

山药多糖 RDPS-I 的结构分析及抗肿瘤活性

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: 目的 研究山药多糖的化学结构和抗肿瘤活性。方法 用水提取山药块茎粗多糖, 经 Sevag 反复脱蛋白 8 次, 透析后经 DEAE-cellulose 及 Sephadex G-100 柱色谱纯化得山药多糖 RDPS-I。经完全酸水解、部分酸水解, 用 PC, GC, IR, 高碘酸氧化, Smith 降解, 甲基化分析, ¹H NMR 及 ¹³C NMR 等研究山药多糖的化学结构。并用小鼠移植性实体瘤研究了 RDPS-I 的体内抗肿瘤作用。结果 RDPS-I 的分子量为 41 000, 比旋光度为 $[\alpha]_D^{20} = +188.4^\circ (c 0.80, H_2O)$, 特性粘度为 $[\eta] = 16.48 \times 10^{-3} (g \cdot mL^{-1})$ 。RDPS-I 是由葡萄糖、甘露糖和半乳糖以 1:0.4:0.1 的摩尔比组成, 以 α -D-(1→3)-Glc 为主链, 在 6-O 位有 α -D-(1→2)-Manp- β -D-1-Galp 支链的杂多糖。RDPS-I 对移植性黑色素 B16 和 Lewis 肺癌有很强的抑制作用。结论 RDPS-I 是由葡萄糖、甘露糖和半乳糖构成的杂多糖, 有很强的体内抗肿瘤活性。

关键词: 山药; 多糖; 结构; 抗肿瘤

中图分类号: R284.1; R284.2 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2003)01-0037-05

Structural analysis and antitumor activity of RDPS-I polysaccharide from Chinese yam

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: **Aim** To study the structure and antitumor activity of polysaccharide from Chinese yam. **Methods** The tube root of Chinese yam was extracted with water, from the extract, the polysaccharide of RDPS-I was separated and purified using Sevag deprotein, DEAE-cellulose and Sephadex G-100 column chromatography. Its structure was researched by PC, GC, IR, partial hydrolysis, periodate oxidation, Smith degradation, methylation analysis, ¹H NMR and ¹³C NMR analysis etc. The antitumor activity *in vivo* also studied with animal experiments. **Results** RDPS-I was found to be composed of Glc, Man and Gal, in a molar ratio of 1:0.4:0.1, contained a backbone composed of α -D-(1,3)-Glc and, a short branch of α -D-(1→2)-Manp- β -D-1-Galp is attached to the main chain, the polysaccharide had a molecular weight of 41 000, $[\alpha]_D^{20} = +188.4^\circ (c 0.80, H_2O)$ and $[\eta] = 16.48 \times 10^{-3} (mL \cdot g^{-1})$. RDPS-I could significantly inhibit the cancer cell line of melanoma B16 and Lewis lung cancer in mice *in vivo*. **Conclusion** RDPS-I is a heteropolysaccharide of Glc, Man and Gal has significant antitumor activity.

Key words: Chinese yam; polysaccharide; structure; antitumor

山药是传统药食同源食物,为薯蓣科薯蓣属植物(*Dioscorea opposita* Thunb)的块茎,有益肾气、健脾胃、止泻痢和化痰涎之功效。其水煎剂有延缓衰老、

防治糖尿病、抗突变及降血糖等作用,对其皂苷及尿囊素等成分的研究已有报道^[1]。其总多糖有明显的抗氧化、增强免疫调节作用^[2],但对其多糖组分的纯化、化学结构和抗肿瘤活性尚未见报道。为促进对山药多糖的进一步开发和应用,本文对其主要多糖 RDPS-I 的分离纯化、化学结构及抗肿瘤活性进行了研究。

收稿日期: 2002-01-18。

基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目(39730480)。

* 通讯作者 Tel: 86-23-68251298, Fax: 86-23-68251947,

E-mail: zhaoguohual971@sohu.com

材料和方法

仪器 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 AM400 型超导核磁共振仪; HP5890/5988A 型色质联用分析仪; Perkin 341 型旋光仪; Waters 244 型高压液相色谱仪, KS-804 柱, Shodex RI SE-71 型示差检测仪。

试剂 DEAE-cellulose(DE-52) 为 Whatman 产品; Sephadex G100 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。

1 山药多糖的化学结构

提取与纯化 山药(干重)1 kg 粉碎, 经乙醚脱脂后用水浸提, 离心除去淀粉, 上清液真空浓缩后, 用 Sevag 法脱蛋白 8 次, 置透析袋中对自来水透析 3 d, 透析内液真空浓缩至一定体积, 加乙醇沉淀, 离心收集白色沉淀, 溶剂干燥得山药粗多糖(27.1 g)。取山药粗多糖 1 g 用 DEAE-纤维素柱纯化, 水洗脱, 分部收集, 主峰多糖乙醇沉淀, 干燥得 RDPS(0.60 g)。取 0.2 g RDPS 再经 Sephadex G100 凝胶色谱柱纯化, 蒸馏水洗脱, 主峰多糖乙醇沉淀, 冷冻干燥后得 RDPS-I 多糖(0.13 g)。

纯度及分子量测定 用高压液相色谱法: 分析柱为 KS-804 柱, 洗脱剂为双蒸馏水, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 常温测定。样品 RDPS-I 及 Dextran 系列标准品分别经 HPLC 分离, 根据洗脱峰的形状判断样品的纯度, 以 Dextran 系列标准品的分子量对数与对应的洗脱体积作标准曲线, 再根据 RDPS-I 的洗脱体积求得其分子量。

糖组成测定^[3-5] RDPS-I 10 mg 加 2 mol·L⁻¹ 三氟醋酸(TFA) 2 mL, 封管后在 120 °C 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(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盐酸羟胺 10 mg 及无水吡啶 1 mL, 溶解后在 90 °C 反应 30 min, 冷至室温, 加入无水醋酸酐 1 mL, 在 90 °C 下继续反应 30 min, 冷至室温, 加入 H₂O 1 mL 摇匀, 用氯仿萃取乙酰化产物进行气相色谱(GC) 分析。

部分酸水解 取 RDPS-I 100 mg 用 0.05 mol·L⁻¹ 的 TFA 封管, 置烘箱中在 100 °C 水解 1 h, 减压蒸干, 再加甲醇 1 mL 蒸干, 重复 3 次, 将 TFA 去除干净。水解物加水溶解后于透析袋中处理 1 d, 袋外部分浓缩后干燥得 RDPS-I-1 组分, 袋内部分浓缩后

再经 Sephadex G100 柱纯化后得 RDPS-I-2 组分, 对 RDPS-I-1 和 RDPS-I-2 进行糖组成分析和甲基化分析。

甲基化反应 取经 P₂O₅ 干燥的 RDPS-I 5 mg, 溶于无水二甲亚砜 2 mL 中, 在氩气保护下注入甲基亚磺酰负离子 1.5 mL, 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, 真空干燥得暗黄色的甲基化产物, 经红外光谱确认样品甲基化完全后, 相继用甲酸和 2 mol·L⁻¹ TFA 水解并乙酰化, 产物加氯仿 0.5 mL 溶解, 即可进行 GC 及 GC-MS 分析^[6,7]。

高碘酸氧化及 Smith 降解 取 RDPS-I 10 mg 加 0.015 mol·L⁻¹ 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[8] 处理反应液, 经完全酸水解、NaBH₄ 还原、乙酰化后进行 GC 分析。

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

2 山药多糖的抗肿瘤活性^[9]

取小鼠体内传代的 BI6 黑色素瘤细胞或 Lewis 肺癌细胞瘤块, 称重, 分别用 RPMI 1640 培养液稀释按质量浓度制成 1:5 (BI6) 和 1:10 (Lewis) 的细胞悬液, 0.2 mL/只, 接种于试验 C57BL/6 小鼠右前肢腋部皮下。接种后 24 h 开始每天给予低剂量组(LD)、中等剂量组(MD) 和高剂量组(HD) 分别为 50, 150 和 250 mg·kg⁻¹ 的多糖受试物 1 次, 对照组(NC) 给予等量的生理盐水, 连续 4 周, 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。

结果与讨论

1 RDPS-I 的化学结构

山药块茎粉碎后经热水浸提、乙醇沉淀、脱蛋白得 RDPS 粗多糖。经 DEAE-纤维素离子交换色谱及 Sephadex G100 柱色谱进一步分离纯化, 得白色无定形粉末状多糖 RDPS-I。RDPS-I 溶解后经 HPLC 色谱得到其洗脱曲线是一对称的单一峰(图 1), 证明 RDPS-I 已是均一多糖。元素分析此多糖不含氮, 比

旋光度为 $[\alpha]_D^{20} + 188.4^\circ$ (c 0.80, H₂O), 特性粘度为 $[\eta] = 16.48 \times 10^{-3}$ (mL·g⁻¹), HPLC 测得其分子量为 41 000。

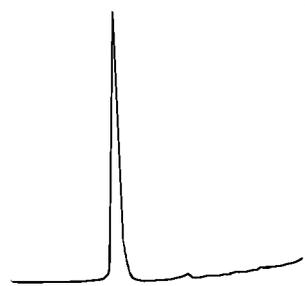


Figure 1 HPLC of RDPS-I

RDPS-I 经完全酸水解,产物用 PC 法检测发现有葡萄糖、甘露糖和半乳糖的斑点,表明 RDPS-I 是一种杂聚糖,图 2 a 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 2 b 是 RDPS-I 完全水解物的糖腈乙酸酯衍生物的 GC 图,表明 RDPS-I 是由葡萄糖、甘露糖和半乳糖组成,摩尔比为 1:0.4:0.1。

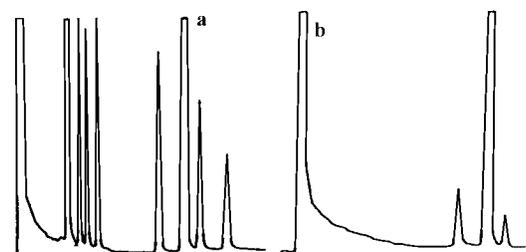


Figure 2 GC analysis of sugar composition of RDPS-I

甲基化产物水解、还原、乙酰化后进行 GC-MS 分析,数据与文献[6,7]对照,结果见表 1。

Table 1 The results of methylated analysis of RDPS-I and its hydrolysates

Methylated sugar	Molar ratio	T _R	MS main fragments (m/z)	Linkages type
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	Very little	1.00	43,45,87,102,118,129,145,162,205	Glc-(1→
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	2	1.19	43,45,87,102,118,129,145,162,205	Gal-(1→
2,4,6-Me ₃ -Glc	17	1.82	43,45,59,71,87,101,118,129,161,234,277	→3)-Glc-(1→
3,4,6-Me ₃ -Man	7	1.84	43,45,59,71,88,101,129,145,161,233	→2)-Man-(1→
2,4-Me ₂ -Glc	2	4.21	87,101,118,129,189,234	→3,6)-Glc-(1→

T_R is the relation time of each component, relative to that of 1,5-O-acetyl-2,3,4,6-Me₄-Glc

由表 1 可知, RDPS-I 主要是以 1,3-连接的葡萄糖糖残基为主。RDPS-I 部分酸水解后获得两个组分, RDPS-I-1 为透析袋外的部分,糖组成分析发现只有甘露糖和半乳糖,甲基化分析为 1,3,4,6-Me₄-Man 和 3,4,6-Me₄-Man 及 2,3,4,6-Me₄-Gal (2:5:2)。RDPS-I-2 为透析袋内部分纯化得到的多糖,糖组成分析发现只含葡萄糖,甲基化分析其连接方式为(1→3)连接的葡聚糖,分子量约为 36 000。由此可以初步认为 RDPS-I 的主链是(1→3)连接的葡聚糖,侧链由甘露糖和半乳糖构成,其连接方式为(1→2)连接。在 6 位连有低聚甘露半乳糖分支。RDPS-I 经高碘酸氧化,每摩尔己糖残基消耗 IO₄⁻ 0.401 mol (理论值为 0.433 mol),生成甲酸 0.08 mol (理论值为 0.1 mol)^[10]。Simth 降解产物经 GC 分析发现主要为葡萄糖和甘油,葡萄糖是 1,3-葡萄糖残基和 1,3,6-葡萄糖残基的降解产物,而甘油是 1-半乳糖残基和 1,2-甘露糖残基的降解产物。这与甲基化分析的结果相吻合。图 3 是 RDPS-I 的¹³CNMR 图谱,经与文献^[11-13]比较,将其碳信号归属于表 2。

Table 2 Assignment of ¹³CNMR chemical shifts of RDPS-I

Sugar residue	Chemical shift					
	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆
α(1→3)Glc	101.9	73.1	82.2	72.6	75.1	62.9
α(1→3)Glc	101.7	73.1	82.5	72.4	75.9	62.9
α(1→2)Man	102.5	78.2	74.2	71.3	72.4	63.8
β(1→)Gal	105.9	73.7	75.9	71.3	75.1	63.8

图 3 中 C₁ 的 3 个强吸收峰都在 δ 103 (δ:101.7, 101.9, 102.5) 以下,在 RDPS-I 的¹HNMR (图 4) 中有 3 个强吸收峰也都处在 δ 5.0 (δ:5.51394, 5.55863, 5.56460) 以上,表明 RDPS-I 的糖苷键类型主要是 α-型,但同时也发现在 RDPS-I 的¹³CNMR 谱中有 1 个较弱的 C₁ 信号处在 δ 103 (δ 105.891) 以上,在¹HNMR 中也有 1 个 H₁ 信号处在 δ 5.0 (δ 4.95367) 以下,表明 RDPS-I 的糖苷键中也存在少量的 β 构型(α-型 C₁ 信号在 δ 103 以下, H₁ 信号在 δ 5.0 以上;β-型 C₁ 信号在 δ 104 以上, H₁ 信号在 δ 5.0 以下)^[13]。

在 RDPS-I 的红外光谱 (图 5) 中, 1046.23, 1084.68 和 1154.61 cm⁻¹ 的吸收峰表示 RDPS-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。808.87 cm⁻¹ 是甘露糖的特征吸收峰^[12]。

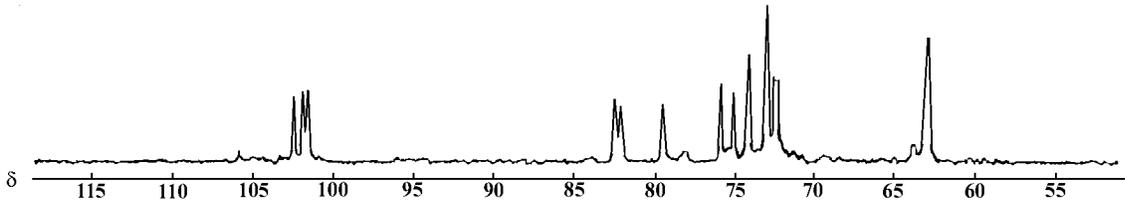


Figure 3 ¹³C NMR spectrum of RDPS-I

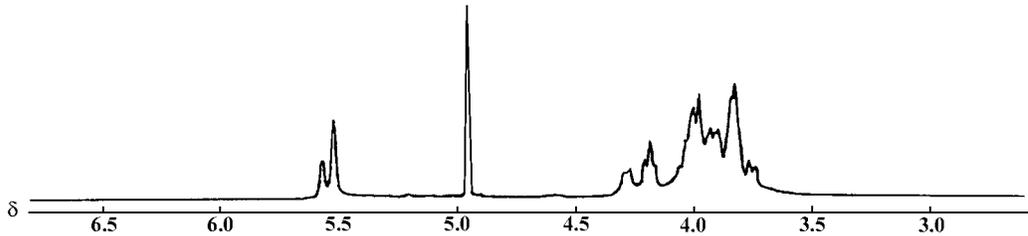


Figure 4 ¹H NMR spectrum of RDPS-I

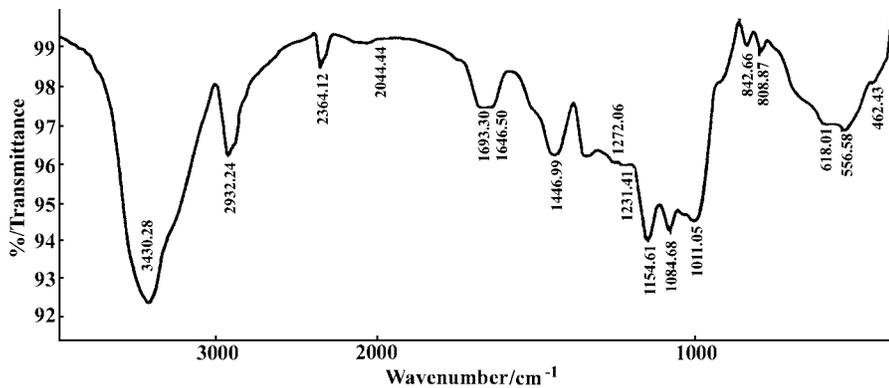


Figure 5 IR spectrum of RDPS-I

2 RDPS-I 的抗肿瘤活性

由表 3 可见, 50 mg·kg⁻¹ RDPS-I 对 Lewis 肺癌有显著地抑制作用, 而对 B16 黑色素瘤没有明显作用, 等于或高于 150 mg·kg⁻¹ 的 RDPS-I 对 B16 黑色素瘤和 Lewis 肺癌都有显著的抑制效果, 且中等剂量(150 mg·kg⁻¹) 作用最佳。

Table 3 Inhibitory effect of RDPS-I on cancer cell in mice *in vivo*

Cancer kind	Group	Tumor weight/g	Inhibitory rate/ %
Melanoma	NC	4.2 ± 0.4	-
B16	LD	3.92 ± 0.21	7.7
	MD	2.94 ± 0.26 ^{***}	31.4
	HD	3.33 ± 0.17 ^{**}	21.5
Lewis lung Cancer	NC	6.10 ± 0.22	-
	LD	5.0 ± 0.3 ^{**}	18.1
	MD	4.08 ± 0.26 ^{***}	33.0
	HD	4.5 ± 0.4 ^{***}	27.1

n = 10, $\bar{x} \pm s$. ^{**} P < 0.05 vs NC; ^{***} P < 0.01 vs NC

References :

- [1] Nie GH, Zhou KF, Dong XH, *et al.* Research advances of yam [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1993, **24**(3) : 158 - 159.
- [2] Zhao GH, Wang Y, Li ZX, *et al.* The regulation of immune function by polysaccharide from Chinese yam [J]. *Acta Nutr Sin* (营养学报), 2002, **24**(2) : 187 - 188.
- [3] Li ZX, Liu FM, Chen YZ. Chemical structure of a glucan from *Podophyllum omodi* Wall var. *spraque* [J]. *Acta Chem Sin* (化学学报), 1996, **54**(10) : 1037 - 1040.
- [4] Albersheim P, Nevins DJ, English PD, *et al.* A method for the analysis of sugars in plantcell-wall polysaccharide by gas-liquid chromatography [J]. *Carbohydr Res*, 1967, **5**(2) : 340 - 345.
- [5] Li ZX, Huang CG, Cai YJ, *et al.* The structure and antioxidative activity of polysaccharide from *Asparagus cochinchinensis* [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2000, **35**(5) : 358 - 362.
- [6] Bjorndal H, Lindberg B, Svensson S. Mass spectrometry of partially methylated alditol acetates [J]. *Carbohydr Res*, 1967, **5**(2) : 433 - 440.
- [7] Fang JN. Methylation analysis method of polysaccharide [J].

- Foreign Med Sci (Pharm)* (国外医学-药学分册), 1986, 4 (3) :222 - 225 .
- [8] Whister RL. *Methods in Carbohydrate Chemistry*. 5 Vol (*General Polysaccharide*) [M]. New York Academic Press, 1965 .361 - 370 .
- [9] Hamuro J, Chihara G. Mechanisms of action of antitumor polysaccharide. I. Effects of antilymphocyte serum on the antitumor activity of lentinan [J]. *Int J Cancer*, 1971 ,8(1) : 41 - 46 .
- [10] Aspinall GO, Ferrier RJ. A spectrophotometric method for the determination of periodate consumed during the oxidation of carbohydrates [J]. *Chem Ind (London)* , 1957 ,7(10) : 1216 - 1221 .
- [11] Agrawal PK. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides [J]. *Phytochemistry*, 1992 ,32(10) :3307 - 3330 .
- [12] Zhang WJ. *Biochemical Research Method of Glycoconugales (复合多糖生化研究技术)* [M]. 2nd ed. Hangzhou: Zhejiang University Press, 1999 .193 - 198 .
- [13] Gorin PAJ. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of polysaccharides [J]. *Adv Carbohydr Chem Biochem*, 1981 ,38(1) :13 - 39 .