

安络小皮伞菌丝体活性多糖筛选及其 化学结构研究 (摘要)

陈南 指导教师: 金向群, 高其品, 姜瑞芝

(吉林大学, 药物化学专业, 吉林长春)

本实验对具有显著镇痛作用药用真菌安络小皮伞菌丝发酵物中多糖进行提取和纯化并对各部位群进行理化性质、平均分子量、单糖组成分析、小鼠扭体镇痛药理活性实验, 并对一个部位群进行多糖结构分析。方法采用水提 80%乙醇纯析的方法从安络小皮伞菌丝发酵物中提取多糖类成分 MAEP 并采用弱碱性阴离子交换剂 DEAE Sephadex A-50, 分子量 5000 中空纤维超过滤器、D101 大孔树脂, 3 种方法对其进行进一步的纯化, 然后对分离出的多个部位群采用分光光度法进行理化性质测定、采用示差折光检测器和高效液相色谱仪进行平均分子量测定、采用气相色谱仪以酸水解衍生法进行单糖组成分析, 然后对他们进行药理实验来考查他们对乙酸导致小鼠扭体反应的抑制作用, 最后对分离出的一个多糖部位群 (MAEP_{3b}) 采用 GC-MS 以部分甲基化部分乙酰化法进行结构研究。结果表明 MAEP 对乙酸导致小鼠扭体反应的抑制作用与原料药 (安络小皮伞菌丝发酵物) 相比有显著性差异, MAEP_{3b} 的总糖、蛋白、糖醛酸含量分别为 63%、44%、1.1%; 分子量主要分布于 19180—187, 分子量 2891 所占比例最大为 32.3%; MAEP_{3b} 的单糖组成 (摩尔比) 为: Man: Glu: Gal=3.4 : 36.2: 1.0; MAEP_{3b} 主链骨架是 1→2、1→3、1→4、1→6 连接的 Glu, 1→4 连接 Man, 1→2 连接的 Gal; 并在 1→4 连接的 Glu 的 6 位或 1→6 连接 Glu 的 4 位以及 Man 的 3 位有分支; 以 Glu 为末端。

1 安络小皮伞

1.1 生物学特征

安络小皮伞 [*Marasmius androsaceus* (L.ex Fr.) Fr.] 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。多生于深山密林, 阴凉潮湿, 近水酸性土上面的枯枝, 枯木或竹枝上, 是一种有较高价值的中药。它的皂甙部分已作为医药“安络痛”生产。

安络小皮伞做为工业原料, 主要是采用液体或固体发酵法人工培养。用甘蔗渣、麸皮或米糠为基质进行固体培养取菌丝体连同基质干燥备用。其化学成分有甘露醇、胆甾醇醋酸酯、氨基酸、对羟基肉桂酸、麦角甾醇、及糖类和蛋白类成分等。

其固体培养的菌丝可治疗多种神经痛、风湿痛、神经炎和类风湿性关节炎等疾病, 均取得显著疗效。以安络小皮伞为主要原料制成的中成药痛宁、安络痛, 很久以来都是被广大患者所认可的镇痛疗效确切, 效果持久的良药^[34]。

1.2 目前现状

安络小皮伞镇痛具有起效慢(3~5 天), 药效较长的特点。有报道指出, 其水提醇沉物很可能是安络小皮伞长效镇痛的有效部分。市售的“安络痛”和“安络解痛片”均由安络小皮伞制成。“安络痛”由菌丝体经乙醇提取制成, 而“安络解痛片”则由菌丝体连同培养基质的粗提物制成。安络小皮伞中具有镇痛作用的物质有对羟基肉桂酸、三十碳酸、麦角甾醇、萜内酯类化合物和皂甙等, 它们都是醇溶性物质。对羟基肉桂酸镇痛起效快、时效短,

同“安络痛”和“安络解痛片”的临床镇痛特点不相吻合。我国市场上以安络小皮伞干菌体为原料制得的药品有安络痛片。尽管该制剂对坐骨神经痛, 三叉神经痛, 风湿性关节炎等显示出良好的疗效, 但对其有效成分的提取、分离、纯化方法及活性成分的基本化学组成等问题仍未得到解决, 长期以来一直制约着该原料药的开发利用。有实验证明, 其水提醇沉物可能是长时效镇痛的有效成分^[34]。

2 安络小皮伞菌丝体多糖的活性试验

2.1 MAEP 对乙酸导致小鼠扭体反应的抑制作用

2.1.1 实验方法

小鼠禁食(自由进水)24h 后, 按个组分提取收率灌胃给予受试药物连续 10 天后, 再腹腔注射 0.6%醋酸 0.2ML/只。观察记录注射醋酸后小鼠 20Min 内小鼠扭体次数。

2.1.2 结果

表 1 MAEP 对乙酸导致小鼠扭体反应的影响

样品	剂量(g/kg)	小鼠个数(n)	20min 扭体次数
模型组	—	10	25.5±4.192
阳性药组	2	10	16±3.122
水提取沉淀组	0.628	10	17.2±4.092
水溶 80%乙醇溶组	1	10	19.33±3.894
MAEP 水提沉淀组	0.112	10	12.7±2.582*
MAEP 溶于水组	0.148	10	12.4±1.102*

注: 阳性药为安络小皮伞菌丝体发酵物; *与阳性药组比较 P<0.05

表 1 实验结果表明, MAEP 水提沉淀组、MAEP 溶于水组对乙酸导致小鼠扭体反应有抑制作用与阳性药组相比有显著性差异, 即 P<0.05。

2.2 MAEP_{2a}、MAEP_{2b} 对乙酸导致小鼠扭体反应的抑制作用

表 2 MAEP_{2a}、MAEP_{2b}对乙酸导致小鼠扭体反应的抑制作用

样品	剂量(g/kg)	小鼠个数(n)	20min 扭体次数
模型组	—	10	16.1±3.157
阳性药组	0.148	10	9.4±1.869
MAEP _{2a} 组	0.074	10	8.8±2.022
MAEP _{2b} 组	0.148	10	9.7±2.077

注: 阳性药为 MAEP。

表 2 实验结果表明, MAEP_{2a}、MAEP_{2b}组部与阳性药对乙酸导致小鼠扭体反应的抑制作用相比无显著性差异, 实验证明按 5000 分子量截流并不能准确分离出 MAEP 中更强的活性位点。但通过理化性质结果可以发现 MAEP_{2a}、MAEP_{2b}的总糖含量是逐渐升高的, 而活性却是逐渐减弱的, 因此可以推断 MAEP 中的活性成分可能是蛋白类或糖蛋白。

2.3 MAEP_{3a}、MAEP_{3b}、MAEP_{3c} 对乙酸导致小鼠扭体反应的抑制作用

2.3.1 实验方法

小鼠禁食(自由进水)24h 后, 各组分按 0.148g/kg 连续灌胃给予受试药物 10 天后, 再腹腔注射 0.6%醋酸 0.2ML/只。观察记录注射醋酸后小鼠 20min 内小鼠扭体次数。

2.3.2 结果

表 3 MAEP_{3a}、MAEP_{3b}、MAEP_{3c}对乙酸导致小鼠扭体反应的影响

样品	剂量(g/kg)	小鼠个数(n)	20min 扭体次数
模型组	—	10	20.9±2.243
阳性药组	0.148	10	11.0±1.489
MAEP _{3a} 组	0.148	10	16.9±3.683
MAEP _{3b} 组	0.148	10	12.7±1.491
MAEP _{3c} 组	0.148	10	11.2±1.428

注: 阳性药为 MAEP

表 3 实验结果表明, MAEP_{3a}、MAEP_{3b}、MAEP_{3c}部分与阳性药对乙酸导致小鼠扭体反应的抑制作用相近没有显著差异。实验证明以

对 D101 大孔树脂吸附能力并不能准确分离出 MAEP 中更强的活性位点。但经理化测定结果可知, MAEP_{3a}、MAEP_{3b}、MAEP_{3c} 的总糖含量是逐渐降低的, 而他们的活性却是逐渐增强的, 因此 MAEP 中活性成分可能是蛋白类或糖蛋白。

3 讨论

1、三次药理实验结果表明 MAEP 的活性与安络小皮伞菌丝发酵物相比有显著差异

($P < 0.05$)。

2、按照分子量 (5k) 及按照对大孔树脂 (D101) 的吸附程度对 MAEP 的分离并不能准确找到比 MAEP 活性更强的作用位点, 因此需要进一步实验摸索 MAEP 的活性位点。

3、通过对采用中空纤维素 (分子量 5K) 和大孔树脂 (D101) 分离的样品的理化性质比较发现, 随着总糖含量的升高, 活性反而逐渐下降。

因此 MAEP 中对乙酸导致小鼠扭体反应的抑制作用的活性成分可能是蛋白类或糖蛋白。
