

柳蘑多糖对肿瘤细胞增殖抑制作用的研究

周聪¹, 孙月¹, 李德海¹, 顾嘉林¹, 龚金华²

(1. 东北林业大学林学院, 黑龙江哈尔滨 150040) (2. 康盟有限公司, 香港 999077)

摘要: 为了研究提取溶剂酸碱性对柳蘑多糖的制备及抑制肿瘤细胞增殖的影响, 本文利用稀酸、蒸馏水和稀碱溶剂分别制备三种柳蘑多糖 (SPAP1、WPAP1 和 JPAP1), 经过脱蛋白对应得到三种脱蛋白的柳蘑多糖 (SPAP2、WPAP2 和 JPAP2), 分别考察柳蘑多糖提取率和纯度的变化以及对肿瘤细胞增殖抑制作用的影响, 并采用红外光谱仪初步分析柳蘑多糖的结构差异。研究表明, 提取溶剂酸碱性对柳蘑多糖的提取率及纯度均有显著影响, 其中 JPAP1 的提取率最高, 为 11.02%, SPAP2 的纯度最高, 为 73.91%。SPAP2 对肿瘤细胞增殖抑制效果显著高于其它柳蘑多糖 ($p < 0.05$), 并与多糖浓度和给药时间成量效关系。其中 SPAP2 对 HeLa 细胞的增殖抑制效果最好, 抑制率为 90.88%; 红外光谱分析 SPAP2 在 $1078 \pm 4 \text{ cm}^{-1}$ 和 $759.83 \pm 5 \text{ cm}^{-1}$ 处有较强的吸收峰, 表明 SPAP2 中 C-O-H 或 C-O-C 和环氧基团含量高于其它柳蘑多糖。本论文结果为深入开发柳蘑多糖产品及进一步研究柳蘑多糖诱导肿瘤细胞凋亡机制提供理论依据。

关键词: 柳蘑; 多糖; 提取溶剂酸碱性; 肿瘤细胞

文章篇号: 1673-9078(2017)9-56-62

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.9.008

Inhibitory Effect of Polysaccharides from *Pholiota adiposa* on Tumor Cell Proliferation

ZHOU Cong¹, SUN Yue¹, LI De-hai¹, GU Jia-lin¹, GONG Jin-hua²

(1. College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China) (2. Concord Alliance Limite, Hong Kong 999077, China)

Abstract: To study the effects of extraction solvent acidity on the preparation of *Pholiota adiposa* polysaccharides (e.g., yield and purity) and their inhibitory effects on tumor cell proliferation, three types of *P. adiposa* polysaccharides (SPAP1, WPAP1, and JPAP1) were prepared using 0.1 mol/L HCl (aq), distilled water, and 0.1 mol/L sodium hydroxide (aq), respectively. The deproteinized *P. adiposa* polysaccharides (SPAP2, WPAP2, and JPAP2) were obtained from the deproteinization of SPAP1, WPAP1, and JPAP1, respectively. The effects of the extraction yield and purity of *P. adiposa* polysaccharides on the proliferation of tumor cells were investigated, and the differences in the structures of *P. adiposa* polysaccharides were preliminarily analyzed by infrared spectrometry. The result indicated that the acidity of the extraction solvent considerably impacted the extraction yield and purity of *P. adiposa* polysaccharides, and the highest extraction yield and the highest purity were found in JPAP1 (11.02%) and SPAP2 (73.91%), respectively. The inhibitory effect of SPAP2 on tumor cell proliferation was significantly higher than those of other *P. adiposa* polysaccharides ($p < 0.05$) and dose- and time-dependent effects of polysaccharide treatment were observed. SPAP2 exhibited the strongest inhibitory effect on the proliferation of HeLa cells, with an inhibition rate of 90.88%. Infrared spectroscopy results showed that SPAP2 had strong absorption peaks at $1078 \pm 4 \text{ cm}^{-1}$ and 759.83 cm^{-1} , which indicated that the content of C-O-H and C-O-C groups in SPAP2 were higher than those in other polysaccharides. These results may provide a theoretical basis for further development of *P. adiposa* polysaccharide products and an in-depth study on the mechanism of *P. adiposa* polysaccharide-induced tumor cell apoptosis.

Key words: *Pholiota adiposa*; polysaccharide; the type of solvent(PH); tumor cell

收稿日期: 2017-03-14

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金资助 (2572014CA19); 黑龙江省自然科学基金面上项目 (G2015062); 黑龙江省教育厅科学技术研究项目 (12543015)

作者简介: 周聪 (1994-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 新资源食品加工与利用; 通讯作者: 李德海 (1976-), 男, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 食品化学及植物有效成分研究

近年来癌症发病率居高不下, 目前医学大多采用药物化疗, 但药物本身具有毒副作用较大、水溶性低及生物利用效果低等缺点, 因此, 开发一种安全性强、毒副性小的新型抗癌药物已成为学者们关注的热点^[1,2]。研究发现, 真菌中的天然活性成分多糖具有极佳的抗肿瘤效果, 且又因其无毒副作用等优点而备受国内外学者的关注^[3]。

柳蘑(*Pholiota adipose*), 又名多脂鳞伞、黄伞, 属于层菌纲, 磷伞属, 在秋季生长于杨柳及桦树的树干上, 单生或丛生, 是一种优质食药真菌, 其子实体或菌丝体中均含有丰富的蛋白质、纤维素、多糖、微量元素、氨基酸和维生素等多种营养成分^[4,5]。研究表明多糖是柳蘑中主要的活性成分, 其具有抗氧化、抗肿瘤、降血脂、抑菌和调节免疫力等生物活性^[6]。目前, 关于柳蘑多糖对体内抗肿瘤活性研究已有少量说明, 蒋晓琴^[7]等从柳蘑子实体中提取柳蘑粗多糖, 研究发现高、中、低剂量组柳蘑粗多糖均对小鼠S180肉瘤有抑制作用; 姜红霞等^[8]从柳蘑子实体中提取水溶性柳蘑多糖, 研究发现柳蘑多糖具有一定的体内抗肿瘤活性且与其结构有一定的关联; 赵永勋^[9]等从柳蘑菌丝体中提取柳蘑菌丝体粗多糖, 研究发现柳蘑菌丝体粗多糖对荷瘤小鼠的肿瘤生长有一定的抑制作用且可能与其增强宿主的免疫功能相关; Hu等^[10]从柳蘑菌丝体中提取并纯化分级得到三种水溶性多糖, 研究发现三种多糖级分均有一定的体内抗肿瘤活性; 但有关柳蘑多糖在体外细胞方面的抗肿瘤研究还未有相关报道。本实验以柳蘑为原料, 研究不同酸碱性提取溶剂对柳蘑多糖抑制肿瘤细胞增殖及多糖结构的影响, 为进一步研究柳蘑多糖诱导肿瘤细胞凋亡机制及其构效关系提供了科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 原料

柳蘑子实体, 由东北林业大学林学院森林培育实验室提供。

人宫颈癌细胞株(HeLa)、人结肠癌细胞株(Caco-2)购于美国ATCC; 人肝癌细胞株(HepG2)购自中国科学院上海细胞研究所。

1.2 试剂与设备

DMEM培养液、0.25%胰蛋白酶消化液, Hyclone公司产品; DMSO, sigma公司产品; 青霉素、链霉素、果氨酰胺, Gibico公司产品; 胎牛血清, 四季青公司产品; 其它试剂均为国产分析纯。

JA2003分析天平, 上海良平仪器仪表有限公司; RE-52旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器公司; FDU-1200真空冷冻干燥器, 东京理化EYELA; BHC-1300IIA2超净工作台, 苏州苏洁净化设备有限公司; CO₂培养箱, Thermo; 全自动酶标仪, 瑞士哈美顿公司; XDS-500D倒置显微镜, 上海蔡康光学仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 柳蘑多糖的制备

取柳蘑子实体粉末烘干, 石油醚(1:4, V/V)浸泡12h脱脂, 挥干溶剂。准确称取三份脱脂后的柳蘑干粉, 按料液比1:30分别加入稀酸(0.1 mol/L HCl)、去离子水和稀碱(0.1 mol/L NaOH), 于45℃条件下浸提4h, 提取两次, 合并提取液, 调pH至中性, 45℃浓缩至原体积的1/3, 流水透析48h, 加4倍体积的95%乙醇静置过夜(4℃), 离心, 冷冻干燥后依次得未经纯化的三种柳蘑多糖粉末: 酸溶性柳蘑多糖(SPAP1)、水溶性柳蘑多糖(WPAP1)、碱溶性柳蘑多糖(JPAP1); 取未经纯化的柳蘑多糖粉溶解, 采用Servge法^[11]脱蛋白4次, 然后在5% H₂O₂、37℃条件下脱色3h^[12], 经透析、醇沉和冷冻干燥后得纯化后的柳蘑多糖粉末: 酸溶性柳蘑多糖(SPAP2)、水溶性柳蘑多糖(WPAP2)、碱溶性柳蘑多糖(JPAP2)。

1.3.2 柳蘑多糖含量的测定

1.3.2.1 标准曲线的绘制

采用苯酚硫酸法^[13]测定柳蘑多糖含量, 得标准曲线 $Y=0.017X-0.156$ ($R^2=0.999$)。

1.3.2.2 柳蘑多糖含量的测定

取2 mL多糖提取液, 稀释适当倍数后, 采用苯酚硫酸法测吸光度, 依公式(1)计算柳蘑多糖的得率。

$$\text{多糖得率}(\%) = \frac{CVN}{m} \times 100\% \quad (1)$$

式中: C为稀释后提取液中多糖的浓度, V为稀释后提取液的体积, N为提取液的稀释倍数, m为柳蘑干粉质量。

取适当多糖以适当蒸馏水复溶后, 稀释至一定体积, 采用苯酚硫酸法测吸光度, 并以如下公式计算柳蘑多糖的纯度。

$$\text{多糖纯度}(\%) = \frac{CV}{m} \times 100\% \quad (2)$$

式中: C为稀释后溶液中多糖的浓度, V为稀释后溶液的体积, m为柳蘑多糖质量。

1.3.3 柳蘑多糖对肿瘤细胞增殖抑制率的测定

1.3.3.1 细胞培养

肿瘤细胞常规接种于含10%新鲜牛血清的DMEM培养液中, 37℃、5% CO₂条件下培养, 取对数生长期的细胞进行试验。

1.3.3.2 实验分组

分别检测六种柳蘑多糖对HeLa、HepG2以及Caco-2细胞增殖的抑制作用。共设3个组, 分别为细胞对照组(加DMEM培养液、药物组(加含不同浓度柳蘑多糖的DMEM培养液: 0.25 mg/mL、0.5

mg/mL、0.75 mg/mL、1.0 mg/mL、2.0 mg/mL、3.0 mg/mL、4.0 mg/mL、5.0 mg/mL 和 6.0 mg/mL) 以及阳性药物组 (加含 0.15 mg/mL 5-氟尿嘧啶的 DMEM 培养液: 5-Fu), 每组设 6 个平行复孔。

1.3.3.3 四甲基偶氮唑蓝还原法 (MTT) 比色法

根据文献^[14]稍作修改。取处于对数生长期的肿瘤细胞, 以 0.25%胰蛋白酶消化成单细胞悬液, 调整细胞浓度为 5×10^4 个/mL, 接种于 96 孔板中, 每孔 100 μ L, 常规培养至细胞贴壁后进行给药处理, 继续培养 48 h, 每孔加 20 μ L MTT, 继续培养 4 h, 弃去上层培养液, 每孔加 150 μ L DMSO, 震荡 10 min, 用酶标仪检测其在 490 nm 波长处的 OD 值, 按下式计算肿瘤细胞的增殖抑制率。

增殖抑制率(%)=(1-药物组 OD 值/对照组 OD 值)×100%

当 IR>0 时说明药物对细胞增殖具有抑制作用; 当 IR=0 时表明药物对细胞增殖无影响; 当 IR<0 时说明药物对细胞增殖具有促进作用。

1.3.3.4 柳蘑多糖的红外光谱分析

采用 KBr 压片法。称取相同质量的 6 种柳蘑多糖样品, 分别加入 100 mg 经过研细处理的干燥 KBr 粉末, 混合研细, 压成透明薄片。Vector 22 型红外光谱仪在 4 000~400 cm^{-1} 波数范围内进行测定。红外光谱仪测定参数: 分辨率: 4.0 cm^{-1} 背景扫描次数: 32 次; 检测器: 氟化硫三肽。

1.3.3.5 统计数据的处理

使用 Origin 8.6 和 SPSS 13 软件对数据进行统计学分析, MTT 检验做 6 个复孔平行, 其他实验均做 3 组平行实验。结果用平均值±标准差表示, 用组间方差分析进行统计分析, 采用最小差异显著法进行显著性比较 ($p < 0.05$)。

2 结果与讨论

2.1 提取溶剂酸碱性和柳蘑多糖得率及纯度的影响

本实验分别采用酸性、中性以及碱性的提取溶剂提取柳蘑多糖, 比较了不同酸碱性的提取溶剂对柳蘑多糖得率及纯度的影响, 同时对柳蘑多糖脱蛋白、色素前后的得率以及纯度进行了比较, 其结果如图 1 所示。

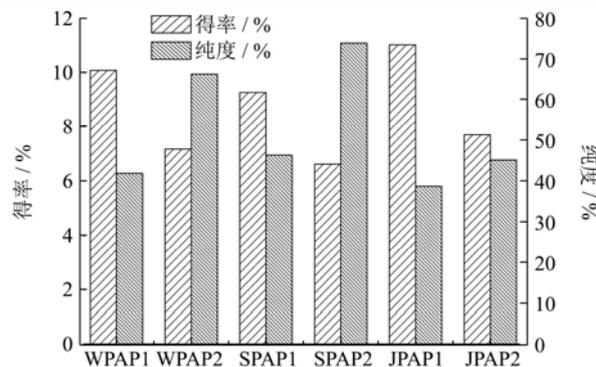


图 1 提取溶剂提取溶剂酸碱性和柳蘑多糖得率及纯度的影响
Fig. 1 Effect of extraction solvent acidity on the yield and purity of *P. adiposa* polysaccharides

由图 1 可以看出, 提取溶剂的酸碱性和柳蘑多糖的得率及纯度均有显著影响。未经纯化的三种柳蘑多糖中, JPAP1 得率最高, SPAP1 次之, WPAP1 最低, 可能是柳蘑子实体细胞壁在稀酸、稀碱条件下更容易胀破从而使得多糖大量释放^[15]; SPAP1 纯度最高, WPAP1 次之, JPAP1 纯度最低, 可能是蛋白等物质在碱性条件被释放进而降低了柳蘑多糖的纯度。三种柳蘑多糖经脱蛋白、色素后其多糖得率降低与纯度提高的程度也不尽相同, 其中 SPAP2 纯度提升幅度最大, 达到 73.91%, 同时其得率降低幅度最小, 仅降低了 2.65%, 而 JPAP2 纯度提升最少, 得率下降最大, 可能是蛋白在碱性条件下更容易与多糖结合形成糖蛋白进而增加了多糖纯化的难度。

2.2 柳蘑多糖对抑制 HeLa 细胞增殖的影响

本实验以 HeLa 细胞为研究目标, 采用 MTT 法检测 HeLa 细胞经六种柳蘑多糖作用 48 h 后的增殖抑制情况, 结果如图 2 所示。

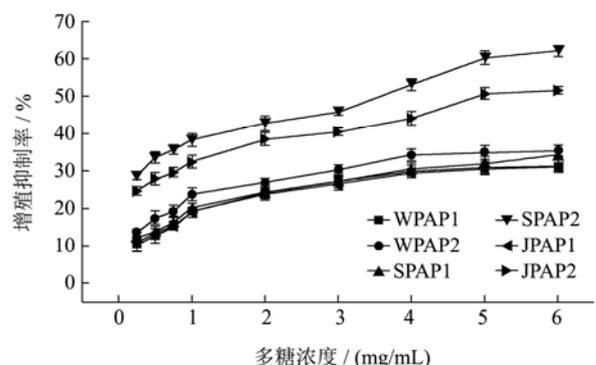


图 2 不同柳蘑多糖对 HeLa 细胞增殖抑制的影响
Fig. 2 Effects of different *P. adiposa* polysaccharides on HeLa cell proliferation

由图 2 可以看出,六种柳蘑多糖对 HeLa 细胞的增殖均有显著的抑制作用,且在 0.25~6 mg/mL 范围内均随着多糖浓度的增加而增强。在未脱蛋白前,三种柳蘑多糖(WPAP1、SPAP1 和 JPAP1)对 HeLa 细胞增殖的抑制作用并无显著的差异 ($p>0.05$),经脱蛋白、色素纯化后,在相同多糖浓度的条件下,SPAP2 对 HeLa 细胞增殖的抑制率明显高于 WPAP2 与 JPAP2 两种柳蘑多糖 ($p<0.05$),并于多糖浓度为 5 mg/mL 时抑制效果达到最佳,为 $60.06\pm 1.93\%$ 。可能是柳蘑多糖经脱蛋白、色素纯化后,不仅提高了柳蘑多糖纯度,而且还提高了柳蘑多糖中某些具有良好抗肿瘤活性的官能团含量^[16]。

2.3 不同柳蘑多糖对抑制 Caco-2 细胞增殖的影响

本实验以 Caco-2 细胞为研究目标,采用 MTT 法检测 Caco-2 细胞经六种柳蘑多糖作用 48 h 后增殖抑制情况,结果如图 3 所示。

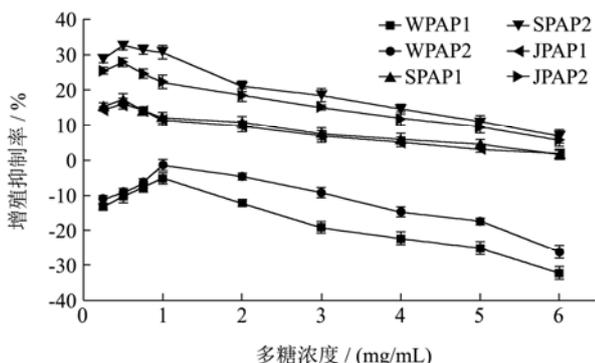


图 3 不同柳蘑多糖对 Caco-2 细胞增殖抑制的影响

Fig. 3 Effect of different *P. adiposa* polysaccharides on Caco-2 cell proliferation

由图 3 可以看出,在 0.25~6 mg/mL 浓度范围内,碱溶性柳蘑多糖以及酸溶性柳蘑多糖均具有显著的抑制 Caco-2 细胞增殖的效果,而水溶性柳蘑多糖则没有表现出抑制 Caco-2 细胞增殖的效果 ($p<0.05$),其原因可能是水溶性柳蘑多糖中不含能抑制 Caco-2 细胞增殖的官能团。在相同多糖作用浓度条件下,SPAP2 对 Caco-2 细胞增殖的抑制效果明显高于其它柳蘑多糖。在低浓度时,SPAP2 对 Caco-2 细胞增殖的抑制效果随浓度的增大而增强,于 0.5 mg/mL 是达到最高,为 $32.53\pm 1.11\%$,超出该浓度范围后,其对 Caco-2 细胞的增殖抑制效果随浓度的增大而降低。可能是碱溶性柳蘑多糖和酸溶性柳蘑多糖中既含有能抑制 Caco-2 细胞增殖的官能团,同时也存在能干扰其发挥作用的官能团,两者在不同的多糖浓度条件下发挥的

作用强弱也不同,如长春新碱能抑制骨髓基质细胞增殖,而黄精多糖能干预长春新碱发挥作用^[17]。

2.4 不同柳蘑多糖对抑制 HepG-2 细胞增殖的影响

本实验以 HepG-2 细胞为研究目标,采用 MTT 法检测 HepG-2 细胞经六种柳蘑多糖作用 48 h 后增殖抑制情况,结果如图 4 所示。

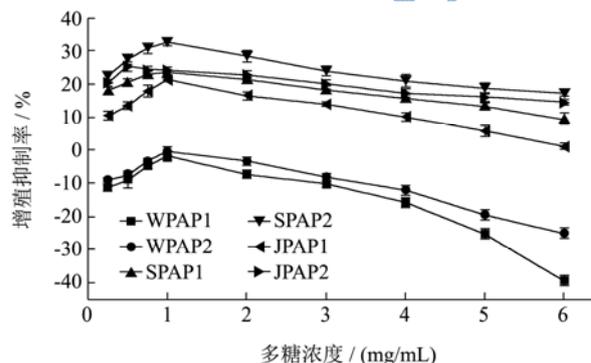


图 4 不同柳蘑多糖对 HepG-2 细胞增殖抑制的影响

Fig. 4 Effect of different *P. adiposa* polysaccharides on HepG-2 cell proliferation

由图 4 可以看出,在 0.25~6 mg/mL 浓度范围内,碱溶性柳蘑多糖以及酸溶性柳蘑多糖均具有显著的抑制 HepG-2 细胞增殖的效果,而水溶性柳蘑多糖则没有表现出抑制 HepG-2 细胞增殖的效果 ($p<0.05$),其原因可能是水溶性柳蘑多糖中可能含有能促进 HepG-2 增殖的官能团。其中,SPAP2 对 HepG-2 细胞增殖抑制效果明显高于其它五种柳蘑多糖,且与多糖浓度成量效关系,在 0.25~1 mg/mL 浓度范围内随多糖浓度的增大而增强,于多糖浓度为 1 mg/mL 时达到最佳,为 $32.73\pm 1.27\%$,当多糖浓度超出 1 mg/mL 时则随多糖浓度的增大而降低。分析其原因可能是 HepG-2 中能与 SPAP2 相结合的分子有限,只能与一定量的 SPAP2 相结合进而发挥出抑制细胞增殖的效果,当 SPAP2 的量超出其最大结合量时,则会反过来抑制其表达,这与同一浓度条件下黄芪多糖对鼻咽癌 CNE-2 细胞吸光度的影响随时间变化的趋势相一致^[18]。

2.5 时间对 SPAP2 抑制人体肿瘤细胞增殖的影响

以筛选出的抑制三种肿瘤细胞增殖效果最佳的 SPAP2 为研究对象,分别以浓度为 0.5 mg/mL、1 mg/mL、5 mg/mL 的 SPAP2 作用 Caco-2 细胞、HepG-2 细胞、Hela 细胞,利用 MTT 法检测三种肿瘤细胞在

1~7 d 时间范围内的增殖抑制率, 研究时间对 SPAP2 对肿瘤细胞增殖抑制效果的影响, 其结果如图 5 所示。

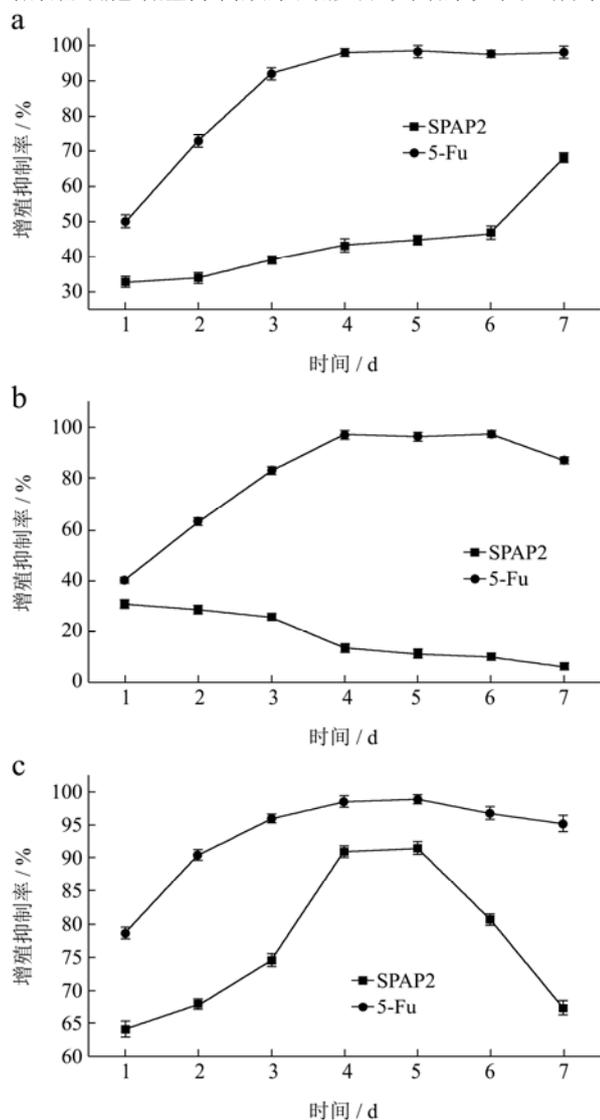


图 5 时间对 SPAP2 抑制肿瘤细胞增殖的影响

Fig. 5 Effect of SPAP2 treatment time on tumor cell proliferation

注: a, 时间对 SPAP2 抑制 Caco-2 细胞增殖的影响; b, 时间对 SPAP2 抑制 HepG-2 细胞增殖的影响; c, 时间对 SPAP2 抑制 Hela 细胞增殖的影响。

由图 5a 所示, 在最佳药物浓度 0.5 mg/mL 的条件下, SPAP2 对 Caco-2 细胞增殖的抑制作用随着时间的增加而增强, 于第 7 d 时达到最佳, 为 68.02±1.36%, 与白毛藤多糖对人卵巢癌细胞 (SKOV3) 增殖的抑制作用随时间延长而增强的趋势一致, 可能是 SPAP2 是通过激活或抑制 Caco-2 细胞中某分子的表达进而达到抑制 Caco-2 细胞增殖的效果^[19], 在此过程中 SPAP2 并不会产生消耗, 故而其抑制 Caco-2 细胞增殖的效果会随着时间的延长而增强; 由图 5 (b) 所示, 在最佳药物浓度 1 mg/mL 的条件下, SPAP2 对 HepG-2 细胞增

殖的抑制作用随着时间的增加而降低, 在第 1 d 时效果最佳, 为 30.62±1.77%, 可能 SPAP2 是通过与 HepG-2 细胞中某分子结合得到一种能抑制 HepG-2 细胞增殖的新分子, 由于 SPAP2 的消耗未得到补充, 因此其抑制效果会随着时间的延长而下降; 由图 5 (c) 所示, 在最佳药物浓度 5 mg/mL 的条件下, SPAP2 对 Hela 细胞增殖的抑制作用先随着时间的增加而增强, 超出一定时间范围后再随着时间的增加而降低, 于第 4 d 时效果达到最佳, 为 90.88±0.92%, 可能 SPAP2 是通过激活 Hela 细胞中分子表达进而达到抑制 Hela 细胞增殖的效果, 初始时 SPAP2 的量远高于 Hela 细胞中分子的数量, 故随着时间的延长, 其抑制 Hela 细胞增殖的效果也逐渐增强, 然而随着时间的延长, Hela 细胞不断增殖, Hela 细胞中该分子的数量也不断增加, 当与 SPAP2 的量达到平衡后, SPAP2 已无法再通过激活更多的分子达到抑制 Hela 细胞增殖的效果, 故 SPAP2 对 Hela 细胞增殖的抑制作用先随着时间的延长而增强, 当超过一定时间范围后则会随着时间的延长而逐渐下降。

2.6 柳蘑多糖红外光谱 (IR) 分析

对比分析 SPAP1、SPAP2、WPAP1、WPAP2、JPAP1 和 JPAP2 等 6 种多糖红外图谱结果如下 (图 6)。

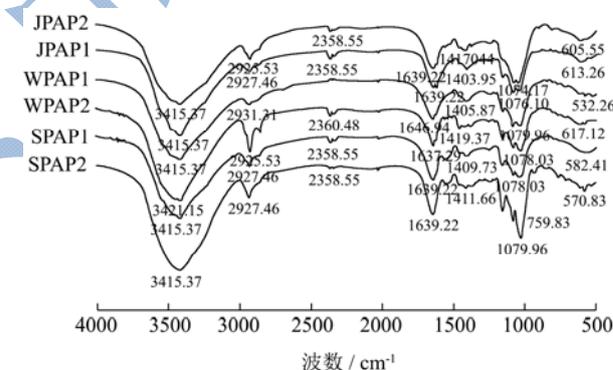


图 6 柳蘑多糖红外光谱分析

Fig. 6 FTIR analysis of the polysaccharides from *P. adiposa*

如图 6 所示, 6 种柳蘑多糖红外光谱中的特征吸收峰存在一定差异。6 种多糖在 3415±6 cm⁻¹ 处均有强吸收峰, 说明其存在分子间或分子内氢键, 是由 O-H 伸缩振动引起的^[20]; 6 种多糖在 2927±5 cm⁻¹ 处存在中强吸收峰, 是由糖链中次甲基 (-CH₂-) C-H 伸缩振动吸收, 其中 WPAP2 的吸收峰最强, 说明 WPAP2 较其它 5 种柳蘑多糖含有更多的 (-CH₂-) -CH 结构, 以上两种基团的吸收峰均为多糖的特征吸收峰^[21]。在 1078±4 cm⁻¹ 处 6 种多糖存在较强吸收峰, 是糖分子中两种 C-O 键的变角振动吸收, 包括 C-O-H 和 C-O-C 键, 其中 SPAP2 在此处的吸收强度明显大于其它 5 种柳蘑多糖, 故推测柳蘑多糖对肿瘤细胞增殖抑制效果

可能与 C-O-H 和 C-O-C 两种官能团有关。在 $1639\pm 8\text{ cm}^{-1}$ 处 6 种多糖存在较强吸收峰, 为酰胺基团的特征吸收峰; 在 1410 cm^{-1} 附近 6 种多糖存在较弱吸收峰, 为 C-H 的弯曲振动; SPAP2 在 759.83 cm^{-1} 处有较弱吸收峰, 为环氧化合物的特征吸收峰, 推测是否具有环氧化合物可能与抗肿瘤活性强弱有关。

3 结论

本论文结果表明提取溶剂酸碱性对柳蘑多糖的制备及抗肿瘤作用有显著影响。酸性和碱性溶剂均能够提高柳蘑多糖的提取率及且有利于多糖的纯化。SPAP2 对肿瘤细胞增殖的抑制效果显著高于其它 5 种柳蘑多糖 ($p<0.05$), 并且与多糖浓度和给药时间成量效关系。其中, SPAP2 对 HeLa 细胞的增值抑制效果最好, 在一定浓度范围内抑制效果随着多糖浓度和给药时间的增加而增强, 抑制率最高可达 90.88%; 红外光谱分析 SPAP2 在 $1078\pm 4\text{ cm}^{-1}$ 和 759.83 cm^{-1} 处有较强的吸收峰, 表明 SPAP2 中 C-O-H 或 C-O-C 和环氧基团含量高于其它 5 种柳蘑多糖, 初步推测 SPAP2 抗肿瘤活性可能与其官能团含量相关。本论文为进一步研究柳蘑多糖诱导肿瘤细胞凋亡机制及其构效关系提供了科学依据。

参考文献

- [1] Ghosh Jyotirmoy, Das Joydeep, Manna Prasenjit, et al. The protective role of arjunolic acid against doxorubicin induced intracellular ROS dependent JNK-p38 and p53-mediated cardiac apoptosis [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(21): 4857-4866
- [2] Liu Jinhua, Zhao Yongxing, Guo Qianqian, et al. TAT-modified nanosilver for combating multidrug-resistant cancer [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(26): 6155-6161
- [3] Meng Xin, Liang Hebin, Luo Lixin. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on the structural characteristics, antitumor mechanisms and immunomodulating activities [J]. *Carbohydrate Research*, 2016, 424: 30-41
- [4] Sun Yongxu, Wang Shusheng, Li Tianbao, et al. Purification, structure and immunobiological activity of a new water-soluble polysaccharide from the mycelium of *Polyporus albicans* (Imaz.) Teng [J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(4): 900-904
- [5] Chen Yi, Xie Mingyong, Nie Shaoping, 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
- [6] 酒荣波,孙继政,高艳霞,等.黄伞多糖的研究进展[J].中国酿造,2015,34(10):9-12
SA Rong-bo, SUN Ji-zheng, GAO Yan-xia, et al. Research progress of *pholiota adiposa* polysaccharides [J]. *China Brewing*, 2015, 34(10): 9-12
- [7] 蒋晓琴,丁晓明,刘海燕,等.黄伞粗多糖抗肿瘤及对荷瘤小鼠免疫功能影响的研究[J].中国药师,2007,10(2):119-121
JIANG Xiao-qin, DING Xiao-ming, LIU Hai-yan, et al. Effect of crude polysaccharides of *pholiota adiposa* on anti-tumor and immunity in bearing-tumor mice [J]. *China Pharmacist*, 2007, 10(2): 119-121
- [8] 姜红霞,聂永心,苏延友.黄伞子实体多糖的结构初探及抗肿瘤活性研究[J].时珍国医国药,2012,23(1):139-141
JIANG Hong-xia, NIE Yong-xin, SU Yan-you. Structure and antitumor activity of polysaccharides of *pholiota adiposa* [J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2012, 23(1): 139-141
- [9] 赵永勋,李克颖,张跃华.多脂鳞伞菌丝体多糖抗肿瘤活性研究[J].食用菌学报,2007,14(2):49-54
ZHAO Yong-xun, LI Ke-ying, ZHANG Yue-hua. Study on antitumor activity of polysaccharide of *pholiota adiposa* [J]. *Acta Edulis Fungi*, 2007, 14(2): 49-54
- [10] Hu Qingxiu, Wang Hexiang, Ng Tzi Bun. Isolation and purification of Polysaccharides with Anti-tumor activity from *Pholiota adiposa* (Batsch) P. Kumm. (higher basidiomycetes) [J]. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2012, 14(3): 271-284
- [11] Nie Yongxin, Jiang Hongxia, Su Yanyou, et al. Purification, composition analysis and antioxidant activity of different polysaccharides from the fruiting bodies of *Pholiota adiposa* [J]. *African Journal of Biotechnology*, 2012, 11(65): 12885-12894
- [12] 赵艳,王白娟,杨青松,等.红雪茶多糖过氧化氢脱色工艺优化[J].南方农业学报,2016,47(5):710-714
ZHAO Yan, WANG Bai-juan, YANG Qing-song, et al. Optimization for decolorization process of *Lethariella* spp. polysaccharides with hydrogen peroxide [J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2016, 47(5): 710-714
- [13] 王振斌,刘加友,马海乐,等.无花果多糖提取工艺优化及其超声波改性[J].农业工程学报,2014,30(10):262-269
WANG Zhen-bin, LIU Jia-you, MA Hai-le, et al. Extraction process optimization and ultrasonic modification of polysaccharide from *Ficus carica* L. [J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2014, 30(10): 262-269

- [14] Xu Weili, Liu Jiaren, Liu Huikun, et al. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by γ -tocotrienol in human colon carcinoma HT-29 cells [J]. Nutrition, 2009, 25(5): 555-566
- [15] 薛丹,黄豆豆,黄光辉,等.植物多糖提取分离纯化的研究进展[J].中药材,2014,37(1):157-161
XUE Dan, HUANG Dou-dou, HUANG Guang-hui, et al. Advances in extraction and purification of plant polysaccharides [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2014, 37(1): 157-161
- [16] 钟城城,曲有乐,陈荫.厚壳贻贝多糖的提取工艺优化及体外生物活性研究[J].食品科学,2014,35(10):107-114
ZHONG Cheng-cheng, QU You-le, CHEN Yin. Optimized extraction and bioactivity *in vitro* of polysaccharides from *Mytilus coruscus* [J]. Food Science, 2014, 35(10): 107-114
- [17] 余东游,尚沁沁,史艳云.MNC 驱铅对 Caco-2 细胞增殖率、LDH 活性及细胞形态的影响[J].中国畜牧杂志,2013, 49(19):33-37
YU Dong-you, SHANG Qin-qin, SHI Yan-yun. Effects of MNC on lead growth rate and cell morphology of Caco-2 cells [J]. Chinese Journal of Animal Science, 2013, 49(19): 33-37
- [18] 相芳,魏玮.黄芪多糖对鼻咽癌 CNE-2 细胞增殖抑制作用的研究[J].现代预防医学,2012,39(2):394-395,398
XIANG Fang, WEI Wei. Study on the antir proliferation effect of astragalus polysaccharides on human nasopharyngeal carcinoma Cne-2 cells [J]. Modern Preventive Medicine, 2012, 39(2): 394-395, 398
- [19] 杨旭东,张杰,吴英俊.白毛藤多糖抑制人卵巢癌细胞增殖作用及其机制研究[J].长春中医药大学学报,2011, 27(4):521-522
YANG Xu-dong, ZHANG Jie, WU Ying-jun. Study on the inhibitory effect of pleurotus mandshurica polysaccharide on proliferation of human ovarian cancer cells and its mechanism [J]. Journal of Changchun University of Traditional Chinese Medicine, 2011, 27(4): 521-522
- [20] 赵玉丛,李利红.不同提取方法对黄芪多糖结构和提取率的影响[J].中国兽医杂志,2014,50(4):91-93
ZHAO Yu-cong, LI Li-hong. Effects of different extraction methods on the structure and extraction yields of astragalus polysaccharide [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2014, 50(4): 91-93
- [21] 刘冰,许程剑,王月香,等.阿魏菇多糖的分离纯化与结构分析[J].食品研究与开发,2014,35(8):78-81,85
LIU Bing, XU Cheng-jian, WANG Yue-xiang, et al. The research of the extraction, purification, structure analysis of pleurotus ferulae polysaccharide [J]. Food Research and Development, 2014, 35(8): 78-81, 85