

文章编号:1001-6880(2014)10-1723-05

真菌多糖的提取、改性及抗肿瘤活性的研究进展

沈洁, 刘昱均, 胡学一*

江南大学化学与材料工程学院, 无锡 214122

摘要:真菌多糖具多种生物活性, 特别是在抗肿瘤方面显得尤为突出, 已成为一大研究热点。真菌多糖的抗肿瘤活性与其本身的构型有关, 而多糖构型又受到提取方式的影响。另外, 对真菌多糖化学改性能提高其生物活性。本文从真菌多糖的提取、改性和抗肿瘤活性这三个方面进行综述。

关键词:真菌多糖; 化学改性; 抗肿瘤

中图分类号:O629.12

文献标识码:A

Research Progress in Extraction, Chemical Modification and Anticancer Activity of Fungi Polysaccharides

SHEN Jie, LIU Yu-jun, HU Xue-yi*

School of Chemical & Material Engineering, Jiangnan University, Jiangsu Wuxi 214122, China

Abstract: Fungi polysaccharides possess various biological activities. Especially their anticancer activity has been received much attention. The anticancer activity of Fungi polysaccharides is related to their conformations that are affected by different extraction. In addition, chemical modification of polysaccharides can improve their anticancer activity. Here, the extraction, modification and anticancer activity are reviewed in this paper.

Key words: Fungi polysaccharide; chemical modification; anticancer activity

真菌在中国医术历史中起到重要作用,《神龙本草经》、《本草纲目》中记录的真菌类药物有20多种。近年来,随着分子生物学的发展,人们逐渐认识到真菌类多糖及其复合物分子不仅仅只是能量载体,更具备许多生物功能活性,能够参与调解多种生命现象,例如:分子识别、细胞粘接与融合、调节信号通路、分子免疫与分子应答、细胞分化与细胞代谢等^[1]。

真菌通过野外采集或人工栽培,采用子实体入药,其生长周期长、劳动强度大,成分比例不稳定、受自然影响较大,使得大量使用真菌类药物受到限制^[2]。随着液体深层发酵技术的发展,多种真菌的深层发酵技术日益完善,具有原料易得、生产周期短、产品质量稳定、生产效率高等优点。采用液体深层发酵技术制备的菌丝体,其真菌类活性成分往往也比子实体中的多,且容易获得,为大规模生产创造标准化、集约化的有利条件。

1 多糖的提取与处理

多糖存在于细胞壁或者胞间质中,与细胞壁或者胞间质常以氢键或离子键结合,因此不同种类的多糖需要采用不同的方法来破坏多糖与各有机体的结合力^[3]。提取多糖的方法大体相同,都是利用多糖可溶于水、酸、碱等溶剂,而不溶于乙醇、甲醇等有机溶剂的特点。通过细胞破壁的方式,将多糖分子从细胞壁或者胞间质中释放;溶解出的多糖经过脱蛋白、脱色素、乙醇沉淀等后续处理步骤,最后经过冷冻干燥获得粗多糖。

1.1 多糖的提取

多糖为极性大分子化合物,利用多糖可溶于水的特点,考察不同的提取温度、溶剂加入量、提取时间对多糖得率的影响。提取溶剂多为水、酸和碱,提取温度与溶剂紧密相关,在酸性条件下提取温度不宜太高,以防止多糖分子降解,因此常在提取液中加入硼氢化钠防止氧化。为了避免多糖在提取过程中分解,多在温和条件下加入特定的生物酶来辅助提取多糖,常用的有纤维素水解酶、果胶酶和蛋白酶。马长清等^[4]用纤维素酶提取的香菇多糖其得率比

收稿日期:2013-12-04 接受日期:2014-06-06

基金项目:国家自然科学基金项目(20875038)

* 通讯作者 Tel:86-510-85327993; E-mail:senger1985@163.com

单纯热水提取的高出 54%, 具有理想的提取效果。沈爱英等^[5]联合使用纤维素酶, 果胶酶和蛋白酶提取姬松茸子实体多糖, 结果表明其提取率高于水提、碱提和酸提, 提取时间仅为水提法的一半。林魁等^[6]研究发现木瓜蛋白酶能显著提高双孢蘑菇多糖的提取效率; 梁敏等^[7]

用木瓜蛋白酶、纤维素酶复合提取香菇多糖并确定其最佳工艺条件, 最终使得提取率比传统水提法提高了 8%。

除了使用不同的酶来水解多糖所处的纤维素、蛋白质、果胶等不同环境外, 微波辅助提取和超声辅助提取也广泛应用于多糖的提取。微波辐射能够穿透介质到达待提取的物料, 极性物质在微波辐射过程中有较强的吸收, 使得分子的偶极矩发生变化, 发生分子振动, 从而加热物料使得细胞内部的水分气化, 产生的压力使得细胞壁破碎, 从而释放体系中的多糖。王美珠等^[8]研究了微波辅助提取香菇多糖, 并与常规热水提取方法比较, 发现微波辅助提取多糖的时间缩短 200%、多糖得率提高了 35%。用微波辅助提取黑灵芝孢子粉多糖除了能提高多糖的得率及纯度以外, 还具有快速高效、节省溶剂等优点^[9]。易鹏^[10]等研究了微波提取茯苓多糖的工艺, 发现微波功率对茯苓多糖提取的影响最大。张桂春等^[11]采用微波辅助法提取发酵灰树花多糖。该多糖经 570W 的微波处理 4.5 min 再用热水提取 2 h 后具有最高的得率。超声波辅助提取多糖是利用了超声波的“空化”作用, 使得细胞壁发生破裂, 多糖可以迅速扩散到溶剂中。尤丽君等^[12]采用超声—高温热水提取香菇多糖, 最终得率为 15.7%, 为传统水提得率的 1.4 倍, 并且超声提取的多糖其三螺旋结构更加完整。这表明用超声法提取香菇多糖在得率上优于传统水提法, 并且从多糖结构上来看超声提取的多糖更具有生物活性。姜宁等^[13]考察了超声波提取金针菇菌丝体多糖的工艺条件。结果表明在超声功率 80 w、超声时间 10 min、料液比 1: 100、pH8.0 这一最佳工艺条件下, 多糖得率为 3.46%。与水浴法提取金针菇菌丝体多糖相比, 超声法提高了多糖得率, 而且缩短了提取时间, 是一种高效的提取方法。但是刘娜女^[14]等研究发现超声波辅助提取鸡腿菇多糖过程中, 超声会破坏多糖的 C = O 键从而形成 C-O; 使得多糖的螺旋聚集体发生降解, 因此超声法提取多糖还是受到了一定的限制。

1.2 多糖的后续处理

采用浸提法获得的多糖溶液中含有大量的杂质, 需要进一步除去, 常见的杂质有蛋白、寡糖、色素及其他小分子物质^[15]。

1.2.1 脱蛋白

采用浸提法获得的多糖溶液中含有大量可溶性蛋白, 部分蛋白以游离蛋白的形式存在, 部分以结合蛋白的形式存在。脱除蛋白的原理大体相似, 都是通过脱蛋白试剂使得蛋白质发生变性, 以沉淀的形式分离除去; 主要的方法有: Sevag 法、三氟三氯乙烷法和三氯乙酸法^[16]。

Sevag 法是最温和的除蛋白方法, 利用蛋白质在氯仿溶液中发生变性, 沉淀后离心去除。Sevag 试剂为氯仿与正丁醇体积比为 4: 1 的混合液, 在去蛋白过程中, 加入 20% 的 Sevag 试剂, 高速搅拌 20 min 后离心分离变性蛋白, 经过反复多次可除去多糖中的游离蛋白。

三氟三氯乙烷法是一种高效、简单的去蛋白方法, 将三氟三氯乙烷直接加入多糖溶液中搅拌 20 min 后离心, 收集水相。由于三氟三氯乙烷沸点低易挥发且有一定的毒性, 使用中受到一定的限制。

三氯乙酸法是一种简单的去蛋白方法, 在多糖溶液中加入 5% 的三氯乙酸静置过夜, 离心收集上层清液。但其反应剧烈, 且容易使多糖分子链断裂, 故常在 5 °C 条件下进行, 因此不适合应用在多糖溶液体系。

1.2.2 脱色素

采用浸提法获得的多糖溶液中含有一些色素, 部分色素以游离式存在, 部分以结合色素形式存在。常用的脱色方法有: 双氧水脱色法、活性炭脱色法和树脂层析法^[17]。

双氧水脱色法是利用双氧水的氧化性将色素的发色基团氧化, 但被氧化后的色素杂质并未脱离体系, 仍需要进行后续的处理。使用双氧水脱色过程时, 双氧水的浓度不易过高, 否则会导致多糖的还原性官能团被氧化。

活性炭脱色法在多糖脱色应用中受到众多限制, 活性炭脱色法是利用活性炭吸附色素分子达到去除色素的目的, 但活性炭也会吸附多糖造成多糖损失, 而一些酚类色素由于带有负电荷不易被活性炭吸附。

树脂层析法是利用色素的电负性吸附色素达到去除色素的目的, 酚类色素由于带有负电荷, 常常使

用弱碱性离子交换树脂吸附色素,常使用 DEAE 纤维素树脂。如果是结合色素,DEAE 有很强的吸附性,不能被水洗脱,则考虑使用双氧水脱色法脱色。

1.2.3 除去低聚糖等小分子杂质

传统的去除小分子杂质的方法多选用透析法,利用浓度差产生的推动力使得透析袋内的杂质透析到体系外。超滤法相比透析法而言具有通量大、效率高等优势,通过外加压力加快透析速度,同时超滤过程中可以将体系中的水分子分离,得到浓缩的多糖,便于后续处理^[18]。

1.2.4 多糖的纯化

纯化多糖的常用方法主要有以下几种:分级沉淀法、纤维素阴离子交换柱法以及凝胶柱层析法^[19]。分级沉淀法是利用多糖分子在加入有机溶剂后其在溶液中溶解度的改变,使得不同分子量范围的多糖在加入不同量有机溶剂的溶液中逐级分步析出。通常情况下以乙醇为沉淀剂,乙醇的体积分数一般选取 30%、50%、70% 和 90%,获得四个沉淀组分。该方法主要用于分离溶解度差异较大的多糖体系。纤维素阴离子交换柱法是利用不同多糖对树脂的吸附能力不同,通过不同浓度的盐溶液洗脱,可以将不同吸附能力的多糖置换;多糖的吸附能力与其结构和带电性有关,一般而言,直链多糖应为空间位阻小,其吸附能力比支链多糖大,分子量大的多糖吸附能力强,酸性多糖比中性多糖的吸附能力强。该方法适合于分离酸性多糖、中性多糖和粘多糖。凝胶柱层析法常用的填料有葡聚糖凝胶和琼脂糖凝胶,利用不同分子量的多糖通过凝胶填料的难易程度不同,分子量大的多糖先被洗出,分子量小的多糖保留时间长后被洗出,从而达到分离的目的,此方法只适合分离粘多糖。

2 多糖的化学改性

一些多糖的活性与其所含的化学基团有密切的联系,多糖的衍生化反应主要有硫酸酯化、羧甲基化、和乙酰基化。其中硫酸酯化的研究比较火热,研究发现天然的海藻多糖含有最多的硫酸酯键——硫酸根取代度为 3,其具有抗 HIV 病毒活性^[20];天然香菇多糖具有很强的肿瘤抑制活性,经过硫酸酯化改性过后,肿瘤抑制活性下降甚至消失,但抗 HIV 病毒活性却大大提高^[21]。

2.1 硫酸酯化

多糖的硫酸酯化合成方法有 Wolfrom(氯磺酸-

吡啶法)法、SO₃-吡啶法、浓硫酸法^[22]。其中 Wolfrom 法应为操作简单,反应物易得等原因被广泛使用。

一些多糖本身没有体外抗肿瘤活性,经过硫酸酯化后便具备了一定的抗肿瘤活性;一些本身抗肿瘤活性不强的多糖经过硫酸酯化后抗肿瘤活性增强。Zhu 等^[23]研究了发酵冬虫夏草多糖,经过硫酸酯化改性后的多糖对 K562 的抑制率提高 60%,但抗氧化能力下降 50%;Wei 等^[24]研究了红芪多糖,经过硫酸酯化改性后的多糖对 A549 和 BGC-823 有显著的抑制作用,并且都将细胞的生长周期抑制在 G1 期。

2.2 羧甲基化

多糖的羧甲基化采取的一般步骤为:将多糖在 95 °C 下用 30% 的 NaOH 溶液处理 2 h,残渣水洗至中性后悬浮在 0.06% 的氯乙酸溶液中,用乙酸调节 pH 至 4.5,于 50 °C 下震荡 6 h。

一些多糖本身没有抗肿瘤活性,经过羧甲基化后便具备了一定的抗肿瘤活性。例如:Wiater 等^[25]研究了羧甲基化平菇多糖,发现其对肿瘤细胞的线粒体代谢有显著的抑制作用,而未羧甲基化的平菇多糖则不具备这个活性;Zhang 等^[26]研究了羧甲基化蘑菇多糖,发现其对 HL-60 肿瘤细胞的 IC₅₀ 仅为 42 mg/mL,比未羧甲基化蘑菇多糖的半致死量减少了 40%;Xu 等^[27]对子实体灵芝多糖进行了羧甲基化改性,发现其浓度为 5 mg/mL 下体外抗羟基自由基达到 87%,比改性前提高了 30%。

2.3 乙酰基化

乙酰化多糖是重要的多糖支链改性衍生物。乙酰化改性使得多糖链发生伸展,使包裹在体系内的羟基暴露在外,进而改善多糖的水溶性。随着乙酰基增加,糖链的伸展程度增加,羟基暴露程度增加,多糖溶解度增大,抗肿瘤活性增强;但随着乙酰化程度加深,羟基数量变少,反而使得溶解度降低,失去抗肿瘤活性;Hu 等^[28]研究了乙酰基化的羊肚菌多糖在 500 μg/mL 浓度下能使 HepG2 细胞发生凋亡;Ma 等^[29]研究了乙酰基化的蘑菇多糖,发现其抗脂质过氧化性明显增强。

3 真菌多糖的抗肿瘤活性

真菌多糖主要有两种抗肿瘤方式——直接作用于肿瘤细胞产生细胞毒性和通过免疫系统抑制肿瘤细胞生长的调节免疫功能。在直接抗肿瘤方面,Wu

et al.^[30]发现来自 *Armillaria mellea* 的多糖 AMP 通过阻断肺癌细胞 A₅₄₉ 于 G0/G1 期来抑制细胞生长。另外 AMP 也能降低 A₅₄₉ 细胞线粒体膜电位, 释放细胞色素 C 来发挥抗肿瘤作用。云芝多糖 PSK 通过提高 p21(WAF)/(CIP1) 的表达诱导胰腺癌细胞程序性死亡^[31]。另有研究表明, 发酵 *Trichoderma pseudokoningii* 多糖 EPS 可抑制血癌细胞 K562 增殖, 该作用主要通过线粒体信号通路来上调 Bax 和 p53 mRNA 表达, 下调 Bcl-2 mRNA 表达, 最终导致 K562 细胞凋亡^[32]。黑灵芝多糖 PSG-1 对肉瘤细胞 S-180 的凋亡作用主要由 Bcl-2 蛋白表达的降低、线粒体膜电位的下降和 activation of caspase-3 and -9 的活化这几个因素构成^[33]。Miao et al.^[34] 研究了源于 *Lepista sordida* 多糖 LSPc1 的抗肿瘤机制。该多糖促使细胞周期停留在 G2/M 期, 并且提高了 Bax/Bcl-2 表达比值和 caspase-3 and -9 的活性。另外富含硒的灵芝多糖以激活聚合酶 ADPribose 的方式来达到直接抑制乳腺癌细胞 MCF-7 增殖的效果^[35]。在免疫调节方面, 黑灵芝多糖 PSG-1 能活化免疫细胞使其释放细胞因子 IFN- α 、IL-1 β 和 NO 以抑制 CT26 细胞增殖^[36]。Sun et al.^[37] 研究发现 Huaier 多糖之所以能刺激免疫细胞释放 NO 是因为其激发了 NO 合成因子(iNOS)的活性。近年来的研究发现, 细胞的氧化受损是诱发肿瘤的主要原因之一。解决该问题的根本途径就是有效清除活性氧。研究指出, 来自 *Pleurotus abalonus* 的子实体多糖通过抗氧化、清除氧自由基发挥抗肿瘤作用^[38]。有文献报道了灵芝多糖显著降低氧自由基、DPPH 自由基、氢氧根自由基的含量, 减少了细胞被氧化的概率^[39]。由此可见, 多糖对清除自由基方面很有成效。

4 结论

真菌多糖是中药活性成分研究的一大热点。其多种生物活性与低毒性等特点使真菌多糖直接或作为先导化合物间接发展成药物。随着研究的不断深入, 真菌多糖的提取、分离、合成以及制药工艺的进一步发展, 将会开发出越来越多的药用真菌多糖。

参考文献

1 Zhang SZ(张树政), Glycoscience and glycotechnology (糖生物学与糖生物工程). Beijing: Tsinghua University Pub-

lishing House, 2002.

- 2 Yu FQ (于富强), et al. Prospects of exploitation and utilization on edible fungi resource in Yunnan. *Chin Wild Plant Resour* (中国野生植物资源), 2002, 21: 21-25.
- 3 Yin Y (尹艳), et al. Progresses in polysaccharides extraction. *Sci & Technol of Food Ind* (食品工业科技), 2007, 28: 248-250.
- 4 Ma CQ (马长清), et al. A study of methods for extraction of Lentinan and amino acids from the foot body of *Lentinus Edodes*. *Her of Med* (医药导报), 2003, 22: 374-376.
- 5 Shen AY (沈爱英), Gu WY (谷文英). Study on extraction of *Aga ricus blazei* polysaccharide by composite enzyme. *Edible Fungi* (食用菌), 2001, 3: 7-9.
- 6 Lin K (林魁), et al. Study on extraction of *Agaricus bisporus* by enzyme. *Mod agri technol* (现代农业科技), 2012, 18: 289-290.
- 7 Liang M (梁敏), Wu HY (邬洪源). *Lentinan extraction by composite enzyme*. *J Sci Teachers'College & University* (高师理科学刊), 2008, 6: 72-74.
- 8 Wang MZ (王美珠), et al. Two extraction methods of Lentian polysaccharide. *Amino Acids & Biotic Resour* (氨基酸和生物资源), 2012, 34: 51-52.
- 9 Huang P (黄璞), et al. Study on microwave-assisted extraction of polysaccharides from spores of *Ganoderma atrum* with response surface analysis. *Food Sci* (食品科学), 2007, 10: 200-203.
- 10 Yi P (易鹏), et al. Study on technics of microwave extraction of pachyman from *Poria Cocos*. *J Chengdu University of Traditional Chin Med* (成都中医药大学学报), 2012, 4: 17.
- 11 Zhang GC (张桂春), et al. Microwave-assisted extraction of polysaccharides from total fermentation of *Cirifola frondosa* and their anti-tumor activity. *Food Sci* (食品科学), 2013, 34: 30-35.
- 12 You LJ (游丽君), et al. Characteristics of *Lentinan* polysaccharide extracted by ultrasonic wave and hot water. *Mod Food Sci & Technol* (现代食品科技), 2013, 9: 2167-2172.
- 13 Jiang N (姜宁), et al. Study on ultrasonic extraction process of polysaccharides from *Flammulina velutipes* (Cart.) Sing. *Food Sci* (食品科学), 2008, 29: 289-292.
- 14 Liu NN (刘娜女), et al. Effect of ultra son ic2a ssisted extraction on polysaccharide structure from *Coprinus comatus* characterized by FTIR and AFM. *Chin J Bioprocess Eng* (生物加工过程), 2010, 8: 56-60.
- 15 Sheng JR (盛家荣), et al. The extraction, isolation and structure analysis of polysaccharides. *Journal of Guangxi Teachers College* (广西师院学报), 1999, 16(4): 49-54.

- 16 Zhu XX (朱晓霞), Luo XG (罗学刚). Progress in extraction and purification of polysaccharides. *Food Res & Dev* (食品研究与开发), 2007, 28:186-189.
- 17 Fu XP (付学鹏), Yang XJ (杨晓杰). The study on decolorization methods of plant polysaccharide. *Food Res & Dev* (食品研究与开发), 2006, 30:28-31.
- 18 Feng WL(冯文亮), et al. Study on the high-purity Fructooligosaccharide by the nanofiltration technique. *J Dairy Sci & Technol* (乳业科学与技术), 2003, 3:102-105.
- 19 Liu XH (刘兴华), Zhao HR (赵浩如). Extraction, separation and purification of natural glycoproteins. *Prog in Pharm Sci* (药学进展), 2006, 30:543.
- 20 Zvyagintseva TN, et al. Water-soluble polysaccharides of some far-eastern brown seaweeds. Distribution, structure, and their dependence on the developmental conditions. *J Expmar Biol Eco*, 2003, 294:1-13.
- 21 Yoshida O, et al. Sulfation of the immunomodulating polysaccharide *lentinan*: a novel strategy for antivirals to human immunodeficiency virus (HIV). *Biochem Pharmacol*, 1988, 37: 2887-2891.
- 22 Huang XY (黄小燕), et al. Research progress on sulfating modification of polysaccharides and sulfated polysaccharides. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2007, 19:328-332.
- 23 Zhu ZY, et al. Sulfated modification of the polysaccharide from *Cordyceps gunnii* mycelia and its biological activities. *Carbohydr Polym*, 2013, 92:872-876.
- 24 Wei DF, et al. Sulfated modification, characterization and antitumor activities of Radix hedysari polysaccharide. *Int J Biol Macromol*, 2012, 51:471-476.
- 25 Wiater A, et al. alpha-(1 -> 3)-D-Glucans from fruiting bodies of selected macromycetes fungi and the biological activity of their carboxymethylated products. *Biotechnol Lett*, 2011, 33:787-795.
- 26 Zhang M, et al. Carboxymethylated beta-glucans from mushroom sclerotium of *Pleurotus tuber-regium* as novel water-soluble anti-tumor agent. *Carbohydr Polym*, 2004, 57:319-325.
- 27 Xu J, et al. Carboxymethylation of a polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* enhances its antioxidant activities in vitro. *Carbohydr Polym* 2009, 78:227-234.
- 28 Huang QL, et al. Fractionation, characterization and antioxidant activity of exopolysaccharides from fermentation broth of a *Cordyceps sinensis* fungus. *Process Biochem*, 2013, 48:380-386.
- 29 Ma LS, et al. Chemical modification and antioxidant activities of polysaccharide from mushroom *Inonotus obliquus*. *Carbohydr Polym*, 2012, 89:371-378.
- 30 Wu J, et al. A polysaccharide from *Armillaria mellea* exhibits strong in vitro anticancer activity via apoptosis-involved mechanisms. *Int J Biol Macromol*, 2012, 51:663-667.
- 31 Rosendahl AH, et al. Polysaccharide-K (PSK) increases p21 (WAF/Cip1) and promotes apoptosis in pancreatic cancer cells. *Pancreatology*, 2012, 12:467-474.
- 32 Huang T, et al. An exopolysaccharide from *Trichoderma pseudokoningii* and its apoptotic activity on human leukemia K562 cells. *Carbohydr Polym*, 2012, 89:701-708.
- 33 Li WJ, et al. *Ganoderma atrum* polysaccharide induces anti-tumor activity via the mitochondrial apoptotic pathway related to activation of host immune response. *J Cell Biochem*, 2011, 112:860-871.
- 34 Miao S, et al. *Lepista sordida* polysaccharide induces apoptosis of Hep-2 cancer cells via mitochondrial pathway. *Int J Biol Macromol*, 2013, 61:97-101.
- 35 Shang D, et al. A novel polysaccharide from Se-enriched *Ganoderma lucidum* induces apoptosis of human breast cancer cells. *Oncol Rep*, 2011, 25:267-272.
- 36 Zhang S, et al. Immunomodulatory effect of *Ganoderma atrum* polysaccharide on CT26 tumor-bearing mice. *Food Chem*, 2013, 136:1213-1219.
- 37 Sun Y, et al. A polysaccharide from the fungi of *Huaier* exhibits anti-tumor potential and immunomodulatory effects. *Carbohydr Polym*, 2013, 92:577-582.
- 38 Shi X, et al. ROS-dependent mitochondria molecular mechanisms underlying antitumor activity of *Pleurotus abalonus* acidic polysaccharides in human breast cancer MCF-7 Cells. *Plos One*, 2013, 8(5):264-266.
- 39 Chen XP, et al. Free radical scavenging of *Ganoderma lucidum* polysaccharides and its effect on antioxidant enzymes and immunity activities in cervical carcinoma rats. *Carbohydr Polym*, 2009, 77:389-393.