

决明子中一种新的降脂蛋白的纯化与生化特性

李楚华^①, 李梅^②, 常文瑞^②, 郭宝江^{①*}

① 华南师范大学生命科学学院, 广东省植物发育生物工程重点实验室, 广州 510631;

② 中国科学院生物物理研究所, 北京 100101

* 联系人, E-mail: guobj@scnu.edu.cn

收稿日期: 2008-07-02; 接受日期: 2008-07-24

广东省科技厅(批准号: 2003C34409)和广州市科技局(批准号: 2002Z3-E5041)资助项目

摘要 决明子是一种传统中药, 具有降低血清胆固醇的作用. 通过凝胶排阻及离子交换层析技术从决明子中分离出一种具有抑制胆固醇合成作用的新蛋白 Peak -3, 将之命名为新决明子蛋白. 质谱分析表明该蛋白分子量为 19.7 kD, 等电聚焦(IEF)电泳结果显示其等电点为 4.80. SDS-PAGE 及等电聚焦电泳的结果均为单一条带, 表明新蛋白为均一组分. 对该蛋白 N-端进行测序, 结果为 IPYISASFPLNIEFPSE, 用 BLAST 在 NCBI-BLASTP 库中搜索没有找到同源蛋白. 圆二色谱结果显示该蛋白具有 12.5%的 α 螺旋, 55.6%的 β 折叠, 31.9%的无规卷曲.

关键词

决明子
新蛋白
纯化
化学特性
胆固醇合成

心血管疾病是引起世界人口死亡的主要原因之一, 而血清中胆固醇过高又是导致动脉粥样硬化及其他心血管疾病的主要病因. 动脉粥样硬化、冠心病等心血管疾病与脂质代谢障碍具有一定的相关性. 决明子能降低血清总胆固醇(total cholesterol, TC)和甘油三酯(triglyceride, TG)的水平, 延缓和部分逆转动脉硬化斑块的形成, 从而明显降低心血管疾病的发病率和死亡率^[1].

在中医治疗中, 决明子(*Cassia obtusifolia* L.seeds)治疗高脂血症和高血压具有很好的应用价值^[2]. 决明子具有清肝明目、祛风散热、抗应变^[3]和抗氧化的功效^[4]. 决明子含有一系列具有生物活性的蒽醌类物质, 如大黄素^[5]、大黄酸、大黄素葡萄糖甙等^[6]. 大黄素葡萄糖甙、大黄素蒽酮、大黄素能显著降低血浆中TC和TG的含量, 并能抑制血小板凝集^[7].

决明子中全部蛋白占其总量的 18.56%~22.93%. 研究表明, 决明子粗蛋白可明显降低高脂血症大鼠血清的TG, TC和LDL-C(低密度脂蛋白胆固醇)含量^[8]. 但对其具体的组成及其作用机制却了解甚少. 为

深入研究决明子蛋白的生化性质及其功能, 本实验对决明子粗蛋白进行分离纯化, 并对其化学性质进行了测定.

1 材料与方法

1.1 材料

决明子购于广州药房, 产自安徽. 层析柱分子筛 Superdex 75 和离子交换柱 Resource Q 购于 Amersham Pharmacia 生物技术公司. 所用生化试剂均为分析纯, 购于 Sigma 公司.

1.2 粗蛋白的提取

决明子(1000 g)充分碾碎后用石油醚浸泡 24 h 脱脂, 回收溶剂, 挥干后以 1 g: 10 mL 的体积浸泡于 50 mmol/L KH_2PO_4 -NaOH (pH 8.0)的缓冲液 10 h, 4℃, 重复 3 次, 合并提取液. 提取液于 4℃, 12000×g 高速离心 20 min, 上清液边搅拌边加入硫酸铵至 50%的饱和度. 与上述相同条件离心, 沉淀物脱盐后于冷冻干燥仪中冷冻干燥, 粉末状样品(粗蛋白)

储于-20℃冰箱中。

1.3 决明子粗蛋白的分离与纯化

(1) 缓冲液. 分子筛 Superdex75 柱子的缓冲液为 0.15 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0). 离子柱 Resource Q 的缓冲液包括 A 和 B, 缓冲液 A 为 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0), 缓冲液 B 为 A 液中加入 1 mol/L NaCl.

(2) 方法. 整个分离纯化过程均在 4℃ 条件下进行 (图 1). 粗蛋白冻干粉充分溶解于 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0) 的缓冲液中, 上样前在 12000×g, 4℃ 条件下离心 20 min, 分子筛 Superdex 75 层析柱用 0.15 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0) 的缓冲液平衡。

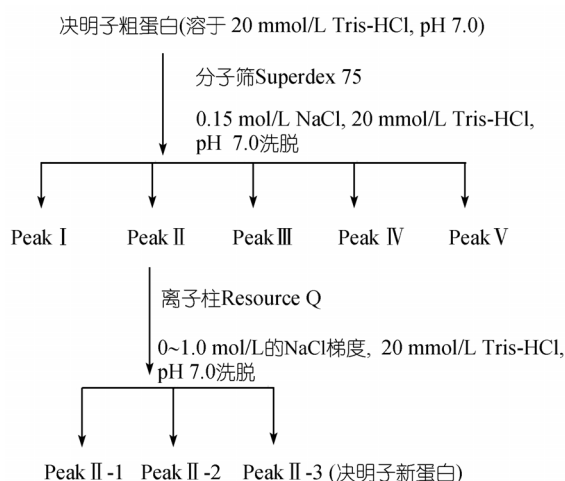


图 1 决明子新蛋白分离纯化示意图

收集 Superdex 75 层析柱的 号峰部分, 脱盐, 进一步纯化. Resource Q 柱首先用缓冲液 A 进行平衡. 上样后, 采用 0~1.0 mol/L 的 NaCl 梯度的缓冲液 B 进行洗脱, 在 NaCl 浓度约为 0.3 mol/L 处分离得到 Peak -3.

1.4 电泳

样品进行电泳时分离胶浓度为 15%, 蛋白采用考马斯亮蓝 G250 进行染色. 等点聚焦电泳用于测定蛋白的等电点(pI), 采用平板进行, 载体两性电解质(pharmalyte)pH 范围为 2.5~5.0, 标准品 pH 范围为 2.5~6.5.

1.5 质谱分析、N-端测序及圆二色光谱预测蛋白二级结构

MALDI-TOF 质谱测定 Peak -3 的分子量. 样品用双蒸水充分脱盐, 经 SDS-PAGE 后用垂直板法电转移到 PVDF 膜上, 在蛋白测序仪上测定 N-端序列.

圆二色谱在 CD 光谱仪上进行测定, 被测样品 Peak -3 蛋白浓度为 5 μg/mL, 采用 100 μL 液池. 灵敏度 100 mdeg, 清晰度 1 nm, 带宽 1.0 nm, 190~260 nm 扫描累加 3 次. 二级结构的比例按 Microcal Origin 软件计算而得^[9].

1.6 决明子粗蛋白及其组分对胆固醇合成的影响

两性霉素 B 细胞模型法用于检测粗蛋白及其组分在胆固醇合成中的作用, 细胞模型根据韩峰和顾振纶^[10]及本实验室的方法改进而成.

(1) 细胞培养液的配制. A 液: RPMI1640 培养基 (含谷氨酰胺 300 μg/mL 及 10% 小牛血清); B 液: A 液去除小牛血清加入 10% 无脂蛋白血清; C 液: B 液加入不同剂量待测样品及阳性对照新伐他汀 (Simvastatin); D 液: B 液加入两性霉素 B 300 μg/mL.

(2) 分组. 实验分 7 个组进行, 每组设 6~7 个复孔. 第一组为阴性对照组 (加入等量培养液), 第二组为阳性对照组 (Simvastatin, 0.5 mg/mL), 第 3~7 组分别为决明子粗蛋白, Peak , Peak , Peak 和 Peak -3, 每个样品设不同剂量.

(3) 细胞培养. 中国仓鼠卵细胞 (CHO) 直接用 A 液稀释调整细胞浓度为 2×10^4 个/mL, 每孔 100 μL 接种于 96 孔板中, 于 37℃, 5% CO₂/95% O₂ 中培养. 待细胞贴壁后换 B 液 (200 μL). 第 2 天换 C 液 (200 μL), 继续培养 24 h, 无脂蛋白血清清洗 3 次. 加入 D 液 (200 μL) 培养 8 h 后, 无脂蛋白血清清洗 3 次. 加入 5 mg/mL MTT 10 μL, 继续培养 4 h, 加入酸化的 10% SDS 100 μL 终止反应. 以岛津 UV-1206 分光光度计在 570 nm 处检测吸光值. 光密度值越高, 表示细胞存活越多, 样品抑制胆固醇生物合成的作用越强.

1.7 蛋白浓度测定及数据统计与分析

蛋白浓度测定采用考马斯亮蓝法. 数据分析应用 SPSS 10.0 统计软件, 统计结果用 $M \pm SD$ 表示, 显著性检验采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为显著性差异.

2 结果

2.1 粗蛋白的分离与纯化

决明子粗蛋白充分溶解于 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0)的缓冲液中, 12000×g, 4℃条件下高速离心 20 min. 粗蛋白经分子筛和离子交换柱层析得到纯化. 粗蛋白经分子筛分离得到 5 个 peaks(图 2(a)), 收集 Peak , 脱盐后进一步用离子交换柱进行纯化. 使用 NaCl 线性梯度洗脱(0~1.0 mol/L), 在盐浓度约为 0.3 mol/L 处洗下主峰. 洗脱过程由 280 nm 的吸光值作为监测(图 2(b)).

2.2 质谱分析、等电点测定、N-端测序及 CD 预测决明子新蛋白 Peak -3 的二级结构

SDS-PAGE 和 IEF 电泳均显示 Peak -3 为一条均一的蛋白带(图 3 和图 4), 分子量为 19.7 kD, 等电点约为 4.80.

质谱显示 Peak -3 的分子量为 19680, N-端氨基酸测序结果为 IPYISASFLNIEFLPSE, 通过 BLAST 在 NCBI-BLASTP 库中进行搜索, 没有找到同源蛋白存在, 表明 Peak -3 是一种新蛋白, 本研究将 Peak -3 命名为决明子新蛋白.

圆二色谱分析(CD)结果表明新蛋白的α螺旋比

例为 12.5%, β折叠比例为 55.6%, 无规卷曲为 31.9% (图 5).

2.3 决明子蛋白及其组分对中国仓鼠卵细胞中胆固醇合成的影响

结果见表 1. 阳性对照 Simvastatin 组 A_{570} (0.270 ± 0.011)明显高于对照组的(0.037 ± 0.006) ($P < 0.01$).

决明子粗蛋白以及其组分 Peak , Peak , Peak -3(新蛋白)的 A_{570} 均显著比对照组高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且随着样品剂量的增大, A_{570} 也升高, 具有明显的量效关系, 以 Peak 的吸光值最高. 结果表明决明子粗蛋白及其组分 Peak , Peak , Peak -3 均能抑制中国仓鼠卵细胞中胆固醇的合成.

虽然 Peak -3 是从 Peak 中分离而来, 且其纯度也高于 Peak , 但 Peak -3 的 A_{570} 却显著低于 Peak 的 ($P < 0.05$), 提示 Peak -3 可能需要与其他物质结合才完全显示其在细胞内胆固醇合成中的抑制作用. 实验中发现粗蛋白及其组分均呈现出棕褐色, 且随着样品纯度的提高, 颜色逐渐变浅.

3 讨论

本实验从决明子中分离出一种新的蛋白即 Peak

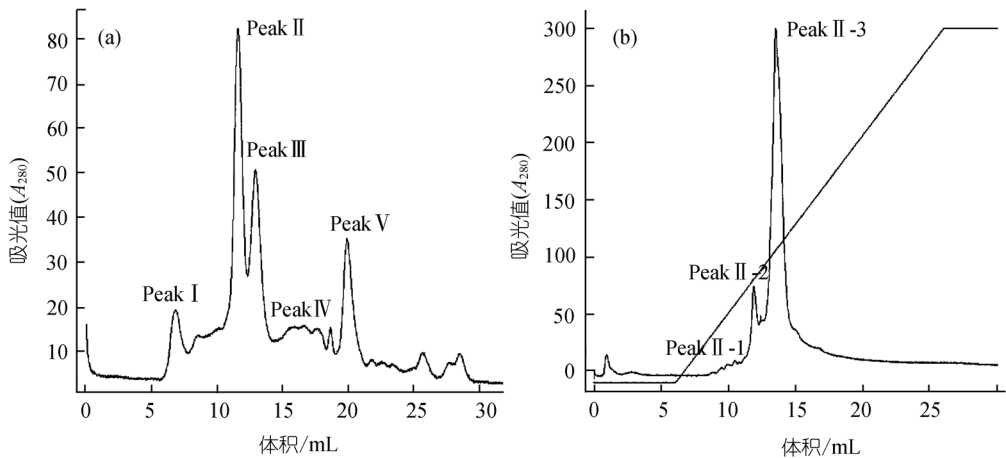


图 2 决明子粗蛋白的分离纯化

(a) 分子筛柱层析. 粗蛋白上样前 Superdex 75 先用缓冲液 0.15 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.0 进行平衡; (b) 离子交换柱层析. Superdex 75 收集的 Peak 脱盐后上样于离子交换柱 Resource Q, 上样前柱子先用缓冲液 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.0 平衡, 在盐浓度约为 0.3 mol/L 处洗脱下 Peak -3

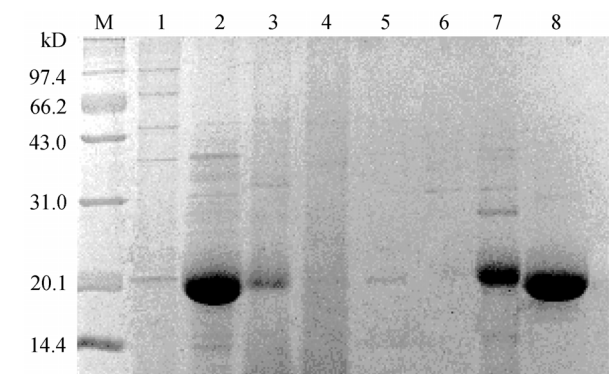


图 3 决明子各蛋白成分 SDS-PAGE 电泳图

M: 分子量标记; 泳道 1: Peak ; 泳道 2: Peak ; 泳道 3: Peak ; 泳道 4: Peak ; 泳道 5: Peak ; 泳道 6: Peak -1; 泳道 7: Peak -2; 泳道 8: Peak -3

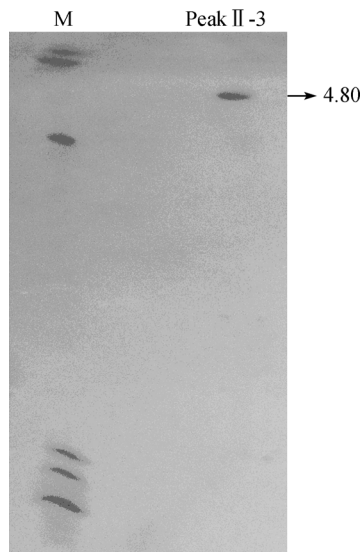


图 4 Peak -3 的等电聚焦电泳(IEF)图

两性电解质的 pH 范围为 2.5~5.0, 标准品 pH 范围为 2.5~6.5

-3 组分. 新蛋白、决明子粗蛋白及其他组分如 Peak , Peak 可抑制中国仓鼠卵细胞中胆固醇的合成, 以 Peak 的抑制作用最强. 虽然新蛋白是从 Peak 中分离而来, 纯度也高于 Peak , 但其对胆固醇合成的抑制作用却不如 Peak . 这可能是 Peak -3 需要与其他小分子物质结合才能完全发挥其对胆固醇合成的抑制作用. 新蛋白的这种特性符合中草药的特点. 中草药活性的发挥通常需要与其他物质结合. 纯化过程中发现决明子粗蛋白及其组分如 Peak , Peak ,

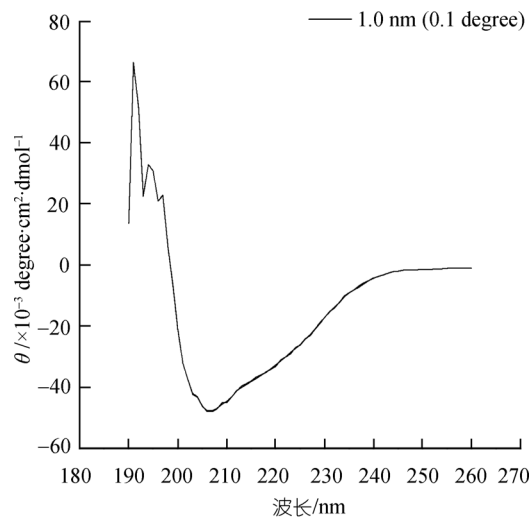


图 5 决明子蛋白 Peak -3(新蛋白)圆二色谱图

表 1 决明子粗蛋白及其不同组分对胆固醇合成的影响^{a)}

组别	剂量 (%)	n	A ₅₇₀ (M±SD)
对照	0	7	0.037±0.006
Simvastatin	5	7	0.270±0.011**
粗蛋白	1	7	0.033±0.008
	2	7	0.047±0.010
	5	7	0.056±0.012
	10	7	0.077±0.007*
Peak	1	7	0.036±0.007
	2	7	0.046±0.005
	5	7	0.049±0.010
	10	7	0.045±0.003
Peak	1	7	0.113±0.011*
	2	7	0.156±0.014**
	5	7	0.182±0.018**
	10	7	0.172±0.015**
Peak	1	7	0.068±0.009*
	2	7	0.065±0.009*
	5	7	0.091±0.012*
	10	7	0.104±0.007*
Peak -3	1	6	0.042±0.012 [#]
	2	6	0.038±0.014 [#]
	5	6	0.069±0.021 [#]
	10	6	0.089±0.018 [#]

a)与对照组比较, ** P<0.01, * P<0.05; 与 Peak 组比较, # P<0.05. 蛋白浓度为 0.5 mg/mL

Peak -1, Peak -2 及 Peak -3 均带有棕褐色, 随着样品纯度的提高, 样品颜色逐渐变浅. 所以, 本研究推测 Peak -3 可能需要与某些带有颜色的小分子结合才完全发挥其药效作用, 这种带有颜色的小分子可能是新蛋白发挥降脂功能的辅助因子.

大豆蛋白具有一系列的生物功能, 例如降低胆固醇的合成、减低体重等. 在大豆蛋白降低胆固醇合

成的研究中, 主要集中在机制及临床应用方面^[11]. Anderson 等人^[12]的实验结果表明摄入大豆蛋白能显著降低血清中的总胆固醇、低密度酯蛋白及甘油三酯的水平. 此外, 大豆蛋白对实验性高脂血症动物模型确有显著的降脂功效^[13]. 而决明子属于豆科植物. 因此推测, 从决明子中分离的新蛋白对于治疗高脂血症具有重要的应用价值.

致谢 感谢中国军事医学科学院质谱中心对质谱分析、北京大学生命科学学院对蛋白质 N-端测序的帮助.

参考文献

- 1 陈卫星, 刁国俊, 蒋文娟. 决明子对高胆固醇血症小鼠模型的影响. 中草药, 1991, 22(2): 72—73
- 2 Patil U K, Saraf S, Dixit V K. Hypolipidemic activity of seeds of *Cassia tora* Linn. J Ethnopharmacol, 2004, 90: 249—252^[DOI]
- 3 Choi J S, Lee H, Yark K. *In vitro* antimutagenic effects of anthraquinone aglycones and naphthopyrone glycosides from *Cassia tora*. Planta Medica, 1997, 63(1): 11—14^[DOI]
- 4 Guo C Y, Horn W C, Pin D D. Extraction and identification of an antioxidative component from Jue Ming Zi (*Cassia tora* L.). J Agric Food Chem, 1998, 46: 820—824^[DOI]
- 5 李楚华, 李续娥, 郭宝江. 发明专利(中国), 专利号 200510036857.X
- 6 Vadivel V, Janardhanan K. Agrobotanical traits and chemical composition of *Cassia obtusifolia* L: a lesser-known legume of the Western Ghats region of South India. Plant Foods Human Nitrit, 2002, 57: 151—164^[DOI]
- 7 李楚华, 李续娥, 郭宝江. 决明子提取物降脂作用的研究. 华南师范大学学报(自然科学版), 2002, 4: 29—32
- 8 李续娥, 郭宝江. 决明子蛋白质和蒽醌苷对高脂血症大鼠血脂的影响. 中国中药杂志, 2002, 27: 374—376
- 9 沈星灿, 梁宏, 何锡文, 等. 圆二色光谱分析蛋白质构象的方法及研究进展. 分析化学评述与进展, 2004, 32: 388—394
- 10 韩峰, 顾振纶. 百草降脂灵对细胞内胆固醇合成作用的影响. 苏州大学学报(医学版), 2002, 22: 517—519
- 11 Takamatsu K, Tachibana N, Matsunoto I, et al. Soy protein functionality and nutrigenomic analysis. BioFactors, 2004, 21: 49—53
- 12 Anderson J W, Johnstone B M, Cook-Newell M F. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. New Engl J Med, 1995, 333: 276—282^[DOI]
- 13 Wergedahl H, Liaset B, Gudbrandsen O A, et al. Fish protein hydrolysate reduces plasma total cholesterol, increase the proportion of HDL cholesterol and lowers acyl-CoA: cholesterol acyltransferase activity in liver of Zucker rats. J Nutri, 2004, 134: 1320—1327