

枸杞多糖的分离纯化及其体外抗增殖和抗炎活性分析

乔西凤¹, 马丛伟¹, 张颖², 林展乐¹, 黄菁霞¹, 林丽³, 张勇民^{4,5}, 杨宜婷^{2*}, 杜志云^{1*}

(1. 广东工业大学生物医药学院, 广东广州 510006) (2. 无限极(中国)有限公司, 广东广州 510623)

(3. 佛山市康侬爱伦生物技术有限公司, 广东佛山 523281) (4. 索邦大学分子化学研究所, 法国巴黎 75005)

(5. 内蒙古大学化学化工学院, 内蒙古呼和浩特 010021)

摘要: 研究不同枸杞 (*Lycium barbarum*, Gouqi, GQ) 多糖组分对苯甲酸雌二醇 (Estradiol, E2) 及黄体酮 (Progesterone, P) 联合诱导小鼠乳腺上皮细胞 (HC11 细胞) 增殖的抑制作用的影响。通过水提醇沉及柱分离法获得不同组分; 并对其分子量及体外抗增殖、抗炎作用进行初步分析。结果显示, 枸杞粗多糖通过 DEAE-52 离子色谱柱和 Sephadex G-50 凝胶柱洗脱出 7 种多糖组分, 分别为 GQ-01、GQ-02、GQ-03、GQ-04、GQ-05、GQ-06、GQ-07, 其平均相对分子量分别为 113 ku、<1 ku、367 ku、613 ku、81 ku、110 ku、<1 ku。选用不同浓度枸杞多糖 (5、25、125、250、500、1 000 $\mu\text{g/mL}$) 处理 HC11 细胞, 发现 250 $\mu\text{g/mL}$ (GQ-01、GQ-04 及 GQ-06) 可显著抑制 E2 (25 $\mu\text{g/mL}$) + P (250 $\mu\text{g/mL}$) 联合诱导的 HC11 细胞增殖活性, 分别降低了 28.13%、26.74%、30.83% ($P < 0.01$); GQ-01 及 GQ-06 可调节 G0/G1 与 G2/M 期转变而影响细胞周期的分布; 与模型组相比, GQ-06 可极显著抑制 E2+P 联合诱导雌激素受体 (ER α) 水平, 降低了 5.54% ($P < 0.01$); GQ-04 及 GQ-06 可显著抑制 LPS 诱导 RAW264.7 细胞的 NO 水平的产生, 与模型组相比 NO 水平分别降低了 13.43%、12.65% ($P < 0.05$)。该研究表明, GQ-06 可能通过影响细胞周期分布及抑制 ER α 的水平, 从而抑制乳腺上皮细胞过度增殖; 此外, 还可抑制 LPS 诱导 RAW364.7 细胞中 NO 的释放, 降低细胞的炎症反应。该研究将为功能性食品深度开发提供重要的理论依据。

关键词: 枸杞多糖; 小鼠乳腺上皮细胞 (HC11 细胞); 细胞周期; 雌激素受体 (ER α); 一氧化氮 (NO)

文章编号: 1673-9078(2023)02-125-134

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.2.0297

Isolation and Purification of *Lycium Barbarum* Polysaccharides and Analysis of its *in Vitro* Anti-proliferative and Anti-inflammatory Activities

QIAO Xifeng¹, MA Congwei¹, ZHANG Ying², LIN Zhanle¹, HUANG Jingxia¹, LIN Li³, ZHANG Yongmin^{4,5}, YANG Yiting^{2*}, DU Zhiyun^{1*}

(1. School of Biomedical and Pharmaceutical Sciences, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China)

(2. Infinitus (China) Co. Ltd., Guangzhou 510623, China) (3. Foshan Allan Conney Biotechnology Co. Ltd., Foshan 523281,

China) (4. Sorbonne Université, CNRS, Institut Parisien de Chimie Moléculaire, Paris 75005, France)

(5. Inner Mongolia University Research Center for Glycochemistry of Characteristic Medicinal Resources, School of Chemistry and Chemical Engineering, Inner Mongolia University, Huhehaote 010021, China)

Abstract: To investigate the effects of *Lycium barbarum* polysaccharides on the proliferation of Estradiol (E2) and progesterone (P) induced-mouse mammary gland epithelial cells (HC11) and LPS-induced inflammatory response in macrophages. Different components were

引文格式:

乔西凤, 马丛伟, 张颖, 等. 枸杞多糖的分离纯化及其体外抗增殖和抗炎活性分析[J]. 现代食品科技, 2023, 39(2): 125-134

QIAO Xifeng, MA Congwei, ZHANG Ying, et al. Isolation and purification of lycium barbarum polysaccharides and analysis of its *in vitro* anti-proliferative and anti-inflammatory activities [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(2): 125-134

收稿日期: 2022-03-16

基金项目: 国家自然科学基金项目 (22178070); 科技兴安项目 (2021CG0029)

作者简介: 乔西凤 (1983-), 女, 博士, 研究方向: 多糖免疫功效研究, E-mail: qiaoxifeng.787@163.com; 共同第一作者: 马丛伟 (2000-), 男, 硕士, 研究方向: 天然产物功效评价, E-mail: 1290071980@qq.com

通讯作者: 杨宜婷 (1976-), 女, 高级工程师, 研究方向: 天然资源研究与健康食品研制, E-mail: yuki.yang@infinitus-int.com; 共同通讯作者: 杜志云 (1969-), 男, 教授, 研究方向: 分子营养学与功能化妆品, E-mail: zhiyundu@gdut.edu.cn

obtained by water extraction, ethanol precipitation and column separation, and their molecular weights, and *in vitro* anti-proliferative and anti-inflammatory effects were preliminarily analyzed. The result showed that seven *Lycium barbarum* polysaccharides components were eluted out by DEAE-52-ion chromatography column and Sephadex G-50 gel column (GQ-01, GQ-02, GQ-03, GQ-04, GQ-05, GQ-06 and GQ-07, respectively), and their mean relative molecular weights were 113 ku, <1 ku, 367 ku, 613 ku, 81 ku, 110 ku, and <1 ku. Different *Lycium barbarum* polysaccharide concentrations (5, 25, 125, 250, 500, 1 000 $\mu\text{g/mL}$) were used to treat HC11 cells, and GQ-01, GQ-04 or Gq-06 at 250 $\mu\text{g/mL}$ could significantly inhibit the proliferation of HC11 cells co-treated with E2 (25 $\mu\text{g/mL}$) and P (250 $\mu\text{g/mL}$) by 28.13%, 26.74% and 30.83%, respectively ($P<0.01$). GQ-01 and Gq-06 could regulate the G0/G1 and G2/M phase transition to affect the cell cycle distribution. Compared with the model group, Gq-06 could significantly inhibit the E2+P induced ER α level (decreased by 5.54%) ($P<0.01$). Compared with the model group, the production of NO in macrophages could be significantly inhibited by GQ-04 and GQ-06 (by 13.43% and 12.65%, respectively) ($P<0.05$). This research showed that GQ-06 may inhibit the excessive proliferation of mammary gland epithelial cells by affecting the cell cycle distribution and the level of ER α , and also suppress LPS-induced NO release to reduce the inflammatory response in RAW264.7 cells. This study will provide an important theoretical basis for further development of functional foods.

Key words: *Lyciumbarbarum* polysaccharide; mammary gland epithelial cell (HC11 cells); cell cycle; estrogen receptor α (ER α); nitric oxide (NO)

乳腺增生是一种以乳腺组织导管和小叶出现结构退行性改变,以周期性乳房疼痛为主要特征的非炎症、非肿瘤的慢性乳腺疾病^[1]。因竞争压力增加及生活习惯改变,本病以中年女性发病率较高,尤以肝郁气滞型最常见,严重时发展成乳腺癌^[2-4],西医治疗主要以激素类,如黄体酮、三苯氧胺及维生素类等为主,但这类药物存在很大的副作用。中医药有着悠久且丰富的临床治疗经验,并以其经济、安全、副作用小,在治疗乳腺增生中取得较好效果,已被广大患者接受。中医认为乳腺增生属于“乳癖”范畴,明代龚居中在《外科活人定本》^[5]中载:“乳癖,此症生于正乳之上,乃厥阴,阳明之经所属也……何谓之癖,若硬而不痛,如顽核之类”,介绍了乳癖与肝、脾间的关系。随着多数医学者对乳癖的逐渐认识,发现其病因主要为情志、饮食和劳倦内伤等,进而导致肝气郁结、冲任不和、寒凝气滞、瘀血阻络,寻找具有相关功效的中草药,对缓解乳腺增生疾病具有重要的价值。

枸杞为传统的中药材及药食同源产品,近年来,作为一种具有高度优势的营养、预防和治疗功能的超级功能性食品而备受瞩目^[6]。在中国药典中,枸杞是一种有助于视力和长寿,以及平衡体内阴阳协调来治疗糖尿病的藥物^[7,8]。同时,在抗肿瘤^[9]、免疫调节^[10,11]、血糖稳态、脂质代谢、促进男性生育等方面具有调控作用^[12]。多糖、类胡萝卜素和酚类物质是枸杞中三种主要的活性物质。枸杞多糖作为最重要的成分,是由6种单糖组成(葡萄糖,半乳糖,阿拉伯糖,鼠李糖,甘露糖和木糖)^[13]。研究发现,枸杞多糖可调节雌激素代谢,抑制 MCF-7 细胞增殖作用^[14],还可通过激活 ERK1/2 通路抑制 MCF-7 细胞的细胞周期 S 期停滞、诱导细胞凋亡抑制细胞增殖作用^[15]。枸杞多糖还可抑

制乳腺炎小鼠组织中 TNF- α 表达水平^[16]。研究发现,机体的免疫调节活性与生理功能息息相关,例如,炎症、肿瘤及癌症等的发生,均是机体免疫系统紊乱的结果。在植物多糖研究中,小鼠 RAW264.7 巨噬细胞常作为体外免疫调节研究的模型^[17,18],其能够产生促炎细胞因子,如肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素-1 β 和分泌 NO 等炎症介质,来调节免疫反应^[19]。

研究发现,体外培养的原代正常人的乳腺上皮细胞仍具有体内细胞的遗传特性,且在体外联合应用 E2 和 P 可促进增殖^[20]。因此,为拟构建体内乳腺组织良性增生模型,本研究通过体外 E2+P 联合诱导小鼠乳腺上皮细胞增殖模型,MTT 法检测枸杞多糖对 HC11 细胞增殖作用,流式细胞术分析枸杞多糖对 HC11 细胞凋亡和细胞周期分布影响,ELISA 检测 ER α 表达水平,同时,通过 LPS 诱导 RAW264.7 巨噬细胞的炎症模型,检测炎症介质 NO 的产生,揭示枸杞多糖组分对 E2+P 联合诱导 HC11 细胞增殖的抑制作用。本论文以枸杞多糖为研究对象,探索其分离纯化、体外抗增殖及抗炎活性,为枸杞多糖的深度开发提供重要的理论基础。

1 材料与方法

1.1 样品试剂

枸杞,购自中国青海;小鼠乳腺上皮细胞(HC11 细胞)、小鼠单核巨噬细胞(RAW264.7 细胞),中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心;细胞培养皿,美国 Corning 公司;MTT,美国 Sigma 公司;DEAE-52 纤维素、大孔树脂、G-50 葡聚糖凝胶、G-25 葡聚糖凝胶,北京瑞达恒辉科技发展有限公司;乳癖

消片(RPXP), 辽宁恒仁药业有限公司; 黄体酮(P), 浙江仙琚制药股份有限公司苏州分公司; 苯甲酸雌二醇注射液(E2), 宁波通用药业股份有限公司; 脂多糖(LPS, 纯度>99%), 美国Sigma公司; DMEM 高糖培养基、青霉素链霉素溶液、PBS 缓冲液、0.25% 胰蛋白酶、胎牛血清, 美国Gibco公司; Annexin V-FITC 细胞凋亡试剂盒、BCA 蛋白浓度检测试剂盒、雌激素受体(ER α) ELISA 检测试剂盒、一氧化氮(NO) 检测试剂盒, 碧云天生物技术有限公司。

1.2 仪器

玻璃层析柱(内径 12 mm×高度 800 mm), 伟业玻璃制品有限公司; N-1300V-W 旋转蒸发仪, 东京理化; Infinite M200 Pro 酶标仪, 美国Bio-Tek 基因有限公司; TGL-16GA 二氧化碳培养箱, 美国Thermo 公司; AUW120D 电子分析天平, 日本岛津公司; VD-650 超净台, 江苏通净净化设备公司; LC-2030C 高效液相色谱仪, 日本岛津公司; ShedexOHpak HQSB 804 色谱柱(8.0 mm×300 mm)与 HQSB 802.5 色谱柱(8.0 mm×300 mm), 日本岛津公司; FACSCalibur 流式细胞仪, 美国Becton Dickinson 公司。

1.3 枸杞多糖组分的提取与分离

称取枸杞 100 g, 提取两次, 第一次加 10 倍量超纯水, 煮沸提取 2 h; 第二次加 8 倍量超纯水, 煮沸提取 1 h^[21,22]。80 目筛网过滤, 温度 65~80 °C, 真空度 -0.04~-0.07 MPa, 浓缩至固形物含量为 35%±5%, 降温出料。检测固形物含量, 先加浓缩液再边搅拌边缓慢加入乙醇, 调至乙醇浓度为 75%, 静置过夜(12 h 以上)。抽取上清液, 取出沉淀物。提取物在 70~100 °C 烘箱烘干, 获得枸杞多糖。利用大孔树脂, 解吸已吸附的色素, 洗涤大孔树脂, 使大孔树脂再生。脱色 2 遍后, 将多糖溶液在 65 °C 的水浴中旋转蒸发, 浓缩后再脱色一次。采用Sevage法去除蛋白, 向枸杞多糖溶液中加入氯仿:正丁醇混合溶剂(4:1, V/V), 充分混匀 60 min 后离心取上清液。重复脱蛋白操作步骤共 3 次, 对上清液进行浓缩, 冻干后得枸杞粗多糖^[23]。

依次用 0.1 mol/L 盐酸、超纯水、0.1 mol/L 氢氧化钠溶液, 先对 DEAE-52 纤维素柱进行预处理; 配制 50 mg/mL 的枸杞多糖水溶液, 缓慢上样 5 mL, 依次用超纯水、2 mol/L 氯化钠溶液洗涤, 分别收集样品洗脱液, 重复步骤多次。用超纯水溶解配制 50 mg/mL 的枸杞多糖溶液, 上样 5 mL, 采用 Sephadex G-50 与 Sephadex G-25 葡聚糖凝胶柱分离纯化, 用超纯水洗脱, 按次序收集洗脱液。采用苯酚硫酸比色法检测, 以洗

脱管数为横坐标, 紫外分光光度法测的吸光度为纵坐标, 绘制曲线。根据洗脱曲线, 对同一洗脱峰的样品进行合并, 对洗脱液进行浓缩, 干燥, 收集单一枸杞多糖组分。

1.4 枸杞多糖组分平均相对分子量测定

取样品 2 mg, 溶于 0.4 mL 0.1 mol/L Na₂SO₄ 溶液中溶解(5 mg/mL), 配制成 5 mg/mL 的溶液, HQSB 804 色谱柱与 HQSB 802.5 色谱柱串联, 流动相为 0.1 mol/L Na₂SO₄ 溶液, 流速为 0.6 mL/min, 柱温为 35 °C, 进样量为 100 μ L^[24]。标准品为已知分子量的葡聚糖标准品, 并将其配制成 1.0 mg/mL 的溶液, 按上述条件测定标准品和枸杞多糖的保留时间, 以葡聚糖标准品平均分子质量的对数值 lgM_w 为因变量, 保留时间 *t* 为自变量, 进行相关回归分析, 得到一元线性回归方程, 根据回归方程, 计算枸杞多糖样品的平均分子量。

1.5 枸杞多糖组分对 HC11 细胞增殖作用

选择对数生长期的 HC11 细胞传代后, 将密度调整为每毫升 6×10^4 个, 取 6×10^3 个 HC11 细胞(100 μ L) 接种于 96 孔板中, 培养 24 h 后, 每孔替换加入含各浓度(0、5、25、125、250、500、1 000 μ g/mL) 枸杞多糖组分(GQ-01 至 GQ-07)的培养基 100 μ L, 继续培养 24 h。去除旧培养基, 用 PBS 清洗一遍并吸除。避光, 每孔加入 100 μ L MTT (0.5 mg/mL) 溶液, 继续孵育 4 h。去除 MTT 溶液, 加入 200 μ L DMSO, 震荡 10 min, 酶标仪中 570 nm 检测细胞存活率。

1.6 枸杞多糖组分对 HC11 细胞凋亡的作用

细胞铺板至 96 孔板 24 h 后, 替换加入 2 mL E2 (25 μ g/mL) + P (250 μ g/mL) 诱导 HC11 细胞, 及 250 μ g/mL 枸杞粗多糖(GQ)与 250 μ g/mL 枸杞多糖(GQ-01 和 GQ-06)及阳性对照乳癖消片(PRXP)浓度为 500 μ g/mL。组别设置为空白组, E2+P 造模组, (E2+P) 造模组+阳性对照组, (E2+P) 造模+枸杞多糖组分(GQ-01 及 GQ-06), 每组设 3 个复孔, 各多糖组分处理 24 h 后, 收集细胞, PBS 清洗一次, 加入 0.25% 胰酶消化细胞, 并加入细胞培养液轻吹打细胞, 转移至离心管中, 1 700 r/min 离心 5 min, 弃上清, 收集细胞, 用 PBS 重悬细胞并计数。各组样品取 5~10 万重悬的细胞, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 195 μ L Annexin V-FITC 结合液轻重悬细胞, 加 5 μ L Annexin V-FITC, 轻混匀, 再加 10 μ L PI 染色液, 室温避光孵育 10~20 min, 立即用上流式细胞仪检测。

1.7 枸杞多糖组分对 HC11 细胞的细胞周期作用

细胞铺板及实验分组同实验步骤 1.6, 收集细胞后, 加入预冷 $\varphi=70\%$ 乙醇 4℃固定 30 min, 重悬于 0.5 mL 碘化丙啶 (PI) 溶液中, 37℃避光温浴 30 min。利用流式细胞仪分析细胞周期分布。

1.8 枸杞多糖组分对 HC11 细胞的雌激素受体 (ER α) 表达水平的影响

细胞铺板及实验分组同实验步骤 1.6, 24 h 后取培养上清, 1 200 r/min 离心 5 min, 取上清液备用, 利用 BCA 法测定蛋白浓度, 再使用 ER α 试剂盒检测其蛋白表达水平。

1.9 枸杞多糖组分对 RAW264.7 细胞毒性作用及 NO 水平检测

根据实验步骤 1.5, 检测不同浓度枸杞多糖对 RAW264.7 细胞的细胞毒性作用; 筛选合适的浓度后, 进行 NO 检测实验。将 RAW264.7 细胞铺板至 96 孔板 24 h, 加入各枸杞多糖组分及 LPS, 组别分别设为不

加药物单加细胞组为空白组、1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 组为阳性对照组、250 $\mu\text{g/mL}$ 枸杞多糖组分+LPS 组为实验组 (GQ-01-GQ-07)。处理 24 h 后, 检测 NO 水平。

1.10 数据处理

数据分析使用 GraphPad Prism 5 软件进行统计学分析, 试验结果用平均值 $\pm$ 标准差表示, *代表 $P<0.05$ 表示数据有显著差异, **代表 $P<0.01$ 表示数据有极显著差异。

2 结果与讨论

2.1 枸杞多糖组分分离纯化及平均相对分子质量

目前在植物多糖分离纯化中, 通常采用离子交换色谱柱和凝胶色谱柱这两种色谱柱对粗多糖组分进行分离, 离子交换色谱柱主要通过不同多糖组分与离子交换剂间的作用力强弱不同进行分离, 而凝胶色谱柱主要根据分子量大小进行分离^[25]。研究发现采用 DEAE 纤维素柱和 Sephadex G-150 柱结合对枸杞多糖进行分离纯化, 最后获得 5 个高纯度组分^[26]。

表 1 枸杞多糖组分平均相对分子质量

Table 1 Average relative molecular weights of *Lyciumbarbarum* polysaccharides components

枸杞粗多糖		枸杞多糖组分						
组分名称	GQ	GQ-01	GQ-02	GQ-03	GQ-04	GQ-05	GQ-06	GQ-07
分子量/ku	48	113	<1	367	613	81	110	<1

本研究采用 DEAE-52 离子色谱柱与 Sephadex G-50、Sephadex G-25 凝胶树脂柱结合, 通过对枸杞多糖的分离纯化共获得 7 种枸杞多糖组分, 如表 1 所示, 对 DEAE 纤维素柱已用超纯水洗脱的枸杞多糖, 通过 G-50 葡聚糖凝胶柱共分离纯化出 2 种枸杞多糖组分 (GQ-01、GQ-02) (表 1); 对 DEAE 纤维素柱已用氯化钠洗脱的枸杞多糖溶液, 利用 G-50 葡聚糖凝胶与 G-25 葡聚糖凝胶柱共分离纯化出 5 种枸杞多糖组分 (GQ-03、GQ-04、GQ-05、GQ-06、GQ-07) (表 1)。通过使用高效液相色谱分析其平均相对分子量, 根据葡聚糖标准品的 $\lg M_w$ 为纵坐标 (y), 保留时间 t 为横坐标 (x), 得线性回归方程为 $y=11.17-0.234 1x$ ($R^2=0.994 3$), 计算枸杞多糖各组分的平均相对分子量 (M_w), 结果如表 1 所示, 发现 GQ-01 相对分子质量为 113 ku, 占比 96.7%; GQ-02 相对分子质量为小于 1 ku, 占比为 64.0%; GQ-03 相对分子质量分别为 367 ku, 占比 62.08%; GQ-04 相对分子质量为 613 ku, 占比为 70.3%; GQ-05 相对分

子质量为 81 ku 的多糖, 占比为 71.2%; GQ-06 相对分子质量为 110 ku 的多糖, 占比为 52.7%; GQ-07 相对分子质量为小于 1 ku 的多糖, 占比为 53.9%。根据以上结果表明, 共分离出 2 种分子量较大枸杞多糖组分 GQ-03 (367 ku) 和 GQ-04 (613 ku); 3 种中等分子量枸杞多糖组分 GQ-01 (113 ku)、GQ-05 (81 ku) 和 GQ-06 (110 ku); 2 种小分子量的枸杞多糖组分 GQ-02、GQ-07 均小于 1 ku。

2.2 枸杞多糖组分对 HC11 细胞增殖的影响

乳腺疾病的发生是一个渐进过程, 从起初发病至严重癌变是乳腺上皮细胞增殖过度及细胞凋亡减弱的结果。为研究各枸杞多糖组分是否影响乳腺上皮细胞的增殖活性, 利用 MTT 实验检测枸杞多糖组分对 HC11 细胞活力的作用。结果如图 1 所示, 当用不同浓度 (5、25、125、250、500、1 000 $\mu\text{g/mL}$) 的枸杞多糖组分及阳性对照处理 HC11 细胞时, 发现 250 $\mu\text{g/mL}$ (RXPX、GQ-01 及 GQ-06) 即可极显著抑制 HC11

细胞增殖 ($P<0.01$), HC11 细胞活性分别降低了 40.65%、36.74%、30.73%, 且呈剂量依赖效应。结果表明, 当用不同浓度枸杞多糖组分直接刺激 HC11 细胞, 发现其对 HC11 细胞具有低浓度促进细胞增殖, 高浓度抑制细胞增殖的作用。但枸杞多糖组分抑制 HC11 细胞增殖的浓度有所差异, 仅有 GQ-01 及 GQ-06 随着浓度的升高, 会呈现更显著抑制 HC11 细胞的过度增殖的作用。

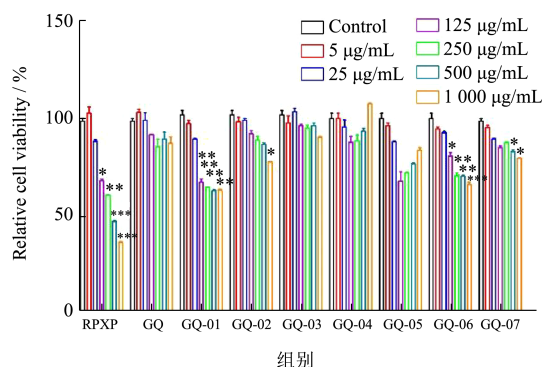


图1 枸杞多糖组分对 HC11 细胞增殖的影响

Fig.1 Effects of *Lyciumbarbarum* polysaccharides components on the proliferation of HC11 cells

注: *为样品组与模型组比较 ($*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$)。

2.3 利用不同激素水平处理检测枸杞多糖组分对 HC11 细胞增殖的影响

本研究利用 E2 与 P 联合刺激 HC11 细胞, 构建 HC11 细胞增殖模型, 结果如图 3 所示, 单独用不同浓度 (5~1 000 µg/mL) P 处理 HC11 细胞, 发现 250 µg/mL P 会显著促进 HC11 细胞增殖 ($P<0.05$), HC11 细胞活性增加了 11.70% (图 2a); 单独用不同浓度 (0.01~25 µg/mL) E2 处理 HC11 细胞时, 研究发现 25 µg/mL E2 可显著促进 HC11 细胞增殖 ($P<0.01$) HC11 细胞活性增加了 20% (图 2b); 最后选择不同浓度 E2 (0.01~25 µg/mL) 与浓度为 250 µg/mL P 联合处理 HC11 细胞, 发现当 25 µg/mL E2 与 250 µg/mL P 联合 (浓度比为 1:10) 处理时, 可极显著促进 HC11 细胞增殖 ($P<0.001$), HC11 细胞活性增加了 36.25% (图 2c), 结果表明, 当单独使用 P 浓度为 250 µg/mL 或 E2 浓度为 25 µg/mL 时, 均可显著促进乳腺上皮细胞增殖。然而, 当 25 µg/mL E2 与 250 µg/mL P 联合使用时, 也可极显著促进乳腺上皮细胞增殖, 提示 E2 与 P 联合使用比单独使用 E2 或 P, 具有较好地促进乳腺上皮细胞增殖的作用。表明 E2+P 联合诱导可在体外成功构建小鼠乳腺上皮细胞增殖模型。

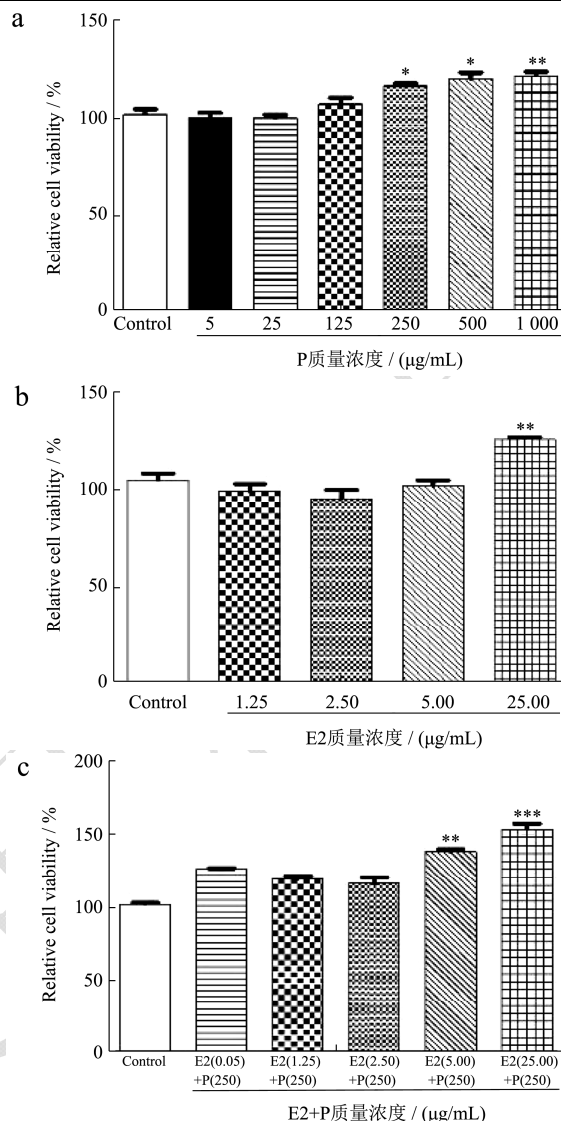


图2 E2+P 联合诱导 HC11 细胞增殖

Fig.2 E2+P joint induced HC11 cell proliferation

注: a 为不同浓度 (5~1 000 µg/mL) P 对 HC11 细胞增殖作用; b 为不同浓度 (0.01~25 µg/mL) E2 对 HC11 细胞增殖作用; c 为不同浓度 (0.01~25 µg/mL) E2 与 250 µg/mL P 联合诱导 HC11 细胞增殖作用。*为样品组与对照组比较 ($*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$)。

2.4 枸杞多糖组分对激素造模后的 HC11 细胞增殖的影响

为检测枸杞多糖组分是否对 E2+P 联合造模 HC11 细胞增殖的影响, 利用 MTT 实验检测枸杞多糖组分处理造模后 HC11 细胞增殖活性。结果如图 3 所示, 与对照组比较, E2+P 联合处理 HC11 细胞模型组, 可显著促进 HC11 细胞增殖 ($P<0.01$); 与模型组比较, 250 µg/mL (GQ-01, GQ-03, GQ-04, GQ-06) 可显著抑制 E2+P 联合诱导的 HC11 细胞增殖作用 ($P<0.01$),

HC11 细胞活性分别降低了 28.13%、22.15%、26.74%、30.83%，其中随着浓度增加，GQ-01、GQ-04 及 GQ-06 对 HC11 细胞的抑制作用增强，存在统计学意义，并具有剂量依赖效应，尤其，GQ-01 与 GQ-06 对 HC11 细胞的抑制率更高，表明 250 $\mu\text{g/mL}$ 枸杞多糖组分（GQ-01 及 GQ-06）可显著抑制 HC11 细胞增殖作用。

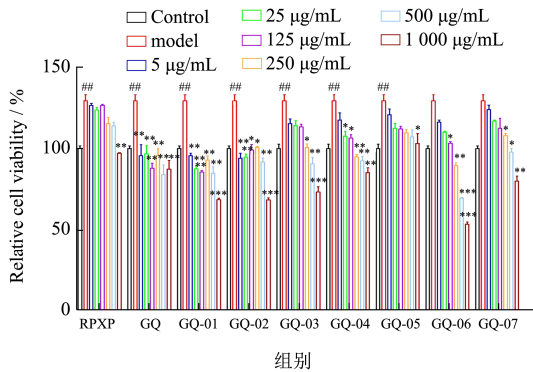


Fig.3 *Lyciumbarbarum* polysaccharides components inhibited (E2+P)-induced the proliferation of HC11 cells

注：#为模型组与对照组比较（ $^{##}P<0.01$ ）；*为样品组与模型组比较（ $^{*}P<0.05$ ， $^{**}P<0.01$ ， $^{***}P<0.001$ ）。

2.5 枸杞多糖组分对 HC11 细胞凋亡的影响

乳腺增生的发病主要由雌、孕激素比例失调，雌激素水平较高，导致 Bcl-2 蛋白（抗凋亡因子）的大量表达，抑制线粒体细胞色素 C 的释放，无法激活含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶（Caspase），抑制细胞凋亡，进而造成乳腺上皮细胞的过度增殖，使乳腺组织过度增生和复旧不全^[27,28]。组织细胞凋亡也叫程序性死亡，是一种由遗传控制的有序的死亡形式^[29]。本研究利用流式细胞仪检测枸杞多糖组分对 HC11 细胞凋亡作用。结合 2.2 及 2.4 实验结果，选择 GQ-01 及 GQ-06 用于流式细胞术检测细胞凋亡作用。结果如图 5 所示，与正常组（图 4a）相比，E2+P 诱导模型组中凋亡细胞未见明显增多（图 4b）；与模型组比较，GQ-01 及 GQ-06 处理后，未见明显的细胞凋亡现象（图 4e、4f）。结果表明，在体外，枸杞多糖可能不是通过影响细胞凋亡来抑制 HC11 细胞增殖作用，具体机制还需进一步探究。

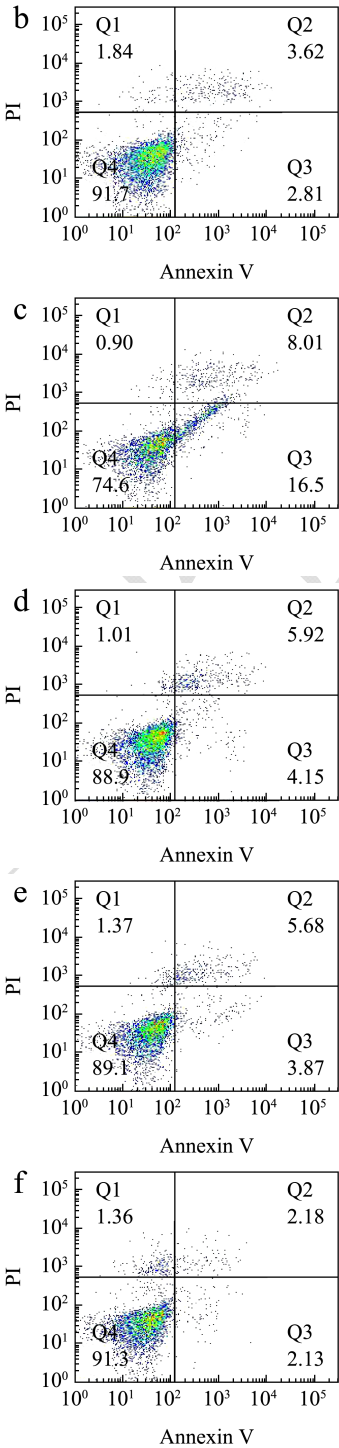
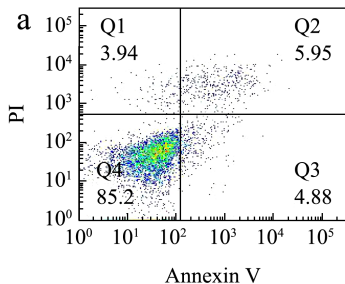


图 4 枸杞多糖对 E2+P 联合诱导 HC11 细胞凋亡的影响

Fig.4 Effect of *Lyciumbarbarum* polysaccharides components on (E2+P)-induced apoptosis in HC11 cells

注：a 为正常组；b 为 E2+P 诱导组；c 为 RXP 组；d 为 GQ；e 为 GQ-01；f 为 GQ-06。

2.6 枸杞多糖组分对 HC11 细胞周期的影响

细胞周期是由 G0/G1 期向 S 期过渡，使细胞由静止的 G0/G1 期向 DNA 合成期（S 期）即 S 转化，并为细胞由 S 期向活跃的有丝分裂期 G2/M 期转化提供

有利条件,而增强细胞增殖^[30]。本研究通过流式细胞术检测枸杞多糖组分对细胞周期分布的影响,结果如图5所示,与对照组比较,模型组(E2+P)可降低G0/G1的比例,G2/M期的HC11细胞比例增加;与模型组比较,GQ、GQ-01、GQ-06组的G2/M期的细胞比例降低,G0/G1期比例逐渐增加。此结果表明枸杞多糖组分在体外可能通过调节G0/G1、G2/M期的转变,影响细胞周期分布及进程,进而抑制乳腺上皮细胞的过度增殖,但具体的作用机制还需进一步研究。

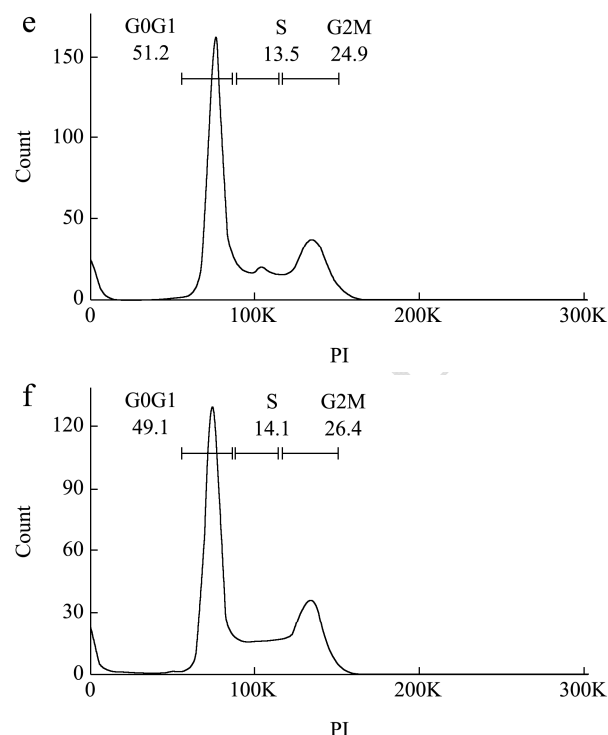
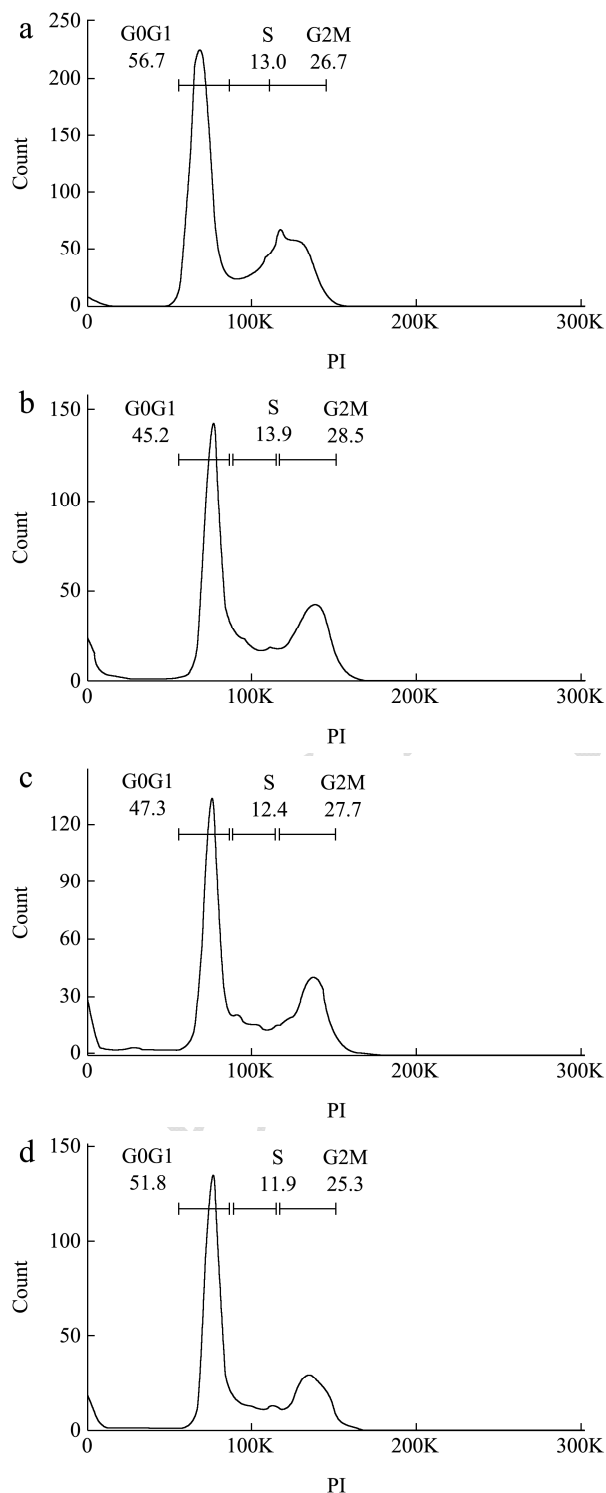


图5 枸杞多糖组分对E2+P诱导HC11细胞的细胞周期分布的影响

Fig.5 Effect of *Lycium barbarum* polysaccharides components on (E2+P)-induced cell cycle distribution in HC11 cells

注: a为正常组; b为E2+P诱导组; c为RXP组; d为GQ; e为GQ-01; f为GQ-06。

2.7 枸杞多糖组分对HC11细胞中雌激素受体

(ER α) 水平的影响

在前期研究中发现,枸杞粗多糖可显著抑制乳腺增生小鼠中ER α 的表达水平^[22]。本研究通过ELISA实验检测乳腺增生小鼠中ER α 的表达水平。结果如图6所示,与空白组比较,枸杞多糖组分极显著抑制E2+P诱导的ER α 的水平($P<0.01$);与模型组比较,GQ-01显著抑制E2+P诱导的ER α 的水平,ER α 水平降低了4.90%($P<0.05$),而RXP与GQ-06极显著抑制E2+P诱导的ER α 的水平,ER α 水平分别降低了6.36%、5.54%($P<0.01$)。研究发现E2升高或P缺乏会引起E2/P比例失调而引起乳腺上皮细胞的过度增殖。增殖细胞又会通过激素受体系统促进ER和孕激素受体(PR)的合成,形成病理性的增殖循环。ER和PR可结合E2和P。ER含有ER α 和ER β 两个亚基,可与E2结合形成激素受体复合物^[31]。E2可促进乳腺上皮细胞中ER和PR的表达,增加乳腺组织对激素的敏感性而诱导乳腺增生的产生^[32]。因此,结果表明GQ-06能通过抑制ER α 的水平,抑制乳腺上皮细胞的

表达, 缓解乳腺增生的症状。

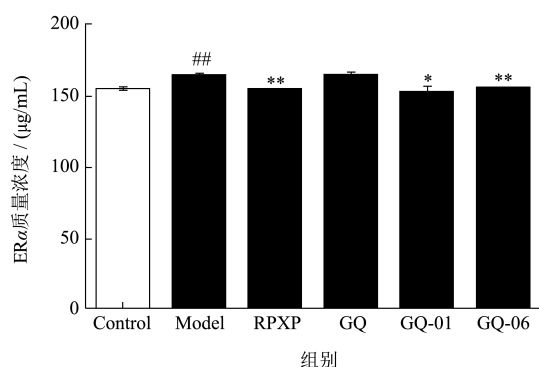


图6 枸杞多糖组分抑制 E2+P 诱导的 HC11 细胞的 ERα 的产生

Fig.6 *Lyciumbarbarum* polysaccharides components inhibited (E2+P)-induced the production of ERα in HC11 cells

注: #为对照组与模型组比较 (### $P<0.01$); *为样品组与模型组比较 (* $P<0.05$, ** $P<0.01$).

2.8 枸杞多糖组分对 RAW264.7 细胞的 NO 水

平的影响

RAW264.7 细胞为小鼠体内的单核巨噬细胞, 能对外界刺激产生促炎因子, 如 IL-6、TNF-α 及分泌 NO 等炎症介质, 间接杀死病原体^[19]。NO 是由 iNOS 合成, 是许多器官引起炎症的炎症调节子, 可调节许多生理与病理条件, 包括神经转导与炎症反应。尽管 NO 在抗肿瘤, 抗病毒复制及其他疾病中发挥重要作用, 但过量 NO 的产生会危害宿主的健康^[33]。因此, 抑制过量的 NO, 可抑制炎症作用。巨噬细胞可通过 LPS 诱导活化, 产生大量 NO 等炎症介质, 适量的炎症介质可提高机体免疫反应及修复机体损伤, 而过量或持续产生 NO 等炎症介质则会引起细胞的炎症反应, 导致细胞损伤和凋亡^[34]。因此, 本文检测了枸杞多糖组分对 RAW264.7 巨噬细胞中 NO 水平的调节, 结果如图 7 所示, 随着枸杞多糖浓度升高, 细胞增殖率越高, 表明细胞毒性越小(图 7a), 因此, 选择 250 μg/mL 的枸杞多糖进行后续实验。利用 NO 检测试剂盒发现, 与空白组比较, LPS 可诱导 RAW264.7 巨噬细胞的 NO 水平的产生 ($P<0.001$); 与 LPS 组比较, RPXP、GQ、GQ-04 及 GQ-06 可显著抑制 LPS 诱导 RAW264.7 巨噬细胞中 NO 水平的产生、其巨噬细胞中 NO 水平分别降低了 12.82%、29.46%、13.43%、12.65% ($P<0.05$) (图 7b)。王莹等^[25]发现两种枸杞多糖组分可促进巨噬细胞的增殖与吞噬能力。杨青等^[35]发现枸杞多糖可显著促进巨噬细胞由 M2 向 M1 的极化状态转变, 有助于促进巨噬细胞来抵抗小鼠胰腺癌细胞的毒性作用, 从而达到抗炎及抗肿瘤的作用。因此, 本结果表明

GQ-04 及 GQ-06 可抑制 LPS 诱导巨噬细胞的炎症反应, 调节机体的免疫反应。

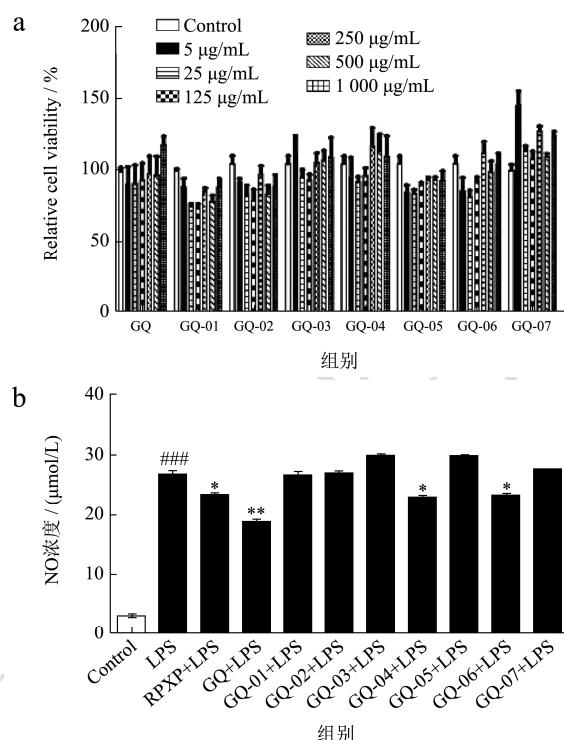


图7 枸杞多糖组分调节 RAW264.7 巨噬细胞中 NO 水平的产生

Fig.7 *Lyciumbarbarum* polysaccharide components regulates the production of NO in RAW264.7 macrophages

注: a 为枸杞多糖组分对 RAW264.7 细胞增殖作用; b 为枸杞多糖组分对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞产生的 NO 水平的影响; #为对照组与模型组比较 (### $P<0.001$); *为样品组与模型组比较 (* $P<0.05$, ** $P<0.01$).

3 结论

本研究共分离纯化 7 种不同分子量的枸杞多糖组分, 2 种为枸杞中性多糖, 5 种为枸杞酸性多糖。在体外实验中, 通过 E2+P 联合诱导 HC11 细胞增殖模型发现 GQ-01, GQ-03, GQ-06 对 E2+P 诱导的 HC11 细胞增殖具有明显抑制作用, GQ-01 及 GQ-06 可通过调节细胞周期分布影响 HC11 细胞增殖, 但其对细胞凋亡作用无影响; GQ-06 可显著抑制 E2+P 联合诱导的 HC11 细胞产生 ERα 的水平; 同时, 发现 GQ-04 和 GQ-06 可显著抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞的 NO 水平的产生。综上, 发现 GQ-06 (Mw=110 ku) 可能主要通过抑制乳腺上皮细胞的过度增殖, 及抑制巨噬细胞的炎症作用, 而发挥抗乳腺细胞增殖及抗炎活性。随着多糖研究的不断深入, 枸杞多糖作为一种天然产物, 也将为功能性食品的开发与应用提供重要的理论依据。

参考文献

- [1] 连小龙,韩涛.中药抗乳腺增生作用机制研究进展[J].中兽医药学杂志,2017,36(3):80-82
- [2] 刘群,王桂杰,李群.女性乳腺增生发病情况分析与健康教育[J].现代护理,2006,12(17):1569-1570
- [3] 陈莎莎.乳块消方对乳腺增生模型大鼠作用及其机理[D].南京:南京农业大学,2004
- [4] 刘晓,石岳.中医治疗乳腺增生的研究进展[J].中药临床研究,2015,7(7):147-148
- [5] 明·龚居中撰.中医古籍临证必读丛书·外科卷·外科活人定本[M].长沙:湖南科学技术出版社,1994
- [6] Wu D T, Guo H, Shang L, et al. Review of the structural characterization, quality evaluation, and industrial application of *Lyciumbarbarum* polysaccharides [J]. Trends in Food Science & Technology, 2018, 79: 171-183
- [7] Chi Z S. Chemical constituents of *Fructus lycii* and *Folium lycii* (I)-nutrients in *Fructus lycii* and *Folium lycii* [J]. Zhong Yao Tong Bao, 1986, 11: 41
- [8] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China Part I [M]. Chemical Industry Press: Beijing, China, 2015
- [9] Zhang Z P, Liu X M, Wu T, et al. Selective suppression of cervical cancer Hela cells by 2-O-p-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid isolated from the fruit of *Lyciumbarbarum* L [J]. Cell Biology and Toxicology, 2011, 27(2): 107-121
- [10] Zhang X R, Qi C H, Cheng J P, et al. *Lyciumbarbarum* polysaccharide LBP4-OL may be a new toll-like receptor 4/MD2-MAPK signaling pathway activator and inducer [J]. International Immunopharmacology, 2014, 19(1): 132-141
- [11] Nan Y, Wang R, Yuan L, et al. Effects of *Lyciumbarbarum* polysaccharides (LBP) on immune function of mice [J]. African Journal of Microbiology Research, 2012, 6(2): 4757-4760
- [12] Zhu M Y, Mo J G, He C S, et al. Extraction, characterization of polysaccharides from *lyciumbarbarum* and its effect on bone gene expression in rats [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80(3): 672-676
- [13] B Kulczyński, Anna Gramza-Michałowska. Goji berry (*Lyciumbarbarum*): Composition and health effects-a review [J]. Polish Journal Food and Nutrition Sciences, 2016, 66: 67-76
- [14] Li G, Sepkovic D W, Bradlow H L, et al. *Lyciumbarbarum* inhibits growth of estrogen receptor positive human breast cancer cells by favorably altering estradiol metabolism [J]. Nutrition and Cancer, 2009, 61(3): 408-414
- [15] Shen L, Du G. *Lyciumbarbarum* polysaccharide stimulates proliferation of MCF-7 cells by the ERK pathway [J]. Life Sciences, 2012, 91(10): 353-357
- [16] 安泓霏,王晓亮,等.枸杞多糖对乳腺炎小鼠乳腺组织 TNF- α 表达的影响[J].黑龙江畜牧兽医,2018,17:21-25
- [17] 京迎,付海田,邓超,等.基于巨噬细胞模型的竹荪多糖的免疫功能[J].食品与生物技术学报,2016,40(8):849-854
- [18] 崔石阳,姜帆,韩建春,等.北五味子多糖对 RAW264.7 细胞的免疫调节作用[J].食品科学,2017,38(19):201-205
- [19] Zhang L, Wang C C. Inflammatory response of macrophages in infection [J]. Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International, 2014, 13(2): 138-152
- [20] 叶媚娜,陈红风.温肾中药对原代培养正常人乳腺上皮细胞增殖的影响[J].中西医结合学报,2006,8(4):397-401
- [21] Zhu J, Liu W, Yu J, et al. Characterization and hypoglycemic effect of a polysaccharide extracted from the fruit of *Lyciumbarbarum* L [J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 98(1): 8-16
- [22] Qiao X F, Wang B Y, Yuan Z Q, et al. The polysaccharides from YiqiYangyin complex attenuated mammary gland hyperplasia: Integrating underlying biological mechanisms and network pharmacology [J]. Journal of Functional Foods, 2022, 88: 104878
- [23] Liu J, Li T Y, Chen H Y, et al. Structural characterization and osteogenic activity in vitro of novel polysaccharides from the rhizome of *Polygonatum sibiricum* [J]. Food & Function, 2021, 12: 6626-6636
- [24] Wang Y, Wei X, Jin Z. Structure analysis of a neutral polysaccharide isolated from green tea [J]. Food Research International, 2009, 42(5-6): 739-745
- [25] 王莹,金红宇,等.不同分子量枸杞多糖对 RAW264.7 巨噬细胞的免疫调节作用[J].中国新药杂志,2021,30(12):1079-1086
- [26] Tang H L, Chen C, Wang S K, et al. Biochemical analysis and hypoglycemic activity of a polysaccharide isolated from the fruit of *Lyciumbarbarum* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 77: 235-242
- [27] 李瑞霞,李斌.雌激素抗凋亡作用的研究现状[J].复旦学报(医学版),2006,6:858-860
- [28] 中华预防医学会妇女保健分会乳腺保健与乳腺疾病防治学组.乳腺增生症诊治专家共识[J].中国实用外科杂志,2016,36(7):759-762
- [29] Zaman S, Wang R, Gandhi V. Targeting the apoptosis

- pathway in hematologic malignancies [J]. *Leukemia Lymphoma*, 2014, 55: 1980-1992
- [30] 刘英傅,付越,郝璐,等.白藜芦醇对小鼠脾淋巴细胞免疫调节活性的影响[J].*食品工业科技*,2016,37(8):335-339
- [31] Higa G M, Fell R G. Sex hormone receptor repertoire in breast cancer [J]. *International Journal of Cancer*, 2013, 284036
- [32] Mehta R G, Hawthorne M, Mehta R R, et al. Differential roles of ERalpha and ERbeta in normal and neoplastic development in the mouse mammary gland [J]. *Plos One*, 2014, 9: e113175
- [33] Worrall N K, Lazenby W D, Misko T P, et al. Modulation of *in vivo* alloreactivity by inhibition of inducible nitric oxide synthase [J]. *Journal of Experimental Medicine*, 1995, 181: 63-70
- [34] 倪湾,李敬双,于洋.洋葱槲皮素对脂多糖诱导的小鼠腹腔巨噬细胞炎症反应抑制作用[J].*食品工业科技*,2017,38(23): 284-288
- [35] 杨青.枸杞多糖通过诱导巨噬细胞极化抗胰腺癌的实验研究[J].*天津医药*,2015,43(11):1288-1291