



## 灰树花菌丝体多糖的硫酸酯化及其降血脂作用

杨庆伟, 鲁梅芳, 金玉妍

(天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

**摘要:** 对灰树花菌丝体的水不溶性多糖进行硫酸酯化,得到硫酸酯化多糖(S-GF),并对其降血脂活性进行研究.通过对 S-GF 的红外光谱分析,其中两个特征吸收峰(1 236 和 823  $\text{cm}^{-1}$ )的出现表明硫酸酯化反应已经完成. S-GF 中硫酸根质量分数为 17.7%.通过 Sephadex G50 柱层析图谱,证明 S-GF 为均一组分.小鼠实验表明,S-GF 明显反映出对小鼠血脂的调节作用.在实验条件下给药剂量为 50  $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 时,高血脂症模型小鼠可达到治愈的程度. S-GF 呈现出明显的降血脂作用.

**关键词:** 灰树花; 硫酸酯化多糖; 降血脂

**中图分类号:** Q539      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1672-6510(2009)04-0025-04

## Sulfation and Hypolipidemic Effect of Polysaccharide of *Grifola frondosa* Mycelia

YANG Qing-wei, LU Mei-fang, JIN Yu-yan

(College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** Determine hypolipidemic effects of a chemically sulfated polysaccharide(S-GF), which was derived from water-insoluble polysaccharide of *Grifola frondosa* mycelia. Two characteristic absorption bands (1 236 and 823  $\text{cm}^{-1}$ ) appeared in FTIR spectrum of S-GF, which indicated that the sulfation reaction had actually occurred. The sulfur content in S-GF was 17.7%. A single and homogeneous peak was found on Sephadex G50 chromatographic profile for S-GF. S-GF showed the notable regulating effect on mice blood lipidemic profile. Hyperlipidemia models were cured at the dose of 50  $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ . S-GF indicated notable hypolipidemic effects.

**Keywords:** *Grifola frondosa*; sulfated polysaccharide; hypolipidemic

灰树花(*Grifola frondosa*)是担子菌亚门,层菌纲,无隔担子菌亚纲,非褶菌目,多孔菌属中的一种大型真菌,又名贝叶多孔菌(*Polyporus frondosus*)、栗子蘑、佛菌以及重菇等.大量的药理药效的研究证明,灰树花多糖具有显著的抗肿瘤、降血糖、抗肝炎、抗 HIV 病毒以及改善免疫系统功能等功效<sup>[1-3]</sup>.而在降血脂方面只有袁德云等人<sup>[4]</sup>曾对其水溶性多糖进行过研究.最近 10 年,多糖及其他的衍生物,尤其是硫酸酯化衍生物的生物活性的研究越来越受到人们的关注<sup>[5]</sup>.在对灰树花多糖的研究中发现,该菌丝体中水不溶性多糖的占有量为水溶性多糖的 6 倍.因此,本文针对灰树花的水不溶性多糖进行修饰,使其提高水

溶性和生理活性,并且对该修饰物的降血脂活性进行了研究.

### 1 材料与amp;方法

#### 1.1 材料

灰树花菌丝体干粉,天津科技大学菌种保藏中心提供,编号 39025;雄性健康昆明种小鼠,体重 18 ~ 22 g;高脂饲料(以质量分数计):基础饲料添加 1%胆固醇、10%猪油、0.2%胆酸盐、10%蛋黄粉、5%蔗糖.

琼脂糖凝胶 DEAE Sepharose F.F.,天津博美生物技术有限责任公司;葡聚糖凝胶 Sephadex G50,北

京欣经科生物技术公司;总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)试剂,中生北控生物科技股份有限公司。

SP-2102PC 分光光度计,上海光谱仪器有限公司;VECTOR22 傅里叶变换红外光谱仪;酶标仪(Fcc);垂直电泳系统(Bio-rad)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 水不溶性多糖制备

取灰树花菌丝体干粉加蒸馏水至菌丝体的质量分数为 60%,在冰水浴下超声波破壁 10 min,然后加水稀释到质量分数为 4%,80 °C 水浴 6 h。剩余残渣溶解在 2% NaOH 溶液中 4 °C 过夜,上清液用冰醋酸中和,碱性沉淀物溶解在 0.05 mol/L NaOH 溶液中,离心得到的上清液加 3 倍体积的 95%乙醇溶液,过夜,沉淀物真空干燥,得到白色絮状物质水不溶性多糖 GF<sup>[6]</sup>。将样品 GF 配制成 10 mg/mL 溶液,微孔过滤后上 DEAE Sepharose F.F.柱,上样体积为 20 mL。

### 1.2.2 硫酸酯化多糖制备与分离

通过氯磺酸-吡啶法对灰树花水不溶性多糖 GF 进行硫酸酯化。酯化试剂的制备:无水吡啶(40 mL)置于反应瓶中,冰盐浴冷却,剧烈搅拌下缓慢加氯磺酸 20 mL,继续搅拌 30 min,备用<sup>[7]</sup>。

将 GF(200 mg)悬浮于无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(100 mL)中,倒入上述酯化试剂的反应瓶,于 60 °C 搅拌反应 3 h,用 2.5 mol/L NaOH 溶液中和,加入 95%的乙醇,离心分离,收集沉淀,将沉淀溶于适量的蒸馏水中,超滤、浓缩后转至 DEAE Sepharose F.F.(1.8 cm×10 cm)阴离子交换柱,0~1.5 mol/L NaCl 溶液梯度洗脱,流量为 0.25 mL/min,用苯酚-硫酸法检测多糖含量。通过 DEAE Sepharose F.F.层析图谱,收集一个主要洗脱峰,冷冻干燥,得到硫酸酯化多糖 S-GF。

### 1.2.3 Sephadex G50 凝胶柱层析

取 1 mL 的 S-GF 溶液,上 Sephadex G50 柱(柱高 10 cm),流量为 0.25 mL/min,以去离子水洗脱,分部收集(每管 2 mL),用苯酚-硫酸法检测多糖的纯度。

### 1.2.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳

将 S-GF 溶解于蒸馏水中,配成 10 mg/mL 的溶液,备用。参照文献<sup>[8]</sup>配制适宜浓度的分离胶和 5%的浓缩胶并处理样品溶液。以 40 V/cm 进行电泳,直到染料抵达分离胶的底部。阿里新兰染液染色,80%乙醇溶液脱色。

### 1.2.5 硫酸基含量测定

采用氯化钡-明胶浊度法<sup>[9]</sup>。

### 1.2.6 红外光谱分析

溴化钾压片,测定范围为 400~4 000 cm<sup>-1</sup>。

### 1.2.7 降血脂实验

首先对实验小鼠进行高血脂症建模,经 14 d 的有效饲喂后分析血样确证。将建模小鼠分为高脂对照组和高、中、低剂量给药组与阴性对照组,每组 6 只。建模实验成功后,对给药组灌胃不同剂量的 S-GF 生理盐水溶液,高脂对照组灌胃等量生理盐水,并同时继续饲喂高脂饲料,阴性对照组饲喂基础饲料外,同样灌胃等剂量生理盐水。再过 14 d 后摘眼球取血,测定小鼠血清 TC、TG、HDL-C 和 LDL-C 含量。采用组间 *t* 检验法。

## 2 结果与分析

### 2.1 S-GF 的分离纯化

从图 1 看出,经 DEAE Sepharose F.F.柱层析洗脱可以得到两个峰,收集第一个高峰,命名为 S-GF。

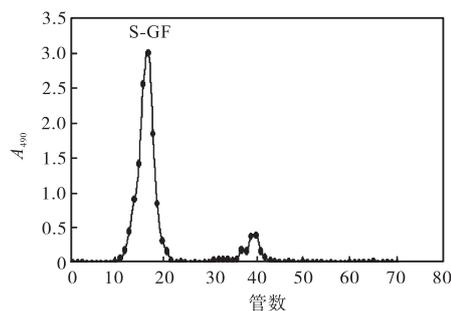


图 1 硫酸酯化多糖 DEAE Sepharose F.F.层析图谱

Fig.1 DEAE sepharose fast flow chromatographic profile for sulfated polysaccharide

### 2.2 S-GF 纯度鉴定

如图 2 所示,对 S-GF 进行 Sephadex G50 凝胶柱层析,所得的洗脱峰为单一的洗脱峰。

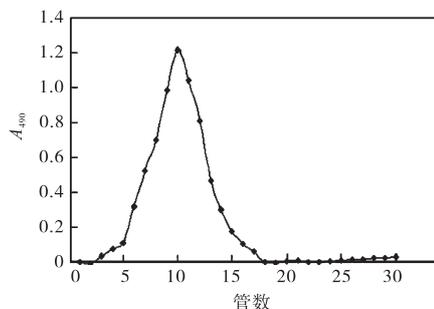


图 2 硫酸酯化多糖的 Sephadex G50 层析图谱

Fig.2 Sephadex G50 chromatographic profile for S-GF

图3显示S-GF聚丙烯酰胺电泳图,形成单一带,这两种方法都证明了S-GF是均一组分。

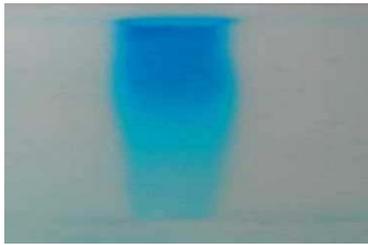


图3 硫酸酯化多糖聚丙烯酰胺电泳图

Fig.3 Polyacrylamide gel electrophoresis of S-GF

## 2.3 S-GF的性质鉴定

### 2.3.1 硫酸根含量测定

样品S-GF中含硫量为17.7%,硫酸基取代度为2.05。

### 2.3.2 GF, S-GF红外光谱分析

由红外吸收光谱分析图4显示,GF、S-GF都含有多糖母体特征吸收峰,在 $1236\text{ cm}^{-1}$ 和 $823\text{ cm}^{-1}$ 处,硫酸酯化后S-GF出现强吸收峰,而GF在这两处均无明显吸收。其中 $1236\text{ cm}^{-1}$ 为S=O的伸缩振动特征峰, $823\text{ cm}^{-1}$ 为糖环C-O-S的伸缩振动的特征峰。以上结论充分说明水不溶性多糖GF已经形成硫酸酯化多糖S-GF。

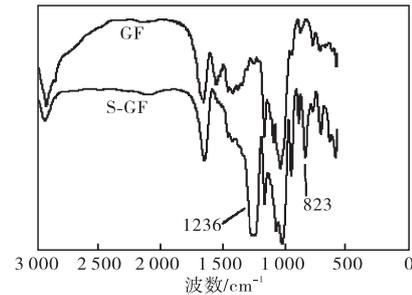


图4 GF和S-GF红外光谱分析对比

Fig.4 Comparison of GF and S-GF IR spectra

## 2.4 降血脂实验测定结果

如表1所示,S-GF在一定剂量下,具有较显著的调节血脂代谢的作用。中剂量组小鼠血清中TC、TG、LDL-C与高脂对照组相比,浓度分别降低20.9%、24.8%、53.7%,说明有明显作用;高剂量组测定TC、TG、LDL-C与高脂对照组相比,浓度分别降低32.8%、43.1%、65.1%,也有明显作用;HDL-C浓度在25~100 mg/(kg·d)剂量范围内没有明显变化,但是 $c_{\text{HDL-C}} : c_{\text{TC}}$ 值与高脂对照组相比,中剂量组升高27.2%,高剂量组升高48.7%,都有显著差异。TC、TG、LDL-C浓度随着样品剂量增大而减小, $c_{\text{HDL-C}} : c_{\text{TC}}$ 值随着剂量增大而增大,其中中剂量组各项指标最接近阴性对照组。

表1 S-GF对实验性高脂血症小鼠血脂水平的影响( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

Tab.1 Effects of S-GF on serum of experimental hypercholesterolemia mice ( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

组别	$c_{\text{TC}}/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	$c_{\text{TG}}/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	$c_{\text{HDL-C}}/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	$c_{\text{LDL-C}}/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	$c_{\text{HDL-C}} : c_{\text{TC}}$
阴性对照	4.30±0.61	1.70±0.32	1.59±0.17	1.71±0.29	0.372±0.031
高脂对照	7.13±1.04	2.46±0.35	2.11±0.26	3.07±0.39	0.302±0.060
低剂量组	6.77±0.88	2.23±0.44	2.04±0.37	2.42±0.40*	0.303±0.051
中剂量组	5.64±0.82*	1.85±0.45*	2.11±0.22	1.42±0.20***	0.384±0.084*
高剂量组	4.79±0.69**	1.40±0.42***	2.13±0.27	1.07±0.20***	0.449±0.063**

注:低、中、高剂量组(25、50、100 mg/(kg·d))与阳性对照比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ,\*\*\* $P<0.001$ 。

## 3 讨论

灰树花菌丝体中水不溶性多糖经过硫酸酯化后,上DEAE Sepharose F.F.柱层析,得到S-GF。通过Sephadex G50凝胶柱层析和聚丙烯酰胺电泳鉴定S-GF为均一组分。红外吸收光谱分析S-GF除了多糖母体特征吸收峰得以保留外,还有硫酸根的特征峰,证明水不溶性多糖GF已经形成硫酸酯化多糖S-GF。氯化钡-明胶浊度法鉴定,硫酸根取代度为2.05。

高脂血症是一种常见的代谢性疾病,表现为体内血浆中不同脂质异常堆积。主要脂质包括胆固醇和甘油三酯<sup>[10]</sup>。LDL-C含量越高,HDL-C含量越低,胆固醇在血清中含量越高,越易诱发各种高脂血症和心

血管疾病<sup>[11]</sup>。 $c_{\text{HDL-C}} : c_{\text{TC}}$ 值升高,具有防止动脉粥样硬化的作用。袁德云等<sup>[4]</sup>报道灰树花胞内多糖GIP 10 mg/(kg·d)和发酵液GFL 160 mg/(kg·d)降血脂功效接近阴性对照组,与本文中中剂量组50 mg/(kg·d)功效类似。灰树花菌丝体水不溶性多糖进行硫酸酯化后得到的S-GF降血脂作用比菌丝体水溶性多糖低,比灰树花胞外多糖高。因此,灰树花硫酸酯化多糖S-GF具有显著的降血脂作用,是一种有良好开发前景的新型降脂保健品。

## 参考文献:

- [1] Kawagishi H, Nomura A, Mizuno T, et al. Isolation and characterization of a lectin from *Grifola frondosa* fruiting

- bodied[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*,1990,1034: 247-252.
- [2] Suzuki I,Itani T,Ohno N,et al. Antitumor-activity of a polysaccharide fraction extracted from cultured fruiting bodied of *Grifola frondosa*[J]. *Journal of Pharmacobiodynam*,1984,7:492-500.
- [3] Smith J E , Rowan N J , Sullivan R. Medicinal mushrooms:a rapidly developing area of biotechnology for cancer therapy and other bioactivities[J]. *Biotechnology Letters*,2002,24:1839-1845.
- [4] 袁德云,章克昌. 灰树花发酵液及其胞内纯化物的降血脂作用[J]. *中国药学杂志*,2003,38(7):507-508.
- [5] Xing R,Liu S,Yu H H,et al. Preparation of high-molecular weight and high-sulfate content chitosans and their potential antioxidant activity in vitro[J]. *Carbohydrate Polymers*,2005,61:148-154.
- [6] Nie X H,Shi B J,Ding Y T,et al. Preparation of a chemically sulfated polysaccharide derived from *Grifola frondosa* and its potential biological activities[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*,2006,39: 228-233.
- [7] Yoshida T, Yasuda Y, Mimura T, et al. Synthesis of curdlan sulfates having inhibitory effects in vitro against AIDS viruses HIV-1 and HIV-2[J]. *Carbohydrate Research*,1995,276:425-436.
- [8] 董晓燕. 生物化学实验[M]. 北京:化学工业出版社,2002:22.
- [9] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州:浙江大学出版社,1994:91-92.
- [10] 王艳梅,李智恩,牛锡珍,等. 孔石莼多糖降血脂活性的初步研究[J]. *中国海洋药物*,2003,22(2):33-35.
- [11] 沈同. 生物化学(下)[M]. 北京:高等教育出版社,1991:213.

---

(上接第24页)

- [4] Al-Hasan R H, Ali A M, Ka'wash H H, et al. Effect of salinity on the lipid and fatty acid composition of the halophyte *Navicula* sp.: Potential in mariculture [J]. *Journal of Applied Phycology*,1990,2(3):215-222.
- [5] 朱松玲,王怡洁. 盐度变化对杜氏盐藻游离氨基酸和脂肪酸含量的影响[J]. *海洋科学*,2005,29(3):8-11.
- [6] 周洪琪,易翠平,丁卓平,等. 环境因子对青岛大扁藻、亚心形扁藻、微绿球藻脂肪酸组成的影响[J]. *浙江海洋学院学报:自然科学版*,2001,20(增刊):112-117.
- [7] 吴瑞珊,魏东. 盐度及其调节方式对眼点拟微球藻的生长和EPA积累的影响[J]. *现代食品科技*,2007,23(12):4-8.
- [8] Teshima S, Yamasaki S, Kanazawa A, et al. Effect of water temperature and salinity on eicosapentaenoic acid level of marine *Chlorella*. *Bull.*[J]. *Jap Soc Sci Fish Nissuishi*, 1983,49:805-807.
- [9] 缪锦来,王波,阚光峰,等. 环境因子对2种南极绿藻脂肪含量和脂肪酸组成的影响[J]. *海洋科学*,2005,29(1):4-11.
- [10] 梁英,麦康森,孙世春,等. 不同培养基对筒柱藻 *Cylindrotheca fusiformis* 生长及脂肪酸组成的影响[J]. *海洋湖沼通报*,2000(1):60-67.
- [11] Sultana N, Hossain M A. Mass-scale mono-culture of marine unicellular algae *Chlorella minutissima* under different salinities[J]. *Indian J Fish*,1989,36:307-313.
- [12] Al-Shayji Y, Hamdan J. Selection of *Chlorella* species for intensive culture production. 1. Growth of five species in high salinity conditions[J]. *Annu Res Rep Kuwait Inst Sci Res*, 1985,10:70-72.
- [13] 蒋敏霞,柳敏海,邢晨光,等. 不同生长条件对绿色巴夫藻生长与脂肪酸组成的影响[J]. *水生生物学报*,2007,31(1):88-93.
- [14] 缪晓玲,吴庆余. 微藻生物质可再生能源的开发利用[J]. *可再生能源*,2003,109(3):13-16.