

# 阿魏侧耳多糖的分离纯化与抗肿瘤活性的研究\*

董洪新\*\* 吕作舟

(华中农业大学应用真菌研究所 武汉 430070)

**摘要:** 从阿魏侧耳 (*Pleurotus ferulae*) 子实体中用热水浸提出粗多糖 PFW, 将 PFW 脱蛋白后, 经 DEAE-纤维素柱层析, 得两种多糖 PF<sub>1</sub> 和 PF<sub>2</sub>。用光散射和 GPC 联机测定: PF<sub>1</sub> 含有两种组分其重均分子量分别为  $7.875 \times 10^5$  和  $3.245 \times 10^4$ ; PF<sub>2</sub> 重均分子量为  $3.187 \times 10^6$ 。用 IR 和 GC 分析它们组成和结构, 结果表明: PF<sub>1</sub> 由鼠李糖、葡萄糖、半乳糖和甘露糖组成, 含有  $\beta$ -糖苷键和甘露糖苷; PF<sub>2</sub> 由鼠李糖、木糖、葡萄糖、半乳糖和甘露糖组成, 含有  $\alpha$ -糖苷键。给小鼠腹腔注射多糖, 对移植性肿瘤 S-180 均有一定的抑制作用。

**关键词:** 阿魏侧耳, 多糖, 分离, 纯化, 抗肿瘤活性

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2003) 02-0016-05

## STUDIES ON ISOLATION, PURIFICATION AND ANTITUMOR ACTIVITY OF POLYSACCHARIDES OF *PLEUROTUS FERULAE*

DONG Hong-Xin LU Zuo-Zhou

(Institute of Applied Mycology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

**Abstract:** PFW was isolated from fruit body of *Pleurotus ferulae* by using hot water. Proteins were removed from PFW with Sevag method, after DEAE-cellulose chromatography, PF<sub>1</sub> and PF<sub>2</sub> were isolated from PFW. The weight was determined by using multiangle laser photometer combined with GPC; the results showed: PF<sub>1</sub> contains two fractions, the weights (Mw) are  $7.875 \times 10^5$  and  $3.245 \times 10^4$ , the Mw of PF<sub>2</sub> is  $3.187 \times 10^6$ . The components and structure of polysaccharides were analyzed by IR and GC. The polysaccharides PF<sub>1</sub> consists of rhamnose, glucose, galactose, mannose; PF<sub>2</sub> consists of rhamnose, xylose, glucose, galactose, mannose; PF<sub>1</sub> contains  $\beta$ -glucoside and mannoside, PF<sub>2</sub> contains  $\alpha$ -glucoside. It was found polysaccharides have antitumor activity on the implanted Sarcoma 180 in mice.

**Key words:** *Pleurotus ferulae*, Polysaccharides, Isolation, Purification, Antitumor activity

阿魏侧耳 (*Pleurotus ferulae* lanzi) 又名阿魏蘑、白灵菇等, 含有多糖等活性物质, 具有调节人体生理平衡, 增强人体免疫功能的作用。近年来阿魏侧耳的研究在国内外有了较大的发展, 但有关其多糖的研究报道甚少。甘勇等<sup>[2]</sup>对阿魏侧耳多糖的理化性质及免疫活性做了初步的研究, 本研究在此基础上进一步对阿魏侧耳多糖进行分离纯化并测定其抗肿瘤活性, 以进一步完善阿魏侧耳多糖的研究、开发和应用。

## 1 材料与方法

### 1.1 多糖的分离纯化及分析

子实体由北京金信食用菌有限公司提供。

#### 1.1.1 粗多糖 PFW 的提取: 参照张欣等<sup>[3]</sup>的方法进行。

\* 湖北省重点科技计划资助项目 (No. 952P1007)

\*\* 现工作单位: 烟台师范学院生物科学与技术系, 264025

收稿日期: 2002-04-15, 修回日期: 2002-06-20

**1.1.2 多糖的分离纯化:**将 PFW 经 Sevag 法脱蛋白后,上 DEAE-纤维素(OH-)柱层析,先以蒸馏水洗脱,再用 0.1mol/L 的 NaCl 溶液洗脱,得二级份、蒸馏水透析、减压浓缩、乙醇沉淀、真空冷冻干燥,得到白色粉末 PF<sub>1</sub> 和淡黄色粉末 PF<sub>2</sub>。

**1.1.3 糖含量的测定:**采用苯酚—硫酸法,以葡萄糖为标准物<sup>[4]</sup>。

**1.1.4 紫外分光光度法:**采用 UV-160A 紫外可见光谱仪扫描<sup>[2]</sup>。

**1.1.5 分子量的测定:**采用光散射法与凝胶渗透色谱(GPC)联机测定。

**1.1.6 分子构型分析:**采用红外光谱分析,用 Nicolet FT-IR 红外光谱仪进行测定<sup>[4]</sup>。

**1.1.7 糖组成分析:**采用气相色谱法<sup>[4]</sup>,使用 GC-9A 气相色谱仪。

## 1.2 抗肿瘤试验

昆明(KM)小鼠由湖北省医学实验动物饲养中心购买。

**1.2.1 肉瘤 180(S-180)瘤株制备:**由同济医科大学药学院提供的腹水型荷瘤小鼠制备<sup>[5]</sup>。

**1.2.2 抑瘤试验:**参照齐德生等<sup>[6]</sup>方法,剂量为 10mg/kg·d×9,对照组注射同体积生理盐水<sup>[6]</sup>。

**1.2.3 抑瘤率计算方法:**抑瘤率(%) = [A-B] / A × 100; 式中: A 是对照组的平均瘤重, B 是给药组的平均瘤重。

## 2 结果与分析

### 2.1 多糖的糖含量分析

以苯酚—硫酸法测定,得到多糖浓度  $x$  (mg/mL) 与吸光度  $y$  之间线性方程  $y = -0.0314 + 0.2816x$ , 相关系数  $r = 0.9968$ , 由此计算出多糖 PFW、PF<sub>1</sub> 和 PF<sub>2</sub> 的糖含量分别为 69.5%, 82.5%, 92.3%, 可见 PF<sub>2</sub> 的糖含量较高。

### 2.2 紫外光谱分析结果

对 PF<sub>1</sub> 和 PF<sub>2</sub> 的水溶液进行紫外扫描,结果表明:每种均无 260nm 的核酸吸收峰和 280nm 处的蛋白质吸收峰,说明 PF<sub>1</sub> 和 PF<sub>2</sub> 不含核酸和蛋白质。

### 2.3 分子量测定结果

用 0.1mol/L 的 NaCl 作溶剂,在多角度激光散射仪(DAWN, DSP)上于 632.8nm 波长和 25℃ 下测量,其分子量测定结果见表 1。

测定分子量的 GPC 图谱见图 1、2。从 GPC 图谱上可以看出,PF<sub>1</sub> 出现两个峰,证明含有两种组分,由 Aux1 检测图可知:第一峰值分子量大,但含量低;而第 2 个峰值的分子量小,其含量高。

### 2.4 红外光谱分析结果

PF<sub>1</sub> 和 PF<sub>2</sub> 的红外光谱图见图 3、4。

从图谱中可以看出,两种多糖在 1,250cm<sup>-1</sup>(O-H)、1,640cm<sup>-1</sup>(C=O)和 2,925cm<sup>-1</sup>(C-H)处显示出多糖的特征吸收峰,PF<sub>1</sub> 在 800cm<sup>-1</sup>和 870cm<sup>-1</sup>处有吸收,表示有甘露糖苷存在,在

表 1 多糖分子量统计结果

样品	时间 (min)	数均分子量 (Mn)	重均分子量 (Mw)	分布宽度 (Mw/Mn)
PF <sub>1</sub>	10.425-17.788	5.545 × 10 <sup>5</sup>	7.875 × 10 <sup>5</sup>	1.420
	18.025-23.958	3.072 × 10 <sup>4</sup>	3.245 × 10 <sup>4</sup>	1.056
PF <sub>2</sub>	10.308-24.637	2.339 × 10 <sup>6</sup>	3.187 × 10 <sup>6</sup>	1.363

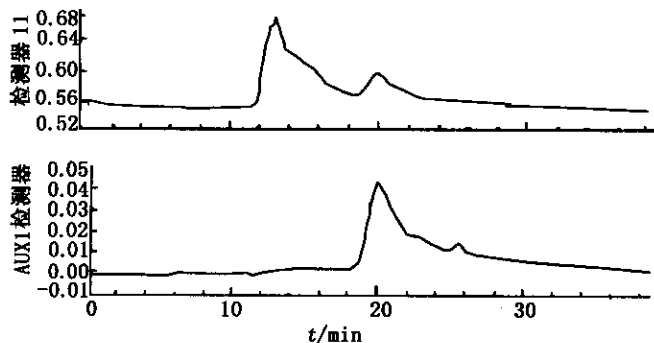


图1 测定 PF<sub>1</sub> 分子量的 GPC 图

890cm<sup>-1</sup>处有 β-糖苷键吸收峰, PF<sub>2</sub> 在 850cm<sup>-1</sup>有吸收,表示有 α-糖苷键存在。PF<sub>2</sub> 在 920cm<sup>-1</sup>、850cm<sup>-1</sup>、760cm<sup>-1</sup>处有葡萄糖吡喃糖特征吸收峰;而在 920cm<sup>-1</sup>吸收峰相对较强,表明含 α-D-葡萄糖。

### 2.5 多糖的单糖组成分析

将 PF<sub>1</sub> 和 PF<sub>2</sub> 制成三甲基硅烷衍生物进行气相色谱分析,与标准单糖比较,根据气相色

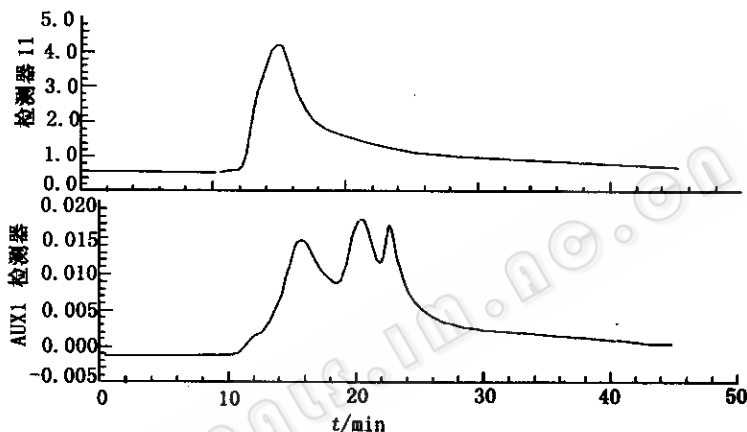


图2 测定 PF<sub>2</sub> 分子量的 GPC 图

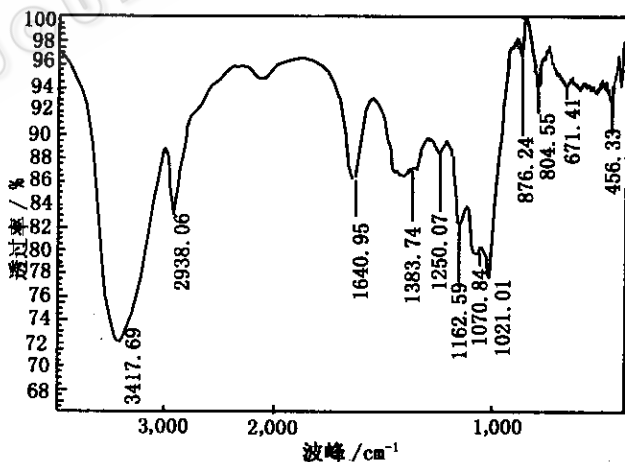
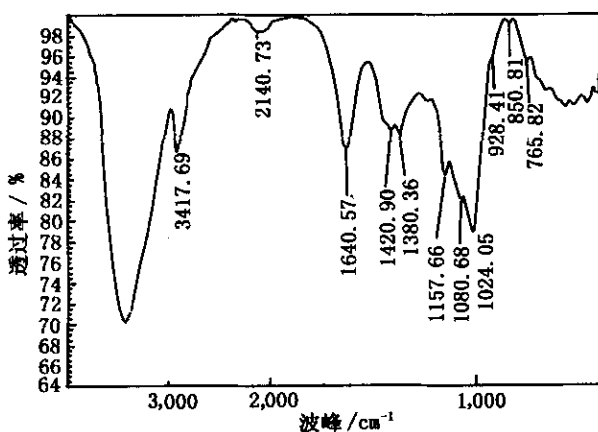


图3 PF<sub>1</sub> 的红外光谱图

谱分析中各峰面积算出单糖组成的百分比。多糖的单糖组成和含量汇集于表 2。

由表 2 可以看出, PF<sub>1</sub> 由鼠李糖、葡萄糖、半乳糖和甘露糖组成; PF<sub>2</sub> 比 PF<sub>1</sub> 多含有木糖, 两种多糖都含有较多的葡萄糖和半乳糖, 其中 PF<sub>1</sub> 还含有较多的甘露糖, 与红外光谱证明 PF<sub>1</sub> 存在甘露糖苷相一致。

图4 PF<sub>2</sub>的红外光谱图

## 2.6 抑瘤活性结果

不同多糖对 S-180 抑制效果见表 3。

在相同剂量下, 各种多糖对 S-180 肉瘤表现出明显的抑制作用。纯化的多糖与粗多糖相比并未表现出显著的差异。在体重变化上, 各处理促使小鼠体重增长率比对照偏高, 说明多糖有抗肿瘤作用, 但无毒副作用, 不影响小鼠的正常生长。

表 2 多糖的单糖组成和含量

样品	含量 (%)				
	Rha	Xyl	Glc	Gal	Man
PF <sub>1</sub>	1.77	-	33.40	42.07	22.76
PF <sub>2</sub>	1.13	2.84	36.46	54.84	4.73

注: Rha: 鼠李糖, Xyl: 木糖, Glc: 葡萄糖, Gal: 半乳糖, Man: 甘露糖

## 3 讨论

在多糖分离纯化上, 经 DEAE-纤维素柱层析分离得到两种多糖 PF<sub>1</sub> 和 PF<sub>2</sub>, 在分子量测定的

表 3 多糖对 S-180 抑制结果

样品	剂量 (mg/kg × days)	鼠数	瘤重	体重增加百分率 (%)	抑制率 (%)
Control	-	8	1.10	18.1	-
PF <sub>1</sub>	10 × 9	8	0.52	22.4	52.7
PF <sub>2</sub>	10 × 9	8	0.53	21.6	51.8

GPC 图谱上, PF<sub>1</sub> 出现两个峰, 说明 PF<sub>1</sub> 有两种组分, 若需进一步分离, 可通过葡聚糖凝胶过滤等方法来实现。

在抗肿瘤活性试验上, 提取的多糖均表现出对 S-180 肉瘤的抑制作用。在剂量的选择上本研究是参照大多数文献所报道的, 其具体最佳剂量选择、试验的重现性问题, 所提取多糖的实用价值等问题仍需进一步研究。

多糖的生物活性常受它的分子量, 支化度和链构象的影响, 本研究通过抗肿瘤试验, 发现所分离多糖的分子量及分子构型与其生物活性没有明确的关系, 至于对多糖进行化学修饰或降解能否提高其生物活性, 还有待进一步探讨。

## 参考文献

- [1] 陈文良. 食用菌, 1999, (4): 40.
- [2] 甘男, 吕作舟. 菌物系统, 2001, 20 (2): 228~232.
- [3] 张欣, 吕作舟. 华中农业大学学报, 1998, 17 (6): 537~541.
- [4] 张惟杰主编. 糖复合物生化研究技术 (第二版). 杭州: 浙江大学出版社, 1999.
- [5] 徐叔云, 卞如濂, 陈修云主编. 药理实验方法学, 北京: 人民卫生出版社, 1982.
- [6] 齐德生, 于炎湖. 华中农业大学学报, 1994, 13 (2): 160~163.