

安络小皮伞镇痛作用糖蛋白纯化方法研究

高阳¹, 杨献玲², 徐多多¹

(¹ 长春中医药大学研发中心, 长春 130117)

(² 吉林省食品药品检验所, 长春 130021)

安络小皮伞 (*Marasmius androsaceus*) 俗称鬼毛针, 是一种真菌, 属担子菌纲、伞菌目、白蘑科小皮伞属。为进一步了解安络小皮伞糖蛋白的纯化、制备方法^[1], 笔者对其进行不同方法的分离, 结合对小鼠的醋酸扭体抑制实验, 对各种分离方法的结果进行了比较, 为安络小皮伞的进一步开发利用提供依据。

1 仪器与材料

1.1 材料

安络小皮伞浸膏由吉林新华药业提供。葡萄糖标准品、标准牛血清蛋白、标准葡萄糖醛酸均为 Sigma 公司产品, 纯度为 99%。其余试剂均为国产分析纯。试剂甲、试剂乙为本实验室配制。大孔吸附树脂 D101 (国产); DEAE-Sephadex A-50, 为 Sigma 公司产品。

1.2 仪器

BSZ-100A 自动部分收集器; 752 紫外可见分光光度计; Mettler-Toledo 天平 AB204-N (梅特勒-托利多仪器上海有限公司); 德国 Christ Alpha-2 型冷冻干燥机; 气相色谱为温岭福立分析仪器公司 GC-9790 及 N-2000 双通道色谱工作站, 1%OV-225 不锈钢填充柱 (2mm×2m)。

2 实验方法

2.1 安络小皮伞糖蛋白的制备

安络小皮伞菌丝体发酵物加重蒸水热水浴搅拌, 离心, 残渣弃去, 合并上清液, 浓缩, 加乙醇至醇含量为 80%, 搅拌、静置过夜、离心, 醇沉部分干燥, 加水溶解, 离心, 上清液

冷冻干燥, 得安络小皮伞粗糖蛋白。

2.2 样品的分离

2.2.1 DEAE-Sephadex A-50 离子交换柱分离纯化浸膏多糖

取样品 10g 以 60mL 重蒸水溶解, 离心后上样, 分别以蒸馏水 0.2、0.4、0.8 mol/L NaCl 溶液洗脱, 合并各部分洗脱液, 浓缩, 冷冻干燥, 得到 4 部分样品, 收率依次为 19%、10%、8%、0.3% (除蒸馏水洗脱部分外, 其余各部分需经透析后再冷冻干燥)。

2.2.2 大孔树脂柱层析

取样品 50g 以 500mL 重蒸水溶解, 离心后上样, 分别以重蒸馏水、30%乙醇、60%乙醇、95%乙醇洗脱, 收集洗脱液, 回收乙醇, 浓缩后分别冷冻干燥得到 4 部分, 收率依次为 56.9%、19.2%、11.5%、0.1%。

2.3 样品理化性质的测定

样品以葡萄糖为标准品, 苯酚硫酸法测定总糖含量^[2]; 以牛血清白蛋白为标准品, Lowry 法测定蛋白质含量^[3]; 以葡萄糖醛酸为标准品, 间羟基联苯法测定糖醛酸含量^[4]。分子量分布采用高效液相色谱法进行了测定, 将样品用 0.7% 硫酸钠溶液溶解样品配置成 5mg/mL, 岛津液相色谱系统: 10AT-VP 泵, 示差折光检测器, 并采用 GPC 多糖专用软件处理; 单糖组成利用气相色谱法对样品的糖醇乙酸酯衍生物进行分析^[2]。

2.4 经超滤分离样品的分子量分布测定

采用高效液相色谱法对超滤分离的两部分样品分子量分布进行测定, 希望通过结合药理实验结果了解分子量的不同对活性的影响。

2.5 不同分离方法分离得到的样品镇痛实验

2.5.1 药品与仪器

样品为本实验室按照前述方法制备。阳性药为阿司匹林, 醋酸。动物: 昆明种小鼠 (清洁级), 体质量 18~22g, 雌雄兼用, 随机分组, 每组 10 只。

2.5.2 实验方法

表 1 不同分离方法得到的样品理化性质测定结果

样品	糖%	蛋白质%	糖醛酸%	组成糖种类	摩尔比
糖蛋白粗品经 DEAE 柱水洗部分	66.3	26.7	1.3	Glc:Man	4.5:1
糖蛋白粗品 DEAE 柱 0.2MNaCl 洗脱部分	46.3	48.2	1.2	Glc:Man	10:1
糖蛋白粗品经 DEAE 柱 0.4M NaCl 洗部分	31.1	64.5	0.8	Glc:Man	5.8:1
糖蛋白粗品经 D101 树脂柱水洗部分	70.1	37.1	1.9	Glc:Man	6.5:1
糖蛋白粗品经 D101 树脂柱 30% 醇洗部分	63.3	44.5	1.1	Glc:Man	11.2:1.0
糖蛋白粗品经 D101 树脂 60% 醇洗部分	50.2	63.2	1.4	Glc:Man	10.5:1.0
糖蛋白粗品经超滤器分离浓缩液部分	38.3	65.8	1.2	Glc:Man	10:1
糖蛋白粗品经超滤器分离超滤液部分	64.7	32.1	2.7	Glc:Man	13:1

实验结果表明, 各部分样品糖醛酸很低, 主要是由糖和蛋白构成的糖蛋白类物质, 其中糖蛋白部分中的糖主要由葡萄糖和甘露糖组成。

3.2 超滤样品分子量分布的测定

浓缩液分子量 23018, 为 90%; 超滤液分子量 770, 为 54%。

3.3 镇痛实验

见表 2~表 4。

表 2 不同分离部分对乙酸导致小鼠扭体反应的影响

($\bar{x} \pm s$, n=10)

组别	剂量/ (g/kg)	20 min 扭体次数
模型组	—	20.3±3.157
阳性药组	1	15.4±1.869
DEAE 水洗部分	0.224	13.6±2.022
DEAE 0.2MNaCl	0.268	12.7±2.077

表 2 表明, 不同洗脱部分均具有明显的镇痛作用, 镇痛作用基本相同。

表 3 D101 树脂柱分离各部分对乙酸导致小鼠扭体

小鼠禁食(自由进水)24h 后, 按照表中所述剂量, 灌胃给予受试药物连续 10d 后, 再腹腔注射 0.6%醋酸 0.2mL/只, 观察记录注射醋酸后 20min 内小鼠扭体次数。

3 实验结果

3.1 不同方法分离得到的样品理化性质的测定, 见表 1。

反应的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=10)

组别	剂量/ (g/kg)	20 min 扭体次数
模型组	—	20.9±2.243
阳性药组	0.148	11.0±1.489
水洗部分组	0.148	16.9±3.683
30%醇洗部分组	0.148	12.7±1.491
60%醇洗部分组	0.148	11.2±1.428

表 3 表明, 30%和 60%乙醇洗脱部分均具有明显的镇痛作用, 水洗脱部分与醇洗脱部分相比活性较弱。

表 4 浓缩液、超滤液对乙酸导致小鼠扭体反应的影响

($\bar{x} \pm s$, n=10)

组别	剂量/ (g/kg)	20 min 扭体次数
模型组	—	16.1±3.157
阳性药组	0.148	9.4±1.869
浓缩液组	0.074	8.8±2.022
超滤液组	0.148	9.7±2.077

表 4 表明, 超滤液和浓缩液均具有明显的镇痛作用。

4 小 结

本实验研究结果为进一步开发和利用安络小皮伞奠定了一定的基础:

1)3种方法均可对安络小皮伞糖蛋白部分起到分离和纯化的作用,通过离子交换柱层析的方法和通过超滤的方法均可将安络小皮伞糖蛋白部分按照携带电荷的不同或分子量大小不同进行分离。但是所得到的各个部分虽然携带电荷不同或分子量不同,但均具有相似的镇痛作用。

2)通过大孔树脂柱层析的方法可将安络小皮伞糖蛋白部分分离得到不同极性的部分,极性最大的水洗脱部分活性很弱,但极性较小的部分具有很高的活性,说明可通过该方法有效富集有效部分,使活性成分更加集中。水洗脱的部分糖蛋白极性大,但活性较弱,随着极性

的增加,安络小皮伞糖蛋白镇痛作用有所降低。

3)在一定的范围内,糖的含量、蛋白的含量以及不同的分子量,对安络小皮伞糖蛋白的镇痛作用无明显影响。表明多种糖蛋白均具有镇痛作用。

参考文献

- [1] Isolation G Q, characterization of glycopeptides with analgesic activities from *Marasmius androsaceus* [M]. *Carbohydrate polymers*, 2012.
- [2] 张惟杰.糖复合物生化研究技术[M].杭州:浙江大学出版社,1999:11-12,40.
- [3] Li j w, Xiao N G, Yu R Y, et al. Theories and Methods of Biochemical Experiment [M]. Beijing: peking university press,1994: 160-176.
- [4] Nelly B K, Gustar A H. New method for quantitative determination of uronic acid [J]. *Anal Biochem*, 1973 (54) : 484-487.

