

羧甲基茯苓多糖的制备及抗肿瘤活性研究

宋波¹, 李小莲², 吴一周², 沈雁², 邓雯嬅^{1*} (1.南京医科大学附属儿童医院药学部, 南京 210000; 2.中国药科大学药剂系, 南京 210009)

摘要: 目的 提取茯苓药材中的多糖, 测定其总糖含量, 并进行羧甲基化改性, 考察茯苓多糖与修饰后的羧甲基茯苓多糖的抗肿瘤活性。方法 采用稀碱浸提法提取茯苓多糖, 苯酚-硫酸显色法测定茯苓多糖中总糖含量, 通过羧甲基化反应得到羧甲基茯苓多糖。并采用 MTT 法检测茯苓多糖与羧甲基茯苓多糖对人肝癌细胞 HepG-2 的毒性反应。结果 苯酚-硫酸法测得茯苓多糖中总糖含量为 95.96%, 羧甲基茯苓多糖与茯苓多糖对 HepG-2 细胞的增殖均具有一定的抑制作用, 其中羧甲基茯苓多糖活性更强。结论 经过修饰后的羧甲基茯苓多糖具有更好的抗肿瘤活性。

关键词: 茯苓多糖; 羧甲基茯苓多糖; 抗肿瘤; HepG-2

中图分类号: R284.2; R285.5 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2019)11-1328-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.11.003

引用本文: 宋波, 李小莲, 吴一周, 等. 羧甲基茯苓多糖的制备及抗肿瘤活性研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(11): 1328-1332.

Study on Preparation and Anti-tumor Activity of Carboxymethylpachyman

SONG Bo¹, LI Xiaolian², WU Yizhou², SHEN Yan², DENG Wenyan^{1*} (1. Department of Pharmacy, Children's Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210000, China; 2. Department of Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To extract pachyman polysaccharides(PPS) from *Poria cocos*, and determine the content of total polysaccharide in PPS. To obtain the carboxymethylpachyman(CMP) by carboxymethylation modification of PPS, and evaluate the antitumor activity of PPS and CMP. **METHODS** Soaking extraction by diluted alkali solution was used to prepare PPS, and phenol-sulfuric method was used to measure the total polysaccharide. Preparation of CMP by carboxymethylation reaction. MTT assay was used to determine the cytotoxicity of PPS and CMP for HepG-2. **RESULTS** The content of the total polysaccharide in PPS was 95.96%, which determined by phenol-sulfuric method. Both of PPS and CMP inhibited the proliferation of HepG-2 cells, CMP had stronger activity. **CONCLUSION** The anti-tumor activity of CMP, which was modified with carboxymethyl, is more prominent than PPS.

KEYWORDS: pachyman polysaccharides; carboxymethylpachyman; anti-tumor activity; HepG-2

茯苓是一种多孔菌科卧孔菌属的传统中药材^[1], 其性味甘、淡、平, 归属心、肺、脾、肾经^[2]。茯苓具有多种药理作用, 如保肝护肝、利尿、抗肿瘤、抗炎、抗病毒, 增强免疫力、抗氧化延缓衰老等, 有良好的应用前景^[3-4]。茯苓多糖(pachyman polysaccharides, PPS)是茯苓的主要成分之一, 含量可达到茯苓干重的 80%。PPS 具有一定的抗肿瘤活性, 其机制可能是 PPS 对肿瘤细胞具有一定的毒性, 也可能是 PPS 能通过增强免疫功能从而发挥抑制肿瘤生长的作用^[5]。不同方法提取得到的 PPS 活性会有一些的区别, 通常采用的方法有水提醇沉法和稀碱浸提法, 由于水提醇沉法得到的 PPS 产率较低, 所以本实验选择的是稀碱浸提法。PPS

经过修饰后, 其水溶性和生物活性均增强, 并促进了其抗肿瘤活性^[6]。文献报道 PPS 与羧甲基茯苓多糖(carboxymethylpachyman, CMP)的抗肿瘤活性多以 S180 肉瘤为模型, 而对其他类型肿瘤的作用报道较少。故本实验经过化学修饰将 PPS 改性成为 CMP, 并考察 PPS 与 CMP 对人肝癌细胞 HepG-2 的毒性。

1 仪器与材料

1.1 仪器

生物安全柜(苏州安泰空气技术有限公司); Model 311 CO₂ 培养箱(Thermo Fisher Scientific); DSZ2000 倒置显微镜(南京冀飞科技有限公司); ELX800 酶标仪(美国伯腾仪器有限公司);

基金项目: 国家科技重大专项(2017ZX09101001); 国家自然科学基金项目(81673364)

作者简介: 宋波, 男, 主管药师 Tel: 15195959033 E-mail: wssb@2008.sina.com *通信作者: 邓雯嬅, 女, 主管药师 Tel: (025)83117220 E-mail: gracias0@sina.com

DZF-75KB-III立式压力蒸汽灭菌锅(上海申安医疗器械厂);真空冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司);RE52-AA 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);ML104 分析天平(梅特勒托利多仪器有限公司);电子控温仪(郑州长城工贸易有限公司);752-紫外分光光度计(上海菁华仪器有限公司);(AVACE)AV-500 型核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司)。

1.2 试剂

苯酚(批号:10072020766)、浓硫酸(批号:1501141100)购自南京化学试剂有限公司;无水乙醇(批号:P1362300)、一氯乙酸(批号:20160233)购自国药集团化学试剂有限公司;氢氧化钠(西陇化工股份有限公司,批号:1609122);DEAE 纤维素-52(北京瑞达恒辉科技发展有限公司,批号:20170118);DMEM 完全培养基(江苏凯基生物技术有限公司,批号:35000050);MTT 试剂(江苏凯基生物技术有限公司,批号:20170320);无水葡萄糖对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号:20150422;纯度:>98%)。

1.3 细胞株

HepG-2 人肝癌细胞购于江苏凯基生物技术股份有限公司。

2 方法与结果

2.1 PPS 的提取

80%乙醇回流脱脂 3 h,抽滤除去滤液,重复 2 次,烘箱 105 °C 干燥得脱脂茯苓粉末^[7]。取脱脂茯苓粉末,按料液比 1:10 加入水,70 °C 回流提取 2 h,重复 2 次除去水溶性杂质。再按相同料液比加入 0.5 mol·L⁻¹ NaOH,50 °C 提取 0.5 h,抽滤得滤液,重复该操作 2 次。合并所得滤液,将所得的溶液用 0.5 mol·L⁻¹ HCl 调 pH 至 7,溶液析出胶状沉淀。用少量水洗涤胶状沉淀,冷冻干燥,得到 PPS。

2.2 PPS 中总糖含量测定

2.2.1 苯酚-浓硫酸法测定糖含量 将葡萄糖对照品置于烘箱中,105 °C 放置 2 h 后,称取 1.0 g 葡萄糖于 100 mL 量瓶中加水溶解稀释至刻度线。取 1 mL 加入 100 mL 量瓶中,加水稀释至刻度线得到 100 μg·mL⁻¹ 的葡萄糖对照品溶液。精密吸取 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 1.0 mL 葡萄糖对照品溶液于试管中,每根试管各加蒸馏水至 1.0 mL。加入 5% 苯酚试剂 1.2 mL,摇匀。加入 5.0 mL 浓硫酸,即

刻摇匀。室温静置 30 min 后于 490 nm 波长处测定吸光度值。以测得的吸光度为纵坐标(y),葡萄糖浓度为横坐标(x, μg·mL⁻¹)绘制标准曲线,得回归方程。结果表明葡萄糖对照品在 10~100 μg·mL⁻¹ 内吸光度与浓度呈良好的线性关系,标准曲线为 $y=0.098x+0.121$, $R^2=0.9994$ 。

2.2.2 仪器精密度试验 移取 0.5 mL 的葡萄糖对照品溶液,按“2.2.1”项下方法测定,连续测定吸光度 3 次,连续测定 3 d,得到日内、日间精密度分别为 1.59%, 1.33%,符合方法学要求。

2.2.3 重复性与稳定性试验 移取 0.5 mL 葡萄糖对照品溶液 5 份,按“2.2.1”项下方法测定吸光度;移取 0.5 mL 葡萄糖对照品溶液 1 份,按“2.2.1”项下方法测定,2 h 内每隔 30 min 测定 1 次,即共测定 4 次吸光度。结果表明重复性试验中 5 个样品的 RSD 为 1.69%,稳定性试验中 4 次测定得到数据的 RSD 为 0.12%,均<2%,符合方法学要求。

2.2.4 PPS 样品的测定 精密称取 PPS 10 mg 于 10 mL 量瓶中。加 DMSO 溶解稀释至刻度线。移取 1 mL 于 10 mL 量瓶中,加水稀释至刻度。移取 0.5 mL,按“2.2.1”项下方法操作,测得吸光度值为 0.592,PPS 样品中总糖的含量为 95.96%。

2.2.5 回收率试验 精密称取 10 mg PPS 于 10 mL 量瓶中,共 9 份。加 DMSO 溶解并稀释至刻度,摇匀。分别移取 1 mL 于 10 mL 量瓶中,加水稀释至刻度线。分别移取 0.2 mL 于 9 根试管中。加入 0.16, 0.20, 0.24 mL 葡萄糖对照品溶液各 3 份,按“2.2.1”项下方法测吸光度值,结果见表 1。

表 1 茯苓多糖回收率

Tab. 1 Recovery of pachyman polysaccharides

对照品加入量/μg	样品加入量/μg	测得量/μg	回收率/%	RSD/%
16.10	19.25	35.03	98.38	
16.10	19.29	35.54	100.8	
16.10	19.21	34.83	97.52	
20.12	19.25	39.15	98.86	
20.12	19.27	39.52	100.8	1.24
20.12	19.23	39.12	98.78	
24.14	19.25	43.20	98.98	
24.14	19.21	42.89	97.58	
24.14	19.27	43.44	100.1	

2.3 CMP 的制备

配制 30%NaOH 的异丙醇溶液,称取 5.0 g PPS 一并加入圆底烧瓶中,搅拌,充分混合后冰水浴搅拌分散 3 h。称取 18 g 氯乙酸,投入反应液中,50 °C 下继续反应。待反应物中出现大量黏稠物附着后,加入适量纯水。收取反应后所得的反应液蒸发浓缩,并加入 70%甲醇-乙酸溶液后抽滤。抽滤完成后用甲醇冲洗、乙醚洗涤沉淀。沉淀物加入纯水溶解,搅拌并过滤。将所得溶液置于透析袋中,透析 72 h 除去残留的有机溶剂。将所得溶液冻干,即得所需的 CMP 粗品。反应式见图 1。

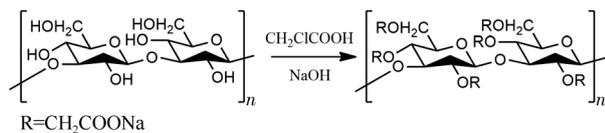


图 1 羧甲基茯苓多糖的合成反应

Fig. 1 Reaction formula of carboxymethylpachymaran

2.4 CMP 的纯化

将 CMP 粗品溶于超纯水中,加入到经过预处理的 DEAE-52 纤维素层析柱中,依次采用 0, 0.5, 1.0, 1.5 mol·L⁻¹ NaCl 溶液作为流动相进行洗脱,流速控制为 0.5 mL·min⁻¹,收集洗脱下的溶液,5 mL 为一个洗脱单位。测定 DEAE-52 纤维素柱层析所得洗脱液的吸光度值。并且以收集的管数编号为横坐标,以测得的吸光度为纵坐标作图,结果见图 2。在 41~55 管处的吸收峰对称度较好,主要产物集中在此部分,收集这部分的产物,经 72 h 透析脱盐后冷冻干燥,得到精制的 CMP,留作细胞试验用。按下列公式计算收率:收率(%)= $m_1/m_2 \times 100\%$, m_1 为羧甲基反应中投入的 PPS 质量, m_2 为精制后 CMP 的质量,计算得到的收率为 86.0%。

2.5 CMP 取代度的测定

精密称取精制的 CMP 500 mg 于锥形瓶中,加入 0.1 mol·L⁻¹ HCl 溶液 50 mL,用 0.1 mol·L⁻¹ NaOH 溶液进行滴定,并同时测定溶液的 pH。按下列公式计算羧甲基的取代度: $DS=0.203A/(1-0.058A)$, $A=(V_2-V_1)c/0.5$; 式中 DS 为羧甲基取代度, A 为羧甲基物质的量(mmol), V_1 、 V_2 分别为测定液中 pH=2 和 4 时所用的 NaOH 溶液的体积(mL), c 为 NaOH 的浓度(mol·L⁻¹)。结果显示,滴定至 pH=2 时,所消耗的 NaOH V_1 为 42.35 mL, pH=4 时, V_2 为 59.76 mL,计算得到 $DS=8.4$ 。

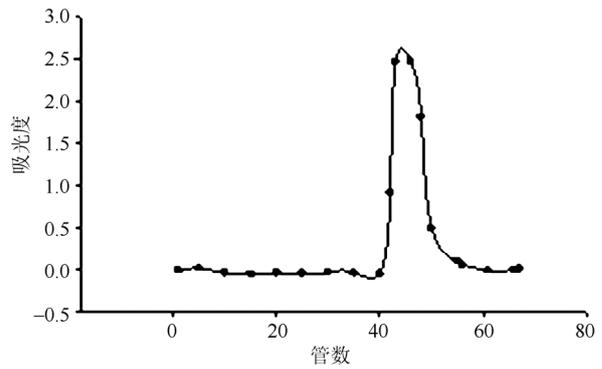


图 2 羧甲基茯苓多糖的柱层析吸光度

Fig. 2 Absorbance value of column chromatography of carboxymethylpachymaran

2.6 PPS 和 CMP 的红外光谱分析

PPS 主要由 β -(1 \rightarrow 3)-D-葡聚糖组成,其本身生物活性较低。为了提高其抗肿瘤活性,可将其进行羧甲基化的结构改性,得到具有较高抗肿瘤活性的 CMP。分别称取干燥的 PPS 与精制的 CMP 各 1 mg 与 KBr 粉末压片,在 4 000~400 cm⁻¹ 内进行红外扫描,结果见图 3。3 600~3 200 cm⁻¹ 间峰形较宽的吸收峰由糖链非游离 O-H 键的伸缩振动产生,3 000~2 800 cm⁻¹ 间的吸收峰由糖类甲基、亚甲基 C-H 键的伸缩振动产生,1 200~1 000 cm⁻¹ 之间的特征吸收峰证明糖链中含有吡喃环结构。890 cm⁻¹ 附近为 β -吡喃糖特征吸收峰。CMP 890 cm⁻¹ 的 β -吡喃糖特征吸收峰减弱,但出现 1 594 cm⁻¹ 左右的吸收峰,该吸收峰为羧甲基特征吸收峰,由 C=O 的非对称伸缩振动产生。IR 结果表明,PPS、CMP 多糖分子中的葡萄糖单元是以 β -吡喃型糖苷键相连,在 CMP 多糖分子中存在 -CH₂COO-基团。

2.7 PPS 和 CMP 的 ¹H-NMR 分析

分别取适量干燥的 PPS 与精制的 CMP 溶于 D₂O,500 MHz 频率照射,20 °C 下核磁共振仪记录图谱,结果见图 4。 δ 3.5~4.0 为 C₂-C₆ 质子堆积峰。在 CMP 的 ¹H-NMR 中,在 δ 为 4.2~4.5 间出现了羧甲基(-OCH₂COO-)中质子的信号峰。

2.8 PPS 和 CMP 对 HepG-2 细胞的毒性

取对数生长期的 HepG-2 细胞,消化离心,弃去上清液,重悬使细胞密度为 1 mL 5 \times 10⁴ 个,将细胞接种于 96 孔板中,每孔 100 μ L,放入培养箱中培养 24 h,将 PPS 与 CMP 稀释成不同浓度的溶液,加入 96 孔板中,孵育 24, 48 h 后,每孔加入 20 μ L MTT 溶液(浓度为 5 mg·mL⁻¹),培养箱中孵

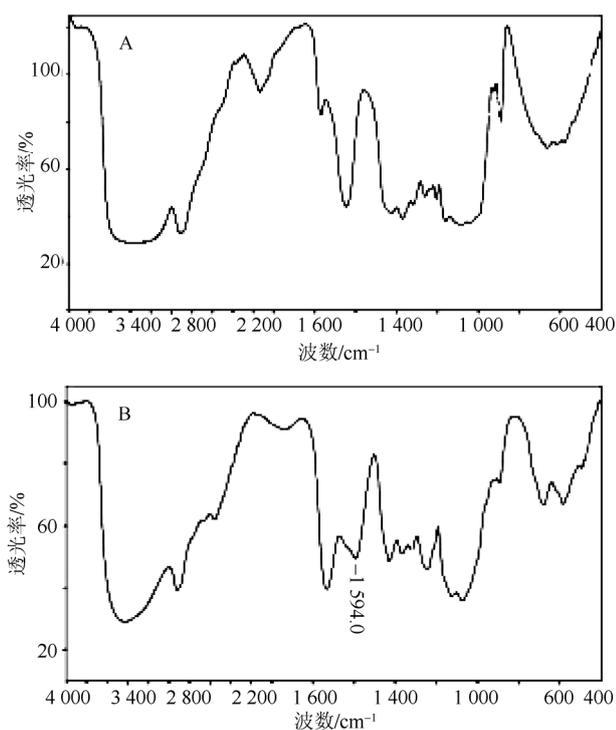


图3 茯苓多糖(A)、羧甲基茯苓多糖(B)的红外光谱图
Fig. 3 IR spectrogram of pachyman polysaccharides(A) and carboxymethylpachyman(B)

育4 h。将MTT溶液小心吸出，每孔加入150 μL DMSO，震荡10 min后采用酶标仪测定各样品在490 nm下的吸光度值(A)，并按以下公式计算细胞存活率：细胞存活率=(A_{样品}-A_{空白})/(A_{对照}-A_{空白})×100%。结果见表2，PPS处理过的细胞，存活率均>80%，说明PPS对HepG-2细胞的增殖几乎没有抑制作用；而CMP处理过的细胞，CMP浓度越大，作用时间越长，细胞存活率越小，说明CMP的抗肿瘤活性具有浓度依赖性，相对于PPS而言，其细胞毒性较大。采用SPSS 19.0计算IC₅₀值，作用48 h后，CMP的IC₅₀值为210.2 μg·mL⁻¹。

表2 茯苓多糖与羧甲基茯苓多糖的细胞存活率(n=4)

Tab. 2 Cell viability of pachyman polysaccharides and carboxymethylpachyman(n=4)

浓度/ μg·mL ⁻¹	茯苓多糖 24 h		茯苓多糖 48 h		羧甲基茯苓多糖 24 h		羧甲基茯苓多糖 48 h		%
	细胞存活率	RSD	细胞存活率	RSD	细胞存活率	RSD	细胞存活率	RSD	
0	100.00	1.86	100.00	5.29	100.00	2.15	100.00	3.09	
10	87.58	2.17	87.05	3.00	85.31	3.22	88.12	2.79	
20	84.06	1.88	85.07	3.83	83.83	3.10	81.44	0.66	
50	85.49	1.65	83.35	2.57	78.83	1.60	66.06 ²⁾	1.83	
100	82.75	2.68	82.98	2.18	75.05 ¹⁾	3.80	59.87 ²⁾	6.01	
200	81.75	4.60	82.23	2.96	73.29 ¹⁾	6.50	51.64 ²⁾	7.37	
500	81.35	1.78	81.39	3.21	58.33 ¹⁾	5.01	48.22 ²⁾	1.28	
1 000	81.93	0.96	80.94	3.22	58.28 ¹⁾	3.09	19.79 ²⁾	14.99	

注：与茯苓多糖 24 h 比较，¹⁾P<0.01；与茯苓多糖 48 h 比较，²⁾P<0.01。

Note: Compared with pachyman polysaccharides 24 h, ¹⁾P<0.01; compared with pachyman polysaccharides 48 h, ²⁾P<0.01.

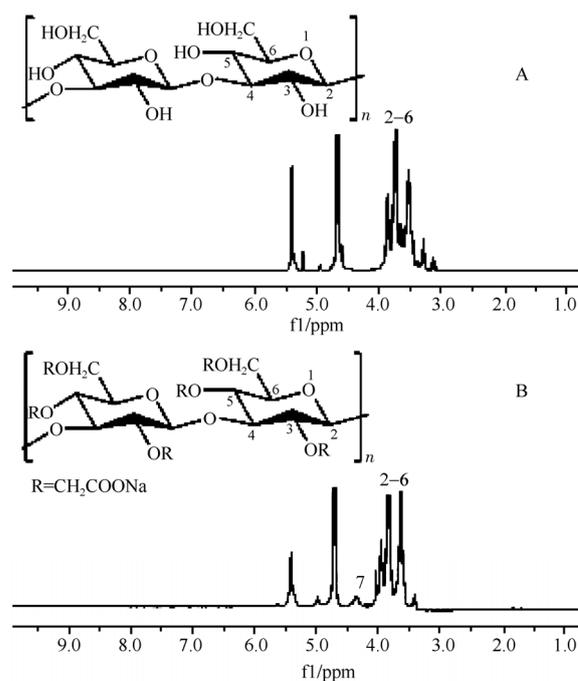


图4 茯苓多糖(A)、羧甲基茯苓多糖(B)的¹H-NMR图谱
2-6-C2-C6 质子堆积峰；7-羧甲基(-OCH₂COO-)中质子的信号峰。

Fig. 4 ¹H-NMR spectrogram of pachyman polysaccharides (A) and carboxymethylpachyman(B)

2-6-proton peak of C₂-C₆; 7-proton peak of carboxymethyl(-OCH₂COO-).

3 讨论

多糖在强酸作用下，会水解成为单糖，并迅速脱水成为糠醛，生成的糠醛能与酚类物质发生缩合反应，生成有色物质，在490 nm条件下有最大吸收，且反应迅速、完全^[8]。以这一反应为基础，本实验建立了PPS含量测定的方法，其操作简单、精密度良好、重复性高、稳定性佳、回收率优，适用于糖类物质的含量测定。本实验所采用的提取方法能提取出碱溶性PPS，且总糖含量高达95.96%，可用于后续CMP的制备纯化。CMP的

制备方法主要有水媒法与溶媒法,水媒法是指将 PPS 溶于稀碱液后,加入卤代酸水溶液,在适宜的温度下进行醚化反应;溶媒法则是将 PPS 悬浮分散在有机溶剂中,加入一定浓度的碱液碱化后,再加入卤代酸,适宜温度下进行醚化反应。溶媒法主要以有机溶剂为介质,反应均匀、稳定,而水媒法副反应较多,同时在酸化的过程中会产生大量黏稠物,后处理困难,所以本实验采用溶媒法^[9]。

根据文献报道,未经修饰改性的 PPS 对肿瘤的抑制率仅为 0~3%,而改性后的 PPS 生物活性将提高^[10]。从本实验可以看出,PPS 对 HepG-2 细胞的抑制作用较小,而 CMP 在高浓度条件下对 HepG-2 细胞表现出较大的细胞毒性,说明经过此方法得到的 CMP 具有较好的抗肿瘤活性,具有良好的开发价值与应用前景。

REFERENCES

- [1] NIU S, HAO L M, ZHAO S X, et al. Research progress in polysaccharides from *Poria cocos* [J]. Food Sci(食品科学), 2012, 33(13): 348-353.
- [2] ZHANG M. PSP improves learning and memory and its mechanism [J]. J Beihua University(Nat Science)(北华大学学报: 自然科学版), 2018, 19(1): 39-44.
- [3] ZHANG X J, XU J, LIN Z B. The effect of carboxymethylpachymaran(CMP) on immunological function in mice [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2002, 37(12): 913-916.
- [4] WASSER S P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 60(3): 258-274.
- [5] CHIHARA G, MAEDA Y, HAMURO J, et al. Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk.) sing [J]. Nature, 1969, 222(5194): 687-688.
- [6] WEI X J, HU T J, CHEN J R, et al. Inhibitory effect of carboxymethylpachymaran on cyclophosphamide-induced oxidative stress in mice [J]. Int J Biol Macromol, 2011, 49(4): 801-805.
- [7] LIU Y, WANG W X, JIANG H. Isolation and molecular weight determination of *Poria cocos* (Schw.) Wolf [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2016, 33(11): 1402-1405.
- [8] CHEN C X. The antitumor activity and immune effect of carboxymethylpachymaran(CMP) [J]. Acta Edulis Fungi(食用菌学报), 2001, 8(3): 39-44.
- [9] SHI Q D, JIANG X M. Twice alkalization method for preparation of carboxymethylpachymaran [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 1996, 8(2): 78-81.
- [10] CHEN C X, ZHAO D M, ZHANG X J, et al. Anti-tumor experiment of carboxymethyl tuckahoe polysaccharide [J]. Fujian J Tradit Chin Med(福建中医药), 2002, 33(3): 38-40.

收稿日期: 2018-07-17

(本文责编: 沈倩)