

槲寄生中多肽 B6的分离纯化和一级结构测定

孔景临* 杜秀宝 范崇旭 郑晓军

(北京药物化学研究所 北京 102205)

摘要 采用离子交换、凝胶过滤、HPLC等提取、分离、纯化方法,从我国东北产槲寄生中得到第二种新成分槲寄生毒素 B6。Edman降解结合质谱技术测定其一级结构为 KSCCPNTTGRN IYNT CRFAGSRERCA KLSGCK IISASTCPSD YPK。进化分析说明该成分与白果槲寄生中的槲寄生毒素同源性很高,亲缘关系较近。同源建模表明 B6是一种高 螺旋的多肽。

关键词 槲寄生 槲寄生毒素 分离纯化 一级结构

槲寄生 [*Viscum coloratum* (Komar) Nakai]为桑寄生科槲寄生属植物,是一种半寄生性常绿小灌木,在我国东北分布比较广泛。槲寄生叶和小枝可入药,能治疗风湿麻痹、腰膝酸软、高血压等症,是传统中药材^[1]。国内对槲寄生有效成分的研究始于上世纪 80 年代,工作主要集中在小分子化合物上^[2,3]。而国外学者对槲寄生属植物白果槲寄生 (*Viscum album* L)中的槲寄生毒素 (viscotoxins)和毒蛋白,即槲寄生凝集素 (mistletoe lectins)则进行了较为系统的研究^[4,5]。含有这两类成分的白果槲寄生水提液制剂如 Iscador、Helixor、Plenosol 等,在欧洲上市多年,是疗效可靠的癌症辅助治疗药物^[6,7]。

目前,从白果槲寄生中发现并确定结构的槲寄生毒素共有 7 种,均为含 46 个氨基酸残基的碱性多肽^[8,9]。我国不产白果槲寄生,我们首次报道了槲寄生中也存在一类碱性多肽,并确定了毒素 B2 的一级结构,它与白果槲寄生毒素的同源性较高,并具有抗癌活性^[10,11]。继续开展这一研究对于开发和利用东北的槲寄生资源,形成拥有我国自主知识产权的药物具有重要意义。本文在已有实验的基础上,从槲寄生中分离到另一种新成分:槲寄生毒素 B6。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

植物样品采自吉林省柳河县,寄主为杨树。经北

京药物化学研究所郑硕研究员鉴定为槲寄生 [*Viscum coloratum* (Komar) Nakai],标本由本实验室保存。

AKTA prime液相层析仪(瑞典);Agilent 1100高效液相色谱仪(美国);Brucker Biflex 质谱仪(瑞士);岛津 2010 LC/ESI/MS联用仪(日本);Applied Biosystems Procise 491 N端氨基酸测序仪(美国)。CM Sepharose F F 弱阳离子交换柱, Sephadex G-25 superfine 凝胶过滤柱提取为 Amersham 产品;二硫苏糖醇 (DTT)为 Sigma 产品;碘代乙酰胺 (IAM)和重蒸过的三氟乙酸 (TFA)为 Fluka 产品;色谱纯乙腈 (CH₃CN)为 Dikma 产品; 氰基-4-羟基肉桂酸 (CCA)为 Aldrich 产品;其他试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 槲寄生毒素的提取分离 槲寄生毒素的提取方法在作者的论文^[10,11]中作过介绍。经过弱阳离子交换柱、凝胶过滤柱提取、粗分得到的槲寄生毒素混和物,浓缩后,用 9.6 × 250mm Vydac C18 反相半制备柱,在高效液相色谱仪上进行分离, DAD 检测器,紫外检测波长设为 214nm。流动相 A 为 CH₃CN (含 0.1% TFA), B 相为 H₂O (含 0.1% TFA), CH₃CN 起始梯度为 15%,流速为 2ml/min,以 1% CH₃CN/min 的线性梯度洗脱,收集色谱峰 (图 1)。

1.2.2 槲寄生毒素 B6 的纯化及其衍生化产物的制备 将图 1 中的 6 号峰收集后,减压蒸馏除去 CH₃CN 和部分 H₂O,使用 4.6 × 250mm Zorbax 300SB C3 反相分析柱进行纯化。CH₃CN 起始梯度为 18%,流速为 1ml/min,以 1% CH₃CN/min 的线性梯度洗脱,收集色谱峰,冻干后得

收稿日期: 2005-03-31 修回日期: 2005-05-24

*电子信箱: jlkong@sina.com

到白色粉末,命名为槲寄生毒素 B6 (viscotoxin B6)。

鉴于槲寄生毒素中含有二硫键,测序前对其进行还原衍生化处理。称取槲寄生毒素 B6 冻干粉 300 μ g, 将其溶于 150 μ l 含 6 mol/l 盐酸胍及 0.01 mol/l EDTA 的 1 mol/l Tris · HCl 缓冲溶液 (pH 8.5) 中,浓度为 2 μ g/ μ l。37 °C 下温育 2 h 后,加入 3.3 mg DTT 并立即通氮气 5 min,在 37 °C 下反应 5 h。冷至室温,避光加入 8.7 mg IAM,于暗处反应 1 h。将反应液分两次在高效液相色谱仪上,使用 4.6 \times 250 mm Zorbax 300SB C3 反相分析色谱柱进行分离,紫外检测波长为 214 nm。色谱条件:先用 100% 的 B 相 (H₂O 相) 洗脱 7 min 除盐, A 相 (CH₃CN 相) 再从 0% 开始增加 CH₃CN 浓度,通过 1% CH₃CN/min 梯度洗脱的方法,分离还原衍生化的多肽。减压蒸馏除 CH₃CN 后冻干,供质谱分析和测序用。

1.2.3 样品纯度和分子量的质谱分析 将衍生化的槲寄生毒素 B6 溶于 0.1% TFA 中,以 CCA 为基质。结晶后,采用脉冲氮激光 (337 nm) 作为离子解析电离源,以线性-延时引出模式,在 Bruker Biflex 型 MALD-TOF 质谱仪上进行分析,判断纯度是否满足测序要求。

将用于测序的样品溶于 1 l 的 CH₃OH 水溶液 (内含 3% 的 HOAc) 中,浓度为 1 μ g/ μ l。在 LC/ESI 联用仪上测定样品平均分子量。直接进样,正离子模式检测。

1.2.4 氨基酸序列测定 在 Applied Biosystems Procise model 491 N 端氨基酸测序仪上进行序列分析,循环终止于第 46 个氨基酸残基。

1.2.5 生物信息学分析 使用蛋白质家族和结构域数据库 PROSITE (<http://www.expasy.org/prosite>) 第 18.23 版 (2004.3.14 发布) 分析槲寄生毒素 B6 的结构域。使用 Blastp^[12] 软件,搜索槲寄生毒素 B6 的同源序列。在 BioEdit 软件环境下,将同源序列组织成聚类分析软件 ClustalX 识别的 .fasta 格式文件。用 ClustalX (版本 1.83) 对这些序列进行多重比对,输出 .dnd 格式的进化树文件。使用 Phylip 软件包 (版本 3.6, 2004 年 1 月发布) 中的 drawgram.exe 程序,绘制出进化树。通过 Internet 向 SwissModel 服务器提交槲寄生毒素 B6 的序列,收到了包含最后模型原子坐标和 .pdb 格式 3D 图的 E-mail,用 ViewLite 软件分析其二级结构。

2 结果与分析

2.1 槲寄生毒素 B6 的分离纯化

如图 1 所示,当 CH₃CN 梯度为 32% ~ 39% 时,出现了一组色谱峰,收集该部分,除溶剂后冻干,得白色

粉末 54 mg,槲寄生毒素在槲寄生中的总含量为 0.5%。

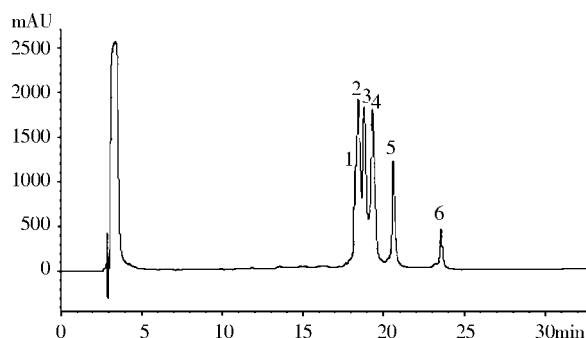


图 1 用 Vydac C18 半制备柱对槲寄生多肽混合物进行分离,槲寄生毒素 B6 在峰 6 中

Fig 1 The concentrated viscotoxin mixture was applied to a Vydac semipreparative C18 column, viscotoxin B6 was present in peak 6

图 2a 是槲寄生毒素 B6 用 Zorbax 300SB C3 反相分析柱纯化的结果。从图中可以看出,在 CH₃CN 梯度约为 32.3% 时,出现了槲寄生毒素 B6 的色谱峰。该成分在 C3 柱上的保留时间较 C18 柱稍有提前。纯化的样品冻干后,称重为 3.1 mg,在槲寄生毒素中占 5.7%。

进行 N 端氨基酸测序前,需要将样品中的二硫键还原衍生化。图 2b 中 1 是还原衍生化的槲寄生毒素 B6 经 C3 柱纯化的结果;2 是相同色谱条件下,天然样品的色谱图,比较可见衍生化产物的保留时间较天然样品提前。

2.2 样品纯度和分子量的分析结果

N 端氨基酸测序对样品纯度要求较高,采用 MALD-TOF-MS 对衍生化槲寄生毒素 B6 的分析结果见图 2c,从中可以看出该样品纯度完全满足测序要求。由于实验中所用质谱仪误差较大,提供的质量数不能作为判断测序结果正确与否的证据,故又采用电喷雾质谱进行分子量分析,其电离后所得的多电荷谱图见图 2d。计算可知质荷比 663.87, 758.60, 884.86, 1061.69 分别对应的正电荷态为 8, 7, 6, 5。用随机软件处理数据,得到衍生化槲寄生毒素 B6 的平均分子量为 5303.1 Da。

2.3 氨基酸序列测定结果

N 端测序结果给出槲寄生毒素 B6 的氨基酸序列为 KSCCPNTTGRN IYN TCRFAGASRERCAKLSGCKIISA-STCPSDYPK。

根据测序结果,计算 B6 的平均分子量为 4954.68 Da。6 个 Cys 形成的 3 对二硫键被全部还原并用 IAM

衍生化所得产物,其平均分子量的计算值应为 5303.0 Da,这与 ESI/MS的测定结果 5303.1 Da一致,由此确信 B6的测序结果无误。

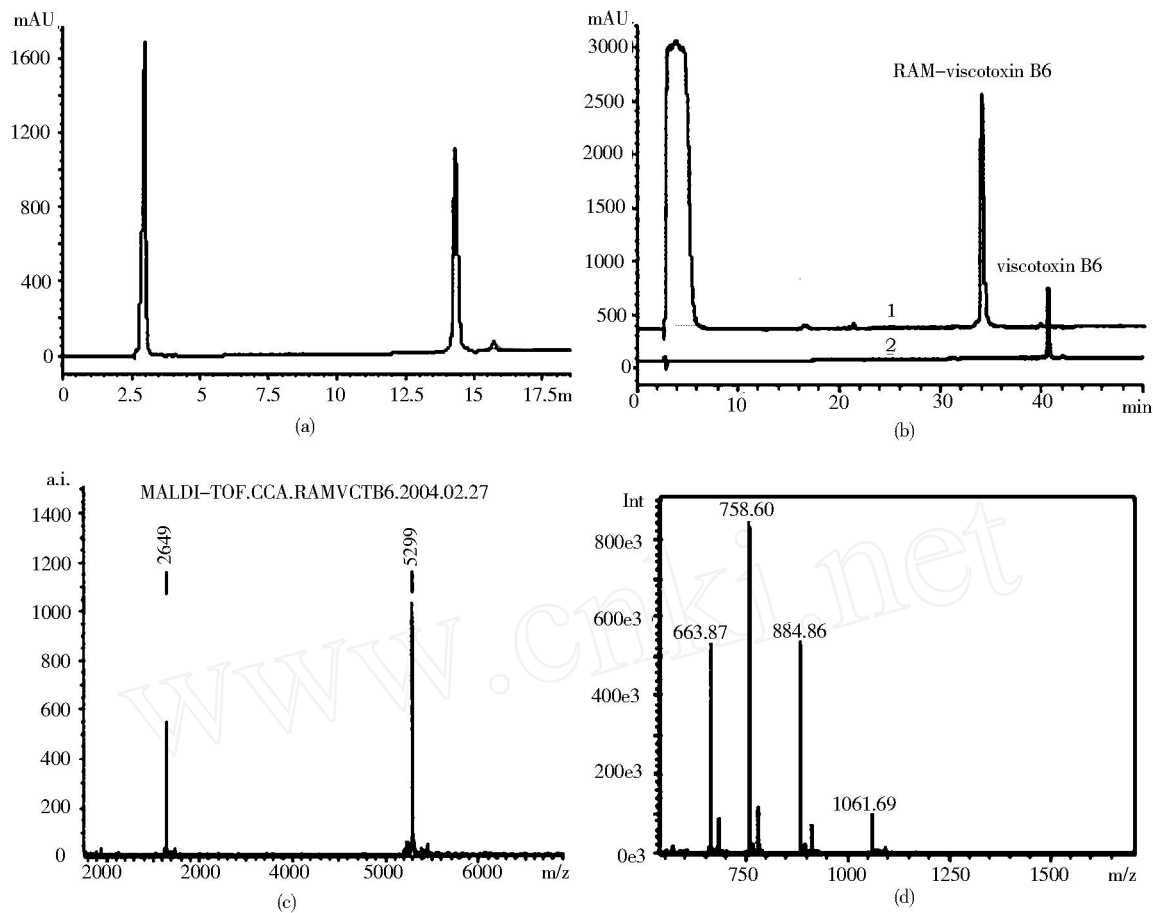


图 2 槲寄生毒素 B6及其衍生化样品的色谱质谱分析

(a):用 Zorbax 300SB C3分析柱纯化槲寄生毒素 B6; (b):用 Zorbax 300SB C3分析柱纯化衍生化槲寄生毒素 B6(1)及天然样品(2); (c):以 CCA为基质,线性模式下还原衍生化槲寄生毒素 B6的质谱图; (d):还原衍生化槲寄生毒素 B6的 ESI谱图

Fig 2 Chromatography and mass spectra analysis of viscotoxin B6 and its derivate

表 1 槲寄生毒素的一级结构

Table 1 Primary structures of viscotoxins

Viscotoxin	Species	Primary structure
A1	<i>V. album</i>	KSCCPSTTGRN IYN TCR L TGSSR ETCA KL SGCK IISA STCP SN YPK
A2	<i>V. album</i>	KSCCPN TTGRN IYN TCR FGGSR QVCA SL SGCK IISA STCP SD YPK
A3	<i>V. album</i>	KSCCPN TTGRN IYNACRL TGA PR PTCA KL SGCK IISGTCPSD YPK
B	<i>V. album</i>	KSCCPN TTGRN IYN TCR L GGSR ERCA SL SGCK IISA STCP SD YPK
C1	<i>V. album</i>	KSCCPN TTGRN IYN TCR FA GGSR ERCA KL SGCK IISA STCP SD YPK
1-PS	<i>V. album</i>	KSCCPN TTGRN IYN TCR FGGSR EVCA R ISGCK IISA STCP SD YPK
U-PS	<i>V. album</i>	KSCCP TTTARN IYN TCR FGGSR PVCA KL SGCK IISG TKCD SN GNH
B2	<i>V. colonatum</i>	KSCCKN TTGRN IYN TCR FA GGSR ERCA KL SGCK IISA STCP SD YPK
B6	<i>V. colonatum</i>	KSCCPN TTGRN IYN TCR FA GA SR ERCA KL SGCK IISA STCP SD YPK

表 1列出了白果槲寄生和槲寄生中几种毒素的一级结构。序列比对可见,2种植物中存在的此类活性成分同源性较高。在氨基酸组成上,白果槲寄生中毒素的酸性氨基酸残基为 1~2个、碱性残基为 6~8个;槲

寄生中 B2、B6的碱性残基分别为 9、8个,酸性残基均为 2个。Omiga 2.0软件分析 B2、B6的等电点为 9.36、9.00,表明这 2种毒素均为碱性多肽。

2.4 生物信息学分析

PROSITE 搜索结果指出槲寄生毒素 B6 具有 thionin(硫堇)家族的特征序列 CcknttgRni YnC,为硫堇家族多肽。

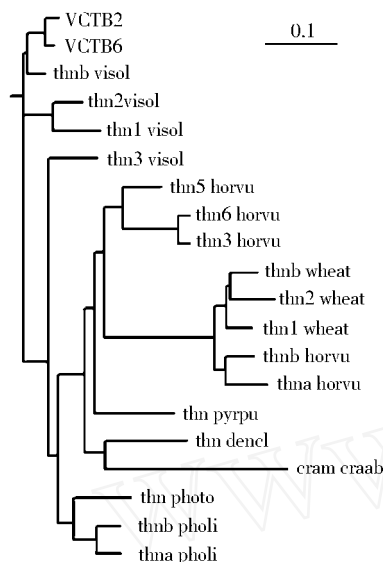


图 3 硫堇家族的进化树

Fig 3 A phylogenetic tree of thionin family

通过 ClustaIX 运算得到的进化树文件 vcthoma.dnd,用 drawgram.exe 程序打开,出现图 3 所示的进化树。由图可见硫堇家族的多肽具有较为明显的种属特异性,来自禾本科、十字花科、桑寄生科(包括桑寄生科内不同属种)植物中的多肽在进化上属于不同的分支。槲寄生毒素 B2、槲寄生毒素 B6 与来自同属植物白果槲寄生的 thnb visol(viscotoxin B 前体)关系最近;与白果槲寄生中的 thn2 visol(viscotoxin A2)、thn1 visol(viscotoxin 1-PS)以及 thn3 visol(viscotoxin A3 前体)的关系较近;和同为桑寄生科但不同属的植物北美洲槲寄生中的 thn photo(phoratoxin)、thnb pholi(ligatoxin B)、thna pholi(ligatoxin A)也表现出一定的亲缘关系。

槲寄生毒素 B6 同源模建的结果见图 4,其 Cys 的配对方式与已研究过的槲寄生毒素相同,均为 Cys3-Cys40、Cys4-Cys32、Cys16-Cys26,3 对二硫键形成同心模体(Concentric Motif)。其中含有的二级结构类型包括螺旋、折叠和转角。槲寄生毒素 B6 的残基 1~3,33~35 形成 2 个反平行的折叠;残基 7~19,23~30

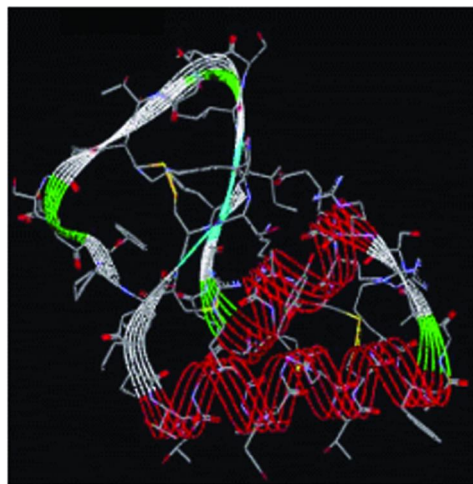


图 4 同源模建得到的槲寄生毒素 B6 的 3D 结构

Fig 4 3D structure of viscotoxin B6 with modeling by homology method

对应 2 段反平行的螺旋,结构中螺旋的含量较高。

3 讨论

通过槲寄生毒素 B2、B6 的序列比对发现,两者仅在第 5、21 位相差 2 个氨基酸残基,B2 在这两个位置的残基 K、G,在 B6 中被分别替换为较两者疏水的 P 和 A,结构上的变化导致了毒素 B6 在反相色谱柱(图 1)上,比 B2 的保留时间延长。根据 Parker 等提出的算法^[13],使用 BioEdit 软件对 B2 和 B6 的亲疏水性进行了比较,结果表明 B6 的疏水性强于 B2,这与它们的反相色谱行为相符。在对 B6 提纯时,采用了固定相疏水性弱于 C18 柱的 C3 柱,质谱分析表明纯化效果较好。

槲寄生毒素 B6 及其同源序列多重比对的结果表明,这些多肽中半胱氨酸的位置非常保守。B6 高级结构的模拟结果中有两点值得注意:一是在残基 7~30 之间形成了一个“螺旋-转角-螺旋”的模体(Helix-Turn-Helix motif, HTH motif),HTH 模体是 DNA 结合蛋白的结构特征,从这一点看,B6 可能具有与 DNA 结合的能力;二是 B6 中的螺旋具有两亲(amphipathic)螺旋的特点^[14]。B6 中 7~19,23~30 两段螺旋,一侧是 R、N、R、E、K,集中着亲水的带电残基,一侧是相对疏水的 I、C、A、C、L。已有研究发现含有带正电荷两亲螺旋的多肽能够溶解细胞膜。多肽先靠静电作用或是疏水作用与细胞膜结合,随后将疏水内核插入细胞膜的脂双层中,导致细胞膜溶解。槲寄生多肽两亲螺旋中碱性氨基酸残基的比例较高,在体内会带正电荷,由

此预计它们也具有溶解细胞膜的细胞毒性。药理学实验已经证实先前发现的槲寄生毒素 B2 具有杀伤肿瘤细胞的活性。

SwissModel 是基于序列同源性来预测靶蛋白质或多肽高级结构的,因此,靶与模板序列相似程度的高低直接影响着预测的准确性。由于槲寄生毒素 B6 与作为模板的 1 ORL (viscotoxin C1) 同源性高达 97.8%,所以能够认为反馈的预测结果可靠性较高,在此基础上功能分析,对于进一步开展槲寄生多肽的活性研究具有一定的指导意义。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2000年版一部). 北京:化学工业出版社,2000. 305 ~ 306
Pharmacopoeia committee Pharmacopoeia of the People's Republic of China Beijing: Chemical Industry Press, 2000. 305 ~ 306
- [2] 孔德云,李惠庭,罗思齐. 槲寄生化学成分的研究. 药学报,1992,27(10): 792 ~ 795
Kong D Y, Li H T, Luo S Q. Acta Pharmaceutica Sinica, 1992, 27(10): 792 ~ 795
- [3] 孔德云,罗思齐,李惠庭,等. 槲寄生化学成分的研究. 药学报,1988,23(8): 593 ~ 600
Kong D Y, Luo S Q, Li H T, et al. Acta Pharmaceutica Sinica, 1988, 23(8): 593 ~ 600
- [4] Urech K, Schaller G, Ziska P, et al. Comparative study on the cytotoxic effect of viscotoxin and mistletoe lectin on tumour cells in culture. Phytotherapy Research, 1995, 9: 49 ~ 55
- [5] Ochocka J R, Piotrowski A. Biologically active compounds from European mistletoe (*Viscum album* L.). Canada Journal of Plant Pathology, 2002, 24: 21 ~ 28
- [6] Karkabounas S, Assinakopoulos D, Malamas M, et al. Antiproliferative and anticarcinogenic effects of an aqueous preparation of *Abies alba* and *Viscum album* ssp. *seabii*, on a L-1210 malignant cell line and tumor-bearing Wistar rats. Anticancer Research, 2000, 20: 4391 ~ 4395
- [7] Burger A M, Mengs U, Schuler J B, et al. Anticancer activity of an aqueous mistletoe (AME) in syngeneic murine tumor models. Anticancer Research, 2001, 21: 1965 ~ 1968
- [8] Ortu S, Scaloni A, Giannattasio M, et al. Amino acid sequence, S-S bridge arrangement and distribution in plant tissues of thionins from *Viscum album*. Biological Chemistry, 1997, 378(3): 989 ~ 996
- [9] Schrader G, Urech K, Grazi G, et al. Viscotoxin composition of the three European subspecies of *Viscum album*. Planta Medicine, 1998, 64(2): 677 ~ 678
- [10] Kong J L, Du X B, Fan C X, et al. Purification and primary structure determination of a novel polypeptide isolated from mistletoe *Viscum coloratum*. Chinese Chemical Letter, 2004, 15(11): 1311 ~ 1314
- [11] 孔景临,杜秀宝,范崇旭,等. 一种槲寄生多肽的一级结构分析和抗肿瘤活性. 药学报,2004,39(10): 813 ~ 817
Kong J L, Du X B, Fan C X, et al. Acta Pharmaceutica Sinica, 2004, 39(10): 813 ~ 817
- [12] Altschul K, Stephen F, Thomas L, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research, 1997, 25: 3389 ~ 3402
- [13] Parker J M, Guo R D, Hodges R S. New Hydrophobicity Scale Derived from High Performance Liquid Chromatography Peptide Retention Data: Correlation of Predicted Surface Residues with Antigenicity and X-ray-Derived Accessible Sites. Biochemistry, 1986, 25: 5425 ~ 5432
- [14] 阎隆飞,孙之荣. 蛋白质分析结构. 北京:清华大学出版社,1999. 33 ~ 34
Yan L F, Sun Z H. Beijing: Tsinghua University Press, 1999. 33 ~ 34

Purification and Primary Structure Determination of a Novel Polypeptide from Mistletoe *Viscum coloratum*

KONG Jing-lin DU Xiu-bao FAN Chong-xu ZHENG Xiao-jun

(Research Institute of Pharmaceutical Chemistry Beijing 102205, China)

Abstract A novel polypeptide, named viscotoxin B6, was obtained from mistletoe (*Viscum coloratum*) in northeast China by ion exchange, gel filtration and reversed phase HPLC techniques. The primary structure of viscotoxin B6 was determined to be KSCCPNTTGRN IYNTCRFAGA SRERCAKLSGCKIISASTCPSDYK by Edman degradation combined with mass spectrum analysis. Phylogenetic analysis showed viscotoxin B6 shared high homology with viscotoxins from mistletoe *V. album*. With modeling by homology method, viscotoxin B6 was found to have high content of α -helix in its predicted three-dimensional structure.

Key words Mistletoe Viscotoxin Extraction and purification Primary structure