

茯苓多糖制备工艺及药理作用研究进展

张璐*, 刘强

(南方医科大学中医系, 广东 广州 510515)

[摘要] 目的: 综述近年来茯苓多糖制备工艺及药理作用的研究进展。方法: 主要对近十年来有关茯苓多糖制备工艺及药理作用的文献进行综述。结果: 茯苓多糖的制备方法有发酵醇沉法、稀碱浸提法、水提醇沉法、微波辅助提取法; 茯苓多糖具有抗肿瘤作用、免疫增强作用、保肝与催眠作用、抗衰老作用、抗单纯疱疹病毒作用、抗炎作用、防石消石作用等。结论: 茯苓多糖制备工艺较为成熟, 有较广泛药理作用。

[关键词] 茯苓多糖; 制备工艺; 药理作用

[中图分类号] R283.6, R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2006)04-0061-04

Advance Progress on the Preparation Process and Pharmacyology of Carboxymethylpachymaran

ZHANG Lu, LIU Qiang

(Department of TCM, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

[Abstract] **Objective:** To introduce the advance of the preparation process and pharmacyology of Carboxymethylpachymaran(CMP) in recent years. **Methods:** The literatures on the preparation process and pharmacyology of CMP were summarized. **Results:** CMP could be preparation by fermentation-alkohol-deeping, dilute-base extracting, water extraction and lkoahl-deeping and Macrowave extracting. CMP has the effects of anti-tumor, immunoenhancement, nourishing liver and hypnosis, fighting against senium, anti-herpes simplex virus, antiinflammatory action and eliminating calculus. **Conclusions:** the preparation process of CMP is maturate and its pharmacology action is wide.

[Key words] Carboxymethylpachymaran; preparation process; Pharmacological effects

茯苓为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核, 其性味甘、淡、平, 归脾胃肺肾经。有利水渗湿, 益脾宁心之功效。主治气虚劳伤、水肿、痰饮、呕吐、腹泻、热淋、遗精、惊悸、健忘等症。羟基茯苓多糖 (Carboxymethylpachymaran, CMP) 是茯苓的有效部位之一, 为灰白色粉末, 味微咸, 无嗅, 略有吸湿性。其多糖含量 $\geq 60\%$, 溶于水, 呈现棕色透明胶状, 无沉淀。其重金属指标为: Sb < 1ppm, As < 1.4ppm, Cd < 2ppm。CMP 具有抗肿瘤、提高机体免疫力、抗炎等作用, 并逐步应用于临床。本文综述了

近年来茯苓多糖主要的研究进展, 供同行参考。

1 制备方法

1.1 发酵醇沉法^[1] 茯苓菌丝摇瓶培养 10d, 分离发酵上清液。在上清液中加入 3 倍量的 95% 乙醇, 过夜, 过滤得沉淀。沉淀相继用乙醇、丙酮、乙醚洗涤, 用 sevag 法除去沉淀中的蛋白质, 得到茯苓粗多糖。在剧烈搅拌下加入高碘酸钠进行选择性氧化。调 pH 值 3~4, 适度酸解后, 过滤, 固体物用水洗涤, 该固体物为茯苓次多糖。将茯苓次多糖加入到少量 1% 氢氧化钠水溶液中, 碱溶后, 加入异丙醇, 快速搅拌下加入氯乙酸异丙醇溶液, 在恒温 50℃ 放置反应, 当反应呈糊状时, 即可停止。将上层异丙醇倾出来, 下层加入稀醋酸溶液, 剧烈搅拌, 加入乙醇, 过滤, 固体物部分溶解于水中, 用乙醇沉淀, 过滤, 干燥, 得白

[收稿日期] 2005-04-08

[通讯作者] 张璐, Tel: (020) 61648264; E-mail: ulgnahz

@fimmu.com

色粉末状固体物,即为 CMP。

1.2 稀碱浸提法^[2] 取过 60 目筛的茯苓皮和茯苓粉末各 15g 分别溶于 3℃的 0.5mol/L NaOH 3000mL 液中,搅拌至粉末溶解,此时溶液呈粘稠状态。5℃以下冷藏,过夜,抽渣弃去,滤液以 10%的醋酸液中和至酸性,再加入等量 95%乙醇,于 3℃放置过夜,滤取沉淀,流水透析两天,再依次用蒸馏水、无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤后,减压抽干,置干燥箱中 60℃以下干燥,即得茯苓多糖粗品,呈淡黄色细颗粒状结晶。称取茯苓多糖粗品 5g,溶于 500mL 二甲基亚砜中,在室温下搅拌 15h 后,加入 500mL 蒸馏水,继续搅拌 20min,放置 2h,抽滤。沉淀用无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤,置红外干燥箱中干燥,即可得茯苓精制品 4.44g,产率为其原料的 52.8%。

1.3 水提醇沉法^[3] 准确称取茯苓 500g,切成碎片,加入 4~6 倍量的水,回流提取 3 次,时间分别是 3,2 和 1h。合并 3 次提取液滤过,除去不溶性杂质,得 2000mL 滤液。取 600mL 减压蒸馏浓缩成 76mL,在搅拌下加入乙醇,使含醇量达到 80%,静置 12h,离心,收集沉淀,加蒸馏水 60mL 溶解煮沸,趁热滤除不溶物,滤液在搅拌下再加入乙醇,使含醇量达到 80%,放置,析出褐色沉淀后,低温干燥,即得茯苓多糖粗品。将粗品溶于 150mL 蒸馏水中,煮沸,在搅拌下加入 1%鞣酸溶液,煮沸,离心,取上清液加入鞣酸溶液不混浊为止。加入 2%的活性炭,搅拌 10min,趁热用布氏漏斗滤过,滤液放冷,加入乙醇使含醇量达到 70%,静置 24h,滤取析出物,用 70%乙醇 100mL,反复洗涤沉淀,检查不含鞣酸为止。将湿品溶于 583mL 的 20%的热乙醇中,置于有 50g 中性氧化铝的布氏漏斗中,减压后,再加入 60℃的热蒸馏水连续洗脱,流出液减压浓缩成 62.5mL,加入乙醇使含醇量达到 70%,放置,滤取沉淀于低温(或冷冻)干燥,即得茯苓多糖纯品。

1.4 微波辅助提取法^[4] 将块状茯苓粉碎为小颗粒状,称取 10g 的茯苓粉末,溶解于 500mL 的溶液中,提取 30min,在 42%的微波占空比下回流提取后滤过,残渣依法再提取两次,合并滤液,低温浓缩至 50mL。Sevag 法除蛋白 3 次,低温浓缩至约 15mL,加入 4 倍乙醇,静置,过夜。小心吸取上清液,弃去,剩余物真空干燥,得茯苓多糖粗品。取部分茯苓多糖粗品固体,用无水乙醇洗 1 次,用乙醚洗 2 次,真空干燥,得精制茯苓多糖。

2 药理作用

2.1 抗肿瘤作用 CMP 注射液 25~500mg/kg 剂量腹腔注射,对 ICR/JCL 品系的小鼠肿瘤 U-14 有较强的抑制作用;CMP 灌胃与静脉注射给药,对小鼠 S-180 肉瘤与小鼠肝癌 H22 均有抑制作用。小鼠灌胃给药的最适剂量为 50~200mg/kg,小鼠静脉注射给药的最适剂量为 5~100mg/kg。体外实验结果表明,当 CMP 浓度为 0.25% 与 0.5% 时,对小鼠艾氏腹水癌细胞的生长有较强的抑制作用;CMP 浓度 0.1~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对小鼠 S-180 肉瘤细胞的生长有一定的抑制作用;CMP 浓度 0.1~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对小鼠 H22 肝癌细胞的生长有一定的抑制作用^[5]。

CMP 的生物活性与使用剂量之间存在一定的关系,在最佳剂量时活性最高,而超过或低于最佳剂量时活性就会明显降低,与一般化学药物不同。CMP 可提高小鼠血清中 TNF- α 的含量。TNF 的诱生涉及到巨噬细胞的活化,增殖和发育分化的各个阶段。茯苓多糖能促进小鼠腹腔巨噬细胞代谢,使其数量、形态以及细胞膜酶活性均发生明显改变,其吞噬、吞噬功能以及溶酶体酶含量及其释放均能显著提高。茯苓多糖还可能影响 DNA 的转录过程,使 mRNA 水平增高,进而使 TNF 的表达生成量增加^[6]。

2.2 免疫增强作用^[7,8] CMP 能明显增强荷瘤小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能,明显增加小鼠脾抗体分泌细胞数(PFC)以及特异的抗原结合细胞数(SRFC),明显增强小鼠对牛血清白蛋白(BSA)诱导的迟发型超敏反应(DTH),明显增强小鼠脾 T 细胞生长因子(TCGF)的生长,这可能是其增强免疫应答功能及抑瘤率的机制之一。

CMP 能诱导人血淋巴细胞产生干扰素- α (IFN- α)、干扰素- γ (IFN- γ)、白细胞介素-2(IL-2)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)与粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)。药理试验证明,CMP 能增强小鼠的免疫功能,表明 CMP 是一种抗肿瘤免疫增强剂。

CMP 静脉注射剂量在 5, 10, 50mg $\cdot\text{kg}^{-1}$ 时对小鼠脾淋巴细胞增殖、腹腔巨噬细胞吞噬功能均有明显的促进作用,体外给药浓度在 0.1~50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时对小鼠脾淋巴细胞增殖有直接的促进作用。对小鼠混合淋巴细胞反应也有明显的促进作用,CMP 还显著增强 ConA 及 LPS 活化的小鼠脾淋巴细胞的增殖反应及小鼠腹腔巨噬细胞吞噬中性红的作用。说明

CMP 体内外给药均可显著增强小鼠免疫功能。

2.3 保肝与催眠作用^[9] CMP 具有保肝作用, CMP 100mg/kg·d 与 200mg/kg·d 连续腹腔给药 5d, 小鼠血清谷丙转氨酶分别降低 27.32% 与 41.03%, 与生理盐水对照组比, $P < 0.05$ 与 $P < 0.01$ 。大鼠肝部分切除手术前按 100mg/kg·d 连续腹腔给药 4d, 手术后连续腹腔给药 3d。大鼠的肝再生度与再生肝重/体重分别增加 73.29% 与 18.95%, 与生理盐水对照组比, $P < 0.01$ 与 $P < 0.001$ 。CMP 具有催眠作用, CMP 100mg/kg·d 连续腹腔给药 7d, 能增强硫喷妥钠对小鼠中枢的抑制, 小鼠翻正反射消失持续的时间为硫喷妥钠对照组的 4.69 倍。与硫喷妥钠对照组比 $P < 0.05$ 。

2.4 抗衰老作用^[10] 茯苓多糖能不同程度增加血清中 TSOD 和 Cu SOD 活性, 降低 MDA 含量, 但对 MAO 活性则无明显影响。茯苓多糖还能延缓小鼠游泳死亡时间。说明茯苓多糖有较好的抗动物衰老作用。

2.5 抗单纯疱疹病毒作用^[11] 张信岳等观察 CMP 钠体外抗单纯疱疹病毒 3 型(HSV-1)的作用。方法采用细胞病变抑制试验法, 观察 CMP 钠对因感染 HSV-1 而引起的猪肾传代细胞病变的保护作用。结果发现在感染 10 和 100 TCID₅₀ (半数细胞培养感染量) 的 HSV-1 情况下, CMP 钠 2.0mg/mL 对 HSV-1 的致猪肾传代细胞的细胞病变 (CPE) 具有抑制作用, 在感染 HSV-110TCID₅₀ 的情况下, CMP 钠的 ID₅₀ 为 0.5 mg/mL。说明 CMP 钠在体外有抗 HSV-1 作用。

2.6 抗炎作用^[12] 茯苓多糖对棉球所致大鼠皮下肉芽肿形成有抑制作用, 同时小剂量下也能抑制二甲苯所致的小鼠耳肿。说明茯苓多糖具有抑制急慢性炎症反应作用。

2.7 防石、消石作用^[13] 陈焱等比较了茯苓多糖与消石素、五淋化石丹的防石作用。实验将 120 只雄性 Wister 成年大鼠分茯苓多糖、消石素、五淋化石丹和成石对照等 4 组, 每日喂以成石药乙二醇的同时, 分别以茯苓多糖、消石素、五淋化石丹和自来水灌胃, 4 周后处死取肾, 常规病理切片, 偏光镜下观察成石情况并摄影, 比较各组照片上草酸钙结晶面积。结果发现茯苓多糖、消石素及五淋化石丹组草酸钙结晶面积明显小于成石对照组 ($P < 0.01$); 茯苓多糖组草酸钙结晶面积显著小于消石素组 ($P < 0.01$), 虽小于五淋化石丹组但差异无显著性 ($P > 0.05$); 消石

素组与五淋化石丹组差异无显著性 ($P > 0.05$)。表明茯苓多糖、消石素及五淋化石丹均能抑制大鼠肾内草酸钙结晶的形成和沉积, 其强度为: 茯苓多糖 > 五淋化石丹 > 消石素。

2.8 抗病毒作用^[14] 用 100~1000 μ g/mL 浓度的 CMP 预处理人胚肺细胞 24h 后弃上清, 再加不同浓度的滤泡性口腔炎病毒 (VSV-Indiana 株), 于 37℃ 培养 24h, VSV-Indiana 在人胚肺细胞上所呈现的 CPE 情况, 与不加 CMP 的对照组比, 有明显的区别, 100 μ g/mL 为有效间接抗病毒浓度, 1000 μ g/mL 抗病毒效果更显著, 在人胚肌皮细胞与人胚肺细胞上所呈现的间接抗病毒作用是一致的。

3 安全性试验^[15]

无论是口服, 还是腹腔注射与静脉注射, 安全范围都较大。小鼠静脉注射 CMP 注射液, 按改良寇氏法, 测得 LD₅₀ 为 3.13g/kg。而犬长期毒性实验的高剂量组为 LD₅₀/10, 低剂量组为 LD₅₀/20, 连续静脉注射 3 个月, 均未发现毒性反应。CMP 的人拟临床给药途径是静脉注射, 最大剂量拟定为 2mg/kg·d, 可以推算人拟临床最大剂量的 78~156 倍是安全的。

鼠伤寒沙门氏菌致突变实验是经细菌为指示生物的体外实验, 遗传学终点为基因突变。在每皿中加入 CMP 的剂量在 0.5 μ g~5.0mg 范围内, 均能证明 CMP 为非致突变物。

小鼠骨髓多染红细胞微核实验的结果表明, 相当于人拟临床最大剂量的 125 倍 (250mg/kg) 无致突变的结果, 提示 CMP 为非致突变物。

大鼠致畸胎实验的结果表明, 相当于人拟临床最大剂量的 125 倍 (250mg/kg·d), 对妊娠大鼠无致畸胎的结果。

[参考文献]

- [1] 纪芳, 李鹏飞, 徐胜元, 等. 羧甲基茯苓多糖的制备及体内抗肿瘤作用的实验研究[J]. 中国微生态学杂志, 2003, 15(6): 333-334.
- [2] 潘琦, 贾向云, 罗天浩, 等. 茯苓皮提取茯苓多糖实验方法研究[J]. 云南中医学院学报, 1997, 20(3): 13-15.
- [3] 李俊, 韩向晖, 李仲洪, 等. 茯苓多糖的提取及含量测定[J]. 中国现代应用药学杂志, 2000, 17(1): 49-50.
- [4] 聂金媛, 吴成岩, 吴世容, 等. 微波辅助提取茯苓中茯苓多糖的研究[J]. 中草药, 2004, 35(12): 1346-1348.
- [5] 赵大明, 张秀军, 林志彬. 羧甲基茯苓多糖的抗肿瘤实验[J]. 福建中医药, 2002, 33(3): 38-40.

- [6] 淡新提, 王艺峰. 化学修饰的茯苓多糖抗肿瘤效应的组织学观察[J]. 武汉大学学报(医学版), 2004, 25(6): 652-654.
- [7] 杨吉成, 盛伟华, 张云, 等. 羧甲基茯苓多糖对 HPBL 分泌 IL-2 TNF JL-6 JFN- γ 的调节作用[J]. 中国免疫学杂志, 1997, 13(5): 293-295.
- [8] 张秀军, 徐俭, 林志彬. 羧甲基茯苓多糖对小鼠免疫功能的影响[J]. 中国药学杂志, 2002, 37(12): 913-916.
- [9] 陈春霞. 羧甲基茯苓多糖的保肝与催眠作用[J]. 中国食用菌, 2003, S1 期: 46-47.
- [10] 侯安继, 陈腾云, 彭施萍, 等. 茯苓多糖抗衰老作用研究[J]. 中药药理与临床, 2004, 20(3): 10-11.
- [11] 张信岳, 杨根元, 梁丽坚. 羧甲基茯苓多糖钠体外抗单纯疱疹病毒 3 型的作用[J]. 中药新药与临床药理, 2003, 14(3): 161-163.
- [12] 侯安继, 彭施萍, 项荣. 茯苓多糖抗炎作用研究[J]. 中药药理与临床, 2003, 19(3): 15-16.
- [13] 陈焱, 刘春晓, 张积仁. 茯苓多糖防石作用的实验研究[J]. 中华泌尿外科杂志, 1999, 20(2): 114-115.
- [14] 陈春霞. 羧甲基茯苓多糖研究进展[J]. 中国食用菌, 2005, 24(1): 17-20.
- [15] 叶聚荣, 林建峰, 林大杰, 等. 羧甲基茯苓多糖的安全性实验[J]. 福建中医药, 2003, 34(3): 27-31.