

灵芝孢子粉多糖 Lzps-1 的化学研究及其总多糖的抗肿瘤活性

江 艳, 王 浩, 吕 龙, 田庚元*

(中国科学院 上海有机化学研究所, 上海 200032)

摘要: 目的 研究微波软化灵芝孢子粉中的多糖组分及其抗肿瘤活性。方法 用水提取微波软化灵芝孢子粉总多糖, 总多糖经分级沉淀得到多糖组分 Lzps-C, 再采用 DEAE-cellulose 和 Sephadex G-50 柱色谱进行分离纯化, 用化学和光谱方法分析其结构。结果 从微波软化灵芝孢子粉的水提物中分得一个多糖 Lzps-1, 其平均分子量为 8 000, 为葡聚糖。微波软化灵芝孢子粉的水提物得到的总多糖 Lzps 对小鼠 Lewis 肺癌、小鼠 S₁₈₀ 肉瘤有较好的抑制作用, 并能明显提高荷 Lewis 肺癌小鼠 NK 活性。结论 Lzps-1 是首次从灵芝孢子粉中分离得到。Lzps 具有抗癌活性。

关键词: 灵芝孢子; 多糖; 抗肿瘤

中图分类号: Q539 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2005)04 - 0347 - 04

Chemistry of polysaccharide Lzps-1 from *Ganoderma lucidum* spore and anti-tumor activity of its total polysaccharides

JIANG Yan, WANG Hao, LÜ Long, TIAN Geng-yuan*

(Shanghai Institute of Organic Chemistry, Shanghai 200032, China)

Abstract: **Aim** To study the structure and anti-tumor activity of polysaccharide from *Ganoderma lucidum* spore treated with microwave. **Methods** DEAE-cellulose and Sephadex G-50 column chromatography were used to isolate and purify the polysaccharide whose structure was characterized by using chemical and spectral methods. **Results and Conclusion** One polysaccharide, named Lzps-1 was obtained from the water extract, with its molecular weight estimated by HPGPC to be 8 000. Its structure was investigated to be glucan. The total polysaccharides, Lzps processed antitumor activity against sarcoma 180 and Lewis lung cancer in mice and enhanced the NK cell activity. Lzps-1 is obtained for the first time from *Ganoderma spore* Lzps has anti-tumor activity.

Key words: *Ganoderma lucidum* spore; polysaccharide; antitumor

灵芝是担子菌纲多孔菌科灵芝属真菌赤芝和紫芝的总称, 有扶正固本等功效, 被《本经》列为上品。据报道, 灵芝孢子有降血糖^[1]、调节肌体免疫功能^[2]、临床试用治疗萎缩性肌强直等疑难疾病有较满意效果^[3]。灵芝孢子化学成分有蛋白质、氨基酸类、糖肽类和维生素类等多种成分^[4]。

作者对微波软化灵芝孢子粉水提物采用醇沉淀、膜分离得到总多糖 Lzps, 初步药理试验证明 Lzps

具有抗癌活性, Lzps 经有机溶剂分级沉淀得到 Lzps-C, Lzps-C 再采用 DEAE-cellulose 和 Sephadex G-50 柱色谱进行分离纯化, 得到多糖 Lzps-1, 经 HPLC 分析 Lzps-1 是 Lzps 的主要成分, 并对 Lzps-1 进行了结构分析。

材料和方法

微波软化孢子粉由中国科学院沈阳金属研究所张劲松教授提供。

试剂 单糖对照品: 鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、半乳糖、葡萄糖、葡糖醛酸及多糖均一性和相

收稿日期: 2004-05-29.

* 通讯作者 Tel: 86 - 21 - 64163300 - 1307, Fax: 86 - 21 - 64166128,
E-mail: tiangy@mail.sioc.ac.cn

对分子量测定所用标准品均为 Sigma 产品;其他试剂为国产 AR 级;柱色谱用 DEAE 纤维素为上海恒信化学试剂有限公司生产;Sephadex G-50 凝胶为 Apha macia 公司出品。

仪器 岛津高效液相系统:SPD-10AD Pump, SPD-10A UV-VID, RID-6A, CTO-6A Column Oven, Phenomenex Biosep-Sec-S4000 色谱柱;GC 为 Agilent 1100, OV 17 柱;核磁共振仪为 Varian-300 型;红外光谱仪为 Nicolet FT-IR 360;722 型可见分光光度计为上海精密科学仪器厂生产;UV-754 型紫外分光光度计为上海第二分析仪器厂生产;LG-03 型冷冻干燥机为上海市离心机械研究所生产。

1 灵芝多糖的化学结构

1.1 提取与纯化 经微波软化的灵芝孢子粉,加入 10 倍的去离子水,室温浸泡,过滤,滤液浓缩后再加入 6 倍无水乙醇醇沉,沉淀加水溶解后放入截流分子量 1 000 u 的半透膜对水透析,透析液经离心得到清液再经冷冻干燥,得总多糖 Lzps,总收率为 1.7%,其 HPLC 图谱见图 1。总多糖 Lzps 用水溶解后,依次加入 2, 3, 5 和 7 倍无水乙醇分级沉淀,从 5 倍醇沉产物 Lzps-C 取 50 mg 用离子交换柱 DEAE-cellulose 和 Sephadex G-50 凝胶柱进行纯化,蒸馏水洗脱,主峰冷冻干燥后,最后得灵芝孢子粉多糖纯品 Lzps-1 27 mg,其 HPLC 图谱见图 2, Lzps-1 为总多糖的主要成分, Lzps-1 纯度 97.25%。

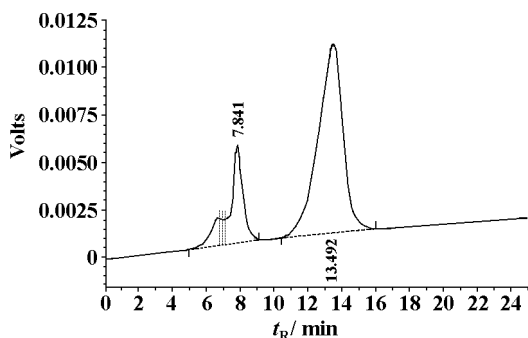


Figure 1 HPLC of Lzps

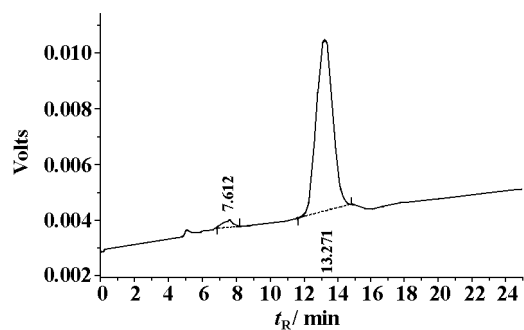


Figure 2 HPLC of Lzps-1

1.2 纯度及分子量测定 用 HPLC 方法:色谱柱为 Biosep-Sec-S 4000 柱,洗脱剂为双蒸水,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 25 °C。样品 Lzps-1 和标准品分别经 HPGPC 分离,绘制标准葡聚糖的 lgM_w 与 t_R 标准曲线,根据 Lzps-1 的保留时间求其分子量。

1.3 单糖组成分析 取 Lzps-1 2 mg 放置于水解管中,加 1 mol·L⁻¹ H₂SO₄ 溶液 2 mL,充 N₂,100 °C 下水解 4 h,然后将反应液移入离心管,加入 BaCO₃ 固体中和至溶液为中性,离心,上清液过滤。完全酸水解后的样品移入 20 mL 蛋形瓶中,加入 NaBH₄ 10 mg 及氨水 10 μL 使成碱性,室温搅拌 3 h,用醋酸中和至无气泡,减压抽干,再用甲醇溶解并旋转蒸发,重复 6 次,以充分带走硼酸根,80 °C 油泵干燥 1 h 后,加入无水吡啶 2 mL,乙酸酐 2 mL,80 °C 反应 1 h,然后用油泵抽干溶剂,再用氯仿溶解后过滤,除去不溶盐类,浓缩后作气相分析。

1.4 甲基化分析 取样品 7 mg 加入蛋形瓶中,80 °C 下油泵干燥 30 min,加入无水 DMSO 2 mL,超声 2 min 后,加入 NaOH 100 mg,充 N₂,超声 2 min 后搅拌使其充分溶解,加入 CH₃I 0.8 mL,室温下搅拌 2 h 后,加水 2 mL 淬灭反应,再用氯仿萃取。经 IR 红外光谱鉴定,3 500 cm⁻¹ 处已无吸收峰,表明产物的羟基已经完全被取代,然后用 88% 的甲酸 3 mL 100 °C 水解 3 h,减压抽去过量甲酸,再用 0.125 mol·L⁻¹ H₂SO₄ 4 mL 溶解,100 °C 反应 16 h。

甲基化 还原乙酰化衍生物做 GC-MS 分析。

1.5 IR,¹H NMR 及 ¹³C NMR 光谱分析 取 Lzps-1 溴化钾压片后常规测定 IR 吸收光谱。另取 Lzps-1 30 mg 溶于 D₂O 0.5 mL 中,测定 NMR。

2 Lzps 的抗肿瘤活性

对 Lewis 肺癌足趾接种的疗效试验和小鼠 S₁₈₀ 肉瘤疗效试验按文献 [5] 方法进行。对荷 Lewis 肺癌小鼠的 NK 细胞活性的测试按文献 [6] 方法进行。

结果

1 Lzps-1 的化学结构

由 HPLC 分析绘制标准葡聚糖的 lgM_w 与 t_R 标准曲线,线性方程为:lgM_w = 8.478 77 - 0.330 31 t_R (r = - 0.999 6)。通过线性方程可以计算多糖的分子量。结果:测得其 Lzps-1 分子量范围为 5 000 - 11 000 u,数均分子量为 8 000。

从单糖组成分析得知 Lzps-1 所含单糖残基为葡萄糖。

Lzps-1 的红外光谱中 890 cm⁻¹ 为 β 构型的特征

吸收, 840 cm^{-1} 为 α 构型的特征吸收, 1 078 cm^{-1} , 1 039 cm^{-1} 为吡喃环的特征吸收。

Lzps-1 以重水 (D_2O) 为溶剂, 经多次交换后绘制核磁共振光谱图 (核磁共振氢谱的绘制是在 70 - 90 $^\circ\text{C}$ 的条件下进行的)。 ^1H NMR δ : 5.33, 5.32 为 α -GlcP(1 \rightarrow , 4.77 - 4.69 为 \rightarrow 3) β -GlcP(1 \rightarrow , δ 4.53 -

Table 1 Assignment of ^{13}C NMR chemical shifts of Lzps-1

Sugar residue	Chemical shift					
	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆
$\alpha\text{GlcP}(1\rightarrow$	100.4	72.4	81.9	71.6	73.8	61.7
$\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{GlcP}(1\rightarrow$	103.5	74.1	86.2	70.7	76.8	62.0
$\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{GlcP}(1\rightarrow$	103.9	74.0	75.7	81.9	74.6	61.7
$\rightarrow 6)\text{-}\beta\text{GlcP}(1\rightarrow$	103.8	73.8	76.0	69.3	76.0	69.4
$\rightarrow 1, 6)\text{-}\beta\text{GlcP}(3\rightarrow$	103.7	74.2	86.3	70.9	76.9	69.9

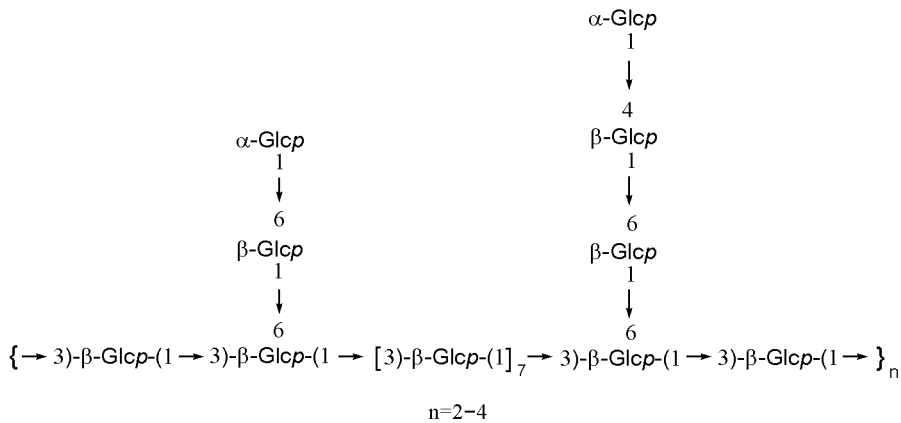
4.47 为 $\rightarrow 6)\beta\text{-GlcP}(1\rightarrow, \rightarrow 3, 6)\beta\text{-GlcP}(1\rightarrow, \rightarrow 4)\beta\text{-GlcP}(1\rightarrow$, 此结果与红外结果吻合。将其碳信号归属于表 1。

由甲基化 还原乙酰化衍生物的 GC-MS 图谱分析得知, Lzps-1 含有碎片 (表 2)。

Table 2 The results of methylated analysis of Lzps-1

t/m in	Methylated sugars	Linkage	Molar ratio
15.71	2, 3, 4, 6-Me4-Glc	1-Glc	2
18.76	2, 4, 6-Me3-Glc	1, 3-Glc	9
18.98	2, 3, 6-Me3-Glc	1, 4-Glc	1
19.60	2, 3, 4-Me3-Glc	1, 6-Glc	2
22.57	2, 4-Me2-Glc	1, 3, 6-Glc	2

根据甲基化、NMR 等分析, 可以推断 Lzps-1 具有以下可能的重复单元结构:



2 总多糖的抗肿瘤活性

灵芝孢子总多糖体内抗肿瘤实验表明, 灵芝孢子总多糖 (Lzps) 对小鼠 Lewis 肺癌足趾接种模型抑制率在 200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 两个剂量组下分别为 62.89% 和 53.03% (表 3), 对小鼠 S_{180} 肉瘤 (腋下接种) 抑制率在 200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 两个剂量组下分别为 57.36% 和 46.79% (表 4), 对荷 Lewis 肺癌小鼠 NK 活性两个剂量组分别为 55.20% 和 54.47% (表 5)。实验结果显示 Lzps 抗肿瘤疗效明显, 对荷 Lewis 肺癌小鼠 NK 活性也有明显的提高和促进作用。

讨论

微波软化的灵芝孢子粉破坏了其原有的坚硬孢子壁, 使得有效成分更易提取。此外本文所得到的多糖 Lzps-1 与香菇多糖的结构类似, 都是以 β -(1 \rightarrow 3) 葡萄糖为主链, β -(1 \rightarrow 6) 葡萄糖为侧链的葡聚糖, 只是 Lzps-1 在 β -(1 \rightarrow 6) 的侧链上多了一个 α -(1 \rightarrow 4) 葡萄糖, 而 Lzps-1 的分子结构比香菇多糖小很多, 更利于机体吸收, 并降低了抗原性。Lzps 与现有的多糖药物相比具有更高的抗癌活性, 有很大的开发潜力。

Table 3 Effect of Lzps on the inhibition of Lewis pulmonary carcinoma in mice ($\bar{x} \pm s$)

Sample	Dose / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	Administration method	No. of mice	Tumor weight / g	Inhibition / %
Lzps	200	ip \times 10 qd	10 / 10	0.33 \pm 0.04***	62.89
Lzps	100	ip \times 10 qd	10 / 10	0.42 \pm 0.04***	53.03
CTX	30	ip \times 7 qd	10 / 10	0.009 \pm 0.020***	98.40
Control	-	ip \times 10 qd	20 / 20	0.89 \pm 0.12	

Control: 0.9% NaCl solution; CTX: Cyclophosphamide. *** $P < 0.01$ vs control

Table 4 Effect of Lzps on the inhibition of sarcoma 180 in mice ($\bar{x} \pm s$)

Sample	Dose /mg• kg ⁻¹	Administration method	No. of mice	Tumor weight/g	Inhibition /%
Lzps	200	ip × 10 qd	10 / 10	1.13 ± 0.15***	57.36
Lzps	100	ip × 10 qd	10 / 10	1.41 ± 0.17***	46.79
CTX	30	ip × 7 qd	10 / 10	0.28 ± 0.10***	89.43
Control	-	ip × 10 qd	20 / 20	2.65 ± 0.26***	

Control: 0.9% NaCl solution; CTX: Cyclophosphamide. *** $P < 0.01$ vs control

Table 5 Effect of Lzps on NK activity in Lewis pulmonary carcinoma mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Sample	Dose /mg• kg ⁻¹	Administration method	#A	NK activity /%	NK activity in contrast with Control /%
Lzps	200	ip × 10 qd	0.37 ± 0.05***	55.20	29.21
Lzps	100	ip × 10 qd	0.37 ± 0.03***	54.47	28.05
Control	-	ip × 10 qd	0.52 ± 0.06	36.72	0.05

#A average of testing group - A average of control. A average of target cell = 0.82 ± 0.05. Control: 0.9% NaCl solution. *** $P < 0.01$ vs control

References

- [1] Zhang LH, Xiao PG. Prevention and treatment of experimental diabetes in mice by spore extract of Lingzhi [J]. *Chin Tmdit Herb Drugs (中草药)*, 1993, **24**(5): 246 - 247.
- [2] Zhang LH, Wang HX. Immunological effect of *Ganoderma lucidum* spore extract *in vivo* and *in vitro* [J]. *Chin J Immunol (中国免疫学杂志)*, 1994, **10**(3): 169 - 172.
- [3] Hou CY, Sun YT, Yang L, *et al.* Studies on the chemical constituents of the spores from *Ganoderma lucidum* (Leyss. Et Fr.) Karst [J]. *Acta Bot Sin (植物学报)*, 1988, **30**(1): 66 - 70.
- [4] Zhao DX, Yang XL, Zhu HS, *et al.* Progress in the studies of *Ganoderma* spore [J]. *Chin Tmdit Herb Drugs (中草药)*, 1999, **30**(4): 305 - 307.
- [5] Yu SC, Zhang YZ. Effect of *Achyranthes bidentata* polysaccharides (ABP) on antitumor activity and immune function of S₁₈₀-bearing mice [J]. *Chin J Oncol (中华肿瘤杂志)*, 1995, **17**: 275 - 278.
- [6] Wang XJ, Lu H. NK activity in mice detected by MTT method [J]. *Chin J Exp Clin Virol (中华实验和临床病毒学杂志)*, 1991, **5**: 81 - 83.