

古尼虫草的生物活性物质 I. 含肽镇痛组分的分离及性质*

朱振元^{1 2} 梁宗琦^{1 **} 常胜军¹ 刘爱英¹

(¹ 贵州大学生物技术学院 真菌资源研究室 贵阳 550025)

(² 浙江大学农业与生物技术学院 杭州 310029)

摘 要 :用理化分离分析和生物检测方法相结合,从古尼虫草(*Cordyceps gunnii*(Berk.)Berk.)无性型,古尼拟青霉(*Paecilomyces gunnii* Liang)菌丝体中初步分离纯化得到镇痛物质,该物质经氨基酸组成分析表明是一种酸性氨基酸残基高的肽类物质。经不同温度、pH 及蛋白酶的稳定性试验分析观察到这种肽类物质对酸稳定、在酸性条件下抗热,对胃蛋白酶、胰蛋白酶部分敏感,对蛋白酶 K 不敏感。经小鼠竖尾法和大鼠攻击法测定,无吗啡类药物依赖性。

关键词 :古尼虫草,古尼拟青霉,镇痛活性成分,药物依赖性

中图分类号 :Q939.5 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2002)06-0732-05

虫草是一类重要的昆虫病原真菌,具有种类多、数量大、代谢产物多样性及多种药理作用等特点^[1,2]。最早报道虫草对中枢神经系统有作用的是 Brewster 和 Alsberg,他们给家兔及小鼠静脉或皮下注射冬虫夏草(*Cordyceps sinensis*(Berk.)Sacc.)浸提液证明对中枢抑制有作用。国内张士善等也报道了冬虫夏草浸剂有镇静及催眠作用^[3]。陈祝安等报道细脚拟青霉(*Paecilomyces tenuipes*(Peck)Samson)发酵菌丝体,以 2.5g/kg 剂量注射小鼠腹腔可抑制由醋酸所致的扭体反应,其效果相当于 10mg/kg 吗啡^[4]。此外,蝉花也有类似作用^[5]。古尼虫草及无性型,古尼拟青霉含多种生理活性物质,具有广泛的药理作用^[6]。李淑芳等报道用小鼠扭体法实验观察到,在所试古尼虫草菌丝体浸提液的剂量下镇痛率为 100%,热板刺激法 1.5 小时后痛阈延长为 79%,其镇痛强度与度冷丁相似^[7]。

一些国外文献已报道了非虫草来源多肽的镇痛作用原理及其分离提取方法^[8~12]。虽然国内报道了虫草及其无性型具有镇痛作用,但尚未揭示其镇痛作用的化学成分。张士善等^[3]研究认为冬虫夏草的镇静作用是由氨基酸,尤其是色氨酸所引起。古尼虫草菌丝体的镇痛作用是否也是氨基酸?本文将报道对古尼虫草镇痛组分的确定、分离及其性质的第一部分研究结果。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株 :古尼虫草(*Cordyceps gunnii*(Berk.) Berk.)的无性型,古尼拟青霉

* 贵州省“九五”攻关课题(95D96A-139)

** 课题负责人

作者简介 朱振元(1969-)男,湖南武冈市,贵州大学生物技术学院讲师,微生物学硕士,浙江大学在读博士研究生,主要从事真菌代谢产物研究。

收稿日期 2002-01-14,修回日期 2002-04-23

(*Paecilomyces gunnii* Liang) 5-19 菌株保存于贵州大学(南区)真菌资源研究室。

1.1.2 试剂: DEAE-Cellulose-52, Sephadex G-25 为 Pharmacia 产品;透析袋(透析值:12 000~14 000)为美国联合碳化物公司产品;盐酸吗啡注射液、盐酸哌替啶(度冷丁)为沈阳第一制药厂产品;胃蛋白酶、蛋白酶 K、胰蛋白酶为华美生物技术公司产品。

1.1.3 试验动物:昆明纯种小白鼠(*Mus musculus*);大白鼠(*Rattus norvegicus* Wistar), 贵州省卫生防疫站实验动物室提供。

1.2 方法

1.2.1 菌丝体制备:古尼拟青霉菌丝体生产按梁宗琦等^[13]的方法进行。

1.2.2 丙酮分级沉淀:参照文献[14]进行。

1.2.3 透析:将样品置于透析袋内,放入烧杯中用蒸馏水透析 10~12 h,收集透析外液,重复透析,合并透析外液。

1.2.4 Sephadex G-25 葡聚糖凝胶柱层析:参照文献[15],柱 60cm×3.4cm,洗脱液为去离子水,流速为 5mL/min,每分钟收集 1 管,紫外分光光度计 280nm 下检测。

1.2.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳板:17cm×15cm,浓缩胶 3%,分离胶 11%,电泳缓冲液 Tris-Gly, pH8.3。电泳条件:恒压,浓缩胶 80V,分离胶 180V,电泳 6 h 后考马斯亮蓝染色。

1.2.6 氨基酸组成分析:用氨基酸自动分析仪(美国,贝克曼公司 6300 型)分析。

1.2.7 化学刺激法,小白鼠竖尾试验法,大白鼠攻击试验法:分别按文献[16~17]方法进行。扭体抑制率按下式计算:

$$\text{扭体抑制率}(\%) = 1 - \frac{\text{药物组扭体总次数}}{\text{NS 组扭体次数}} \times 100\%$$

1.2.8 镇痛活性成分对温度、酸碱度、蛋白酶的稳定性分析:将镇痛活性成分配成水溶液, pH 值分别调为 1 和 7,分别在 30、50、80 和 100℃ 下恒温水浴 30min,然后检测镇痛活性。古尼镇痛活性成分(5mg/mL)与胃蛋白酶、胰蛋白酶、蛋白酶 K 在最适酶促条件下 37℃ 反应 90min(酶液反应浓度均为 1mg/mL),检测镇痛活性。以不加酶液处理为对照。

2 结果和分析

2.1 活性物质的提取及其活性检验

提取实验表明,古尼拟青霉菌镇痛活性成分存在于菌丝体中,为水溶性物质(表 1)。

2.2 活性成分的初步分离

2.2.1 丙酮分级沉淀分离:菌丝体水提取物用丙酮分级沉淀,依次得到由深变浅的棕褐色沉淀物 I、II、III、IV。上清液挥干后得棕色残留物,残留物的重量大大高于各种沉淀物之和。从表 2 可见,沉淀 I 和 II 均有明显的镇痛作用,但沉淀 III 和 IV 及残留物的镇痛作用则不明显。

表 1 菌丝体水提取液对醋酸所致小鼠扭体反应的抑制效果

Table 1 Inhibit effect of water extract of *P. gunnii* on acetic induced writhing in mice

Group	Number of mice	Doses	Average	Inhibitory rate/%
Physiological saline	10	0.2mL/mice	52	/
Dolandin	10	25mg/kg	0	100
Water extract	10	0.2mL/mice	7	86.53

* P < 0.01(Compared with N. S. group)

Note: concentration of testing sample 0.05g/mL.

表 2 丙酮分级沉淀物对醋酸所致小鼠扭体反应的影响

Table 2 Effect of grade sediment of acetone on acetic induced writhing in mice

Group	Number of mice	Doses	Average	Inhibitory rate/%
Physiological saline	10	0.2mL/mice	52	/
Dolandin	10	25mg/kg	0	100
Sedimentation I	10	0.2mL/mice	11	78.84
Sedimentation II	10	0.2mL/mice	5	90.38
Sedimentation III	10	0.2mL/mice	37	28.84
Sedimentation IV	10	0.2mL/mice	46	11.54
Residue	10	0.2mL/mice	47	9.60

Note :Concentration of testing samples 0.05g/mL.

** P < 0.01(Compared with N.S. group)

表 3 透析内外液对醋酸所致小鼠扭体反应的影响

Table 3 Effect of inside and outside solution of dialysis on acetic induced writhing in mice

Group	Number of mice	Doses	Average	Inhibitory rate/%
Physiological Saline	10	0.2mL/mice	52	/
Dolandin	10	25mg/kg	0	100
Outside solution of dialysis	10	0.2mL/mice	4	92.31
Inside solution of dialysis	10	0.2mL/mice	47	9.61

Note :Concentration of testing sample 0.05g/mL.

** P < 0.01(Compared with N.S. group)

2.3 镇痛物质的特性

2.3.1 红外光谱 将纯化的镇痛活性成分与度冷丁作红外分析。度冷丁在 1625cm^{-1} 处有 $\text{V}_{\text{C}=\text{O}}$ 峰,在 2500cm^{-1} 处有 $\text{V}_{\text{N}-}$ 峰,在 $1240\text{cm}^{-1} \sim 700\text{cm}^{-1}$ 为度冷丁的指纹峰, $\text{V}_{\text{C}=\text{O}}$ 和 $\text{V}_{\text{N}-}$ 峰为度冷丁的结构峰,这些在古尼虫草镇痛组分红外图谱中均无,而出现的是 3400cm^{-1} 处的 $\text{V}_{\text{NH}-}$ 峰和 1625cm^{-1} 的 $\text{V}_{\text{COOH}-}$ 峰,说明古尼虫草镇痛组分活性成分不是度冷丁类镇痛物质,而是含氨基和羧基基团类物质。

2.3.2 氨基酸组成分析结果 :用氨基酸自动分析仪测定镇痛活性成分的游离和水解氨基酸结果见表 4。从表中可以看出分离纯化的镇痛物质中游离氨基酸含量很低,而水解氨基酸含量很高,这表明镇痛活性成分的

2.2.2 透析法分离 :将沉淀 I、II 和 III 合并,透析,透析内外液浓缩至干,分别得棕褐色、棕黄色的粉末。药理实验显示,透析袋内液没有镇痛活性,透析袋外液具有较强的镇痛作用(表 3)。由于我们使用的透析袋的透析值为 12 000,表明镇痛活性物质的分子量不高于 12 000 为低分子物质。

2.2.3 葡聚糖柱层析 :透析处理后的镇痛活性成分用葡聚糖柱层析纯化(图 1)。将峰 1(13 ~ 29)和峰 2(30 ~ 36)收集液浓缩至干,均得淡黄色粉末。实验检测均具镇痛作用。

2.2.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳 :柱层析纯化后的镇痛组分粗品与未纯化的镇痛粗品,用凝胶电泳分离纯化。未经葡聚糖柱层析纯化的粗品能见模糊的谱带,纯化后的粗品可见两条明显的谱带,且迁移距离大,表明分子量小(图略)。

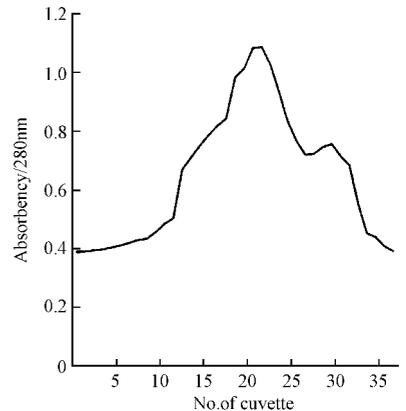


图 1 透析外液洗脱曲线

Fig.1 Elution profile of outside solution of dialysis on Sephadex G-25

化学物质不是游离氨基酸,而是含肽物质。同时由表中也可以观察到古尼虫草镇痛组分的多肽链中,酸性氨基酸残基数超过了碱性氨基酸残基数使该肽为酸性。

表 4 镇痛活性成分的游离及水解氨基酸测定结果

Table 4 Hydrolyze and dissociation amino acid of analgesic substance

Amino acids	Relative content/(mg/mg)		Relative mmol/ (mmol/100g)	Relative molecule
	Dissociation	Hydrolyze		
Asp	20.52	1934.46	14.53	51.35
Glu	/	1797.04	12.21	43.16
Ser	40.63	1300.21	12.37	43.72
His	/	750.53	4.83	17.09
Gly	91.45	1437.63	19.15	67.67
Thr	60.95	1955.60	16.41	58.01
Arg	/	1078.24	6.18	21.87
Tyr	/	169.13	0.93	3.29
Ala	71.11	782.24	8.78	31.02
α -Gaba	/	63.42	0.61	2.17
Trp	/	63.42	0.31	1.09
Met	/	42.28	0.28	1
Val	/	433.40	3.69	13.07
Phe	/	179.70	1.08	3.84
Ile	/	253.70	1.93	6.83
Leu	/	359.41	2.74	9.68
Om	/	359.41	2.71	9.61
Lys	91.43	2 441.86	16.70	59.02
合计	376.09	15401.68	125.44	443

2.3.3 不同温度、酸碱度对活性成分的影响:在同一温度不同 pH 条件下,镇痛活性成分的镇痛效果没有明显差别;在同一 pH 值时,镇痛组分在不同温度下的镇痛效果差别也不明显(图 2),表明古尼镇痛活性成分在中性和酸性条件下稳定且抗热。

2.3.4 活性成分对蛋白酶的敏感性

古尼镇痛活性成分经蛋白酶 K 处理后镇痛活性保持 100%,经胃蛋白酶处理后活性下降了 15%~20%,经胰蛋白酶处理后镇痛活性下降了 25%~30%(图 3),说明此镇痛组分对蛋白酶 K 不敏感,对胃蛋白酶、胰蛋白酶部分敏感。

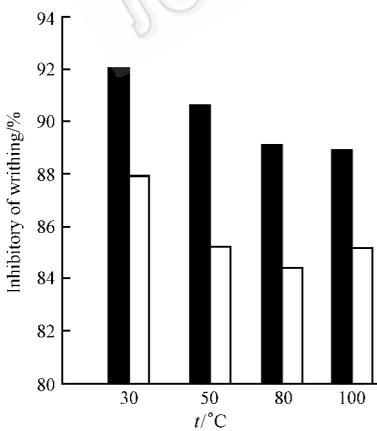


图 2 不同温度、pH 值对镇痛活性成分镇痛活性的影响

Fig.2 Effect of different temperature, pH on the analgesic substance

■. pH 7.0 □. pH 1.0

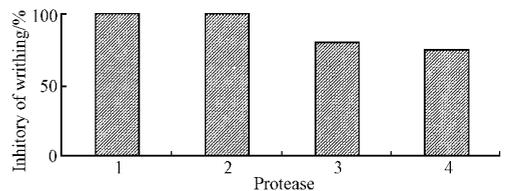


图 3 蛋白酶对古尼镇痛活性成分的影响

Fig.3 Effect of proteases on the analgesic substance

1. Comparison 2. Protease K 3. Trypsin 4. Pepsin.

2.4 镇痛活性成分的药物依赖性

2.4.1 小白鼠竖尾实验:小白鼠注射吗啡(15mg/kg)15 分钟后,均出现竖尾和不停地走动。注射镇痛活性成分(25mg/kg)没有出现竖尾。表明古尼虫草镇痛活性成分无吗啡类药物依赖性。

2.4.2 大白鼠攻击实验 大白鼠连续注射吗啡和镇痛组分九天。停药 24 h 吗啡组出现互相攻击,停药 48 h 出现互相撕咬直至头腹部受伤而死亡,死亡率达 50% 以上。注射虫草镇痛活性成分组,则没有出现这种现象。表明古尼虫草镇痛组分无吗啡类药物依赖性。

参 考 文 献

- [1] 梁宗琦. 生物多样性,1999,7(2):145~150.
- [2] 梁宗琦. 贵州农学院丛刊,1994,26:1~5.
- [3] 张士善. 药学报,1991,26(5):326~330.
- [4] 陈祝安. 真菌学报,1989,8(3):214~215.
- [5] 陈祝安. 真菌学报,1993,12(2):138~144.
- [6] 梁宗琦,董熙昌,刘爱英,等. 中国虫生真菌研究与应用. 第二卷. 北京:中国农业科技出版社,1991.74~79.
- [7] 李淑芳,鲍淑娟. 贵阳医学院学报,1990,15(1):25~28.
- [8] Evans C J, Keith D E, Merrison Jr H, et al. *Science*, 1992, **258**:1952~1955.
- [9] Meunier J C, Mellreau C, Toll L, et al. *Nature*, 1995, **337**:532~535.
- [10] Zhu J M, Yin J, Law P Y, et al. *J Biol Chem*, 1996, **271**:1430~1434.
- [11] Wilce M C J, Aguilar M T, Hearn M T. *J Chromatogr*, 1991, **536**:165.
- [12] Rely M D, Thanabal V, Omeclnaky D J. *J Am Chem Soc*, 1992, **114**:6251.
- [13] 梁宗琦. *Fungal Science*, 1997, **12**(1,2):51~57.
- [14] 陆温如主编. 中药化学. 贵阳:贵州人民出版社,1990.535~538.
- [15] 张龙翔,张庭芳. 生化实验方法和技术. 北京:高等教育出版社,1984.123~154.
- [16] 苗明三主编. 实验动物和动物实验技术. 北京:中国中医药出版社,1997.186~187.
- [17] 徐叔云,卞如濂,陈修主编. 药理学实验方法. 第2版. 北京:人民卫生出版社,1992.256~263.

Bioactive Substances from *Cordyceps gunnii* I. Separation, Purification and Properties of Analgesic Substance

Zhu Zhenyuan^{1,2} Liang Zongqi¹ Chang Shengjun¹ Liu Aiying¹

(¹ Laboratory of Fungus Resources, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

(² Departement of Plant protection, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: The analgesic substance from mycelia of *Paecilomyces gunnii* Liang that is anamorph of *Cordyceps gunnii* (Berk.) Berk. was isolated and purified by combined with separation and analyzing and biology experiment. Based on the results by amino acid analyzer showed that the analgesic substance from *P. gunnii* is not dissociate amino acid but a bioactive peptide consisting of more acidic amino acids. The analgesic bioactive substance was stable to acids and host under acidic condition. It was not sensitive to proteinase K and partly sensitive to pepsin and trypsin. By animal tests of *Mus musculus* and *Rattus norvegicus* showed the analgesic bioactive substance have no drug addiction being similar to morphia.

Key words: *Cordyceps gunnii*, *Paecilomyces gunnii*, Analgesic bioactive substance, Drug addiction