

· 基础研究 ·

发酵虫草菌粉多糖成分的理化性质及其对 ConA 抑制 L-O₂ 细胞增殖活性的影响蒋洪亮¹, 麻浩², 何丽芳², 赵修南², 单俊杰^{2*}, 王海南^{1,3*}

(1. 贵州大学 药学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 军事科学院 军事医学研究院 毒物药物研究所, 北京 100850;

3. 国家药品监督管理局, 北京 100053)

[摘要] 目的: 将发酵虫草菌粉(Cs-4)粗多糖进行分离纯化, 并观察纯化产物对 ConA 抑制人正常肝细胞(L-O₂ 细胞株)增殖活性的拮抗作用。方法: 发酵虫草菌粉(Cs-4)通过水提醇沉、复溶、透析、浓缩、冷冻干燥得粗多糖, 采用 DEAE-纤维素离子交换、sephadex-G-100 柱色谱分离纯化粗多糖, MTT 法检测细胞增殖活性。结果: 发酵虫草菌粉(Cs-4)粗多糖经分离纯化得到均一成分, 命名为 CSMP-60-B-I。高效凝胶渗透色谱法测得其相对峰高分子量为 32 336 Da。毛细管电泳测得单糖组成为木糖-阿拉伯糖-葡萄糖-半乳糖-甘露糖(0.09:0.20:1.00:3.70:3.58)。高浓度 ConA 能抑制 L-O₂ 细胞增殖, 而加入 CSMP-60-B-I 后, 这种抑制作用大大减弱。结论: 发酵虫草菌粉(Cs-4)粗多糖的分离纯化产物 CSMP-60-B-I 对 ConA 抑制 L-O₂ 细胞增殖活性有拮抗作用, 提示其可能有保肝作用。

[关键词] 发酵虫草菌粉; 多糖; 分离纯化; 肝细胞

Physicochemical Properties of Homogeneous Polysaccharide Extracted from Fermented Cordyceps Powder and Its Antagonism of Inhibition Effect on Cell Proliferation Activity of L-O₂

JIANG Hong-liang¹, MA Hao², HE Li-fang², ZHAO Xiu-nan², SHAN Jun-jie^{2*}, WANG Hai-nan^{1,3*}

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China;

2. Institute of Pharmacology and Toxicology, Institute of Military Medicine,

Academy of Military Sciences, Beijing 100850, China;

3. China Drug Administration, Beijing 100053, China)

[Abstract] **Objective:** To isolate and purify the total polysaccharides extracted from fermented Cordyceps powder (Cs-4) and observe the antagonism of inhibition effect on cell proliferation activity of L-O₂. **Methods:** The fermented Cordyceps powder(Cs-4) was extracted with water at 60 °C and precipitated with ethanol, then redissolved, dialyzed, concentrated and lyophilized to obtain the total polysaccharides. The total polysaccharides were fractionated by a DEAE-cellulose column. The cell proliferation activity of L-O₂ was detected by MTT. **Results:** The total polysaccharides extracted from fermented Cordyceps powder(Cs-4) were fractionated to obtain homogeneous polysaccharide named CSMP-60-B-I. The relative peak molecular weight of CSMP-60-B-I was 32 336 Da, determined by high performance gel permeation chromatography. The composition of monosaccharides and molar ratios were xylose-arabinose-glucose-galactose-mannose(0.09:0.20:1.00:3.70:3.58), determined by capillary electrophoresis. The results showed that ConA in high concentration could inhibit the cell proliferation activity of L-O₂ *in vitro*. After the addition of CSMP-60-B-I, the inhibiting effect was greatly reduced. **Conclusion:** CSMP-60-B-I may have the effect of reducing inhibition of cell proliferation activity of L-O₂ by ConA in high concentration, implicating that CSMP-60-B-I might have hepatoprotective effect.

[Keywords] Fermented Cordyceps powder; polysaccharide; isolation and purification; hepatocyte

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20171103007

发酵虫草菌粉(Cs-4)是由我国科技人员从天然冬虫夏草分离获得 Cs-4 菌株, 经人工发酵培养制成。已有文献报道将其用于肝病的治疗, 作为补益类药物, 推测多糖可能是其主要的药效物质之一。为此,

将发酵虫草菌粉(Cs-4)粗多糖进行一系列分离纯化, 获得均一成分 CSMP-60-B-I, 对其理化性质及其对 ConA 抑制人源肝细胞增殖活性的拮抗作用进行了初步研究。

* [通信作者] 单俊杰, 研究员, 研究方向: 中药多糖化学及生物活性; E-mail: shanjunjie0012@126.com
王海南, 研究员, 研究方向: 药物化学; E-mail: md_wanghainan@126.com

1 仪器与材料

1.1 仪器

UV-2000 紫外分光光度计(上海龙尼柯仪器有限公司); 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司 Delta 600, 2414 示差检测器); 分析天平(Ohaus 公司); LGJ-25 C 冷冻干燥机(北京四环冻干机厂); DZF-6020 真空干燥箱(上海一恒科技有限公司); QL-861 涡旋振荡器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); MCO-15AC 孵育箱(SANYO 公司); 3001 闪烁扫描酶标仪(Thermo 公司); BSZ-100 型自动部分收集器(上海青浦沪西仪器厂); Beckman P/ACE™ MDQ Capillary Electrophoresis System(美国贝克曼库尔特公司)。

1.2 材料

发酵虫草菌粉(Cs-4, 江西国药有限责任公司, 批号: Z10890021)。二乙胺基乙基纤维素(DEAE-Cellulose, 上海恒信化学试剂有限公司); Sephadex G-100(Pharmacia 公司); 单糖、葡萄糖标准品(Sigma 公司); 峰高分子量为 6000、 1.04×10^4 、 4.0×10^4 、 6.6×10^4 和 2.0×10^5 Da 的葡聚糖(Sigma 公司); 三氟乙酸(TFA, 99%, ACROS ORGANIC 公司); 1-苯基-2-甲基-4-吡唑啉酮(PMP, 99%, Aldrich 公司); 人正常肝细胞株 L-O₂(军事医学科学院毒物药物研究所李前教授惠赠); DMEM 培养液(Gibco 公司); RPMI-1640 液(Gibco 公司); 胎牛血清(FBS, 浙江天杭生物科技有限公司); 胰蛋白酶(Amresco 公司); 噻唑蓝(MTT, Amresco 公司); 刀豆蛋白 A(Concanavalin, ConA, Sigma 公司); 十二烷基硫酸钠(SDS, Amresco 公司); 其他试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 多糖 CSMP-B-1 的制备

称取发酵虫草菌粉 1 kg, 加 15 L 去离子水, 置于 60 °C 水浴中加热提取 4 h, 然后多层纱布滤过, 滤渣在相同条件下再重复提取 1 次。合并滤液, 离心($3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min), 上清液 50 ~ 55 °C 减压浓缩, 浓缩液加入 3 倍体积 95% 乙醇水, 静置醇沉 48 h。离心($3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min), 分离沉淀, 沉淀部分多次加入去离子水重复溶解多糖, 离心($3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 20 min)得上清液, 膜透析上清液 72 h, 以除去小分子杂质。将袋内透析液离心, 上清液减压浓缩后, 进行冷冻干燥, 得到发酵虫草菌粉粗多糖 CSMP-60^[1-3]。

称取 CSMP-60 粗多糖 1 g, 加入 20 mL 水, 置于 60 °C 水浴中加热溶解, 离心, 沉淀再重复操作 1 次。合并上清液上样 DEAE-纤维素色谱柱(6.0 cm × 30 cm), 依次采用 H₂O、0.25 和 0.5 mol·L⁻¹ NaHCO₃ 洗脱, 苯酚-硫酸法检测含糖组分^[6], 收集 0.25 mol·L⁻¹ NaHCO₃ 洗脱的含糖组分, 水透析脱盐、浓缩和冷冻干燥获得多糖组分 CSMP-60-B。CSMP-60-B 再经过 Sephadex-G-100 柱进一步分离和纯化, 最终获得分子量均一多糖 CSMP-60-B-1^[4,6]。

2.2 CSMP-B-1 的理化性质测定

2.2.1 纯度鉴定和峰高分子量测定 用高效凝胶渗透色谱(HPGPC)方法, 以 TSK gel-G3000 PWXL (7.8 mm × 300 mm) 为色谱柱。流动相: 0.1 mol·L⁻¹ Na₂SO₄ 溶液; 进样体积: 20 μL; 柱温箱温度: 35 °C; 检测器为 2414 示差检测器和 2998 紫外检测器。分别准确称取 5 mg 峰高分子量为 6000、 1.04×10^4 、 4.0×10^4 、 6.6×10^4 和 2.7×10^5 Da 的葡聚糖标准品, 分别加入 500 μL 0.1 mol·L⁻¹ Na₂SO₄ 溶解, 0.22 μm 水系微孔滤膜过滤。滤液上样。采用 Waters Empower 2.0 GPC 软件处理实验数据, 以标准葡聚糖的保留时间(t_R)为横坐标, 分子量的对数(lg Mp)为纵坐标, 绘制多糖分子量的标准曲线。

准确称取 5 mg 多糖 CSMP-60-B-1, 同样加入 500 μL 0.1 mol·L⁻¹ Na₂SO₄ 溶解、过滤和进样。根据样品峰形状和保留时间, 判断多糖纯度和计算其峰高分子量^[7]。

2.2.2 单糖组成测定 CSMP-B-60-1 完全酸水解: 称取 5 mg CSMP-B-60-1, 加入 5 mL 三氟乙酸(TFA), 密封后置于 120 °C 烘箱中加热 2 h 进行完全酸水解反应。水解液再多次加入甲醇, 反复减压蒸除残留的三氟乙酸。待进行 PMP 衍生化。

单糖 PMP 衍生化^[8-10]: 准确称取单糖标准品(氨基葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、葡萄糖、鼠李糖、岩藻糖、半乳糖、甘露糖、葡萄糖醛酸和半乳糖醛酸)各 10 mg, 加 5 mL 超纯水溶解, 涡旋混匀。取 40 μL 标准单糖混合液于试管中, 依次加入 600 μL 0.3 mol·L⁻¹ 氢氧化钠和 600 μL 0.5 mol·L⁻¹ PMP-甲醇溶液(现用现配)。涡旋混匀, 在 70 °C 水浴中反应 30 min, 取出自然冷却至室温。缓慢加入 600 μL 0.3 mol·L⁻¹ 盐酸, 使溶液 pH 为 7。加 1 mL 三氯甲烷萃取, 向水相继续加入 1 mL 三氯甲烷, 重复萃取 2 次, 合并水相, 水相经 0.22 μm 滤膜滤过, 进毛细管电泳分析。CSMP-B-60-1 完全酸水解产物也按

相同的 PMP 衍生方法, 制备单糖衍生物, 然后进行毛细管电泳分析。

毛细管电泳条件: 缓冲盐溶液为 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼砂溶液 ($\text{pH} = 10.57$); 毛细管柱为 $\Phi 50 \mu\text{m} \times 60 \text{ cm}$; 分离电压为 15 kV ; 检测波长为 245 nm ; 进样压力为 0.5 psi ($1 \text{ psi} = 6.895 \text{ kPa}$); 进样时间为 10 s ; 柱温为 25°C 。

2.3 细胞培养

细胞常规传代培养条件: 从液氮冷冻保存的容器中取出 L-O_2 细胞株, 经常规处理后接种入添加含 10% FBS 的 DMEM 液的玻璃瓶中, 放于 37°C 、 $5\% \text{ CO}_2$ 、饱和湿度的孵育箱静置培养。3~4 d 传代 1 次, 传代时弃去培养上清液, 用 PBS 淋洗 1 次, 经 0.125% 胰酶和 0.01% EDTA- Na_2 的混合液消化后, 以含 10% FBS 的 DMEM 液制成细胞悬液, 按 1:3 传代培养扩增, 备用。

2.4 MTT 法检测细胞增殖活性

实验设正常组、ConA 模型组和多糖组, 每组设平行 6 复孔。取对数生长期 L-O_2 细胞, 经消化处理后, 以 10% FBS 的 DMEM 液制成单细胞悬液, 用 Trypan blue 液染色, WBC 计数法计数活细胞总数, 接种入 96 孔细胞培养板, 密度为 $1 \times 10^4/\text{孔}$, 培养箱孵育贴壁 5 h。然后各多糖组分别加入用 RPIM-1640 液配制的使其终质量浓度为 10 、 50 、 $250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的多糖 (具有均一分子量) 溶液。ConA 模型组和多糖组再加入用 RPIM-1640 液配制的 ConA 溶液 ($500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。按常规静置共孵育 72 h。MTT 显色法检测: 向含有培养物的 96 孔板每孔加入 0.5% MTT 液 $20 \mu\text{L}$, 继续于孵育箱培养 4 h, 去上清液, 加入 10% SDS 液 $200 \mu\text{L}/\text{孔}$, 37°C 温箱过夜后在闪烁扫描酶标仪上 570 nm 波长检测吸光度 (A) 值^[11]。

2.5 统计学方法

实验结果数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 采用 SPSS 13.0 统计软件进行 one-way ANOVA 方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 多糖组分

粗多糖经过 DEAE-纤维素柱洗脱后, 得 3 个洗脱峰, 从左至右分别命名为 CSMP-60-A (去离子水洗脱), CSMP-60-B ($0.25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$ 洗脱), CSMP-60-C ($0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$ 洗脱), 结果见图 1。

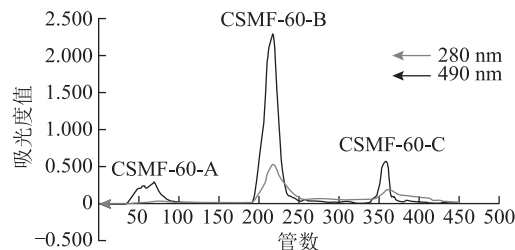


图1 CSMP-60 在 DEAE-纤维素柱洗脱曲线

CSMP-60-B 进一步用 Sephadex-G-100 纯化, 用苯酚-硫酸法测定 $\lambda = 490 \text{ nm}$ 的吸收峰, 用 $\lambda = 280 \text{ nm}$ 检测非糖物质的吸收峰。最终 CSMP-60-B 组分经过凝胶柱色谱分离得到单一峰, 收集 43 管至 63 管, 得到 CSMP-60-B-I, 结果见图 2。

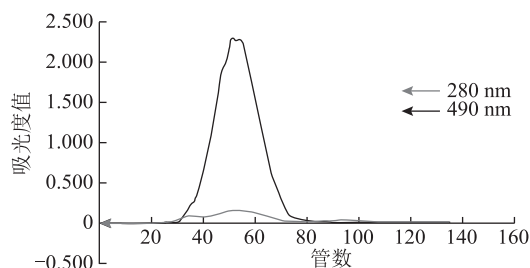


图2 CSMP-60-B 在 Sephadex G-100 柱洗脱曲线

3.2 多糖纯度及峰高分子量

运用高效凝胶渗透色谱法测得 CSMP-60-B-I 峰高分子量 $32\ 336 \text{ Da}$, 而且峰型为单一对称峰, 结果见图 3。

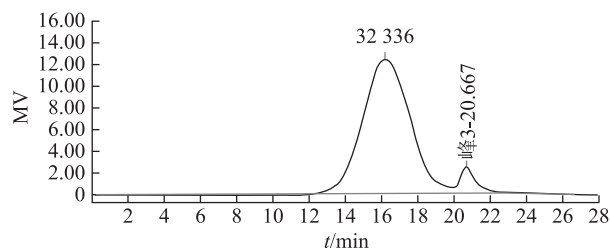


图3 CSMP-60-B-I 的高效凝胶渗透色谱图

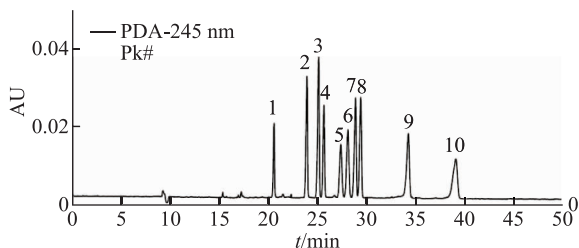
3.3 单糖组成

运用毛细管电泳测得 CSMP-60-B-I 的单糖组成及比例为木糖-阿拉伯糖-葡萄糖-半乳糖-甘露糖 ($0.09:0.20:1.00:3.70:3.58$)。标准单糖混合物和 CSMP-60-B-I 单糖混合物的 CE 图谱分别见图 4 和图 5。

3.4 CSMP-60-B-I 对 ConA 抑制 L-O_2 细胞增殖活性的影响

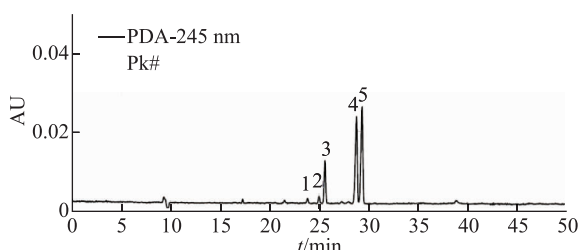
模型组 ConA 对 L-O_2 细胞增殖活性具有明显抑制作用, CSMP-60-B-I 低、中、高剂量均对 ConA 抑

制 L-O₂ 细胞增殖活性有拮抗作用, 且呈现一定的量效关系, 结果见表 1。



注: 1. 氨基葡萄糖; 2. 木糖; 3. 阿拉伯糖; 4. 葡萄糖; 5. 鼠李糖; 6. 岩藻糖; 7. 半乳糖; 8. 甘露糖; 9. 葡萄糖醛酸; 10. 半乳糖醛酸。

图 4 标准单糖 PMP 衍生物的 CE 图谱



注: 1. 木糖; 2. 阿拉伯糖; 3. 葡萄糖; 4. 半乳糖; 5. 甘露糖。

图 5 CSMP-60-B-I 单糖衍生物的 CE 图谱

表 1 CSMP-60-B-I 对 ConA 抑制 L-O₂ 细胞增殖活性的影响

组别	A _{570 nm}
正常组	0.402 ± 0.011
模型组	0.192 ± 0.012 ***
10 μg·mL ⁻¹ 组	0.280 ± 0.021 ##
50 μg·mL ⁻¹ 组	0.413 ± 0.046 ###
250 μg·mL ⁻¹ 组	0.478 ± 0.016 ###

注: 与正常组比, *** $P < 0.001$; 与模型组比, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ 。

4 讨论

将发酵虫草菌粉在 60 °C 进行连续提取, 制备粗多糖。利用 DEAE-cellulose 离子交换树脂柱色谱和 Sephadex-G-100 凝胶柱色谱对发酵虫草菌粉粗多糖进行纯化后得到白色粉末 CSMP-60-B-I。

高效凝胶渗透色谱法具有操作简单、快速、灵敏、重复性好和样品量少等特点, 成为目前测定多糖相对分子质量及其分布最理想的方法。应用高效凝胶渗透色谱法对 CSMP-60-B-I 进行纯度鉴定, 确定其为分子量均一的多糖, 峰高分子质量为 32 336。当然, 通常所谓的多糖纯品实质上是一定相对分子质量范围的均一组分, 它的纯度只代表相似链长的平均配布。

多糖的单糖组成分析必须使用高效的分离技术,

方可实现多糖组成单糖的有效分离。多糖单糖组成分析较常用的方法有薄层色谱法、气相色谱法、HPLC、毛细管电泳法、离子色谱法等。毛细管电泳法具有样品用量少、时间短、灵敏度高、分离效果明显等优点, 采用毛细管电泳法对 CSMP-60-B-I 进行单糖组成分析, 结果显示 CSMP-60-B-I 的单糖主要为葡萄糖、半乳糖、甘露糖以及少量木糖和阿拉伯糖。关于 CSMP-60-B-I 的结构分析, 将随着实验的深入另文报道。

已有研究显示, 高浓度 ConA 对肝细胞有损伤作用^[12], 能抑制细胞增殖。而 CSMP-60-B-I 加入后, 这种抑制作用大大减弱, 在一定范围内, 随着剂量增加, 甚至促进肝细胞的增殖。这一结果提示, CSMP-60-B-I 可能对肝细胞有保护作用, 其确切的保肝作用尚有待体内实验的进一步证实。

参考文献

- [1] 刘鹏, 程显好, 刘亚丽, 等. 虫草菌丝体多糖的提取方法[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(3): 227-231.
- [2] 刘华晶, 许修宏, 马怀良, 等. 蛹虫草菌丝体粗多糖提取方法初探[J]. 东北农业大学学报, 2008, 39(1): 58-61.
- [3] 韩永萍, 林强, 何绪文. 虫草菌丝体多糖的提取研究[J]. 中国食用菌, 2007, 6(6): 53-55.
- [4] 刘金花, 李富奎, 贾得儒, 等. 中国被毛孢发酵虫草菌丝体多糖的提取、纯化及其理化性质[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(3): 222-226.
- [5] 黄建忠, 施巧琴, 周晓兰, 等. 粉被虫草菌丝体多糖的分离纯化及其性质[J]. 福建师范大学学报, 1998, 14(3): 82-85.
- [6] 郑必胜, 唐芳勇, 闫文娟, 等. 苯酚-硫酸法测定广东虫草菌丝体多糖含量的研究[J]. 农产品加工·学刊, 2008(8): 18-22.
- [7] 黄小方. 板蓝根多糖提取分离及其分子量测定的研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2007.
- [8] 张海英, 凌建亚, 吕鹏, 等. 毛细管区带电泳定性分析蒙山九州虫草菌丝体和发酵液多糖水解液组分[J]. 复旦学报(医学版), 2007, 34(3): 447-449.
- [9] 文松. 板蓝根多糖佐剂理化性质及作用机理研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2015.
- [10] 杨洁, 姜廷福, 王远红, 等. 高效毛细管电泳法测定海参多糖的单糖组成[J]. 中国海洋大学学报, 2011, 41(增刊): 344-348.
- [11] 滕芳芳, 胡晓斐, 刘晨晨, 等. LPS 致肝细胞损伤模型的建立研究[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(4): 1071-1073.
- [12] 曹怡, 刘波, 徐彭, 等. 淫羊藿苷干预 ConA 诱导体外 BRL-3A 细胞损伤的机制[J]. 中药药理与临床, 2015, 31(3): 21-24.

(收稿日期 2017-11-03)