

姬松茸菌丝体多糖体外抗肿瘤活性的研究及结构初探

姜 荷, 谷文英*

(江南大学食品学院, 江苏 无锡 214036)

姬松茸 (*Agaricus blazei* Murill, ABM), 又名巴西蘑菇, 是近年来在日本、美国和我国各地区掀起栽培热潮的一种重要的药食兼用菌种^[1]。近些年来, 姬松茸作为抗癌剂、免疫调节剂、抗突变剂和抗菌物质引起了人们的极大关注。国内外学者已经证明姬松茸中丰富的多糖是发挥抗肿瘤作用的最主要的成分之一^[2-4]。深层发酵获得的菌丝体多糖的生理活性接近于子实体多糖^[2,3], 并且由于深层发酵具有生产工艺简便、培养材料易得、生产成本低、易于实现工业化等优点, 从而成为开发姬松茸活性多糖的一种有效手段。对于姬松茸多糖发挥抗肿瘤作用的机制, 目前尚无定论, 一种观点是多糖作为一种理想的免疫调节剂, 通过激活免疫反应起到抗肿瘤作用^[2,4]; 但也有一些研究报告指出姬松茸多糖对肿瘤细胞具有一定的细胞毒作用^[5,6], 这可能是由于不同学者采用的菌种、培养、分离纯化条件不同所致。

真菌多糖生物活性的研究表明, 真菌多糖的化学结构对其生物活性起着至关重要的作用。多糖的构效关系是指多糖一级结构和高级结构与其生物活性的关系, 它可为活性多糖的目的性筛选提供必要的理论指导, 是当前糖化学和糖生物学共同关注的焦点问题。本实验对深层发酵所得的姬松茸菌丝体进行了热水浸提, 得到了水溶性多糖 HWSP。采用了两种肿瘤细胞, 对 HWSP 的体外抗肿瘤活性进行了研究。采用凝胶柱色谱, 按相对分子质量分布对 HWSP 进行了初步分离, 结合体外细胞实验筛选活性组分, 对各分离组分的抗肿瘤活性与相对分子质量分布及单糖组成之间的关系进行了研究。

1 材料与设备

1.1 多糖: 菌丝体是由本实验室筛选、保存的菌种 *Agaricus blazei* Murill 经深层发酵获得。菌丝体干粉经 90℃ 热水提取 3 次, 每次 3 h, 水提物浓缩至原体积的 1/5, 加入乙醇至终体积分数为 85%, 离心得沉淀, 冻干得 HWSP。

1.2 主要试剂: MTT [3-(4,5-dimethyliazol-2-yl)-

2,5-diphenyltetrazolium], Sigma 公司产品; RPMI-1640 培养液, Gibco 产品; 小牛血清, 杭州四季青生物工程材料有限公司; 刀豆蛋白 A (ConA), 上海华美生物工程公司; 注射用盐酸多柔比星 (Doxorubicin Hydrochloride for injection, DHI), 浙江海正药业股份有限公司。

1.3 细胞: 鼠结肠癌细胞 CT-26 由上海第二军医大学惠赠, 人肝癌 Bel-7402 由本校医学系提供。

1.4 主要仪器: CO₂ 培养箱, Harris 公司; Thermo-labsystems Multiskan MK3 酶联免疫检测仪, 上海雷勃分析仪器有限公司。

1.5 凝胶柱材料: Sepharose CL-6B; Dextran T-10 T-40 T-70 T-500, Pharmacia 产品。

2 实验方法

2.1 姬松茸多糖对癌细胞的抑制作用: 将癌细胞 Bel-7402 或 CT-26 置 5% CO₂、37℃ 培养箱内, 在含有 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液中贴壁生长。用含 0.125% 胰蛋白酶和 0.01% DETA 的消化液消化处于指数生长期的癌细胞, 以 3×10^4 /mL 密度接种于 96 孔培养板上, 每孔 150 μ L, 培养 24 h 后, 倾去培养液, 然后加入不同质量浓度的多糖 (终浓度分别为 0.010 0、0.050 0、0.100 0、0.200 0 g/L), 每个质量浓度 3 孔重复, 每孔加 50 μ L 样品, 对照组加同量培养液。培养 48 h 后, 每孔加入 MTT (5 g/L) 20 μ L, 继续培养 4 h, 离心, 弃去上清液, 每孔加入二甲基亚砷 150 μ L, 平板振荡仪振荡 10 min, 酶联免疫仪 570 nm 波长下检测各孔吸光度 (A), 按下公式计算抑制率 (RI)。

$$RI = (1 - \bar{A}_{\text{实验}} / \bar{A}_{\text{对照}}) \times 100\%$$

2.2 凝胶柱色谱洗脱: HWSP 10 mg 溶解于 3 mL 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 中, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液上样; 柱型号: 1.6 cm $\times$ 80 cm; 体积流量: 9 mL/h; 每管收集体积 3 mL; 洗脱剂: 含 10 mmol/L NaCl 的磷酸盐缓冲液; 温度: 室温。

2.3 单糖组成分析: 单糖组成^[7]。

收稿日期: 2005-03-23

作者简介: 姜 荷 (1976-), 女, 满族, 辽宁人, 在读博士研究生, 研究方向为天然药食科学。

* 通讯作者 谷文英 Tel: (0510) 5879957 E-mail: wygu@sytu.edu.cn

3 实验结果

3.1 姬松茸菌丝体多糖 HWSP 对 CT-26 及 Bel-7402 细胞的体外作用效果: 姬松茸菌丝体多糖 HWSP 对 CT-26 的体外抑制效果较明显, 但并不呈单纯的剂量效应关系, 在 0.100 0 g/L 的作用剂量

时 RI 达到了最高, 为 39.90%。HWSP 对肝癌细胞的生长具有较高度度的抑制作用, 在 0.200 0 g/L 的剂量下, RI 高达 62.59%, 与临床常用的化疗药物 DHI 的抑制水平相近, 而且具有剂量依赖关系。结果见表 1。

表 1 HWSP 组分对体外培养的 CT-26 和 Bel-7402 的抑制作用

Table 1 Inhibition of HWSP fractions on CT-26 and Bel-7402 *in vitro*

组 别	质量浓度/(g · L ⁻¹)	CT-26		Bel-7402	
		$A_{570}(\bar{x} \pm s)$	$RI/\%$	$A_{570}(\bar{x} \pm s)$	$RI/\%$
对照组	—	0.777 ± 0.044	—	0.842 ± 0.031	—
DHI	0.000 5	—	—	0.272 ± 0.004 **	67.70
HWSP	0.010 0	0.614 ± 0.021 *	20.98	0.576 ± 0.021 *	31.59
	0.050 0	0.636 ± 0.032 *	18.15	0.551 ± 0.018 **	34.56
	0.100 0	0.467 ± 0.014 **	39.90	0.418 ± 0.015 **	50.36
	0.200 0	0.597 ± 0.012 *	23.17	0.315 ± 0.007 **	62.59

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

3.2 HWSP 经凝胶柱色谱分离的各组分的体外抗肿瘤活性: 基于上述结果, 为明确 HWSP 中具抗癌活性的关键组分, 首先采用凝胶柱色谱对 HWSP 进行分离。洗脱结果如图 1 所示。将洗脱的糖峰按相对分子质量分布分成 3 部分, 根据标准相对分子质量多糖在相同的柱子和洗脱条件下的洗脱体积与相对分子质量的关系, 确定分别收集相对分子质量分布大于 7×10^5 的组分 P_1 、相对分子质量分布在 $7 \times 10^4 \sim 7 \times 10^5$ 的组分 P_2 以及相对分子质量分布低于 5.5×10^4 的组分 P_3 , 并对 3 个组分进行体外活性跟踪实验, 结果见表 2。组分 P_3 具有显著的抑制 CT-26 生长的生物活性, 在 0.10、0.20 g/L 的质量浓度时, 其 RI 均高于 65%。 P_1 、 P_2 对 CT-26 的抑制活性较低, RI 均低于 30%。即 HWSP 对 CT-26 起抑制作用的关键活性组分为 P_3 。组分 P_2 则对 Bel-

7402 细胞无抑制作用, 组分 P_1 、 P_3 体外对 Bel-7402 细胞均具有显著的抑制效果。在相同质量浓度下, P_1 组分的抑制效果要优于 P_3 , 但二者单独用药时的抑制效果并没有明显高于 HWSP 粗品, 推测二者之间

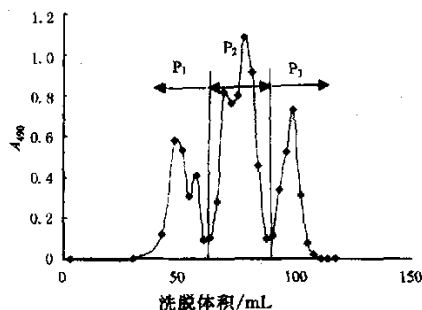


图 1 HWSP 的凝胶柱色谱洗脱图谱

Fig. 1 Elution pattern of HWSP on gel column chromatography

表 2 HWSP 经凝胶柱色谱洗脱的 3 个组分对体外培养的结肠癌细胞 CT-26 和肝癌细胞 Bel-7402 的抑制作用

Table 2 Inhibition of three fractions eluted by gel column chromatography on CT-26 and Bel-7402 *in vitro*

组别	质量浓度/(g · L ⁻¹)	CT-26		Bel-7402	
		$A_{570}(\bar{x} \pm s)$	$RI/\%$	$A_{570}(\bar{x} \pm s)$	$RI/\%$
对照组	—	0.937 ± 0.013	—	0.731 ± 0.026	—
DHI	—	—	—	0.252 ± 0.019	65.53
P_1	0.05	0.810 ± 0.018	13.55	0.473 ± 0.025 **	35.27
	0.1	0.677 ± 0.050 *	27.75	0.351 ± 0.005 **	52.00
	0.2	0.679 ± 0.043 *	27.53	0.311 ± 0.053 **	57.44
P_2	0.05	0.794 ± 0.012	15.26	0.666 ± 0.025	8.86
	0.1	0.774 ± 0.036	17.40	0.575 ± 0.046	21.34
	0.2	0.667 ± 0.015 **	28.82	0.649 ± 0.033	11.25
P_3	0.05	0.686 ± 0.039 *	26.79	0.515 ± 0.029 **	29.55
	0.1	0.318 ± 0.003 **	66.06	0.458 ± 0.045 **	37.35
	0.2	0.308 ± 0.001 **	67.13	0.445 ± 0.016 **	39.12

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

在药效上可能存在着某种程度上的协同增效作用。

3.3 凝胶分离的各组分的单糖组成分析:由表3可以看出, P_1 和 P_3 两个组分均是以葡萄糖为主,此外均含有较多的甘露糖; P_2 则是以甘露糖为主。对CT-26起主要抑制作用的 P_3 组分与其他两个组分的单糖组成的主要差异在于其不含有岩藻糖;对Bel-7402起抑制作用的组分 P_1 及 P_3 ,在单糖组成上主要表现在鼠李糖的变化上,如活性最强的 P_1 组分鼠李糖的量最高,活性次之的 P_3 组分鼠李糖量略低于 P_1 ,而对Bel-7402没有抑制活性的 P_2 组分则未检出有鼠李糖的存在。

表3 HWSP经凝胶柱色谱洗脱的3个组分的单糖组成

Table 3 Sugar components of HWSP fractions eluted by gel column chromatography

组分	Rha	Ara	Xyl	Fuc	Man	Gal	Glc
P_1	7.8	—	10.0	15.4	30.9	10.8	100
P_2	—	9.1	10.3	11.5	147.5	14.0	100
P_3	4.8	11.6	4.7	—	67.8	11.9	100

4 讨论

姬松茸是一种具有治疗和保健作用的药食同源真菌,其丰富的多糖作为一种低毒而免疫活性强的物质引起了广泛的关注。本实验采用热水提取深层发酵菌丝体得到了水溶性多糖HWSP,其对体外培养的不同肿瘤细胞具有一定程度的选择性杀伤作用,值得关注的是它与化疗药物盐酸多柔比星对肝癌Bel-7402细胞具有相当的抑制作用,此结果尚未见其他资料报道。HWSP对Bel-7402的抑制效果要远高于CT-26,这种差异可能是由于不同的肿瘤细胞有不同的凋亡阈,即对药物浓度和/或药物类型的敏感性不同所致^[8]。越来越多的证据表明,目前常用的抗癌药、激素和热疗的作用机制之一就是引发肿瘤细胞凋亡,也有研究表明某些多糖在体外对肿瘤细胞的生长有抑制作用,其作用机制与细胞周期改变以及某些相关基因的表达有关^[9]。本实验亦通过显微镜观察看出,HWSP对肿瘤细胞作用的直观形态效果与化疗药物盐酸多柔比星相类似,均使肝癌细胞发生皱缩、变形,关于HWSP对肿瘤细胞是否具有诱导其凋亡的作用,需要进一步通过实验验证。

糖的化学结构是其生物活性的基础,多糖受单糖组成、相对分子质量的大小、糖苷键的连接方式、多糖的立体结构等多种因素的影响,从而呈现出生理活性的多样性。多糖具有独特复杂的化学结构,决定了对其构效关系研究的复杂性和难度,目前仍尚无统一的规律和结论。由于具有生物学活性的不同

的多糖有其最佳相对分子质量范围,所以本实验首先采用凝胶柱色谱对HWSP进行分离,利用相对分子质量分布差异洗脱,得到3个主要的糖峰。结合体外抗肿瘤效果的差异,对具有不同生物活性的组分的相对分子量分布及单糖组成情况进行了初步分析:对CT-26细胞而言,相对分子量分布低于 5.5×10^4 的组分 P_3 具有较高的抑制效果,与其他两个无明显抑制效果的组分在单糖组成上主要体现在 P_3 不含有岩藻糖;对Bel-7402而言,具有抑制效果的两个组分 P_1 、 P_3 ,相对分子量分别分布在大于 7×10^5 和低于 5.5×10^4 两个区间内,而在单糖组成上则表现出活性与鼠李糖的有无及含量的变化有一定的相关性,即鼠李糖的量高,抑制活性相对较强,而不含鼠李糖的组分 P_2 则对Bel-7402无抑制作用。活性组分 P_1 、 P_3 单独用药时对Bel-7402的抑制效果并没有明显高于HWSP粗品,推测二者之间在药效上可能存在着某种程度上的协同增效作用。上述只是针对本姬松茸菌丝体多糖对CT-26和Bel-7402细胞体外抑制活性规律的一个初步观察结果,为揭示其构效关系,还需要从更为详尽的一组结构和高级结构上进行大量的实验来进行解析。

References:

- [1] Kawariharatake M. *Agaricus blazei* Murill, Medicinal and dietary effects [J]. *Food Rev Int*, 1995, 11(1): 167-172.
- [2] Mizuno T, Hagiwara T, Nakamura T, et al. Studies on the best-mediated antitumor polysaccharides. Part X. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from himematsutake, the fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murill [J]. *Agric Biol Chem*, 1990, 54, 2897-2905.
- [3] Mizuno M, Minato K I, Ito H, et al. Anti-tumor polysaccharide from the mycelium of liquid-cultured *Agaricus blazei* Murill. [J]. *Biochem Mol Biol Int*, 1999, 47(4): 707-714.
- [4] Liu C J, Gu W Y. Studies on immunomodulatory function of *Agaricus blazei* Murill polysaccharide [J]. *J Wuxi Light Ind Univ* (无锡轻工大学学报), 2002, 21(2): 167-169.
- [5] Chen C, Wang J, Li X Y, et al. An experimental study on *Liangjin* mushroom polysaccharide inducing HL-60 cell apoptosis [J]. *Chin J New Drugs Clin Rem* (中国新药与临床杂志), 2002, 21(6): 349-352.
- [6] Fujimiya Y, Suzuki Y, Oshiman K I, et al. Selective tumoricidal effect of soluble proteoglycan extracted from the basidiomycete, *Agaricus blazei* Murill, mediated via natural killer cell activation and apoptosis [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 1998, 46: 147-159.
- [7] Englyst H, Wiggins H S, Cummings J H. Determination of the non-starch polysaccharides in plant foods by gas-liquid chromatography of constituents sugars alditol acetates [J]. *Analysis*, 1982, 7: 307-318.
- [8] Fisher D E. Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold [J]. *Cell*, 1994, 78: 539-542.
- [9] Zhou Y. Advances in studies on antitumor activity of polysaccharide [J]. *Foreign Med Sci, Sect Hygiene* (国外医学:卫生学分册), 2001, 28(3): 129-132.