

## 黄芪多糖 APS-II 在 M 细胞上的转运吸收机制初探

吕弯弯<sup>1,2,3</sup>, 李科<sup>1,2,3,4\*</sup>, 冯仕红<sup>1,2,3</sup>, 文雨薇<sup>1,2,3</sup>, 秦雪梅<sup>1,2,3</sup>, 杜昱光<sup>4</sup>, 李震宇<sup>1,2,3</sup>

(1. 山西大学中医药现代研究中心, 山西太原 030006; 2. 山西大学化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 山西太原 030006; 3. 地产中药功效物质研究与利用山西省重点实验室, 山西太原 030006; 4. 中国科学院过程工程研究所, 北京 100190)

**摘要:** 通过建立 M 细胞模型, 探究黄芪多糖 APS-II 在体内的吸收机制。首先将黄芪多糖 (*Astragalus polysaccharides*, APS) 通过超滤法分为 2 种不同相对分子质量多糖 APS-I (> 2 000 kDa) 和 APS-II (10 kDa), 并制备出黄芪多糖 APS-II (10 kDa), 然后对其进行荧光标记; 同时通过 Caco-2 细胞和 Raji 细胞构建 M 细胞模型, 并进行模型验证。采用转运抑制剂对 M 细胞模型进行处理, 探究黄芪多糖 APS-II 在 M 细胞上的转运情况。结果显示, 通过结构与活性验证 FITC 已成功标记到了 APS-II 的末端, 同时 M 细胞模型构建成功, 并发现 APS-II 可以被 M 细胞所转运, 通过 5-(*N*-乙基-*N*-异丙基) 阿米洛利 (EIPA)、染料木素 (genistein)、dynasore 和诺考达唑 (nocodazole) 4 种转运抑制剂说明 APS-II 可能通过网格蛋白和小窝蛋白介导的内吞作用进入细胞。

**关键词:** 黄芪多糖 APS-II; M 细胞; 转运抑制剂; 吸收机制

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)10-2820-08

## Preliminary study of the transport and absorption mechanism of *Astragalus polysaccharide-II* on M cells

LÜ Wan-wan<sup>1,2,3</sup>, LI Ke<sup>1,2,3,4\*</sup>, FENG Shi-hong<sup>1,2,3</sup>, WEN Yu-wei<sup>1,2,3</sup>, QIN Xue-mei<sup>1,2,3</sup>,  
DU Yu-guang<sup>4</sup>, LI Zhen-yu<sup>1,2,3</sup>

(1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine of Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 2. Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering, Ministry of Education of Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 3. Key Laboratory of Effective Substances Research and Utilization in TCM of Shanxi Province, Taiyuan 030006, China; 4. Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

**Abstract:** To explore the absorption mechanism of APS-II *in vivo* by establishing M cell model. First, *Astragalus polysaccharides* (APS) was divided into two different molecular weight polysaccharides APS-I (> 2 000 kDa) and APS-II (10 kDa) by ultrafiltration, and APS-II (10 kDa) was prepared and fluorescently labeled. Meanwhile, M cell model was constructed by Caco-2 cells and Raji cells. The M cell model was treated with transport inhibitors to explore the transport of APS-II on M cells. The results show that FITC has been successfully labeled to the end of APS-II, and the M cell model was successfully constructed, which found that APS-II could be transported by M cells, and four transport inhibitors of 5-(*N*-ethyl-*N*-isopropyl) amiloride (EIPA), genistein, dynasore and nocodazole indicated that APS-II may enter cells through clathrin and caveolin-mediated endocytosis.

**Key words:** *Astragalus polysaccharide-II*; M cell; transport inhibitor; mechanism of absorption

收稿日期: 2024-01-31; 修回日期: 2024-08-14.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81872962); 国家博士后科学基金资助项目 (2019M650851); 国家重点研发计划 (2019YFC1710800); 山西省重点研发计划重点项目 (201603D311101); 山西省优秀科技人才项目 (201605D211030, 201705D211020); 山西省科技创新人才团队专项基金。

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-351-7019297, E-mail: like@sxu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0103

近年来,多糖作为一种天然的大分子聚合物,在细胞间通讯、细胞黏附和免疫系统识别中起着重要作用<sup>[1]</sup>。研究表明,多糖口服后可以发挥多种药理活性,如抗肿瘤<sup>[2]</sup>、抗氧化<sup>[3]</sup>、免疫调节<sup>[4]</sup>等。但由于多糖结构复杂、吸收机制尚不明确等问题,严重阻碍了多糖的进一步发展<sup>[5]</sup>。因此探索多糖口服吸收机制具有重要意义。

多糖穿过肠上皮层的主要途径有细胞旁通路、跨细胞通路。跨细胞转运主要是通过网格蛋白介导的内吞作用、小窝介导的内吞作用、巨胞饮作用和受体介导的内吞作用<sup>[6,7]</sup>。Caco-2 细胞是一种人结肠癌细胞系,广泛用于人体肠道药物吸收的模型。Zhang 等<sup>[8]</sup>发现天麻多糖 (GEP-Cy5.5) 可以通过胃肠道进入血液,同时在 Caco-2 细胞模型中表明, GEP-Cy5.5 可通过网格蛋白和巨胞饮作用调节的内吞作用被小肠吸收。但由于 Caco-2 细胞模型缺少细胞异质性,且对大分子转运能力低<sup>[9]</sup>。因此需要一种新的细胞模型来探究多糖的吸收机制。Liang 等<sup>[10]</sup>发现葡聚糖和聚苯乙烯珠这两种物质在转化的 M 细胞上的转运率高于对照 Caco-2 细胞。Chen 等<sup>[11]</sup>采用肠道灌流评价黄连多糖对派氏结 (Peyer's patches, PPs) 相关免疫的调控作用,发现空肠段的 PPs 中表现出较强的荧光信号同时可以调节 PPs 中 IFN- $\gamma$ 、IL-4 和 TGF- $\beta$  的分泌,证实了黄连多糖可以经 M 细胞转运起到抗炎及调节肠道微环境的作用。

黄芪多糖 APS-II 是否可以经 M 细胞转运还未见报道。前期 Wang<sup>[12]</sup>通过大鼠肠翻转实验证明了黄芪多糖可以在小肠吸收,其转运累积量与转运时间成正比。Zhang 等<sup>[13]</sup>通过研究黄芪多糖对 4T1 乳腺肿瘤小鼠模型的影响作用,其可以进入 PPs (对照铁皮石斛多糖未能进入 PPs),并特异性激活树突状细胞发挥免疫作用。

## 材料与方 法

**材料与试剂** 仿野生黄芪 (2020 年 5 月于山西浑源产地采集,山西大学中医药现代研究中心秦雪梅教授鉴定为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* var. *Mongholicus*); MEM 培养基、1640 培养基、0.25% 胰蛋白酶-EDTA、双抗、DMEM 高糖培养基、脂多糖均购自北京索莱宝公司;胎牛血清 (Cellmax 公司);酪胺、氰硼氢化钠、FITC、荧光素钠均购自麦克林生化科技公司;Caco-2 细胞与 Raji 细胞购自普诺赛生命科技公司;Transwell 细胞培养室 (兰杰柯科技公司);碱性磷酸酶试剂盒 (碧云天生物技术公司);诺考达唑 (nocodazole)、染料木素 (genistein)、dynasore、5-(*N*-乙基-*N*-异丙基)阿米洛利 [5-(*N*-ethyl-*N*-isopropyl) amiloride, EIPA] 均购自 MCE 公司。

**仪器** 低速离心机 (SC-3610,安徽中科中佳科学仪器公司)、紫外可见分光光度计 (UV-2450,日本岛津公司)、荧光分光光度计 (F-7100FL,日立科学仪器公司)、示差检测器 (日本昭和电工公司)、依利特液相色谱仪 (大连依利特公司)、酶标仪 (Infinite 200 Pro,瑞士 TECAN)、凝胶色谱柱 TSK gel G4000PWXL (日本 Tosoh 公司)、岛津半制备高效液相色谱 (日本岛津仪器有限公司)、蒸发光检测器 (上海通微分析技术有限公司)。

**黄芪多糖制备过程** 参考课题组前期所建立的方法<sup>[14]</sup>,将黄芪粉末采用水提醇沉的方法,并用木瓜蛋白酶结合三氯乙酸法除蛋白,沉淀冷冻干燥后得到黄芪多糖 (*Astragalus polysaccharides*, APS)。将冷冻干燥后的 APS 配制成一定浓度的多糖溶液,采用分子截留量为 10 kDa 的超滤膜收集 APS-II 组分,浓缩,冷冻干燥后得 APS-II 组分。

**APS-II 的荧光标记及验证** 参考文献<sup>[15-17]</sup>方法,取 APS-II 约 200 mg 溶于 20 mL 0.2 mol·L<sup>-1</sup> 的磷酸盐缓冲液 (pH 8.0) 中,加入同等质量的酪胺 (tyramine, Tyr),室温下反应 24 h 后加入氰基硼氢化钠 100 mg,于 37 °C 磁力搅拌器中反应 96 h。反应完毕后,离心,将上清液经透析袋 (3 000 Da) 透析,之后用 0.5 mol·L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub> 调至 pH 8.5,加入异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 20 mg,室温下避光反应过夜,醇沉,静置有沉淀析出,离心,弃上清,沉淀加水复溶,再沉淀,直至上清液中无绿色荧光。得到的沉淀加蒸馏水复溶,用透析袋 (3 000 Da) 透析,冷冻干燥后得 APS-II-FITC。荧光标记后的产物经过紫外-可见光谱法、荧光光谱法及凝胶色谱法进行验证,并对其进行巨噬细胞增殖和吞噬活性的验证。

**细胞毒性实验** 通过 CCK-8 法测定 APS-II 对 Caco-2 细胞及 Raji 细胞的毒性评价及抑制剂对 Caco-2 细胞的毒性评价。将细胞以每毫升  $2 \times 10^4$  个密度接种到 96 孔板,每孔 100  $\mu$ L,培养 24 h 后将不同浓度的 APS-II 和各种抑制剂加入 96 孔板中培养 24 h 后加入 CCK-8 溶液,测定细胞活力。

**M 细胞模型的建立及验证** 参考文献<sup>[18]</sup>构建 M 细胞模型,将每毫升  $2 \times 10^5$  个的 Caco-2 细胞悬液接种于 Transwell 小室内侧并置于 12 孔板中,于 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。每隔一天更换 Caco-2 细胞的培养基。在第 3~5 天,翻转小室将硅管缠绕在小室的基底外侧,使硅管超过小室的高度 1 cm。将倒置的小室与附着的硅管置于充满完全培养基的大培养皿中培养。在第 14~16 天,并在硅管中加入每毫升  $2.5 \times 10^5$  个 Raji 细胞悬液。共培养后 4~6 天,模型构建成功可进行转

运研究,将Caco-2细胞的倒置单培养物设置为对照。通过碱性磷酸酶试剂盒检测碱性磷酸酶活性,以测试M细胞是否分化。在透射电镜下观察M细胞形态,并在AL侧加入 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 荧光素钠,按下列公式(1)计算表观渗透系数Papp值。

$$P_{\text{app}} = \frac{\Delta Q}{\Delta t \times A \times C_0} \quad (1)$$

式(1)中, $\Delta Q$ 为荧光素钠累计转运量, $\Delta t$ 为转运时间, $A$ 为Transwell小室的底面积, $C_0$ 为加入的荧光素钠初始浓度。

**APS-II的转运** 参考文献<sup>[18,19]</sup>,将细胞模型用预热的HBSS洗涤, $37\ ^\circ\text{C}$ 预处理30 min。然后将共培养模型分为正常组和抑制剂组,抑制剂组采用不同途径抑制剂的HBSS溶液(其抑制剂浓度由CCK-8筛选得到)处理,然后在单培养、共培养正常组及共培养抑制剂组AL侧分别加入 $500\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  APS-II-FITC 0.4 mL, BL侧加入1.2 mL HBSS缓冲溶液,置于 $37\ ^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$ 培养箱中转运2 h,每隔30 min从BL侧吸取200  $\mu\text{L}$ 溶液,并用HBSS补足,待孵育完成后收集BL侧转运介质进行荧光测量,每组设置3个平行。

**高效凝胶色谱法测量转运后APS-II-FITC的相对分子质量** 转运后收集APS-II-FITC,使用蒸发光检测器测量不同时间段的相对分子质量,并与转运前的相对分子质量相比较。

**统计学分析** 本实验所有数据均由3个平行测量的数据 $\bar{x} \pm s$ 表示。实验结果采用GraphPad Prism 9软件进行分析,各组之间的显著性采用单因素方差分析(ANOVA), $P < 0.05$ 认为具有统计学意义。

## 结果

### 1 APS-II荧光标记及验证

将APS-II、APS-II-FITC及FITC进行紫外-可见光谱扫描,结果见图1A,APS-II在300~700 nm内没有紫外吸收,FITC与APS-II-FITC在490 nm处有相同紫外吸收;然后通过荧光光谱扫描(图1B),发现APS-II-FITC与FITC具有相同的吸收和发射光谱,且APS-II-FITC的最大发射波长在518 nm左右,而未标记的黄芪多糖APS-II在此波长下没有吸收,且在最大发射波长下,APS-II-FITC中APS-II浓度越高,其荧光强度越大(图1C);之后高效凝胶色谱法验证结果(图1D)显示其保留时间差异较小且峰形相似,综上所述FITC已经被标记在APS-II上,且标记后的APS-II结构没有发生改变。

而巨噬细胞在机体免疫系统发挥着重要的作用<sup>[20]</sup>,因此将标记后的APS-II作用于巨噬细胞并研究

其吞噬活性,发现不同浓度的APS-II-FITC培养巨噬细胞24 h后的存活率均在90%以上,因此APS-II-FITC可在 $10\sim 500\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内促进其增殖(图1E)并且可以促进细胞吞噬(图1F)。

### 2 细胞毒性实验

Caco-2细胞为贴壁细胞,其呈岛状生长,且常常含有巨大的空泡。培养4~7天以后Caco-2细胞如图2A所示,Raji细胞是悬浮细胞,多抱团生长,如图2B所示。Caco-2细胞与Raji细胞在M细胞分化过程中发挥重要的作用,因此测定APS-II-FITC对两种细胞活力的影响,与空白组相比, $0\sim 500\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内APS-II-FITC与细胞培养24 h后其存活率均在90%以上。

### 3 M细胞模型建立与验证

对单培养与共培养结束后的细胞进行透射电镜观察,结果如下图3,可以看出单培养的Caco-2细胞具有致密的微绒毛,形成刷状边界,相邻细胞连接紧密,细胞与细胞间间隔较小(图3A、B);而共培养的细胞表面缺少微绒毛(图3C、D)。

碱性磷酸酶的下调是M细胞分化的一个特征<sup>[21]</sup>。因此通过测定细胞碱性磷酸酶活力来判断M细胞是否分化成功。碱性磷酸酶标准曲线经拟合得到 $y = 0.0048x - 0.0378$ , $R^2 = 0.9994$ 。在图3E中在加入Raji细胞共培养3天后,可以看出其碱性磷酸酶在下降,而单培养的Caco-2细胞碱性磷酸酶呈现上升的趋势;图3F为培养结束后共培养与单培养的AL侧碱性磷酸酶活力比较,且共培养碱性磷酸酶的下调显著,表明共培养有M细胞分化成功。

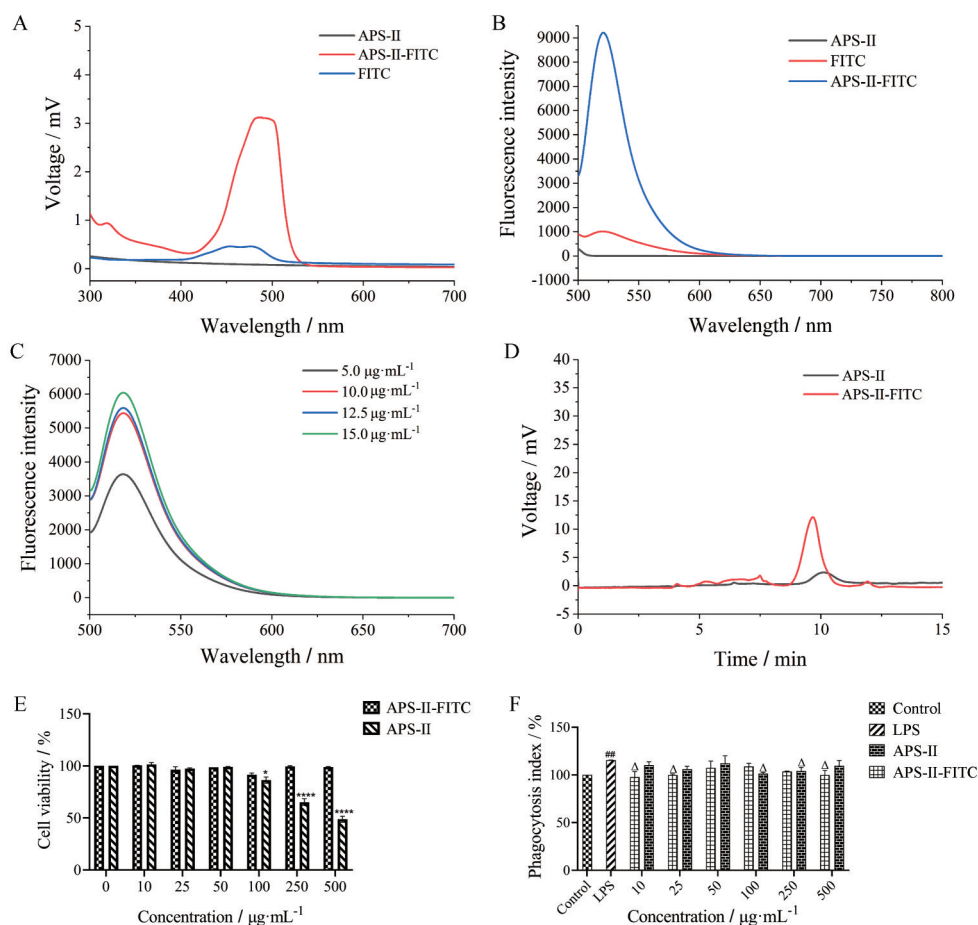
亲水标志化合物荧光素钠通过细胞旁途径被动转运,常做荧光探针<sup>[22]</sup>。通过荧光素钠检测细胞单层通透性,结果表明,荧光素钠在 $2\sim 10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好( $R^2 = 0.9917$ ),测得的标准曲线为 $y = 340.33x + 428.22$ 。图3G中可以看出共培养Papp值高于单培养,原因是共培养的紧密连接可能不像以前的那样紧密,但在30 min内其Papp值在 $2\times 10^{-7}\sim 7\times 10^{-7}\ \text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ 标准范围内<sup>[19]</sup>。

### 4 APS-II的转运

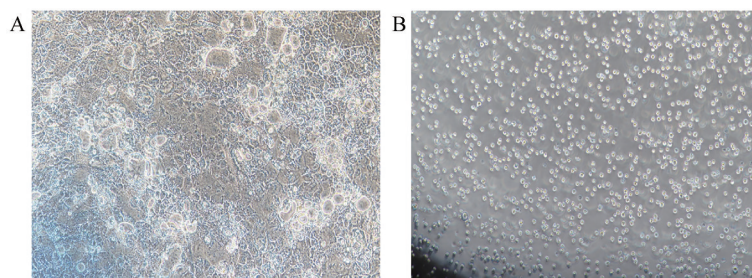
M细胞具有较好的抗原捕获能力,能将大分子物质高效转运。APS-II-FITC在 $1\sim 50\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好( $R^2 = 0.9985$ ),测得的标准曲线为 $y = 877.25x - 693.15$ ,图4显示,共培养物运输APS-II-FITC速率高于单培养物。又测定了不同浓度APS-II-FITC在M细胞上的转运量(图5),结果显示在一定范围内,APS-II-FITC的浓度越大,其转运效果越好。

### 5 转运抑制剂对APS-II转运量的影响

通过CCK-8法测定各抑制剂对Caco-2细胞的毒



**Figure 1** Fluorescence labeling and verification of APS-II-FITC. A: UV scanning spectrum; B: Fluorescence spectrum scanning; C: Fluorescence spectra scanning of APS-II-FITC with different concentrations; D: Determination of molecular weight by HPGC; E: The effect of APS-II-FITC on the proliferation activity of RAW 264.7 cells; F: The effect of APS-II-FITC on phagocytic activity of RAW 264.7 macrophages.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  vs  $0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; ## $P < 0.01$  vs control;  $\Delta P < 0.05$  vs LPS. APS-II: *Astragalus polysaccharides-II*; FITC: Fluorescein isothiocyanate; LPS: Lipopolysaccharide; HPGC: High gel permeation chromatography

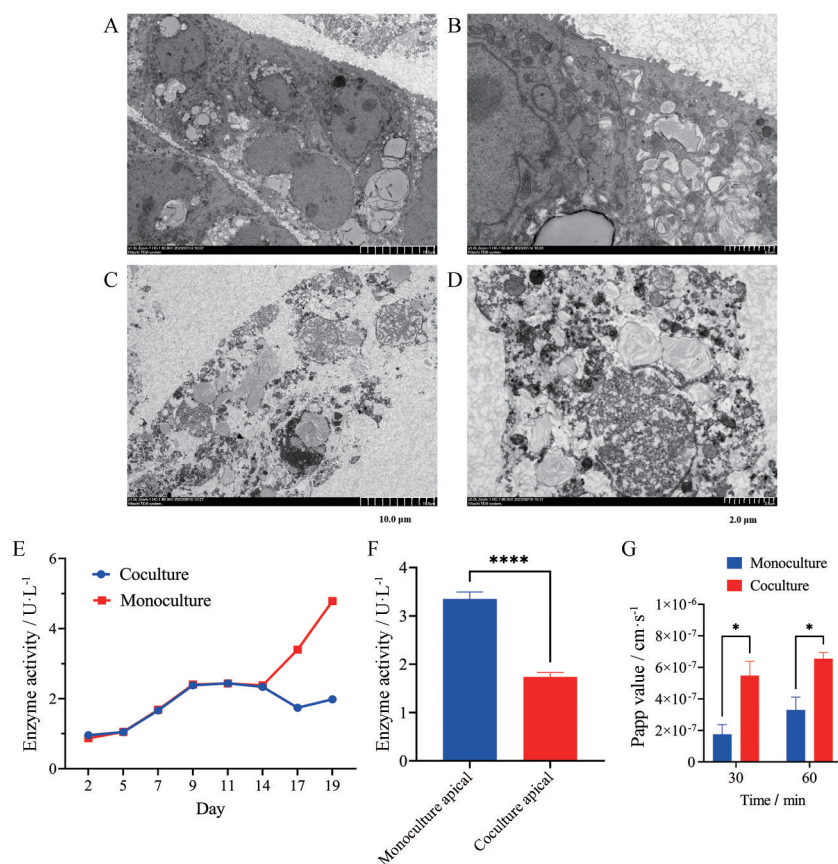


**Figure 2** Caco-2 cell (A) and Raji cell (B) culture, magnification:  $100\times$

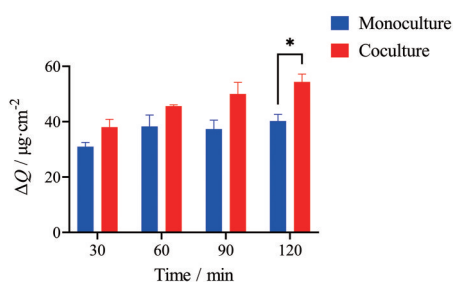
性(图6),结果表明,EIPA在 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、诺考达唑在 $2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、dynasore在 $75 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 以下对Caco-2细胞无明显毒性。如图7所示,加入诺考达唑、EIPA后对APS-II-FITC的转运量均无明显变化;加入dynasore、染料木素后APS-II-FITC的转运量有所下降,且在30 min内其转运百分比分别为69.7%与91.7%,说明APS-II可能通过网络蛋白和小窝蛋白介导的内吞作用进入细胞。

## 6 高效凝胶色谱法测量转运后 APS-II-FITC 的相对分子质量

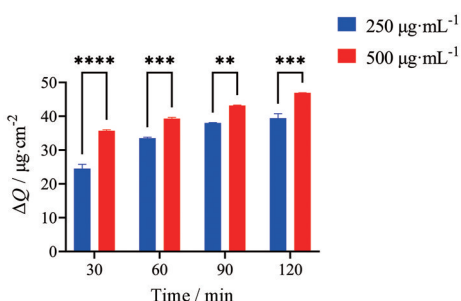
通过使用蒸发光检测器结合凝胶色谱柱进行转运后相对分子质量的测定,可以发现转运前APS-II-FITC的保留时间在11.858 min,转运30 min后保留时间在11.848 min,60 min后保留时间在11.895 min,以此可以看出转运前后APS-II-FITC的相对分子质量没有发生改变,说明转运后的APS-II-FITC没有被细



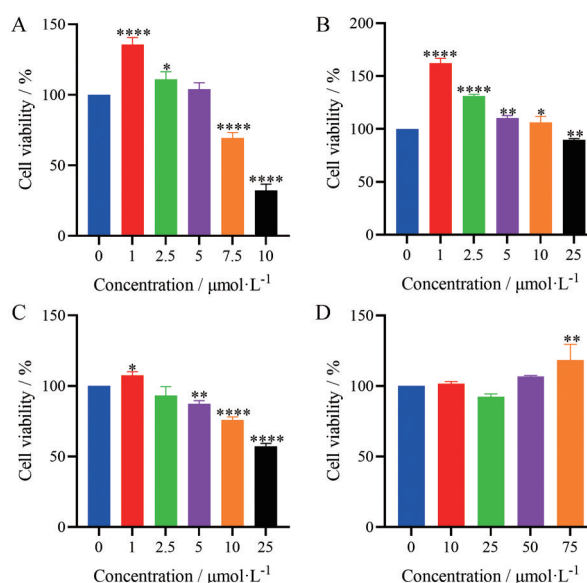
**Figure 3** Verification of M cell model. A and B: Transmission electron microscopy of monoculture; C and D: Transmission electron microscopy of coculture (scale: A and C 10.0  $\mu\text{m}$ , B and D 2.0  $\mu\text{m}$ ); E: Determination of alkaline phosphatase at different time; F: Comparison of alkaline phosphatase between the two groups at the end of culture; G: Transport of fluorescein sodium by monoculture and coculture.  $n = 3, \bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$



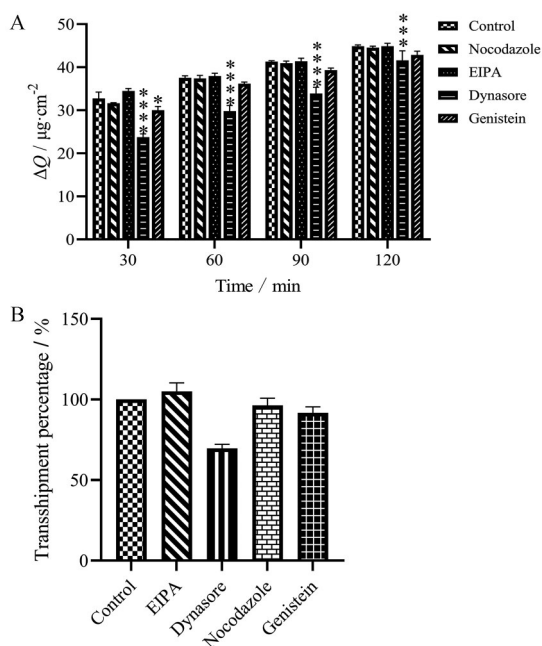
**Figure 4** Transport of APS-II-FITC by monoculture and coculture.  $n = 3, \bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$



**Figure 5** Transport of APS-II-FITC at different concentrations on M cells.  $n = 3, \bar{x} \pm s$ . \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$



**Figure 6** Effect of transport inhibitor on the viability of Caco-2 cells. A: EIPA cytotoxicity; B: Genistein cytotoxicity; C: Nocodazole cytotoxicity; D: Dynasore cytotoxicity;  $n = 3, \bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  vs 0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . EIPA: 5-(*N*-Ethyl-*N*-isopropyl) amiloride



**Figure 7** The effect of transport inhibitors on the transport of APS-II. A: Effects of transport inhibitors on the transport capacity of M cells, B: Percentage of transport for 30 min.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  vs control

胞中的酶类降解。

## 讨论

大量的研究表明黄芪多糖具有免疫调节的作用<sup>[23,24]</sup>, 但其在肠道中的吸收机制尚不清楚。随着免疫分析、荧光和同位素标记等多糖检测技术的发展, 多糖的口服药代动力学逐渐被揭示。多糖经过荧光标记后, 其末端荧光标记对多糖的生物活性影响较小。

多糖在细胞旁途径的转运主要受紧密连接分子 (tight junctions, TJs) 的限制, 细胞与细胞之间的间隙只能通过分子半径小于 15 Å (约 3.5 kDa) 的多糖<sup>[25]</sup>。本研究 APS-II 的相对分子质量约为 10 kDa, 因此很难通过细胞旁途径转运。M 细胞可以通过其特有的吞噬作用对大分子药物进行吸收转运<sup>[26]</sup>, M 细胞形态不规则、顶端缺少刷状边缘<sup>[27]</sup>, 通过摄取、转运肠腔内抗原或病原体, 递交给抗原提呈细胞, 加工处理后呈递给淋巴细胞, 从而诱导肠道黏膜免疫系统的免疫应答作用, 且 M 细胞跨上皮转运是非常高效的<sup>[28,29]</sup>。M 细胞的转运机制可能与转运物的性质有关, 如 pH、相对分子质量、空间结构等<sup>[30]</sup>。不同相对分子质量的透明质酸<sup>[31]</sup>在 Caco-2 细胞上的转运都存在能量依赖性, 但 10 kDa 透明质酸的转运比 100~200 kDa 透明质酸的效率高。聚甘露糖醛酸 (PM) 和聚古尿酸 (PG) 都是相对分子质量相似的聚糖醛酸, 但 PM 的跨细胞单层转运主要

通过小窝介导的内吞作用实现, 而 PG 的跨细胞单层转运主要通过网格蛋白介导的内吞作用实现, 这主要是由于 PM 和 PG 空间结构不同, 其结构单元仅在 C5 的羟基位置上有所不同, 但当它们聚合成链时, 空间构象差异很大, 这也导致了它们的理化性质和生物活性的差异<sup>[32]</sup>。香菇多糖<sup>[33]</sup>穿过肠道和上皮单层是由巨胞饮作用和网格蛋白介导的内吞作用介导的。当归多糖<sup>[34]</sup>口服后可通过巨胞饮途径和网格蛋白和小窝 (或脂筏) 相关途径介导的内吞过程吸收, 然后被吸收并循环到血液中。本实验通过测定 APS-II-FITC 的荧光强度来确定 APS-II 的转运量, 并采用转运抑制剂处理细胞模型, 发现 APS-II 可能主要是通过网格蛋白和小窝蛋白介导的内吞作用进入细胞。

M 细胞介导的转吞作用也可能是其他受体介导的。Zhang 等<sup>[35]</sup>通过体内和体外模型证明了黄芪多糖可以被小肠上皮细胞转运, 并完整地进入宿主免疫系统, 并首次证明了高表达 GP2 的 M 细胞是黄芪多糖的特异性转运蛋白细胞。研究表明 TLR4 是黄芪多糖 APS 的受体之一<sup>[28]</sup>, 且多糖中含有葡萄糖和甘露糖部分易被 TLR2 所识别<sup>[36]</sup>, 本课题组前期通过对 APS-II 的结构进行解析, 发现其主要是由  $\alpha$ -D-1,4-葡聚糖组成, 且在主链上存在少量  $\alpha$ -D-(1→4,6)-葡聚糖、阿拉伯聚糖和半乳聚糖<sup>[37]</sup>。三七多糖 PNP 主要是由葡萄糖组成, 并通过研究巨噬细胞中 TLR2 与 TLR4 受体的表达, 发现多糖处理后 TLR2 蛋白水平上调, 说明 PNP 免疫作用可能与 TLR2 受体相关<sup>[38]</sup>。Wu 等<sup>[39]</sup>通过分子动力学模拟了香菇多糖的三螺旋结构, 并探索了香菇多糖与 dectin-1 的结合机制, 发现香菇多糖在水中可保持弯曲的三螺旋, 主链刚性, 侧链相对柔性, 提供了香菇多糖主要通过氢键和 CH- $\pi$  相互作用与 dectin-1 结合的信息。因此, 本研究还需进一步探究 M 细胞上其他表面标志物能否介导多糖的转运, 并为其他天然多糖口服吸收机制奠定基础。

**作者贡献:** 吕弯弯和李科负责文中实验方案设计; 吕弯弯负责实验实施、数据收集、结果分析和负责文章撰写等工作; 李科、冯仕红和文雨薇负责提供文章思路, 在文章写作方面进行指导和修改; 秦雪梅、杜昱光和李震宇对整个实验内容给予监督, 并对文章进行修改完善。

**利益冲突:** 所有作者均声明不存在任何利益冲突。

## References

- [1] Yu Y, Shen M, Song Q, et al. Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: a review [J]. Carbohydr Polym, 2018, 183: 91-101.
- [2] Wang CZ, Zhang XQ, Liu YF, et al. Research progress on anti-

- tumor mechanism of *Astragalus* polysaccharide regulating immune cells [J]. Chin Arch Tradit Chin Med (中华中医药学刊), 2024. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R.20231013.1732.018.html>.
- [3] Chen BN. Effect of *Astragalus* extraction method on chemical composition and antioxidant activity [J]. Chin J Mod Med (中国现代医药杂志), 2023, 25: 83-86.
- [4] Zhao XL, Zhao WX, Duan CC, et al. Research progress on the relationship between chemical characterization and immune regulation of *Astragalus* polysaccharides [J]. Chin Arch Tradit Chin Med (中华中医药学刊), 2024, 24: 1-8.
- [5] Zhang Y, Liu J, Dou P, et al. Oral absorption characteristics and mechanisms of a pectin-type polysaccharide from *Smilax china* L. across the intestinal epithelium [J]. Carbohydr Polym, 2021, 270: 118383.
- [6] Liu C, Kou Y, Zhang X, et al. Strategies and industrial perspectives to improve oral absorption of biological macromolecules [J]. Expert Opin Drug Deliv, 2018, 15: 223-233.
- [7] Lundquist P, Artursson P. Oral absorption of peptides and nanoparticles across the human intestine: opportunities, limitations and studies in human tissues [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2016, 106: 256-276.
- [8] Zhang B, Liu M, Liu G, et al. Oral absorption mechanism of the polysaccharides from *Gastrodia elata* Blume base on fluorescence labeling [J]. Food Res Int, 2021, 144: 110342.
- [9] Meng Y, Xu YH, Wu L, et al. Application progress of Caco-2 single cell model and coculture model [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2023, 58: 1271-1275.
- [10] Liang E, Kabcenell AK, Coleman JR, et al. Permeability measurement of macromolecules and assessment of mucosal antigen sampling using *in vitro* converted M cells [J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 2001, 46: 93-101.
- [11] Chen QQ, Ren RR, Zhang QQ, et al. *Coptis chinensis* Franch polysaccharides provide a dynamically regulation on intestinal microenvironment based on the intestinal flora and mucosal immunity [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 267: 113542.
- [12] Wang YR. Study on Absorption Mechanism of *Astragalus* Polysaccharide in Small Intestine (黄芪多糖小肠吸收机制研究) [D]. Tianjin: Tianjin University, 2009.
- [13] Zhang Q, Li L, Hao S, et al. A lymphatic route for a hyper-branched heteroglycan from Radix Astragali to trigger immune responses after oral dosing [J]. Carbohydr Polym, 2022, 292: 119653.
- [14] Cui LJ. Study on the Immune Regulation Mechanism of *Astragalus* Polysaccharide APS-II and the Structure and Activity of Its Enzymatic Oligosaccharide Fragments (黄芪活性多糖 APS-II 免疫调控机制及其酶解寡糖片段的结构和活性研究) [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2021.
- [15] Li F, Wei YL, Zhao J, et al. Transport mechanism and subcellular localization of a polysaccharide from *Cucurbita moschata* across Caco-2 cells model [J]. Int J Biol Macromol, 2021, 182: 1003-1014.
- [16] Bai X, Zhang E, Hu B, et al. Study on absorption mechanism and tissue distribution of fucoidan [J]. Molecules, 2020, 25: 1087.
- [17] Chen XY, Tan XB, Sun E, et al. Study on oral absorption enhancers of *Astragalus* polysaccharides [J]. Chin J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2014, 39: 1243-1247.
- [18] Beloqui A, Brayden DJ, Artursson P, et al. A human intestinal M-cell-like model for investigating particle, antigen and microorganism translocation [J]. Nat Protoc, 2017, 12: 1387-1399.
- [19] Yang X, Chen X, Lei T, et al. The construction of *in vitro* nasal cavity-mimic M-cell model, design of M cell-targeting nanoparticles and evaluation of mucosal vaccination by nasal administration [J]. Acta Pharm Sin B, 2020, 10: 1094-1105.
- [20] Zhang XL. Study on Sugar-containing Macromolecules and Immune Activity of Shanxi Aged Vinegar (山西老陈醋含糖大分子及其免疫活性研究) [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2022.
- [21] Sun X, Luo YP. Establishment and evaluation of Caco-2 cell monolayer model [J]. Drug Eval (药品评价), 2015, 12: 33-35, 39.
- [22] Guo P, Li N, Fan LL, et al. Study of penetration mechanism of labrasol on rabbit cornea by Ussing chamber, RT-PCR assay, Western blot and immunohistochemistry [J]. Asian J Pharm Sci, 2019, 14: 329-339.
- [23] Li W, Chen GC, Hu WL, et al. Immunomodulatory activity and mechanism of APS10-100 component [J]. Chin J Vet Sci (中国兽医学报), 2023, 43: 1710-1719.
- [24] Yu YY, Yu YS, Wang YY, et al. New research progress on immune regulation and anti-tumor mechanism of *Astragalus* polysaccharide [J]. World Chin Med (世界中医药), 2023, 18: 2998-3003.
- [25] Rubas W, Cromwell ME, Shahrokh Z, et al. Flux measurements across Caco-2 monolayers may predict transport in human large intestinal tissue [J]. J Pharm Sci, 1996, 85: 165-169.
- [26] Li P. Preliminary Study on Immune Activity and Absorption Mechanism of Vinegar *Bupleurum* Polysaccharide (醋柴胡多糖免疫活性及其吸收机制初探) [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, 2020.
- [27] Du YY, Wang B, Zhang N. Research progress on the biological function and targeting vector of intestinal Peyer's patches M cells in lymphatic transmission [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2020, 55: 1166-1174.
- [28] Nakamura Y, Kimura S, Hase K. M cell-dependent antigen uptake on follicle-associated epithelium for mucosal immune surveillance [J]. Inflamm Regener, 2018, 38: 15.
- [29] Wu JJ, Yuan XY, Yang Y. Based on the intestinal M cell model, the effect of *Coptis chinensis* polysaccharide on the absorption of berberine through the small intestine and its related mechanism were studied [J]. Cent South Pharm (中南药学), 2020, 18:

- 525-530.
- [30] Tan YS, Hasigerile. The function of M cells and its role in drug absorption [J]. Inner Mongolia Med J (内蒙古医学杂志), 2007, 39: 1085-1088.
- [31] Xiao H. Study on the Transport Mechanism of Different Molecular Weight Hyaluronic Acid in Caco-2 Cell Monolayer Model (不同分子量透明质酸在Caco-2细胞单层模型中的转运机制研究) [D]. Jinan: Shandong University, 2024.
- [32] Wang Y, Bai X, Hu B, et al. Transport mechanisms of polymanuronic acid and polyguluronic acid across Caco-2 cell monolayers [J]. Pharmaceutics, 2020, 12: 167.
- [33] Zheng Z, Pan X, Wang H, et al. Mechanism of lentinan intestinal absorption: clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis [J]. J Agric Food Chem, 2021, 69: 7344-7352.
- [34] Wang K, Cheng F, Pan X, et al. Investigation of the transport and absorption of *Angelica sinensis* polysaccharide through gastrointestinal tract both *in vitro* and *in vivo* [J]. Drug Deliv, 2017, 24: 1360-1371.
- [35] Zhang QW, Shuang H, Li LF, et al. M cells of mouse and human Peyer's patches mediate the lymphatic absorption of an *Astragalus* hyperbranched heteroglycan [J]. Carbohydr Polym, 2022, 296: 119952.
- [36] Shao BM, Xu W, Dai H, et al. A study on the immune receptors for polysaccharides from the roots of *Astragalus membranaceus*, a Chinese medicinal herb [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 320: 1103-1111.
- [37] Li HF. Structural Analysis of *Astragalus* Polysaccharide APS-II and Its  $\alpha$ -1, 4-Glucan Endoglucanase Degrading Oligosaccharides (黄芪活性多糖 APS-II及其 $\alpha$ -1,4葡聚糖内切酶降解寡糖的结构解析) [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2023.
- [38] Jiang XL, Ma GF, Zhao BB, et al. Structural characterization and immunomodulatory activity of a novel polysaccharide from *Panax notoginseng* [J]. Front Pharmacol, 2023, 14: 1190233.
- [39] Wu X, Zheng Z, Guo T, et al. Molecular dynamics simulation of lentinan and its interaction with the innate receptor dectin-1 [J]. Int J Biol Macromol, 2021, 171: 527-538.