

菊花多糖的结构特征及其对 NF- κ B 和肿瘤细胞的活性研究

范灵婧^{1,2}, 倪鑫炎², 吴纯洁^{1*}, 丁 侃^{2*}

1. 成都中医药大学, 四川 成都 611137

2. 中国科学院上海药物研究所 糖化学与糖生物学实验室, 上海 201203

摘要: 目的 阐明菊花多糖的结构特征, 研究其对 NF- κ B 和肿瘤细胞的活性。方法 以杭菊花、怀菊花和亳菊花为原料药材, 经水提醇沉、离子交换树脂和凝胶过滤柱色谱分离纯化, 获得 6 种中性均一多糖。应用高效凝胶渗透色谱 (HPGPC)、红外光谱 (IR)、气相色谱 (GC) 及气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 等方法对其一级结构特征进行初步分析, 同时运用 6 种菊花多糖对胰腺癌 (PANC-1) 和肝细胞 (LO2) 的 MTT 实验及 NF- κ B 信号激活实验进行了活性测定。结果 6 种多糖 CMTA0S1、CMTA0S3、CMJA0S1、CMJA0S2、CMBA0S1 和 CMBA0S3 的重均相对分子质量依次为 7.52×10^4 、 7.80×10^3 、 7.80×10^4 、 1.04×10^4 、 5.79×10^4 和 1.35×10^4 , 其中 CMTA0S1、CMJA0S1 和 CMBA0S1 主要由半乳糖、阿拉伯糖和葡萄糖组成, 物质的量比分别为 1.23 : 1.00 : 0.20、2.18 : 1.00 : 0.53 和 3.30 : 1.00 : 0.75; CMTA0S3、CMJA0S2 和 CMBA0S3 主要由半乳糖、阿拉伯糖、葡萄糖和甘露糖组成, 物质的量比分别为 0.73 : 1.00 : 0.40 : 0.21、1.39 : 1.00 : 0.84 : 0.55 和 1.19 : 1.00 : 0.48 : 0.19。6 种菊花多糖以末端-呋喃阿拉伯糖、1, 5-呋喃阿拉伯糖、1, 4-吡喃半乳糖、1, 3, 6-吡喃半乳糖和 1, 4-吡喃葡萄糖 5 种连接方式为主。生物活性研究表明菊花多糖均对胰腺癌 PANC-1 细胞具有明显抑制作用, 以杭菊花多糖 CMTA0S3 和怀菊花多糖 CMJA0S2 抑制率最强, 接近 70% 且呈现出良好的浓度依赖性。针对核因子 NF- κ B 活性实验结果显示, 菊花多糖中只有粗多糖 CMBA 表现出较强的免疫抑制活性, 而均一多糖 CMTA0S1 和 CMJA0S1 则显示出潜在的免疫激活活性。**结论** 3 种菊花中的 6 种中性多糖结构具有一定程度的相似性, 对胰腺癌 PANC-1 细胞具有良好的抑制作用, 且对 NF- κ B 活性有明显调节作用。

关键词: 菊花; 中性多糖; 胰腺癌细胞; 肝细胞; NF- κ B

中图分类号: R284.18 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253 - 2670(2013)17 - 2364 - 08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.17.006

Structure features of polysaccharides from *Chrysanthemum morifolium* and their activities against tumor cells and NF- κ B

FAN Ling-jing^{1,2}, NI Xin-yan², WU Chun-jie¹, DING Kan²

1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. Glycochemistry & Glycobiology Laboratory, Shanghai Institutes of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China

Abstract: Objective To clarify the structure features of polysaccharides from *Chrysanthemum morifolium* (PCM) and to study their activities against tumor cells and NF- κ B. **Methods** Six homogeneous neutral polysaccharides were obtained from three kinds of *C. morifolium* (Hangju, Huaiju, and Boju) flowers by successive hot water extraction, followed by ethanol precipitation, ion-exchange chromatography, and gel permeation chromatography. Their primary structures were characterized by HPGPC, IR, GC, and GC-MS analyses. Their bioactivities were examined by MTT assay using PANC-1 and LO2 cells. In addition, NF- κ B signaling activation in PANC-1 and LO2 cells treated by polysaccharides were also measured. **Results** The weight-average molecular mass of the six PCM, CMTA0S1, CMTA0S3, CMJA0S1, CMJA0S2, CMBA0S1, and CMBA0S3 was 7.523×10^4 , 7.80×10^3 , 7.80×10^4 , 1.04×10^4 , 5.79×10^4 , and 1.35×10^4 , respectively. CMTA0S1, CMJA0S1, and CMBA0S1 mainly contained galactose (Gal), arabinose (Ara) and glucose (Glc) residues in molar ratio of 1.23 : 1.00 : 0.20, 2.18 : 1.00 : 0.53, and 3.30 : 1.00 : 0.75, while CMTA0S3, CMJA0S2, and CMBA0S3 mainly contained Gal, Ara, Glc, and mannose (Man) residues in molar ratio of 0.73 : 1.00 : 0.40 : 0.21, 1.39 : 1.00 : 0.84 :

收稿日期: 2013-04-22

基金项目: 国家杰出青年科学基金资助项目 (8112525)

作者简介: 范灵婧 (1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药新制剂、新剂型、新技术研究。E-mail: fanlingjing@foxmail.com

*通信作者 吴纯洁 E-mail: wcj-one@263.net

丁 侃 E-mail: kding@mail.shcnc.ac.cn

0.55, and 1.19 : 1.00 : 0.48 : 0.19. Methylation analysis indicated that six PCM primarily consisted of T-arabinofuranosyl, 1, 5-arabinofuranosyl, 1, 4-galactopyranosyl, 1, 3, 6-galactopyranosyl, and 1, 4-glucopyranosyl residues. The biological activity study suggested that all the PCM could inhibit the growth of PANC-1 cells. Among them the inhibitory rates of CMTA0S3 and CMJA0S2 were at most to 70% with concentration-effect relationship. The NF- κ B inhibition test indicated that only the crude polysaccharide CMBA had strong immunosuppressive activity, and homogeneous polysaccharides CMTA0S1 and CMJA0S1 showed potential immunostimulation. **Conclusion** The six homogeneous polysaccharides share similar structures and inhibition on PANC-1 cells growth. Meanwhile they also may regulate the NF- κ B activation.

Key words: *Chrysanthemum morifolium* Ramat.; neutral polysaccharide; PANC-1 cell; LO2 cell; NF- κ B

菊花系菊科植物菊 *Chrysanthemum morifolium* Ramat. 的干燥头状花序, 按其产地和加工方法不同, 可分为杭菊、亳菊、贡菊、滁菊、祁菊、怀菊、济菊、黄菊等品种^[1]。作为一种药食同源的传统中药, 菊花深受历代医家的喜爱, 东汉《神农本草经》把菊花列为上品。菊花性凉, 味甘、苦。归肺、肝经。具有散风清热、平肝明目、清热解毒之功效, 主治风热感冒、头痛眩晕、目赤肿痛、眼目昏花、疮痍肿毒等症^[2]。目前, 国内外对菊花的研究多集中在萜类、黄酮类和微量元素等小分子有效成分的提取分离及应用方面。多糖是菊花水溶性成分中主要成分之一, 但对菊花中多糖的研究多局限于提取工艺以及粗多糖生物活性问题的探讨, 对其中均一多糖的报道甚少。

核因子 NF- κ B (nuclear factor- κ B) 的持续激活会导致一些疾病的发生, 例如癌症、类风湿性关节炎、慢性炎症等, 因此 NF- κ B 已经成为开发治疗上述疾病药物的重要靶标^[3-4]。菊花中的小分子化合物, 如萜类已被证实有好的抗炎活性, 但大分子化合物多糖的抗炎活性尚无相关报道。胰腺癌是消化道常见的恶性肿瘤之一, 多发生于胰头部^[5]。一般认为胰腺癌对于放疗和化疗均不敏感, 手术成功率低, 病情恶变快, 多数药物的近期有效率低于 10%, 且对病人有较大的副作用, 因此寻找更好的候选药物势在必行。

根据国内外文献报道多糖除通过免疫激活来达到抗肿瘤的作用外, 也可以直接作用于肿瘤细胞, 以抑制肿瘤细胞的生长。为深入诠释菊花的药效物质基础, 本实验选取 3 种代表性菊花 (杭菊花、怀菊花和亳菊花) 为原料药材, 对其中多糖的化学结构和生物活性进行了较系统的研究, 并报道了 6 种菊花中性均一多糖的部分结构特征及其靶向核因子 NF- κ B 和抗肿瘤的活性分析。

1 材料、试剂与仪器

1.1 材料

杭菊花 (产地: 浙江桐乡)、怀菊花 (产地: 河

南焦作)、亳菊花 (产地: 安徽亳州), 生药材均购自上海东胡庆余堂国药号有限公司, 由中国药科大学李萍教授鉴定为杭菊 *Chrysanthemum morifolium* cv. Hangju、怀菊 *Chrysanthemum morifolium* cv. Huaiju 和亳菊 *Chrysanthemum morifolium* cv. Boju 的头状花序。

DEAE-Cellulose (英国 Whatman 公司), Sephacryl S—300 HR (瑞典 Pharmacia 公司), 透析袋 (分子截留为相对分子质量 3 500, 上海绿鸟公司), DC-Alufolien 型纤维素薄层色谱板 (德国 Merck 公司)。

细胞系: HEK293/NF- κ B-Luc; 稳转 NF- κ B, 转染方法^[6]为: 用人 TLR4A、MD2 和 CD14 基因稳转 HEK293 细胞, 细胞系以 DMEM 培养基 (美国 Thermo 公司) 培养, 培养基中含 10% 血清 (美国 Gibco 公司)、100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素, 培养条件为 37 °C 含 5% CO₂。将 NF- κ B 荧光素报告质粒 pNF κ B-TA-Luc 与空白质粒 pCDNA3.1 用 Lipofectamine 2 000 (美国 Invitrogen 公司) 进行共转。融合后, 将细胞换到含 0.8 mg/mL G418 (德国 Merck 公司) 完全培养基中继续培养。3 周后分离形成的单克隆, 用 1 μ g/mL LPS (美国 Sigma 公司) 作为刺激物在虫荧光素酶检测系统中 (美国 Promega 公司) 进行检测。约 2 个月后可得到作为后续实验的稳定株。人胰腺癌细胞株 PANC-1 和人正常肝细胞株 LO2 (中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库, 中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心)。

1.2 试剂

单糖标准品: L-鼠李糖、L-阿拉伯糖、D-木糖、D-甘露糖、D-半乳糖和 D-葡萄糖 (美国 Fluka 公司), 已知相对分子质量的标准品: Dextran T- (末端-) 2 000、T-700、T-580、T-500、T-80、T-70、T-40、T-11、T-9.3 和 T-4 (瑞典 Pharmacia 公司), 碘甲烷 (上海中国远航试剂厂), 牛血清白蛋白 (BSA, 电

泳级, 北京红星生物化学制品厂), 硼氢化钠 (NaBH_4)、三氟乙酸 (TFA) 和二甲基亚砷 (DMSO) (德国 Merck 公司), 盐酸、硫酸、苯酚等其他试剂均为国产 AR 级试剂。

1.3 仪器

B5—1 磁力搅拌器、BSZ—100 自动部分收集器和 HL—2 恒流泵 (上海青浦沪西仪器厂), Modulyo 型冷冻干燥器 (英国 Edwards 公司), 日立 20PR—52D 型高速离心机 (日本 Hitachi 公司), 752N 紫外可见分光光度计 (上海精科仪器有限公司), Perkin-Elmer 599B 型红外分光光度计 (美国 Perkin-Elmer 公司), II 级生物安全柜 (上海立康生物医疗科技公司), serial II 细胞培养箱 (美国 Thermo 公司), Novostar 全波长双板多功能仪/酶标仪 (美国 BMG Labtech 公司)。

GC 用岛津 GC—14BPF 型气相色谱仪, 色谱柱为 3% OV-225/AW-DMCS-Chromosorb W 玻璃填充柱 (2.5 m×3 mm), 柱温: 210 °C (糖组成分析)、190 °C (甲基化分析), 进样室温度: 240 °C, 氢焰离子法 (FID) 检测, 检测室温度: 250 °C。GC-MS 用 Finnigan FD—800 型气相色谱仪, 色谱柱为 HP-1 毛细管柱 (25 m×0.25 mm, I.D.), 柱温: 200 °C (13 min) 梯度升温至 250 °C (20 min), 总离子法 (TIC) 检测, 温度: 250 °C。高效凝胶渗透色谱 (HPGPC) 用 Agilent 1260 Series 高效液相系统, Ultrahydrogel™ 2 000 和 Ultrahydrogel™ 500 串联柱, G1362A 示差检测器, Millenium³² 版数据处理软件, 流动相为 0.1 mol/L 的 NaNO_3 溶液, 柱温 25 °C, 体积流量为 0.5 mL/min。

2 方法

2.1 粗多糖的提取

3 种干燥菊花药材各取 3.8 kg, 分别加入 95% 乙醇脱脂 2 次, 每次 3 d。干燥脱脂后的菊花用 10 倍体积沸水提取, 每次 4 h, 硫酸-苯酚法^[7]检测提取液的含糖量, 直至糖反应不明显。合并提取液, 加热浓缩至合适体积后, 离心, 上清液用流动水透析 2 d, 以除去色素和小分子无机物。透析袋内液浓缩至约 5 L, 离心后取上清液用 4 倍体积 95% 乙醇于 4 °C 下进行沉淀, 静置过夜后离心。沉淀物用无水乙醇和丙酮依次洗涤 2 次后, 于 50 °C 真空干燥器中干燥, 得到菊花水提粗多糖。

2.2 DEAE-纤维素阴离子柱色谱纯化

上述 3 种粗多糖经 Lowry 法^[8]测定后, 蛋白量

均在 5% 以下, 表明不需除蛋白可进一步分离纯化。粗多糖首先利用 DEAE-纤维素阴离子交换柱 (50 cm×5 cm) 色谱进行分离, 用去离子水进行洗脱, 硫酸-苯酚法跟踪检测, 合并洗脱单一高峰部分, 浓缩至小体积后对去离子水透析, 冷冻干燥后得到次级粗多糖。

2.3 Sephacryl S-300 柱色谱纯化

经 DEAE-纤维素阴离子交换柱分离所得的次级粗多糖用 Sephacryl S-300 柱 (90 cm×2.6 cm) 进一步分离纯化, 以 0.2 mol/L NaCl 溶液作为平衡和洗脱液, 用硫酸-苯酚法跟踪检测, 合并洗脱单一高峰部分, 浓缩至小体积后对去离子水透析, 冷冻干燥后得到均一菊花多糖 (polysaccharides from *Chrysanthemum morifolium*, PCM)。

2.4 相对分子质量测定^[9-10]

取已知相对分子质量的 Dextran T-系列标准葡聚糖 T-2 000、T-700、T-580、T-500、T-110、T-80、T-70、T-40、T-11、T-9.3 和 T-4, 分别用流动相配制成 1% 的溶液, 10 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 每次进样 20 μL , 以相对分子质量的对数值对保留时间作标准曲线。样品按上述方法操作, 然后根据标准曲线计算出该多糖的相对分子质量。

2.5 红外光谱分析

取“2.3”项下制得的均一多糖样品各 2 mg, 与 150~200 mg 经干燥的 KBr 粉末在红外灯下研磨均匀, 压成薄片, 进行红外光谱扫描。

2.6 糖组成分析^[11-12]

取“2.3”项下制得的均一多糖样品各 2 mg, 加 4 mL 2 mol/L TFA, 于 110 °C 下水解 2 h, 加甲醇于 40 °C 反复减压浓缩至干, 以除尽 TFA。残余物用 0.5 mL 蒸馏水溶解, 取 5 μL 在纤维素板上与标准单糖对照进行薄层分析, 展开剂为醋酸乙酯-吡啶-水-乙酸 (5:5:3:1), 显色剂为苯胺-邻苯二酸, 于 110 °C 加热 10 min 显色。加 25 mg NaBH_4 在剩余溶液中, 室温下还原 3 h, 然后用 25% 乙酸中和至 pH 值在 4~5。加甲醇数次减压蒸干以除去反应副产物硼酸及水后, 加 2 mL 乙酸酐, 于 100 °C 下反应 1 h, 反应液加甲苯数次减压浓缩至形成干燥粉末。用氯仿萃取乙酰化产物, 加入等体积水洗涤 4 次后, 用无水硫酸钠干燥氯仿层, 减压浓缩后进行 GC 分析。

2.7 糖残基连接方式分析^[13]

取 10 mg 经 P_2O_5 充分干燥后的多糖样品, 加 3

mL 干燥 DMSO, 通 N₂ 后密塞, 于室温下搅拌 10 min 后快速加入 25 mg 干燥 NaOH 粉末, 搅拌 15 min 后置于冰水浴中, 逐滴加入 0.6 mL 碘甲烷, 室温下继续反应 30 min, 加入 2 mL 蒸馏水终止反应。减压除去过量碘甲烷后, 对去离子水透析并冻干。重复上述操作 3 次后, 取少量甲基化产物用石蜡膜法进行红外光谱检测, 若红外光谱中 3 300 cm⁻¹ 左右的 O-H 振动吸收峰消失, 同时 1 000~1 400 cm⁻¹ 的 C-O 振动吸收峰显著增强, 则表明样品已经完全甲基化, 否则需要继续反应。将已完全甲基化的多糖样品溶于 3 mL 90% 甲酸溶液中, 于 100 °C 下解聚 6 h, 反应液加甲醇多次减压蒸干除去过量甲酸。依次进行 TFA 水解、NaBH₄ 还原、乙酰化和氯仿萃取, 方法同“2.6”项下所述, 制得部分甲基化的阿尔迪醇乙酯衍生物, 减压浓缩后进行 GC-MS 分析。

2.8 抗肿瘤细胞活性分析

将处于对数生长期的 PANC-1 和 LO2 细胞 100 μL/孔分别接种于 96 孔微量培养板内, 细胞浓度为 5×10⁵、8×10⁵ 个/mL, 于 37 °C 含 5% CO₂ 培养箱孵育 24 h。分别加入含有空白对照组、阳性药物对照组和多糖样品组的培养基溶液 100 μL, 使其终质量浓度为 4.1、12.3、37.0、111.1、333.3、1 000.0 μg/mL, 每个质量浓度均为 3 个复孔。培养箱培养 72 h 后, 用 MTT 法^[14-15]检测, 并按下述公式计算抑制率。

$$\text{抑制率} = (\text{空白对照组 } A_{490} - \text{加样组 } A_{490}) / \text{空白对照组 } A_{490}$$

2.9 对核转录因子 NF-κB 抑制作用分析

将处于对数生长期的 293/NF-κB-Luc 细胞 100 μL/孔, 接种于 96 孔微量培养板内, 细胞浓度为 3×10⁴ 个/mL, 培养 24 h 后加入以培养基稀释的多糖样品 100 μL/孔, 使得终质量浓度分别为 250、500、1 000 μg/mL, 每个质量浓度均为 3 个复孔, 另设空白对照孔 (仅加相应体积的样品溶解液) 和阳性对照孔 (每孔加入 20 μL 10 μg/mL LPS, 终质量浓度为 1 μg/mL)。细胞在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 15 min 后, 加入 20 μL 10 μg/mL LPS, 使其终质量浓度为 10 μg/mL。细胞培养 6 h 后, 去除孔中的培养基, 以虫荧光素酶检测系统中的裂解液 1×CCLR 裂解细胞, 20 μL/孔, 裂解后转入 96 孔荧光检测板, 每孔加入 40 μL 检测底物, 立即读取相对光单位 (Relative Light Unit, RLU), 并按下述公式计算抑制率。

$$\text{抑制率} = (\text{RLU}_{\text{LPS}} - \text{RLU}_{\text{样品}}) / (\text{RLU}_{\text{LPS}} - \text{RLU}_{\text{空白}})$$

3 结果

3.1 菊花多糖的分离纯化

干燥菊花药材, 经脱脂风干、沸水提取、流动水透析、乙醇沉淀和真空干燥后, 得到杭菊花水提粗多糖 (CMTA) 得率 5.73%、怀菊花水提粗多糖 (CMJA) 得率 8.19% 和亳菊花水提粗多糖 (CMBA) 得率 9.70%。

水提粗多糖 CMTA、CMJA 和 CMBA 分别经 DEAE-纤维素阴离子交换柱 (每次称取约 7 g 样品溶于 50 mL 去离子水, 离心后上样) 分离纯化后, 所得次级粗多糖分别命名为 CMTA0 (得率 9.90%)、CMJA0 (得率 19.39%) 和 CMBA0 (得率 9.43%)。

次级粗多糖 CMTA0、CMJA0 和 CMBA0 (每次称取约 100 mg 样品溶于 4 mL 0.2 mol/L NaCl 溶液, 离心后上样) 经 Sephacryl S-300 柱进一步分离纯化, 得到杭菊花多糖 CMTA0S1 (得率 11.73%) 和 CMTA0S3 (得率 38.34%), 怀菊花多糖 CMJA0S1 (得率 18.82%) 和 CMJA0S2 (得率 48.53%), 亳菊花多糖 CMBA0S1 (得率 6.07%) 和 CMBA0S3 (得率 42.91%)。

3.2 菊花多糖糖纯度与重均相对分子质量分析

上述 6 种多糖的 HPGPC 结果见图 1, 6 种多糖在 HPGPC 中均为单一对称峰, 表明其为均一组分。根据洗脱时间, 从标准曲线上求得 6 种均一多糖的重均相对分子质量, CMTA0S1、CMTA0S3、CMJA0S1、CMJA0S2、CMBA0S1 和 CMBA0S3 的重均相对分子质量依次为 7.52×10⁴、7.80×10³、7.80×10⁴、1.04×10⁴、5.79×10⁴、1.35×10⁴, 结果见表 1。

3.3 菊花多糖的红外光谱分析

根据红外光谱图显示 6 种菊花多糖具有一般多

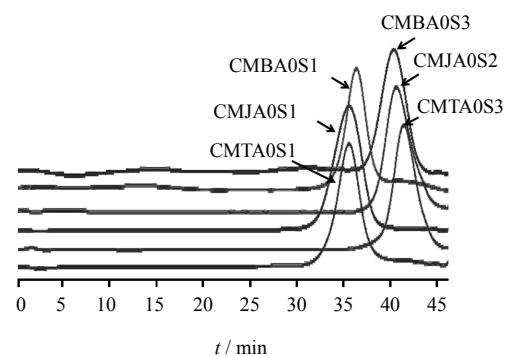


图 1 CMTA0S1、CMTA0S3、CMJA0S1、CMJA0S2、CMBA0S1 和 CMBA0S3 的高效凝胶色谱图

Fig. 1 HPGPC of CMTA0S1, CMTA0S3, CMJA0S1, CMJA0S2, CMBA0S1, and CMBA0S3

表 1 CMTA0S1、CMTA0S3、CMJA0S1、CMJA0S2、CMBA0S1 和 CMBA0S3 的重均相对分子质量

Table 1 Weight-average molecular mass of CMTA0S1, CMTA0S3, CMJA0S1, CMJA0S2, CMBA0S1, and CMBA0S3

多糖样品	t / min	M _w
CMTA0S1	35.61	7.52 × 10 ⁴
CMTA0S3	41.46	7.80 × 10 ³
CMJA0S1	35.61	7.80 × 10 ⁴
CMJA0S2	40.66	1.04 × 10 ⁴
CMBA0S1	36.40	5.79 × 10 ⁴
CMBA0S3	40.39	1.35 × 10 ⁴

糖在红外光谱图中的特征性结构，如图 2 所示，自上而下依次是 CMTA0S1、CMTA0S3、CMJA0S1、CMJA0S2、CMBA0S1 和 CMBA0S3。6 种多糖在 4 000~700 cm⁻¹ 有以下几组共同的特征峰^[16-17]：其中 3 415 cm⁻¹ 处的强宽峰是 O-H 的伸缩振动峰，由于羟基形成氢键吸收峰变宽，提示多糖分子间或分子内氢键的存在；在 2 927 cm⁻¹ 处的中强吸收峰是由糖链中次甲基 (-CH₂-)C-H 伸缩振动引起，是 C-H 的特征峰；1 730 cm⁻¹ 处的峰是 C=O 键的伸缩振动吸收峰；1 634 cm⁻¹ 处的峰是糖分子中结合水的吸收峰；1 420 cm⁻¹ 和 1 060 cm⁻¹ 处的吸收峰为糖环外 C-O 及糖环内 C-O 的伸缩振动峰，且后者为吡喃环的特征峰；1 375 cm⁻¹ 和 1 255 cm⁻¹ 处的 2 个吸收峰是 C-H 弯曲振动峰；890 cm⁻¹ 处的峰是 β-端基差向异构的 C-H 变角振动吸收峰，770 cm⁻¹ 处的吸收峰由 D-葡萄糖吡喃糖环的对称振动引起，两者均为吡喃环的特征吸收峰。6 种多糖在 700~600 cm⁻¹ 吸收峰特征差异性较大，需通过其他手段进一步分析研究。

3.4 菊花多糖的糖组成结果分析

紫外检测结果显示，6 种菊花均一多糖在 280 nm 处无明显吸收，且对蛋白质试验 Lowry 反应呈阴性，表明多糖不含肽或蛋白质。间苯基苯酚试验^[18]

表 2 CMTA0S1、CMTA0S3、CMJA0S1、CMJA0S2、CMBA0S1 和 CMBA0S3 的糖组成结果
Table 2 Sugar composition of CMTA0S1, CMTA0S3, CMJA0S1, CMJA0S2, CMBA0S1, and CMBA0S3

多糖样品	比例 / %				
	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
CMTA0S1	40.24	2.41	—	49.46	7.89
CMTA0S3	41.16	3.49	8.64	30.15	16.55
CMJA0S1	25.85	4.12	—	56.24	13.80
CMJA0S2	25.68	3.03	14.07	35.61	21.61
CMBA0S1	18.46	6.67	—	60.96	13.81
CMBA0S3	33.66	3.64	6.43	40.04	16.23

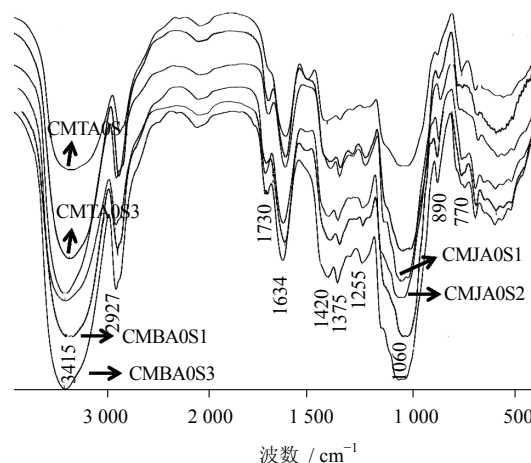


图 2 CMTA0S1、CMTA0S3、CMJA0S1、CMJA0S2、CMBA0S1 和 CMBA0S3 的红外光谱图

Fig. 2 Infrared spectra of CMTA0S1, CMTA0S3, CMJA0S1, CMJA0S2, CMBA0S1, and CMBA0S3

结果呈阴性，说明多糖不含糖醛酸，且完全水解后进行 TLC 分析，在糖醛酸对应处无红色斑点，表明 6 种菊花均一多糖均为中性多糖。糖组成结果表明 6 种多糖的单糖残基主要为半乳糖 (Gal)、阿拉伯糖 (Ara) 和葡萄糖 (Glc)，如表 2 所示，其中 CMTA0S3、CMJA0S2 和 CMBA0S3 还含有一定比例的甘露糖 (Man)。CMTA0S1、CMJA0S1 和 CMBA0S1 主要由 Gal、Ara、Glc 和少量木糖 (Xyl) 组成，物质的量比分别为 1.23 : 1.00 : 0.20 : 0.06、2.18 : 1.00 : 0.53 : 0.16 和 3.30 : 1.00 : 0.75 : 0.37；CMTA0S3、CMJA0S2 和 CMBA0S3 主要由 Gal、Ara、Glc、Man 和少量 Xyl 组成，物质的量比分别为 0.73 : 1.00 : 0.40 : 0.21 : 0.08、1.39 : 1.00 : 0.84 : 0.55 : 0.12 和 1.19 : 1.00 : 0.48 : 0.19 : 0.11。

3.5 菊花多糖糖残基连接方式分析

对 6 种菊花均一多糖经甲基化反应后得到部分甲基化的糖醇乙酸酯产物进行 GC-MS 分析，根据

质子碎片峰和糖组成结果结合标准图谱对各峰进行归属, 结果见表3。结果表明, 6种菊花均一多糖糖残基连接方式具有较多共同性: 1) *Araf* 为主要糖单元之一, 主要有2种连接方式, T-*Araf* 和 5-*Araf*; 2) *Xylp* 以 1, 3- 连接存在于6种多糖中; 3) *Galp* 是主要的糖单元之一, 有4种连接方式, T-, 1, 4-,

1, 6- 和 1, 3, 6-*Galp*, 其中只有少部分 *Galp* 残基存在于非还原末端; 4) *Glcp* 也是主要的糖单元之一, 在6种菊花均一多糖中共有3种连接方式, 1, 3-, 1, 4- 和极少比例的 1, 4, 6-*Glcp*; 5) *Manp* 是 CMTA0S3、CMJA0S2 和 CMBA0S3 的组成糖单元, 仅以 1, 4, 6- 连接存在于此3种多糖中。

表3 CMTA0S1、CMTA0S3、CMJA0S1、CMJA0S2、CMBA0S1 和 CMBA0S3 的甲基化结果
Table 3 Methylation analysis data of CMTA0S1, CMTA0S3, CMJA0S1, CMJA0S2, CMBA0S1, and CMBA0S3

部分甲基化的糖基	糖基连接方式	比例 / %					
		CMTA0S1	CMTA0S3	CMJA0S1	CMJA0S2	CMBA0S1	CMBA0S3
2, 3, 4-Me ₃ -Ara	T- <i>Araf</i>	22.0	8.1	14.1	5.7	14.4	8.1
3, 4-Me ₂ -Ara	1, 2- <i>Araf</i>	5.9	—	—	—	—	—
2, 3-Me ₂ -Ara	1, 5- <i>Araf</i>	12.0	32.4	14.5	18.9	9.7	23.9
2, 4-Me ₂ -Xyl	1, 3- <i>Xylp</i>	1.2	9.0	2.8	3.3	15.4	7.3
2, 3, 4, 6-Me ₄ -Gal	T- <i>Galp</i>	3.0	4.4	5.8	6.3	5.1	4.0
2, 3, 6-Me ₃ -Gal	1, 4- <i>Galp</i>	6.3	14.8	20.2	25.2	—	24.7
2, 3, 4-Me ₃ -Gal	1, 6- <i>Galp</i>	16.9	6.2	16.7	5.0	21.9	8.7
2, 4-Me ₂ -Gal	1, 3, 6- <i>Galp</i>	24.2	7.0	17.5	3.9	18.7	6.0
2, 4, 6-Me ₃ -Glc	1, 3- <i>Glcp</i>	8.6	—	5.2	—	5.5	—
2, 3, 6-Me ₃ -Glc	1, 4- <i>Glcp</i>	—	13.1	3.2	24.1	15.3	12.8
2, 3-Me ₂ -Glc	1, 4, 6- <i>Glcp</i>	—	1.5	—	1.3	2.3	2.7
2, 3-Me ₂ -Man	1, 4, 6- <i>Manp</i>	—	3.6	—	6.3	—	2.0

3.6 菊花多糖抗肿瘤细胞活性分析

通过 MTT 法, 检测了3种菊花中6种粗多糖和6种均一多糖对胰腺癌细胞生长的影响, 结果见图3。抗菊花多糖在 37.0~1 000.0 μg/mL 对 PANC-1 细胞的抑制率随质量浓度的增加而升高, 呈现良好的质量浓度依赖性, 且其对 PANC-1 细胞的抑制趋势随纯化的进行而提高, 其中均一多糖 CMTA0S3 在达到 1 000 μg/mL 时, 对 PANC-1 细胞的抑制率高达 69.4%。怀菊花多糖在 12.3~1 000 μg/mL, 也呈现出良好的质量浓度依赖性, 其中对 PANC-1 细胞抑制率最高的多糖为次级怀菊花水提粗多糖

CMJA0, 当多糖质量浓度为 1 000 μg/mL 时, 其抑制率达到 69.3%, 其均一多糖 CMJA0S2 对 PANC-1 细胞的抑制率随质量浓度的升高而加强, 最高达 66.0%。亳菊花水提粗多糖 CMBA 在 1 000 μg/mL 时, 对 PANC-1 细胞的抑制率高达 72.9%, 但在低质量浓度时表现出促进 PANC-1 细胞生长的活性, 且随着纯化的进行, 亳菊花多糖对 PANC-1 细胞的抑制率下降, 提示 CMBA 对 PANC-1 细胞的抑制力可能不完全来自多糖的活性。

由于正常肝细胞对化合物的细胞毒性比较敏感, 故本实验选用人正常肝细胞株 LO2 进行毒性实

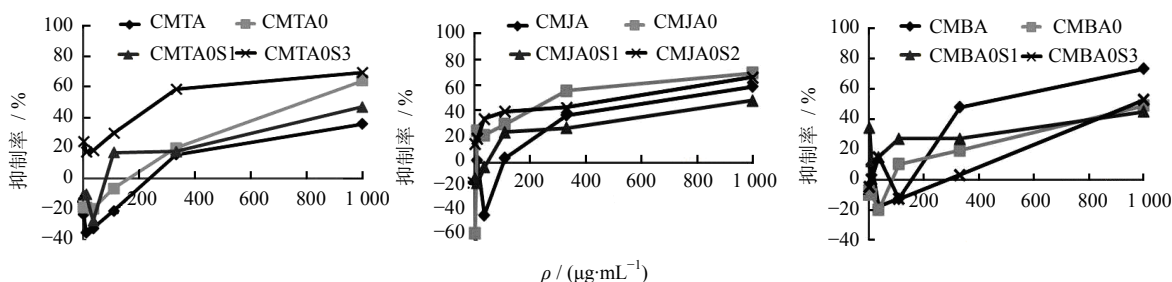


图3 菊花多糖抑制 PANC-1 细胞的生长
Fig. 3 Inhibition of PCM on PANC-1 cells growth

验, MTT 实验结果见图 4。杭菊花和怀菊花多糖, 不论粗多糖还是均一多糖对 LO2 细胞均没有明显毒性, 当质量浓度在 333.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 大部分多糖甚至表现出了促进 LO2 细胞生长的作用。亳菊花多糖中的均一多糖 CMBA0S1 和 CMBA0S3 在各质量浓度均显示出促进 LO2 细胞生长的作用, 但粗多糖 CMBA 和 CMBA0 在 1 000.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时显示出对 LO2 细胞生长有较小的抑制作用, 抑制率分别为 31.1%和 15.5%。

3.7 菊花多糖对 NF- κ B 抑制作用分析

为了探索菊花多糖可能存在的免疫调节活性,

借助应用 293/NF- κ B-Luc 细胞系检测各菊花多糖对核转录因子 NF- κ B 的抑制作用作为评价指标, 结果见图 5。12 种菊花多糖中只有亳菊花水提粗多糖表现出较强的免疫抑制活性, 且活性随着质量浓度的增加而加强, 显示出较好的浓度依赖性, 当 CMBA 达到 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 其抑制率为 56.2%。而均一多糖 CMTA0S1 和 CMJA0S1 则可能有潜在的免疫激活活性。NF- κ B 转录活性实验结果表明, 菊花多糖对 NF- κ B 的抑制作用随着质量浓度的升高和(或)纯化程度的加深会发生明显变化。

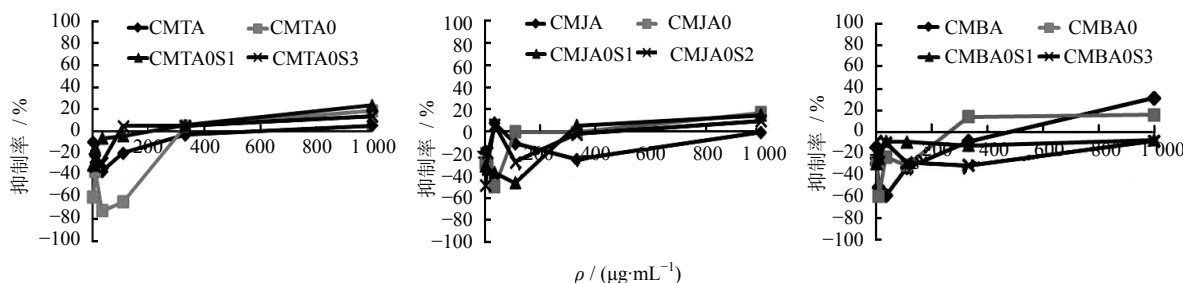


图 4 菊花多糖抑制 LO2 细胞的生长

Fig. 4 Inhibition of PCM on LO2 cells growth

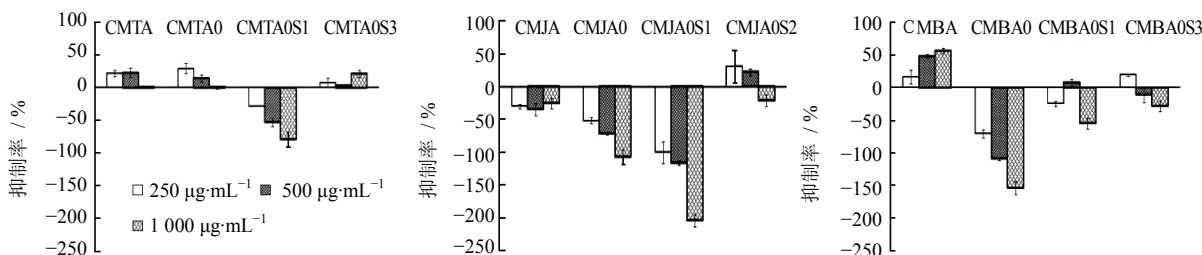


图 5 菊花多糖对核因子 NF- κ B 的抑制作用

Fig. 5 Inhibition of PCM on NF- κ B

4 讨论

本实验选取 3 种代表性菊花为原料药材, 通过水提醇沉获得 6 种粗多糖, 然后经过柱色谱等方法进行分离纯化, 获得 6 种结构性质具有类比性的中性均一多糖, 并对其一级结构进行了初步分析。结果表明 6 种菊花中性均一多糖均具有阿拉伯半乳糖^[19-20]的结构特征, 这些结构特征表明此 6 种多糖不同于之前报道过的菊花多糖^[21-23], 是从菊花中分离纯化到的新型均一多糖。但由于多糖结构的复杂性, 尚未对此 6 种多糖的精细结构进行进一步讨论, 在接下来的实验中课题组拟通过部分酸水解、酶解和核磁共振等分析方法进行深入研究。

同时通过 PANC-1 和 LO2 细胞的 MTT 实验及

NF- κ B 转录活性实验对菊花多糖的生物活性进行了测定, 拟寻找较好的治疗胰腺癌的先导药物, 并探索其可能存在的免疫调节活性。结果表明此 6 种中性均一多糖均无明显肝毒性, 且对 PANC-1 细胞具有明显抑制作用, 其中以杭菊花多糖 CMTA0S3 和怀菊花多糖 CMJA0S2 抑制率最强, 当多糖为 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 抑制率达到 69.4%和 66.0%, 且具有浓度依赖性, 该 2 种均一多糖对 PANC-1 细胞表现出的良好抑制力可能与其相对分子质量较小有关。以上实验结果为深入开展菊花多糖研究、拓展菊花综合利用途径奠定了理论基础和实验依据。

参考文献

[1] 王芳. 菊花化学成分的研究进展 [J]. 中国新医学论

- 坛, 2008, 8(3): 23-24.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [3] Kidd P M. The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment [J]. *Altern Med Rev*, 2005, 5(1): 4-27.
- [4] Dale E, Davis M, Faustman D L. A role for transcription factor NF-kappaB in autoimmunity: possible interactions for genes, sex, and the immune response [J]. *Adv Physiol Educ*, 2006, 30(4): 152-158.
- [5] Jemal A, Siegel R, Xu J, *et al.* Cancer statistics, 2010 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2010, 60(5): 277-300.
- [6] Fang J P, Liu Y, Li J, *et al.* A novel small molecule, HK-156, inhibits lipopolysaccharide-induced activation of NF- κ B signaling and improves survival in mouse models of sepsis [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2012, 33(9): 1204-1216.
- [7] Dubios M, Gilles K A. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. *Anal Chem*, 1956, 28(3): 350-356.
- [8] Bensadon A, Weinstein D. Assay of protein in the presence of interfering materials [J]. *Anal Biochem*, 1976, 70(1): 241-250.
- [9] Dong Q, Jia L M, Fang J N. A b-D-glucan isolated from the fruiting bodies of *Hericium erinaceus* and its aqueous conformation [J]. *Carbohydr Res*, 2006, 341(6): 791-795.
- [10] Liu C P, Bao X F, Fang J N. Retention behaviors of uronic acid-containing polysaccharides and neutral polysaccharides in HPGPC [J]. *Chin Chem Lett*, 2001, 12(10): 909-912.
- [11] Jia L M, Liu L, Dong Q, *et al.* Structural investigation of a novel rhamnoglucogalactan isolated from the fruiting bodies of the fungus *Hericium erinaceus* [J]. *Carbohydr Res*, 2004, 339(16): 2667-2671.
- [12] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术 [M]. 第二版. 杭州: 浙江大学出版社, 1999.
- [13] Needs P W, Rigby N M, Ring S G, *et al.* Specific degradation of pectins via a carbodiimide-mediated Lossen rearrangement of methyl esterified galacturonic acid residues [J]. *Carbohydr Res*, 2001, 333(1): 47-58.
- [14] Sylvester P W. Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability [J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 716(10): 157-168.
- [15] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. *J Immunol Methods*, 1983, 65(1), 55-63.
- [16] Haxaire K, Maréchal Y, Milas M, *et al.* Hydration of polysaccharide hyaluronan observed by IR spectrometry. I. Preliminary experiments and band assignments [J]. *Biopolymers*, 2003, 72(1): 10-20.
- [17] Zhang Q, Qi H, Zhao T, *et al.* Chemical characteristics of a polysaccharide from *Porphyra capensis* (Rhodophyta) [J]. *Carbohydr Res*, 2005, 340(15): 2447-2450.
- [18] Blumencrantz N, Asboe H G. New method for quantitative determination of uronic acid [J]. *Anal Biochem*, 1973, 54(2): 484-489.
- [19] James H P, Ernest V G, Gyongyi G. New molecular weight forms of arabinogalactan from *Larix occidentalis* [J]. *Carbohydr Res*, 1997(301): 89-93.
- [20] Chandrasekaran R, Janaswamy S. Morphology of western larch arab-inogalactan [J]. *Carbohydr Res*, 2002, 337(21): 2211-2222.
- [21] Zheng Y, Liu L, Fang J N. A Novel Polysaccharide from *Chrysanthemum morifolium* [J]. *Acta Bot Sin*, 2004, 46(8): 997-1001.
- [22] Zheng Y, Wang X S, Fang J. Two acidic polysaccharides from the flowers of *Chrysanthemum morifolium* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2006, 8(3): 217-222.
- [23] 金红英, 施松善, 王顺春, 等. 野菊花中性多糖 CIP-C 的分离纯化及结构解析 [J]. 高等学校化学学报, 2012, 33(4): 755-760.