

# 醋柴胡多糖的分离纯化及协同抗肝癌活性的研究

刘志芬<sup>1</sup>, 王小双<sup>2</sup>, 李苹<sup>1</sup>, 吴亚运<sup>1</sup>, 刘丽娟<sup>2</sup>, 赵瑞芝<sup>2</sup>, 赵亚<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>广州中医药大学第二临床医学院 中医证候全国重点实验室;

<sup>2</sup>广州中医药大学第二临床医学院 省部共建中医湿证重点实验室, 广州 510006

**摘要:** 对醋柴胡多糖 (polysaccharide from vinegar-baked Bupleuri Radix, VBRBP) 进行分离纯化, 初步分析其结构特征并探究其联合化疗药的协同抗肝癌活性。通过水提醇沉、膜分离及纤维素层析从醋柴胡中分离纯化得到醋柴胡均一多糖, 采用高效凝胶渗透色谱法、PMP 柱前衍生法、傅里叶变换红外光谱、气质联用和核磁共振波谱等方法对醋柴胡均一多糖进行结构鉴定, 并测定其联合不同化疗药物对 HepG2 和 Huh7 两种肝癌细胞株的增殖抑制作用。结果表明, 经过分离纯化得到的醋柴胡均一多糖 5-1 (polysaccharide 5-1 from vinegar-baked Bupleuri Radix, VBRBP5-1) 是一种中性多糖, 相对分子量为 30.78 kDa, 由甘露糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖组成, 摩尔比为 1.96 : 2.38 : 58.48 : 22.85 : 14.32; 主链是由 1- $\alpha$ -D-葡萄糖、1, 6- $\alpha$ -D-葡萄糖、1, 4, 6- $\alpha$ -D-葡萄糖、1, 4- $\alpha$ -D-葡萄糖、1, 3, 6- $\beta$ -D-半乳糖残基构成, 支链主要含有 1- $\beta$ -D-半乳糖、1, 4- $\beta$ -D-半乳糖和 1- $\alpha$ -L-阿拉伯糖、1, 3, 5- $\alpha$ -L-阿拉伯糖、1, 5- $\alpha$ -L-阿拉伯糖残基片段。VBRBP5-1 能增强 10-羟基喜树碱、甲氨蝶呤和顺铂对肝癌细胞的抑制率, 显示出协同增效作用, 其中对顺铂的协同增效作用在两种肝癌细胞中均优于其他抗肿瘤药物。本研究解析了 VBRBP5-1 的结构并探索了其协同抗肝癌活性, 为醋柴胡多糖的构效关系阐释及后续深入开发和利用提供参考。

**关键词:** 醋柴胡; 均一多糖; 结构表征; 协同抗肝癌

中图分类号: R284

文献标识码: A

## Isolation, purification and synergistic anti-liver cancer activity of polysaccharide from vinegar-baked Bupleuri Radix

LIU Zhi-fen<sup>1</sup>, WANG Xiao-shuang<sup>2</sup>, LI Ping<sup>1</sup>,

WU Ya-yun<sup>1</sup>, LIU Li-juan<sup>2</sup>, ZHAO Rui-zhi<sup>2</sup>, ZHAO Ya<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>National Key Laboratory of Chinese Medicine Syndrome, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine; <sup>2</sup>State Key Laboratory of Dampness Syndrome of Chinese Medicine, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou

University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

**Abstract:** This study aims to isolate and purify polysaccharide from vinegar-baked Bupleuri Radix (VBRBP), and to preliminarily analyze its structural characteristics, and explore its synergistic anti-liver cancer activity in combination with chemotherapeutics. One homogeneous polysaccharide from vinegar-baked Bupleuri Radix was isolated and purified by water extraction and alcohol precipitation, membrane separation and cellulose chromatography. High-performance gel permeation chromatography, 1-phenyl-3-

methyl-5-pyrazolon pre-column derivatization, Fourier transform infrared spectroscopy, gas chromatography-mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy were used to identify the structure of VBRBP, and the inhibitory effect of its combination with different chemotherapeutics on the proliferation of HepG2 and Huh7 liver cancer cell lines was measured. The results showed that the homogeneous polysaccharide 5-1 from vinegar-baked Bupleuri Radix (VBRBP5-1) obtained through separation and purification is a neutral polysaccharide with a relative molecular weight of 30.78 kDa, composed of mannose, galacturonic acid, glucose, galactose and arabinose, with a molar ratio of 1.96 : 2.38 : 58.48 : 22.85 : 14.32. The backbone of VBRBP5-1 was composed of 1- $\alpha$ -D-glucose, 1,6- $\alpha$ -D-glucose, 1,4,6- $\alpha$ -D-glucose, 1,4- $\alpha$ -D-glucose and 1,3,6- $\beta$ -D-galactose residues, and the branched chain mainly contained 1- $\beta$ -D-galactose, 1,4- $\beta$ -D-galactose and 1- $\alpha$ -L-arabinose, 1,3,5- $\alpha$ -L-arabinose, 1,5- $\alpha$ -L-arabinose residues. Combined administration of VBRBP5-1 could enhance the inhibition rates of 10-hydroxycamptothecin, methotrexate and cisplatin on hepatocellular carcinoma cells, showing a synergistic effect, in which the synergistic effect on cisplatin was superior to the others in these two hepatocellular carcinoma cells. In this study, the structure of VBRBP5-1 was analyzed and its synergistic anti-liver cancer activity was explored, which provided a reference for the interpretation of the structure-activity relationship and subsequent further development and utilization of polysaccharides from vinegar-baked Bupleuri Radix .

**Key words:** vinegar-baked Bupleuri Radix ; homogeneous polysaccharide; structural characterization; synergistic anti-liver cancer

柴胡为伞形科植物柴胡 (*Bupleurum chinense* DC.) 或狭叶柴胡 (*Bupleurum scorzoniferolium* Willd.) 的干燥根, 其性辛、苦, 微寒, 归肝、胆、肺经, 具有解表退热、疏肝解郁、升举阳气的功效, 经醋制后能增强疏肝止痛作用, 为经典的肝经引经药, 临床主要用于治疗肝脏相关疾病<sup>[1]</sup>。现代研究显示醋柴胡的肝引经作用主要表现在促进药物靶向分布和协同增效两方面, 王锦秋<sup>[2]</sup>等人研究证实醋柴胡水提液可增加大黄酸、氧化苦参碱等药物的肝内分布, 显著增强大黄酸抗急性肝炎的活性。醋柴胡多糖是醋柴胡水提液的主要成分之一, 近期研究表明醋柴胡多糖能够促进大黄酸和氧化苦参碱的肝靶向作用<sup>[3,4]</sup>。目前, 系统性化疗是晚期肝癌治疗的主要方法之一, 然而由于化药本身的毒性以及在靶部位的分布浓度较低, 常引起严重的毒副作用, 因此, 与其他药物或佐剂组合以提高药物的敏感性产生协同治疗的作用是一种有效的策略<sup>[5]</sup>。Wang<sup>[6]</sup>和 Wu<sup>[7]</sup>等从体外及体内对醋柴胡多糖协同抗肝癌作用展开了药理研究, 发现醋柴胡多糖能对甲氨蝶呤、顺铂、10-羟喜树碱胶束、紫杉醇等多种常规抗肿瘤药起到不同程度的协同增效作用, 提示了醋柴胡多糖在提高化疗敏感性、协同增效方面的巨大潜力。然而, 目前尚不完全清楚何种结构的醋柴胡多糖在协同化疗药抗肝癌作用中具有优势。明确的结构和清晰的构效关系是糖类药物研发的前提。故本文通过分离纯化从醋柴胡中获得醋柴胡均一多糖 5-1 (polysaccharide 5-1 from vinegar-baked Bupleuri Radix, VBRBP5-1), 并运用高效凝胶渗透色谱法 (high-performance gel permeation chromatography, HPGPC)、傅里叶变换红外光谱 (Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR)、气质联用 (gas chromatography-mass

spectrometry, GC-MS) 和核磁共振波谱 (nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR) 等方法对 VBRBP5-1 进行结构解析, 采用肝癌细胞模型研究醋柴胡多糖与抗肿瘤药物联合治疗的作用, 为进一步丰富醋柴胡多糖结构信息、阐明醋柴胡多糖协同抗肝癌作用的构效关系研究提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

醋柴胡饮片 (批号: 201706, 康美药业有限公司) 由广州中医药大学第二附属医院陈文良副主任中药师鉴定为正品; 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone, PMP) ( $\geq 99\%$ , 批号: C1822095, 上海阿拉丁生化科技有限公司); Dextran 60 K、Dextran 40 K、Dextran 18 K、Dextran 16 K、Dextran 9 K、Dextran 7 K、Dextran 5 K 和 Dextran 4 K 等葡聚糖标准品 (色谱纯, 北京绿百草科技发展有限公司); *L*-阿拉伯糖 (*L*-arabinose, Ara) (批号: Z2907H23894)、*D*-葡萄糖 (*D*-glucose, Glc) (批号: Y01D5Y3)、*L*-鼠李糖 (*L*-rhamnose, Rha) (批号: C11366744)、*L*-核糖 (*L*-ribose, Rib) (批号: S11176)、*D*-甘露糖 (*D*-mannose, Man) (批号: AA0416LA13)、*D*-半乳糖 (*D*-galactose, Gal) (批号: Z22J9H64187)、*D*-半乳糖醛酸 (*D*-galacturonic acid, GalA) (批号: S12J10I90131)、*D*-葡萄糖醛酸 (*D*-glucuronic acid, GlcA) (批号: K14J7S9017) ( $\geq 98\%$ , 上海源叶生物科技有限公司); DMEM 培养基 (批号: 8120498)、PBS 磷酸盐缓冲液 (批号: 812021)、南美血清 (fetal bovine serum, FBS) (批号: 2176398) (美国 Gibco 公司); 噻唑蓝 (thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT) (纯度 $\geq 98\%$ , 批号: 2176398, MP 生物医疗公司); 10-羟基喜树碱 (10-hydroxycamptothecine, 10-HCPT) (纯度 $\geq 98\%$ , CAS: 19685-09-7, 美仑生物科技有限公司); 甲氨蝶呤 (methotrexate, MTX) (纯度 $\geq 99\%$ , CAS: 59-05-2, 上海信谊药厂有限公司); 顺铂 (cisplatin, DDP) (纯度 $\geq 99\%$ , CAS: 15663-27-1, 日本 TGI 公司); DEAE 纤维素 DE-52 (批号: M24IS210366, 上海源叶生物科技有限公司); 甲醇和乙腈为色谱级, 德国 Merck 公司提供, 其余试剂均为分析纯。Huh7、HepG2 细胞 (中国科学院武汉大学典型培养物保藏中心)。

### 1.2 仪器与设备

VERSAflux13 膜分离系统配中空纤维柱 UFP-750-E-4MA、UFP-100-C-4MA、UFP-10-C-4MA、UFP-3-C-4MA (美国 GE Healthcare 公司); HL2B 数显恒流泵和 CBS-A 程控全自动部分收集器 (上海沪西分析仪器厂有限公司); Infinite M1000Pro 酶标仪 (瑞士 Tecan 公司); 傅里叶变换红外光谱仪 (美国 PerkinElmer 公司); 600 MHz 核磁共振波谱仪 (美国 Bruker 公司); 5975C-7890A GC-MS 仪、1200、1260 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); MS7-H550-pro 加热磁力搅拌器 (大龙兴创实验仪器北京有限公司); HR40-IIA2 生物安全柜 (青岛海尔特种电器有限公司); WCI-180 CO<sub>2</sub> 孵箱 (北京维根技术有限

公司)；IC-1000 细胞计数仪(上海睿钰生物科技有限公司)；Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)(北京迪科马科技有限公司)；TSKgel G3000PW<sub>XL</sub> 色谱柱(7.8 mm×300 mm, 7 μm)(日本东曹株式会社)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 醋柴胡多糖的提取、分离、纯化

8 kg 醋柴胡饮片打碎, 5 倍体积 70%乙醇加热回流脱脂 4 次, 残渣干燥后加 10 倍体积水回流提取 3 次。提取液过滤、合并、减压浓缩至 8 000 mL, 加入 4 倍体积的无水乙醇在 4 °C 下沉淀过夜。所得沉淀用无水乙醇和丙酮洗涤 3 次, 再通过 Sevage 方法去除蛋白质得到醋柴胡总多糖。用 VERSAflux13 膜分离系统以 750、100、10 和 3 kDa 的超滤膜分离柱对醋柴胡总多糖进行分离得到 VBRBP1~VBRBP15。将 VBRBP5 上样到 DEAE-52 柱上, 然后依次用纯水、0.1、0.2、0.4、0.8 mol/L NaCl 和 1.0 mol/L NaCl 与 0.5 mol/L NaOH 混合液以 5 mL/min 的速率洗脱。用苯酚-硫酸法<sup>[8]</sup>测定多糖浓度并根据吸光度作洗脱曲线。水洗脱收集到的溶液浓缩并用 3 500 Da 的透析袋透析 72 h 后冻干得到 VBRBP5-1。

#### 1.3.2 VBRBP5-1 的结构表征

##### 1.3.2.1 相对分子质量和糖醛酸含量测定

采用高效液相凝胶色谱法测定 VBRBP5-1 的分子量, 取适量干燥的 VBRBP5-1 和 60、40、18、16、9、7、5、4 kDa 的葡聚糖标准品, 用蒸馏水溶解配成 2.0 mg/mL 的溶液, 过 0.45 μm 的水系滤膜进行液相分析。色谱条件: TSKgel G3000PW<sub>XL</sub> (7.8 mm×300 mm, 7 μm) 色谱柱, 流动相: 超纯水, 流速: 0.35 mL/min, 柱温: 40 °C, 示差折光检测器温度: 40 °C, 进样量: 10 μL。以标准品的重均分子量对数 log<sub>10</sub>(M<sub>w</sub>) 为横坐标, 保留时间为纵坐标绘制标准曲线, 计算 VBRBP5-1 分子量分布。

采用间羟基联苯法对 VBRBP5-1 的糖醛酸含量进行分析, 以 GalA 为标准品, 用超纯水稀释成浓度梯度依次为: 500、250、125、62.5、31.25、15.6、7.8、3.9、1.95 及 0 μg/mL 的对照品溶液, 分别取不同浓度的对照品溶液 1 mL 置于具塞试管中, 在冰浴中加入含有四硼酸钠的硫酸溶液 6 mL, 混匀, 沸水浴中加热 12 min 之后冰浴放冷至室温, 并加入 1.5 mg/mL 的间羟基联苯溶液 100 μL, 涡旋 30 s 混匀, 分别移取 200 μL 于 96 孔板中, 并使用酶标仪测定各反应液在 525 nm 下的吸光度, 以吸光度为纵坐标, GalA 含量为横坐标绘制标准曲线, 计算 VBRBP5-1 的糖醛酸含量。

##### 1.3.2.2 FT-IR 分析

取微量 VBRBP5-1 干燥样品, 使用傅里叶变换红外光谱仪在 4 000~500 cm<sup>-1</sup> 波数范围内进行红外扫描。

##### 1.3.2.3 单糖组成分析

采用完全酸水解和 PMP 柱前衍生化测定 VBRBP5-1 单糖组成<sup>[9]</sup>, 5 mg 多糖样品溶于 2 mol/L 的三氟乙

酸中，氮气环境下 110 °C 密闭水解 6 h。冷却后加入甲醇溶液，减压旋干，重复 5 次以上以除去多余的三氟乙酸，超纯水复溶。称取各单糖标准品 10.00 mg：Ara、Rib、Glc、Rha、Man、Gal、GalA 和 GlcA，加入超纯水溶解配制 2.00 mg/mL 的单糖标准液。各单糖标准液混合并依次对半稀释成浓度为 500、250、125、62.5、31.25、15.63、7.8、3.9、0 µg/mL 的标准曲线工作液。取多糖水解样品或混合标准品液 500 µL，加入 500 µL 0.3 mol/L NaOH 和 500 µL 0.6 mol/L 溶于甲醇的 PMP 溶液，混匀，在 70 °C 反应 100 min。反应结束后，冷却至室温，加入 500 µL 0.3 mol/L HCl 中和反应体系，再加入氯仿萃取三次，取水相过 0.22 µm 水系滤膜后，上机检测。

液相色谱条件：Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 µm）；流动相：磷酸盐缓冲液（pH=6.83）：乙腈=83：17；流速：1.0 mL/min；柱温：37 °C，进样体积：20 µL，检测波长：254 nm。

#### 1.3.2.4 甲基化分析

将干燥的 VBRBP5-1 20 mg 在氮气环境中加入 3 mL 无水 DMSO，超声溶解 1 h。注入 NaOH/DMSO 悬浮液，在 18~20 °C 的温度条件下再超声处理 1 h。甲基化反应通过加入 1.5 mL CH<sub>3</sub>I 来引发，并在室温下持续反应 30 min。将反应物用 2 mL CHCl<sub>3</sub> 萃取三次。然后将全甲基化产物在 3 mL 甲酸（88%）中预水解 6 h，并在 3 mL 2 mol/L 三氟乙酸中完全水解 6 h，减压旋干除去多余的酸。水解产物在室温下用 20 mg NaBD<sub>4</sub> 还原 4 h，然后用乙酸酐-吡啶（1：1）在 95 °C 下乙酰化 1 h。用 2 mL CHCl<sub>3</sub> 萃取三次，氮吹后离心，上机检测。使用 Agilent HP-5MS 毛细管柱（0.25×250 µm，30 m）通过 GC-MS 分析部分甲基化的糖醇乙酸酯。程序升温，起始温度 150 °C，持续 2 min，以 2.5 °C/min 速度升至 250 °C，保持 20 min；进样量 1 µL，分流比 8：1，MS 四极杆 150 °C，离子源 230 °C。

#### 1.3.2.5 NMR 分析

取 VBRBP5-1 样品 50 mg 溶于 0.5 mL D<sub>2</sub>O 中，冷冻干燥，重复 3 次，复溶于 0.5 mL D<sub>2</sub>O 中，用 600 MHz 核磁共振波谱仪检测 VBRBP5-1 的 1D NMR（<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR）和 2D NMR（HSQC、HMBC、<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY）图谱。

### 1.3.3 VBRBP5-1 协同抗肝癌活性

#### 1.3.3.1 细胞培养

Huh7、HepG2 细胞在含有 10% FBS 的 DMEM 培养基中，于 5% CO<sub>2</sub> 的 37 °C 恒温细胞培养箱中培养。

#### 1.3.3.2 MTT 法检测抗肿瘤药联用 VBRBP5-1 对 Huh7、HepG2 细胞增殖抑制作用

实验分组设置为空白组、抗肿瘤药单用组 MTX（40 µg/mL）、DDP（16 µg/mL）、10-HCPT（1 µg/mL）、40 µg/mL 的 VBRBP5-1 单用组和 VBRBP5-1 联用抗肿瘤药组。分别取对数生长期的 Huh7、HepG2 细胞株进行如下实验：将细胞以 5×10<sup>3</sup> 个/孔的密度接种到 96 孔板中并培养 24 h，吸弃孔内上清液，

用培养基稀释药物到合适浓度，100  $\mu\text{L}$ /孔，孵育 48 h。每孔加 20  $\mu\text{L}$  MTT 溶液（5 mg/mL），在 37  $^{\circ}\text{C}$  下避光孵育 4 h。吸弃孔内上清液，每孔加入 150  $\mu\text{L}$  的 DMSO，振荡 10 min，使用酶标仪在 490 nm 波长处测定溶解后结晶物的吸光度值，按公式（1）计算各组药物对肝癌细胞增殖抑制率（ $R$ ）。

$$R = [1 - (A_1 - A_2) / (A_3 - A_2)] \times 100\% \quad (1)$$

式中， $A_1$  为给药组吸光度； $A_2$  为空白组吸光度； $A_3$  为对照组吸光度。

按公式（2）计算联用指数（ $q$ ）评价 VBRBP5-1 对抗肿瘤药的增效作用<sup>[10]</sup>。

$$q = R_{a+b} / (R_a + R_b - R_a \times R_b) \quad (2)$$

式中  $R_a$  和  $R_b$  为各药单用抑制率， $R_{a+b}$  为两药联用抑制率。 $q > 1.15$  为协同作用， $0.85 \leq q \leq 1.15$  为叠加作用， $q < 0.85$  为拮抗作用。

### 1.3.4 统计分析

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析，本实验涉及的计量资料均符合正态分布，计量资料数据采用均值  $\pm$  标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，组间比较采用  $t$  检验，以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 VBRBP5 的洗脱曲线

醋柴胡药材脱脂后采用热水提取法得到醋柴胡粗多糖，除去小分子化合物和蛋白质后经膜分离系统截留得到 VBRBP1~VBRBP15 五个不同分子量段（ $>750$ 、 $100\sim750$ 、 $10\sim100$ 、 $3\sim10$  及  $<3$  kDa）的醋柴胡多糖，其中 VBRBP5（ $<3$  kDa）经 DEAE-52 进一步纯化，洗脱曲线见图 1，发现水洗脱部位 VBRBP5-1 得率最高，占分离产物总量的 94.4%。

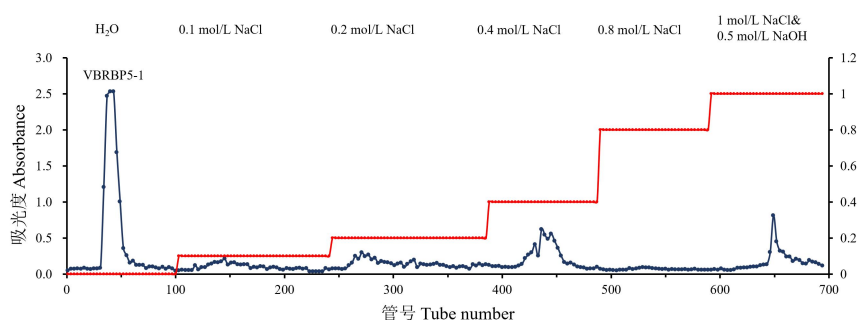


图 1 VBRBP5 的洗脱曲线

Fig. 1 Elution curve of VBRBP5

### 2.2 VBRBP5-1 的结构表征

#### 2.2.1 糖醛酸含量与相对分子量分析

HPGPC 图谱（见图 2）显示 VBRBP5-1 具有相对单一的色谱峰，说明均一性良好，该峰保留时间为 19.932 min，根据拟合的葡聚糖标准品的回归方程： $Y = -4.9763X + 42.092$ （ $R^2 = 0.9923$ ），计算出 VBRBP5-1

的相对分子量为 30.78 kDa。以 GalA 为标准品绘制的糖醛酸含量测定标准曲线： $Y=0.0327+0.0041X$  ( $R^2=0.9982$ ) 测得 VBRBP5-1 的糖醛酸含量为 2.40%。

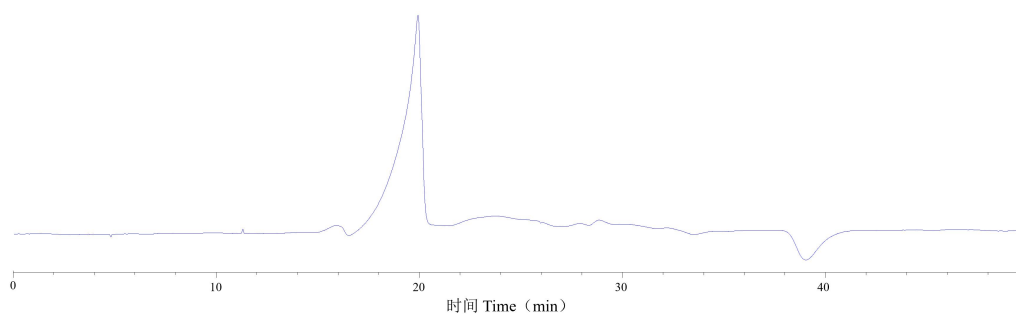


图 2 VBRBP5-1 的 HPGPC 图谱

Fig. 2 HPGPC spectrum of VBRBP5-1

### 2.2.2 单糖组成分析

通过和单糖标准品对应的保留时间比对可确认多糖中单糖的类型，这对分析多糖的结构表征及生物活性具有重要意义。VBRBP5-1 的单糖组成分析结果见图 3，比对单糖标准品推测出 VBRBP5-1 主要由 Glc、Gal 和 Ara 组成，此外还含有微量的 Man 和 GalA，相对摩尔比为 Man : GalA : Glc : Gal : Ara=1.96 : 2.38 : 58.48 : 22.85 : 14.32。

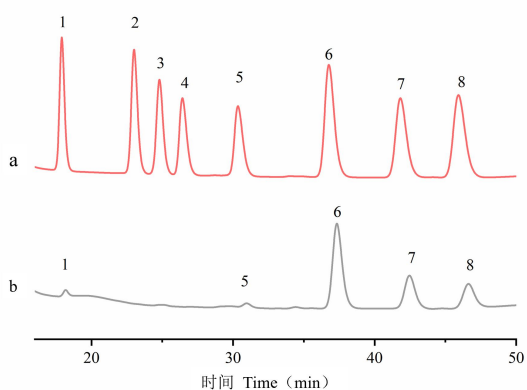


图 3 混合单糖对照品 (a) 和 VBRBP5-1 (b) PMP 衍生物的 HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC chromatogram of mixed monosaccharide reference (a) and VBRBP5-1 (b) PMP derivative

注：Note: 1. Man; 2. Rib; 3. Rha; 4. GlcA; 5. GalA; 6. Glc; 7. Gal; 8. Ara。

### 2.2.3 FT-IR 分析

VBRBP5-1 的红外光谱如图 4 所示， $3327\text{ cm}^{-1}$  附近的宽而强的 O-H 伸缩振动峰和  $2943\text{ cm}^{-1}$  处 C-H 的伸缩振动峰是糖类物质基本的 2 个特征吸收峰<sup>[11]</sup>； $1639\text{ cm}^{-1}$  是 COO<sup>-</sup> 的非对称振动吸收峰； $1400\sim 1200\text{ cm}^{-1}$  范围内出现吸收峰是 C-H 角振动吸收峰<sup>[12]</sup>；在  $1100\sim 1010\text{ cm}^{-1}$  附近出现两个吸收峰说明 VBRBP5-1

有呋喃糖；925  $\text{cm}^{-1}$  处出现吸收峰说明 VBRBP5-1 具有 $\beta$ 构型<sup>[13]</sup>。

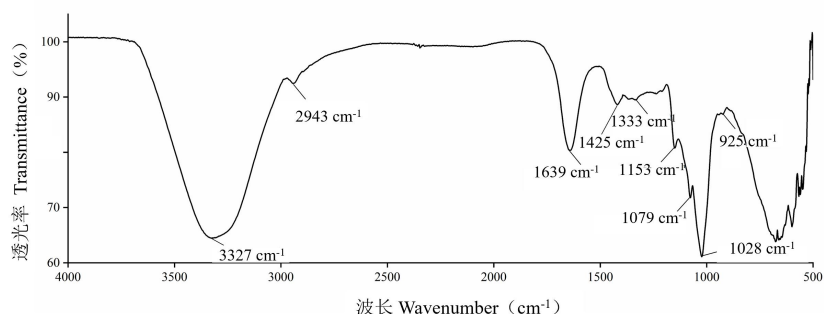


图 4 VBRBP5-1 的红外图谱

Fig. 4 Infrared spectrum of VBRBP5-1

### 2.2.4 甲基化分析

甲基化分析是研究糖苷键连接方式的最为重要和经典的方法之一。VBRBP5-1 的甲基化总离子流图（见图 5）和碎片离子信息（见图 6 和表 1）结果显示，VBRBP5-1 一共鉴定出十种糖残基：1：1-呋喃阿拉伯糖（1-arabinofuranose, T-Araf）、2：1,5-呋喃阿拉伯糖（1,5-arabinofuranose, 1,5-Araf）、3：1-吡喃葡萄糖（1-glucopyranose, T-Glcp）、4：1-吡喃半乳糖（1-galactopyranose, T-Galp）、5：1,3,5-呋喃阿拉伯糖（1,3,5-arabinofuranose, 1,3,5-Araf）、6：1,4-吡喃半乳糖（1,4-galactopyranose, 1,4-Galp）、7：1,4-吡喃葡萄糖（1,4-glucopyranose, 1,4-Glcp）、8：1,6-吡喃葡萄糖（1,6-glucopyranose, 1,6-Glcp）、9：1,4,6-吡喃葡萄糖（1,4,6-glucopyranose, 1,4,6-Glcp）、10：1,3,6-吡喃半乳糖（1,3,6-galactopyranose, 1,3,6-Galp），峰面积比分别为 6.83 : 5.94 : 9.71 : 2.12 : 4.74 : 16.30 : 45.90 : 4.67 : 1.85 : 1.94，主要的残基比例基本和单糖组成相似。

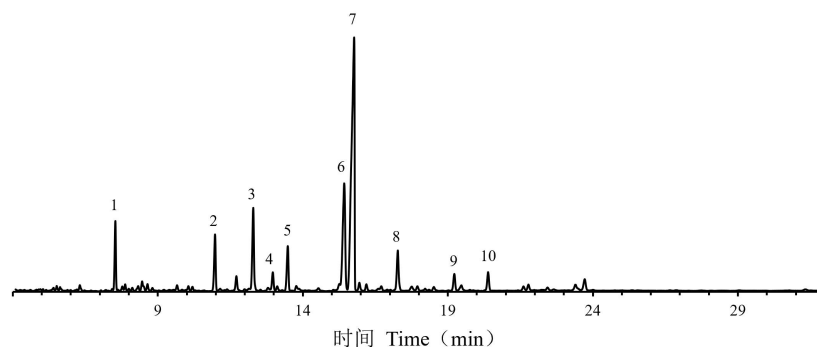


图 5 VBRBP5-1 的糖醇乙酯衍生物总离子流图

Fig. 5 Total ion chromatogram of methylated alditol acetates of VBRBP5-1



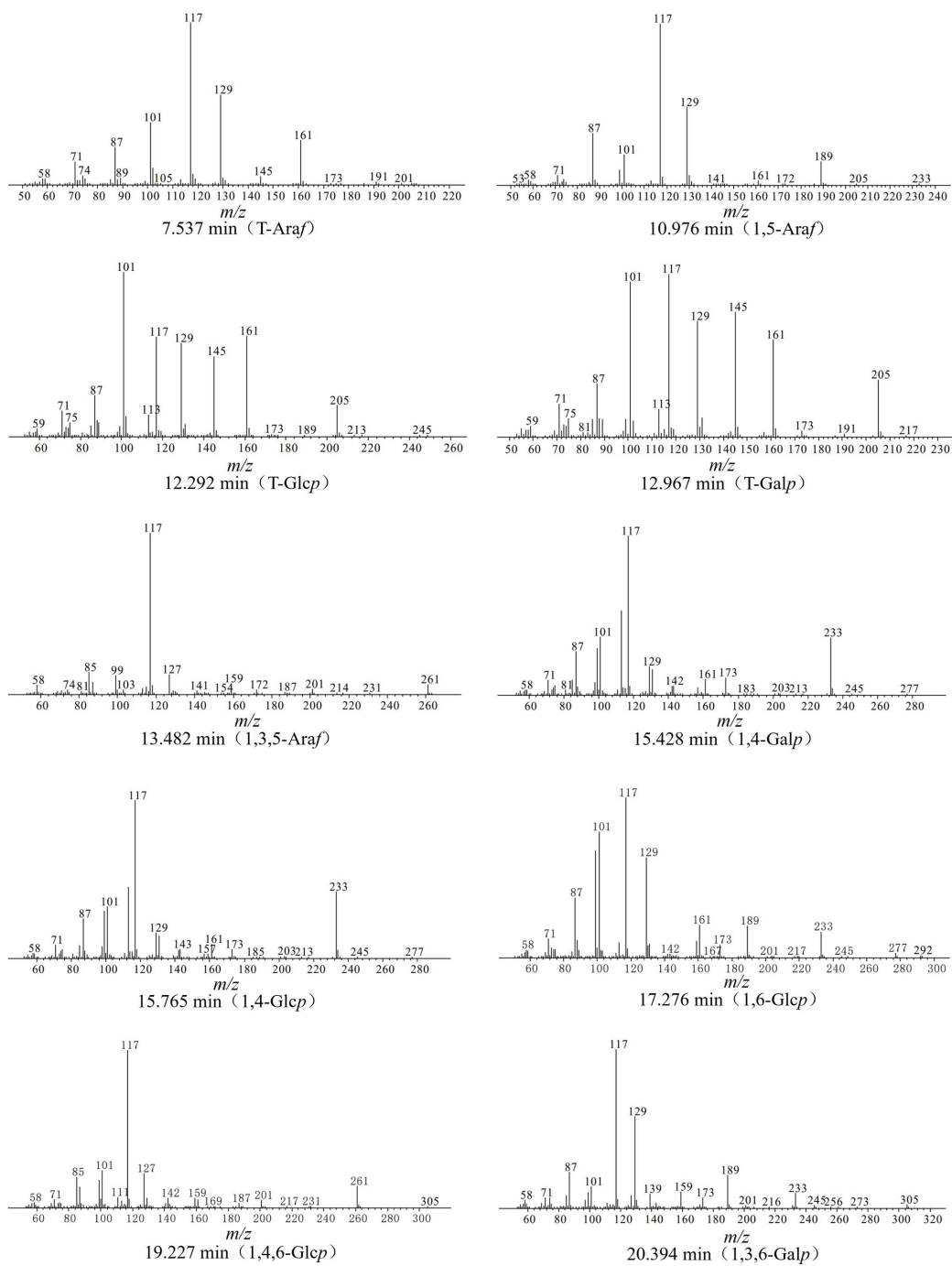


图 6 VBRBP5-1 的气质联用碎片离子峰

Fig. 6 Fragment ion peak of VBRBP5-1 by GC-MS

表 1 VBRBP5-1 甲基化分析结果

Table 1 VBRBP5-1 methylation analysis results

保留时间 Retention time (min)	峰面积比 Peak area ratio (%)	甲基化残基 Methylated residues	连接方式 Linkage type	离子碎片 Mass fragment ( <i>m/z</i> )
7.537	6.83	2,3,5-Tri- <i>O</i> -methyl-arabinitol	T-Araf	71、87、101、117、129、161
10.976	5.94	2,3-Di- <i>O</i> -methyl-arabinitol	1,5-Araf	87、101、117、129、189
12.292	9.71	2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -methyl-glucitol	T-Glcp	59、71、87、101、117、129、145、 161、205
12.967	2.12	2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -methyl-galactitol	T-Galp	57、71、87、101、117、129、145、 161、191、205
13.482	4.74	2- <i>O</i> -Methyl-arabinitol	1,3,5-Araf	85、99、117、127、159、261
15.428	16.30	2,3,6-Tri- <i>O</i> -methyl-galactitol	1,4-Galp	71、87、99、101、113、117、129、 131、142、161、173、233
15.765	45.90	2,3,6-Tri- <i>O</i> -methyl-glucitol	1,4-Glcp	71、87、99、101、113、117、129、 131、142、161、173、233
17.276	4.67	2,3,4-Tri- <i>O</i> -methyl-glucitol	1,6-Glcp	71、87、99、101、117、129、161、 173、189、233
19.227	1.85	2,3-Di- <i>O</i> -methyl-glucitol	1,4,6-Glcp	85、101、117、127、261
20.394	1.94	2- <i>O</i> -Methyl-galactitol	1,3,6-Galp	59、87、101、117、129、139、159、 189、233、305

### 2.2.5 NMR 分析

VBRBP5-1 的  $^1\text{H}$  NMR 和  $^{13}\text{C}$  NMR、HSQC、HMBC 和  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY 示于图 7 中。在  $^1\text{H}$  NMR 和  $^{13}\text{C}$  NMR 中，VBRBP5-1 的大部分质子和碳信号分别分布在  $\delta_{\text{H}}$  3.0~5.5 和  $\delta_{\text{C}}$  60~110 范围内，这是多糖的标志性位移，其中  $\delta_{\text{H}}$  4.5~5.41 为端基质子信号，其余质子信号堆叠在  $\delta_{\text{H}}$  3.0~4.2，相互交叉重叠，由于存在偶合和裂分，需要借助 HSQC 才能确定端基质子的位置； $\delta_{\text{C}}$  97~108 为端基碳信号，此范围内有几个信号，就表示有几种单糖类型，但是同种单糖的端基碳信号接近，几乎重叠，其余碳信号  $\delta_{\text{C}}$  60~83.89 是 VBRBP5-1 的单糖残基 C2~C6 信号位移的重叠，结合 HSQC 谱，可以归属 10 个端基质子和端基碳的偶合信号，分别为  $\delta_{\text{C}}$  107.3/ $\delta_{\text{H}}$  5.12、 $\delta_{\text{C}}$  107.3/ $\delta_{\text{H}}$  5.11、 $\delta_{\text{C}}$  107.3/ $\delta_{\text{H}}$  5.11、 $\delta_{\text{C}}$  104.4/ $\delta_{\text{H}}$  4.66、 $\delta_{\text{C}}$  104.4/ $\delta_{\text{H}}$  4.66、 $\delta_{\text{C}}$  103.3/ $\delta_{\text{H}}$  4.50、 $\delta_{\text{C}}$  97.9/ $\delta_{\text{H}}$  4.99、 $\delta_{\text{C}}$  99.6/ $\delta_{\text{H}}$  5.41、 $\delta_{\text{C}}$  97.9/ $\delta_{\text{H}}$  4.99、 $\delta_{\text{C}}$  99.6/ $\delta_{\text{H}}$  5.41。一般来讲  $\alpha$ -苷键端基质子信号的化学位移大于 5.0， $\beta$ -苷键端基质子信号的化学位移小于 5.0，Glc 的  $\alpha$ -苷键端基碳信号化学位移小于 101， $\beta$ -苷键端基碳信号化学位移大于 101，结合单糖组成分析可以初步判断 VBRBP5-1 主要是以  $\alpha$ 糖苷键连接的呋喃型 Ara、吡喃型 Glc 和  $\beta$ 糖苷键连接吡喃型 Gal 构成。结合各核磁谱图分析和文献报道可对各单糖残基化学位移值进

行归属<sup>[12, 14-16]</sup>, 具体数据见表 2, VBRBP5-1 的可归属出 10 种糖残基, 分别为 T- $\alpha$ -L-Araf、 $\rightarrow$ 5)- $\alpha$ -L-Araf(1 $\rightarrow$ 、 $\rightarrow$ 3,5)- $\alpha$ -L-Araf(1 $\rightarrow$ 、T- $\beta$ -D-Galp、 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Galp(1 $\rightarrow$ 、 $\rightarrow$ 3,6)- $\beta$ -D-Galp(1 $\rightarrow$ 、T- $\alpha$ -D-Glcp、 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-Glcp(1 $\rightarrow$ 、 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-Glcp(1 $\rightarrow$ 、 $\rightarrow$ 4,6)- $\alpha$ -D-Glcp(1 $\rightarrow$ , 依次标记为 A~J。以表 2 中糖残基 H ( $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-Glcp(1 $\rightarrow$ ) 的推断过程为例, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY 谱中显示的相关信号有  $\delta_{\text{H}} 5.41/\delta_{\text{H}} 3.63$ 、 $\delta_{\text{H}} 3.63/\delta_{\text{H}} 3.97$ 、 $\delta_{\text{H}} 3.97/\delta_{\text{H}} 3.66$ 、 $\delta_{\text{H}} 3.66/\delta_{\text{H}} 3.94$ 、 $\delta_{\text{H}} 3.94/\delta_{\text{H}} 3.86$ , 分别为残基 H 的 H1-H2、H2-H3、H3-H4、H4-H5、H5-H6 的相关信号, 表明残基 H 的 H2~H6 化学位移分别为  $\delta_{\text{H}} 3.63$ 、3.97、3.66、3.94、3.86。此外, 根据 HSQC 谱, 可观察到  $\delta_{\text{C}} 73.1/\delta_{\text{H}} 3.63$ 、 $\delta_{\text{C}} 74.8/\delta_{\text{H}} 3.97$ 、 $\delta_{\text{C}} 78.3/\delta_{\text{H}} 3.66$ 、 $\delta_{\text{C}} 69.5/\delta_{\text{H}} 3.94$ 、 $\delta_{\text{C}} 60.6/\delta_{\text{H}} 3.86$  的相关信号, 可判断糖残基 H 的 C2~C6 化学位移分别为  $\delta_{\text{C}} 73.1$ 、74.8、78.3、69.5、60.6, 结合文献报道的残基化学位移信息可以推断残基 H 为 Glc 残基, 连接类型为 1,4- $\alpha$ -D-Glcp (甲基化结果中含量最高)。

根据 HMBC 谱确认相邻糖残基之间的连接方式, 在 VBRBP5-1 的 HMBC 光谱 (见图 7d) 中,  $\delta_{\text{C}} 69.5/\delta_{\text{H}} 4.99$  为  $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-Glcp(1 $\rightarrow$ ) (I) 的 C-6 和 T- $\alpha$ -D-Glcp (G) 的 H-1 相关信号,  $\rightarrow$ 4,6)- $\alpha$ -D-Glcp(1 $\rightarrow$ ) (J) 的 C-6 和  $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-Glcp(1 $\rightarrow$ ) (I) 的 H-1 相关信号;  $\delta_{\text{C}} 69.5/\delta_{\text{H}} 5.41$  为  $\rightarrow$ 3,6)- $\beta$ -D-Galp(1 $\rightarrow$ ) (F) 的 C-6 和  $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-Glcp(1 $\rightarrow$ ) (H) 的 H-1 相关信号;  $\delta_{\text{C}} 78.3/\delta_{\text{H}} 5.41$  处的为  $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-Glcp(1 $\rightarrow$ ) (H) 的 C-4 和  $\rightarrow$ 4,6)- $\alpha$ -D-Glcp(1 $\rightarrow$ ) (J) 的 H-1 相关信号;  $\delta_{\text{C}} 104.4/\delta_{\text{H}} 3.66$  为  $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Galp(1 $\rightarrow$ ) (E) 的 C-1 和  $\rightarrow$ 4,6)- $\alpha$ -D-Glcp(1 $\rightarrow$ ) (J) 的 H-4 相关信号;  $\delta_{\text{C}} 104.4/\delta_{\text{H}} 4.19$  为 T- $\beta$ -D-Galp (D) 的 C-1 和  $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Galp(1 $\rightarrow$ ) (E) 的 H-4 相关信号;  $\delta_{\text{C}} 66.2/\delta_{\text{H}} 5.11$  为  $\rightarrow$ 5)- $\alpha$ -L-Araf(1 $\rightarrow$ ) (B) 的 C-5 和  $\rightarrow$ 3,5)- $\alpha$ -L-Araf(1 $\rightarrow$ ) (C) 的 H-1 相关信号,  $\rightarrow$ 3,5)- $\alpha$ -L-Araf(1 $\rightarrow$ ) (C) 的 C-5 和  $\rightarrow$ 5)- $\alpha$ -L-Araf(1 $\rightarrow$ ) (B) 的 H-1 相关信号;  $\delta_{\text{C}} 82.3/\delta_{\text{H}} 5.12$  为  $\rightarrow$ 3,5)- $\alpha$ -L-Araf(1 $\rightarrow$ ) (C) 的 C-3 和 T- $\alpha$ -L-Araf (A) 的 H-1 相关信号;  $\delta_{\text{C}} 77.6/\delta_{\text{H}} 5.11$  为  $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Galp(1 $\rightarrow$ ) (E) 的 C-4 和  $\rightarrow$ 3,5)- $\alpha$ -L-Araf(1 $\rightarrow$ ) (C)、 $\rightarrow$ 5)- $\alpha$ -L-Araf(1 $\rightarrow$ ) (B) 的 H-1 相关信号;  $\delta_{\text{C}} 77.6/\delta_{\text{H}} 4.66$  为  $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Galp(1 $\rightarrow$ ) (E) 的 C-4 和 T- $\beta$ -D-Galp (D) 的 H-1 相关信号;  $\delta_{\text{C}} 78.3/\delta_{\text{H}} 4.66$  为  $\rightarrow$ 4,6)- $\alpha$ -D-Glcp(1 $\rightarrow$ ) (J) 的 C-4 和  $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Galp(1 $\rightarrow$ ) (E) 的 H-1 相关信号。由于多糖结构复杂, NMR 谱图中信号重叠严重, 仅采用 NMR 分析难以确定糖残基的连接位点, 因此基于上述结果和文献报道<sup>[12, 14, 15]</sup>, 综合单糖组成和甲基化实验鉴定的残基及其比例, 推断 VBRBP5-1 是一种以葡萄糖和半乳糖为主链的多分支多糖, 其主链是由 T- $\alpha$ -D-Glcp (G) 的 C-1 与  $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-Glcp(1 $\rightarrow$ ) (I) 的 C-6 相连,  $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-Glcp(1 $\rightarrow$ ) (I) 的 C-1 与  $\rightarrow$ 4,6)- $\alpha$ -D-Glcp(1 $\rightarrow$ ) (J) 的 C-6 相连,  $\rightarrow$ 4,6)- $\alpha$ -D-Glcp(1 $\rightarrow$ ) (J) 的 C-1 与  $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-Glcp(1 $\rightarrow$ ) (H) 的 C-4 相连,  $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-Glcp(1 $\rightarrow$ ) (H) 的 C-1 与  $\rightarrow$ 3,6)- $\beta$ -D-Galp(1 $\rightarrow$ ) (F) 的 C-6 相连; 此外支链推出三种类型, 一是由  $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Galp(1 $\rightarrow$ ) (E) 的 C-4 与 T- $\beta$ -D-Galp (D) 的 C-1 相连, 通过  $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Galp(1 $\rightarrow$ ) (E) 的 C-1 与主链  $\rightarrow$ 4,6)- $\alpha$ -D-Glcp(1 $\rightarrow$ ) (J) 的 C-4 相连, 二是  $\rightarrow$ 3,5)- $\alpha$ -L-Araf(1 $\rightarrow$ ) (C) 的 C-1 与  $\rightarrow$ 5)- $\alpha$ -L-Araf(1 $\rightarrow$ ) (B) 的 C-5 相连, T- $\alpha$ -L-Araf (A) 的 C-1 与  $\rightarrow$ 3,5)- $\alpha$ -L-Araf(1 $\rightarrow$ ) (C) 的 C-3 相连,  $\rightarrow$ 5)- $\alpha$ -L-Araf(1 $\rightarrow$ ) (B) 的 C-1 与  $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-

Galp(1→(E))的 C-4 相连, 通过→4)-β-D-Galp(1→(E))的 C-1 与主链上→4,6)-α-D-Glcp(1→(J))的 C-4 相连; 三是→5)-α-L-Araf(1→(B))的 C-1 与→3,5)-α-L-Araf(1→(C))的 C-5 相连, T-α-L-Araf(A)的 C-1 与→3,5)-α-L-Araf(1→(C))的 C-3 相连, →3,5)-α-L-Araf(1→(C))的 C-1 与→4)-β-D-Galp(1→(E))的 C-4 相连, 通过→4)-β-D-Galp(1→(E))的 C-1 与主链上→4,6)-α-D-Glcp(1→(J))的 C-4 相连。

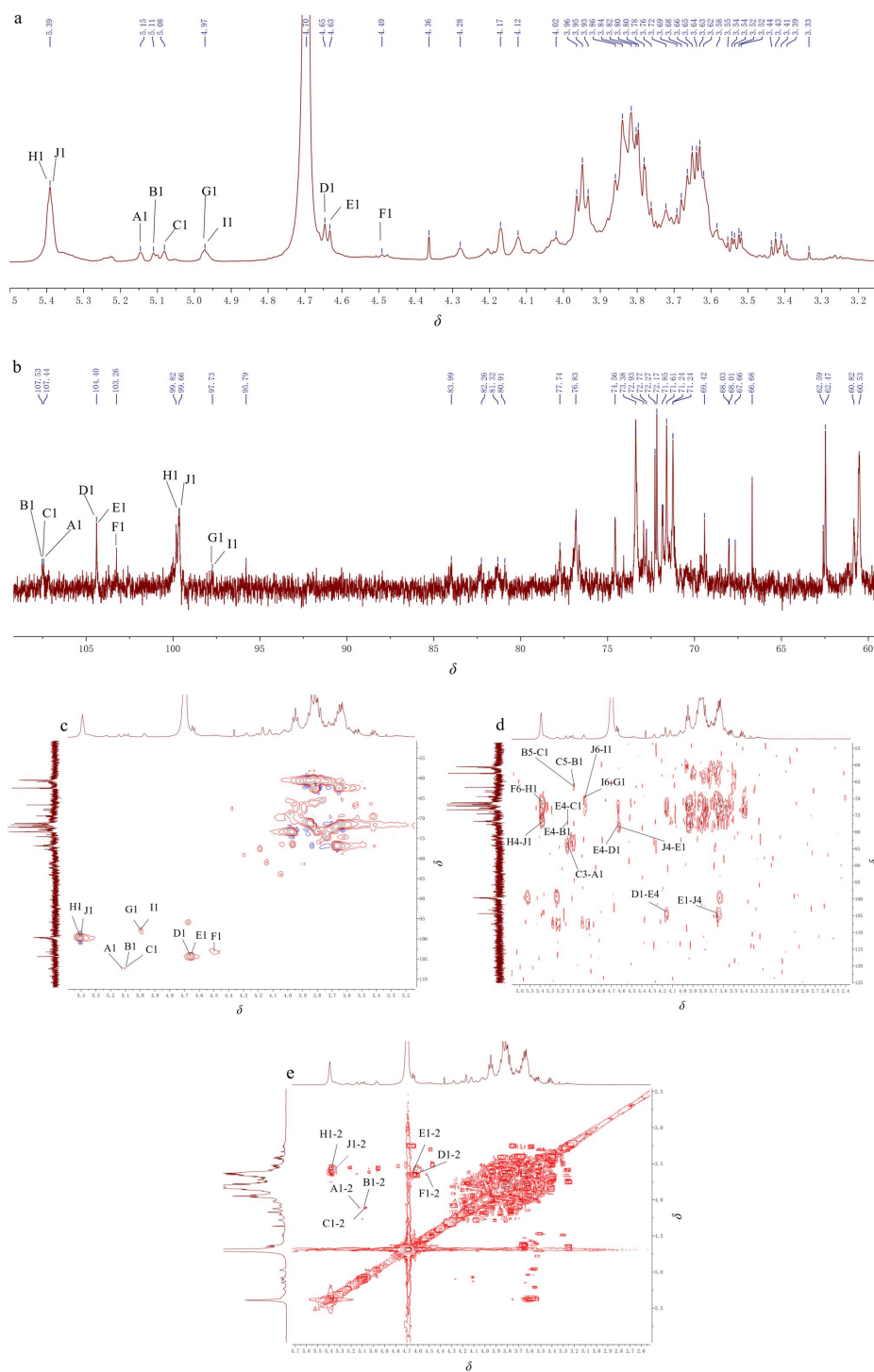


图 7 VBRBP5-1 的  $^1\text{H}$  NMR (a)、 $^{13}\text{C}$  NMR (b)、HSQC (c)、HMBC (d) 和  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (e)

Fig. 7 <sup>1</sup>H NMR (a), <sup>13</sup>C NMR (b), HSQC (c), HMBC (d) and <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY (e) spectra of VBRBP5-1

表 2 VBRBP5-1 的 <sup>1</sup>H NMR 和 <sup>13</sup>C NMR 数据

Table 2 <sup>13</sup>C NMR and <sup>1</sup>H NMR data of VBRBP5-1

编号 No.	糖残基 Sugar residue	$\delta_C/\delta_H$					
		C1/H1	C2/H2	C3/H3	C4/H4	C5/H5	C6/H6
A	T- $\alpha$ -L-Araf	107.3/5.12	81.0/4.14	76.8/3.84	83.9/4.05	62.4/3.65	—
B	→5)- $\alpha$ -L-Araf(1→	107.3/5.11	80.9/4.14	76.5/3.97	83.9/4.05	66.2/3.82	—
C	→3,5)- $\alpha$ -L-Araf(1→	107.3/5.11	80.9/4.14	82.3/4.12	83.9/4.05	66.2/3.82	—
D	T- $\beta$ -D-Galp	104.4/4.66	72.4/3.7	73.3/3.97	71.3/3.73	70.9/3.7	60.5/3.83
E	→4)- $\beta$ -D-Galp(1→	104.4/4.66	71.5/3.64	73.1/3.63	77.6/4.19	74.6/3.74	60.5/3.83
F	→3,6)- $\beta$ -D-Galp(1→	103.3/4.5	71.5/3.64	79.8/3.68	67.6/3.89	73.2/3.8	69.5/3.94
G	T- $\alpha$ -D-Glcp	97.9/4.99	67.6/3.89	—	71.7/3.79	69.5/3.94	60.6/3.86
H	→4)- $\alpha$ -D-Glcp(1→	99.6/5.41	73.1/3.63	74.8/3.97	78.3/3.66	69.5/3.94	60.6/3.86
I	→6)- $\alpha$ -D-Glcp(1→	97.9/4.99	—	—	—	—	69.5/3.94
J	→4,6)- $\alpha$ -D-Glcp(1→	99.6/5.41	73.1/3.63	74.8/3.97	78.3/3.66	69.5/3.94	69.5/3.94

### 2.3 VBRBP5-1 抗肝癌联用活性

根据课题组前期对抗肿瘤药物和 VBRBP5-1 浓度的探索，本实验选择了抑制作用较小的浓度 MTX (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、DDP (16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、10-HCPT (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、VBRBP5-1 (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 进行联用作用的分析。表 3 结果显示 MTX、DDP 和 10-HCPT 48 h 对 Huh7 细胞单用抑制率分别为 41.40%、17.74%和 27.91%，40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 VBRBP5-1 联用上述抗肿瘤的细胞抑制率均显著增加 ( $P < 0.001$ )，表现出协同增效作用，其中对 DDP 的抑制率增加了 23.4%，联用指数为 2.32，协同增效作用优于 MTX 和 10-HCPT。表 4 结果显示 MTX、DDP 和 10-HCPT 48 h 对 HepG2 细胞单用抑制率分别为 50.72%、13.42%和 54.95%，40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 VBRBP5-1 联用上述抗肿瘤的细胞抑制率均显著增加 ( $P < 0.05$ )，表现出协同增效作用，其中 10-HCPT 为相加作用，DDP 联用指数为 1.77，协同增效作用优于 MTX 和 10-HCPT。

结果显示 VBRBP5-1 对于不同抗肿瘤的联用作用不同，其中与 DDP 联用在两种肝癌细胞中均较其他抗肿瘤的显示出了更优的协同增效作用，推断 VBRBP5-1 可能更适合与 DDP 联用，这可能与多糖的结构特征等因素相关。

表 3 VBRBP5-1 联用抗肿瘤药对 Huh7 细胞体外抑制作用的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 3 Effect of VBRBP5-1 combined with antitumor agents on the inhibitory effect of Huh7 cells in vitro ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

抗肿瘤药 Antineoplastic	抑制率 Inhibition rate (%)		联用指数 Combination index	作用评价 Function evaluation
	单用 Monotherapy	联用 VBRBP5-1 Combination with VBRBP5-1		
MTX (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	41.40 $\pm$ 3.30	57.52 $\pm$ 3.31***	1.39	协同
DDP (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	17.74 $\pm$ 3.10	41.14 $\pm$ 3.24***	2.32	协同
10-HCPT (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	27.91 $\pm$ 4.68	42.86 $\pm$ 2.72***	1.54	协同

注：与抗肿瘤药单用抑制率比较，\*\*\* $P < 0.001$ 。

Note: Compared with the inhibition rates of antineoplastic monotherapy, \*\*\* $P < 0.001$ .

表 4 VBRBP5-1 联用抗肿瘤药对 HepG2 细胞体外抑制作用的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 4 Effect of VBRBP5-1 combined with antitumor agents on the inhibitory effect of HepG2 cells in vitro ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

抗肿瘤药 Antineoplastic	抑制率 Inhibition rate (%)		联用指数 Combination index	作用评价 Function evaluation
	单用 Monotherapy	联用 VBRBP5-1 Combination with VBRBP5-1		
MTX (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	50.72 $\pm$ 8.93	73.01 $\pm$ 3.24**	1.42	协同
DDP (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	13.42 $\pm$ 6.64	30.04 $\pm$ 6.41**	1.77	协同
10-HCPT (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	54.95 $\pm$ 3.11	59.99 $\pm$ 2.67*	1.09	叠加

注：与抗肿瘤药单用抑制率比较，\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the inhibition rates of antineoplastic monotherapy, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

### 3 讨论与结论

天然多糖已被报道具有免疫、抗肿瘤、抗氧化等多种药理活性<sup>[17]</sup>，且其生物活性与理化性质、分子量、单糖组成、糖苷键种类、取代基的种类及取代程度等密切相关<sup>[18]</sup>，因此解析多糖表征和结构对其生物活性的研究具有重要意义。在多糖的构效关系研究中发现 Ara、Gal 和 Glc 可能与活性具有密切相关性。从柴胡根中分离出的以 Ara、Gal、Glc、GalA 为主的水溶性柴胡多糖能够将 H22 肝癌细胞的生长周期停滞在 S 期诱导细胞凋亡从而抑制 H22 肝癌细胞的快速增殖进而抑制小鼠 H22 肿瘤生长<sup>[19]</sup>；天府花生叶片多糖主要由 Glc、Ara、Gal 和木糖组成，其能够抑制腹水癌细胞 (S180)、小鼠胃癌细胞 (MFC) 的增殖<sup>[20]</sup>。最新

研究还发现 Ara 和 Glc 的比例与化疗药物组合的协同抗肝癌活性呈正相关, 其中 T- $\alpha$ -Araf、 $\rightarrow$ 5)- $\alpha$ -Araf(1 $\rightarrow$ 、 $\rightarrow$ 3,5)- $\alpha$ -Araf(1 $\rightarrow$ 结构片段的组合活性贡献度最大<sup>[6]</sup>。目前大多数报道的柴胡多糖主要由 Glc、Ara、Gal、Man、GalA、Rha 和 GlcA 等组成, 分子量范围为 5~2 010 kDa<sup>[21]</sup>。常见的连接残基如 1,6-Glcp、1,3-Glcp 和 1,3,6-Glcp; 1,5-Araf, 1,3,5-Araf; 1,4-Galp、1,6-Galp 和 1,4,6-Galp; 1,4-Manp 和 1,4,6-Manp 等<sup>[12]</sup>。本研究所得 VBRBP5-1 是醋柴胡中分离出的以 Glc、Gal 和 Ara 为主的均一多糖。其相对分子量为 30.78 kDa, 糖醛酸含量为 2.40%, 单糖组成为 Man、GalA、Glc、Gal 和 Ara, 摩尔比为 1.96 : 2.38 : 58.48 : 22.85 : 14.32。结构中包含 T- $\alpha$ -L-Araf、 $\rightarrow$ 5)- $\alpha$ -L-Araf(1 $\rightarrow$ 、 $\rightarrow$ 3,5)- $\alpha$ -L-Araf(1 $\rightarrow$ 、T- $\beta$ -D-Galp、 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Galp(1 $\rightarrow$ 、 $\rightarrow$ 3,6)- $\beta$ -D-Galp(1 $\rightarrow$ 、T- $\alpha$ -D-Glcp、 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-Glcp(1 $\rightarrow$ 、 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-Glcp(1 $\rightarrow$ 和 $\rightarrow$ 4,6)- $\alpha$ -D-Glcp(1 $\rightarrow$ 糖残基片段。主链由 Glc 和 Gal 构成, 且含有支链, 支链与主链节点处存在 $\rightarrow$ 4,6)- $\alpha$ -D-Glcp(1 $\rightarrow$ 。主链含有 T- $\alpha$ -D-Glcp $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 、 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-Glcp(4)-(1 $\rightarrow$ 、 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-Glcp(4)-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 、 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Galp(3)-(1 $\rightarrow$ 等结构片段, 支链主要含有 T- $\beta$ -D-Galp $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 、 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-Glcp(6)-(1 $\rightarrow$ 和 T- $\alpha$ -L-Araf $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-Araf(5)-(1 $\rightarrow$ 、 $\rightarrow$ 5)- $\alpha$ -L-Araf(3)-(1 $\rightarrow$ 5)- $\alpha$ -L-Araf-(1 $\rightarrow$ 、 $\rightarrow$ 5)- $\alpha$ -L-Araf-(1 $\rightarrow$ 5)- $\alpha$ -L-Araf(3)-(1 $\rightarrow$ 、 $\rightarrow$ 5)- $\alpha$ -L-Araf-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 、 $\rightarrow$ 5)- $\alpha$ -L-Araf(3)-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 等残基片段, 通过对比已知的柴胡多糖可知 VBRBP5-1 所含有的主链连接类型、分支连接位点等均与所知醋柴胡多糖不同<sup>[21]</sup>, 为新分离得到的多糖, 研究结果进一步丰富了醋柴胡多糖的结构信息。同时, 本研究发现 VBRBP5-1 能增强 10-HCPT、MTX 和 DDP 对 Huh7 和 HepG2 两种肝癌细胞的抑制率, 体现出其在肝癌化疗增效方面的巨大潜力, 有望开发成为化疗药联用的功能性辅料。结合前期研究醋柴胡多糖主要通过影响膜转运蛋白介导药物的内流和外排发挥协同增效作用<sup>[4, 22]</sup>, 而本研究的化疗药物 MTX、DDP 和 10-HCPT 是乳腺癌耐药蛋白 (breast cancer resistant protein, BCRP)、多药耐药蛋白 2 (multidrug resistance protein, MRP2) 和 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 等 ABC 转运蛋白 (ATP-binding cassette transporter) 的底物, 目前, ABC 转运蛋白已被证实是包括肝癌在内的大部分癌症产生耐药的主要因素之一<sup>[23, 24]</sup>, 从而我们推测 VBRBP5-1 协同化疗药增效的作用与影响 ABC 转运蛋白等外排型转运蛋白逆转耐药有关, 因此这可能是后续进行机制研究的方向之一。

综上所述, 本研究分离出了一种能够与多种肝癌化疗药物联用增效的醋柴胡中性均一多糖 VBRBP5-1, 并使用 HPGPC-RID、GC-MS、NMR 等方法解析了其结构, 为进一步丰富醋柴胡多糖的结构信息和阐明醋柴胡多糖协同抗肝癌作用及其机理具有重要的意义。

#### 参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典: 第一部)[M]. Beijing: China Medical Science Press. 2020: 293.
- 2 Wang JQ. Exploring the effect of enhancing liver-targeting of rein by vinegar-baked Radix Bupleuri based on HNF1a/HNF4a[D]. Guangdong: Guangdong Pharmaceutical University (广东药科大学), 2019.

- 3 Zhao Y,Wang JQ,Liu LJ,et al.Different parts of vinegar-baked Bupleuri Radix water extract affect the distribution of rhein and hepatic nuclear factor 1/4 $\alpha$  by single administration[J].Cent South Pharm(中南药学),2024,22:1812-1816.
- 4 Wu YY,Liu LJ,Zhao Y,et al.Polysaccharides of vinegar-baked *radix bupleuri* promote the hepatic targeting effect of oxymatrine by regulating the protein expression of HNF4 $\alpha$ ,Mrp2,and OCT1[J].J Ethnopharmacol,2021,267:113471.
- 5 Hu QY,et al.Recent advances of cocktail chemotherapy by combination drug delivery systems[J].Adv Drug Deliv Rev,2016,98:19-34.
- 6 Wang XS,Gan JF,Han MH,et al.Comparison of structure and the synergistic anti-hepatocellular carcinoma effect of three polysaccharides from vinegar-baked Radix Bupleuri[J].Int J Biol Macromol,2024,282:136755.
- 7 Wu HY,Yu TY,Tian Y,et al.Enhanced liver-targeting via coadministration of 10-hydroxycamptothecin polymeric micelles with vinegar baked Radix Bupleuri[J].Phytomedicine,2018,44:1-8.
- 8 Bai RB,Ma YL,Zhang P,et al.Content determination of saccharide in polysaccharides containing galacturonic acid by phenol-sulfuric acid method combined with calibration factor method[J].Chin Pharm(中国药房),2017,281:2974-2978.
- 9 Bailly C,Hecquet PE,Kouach M,et al.Chemical reactivity and uses of 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone(PMP),also known as edaravone[J].Bioorg Med Chem,2020,28:115463.
- 10 Ding M,Dong CF,Mao YF,et al.A combined network pharmacology and molecular biology approach to investigate the potential mechanisms of G-M6 on ovarian cancer[J].Bioorg Chem,2023,138:106657.
- 11 Zhou LQ,Huang Y,Lu Y,et al.Structural identificatin and in vitro antitumor activity of wild *Morchella esculenta* polysaccharide from Xiaojin County of Sichuan Province[J].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2022,34:2077-2088.
- 12 Wang XS,Zhao Y,Wu YY,et al.Size,surface charge and flexibility of vinegar-baked Radix Bupleuri polysaccharide affecting the immune response[J].Arab J Chem,2022,15:104008.
- 13 Wang KP,Zhang QL,Liu Y,et al.Structure and inducing tumor cell apoptosis activity of polysaccharides isolated from *Lentinus edodes*[J].J Agric Food Chem,2013,61:9849-9858.
- 14 Huang CF,Jing XQ,Wu QH,et al.Novel pectin-like polysaccharide from *Panax notoginseng* attenuates renal tubular cells fibrogenesis induced by TGF- $\beta$ [J].Carbohydr Polym,2022,276:118772.
- 15 Wang KL,Lu ZM,Mao XJZ,et al.Structural characterization and anti-alcoholic liver injury activity of a polysaccharide from *Coriolus versicolor* mycelia[J].Int J Biol Macromol,2019,137:1102-1111.
- 16 Fan YJ,Lin MC,Luo AS,et al.Characterization and antitumor activity of a polysaccharide from *Sarcodia ceylonensis*[J].Molecules,2014,19:10863-10876.
- 17 Yang FD,et al.Radix Bupleuri:a review of traditional uses,botany,phytochemistry,pharmacology,and toxicology[J].Biomed Res Int,2017,2017:7597596.
- 18 Li XL,Bai QF,Sun TJ,et al.Structural characterization and antioxidant activity of *Dendrobium officinale* polysaccharides[J].Sci Technol Food Ind(食品工业科技),2024,45:32-39.
- 19 Shi SY,Chang ML,Liu HP,et al.The structural characteristics of an acidic water-soluble polysaccharide from *Bupleurum chinense* DC and its *in vivo* anti-tumor activity on H22 tumor-bearing mice[J].Polymers,2022,14:1119.
- 20 Lu RJ,Xia YL,You Y,et al.Structural identification,*in vitro* immunomodulatory and antitumor activities of polysaccharides AHL-P from *Arachis hypogaea* leaves[J].Food Sci(食品科学),2023,44:45-54.
- 21 Yu XY,et al.Extraction,purification,structure characteristics,biological activities and pharmaceutical application of Bupleuri Radix polysaccharide:a review[J].Int J Biol Macromol,2023,237:124146.
- 22 Liu LJ,Zhao Y,Wu YY,et al.Synergistic effect of polysaccharide from vinegar-baked Radix Bupleuri with lamivudine against hepatitis B virus *in vitro*[J].World Chin Med(世界中医药),2023,18:1079-1084.
- 23 Galetin A,et al.Membrane transporters in drug development and as determinants of precision medicine[J].Nat Rev Drug Discov,2024,23:255-280.
- 24 Zhan WB,Wang CH.Convection enhanced delivery of chemotherapeutic drugs into brain tumour[J].J Control Release,2018,271:74-87.



收稿日期: 2024-07-11

接受日期: xxxx-xx-xx

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82074086, 82173981)

\*通信作者 Tel: 13423631120; E-mail: 13423631120@163.com