植物多糖的分离纯化及抗肿瘤作用研究进展

范媛媛[1],左绍远[1,2]* (1. 大理大学基础医学院,云南大理 671000;2. 云南省昆虫生物医药研发重点实验室,云南大理 671000)

摘要 多糖的分离纯化是多糖研究的重要组成部分,多糖具有多种生物学活性,其中抗肿瘤是多糖的主要活性之一。多糖抗肿瘤机制大多与其免疫调节作用相关,通过总结相关文献,综述了近几年多糖的提纯方法、抗肿瘤活性及其作用机制。

关键词 多糖;分离纯化;抗肿瘤;免疫调节
中图分类号 Q946.3 **文献标识码** A
文章编号 0517-6611(2019)09-0023-03
doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2019.09.007
开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Research Advances in Purification and Antitumor Activity of Plant Polysaccharides

FAN Yuan-yuan[1], ZUO Shao-yuan[1,2] (1. College of Basic Medicine, Dali University, Dali, Yunnan 671000; 2. Provincial Key Laboratory of Entomology Biopharmaceutical R&D, Laboratory of Entomology Biopharmaceutical R&D, Dali, Yunnan 671000)

Abstract The extraction and purification of polysaccharides is an important part of polysaccharide research. Polysaccharides have many biological activities, among which antitumor is one of the main activities of polysaccharides. The anti-tumor mechanism of polysacchrides is mostly related to immune regulation. The purification methods, antitumor activity and mechanism of polysaccharides in recent years were reviewed by summing up the literature.

Key words Polysaccharide; Separation and purification; Antitumor; Immune regulation

多糖广泛存在于动物、植物及微生物的细胞壁中,常由10个以上的单糖通过糖苷键连接而形成高分子聚合物。多糖不仅是组织细胞的重要组成成分,其在细胞识别、细胞信号转导、细胞间物质运输、细胞分化、凋亡等过程中均发挥重要作用。研究表明,不同来源的多糖具有免疫调节、抗肿瘤、抗病毒、抗氧化等多种生物学活性。其中抗肿瘤活性是多糖的主要活性之一,也是近几年多糖研究领域的前沿问题。笔者通过总结近几年的相关文献,对多糖的提纯方法、抗肿瘤作用进行综述。

1 多糖的提取

多糖的提取方法有多种,主要有水提法、酶提法、超声波提取法、微波辅助提取法等,可根据不同的原料来源选择合适的方法。

1.1 水提法 多糖大都溶于水,且随着温度的提高提取效率也提高[1],但水温一般应控制在80℃以下,否则会导致糖苷键的断裂而破坏多糖的结构。水提法操作流程不复杂,成本较低,通常可获得较满意的提取效率,因此,目前热水浸提法在多糖分离提取中得到广泛应用。

左绍远等[2]在研究红花蜂花粉多糖时用水提醇沉法提取多糖,经苯酚-硫酸法测定多糖含量为86.12%,多糖提取率为2.85%。罗永会等[3]用水提法对慈姑进行提取多糖,最佳工艺条件:提取时间3 h,温度70 ℃,料水比1∶15,提取2次,多糖提取率达12.94%。曾婷等[4]应用热水浸提法提取仙茅粗多糖。仙茅干粉经乙醇脱脂处理后,加入35倍的蒸馏水煮沸水浴2.5 h,提取液进行抽滤,残渣再重复以上步骤提取2次,滤液合并用95%乙醇沉淀过夜,65 ℃真空干燥得到仙茅粗多糖,采用硫酸-苯酚法测定仙茅多糖质量分数为91.8%。

1.2 酶提法 酶法提取多糖可分为单一酶提取法和复合酶提取法。吴素萍等[5]采用纤维素酶提取枸杞多糖,通过正交试验对酶解pH、酶解温度、酶解时间、加酶量4种影响因素进行研究,得到提取枸杞多糖的最佳工艺条件为加水量50 mL、pH 5.0、酶解温度50 ℃、酶解时间60 min、加酶量0.5%。在该条件下多糖得率为11.2%,而采用水提法多糖得率为8.1%。于翠芳等[6]采用复合酶提取法在单因素基础上进行3因素3水平的Box-Dehnken中心组合试验设计,得出复合酶提取法的最佳工艺,多糖得率为13.96%,与单一酶相比,在多糖得率上并无明显优势,但其时间比单一酶缩短50%。滕利荣等[7]研究了热水提法和复合酶提法的最佳条件,用纤维素酶、果胶酶、胰酶3种酶按比例加入百合块茎干品中,选取pH、酶促反应温度和时间3个影响因素进行正交试验,在最适条件下,多糖提取率为31.03%,是热水提法的2.85倍,且还对2种不同方法得到的多糖抗氧化活性进行比较,酶法提取的多糖对O_2^-的清除率和对OH^-的抑制作用均明显高于水提法得到的多糖。

1.3 超声波提取法 胡斌杰等[8]在提取灵芝多糖中应用了超声波法,将灵芝菌粉按一定条件(料液比、时间、温度、粒度)超声提取2次,过滤,滤液合并,醇沉,用苯酚-硫酸法测定多糖含量,在超声波法提取温度50 ℃、时间20 min、粒度40目,传统热水提法提取温度80 ℃、时间1.5 h、粒度40目的条件下,超声法提取率较热水提取法提高了30%以上,而时间缩短了近75%。超声法温度适中,避免了高温有可能对多糖有效成分的破坏,从而使多糖的生物活性得以保持。虽然超声波提取法的提取率率优于水提法,但超声提取时间>20 min时,多糖的提取率会逐渐下降,可能是由于超声波较长时间的机械剪切使多糖降解而导致[9]。

1.4 微波辅助提取法 微波辅助提取是一种利用微波能量来提取多糖的新技术,与超声的作用原理相似。聂金媛

基金项目 国家自然科学基金资助项目(31460231);云南省昆虫生物医药研发重点实验室项目(2014-10)。
作者简介 范媛媛(1991—),女,山东泰安人,硕士研究生,研究方向:多糖的分离纯化与生物学活性。*通信作者,教授,硕士,从事复合多糖研究。
收稿日期 2018-11-10

等[10]采用微波辅助提取法提取茯苓多糖,选择微波作用时间、占空比、固液比 3 个因素,每个因素确定 15 个水平,以 U15 均匀设计表进行试验,得出最佳提取工艺:微波作用时间 18 min,占空比 42%,固液比 1∶50。在此条件下,茯苓多糖提取率为 2.792%,相比水提法的多糖得率高 1.35%。王丽等[11]采用微波法处理米糠多糖,通过单因素和正交试验最终得出微波辅助提取米糠多糖的最优工艺条件为料液比 1∶10;微波辐射时间 2 min;微波功率 400 W,多糖提取率为 2.76%,高于传统水提多糖得率 2.02%。黄璞等[12]为优化黑灵芝孢子粉多糖的微波提取工艺,在单因素试验基础上,采用响应面分析法和 Box-Behnken 中心组合设计的方法,研究提取温度、提取时间以及水料比 3 个自变量及其交互作用对多糖提取率的影响。利用 SAS 和响应面分析相结合的方法,模拟得到二次多项式回归方程的预测模型,并确定微波提取多糖最佳条件:温度 129 ℃、时间 27 min、水料比为 31∶1。在此条件下,多糖提取率理论值为 2.73%,实际值为 2.64%,误差较小。试验证明,微波辅助提取法提取效率高,试验时间短,可供选择的溶剂较多,溶剂用量少,节能。此外,由于微波作用时间短,可有效避免长时间高温操作对样品造成的损坏,有利于热不稳定多糖的提取[13]。

2 多糖的分离纯化

多糖的粗提物通常为糖蛋白,且常含有色素及小分子杂质等,需进行脱蛋白、脱色及透析去除小分子杂质,可得总多糖。总多糖通常是多种不同级分多糖的混合物,常需进一步分离分级、纯化,以便获得均一的多糖组分。刘红梅等[14]在北极海参多糖的分离纯化及抗肿瘤活性研究中发现,3 种精制多糖对 4 种肿瘤细胞的抑制作用明显强于总多糖,提示多糖的均一性与活性密切相关。

2.1 脱蛋白、脱色 多糖的提纯方法有多种,脱蛋白常用的方法有 Sevage 法、酶法、三氟三氯乙烷法、沉淀法、硫酸铵法等。去除色素的方法有活性炭吸附、滤膜超滤、过氧化氢法、离子交换树脂法、反胶束法等。

Sevage 法是最常用的方法之一。Sevage 法去除蛋白是根据蛋白质在氯仿等有机溶剂变性而不溶于水的特点,将多糖水溶液、氯仿、戊醇或正丁醇按比例调成混合物振荡,蛋白质与氯仿-戊醇(正丁醇)生成凝胶物而分离的原理,以去除水层和溶剂层交界处的变性蛋白。程轩轩等[15]采用水提醇沉法提取白箭多糖,取白箭多糖水溶液,按 4 倍体积加入正丁醇-氯仿(1∶4)混合液振荡离心取上层溶液,经 6 次脱蛋白过程后得到蛋白脱出率/多糖保留率分别为 31.84%/95.44%、34.08%/93.61%、39.66%/89.14%、78.21%/84.57%、79.33%/78.28%、79.33%/77.27%。Sevage 法脱蛋白较温和,可避免多糖降解,但脱蛋白效率不高,且多糖保留率随脱蛋白次数增加而减少。常与酶法脱蛋白结合,可提高脱蛋白效率。

色素分为脂溶性和水溶性,脂溶性色素可在提取多糖前对原料进行石油醚、乙醇回流,大部分脂溶性色素可去除。水溶性色素极易溶于水和乙醇,在醇沉步骤将其去除[16]。对残留的色素可用透析、活性炭吸附等方法去除,熊伟等[16]采用活性炭吸附方法对螺旋藻粗多糖进行脱色处理,由于活性炭是具有多空结构的物质,因此能吸附多糖水溶液中的色素。

2.2 柱层析法 柱层析法作为常用提纯方法之一,在分级纯化多糖时应用广泛。曹永强等[17]采用 DEAE-Sepharose Fast Flow 离子交换柱纯化植物乳杆菌胞外粗多糖,透析、冷冻干燥后得到 SKT109 胞外中性多糖和 YW11 胞外酸性多糖样品,2 种样品经过 DEAE-Sepharose FastFlow 离子交换柱层析,有可能会含有相同电荷的不同组分,再经 Sepharose CL-6B 凝胶柱纯化,经纯化后的 2 种多糖纯品的总多糖含量达 92.31%、89.02%,纯度较高。吕乐等[18]为研究葡萄树伤流液多糖的抗氧化能力,采用 DEAE-52 纤维素柱对吐鲁番无核白和喀什木纳格葡萄树伤流液中多糖进行分离纯化,得到 8 个均一多糖组分。

3 多糖抗肿瘤作用

恶性肿瘤一直是危害人身健康的重要疾病之一。目前肿瘤的治疗常采取手术及放化疗。但放化疗存在较严重的免疫抑制和造血抑制的毒副作用。而多糖可抑制肿瘤生长且毒副作用小,具有较好的临床实际应用价值。

3.1 多糖的免疫调节作用 体内众多的免疫系统起着抗肿瘤的作用,而多糖则是一种免疫增强剂,不但能激活 T 细胞、B 细胞、M 、NK 细胞、CTL 细胞、LAK 细胞等免疫细胞的活性,激活网状内皮系统(RES)吞噬、清除老化细胞和异物以及病原体的作用,还能促进 IL-1、IL-2、TNF-α、INF-γ、NO 等生成,调节机体抗体和补体的形成,提高机体抗肿瘤免疫力[19]。

3.1.1 激活 T/B 淋巴细胞、激活抗原呈递细胞。高向东[20]从海洋耐盐炭团菌(YC4108)提取得到 YCP1,将 YCP1 作用到荷瘤小鼠体内,发现 YCP1 对小鼠 Heps 实体瘤有明显抑制作用,抑瘤率为 50.2%。YCP1 经纯化得到 YCP2 和 YCP3 2 种多糖组分,虽然在体外对肝癌细胞 SMMC(-)21 无直接杀伤作用,但试验显示 2 种组分可显著提高小鼠脾淋巴细胞 IL-2 和 IFN-γ 和巨噬细胞 IL-1 和 TNF-α 的产生能力,并与剂量大小成正比。采用 RF-PCR 法来探究各组分多糖对小鼠脾淋巴细胞和巨噬细胞中细胞因子基因表达的影响,结果显示 YCP2 和 YCP3 能够显著提高小鼠脾淋巴细胞 IL-2 和 IFN-γ 及小鼠巨噬细胞 TNF-α 基因表达水平。表明炭团菌多糖的抗肿瘤作用与诱发免疫反应及提高细胞因子表达水平有关。

抗原提呈细胞(DC)在抑制肿瘤、阻碍肿瘤进行性浸润方面有一定的作用,李明松等[21]将 DC 体外诱导的细胞毒 T 淋巴细胞(CTL)背部皮下注射回输荷瘤裸鼠体内,并对肿瘤细胞凋亡情况进行检测,发现 DC 诱导的抗肿瘤免疫主要是通过诱导移植瘤细胞凋亡来实现。

3.1.2 激活巨噬细胞。巨噬细胞是机体内一种能够分泌细胞毒效应分子并对肿瘤细胞与入侵到机体的外来病原微生物具有抑制或清除作用的免疫效应细胞。但无活化的巨噬细胞,其吞噬杀伤作用是有限的。溶菌酶是正常体液中抗微生物的物质之一,系巨噬细胞和白细胞所产生,测定其含量

可反映该类细胞非特异性免疫功能的强弱,云芝多糖能明显增加小鼠血清溶菌酶含量,促进巨噬细胞的非特异性免疫功能,发挥抗肿瘤作用。香菇多糖能激活巨噬细胞,增强细胞毒作用,提高 NKC 活性,诱导白细胞聚集发挥抗肿瘤作用[22]。海带硫酸多糖能激活小鼠腹腔巨噬细胞,提高小鼠腹腔巨噬细胞的过氧化物酶活性及其吞噬功能,从而抑制小鼠 S180 肉瘤[23]。

3.2　对肿瘤细胞的直接抑制作用　杨瑾等[24]提取板桥党参多糖研究抗肿瘤活性,对板党多糖干预昆明小鼠的抑瘤率、安全性评价、体外增殖抑制 3 个方面进行测评,结果表明当板党多糖剂量为 100 和 200 mg/kg 时,其抑瘤率分别为 34.16%、37.59%,虽然比环磷酰胺组抑瘤率低,但相对安全且无毒副作用,在体外增值抑制方面显示,板党多糖 10 ug/mL 对 MCF-7 细胞的抑制作用不明显,100、500、1 000 ug/mL 对 MCF-7 细胞的抑制率随质量浓度增加而升高,呈良好的质量浓度依赖性,证明板党多能够直接抑制肿瘤细胞活性。还有学者研究牛膝多糖能提高荷瘤小鼠自然杀伤细胞(NKC)的活性,ABPS 100 mg/kg ip 能提高 LPS 诱导的 TNF-α 及 NO 的产生和 NOS 的活性,提高 T-淋巴细胞增殖能力,并对肿瘤细胞起不同程度的杀伤和抑制作用[25]。

3.3　对癌基因的影响　p53 作为公认的抗癌基因,与细胞凋亡关系密切,其表达产物对细胞增殖起负调节作用,表达产物增多意味着癌细胞活性下降[26]。魏小龙等[27]利用 Northern 杂交和狭线杂交的定量检测方法,发现低分子量(1 000~2 000 u)地黄多糖(LRPS)可使小鼠 Lewis 肺癌细胞内的正调控基因 *c-fos* 基因表达明显增加,负调控基因 *c-myc* 基因表达明显减少,又采用 RT-PCR 的方法检测体外多糖对 *p*53 基因表达水平的影响,结果 *p*53 基因表达明显增加。董兰凤等[28]采用附子多糖和酸性多糖以腹腔注射和灌胃 2 种给药途径对荷瘤小鼠(S180、H22)进行抑瘤率研究,结果显示 2 种多糖均提高了抑癌基因 *p*53 和 *Fas* 的表达,有显著的抑瘤作用。

3.4　多糖改变肿瘤细胞膜的生长特性　多糖对肿瘤细胞膜的影响主要与唾液酸(SA)和磷脂(PI)转换有关。SA 位于细胞膜表面糖蛋白和糖脂的聚糖链末端,与细胞膜的许多功能有关,具有阻碍病原体附着细胞及使细胞产生免疫抗体的作用。肿瘤细胞膜 SA 含量的降低,与肿瘤细胞转移、相关抗原的表达和免疫应答细胞的过程相关。PI 转换是指存在于细胞膜与内质网上的磷脂酸肌醇在其激酶催化下发生磷酸化反应的过程[26]。周永[19]从大肠杆菌中提取的荚膜多糖能抑制 B16-BL16 黑色素瘤细胞及 MDA-MB-231 乳腺癌细胞的转移,并能降低 B16-BL16 对内皮细胞、细胞间的黏附分子、选择性蛋白的黏附作用。

4　展望

先进的提取、分离、纯化技术的发展,将极大地提高多糖的分离纯化效率。多糖可通过促进细胞凋亡、细胞周期阻滞等机制而直接抑制肿瘤细胞生长,同时可作为免疫增强剂,通过增强机体免疫力而抑制肿瘤的发生、发展。因此,多糖作为一种潜在的新抗肿瘤药物资源,具有良好的应用前景。

参考文献

[1] 李志平. 巢湖蓝藻多糖的分离、纯化及理化性质研究[D]. 合肥:安徽大学,2014.
[2] 左绍远,钱金栉. 云南产红花蜂花粉多糖的分离提取及含量测定[J]. 时珍国医国药,2012,23(11):2765-2766.
[3] 罗永会,张翠香,徐春萍,等. 慈姑多糖的提取研究[J]. 热带农业工程,2012,36(3):5-8.
[4] 曾婷,彭梅,杨娟. 仙茅多糖的分离纯化及结构分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(16):53-57.
[5] 吴素萍,徐建宁. 酶法提取枸杞多糖的研究[J]. 食品科技,2007,32(8):114-117.
[6] 于翠芳,朱英莲,王世清. 复合酶法提取枸杞多糖工艺[J]. 食品研究与开发,2014,35(4):40-43.
[7] 滕利荣,孟庆繁,刘培源,等. 酶法提取百合多糖及其体外抗氧化活性[J]. 吉林大学学报(理学版),2003,41(4):538-542.
[8] 胡斌杰,陈金锋,王宫南. 超声波法与传统热水法提取灵芝多糖的比较研究[J]. 食品工业科技,2007,28(2):190-192.
[9] 浦跃武,王金全. 超声波提取玛咖多糖的工艺研究[J]. 食品科技,2010,35(3):174-177.
[10] 聂金媛. 几种中草药中活性多糖的提取及分离分析[D]. 重庆:重庆大学,2004.
[11] 王丽,赵颖,崔换天,等. 基于 IL-7 的甘草多糖抗肿瘤机制的研究[J]. 天津中医药,2016,33(6):373-377.
[12] 黄璞,谢明勇,聂少平,等. 响应曲面法优化微波辅助提取黑灵芝孢子多糖工艺研究[J]. 食品科学,2007,28(10):200-203.
[13] 张自萍. 微波辅助提取技术在多糖研究中的应用[J]. 中草药,2006,37(4):630-632.
[14] 刘红梅,周晓秋,姚亚楠,等. 北极海参多糖的分离纯化及抗肿瘤活性研究[J]. 济南大学学报(自然科学版),2016,30(5):403-408.
[15] 程轩轩,张旭红,杨慧文,等. 白箭多糖的分离纯化及抗氧化活性研究[J]. 中草药,2017,48(20):4219-4223.
[16] 熊伟,谭德勇,陈贵元,等. 云南天然钝顶螺旋藻片多糖提取工艺的正交实验优化与脱色脱蛋白方法研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(11):2925-2927.
[17] 曹永强,张健,赵雯,等. 植物乳杆菌胞外多糖的分离纯化及其乳化特性[J]. 食品科学,2016,37(17):7-13.
[18] 吕乐,布热米古丽·买买提,艾尔肯·依不拉音. 新疆吐鲁番、喀什葡萄树伤流液多糖分离纯化及其抗氧化活性比较研究[J]. 西北药学杂志,2016(2):124-130.
[19] 周永. 多糖类抗肿瘤作用的研究进展[J]. 海峡药学,2010,22(2):102-104.
[20] 高向东. 海洋炭团菌多糖与银杏内酯结构与功能研究[D]. 南京:南京大学,2001.
[21] 李明松,袁爱力,张万岱,等. 树突状细胞诱导的抗肿瘤免疫诱导移植瘤细胞凋亡并抑制其增殖[J]. 世界华人消化杂志,2000,8(1):56-58.
[22] WANG H X,NG T B,OOI V E,et al. A polysaccharide-peptide complex from cultured mycelia of the mushroom *Tricholoma mongolicum* with immunoenhancing and antitumor activities[J]. Biochemistry and cell biology,1996,74(1):95-100.
[23] 吴梧桐,高美凤,吴文俊. 多糖的抗肿瘤作用研究进展[J]. 中国天然药物,2003,1(3):182-186.
[24] 杨瑾,董兴高,袁德培,等. 板桥党参多糖抗肿瘤活性实验研究[J]. 湖北民族学院学报(医学版),2014,31(1):6-8.
[25] 李宗锴,李电东. 牛膝多糖的免疫调节作用[J]. 药学学报,1997,32(12):881-887.
[26] 季宇彬,肖凤,汲晨锋. 多糖抗肿瘤研究进展[J]. 上海医药,2007,28(7):309-311.
[27] 魏小龙,茹祥斌. 低分子质量地黄多糖体外对 Lewis 肺癌细胞 p53 基因表达的影响[J]. 中国药理学通报,1998,14(3):245-248.
[28] 董兰凤,刘京生,苗智慧,等. 附子多糖对 H22 和 S180 荷瘤小鼠的抗肿瘤作用研究[J]. 中国中医基础医学杂志,2003,9(9):14-17.

(上接第 22 页)

[66] 吴比,胡伟,邢永忠. 中国水稻遗传育种历程与展望[J]. 遗传,2018,40(10):841-857.
[67] 梁康迳,王雪仁,章清杞,等. 基因型×环境互作效应对水稻茎秆抗倒性杂种优势的影响[J]. 福建农业大学学报,2000,29(1):12-17.
[68] 薛满德,龙艳,裴新梧. 基因编辑技术及其在作物育种中的应用与安全管理[J]. 中国农业科技导报,2018,20(9):12-22.