

# 具有抗突变活性的香菇柄 PJF1 多糖的研究

郑建仙 丁霄霖

(华南理工大学) (无锡轻工业大学)

**摘要** 通过酸水解、甲基化和 Smith 降解等分析方法,借助于气相色谱和红外光谱对存在于香菇柄中 PJF1 多糖组分的化学本质作了剖析,建立了结构模型。应用姐妹染色单体互换和微核双指标生物试验法证实 PJF1 具有明显的抗突变活性,是一种廉价而又很实用的天然活性物质。

**主题词** 香菇;多糖;结构模型/抗突变;活性物质

**中图分类号** TS201.2

## 0 前言

自日本人千原 1969 年报道从香菇中分离出一种抗肿瘤多糖而轰动整个医学药物界之后,全世界掀起了一股从食用菌中寻找抗肿瘤药物的热潮。随后的分析表明这种抗肿瘤多糖是由  $\beta(1 \rightarrow 3)$  糖苷键连接的葡聚糖,现命名为香菇多糖(Lentinan);用这种多糖喂养已移植肿瘤的小鼠,证明抗肿瘤效果显著,有效率达 90%~100%,且没有任何毒性<sup>[1]</sup>。

然而,至今为止有关抗肿瘤的研究均是针对香菇全部的 Lentinan。作者在进行香菇膳食纤维研究过程中,意外地发现存在香菇柄中的 PJF1 多糖的化学结构相似于 Lentinan,经生物试验证实 PJF1 具有明显的抗突变效果。由于香菇柄是香菇脱水厂的下脚料,具有成本低廉的优越性,因此是一种廉价而又实用的天然活性物质,应用前景广阔。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要原材料

香菇柄 取材于福建省古田县新鲜干燥的出口级香菇的下脚料。

### 1.2 PJF1 多糖的提取与纯化

收稿日期:1994-07-07

取适量香菇柄,经SLS(十二烷基硫酸钠)、PAW(苯酚、乙酸和水混合物)和DMSO(二甲基亚砷)连续处理所得残渣用80℃热水提取8h,提取液浓缩后经Sepharose CL-2B凝胶层析柱提纯即是<sup>[2]</sup>

### 1.3 化学结构分析

**1.3.1 单糖组成分析** PJF1经1mlH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>在100℃下水解5h,转化成Alditol acetates衍生物,经日本岛津公司GC-14A气相色谱仪分析<sup>[3]</sup>。

**1.3.2 甲基化分析** 将PJF1分散于DMSO溶剂中,在N<sub>2</sub>保护下滴加甲基亚磺酰负离子进行甲基化,再经水解和乙酰化后用气相色谱进行鉴定<sup>[4]</sup>

**1.3.3 Smith降解** 取100mgPJF1悬浮于15mmol高碘酸钠水溶液中,置于4℃的黑暗环境中使之发生氧化反应,间或振荡,于8,10,14……小时间隔取样,测定被消耗的高碘酸钠数量,至高碘酸钠消耗量恒定不变时,表明氧化作用完全,所剩大分子组分即为Smith降解产物<sup>[5]</sup>。

**1.3.4 红外光谱法** 取PJF1 3~5mg放入玛瑙研钵中,添加100mol 200mg光谱纯KBr,在红外灯下研磨均匀,装入压片模具中抽气加压,保持3~5min,去压后所得薄片经日本岛津公司IR-440红外光谱仪扫描作图。

### 1.4 生物试验法

**1.4.1 实验动物与实验方法** 实验动物用C<sub>57</sub>纯种小鼠(20~22g)随机地分为5组,每组10只,设空白及实验对照组。三个实验组均连续灌胃PJF1多糖水溶液10d,剂量分别为3mg/kg,6mg/kg和12mg/kg,空白对照组每天灌胃蒸馏水0.4ml/只;实验组及对照组用公认的诱变剂环磷酰胺(CPP)腹腔注射20mg/kg,第11d各组均脱臼处死,取骨髓进行SCE和MN常规制片。

**1.4.2 小鼠活体骨髓细胞SCE制片分析** 常规制片<sup>[6]</sup>中特别注意固定液的恒定,要加盖不使挥发以免造成两者比例失调。经紫外灯光照25min后加入5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-Br-du),磁力搅拌2~2.5h;实验对照组脱臼处死前30h腹腔注射CPP 20mg/kg,空白组、实验对照组和各实验组处死前3~4h均注射秋水仙素5mg/kg。常规制备骨髓细胞染色体标本,标本在37℃恒温箱中老化2d后进行分化染色,每只动物制片4张,每片至少计数30个中期分裂相,按Lamber计数SCE。

**1.4.3 小鼠活体骨髓细胞MN制片分析** 将骨髓细胞置于生理盐水中,去除上清液加入37℃预温的0.07mol KCl 3ml置于37℃环境中,8min后加入固定液(甲醇:冰醋酸=3:1)1ml预固定,离心后去除上清液,再加固定液4ml混匀,固定两次后气干法滴片,用pH=6.4的Giemsa液(1:10)染色15min,每个标本统计5000个细胞,计算出微核率。

## 2 材料与方方法

### 2.1 PJF1多糖化学结构的分析

从表1的单糖分析结果表明,葡萄糖Glc占PJF1水解单糖总量的75%,因此PJF1分子的框架结构只能是一种葡聚糖。表2的结果表明甲基化PJF1水解分离出4种甲基化葡糖残基,2,3,4,6-Me<sub>4</sub>Glc,2,4,6-Me<sub>3</sub>Glc,2,3,4-Me<sub>3</sub>Glc和2,4-Me<sub>2</sub>Glc的摩尔比为9.5:16.5:1:10.5。2,4,6-Me<sub>3</sub>Glc的含量最多表明主链是由(1→3)糖苷链连接,2,4-Me<sub>2</sub>Glc的存

在表明主链上部分 Glc 通过 C<sub>6</sub> 分支点连有侧链,而 2,3,4-Me<sub>3</sub>Glc 的出现说明 PJF1 分子中还混杂有(1→6)糖苷键。

PJF1 在黑暗处用 15mmol 高碘酸钠进行氧化,72h 后高碘酸钠的消耗量达到恒定。将 Smith 降解产物 DPJF1 和原分子 PJF1 注入 Sepharose CL-2B 凝胶层析柱(2.0×100cm,床高 96cm),用 0.4mol NaOH 作洗脱液,每管收集 5ml,取样用硫酸苯酚法显色后在 480nm 处进行比色。洗脱结果如图 1 所示,由此可知降解后的 DPJF1 仍是大分子物质,这说明(1→6)糖苷键是位于原分子 PJF1 的侧链。因为若在主链上存在(1→6)键,那 Smith 降解后必定有低分子物质生成,但这种情况并没有出现。对 DPJF1 再次进行甲基化分析,只分离出两种甲基糖 2,3,4,6-Me<sub>4</sub>Glc 和 2,4,6-Me<sub>3</sub>Glc,表明降解后 DPJF1 为一线性分子,说明 PJF1 原分子中不带(1→3)键连接的侧链。

表 1 PJF1 多糖的单糖组成(mol%)

单糖	Xyl	Man	Glc	Gal
含量	5	6	75	5

表 2 PJF1 多糖的甲基化分析结果(mol%)

甲基化单糖	糖苷键位置	相对含量
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> Glc	Glc(1→	19
2,4,6-Me <sub>3</sub> Glc	→3)Glc(1→	33
2,3,4-Me <sub>3</sub> Glc	→6)Glc(1→	2
2,4-Me <sub>2</sub> Glc	→3,6)Glc(1→	21
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> Gal	Gal(1→	2
2,3,4-Me <sub>3</sub> Gal	→6)Gal(1→	5
3,4-Me <sub>2</sub> Gal	→2,6)Gal(1→	7
2,3,5-Me <sub>3</sub> Xyl	Xyl(1→	5
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> Man	Man(1→	2
2,4,6-Me <sub>3</sub> Man	→3)Man(1→	4

注 2,3,4,6-Me<sub>4</sub>Glc=1,5-di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-glucitol, etc.

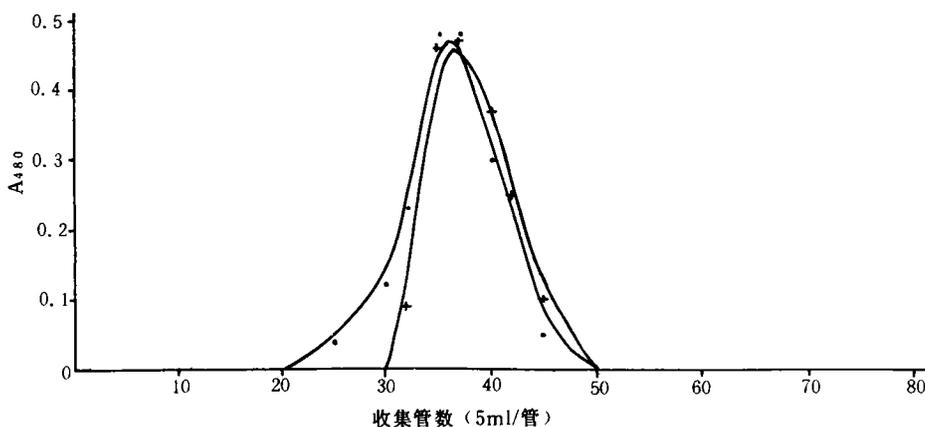


图 1 PJF1 和 DPJF1 两种组分的 Sepharose CL-2B 凝胶层析图

—•— PJF1      —+— DPJF1

存在于 PJF1 中的非 Glc 单糖主要有 3 种:Gal(半乳糖)、Man(甘露糖)和 Xyl(木糖),以 Gal 的存在数量最多。2,3,4,6-Me<sub>4</sub>Gal,2,3,4-Me<sub>3</sub>Gal 和 3,4-Me<sub>2</sub>Gal 的相对摩尔比为 1:2.5:3.5,说明由(1→6)糖苷键连接的半乳糖链上,通过 C<sub>2</sub> 位置带有侧链;2,3,4,6-Me<sub>4</sub>Man 与 2,4,6-Me<sub>3</sub>Man 的摩尔比为 1:2.2,即 Man 是通过(1→3)键连接,不带侧链;Xyl 仅以非还原尾端形式出现,只能作为某主链的侧链或支链的支支链形式存在。

仔细观察表 2,在 PJF1 分子主链上带有分支点的 Glc 数目与非还原尾端 Glc 的数目仅相差 2,也就是说主链至多只能再带 2 个单位的非 Glc 侧链。对 Gal,Man 和 Xyl 的存在情况

分析表明, Gal 聚链最有可能成为(1→3)葡聚糖主链的支链, 加上2个单位的非还原尾端 Gal, 主链上带分支点的 Glc 数目正好与非还原端 Glc 与 Gal 之和相等。从表2非还原尾端 Man, Xyl 的数量发现, (1→3)糖苷键连的甘露聚糖链和单一的 Xyl 只能是以半乳糖支链的支链形式出现, 只以单一非还原尾端形式存在的 Xyl 其连接方式比较自由, 它也许还可作为(1→3)Glc 或(1→6)Glc 支链或单一[Glc(1→)]支链的非还原尾端。

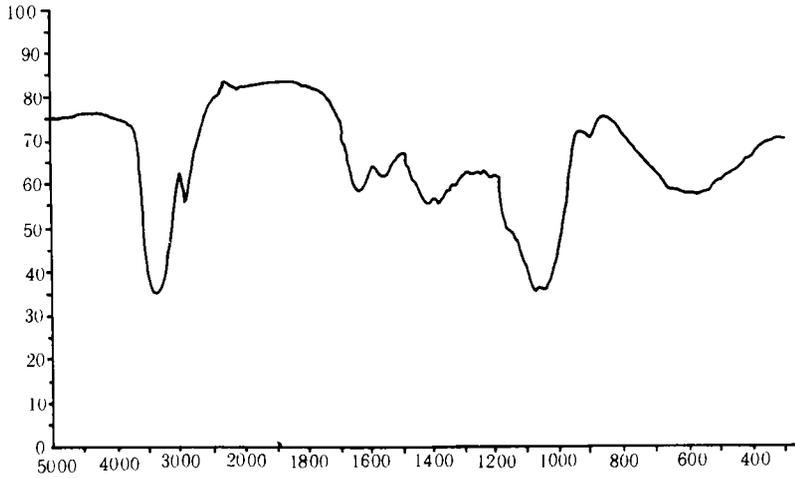
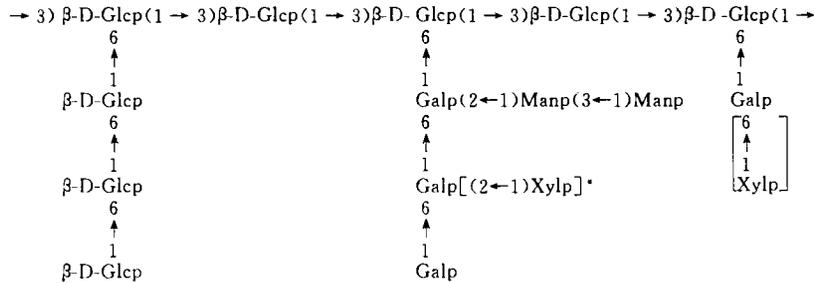


图2 PJF1 的红外光谱图

PJF1 的红外光谱图见图2所示, 900cm<sup>-1</sup>处的吸收峰表明是β型糖苷键。据此, 即推出如图3所示的PJF1化学结构模型。

已知存在于香菇伞部具有抗肿瘤活性的香菇多糖的化学结构如图4所示<sup>[2]</sup>, 仔细比较图3和图4, 可知两者的主链框架结构完全一样, 仅在支链组成上有所差异。此外, 两者的分



\* Xylp 是以非还原尾端形式出现, 其连接方式比较灵活

图3 PJF1 多糖的化学结构模型

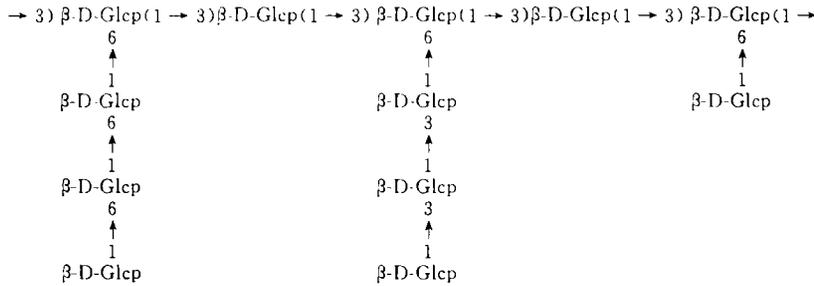


图4 香菇多糖的化学结构特征

子聚合度及溶解特性等完全相似。有鉴于 Lentinan 具有明显的抗肿瘤活性,因此可以推测 PJF1 也同样具有这方面生理活性,下面通过生物试验予以证实。

## 2.2 PJF1 多糖的抗突变生物试验

分子生物学(特别是基因学)的研究与发展引导人们对可能引起基因突变的物质进行分析与检测。致突变是恶性肿瘤和畸形病变等疾病的先兆,对“致突变”的逆思维导致了“抗突变”的出现。抗突变是防止恶性肿瘤产生的基础,一种物质具有抗突变活性,那就说明它是具有保护机体免于发生肿瘤病变的生理活性物质。

姐妹染色单体互换(Sister Chromatid Exchange,简称 SCE)是检测诱变剂灵敏而又可靠的指标<sup>[7,8]</sup>。在 DNA 复制过程中,5-Brdu 可作为核苷酸单体掺入新合成 DNA 链中胸腺嘧啶核苷(T)所占的位置,经历了两个细胞周期后,其染色体的两条姐妹染色单体的 DNA 双链在化学组成上就有了差别:一条染色体 DNA 双链的一股含有 5-Brdu,另一股则没有。另一条染色体单体的 DNA 则两股都含有 5-Brdu。借助于差别染色,在光学显微镜下可观察到这种不同。

DNA 受损时可进行修复——重组修复,即比姐妹染色单体互换来修复损伤。在修复时掺入 5-Brdu 则可观察到修复部位,此部位也代表受损部位。受损部位多则修复的部位也多,说明其受损伤大,从而表现出 SCE 频率高。SCE 频率若与正常 SCE 频率有统计学差异,则说明有诱变剂存在。对致突变作用进行逆思维,即注入公认的致突变剂(环磷酰胺 CPP)作为实验对照。CPP 的致突变作用使 SCE 频率明显升高,与空白对照组有显著差异;各实验组喂以不同浓度的 PJF1 多糖溶液并注入等量的 CPP,若由于 CPP 致突变作用本应升高的 SCE 频率实际上未升高或升高很少,与实验对照组有显著差异,则表明具有抗突变效果。

微核(Micronuclear,简称 MN)是检测诱变剂灵敏的细胞整体方法。染色体受诱变剂损伤而发生断裂,丧失着丝粒的染色体断片或染色单体断片在细胞分裂后期,染色体在纺垂体的牵引下移向细胞两极时,这些断片便遗落在细胞质中,分裂末期之后便单独形成 1~n 个小核,即微核。微核的形成说明染色体受损较严重。若微核的频率与正常的微核频率有统计学差异,则说明有诱变剂存在。与 SCE 一样,对 MN 进行逆向思维,并使用 CPP 后观察,各实验组喂以不同浓度的 PJF1 多糖溶液,若由于 CPP 致突变作用本应升高的 MN 频率不升高或升高很少,与实验对照组有显著差异,则表明具有抗基因突变效果。

SCE 和 MN 双指标互相验证,使试验结果更为可靠。对 PJF1 多糖组分的分析结果列于表 3 和表 4。由表 3 可知,3 个剂量组 SCE 频率与实验对照组均有显著差异( $P < 0.05$ ),表明在此 3 个剂量下均有明显的抗突变效应;而 3 个剂量组的 SCE 之间(表中 b 与 c,c 与 d,d 与 b)无显著差异( $P > 0.05$ ),表明它没有剂量——效应关系。从表 4 可知,3 个剂量组与实验对照组均有显差( $P < 0.05$ ),而与空白对照组均无显差,说明在这 3 个剂量下均有明显的抗突变效应,而 3 个剂量组之间(即 c 与 d,d 与 e,e 与 c)均无显差,说明无剂量——效应关系。

表 3 PJF1 多糖组分的 SCE 检测结果<sup>\*</sup>

组别	空白对照 (a)	3mg/kg (b)	6mg/kg (c)	12mg/kg (d)	实验对照 (e)
SCE 均数	25.95	66.56	66.72	67.63	71.91
SCE 频率	2.595	6.656	6.672	6.673	7.191
P(与 e)	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	

续表 3

组别	空白对照 (a)	3mg/kg (b)	6mg/kg (c)	12mg/kg (d)	实验对照 (e)
P		>0.05 (b与c)	>0.05 (c与d)	>0.05 (d与b)	

注 \* 每组 10 只小鼠, 每只计数 30 个中期分裂相细胞

表 4 PJF1 多糖组分的 MN 检测结果\*

组别	空白对照 (a)	实验对照 (b)	3mg/kg (c)	6mg/kg (d)	12mg/kg (e)
MN 均值	16	48	26	21	15
MN 频率	3.2‰	9.6‰	5.2‰	4.2‰	3‰
P(各组与 a)		<0.05	>0.05	>0.05	>0.05
P(各组与 b)	<0.05		<0.05	<0.05	<0.05
P			>0.05 (c与d)	>0.05 (d与e)	>0.05 (e与c)

注 \* 每组 10 只小鼠, 每只计数 5000 个多染白血细胞

### 3 结 论

化学结构分析表明存在于香菇柄部的 PJF1 多糖组分其结构相似于存在于香菇伞部已知具有抗肿瘤活性的香菇多糖, 经姐妹染色单体互换(SCE)和微核(MN)双指标检测的生物试验结果表明 3 个剂量(3mg/kg, 6mg/kg 和 12mg/kg)的 PJF1 多糖均表现出明显的抗突变效应, 证实 PJF1 具有明显的保护机体免遭肿瘤侵害的生理功能。

### 参 考 文 献

- 1 Chihara G, et al. Nature, 1969, 222: 687
- 2 郑建仙. 活性多糖化学与工艺学的研究. [博士论文]. 1993
- 3 Blakeney A B, et al. Carbohydr. Res. 1983, 113: 29
- 4 Blakeney A B, et al. Carbohydr. Res. 1983, 113: 29
- 5 Smith F, et al. J. Am. Chem. Soc. 1952, 74: 4970
- 6 王仁礼等. 遗传. 1984, 6: 41
- 7 Hall J D, et al. Exp. Cell Res. 1982, 139: 359
- 8 Lohman P H M, et al. Mutation Research, 1987, 181: 227

## Studies on the Antimutative PJF1 Polysaccharide from Foot Body of *Lentinus Edodes*

Zheng Jianxian                      Ding Xiaolin

(South China Univ. of Technology) (Wuxi Univ. of Light Ind.)

**Abstract** Through various analysis of acid hydrolysis, methylation and Smith degradation, with the help of GC and IR etc., the chemical nature of PJF1 polysaccharide from foot body of *Lentinus edodes* was analysed and its structural model was founded. The biotest of sister chromatid exchange (SCE) and micronuclear method (MN) showed that PJF1 did have strong antimutative effect, which implying this low cost but practical vital component will find its wide applications in foods.

**Subject-words** *lentinus edodes*; Polysaccharide; Structural models / Antimutation; Vital component