

紫芝菌丝体多糖的结构鉴定及免疫活性研究

张婷¹, 吴晖¹, 赖富饶¹, 张晓元^{1,2}, 闵甜¹, 董洲¹, 李慧娴¹

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

(2. 韶关市华工高新技术产业研究院, 广东韶关 512027)

摘要: 本采用热水浸提紫芝菌丝体得到粗多糖后经 DEAE-sepharose Fast Flow 和 Sephacryl S-200 HR 分离纯化出一种新型的灵芝多糖 LZ1。通过采用凝胶渗透色谱法、电泳、紫外、红外光谱、气相色谱、核磁共振、高碘酸氧化和 Smith 降解方法等方法对 LZ1 进行结构鉴定和解析, 结果表明 LZ1 是不含核酸、蛋白质的均一多糖, 其分子量为 7498 u; 其是由鼠李糖、岩藻糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖以 0.94:0.50:1.68:26.91:4.80:17.12 的摩尔比组成的酸性杂多糖, 其糖苷键为 1→4、1→2 或 1→6、1→3; 刚果红实验表明 LZ1 没有三螺旋结构; 通过小鼠巨噬细胞 RAW264.7 体外免疫模型, 研究 LZ1 对 TNF- α 、IL-6、NO 三种细胞因子的分泌情况的影响发现 LZ1 对这三种细胞因子的分泌有明显的促进作用, 且呈现浓度相关性, 表现出明显的免疫活性; 通过 AAPH 诱导的红细胞氧化溶血模型对 LZ1 的抗氧化活性进行评价, 发现 LZ1 有很好的抑制 AAPH 诱导的红细胞氧化溶血的特性。

关键词: 菌丝体; 多糖; 结构; 免疫调节; 抗溶血

文章编号: 1673-9078(2017)4-52-60

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.4.009

Characterization of the Structure and Immunomodulatory Activities of Polysaccharides from *Ganoderma Lucidum* Mycelium

ZHANG Ting¹, WU Hui¹, LAI Fu-rao¹, ZHANG Xiao-yuan^{1,2}, MIN Tian¹, DONG Zhou¹, LI Hui-xian¹

(1. College of Food Sciences and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Research Institute of Shaoguan Huagong High-tech Industry, Shaoguan 512027, China)

Abstract: A new polysaccharide LZ1 was isolated and purified using DEAE-Sepharose Fast Flow and Sephacryl S-200 HR from crude polysaccharide extract obtained from *Ganoderma lucidum* mycelium via hot-water extraction. The structure of LZ1 was identified and elucidated by gel permeation chromatography (GPC), scanning electron microscopy (SEM), ultraviolet spectroscopy, Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy, gas chromatography (GC), nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, periodate oxidation, and Smith degradation. The results showed that LZ1 was a homogeneous polysaccharide and did not contain impurities such as proteins and nucleic acids. The molecular weight (Mw) was determined to be 7498 u by GPC. LZ1 was an acidic polysaccharide and consisted of rhamnose, fucose, mannose, glucose, galactose, and arabinose at a molar ratio of 0.94:0.50:1.68:26.91:4.80:17.12. The main glycosidic linkage types were 1→4 and 1→2 or 1→6 and 1→3. Congo red test suggested that there were no triple helical structures in LZ1. The effect of LZ1 on the expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin 6 (IL-6), and nitric oxide (NO) was studied using murine macrophage RAW264.7 cells as an *in vitro* immunomodulatory model. The results showed that LZ1 significantly promoted the secretion of TNF- α , IL-6, and NO in a concentration-dependent manner, and exhibited excellent immunomodulatory activity. Evaluation of the antioxidant activity of LZ1 by a 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)-induced oxidative hemolysis model in erythrocytes suggested that LZ1 could effectively inhibit the AAPH-induced oxidative hemolysis of erythrocytes.

Key words: mycelium; polysaccharides; structure; immunomodulatory; anti-hemolysis

收稿日期: 2017-03-08

基金项目: 广东省科技计划项目 (2016A040402020); 广东省科技计划项目 (2016B010121014)

作者简介: 张婷 (1989-), 女, 研究生, 硕士, 研究方向: 食品安全与天然产物化学

通讯作者: 吴晖 (1967-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品安全与天然产物化学; 赖富饶 (1981-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 天然产物化学

灵芝 (*Ganoderma lucidum*) 是担子菌纲, 多孔菌科, 灵芝属真菌, 有“仙草”和“还魂草”之称。中国灵芝属真菌多达 75 种, 以赤芝、紫芝、黑芝、松杉灵芝等为常见^[1-3]。灵芝最为中国及其他亚洲国家的传统名贵菌类药材, 现代科学也证明其有抗肿瘤、免疫调节、抗氧化、抗衰老及降血糖血脂等药理和保健功能。目前已有多糖类、三萜类、油脂类、蛋白类、生物碱类

和甾醇类等 200 多种生理活性物质从灵芝中分离出来 [4-5]。

灵芝多糖是灵芝的主要活性物质之一, 最为一种天然的高分子聚合物, 不仅安全无毒, 且具有显著的生物活性和药理作用, 如抗肿瘤、免疫调节、抗氧化抗衰老及降血糖血脂, 是潜在的辅助治疗肿瘤药物以及其它重要保健品的原材料^[6-8]。越来越多的灵芝多糖产品在市场上不断出现, 由于天然灵芝生长缓慢, 其产量有限, 不能满足市场的需要, 利用发酵技术生产的真菌, 具有产量高、生长快、周期短和污染小等特点, 因此目前灵芝多糖的主要来源是通过发酵生产的菌丝体、子实体、孢子粉以及发酵液。灵芝菌丝体具有周期短, 产量高, 营养价值高等特点, 目前已成为保健品和医药、化妆品等灵芝相关产业的主要原料^[9]。本文以购买的紫芝菌丝体为原料, 热水浸提、对粗多糖进行纯化分离, 得到的多糖组分进行结构鉴定、免疫活性和抗溶血特性的研究, 为灵芝多糖在食品和医药领域的应用与开发提供理论基础, 指明新的方向。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

紫芝菌丝体购于东莞市氏农业有限公司; 碳酸氢钠、无水乙醇、氯化钠、苯酚、硫酸、氯仿、正丁醇 (均为分析纯), 广东光华科技公司; 重水, 分析纯, Damas-beta; 刚果红、溴甲酚绿、甲基红 (均为分析纯) 天津大茂试剂厂; PBS 磷酸缓冲液 Gibco 公司; 葡聚糖标准品, 美国 Sigma 公司; 羊血, 鸿泉生物; 一氧化氮 (NO) 测试盒, 南京建成生物工程研究所; IL-6 Elisa、TNF- α Elisa 试剂盒, 欣博盛生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

JC101 型不锈钢鼓风干燥箱, 上海福玛实验设备有限公司; BSZ-160F 自动部份收集器, 上海精科实业有限公司; 低温冷冻干燥机宁波新芝生物科技股份有限公司; 凝胶渗透色谱柱, 美国 Waters 公司; 气相色谱仪, 美国惠普公司; 傅里叶变换红外光谱仪, Bruker 公司; 紫外分光光度计, 上海棱光技术有限公司; 扫描电子显微镜, S-3700N 日本日立公司; HP4890D 气相色谱仪, 美国惠普公司; 600 MHz 核磁共振波谱仪, Bruker 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 灵芝粗多糖 LZ 的提取

紫芝菌丝体→过 80 目筛→80%的乙醇, 85 °C 冷凝回流 2 h→抽滤后放烘箱(55 °C)烘干→料液比 1:30 提取, 用 Na₂CO₃ 溶液调 pH 为 7, 90 °C 热水搅拌浸提 4 h→离心 (3500 r/min, 10 min)→取上清液旋转蒸发浓缩至 1/3~1/5 体积→80%的乙醇醇沉, 4 °C 放置 12 h→离心 (3500 r/min, 10 min) 取沉淀→复溶、Sevage 法除蛋白→醇沉、离心(3500 r/min, 10 min)→复溶、透析、冷冻干燥→灵芝粗多糖 LZ^[10]。

1.3.2 灵芝粗多糖 LZ1 的纯化

将粗多糖 LZ 配置成 5 mg/mL 的多糖溶液, 取 20 mL 多糖溶液于 DEAE-Sepharose Fast Flow(3.6 cm×20 cm) 柱层析, 依次用 0、0.1、0.2、0.3、0.5 mol/L 的 NaCl 溶液洗脱一定体积, 洗脱速度 1 mL/min, 每管 10 mL, 收集 30 管, 苯酚-硫酸法跟踪显色, 收集洗脱液, 旋转浓缩, 3000 u 透析袋透析, 干燥得到较纯的不同灵芝多糖组分; 将得到的 LZa 组分配成 10 mg/mL 多糖溶液, 经 Sephacryl S-200 HR 凝胶柱 (1.6 cm×70 cm) 纯化, 蒸馏水洗脱, 流速 0.4 mL/min, 每管 2 mL, 苯酚-硫酸法跟踪显色, 洗脱液收集, 旋转浓缩、3000 u 透析、干燥得到较纯的灵芝多糖 LZ1。

1.3.3 LZ1 的分子量及纯度测定^[11]

利用高效凝胶渗透色谱法测定 LZ1 的分子量及纯度鉴定。将样品和葡聚糖标准品分别用 0.02 mol/L KH₂PO₄ 溶液配制成 1.0 mg/mL 的溶液, 过 0.45 μ m 滤膜, 上样 20 μ L, 检测 45 min, 记录色谱图, 用相应的软件对以葡聚糖标准品的相对分子质量的对数值 log Mw 为纵坐标、洗脱体积 V 为横坐标的曲线进行拟合得到标准曲线和回归方程, 根据样品 LZ1 的保留时间, 利用标准曲线计算得出其分子量。

色谱条件: TSK G-5000PWXL 凝胶柱 (7.8 nm×300 mm) 和 TSK G-3000PWXL 凝胶柱 (7.8×300 mm) 串联使用, 流动相是 pH 6.0, 0.02 mol/L 的 KH₂PO₄ 缓冲溶液, 流速 0.6 mL/min, 柱温 35 °C, 检测器为 2414 示差检测器。

1.3.4 电子显微镜扫描 (SEM) ^[12]

将制得的少量样品 LZ1 分散固定在金属样品台上, 清除多余的不能被粘附在样品台上的粉末, 使得样品台上保留一层薄薄的待测样品。将黏附有样品的样品台置于镀膜仪中镀金后, 在扫描电子显微镜下放大不同的倍数来观察样品的表面结构。

1.3.5 紫外全波段扫描^[13]

称取一定量的灵芝多糖 LZ1, 配成浓度为 0.05 mg/mL 溶液, 用 UV 2300 紫外可见分光光度计在 190~400 nm 下连续扫描, 以蒸馏水为空白, 扫描间距为 0.5 nm, 绘制出紫外扫描光谱图, 对其进行分析。

1.3.6 红外光谱分析^[14]

称取少量的 LZ1 样品(1~5 mg), 与适量的干燥的 KBr 粉末混和, 研磨均匀后压片。将制好的压片放在红外光谱仪中在 4000~400 cm^{-1} 范围内进行扫描, 对得到的红外图谱进行解析。

1.3.7 单糖组成测定^[15,16]

1.3.7.1 LZ1 水解

于安培瓶中称取 10.0 mg LZ1 样品, 加入 4 mL、2 mol/L 三氟乙酸, 用酒精喷灯将安瓶瓶封口后置于 110 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 6 h。反应完后, 冷却至室温, 减压旋干 TFA, 加入 1 mL 甲醇混合后, 继续蒸干, 重复 3 次以完全去除残留的 TFA。

1.3.7.2 衍生化反应

向 LZ1 的水解物中加入 10 mg 盐酸羟胺和 1 mL 吡啶, 90 $^{\circ}\text{C}$ 恒温震荡反应 30 min, 冷却后加入 1 mL 醋酸酐, 于 90 $^{\circ}\text{C}$ 下进行乙酰化反应 30 min, 最终生产糖腈乙酸酯衍生物, 冷却过有机膜, 转移至进样瓶待测。所有的单糖标准品和混标也按照上述步骤进行衍生化并转移至进样瓶中待测。

1.3.7.3 GC 条件:

使用 Agilent HP-5 毛细管柱(30 $\text{m}\times 320\ \mu\text{m}\times 0.25\ \mu\text{m}$); 载气 N_2 , 流量 20.0 mL/min, 进样量 1.0 μL , 分流比为 10:1。最终升温程序: 165 $^{\circ}\text{C}$ 后以 0.5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 变速升至 171 $^{\circ}\text{C}$, 再以 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 速度升温至 180 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.3.8 高碘酸氧化和 Smith 降解分析^[17,18]

1.3.8.1 高碘酸氧化

高碘酸钠标准曲线: 分别往 6 支试管, 编号分别为 0、1、2、3、4、5, 分别加入 0、0.5、1.0、1.5、2.0 和 4.0 mL、30 mmol/L 高碘酸钠溶液→依次往补加蒸馏水至液体体积 4 mL→混匀→各取 0.1 mL 稀释至 25 mL→于 223 nm 处测吸光值。以高碘酸钠毫摩尔数为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制出高碘酸钠标准曲线。

样品测定: 精确称取 25 mg LZ1 样品→加蒸馏水溶解转移至 25 mL 的容量瓶中→加入 12.5 mL、30 mmol/L 高碘酸钠→定容→室温避光反应→分别在 0、6、12、24、36、48、60、72...h 间隔取出反应液 100 μL 并用蒸馏水定容至 25 mL, 按照标准曲线制作方法检测→OD 值稳定→加入 2 mL 反应终止剂(乙二醇)。

计算甲酸的生成量: 取 2 mL 最终溶液→加 1~2 滴指示剂(溴甲酚蓝)→用 0.01 mol/L NaOH 标准溶液(用邻苯二甲酸氢化钾标定)滴定→推算出甲酸的生成量。剩余的反应液用于后续的 Smith 降解反应。

1.3.8.2 Smith 降解反应

氧化后剩下溶液→装 3 ku 透析袋→流水透析 48

h→蒸馏水透析 24 h→浓缩至 10 mL→加 70 mg 硼酸氢钠还原过夜→用 50%醋酸调 pH 至 6~7→装 3 ku 透析袋→流水透析 48 h→蒸馏水透析 24 h→浓缩→蒸干→水解→衍生化(水解和衍生化的方法参照单糖解析的方法)。

单标、内标、混标: 10 种单糖标准品、肌醇、乙二醇、丙三醇和赤藓醇标准品衍生化参照单糖解析中的方法。

GC 色谱条件:

使用 Agilent HP-5 毛细管柱(30 $\text{m}\times 320\ \mu\text{m}\times 0.25\ \mu\text{m}$); 载气 N_2 , 载气流量 20.0 mL/min, 进样量为 1.0 μL , 分流比为 10:1。最终升温程序: 150 $^{\circ}\text{C}$ 后以 2.5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 变速升至 200 $^{\circ}\text{C}$, 并保持恒温 12 min; 使用 FID 检测器(温度为 200 $^{\circ}\text{C}$)。

1.3.9 三螺旋结构^[19]

刚果红常被用于验证多糖的链状结构, 它能与三螺旋构象的多糖形成络合物, 刚果红的最大吸收波长发生偏移, 当 NaOH 浓度过大时, 多糖的三螺旋结构会被破坏, 其最大吸收波长会急剧下降。本实验采用刚果红法对 LZ1 是否具有三螺旋结构进行测定和分析。

1.3.10 核磁共振谱分析^[20-22]

称取 30 mg 左右的 LZ1 溶于 600 μL 重水中, 震荡混匀使其完全溶解后转移至核磁管中, 于核磁共振仪上进行 ^1H 谱、 ^{13}C 谱测量分析。

1.3.11 LZ1 的免疫调节活性研究^[23,24]

1.3.11.1 LZ1 溶液的配制

将 LZ1 用 DMEM 培养基溶解后配成 1 mg/mL 的母液, 并等梯度稀释成 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 五个剂量组。

1.3.11.2 细胞培养

解冻小鼠巨噬细胞 RAW264.7, 迅速将解冻细胞转移到 15 mL 的无菌离心管, 加入 12 mL DMEM 培养基, 混匀后低速离心。除去培养基, 加入新鲜的培养基, 将细胞悬浮后转移至细胞培养瓶中。放在 CO_2 培养箱中培养(37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2), 每两天更换一下培养基。

1.3.11.3 LZ1 对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 细胞因子分泌的作用

将处于对数生长期的 RAW264.7 细胞用胰蛋白酶消化, 配成细胞浓度为 1×10^6 个/mL 的细胞悬液, 接种在 96 孔板中, 在 CO_2 培养箱培养 24 h 后, 吸去培养基, 加入 100 μL 不同浓度(1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LZ1 溶液, 将加入 100 μL 含脂多糖(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的培养基最为阳

性对照组,加 100 μL DMEM 培养基于调零组和阴性对照组,每组做 3 个平行。将细胞放回 CO_2 培养箱中培养 24 h,用 NO 和 Elisa 试剂盒测定细胞上清液中 NO、TNF- α 和 IL-6 因子的表达量。

1.3.12 LZ1 抑制红细胞氧化性溶血研究^[25]

1.3.12.1 红细胞悬液的制备

取 9 mL 羊血于离心管中,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 1000 g 离心 5 min 使红细胞和血清分离。加入 6 mL PBS 缓冲液重悬红细胞后离心,去上清。此步骤重复 3 次。将洗涤干净的红细胞用 PBS 稀释配成浓度为 20% 的细胞悬液。

1.3.12.2 LZ1 对 AAPH 诱导的红细胞氧化性溶血的保护作用

取制备好的红细胞悬液 0.2 mL 于 10 mL 离心管中,分成对照组, LZ1 保护组(设计五个浓度),全溶组,毒性组,每组设立 3 个平行。向对照组,毒性组加入 0.2 mL PBS 溶液,保护组加入 0.2 mL 用 PBS 配制好的不同浓度的 LZ1 溶液,全溶组加 0.2 mL 蒸馏水。置于恒温振荡孵育器中 37 $^{\circ}\text{C}$ 预培养 20 min,分别对照组和毒性组加入 0.4 mL PBS,保护组加入 0.4 mL AAPH 溶液(浓度 200 mmol/L),全溶组加 0.4 mL 蒸馏水,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡避光培养 2 h。

1.3.12.3 溶血抑制率测定

向按二处理后的对照组,保护组,毒性组红细胞反应液加入 8 mL 的 PBS 进行稀释,全溶组加 8 mL 蒸馏水,离心(4 $^{\circ}\text{C}$, 1200 g, 10 min)。吸取 200 μL 上清液至酶标板中,540 nm 处检测其吸光值。红细胞溶血抑制率的计算公式为:

$$\text{溶血抑制率} = \left(1 - \frac{A - A_{\text{对照}}}{A_{\text{全溶}} - A_{\text{对照}}}\right) \times 100\%$$

1.3.13 数据处理

每个实验平行 3 次,采用 Origin 8.5 和 SPSS 19.0 软件对实验数据进行处理分析。

2 结果与分析

2.1 灵芝菌丝体多糖离子交换柱层析

将制得的灵芝粗多糖 LZ 用 DEAE-Sephrose Fast Flow 阴离子交换层析分离纯化,经蒸馏水和不同浓度的 NaCl 洗脱后得到不同的吸收峰,如图 1 所示,灵芝多糖一共出现五个峰,其中蒸馏水、0.1、0.2 mol/L NaCl 的洗脱峰较高,峰形较好,0.3、0.5 mol/L NaCl 的洗脱峰不但峰低,而且有蛋白峰,考虑多方面因素,只收集蒸馏水、0.1、0.2 mol/L NaCl 三个洗脱峰,分别命名为 LZa(蒸馏水洗脱组分)、LZb(0.1 mol/L NaCl

洗脱组分)、LZc(0.2 mol/L NaCl 洗脱组分)。分别收集三个吸收峰对应的收集管中的洗脱液,经浓缩—透析—真空冷冻干燥后得到较纯的灵芝多糖 LZa、LZb 和 LZc 进行下一步研究,本文只对 LZa 进行研究。

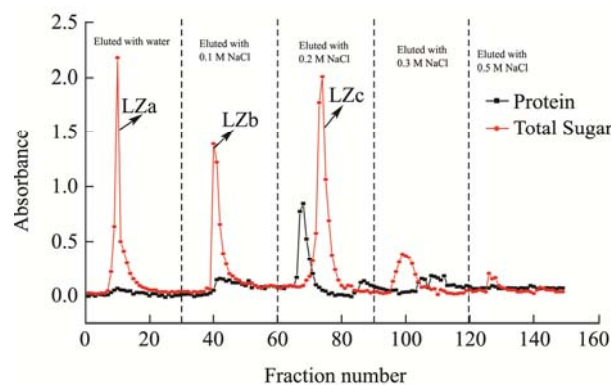


图 1 LZ 在 DEAE-纤维素阴离子交换柱上的洗脱曲线

Fig.1 Elution curve of LZ in anion-exchange chromatography (DEAE-Sephrose Fast Flow)

2.2 LZa 的凝胶过滤柱层析

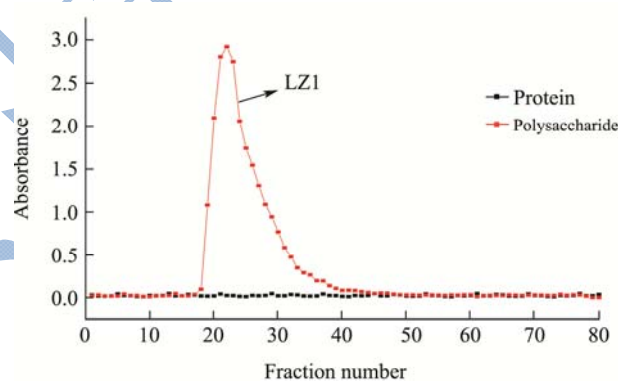


图 2 LZa 的 Sephacryl S-200 HR 洗脱曲线

Fig.2 Elution profile of LZa on a Sephacryl S-200 HR column

将制得的 LZa 用蒸馏水洗脱过 Sephacryl S-200 HR 凝胶柱进一步分离纯化,洗脱峰如图 2 所示,该吸收峰单一—稳定,高而尖,收集吸收峰相对应的收集管内的溶液,经浓缩—透析—真空冷冻干燥后得到多糖干品命名为 LZ1,经苯酚—硫酸法分析得到 LZ1 的糖分含量为 96.7%,说明灵芝菌丝体 LZ1 的分离效果较好,纯度较高,可以用于后续的结构鉴定及构效关系研究。

2.3 LZ1 的分子量及纯度测定

根据绘制的标准曲线计算出样品的分子量。如图 3 所示, LZ1 的高效液相色谱图为单一的对称峰,其分子量为 7498 u,表明通过离子柱和凝胶柱纯化得到的多糖为纯净物。

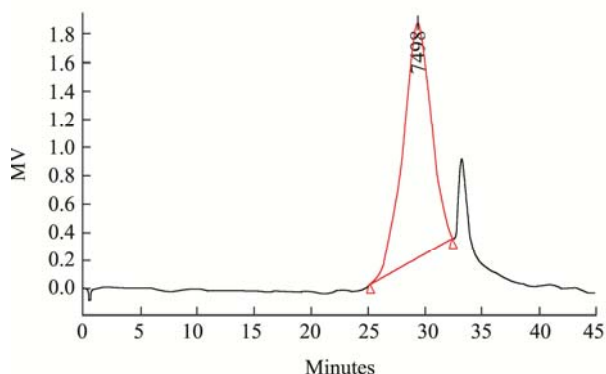


图3 LZ1 的 GPC 色谱图

Fig.3 Chromatogram of LZ1 by GPC

2.4 LZ1 的 SEM 分析

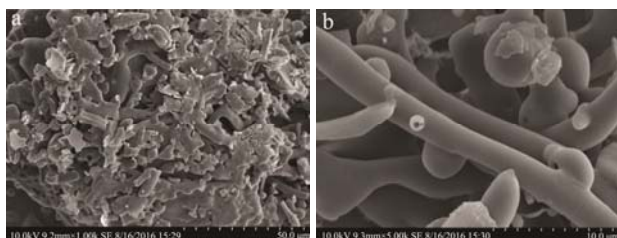


图4 LZ1 的 SEM 图

Fig.4 SEM images of LZ1

多糖结构复杂, 对其表面结构形式多样, 国际上还没有统一标准。图4是 LZ1 的电子显微镜扫描结果, 给出了样品的表面结构特征。A 为 LZ1 放大 1000 倍时, 可观察到样品均匀分散开来, 表面均匀, 没有大面积的褶皱出现, 特初步判定样品纯度比较高、其表面光滑, 并可能伴有突起的小泡, 没有出现空洞和凹槽。B 为 LZ1 放大 5000 倍时, 可清晰看到树枝类的条状结构, 其表面光滑, 偶有突起的圆形泡状结构, 末端无凸起, 光滑。

2.5 紫外全波段扫描

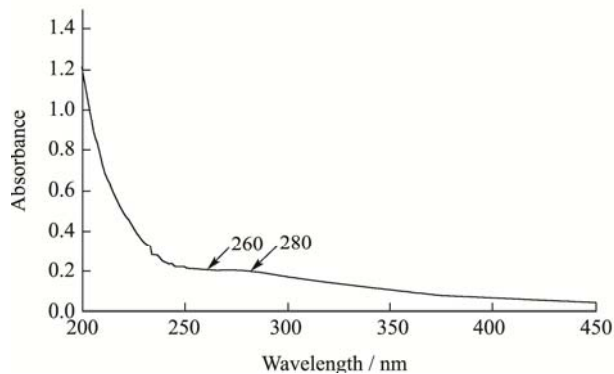


图5 LZ1 的紫外扫描光谱图

Fig.5 Ultraviolet scanning spectrum of LZ1

如图5所示 LZ1 在 260 nm 和 280 nm 附近特征吸收峰, 但符合多糖的紫外吸收光谱特征。表明分离得到 LZ1 不含核酸和蛋白质, 通过 *Sevage* 法除蛋白以及过离子柱和凝胶柱得到了较为纯净的灵芝多糖, 也说明灵芝菌丝体多糖中蛋白是以游离态形式存在的。

2.6 红外光谱分析

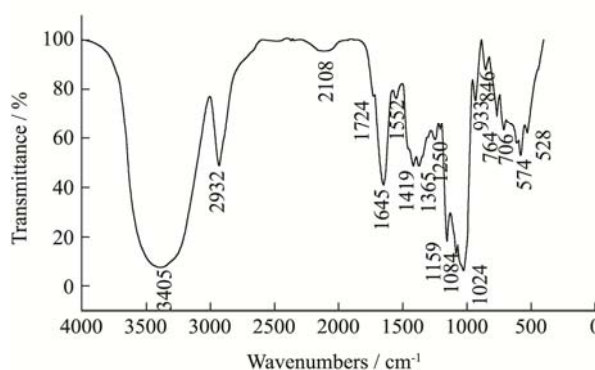
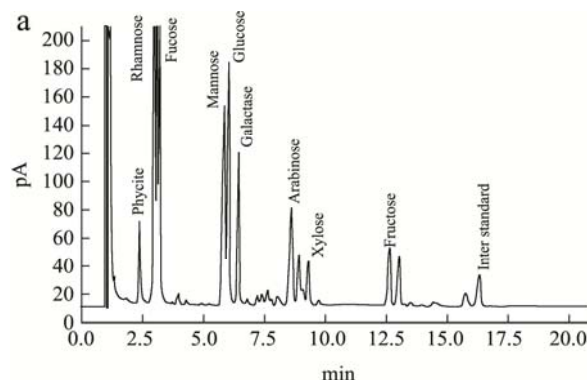


图6 LZ1 的红外扫描图

Fig.6 FT-IR spectrum of LZ1

如图6所示是 LZ1 的红外吸收光谱, LZ1 在 3405 cm^{-1} 处出现较宽的吸收峰, 是由于 LZ1 中非游离 O-H 伸缩振动引起的。2932 cm^{-1} 处的吸收峰是由于 C-H 反对称伸缩振动引起的, 这些都证明了 LZ1 为糖类物质。1645 cm^{-1} 的吸收峰是由于多糖结合水引起的或者为 C=O 的伸缩振动峰, 1724 cm^{-1} 处的小拐点峰表明 LZ1 中可能存在乙酰基团或少量酸性糖, 这与单糖组成分析相吻合。1430~1200 cm^{-1} 范围内出现的吸收峰是由于 O-H 变角振动和 C-O 的伸缩振动引起的。图谱在 1200~1000 cm^{-1} 的三个峰值 1159 cm^{-1} 、1084 cm^{-1} 和 1024 cm^{-1} 是吡喃环中的伸缩振动引起的, 表明了 LZ1 糖链中含有吡喃型糖环。846 cm^{-1} 处的吸收峰表明 LZ1 中有 α -葡萄糖吡喃糖存在。764 cm^{-1} 为 D-吡喃环的对称环伸缩振动峰。红外分析表明, 该组分多糖亚基可能是由含酸性单糖的单糖残基组成的聚合物, 单糖残基中存在 α -吡喃糖苷。

2.7 单糖组成分析



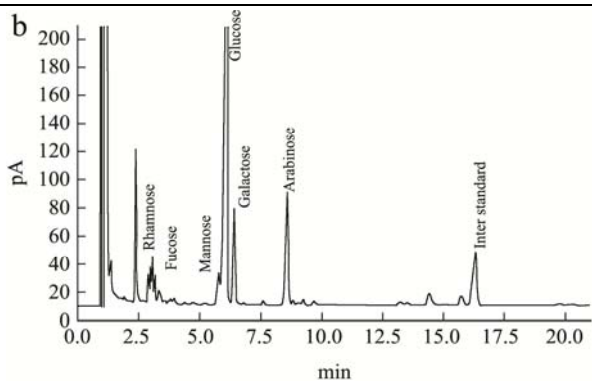


图7 单糖标准品 (a) 和 LZ1 (b) 离子色谱图

Fig.7 Ion exchange chromatographic analysis of the monosaccharide standard mixture (a), and LZ1 (b)

用内标法计算出得出 LZ1 由鼠李糖、岩藻糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖以 0.94:0.50:1.68:26.91:4.80:17.12 的摩尔比构成, 其中葡萄糖最多, 其次为阿拉伯糖, 由此可知 LZ1 的单糖组成与国内外文献报道的灵芝多糖和菌丝体多糖的组成差异性比较大, 造成这种差异的原因可能是与灵芝的种类、发酵条件以及分离纯化方法有关。这也进一步证实了 LZ1 是一种新型的灵芝菌丝体多糖。

2.8 高碘酸氧化和 Smith 降解分析

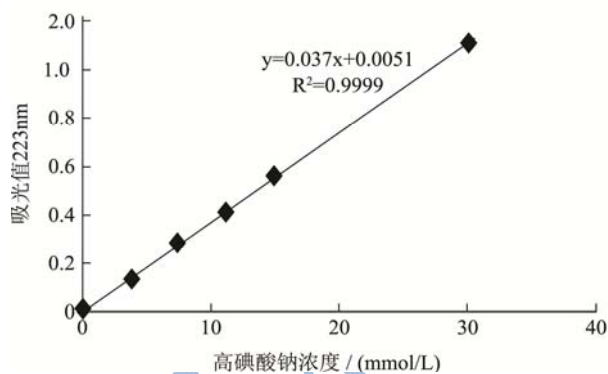


图8 高碘酸钠标准曲线

Fig.8 Standard curve of NaIO₄

高碘酸氧化和 Smith 降解是分析多糖中糖苷键类型和比例的常用方法。本实验利用高碘酸氧化特异性作用于 LZ1 的糖链中连三羟基或连二羟基处的 C-C 键, 然后对氧化反应产物进行分析。LZ1 在高碘酸氧化反应进行 96 h 后, 反应液在 223 nm 处的吸光值恒定变化, 说明氧化反应已完全, 计算得出每摩尔糖残基消耗 1.32 mol 高碘酸; 用氢氧化钠 (0.01 mol/L) 标准液对高碘酸氧化产物进行滴定, 消耗氢氧化钠 0.56 mL, 由此推算出甲酸的生成量为 0.59 mol/L, 表明 LZ1 中存在 (1→) 或者 (1→6) 糖苷键。

将经高碘酸氧化后的 LZ1 的产物进行 Smith 降解后经 GC 分析, 如图 9 所示 LZ1 样品经 Smith 降解后

出现丙三醇, 赤藓糖醇, 鼠李糖和甘露糖。根据 Smith 降解反应原理, 赤藓醇的出现表明 LZ1 糖链中含有 1→4 键, 丙三醇的出现则说明含有 1→2 或 1→6 键。鼠李糖和甘露糖的出现表明糖链中含有 1→3 键。

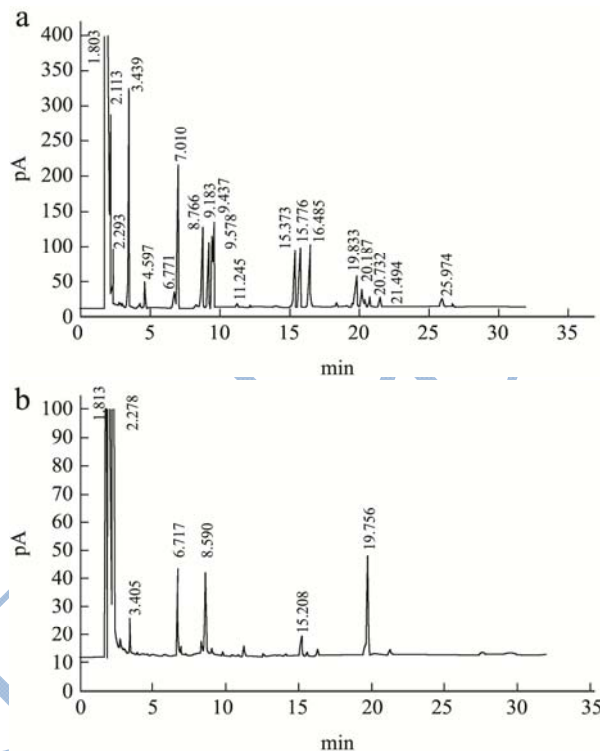


图9 各标准品 (a) 和 LZ1 Smith 降解产物 (b) 的 GC 图

Fig.9 GC spectrum of standards (a) and LZ1 after Smith degradation (b)

2.9 三螺旋结构

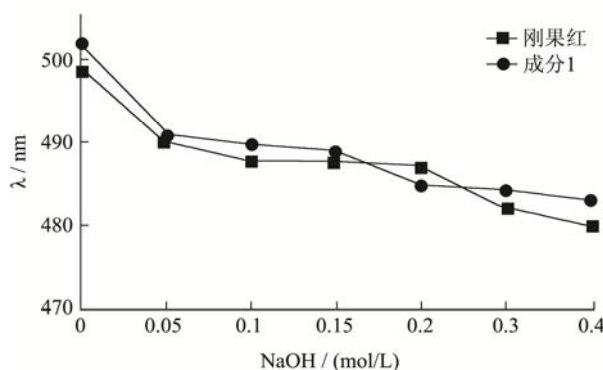


图10 刚果红与 LZ1 混合液的波长变化

Fig.10 Change in the absorption wavelength of Congo red-LZ1 complex

根据文献报道, 多糖的活性与其三螺旋结构有重要的相关性。如图 10 所示, LZ1 与刚果红形成络合物, 与刚果红相比最大吸收波长并没有发生红移, 随着 NaOH 浓度的增大, LZ1 的最大吸收波长也没有发生急剧的下降, 可以判断出 LZ1 不具有三螺旋结构, 这与常见的灵芝多糖不同, 也可以确定得到的是一种新

型灵芝多糖。

2.10 核磁共振谱分析

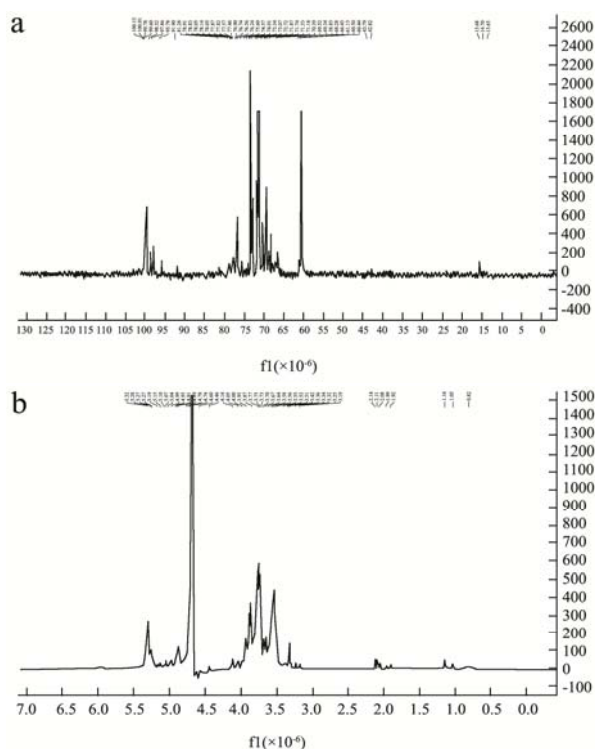


图 11 LZ1 的核磁共振波谱图

Fig.11 NMR spectrum of LZ1

注：a, LZ1 核磁共振碳谱图；b, LZ1 核磁共振氢谱图。

核磁共振(NMR)是分析多糖结构最为精确、高效的方法之一。本文中采用一维核磁共振波谱技术 ^1H 谱和 ^{13}C 谱对灵芝菌丝体多糖 LZ1 中糖苷键类型、单糖残基的种类和异头碳等结构特征进行分析。

从图 11a 中可以看出，异头碳的共振峰集中在 δ 60.44~100.13 范围内， α -型糖苷异头碳的化学位移通常在 δ 95~101 范围内，而多数 β -型糖苷异头碳的化学位移位于 δ 101~105，由图 11a 可知 LZ1 是以 α -型糖苷构型存在。 ^{13}C 谱在 δ 103~112 以及 δ 82~84 区间均没有信号，表明 LZ1 不含呋喃糖，从而也可确定单糖残基为吡喃糖构型， δ 78 和 δ 68 附近分别为取代后的 C \rightarrow 3 和 C \rightarrow 6 糖苷键的共振峰，表明 LZ1 存在 1 \rightarrow 3 和 1 \rightarrow 6 糖苷键。 δ 69.52 附近出现的信号属于 (1 \rightarrow 6)- β -D-葡萄糖残基的 C-6 信号。 δ 68.83 $\times 10^{-6}$ 的信号峰属于 (1 \rightarrow 6)- β -D-半乳糖残基的 C-6 信号。 δ 66.43 信号属于 (1 \rightarrow 6)- β -D-甘露糖残基的 C-6 信号。 δ 78.287~81.436 范围出现信号峰表明 LZ1 糖链的主要链接方式含有 (1 \rightarrow 2)，(1 \rightarrow 3) 或 (1 \rightarrow 4) 键。这与 2.8 糖苷键的测定结果一致。如图 11b 所示，LZ1 的 ^1H 信号大多集中在 δ 3.20~5.50 处，在 δ 5.00~5.40：5.04、5.07、5.10、5.15、5.19、5.27、5.28 和 5.32 出现信号峰表明

LZ1 中存在 α -型吡喃糖。这与 2.6 红外测得的结果相符。 δ 4.70 的强信号为 D-Galp 的异头氢信号， δ 3.5~4.00 为鼠李糖 C-2、C-3、C-4 和 C-5 位的氢信号所在的区域，此区域的氢信号较复杂地重叠在一起。

2.11 LZ1 的免疫调节活性研究

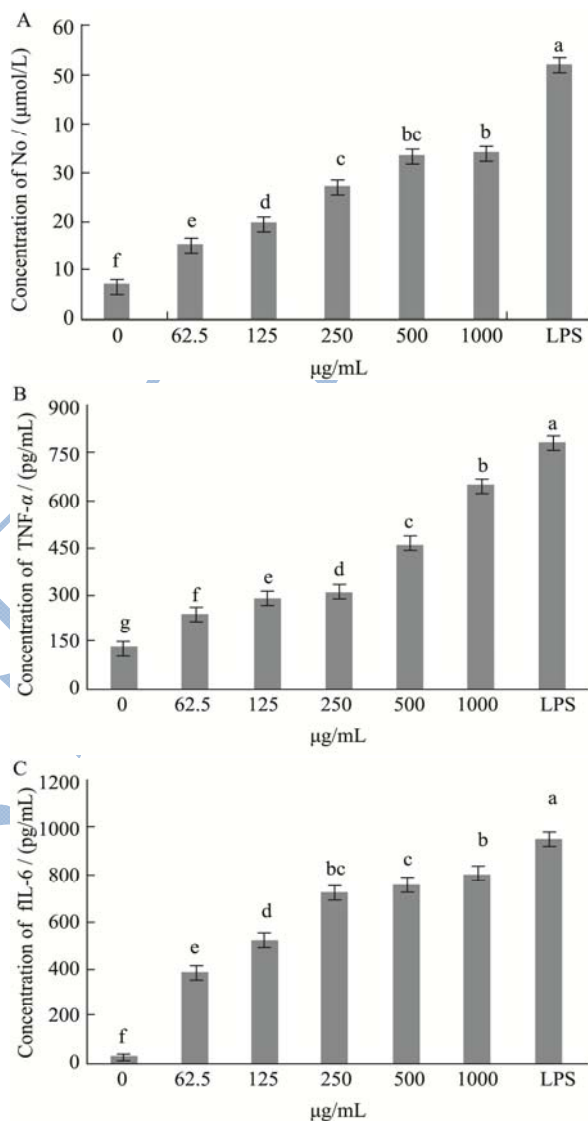


图 12 成分 1 对小鼠巨噬细胞表达 NO (A)、TNF- α (B) 和 IL-6 (C) 的影响

Fig.12 Effects of different concentrations of LZ1 on the expression of NO (A), TNF- α (B), and IL-6(C) in murine macrophages

先天性免疫应答的刺激调节可以增强机体对抗外源病原体的威胁。研究认为，通过激活巨噬细胞系统和补体系统来实现免疫系统的刺激调节^[26-28]。本文研究了不同浓度 LZ1 对小鼠巨噬细胞分泌细胞因子 NO、TNF- α 和 IL-6 的影响。如图 12 所示，经过 LZ1 处理后，小鼠巨噬细胞中 NO、TNF- α 和 IL-6 的表达量均显著升高，且表达量随着 LZ1 浓度的升高而升高，

呈现出明显的剂量效应。如图 12A 所示 LZ1 对 NO 的表达随着 LZ1 浓度生物升到不断升高, 当浓度达到 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上时其对 NO 的表达的促进增长速度下降; 如图 12B 所示, LZ1 对 TNF- α 的激活表达最不明显, 在 LZ1 低浓度时仅为阴性对照的 2 倍左右, 经过 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LZ1 处理的小鼠细胞其 TNF- α 的表达水平也只有阴性对照的 4 倍左右; 如图 12C 所示, LZ1 对 IL-6 的激活表达最为显著, 小鼠巨噬细胞经 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LZ1 处理后其 IL-6 的表达水平将近是阴性对照组的 60 倍。以上研究结果表明 LZ1 具有较强的免疫调节功能。

2.12 LZ1 抑制红细胞氧化性溶血研究

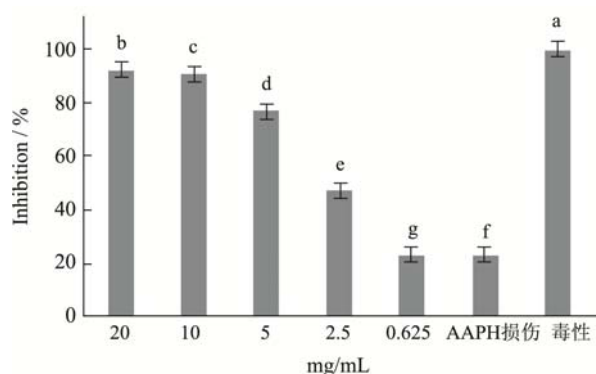


图 13 LZ1 对 AAPH 诱导的红细胞溶血的抑制作用

Fig.13 Inhibitory effect of LZ1 on AAPH-induced erythrocyte hemolysis

本文通过 AAPH 诱导的红细胞氧化性溶血模型对 LZ1 的抗氧化活性进行评价。红细胞膜表面含有多种不饱和脂肪酸, 极易被过氧化而造成氧化损伤。AAPH 是一种自由基激发剂, 它可以在生理温度下热分解产生大量的自由基, 用这些自由基会对红血细胞膜进行攻击, 诱导脂质和蛋白质的过氧化, 损伤细胞膜, 最终引发氧化性溶血。因此, 可以通过检测 LZ1 对红细胞氧化性溶血的抑制作用来评价其抗氧化活性的强弱。如图 13 所示, 随着 LZ1 浓度的增加, 红细胞氧化性溶血抑制效果明显增加。当 LZ1 的终浓度达到 20 mg/mL 的时候, 对溶血的抑制率可以高达 91.10%, 说明 LZ1 很好的抑制了 AAPH 诱导的红细胞氧化性溶血。

3 结论

紫芝菌丝体粗多糖 LZ 经提取分离纯化得均一多糖 LZ1。GPC 测得其分子量为 7498 u。经紫外光谱、电镜扫描、红外、气相、核磁、刚果红、高碘酸氧化和 Smith 降解分析, 得 LZ1 是由鼠李糖、岩藻糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖以 0.94:0.50:1.68:26.91:

4.80:17.12 的摩尔比组成的酸性杂多糖, 单糖之间的连接方式主要是 1 \rightarrow 4、1 \rightarrow 2 或 1 \rightarrow 6、1 \rightarrow 3, 并且 LZ1 没有三螺旋结构。通过研对不同浓度 LZ1 对小鼠巨噬细胞分泌细胞因子 NO、TNF- α 和 IL-6 影响的研究, 发现小鼠巨噬细胞中 NO、TNF- α 和 IL-6 的表达量随着 LZ1 浓度的升高而升高, 呈现出明显的剂量效应, 说明其有很强的免疫调节活性; 通过 AAPH 诱导的红细胞氧化性溶血模型对 LZ1 的抗氧化活性进行评价, 发现 LZ1 有抑制 AAPH 诱导的红细胞氧化性溶血的特性。为灵芝多糖类产品的开发和利用提供了一定的科学证据和研究思路。然而, 真菌多糖结构复杂, 具有丰富多样的生理活性 (如抗肿瘤、抗病毒、降血脂、降血压、降血糖和抗炎等), 特别是临床上的应用更需要进一步的探讨和研究。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015
Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of people's republic of China [M]. Beijing: The Medicine Science and Technology Press of China, 2015
- [2] 林志彬. 灵芝的现代研究[M]. 第 4 版. 北京: 北京大学医学出版社, 2015
LIN Zhi-bin. Modern research of *Ganoderma lucidum* [M]. Beijing: Peking University Medical Press, 2015
- [3] 陈若芸. 灵芝化学成分与质量控制方法的研究综述[J]. 食用菌, 2015, 23(5): 270-275
CHEN Ruo-yun. Review of research on chemical constituents of *Ganoderma lucidum* and its quality control method [J]. Edible and Medicinal Mushrooms, 2015, 23(5): 270-275
- [4] 杨锦生. 灵芝主要化学成分及其药理作用研究述评[J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(4): 906-907
YANG Jin-sheng. Review on the main chemical components and pharmacological effects of *Ganoderma lucidum* [J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2012, 30(4): 906-907
- [5] 左军, 李忠威, 马育轩, 等. 灵芝多糖现代药理研究进展[J]. 中医药信息, 2015, 32(5): 122-123
ZUO Jun, LI Zhong-wei, MA Yu-xuan, et al. Research progress on modern pharmacology of *Ganoderma lucidum* polysaccharides [J]. Information on Traditional Chinese Medicine, 2015, 32(5): 122-123
- [6] 谭才邓, 廖延智. 灵芝液体发酵产胞内多糖的培养基优化[J]. 现代食品科技, 2013, 29(3): 549-552

- TAN Cai-deng, LIAO Yan-zhi. Optimization of medium for intracellular polysaccharide production by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* [J]. Modern Food Science, 2013, 29(3): 549-552
- [7] 陶如玉,郝利民,陈强,等.灵芝菌丝体液态发酵及多糖药理活性研究进展[J].食品科学,2015,36(9):260-264
- TAO Ru-yu, HAO Li-min, CHEN Qiang, et al. Recent progress in pharmacological activities of polysaccharides from the mycelia of liquid-cultured *ganoderma lucidum* [J]. Food Science, 2015, 36(9): 260-264
- [8] 刘剑利,曹向宇,芦秀丽,等.香菇菌丝体多糖的分离纯化和抗氧化作用[J].食品科学,2011,32(12):19-23
- LIU Jian-li, CAO Xiang-yu, LU Xiu-li, et al. Extraction optimization, purification and antioxidant activity of polysaccharide from *lentinus edodes* mycelium [J]. Food Science, 2011, 32(12): 19-23
- [9] Ma C W, Feng M Y, Zhai X F, et al. Optimization for the extraction of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* and their antioxidant and antiproliferative activities [J]. J Taiwan Inst. Chem. E., 2013, 44(6): 886-894
- [10] 张婷,吴晖,赖富饶,等.灵芝菌丝体多糖提取工艺的优化[J].安徽农业科学,2016,44(29):63-76
- ZHANG Ting, WU Hui, LAI Fu-rao, et al. Optimizing extraction technique for mycelia polysaccharides from the *ganoderma lucidum* [J]. Journal of Anhui Agri. Sci., 2016, 44(29): 63-76
- [11] Byun E H, Kim J H, Sung N Y, et al. Effects of gamma irradiation on the physical and structural properties of β -glucan [J]. Radiation Physics and Chemistry, 2008, 77(6): 781-786
- [12] Zhao L Y, Dong Y H, Chen G T, et al. Extraction, purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80(3): 783-789
- [13] Dai Y C, CAO Y, Zhou L W, et al. Notes on the nomenclature of the most widely cultivated *Ganoderma* species in China [J]. Mycosystema, 2013, 32(6): 947-952
- [14] Guo F C, Kwakkel R P, Williams B A, et al. Coccidiosis immunization: effects of mushroom and herb polysaccharides on immune responses of chickens infected with *Eimeria tenella* [J]. Avian Diseases, 2005, 49(1): 70-73
- [15] 于华峥,刘艳芳,周帅,等.灵芝子实体、菌丝体及孢子粉中多糖成分差异比较研究[J].菌物学报,2016,35(2):170-177
- YU Hua-zheng, LIU Yan-fang, ZHOU Shuai, et al. Comparison of the polysaccharides from fruiting bodies, mycelia and spore powder of *Ganoderma lingzhi* [J]. Mycosystema, 2016, 35(2): 170-177
- [16] SONG Yi, DU Bing-dian, ZHOU Ting, et al. Optimization of extraction process by response surface methodology and preliminary structural analysis of polysaccharides from defatted peanut (*Arachis hypogaea*) cakes [J]. Carbohydrate Research, 2011, 346(2): 305-310
- [17] Tian Y, Zeng H, Xu Z, et al. Ultrasonic-assisted extraction and antioxidant activity of polysaccharides recovered from white button mushroom (*Agaricus bisporus*) [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 88(2): 522-529
- [18] Xu X, Yan H, Zhang X. Structure and immuno-stimulating activities of a new heteropolysaccharide from *Lentinula edodes* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(46): 11560-11566
- [19] Lee H H, Lee J S, Cho J Y, et al. Structural characteristics of immunostimulating polysaccharides from *Lentinus edodes* [J]. J Microbiol. Biotechnol., 2009, 19(5): 455-61
- [20] 刘玉红,王凤山.核磁共振波谱法在多糖结构分析中的应用[J].食品与药品,2007,9(8):39-43
- LIU Yu-hong, WANG Feng-shan. Applications of nuclear magnetic resonance spectroscopy in structural analysis of polysaccharides [J]. Food and Drug, 2007, 9(8): 39-43
- [21] HUANG Sheng-quan, LI Jin-wei, LI Yu-qiang, et al. Purification and structural characterization of a new water-soluble neutral polysaccharide GLP-F1-1 from *Ganoderma lucidum* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2011, 48: 165-169
- [22] Bock K, Duus J, Norman B, et al. Assignment of structures to oligosaccharides produced by enzymic degradation of a β -D-glucan from barley by ^1H - and ^{13}C -nmr spectroscopy [J]. Carbohydrate Research, 1991, 211(2): 219-233
- [23] Chen T Q, Wu Y B, Wu J G, et al. Efficient extraction technology of antioxidant crude polysaccharides from *Ganoderma lucidum* (Lingzhi), ultrasonic-circulating extraction integrating with superfine-pulverization [J]. J. Taiwan Inst Chem E, 2014, 45(1): 57-62
- [24] Pan K, Jiang Q, Liu G, et al. Optimization extraction of *Ganoderma lucidum* polysaccharides and its immunity and antioxidant activities [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 55(2): 301-306
- [25] 宫妍婕.四种多糖对细胞因子诱导的杀伤性细胞和树突状细胞抗肿瘤作用的影响[D].济南:山东大学,2016
- GONG Yan-jie. Influence of four polysaccharides on antitumor effect of induced killer cells and dendritic cells [D].

- Jinan: Shandong University, 2016
- [26] 王波.灵芝多糖提取、分离纯化、表征及体外抗氧化活性探究[D].郑州:郑州大学,2016
- WANG Bo. Extraction, Isolation, purification, characterization and *in vitro* antioxidant activity of polysaccharide from *ganoderma lucidum* [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2016
- [27] 王君巧,聂少平,余强,等.黑灵芝多糖对免疫抑制小鼠的免疫调节和抗氧化作用[J].食品科学,2012,33(23):274-277
- WANG Jun-qiao, NIE Shao-ping, YU Qiang, et al. Immunomodulatory activity and antioxidant activity of polysaccharides from the black *ganoderma lucidum* [J]. Food Science, 2012, 33(23): 274-277
- [28] Tseng Y, Yang J, Mau J. Antioxidant properties of polysaccharides from *Ganoderma tsugae* [J]. Food Chemistry, 2008, 107(2): 732-738

现代食品科技