

松木层孔菌胞外多糖的组成分析及免疫学活性研究

袁雷, 钟国辉, 田发益(西藏农牧学院生物技术中心, 西藏 林芝 860000)

摘要: 目的 研究松木层孔菌胞外多糖的单糖组成和免疫学活性。方法 使用冻融分级、酶+seveg 法脱蛋白和 Sepharose CL-6B 层析纯化松木层孔菌胞外粗多糖(CPPE), 得到级分 PPE, 用 HPLC 分析其均一性和分子量, 用气相色谱法测其单糖组成。结果 经 HPLC 验证, PPE 为均一组分, 分子量为 3.9×10^4 Da。气相色谱分析表明, PPE 为甘露聚糖。淋巴细胞增殖实验显示, PPE 能促进小鼠淋巴细胞的增殖, 同时也可协同有丝分裂原 ConA 和 LPS 促进小鼠脾 T、B 淋巴细胞的增殖。结论 PPE 具有提高机体免疫力的功能。

关键词: 松木层孔菌; 胞外多糖; 组成分析; 淋巴细胞增殖

中图分类号: R284.1; R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2010)08-0711-04

Study on Composition and Immunomodulating Activities of Extracellular Polysaccharide from Culture Medium of *Phellinus pini*

作者简介: 袁雷, 男, 硕士, 讲师

Tel: (0894)5831835

E-mail: yuanlei202@yahoo.com.cn

ABSTRACT: OBJECTIVE Study on monosaccharide composition and immunomodulating activities of extracellular polysaccharide of *Phellinus pini*. **METHODS** PPE was purified from CPPE using a combination of techniques, such as: frozen-thawed, deproteinated by enzyme/Sevag method and Sepharose CL-6B column chromatography. Homogeneity and molecular weight of PPE were analyzed by HPLC, and its composition was assayed by GC. **RESULTS** PPE appeared as single symmetrical peak on HPLC, and the average molecular weights was 39 kDa. Monosaccharide analysis by GC shows that it was mannan. The bioassay showed that PPE could stimulate mouse splenic lymphocytes proliferation and increase the ConA or LPS-induced lymphocytes proliferation *in vitro*. **CONCLUSION** The results showed that PPE have the function of enhancing the immunity.

KEY WORDS: *Phellinus pini*; extracellular polysaccharide; composition analysis; lymphocyte transformation

松木层孔菌隶属于层孔菌属,是一种寄生于云杉、落叶松、松等针叶树活立木上的多年生腐生菌^[1],近几年的研究发现,层孔菌属多糖具有免疫调节、抗肿瘤、抗氧化、降血脂、降血糖等生物学活性^[2-7]。王稳航等^[5]的研究表明,松木层孔菌子实体水提多糖(PS I)、碱提多糖(PS II)、磺化多糖(PS III)具有抗氧化功能,3种多糖均能不同程度地提高小鼠血清、心、肝、脑、脾中 SOD、GSH-Px 活力,降低 MDA 生成量,而对 TOAC 值影响较小;同时,3种多糖均显著提高了小鼠体内血清 NO 生成量。松木层孔菌水提多糖 PS I 能显著提高小鼠的脾指数和胸腺指数,能显著促进脾细胞体外增值能力,具有提高机体免疫力的功能^[8]。然而,关于松木层孔菌的发酵培养,胞外多糖组成分析和免疫学活性方面的研究还未见报道。

本试验对松木层孔菌胞外多糖(PPE)的单糖组成进行分析,并对其免疫学活性进行了初步的考察。

1 材料与方法

1.1 材料

松木层孔菌发酵液的获得:本实验室从松木层孔菌子实体中分离菌种,取活化后的斜面母种接入 500 mL 锥形瓶中,28℃,140 r·min⁻¹ 培养 7 d。发酵结束后,4 000 r·min⁻¹ 离心收集新鲜发酵液备用。

1.2 试剂与仪器

Sepharose CL-6B(Amersham Biosciences),蓝色葡聚糖(Blue dextran 2000)、标准分子量葡聚糖(133 800, 84 400, 41 100, 21 400, 2 500)、链蛋白酶(Sigma),其余试剂均为国产分析纯或色谱纯;

LC-10ATVP 色谱仪(日本 SHIMADZU, SHIMADZU ID-10A 检测器,CLASS VP 工作站);TSK-GEL TYP G3000PWXL 色谱柱(7.8 mm×30.0 cm, 7 μm)。

Vavian 3400 气相色谱仪(美国 Vaviam 公司,附 FID 检测器,HP3365 化学工作站);SE-30 色谱柱(50 mm×0.20 mm, 0.25 μm)。

1.3 PPE 的提取纯化

松木层孔菌发酵液浓缩至原体积的 1/10,用 3 倍体积预冷的 98%乙醇醇沉,静置过夜,离心,常规干燥,得褐色发酵液粗多糖,命名为 CPPE。CPPE 经冻融分级、链蛋白酶+Sevag 法联合脱蛋白、Sepharose CL-6B 层析柱(2.5 cm×90 cm)层析(洗脱液:0.9%NaCl,流速:0.5 mL·min⁻¹,以苯酚-硫酸法检测,合并糖峰部分洗脱液,透析后浓缩冻干,得松木层孔菌胞外多糖 PPE。利用 HPLC 对 PPE 进行均一性及分子量测定,分析条件:流动相为 0.7%Na₂SO₄;流速为 0.5 mL·min⁻¹;柱温为 40℃;压力 1.6 MPa。

1.4 PPE 的单糖组成分析

PPE 的预处理^[9]:称取 PPE(10 mg)经 2 mol·L⁻¹ 三氟乙酸(TFA)120℃封管水解 3 h,用无水乙醇蒸除 TFA 至中性;加 1 mg 肌醇和 1 mL 0.1 mol·L⁻¹ Na₂CO₃,30℃干燥箱保温 50 min;加 KBH₄ 50 mg,室温放置 1.5 h;25%乙酸中和 KBH₄,并用阳离子交换树脂除盐;甲醇除酸至中性;将干燥物 85℃真空加热 2 h;加 1 mL 正丙胺,1 mL 无水吡啶,55℃保温 30 min, N₂ 吹干;加 0.5 mL 无水吡啶和 0.5 mL 乙酸酐,90℃保温 1 h, N₂ 吹干;加 1 mL 无水二氯甲烷,离心,取上清气相色谱仪分析。

PPE 的气相色谱分析条件:以高纯氮气为载气,气化温度 280℃,检测温度 280℃,柱温为 130℃(2 min),以 10℃·min⁻¹ 程序升温至 250℃(20 min)。

1.5 PPE 免疫活性研究

采用 MTT 法检测小鼠体外脾淋巴细胞的增殖情况^[3]。小鼠颈椎脱臼处死后,无菌条件下取出脾脏,轻轻研磨制备脾细胞,用 0.01%Tris-NH₄Cl 溶

解红细胞, Hank's 洗涤 3 次后, 用 RPMI 1640 完全培养基制备脾细胞悬液, 调整细胞浓度为 10^6 mL^{-1} 。100 μL 含有无菌待测样品的细胞悬液加入含有或者不含 ConA(终浓度 $5.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、LPS(终浓度 $10.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的 96 孔培养板中。加入待检样品 20 μL , 用 RPMI 1640 完全培养基补至 200 μL 。每个样品重复 3 个孔。混匀后放入培养箱 5% CO_2 , 37 $^\circ\text{C}$ 预孵 72 h。每孔加入 20 μL 的 MTT 染色液 $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 5% CO_2 , 37 $^\circ\text{C}$ 反应 4 h。培养结束后, 去上清液, 加入 100 μL 的 DMSO, 震荡溶解, 酶标仪 570 nm 处检测。

2 结果与讨论

2.1 提取纯化

松木层孔菌发酵液经分离纯化后得到褐色粉末状固体 CPPE, 经苯酚-硫酸法测得其总糖含量为 33.56%, 凯氏定氮法测得蛋白含量为 31.68%。纯化后胞外多糖 PPE 为淡黄色粉末, 比旋光度 $[\alpha]_D^{20} = +21.3^\circ$, 糖含量为 92.84%, HPLC 分析结果显示, 样品为对称单一峰, 表明所获得的多糖纯度较高, 其分子量为 39 kDa, 见图 1。

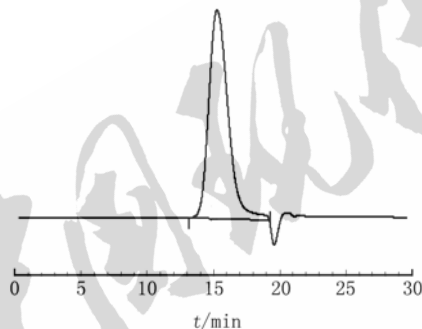


图 1 PPE 的 HPLC 谱图

Fig 1 HPLC spectrum of PPE

2.2 PPE 单糖组成

糖组成分析结果表明, PPE 为甘露聚糖, 见图 2。

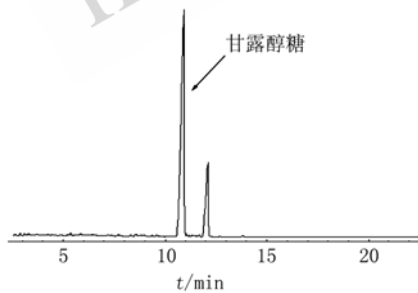


图 2 PPE 的单糖组成 GC 谱图

Fig 2 GC chromatogram of PPE

2.3 免疫活性研究结果

应用 MTT 法对 PPE 进行了体外免疫活性实验, 结果见表 1。

表 1 PPE 对小鼠脾淋巴细胞增殖作用的影响

Tab 1 Effects of PPE and PPE on ConA- or LPS- induced lymphocyte proliferation in mouse splenocytes *in vitro*

组别	OD(570 nm)		
	PPE	PPE+ConA	PPE+LPS
阴性对照组	0.424±0.013		
ConA 阳性对照组	0.486±0.021		
LPS 阳性对照组	0.898±0.023		
PPE(25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	0.483±0.017 ¹⁾	0.543±0.024 ¹⁾	0.901±0.031
PPE(50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	0.585±0.035 ²⁾	0.564±0.021 ¹⁾	0.978±0.029 ¹⁾
PPE(100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	0.605±0.041 ²⁾	0.594±0.019 ²⁾	1.028±0.041 ²⁾
PPE(200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	0.512±0.014 ²⁾	0.641±0.044 ²⁾	0.834±0.022

注: 与阴性对照组相比, ¹⁾ $P < 0.05$; ²⁾ $P < 0.01$

Note: Compared with negative control group, ¹⁾ $P < 0.05$; ²⁾ $P < 0.01$

3 结论

松木层孔菌胞外粗多糖经纯化后, 得到一个级分, 糖含量由粗多糖的 33.56% 提高到纯化后的 92.84%, 重均分子量集中在 39 kDa 附近; 松木层孔菌胞外多糖为均一多糖, 由甘露糖组成, 为甘露聚糖; 松木层孔菌胞外多糖具有促进小鼠脾淋巴细胞增殖的作用, 同时可协同有丝分裂原 ConA 和 LPS 促进小鼠脾 T、B 淋巴细胞的增殖。

由表 1 可以看出, PPE 能够促进小鼠脾淋巴细胞的增殖(浓度为 50, 100, 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 具有显著差异), 同时也可协同有丝分裂原 ConA(浓度为 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时具有显著差异)和 LPS(100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时具有显著差异)促进小鼠脾 T、B 淋巴细胞的增殖。

4 讨论

通过发酵工程技术生产真菌多糖, 具有生产周期短、成本低廉、适宜工业化的大规模生产等优点, 近年来已成为真菌多糖研究和开发的热点之一。松木层孔菌由于受其生理生态的特殊性和复杂性以及外部环境条件制约, 天然资源非常有限, 笔者通过液态发酵技术成功培养出松木层孔菌, 说明松木层孔菌适合发酵培养, 为以后的大规模生产提供了理论依据。

笔者从松木层孔菌发酵液中分离出松木层孔菌胞外粗多糖, 在对其进行纯化的过程中发现, 在去除了其中的蛋白质成分之后, 松木层孔菌胞

外粗多糖分布相对比较集中,因此后续的纯化步骤很简单,这一特点为松木层孔菌胞外多糖的工业化生产降低生产成本、快速进入市场提供了便利的条件。

对松木层孔菌胞外多糖的单糖组成进行分析表明,该多糖仅由甘露糖组成,为甘露聚糖。由于该胞外多糖单糖组成比较单一,对其结构方面的分析工作相对会比较轻松,而且很有可能得到该多糖非常精确的结构信息。

甘露聚糖结合凝集素(MBL)是哺乳动物C型凝集素超家族的成员,在机体抗感染免疫反应中处于第一线^[10]。MBL能特异性地识别多种病原微生物表面的多糖结构,进而激活补体系统和调理吞噬杀灭病原^[11-12]。同时,它也参与多种免疫性疾病的发生^[13]。松木层孔菌胞外多糖为甘露聚糖,通过对其免疫学活性的初步研究发现,该多糖具有促进小鼠脾淋巴细胞增殖的作用,为进一步研究该多糖的抗病毒、抗肿瘤、免疫调节等方面的活性提供理论基础,并为松木层孔菌的开发利用提供了有价值的参考资料。

REFERENCES

- [1] MAO X L. The Macrofungi in China(中国大型真菌) [M]. Zhengzhou: Henan Science and Technology Press, 2000: 480.
- [2] CHANG Z Q, OH B C, LEE S P, et al. Comparative immunomodulating activities of polysaccharides isolated from *Phellinus* spp. on cell-mediated immunity [J]. *Phytother Res*, 2008, 22(10): 1396-1399.
- [3] LI X, JIAO L L, ZHANG X, et al. Anti-tumor and immunomodulating activities of proteoglycans from mycelium of *Phellinus nigricans* and culture medium [J]. *Int Immunopharmacol*, 2008, 8(6): 909-915.
- [4] HAN S B, LEE C W, JEON Y J, et al. The inhibitory effect of polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* on tumor growth and metastasis [J]. *Immunopharmacology*, 1999, 41(2): 157-164.
- [5] WANG W H, LI Y, LIU A J. Effect of different polysaccharides from fungus *Phellinus pini* on antioxidant capacity of normal mice [J]. *Prog Mod Biomed*(现代生物医学进展), 2008, 8(8): 1439-1441.
- [6] ZOU X, GUO X, SUN M. pH control strategy in a shaken minibioreactor for polysaccharide production by medicinal mushroom *Phellinus linteus* and its anti-hyperlipemia activity [J]. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2009, 32(2): 277-281.
- [7] CHO E L, HWANG H J, KIN S W, et al. Hypoglycemic effects of exopolysaccharides produced by mycelial cultures of two different mushrooms *Tremella fuciformis* and *Phellinus baumii* in ob/ob mice [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 75(6): 1257-1265.
- [8] LIU A J, REN Y, WANG W H, et al. Study on immunological properties of a water-soluble polysaccharide PS 1 extracted from *Phellinus pini*(Fr.) [J]. *Prog Mod Biomed*(现代生物医学进展), 2006, 6(11): 14-17.
- [9] TONG H B, LIANG Z Y, WANG G Y. Structural characterization and hypoglycemic activity of a polysaccharide isolated from the fruit of *Physalis alkekengi* L [J]. *Carbohydr Polym*, 2008, 71(2): 316-323.
- [10] TABONA P, MELLOR A, SUMMERFIELD J A. Mannose binding protein is involved in first-line host defence: evidence from transgenic mice [J]. *Immunology*, 1995, 85(1): 153-159.
- [11] IKEDA K, SANNOH T, KAWASAKI N, et al. Serum lectin with known structure activates complement through the classical pathway [J]. *J Bio Chem*, 1987, 262(16): 7451-7454.
- [12] Malhotra R, Laursen S B, Willis A C, et al. Localization of the receptor-binding site in the collectin family of proteins [J]. *Biochem J*, 1993, 293(1): 15-19.
- [13] IP W K, LAU Y L, CHAN S Y, et al. Mannose-binding lectin and rheumatoid arthritis in southern Chinese [J]. *Arthritis Rheum*, 2000, 43(8): 1679-1687.

收稿日期: 2009-12-14