

- 皮细胞增殖及上皮生长因子受体磷酸化的影响[J]. 中华肾脏病杂志, 2002, 18(1): 38~40.
- [19] 陈家树. 董廷瑶教授运用三棱莪术配伍的经验[J]. 辽宁中医杂志, 1995, 22(10): 440~441.
- [20] 赵晓威, 尚尔寿. 三棱莪术汤为主治疗肝硬化腹水 40 例[J]. 湖南中医药导报, 2001, 7(12): 590, 606.
- [21] 付俊, 赵阿林. 三棱莪术汤治疗急性腰扭伤 297 例[J]. 浙江中

- 医杂志, 1999, (7): 298.
- [22] 唐克平. 三棱和伤汤治疗胸部陈旧性损伤[J]. 吉林中医药, 1998, (2): 32.
- [23] 曹广艳, 李侠. 三棱莪术散治疗肌注硬结 58 例[J]. 中国民间疗法, 1998, 10(5): 30.
- [24] 杨德芝, 侯静. 三棱、莪术促进胃动力的应用[J]. 安徽中医临床杂志, 2000, 12(2): 157~158.

云芝糖肽的研究进展

邹巧根¹, 朱玲², 王伟¹, 相秉仁¹

(1. 中国药科大学分析测试中心 南京 210038 2. 郑州大学药学院 郑州 450052)

关键词: 云芝糖肽; 提取精制; 结构组成; 毒性试验; 药理作用

中图分类号: R284.2

文献标识码: B

文章编号: 1001-1528(2003)07-0578-03

1 概述

多糖的免疫调节及其对肿瘤较好的治疗等作用使越来越多的受到了人们的重视, 一批多糖类药物在许多国家已被用到了临床上, 并取得了很好的疗效。

中药云芝又称彩云革盖菌^[1], 按照真菌分类, 是多孔菌科真菌云芝属(*Coriolus versicolor* (L) Fr.) 的子实体, 别名杂色云芝。云芝性微甘、寒, 能清热、消炎, 主治气管炎、肝炎、肿瘤等。云芝糖肽(PSP)是从天然产物担子菌纲云芝中提取的一种混合蛋白多糖(Proteoglycan), 文献报道系由15%蛋白质组成的蛋白多糖体^[2], 具有免疫调节作用, 临床用于抗肿瘤, 抑制动脉硬化, 消炎等作用。

2 分离提取

传统的云芝糖肽提取方法是水提醇沉原料在90~95℃的水浴条件下溶解云芝糖肽等水溶性成分, 过滤, 滤液浓缩至一定体积后, 利用多糖溶于水而不溶于醇的特点, 将糖肽沉淀出来。有文献报道, 对于云芝糖肽, 酸提取可将多糖含量提高至90%以上, 但经过比较, 用酸提取方法得到的糖肽含量在45~50%, 得率在10%左右。这与水提醇沉方法无明显差别, 且操作烦琐, 因此, 目前一般采用水提醇沉提取云芝糖肽。^{[3][4]}

沉淀所获的云芝糖肽常含有较多的游离蛋白及植物色素, 为了使云芝糖肽精品中具有较好的色泽和较高的给药安全性, 应经过脱色和去蛋白的步骤对云芝糖肽进行精制。有人曾使用活性炭, 大孔树脂及双氧水等方法进行脱色处理, 但都未达到理想结果。说明云芝糖肽具有高度不均一性和复杂的物理性质。很难用传统化学方法将其纯化, 脱色。应考虑采用与以往不同的更有效的方法。

目前, 云芝糖肽除蛋白多采用 Sevege 法。通常以正丁

醇-氯仿 1:4 作为萃取液, 加入到样品水溶液中振摇。离子法除去形成凝胶状的蛋白质, 反复多次直至正丁醇氯仿层不浑浊为止。由于云芝糖肽中蛋白质有游离态和结合态两种形式, 所以, 在进行脱蛋白时还要考虑与蛋白结合的多糖的情况, 因此, 在考察萃取效率时, 还要同时检测多糖含量。^[5]

云芝糖肽的传统精制方法是使用凝胶色谱和离子交换色谱, 利用分子筛效应。所用最小孔径的凝胶柱一般为所得多糖纯度可达96%以上。可以大幅度提高精度。但此法对于工业化的大量粗品的精制则不太适用。

有报道采用超滤膜技术可以使云芝糖肽含量提高, 并达到80%以上。还可以通过条件优化和实用性设计, 适用于工业化生产。该方法的原理是利用膜的选择性, 在膜的两侧存在一定量的能量差作用推动力。而溶液中各组分透过膜迁移速度不同而实现分离。所以, 膜分离操作属于速率控制传质过程, 具有设备简单, 无相变, 处理效率高, 节能等优点。^[6]

云芝糖肽的纯化和分子量测定常用方法有超离心法, 高压电泳法, 渗透压法, 粘度法和光散射法等。这些方法比较麻烦, 误差也较大, 目前常用的方法是高效凝胶渗透色谱法(HPGPC)。该方法具有快速, 高分辨和重现性好的优点。^{[7][8][9]}

3 结构分析

云芝糖肽的结构分析主要包括以下几个方面。

- (1) 云芝糖肽的单糖组成。
- (2) 云芝糖肽中单糖和糖苷键的连接类型。
- (3) 云芝糖肽中的结合蛋白的种类和含量。
- (4) 云芝糖肽中单糖与氨基酸的连接方式。

收稿日期: 2002-9-10

作者简介: 邹巧根(1963~), 男, 江苏苏州市人, 讲师. 研究方向: 药物分析 电话: 025-3111184. E-mail: zqg@hotmail.com

目前应用于云芝糖肽的单糖组成的方法主要有薄层色谱法,高效液相色谱法及衍生化气相色谱法等方法,其中衍生化气相色谱法是在多糖分析中最常用的手段。

无论采用哪种分析方法,首先要做的是将云芝糖肽完全水解,常用的水解方法有稀硫酸水解和三氟乙酸水解,两种水解方法都可以使云芝糖肽达到水解完全。^[10]

应用于云芝糖肽的单糖组成的测定方法中,薄层色谱法比较简单,但是存在灵敏度低的缺点,有些含量低的单糖不易检测出来,但利用此方法可以初步检测云芝糖肽的组成及验证糖肽水解是否完全。^[11]

由于单糖无紫外吸收,因此在用到高效液相色谱法测定云芝糖肽的组成时,无法用紫外检测器,只能用其他如蒸发光散色检测器等通用型检测器。在用高效液相色谱法测定单糖的组成时,由于各单糖结构相似,峰不易分开,因此会出现各单糖的峰分离度不够的现象。这对于分析云芝糖肽的单糖组成带来一定困难。^[12]

鉴于上述原因,所以现在多糖组成研究更多采用气相色谱法。由于单糖的挥发性很低,所以在应用气相色谱法对云芝糖肽的单糖组成进行分析时,必须首先要进行衍生化处理以增加其挥发性。常用的衍生化处理有硅烷化和乙酰化。但如果水解后的产物直接进行衍生化处理进行分析,会有单糖出现多重峰的现象。产生这种情况的原因可能是单糖中结构存在异构体互变的现象。

因此,为了避免这种情况,通常在衍生化之前可将糖和盐酸羟胺在吡啶中加热反应,然后加入醋酐后加热继续反应生成具有挥发性的糖脎乙酸酯衍生物。或对水解样品进行还原处理(通常用 NaBH_4),将水解后的单糖还原成为糖醇化合物,再进行衍生化处理生成糖醇乙酸酯衍生物,可以避免这种现象的发生。当前文献报道云芝糖肽主要由葡萄糖,甘露糖,岩藻糖,鼠李糖,半乳糖组成,最近,又有人从中检测到有木糖。其摩尔比根据药材来源不同有所差别,但葡萄糖的含量基本都在50%以上。^[13]

目前常用的糖苷键分析方法主要有高碘酸氧化和 smith 降解,红外光谱法,核磁共振光谱等分析方法。通过高碘酸氧化和 smith 降解产物,可以了解云芝糖肽中的糖苷键的连接方式,通过红外光谱图,核磁共振可以了解糖苷键的构型(α 型或 β 型)。还可以通过酶解,以特定酶与云芝糖肽反应,确定糖苷键的连接。^[14]据文献报道,云芝糖肽的糖苷键的连接方式主要是 $\beta(1\rightarrow3)$ 连接,且其中葡萄糖的含量超过50%,因此,认为云芝糖肽是以 $\beta(1\rightarrow3)$ 为连接方式的含蛋白的葡聚糖。但张喆等^[15]发现其中还存在有的 α 连接方式。

常用的测定蛋白质的方法有 Lowry 法,紫外吸收法(A_{280}, A_{205})等。Lowry 法不足之处是不同蛋白质间的测定差异大,反应速度慢及有时出现标准曲线的非线性。对本实验而言,样品是从真菌中提取的多糖类物质,不可避免含有大量的还原性物质,如某些单糖、寡糖。因此,以还原反应定量蛋白质的 Lowry 法就不适用了。紫外吸收法(A_{280}, A_{205})

也是最常用的方法之一。该法的优点是在于不要试剂,温度影响小,测定后样品能够回收,操作简单。但是,溶液的浊度成为其较大误差的原因。考马斯亮蓝法是染料结合法中较好的一种。最大优点在于一些干扰 Lowry 法的还原性物质对该法无干扰。同时,该法灵敏度高,显色稳定,消耗样品少,重复性好且操作简便,是比较理想的测定云芝糖肽中蛋白质含量的方法。^[16]

琼脂糖凝胶电泳也可以用于云芝糖肽中蛋白质的测定。琼脂糖凝胶电泳广泛的用于 DNA 的研究。而在糖肽研究中,作为纯度测定的一种方法,正以其操作简便,便于处理等优点,得到越来越广泛的应用。其原理是因为位阻的因素决定了不同多糖与巴比妥形成了不同复合物,因此,在电场作用下,糖复合物的 R_f 值各不相同,故能够较好的分离分子大小不同的多糖。琼脂糖凝胶电泳的主要作用一是可以确定云芝糖肽为糖肽,二是了解云芝糖肽中蛋白质与糖链的结合状态及提纯情况。以往文献报道云芝糖肽蛋白含量在15%左右,但张喆等^[3]通过以上方法对自己纯化的云芝糖肽的蛋白含量进行测定,其蛋白含量在4~8%,和以往文献报道有差异,考虑可能是由于云芝糖肽的蛋白存在游离和结合两种状态,以往纯化方式没有很好的除去其中的游离蛋白,致使蛋白含量较高。^[17]

通常糖肽中蛋白质与糖基之间只有 N-和 O-两种连接方式,主要通过天冬酰胺的侧链酰胺与糖形成 N-糖肽键;丝、苏或氨酸的侧链羟基与糖形成 O-糖肽键。最常见的是 N-糖蛋白,以天冬酰胺的侧链酰胺基与乙酰氨基葡萄糖通过一个 β -N-糖苷键相连接(α 构型较少)。N-糖蛋白的特点是肽链序列中天冬酰胺之后第二个氨基酸残基一定是丝氨酸(Ser)或苏氨酸(Thr)。另一种糖蛋白是 O-糖蛋白,即糖与肽链之间通过 O-糖苷键相连。有 α 和 β 两种类型。氨基酸残基通常是丝氨酸或苏氨酸,也有酪氨酸,4或5-羟基赖氨酸和4-羟基苯基甘氨酸等,其中由 Ser 和 Thr 与木糖形成的 β -O-糖苷键糖肽为蛋白聚糖的重要组成部分。而由 Ser 和 Thr 与 N-乙酰氨基半乳糖形成的 α -O-糖苷键形式糖肽为粘蛋白等糖蛋白的重要结构单元。O-糖蛋白中还有一类是由糖与氨基酸的侧链酚羟基形成的糖苷键的糖肽,叫 O-芳香糖肽。^[18]

糖肽中的 N-或 O-糖苷键相当于缩醛结构,因此具有缩醛的化学敏感性,遇到酸会被切断或端基异构化,O-糖苷键对碱也敏感,中等强度的碱就可以通过糖的 β -消除反应而使糖肽分解。强亲核试剂也会切断糖苷键或使其异构化。 β -消除反应测定 O-糖苷键方法是先将云芝糖肽 0.2mol/L - 1.0mol/L NaBH_4 溶液中,45℃反应24h,然后取样做氨基酸分析。比较各氨基酸相对含量的变化。如果云芝糖肽经过消除反应后在 240nm 处紫外吸收增加,氨基酸分析如能揭示丝氨酸和苏氨酸残基数减少,即可证明云芝糖肽结构中存在 O-糖苷键,丝氨酸和苏氨酸残基数减少的数量可反映多肽中糖链的可能连接点。^[19]

关于组成云芝糖肽的氨基酸种类及氨基酸与糖基的连接方式的问题,目前国内还未见有研究结果报道。这应该是

今后云芝糖肽研究的一个主要方向。

4 毒性实验^[20]

4.1 急性毒性实验 云芝糖肽是从国内培养的云芝菌中提得的真菌制品。小鼠口服给药测不出 LD₅₀,最大耐受量达 20g·kg⁻¹,尚未见小鼠死亡。说明其最小致死量 > 20g·kg⁻¹,故 PSP 口服毒性极小。注射 LD₅₀为 300.36g·kg⁻¹。

4.2 慢性毒性实验 大鼠和猴分别灌服比临床剂量高 200 和 100 倍的 PSP 每天 1 次,连续 6 个月,结果各剂量组生长发育、血常规、血液生化及心电图均无明显影响,组织病理学检查未见明显异常。

4.3 其他 小鼠腹腔注射云芝糖肽,所做实验、微核实验、染色体畸变实验,结果均为阴性,以真核和原核细胞分别检测,表明云芝糖肽没有显示致突变作用。

5 药理作用

5.1 抗肿瘤活性^{[21][22][23]} 实验证实云芝糖肽具有明显的扶正祛邪作用,能增强正常机体和荷瘤动物的免疫功能,能抑制体外培养动物和人癌细胞的生长,能改善肿瘤患者的临床症状,提高 Kanofsky 评分值,总有效率为 82.96%。研究证明 PSP 可有效地抑制 S-180A 肿瘤生长,口服 PSP 500~1000mg·kg⁻¹抑瘤率达 31.96%~32.99% (P<0.05)。PSP 25mg·kg⁻¹腹腔给药抑瘤率达 34.84%,与对照组相比差异显著 (P<0.05),高于或低于此剂量均未见有更强的抗肿瘤作用。PSP 对腹腔接种 S-180A 细胞小鼠的生存率有延长作用,以 25mg·kg⁻¹较好,生命延长率为 44.62%。PSP 还可使荷瘤小鼠脾脏和胸腺的重量有所增加,提示 PSP 对机体非特异性免疫功能具有增强作用。

5.2 抗溃疡活性^[20] 用云芝糖肽给大鼠灌胃,对大鼠应激性,幽门结扎型,醋酸型,消炎痛型等实验胃溃疡等都有明显抑制作用,并能显著降低幽门结扎型溃疡的胃酸总酸度,但对胃液分泌量胃蛋白活性,游离酸度,胃液中 PEG₂ 含量均无明显影响。

5.3 抗病毒,抗肝炎活性 宋子贤等^[20]对云芝糖肽对肝炎的治疗作用进行了临床观察,患者经用云芝糖肽治疗后,HBsAg、HBeAg 阴转率分别为 16.7%、26.7%。对 HBV 复制标志物阴转率明显高于对照组,说明云芝糖肽胶囊对 HBV 复制有明显抑制作用,对消除 HBV 携带者具有较好疗效。虽然,本治疗组 HBeAg 阴转率较刘树林等报道干扰素治疗慢性乙型肝炎 HBeAg 阴转率 45% 为低,但干扰素副作用较高,且价格昂贵,部分病人因不能耐受不得不中途停药,给治疗带来一定困难。ACT 复常率为 80.3%,与对照组相比,有显著性差异。从本组病例看云芝糖肽胶囊对治疗慢性乙型肝炎具有一定疗效,且价格较低,无明显不良反应,值得推广使用。

可以想象,随着对云芝糖肽的研究的进一步深入,云芝糖肽的结构和药理作用会更多的被人们所认识,云芝糖肽必

将会有更好的应用前景。

参考文献:

- [1] 应建浙,等.中国药用真菌图鉴[M].北京科学出版社,1987,12:116-117.
- [2] Yang Q Y, Hu YJ, Li XY, et al, PSP international symposium. [C], KongHong, 1993, Fudan University Press, 1993. 56.
- [3] 张喆.云芝糖肽的纯化和理化性质研究[D].硕士学位论文 2-6.
- [4] 罗立新,等.灵芝多糖的分离及纯化[J].食品工业科技,1998,(3):4-7.
- [5] 方一韦,等.具有药理活性多糖的研究现状[J].分析化学,1994,22(9):955-960.
- [6] 张喆.云芝糖肽的纯化和理化性质研究[D].硕士学位论文,10-11.
- [7] 陈重西,等.凝胶渗透色谱分析的精密度和准确性[J].色谱,1987:7(3).
- [8] 李静,等.云芝多糖组分的相对分子质量的凝胶渗透色谱表征[J].分析测试学报,1999,18(4):49-51.
- [9] 柳卫莉,等.凝胶渗透色谱法研究多支链生漆多糖的分子量[J].生物化学与生物物理学报,1993;25(4):409-414.
- [10] 吴东儒,等.糖类的生物化学[J].高等教育出版社,1987.
- [11] 张喆.云芝糖肽的纯化和理化性质研究[D].硕士学位论文,18-19.
- [12] 张喆.云芝糖肽的单糖组成分析[J].中国药科大学学报.
- [13] 张惟杰.糖复合物生物研究技术[M].上海科技出版社,1987,38-43.
- [14] 张惟杰.糖复合物生物研究技术[M].上海科技出版社,1987,121-128,163-164.
- [15] 张喆.云芝糖肽的纯化和理化性质研究[D].硕士学位论文,44-45.
- [16] 李娟,等.应用考马期亮蓝法测定总蛋白的含量[J].中国生物制品学杂志,2000,13(2):118-120.
- [17] 高凌云,等.琼脂糖凝胶电泳法的探讨[J].福建医科大学学报,2001,35(1):93.
- [18] 许家喜,等.糖肽的合成[J].化学通报,1998,(3):22-29.
- [19] 曾麒燕,等.红桂木凝集素糖蛋白的特征及其糖肽性质的分析[J].广西医科大学学报,1999,16(3):293-295.
- [20] 单有亮,等.云芝多糖研究进展[J].中草药,1998,29(5):349-351.
- [21] 刘燕,等.云芝多糖抗肿瘤作用研究进展[J].中成药,2001,23(10):745-757.
- [22] 过一敏,等.云芝糖肽对晚期恶性肿瘤的治疗作用[J].镇江医学院学报,2000,10(2):229-231.
- [23] 梁中琴,等.云芝糖肽抗肿瘤的实验研究[J].苏州医学院学报,1999,19(7):763-765.
- [24] 宋子贤,等.云芝糖肽胶囊治疗慢性乙型肝炎临床观察[J].广西医学,2000,22(6):1424-1425.