

黑参多糖的抗氧化和抗肿瘤活性

魏婷, 郭晓萌, 张焱*

(天津科技大学食品科学与工程学院, 天津 300450)

摘要: 为开发黑参多糖在食品药品领域的应用潜力, 以黑参多糖为原料利用高效液相色谱等方法测定多糖的理化性质, 通过体外抗氧化和对癌细胞抑制率的实验评估多糖的抗氧化和抗肿瘤活性。结果表明: 黑参多糖经 SephadexG-200 葡聚糖凝胶色谱柱分离出具有单一组分的 BGP-1, 其分子量约为 1.80×10^6 u, 主要由葡萄糖、阿拉伯糖和甘露糖组成的, 摩尔比为 70.52:17.35:5.63, 同时还含有少量的半乳糖和木糖。紫外光谱扫描得出黑参多糖已无明显的杂质, 傅里叶红外光谱显示其是含有 α -糖苷构型的中性多糖。抗氧化实验中黑参多糖在 0.8~4.0 mg/mL 范围内具有一定的抗氧化活性, 均可达到同浓度 Vc 作用下 62% 以上的效果。MTT 法和流式细胞术实验证实黑参多糖对 MGC-803 胃癌细胞的生长进行抑制, 在 4.0 mg/mL 抑制率达到 85.30%, Western Blot 结果发现 0.8~4.0 mg/mL 的黑参多糖通过线粒体途径的信号传递来促进细胞凋亡。综上证实黑参多糖具有抗氧化和抗肿瘤活性, 可经研发后应用于药物制剂领域。

关键词: 黑参; 多糖; 提取纯化; 抗氧化; 抗肿瘤

文章编号: 1673-9078(2023)03-55-65

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.3.0445

Antioxidant and Antitumor Activity of Black Ginseng Polysaccharides

WEI Ting, GUO Xiaomeng, ZHANG Yan*

(College of Food Science and Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300450, China)

Abstract: In order to develop the application potential of black ginseng polysaccharides in the food and medicine industries, the physical and chemical properties of polysaccharides were determined using high performance liquid chromatography and other methods. The antioxidant and antitumor activities of polysaccharides were evaluated through *in vitro* antioxidative and tumor cell inhibition experiments. A single component, BGP-1 (molecular weight 1.80×10^6 u) was separated from black ginseng polysaccharide using a Sephadex G-200 column chromatography. The polysaccharides were found to be mainly composed of glucose, arabinose, and mannose, with a molar ratio of 70.52:17.35:5.63, and also contained a small amount of galactose and xylose. Ultraviolet spectrum scanning showed that the black ginseng polysaccharide had no obvious impurities, and Fourier infrared spectrum showed that it was a neutral polysaccharide with α -glycoside configuration. In the antioxidant experiment, polysaccharides from black ginseng showed a certain antioxidant activity in the range of 0.8~4.0 mg/mL, and all could achieve the effect of more than 62% under the same concentration of Vc. The MTT method and flow cytometry experiments confirmed that black ginseng polysaccharides inhibited the growth of MGC-803 gastric cancer cells, and the inhibition rate reached 85.30% at 4.0 mg/mL. The Western Blot results showed that 0.8~4.0 mg/mL black ginseng polysaccharide promoted cell apoptosis through the signal transduction of the mitochondrial pathway. In conclusion, black ginseng polysaccharides have antioxidant and antitumor activities, which can be used in the field of pharmaceutical preparations after research and development.

Key words: black ginseng; polysaccharides; extraction and purification; antioxidation; antitumor

引文格式:

魏婷, 郭晓萌, 张焱. 黑参多糖的抗氧化和抗肿瘤活性[J]. 现代食品科技, 2023, 39(3): 55-65.

WEI Ting, GUO Xiaomeng, ZHANG Yan, et al. Antioxidant and antitumor activity of black ginseng polysaccharides [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(3): 55-65.

当生物体发生生理代谢时, 机体在持续地与体外进行能量交换, 在这个交换的过程中产生了机体代谢

收稿日期: 2022-04-13

作者简介: 魏婷 (1997-), 女, 硕士, 研究方向: 功能食品开发, E-mail: 1411128792@qq.com

通讯作者: 张焱 (1979-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 功能食品开发, E-mail: cpzyyan@tust.edu.cn

废物-自由基, 体内自由基的数量越多, 对细胞膜上电子的摄取量就越大, 当自由基数量不可控制时, 就对正常细胞产生损伤, 细胞的部分功能流失, 进一步导致机体的器官也受到毒害从而导致人体健康在一定程度上受损。天然植物中的多糖以其显著的清除自由基功效而受到重视。Chen 等^[1]报道, 灵芝子多糖能够起到清除自由基的功效, 为灵芝类多糖研发抗氧化物质

提供给一定的理论和数据基础。

胃癌是来源于胃粘膜表面上皮的恶性肿瘤,在所有恶性癌症中排在第3位^[2]。胃癌在日本和中国等亚洲地区更为普遍,饮食不规律是导致胃癌的主要原因,这也导致现代人患胃癌几率逐年上升^[3]。目前,许多学者和专家一致在寻找临床治疗此种疾病效果更好的药物^[4]。大量文献都有对多糖的抗肿瘤活性进行研究报告,目前已被发现的天然植物多糖可抑制一些胃癌、肺癌、宫颈癌等的癌细胞增殖。Cai等^[5]利用提取出的人参多糖对胃癌细胞 HGC-27 进行了作用机制研究,结果显示随着浓度的增高,人参多糖可以阻止细胞侵袭和转移过程。程素盼^[6]探究了分离纯化后的太麻多糖抗肿瘤活性,发现不同分子量组分的多糖均对肝癌 HepG 2 细胞和宫颈癌 Hela 细胞呈现抑制生长的作用,且分子量浓度更高的组分具有更好的抑制效果。

黑参是将人参的根茎进行九蒸九曝、多次加工操作而获得的一种新型人参加工品。查阅大量文献可知,黑参有着广泛的生物活性,其中较为显著的是抗癌活性和抗氧化活性,一些少量文献中也记录着,黑参可能存在提高机体免疫和降血糖、减少胆固醇以及抗衰老等活性^[7,8],此前也有报道,黑参多糖对羟自由基的清除能力强于白参多糖的清除能力^[9]。但总体而言国内外相对于人参的其他炮制品如生晒参、红参等研究较全面,而有关黑参功效的全面报道相对较少^[10],因此黑参具有很好的研发前景。

本研究探讨了黑参提取物多糖的提取工艺和初级结构,采用化学实验法探究其生物活性,开发其在药物领域的潜力,为其今后的研究开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

1.1.1 原料

鲜参是采购自吉林长青参业有限公司;黑参来源于天津科技大学 302 实验室自制。

黑参制备工艺如下:

将鲜参在零下 20 °C 冰箱中冷冻 2 h 后取出放置于室温下直至其完全融化→再次在零下 20 °C 冰箱中冷冻 2 h,再次至室温下完全融化→第一阶段的发酵温度设为 45 °C,湿度 60~80,时间 7 d→第二阶段发酵温度设置 80 °C,湿度 60~80,时间 7 d→第三阶段发酵温度设置 60 °C,湿度 60~80,时间 14 d→第四阶段温度 45 °C,干燥 7 d 至水分 12% 以下,冻干即得到黑参原料

MGC-803 细胞购买于北京协和细胞库。

1.1.2 试剂

无水乙醇、正丁醇、葡聚糖凝胶 G200 均为分析

纯,购自天津江天化工有限公司;DMEM 培养基、噻唑蓝 (MTT)、二甲基亚砷 (DMSO) 购自北京索莱宝科技有限公司,Annexin V-FITC 凋亡试剂盒、活性氧检测试剂盒以及罗丹明-123 染液均购自美国 Sigma 公司。

1.1.3 仪器

Genesys 19s 紫外可见分光光度计,美国 Thermo 公司;BD FACSCaliber 流式细胞仪,美国 Becton Dickinson 公司;MCO-18AIC CO₂ 恒温培养箱,日本三洋公司;ES1035B 电子分析天平,上海力辰仪器科技有限公司;PowerPac 1000 电泳仪、Trans-Blot SD 电转仪,美国 BIO-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 黑参多糖的制备与纯化

将黑参按料液比 1:35 放于 50 °C 温水浸泡,超声提取 60 min,冻干后加 80% 体积分数的乙醇浸泡,并在 4 °C 冰箱静置过夜,收集沉淀加水溶化后冻干成粉末。加水溶解,采用大孔树脂 AB-8 脱色,Sevag 法^[11,12]除蛋白,在透析袋中透析,经 48 h 后换成超纯水在 4 °C 度冰箱中透析 24 h,冷冻干燥 24 h 得到粗的黑参多糖。将粗黑参多糖按 20 mg/mL 配置成溶液,过 Sephadex-G200 葡聚糖凝胶柱,速调节为 0.33 mL/min,每管收集 1 mL,每管抽 0.2 mL 在酶标仪下测糖含量合并相同的组分,冻干即得到黑参多糖。

1.2.2 黑参多糖相对分子质量的测定和单糖组成的测定

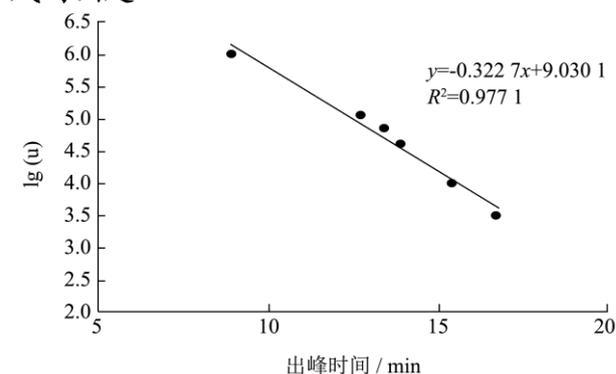


图1 多糖标准品标准曲线图

Fig.1 Standard curve of standard polysaccharide

分别将葡聚糖标准品 (T3、T10、T40、T70、T110、T1000)、黑参多糖用水溶解过滤膜后备用, HPLC 上样,凝胶色谱柱选用 TSK-GELG4000PWXL。通过对不同分子量大小的葡聚糖标准品出峰时间的测定,绘制出如图 1 的标准曲线,再根据样品的出峰时间即可算出其分子量大小。采用 PMP-衍生化法测黑参多糖的单糖组成成分,分别进行多糖的水解和衍生化,然

后用色谱柱 C₁₈ 上 HPLC 进行测定^[13,14]。

1.2.3 多糖的扫描电子显微镜 (SEM) 分析

采用扫描电镜可以在大倍数下放大分子物质的结构表面,从而能够观察到多糖更细致的形貌,探究其形态规律。用牙签蘸取微量的 BGP-1 干粉样品粘贴在样品台的导电胶上,洗耳球轻轻吹拭,使表面只有薄薄的一层,做好各组标记。喷金处理后上机进行操作,将放大倍数设置为 300 倍和 1 000 倍,调节 X 轴和 Y 轴找到合适的局部照片进行拍照保存。

1.2.4 多糖紫外-可见光谱 (UV) 分析

紫外全波长扫描可检测多糖的纯度。精密称取 2 mg 的 BGP-1, 溶解于 2 mL 的超纯水中,使样品配制成为 1 mg/mL 的水溶液,吸取 200 μ L 到 96 孔板中,使用紫外光谱仪在 200~800 nm 波长内进行全波长扫描,以蒸馏水作为空白对照组,记录紫外吸收光谱。

1.2.5 多糖的红外光谱 (FT-IR) 分析

在操作台的天平上精确称取 1 mg 的 BGP-1 冻干粉,然后与少量的溴化钾粉末在研钵中进行快速的研磨均匀,直至混合固体细致成粉。小心将混合物粉末装入压片模具中固定进行压片,压力上升到 90 Pa 时泄压,此时观察,若粉末被压成均匀一致且透明无裂痕的薄片就可以在傅里叶红外光谱仪上进行扫描,否则需要重新进行压片操作。扫描次数:16 次,保存每个样品的红外光谱图。

1.2.6 抗氧化活性的检测

DPPH 自由基清除测定:按照 Wang^[15]的方法,分别在 250 μ L 的 0、0.4、0.8、1.6、2.4、3.2、4.0 mg/mL 质量浓度的黑参多糖溶液中加入 1.25 mL 的 DPPH 溶液,30 min 后 517 nm 处测定吸光值记为 A₁。另取一组同样浓度的样品溶液加入等量的 75% 乙醇,吸光度值记为 A₂,以抗坏血酸为阳性对照另做一组实验。反应要在避光环境下进行。

$$C_1 = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3} \right) \times 100\% \quad (1)$$

式中:

C₁—DPPH 自由基清除率, %;

A₁—DPPH 组在 517 nm 处的吸光度值;

A₂—75% 乙醇组在 517 nm 处的吸光度值;

A₃—抗坏血酸组在 517 nm 处的吸光度值。

羟自由基清除能力的测定:参考陈放^[16]的方法并稍作修改,将黑参多糖溶于一定蒸馏水中,配置成 0、0.4、0.8、1.6、2.4、3.2、4.0 mg/mL 的多糖溶液。分别在七个试管中按顺序加 1 mL 多糖溶液、1.6 mL FeSO₄ 溶液、1.0 mL 水杨酸和 1.0 mL 的 H₂O₂ 溶液,30 min 后在酶标仪上记录吸光度值 A₅,另取七个试管

中分别加入等量的蒸馏水、FeSO₄ 溶液、水杨酸和 H₂O₂,吸光度值记为 A₀,另外一组中添加试剂分别为多糖溶液、FeSO₄ 溶液、水杨酸和蒸馏水,吸光度值记为 A₄。用抗血酸 (Vc) 作为对照,做三组平行组,全部反应要在 37 $^{\circ}$ C 水浴中进行。

$$C_2 = \left(1 - \frac{A_0 - A_5}{A_4} \right) \times 100\% \quad (2)$$

式中:

C₂—羟自由基清除率, %;

A₅—多糖+H₂O₂ 溶液组的吸光度值;

A₀—蒸馏水+H₂O₂ 溶液组的吸光度值;

A₄—蒸馏水+多糖溶液组的吸光度值。

超氧阴离子自由基清除测定:参考朱振元等^[17]的实验方法,向 1 mL 0、0.4、0.8、1.6、2.4、3.2、4.0 mg/mL 浓度的多糖样品中分别添加盐酸缓冲液和超纯水,20 min 反应结束后分别向试管中加 0.4 mL 25 mmol/L 邻苯三酚溶液和 2~3 滴 8 mol/L HCl,酶标仪下的吸光度值记为 A₇;另取一组试管,将多糖溶液换位蒸馏水做同样操作,吸光度值记为 A₆,以 Vc 为阳性对照。其中,Tris-HCl 要先在室温下静置 20 min,将 pH 值调为 8.2;邻苯三酚和盐酸中间要隔 5 min 的反应时间,测定波长选择 325 nm。

$$C_3 = \frac{A_6 - A_7}{A_6} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

C₃—超氧阴离子自由基清除率, %;

A₇—多糖溶液组的吸光度值;

A₆—蒸馏水组的吸光度值。

还原能力的测定:参考何运辉^[18]的实验方法,向各浓度的多糖溶液中加入 2.5 mL 磷酸缓冲液 (0.2 mol/L, pH 值 6.6),和 2.5 mL 铁氰化钾溶液,水浴反应后再加入 2.5 mL 三氯乙酸,混匀后离心,向上清液中加入等量的超纯水和 0.5 mL 的三氯化铁,静置反应后测定吸光度记为 A₉,另取一组试管以蒸馏水代替多糖液进行同样操作吸光度记为 A₈,其中,磷酸缓冲液浓度 0.2 mol/L, pH 值 6.6;波长选在 700 nm 处,水浴温度选择 50 $^{\circ}$ C,时间 20 min。

$$R = \frac{A_8 - A_9}{A_8} \times 100\% \quad (4)$$

式中:

R—还原能力, %;

A₉—多糖溶液组的吸光度值;

A₈—蒸馏水组的吸光度值。

1.2.7 抗肿瘤活性的检测

MTT 法检测黑参多糖对细胞的增殖抑制率:取生

长状态良好的 MGC-803 细胞进行传代培养, 24 h 后将培养瓶从培养箱中取出来后收集细胞, 得到细胞沉淀, 将用培养基配制且过膜除菌的黑参多糖溶液配制成不同浓度重悬细胞, 在 96 孔板中每孔加入 100 μL , 使其终浓度为 0、0.8、2.4、4 mg/mL, 每组三组复孔。再培养 48 h 后取出 96 孔板, 在每孔中用移液枪吸取 20 μL 的 MTT 后再培养 4 h, 最后进行加 DMSO 的操作, 在此之前要先每孔弃去 150 μL 的上清液, 替换为等量的 DMSO, 于室温下在震荡仪上震荡 96 孔板 10 min, 使晶体充分溶解。最后在酶标仪上与 570 nm 处测定每组的吸光度值。

$$S = \left(1 - \frac{A_i}{A_j}\right) \times 100\% \quad (5)$$

式中:

S ——抑制率, %;

A_i ——加药组的吸光度值;

A_j ——以培养基代替等量的黑参多糖溶液的对照组的吸光度值。

Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡的检测:

参考同样的细胞培养方法后收集各浓度细胞, 向细胞沉淀中加入 195 μL 结合液 (buffer) 混匀细胞, 调整细胞密度为每毫升 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个。向悬液中分别滴加 5 μL Annexin V-FITC 和 10 μL 碘化丙啶 (PI), 每加一步后都轻轻混匀, 是内容物充分发生反应, 然后静置 15 min。利用流氏细胞仪检测细胞凋亡率, 反应过程及上机过程都要在避光环境下进行。

黑参多糖对细胞线粒体膜电位影响的检测: 参考同样的细胞培养方法后用细胞计数板将每个浓度组的细胞调整为约每毫升 1.0×10^6 个, 在离心管中吸取 500 μL 细胞悬液和 5 μL 的 Rh-123, 37 $^\circ\text{C}$ 在培养箱中避光孵育 30 min。设置转速 1 500 r/min, 时间为 5 min 离心收集细胞, 再用 PBS 清洗染液后再离心, 重复两次清洗操作。用 PBS 重悬细胞至 1 mL, 用流式细胞仪进行荧光强度变化的检测。

黑参多糖对细胞内活性氧含量影响的检测: 参考同样的细胞培养方法后收集细胞, 用 DCFH-DA 对沉淀进行重悬后在到培养箱中培养 0.5 h, 其中每 3~5 min 震荡将其混匀一次。培养结束后以培养基再细胞进行洗涤后进行上机检测。需要注意的是: DCFH-DA 要用培养基提前稀释至浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$; 培养基洗涤细胞的目的是避免有些 DCFH-DA 没有完全深入细胞而是残留在悬液中, 对实验造成干扰; 这两步中所用的培养基应不含血清; 每次洗涤后离心细胞时的转速应为 1 500 r/min, 时间为 5 min。

WB 蛋白免疫印记法检测细胞凋亡相关蛋白的变

化: 参考同样的细胞培养方法后收集细胞, 依次进行电泳、转印、封闭 PVDF 膜、进行一抗、二抗杂交: 将 PVDF 膜放入稀释好的一抗溶液中, 要确保 PVDF 膜的每个角落充分地与一抗接触到, 然后放置于 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中孵育 18 h。孵育一抗结束后用 TBST 清洗 PVDF 膜三次, 每次时间最好为 15 min。膜彻底洗净后再放入稀释好的二抗中, 放置于摇床上孵育 2 h, 孵育结束后, 再清洗三次膜、最后在暗室中进行膜的曝光显影。

1.3 数据处理

实验数据用软件 IBM SPSS Statistics 26 进行, 采用软件 Origin 2019 进行制图。方差分析采用 t 检验法检验, 检验水平 $P < 0.05$ 为差异, 有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 多糖的提取与纯化

经过脱色脱蛋白过葡聚糖凝胶柱后得到单一组分黑参多糖, 命名为 BGP-1, 其洗脱曲线见图 2。

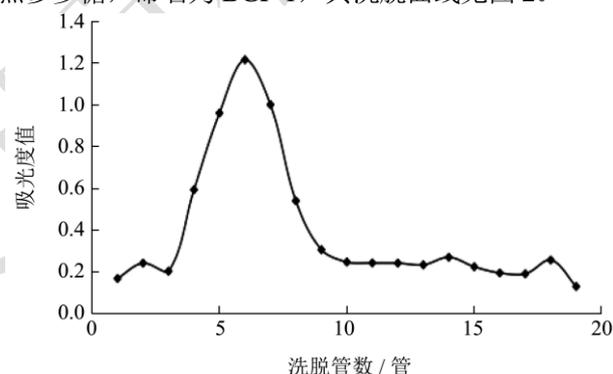


图 2 洗脱曲线

Fig.2 Elution curve

2.2 多糖的结构分析

2.2.1 分子量的测定

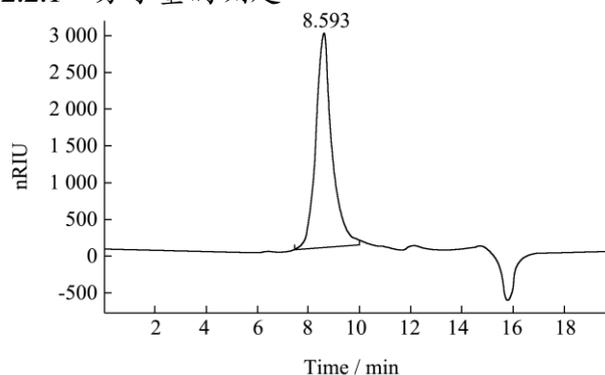


图 3 黑参多糖 HPLC 色谱图

Fig.3 HPLC chromatogram of polysaccharide from Black ginseng

HPLC 色谱图 3 显示, 黑参多糖在 8.59 min 处出现了单一且对称的峰型, 由此表明纯化后的多糖组分单一, 将此组分命名为 BGP-1, 将 BGP-1 的出峰时间代入图 1 标准曲线方程的 x 值中, 算得 log M 约为 6.26, 也就是 BGP-1 的分子量约为 1.80×10^6 u。这说明 BGP-1 的分子量较大, 纯度较高。

2.2.2 单糖组成分析

通过 PMP-柱前衍生化法和液相色谱检测黑参多糖 BGP-1 的单糖组成, 将多糖先水解后衍生化后, 在特定时间内将各单糖成分分离。在其他实验条件和分离时间相同的前提下, 分别将标准混合单糖和黑参多糖 BGP-1 进行上样。根据单糖的出峰时间以及响应值就可以判定出所测多糖中的单糖组分和各单糖之间的摩尔比。标准混合单糖出峰图及 BGP-1 出峰图如图 4 和图 5 所示, 通过两图对比可以得出, 黑参多糖的主要单糖组成成分有葡萄糖、阿拉伯糖和甘露糖, 经过计算得到其摩尔比为 70.52:17.35:5.63, BGP-1 中同时还存在少量的半乳糖醛酸、半乳糖和木糖。

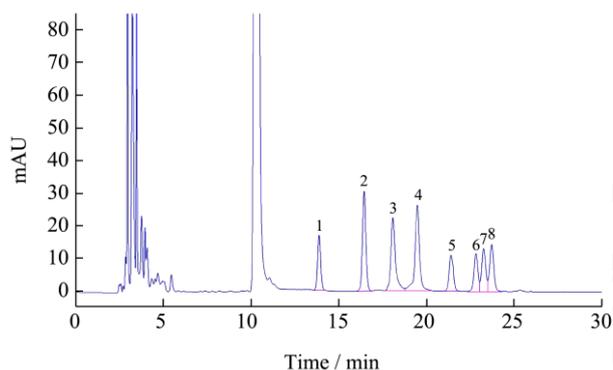


图 4 标准单糖液相色谱图

Fig.4 HPLC of standard monosaccharide

注: 图中 1~8 分别代表甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖和阿拉伯糖。图 5 同。

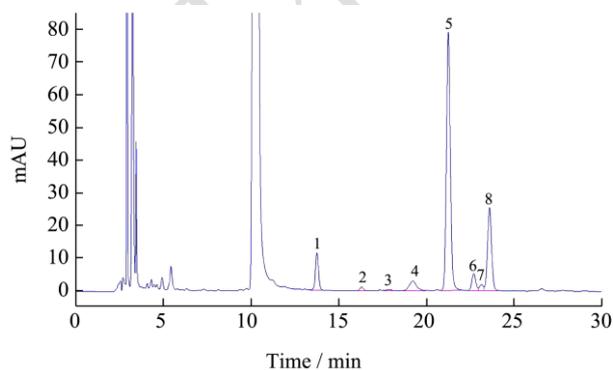


图 5 BGP 单糖组成液相色谱图

Fig.5 HPLC of BGP monosaccharide

2.2.3 紫外可见光全波长扫描

BGP-1 的紫外全波长扫描图如下图 6 所示, 在 260 nm 和 280 nm 处没有出现明显的吸收峰, 说明

BGP-1 中不存在或存在微量的核酸、蛋白质这些杂质, 会对后续多糖活性的测定判断产生影响。

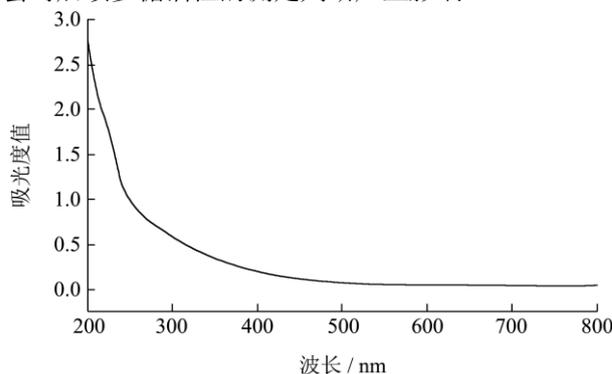


图 6 BGP-1 紫外可见光全波长扫描

Fig.6 UV spectrum of BGP-1

2.2.4 SEM 观察多糖表面结构

扫描电子显微镜 (SEM) 是探究的多糖外貌特征的常见有效的手段, 通过将多糖表面按一定比例放大, 可以在显示屏上清晰地观察并记录下到结构的分布规律。黑参多糖 BGP-1 的扫描电镜图如图 7 所示, 在 300 和 1 000 倍的放大倍数下, BGP-1 呈现丝状以及微量的片状结构, 表面无明显的孔洞, 交织在一起的结构层层堆积, 构成了刚性结构。

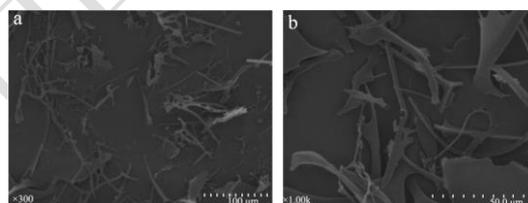


图 7 BGP-1 电镜扫描图

Fig.7 SEM images of BGP-1

注: a: $\times 300$; b: $\times 1000$ 。

2.2.5 多糖的红外光谱分析

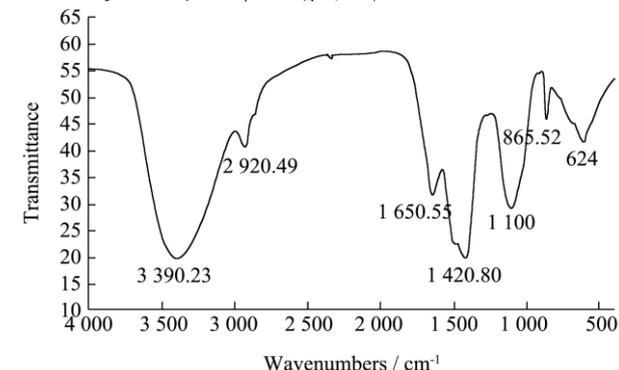


图 8 BGP-1 红外光谱图

Fig.8 FT-IR spectrum of BGP-1

大量实验研究证实, 红外光谱法可以对所选化合物的特征官能团进行鉴定和分析, 例如在特定的吸收峰值范围内就能够判断多糖的糖苷构型。BGP-1 的红外光谱图如 8 所示, 在 $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$ 的扫描范围内,

红外图谱证实 BGP-1 存在如下几个特征官能团^[19]。3 390.23 cm^{-1} 处有一个最宽的吸收峰, 那是由于 O-H 伸缩振动引发的, 2 920.49 cm^{-1} 附近甲基和亚甲基中的 C-H 键伸缩振动引起的吸收峰和 1 420.80 cm^{-1} 处的峰 (C-H 弯曲振动) 这几个峰是多糖的特征峰。在 1 650.55 cm^{-1} 处的条带表明存在结合水。在 1 100 cm^{-1} 范围内的峰属于 BGP-1 中 C-O-H 侧基团和 C-O-C 糖苷环的特征。此外, 在 865.52 cm^{-1} 处的特征吸收表明 BGP 中存在 α -糖苷键。据此推测, BGP 是一种含有 α -糖苷构型的中性多糖。

2.3 多糖抗氧化活性

多糖的抗氧化能力如图 9 所示。

2.3.1 黑参多糖对 DPPH 自由基的清除能力

如图 9a 所示, 黑参多糖对 DPPH 自由基的清除率呈现依次上升的趋势, 高浓度时增长率减缓。在加药剂量在 0.4~3.2 mg/mL 的范围内, 清除率由 35.44% 上升到 69.74%, 继续增大质量浓度到 4 mg/mL 时, 抑制率趋于平缓, 达到最大值 70.59%, 且达到了 Vc 清除率效果的 69.99%。这说明 BGP-1 对 DPPH 具有良好的清除率。

2.3.2 黑参多糖对羟基自由基的清除能力

如上图 9b 所示, 随着黑参多糖质量浓度由 0.4 mg/mL 增大到 4 mg/mL 时, 对羟自由基的清除活性逐渐增大, 清除率由 33.54% 上升到 69.52%, 量效关系显著。经对比可以看出, 在相同浓度下, BGP-1 的清除能力均低于 Vc 的清除率。经计算, BGP-1 对羟自由基的清除率达到抗坏血酸清除率效果的 62.64%。效果稍微差于同浓度对比下对 DPPH 自由基的抑制效果。

2.3.3 黑参多糖对超氧阴离子自由基的清除能力

在黑参多糖控制在 0~4.0 mg/mL 内时, 黑参多糖对超氧阴离子自由基的抑制作用变化显著, 在 0.4~1.6 mg/mL 时, 清除能力由 40.73% 上升到 71.58%, 当质量浓度为 1.6~4 mg/mL 时, 清除能力从 71.58% 上升到 85.30%, 上升效果趋于平缓。每克黑参多糖的超氧阴离子清除能力相当于 885.77 mg Vc 的清除能力, 说明此浓度下的黑参多糖对超氧阴离子具有明显清除作用。

2.3.4 黑参多糖的还原能力

如图 9d 所示, 随着黑参多糖质量浓度由 0 mg/mL 到 4 mg/mL 时, 吸光度值升高, 证明还原力随浓度变化而逐渐增大。经过对比可以看出, 在相同浓度下, 黑参多糖的还原力低于 Vc 的还原力。经计算, 在质量浓度为 2.4 mg/mL 时, 每克黑参多糖的还原力相当

于 622.94 mg Vc 的还原力。即达到 Vc 效果的 62.29%。

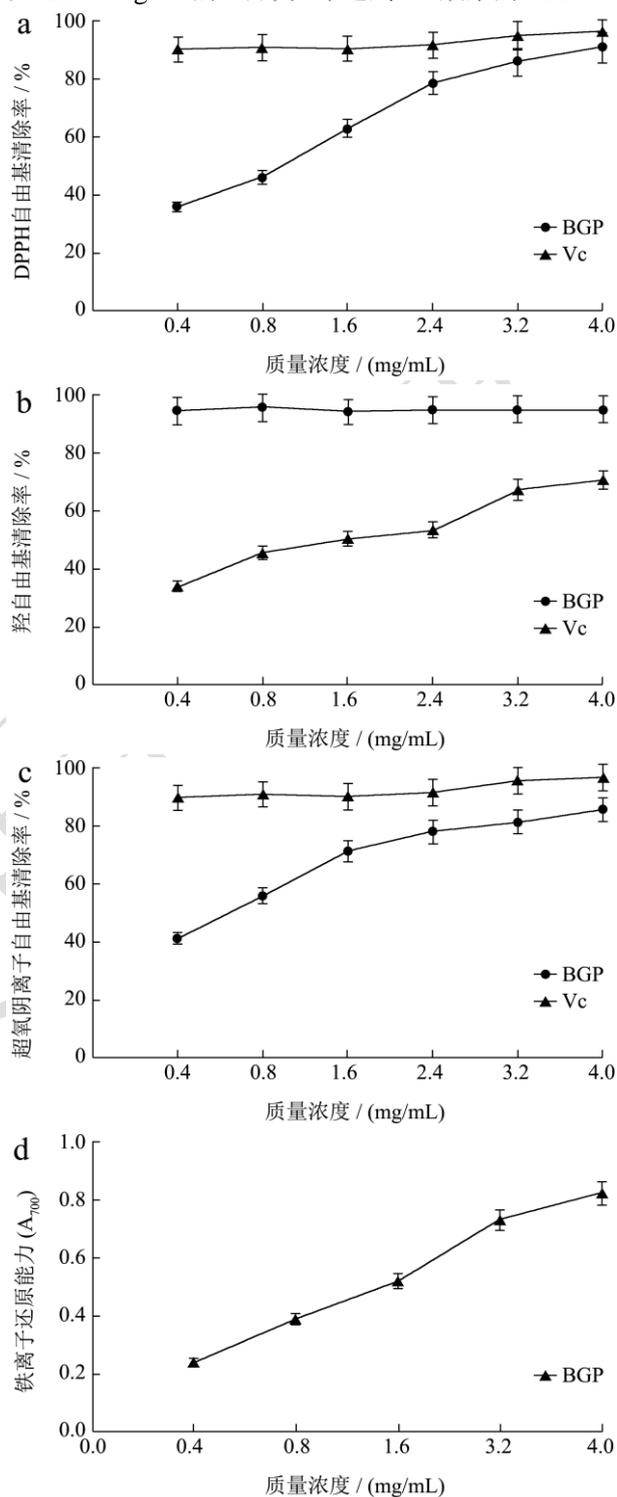


图 9 BGP-1 的抗氧化能力

Fig.9 Antioxidant capacity of BGP-1

2.4 多糖对癌细胞的活性

2.4.1 MTT 检测对细胞增殖率的影响

对黑参多糖进行增殖抑制实验, 选取 0.4、0.8、1.6、2.4、3.2、4 mg/mL 6 个质量浓度梯度, 12、24、48 h 3 个时间梯度, 如图 10 所示, 黑参多糖能够显著

抑制 MGC-803 细胞的增殖，并且随着作用浓度的不断加大和时间得延长，MGC-803 细胞的存活率越低，当作用时间为 48 h 时，对细胞的抑制率从 22.40% 上升到 85.30%，呈现出对作用浓度和时间的依赖关系。经计算，作用时间为 48 h 时，黑参多糖对 MGC-803 细胞的作用效果较为明显。根据实验的半致死浓度 (IC₅₀) 结果以及时间、经济因素上的考虑，在随后的细胞实验中，采用浓度分别为 0、0.8、2.4 以及 4 mg/mL 的黑参多糖作用细胞 24 h 来探究其对细胞凋亡的机制。

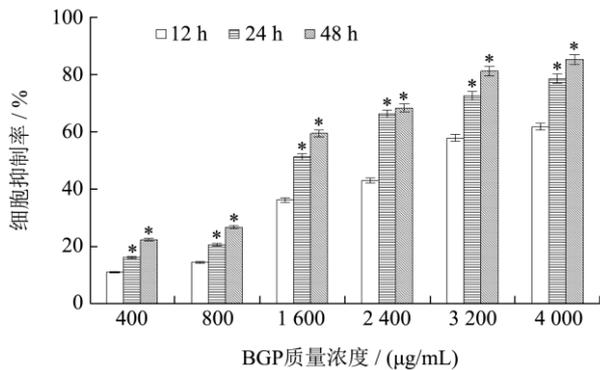


图 10 各条件下 BGP-1 对 MGC-803 细胞的抑制作用

Fig.10 Inhibitory effect of BGP-1 on MGC-803 cells at different concentrations and time

注：与空白组相比显著性差异 $P < 0.05$ 。

2.4.2 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡

将 Annexin-V 进行荧光 (FITC) 标记，在此荧光探针进入细胞后，与发生早期凋亡的胞外 PS 结合后发生的反应产生荧光，荧光的变化规律就可以作为探究细胞早期凋亡的依据。当细胞发生晚期凋亡和坏死时，细胞膜遭到损坏，形态破裂，此时 PI 能够轻松渗入细胞内对核进行染色。因而此法可以通过染色判断细胞是否正处于晚期凋亡甚至要到坏死的阶段。综合这两种染色方法就可以检测到并探究细胞凋亡的完整过程。结果图中各阶段细胞分布位置如下：正常细胞分布在左下象限；早期凋亡细胞分布在右下象限；晚期凋亡细胞分布在右上象限；坏死细胞分布在左上象限。

图 11a 为 0 mg/mL 的作用质量浓度，即正常生长状态下的细胞，此时绝大部分细胞都处在左下象限，表明此时大部分细胞都是正常细胞，未发生凋亡，而左上象限有个别细胞的分布，原因可能是在收集细胞时离心操作不当，转速过大造成了细胞坏死；当作用质量浓度上升为 0.8、2.4 和 4 mg/mL 时，如图 11b~11d 所示，与零浓度组相比，左下象限细胞数目逐渐发生偏移，大部分都转移到了右上和右下象限，作用浓度越大，偏移的数目越多，及随着浓度的增高，细胞逐渐发生了凋亡，早期凋亡的细胞数目由最初的 3.51%

上升至最高浓度时的 15.32%，晚期凋亡细胞数目由 14.96% 升至 61.89%，总凋亡细胞比例从 18.83% 提升至 78.92%，各个象限的散点数也印证了凋亡的发生，作用质量浓度为 4 mg/mL 时绝大部分细胞都已经发生了凋亡，凋亡数目远远超过了正常细胞的数目，这与在显微镜下观察到的细胞数变化也相一致，实验结果印证了黑参多糖能诱导 MGC-803 细胞凋亡。

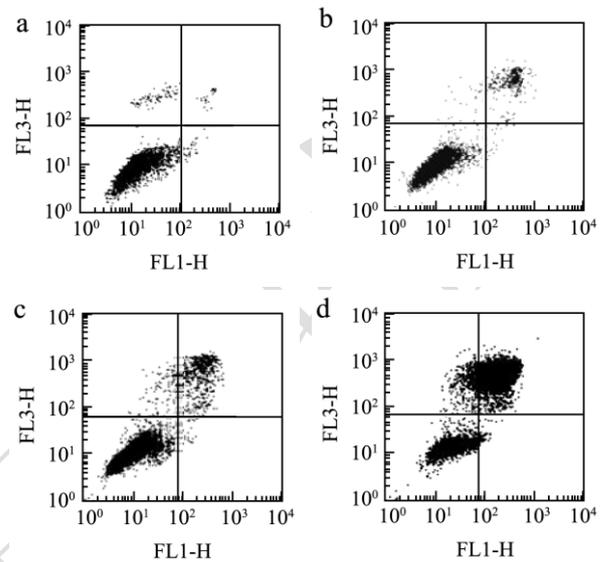


图 11 BGP-1 作用后 MGC-803 细胞的双染结果图

Fig.11 Staining results of MGC-803 cells induced by BGP-1

注：a~d 分别为 0、0.8、2.4、4.0 mg/mL。图 13、15 同。

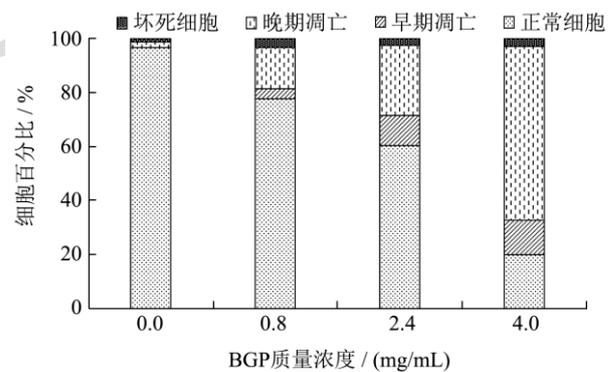
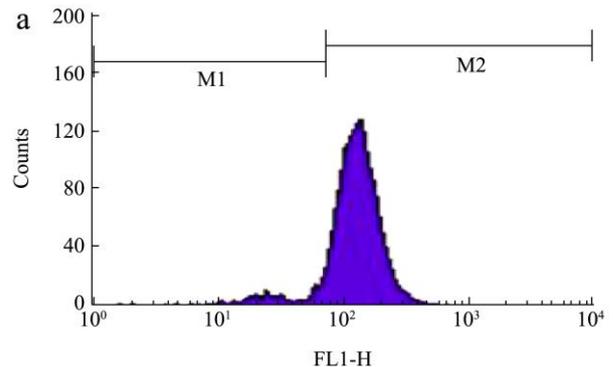


图 12 各时期细胞分布百分比

Fig.12 Percentage of cell distribution in each period

2.4.3 黑参多糖对细胞线粒体膜电位的影响



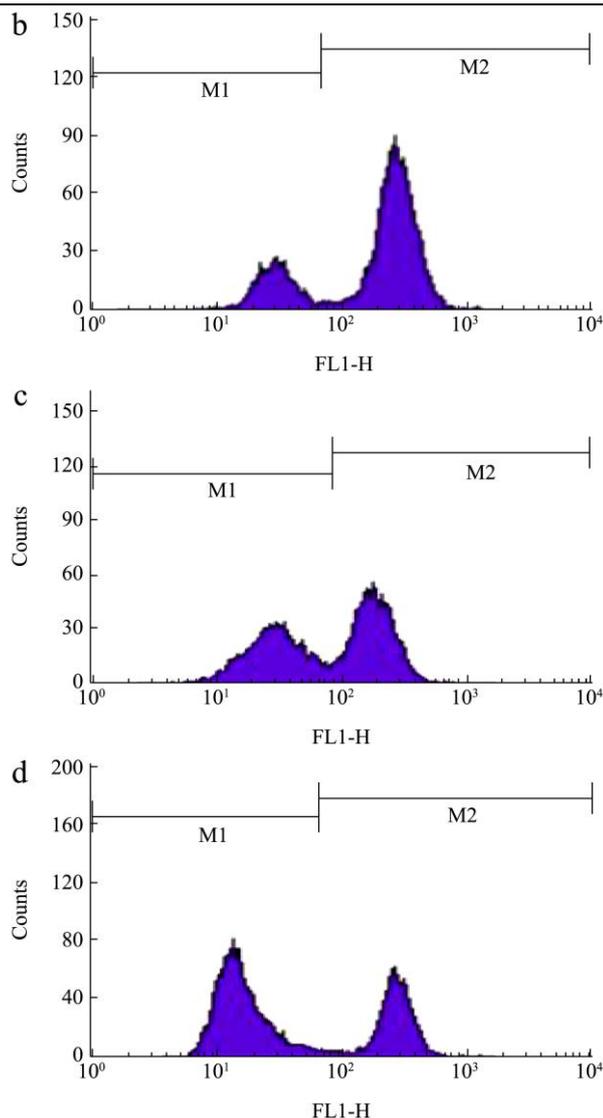


图 13 黑参多糖对细胞线粒体膜电位的影响

Fig.13 Effect of Black ginseng polysaccharide on mitochondrial transmembrane potential of MGC-803 cells

由于线粒体膜电位降低是细胞发生凋亡的重要标志, 因此若要佐证凋亡的发生, 最好进行细胞线粒体膜电位的检测。当细胞发生凋亡时, 结合 Rh-123 的能力降低, 通过用流式细胞仪观察被 Rh-123 染色后细胞荧光强度变化的差异, 从而能够对细胞中线粒体膜电位的差异有初步判断, 进而印证细胞早期凋亡的发生。

图 13 中, M2 代表有荧光强度的细胞, M1 则是没有荧光强度的细胞。观察图 13a~13d 趋势可发现, 当黑参多糖质量浓度由 0 mg/mL 变化为 4 mg/mL 后, M2 占总细胞含量逐渐减少, 表明 RH-123 的可见荧光强度发生了减弱, 说明细胞开始发生凋亡, 线粒体膜电位差消失, 从而由电位差作用进入线粒体基质的 RH-123 逐渐减少。活细胞数目逐渐变少, 表现为信号峰不断向左移。M2 的细胞占比由最初的 97.41% 减少为最高浓度时的 39.71%, 印证了细胞的凋亡, 即细胞

膜内破坏, 造成线粒体膜电位差的消失, RH-123 只能结合到越来越少的细胞, 因而可见的荧光强度降低。此实验也说明, MGC-803 在黑参多糖的作用下发生了凋亡。

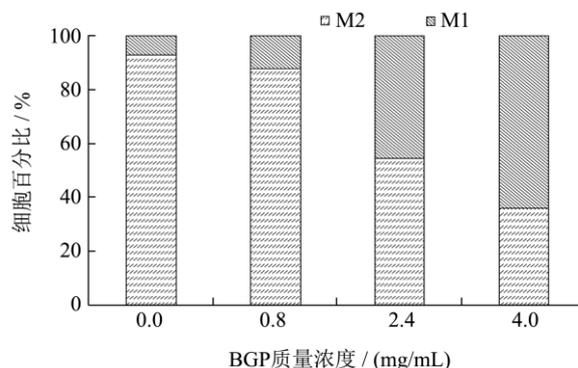


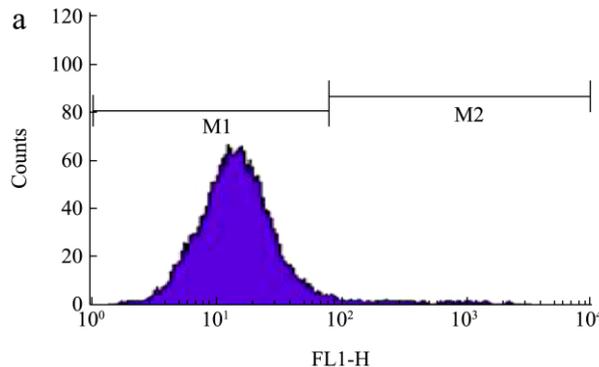
图 14 黑参多糖对 MGC-803 细胞线粒体跨膜电位的影响结果

Fig.14 Effect of Black ginseng polysaccharide on mitochondrial transmembrane potential of MGC-803 cells

2.4.4 黑参多糖对细胞内活性氧含量的影响

活性氧 (ROS) 包含超氧自由基、过氧化氢及一些羟化物等, 通常情况下 ROS 在细胞中的含量处于正常的低水平状态, 当发生凋亡时, 细胞内的氧化系统平衡发生破坏, ROS 含量也猛然上升, ROS 过量会导致细胞中促凋亡因子产生激活, 加速细胞的凋亡进程。利用荧光法可检测 ROS 含量, 在 ROS 的影响下, DCFH 被氧化为具有荧光特性的物质 DCF, 判定方法为细胞内存在越多的活性氧, 就能够氧化越多的 DCFH, 在仪器上能够检测到的荧光也就越来越强, 也就可以判定细胞凋亡的程度。

测定结果反映在图 15 的峰值变化中, 当加药浓度为 0 mg/mL 时, 即细胞在正常状态下生长, 细胞几乎全部处于 M1 范围, 即不能够观察到荧光, 当加药浓度逐渐由 0.8 mg/mL 增长到 4.0 mg/mL 时, M2 细胞占比增多, 越来越多的细胞能够观察到荧光, 证明细胞发生了凋亡, 也反映了 ROS 含量从开始的 15.12% 上升到 60.29%, 此实验证明 MGC-803 细胞在黑参多糖的作用发生氧化损伤, ROS 含量超标, 造成细胞凋亡。



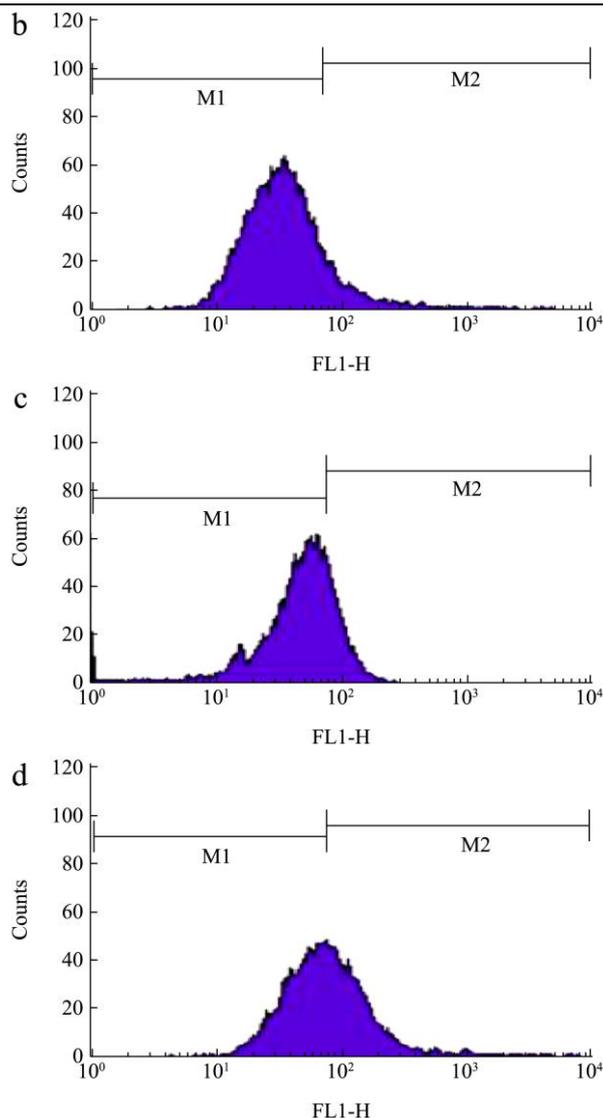


图 15 黑参多糖对 MGC-803 细胞内活性氧的影响

Fig.15 Effects of black ginseng polysaccharide on intracellular

reactive oxygen species on MGC-803 cells

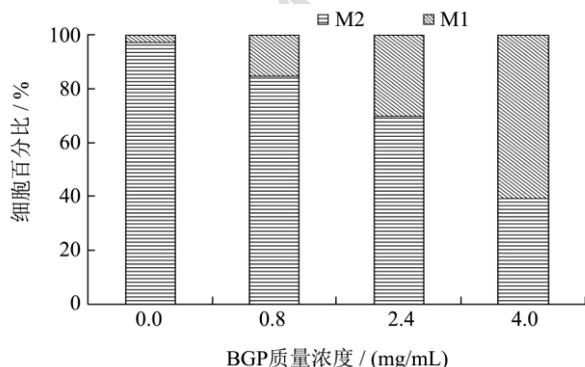


图 16 黑参多糖对 MGC-803 细胞内活性氧的影响结果

Fig.16 Effect of black ginseng polysaccharide on intracellular

reactive oxygen species on MGC-803 cells

2.4.5 MGC-803 细胞内相关蛋白的变化

免疫印记法 (WB) 可以通过抗原抗体的特异性结合检测样品中特定蛋白, 然后对蛋白进行定性定量分析, 通过对条带宽浅的观察就能直接感受到与凋亡相关基因的表达变化。以 β -actin 作为内参, 选择 Bcl 家族中的 *Bcl-2*, *Bax* 基因, Caspase 家族中的 *Caspase-3*、*Caspase-9* 因子以及 *Cyt-C* 为主要研究因子, 测定黑参多糖作用 MGC-803 细胞 24 h 后胞内相关蛋白的变化。

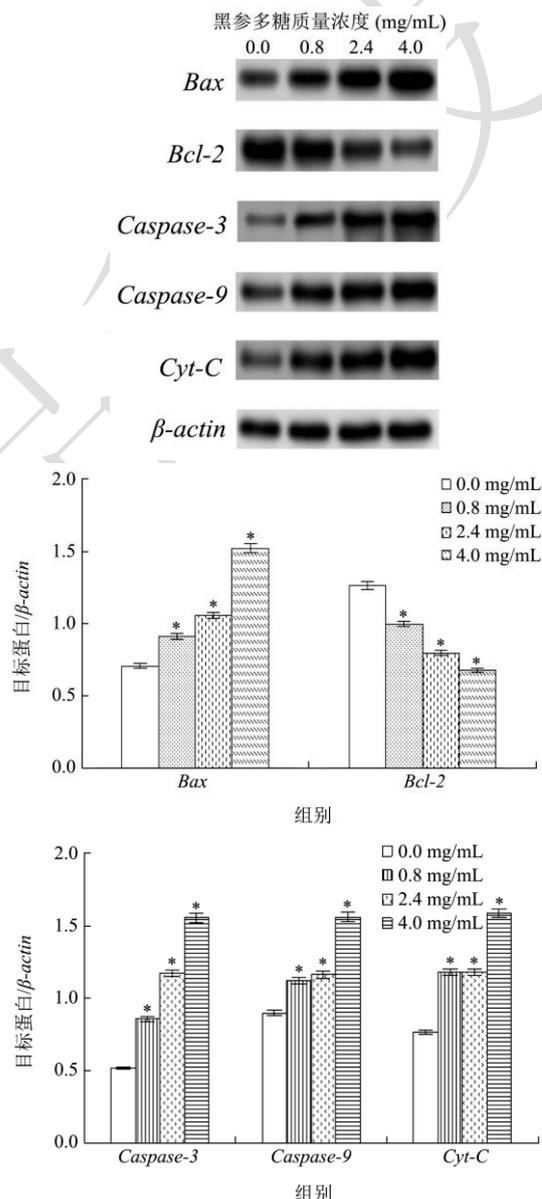


图 17 BGP-1 作用后 MGC-803 细胞中相关蛋白表达水平

Fig.17 Expression levels of related proteins in MGC-803 cells

after BGP-1 treatment

注: 与空白组相比显著性差异 $P < 0.05$ 。

本研究采用的 *Bax*、*Bcl-2*、*Caspase-3*、*Caspase-9* 及 *Cyt-C* 各基因的表达水平如图 17 所示。促凋亡的 *Bax* 基因表达量随着 BGP 浓度的增大而升高 ($P < 0.05$)，相反，抑凋亡基因 *Bcl-2* 的蛋白条带逐渐变浅，表明其表达量减少 ($P < 0.05$)，*Cyt-C* 释放，表达量升高，可能的原因是 *Bcl-2* 由于是细胞线粒体膜通透性的调控蛋白，含量的降低使线粒体膜内的平衡消失，膜通透性增强，造成了线粒体膜电位的降低，*Cyt-C* 释放出来，而 *Cyt-C* 能够通过激活 *Caspase* 家族通路而诱导细胞凋亡^[20]。*Caspase-3* 以及 *Caspase-9* 由正常的抑制状态被激活^[21]，表达量不断升高，条带明显地变宽，这些线粒体途径相关蛋白 *Bcl-2*、*Bax*、*Caspase-3*、*Caspase-9* 表达量的变化印证了黑参多糖通过线粒体途径的信号传递来促进 MGC-803 细胞凋亡，与细胞凋亡相关检测的实验所得出的结论一致。

3 结论

本研究利用水提醇沉法提取粗黑参多糖，并用 Sephadex-G200 层析柱法得到单一组分的黑参多糖，其分子量为 1.80×10^6 u，其主要单糖为葡萄糖，阿拉伯糖和甘露糖，摩尔比为 70.52:17.35:5.63。紫外光谱图验证多糖中不含核酸和蛋白等杂质，不会对活性测定实验结果造成干扰。扫描电镜图记录下多糖的表面结构，呈现丝状以及微量的片状结构，表面无明显的孔洞，交织在一起的结构层层堆积。傅里叶红外光谱图验证了多糖的特征官能团， 865.52 cm^{-1} 处的特征吸收表明黑参多糖中存在 α -糖苷键构型。

体外抗氧化实验证实黑参多糖具有较强的抗氧化活性，相对于其他人参加工品如白参、红参等，黑参由于具有更高的多糖含量，因而在抗氧化活性方面具有更优的效果，在医药领域可能具有一定的应用潜力。MTT 实验结果表明黑参多糖在一定浓度范围内能抑制 MGC-803 胃癌细胞的生长，在 4.0 mg/mL 抑制率达到 85.30%。用流式细胞术分析得出，黑参多糖能通过线粒体途径的信号传递来促进细胞凋亡。这表明黑参多糖具有一定的抗肿瘤作用，可以为将来黑参产品的开发提供理论依据。但是要准确研究其抗癌细胞凋亡机制，还应该继续采用多种细胞进行实验，本文由于试验局限性，只研究了 MGC-803 的细胞凋亡。未来可以探究黑参多糖对肝癌、肺癌等癌细胞的作用机制。可为以后黑参多糖的深入研发提供一定的实验依据和理论基础，进而拓宽黑参多糖药物制剂领域。

参考文献

[1] Chen Y, Xie M Y, Nie S P, et al. Purification, composition

analysis and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of *Ganoderma atrum* [J]. Food Chemistry, 2008, 107(1): 231-241.

[2] Li D, Cheng P, Wang J, et al. IRF6 is directly regulated by ZEB1 and ELF3, and predicts a favorable prognosis in gastric cancer [J]. Front Oncol, 2019, 9: 220.

[3] Lai Z, Yang Y, Wang C, et al. Circular RNA 0047905 acts as a sponge for microRNA4516 and microRNA1227-5p, initiating gastric cancer progression [J]. Cell Cycle, 2019, 123: 280-290.

[4] Long X S, Hu X, Liu S C, et al. Insights on preparation, structure and activities of *Gracilaria lemaneiformis* polysaccharide [J]. Food Chemistry, 2021, 12: 1575-1590.

[5] Cai J P, Wu Y J, Li C, et al. Panax ginseng polysaccharide suppresses metastasis via modulating Twist expression in gastric cancer [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 3: 22-25.

[6] 程素盼.天麻多糖分离纯化、结构表征及抗肿瘤活性研究[D].济南:山东中医药大学,2019.

[7] HAN J Y, HANG H S, Choi S W, et al. Cytochrome P450 CYP716A53v2 catalyzes the formation of proto-panaxadiol during ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng* [J]. Plant and Cell Physiology, 2012, 53(9): 1535-1545.

[8] 王泽旭.黑参水提物对免疫低下小鼠的干预作用[D].大连:大连医科大学,2021.

[9] 刘佳维,朱彦飞,侯甲福,等.黑参多糖清除自由基研究[J].实验室科学,2018,21(1):37-39.

[10] 陈林,郑红英,郭建鹏.基于响应面法的人参新炮制品“黑参”提取工艺研究[J].中华中医药杂志,2021,36(3):1607-1611.

[11] 张婷,吴晖,赖富饶,等.紫芝菌丝体多糖提取工艺的优化[J].安徽农业科学,2016,44(29):63-76.

[12] 厉晓腊,陈官菊,方鸣,等.蝉花虫草多糖脱蛋白研究[J].浙江农业科学,2018,59(11):63-66.

[13] Liu X C, Zhu Z Y, Tang Y L, et al. Structural properties of polysaccharides from cultivated fruit bodies and mycelium of *Cordyceps militaris* [J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 142: 63-72.

[14] Wei W, Feng L, Bao W R, et al. Structure characterization and immunomodulating effects of polysaccharides isolated from *Dendrobium officinale* [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2016, 64(4): 881-889.

[15] Wang J, Zhang J, Zhao B, et al. A comparison study on microwave-assisted extraction of *Potentilla anserina*

- L-polysaccharides with conventional method: Molecule weight and antioxidant activities evaluation [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80(1): 84-93.
- [16] 陈放. 苦瓜多糖及其衍生物的制备和抗氧化活性研究[D]. 重庆: 重庆师范大学, 2020.
- [17] 朱振元, 董海燕, 王腾月. 古尼虫草菌丝体多糖降解及体外抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(10): 1-5.
- [18] 何运辉. 洋葱皮多糖提取、结构表征及抗氧化研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2019.
- [19] 何婷婷, 柴军红, 钟读波. 蒲公英活性成分提取工艺的优化、多糖红外表征及其抗氧化性[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(11): 163-166.
- [20] Qi X. Oridonin nanosuspension was more effective than free oridonin on G2/Mcell cycle arrest and apoptosis in the human pancreatic cancer PANC-1 cell line [J]. International Journal of Nanomedicine, 2012, 7(9): 1793-1804.
- [21] Pu X, Storr S J, Zhang Y M, et al. Caspase-3 and caspase-8 expression in breast cancer: caspase-3 is associated with survival [J]. Apoptosis, 2017, 22(3): 357-368.

勘 误

应作者要求, 对 2023 年第 39 卷第 1 期文章《核桃调和油在不同烹饪温度下氧化稳定性的变化》作出以下勘误:

(1) 1.2.2.1 文段, 关于单不饱和脂肪酸和多不饱和脂肪的描述有误, 应改为“饱和脂肪酸(Saturated Fatty Acid, SFA):单不饱和脂肪酸(Polyunsaturated Fatty Acids, PUFA):多不饱和脂肪酸(Monounsaturated Fatty Acids, MUFA)=0.27:1:1”。

(2) 图 10 有误, 应更正为:

