

香菇多糖 LNT₂ 的提取分离纯化、结构及体外抗肿瘤活性研究

李石军², 王凯平¹, 汪柳², 辜明², 曾芳², 张玉^{2*}

1. 华中科技大学同济医学院药学院, 湖北 武汉 430030

2. 华中科技大学同济医学院协和医院 药剂科, 湖北 武汉 430020

摘要: 目的 从香菇子实体中分离纯化得到精制香菇多糖, 并对其结构和体外抗肿瘤活性进行研究。方法 采用碱提-醇沉法提取香菇粗多糖, 并通过脱色、超滤分离纯化得到精制香菇多糖, 命名为 LNT₂。苯酚-硫酸法测定总糖量, 高效凝胶色谱法测定相对分子质量, 紫外光谱检测蛋白质和核酸, 旋光度实验测定比旋光度。综合运用酸水解、高碘酸氧化、甲基化等化学分析法和傅里叶红外光谱、核磁共振光谱等光谱分析法对 LNT₂ 的化学结构进行分析; 通过刚果红实验对 LNT₂ 的糖链构象进行考察; 采用四甲偶氮唑盐 (MTT) 比色法测定 LNT₂ 对小鼠肝腹水瘤 H₂₂ 细胞增殖的抑制率。结果 经测定香菇多糖 LNT₂ 为均一组分多糖, 其相对分子质量 (M_w) 为 1.852×10^5 、含糖量为 94.99%, 比旋光度为 $+8.03^\circ$; 紫外光谱显示 LNT₂ 在 280 和 260 nm 处无吸收峰。综合化学分析和光谱分析推出 LNT₂ 为 β 构型的葡聚糖, 其主链由 1-3 连接的葡聚糖组成, 分支点位于糖的 6 位, 侧链由末端葡萄糖残基组成; 刚果红实验表明 LNT₂ 分子在较低浓度 NaOH 溶液中呈三螺旋构象。体外抗肿瘤实验表明 LNT₂ 能显著抑制小鼠肝腹水瘤 H₂₂ 细胞的增殖, 且呈量效依赖性。结论 精制香菇多糖 LNT₂ 为均一相对分子质量的多糖组分, 其结构为 β 构型 1-3 连接葡聚糖; 初步表明 LNT₂ 为三股螺旋结构, 且具有一定的抗肿瘤活性, 为其进一步的开发利用奠定了一定的基础。

关键词: 香菇多糖; 抗肿瘤; 构象分析; MTT 法; H₂₂ 细胞

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2014)09-1232-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.09.007

Isolation, purification, structural elucidation, and antitumor activity *in vitro* of lentinan LNT₂

LI Shi-jun², WANG Kai-ping¹, WANG Liu², GU Ming², ZENG Fang², ZHANG Yu²

1. School of Pharmacy, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

2. Wuhan Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China

Abstract: Objective To purify the lentinan from sporophore of *Lentinus edodes* and to study the structure and antitumor activity *in vitro* of lentinan. **Methods** A refined lentinan, named LNT₂, was isolated from the sporophore of *L. edodes* by alkali extraction and alcohol precipitation, and further purified by hydrogen peroxide decoloration and ultrafiltration. The molecular weight and sugar content of LNT₂ were measured by HPLC and phenol-sulfuric acid method, respectively. UV was used to detect the protein and nucleic acid in LNT₂, and specific rotation was detected. The chemical structure of LNT₂ was determined by acid hydrolysis, periodate oxidation, methylation analysis, Fourier infrared spectrum, and NMR experiments. The chain conformation of LNT₂ was evaluated by Congo-red test. The inhibitory effect of LNT₂ on H₂₂ tumor cells growth was evaluated using MTT assay. **Results** The molecular weight, sugar content, and $[\alpha]_D^{20}$ value of LNT₂ were estimated to be 185 200, 94.99%, and $+8.03^\circ$, respectively. UV spectrum showed that there were no peaks at 280 and 260 nm. Chemical and spectroscopic analyses illustrated that LNT₂ had a backbone chain of β -(1→3)-linked glucopyranosyl residues and had branches of single glucosyl stubs at C-6 of terminal glucose sugar residues. Congo-red test revealed that LNT₂ exhibited a triple helix conformation in low concentration of NaOH solution. Results of the antitumor activity *in vitro* demonstrated that LNT₂ could exhibit the strong effect against the growth of H₂₂ tumor cells and showed a dose-dependent manner. **Conclusion** LNT₂ is composed of β -(1→3)-linked glucan and has a triple helix conformation. Moreover, LNT₂ could present the certain antitumor activities *in vitro*. Our study lays a solid foundation for the development and utilization of LNT₂.

Key words: lentinan; antitumor; structure analysis; MTT method; H₂₂ cells

收稿日期: 2014-01-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81373300)

作者简介: 李石军 (1986—), 男, 硕士, 药师, 研究方向为临床肿瘤。Tel: (027)65650894 18571571986 E-mail: 04yaolishijun@163.com

通信作者: 张玉 (1968—), 男, 博士, 教授, 研究方向为植物多糖的抗肿瘤作用及其机制。Tel: (027)63559222 E-mail: wkpczq@163.com

多糖是自然界中最丰富的生物大分子,广泛存在于动物、植物和微生物(细菌和真菌)中^[1]。真菌多糖作为药物研究始于20世纪50年代,60年代后由于其免疫抑制作用而受到广泛关注,目前从真菌子实体和菌丝体中已得到数百种真菌多糖,香菇多糖一直是该领域研究的热点和难点。1969年,日本学者 Chihara 等^[2]首次从香菇 *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. 子实体中提取得到具有明显抗肿瘤活性的香菇多糖(lentinan),其结构为 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖。现代研究表明香菇多糖除具有抗病毒^[3]、抗肿瘤^[4]、调节免疫力^[5]等药理活性外,还有降血糖^[6]、抗氧化^[7]等多种功效。

目前学者普遍认为香菇多糖的活性与其理化性质、化学结构和糖链构象有很大关系。有研究指出,大多从香菇中提取的活性多糖都具有以下特征:主链结构为 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖,相对分子质量主要分布在 $4 \times 10^5 \sim 8 \times 10^5$,糖链构象为多股螺旋结构;但也有研究表明相对分子质量小于 4×10^5 的香菇多糖也具有较好的抗肿瘤活性^[8]。我国近年来也开展了大量香菇多糖的研究工作,已成功开发出香菇多糖注射剂及多种相关保健品,作为癌症的辅助治疗广泛应用于临床^[9]。随着我国香菇多糖提取工艺的研究不断深入,稀碱浸提法已成为最具有代表性的工艺。与传统的热水浸提法相比,所得粗多糖产率和纯度更高^[10]。本研究采用碱提法从香菇子实体中提取相对分子质量小于 4×10^5 的单一组分香菇多糖,并对其结构、糖链构象以及体外抗肿瘤活性进行研究,以期多糖的构效关系和相对分子质量小于 4×10^5 香菇多糖的开发利用提供基础。

1 仪器与材料

1100 LC/MSD Trap 二维液相色谱-离子阱质谱联用仪、7890A/5975C 型气相色谱质谱联用仪、Agilent-HP5 交联毛细管玻璃柱(美国 Agilent 公司), Lambda 35 紫外可见分光光度计(美国 PerkinElmer 公司),美国 Cary—50 型紫外分光光度仪(美国 Varian 公司),CHRIST 冻干机(德国 Marin Christ 公司),VERTEX 70 傅里叶变换显微红外/拉曼光谱仪(德国 Bruker 公司),AV400 核磁共振波谱仪(瑞士 Bruker 公司),酶标仪, XD—101 倒置显微镜, Air Tech 标准净化工作台(苏净集团安泰公司制造), FORMAIH CO₂ 水套培养箱(美国 FORMA 公司)。氢氧化钠,浓硫酸,苯酚,医用酒精,刚果红,5-氟尿嘧啶(5-FU),实验用水为双蒸水, Dextran-T

系列标准品、葡萄糖(批号 LB60595)、半乳糖(批号 SL08403)、甘露糖(批号 SL08455)、阿拉伯糖(批号 10115077)、木糖(批号 LB56239)和鼠李糖(批号 10137156)对照品(Sigma 公司),其他试剂均为分析纯。

香菇购自武汉太平洋商城,产地湖北房县,由华中科技大学同济医学院药学院中药部阮金兰教授鉴定伞形科香菇属香菇 *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. 的子实体。

昆明小鼠(清洁级),雌性,体质量 18~22 g,动物合格证号: SCXK 2004-0007。

2 方法与结果

2.1 香菇多糖的提取、分离与纯化

香菇子实体经剪碎、乙醇浸泡 24 h 后,采用沸水浸提,除去水提液,滤干后的香菇子实体再用碱提,再经 5 mol/L 的 HAc 溶液调碱提液的酸碱度至 pH 7,离心弃去沉淀,上清液浓缩后醇沉得到粗多糖;采用 1% H₂O₂ 对粗多糖进行脱色;脱色后粗多糖依次用超滤膜进行分离,收集中间组分的滤液,经冻干得到精制香菇多糖,命名为 LNT₂。苯酚-硫酸法测定 LNT₂ 的含糖量为 94.99%;高效凝胶色谱法(HPGPC)测定 LNT₂ 的相对分子质量为 1.852×10^5 (图 1);LNT₂ 在 200~400 nm 波长进行扫描,结果表明在 280、260 nm 处没有吸收峰(图 2),表明样品中不含蛋白质和核酸;参照《中国药典》2010 年版二部附录 VIE 旋光度测定的方法进行比旋光度测定,LNT₂ 的比旋光度为 $[\alpha]_D^{20} + 8.03^\circ$ 。

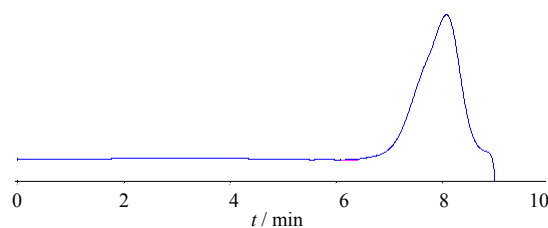


图 1 LNT₂ 的 HPGPC 色谱图

Fig. 1 HPGPC of LNT₂

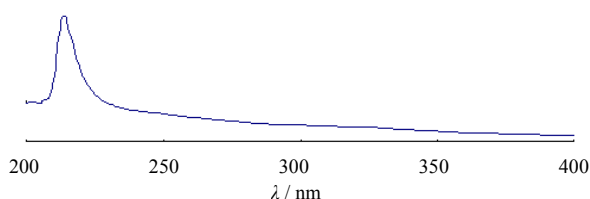


图 2 LNT₂ 的紫外扫描图

Fig. 2 UV scanning spectrum of LNT₂

2.2 香菇多糖 LNT₂ 的结构研究

2.2.1 单糖组成分析 采用气相色谱-质谱联用(GC-MS)对多糖样品进行单糖组成分析。首先将多糖完全水解成单糖,然后衍生化生成糖酐乙酸酯进行 GC-MS 分析^[11]。将样品以及各单糖对照品制备成适合进行气相分析的糖酐乙酸酯衍生物后,通过比对在相同色谱条件下各单糖对照品衍生物色谱峰的保留时间和色谱峰峰面积,来确定多糖样品中单糖组成的种类以及比例。

精制香菇多糖 LNT₂ 经 2 mol/L 硫酸水解,水解产物和各单糖对照品衍生物经 GC-MS 分析,得到色谱图(图 3、4)。LNT₂ 在 GC-MS 色谱图中的 t_R (10.618 min) 与标准单糖中 *D*-葡萄糖的 t_R (10.609 min) 一致;与 NIST08 标准质谱库比较,得出 LNT₂ 全水解衍生物为 *D*-吡喃葡萄糖糖酐乙酸酯。综上所述,全水解实验结果表明 LNT₂ 仅由 *D*-吡喃葡萄糖组成。

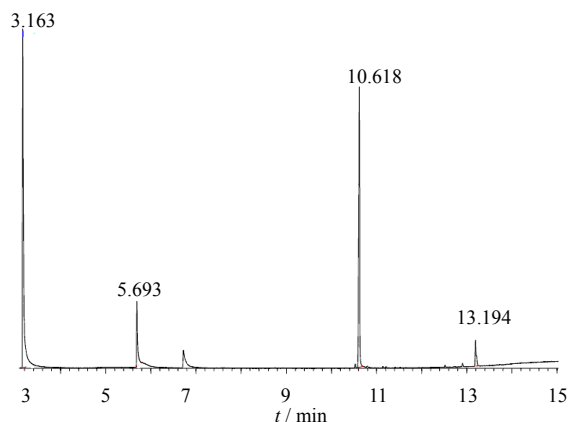
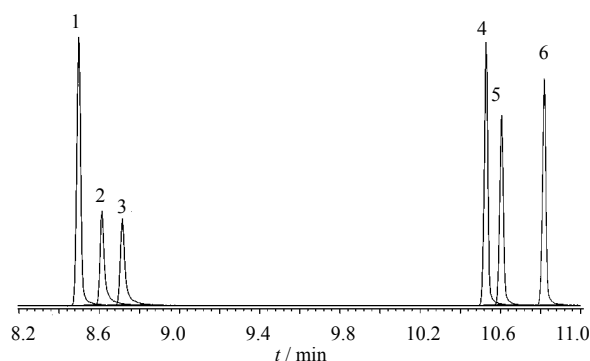


图 3 LNT₂ GC-MS 色谱图

Fig. 3 GC-MS chromatogram of LNT₂



1-鼠李糖 2-阿拉伯糖 3-木糖 4-甘露糖 5-*D*-葡萄糖 6-半乳糖
1-rhamnose 2-arabinose 3-xylose 4-mannose 5-*D*-glucose 6-galactose

图 4 单糖对照品 GC-MS 色谱图

Fig. 4 GC-MS chromatogram of monosaccharide reference substance

2.2.2 高碘酸氧化 高碘酸可以选择性氧化糖的邻二羟基或邻三羟基,生成相应的多糖醛、甲醛或甲酸;反应定量地进行,每开裂 1 个 C-C 键消耗 1 分子高碘酸,通过测定高碘酸的消耗量及甲酸的释放量,可以判断糖苷键的位置、糖残基的种类和比例。以高碘酸钠的浓度为横坐标 (X),吸光度 (A) 值为纵坐标 (Y),绘制标准曲线。得到回归方程: $Y = 8.7324X + 0.0053$, $R^2 = 0.9999$ 。根据反应前后 A 值的变化计算高碘酸的消耗量,通过滴定计算甲酸的生成量。根据多糖的高碘酸氧化规律,计算得 LNT₂ 中各糖残基的量及比值。结果 1-3 或 1-3-6 连接的糖残基占 74.4%, C-1, 6 或末端连接的糖残基占 25.6%,残基比为 2.91:1。

2.2.3 甲基化分析 甲基化分析常采用改良的 Hakomori 法^[12-13]。称取精制香菇多糖 20 mg,溶于无水 DMSO 中,先与甲基亚磺酰甲基钠反应,再用碘甲烷进行甲基化,反应液经蒸馏水透析、冻干,经 IR 检测甲基化样品在 3500 cm^{-1} 附近无吸收峰,得到全甲基化样品。全甲基化样品先用 90% 甲酸于 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 密闭水解 6 h,再用 2 mol/L 三氟乙酸于 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 密闭进一步水解 6 h,减压蒸干后先与 1 mol/L 醋酸反应,再与醋酸酐反应,得全甲基化糖醇乙酸酯,最后进行 GC-MS 分析。

由 GC-MS 色谱图(图 5)可知:精制香菇多糖 LNT₂ 主要由 1-、1-3-、1-3-6 连接的 *D*-吡喃葡萄糖组成,分支侧链为 1, 3-连接 *D*-吡喃葡萄糖 C₆ 位上的末端葡萄糖基;各连接类型糖残基的物质的量比为 1:1.70:1.08,与高碘酸氧化实验结果基本符合。LNT₂ 甲基化实验 GC-MS 结果分析见表 1。

2.2.4 红外光谱解析 取干燥多糖样品(LNT₂)约 2 mg,加入 100~200 mg 干燥的 KBr 晶体,在玛瑙研钵中研磨成均匀粉末,用压片机压片。采用傅里叶变换红外光谱仪在 $4000\sim400\text{ cm}^{-1}$ 扫描分析。

LNT₂ 的红外图谱(图 6)显示: 3396 cm^{-1} 处的吸收峰为 O-H 的伸缩振动峰; 1424 和 2922 cm^{-1} 处分别为 C-H 的变角振动和伸缩振动峰; 896 cm^{-1} 处有弱吸收峰,为 β 糖苷键的吸收峰; 1162 、 1077 和 1043 cm^{-1} 处 3 个相关吸收峰为吡喃环上 C-O-C 和 C-O-H 的伸缩振动所致。在 875 、 813 cm^{-1} 处几乎无吸收,说明 LNT₂ 中不含甘露糖。由图谱分析可知, LNT₂ 是多糖类化合物,为 β -吡喃糖环的结构。

2.2.5 核磁共振波谱实验

(1) 部分酸水解: 称取 100 mg 精制多糖样品,

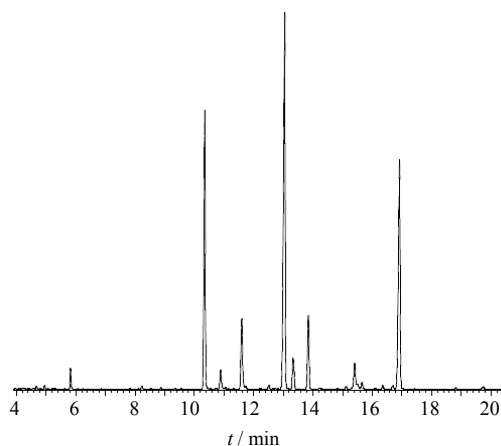


图5 LNT₂甲基化实验 GC-MS 色谱图

Fig. 5 GC-MS chromatogram of methylation of LNT₂

表1 LNT₂甲基化实验结果

Table 1 Results of methylation of LNT₂

甲基化产物	t_R / min	质谱碎片 (m/z)	连接类型	摩尔比
2, 3, 4, 6-Me ₄ Glc	10.34	43, 71, 101, 129, 161, 205	1-Glc	1.00
2, 4, 6-Me ₃ Glc	13.05	43, 87, 117, 161, 203, 233, 277	1, 3-Glc	1.70
2, 4-Me ₂ Glc	16.92	43, 87, 117, 159, 173, 201, 233	1, 3, 6-Glc	1.08

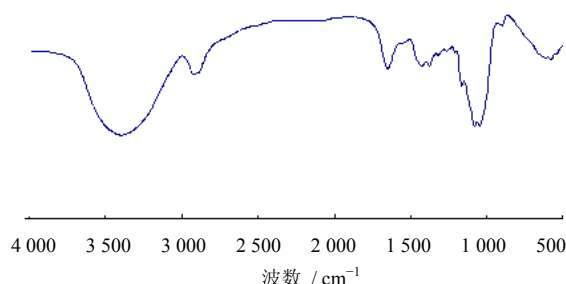


图6 LNT₂的 IR 扫描图

Fig. 6 IR scanning spectrum of LNT₂

DEPT-135 谱表明 LNT₂-p 含有 C-6 位 (δ 61.4) 未被取代的糖残基。综合以上分析,可以初步推断 LNT₂ 的基本结构单元见图 7。

2.2.6 刚果红实验 称取一定量的刚果红,用蒸馏水配制成 0.2 mmol/L 的刚果红溶液、2 mg/mL 的 LNT₂ 样品溶液和不同浓度的 NaOH 溶液 (0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 mol/L),备用。将多糖溶液 (2 mg/mL) 和刚果红溶液 (0.2 mmol/L) 等体积混合 (各 2 mL) 再加入 4 mL 不同浓度的 NaOH 溶液后,混合摇匀,依次测定混合液在 0~0.5 mol/L 的 NaOH 溶液中各溶液最大吸收波长 ($\lambda_{\max}$) 的变化。

LNT₂ 的刚果红实验结果 (图 8) 表明, LNT₂

加 10 mL 0.1 mol/L 三氟乙酸,封管于 100 °C 水解 1 h。蒸馏水透析后,袋内溶液经冻干后得到 LNT₂ 的部分酸水解产物,命名为 LNT₂-p。

(2) 样品测试: 称取 LNT₂-p 约 50 mg 于核磁管中,对样品 LNT₂-p 进行 ¹H-NMR 谱、¹³C-NMR 谱和 DEPT-135 谱测定。根据实验结果,¹³C-NMR 谱表明 LNT₂-p 所有糖残基的异头碳信号均出现在 δ 103.4, 为 β 构型糖残基,与红外光谱分析得出的结果相符,与甲基化标准单糖的 NMR 数据比较^[14-15], C-3 信号 (δ 86.8) 向低场移动说明含有 C-3 位被取代的糖残基, C-6 信号 (δ 68.9) 向低场移动表明含有 C-6 位被取代的糖残基。¹H-NMR 谱表明 LNT₂-p 有 4 个糖残基,糖残基的异头氢信号分别为 δ 4.52、4.64、4.91 和 5.17; 各糖残基峰强比为 1 : 1 : 1 : 1。

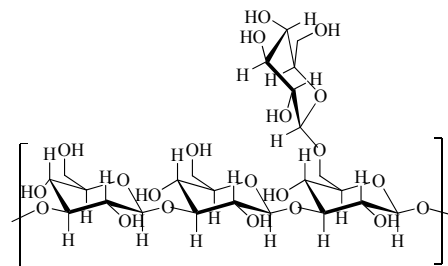


图7 LNT₂的基本化学结构

Fig. 7 Basic chemical structure of LNT₂

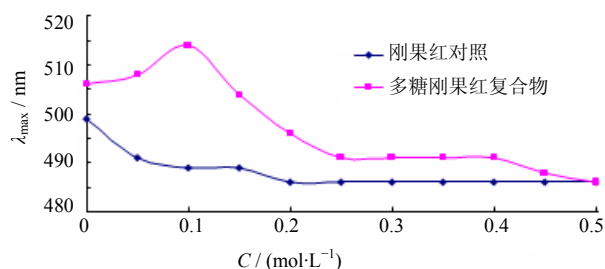


图8 LNT₂刚果红实验结果

Fig. 8 Results of Congo-red test of LNT₂

与刚果红形成络合物在 NaOH 溶液 0~0.5 mol/L 内 $\lambda_{\max}$ 的变化如下: 在 0~0.1 mol/L NaOH 溶液中,络合物的 $\lambda_{\max}$ 出现红移,并当 NaOH 溶液浓度为 0.1 mol/L 时达到最大值,可能是 LNT₂ 在弱碱环境下其

溶解度逐渐增大所致;当 NaOH 溶液浓度大于 0.1 mol/L 时,络合物的 $\lambda_{\max}$ 逐渐减少,并当 NaOH 浓度为 0.5 mol/L 时,络合物的最大吸收波长下降到与刚果红溶液一致,表明 LNT₂ 高度有序的螺旋结构逐渐解体。综合文献报道^[16],初步得出 LNT₂ 在较低浓度 NaOH 溶液中呈三螺旋构象。

2.2.7 LNT₂ 抑制 H₂₂ 肿瘤细胞增殖实验 采用 MTT 法进行肿瘤细胞抑制实验检测。将 H₂₂ 细胞注入小鼠腹腔中进行细胞传代培养,从 H₂₂ 腹水瘤小鼠的腹水中抽取处于对数生长期的 H₂₂ 细胞,用含 10%胎牛血清 RPMI 1640 培养液调整肿瘤细胞浓度至 1×10^5 /mL。接种于 96 孔培养板。每孔加细胞悬液 100 μ L (1×10^4 个细胞)。实验设对照组(含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养液),香菇多糖各浓度(800、400、200、100、50、25、12.5 μ g/mL)组,阳性对照组(5-FU),共 9 组,每组设 6 个复孔。香菇多糖各浓度组每孔加入 100 μ L 的各浓度多糖溶液,阳性对照组每孔加入 100 μ L 200 mg/mL 5-FU 溶液,调整板内各孔液体总量,使其均为 200 μ L,不足者补以含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养液。培养板混匀后置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 和 95%湿度条件下培养 24 h 后,每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 磷酸盐缓冲液 20 μ L,同样条件下继续培养 4 h,终止培养,2 000 r/min 离心 10 min,然后弃去培养孔内的培养液,每孔加入 150 μ L DMSO,震荡 10 min,使形成的甲臜颗粒充分溶解后,混匀后用酶标仪于 490 nm 波长处测定各孔的吸光度(A_{490})值,按下面公式计算细胞生长抑制率。

抑制率 = $1 - \text{实验孔 } A_{490} \text{ 平均值} / \text{对照孔 } A_{490} \text{ 平均值}$

采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 t 检验。LNT₂ 体外抗肿瘤活性结果见表 2。

由表 2 可知,在 12.5~800 μ g/mL 时,与对照组和 5-Fu 组比较,LNT₂ 对 H22 细胞具有显著的抑制作用,并且随着浓度的增加,细胞的生长抑制率也随之升高,呈量效依赖性。当 LNT₂ 的质量浓度为 800 μ g/mL 时,抑制率最高达到 52.62%。

3 讨论

本实验采用的提取工艺简单、有效,且未使用有害试剂。得到的精制香菇多糖 LNT₂ 经 HPGPC 和 UV 实验表明为均一相对分子质量的多糖组分,不含蛋白质和核酸,其相对分子质量为 1.852×10^5 ,比旋光度为 +8.03 $^{\circ}$;进一步的化学分析和光谱分析

表 2 LNT₂ 对肝癌实体瘤细胞 H₂₂ 生长抑制作用
($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Inhibitory effect of LNT₂ on growth of liver cancer solid tumor cells H₂₂ ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	$\rho / (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	A_{490} 值	抑制率 / %
对照	0	0.677 ± 0.068	—
5-FU	50	$0.588 \pm 0.035^{* \#}$	13.16
LNT ₂	800	$0.321 \pm 0.013^{* \#}$	52.62
	400	$0.349 \pm 0.025^{* \#}$	48.40
	200	$0.350 \pm 0.021^{* \#}$	48.27
	100	$0.388 \pm 0.029^{* \#}$	42.63
	50	$0.445 \pm 0.034^{* \#}$	34.25
	25	$0.456 \pm 0.016^{* \#}$	32.62
	12.5	$0.491 \pm 0.017^{* \#}$	27.52

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 5-FU 组比较: $^{\#}P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; $^{\#}P < 0.05$ vs 5-FU group

表明 LNT₂ 的结构为具有分支侧链的 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖,与大多文献报道^[8]的抗肿瘤活性多糖的结构特征相符。现代研究表明,多糖的活性不仅与其一级结构有关,而且与糖链的高级构象密切相关,大量研究表明,只有具有三股螺旋结构的香菇多糖才具有较强的生物活性^[17]。实验结果表明 LNT₂ 的糖链构象为三股螺旋构象,具有潜在抗肿瘤活性的研究价值。为了进一步研究 LNT₂ 的高级构象,后续还将进行 X 射线衍射和原子扫描(ATM)实验。

体外抗肿瘤实验表明 LNT₂ 具有明显抑制鼠肝腹水瘤 H₂₂ 细胞的活性。Fan 等^[18]和 Joseph 等^[19]报道在体外具有一定抗肿瘤活性的多糖在体内也具有抗肿瘤作用,因此后续实验将进一步对 LNT₂ 在小鼠体内抗肿瘤的活性进行研究,以对其体内、外抗肿瘤活性进行全面的评估。

大多从香菇中提取的抗肿瘤活性多糖其相对分子质量主要分布在 $4 \times 10^5 \sim 8 \times 10^5$,而本实验从香菇子实体得到的香菇多糖 LNT₂ 相对分子质量为 1.852×10^5 ,同样具有一定的体外抗肿瘤活性。因此为相对分子质量小于 4×10^5 香菇多糖的开发利用提供了一定基础,在今后研究中,可以对不同相对分子质量香菇多糖的结构与活性之间的关系进行探讨,为多糖类药物的研究和开发提供理论依据。

参考文献

- [1] Mizuno T. Development of antitumor polysaccharides from mushroom fungi [J]. *Foods Food Ingrid J Jpn*, 1996, 167: 69-85.

- [2] Chihara G, Maeda Y, Hamuro J, *et al.* Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing [J]. *Nature*, 1969, 222: 687-688.
- [3] Lorenzen K, Anke T. Basidiomycetes as a source for new bioactive natural products [J]. *Curr Org Chem*, 1998(2): 329-364.
- [4] Borchers A T, Stern J S, Hackman R M, *et al.* Mushrooms, tumors, and immunity [J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1999, 221(4): 281-293.
- [5] Choo Ooi V E, Liu F. A review of pharmacological activities of mushroom polysaccharides. [J]. *Inter J Med Mushrooms* 1999, 1(3): 195-206.
- [6] Tzianabos A O. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2000, 13(4): 523-533.
- [7] Reshetnikov S V, Tan K K. Higher basidiomycota as a source of antitumor and immunostimulating polysaccharides (review) [J]. *Inter J Med Mushrooms*, 2001, 3(4): 361-394.
- [8] Zhang Y, Li S, Wang X, *et al.* Advances in lentinan: Isolation, structure, chain conformation and bioactivities [J]. *Food Hydrocolloid*, 2011, 25: 196-206.
- [9] Higashi D, Seki K, Ishibashi Y, *et al.* The effect of lentinan combination therapy for unresectable advanced gastric cancer [J]. *Anticancer Res*, 2012, 32(6): 2365-2368.
- [10] Wang X, Xu X, Zhang L. Thermally induced conformation transition of triple-helical lentinan in NaCl aqueous solution [J]. *J Phys Chem B*, 2008, 112(33): 10343-10351.
- [11] Hawksworth D L. *The Tropical Fungal Biota: Census, Pertinence, Prophylaxis, and Prognosis* [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1993.
- [12] Shu T C. Global impact of edible and medicinal mushrooms on human welfare in the 21st century: nongreen revolution [J]. *Inter J Med Mushrooms*, 1999, 1(1): 1-7.
- [13] Mizuno T. The extraction and development of antitumor-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan (Review) [J]. *International J Med Mushrooms*, 1999, 1(1): 9-29.
- [14] Sharon N, Lis H. Carbohydrates in cell recognition [J]. *Scientific Ame*, 1993, 268(1): 82-89.
- [15] Mizuno T, Saito H, Nishitoba T, *et al.* Antitumor-active substances from mushrooms [J]. *Food Rev Int*, 1995, 11(1): 23-61.
- [16] Yui T, Ogawa K, Kakuta M, *et al.* Chain conformation of a glucurono-xylo-mannan isolated from fruit body of *Tremella fuciformis* Berk [J]. *J Carbohydr Chem*, 1995, 14(2): 255-263.
- [17] Wasser S. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 60(3): 258-274.
- [18] Fan L, Ding S, Ai L, *et al.* Antitumor and immunomodulatory activity of water-soluble polysaccharide from *Inonotus obliquus* [J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 90: 870-874.
- [19] Joseph M M, Aravind S R, George S K, *et al.* A galactomannan polysaccharide from *Punica granatum* imparts *in vitro* and *in vivo* anticancer activity [J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 98: 1466-1475.