

# 一种微生物来源的白细胞介素 1 受体拮抗剂 ——多糖 139A 的化学结构研究

陈 晶<sup>1</sup>, 吴剑波<sup>1\*</sup>, 刘叶民<sup>2</sup>, 徐桂芸<sup>2</sup>

(1. 中国医学科学院、中国协和医科大学医药生物技术研究所, 北京 100050; 2. 中国科学院化学研究所, 北京 100080)

关键词: 白细胞介素 1; 受体拮抗剂; 多糖

中图分类号: R343.2

文献标识码: A

文章编号: 0513 - 4870(2001)10 - 0787 - 03

白细胞介素 1(IL-1)是一种重要的细胞因子,有广泛的生物学活性,它通过与细胞表面的白细胞介素 1 受体(IL-1R)结合而起作用。

白细胞介素 1 不仅参与多种生理过程,如免疫活性细胞的调节、造血、神经内分泌及抗肿瘤等,而且与败血症休克、炎症、急慢性骨髓白血病、类风湿性关节炎及骨质疏松等疾病的病理变化有关<sup>[1]</sup>。因此,降低白细胞介素 1 已成为一种治疗这些疾病的方法。天然存在的白细胞介素 1 受体的拮抗剂(IL-1ra)由于应用范围的局限性和效果的不确定性,使用受到限制。随着基因工程的发展,利用重组受体进行药物筛选为寻找新型的 IL-1ra 类药物提供了可能。1997 年报道了从链霉菌发酵产物中筛选到了 3 个有拮抗作用的小分子化合物(属已知化合物)<sup>[2]</sup>。本所利用重组的 I 型白细胞介素 1 可溶性受体(sIL-1RI)为靶点建立其拮抗剂筛选模型,并对用此模型筛选到的抗 IL-1R 活性的链霉菌 139 进行了研究,从其代谢产物中分离得到了有拮抗作用的多糖 139A。本文介绍对多糖 139A 化学结构的研究。

## 材 料 和 方 法

仪器和材料 糖的组成、甲基化分析用 Carlo Erba 4160 型(意大利)毛细管气相色谱仪(配有氢火焰离子化检测器)进行测定。

Diaion HP-20 大孔吸附树脂为日本产品,DEAE Sephadex A-25 为进口分装。三氟乙酸为 Fluka 公司产品(A.R.);硼氢化钠为 Aldrich 公司产品(A.R.);碘甲烷经重蒸馏;乙酸酐和吡啶等其他化学试剂(A.R.)均为北京化工厂产品。

链霉菌 139 的发酵 种子和发酵培养基均为 F19 培养基:葡萄糖 1%;淀粉 2%;黄豆粉 2%;胰蛋白胨 0.2%;牛肉膏 0.2%;酵母膏 0.4%;K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05%;CaCO<sub>3</sub> 0.3%;微量盐溶液 0.1 mL。

以在葡萄糖-天门冬素琼脂斜面上 28℃培养 7 d 的链霉菌 139 作为菌种,接种于 100 mL 种子培养基中(500 mL 三角烧瓶装),28℃振荡摇床上培养 48 h,然后转种至发酵培养基中在 28℃振荡摇床上培养 96 h,即可放瓶提取。

链霉菌 139 中 sIL-1RI 拮抗剂的提取、纯化 将发酵液离心,滤液经 Diaion HP-20 大孔树脂吸附,将流出液通过 001×7 强酸性苯乙烯系阳离子交换树脂,流出液用 60%乙醇沉淀,反复两次。沉淀离心去上清液后挥去乙醇,得棕色不定形固体。此固体用少量水溶解,经二乙胺基乙基凝胶 A-25 柱色谱,用蒸馏水洗脱,洗脱液透析后冷冻干燥,得白色絮状固体,即 139A。在高效凝胶过滤色谱中呈单一峰,表明其为均一组分。用凝胶色谱法测得其分子量为  $6.33478 \times 10^5$ ,分布宽度( $M_w/M_n$ )为 20.36<sup>[3]</sup>。

气相色谱(GC)分析<sup>[4]</sup> 将样品 2 mg 溶解在 2 mol·L<sup>-1</sup>的三氟乙酸 2 mL 中,在 120℃水解 1 h,用 N<sub>2</sub> 除去水解液后,加入 0.5 mol·L<sup>-1</sup>氢氧化钠和硼氢化钠 1.5 mL,室温放置过夜进行还原,用乙酸中和后,加甲醇除去过量的硼氢化钠,残渣在五氧化二磷存在下真空干燥 4 h,加入乙酸酐和吡啶各 0.5 mL,在 100℃反应 30 min。冷至室温后用 N<sub>2</sub> 除去过量的乙

收稿日期: 2001-03-26.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39670016)。

作者简介: 陈 晶(1975-),女,在读博士研究生;

吴剑波(1937),男,博士生导师,研究员。

\* 通讯作者 Tel:(010)63017303, Fax:(010)63017302,

E-mail:wujb0825@sina.com

酸酐和吡啶,加入二氯甲烷 0.5 mL 溶解衍生物,收集通过微型过滤器的二氯甲烷液,浓缩至所需体积进行 GC 分析。

GC 条件:ov-225 石英毛细管柱(0.32 mm × 25 ml),柱温从 160 °C 程序升温(5 °C · min<sup>-1</sup>)至 220 °C,检测器和进样器均为 250 °C,载气为氦气,线速度为 48 m · s<sup>-1</sup>。

甲基化分析 139A 多糖样品 2 mg 溶解在二甲亚砜 2 mL 中,加入碘甲烷 2 mL,室温反应 4 h。上述反应重复 2 至 3 次,至 IR 检测表明无羟基吸收,甲基化完全为止。然后将甲基化的多糖样品进行水解、还原、乙酰化和气相色谱分析,步骤同上。

气相色谱-质谱联用的质谱条件:EI 源,离子化电势 70 eV,电子源温度为 160 °C。

### 结果和讨论

139A 经水解、乙酰化后的气相色谱分析,表明该多糖由鼠李糖(Rhm)、木糖(Xyl)、葡萄糖(Glc)、甘露糖(Man)、阿拉伯糖(Ara)、岩藻糖(Fuc)、半乳糖(Gal)组成。经毛细管电泳法测得还含有半乳糖醛酸(GalA),但在此条件下无法测出。气相色谱图见图 1。

经甲基化-水解-还原-GC 分析,从部分甲基部分乙酰基单糖衍生物的净保留时间与标准品 2,3,4,6-O-四甲基-1,5-O-二乙酰基葡萄糖醇酯的净保留时间比较,得到的相对保留值再与文献<sup>[5]</sup>值比较,并结合 GC-MS 联用技术测定结果,确定了单糖的部分甲基化部分乙酰化糖醇乙酸酯的结构,从而确定了构成 139A 的单糖的连接点。部分甲基化部分乙酰化糖醇乙酸酯的色谱峰面积经相应因子校正后得到相对摩尔数,结果见表 1。

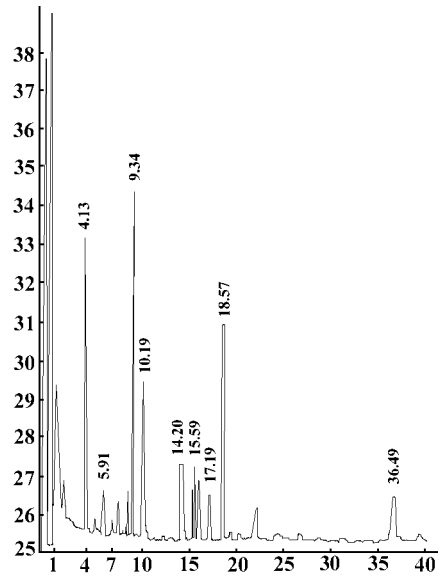
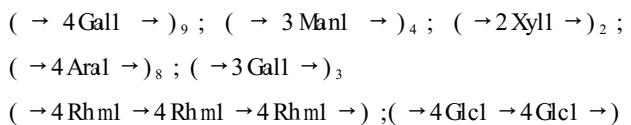


Figure 1 Gas chromatogram of polysaccharide 139A

1. 1- O-acetyl-2,3,4,5-tetra- O-methylarabinitol;
2. 1- O-acetyl-2,3,4,5-tetra- O-methylfucitol;
3. 1,4-Di- O-acetyl-2,3,5-tri- O-methylarabinitol;
4. 1,2-Di- O-acetyl-3,4,5-tri- O-methylxylitol;
5. 1,2,4-Tri- O-acetyl-3,5-di- O-methylrhamnitol;
6. 1,3-Di- O-acetyl-2,4,5,6-tetra- O-methylmannitol;
7. 1,3-Di- O-acetyl-2,4,5,6-tetra- O-methylgalactitol;
8. 1,4-Di- O-acetyl-2,3,5,6-tetra- O-methylgalactitol;
9. 1,4,6-Tri- O-acetyl-2,3,5-tri- O-methylglucitol

根据组成多糖 139A 的单糖的相对摩尔比,可以推测 139A 重复单位的片段组成的最大可能为:



2	2	2	6	6
↓	↓	↓	↓	↓
1	1	1	1	1
Ara	Ara	Ara	Fuc	Fuc

Table 1 Methylation analysis of 139A

No.	Methylated sugar	Mode of linkage	Molar ratio	Relative retention time	
				Test value	Reference
1	1- O-acetyl-2,3,4,5-tetra- O-methylarabinitol	Ara(1-	3	0.43	0.41
2	1- O-acetyl-2,3,4,5-tetra- O-methylfucitol	Fuc(1-	2	0.58	0.58
3	1,4-Di- O-acetyl-2,3,5-tri- O-methylarabinitol	-4) Ara(1-	8	1.08	1.07
4	1,2-Di- O-acetyl-3,4,5-tri- O-methylxylitol	-2) Xyl(1-	2	1.19	1.19
5	1,2,4-Tri- O-acetyl-3,5-di- O-methylrhamnitol	-2,4) Rhm(1-	3	1.69	1.67
6	1,3-Di- O-acetyl-2,4,5,6-tetra- O-methylmannitol	-3) Man(1-	4	1.89	1.90
7	1,3-Di- O-acetyl-2,4,5,6-tetra- O-methylgalactitol	-3) Gal(1-	3	2.04	2.03
8	1,4-Di- O-acetyl-2,3,5,6-tetra- O-methylgalactitol	-4) Gal(1-	9	2.23	2.22
9	1,4,6-Tri- O-acetyl-2,3,5-tri- O-methylglucitol	-4,6) Glc(1-	2	4.48	4.50

药理实验表明, 139A 对小鼠角叉菜胶性关节炎有明显的抑制作用; 对大鼠佐剂性关节炎、多发性关节炎有明显的预防作用, 临床药理实验正在进行中。

#### REFERENCES:

- [1] Moreland, Larry W. The role of cytokines in rheumatoid arthritis: inhibition of cytokines in therapeutic trials [J]. *Drugs Today*, 1999, **35**(4-5): 309 - 319.
- [2] Stefanelli S, Corti E, Montanini N, *et al.* Inhibitors of type-I interleukin-1 receptor from microbial metabolites [J]. *J Antibiot*, 1997, **50**(6): 484 - 487.
- [3] Wu Q, Wu JB, Li Y. Screening, purification and pharmacological study on a IL-1 R antagonist streptomyces 139 [J]. *Chin J Antibiot* (in Chinese), 1999, **24**(6): 401 - 403.
- [4] Xu GY, Chang LW, Fei LH. Composition analysis of carbohydrate released from bovine submaxillary mucin by capillary gas chromatography [J]. *Chin J Anal Chem* (in Chinese), 1998, **26**(8): 922 - 926.
- [5] Jansson PE, Kenne L, Liedgren H, *et al.* A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates [J]. *Chem Commun*, 1976, **8**(15): 1 - 74.

## STUDY ON THE STRUCTURAL PROPERTY OF POLYSACCHARIDES 139A — A KIND OF IL-1R ANTAGONISTS FROM MICROORGANISM

CHEN Jing<sup>1</sup>, WU Jianbo<sup>1</sup>, LIU Yemin<sup>2</sup>, XU Guiyun<sup>2</sup>

(1. Institute of Medical Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 2. Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

**ABSTRACT:** **AIM** To study the structural property of the bioactive component from the fermentation broth of *Streptomyces* 139 which can inhibit IL-1R. **METHODS** Polysaccharide 139A is extracted and purified by means of macroreticular resin Diaion HP-20, cation exchange and DEAE Sephadex A-25 chromatography. The sugar compositions were analyzed with GC, the linkage positions of 139A were determined by methylation and GC-MS. **RESULTS** The bioactive component which can inhibit IL-1R is a kind of polysaccharides. **CONCLUSION** The components of 139A repeat units are conjectured.

**KEY WORDS:** interleukin-1; receptor antagonist; polysaccharide