu\text{g/mL}$  质量浓度芜菁多糖给药。

Western-Blot 实验检测 GSDMD 蛋白表达水平: 取对数生长期的 RAW264.7 细胞, 以细胞浓度为  $5 \times 10^5$  个/mL, 接种于 6 孔板, 2 mL/孔, 细胞分为 4 组: 空白对照组、模型组、BRP 250  $\mu\text{g/mL}$  给药组、BRP 500  $\mu\text{g/mL}$  给药组。药物处理方法: 先用 LPS 及 ATP 联合处理细胞 12 h, 然后再以不同浓度的 BRP 干预细胞 24 h。以 RIPA 细胞裂解液裂解各组细胞提取总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。取 10  $\mu\text{L}$  蛋白样品进行凝胶电泳, 缓冲液漂洗, 转膜封闭加一抗(GSDMD 抗体、 $\beta$ -actin 抗体, 稀释倍数均是 1:1000),  $4^\circ\text{C}$  条件下孵育过夜, 洗膜后加入二抗(1:5000), 室温下孵育 2 h, 漂洗后, 用凝胶成像系统拍照, 并分析蛋白产物条带的相对光密度值。

ELISA 法检测细胞 IL-18、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6 含量: RAW264.7 细胞以  $2 \times 10^5$  个/mL 接种于 48 孔板中, 300  $\mu\text{L}$  每孔, 置于  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱培养, 贴壁后弃去上清, 分组同上,  $1000 \times g$   $4^\circ\text{C}$  离心 15 min, 收集上清, 96 孔板 100  $\mu\text{L}$  每孔加至孔内, 贴上板贴在培养箱孵育 2 h, 弃去液体后甩干。以洗涤液洗涤 5 次后, 加入显色剂 100  $\mu\text{L}$ ,  $37^\circ\text{C}$  下避光显色 15 min; 每孔加入终止液 50  $\mu\text{L}$ , 在波长  $\lambda=450$  nm 测各孔 OD 值, 绘制出标准曲线, 计算细胞因子 IL-18、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6 释放水平。

## 1.4 数据处理

每组实验重复 3 次并取平均值, 数据以平均值 $\pm$ 标准偏差表示, 采用 Origin 2021 对所得数据进行单因素方差分析, 利用 Image J 进行 Western-Blot 结果分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 葡萄糖溶液标准曲线

标准曲线方程为  $Y=19.789X-0.0267$ ,  $r^2=0.9991$ , 在 0.015~0.040 mg/mL 范围内, 线性关系良好。

### 2.2 方法学考察

精密度实验: 精密吸取 0.5 mL 葡萄糖对照品溶液, 按 1.2.4 项操作, 在紫外-分光光度计中连续重复测定吸光度 6 次, 计算其相对标准偏差(relative standard deviation, RSD) 为 1.1%, 低于 2%, 设备精密度高。

稳定性实验: 取芜菁多糖溶液, 每 20 min 一次吸光度, 共测 2 h 进行稳定性考察, 得到吸光度的 RSD 为 0.5%, 供试品溶液在 2 h 内, 稳定性良好。

重复性实验: 精密称取 6 份 0.01 g 芜菁多糖干燥品, 加蒸馏水溶解后转移至 100 mL 的容量瓶加入蒸馏水至刻度线。各精密吸取 2 mL 供试品溶液移至试管中, 按 1.2.4 项操作, 吸光度 RSD 为 0.7%, 重复性良好。

加样回收实验: 分别精密吸取 6 份已知多糖含量的芜菁样品溶液, 依次添加低、中、高浓度的葡萄糖对照品溶液, 按照标准曲线法在 490 nm 处测定吸光度值。测得平均回收率为 99.8%, RSD 为 1.0%, 该实验方法准确可行。

### 2.3 多糖保留率

吸取过柱前和过柱后的芜菁多糖溶液, 利用苯酚-硫酸法在 490 nm 的波长处测定吸光度, 计算多糖含量以及多糖保留率, 同时与 Savage 法作对比, 比较两种方法的多糖保留率。AB-8 大孔吸附树脂法相比 Savage 法, 多糖损失较少, 可能由于 Savage 法每次除去蛋白质变性胶状物时, 不可避免的溶有少量多糖, 另外少量多糖与蛋白质结合的蛋白聚糖和糖蛋白, 在处理过程中会沉淀<sup>[28]</sup>, 从而造成多糖的损失, 结果详见表 1。

表 1 多糖保留率实验结果

Table 1 Results of the polysaccharide retention rate experiment

方法	方式	吸光度 ( $A_{490\text{nm}}$ )	多糖含量 (mg/mL)	多糖保留率 (%)
AB-8 大孔吸附树脂	过柱前	0.692 $\pm$ 1.15	68.3 $\pm$ 0.33	85.9 $\pm$ 1.53
	过柱后	0.585 $\pm$ 1.01	58.7 $\pm$ 0.16	
Savage 法	前	0.574 $\pm$ 1.07	30.4 $\pm$ 0.92	77.6 $\pm$ 1.25
	后	0.441 $\pm$ 1.30	23.6 $\pm$ 0.41	

### 2.4 蛋白去除率

本研究通过吸取过柱前和过柱后的芜菁多糖溶液, 测定吸光度, 计算蛋白去除率。AB-8 大孔吸附树脂可去除多糖中大部分蛋白杂质, Savage 法需多次重复, 处理效率较低, 因此 AB-8 大孔吸附树脂去除蛋白质效果较好。大孔吸附树脂具有理化性质稳定, 耐强酸强碱, 不溶于水及一

些有机溶剂的性质, 其作用原理是通过树脂表面作用及形成氢键作用选择性吸附。研究表明大孔吸附树脂在一些多糖的除杂过程中表现优异, 如对瓦布贝母内生真菌胞外多糖有很好的纯化效果<sup>[28-29]</sup>。结果详见表 2。

### 2.5 芜菁多糖对 RAW264.7 细胞增殖率的影响

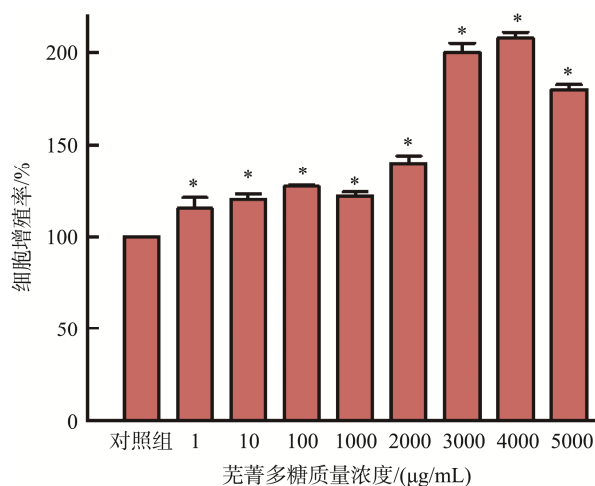
筛选芜菁多糖干预细胞浓度, CCK-8 法检测不同质量浓度芜菁多糖对细胞增殖率的影响。发现 1~2000  $\mu\text{g/mL}$  芜菁多糖对 RAW264.7 巨噬细胞增殖具有显著的促进作用( $P < 0.05$ ), 3000~4000  $\mu\text{g/mL}$  影响也十分显著, 而 5000  $\mu\text{g/mL}$  时, 细胞增殖率开始出现下降趋势, 与以往研究相似<sup>[5]</sup>, 如图 1 所示。为了筛选焦亡模型建立的最佳条件, 通过不同质量浓度 LPS 对

细胞抑制率结果判断, LPS 在 0.5~2.0  $\mu\text{g/mL}$  时对 RAW264.7 细胞的抑制率相近, 所以选择最低质量浓度 0.5  $\mu\text{g/mL}$  LPS 及 5 mmol/L ATP<sup>[30]</sup>作为最佳造模条件, 如图 2 所示。研究发现 LPS 刺激巨噬细胞可能仅激活启动信号<sup>[23-24]</sup>, 而 ATP 属于内源危险信号, LPS 与 ATP 共同刺激细胞可发生明显的细胞焦亡<sup>[30]</sup>。

通过检测 250、500、1000  $\mu\text{g/mL}$  质量浓度芜菁多糖对细胞抑制率的影响, 与模型组作比较, 250、500  $\mu\text{g/mL}$  芜菁多糖对 RAW264.7 巨噬细胞焦亡的抑制作用明显, 有显著差异( $P < 0.05$ )。可能因为细胞焦亡是由炎症因子大量释放导致的程序性细胞死亡, 而多糖具有抗炎、调节免疫的活性, 对细胞焦亡有促进或者抑制的作用, 如图 3 所示。

表 2 蛋白质去除率实验结果  
Table 2 Results of the protein removal rate experiments

方法	方式	吸光度( $A_{260\text{ nm}}$ )	吸光度( $A_{280\text{ nm}}$ )	蛋白质含量/(mg/mL)	蛋白去除率/%
AB-8 大孔吸附树脂	过柱前	5.385±2.06	5.268±1.15	3.65±1.35	91.0±0.84
	过柱后	0.514±1.18	0.489±1.85	0.33±1.47	
Savage 法	前	3.672±2.37	3.523±3.13	2.39±2.84	72.8±1.21
	后	1.073±1.43	0.922±2.01	0.65±1.03	



注: \*表示与对照组相比有统计学差异( $P < 0.05$ ), 下同。

图 1 芜菁多糖对细胞增殖率的影响

Fig.1 Effects of *Brassica rapa* L. polysaccharide on cell value added rate

### 2.6 芜菁多糖对 GSDMD 蛋白表达量的影响

Westem-Blot 实验结果显示, 与模型组相比, 250、500  $\mu\text{g/mL}$  质量浓度的芜菁多糖对焦亡关键蛋白 GSDMD 有明显抑制作用( $P < 0.05$ )。细胞焦亡过程涉及 NLRP3 及 ASC 的激活, caspase-1 对 GSDMD 蛋白的切割<sup>[26-27]</sup>, 很多研究发现多糖对 NLRP3 炎症小体有调节作用<sup>[12]</sup>, 芜菁多糖很有可能通过影响 NLRP3, 下调 GSDMD 蛋白的表达, 减轻炎症损伤, 发挥抗细胞焦亡作用, 如图 4a、b 所示。

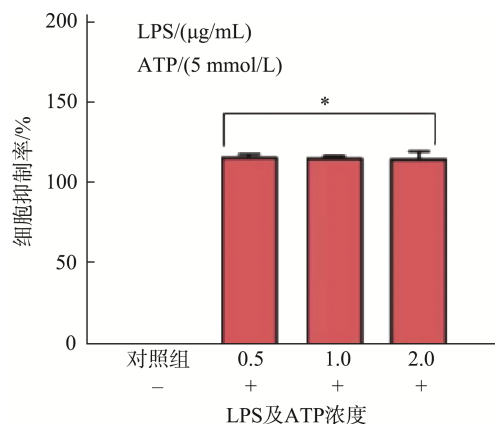
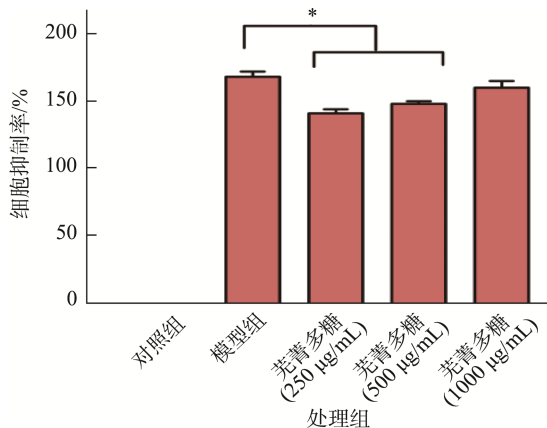


图 2 LPS 质量浓度筛选

Fig.2 LPS mass concentration screening



注: \*表示与模型组相比有统计学差异( $P < 0.05$ )。

图 3 不同质量浓度芜菁多糖对细胞焦亡的影响

Fig.3 Effects of different concentration of *Brassica rapa* L. polysaccharide on pyrodeath of cells

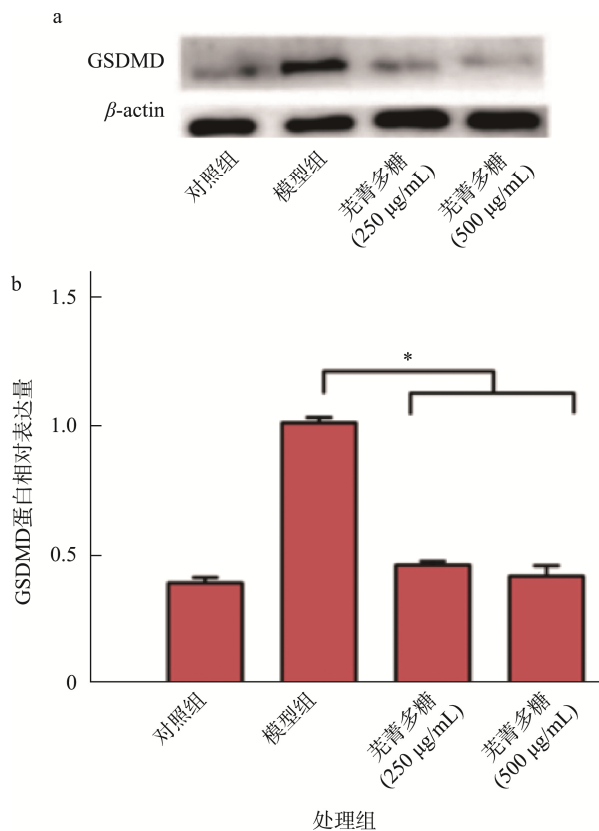


图4 Western-Blot法实验结果(a)和Image J灰度分析结果(b)  
Fig.4 Western Blot test results (a) and gray analysis results of Image J (b)

## 2.7 芜菁多糖对 RAW264.7 细胞炎症因子水平的影响

IL-18、IL-1 $\beta$ 为细胞焦亡特征炎症因子, caspase-1激活炎症细胞因子 IL-18、IL-1 $\beta$ 等的合成和释放,产生级联放大的炎症反应<sup>[12]</sup>。由表3可知,与对照组相比,模型组细胞 IL-18、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6水平显著升高( $P<0.05$ );与模型组相比,芜菁多糖 250、500  $\mu\text{g/mL}$  给药组细胞 IL-6、IL-18、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 水平显著降低( $P<0.05$ )。结果表明,芜

菁多糖可以降低LPS/ATP诱导的RAW264.7细胞炎症因子IL-18、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6的释放,抑制LPS/ATP诱导焦亡过程中的炎症反应。

## 3 讨论与结论

多糖具有抗炎、调节免疫的活性,对细胞焦亡有促进或者抑制的作用,虽然多糖可以通过调节NLRP3等炎症小体的活化起到调节炎症的作用,但是其具体作用方式仍需要进一步探究。

芜菁多糖大孔吸附树脂法除蛋白,改善了以往多糖损失严重,蛋白去除效果不佳的问题,为今后芜菁多糖的纯化提供参考。

本研究发现通过AB-8大孔吸附树脂法对芜菁粗多糖除蛋白;用紫外-可见分光光度法在490 nm处检测过柱前后多糖含量,在260和280 nm处检测过柱前后蛋白含量,多糖保留率为85.9%,蛋白去除率为91.0%,与以往采用的Savage法相比该方法除蛋白效果更佳,AB-8大孔吸附树脂能吸附杂质蛋白及色素、可再生、操作简便。细胞实验确定最佳造模条件为0.5  $\mu\text{g/mL}$  LPS及5 mmol/L ATP干预12 h,并设置不同浓度给药组干预焦亡细胞。CCK-8实验和Western-Blot实验结果显示,芜菁多糖对细胞焦亡的抑制作用显著,对焦亡关键蛋白GSDMD表达有明显的抑制,但芜菁多糖对细胞焦亡的具体作用机制仍需通过更全面、深入的研究加以阐释。后续研究可继续在蛋白以及基因水平上检测焦亡相关其他蛋白及基因的表达水平,寻找芜菁多糖抗细胞焦亡作用靶点,如检测caspase-1、NLRP3蛋白水平,活性氧及乳酸脱氢酶水平等。

综上所述,大孔吸附树脂法纯化芜菁多糖效果与Savage法相比有所改善;芜菁多糖可以抑制细胞焦亡,减轻细胞损伤,发挥抗炎作用,其机制可能与芜菁多糖抑制细胞内GSDMD蛋白的表达及调控IL-18、IL-1 $\beta$ 等炎症因子有关,这将为探讨芜菁的生物活性提供新的研究思路与方法,为芜菁资源的开发利用提供基础。

表3 芜菁多糖对RAW264.7焦亡细胞上清中IL-18、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6的影响

Table 3 Effects of *Brassica rapa* L. polysaccharide on IL-18, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 in the supernatant of RAW264.7 pyrocytes

组别	IL-18	IL-1 $\beta$	TNF- $\alpha$	IL-6
对照组	32.16 $\pm$ 1.35	22.93 $\pm$ 0.43	80.89 $\pm$ 0.92	100.19 $\pm$ 14.34
模型组	148.51 $\pm$ 7.01 <sup>#</sup>	80.16 $\pm$ 2.06 <sup>#</sup>	388.84 $\pm$ 0.51 <sup>#</sup>	525.53 $\pm$ 31.10 <sup>#</sup>
芜菁多糖/(250 $\mu\text{g/mL}$ )	72.83 $\pm$ 9.68 <sup>*</sup>	34.21 $\pm$ 4.02 <sup>*</sup>	175.22 $\pm$ 0.39 <sup>*</sup>	410.10 $\pm$ 48.53 <sup>*</sup>
芜菁多糖/(500 $\mu\text{g/mL}$ )	70.96 $\pm$ 5.90 <sup>*</sup>	44.05 $\pm$ 3.18 <sup>*</sup>	184.87 $\pm$ 0.96 <sup>*</sup>	482.70 $\pm$ 24.69 <sup>*</sup>

注: \*表示与模型组相比有统计学差异( $P<0.05$ ), #表示与对照组相比有统计学差异( $P<0.05$ )。

## 参考文献

- [1] 韩睿, 赵孟良, 孙世英, 等. 19份芜菁种质资源地下部性状的遗传多样性分析[J]. 青海大学学报(自然科学版), 2020, 38(5): 18–27.  
HAN R, ZHAO ML, SUN SY, *et al.* Genetic diversity analysis of subplot traits of 19 turnip germplasms [J]. J Qinghai Univ (Nat Sci Ed), 2020, 38(5): 18–27.
- [2] 李时珍. 本草纲目[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2011.  
LI SZ. Compendium of materia medica [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2011.
- [3] 姚军, 乌英, 海力茜·陶尔大洪, 等. 恰麻古多糖的体外抗氧化作用研究[J]. 华西药理学杂志, 2014, 29(5): 606–607.  
YAO J, WU Y, HAILIQIAN TERDH, *et al.* Study on antioxidant activity of chimagu polysaccharide *in vitro* [J]. West China J Pharm Sci, 2014, 29(5): 606–607.
- [4] 王花, 包国雁, 张萍, 等. 高原药食两用植物芜菁醚提取物对衰老小鼠免疫器官 SOD、MDA、GSH-Px 水平的影响[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(1): 58–60.  
WANG H, MI GY, ZHANG P, *et al.* Effects of ether extract of Turnip on SOD, MDA and GSH-Px levels in immune organs of aging mice [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2014, 25(1): 58–60.
- [5] 陈卓尔. 维药恰麻古多糖结构特征及其免疫活性的初步研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2017.  
CHEN ZER. Preliminary study on structural characteristics and immune activity of ancient polysaccharides from *Chicama*, a vitamin medicine [D]. Urumqi: Xinjiang Medical University, 2017.
- [6] 李亚童, 阿依夏古丽·巴卡斯, 李改茹, 等. 新疆芜菁酸性多糖分离纯化、抗氧化活性研究及红外表征[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(4): 1050–1057.  
LI YT, AYIXIAGULI BKS, LI GR, *et al.* Isolation and purification, antioxidant activity and infrared characterization of acidic polysaccharides from Xinjiang Turnip [J]. J Food Saf Qual, 2021, 13(4): 1050–1057.
- [7] 唐伟敏, 金露, 谢亮华, 等. 芜菁多糖的分离纯化、化学结构及其抗疲劳动物试验研究[J]. 中国食品学报, 2018, 18(12): 22–31.  
TANG WM, JIN L, XIE LH, *et al.* Isolation, purification, chemical structure and anti-fatigue animal study of polysaccharides from turnip [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2018, 18(12): 22–31.
- [8] XU Y, WU YJ, SUN PL, *et al.* Chemically modified polysaccharides: Synthesis, characterization, structure activity relationships of action [J]. Int J Biol Macromol, 2019, 132970–132977.
- [9] TANG QL, HUANG GL. Preparation and antioxidant activities of cuarbit polysaccharide [J]. Int J Biol Macromol, 2018, 117, 362–365.
- [10] LIU LQ, LI MZ, YU ML, *et al.* Natural polysaccharides exhibit anti-tumor activity by targeting gut microbiota [J]. Int J Biol Macromol, 2019, 121, 743–751.
- [11] FENG YQ, ZHANG JX, WEN CT, *et al.* Recent advances in *Agaricus bisporus* polysaccharides: Extraction, purification, physicochemical characterization and bioactivities [J]. Process Biochem, 2020, 94(7): 39–50.
- [12] 范文涛, 吕凯, 吴陈颢, 等. 细胞焦亡的研究进展及多糖在细胞焦亡中的潜在作用[J]. 食品科学, 2022, 43(11): 345–354.  
FAN WT, LV K, WU CH, *et al.* Progress in pyroptosis and the potential role of polysaccharides in pyroptosis [J]. Food Sci, 2022, 43 (11): 345–354.
- [13] 王筱瑜, 季子非, 萨日娜, 等. 银杏落叶粗多糖除蛋白方法的筛选及优化[J]. 食品工业科技, 2019, 40(10): 232–237.  
WANG XY, JI ZY, SA RN, *et al.* Screening and optimization of protein removal method of ginkgo deciduous crude polysaccharide [J]. Sci Technol Food Ind, 2019, 40(10): 232–237.
- [14] 郭智高, 翁少伟, 唐文迪, 等. 黑木耳多糖几种脱蛋白方法的对比研究[J]. 食品工业, 2018, 39(6): 54–58.  
WU ZG, WENG SW, TANG WD, *et al.* Comparative study of several deprotein methods of black *Auricularia auriculata* polysaccharides [J]. Food Ind, 2018, 39(6): 54–58.
- [15] FERRINGTON DA, FISHER CR, KOWLURU RA. Mitochondrial defects drive degenerative retinal diseases [J]. Trends Mol Med, 2020, 26(1): 105–118.
- [16] 乔丽洁, 王安平, 阿依夏古丽·巴斯卡, 等. 响应面法优化天山岩黄茛多糖提取工艺[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(1): 59–65.  
QIAO LJ, WANG ANP, AYIXIAGULI BSK, *et al.* Extraction, identification and content determination of refined polysaccharides from turnip [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(12): 4115–4120.
- [17] 国家药典委员会. 中国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.  
National Pharmacopoeia Commission. Chinese Pharmacopoeia [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020.
- [18] COOKSON BT, BRENNAN MA. Pro-inflammatory programmed cell death [J]. Trends Microbiol, 2016, 9(3): 113–114.
- [19] KAYAGAKI N, STOWE IB, LEE BL, *et al.* Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling [J]. Nature, 2016, 526: 666–671.
- [20] KESAVARDHANA S, MALIREDDI RKS, KANNEGANTI TD. Caspases in cell death, inflammation, and pyroptosis [J]. Annu Rev Immunol, 2020, 38: 567–595.
- [21] 肖少波, 张锦鹏, 董旺, 等. 细胞焦亡: 一种与炎症相关的细胞死亡[J]. 生命的化学, 2017, 37(3): 423–428.  
XIAO SB, ZHANG JP, DONG W, *et al.* Cell pyroptosis: A type of cell death associated with inflammation [J]. Chem Biol, 2017, 37(3): 423–428.
- [22] 席兴宇, 王红亮. Caspase-1 介导的细胞焦亡[J]. 生物学通报, 2017, 52(6): 4–6.  
XI XZ, WANG HL. Cell apoptosis mediated by caspase-1 [J]. Bull Biol, 2017, 52(6): 4–6.
- [23] BRENNAN MA, COOKSON BT. *Salmonella* induces macrophage death by

- caspase-1-dependent necrosis [J]. *Mol Microbiol*, 2000, 38: 31–40.
- [24] CUI L, WANG W, LUO Y, *et al.* Polysaccharide from *Scutellaria baicalensis* Georgi ameliorates colitis via suppressing NF- $\kappa$ B signaling and NLRP3 inflammasome activation [J]. *Int J BioMicromol*, 2019, 132: 393–405.
- [25] HOU J, ZHAO R, XIA W, *et al.* PD-L1-mediated gasdermin C expression switches apoptosis to pyroptosis in cancer cells and facilitates tumour necrosis [J]. *Nat Cell Biol*, 2022, 22: 1264–1275.
- [26] HUANG Z, ZHANG Q, WANG Y, *et al.* Inhibition of caspase-3-mediated GSDME-derived pyroptosis aids in noncancerous tissue protection of squamous cell carcinoma patients during cisplatin-based chemotherapy [J]. *Am J Cancer Res*, 2020, 10: 4287–4307.
- [27] HUPPERTZ C, JÄGER B, WIECZOREK G, *et al.* The NLRP3 inflammasome pathway is activated in sarcoidosis and involved in granuloma formation [J]. *Eur Respir J*, 2020, 55: 1900119.
- [28] 潘峰, 阮国永, 杨建波, 等. 大孔吸附树脂纯化吴茱萸果实多糖工艺优化[J]. *现代食品科技*, 2021, 37(9): 216–225, 304.
- PAN F, RUAN GY, YANG JB, *et al.* Optimization of fruit polysaccharide process for purification of large hole adsorption resin [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2021, 37(9): 216–225, 304.
- [29] 杨星星, 杨锦颖, 董庆军, 等. 马齿苋粗多糖除蛋白方法的筛选及优化 [J]. *粮食流通技术*, 2021, 13: 27.
- YANG XX, YANG JY, DONG QJ, *et al.* Screening and optimization of the crude polysaccharide protein removal method in purslane [J]. *Grain Distrib Technol*, 2021, 2021, 13: 27.
- [30] 刘蓓桦, 候梁, 罗伟珏, 等. LPS 与 ATP 共同诱导巨噬细胞中 NLRP3 炎症小体的激活[J]. *北京农学院学报*, 2018, 33(1): 74–78.

LIU BH, HOU L, LUO WY, *et al.* LPS together with ATP induced the activation of the NLRP 3 inflammasome in macrophages [J]. *J Beijing Univ Agric*, 2018, 33(1): 74–78.

(责任编辑: 黄周梅 韩晓红)

## 作者简介



古丽米拉·卡德尔, 硕士研究生, 主要研究方向为天然药物化学。

E-mail: 3160214670@qq.com



阿吉然姆·阿布拉, 硕士研究生, 主要研究方向为天然药物化学。

E-mail: 3325517316@qq.com



海力茜·陶尔大洪, 教授, 主要研究方向为天然药物化学。

E-mail: hailiqian2471@sina.com

杨 飞, 博士研究生, 主要研究方向为天然药物化学。

E-mail: 279533257@qq.com