

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.01.004

黄芪多糖的氧化降解及其抗氧化和抗肿瘤活性研究

邓六勤, 黎梅桂, 吴宝仪

(广东省广州市妇女儿童医疗中心, 广东 广州 510000)

摘要:目的 探讨黄芪多糖及其氧化降解片段的抗氧化、抗肿瘤活性。方法 采用维生素 C 和过氧化氢体系诱导产生自由基并降解黄芪多糖, 并对黄芪多糖及其降解产物的抗氧化、抗肿瘤活性进行研究。结果 不同浓度的诱导体系得到的黄芪多糖相对分子质量不同; 体外抗氧化和抗肿瘤作用随着黄芪多糖降解片段相对分子质量降低而活性增强。结论 黄芪多糖的生物活性与其相对分子质量相关。

关键词:黄芪多糖; 氧化降解; 抗氧化; 抗肿瘤; 相对分子质量

中图分类号: R284.1; R285.1

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2018)01-0013-04

Oxidative Degradation, Antioxidation and Antitumor Activity of *Astragalus* Polysaccharides

Deng Liugin, Li Meigui, Wu Baoyi

(Guangzhou Women and Children Medical Care Center, Guangzhou, Guangdong, China 510000)

Abstract: Objective To study the oxidative degradation, antioxidant and antitumor activity of *Astragalus* polysaccharide. **Methods** The *Astragalus* polysaccharides was degraded by free radicals induced by the vitamin C and hydrogen peroxide system, and the oxidative degradation, antioxidant and antitumor activity of *Astragalus* polysaccharide were analyzed. **Results** *Astragalus* polysaccharides with different molecular mass were obtained by different concentrations of induction system. *In vitro*, antioxidant activity and antitumor activity were increased with the decrease of molecular weight of the fragments. **Conclusion** The biological activity of *Astragalus* polysaccharide is related to its relative molecular mass.

Key words: *Astragalus* polysaccharides; oxidative degradation; antioxidant; antitumor; relative molecular mass

黄芪为豆科植物膜荚黄芪、蒙古黄芪、多序岩黄芪或红芪的干燥根,味甘,性微温,具有补气固表、利水退肿、脱毒排脓、生肌等功效^[1]。现代药理研究表明,黄芪具有调节免疫、增强体质、抗氧化、抗病毒、抗肿瘤及改善心肌缺血等功能^[2-4]。黄芪的主要化学成分有黄酮类、皂苷类、黄芪多糖、氨基酸等^[5],黄芪多糖(*astragalus* polysaccharide, APS)是黄芪中最主要的活性成分^[6],具有增强机体抵抗力,促进抗体生成,增强免疫力,双向调节血糖和保护心血管系统等作用^[7-8],目前广泛用于中医临床制剂和动物饲料^[9]。黄芪多糖的组成较复杂,其相对分子质量为 10~50 kD^[10]。黄芪多糖具有一定的生物学活性,但由于其相对分子质量大,溶解性差,不易被吸收,故在应用方面受到很大限制。李红法等^[11]采用乙醇分级沉淀法提取黄芪多糖,获得了不同相对分子质量

的黄芪多糖,表明随着黄芪多糖相对分子质量的降低,抗氧化活性增强。故采用适宜的方法将黄芪多糖相对分子质量降低,有助于提高其生物活性。本研究中采用维生素 C(Vit C)和过氧化氢体系诱导产生的自由基降解黄芪多糖,制备低相对分子质量黄芪多糖,并研究其抗氧化、抗肿瘤活性,为探讨低相对分子质量黄芪多糖在抗肿瘤药物和保健食品中的应用提供试验依据。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

仪器: T1000 型电子天平(常熟市双杰测试仪器厂); HWS24 型电热恒温水浴锅(上海-恒科技有限公司); Eyela N-1100 型旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司); OSB-2100 型油浴锅(上海爱朗仪器有限公司);

第一作者: 邓六勤,女,副主任中药师,研究方向为临床药学,(电话)020-38076263(电子信箱)dengluiqing@yeah.net。

究[J]. 南昌大学学报医学版,2008,48(5): 53-55.

[12] 傅强,蔡文伟. 抑制脂肪酸合成酶对大肠癌细胞生长的影响及其机制[J]. 胃肠病学,2002,7(4): 202-205.

[13] Pizer ES, Thupari J, Han WF, et al. Malonyl-coenzyme A is a potential mediator of cytotoxicity induced by fatty-acid synthase inhibition in human breast cancer cells and xenografts[J]. Cancer Research, 2000, 60(2): 213-218.

[14] Ho TS, Ho YP, Wong WY, et al. Fatty acid synthase inhibitors

cerulenin and C75 retard growth and induce caspase-dependent apoptosis in human melanoma A-375 cells[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2007, 61(9): 578-587.

[15] Pettersson F, Dalglish AG, Bissonnette RP, et al. Retinoids cause apoptosis in pancreatic cancer cells via activation of RAR- γ and altered expression of Bcl-2/Bax[J]. British Journal of Cancer, 2002, 87(5): 555-561.

(收稿日期 2017-09-05)

SHB-3型循环水多用真空泵(巩义市予华仪器有限公司);CO₂细胞培养箱;显微镜;酶标仪(Bio-Rad Inc. USA)。

试药:FeCl₂·4H₂O(天津市大茂化学厂,批号为20151220);H₂O₂(天津市大茂化学厂,批号为20160720);水杨酸(天津市致远化学试剂有限公司,批号为20150208);邻苯三酚(天津市致远化学试剂有限公司,批号为20160315)。以上试剂均为分析纯。去离子水(实验室自制);黄芪购买于清平中药材市场,经邓六勤副主任中药师鉴定为中药黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge。药材打粉后,过4号筛,备用。

1.2 方法

1.2.1 铁皮石斛粗多糖的提取分离

取黄芪粉末约100 g,精密称定,用石油醚回流提取2 h,过滤,弃去滤液,滤渣重新用80%乙醇回流提取2 h,除去可溶性杂质,包括色素、游离糖等。处理后的黄芪粉末加入去离子水,回流提取2 h,连续提取3次,合并滤液。合并的滤液以4 000 r/min的速率离心10 min。减压浓缩上清液,浓缩液加入4倍体积的无水乙醇,低温冷藏,静置过夜。离心,沉淀置60℃的烘箱中烘干。用热水溶解烘干的粗多糖,用Sveag法脱蛋白,重复3~5次。脱蛋白后的多糖用无水乙醇沉淀,静置过夜,离心,60℃烘干,得到黄芪粗多糖。

1.2.2 H₂O₂-Vit C-Fe²⁺氧化降解粗多糖的提取

称取1.2.1项下得到的粗多糖3.2 g,置500 mL锥形瓶中,加320 mL纯水使其溶解,加入新鲜配制的不同量的100 mmol的Vit C,1 000 mmol的FeCl₂·4H₂O,1 000 mmol H₂O₂,置暗处反应2 h。然后将反应液置于300 Da透析袋中,在纯水中透析2 d,透析液以7 000 r/min的速率离心10 min,冷冻干燥上清液,得不同降解片段的粗多糖。

1.2.3 多糖相对分子质量测定

黄芪多糖降解片段样品及标准多糖 Dextran standard 系列样品分别经高效液相凝胶渗透色谱(HPGPC)分析,所用仪器为Agilent 1100 series型高效液相色谱(HPLC)主机,配置示差折光检测器,分析柱为TSK G4000PWXL(300 mm×7.5 mm)和TSK G5000PWXL(300 mm×7.8 mm)串联柱样品质量浓度为1.5 g/L;进样量为20 μL;流动相为醋酸钠;检测器灵敏度为4;柱温为40℃;流速为0.6 mL/min。葡聚糖标准品(相对分子质量1 270,5 220,11 600,23 800,48 600,80 900,147 600,273 000,409 800,667 800)建立标准曲线。

1.2.4 抗氧化活性测定

对O₂·的清除作用:取5 g/L的多糖样品溶液

50 μL,125 μL Tris 缓冲液,25 μL 邻苯三酚,迅速混匀,于325 nm波长下测定吸光度(A),每30 s测1次,连续测5 min,以水代替样品测A₀,ΔA为线性回归方程的回归系数。清除率=(1-ΔA/ΔA₀)×100%。

对·OH的清除作用:取2 mL不同质量浓度(0.5,1,2,3,5 g/L)的多糖样品与2 mL 6 mmol/L FeSO₄,2 mL 2.4 mmol/L H₂O₂混合,摇匀,静置10 min,再加入6 mmol/L的水杨酸2 mL,摇匀,37℃水浴30 min,4 000 r/min离心10 min,上清液于510 nm波长处测定A_i,用1 mL水代替样品测定A₀,用2 mL水代替H₂O₂溶液测定A_j。清除率=[1-(A_i-A_j)]/A₀×100%。

1.2.5 体外抗肿瘤活性测定

细胞株及培养条件:人肝癌细胞株 HepG-2 常规培养于含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基中,37℃,5% CO₂,培养箱中培养,3 d换液1次,取对数生长期细胞用于试验。

MTT法检测细胞生长抑制率:细胞以5×10⁴/孔接种于96孔板,置37℃、5% CO₂的培养箱中,次日细胞贴壁后弃去培养液,加入质量浓度为10,25,50,100,400 μg/mL的黄芪多糖培养液100 μL,每个质量浓度设5孔,同时设无药阴性对照组5孔,以及阳性对照组5-氟尿嘧啶(5-FU),质量浓度为100 μg/mL,设5孔;然后置37℃、5% CO₂培养箱继续培养24,36,48 h;取出后加入5 g/L的MTT溶液20 μL,37℃避光继续培养4 h;每孔加二甲基亚砜(DMSO)150 μL,震荡10 min,混匀使甲瓚结晶充分溶解;置酶标仪490 nm波长下检测各孔吸光度(OD),取5个复孔的均值为最终结果;计算细胞抑制率,细胞抑制率=(阴性对照组OD值-多糖组OD值)/阴性对照组OD值×100%。

2 结果

2.1 氧化降解

黄芪粗多糖用不同质量浓度的H₂O₂-Vit C-Fe²⁺氧化降解后,共得到6个降解片段,冷冻干燥后称定质量。不同相对分子质量多糖片段的降解方法和得率见表1。

2.2 相对分子质量测定

系列相对分子质量标准品的HPGPC分析保留时间见表2。以保留时间计算各自的分配系数(K_{aw})作横坐标、相对分子质量为纵坐标,线性回归方程为Y=-0.3109X+13.148(R²=0.9945)。黄芪粗多糖及其降解片段洗脱峰型对称,由线性回归方程及样品保留时间可计算出黄芪多糖相对分子质量结果为:粗多糖269 459.60 u,片段1为74 446.11 u,片段2为105 006.92 u,片段3为167 793.73 u,片段4为87 565.35 u,片段5为133 226.45 u,片段6为96 574.76 u。

表1 氧化降解因素水平表

多糖片段	Vit C(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	FeCl ₂ · 4H ₂ O(mL)	粗多糖(mL)	纯水(mL)	得率(%)	多糖含量(%)
1	0.5	0.05	0.05	22	27.1	66.17	80.96
2	1	0.1	0.1	44	4.8	76.08	77.98
3	2	0.2	0.2	22	25.5	57.79	72.54
4	4	0.4	0.4	44	1.2	55.18	71.55
5	5	0.5	0.5	22	22.0	57.37	60.23
6	6	0.6	0.6	44	0	64.60	76.70

表2 标准品的 HPGPC 分析保留时间

MW(Da)	lgMW	RT(min)
1 270	3.103 804	32.262
5 000	3.698 970	30.491
12 000	4.079 181	29.309
23 800	4.376 577	28.189
48 600	4.686 636	27.174
80 700	4.906 874	26.416
147 600	5.169 086	25.284
273 000	5.436 163	24.652
409 800	5.612 572	24.300
667 800	5.824 646	23.985

注:MW 为标准品的相对分子质量,RT 为分析保留时间。

2.3 黄芪多糖体外抗氧化活性研究

2.3.1 对羟基的清除作用

黄芪粗多糖及其降解片段对·OH的清除作用效果见图1A。线性范围为0.5~5.0 g/L,阳性药Vit C对·OH的清除效果非常明显,清除率近100.00%。由图1A可见,粗多糖和6个降解片段对羟基的清除能力均随质量浓度的增高而增大,5 g/L片段1清除率已超过60%。降解片段1~6和降解前的粗多糖的半数抑制浓度(IC₅₀)分别为1.669,7.043,12.742,2.428,9.641,2.573 g/L。6个降解片段的清除效果均比粗多糖好,且清除作用1>4>6>5>2>3。

2.3.2 对超氧基的清除作用

黄芪粗多糖及其降解片段对O₂·的清除作用效果见图1B。线性范围为0.5~5.0 g/L,阳性药Vit C对O₂·的清除效果非常明显,清除率趋近100.00%。由图1B可见,黄芪多糖对O₂·的清除作用较弱。黄芪粗多糖降解前对O₂·的清除率在质量浓度为5 g/L时为40.1%。降解后的多糖片段清除作用有所增强,片段1在质量浓度为5 g/L时清除率达66.4%。降解片段1,4,6清除作用明显优于粗多糖,也比片段2,3,5清除效果好。可见,6个降解片段的清除效果均比粗多糖好。

2.4 体外抗肿瘤活性

体外抗肿瘤活性采用MTT法评价。阳性对照药为5-Fu,24,48 h时的抑制率为51.32%和61.47%,检

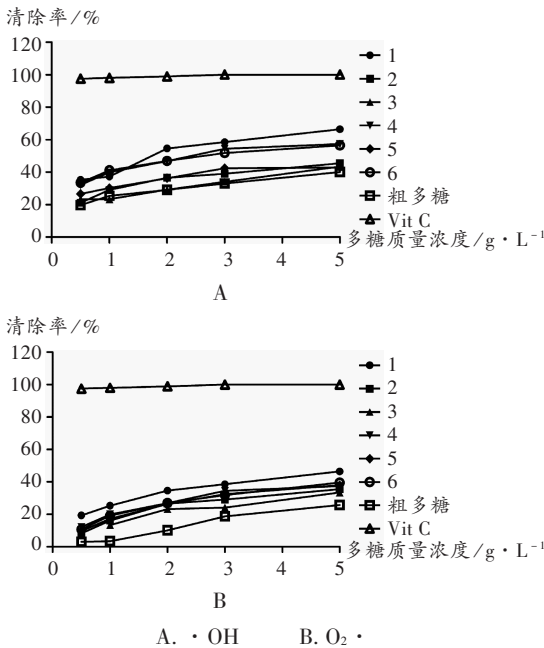


图1 黄芪粗多糖及其降解片段清除作用

测正常,可作为比较。黄芪粗多糖及其降解片段1,4,6清除自由基的能力较强,故抗肿瘤活性选择片段1,4,6作进一步研究。在质量浓度为50~800 μg/mL范围内处理HepG-2,分别于24,48 h时测定对HepG-2的生长抑制作用,细胞存活率见图2。可见,黄芪多糖对HepG-2的生长抑制存在浓度依赖性,随着给药质量浓度的增大,细胞活性降低。

由图2可见,给药48 h比给药24 h时抑制作用强,说明黄芪多糖对HepG-2抑制作用存在时间依赖性。降解片段1对HepG-2抑制作用较突出,24 h时和48 h时的抑制作用均比其他多糖强,48 h时在给药质量浓度为800 μg/mL时,其抑制率达57%。虽然降解片段6在800 μg/mL时略微低于粗多糖,该给药质量浓度非常高,但差异不明显。可见,无论是24 h时还是48 h时,各给药质量浓度下,黄芪多糖降解片段均表现出更好的抗HepG-2活性,高于降解前的粗多糖的活性。

3 讨论

多糖是来源于高等植物、动物细胞膜及微生物细胞壁中的一类天然大分子,是构成生命的四大基本物质之

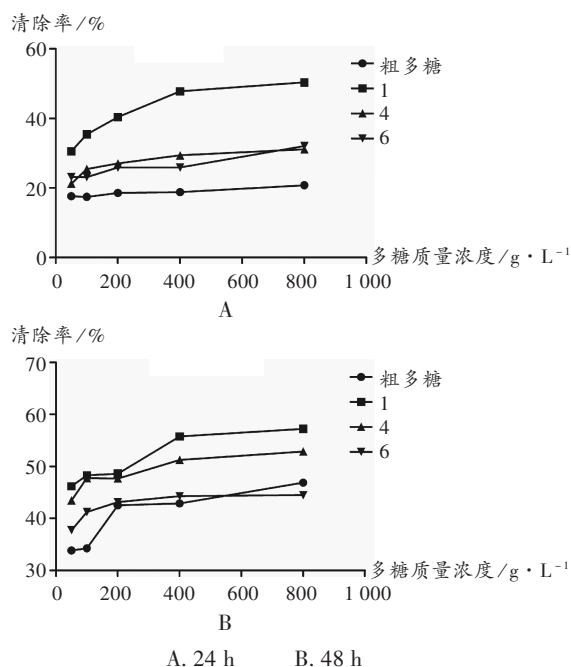


图2 不同浓度的黄芪多糖对 HepG-2 细胞的抑制效果

一,广泛参与细胞间信号转导、细胞分化、再生等各种生命现象。现代药理研究表明,多糖具有抗病毒、抗菌、抗肿瘤、抗氧化、调血脂、增强免疫等生物活性,且来源广泛,不良反应少,在食品和新药研发领域已受到越来越多的关注。

目前,国内外学者提出的多糖降解方法主要分为化学降解法、物理降解法和生物降解法^[12]。多糖在氧化剂的存在下可进行氧化降解,用 H₂O₂ 氧化降解多糖无毒,无副产物,是较理想的化学降解方法。王琪琳^[13]报道,海带硫酸多糖可被 H₂O₂ 有效地降解,降解之后海带硫酸多糖的多糖含量、硫酸根含量及单糖组成基本无变化。孙利芹等^[14]用过氧化氢辅助超声波降解法制备低相对分子质量紫球藻多糖,研究表明,相对分子质量小的多糖对自由基有明显的清除作用,相对分子质量对其抗氧化活性有显著影响。

黄芪的多糖含量超过 10%,是其主要成分和活性物质。大分子的黄芪多糖虽具有一定的生物活性,但由于其相对分子质量大,溶解性较差,生物利用率较低,制约了其药效发挥。研究表明,黄芪多糖的生物活性与其相对分子质量大小相关。文献[12]报道采用分步醇沉法对黄芪总多糖进行分离,结果显示,不同相对分子质量黄芪多糖均有抗氧化作用,且抗氧化能力与其相对分子质量大小有关。

本研究中,通过氧化降解,使黄芪多糖相对分子质量降低,得到 6 个不同相对分子质量的粗多糖片段。由基体外抗氧化试验表明,黄芪多糖降解后的片段抗氧化活性增强,清除羟基的作用比清除超氧基强。然后,

用体外抗氧化活性较强的片段进行体外抗肿瘤研究,结果显示,降解片段对 HepG-2 抑制作用比降解前的粗多糖强。

黄芪为补气佳品^[15],但目前主要作为茶饮或临床调配使用,极少有深加工的保健产品。本研究中采用氧化降解的方法降解黄芪多糖,为寻找多糖生物活性较强适宜的相对分子质量范围,提高黄芪的生物利用度,以及为其他中药材多糖的降解提供参考。同时,本研究中还发现黄芪多糖具有一定抗氧化、抗肿瘤作用,提示其可在抗衰老、抗肿瘤等方面发挥作用,进一步扩大了黄芪的药用范围,为黄芪多糖精加工提供理论依据,有望开发为药品或多糖保健品,以提高黄芪的经济利用价值。

参考文献:

- [1] 朱振元,刘荣强,周芳,等. 黄芪多糖的分离纯化和抗肿瘤活性研究[J]. 现代食品科技,2011,27(4): 376-379.
- [2] 刘明研. 黄芪多糖对犬免疫指标的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医,2011(7): 142-144.
- [3] 路景涛,杨雁,陈敏珠. 黄芪多糖对细菌脂多糖诱导大鼠腹腔巨噬细胞释放 TNF- α , NO 及 IL-1 的影响[J]. 安徽医科大学学报,2004,39(2): 139-141.
- [4] 陈光,臧文臣,刘显清,等. 黄芪多糖对动物肿瘤细胞凋亡影响的研究[J]. 中医药学报,2002,30(4): 55-56.
- [5] 史婉璐,王红秋. 黄芪化学成分及药理作用综述[J]. 黑龙江科技信息,2012(15): 52,56.
- [6] 吕淑华. 黄芪多糖抗肿瘤作用研究进展[J]. 江西中医学院学报,2009,21(1): 85-87.
- [7] 单俊杰,王顺春,刘涤,等. 黄芪多糖体的化学和药理研究进展[J]. 上海中医药大学学报,2000,14(3): 62-65.
- [8] 汪佳佳,毕会民,刘敏,等. 黄芪多糖对 KKAy 小鼠血糖和肝脏抗氧化能力的影响[J]. 湖北中医药大学学报,2015,17(5): 5-6.
- [9] 郭小清,唐莉萍,杜海. 黄芪多糖的药理作用及其在畜禽保健中的应用[J]. 中国动物保健,2004(3): 45-47.
- [10] 姜琛璐,汤承,骞宇,等. 黄芪多糖免疫调节作用研究进展[J]. 食品科学,2013,34(11): 327-332.
- [11] 李红法,郭松波,满淑丽,等. 乙醇分级沉淀提取黄芪多糖及其理化性质和抗氧化活性研究[J]. 中国中药杂志,2015,40(11): 2112-2116.
- [12] 段科,单虎,林英庭. 微波辅助盐酸/过氧化氢降解浒苔多糖及其抗氧化活性[J]. 食品科技,2015,12(40): 142-147.
- [13] 王琪琳. 海带硫酸多糖降解研究进展[J]. 聊城大学学报,2007,20(1): 49-52.
- [14] 孙利芹,王长海,石全见,等. 紫球藻多糖的降解及其体外抗氧化活性[J]. 华东理工大学学报,2010,36(2): 211-215.
- [15] 昭日格图,娜日苏,博日吉汗格日勒图,等. 黄芪多糖咀嚼片降血脂人体试食试验研究[J]. 食品科学,2009,30(15): 196-199.

(收稿日期:2017-08-16;修回日期:2017-09-30)