

# 药用真菌 $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖构效关系及检测方法研究进展\*

陈春锋 杨晓彤\*\*

(上海师范大学微生物与免疫研究所 上海 200234)

**摘要:**  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖是许多活性真菌多糖的核心结构, 由于具有免疫调节、抗肿瘤等多种生物活性, 已成为研究热点。本文从  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖的主链、支链分支度、支链基团、分子量及空间结构等方面介绍了结构与生物活性之间的关系, 并对目前该类多糖的定性方法及鲎G因子、半乳糖神经酰胺 ELISA 等定量检测方法进行了综述。

**关键词:**  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖, 构效关系, 检测

**中图分类号:** Q539 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 05-0150-04

## Progresses in the Studies of Structure-activity Correlation and Detection Methods of Medicinal Fungal $\beta$ -(1,3)-D-glucans\*

CHEN Chun-Feng YANG Xiao-Tong\*\*

(Institute of Microbiology and Immunology, Shanghai Normal University, Shanghai 200234)

**Abstract:**  $\beta$ -(1,3)-D-glucan is a core structure of many bioactive fungal polysaccharides. It has drawn intensive attentions in recent because of its multiple bioactivities, particularly the immunomodulatory and antitumor actions. In this review, we introduced the studies of structure-activity correlation of these  $\beta$ -(1,3)-D-glucans, particularly the contributions of main backbone, branch degree and residues, molecular weight and conformation to the activities. We also summarized the recent progress in the detective methods for both quantitation and qualification using limulus G factor assay, galactosyl ceramide ELISA and etc.

**Key words:**  $\beta$ -(1,3)-D-glucan, Structure-activity correlation, Detection

许多菌物多糖因具有免疫抗癌、抗病毒、抗衰老、抗辐射、抗炎症等功效而受到重视, 其中香菇多糖、裂褶菌多糖、云芝糖肽 PSP、PSK 等已作为临床药物应用于免疫性缺陷疾病、自身免疫病和肿瘤等疾病的治疗, 并取得了良好临床效果<sup>[1]</sup>。Yadomae 等对这些菌类中活性多糖的结构与生物活性进行了比较研究, 发现免疫活性最强的多糖主链往往由  $\beta$ -(1,3) 连接的糖基组成, 沿主链随机分布  $\beta$ -(1,6) 连接的葡萄糖基侧链<sup>[2,3]</sup>。这个观点得到许多研究者的支持, 认为  $\beta$ -(1,3) 结构是决定多糖免疫活性的核心结构<sup>[4-6]</sup>。本文概述了这类菌物多糖的构效关系研究进展以及检测方法。

### 1 结构与生物活性的关系

Yadomae 等发现  $\beta$ -(1,3) 结构与生物活性相关。此后的研究发现, 该类多糖的主链、支链、支链基团、分子量及空间三维结构也均影响着多糖的生物活性<sup>[7]</sup>。

#### 1.1 主链对生物活性的影响 研究表明, 药用真菌活性多糖多以 $\beta$ -(1,3)-D-葡聚

\*上海市教育委员会科学项目资助 (No. 04DB20)

\*\*通讯作者 Tel: 021-64322895, E-mail: xtyang@shnu.edu.cn

收稿日期: 2005-12-05, 修回日期: 2006-04-05

糖为主链结构。目前研究较多的活性多糖如香菇多糖、裂褶菌多糖、灰树花多糖、猪苓多糖等,均为 $\beta$ - (1, 6) 分支的 $\beta$ - (1, 3) -D-葡聚糖<sup>[8,9]</sup>, 另外, 具有 $\beta$ - (1, 3) -D-葡聚糖结构的灵芝多糖也具有很强的免疫活性。Matsuzaki 等人研究了 $\beta$ - (1, 3) 连接的葡聚糖主链对其抗肿瘤活性的重要性以及连接到 $C_6$ 的糖基的作用, 结果表明,  $\beta$ - (1, 3) 连接的骨架结构对于抗肿瘤活性是必需的。含来自真菌多糖的主链为 $\beta$ - (1, 3) 的葡聚糖通常具有90% ~ 100%的肿瘤抑制率, 而其他构型的真菌多糖仅存在10% ~ 40%的肿瘤抑制率。

**1.2 支链分支度及支链基团的影响** 支链的分支度及支链基团与免疫活性密切相关。临床实验和药理研究表明, 分支度 (DB) 在0.2 ~ 0.33的 $\beta$ - (1, 3) -D-葡聚糖的生物活性较强。如DB为0.3的香菇多糖、裂褶菌多糖, DB为0.31 ~ 0.36灰树花多糖, DB为0.2的猪苓多糖均显示出较强的免疫活性。而来自 *Poria cocos* (DB为0.02) 的茯苓多糖, 其抗肿瘤活性是很微弱的; Misaki 报道从 *Ganoderma lucidum* 中提取的低分支度 (DB为0.06) 的葡聚糖, 其活性也很低; 来自于 *Pestalotia* sp. 815 的真菌多糖 *pesta-*lotan DB为2.8时活性很低, 然而经过氧化还原处理将部分葡聚糖分支还原成羟基后, DB降至1.0, 在大鼠体内的抑瘤率从57%提高到92.3%。

经<sup>13</sup>C核磁共振谱分析推断, 连接在 $\beta$ - (1, 3) -葡聚糖葡聚糖骨架上的亲水基团 (多羟基), 对抗肿瘤活性起重要作用。原因是多羟基的存在增加了葡聚糖的水溶性, 杨海龙等利用分子力学 (MM2) 方法研究葡聚糖构象时认为, 羟基与受体之间通过弱作用力或氢键相互结合并引起受体构象的变化, 从而激发生物体内的生理生化反应。因此, 在增加或维持抗肿瘤活性的基础上, 可对 $\beta$ - (1, 3) -葡聚糖进行硫酸化、磷酸化、羧甲基化、磷酸化、磺酰化, 以增加 $\beta$ - (1, 3) -葡聚糖的水溶性。

**1.3 分子量的影响**  $\beta$ - (1, 3) -多糖的生物活性在很大程度上取决于其分子量的大小。高分子量的葡聚糖往往比低分子量的葡聚糖呈现较强的免疫活性<sup>[4,10]</sup>, 特别是100 ~ 200kD的高分子组分呈现较强的活性。如分子量大于100kD的裂褶菌多糖有生物活性, 而分子量小于50kD的无抗肿瘤活性, 但也有部分分子量较小的多糖片段例外, Blaschek 等报道平均分子量小于 $2 \times 10^4$ 的 $\beta$ - (1, 3) -D-葡聚糖也显示出很强的抗肿瘤活性。由此可见, 不同多糖产生生物学活性的最佳相对分子质量可能不同。

**1.4 空间三维结构的影响**  $\beta$ - (1, 3) 多糖的一些生物活性如补体活性、血浆凝固及抗肿瘤活性受空间结构的影响<sup>[11]</sup>。Ohno 等人研究发现, 含有 (1, 6) 分支的 $\beta$ - (1, 3) -D-葡聚糖刺激免疫与抗肿瘤活性构象为3股螺旋; Kojima 等对裂褶菌的研究结果表明, 只有三股螺旋的结构 (分子量大于 $10^5$ ) 才是有活性的。如果在裂褶菌多糖中加入尿素或二甲亚砜, 使立体构型发生改变失去三股螺旋结构, 则其活性也就丧失。但对于多糖生物活性与多糖构象之间关系的认识上目前尚无定论, 如Saito 等则发现,  $\beta$ - (1, 3) -D-葡聚糖的单股螺旋构象是其生物活性的基础, 而Demleitner 等研究认为构象对活性的影响并非主要的,  $\beta$ - (1, 3) -糖苷键才是其具有抗肿瘤活性的关键。

## 2 $\beta$ - (1, 3) -葡聚糖的检测方法

$\beta$ - (1, 3) -葡聚糖作为一种重要的生物免疫反应调节剂, 已成为当今医药和保健食品行业关注的焦点。其结构的定性及含量的测定是评价质量、推断活性的重要手段。目前用于结构方面的测定方法有甲基化分析法、NMR法、酶学方法等。定量测定的方

法有鲎G因子、ELISA法等。

**2.1 甲基化分析法** 甲基化分析是多糖结构分析的常用手段之一。将多糖中各单糖残基全部甲基化,进而水解甲基化单糖,其羟基所在位置即为原来单糖残基连接点,再进行GC或GC-MS分析,通过确认未有甲基化的羟基位置来判断糖苷键的组成。1-3连接型多糖中单糖残基1-3位的羟基因形成糖苷键所以不能被甲基化,因此水解后产生的单糖该两个位置均无甲基形成。但甲基化分析的局限是无法知道异头碳糖苷键构型及糖链中各单糖残基的顺序信息。

**2.2 NMR法** NMR法研究糖链结构的特点是不破坏样品结构、构型,并且样品易于回收。与用于研究糖类化合物结构的经典方法相比,NMR方法能够得到较完全和详细的信息。一维NMR,尤其是 $^{13}\text{C}$  NMR常用于多糖结构分析,如异头碳的构型问题、多糖残基中取代位置和分支点的确定、多糖中各残基种类和比例的确定等。 $^{13}\text{C}$  NMR研究表明,一般 $\beta$ 型连接的葡聚糖 $\text{C}_1$ 化学位移 $\delta$ 为103~105, $\text{C}_3$ 化学位移 $\delta$ 为86.7。近年来,随着NMR技术的发展和不断完善,光谱的展开度和灵敏度都得到了很大提高,二维NMR及固体NMR技术已成为复杂多糖化合物及其衍生物结构分析中常用的方法<sup>[12,13]</sup>。另外,脉冲场梯度和多糖的 $^{13}\text{C}$ 标记技术的应用为NMR在多糖结构研究提供了更广阔的天地。

**2.3 酶学方法** 酶促反应是多糖的结构研究中一种重要的手段。利用专一性水解 $\beta$ -(1,3)型糖苷键的酶对多糖底物的催化反应可以确认多糖中是否存在该种糖苷键类型。能专一性酶解 $\beta$ -(1,3)型葡聚糖的酶称 $\beta$ -(1,3)-葡聚糖酶,根据作用方式分为内切和外切两种,内切 $\beta$ -(1,3)-葡聚糖酶以随机方式切断 $\beta$ -(1,3)-葡聚糖,外切 $\beta$ -(1,3)-葡聚糖酶从多糖非还原端降解葡萄糖残基。

Burtseva等<sup>[14]</sup>从真菌*Trichoderma aureviride*中分离了一种特异端解 $\beta$ -(1,3)、 $\beta$ -(1,6)结构多糖的 $\beta$ -(1,3)-葡聚糖酶,可以用来判断多糖中是否存在该两种糖苷键。张作明等以茯苓多糖为底物,从生胞噬胞菌(*Sporocytophaga*)中分离出一种以随机方式切断 $\beta$ -1,3-糖苷键的内切 $\beta$ -(1,3)-葡聚糖酶。 $\beta$ -(1,3)-葡聚糖酶的分离、纯化为研究菌物多糖组成、结构提供了强有力工具。另外,放射性标记方法的引入使得酶学方法在多糖结构研究中应用前景更加广阔。

**2.4 鲎G因子法** Tanaka等人利用 $\beta$ -(1,3)-葡聚糖能特异地激活鲎的阿米巴状细胞裂解物中的G因子,研制了快速定量测定真菌 $\beta$ -(1,3)-葡聚糖的方法<sup>[15]</sup>。

该试剂盒具有快速、灵敏、特异性强、重复性好等优点,检测限可达pg级( $10^{-12}$ ),缺点是反应易受葡聚糖的分子量、分支度,特别受到多糖的三维结构影响。Tanaka等研究发现平均分子量在6.8~216.0kD之间的 $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖,随着其分子量的增加和分支度的减少,激活G因子的能力越强;分子量在6.75~27.50kD之间的裂褶菌多糖对G因子的级联反应有抑制作用。Aketagawa等发现单股螺旋的 $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖在G因子反应中起着决定性的作用;Nagi等在研究NaOH处理过的Sonifilan (SPG)对鲎G因子反应的影响时发现三股螺旋 $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖不与G因子反应。故样品用该法测定之前,常用NaOH对 $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖进行预处理,使其转化为单股螺旋,以减少因构象造成的实验误差。

该法首先被应用于检测深部真菌感染患者血清中的 $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖含量。Yang等<sup>[16]</sup>首次将该方法移植于菌物多糖中 $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖含量的定量测定,分

析了19种食、药用蘑菇中提取的27个多糖样品,发现该方法对香菇多糖和裂褶菌多糖纯品的测定结果与理论值相当符合,推断该方法同样适合菌物多糖中 $\beta$ - (1, 3) -D-葡聚糖含量的检测。除鲎G因子外,蚕(Silkworm)<sup>[17]</sup>和大黄粉虫(*Tenebrio molitor*)<sup>[18]</sup>、海绵动物(*sponge Suberites domuncula*)<sup>[19]</sup>中也发现存在能与(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-葡聚糖专一反应的蛋白质分子,可为 $\beta$ - (1, 3) -葡聚糖的定量测定提供新方法。

**2.5 ELISA 实验法** 半乳糖神经酰胺(Galactosyl ceramide)可高亲和性地与 $\beta$ - (1, 3) -D-葡聚糖结合。Donald等依此建立了一种以半乳糖神经酰胺为包被物,鼠抗 $\beta$ - (1, 3) -D-葡聚糖单克隆抗体的ELISA检测系统,特异性检测生物体液中 $\beta$ - (1, 3) -D-葡聚糖<sup>[20]</sup>。闻平等用该法检测各种生物体液中 $\beta$ - (1, 3) -D-葡聚糖的含量时发现,葡聚糖的含量低于0.8ng/ml时线性良好,并具有良好的重复性和满意的回收率,并相对鲎G因子法受干扰物质的影响更小,并同样具有较高的精密度和准确度。但本法尚无分子量、分支度及三维构型对测定影响的报告,此外,鼠抗 $\beta$ - (1, 3) -D-葡聚糖单克隆抗体是否能广谱识别各种菌物 $\beta$ - (1, 3) -多糖还需进一步验证。

### 3 研究展望

我国菌物资源丰富,菌物 $\beta$ - (1, 3) -D-葡聚糖作为一类重要的免疫活性多糖,其抗肿瘤、免疫调节等活性越来越引起人们的重视。不少菌物多糖制剂已广泛应用于临床,并显示出很好的疗效。然而由于多糖结构的复杂性和研究手段的局限性,其结构-活性关系及其在体内的作用机理还不够清楚。糖生物学的发展和分子生物学、检测手段完善势必推动对多糖的认识向深层次发展,菌物多糖的开发应用也将具有更广阔的前景。

### 参考文献

- [1] Zaidman B Z, Yassin M, Mahajna J, et al. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, **67**: 453 ~ 468.
- [2] Yadomae T, Ohno N. *Recent Res Devel Chem Pharm Sci*, 1996, **1**: 23 ~ 33.
- [3] Yadomae T. *Yakugaku Zasshi*, 2000, **120** (5): 413 ~ 431.
- [4] Wasser S P. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, **60**: 258 ~ 274.
- [5] Bao X F, Dong Q, Fang J N. *Acta Bioch Sin*, 2002, **60**: 258 ~ 274.
- [6] Zekovic D B, Kwiatkowski S, Vrvic M M, et al. *Crit Rev Biotechnol*, 2005, **25** (4): 205 ~ 230.
- [7] Tokunaka K, Ohno N, Adachi Y, et al. *Int Immunopharmacol*, 2000, **22**: 383 ~ 394.
- [8] Borchers A T, Keen C L, Gershwin M E. *Exp Biol Med*. 2004, **229** (5): 393 ~ 406.
- [9] 冀颐之, 杜连祥. *微生物学通报*, 2003, **30** (5): 15 ~ 20.
- [10] Cleary J A, Kelly G E, Husband A J, et al. *Immunol Cell Biol*, 1999, **77** (5): 395 ~ 403.
- [11] Noriko N M, Ohno N, Adachi Y, et al. *Biol Pharm Bull*, 1995, **18** (1): 185 ~ 189.
- [12] Bao X, Liu C, Fang J, et al. *Carbohydr Res*, 2001, **332** (1): 67 ~ 74.
- [13] Fairweather J K, Him J L, Heux L, et al. *Glycobiology*, 2004, **14** (9): 775 ~ 781.
- [14] Burtseva Y V, Verigina N S, Sova V V, et al. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, **39** (5): 475 ~ 481.
- [15] Finkelman M. *LAL update*, 2001, **19**: 1 ~ 3.
- [16] Yang X T, Wan J M, Mi K, et al. *Mycosystema*, 2003, **22** (2): 296 ~ 302.
- [17] Ochiai M, Ashida M. *Biol Chem*, 2000, **275**: 4995 ~ 5002.
- [18] Zhang R, Cho H Y, Kim H S, et al. *Biol Chem*, 2003, **278** (43): 42072 ~ 42079.
- [19] Perovic-Ottstadt S, Adell T, Proksch P, et al. *Eur J Biochem*, 2004, **271** (10): 1924 ~ 1937.
- [20] Milton D K, Alwis K U, Fiset L, et al. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67** (12): 5420 ~ 5424.