



# Construction and Biofunctions of the Triple Helical Lentinan Nanocomposites

Xuwei Jia

College of Food and Biological Engineering, Zhengzhou  
University of Light Industry



# 主要内容

多糖研究历史

多糖的基本概念和种类

多糖的生物医用功能

香菇多糖的提取及结构表征

香菇多糖纳米复合物的构建



# 多糖研究的历史

- **1855年Claude Bernard**鉴定了“肝的原样物质”是葡萄糖的一种储藏形式。
- **1923年M.Heidelberger**和**T. Oswald**提出细菌的抗原部分是由糖类物质组成而不是蛋白质。
- **1936年Shera**实验证实多糖有抗肿瘤作用。
- **1958年Brander**报道了酵母细胞壁多糖(**Zymosan**)具有抗肿瘤活性。



# 多糖研究的历史

- **1969年**日本学者千原郎首次报道了从香菇子实体中分离出一种抗肿瘤多糖(**lentinan, LNT**)。
- **1988年**Dwek Rademache和Parekh首先创立了“糖生物学(**glycobiology**)”。
- **2003年**美国《**Technology Review**》刊文称,在基因组学和蛋白质组学后,糖组学(**glycomics**),有望取得突破性进展。



# 多糖的基本概念和种类

多糖是由十个以上单糖通过糖苷键以共价键形式结合起来的聚糖

(Polysaccharide或glycan)

可用 $(C_6H_{10}O_5)_n$ 表示，其中 $n > 10$

*自然界很少存在 $n$ 为10-30的多糖*

匀多糖——只有一种类型的单糖组成的多糖

杂多糖——几种类型的单糖组成的多糖

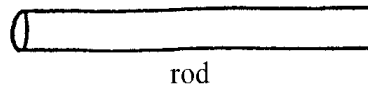
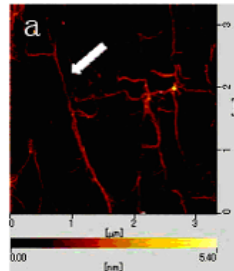
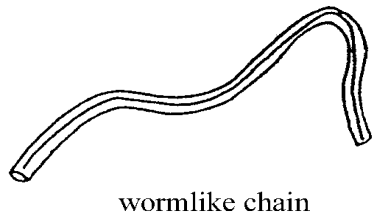
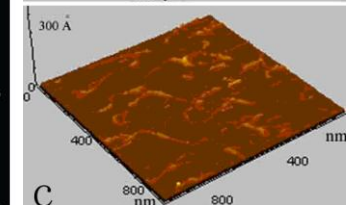
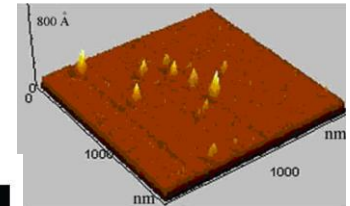
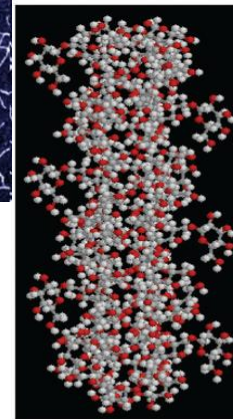
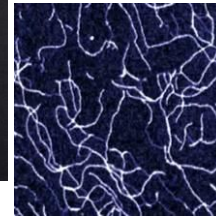
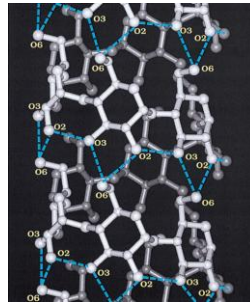
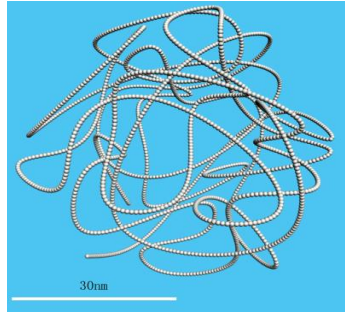
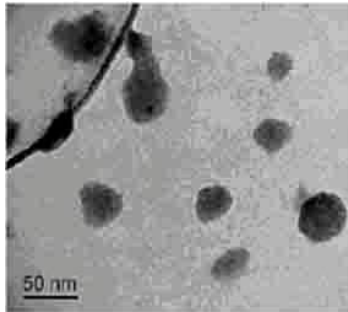
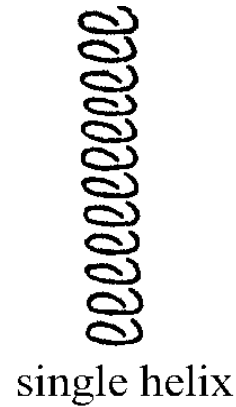
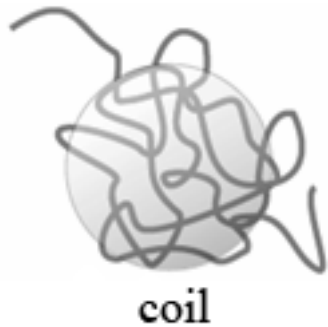
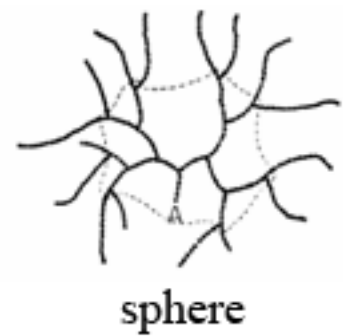


# Various polysaccharide

微生物 (包括高等真菌)	海洋生物	陆生植物	动物
葡聚糖 ( <b>Dextran</b> ) 果聚糖 ( <b>Levan</b> ) 黄源胶 ( <b>Xanthan</b> ) 甘露聚糖 ( <b>Mannan</b> ) 香菇多糖 ( <b>Lentinan</b> ) 黑曲霉多糖 ( <b>Nigeran</b> ) 胞外多糖 ( <b>Exopolysacch- aride</b> )	琼脂 ( <b>Agar</b> ) 藻酸 ( <b>Alginic acid</b> ) 卡拉胶 ( <b>Carrageenin</b> ) 海带多糖 ( <b>Laminaran</b> )	淀粉 ( <b>Starch</b> ) 纤维素 ( <b>Cellulose</b> ) 木聚糖 ( <b>Xylan</b> ) 果胶 ( <b>Pectin</b> ) 阿拉伯胶 ( <b>Gum arabic</b> ) 卡胶 ( <b>Mucilage</b> )	糖原 ( <b>Glycogen</b> ) 硫酸软骨素 ( <b>Chondroitin sulfate</b> ) 肝素 ( <b>Heparin</b> ) 透明质酸 ( <b>Hyaluronic acid</b> ) 壳聚糖 ( <b>Chitin</b> )



# Various polysaccharide conformations



Side View

Chen X., Zhang L. *Carbohydr. Polym.*, 2009, 75, 586  
 Tao Y., Zhang L. *Biomacromolecules*, 2007, 8, 2321  
 Numata M. *Chem. Commun.*, 2011, 47, 1961

Zhang Y., Zhang L., *J. Phys. Chem. B*, 2010, 114, 4945.  
 Gessler K., *P. Natl. Acad. Sci.*, 1999, 96, 4246.  
 Okajima M. *Macromolecules* 2009, 42, 3057-3062.



# 多糖生物医用功能

——国内外正在形成**热点**

生物细胞 特征:

繁殖(复制)  $\rightleftharpoons$  凋亡 ----- 平衡

平衡破坏: 细胞过度增生 --- 组织表

面大体积堆积(肿瘤) --- 增生

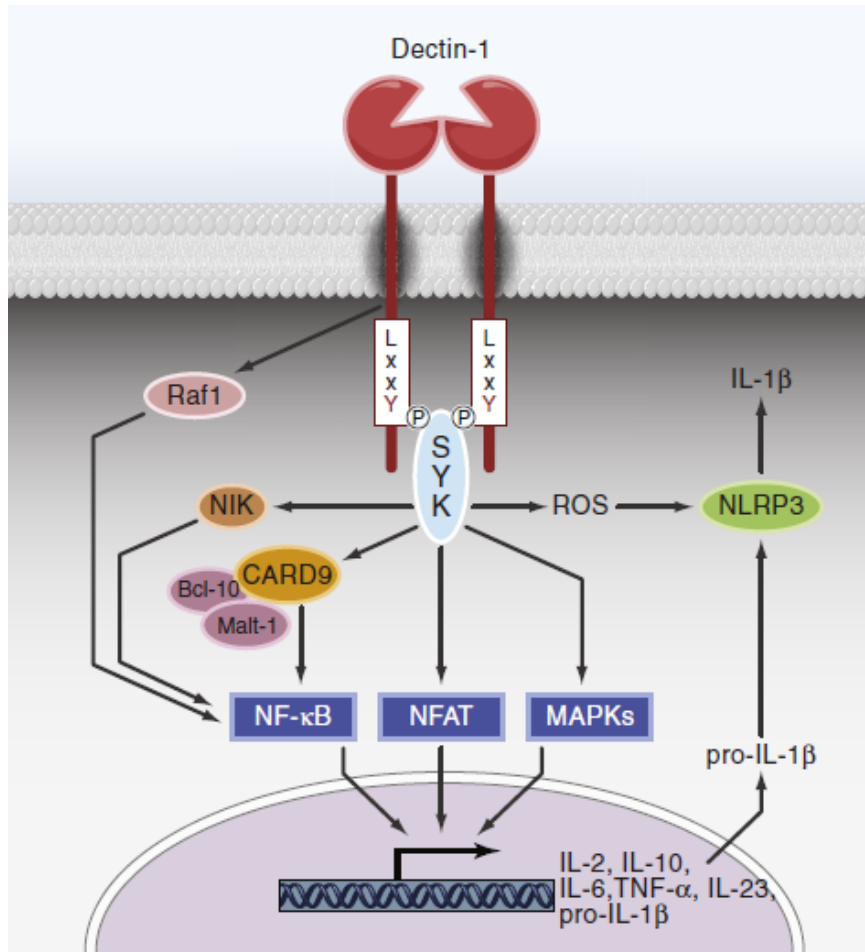
细胞基因突变(癌)

癌细胞源于正常细胞 找既抑制癌细胞又不

伤正常细胞 ----- 困难



# Polysaccharides play an important role in modulating all kinds of life activities, and can stimulate immune responses



Only  $\beta$ -1,3-glucan with a specificity can be recognized by Dectin-1

Osorio F, Sousa C. *Immunity*, 2011, 34, 651

Brown G, Gordon S. *Nature*, 2001, 413, 36

Adams E, et al. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2008, 325, 115



多糖是一种免疫调节剂（激活机体免疫反应），但也有少数多糖具直接杀死癌细胞作用或两者俱存。

---- **anti-tumor**

---- **anti-inflammation**

---- **anti-virus**

---- **immunomodulator**



多糖作为药物的最大特点是毒副作用很小

但是

多糖的研究毕竟起步较晚

——各方面尚须进行深入的研究

——大量新的活性多糖有待于研究与开发

——作用机制有待于完善



高等真菌(主要是蘑菇类)产生的

$\beta$ -葡聚糖

某些植物产生的具抗补体作用的

果胶类多糖

海洋藻类产生的硫酸酯多糖



香菇多糖, 云芝糖肽, 裂褶菌多糖  
-----正式在临床上应用

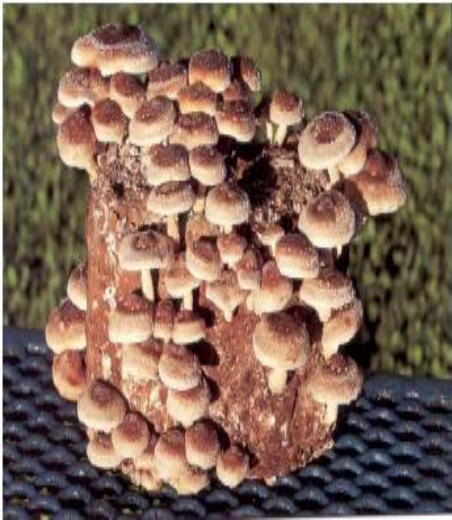
证明在提高机体免疫功能上特别是  
肿瘤辅助治疗中具有显著作用---受到  
临床医生的青睐。

但是, 人们期待更有效的活性多糖  
的问世。



# 香菇多糖的提取及结构表征

*Lentinus edodes*



Lentinan sample



## **Lentinan can stimulate immune system to produce anti-tumor activity**

**Chihara et al. demonstrated that Lentinan from *Lentinus edodes*, a  $\beta$ -(1→3)-D-glucan, exhibited anti-cancer bioactivities.**

**Chihara G, Maeda Y, et al. *Nature*, 1969, 222, 687**

**We'd like to clarify the chain conformation and anti-tumor activities of some fungi polysaccharides from Chinese traditional medicines**



## 一.多糖的分离提取方法

——通过提取分离纯化不使原有的多糖性质改变（如结构改变、降解等）。

存在于动植物细胞壁外——胞外多糖

存在于细胞壁内——胞内多糖（大多数多糖）

第一步——细胞壁粉碎



动植物的细胞大多由脂质包围，用机械粉碎后还必须脱脂  
(沙氏提取器，乙醇回流)

——脱脂后就可以进行提取

**A. 热水提取法:**

根据大多数多糖在热水中溶解度较大且稳定的性质进行提取——这种方法提取多糖的破坏最小。

**B. 稀碱水溶液提取法:**

酸性多糖或分子量较大的多糖在热水中溶解度不大，所以常用5-15% NaOH或Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>水溶液提取。

**C. 超声波气流粉碎技术**

**D. 复合酶浸提**

**E. 超临界萃取。。。**





# 除蛋白

- 传统上有**Sevag法**、**三氟三氯乙烷法**及**三氯乙酸法**等。另外，也可以在多糖的水提液中加入**中性蛋白酶**和**糜蛋白酶**，与有机溶剂结合进行脱蛋白。
- 除蛋白的效果可以用茚三酮反应检测，结果呈阴性；同时在**200~280nm**处测定除蛋白后样品的紫外吸收曲线来检测效果，除掉蛋白质的多糖溶液一般在**260~280 nm**的紫外吸收峰会消失，说明多糖不含有蛋白。





## 除色素

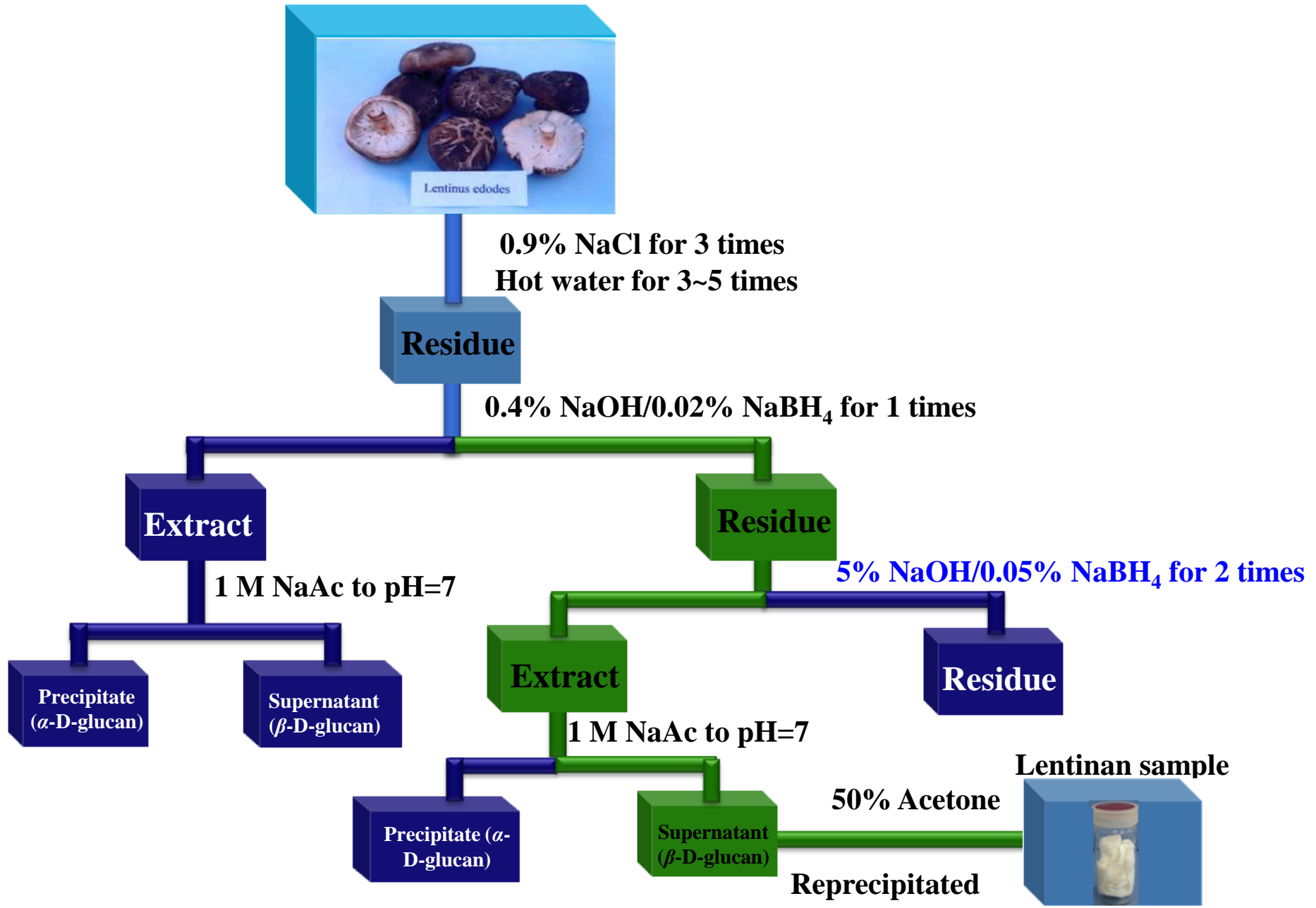
- 食品级粉末状活性炭吸附？
- 弱碱性离子交换树脂？
- 大孔吸附树脂柱层析？
- 双氧水对色素的有色基团产生破坏而除去色素；
- 也可用十六烷基三甲基溴化铵-正己醇-异辛烷组成的反胶束溶液（专利）



# 多糖的分离纯化

- 最常用的纯化多糖的方法是色谱法，
- 纤维素柱层析
- 阴离子交换色谱（如**DEAE-cellulose**和**DEAE-Sephadex**、**DEAE-Sepharose**）
- 各种凝胶色谱
- 实验中常将粗多糖经色谱柱洗脱，按洗脱曲线的不同峰收集不同的组分，从而分级得到各个均一多糖成分。

# ● “Green” extraction process





# 多糖的结构分析

## 一、高分子定义

由单体单元键接成的大分子，分子链类似“一串珠”

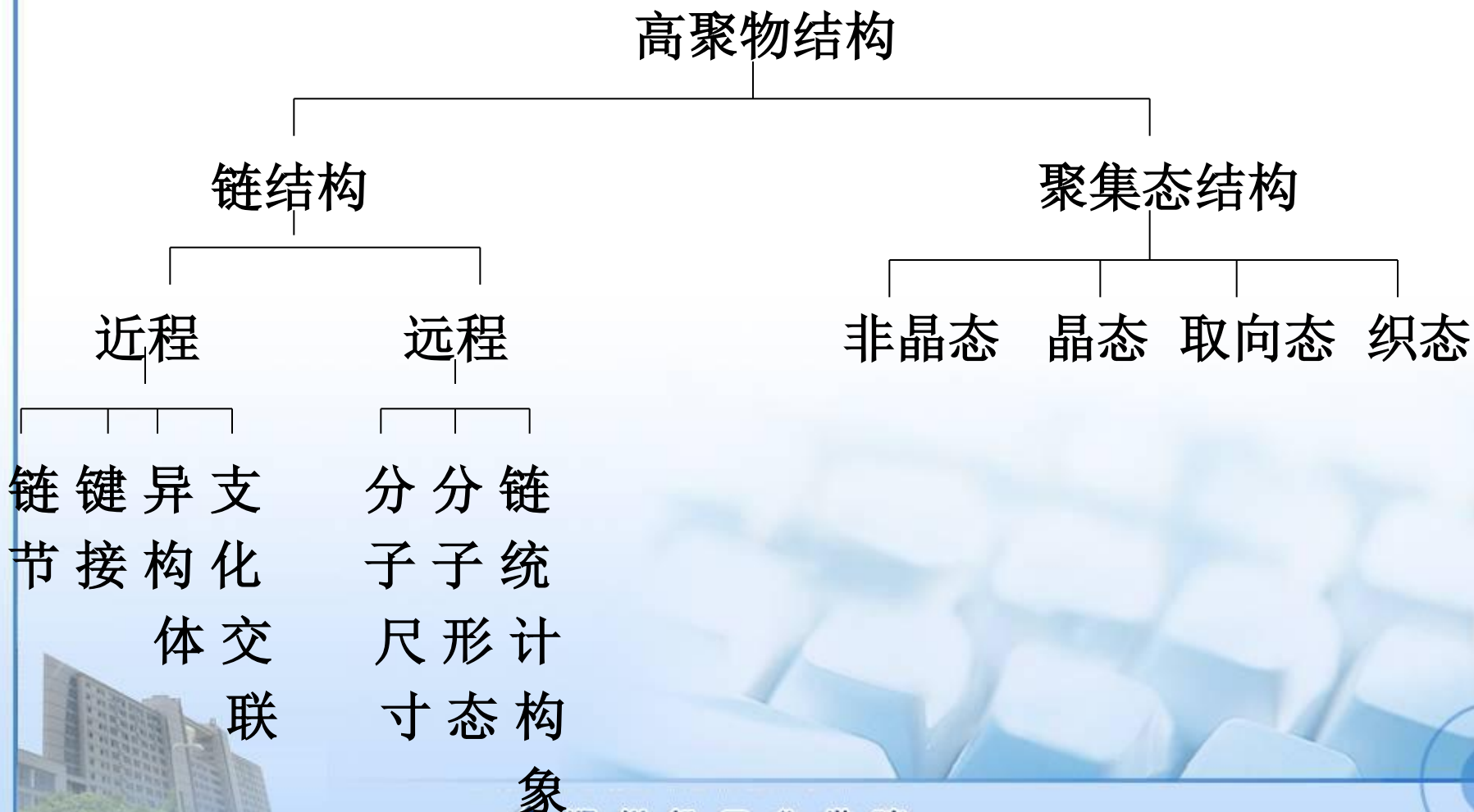
## 二、高分子结构特征

- 1、分子量很大 ( $M = 5000-10^8$ )
- 2、高分子链柔顺性随链长 $\uparrow$ 而增大
- 3、分子量及组成的多分散性：分子量分布、组成分布， $M$ 只存在统计平均意义
- 4、多重转变：多种结构对应多重运动，反映转变 ( $T_b, T_g, T_f$ )
- 5、高分子链互相排列、堆积成聚集态结构



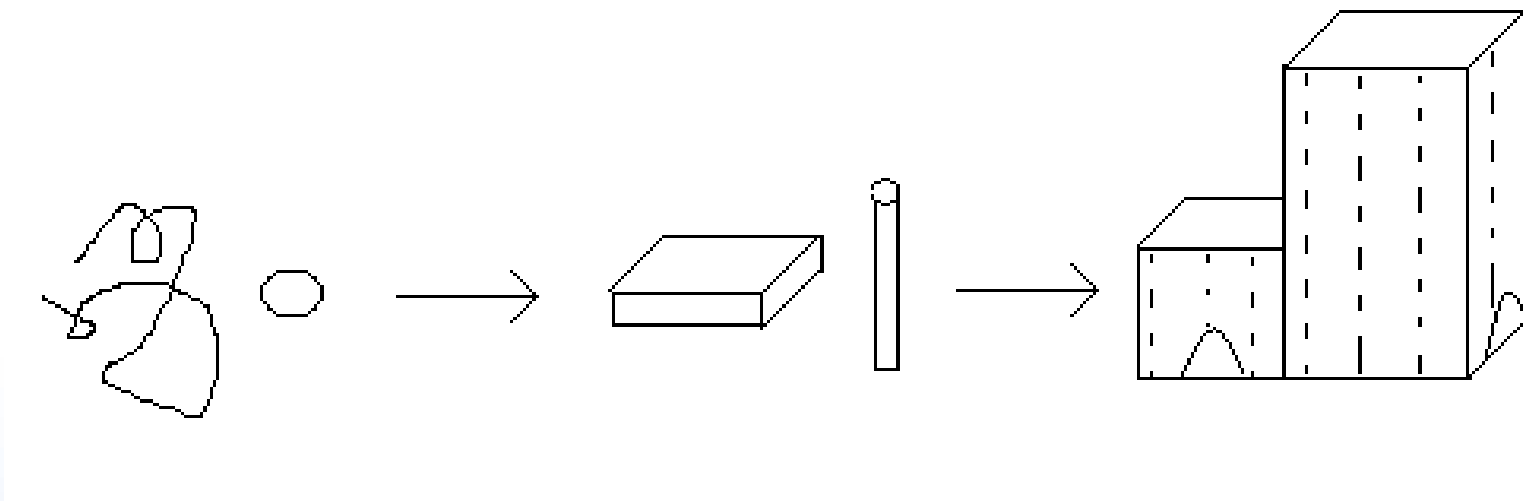
# 三、结构

- 1、链结构：近程（一级）；远程（二级）
- 2、聚集态结构（三级）：分子链排列和堆砌在一起





# Architecture of Macromolecules



一级结构

二级结构

三级结构



# 多糖的化学结构

## 化学分析方法

- **酸水解** 鉴定多糖的单糖组成常用的方法。
- **甲基化法** 阐明单糖的连接方式(键型)、重复结构中某种单糖的数目、末端糖的性质及分支点的位置等。
- **过碘酸氧化** 确定多糖中各种单糖的键型及其比例。
- **Smith降解** 阐明多糖中单糖的部分连接顺序和键型。



# 多糖的化学结构

## 物理分析方法

- 紫外光谱法 检测多糖中是否含有蛋白质、核酸、多肽类。
- 红外光谱法 确定吡喃糖的苷键构型及常规观察其他官能团。
- 气相色谱法 分析多糖水解后单糖的组成及比例。
- 核磁共振光谱法 主要用于确定多糖结构糖苷键的构型以及重复结构中单糖的数目。
- 质谱法 鉴定各种甲基衍生物的碎片、确定各种单糖残基的连接位置。电喷雾电离质谱、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱和快原子轰击质谱还可以测定糖链的相对分子质量及糖链的一级结构。



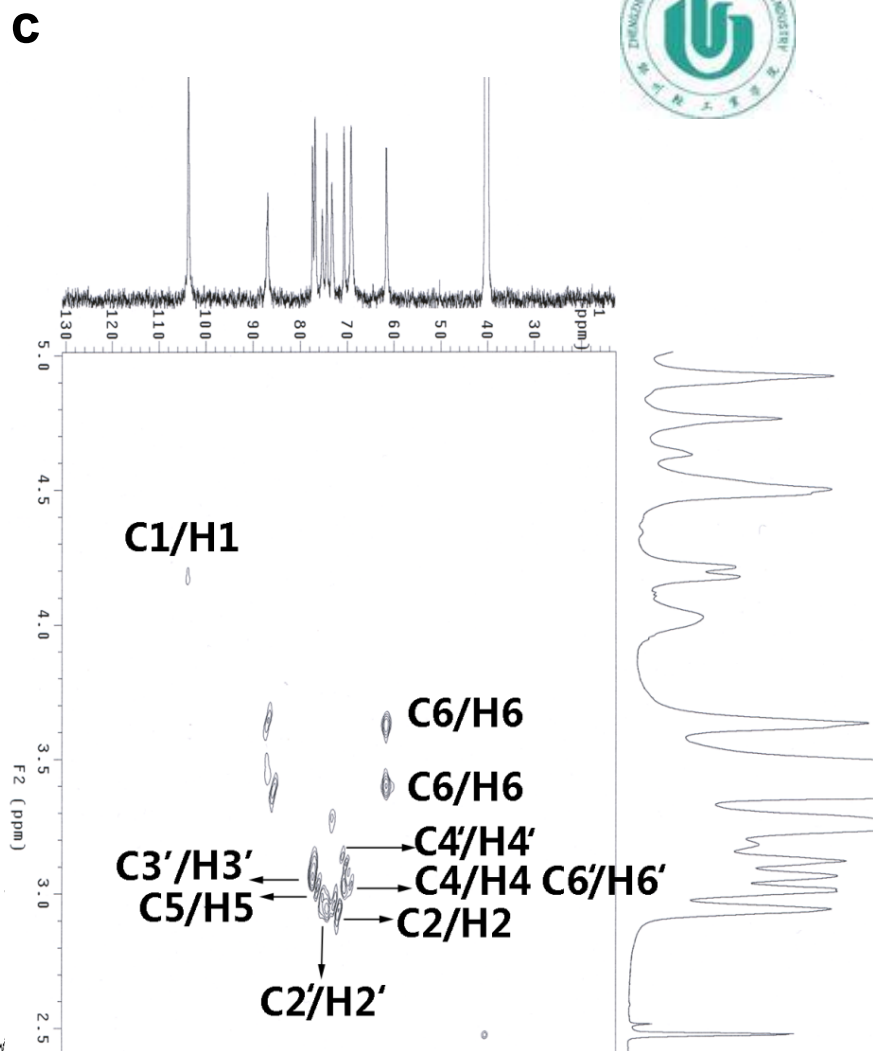
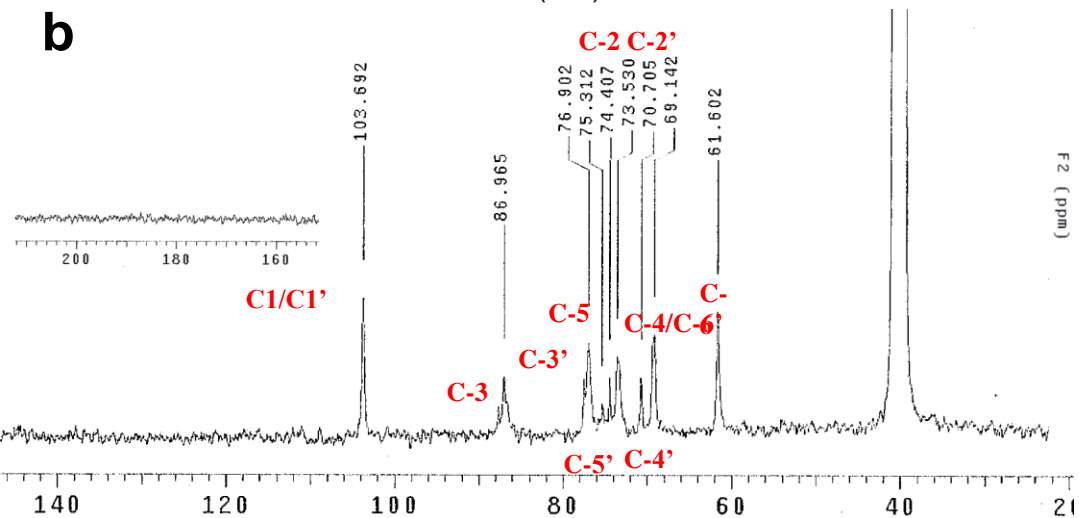
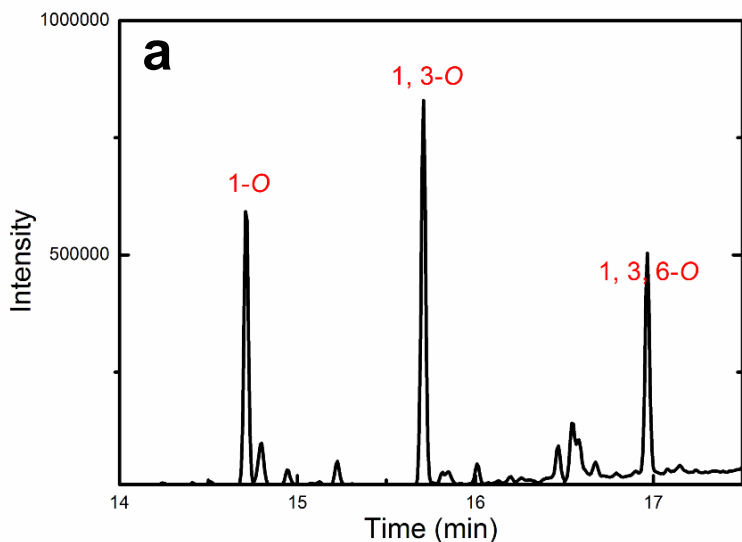
# 多糖的结构分析

## 生物学方法

- **酶学方法** 即利用各种特异性糖苷酶水解多糖分子得到寡糖片段，再与其他定性、定量方法联用推测多糖的结构。
- **免疫学方法** 根据多糖抗原与蛋白质抗体的特异性，制备对抗未知多糖的抗体，来阐明未知多糖的结构。



# ● Structure of Lentinan

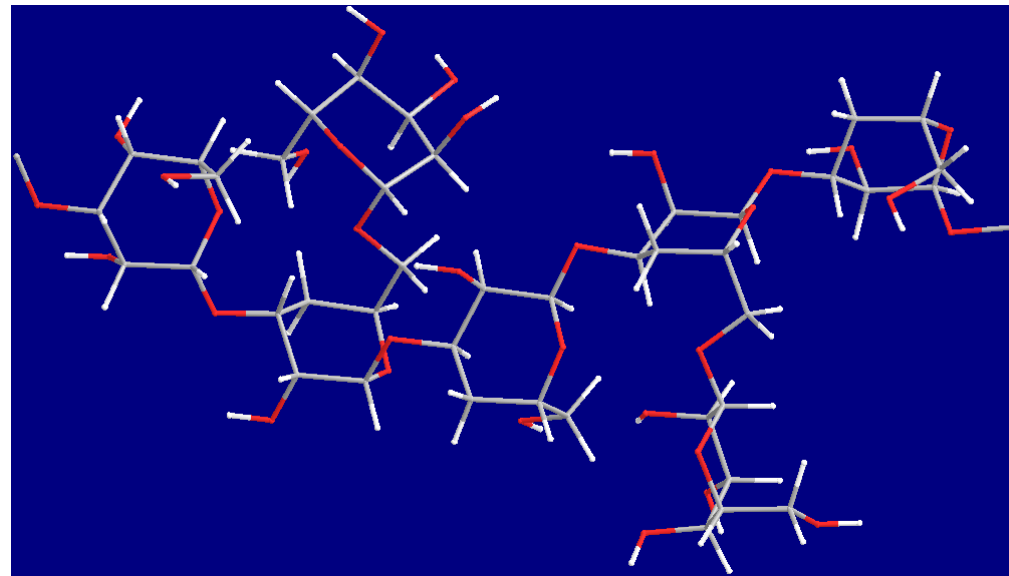
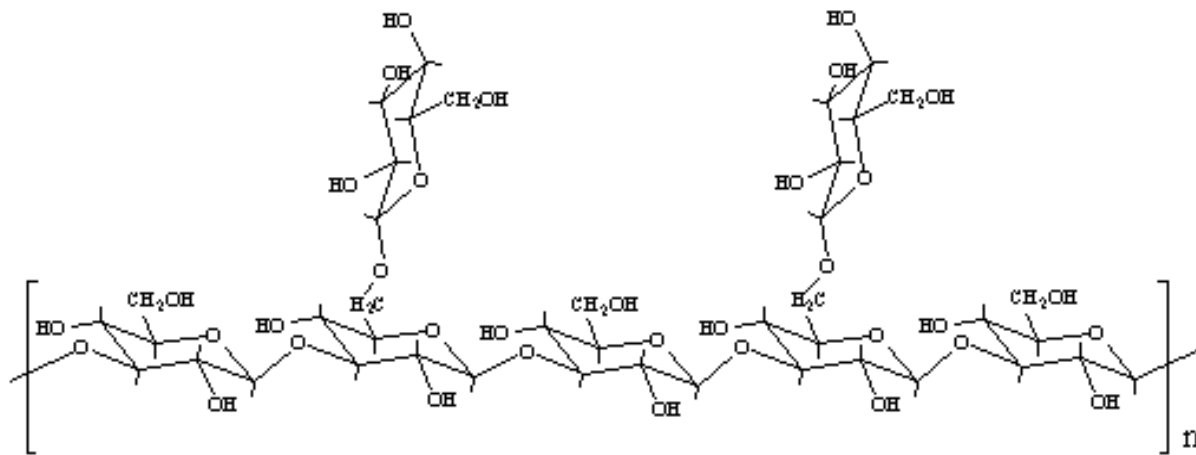


GC-MS profile of methylated Lentinan(a) ,  $^{13}\text{C}$  NMR (b) and HMQC (c) spectra of Lentinan in  $\text{DMSO-d}_6$





# Repeating unit of Lentinan



**$\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucan with two  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucosyl residues in interval of every five main-chain glucoses**



# 多糖的构象分析

多糖的化学平面结构测定比较困难，特别是含有几种糖残基的杂多糖，至于决定多糖活性的高级结构（三维结构）测定更难。因为多糖是水溶性胶状物质不能结晶，这样限制了用通常X-衍射方法去测定立体结构。



# 什么是光散射?

自然界中...

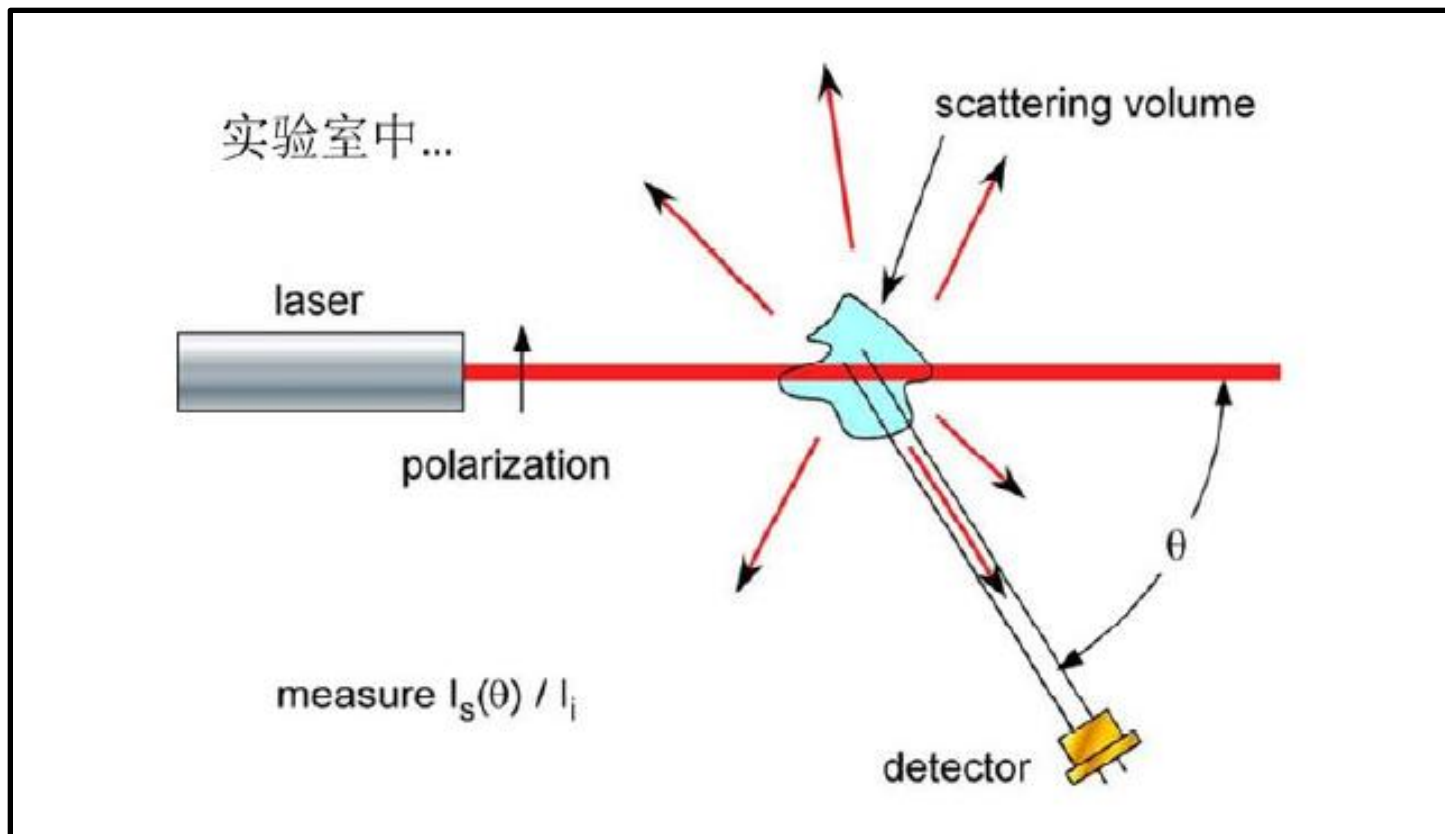


日落与晚霞

蓝色天空和云彩



# 什么是光散射?

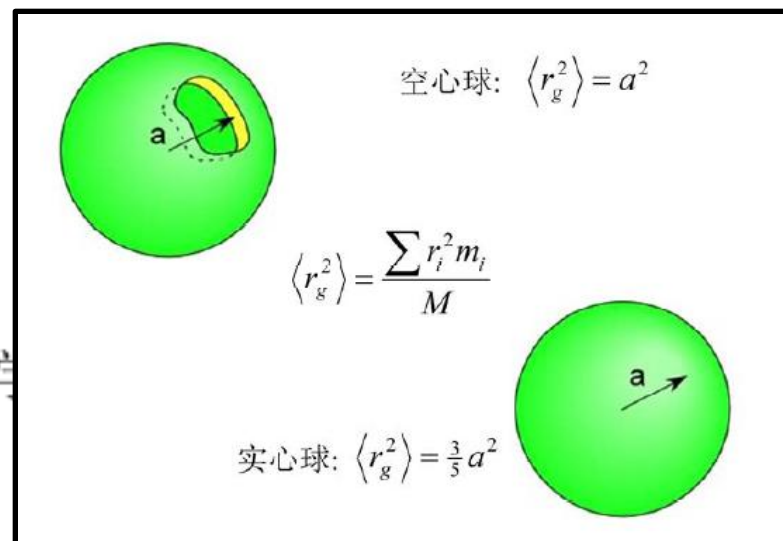


# 什么是光散射?

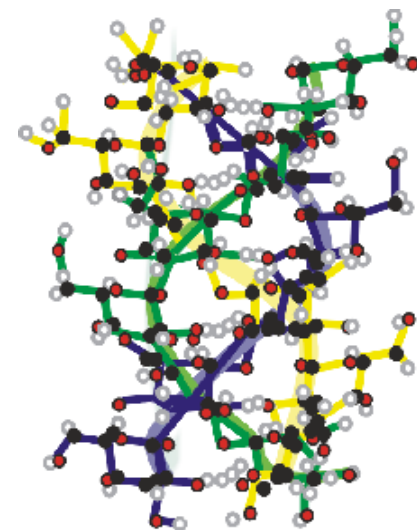
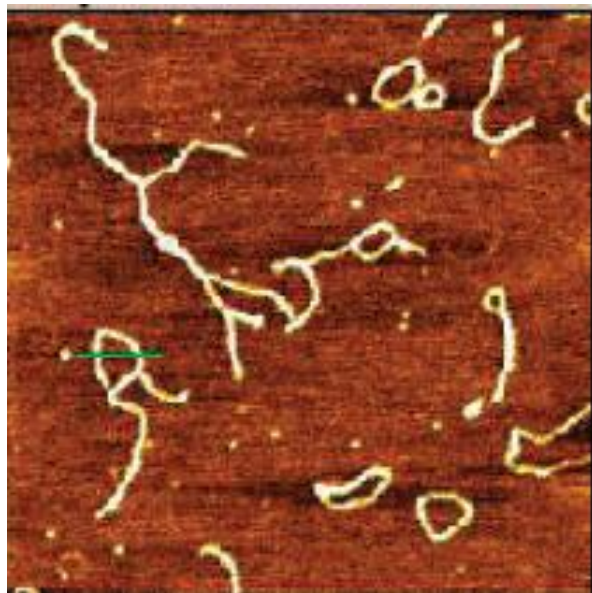
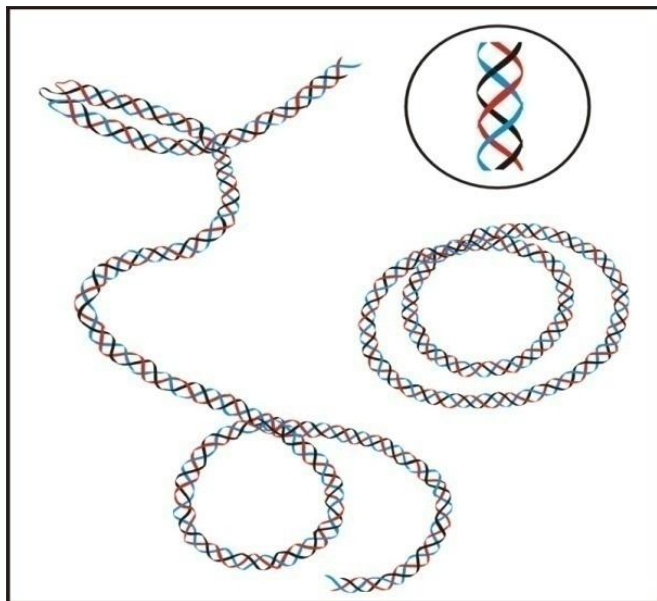
在溶液体系下，光散射可以测定以下物理量：

- 摩尔质量， $M$
- 分子尺寸， $r_g$
- 第二维利系数， $A_2$
- 平移扩散系数， $D_t$

- 从而计算流体力学



# 香菇多糖的构象

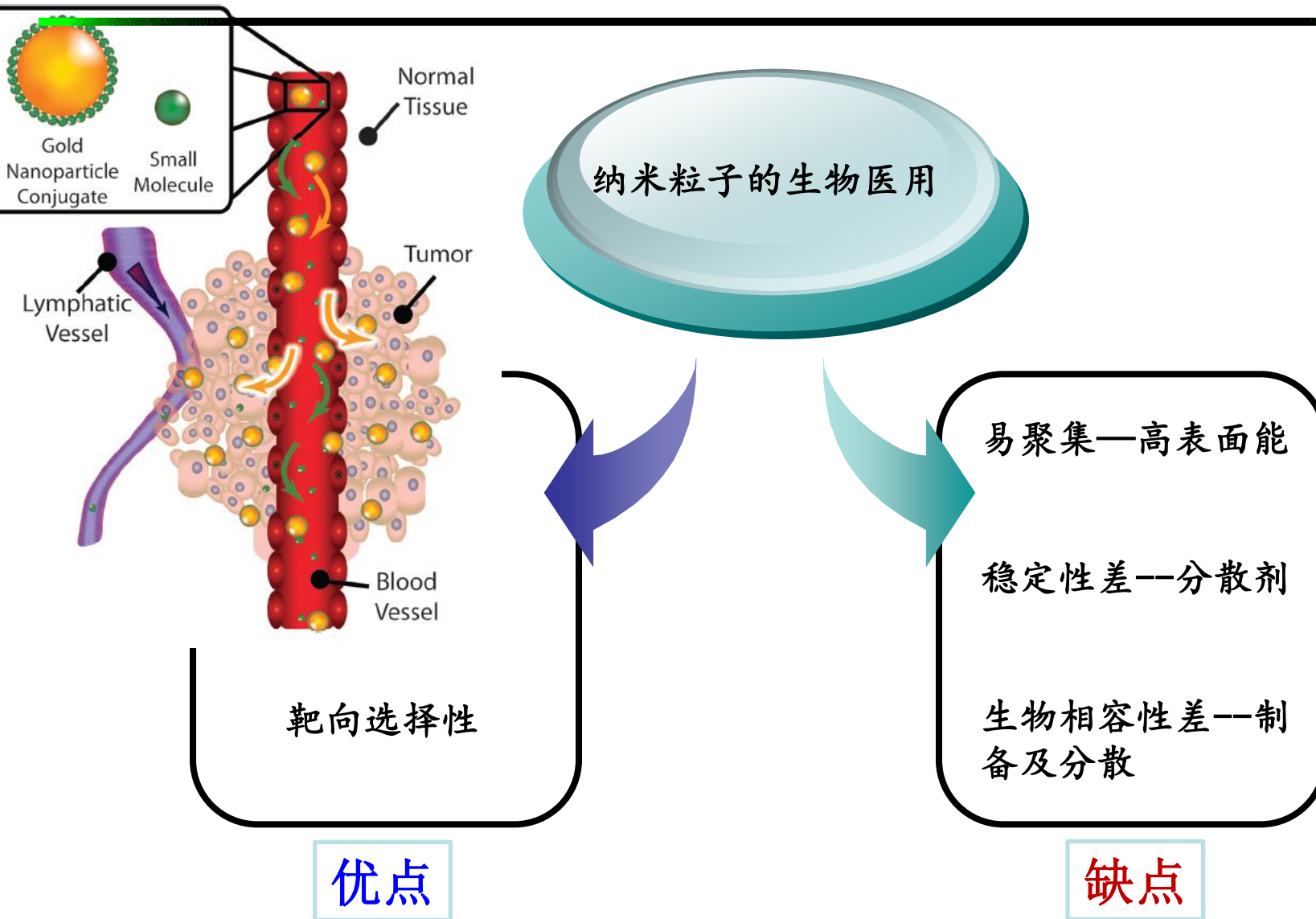


构象模型

香菇多糖是一种具有高度有序的二螺旋多糖，并且水溶性非常好

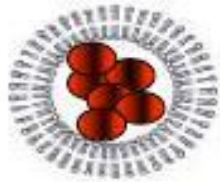


# 香菇多糖纳米复合物的构建

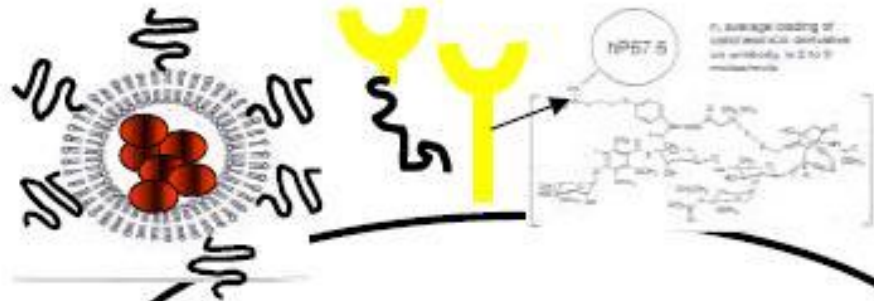


# Many "Nanomedicines" are already in routine clinical use

**Liposomes**  
Bangham, Gregoriadis



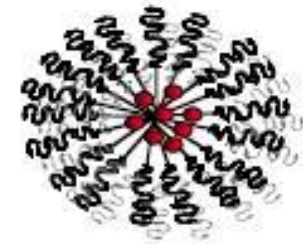
**Antibodies and their Conjugates**  
Celltech-UCB



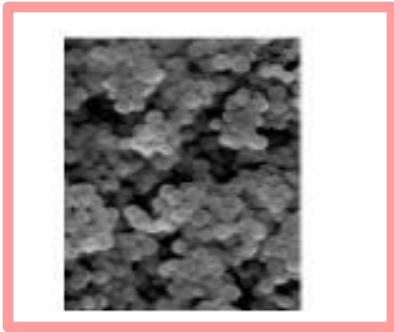
**Viruses as viral vectors for gene therapy**  
Seymour



**polymer micelles**



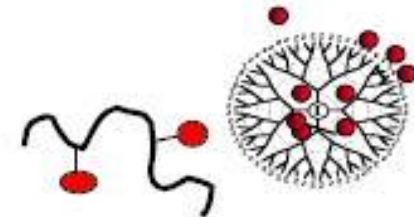
**Nanoparticles**  
Florence, Daves, Illum

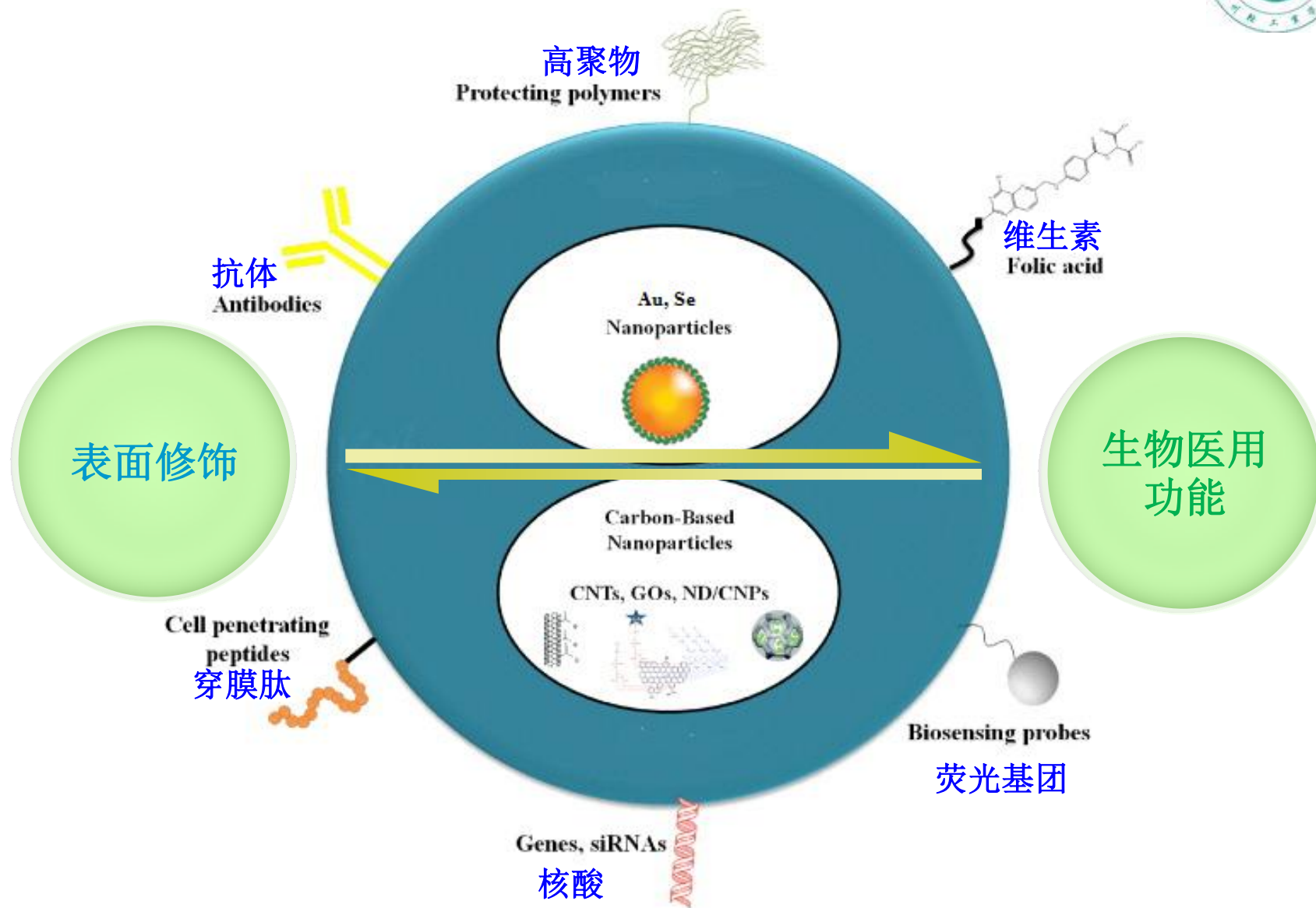


**Polymer-protein conjugates**



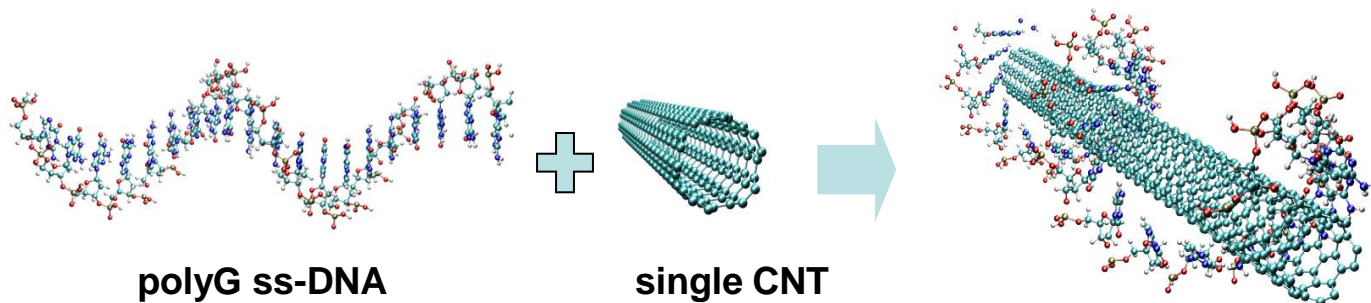
**Unimolecular Polymeric Drugs and Conjugates**  
Duncan



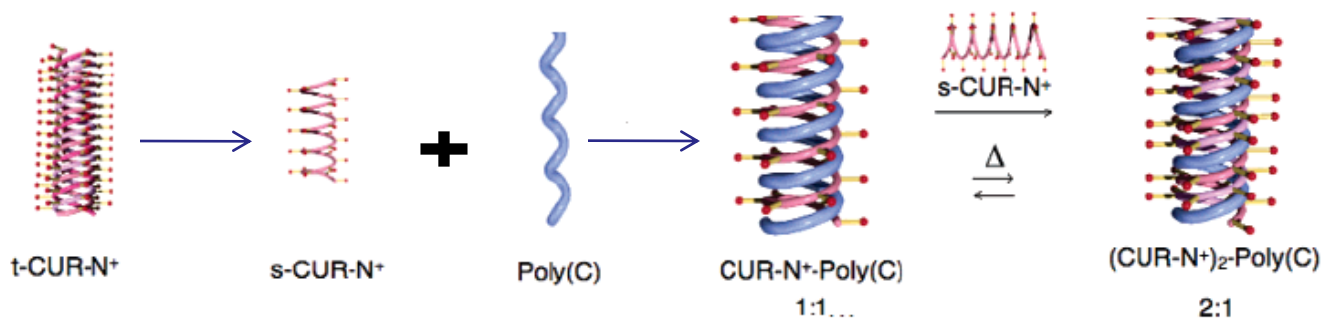


# 螺旋生物大分子复合物的组装方式

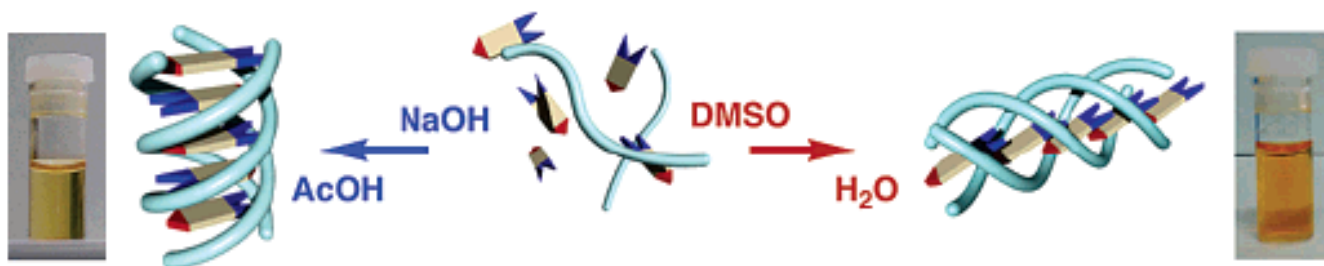
缠绕



共螺旋



包合





## 香菇多糖链构象转变



DMSO  
NaOH  
140 °C



透析  
降温



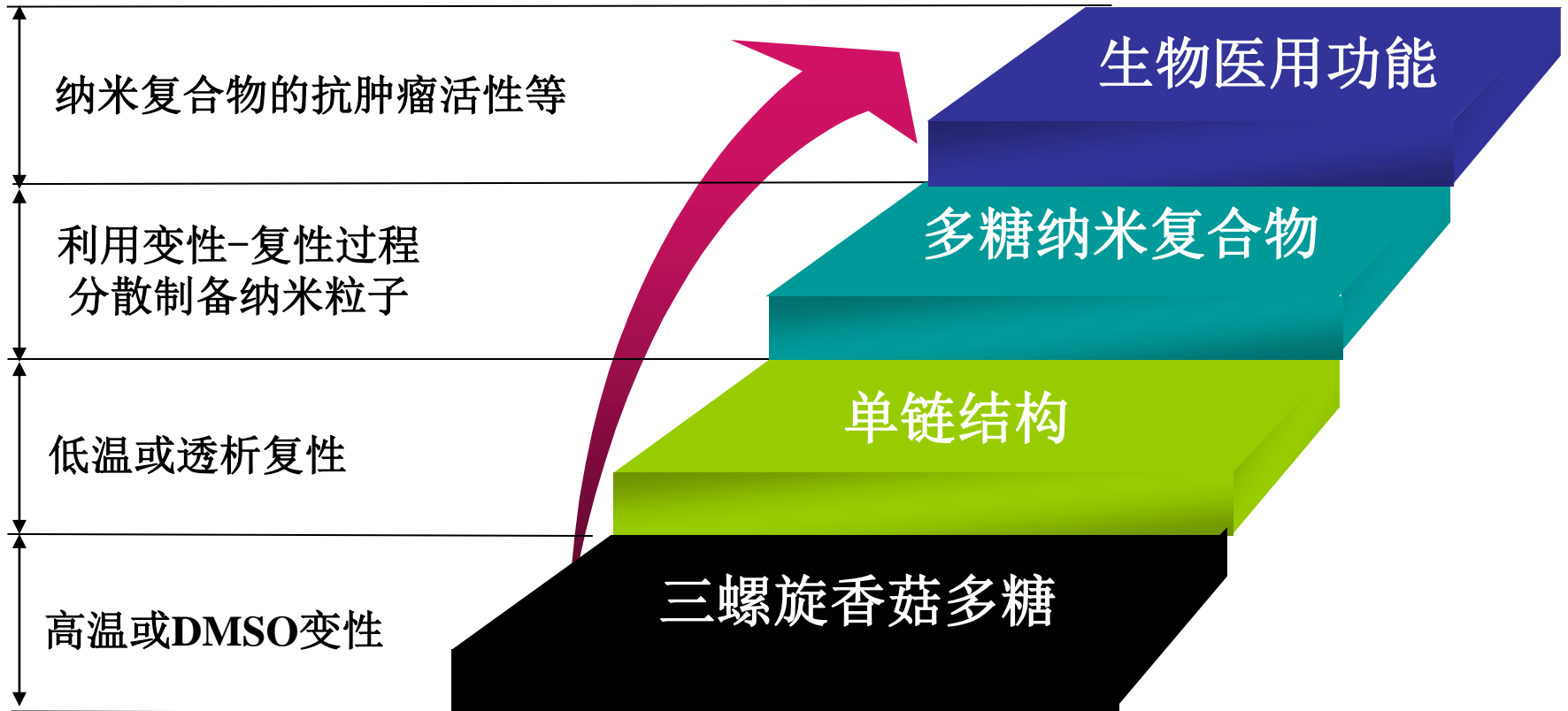
氢键的破坏与重组

是否可用于构建纳米粒子/香菇多糖复合物





# 构思





# 基于香菇多糖三螺旋结构的变性-复性 过程还原及分散金纳米粒子

揭示香菇多糖的还原性  
分散金纳米粒子的机理

# 香菇多糖与金纳米粒子复合物的制备



金纳米粒子的制备常用柠檬酸钠、硼氢化钠等还原氯金酸得到

存在稳定性差以及生物相容性等问题

采用更绿色的方法合成以及分散纳米金

香菇多糖

还原并分散制备金纳米粒子

揭示香菇多糖的还原性分散金纳米粒子的机理

多羟基结构

变性-复性过程

# 还原反应的浓度依赖性



$t=15 \text{ min}$ ,  $T = 100 \text{ }^\circ\text{C}$

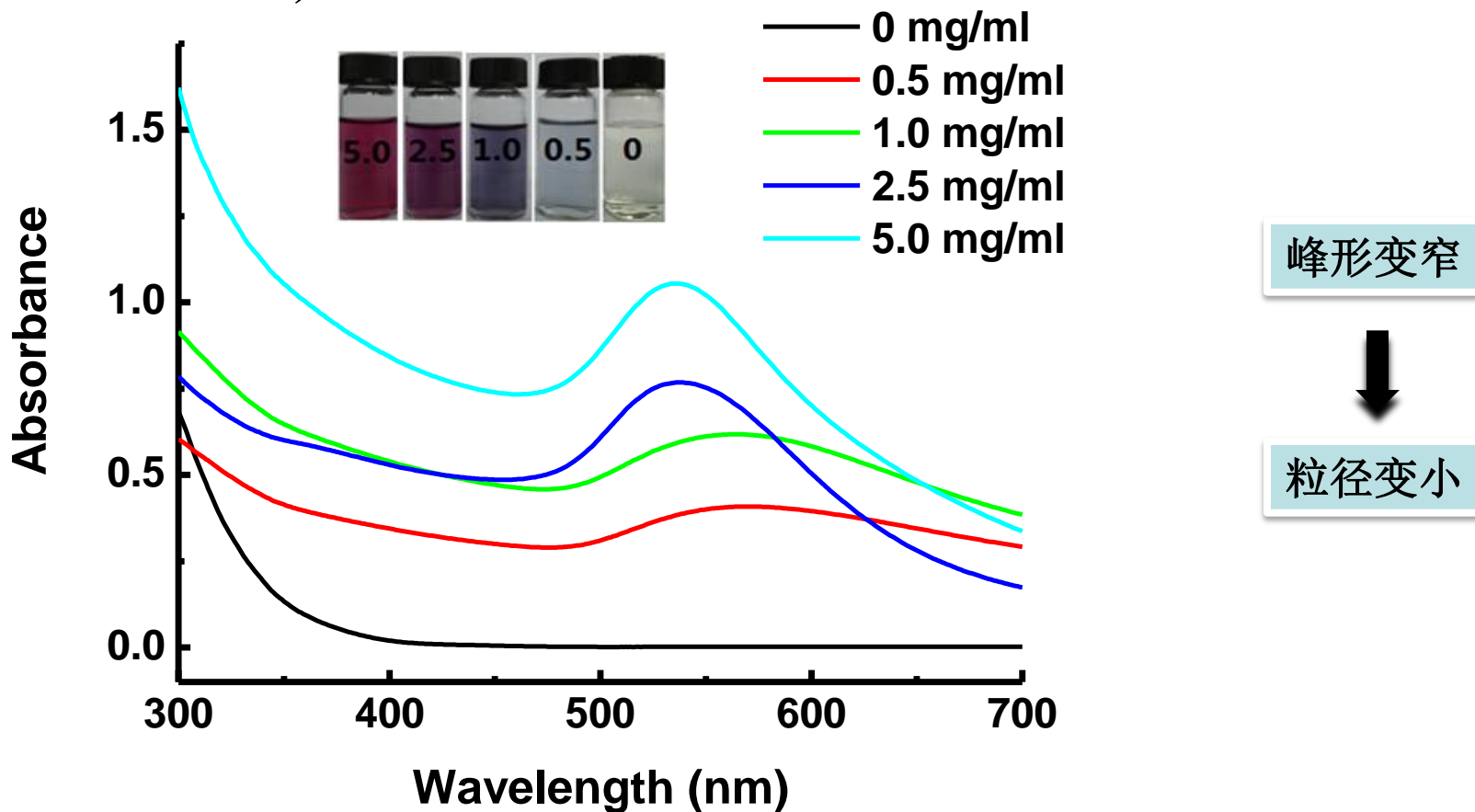
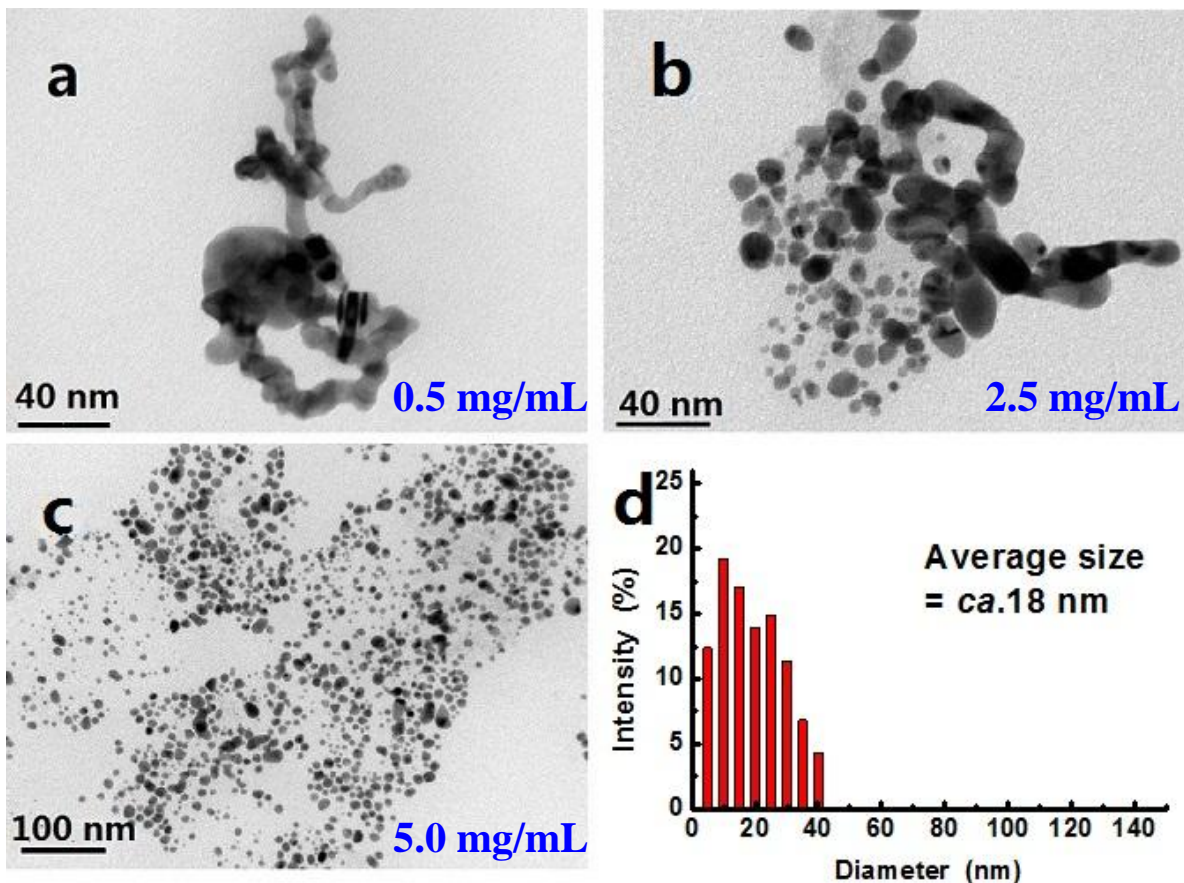


Figure 1.2 Concentration-variant photo images and UV-vis absorption spectra of the aqueous mixture of s-LNT (four concentrations as indicated in the figure) and  $\text{HAuCl}_4$  (0.1 mg/ml).

$t=15 \text{ min}$ ,  $T = 100 \text{ }^\circ\text{C}$



纳米带



球状

金纳米粒子形状可控

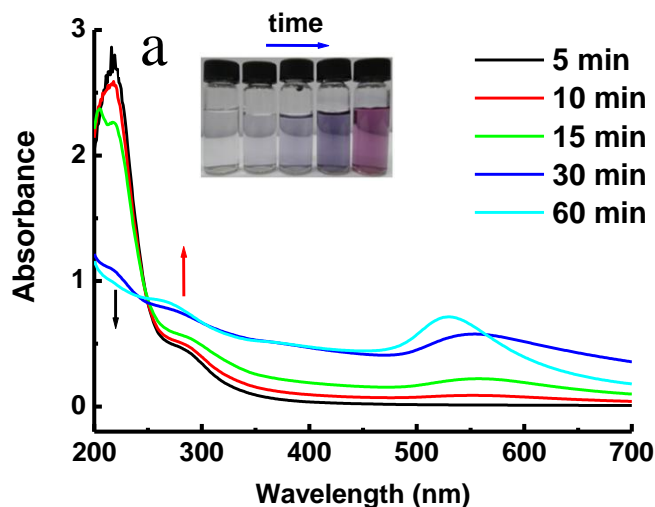
Figure 1.3 TEM images of AuNPs obtained at 100°C for 15 min at different s-LNT concentration of (a) 0.5 mg/mL, (b) 2.5 mg/mL, and (c) 5.0 mg/mL. (d) Size distribution of AuNPs in (c).



# 还原反应的时间依赖性



$c_{s-LNT} = 0.5 \text{ mg/mL}$ ,  $T = 100 \text{ }^\circ\text{C}$



220 nm ↓  $\text{Au}^{3+}$  被还原  
280 nm ↑ 羟基与金纳米粒子结合

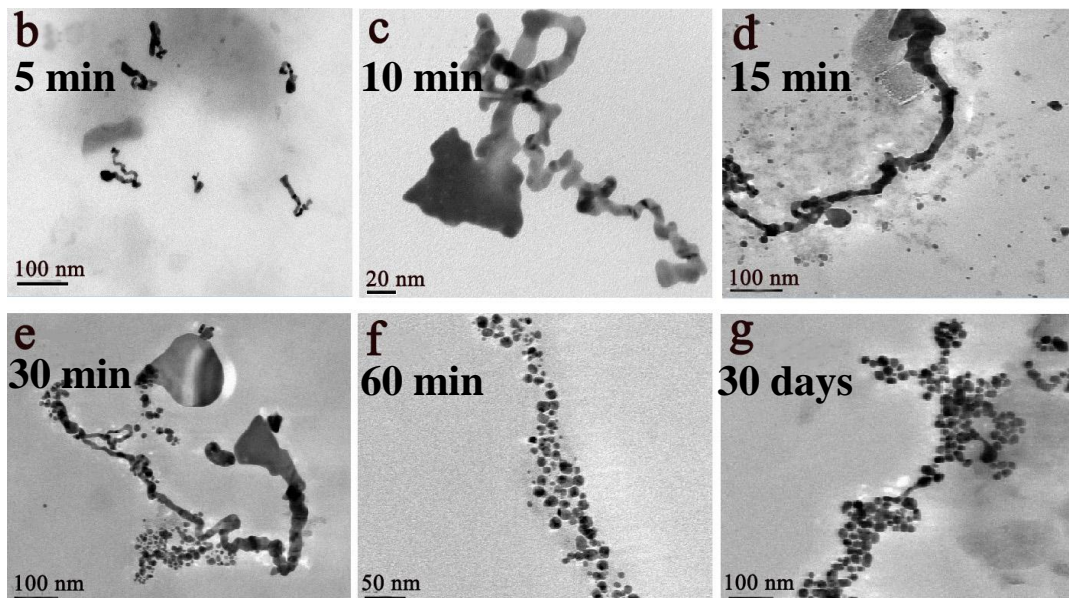
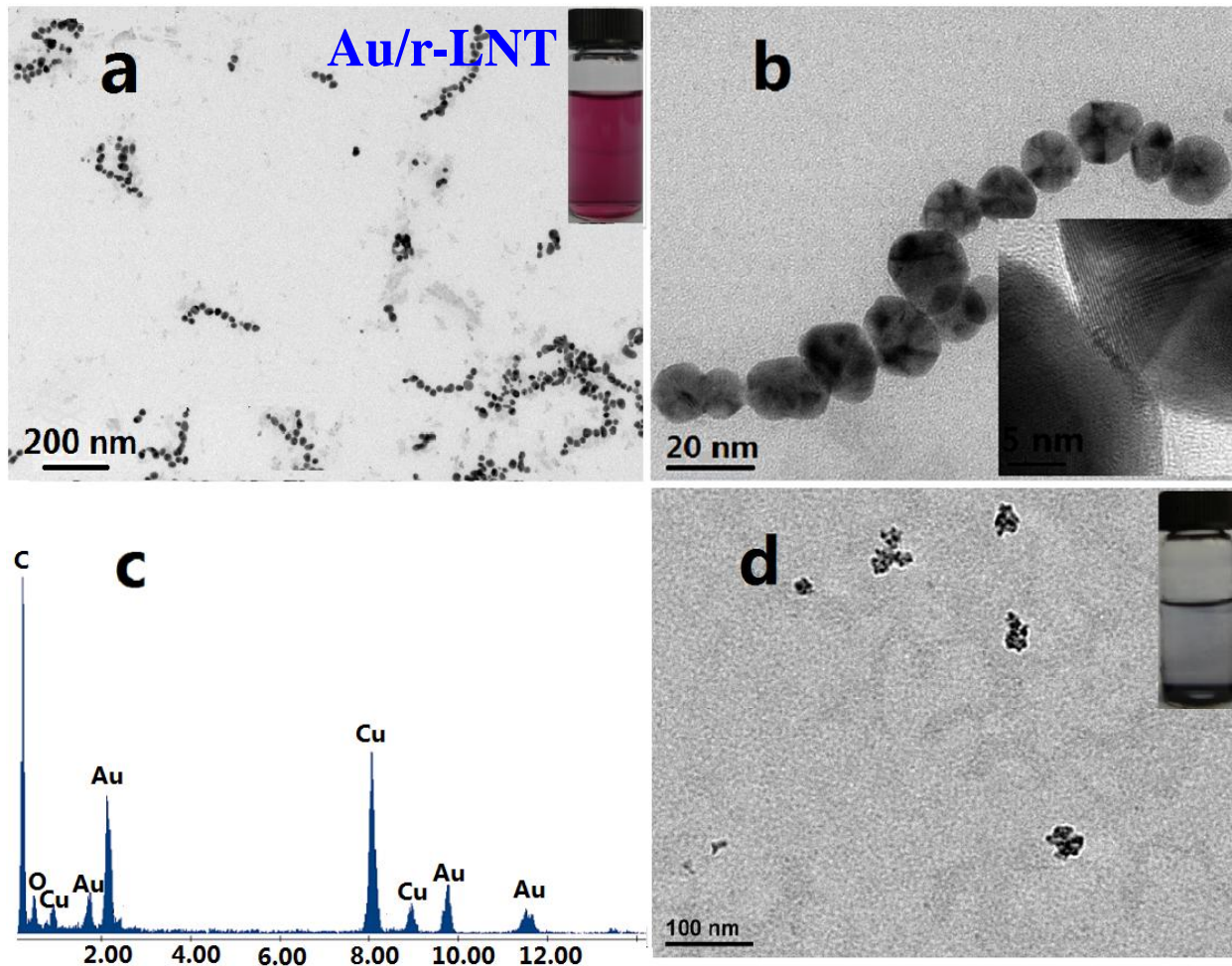


Figure 1.4 UV-vis absorption spectra (a) and TEM images of AuNPs obtained at  $100^\circ\text{C}$  with  $c_{s-LNT}$  of  $0.5 \text{ mg/mL}$  for reaction time of (b) 5 min, (c) 10 min, (d) 15 min, (e) 30 min, and (f) 60 min. Image (g) stands for the AuNPs formed in (d) which was placed at room temperature for 30 days.

# 金纳米粒子的分散



$c_{S-LNT} = 5 \text{ mg/mL}$ ,  $T = 100 \text{ }^\circ\text{C}$ , 反应10min后, 室温放置7天



金纳米粒子在多糖复性过程中包裹进三螺旋空腔中, 形成纳米线结构。

DMSO破坏三螺旋结构, 导致金纳米粒子聚集沉降。

Figure 1.7 (a,b), TEM images of AuNPs; (c), the typical EDX spectrum from HRTEM (b); and (d), TEM images of AuNPs in DMSO.



## ➤ 硫醇萃取实验

不同配体与金纳米粒子结合的能力

$RSH \approx RNH_2 \approx R_3P \approx RSiH_3 > RI > ROH \approx RBr.$

Au/r- Au/t- Au/s-  
LNT LNT LNT

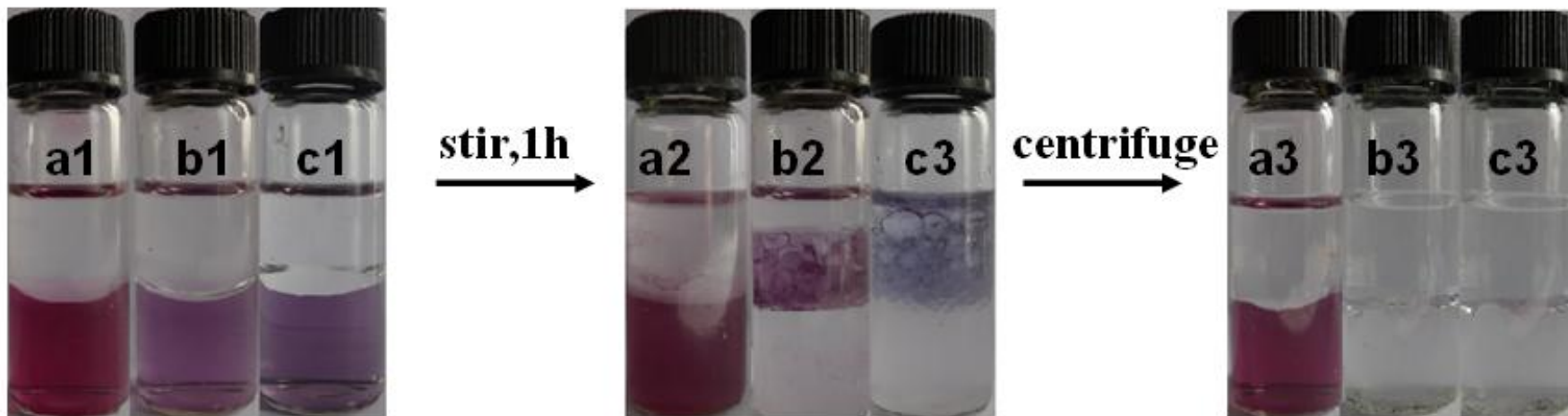
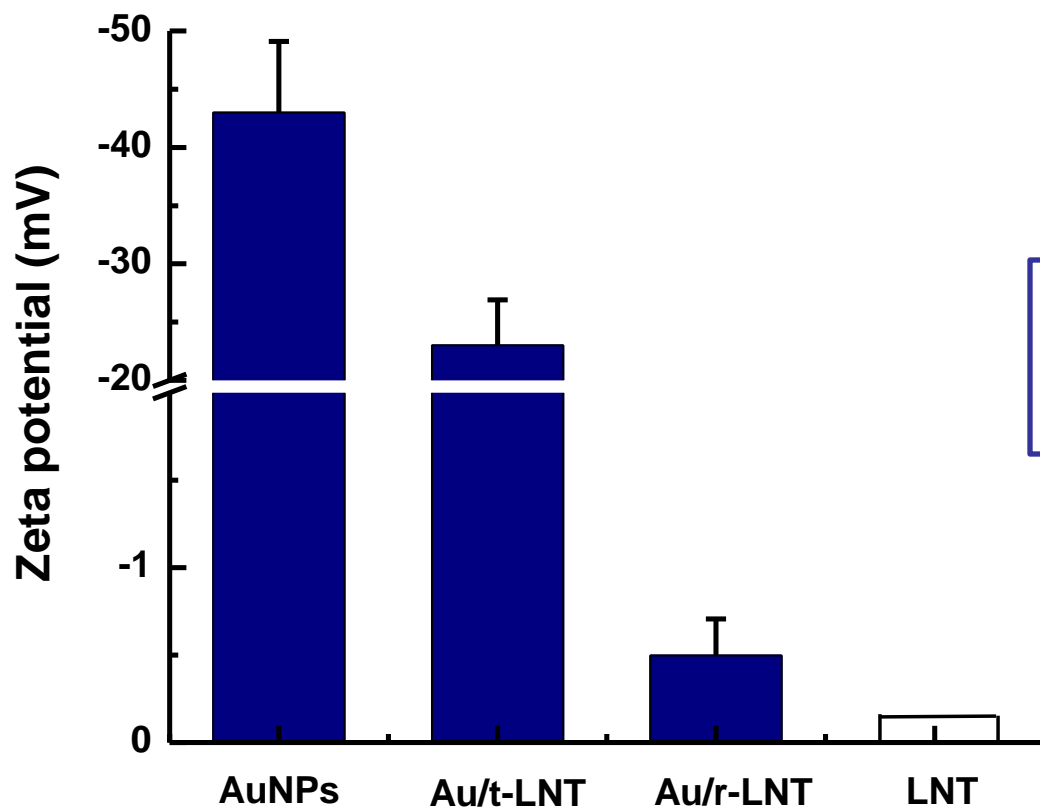


Figure 1.8 The color changes of Au/r-LNT (a-1,2,3), Au/t-LNT(b-1,2,3) and Au/s-LNT(c-1,2,3) solutions mixed with dodecanethiol. 1 indicates addition of dodecanethiol into AuNPs/LNT solutions without stirring, 2 indicates mixture 1 after stirring for 1h, and 3 stands for mixture 2 after centrifugation.

a-三螺旋链包合金纳米粒子；b-三螺旋链未包合纳米金粒子；c-单链未包合纳米金粒子。  
只有被三螺旋链包合的，未被萃取出来。



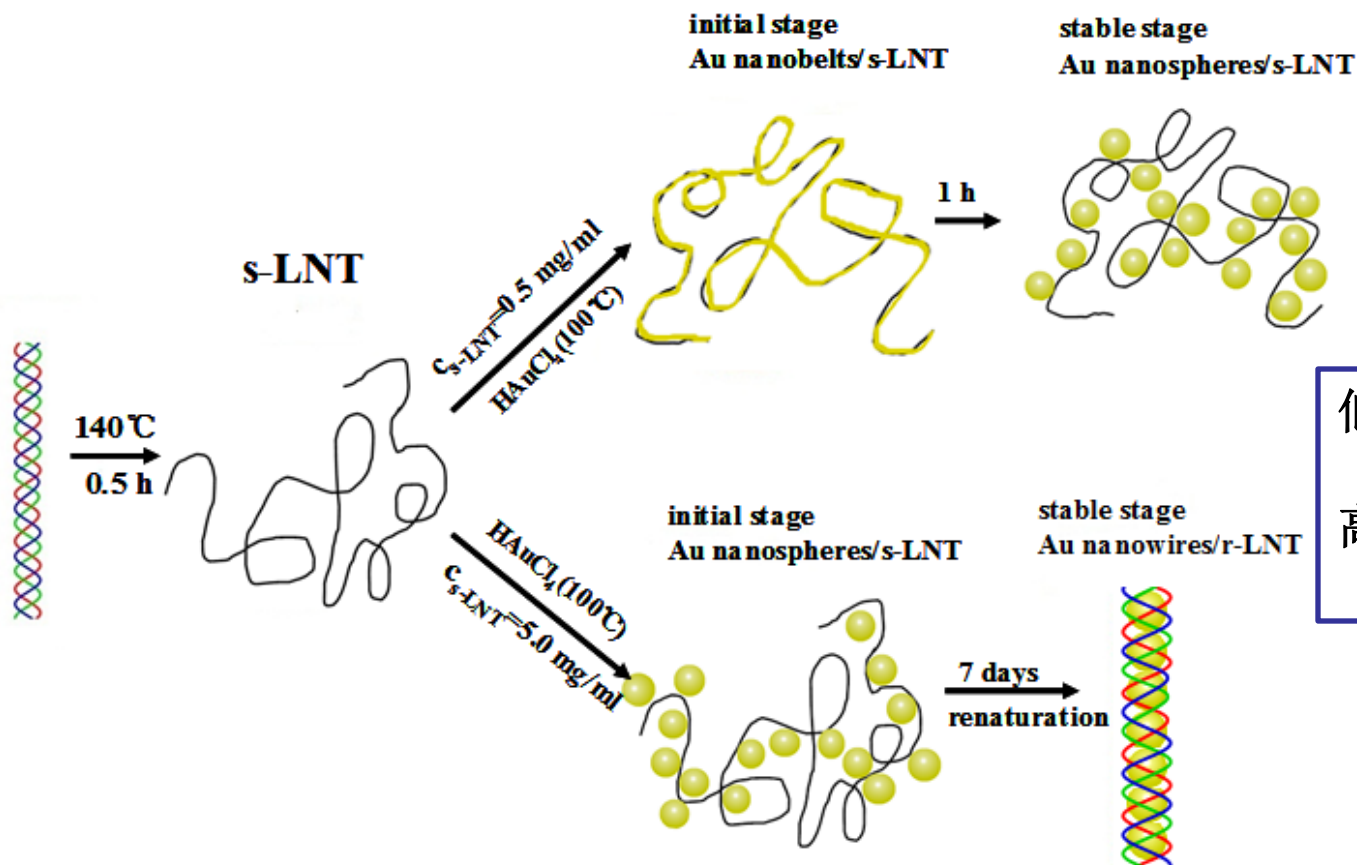
## ➤ zeta 电位



多糖链对金纳米粒子表面的包覆可以大大降低粒子的zeta电位。

Figure 1.9 Zeta potential of AuNPs, Au/t-LNT, Au/r-LNT in aqueous solution.

# 金纳米粒子的合成及分散机理



低浓度: AuNPs...OH

高浓度: 疏水相互作用  
螺旋空腔包裹

Figure 1.10 Scheme of synthesis and dispersion of AuNPs by s-LNT at different concentrations.



# 第二部分



## 金纳米粒子/香菇多糖复合物的抗肿瘤 活性及作用机制

揭示 **Au/r-LNT** 复合物的  
抗肿瘤功能和抗肿瘤机制

# Au/r-LNT复合物的抗肿瘤机理

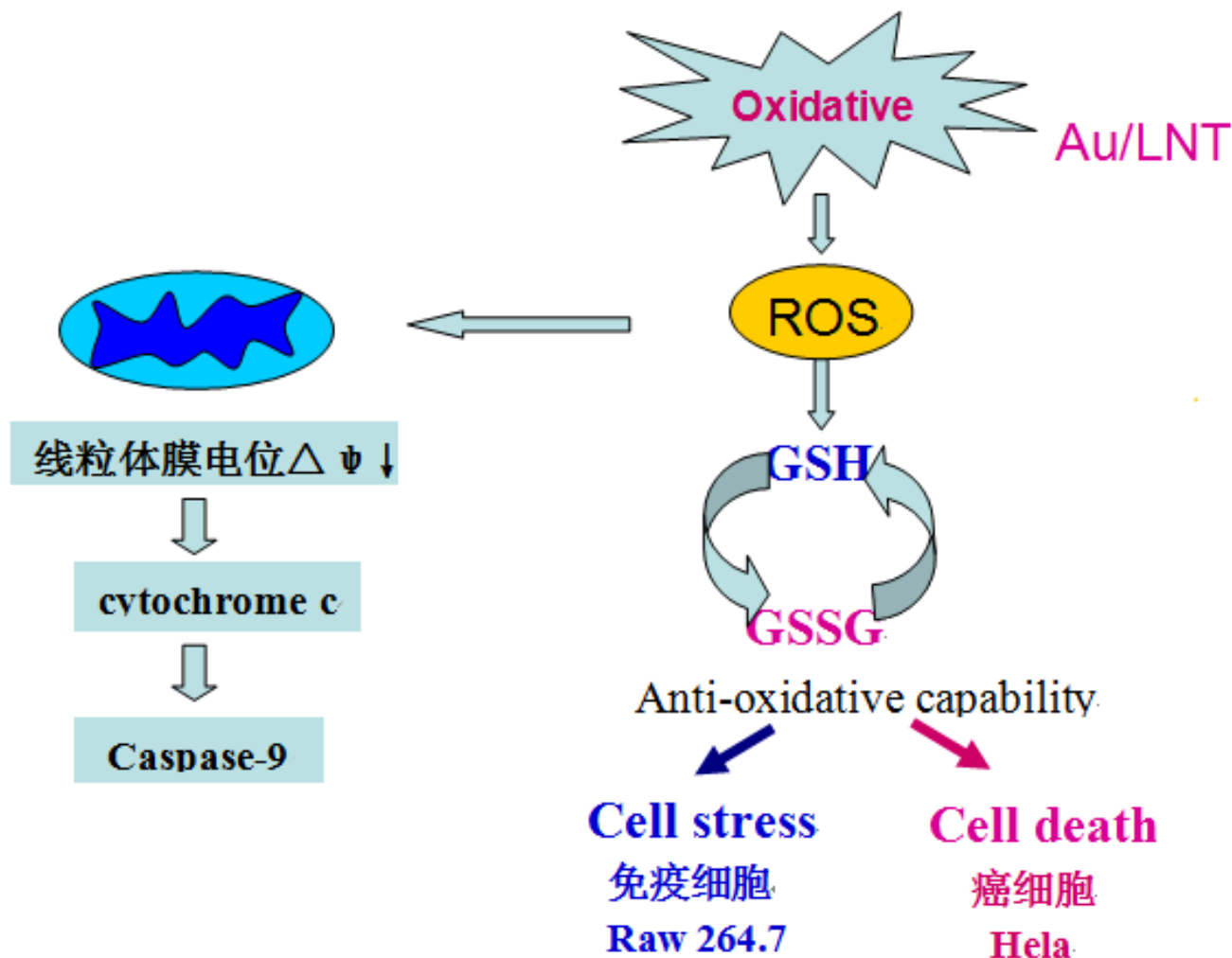


Figure 2.8 Scheme of various metabolic responses of macrophages of RAW 264.7 and cancer cells of HeLa to Au/r-LNT exposure.

# Au/r-LNT的体外抗肿瘤活性

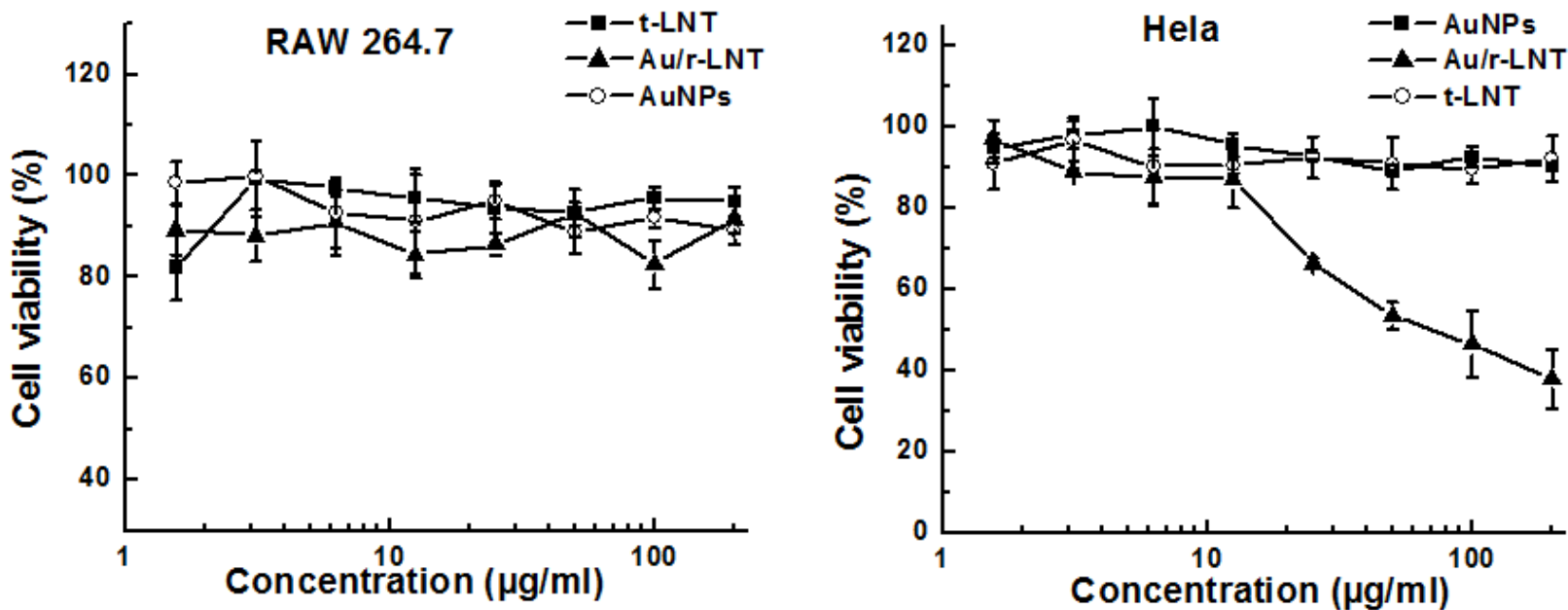


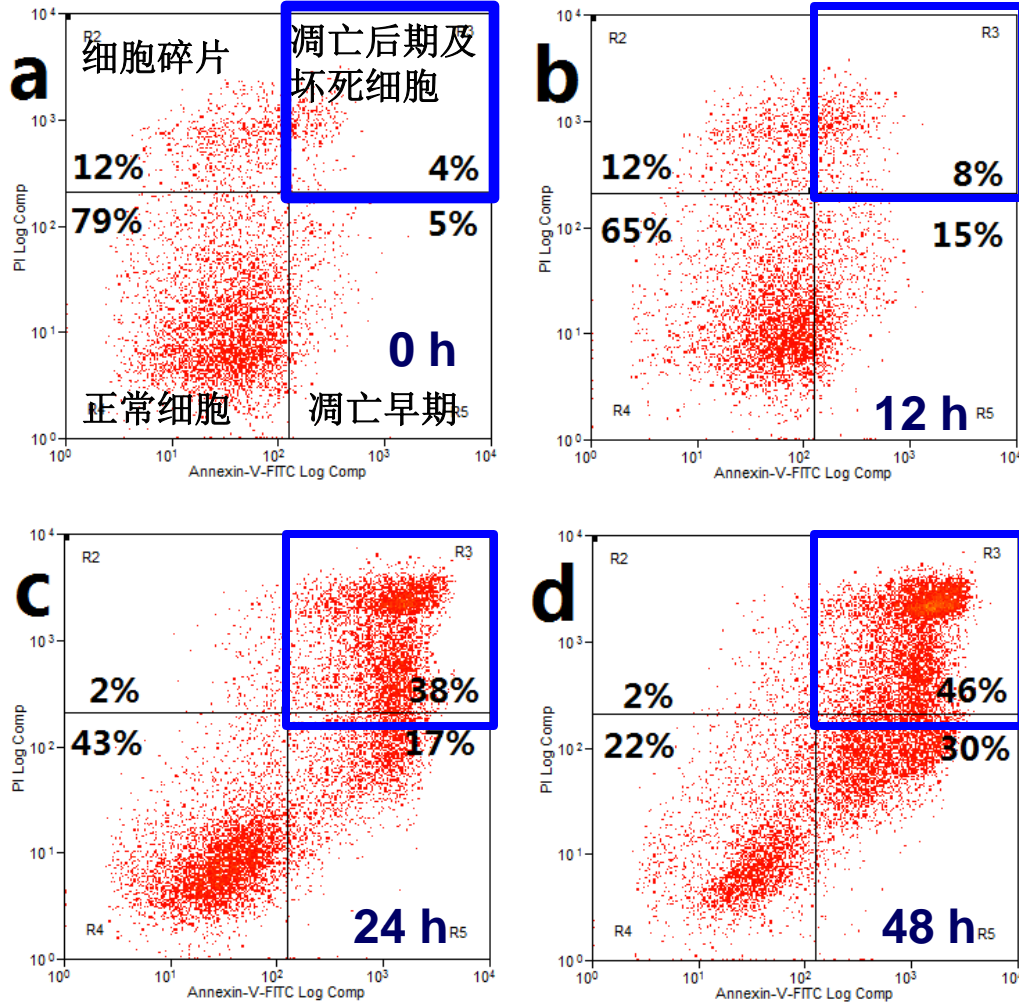
Figure 2.1 Cell viability of AuNPs, Au/r-LNT and t-LNT to RAW264.7 and Hela cells for 48 h determined by MTT assay. All data are expressed as means  $\pm$  SD of three independent experiments, each performed in duplicate.

只有Au/r-LNT复合物能抑制肿瘤细胞的增殖，并且对正常细胞无毒性。

# Au/r-LNT复合物抗肿瘤机制



## AnnexinV-FITC和PI双染



Au/r-LNT复合物可以诱导肿瘤细胞凋亡。

Figure 2.2 Apoptosis rate of HeLa cells treated with Au/r-LNT for 0 h (a), 12 h (b), 24h (c), 48h (d), the concentrations of Au nanoparticles was 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .



## ➤ 细胞内活性氧（ROS）水平

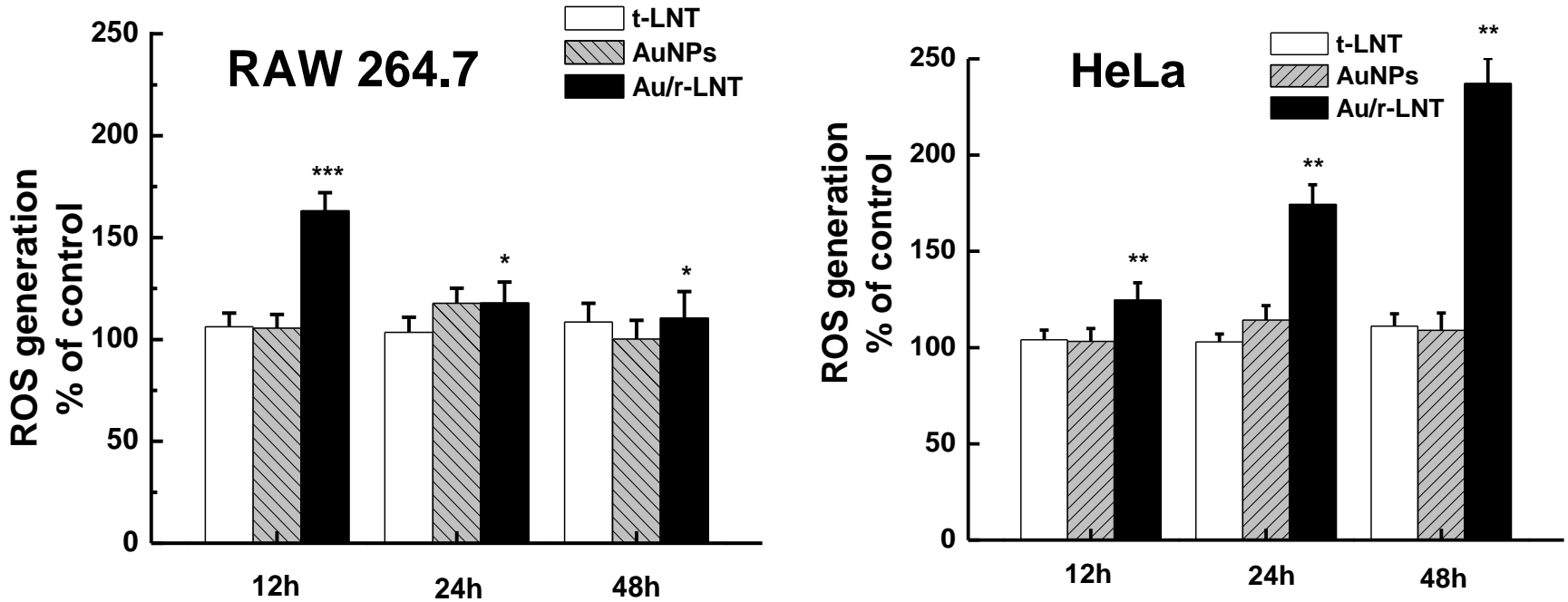
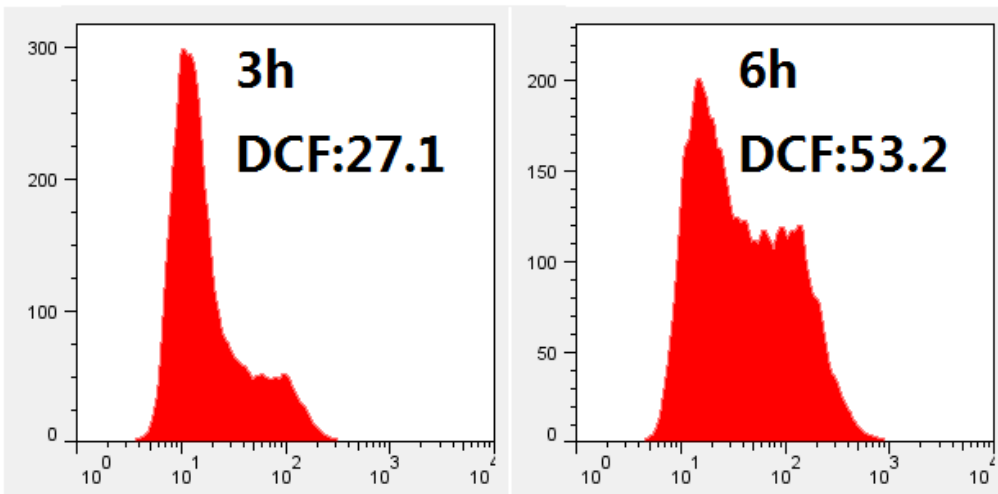


Figure 2.3 ROS generation in RAW 264.7 and Hela cells.

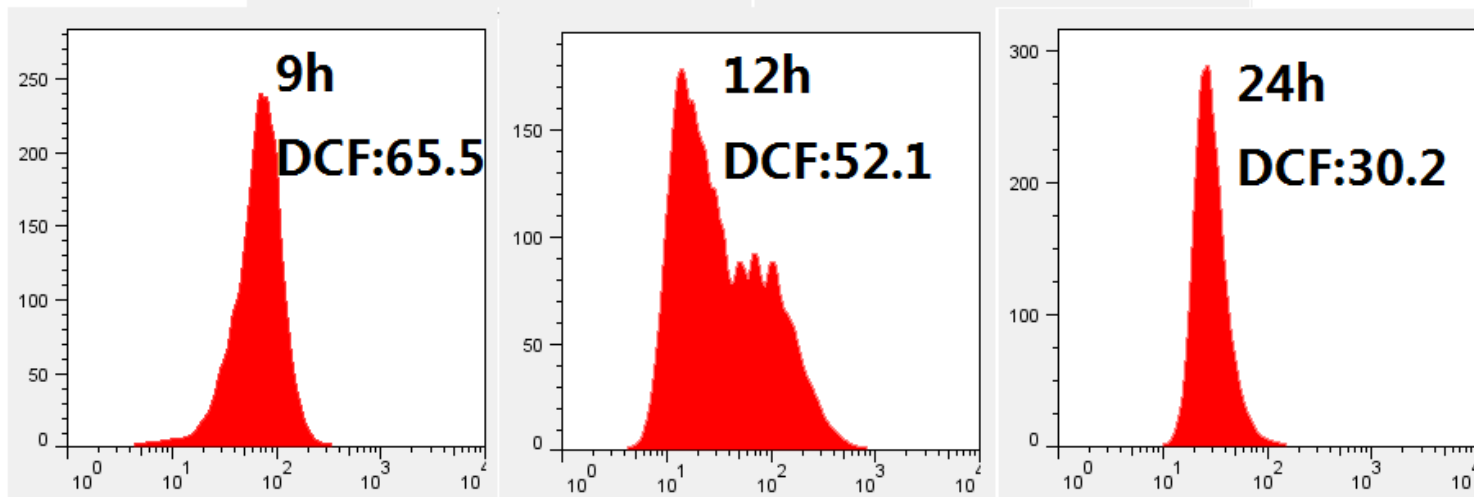
Au/r-LNT能促使两种细胞产生大量活性氧，肿瘤细胞ROS持续增加，正常细胞有下降趋势。



RAW 264.7



RAW 264.7细胞对ROS反应敏感，可以清除ROS



**Figure 2.4** Flow cytometric analysis of ROS levels in Au/r-LNT(210  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , that is including 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  AuNPs) treated Hela Cells for designated time.





## ► 细胞抗氧化能力

还原型谷胱甘肽（GSH）是细胞内主要的活性氧清除试剂

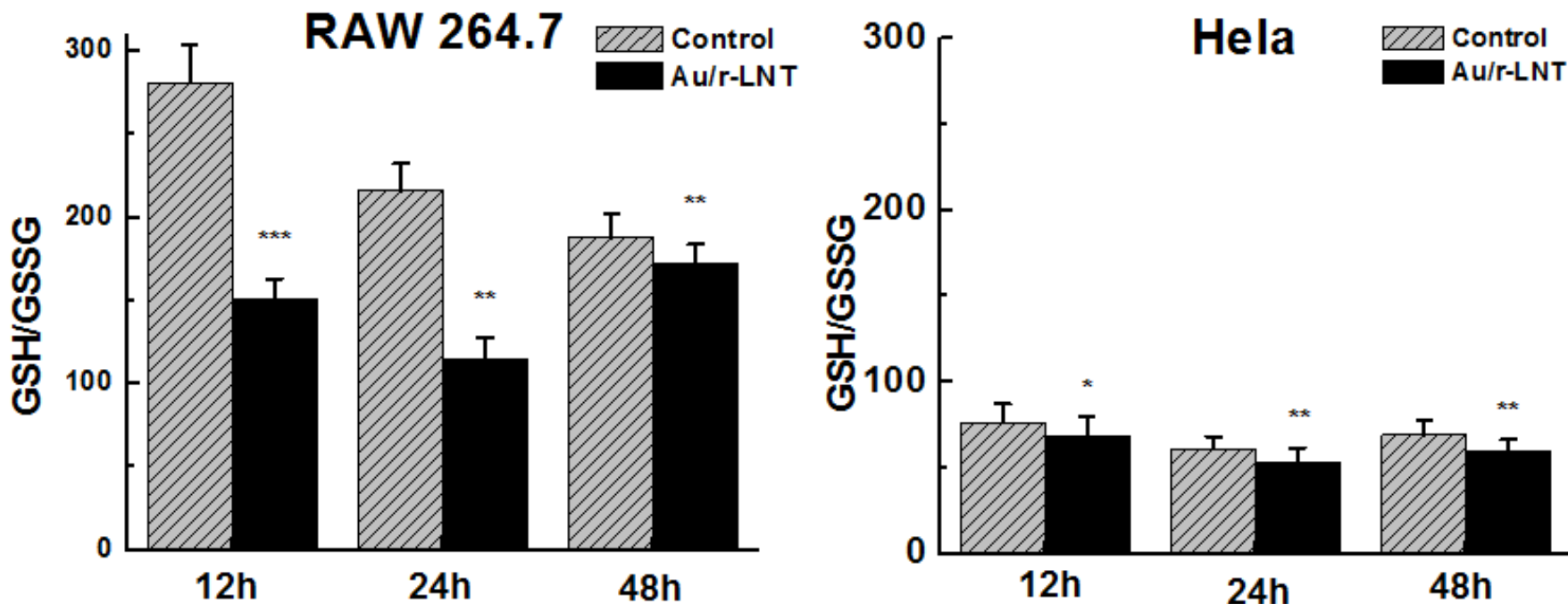


Figure 2.5 Effect of Au/r-LNT exposure on intracellular redox states as indicated by the ratio of GSH to GSSG.

肿瘤细胞对外源刺激产生的活性氧反应不敏感，调控能力不足。



## ➤ 线粒体损伤

线粒体跨膜电位下降是线粒体受损的标志之一

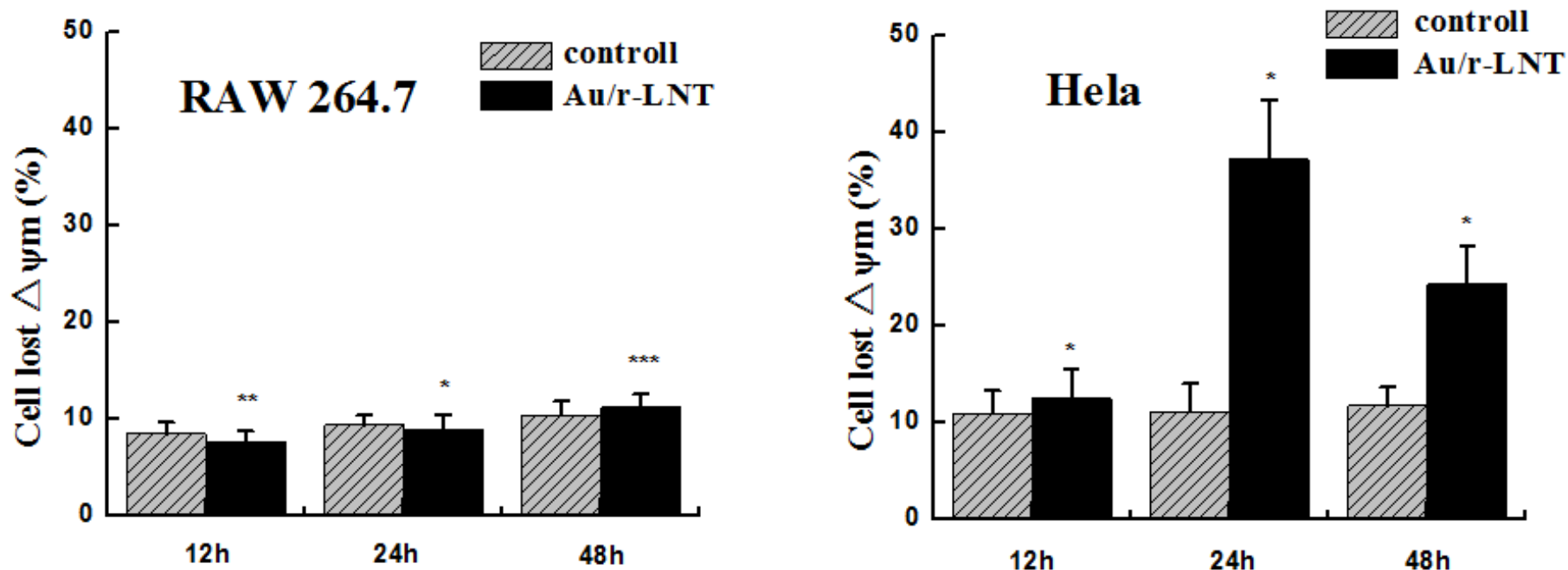


Figure 2.6 Loss of mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) in RAW 264.7 and HeLa cells.

肿瘤细胞线粒体跨膜电位下降，处于低电位下的比例大大上升，线粒体功能受损。



## ➤ caspase-9 酶活性变化

caspase-9是凋亡的引发剂，即开始凋亡过程

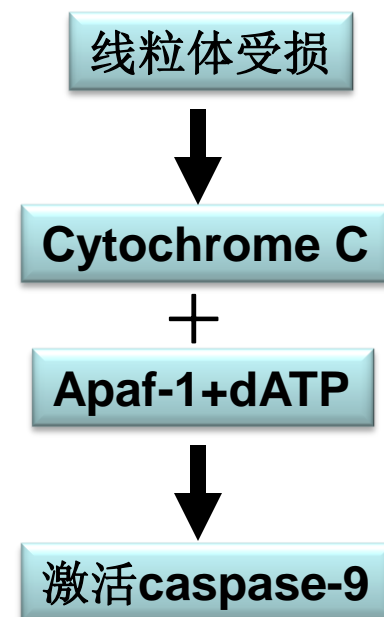
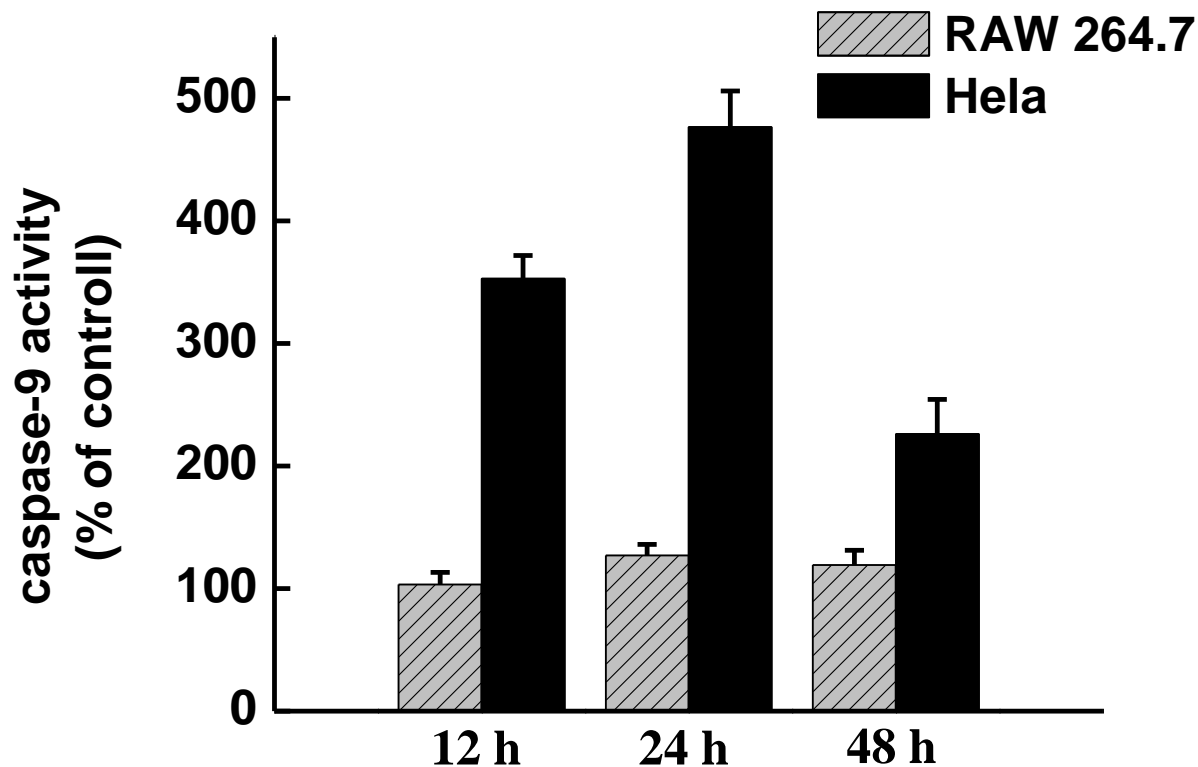


Figure 2.7 Caspase-9 activity was measured with whole cell extracts by a fluorometric method.

Au/r-LNT能激活肿瘤细胞内凋亡酶caspase-9。



# 预分散对碳纳米管/三螺旋香菇多糖复合物稳定性和细胞毒性的影响

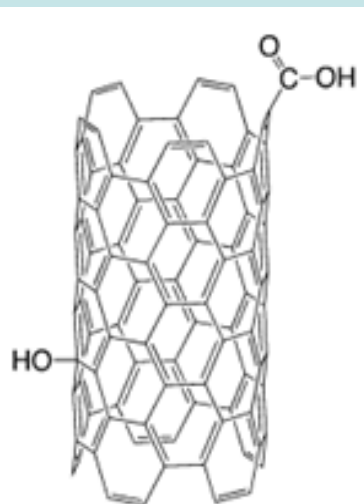
揭示不同改性方法对碳纳米管分散的影响  
降低碳纳米管的细胞毒性

# 研究思路



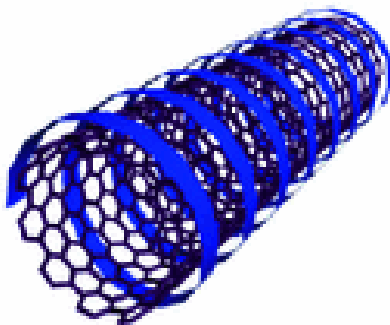
## 碳管衍生化

羧基化和氨基化改变碳管在极性溶剂中的分散性



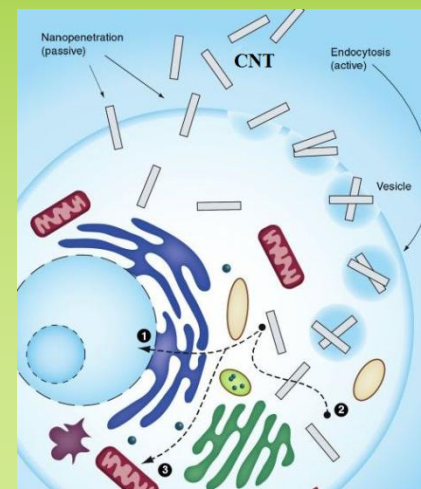
## 碳管/多糖复合物

探讨预分散条件



## 细胞毒性

评价碳管及其复合物的细胞毒性





■单壁碳纳米管（SWNT）先进行羧基化和氨基化，提高在极性溶剂中的分散性。

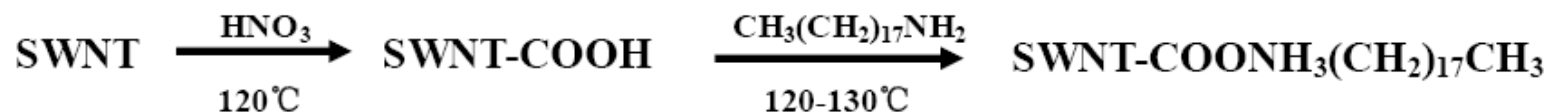
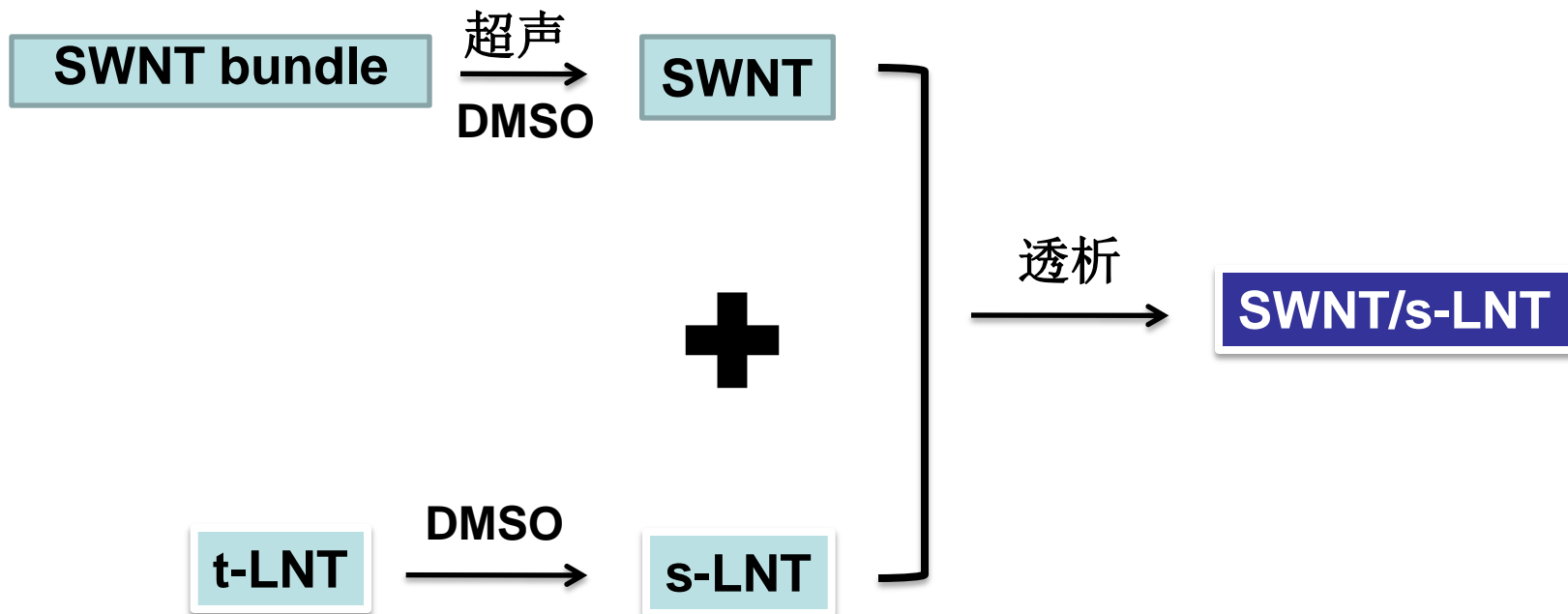


Figure 5.1 Synthesis of SWNT-COOH and SWNT-NH<sub>2</sub>.

■采用十八胺进一步氨基化可以保证碳管长度不变

# SWNT/s-LNT复合物的构建



SWNT及其两种衍生物用同样的方法分散

## 透射电镜

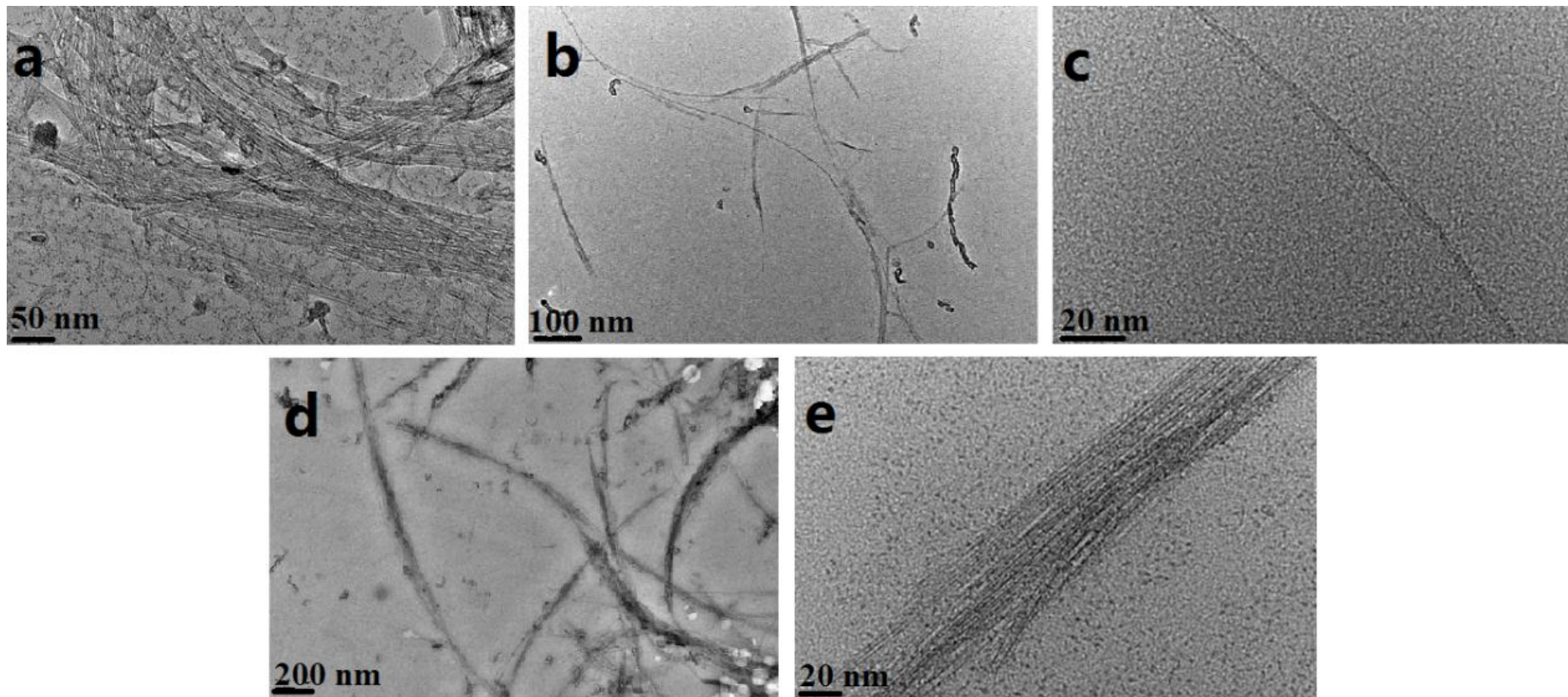


Figure 5.3 TEM images of SWNT/s-LNT (a), SWNT-NH<sub>2</sub>/s-LNT (b, c) and SWNT-COOH/s-LNT (d, e).

SWNT/s-LNT 仍然为聚集状态

SWNT-NH<sub>2</sub>/s-LNT 分散效果最好, 多以单根存在

SWNT-COOH/s-LNT 分散效果一般, 单根和束状共存

## ➤原子力显微镜

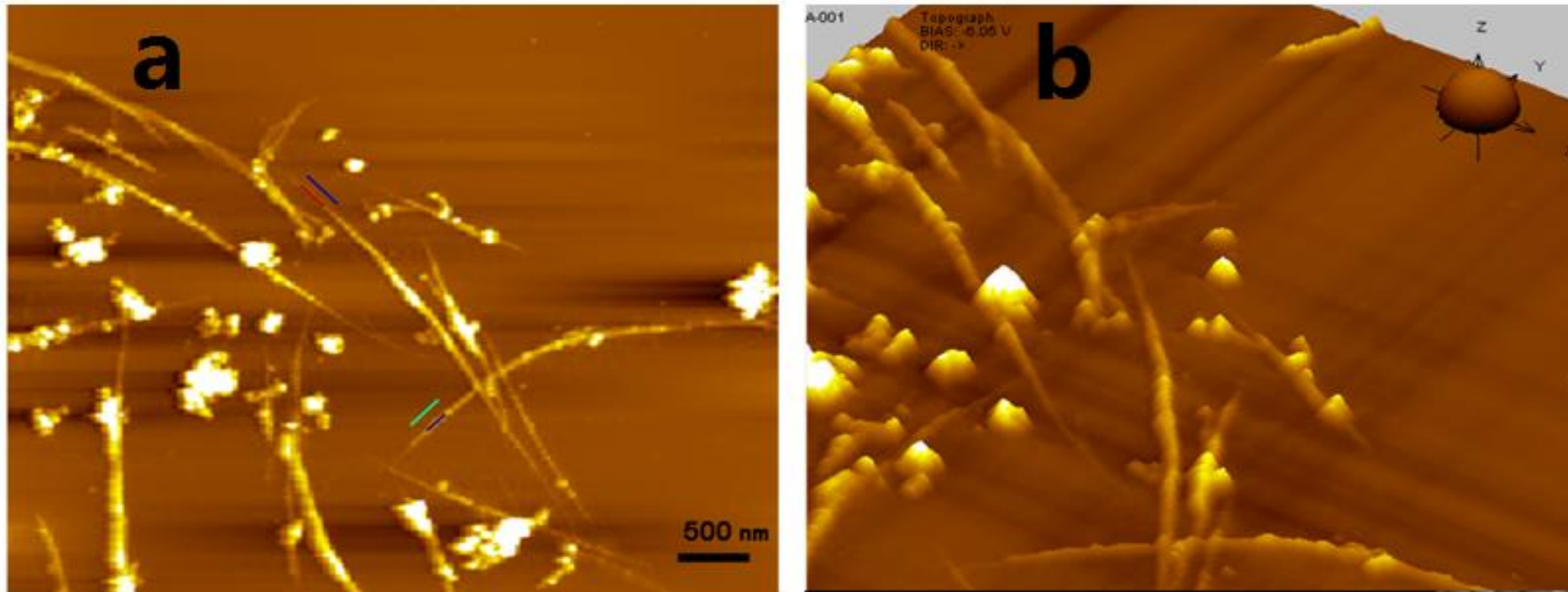


Figure 5.4 The 2D (a) and 3D (b) AFM height image of SWNT-COOH/s-LNT composites.

复合物表面具有明显的周期性螺旋结构，揭示s-LNT具有很强的螺旋包合物构建能力。

# 细胞毒性



## ➤ MTT assay

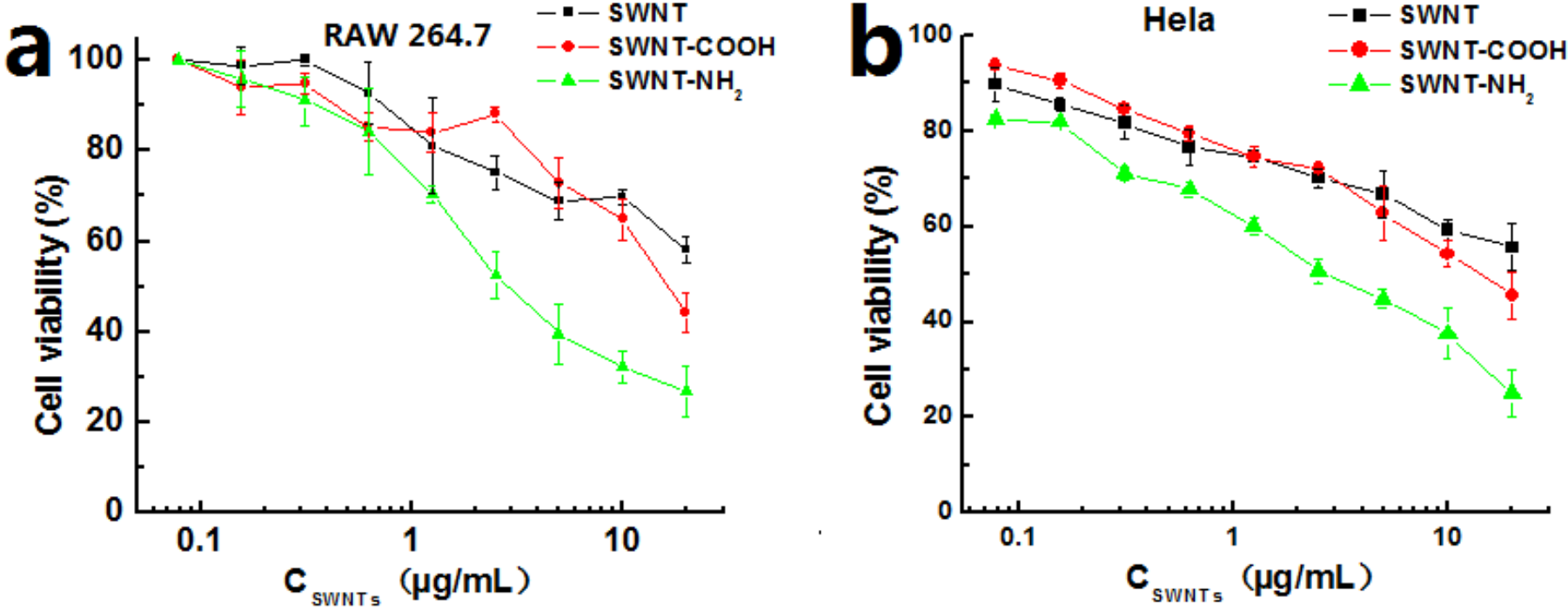
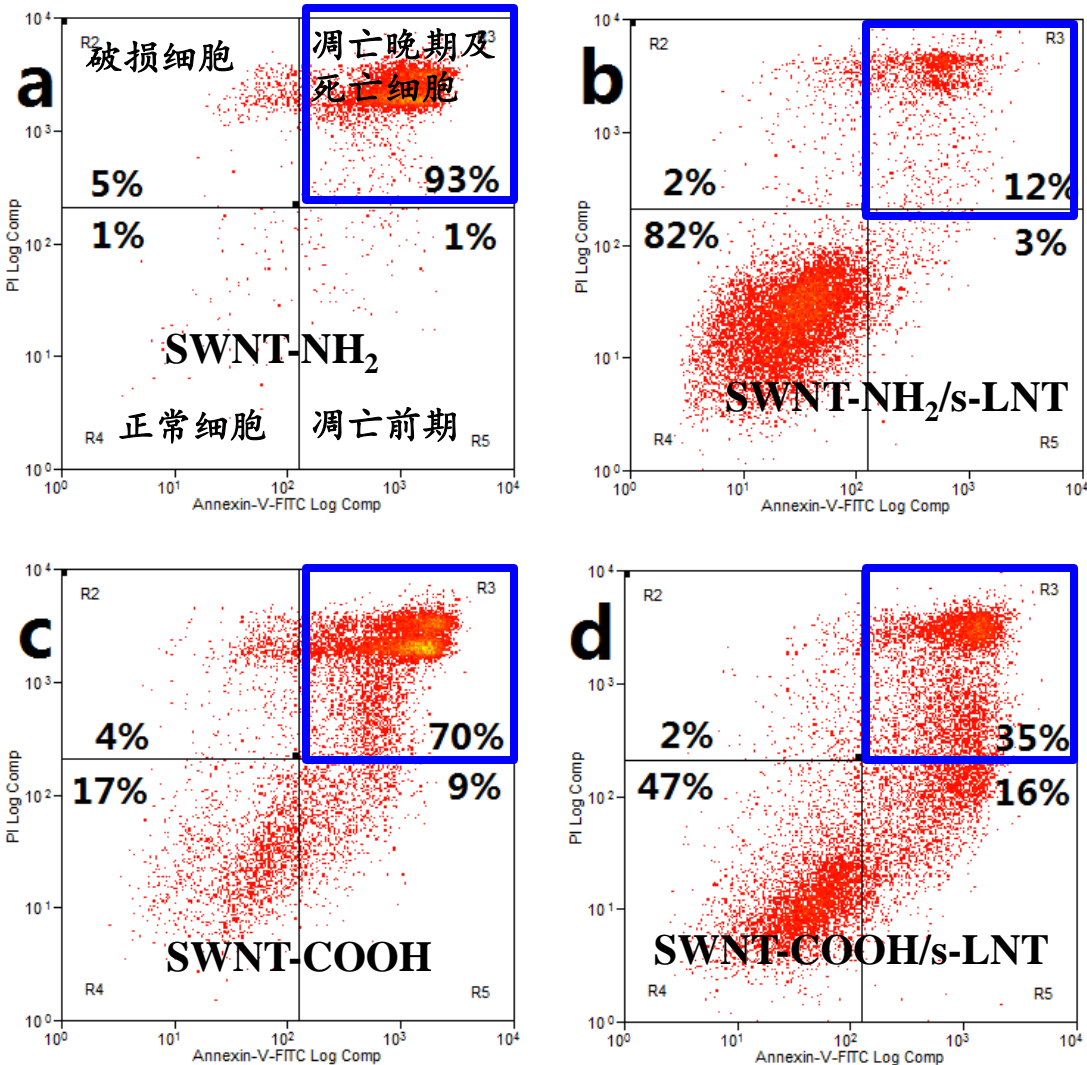


Figure 5.5 Cell viability results of Raw 264.7 and HeLa cells incubated with SWNT, SWNT-COOH and SWNT-NH<sub>2</sub> for 48h determined by MTT assay.

碳纳米管及其衍生物均显示很高的细胞毒性，并且衍生化后细胞毒性更高。



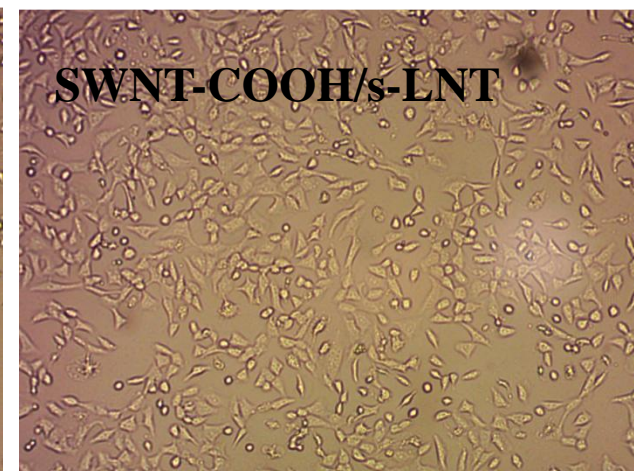
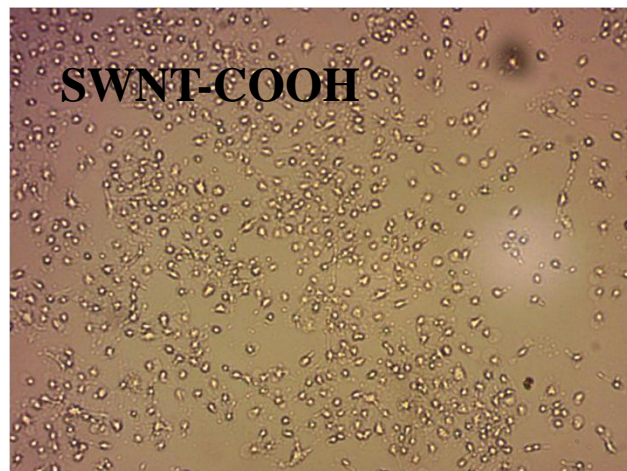
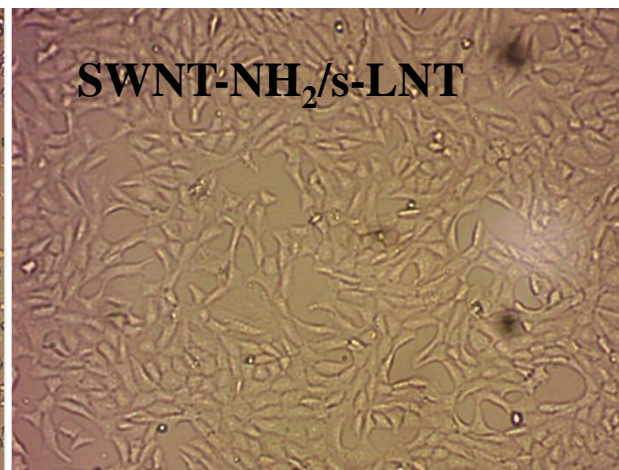
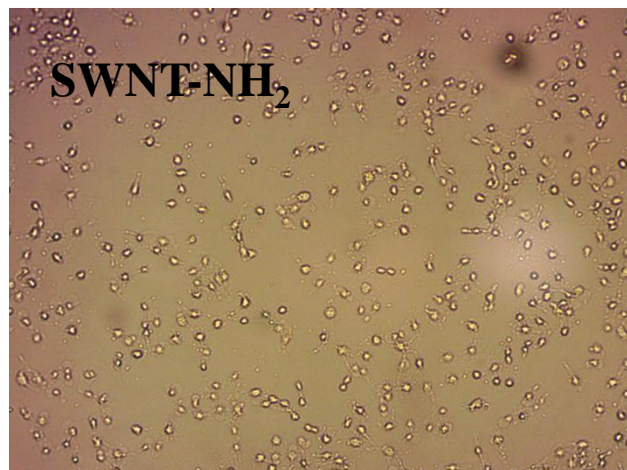
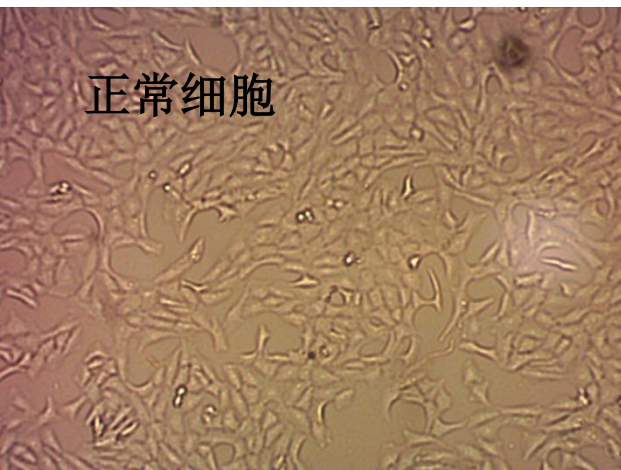
# AnnexinV-FITC和PI双染



**SWNT-NH<sub>2</sub>和SWNT-COOH与s-LNT复合之后大大提高生物相容性。**  
 处于凋亡晚期细胞比例大大降低。

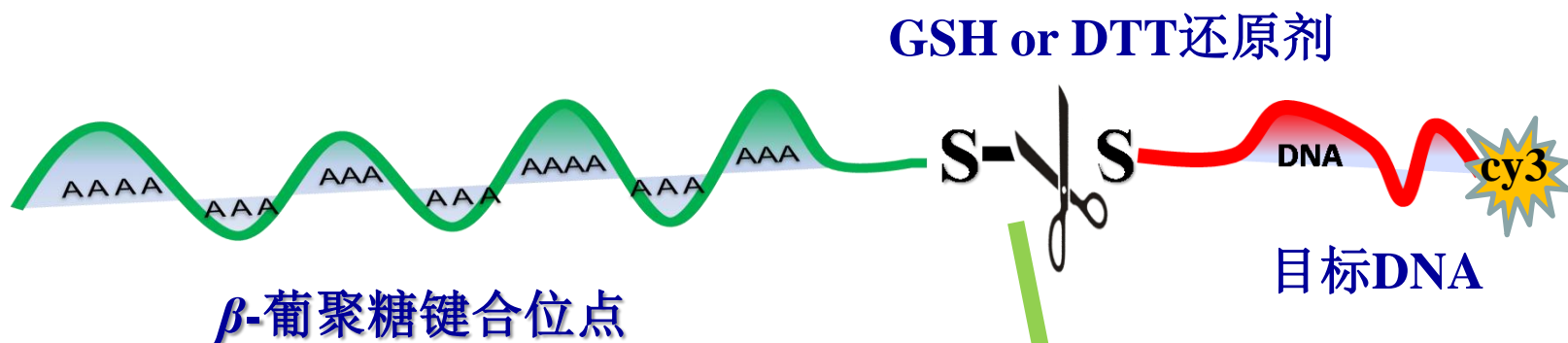
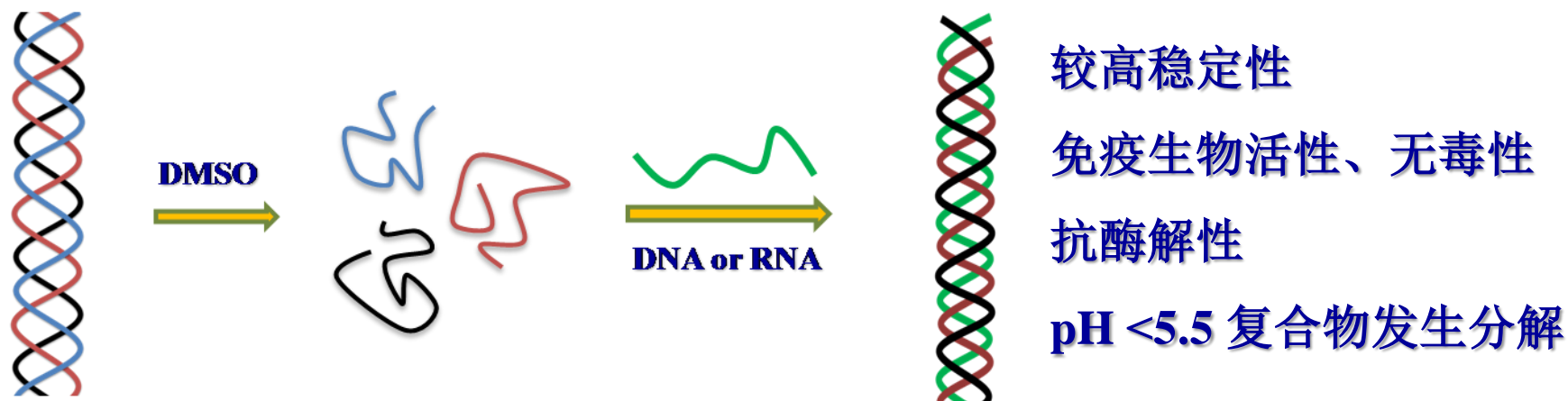
**Figure 5.7 Apoptosis rate of Hela cells treated with SWNT-NH<sub>2</sub> (a), SWNT-NH<sub>2</sub>/s-LNT (b), SWNT-COOH (c), SWNT-COOH/s-LNT (d) for 72 h, the concentrations of CNT in four samples were 10 µg/mL.**

## ➤ 细胞形态



**s-LNT与碳纳米管复合后，固缩死亡的细胞比例大大降低。**

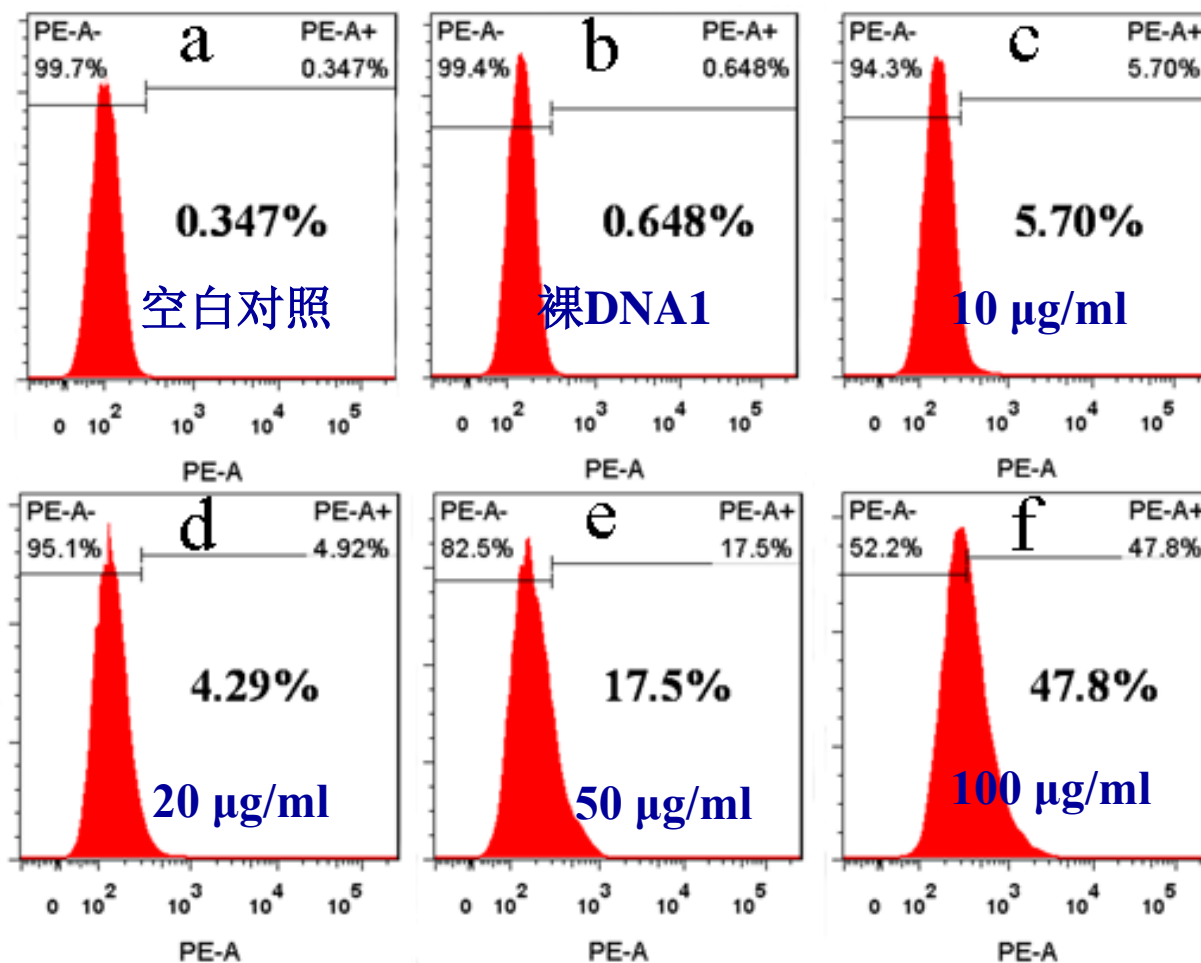
# 香菇多糖用于基因载体



实现目标DNA  
的智能释放



# 流式细胞仪

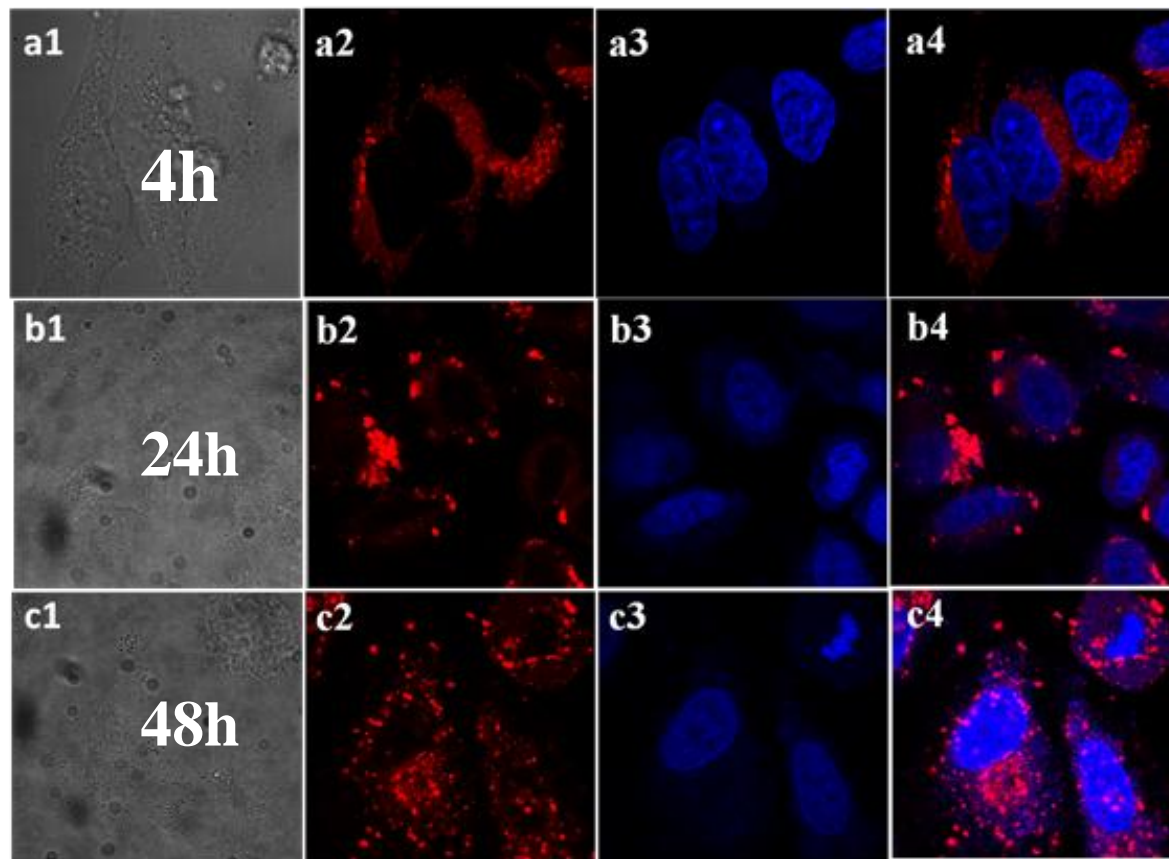


转染效率随多糖的增加而显著提高

Fig. 4.7 Flow cytometry images of Cy3-DNA1-SS-poly(dA)<sub>50</sub>/s-LNT2 complex at different concentration of s-LNT2.



# 荧光共聚焦显微镜



转染可以在癌细胞中发生，在细胞质高含量GSH的作用下，发生二硫键断裂

**Fig. 4.8** Confocal images of HeLa cells after incubation with complex of Cy3-DNA1-SS-poly(dA)<sub>50</sub>/s-LNT2 for (a) 4 h, (b) 24 h, and (c) 48 h. From left to right: transmitted light images (1), confocal images (2 and 3), and overlapped images (4) of the same field. The blue and red colors corresponded to the nucleus dye (Hoechst 33258) and Cy3 labelled DNA1. The micrographs are obtained at magnification of 1000 ×. *J Mater. Chem. B* 2014, 2,933-944.

