

## 猪肝组织中硫酸乙酰肝素的分离纯化及二糖组成分析

吕惠中<sup>1</sup>, 于广利<sup>1</sup>, 赵 峡<sup>1</sup>, 张 峥<sup>2</sup>

1. 中国海洋大学 医药学院 糖科学与糖工程室, 山东 青岛 266003;
2. 青岛大学 医学院 生物化学与分子生物学教研室, 山东 青岛 266021)

**摘要:**目的 从少量猪肝组织中分离纯化硫酸乙酰肝素(HS)并进行二糖组成分析。方法 分别采用胰蛋白酶及中性蛋白酶对猪肝组织进行酶解,再分别采用 AG 50W-X2 强阳离子交换色谱、Sephadex G-10 凝胶过滤色谱、Q-Sepharose Fast Flow 强阴离子交换色谱法纯化。将纯化的 HS 分别采用肝素酶 和 降解,所得到的二糖经 2-氨基苯甲酰胺标记后,采用 PA03 色谱柱分析其二糖组成。结果 经色谱和电泳分析,所得到的 HS 不含蛋白质及其它糖胺聚糖,其二糖组成以非硫酸化和低硫酸化二糖为主。结论 该方法可以有效分离、纯化猪肝组织中的 HS,并适用于少量组织中 HS 二糖组成分析。

**关键词:** 猪肝; 硫酸乙酰肝素; 纯化; 二糖组成分析

中图分类号:TQ460.6; Q533 文献标识码:A 文章编号:1005-1678(2007)05-0297-04

### Isolation, purification and disaccharide composition analysis of heparan sulfate from porcine liver

LU Hui-zhong<sup>1</sup>, YU Guang-li<sup>1</sup>, ZHAO Xia<sup>1</sup>, ZHANG Zheng<sup>2</sup>

1. Glycoscience and Glycoengineering Laboratory, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;
2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Medical School, Qingdao University, Qingdao 266021, China)

**Abstract:** **Purpose** To isolate and to purify heparan sulfate (HS) from a small amount of porcine liver tissue and to analyze its disaccharide composition. **Methods** The HS was digested with trypsin and neutrase, and then purified by chromatography with AG 50W-X2, Sephadex G-10 and Q-Sepharose Fast Flow columns, respectively. The purified HS was treated with heparinase and , the resulted disaccharides were labeled with 2-aminobenzamide (2-AB) and analyzed by HPLC on a PA03 column. **Results** The chromatography and electrophoresis data showed that the product was free of proteins and other glycosaminoglycans. Non-sulfated and low sulfated disaccharides were major components in porcine liver HS. **Conclusion** The method can be efficiently used to extract, purify and analyze disaccharide composition of HS from a small amount of liver tissue.

**Key words:** porcine liver; heparan sulfate; purification; disaccharide composition analysis

硫酸乙酰肝素(Heparan sulfate, HS)是一类广泛存在于动物组织基质及细胞膜的糖胺聚糖(Glycosaminoglycan, GAG)。HS糖链由N-乙酰氨基葡萄糖通过-(1→4)-糖苷键与葡萄糖醛酸或艾杜糖醛酸连接构成二糖单元,与肝素的主要区别在于糖残基的

硫酸化修饰程度不同。HS是自然界中结构最复杂的生物大分子之一,其结构的复杂性和多样性是其参与各种生命活动的基础<sup>[1]</sup>。与肝素相比,HS具有抗栓活性强、抗凝血活性弱的优点,因此,HS日益引起研究者的兴趣。

几乎所有动物不同组织中均含有HS,但目前的HS原料主要限于牛肺、胰、脾及猪十二指肠等,不同来源的HS其结构及药理作用均有明显差异。肝脏是HS的重要来源,对其进行分离纯化并进行结构研究十分重要,尤其在对HS与肿瘤等许多重大疾病的发生发展关系的研究中,由于组织来源的限制,

收稿日期:2007-02-05;修回日期:2007-04-10

基金项目:国家重点基础研究专项(2003CB716401)

作者简介:吕惠中(1970-),男,北京人,博士研究生,主要从事糖生物学研究;于广利,通信作者,教授,博士生导师,E-mail:glyu@ouc.edu.cn。

目前常用的分离纯化方法难以满足微量生化分析的需要。因此,本文报道了一种从少量猪肝组织中分离纯化 HS、并对其二糖组成进行微量分析的方法。

## 1 材料

新鲜猪肝脏,市售;胰蛋白酶、中性蛋白酶、HS 二糖对照品、2-氨基苯甲酰胺(2-aminobenzamide, 2-AB)、 $\text{NaBH}_3\text{CN}$ 、肝素酶、肝素酶,均为美国 Sigma 公司;AG 50W-X2,美国 BioRad 公司;Sephadex G10、Q-Sepharose Fast Flow(QFF),均为瑞典 Amersham Biosciences 公司;PA03 高效液相色谱柱(4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ),日本 YMC 公司;Agilent 1100 高效液相色谱仪及其色谱工作站,美国 Agilent 公司;TU-1810 型紫外可见分光光度计,中国普析通用仪器有限公司;R-200 型旋转蒸发仪(带 Buchi Vac V-500 隔膜泵),瑞士 Buchi 公司。

## 2 方法

### 2.1 猪肝组织中糖胺聚糖的提取

取猪肝脏 100 mg,剪碎,加丙酮 5 mL,匀浆。分别用丙酮和氯仿-甲醇(2:1)搅拌脱脂各 4 h,离心(4 500 r/min) 10 min,得到沉淀,烘干,加入 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0) 2 mL,胰蛋白酶 2 mg,甲苯 20  $\mu\text{L}$ ,37  $^{\circ}\text{C}$  下酶解 24 h,然后 80  $^{\circ}\text{C}$  下灭活 10 min。冷却至室温后,调 pH 值为 7.0,加入中性蛋白酶 2 mg,40  $^{\circ}\text{C}$  下酶解 24 h,80  $^{\circ}\text{C}$  下灭活 10 min,冷却至室温,离心(4 500 r/min) 10 min,取上清液对水透析(截留相对分子质量 1 000) 2 d,将膜内液旋转蒸发,并用氮吹仪浓缩至约 0.5 mL,冷冻干燥得粗提物。

### 2.2 HS 的纯化

以 3 mmol/L HCl 溶液为流动相充分平衡 AG Dowex 50W  $\times$  2 色谱柱(3 mL),将上述糖胺聚糖粗提物用流动相 100  $\mu\text{L}$  溶解后上样,流速 0.1 mL/min,分部收集,吡啶法检测,合并含糖组分并用稀氨水中和后,浓缩至 0.2 ~ 0.3 mL。采用 Sephadex G-10 凝胶过滤色谱柱(10 mm  $\times$  250 mm)以水为流动相,在流速 0.5 mL/min 下进行脱盐处理,合并含糖组分,浓缩至 0.2 ~ 0.3 mL。再采用 Q-Sepharose Fast Flow 色谱柱(1 mL),分别用水、0.4 mol/L NaCl、0.7 mol/L NaCl 溶液各洗脱 3 mL,流速 0.1 mL/min,收集 0.7 mol/L NaCl 溶液洗脱部分,0 透析 2 d 后浓缩至约 0.5 mL,冻干,得 HS(30 ~ 40  $\mu\text{g}$ )。

### 2.3 糖醛酸含量测定

参考吡啶法<sup>[2]</sup>,略加改进:取糖胺聚糖溶液 100  $\mu\text{L}$ ,加入预冷硫酸 500  $\mu\text{L}$ ,混匀,沸水中加热 20 min,

立即冷却,加入 0.1% 吡啶乙醇溶液 20  $\mu\text{L}$ ,混匀,沸水中加热 15 min,立即冷却,以葡萄糖醛酸为对照,在 532 nm 波长处测定吸光度。

### 2.4 HS 纯度分析

醋酸纤维素薄膜电泳<sup>[3]</sup>:以 0.1 mol/L ZnAc 为电泳缓冲液(pH 6.3),上样 1  $\mu\text{L}$ ,在 100 V 下电泳 30 min 取出,用 1% Alcian blue(阿尔辛蓝)溶液染色 30 min,再经 2% 乙酸脱色。

### 2.5 HS 的酶解

取 HS 供试品约 10  $\mu\text{g}$ ,加入酶解液(50 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  缓冲液,pH 7.0,含 0.01% 牛血清白蛋白、100 mmol/L NaCl、肝素酶和肝素酶各 0.01 u) 20  $\mu\text{L}$ ,30  $^{\circ}\text{C}$  下酶解 48 h,沸水中灭活 5 min,超滤(截留相对分子质量 3 000)离心 15 min,冻干,得 HS 二糖。

### 2.6 HS 二糖的荧光标记<sup>[4]</sup>

取 HS 二糖约 10  $\mu\text{g}$ ,加入标记试剂(冰乙酸 15  $\mu\text{L}$ ,二甲亚砜 35  $\mu\text{L}$ ,2-AB 2.3 mg, $\text{NaBH}_3\text{CN}$  3.1 mg) 50  $\mu\text{L}$ ,65  $^{\circ}\text{C}$  下反应 4 h。将标记后的 HS 二糖采用纸色谱法去除过量 2-AB,以正丁醇-乙醇-水(4:1:1)为展开剂,经两次展开后在 254 nm 紫外灯下将标记供试品剪下,分别用乙腈 5 mL、水 1 mL 洗涤,合并水洗部分,0.22  $\mu\text{m}$  滤器过滤,冻干备用。

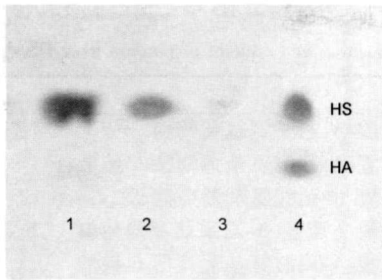
### 2.7 HS 二糖的组成分析

采用 HPLC 法,色谱条件为:PA03 色谱柱,以 16 ~ 0.798 mol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  溶液为流动相梯度洗脱,流速 0.8 mL/min,柱温 35  $^{\circ}\text{C}$ ,荧光检测器检测,激发波长 330 nm,发射波长 420 nm。分别取标记后的 HS 二糖和二糖对照品 20  $\mu\text{L}$ ,注入色谱仪,采用专用色谱软件采集和分析数据。

## 3 结果与讨论

### 3.1 猪肝组织中 GAG 的提取

动物组织中 GAG 常与蛋白质结合成相应的蛋白聚糖,因此,可分别用稀碱水解法和蛋白酶水解法释放蛋白聚糖中的 GAG。但碱水解常会造成 HS 糖链中艾杜糖醛酸 C2 上 *o*-硫酸基团的丢失,同时艾杜糖醛酸 C2、C3 上的反式羟基易发生差向异构作用,乙酰氨基葡萄糖 C6 位也易去硫酸基而形成 3,6-内醚葡萄糖,不利于进一步结构研究。因此本实验分别采用了胰蛋白酶与中性蛋白酶两步酶解法进行酶解,以使 HS 提取完全。提取后的 HS 经醋酸纤维素薄膜电泳检查,结果(见图 1,第 1 道)显示,猪肝组织的 GAG 组成简单,除 HS 外,仅含少量透明质酸,有利于进一步纯化。



1. 纯化前; 2. 纯化后; 3. 经肝素酶、降解后; 4. HS 和透明质酸 (HA) 对照品

1. Before purification; 2. After purification; 3. Digested by heparinase and ; 4. Standards of HS and HA

图 1 醋酸纤维素薄膜电泳图

Fig 1 Cellulose acetate membrane electrophoresis graph

### 3.2 总糖胺聚糖的纯化

GAG 经酶解提取后, 蛋白质是最主要的杂质。目前多采用三氯乙酸沉淀法去除杂蛋白。由于 GAG 在强酸环境中不稳定, 常造成糖链结构变化, 因此, 本实验采用了温和的阳离子交换色谱法去除蛋白质。大多数氨基酸 pI 在 4.0 以上, 在 pH 3.0 时带有正电荷, 而 GAG 分子中含有羧基和硫酸酯基, 故在 pH 3.0 时带负电荷<sup>[5]</sup>, 所以采用阳离子交换色谱以 3 mmol/L HCl 溶液 (pH 3.0) 为流动相洗脱时, 可使 GAG 与蛋白质完全分离。结果见图 2。纯化后的 GAG 经薄层色谱以及茚三酮显色分析表明, 供试品中不含蛋白质。

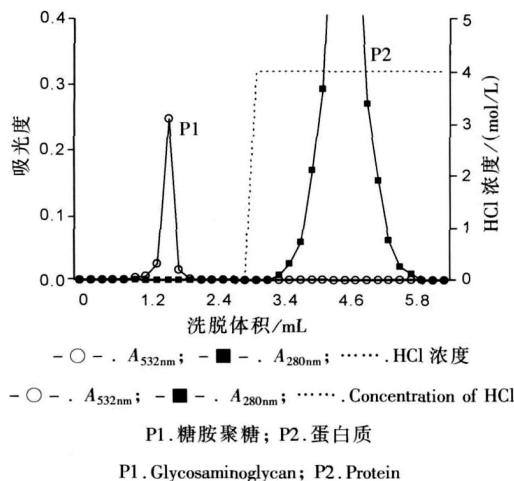


图 2 供试品在 AG 50W-X2 的色谱分离图

Fig 2 Separation graph of sample on a AG 50W-X2 column

### 3.3 HS 的纯化

肝组织中含有丰富的肝糖原, 提取液中还含有大量中性糖。另外, 肝组织中除 HS 外, 还含有其他 GAG 成分, 因此需要进一步分离纯化。虽然乙醇分级沉淀法是 GAG 制备中最常用的一种分级方法, 但不适于 GAG 的微量提取分离。另一种实验室常用

的分级方法是软骨素酶 ABC 消化法, 可以将透明质酸、硫酸软骨素、硫酸皮肤素降解为低分子寡糖, 再用凝胶色谱法去除, 但此法成本较高, 操作烦琐, 且无法去除中性糖。此外, 季铵盐络合法也常用于 GAG 的纯化, 季铵盐与 GAG 形成的复合物可在不同浓度盐溶液中解离, 但在微量条件下因难以准确控制临界盐浓度, 常使分离效果不理想。因此本实验采用了阴离子交换色谱法。不同 GAG 由于结构差异, 所携带的负电荷密度不同, 在阴离子交换树脂上的保留行为也不同, 因此在色谱分离时可以用不同盐浓度分别进行洗脱而得以分离。首先用水洗脱可去除中性糖, 透明质酸可在 0.4 mol/L NaCl 溶液下洗脱, 而 HS 可在 0.7 mol/L NaCl 溶液下洗脱, 结果见图 3。电泳结果 (图 1, 第 2 道) 显示, 纯化后的 HS 为单一条带, 表明已不含其它糖胺聚糖成分。其迁移率与 HS 对照品一致, 且可被肝素酶、降解 (图 1, 第 3 道), 证明其为 HS。需要说明的是, 其他组织来源的 GAG 中还可能存在硫酸软骨素、硫酸皮肤素、硫酸角质素及肝素, 其中硫酸软骨素和硫酸皮肤素可在 0.8 mol/L NaCl 溶液下洗脱, 肝素可在高于 1.0 mol/L NaCl 溶液下洗脱。

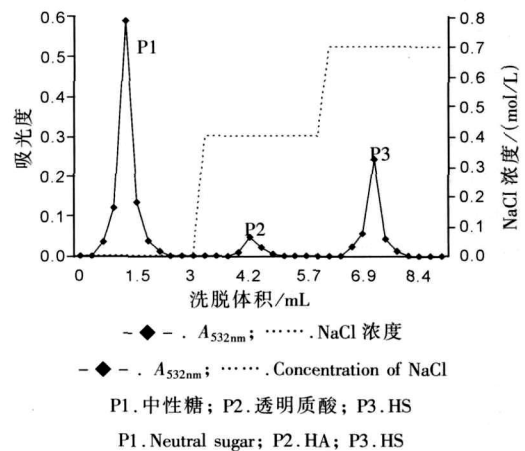


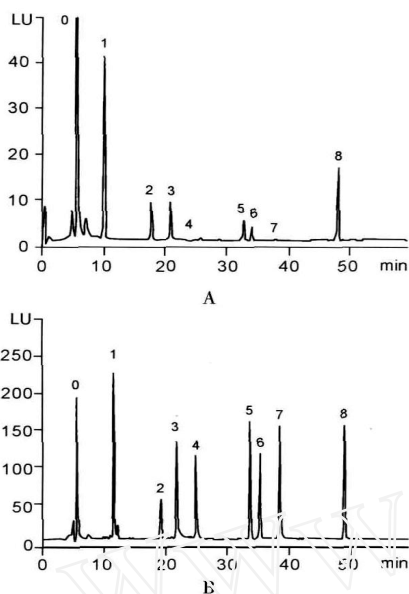
图 3 供试品在 Q-Sepharose Fast Flow 上的分离图

Fig 3 Separation graph of sample on a Q-Sepharose Fast Flow column

### 3.4 HS 中的二糖组成分析

HS 结构虽然复杂, 但可以通过其二糖组成分析剖析其细微结构, 且二糖组成分析是研究 HS 构效关系的基础。本实验采用特异酶解获得二糖, 经 2-AB 荧光标记后采用高效液相色谱 (HPLC) 分析 (最低检出限小于 100 ng)。猪肝 HS 二糖组成分析结果见图 4 和表 1。

表 1 显示, 猪肝组织 HS 中, 非硫酸化二糖比例最高 (48.2%), 三硫酸二糖次之 (21.4%), 不同类型二硫酸二糖较低 (10.1%), 不同类型单硫酸化二糖



A. 猪肝 HS; B. 各种二糖对照品

A. Porcine liver HS; B. Disaccharides standards

0. 2-AB; 1. 己糖醛酸-*N*-乙酰氨基葡萄糖; 2. 己糖醛酸-*N*-乙酰氨基葡萄糖-*G*-硫酸; 3. 己糖醛酸-*N*-硫酸氨基葡萄糖; 4. 己糖醛酸-2-硫酸-*N*-乙酰氨基葡萄糖; 5. 己糖醛酸-*N*-硫酸氨基葡萄糖-*G*-硫酸; 6. 己糖醛酸-2-硫酸-*N*-硫酸氨基葡萄糖; 7. 己糖醛酸-2-硫酸-*N*-乙酰氨基葡萄糖-*G*-硫酸; 8. 己糖醛酸-2-硫酸-*N*-硫酸氨基葡萄糖-*G*-硫酸

0. 2-AB; 1. UA-GcNAc; 2. UA-GcNAcS; 3. UA-GcNS; 4. UA2S-GcNAc; 5. UA-GcNS6S; 6. UA2S-GcNS; 7. UA2S-GcNAc6S; 8. UA2S-GcNS6S

图4 猪肝 HS 的二糖组成 HPLC 色谱图

Fig 4 HPLC graph of porcine liver HS disaccharide composition 低(9.9%), 猪肝 HS 二糖平均取代度约为 1.0, 远比肝素(2.0~3.0)低。

表 1 猪肝组织 HS 中二糖组成及其含量

Tab 1 Composition and content of porcine liver HS disaccharides

二糖	含量/ %
己糖醛酸- <i>N</i> -乙酰氨基葡萄糖	48.2
己糖醛酸- <i>N</i> -乙酰氨基葡萄糖- <i>G</i> -硫酸	10.5
己糖醛酸- <i>N</i> -硫酸氨基葡萄糖	9.9
己糖醛酸-2-硫酸- <i>N</i> -乙酰氨基葡萄糖	-
己糖醛酸- <i>N</i> -硫酸氨基葡萄糖- <i>G</i> -硫酸	5.4
己糖醛酸-2-硫酸- <i>N</i> -硫酸氨基葡萄糖	4.7
己糖醛酸-2-硫酸- <i>N</i> -乙酰氨基葡萄糖- <i>G</i> -硫酸	-
己糖醛酸-2-硫酸- <i>N</i> -硫酸氨基葡萄糖- <i>G</i> -硫酸	21.4

综上所述,此方法可以有效分离、纯化微量猪肝组织中 HS,并进行二糖组成分析,为比较不同生物组织以及正常和肿瘤组织中 HS 的结构差异性提供了参考方法。

## 参考文献:

- [1] Vynios D H, Karamanos N K, Tsiganos C P. Advances in analysis of glycosaminoglycans: its application for the assessment of physiological and pathological states of connective tissue[J]. J Chromatogr B, 2002, 781(1-2): 21-38.
- [2] Bitter T, Muir H. A modified uronic acid carbazole reaction[J]. Anal Biochem, 1962, 4: 330-334.
- [3] Renzo C, Sato S, Setien A, et al. A new electrophoretic method for the complete separation of all known animal glycosaminoglycans in a monodimensional run[J]. Anal Biochem, 1979, 99(2): 311-315.
- [4] Bigge J C, Patel T P, Bruce J A, et al. Nonspecific and efficient fluorescent labeling of glycans using 2-aminobenzamide and anthranilic acid[J]. Anal Biochem 1995, 230(2): 229-238.
- [5] 张峥, 耿芳宋, 高华. 猪软骨中硫酸软骨素的分离纯化[J]. 中国生化药物杂志, 2004, 25(3): 144-146.

## 《药学服务与研究》杂志 2008 年征订启事

《药学服务与研究》杂志是第二军医大学主管、第二军医大学长海医院主办的我国第一本有关药学服务方面的全国性专业学术期刊, 主要报道药学尤其是药学服务的研究进展和实践, 介绍国内外药学领域的新知识、新技术、新方法和新成果, 为安全、有效、经济用药提供理论和实践信息。国内统一连续出版物号 CN31-1877/R, 国际标准连续出版物号 ISSN 1671-2838。

本刊读者对象为从事医药卫生工作的中高级科研、医疗、教学、管理、生产、营销机构的人员和高等医药院校的师生。本刊创刊于 2001 年 12 月, 现为中国科技核心期刊、中国科技论文统计源期刊、中国科学引文数据库、中国生物学数据库核心期刊、中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊, 并已被国际著名检索期刊和数据库, 如美国化学文摘(CA)、俄罗斯文摘杂志(VINITI)、美国国际药文摘(IPA)和荷兰 Elsevier 文献数据库收录和利用, 也被国内很多大型数据库和文摘类期刊收录和利用。本刊国内外公开发行, 邮发代号 4-706, 国外发行代号 BM 3731, 为双月刊, 双月末出版, 大 16 开, 正文 80 页, 国内每期(册)定价 10 元, 全年 60 元。敬请及时到当地邮局订阅, 也可直接汇款至本杂志社订阅, 免邮资费。地址: 上海市长海路 174 号, 邮编: 200433; 电话: 021-65519829(兼传真), 021-25074639; http://www.pcarjournal.net.cn; E-mail: PharmCR@yahoo.com.cn。