

# 化学修饰水提麦冬多糖 WPOJ 的抗肿瘤活性研究

张小平, 孙润广\*, 王小梅, 张力妮

(陕西师范大学 物理学与信息技术学院, 陕西 西安 710062)

**摘要:** 对水提麦冬多糖(WPOJ)进行了3种化学修饰,并比较了修饰前后各组分抗肿瘤活性的变化。实验采用氯磺酸-吡啶法制备硫酸化麦冬多糖(S-WPOJ),利用WPOJ与磷酸化试剂和氯乙酸异丙酸反应分别得到磷酸化、羧甲基化麦冬多糖(P-WPOJ、C-WPOJ)。通过红外光谱技术对WPOJ化学修饰前后的结构进行检测,同时利用MTT法对修饰前后麦冬多糖的抗肿瘤效果进行比较分析。结果表明:化学修饰后的WPOJ分别具有硫酸基团、磷酸基团、羧甲基的特征吸收峰,化学修饰后的WPOJ抗肿瘤效果明显有不同程度的提高,其中,羧甲基化麦冬多糖C-WPOJ对K562细胞的抑制作用最强。

**关键字:** K562细胞;WPOJ;化学修饰;抗肿瘤

中图分类号:O 629.12 文献标志码:A 文章编号:1673—1689(2014)04—0368—06

## Study on Anti-Tumor Activities of WPOJ of Chemical Modification

ZHANG Xiaoping, SUN Run Guang\*, WANG Xiaomei, ZHANG Lini

(College of Physics and Information Technology, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

**Abstract:** The aim is to chemical modify WPOJ by using three kinds of methods, and to compare the anti-tumor activities of them before and after modification. The experiment made S-WPOJ with chlorosulfonic acid-pyridine method, the WPOJ was phosphorylated by phosphorylation reagent and was carboxymethylated by isopropyl chloroacetate acid. The infrared spectroscopy was adopted to test the structure of WPOJ before and after chemical modification, at the same time, its anti-tumor activities were also analysed by the MTT method before and after modification. and the result showed that there are characteristic absorption peak of sulfuric acid, phosphate groups, carboxymethyl groups after chemical modification WPOJ respectively, and the WPOJ of chemical modification have obviously improved anti-tumor activities at different levels and the anti-tumor activities of CWPOJ is the most strongest.

**Keyword:** K562 cells, WPOJ, chemical modification, anti-tumor

20世纪以来,癌症的治疗一直是人们所面临的  
一大难题。目前,癌症的治疗手段有手术治疗、化

疗、放疗<sup>[1-2]</sup>。近年来取得了一定进展。化疗可以补充  
手术和放疗的不足,防止肿瘤的复发和转移,尤其

收稿日期:2013-06-24

基金项目:国家自然科学基金项目(10874108);陕西省自然科学基金研究计划项目(SJ08A16)。

\*通信作者:孙润广(1958—),男,陕西延安人,理学博士后,教授,博士研究生导师,主要从事生物工程研究。E-mail:sunrun Guang@snnu.edu.cn

对晚期肿瘤化疗可控制肿瘤的发展,减轻患者痛苦,延长生存期<sup>[9]</sup>。然而,抗癌药物都可产生一定的毒副作用,其程度与计量大小成正比,如胃肠道反应,肝肾功能损害,心脏损害,骨髓出血、贫血、感染,口腔粘膜损害,脱发及出血性膀胱炎和过敏反应等<sup>[4]</sup>。这些严重的毒副作用很难避免,因此新药物的需求在不断增加,经过近年来的临床实践,发现中草药不但对某些癌症有较好的疗效,而且对减轻化疗后的毒副作用有非常显著的效果,因此越来越引起广大学者与医学界的重视。

麦冬属于百合科沿阶草属植物,主要生长于四川、浙江等地,以块根入药,具有养阴生津、润肺清心之功效。现代药理学研究表明麦冬主要含有甾体皂苷、多糖、氨基酸和黄酮等活性成分,具有降血糖、抗氧化、抗衰老及抗心肌缺血、抗肿瘤等作用<sup>[5]</sup>。由于多糖的结构与其活性紧密联系,研究发现对多糖进行衍生化修饰可以增强多糖的活性<sup>[6]</sup>。

作者观察了 WPOJ、化学修饰的 WPOJ 对体外培养的人白血病 K562 细胞有无凋亡诱导作用,旨在比较 WPOJ 和化学修饰的 WPOJ 在结构和抗肿瘤活性方面的差异,为麦冬多糖的进一步研究提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

水提麦冬多糖 WPOJ:作者所在实验室提取<sup>[7]</sup>;K562 细胞:陕西师范大学生命科学学院提供;RPMI1640 培养基:美国 GIBCO 公司产品;新生小牛血清:杭州四季青生物工程有限公司产品;四甲基偶氮唑盐(MTT):美国 Amresco 公司产品;其他试剂均为国内分析纯,实验室用水为 3 次蒸馏水。

### 1.2 仪器与设备

HH·CP-01W 型二氧化碳细胞培养箱:上海博讯实业有限公司医疗设备厂产品;TH4-200 倒置显微镜:日本奥林巴斯有限公司产品;DG5032 型酶联免疫检测仪:南京华东电子集团意料设备有限公司产品;TDL80-2B 小型离心机:上海安亭科学仪器厂产品;CF16RX 高速冷冻离心机:日本日立公司产品;H-H-4 型恒温水浴锅:上海浦东物理光学仪器公司产品;Avatar360E.S.P.F TIR 傅里叶变换红外光谱仪:尼高力公司产品;TB-215D 电子天平/精度:北

京塞多利斯仪器系统公司产品。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 化学修饰多糖

1) S-WPOJ 的制备:实验采用氯磺酸-吡啶法<sup>[8]</sup>,将附有冷凝管、分液漏斗和搅拌装置的三口烧瓶置于冰浴中,打开搅拌器,先加入 15 mL 吡啶,然后将 5 mL 氯磺酸缓慢滴入三口烧瓶直至有大量淡黄色固体出现,然后加入含有 1.0 g WPOJ 的 25 mL 无水甲酰胺溶液,迅速将整个反应装置移入 60 °C 恒温水浴中,恒温搅拌反应 2 h 后,再次冰浴冷却,随即用事先配好的 10 mol/L 的氢氧化钠溶液调节 pH 为中性,将反应液倾入 1 000 mL 的烧杯中,加入五倍体积的无水乙醇,在 4 °C 冰箱保存 4 h,沉淀、离心、透析、冷冻干燥即得 S-WPOJ。

2) P-WPOJ 的制备:将 1.0 g WPOJ 加到一定量的磷酸化试剂(三聚磷酸钠与三偏磷酸钠质量比为 6:1)中,在 60 °C 下恒温搅拌反应 2 h,调节 pH 为中性,用 5 倍无水乙醇沉淀 24 h,离心、透析、冷冻干燥即可得 P-WPOJ<sup>[9]</sup>。

3) C-WPOJ 的制备:将 WPOJ 1.0 g 加入到质量分数 1% 氢氧化钠水溶液中,碱溶后,加入氯乙酸的异丙醇溶液,在 55 °C 恒温搅拌反应 5 h 后,调节 pH 值为中性,加入 5 倍乙醇沉淀,离心、透析、冷冻干燥即为 C-WPOJ<sup>[10]</sup>。

**1.3.2 WPOJ 的红外光谱分析** 依次分别将 WPOJ、S-WPOJ、P-WPOJ、C-WPOJ 干燥粉末 1 mg 与 100 mg 无水溴化钾混合研磨后压片,于 4 000~400  $\text{cm}^{-1}$  进行扫描,DTGS 检测器<sup>[11-15]</sup>。

**1.3.3 细胞培养** 将 K562 细胞接种于 RPMI1640+10% (体积分数) 新生小牛血清的培养液中,且含青霉素和链霉素各 100 U/ml,在体积分数 5%  $\text{CO}_2$ 、37 °C 培养箱及饱和水蒸汽条件下常规培养及传代,使用对数期细胞进行实验<sup>[12-13]</sup>。

#### 1.3.4 K562 细胞的增值实验(MTT 法)<sup>[14]</sup>

1) 实验分为空白组、对照组、实验组,每组设 6 个复孔,将 K562 细胞调整成浓度为  $1 \times 10^5$  /mL 接种于 96 孔板中,每孔 100  $\mu\text{L}$ ,在 37 °C、5%  $\text{CO}_2$  饱和湿度的培养箱中培养 24 h,在实验组分别加入 800、400、200、100、50、25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 WPOJ 100  $\mu\text{L}$ ,空白组和对照组加入等体积的 1640 培养基,药物与细胞接触 24、48、72 h 后,加入 MTT(5 mg/mL) 20  $\mu\text{L}$ /孔,培养箱中孵育 4 h 后离心弃上清,加 DMSO 180

μL/孔,避光震荡 15 min,使 Formazan 完全溶解后,用酶联免疫检测仪在波长 492 nm 处测量各孔的吸光度(OD 值),实验重复 3 次,计算细胞相对抑制率:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{(\text{对照组 OD 值} - \text{实验组 OD 值})}{(\text{对照组 OD 值} - \text{空白组 OD 值})} \times 100\%$$

2) 按(1)方法依次检测 S-WPOJ、P-WPOJ、C-WPOJ 对 K562 细胞增长的抑制作用,质量浓度范围为 0~800 μg/mL。

### 1.4 数据处理

用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析,利用 OriginPro 8.5 作图。

## 2 实验结果与分析

### 2.1 红外结果分析<sup>[14]</sup>

图 1 中,WPOJ 的特征吸收峰:3 382.96 cm<sup>-1</sup> 出现的宽峰是 O—H 的伸缩振动峰,表明该多糖存在分子间氢键;2 932.63 cm<sup>-1</sup> 处为多糖的 C—H 伸缩振动引起的;1 455 cm<sup>-1</sup> 附近出现的特征峰为—CH 变角峰,1 129 cm<sup>-1</sup> 附近的峰为—CH 弯曲振动,1 641、1 026 cm<sup>-1</sup> 附近出现的峰为 C—O 伸缩振动。

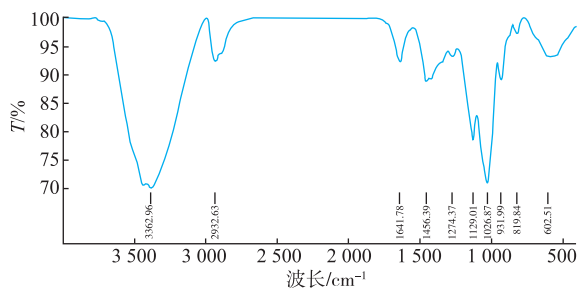


图 1 WPOJ 的红外图谱

Fig. 1 Infrared ray spectrums of WPOJ

图 2 中,硫酸化的 WPOJ,在 1 267 cm<sup>-1</sup> 处出现了 S=O 伸缩振动峰,证明 WPOJ 被硫酸化了,硫酸化前后羟基的变化还发生在 1 038 cm<sup>-1</sup> 附近,此处吸收峰反映了 C—O—H 中 C—O 伸缩振动的变化。

图 3 中,磷酸化修饰的 WPOJ,在 1 110~980 cm<sup>-1</sup> 是由于 P—O—C 伸缩振动引起,出现了 1 个较宽的峰。此外,在 3 438 cm<sup>-1</sup> 附近,吸收峰的强度较修饰前有明显的减弱,说明磷酸化修饰后多糖内羟基有所减少,进而可降解分子质量,增强多糖的水溶性。

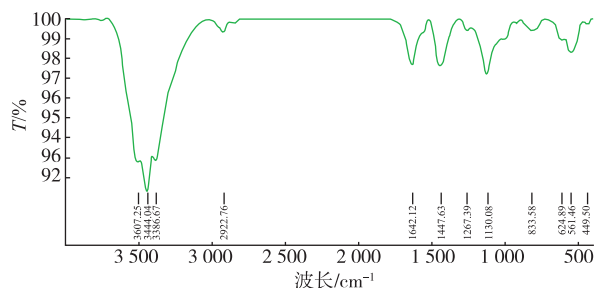


图 2 S-WPOJ 的红外图谱

Fig. 2 Infrared ray spectrums of S-WPOJ

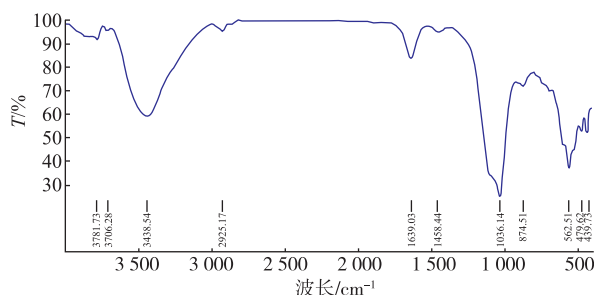


图 3 P-WPOJ 的红外图谱

Fig. 3 Infrared ray spectrums of P-WPOJ

图 4 表明:相比 WPOJ,C-WPOJ 除显示原多糖的特征吸收峰外,在 1 604 cm<sup>-1</sup>、1 429 cm<sup>-1</sup> 处分别出现了 C=O 非对称和对称伸缩振动峰,在 1 324 cm<sup>-1</sup> 处出现了 COO—的特征吸收峰,说明多糖的部分游离羟基已被羧甲基取代。

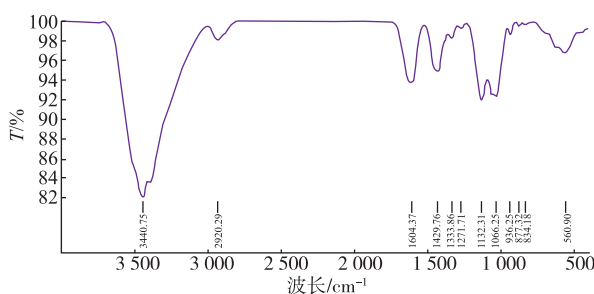


图 4 C-WPOJ 的红外图谱

Fig. 4 Infrared ray spectrums of C-WPOJ

### 2.2 抗肿瘤实验分析

表 1 是 WPOJ 对 K562 细胞体外增值抑制作用的显著性差异分析,说明实验结果具有可靠性[D(492),n=6, x̄±s]。图 5 显示:WPOJ 对 K562 细胞在整个作用阶段的效果几乎不明显,抑制率分布在-7.280%~16.552%范围内,说明未经处理的 WPOJ 对 K562 细胞有很微弱的抑制作用甚至没有。

表 1 WPOJ 对 K562 细胞的增殖抑制结果

Table 1 Inhibition effect of WPOJ on proliferation of K562 cells

质量浓度/ ( $\mu\text{g/mL}$ )	24 h		48 h		72 h	
	A	抑制率/%	A	抑制率/%	A	抑制率/%
0	0.525 $\pm$ 0.007**	0	0.761 $\pm$ 0.013**	0	0.972 $\pm$ 0.035*	0
25	0.511 $\pm$ 0.044*	2.761	0.707 $\pm$ 0.021*	7.192	1.022 $\pm$ 0.082*	-5.140
50	0.497 $\pm$ 0.032*	5.236	0.641 $\pm$ 0.034*	15.829	1.007 $\pm$ 0.041*	-3.600
100	0.493 $\pm$ 0.044*	6.140	0.635 $\pm$ 0.018*	16.552	0.960 $\pm$ 0.061*	1.310
200	0.497 $\pm$ 0.129**	5.474	0.646 $\pm$ 0.039*	15.205	1.000 $\pm$ 0.085*	-2.880
400	0.514 $\pm$ 0.005**	2.094	0.669 $\pm$ 0.024*	12.085	1.010 $\pm$ 0.079*	-3.860
800	0.528 $\pm$ 0.271*	-0.524	0.742 $\pm$ 0.023*	2.496	1.043 $\pm$ 0.055*	-7.280

\*代表  $p < 0.05$  (相对于空白组),表示有显著性差异;\*\*代表  $p < 0.01$  (相对于空白组),表示有极显著性差异。

表 2 S-WPOJ 对 K562 细胞的增殖抑制结果

Table 2 Inhibition effect of S-WPOJ on proliferation of K562 cells

质量浓度/ ( $\mu\text{g/mL}$ )	24 h		48 h		72 h	
	A	抑制率/%	A	抑制率/%	A	抑制率/%
0	0.534 $\pm$ 0.062*	0	0.711 $\pm$ 0.015**	0	1.749 $\pm$ 0.042*	0
25	0.502 $\pm$ 0.082*	6.000	0.655 $\pm$ 0.033*	7.911	1.721 $\pm$ 0.021*	1.615
50	0.438 $\pm$ 0.041*	17.901	0.571 $\pm$ 0.081*	19.691	1.694 $\pm$ 0.036*	3.158
100	0.403 $\pm$ 0.068*	24.602	0.428 $\pm$ 0.100*	39.803	1.553 $\pm$ 0.062*	11.219
200	0.388 $\pm$ 0.069*	27.366	0.386 $\pm$ 0.062*	45.781	1.478 $\pm$ 0.065*	15.521
400	0.394 $\pm$ 0.013**	26.101	0.432 $\pm$ 0.019**	39.170	1.486 $\pm$ 0.074*	15.078
800	0.395 $\pm$ 0.058**	26.008	0.438 $\pm$ 0.016**	38.326	1.507 $\pm$ 0.049*	13.863

\*代表  $p < 0.05$  (相对于空白组),表示有显著性差异;\*\*代表  $p < 0.01$  (相对于空白组),表示有极显著性差异。

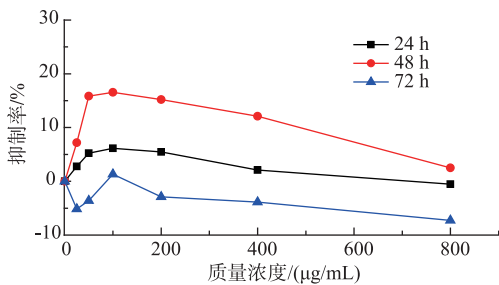


图 5 不同质量浓度不同时间的 WPOJ 对 K562 细胞的增殖影响

Fig. 5 Inhibition effects of different concentration WPOJ on K562 cells at different time

图 6 表明:S-WPOJ 在整个作用时间段内对 K562 细胞的抑制作用均大于 WPOJ, 在浓度为 0~200  $\mu\text{g/mL}$  之间,S-WPOJ 对 K562 细胞的抑制作用迅速增加达到抑制率最大,随着质量浓度的继续增大,抑制率反而有所降低,在作用 48h 之后,S-WPOJ 对 K562 细胞的抑制作用最强,达到 45.781%。

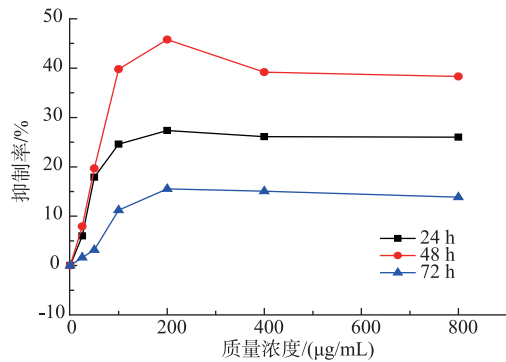


图 6 不同质量浓度不同时间的 S-WPOJ 对 K562 细胞的增殖影响

Fig. 6 Inhibition effects of different concentration S-WPOJ on K562 cells at different time

图 7 表明:P-WPOJ 相对于 WPOJ 抑制率均有所增加,而且随着浓度的持续增大,抑制率先减小后增大,随着时间的持续增长,抑制率也是先减小后增大,在浓度为 100  $\mu\text{g/mL}$ ,作用时间 48 h 后,P-WPOJ 对 K562 表现出最大的抑制率为 38.013%。

表 3 P-WPOJ 对 K562 细胞的增殖抑制结果

Table 3 Inhibition effect of P-WPOJ on proliferation of K562 cells

质量浓度/ ( $\mu\text{g/mL}$ )	24 h		48 h		72 h	
	A	抑制率/%	A	抑制率/%	A	抑制率/%
0	0.608 $\pm$ 0.065*	0	1.213 $\pm$ 0.063*	0	1.911 $\pm$ 0.035*	0
25	0.507 $\pm$ 0.062*	16.536	0.902 $\pm$ 0.043*	25.665	1.688 $\pm$ 0.077*	11.681
50	0.459 $\pm$ 0.039*	24.476	0.853 $\pm$ 0.027*	29.664	1.592 $\pm$ 0.088*	16.717
100	0.411 $\pm$ 0.062*	32.415	0.752 $\pm$ 0.004**	38.013	1.398 $\pm$ 0.098*	26.880
200	0.434 $\pm$ 0.045*	28.671	0.829 $\pm$ 0.024*	31.643	1.468 $\pm$ 0.079*	23.205
400	0.526 $\pm$ 0.057*	13.639	1.022 $\pm$ 0.080*	15.749	1.688 $\pm$ 0.057*	11.707
800	0.555 $\pm$ 0.041*	8.680	1.068 $\pm$ 0.088*	11.936	1.768 $\pm$ 0.041*	7.495

\*代表  $p < 0.05$  (相对于空白组),表示有显著性差异; \*\*代表  $p < 0.01$  (相对于空白组),表示有极显著性差异。

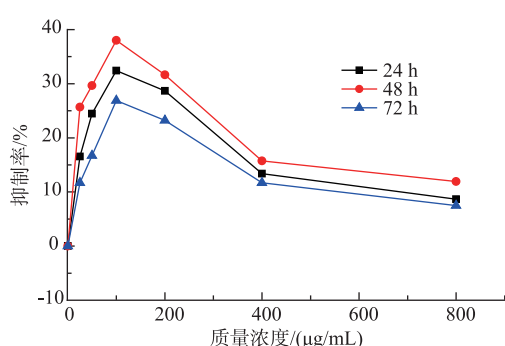


图 7 不同质量浓度不同时间的 P-WPOJ 对 K562 细胞的增殖影响

Fig. 7 Inhibition effects of different concentration P-WPOJ on K562 cells at different time

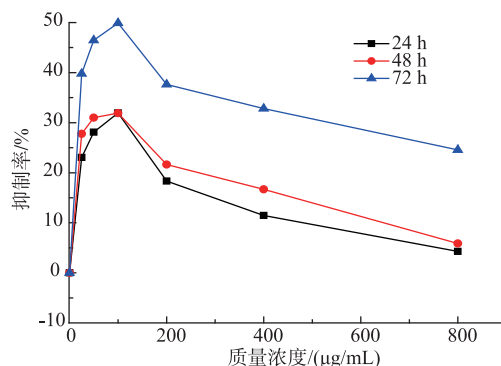


图 8 不同质量浓度不同时间的 C-WPOJ 对 K562 细胞的增殖影响

Fig. 8 Inhibition effects of different concentration C-WPOJ on K562 cells at different time

表 4 C-WPOJ 对 K562 细胞的增殖抑制结果

Table 4 Inhibition effect of C-WPOJ on proliferation of K562 cells

质量浓度/ ( $\mu\text{g/mL}$ )	24 h		48 h		72 h	
	A	抑制率/%	A	抑制率/%	A	抑制率/%
0	0.600 $\pm$ 0.056*	0	1.033 $\pm$ 0.043*	0	1.608 $\pm$ 0.086*	0
25	0.462 $\pm$ 0.014**	23.030	0.746 $\pm$ 0.028*	27.776	0.968 $\pm$ 0.065*	39.795
50	0.432 $\pm$ 0.055*	28.113	0.713 $\pm$ 0.048*	30.994	0.861 $\pm$ 0.032*	46.479
100	0.408 $\pm$ 0.057*	31.945	0.704 $\pm$ 0.056*	31.914	0.806 $\pm$ 0.010**	49.899
200	0.490 $\pm$ 0.064*	18.326	0.810 $\pm$ 0.050*	21.631	1.003 $\pm$ 0.016**	37.634
400	0.532 $\pm$ 0.014**	11.454	0.861 $\pm$ 0.038*	16.695	1.081 $\pm$ 0.045*	32.815
800	0.574 $\pm$ 0.016**	4.290	0.972 $\pm$ 0.075*	5.880	1.213 $\pm$ 0.061*	24.561

\*代表  $p < 0.05$  (相对于空白组),表示有显著性差异; \*\*代表  $p < 0.01$  (相对于空白组),表示有极显著性差异。

图 8 显示: 在质量浓度为 0~100  $\mu\text{g/mL}$  之间, 随着浓度的增加, C-WPOJ 的抑制活性与浓度呈正相关, 当浓度大于 100  $\mu\text{g/mL}$ , C-WPOJ 对 K562 细胞的抑制作用逐渐减弱, 在整个作用时间段内, C-WPOJ 对 K562 细胞的抑制率随着时间的增长抑制

率持续增长, 在 72 h, 100  $\mu\text{g/mL}$  时抑制率最大, 达到 49.899%。

### 3 结语

1) WPOJ 和经化学修饰的 WPOJ 对 K562 细胞



的抑制作用都随着浓度的增加先增强后缓慢减弱,在 100~200  $\mu\text{g/mL}$  范围内均表现出较强的抗肿瘤活性;随着时间的变化,WPOJ,S-WPOJ,P-WPOJ 均在作用 48 h 后达到抑制率最高,而 C-WPOJ 在 72 h 达到最高的抑制率。

2) WPOJ 对 K562 细胞的生长显示出较低的抑制率,而经化学修饰的 WPOJ 对 K562 细胞均表现出较强的抗肿瘤活性,C-WPOJ 的抗肿瘤效果最佳,

S-WPOJ,P-WPOJ 效果次之。

3) 造成这种结果的原因可能是化学修饰适当地降解了 WPOJ 的相对分子质量,改善了多糖的水溶性,进而提高了 WPOJ 的抗肿瘤活性。这为今后对于多糖的衍生化修饰以及抗肿瘤方面提供了一定的参考价值,而修饰后的麦冬多糖对 K562 细胞的作用机理还尚不明确,有待于进一步深入研究。

### 参考文献:

- [1] 黄霞,肖丙秀,赵军伟,等. 枸杞多糖对人肝癌 HepG2 生长的影响及分子机制[J]. 中草药,2010,41(9):1501-1503.  
HUANG Xia,XIAO Bingxiu,ZHAO Junwei, et al. Chinese traditional and herbal drugs,2010,41(9):1501-1503.(in Chinese)
- [2] 郝玉栓,袁征,单铁英,等. 枸杞多糖对实验性食管癌大鼠食管癌细胞的生长抑制作用[J]. 职业与健康,2010,26(22):601-602.  
HAO Yushuan,YUAN Zheng,SHAN Tiewing,et al. Growth inhibition of lycium baraum polysaccharides on esophageal carcinoma cells of experimental esophageal carcinoma rats.[J]. **Occup and Health**,2010,26(22):601-602.(in Chinese)
- [3] 马秀梓,孙润广,李佳媚,等. 3 种中药多糖抗肿瘤作用的研究[J]. 陕西师范大学学报:自然科学版,2012,40(6):77-80.  
MA Xiuzi,SUN Runguang,LI Jiamei,et al. The study on anticancer activities of three Chinese medicine polysaccharides [J]. **Journal of Shaanxi Normal University:Natural Science Edition**,2012,40(6):77-80.(in Chinese)
- [4] 王岚. 癌症患者常见化疗药物副反应的观察与护理[J]. 医药论坛杂志,2003,24(18):81-82.  
WANG Lan. In observation and care for cancer patients after chemotherapy drugs [J]. **Journal of Medical Forum**,2003,24(18):81-82.(in Chinese)
- [5] 阳美平,吴皓,尹莲,等. 麦冬皂苷和多糖类成分的研究发展[J]. 中华中医药学刊,2008,26(10):2169-2171.  
YANG Meiping,WU Hao,YIN Lian,et al. Advances in research of saponins and polysaccharides in ophiopogonis japonicus[J]. **Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine**,2008,26(10):2169-2171.(in Chinese)
- [6] 刘占峰,孙汉文. 多糖的化学修饰研究发展[J]. 河北大学学报:自然科学版,2005,25(1):104-108.  
LIU Zhanfeng,SUN Hanwen. Progress of the research on chemically modifications of polysacchride [J]. **Journal of Hebei University:Natural Science Edition**,2005,25(1):104-108.(in Chinese)
- [7] 王小梅,孙润广,薛慧君,等. 麦冬多糖 POJ-U1a 的结构研究及原子力显微镜观测[J]. 食品工业科技,2011,32(3):81-87.  
WANG Xiaomei,SUN Runguang,XUE Huijun,et al. Structure investigation and observation of microstructure of ophiopogon japonicas polysaccharide POJ-U1a with atomic force microscope [J]. **Science and Technology of Food Industry**,2011,32(3):81-87.(in Chinese)
- [8] 彭永华,金征宇,王元凤. 硫酸酯化茶多糖的制备及降血糖活性的研究[J]. 食品工业科技,2006,27(11):167-169.  
PENG Yonghua,JIN Zhengyu,WANG Yuanfeng. Preparation and hypoglycemic effect of Sulfated Tea Polysaccharides [J]. **Science and Techology of Food Industry**,2006,27(11):167-169.(in Chinese)
- [9] 张难,楸树毅,吴远根,等. 磷酸化香菇多糖的制备及其部分理化性质的研究[J]. 食品研究与开发,2008,29(8):21-25.  
ZHANG Nan,QIU Shuyi,WU Yuangen,et al. Preparation and partial physico chemical property study of phosphorylated lentinan [J]. **Research and Development of Food**,2008,29(8):21-25.(in Chinese)
- [10] Silva D A,Paula C M,Feitosa P A,et al. Carboxymethylation of cashew tree exudates polysaccharide [J]. **Carbohydrate Polymeters**,2004,58(2):163.
- [11] 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,1998.
- [12] 陈义勇,顾小红,汤坚. 桦褐孔菌多糖的抗肿瘤活性研究[J]. 食品与生物技术学报,2011,30(1):65-69.  
CHEN Yiyong,GU Xiaohong,TA Jian. Study on anti-tumor activities of polysaccharides from inonotus obliquus [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2011,30(1):65-69.(in Chinese)
- [13] 司徒镇强. 细胞培养[M]. 北京:世界图书出版公司,2007.
- [14] Talorete T P,Bouaziz M,Sayadi S,et al. Influence of medium type and serum on MTTreduction by flavonoids in the absence of cell[J]. **Cytotechnology**,2006,52(3):189-198.
- [15] 叶宪曾,张新祥. 仪器分析教程[M]. 北京:北京大学出版社,2007.