

- on blood glucose, blood lipid and free radicals in rats with diabetes mellitus [J]. *Pharmacol Res*, 2005, 51: 147-152.
- [13] Huseyin O, Nurten O, Ramazan Y, et al. Effects of caffeic acid phenethyl ester on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat heart [J]. *Clin Biochem*, 2005, 38: 191-196.
- [14] Matsushige K, Basnet P, Hase K, et al. Propolis protects pancreatic-cells against toxicity of streptozotocin (STZ) [J]. *World Notes, Phytomed*, 1996, 3: 203-209.
- [15] Takagi Y, Choi I S, Yamashita T, et al. Immune activation and radioprotection by propolis [J]. *Am J Chin Med*, 2005, 33(2): 231-240.
- [16] Park J H, Lee J K, Kim H S, et al. Immunomodulatory effect of caffeic acid phenethyl ester in Balb/c mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2004, 4(3): 429-436.
- [17] Orsolic N, Sver L, Terzic S, et al. Peroral application of water-soluble derivative of propolis (WSDP) and its related polyphenolic compounds and their influence on immunological and antitumour activity [J]. *Vet Res Commun*, 2005, 29(7): 575-593.
- [18] Hu Y X, Hu C S, Hu Y M, et al. Effects of Beijing Propolis on Immune Function in Mice [J]. *Pract Prev Med (实用预防医学)*, 2005, 12(5): 1049-1052.
- [19] Shao Y. Immune function regulating of propolis on mice [J]. *Zhejiang J Integr Tradit Chin West Med (浙江中西医结合杂志)*, 2005, 15(2): 90-92.
- [20] Havsteen, Bent H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids [J]. *Pharmacol Ther*, 2002, 96: 67-202.
- [21] Bai F M, Cai T Y. The advances of bioactivities and mechanism of flavanoids [J]. *Food Sci (食品科学)*, 1999 (8): 11-13.
- [22] Jin G X, Gong H M, Duan W Z, et al. Prophylaxis experiment of fengbei huayu capsule on the microvessel lesion in diabetic rats [J]. *Chin J Chin Rehabil (中国临床康复)*, 2005, 9(27): 96-98.
- [23] Zheng H Y, Chang Y Q, Chang X T, et al. Animal study on the blood lipid's regulation by the propolis flavonoids [J]. *Food Sci (食品科学)*, 2004, 25(5): 169-171.
- [24] Qian R H, Zhao F, Zhu J P. Reducing blood lipids effect of propolis in rats [J]. *Prev Treat Cardio-Cerebral-Vascul Dis (心脑血管病防治)*, 2003, 3(4): 24-25.
- [25] Hu F L, Zhan Y F, Chen M L, et al. Effects of propolis on blood lipid and liver lipid of hyperlipidemic SD rats [J]. *J Zhejiang Univ, Agric Life Sci (浙江大学学报: 农业与生命科学版)*, 2004, 30(5): 510-514.
- [26] Li J H, Yang Z X, Wang Q H, et al. Effect of ginkgo leaf placental and propolis compound on cholesteol MDA content and spleen weight of rat of hyperlipidemia [J]. *J Qiqihar Med Coll (齐齐哈尔医学院学报)*, 2002, 23(12): 1321-1322.
- [27] Tian Q J, Yin Y, Li Y L, et al. Study on regulating blood lipid effect of propolis [J]. *J Geriatr (老年学杂志)*, 1991, 11(6): 357.
- [28] Huang W C. Application of bee products on metabolic disease and arteriosclerotic treatment [J]. *Apicult Chin (中国养蜂)*, 1998, 49(6): 35.
- [29] Anila K, Vijayalakshmi N R. Flavonoids from *Embolia officinalis* and *Mangifera indica*-effectiveness for dyslipidemia [J]. *J Ethnopharmacol*, 2002, 79: 81-87.

金针菇生物活性物质结构与功能的研究进展

金 湘¹, 姜 恺², 毛培宏^{1,2*}

(1. 新疆大学 离子束生物技术中心, 新疆 乌鲁木齐 830008; 2. 新疆特殊环境微生物重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830000)

摘 要: 金针菇 *Flammulina velutipes* 含有多种生物活性物质, 具有很高的药用价值。总结了近年来金针菇中火菇素 (flammulin)、溶细胞素 (flammutoxin)、免疫调节蛋白 (Fip-five)、抗病毒蛋白、跨上皮电抗性蛋白 (TEER-TDP) 和金针菇多糖 (FVP) 的研究进展。

关键词: 金针菇; 火菇素; 溶细胞素; 免疫调节蛋白 Fip-five

中图分类号: Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2007)10-1596-03

Advance in studies on structures and functions of bioactive metabolites from *Flammulina velutipes*

JIN Xiang¹, LOU Kai², MAO Pei-hong^{1,2}

(1. Center of Ion Beam Biotechnology, Xinjiang University, Urumqi 830008, China; 2. Key Laboratory of Microorganisms in Xinjiang Specific Environment, Urumqi 830000, China)

Key words: *Flammulina velutipes* (Curt. ex Fr.) Sing.; flammulin; flammutoxin (FTX); Fip-five

金针菇 *Flammulina velutipes* (Curt. ex Fr.) Sing. 是一种传统的食用菌, 由于其含有多糖、糖蛋白、蛋白聚糖、火菇素、火菇毒素、倍半萜等多种生物活性物质^[1,2], 而被认为

具有很高的药用价值。长期以来, 众多学者对其生物学特性、营养成分、保健功效以及开发应用进行了广泛的研究。本文主要综述近年来金针菇火菇素 (flammulin)、火菇毒素

收稿日期: 2007-03-29

基金项目: 新疆特殊环境微生物实验室开放基金项目 (XJYSO203-2005-01)

作者简介: 金 湘 (1960—), 女, 新疆奇台人, 助理研究员, 主要从事微生物学、分子生物学和离子束生物技术相关领域研究, 先后在国内外学术期刊发表研究论文 31 篇 (其中 SCI 4 篇)。 Tel: (0991) 4543656 E-mail: jinxiang@xj.cninfo.net

* 通讯作者 毛培宏 Tel: (0991) 4543656 E-mail: phmao@china.com phmao@xju.edu.cn

(flammutoxin, FTX)、免疫调节蛋白 Fip-five、抗病毒蛋白、跨上皮电抗性蛋白 (TEER-TDP) 和金针菇多糖 (FVP) 研究方面的进展。

1 火菇素 (flammutoxin)

火菇素是金针菇中具有抗癌活性和增强免疫功能的一种结构简单的碱性蛋白质^[3]。Ishikawa 等最先获得了金针菇原火菇素,并证实它具有抗癌作用。周凯松等^[4]首次研究了火菇素的理化性质,其相对分子质量为 1.98×10^4 , 不含蛋氨酸。周凯松等^[5]应用免疫学方法,检测了金针菇的菌丝体和子实体,结果只在子实体中发现了与火菇素抗体相结合的抗原信号,同时,以火菇素为抗原制备的抗血清为探针,对构建的金针菇 cDNA 表达文库进行免疫印迹筛选,获得了金针菇火菇素相关基因的阳性克隆^[6,7]。对火菇素生物合成相关基因的进一步研究,将为构建火菇素高产量和高速率表达的工程菌株奠定基础。

2 火菇毒素 (flammutoxin, FTX)

FTX 产生于金针菇子实体发育与生长阶段,是一种相对分子质量为 3.1×10^4 的心脏毒素蛋白,具有细胞溶解作用。Tomita 等^[8]应用平面脂质双分子层通道技术,以内外孔径分别为 5 和 10 nm 的环状低聚体为靶细胞,研究了 FTX 的电生理学特性。在由磷脂和胆固醇组成的双分子层中,当对电压门控离子通道施加较大电流 (20~30 pA) 和较小电流 (1.0~4.5 pA) 时,发现 FTX 呈现两种不同类型的阳离子选择性:细胞溶解酶的复合物状态和聚集毒素的中间状态。随后, Tomita 等^[9]分析了 FTX 的氨基酸序列,并进行了 FTX 基因克隆与表达研究。

FTX 由 251 个氨基酸组成,与其前体氨基酸序列相比,少了 C 端 20 个氨基酸残基,其他则与其前体氨基酸序列一致。通过基因突变, Tomita 等^[9]获得了不含 C 端 20 个氨基酸残基的重组 FTX (rFTX251)。与天然 FTX 一样, rFTX251 在溶液中呈单体状态,在人工细胞上呈环状孔聚体,引起细胞溶解。而含 C 端 20 个氨基酸残基的重组 FTX (rFTX271) 与 rFTX251 相反,在溶液中呈二聚体,黏附于人红细胞表面,不引起细胞溶解。当用胰蛋白酶水解 rFTX271 二聚体 Lys241 与 Met252 的肽键后, rFTX271 可转变为具有溶细胞作用的单体。这些研究结果说明了 FTX 是金针菇蛋白质合成过程中的后续加工修饰的产物,而含有 271 个氨基酸残基的前体没有生物活性。

3 免疫调节蛋白 Fip-five

Fip-five 是从金针菇子实体中分离提取的相对分子质量为 1.3×10^4 蛋白质,由 114 个氨基酸组成,不含组氨酸、半胱氨酸和蛋氨酸,但富含天冬氨酸和缬氨酸, N 端为乙酰化氨基酸, N 端紧接着的 α -螺旋中包含一个“假 h 型拓扑结构”。Fip-five 与人类和鼠类免疫球蛋白 Ig-A 重链可变区的同源性为 28%,其中 11% 高度保守,与来源于草菇免疫调节蛋白 Fip-vvo 和灵芝免疫调节蛋白 LZ-B 的同源性为 60%~70%^[10,11]。

Fip-five 的结构和功能与植物凝集素和免疫球蛋白的结

构和免疫功能相似,并对食物过敏性免疫反应和过敏性呼吸道疾病也有预防和治疗作用^[12,13]。特别有意义的是, Wang 等^[14]在研究 Fip-five 对 T 细胞的激活作用时发现,其对于干扰素 (IFN) 的产生和分泌具有显著的促进作用。

Ko 等^[15]将 Fip-five 基因转入大肠杆菌 *E. coli* TG1 中,获得的重组 Fip-five 具有与天然 Fip-five 一样的免疫调节活性,但对人外周血淋巴细胞促分裂的活性仅为天然 Fip-five 的 50%。由于原核微生物缺乏蛋白质合成的后续加工和修饰机制, Fip-five 基因在 *E. coli* 中表达所获得的重组 Fip-five 难以形成具有完整生物活性的二聚体结构,因此,利用真核表达系统获得重组 Fip-five,值得进一步研究。

4 抗病毒蛋白

目前已从金针菇子实体中分离纯化出 2 种具有抗病毒活性的蛋白质。Wang 等^[16]获得的相对分子质量 1.38×10^4 的单链核糖体失活蛋白对艾滋病病毒 (HIV-1) 的反转录酶具有抑制作用。付鸣佳等^[17,18]获得的相对分子质量 3×10^4 的不含糖基的蛋白 Zb 对乙型肝炎病毒 (HBV) 的 HbsAg 具有明显的抑制作用。这 2 种蛋白除了具有抗病毒活性外,前者对 β -糖苷酶和 β -糖苷酶均有抑制作用,而后者不仅对胃癌细胞有抑制作用,还具有凝血活性。

5 跨上皮电抗性蛋白 (TEER-TDP, TDP)

TDP 是一种非糖基化水溶性蛋白,相对分子质量约为 3×10^4 。TDP cDNA 的 ORF 编码 272 个氨基酸,与已知的蛋白质无同源性,被认为是一种新蛋白质。TDP 的生物活性主要表现为能快速降低人肠细胞的跨上皮电抗性,并同时提高细胞旁通透性 (paracellular permeability)。尽管 TDP 的 N 端序列与 FTX 完全一致,但 TDP 对细胞无毒性,也无促细胞分裂作用^[19,20]。

6 金针菇多糖 (FVP)

FVP 是一个以葡聚糖为主,由数个多糖组分构成的混合多糖^[21],其空间结构决定其生物活性^[22]。研究证明, FVP 对肝脏损伤有保护作用,对小鼠肿瘤 S₁₈₀、Hep3 和 H₂₂、L615 及 Lewis 肺癌均有明显的抑制作用^[23,24],是抗肿瘤、抗白血病的有效物质,其主要作用机制是干扰肿瘤细胞的有丝分裂,抑制肿瘤组织的非特异性酯酶活性,增加机体的体液免疫功能。特别是 FVP 对化疗药物环磷酰胺具有一定的增效减毒作用^[25]。此外, FVP 对烟草花叶病毒和黄瓜黄叶病毒有明显的抑制作用^[26],并能诱导甜瓜产生抗白粉病的能力^[27]。

7 展望

金针菇是一种小型食用菌,子实体丛生,菌盖滑嫩,其直径仅 2 cm 左右。但这种小型的子实体中包含了多种有生物活性的蛋白质、萜类和多糖类物质。由于这些天然生物活性物质的量很低,限制了其在医疗领域中的应用。因此,以提高这些生物活性物质产量为目标的常规育种、分子育种^[28]和人工栽培技术将是金针菇育种研究的一个重要方向。

随着研究手段的不断更新和多种研究方法的应用^[29,30],将在金针菇中发现更多的生物活性物质。虽然金针菇的一些生物活性蛋白基因、酶基因已被克隆和表达^[6,7,9,15,19,31~34],

但仍有很大的研究潜力。

新疆特殊环境中大型药用真菌资源丰富^[35], 绝大部分还不能进行人工栽培, 而且天然产量低, 受季节限制, 根本满足不了医药市场的需求。借鉴金针菇生物活性物质研究的方法和技术, 结合蛋白质组学和高通量筛选技术, 将极大地提高这些药用真菌的研究水平, 将进一步推动这些药用真菌功能基因的克隆和表达研究进程。

References:

- [1] Ishikawa N K, Yamaji K, Tahara S, et al. Highly oxidized cuparene-type sesquiterpenes from a mycelial culture of *Flammulina velutipes* [J]. *Phytochemistry*, 2000, 54(8): 777-782.
- [2] Ishikawa N K, Fukushi Y, Yamaji K, et al. Antimicrobial cuparene-type sesquiterpenes, enokipodins C and D, from a mycelial culture of *Flammulina velutipes* [J]. *J Nat Prod*, 2001, 64(7): 932-934.
- [3] Zhou K S, Peng J F, Chang N, et al. Purification and crystallization of flammulin, a basic protein with anti-tumor activities from *Flammulina velutipes* [J]. *Chin Chem Lett*, 2003, 14(7): 713-716.
- [4] Chen C, Xue J G, Zhou K S, et al. Purification and characterization of flammulin, a basic protein with anti-tumor activities from *Flammulina velutipes* [J]. *J Chin Pharm Sci (中国药科学英文版)*, 2003, 12(2): 60-65.
- [5] Zhou K S, Lu P, Xue J G, et al. Detection of flammulin with immunoblot [J]. *Microbiology (微生物学通报)*, 2004, 31(1): 10-13.
- [6] Zhou K S, Chang N, Peng J F, et al. Construction of cDNA expression library of *Flammulina velutipes* [J]. *Mycosystema (菌物系统)*, 2003, 22(1): 101-106.
- [7] Zhou K S, Xue J G, Huang F, et al. Purification of flammulin and preliminary immunoscreening of its cDNA [J]. *J Shandong Univ: Sci Ed (山东大学学报: 理学版)*, 2004, 39(2): 120-124.
- [8] Tadjibaeva G, Sabirov R, Tomita T. Flammutoxin, a cytolysin from the edible mushroom *Flammulina velutipes*, forms two different types of voltage-gated channels in lipid bilayer membranes [J]. *BBA/Biomembranes*, 2000, 1467(2): 431-443.
- [9] Tomita T, Mizumachi Y, Chong K, et al. Protein sequence analysis, cloning, and expression of flammutoxin, a pore-forming cytolysin from *Flammulina velutipes* [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(52): 54161-54172.
- [10] Ko J L, Hsu C H. A new fungal immunomodulatory protein, FIP-fve isolated from the edible mushroom, *Flammulina velutipes* and its complete amino acid sequence [J]. *Eur J Biochem*, 1995, 228: 244-249.
- [11] Seow S V, Kuo I C. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies on the fungal immunomodulatory protein Fve from the golden needle mushroom (*Flammulina velutipes*) [J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2003, 59(8): 1487-1489.
- [12] Hsieh K Y, Hsu C I. Oral administration of an edible-mushroom-derived protein inhibits the development of food-allergic reactions in mice [J]. *Clin Exp Allergy*, 2003, 33(11): 1595-1602.
- [13] Liu Y H, Kao M C. Efficacy of local nasal immunotherapy for Dp2-induced airway inflammation in mice: using Dp2 peptide and fungal immunomodulatory peptide [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2003, 112(2): 301-310.
- [14] Wang P H, Hsu C I, Tang S C, et al. Fungal Immunomodulatory protein from *Flammulina velutipes* induces interferon-production through p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway [J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(9): 2721-2725.
- [15] Ko J L, Lin S J. Molecular cloning and expression of a fungal immunomodulatory protein, Fip-fve, from *Flammulina velutipes* [J]. *J Formos Med Assoc*, 1997, 96(1): 517-524.
- [16] Wang H, Ng T B. Isolation and characterization of velutin, a novel low-molecular-weight ribosome-inactivating protein from winter mushroom (*Flammulina velutipes*) fruiting bodies [J]. *Life Sci*, 2001, 68(18): 2151-2158.
- [17] Fu M J, Wu Z J, Lin Q Y, et al. The purification of antiviral portein in *Flammulina velutipes* and its characteristic against tobacco mosaic virus [J]. *J Fujian Agri Forest Univ: Nat Sci (福建农林大学学报: 自然科学版)*, 2003, 32(1): 84-88.
- [18] Fu M J, Wu Z J, Lin Q Y, et al. Change in protein content of *Flammulina velutipes* and biological activities of one protein [J]. *Chin J Appl Environ Biol (应用与环境生物学报)*, 2005, 11(1): 40-44.
- [19] Watanabe H, Narai A, Shimizu M. Purification and cDNA cloning of a protein derived from *Flammulina velutipes* that increases the permeability of the intestinal Caco-2 cell monolayer [J]. *Eur J Biochem*, 1999, 262: 850-857.
- [20] Narai A, Watanabe H, Iwanaga T, et al. Effect of a pore-forming protein derived from *Flammulina velutipes* on the Caco-2 intestinal epithelial cell monolayer [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004, 68(11): 2230-2238.
- [21] Qin X M, Yu J, Ning E C, et al. Primary studies on polysaccharide compositions from *Flammulina velutipes* [J]. *Acta Edulis Fungi (食用菌学报)*, 2005, 12(2): 27-31.
- [22] Xie C, Gao X D, Wang J, et al. Studies on dimensional structure and biological activity of *Flammulina velutipes* polysaccharides containing germanium [J]. *J China Pharm Univ (中国药科大学学报)*, 2004, 35(6): 576-580.
- [23] Wu X Z, Gao X D. The liver-protective and anti-tumor effects of extract from *Flammulina velutipes* in mice [J]. *Chin J Biochem Pharm (中国生化药物杂志)*, 2002, 23(4): 176-178.
- [24] Miao L C, Wang L Q, Wu D. Experimental study on the effect of Fvp on antitumor and antileukemia in mice [J]. *Pharm J Chin PLA (解放军药科学学报)*, 2003, 19(3): 171-173.
- [25] Yuan Q, Chen Z Y, Yan M X. Influences of FVP on the curative and negative effects of CTX [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2005, 30(12): 933-935.
- [26] Zhang C, Cao H Q, Chen L, et al. Preliminary study on the inhibition of polysaccharide of edible fungi to plant virus [J]. *J Anhui Agric Univ (安徽农业大学学报)*, 2005, 32(1): 15-18.
- [27] Zhang Q X, Wang Y, Zhang L Q. Mannose oligosaccharides and culture extract of *Flammulina velutipes* induce systemic resistance on melo [J]. *Acta Phytopathol Sin (植物病理学报)*, 2005, 35(1): 87-89.
- [28] Liu W X, Xie B G, Wang X Q, et al. Studies on RAPD markers of color gene in *Flammulina velutipes* [J]. *Chin Agric Sci Bull (中国农学通讯)*, 2005, 21(9): 54-56.
- [29] Sakamoto Y, Ando A, Tamai Y, et al. Protein expressions during fruit body induction of *Flammulina velutipes* under reduced temperature [J]. *Mycol Res*, 2002, 106: 222-227.
- [30] Jiang S X, Chen W B, Shao B Y, et al. Cloning and sequencing of an endogenous unknown gene in six species of fungus [J]. *Food Sci (食品科学)*, 2004, 25(10): 270-272.
- [31] Nakai R, Sen K, Kurosawa S, et al. Cloning and sequencing analysis of Trp1 gene of *Flammulina velutipes* [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2000, 190(1): 51-56.
- [32] Kuo C Y, Chou S Y, Huang C T. Cloning of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and use of the gpd promoter for transformation in *Flammulina velutipes* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 65(5): 593-599.
- [33] Zhang Y B, Jiang Q, Jiang M L, et al. Cloning of a lactase gene from *Flammulina velutipes* and study on its expression in *Pichia pastoris* [J]. *Acta Microbiol Sin (微生物学报)*, 2004, 44(6): 775-779.
- [34] Liu S Q, Guo L Q, Lin J F, et al. The Screening of *Flammulina velutipes* strain producing phytase and cloning of its phytase gene region [J]. *Acta Edulis Fungi (食用菌学报)*, 2005, 12(3): 1-6.
- [35] Mao P H, Jin X, Wang Y, et al. Research and development on the resources of microorganisms in Xinjiang specific environment [J]. *Biotechnol (生物技术)*, 2006, 16(5): 88-91.