

文章编号:1009-038X(2002)01-0062-05

百合多糖的化学结构及抗肿瘤活性

赵国华¹, 李志孝², 陈宗道¹

(1. 西南农业大学 食品科学学院, 重庆 400716; 2. 兰州大学 应用有机化学国家重点实验室, 甘肃兰州 730000)

摘要:用水提取百合块茎粗多糖,经 Sevag 脱蛋白质,透析后经 DEAE-cellulose 及 Sephadex G-100 柱色谱纯化,得到百合纯多糖组分 LBPS-I。经完全酸水解,PC,GC,IR,高碘酸氧化,Smith 降解,甲基化分析,¹H 及 ¹³C-NMR 等研究百合多糖的化学结构,表明 LBPS-I 的相对分子质量为 30 200,比旋光度 $[\alpha]_D^{20} = +192.3 (\pm 0.75, \text{H}_2\text{O})$,特性粘度 $[\eta] = 14.06 \times 10^{-3} \text{ mL/g}$ 。LBPS-I 是由 $\alpha\text{-D-(1 \rightarrow 4)\text{-GlcP}}$ 和 $\alpha\text{-D-(1 \rightarrow 3)\text{-GlcP}}$ 以 2:1 的比例交替形成主链,并有 $\alpha\text{-D-(1 \rightarrow 6)\text{-GlcP}}$ 侧链的葡聚糖。小鼠移植性实体瘤研究表明, LBPS-I 对移植性黑色素 B16 和 Lewis 肺癌有较强的抑制作用。

关键词:百合;多糖;结构;抗肿瘤

中图分类号:R 284.1;R 284.2

文献标识码:A

Chemical Structure and Antitumor Activity of Polysaccharide from *Lilium brownii*

ZHAO Guo-hua¹, LI Zhi-xiao², CHEN Zong-dao¹

(1. Food College, South-west Agricultural University, Chongqing 400716, China; 2. National Laboratory of Applied Organic Chemistry, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

Abstract: The tube root of *Lilium brownii* was extracted with water, from the extract, the polysaccharide of LBPS-I was isolated and purified using Sevag deprotein, DEAE-cellulose and Sephadex G-100 column chromatography. Its structure was determined by PC, GC, IR, periodate oxidation, Smith degradation, methylation analysis, ¹H-NMR and ¹³H-NMR analysis etc. LBPS-I was found contained a backbone composed of $\alpha\text{-D-(1 \rightarrow 4)\text{-GlcP}}$ and $\alpha\text{-D-(1 \rightarrow 3)\text{-GlcP}}$ (2:1), a short $\alpha\text{-D-(1 \rightarrow 6)\text{-GlcP}}$ branch was attached to the main chain. LBPS-I had a molecular weight of 30 200, $[\alpha]_D^{20} = +192.3 (\pm 0.75, \text{H}_2\text{O})$ and $[\eta] = 14.06 \times 10^{-3} \text{ mL/g}$. LBPS-I significantly inhibited the cancer cell line of melanoma B16 and Lewis lung cancer in mice in vivo.

Key words: *Lilium brownii*; polysaccharide; structure; antitumor

百合,拉丁名为 *Lilium brownii* F. E. Brown var. *Colchesteri* Wils,百合科百合属植物。已有的研究表明,百合炮制剂具有止咳、消炎、增强机体免疫功能的作用^[1,2]。吴少华等^[3,4]曾对百合总多糖的分离、组成和免疫活性做过初步的研究,表明百合总多糖

具有良好的增强免疫调节的作用,但对其多糖组分的进一步分离纯化和化学结构的研究尚未见报道。为促进对百合多糖的进一步开发和应用,本文对百合多糖主要组分 LBPS-I 的分离纯化、化学结构及抗肿瘤活性的研究作报道。

收稿日期:2001-11-13; 修订日期:2001-11-30。

作者简介:赵国华(1971-),男,甘肃古浪人,工学博士,讲师。

万方数据

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

百合购自重庆市百货公司;DEAE-cellulose(DE-52)为 Whatman 产品;Sephadex G-100、Sephacrose CL-4B 及 Dextran 系列标准品为 Pharmacia 产品;三氟醋酸、标准单糖和糖醇为 Emerck 产品;硼氢化钠为 Aldrich 产品。

170 SX 型红外光谱仪;Shimadzu GC-9A 型气相色谱仪;OV-225 石英毛细管柱(0.29 mm×25 m);Bruker AM-400 型超导核磁共振仪;HP5890/5988A 型气质联用分析仪;Perkin 341 型旋光仪。

Lewis 肺癌细胞和 C57BL/6 小鼠由卫生部兰州生物制品研究所提供。

1.2 实验方法

1.2.1 提取与组分纯化 百合块茎清洗破碎后用温水提取 3 次,4 层纱布过滤得提取液,经减压浓缩、乙醇沉淀,沉淀物加少量水溶解,Sevag 法脱蛋白质 8 次,自来水透析 2 d,透析内液用乙醇沉淀,沉淀物连续用无水乙醚或丙酮洗涤干燥,得灰白色百合粗多糖。取适量粗多糖用水溶解后进行 DEAE-纤维素离子交换柱色谱,用水洗脱,硫酸-萘酚法检测,收集主峰多糖,再经 Sephadex G-100 凝胶色谱纯化,硫酸-萘酚法检测,收集主峰多糖,真空浓缩、乙醇沉淀后干燥得 LBPS-I 多糖。

1.2.2 纯度鉴定 采用凝胶色谱法。取 LBPS-I 10 mg 溶于最小体积的 0.1 mol/L NaCl 溶液中,小心将其完全加到 Sepharose CL-6B 柱(15 mm×900 mm)顶,用 0.1 mol/L NaCl 洗脱,体积流量为 8 mL/h,每管收集 1 mL,用硫酸-萘酚法检测多糖。

1.2.3 重均分子式量测定 采用凝胶色谱法。取用 0.1 mol/L NaCl 溶液充分溶胀(48 h)的 Sephadex G-100 装柱(15 mm×900 mm),用 0.1 mol/L NaCl 溶液平衡 3 d,先后将 5 种已知相对分子质量的葡聚糖标准品(Dextran 系列,重均分子式量分别为 10 000,40 000,70 000,110 000 和 500 000)进行凝胶色谱分离,上样量各 5 mg,用 0.1 mol/L NaCl 洗脱,体积流量为 6 mL/h,按 1 mL/管分部收集,用硫酸-萘酚法检测多糖,分别求得相对应的洗脱体积 V_e 。再用蓝色葡聚糖(重均分子式量为 2 000 000)上柱求得柱的外水体积 V_o ,以 V_e/V_o 为纵坐标, $\lg M_r$ 为横坐标,得到相对分子质量测定标准曲线。取 LBPS-I 5 mg 上样,按与 Dextran 标准品层析相同的条件操作,求得相应的洗脱体积,求得 V_e/V_o 值,查标准曲线可求得相对分子质量。

1.2.4 糖组成测定 LBPS-I 10 mg 加 2 mol/L 三氟醋酸(TFA)2 mL,封管后在 120 °C 下水解 2 h,冷却后减压蒸干除去 TFA,用纸色谱法(PC)检测水解产物,展开剂为乙酸乙酯-吡啶-醋酸-水(质量比 5:5:1:3),用苯胺-邻苯二甲酸试剂显色。剩余水解物减压干燥过夜后加入 10 mg 盐酸羟胺及 1 mL 无水吡啶,温热溶解后在 90 °C 反应 30 min,冷至室温,加入 1 mL 无水醋酸酐,在 90 °C 下继续反应 30 min,冷至室温,加入 1 mL H₂O 摇匀,再用氯仿萃取乙酰化产物 3 次,每次 1 mL,合并氯仿层。同法制备各种标准单糖的糖腈乙酸酯衍生物,分别进行气相色谱(GC)分析。色谱条件:OV-225 玻璃毛细管柱(0.29 mm×25 m),柱温 235 °C,载气为 N₂,体积流量 46 mL/min。详见文献[5]。

1.2.5 甲基化反应 取经 P₂O₅ 干燥的 LBPS-I 5 mg 溶于 2 mL 无水二甲亚砜中,在氩气保护下注入 1.5 mL 甲基亚磺酰负离子,室温反应 1 h。置于冰浴至内容物冻结,滴加碘甲烷 1 mL。封口后在室温下反应 1 h。用氩气将碘甲烷驱净,加水 2 mL,用氯仿萃取甲基化产物 2 次,每次 1 mL,合并氯仿层用水洗 2 次,加无水硫酸钠过夜,过滤除去无水硫酸钠,减压蒸去氯仿,真空干燥得到暗黄色的甲基化产物。经红外光谱确认样品甲基化完全后,加甲酸 1 mL,充氩气封管,100 °C 水解 6 h,除去甲酸。再加 2 mol/L TFA 1 mL,充氩气封管,100 °C 水解 6 h,减压蒸干,加甲醇蒸干除尽 TFA,加水 2 mL,加 5 mg NaBH₄,室温反应 5 h,用 0.1 mol/L 醋酸中和后蒸干,加甲醇蒸干除尽 BO₄⁺,减压干燥过夜,加无水吡啶 1 mL,无水醋酸酐 1 mL,封管于 100 °C 反应 1 h。用玻璃棉滤去不溶物,减压蒸干,加 0.5 mL 氯仿溶解,即可进行气质联机(GC-MS)分析^[6]。GC-MS 分析仪器操作条件:OV225 石英毛细管柱,填充柱(0.22 mm×25 m),程序升温 50 °C→230 °C,升温速率 20 °C/min, EI 源,70 eV。

1.2.6 高碘酸氧化及 Smith 降解 取 LBPS-I 10 mg,加 0.015 mol/L 高碘酸钠 20 mL,4 °C 暗处进行氧化反应,分光光度法(223 nm)间断检测反应过程,待反应完全后,按文献[7]所述方法处理反应液,经完全酸水解、NaBH₄ 还原、乙酰化后,进行 GC 分析。

1.2.7 IR、¹H-NMR 及 ¹³C-NMR 光谱分析 取 LBPS-I 1 mg 与 KBr 压片后在 170 SX 红外光谱仪常规测定。另取 LBPS-I 30 mg 溶于 0.5 mL D₂O 中,测定 ¹H-NMR 及 ¹³C-NMR。

1.2.8 LBPS-I 的抗肿瘤活性评价 取小鼠体内传代的 B16 黑色素瘤细胞或 Lewis 肺癌细胞瘤块,称

重,分别用 RPMI 1640 培养液稀释,制成 20 g/dL (B16)和 10 g/dL (Lewis)的细胞悬液 0.2 mL/只,接种于试验组 C57BL/6 小鼠右前肢腋部皮下。接种后 24 h 开始每天分别给予一定量的多糖受试物 1 次,对照组给予等量的生理盐水,连续 8 d,结束后,颈椎脱臼处死小鼠,先称体重,再小心剥出肿瘤组织并称重,按下式计算体内肿瘤抑制率:

$$\text{抑制率} = [\text{对照组瘤重}(\text{g}) - \text{实验组瘤重}(\text{g})] \div \text{对照组瘤重}(\text{g})$$

2 结果与讨论

2.1 LBPS-I 的化学结构

2.1.1 纯度及相对分子质量 百合块茎粉碎后经热水浸提、乙醇沉淀、脱蛋白得 LBPS 粗多糖。经 DEAE-纤维素离子交换色谱及 Sephadex G-100 柱色谱进一步分离纯化,得到灰白色无定形粉末状多糖 LBPS-I。取 10 mg LBPS-I 溶解后经 Sepharose CL-6B 柱色谱,得到其洗脱曲线是一对称的单一

峰,证明 LBPS-I 已是均一多糖.元素分析此多糖不含氮,比旋光度 $[\alpha]_D^{20} = +192.3$ (c 0.75, H_2O),特性粘度 $[\eta] = 14.06 \times 10^{-3}$ mL/g,凝胶色谱法测得其重均分子量为 30 200.

2.1.2 糖组成 LBPS-I 经完全酸水解,产物用 PC 法检测发现只有葡萄糖的斑点,说明 LBPS-I 是一种葡聚糖.图 1a 是标准单糖的糖腈乙酸酯衍生物的 GC 图,按出峰的先后依次为鼠李糖、岩藻糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖和内标肌醇.图 1b 是 LBPS-I 完全水解物的糖腈乙酸酯衍生物的 GC 图,只有一个峰,证明 LBPS-I 是由葡萄糖组成.

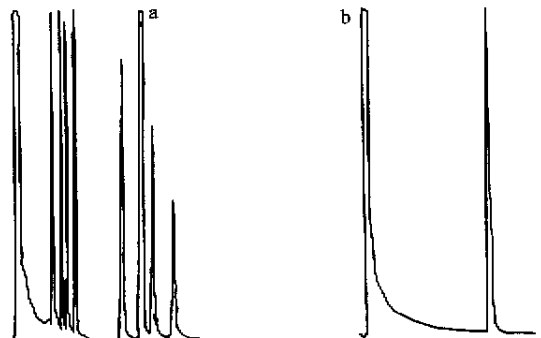


图 1 LBPS-I 的糖组成 GC 分析

Fig.1 Sugar composition GC analysis of LBPS-I

2.1.3 连接方式 甲基化产物水解、还原、乙酰化后进行 GC-MS 分析,数据与文献 6 对照,结果见表 1.

表 1 LBPS-I 甲基化分析结果

Tab.1 The results of methylated analysis of LBPS-I and its hydrolysates

Methylated-sugar	Ratio ^{a1)}	Time/min ²⁾	MS main fragments(m/z)	Linkages type
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	2.1	1.00	43, 45, 71, 87, 101, 117, 129, 145, 161, 205	Glc-(1→
2,4,6-Me ₃ -Glc	9.3	1.82	43, 45, 71, 87, 99, 101, 117, 129, 161, 189, 233, 277	→3)-Glc-(1→
2,3,4-Me ₃ -Glc	5.2	2.22	43, 87, 99, 101, 117, 129, 189, 233	→6)-Glc-(1→
2,3,6-Me ₃ -Glc	18.4	2.32	43, 45, 71, 87, 99, 101, 113, 117, 129, 131, 161, 233	→4)-Glc-(1→
2,4-Me ₂ -Glc	1	4.21	43, 59, 87, 101, 117, 129, 189, 233	→3,6)-Glc-(1→
2,3-Me ₂ -Glc	1	4.50	43, 85, 87, 99, 101, 117, 127, 159, 161, 201, 261	→4,6)-Glc-(1→

注 : 1) Molar ratio ; 2) Retention time are relative to 2,3,4,6-Me₄-Glc

由表 1 可知, LBPS-I 是以 1,4-和 1,3-连接的葡萄糖残基(2:1)为主链,在 6-位连有短的 1,6-分支。LBPS-I 经高碘酸氧化,每摩尔己糖残基消耗 IO_4^- 0.838 3 mol,生成甲酸 0.302 6 mol。Simth 降解产物经 GC 分析,发现主要为赤藓醇和葡萄糖,以及少量的甘油。赤藓醇是 1,4,6-和 1,4-葡萄糖残基的降解产物,葡萄糖是 1,3,6-和 1,3-葡萄糖残基的降解产物,而甘油是 1,6-葡萄糖残基的降解产物^[8]。这与甲基化分析的结果基本吻合。图 2 是 LBPS-I 的 ^{13}C -NMR 图谱,经与文献^{9,10}比较,将其碳信号归于表 2。

表 2 LBPS-I 的¹³C-NMR 化学位移归属

Tab.2 Assignment of ^{13}C -NMR chemical shifts of LBPS-I

Sugar residus	Chemical shifts					
	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆
α -(1 $\rightarrow$ 3)Glc	101.9	73.1	82.2	72.6	75.1	62.9
α -Gl(1 $\rightarrow$ 3) $\rightarrow$	101.8	73.1	82.5	72.4	75.9	62.9
α -Gl(1 $\rightarrow$ 4) $\rightarrow$	102.5	74.1	72.9	79.6	75.9	62.9
α -Glc(1 $\rightarrow$ 4) δ						
α -Glc(1 $\rightarrow$ 3) δ	100.4	71.3	72.9	74.3	76.1	68.2

2.1.4 糖苷键构型 图 2 中 C₁ 的 4 个强吸收峰都处在 δ 103 以下,这说明 LBPS-I 中的糖苷键类型主要是 α-型(α-型 C₁ 信号在 δ 103 以下,β-型 C₁ 信号在 δ 103 以上)^[11].在图 3 中,850.37 cm⁻¹的峰表明 LBPS-I 中的糖苷键为 α-型(β-型糖苷键的吸收峰在 890 cm⁻¹左右处)^[11],说明 LBPS-I 是以 α-型糖苷键为主, LBPS-I 的较大正数的比旋光度 +192.3(c = 0.75, H₂O)也证明了这一点^[11].红外光谱中 1 044.76 cm⁻¹、1 110.20 cm⁻¹和 1 157.56 cm⁻¹的吸

收峰表示 LBPS-I 中的糖环构型为吡喃型(呋喃型糖环在此区间上只有两个强吸收峰),而 924.71 cm⁻¹的吸收峰是 D-吡喃葡萄糖的非对称环伸缩振动的特征吸收峰^[11].

2.2 LBPS-I 的抗肿瘤活性

由表 3 可以清楚地看出,等于或高于 50 mg/kg 剂量的 LBPS-I 对 B16 黑色素瘤和 Lewis 肺癌的抑制效果都达到了显著以上水平,中等剂量(150 mg/kg)作用最佳,抑瘤活性呈量效相关.

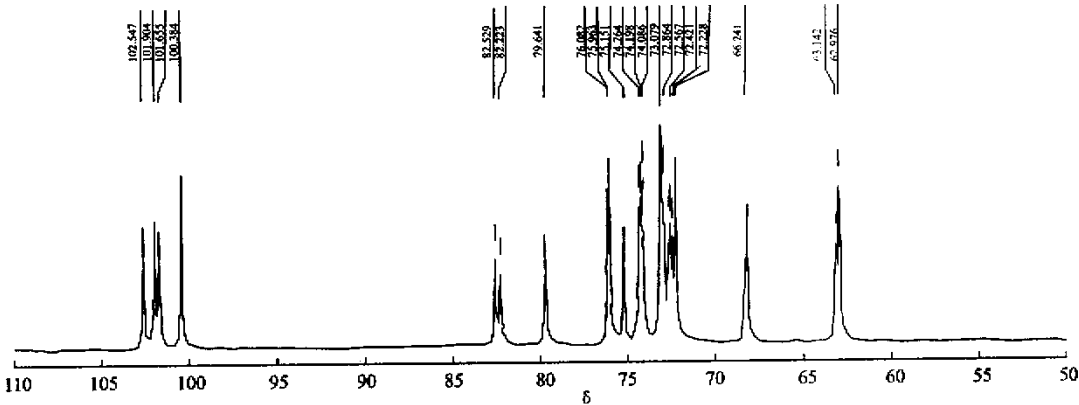


图 2 LBPS-I 的¹³C-NMR 图谱
Fig.2 ¹³C-NMR spectrum of LBPS-I

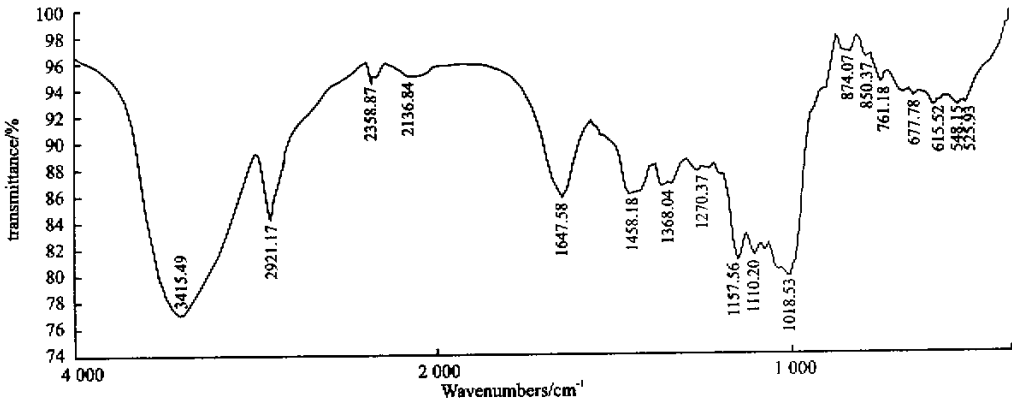


图 3 LBPS-I 的红外光谱图
Fig.3 4-14 IR spectrum of LBPS-I

表 3 LBPS-I 的抗肿瘤活性

Tab.3 Inhibitory effect of LBPS-I on cancer cell in mice in vivo							
Cancer kind	Dose/ (mg/kg)	Tumor weight ($\bar{X} \pm S$)/mg	Inhibitory rate/%	Cancer kind	Dose/ (mg/kg)	Tumor weight ($\bar{X} \pm S$)/mg	Inhibitory rate/%
Melanoma	0	1 447 ± 143		Lewis lung	0	1 882 ± 147	
B16	50	1 137 ± 147 ¹⁾	21.4	Cancer	50	1 403 ± 114 ²⁾	25.5
	150	874 ± 69 ²⁾³⁾	39.6		150	1 124 ± 144 ²⁾³⁾	40.3
	250	993 ± 187 ²⁾	31.4		250	1 235 ± 100 ²⁾	34.4

注 1) $P < 0.05$ compared with Normal control group 2) $P < 0.01$ compared with Normal control group ; 3) $P < 0.05$ compared with Low dose group. 万方数据

3 结 论

1)经水提取、乙醇沉淀、柱色谱分离获得了均一的 LBPS-I 多糖 ,该多糖是一种纯粹的非淀粉类葡

聚糖 ,是由 α -D-(1 4)-Glc_p 和 α -D-(1 3)-Glc_p 以 2:1 的比例交替形成主链 ,并有 α -D-(1 ,6)-Glc_p 侧链的葡聚糖 .

2)鼠移植性实体瘤研究表明 ,LBPS-I 对移植性黑色素 B16 和 Lewis 肺癌有较强的抑制作用 .

参考文献 :

[1] 李卫民 孟宪纾 . 中药百合的研究概况[J]. 中草药 ,1991 22(6) :277 - 279 .
[2] 侯秀云 陈发奎 . 百合化学成分的分离与结构鉴定[J]. 药学学报 ,1998 23(12) :923 - 926 .
[3] 姜茹 匡永清 吴少华 . 百合免疫活性多糖的分离及其组成[J]. 第四军医大学学报 ,1998 19(2) :188 .
[4] 张继敏 匡永清 吴少华等 . 百合多糖对小鼠免疫功能的影响[J]. 中国中医药科技 ,1996 3(5) :15 - 17 .
[5] 李志孝 刘方明 陈耀祖 . 鬼臼葡聚糖的化学结构[J]. 化学学报 ,1996 54 :1037 .
[6] BJORDAL H , LINDBERG B , SVENSSON S . Mass spectrometry of partially methylated alditol acetates[J]. **Carbohydr Res** , 1967 , 5 : 433 - 440 .
[7] WHISTER R L . Methods in carbohydrate chemistry[M]. New York and London : Academic Press ,1965 . 2 - 23 .
[8] ASPINALL G O , FERRIER R J . A spectrophotometric method for the determination of periodate consumed during the oxidation of carbohydrates[J]. **Chem Ind** (London) ,1957(7) :1216 - 1221 .
[9] AGRAWAL P K . NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides[J]. **Phytochemistry** , 1992 32 (10) :3307 - 3330 .
[10] GORIN P A J . Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of polysaccharides[J]. **Adv Carbohydr Chem Biochem** , 1981 38 : 13 - 39 .
[11] 张惟杰 . 复合多糖生化研究技术[M]. 杭州 : 浙江大学出版社 ,1994 . 324 - 340 .

(责任编辑 :秦和平)

(上接第 61 页)

内过氧化氢的用量从 1987 年的 82 万吨增长到 1995 年的 195 万吨 ,而美国从 1991 年的 11.5 万吨增长到 1999 年的 22 万吨^[2] . 而利用过氧化氢酶快速去除过氧化氢不仅完全 ,节约用水和能源 ,缩短工艺时间 ,而且不会生成硫酸盐或氮盐等有害物质 ,且酶本身是生物可降解材料 ,有利于保护环境 . 纺织

品和纸浆的漂白都是在 70 ~ 95 ℃ 的高温条件下完成的 ,而所获得的重组酶的良好热稳定性将使得漂白结束后不需用水清洗 ,直接在位清除过氧化氢成为可能 . 重组酶的良好贮存稳定性也是其商品化的一大优势 . 因此 ,所获得的重组酶就其性质来说有商品化的潜力 .

参考文献 :

[1] 周一 严自正 卢运玉等 . 耐热过氧化氢酶产生菌的筛选和发酵条件的研究[J]. 微生物学报 ,1990 30(3) :223 - 227 .
[2] PATRICK DHAESE . Catalase : An enzyme with growing industrial potential[J]. **Chimica Oggi** ,1996 14(1) :19 - 21 .
[3] SUVIT LOPRASERT , SEIJI NEGORO , HIROSUKE OKADA . Thermostable peroxidase from *Bacillus stearothermophilus*[J]. **Journal of General Microbiology** ,1988 134 :1971 - 1976 .
[4] ALLGOOD G S , PERRY J J . Characterization of a manganese-containing catalase from the obligate thermophile *Thermoleophilum album* [J]. **J Bacteriology** ,1986 168(2) :563 - 566 .
[5] MASAYUKI KAGAWA , NORIYUKI MURAKOSHI , YASUSHI NISHIKAWA , et al . Purification and cloning of a thermostable manganese catalase from a thermophilic bacterium[J]. **Archives of Biochemistry and Biophysics** ,1999 363(2) :346 - 355 .
[6] AEBI H E . CATALASE . Methods of Enzymatic analysis[M]. Weinheim : Verlag Chemie , 1983 .

(责任编辑 :李春丽 朱 明)