



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：冷提取党参多糖的结构特征及抗肿瘤作用
作者：曹胜宇，常凯乐，牟澜，王臻，王若涵，刘安军
DOI：10.13364/j.issn.1672-6510.20250068
收稿日期：2025-04-01
网络首发日期：2026-01-29
引用格式：曹胜宇，常凯乐，牟澜，王臻，王若涵，刘安军. 冷提取党参多糖的结构特征及抗肿瘤作用[J/OL]. 天津科技大学学报.
<https://doi.org/10.13364/j.issn.1672-6510.20250068>



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.1672-6510.20250068

冷提取党参多糖的结构特征及抗肿瘤作用

曹胜宇, 常凯乐, 牟澜, 王臻, 王若涵, 刘安军

(天津科技大学食品科学与工程学院, 天津 300457)

摘要: 为了研究冷提取党参多糖的结构特征及其体内抗肿瘤活性, 通过冷水从党参中分离并纯化得到一种富含果糖的多糖 (CCP4), 利用傅里叶变换红外光谱和甲基化分析等多种分析方法对其进行结构表征。结果表明: CCP4 的相对分子量为 8.86×10^3 , 主要由果糖和葡萄糖组成, 物质的量比为 1 : 0.26, 其主链由 (2→1)- β -D-Fruf 和 (1→)- α -D-Glcp 组成, (2→6)- β -D-Fruf 为侧链。建立动物肿瘤模型研究 CCP4 在体内的抗肿瘤作用, 结果表明 CCP4 能显著抑制实体瘤的增殖, 将肿瘤细胞周期阻滞在 S 期, 有效保护免疫器官, 促进细胞因子的表达, 调节淋巴细胞亚群的比例, 增强免疫细胞的活性。研究结果为进一步开发和应用党参多糖于工业生产和医疗领域提供理论基础和技术支持。

关键词: 党参多糖; 结构特征; 抗肿瘤活性

中图分类号: TS201.2

文献标志码: A

Structural Characterization and Antitumor Effect of Cold-Water Extracted Polysaccharide from *Codonopsis pilosula*

CAO Shengyu, CHANG Kaile, MU Lan, WANG Zhen, WANG Ruohan, LIU Anjun

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

Abstract: To investigate the structural characteristics and *in vivo* antitumor activity of cold-extracted polysaccharide from *Codonopsis pilosula*, a fructose-rich polysaccharide (CCP4) was isolated and purified from *C. pilosula* using cold water. Its structure was characterized using various analytical methods, including Fourier transform infrared spectrum and methylation analysis. The results demonstrated that CCP4 had a molecular weight of 8.86×10^3 , was primarily composed of fructose and glucose with a molar ratio of 1:0.26. Its main chain consisted of (2→1)- β -D-Fruf and (1→)- α -D-Glcp, with (2→6)- β -D-Fruf as the side chain. The animal tumor model was established to study its antitumor effects *in vivo*, and the findings revealed that CCP4 significantly suppressed the proliferation of solid tumors, blocked the cell cycle of tumor cells in the S phase, effectively protected the immune organs, promoted cytokine expression, regulated the proportion of lymphocyte subsets in peripheral blood, and enhanced immune cell activity. These findings provided a theoretical foundation and technical support for further developing and applying *C. pilosula* polysaccharides in industrial production and medical fields.

Key words: *C. pilosula* polysaccharide; structural characteristics; antitumor activity

收稿日期: 2025-04-01; 修回日期: 2025-06-06

作者简介: 曹胜宇(2000—), 男(汉族), 安徽宿州人, 硕士研究生; 通信作者: 刘安军, 教授, laj@tust.edu.cn



肿瘤的产生是由于致癌物质诱导体细胞发生驱动突变,导致增殖失控和适应能力增强,癌细胞逃避凋亡,在没有接触抑制的情况下无限增殖^[1]。恶性肿瘤死亡率高,已成为全球人类健康的重大威胁。化学治疗是治疗癌症的主要方法,但会给患者带来严重的副作用^[2]。与化学治疗相比,植物多糖毒性低,疗效好,因此被认为在癌症预防和治疗方面有很大潜力。因此,探索能保留植物多糖生物活性的创新提取和加工方法至关重要。

党参(*Codonopsis pilosula*)是中国北方一种药食两用植物,因其性平、味甘,具有补脾益肺、益气养血的功效而闻名。药理研究证实,它含有多糖、苷类、生物碱和其他生物活性化合物。其中,多糖是具有显著药理作用的关键活性分子,包括免疫调节、抗炎和抗肿瘤活性^[3]。多糖是由单糖通过糖苷键连接而成的聚合物,其生物活性受其组成、键类型和聚合度的影响,并随提取方法的不同而变化^[4]。以往对*C. pilosula*多糖的研究主要集中在高温提取方面。利用高温从党参中提取出水溶性多糖 CCP1 可抑制 HepG2 细胞迁移,诱导细胞凋亡,使细胞周期停滞在 G2/M 期^[5]。但是,热水会破坏多糖结构,降低生物活性^[6]。因此,探索更温和的多糖提取方法以保留功能特性至关重要。采用冷水从黄芪中提取的多糖在抗肿瘤和免疫调节活性方面更强,且副作用较小^[6]。冬虫夏草多糖 CMPs-4 在诱导 Eca-109 食管癌细胞凋亡方面的效果优于 CMPs-80^[7]。然而,用冷水提取党参多糖的生物活性却鲜有报道。虽然冷水提取的产量较低,但它可以保护多糖的结构,从而影响生物活性。用冷水提取党参多糖可能具有良好的体内抗肿瘤活性。

本研究探讨通过冷水从党参中提取多糖的结构特性和生物活性;利用冷水从党参中分离低相对分子质量的均质多糖(CCP4),并对其结构特征进行研究;利用 H22 肿瘤小鼠模型评估 CCP4 的抗肿瘤效果,为其在食品和制药行业的潜在应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

党参(*Codonopsis pilosula*),产自山西省平顺县;小鼠 H22 肝癌细胞,中国科学院上海生命科学研究院;

SPF 级昆明雌性小鼠,8 周龄,体重 18~22 g,北京斯贝福生物科技有限公司,许可证号为 SCXK(京)2019-0010。

无水乙醇、甲醇、二氯甲烷,分析纯,天津市江天化工技术股份有限公司;中性红、三氟乙酸(TFA)、单糖标准品,分析纯,天津科密欧化学试剂有限公司;磷酸盐缓冲液(PBS)、红细胞裂解液、生理盐水、环磷酰胺(CTX)、RPMI 1640 培养基,生物试剂,天津泰进科技有限公司;噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)、碘化丙啶(PI)、核糖核酸酶(RNase)、脂多糖(LPS)、刀豆蛋白(ConA)以及肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素-2(IL-2)、 γ 干扰素(IFN- γ)试剂盒,北京索莱宝生物技术有限公司。

ST-16R 型高速冷冻离心机、ICS-5000+型离子色谱、NicoletIS50 型傅里叶变换红外光谱仪,赛默飞世尔科技有限公司;FD-1A-50 型真空冷冻干燥机,上海仪电科学仪器有限公司;Synergy HTX 型酶标仪,美国伯腾公司;1260 infinity II 型高效液相色谱仪,安捷伦科技(中国)有限公司;GC-2010 型气相色谱,日本岛津公司;BD FACSCallibur 型流式细胞仪,美国 Becton Dickinson 公司。

1.2 党参多糖 CCP4 的制备

将新鲜党参根置于 60℃ 恒温烘箱中干燥至完全失水,得到干燥的党参根。党参根经过粉碎处理后,过 80 目筛网,得到细腻均匀的粉末,用 95% 乙醇溶液浸泡 6 h 除去亲脂杂质,烘干后作为后续提取的原料。将一定量的党参粉末在 4℃ 条件下用超纯水提取 2 次,每次 12 h(料液比 1:25)。合并提取液并用旋转蒸发仪浓缩,加入 3 倍体积无水乙醇在 4℃ 充分沉淀。沉淀物溶于超纯水,6000 r/min 离心 15 min,收集上清液,冷冻干燥后得到党参粗多糖。

将粗多糖溶解于超纯水中,使用截留相对分子质量为 500 的透析袋流水透析 48 h,制成 50 mg/mL 溶液,采用 Sephadex G-75 层析柱对多糖溶液进行纯化,洗脱液为超纯水,流量 0.5 mL/min。使用自动收集器每 5 min 收集 1 份样品,所收集的组分经过的液相分析验证,确认为单一组分的多糖溶液。通过真空冷冻干燥,得到纯化后的冷提党参纯多糖 CCP4。

1.3 党参多糖的化学组成

多糖中总糖、还原糖、蛋白质和糖醛酸的含量分

别采用苯酚硫酸法^[8]、3,5-二硝基水杨酸(DNS)法^[9]、考马斯亮蓝法和唑啉硫酸法^[10]进行测定。

1.4 党参多糖的纯度和相对分子质量分布

1.0 mg 多糖样品溶于 1 mL 超纯水, 用 0.22 μm 水相膜过滤, 获得澄清多糖溶液。对多糖溶液进行紫外全波长扫描, 判断其在 260 nm 和 280 nm 是否出现核酸或蛋白质吸收峰。

采用高效液相色谱测定相对分子质量。色谱条件: TSK-GEL G4000 PWxl 型色谱柱(7.8 mm × 300 mm), 示差检测器 (RID), 流动相为超纯水, 柱温 30°C, 流量 0.8 mL/min, 上样量 20 μL, 分析时间为 20 min。T 系列右旋糖酐 (T-110、T-70、T-40、T-10 和 T-3) 作为标准品。多糖样品在上样之前, 使用 0.22 μm 水相膜过滤, 随后按照相同的实验条件进行分析检测。通过比较多糖样品的出峰时间, 并参照标准曲线, 得出多糖的相对分子质量。

1.5 傅里叶变换红外光谱分析和单糖组成

向研钵中放入 1.0 mg 党参多糖样品和 150.0 mg KBr, 研磨至混合物贴壁。将研磨粉末置于压片模具, 压制出透明 KBr 片。随后使用傅里叶变换红外光谱仪进行扫描, 分辨率设为 4 cm⁻¹, 扫描次数 32 次, 扫描范围 400~4000 cm⁻¹。

使用离子色谱法 (IC) 分析 CCP4 的单糖组成, 采用 CarboPac A20 色谱柱 (3 mm × 150 mm) 和 Dionex ICS2500 系统。将 10 mg CCP4 与 2 mol/L 三氟乙酸 (TFA) 混合, 在密封小瓶中反应。将 N₂ 注入管中, 100°C 降解 30 min。去除 TFA 后, 使用 N₂ 吹干, 用超纯水稀释至 100 mg/L, 经 RP-10 萃取柱过滤后, 再通过离子色谱分析单糖组成。准确称取 5.0 mg 的 D-木糖、D-果糖、D-阿拉伯糖、D-葡萄糖、D-甘露糖、葡萄糖醛酸等 9 种标准品, 溶于水中并定容至 100 mL, 最终制得 50 mg/L 混合标准溶液。

离子色谱条件: 双脉冲电流传感器, 色谱柱为 CarboPac A20 (3 mm × 150 mm), 柱温 30°C, 流动相 A、B、C 分别为水、NaOH 和 NaAc, 进样量 1 mL, 流量 0.45 mL/min, 三元梯度洗脱程序, 使用 Dionex ICS2500 色谱系统分析。

1.6 党参多糖的甲基化反应

甲基化分析基于文献方法并稍加修改^[11]。将 10 mg CCP4 与 25 mg NaOH 和 2 mL DMSO 混合, 冰水浴超声处理 5 h; 加入 2 mL 碘甲烷 (CH₃I), 超声处理 12 h, 加入 0.5 mL 水终止反应。傅里叶变换红外光谱分析多糖的甲基化程度, 若没有甲基化完全, 重

复以上操作, 直到所有反应完成。向甲基化多糖中加入 TFA, 100°C 降解, 去除 TFA 后, 加入 2 mL 超纯水和 NaBH₄ 还原 2 h。反应结束后加入乙酸调节 pH=5.0, 蒸干后加入乙酸酐 2 mL, 100°C 乙酰化 1 h。最终产物蒸干后, 使用二氯甲烷溶解并通过气相色谱-质谱联用仪进行分析。

气相色谱条件: HP-5 型色谱柱; 初始温度 100°C, 持续 2 min, 以 5°C/min 的速率升至 240°C, 持续 2 min; 10°C/min 的速率升至 320°C, 持续 2 min; 载气为高纯氦气; 进样口温度 250°C; 分流比 20 : 1; 进样量 1 μL; 离子源温度 230°C。分析完成后将样品 MS 离子碎片峰与 NIST05 数据库比对, 确定甲基取代位。

1.7 党参多糖 CCP4 的体内抗肿瘤作用

1.7.1 H22 荷瘤小鼠模型的建立

60 只 SPF 级昆明小鼠在实验鼠房中适应 7 d, 光/暗交替 12 h/12 h, 自由摄食饮水。将小鼠分为 6 个实验组: 模型组、空白组、CTX 组以及 CCP4 的高剂量组 (200 mg/kg)、低剂量组 (50 mg/kg) 和中剂量组 (100 mg/kg)。空白组、模型组及 CTX 组小鼠灌胃 0.2 mL 无菌生理盐水; 参照相关文献^[12], 将 CCP4 各剂量组分别给予 50、100、200 mg/kg CCP4 溶液, 每只小鼠灌胃 0.2 mL。持续干预 15 d 后, 取荷瘤小鼠腹腔液, 用 PBS 缓冲液将肿瘤细胞稀释至 1 × 10⁷ 个/mL。除空白组外, 其余 50 只小鼠在右侧皮下注射 0.2 mL, 接种后 24 h 确认无急性排斥反应。随后按照上述方法对各组小鼠灌胃处理, CTX 组小鼠腹腔注射 20 mg/kg CTX 0.2 mL^[13], 持续 15 d 后实验结束。

1.7.2 小鼠体重、器官指数及抑瘤率测定

在实验期间, 每 2 天给各组小鼠称取体重并记录。实验结束后, 取出小鼠实体瘤、胸腺和脾脏并称重。分别根据式 (1) 和式 (2) 计算脾脏/胸腺指数 (w) 和抑瘤率 (R), 评估治疗效果。

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

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

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 CCP4 或 CTX 组肿瘤质量, g; m_4 为模型组肿瘤质量, g。

1.7.3 小鼠外周血细胞因子检测

从小鼠眼眶采集 1 mL 血液, 转移至 1.5 mL EP 管中, 静置 2 h, 15000 r/min 离心 5 min, 收集上清液并保存于 -80°C。参照 ELISA 试剂盒, 测定小鼠血清

中的 IL-2、IFN- γ 和 TNF- α ，分析其表达水平。

1.7.4 小鼠外周血淋巴细胞亚群分布检测

外周血样本经眼眶静脉丛采集后，取 20 μL 全血与 500 μL 红细胞裂解缓冲液于流式检测管中涡旋混匀。添加 2 μL FITC-CD3 及 PE-CD19，经振荡后，置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 暗箱中孵育 30 min。反应终止后，1000r/min 离心 5 min，移除上清液。每管加入 1 mL 裂解液分散细胞，静置 10 min 完成裂解。采用 PBS 清洗，1000r/min 离心 5 min，彻底去除游离抗体，500 μL PBS 重悬细胞，经 300 目尼龙滤膜过滤后，用 BD FACSCalibur 流式细胞仪检测，数据经 Cellquest 软件分析。

1.7.5 小鼠巨噬细胞吞噬能力检测

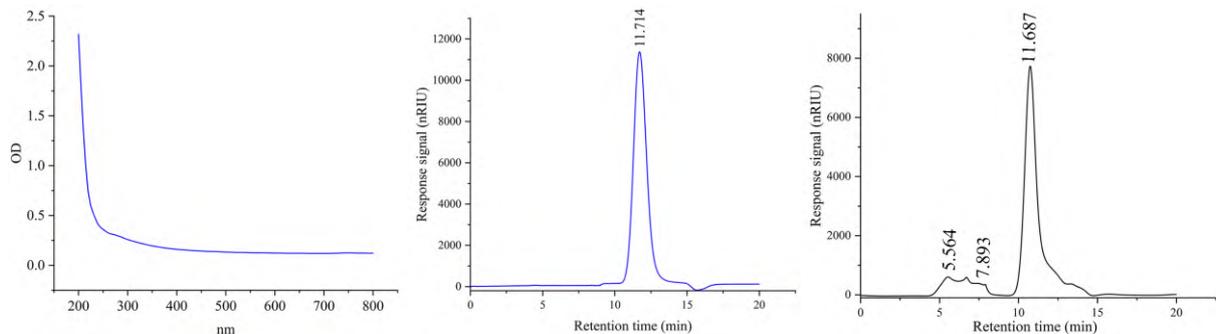
实验小鼠处死后，吸取腹腔巨噬细胞。离心弃掉上清液，加入 5 mL PBS 悬浮细胞，使细胞密度达到 1×10^6 个/mL。用 RPMI 1640 培养基悬浮并置于 96 孔板，每孔加入 200 μL 。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育 2 h，去除上清液，轻柔冲洗 3 次。在显微镜下观察巨噬细胞贴壁后，加入 100 μL 0.075% 中性红溶液，置于培养箱中孵育 2 h。每孔加入 100 μL 裂解缓冲液（无水乙醇与乙酸等体积比），覆盖板底细胞层，密封后 4 $^{\circ}\text{C}$ 低温裂解 12 h，确保胞内中性红完全溶解释放；室温平衡 10 min，测定 540 nm 处吸光度，通过吸光度反映巨噬细胞的吞噬活性强度。

1.7.6 小鼠脾淋巴细胞增殖检测

取脾脏组织，研磨离心获得细胞沉淀，用 RPMI 1640 培养基重悬至 1×10^7 个/mL；分别加入 RPMI 1640、ConA 和 LPS，培养 44 h 后加入 MTT。弃上清液，加入 DMSO 静置 15 min，用酶标仪测定 570 nm 处吸光度 (A_{570})。刺激指数 (SI) 为 ConA/LPS 刺激组和 RPMI 1640 对照组的 A_{570} 的比值。

1.7.7 小鼠实体瘤细胞周期阻滞检测

取适量小鼠实体瘤组织，轻轻研磨获得肿瘤细胞



(a) 紫外全波长扫描 (b) 粗多糖高效液相色谱 (c) 纯化多糖 CCP4 高效液相色谱

悬液。将细胞悬液稀释至 1×10^6 个/mL，用 70% 乙醇溶液固定，离心后用 PBS 清洗并重悬。加入 50 μL RNase，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min，随后加入 50 μL PI 并避光孵育。采用流式细胞仪检测细胞周期，数据通过 ModFit LT 软件进行分析。

1.8 数据处理

所有实验进行 3 次重复性操作。数据以“平均值 \pm 标准差”表示。采用 SPSS 19.0 统计软件分析， 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 党参多糖 CCP4 的化学组成、纯度和相对分子质量分析

化学成分表明，纯化后的党参多糖 CCP4 含有 (81.46 \pm 2.14) % 多糖、(0.48 \pm 0.95) % 蛋白质、(0.61 \pm 0.11) % 糖醛酸和 (0.83 \pm 1.06) % 还原糖，多糖的提取率为 9.42%。CCP4 的紫外全波长扫描和高效液相图如图 1 所示。

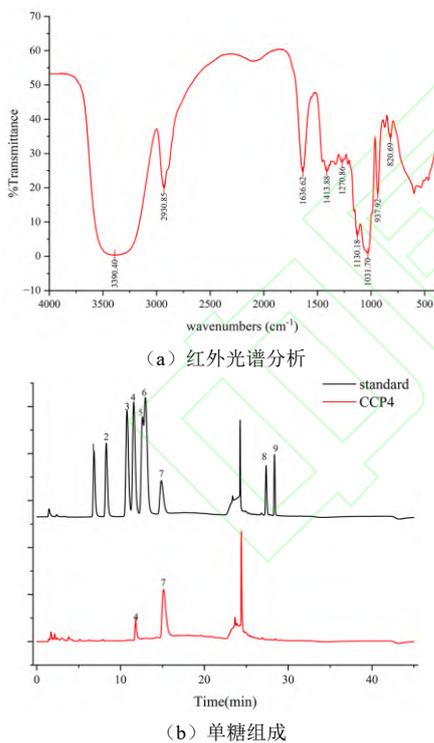
由图 1(a) 可知，纯化的党参多糖在 260 nm 和 280 nm 处未见显著吸收峰，显示其核酸与蛋白质含量极低，与前述蛋白质含量测定结果相符，表明该党参多糖为中性糖。由图 1(b) 可知，粗多糖的高效液相色谱图存在 3 个明显峰，2 个杂峰的出峰时间为 5.564 min 和 7.893 min。粗多糖主要成分的出峰时间为 11.687 min。由图 1(c) 可知，CCP4 的高效液相色谱图呈现单一且对称的单峰，出峰时间为 11.714 min。利用标品相对分子质量的对数值 ($\lg M_w$) 及其对应的出峰时间构建标准曲线，回归方程为 $y = -0.5841x + 10.791$ ， $R^2 = 0.9983$ 。将出峰时间代入回归方程，计算得出 CCP4 的相对分子质量为 8.86×10^3 。

图 1 CCP4 的紫外全波长扫描和高效液相色谱图

Fig.1 UV spectrum and HPLC profile of CCP4

2.2 党参多糖 CCP4 的傅里叶变换红外光谱和单糖组成分析

CCP4 的傅里叶变换红外光谱分析和单糖组成如图 2 所示。IR 光谱分析显示糖分子结构中存在 O—H 伸缩振动, 在 3390 cm^{-1} 处有明显的峰; 在 2930 cm^{-1} 处观察到的峰表明糖环结构中的 C—H 键伸缩振动; 同时, 多糖的羰基 C=O 伸缩振动在 1636 cm^{-1} 处显现; 1413 cm^{-1} 的峰表明多糖结构中的 C—H 键的弯曲振动, 而 C—H 的变角振动则出现在 $1200\sim 1400\text{ cm}^{-1}$ 范围内; 在 $1000\sim 1200\text{ cm}^{-1}$ 之间观察到的吸收峰对应 C—O 键的伸缩振动和一级醇 O—H 的变角振动^[14]。此外, 937 cm^{-1} 的吸收峰与果糖中呋喃环结构的对称伸缩振动特征相符^[15]。CCP4 的单糖主要由果糖和葡萄糖组成, 根据从不同浓度标准品构建标准曲线, 计算得出果糖和葡萄糖的物质的量比为 $1 : 0.26$, 这与之前报道的文献有所不同^[16]。



注: 1. 鼠李糖; 2. 阿拉伯糖; 3. 半乳糖; 4. 葡萄糖; 5. 木糖; 6. 甘露糖; 7. 果糖; 8. 半乳糖醛酸; 9. 葡萄糖醛酸

图 2 CCP4 的傅里叶变换红外光谱分析和单糖组成

Fig.2 Fourier transform infrared spectrum and monosaccharide composition of CCP4

2.3 党参多糖 CCP4 的甲基化分析

通过甲基化实验对多糖糖苷键的类型进行了检

测和解析。如图 3 为 CCP4 甲基化前后的红外光谱。相较于甲基化处理前的红外光谱图, 经过甲基化修饰后的光谱在约 3420 cm^{-1} 表现出 O—H 伸缩振动吸收峰的明显减弱。与此同时, 在约 2900 cm^{-1} 的位置, C—H 伸缩振动的吸收峰则呈现出明显的增强趋势, 指示了甲基化反应的充分进行与彻底完成。

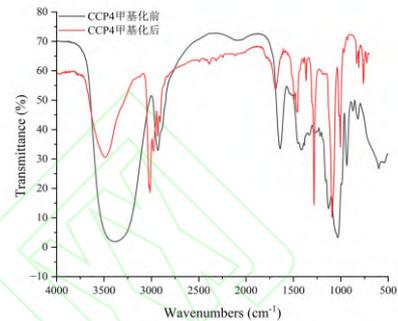


图 3 CCP4 的甲基化红外光谱图

Fig. 3 IR spectrums of CCP4 after Methylation

CCP4 的甲基化实验结果见表 1。CCP4 由 (2→1)-Fru_f、(2→6)-Fru_f 和 (1→)-Glc_p 三种糖苷键类型组成。结合质谱碎片特征及相关文献对比, 推测其可能为以 (2→1)-Fru_f 为主链连接的果聚糖结构, 但与以往文献不同的是带有 (2→6)-Fru_f 支链^[17]。研究表明, (2→6)-Fru_f 连接的存在可通过刺激免疫细胞活化和增强 NK 细胞的细胞毒性作用抑制肿瘤增殖, 这种作用可能归因于其与免疫受体的相互作用增强, 其效率高于线性结构^[15]。Xu 等^[18]证实, 党参多糖中的糖侧链在抑制肿瘤和激活免疫系统方面具有重要作用。

表 1 CCP4 的甲基化实验结果

Tab. 1 Methylation analysis of CCP4

甲基化糖残基	键型	物质的量比
3,4,6-Me ₃ -Man _p	(2→1)-Fru _f	3.06
1,3,4-Me ₃ -Man _p	(2→6)-Fru _f	0.84
2,3,4,6-Me ₄ -Glc _p	(1→)-Glc _p	1

2.4 党参多糖 CCP4 的抗肿瘤作用

2.4.1 小鼠生理指标分析

CCP 对小鼠生理指标的影响如图 4 所示, *表示与空白组相比差异显著 ($P < 0.05$), #表示与模型组相比差异显著 ($P < 0.05$)。

由图 4(a)可知, 接种肿瘤细胞前, 各组小鼠的体重并无差异, 而小鼠最终体重均有增加。模型组体重由于肿瘤导致异常增加而显著高于空白组 ($P < 0.05$), CTX 组小鼠体重显著低于模型组 ($P < 0.05$), 说明

CTX 虽然能治疗肿瘤，但会导致小鼠毒害反应及损伤。CCP4 剂量组小鼠的体重呈剂量依赖性增加，高剂量组的体重接近于空白组 ($P<0.05$)，并且未对小鼠造成负面影响产生毒害作用。

由图 4(b)可知，CTX 组和实验组的肿瘤质量都存在明显降低，CTX 组的肿瘤质量最轻，且抑瘤率达到了 55.13%。CCP4 组小鼠随着剂量的增加，小鼠肿瘤的生长逐渐变慢，小鼠的肿瘤质量显著降低 ($P<0.05$)，高剂量组的抑制效果最为显著，抑瘤率达到 48.18%。这进一步表明党参多糖可以抑制肿瘤的生长。

研究表明，肿瘤的增殖会引起脾脏的增大，胸腺则发生受损萎缩，免疫器官的免疫调节能力与其体积和重量密切相关^[19]。由图 4(c)可知，模型组小鼠的免疫器官指数下降 ($P<0.05$)，反映出肿瘤细胞的异常增殖对免疫系统造成严重损害，引发胸腺萎缩及脾脏

肿大，抑制了免疫功能发挥。CCP4 剂量组的免疫器官指数都得到了明显的改善 ($P<0.05$)，且呈现出剂量依赖性，表明党参多糖在一定程度上保护了免疫器官。虽然 CTX 对小鼠肿瘤的抑制效果最好，但是免疫器官均显著低于模型组 ($P<0.05$)。这说明 CTX 虽然对肿瘤有很好的治疗效果，但是对免疫器官有严重的毒害作用，使免疫系统受到抑制。

IL-2、TNF- α 和 IFN- γ 是重要的血清因子，在免疫响应和炎症恢复过程中发挥核心作用^[20]。由图 4(d)可知，模型组的细胞因子水平显著低于空白组 ($P<0.05$)，表明细胞因子水平降低与肿瘤异常生长相关。在 CTX 组中，细胞因子水平显著下降 ($P<0.05$)，提示 CTX 具有毒性作用，导致免疫细胞受损。相比之下，CCP4 组的细胞因子水平呈显著的剂量依赖性增加，尤其高剂量组的水平接近空白组，表明 CCP4 可以增强激活血清细胞因子的释放，改善免疫功能。

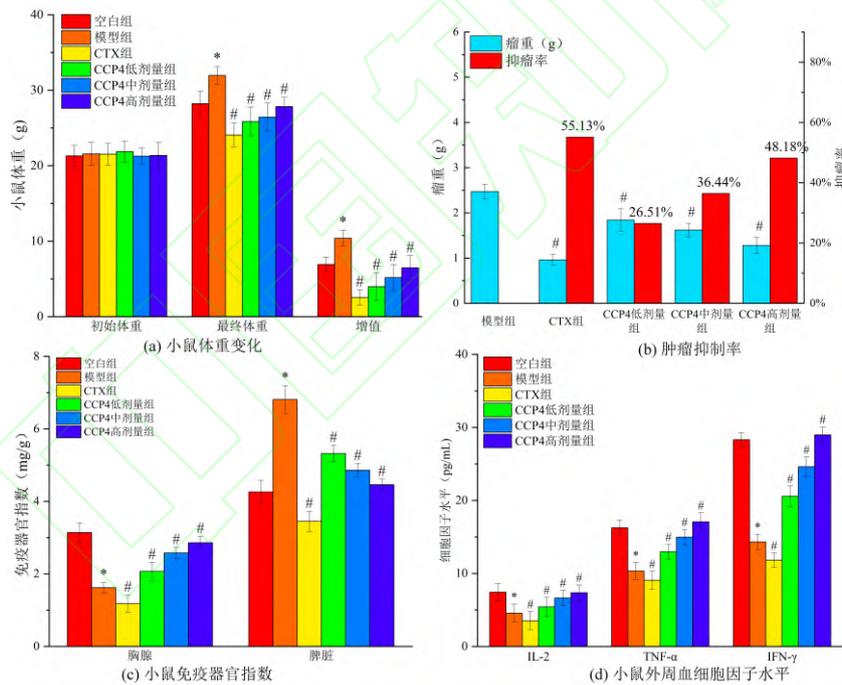


图 4 CCP 对小鼠生理指标的影响

Fig. 4 Effect of CCP on physiological indices in mice

2.4.2 小鼠外周血淋巴细胞亚群分布分析

CD19B 淋巴细胞是体液免疫的重要调控因子，通过增强 B 细胞受体 (BCR) 信号发挥关键功能^[21]。CD3T 淋巴细胞在识别抗原后，通过传递活化信号引导自身增殖与分化，从而显著提升免疫调节能力，在抗肿瘤免疫反应中，CD3 T 淋巴细胞中的 CD4T 淋巴细胞主要负责激活并招募 CD8 T 淋巴细胞、NK 细胞

和巨噬细胞，协同放大抗肿瘤免疫效应^[22]。各组小鼠 CD3 T 细胞和 CD19 B 细胞比例的散点图及柱状图分析如图 5 所示，*表示与空白组相比差异显著 ($P<0.05$)，#表示与模型组相比差异显著 ($P<0.05$)。

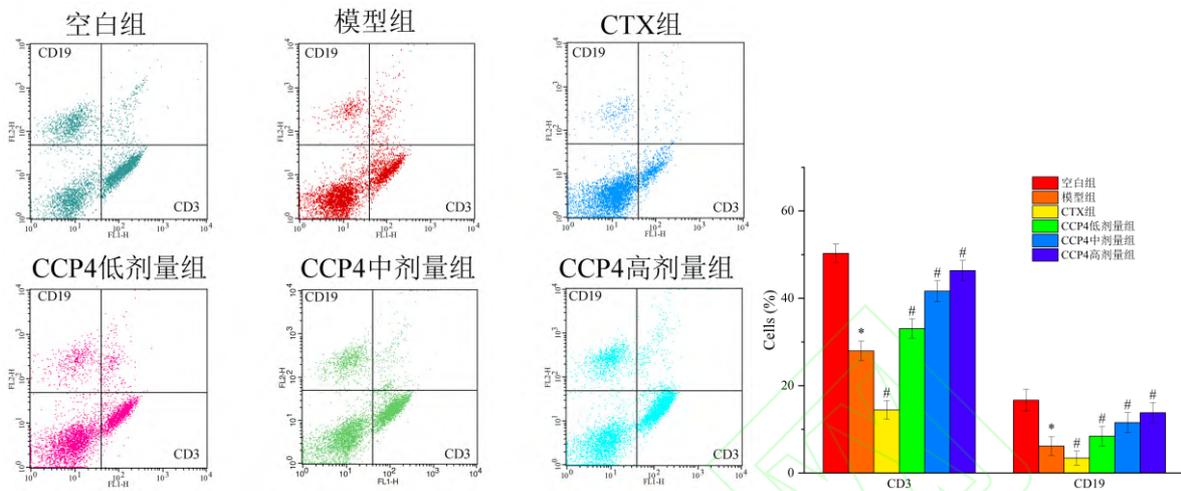


图5 各组小鼠 CD3 T 细胞和 CD19 B 细胞比例的散点图及柱状图分析

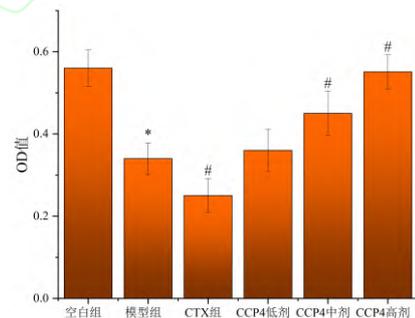
Fig. 5 Scatter plot and bar chart analysis of the proportions of CD3 T cells and CD19 B cells in each group of mice.

与空白组相比，模型组中 CD3 T 细胞及 CD19 B 细胞的比例显著降低 ($P < 0.05$)，表明肿瘤诱导了免疫抑制。在 CTX 组中，这些细胞比例进一步下降，反映出 CTX 对免疫系统产生了显著的副作用，导致免疫抑制。相比模型组，CCP4 各剂量组中 CD3 T 细胞及 CD19 B 细胞的比例显著升高，且呈剂量依赖性。具体而言，CD3 和 CD19 细胞分别从 33.05% 和 8.44% 增加到 46.35% 和 13.8% ($P < 0.05$)。这表明 CCP4 能够增强免疫功能，有效抑制 H22 细胞的生长。

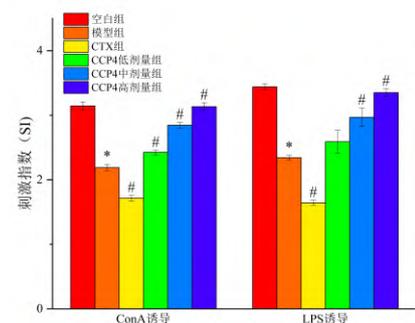
2.4.3 小鼠免疫细胞活性分析

巨噬细胞作为一个特殊的免疫细胞，在生物体内扮演着特定的防御角色。它们不仅能够吞噬和消除病原，还会激发身体的免疫力，对入侵的病原体作出反应^[23]。此外，巨噬细胞还能生成促炎性因子，这些因子能够激活抗肿瘤免疫反应，在机体的整体免疫响应中发挥着决定性的作用^[24]。ConA 和 LPS 均具有促进淋巴细胞转化的特点，其中 ConA 能够刺激 T 细胞，LPS 则通过刺激 B 细胞来发挥作用，脾淋巴细胞的增殖可以反应出机体发生特异性免疫^[14]。通过评估小鼠巨噬细胞吞噬能力以及脾淋巴细胞增殖能力，CCP4 对免疫细胞活性的影响如图 6 所示，*表示与空白组相比差异显著 ($P < 0.05$)，#表示与模型组相比差异显著 ($P < 0.05$)。模型组小鼠吞噬能力和淋巴细胞增殖显著降低 ($P < 0.05$)，表明肿瘤生长损害了免疫功能。CTX 组小鼠吞噬能力和淋巴细胞增殖的进一步下降表明 CTX 对免疫细胞具有显著毒性作用。CCP4 处理

组淋巴细胞增殖和巨噬细胞吞噬能力均显著增强 ($P < 0.05$)，且呈剂量依赖性，高剂量组效果最为显著。这表明 CCP4 处理能够增强免疫细胞活性，可能有助于缓解肿瘤诱导的免疫抑制。



(a) 小鼠巨噬细胞吞噬能力



(b) 小鼠淋巴细胞增殖能力

图6 CCP4 对免疫细胞活性的影响

Fig. 6 Effect of CCP4 on immune cell activity

2.4.4 小鼠实体瘤细胞周期阻滞分析

细胞周期是一个精密调控的连续过程，包括间期

与有丝分裂期（M 期）两大阶段，间期又被分为 G1 期、S 期和 G2 期^[25]。在这一过程中，间期扮演着至关重要的角色，它不仅是细胞生长和 DNA 复制的关键时期，也是细胞准备进入有丝分裂的必经阶段。细胞周期的精确调控对于保持细胞遗传稳定性和生物体正常发育至关重要^[26]。肿瘤细胞中，细胞周期调控异常会导致细胞增殖失控。因此，通过药物干预阻滞细胞周期的特定阶段，能够有效抑制细胞增殖，促进细胞分化或诱导凋亡，为癌症治疗提供潜在的有效策略^[27]。各组小鼠 H22 肿瘤细胞周期的直方图与柱状图结果如图 7 所示。模型组凋亡率仅为 4.57%，说明肿瘤细胞处于正常的生长过程。CTX 处理组对小鼠肿瘤细胞表现出显著抑制效果，凋亡率达到 23.26%。而 CCP4 处理后肿瘤细胞凋亡率明显升高，分别为

6.72%、13.16%和 20.25%。关于细胞周期阻滞，经 CCP4 处理后，S 期肿瘤细胞的比例呈剂量依赖性增加，从 37.85% 升高至 54.36%。这表明 CCP4 处理可使细胞周期阻滞于 S 期，从而诱导 H22 细胞凋亡，进一步证实 CCP4 增强了抗肿瘤免疫反应。

CCP4 能够通过免疫调节通路和直接抗肿瘤通路抑制肿瘤的生长，如图 8 所示。在免疫调节通路，CCP4 显著保护免疫器官，促进细胞因子释放，激活免疫应答，提高免疫细胞活化能力，进而增强免疫调节能力抑制肿瘤生长。在直接抗肿瘤通路中，CCP4 诱导 H22 肿瘤细胞周期 S 期阻滞，抑制 DNA 复制，触发肿瘤细胞凋亡。免疫调节与细胞周期阻滞发挥协同作用，共同抑制肿瘤的增殖。

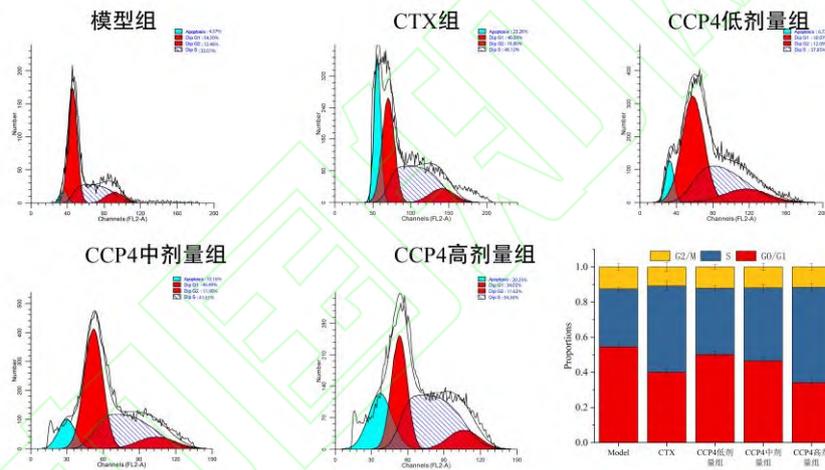


图 7 各组小鼠 H22 肿瘤细胞周期的直方图与柱状图结果

Fig.7 Results of the histogram and bar chart of the cell cycle of H22 tumor cells

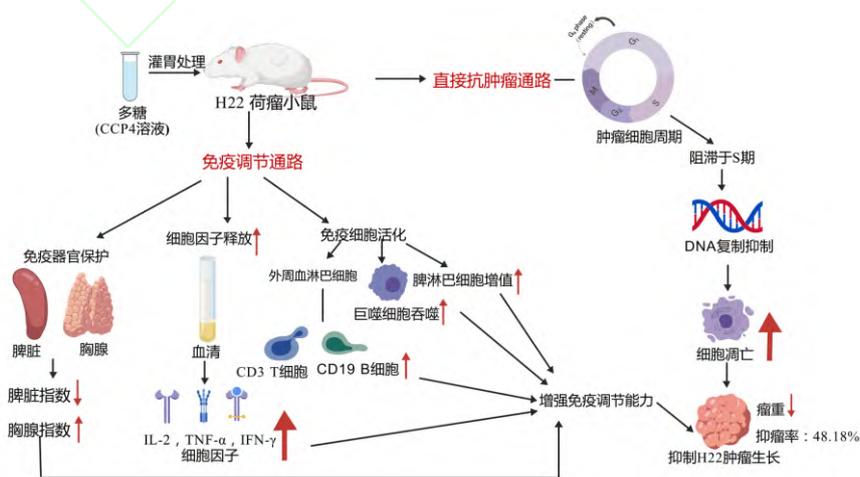


图 8 CCP4 抑制 H22 肿瘤的通路图

Fig.8 The pathway map of CCP4 inhibiting H22 tumor

3 结论

本研究采用冷水提取法从党参中提取多糖,并经透析 SephadexG-75 纯化得到多糖 CCP4。结构分析表明, CCP4 为均一多糖,含有含有 (81.46±2.14) %多糖、(0.48±0.95) %蛋白质、(0.61±0.11) %糖醛酸和 (0.83±1.06) %还原糖,多糖的提取率为 9.42%,相对分子质量为 8.86×10^3 ,由果糖和葡萄糖组成,物质的量比为 1 : 0.26。该多糖以(2→1)- β -D-Fruf 和 (1→)- α -D-Glcp 为主链,以(2→6)- β -D-Fruf 为支链的方式连接而成。动物实验结果表明, CCP4 对免疫器官具有保护作用,能够阻滞细胞周期于 S 期,诱导肿瘤细胞凋亡,促进外周血细胞因子表达,调节外周血淋巴细胞亚群比例,增强免疫细胞活性,并抑制 H22 荷瘤小鼠的肿瘤生长,其抑瘤率达到 48.18%,具有明显的抗肿瘤作用。本研究为党参多糖在食品和医药行业的应用与开发提供理论支持。

参考文献:

- [1] PUISIEUX A, POMMIER R M, MOREL A P, et al. Cellular pliancy and the multistep process of tumorigenesis[J]. Cancer cell, 2018, 33(2): 164-172.
- [2] ZHENG Y, ZHANG W, XU L, et al. Recent progress in understanding the action of natural compounds at novel therapeutic drug targets for the treatment of liver cancer[J]. Frontiers in oncology, 2021, 11: 795548.
- [3] 苏圆锦, 奚佳玉, 史奇, 等. 药食同源中药党参的研究进展[J]. 中草药, 2023, 54(8):2607-2617.
- [4] AZMIR J, ZAIDUL I S M, RAHMAN M M, et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review[J]. Journal of food engineering, 2013, 117(4): 426-436.
- [5] BAI R, LI W, LI Y, et al. Cytotoxicity of two water-soluble polysaccharides from *Codonopsis pilosula* Nannf. var. *modesta* (Nannf.) L. T. Shen against human hepatocellular carcinoma HepG2 cells and its mechanism[J]. International journal of biological macromolecules, 2018, 120: 1544-1550.
- [6] YU J, JI H, YANG Z, et al. Relationship between structural properties and antitumor activity of Astragalus polysaccharides extracted with different temperatures[J]. International journal of biological macromolecules, 2019, 124: 469-477.
- [7] NURMAMAT E, XIAO H, ZHANG Y, et al. Effects of different temperatures on the chemical structure and antitumor activities of polysaccharides from *Cordyceps militaris*[J]. Polymers, 2018, 10 (4) :430.
- [8] GUO Y F, DENG R X, WANG Y H, et al. Extraction, separation, and antioxidant activity of polysaccharides from peony seed shell[J]. Industrial crops and products, 2024, 222: 119843.
- [9] KURZYNA-SZKLAREK M, CYBULSKA J, ZDUNEK A. Analysis of the chemical composition of natural carbohydrates: an overview of methods[J]. Food chemistry, 2022, 394: 133466.
- [10] HOU Y, ZHAO J, YIN J, et al. Structural properties of *Bletilla striata* polysaccharide and the synergistic gelation of polysaccharide and xanthan gum[J]. Food hydrocolloids, 2023, 142: 108843.
- [11] YU S, DONG X, MA R, et al. Characterization of a polysaccharide from *Polygala tenuifolia* Willd. with immune activity via activation MAPKs pathway[J]. Bioorganic chemistry, 2023, 130: 106214.
- [12] JI H, YU J, LIU A. 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.
- [13] LIU W, WANG J, ZHANG Z, et al. In vitro and in vivo antioxidant activity of a fructan from the roots of *Arctium lappa* L.[J]. International journal of biological macromolecules, 2014, 65: 446-453.
- [14] DONG X D, YU J, FENG Y Y, et al. Alcohol-soluble polysaccharide from *Castanea mollissima* Blume: preparation, characteristics and antitumor activity[J]. Journal of functional foods, 2019, 63: 103563.
- [15] ZHANG J, CHEN C, FU X. Fructus mori L. polysaccharide-iron chelates formed by self-embedding with iron(III) as the core exhibit good antioxidant activity[J]. Food & function, 2019, 10(6): 3150-3160.
- [16] ZOU Y F, ZHANG Y Y, ZHU Z K, et al. Characterization of inulin-type fructans from two species of *Radix Codonopsis* and their oxidative defense activation and prebiotic activities[J]. Journal of the science of food and agriculture, 2021,

- 101(6): 2491-2499.
- [17] WANG M, CHEONG K L. Preparation, structural characterisation, and bioactivities of fructans: a Review[J]. *Molecules*, 2023, 28 (4) : 1613.
- [18] XU C, LIU Y, YUAN G, et al. The contribution of side chains to antitumor activity of a polysaccharide from *Codonopsis pilosula*[J]. *International journal of biological macromolecules*, 2012, 50(4): 891-894.
- [19] DONG X D, LIU Y N, ZHAO Y, et al. Structural characterization of a water-soluble polysaccharide from *Angelica dahurica* and its antitumor activity in H22 tumor-bearing mice[J]. *International journal of biological macromolecules*, 2021, 193: 219-227.
- [20] DASH S, SAHU A K, SRIVASTAVA A, et al. Exploring the extensive crosstalk between the antagonistic cytokines-TGF- β and TNF- α in regulating cancer pathogenesis[J]. *Cytokine*, 2021, 138: 155348.
- [21] MORBACH H, SCHICKEL J N, CUNNINGHAM-RUNDLES C, et al. CD19 controls Toll-like receptor 9 responses in human B cells[J]. *Journal of allergy and clinical immunology*, 2016, 137(3):889-898.
- [22] DENG H, NIU Z, ZHANG Z, et al. Back on the scene: advances and challenges in CD3-related drugs in tumor therapy[J]. *Drug discovery today*, 2022, 27(8): 2199-2208.
- [23] 李雨凝, 张乐蒙. 肿瘤相关巨噬细胞在抗肿瘤免疫治疗中的应用及展望[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2024, 45(6): 983-993.
- [24] BAO Y, WANG G, LI H. Approaches for studying human macrophages[J]. *Trends in immunology*, 2024, 45(4): 237-247.
- [25] JAIN R K, HONG D S, NAING A, et al. Novel phase I study combining G1 phase, S phase, and G2/M phase cell cycle inhibitors in patients with advanced malignancies[J]. *Cell cycle*, 2015, 14(21): 3434-3440.
- [26] 王伟玲, 吕明晓, 吉敬. 细胞周期调控蛋白作为抗肿瘤药物潜在靶标的研究进展[C]//南京康复医学会. 第二届全国康复与临床药学学术交流会议论文集(四). 连云港:江苏海洋大学药学院, 2022:400-404.
- [27] WANG Z, REN M, LIU W, et al. Role of cell division cycle-associated proteins in regulating cell cycle and promoting tumor progression[J]. *Biochimica et biophysica acta-reviews on cancer*, 2024, 1879(5): 189147.