

细脚拟青霉多糖 PTPS-1 的结构特征和抗肿瘤活性的初步研究

金丽琴¹, 左江成², 吕建新^{2*}, 李宝剑², 李 东²

(1. 温州医学院临床医学部 生物化学教研室, 浙江 温州 325035; 2. 温州医学院细胞与分子医学研究所, 浙江 温州 325035)

摘 要:目的 分析鉴定细脚拟青霉多糖 PTPS-1 的理化性质和结构特征, 并观察其抗肿瘤活性。方法 采用 DEAE-纤维素及 Sephadex G-100 柱色谱分离纯化得到 PTPS-1; 利用 HPLC、GC、IR、部分酸水解及 NMR 分析 PTPS-1 的相对分子质量、组成和结构特征; 采用 CCK-8 检测观察 PTPS-1 对小鼠脾细胞和 PTPS-1 刺激培养的小鼠腹腔巨噬细胞上清对 Sp2/0 细胞的增殖活性。结果 PTPS-1 的纯度为 98.977%, 平均相对分子质量为 1.84×10^4 , 由甘露糖和半乳糖组成, 二者摩尔比为 1.3 : 1, 糖链结构中主链含有 α -(1→6)、 α -(1→2) 和 β -(1→3) 连接的糖苷键, 支链含有 Gal-(1→3) 连接。PTPS-1 可明显促进小鼠脾细胞的增殖 ($P < 0.01$), PTPS-1 刺激培养的小鼠腹腔巨噬细胞上清能抑制 Sp2/0 细胞的增殖 ($P < 0.01$)。结论 PTPS-1 是从细脚拟青霉中分离出的具有免疫调节和抗肿瘤活性的中性杂多糖。

关键词: 细脚拟青霉; 多糖类; 抗肿瘤活性

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)12-1772-05

Structural characters and antitumor activity of a polysaccharide PTPS-1
from *Paecilomyces tenuipes*JIN Li-qin¹, ZUO Jiang-cheng², LÜ Jian-xin², LI Bao-jian², LI Dong²

(1. Biochemistry Section, Department of Clinic Medicine, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China;

2. Institute of Cellular and Molecular Medicine, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China)

Abstract: **Objective** To investigate the physicochemical properties, structural characters and antitumor activity of a polysaccharide PTPS-1 from *Paecilomyces tenuipes*. **Methods** PTPS-1 was obtained by DEAE-cellulose and Sephadex G-100 chromatography column. The methods of HPLC, GC, IR, and NMR were used to investigate the molecular weight, monosaccharide composition, and structural characters of PTPS-1. The CCK-8 kit was used to determine the proliferation of PTPS-1 on murine splenocyte and the supernatant of the murine macrophage with PTPS-1-stimulated on Sp2/0 cells. **Results** PTPS-1, whose molecular weight was 1.84×10^4 and purity was 98.977%, contained mannose (Man) and galactogen (Gal) as monosaccharide constitute in molar ratio of 1.3 : 1. It consisted of a backbone of α -(1→6), α -(1→2), and β -(1→3) linkage, whose branches were made by Gal-(1→3) linkage. PTPS-1 significantly stimulated the murine splenocyte proliferation and the supernatant of macrophage inhibited the growth of Sp2/0 cells *in vitro*. **Conclusion** PTPS-1 is a polysaccharide from *P. tenuipes* with immunomodulatory and antitumor activity.

Key words: *Paecilomyces tenuipes* (Peck) Samson; polysaccharides; antitumor activity

细脚拟青霉 *Paecilomyces tenuipes* (Peck) Samson 是一种寄生在蛾蛹体和幼虫上的真菌, 为虫草属真菌的无性型阶段^[1], 与名贵中药材冬虫夏草的无性型——中国拟青霉为同属真菌, 两者的化学

成分十分相似。冬虫夏草及其多糖的研究报道很多, 但对细脚拟青霉及其多糖的研究报道还很少。研究表明, 细脚拟青霉能够增加小鼠常压耐缺氧能力, 具镇痛、镇静作用, 可以改善机体的营养状况, 促进生

收稿日期: 2008-05-16

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(301036)

作者简介: 金丽琴(1963—), 女, 浙江温州人, 教授, 硕士生导师, 从事生化免疫药理学研究。

Tel: (0577)86689889 E-mail: liqinjin@126.com

* 通讯作者 吕建新 Tel/Fax: (0577)86689805 E-mail: ljx@wzmc.net

长,逆转免疫抑制作用,增强机体的免疫功能以及加快体内自由基代谢^[2~5]。而细脚拟青霉中的多糖是发挥免疫调节的主要成分之一,这已得到国内外学者的共识。细脚拟青霉多糖(*Paecilomyces tenuipes* polysaccharide, PTPS)能够激活巨噬细胞和单核细胞,增强机体新陈代谢、促进人外周血单个核细胞的增殖和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的表达,增强肠系膜淋巴细胞产生白细胞介素-2 (IL-2)、 γ -干扰素 (IFN- γ)、粒-单核细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 和白细胞介素-10 (IL-10)^[6~8]。鉴于多糖的生物学活性与其相对分子质量、单糖组成和化学结构有关,本实验从细脚拟青霉菌丝体中分离纯化出单一的多糖组分 PTPS-1,分析其结构特征,观察其抗肿瘤活性,为进一步深入研究多糖结构与活性之间的关系打下基础。

1 材料

1.1 仪器:RSZ-100 自动部分收集器(上海青浦沪西仪器厂),冷冻干燥机(北京四环医学仪器厂),DU800 型可见紫外分光光度计(Coulter 公司),高效液相色谱仪(Shimadzu LC210AD),气相色谱仪(Agilent Tec 公司),670FT-IR 红外光谱仪(Nicolet 公司),Bruker Avance-300 核磁共振仪(Bruker 公司),Forma series Ⅱ 隔水式 CO₂ 培养箱(Thermo 公司),酶标仪(Dialab 公司)。

1.2 主要试剂:鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、半乳糖、葡萄糖和葡聚糖对照品(Fluka 产品),RPMI 1640 培养基(Gibco 产品),Cell Counting Kit-8 (CCK-8,日本同仁化学研究所)。

2 实验方法

2.1 PTPS-1 制备:细脚拟青霉粗多糖的提取参考文献方法^[6]。粗多糖经 DEAE 纤维素 52 阴离子柱(30 cm×2.6 cm)色谱,0~0.5 mol/L 的 NaHCO₃ 梯度洗脱,收集主要吸收峰;合并收集的样品再经 Sephadex G-100 凝胶柱(100 cm×3.4 cm 和 100 cm×1.6 cm)色谱纯化,以 0.1 mol/L 的 NaCl 洗脱得纯的细脚拟青霉多糖单一组分 PTPS-1,冷冻干燥备用。

2.2 纯度和相对分子质量测定:PTPS-1 和相对分子质量分别为 25 000、80 000、270 000 和 670 000 的葡聚糖的对照品分别经高效凝胶渗透色谱检测。色谱柱为 Phenomenex Biosep-SEC-S4000(300 mm×7.8 mm),流动相双蒸水,柱温 25 ℃,示差检测器监测。以对照葡聚糖的相对分子质量(M)的对数值与保留时间(R_t)求得标准曲线:lg M = 8.478 77 -

0.330 31 R_t (R^2 = 0.999 2),再由标准曲线求得样品的平均相对分子质量,纯度由峰面积比可知。

2.3 紫外光谱分析:将一定量 PTPS-1 超纯水配制成 1 g/L 溶液,在紫外可见光谱仪上扫描分析,波长范围为 200~400 nm。

2.4 单糖组成分析:取多糖 PTPS-1 25 mg,制备糖醇乙酸酯衍生物^[9]。气相色谱条件为:HP-5 色谱柱(30 m×0.32 mm,液膜 0.25 μ m);氮气:1 mL/min,氢气:40 mL/min,空气:450 mL/min;柱温 220 ℃,气化室温度和检测器温度均为 250 ℃;上样量 1 μ L。另取标准单糖混合物同上衍生化,作单糖气相色谱标准。

2.5 高碘酸氧化:称取多糖 PTPS-1 样品 28 mg 溶解于 28 mL 的 15 mmol/L 的 NaIO₄ 溶液中,避光 4 ℃ 反应。按 4、12、24、48、72 h……间隔取样 1 μ L,以 250 倍蒸馏水稀释,用紫外分光光度计在 223 nm 测吸光度(A),至吸光度达一稳定值后,加乙二醇终止反应。用标定为 4.798 mmol/L 的 NaOH 滴定,测定 NaIO₄ 的消耗量和甲酸的生成量。

2.6 红外光谱分析:取 1 mg 干燥的多糖 PTPS-1,经 KBr 压片,在 700~4 000 cm⁻¹ 中红外区扫描,记录红外光谱图。

2.7 PTPS-1 的部分酸水解:取 PTPS-1 150 mg 溶解于 0.05 mol/L 的三氟乙酸,100 ℃ 反应 1 h,减压蒸发去除三氟乙酸,置透析袋于蒸馏水透析 48 h,袋内多糖部分减压浓缩。浓缩液于 Sephadex G-100 凝胶色谱柱纯化后冷冻干燥备用。

2.8 核磁共振:称取 PTPS-1 70 mg 和部分酸水解后的 PTPS-1 35 mg 分别溶解于 0.5 mL D₂O (99.8%) 进行核磁共振 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 分析。

2.9 小鼠脾细胞悬液的制备:取 8 周龄 BALB/C 小鼠(18~22 g),无菌条件下取脾脏制备单个脾细胞悬液。用 0.8% NH₄Cl 溶解红细胞后用 RPMI 1640 液清洗 2 次,以含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液调整脾细胞浓度为 1×10⁷/mL。

2.10 不同浓度 PTPS-1 对小鼠脾细胞增殖活性的影响:将上述脾细胞悬液按 100 μ L/孔接种到 96 孔培养板。设置 5 组,每组设 3 个重复孔。对照组不含 PTPS-1,Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ 组分别加入不同质量浓度的 PTPS-1,得到各组 PTPS-1 的终质量浓度分别为 30、100、300、500 mg/L。每组设 4 个复孔,将细胞培养于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中 48 h 后,每个实验孔加 10 μ L CCK-8 试剂再培养,4 h 后取出培养板于酶标仪上 450 nm 处测 A 值,计算增殖率。

$$\text{增殖率} = \frac{(\text{实验组 } A \text{ 值} - \text{对照组 } A \text{ 值})}{\text{对照组 } A \text{ 值}} \times 100\%$$

2.11 不同质量浓度 PTPS-1 刺激培养小鼠腹腔巨噬细胞上清的获取:常规方法取小鼠腹腔巨噬细胞,用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 液调节细胞浓度为 $2 \times 10^6/\text{mL}$,按 $200 \mu\text{L}/\text{孔}$ 接种于 96 孔培养板,分别加入不同质量浓度的 PTPS-1,得到各组 PTPS-1 的终质量浓度分别为 0、30、100、300、500 mg/L。每组设 4 个复孔,将细胞培养于 37°C 、5% CO_2 培养箱中 48 h,收集各组上清备用。

2.12 不同质量浓度 PTPS-1 刺激培养小鼠巨噬细胞上清的抗肿瘤实验:取对数生长期的 Sp2/0 细胞,调节细胞浓度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$,按 $70 \mu\text{L}/\text{孔}$ 加到 96 孔培养板,设置①对照组:加 $30 \mu\text{L}$ 上述未经 PTPS-1 刺激培养的小鼠巨噬细胞上清;②PTPS-1 刺激培养小鼠巨噬细胞的上清各组即 I、II、III、IV 组:分别加入 $30 \mu\text{L}$ 上述经不同质量浓度 PTPS-1 刺激培养的小鼠巨噬细胞上清,每组设 4 个复孔。将细胞培养于 37°C 、5% CO_2 培养箱中 48 h 后,每个实验孔加 $10 \mu\text{L}$ CCK-8 试剂再培养,2 h 后取出培养板于酶标仪上 450 nm 处测 A 值,以 A 值判定细胞的生长状况,计算抑制率。

$$\text{抑制率} = \frac{(\text{对照组 } A \text{ 值} - \text{实验组 } A \text{ 值})}{\text{对照组 } A \text{ 值}} \times 100\%$$

2.13 统计学处理:数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 11.5 软件的单因素方差分析(One-way ANOVA)作总体差异显著性检验,各组间两两比较采用 LSD 法。

3 结果

3.1 多糖的理化性质与结构特征

3.1.1 多糖的提取与纯化:从菌丝体中提取的多糖经 DEAE-纤维素-52 柱色谱纯化,得到 f_1 、 f_2 和 f_3 3 个组分。 f_1 再经 Sephadex G-100 柱色谱多次纯化后,色谱图峰形对称,无杂峰和拖尾,说明 f_1 为纯品。收集后经透析、冷冻干燥,样品性状为白色、易溶于水的结晶体,命名为 PTPS-1。

3.1.2 PTPS-1 质量分数和相对分子质量:PTPS-1 的高效液相分析可知,从 PTPS-1 所占的峰面积比确定 PTPS-1 的质量分数为 98.977%,根据系列标准葡聚糖的相对分子质量和对应保留时间的标准曲线,由 PTPS-1 的保留时间 12.758 min,计算出 PTPS-1 的相对分子质量为 1.84×10^4 。

3.1.3 紫外光谱分析:PTPS-1 的水溶液经紫外扫描在 260 nm 和 280 nm 处没有吸收峰,表明 PTPS-1 不含蛋白和核酸。

3.1.4 单糖组成分析:PTPS-1 经糖醇衍生化后的

气相色谱图只有 2 个峰,保留时间分别为 7.340、7.621 min,与标准单糖气相色谱中甘露糖和半乳糖的保留时间 7.364、7.650 min 极为相近,因此,PTPS-1 由甘露糖和半乳糖组成,二者经校正的摩尔比为 1.3:1。

3.1.5 红外光谱分析:红外光谱图上每一个吸收峰都对应于分子中原子或官能团振动情况。多糖 PTPS-1 在 3368.3 cm^{-1} 处为 O-H 的伸缩振动, 2933.2 cm^{-1} 处为 C-H 的伸缩振动, 1646.7 cm^{-1} 处为 C=O 的伸缩振动, 1418 cm^{-1} 和 1380 cm^{-1} 处为 C-H 的变角振动, 1035.8 cm^{-1} 处的强吸收峰显示此处为吡喃环的 C-O 的伸缩振动, 890 cm^{-1} 处表明糖残基中有为 β 构型的糖苷键, 820 cm^{-1} 处的吸收峰说明多糖中含有甘露糖。

3.1.6 高碘酸氧化:PTPS-1 经高碘酸氧化一个糖残基分子消耗 1.089 分子高碘酸同时生成 0.48 分子甲酸,高碘酸消耗量稍大于甲酸生成量的 2 倍,由此可推知多糖分子中存在较多的 1 $\rightarrow$ 2 或 1 $\rightarrow$ 6 连接的糖苷键,高碘酸消耗量及甲酸生成量说明分子中可氧化糖基占 60.9%,而不可氧化的占 39.1%,说明糖分子中存在 1 $\rightarrow$ 3 或 1 $\rightarrow$ 3,6 键型。

3.1.7 核磁共振谱分析:PTPS-1 水解前后氢谱分析,H1 质子峰的化学位移分布在 δ 4.8~5.3,大于 δ 5.0 的吸收峰为 α 构型的糖苷键,另有部分 H1 质子峰的化学位移小于 δ 5.0,则说明 PTPS-1 中还存在部分 β 构型糖苷键。PTPS-1 水解前后异头碳区域化学位移大于 δ 103 的异头碳,可确定是 β -半乳糖残基 C-1 的信号;化学位移 δ 81.3~87.4 的吸收峰为半乳糖 C-3 化学位移值,其仅在水解前出现,说明 PTPS-1 的支链为半乳糖 1 $\rightarrow$ 3 连接,化学位移 δ 78.4、78.7 处的吸收峰为甘露糖 C-2 化学位移值,其水解前后均出现,说明 PTPS-1 的主链含有甘露糖 1 $\rightarrow$ 2 连接,PTPS-1 水解前后在 C-6 取代区均存在 δ 67.0 和 68.7 的峰,表明 PTPS-1 主链中有 1 $\rightarrow$ 6 连接的糖苷键。

3.2 PTPS-1 的生物学活性

3.2.1 不同质量浓度 PTPS-1 对小鼠脾细胞增殖活性的影响:结果见表 1,以 A 值表示细胞的增殖程度。脾细胞在不同质量浓度 PTPS-1 的刺激下,均有不同程度的增殖,脾细胞的增殖活性随 PTPS-1 剂量的增加而增加。与对照组比较,PTPS-1 在 100~500 mg/L 均能显著促进小鼠脾细胞的增殖活性 ($P < 0.01$),30 mg/L PTPS-1 组无显著性差异 ($P > 0.05$),表明 PTPS-1 促进脾细胞增殖在一定

质量浓度下具有剂量依赖效应。

表 1 PTPS-1 对小鼠脾细胞增殖活性的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Effect of PTPS-1 on proliferation of murine splenocytes ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	PTPS-1/(mg · L ⁻¹)	A	增殖率/%
对照	0	0.369 ± 0.011	—
I	30	0.398 ± 0.014	7.9
II	100	0.440 ± 0.032**	19.2
III	300	0.455 ± 0.028**	23.3
IV	500	0.467 ± 0.021**	26.6

与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

3.2.2 不同质量浓度 PTPS-1 刺激培养小鼠腹腔巨噬细胞的上清对 Sp2/0 细胞增殖活性的影响: 结果见表 2, 以 A 值表示细胞的增殖程度。500 mg/L PTPS-1 刺激培养小鼠巨噬细胞的上清对 Sp2/0 的抑制作用显著强于对照组 ($P < 0.01$), 其余各组对 Sp2/0 的抑制作用与对照组比较无显著差异 ($P > 0.05$), 提示一定质量浓度的 PTPS-1 能通过巨噬细胞介导而发挥抗肿瘤作用。

表 2 PTPS-1 刺激小鼠巨噬细胞上清对 Sp2/0 细胞增殖活性的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 2 Proliferation of Sp2/0 cells by supernatant of PTPS-1-stimulated murine macrophages ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	PTPS-1/mg · L ⁻¹	A	抑制率/%
对照	0	0.435 ± 0.045	—
I	30	0.401 ± 0.013	7.8
II	100	0.407 ± 0.036	7.1
III	300	0.400 ± 0.032	8.0
IV	500	0.368 ± 0.025**	25.4

与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

4 讨论

本实验通过离子交换和凝胶色谱的方法, 从细脚拟青霉粗多糖中纯化出一种易溶于水的单一多糖组分 PTPS-1, 气相色谱分析表明 PTPS-1 由甘露糖和半乳糖组成, 红外光谱也反映 PTPS-1 中含有甘露糖。核磁共振图谱解析^[10~15], PTPS-1 存在 α 和 β 构型的糖苷键, 主链由甘露糖和半乳糖以 1→6、1→2 和 1→3 连接, 支链主要为半乳糖 1→3 连接, 该结果与高碘酸氧化分析的结果一致。

由于脾细胞中主要含 T、B 淋巴细胞, 而 T、B 淋巴细胞在机体的免疫反应中发挥重要作用, 如产生细胞因子, 抗体等。本实验中, PTPS-1 单独能刺激脾细胞增殖的实验结果表明: PTPS-1 具有多克隆刺激剂的功能, 提示 PTPS-1 可通过刺激 T、B 淋

巴细胞调节免疫系统的功能, 可见该多糖对细胞免疫和体液免疫均有增强作用, 并可能通过免疫调节抑制肿瘤细胞增殖。由于 PTPS-1 随着质量浓度的增加而对脾细胞的促增殖作用逐渐增强, 表明 PTPS-1 促进脾细胞的增殖具有剂量效应。

巨噬细胞是一种具有多种功能的免疫细胞, 其不仅参与机体的特异性和非特异性免疫反应, 而且还参与机体的抗肿瘤免疫监视作用。有研究表明^[16], 只有激活的巨噬细胞能抑制肿瘤细胞的生长、转移, 并且具有强大的胞内杀菌作用和胞外溶瘤作用。本实验中, PTPS-1 在一定质量浓度下刺激培养巨噬细胞的上清能够抑制 Sp2/0 细胞的增殖 ($P < 0.01$), 因此推测 PTPS-1 可能通过激活巨噬细胞产生某些分化诱导因子从而实现抑制 Sp2/0 细胞的生长, 这可能与冬虫夏草多糖诱导单个核细胞产生分化诱导因子 IFN- γ 和 TNF- α 对 U937 细胞的生长抑制作用类似^[17], 还有待进一步深入研究证实。

陆榕等^[18]从细脚拟青霉中分离出一种为 α -(1→6)结合的葡聚糖组分, 与天然存在的 Dextran 多糖的主链结构相类似。与之比较, 结构更为复杂。PTPS-1 组成和结构特征与冬虫夏草的活性多糖成分接近^[19], 推测 PTPS-1 可能就是其发挥免疫调节和抗肿瘤活性的基础。

鉴于 PTPS-1 能促进脾细胞的增殖和对肿瘤细胞 Sp2/0 的生长抑制作用以及具有与冬虫夏草活性多糖成分相似的组成和结构特征, 表明本实验已成功地从细脚拟青霉中分离纯化出活性多糖组分——PTPS-1, 这为进一步深入研究 PTPS-1 的结构与活性之间的关系打下了良好的基础。

参考文献:

- [1] Fukatsu T, Sato H, Kuriyama H. Isolation, inoculation to insect host, and molecular phylogeny of an entomogenous fungus [J]. *Invertebr Pathol*, 1997, 70(3): 203-208.
- [2] 陈祝安, 徐 珊. 细脚拟青霉培养性状和药理作用的初步研究 [J]. *真菌学报*, 1989, 8(3): 214-220.
- [3] 吕建新, 金丽琴, 楼永良, 等. 细脚拟青霉对小鼠体液免疫功能的影响 [J]. *中国实验临床免疫学杂志*, 1996, 8(6): 8-10.
- [4] 吕建新, 金丽琴, 陈国荣, 等. 细脚拟青霉对大鼠腹腔巨噬细胞的激活作用 [J]. *中国免疫学杂志*, 1997, 13(3): 139-141.
- [5] 金丽琴, 吕建新, 胡云良, 等. 细脚拟青霉对大鼠脂质过氧化物和还原型谷胱甘肽水的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 1997, 13(4): 379-382.
- [6] 金丽琴, 吕建新, 袁 谦, 等. 细脚拟青霉总多糖对大鼠非特异性免疫调节作用 [J]. *科技通报*, 2002, 18(4): 276-280.
- [7] 丁保金, 金丽琴, 吕建新. 细脚拟青霉总多糖对人外周血单

- 核细胞 TNF- α 水平及增殖活性的影响 [J]. 中国生化药物杂志, 2004, 25(5): 268-270.
- [8] Fumihide T, Nobuo Y, Remiko Y, *et al.* The liquid culture filtrates of *Paecilomyces tenuipes* (Peck) Samson (= *Isaria japonica* Yasuda) and *Paecilomyces cicadae* (Miquel) Samson (= *Isaria sinclairii* (Berk.) Llod) regulate Th1 and Th2 cytokine response in murine Peyer's patch cells *in vitro* and *ex vivo* [J]. *Int Immunopharmacol*, 2005, 5(5): 903-916.
- [9] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术 [M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1999.
- [10] 王展, 方积年. 高场核磁共振波谱在多糖结构中的应用 [J]. 分析化学评述与进展, 2000, 28(2): 242.
- [11] Stenutz R, Jansson P E, Widmalm G. Computer-assisted structural analysis of oligo- and polysaccharides: An extension of CASPER to multibranched structures [J]. *Carbohydr Res*, 1998, 306(1-2): 11-17.
- [12] Wang X S, Duan J Y, Fang J N. Structural features of a polysaccharide from *Centella asiatica* [J]. *Chin Chem Lett*, 2004, 15(2): 189.
- [13] Yuriy A K, Alexander S S, Sofya N S, *et al.* Structure of the O-polysaccharide of *Aeromonas hydrophila* O:34; a case of random O-acetylation of 6-deoxy-L-talose [J]. *Carbohydr Res*, 2002, 337(15): 1381-1386.
- [14] Dominika D, Philip V T, Nikolay P A, *et al.* Structure of the O-specific polysaccharide of *Proteus penneri* 103 containing ribitol and 2-aminoethanol phosphates [J]. *Carbohydr Res*, 2002, 337(17): 1535-1540.
- [15] Zhao G H, Kan J Q, Lib Z X, *et al.* Structural features and immunological activity of a polysaccharide from *Dioscorea opposita* Thunb. roots [J]. *Carbohydr Poly*, 2005, 61(2): 125-131.
- [16] Fishman M, Gunther G. Induction of tumor cell resistance to macrophage-mediated lysis by preexposure to non-activated macrophages [J]. *Cell Immunol*, 1986, 99(1): 241-256.
- [17] Chen Y J, Shiao M S, Lee S S, *et al.* Effect of *Cordyceps sinensis* on the proliferation and differentiation of human leukemic U937 cells [J]. *Life Sci*, 1997, 60(25): 2349-2359.
- [18] 陆榕, 孙立崧, 王仲孚, 等. 细脚拟青霉多糖 I 的化学结构 [J]. 中草药, 2001, 32(10): 865-867.
- [19] 袁建国, 程显好, 侯永勤. 冬虫草夏草多糖组分分析及药理实验 [J]. 食品与药品, 2005, 7(1A): 45-48.

变绿红菇化学成分研究

汤建国^{1,2}, 邵红军¹, 刘吉开^{1*}

(1. 中国科学院昆明植物研究所 植物化学与西部资源持续利用国家重点实验室, 云南 昆明 650204;

2. 红塔烟草(集团)有限责任公司技术中心, 云南 玉溪 653100)

摘要:目的 研究变绿红菇 *Russula virescens* 子实体化学成分。方法 变绿红菇子实体用 95%乙醇浸泡提取浓缩, 经硅胶、RP-8、Sephadex LH-20 等多种材料进行分离, 波谱学方法鉴定化合物的结构。结果 分离鉴定了 8 个化合物, 分别为铁屎米酮 (canthin-6-one, I)、3 β -羟基-5 α , 8 α -过氧化麦角甾-6, 22-二烯 (II)、3 β -羟基-麦角甾-5, 7-22-三烯 (III)、3 β , 5 α , 6 β -三羟基-麦角甾-7, 22-二烯 (IV)、硫代乙酸酐 (V)、顺丁烯二酸 (VI)、D-阿洛醇 (VII)、腺嘌呤核苷 (VIII)。结论 所有化合物均为首次从该菌中分到, 其中化合物 I 为首次从该属中分到。

关键词:变绿红菇; 铁屎米酮; 3 β -羟基-5 α , 8 α -过氧化麦角甾-6, 22-二烯

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)12-1776-03

Chemical constituents of *Russula virescens*

TANG Jian-guo^{1,2}, SHAO Hong-jun¹, LIU Ji-kai¹

(1. State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany,

Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China; 2. Center of Technology,

Hongta Tobacco Group Co., Ltd., Yuxi 653100, China)

Abstract: Objective To study the active constituents of *Russula virescens*. **Methods** The compounds were isolated by silica gel, RP-8, Sephadex LH-20 and their structures were elucidated by spectral methods. **Results** Eight compounds were isolated and identified as canthin-6-one (I), 5 α , 8 α -epidioxy-(22E, 24R)-ergosta-6, 22-dien-3 β -ol (II), (22E, 24R)-ergosta-5, 7, 22-trien-3 β -ol (III), (22E, 24R)-ergosta-7, 22-dien-3 β , 5 α , 6 β -triol (IV), thioacetic anhydride (V), maleic acid (VI), D-allitol (VII), ribosido-

收稿日期: 2008-03-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30470027)

作者简介: 汤建国 (1975-), 湖南沅江市人, 中国科学院昆明植物研究所在读博士生, 从事高等真菌次生代谢产物活性成分研究。

Tel: (0871) 5223411 E-mail: tjg111@163.com

* 通讯作者 刘吉开 E-mail: jkliu@mail.kib.ac.cn