

喇叭菌多糖的结构和抗肿瘤活性

范晓丹¹, 陈耀华¹, 常杰², 陈健¹

(1.华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

(2.华南理工大学传热强化与过程节能教育部重点实验室, 广东广州 510640)

摘要: 从喇叭菌子实体中分离纯化得到喇叭菌多糖 CCP I, 通过高效凝胶渗透色谱法和气相色谱法测定其相对分子质量和单糖组成, 分析了它的红外光谱特征和核磁共振图谱。研究表明, 喇叭菌多糖 CCP I 的重均相对分子质量为 16270 Da, 具有典型的多糖红外吸收, 是一种含有 α 和 β 型吡喃糖苷键的杂多糖, 由岩藻糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖组成, 摩尔比为 1:2.11:3.13:6.45。糖链中 C-6 大部分被取代, C-2、C-3 或 C-4 部分被取代。采用体外抗补体活性测定方法和四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法评价了喇叭菌多糖 CCP I 的抗补体活性和抗肿瘤活性, 发现当 CCP I 浓度为 4 mg/mL 时, 抗补体活性达到 70.44%, 对人肝癌细胞 Hep G2 和人体乳腺癌细胞 MCF-7 的增殖均有明显抑制作用且呈剂量依赖性, 当 CCP I 浓度为 1000 μ g/mL 时, 对 Hep G2 和 MCF-7 抑制率分别达到 60.06% 和 55.80%。

关键词: 喇叭菌; 多糖; 纯化; 单糖组成; 结构; 抗补体; 抗肿瘤; 活性

文章篇号: 1673-9078(2014)4-50-54

Structure and Antitumor Activity of Water-soluble Polysaccharide from *Craterellus cornucopioides*

FAN Xiao-dan¹, CHEN Yao-hua¹, CHANG Jie², CHEN Jian¹

(1.College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2.Key Laboratory of Enhanced Heat Transfer and Energy Conservation of the Ministry of Education, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: One polysaccharide, named CCP I, was isolated and purified from the sporophore of *Craterellus cornucopioides*. The relative molecular mass and monosaccharide composition of CCP I were determined by using high-performance gel permeation chromatography and gas chromatography, and its spectra of IR and NMR were also investigated. The weight-average relative molecular mass of CCP I was 16270 Da. It possessed typical infrared absorptions of polysaccharides and showed α - and β -configuration pyranoside. In addition. It was determined as a kind of heteropolysaccharide containing fucose, mannose, glucose and galactose in a molar ratio of 1:2.11:3.13:6.45. Most of glycan C-6 were substituted, and part of C-2, C-3 or C-4 was replaced. Moreover, its anti-complement activity in vitro and antitumor activity by MTT were evaluated, which indicated that the anti-complement activity reached 70.44% when the concentration of CCP I was 4 mg/mL and it remarkably inhibited the growth of human liver cancer cell line Hep G2 and human breast cancer cell line MCF-7 in a dose-dependent manner. When the concentration of CCP I was 1000 μ g/mL, the inhibition ratios of Hep G2 and MCF-7 were 60.06% and 55.80%, respectively.

Key words: *Craterellus cornucopioides*; polysaccharide; purification; monosaccharide composition; structure; anti-complement; antitumor; activity

喇叭菌 (*Craterellus cornucopioides*), 又名梢棒菌、喇叭菌, 是一种分布较广的世界性食用菌, 该菌子实体虽小, 但菌肉含水量较少, 柔中有脆, 具有浓郁的

收稿日期: 2013-11-22

基金项目: 广东省海洋渔业科技推广专项项目 (A201301B04)

作者简介: 范晓丹 (1980-), 女, 博士, 讲师, 主要研究方向天然产物有效成分研究

通讯作者: 陈健 (1967-), 男, 博士, 副教授, 主要从事天然产物化学和生物分离技术研究

水果香气^[1]。在我国具有长期采集食用喇叭菌的历史, 其主要分布于云南、安徽、浙江、福建、湖南、广西、陕西、四川、西藏等地。喇叭菌多糖含量丰富, 脂肪含量较低, 含有多种蛋白质和矿物质元素, 且富含十几种氨基酸, 其中 7 种为人体必需氨基酸。研究发现其水提物具有较好的降血糖和抗氧化活性, 是一种营养价值高、味道鲜美且毒性较小的食用菌, 具有良好经济价值和开发前景^[2]。

国际上, 多糖被称为“生物应答效应物”, 广泛参

与细胞的各种生命活动,能通过激活免疫细胞,清除老化细胞和异物等对机体进行免疫调节,对肿瘤的生长有一定的抑制作用。许多食用菌多糖均被发现具有上述生理活性,而抗肿瘤则是食用菌多糖最重要的活性作用。目前最常用的体外抗肿瘤药物筛选方法有三种:分别是四甲基偶氮唑盐(MTT)微量酶反应比色法、四唑氮衍生物(XTT)法和磺基罗丹明B(SRB)法,其中MTT法实验周期短、所需细胞数目较少及所得数据较准确,成为药物筛选的主要手段。

目前,喇叭菌的研究主要针对其营养价值,对其多糖的研究较少,特别是关于多糖结构分析及抗肿瘤活性研究鲜见报道。文中分析了喇叭菌子实体纯化多糖的光谱特征、核磁共振图谱及单糖组成,评价了其在体外的抗补体活性和抗肿瘤活性,为进一步开发喇叭菌子实体多糖的食用和药用价值提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 原料

喇叭菌,购于广州一德路干货市场;D354FD树脂,广州市广联津化工有限公司;单糖标准品葡萄糖、岩藻糖、木糖、甘露糖、鼠李糖、阿拉伯糖及半乳糖,美国Sigma公司;Whatman DEAE-52,广州展晨生物科技有限公司进口分装;Sephacrose CL-6B,美国Pharmacia公司;低糖DMEM培养基、优级胎牛血清,美国Invitrogen公司;MTT细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒,美国Sigma公司;绵羊红细胞,南方试剂厂;其它试剂均为国产分析纯。

1.2 主要仪器设备

721-P型分光光度计,上海现科仪器有限公司生产;BT-200型恒流泵、DBS-100型自动部分收集器,上海沪西仪器厂生产;冷冻干燥系统、3543型培养箱,美国Thermo公司;Vector 33型傅里叶变换红外光谱仪,德国Bruck公司生产;液相色谱系统,美国Waters公司生产;气相色谱系统,美国Aglient公司生产;超导核磁共振谱仪,瑞士布鲁克公司生产;680型酶标仪,美国伯乐公司生产;CK40-F200型倒置显微镜,日本Olympus公司生产。

1.3 试验方法

1.3.1 喇叭菌多糖的分离纯化

喇叭菌子实体干品100g于90℃热水浸提(液料比30:1,提取时间3h,提取2次),混合物抽滤,滤液合并后减压浓缩。将浓缩糖液和Sevage试剂(三氯

甲烷/正丁醇体积比为5:1)混合,两者体积比为5:1,震荡20min,于4000r/min离心15min,取上部糖液添加一倍体积D354FD树脂,50℃水浴3h,对多糖进行脱色,低温浓缩至200mL,加入四倍体积的无水乙醇,4℃醇沉12h以上,将混合液4000r/min离心15min,所得沉淀物于50℃真空干燥,制得喇叭菌粗多糖干品。取10mL 10mg/mL多糖样品过DEAE-52阴离子层析柱,先用蒸馏水洗脱,再依次用0.01mol/L、0.05mol/L、0.1mol/L、0.3mol/L和0.5mol/L的NaCl溶液及0.1mol/L、0.3mol/L和0.5mol/L的NaOH溶液以流速15mL/h洗脱,收集洗脱液并浓缩,透析,再将2mL 10mg/mL多糖样品经过Sephacrose CL-6B凝胶柱层析,用0.1mol/L NaCl以流速9mL/h洗脱,收集洗脱液,透析并冷冻干燥得到多糖CCP I。

1.3.2 喇叭菌多糖CCP I的相对分子质量测定

CCP I的均一程度和相对分子质量用高效凝胶渗透色谱测定。样品配制成1g/L的水溶液,用0.45μm微孔滤膜过滤后进样。色谱条件为:TSK-GEL G-4000PWXL柱(7.8mm×300mm)与TSK-GEL G-2500PWXL柱(7.8mm×300mm)串联,流动相为0.02mol/L的KH₂PO₄溶液,流速为0.6mL/min,柱温为35℃。

1.3.3 红外光谱分析

取约2mg CCP I与KBr混合研细后,在4000~400cm⁻¹范围内进行红外扫描。

1.3.4 单糖组成分析

多糖的水解:称取10mg CCP I放入小管中,加3mL 3mol/L的三氟乙酸,充氮气封管,105℃水解6h。将水解液减压蒸干,加1.5mL甲醇溶解,再减压蒸干,重复多次以除尽残余的三氟乙酸。

衍生化:往CCP I的水解物、单糖标准品中加入10mg盐酸羟胺和1mL吡啶,90℃水浴30min并振荡,冷却至室温,加入醋酸酐1mL,于90℃水浴中保持30min,生成具有挥发性的糖腈乙酸酯衍生物。

气相色谱条件:采用Aglient 6890N气相色谱仪、DB-1701毛细管柱(30m×0.25m×0.25μm)及氢火焰离子化检测器;高纯氮作载气,流速为1mL/min。程序升温:初始柱温为180℃,以2℃/min升至220℃,保持1min,以5℃/min升至250℃,保持2min;进样口温度为250℃,分流比为1:14.5,汽化室温度为260℃,检测器温度为300℃,吹扫流速为4.0mL/min。

1.3.5 核磁共振分析

取30mg喇叭菌多糖CCP I,用0.5mL重水溶解,冷冻过夜,再用0.5mL溶解,反复溶解冻干三次,溶解后置于核磁管中,测定氢谱和碳谱。

1.3.6 喇叭菌多糖 CCP I 的抗补体活性

取 50 μL 豚鼠血清 (1:20) 与 30 μL 各浓度 (1、2、4、6、8 mg/mL) 的 CCP I 样品溶液混合, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min, 加入 200 μL 致敏绵羊红细胞, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min, 2000 r/min 离心 10 min。取 100 μL 上清液, 在 405 nm 处测定吸光值, 用肝素钠作为阳性对照^[3-4]。溶血抑制率的计算公式为:

$$\text{抑制率} = \left(1 - \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}}{A_0 - A_{\text{空白}}} \right) \times 100\%$$

1.3.7 喇叭菌多糖 CCP I 的抗肿瘤活性实验

取对数生长期的贴壁细胞, 1000 r/min 离心 10 min, 用 0.25% 的胰蛋白酶溶液消化后, 用 10% (体积分数) 小牛血清 RPMI-1640 培养基稀释。用玻璃滴管轻轻吹打成单细胞悬液, 显微镜下用血细胞计数板计数, 制成密度为 1.5×10^4 个/mL 的细胞悬液。

将配好的细胞悬液以每孔 200 μL 加入到 96 孔培养板中, 外层加 200 μL 磷酸盐缓冲液 (PBS), 封口, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% (体积分数) CO_2 培养箱中培养 24 h, 倒掉原培养基, 再加入 100 μL 培养基和 100 μL 不同浓度的多糖溶液, 以三蒸水为溶剂对照组, 以不加细胞和多糖溶液的培养基为空白对照组, 每组 5 个平行样, 封口继续培养 72 h 后, 取出培养板, 弃去原培养基, 用 PBS 清洗后, 每孔加入 180 μL 培养基和 20 μL 5 mg/mL MTT 溶液, 继续培养 4 h。吸弃上清液, 每孔加 150 μL 二甲基亚砜, 在低速振荡器上振荡 15 min, 用自动酶标仪测定 490 nm 波长下吸光值, 并以五氟尿嘧啶 (5-FU) 作为阳性对照^[5-6]。肿瘤细胞增殖抑制率计算公式为

$$\text{IR}\% = (1 - A_{\text{实验}}/A_{\text{对照}}) \times 100\%$$

2 结果与讨论

2.1 喇叭菌多糖 CCP I 的相对分子质量和纯度

采用高效凝胶渗透色谱法 (GPC) 并结合冻融分析法共同鉴定喇叭菌多糖 CCP I 的纯度, 同时利用 GPC 检测样品的分子质量及其分布。

图 1 是 CCP I 的 GPC 图谱, 可以看出 CCP I 是单一对称峰, 其峰位相对分子质量 M_p 为 19040 Da, 数均相对分子质量 M_n 为 13400 Da, 重均相对分子质量 M_w 为 16270 Da。多糖相对分子质量多分散性程度用相对分子质量分布指数 D 表示, 即 M_w/M_n 。CCP I 的 D 值为 1.21, 说明其为相对分子质量分布比较集中的多糖。

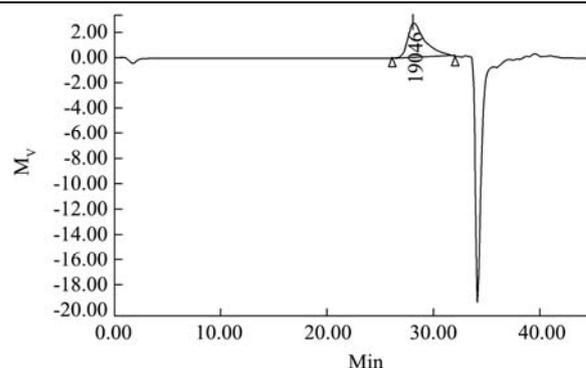


图 1 CCP II-1 的 GPC 图谱

Fig.1 The GPC diagram of CCP II-1

采用冻融分析进一步鉴定 CCP I 的纯度, 将样品经 10000 r/min 下离心 15 min, 未发现沉淀, 说明其为单一组分。

2.2 CCP I 的化学结构

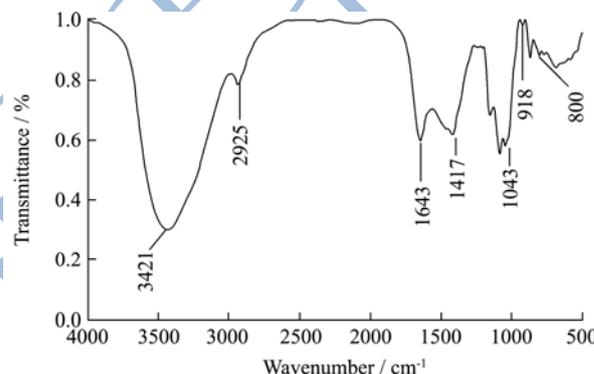


图 2 CCP I 的红外光谱图

Fig.2 Infrared spectrum diagram of CCP I

CCP I 的红外吸收光谱如图 2 所示。CCP I 在 3421 cm^{-1} 附近有很强吸收, 属于 O-H 伸缩振动的特征吸收; 2925 cm^{-1} 附近的弱吸收代表 CH_3 、 CH_2 、 CH 等的 C-H 伸缩振动; 1643 cm^{-1} 附近是多糖中-CHO 的 C=O 的伸缩振动峰, 糖的水化物有此吸收; 1417 cm^{-1} 处是多糖羧基中 C-O 的伸缩振动吸收峰; 上述几种红外吸收都是糖类的特征吸收峰^[7], 因此可确认 CCP I 为糖类化合物。此外, $1151 \sim 1043 \text{ cm}^{-1}$ 处的吸收属于吡喃的伸缩振动^[8], 所以 CCP I 有吡喃糖苷存在; 在异头碳区 ($950 \sim 700 \text{ cm}^{-1}$) 及 918 cm^{-1} 、 800 cm^{-1} 处的吸收峰与甘露糖的存在相对应^[9], 因此 CCP I 含有甘露糖。

2.3 CCP I 的单糖组成

图 3 为单糖标准品和 CCP I 的糖腈乙酸酯衍生物的气相色谱图, 图 3a 的 7 个峰 (8.748、9.740、10.097、10.866、16.151、17.254、18.071 min) 分别表示标准鼠李糖、岩藻糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、

半乳糖。图 3b)示 CCP I 为杂多糖,单糖组成为岩藻糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖,摩尔比为 1:2.11:3.13:6.45。类似于 CCP I,单糖组成中含有岩藻糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖的多糖有棘托竹荪多糖,它对小鼠肉瘤 S-180 具有一定的抑制作用^[10]。

2.4 核磁共振分析

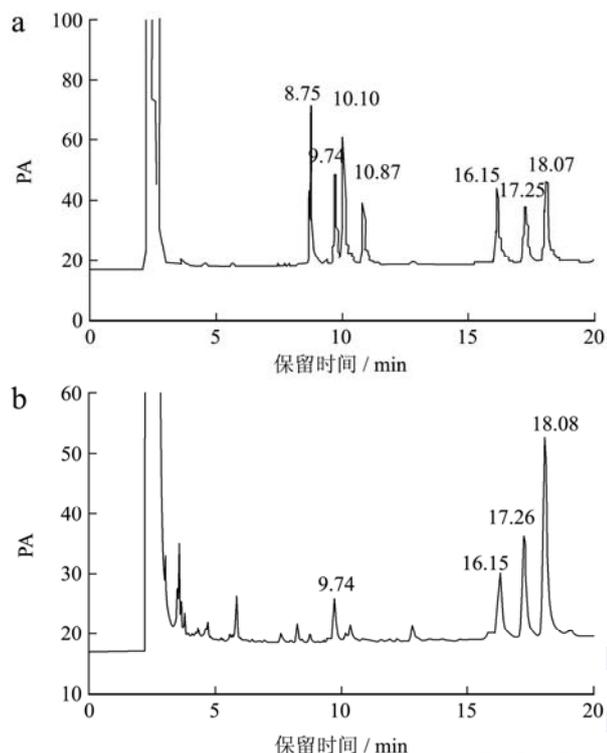


图 3 单糖标准品和 CCP I 的气相色谱图

Fig.3 The GC diagram of standard monosaccharide and CCP I

注: a: 单糖标准品; b: CCP I。

图 4a 为 CCP I 的核磁共振氢谱,可以看出 CCP I 样品 C1 上质子的共振信号有 δ 5.36、 δ 5.33、 δ 5.04 和 δ 4.96 四个吸收,证实其有四种单糖。 δ 值大于 5.0 ppm 有 δ 5.36、 δ 5.33 和 δ 5.04 三个吸收,化学位移小于 5 ppm 有 δ 4.96 一个较强吸收,表明 CCP I 含有 α 型和 β 型糖苷键;在异头碳区 (δ 5.3~4.4) 有 δ 4.51 和 δ 4.49 处的信号,表明 CCP I 糖链中有 6 个糖残基组成的重复单位。图 4b 为 CCP I 的核磁共振碳谱,由图可知 δ 101.50 ppm 为 β 型糖苷键异头碳的信号, δ 97.92 ppm 为 α 型糖苷键异头碳的信号;在非异头碳区域,大量信号堆积在 δ 60~75 ppm 范围内,说明 CCP I 的糖链中 C-6 大部分被取代,在 δ 78~85 ppm 间有 δ 78.85 ppm 一个较强共振信号,说明 C-2、C-3 和 C-4 中有碳被取代,在 δ 82~88 ppm 处无吸收信号,表明所有的糖残基为吡喃型糖苷^[11]。

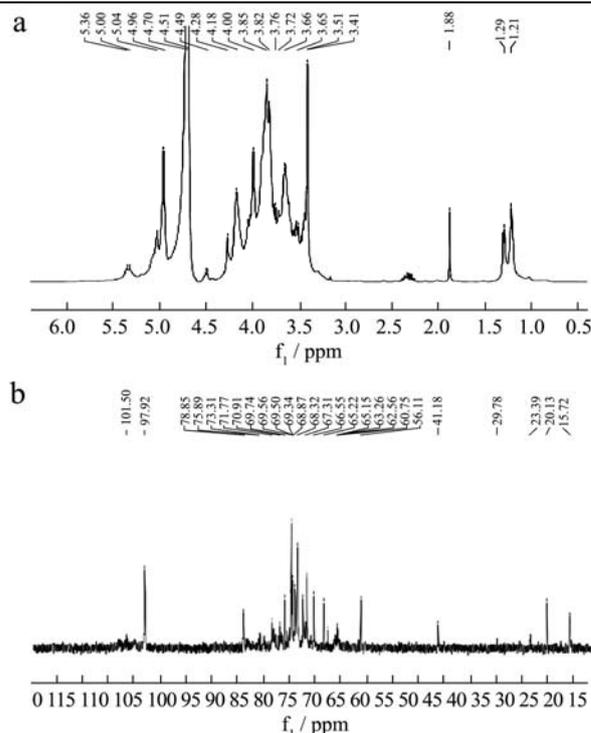


图 4 CCP I 的核磁共振图谱

Fig.4 NMR Spectroscopy of CCP I

注: a: CCP I 的核磁共振氢谱; b: CCP I 的核磁共振碳谱。

2.5 CCP I 的抗补体活性

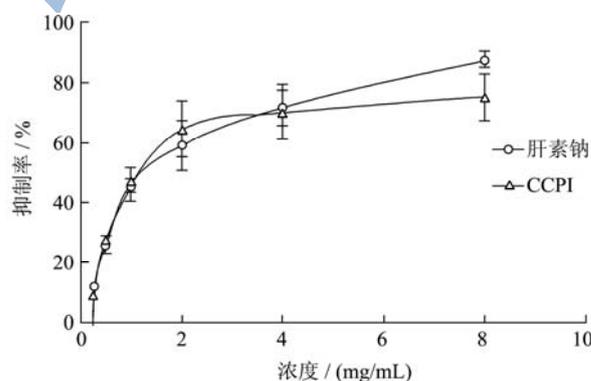


图 5 CCP I 对补体的抑制作用

Fig.5 The anti-complement activity of different concentrations of CCP I

补体是经活化并具有酶活性的蛋白质,在某些情况下,补体过度激活所产生的活化片段可导致炎症的产生,引发各种病理反应,如急性呼吸窘迫综合症、系统性红斑狼疮和类风湿性关节炎等。肝素钠是一种较为成熟的补体抑制剂,作为体外抗补体活性测定实验的阳性对照。由图 5 可以看出 CCP I 表现出良好的抗补体活性,且随着浓度的增大,活性有明显的增强。当 CCP I 浓度为 4 mg/mL 时,对补体抑制率达到

70.44%，与阳性对照肝素钠相当。

2.6 CCP I 的抗肿瘤活性

多糖的抗肿瘤活性可能与提取方式、提取部位以及多糖的相对分子质量、化学结构等相关^[12]。CCP I 的抗肿瘤活性如表 1 所示，CCP I 对人体肝癌细胞 Hep G2 和人体乳腺癌细胞 MCF-7 细胞增殖都有明显的抑制作用，且浓度越高，抑制作用越明显，呈剂量依赖性。当 CCP I 浓度为 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时，其对 Hep G2 和 MCF-7 抑制率达到 60.06% 和 55.80%，分别与 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 阳性对照 5-FU 的抑制作用相当。CCP I 较强的抗肿瘤活性可能与其单糖组分中的甘露糖和葡萄糖有关，因为人体的巨噬细胞有一个多糖受体，该受体对葡萄糖和甘露糖有高度专一性，故含有葡萄糖和甘露糖的菌类多糖可能具有抗癌活性^[13]。

表 1 CCP I 对 Hep G2 和 MCF-7 细胞增殖的抑制作用^[1]

Table 1 Growth inhibition of cells Hep G2 and MCF-7 by

CCP I

浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Hep G2 抑制率		MCF-7 抑制率	
	CCP I /%	5-FU/%	CCP I /%	5-FU/%
62.5	10.61 \pm 0.05	46.96 \pm 0.04	26.78 \pm 0.02	37.79 \pm 0.01
125	22.06 \pm 0.02	55.43 \pm 0.03	37.82 \pm 0.04	55.17 \pm 0.06
250	30.06 \pm 0.06	62.57 \pm 0.02	44.33 \pm 0.01	67.57 \pm 0.01
500	41.03 \pm 0.03	70.64 \pm 0.02	49.81 \pm 0.05	89.16 \pm 0.03
1000	60.06 \pm 0.01	-	55.80 \pm 0.04	-

注：1) 平行实验数 n=5；抑制率用平均值 \pm 标准偏差表示。

3 结论

文中通过水提醇沉、除蛋白、脱色、离子交换柱层析和凝胶柱层析分离纯化相对分子质量分布比较集中的喇叭菌子实体多糖组分 CCP I，红外光谱和核磁共振图谱结果证明它是一种含有 α 和 β 型吡喃糖苷键的杂多糖。单糖组成分析显示，CCP I 由岩藻糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖四种单糖组成。CCP I 具有较好的抗补体活性。MTT 实验表明，CCP I 对人肝癌细胞 Hep G2 和人体乳腺癌细胞 MCF-7 的增殖都有抑制效果，有进一步研究利用的价值。但对其高级结构、构效关系和药理的研究还不够深入，且生长环境不同、培养条件不同、提取分离技术不同都会造成多糖结构的差异，影响其活性；因此，还需要进一步准确分析喇叭菌多糖的结构、构效关系和药理药效，以充分开发利用其价值。

本文的工作受到华南理工大学传热强化与过程节能教育部重点实验室的开发基金的支

持。

参考文献

- [1] 彭卫红,甘炳成,谭伟,等.四川省龙门山区主要大型野生经济真菌调查[J].西南农业学报,2003,16(1):36-40
Peng Wei-hong, Gan Bing-cheng, Tan Wei, et al. Studies on economic mushrooms in Longmen mountain areas [J]. South west China Journal of Agricultural Sciences, 2003, 16(1): 36-40
- [2] Liu Y T, Sun J, Luo Z Y. Chemical composition of five wild edible mushrooms collected from Southwest China and their antihyperglycemic and antioxidant activity [J]. Food and Chemical Toxicology, 2012, 50(5): 1238-1244
- [3] Lustep H L, Clark W M. Current status of neuroprotective agents in the treatment of acute ischemic stroke [J]. Curr Neurol Neurosci Rep, 2001, 1(1): 13-18
- [4] Gao H W, Zhang M M, Liu Y L, et al. Anticomplement activity of ginsenosides from *Panax ginseng* [J]. Journal of Functional Foods, 2013, 5(1): 498-502
- [5] Suresh V, Senthilkumar N, Thangam R, et al. Separation, purification and preliminary characterization of sulfated polysaccharides from *Sargassum plagiophyllum* and its in vitro anticancer and antioxidant activity [J]. Process Biochemistry, 2013, 48 (2): 364-373
- [6] Ye H, Wang K Q, Zhou C H, et al. Purification, antitumor and antioxidant activities in vitro of polysaccharides from the brown seaweed *Sargassum pallidum* [J]. Food Chemistry, 2008, 111(2): 428-432
- [7] Xu W T, Zhang F F, Luo Y B, et al. Antioxidant activity of a water-soluble polysaccharide purified from *Pteridium aquilinum* [J]. Carbohydrate Research, 2009, 344(2): 217-222
- [8] Cai W R, Gu X H, Tang J. Extraction, purification and characterization of the polysaccharides from *Opuntia milpaalta* [J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 71(3): 403-410
- [9] Chen Y, Xie M Y, Nie S P, et al. Purification, composition analysis and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of *Ganoderma atrum* [J]. Food Chemistry, 2008, 107(1): 231-241
- [10] 林玉满,余萍,刘艳如.棘托竹荪子实体水溶性多糖 DE2-2 的分离纯化和鉴定[J].食用菌学报,2001,8(1):15-18
Lin Yu-man, Yu Ping, Liu Yan-ru. Isolation, purification and identification of water-soluble polysaccharide DE2-2 from fruitbodies of *Dictyophora echinvolvata* [J]. Acta Edulis Fungi, 2001, 8(1): 15-18
- [11] 张惟杰.糖复合物生化研究技术[M].杭州:浙江大学出版

- 社,2003
- Zhang Wei-jie. Biochemical technology of glycoconjugate [M]. Hangzhou: ZheJiang University Press, 2003
- [12] Zhang M, Zhang L N, Cheung P C K, et al. Molecular weight and anti-tumor activity of the water-soluble polysaccharides isolated by hot water and ultrasonic treatment from the sclerotia and mycelia of *Pleurotus tuber-regium* [J]. Carbohydrate Polymers, 2004, 56(2): 123-128
- [13] Zhang M, Cui S W, Cheung P C K, et al. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity [J]. Trends in Food Science & Technology, 2007(18): 4-19

现代食品科技