

Study on Content and Antimutagenic Effect of Lentinas Edodes Polysaccharides

Haixing Ruan, Hong Yu, Jia Liu

Guizhou Center for Disease Control and Prevention, Guiyang 550004, China
Email: haixingruan@yahoo.com.cn

Received 2013

Abstract: Objective: To analyze the content of polysaccharides in lentinas edodes and investigate the effect on antimutation of polysaccharides, so as to provide the reference for exploitation and utilization of lentinas edodes. **Methods:** Lentinas edodes polysaccharides were measured by sulfuric acid-phenol test. Ames assay, micronucleus formation assay and testicle cells chromosome aberration test were used to analyze the antimutagenic activities of Lentinas edodes polysaccharides. **Results:** The content of lentinas edodes polysaccharides ranged from 0.236 mg/g (dry weight) to 0.268 mg/g (dry weight). In four treatment groups (added S9 or not), the lentinas edodes polysaccharides in TA98 and TA100 could effectively inhibit revertant colonies induced by Dexon, MMS and 2-AAF, and the inhibitory rates were 37.7%, 69.8%, 70.3%, 78.1%, 39.0%, 78.1%, 83.0% and 88.6%, respectively. The lentinas edodes polysaccharides could inhibit cyclophosphamide-induced micronucleus formation of polychromatic erythrocytes of mice bone in treatment groups with the inhibitory rate of 31.80%, 52.80% and 63.10%, respectively. The lentinas edodes polysaccharides could markedly reduce the rate of chromosome aberration in mice testicle cells induced by mitomycin C, and the inhibitory rates were 13.9%, 23.3% and 77.9%, respectively. **Conclusions:** The polysaccharide of lentinas edodes has certain ability of antimutation.

Keywords: Lentinas Edodes; Content of Polysaccharides; Antimutation

香菇多糖成分测定及抗突变作用的研究

阮海星, 俞红, 刘佳

贵州省疾病预防控制中心 550004
Email: haixingruanyahoo.com.cn

收稿日期: 2013

摘要: 目的: 本研究通过分析香菇中的多糖及其抗突变作用, 为香菇的开发和利用提供科学依据。 **方法:** 采用硫酸-苯酚法测定香菇多糖; 通过鼠伤寒沙门氏菌/微粒体酶试验(Ames)、小鼠骨髓细胞微核试验和睾丸生殖细胞染色体分析方法对香菇提取液(多糖部分)进行了抗突变试验。 **结果:** 香菇中多糖含量为 0.252 ± 0.016 mg/g(干品计); 香菇多糖提取液的4个剂量组在加与不加微粒体酶活化系统(S₉)的条件下, 均能抑制由敌克松(Dexon)、甲基甲烷磺酸酯(MMS)和2-乙酰氨基芴(2-AAF)所引起的TA98、TA100回变菌落数的增加; 抑制率分别为37.7%、69.8%、70.3%、78.1%、39.0%、78.1%、83.0%和88.6%。香菇多糖提取液能抑制由环磷酰胺(40.0 mg)引起的小鼠微核率的增加, 抑制率分别为31.8%、52.8%和63.1%; 同时也抑制由丝裂霉素-C(2.0 mg)引起的小鼠的睾丸生殖细胞染色体畸变率的增加, 抑制率分别为13.9%、23.3%和77.9%。 **结论:** 香菇具有一定的抗突变作用。

关键词: 香菇; 多糖含量; 抗突变

*基金项目: 贵州省卫生厅科技基金课题(20030163)

1 引言

香菇(*Lentinus edodes*), 在我国素有“山珍之称”, 它不仅味美, 肉鲜嫩可口, 而且含有多糖、蛋白质、氨基酸、脂肪、碳水化合物、维生素和微量元素。有资料表明: 常食香菇, 有预防佝偻病、感冒、降低血压、血脂、提高免疫、抗肿瘤、调节免疫功能和刺激干扰素形成的功能^[1]。为进一步分析香菇中的多糖含量及抗突变作用的功能, 我们对香菇进行了多糖成分测定和抗突变试验研究, 旨在为香菇的开发和利用提供科学依据。

2 材料与方法

2.1 方法

采用硫酸-苯酚法测定多糖; 依照卫生部保健食品功能学评价程序和方法^[4], 对香菇进行多抗突变试验。

2.2 实验器材

1) 样品收购: 香菇购于贵阳新发食品有限公司生产的干品, 生产基地位于贵州省黔东南地区。

2) 样品多糖部分的制备: 按文献[2]方法进行, 将香菇干品置 60℃, 2~3 h, 粉碎成粗粉, 用蒸馏水浸泡 2 h, 加热煮沸, 控制温度继续加热 30 min。冷却后用双层纱布过滤, 压榨, 重复 1 次, 合并 2 次滤液于 80℃水浴减压浓(1 ml = 0.5 g 干品)。浓缩液中加入等量的 95%乙醇, 混匀, 沉淀后离心, 沉淀物为糖部分(受试物)备用。

3) 多糖的精制: 按文献^[3]方法进行, 精确吸取上述试液 10 ml, 加入 4 倍(40 ml) 95%乙醇, 于 60℃水浴上密封提取 1 h, 弃上清, 沉淀用 5 ml 95%乙醇洗 3 次。沉淀物加入 50 ml 水, 在 80℃水浴中加热溶解 30 min, 过滤, 残渣用 5 ml 热水洗 3 次, 与滤液合并, 冷却后移至 100 ml 容量瓶中, 定容, 备用。

4) 试验菌株: 所采用的指示菌为鼠伤寒沙门氏菌组氨酸缺陷型 TA98、TA100 经生物学鉴定合格后进行试验。

5) 试验动物: 昆明种成年小鼠, 由贵阳医学院实验动物中心提供, 体重 25~30 g, 合格证号: SCXK(黔) 2002-0001(实验动物合格证号)。

6) 仪器 723 型分光光度计(上海分析仪器厂生产)。

2.3 实验方法

1) 香菇中多糖含量测定 按 2.2 的 3) 多糖的精制的阐述, 精确吸取。

2) 所得待测样品液 2.0 ml 于 10 ml 容量瓶中定容, 再吸取 2.0 ml 于 10 ml 试管中, 并做平行样($n = 4$), 同时做空白实验。用硫酸! 苯酚法测定多糖的含量。

3) 鼠伤寒沙门氏菌/微粒体酶(Ames) 试验: 按方法[4] 进行试验, 采 TA98、TA100 合格菌株, 用平板掺入法的预培养法试验。设剂量组 2.5 mg/0.1 mL + 阳性物、5.0 mg/0.1 mL + 阳性物、10.0 mg/0.1 mL + 阳性物、20.0 mg/0.1 mL + 阳性物, 共 4 个组。另设阴性蒸馏水、二甲亚砜溶剂(DMSO) 与致突变阳性物(Dexon、MMS、2-AAF) 用二甲亚砜配制。试验采用方法 A: 受试物直接灭活致突变物加与不加 S9; 方法 B: 受试物间接灭活致突变物加与不加 S9; 2 种方法进行。37℃ 培养 48 h, 计数菌落数。

4) 小鼠骨髓细胞微核试验: 按[4] 中所述方法进行试验, 受试物试验设 1.5 g/kg BW; 3.0 g/kg BW; 6.0 g/kg BW 3 个剂量组, 另设阻性(蒸馏水) 及致突变物(CP40.0 mg/kg BW) 对照组。采用 25~30 g 健康雌性小鼠, 阴性与致突变物对照组均给予同等量的蒸馏水, 试验组分别给予受试物, 经口连续给予 30 d, 在试验第 30 d 和第 31 d 经口给予致突变物(CP40.0 mg/kg BW), 于末次给予致突变物后 6 h 颈椎脱臼处死动物, 取胸骨骨髓制片、镜检。每只小鼠镜检分析 1 000 个嗜多染红细胞(PCE) 微核(MCN) 数, 以千分率表示。

5) 小鼠睾丸初级精母细胞染色体畸变试验: 按[4] 中所述方法进行试验, 受试物试验设 1.5 g/kg BW; 3.0 g/kg BW; 6.0 g/kg BW 3 个剂量组, 另设阻性(蒸馏水) 及致突变物(CP40.0 mg/kg BW) 对照组。采用 25~30 g 健康雄性小鼠, 阴性与致突变物对照组均给予同等量的蒸馏水, 试验组分别给予受试物, 经口连续给予 30 d, 在试验第 30 d 和第 31 d 腹腔注射给予致突变物丝裂霉素-C(MMC2.0 mg/kg BW), 12 d 颈椎脱臼处死动物, 取睾丸制片、镜检。每只小鼠镜检分析 100 个中期相细胞, 计算细胞的畸变率及抑制率以

千分率表示。

2.4 统计学方法

多糖的含量根据所得吸光度值,由回归方程计算样品中的多糖含量。Ames 试验数据用方差分析统计。计算其抑制率[5]。小鼠骨髓细胞微核试验数据采用泊松分布进行U检验。小鼠睾丸初级精母细胞染色体畸变试验采用卡方 X^2 进行统计。

3 结果

3.1 多糖含量的测定

按 2.3 的 1) 香菇中多糖含量测定中所测的多糖吸光度值结果,并计算出多糖的含量,见表 1。

样品号 1 2 3 4 x 吸光度 1.964 1.925 1.931 1.956
1.944 多糖含量 0.256 0.250 0.252 0.254 0.252。

3.2 Ames 试验结果

方法 A 和方法 B,在加与不加 S₉ 的条件下,受试物对 TA98、TA100 的拮抗作用,表现在受试物直接灭活(方法 A) 致突变物与受试物间接灭活(方法 B) 致突变物的试验中,均有不同程度抑制由 Dexon、MMS、2-AAF 引起的 TA98、TA100 回变菌落数的增加,且抑制率随受试物剂量增加而增加,TA98 高达 78%、TA100 高达 88.6%。各受试物剂量组与致突变物组相比,经统计处理差异有统计学意义($P < 0.05$; $P < 0.01$)。有剂量-反应关系。见表 3。

Table 1. lentinas edodes content determine(mg/g various)
表 1. 香菇中多糖的含量测定结果(mg/g 干品计)

样品号	1	2	3	4	X	S
吸光度	1.964	1.925	1.931	1.956	1.944	0.016
多糖含量	0.256	0.250	0.252	0.254	0.252	0.002

Table 2. Ames test TA98、TA100、spontaneous back to variable colony and mutagenic colon
表 2. 鼠伤寒沙门氏菌 TA98、TA100 自发回变菌落数与致突变物菌落数($\bar{X} \pm s$)

菌液量(0.1 mL)	TA98		TA100	
	- S9	+ S9	- S9	+ S9
自发回变数				
A	37.0 ± 6.0**	41.0 ± 7.0**	134.0 ± 19.0**	124.0 ± 8.0**
B	38.0 ± 7.0**	33.0 ± 3.0**	147.0 ± 12.0**	139.0 ± 29.0*
诱发回变数				
A	1344.0 ± 66.0	2793.0 ± 250.0	2981.0 ± 532.0	3510.0 ± 61.0
B	1052.0 ± 120.0	1169.0 ± 303.0	3523.0 ± 153.0	624.0 ± 56.0

注: - S9: 致突变物 TA98 Dexon (30 μg/0.1 mL)、MM S (1.0 μ L/0.1 mL)、+ S9: 2- AAF (40.0 μg/0.1 mL)**: $P < 0.01$; *: $P < 0.05$ 。
A: 方法 A, B: 方法 B。

Table 3. lentinas extract and mutagenic tingsTA98、TA100 colony ($\bar{X} \pm s$) and inhibition rate
表 3. 香菇提取物 + 致突变物对 TA98、TA100 菌落形成数($\bar{X} \pm s$ 个) 与抑制率($\times 10^{-2}$)

受试物剂量 (mg/0.1mL)		TA98				TA100			
		- S9	抑制率	+ S9	抑制率	- S9	抑制率	+ S9	抑制率
2.5	A	887.0 ± 175.0	37.7	1880.0 ± 87.0	37.7	1705.0 ± 545.0	44.8	2182.0 ± 778.0	39.0
	B	945.0 ± 260.0	10.8	1041.0 ± 178.0	11.1	2736.0 ± 3 76.0	23.3	4070.0 ± 167.0	39.1
5.0	A	424.0 ± 50.0	69.8	1546.0 ± 604.0	45.3	1546.0 ± 206.0	56.9	1087.0 ± 746.0	78.1
	B	1071.0 ± 481.0	2.9	1010.0 ± 64.0	14.0	1761.0 ± 685.0	52.2	551.0 ± 94.0	6.6
10.0	A	418.0 ± 42.0	70.3	1705.0 ± 544.0	41.2	1066.0 ± 109.0	67.3	683.0 ± 214.0	83.0
	B	449.0 ± 48.0	59.4	894.0 ± 310.0	24.0	3140.0 ± 569.0	62.8	511.0 ± 81.0	15.6
20.0	A	316.0 ± 83.0	78.1	814.0 ± 127.0	39.1	954.01 ± 124.0	81.5	521.0 ± 128.0	88.6
	B	767.0 ± 209.0	28.1	826.0 3 ± 38.0	30.5	1335.0 ± 458.0	64.2	531.0 ± 131.0	11.1

3.3 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验结果

随受试物剂量增加,各受试物剂量组与致突变物组相比,微核数明显减少。3个剂量组随剂量增加而出现的微核数有所减少,抑制率增加,其抑制率分别为:31.8%、52.8%、63.1%。差异均有统计学意义($P < 0.01$)。有剂量反应-关系。见表4。

3.4 小鼠睾丸初级精母细胞染色体畸变试验结果

随受试物剂量增加,各受试物剂量组与致突变物组相比,片段、环状体畸变细胞明显减少,抑制率增加,常染色体单价体及性染色体单价体细胞数明显减少,畸变率降低。3个剂量组出现生殖细胞畸变率分别为:34.3%、32.3%、20.5%。随剂量增加而出现的畸变细胞数有所减少,抑制率有所增加,抑制率分别为差异均有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$)。有剂量反应-关系,见表5。

4 讨论

据资料[1]报道香菇多糖具有较好的生理活性及功效。多糖是由单糖连接而成的多聚物,现代研究证

明,香菇中所含的多糖主要为甘露醇,海藻糖、菌糖、葡萄糖、戊聚糖和甲基戊聚糖等6种多糖体[1]。这些多糖及糖复合物参与和介导细胞各种生命现象的调节,参与人体免疫功能调节和T淋巴细胞活性,可降低甲基类化合物诱发肿瘤的能力,对癌细胞有较强的抑制作用[6]。经试验表明,对小白鼠肉瘤180的抑制率为97.5%,对艾氏癌的抑制率为80%。香菇中还含有双链核糖核酸,能诱导产生干扰素,具有抗病毒的能力[6],从而对提高机体免疫起着积极的保护作用。此外,香菇中含有16种氨基酸,其中7种是人体必需氨基酸和钙、铁、锌、锰、镁、磷、硒等必需矿物元素。所含氨基酸对维持人体生命健康基础起着积极的作用。而矿物元素对参与人体代谢,维持机体自身稳定性有着十分重要的作用[10]。故认为,香菇提取物对可引起的染色体断裂剂(CP)DNA分子的损伤和伤害起到了一定的预防作用。

在本试验研究中,用硫酸苯酚法测定多糖的含量。在抗突变试验研究中即体现了体外、体内细胞相结合的评价的原则,对香菇的功效成分进行了抗突变作用的验证,并提供了科学依据。建议进一步开发香菇

Table 4. lentinas extract mutagenic tings mice micronucleus cells influence and inhibition rate
表4. 香菇提取物对致突变物引起的小鼠骨髓嗜多染红细胞微核率的影响($\times 10^{-3}$)及抑制率($\times 10^{-2}$)

受试物剂量(g/kg/BW)	嗜多染红细胞数(个)	核率细胞数(个)	微核率($\bar{X} \pm s\%$)	抑制率(%)
0.0	10000	14	1.40 \pm 0.97	
(+)	10000	209	20.9 \pm 3.84	
1.5	10000	147	14.7 \pm 2.58*	31.80
3.0	10000	106	10.6 \pm 2.07**	52.80
6.0	10000	86.8	8.60 \pm 2.22**	63.10

注:0.0:阴性(蒸馏水)对照组、(+):CP(40.0 mg/kgBW)。*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ 。

Table 5. lentinas extract mutagenic tings mice testicular chromosome distortion rate influence and inhibition rate
表5. 香菇提取物对致突变物引起的小鼠睾丸初级精母细胞染色体畸变率的影响及抑制率

受试物剂量(g/kg/BW)	观察细胞数(个)	畸变细胞数(个)	未畸变细胞数	畸变率($\bar{X} \pm s\%$)	抑制率(%)
0.0	800	102	698	12.75 \pm 9.0	
(+)	800	298	502	37.25 \pm 3.84	
1.5	800	274	526	34.25 \pm 5.17*	13.95
3.0	800	258	542	32.25 \pm 5.18**	23.25
6.0	800	164	636	20.05 \pm 9.53**	77.90

注:0.0:阴性(生理盐水)、对照组、(+):MMC(2.0 mg/kgBW)。*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ 。

的深加工技术,对保健食品进行有效剂型的研究,以提高人体利用度,使香菇的有效成分,成为保健食品的增效因子。为香菇的保健作用开辟更广阔的应用前景。

参考文献 (References)

- [1] Chinara. G. 香菇多糖免疫药理作用[J]. 国外医学植物学分册, 1993, 8 (4) : 165- 166.
- [2] 中国医学科学院药物研究所. 中药有效成分的研究[M] . 北京: 人民出版社, 1972: 227-228.
- [3] 余晓雷, 张可, 郑旭霞. 芦荟中多糖含量测定方法的探讨[J] . 营养学报, 2003, 25 (2) : 149-152.
- [4] 卫生部监督司, 保健食品功能学评价程序和方法[S] . 1996: 63-66.
- [5] 赵素娟, 王淑惠, 邓雪, 等. 盐藻素抗突变作用的初探[J]. 卫生毒理学杂志, 2003, 17: 65-66.
- [6] 陈冠敏, 林升清, 黄宗秀, 等. 香菇抗突变作用的研究[J] . 癌变、畸变、突变, 2000, 12 (2) : 105-108.
- [7] Y. He. Effects of Carotenids on aflatoxin B- induced mutagenesis in *Styphimurium* TA98 and TA100. *Nutr Cancer*, 1990, 13 (4) : 243- 247