

北苍术多糖的酶法辅助超声提取工艺的优化及其体外抗肿瘤活性研究

许静¹, 孟利娜², 南楠¹, 顾琼¹, 刘芳³, 周晶^{1*}

1. 天津医科大学药学院 天津市临床药物关键技术重点实验室, 天津 300070

2. 鄂尔多斯市中心医院 药剂科, 内蒙古 鄂尔多斯 017000

3. 天津医学高等专科学校, 天津 300222

摘要: **目的** 通过生物酶解技术优化北苍术多糖的酶辅助超声提取方法, 并考察其体外抗肿瘤活性。**方法** 选用纤维素酶和果胶酶水解北苍术药材, 酶解后采用超声法提取北苍术药材中多糖。以多糖得率为指标, 在单因素试验的基础上采用 4 个因素(酶用量、酶解时间、酶解 pH 值、酶解温度) 3 个水平 $L_9(3^4)$ 正交设计法对酶解条件进行优选, 并选用苯酚-浓硫酸法测定多糖, 采用 MTS、台盼蓝法对北苍术粗多糖体外抗肿瘤活性进行初探。**结果** 最佳酶解条件为酶用量为药材 1.2%、在 60 °C、pH 5 条件下酶解 50 min, 再以超声提取 40 min, 北苍术多糖的得率为 32.29%, 所提粗多糖对 HeLa 细胞增殖的抑制率为 64.42%。**结论** 酶解辅助超声提取北苍术中多糖简便易行, 可以提高多糖得率, 多糖活性较好。

关键词: 北苍术多糖; 酶解; 超声提取; 正交试验; 苯酚-浓硫酸; MTS; 台盼蓝

中图分类号: R284.2; R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2014)03-0231-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2014.03.004

Optimization of enzymatic auxiliary ultrasonic extraction of polysaccharide from *Atractylodes chinensis* and its antitumor activity *in vitro*

XU Jing¹, MENG Li-na², NAN-nan¹, GU Qiong¹, LIU Fang³, ZHOU Jing¹

1. Tianjin Key Laboratory on Technologies Enabling Development of Clinical Therapeutics and Diagnostics, School of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

2. Department of Pharmacy, Erdos City Center Hospital, Erdos 017000, China

3. Tianjin Medical College, Tianjin 300222, China

Abstract: Objective To optimize the enzymatic auxiliary ultrasonic extraction of polysaccharide from *Atractylodes chinensis* by biological enzyme technology and to study its antitumor activity *in vitro*. **Methods** Cellulase and pectinase were used for hydrolysis and then ultrasonic extracting method was chosen to extract the polysaccharide from roots of *A. chinensis*. The yield of polysaccharide purity from crude polysaccharide was taken as indicators. Based on single-factor test, the ultrasonic-assisted extracting technology of *A. chinensis* polysaccharide was optimized by $L_9(3^4)$ orthogonal test, and four factors included enzymolysis temperature, enzyme content, enzymolysis pH value, and enzymolysis time with three levels. The phenol-sulphuric acid method was applied for the determination of polysaccharide, and then using MTS and trypan blue staining to study antitumor activity on the polysaccharides. **Results** The optimal enzymolysis extracting conditions of *A. chinensis* polysaccharide were as follows: temperature was 50 °C, content was 1.2%, pH value was 5, and time was 50 min. Under the conditions, the purity of polysaccharide was 32.29%, and inhibitory rate of polysaccharide on the proliferation of HeLa cells was 64.42%. **Conclusion** Enzymatic auxiliary for ultrasonic extraction process has the advantages of short time, simple operation, and higher extract rate, which could provide the reference for development and utilization of *A. chinensis*.

Key words: *Atractylodes chinensis* (DC.) Koidz.; enzymolysis; ultrasonic extraction; orthogonal test; phenol-sulfuric acid; MTS; trypan blue

收稿日期: 2013-10-22

基金项目: 天津市科技攻关项目(06YFGPSH02900)

作者简介: 许静(1988—), 女, 天津医科大学 2012 级硕士, 研究方向: 天然药物化学。Tel: 13821364134 E-mail: xujingkuale@163.com

*通信作者 周晶, 天津医科大学药学院药物化学教研室主任, 天津市监督管理局药品审评专家, 卫生部“卫生专业技术资格考试专家委员会”委员。Tel: 13920680193 E-mail: zhou195620@126.com

北苍术为菊科植物北苍术 *Atractylodes chinensis* (DC.) Koidz. 的干燥根茎, 为《中国药典》2010 年版一部收载的苍术药材之一, 具有燥湿健脾、祛风散寒、明目的功效^[1]。北苍术挥发油具有较好的保肝作用^[2], 也有报道发现北苍术水提液具有促进肝脏蛋白质合成和胆汁分泌的作用, 并对大鼠肝细胞的 DNA 损伤和脂质过氧化具有保护作用。苍术多糖是水提液的主要成分, 具有抗肿瘤、抗病毒、抗凝血作用^[3]。为了提高苍术中有效成分的利用率, 本实验采用纤维素酶、果胶酶处理, 结合超声法提取北苍术多糖, 通过正交试验优化得到最佳提取工艺, 并对多糖的体外抗肿瘤活性进行测定, 以期对北苍术有效成分的开发利用提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

日本日立 U-3310 紫外可见分光光度计; 微量移液器(赛默飞世尔科技有限公司); 旋转蒸发器(上海申生科技有限公司); 循环水式多用真空泵(上海翔雅仪器设备有限公司); 超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 电热恒温水浴锅(北京科伟永鑫实验仪器设备厂); ELX800 酶标仪(美国 BioTek 公司); LDZX-50KBS 高压灭菌器(上海申安医疗器械厂); 3517-2 CO₂ 培养箱(美国 Shellab 公司); PHS-25 型精密酸度计(杭州亚美电子仪器厂)。

1.2 药品与试剂

纤维素酶(天津利华酶制品厂, 5 000 U/g, 批号 11-01-10); 半纤维素酶(天津利华酶制品厂, 5 000 U/g, 批号 11-08-30); 果胶酶(天津利华酶制品厂, 5 000 U/g, 批号 10-09-20); 北苍术购自河北安国市同利中药材有限公司, 由天津医科大学生药教研室周晔教授鉴定, 符合《中国药典》2010 年版一部要求; 丙酮、石油醚、乙醇、柠檬酸、苯酚、浓硫酸等(分析纯, 天津基准化学试剂有限公司); 台盼蓝(上海试剂三厂); MTS 购自美国 Promega 公司; 人类肝癌细胞 HepG2、7721 和乳腺癌细胞 SKBR3 宫颈癌细胞株 HeLa 由天津医科大学肿瘤医院的吴雄志博士提供。细胞在 DMEM 培养基(美国 Gibco 公司)培养, 并补充 10%胎牛血清(美国 Sigma 公司)、50 U/mL 青霉素和 50 mg/mL 链霉素, 细胞在 37℃, 5%二氧化碳培养箱培养。

2 方法与结果

2.1 北苍术药材的前处理

称取粉碎、过 40~80 目筛的北苍术约 100 g,

用石油醚 400 mL、95%乙醇溶液 400 mL 依次脱脂, 挥干有机溶剂后得疏松状脱脂粉 81.64 g, 即脱脂率为 18.36% ($n=4$)。

2.2 比色法测定北苍术多糖

多糖类成分在硫酸的作用下, 先水解成单糖分子, 并迅速脱水生成糖醛衍生物, 然后和苯酚生成有色化合物, 因此采用比色法测定其含量^[4-5]。根据前期工作的方法学考察结果, 本研究采用此法测定北苍术多糖^[6]。

2.3 单因素条件筛选

2.3.1 酶种类的选择 精密称取脱脂北苍术药材约 5 g, 加入药材质量 1.0% 的纤维素酶、半纤维素酶、果胶酶和各种复合酶, 溶于 25 mL 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液(pH 5), 50 ℃ 条件下水浴酶解 40 min 后用沸水灭酶 10 min, 蒸馏水补充至 100 mL, 60 ℃ 超声提取 40 min, 8 层纱布趁热滤过后 4000 r/min 离心 10 min, 55 ℃ 减压旋蒸浓缩至 10 mL, 缓慢加入 4 倍量 95%乙醇, 边加边轻轻振摇以析出絮状沉淀, 4 ℃ 条件下过夜, 4 000 r/min 离心 10 min, 沉淀依次用无水乙醇、丙酮洗涤 2 次, 干燥至恒定质量。精密称取粗多糖质量, 计算粗多糖得率。采用苯酚-浓硫酸法测定, 计算多糖的质量分数, 结果见表 1。可知用纤维素酶与果胶酶按 1:1 所提多糖质量分数较高, 且其多糖得率也较高, 因此选择纤维素酶和果胶酶处理药材以提取多糖。

$$\text{水提物得率} = \frac{\text{沉淀质量}}{[\text{脱脂药材质量} \times (1 - \text{脱脂率})]}$$

$$\text{多糖得率} = \frac{\text{多糖质量浓度} \times \text{体积} \times \text{稀释倍数}}{\text{多糖样品质量}}$$

$$\text{多糖的质量分数} = \frac{\text{多糖质量}}{\text{水提物质量}}$$

表 1 不同酶对北苍术多糖提取效果的影响 ($n=2$)

Table 1 Effect of different enzyme on extraction of polysaccharide from *A. chinensis* ($n=2$)

酶种类	水提物 得率/%	多糖得 率/%	多糖质量 分数/%
纤维素酶	47.60	27.72	70.84
果胶酶	42.06	23.33	78.30
半纤维素酶	37.77	21.48	68.86
纤维素酶-半纤维素酶(1:1)	39.91	25.08	77.44
半纤维素酶-果胶酶(1:1)	36.79	26.93	84.65
纤维素酶-果胶酶(1:1)	39.81	27.60	85.27
纤维素酶-半纤维素酶-果 胶酶(1:1:1)	40.34	27.40	81.19

2.3.2 酶用量对北苍术多糖得率的影响 精密称取北苍术脱脂药材粉末约 5 g, 加入相当于脱脂药材 0.8%、1.0%、1.2%、1.4% 的复合酶 (纤维素酶与果胶酶比例为 1:1) 后加入 25 mL 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液 (pH 5), 以下操作同“2.3.1”项下, 不同酶用量对北苍术粗多糖得率的影响见表 2。可知在酶用量为 0.8%~1.4% 时, 北苍术多糖的得率随着酶用量的增加先升高后降低, 当酶用量为 1.0% 时, 多糖得率较高, 为 20.08%。

表 2 酶用量对北苍术多糖得率的影响 (n=2)

Table 2 Effect of enzyme dosage on yield of polysaccharide from *A. chinensis* (n = 2)

酶用量/%	多糖得率/%
0.8	18.82
1.0	20.08
1.2	19.52
1.4	19.08

2.3.3 酶解温度对多糖得率的影响 精密称取北苍术脱脂药材粉末约 5 g, 依据“2.3.2”项下实验结果, 加入 1.0% 的复合酶后加入 25 mL 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液 (pH 5), 于 30、40、50、60 °C 条件下分别水浴酶解 40 min, 以下操作同“2.3.1”项下, 不同酶解温度对北苍术多糖的得率影响见表 3。可知 50 °C 为最佳条件, 此时多糖的得率为 20.91%。

表 3 酶解温度对北苍术多糖得率的影响 (n=2)

Table 3 Effect of enzyme temperature on yield of polysaccharide from *A. chinensis* (n=2)

酶解温度/°C	多糖得率/%
30	16.08
40	20.12
50	20.91
60	17.36

2.3.4 酶解 pH 对多糖得率的影响 精密称取北苍术脱脂药材粉末约 5 g, 依据“2.3.3”结果, 加入相当于脱脂药材 1.0% 的复合酶后加入 pH 值分别为 3、4、5、6 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液 25 mL, 于 50 °C 条件下水浴酶解 40 min, 以下操作同“2.3.1”项下, 不同酶解 pH 值对北苍术多糖的得率见表 4。可知, 当 pH 值为 5 时, 多糖得率最高, 为 21.74%。

表 4 酶解 pH 值对北苍术多糖得率的影响 (n = 2)

Table 4 Effect of pH value of enzymatic hydrolysis on yield of polysaccharide from *A. chinensis* (n = 2)

酶解 pH 值	多糖得率/%
3	17.86
4	20.26
5	21.74
6	21.46

2.3.5 酶解时间对多糖得率的影响 精密称取北苍术脱脂药材粉末约 5 g, 依据“2.3.4”结果, 加入相当于脱脂药材 1.0% 的复合酶后加入 25 mL 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液 (pH 5), 于 50 °C 条件下分别水浴酶解 30、40、50、60 min, 以下操作同“2.3.1”项下, 结果见图 1。可知, 当酶解时间为 50 min 时北苍术多糖的得率最高, 达 22.65%。

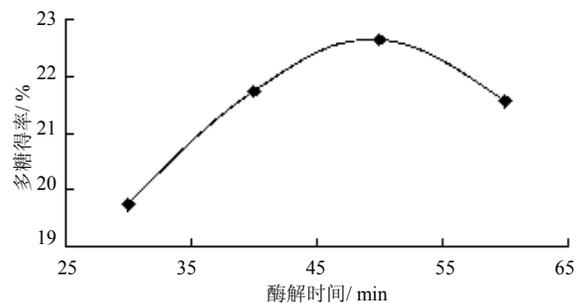


图 1 酶解时间对北苍术多糖得率的影响

Fig.1 Effect of hydrolysis time on yield of polysaccharide from *A. chinensis*

2.4 正交设计优选酶辅助超声法提取工艺条件

2.4.1 因素与水平的设计 根据超声法提取北苍术多糖的单因素条件考察结果可知, 酶用量 1.0%, 在柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液 pH 5、50 °C 条件下酶解 50 min 下得到的北苍术多糖收率较高, 因此设计酶解辅助超声法提取北苍术多糖 $L_9(3^4)$ 正交试验的影响因素与水平, 见表 5。

表 5 因素与水平

Table 5 Factors and levels

水平	因素			
	A 酶用量/%	B 酶解温度/°C	C 酶解 pH 值	D 酶解时间/min
1	0.8	40	4	40
2	1.0	50	5	50
3	1.2	60	6	60

2.4.2 正交试验结果 精密称取北苍术脱脂药材粉末约 5 g, 分别按正交设计表设定的条件进行酶解后超声提取, 方法同“2.3.1”项下, 结果见表 6。

表 6 正交试验方案与结果

Table 6 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

试验号	A	B	C	D	多糖得率/%
1	0.8	40	4	40	19.14
2	0.8	50	5	50	23.27
3	0.8	60	6	60	20.38
4	1.0	40	5	60	22.89
5	1.0	50	6	40	25.12
6	1.0	60	4	50	22.09
7	1.2	40	6	50	21.98
8	1.2	50	4	60	26.81
9	1.2	60	5	40	23.58
K_1	20.93	21.34	22.68	22.70	
K_2	23.37	25.07	23.33	22.45	
K_3	24.21	22.10	22.49	23.36	
R	3.28	3.73	0.84	0.91	

2.4.3 验证试验 精密称取北苍术脱脂药材粉末约 5 g, 按优选工艺条件进行重复验证试验, 同时作对照试验: 料液比为 1:20, 60 °C 条件下直接超声 40 min, 结果见表 7。可知酶解辅助超声法提取北苍术多糖得率达 32.29%, 比非酶解组超声提取的多糖得率高出 48.73%, 条件稳定且重现性好。

表 7 验证试验结果 (n=3)

Table 7 Results of verified test (n=3)

方法	多糖得率/%	多糖质量分数/%
酶解超声提取	32.29	89.23
超声提取	21.71	86.02

2.5 北苍术粗多糖体外抗肿瘤活性试验^[7-8]

2.5.1 北苍术粗多糖对人卵巢癌细胞株 Skov3 和宫颈癌细胞株 HeLa 细胞增殖的影响 将 Skov3 细胞和 HeLa 细胞以 3×10^3 /孔密度接种于 96 孔板中, 贴壁 24 h 后, 分别加入北苍术粗多糖 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 对照组加相同体积的磷酸盐缓冲液 (PBS), 每个剂量设 4 个副孔, 培养 4 d 后每孔加入 20 μL MTS, 放入培养箱继续培养 90 min 后用酶标仪于 490 nm 处检测吸光度 (A) 值, 用 A 值表示卵巢癌细胞株 Skov3 和宫颈癌细胞株 HeLa 细胞的增殖水平。采

用 SPSS 16.0 分析实验数据。结果见表 8。可知就卵巢癌和宫颈癌细胞而言, 加药组与对照组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ 、0.01), 说明北苍术多糖能有效地抑制卵巢癌细胞株 Skov3 和宫颈癌细胞株 HeLa 细胞的增殖, 并且对宫颈癌细胞株 HeLa 细胞的抑制作用明显高于对照组。

抑制率 = (对照组平均 A 值 - 加药组平均 A 值) / 对照组平均 A 值

表 8 北苍术粗多糖对 Skov3 和 HeLa 细胞增殖的抑制作用

Table 8 Inhibition of polysaccharide from *A. chinensis* on Skov3 and HeLa cell proliferation

细胞	组别	A	抑制率/%
Skov3 细胞	对照	1.383 ± 0.020	31.96
	加药	0.941 ± 0.015*	
HeLa 细胞	对照	1.931 ± 0.109	64.42
	加药	0.687 ± 0.053**	

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

2.5.2 台盼蓝法测定北苍术多糖对人肝癌细胞株 HepG2 和 7721 的影响 将人肝癌细胞株 HepG2 和 7721 细胞以 3×10^5 /孔密度接种于 24 孔板中, 接种后 24 h 加药培养, 分别加入北苍术粗多糖 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 对照组加相同体积的 PBS, 每组 3 个副孔。加药后第 4 天收集细胞, 利用台盼兰染色, 光学正置显微镜下进行细胞计数。采用 SPSS 16.0 分析实验数据, 结果见表 9。可见与对照组比较, 加药组对抑制肝癌细胞株 HepG2 的细胞增殖无统计学意义, 而对肝癌细胞株 7721 的抑制有统计学意义 ($P < 0.001$), 说明北苍术多糖对肝癌细胞株 7721 的抑制作用较好。

抑制率 = (对照组平均细胞数 - 加药组平均细胞数) / 对照组平均细胞数

表 9 北苍术粗多糖对肝癌细胞株 HepG2 和 7721 的影响

Table 9 Effect of polysaccharide from *A. chinensis* on liver cancer cell line HepG2 and 7721

细胞	组别	细胞数 ($\times 10^5$)	抑制率/%
HepG2 细胞	对照	1.310 ± 0.085	15.88
	加药	1.020 ± 0.078	
7721 细胞	对照	1.280 ± 0.048	21.09
	加药	1.010 ± 0.038***	

与对照组比较: *** $P < 0.001$

*** $P < 0.001$ vs control group

3 讨论

生物酶解法是利用酶所具有的极高催化活性和高度专一性等特点,使组成植物细胞壁的纤维素和半纤维素快速水解,使其细胞内的有效成分易于溶解、扩散的一种新方法。超声提取技术是利用超声波产生的强烈振动、较高的加速度、强烈的空化效应、搅拌作用等,使药物的有效成分较快进入溶剂的一种提取方法^[9-10]。本实验以多糖得率为考察指标,通过正交设计筛选并确定最佳酶解辅助超声提取工艺。结果显示,生物酶解辅助超声提取法能显著提高北苍术多糖的提取量,比直接超声法高出 48.73%,相对提取成本较低,具有可操作性,适用于制药工业大生产的需要。但在实验中也发现,由于加酶量少,因此应严格控制酶的重量以确保实验结果的准确性。

据证实^[11],许多抗癌药物在抑制肿瘤细胞生长的同时对机体免疫系统、消化系统生殖系统等都有一定的副作用,寻找新型替代药物势在必行。本研究显示,在剂量为 100 μg/mL 时,北苍术粗多糖对人卵巢癌细胞株 Skov3 和宫颈癌细胞株 HeLa 细胞的增殖具有明显的抑制作用,而对肝癌细胞株 HepG2 的抑制作用较弱,这说明其对肿瘤细胞有一定的选择性。对于北苍术多糖的结构特点以及抗肿瘤活性的作用机制等还有待于深入研究。

参考文献

[1] 国家中药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 [M].

第7卷. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 709-715.

[2] 鲁卫. 家中有本草, 健康无烦恼-介绍苍术 [J]. 媒体互动, 2013(3): 64-65.

[3] 塔西斯, 张洁, 杭永付, 等. 北苍术炮制前后水提液和多糖部位保肝作用比较研究 [J]. 现代中药研究与实践, 2011(3): 45-47.

[4] 梁存权. 比色法测定植物多糖含量方法概述 [J]. 北方药学, 2011, 8(12): 4.

[5] 何先元, 许晋芳, 王秋霜, 等. 当归多糖的超声提取及含量测定 [J]. 中国药业, 2010, 19(19): 34-35.

[6] 孟利娜, 南楠, 周晶, 等. 正交试验优化超声法提取北苍术多糖的工艺研究 [J]. 现代药物与临床, 2012, 27(5): 449-452.

[7] Taylor D J, Parsons C E, Han H, *et al.* Parallel screening of FDA-approved antineoplastic drugs for identifying sensitizers of TRAIL-induced apoptosis in cancer cells [J]. *BMC Cancer*, 2011, 11: 470.

[8] 李建勋, 华海婴, 李瑞. 紫苏醇亚微乳剂对人乳腺癌细胞 MCF-7 增殖的抑制作用研究 [J]. 中国药房, 2010, 21(45): 4238-4239.

[9] 黄锁义, 刘胜利, 郭立强, 等. 正交设计优化木瓜多糖的超声提取工艺 [J]. 安徽农业科学, 2012, 40(5): 2618-2620.

[10] 周晶, 冯淑华. 中药提取分离新技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2010: 101-102.

[11] 马伟伟, 李丽, 周革非. 海黍子硫酸多糖体外免疫与抗肿瘤活性研究 [J]. 食品科学, 2013, 34(7): 270-274.