

中药五加皮抗肿瘤活性成分的分离

单保恩¹, 斯重阳¹, 张金忠¹, 梁文杰¹, 李巧霞¹, 张 华², 刘刚叁²

(1. 河北医科大学第四医院科研中心, 河北 石家庄 050011; 2. 华北制药集团新药研究开发中心, 河北 石家庄 050017)

【摘要】背景与目的: 分离中药五加皮抗肿瘤活性成分, 确定其分子量, 为抗肿瘤新药开发研制提供依据。材料与方法: 采用³H-TdR 掺入法测定五加皮有效成分对肿瘤细胞增殖反应的影响; 经凝胶层析进一步分离五加皮抗肿瘤成分; 用 SDS-PAGE 电泳、二次元电泳分离并确定其成分和分子量; 经蛋白酶 E 和 NaIO₄ 处理分析了有效成分的化学组成。结果: 经凝胶层析和 SDS-PAGE 电泳分析, 我们从五加皮提取物(S200F2)中分离得到分子量约 64 kDa 的单一成分, 该成分对 MT-2 细胞增殖有抑制作用。经蛋白酶 E 和 NaIO₄ 处理分析, 该成分的抗肿瘤作用与蛋白质成分有关, 与糖成分无关, 说明该成分是蛋白质。经二次元电泳法分离后确认该成分是单一蛋白质。结论: 以上结果提示, 五加皮抗肿瘤活性是一种分子量约 64 kDa 的单纯蛋白质成分, 该成分的进一步纯化将为抗肿瘤新药物的开发和中药有效成分的研究提供实验依据。

【关键词】五加皮; 有效成分分离; 抗肿瘤

中图分类号: R730.52

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2004)04-0203-03

The Isolation of Anti-tumor Component of *Acanthopanax Gracilistylus*

SHAN Bao-en, SI Chong-yang, ZHANG Jin-zhong, *et al*

(Research center, The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China)

【ABSTRACT】BACKGROUND & AIM: The anti-tumor active components were isolated from *Acanthopanax gracilistylus* to identify its molecular weight and supply the scientific evidence for developing new anti-tumor drugs. MATERIAL AND METHODS: The effects of the active component on the proliferation of tumor cells was investigated by ³H-TdR incorporation methods. The active component was isolated 2D by chromatography. Its elements and molecular weight were measured by SDS-PAGE and 2D electrophoresis. Its chemical nature was analyzed by treatment with pronase E and NaIO₄. RESULTS: By gel-filtration and SDS-PAGE, a 64 kDa protein was isolated (G100F), which inhibited the proliferation of MT-2 tumor cells. The anti-tumor active component being not a polysaccharide but a protein was measured by treatment with pronase E and NaIO₄. This result was further confirmed by 2D electrophoresis. CONCLUSION: The anti-tumor active component of *Acanthopanax gracilistylus* is a 64 kDa protein. The purification of this component will supply scientific evidence for the development of new anti-tumor drugs and the study of the active component.

【KEY WORDS】acanthopanax gracilistylus; active component; purification; anti-tumor effect

新中国成立 50 多年来, 我国的新药研究和生产水平发生了翻天覆地的变化, 建立了独立的制药工业体系, 能够生产 1 300 余种化学原料药, 除满足我国的市场需求外, 还有相当部分出口, 医药产业已成为重要的国民经济支柱产业之一。中医药是最有我

民族特色和优势的领域, 由于资源广阔, 研制成本低, 以及长期临床经验的积淀, 使近年来中成药工业发展迅猛, 已成为我国工业效益最好的领域之一。但是, 由于对中药有效成分的研究和新药研制开发能力不强, 严重阻碍着中药事业的发展 and 中药走向界

收稿日期: 2003-11-24; 修订日期: 2004-01-06

基金项目: 国家自然科学基金(No. 30271595), 国家教委、河北省教育厅资助项目(No. 2001245)

作者简介: 单保恩(1962-), 男, 河北省广平人, 教授, 博士生导师, 研究方向: 肿瘤免疫学。

Tel: 6033941-283, E-mail: baoenshan35@hotmail.com

的步伐^[1,2]。面对国际上对药物品种知识产权保护的日益加强,中药有效成分研究、亦即新药或药物品种创新研究提高到日程的首位加以考虑。本文就中药五加皮抗肿瘤有效成分的分离、纯化进行了研究。

1 材料与方 法

1.1 五加皮提取液制备 干品 5 g,加蒸馏水 100 ml 浸泡过夜,100 ℃水浴 1 h,滤纸过滤除去不溶物质,用无菌滤器除菌后作为提取液 4 ℃冰箱保存。

1.2 细胞株和主要试剂 MT-2 细胞株由日本产业医科大学山下优毅教授惠赠。RPMI1640 培养基、LPS 为美国 GIBICO 公司产品;胎牛血清为杭州四季青生物材料公司产品;Sephadex G-100 凝胶为 Pharmacia 公司产品。

1.3 肿瘤细胞增殖实验分析 收集培养中的 MT-2 细胞,用 PBS 洗涤后,RPMI1640 培养基重悬细胞,调整细胞浓度为 1×10^5 个/ml,加于 96 孔培养板中,每孔 100 μ l (1×10^4 个细胞),加入 10 μ l 五加皮分离液,37 ℃,5 % CO₂ 条件下培养 48 h,每孔加入 10 μ l ³H-TdR(特异性活性为 6 Ci/mmol,中国原子能研究所)。继续培养 24 h,用细胞收集器(上海跃进医疗器械厂产品)将细胞收集到滤纸上,用液闪仪(美国贝克曼 LS6500 型)测定细胞放射线活性(cpm)。

1.4 凝胶层析分离 Sephadex G-100 层析柱(2 cm × 60 cm),上样(S200F2) 2 ml,用 PBS 平衡并洗脱 S200F2 成分,调整流速 10 ml/h,每管接收 2 ml 层析液。层析液成分中的蛋白质含量用紫外分光光度计测定 280 nm 吸光度值;中性糖含量用酚-硫酸法测定,结果用 492 nm 吸光度值表示^[3]。

1.5 SDS-PAGE 电泳分离 200 μ g 五加皮提取物及各种提取成分上样 SDS-PAGE 凝胶(分离胶浓度为 10 %),按常规方法进行 SDS-PAGE 电泳分离^[3],凝胶用溴酚蓝染色。蛋白 marker(日本和光纯药工业株式会社)中高分子量产品(MW: 15 ~ 150 kDa)。

1.6 蛋白酶 E 和 NaIO₄ 处理 蛋白酶 E 处理:将五加皮提取液及各种纯化成分分别调整蛋白浓度 1 mg/ml,取 1 ml 样本加入 0.4 g Pronase E(Sigma)在 4 ml 含有 50 mmol/L CaCl₂ 的 0.1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0) 缓冲液中 37 ℃培养 36 h,再加入 0.2 mg Pronase E 继续培养 36 h,将反应混合物 100 ℃加热 10 min 灭活 Pronase E,用 PBS 透析后备用。NaIO₄ 处理:1 ml 样本加入 100 μ l 0.1 mol/L NaIO₄,37 ℃培养 4 h,加入 Ethyleneglycol(Sigma),将反应液用 PBS 透析后备用。

1.7 二次元电泳分析 将 Immoiline DryStrip 凝胶

(Amersham pharmacia) 用水合缓冲液(含 8 mol/L 脲素,0.5 % Triton X-100,10 mmol/L DTT,0.5 % NP-40,2 % β -巯基乙醇,0.8 % Pharmalyte 试剂(Amersham pharmacia),0.01 % 溴酚蓝)水化 24 h,放入 Multiphor II 2-D 电泳系统(Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden)。上样 200 μ g 五加皮提取成分,在 300 V 电压,1 mA 电流和 5 W 功率条件下电泳 8 h,然后将电压升至 2 000 V,继续电泳 8 h(一次元电泳)。SDS-PAGE 二次元电泳应用 Excel 凝胶(Amersham pharmacia),600 V,20 mA 和 30 W 条件下电泳 30 min,将 Immoiline DryStrip 凝胶上样品转移到 Excel-SDS 凝胶后,在 600 V 电压,50 mA 电流下电泳 70 min。电泳凝胶用 0.1 % 溴酚蓝染色。

1.8 统计学方法 用 SPSS10.0 软件,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较用单因素方差分析、实验组与对照组组间均数比较用独立样本 *t* 检验。

2 结 果

2.1 凝胶层析分离得到单一的抗肿瘤蛋白成分 五加皮提取液用 Sephacryl S-200 凝胶层析分离后,得到了一种对 MT-2 细胞增殖反应有较强抑制作用的蛋白质 S200F2。将 S200F2 进一步用 Sephadex G-100 层析分离后,得到单一的蛋白质峰(图 1),该蛋白质对 MT-2 细胞的增殖反应有较强的抑制作用,我们将其命名为 G100F。

2.2 SDS-PAGE 电泳分离 加皮提取液、S200F2 成分和 G100F 成分经 SDS-PAGE 电泳分离后,将凝胶分成 3 个部分(分别为分子量 > 75 kDa > 55 kDa < 75 kDa 和 < 55 kDa)测定其活性部位,如图 2 所示,分子量约 64 kDa 的蛋白质对 MT-2 细胞的增殖反应有较强抑制作用,与凝胶分离得到成分相一致。

2.3 蛋白酶 E 处理 如图 3 所示,五加皮抗肿瘤活性

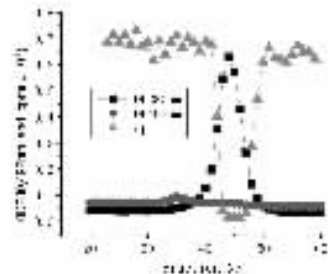


图 1 Sephadex G-100 层析分离五加皮 S200F2 成分后,各层析液的蛋白质和糖含量及各成分对 MT-2 细胞抑制实验曲线图。蛋白质用 OD 280 nm,糖用 OD 492 nm,肿瘤细胞抑制活性用 cpm 表示
Figure 1 The active component from Sephacryl S-200 peak2 was rechromatographed on a Sephadex G-100. The protein concentration was detected in terms of at 280 nm. The glucose concentration was investigated by the phenol-sulfuric acid method. The activity of each fraction was determined in terms of ³H-TdR incorporation of MT-2 cells

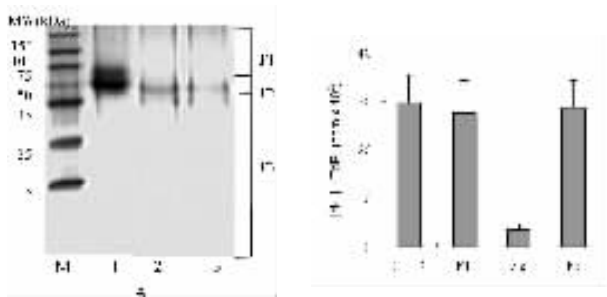


图2 A: 五加皮提取液、S200F2成分和G100F成分SDS-PAGE电泳分离结果。泳道M: 标准蛋白, 泳道1: 五加皮提取液, 泳道2: S200F2成分, 泳道3: G100F成分。B: 将各成分用SDS-PAGE分离后, 再分成三个部分测定其对MT-2细胞增殖的抑制试验

Figure 2 A: Crude Age and the active component from Sephacryl S-200 and Sephadex G-100 were subjected to SDS-GAGE and the bands were stained with CBB. Lane M: molecular weight, lane 1: crude Age, lane 2: the active component from Sephacryl S-200, lane 3: the active component from sephadex G-100. B: The effect of Age, S200F2 and G100F on the proliferation of MT-2

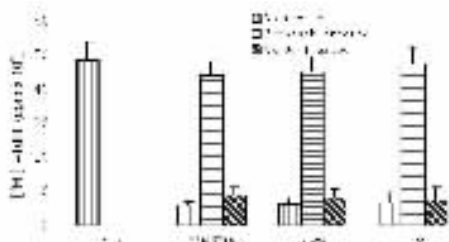


图3 五加皮抗肿瘤活性成分, 用蛋白酶E和NaIO₄处理后对肿瘤细胞增殖反应的影响

Figure 3 The effect of Age, S200F2 and G100F treatment with pronase E and NaIO₄ on the proliferation of MT-2

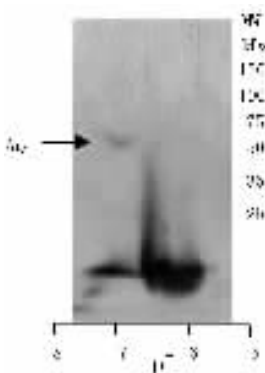


图4 五加皮G100F成分的二次元电泳分离用Immoiline DryStrip凝胶将五加皮G100F进行一次元电泳分离后, 将Immoiline DryStrip凝胶上的样品转移到Exce-SDS凝胶进行二次元电泳分离。电泳凝胶用0.1%溴酚蓝染色

Figure 4 G100F was confirmed by quadratic electrophoresis

消失, 证明五加皮抗肿瘤活性与蛋白质成分有关。但经NaIO₄处理后, 五加皮抗肿瘤活性没有变化, 显示五加皮抗肿瘤活性与糖成分无关系。

2.4 二次元电泳法分离 五加皮G100F成分经二次元电泳分离后可见有一条蛋白条带, 即五加皮G100F成分为单一蛋白质成分, 分子量为64kDa, 我们将其命名为Age(图4)。

3 讨论

目前, 除我国之外, 全球已有170多家公司、40余个研究团体开展从中草药中寻找新药的工作。我国现存中药资源种类12807种, 有限的中药资源正在做着一次性分配, 谁占有较多的中药有效成分专利, 谁就将在中药的商业开发方面抢得先机^[4]。我国是肿瘤高发国, 中药有效成分的研究将对我国抗肿瘤新药开发起到很大的推动作用。

现代科技的广泛应用使中药的研制与生产得到很大提高, 临床应用效果可以与西药相比拟^[5]。建国以来我国首次上市、化学结构清楚或基本清楚的新药有200多种, 其中来源于中草药有效成分及其衍生物的占72.8%, 而直接以中药有效成分作为原型药的就有100多种^[6]。但必须用现代化的研究思路与手段, 分析、研究传统中药的有效成分, 用现代化的手段与工艺进行加工, 改造传统中药的剂量与剂型, 提高中药的有效性、方便性与可靠性, 才能使中药真正走向世界^[5]。

中药区别于西药的最大特点, 就是其有效成分和作用机制十分复杂、难以解说。这也是中药现代化研究长期少有突破的症结所在^[7]。关于单味中药作用机制研究的报道很少, 而有关五加皮的研究报道则几乎为零。本研究直接将五加皮样品提取物进行凝胶柱层析分离, 然后将所获得的样品直接用于高通量抗肿瘤活性筛选, 对获得的筛选样品进行活性判断, 确定某种活性成分所在的位置, 然后再用另一种层析分析(Sephadex G-100层析)法进一步分离其活性成分, 这两种层析方法结合, 分离得到了单一的蛋白质成分^[8]。经SDS-PAGE电泳、蛋白酶E和NaIO₄处理、及二次元电泳确认五加皮抗肿瘤活性物质是一种分子量约64kDa的蛋白质, 该成分的进步研究将为抗肿瘤新药的研制与开发提供较好的实验依据^[9]。

参考文献:

- [1] 黄国林. 在中药现代化进程中应注意的几个问题[J]. 中药材, 2001, 24(8): 619-620.
- [2] 黄璐琦, 商敏凤. 加入WTO有利于中药现代化[J]. 中药研究与信息, 2000, 2(8): 12.
- [3] 许松林, 徐世民, 于爱华. 天然产物分离的新技术-分子蒸馏[J]. 中草药, 2001, 32(6): 562-563.
- [4] 蔡仲德, 姜廷良. 中药领域强化专利保护的探讨[J]. 中国药房, 1999, 10(1): 1-3.
- [5] 吕阳成, 骆广生, 戴献元. 中药提取工艺研究进展[J]. 中国医药工业杂志, 2001, 32(5): 232-235.

0.05)。

3 讨论

氯化汞是工业生产中普遍应用的化学物质,对动物和人体多种器官造成毒害。汞的神经毒性和肾毒作用早已得到公认。近年来对汞的生殖毒性也已重视,陈小玉^[6]、王灿等^[7]研究显示汞蒸气和高剂量氯化汞(3 mg/kg)对雄性小鼠精子密度,精子活动率和精子头畸形率有影响。但小剂量、亚慢性对小鼠精子密度,精子活动率和精子头畸形率影响的研究尚少见。甲基汞影响雄性小鼠生精过程,使成熟精子数量降低,精子畸形率升高^[8]。蔡原等^[9]研究发现用氯化汞连续染毒小鼠,15 d处死,可使小鼠早期生精细胞的微核率和减数分裂异常率升高。我们用小剂量氯化汞处理雄性小鼠,染毒后再自由饮食23 d后观察氯化汞对雄性动物生殖细胞的亚慢性毒作用。结果发现三种剂量氯化汞致小鼠精子头畸形率显著性增高,0.5 mg/kg和1 mg/kg剂量组精子数量显著降低。3种剂量的氯化汞对精子活动率、生精细胞微核率和减数分裂异常率的影响无显著性差异。

铅是重要的环境污染物和职业有害物。铅的神经毒性、免疫毒性和致畸效应有较多报道,铅对男(雄)性生殖毒性的研究虽有报道,但结果并不一致。人群流行病学调查显示,接触铅男性精子数量、精子活动率下降,精子头畸形率升高^[10]。朱建华等^[11]认为铅通过影响支持细胞从而导致生精障碍。Wadi SA报道铅对雄性生殖系统的作用,CF-小鼠0.25%和0.5%铅饮6周,高剂量组附睾中的精子计数,运动型精子率显著减少,不正常精子率增加^[12]。项华等^[13]报道的高剂量醋酸铅能使小鼠生殖细胞微核率和减数分裂异常率增加。我们用3种浓度醋酸铅腹腔注射4周龄雌性小鼠,3种浓度醋酸铅可降低小鼠精子数量、精子活动率,增高精子头畸形率。高浓度的醋酸铅使生精细胞微核率升高,但3种浓度的醋酸铅减数分裂异常率与对照组比均无统计学差异。

汞、铅暴露对小鼠精子具有亚慢性毒性作用,高

浓度铅组影响生精细胞的微核率;汞、铅对小鼠精子数量、活动率、畸形率、微核率和减数分裂率的影响基本一致。

参考文献:

- [1] 陈琛,李灵宏,姚武,等.汞对男工生殖功能影响的研究[J].工业卫生与职业病,1994,20(4):21-24.
 - [2] 沈彤.铅对男(雄)性生殖生育的影响研究现状[J].国外医学卫生学分册,2001,28(6):342-345.
 - [3] Barratt CL, Davies AG, Bansal MR, et al. The effects of lead on the male rat reproductive system[J]. *Andrologia*, 1989, 21(2): 161-6.
 - [4] Acharya UR, Acharya S, Mishra M, et al. Lead acetate induced cytotoxicity in male germinal cells of Swiss mice[J]. *Ind Health*, 2003, 41(3): 291-294.
 - [5] Gulvik ME. Spermatogenesis and maturation of spermatozoa in rats exposed to lead [J]. *Annales Academiae Medicae Stetinensis*, 1989, 35: 73-87.
 - [6] 陈小玉.汞蒸气对雄性小鼠的生殖毒性[J].卫生毒理学杂志,1992,6(2):142-144.
 - [7] 王灿,张朝红.氯化汞对小鼠精子毒性作用的研究[J].中华劳动卫生职业病杂志,1994,12(5):290-291.
 - [8] 孙志伟,王献理,林秀武.慢性甲基汞染毒所致小鼠生精过程改变及定量组织学分析[J].癌变·畸变·突变,1995,7(4):236-237.
 - [9] 蔡原,张颖花,万伯健,等.氟化钠、氯化汞和亚砷酸钠对小鼠睾丸早期精细胞微核率的影响[J].中国公共卫生学报,1995,14(2):120-122.
 - [10] 马勇,陈晓霞.低剂量铅接触对男工精液质量的影响[J].新疆医学院学报,1998,21(1):27-29.
 - [11] 朱建华,范广勤,冯昶,等.铅对小鼠睾丸脂质过氧化作用的研究[J].中国公共卫生学报,1998,17(3):166-168.
 - [12] Wadi SA, Ahmad G. Effects of lead on the male reproductive system in mice[J]. *J Toxicol Environ Health A*, 1999, 56(7): 513-521.
 - [13] 项华,蔡瑾,王梅.硒与铅的致突变性及硒的拮抗效应[J].环境与健康杂志,2002,19(3):195-197.
- (上接205页)
- [6] 梁逸曾.浅议中药色谱指纹图谱的意义、作用及可操作性[J].中药新药与临床药理,2001,12(3):196-200.
 - [7] 郑志华.加强中药质量标准研究是实现中药现代化的必要前提[J].中国药业,2001,10(2):4-6.
 - [8] 周北君,陈蕙芳.建立植物活性成分数据库.为新药研
- 究服务、为中药现代化服务[J].药学实践杂志,2000,18(5):351-352.
- [9] 曹治权.中药药效的物质基础和作用机理研究新思路(一)中药中化学物质种形态和生物活性关系的研究[J].上海中医药大学学报,2000,14(1):36-40.