

亮菌多糖的纯化工艺及抗肿瘤活性研究^{*}

★ 黄纯^{**} 周凤娟 (中国药科大学高等职业技术学院 镇江 212003)

摘要:目的:研究亮菌多糖的分离纯化工艺及体内抗肿瘤活性。方法:采用 DEAE-纤维素色谱柱对粗品亮菌多糖 ALPⅡ进行纯化,以上样回收率为考察指标,通过单因素试验研究不同浓度的 NaCl 溶液对纯化效果的影响。以抑瘤率为考察指标,采用荷瘤小鼠研究 ALP2 体内抗肿瘤活性。结果:粗品 ALPⅡ经纯化后得到精品多糖 ALP1 和 ALP2;NaCl 浓度为 0.2 mol/L 时上样回收率最高,ALP2 对实体瘤 S180 和实体瘤腹水瘤 EAC 都有明显的抑制作用。结论:以 DEAE-纤维素色谱柱分离纯化粗品亮菌多糖,NaCl 的适宜浓度为 0.2mol/L;初步药效试验表明 ALP2 具有抗肿瘤活性。

关键词:亮菌多糖;分离纯化;抗肿瘤活

中图分类号:R 285.5 **文献标识码:**A

Study on the Technique of Purification and Antitumor Activities of Armillariella Lucidum Polysaccharide

HUANG Chun, ZHOU Feng-juan

China Pharmaceutical University Altitude Vocational School, Zhenjiang 212003

Abstract: Objective: To study on purification technology and anti-tumor activity of Armillariella Lucidum Polysaccharide (ALP). Methods: Crude ALPⅡ were purified through DEAE-cellulose ion-exchange chromatography. The effect of different concentrations of NaCl was tested by single factorial test. The in vivo antitumor activity was studied on ALP2. Results: Two pure polysaccharide, ALP1 and ALP2 were obtained. The highest recycling rate of Polysaccharide was found by the concentration of 0.2mol/L NaCl. ALP2 can inhibit the growth of S180 and EAC. Conclusions: The optimum concentration of NaCl is 0.2mol/L. The primary effect showed that ALP2 has the anti-tumor activity.

Key Words: Armillariella Lucidum Polysaccharide(ALP); Purification; Anti-tumor activity

亮菌学名为白蘑科密环菌属假密环菌 [*Armillariella tabescens* (Scop. ex. fr) sing], 上世纪 60 年代发现于镇江, 是我国首次发现并拥有自主知识产权的一种真菌。因为能发出浅蓝色的荧光, 在暗处清晰可见, 故名为亮菌^[1]。亮菌发酵菌粉由假密环菌的培养体经提取获得, 其化学成分复杂且因所用菌种、培养法、提取手段不同而异, 亮菌多糖是其中主要的有效成分之一。本实验室从亮菌发酵菌粉中提取出亮菌多糖粗品 ALPⅡ, ALPⅡ经 DEAE-纤维素色谱柱纯化后得 2 种均一多糖 ALP1 和 ALP2。本文以多糖上样回收率作为考察指标, 通过单因素实验研究了不同浓度的 NaCl 溶液对纯化效果的影响, 并对 ALP2 的体内抗肿瘤活性进行了初步的研究。

1 仪器与材料

1.1 仪器 BS-100A 自动部分收集器, 722 型分光

光度计, 上海沪西分析仪器厂。

1.2 试剂 亮菌菌粉, 无锡百方吉生物科技有限公司提供; DEAE 纤维素, 上海恒信化学试剂有限公司; 注射用环磷酰胺, 江苏恒瑞医药股份有限公司; 氯化钠注射液, 江苏亚邦生缘药业有限公司; 氯化钠、硫酸、苯酚、葡萄糖, 中国医药集团上海化学试剂公司。其余试剂皆为国产分析纯。

1.3 实验动物 ICR 小鼠, 18~22 g, 雄雌各半, 由江苏省肿瘤医院提供。

2 方法与结果

2.1 亮菌多糖的含量测定 采用硫酸-苯酚法

2.2 亮菌粗多糖的提取(采用水提醇沉法)工艺
亮菌菌粉→热水提取→离心→上清液浓缩→脱蛋白→脱气→流水透析→70%乙醇沉淀→无水乙醇, 丙酮洗涤→真空干燥→亮菌多糖粗品 ALPⅡ。

2.3 亮菌多糖的纯化工艺(柱色谱法) ALPⅡ→

^{*} 基金项目: 中国药科大学青年教师基金(D0510)

^{**} 作者简介: 黄纯, 女, 中国药科大学高等职业技术学院教师

DEAE 纤维素柱→蒸馏水洗脱(硫酸-苯酚法测定洗脱曲线,收集洗脱液,浓缩、冷冻干燥,得白色精品多糖 ALP1)→NaCl 溶液洗脱→收集洗脱液→透析→透析液浓缩、冷冻干燥,得淡黄色精品多糖 ALP2。硫酸-苯酚法测定 ALP1 和 ALP2 的糖含量均接近 100%。

2.4 分离纯化的单因素考察 流速 18 ml/h,上样量 80 mg/次,柱高约 18 cm。以上样回收率为考察指标,选择 0.05、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3 mol/L 不同浓度的 NaCl 进行洗脱,重复实验 3 次取平均值,确定适宜的盐洗浓度。实验结果见表 1。

表 1 不同浓度 NaCl 溶液洗脱的上样回收率

NaCl 浓度/mol·L ⁻¹	上样回收率(%)
0.05	43.6
0.1	81.2
0.15	84.1
0.2	85.1
0.25	85
0.3	84.9

表 2 ALP2 体内抗肿瘤效果

瘤种	组别	n	剂量 /mg·kg ⁻¹	给药前体重 /g	给药后体重 /g	瘤重/g	抑瘤率(%)
S180	生理盐水	10		18.97±1.33	24.36±1.58	1.03±0.16	
	环磷酰胺	10	20	18.55±0.66	23.2±0.58	0.37±0.04**	64.1
	ALP2	10	80	19.38±0.85	24.18±2.16	0.64±0.09**	37.9
	ALP2	10	20	19.27±0.79	24.3±2.15	0.88±0.06*	14.6
	ALP2	10	5	19.28±1.46	24.58±1.90	0.96±0.16	6.7
EAC	生理盐水	10		20.67±1.78	28.2±2.77	1.71±0.1	
	环磷酰胺	10	20	20.70±1.34	22.56±2.06**	0.48±0.08	71.9
	ALP2	10	80	20.43±1.08	25.85±1.29	0.94±0.18**	45
	ALP2	10	20	20.58±1.65	27.00±2.60	1.32±0.19**	23
	ALP2	10	5	20.59±1.94	25.43±2.95	1.41±0.44*	17.5

注:与生理盐水组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

3 讨论

亮菌粗多糖 ALPII 是亮菌发酵菌粉经热水提取醇沉得到的淡棕色粉末状样品。为了提高其纯度,本实验采用国产 DEAE-纤维素(OH-型)柱色谱法对粗品其进一步分离纯化,所得水洗组分 ALP1 和盐洗组分 ALP2 的糖含量接近 100%。本实验以上样回收率作为考察指标,选择不同浓度的 NaCl 洗脱液进行单因素考察,发现随着 NaCl 浓度的增加上样回收率先是增加然后基本不变,0.2、0.25、0.3 mol/L 的 NaCl 溶液洗脱的上样回收率基本接近。考虑到 NaCl 浓度过低则样品中的多糖洗脱不完全,损失太多;过高会使得洗脱液中混有过多的 NaCl 等小分子物质,不仅给透析带来不便而且造成浪费,所以确定最适宜的洗脱浓度为用 0.2 mol/L。

真菌多糖作为一类低毒而免疫活性强、毒副作

2.5 ALP2 的抗肿瘤活性研究 取小鼠 100 只,雌雄各半,按移植性肿瘤研究法^[2]接种实体型肉瘤 S180,腹水瘤 EAC 各 50 只,接种后 24 h 称鼠重,随机分为 5 组。空白对照组、环磷酰胺组(20 mg/kg)分别为阴、阳性对照组,ALP2 组设高、中、低 3 个剂量组(80、20、5 mg/kg)。接种 24 h 后腹腔给药,每天一次,共给药 8 次,于停药后第二天处死荷瘤小鼠称重,并分离瘤块称重,记录瘤重。计算抑瘤率。抑瘤率=(1-给药组瘤重/空白组瘤重)×100%,所得数据进行统计学处理(t 检验)。

实验结果见表 2,与生理盐水对照组相比,ALP2 高、中剂量组及环磷酰胺组对 EAC 瘤株的肿瘤生长有显著抑制作用,ALP2 高剂量组及环磷酰胺组对 S180 瘤株的肿瘤生长有显著抑制作用。ALP2 组对小鼠体重无明显影响,而环磷酰胺组对小鼠体重增长有抑制作用。

用少、来源广的生物大分子,受到人们的广泛注意。本实验选用精品亮菌多糖 ALP2 作为研究对象,以环磷酰胺作为阳性对照,考察了 ALP2 对移植性实体型肉瘤 S180、腹水瘤 EAC 的抑制作用,初步的药效实验已表明 ALP2 具有较好的抗肿瘤活性,而且 ALP2 具有较好的水溶性,注射方便,具有良好的开发前景。目前对亮菌多糖的抗肿瘤虽有研究,但研究的还不够透彻和全面,至今尚未有文献报道亮菌多糖在临床上用于癌症治疗,故有待于我们进一步加强这方面的研究。

参考文献

- [1]江苏省“亮菌”科研协作组微生物小组.假密环菌的研究[J].微生物学报,1974,14(1):9.
- [2]徐淑云,卞如濂,陈修.药理实验方法[M].第3版.北京:中国医药科技出版社,1995.120-125.

(收稿日期:2007-07-25)