

# 梭柄松苞菇多糖组分的部分理化性质及对 S-180 瘤抑制活性研究

李张 陈洁 汪森 罗强 熊川 杨志荣\*

(四川大学 生命科学学院 四川 成都 610065)

**摘要:** 【目的】分离和纯化梭柄松苞菇子实体多糖, 并对其结构和抗肿瘤活性进行研究。

【方法】采用热水浸提法提取梭柄松苞菇子实体多糖, 采用 DE-52 纤维素柱和 Sephadex G-100 进行多糖的分离纯化, HPGPC 测定多糖分子量, HPLC 测定单糖组成, 红外光谱进行结构分析, 甲基化实验测定连接方式, 核磁共振测定异头碳构型, 采用 S-180 荷瘤小鼠模型对梭柄松苞菇子实体多糖抗肿瘤活性进行研究, 并测定了荷瘤小鼠血清细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-2 和 IL-6 的含量。【结果】从梭柄松苞菇子实体中分离纯化得到多糖命名为 CVP-A, 结果表明, CVP-A 平均分子量为 10 289, 单糖组成主要为葡萄糖, 还含有少量木糖, 含量比约为 15:2。甲基化实验, 核磁共振以及红外光谱分析结果表明 CVP-A 主链为(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-葡聚糖, 侧链连接在主链葡萄糖残基 2 号碳位置。S-180 荷瘤小鼠模型实验表明, CVP-A 对实验性 S-180 实体瘤具有较好的抑制作用, 连续 10 d 腹腔注射 25、50 和 75 mg/(kg·d) CVP-A 的昆明小鼠的肿瘤抑制率分别为 31.99%、42.68%和 60.18%。小鼠血清细胞因子测定表明, CVP-A 能提高荷瘤小鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IL-2 和 IL-6 的含量。【结论】梭柄松苞菇多糖可能作为一个潜在的抗癌药物而开发利用。

**关键词:** 多糖提取, 分离纯化, 结构研究, 抗肿瘤

基金项目: 四川省科技厅共享平台项目(No. 09PT-02)

\*通讯作者: Tel: 86-28-85460487; 信箱: bioyang@163.com

收稿日期: 2012-12-17; 接受日期: 2013-02-28

# Parts of physical and chemical properties of the polysaccharides from *Catathelasma ventricosum* (Pk.) Sing. *Armillaria ventricosa* Peck and their inhibitory effect on S-180 tumor

LI Zhang CHEN Jie WANG Miao LUO Qiang XIONG Chuan  
YANG Zhi-Rong\*

(College of Life Science, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610065, China)

**Abstract:** [Objective] This article mainly studied the extraction, purification, structure and anti-tumor effects of a novel polysaccharide purified from the fruit bodies of *Catathelasma ventricosum* (Pk.) Sing. *Armillaria ventricosa* Peck. [Methods] The polysaccharides of *Catathelasma ventricosum* (Pk.) Sing. *Armillaria ventricosa* Peck were extracted with boiling water and purified by DE-52 column and Sephadex G-100 column. The molecular weight, monosaccharide composition and backbone structure were analysed by HPGPC, HPLC, FT-IR, methylation and NMR; the anti-tumor effect was investigated by S-180 tumor-bearing mice and evaluated by the cytokine levels of IL-2, IL-6 and TNF- $\alpha$  in serum samples of the tumor-bearing mice. [Results] A novel polysaccharide was extracted from the fruit bodies of *Catathelasma ventricosum* (Pk.) Sing. *Armillaria ventricosa* Peck and named CVP-A, the results had showed that the molecular weight of CVP-A was 10 289, the monosaccharide composition of CVP-A were mainly composed of glucose and a small amount of xylose, with a ratio near 15:2. The results of HPGPC, HPLC, FT-IR, methylation and NMR revealed that CVP-A had a backbone structure of (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-glucopyranose which branched at the O-2 of the glucose residues. The results of S-180 tumor-bearing mice model had showed that CVP-A had a good inhibiting effect on the experimental S-180 solid tumor, after injection of 25 mg/(kg·d), 50 mg/(kg·d), 75 mg/(kg·d) CVP-A for ten days, the three Kunming mice group had a tumor inhibition ratio of 31.99%, 42.68%, 60.18%, in which the cytokines levels of IL-2, IL-6 and TNF- $\alpha$  in S-180 tumor-bearing mice were increased significantly. [Conclusion] *Catathelasma ventricosum* (Pk.) Sing. *Armillaria ventricosa* Peck may be a potential source for anti-tumor development.

**Keywords:** Extraction of polysaccharide, Isolation and purification, Structure elucidation, Anti-tumor effect

真菌多糖被证明具有抗肿瘤、抗炎、抗凝血、抗病毒、降血糖、降血脂等功能<sup>[1]</sup>, 从而得到广泛研究。真菌多糖作为免疫调节剂, 可以增强机体特异性免疫和非特异性免疫, 增强巨噬细胞、

单核细胞、中性粒细胞和 NK 细胞作用, 提升机体免疫力, 起到抗肿瘤的作用<sup>[2]</sup>。目前, 国内外对于真菌多糖的研究较热, 主要集中在真菌多糖的资源开发, 结构解析以及药理作用等方面, 并且

已有多种真菌多糖被开发为抗肿瘤药物进行临床试验。梭柄松苞菇, 拉丁学名为 *Catathelasma ventricosum* (Pk.) Sing. *Armillaria ventricosa* Peck, 又名梭柄乳头蘑、老人头, 属于伞菌目, 白蘑科, 松苞菇属, 分布于黑龙江、四川、云南、西藏地区。本文从梭柄松苞菇子实体中提取到一种多糖, 经纯化后命名为 CVP-A, 对其结构进行了研究, 并采用 S-180 荷瘤小鼠模型及荷瘤小鼠血清的细胞因子 IL-2、IL-6、TNF- $\alpha$  的含量变化测定了该多糖的抗肿瘤活性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

梭柄松苞菇(由攀枝花农林科学研究院柳承义鉴定)子实体采自四川省攀枝花地区, DE-52 和 Sephadex G-100 购自 Whatman 公司, 乙醇、氯仿、正丁醇、氯化钠、三氟乙酸、甲醇、DMSO、氢氧化钠、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 、无水硫酸钠、吡啶、乙酸酐、 $\text{NaBD}_4$  均为国产分析纯, 乙腈为国产色谱纯, 环磷酸胺购自 Sigma 公司, 昆明小鼠购自达州动物所。Bench Top Freeze Dryers, VirTis; UV2450, SHIMADZU; Microplate Reader (Model 680), Bio-Rad; Laborzentrifugen 4-16K, Sigma; Rota-Vapor R-200, BüCHI; HPLC 1525, Fraction Collector III, Waters。

### 1.2 多糖的提取、分离及纯化

**1.2.1 提取流程:** 采用热水浸提法<sup>[3-4]</sup>, 取 200 g 梭柄松苞菇子实体经粉碎后, 加入 500 mL 95% 乙醇脱脂过夜, 重复 2 次, 加入 20 倍体积纯水, 沸水浴 6 h, 反复提取 3 次, 6 000 r/min 离心收集上清, 然后减压蒸馏浓缩, 浓缩产物加入 9 倍体积无水乙醇过夜醇沉, 醇沉产物 6 000 r/min 离心收集沉淀, 沉淀用适量纯水溶解, 加入 5 倍体积 Savag 试剂(氯仿:正丁醇=4:1, V/V)剧烈振荡<sup>[5-6]</sup>, 静置分层后收集上层溶液, 反复除蛋白直至除尽, 除蛋白后的产物经过 6 000 r/min 离心, 除去残留

氯仿和正丁醇, 再减压蒸馏浓缩与醇沉, 方法同上, 收集沉淀溶解后经 5 000 kD 分子量透析袋流水透析 3 d, 冷冻干燥得到粗多糖。

**1.2.2 多糖的分离纯化:** 称取 5 g 粗多糖样品, 充分溶解于 50 mL 蒸馏水中, 离心除去沉淀, 上清液加到 DE-52 纤维素柱(4.5 cm $\times$ 40.0 cm)内进行分离, 洗脱液为 0、0.1、0.2、0.5、1.0 mol/L NaCl, 进行梯度洗脱<sup>[7]</sup>。洗脱速度为 1.0 mL/min, 每管收集 3 mL, 采用苯酚硫酸法检测, 合并洗脱峰洗脱液进行浓缩, 透析, 冷冻干燥, 在 0.1 mol/L NaCl 梯度洗脱得到 CVP-A 的半纯品。称取 CVP-A 的半纯品 1 g, 溶解于蒸馏水中, 离心除去沉淀, 上清液上样到 Sephadex G-100 凝胶柱(2.6 cm $\times$ 100 cm)进行分离, 用 0.1 mol/L NaCl 溶液洗脱, 控制洗脱速度为 1.0 mL/min, 采用苯酚硫酸法检测收集液, 收集各洗脱峰洗脱液, 浓缩, 透析, 冷冻干燥得到 CVP-A 纯品。

### 1.3 多糖的结构鉴定

**1.3.1 CVP-A 的分子量测定和单糖组成测定:** 采用高效凝胶渗透色谱(HPGPC)测定 CVP-A 的分子量, 通过标准 T 葡聚糖进行标定(T-500, T-110, T-70, T-40 和 T10), Water GPC 软件进行分析<sup>[8-9]</sup>。取 20 mg CVP-A 样品溶解于 2 mL 2 mol/L 的三氟乙酸中, 封管, 沸水浴 6 h, 60  $^{\circ}\text{C}$  减压蒸干, 加入少量甲醇减压蒸干, 反复 3 次以除尽三氟乙酸。取 10 mg 水解产物, 溶于 1 mL 蒸馏水中, 进行 HPLC 检测, 检测条件<sup>[10]</sup>为: 流动相为乙腈:水=70:30 (V/V), 流速 1.0 mL/min, 固定相为氨基柱, 检测器为示差折光检测器, 柱温为 20  $^{\circ}\text{C}$ , 进样量为 10  $\mu\text{L}$ 。

**1.3.2 CVP-A 的红外光谱分析及核磁共振氢谱:** 取 2 mg 冷冻干燥的 CVP-A 纯品, 加入干燥 KBr 进行研磨, 压片, 测定 CVP-A 在 4 000–400  $\text{cm}^{-1}$  的红外吸收光谱<sup>[11]</sup>。取 10 mg 冷冻干燥的 CVP-A 纯品, 加入 1 mL 纯度为 99.5%的  $\text{D}_2\text{O}$  充分溶解,

然后离心除去沉淀, 将上清液用于 400 M 核磁共振氢谱分析。

**1.3.3 CVP-A 的甲基化分析:** 冷冻干燥过后的 CVP-A 纯品 0.1 mg 放入 4 mL EP 管内, 加入 0.3 mL 无水 DMSO, 充入氮气, 超声波水浴 30 min, 再加入约 10 mg 新鲜磨制的氢氧化钠粉末, 超声波水浴 30 min, 冰浴冷却至样液凝固, 加入 0.1 mL  $\text{CH}_3\text{I}$ , 充入氮气, 超声波水浴 30 min, 期间控制超声波水浴温度为 18 °C–20 °C, 冰浴至样液凝固, 再加入 0.1 mL  $\text{CH}_3\text{I}$ , 充入氮气, 超声波水浴 30 min, 期间控制超声波水浴温度为 18 °C–20 °C。加入 1 mL 含 4 mmol/L  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  的水溶液, 终止甲基化反应。向反应液中加入 0.5 mL 氯仿混匀振荡, 静置数分钟后收集下层氯仿相, 重复此操作 4 次。合并氯仿相, 并加入 0.5 mL 纯水, 振荡混合, 离心除去水相, 重复操作 5 次。向氯仿相中加入少量无水硫酸钠充分混合, 除去水分, 过滤, 滤液用氮气吹干, 得到 CVP-A 甲基化多糖<sup>[12]</sup>, 加入 0.5 mL 2 mol/L 三氟乙酸 120 °C 水解 2 h, 冷却至室温, 用氮气吹干, 再加入 0.1 mL 甲醇, 用氮气吹干。加入 0.5 mL 新配 10 g/L  $\text{NaBD}_4$ , 室温反应 2 h, 期间振荡数次, 逐滴加入 4 mol/L 乙酸中和, pH 试纸检测, 再加入 0.1 mL 甲醇, 用氮气吹干。加入 0.5 mL 新配置的吡啶/乙酸酐(1:1, V/V), 120 °C 反应 30 min, 冷却至室温, 氮气吹干, 加入 2 mL 二氯甲烷, 漩涡振荡, 离心取上清液, 进行 GC-MS 分析。

#### 1.4 CVP-A 抗肿瘤活性研究

**1.4.1 S-180 荷瘤小鼠模型的建立:** 取 S-180 瘤株在小鼠体内腹水传代 3 次, 每次 7 d。在无菌条件下抽取荷瘤小鼠腹水, 用无菌生理盐水调整细胞浓度至  $1 \times 10^7$  个, 在小鼠右肢皮下注射 0.2 mL 细胞悬液<sup>[13]</sup>。

**1.4.2 小鼠分组及给药:** 所购昆明小鼠为 5 周龄小鼠, 体重为 30 g 左右, 将昆明小鼠分成 6 组,

每组 10 只, 雌雄各半, 除正常对照组外, 其它 5 组均按照 S-180 荷瘤小鼠模型<sup>[14]</sup>接种肿瘤。正常对照组和阴性对照组每天腹腔注射等量生理盐水 0.2 mL, 阳性对照组按照 25 mg/(kg·d) 腹腔注射环磷酰胺 0.2 mL, CVP-A 25  $\mu\text{g/g}$  组、CVP-A 50  $\mu\text{g/g}$  组、CVP-A 75  $\mu\text{g/g}$  组浓度梯度组分别按照 25、50 和 75 mg/(kg·d) 腹腔注射 CVP-A 多糖水溶液 0.2 mL。连续给药 10 d。

**1.4.3 小鼠的处理:** 连续给药 10 d 后, 称重, 然后进行小鼠眼球采血, 采血后将小鼠脱颈椎处死, 取瘤块及肝脏、脾脏、胸腺等器官称重。计算器官指数和抑瘤率, 器官指数(mg/g)=各器官重量(mg)/体重(g), 抑瘤率(%)=[(阴性组平均瘤重-给药组平均瘤重)/阴性组平均瘤重]×100, 统计结果表示为  $x \pm s$ , 组间差异进行 *t* 校验, 用统计软件 SPSS 19.0 进行分析。

**1.4.4 小鼠血清细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-2、IL-6 的含量测定:** 将小鼠眼球采得的血液, 室温静置 2 h, 然后再 4 °C 静置 4 h, 4 000 r/min 离心 10 min, 收集上层血清, 置于 -20 °C 冰箱保存备用。小鼠血清细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-2、IL-6 的含量采用 ELISA 试剂盒检测, 重复 3 次, 统计结果表示为  $x \pm s$ , 组间差异进行 *t* 校验, 用统计软件 SPSS 19.0 进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 分离纯化结果

200 g 梭柄松苞菇子实体热水浸提得到梭柄松苞菇粗多糖 28.7 g, 得率为 14.35%。取其中 5 g 梭柄松苞菇粗多糖经过 DE-52 纤维素柱(4.5 cm×40 cm)分离, 在 0.1 mol/L NaCl 洗脱时得到 CVP-A 半纯品 1 530 mg, 如图 1 所示, 再经过分子筛柱 Sephadex G-100 (2.6 cm×100 cm) 分离纯化过后, 得到 CVP-A 纯品 343 mg, 如图 2 所示。

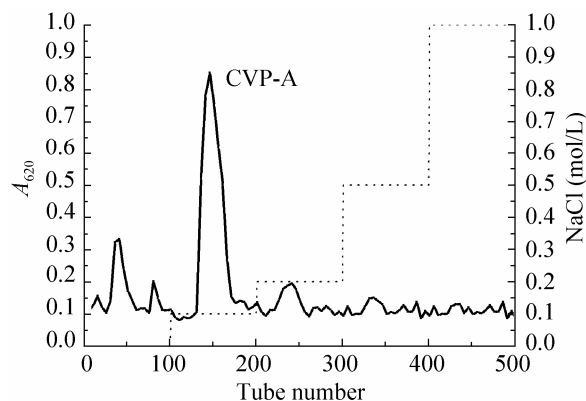


图 1 梭柄松苞菇粗多糖 DE-52 纤维素柱(4.5 cm×40 cm)层析曲线

Fig. 1 DEAE-52 cellulose column (4.5 cm×40 cm) chromatography curve of the crude polysaccharides of *Catathelasma ventricosum* (Pk.) Sing. *Armillaria ventricosa* Peck

注: 图中 CVP-A 即为在 0.1 mol/L NaCl 梯度洗脱所得多糖。  
Note: CVP-A was collected at the concentration of 0.1 mol/L NaCl gradient.

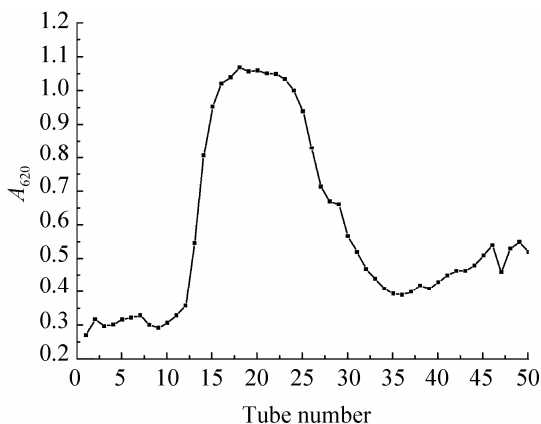


图 2 CVP-A Sephadex G-100 凝胶柱(2.6 cm×100 cm)层析曲线

Fig. 2 Sephadex G-100 (2.6 cm×100 cm) chromatography curve of CVP-A

注: 洗脱液为 0.1 mol/L NaCl.

Note: The eluent is 0.1 mol/L NaCl.

## 2.2 CVP-A 的分子量和单糖组成分析

HPGPC 测定结果如图 3 所示, 测得 CVP-A 的平均分子量为 10 289, 峰型单一, 左右对称, 为纯品多糖。经过 HPLC 测定, CVP-A 单糖组成

主要为葡萄糖, 并且含有少量木糖。

## 2.3 CVP-A 的红外吸收光谱

如图 4 所示, CVP-A 的红外吸收光谱中, 3 395.48  $\text{cm}^{-1}$  为多糖 O-H 伸缩振动, 2 923.24  $\text{cm}^{-1}$  为糖类 C-H 伸缩振动, 1 640.76  $\text{cm}^{-1}$  为酰胺基 C=O 伸缩振动, 1 421.50  $\text{cm}^{-1}$  为糖类 C-H 变角振动, 1 022  $\text{cm}^{-1}$  的强吸收峰说明 CVP-A 单糖组成主要为葡萄糖, 848.54  $\text{cm}^{-1}$  说明 CVP-A 的糖苷键类型为  $\alpha$  构型<sup>[15-16]</sup>, 929.54  $\text{cm}^{-1}$  和 848.54  $\text{cm}^{-1}$  为 (1→4)- $\alpha$ -D-葡聚糖的特征吸收峰<sup>[17]</sup>, 759.83  $\text{cm}^{-1}$  为  $\alpha$ -吡喃环对称伸缩振动。

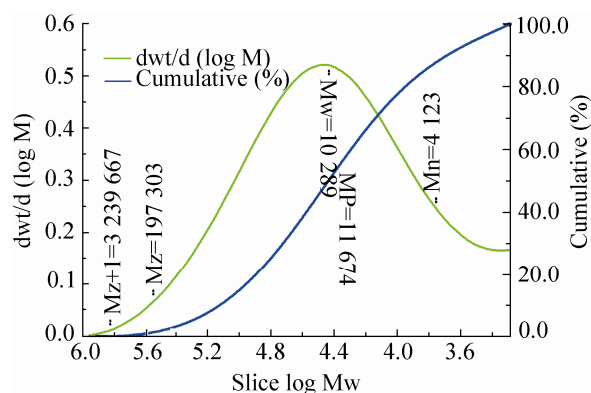


图 3 CVP-A 的 HPGPC 图

Fig. 3 High performance gel permeation chromatography of CVP-A

注: 测得 CVP-A 平均分子量为 10 289.

Note: The average molecular weight of CVP-A was 10 289.

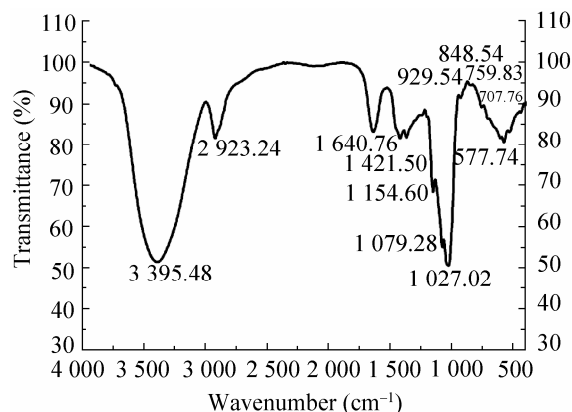


图 4 CVP-A 红外光谱吸收图谱

Fig. 4 Infrared absorption spectra of CVP-A

## 2.4 CVP-A 的甲基化结果和核磁共振氢谱

甲基化结果如表 1 所示, 结果显示 CVP-A 多糖连接方式主要为 1→4, 1→2,4 连接, 部分葡萄糖和全部的木糖均为支链, 百分含量之比 2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Glu:2,3,6-Me<sub>3</sub>-Glu:3,6-Me<sub>2</sub>-Glu:1,2,3,4-Me<sub>4</sub>-Xyl 约为 3:7:5:2, 根据结果推测, CVP-A 中葡萄糖和木糖的比例为 15:2, CVP-A 的主链连接方式主要为 1→4 连接, 侧链连接在主链葡萄糖的 2 号碳位置上, 侧链含木糖和葡萄糖, 一个侧链分支对应一个木糖或葡萄糖残基。

CVP-A 400M 核磁共振氢谱图如图 5 所示, 其中最高信号峰为溶剂峰, 异头碳 H-1 的化学位

表 1 CVP-A 甲基化结果 Table 1 Methylation of CVP-A		
甲基化多糖 Methylated sugar	连接方式 Linkage	相对含量 Relative amount (%)
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glu	T-	3.68
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Glu	1,4-	8.58
3,6-Me <sub>2</sub> -Glu	1,2,4-	6.07
1,2,3,4-Me <sub>4</sub> -Xyl	T-	2.31

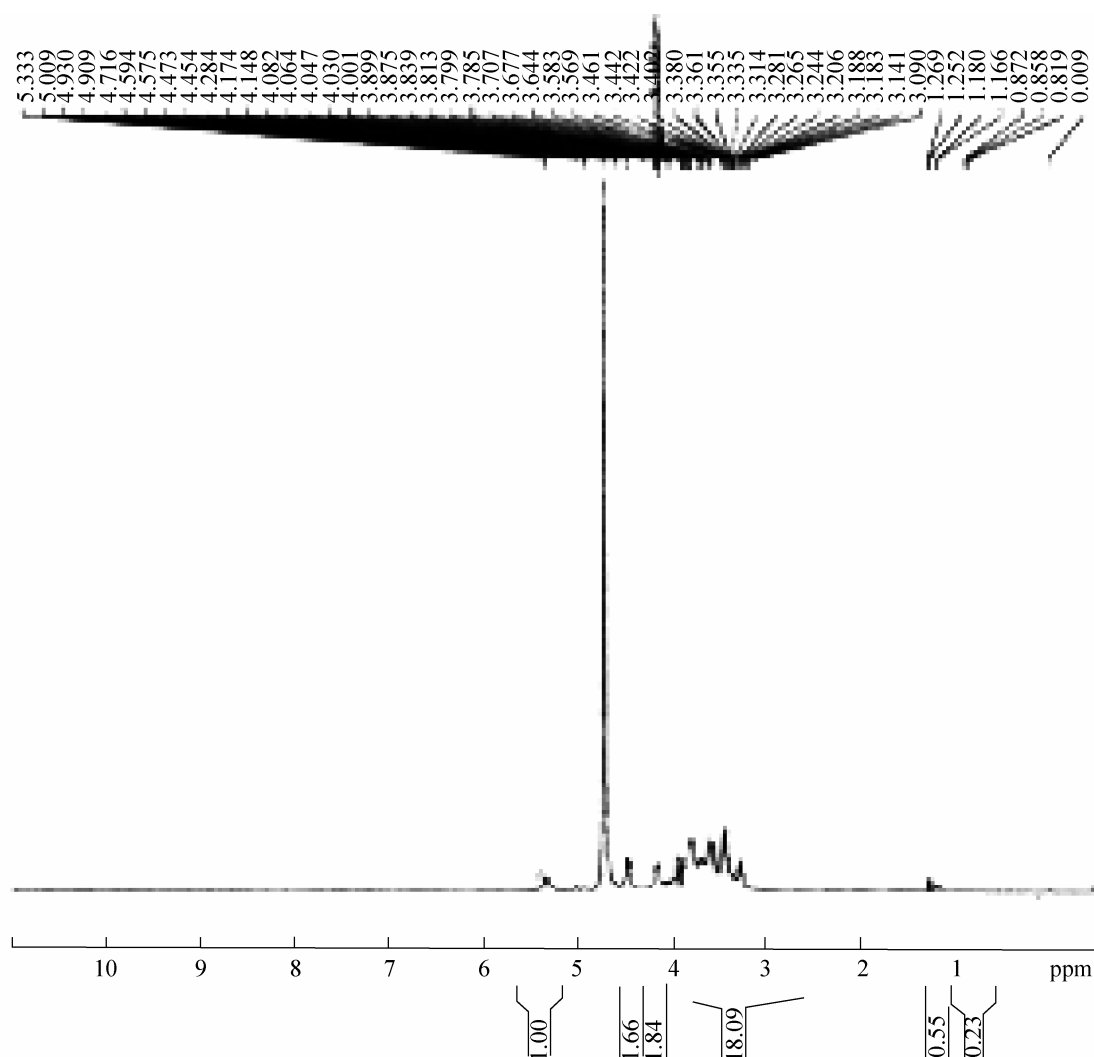


图 5 CVP-A 的核磁共振氢谱  
Fig. 5 <sup>1</sup>H NMR spectroscopy of CVP-A

移在 4.5–5.5 ppm 区域, 其中  $\alpha$  型吡喃糖的 H-1 化学位移大与 4.95 ppm, CVP-A 的异头碳质子 H-1 的化学位移分别为 5.333 ppm 和 5.009 ppm, 均大于 4.95 ppm, 因此可判断 CVP-A 异头碳构型为  $\alpha$  构型<sup>[18]</sup>, 分别为  $\alpha$ -D-葡聚糖和  $\alpha$ -D-木糖, 结果与 CVP-A 的红外图谱相互印证。

## 2.5 CVP-A 的抗肿瘤效果

如表 2 所示, 在连续给药 10 d 后, CVP-A 75  $\mu\text{g/g}$  组, CVP-A 50  $\mu\text{g/g}$  组, CVP-A 25  $\mu\text{g/g}$  组的肿瘤抑制率分别为 60.18%、42.68%、31.99%, 阳性对照组的肿瘤抑制率为 56.83%。与阴性对照组相比, CVP-A 给药组具有一定的肿瘤抑制效果, 随着 CVP-A 的浓度增加, 抑制 S-180 实体瘤形成的效果增大; 与阴性对照组相比, 阳性对照组的抑瘤效果较好, 较低于 CVP-A 75  $\mu\text{g/g}$  组。如表 3 所示, 在 CVP-A 给药组中, 小鼠的胸腺指数随着 CVP-A 浓度的增加而增大, 且明显的大于阴性对照组和阳性对照组, 说明 CVP-A 对小鼠胸腺增殖有一定影响; 在 CVP-A 给药组中, 小鼠的肝脏指数和脾脏指数也明显大于阳性对照组和阴性对照组, 说明 CVP-A 能对给药小鼠的肝脏和脾脏产生影响。与阴性对照组和正常对照组相比,

阳性对照组的胸腺指数、肝脏指数、脾脏指数都有所下降, 证明环磷酰胺可能对小鼠免疫系统具有抑制作用。表 2 和表 3 中数据显著性比较均采用  $t$  校验, \*表示  $P < 0.05$ ; \*\*表示  $P < 0.01$ 。

表 2 不同浓度 CVP-A 对 S-180 荷瘤小鼠抑瘤率的影响

Table 2 The influence of CVP-A on S-180 tumor-bearing mice in tumor-inhibition rate and organ index

组别 Group	瘤重 Tumor weight (g)	抑瘤率 Tumor-inhibition rate (%)
Normal control group	—	—
Negative control group	2.48±0.22	—
Positive control group	1.07±0.15	56.83±4.87*
CVP-A 25 mg/kg group	1.69±0.10	31.99±4.21*
CVP-A 50 mg/kg group	1.42±0.13	42.68±5.07*
CVP-A 75 mg/kg group	0.99±0.16	60.18±6.41*

注: 每组动物为 10 只, 与阴性对照组(Negative control group)的显著性比较采用  $t$  校验. \*:  $P < 0.05$ .

Note: There were ten mice in each group, significant differences compared to Negative control group was evaluated using Students's  $t$  test. \*:  $P < 0.05$ .

表 3 不同浓度 CVP-A 对 S-180 荷瘤小鼠脏器指数的影响

Table 3 The influence of CVP-A on S-180 tumor-bearing mice in organ index

组别 Group	胸腺指数 Thymus index (mg/g)	肝脏指数 Hepatic index (mg/g)	脾脏指数 Spleen Index (mg/g)
Normal control group	2.32±0.45	51.67±7.21	9.23±1.33
Negative control group	2.43±0.56	52.20±6.09	9.58±1.26
Positive control group	1.99±0.83*	45.33±5.66*	8.77±2.87*
CVP-A 25 mg/kg group	2.99±0.48**	64.45±4.02**	12.30±2.28**
CVP-A 50 mg/kg group	3.61±0.86**	59.40±7.72**	11.68±3.57**
CVP-A 75 mg/kg group	4.11±0.99**	59.82±4.87**	9.05±1.64*

注: 每组动物为 10 只, 与正常对照组(Normal control group)和阴性对照组(Negative control group)的显著性比较采用  $t$  校验. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .

Note: There were ten mice in each group, significant differences compared to normal control group and negative control group was evaluated using Students's  $t$  test. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .

## 2.6 CVP-A 对 S-180 荷瘤小鼠血清细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-2、IL-6 的含量

如图 6 所示, 与正常对照组和阴性对照组相比, CVP-A 能不同程度地提高荷瘤小鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IL-2、IL-6 含量水平, 且随着 CVP-A 给药浓度的增加而增大。CVP-A 能较显著促进肿瘤坏死因子 TNF- $\alpha$  的表达, 对于 IL-2 和 IL-6 的影响则稍弱。阳性对照组注射环磷酰胺, 对荷瘤小鼠免疫系统产生了抑制, 结果显示阳性对照组 TNF- $\alpha$ 、IL-2、IL-6 含量水平均比正常对照组有所下降, 而阴性对照组 TNF- $\alpha$ 、IL-2、IL-6 含量

水平比正常对照组有所上升。

## 3 结论

### 3.1 梭柄松苞菇多糖的分离提取和结构鉴定

从梭柄松苞菇子实体中分离得到一种多糖, 经 DE-52 纤维素柱和 Sephadex G-100 分子筛柱纯化后, 得到纯品多糖 CVP-A, 经三氟乙酸水解并用 HPLC 测定其单糖组成主要为葡萄糖, 含有少量木糖, HPGPC 测得 CVP-A 多糖平均分子量为 10 289, CVP-A 的甲基化实验, 核磁共振氢谱以及红外吸收光谱表明, CVP-A 中葡萄糖和木糖的

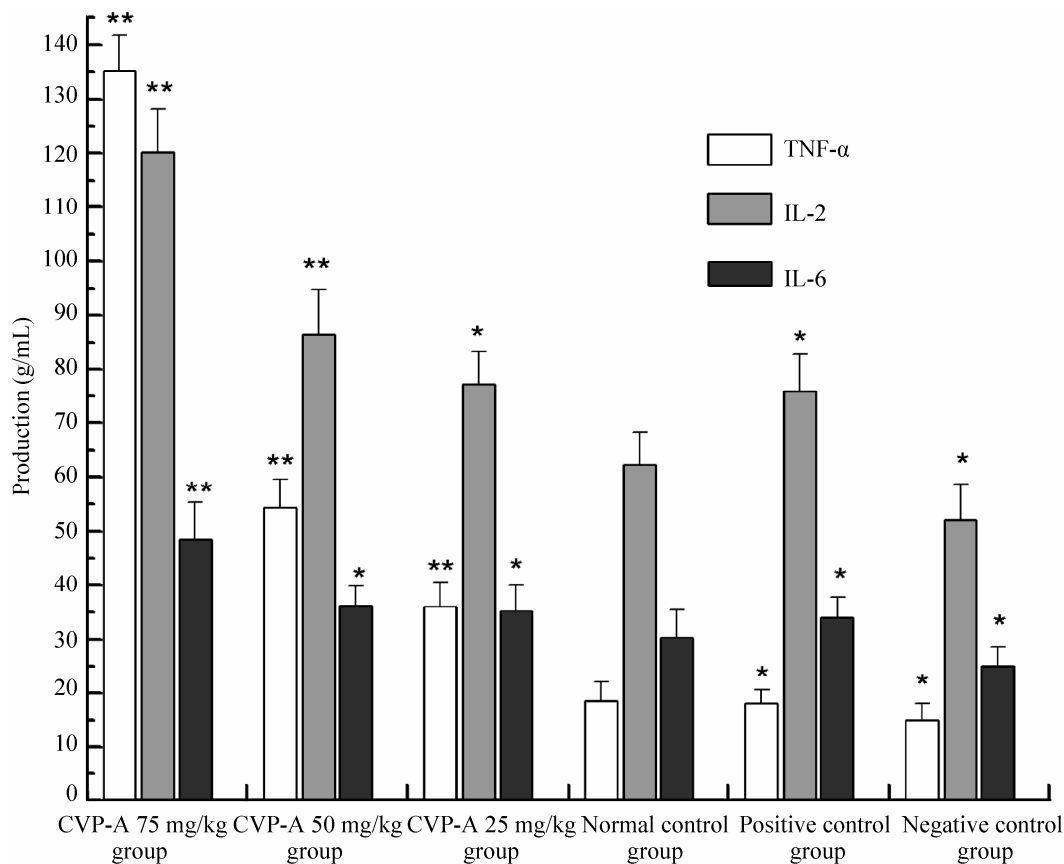


图 6 CVP-A 对 S-180 荷瘤小鼠血清细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-2、IL-6 的含量影响

Fig. 6 *In vivo* effect of CVP-A on serum IL2, IL6 and TNF- $\alpha$  production of tumor-bearing mice

注: 数据均为  $\bar{x} \pm s$  形式, 每组动物为 10 只, 与正常对照组(Normal control group)的显著性比较采用 *t* 校验. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .

Note: Data were presented as  $\bar{x} \pm s$ , there were ten mice in each group, significant differences compared to normal control group was evaluated using students's *t* test. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .



含量比约为 15:2, 主链构型可能为(1→4)- $\alpha$ -D-葡聚糖, 侧链连接在主链葡萄糖残基 2 号碳位置, 侧链主要由葡萄糖和木糖组成。

### 3.2 CVP-A 的抗肿瘤效果

采用 S-180 荷瘤小鼠模型对 CVP-A 抗肿瘤效果进行研究, 实验结果表明, CVP-A 具有一定的抗肿瘤作用, 给药量为 75、50 和 25 mg/(kg·d) 时, 肿瘤抑制率分别为 60.18%、42.68%和 31.99%, 可以显著地抑制 S-180 实体瘤形成。此外, CVP-A 对小鼠胸腺增殖有一定影响, 随着给药量增加, 小鼠胸腺指数增大, 对 S-180 荷瘤小鼠血清细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-2、IL-6 的含量进行测定, 结果显示 CVP-A 能提高 S-180 荷瘤小鼠血清细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-2、IL-6 的含量, 表明 CVP-A 能促进小鼠细胞分泌细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-2、IL-6, 具有潜在的药用价值<sup>[19]</sup>。

目前, 全世界有很多种多糖已经分别作为抗肿瘤药物进行了临床试验, 而且多糖在食品工业、发酵工业和石油工业中也有广泛的应用。本文主要对梭柄松苞菇子实体提取的一种多糖进行了分离、纯化、结构分析以及抗肿瘤活性的研究, 以期能开发其潜在的药用价值。

### 参 考 文 献

- [1] 钟昕, 周素梅, 王强. 药用真菌多糖研究进展[J]. 科技导报, 2009, 27(9): 97-101.
- [2] Moradali MF, Mostafavi H, Ghods S, et al. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi)[J]. International Immunopharmacology, 2007, 7: 701-724.
- [3] 苏红, 李青连, 魏磊, 等. 真菌多糖水提及化学辅助提取方法研究进展[J]. 微生物学通报, 2010, 37(3): 426-432.
- [4] 王雪冰, 赵天瑞, 樊建. 食用菌多糖提取技术研究概况[J]. 中国食用菌, 2010, 29(2): 3-6.
- [5] 梁敏. 香菇多糖的功能性与提取方法探讨[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(12): 175-177.
- [6] Huang SQ, Ning ZX. Extraction of polysaccharide

from *Ganoderma lucidum* and its immune enhancement activity[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2010, 47: 336-341.

- [7] 矫丽曼, 纪纯阳, 阚国仕, 等. 美味牛肝菌胞外多糖的分离纯化及组分分析[J]. 食品工业科技, 2010, 5: 164-166.
- [8] Ding X, Feng S, Cao M, et al. Structure characterization of polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Tricholoma matsutake*[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 81: 942-947.
- [9] Sun HH, Mao WJ, Chen Y, et al. Isolation, chemical characteristics and antioxidant properties of the polysaccharides from marine fungus *Penicillium* sp. F23-2[J]. Carbohydrate Polymers, 2009, 78: 117-124.
- [10] 刘建伟, 刘志华, 刘智勇. HPLC 法测定木糖母液的组成[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(5): 1881-1882.
- [11] 张赛金, 李文权, 邓永智, 等. 海洋微藻多糖的红外光谱分析初探[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2005, 44(增刊): 212-214.
- [12] Needs PW, Selvendran RR. Avoiding oxidative degradation during sodium hydroxide/methyl iodide-mediated carbohydrate methylation in dimethyl sulfoxide[J]. Carbohydrate Research, 1993, 245: 1-10.
- [13] 林卡莉, 陈同强, 黄志华, 等. 香菇多糖对荷瘤鼠免疫细胞及生存率的影响[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(12): 3077-3079.
- [14] 陈真, 郭青龙, 钱之玉, 等. 海洋真菌多糖 YCP 对荷瘤小鼠的抗肿瘤作用[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 24(5): 1-5.
- [15] Chen Y, Mao WJ, Yang YP, et al. Structure and antioxidant activity of an extracellular polysaccharide from coral-associated fungus, *Aspergillus versicolor* LCJ-5-4[J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 7: 42.
- [16] Peng XB, Li Q, Ou LN, et al. GC-MS, FT-IR analysis of black fungus polysaccharides and its inhibition against skin aging in mice[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2010, 47: 304-307.
- [17] Song GL, Du QZ. Structure characterization and antitumor activity of an  $\alpha$ -glucan polysaccharide from *Auricularia polytricha*[J]. Food Research International, 2011, 10.035.
- [18] Zhang YY, Li S, Wang XH, et al. Advances in lentinan: Isolation, structure, chain conformation and bioactivities[J]. Food Hydrocolloids 2011, 25: 196-206.
- [19] 刘玉红, 王凤山. 核磁共振波谱法在多糖结构分析中的应用[J]. 食品与药品, 2007, 9(8A): 39-42.