

芪归多糖的分离纯化及体外抑制肿瘤细胞增殖研究

刘文娟¹, 马善波², 鹿纹菲¹,
崔东晓¹, 徐顶巧¹, 乐世俊¹, 曹蔚³, 唐于平^{1*}

¹陕西中医药大学 陕西中医药管理局中药配伍重点研究室, 咸阳 712046;

²空军军医大学第一附属医院药剂科, 西安 710032; ³西北农林科技大学化学与药学院, 杨凌 712100

摘要: 黄芪-当归配伍为经典补气养血药对, 多糖是其重要药效物质。本研究从芪归药对中分离纯化获得 6 种芪归多糖, CCK-8 实验筛选发现其中两种 AAPS-1a 和 AAPS-3a 对人结肠癌细胞 HCT116 和肺癌细胞 A549 抑制作用显著, 对 HCT116 增殖抑制作用最强, IC₅₀ 值分别为 (47.59 ± 1.3) μg/mL 和 (18.33 ± 2.5) μg/mL; 对 A549 增殖抑制作用次之, IC₅₀ 值分别为 (52.12 ± 1.1) μg/mL 和 (170.21 ± 2.3) μg/mL。同时, AAPS-1a 和 AAPS-3a 显著诱导 HCT116 和 A549 细胞发生凋亡, HCT116 细胞凋亡率分别为 31.4% 和 46.5%; A549 细胞凋亡率分别为 19.3% 和 33.0%。结构特征分析表明, AAPS-1a 和 AAPS-3a 为分子量分别为 7.3 × 10⁵、8.5 × 10⁴ Da 的均一多糖。本研究从芪归药对中筛选获得具有肿瘤细胞增殖抑制活性的芪归均一多糖, 为阐明芪归多糖抗肿瘤结构基础研究提供重要实验依据。

关键词: 黄芪-当归药对; 芪归多糖; 分离纯化; 增殖; 凋亡

中图分类号: R932

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)10-1651-08

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.10.001

Isolation and purification of Qi-Gui polysaccharides and their *in vitro* inhibitory activity on tumor cell proliferation

LIU Wen-juan¹, MA Shan-bo², LU Wen-fei¹,
CUI Dong-xiao¹, XU Ding-qiao¹, YUE Shi-jun¹, CAO Wei³, TANG Yu-ping^{1*}

¹Key Laboratory of Shaanxi Administration of Traditional Chinese Medicine for TCM Compatibility, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, China; ²Department of Pharmacy, Xijing Hospital, Air Force Military Medical University, Xi'an 710032, China; ³Shaanxi Key Laboratory of Natural Products & Chemical Biology, School of Chemistry & Pharmacy, Northwest A&F University, Yangling 712100, China

Abstract: Astragali Radix-Angelica Sinensis Radix (Qi-Gui herb pair) has long been used as a classic herb pair for tonifying qi and nourishing blood. Polysaccharide is one of its major active ingredients. Two of the Qi-Gui polysaccharides named AAPS-1a and AAPS-3a, significantly inhibited the proliferation of human colon cancer cells HCT116 and human lung carcinoma cells A549, with IC₅₀ of (47.59 ± 1.3) μg/mL, (18.33 ± 2.5) μg/mL for HCT116 cells, and IC₅₀ of (52.12 ± 1.1) μg/mL, (170.21 ± 2.3) μg/mL for A549 cells. Furthermore, AAPS-1a and AAPS-3a induced apoptosis in HCT116 and A549 cells. The apoptotic rate of the HCT116 cells were 31.4%, 46.5% respectively and the apoptotic rate of the A549 cells were 19.3% and 33.0% separately. Structural analysis showed that AAPS-1a and AAPS-3a were homogeneous polysaccharides with molecular weights of 7.3 × 10⁵ and 8.5 × 10⁴ Da, respectively. Our study found two homogeneous Qi-Gui polysaccharides with significant anti-tumor activity *in vitro*, which provide experimental basis for clarifying the anti-tumor structure of polysaccharides in Qi-Gui herb pair.

Key words: Astragali Radix-Angelica Sinensis Radix (Qi-Gui herb pair); Qi-Gui polysaccharides; isolation and purification; proliferation; apoptosis

收稿日期: 2023-03-29

接受日期: 2023-07-05

基金项目: 陕西省中医药管理局中医药传承创新暨“秦药”开发重点科学研究项目(2021-02-22-007); 国家自然科学基金面上项目(82274084); 陕西省重点研发计划(2022SF-205)

* 通信作者 Tel: 86-29-38184350; E-mail: yupingtang@sntcm.edu.cn

黄芪-当归配伍是临床最常用、最具代表性的补气养血药对。在中医方剂数据库中,黄芪与当归配伍的频次高达 2 632 次^[1]。黄芪和当归以 5:1 配伍形成当归补血汤,是一首补气生血的传世名方,因其组方精炼、疗效确切而广受中医药研究学者青睐。芪归药对又可作为基础药对配伍组方,黄芪当归建中汤、补中益气汤、归脾汤、圣愈汤、补阳还五汤等方中无不用芪归药对组方,临床应用及研究多围绕该药对展开。现代药理学研究表明:芪归药对具有促进造血、免疫调节、心血管保护、抗肿瘤等作用^[2,3]。芪归药对抗肿瘤作用明显,对结肠癌^[4]、肺癌^[5]、白血病^[6]等都表现出显著的抑制作用。

多糖在芪归药对中含有丰富,为黄芪和当归所共有的大分子类活性成分,具有改善贫血、抗衰老、抗纤维化、抗肿瘤等作用。多糖是芪归药对发挥补血功效的重要活性成分,与非多糖组分相比,当归补血汤多糖组分的补血作用更强,能显著促进血虚小鼠骨髓造血、加快血细胞的分化与成熟、增加外周血红细胞数目,且当归多糖补血活性尤为显著^[7,8]。芪归多糖还可增强免疫和抗氧化功能,调节衰老细胞周期、端粒酶活性延缓细胞衰老,减轻衰老模型小鼠肾组织氧化损伤^[9]。此外,芪归多糖对 CCl_4 诱导的肝纤维化损伤、环磷酸胺引起的脾和胸腺损伤具有保护作用^[10]。多糖是芪归药对发挥抗肿瘤作用的主要药效物质之一,组成芪归药对的黄芪、当归单味药多糖对多种肿瘤具有显著抑制作用。黄芪多糖对肺癌、乳腺癌、黑色素瘤等作用显著,能通过直接抑制肿瘤细胞增殖,诱导凋亡和周期阻滞、激活免疫系统、调节炎症微环境发挥抗肿瘤作用^[11]。当归多糖对白血病、黑色素瘤、结肠癌、肝癌等作用突出,能通过抑制肿瘤细胞增殖、诱导凋亡、增强免疫、调节自噬、抑制肿瘤细胞侵袭和迁移等方式发挥抗肿瘤作用^[12-14]。国内外学者对组成芪归药对的单味药黄芪、当归中多糖结构进行了广泛深入的研究。目前已从黄芪中分离获得 34 种均一多糖,从当归中分离获得均一多糖 39 种,这些多糖的一级结构包括分子量、单糖组成、糖残基组成、糖苷键的构型及连接顺序等均进行了解析^[11,14]。但目前对芪归多糖的研究多涉及提取工艺的优化,芪归均一多糖的相关研究报道甚少,对于芪归药对多糖的抗肿瘤活性还未进行系统研究。芪归药对中是否具有显著肿瘤细胞增殖抑制作用的新型结构多糖,还未见报道。结合前期研究基础和文献报道,本研究从芪归药

对中分离获得 6 种芪归多糖,并选择了单味药当归多糖或黄芪多糖对其具有显著抑制作用的人结肠癌细胞 HCT116、肺癌细胞 A549 和白血病细胞 K562,考察了芪归多糖对 3 种肿瘤细胞的增殖抑制作用和凋亡诱导作用,发现 2 种芪归多糖能显著抑制 HCT116 细胞和 A549 细胞增殖并诱导其凋亡,为具有潜在抗肿瘤活性均一多糖,本研究为基于“芪归多糖”及“黄芪-当归药对”的健康产品研发与进一步应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

人结肠癌细胞株 HCT116、白血病细胞株 K562 和肺癌细胞株 A549 为本室传代保株。无水乙醇、氯仿、正丁醇、过氧化氢、氯化钠、硝酸钠(均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司);DMEM/1640 基础培养基(货号: C11995500BT,赛默飞世尔科技公司);胎牛血清(货号: 10100147,美国 Gibco 公司);CCK-8 试剂盒(货号: C0039,碧云天生物技术有限公司);Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(货号: FXP0211-100,四正柏生物技术有限公司);100 × 青链霉素混合液(货号: P1400,索莱宝生物技术有限公司);胰蛋白酶-EDTA(货号: T1300,索莱宝生物技术有限公司)。

红外光谱仪(TENSOR 27,布鲁克科技有限公司);高效液相色谱仪(Ultimate 3000,赛默飞世尔科技有限公司);流式细胞分析仪(FACS Calibur, BD Biosciences)。

1.2 方法

1.2.1 芪归总多糖的提取

称取黄芪饮片 4.0 kg,酒当归饮片 1.0 kg 混匀;加入 4 倍体积无水乙醇回流 3 次,除去脂质类杂质;挥发去除乙醇,加入去离子水至 6 倍体积,待饮片吸水完全,80 °C 煎煮 2 次,每次 1 h;合并煎煮液,浓缩、离心取上清,加入 4 倍体积无水乙醇沉淀,4 °C 静置过夜,离心收集沉淀,复溶于水,获得芪归粗多糖。用 Sevag 试剂(氯仿:正丁醇 = 5:1)结合反复冻融除去蛋白质类杂质;以多糖:水:过氧化氢 = 10:1:0.5 混匀,pH = 7,70 °C 氧化脱色 3 h;浓缩,离心收集上清,透析 48 h,收集袋内液,为芪归总多糖(polysaccharides from Astragali Radix-Angelica Sinensis Radix, AAPS)。

1.2.2 AAPS 的分离和纯化

利用 DEAE Sephadex A-25 离子交换柱,以梯度

NaCl 溶液(0、0.5、1.0、2.0 mol/L)洗脱,将总多糖分为4个亚组分(AAPS-1、AAPS-2、AAPS-3和AAPS-4);利用Sephadex G-100尺寸排阻柱,以0.1 M的NaCl溶液洗脱,对4个亚组分进一步分离纯化,得到6种芪归均一多糖,分别命名为AAPS-1a、AAPS-1b、AAPS-2a、AAPS-2b、AAPS-3a和AAPS-4a。

1.2.3 均一性和相对分子量的测定

系列标准葡聚糖(Dextran T-10、T-50、T-120、T-50、T-150和T-410)及样品临用前溶解于0.1 mol/L NaNO₃中,终浓度为1 mg/mL,高速离心后,取200 μL采用凝胶色谱-示差-多角度激光光散射系统进行分析,色谱柱:TSK-GEL G2500 PWXL柱(TOSOH,7.8 mm × 30.0 cm)或TSK-GEL G4000 PWXL柱(TOSOH,7.8 mm × 30.0 cm);进样量10 μL,流动相0.05 mol/L Na₂SO₄水溶液,流速0.5 mL/min,柱温25 °C,等度洗脱100 min。根据公式 $K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$ 计算各葡聚糖标准品的分配系数 K_{av} ,并以 K_{av} 为横坐标,以标准葡聚糖分子量(Mw)的对数(lgMw)为纵坐标,绘制标准曲线(V_e 表示各标准葡聚糖的洗脱体积; V_0 为根据蓝色葡聚糖确定的空体积, V_t 为根据葡萄糖确定的总体积);样品同法制备,进样10 μL;根据得到的 V_e 值计算其分子量大小。

1.2.4 FT-IR 分析

分别称取多糖2 mg,与干燥KBr研磨混匀,压片,红外光谱仪测定4 000 ~ 400 cm⁻¹的红外光谱,确定糖分子中主要官能团和吡喃糖的糖苷键构型。

1.2.5 细胞培养

选取人结肠癌细胞株HCT116、白血病细胞株K562和肺癌细胞株A549,分别给予含10%胎牛血清的DMEM或RPMI1640培养液,5% CO₂、37 °C条件下培养箱中培养。

1.2.6 CCK-8 检测细胞增殖

取对数生长期HCT116、K562和A549细胞,分别以 5×10^3 个/孔接种于96孔板。待细胞过夜贴壁,给予终浓度为0、0.1 ~ 100 μg/mL的芪归多糖溶液培养48 h,每组设8个复孔,每孔加入10 μL CCK-8溶液,37 °C孵育2 h,酶标仪490 nm测吸光度值(A),实验重复3次。按照下列公式计算细胞抑制率:细胞抑制率 = $(A_{\text{对照组}} - A_{\text{实验组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$,以对数药物浓度lg C(C:给药浓度,μg/mL)为横坐标,抑制率为纵坐标绘制增殖抑

制曲线。

1.2.7 流式细胞术检测细胞凋亡

取对数生长期细胞,分别以 1×10^5 个/mL的密度接种于六孔板中,每孔3 mL,细胞过夜贴壁后,分别加入终浓度为50 μg/mL的AAPS-1a或AAPS-3a,对照组只加培养液,每组设4个复孔。培养48 h后,收集细胞,预冷的PBS清洗细胞2次。结合缓冲液重悬细胞,调整细胞密度为 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 个/mL,分别取100 μL细胞悬液用于周期和凋亡测定。加入Annexin V/FITC 5 μL,室温避光孵育5 min;加入PI染液10 μL,PBS 400 μL,立刻进行流式检测。

1.2.8 统计分析

数据表示为平均值 ± 标准误,并采用方差分析(ANOVA)或t检验(Student's t-test)进行显著性分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 芪归均一多糖的提取分离和纯化

如图1所示,芪归总多糖(AAPS)经DEAE-Sephadex A-25离子交换柱分离,用梯度NaCl洗脱获得4个亚组分AAPS-1、AAPS-2、AAPS-3和AAPS-4。各亚组分进一步经Sephadex G-100葡聚糖凝胶柱分离和纯化,以0.1 mol/L NaCl洗脱,苯酚-硫酸法测定糖含量,收集含糖组分,分别命名为AAPS-1a、AAPS-1b、AAPS-2a、AAPS-2b、AAPS-3a和AAPS-4a,得率分别为18.7%、15.5%、21.2%、13.8%、9.1%和10.8%。

2.2 芪归总多糖的肿瘤细胞增殖抑制活性评价

为了初步明确芪归多糖是否具有肿瘤细胞增殖抑制作用,及其对不同肿瘤细胞的增殖抑制活性,首先测定了芪归总多糖(AAPS)对人结肠癌细胞HCT116、肺癌细胞A549和白血病细胞K562增殖的影响(见图2)。AAPS均能剂量依赖性抑制3种肿瘤细胞的增殖,同等浓度最大抑制率分别为65.7%、33.4%、22.4%,对HCT116细胞增殖抑制作用最强,IC₅₀值为 $(66.51 \pm 2.2) \mu\text{g/mL}$ 。同等浓度作用条件下,当归总多糖(polysaccharides from Angelica Sinensis Radix, ASPS)和黄芪总多糖(polysaccharides from Astragali Radix, ARPS)对HCT116细胞最大抑制率分别为28.7%、49.6%,抑制作用弱于AAPS。

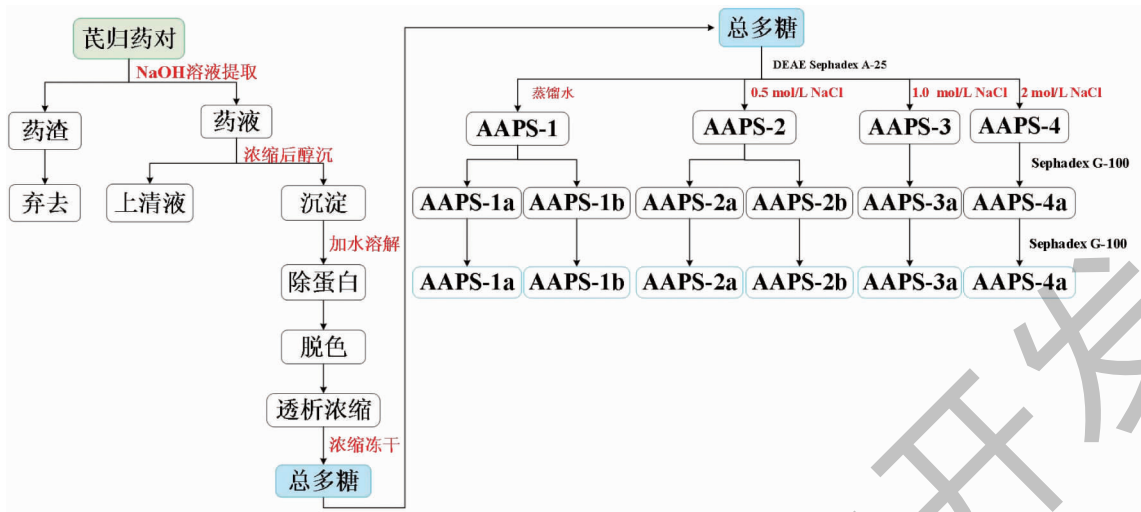


图1 芪归多糖的分离纯化流程

Fig. 1 The isolation and purification processes of Qi-Gui polysaccharides

该结果提示,芪归总多糖 AAPS 中含有具有显著抗结肠癌活性的均一多糖组分。因此,需要对 AAPS

进一步分离纯化获得的芪归均一多糖进行肿瘤细胞增殖抑制活性测定,以筛选获得活性组分。

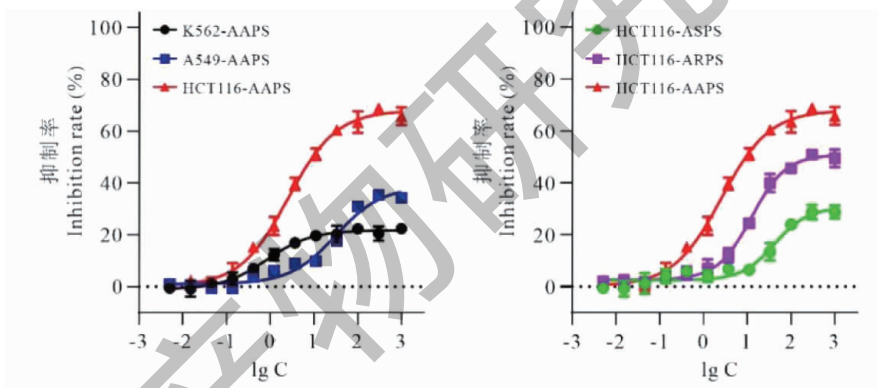


图2 当归总多糖、黄芪总多糖和芪归总多糖对肠癌细胞 HCT116 增殖的抑制作用

Fig. 2 Inhibitory effects of ASPs, ARPs and AAPS on the proliferation of HCT116 cells

2.3 6种芪归均一多糖对人结肠癌细胞 HCT116 增殖抑制作用评价

评价 AAPS 分离纯化后获得的 6 种芪归均一多糖对 HCT116、A549、K562 增殖的影响(见图 3)。6 种芪归均一多糖中, AAPS-1a 和 AAPS-3a 对 HCT116 增殖抑制作用最强,同等浓度最大抑制率分别为 82.8% 和 94.1%, IC_{50} 值分别为 $(47.59 \pm 1.3) \mu\text{g/mL}$ 和 $(18.33 \pm 2.5) \mu\text{g/mL}$; 对 A549 增殖抑制作用次之,同等浓度最大抑制率分别为 74.4% 和 81.8%, IC_{50} 值分别为 $(52.12 \pm 1.1) \mu\text{g/mL}$ 和 $(170.21 \pm 2.3) \mu\text{g/mL}$; 对 K562 的抑制作用最弱,最大抑制率分别为 45.4% 和 36.4%。结果表明,芪归均一多糖 AAPS-1a 和 AAPS-3a 对 HCT116 和

A549 细胞具有明显的增殖抑制作用,且对 HCT116 的抑制作用最强,为潜在的抗结肠癌活性均一多糖。

2.4 AAPS-1a 和 AAPS-3a 对正常人肠上皮细胞 HIEC 增殖活性的影响

明确芪归均一多糖 AAPS-1a 和 AAPS-3a 对 HCT116 细胞的显著增殖抑制后,研究进一步测定了芪归总多糖 AAPS 和 AAPS-1a、AAPS-3a 对人肠上皮细胞 HIEC 增殖的影响,结果如图 4 所示:测定浓度范围内, AAPS、AAPS-1a 和 AAPS-3a 均对 HIEC 细胞毒性较小,最大抑制率分别为 17.62%、15.63% 和 24.25%,显著低于对 3 种肿瘤细胞的抑制。以上结果表明, AAPS-1a 和 AAPS-3a 对肿瘤细胞的增殖抑制作用有一定特异性。

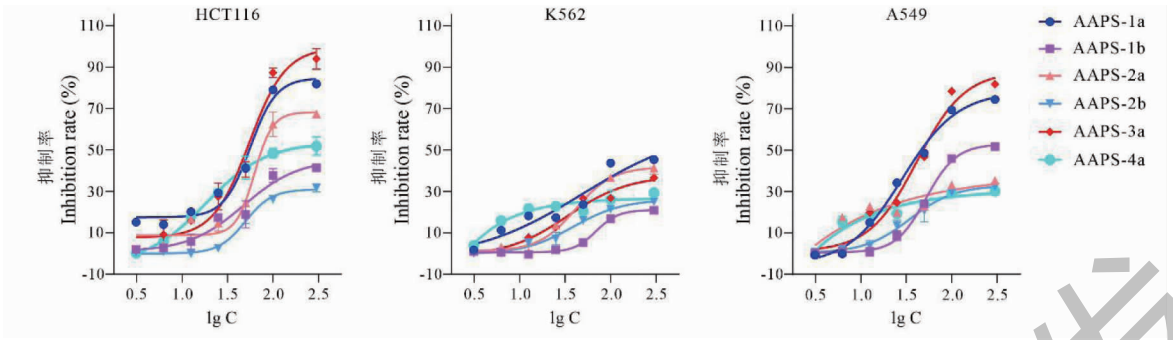


图3 6种芪归均一多糖对HCT116、A549和K562的增殖抑制作用

Fig. 3 Inhibitory effects of six Qi-Gui homogeneous polysaccharides on HCT116, A549, and K562 cells

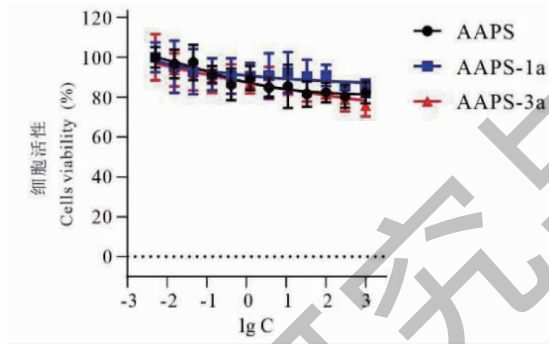


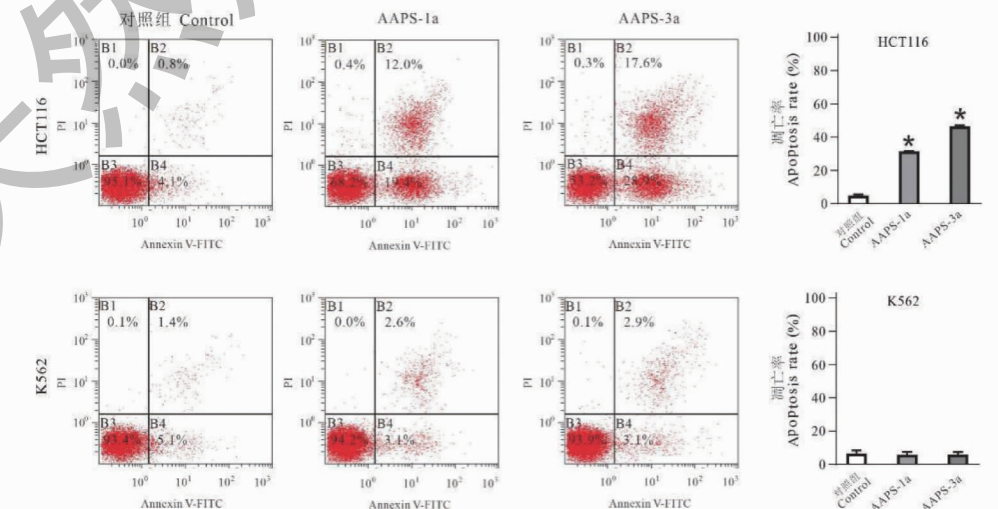
图4 AAPS、AAPS-1a和AAPS-3a对人肠上皮细胞HIEC增殖的抑制作用

Fig. 4 Inhibitory effects of AAPS, AAPS-1a, and AAPS-3a on HIEC cells

2.5 AAPS-1a和AAPS-3a显著诱导HCT116细胞凋亡

确定了AAPS-1a和AAPS-3a的结肠癌细胞增殖抑制作用后,进一步测定了其对3种肿瘤细胞凋亡的影响(见图5)。AAPS-1a和AAPS-3a能显著诱导HCT116细胞和A549细胞发生凋亡,分别给予AAPS-1a或AAPS-3a,HCT116凋亡率分别为31.4%

和46.5%;A549凋亡率分别为19.3%和33.0%。此外,AAPS-1a和AAPS-3a对K562细胞凋亡无显著影响,给予AAPS-1a或AAPS-3a后凋亡率分别为5.6%和6.0%,与正常组相比无显著差异。以上结果表明,芪归均一多糖AAPS-1a和AAPS-3a通过诱导凋亡对结肠癌和肺癌发挥体外抗肿瘤作用。



续图5(Continued Fig.5)

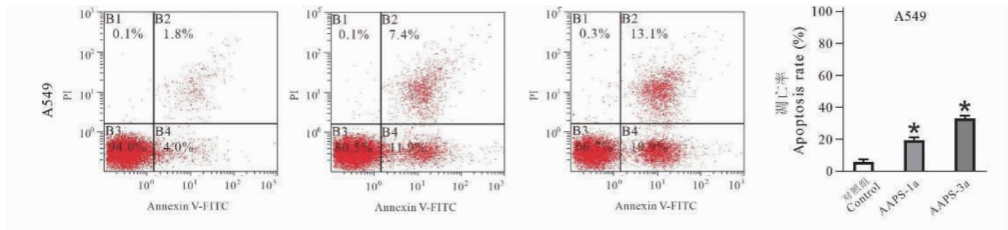


图5 AAPS-1a和AAPS-3a对HCT116、A549和K562凋亡的影响

Fig. 5 Effects of AAPS-1a and AAPS-3a on apoptosis of HCT116, A549 and K562 cells

2.6 AAPS-1a和AAPS-3a的纯度和分子量测定

HPSEC法测定了AAPS-1a和AAPS-3a的纯度和分子量。结果如图6A所示,AAPS-1a和AAPS-3a的HPSEC图谱中信号峰均呈单一对称性,说明AAPS-1a和AAPS-3a为均一性多糖;结合由系列葡

聚糖(T-1、T-5、T-12、T-50、T-150、T-410)的保留时间与其各自分子量的对数绘制的校准曲线(见图6B),计算得到AAPS-1a和AAPS-3a的分子量分别为 7.3×10^5 、 8.5×10^4 Da。

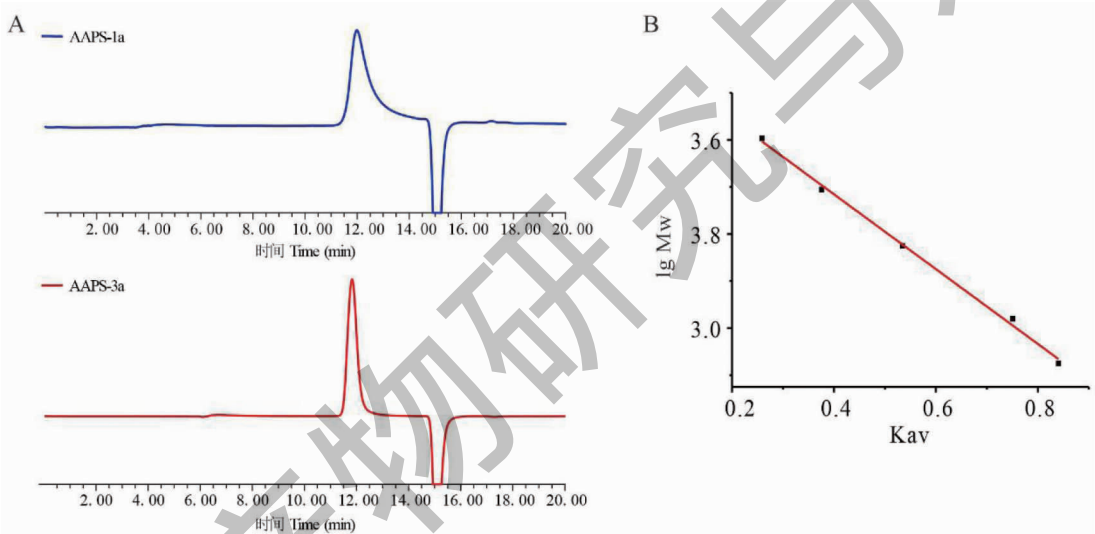


图6 AAPS-1a和AAPS-3a的纯度和分子量测定

Fig. 6 The homogeneity and molecular weight determination of AAPS-1a and AAPS-3a

注:(A) AAPS-1a和AAPS-3a的HPSEC图谱;(B)分子量测定标准曲线。Note:(A) HPSEC chromatograms of AAPS-1a and AAPS-3a;(B) The standard curve for molecular weight determination.

2.7 AAPS-1a和AAPS-3a的FT-IR分析

采用FT-IR对AAPS-1a和AAPS-3a的结构进行初步分析,2种多糖的FT-IR图谱均显示多糖分子和基团的特征信号(见图7)。其中, 3393 cm^{-1} 处的信号为O-H伸缩振动, 2929 cm^{-1} 和 1422 cm^{-1} 处信号为C-H拉伸振动和弯曲振动, 1356 cm^{-1} 处信号为多糖的环外C-O伸缩振动, 1652 cm^{-1} 附近信号为含有结合水的多糖产生的O-H变形振动。此外,还观察到 1015 、 1279 和 1156 cm^{-1} 处的信号,对应于吡喃糖的C-O弯曲振动。

3 讨论与结论

多糖由多个单糖单元通过糖苷键连接而成,是

自然界最丰富、最重要的生物聚合物之一^[15]。自1969年Nature杂志首次报道香菇多糖的抗肿瘤作用以来^[16],多糖作为药物的研究和应用引起了国内外学者的广泛关注。中药多糖在免疫调节、抗肿瘤、抗糖尿病、抗氧化、抗病毒、心血管保护和神经保护活性等方面具有突出的药理活性,是近年来中药活性成分研究领域的热点^[17]。目前,已从灵芝^[18]、人参^[19]、黄芪^[11]、当归^[14]、枸杞^[20]等中药中获得数百种具有显著药理作用且纯度较高的“活性多糖”。

与单味药多糖相比,复方多糖可结合各单味药多糖的生物活性,起到协同增效的作用。此外,复方多糖受到药材来源、炮制技术、配伍效应、提取方式

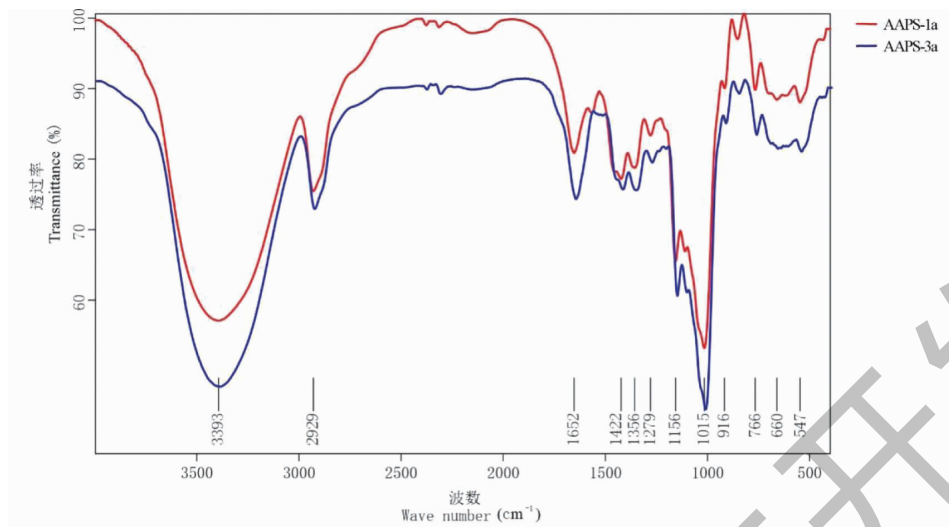


图7 AAPS-1a 和 AAPS-3a 的 FT-IR 图谱

Fig. 7 The FT-IR spectra of AAPS-1a and AAPS-3a

的影响,其纯度和结构特征与单味药多糖有所不同,如何在单味药多糖研究的基础上有效、充分地分离纯化中药复方多糖,并阐明其结构基础和作用机制,是近年来中药药效物质研究的热点与难点之一^[21]。从中药复方如四君子汤中获得的均一多糖结构与单味药多糖有所不同^[22]。研究发现,芪归药对多糖具有明显抗肿瘤活性^[23],但芪归多糖抗肿瘤的结构基础和作用机制尚不清楚,芪归药对中多糖类成分的结构和活性与单味药相比是否有所不同,还尚未见报道。本研究从芪归药对中分离得到芪归总多糖(AAPS),对其进行肿瘤细胞增殖抑制活性筛选发现AAPS对结肠癌细胞增殖抑制作用显著。对AAPS进行进一步分离纯化后,发现其中两种芪归多糖AAPS-1a和AAPS-3a能显著抑制人结肠癌细胞HCT116和肺癌细胞A549增殖,并诱导其凋亡。结构分析初步表明,AAPS-1a和AAPS-3a的分子量分别为 7.3×10^5 、 8.5×10^4 Da的芪归均一多糖。综上所述,AAPS-1a和AAPS-3a为具有潜在抗肿瘤作用的活性芪归均一多糖。本研究为后续的芪归多糖抗肿瘤物质基础和构效关系研究提供研究基础,为中药复方大分子物质基础研究提供重要方法、思路 and 实验依据。

参考文献

- Jin Y, Shang RX, Ye L, et al. Data analysis of herb pairs containing *Angelica Sinensis Radix* in TCM clinic application [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2016, 22: 194-199.
- Xiang L, Zhang QY, Zhao QM, et al. Research progress on chemical constituents, pharmacological effects and clinical applications of *Astragali Radix-Angelica Sinensis Radix* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2022, 53: 2196-2213.
- Xu TF, He CG, Yang K, et al. Network pharmacological study on the potential mechanism of Danggui Buxue Decoction in the treatment of diabetic nephropathy [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2020, 32: 1499-1506.
- Feng SH, Zhao B, Zhan X, et al. Danggui Buxue decoction in the treatment of metastatic colon cancer: network pharmacology analysis and experimental validation [J]. *Drug Des Dev Ther*, 2021, 15: 705-720.
- Shen YL. Study on inhibitory effects and mechanism of Danggui Buxue Decoction on the proliferation of Lewis lung cancer [D]. Chengdu: Chengdu University of Chinese Medicine (成都中医药大学), 2017.
- Chen P. Clinical observation on 24 cases of leukemia treated by *Angelica Buxue Decoction* [J]. *Chin Prac Med* (中国实用医药), 2016, 11: 209-210.
- Ning L, Cheng CX, Jin RM, et al. Effect of components of Dang-Gui-Bu-Xue decoction on hematopenia [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2002, 27: 50-53.
- Wang YP, Li XY, Song CQ, et al. Effect of different fractions from Danggui Buxue Tang on immunological function in normal and blood-deficiency mouse [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33: 41-44.
- Zhang KL, Chen B, Tian CY, et al. Study on the mechanism of Guiqi polysaccharides delaying rat brain aging [J]. *J Food Sci Biotechnol* (食品与生物技术学报), 2022, 41: 51-57.

- 10 Hu J, Li K, Li AP, et al. Research progress on material basis of Danggui Buxue Decoction[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2020, 51: 5658-5663.
- 11 Jin ML, Zhao K, Huang QS, et al. Structural features and biological activities of the polysaccharides from *Astragalus membranaceus*[J]. Int J Biol Macromol, 2014, 64: 257-266.
- 12 Liu WJ, Xiao KM, Ren L, et al. Leukemia cells apoptosis by a newly discovered heterogeneous polysaccharide from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels [J]. Carbohydr Polym, 2020, 241: 116279.
- 13 Zhang T, Liu W, Fu C, et al. Structures and anti-melanoma activities of two polysaccharides from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels[J]. Int J Biol Macromol, 2021, 183: 972-981.
- 14 Nai JJ, Zhang C, Shao HL, et al. Extraction, structure, pharmacological activities and drug carrier applications of *Angelica sinensis* polysaccharide [J]. Int J Biol Macromol, 2021, 183: 2337-2353.
- 15 Gerald WH, Ronald JC. Glycomics hits the big time [J]. Cell, 2010, 143: 672-676.
- 16 Chihara G, Maeda Y, Hamuro J, et al. Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk.) sing[J]. Nature, 1969, 222: 687-688.
- 17 Gong HX, Li WN, Sun JL, et al. A review on plant polysaccharide based on drug delivery system for construction and application, with emphasis on traditional Chinese medicine polysaccharide [J]. Int J Biol Macromol, 2022, 211: 711-728.
- 18 Sohretoglu D, Zhang C, Luo J, et al. *ReishiMax* inhibits mTORC1/2 by activating AMPK and inhibiting IGFR/PI3K/Rheb in tumor cells [J]. Signal Transduction Targeted Ther, 2019, 4: 21.
- 19 Li B, Zhang N, Feng QS, et al. The core structure characterization and of ginseng neutral polysaccharide with the immune-enhancing activity [J]. Int J Biol Macromol, 2019, 123: 713-722.
- 20 Song JB, Liu L, Li ZQ, et al. *Lycium barbarum* polysaccharide improves dopamine metabolism and symptoms in an MPTP-induced model of Parkinson's disease [J]. BMC Medicine, 2022, 20: 401-412.
- 21 Li CL, Wang W, Zhang Y, et al. Research progress on extraction, separation and purification of polysaccharide from traditional Chinese medicine [J]. China Pharm (中国药房), 2016, 27: 2700-2703.
- 22 Lu Y, Li L, Zhang JW, et al. Total polysaccharides of the Si-junzi decoction attenuate tumor necrosis factor- α -induced damage to the barrier function of a Caco-2 cell monolayer via the nuclear factor- κ B-myosin light chain kinase-myosin light chain pathway [J]. World J Gastroenterol, 2018, 24: 2867-2877.
- 23 Li Y. Study on extraction and pharmacology of Guiqi polysaccharides [D]. Lanzhou: Lanzhou University of Technology (兰州理工大学), 2012.