

## 糙皮侧耳糖蛋白的性质及体外抗肿瘤活性研究

姜自彬 李华<sup>1</sup> 曹吉超<sup>1</sup> (济南 250022 济南军区药品检验所; <sup>1</sup> 济南 250022 山东医科大学生生化制药教研室)

**摘要** 目的:对糙皮侧耳真菌提取液进行纯化,并对纯化组分的理化性质及体外抗肿瘤作用进行研究。方法:用离子交换、凝胶过滤进行纯化,采用 SDS-PAGE 测定蛋白分子量,用氨基酸自动分析仪测定氨基酸的组成,通过福林酚法测定其蛋白和多糖的含量,用薄层层析确定多糖的组成,将 POGP 直接与 S<sub>180</sub> 腹水瘤细胞及小鼠正常细胞液混合,观察其活性。结果:纯化得到对肿瘤细胞具有细胞毒作用的糖蛋白(POGP),SDS-PAGE 显示 POGP 为单一色带,其分子量为 102.3KD,氨基酸组成中鸟氨酸、精氨酸含量较高,蛋白与多糖的含量分别为 78.34% 和 16.53%,其多糖主要由甘露糖组成,POGP 对小鼠正常细胞均无作用,对 S<sub>180</sub> 腹水瘤细胞具有细胞毒作用,甘露糖可抑制 POGP 的抗瘤活性。结论:POGP 具有特异性抗肿瘤作用,值得进一步开发研究。

**关键词** 糙皮侧耳;糖蛋白;理化性质;抗肿瘤活性

### Studies on the properties and antitumor activity in vitro of the glycoprotein from pleurotus ostreatus

Jiang Zibin (Jiang ZB), Li Hua (Li H), Cao Jichao (Cao JC) (Department of Biochemical Pharmaceutics, Shandong Medical University, Jinan 250022)

**ABSTRACT OBJECTIVE:** To purify the extract from pleurotus ostreatus, and study on the physicochemical properties and antitumor activity in vitro of the purified component. **METHOD:** The ion-exchange and gel filtration chromatograph were used. The molecular weight was determined with SDS-PAGE. The composition of amino acids were determined with amino acids automatic analysis instrument. The folin-phenol method and the sulfuric acid-phenyphenol method were used to determine the contents of protein and polysaccharide. The compositions of polysaccharide were determined with thin-layer chromatograph. The purified component was added to the S<sub>180</sub> ascite tumor cells and the mouse's normal cells solution to test the activity. **RESULTS:** The glycoprotein POGP with cytotoxicity to tumor cells was separated from pleurotus ostreatus. SDS-PAGE showed that POGP had a single band, and its MW was 102.3KD. The contents of orn and arg in POGP were high. There were 78.34% of protein and 16.53% of polysaccharide in POGP. The polysaccharide was mainly composed of mannose. POGP had cytotoxicity to S<sub>180</sub> ascite tumor cells and no activity to mouse's normal cells. The mannose could inhibit the cytotoxicity of POGP. **CONCLUSION:** POGP has specific antitumor activity and need further researching.

**KEY WORDS** pleurotus ostreatus, glycoprotein, physicochemical properties, antitumor activity

糙皮侧耳(Pleurotus ostreatus, 简称 PO)系担子菌纲口蘑科真菌,含有多种活性成分,具有抗肿瘤、抗氧化、降低胆固醇及免疫调节等多种药理作用。Yoshika 等的研究表明,PO 子实体的水提液对小鼠肉瘤及艾氏瘤的抑制率分别达 75% 及 60%,并从其水提物中分离出一葡聚糖组分,后者在 0.1 mg/Kg 剂量时,有很强的抗肿瘤作用<sup>[1]</sup>,但关于 PO 抗肿瘤糖蛋白的研究,国内外尚未见有报道。

本文采用离子交换、凝胶过滤等方法,分离得到了具有抗肿瘤作用的糖蛋白(Pleurotus ostreatus glycoprotein, POGP),并对其理化性质及抗肿瘤活性进行了探讨。

#### 1 试验材料

仪器:UV-120-02 紫外分光光度计(Simazu 公司);835-50 型氨基酸自动分析仪(Hitachi 公司);DY-600 型电泳仪(广州汕头市郊金砂广播仪器厂)。

试剂:糙皮侧耳真菌子实体(购自市场);Imberlite 离子交换树脂(英国进口分装);Sephadex G-100(上海试剂厂);SDS 标准分子量蛋白(上海博奥生物技术有限公司);标准葡萄糖、甘露糖、半乳糖、鼠李糖(分析纯,上海试剂二厂);其它试剂均为分析纯或化学纯。

动物:S<sub>180</sub>小鼠(山东省医学科学院实验动物中心)。

## 2 方法与结果

### 2.1 POGP 的制备

取 PO 500g,加入 10mmol/L、pH7.0 的磷酸盐缓冲液(PBS)制成匀浆,搅拌提取,收集滤液,经硫酸铵沉淀、对自来水、PBS 溶液透析、浓缩后,得 PO 糖蛋白提取液。

提取液上 Imberlite 阳离子交换柱,用 0.2mol/L、pH 7.4PBS 缓冲液洗脱,洗脱液于 280nm 处测定吸收度,得到组份 P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>,将 P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub> 分别与 S<sub>180</sub>腹水瘤细胞混合,于显微镜下观察对 S<sub>180</sub>腹水瘤细胞的杀伤作用,发现 P<sub>1</sub> 活性较强(见图 1)。

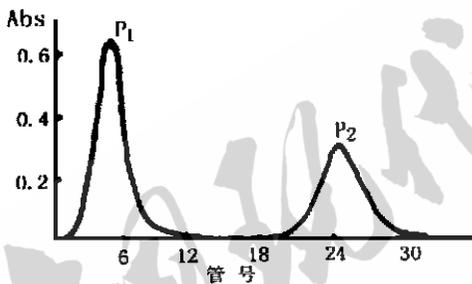


图 1 PO 糖蛋白阳离子交换色谱图/35cm × 1.5cm

将 P<sub>1</sub> 浓缩后上 Sephadex G-100 柱,用 PBS 缓冲液洗脱,得组分 P<sub>1.1</sub>、P<sub>1.2</sub>,按上述方法发现 P<sub>1.2</sub> 为主要活性成分 POGP(见图 2)。

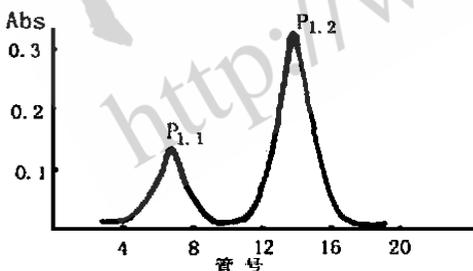


图 2 P<sub>1</sub> 的 Sephadex G-100 凝胶过滤色谱图/35cm × 1.5cm

### 2.2 理化性质测定

2.2.1 分子量测定 按王重庆等介绍方法用 SDS-PAGE 测定分子量<sup>[2]</sup>,标准蛋白分子量的直线方程为  $Y = -1.51X + 2.34, r = 0.9993$ 。POGP 分子量为 102.3 KD。

2.2.2 氨基酸分析 POGP 用 6mol/L 盐酸于 105℃ 水解 24h,用氨基酸自动分析仪测定,结果见表 1,从表中可知,POGP 中鸟氨酸、精氨酸含量较高。

表 1 POGP 的氨基酸含量/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$

氨基酸	含量	氨基酸	含量
Asp	398.21	Ile	276.69
Thr	218.91	Leu	274.12
Ser	204.30	Tyr	274.12
Glu	458.05	Phe	326.55
Gly	253.75	Orn	596.96
Ala	275.70	Lys	492.96
Cys	239.40	Trp	248.11
Val	492.83	Arg	537.85
Met	323.57		

2.2.3 多糖及蛋白质含量测定 分别用硫酸-苯酚法<sup>[3]</sup>、福林-酚法<sup>[4]</sup>测定。POGP 中多糖、蛋白质的百分含量分别为  $16.53\% \pm 1.34\%$  和  $78.34\% \pm 7.13\%$ 。

2.2.4 多糖组成测定 依照文献<sup>[5]</sup>,以 D-甘露糖(Man)、D-半乳糖(Gal)、D-鼠李糖(Rha)、D-葡萄糖(Glu)为标准,用薄层析测定。

以 Glu 的 R<sub>f</sub> 值为参比,POGP 及各标准糖的相对比值为:POGP:Man:Gal:Rha:Glu 为 1.46:1.46:1.11:2.03:1.00,POGP 水解液与甘露糖层析迁移率相同,表明 POGP 所含单糖主要由甘露糖组成。

### 2.3 POGP 的体外抗肿瘤活性测定

抽取 S<sub>180</sub>腹水瘤细胞,用生理盐水稀释 4 倍后,取少许分别加入 0.24mg/ml 的 POGP 溶液、PBS、蒸馏水与之混合,于显微镜下观察 POGP 对瘤细胞的作用;取新鲜小鼠脾、肝脏、肾、胸腺细胞,制成细胞混悬液,按上述方法观察 POGP 作用。

显微镜下可见 S<sub>180</sub>腹水瘤细胞在 POGP 的作用下,细胞逐渐膨胀,细胞膜上形成一些小泡状凸起,在 1h 内完全破碎,PBS 溶液则对瘤细胞无作用,蒸馏水使瘤细胞涨大,但无破碎现象;而 POGP 对脾、肝脏、肾、胸腺等细胞没有作用,细胞完好无损。

### 2.4 单糖事先处理瘤细胞对 POGP 杀伤瘤细胞作用的影响

取 0.5ml S<sub>180</sub>腹水瘤细胞 5 份,分别加入 10mg Man、Glu、Gal、木糖(Xyl)、果糖(Fru),于 4℃ 放置 1h,离心,弃上清,以 PBS 溶液冲洗后,各加入 0.5ml POGP,于显微镜下观察 POGP 对瘤细胞的作用。

结果表明,以 5 种单糖事先处理腹水瘤细胞处理后,均不影响 POGP 对此等瘤细胞的杀伤作用。

## 2.5 单糖对 POGP 杀伤瘤细胞作用的影响

取 0.5 ml POGP 5 份,分别加入 10 mg Man、Glu、Gal、Xyl、Fru,溶解后于显微镜下观察加有不同单糖的 POGP 对 S<sub>180</sub>腹水瘤细胞的杀伤作用。

结果表明甘露糖可抑制 POGP 对 S<sub>180</sub>腹水瘤细胞的杀伤作用,而其它单糖均不影响 POGP 的活性。

## 3 讨论

本实验发现 POGP 对 S<sub>180</sub>腹水瘤细胞具有直接细胞毒性作用,可使瘤细胞膨胀,直至破裂;而对正常小鼠脾、肝脏、肾、胸腺等细胞无作用,说明 POGP 具有特异性细胞毒作用。据报道,真核细胞膜上含有 2%~10%的碳水化合物,它们以糖脂或糖蛋白的形式存在,其糖链中的单糖有己糖(半乳糖、甘露糖及少量葡萄糖)以及乙酰氨基葡萄糖和乙酰氨基半乳糖等。肿瘤细胞膜上的成分与正常细胞膜有许多不同。癌变时,细胞膜上的一些基因重新启动,致使分化发育的阶段抗原再次出现,同时基因也可编码一些糖苷酶,使糖蛋白或糖脂中的糖链出现异常。Maschke 等发现在许多肿瘤细胞中,特异的能被小脑可溶性凝集素(CSL)识别的聚糖合成增加<sup>[6]</sup>。此外,肿瘤细胞膜上的糖蛋白和糖脂的糖链可出现缺陷现象,如小鼠 3T3 细胞、大鼠肝细胞、人腺癌细胞、人脑瘤细胞都可出现糖链缺失。因此作为体现细胞和分子表型及抗原性的糖链,在肿瘤细胞膜上就发生很大改变,POGP 的特异性细胞毒作用可能与其对肿瘤细胞膜上特异的糖链识别结合有

关。

根据单糖抑制实验,发现甘露糖与 POGP 混合可阻断 POGP 的细胞毒作用,而甘露糖事先与肿瘤细胞混合作用一小时再除去后并不影响 POGP 对肿瘤细胞的杀伤作用,进一步表明 POGP 蛋白部分可被细胞膜上的甘露糖识别并与之结合而发挥作用,将甘露糖加入 POGP 溶液,则可抑制 POGP 与肿瘤细胞膜的糖链结合,从而使其失去细胞毒活性。

## 参考文献

- 1 Yoshika Y, Tabeta R, Saito H, *et al.* Antitumor polysaccharides from *P. ostreatus* (Fr.) *quel* isolation and structure of  $\beta$ -glucan. *Carbohydr Res*, 1985, 140(1): 93.
- 2 王重庆, 李云兰, 李德昌, 等. 高级生物化学实验教程. 北京: 北京大学出版社, 1994: 42.
- 3 李建武, 肖能庚, 余瑞元, 等. 生物化学实验原理和方法. 北京: 北京大学出版社, 1994: 125.
- 4 蔡武城, 袁厚积. 生物物质常用化学分析法. 北京: 科学出版社, 1982: 95.
- 5 吴伯良, 王璇, 杨文, 等. 西瓜根抗癌糖蛋白的生理生化特征及其对肺癌细胞杀伤作用初步研究. 暨南大学学报, 1990, 11(13): 79.
- 6 Maschke S, Robert J, Coindre JM, *et al.* Malignant cells have increased levels of common glycoprotein ligands of the endogenous cerebellar soluble lectin CSL. *Eur J Cell Biol*, 1993, 62(1): 163.