



天津科技大学学报

Journal of Tianjin University of Science & Technology

ISSN 1672-6510, CN 12-1355/N

《天津科技大学学报》网络首发论文

题目：不同温度提取黄芪多糖的分离纯化、结构特征及抗肿瘤活性
作者：牟澜，王若涵，曹胜宇，王臻，代可遥，刘安军
DOI：10.13364/j.issn.1672-6510.20250064
收稿日期：2025-03-28
网络首发日期：2026-01-29
引用格式：牟澜，王若涵，曹胜宇，王臻，代可遥，刘安军. 不同温度提取黄芪多糖的分离纯化、结构特征及抗肿瘤活性[J/OL]. 天津科技大学学报.
<https://doi.org/10.13364/j.issn.1672-6510.20250064>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。



DOI: 10.13364/j.issn.1672-6510.20250064

不同温度提取黄芪多糖的分离纯化、结构特征及抗肿瘤活性

牟 澜, 王若涵, 曹胜宇, 王 臻, 代可遥, 刘安军
(天津科技大学食品科学与工程学院, 天津 300457)

摘要: 探究提取温度对黄芪多糖 (*Astragalus membranaceus* polysaccharides, APS) 结构及抗肿瘤活性的影响。采用水提醇沉法分别在 4 °C 和 120 °C 条件下制备了黄芪多糖 APS4 和 APS120, 提取率分别为 1.09% 和 4.84%, 相对分子质量分别为 2.17×10^5 和 1.82×10^6 。结构分析表明: APS4 是以 (1→6)- α -D-Glcp 为主链的葡聚糖, 而 APS120 是杂多糖。体内抗肿瘤实验显示: 两种多糖 APS4 和 APS120 均能显著保护 H22 荷瘤小鼠免疫器官、提升细胞因子水平并抑制肿瘤生长, 抑瘤率分别达 46.79% 和 37.87%。冷水提取的 APS4 表现出更强的抗肿瘤活性, 表明低温提取更利于保留活性结构。本研究为黄芪多糖的定向制备及抗肿瘤应用提供了理论依据。

关键词: 黄芪多糖; 结构表征; 体内抗肿瘤活性

中图分类号: R284

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510 (0000)00-0000-00

Structural Characteristics and Anti-Tumor Activity of *Astragalus membranaceus* Polysaccharides Extracted at Different Temperatures

MU Lan, WANG Ruohan, CAO Shengyu, WANG Zhen, DAI Keyao, LIU Anjun

(College of Food Science and Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: To investigate the effect of extraction temperature on the structure and antitumor activity of *Astragalus membranaceus* polysaccharide (APS). APS4 and APS120 were prepared by aqueous alcoholic precipitation at 4 °C and 120 °C, respectively, with extraction rates of 1.09% and 4.84%, and molecular weights of 2.17×10^5 Da and 1.82×10^6 Da, respectively. Structural analyses showed that APS4 was a glucan with (1→6)- α -D-Glcp as the main chain, whereas APS120 is a heteropolysaccharide. *In vivo* antitumor experiments showed that both *A. membranaceus* polysaccharides APS4 and APS120 significantly protected immune organs, elevated cytokine levels, and inhibited tumor growth in H22 hormonal mice, with tumor suppression rates of 46.79% and 37.87%, respectively. The cold-water extracted APS4 showed stronger antitumor activity, indicating that the low-temperature extraction is more conducive to the retention of the active structure. The conclusion provides a theoretical basis for the targeted preparation and antitumor application of *A. membranaceus* polysaccharides.

Key words: *Astragalus membranaceus* polysaccharides (APS); structural characteristics; anti-tumor activity *in vivo*

收稿日期: 2025-03-28; 修回日期: 2025-06-05

作者简介: 牟澜(2000—), 女, 吉林长春人, 硕士研究生; 通信作者: 刘安军, 教授, ajliu1212@163.com

肿瘤是严重影响人类健康并且致死率极高的疾病,目前患病率仍在上升。肝癌作为主要致死的五大癌症类型之一^[1],治疗的手段主要有手术、放疗和化疗,现在基于肿瘤环境的免疫疗法也在临床推进^[2-4]。但是,由于肝癌被诊断出多处于晚期,化疗过程不仅对正常细胞和器官有毒性损伤,而且会产生耐药性,肿瘤复发后通常更具侵袭性,对化疗敏感性降低^[5],预后较差,因此急需寻找低毒性、低副作用的抗肝癌药物。

多糖作为天然产物,它的生物活性与其结构特征密切相关,不同的提取方法对产物的结构和生物活性均有影响^[6],虎乳灵芝(*Lignosus rhinocerotis*)多糖经超声处理后解开三螺旋结构,超声后再经 H_2O_2 /维生素 C 处理,抗肿瘤活性提高^[7]。同种方法处理不同时间也会改变结构,影响其理化性质和生物活性^[8],在微波提取过程中,随着时间的推移会产生大量泡沫,人参多糖的活性成分有所损失^[9]。此外,多糖可以进行人为结构修饰,如紫杉多糖经乙酰化后可以提高巨噬细胞的吞噬能力,提高免疫活性^[10]。

黄芪(*Astragalus L.*)是豆科黄芪属植物,药用与食用同源,含有多糖类、黄酮类、皂苷类等活性成分^[11]。黄芪多糖作为黄芪主要的活性成分之一,具有降血糖^[12]、调节肠道菌群^[13]、抗肿瘤^[14]、免疫促进^[15]等作用。已有研究证实黄芪能通过调节树突状细胞的成熟、细胞表面分子的表达、细胞因子的分泌、吞噬作用等途径影响其生理功能^[16],参与抑制肿瘤或其他疾病的发生和发展。因此,黄芪多糖也作为免疫刺激剂与药物联用发挥协同免疫作用增强免疫反应。研究人员通常在 $80\text{ }^\circ\text{C}$ 或沸水($100\text{ }^\circ\text{C}$)条件下提取黄芪多糖,并进行结构鉴定与活性研究。然而,关于低温提取黄芪多糖的结构表征和抗肿瘤活性的研究相对较少。Li 等^[17]在提取灰树花多糖时,比较了低温提取与低温提取后加热处理多糖的活性,研究结果表明加热过程会改变多糖的结构,导致糖苷键降解,分支度降低,使生物活性下降。因此,本研究以黄芪为原料,在冷水浸提收集滤液后再次对滤渣热水提取,获得两种不同组分的多糖,鉴定多糖的结构特征,比较其抗肿瘤活性,进一步探究低温提取与高温提取所得多糖组分和活

性的差异,旨在为黄芪多糖在功能食品的应用和新型制剂的开发中提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 原料和试剂

黄芪购自天津当地中药店。葡萄糖标准品、6种标准单糖、二甲基亚砷(DMSO)、环磷酰胺(CTX)、HE 试剂盒和碘化丙啶(PI),北京索莱宝科技有限公司;ELISA 检测试剂盒(TNF- α 、IFN- γ 和 IL-2),南京建成生物工程研究所有限公司;其他化学试剂均为分析纯试剂。

1.2 仪器与设备

FD-1A-50 型真空冷冻干燥机,博医康(北京)仪器有限公司;DBS-100 型全自动收集器,上海沪西分析仪器厂有限公司;Synergy HTX 型全自动酶标仪,北京伯腾仪器有限公司;Aglient1200 型高效液相色谱仪,安捷伦科技(中国)有限公司;ICS5000+型离子色谱仪,赛默飞世尔科技有限公司;YDCY-24S 型氮吹仪,上海熙扬仪器有限公司;SYQ0689 型高温油浴锅,世联博研(北京)科技有限公司;VECTOR-22 型傅里叶变换红外光谱仪,德国布鲁克公司;SU1510 型扫描电子显微镜,HITACHI 日立科学仪器株式会社;XDS-900C 型倒置显微镜,上海蔡康光学仪器有限公司;BD FACSCaliber 型流式细胞仪,美国 Becton Dicknson 公司。

1.3 黄芪粗多糖提取与纯化

采用水提醇沉法提取黄芪多糖。将黄芪干燥根茎粉碎后,先用去离子水 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 浸提过夜,料液质量体积比(g:mL)为 1:20。浸提完成后收集滤液和滤渣,将此过程获得的滤液反复冻融浓缩后,加入无水乙醇进行醇沉,使最终醇浓度达到 50%。3500 r/min 离心 20 min,收集沉淀,待残留乙醇挥发后,加入去离子水复溶,采用 Sevage 法去除蛋白质^[18],得到粗黄芪多糖。

使用 Sephadex G-200 凝胶柱纯化粗黄芪多糖,经过冷冻干燥后得到黄芪多糖 APS4。对于滤渣部分,再次加入去离子水,料液质量体积比(g:mL)为 1:20,使用高压灭菌锅($120\text{ }^\circ\text{C}$, 30 min)对黄

芪进行二次提取,收集浸提液。将提取液在 60 °C 下用旋转蒸发器浓缩,加入等体积的无水乙醇进行醇沉,离心并复溶,得到另一粗黄芪多糖,使用截留相对分子质量为 3.0×10^5 的透析袋流水透析 3 d,冷冻干燥后得到纯化后另一组分的黄芪多糖 APS120。

1.4 结构鉴定

1.4.1 化学成分和相对分子质量分析

黄芪多糖的糖含量、蛋白质含量、葡萄糖醛酸含量和还原糖含量分别用苯酚-硫酸法、考马斯亮蓝法、硫酸-咔唑法和二硝基水杨酸(DNS)法检测^[19]。

采用高效液相色谱法检测黄芪多糖的相对分子质量。色谱条件:色谱柱为 TSK-GEL G4000PWXL (7.8 mm×300 mm),示差检测器(RID),流动相为超纯水,进样量 20 μ L (1 mg/mL),流量 0.80 mL/min^[20]。以 T1、T3、T10、T40、T70、T110、T1000 葡聚糖为标准品绘制标准曲线,计算黄芪多糖的相对分子质量。

1.4.2 傅里叶变换红外光谱和单糖成分分析

采用 KBr 压片法,在 400~4000 cm^{-1} 范围内使用红外光谱仪进行扫描^[21],采用 OMNIC 软件分析数据。

5 mg 干燥黄芪多糖溶解于 2 mL 2 mol/L 三氟乙酸(TFA)中,在 110 °C 油浴锅中加热反应 3 h,使多糖完全酸水解,用氮吹仪吹干;加入甲醇溶解残留物,再次用氮吹仪吹干,重复 3 次,彻底去除 TFA;将干燥的水解产物溶解于超纯水中,配制成 10 mg/L 的溶液^[22]。采用 ICS5000+ 型色谱系统和 Dionex CarboPac PA20(150 mm×3 mm)高效阴离子交换柱进行分析。

1.4.3 甲基化分析

准确称取 10 mg APS,加入 2 mL DMSO (4A 分子筛干燥处理)和 25 mg NaH,超声处理 24 h;加入 1 mL 碘甲烷进行甲基化反应,在冰水浴条件下超声 6 h,加入 1 mL 水淬灭反应,弃掉上层杂质,余下溶液用氮吹仪吹干,利用傅里叶变换红外光谱仪判断是否完全甲基化,若未完全甲基化则重复甲基化过程。甲基化后的样品加入 TFA 进行酸水解,方法同 1.4.2 节,然后加入 25 mg NaBH₄,在室温下进行还原反应,过夜。反应结束后,用乙酸调节 pH=5.0~5.2,随后加入甲醇与乙酸,蒸干,重复 5~6 次以除去多余 NaBH₄;加入乙酸酐进行乙酰化反应(100 °C 反应 1 h),加入甲醇复溶 3 次,每次用氮气吹干;加入 CH₂Cl₂ 溶解样品,用去离子水萃取,得到挥发性甲基化产物

PMAAs。PMAAs 经 0.22 μ m 尼龙滤膜过滤后可上机检测^[23]。采用 Agilent 气相色谱-质谱检测分析,色谱柱为 HP-5 ms (30 m×250 μ m×0.25 μ m)。

1.4.4 黄芪多糖的形态表征

将冷冻干燥的黄芪多糖样品固定于样品台,用洗耳球轻轻吹去表面多余的样品,经喷金处理后放置于扫描电子显微镜的观察台上,将扫描电子显微镜调整至合适倍数后观察黄芪多糖的表面形态特征。

1.5 黄芪多糖体内抗肿瘤活性

1.5.1 动物实验方案设计

SPF 级雌性昆明小鼠(18~22 g)购自北京斯贝福生物技术有限公司,实验小鼠批号为 NO.110324241101313082,动物实验的伦理批准号为 2024006。动物饲养于 SPF 级屏障系统,恒温(22±2) °C,恒湿(50±5)%,光/暗周期 12 h/12 h,自由摄食饮水。小鼠适应性喂养 1 周后,被随机分为 7 组,分别为空白组、模型组、CTX 组、L-APS4 组、H-APS4 组、L-APS120 组和 H-APS120 组。由于 CTX 能有效抑制肿瘤生长,所以选择腹腔注射 CTX 的小鼠为阳性对照。空白组和模型组小鼠每天灌胃生理盐水,L-APS4 组和 L-APS120 组每天灌胃剂量为 100 mg/kg,H-APS4 组和 H-APS120 组每天灌胃剂量为 200 mg/kg,灌胃体积均为 0.2 mL。给药 15 d 后,除空白组外,其余组小鼠于右侧腋下皮下接种 H22 肝癌细胞悬液。继续相应给药方案,CTX 组每天腹腔注射 20 mg/mL CTX 0.2 mL,直至实验周期结束^[24]。

最后一天禁食 12 h,脱颈处死,血液在 4 °C 静置备用,解剖后取脾脏、实体瘤和胸腺,剔除多余结缔组织,用 PBS 缓冲液冲洗并吸干水分,对各组织称量记录,置于 -20 °C 冻存备用。

1.5.2 体重、免疫器官指数和肿瘤抑制率的测定

实验结束时称取小鼠体重以及脾脏、胸腺、肿瘤的质量,分别根据式(1)和式(2)计算脾脏/胸腺指数(I)和抑瘤率(R),用来评定药物和黄芪多糖对荷瘤小鼠免疫器官的影响。

$$I = \frac{m_1}{m_2} \times 100\% \quad (1)$$

$$R = \left(1 - \frac{m_3}{m_4} \right) \times 100\% \quad (2)$$

式中: m_1 为小鼠脾脏/胸腺的质量,g; m_2 为小鼠体重,g; m_3 为实验组小鼠肿瘤平均质量,g; m_4 为模

型组小鼠肿瘤平均质量, g。

1.5.3 实体肿瘤的细胞形态学观察

剪取小块实体肿瘤组织 (50 mg) 并用 PBS 缓冲液清洗, 轻轻研磨, 经 200 目细胞筛过滤。滤液经 4 °C、1500 r/min 离心 5 min, 弃上清液后用 PBS 重悬细胞, 制备肿瘤细胞悬液。滴加 10 μL 细胞悬液于载玻片上, 固定后进行苏木精-伊红染色 (HE 染色), 在显微镜下观察肿瘤细胞的形态。

1.5.4 细胞因子含量检测

收集小鼠眼眶血, 4 °C、4000 r/min 离心 10 min, 收集血清, 在 -20 °C 条件下存储。用 ELISA 试剂盒测定血清中肿瘤坏死因子 α (TNF-α)、γ 干扰素 (IFN-γ) 和白细胞介素-2 (IL-2) 的含量, 并通过 ELISACalc 软件拟合回归曲线。

1.5.5 肿瘤细胞周期分析

采用 1.5.3 节的方法制备实体肿瘤细胞悬液, 缓慢加入预冷至 4 °C 的 70% 乙醇, 轻轻振荡混匀, 4 °C 固定过夜。固定好的细胞用 PBS 缓冲液洗涤 1 次, 加入 50 mg/mL 核糖核酸酶 A (RNase A), 混匀, 37 °C 孵育 30 min, 50 mg/mL 加入 PI 染液, 4 °C 孵育 10 min。最后经细胞筛过滤并收集样品, 使用流式细胞仪检测, 用 Modfit LT 处理数据。

1.6 统计分析

所有实验均重复 3 次, 数据用 SPSS 26.0 进行分析, 以“平均值±标准差”表示, *t* 检验和单因素方差分析 (ANOVA), *P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 提取率与成分均一性分析

黄芪多糖的提取率和化学成分见表 1。APS120 的提取率明显高于 APS4, 两种黄芪多糖都几乎未检测出蛋白质、还原糖和糖醛酸。通过高效液相色谱法 (HPLC) 测定黄芪多糖的相对分子质量 (图 1)。APS4 的液相色谱显示出单一对称峰, 提示其为均一组分。以葡聚糖作为标准品绘制的标准曲线如图 2 所示, $y = -0.5764x + 10.721$, $R^2 = 0.9967$ 。将 APS4 的出峰时间代入, 可得其相对分子质量为 2.17×10^5 。APS120 的谱图也呈现出单一对称峰, 但出峰时间明显提前, 相对分子质量为 1.82×10^6 , 该结果表明高温下提取的黄芪多糖分子更大。

表 1 APS4 和 APS120 化学成分组成

Tab. 1 Chemical composition of APS4 and APS120

组别	APS4	APS120
总糖 (粗) /%	53.90±2.14	51.60±3.09
提取率/%	1.09±0.23	4.84±0.35
总糖 (纯化) /%	92.96±2.39	89.28±4.18
蛋白质/%	0.96±0.17	1.13±0.13
糖醛酸/%	0.54±0.11	1.68±0.12
还原糖/%	0.16±0.09	0.26±0.12

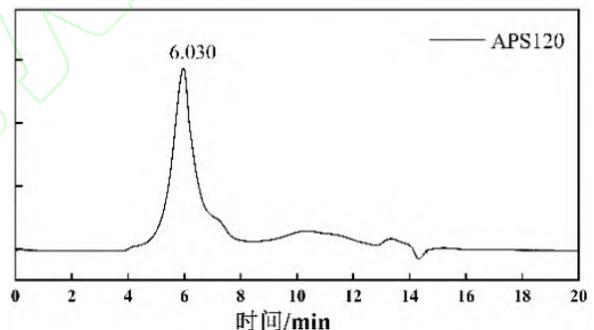
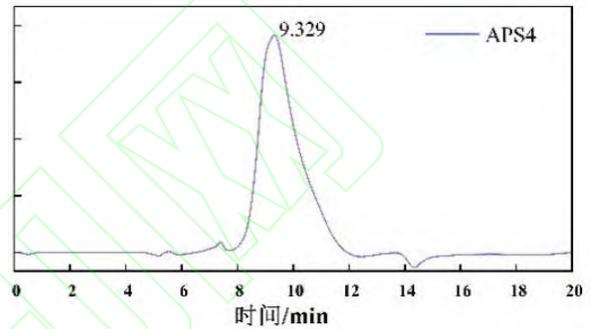


图 1 APS4 和 APS120 高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC spectra of APS4 and APS120

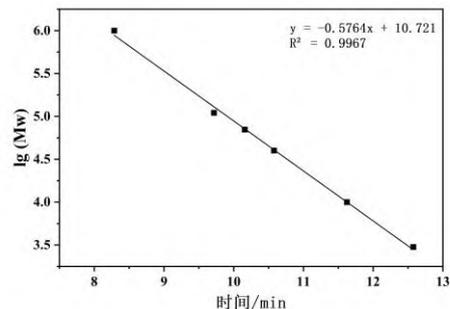


图 2 标准曲线

Fig. 2 Standard curve

2.2 傅里叶变换红外光谱分析

APS4 和 APS120 傅里叶变换红外光谱图如图 3 所示。APS4 和 APS120 的吸收峰大致相同。在 3420 cm^{-1} 处的吸收峰表示 O—H 的伸缩振动; 2922 cm^{-1} 处的吸收峰表示 C—H 的伸缩振动; 1418 cm^{-1} 处的吸收峰表示 C—H 的角振动, 这 3 个特征峰均为典型的多糖红外吸收峰。 1630 cm^{-1} 处的吸收峰表示结合水的存在, $1000\sim 1200\text{ cm}^{-1}$ 范围内的三个吸收峰归属于 C—O—H 和 C—O—C 的伸缩振动; $1000\sim 1050\text{ cm}^{-1}$ 范围内的吸收峰表明吡喃环的存在^[25]。 860 cm^{-1} 处的吸收峰表明 APS4 和 APS120 含有 α 构型的糖苷键^[26], 由于没有糖醛酸的特征吸收峰, 证实其为中性多糖^[27]。

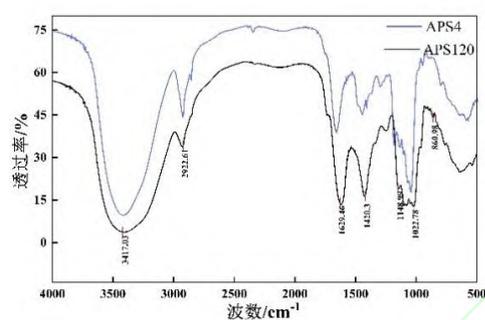


图 3 APS4 和 APS120 傅里叶变换红外光谱图

Fig. 3 Fourier transform infrared spectrometer of APS4 and APS120

2.3 单糖组成分析

混合标准单糖、APS4 和 APS120 离子色谱分析结果如图 4 所示。与混合标准单糖的离子色谱对比可知, APS4 只含有葡萄糖, 即 APS4 是一种葡聚糖; 而 APS120 主要由鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖和木糖组成, 物质的量比为 $0.13 : 0.16 : 0.14 : 1 : 0.1$ 。该结果与硫酸-咔唑法(未检出糖醛酸)和红外光谱分析(缺乏糖醛酸特征峰)结果相印证, 证实 APS4 与 APS120 均为中性多糖。以往的研究表明, APS 通常是一种杂多糖或者是 α 构型的葡聚糖^[28], 本研究结果与此相符。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 提取获得的 APS4 与 $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ 二次提取获得的 APS120 在单糖组成上存在显著差异, 表明提取温度显著影响黄芪多糖的组分特征。

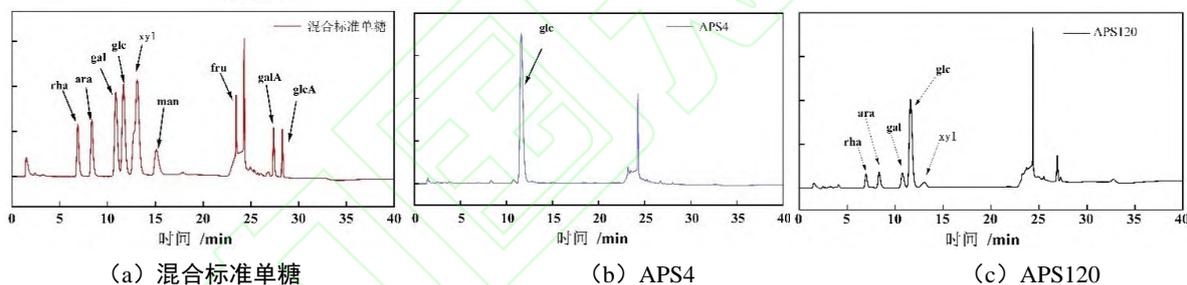


图 4 混合标准单糖、APS4 和 APS120 离子色谱

Fig. 4 IC spectra of standards monosaccharides APS4 and APS120

2.4 甲基化分析

APS4 甲基化后的红外光谱图如图 5 所示。通过甲基化实验可以粗略推断黄芪多糖的糖苷键构型。与未甲基化的样品相比, 甲基化后的样品在 3400 cm^{-1} 处的吸收峰明显减弱, 2900 cm^{-1} 处的甲基特征吸收峰明显增强。APS4 甲基化糖残基结果见表 2。与离子碎片的质谱图^[29-30]比对, APS4 主要有 2 种糖苷键构型, 为 $\rightarrow 6\text{-GlcP-(1}\rightarrow$ 和 $\text{D-GlcP-(1}\rightarrow$, 占比分别为 83.9% 和 16.1% , 将以上两种残基分别标记为 A 和 B。

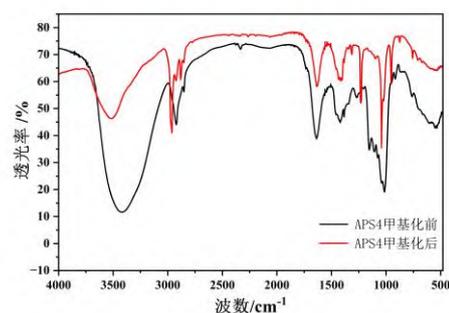


图 5 APS4 甲基化后的红外光谱图

Fig. 5 FT-IR spectrums of APS4 after methylation

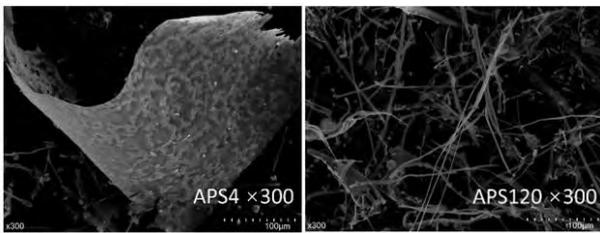
表 2 APS4 甲基化糖残基

Tab. 2 Methylation analysis of APS4 by GC-MS

命名	甲基化糖残基	糖苷键构型	比例/%	质量碎片/ m/z
A	2,3,4-Me3-Glcp	→6)-Glcp-(1→	83.9	58, 71, 87, 101, 117, 129, 145, 161, 173, 189, 217, 233
B	2,3,4,6-Me4-Glcp	D-Glcp-(1→	16.1	43, 57, 71, 88, 101, 129, 145, 161, 205

2.5 扫描电子显微镜观察

APS4 和 APS120 扫描电子显微镜图如图 6 所示。APS4 整体上呈片状结构，表面不光滑，伴有纹状，无疏松孔洞，结构致密，刚性较强。APS120 整体为散乱无序的丝状。



(a) APS4 (b) APS120

图 6 APS4 和 APS120 扫描电子显微镜图

Fig. 6 Microscopic morphology of APS4 and APS120

2.6 黄芪多糖的体内抗肿瘤活性

2.6.1 小鼠体重、免疫器官和抑瘤率的变化

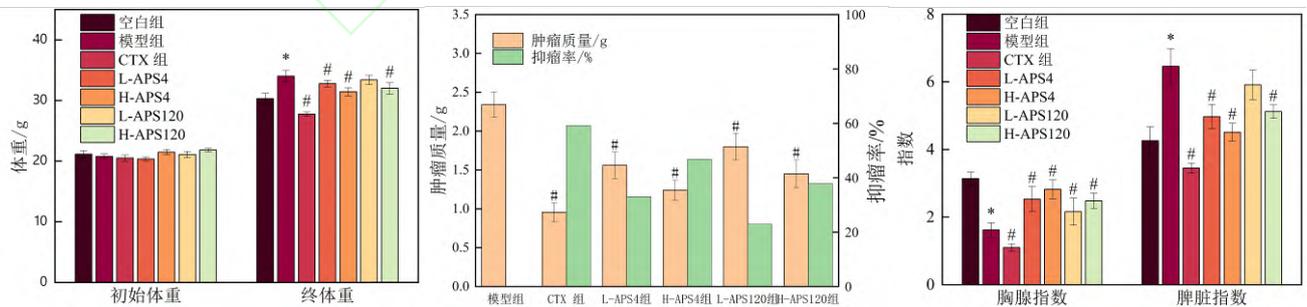
APS 体内抗肿瘤活性结果如图 7 所示，*表示与空白组相比有显著差异 ($P < 0.05$)，#表示与模型组相比有显著差异 ($P < 0.05$)。

由图 7(a)可知，各组小鼠初始体重无明显差异，实验周期结束后，与空白组相比，模型组的体重明显增加；随着剂量的增加，所有剂量组小鼠的体重都较模型组有明显下降 ($P < 0.05$)，其数值更接近空白组。

由图 7(b)可知，与模型组相比，各实验组肿瘤质量均有显著降低 ($P < 0.05$)，但降低程度不同。其中，以 CTX 组肿瘤质量最小，经计算，其肿瘤抑制率达 59.17%；L-APS4 组和 L-APS120 组肿瘤抑制率分别为 33.04%和 22.91%；相比于低剂量组，高剂量组的肿瘤抑制率有所提高，H-APS120 组和 H-APS4 组抗肿瘤率分别为 37.87%和 46.79%。

胸腺和脾脏作为机体的免疫器官，其变化可以反映机体的免疫功能。当机体免疫受到抑制，会出现胸腺萎缩、脾脏肿大的现象^[31]。由图 7(c)可知，与空白组相比，模型组小鼠的胸腺指数显著下降，脾脏指数明显升高 ($P < 0.05$)；与模型组相比较，APS 各剂量组小鼠的胸腺指数明显升高，脾脏指数明显下降 ($P < 0.05$)。CTX 通常被用作治疗肿瘤的化疗药物和免疫抑制剂，即 CTX 在抗肿瘤的同时也抑制机体免疫功能^[32]。CTX 组的实验动物出现体重减轻、胸腺指数降低和脾脏指数增大现象 ($P < 0.05$)。

综上所述，APS 高剂量组的抑瘤率虽然不及 CTX 组，但是效果也显著，H-APS4 组抑瘤率达到 46.79%，免疫器官指数却明显趋近空白组水平。上述结果表明，APS 在抑制肿瘤的同时，免疫器官也明显得到改善，口服 APS 对免疫器官具有保护作用，在一定范围内，APS 灌胃剂量越大，保护作用越强。



(a) 各组小鼠体重变化 (b) 肿瘤质量与抑瘤率 (c) 免疫器官指数

图 7 APS 体内抗肿瘤活性

Fig. 7 Antitumor effects of APS in vivo

2.6.2 实体肿瘤细胞 HE 染色结果

将各组小鼠肿瘤细胞进行 HE 染色后, 结果如图 8 所示。模型组小鼠肿瘤细胞呈现紫色, 细胞形态较完整。各实验组均可观察到肿瘤细胞的形态变化, L-APS4 组和 L-APS120 组胞质被染色, 各剂量组小鼠肿瘤细胞出现不同程度的核固缩, H-APS4 组和

H-APS120 组相较于低剂量组核碎片增多, 出现核小体, 呈现剂量依赖性凋亡特征。CTX 组肿瘤细胞经染色后几乎都呈粉红色, 说明产生细胞毒作用, 出现核碎裂现象, 与文献中肿瘤细胞表现形态一致^[33]。

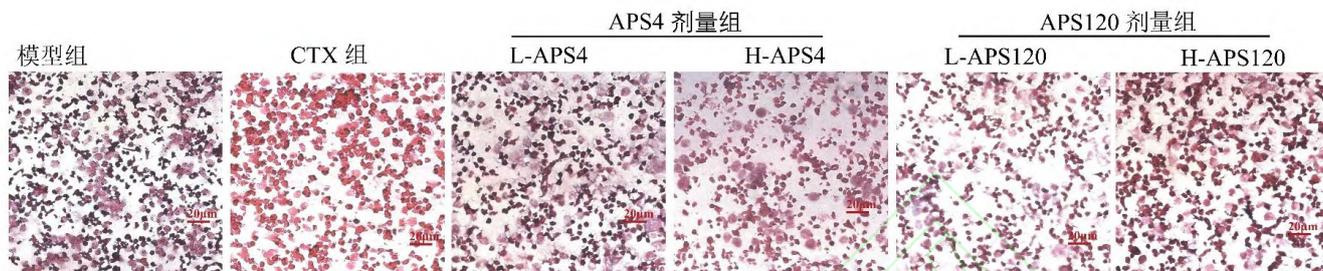


图 8 实体肿瘤细胞 HE 染色

Fig. 8 HE staining of solid tumor cells

2.6.3 血清中细胞因子水平

细胞因子种类繁多, 主要参与机体免疫反应和炎症反应, 由被激活的免疫细胞合成和分泌, 产生于机体自我调控时。Th1 通过 IL-2 和 IFN- γ 介导促进 T 细胞增殖以及激活 NK 细胞。多功能促炎细胞因子 TNF- α 对于宿主先天性和获得性免疫反应是必需的^[34]。为探究 APS 对荷瘤小鼠的免疫调节作用, 对小鼠血清中 IL-2、IFN- γ 和 TNF- α 进行测定, 结果如图 9 所示, *表示与空白组相比有显著差异 ($P < 0.05$), #表示与模型组相比有显著差异 ($P < 0.05$)。

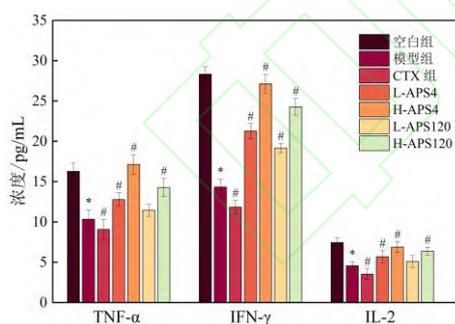


图 9 血清中细胞因子含量

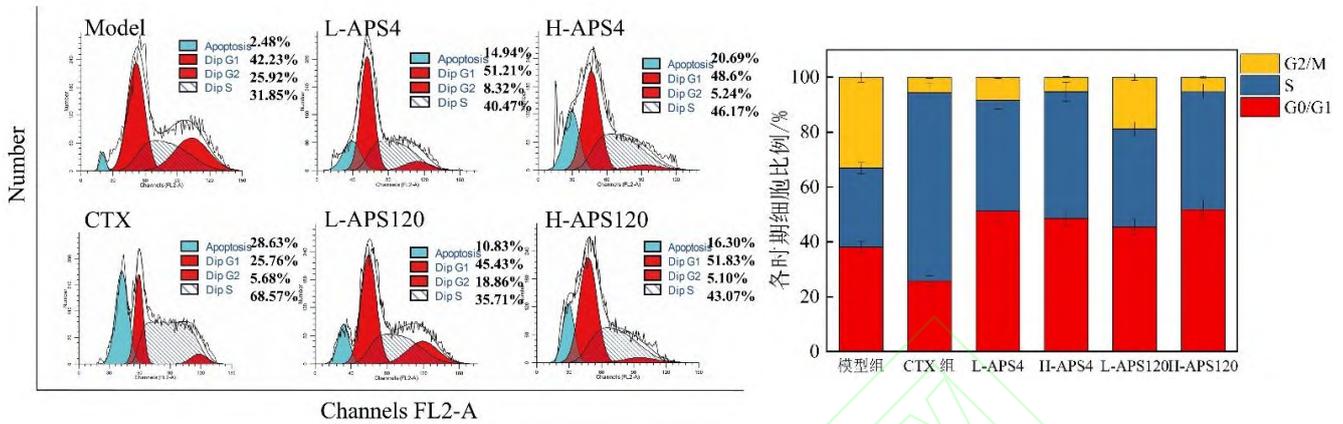
Fig. 9 Cytokine levels in sera

由图 9 可知, 与空白组相比较, 模型组水平均显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组相比, CTX 组各细胞因子的表达水平更低, 各剂量组荷瘤小鼠的细胞因子水平则显著回升 ($P < 0.05$), 其中 H-APS4 组效果最为显著。结果表明, APS 可能通过激活 Th1 型免疫应答, 促进 IL-2、IFN- γ 和 TNF- α 的分泌, 从而增强抗肿瘤免疫效应。

2.6.4 实体肿瘤细胞周期分析

细胞周期可分为 G0/G1 期、S 期和 G2/M 期, 各时期的 DNA 含量不同, 当细胞凋亡时染色体 DNA 受到损伤产生亚 G1 期。碘化丙啶 (PI) 是一种可以与核酸非特异性结合的荧光染料, 样品经 RNase A 酶处理去除 RNA 后, 再用 PI 染色, 用流式细胞仪测定不同 DNA 含量的细胞, 可分析其分布情况^[35]。

实体肿瘤细胞周期分布和各细胞周期占比如图 10 所示。模型组肿瘤细胞的 G0/G1 期、S 期和 G2/M 期的比例分别为 42.23%、31.85% 和 25.92%, 凋亡率仅 2.48%, 说明肿瘤生长处于良好状态。与模型组相比, CTX 组的肿瘤细胞 S 期增长至 68.57%, G2/M 期下降至 5.68%, 肿瘤细胞凋亡率达到 28.63%, 说明 CTX 组的肿瘤细胞被阻滞在 S 期。荷瘤小鼠经口服 APS4 和 APS120, 高剂量的肿瘤细胞凋亡率分别达到 20.69% 和 16.30%。相比于模型组, APS4 组 S 期占比上升至 40.47% 和 46.17%, APS120 组 G0/G1 期比例分别升高至 45.43% 和 51.83%, 表明 APS4 和 APS120 通过将细胞阻滞在 S 期和 G0/G1 期诱导 H22 肿瘤细胞凋亡。



(a) 细胞周期分布 (b) 各细胞周期占比

图 10 实体肿瘤细胞周期分布和各细胞周期占比

Fig. 10 Cell cycle distribution and proportion of each cell cycle in solid tumors

3 结论

APS4 是一种以 1, 6- α -GlcP 为主链的 α 构型葡聚糖, 相对分子质量为 2.17×10^5 ; APS120 是一种 α 构型杂多糖, 由鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖和木糖共同组成, 其中葡萄糖为主要组分, 物质的量比为 0.13 : 0.16 : 0.14 : 1 : 0.1, 相对分子质量为 1.82×10^6 , 以上两种多糖均为中性多糖。

体内抗肿瘤实验表明, APS4 和 APS120 均能保护荷瘤小鼠的免疫器官、调节细胞因子的水平, 并通过干扰 DNA 的正常复制阻滞细胞生长周期, 进一步诱导肿瘤细胞凋亡, 达到对 H22 荷瘤小鼠的肿瘤抑制作用, 具体作用机制及分子通路仍需继续研究。经比较, 4 $^{\circ}$ C 提取的 APS4 表现出更强的抗肿瘤活性, 其最佳抑瘤率达 46.79% (200 mg/kg/d), 显著高于 APS120 组 (37.87%)。这种活性差异可能与以下机制有关: 低温提取获得的黄芪多糖更好地保留了活性结构域; APS120 的高相对分子质量导致该多糖的生物利用度降低; 高温导致多糖活性结构域被破坏, 导致其抗肿瘤活性的降低。因此, 在以获得具有更高活性的多糖为目的, 选择或优化多糖的提取条件时, 高温条件可能需要被格外考虑。

本研究验证了 APS4 可通过免疫调节抑制 H22 肝癌的作用, 为开发基于黄芪多糖的肿瘤膳食辅助剂提供了实验依据, 可以进一步研究其与临床抗肿瘤药物的协同效应。

参考文献:

- [1] HAN B, ZHENG R, ZENG H, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2022[J]. Journal of the national cancer center, 2024, 4(1): 47-53.
- [2] WEI H, DONG C, LI X. Treatment options for hepatocellular carcinoma using immunotherapy: present and future[J]. Journal of clinical and translational hepatology, 2024, 12(4): 389-405.
- [3] VITALE I, MANIC G, COUSSENS L M, et al. Macrophages and metabolism in the tumor microenvironment[J]. Cell metabolism, 2019, 30(1): 36-50.
- [4] AGHANEJAD A, BONAB S F, SEPEHRI M, et al. A review on targeting tumor microenvironment: The main paradigm shift in the mAb-based immunotherapy of solid tumors[J]. International journal of biological macromolecules, 2022, 207: 592-610.
- [5] MARIN J J G, BRIZ O, HERRAEZ E, et al. Molecular bases of the poor response of liver cancer to chemotherapy[J]. Clinics and research in hepatology and gastroenterology, 2018, 42(3): 182-192.
- [6] CHEN G, FANG C, RAN C X, et al. Comparison of different extraction methods for polysaccharides from bamboo shoots (*Chimonobambusa quadrangularis*) processing by-products[J]. International journal of biological macromolecules, 2019, 130: 903-914.

- [7] CAI W, LUO Y, XUE J, et al. Effect of ultrasound assisted H₂O₂/Vc treatment on the hyperbranched *Lignosus rhinocerotis* polysaccharide: structures, hydrophobic microdomains, and antitumor activity[J]. Food chemistry, 2024, 450: 139338.
- [8] CUI R, ZHU F. Ultrasound modified polysaccharides: a review of structure, physicochemical properties, biological activities and food applications[J]. Trends in food science & technology, 2021, 107: 491-508.
- [9] SHEN S, ZHOU C, ZENG Y, et al. Structures, physicochemical and bioactive properties of polysaccharides extracted from *Panax notoginseng* using ultrasonic/microwave-assisted extraction[J]. LWT-Food science and technology, 2022, 154: 112446.
- [10] LIU X, XIE J H, JIA S, et al. Immunomodulatory effects of an acetylated *Cyclocarya paliurus* polysaccharide on murine macrophages RAW264.7[J]. International journal of biological macromolecules, 2017, 98: 576-581.
- [11] ABD ELKADER H T A E, ESSAWY A E, AL-SHAMI A S. *Astragalus* species: phytochemistry, biological actions and molecular mechanisms underlying their potential neuroprotective effects on neurological diseases[J]. Phytochemistry, 2022, 202: 113293.
- [12] LI L, XIE J C, ZHANG Z M, et al. Recent advances in medicinal and edible homologous plant polysaccharides: preparation, structure and prevention and treatment of diabetes[J]. International journal of biological macromolecule, 2024, 258(2): 128873.
- [13] WANG H, ZHU W, HONG Y, et al. *Astragalus* polysaccharides attenuate chemotherapy-induced immune injury by modulating gut microbiota and polyunsaturated fatty acid metabolism[J]. Phytomedicine, 2024, 128: 155492.
- [14] YU J, JI H Y, DONG X D, et al. Apoptosis of human gastric carcinoma MGC-803 cells induced by a novel *Astragalus membranaceus* polysaccharide via intrinsic mitochondrial pathways[J]. International journal of biological macromolecules, 2019, 126: 811-819.
- [15] AN E K, ZHANG W, KWAK M, et al. Polysaccharides from *Astragalus membranaceus* elicit T cell immunity by activation of human peripheral blood dendritic cells[J]. International journal of biological macromolecules, 2022, 223: 370-377.
- [16] WANG D, CUI Q, YANG Y J, et al. Application of dendritic cells in tumor immunotherapy and progress in the mechanism of anti-tumor effect of *Astragalus* polysaccharide (APS) modulating dendritic cells: a review[J]. Biomedicine & pharmacotherapy, 2022, 155: 113541.
- [17] LI X Q, LIU A J. Relationship between heat treatment on structural properties and antitumor activity of the cold-water soluble polysaccharides from *Grifola frondosa*[J]. Glycoconjugate journal, 2020, 37(1): 107-117.
- [18] CAI G F, WU C H, MAO N N, et al. Isolation, purification and characterization of *Pueraria lobata* polysaccharide and its effects on intestinal function in cyclophosphamide-treated mice[J]. International journal of biological macromolecules, 2022, 218: 356-367.
- [19] YU S S, DONG X D, JI H Y, et al. Antitumor activity and immunomodulation mechanism of a novel polysaccharide extracted from *Polygala tenuifolia* Willd. evaluated by S180 cells and S180 tumor-bearing mice[J]. International journal of biological macromolecules, 2021, 192: 546-556.
- [20] CAO T Q, AN H X, MA R J, et al. Structural characteristics of a low molecular weight velvet antler protein and the anti-tumor activity on S180 tumor-bearing mice[J]. Bioorganic chemistry, 2023, 131: 106304.
- [21] HUO Y, DING W J, LIU Y R, et al. Selenochemical modification of low molecular weight polysaccharides from *Grifola frondosa* and the mechanism of their inhibitory effects on gastric cancer cells[J]. International journal of biological macromolecules, 2024, 269: 131812.
- [22] MA R J, CAO T Q, AN H X, et al. Extraction, purification, structure, and antioxidant activity of polysaccharide from *Rhodiola rosea*[J]. Journal of molecular structure, 2023, 1283: 135310.
- [23] DAI K Y, DING W J, LI Z T, et al. Comparison of structural characteristics and anti-tumor activity of two alkali extracted peach gum arabinogalactan[J]. International journal of biological macromolecules, 2024, 279: 135407.
- [24] 余莎莎. 远志多糖的结构鉴定及抗肿瘤免疫调控机制研究[D]. 天津:天津科技大学, 2023.
- [25] LÜ Q Q, CAO J J, LIU R, et al. Structural characterization, α -amylase and α -glucosidase inhibitory activities of

- polysaccharides from wheat bran[J]. Food chemistry, 2021, 341: 128218.
- [26] PAN L C, ZHU Y M, ZHU Z Y, et al. Chemical structure and effects of antioxidation and against α -glucosidase of natural polysaccharide from *Glycyrrhiza inflata* Batalin[J]. International journal of biological macromolecules, 2020, 155: 560-571.
- [27] ZHANG X, LIU Z, ZHONG C, et al. Structure characteristics and immunomodulatory activities of a polysaccharide RGRP-1b from *Radix ginseng* Rubra[J]. International journal of biological macromolecules, 2021, 189: 980-992.
- [28] CHEN T, XIE L M, SHEN M Y, et al. Recent advances in *Astragalus* polysaccharides: structural characterization, bioactivities and gut microbiota modulation effects[J]. Trends in food science & technology, 2024, 153: 104707.
- [29] CHEN G M, JIANG N, ZHENG J P, et al. Structural characterization and anti-inflammatory activity of polysaccharides from *Astragalus membranaceus*[J]. International journal of biological macromolecules, 2023, 241: 124386.
- [30] YU S S, DONG X D, MA R J, et al. Characterization of a polysaccharide from *Polygala tenuifolia* Willd. with immune activity via activation MAPKs pathway[J]. Bioorganic chemistry, 2023, 130: 106214.
- [31] WANG T, SHEN C, GUO F, et al. Characterization of a polysaccharide from the medicinal lichen, *Usnea longissima*, and its immunostimulating effect in vivo[J]. International journal of biological macromolecules, 2021, 181: 672-682.
- [32] WU J F, YU G X, ZHANG X S, et al. A fructan-type garlic polysaccharide upregulates immune responses in macrophage cells and in immunosuppressive mice[J]. Carbohydrate polymers, 2024, 344: 122530.
- [33] JI H Y, YU J, LIU A J. Structural characterization of a low molecular weight polysaccharide from *Grifola frondosa* and its antitumor activity in H22 tumor-bearing mice[J]. Journal of functional foods, 2019, 61: 103472.
- [34] DOSTERT C, GRUSDAT M, LETELLIER E, et al. The TNF family of ligands and receptors: communication modules in the immune system and beyond[J]. Physiological reviews, 2019, 99(1): 115-160.
- [35] DING S Y, YAN Z Q, LIU H P, et al. Structural characterization and antitumor activity of a polysaccharide extracted from *Perilla frutescens* var. *frutescens*[J]. Industrial crops and products, 2022, 187: 115334.