

一种羧甲基茯苓多糖的结构及生物活性

刘晓菲, 胡双飞, 张学武

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 本文利用 DEAE-52 纤维素层析柱、Sephadex-G200 和 Sephadex-G150 层析柱对羧甲基茯苓粗多糖进行分离纯化, 得到一种纯化多糖组分, 不仅鉴定了其结构, 而且也探究了其体外抗肿瘤活性和抗炎活性。该多糖是一种分子量为 20.96×10^4 u 的 (1→3)- β -D-葡聚糖, 含有少量 (1→6) 和 (1→2) 糖苷键, 单糖组成为只包含 D-葡萄糖, 具有三螺旋结构。该多糖对人结肠癌细胞 HT-29、人肝癌细胞 HepG-2、人胃癌细胞 SGC-7901、人乳腺癌细胞 MCF-7 以及人肺癌细胞 A549 的细胞增殖具有抑制作用, 其 IC_{50} 值分别为 140.5 $\mu\text{g/mL}$ 、264.3 $\mu\text{g/mL}$ 、102.5 $\mu\text{g/mL}$ 、256.4 $\mu\text{g/mL}$ 、313.2 $\mu\text{g/mL}$ 。此外, 该多糖对脂多糖 (LPS) 诱导的小鼠巨噬细胞 RAW264.7 有一定的抑制作用, 而在无 LPS 刺激的情况下对该细胞反而具有一定的激活效果。研究结果为以茯苓多糖为主要活性成分的保健食品和药品开发提供了理论基础和技术支持。

关键词: 羧甲基茯苓多糖; 结构; 抗肿瘤活性; 抗炎活性

文章编号: 1673-9078(2018)07-42-49

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.7.007

Structure and Bioactivities of a Carboxymethyl Polysaccharide from Pachyman

LIU Xiao-fei, HU Shuang-fei, ZHANG Xue-wu

(College of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: A carboxymethyl polysaccharide from Pachyman was isolated and purified using DEAE-52 cellulose column, Sephadex-G200 column and Sephadex-G150 column in the work. The structure of this polysaccharide was identified and its anti-proliferation activity and anti-inflammation activity investigated. This polysaccharide is a (1→3)- β -D-glucan with an average molar mass of 20.96×10^4 u, which also has a little (1→2) glucosidic bonds. Its monosaccharide composition only contained D-glucose and the triple helical structure did not exist. This polysaccharide exhibited a strong anti-proliferation effect on HT-29, HepG-2, SGC-7901, MCF-7 and A549 cells, with IC_{50} values of 140.5 $\mu\text{g/mL}$, 264.3 $\mu\text{g/mL}$, 102.5 $\mu\text{g/mL}$, 256.4 $\mu\text{g/mL}$ and 313.2 $\mu\text{g/mL}$, respectively. In addition, this polysaccharide exhibited an inhibitory effect on LPS-induced RAW264.7 cells, but could activate RAW264.7 cells in the absence of LPS. The findings would be of great importance for the development of Pachyman polysaccharide-based health foods and drugs.

Key words: carboxymethyl polysaccharide; structure; anti-proliferation activity; anti-inflammation activity

茯苓为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核^[1], 收载于《中国药典》, 位列中药“四君八珍”之中, 别称玉灵、茯灵、松苓和茯菟等, 具有很高的食补和药用价值, 具有祛湿利尿、健脾和胃及安神宁心等功效, 是一种药食两用的传统中药材。茯苓多糖 (Pachyman) 为茯苓的主要有效成分, 占茯苓菌核的 80% 以上。大量研究发现茯苓多糖具有多种生物活性^[2-4]。茯苓多糖主要包括中性多糖和酸性多糖, 其中具有水溶性的中性多糖比例极小, 而含有的大量的酸性多糖为碱溶性多糖, 水溶性较差, 不利于人体

收稿日期: 2017-12-21

基金项目: 广州市产学研协同创新重大专项 (201704020024)

作者简介: 刘晓菲 (1984-), 女, 博士研究生, 研究方向: 功能性多糖研究

通讯作者: 张学武 (1963-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 功能食品研究

吸收, 故临床应用受到很大的限制。研究发现多糖的药理活性与其溶解度有着密切的关系, 水溶性是多糖发挥生物学活性的重要条件之一。此外, 单糖组成、糖苷键构型、连接方式以及分支度等结构信息都是影响多糖生物活性的重要因素。因此对碱溶性茯苓多糖进行化学修饰以改善其溶解性能、提升其生理功效, 并研究多糖的结构与其活性之间的构效关系成为当前研究的热点。茯苓多糖经羧甲基化改性可得到水溶性羧甲基茯苓多糖 (Carboxymethyl Pachyman, CMP), 具有抗肿瘤、抗炎和免疫增强等作用^[5-7]。目前, 对于茯苓多糖羧甲基化改性、纯化以及评价其生物活性, 并分析其构效关系等系统的研究工作仍处于起步阶段, 尤其是对纯化羧甲基茯苓多糖的抗炎作用的研究鲜有报道。本实验通过对具有良好水溶性的羧甲基茯

羧基多糖进行分离纯化, 表征其纯化产物结构以及评价其抗肿瘤和抗炎活性的研究, 以期深层次研究羧甲基茯苓多糖结构与其药效的关系及进一步开发该多糖相关产品, 并为将其应用于食品、医药、保健品以及化妆品化工等领域提供数据支持与理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

羧甲基茯苓粗多糖, 本实验室自制, 羧甲基化取代度 0.52; 人结肠癌细胞 (HT-29)、人肝癌细胞 (HepG-2)、人乳腺癌细胞 (MCF-7)、人胃癌细胞 (SGC-7901)、人肺癌细胞 (A549), 购自中山大学动物细胞实验室; 小鼠单核巨噬细胞 (RAW264.7), 广东省人民医院馈赠; DEAE-52 纤维素、Sephadex-G200、Sephadex-G150 上海源叶生物科技有限公司; Mouse TNF- α Elisa kit、Mouse IL-1 β Elisa kit、Mouse IL-6 Elisa kit, 欣博盛生物科技有限公司; RPMI-1640 培养基、DMEM 高糖基础培养基, Gibco 公司; McCoy's 5A 基础培养基, 杭州吉诺生物医药技术有限公司; L-鼠李糖、L-阿拉伯糖、D-木糖、D-甘露糖、D-岩藻糖、D-葡萄糖、D-半乳糖标准品, Sigma 公司; 其它试剂为分析纯。

RE-52 型旋转蒸发器, 上海荣生有限公司; HL-2B 型恒流泵, 上海精科实业有限公司; DBS-100 型自动部分收集器, 上海沪西分析仪器厂; Model-550 酶联免疫检测仪, Bio-Rad 公司; MCO-17AC CO₂ 培养箱, Sanyo 公司; Allegra X-22R 型高速冷冻离心机, Beckman Coulter 公司; UV2300 紫外分光光度计, 上海天美科学仪器有限公司; Nexus FT-IR 红外光谱仪, Thermo Nicolet 公司; Waters Breeze GPC 凝胶渗透色谱仪, 美国沃特斯公司; Agilent 6890 N 气相色谱系统, 美国安捷伦公司; 600 MHz 核磁共振波谱仪, Bruker 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 羧甲基茯苓多糖的纯化

羧甲基茯苓粗多糖样品上 DEAE-52 纤维素层析柱纯化, 用 0.2 mol/L NaCl 溶液洗脱, 采用苯酚-硫酸法进行跟踪检测, 收集主要洗脱峰, 真空浓缩、透析后冷冻干燥, 获得羧甲基茯苓多糖 CMP4; Sephadex-G200 和 Sephadex-G150 层析柱进一步纯化, 0.2 mol/L NaCl 溶液洗脱获得羧甲基茯苓多糖 CMP44。

1.2.2 CMP44 结构鉴定

1.2.2.1 纯度测定

CMP44 溶于定量超纯水, 取 1.0 mL 于 25 mL 比色管中, 补加超纯水至 2.00 mL, 加入 5% 苯酚溶液 1 mL, 混合摇匀后快速加入浓硫酸 5.00 mL, 30 min 沸水浴, 静置冷却, 以不加葡萄糖标准溶液比色管为空白对照, 于 490 nm 处测其吸光度值; 五个平行。根据葡萄糖标准曲线计算样品中多糖含量。

1.2.2.2 相对分子质量测定

GPC 色谱条件: Water Breeze GPC 凝胶渗透色谱仪, TOSOH 公司色谱柱 TSK-GEL G-5000PW_{XL} column 与 TSK-GEL G-3000PW_{XL} column (7.8 mm \times 300 mm) 串联, 柱温: 35 $^{\circ}$ C; 流动相 0.02 mol/L KH₂PO₄ 溶液, pH 值 6.0, 流速 0.6 mL/min。

GPC 校正曲线方程: 葡聚糖标准品系列分别用流动相配制成 1.0 mg/mL 的标准溶液, 进样量 20 μ L, 采集色谱图。

CMP44 用流动相配制成浓度为 1.0 mg/mL 的溶液, 0.45 μ m 水相微孔滤膜过滤, 进样量 20 μ L, 采集色谱图。

1.2.2.3 紫外光谱分析

称取 CMP44 1 mg, 超纯水溶解, 配成 1 mg/mL 的样液, 以超纯水为空白对照, 于 200~400 nm 波长范围内进行扫描分析。

1.2.2.4 红外光谱分析

称取 CMP44 2 mg, 加入适量已干燥的 KBr 粉末, 研磨均匀、压片, 于 400~4000 cm⁻¹ 区间内进行扫描分析。

1.2.2.5 单糖组成分析

GC 色谱条件: Agilent 6890 N 气相色谱仪; DB-1701 毛细管柱 (30.0 m \times 320 μ m \times 0.25 μ m), 进样前依次吡啶洗针 3 次, 丙酮洗针 3 次; 进样口温度设为 250 $^{\circ}$ C, 分流比 20:1; 载气氮气, 流速为 40 mL/min; 氢气流速为 25 mL/min, 空气流速为 450 mL/min。程序升温: 初始温度为 180 $^{\circ}$ C, 保持 2 min; 2 $^{\circ}$ C/min 升温至 220 $^{\circ}$ C, 保持 1 min; 7 $^{\circ}$ C/min 升温至 250 $^{\circ}$ C, 保持 1 min; 检测器温度 250 $^{\circ}$ C; 进样量 1.0 μ L。

样品水解: 称取 CMP44 10 mg 于安瓿瓶内, 加入 2 mol/L 的三氟乙酸溶液 4 mL, 用酒精喷灯封口后 110 $^{\circ}$ C 水解 8 h。水解液冷却至室温, 加入适量甲醇, 减压浓缩蒸干, 重复 5 次完全除去三氟乙酸。

单糖衍生化: 水解物中加入 0.5 mL 吡啶和 10 mg 盐酸羟胺, 90 $^{\circ}$ C 水浴并振荡反应 30 min, 冷却至室温后加入 0.5 mL 醋酸酐, 90 $^{\circ}$ C 继续水浴 30 min 进行乙酰化处理; 单糖标准品采用相同操作方法进行衍生化。

上述单糖气相衍生物经 0.45 μ m 滤膜过滤, 按照

气相色谱条件, 进行上机分析。

1.2.2.6 高碘酸氧化和 Smith 降解分析

高碘酸氧化: 称取 CMP44 20 mg, 溶于 15 mmol/L 的 NaIO₄ 溶液。混匀后室温暗处反应, 每间隔 6 h 取样, 223 nm 波长下测定其吸光度值, 至值恒定后向体系中加入 1.5 mL 乙二醇终止反应。根据 NaIO₄ 标准曲线计算出高碘酸消耗量。将含有乙二醇的溶液放置 20 min 后, 取 2 mL, 加入酚酞指示剂, 已标定的 NaOH 标准溶液进行滴定, 计算甲酸生成量。溶液剩余部分用于 Smith 降解反应。

Smith 降解: 将乙二醇处理后的溶液进行透析, 流水、超纯水各 24 h。减压浓缩后加入硼氢化钠进行还原, 过夜。然后, 用 50% 的醋酸调其 pH 值至 6~7, 中和剩余硼氢化钠, 流水、超纯水各 24 h 透析。减压浓缩至干, 加入 2 mol/L 三氟乙酸, 110 °C 封管水解反应 8 h 乙酰化, GC 上机分析, 色谱条件同 1.2.2.5。

1.2.2.7 核磁共振分析

CMP44 样品 15 mg 溶于 0.5 mL 重水中, 溶解后转移至核磁管中, 于 600 MHz 核磁共振仪上进行氢谱 (¹H-NMR) 和 碳谱 (¹³C-NMR) 分析, 采用 MestReNova-11.0.2 软件对图谱进行分析。

1.2.2.8 三螺旋结构分析

称取 CMP44 2 mg, 加入超纯水和 100 μmol/L 刚果红试剂各 2 mL, 加入 4 mol/L NaOH 溶液, 使溶液中碱浓度逐渐增加至 0.5 mol/L, 于 400~600 nm 波长范围内进行扫描, 测定最大吸收波长。以不加 CMP44 样品的刚果红溶液为对照。横坐标 NaOH 浓度, 纵坐标最大吸收波长绘制曲线。

1.2.3 CMP44 体外抗肿瘤活性

1.2.3.1 样品溶液配制

CMP44 以 DMEM 高糖基础培养基和 McCoy's 5A 基础培养基分别配制成 1000 μg/mL 的多糖母液, 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 两倍稀释至不同浓度梯度, 待用。

1.2.3.2 细胞培养

用 DMEM 高糖完全培养基 (10% 胎牛血清, 1% 青霉素-链霉素) 培养 HepG-2、SGC-7901、MCF-7、A549 细胞; McCoy's 5A 完全培养基 (10% 胎牛血清, 1% 青霉素-链霉素) 培养 HT-29 细胞。取对数生长期的细胞进行实验。

1.2.3.3 细胞增殖测定

采用 MTT 比色法^[8]分析 CMP44 对五种肿瘤细胞增殖的抑制作用。取对数生长期细胞 100 μL 接种于 96 孔板, 培养 48 h。分别加入 31.25~1000 μg/mL 的 CMP44 和阳性药物 5-氟尿嘧啶 (5-Fu) 溶液, 每孔加入 200 μL, 空白培养基为对照, 每个样品设 5 个复孔,

继续培养 48 h。用 PBS 洗板 2 次, 加入 20 μL 5 mg/mL 的 MTT 溶液和 180 μL 相应基础培养液, 培养 4 h。取出去除含有 MTT 的培养液, 加入 150 μL DMSO 振荡反应 15 min, 490 nm 处测定其吸光度值。

$$\text{细胞增殖抑制率(\%)} = (1 - \text{OD}_{\text{给药}} / \text{OD}_{\text{对照}}) \times 100\%$$

1.2.4 CMP44 体外抗炎活性

1.2.4.1 样品溶液配制

CMP44 以 RPMI-1640 基础培养基配制成 1000 μg/mL 的母液, 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 两倍稀释成不同浓度, 待用。

1.2.4.2 细胞培养

以 RPMI-1640 完全培养基 (含 8% 胎牛血清) 培养 RAW264.7 细胞。

1.2.4.3 细胞毒性测定

采用 MTT 比色法测定 CMP44 对 RAW264.7 细胞的毒性强弱, 测定操作同 1.2.3.3。

1.2.4.4 实验分组

取对数生长期 RAW264.7 细胞, 用血球平板计数调整细胞悬液密度约为 1×10^5 个/mL, 反复吹打均匀, 100 μL/孔接种于 96 孔板, 培养 24 h, 吸除培养液, 依照以下实验分组进行给药处理: Control 组, 细胞培养液 100 μL; LPS 组: LPS (终浓度 1 μg/mL) 细胞培养液 100 μL; LPS+CMP44 样品组: 含 LPS (终浓度 1 μg/mL) 及 CMP44 (31.25~1000 μg/mL) 的细胞培养液 100 μL; CMP44 样品组: CMP44 (31.25~1000 μg/mL) 的细胞培养液 100 μL。每组样本均设 5 个复孔。封板后培养 24 h, 收集上清液。

1.2.4.5 NO 释放量测定

CMP44 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 释放量测定采用 Griess 试剂法^[9]。96 孔板中加入已收集的上清液取 100 μL, 加入等体积 Griess 试剂 (0.1% 的 1-萘乙烯二胺与溶于 5% 磷酸中的 1% 对氨基苯磺酸等体积混合), 室温下振荡反应 10 min, 540 nm 处测定其吸光度值, 根据 NO₂⁻ 标准曲线 (NaNO₂ 溶液 0~200 μmol/L 浓度与 Griess 试剂反应, 以 NO₂⁻ 的浓度为横坐标, 540 nm 处吸光度值为纵坐标绘制曲线), 计算细胞上清液中 NO 的释放量以及 CMP44 对 NO 释放的抑制率。

1.2.4.6 细胞因子释放量测定

CMP44 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞释放 IL-6、TNF-α 及 IL-1β 测定采用 ELISA 酶联免疫试剂盒, 按照说明书进行操作。

1.3 统计分析

所有实验重复 3 次, 数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$)

表示, SPSS 19.0 软件进行 one-way ANOVA 分析, 两组间比较采用 t 检验, $p < 0.05$ 为差异显著, $p < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果与讨论

2.1 羧甲基茯苓多糖柱层析分离纯化

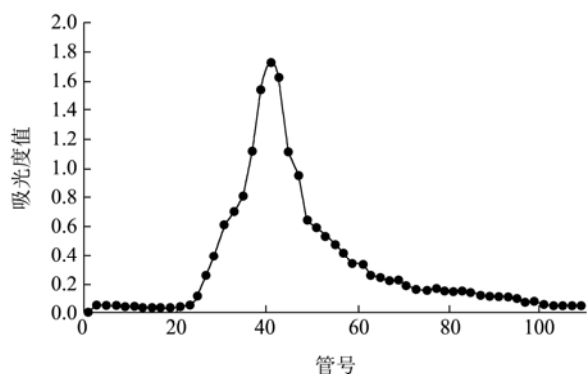


图 1 DEAE-52 纤维素层析柱洗脱曲线

Fig.1 Elution curve of DEAE-52 cellulose column chromatography

羧甲基茯苓粗多糖以 0.2 mol/L NaCl 溶液为洗脱溶液, 经 DEAE-52 纤维素层析柱纯化, 苯酚-硫酸法检测的洗脱曲线如图 1 所示。从曲线图可见, 洗脱峰形较对称, 分离效果较好。收集主要组分对应的试管溶液, 经真空浓缩、透析、冷冻干燥后获得组分, 命名为 CMP4。

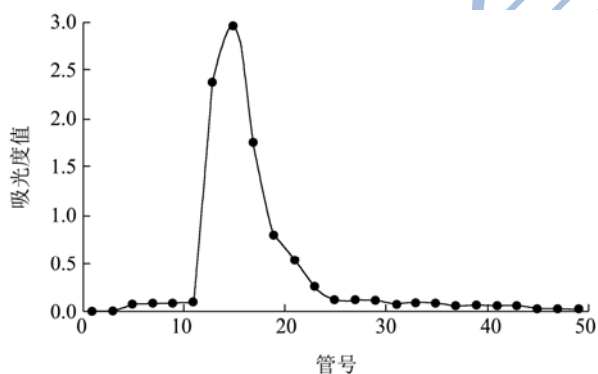


图 2 Sephadex-G200 和 Sephadex-G150 葡聚糖凝胶层析柱洗脱曲线

Fig.2 Elution curve of Sephadex-G200 and Sephadex-G150 column chromatography

CMP4 经 Sephadex-G200 和 Sephadex-G150 葡聚糖凝胶层析柱纯化, 以苯酚-硫酸法检测的洗脱曲线如图 2 所示。从曲线图可见, 纯化得到单一且高而尖的对称洗脱峰, 收集吸收峰对应主要试管溶液, 经真空浓缩、透析、冷冻干燥后获得组分, 命名为 CMP44。

2.2 CMP44 结构鉴定分析

2.2.1 纯度及相对分子质量

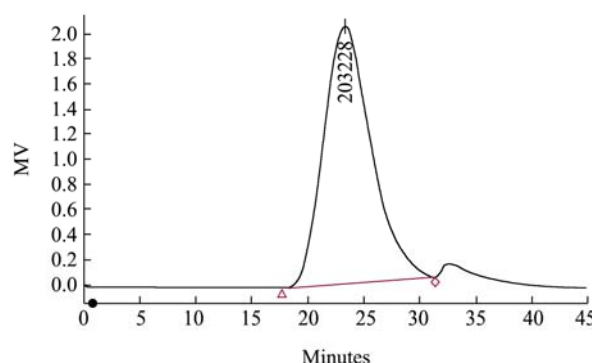


图 3 CMP44 的 HPGPC 色谱图

Fig.3 Chromatography of CMP44 by HPGPC

CMP44 的高效凝胶色谱图如图 3 所示。从图可见, 峰形为单一对称峰, 相对分子质量约 20.96×10^4 u, 洗脱峰处相对分子质量 20.32×10^4 u。根据苯酚-硫酸法测定的葡萄糖标准曲线 $y = 7.4765x - 0.0084$, $R^2 = 0.9996$, 计算出 CMP44 的多糖含量为 99%。

2.2.2 紫外光谱分析

CMP44 在 260 nm 与 280 nm 处的紫外扫描结果均没有响应信号, 说明纯化后的 CMP44 不含有蛋白质和核酸, 纯化效果较好。

2.2.3 红外光谱分析

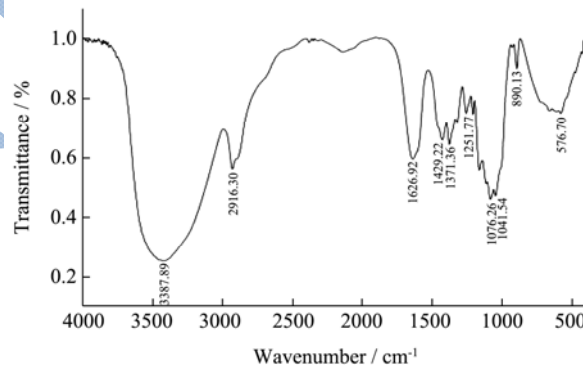


图 4 CMP44 的红外光谱图

Fig.4 Infrared spectrum diagram of the CMP44

CMP44 的红外光谱扫描结果如图 4 所示。4000~1650 cm^{-1} 呈现出典型的多糖特征吸收峰。其中, 3600~3200 cm^{-1} 峰形相对较宽的吸收峰是糖链非游离 O-H 键伸缩振动产生。

3000~2800 cm^{-1} 吸收峰是糖类甲基、亚甲基 C-H 键伸缩振动产生。1630 cm^{-1} 与 1420 cm^{-1} 附近处的吸收峰为羧甲基特征吸收峰, 分别由 C=O 的非对称伸缩振动和次甲基伸缩振动产生。890 cm^{-1} 附近处为 β -吡喃糖特征吸收峰。

2.2.4 单糖组成分析

CMP44 经水解、乙酰化处理后的气相色谱结果表明, 该多糖均一多糖, 仅由 D-葡萄糖一种单糖组成。

2.2.5 高碘酸氧化和 Smith 降解分析

根据已建立的高碘酸氧化反应标准曲线 $y=9.8983x+0.0017$, $R^2=0.9997$, 计算得出 CMP44 糖链中 8.13% 为 (1→6) 连接, 79.71% 为 (1→3) 连接, 12.16% 为 (1→4) 和 (1→2) 连接。Smith 降解后经气相色谱结果表明, 终产物中含有丙三醇和相应单糖葡萄糖, 赤藓醇未检出。根据 Smith 降解反应原理, 并结合高碘酸氧化分析结果推断出 CMP44 以 (1→3) 糖苷键为主链, 含有 (1→6) 糖苷键支链, 可能含有 (1→2) 糖苷键。

2.2.6 核磁共振波谱分析

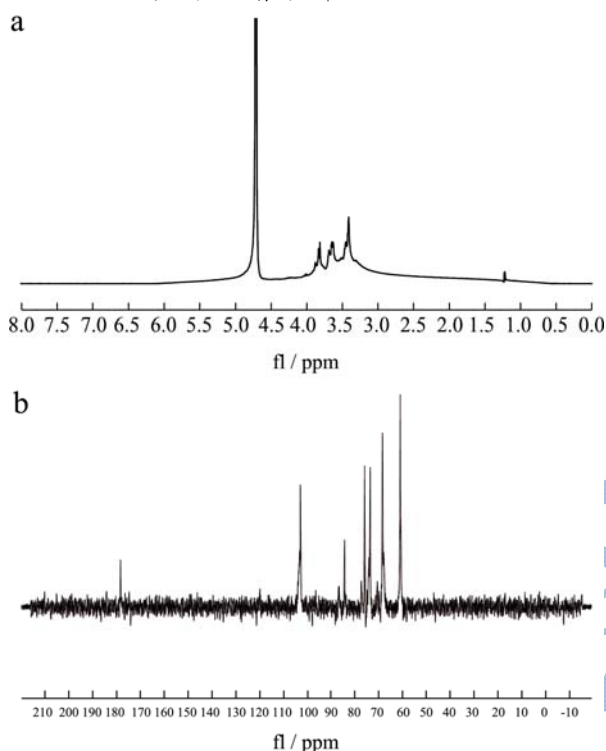


图 5 CMP44 的 ^1H (a) 和 ^{13}C (b) NMR 图

Fig.5 The ^1H (a) and ^{13}C (b) NMR spectrum of CMP44

CMP44 的 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR 谱如图 5 所示。从谱图分析可知, CMP44 含有羧甲基, 是以 β -(1,3)

糖苷键为主链的 D-葡聚糖结构。

2.2.7 三螺旋结构分析

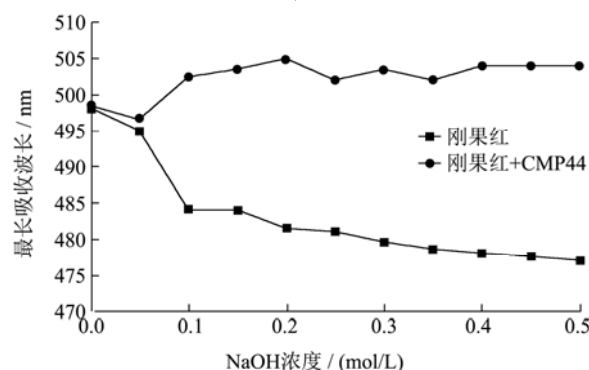


图 6 不同碱浓度下 CMP44 与刚果红混合液的最大吸收波长变化

Fig.6 The maximum absorption wavelength of CMP44-Congo red mixture at different concentrations of NaOH solution

CMP44 与刚果红混合溶液在 0~0.5 mol/L NaOH 溶液浓度范围内最大吸收波长的变化情况如图 6 所示。从图可见, CMP44 与刚果红混合液最大吸收波长显著高于不含多糖的刚果红溶液, 说明该多糖能和刚果红形成络合物并发生红移, 这种多糖与刚果红混合溶液在不同浓度碱溶液中表现出的特殊变化趋势, 可以证明 CMP44 具有三螺旋结构。

2.3 CMP44 体外抗肿瘤作用分析

MTT 法测定的 CMP44 对肿瘤细胞 HT-29、HepG-2、SGC-7901、MCF-7 以及 A549 增殖的抑制率结果如表 1 所示。

从表 1 看出, 在 31.25~1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内 CMP44 样品对五种肿瘤细胞均显示出不同程度的细胞增殖抑制活性, 并且抑制作用呈剂量依赖性增强。CMP44 对五种肿瘤细胞的生长抑制效果不及阳性药 5-Fu。CMP44 对 SGC-7901 抑制效果最好, HT-29 细胞次之, A549 细胞最差, IC_{50} 值分别为 102.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、140.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、313.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

表 1 CMP44 对五种癌细胞的抑制效果

Table 1 Anti-proliferative effects of CMP44 on five cancer cells ($\bar{x} \pm s$, n=5)(%)

细胞名称	样品浓度/ $(\mu\text{g}/\text{mL})$						IC_{50} 值 / $(\mu\text{g}/\text{mL})$	Adj. R-Square
	31.25	62.5	125	250	500	1000		
HT-29	22.13 \pm 1.80 ^f	35.94 \pm 2.91 ^e	44.99 \pm 2.01 ^d	63.45 \pm 2.20 ^c	75.32 \pm 1.85 ^b	85.37 \pm 2.38 ^a	140.5	0.989
HepG-2	21.61 \pm 1.46 ^f	28.62 \pm 1.58 ^e	36.42 \pm 1.89 ^d	46.85 \pm 2.90 ^c	66.22 \pm 2.45 ^b	79.62 \pm 1.71 ^a	264.3	0.991
SGC-7901	32.35 \pm 2.99 ^f	40.56 \pm 3.75 ^e	55.05 \pm 2.99 ^d	65.38 \pm 1.89 ^c	78.28 \pm 2.60 ^b	86.51 \pm 2.69 ^a	102.5	0.995
MCF-7	18.08 \pm 2.00 ^f	27.05 \pm 2.79 ^e	34.33 \pm 4.14 ^d	52.56 \pm 3.48 ^c	62.16 \pm 4.97 ^b	73.42 \pm 2.61 ^a	256.4	0.976
A549	12.78 \pm 1.32 ^f	22.75 \pm 2.87 ^e	29.30 \pm 2.36 ^d	46.07 \pm 4.31 ^c	60.12 \pm 3.74 ^b	74.04 \pm 2.87 ^a	313.2	0.991

注: 表 1 中 a~f 表示不同浓度间的显著性差异, 按照字母表顺序从大到小排列, 相邻字母间 $p < 0.05$, 差异显著。

2.4 CMP44 体外抗炎作用分析

2.4.1 CMP44 干预对 RAW264.7 细胞增殖影响

分别将不同浓度的 CMP44 溶液、CMP44 溶液和

LPS 溶液与 RAW264.7 细胞共同孵育 24 h, MTT 法检测分析 CMP44 干预后细胞的生长情况, 如图 7 所示。

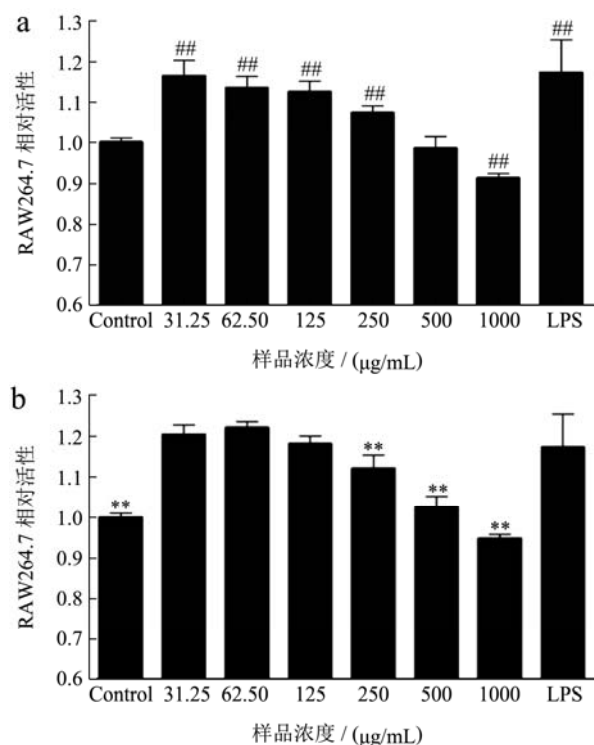


图7 CMP44 对 RAW264.7 细胞增殖的影响

Fig.7 Effects of CMP44 on proliferation of RAW264.7 cells

注: (a) 代表 CMP44 对无 LPS 诱导时 RAW264.7 细胞增殖的影响 (与 Control 组相比较, ^{##} $p < 0.05$, ^{###} $p < 0.01$); (b) 代表 CMP44 对 LPS 诱导时 RAW264.7 细胞增殖的影响 (与 LPS 组相比较, ^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$)。

从图 7 (a) 可见, LPS 诱导能够显著激活 RAW264.7 细胞的活性 (^{###} $p < 0.01$)。无 LPS 诱导时, CMP44 浓度 $\leq 500 \mu\text{g/mL}$ 时, 细胞存活率 $\geq 100\%$, 无细胞毒性, 在浓度为 $1000 \mu\text{g/mL}$ 时, CMP44 对 RAW264.7 细胞生长抑制率仅为 5.28%, 细胞存活率 $> 90\%$ 。从图 7 (b) 可见, LPS 诱导时, 与 LPS 组相比, CMP44 在低浓度范围时对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞增殖体现出抑制作用, 但显著不差异 ($p > 0.05$); 浓度 $\geq 250 \mu\text{g/mL}$ 时, 开始表现出显著的抑制作用 ($p < 0.01$), 并呈现浓度依赖性关系。结果说明, CMP44 在 $31.25 \sim 1000 \mu\text{g/mL}$ 浓度内对 RAW264.7 细胞无明显细胞毒性, 且对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞具有较强的抑制作用, 因此可选择此浓度梯度用于后续实验研究。

2.4.2 CMP44 干预对 RAW264.7 细胞释放 NO 的影响

LPS 诱导活化巨噬细胞释放的 NO 可直接或间接的介导免疫反应与炎症反应。NO 极其不稳定, 细胞培养液中能够快速代谢成为 NO_2^- , 因此可采用 Griess

试剂法进行测定。结合已建立的 NO_2^- 标准曲线 $y = 0.00465x + 0.02714$, $R^2 = 0.9992$, 计算出 CMP44 干预后 RAW264.7 细胞释放 NO 含量如图 8 所示。

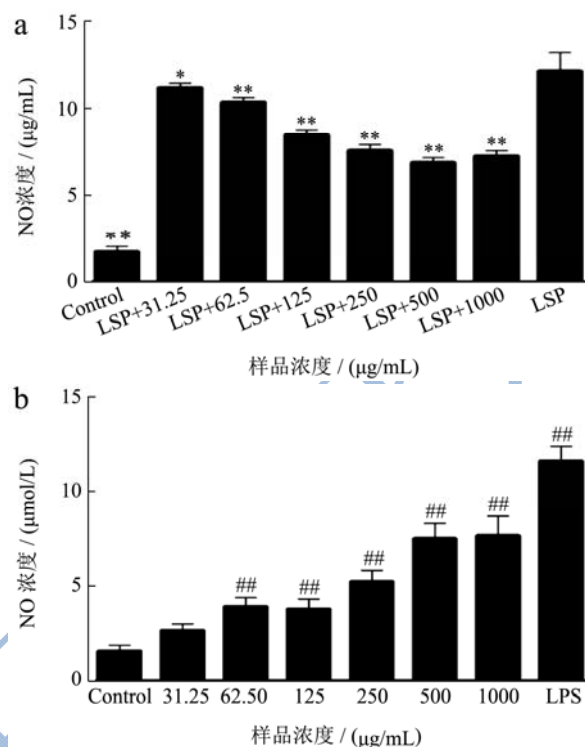


图8 CMP44 对 RAW264.7 细胞释放 NO 的影响

Fig.8 Effects of CMP44 on NO of RAW264.7 cells

注: (a) 表示 CMP44 对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞释放 NO 的影响 (与 LPS 组相比较, ^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$); (b) 表示 CMP44 对无 LPS 刺激 RAW264.7 细胞释放 NO 的影响 (与 Control 组相比较, [#] $p < 0.05$, ^{##} $p < 0.01$)。

从图 8 (a) 可见, $1 \mu\text{g/mL}$ 浓度的 LPS 刺激 RAW264.7 细胞后, LPS 组细胞培养上清液中 NO 含量水平显著高于无 LPS 刺激 Control 组 (^{##} $p < 0.01$), 因此说明 LPS 诱导 RAW264.7 细胞产生炎症反应模型成功。与 LPS 组相比较, CMP44 在 $31.25 \mu\text{g/mL}$ 时即对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 释放量显著降低 (^{**} $p < 0.01$), 具有剂量依赖性, 剂量为 $1000 \mu\text{g/mL}$ 时 NO 释放抑制率达到 46.87%。

结果表明, CMP44 干预处理对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症模型有抑制作用, 能够显著抑制由 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞大量释放 NO 而发挥保护作用。由图 8 (b) 可见, CMP44 干预也可诱导无 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞 NO 产生, 并且随着 CMP44 剂量的增加, 生成量逐渐升高, 与 Control 组相比较, CMP44 从 $62.5 \mu\text{g/mL}$ 剂量时开始对 NO 的生成出现显著性差异 (^{##} $p < 0.01$)。经 CMP44 处理后, NO 生成量最大值是 Control 组的 3.17 倍。

2.4.3 CMP44 干预对 RAW264.7 细胞分泌

IL-6、TNF- α 及 IL-1 β 的影响

细胞因子在调节细胞免疫功能和介导炎症反应中起着重要的作用^[10]。采用 ELISA 试剂盒检测细胞上清液中细胞因子的 IL-6、TNF- α 与 IL-1 β 的含量。CMP44 干预对 RAW264.7 细胞分泌 IL-6、TNF- α 及 IL-1 β 的影响如表 2 所示。

从表 2 看出, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的 LPS 诱导 RAW264.7 后, LPS 组细胞上清液中 IL-6、TNF- α 及 IL-1 β 含量明显高于 Control 组 ($^{###}p<0.01$)。与 LPS 组相比较, CMP44 干预从剂量 31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 开始对 RAW264.7 细胞 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的释放量降低程度表现出显著性差异 ($*p<0.01$)。抑制作用呈剂量依赖性, 剂量为 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 对 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的抑制率分别为 79.48%、44.33% 和 34.72%。结果表明, CMP44 处理能够显著抑制由 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞大量释放炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β , 具有较强的抗

炎活性。

此外, CMP44 处理还可诱导无 LPS 刺激 RAW264.7 细胞的 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的产生, 具有明显的剂量关系。与 Control 组相比较, CMP44 从剂量 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 开始对 TNF- α 的表达出现显著性差异 ($^{##}p<0.01$); 剂量 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 开始对 IL-6 的分泌出现显著性差异 ($^{#}p<0.01$); 剂量 31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 开始对 IL-1 β 的分泌出现显著性差异 ($^{#}p<0.05$)。1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量时, CMP44 对 IL-6 的激活最为显著, IL-6 生成量达到 Control 组的 13.37 倍; 对 IL-1 β 的激活作用较强, IL-1 β 生成量是 Control 组的 8.50 倍; 对 TNF- α 的激活作用较弱, TNF- α 生成量仅为 Control 组的 3.17 倍。结果表明, CMP44 能够诱导 RAW264.7 细胞生成 NO、TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β , 呈剂量依赖性, 具有显著的免疫调节活性。

表 2 CMP44 对 RAW264.7 细胞分泌细胞因子的影响

Table 2 Effects of CMP44 on cytokine secretion of RAW264.7 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

组别	给药剂量/ $(\mu\text{g}/\text{mL})$	TNF- α / (pg/mL)	IL-6/ (pg/mL)	IL-1 β / (pg/mL)
Control 组	0	471.0 \pm 45.93	52.97 \pm 11.16	13.15 \pm 3.06
LPS 组	0	1858 \pm 54.41 $^{###}$	1224 \pm 103.80 $^{###}$	251.5 \pm 24.82 $^{###}$
CMP44+LPS 组	31.25	1478 \pm 57.90 **	1089 \pm 31.70 $^{##}$	207.9 \pm 10.16 **
	62.50	1351 \pm 74.65 **	978.7 \pm 45.98 **	200.2 \pm 12.76 **
	125	1229 \pm 84.14 **	914.5 \pm 53.80 **	170.5 \pm 8.45 **
	250	1031 \pm 81.03 **	782.9 \pm 44.66 **	166.1 \pm 8.97 **
	500	893.6 \pm 67.76 **	699.4 \pm 34.83 **	171.4 \pm 9.33 **
	1000	755.7 \pm 63.80 **	703.5 \pm 44.29 **	168.8 \pm 11.18 **
CMP44 组	31.25	543.7 \pm 48.51	97.86 \pm 20.09	42.12 \pm 7.57 $^{\#}$
	62.50	575.7 \pm 37.90	210.7 \pm 32.44 $^{##}$	46.72 \pm 8.65 $^{##}$
	125	726.1 \pm 82.53 $^{##}$	301.0 \pm 28.68 $^{##}$	49.19 \pm 11.31 $^{##}$
	250	899.1 \pm 72.84 $^{##}$	453.1 \pm 34.90 $^{##}$	69.97 \pm 13.64 $^{##}$
	500	1068 \pm 80.58 $^{##}$	643.7 \pm 33.20 $^{##}$	111.5 \pm 15.61 $^{##}$
	1000	1096 \pm 76.75 $^{##}$	700.00 \pm 34.44 $^{##}$	110.4 \pm 14.51 $^{##}$

注: 与 Control 组相比, $^{\#}p<0.05$, $^{##}p<0.01$; 与 LPS 组相比, $*p<0.05$, $^{**}p<0.01$ 。

3 结论

3.1 多糖复杂的结构特征和成分组成决定其具有繁杂多样的生物学功能。多糖纯度、相对分子量、糖苷键链接方式、修饰基团取代度大小以及高级结构等因素都与多糖的性质和活性密切相关^[11,12]。分子结构的微小变化和立体结构因素也会影响多糖活性。此外多糖的纯度越高其相应的利用价值就会越大^[13]。本实验对羧甲基化茯苓粗多糖依次经 0.2 mol/L NaCl 溶液洗脱 DEAE-52 纤维素、Sephadex-G200 和 Sephadex-G150 层析柱, 纯化得到纯度 99%、平均相

对分子量 20.96×10^4 u 的高纯组分 CMP44, 是单糖组成为 D-葡萄糖的均一多糖, 主链结构为 (1 \rightarrow 3)- β -D-葡聚糖, 含有少量 (1 \rightarrow 6)- β 和 (1 \rightarrow 2)- β 糖苷键, 并且具有三螺旋结构。大量研究发现, β 构型多糖大多具有较强的生物活性, 且文献报道, 含有一定比例 (1 \rightarrow 6) 支链的 (1 \rightarrow 3)- β -D-葡聚糖则显示出极高的活性^[14,15], 因此推测 CMP44 可能具有良好生物活性。

3.2 CMP44 在 31.25~1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内对五种肿瘤实验细胞的增殖均表现出一定的抑制作用, 具有较好的体外抗肿瘤活性, 且呈一定的剂量依赖性, 抗肿瘤作用大小顺序如下所示:

SGC-7901>HT-29>HepG-2>MCF-7>A549。

同时, CMP44 还能够激活小鼠巨噬细胞 RAW264.7 细胞释放 NO、TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β , 具备一定的免疫调节作用, 且生成量随着 CMP44 添加浓度的增加而升高。因此推测 CMP44 可能具有增强机体免疫力和直接抑制肿瘤细胞生长的双重抗肿瘤作用。结合实验结果及文献报道, 推测 CMP44 所具有的 (1 \rightarrow 3)- β -D-吡喃葡聚糖基本骨架结构为其发挥抗肿瘤作用的基础^[16], 另外, 相对分子质量、分支度等也是影响其抗肿瘤活性的可能因素^[17]。

3.3 此外, CMP44 在 31.25~1000 μ g/mL 浓度范围内对 RAW264.7 细胞无细胞毒性, 并且能够不同程度的抑制由 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO、TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的大量释放从而发挥抗炎和保护作用, 因此提示 CMP44 具有较强的增强机体免疫力和抗炎活性双向调节作用, 其抗炎作用的发挥推测是通过抑制炎症细胞的活性和炎性细胞因子的合成与分泌, 以此阻断其过量生成而导致的致炎作用, 调节细胞因子网络恢复平衡; 而其细胞免疫功能的发挥则可能与其调节相关细胞因子分泌、增强巨噬细胞吞噬能力有关^[18]。

3.4 综上, 纯化得到的羧甲基茯苓多糖 CMP44 具有良好的抗肿瘤作用和抗炎作用, 同时还具有一定的调节免疫功能, 提示其在开发肿瘤治疗药物、急慢性炎症相关性疾病的治疗药物以及增强机体免疫力保健品等诸多领域都具有较大的潜在应用价值。因此, 有待于日后对 CMP44 的生物活性开展动物实验以进一步验证其活性, 并借助蛋白组学、基因组学和代谢组学等多组学相关分析技术在各个水平上进行探讨研究其作用机理, 为临床应用奠定理论基础。

参考文献

- [1] 姜辉, 杨生玉, 林标声. 发酵液中羧甲基茯苓多糖的制备及黏度特性研究[J]. 食品工业科技, 2009, 30(10): 104-106
JIANG Hui, YANG Sheng-yu, LIN Biao-sheng. Study on the preparation and viscosity of carboxymethyl pachman from fermentation broth [J]. Science and Technology of Food Industry, 2009, 30(10): 104-106
- [2] 牛爽, 郝利民, 赵树欣, 等. 茯苓多糖的研究进展[J]. 食品科学, 2012, 33(13): 348-353
NIU Shuang, HAO Li-min, ZHAO Shu-xin, et al. Research Progress in Polysaccharides from *Poria cocos* [J]. Food Science, 2012, 33(13): 348-353
- [3] 侯安继, 彭施萍, 项荣. 茯苓多糖抗炎作用研究[J]. 中药药理与临床, 2003, 19(3): 15-16
HOU An-ji, PENG Shi-ping, XIANG Rong. Study on the anti-inflammatory effect of *Poria cocos* [J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2003, 19(3): 15-16
- [4] Ke R, Lin S, Chen Y, et al. Analysis of chemical composition of polysaccharides from *Poria cocos* Wolf and its anti-tumor activity by NMR spectroscopy [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80(1): 31-34
- [5] Hamuro J, Maeda Y, Arai Y, et al. The significance of the higher structure of the polysaccharides lentinan and pachyman with regard to their antitumor activity [J]. Chemico-Biological Interactions, 1971, 3(1): 69-71
- [6] 王灿红, 何晓山, 张丽静, 等. 羧甲基茯苓多糖对氟尿嘧啶致肠炎小鼠的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(4): 484-489
WANG Can-hong, HE Xiao-shan, ZHANG Li-jing, et al. Protective effects of CMP on 5-Fu-induced intestinal mucositis of mice [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2016, 32(4): 484-489
- [7] 陈春霞. 羧甲基茯苓多糖的抗肿瘤活性与免疫效应[J]. 食用菌学报, 2001, 8(3): 39-44
CHEN Chun-xia. The antitumor activity and immune effect of Carboxymethylpachyman (CMP) [J]. Acta Edulis Fungi, 2001, 8(3): 39-44
- [8] 何胜洁, 毛新亮, 张学武, 金钱龟酶解多肽的分离、纯化及抗肿瘤活性研究[J]. 现代食品科技, 2015, 31(10): 86-90, 167
HE Sheng-jie, MAO Xin-liang, ZHANG Xue-wu. Study of the separation, purification, and anti-tumor activities of peptides prepared from enzymolyzed *Cuora trifasciata* meat [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(10): 86-90, 167
- [9] 陈健, 向莹. 滑子菇多糖的免疫活性及抗肿瘤作用[J]. 现代食品科技, 2013, 9(8): 1800-1804
CHEN Jian, XIANG Ying. Immunological and antitumor activities of the polysaccharides from *Pholiota nameko* [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 9(8): 1800-1804
- [10] Sprague A H, Khalil R A. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease [J]. Biochemical Pharmacology, 2009, 78(6): 539-552
- [11] Zhang M, Zhang L, Cheung PCK, et al. Molecular weight and anti-tumor activity of the water-soluble polysaccharides isolated by hot water and ultrasonic treatment from the sclerotia and mycelia of *Pleurotus tuber-regium* [J]. Carbohydrate Research, 2004, 56(2): 123-128
- [12] Li X, Gao W, Cao Y, et al. Antioxidant activity relationships of pachyman derivative [J]. Journal of Food Biochemistry,

- 2014, 38(3): 307-315
- [13] 张文洲,许嵘. 食药真菌多糖的研究进展[J]. 食品工业科技,2014,35(15):395-399
- ZHANG Wen-zhou, XU Rong. Research progress in edible-medicinal fungi polysaccharide [J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(15): 395-399
- [14] Misaki A, Kakuta M, Sasaki T, et al. Studies on interrelation of structure and antitumor effects of polysaccharides: antitumor action of periodate-modified, branched (1→3)- β -D-glucan of *Auricularia auricula-judae*, and other polysaccharides containing (1→3)-glycosidic linkages [J]. Carbohydrate Research, 1981, 92(1): 115-129
- [15] Bohn J A, BeMilier J N. (1→3)- β -D-glucans as biological response modifiers: a review of structure-fuctional activity relationships [J]. Carbohydrate Polymers, 1995, 28(1): 3-14
- [16] Zhang Y, Li S, Wang X, et al. Advances in lentinan: isolation, structure, chain conformation and bioactivities [J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(2): 196-206
- [17] Wang Y, Zhang M, Ruan D, et al. Chemical components and molecular mass of six polysaccharides isolated from the sclerotium of *Poria cocos* [J]. Carbohydrate Research, 2004, 339(2): 327-334
- [18] 廖海峰,邓向亮,罗霞,等. 羧甲基茯苓多糖对巨噬细胞极化的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(13):122-126
- LIAO Hai-feng, DENG Xiang-liang, LUO Xia, et al. Effects of Carboxymethylpachymaran on polarization of macrophages [J]. China Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2016, 22(13): 122-126