

四川小金县野生羊肚菌多糖的结构解析及体外抗肿瘤活性初探

周丽倩¹,黄瑶¹,鲁艳¹,叶姿妤¹,刘欣岚²,丁祥²,侯怡铃^{1*}¹西华师范大学生命科学学院 西南野生动植物资源保护教育部重点实验室;²西华师范大学环境科学与工程学院,南充 637009

摘要:本研究通过热水浸提法从四川小金县的野生羊肚菌中提取多糖(*Morchella esculenta* polysaccharide, ME-P),利用傅里叶红外光谱(FT-IR)、高效液相色谱(HPLC)、气相质谱连用(GC-MS)和核磁共振(NMR)波谱等技术鉴定ME-P的结构,采用CCK-8法检验ME-P的药物毒性并探寻ME-P体外抗肿瘤活性。结果表明,ME-P中含有吡喃糖环,单糖组成为甘露糖、葡萄糖、半乳糖,比例为4:4:1;具有1,2,3,4,6-*D*-甘露糖、2,3,4,6-*D*-甘露糖交替连接为主链,1,6-*D*-葡萄糖和1,2,6-*D*-半乳糖作为支链,4-*D*-葡萄糖与1,2,6-*D*-半乳糖连接作为末端糖的重复单位的结构新颖的多糖。ME-P对巨噬细胞(RAW 264.7)无毒害,且有极显著($P < 0.01$)增殖作用,在质量浓度为1.25 μg/mL时对RAW 264.7的增殖率可高达79.5%。同时,对小鼠结肠癌细胞(CT26.WT)和胃癌细胞(MFC)均有抑制作用,且均为低浓度时抑制效果较好,在ME-P为1.25 μg/mL时,ME-P对CT26.WT和MFC的抑制率分别为28.20%和34.23%。本研究解析出四川小金县羊肚菌多糖(ME-P)为甘露糖、葡萄糖、半乳糖组成的结构新颖的多糖,无毒且对肿瘤细胞显示出显著的抑制作用,该结果为羊肚菌多糖的开发与应用提供了一定的科学依据。

关键词:羊肚菌;多糖;结构解析;体外;抗肿瘤活性

中图分类号:R93

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)12-2077-12

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.12.012

Structural identification and *in vitro* antitumor activity of wild *Morchella esculenta* polysaccharide from Xiaojin County of Sichuan ProvinceZHOU Li-qian¹,HUANG Yao¹,LU Yan¹,YE Zi-yu¹,LIU Xin-lan²,DING Xiang²,HOU Yi-ling^{1*}¹Key Laboratory of Southwest China Wildlife Resources Conservation (Ministry of Education), College of Life Sciences, China West Normal University; ²College of Environmental Science and Engineering, China West Normal University, Nanchong 637009, China

Abstract: In this study, *Morchella esculenta* polysaccharide (ME-P) were extracted by hot water extraction from wild *M. esculenta* in Xiaojin County, Sichuan Province. Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), high performance liquid chromatography (HPLC), gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) and nuclear magnetic resonance (NMR) were used to identify the structure of ME-P. CCK-8 method was used to detect the drug toxicity of ME-P and to explore the antitumor activity of ME-P *in vitro*. The results showed that ME-P contained pyranose ring, and the monosaccharides were composed of mannose, glucose and galactose with a ratio of 4:4:1. The polysaccharides are characterized by a novel structure, which is characterized by the alternating linkage of 1,2,3,4,6-*D*-mannose and 2,3,4,6-*D*-mannose as the main chain, 1,6-*D*-glucose and 1,2,6-*D*-galactose as the branch chain, and the connection of 4-*D*-glucose and 1,2,6-*D*-galactose as a repeating unit of terminal monosaccharide. ME-P is non-toxic to macrophages (RAW 264.7) and has a very significant effect ($P < 0.01$) on proliferation. The proliferation rate of RAW 264.7 can be as high as 79.5% at a mass concentration of 1.25 μg/mL. At the same time, it had inhibitory effect on mouse colon cancer cells (CT26.WT) and gastric cancer cells (MFC), and the inhibition effect was better at low concentration. When ME-P was 1.25 μg/mL, the inhibition rates of ME-P on CT26.WT and MFC were 28.20% and 34.23%, respectively. This study shows that *M. esculenta* polysaccharides (ME-P) in Xiaojin County, Si-

收稿日期:2022-06-22 接受日期:2022-09-26

基金项目:四川省科技厅应用基础重点项目(2018JY0087);四川省科技厅重点研发项目(2018NZ0055)

*通信作者 Tel:86-013890807470; E-mail: starthlh@126.com

chuan Province is a novel polysaccharide composed of mannose, glucose and galactose, which is non-toxic and has significant inhibitory effect on tumor cells. The results provide a scientific basis for the development and application of *Morchella* polysaccharides.

Key words: *Morchella esculenta*; polysaccharides; structure analysis; *in vitro*; antitumor activity

多糖是具有一定的生物活性的大分子化合物,由 10 个及以上的单糖通过 α -或 β -糖苷键连接而成,有直接或间接的抗肿瘤作用,无明显毒副作用,具备潜在的开发应用前景。多糖的单糖种类、排列方式的多样性及结构多样性使其活性功能具有多样性。多糖的支化程度会影响生物活性,但二者不成绝对线性关系,分支度适中时,活性最佳,例如香菇多糖活性最佳的分支度为 0.33^[1]。多糖主链糖苷键的连接方式也影响其抗肿瘤及抗病毒活性^[1], Liu 等^[2]在体外比较研究蛹虫草的菌丝体与子实体多糖的抗肿瘤活性发现由 α -糖苷键连接的菌丝体多糖的抗肿瘤活性高于由 β -糖苷键连接的子实体多糖。具有高级空间结构的真菌多糖比仅有低级结构的多糖亦显示出更强的抑瘤活性,香菇中提取的多糖(1 \rightarrow 3)- β -D-葡聚糖具有三螺旋结构,对 S180 肿瘤抑制率高达 70.0%,而在 DMSO 处理后呈单链存在的葡聚糖抑瘤率仅为 4.2%^[3]。同时,产地、培养方式、提取手段也影响着多糖的单糖组成及结构。例如从双孢蘑菇(*Agaricus bisporus*)菌丝体中提取的多糖主要由葡萄糖组成,但从其子实体中提取的多糖则主要由甘露糖组成^[4]。以蔗糖作为碳源培养基获得的羊肚菌多糖,其单糖组成中出现核糖成分^[5];超声波辅助提取的多糖有 α -糖苷键和 β -糖苷键,而碱提多糖则只有 α -糖苷键。Ren 等^[6]使用超声辅助酶法在同一羊肚菌中提取到三种多糖,其中 MUP-2 是由阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖组成的双螺旋球状结构,显示出较强清除 O_2^- 的能力,而 MUP-3 则是由鼠李糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖形成的片状结构,其清除 DPPH \cdot 、 \cdot OH、ABTS \cdot 的能力均较高。

羊肚菌(*Morchella esculenta*)也被俗称为“羊肚菜”“羊肚子”等,是低温腐生型蕈菌,属于子囊菌亚门盘菌纲、盘菌目、羊肚菌科、羊肚菌属,是世界上珍贵稀有的食药大型真菌之一,在我国分布广泛,主要分布在我国云贵川、东三省以及西北部的新疆、西藏等地区^[7]。羊肚菌多糖是从羊肚菌子实体、菌丝体或发酵提取液中提取的天然活性产物,是羊肚菌的有效活性成分之一。天然多糖具有抗氧化、抗衰

老、抗肿瘤、调节免疫等功能^[7]。目前四川小金县的野生羊肚菌多糖的结构及其抗肿瘤活性尚未见报道。本研究通过热水浸提法从四川小金县野生羊肚菌中提取到多糖(*Morchella esculenta* polysaccharide, ME-P),利用傅里叶红外光谱、高效液相色谱、气相质谱联用、核磁共振波谱等技术进行 ME-P 一级结构的解析。同时选取贴壁生长的巨噬细胞(RAW 264.7)检测其药物毒性,并以结肠癌细胞(CT26.WT)和胃癌细胞(MFC)为例对其体外抗肿瘤活性进行研究。拟为四川小金县羊肚菌资源的开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料试剂与设备

羊肚菌购自四川省小金县;ME-P 经热水浸提及纯化获得^[8];巨噬细胞株 RAW 264.7、结肠癌细胞 CT26.WT、胃癌细胞 MFC(上海生物化学与细胞生物研究所);重水 D_2O ;碘甲烷(批号 2020040601,分析纯);六甲基二硅烷胺(批号 20111017,分析纯);三甲基氯硅烷(生工科技有限公司,批号 2020040801,分析纯);吡啶(上海麦克林生化科技有限公司,货号 P816288,分析纯);溴化钾 KBr(分析纯);三氟乙酸 TFA(世贸化工有限公司,货号 LK60S11,色谱级);乙腈(美国 Thermo Fisher,色谱级);RPMI1640 培养基(Gibco 公司,货号 11835055);胎牛血清(Gibco 公司,货号 16140071);CCK-8 A cell counting kit(上海碧云天生物技术研究,产品编号 C0038)。

HWS28 恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司);ST40 离心机(德国 Eppendorf 公司);TM-1901/1900 系列傅里叶红外光谱仪(美国 Thermo Fisher 公司);1260 高效液相仪、7890A GC-MS 仪(美国 Agilent 公司);Bruker DRX-600(300)超导核磁共振仪(德国 Bruker 公司);Epoch 酶标仪(Wultiskam Go, Gene 有限公司)。

1.1 傅里叶红外光谱(FT-IR)分析

称取 2 mg 冷冻干燥后的 ME-P 和 200 mg KBr 于研钵中,研磨充分后用压片机制片,将片置于傅里叶红外光谱仪中,在波数 500~4 000 cm^{-1} 范围内进

行扫描^[9]。

1.3 ME-P 的高效液相色谱(HPLC)分析

称取 20 mg ME-P,加入摩尔浓度为 2 mol/L 的三氟乙酸(TFA)溶液 5 mL,封瓶后水浴(100 ℃)水解 6 h,12 000 r/min 离心 5 min 弃沉淀,将三氟乙酸挥发除尽后干燥得到水解后的多糖。以 75% 乙腈作为溶剂分别将完全水解后的多糖 ME-P 和单糖标准品配制成质量浓度为 5 μg/mL 的待测样品,经 HPLC 测定后,与单糖标准品的保留时间比对,对 ME-P 的单糖组分及比例进行判定。

HPLC 条件:RID 检测器;1.4 mL/min 流速;上样体积 10 μL;柱温恒定 35 ℃;流动相为 75% 乙腈。

1.4 ME-P 的气相质谱联用(GC-MS)分析

对 ME-P 进行甲基化处理,用三氟乙酸水解,2 mL 的无水吡啶复溶,加入 2 mL 六甲基二硅烷胺、1 mL 三甲基氯硅烷进行硅烷化衍生,50 ℃ 水浴 20 min 后 12 000 r/min 离心取上清进行气相质谱分析测定^[10]。

色谱条件为:Dionex ICS-3000 离子色谱仪;电导检测器;30 m×0.25 nm×0.25 μm 的石英毛细管柱(DB-5MS);载气为高纯氦;升温程序为初始柱温 80 ℃,保持 3 min,以 10 ℃/min 的速率升温至 200 ℃,保持 10 min;进样口温度 250 ℃;进样量 10 μL。

1.5 ME-P 的核磁共振(NMR)分析

将 50 mg ME-P 充分溶于 600 μL 重水(D₂O),高速(12 000 r/min)离心 10 min,取上清置于干燥核磁管中,以内参四甲基硅烷(TMS)测定得到¹H NMR、¹³C NMR、¹H-¹H COSY、HMQC 谱图,用 Me-stReNova 9.0 软件进行分析。

1.6 ME-P 的药物毒性检测及对肿瘤细胞的抑制作用

将处于对数生长期、状态良好的细胞(巨噬细胞株 RAW 264.7、小鼠结肠癌细胞株 CT26. WT、小鼠胃癌细胞株 MFC)消化后稀释至密度为 1×10⁵ 个/mL 后分别加入 96 孔板中,每孔 100 μL,为避免边缘效应在边缘孔加入 200 μL PBS 缓冲液。在 37 ℃、5% CO₂ 孵箱中恒温培养至细胞已完全贴壁且状态稳定后进行药物毒性检测及抗肿瘤活性检测。

药物毒性检测:按 100 μL/孔的加样量依次加入不同质量浓度(1.25、5、10、20 μg/mL)的 ME-P 溶液作实验组;巨噬细胞阳性对照组加入 100 μL 质量浓度为 10 μg/mL 的脂多糖(LPS)溶液、空白对照组(CK)加入等体积的培养基,每组设置三个重复孔。恒温培养 24、48 h 后,向每孔分别加入 5 μL CCK-8

试剂,再继续培养 3 h 检测其在波长 450 nm 处的吸光度值。

抗肿瘤活性检测:按 100 μL/孔的加样量依次加入不同质量浓度(1.25、5、10、20 μg/mL)的 ME-P 溶液作实验组,肿瘤细胞阳性对照组加入 100 μL 质量浓度为 10 μg/mL 的甘露聚糖肽(MAN)溶液,空白对照组(CK)加入等体积的培养基,每组三个重复。肿瘤细胞恒温培养 24 h 后,加入 CCK-8 检测其细胞活力。

上述检测结果按下式计算细胞(增殖)抑制率。

$$p = \frac{A_2 - A_1}{A_1} \times 100\%$$

式中: p 为细胞(增殖)抑制率; A_1 为空白对照组孔的吸光度值; A_2 为实验组孔、阳性对照组孔的吸光度值。

数据采用 SPSS 16.0 软件进行分析处理,对所有数据进行单因素方差分析(ANOVA)统计学分析,数据用平均标准偏差表示,进行 Tukey 检验和 t 检验。 $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。绘图采用 GraphPad Prism 8.0 软件。

2 结果与讨论

2.1 红外光谱

ME-P 的 FTIR(见图 1)在 4 000~500 cm⁻¹ 范围内有明显信号峰。在 1 250~500 cm⁻¹ 的指纹峰区域,1 114 cm⁻¹处、1 187 cm⁻¹处的信号峰分别为吡喃糖环上 C-O-C 和 C-OH 的伸缩振动峰^[11]。在 4 000~1 250 cm⁻¹ 的特征区,指定 1 399 cm⁻¹处信号峰为 C-H 的变角振动峰;1 634 cm⁻¹处的信号峰归属为 C=O 的非对称伸缩振动峰;3 138 cm⁻¹处的信号峰是糖环上次甲基 C-H 的伸缩振动峰;3 432 cm⁻¹处信号峰为 ME-P 的 O-H 的伸缩振动峰^[12]。以上特征吸收峰表明 ME-P 是含吡喃糖环的多糖。

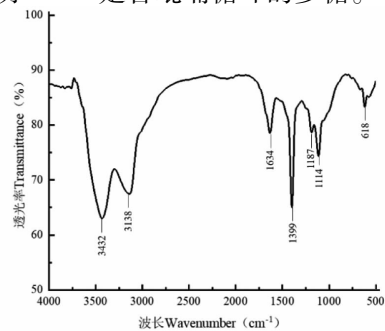


图 1 ME-P 的红外光谱

Fig. 1 Fourier transform infrared spectra of ME-P

2.2 高效液相色谱分析

高效液相色谱结果如图 2 所示,单糖标准品(见图 2a)的保留时间显示葡萄糖保留时间为 14.214 min、半乳糖为 16.704 min、甘露糖为 18.614 min,ME-P(见图 2b)水解单糖的组分保留时间分别

为 14.194、16.693、18.608 min,与单糖标准品比对后显示 ME-P 的单糖组分为葡萄糖(Glc)、半乳糖(Gal)、甘露糖(Man)三种,根据各水解单糖的峰面积(见表 1)提示 Man、Glc、Gal 含量比为 4:4:1。

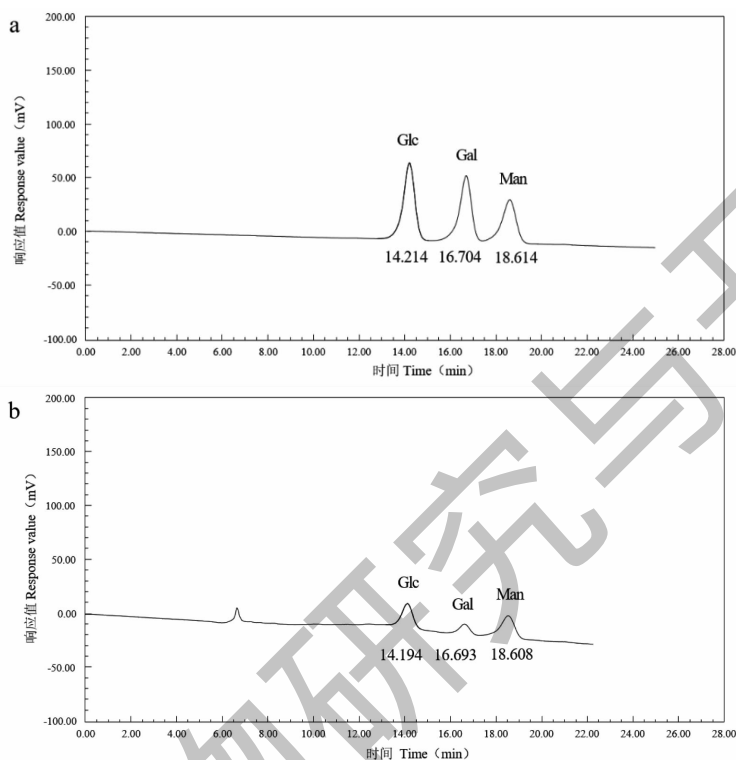


图 2 单糖标准品 (a) 及 ME-P (b) 的高效液相色谱图

Fig. 2 High performance liquid chromatogram of standards (a) and ME-P (b)

表 1 ME-P 水解单糖的保留时间

Table 1 Retention time of hydrolyzed monosaccharide from ME-P

单糖 Monosaccharide	标准品保留时间 Retention time of standard (min)	水解单糖保留时间 Retention time of hydrolyzed monosaccharide (min)	水解单糖峰面积 Peak area of monosaccharide hydrolyzed
葡萄糖 Glc	14.214	14.194	749 420
半乳糖 Gal	16.704	16.693	302 867
甘露糖 Man	18.614	18.608	837 933

2.3 气相质谱联用分析

气相质谱联用分析结果显示(见表 2、图 3), ME-P 中有两种类型的甘露糖(Man)残基碎片离子峰,分别为 1,2,3,4,6-五-O-三甲基硅基-D-吡喃甘露糖及 1-O-甲基-2,3,4,6-四-O-三甲基硅基-D-吡喃甘露糖,提示在 ME-P 中甘露糖(Man)残基分别以 1,2,3,4,6-方式及 2,3,4,6-方式连接(见图 3a、3b)。在 ME-P 中葡萄糖(Glc)的碎片离子峰有 2,

3,4-三-O-甲基-1,6-二-O-三甲基硅基-D-吡喃葡萄糖和 1,2,3,6-四-O-甲基-4-O-三甲基硅基-D-吡喃葡萄糖两种,提示葡萄糖(Glc)在羊肚菌多糖中分别以 1,6-方式和 4-方式连接(见图 3c、3d)。而半乳糖(Gal)残基在 ME-P 中则只存在 1 种,碎片离子峰为 3,4-二-O-甲基-1,2,6-三-O-三甲基硅基-D-吡喃半乳糖(见图 3e),提示半乳糖(Gal)以 1,2,6-方式连接。

表 2 ME-P 中单糖残基的连接位点

Table 2 Linkage sites of monosaccharides in ME-P

甲基化残基 Methylated residue	缩写 Abbreviation	连接方式 Attended mode	峰面积比 Peak area ratio(%)
1,2,3,4,6-五- <i>O</i> -三甲基硅基- <i>D</i> -吡喃甘露糖 1,2,3,4,6-Pent- <i>O</i> -trimethylsilyl- <i>D</i> -mannopyranose	1,2,3,4,6- <i>D</i> -Manp	1,2,3,4,6-	22.1
1- <i>O</i> -甲基-2,3,4,6-四- <i>O</i> -三甲基硅基- <i>D</i> -吡喃甘露糖 1- <i>O</i> -Methyl-2,3,4,6-tetr- <i>O</i> -trimethylsilyl- <i>D</i> -mannopyranose	2,3,4,6- <i>D</i> -Manp	2,3,4,6-	22.2
2,3,4-三- <i>O</i> -甲基-1,6-二- <i>O</i> -三甲基硅基- <i>D</i> -吡喃葡萄糖 2,3,4-Tri- <i>O</i> -methyl-1,6-di- <i>O</i> -trimethylsilyl- <i>D</i> -glucopyranose	1,6- <i>D</i> -Glc p	1,6-	33.8
1,2,3,6-四- <i>O</i> -甲基-4- <i>O</i> -三甲基硅基- <i>D</i> -吡喃葡萄糖 1,2,3,6-Tetr- <i>O</i> -methyl-4- <i>O</i> -trimethylsilyl- <i>D</i> -glucopyranose	4- <i>D</i> -Glc p	4-	10.9
3,4-二- <i>O</i> -甲基-1,2,6-三- <i>O</i> -三甲基硅基- <i>D</i> -吡喃半乳糖 3,4-Di- <i>O</i> -methyl-1,2,6-tri- <i>O</i> -trimethylsilyl- <i>D</i> -galactopyranose	1,2,6- <i>D</i> -Galp	1,2,6-	11.0

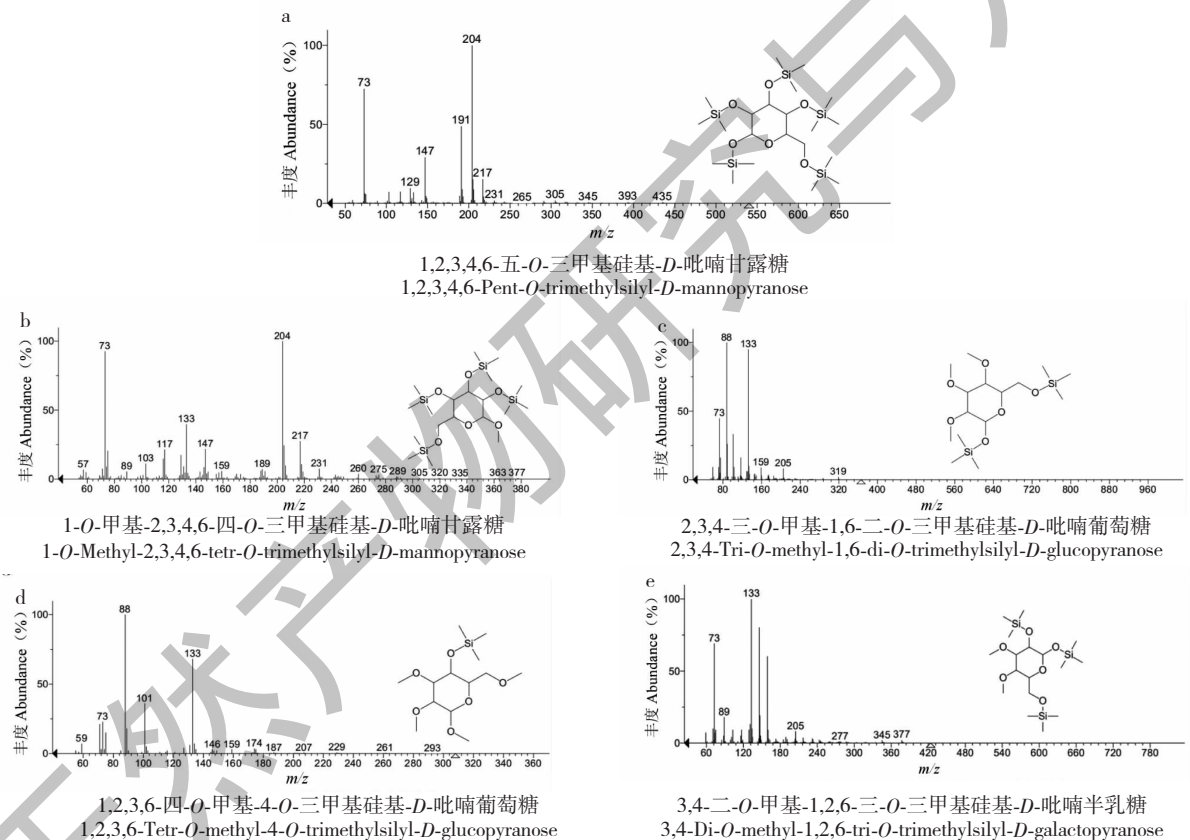


图 3 ME-P 气质联用碎片离子峰

Fig. 3 Fragment ion peak of ME-P by GC-MS

综上, ME-P 由 1,2,3,4,6-*D*-Manp、2,3,4,6-*D*-Manp、1,6-*D*-Glc p、4-*D*-Glc p、1,2,6-*D*-Galp 残基组成, 各单糖残基的含量显示甘露糖为 44.3%, 葡萄糖 44.7%, 半乳糖 11.0%, 其 Man: Glc: Gal 摩尔比为 4:4:1。其中, 葡萄糖的 2 种残基 1,6-*D*-Glc p、4-*D*-Glc p 的含量分别为 33.8% 和 10.9%, 摩尔比为 3:1。

2.4 核磁共振分析

ME-P 的 ^1H NMR 谱如图 4 所示, 异头质子区 δ 4.5 ~ 5.5 范围内有 9 个共振信号峰, 化学位移分别为 δ 5.22、5.19、5.11、5.06、5.03、5.01、4.98、4.90、4.85。各异头质子信号峰的积分比为 1.13:1.76:1.25:1.16:1.57:1.74:1.00:0.31:0.47。位于 δ

3.00 ~ 4.50 区域内的信号峰为 ME-P 单糖糖环上 C2 ~ C6 的氢原子信号重叠。

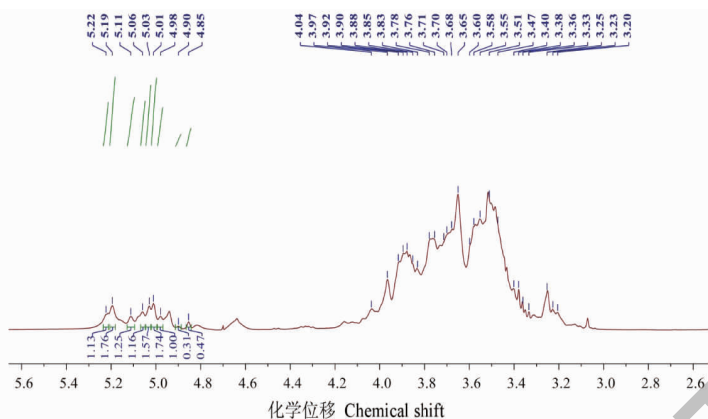


图4 羊肚菌多糖(ME-P)的¹H NMR 图谱

Fig. 4 The ¹H NMR spectrum of ME-P

ME-P 的¹³C NMR 谱(见图 5)可以看出在 δ 90 ~ 110 共振区域有 9 个异头碳的共振峰,化学位移分别为: δ 109.2、108.1、104.8、104.2、102.2、100.6、99.4、98.2、97.8。 δ 60 ~ 81 共振区域为多糖残基 C2 ~ C6 信号位移的重叠。在 δ 82 ~ 88 区域内无吸

收信号,表明 ME-P 均由吡喃糖构成^[13]。在范围为 δ 67 ~ 70 有信号,提示 ME-P 中存在(1 \rightarrow 6)糖苷键,而 δ 80 ~ 83 的信号则表明 ME-P 中存在(1 \rightarrow 3/4)糖苷键^[14]。

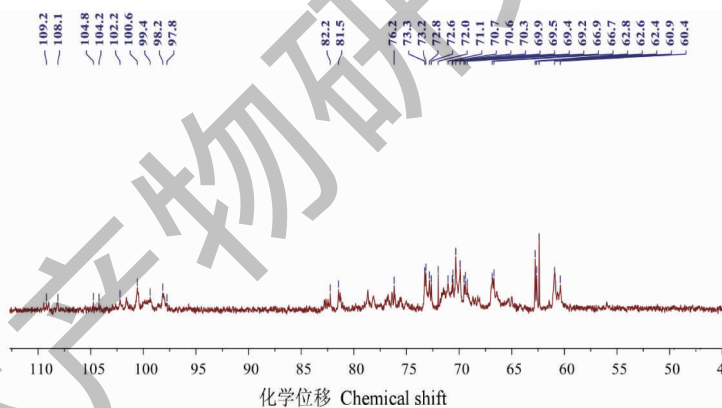


图5 ME-P 的¹³C NMR 图谱

Fig. 5 The ¹³C NMR spectrum of ME-P

¹H-¹H COSY 谱反映氢原子之间的位移关系,根据 ME-P 的¹H-¹H COSY 谱(见图 6)可解析所有单糖残基氢的化学位移。A ~ I 峰为异头氢与相邻碳上的氢之间的化学信号,以 A 峰(δ 5.22/ δ 3.42)为例,其异头氢化学位移为 δ 5.22,对应的邻位氢化学位移为 δ 3.42,则位于 δ 5.22/ δ 3.42 的信号峰归属为 1,6-*D*-Glc 残基 H1 与 H2 的共振耦合信号,并依次将 B 峰(δ 5.19/ δ 3.97)、C 峰(δ 5.11/ δ 3.91)、D 峰(δ 5.06/ δ 3.83)、E 峰(δ 5.03/ δ 3.93)、F 峰(δ

5.01/ δ 4.01)、G 峰(δ 4.98/ δ 3.77)、H 峰(δ 4.90/ δ 3.88)、I 峰(δ 4.85/ δ 3.65)分别归属于 1,6-*D*-Glc、1,6-*D*-Glc、2,3,4,6-*D*-Man、2,3,4,6-*D*-Man、1,2,3,4,6-*D*-Man、1,2,6-*D*-Gal、4-*D*-Glc、1,2,3,4,6-*D*-Man 残基上 H1 与 H2 的共振耦合信号。综上,每个单糖残基上 H1 ~ H6 的信号位移归属见表 3。根据氢谱中积分曲线结果显示,羊肚菌中各单糖残基摩尔比为 Man:Glc:Gal 为 4:4:1,该结果与高效液相结果一致。

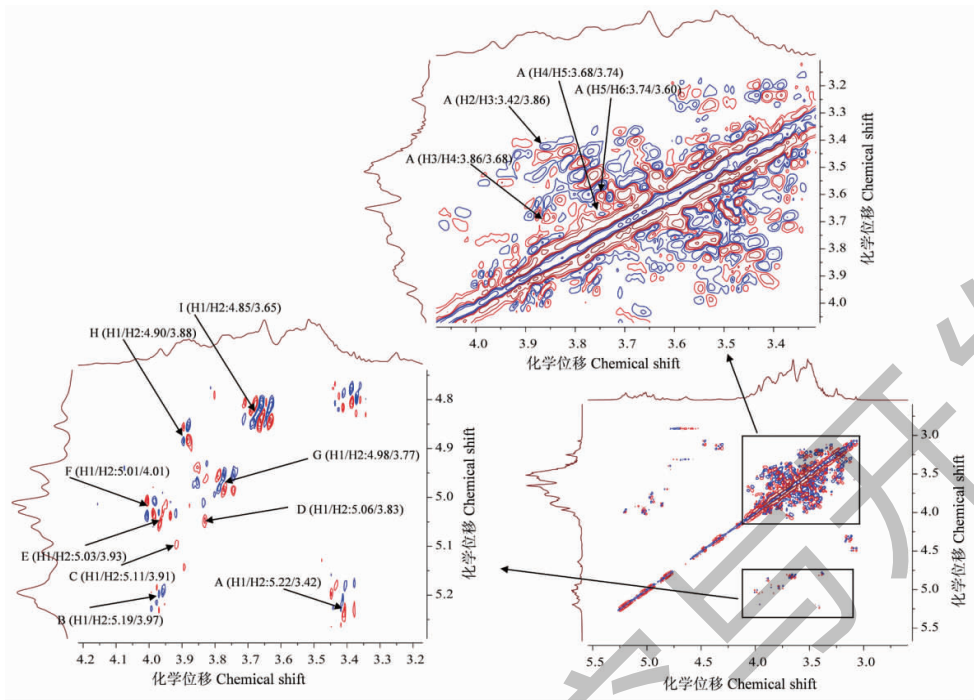
图6 ME-P的 ^1H - ^1H COSY 图谱Fig. 6 ^1H - ^1H COSY spectrum of ME-P

表3 ME-P 的 H 原子的化学位移

Table 3 Chemical shift of H atom of ME-P

糖残基 Sugar residue	化学位移 Chemical shift					
	H1	H2	H3	H4	H5	H6
1,6- <i>D</i> -Glc _p	5.22	3.42	3.86	3.68	3.74	3.60
1,6- <i>D</i> -Glc _p	5.19	3.97	3.56	3.41	3.68	3.73
1,6- <i>D</i> -Glc _p	5.11	3.91	3.80	3.65	3.56	3.74
2,3,4,6- <i>D</i> -Man _p	5.06	3.83	3.67	3.74	3.57	3.66
2,3,4,6- <i>D</i> -Man _p	5.03	3.93	3.77	3.60	3.71	3.41
1,2,3,4,6- <i>D</i> -Man _p	5.01	4.01	3.85	3.94	3.76	3.53
1,2,6- <i>D</i> -Gal _p	4.98	3.77	3.88	3.64	3.67	3.48
4- <i>D</i> -Glc _p	4.90	3.88	3.68	3.74	3.57	3.66
1,2,3,4,6- <i>D</i> -Man _p	4.85	3.65	3.74	3.57	3.83	3.50

HMQC 能反映直接相连的碳氢关系,根据异头氢与异头碳的共振耦合信号,可以将其进行归属,例如 A 峰 H1/C1 (δ 5.22/ δ 108.1) 即归属为 1,6-*D*-Glc_p 的 H1 与 C1 的共振耦合信号,并依次指定 B 峰 H1/C1 (δ 5.19/ δ 99.4)、C 峰 H1/C1 (δ 5.11/ δ 100.6)、D 峰 H1/C1 (δ 5.06/ δ 109.2)、E 峰 H1/C1 (δ 5.03/ δ 104.8)、F 峰 H1/C1 (δ 5.01/ δ 104.2)、G 峰 H1/

C1 (δ 4.98/ δ 98.2)、H 峰 H1/C1 (δ 4.90/ δ 102.2)、I 峰 H1/C1 (δ 4.85/ δ 97.8) 分别为 1,6-*D*-Glc_p、2,3,4,6-*D*-Man_p、2,3,4,6-*D*-Man_p、1,2,3,4,6-*D*-Man_p、1,2,6-*D*-Gal_p、4-*D*-Glc_p、1,2,3,4,6-*D*-Man_p 的 H1 与 C1 的耦合信号,分别与 ^1H - ^1H COSY 谱中 A~I 峰相对应(见图7)。根据各单糖残基质子信号的位移依次归属 C2~C6 信号位移,结果见表4。

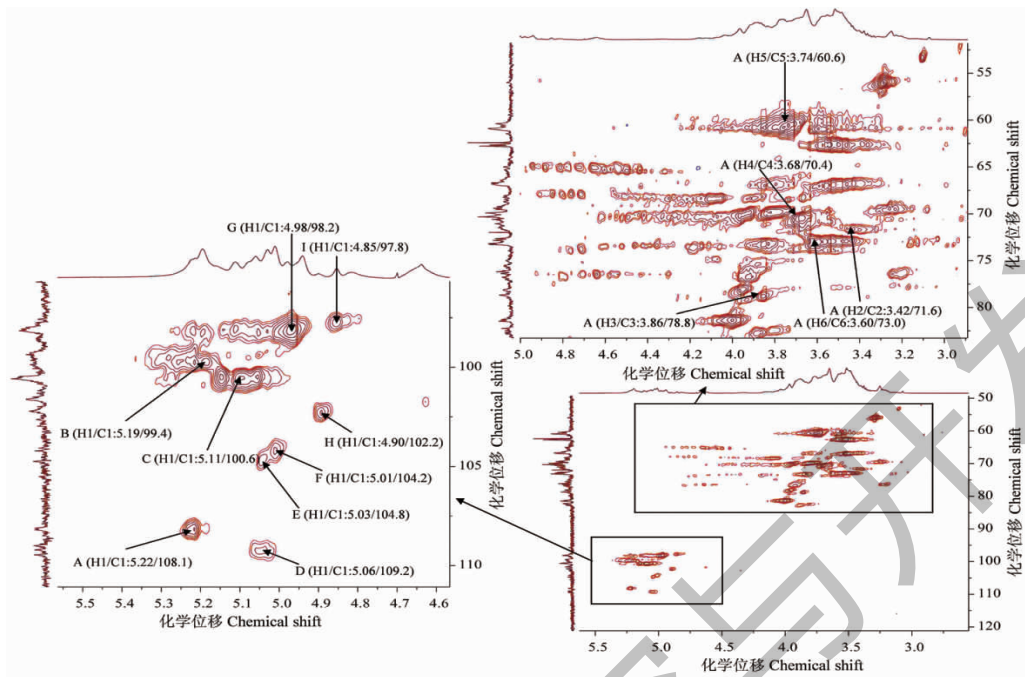


图7 ME-P的HMQC图谱

Fig. 7 HMQC spectrum of polysaccharide ME-P

表4 ME-P的C原子的化学位移

Table 4 Chemical shift of C atom of ME-P

糖残基 Sugar residue	化学位移 Chemical shift					
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
1,6- <i>D</i> -Glc _p	108.1	71.6	78.8	70.4	60.6	73.0
1,6- <i>D</i> -Glc _p	99.4	70.2	67.0	72.9	70.6	68.5
1,6- <i>D</i> -Glc _p	100.6	73.4	69.8	66.9	62.6	69.7
2,3,4,6- <i>D</i> -Man _p	109.2	69.9	73.5	69.7	62.7	68.6
2,3,4,6- <i>D</i> -Man _p	104.8	79.2	66.8	73.0	66.7	71.7
1,2,3,4,6- <i>D</i> -Man _p	104.2	76.8	70.0	81.4	60.9	60.0
1,2,6- <i>D</i> -Gal _p	98.2	66.8	82.7	72.9	70.4	66.9
4- <i>D</i> -Glc _p	102.2	68.7	73.7	82.7	67.1	73.6
1,2,3,4,6- <i>D</i> -Man _p	97.8	66.9	69.7	72.9	73.2	70.5

综合以上 HPLC、FT-IR、GC-MS 和 NMR 的结果显示,ME-P 由甘露糖(Man)、葡萄糖(Glc)、半乳糖(Gal)组成,比例为4:4:1;其一级结构是以1,2,3,4,6-*D*-Man_p与2,3,4,6-*D*-Man_p交替连接为骨架,1,6-*D*-Glc_p、1,2,6-*D*-Gal_p作为支链,4-*D*-Glc_p与1,2,6-*D*-Gal_p连接作为末端糖的重复单位,经 Scifinder 查新结果显示,ME-P 为一种结构新颖的多糖(见图8)。

2.5 ME-P 的药物毒性检测

与空白对照组相比,ME-P 刺激巨噬细胞 24 h 后显示极显著($P < 0.01$)促进细胞增殖的作用,在 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的细胞活力最佳,增殖率可高达 79.5%。在 ME-P 刺激巨噬细胞 48 h 的结果中,药物组均能极显著($P < 0.01$)提高细胞增殖活力,在浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$,增殖率可达 53%(见图9)。以上结果表明 ME-P 对正常免疫细胞无药物毒性,且有显著的增殖作用。

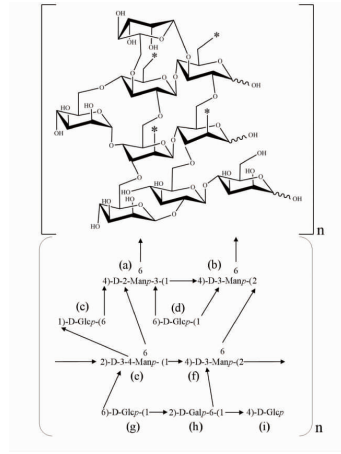


图8 ME-P 的一级结构

Fig. 8 Primary structure of ME-P

注: a, e 为 1,2,3,4,6-*D*-吡喃甘露糖; b, f 为 2,3,4,6-*D*-吡喃甘露糖; c, d, g 为 1,6-*D*-吡喃葡萄糖; i 为 4-*D*-吡喃葡萄糖; h 为 1,2,6-*D*-吡喃半乳糖。 Note: a, e are 2,3,4,6-*D*-mannopyranose; b, f are 2,3,4,6-*D*-mannopyranose; c, d, g are 1,6-*D*-glucopyranose; i is 4-*D*-glucopyranose; h is 1,2,6-*D*-galactopyranose.

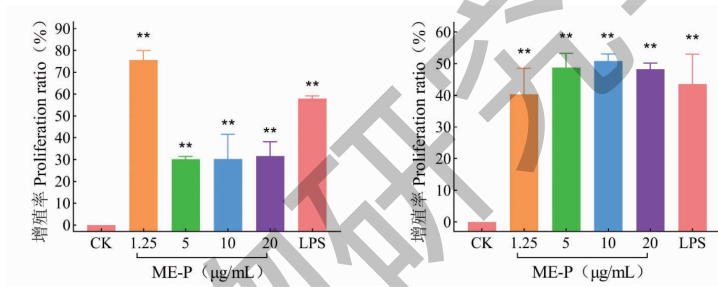


图9 不同浓度 ME-P 处理 RAW 264.7 细胞 24 h(左)、48 h(右)后的增殖率

Fig. 9 Proliferation rate of RAW 264.7 cells treated with different concentrations of ME-P for 24 h (left) and 48 h (right)

注: CK 为空白对照组, LPS(脂多糖)为阳性对照组。与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。 Note: CK is blank control group, and LPS (Lipopolysaccharide) is positive control group. Compared with blank control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.6 ME-P 对肿瘤细胞的抑制作用

2.6.1 ME-P 对小鼠结肠癌细胞 CT26. WT 的抑制作用

ME-P 对 CT26. WT 细胞增殖的抑制实验结果

如图 10 所示。与空白组相比,在 1.25 ~ 20 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内,ME-P 对 CT26. WT 细胞的增殖有抑制作用,其中,在 ME-P 质量浓度为 1.25 $\mu\text{g/mL}$ 时,有显著($P < 0.05$)抑制作用,且抑制率最高,为 28.20%。

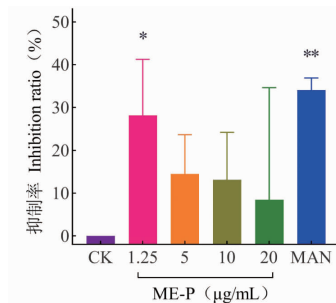


图10 不同浓度 ME-P 处理 CT26. WT 细胞后的抑制率

Fig. 10 Inhibition rate of CT26. WT cells treated with different concentrations of ME-P

注: CK 为空白对照组; MAN(甘露聚糖肽)为阳性对照组。与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。 Note: CK is blank control group, and MAN (mannan peptide) is positive control group. Compared with blank control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Yang 等^[15]研究表明裂褶菌多糖对结肠癌细胞增殖有抑制作用,抑制率可高达 45.32%;Guo 等^[16]发现灵芝多糖对结肠癌细胞也有显著抑制作用,且呈剂量依赖关系,浓度为 10 mg/mL 时抑制率可达 99.43%。我们的结果显示,低浓度的羊肚菌多糖对体外培养的 CT26. WT 细胞增殖显著抑制作用。

2.6.2 ME-P 对小鼠胃癌细胞 MFC 的抑制作用

ME-P 对 MFC 细胞的处理结果如图 11 所示。

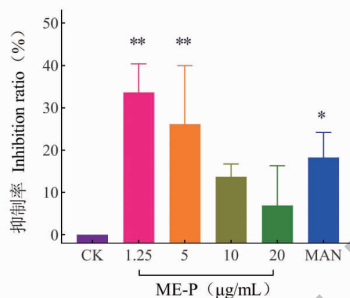


图 11 不同浓度 ME-P 处理 MFC 细胞后的抑制率

Fig. 11 Inhibition rate of MFC cells treated with different concentrations of ME-P

注:CK 为空白对照组,MAN(甘露聚糖肽)为阳性对照组。与空白对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。Note: CK is blank control group, and MAN (mannan peptide) is positive control group. Compared with blank control group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$.

值得注意的是,在本实验中,ME-P 的抑瘤率并不呈浓度依赖性增长,He 等^[18]发现铁皮石斛圆球茎多糖对小鼠肝癌细胞 H₂₂ 的抑瘤率随着多糖浓度升高而降低。Gan 等^[19]则发现枸杞多糖对 S₁₈₀ 肿瘤的抑瘤效果低浓度(5 mg/kg)多糖抑瘤率高于高浓度(20 mg/kg)枸杞多糖。同时,多糖抗肿瘤机制不同,显示出不同的剂量依赖关系。如 Guo 等^[20]发现仿刺参多糖对 HepG-2 细胞直接杀伤作用,抑制率呈剂量依赖型,对 Hca-F 肝癌细胞的抑制则是通过调节免疫系统,抑制率并不呈剂量依赖性。本实验中羊肚菌多糖(ME-P)的抗肿瘤细胞结果显示低浓度效果优于高浓度,其相关机制还有待于进一步研究。

3 讨论与结论

羊肚菌作为名贵野生食药真菌,其多糖的生物活性及其分子机制成为研究热点。研究发现,不同羊肚菌所含多糖的组分比例有差异。He 等^[21]通过酶辅助法提取的梯棱羊肚菌多糖由葡萄糖、甘露糖和半乳糖三种单糖组成,摩尔比为 0.64:0.55:0.27,Xiong 等^[22]从六妹羊肚菌提取的多糖 MSP 由甘露糖、葡萄糖及半乳糖组成,各占比约为 9:1:6。Peng 等^[23]提取到的梯棱羊肚菌多糖由木糖、葡萄糖、半乳糖以及少量的岩藻糖组成,比例为 9.21:8.

ME-P 处理组抑制率在浓度范围内,随着浓度升高,多糖的抑制作用减弱。在 ME-P 质量浓度为 1.25 μg/mL 和 5 μg/mL 时,其抑制效果均为极显著($P < 0.01$),而当 ME-P 的质量浓度为 1.25 μg/mL 时,抑制效果最佳,抑制率为 34.23%。Lv 等^[17]发现黄精多糖能够显著抑制 MFC 细胞,且对 TLR4/NF-κB 信号通路有显著影响。我们的结果表明低浓度的羊肚菌多糖对 MFC 细胞有极显著抑制作用。

59:3.73:1.00。以上研究表明羊肚菌多糖中甘露糖与葡萄糖含量较高,半乳糖含量较少,同时有少量岩藻糖、木糖。而本实验中采用热水浸提法从四川小金县羊肚菌中提取的 ME-P,经 HPLC、FT-IR、GC-MS 和 NMR 测定后显示 ME-P 由甘露糖、葡萄糖、半乳糖组成,各自比例约为 4:4:1,单糖均为吡喃构型,且单糖含量符合以往研究规律。

不同结构的多糖显示出不同的体外抗肿瘤活性,在单糖组分中含有甘露糖和葡萄糖的多糖一般具有抗癌活性^[13],同时以 β-(1→3),α-(1→4)连接的葡聚糖主链,侧链以 β-(1→6)作为分支点的多糖则抗肿瘤活性强^[1]。Zhu 等^[24]从橙盖鹅膏分离出一种是以 α-(1→4)-D-葡萄糖和 α-(1→3)-D-葡萄糖为骨架,α-(1→3)-D-葡萄糖 6-C 上连接一个 →1)-α-D-来苏糖为侧链的多糖(AC-1),并发现 AC-1 对 MFC 细胞有抑制作用,当 AC-1 浓度为 20 μg/mL 时抑制率高达 30.09%。Liu 等^[25]从羊肚菌中提取的多糖 MEPN-B-II 鼠李糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖组成,摩尔比 10.6:13.1:3.2:29.8:43.3;形成重复单元以 →1)-α-D-Galp-(4→和 →1)-β-D-Glcp-(4→连接构成主链,→1)-α-D-Manp-(2→为分支连接→1)-α-D-Glcp-(4→为非还原性末端的多糖结构,该多糖能够体外抑制结肠癌细胞(HT-29)且

抑制率可高达 87%,最适浓度为 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。实验结果显示,ME-P 是具有以 1,2,3,4,6-*D*-甘露糖、2,3,4,6-*D*-甘露糖交替连接为骨架,1,6-*D*-葡萄糖、1,2,6-*D*-半乳糖作为支链,4-*D*-葡萄糖与 1,2,6-*D*-半乳糖连接作为末端糖的重复单位的多糖,在 ME-P 为 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度时,对 MFC 和 CT26. WT 的抑制率分别为 34.23% 和 28.20%。同一多糖对不同癌细胞效果不一,一般以甘露糖,葡萄糖,半乳糖占比大的多糖抗肿瘤效果好。同时不同骨架的多糖对于不同肿瘤细胞的抑制效果亦有差异,例如以葡萄糖为主骨架、分支少的多糖比以甘露糖为主链、葡萄糖为支链的多糖对胃癌细胞(MFC)抑制率低,而以半乳糖为主链、甘露糖为支链的多糖对结肠癌细胞的抑制效果很明显。Liu 等^[26]发现榆耳多糖中单糖组成为半乳糖、葡萄糖、甘露糖和木糖的 G11-3 比只含葡萄糖、甘露糖和木糖的 G11-4b 抑瘤效果好。巨噬细胞有对甘露糖和葡萄糖具有高度专一性的受体,使得含葡萄糖、甘露糖的多糖体内通过免疫系统达到抑癌作用的效果明显^[13]。我们在检测药物毒性时亦发现含有较大比例甘露糖和葡萄糖的 ME-P 对巨噬细胞 RAW 264.7 有极显著($P < 0.01$)增殖作用。

综上所述,本研究利用傅里叶红外、核磁共振、气相质谱联用等技术解析了四川小金县羊肚菌多糖的一级结构,ME-P 由甘露糖、葡萄糖、半乳糖以 4:4:1 的比例组成,是以 1,2,3,4,6-*D*-甘露糖与 2,3,4,6-*D*-甘露糖为主链,1,6-*D*-葡萄糖和 1,2,6-*D*-半乳糖作为支链,4-*D*-葡萄糖与 1,2,6-*D*-半乳糖连接作为末端糖的重复单位的结构新颖的多糖。药物毒性检测显示 ME-P 对巨噬细胞无毒害作用,且能极显著提高细胞增殖活力,增殖率可达 79.5%。体外抗肿瘤活性显示 ME-P 对结肠癌细胞和胃癌细胞均有抑制作用,在质量浓度为 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,对 CT26. WT 结肠癌细胞和 MFC 胃癌细胞的抑制率分别为 28.20% 和 34.23%。以上研究结果表明 ME-P 的结构新颖,无毒副作用并具有一定的抗肿瘤活性,该结果为羊肚菌多糖的开发与应用提供了一定的科学依据。

参考文献

1 Lin MG, Yang YF, Li YH. Advances in studies on structure-activity relationship of antitumor polysaccharides [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2007, 38: 949-953.

2 Liu XC, Zhu ZY, Liu YL, et al. Comparisons of the anti-tumor activity of polysaccharides from fermented mycelia and cultivated fruiting bodies of *Cordyceps militaris in vitro* [J]. Int J Biol Macromol, 2019, 130: 307-314.

3 Li LW, Zhao G. Bioactivity of medicinal fungi polysaccharides for anti-tumor immunity [J]. Chin J Cancer Prev Treat (中华肿瘤防治杂志), 2015, 22: 1156-1160.

4 Liu Y, Zheng DD, Wang DH, et al. Immunomodulatory activities of polysaccharides from white button mushroom, *Agaricus bisporus* (Agaricomycetes), fruiting bodies and cultured mycelia in healthy and immunosuppressed mice [J]. Int J Med Mushrooms, 2019, 21: 13-27.

5 Meng XY. Studies on the isolation of *Morchella* and the primary structure of polysaccharide [D]. Jilin: Jilin University (吉林大学), 2007.

6 Ren JX. Purification, Characterization and *in vitro* antioxidant activity of polysaccharides from *Morchella umbrina* [D]. Taiyuan: Shanxi University (山西大学), 2019.

7 Sun QD, Zhang JP, Xie YY, et al. Recent progress in research on nutrients, functional components and health benefits of *Morchella esculenta* [J]. Food Sci (食品科学), 2019, 40: 323-328.

8 Li J, Zhou WJ, Zhao SH, et al. Isolation, purification, antioxidant and antitumor activities of polysaccharides from *Morchella esculenta* [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2016, 28: 1351-1356.

9 Zhang XS, Xie CQ, Fan JM, et al. Study on modification of *Morchella* polysaccharide by hydrogen peroxide [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2019, 31: 1982-1991.

10 Shen J, Wang YF, Wei XL. Comparison of two kinds of polysaccharides methylation methods [J]. J Shanghai Normal University: Nat Sci (上海师范大学学报: 自科版), 2012, 41: 160-164.

11 Kang CC, Hao LM, Zhang LM, et al. Isolation, purification and antioxidant activity of polysaccharides from the leaves of *Maca (Lepidium meyenii)* [J]. Int J Biol Macromol, 2018, 107: 2611-2619.

12 Zhu HQ, Ding X, Hou YL, et al. Structure elucidation and bioactivities of a new polysaccharide from Xiaojin *Boletus speciosus* frost [J]. Int J Biol Macromol, 2019, 126: 697-716.

13 Fang XD, Chen YD, Chang J, et al. Structure and antitumor activity of water-soluble polysaccharide from *Craterellus cornucopioides* [J]. Mod Food Sci Technol (现代食品科技), 2014, 30: 50-54.

14 Liu W, Lu WS, Chai Y, et al. Preliminary structural characterization and hypoglycemic effects of an acidic polysaccharide SERP1 from the residue of *Sarcandra glabra* [J]. Carbo-

- hydr Polym. 2017,176:140-151.
- 15 Yang N, Wang HF, Dong SQ, et al. Immunological effects of *Schizophyllum commune* polysaccharides in mice [J]. Mod Food Sci Techol(现代食品科技), 2014,30:1-5.
- 16 Guo YT. Inhibitory effect of *Ganoderma Lucidum* polysaccharides on human colon cancer cells proliferation [D]. Changsha: Hunan Agricultural University(湖南农业大学), 2012.
- 17 Lv PT, Duan XB. Antitumor and immunomodulatory effects of *Polygonatum* polysaccharide on MFC gastric cancer bearing mice [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2020, 42: 2169-2172.
- 18 He TG, Yang LT, Li YR, et al. Physicochemical properties and antitumor activity of polysaccharide DCPPIa-1 from suspension-cultured protocorms of *Dendrobium candidum* [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2007, 19: 578-583.
- 19 Gan L, Zhang SH. Effect of *Plantago asiatica* L. seed on the antioxidation in rats [J]. Acta Nutr Sin(营养学报), 2003, 25:200-202.
- 20 Guo LY, Wang L, Zou XY, et al. Antitumor and immunomodulating effects of *Apostichopus japonicus* polysaccharides (AJPS) in tumor-bearing mice [J]. Chin J Microecol(中国微生态学杂志), 2009, 21: 806-808.
- 21 He C, Xu LJ, Chang CM, et al. Extraction optimization and structural characterization of polysaccharides from *Morchella importuna* fruiting body [J]. Acta Edulis Fungi(食用菌学报), 2021, 28: 77-88.
- 22 Xiong C, Luo Q, Li Q, et al. Physical and chemical properties of polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Morchella sextelata* and its antioxidant effect [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2017, 29: 1182-1187.
- 23 Peng TX, Zhang J, Zhang L, et al. Physical and chemical properties of polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Morchella importuna* and its neuroprotective effect [J]. Mod Food Sci Techol(现代食品科技), 2019, 35: 87-95.
- 24 Zhu M, Hou YL, Tang X, et al. The study of immunomodulatory activities, cytotoxicity and anti-tumor activities of polysaccharide from *Amanita caesarea* (AC-1) *in vitro* [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2019, 31: 1481-1490.
- 25 Liu C. Preparation, Molecular characterization and inhibitory effect on human colon cancer of *Morchella esculenta* endopolysaccharide based on submerged fermentation [D]. Jilin: Jilin University(吉林大学), 2017.
- 26 Liu HF, Wang XY, Lv JC, et al. Study on purification, structure identification and antitumor activity of polysaccharides from *Gleostereum incamatum* [J]. Chin J Biochem Pharm(中国生化药物杂志), 2010, 31: 293-296.

致谢:对以下合作单位参与本刊的学术建设表示由衷的感谢!

昆明医科大学药学院

西南交通大学生命科学与工程学院

西南交通大学期刊社