

以人参皂苷 Rg1 为配基的亲色谱介质的制备与初步应用

刘倩, 寇俊萍, 黄娅琳, 乐心逸, 余伯阳*

(中国药科大学中药复方研究室, 南京 211198)

摘要 通过偶联人参皂苷 Rg1 (Rg1) 与环氧活化琼脂糖凝胶 6B (epoxy-activated Sepharose™ 6B, EAS6B), 制备以 Rg1 为配基的亲介质, 以红外光谱法验证其偶联, 并采用正交设计方法优化偶联条件为 40 ℃, pH 13, 每毫升 EAS6B 添加 Rg1 100 μmol。以此条件放大工艺制备的亲介质偶联率为 31.47%, 偶联量为 31.56 μmol/mL; 利用 Rg1-EAS6B 亲介质, 以系列亲和色谱法, 从 PC12 细胞蛋白裂解液中筛选得到 1 个 Rg1 特异性结合蛋白的条带, 为制备含有类似活性基团的中药有效成分的亲色谱介质提供参考依据, 也为进一步探讨人参皂苷 Rg1 的作用机制奠定基础。

关键词 亲和色谱; 介质; 人参皂苷 Rg1; 环氧活化琼脂糖凝胶 6B 正交设计; 高效液相色谱法

中图分类号 Q503 **文献标识码** A **文章编号** 1000-5048(2010)05-0451-05

Preparation and application of affinity chromatography medium with Ginsenoside Rg1 as a ligand

LIU Qian, KOU Jun-ping, HUANG Ya-lin, YUE Xin-yi, YU Bo-yang*

Department of Complex Prescription of TCM, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

Abstract Ginsenoside Rg1 (Rg1) is one major active component of the traditional Chinese herb Ginseng. It showed remarkable neuroprotective effects *in vitro* and *in vivo*. In order to provide new technological support for the identification of the target of Rg1 and further explanation of its activities, the affinity medium Rg1-epoxy-activated sepharose™ 6B (EAS6B) was prepared by coupling Rg1 to EAS6B. The copulation was optimized by a L₉(3⁴) orthogonal design experiment and verified by IR. The optimal coupling method was determined as 40 ℃, pH 13, n(Rg1):V(EAS6B) = 100 μmol: 1 mL according to the orthogonal analysis and practical application. The coupling rate and yield were 31.47% and 31.56 μmol/mL in amplified preparation. Furthermore, a specific protein band was found from PC12 lysate using Rg1-EAS6B medium by serial affinity chromatography from PC12 cell lysate. The study may provide some references for further identifying the target of Rg1 and preparing affinity chromatography resin of other natural compounds with similar active group.

Key words affinity chromatography medium; ginsenoside Rg1; epoxy-activated sepharose™ 6B; orthogonal design; HPLC

This study was supported by the National Science and Technology Support Program of China during the 11th Five-Year Plan Period (No. 2006BAI08B05-08)

中药活性成分是中药赖以发挥独特作用的物质基础, 利用现代多学科技术, 寻找发现其直接作用的特异性靶点, 将有望真正阐释中药的作用机制, 并可能为反映中医药作用特色的创新药物研制提供新靶标。近年来, 亲和色谱技术已广泛应用于生物分子分离和纯化及药物靶点的发现^[1-3]。本

课题组前期成功制备以麦冬活性成分鲁斯可皂苷元为配基的亲色谱柱, 并应用于其抗体纯化和作用靶标发现^[4-5]。

人参皂苷 Rg1 (ginsenoside Rg1, 简称 Rg1) 是传统中药人参的主要有效成分之一, 具有广泛的益

* 收稿日期 2010-01-24 * 通讯作者 Tel: 025-86185158 E-mail: boyangyu59@163.com

基金项目 国家“十五”科技支撑计划资助项目 (No. 2006BAI08B05-08)

智、抗衰老、增强免疫、神经保护等药理活性,但其确切活性机制尚不十分清楚^[6-12]。寻找 Rg1 在体内的特异性结合蛋白,进而发现其直接作用靶标,将可能为深入阐明 Rg1 的作用机制提供新思路。本研究尝试制备以 Rg1 为配基的亲介质,采用正交设计方法优化偶联条件,并应用于筛选 Rg1 的特异性结合蛋白,为进一步发现其靶标蛋白及阐明作用机制等奠定基础。

1 材料

1.1 药品、试剂与细胞株

人参皂苷 Rg1 (南京青泽医药科技开发有限公司); Epoxy-activated SepharoseTM 6B (EAS6B, 瑞典 GE Healthcare 公司); 甲醇 (色谱纯, 江苏汉邦科技有限公司); 乙腈 (色谱纯, 美国 Roe Scientific 公司); 高糖 DMEM 培养基 (美国 Gibco 公司); 青霉素、链霉素 (山东鲁抗医药股份有限公司); 胰蛋白酶 (南京生兴生物技术有限公司); 新生牛血清 (兰州民海生物工程有限公司); 细胞裂解液和 BCA 蛋白定量试剂盒 (碧云天生物技术研究); 亮氨酸、抑肽酶、胰蛋白酶抑制剂 (美国 Amresco 公司); 溴酚蓝 (上海生工生物工程技术有限公司); β -巯基乙醇 (南京大治生物技术有限公司); 其他试剂均为市售分析纯。

PC12 细胞株 (大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞株) 购自中国科学院上海生化细胞所。

1.2 仪器

电子分析天平 (上海 Mettler Toledo 公司); HP-01 真空泵 (江苏汉邦科技有限公司); LC-10A 高效液相色谱仪 (日本岛津公司); Waters Symmetry C₁₈ 色谱柱 (3.9 mm × 150 mm, 5 μ m); Z-323K 冷冻离心机 (德国赫默公司)。

2 方法与结果

2.1 Rg1 亲和介质的制备与偶联反应验证

精密称取 EAS6B 0.02 g 于双蒸水中溶胀 30 min 并用双蒸水抽洗 30 min 待用 (注: 1 g 的 EAS6B 在双蒸水中溶胀后体积约为 3 mL)。各组分别称取一定量的 Rg1 加至 0.5 mL 相应 pH 的 NaOH 溶液中溶解, 向溶液中加入溶胀、抽洗过的 EAS6B, 各组在对应温度下, 水浴振荡 20 h 转速 110 r/min 即得以 Rg1 为配基的亲介质。该偶

联反应发生在 EAS6B 连接臂末端的含氧三元环和 Rg1 的羟基基团之间 (图 1), 反应前后反应体系中有含氧三元环消失, 采用红外光谱观察反应前后体系中的吸收峰变化, 如图 2 所示, 偶联前后峰 1~5 都一致, 但在偶联后峰 6 (1 295 cm^{-1}) 消失, 此峰恰处于环醚的特征峰范围。

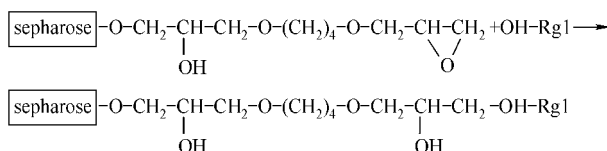


Figure 1 Coupling of ginsenoside Rg1 (Rg1) and epoxy-activated sepharose 6B (EAS6B)

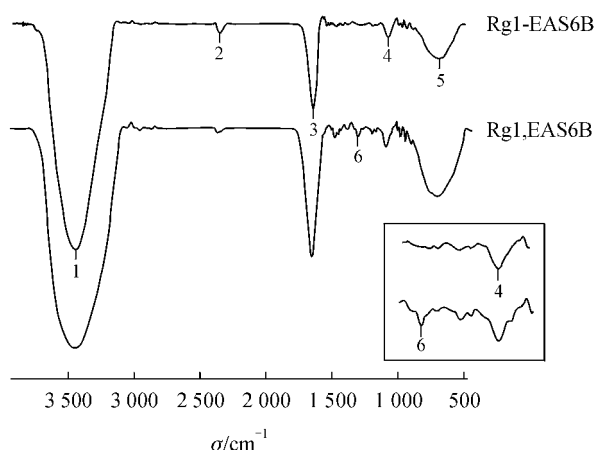


Figure 2 IR analysis of the coupled Rg1-EAS6B resin

2.2 Rg1 亲和介质的制备工艺优化

2.2.1 优化工艺的因素和水平 参考预试验及相关资料^[13], 选择可能影响偶联率和偶联量的 3 个因素, 反应温度 ($^{\circ}\text{C}$)、反应酸碱度 (pH)、反应物比例 [$n(\text{Rg1}):V(\text{填料})$, $\mu\text{mol mL}$], 每个因素 3 个水平, 根据正交设计法的原理和使用原则, 按表 L₉(3)⁴ 进行正交实验设计, 列出实验方案见表 1。

Table 1 Factors and levels of the couples reaction

Level	T/ $^{\circ}\text{C}$	pH	$n(\text{Rg1}):V(\text{EAS6B})/(\mu\text{mol mL})$
1	25	9	50:1
2	33	11	100:1
3	40	13	200:1

2.2.2 HPLC 法测定 Rg1 亲和介质的偶联率与偶联量 参考文献 [14-15] 及预试结果, 采用如下色谱条件测定 Rg1 含量。流动相: 乙腈-水 (23:77); 检测波长: 203 nm; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 室温; 进样量: 20 μ L。精密称取 Rg1 对照品适量, 配制

成一系列质量浓度分别为 24.45、48.90、97.80、146.7、195.6、244.5 $\mu\text{g/mL}$ 的标准溶液。根据上述色谱条件, 以峰面积 (A) 对质量浓度 (c) 进行线性回归, 其回归方程为 $A = 5.0 \times 10^6 c + 27121$ ($r = 0.9995$), 表明 Rg1 在 24.45~244.5 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度范围内与峰面积呈良好的线性关系。进样精密度 RSD 为 1.1% ($n = 3$); 重复性 RSD 为 1.8% ($n = 3$), 均符合含量测定要求。

偶联反应后过滤亲和介质, 收集各组反应溶液, 并用处方中相应 pH 的 NaOH 溶液轻柔洗脱各组填料上未偶联的 Rg1。收集反应溶液和洗脱液后吹干, 甲醇溶解并过滤, 最后用甲醇定溶于 50 mL 量瓶制成 HPLC 样品溶液。根据上述线性回归方程测得剩余 Rg1 的质量, 计算偶联率^[4]。

2.2.3 正交实验结果 结果显示: 各组偶联率在 6.79%~36.98% 之间, 差别较大, 提示实验所考察的 3 个因素对偶联率有一定的影响, 顺序依次为: 温度 > pH > 反应物比例。以偶联率为指标的三因素的极差分析结果显示 40 $^{\circ}\text{C}$, pH 11, $n(\text{Rg1}):V(\text{EAS6B}) = 100 \mu\text{mol}:1 \text{ mL}$ 条件下, Rg1 与 EAS6B 的偶联率最佳。而以偶联量为指标进行的三因素极差分析结果显示, 三因素对偶联量的影响顺序依次为: 反应物比例 > pH > 温度, 以反应物比例的影响最明显, 40 $^{\circ}\text{C}$, pH 13, $n(\text{Rg1}):V(\text{EAS6B}) = 200 \mu\text{mol}:1 \text{ mL}$ 条件下, Rg1 与

EAS6B 的偶联量最佳。

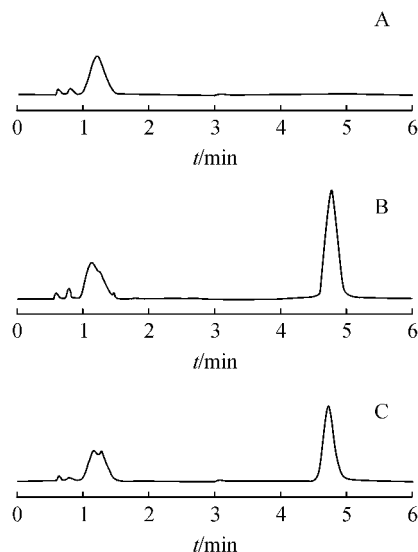


Figure 3 HPLC Chromatograms of Rg1
A: Blank B: Reference Rg1 C: Uncoupled Rg1

在保证偶联率的同时, 为使偶联量尽量增高, 并考虑到 Rg1 和 EAS6B 的用量经济, 最终确定的偶联条件为: 40 $^{\circ}\text{C}$, pH 13, $n(\text{Rg1}):V(\text{EAS6B}) = 100 \mu\text{mol}:1 \text{ mL}$ 。此偶联条件与正交设计实验的第 9 组因素水平一致。另外, 将偶联反应的投料量增大 2.5 倍进行亲和介质的制备, 所测定的偶联率为 31.47%, 偶联量为 31.56 $\mu\text{mol/mL}$, 略高于原实验组。

Table 2 Coupling rates and yields(R/Y) of each group

Group	Level of T	Level of pH	Level of $n(\text{Rg1}):V(\text{EAS6B})$	Coupling rate/%	Yield/ $(\mu\text{mol/mL})$
1	1	1	1	6.97	3.37
2	1	2	2	18.00	17.21
3	1	3	3	23.02	45.28
4	2	1	2	21.14	20.68
5	2	2	3	12.50	24.29
6	2	3	1	11.81	5.845
7	3	1	3	22.31	44.28
8	3	2	1	36.98	17.32
9	3	3	2	27.61	27.65
K1(R/Y)	16.00/21.95	16.81/22.78	18.59/8.85		
K2(R/Y)	15.15/16.94	22.49/19.61	22.25/21.85		
K3(R/Y)	28.97/26.75	20.81/26.26	19.28/37.95		
R(R/Y)	13.82/12.81	5.687/6.652	3.663/29.11		

2.3 Rg1-EAS6B 亲和介质的初步应用

2.3.1 PC12 细胞总蛋白的提取 PC12 细胞采用高糖 DMEM 培养基, 培养于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱

中。待细胞铺满瓶底后, 用预冷的 PBS 收集细胞, 加入细胞裂解液, 12 000 r/min, 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心, 收集上清即为 PC12 细胞总蛋白提取液。

2.3.2 实验溶液的配制 蛋白稀释液: 0.1 mol/L TrisHCl 0.5 mol/L NaCl (pH 7.4) 20 mL, 0.05 mol/L EDTA 4 mL, 0.1 mol/L NaF 2 mL, NP-40 0.04 mL, 10 μ g/mL 亮肽素 0.05 mL, 10 μ g/mL 抑肽酶 0.05 mL, 10 μ g/mL 胰蛋白酶抑制剂 0.05 mL, 加双蒸水定容至 40 mL。

电泳样品缓冲液: 1 mol/L TrisHCl (pH 6.8) 60 μ L, 甘油 300 μ L, 10% 溴酚蓝 100 μ L, 10% SDS 200 μ L, β -巯基乙醇 80 μ L, 加水定容至 1 mL。

2.3.3 系列亲和色谱法筛选 Rg1 结合蛋白 参考文献 [16] 方法, 取细胞总蛋白提取液 0.5~1 mL (约含总蛋白 3~5 mg), 用蛋白稀释液稀释至 1 mL, 加入 Rg1-EAS6B 60 μ L, 4 $^{\circ}$ C 缓慢搅动 4 h 瞬时离心, 将上清液转移至另一离心管, 再另加入 Rg1-EAS6B 60 μ L, 同上操作。将两次孵育的 Rg1-EAS6B 用定量缓冲液洗涤, 并加入电泳样品缓冲液, 沸水中煮 5 min 瞬时离心, 分别得到上清液 A, B 用于 10% SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝染色。如图 4 所示, PC12 细胞总蛋白提取液在经过与 Rg1-EAS6B 共孵育后, 得到了明显的纯化, 仅留有少数蛋白条带出现在共孵育后的亲和介质样品上 (图 4), 两次孵育后的样品 A, B 中有 1 个灰度明显变化的条带 (图 4 BP1)。而 PC12 细胞裂解液中多数非特异性结合条带被洗脱 (图 4 a b)。同时应用未与 Rg1 偶联的空白亲和基质 EAS6B 筛选差异蛋白, 未见明显的蛋白条带出现 (图 4 A0, B0), 提示 BP1 可能为 Rg1 的特异性结合蛋白。

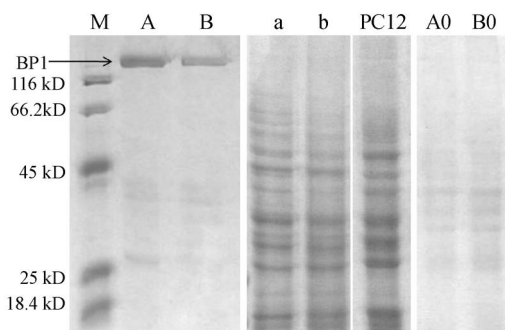


Figure 4 Identification specific binding proteins with Rg1-EAS6B resin by serial affinity chromatography in PC12 lysate
M: marker A, B samples beared on Rg1-EAS6B from PC12 lysate; a, b samples elited from Rg1-EAS6B PC12 lysate; A0, B0 samples beared on EAS6B from PC12 lysate

3 讨论

Rg1 是传统中药人参的主要有效成分之一, 药

理活性广泛, 但作用机制尚未有效阐明, 以其为配基的亲色谱介质将为寻找其作用靶标提供技术手段。本研究针对 Rg1 分子含有多个羟基这一结构特点, 选择了能与羟基、氨基等基团反应的 EAS6B 为基质进行偶联^[2-3]。

鉴于 EAS6B 的连接臂末端具有含氧三元环, 而与 Rg1 偶联后, 含氧三元环消失, 为验证二者的偶联情况, 采用红外吸收光谱法, 对 Rg1 与 EAS6B 的物理混合样品和偶联的亲介质 Rg1-EAS6B 进行比较, 结果显示, Rg1 与 EAS6B 偶联后出现了 1295 cm^{-1} 位置吸收峰的变化, 而此位置处在环醚的特征峰范围内, 证实 Rg1 与 EAS6B 发生偶联反应。

同时考虑到 EAS6B 与含羟基化合物的偶联常受温度、pH、反应物比例等多种因素的影响, 偶联率反映了化合物在偶联反应中的反应效率, 偶联量反映了单位亲和介质上偶联的化合物量, 这两种指标可影响亲和介质的活性基团浓度及应用时的蛋白吸附量, 常用于评价亲和介质的制备性能。本研究采用正交设计实验, 以偶联率、偶联量为指标, 优化了 Rg1 与 EAS6B 亲和色谱介质制备方法, 确定了最终偶联条件为 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 13, $n(\text{Rg1}) : V(\text{EAS6B}) = 100\text{ }\mu\text{mol} : 1\text{ mL}$, 并在此条件下加大制备量, 所得亲和介质参数高于文献报道^[13-17], 表明本研究确定的亲和介质制备条件稳定可行。

最后, 本文还对所制备的亲和介质进行了初步应用研究, 参考文献 [16], 采用“系列亲和色谱法”对 PC12 细胞总蛋白提取液进行纯化筛选, 其筛选原理为: 先后两次将同一份蛋白提取液与两份等量的亲和介质共孵育, 洗脱未与亲和介质结合的非特异性条带, 通过电泳显示结合在亲和介质上的蛋白条带, 两份亲和介质的结合蛋白条带中灰度变化最明显的蛋白为特异性结合蛋白。图 4 结果显示, 与 PC12 细胞总蛋白条带相比, 与 Rg1-EAS6B 孵育后的蛋白条带明显减少, 多数蛋白被洗脱, 提示该亲和介质具有纯化蛋白质的能力; 箭头标注的蛋白条带 BP1 在第 2 次孵育后亲和介质上的结合蛋白样品 B 中比第 1 次孵育的样品 A 中灰度明显减小, 而空白亲和基质 EAS6B 的筛选蛋白结果则未见明显的结合蛋白条带, 根据系列亲和色谱法原理, 提示 BP1 可能为 Rg1 的特异性结合蛋白。另外, 样品 A, B 中尚有一些不明显的差异蛋白条带, 提示

其与 Rg1 亦有一定的亲和力, 但与 BP1 相比较弱, 有待进一步研究。

综上所述, 本研究通过正交设计优选偶联条件, 成功制备了以人参皂苷 Rg1 为配基的亲介质, 并初步应用于 Rg1 的结合蛋白发现, 为进一步研究 Rg1 的作用机制和作用靶点提供技术手段, 同时也为制备类似结构的天然化合物的亲和色谱介质提供参考依据。

参 考 文 献

- [1] Leslie BJ, Hergenrother PJ. Identification of the cellular targets of bioactive small organic molecules using affinity reagents[J]. *Chem Soc Rev*, 2008, **37**(7): 1 347- 1 360.
- [2] Mizushima Y, Ishidoh T, Kamisuki S, et al. Flavonoid glycoside: a new inhibitor of eukaryotic DNA polymerase α and a new carrier for inhibitor affinity chromatography[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **301**(12): 480- 487.
- [3] Mizushima Y, Ishidoh T, Takeuchi T, et al. Monoacetylcurcumin: a new inhibitor of eukaryotic DNA polymerase λ and a new ligand for inhibitor affinity chromatography[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **337**(4): 1 288- 1 295.
- [4] 梁 明(Liang M), 刘 楠(Liu N), 刘吉华(Liu JH), 等. 以鲁斯可皂苷元为配基的亲层析柱的制备及其在纯化抗体中的应用[J]. *中国天然药物(Chin J Nat Med)*, 2006, **4**(5): 363- 367.
- [5] 寇俊萍(Kou JP), 黄娅琳(Huang YL), 余伯阳(Yu BY). 以系列亲和色谱技术为先导探索发现中药有效成分的直接作用靶标[C]. // 2008 中国药理学会药理学发展前沿论坛论文集. 太原: 中国药理学会, 2008 114- 115.
- [6] 徐 丽(Xu L), 刘黎星(Liu LX), 陈文芳(Chen WF). 人参皂苷 Rg1 对 PD 模型大鼠纹状体多巴胺含量的影响及其机制探讨[J]. *中国中药杂志(China J Chin Mater Med)*, 2008, **33**(15): 1 856- 1 859.
- [7] 邬 伟(Wu W), 马飞煜(Ma FY), 杨景全(Yang JQ), 等. 人参皂苷 Rg1 对痴呆模型大鼠行为学及酪氨酸蛋白激酶 A 表达的影响[J]. *中国老年学杂志(Chin J Gerontol)*, 2007, **27**(6): 41- 43.
- [8] 吴 蕾(Wu L), 陈云波(Chen YB), 王 奇(Wang Q), 等. 人参皂苷对 $A\beta_{25-35}$ 蛋白诱导的老年性痴呆体外模型 NG108-15 神经元细胞凋亡的抑制作用[J]. *广州中医药大学学报(J Guangzhou Univ Tradit Chin Med)*, 2007, **24**(2): 126- 131.
- [9] 陈云波(Chen YB), 张大鹏(Zhang DP), 冯 梅(Feng M). 人参皂苷 Rg1 对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的神经细胞核因子- κ B 活化的影响[J]. *中国药理学通报(Chin Pharmacol Bull)*, 2007, **23**(5): 612- 617.
- [10] Chen XC, Zhu YG, Zhu LA, et al. Ginsenoside Rg1 attenuates dopamine-induced apoptosis in PC12 cells by suppressing oxidative stress[J]. *Eur J Pharmacol*, 2003, **473**(1): 1- 7.
- [11] 邵世滨(Shao SB), 丁 岩(Ding Y), 张亚伦(Zhang YL), 等. 人参皂苷 Rg1 对过氧化氢诱导 SK-N-SH 细胞凋亡的保护作用[J]. *中国老年学杂志(Chin J Gerontol)*, 2007, **27**(5): 401- 404.
- [12] 曾育琦(Zeng YQ), 陈晓春(Chen XC), 黄 春(Huang C). 人参皂苷 Rg1 通过调节 GSK-3 β /PP2A 活性减轻皮层神经元 Tau 蛋白过度磷酸化[J]. *解剖学报(Acta Anat Sin)*, 2007, **38**(6): 665- 670.
- [13] Pedersen AK, Brammer SM, Mortensen SB, et al. Affinity purification of recombinant protein tyrosine phosphatase 1B using a highly selective inhibitor[J]. *J Chromatogr B*, 2004, **799**(1): 1- 8.
- [14] 王 柯(Wang K), 季 申(Ji S). 益安宁丸中人参皂苷 Rg1、Re 和 Rb1 的 HPLC 法测定[J]. *中国医药工业杂志(Chin J Pharm)*, 2004, **35**(10): 609- 610.
- [15] 陈 萍(Chen P), 韦 强(Wei Q), 闫占社(Yan ZS), 等. 复方益血胶囊中人参皂苷 Rg1 定量分析方法研究[J]. *中国药科大学学报(J China Pharm Univ)*, 2003, **34**(1): 35- 37.
- [16] Yanamoto K, Yamazaki A, Takeuchi M, et al. A versatile method of identifying specific binding proteins on affinity resins[J]. *Anal Biochem*, 2006, **352**(1): 15- 23.
- [17] Morimoto S, Sumori K, Moriaki J, et al. Morphine metabolism in the opium poppy and its possible physiological function. Biochemical characterization of the morphine metabolite bismorphine[J]. *J Biol Chem*, 2001, **276**(41): 38 179- 38 184.