

安络小皮伞菌糖肽理化性质与镇痛作用

高阳¹, 杨献玲², 徐多多²

(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。也是一种用于治疗多种疼痛的中药, 商品名称为安络痛。研究表明^[1-3], 其镇痛作用为有机酸和甾醇类化合物^[1-3]。笔者对其有效部位进行了筛选, 发现其水提醇沉淀物具有长时效镇痛作用, 并对该有效部位进行分离、纯化, 通过甲基化等方法, 研究其理化性质和化学结构, 确定其镇痛作用的物质基础, 为安络小皮伞菌的进一步开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

安络小皮伞菌丝体发酵物由吉林省新华药业提供。DEAE.Sephadex A-50, Sephadex G-100, 标准单糖 Fuc(岩藻糖)、Rha(鼠李糖)、Am(阿拉伯糖)、Xyl(木糖)、Man(甘露糖)、Gal(半乳糖)、Glu(葡萄糖)、葡萄糖醛酸(GlcA)、牛血清蛋白均为 Sigma 公司产品。其余试剂均为国产分析纯。蛋白质测定用试剂甲、乙为本实验室配制。大孔吸附树脂 D101 为天津大学生产。

1.2 实验方法

1.2.1 样品的制备

安络小皮伞菌丝体发酵物加 5 倍量水溶解, 离心, 重复此操作 4 次, 残渣干燥(R), 上清液合并, 浓缩至小体积, 加 95%乙醇至醇浓度达到 80%, 静止过夜, 离心, 沉淀冷冻干燥(样品 P), 上清液回收乙醇, 得到醇溶性小分子部分(S)。

1.2.2 理化性质的分析

样品总糖、蛋白质、糖醛酸含量测定分别以葡萄糖为标准品, 以苯酚硫酸法测定总糖含量^[4]; 以牛血清白蛋白为标准品, 用 Lowry 法测定蛋白质含量^[5]; 以葡萄糖醛酸为标准品, 间羟基联苯法测定糖醛酸含量^[6]。分子量分布采用高效液相色谱法进行测定^[4]。

1.2.3 对醋酸导致小鼠扭体的抑制作用实验

昆明种小鼠(清洁级), 购自吉林大学, 合格证号为 SCXK(吉)2008-0005, 体质量 18-22 g, 雌雄兼用, 随机分组。样品以水溶解后各组小鼠每天灌胃给药 1 次, 模型对照组给与等体积的水, 连续 10 d, 正常进食。末次给药 1 h 后, 每只小鼠腹腔注射 0.6%的醋酸, 观察小鼠 20 min 内的扭体次数。

1.2.4 大孔树脂柱层析

样品 P 以水溶解, 离心后上样, 分别以水(D1)、30%乙醇(D2)、60%乙醇(D3)、95%乙醇(D4)洗脱, 收集洗脱液, 回收乙醇, 浓缩后分别冷冻干燥得到 D1、2、3、4 等 4 个部分。

1.2.5 D2 部分的纯化

样品 D2 200mg, 以水溶解后在 Sephadex G-100 凝胶色谱柱(60cm×4cm)进行柱层析。每 6mL 为 1 个流分收集洗脱液, 测定其中的糖(酚-硫酸法)和蛋白质(UV 280 nm)含量, 对洗脱流份作图, 根据洗脱曲线合并 12~25 管(D2H)和 26~58 管(D2L), 冻干, 得到纯化糖肽。

1.2.6 纯化样品的结构分析^[8]

采用 Hakomori 法(箱守法), 利用 GC-MS 检测: HP-5 石英毛细管柱为 30mm×0.25 mm, 进样口温度 250℃。柱温 120℃保持 5min, 5℃/min 升到 220℃, 在 220℃保持

20min。进样量为 0.2 μ L。采用美国 FINGAN 公司的 Xcalibur 数据处理系统。红外光谱在 Spectrum 红外光谱仪测定。

2 结果

2.1 糖蛋白部分的提取和性质分析

安络小皮伞菌丝体粗糖肽中的糖部分是由葡萄糖和甘露糖组成, 摩尔比为 1: 9.2。氨基酸分析结果表明, 其中含有 10 种氨基酸(在样品中的百分含量)Glu(6.12%), Asp(10.10%), Hyp(2.19%), Ser(3.46%), Arg(2.01%), Gly(3.02%), Thr(0.30%), Pro(1.33%), Leu(2.21%) and Lys(0.67%)。

2.2 糖蛋白的分离和理化性质分析 见表 1。

表 1 不同糖蛋白理化性质分析结果

样品	总糖含量/%	蛋白质含量/%	糖醛酸含量/%	组成糖/(Man:Glc)	主要峰的分子量/D
D1	70	37	1.9	1:10.0	1, 800
D2	63	44	1.1	1:11.2	15, 000
D3	50	63	1.4	1:10.5	5, 700

2.3 对醋酸导致小鼠扭体的抑制作用实验 见表 2。

2.4 糖蛋白的纯化和糖苷键分析 见表 3。

表 2 各样品对乙酸导致小鼠扭体反应的影响(n=10)

样品	剂量/ (g/kg)	20 min 扭体次数
模型组	—	25.50 \pm 4.192 [#]
阳性药组	0.6	15.40 \pm 1.869
R	0.6	23.87 \pm 3.821
P	0.2	12.70 \pm 2.582 [#]
S	0.2	20.80 \pm 1.924
D1	0.2	16.10 \pm 3.683
D2	0.2	12.10 \pm 1.491 [#]
D3	0.2	11.20 \pm 1.428 [#]
D2H	0.2	12.30 \pm 1.320
D2L	0.2	11.50 \pm 1.180

注:与模型组比较, [#]p<0.05。

表 3 D2H 和 D2L 中糖苷键连接方式

糖基残基	分段	配置	摩尔比率	
			D2H	D2L
Glc	2, 3, 4, 6-Me ₄	1 \rightarrow	8.2	10.5
Glc	3, 4, 6-Me ₃	1 \rightarrow 2	7.4	6.1
Glc	2, 4, 6-Me ₃	1 \rightarrow 3	4.2	7.9
Glc	2, 3, 6-Me ₃	1 \rightarrow 4	47.3	42.8
Glc	2, 3, 4-Me ₃	1 \rightarrow 6	21.5	15.6
Man	2, 3-Me ₂	1 \rightarrow 4, 6	5.3	6.4
Man	2, 3, 6-Me ₃	1 \rightarrow 4	2.6	3.5
Man	2, 6-Me ₂	1 \rightarrow 3, 4	3.8	4.7
Gal	2, 3, 6-Me ₃	1 \rightarrow 2	—	2.6

3 讨论

镇痛实验结果表明, 安络小皮伞菌丝体中分离得到的糖蛋白类成分具有镇痛作用, 该部分含量占菌丝体的 20%以上, 是其镇痛作用的药效物质基础。分离得到的样品 P 为组成复杂的糖蛋白, 经过大孔树脂分离后, 得到的各样品糖和肽的含量有所不同, 组成糖相同但其摩尔比例不同; 表明安络小皮伞糖肽中多种糖肽具有镇痛作用; 通过凝胶柱层析分离得到的纯化糖肽-D2H 和 D2L 具有明显的镇痛作用, 进而证明糖肽类成分是安络小皮伞镇痛作用的有效成分。对纯化糖肽的糖部分进行的分析表明, 该糖蛋白中糖的部分无论分子量大小, 均是由 1-4 连接 Glc 为主链, 在其 6 位连接由 Glc、Man 和 Gal 构成的侧链; 肽部分是由 10 种氨基酸组成; 该镇痛作用可能来自这些糖肽均具有的共性结构部分。

参考文献

- [1] 戴芳澜.中国真菌总汇[M].北京:科学出版社, 1979: 532-534.
- [2] 方圣鼎, 张振德, 陈嫌, 等.安络小皮伞中的镇痛成分[J].中草药, 1989, 20(10):2-4.
- [3] 陈西广, 张翼伸.安络小皮伞中水溶性多糖的研究[J].真菌学报, 1990(2):155.160.
- [4] 张惟杰.糖复合物生化研究技术[M].2 版.杭州:浙江大学出版社, 2003:1-259.
- [5] 李建武, 萧能庚, 余瑞元.生物化学实验原理方法[M].北京:北京大学出版社, 1994.

