

文章编号 :1009-038X(2001)04-0380-04

姬松茸多糖的分离纯化及其对白血病细胞的抑制作用

沈爱英¹, 孙震², 刘平², 谷文英²

(1. 苏州大学 生物系, 江苏 苏州 215151; 2. 无锡轻工大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘要: 姬松茸子实体经热水提取, 乙醇沉淀, DEAE-纤维素和 Sephadex G-200 柱分离纯化, 得 ABP-II- α 和 ABP-II- β 两种纯多糖。研究了两种多糖对体外人白血病细胞的抗癌作用。结果表明, 两种多糖对人白血病细胞均有不同程度的抑制作用, 并与作用时间和作用剂量呈正相关。

关键词: 姬松茸; 多糖; 抗癌活性

中图分类号: Q539

文献标识码: A

Isolation and Purification of Polysaccharides from *Agaricus blazei* Murill and Its Inhibitory on Human Leukaemia Cell

SHEN Ai-ying¹, SUN Zhen², LIU Ping², GU Wen-ying²

(1. Department of Biology, Suzhou University, Suzhou 215151, China; 2. School of Food Science and Technology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036, China)

Abstract: Two polysaccharides, ABP-II- α and ABP-II- β , were isolated from the fruit bodies of *Agaricus blazei* Murill. They were further purified by DEAE-cellulose and Sephadex G-200. The anti-tumor activities of the two polysaccharides against leukaemia cell were studied by MTT method. The results showed that both of them had different degree of anti-tumor activities. The results of the growth period test indicated that the inhibiting activities of ABP-II- α and ABP-II- β against leukaemia cell were positive correlation with reaction time and dose.

Key words: *Agaricus blazei*; polysaccharide; anti-tumor activity

姬松茸(*Agaricus blazei* Murill)又名巴西蘑菇, 是一种药食兼用的珍稀食用菌, 具有显著的防癌、抗癌活性, 被日本食用菌业和医学界称为“奇迹的蘑菇”; “地球上的最后食品”^[1]。目前对真菌多糖的抗肿瘤作用, 大多采用动物体内实验来检测其抗癌活性, 如香菇多糖^[2], 斜顶菌多糖^[3], 金针菇多糖^[4], 云芝多糖^[5]等。有关姬松茸多糖的抗肿瘤活

性的研究, 日本学者水野卓等是通过小鼠肉瘤 S-180 腹腔注射法或口服法鉴别其抗肿瘤效果^[6]。国内有关食用菌多糖或糖蛋白的体外抗癌试验, 有灵芝水溶性提取物^[7], 双孢蘑菇水溶性提取物和云芝糖肽^[8,9]等。而有关姬松茸多糖的体外抗肿瘤活性的研究尚未见报道。作者从姬松茸子实体中分离纯化得到两种纯多糖, 并首次采用体外细胞培养研究

收稿日期 2001-01-03; 修订日期 2001-05-12.

作者简介: 沈爱英(1965-), 女, 江苏吴江人, 工学硕士, 讲师.

万方数据

了姬松茸多糖的抗癌活性。

1 材料与方法

1.1 材料

姬松茸子实体由江苏省张家港市微生物研究所惠供;人白血病细胞株(Daudi)由苏州医学院惠供;96孔,24孔细胞培养板为丹麦NUNC公司产品;RPMI1640培养基为美国GIBCO公司产品;MTT为Sigma公司产品;DEAE—纤维素和Sephadex G-200为Pharmacia公司产品;其余均为国产生化试剂或分析纯。

1.2 方法

1.2.1 多糖的提取 按文献[10]的方法略加改进。姬松茸干粉加水(料水比1:20),85℃浸提2.5h,3000 r/min离心15 min,收集上清液,将沉淀重复进行“热提—离心”一次。两次上清液合并减压浓缩至适当体积。加入终浓度体积分数为75%乙醇,于4℃静置12 h,离心收集沉淀。以无水乙醇、丙酮洗涤沉淀,真空干燥得姬松茸粗多糖。

1.2.2 多糖的分离 粗多糖上DEAE—纤维素(OH型)柱(2.6 cm×50 cm,柱体积240 mL,床体积220 mL),上样量5 mL(122 mg),体积流量0.33 mL/min。依次用蒸馏水,0.1,0.3,0.5 mol/L的NaHCO₃,0.1 mol/L的NaOH为洗脱剂进行洗脱。苯酚—浓硫酸法测定多糖分布^[11]。

1.2.3 多糖的进一步纯化 将DEAE—纤维素柱经0.1 mol/L NaHCO₃洗脱液,经浓缩,透析,过Sephadex G-200凝胶过滤色谱柱(1.7 cm×90 cm),以0.1 mol/L NaCl溶液洗脱,体积流量0.15 mL/min。苯酚—浓硫酸法测定多糖分布^[11]。

1.2.4 MTT 比色分析法测定姬松茸多糖对白血病细胞线粒体活性的影响 按文献[11]的方法。取对数生长期的白血病细胞,用含10%小牛血清(FCS)的1640培养液调细胞浓度至 5×10^4 /mL,接种于96孔的培养板中,每孔100 μL;实验组每孔加入不同浓度的多糖溶液各100 μL,对照组加入RPMI 1640培养液100 μL。每组设3个复孔,于37℃,5%的CO₂培养箱中培养24 h后,弃上清液,每孔加入20 μL MTT,继续培养4 h,每孔加入100 μL 盐酸异丙醇,振荡数次,使紫色结晶全部溶解,酶联免疫检测仪测定570 nm的吸光值。

1.2.5 姬松茸多糖对白血病细胞生长周期的影响 将对数生长期的白血病细胞,用含10%小牛血清(FCS)的1640培养液悬浮并计数,调细胞浓度至

8×10^4 /mL,然后将细胞接种于24孔培养板中,每孔1 mL,将不同浓度的姬松茸多糖溶液加入各培养孔中,每种浓度设3个复孔,同时设无糖RPMI 1640培养液3孔为对照,于37℃,5%的CO₂培养箱中培养24,48,72 h后,取出,进行细胞计数,每个多糖浓度的细胞数取3个复孔的平均值,计算姬松茸多糖对人白血病细胞的增殖抑制率。另外,同时观察对照组与实验组之间的细胞形态变化。

$$\text{抑制率(\%)} = \frac{\text{对照组活细胞数} - \text{实验组活细胞数}}{\text{对照组活细胞数}}$$

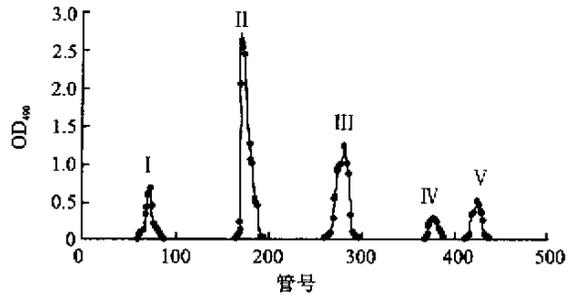
2 结果与分析

2.1 姬松茸多糖的得率

按本文工艺路线提取姬松茸多糖的得率为13.7%。

2.2 DEAE—纤维素柱的分离结果

利用DEAE-cellulose离子交换色谱,对姬松茸粗多糖进行组别分离,依次用H₂O,0.1,0.3,0.5 mol/L的NaHCO₃,0.1 mol/L NaOH洗脱,结果见图1。



注:I,II,III,IV,V分别是以蒸馏水,0.1,0.3,0.5 mol/L NaHCO₃及0.1 mol/L NaOH为洗脱剂时的洗脱液

图1 姬松茸多糖DEAE-cellulose柱层析

Fig.1 Chromatogram of polysaccharide from *Agaricus blazei* on DEAE-cellulose

由图1可以看出,通过逐渐增加洗脱剂的碱性,可以将姬松茸多糖分成5个组分,每个组分所占比例不同,而以0.1 mol/L NaHCO₃为洗脱剂时所占比例最大,达70.28%。

2.3 Sephadex G-200 凝胶过滤色谱柱分离

通过对分离条件的选择试验,上柱量为7 mL,样品质量浓度为6.5 mg/mL,体积流量为10 mL/h的条件下,对组分II(命名为ABP-II)进行分离,结果组分II被分成两个峰,见图2。

2.4 姬松茸多糖对白血病细胞增殖的影响

姬松茸多糖ABP-II-α和ABP-II-β对人白血病

细胞增殖的影响见图3A。从图3A可见,两种多糖对白血病细胞作用24h后,不同组分不同浓度对细胞增殖的抑制作用是不同的。多糖ABP-II- α 在低剂量时与对照无显著差异,只有较高剂量时才对细胞增殖有抑制作用;而多糖ABP-II- β 则从低剂量到高剂量对细胞增殖均有抑制作用。

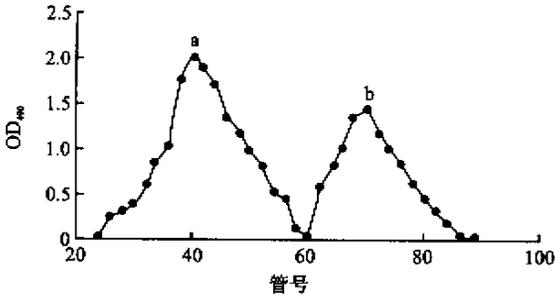


图2 ABP-II的Sephadex G-200柱层析

Fig.2 Chromatogram of ABP-II on Sephadex G-200

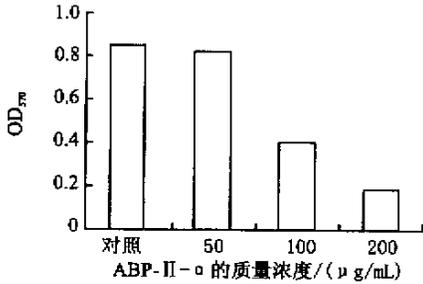


图3 ABP-II- α 对细胞增殖的影响

Fig.3 Effect of ABP-II- α on the cell growth

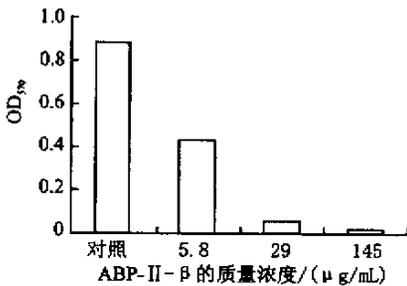


图4 ABP-II- β 对细胞增殖的影响

Fig.4 Effect of ABP-II- β on the cell growth

2.5 姬松茸多糖对白血病细胞生长周期的影响

姬松茸多糖对白血病细胞生长周期的影响见图5。由图5可以看出,多糖ABP-II- α 对白血病细胞有较明显的抑制作用,高质量浓度(100 $\mu\text{g/mL}$)时,无论作用时间长短,均表现出较明显的抑制作用,其抑制率达77.8%~98.4%。中等质量浓度时表现出中等抑制率,20 $\mu\text{g/mL}$ 作用72h时抑制率为43.21%,而低质量浓度(0.16 $\mu\text{g/mL}$)作用72h时,抑制率为25.51%,再降低多糖质量浓度则抑制

作用不明显。

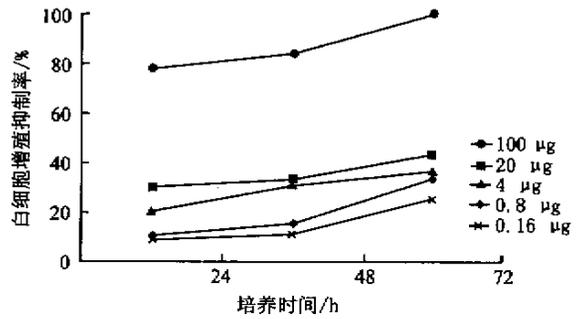


图5 不同剂量ABP-II- α 对不同时间细胞增殖的抑制

Fig.5 The inhibiting of dose(ABP-II- α) on the cell growth at different time

由图6可以看出,多糖ABP-II- β 对白血病细胞的增殖有非常明显的抑制作用,较高质量浓度(20~100 $\mu\text{g/mL}$)下作用48~72h时,抑制率达100%。较低质量浓度(0.8 $\mu\text{g/mL}$)的条件下作用时间短时(24h),抑制率只有22.20%。随着作用时间的延长,抑制率不断增加,48h时为42.23%,72h时为76.1%。其作用剂量及作用时间与其抑制作用均呈正相关。

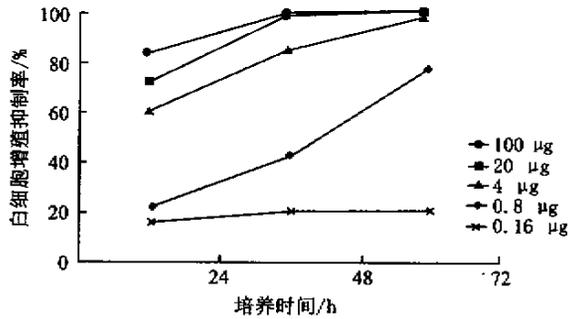


图6 不同剂量ABP-II- β 对不同时间细胞增殖的抑制

Fig.6 The inhibiting of dose(ABP-II- β) on the cell growth at different time

当多糖ABP-II- α (4 $\mu\text{g/mL}$)对Daudi细胞处理48h后,其形态学变化与对照组相比有明显差异。在光学显微镜下观察,可见细胞肿大,细胞内出现多核现象,细胞核边缘出现齿锯状,核内染色质分布不均匀。与对照组相比,用药组细胞染色质发生明显的聚集现象。

3 讨论

3.1 姬松茸子实体多糖提取效果

该工艺经单因子及正交试验优化,粗多糖得率较高。

3.2 姬松茸水溶性多糖组分

根据本研究的分离纯化路线,姬松茸水溶性多

时,抑制率为25.51%,再降低多糖质量浓度则抑制

糖至少含 6 种组分,因 ABP-Ⅱ 为最大组分,因此先对 ABP-Ⅱ 进行纯化及活性试验。

3.3 姬松茸多糖对人白血病细胞的影响

真菌多糖被认为是抗肿瘤的重要有效物质,但是大部分抗肿瘤作用的结论是通过小鼠 S-180 实体瘤得出的。作者以体外培养的人白血病细胞株为材料,研究了多糖对癌细胞的直接作用。MTT 法所测

姬松茸多糖对人白血病细胞线粒体活性的影响反映出其对癌细胞的明显抑制作用,从癌细胞增殖周期结果可以看出,姬松茸多糖能干扰人白血病细胞的细胞周期,使细胞增殖降低。结果表明,姬松茸多糖对白血病细胞增殖有直接的抑制作用,而且这种抑制作用与多糖的作用剂量及作用时间均呈正相关。

参考文献:

- [1] TWADE T, ITO H. Miracle himematsutak[M]. Tokyo Chiku-sha, 1982. 1~152.
- [2] 杜宇野. 香菇多糖的研究进展[J]. 中国食用菌, 1995(4):11.
- [3] 梁忠岩. 斜顶菌中水溶性多糖的研究[J]. 高等学校化学学报, 1983(3):363~369.
- [4] 曹培让. 金针菇子实体多糖 PA3DE 的分离、纯化和分析[J]. 生物化学与生物物理学报, 1989(2):152~156.
- [5] 张翼伸, 李治平, 苗春艳. 云芝多糖的分离与鉴定[J]. 吉林师大学报(自然科学版), 1979(2):108~115.
- [6] 黄年来. 姬松茸与药效[J]. 江苏食用菌, 1994(3):29~31.
- [7] 徐朝晖, 姜世明. 灵芝水溶性提取物对人肝癌 SMMC-7721 细胞 DNA 合成的影响[J]. 中国食用菌, 1996(1):34~35.
- [8] 徐朝晖, 姜世明, 付培武. 双孢蘑菇子实体多糖的提取及其对癌细胞的抑制[J]. 中国食用菌, 1997(4):5~8.
- [9] 李熙民, 许良中. 比较两种云芝蘑菇对体外人癌细胞株的抗癌作用[J]. 上海医科大学学报, 1987(5):326~328.
- [10] 黄文栋, 王亚凡. 一种测定细胞增殖和衰减的快速比色分析法[J]. 生命的化学, 1994(6):44~45.
- [11] 张惟杰. 复合多糖生化研究技术[M]. 上海:上海科技出版社, 1987.