

印度块菌水溶性多糖的单糖组成与抗氧化活性研究

罗 强, 颜 亮, 吴俐莎, 张 杰, 杨志荣, 孙 群*

(四川大学生命科学学院, 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 四川 成都 610065)

摘 要: 采用水提醇沉法对印度块菌子实体水溶性粗多糖进行提取, 并通过酶法-Sevag 法联用脱蛋白, DEAE52 纤维素 Sephadex G-100 柱层析对其进行分离纯化, 得到主要多糖组分 TIP-A。采用高效凝胶渗透色谱(HPGPC)对其均一性进行验证, 测定出相对分子质量(M_r)为 17500。气相色谱质谱联用(GC-MS)分析表明, TIP-A 是由 D-甘露糖、D-葡萄糖、D-半乳糖、L-鼠李糖组成的均一杂多糖, 物质的量比约为 7:2:2:2。对 TIP-A 抗氧化活性研究表明, 其对羟自由基($\cdot\text{OH}$)、超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)、1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基有较强的清除能力, 半抑制质量浓度(IC_{50} 值)分别为 1.06、1.02、1.13 mg/mL。对过氧化氢(300 mmol/L)诱导的 PC12 细胞损伤有较好的抑制能力, 具备开发成天然抗氧化剂的潜力。

关键词: 印度块菌; 多糖; 单糖组成; 抗氧化活性

Monosaccharide Compositions and Antioxidant Activity of Water-soluble Polysaccharide Isolated from *Tuber indicum*

LUO Qiang, YAN Liang, WU Li-sha, ZHANG Jie, YANG Zhi-rong, SUN Qun*

(Key Laboratory of Bio-Resource and Eco-environment, Ministry of Education, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract: A water-soluble crude polysaccharide was extracted from Truffle (*Tuber indicum*) by water extraction and alcohol precipitation and then purified by DEAE 52 cellulose and Sephadex G-100 chromatographic column to obtain a major fraction of polysaccharide (TIP-A). The relative molecular weight (M_r) of TIP-A was determined to be 17500 by high performance gel permeation chromatography (HPGPC). In addition, gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis exhibited that TIP-A was a homogeneous heteropolysaccharide consisted of mannose, glucose, galactose and rhamannose with a molar ratio of 7:2:2:2. TIP-A had strong scavenging activity on hydroxyl, superoxide anion, and 1-diphenyl-2-picryldydrazyl (DPPH) free radicals and IC_{50} values of TIP-A for three kinds of free radicals were 1.06, 1.02 mg/mL and 1.13 mg/mL, respectively. TIP-A could also significantly attenuate PC12 cell damage caused by hydrogen peroxide at the concentration of 300 mmol/L.

Key words: *Tuber indicum*; polysaccharide; monosaccharide composition; antioxidant activity

中图分类号: Q539; TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)23-0052-05

印度块菌(*Tuber indicum*)是一种生长在森林地表的食药真菌, 属于囊菌亚门、块菌目、块菌科、块菌属, 主要分布在中国的四川和云南两省, 与欧洲的黑孢块菌在外形上非常相似。作为亚洲著名的黑块菌, 印度块菌常作为调味品、香水和化妆品工业的原料出口欧洲。据报道, 块菌中含有丰富的蛋白质、氨基酸、碳水化合物、麦角固醇、甾醇等营养物质和芳香成分^[1-2]。

另有研究者从中分离出具生物活性的物质如 α -雄烷醇、神经酰胺、块菌多糖等^[3-5]。其中的块菌多糖具有抗肿瘤, 调节免疫的作用。

自 20 世纪 50 年代以来, 大量研究表明一些食药真菌多糖具有抗氧化、免疫调节、抗肿瘤等重要的生物活性, 因此食药真菌多糖的分离和生物活性研究已逐渐成为国内外研究的热点。抗氧化是真菌多糖的重要

收稿日期: 2010-09-06

基金项目: “十一五” 国家科技支撑计划项目(2006BAD27B09; 2006BAD04A12); 国家“863” 计划项目(2007AA10Z320)

作者简介: 罗强(1985—), 男, 博士研究生, 研究方向为天然产物分离纯化、结构与生物活性。E-mail: killroy@163.com

* 通信作者: 孙群(1967—), 女, 教授, 博士, 研究方向为微生物生物技术。E-mail: qunsun@scu.edu.cn

应用领域之一,可应用在食品、保健品、化妆品等多种产品中。与其他外源性抗氧化剂相比,真菌多糖具有低毒、副作用小、来源广等特点。迄今为止对药食用真菌多糖研究得比较深入的是香菇、茯苓、灵芝、姬松茸多糖等^[6],未见对印度块菌多糖组成分析和抗氧化化作用的报道。

本研究通过水提醇沉法得到一种印度块菌中性多糖的粗提物,经分离纯化后得到均一多糖 TIP-A,利用高效凝胶渗透色谱(HPGPC)测定其相对分子质量,气相色谱-质谱(GC-MS)联用分析其单糖组成,并对 TIP-A 进行羟自由基($\cdot\text{OH}$),超氧阴离子自由基($\text{O}_2^-\cdot$),1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基清除能力测定和体外过氧化氢诱导 PC12 细胞损伤的抗氧化活性研究。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜印度块菌子实体(采集自四川省攀枝花市,海拔 1300~1800m)由攀枝花农林科学院鉴定为印度块菌(*Tuber indicum* Cooke et Massee)。PC12 细胞株由中国科学院细胞生理研究所提供,保存于液氮中。

DEAE-cellulose 52、Sephadex G-100 (Pharmacia 进口分装) 国药集团化学试剂有限公司;D-阿拉伯糖(D-Ara)、D-半乳糖(D-Gal)、D-木糖(D-Xyl)、L-鼠李糖(L-Rha)、D-甘露糖(D-Man)、D-葡萄糖(D-Glu)、D-山梨糖(D-Sor)、1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、四偶氮蓝(NBT)、吩嗪硫酸甲酯(PMS)、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)、硫代巴比妥酸(TBA)、二丁基羟基甲苯(BHT)、标准葡聚糖 T500、T-100、T-70、T-10 Sigma 公司;其余试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

UV2450 紫外分光光度计、GCMS-QP2010 气相色谱日本岛津公司;Waters 2695 高效凝胶渗透色谱 美国 Waters 公司;Bio-Rad imark 酶标仪 美国伯乐公司。

1.3 方法

1.3.1 印度块菌多糖的提取、分离、纯化

新鲜印度块菌子实体切片冻干后粉碎成粉末状,取 200g,用滤纸包好,放入索氏提取器,用 500mL 95%乙醇反复抽提 8h,除去酚类色素、脂类、单糖等醇溶性物质,晾干备用。

上述经乙醇提取后的块菌干粉,加入 2L 双蒸水,于 80℃浸提 4h,抽滤得提取液,重复 3 次。合并 3 次抽滤液,60℃旋转蒸发浓缩至 1L。采用酶解-Sevag 法联用脱蛋白。取脱蛋白后的粗多糖液 2mL,双氧水脱色,在紫外分光光度计 400~200nm 波长扫描,以检查蛋白是否除尽。将除去游离蛋白的粗多糖液浓缩至

500mL,加入 4 倍体积的无水乙醇,4℃过夜沉淀,10000 r/min 离心,沉淀分别用无水乙醇、丙酮、石油醚洗涤各 3 次,冷冻干燥得粗多糖。

将粗多糖溶于适量双蒸水中,用 DEAE 52 纤维素(2.6cm × 50cm)阴离子交换柱层析分离,0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5mol/L NaCl 溶液梯度洗脱,流速约为 2.5mL/min,每管 5mL。0mol/L NaCl 洗脱得到单一组分,命名为 TIP,旋转蒸发至小体积,透析脱盐,冻干。将 TIP 用适量双蒸水溶解,用 Sephadex G-100(1.6cm × 50cm)分子筛层析进一步分离纯化,以双蒸水洗脱,流速为 2mL/min,每管 5mL。得到主要组分 TIP-A,旋转蒸发至小体积,透析脱盐,冻干。以上层析过程,以自动分部收集器收集,苯酚-硫酸法测定^[7]。

1.3.2 印度块菌多糖主要组分的相对分子质量测定和单糖组成分析

TIP-A 的相对分子质量测定采用高效凝胶渗透色谱法^[8]。以标准葡聚糖 T-500、T-110、T-70、T-40 和 T-10 建立标准曲线,通过与样品保留时间的计算得出相对分子质量。

多糖的完全酸水解和衍生化: TIP-A 10mg, 2.0mol/mL 三氟乙酸(TFA) 2mL 于安瓿瓶中,封管 120℃水解 8h,冷却后减压旋转蒸发除去 TFA,再加入 1.5mL 甲醇溶解,减压蒸干,重复 3 次,除尽 TFA。向已水解的样品中加入 2mL 吡啶、2mL 六甲基二硅氮烷和 1mL 三甲基氯硅烷。此反应体系在 50℃ 温育 20min,10000r/min 离心 20min,上清液进样 GC-MS 分析。标准单糖混合样品按上述方法衍生后进样。GC-MS 条件参考文献^[9]。

1.3.3 多糖对自由基清除力测定

羟自由基清除力测定方法参考文献^[10]。以 BHT 为阳性对照。

$$\text{羟自由基清除力}/\% = (1 - \frac{A_s - A_{s\text{-blank}}}{A_c}) \times 100 \quad (1)$$

式中: A_c 为空白对照(未加样品)的吸光度; A_s 为加入样品溶液后反应体系的吸光度; $A_{s\text{-blank}}$ 为样品液的吸光度。

超氧阴离子自由基清除力测定采用 NADH-NBT-PMS 体系,方法参考文献^[11]。以 BHT 为阳性对照。

$$\text{超氧阴离子自由基清除力}/\% = (1 - \frac{A_s - A_{s\text{-blank}}}{A_c}) \times 100 \quad (2)$$

式中: A_c 为空白对照(未加样品)的吸光度; A_s 为加入样品溶液后反应体系的吸光度; $A_{s\text{-blank}}$ 为样品液的吸光度。

DPPH 自由基清除力测定按参考文献^[12]。以 BHT 作为阳性对照。

$$\text{DPPH 自由基清除率}/\% = (1 - \frac{A_s - A_{s-\text{blank}}}{A_c}) \times 100 \quad (3)$$

式中： A_c 为空白对照(未加样品)的吸光度； A_s 为加入样品溶液后反应体系的吸光度； $A_{s-\text{blank}}$ 为样品液的吸光度。

1.3.4 PC12 细胞的培养和块菌多糖对过氧化氢诱导 PC12 细胞损伤抑制活力测定

PC12 细胞采用 DMEM 培养基 37℃ 含二氧化碳培养箱(5% CO_2)中进行培养。过氧化氢诱导 PC12 细胞损伤抑制活力测定参考文献[13]。

$$\text{损伤抑制率}/\% = \frac{A_s - A}{A_0 - A} \times 100$$

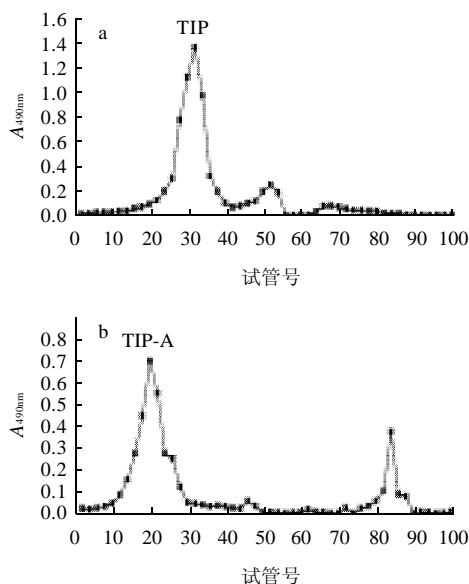
式中： A_s 为加入样品溶液和过氧化氢溶液反应液的吸光度； A_0 为空白对照和过氧化氢溶液反应液的吸光度； A 为过氧化氢溶液的吸光度。

1.3.5 数据统计与分析

实验数据经 Origin 8.0 软件进行统计学分析，并使用该软件使用线性拟合法计算出 IC_{50} 值。

2 结果与分析

2.1 印度块菌多糖主要组分 TIP-A 的分离纯化



a. DEAE52 纤维素柱层析洗脱曲线；b. Sephadex G-100 葡聚糖柱层析洗脱曲线。

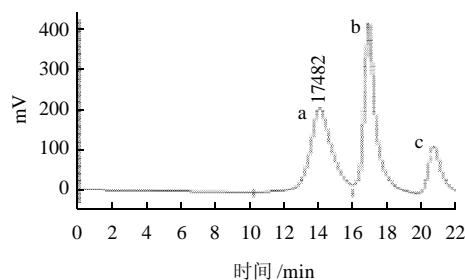
图 1 印度块菌水溶性多糖的层析图谱

Fig.1 Chromatogram of water-soluble polysaccharide from *T. indicum*

由图 1a 可知，经 DEAE52 纤维素阴离子交换柱层析分级、脱色，0mol/L NaCl 溶液(即双蒸水)洗脱下来

的中性水溶性多糖主要为 TIP，将主要出峰段收集起来，旋蒸、透析、冻干。后面有一小峰，可能是层析中的拖尾现象，因此未收集。由图 1 b 可知，经 Sephadex G-100 分子筛柱层析纯化，TIP-A 是印度块菌水溶性多糖的主要组成成分，因此对 TIP-A 进行进一步的成分和抗氧化活性分析。

2.2 TIP-A 相对分子质量、单糖组成

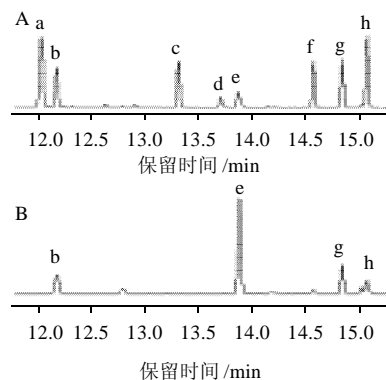


a. TIP-A；b、c. 溶剂峰。

图 2 高效凝胶渗透色谱层析图谱

Fig.2 Chromatogram of TIP-A from high performance gel permeation chromatography (HPGPC)

通过高效凝胶渗透色谱(HPGPC)对 TIP-A 的分析，结果显示为单一对称峰(图 2)，表明其为均一多糖。根据 TIP-A 和标准葡聚糖保留时间的比较，利用 HPGPC 自带软件积分计算出 TIP-A 的相对分子质量(M_r)约为 17500。



a. D- 阿拉伯糖；b. L- 鼠李糖；c. D- 木糖；d. D- 果糖；e. D- 甘露糖；f. D- 山梨糖；g. D- 半乳糖；h. D- 葡萄糖。

图 3 标准单糖混合物气相色谱图(A)与 TIP-A 完全酸水解产物气相色谱图(B)

Fig.3 Gas chromatogram of standard monosaccharide mixture, and monosaccharide compositions in complete acid hydrolysis products of TIP-A

将 TIP-A 完全酸水解后的产物硅烷化衍生，经 GC-MS 分析，将样品出峰与标准单糖出峰的相对保留时间和质谱结果进行比对。由图 3 可知，块菌多糖 TIP-A 由 4 种单糖组成，分别是 D- 甘露糖、D- 葡萄糖、D- 半乳糖、L- 鼠李糖，物质的量比约为 7:2:2:2。

上述实验结果验证了分离纯化得到的印度块菌多糖

的主要水溶性组分 TIP-A 的纯度与均一性, 并证明其是由 D- 甘露糖、D- 葡萄糖、D- 半乳糖、L- 鼠李糖 4 种单糖组成的杂多糖。

2.3 多糖抗氧化性分析结果

2.3.1 TIP-A 对羟自由基的清除力

羟自由基是对机体有害的活性氧簇的一种, 其化学性质非常活泼, 毒性很大, 几乎能与细胞内的每一类有机物发生反应, 因此机体中及时消除羟自由基, 防止过量积累对保护细胞非常重要^[14]。对不同质量浓度的块菌多糖 TIP-A 溶液进行清除羟自由基能力测定, 结果见图 4。

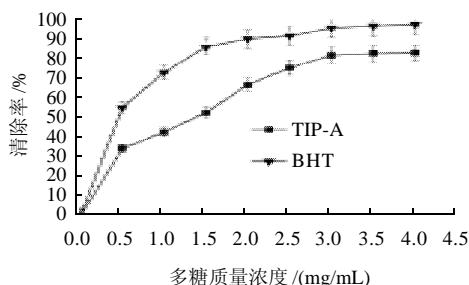


图 4 TIP-A 对羟自由基的清除作用

Fig.4 Scavenging effect of TIP-A on hydroxyl free radicals

图 4 表明, 随着多糖质量浓度的增大, TIP-A 对羟自由基的清除能力逐渐增大, 羟自由基的清除能力与多糖质量浓度呈剂量依赖性。随着多糖质量浓度逐渐升高到 3、3.5、4 mg/mL, 对应的清除率经显著性差异分析, 差异不显著 ($P \geq 0.05$), 羟自由基清除率对多糖质量浓度的剂量依赖性降低, 这可能是由于多糖羟自由基清除率随质量浓度升高达到饱和状态造成的。当多糖质量浓度达到 4 mg/mL 时, 其清除率为 83.13%, 与 1.5 mg/mL 的 BHT 的清除能力相当。块菌多糖 TIP-A 对羟自由基的 IC_{50} 值为 1.06 mg/mL, 与阳性对照 BHT 对羟自由基 IC_{50} 值 0.5 mg/mL 相比较。 IC_{50} 值越小说明清除力越强, 说明块菌多糖 TIP-A 对羟自由基清除力比 BHT 低, 但仍有很好效果。

2.3.2 TIP-A 对超氧阴离子自由基的清除力

超氧阴离子自由基的过量积累会导致生物体损伤, 从而间接的引起风湿性关节炎和老年痴呆症等疾病, 机体中超氧阴离子量的控制是十分重要的^[15]。在 NADH-NBT-PMS 体系中, 不同质量浓度的块菌多糖 TIP-A 溶液的超氧阴离子自由基清除能力见图 5。

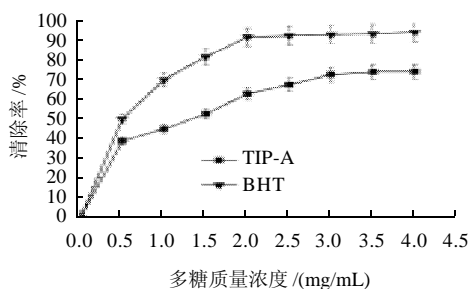


图 5 TIP-A 对超氧阴离子自由基的清除力

Fig.5 Scavenging effect of TIP-A on superoxide anion free radicals

由图 5 可知, 随着 TIP-A 质量浓度的增加, 其对超氧阴离子自由基的清除能力逐渐增强。当质量浓度达到 4 mg/mL 时, 其清除率最大为 75.01%, 仅比 1.5 mg/mL 的 BHT 的清除能力低 7%。块菌多糖 TIP-A 对超氧阴离子自由基的 IC_{50} 值为 1.02 mg/mL, BHT 的 IC_{50} 值 0.49 mg/mL, 说明 TIP-A 对超氧阴离子自由基的清除力比 BHT 低。

2.3.3 TIP-A 对 DPPH 自由基的清除力

DPPH 是一种稳定的芳香类自由基, 天然抗氧化物质对 DPPH 的清除能力被认为是抗氧化物质清除自由基的总能力^[16]。紫红色 DPPH 醇溶液在 517 nm 波长处具有强的特征吸收峰, 当存在自由基清除剂时, 由于与其单电子配对而使其吸收逐渐消失, 由紫色转变成淡黄色, 其褪色程度与其所接受的单电子数量成定量关系, 因而可以用分光光度法进行定量分析^[17]。

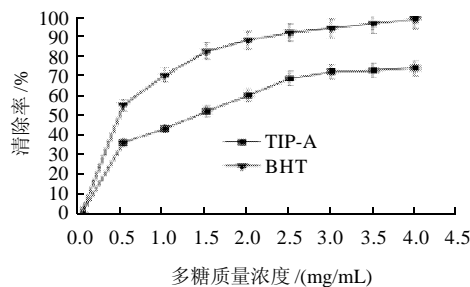


图 6 TIP-A 对 DPPH 自由基的清除力

Fig.6 Scavenging effect of TIP-A on DPPH free radicals

由图 6 可知, 在实验质量浓度范围内, 清除率随着多糖质量浓度的增大而增大。当多糖质量浓度达到 4 mg/mL 时, 清除率为 74.49%。块菌多糖 TIP-A 对 DPPH 自由基的 IC_{50} 值为 1.13 mg/mL, BHT 的 IC_{50} 值为 0.59 mg/mL, 说明 TIP-A 对自由基清除的总能力虽然比阳性对照 BHT 低, 但效果显著。

2.3.4 TIP-A 对过氧化氢诱导 PC12 细胞损伤抑制活力

通过 MTT 细胞实验, 测定了 TIP-A 对过氧化氢诱导 PC12 细胞损伤抑制活力。有研究表明过氧化氢加入培养 PC12 细胞的培养基中, 会引起 PC12 细胞的凋亡^[18]。

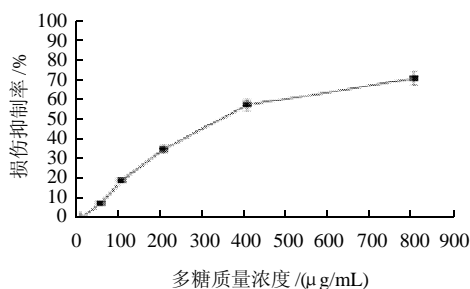


图7 TIP-A对过氧化氢诱导PC12细胞损伤抑制活力
Fig.7 Inhibitory effect of TIP-A on PC12 cell damage caused by hydrogen peroxide

由图7可知,在阴性对照(无TIP-A加入)中,细胞全部死亡。加入多糖溶液在终质量浓度分别为50、100、200、400、800 μg/mL时,相应的损伤抑制率分别为7.6%、19.4%、35.4%、57.9%、71.5%。因此经TIP-A预处理的PC12细胞的生存活力对TIP-A质量浓度有一定的剂量依赖性。TIP-A对过氧化氢诱导的PC12细胞凋亡有较好的抑制作用,提示TIP-A具有开发为抗氧化应激诱导凋亡的神经保护剂的潜力。

3 结 论

本实验采用水提醇沉法提取块菌多糖,通过柱层析进一步分离纯化,得到印度块菌多糖TIP-A。经高效凝胶渗透色谱分析,验证了TIP-A的均一性,测定相对分子质量(M_r)为17500。TIP-A完全酸水解产物经GC-MS分析证实由D-甘露糖, D-葡萄糖, D-半乳糖, L-鼠李糖组成,物质的量比约为7:2:2:2。

块菌多糖对羟自由基、超氧阴离子自由基和DPPH自由基都具有一定的清除能力,并随着块菌多糖质量浓度的增加而增强,块菌多糖的 IC_{50} 值分别是1.06、1.02、1.13 mg/mL。对不同质量浓度的TIP-A抑制过氧化氢诱导PC12细胞损伤的活力测定结果显示:经不同TIP-A质量浓度预处理的PC12细胞,受到过氧化氢诱导的损伤程度与多糖质量浓度成负相关,损伤抑制率与多糖质量浓度成正相关,显示出剂量依赖性。因此,印度块菌多糖具有较强的抗氧化活性,具备开发成为天然抗氧化剂的潜力,有望作为高效、低毒、无副作用的天然抗氧化剂添加到保健食品、化妆品中,本研究为其应用提供了实验依据。还需要进一步深入研究TIP-A的分子结构,探究其分子结构与抗氧化性之间的关系与抗氧化机制。

参考文献:

- [1] 陈应龙, 弓明钦. 块菌资源多样性及其地理分布[J]. 中国食用菌, 2000, 19(5): 6-7.
- [2] CULLERÉ L, FERREIRA V, CHEVRET B, et al. Characterisation of aroma active compounds in the black truffles (*Tuber melanosporum*) and summer truffles (*Tuber aestivum*) by gas chromatography-olfactometry [J]. Food Chemistry, 2010, 122: 300-306.
- [3] BRADSHAW S D. Vertebrate ecophysiology: An introduction to its principles and applications[M]. New York: Cambridge University Press, 2003.
- [4] GAO Jingming, ZHANG Anling, WANG Chenying, et al. A new ceramid from the ascomycete *Tuber indium*[J]. Chinese Chemical Letters, 2002, 13(4): 325-326.
- [5] 胡慧娟, 李佩珍, 林涛, 等. 块菌多糖对小鼠肿瘤及免疫系统的影响[J]. 中国药科大学学报, 1994, 25(5): 289-292.
- [6] ZHANG M, CUI S W, CHEUNG P C K, et al. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity[J]. Trends in Food Science & Technology, 2007, 18: 4-19.
- [7] DUBOIS M, GILLES K A, HAMILTON J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. Analytical Chemistry, 1956, 28: 28-30.
- [8] YAMAMOTO Y, NUNOME T, YAMAUCHI R, et al. Structure of an exocellular polysaccharide of *Lactobacillus helveticus* TN-4, a spontaneous mutant strain of *Lactobacillus helveticus* TY1-2[J]. Carbohydrate Research, 1995, 275: 319-332.
- [9] 武翠玲, 邓永康, 孟延发. 大马勃水溶性多糖的结构研究[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20: 1027-1030.
- [10] GHISELLI A, NARDINI M, BALDI A, et al. Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46: 361-367.
- [11] ROBAK J, GRYGLEWSKI R. Flavonoids are scavengers of superoxide anion[J]. Biochemical Pharmacology, 1998, 37: 837-841.
- [12] LINA C L, WANG B C C, CHANG B S C, et al. Antioxidative activity of polysaccharide fractions isolated from *Lycium barbarum* Linnaeus[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2009, 45: 146-151.
- [13] DING Xiang, TANG Jie, CAO Mei, et al. Structure elucidation and antioxidant activity of a novel polysaccharide isolated from *Tricholoma matsutake*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2010, 47(2): 271-275.
- [14] GUO Shoudong, MAO Wenjun, HAN Yin, et al. Structural characteristics and antioxidant activities of the extracellular polysaccharides produced by marine bacterium *Edwardsiella tarda*[J]. Bioresource Technology, 2010, 101: 4729-4732.
- [15] SUN Zhongwei, ZHANG Lixiang, ZHANG Bin, et al. Structural characterisation and antioxidant properties of polysaccharides from the fruiting bodies of *Russula virescens*[J]. Food Chemistry, 2010, 118: 675-680.
- [16] YI J M, KIM M S, SEO S W, et al. Acanthopanax senticosus root inhibits mast cell-dependent anaphylaxis[J]. Clinica Chimica Acta, 2001, 312(1/2): 163-168.
- [17] 孟繁磊, 陈瑞战, 张敏, 等. 刺五加多糖的提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2010, 31(10): 168-174.
- [18] 钱云飞, 姚文兵, 王华, 等. 开心散抑制过氧化氢诱导的PC12细胞凋亡的机制[J]. 中国天然药物, 2007(5): 379-384.