

· 综 述 ·

黄芪多糖抗肿瘤作用的研究进展※

● 毛倩倩¹ 林久茂^{1,2▲}

摘 要 黄芪多糖是中药黄芪的提取物,具有抗肿瘤、调节免疫、抗氧化、降血糖等多种作用。近年来,其在抗肿瘤方面的作用备受关注。本文通过阅读近几年国内外黄芪多糖抗肿瘤相关文献,主要从调节肿瘤免疫、抑制肿瘤细胞增殖、抑制肿瘤细胞迁移侵袭、诱导肿瘤细胞凋亡、抗血管和淋巴管新生以及联合化疗药物的增效减毒作用几方面展开综述,深入了解黄芪多糖在抗肿瘤方面的作用及机制、研究新进展,为黄芪多糖今后的研究开发和广泛应用提供参考。

关键词 黄芪多糖;抗肿瘤;综述

肿瘤是威胁人类生命健康的重大疾病之一。虽然免疫和靶向治疗使当下肿瘤治疗取得了重大进展,但仍然存在患者响应率低、易产生耐药性、副作用大等多种问题^[1,2]。而中医药因具有整体调节和毒副作用小等特点,临床治疗各类恶性肿瘤疗效显著,备受广大癌症患者的青睐。传统中药黄芪具有扶正抑瘤作用,其重要活性成分黄芪多糖(Astragalus polysaccharides, APS)因能够直接、间接杀伤肿瘤或协同化疗发挥多重抗肿瘤活性,并且具有安全性,因而在肿瘤领域备受关注。黄芪多糖作为黄芪主要有效成分之一,除抗肿瘤作用外,还有调节免疫、抗氧化、降血糖等多种作用^[3],具有良好的应

用前景。由于黄芪多糖的抗肿瘤作用与其结构密切相关,而其提取、结构表征具有复杂性,所以本文对黄芪多糖结构表征简要概述,主要针对黄芪多糖近年来抗肿瘤方面的研究进行综述。

1 黄芪多糖结构表征

黄芪多糖的提取方法种类多,有溶剂法、酶辅助法、微生物发酵法、物理强化法等;纯化的常用方法有 Savege 法、酶法、分级沉淀、层析柱法、膜分离等^[4]。由于黄芪多糖提取纯化手段多样,其性质与生物活性也有差别。结构表征测定主要包括多糖含量测定、分子量测定、单糖组成及比例、糖链的连接顺序、糖苷键的类型以及结构等几

个方面^[5]。

多糖含量的经典检测方法比色法(紫外分光光度法)有两种,分别为苯酚-硫酸法和蒽酮-硫酸法^[5]。近些年测定相对分子量最常用的方法是高效凝胶色谱法(GPC)及 GPC-MALLS(多角度激光光散射)联用法^[6]。据报道^[7],黄芪多糖的分子量多集中在 10000 ~ 50000Da。分子量不同的多糖,其单糖组成、比例以及糖链连接顺序及糖苷键类型也会有差异^[3]。解析单糖组成及比例的技术手段主要包括高效液相色谱、气质联用及液质联用技术^[3]。已有的研究表明^[5,7-9],黄芪多糖是由葡萄糖、鼠李糖、半乳糖、阿拉伯糖、半乳糖醛酸等多种单糖组成的。刘卫宝等^[9]通过 FT-IR、¹H-NMR 分析其提取的黄芪多糖同时包含 α -型吡喃糖和 β -型吡喃糖。

2 抗肿瘤作用及机制

2.1 调节肿瘤免疫

2.1.1 促进固有免疫 巨噬细胞

※ 基金项目 福建省自然科学基金(No.2019J01493);福建省中医药科研课题(No.2017FJZY203)

▲ 通讯作者 林久茂,男,医学博士,研究员,博士研究生导师。Email: linjiucao@fjtc.edu.cn

• 作者单位 1. 福建中医药大学中西医结合研究院(福建 福州 350122); 2. 福建省中西医结合老年性疾病重点实验室(福建 福州 350122)

是单核-吞噬系统的重要组成部分,也是固有免疫系统的关键细胞。激活的巨噬细胞可以直接吞噬异物、病原体、杀死肿瘤细胞,还可以释放细胞因子间接杀死肿瘤细胞^[10]。周丽菁等^[11]构建人源型巨噬细胞 THP-1-乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 共培养体系,经黄芪多糖干预后,MDA-MB-231 的增殖、迁移侵袭受到抑制,凋亡增加;并且发现黄芪多糖干预单独培养 THP-1 细胞 NO、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等细胞因子分泌水平增加。Li 等^[12]研究表明黄芪多糖干预 RAW264.7 小鼠巨噬细胞后的培养上清液对小鼠乳腺癌细胞 4T1 具有明显的抑制作用。进一步研究发现,黄芪多糖可以通过激活 RAW264.7 小鼠巨噬细胞的 TLR4/MyD88 信号通路,进而活化其下游分子 TRAF-6、NF- κ B p65 和 AP-1,促使巨噬细胞分泌各种细胞因子发挥抗肿瘤作用^[13]。

此外,有研究显示^[14-15]黄芪多糖也可以增强白血病细胞 HL-60 细胞对 NK 细胞的杀伤敏感性,其机制可能是通过上调 HL-60 细胞表面的 MICA(NK 细胞表面关键活化受体 NKG2D 的配体)活化来实现的。

2.1.2 促进适应性免疫 树突状细胞(Dendritic cell, DC)是一种专职抗原提呈细胞,能摄取抗原并启动抗原特异性 T 细胞的不同亚群,如细胞毒性 T 细胞、辅助性 T 细胞,这两种 T 细胞起到直接或间接杀伤肿瘤细胞作用^[16]。因此,树突状细胞在启动特异性肿瘤免疫反应时起到了关键作用。廖双叶^[17]研究发现蜜炙黄芪多糖干预过后的人肺癌细胞 A549 表面的 MHC 分子、Hsp-70、钙网蛋白等与免疫原

性死亡相关的蛋白和信号分子的表达水平升高;通过流式细胞术检测到蜜炙黄芪多糖可以促进小鼠骨髓来源 DC 的成熟,提高其活化和抗原提呈能力。Pang 等^[18]制备的黄芪多糖纳米粒子能通过 TLR 活化 DC,使 DC 表面的共刺激分子表达增加、提呈肿瘤抗原能力增强、促使 DC 高效迁移至淋巴结,以激活淋巴结处的初始 T 细胞,抑制继发性肿瘤生长。

Th1 和 Th2 是辅助性 T 细胞的两种亚群,正常情况下,Th1 和 Th2 处于相对稳定状态,并相互制约,以维持机体正常的免疫功能。肿瘤患者体内发生 Th1 细胞受到抑制而 Th2 细胞占优势的现象称为 Th1/Th2 平衡漂移。荆雪宁等^[19]研究发现黄芪多糖诱导的 DC 疫苗能纠正 S180 荷瘤小鼠的 Th1/Th2 失衡,改善免疫状态,增强抗肿瘤的免疫功能。

2.1.3 逆转肿瘤微环境的免疫抑制 肿瘤及其微环境是由肿瘤细胞、血管内皮细胞、成纤维细胞、免疫细胞等细胞成分以及非细胞成分组成的复杂集合体^[20]。正常情况下,免疫系统可以识别和清除突变的细胞。然而,肿瘤微环境中存在的一些免疫抑制细胞(如调节性 T 细胞、肿瘤相关巨噬细胞、骨髓来源抑制细胞等)以及其产生的能够促进癌细胞生长或抑制肿瘤免疫的细胞因子限制了这种免疫监视作用。

调节性 T 细胞(Regulatory T cells, Tregs)是一把双刃剑,具有调节免疫稳态的作用,也能在不同病理环境下抑制免疫反应^[21]。CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 是 Tregs 的经典表面标记组合。在肿瘤微环境中,它们能够通过分泌 IL-35、IL-10 和

TGF- β 等免疫抑制分子、促进 CD8⁺ T 细胞和 NK 细胞溶解、抑制 T 细胞代谢、抑制 DC 成熟和功能等途径促进癌症的发生和发展^[22]。左博靖^[23]研究发现黄芪多糖可以诱导 Tregs 细胞向免疫无能性分化,明显下调 CD4、CD25 的表达,减少细胞因子 IL-10 和 TGF- β 的分泌。

巨噬细胞是肿瘤基质中最丰富的细胞,具有显著的可塑性,可在肿瘤微环境中发挥多种功能。肿瘤微环境中巨噬细胞通常分为经典 M1 和 M2(也称为肿瘤相关巨噬细胞)。M2 能直接影响肿瘤发展的多个步骤,包括癌细胞存活、增殖、侵袭性以及血管生成和免疫抑制;还能间接通过与肿瘤进展相关细胞的相互作用,或者与负调节肿瘤抑制细胞来发挥这些功能^[24]。研究表明黄芪多糖显著增加了非小细胞肺癌细胞 H441 和 H1299 的 M1/M2 巨噬细胞极化率,并且在非小细胞肺癌小鼠模型中异种移植瘤的生长受到抑制,以及 M2 数目显著减少,呈时间依赖性^[25]。

骨髓来源抑制细胞(Myeloid-derived suppressor cells, MDSC)是免疫抑制肿瘤微环境的主要驱动因素之一,其可以诱导 Tregs 的增殖,促使巨噬细胞向 M2 型巨噬细胞发展,可直接杀伤免疫效应细胞,抑制机体免疫,使肿瘤产生免疫耐受现象^[26]。柴旺^[27]研究发现黄芪多糖抑制了皮下黑色素瘤荷瘤小鼠脾内的 Gr1⁺CD11b⁺ MDSC 生成。刘素霞^[28]发现黄芪多糖可以降低 HLA-DR-CD14⁻CD33⁺ MDSC 在外周血单个核细胞中的数量,并指出可能通过促进 MDSC 分化成熟而降低 MDSC 的比例。

免疫检查点分子是癌细胞阻

断抗肿瘤免疫反应的重要免疫抑制机制之一。程序性死亡受体 1 (programmed death 1, PD-1), 可选择性地与程序性死亡配体 1 (programmed death-ligand 1, PD-L1) 或程序性死亡配体 2 (programmed death-ligand 2, PD-L2) 结合, 使 T 细胞功能失活, 在诱导癌细胞免疫逃逸方面发挥重要作用。PD-1 是 M2、Tregs 中发挥作用的关键受体之一^[29]。王洁茹等^[30]发现黄芪多糖能通过下调癌细胞表面的 PD-L1/PD-L2 分子、脾组织 PD-1 的表达及相互作用, 增强 T 细胞抗肿瘤免疫作用抑制荷瘤小鼠皮下黑色素瘤的生长。

2.2 抑制肿瘤细胞增殖 宋鑫等^[31]通过噻唑蓝 (MTT) 法检测到黄芪多糖在体外抑制人结肠癌细胞 HT-29 的半数致死量 (IC₅₀) 为 94.49 μg/mL, 且当浓度小于 200 μg/mL 时, 黄芪多糖对 HT-29 细胞的抑制作用呈剂量依赖性; 利用流式细胞仪检测发现黄芪多糖可使 HT-29 细胞的周期阻滞于 G₁ 期。卜威振等^[32]通过 MTT 法检测到黄芪多糖在体外对前列腺癌细胞 PC3 的增殖亦有抑制作用, 并且具有时间和浓度的依赖性; 台盼蓝染色测定 PC3 细胞生长曲线发现, 与对照组相比, 黄芪多糖组的 PC3 的生长速度存在着不同程度的减慢, 并呈时间依赖性。此外, 黄芪多糖对肝癌细胞 HepG2^[33]、人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y^[34] 等的细胞增殖均有抑制作用。由此可见, 黄芪多糖对多种癌细胞的增殖均有抑制作用。

2.3 抑制肿瘤细胞侵袭和转移 细胞迁移在肿瘤病理发展中发挥重要作用, 在此过程, 蛋白酶不可或缺。基质金属蛋白酶 (matrix

metalloproteinase, MMP) 是与肿瘤转移最密切相关的蛋白酶, MMPs 能降解除多糖外几乎全部的胞外基质。其中 MMP-2、MMP-9 是在肿瘤转移中最直接、最重要的一类蛋白酶, 两种酶均可降解 IV 型胶原。MMP-2 又可激活 MMP-9、MMP-13 呈瀑布效应, 共同介导癌细胞侵袭^[35]。王旗等^[36]通过划痕实验和 Transwell 实验发现黄芪多糖抑制了人结直肠癌细胞 HCT116 的迁移和侵袭, 并且 Western blot 结果显示 MMP-2 和 MMP-9 的表达水平显著降低。李超等^[37]发现视网膜母细胞瘤细胞 RB44 在黄芪多糖干预后, 其迁移和侵袭能力显著下降; 相关基因蛋白 MMP-2、MMP-9 表达下降, 但 E-cadherin 的表达并无明显改变。

2.4 诱导肿瘤细胞凋亡 细胞凋亡是最常见和研究最深入的程序性细胞死亡类型。质膜和膜细胞器如线粒体、内质网、溶酶体等在细胞凋亡中的作用关键, 各种凋亡诱导机制之间的密切联系, 并且可以从一种途径转换到另一种途径, 在大多数情况下, 这些途径的结果是线粒体膜渗透和/或 Caspase 激活^[38]。谢荣丹等^[39]研究发现黄芪多糖能有效抑制 MDA-MB-231 乳腺癌裸鼠移植瘤的生长, 通过 HE 染色、TUNEL 法检测到黄芪多糖诱导人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 凋亡程度呈剂量依赖性, 并且通过 Western blot 法检测凋亡相关蛋白、Bcl-2、Bax、Caspase-7、Caspase-9 的表达水平, 结果显示 Bcl-2/Bax 的比值升高, Caspase-9、Caspase-7 蛋白表达水平显著升高。阎力君等^[40]研究发现黄芪多糖干预人结肠癌 SW620 后使其 Bcl-2/Bax 的比值增加, Cytochrome C 以及

Caspase-9、Caspase-3 的表达上升。由此可得出黄芪多糖可通过线粒体途径诱导肿瘤细胞凋亡。

2.5 抗血管新生和淋巴管新生 在肿瘤的发展过程中, 由于代谢需求的增加和组织缺氧刺激, 肿瘤细胞需要分泌多种促血管生成因子促使血管生成才能继续生长和转移。其分泌的血管内皮生长因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF) 被认为是肿瘤血管生成的关键介质, 靶向 VEGF/VEGFR 信号轴已成为抗血管生成药物发展的核心^[41]。Zhao 等^[42]研究发现黄芪多糖能有效抑制小鼠 Lewis 肺癌的生长和转移, 抑制其肿瘤组织中血管生成、VEGF 和表皮生长因子受体 (Epidermal growth factor receptor, EGFR) 的蛋白表达, 并具有浓度-效应关系, 提示 APS 可能通过降低 VEGF 和 EGFR 的表达, 发挥抑制肿瘤作用。此外, 铁宝霞^[43]研究显示黄芪多糖能下调人结肠癌细胞 LOVO 的 VEGF-C 蛋白和 mRNA 的表达水平, 增强正常人淋巴管内皮 HLEC 细胞的活性, 提示其抗癌作用可能与淋巴管生成有一定关系。但关于黄芪多糖抗血管新生和淋巴管新生的进一步机制研究文献报道尚不多, 其作用机制待进一步深入研究。

3 增效减毒作用

黄芪多糖增强肿瘤细胞对化疗药的敏感性, 张明明等^[44]研究发现黄芪多糖通过调控耐药相关基因 MDR1、xIAP 等的表达提高人胃癌细胞 SGC7901 对洛铂的敏感性。翟秋丽等^[45-46]研究表明黄芪多糖通过调控自噬相关蛋白 Beclin1、LC3-II、P62 增强卵巢癌细胞 SKOV3 的自噬活性, 从而增加

SKVO3 细胞对顺铂的敏感性;又可联合顺铂协同增强宫颈癌细胞 si-ha 通过线粒体途径发生的凋亡。

骨髓抑制和胃肠道反应是常见的化疗的毒副作用,严重影响患者的身体机能、生活质量。石岳坚等^[45]观察弥漫大B细胞淋巴瘤患者使用RCHOP 化疗方案联合注射用黄芪多糖的疗效,与单独化疗的对照组相比,治疗组因化疗所致的不良反应、心脏毒性、免疫抑制、KPS 评分等明显改善。崔伟等^[48]通过观察仅接受新辅助化疗TP 方案和接受黄芪多糖联合新辅助化疗TP 方案治疗宫颈癌患者的近期疗效、生活质量、免疫功能和不良反应等指标,结果显示黄芪多糖除可改善疗效、生活质量,减轻不良反应,还能降低外周血中免疫抑制细胞Tregs 和MDSC 的比例,说明黄芪多糖能缓解化疗所致的不良反应,增强患者免疫功能,改善生活质量,使患者的化疗耐受性提高,具有减毒增效的作用。此外,张明明等^[49]观察发现胃癌患者术后化疗应用黄芪多糖后,其IL-6、CRP、PCT、IL-10 水平及白细胞水平得到改善,炎症反应得到减轻,可有效缓解患者的易感状态,对后期康复起到积极的作用。

4 小结与展望

黄芪多糖在调节肿瘤免疫方面能促进固有免疫、适应性免疫间接杀伤肿瘤,逆转肿瘤微环境的免疫抑制作用;又可通过多种途径直接抗肿瘤细胞;与其他化疗药物联合使用,能增强疗效又能减轻其毒副作用,促进患者预后康复。黄芪多糖作为天然植物的提取物,具有生物安全性良好、靶点多、作用范

围广泛的特点,在新技术联合^[18]、创新剂型^[50]等方面的应用中显示出独特优势和巨大的潜力。然而,其结构分析方面的研究,相较于药理作用方面,略显不足。对化学结构充分分析,明确构效关系,将有利于其在抗肿瘤研究的进一步开发应用。

参考文献

[1] 吕欣阳,任秀宝. PD-1 抑制剂癌症治疗中的肝脏毒性[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2020, 27(6): 691-697.

[2] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020[J]. CA: a cancer journal for clinicians, 2020, 70(1): 7-30.

[3] 芮雯,李婵艺,陈宏远. 黄芪多糖的结构表征与生物活性研究进展[J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(2): 264-270.

[4] 臧凯,张萍,袁彩彤,等. 黄芪多糖提取、纯化及其应用研究进展[J]. 应用化工, 2019, 48(10): 2417-2421.

[5] 杨淑萍. 紫外分光光度法检测黄芪多糖含量[J]. 现代畜牧科技, 2019,47(8): 7-9.

[6] 王莹,许玮仪,李丽潇,等. 注射用黄芪多糖相对分子量测定方法的比较及研究[J]. 药学报, 2019, 54(2): 348-353.

[7] 贾刚. 黄芪有效组分的提取分离及结构鉴定[D]. 长春: 长春中医药大学, 2008.

[8] 曹宇欣,李科,秦雪梅,等. 基于糖特征图谱及免疫细胞活性研究的不同产地黄芪的质量评价[J]. 药学报, 2019, 54(7): 1277-1287.

[9] 刘卫宝,余讯,徐静静,等. 黄芪多糖的分离、结构表征及益生活性研究[J]. 食品与发酵工业,2020,46(7):50-56.

[10] Ngambenjwong C, Gustafson HH, PunSH. Progress in tumor-associated macrophage (TAM)-targeted therapeutics[J]. Advanced Drug Delivery Reviews,2017, 114: 206-221.

[11] 周丽菁,汪志学,龙婷婷,等. 黄芪多糖在体外巨噬细胞-乳腺癌细胞共培养体系中的作用[J]. 免疫学杂志,2017,33(6):469-476.

[12] Li WF, Hu XY, Wang SP, et al. Characterization and anti-tumor bioactivity of astragalus polysaccharides by immunomodulation[J]. Inter-

national Journal of Biological Macromolecules, 2020, 145: 985-997.

[13] Zhou LJ, Liu ZJ, Wang ZX, et al. Astragalus polysaccharides exerts immunomodulatory effects via TLR4-mediated MyD88-dependent signaling pathway in vitro and in vivo[J]. Scientific Reports, 2017, 7:44822.

[14] 曾鹏云,邓黎黎,岳玲玲,等. 黄芪多糖提高HL-60 细胞对NK 细胞杀伤活性的敏感性及其机制[J]. 中国实验血液学杂志,2012,20(4): 880-883.

[15] 邓黎黎. 黄芪多糖对白血病细胞 MICA 表达及NK 细胞杀伤敏感性的影响[D]. 兰州: 兰州大学,2012.

[16] Le Gall CM, Weiden J, Eggermont LJ, et al. Dendritic cells in cancer immunotherapy[J]. Nature Materials,2018,17(6): 474-475.

[17] 廖双叶. 蜜炙黄芪多糖诱导肿瘤细胞免疫原性死亡的实验研究[D]. 广州: 广东药科大学,2017.

[18] Pang GB, Chen C, Liu Y, et al. Bioactive Polysaccharide Nanoparticles Improve Radiation-Induced Abscopal Effect through Manipulation of Dendritic Cells[J]. ACS Applied Materials & Interfaces,2019, 11(45): 42661-42670.

[19] 荆雪宁,邱波,战文翔,等. 黄芪多糖诱导的树突状细胞疫苗对S180 荷瘤小鼠Th1/Th2 类细胞因子的影响[J]. 天津医药, 2014, 42(11): 1080-1083.

[20] Musetti S, HuangL. Nanoparticle-Mediated Remodeling of the Tumor Microenvironment to Enhance Immunotherapy[J]. ACS Nano, 2018, 12(12): 11740-11755.

[21] Saleh R, Elkord E. Treg-mediated acquired resistance to immune checkpoint inhibitors[J]. Cancer Letters,2019,457: 168-179.

[22] 肖文璐,蒋敬庭,卢斌峰. 调节性T 细胞在肿瘤免疫中作用机制及治疗新策略的研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2019, 26(12): 1387-1391.

[23] 左博靖. 基于诱导调节性T 细胞分化的黄芪、甘草多糖对HCT-116 的作用机制[D]. 太原: 山西省中医药研究院,2019.

[24] Najafi M, Hashemi Goradel N, Farhood B, et al. Macrophage polarity in cancer: A review [J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2019, 120(3): 2756-2765.

(下转第 34 页)