

半枝莲多糖 B3-PS2 分离纯化及抗补体活性研究

吴彦^{1*}, 魏和平¹, 王建波²

(1. 安庆师范学院生命科学系, 安徽 安庆 246011; 2. 武汉大学生命科学学院, 湖北 武汉 430072)

摘要: 本文提取半枝莲多糖, 分别经 DEAE-cellulose、Sephacryl S-300 柱层析分离纯化后得到均一的 B3-PS2 组分, 并对该组分进行了抗补体活性研究。研究结果表明 B3-PS2 组分分子质量为 1 100 kD, 主要由 Glc、Gal 和 Ara 三种单糖组成, 糖残基摩尔比为 2.7 : 2.7 : 1.0, 还含有少量的 Man、Rha、Fuc 和 Xyl。B3-PS2 抑制补体活性的经典途径 CH_{50} 为 $(0.23 \pm 0.03) \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 抗补体作用靶点为补体 C1r、C1s、C3、C4 组分。半枝莲多糖 B3-PS2 组分体外抗补体活性接近于阳性对照肝素, 表明活性较好, 这显示了半枝莲多糖治疗补体过度激活相关疾病的潜在价值。

关键词: 半枝莲; 多糖; 抗补体

中图分类号: R931.71

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 06-0615-05

Anti-complement activity of polysaccharide B3-PS2 purified from *Herba Scutellariae Barbatae*

WU Yan^{1*}, WEI He-ping¹, WANG Jian-bo²

(1. The Life Science Department of Anqing Normal College, Anqing 246011, China;

2. College of Life Science, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: The polysaccharide B3-PS2 was extracted and purified from *Herba Scutellariae Barbatae* through chromatography of DEAE-cellulose and Sephacryl S-300 column. Average molecular weight of B3-PS2 was about 1 100 kD. It was composed of Glc, Gal and Ara in the ratio of 2.7 : 2.7 : 1.0, along with trace of Man, Rha, Fuc and Xyl. B3-PS2 inhibited complement activation on the classic pathways with CH_{50} value of $(0.23 \pm 0.03) \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. The targets of B3-PS2 upon the complement system were C1r, C1s, C3 and C4. These results suggested that anti-complementary activity of B3-PS2 was closed to its positive control heparin. It strongly suggested that the polysaccharide B3-PS2 from *Herba Scutellariae Barbatae* could be a potential candidate in treating those complement-associated diseases.

Key words: *Herba Scutellariae Barbatae*; polysaccharide; anti-complement

补体系统是人体重要的免疫防御系统之一, 然而该系统的非正常激活会引起人体免疫系统的过度反应, 造成人体自身正常组织的损伤, 参与多种疾病的病理过程。如类风湿性关节炎、老年性痴呆、系统性红斑狼疮、急性心肌梗死、急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)

等。最新研究还发现重症非典型性肺炎 (SARS) 和禽流感也和补体系统的过度激活相关^[1,2], 目前对此类疾病尚无理想的治疗药物。

中药半枝莲 (*Herba Scutellariae Barbatae*) 别名并头草, 为唇形科植物半枝莲 (*Scutellaria barbata* D.Don) 的干燥全草。主要含有生物碱、黄酮苷、酚类、多糖等活性成分, 具有清热解毒、化瘀利尿、止血定痛等功效。孟延发等^[3]提取的半枝莲多糖对 S-180 肉瘤细胞及腹水肝癌细胞有一定的抑制作用; 陆平成等^[4]研究半枝莲多糖对细胞免疫的调节作用,

收稿日期: 2008-11-06.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30570112); 安徽省教育厅自然科学基金重点研究项目 (KJ2007A123ZC); 安徽省高等学校青年教师科研资助项目 (2005jq1115).

*通讯作者 Tel: 86-556-5500766, Fax: 86-556-5346070,
E-mail: sportman821@sina.com

证明在体外可促进 ConA 诱导的小鼠脾细胞淋巴细胞转化。本文提取半枝莲多糖, 运用活性跟踪的方法分离和纯化了一种有良好抗补体活性的半枝莲多糖组分, 既为进一步开发半枝莲的中药资源, 更为找到较好的抗补体天然药物打下基础。

材料与方法

材料 半枝莲 (购自上海汇丰大药房, 由安庆师范学院魏和平副教授鉴定)。DEAE-Cellulose (上海恒信化学试剂公司), Sephacryl S-300 (北京慧德易公司), 抗补体 C1q、C2、C5、C9 抗血清 (Merck 公司), 抗补体 C1r、C1s 抗血清 (Abcam 公司), 抗补体 C3、C4 抗血清 (上海太阳生物技术公司), 乙醇、NaOH、苯酚、硫酸、三氯醋酸、NaCl、三氟醋酸 (TFA)、 NaBH_4 、冰醋酸、甲醇、醋酐、甲苯及氯仿均为分析纯。

仪器 Jouan MR22i 型低温高速离心机 (JOUAN, 法国); Well scan MK3 型酶标仪 (Thermo Labsystems, 芬兰); Freezedryer18 型冷冻干燥器 (Labconco, 美国); Direct-Q 超纯水系统 (Millipore, 美国); Agilent HP-1100 型高效液相色谱仪 (Agilent, 美国); Trace GC ULTRA DSQ 气相-质谱联用仪 (Thermo Electron, 美国)。

半枝莲粗多糖的提取^[5] 半枝莲粉碎后以乙醇渗漉提取, 药渣晾干后沸水煮 3 次, 每次加四倍水, 煮 2 h。所得母液合并, 浓缩。浓缩液用 15% 三氯醋酸在 4 °C 下脱蛋白, 离心, 上清液用 10% NaOH 溶液中和, 流水透析 2 d, 再浓缩, 乙醇沉淀, 得到的沉淀冷冻干燥得粗多糖 (收率为 3.7%)。

半枝莲多糖中抗补体活性成分的活性导向分离

离子交换柱层析 取半枝莲粗多糖 3 g, 加入适量蒸馏水溶解, 离心, 上清液用 DEAE-cellulose 柱层析 (Cl⁻ 型, 30 cm × 5 cm) 进行初步分离。首先以蒸馏水作为洗脱液, 然后用 0.4、0.8、1.2 及 2.0 mol·L⁻¹ NaCl 溶液洗脱, 流速为 0.8 mL·min⁻¹, 每管 20 min 收集流分, 隔管检测 280 nm 和 490 nm (硫酸-苯酚法) 下的吸收度值。每种洗脱液收集一个组分, 分别为: B1、B2、B3、B4 和 B5。

凝胶柱层析 取离子交换柱层析后的半枝莲多糖组分 100 mg, 加入适量蒸馏水, 10 000 r·min⁻¹ 离心, 上清液用 Sephacryl S-300 柱 (100 cm × 5 cm) 层析分离。以蒸馏水作为洗脱液, 流速为 0.8 mL·min⁻¹, 每管 20 min 收集流分。隔管检测 490 nm 下的吸收度值, 同时活性跟踪各管馏分。

多糖的纯度鉴定及分子质量测定

纯度鉴定 (HPGPC 法) Agilent HP-1100 型高效液相色谱仪, 分析柱为 TSK GMPWXL 型凝胶柱 (300 mm × 7.6 mm), 有效测试分子质量范围为 5~10 000 kD (多糖)。测试条件: 流动相为水, 流速为 0.8 mL·min⁻¹, 柱温 25 °C。

分子质量测定 按照纯度鉴定的方法, 以标准葡聚糖 T-2000 的洗脱体积作为柱的空体积 V_0 , 葡萄糖的洗脱体积作为柱的总体积 V_t , 其他各标准多糖的洗脱体积为 V_e , 以公式 $K_{av} = (V_e - V_0)/(V_t - V_0)$ 计算, 然后以 $\lg M - K_{av}$ 作图得标准曲线, 再由样品的洗脱体积 V_e 计算得到 K_{av} , 求得被测样品分子质量。

糖及蛋白质含量测定 硫酸-苯酚法测定糖含量, 考马斯亮蓝染色法测定蛋白质含量^[6]。

糖组成分析^[7]

样品的完全酸水解及薄层层析 取 5 mg 多糖样品, 加入 2 mol·L⁻¹ 三氟醋酸 (TFA) 4 mL, 充氮气封管, 120 °C 下水解 3 h。减压蒸干, 加入甲醇 1~2 mL, 再蒸干, 重复 3 次, 完全除去 TFA。加入 0.5 mL 水使样品溶解, 用 0.3 mol·L⁻¹ NaH_2PO_4 浸渍过的高效硅胶板薄层层析检测样品所含的糖组成及水解反应进行的是否完全。

还原与乙酰化 将水解后的样品溶于 3 mL 蒸馏水中, 加入 20 mg NaBH_4 还原 2 h, 再逐滴加入冰醋酸破坏过量的 NaBH_4 , 减压蒸干, 加入 1~2 mL 甲醇及一滴冰醋酸, 再减压蒸干, 重复 3 次, 室温下真空干燥 5~6 h。还原后的样品中加入 2 mL 醋酐, 密塞, 100 °C 反应 1 h, 减压蒸干, 加入 2 mL 甲苯, 再蒸干, 重复 3 次。

萃取与气相分析 将乙酰化后的产物用氯仿和蒸馏水交替溶解转移到分液漏斗中, 去除水层, 再以等体积的蒸馏水洗涤 2 次, 氯仿层以无水硫酸钠干燥, 将氯仿溶液浓缩至 0.1 mL 左右后进行气相色谱 (GC) 分析。

GC 条件: HP-5 毛细管色谱柱 (30 m × 0.25 mm); 氦气 1 mL·min⁻¹; 升温程序: 初始柱温 140 °C, 保持 6 min, 然后以每分钟 10 °C 的速度升至 175 °C, 保持 1 min, 然后以每分钟 1 °C 的速度升至 187 °C, 保持 8 min, 再以每分钟 10 °C 的速度升至 250 °C, 保持 4 min。

均一多糖抗补体活性及作用靶点测定

补体经典途径的溶血活性 (CH_{50}) 测定^[8] 取确定临界浓度的补体与供试品混匀, 按表 1 加各试剂。37 °C 水浴 30 min 后低温离心 10 min, 取每管上清液

0.2 mL, 用酶标仪在 405 nm 下测定吸收度。以中药粗提物浓度作为 X 轴, 溶血抑制率作为 Y 轴作图, 计算 CH₅₀ 值。

Table 1 Volume of components for hemolysis assay on the classic pathway (mL)

Component	Sample control	Calibration of sample	Complement control	100% Lysis
BBS	0.2	0.5	0.3	—
H ₂ O	—	—	—	0.5
Complement	0.1	—	0.1	—
Sample	0.1	0.1	—	—
anti-SRBC	0.1	—	0.1	—
2% SRBC	0.1	—	0.1	0.1

补体作用靶点的确定^[9] 将临界浓度的补体 0.2 mL 分别与 0.2 mL 不同稀释度的 C1q、C1r、C1s、C2、C3、C4、C5、C9 抗血清混合, 37 ℃ 水浴后离心。各取上清液 0.2 mL, 分别与 0.1 mL 溶血素、0.2 mL BBS 及 0.1 mL SRBC 混合, 37 ℃ 水浴后离心, 测定上清液在 405 nm 的吸收度, 进行抗补体 C1q、C1r、C1s、C2、C3、C4、C5、C9 抗血清效价测定, 确定临界抗血清浓度。

将临界浓度的抗补体抗血清分别与临界稀释浓度的补体等体积混合, 37 ℃ 水浴后离心 10 min。上清液即为补体缺失血清, 标记后于 -70 ℃ 保存备用。

临界浓度的补体与供试品混匀, 按表 2 加入各成分。37 ℃ 水浴后离心测定吸收度。比较缺失血清组和相应的缺失血清中加入了供试品处理后的人血清的靶点检测组溶血率的变化。

结果

1 半枝莲多糖中抗补体活性成分的活性导向分离

1.1 离子交换柱层析 DEAE-cellulose 柱层析初步分离后, 根据糖显色反应和紫外检测的结果 (图 1) 合并相同流分, 经浓缩、自来水透析、蒸馏水透析及冷冻干燥得到 5 个次级组分: B1、B2、B3、B4 和 B5。

得率 (占半枝莲干重) 分别为: 1.6‰、2.52‰、0.98‰、0.74‰和 0.59‰。

采用补体经典途径的溶血活性测定方法检测半枝莲多糖及 B1~B5 6 个部位的经典途经抗补体活性。结果如图 2 所示, B3、B4、B5 部位活性最强, 半枝莲粗多糖次之, B1、B2 活性很弱。说明半枝莲多糖抗补体活性成分主要集中在 B3、B4、B5 部位, 而此 3 个部位中 B3 含量最高, 取 B3 部位进一步分离纯化。

1.2 凝胶柱层析 B3 凝胶柱层析洗脱图谱和活性跟踪图谱见图 3。收集活性峰部分, 再经过透析、冷冻干燥得到不同组分。收集 13~15 管为 B3-P1 组分,

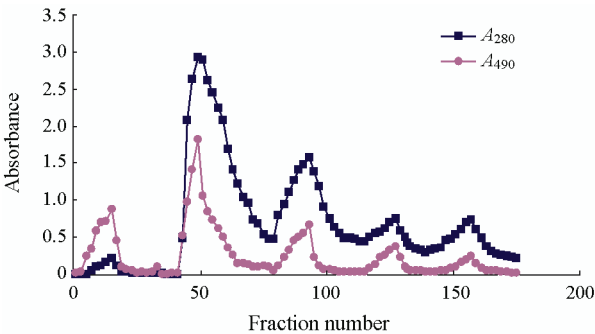


Figure 1 Ion-exchange chromatogram of polysaccharides on DEAE-cellulose column (30 cm × 5 cm)

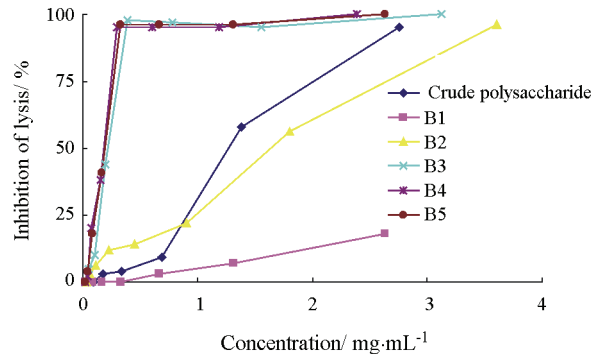


Figure 2 Anti-complementary activity of the subfractions isolated from the crude polysaccharides fraction of *Herba Scutellariae Barbatae* on DEAE-cellulose column

Table 2 Volume of components for complement targets identification assay (mL)

Component	Targets identification	Sample control	Calibration of sample	C-depleted control	Complement control	100% Lysis
BBS	—	0.2	0.5	0.1	0.3	0.5
H ₂ O	—	—	—	—	—	—
Complement	0.1	0.1	—	0.1	0.1	—
Sample	0.1	0.1	0.1	—	—	—
anti-SRBC	0.1	0.1	—	0.1	0.1	—
C-depleted	0.2	—	—	0.2	—	—
2% SRBC	0.1	0.1	—	0.1	0.1	0.1

26~32 管为 B3-P2 组分。

经过糖含量检测,第二个部位 B3-P2 组分含糖量最高,而两个组分活性相差不大,故取 B3-P2 组分进行深入研究。

2 纯度鉴定 (HPGPC 法) 及分子质量测定

经高效凝胶渗透色谱法 (HPGPC) 检测, B3-P2 组分不纯 (图 4), 再经多次 Sephacryl S-300 柱 (100 cm × 5 cm) 层析分离, 得到均一的组分 B3-PS2 (图 4 中的主峰成分)。

B3-PS2 经 HPGPC 分析得到单一对称性峰 (图 5), 表明 B3-PS2 是均一多糖, 其分子质量为 1 100 kD。

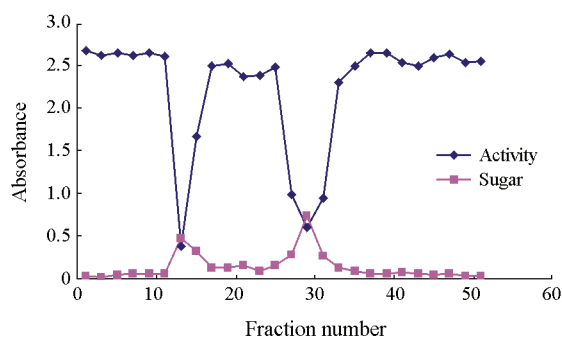


Figure 3 Size-exclusion column chromatography of B3 on Sephacryl S-300 column (100 cm × 5 cm)

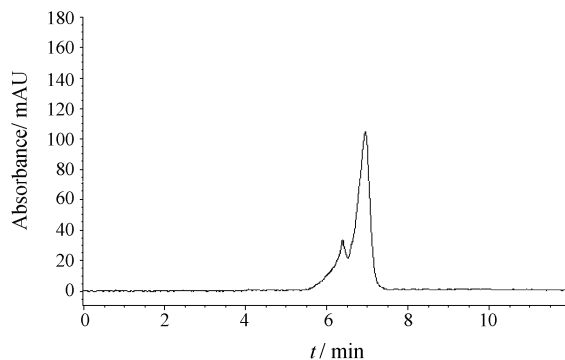


Figure 4 Profile of B3-P2 in HPGPC

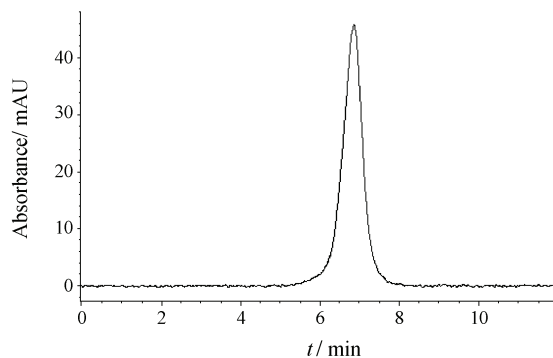


Figure 5 Profile of B3-PS2 in HPGPC

3 B3-PS2 理化性质

B3-PS2 为棕色粉末, 占半枝莲干重的 0.39%。

B3-PS2 的糖含量为 92.3%, 蛋白质含量为 5.2%。

4 B3-PS2 糖组成分析

气相色谱分析结果如图 6, 可知 B3-PS2 组分中糖残基摩尔比为 Glc : Gal : Ara = 2.7 : 2.7 : 1.0, 还含有少量的 Man、Rha、Fuc 和 Xyl。

5 B3-PS2 抗补体活性及作用靶点

由图 7 可知半枝莲多糖组分 B3-PS2 抗补体活性 CH_{50} 为 $(0.23 \pm 0.03) \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 阳性对照肝素的抗补体活性 CH_{50} 为 $(0.20 \pm 0.05) \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

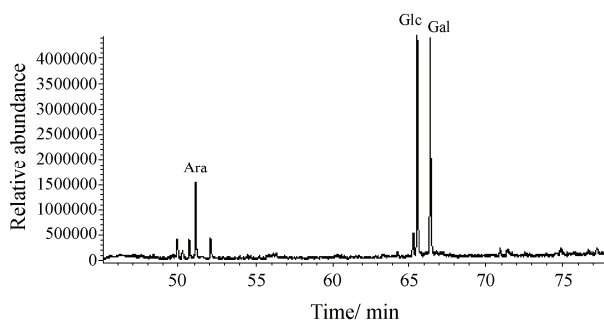


Figure 6 The GC chromatogram of B3-PS2

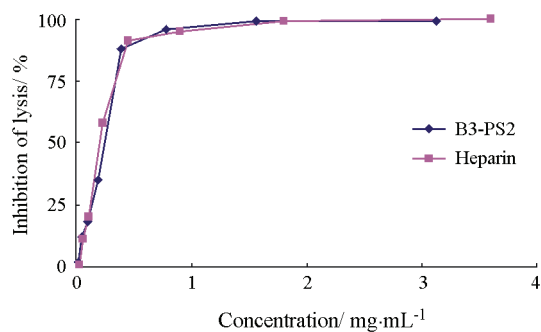


Figure 7 Anti-complementary activity on the classic pathway of B3-PS2 and heparin

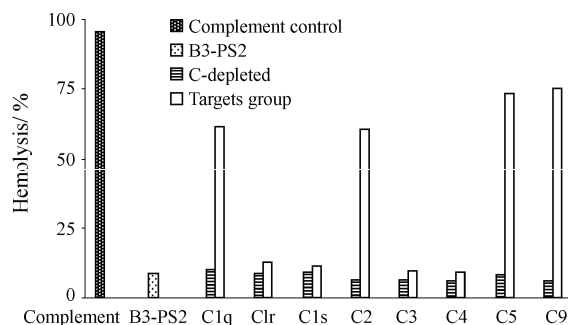


Figure 8 Hemolytic assays for identification the targets of B3-PS2 utilizing C-depleted serum

如图 8 所示, 补体对照组溶血率为 $(95.6 \pm 2.6)\%$, 表示人血清能引起绵羊红细胞全溶血, 实验体系几乎全溶血。中药组的溶血率为 $(8.5 \pm 1.9)\%$, 表明 B3-PS2 能几乎全部抑制人血清引起的绵羊红细胞溶血。缺失血清组的溶血率均小于 10%, 说明缺失血清自身不引起溶血。

为进一步研究 B3-PS2 在补体上的作用位点, 向自制 C1q、C1r、C1s、C2、C3、C4、C5、C9 缺失血清中分别加入经临界浓度 B3-PS2 预处理的人血清, 考察 B3-PS2 预处理的人血清对缺失血清溶血能力的恢复程度, 结果见图 8。经 B3-PS2 预处理的人血清的加入不能使补体 C1r、C1s、C3 和 C4 缺失的血清的溶血能力恢复, 溶血率分别为 $(12.7 \pm 1.5)\%$ 、 $(11.3 \pm 1.8)\%$ 、 $(9.7 \pm 2.1)\%$ 和 $(9.1 \pm 1.6)\%$, 说明 B3-PS2 作用于补体 C1r、C1s、C3、C4 组分。而在补体 C1q、C2、C5 和 C9 缺失血清体系中, 溶血率分别达到 $(61.5 \pm 3.5)\%$ 、 $(60.8 \pm 2.9)\%$ 、 $(73.5 \pm 2.8)\%$ 和 $(75.2 \pm 3.2)\%$, 体系的溶血率明显提高, 结果提示 B3-PS2 不作用于 C1q、C2、C5 和 C9。

讨论

细胞溶血法测总补体的水平在经典途径主要反映的是补体 C1~C9 的水平。该法简便快速, 但因补体(血清)浓度的不同, 会导致同一样品出现不同的 CH_{50} 值。虽然此方法存在缺陷, 但仍能提供重要的信息, 而且也是目前临床和实验室常用的、唯一的、简便有效的测定总补体活性的方法^[10]。补体活化是一个链式反应, 补体激活的任何一个环节受到抑制, 补体都无法完整活化引起溶血效应。若加入缺失血清后, 缺失的组分能被中药处理过的血清补充, 缺失血清的溶血能力恢复, 提示中药粗提物不作用于该组分; 如果加入缺失血清后, 缺失的组分不能被中药处理过的血清补充, 体系不溶血, 则提示中药正是作用于此位点。利用此原理可采用补体缺失血清研究供试品的作用靶点。国外多采用此法对补体抑制剂的作用靶点进行研究^[11]。

肝素是由糖醛酸和氨基葡萄糖聚合而成的一个硫酸化多糖^[12], 是较成熟的补体抑制剂。但由于肝素的抗凝血作用, 在生物体内需较高浓度才能发挥药效, 且副作用大^[13]。B3-PS2 体外抗补体活性接近于肝素, 而且作为从天然产物中提取的活性成分, 用它来作为补体抑制剂, 既有成本低的优势, 又可以直接被机体消化吸收, 副作用小。本文的实验结果为进一

步开发利用半枝莲资源提供了有益的线索。

References

- [1] Makridea SC. Therapeutic inhibition of the complement system [J]. Pharm Rev, 1998, 50: 59-87.
- [2] Lustep HL, Clark WM. Current status of neuroprotective agents in the treatment of acute ischemic stroke [J]. Curr Neurol Neurosci Rep, 2001, 1: 13-18.
- [3] Meng YF, Li ZX, Zhang L, et al. Isolation, purification and analysis of polysaccharide SPS_4 from *Scutellaria barbata* D.Don [J]. Chin J Biochem Mol Biol (中国生物化学与分子生物学报), 1993, 9: 224-228.
- [4] Lu PC, Xu YM. Regulatory function of polysaccharide from *Herba Scutellariae Barbatae* on cellular immunity [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med (南京中医药大学学报), 1989, 5: 32-34.
- [5] Wang SZ, Ding K, Lin SQ, et al. Isolation, purification and structural analysis of GL-PP-3A, an active polysaccharide peptide from *Ganoderma lucidum* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2007, 42: 1058-1061.
- [6] Wang WP, Guo SY, Li L, et al. The determination of protein content in polysaccharides from *Stanuntonia Chinensis* with coomassie brilliant blue method [J]. Food Res Dev (食品研究与开发), 2008, 29: 115-117.
- [7] Neeser JR, Schweizer TF. A quantitative determination by capillary gas-liquid chromatography of neutral and amino sugar (as *O*-methyloxime acetates) and a study on hydrolytic conditions for glycoproteins and polysaccharides in order to increase sugar recoveries [J]. Anal Biochem, 1984, 142: 58-67.
- [8] Xu H, Zhang YY, Zhang JW, et al. Isolation and characterization of an anti-complementary polysaccharide D3-S1 from the roots of *Bupleurum smithii* [J]. Int Immunopharmacol, 2007, 7: 175-182.
- [9] Zhou J, Zhang YY, Zhang JW, et al. Research in Chinese traditional medicine *Eucommia ulmoides* Oliver of the effect on complement system [J]. J Fudan Univ Med Sci (复旦学报医学版), 2006, 33: 101-106.
- [10] Morgen BP. Complement Methods and Protocols [M]. Canada: Humana Press Inc, 2000: 61-72.
- [11] Tissot B, Montdargent B, Chevolut L, et al. Interaction of fucoidan with the proteins of the complement classical pathway [J]. Biochim Biophys Acta, 2003, 1651: 5-16.
- [12] Jaques LB. Heparin: an old drug with a new paradigm [J]. Science, 1979, 206: 528-533.
- [13] Weiler JM, Edens RE, Linhardt RJ, et al. Heparin and modified heparin inhibit complement activation *in vivo* [J]. J Immunol, 1992, 148: 3210-3215.