

真菌多糖 AbEXP 1-a 的结构及其免疫调节活性研究

Study on Chemical Structure and Immunomodulating Activity of Fungal Polysaccharide AbEXP 1-a

张 卉/ZHANG Hui

沈阳化工学院环境与生物工程学院, 沈阳 110142

Department of Environmental and Bioengineering, Shenyang Institute of Chemical Technology, Shenyang 110142, China

[摘要] 采用酸水解法、红外光谱法和核磁共振法对真菌多糖 AbEXP 1-a 的结构进行了研究,并对该多糖的免疫调节活性进行了动物实验检测。结果表明,多糖 AbEXP 1-a 分子由葡萄糖和甘露糖以 3:1 的比例构成。推测其主链由 3 个葡萄糖分子通过 β -(1 $\rightarrow$ 6)糖苷键连在一起,再以 α -(1 $\rightarrow$ 6)或 β -(1 $\rightarrow$ 6)糖苷键与甘露糖连接而构成。多糖 AbEXP 1-a 对小鼠非特异性免疫、体液免疫和细胞免疫均有明显的促进作用,可提高小鼠迟发性变态反应,即多糖 AbEXP 1-a 可以全面提高机体的免疫功能。其最适作用剂量为 10 mg/kg 体重。

[关键词] 微生物工程,真菌多糖,结构,免疫调节

[中图分类号] Q539, Q949.32, R392.11

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-7857(2005)11-0050-04

Abstract: The chemical structure of fungal polysaccharide AbEXP 1-a was studied through acid hydrolysis, IR spectroscopy and NMR spectroscopy. And its immunomodulating activity was tested through animal experiments. The results are as follow: AbEXP 1-a is consisted of glucose and mannose in ratio of 3:1. Its backbone was deduced that consisted of 3 glucoses combined by β -(1 $\rightarrow$ 6) glycosidic linkage and a manose linking to them through α -(1 $\rightarrow$ 6) or β -(1 $\rightarrow$ 6) glycosidic linkage. AbEXP 1-a was found to be capable of promoting non-specific immunity, humoral immunity and cellular immunity of mice. Besides, it also could promote delayed type hypersensitivity in mice. All that means that AbEXP 1a could enhance the immunity of organisms comprehensively and the appropriate dosage is 10 mg/kg body weight.

Key Words: microorganism engineering, fungal polysaccharide, chemical structure, immunomodulating

CLC Numbers: Q539, Q949.32, R392.11

Document Code: A

Article ID: 1000-7857(2005)11-0050-04

20 世纪 70 年代至今,随着真菌多糖抗肿瘤、免疫调节等生物活性的发现,生命科学学者逐渐认识到糖类化合物是生命信息的携带者,在生物体中与核酸、蛋白质具有同等重要的作用。但对真菌多糖的作用机制、多糖结构与功能关系的认识至今未有突破,仍是生命科学研究领域的研究热点之一。本文采用酸水解法、红外光谱法和核磁共振法对真菌多糖 AbEXP 1-a 的结构进行研究,并对该多糖的免疫调节活性进行了动物实验检测。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验药品及动物

真菌多糖 AbEXP1-a :由真菌发酵液中分离纯化获得^[1-3];
多糖 AbEXP1-a 溶液: 配制 5mg/L、10 mg/L、30 mg/L 3 种浓度;

实验动物:昆明种小鼠,体重 18~20 g,40 只,雌雄各半。

1.1.2 主要仪器

Waters 510 高效液相色谱仪,美国;

NIGOLT 550 型傅立叶变换红外光谱仪,美国;
Bruker AVANCE 500 核磁共振仪,瑞士。

1.2 多糖结构分析方法

1.2.1 单糖组分分析

称取纯化多糖 20.0 mg, 溶解于 4ml 2 mol/L 硫酸中, 封管 105℃水解。切开封管, BaCO₃ 中和, 10 000 rpm 离心 5 min, 浓缩上清液, HPLC 法分析单糖组分^[4]。色谱条件: Sugar Pak-1 柱 (30×5.9 cm), 柱温 70℃, 流动相为 1 mmol/L EDTA 二钠钙, 流速 0.4 ml/min, 示差折光检测器 2410, 进样量 10 μ l, 数据处理软件 810。

1.2.2 红外光谱分析

KBr 压片法: 取干燥样品 2 mg 左右, 用 KBr 压片, 400~4 000cm⁻¹ 扫描^[5]。

1.2.3 核磁共振分析

将多糖 AbEXP 1-a 溶解于 D₂O, 进行 ¹³C 和 ¹H 核磁共振分析^[6,7]。

1.3 多糖免疫调节活性检测^[8-10]

1.3.1 实验动物分组及给药方式

收稿日期: 2005-05-20

作者简介: 张 卉, 女, 沈阳市经济开发区 11 号沈阳化工学院环境与生物工程学院, 副教授, 研究方向为生物活性物质研究开发;

E-mail: zhuhui-99@163.com

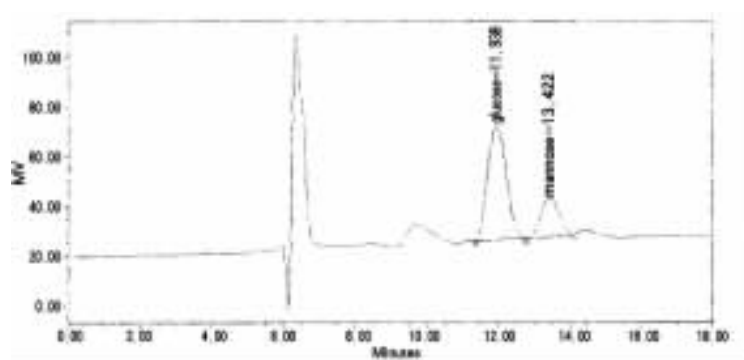


图1 多糖 AbEXP 1-a 水解液的高效液相色谱

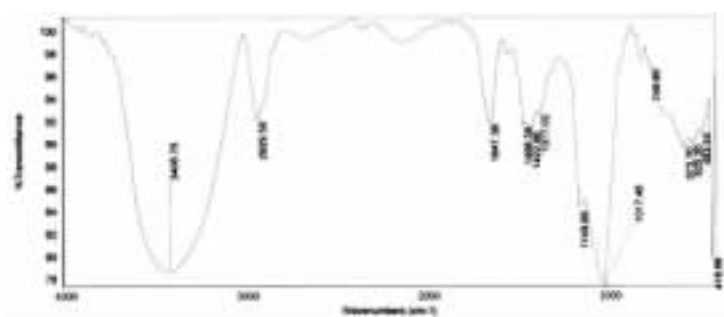
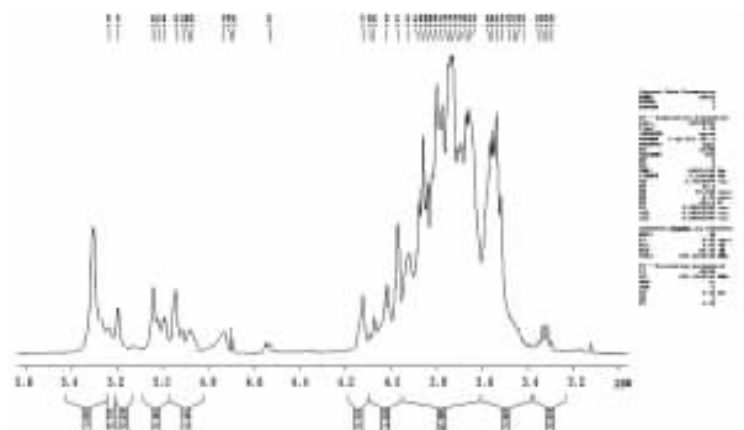
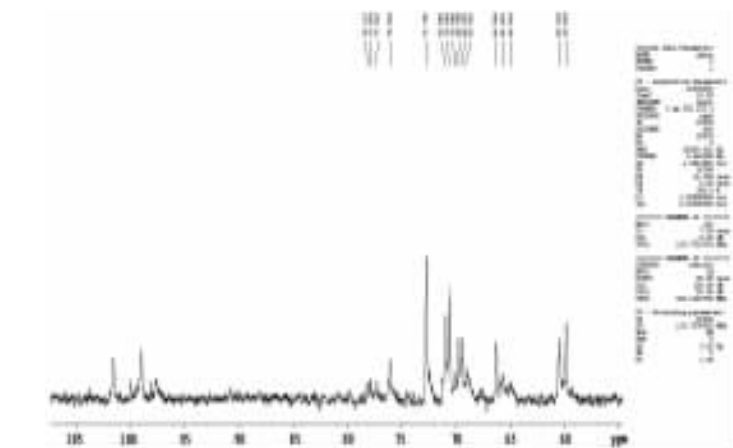


图2 多糖 AbEXP 1-a 的红外光谱

图3 AbEXP 1-a 的 ^1H -NMR 谱图图4 AbEXP 1-a 的 ^{13}C -NMR 谱图

将小鼠随机分组,每组 10 只。每天以腹腔注射给药方式给实验组小鼠注射不同剂量的胞外多糖,0.2 ml/只,连续给药 10 天;给对照组腹腔每天注射同样体积生理盐水。实验期间,一组一笼,自由进食及饮水。

1.3.2 免疫调节功能检测

1) 非特异性免疫: ① 免疫器官重量法——上述各组小鼠末次给药后的次日,眼眶放血处死,剥取脾脏、胸腺称重,比较与对照组的差异显著性;② 腹腔巨噬细胞功能测定——吞噬鸡红细胞指数法。

2) 体液免疫: 鸡红细胞作免疫源的溶血素测定。

3) 细胞免疫: 小鼠外周血中淋巴细胞酶标记染色测定法。

4) 对机体损伤的修复保护作用: 迟发型变态反应(2,4-二硝基氯苯作免疫源)。

给试验组和对对照组小鼠胸背部皮下注射 7% 的 2,4-二硝基氯苯(DNCLB)丙酮溶液 20 μl 致敏,6 d 后用该溶液再次攻击小鼠右耳部两侧,16 h 后用游标卡尺测量各组小鼠的耳厚度,比较耳厚度的变化。

2 结果与分析

2.1 多糖 AbEXP 1-a 的结构

2.1.1 AbEXP 1-a 的单糖组成

对 AbEXP 1-a 酸水解样品进行 HPLC 分析,结果见图 1。

AbEXP 1-a 酸水解液的 HPLC 图谱中有 2 个峰与葡萄糖和甘露糖标准品的保留时间相同,表明 AbEXP 1-a 含有葡萄糖和甘露糖 2 种单糖组分。

2.1.2 AbEXP 1-a 的红外光谱分析结果

多糖 AbEXP 1-a 的红外光谱见图 2。

根据《Sadtler Reference Spectra Collection》中多糖的标准谱图及有关资料进行分析可知: AbEXP 1-a 在 3406.75 cm^{-1} 处有吸收峰,是 O-H 键的伸缩振动,表明多糖存在分子内和分子间的氢键;在 2929.50 cm^{-1} 处的强吸收峰表明分子中有糖类 C-H 键的伸缩振动;1647.38 cm^{-1} 和 1422.66 cm^{-1} 处是多糖类的特征吸收峰;1149 cm^{-1} ~1017 cm^{-1} 之间的吸收峰是糖类 C-O 键的吸收峰;在 810 cm^{-1} 处有甘露糖的特征吸收峰;在 749.99 cm^{-1} 处有葡萄糖的特征吸收峰;573.70 cm^{-1} ~416.56 cm^{-1} 之间的吸收峰,尤其是 416.56 cm^{-1} 处的强吸收峰,是吡喃环碳骨架的吸收峰。930 cm^{-1} ~950 cm^{-1} 之间无吸收,890 cm^{-1} 处有吸收,说明分子中有 α 型和 β 型糖苷键。此外,AbEXP 1-a 在 1650 cm^{-1} ~1590 cm^{-1} 处有吸收峰,表明 AbEXP 1-a 分子中含有氨基。

2.1.3 AbEXP 1-a 的核磁共振分析结果

将多糖 AbEXP 1-a 溶解于 D_2O , 进行 ^{13}C 和 ^1H 核磁共振分析,所得谱图见图 3

和图 4。

由图 3 可见,共振信号主要化学位移小于 5.0 ppm,表明分子中以 β 糖苷键为主;同时化学位移大于 5.0 处也有吸收峰,表明分子中还有 α 型糖苷键。 δ 值为 5.2~5.4 ppm 处有吸收峰,表明分子中有葡萄糖; δ 在 4.95 ppm 处有吸收峰,表明分子中含有甘露糖。由图 4 可见, δ 值为 101.9 ppm 处有吸收峰,表明分子中含有甘露糖; δ 值为 100.3 ppm 处的吸收峰,表明分子中含有葡萄糖; δ 值为 86.52 ppm 附近无吸收,表明 C3 无取代。 δ 在 70~78 ppm 范围内有吸收,表明无 C4 取代。 δ 在 60.6 ppm,60.0 ppm 附近有吸收,表明不存在 C6 取代,而 68.8 ppm 处的吸收峰是 C6 发生取代后的位移,表明分子中部分 C6 被取代,另一部分未被取代。

综合以上分析结果,确定多糖 AbEXP 1-a 分子由葡萄糖和甘露糖以 3:1 的比例构成。推测其主链由 3 个葡萄糖分子通过 β -(1 $\rightarrow$ 6)糖苷键连在一起,再以 α -(1 $\rightarrow$ 6)或 β -(1 $\rightarrow$ 6)与甘露糖连接而构成。

2.2 多糖 AbEXP 1-a 的免疫调节活性检测结果

2.2.1 多糖 AbEXP 1-a 对小鼠非特异性免疫的影响

1) 多糖 AbEXP 1-a 对小鼠免疫器官重量的影响。胸腺与脾脏为动物体内的主要免疫器官。多糖 AbEXP 1-a 以腹腔注射的方式给药,对小鼠免疫器官重量的影响见表 1。

表 1 胞外多糖 AbEXP 1-a 对小鼠脾指数和胸腺指数的影响(ip)

处理	鼠数(只)	剂量 mg/kg	体重(g)	脾指数 (mg/10g, $\bar{X} \pm s$)	胸腺指数 (mg/10g, $\bar{X} \pm s$)
A	9	5	22.02 $\pm$ 1.54	76.29 ^{**}	33.69
B	9	10	21.96 $\pm$ 1.37	78.64 ^{**}	37.15 [*]
C	10	30	22.10 $\pm$ 1.22	82.80 ^{**}	51.24 ^{**}
D	7		21.92 $\pm$ 1.27	45.66	30.55

注:**p<0.01;*p<0.05。

由表 1 可见,受试组小鼠的体重较对照组有所提高,但无显著性差异;3 种浓度的胞外多糖 AbEXP 1-a 对小鼠的脾指数均有显著性影响,而较高浓度组对于胸腺指数才有显著影响。

2) 胞外多糖 AbEXP 1-a 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响。巨噬细胞是由循环血液中的单核细胞衍化而来,在免疫过程中起着重要作用,不仅吞噬功能强,而且能非特异性地吞噬多种抗原,还能识别、杀伤肿瘤细胞。AbEXP 1-a 对小鼠腹腔巨噬细胞对 CRBC 吞噬功能的影响见表 2。

表 2 AbEXP 1-a 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响(ip)

处理	鼠数	剂量(mg/kg)	吞噬率(%) ($\bar{X} \pm s$)	吞噬指数 ($\bar{X} \pm s$)
A	6	5	21.33 $\pm$ 1.99	0.215 $\pm$ 0.021
B	6	10	23.50 $\pm$ 0.99 [*]	0.238 $\pm$ 0.012 [*]
C	5	30	19.80 $\pm$ 1.46	0.198 $\pm$ 0.015
ck	5		18.60 $\pm$ 0.75	0.192 $\pm$ 0.009

注:**p<0.01;*p<0.05

由表 2 可见,三剂量组与对照相比,巨噬细胞对 CRBC 的吞噬率和吞噬指数都有所提高,但只有 10 mg/kg 组与对照相比有显著提高。

2.2.2 多糖 AbEXP 1-a 对小鼠体液免疫的影响

正常小鼠受鸡红细胞免疫后,即可产生抗鸡红细胞抗体(溶血素)。此抗体在体外与鸡红细胞、豚鼠补体一起温育,即可使鸡红细胞溶解,释放出血红蛋白,使溶液呈红色。红色的深浅反映了红细胞溶出血量的多少,从而间接反映血清抗体的形成量。本实验中小鼠溶血素生成量测定结果见表 3。

由表 3 可以看出,实验组的 OD 值均明显高于对照组,而且随着 AbEXP 1-a 腹腔注射剂量的增加,OD 值呈增加趋势,表明小鼠溶血素的生成量随 AbEXP 1-a 给药量的增加而增加。

表 3 胞外多糖 AbEXP 1-a 对小鼠溶血素生成量的影响(ip)

组别	鼠数	剂量(mg/kg)	光密度 OD540 ($\bar{X} \pm s$)
A	7	5	0.082 $\pm$ 0.020 ^{**}
B	7	10	0.199 $\pm$ 0.039 ^{**}
C	7	30	0.264 $\pm$ 0.032 ^{**}
ck	6		0.033 $\pm$ 0.010

注:表中溶血素生成量用 OD₅₄₀ 表示。

2.2.3 胞外多糖 AbEXP 1-a 对小鼠细胞免疫的影响

T 淋巴细胞液中含有非特异性酯酶,可水解 α -醋酸奈酯,生成 α -奈酚和醋酸根离子。前者与六偶氮副品红偶联生成不溶性棕红色沉淀物,而 B 淋巴细胞缺乏此酶,所以此法可测定出外周血中 T 淋巴细胞。表 4 反应 AbEXP 1-a 对小鼠 T 淋巴细胞百分含量的作用效果。

表 4 AbEXP 1-a 对小鼠 T 淋巴细胞百分含量的影响(ip)

处理	鼠数	剂量(mg/kg)	T 淋巴细胞百分比(%) ($\bar{X} \pm s$)
A	6	5	62.833 $\pm$ 1.014
B	6	10	64.000 $\pm$ 0.730 [*]
C	5	30	66.200 $\pm$ 0.663 [*]
ck	5		58.400 $\pm$ 0.245

注:**p<0.01;*p<0.05

由表 4 可见,中等和高剂量的多糖对小鼠 T 淋巴细胞百分含量的作用效果显著,而低剂量时作用效果不显著。

2.2.4 胞外多糖 AbEXP 1-a 对小鼠迟发性变态反应(DTH)的影响

二硝基氯苯为半抗原,皮下注射后,与皮肤蛋白结合形成完全抗原,刺激 T 淋巴细胞增殖成致敏淋巴细胞。再次受到二硝基氯苯攻击时,会使受攻击部位形成迟发性超敏反应。受试组与对照组小鼠受二硝基氯苯攻击后的结果见表 5。

表 5 胞外多糖 AbEXP 1-a 对小鼠迟发性变态反应的影响(ip)

组别	鼠数	剂量(mg/kg)	耳增厚($\times 10^{-3}$ mm) ($\bar{X} \pm s$)
A	9	5	15 $\pm$ 1.2 [*]
B	7	10	35 $\pm$ 2.5 ^{**}
C	8	30	44 $\pm$ 2.3 ^{**}
ck	7		10 $\pm$ 1.0

注:**p<0.01,*p<0.05

由表 5 可见,各剂量的 AbEXP 1-a 对于二硝基氯苯(DNCIB)诱发的迟发性变态反应(DTH)均有显著性影响,并且随着作用剂量增大有增加的趋势。

3 结论

多糖 AbEXP 1-a 分子由葡萄糖和甘露糖以 3:1 的比例构成。推测其主链由 3 个葡萄糖分子通过 β -(1 $\rightarrow$ 6)糖苷键连在一起,再以 α -(1 $\rightarrow$ 6)或 β -(1 $\rightarrow$ 6)糖苷键与甘露糖连接而构成。多糖 AbEXP 1-a 对小鼠非特异性免疫、体液免疫和细胞免疫均有明显的促进作用,可提高小鼠迟发性变态反应,即多糖 AbEXP 1-a 可以全面提高机体的免疫功能,最适作用剂量为 10 mg/kg 体重。

参考文献(References)

- [1] 陈石良,马青,等. 灰树花胞外多糖的性质与结构[J]. 无锡轻工大学学报, 2002, 21(3):244~248
- [2] 李小定,吴谋成. 灰树花多糖的分离、纯化与理化性质[J]. 华中农业大学学报, 2002, 21(2):186~189
- [3] 刘春卉,谢红,等. 金耳子实体和发酵菌丝体多糖的分离、纯化与结构的比较研究[J]. 菌物系统, 1998, 17(3):246~250
- [4] 雷德柱,于淑娟,等. 灰树花胞外多糖的结构分析[J]. 菌物系统,

系统集成度(SID)研究

Research on System Integration Degree

胡杨洋/HU Yang-yang¹, 黄建峰/HUANG Jian-feng², 胡克瑾/HU Ke-jin¹

1. 同济大学经济与管理学院管理科学与工程系, 上海 200092
2. 同济大学理学院数学与应用数学系, 上海 200092

1. School of Economics and Management, Tongji University, Shanghai 200092, China
2. School of Science, Tongji University, Shanghai 200092, China

[摘要] 企业业务流程的连贯性及业务范围的扩大,对企业的信息系统提出了企业内部/间系统协作的需求,然而信息孤岛和冗余似乎打破了企业构造协同工作/商务的梦想。于是,EAI 作为一种解决方案成为企业信息化过程中的新宠。那么,是否任何拥有信息系统的企业都需要实施 EAI? 如果需要 EAI,实施到什么程度最优? 从定性和定量两方面对企业是否需要实施 EAI 进行了分析,并应用数学模型求解了最佳集成度,希望给企业实施 EAI 的决策提供一点思路。

[关键词] 信息孤岛,信息冗余,投资回收期,企业应用集成,集成度

[文献标识码] A

[中图分类号] N945.2

[文章编号] 1000-7857(2005)11-0053-03

Abstract: With the extension of business scale and consistency in business process, requirements of system collaboration within/between businesses have emerged. However, information-isolated islands and redundancy ruin the dream of business collaboration. Thus, EAI, as a solution, turns to be a favor in the IT process. Whether any enterprise with information system needs EAI? If so, what degree would be the optimization? This paper analyzes the necessity of EAI in qualitative and quantitative way, and puts forward a model, System Integration Degree (SID), to give a proper integration degree. A hint is expected to be given to decision-makers when applying EAI.

Key Words: information-isolated island, information redundancy, payback period, enterprise application integration, integration degree

CLC Number : N945.2

Document Code: A

Article ID : 1000-7857(2005)11-0053-03

1 研究背景

随着全球经济一体化和信息技术的快速发展,如何利用各种信息系统,帮助企业实现企业目标是每个企业信息化过程中所必须面对的问题。然而,由于缺乏信息系统的适度集成,很多企业没有搭上信息的快车,反而被浩如烟海的信息所累,大量的信息孤岛和信息冗余使企业一度陷入尴尬。

根据 Gartner Group 的研究数据,当前系统开发中大约 35%~40%的精力用来开发和维护程序之间数据的交换功能。

Gartner Group 另外一份调查数据显示,当前企业 IT 方面平均有 40%投入花在系统集成方面。这些数据表明,企业信息系统集成已经成为了开发商和用户关心的热点,并且需要不小的投入;而作为系统集成的一个重要策略企业应用集成(Enterprise Appliance Integration),本着让企业简单、快捷地集成不同的应用程序的最终目的^[1],则成为各集成厂家和企业用户的新宠。

企业应用集成必须集成企业应用的数据源,从而使它们可以很容易地共享业务

处理和数据。必须在不对原有应用和数据源进行重大改动的情况下,才可以完成应用和数据源的集成^[2]。

据 WinterGreen 公司的调查结果显示,1999 年 EAI 市场增长了 90%,达 5.5 亿美元。另据 IDC^[3]的调查,EAI 市场上全球的营业收入会从 2000 年的 50 亿美元上升到 2005 年的 210 亿美元,这意味着综合年增长率(CAGR)超过 30%。与此对应,整个 IT 服务产业的同期综合年增长率预计为 11%。因此,EAI 在市场前景方面是一个飞

收稿日期: 2005-05-13

作者简介: 胡杨洋,女,上海市中山北二路 1515 号石油大厦 D 座 6 楼 3606 室,同济大学经济与管理学院硕士,主要研究方向为企业管理与系统技术;E-mail: yy8111106@yahoo.com.cn

2002,21(2):280~282

- [5] 张劲松,韩玮玮,等. 云芝子实体多糖(CVP)化学结构的研究[J]. 菌物系统, 2001, 20(4):531~535
- [6] Ana Gutierrez,Alicia Prieto,et al. Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus [J].*Carbohydrate Research*, 1996, 281: 143~154
- [7] Chen JH, Zhan L, Zhou JP, et al. Chemical structure of the water-soluble polysaccharide isolated from the fruiting body of *Ganoderma lucidum*[J]. *Polymer J*, 1998, 30(10): 838~842
- [8] 夏丙南,孙瑞元,张家铨,等. 药理学实验教程(第一版) [M]. 贵州: 贵州人民出版社,1983. 163~169

- [9] Badalyan S M, Hambardzumyan. Investigation of immunomodulating activity of the medicinal mushroom *Flammulina velutipes* (Curt.Fr.)P Farst in vitro cytokine induction by fruiting body extract [J]. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2001, (2~3): 110
- [10] Bisko N A,Gulich M A,Olishevskaya O D,et al. Immunological studies of the edible and medicinal mushroom *Lentinus edodes* (Berk.)Sing [J]. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2001, 3(2~3): 121

(责任编辑 李慧政)