

文章编号: 1673-1689(2006)05-0066-06

# 灰树花菌丝体抗肿瘤糖肽 GFPS1b 结构的研究

崔凤杰<sup>1,2</sup>, 郭文杰<sup>2</sup>, 许泓瑜<sup>2</sup>, 许正宏<sup>2</sup>, 敖宗华<sup>2</sup>, 陶文沂<sup>\*1,2</sup>

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214036)

**摘要:** 以体外抑制肿瘤细胞增殖的活性作为筛选导向, 从灰树花深层发酵培养菌丝体中提取、分离纯化得到一酸性糖肽 GFPS1b。HPGPC 法测得其重均相对分子质量为 21 000。蛋白质质量分数 16.60%, 糖质量分数为 81.32%。利用化学方法(单糖组成分析、部分酸水解、甲基化分析)和仪器方法(GC、GC-MS、红外吸收光谱、核磁共振)分析 GFPS1b 的糖链结构, 结果表明其单糖组成主要有 Glc、Gal、Ara 和少量的糖醛酸, 其糖链主链由两个  $\alpha$ -D-Glc(1 $\rightarrow$ 3)、 $\alpha$ -D-Gal(1 $\rightarrow$ 4)、 $\alpha$ -D-Glc(1 $\rightarrow$ 3 $\beta$ ) 和  $\alpha$ -D-Gal(1 $\rightarrow$ 6)组成的, 其中葡萄糖基的 6 位发生取代, 取代侧链主要为  $\alpha$ -L-Ara-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-Glc(1 $\rightarrow$ )。可以认为 GFPS1b 为一新糖肽。

**关键词:** 灰树花; 糖肽; 纯化; 结构分析; 抗肿瘤

中图分类号: R 979.1

文献标识码: A

## Structural Analysis of Anti-Tumor Acid Heteropolysaccharide GFPS1b from the Cultured Mycelia of *Grifola frondosa* GF9801

CUI Feng-jie<sup>1,2</sup>, GUO Wen-jie<sup>2</sup>, XU Hong-yu<sup>2</sup>, XU Zheng-hong<sup>2</sup>,  
AO Zhong-hua<sup>2</sup>, TAO Wen-yi<sup>\*1,2</sup>

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China;  
2. School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

**Abstract:** Based on bioactivity-directed fractionation, a 21-kDa acid heteropolysaccharide, coded as GFPS1b, was obtained from the cultured mycelia of *Grifola frondosa* GF9801 by hot-water extraction, ethanol precipitation, fractioned by DEAE Sepharose Fast-flow, and further purified by Sephadex G-100 column chromatography. It exhibited more potent antiproliferative activity on MCF-7 cells than other polysaccharide fractions. GFPS1b was an acidic polysaccharide with approximately 16.60% protein and 4.3% uronic acid. Gas chromatography of acid hydrolysate of GFPS1b suggested that it was composed of D-glucose, D-galactose, and L-Arabinose. Periodate oxidation, Smith degradation, methylation analysis, IR, and <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR spectroscopy analysis revealed that GFPS1b had a backbone consisting of  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-linked D-galacopyranosyl and  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-linked D-glucopyranosyl residues substituted at O-6 with of glycosyl residues composed of  $\alpha$ -L-arabinose-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-glucose(1 $\rightarrow$ ) linked residues. Results showed that GFPS1b was a novel antitumor heteropolysaccharide from *G. frondosa* GF9801.

收稿日期: 2005-09-23; 修回日期: 2005-12-22.

基金项目: 江苏省无锡市自然科学基金项目资助项目(CK030002).

作者简介: 崔凤杰(1980-), 男, 安徽阜阳人, 发酵工程博士研究生; \* 为通讯作者.

**Key words:** *Grifola frondosa* acid; heteropolysaccharide; purification; structure analysis; antitumor activity

灰树花(*Grifola frondosa*)又名栗子蘑,属贝叶多孔菌,日本称舞茸,其香味浓郁,质地脆嫩,营养价值高,在民间有悠久的食用历史<sup>[1]</sup>。中国、日本以及北美等地均有分布。其含有众多生物活性物质,其中灰树花糖肽是其最主要的一类活性成分。过去研究主要集中在灰树花子实体中活性多糖,其中日本 Kodama N 等对灰树花子实体多糖 D-Fraction 进行较为深入全面的活性评价,研究结果表明 D-Fraction 具有增强免疫、抑制肿瘤等生理活性<sup>[2,3]</sup>。李小定等从灰树花子实体中提取纯化出一系列具有免疫活性多糖 PGF-1 和 PGF-2<sup>[4,5]</sup>。

多糖的生物活性直接依赖于糖链的结构与构象,揭示多糖结构与功能的关系是目前真菌糖肽的研究热点。虽然有关灰树花多糖结构的分析已有不少报道,但对发酵产物中的糖肽结构研究还较少<sup>[6,7]</sup>。作者从深层发酵培养的菌丝体出发,提取分离纯化出具有体外抑制肿瘤增值活性的糖肽 GFPS1b,并对其结构性质进行较为深入的研究。

## 1 试验材料

### 1.1 材料与试剂

灰树花(*Grifola frondosa* GF9801)为作者所在实验室保藏菌种;灰树花菌丝体按文献[8]方法发酵制备;DEAE-Sepharose Fast-flow 和 Sephadex G-100:瑞典 Pharmacia 公司产品;单糖标准品:Sigma 公司进口分装;标准多糖 Dextran T 系列 T500、T110、T70、T40、T20、T10:瑞典 Pharmacia 公司产品;其他试剂均为化学纯或者分析纯。

### 1.2 主要仪器

AKTA 快速分离制备系统:瑞典 Pharmacia 公司产品;752 型紫外可见分光光度计:上海精密科学仪器有限公司产品;GC-14A 型气相色谱仪:日本岛津公司产品;高效液相色谱仪:美国 Waters 公司产品;835-50G 型氨基酸自动分析仪:日本日立公司产品;Necolite 5D × B 傅立叶变换红外光谱仪:美国 Necolite 公司产品;Finnigan Trace GC-MS 仪:美国 Finnigan 公司产品;Varian Inova 600 核磁共振波谱仪:美国 Varian 公司产品;Multiskan MK3 酶标仪:

芬兰产品。

## 2 试验方法

### 2.1 GFPS1b 的分离纯化

灰树花发酵醪经 5 000 r/min 高速离心后,取菌丝体,自来水充分洗涤,加入 20 倍水(干重计),匀浆,水提 3 次,8 000 r/min 离心后合并上清液,浓缩后,加入 3 倍体积乙醇后 4 ℃ 沉淀 24 h,10 000 r/min 离心收集沉淀,用水复溶。将多糖复溶液上 DEAE-Sepharose Fast-flow (2.6 cm × 13 cm),上样量 10 mL,体积流量 2 mL/min,以此用蒸馏水和 0.1, 0.3, 0.5 mol/L NaCl 溶液进行阶段洗脱,每管收集 6 mL,苯酚-硫酸法隔管检测流出液糖肽含量,280 nm 隔管检测蛋白等吸收。收集各组分,通过透析,冷冻干燥,得到灰树花多糖 GFPS0, GFPS1, GFPS3 和 GFPS5 4 个组分,依据体外对人乳腺癌肿瘤细胞 MCF-7 的作用结果得出,抗肿瘤活性部分主要集中在 GFPS1。将 GFPS1 样品进行复溶,溶液上 Sepharose G-100 柱,超纯水流速 1 mL/min 进行洗脱,得到两个主要峰,收集各主要峰组分,冷冻干燥,得到 GFPS1a 和 GFPS1b,将两组分进行体外抑瘤增值试验,结果发现抗肿瘤活性主要集中在 GFPS1b 组分。

### 2.2 GFPS1b 结构性质的研究

#### 2.2.1 GFPS1b 纯度鉴定及相对分子质量的测定

高压液相色谱鉴定糖肽纯度时,样品为 20 mg/ml 的糖肽溶液。采用 Ultrahydrogel liner (D 7.8 mm × 300 mm) 色谱柱,双柱串联,示差折光检测器,流动相为 0.1 mol/L NaNO<sub>3</sub> 溶液,体积流量为 0.9 mL/min,柱温 45 ℃,进样量 20 μL,记录 Dextran T 系列标准多糖色谱曲线。根据各自的保留时间 RT 得到标准曲线。相同条件下得到样品 GFPS1b 的保留时间,采用 Millennium 2010 (Waters) 软件分析得到样品的相对分子质量。

2.2.2 样品中多糖质量分数及单糖组成分析 以葡萄糖为标样,苯酚-硫酸法测定 GFPS1b 中多糖质量分数;间羟联苯法测定其糖醛酸质量分数,葡萄糖醛酸做标样,将糖肽样品加入 1.0 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2

mL, 100 °C 封管水解 10 h, 水解液用 BaCO<sub>3</sub> 中和至 pH 7.0, 离心取上清液。将上清液旋转蒸发浓缩至干, 加入肌醇内标物 10 mg, 盐酸羟胺 10 mg, 吡啶 0.5 mL 于 90 °C 水浴中加热反应, 反应结束后加入乙酸酐, 进行乙酰化, 反应产物减压浓缩蒸干, 加入氯仿溶解取样, 进行气相色谱分析; 色谱条件为: OV-1701 固定相, 载气 N<sub>2</sub>, 体积流量 1.5 mL/min, 氢火焰检测器(FID), 气室温度 260 °C, 检测温度 250 °C, 程序升温: 180 °C (3 min) → 240 °C (30 min)。根据标准单糖与样品的保留时间的比较, 确定组成单糖的种类, 并根据各峰面积计算出摩尔比。

### 2.2.3 样品中蛋白质质量分数及氨基酸组成分析

BCA 法(BCA™ 蛋白测定试剂盒: 上海申能博彩公司产品)测定 GFPS1b 中蛋白质质量分数, 测定方法按照盒内使用说明, 设定 3 个平行样, 结果取其均值, 精密称取样品, 以 6 mol/L 盐酸溶解, 封管水解 24 h 后定容至 50 mL, 取 1 mL 蒸干, 加 0.02 mol/L 盐酸溶解后用氨基酸自动分析仪分析。

2.2.4 GFPS1b 部分酸水解 按文献<sup>[9]</sup>方法进行, 取 50 mg 样品加入 1 mol/L 氟乙酸, 于 90 °C 水解 1 h, 水解液透析, 然后将袋内溶液加入 3 倍体积乙醇进行醇析, 离心后分别对袋外溶液、袋内沉淀和袋内上清液进行完全酸水解, 测定相应的单糖组成及比例。

2.2.5 GFPS1b 高碘酸氧化及 Smith 降解 同文献<sup>[9]</sup>方法进行, 以 0.15 mol/L 高碘酸钠对 GFPS1b 进行氧化, 间隔一段时间取样, 223 nm 处检测高碘酸消耗量, 反应 48 h 高碘酸消耗量达到恒定值, 加乙二醇中止反应, 透析后浓缩, 加入过量的 KBH<sub>4</sub> 还原过夜, 用醋酸溶液中和至中性, 透析后冷冻干燥, 加入 1 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 进行完全水解, 水解产物分析条件同单糖组成分析。

2.2.6 GFPS1b 甲基化 采用改良 Hakomori 法对 GFPS1b 进行甲基化, 在充分干燥的样品中, 加入 3 mL 以 4 目分子筛脱水的二甲亚砜, 充入氮气, 缓慢加入甲基亚磺酰甲基钠(SMSM), 搅拌 30 min 后, 缓慢滴加 1.5 mL 碘甲烷, 反应 1 h 后加入蒸馏水中止反应, 对水透析, 冻干, IR 检查 3 500 cm<sup>-1</sup> 附近无 -OH 吸收峰。将甲基化产品加入体积分数 90% 甲酸, 密封水解 6 h, 减压蒸干, 加入 2 mol/L 三氟乙酸, 水解 6 h, 用甲醇除去三氟乙酸, 重复 3 次, 加入 KBH<sub>4</sub> 室温反应 2 h 还原, 用甲醇除去 H<sub>2</sub>BO<sub>4</sub>, 加入乙醇和无水吡啶各 0.5 mL, 封管 90 °C 乙酰化 2 h,

干燥后氯仿溶解进行 GC-MS 分析, 并按仪器所附数据库检索定性。

2.2.7 红外光谱及核磁共振测定 Necolit 5D × B 型红外光谱仪, KBr 压片, 扫描范围 4 000 ~ 400 cm<sup>-1</sup>。用 D<sub>2</sub>O 配成 30 mg/mL 的样品溶液, 室温下利用 Varian Inova 600 核磁共振仪进行分析测定。

2.2.8 灰树花糖肽各组分体外对人乳腺癌细胞 MCF-7 抑制作用测定 人乳腺癌细胞 MCF-7 培养于 RPMI 1640 培养液中, 加质量分数 10% 新生牛血清(FCS), 100 U/ml 青霉素, 4 μL/mL 胰岛素。放入 37 °C CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 接种时细胞浓度调整为 3 ~ 5 × 10<sup>5</sup> 个/ml, 将细胞加入 96 孔培养板中, 每孔 150 μL, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24 h, 再加入用完全培养基稀释成不同浓度的样品溶液 150 μL, 空白对照组加入等体积的 RPMI 1640 完全培养基, 每组设 4 个复孔, 将细胞培养板移入 CO<sub>2</sub> 培养箱中, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度条件下培养 48 h 后 MTT 法 570nm 下测定其吸收值, 计算抑制率。

## 3 结果与讨论

### 3.1 灰树花体外抗肿瘤糖肽分离纯化以及活性组分的筛选

灰树花菌丝体糖肽通过水提取, 乙醇沉淀, 复溶后, 经 DEAE-Sepharose Fast-flow 离子交换柱层析, 得到一中性多糖组分(GFSP0)和 3 个盐洗脱组分(GFPS1, GFPS3 和 GFPS5) (如图 1 所示)。由图可以看出, 各组分中糖含量随着盐离子浓度的增加而降低, 4 个组分在 280 nm 下都有一定的吸收, 随着盐离子浓度的增加其相对含量也在增加。

将各组分进行体外对 MCF-7 作用的结果如图 2 所示。结果表明, 灰树花多糖体外抗肿瘤活性主要集中在 GFPS1 组分, 并且对 MCF-7 的作用一定程度上具有剂量依赖关系。而其他组分即使在较高剂量(500 μg/ml)的条件下, 对肿瘤细胞增值的影响都不大。将 GFPS1 进一步经 Sephadex G-100 柱层析。从图 3 洗脱曲线可以看出, 得到两组分 GFPS1a 与 GFPS1b, 其中 GFPS1b 相对含量较大。考察二者体外对 MCF-7 增值作用的影响, 图 4 表明, 抗肿瘤活性组分主要集中在 GFPS1b, 并且经过进一步纯化, 其有效剂量明显低于纯化前 GFPS1 组分。

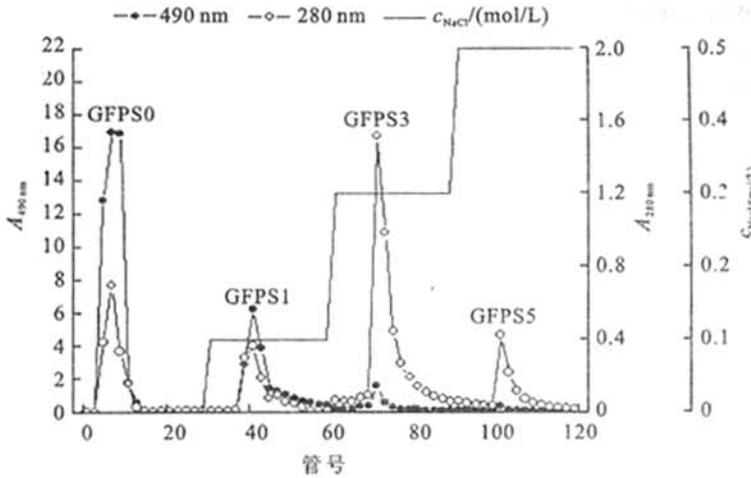


图 1 灰树花多糖在 DEAE-Sephacel fast-flow 层析柱上的洗脱曲线

Fig. 1 Anion-exchange chromatography of polysaccharides from *G. frondosa* GF9801 on DEAE-Sephacel fast-flow

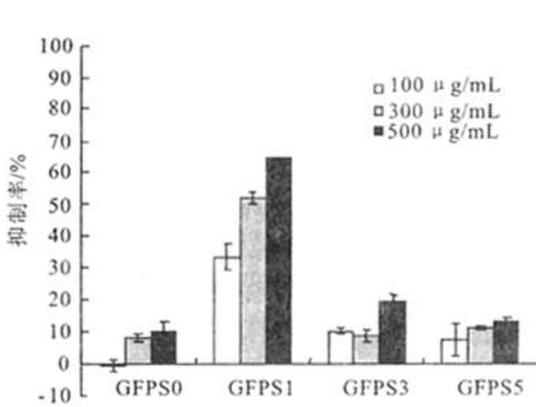


图 2 灰树花多糖不同质量浓度、组分对 MCF-7 细胞增殖抑制率的影响

Fig. 2 Inhibition of proliferation of MCF-7 cells by different concentrations of polysaccharides from *G. frondosa* GF9801

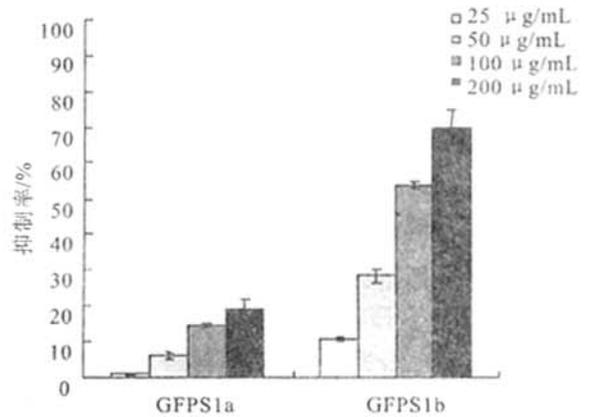


图 4 GFPS1a 和 GFPS1b 对 MCF-7 细胞增殖抑制率的影响

Fig. 4 Inhibition of proliferation of MCF-7 cells by different concentrations of GFPS1a and GFPS1b from *G. frondosa* GF9801

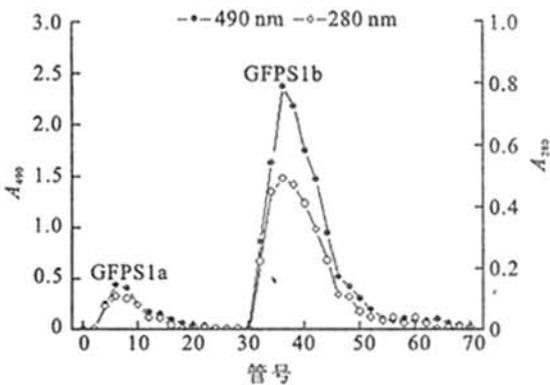


图 3 GFPS1b 经 Sephadex G-100 进一步纯化

Fig. 3 Further purification of GFPS1 by gel filtration on Sephadex G-100

万方数据

### 3.2 GFPS1b 的理化性质

GFPS1b 为棕黄色絮状物, 极易溶解于水, 不溶于乙醇、丙酮等有机溶剂. HPGPC 得到一单一对称谱图, 表明 GFPS1b 为相对单一组分. 软件分析得出相对重均相对分子质量 ( $M_w$ ) 为 21 000; 比色法测得糖质量分数为 86.0%, 蛋白质质量分数为 16.7%, 并含有质量分数 4% 的糖醛酸. 因此可以初步认为 GFPS1b 为一酸性糖肽. GC, GC-MS 分析结果表明, 其主要有葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖组成, 根据内标法结合校正因子计算葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖摩尔比为 6.77: 3.56: 1, 以葡萄糖为主, 因此 GFPS1b 为一酸性糖肽。

GFPS1b 经酸水解后, 氨基酸自动分析仪分析结果如表 1 所示, 由 17 种氨基酸组成, 其中质量分数较高的天冬氨酸、谷氨酸、精氨酸分别为 3.32%、3.01% 和 3.01%。

表1 灰树花糖肽 GFPS1b 中氨基酸组成及质量分数  
Tab.1 Amino acid composition of hydrolyzed GFPS1b from *G. frondosa* GF9801

氨基酸	质量分数/%	氨基酸	质量分数/%
天冬氨酸 Asp	3.32	半胱氨酸 Cys-s	0.21
谷氨酸 Glu	3.01	缬氨酸 Val	1.22
丝氨酸 Ser	1.53	蛋氨酸 Met	0.23
组氨酸 His	0.13	苯丙氨酸 Phe	0.62
甘氨酸 Gly	1.48	异亮氨酸 Ile	0.75
苏氨酸 Thr	1.68	亮氨酸 Leu	1.14
丙氨酸 Ala	0.37	赖氨酸 Lys	1.00
精氨酸 Arg	3.01	脯氨酸 Pro	0.99
酪氨酸 Tyr	0.36		

### 3.3 红外光谱分析

从样品 GFPS1b 的红外光谱图中可看到  $3393\text{ cm}^{-1}$  (C-O)、 $2930\text{ cm}^{-1}$  (C-H)、 $1431\sim 1457\text{ cm}^{-1}$  (C-O) 为多糖糖链特征吸收峰;  $1642\text{ cm}^{-1}$  羧基吸收峰, 表明糖肽中含有一定量的糖醛酸, 这也与前面比色法测定结果相一致;  $863\text{ cm}^{-1}$  左右的吸收峰表明其含  $\alpha$  型构型; 另外  $924\text{ cm}^{-1}$  附近存在较弱的吸收峰, 这是阿拉伯糖呋喃环对称伸缩振动所造成。

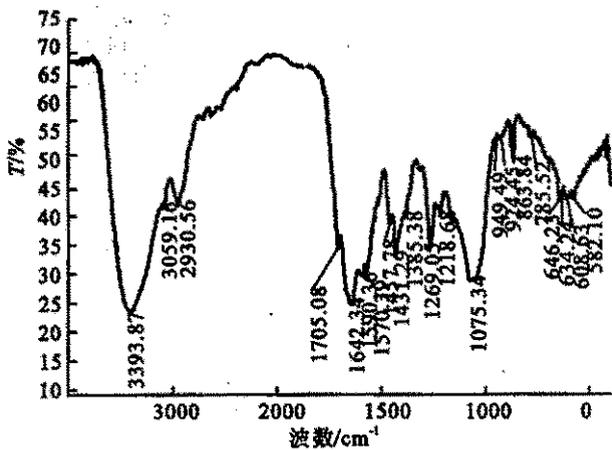


图5 灰树花糖肽 GFPS1b 的红外吸收光谱

Fig.5 FT-IR spectra of GFPS1b from *G. frondosa* GF9801 mycelia

### 3.4 部分酸水解结果

部分酸水解后, 各部分经硅烷化衍生, GC 分

析结果表明, 其主链由 Glc 和 Gal 所构成, 在透析袋内醇析上清液检测出 Ara, Gal 和 Glc, 说明它们可以形成支链或者主链的末端残基, 在透析袋外部分检测出 Ara 的含量远大于袋内部分, 说明 Ara 可能主要存在支链末端。

### 3.5 高碘酸氧化和 Smith 降解

GFPS1b 经高碘酸氧化, 48 h 后吸收达到稳定值, 并产生少量甲酸, 说明 Glc 和 Gal 存在一定量的  $\rightarrow$  或  $1\rightarrow 6$  键型, 或者 Ara 存在  $1\rightarrow$  键型, Smith 降解检测出较多含量的 Glc, 说明 Glc 存在不被高碘酸氧化的键型, 如  $1\rightarrow 3$ ;  $1\rightarrow 2$ ;  $3$ ;  $1\rightarrow 3$ ;  $4$ ;  $1\rightarrow 3$ ;  $6$  等中的某些键型, 同时在检出赤藓醇, 说明还有  $1\rightarrow 4$  键型存在 GFPS1b 的结构中。

### 3.6 甲基化分析

GFPS1b 经甲基化、水解、还原及乙酰化后得到甲基化糖醇乙酸酯, 进行 GC 和 GC/MS 联机分析, 结合本机所带数据库和文献的相对保留时间和不同单糖的主要离子碎片, 可以推断出 GFPS1b 中各糖基的连接方式及各种单糖所对应的比例。分析结果列于表 2。表 2 表明, Ara 位于糖链的末端。糖链的分支点在 Glc 上, 其为  $1,3,6$  连接, Glc 还有  $1\rightarrow 3$ 、 $1\rightarrow 4$  连接方式, 而 Gal 存在  $1\rightarrow 4$  和  $1\rightarrow 6$  两种连接方式。通过各残基的摩尔比, 可以初步判定 GFPS1b 的主链由 Glc  $1\rightarrow 3$ ; Glc  $1\rightarrow 3,6$ ; Gal  $1\rightarrow 4$  以及少量 Gal  $1\rightarrow 6$  组成, 而 Ara  $1\rightarrow$  为糖链的末端残基。

### 3.7 GFPS1b $^1\text{H}$ 和 $^{13}\text{C}$ 核磁共振分析

GFPS1b 的  $^{13}\text{C}$ -NMR 谱显示, 信号出现在  $\delta 99.3\sim 104.1$  之间的化学位移为糖肽端基  $\text{C}^{-1}$  的信号, 同时也进一步证明糖苷键为  $\alpha$  型; 处于低场  $\delta 174.5\sim 175.0$  之间的信号为糖醛酸的化学位移。  $^1\text{H}$  NMR 分析表明  $5.2\delta$  为 H-1 的化学位移, 同样表明 GFPS1b 为  $\alpha$  型。结合文献对 GFPS1b 的 C 和 H 的化学位移进行初步归属, 如表 3 所示。综合以上的结论, 可以推测具有对 MCF-7 增值有一定抑制作用的灰树花糖肽 GFPS1b 的结构式如图 7 所示。

表2 GFPS1b 甲基化结果分析

Tab.2 Methylation analysis data for GFPS1b

峰号	保留时间/min	单糖甲基化衍生物	摩尔比	质子碎片	键型
1	14.06	2,3,5-Me3-Ara	1.6	43,45,71,87,101,117,129,161	Ara( $1\rightarrow$
2	14.99	2,3,5-Me3-Ara	0.1	43,45,71,87,101,117,129	Ara( $1\rightarrow$
3	18.05	2,3,6-Me3-Glu	1.2	43,45,71,87,101,113,117,129,161,173,233	$\rightarrow 4$ )Glc( $1\rightarrow$
4	19.24	2,4,6-Me3-Glu	2.5	43,45,71,87,101,117,129,159,161,189	$\rightarrow 3$ )Glc( $1\rightarrow$
5	19.56	2,3,6-Me3-Gal	1.2	43,45,87,99,101,117,129,161,233	$\rightarrow 4$ )Gal( $1\rightarrow$
6	21.17	2,3,4-Me3-Gal	0.5	43,44,71,87,101,117,139,130,161,189,233	$\rightarrow 6$ )Gal( $1\rightarrow$
7	24.17	2,4-Me2-Glu	1	43,45,71,87,99,129,189,207	$\rightarrow 1,3$ )Glc( $6\rightarrow$

表 3 灰树花糖肽 GFPS1b 的 <sup>1</sup>H <sup>13</sup>C NMR 特征化学位移解析  
Tab. 3 <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR chemical shifts of polysaccharide GFPS1b

残基	H-1/C-1	H-2/C-2	H-3/C3	H-4/C4	H-5/C-5	H-6/C-6
Araf-( α→	4. 99/104. 1	4. 19/82. 0	3. 94/77. 4	4. 09/84. 9	3. 85 /62. 0	-
→4 )Gal( 1→	5. 00/96. 1	3. 93/69. 8	3. 97/69. 3	4. 25/78. 4	4. 37/69. 3	3. 72 /61. 3
→3 )Glc( 1→	5. 25/101. 7	3. 60/73. 1	3. 81/82. 2	3. 34/72. 6	3. 62/75. 1	3. 83/62. 9
→1 β )Glc( 6→	5. 09/103. 5	3. 75/74. 6	3. 79/85. 9	3. 21/69. 3	3. 57/76. 7	3. 79/70. 8
→6 )Gal( 1→	5. 00/99. 3	3. 87/69. 8	3. 55/71. 1	4. 11/70. 2	4. 04/69. 0	3. 93/69. 5
→4 )Glc( 1→	5. 08/100. 0	3. 64/71. 6	3. 91/73. 7	3. 71/77. 3	3. 79/72. 0	4. 01/60. 9

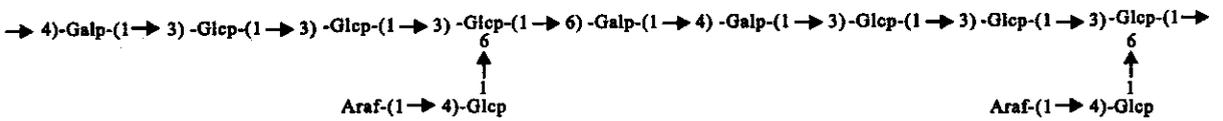


图 6 GFPS1b 的初步结构

Fig. 6 The possible chemical structure of GFPS1b

### 4 结 论

研究表明,以体外抑制肿瘤细胞 MCF-7 增值的活性为主要筛选目标,灰树花深层发酵培养的菌丝体经过水浸提、乙醇沉淀、离子交换、分子筛等分离纯化工具,得到具有较强体外抑制肿瘤细胞 MCF-7 增值作用的糖肽组分 GFPS1b,通过一系列的结构分析表明,GFPS1b 是相对分子质量为 21 000,含有 16.7% 蛋白质,4% 糖醛酸的酸性糖肽,其单糖组成主要有 Glc、Gal、Ara 和少量的糖醛酸,以两个 α - D-Glc( 1→3 ), α - D-Gal( 1→4 ) α - D-Glc( 1→3 , 6 )组成的糖链重复单元,每 2 个重复单元中间由 α - D-Gal( 1→6 )链接,葡萄糖基的 6 位发生取代,取代侧链主要是 α - D-Glc( 1→4 )和 α - L-Ara( 1→。GFPS1b 的理化性质及结构结果表明,该组分与从灰树花子实体中所提取的糖肽 D-Fraction 以及杜巍等所纯化的组分 G. F. -2 的结构都有很大的不同,因此可以认为 GFPS1b 为一新糖肽。

过去诸多研究表明,多糖能够增强人体免疫功能的生物活性物质,被称为“生物反应调节剂(BRM)”,在体外对肿瘤细胞一般不具有直接细胞毒的作用。但是近几年,越来越多研究表明,一定纯度的糖肽在适当的剂量下,对肿瘤细胞起到抑制其增值,促进其凋亡的作用<sup>[10-12]</sup>;并且还可以选择性地作用肿瘤细胞<sup>[13]</sup>,在研究中经离子交换分离所得各糖肽组分(GFPS0, GFPS1, GFPS3, GFPS5)即使在浓度 1000 μg/mL 下,对口腔表皮样细胞 KB 等细胞无明显的直接抑制作用(未附数据)。更有研究表明,多糖体外抗肿瘤作用与其单糖组成、蛋白质含量相对分子质量以及菌种来源及其培养条件都有很强的相关性<sup>[14]</sup>。研究表明,纯化的不同组分,体外抑制肿瘤增值的活性不同,并且随着纯化的进一步进行,有效作用剂量也显著下降。接下来需要对 GFPS1b 作用于 MCF-7 的机制及其构效关系等进行进一步的研究。

### 参考文献:

[ 1 ] Andrea T B , Judith S S , Robert M H , et al. Mushrooms , tumors , and immunity [ J ]. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine** ,1999 , 221 :281 - 293.

[ 2 ] Kodama N , Harada N , Nanba H. A polysaccharide , extract from *Grifola frondosa* , induces Th-1 dominant responses in carcinoma-bearing BALB/c mice [ J ]. **Japanese Journal of Pharmacology** ,2002 , 35 :357 - 360.

[ 3 ] Kodama N , Komuta K , Sakai N , et al. Effects of D-Fraction , a polysaccharide from *Grifola frondosa* on tumor growth involve activation of NK cells [ J ]. **Biological & Pharmaceutical Bulletin** ,2002 , 39 :1647-1670.

## 参考文献：

- [ 1 ] Isao Sakata , Hajime Iwamura. Synthesis and properties of menthyl glycosides[ J ]. **Agric Biol Chem** ,1979 43( 2 ) :307 - 312.
- [ 2 ] Lihua Jiang , Hiroshi Kojima. Isolation of some glycosides as aroma precursor in young leaves of Japanese pepper( *Xanthoxylum piperitum* DC ) [ J ]. **J Agric Food Chem** ,2001 49 :5888 - 5894.
- [ 3 ] Crouzet J , Chassagne D. Naturally Occurring Glycosides[ M ]. **London :Chichester** ,1999.
- [ 4 ] Josip Mastelic , Igor Jerkovic. Synthesis of selected naturally occurring glucosides of volatile compounds. their chromatographic and spectroscopic properties[ J ]. **Croatica Chemica ACTA CCACAA** ,2004 ,77( 3 ) :491 - 500.

( 责任编辑 朱明 )

( 上接第 71 页 )

- [ 4 ] 李小定 , 吴谋成 , 曾晓波 , 等. 灰树花糖肽 PGF-1 对荷瘤小鼠免疫功能的影响 [ J ]. 华中农业大学学报 ,2002 21 ( 2 ) : 261 - 263.
- [ 5 ] 李小定 , 欧阳天贽 , 荣建华 , 等. 灰树花糖肽 PGF-2 的理化性质及化学结构的初步表征 [ J ]. 菌物学报 ,2005 24 ( 2 ) 245 - 250.
- [ 6 ] 杜巍 , 袁静 , 李元瑞 , 等. 灰树花菌丝体糖肽 G. F. -2 理化性质及生物活性的研究 [ J ]. 菌物系统 ,2003 22 ( 2 ) :289 - 195.
- [ 7 ] Lee B C , Bae J T , Pyo H B. et al. Biological activities of the polysaccharides produced from submerged culture of the edible Basidiomycete *Grifola frondosa* [ J ]. **Enzyme and Microbial Technology** ,2003 ,32 :574 - 581.
- [ 8 ] Cui F J , Yin L , Xu Z H , et al. Optimization of the medium composition for production of mycelial biomass and exo-polymer by *Grifola frondosa* GF9801 using response surface methodology [ J ]. **Bioresource Technology** ,2006 ( 2 ) 227 - 230.
- [ 9 ] 张维杰. 糖复合物生化研究技术( 第二版 ) [ M ]. 杭州 : 浙江大学出版社 ,1999.
- [ 10 ] Lee J C , Lee K Y , Son Y O , et al. Plant-originated glycoprotein , G-120 , inhibits the growth of MCF-7 cells and induces their apoptosis[ J ]. **Food and Chemical Toxicology** ,2005 ,43 :961 - 968.
- [ 11 ] Li G , Kim D H , Kim T D , et al. protein-bound polysaccharide from *Phellinus linteus* induces G2/M phase arrest and apoptosis in SW480 human colon cancer cells [ J ]. **Cancer Letter** ,2004 ,216 :175 - 181.
- [ 12 ] Zhang M , Chen H X , Huang J , et al. Effect of lycium barbarum polysaccharide on human hepatoma QGY7703 cells : Inhibition of proliferation and induction of apoptosis [ J ]. **Life Sciences** ,2005 ,76 :2115 - 2124.
- [ 13 ] Takako S H , Nobukazu K , Shigeki S , et al. Protein-bound polysaccharide K induced apoptosis of the human Burkitt lymphoma cell line. Namalwa [ J ]. **Biomedicine & Pharmacotherapy** ,2004 ,58 :226 - 230.
- [ 14 ] Jin Y , Zhang L N , Zhang M , et al. Antitumor activities of heteropolysaccharides of *Poria cocos* mycelia from different strains and culture media[ J ]. **Carbohydrate Research** ,2003 ,338 :1517 - 1521.

( 责任编辑 朱明 )