

蝎皮蛋白质组分的提取分离及体外活性成分筛选

吴立, 张莉, 杜冠华, 吕扬*

(中国医学科学院 中国协和医科大学 药物研究所, 北京 100050)

【摘要】 目的:为了证明蝎皮对免疫功能的影响并探讨蝎皮中含有的活性成分,通过提取分离蝎皮中的水溶性蛋白质和角蛋白质组分,经过体外药理活性筛选,观察其对细胞或体液免疫系统的影响,以期获得具有生物活性的蛋白质组分。**方法:**采用水提与盐析法获得水溶性总蛋白(ST1),还原法获得总角蛋白(ST2),通过 Sephadex G-50 凝胶色谱对水溶总蛋白和总角蛋白进行分离,并对获得的各种蛋白组分进行了体外药理筛选。**结果:**发现蝎皮的蛋白质组分在体外药理实验中显示对 T/B 淋巴细胞转化具有显著促进作用,但对 NK 活性无明显作用。**结论:**蝎皮蛋白提取组分具有一定的免疫调节生物活性,研究结果对蛋白质药物开发提供了基础数据。

【关键词】 蝎皮;水溶性蛋白;角蛋白;T/B 淋转;NK 活性

【中图分类号】 R 284.1;R 285.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1001-5302(2005)14-1083-04

全蝎是常用的中药材,并已作为中药材收入《中国药典》(2000年版)。药用全蝎为节肢动物门蛛型纲蝎目钳蝎科东亚钳蝎 *Buthus martensii* Karsch,在我国分布广泛。现已经证明,全蝎具有息风镇痉、攻毒散结、通络止痛等功效^[1],蝎毒是全蝎的主要活性成分之一,其成分复杂,含有多种多肽^[2](分子质量范围 3~9 kD)和蛋白质^[3]。蝎皮 *scorpii tegument* (ST) 是蝎子生长过程中的代谢产物,由于来源稀少,一直没有进行研究。本研究从东亚钳蝎生长过程中的代谢产物蝎皮中分离分子质量大于 8 kD 以上的水溶性蛋白和角蛋白成分进行体外药物活性筛选研究,发现其对 T/B 淋巴细胞转化具有显著促进作用,为开发全蝎活性代谢产物-蝎皮中的活性蛋白质成分研究提供了实验依据。

1 材料

1.1 药品与试剂 2~6年生蝎皮由江苏海门市家养蝎子技术咨询服务站蔡政提供。SDS-PAGE 低分子质量标准蛋白质为中国科学院上海生物化学研究所产品。伴刀豆球蛋白 A (Con A) 为 Sigma 公司产品。脂多糖(LPS)购自华美生物有限公司。其余试剂均为分析纯或生化试剂。

1.2 仪器 上海安亭科学仪器厂 GL-20G-II 型冷冻离心机,中国科学院生物物理所科龙仪器厂 XZ-7 旋转蒸发器,美国 VISKASE 透析袋 MD34,规格

MW8-10kDa, 34MM, 日本 Tokyo Rikakikai Co. Ltd EYE-LA FREEZE DRYER FD-1 冷冻干燥机,天津血液研究所葡聚糖凝胶 Sephadex G-50 填料,北京市六一仪器厂 DYY-8B 稳压稳流电泳仪 DYCZ-24D 型垂直板电泳槽,德国 BMG 公司产 Flustar 微板多功能测定仪。

1.3 动物和细胞株 BALB/c 小鼠,雌性,体重 18~22 g,购自中国医学科学院动物研究所繁育场。Yac-1 细胞(小鼠 NK 敏感细胞株),购自中国医学科学院基础医学研究所细胞中心。

2 实验方法

2.1 蝎皮水溶性总蛋白的提取 将 400 g 蝎皮经粉碎机粉碎,加入 5 000 mL 蒸馏水,磁力搅拌器温和搅拌(18℃),约 4 h 溶液呈过饱和状,将溶液静置分层,取出上层淡黄色提取液,经在 4~10℃条件下 8 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 取上清液进行抽滤,得淡黄色透明液体。加水抽提重复实验直到硫酸铵盐析实验呈阴性为止。用旋转蒸发器将总蛋白质溶液浓缩适量。按比例在总蛋白溶液中加入硫酸铵盐析进行蛋白质纯化实验,其饱和浓度应达到 90%。4℃条件下 48 h 静置后,得到淡黄色絮状沉淀。4~10℃条件下 6 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 收集蛋白沉淀物,用一定比例的蒸馏水溶解蛋白沉淀物,在 18℃条件下温和搅拌 3 h 促溶,待蛋白质溶解完全后离心,收集上蛋白清液。将剩余沉淀物加入蒸馏水继续溶解,搅拌促溶、离心,收集上层蛋白溶液,弃去杂质沉淀。合并上清蛋白溶液,4℃下透析除盐,3 d

【收稿日期】 2004-08-05

【通讯作者】 *吕扬, Tel: (010)63165212, E-mail: luy@imm.ac.cn

后经钼盐检验证实透析完全。用旋转蒸发仪 30 ℃ 条件下充分浓缩透析后的蛋白溶液,经冷冻干燥后最终获得 1.395 g 蝎皮水溶性总蛋白质粉末。

2.2 蝎皮总角蛋白的提取 本实验使用蝎皮水溶性蛋白质提取后的残渣进行了角蛋白的提取^[4]。将蝎皮水溶性蛋白粗提物残渣经 30 ℃ 烘干后得到淡黄色粉末,分别加入 65 mL 巯基乙酸(14 mol·L⁻¹)、1 920 g 尿素(8 mol·L⁻¹)和蒸馏水至 4 000 mL。用 NaOH 调节溶液 pH 至 10,18 ℃ 条件下搅拌 48 h。倒出上清液,4~10 ℃ 条件下 8 000 r·min⁻¹ 离心 8 min 并抽滤,滤液用醋酸调节 pH 至中性后透析去除尿素,每天换水 3 次,3 d 后透析完全,旋转蒸发仪充分浓缩蛋白溶液。冷冻干燥,最终获得 1.463 g 总角蛋白粉末。

2.3 柱凝胶色谱分离 分别取蝎皮水溶性总蛋白质和总角蛋白各 1 g,用蒸馏水溶解并分多次加样到 Sephadex G-50(2.6 cm×100 cm)凝胶色谱柱上,蛋白质为 10 g·L⁻¹。用蒸馏水洗脱,流速 1.0 mL·min⁻¹。洗脱组分用紫外检测仪 280 nm 处检测,按检测峰不同部分收集各流出组分,所得组分经冷冻干燥后,最终获得蝎皮各不同蛋白质组分。

2.4 SDS-PAGE 电泳 电泳方法采用不连续胶系统^[5],5% 浓缩胶和 12% 分离胶,考马斯亮蓝法染色,标准分子量蛋白为兔磷酸化酶 B(97.4 kD),牛血清白蛋白(66.2 kD),兔肌动蛋白(43 kD),牛碳酸酐酶(31 kD),胰蛋白酶抑制剂(20.1 kD),鸡蛋清溶菌酶(14.4 kD)。以检测蝎皮各蛋白质组分蛋白质分子量的分布情况。

2.5 T/B 淋巴细胞转化实验 常规无菌取 BALB/c 小鼠的脾脏经研磨棒轻轻研磨后,过 200 目钢网,用 1640 培养液洗 1 次,2 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,细胞沉淀用双蒸水、双盐水各洗 1 min 破坏红细胞,离心弃上清。用 1640 培养液调细胞浓度至 2×10⁶·mL⁻¹,100 μL/孔,种于 96 孔板,同时加 ConA(终含量 5 mg·L⁻¹)或 LPS(终含量 5 mg·L⁻¹),90 μL/孔。加样品 10 μL/孔,另设阴性对照孔(加诱导剂,未加药)、空白对照孔(未加诱导剂,未加药)37 ℃,5% CO₂ 孵育 72 h,培养结束前 4 h,加刃天青 10 μL(终含量 5 μmol·L⁻¹),培养结束后,测定荧光强度(激发波长 530 nm,发射波长 590 nm),并按下列公式计算淋巴细胞转化率。

淋巴细胞转化率(%)=(样品孔荧光值-阴性对照孔荧光值)/(阴性对照孔荧光值-空白对照孔荧光值)×100%

2.6 NK 杀伤活性测定 取小鼠脾细胞同上,1640 培养液调整细胞含量至 5×10⁹·L⁻¹,另取 YAC-1,1640 培养液调整细胞密度至 5×10⁸·L⁻¹,分别种于 96 孔板。设以下组别:效应细胞组(脾细胞,100 μL/孔)、靶细胞组(Yac-1 细胞,100 μL/孔),效应细胞和靶细胞实验组(脾细胞和 Yac-1 细胞,各 100 μL/孔)。37 ℃,5% CO₂ 孵育 24 h 后,培养结束前 4 h 加 MTT(终含量 500 mg·L⁻¹),培养结束后测 A 值。按以下公式计算杀伤率(%):

$$\text{NK 杀伤率} = (A_{\text{效应细胞}} + A_{\text{靶细胞}} - A_{\text{实验组}}) / A_{\text{靶细胞}} \times 100\%$$

3 结果

3.1 柱凝胶色谱 分别取 1 g 水溶性总蛋白和总角蛋白上样,用 Sephadex G-50(2.6 cm×100 cm)凝胶色谱柱,蒸馏水洗脱,水溶性总蛋白质获得 2 个(ST1-01,ST1-02)无紫外吸收部分和 2 个(ST1-1,ST1-2)紫外吸收峰部分(图 1),每个紫外吸收峰按上下两部分分段收集,最终将水溶性总蛋白质分成 6 个组分。总角蛋白质获得 1 个(ST2-01)无紫外吸收部分和 3 个(ST2-1,ST2-2,ST2-3)紫外吸收峰部分(图 2),每个紫外吸收峰按上下两部分分段收集,最终将总角蛋白质分成 7 个组分。其每种总蛋白质的回收率分别为 51.3% 和 59.5%。在双缩脲反应中,13 个蛋白质组分的碱性溶液与铜离子相互作用,产生紫色的络合物,证明分离获得的各组分中均含有蛋白质成分。

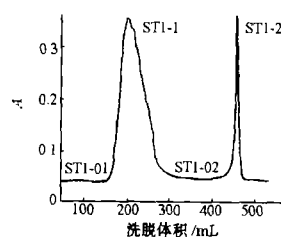


图1 水溶总蛋白质柱色谱凝胶分离图谱

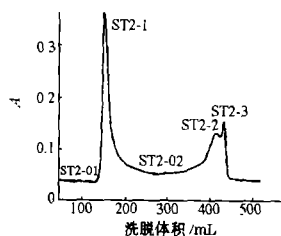


图2 总角蛋白质柱色谱凝胶分离图谱

3.2 SDS-PAGE 电泳 将凝胶色谱所得蛋白质组分

进行 SDS-PAGE 检测,其中 3 个样品(ST1-01, ST2-01, ST2-3S)组分含量太少,故未进行 SDS-PAGE 电泳实验。其他 10 个组分包括 5 个水溶性蛋白质组分:ST1-1S, ST1-1X, ST1-02, ST1-2S 和 ST1-2X 和 5 个角蛋白质组分:ST2-1S, ST2-1X, ST2-2S, ST2-2X 和 ST2-3X,其 SDS-PAGE 电泳实验结果分别见图 3、图 4 所示。



图3 水溶性总蛋白质 SDS-PAGE 电泳结果

M. 标准分子质量蛋白(图 4 同)

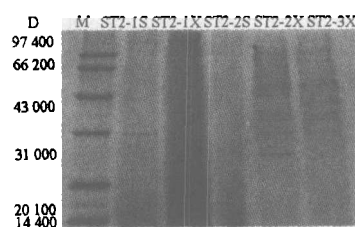


图4 角蛋白质 SDS-PAGE 电泳结果

3.3 蝎皮组分体外对免疫系统的影响 选择经 SDS-PAGE 电泳实验的 10 个蛋白质组分样品进行淋巴细胞转化实验和 NK 活性杀伤实验,筛选实验结果见图 5,图中给出各蛋白组分对于 T/B 淋巴细胞转化情况,结果显示它们均对 T/B 淋巴细胞转化存在显著的促进作用,特别是组分 ST1-2X 和 ST2-1S 的 T 细胞淋转率高达 190.27% 和 183.69%,但各组分对 NK 细胞杀伤活性则无明显改善。

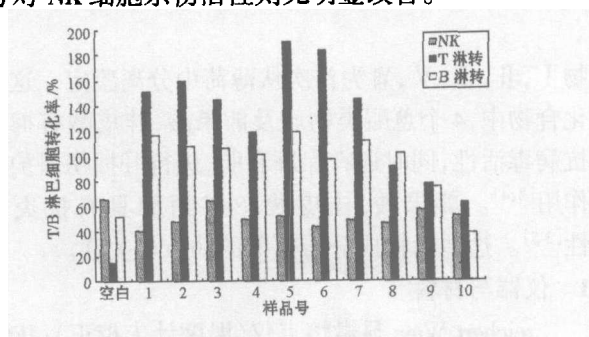


图5 蝎子皮中蛋白质组分对免疫系统的影响($n=3, \bar{x} \pm s$)

4 讨论

4.1 人类对东亚钳蝎的研究主要集中在全蝎与蝎

毒,全蝎和蝎毒一直被认为是其药物活性所在,其研究结果较多,但未见对于蝎子的代谢产物蝎皮成分研究的报道。蝎子一生中大约需要褪皮六七次,这些物质一直没有得到有效利用。

4.2 实验选择 2~6 年生东亚钳蝎蝎皮作为研究对象,使用 400 g 样品中经过水提和还原分别实验获得分子量在 8 kD 以上的水溶性总蛋白质 1.395 g 和总角蛋白质 1.463 g,2 种总蛋白质的收率分别为 0.35% 和 0.36%。蝎皮样品中蛋白质成分收率较低说明在蝎皮壳中蛋白质主要是其结缔及保护性的功能蛋白质,因而水溶性蛋白质和角蛋白质含量较低。

4.3 使用 2 种总蛋白质样品各 1 g 经 Sephadex G-50 凝胶色谱初级分离共得到 13 个蛋白组分,其中水溶性蛋白质组分 6 个,收率为 51.3%。角蛋白质组分 7 个,收率为 59.8%。

4.4 通过 SDS-PAGE 电泳实验证实水溶性蛋白质分子质量主要成分集中在 40 kD 以下;而角蛋白中的蛋白质成分的分子质量则比较分散,其中 ST2-2X, ST2-3X 组分含有的蛋白主要成分在 30 kD 以上。

4.5 在角蛋白质组分的 SDS-PAGE 电泳实验中发现 ST2-1S, ST2-1X 和 ST2-2S 条带具有连续分布性质,故怀疑这些组分中含色素成分,影响了蛋白质成分的显色。

4.6 通过双缩脲实验反应证实分离获得蝎皮的 13 个蛋白质组分中均含有蛋白质成分。

4.7 体外药理筛选实验结果表明,蝎皮中的水溶性蛋白质组分和角蛋白质组分均对于 T/B 淋巴细胞转化显示显著的促进作用,特别是其中的 ST1-2X 和 ST2-1S 组分对 T 细胞淋转率高达 190.27% 和 183.69%。

4.8 本项目研究选择蝎皮中分子质量 8 000 以上的蛋白质组分作为研究对象,分别对水溶性蛋白质与角蛋白质组分进行药理活性筛选研究。研究结果表明,除已知的全蝎和蝎毒具有药用价值外,蝎皮作为蝎子的一种代谢产物,其中的蛋白质组分可能对人体细胞免疫和体液免疫具有一定的促进作用,具有一定的药用价值。本研究将对以蝎皮蛋白质药物的开发提供实验证据。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部.2000.111.
- [2] 周新华.蝎毒的生化研究及临床应用.生物化学与生物物理进展,1984,4(2):20.

- [3] 王琳,魏俊杰,张红军,等. 东亚钳蝎毒蛋白的分离纯化. 白求恩医科大学学报, 1997, 23(2): 143. US: Patent Documents, 5763583. 1998-07.
- [4] Arai, Kozo, Nojiri, *et al.* Process for producing solubilized protein. [5] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社, 2000. 80.

Study on the active protein fractions from scorpions tegument

WU Li, ZHANG Li, DU Guan-hua, LU Yang

(Institute of Materia Medica, Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China)

[Abstract] **Objective:** Extracting the total protein from scorpions tegument, investigating its effect on immune system by transformation of T/B cell. **Method:** Water-soluble protein(ST1) was extracted by distilled water method and salting-out method, while keratin(ST2) by deoxidation method. Sephadex G-50 was used to isolate the protein. The effects of components isolated by sephadex G-50 on T/B and NK cell were investigated. **Result:** The protein from scorpions tegument could increase the transformation of T/B cell distinctly *in vitro*, while no apparent effect on NK cell. **Conclusion:** Protein from scorpions tegument could modulate the immune system, which may offer a new way for people to find protein drugs.

[Key words] scorpions tegument; water-soluble protein; keratin protein; transformation of T/B cell; natural kill cell activity

[责任编辑 李 禾]

薄荷化学成分的研究

刘颖, 张援虎*, 石任兵

(北京中医药大学 中药学院, 北京 100102)

[摘要] 目的: 对薄荷非挥发性成分进行研究。方法: 利用色谱技术进行分离, 波谱技术等方法鉴定结构。结果: 从薄荷中分离鉴定9个化合物, 分别为大黄素(I)、大黄酚(II)、大黄素甲醚(III)、苯甲酸(IV)、反式桂皮酸(V)、 β -谷甾醇(VI)、芦荟大黄素(VII)、熊果酸(VIII)和胡萝卜苷(IX)。结论: 化合物I, II, III, V, VII为首次从薄荷中分离鉴定。

[关键词] 薄荷; 化学成分

[中图分类号] R 284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-5302(2005)14-1086-03

薄荷为唇形科植物薄荷 *Mentha haplocalyx* Briq. 的干燥地上部分, 是一味常用解表中药, 具有宣散风热, 清头目, 透疹等功能, 多用于风热感冒, 风温初起, 头痛, 目赤, 喉痹, 口疮, 风疹, 麻疹, 胸胁胀闷^[1]。现代药理研究发现薄荷的非挥发性成分具有抗炎, 抑菌等功效^[2], 因此作者对薄荷的非挥发性成分进行了研究, 并从中分离鉴定了9个化合物, 其中化合

物I, II, III, V, VII为首次从薄荷中分离鉴定。这些化合物中, 4个萜醌类物质及熊果酸, 桂皮酸有抑菌抗病毒活性, 同时还有保肝利胆, 进行肝损伤保护的作用^[3,4]。熊果酸, 桂皮酸, β -谷甾醇具有抗炎活性^[3-5]。这些活性成分与薄荷的功效相关联。

1 仪器与材料

reichert Wien 显微熔点仪(温度计未校正); JEOL-300型和Bruker-AVANCE DRX-500型核磁共振仪; ESQUIRE-LC型和MS-2010型质谱仪。薄层色谱和柱色谱硅胶均为青岛海洋化工厂产; Sephadex LH-20为上海化学试剂采购供应站分装厂产; AB-8

[收稿日期] 2005-02-15

[通讯作者] *张援虎, Tel: (010)64711199-6050, E-mail: zhangyu-anhu@263.net

• 1086 •