

羊胎盘免疫调节活性因子(SPIF-I)的分离纯化和鉴定研究

吴开平, 魏泓*

(第三军医大学基础部实验动物学教研室, 重庆 400038)

摘要: 为探讨研究羊胎盘的活性组分, 将羊胎盘绞碎通过匀浆、冻融、超滤等步骤制备羊胎盘提取液, 经 Sephadex G 50 和 Sephadex G 25 凝胶过滤、Sephadex G 10 凝胶柱脱盐, 反相高效液相色谱纯化出单一组分并进行理化性质、生物活性初步研究。结果得到紫外特征吸收峰为 273 nm、分子质量为 303.8 的羊胎盘免疫调节活性因子 I (Sheep placental immunoregulating activity factor I, SPIF-I)。体外生物学活性试验证明, SPIF-I 能显著影响小鼠脾淋巴细胞增殖分裂, 具有明显的剂量-效应依赖关系。SPIF-I 是羊胎盘提取液中一种具有免疫调节的小分子活性多肽。

关键词: 羊胎盘; 凝胶层析; 分离纯化; 生物活性

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

Study on Purification and Characterization of Sheep Placental Immunoregulating Activity Factor I

WU Kai-ping, WEI Hong*

(Department of Laboratory Animal Science, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: The sheep placental immunoregulating activity factor I (SPIF-I) that one of the components of sheep placenta was isolated and purified from sheep placenta extract by ultrafiltration, Sephadex G 50, Sephadex G 25 and Sephadex G 10 gel filtration chromatography. SPIF-I exhibited a molecular mass of 303.8 by ESFMS, and its abstract summit of ultraviolet ray was 273 nm. The results of biological activity showed that SPIF-I specifically increased the proliferative respond of mitogen ConA-induced mouse splenocytes. That SPIF-I was a small chain peptide with immunoregulating activity of sheep placenta extract.

Key words: sheep placenta; gel filtration; isolation and purification; biology activity

胎盘具有补气养血益精等功效, 作为民间中药已有多年历史。现代生物学及医学研究表明, 提取胎盘的多种生物活性物质制成的胎盘提取液是一种非常理想的免疫调节剂和营养美容保健品^[1-3]。近年来有关胎盘提取液的研究主要集中在功能和应用方面, 对从中分离纯化出单一活性组分的研究报道甚少^[4-8, 11]。本文从以羊胎盘为材料制备的羊胎盘提取液中分离出羊胎盘免疫调节活性因子 I (SPIF-I) 并进行鉴定, 为以后开发羊源性生物制品提供材料。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

羊胎盘原材料由本校动物中心羊场养殖基地提

供, 置于 20 °C 冰箱保存; Sephadex G 50, Sephadex G 25 和 Sephadex G 10 均为 Pharmacia 公司产品; 噻唑蓝 (Thiazolyl blue, MTT), 刀豆蛋白 A (Concanavalin A, ConA) 和二甲基亚砷 (Dimethyl Sulfoxide, DMSO) 为 Sigma 公司产品; 胸腺肽注射液 (Thymopeptidum, TP) 为西安迪赛生物药业有限责任公司, 其余试剂为国产分析纯。

BFM-6B222 型研磨混炼机, 济南倍力粉技术工程有限公司; CR22G 型高速冷冻离心机, Hitachi KoKi Co. Ltd.; LW 型中空纤维超滤器, 北京市旭成超滤设备厂; Agilent 1100 型高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 仪, 美国惠普公司; 8453 型紫外分光光度计, Agilent 公司; API2000 型质谱仪, 美国 waters 公司; 550 型酶标仪, BioRad 公司。

1.2 羊胎盘提取液的制备

将冷冻羊胎盘绞碎, 超微粉碎制成浆液, 加入灭菌双蒸水混匀并反复冻融 3 次, 18~20 °C 12000 rpm 离心 15 min, 取上清超滤, 得到分子质量在 5000 以

收稿日期: 2005-10-20 接受日期: 2005-12-07

基金项目: 国家自然科学基金 (30070120); 重庆市 2001 年重点技术创新项目 (147)

* 通讯作者: Tel: 86-23-68752051; E-mail: weihong@mail.tmmu.com.cn

下的超滤液。将超滤液在无菌环境中过滤除菌 2 次后冻干于 4 °C 保存。

1.3 SPIF-I 的分离纯化

超纯水稀释羊胎盘提取液冻干粉,以 20 mg/mL 浓度依次经 Sephadex G-50 凝胶柱, Sephadex G-25 凝胶柱层析, Sephadex G-10 凝胶柱脱盐并用反相 HPLC(色谱检测的各项参数参照文献^[9])检测分析各脱盐洗脱峰,将含 SPIF-I 的洗脱峰收集冻干,最后经反相 HPLC 纯化,收集目标成分峰,冻干备用。

1.4 质谱分析与紫外吸收光谱检测

将 SPIF-I 以超纯水稀释后进行紫外光扫描并用 API2000 型质谱仪测定其分子量。

1.5 淋巴细胞增殖实验

采用 MTT 法,参照文献^[10, 11]常规制备小鼠脾淋巴细胞,并用含 10% 小牛血清的 1640 培养液调细胞浓度至 $0.5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^6$ 个/mL,依次向 96 孔细胞培养板中加入淋巴细胞 100 μ L, 20 μ g/mL 的刀豆蛋白(ConA)和不同浓度的 SPIF-I 各 50 μ L,每组设五个复孔,阴性对照组与阳性对照组分别以 1640 培养液和胸腺肽注射液代替 SPIF-I, 37 °C 5% CO₂ 培养箱温育 44 h 后,每孔加入 30 μ L MTT 溶液,继续温育 4 h,加入 100 μ L DMSO,吹打均匀溶解沉淀,酶标仪 550 nm 测 OD 值。

1.6 统计学处理

淋巴细胞增殖实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,并用 SPSS 11.0 统计软件包对数据进行 t 检验。

2 结果

2.1 SPIF-I 的分离纯化

2.1.1 羊胎盘提取液 Sephadex G-50 凝胶层析

羊胎盘提取液经用 Sephadex G-50 凝胶柱(1 cm \times 100 cm)层析, pH 7.4 浓度为 0.01 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液以 0.5 mL/min 流速洗脱。结果出现一个 M 峰(图 1)。各洗脱峰经反相 HPLC 检测分析发现洗脱峰 B 含组分较少,只有两个主要成分峰(图 3),便于进一步分离。

2.1.2 洗脱峰 B 冻干粉 Sephadex G-25 凝胶柱层析

多次重复 Sephadex G-50 凝胶柱层析,收集洗脱峰 B 后经 Sephadex G-25 凝胶柱(1 cm \times 60 cm)层析, pH 7.4 浓度为 0.01 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液以 0.5 mL/min 流速洗脱,结果同样出现一个 M 峰(图 2)。反相 HPLC 检测分析发现此次层析恰好将洗脱峰 B 中的两个主要成分峰分开。将洗脱峰 C 收集经

Sephadex G-10 凝胶柱(1.5 cm \times 30 cm)脱盐,浓缩后再经 HPLC 柱纯化,紫外全波长检测显示(图 4)其纯度达 98.8%(纯度以液相色谱图谱中洗脱峰的峰面积与所有峰总面积百分比计算),将目的成分峰收集,浓缩冻干即为羊胎盘活性因子 I (SPIF-I)。

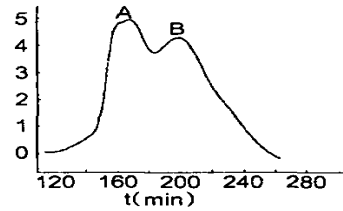


图 1 Sephadex G-50 凝胶柱层析

Fig. 1 Sephadex G-50 gel filtration of sheep placenta extract

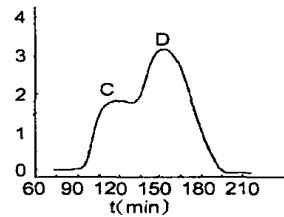


图 2 洗脱峰 B Sephadex G-25 凝胶柱层析

Fig. 2 Sephadex G-25 gel filtration of peak B

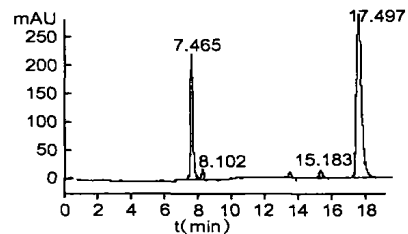


图 3 洗脱峰 B 液相色谱图谱

Fig. 3 RP-HPLC results of peak B

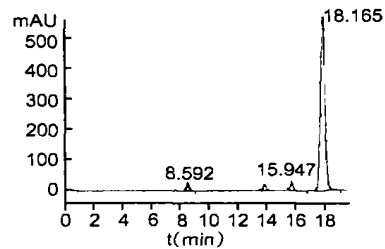


图 4 羊胎盘活性因子 I 液相色谱检测

Fig. 4 RP-HPLC measure for SPIF-I after Sephadex G-15 gel filtration.

2.2 分子量测定

经ES/MS质谱分析(图5)。SPIF-I为单一组分, m/z 304.8为其单电荷峰 $[M+H]^+$, 所以SPIF-I的分子量为303.8。

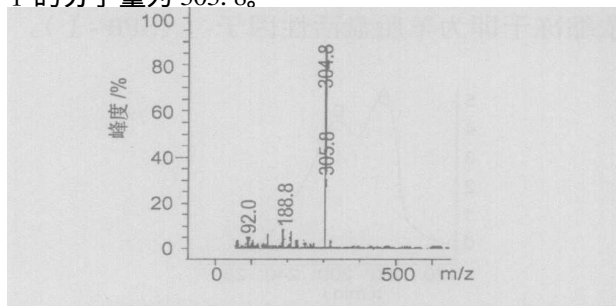


图5 羊胎盘活性因子I的质谱分析

Fig 5 EMFMS spectra of SPIF-I illustrating m/z 304.8 as the protonated molecule $[M+H]^+$ of SPIF-I. The result displayed by the molecular weight of SPIF-I was 303.8

2.3 紫外吸收光谱测定

将SPIF-I在波长100~400 nm进行紫外扫描, 结果显示在273 nm处有单一特征吸收峰(图6)。

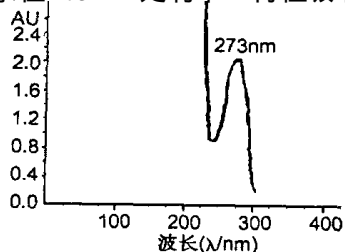


图6 羊胎盘活性因子I紫外扫描检测

Fig 6 Ultraviolet ray measure for SPIF-I. The result displayed by that abstract summit of Ultraviolet ray was 273 nm

2.4 SPIF-I对淋巴细胞分裂增殖的效应

表1 SPIF-I对小鼠淋巴细胞分裂增殖的影响

Table 1 Effect of SPIF-I activity on the proliferation of ConA γ -induced mouse splenocytes in MIT

组别 Group	浓度 Concentration(μ g/mL)	OD550($\bar{x} \pm s$)
Negative control 阴性对照	-	0.371 \pm 0.032
Positive control 阳性对照	1 \times 10 ³	0.469 \pm 0.015 Δ
	0.1875	0.387 \pm 0.027
	0.375	0.394 \pm 0.033
	0.75	0.416 \pm 0.041*
SPIF-I	1.5	0.483 \pm 0.037 Δ
	3.0	0.452 \pm 0.026*
	6.0	0.368 \pm 0.019

注:与阴性对照组比较 $\Delta P < 0.01$; * $P < 0.05$

Note: $\Delta P < 0.01$; * $P < 0.05$, compared with negative control group

3 讨论

由Tab1可知适当浓度的SPIF-I能显著促进小鼠脾淋巴细胞的分裂增殖,并具有明显的剂量-效应依赖关系.与胸腺肽注射液相比,1.5 μ g/mL的SPIF-I与1 mg/mL的胸腺肽(文献报道^[10,11]的胸腺肽最适作用浓度)对小鼠脾淋巴细胞的分裂增殖影响效应相当。

胎盘具有宜气养血、补肾益精之功效,在我国入中药已有几千年历史.由胎盘制备成的胎盘提取液经现代研究表明含有丰富的生物活性成分,具有广泛的免疫学活性,对提高机体细胞免疫功能,尤其是对淋巴细胞的活化、增殖及发挥其细胞免疫功能有着重要意义,是一种较理想的免疫调节剂^[4,11]。羊胎盘提取液组分复杂,经液相色谱、柱层析及薄膜层析检测,均显示其为小分子多肽与核酸组成的混合物^[5,12]。关于羊胎盘提取液中究竟哪些成分在免疫调节中起主导作用及如何从中分离纯化出单一活性组分等方面的研究一直未见报道.本文从羊胎盘提取液中分离的SPIF-I紫外特征吸收峰为273 nm、分子质量为303.8。根据质谱与紫外吸收光谱检测图谱分析SPIF-I组分单一,纯度较高。

SPIF-I的生物学活性研究显示该组分能显著促进小鼠脾淋巴细胞分离增殖,具有明显的剂量-效应依赖关系,在低浓度时促进淋巴细胞成熟,当剂量过高时反而具有抑制作用.实验结果表明SPIF-I是羊胎盘提取液中一种具有免疫调节的小分子活性多肽。

现代生物制药的一个很大发展前景就是从动植物、微生物的生物体或其新陈代谢产物中提取天然生物活性因子研发免疫调节多肽药物.我国具有非常丰富的羊品种资源优势,羊胎盘来源比较方便, SPIF-I在生物学活性实验中,在较低浓度时有较高免疫活性,所以SPIF-I具有较高的进一步研发出类似转移因子、胸腺素^[10]等免疫调节类生物药品的价值.此外羊胎盘中含有的生物活性组分非常丰富^[5,12],本文分离纯化得到的SPIF-I仅是其中的一种,如何运用其它分离方法从羊胎盘肽中提取其它活性组分也是值得下一步探讨的问题。

参考文献

- Micic S, Genbacev O. Post irradiation cystitis improved by irrigation of early placental extract in saline. *Eur Urol*, 1988,

(下转第832页)

- 卫生厅). Xinjiang Herb Drugs (新疆中草药). Urumqi: Xinjiang People's Publishing House, 1975. 92.
- 3 Li DM(李迪民), Chen J(陈坚). Water extracts pharmacology research of *Sorbus tianschanica*. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 1996, 26: 302.
 - 4 Li DM(李迪民), Chen J(陈坚). *Sorbus tianschanica*. *Northwest Pharm J*(西北药学杂志), 1998, 13(2): 66.
 - 5 Gong FJ(龚复俊), Wang YW(王有为), Wang W(王伟). Extraction and isolation progress of total flavonoids from *Metaspuoia glyptostroboides* Hu et Cheng with adsorption method. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2005, 17: 478-481.
 - 6 Yu M(于明), Li X(李铣). *Acta Liaoning TCM*, 2004, 6: 364-366.

(上接第 798 页)

- 1 14: 291-293.
- 2 Huang CH(黄楚华), Yin XL(殷学伦). Progress of study on placenta polypeptide. *Chin J Biochemi Pharm*(中国生化药物杂志), 1994, 15: 294-296.
- 3 Yang GQ(杨桂芹), Zou XH(邹兴淮). Research advances on chemical compositions, pharmacological effect and clinic application of Placenta and its extract from human and animals. *J Shenyang Agric Univ*(沈阳农业大学学报), 2003, 34: 150-154.
- 4 Su Y(苏晔), Wei H(魏泓). Bioactivities and clinical application of placenta immunoregulation factor. *Immunological J*(免疫学杂志), 2002, 18: 117-119.
- 5 Liu SS(刘士山), Zhang ZZ(张子周), Zhu HP(朱和平), et al. Test on function of sheep placenta peptide. *Chin J Biochemi Pharm*(中国生化药物杂志), 2002, 23: 236-238.
- 6 Peng LY(彭立义), Yang DL(杨道理), Qi FL(齐法莲), et al. Identification and clinical study of placental immunoregulating polypeptides. *New Drugs Clin Remed*(新药与临床), 1990, 9: 172-175.
- 7 Sur TK, Biswas TK, Ali L, et al. Anti-inflammatory and anti-platelet aggregation activity of human placenta extract. *Acta Pharmacol Sin*, 2003, 24: 187-192.
- 8 Angelucci C, Lama G, Sica G. The growth of malignant and non malignant human cells is modulated by a human placental extract. *Anticancer Res*, 1999, 19: 429-436.
- 9 Liu Y(刘宇), Wei H(魏泓). Analysis of mixed components of low molecular weight from goat embryo extract by RP-HPLC. *Amino Acids Biotech Res*(氨基酸与生物资源), 2003, 25: 30-33.
- 10 Liu XC(刘希成), Liu Z(刘征), Ma H(马红), et al. Purification and characterization of Thymus activity factor I from calf thymus. *Chin J Biochem Molecular Bio*(中国生物化学与分子生物学报), 2002, 18: 619-623.
- 11 Zhong YY(钟英英). To detect GPIIb/IIIa promoting the proliferation of T lymphocytes by MTT method. *J Chongqing Univ Sci Tech, Nat Sci*(重庆科学技术学院学报, 自科版), 2005, 7: 61-63.
- 12 Lu H(陆晖), Yan XM(闫晓梅), Zhang SQ(张双全). Composition analyses of microelements and amino acids in Sheep placenta living cell extract. *J Nanjing Normal Univ, Nat Sci*(南京师大学报, 自科版), 2001, 24: 79-82.