

槲寄生中多肽成分的结构鉴定 与细胞毒活性研究

□刘石磊* 杜秀宝 孔景临 曹 瑛 范崇旭

(中国人民解放军防化研究院 北京 102205)

摘 要:从我国东北槲寄生(*Viscum coloratum* (Kom.) Nakai)中分离鉴定了5种多肽,其中,3种是新成分,命名为槲寄生毒素B5、B7、B8,B7是目前分离鉴定的唯一含有四对二硫键的槲寄生毒素;1种鉴定为槲寄生毒素C1,系首次从我国槲寄生中分得;还有一种命名为B4,与已知的B6的一级结构相同,但HPLC保留时间相差很大,应该是一个新肽。它们的一级结构分别为:B5 KSCCPSTTGR NIYNTCRFTG SSRETCALKS GCKIISASTC PSDYPK;B8 KSCCPSTTGR NIYNACRFTG SSRETCALKS GCKIISASTC PSDYPK;B7 KSCCRNTTGRN CYNTCRLPG TPRPVCASLC DCKIISGSKC PADYPR;C1 KSCCPNTTGR NIYNTCRFAG GSRERCAKLS GCKIISASTC PSDYP K;B4 KSCCPNTTGR NIYNTCRFAG ASRERCAKLS GCKIISASTC PSDYPK。它们对不同肿瘤细胞系具有选择性细胞毒活性,槲寄生总肽对于人肺癌细胞A549、人宫颈癌细胞Hela、人脑瘤细胞SF126的IC₅₀值分别为:3.7、1.5、2.1 μ g/mL;B4分别为1.3、1.3、1.6 μ g/mL;B7分别为:12、1.3、6.0 μ g/mL。而对于人胃癌细胞BGC效果不明显。

关键词:槲寄生毒素 多肽 结构鉴定 细胞毒活性

药用植物槲寄生是桑寄生科槲寄生属半寄生性常绿灌木或小灌木,寄生于桑科、茶科、芸香科、蔷薇科和豆科等多种植物上,在世界范围分布有100余种。在欧洲槲寄生被誉为“神奇的药草”^[1],长期以来用于各种疾病的治疗,其水提物用于乳腺癌、胃癌、结肠癌及肺癌等常见肿瘤疾病的辅助治疗已有近百年的历史。许多学者对槲寄生活性成分与生物功能、构效关系与作用机制、医药制剂与临床应用等方面开展了广泛的研究工作,取得了令人鼓舞的结果,尤

其是槲寄生的抗肿瘤活性越来越受到人们的关注。由于槲寄生长期药用,对人体十分安全,英国卫生部已同意将其水提物制剂作为癌症化疗药物直接用于临床。专家预测槲寄生有望成为继紫杉醇之后又一种天然抗癌药物。槲寄生属植物在我国大部分省区都有分布,中国植物志记载12种,药典收载1种槲寄生*Viscum coloratum* (Kom.) Nakai,主产于东北,也称北寄生。我国使用槲寄生有记载的历史始于秦汉时期,古代称桑上寄生,为《神农本草经》上品,有补肝肾、强筋骨、祛风湿、养血安胎和降血压的功能,民间还用于治疗肝癌、肺癌等多种癌症。我国槲寄生与

收稿日期:2005-10-20

修回日期:2005-12-09

* 联系人:刘石磊,博士研究生,主要从事天然产物化学研究,Tel:010-66758256,E-mail: liushilei402@263.ent。

38 [World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica]

欧洲白果槲寄生同源,而且天然资源丰富,分布较广,亟待开发。

槲寄生的主要活性成分包括:具有凝集活性的糖蛋白、槲寄生毒素、黄酮、生物碱、多糖、脂质等。其中槲寄生毒素是非常重要的抗肿瘤成分之一,它们是一类分子量在 5000Da 左右的含有 46 个残基的碱性毒性多肽,富含半胱氨酸,已鉴定的槲寄生毒素均含有 3 对二硫键。这类多肽对多种肿瘤细胞系具有细胞毒活性^[2-3],还有免疫调节功效^[4-5]。本文介绍了我国东北槲寄生中毒性多肽成分的分离纯化、一级结构鉴定与细胞毒活性研究。

一、实验方法

1. 槲寄生多肽的提取与纯化

寄生于山杨树的槲寄生样品由孔景临博士于 2004 年 3 月采自吉林省柳河县,我所郑硕研究员鉴定,样品采集后于 -70℃ 保存。将枝叶剪成小段,用液氮冷冻后粉碎,称取 300g,用 0.01mol/L HOAc-NaOAc(pH=5)缓冲溶液 1200mL 分两次提取,离心后上清液过弱阳离子交换柱 CM Sepharose F.F.(1.6×30cm),上样后用 HOAc-NaOAc 缓冲溶液洗去未结合的杂质。用含 0.4 mol/L NaCl 的缓冲溶液进行洗脱,收集洗脱峰得溶液约 70mL,浓缩后用 sephadex G-50 (1.6×100cm)柱在 ACTA prime 低压层析仪上进行分级分离,流动相为 0.2 mol/L HOAc,流速 0.4mL/min,同时记录紫外吸收(280nm)与电导信号。收集槲寄生毒素所对应的峰,浓缩冻干后得粗肽 82mg。

所得粗肽用 HPLC (Agilent 1100) 进一步分离纯化, Vydac RPC18 300 半制备色谱柱 (9.6×250mm),流动相 A 为 0.1%TFA 的乙腈, B 为 0.1%TFA 的水。洗脱梯度: A 从 15% 在 35min 内升到 50%, 流速: 2mL/min。单一肽的纯度分析使用 Vydac RPC18 300 分析柱(4.6×250mm),流速为 1mL/min。

2. 槲寄生多肽的结构鉴定

称取 300μg 多肽,溶于 150μL Tris-HCl 缓冲液(pH=8.5)中, 37℃ 温育 2hr,加入 3mg 二巯基苏糖醇(DTT),冲入氮气 5min,还原 5hr。然后避光加入 9mg 碘代乙酰胺(IAM),衍生 1hr。反应液冷却至室温后用

HPLC 纯化,洗脱梯度: 0%A 保持 8min,在 50min 内升到 50%A,浓缩冻干后得多肽的乙酰化衍生产物约 240μg。

多肽的酶切采用含有 2mmol/L EDTA 的 50mmol/L 碳酸氢铵缓冲溶液(pH=8.5)反应体系,多肽与酶的质量比 30:1,反应温度为 37℃,Glu-C 内切酶(EC 3.4.21.19,序列级)反应 4hr,对于 Lys-C 内切酶(EC 3.4.21.16,序列级)反应 1hr。酶切产物用 HPLC 分离, Vydac C18 分析柱,洗脱梯度: 0%A 保持 20min,在 50min 内升到 50%A。流速为 1mL/min。接收酶切片段,用 MALDI-TOF MS 分析。

衍生多肽及酶切片段进行 N-端测序(Applied Biosystems Procise 491 型脉冲 N-端液相测序仪),辅助 MALDI-TOF、Q-TOF 质谱技术分析多肽的一级结构。

3. 槲寄生多肽的细胞毒活性测定

细胞毒活性的测定采用 MTT 法^[6]。肿瘤细胞系购自中国医学科学院细胞中心。

二、结果

1. 槲寄生多肽的提取与纯化

文献中槲寄生多肽的分离方法大多采用 Sephadex G-25,它的分离范围为 1000~5000Da,而槲寄生多肽的分子量在 5000Da 左右,正处于 G-25 的分离上限,本文改用分离范围是 1500~30000Da 的 Sephadex G-50,效果较好,见图 1。图中峰 3 对应的就是槲寄生毒素组分。用 HPLC 分析该组分的结果见

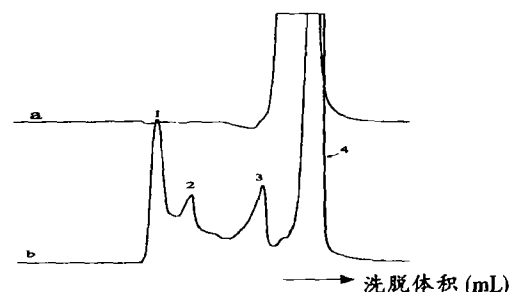


图 1 槲寄生提取液的凝胶(Sephadex G-50)色谱图,
(曲线 a 为电导信号,曲线 b 为紫外吸收信号,
峰 3 为槲寄生多肽组分)

图2, 用MALDI-TOF MS及Q-TOF MS测定各峰的分子量, 结果见表1, 峰1含有2个多肽成分, 其中1个序列已经鉴定^[7], 所以槲寄生毒素组分中共含有7个主要的多肽。

2. 槲寄生多肽的一级结构鉴定

本文对图1中的2~6共5种多肽成分进行了一级结构研究。多肽还原衍生后, N-端测序, 结果见表2。5种多肽N-端测序分别终止于第45、46、30、41、36个氨基酸残基。3号峰(viscotoxin B4)得到了完整的序列, 与孔景临博士鉴定的 viscotoxin B6 序列相同, 但色谱的保留时间存在很大的差别, 有可能存在结构修饰或高级结构差异。2号峰(viscotoxin B3)的末端氨基酸残基不清晰, 用Q-TOF MS测得的准确分子量为4940.2Da, 计算前45个氨基酸残基的片段质量数为4812.5Da, 最后一个氨基酸的质量数计算为: $4940.2 - 4812.5 + 18 = 145.7$, 与赖氨酸146.2Da最为接近, 所以末端确定为赖氨酸。此多肽与亚洲白果槲寄生(*Viscum album* ssp. *C. ohwi*)中分离鉴定的 viscotoxin C1 一级结构相同, 首次从我国槲寄生中分离得到。

图2中的4~6 3个多肽没有测到终点, 需要进行酶切, 测定酶切片段后再进行拼接, 然后得出整个肽的序列信息。从所测得的4号峰(viscotoxin B5)、5号峰(viscotoxin B8)的序列分析, 第24位均为谷氨酸, 分析与槲寄生毒素类似的多肽序列, 这类多肽只有在第24位可能存在谷氨酸, 所以最终选择Glu-C内切酶。用Glu-C进行酶切一般是在37℃反应16hr, 而实验中发现反应时间缩短, 目标片段的收率会提高, 本文中采用了4hr的反应时间。用HPLC纯化B8的酶切片段结

果见图3, 用MALDI-TOF-MS方法分析峰1、峰2的分子量, 分别为2808 Da、2443 Da, 分别对应1~24、25~46残基的片段。B5相应的峰的质量数为2838 Da、2443 Da。分别测定B5、B8的25~46片段的序列,

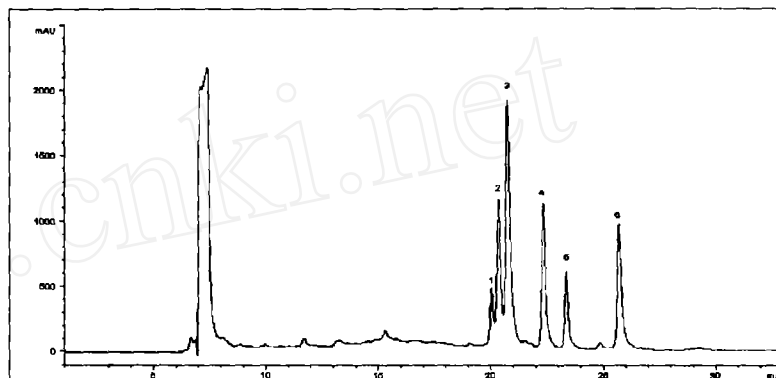


图2 槲寄生多肽组分的液相色谱图(共有6个主要的峰)

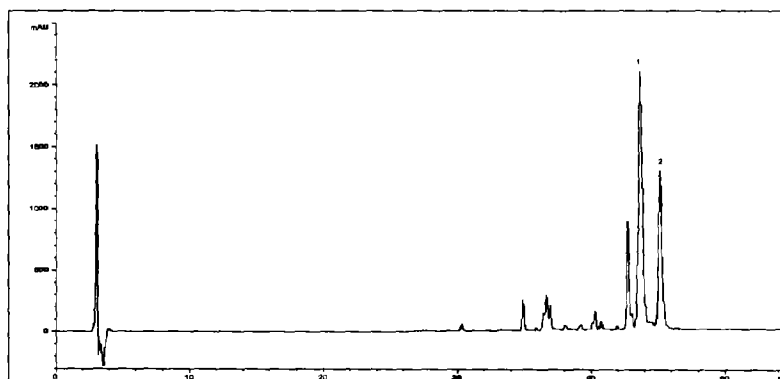


图3 用内切酶 Glu-C 酶切 B8 产物的液相色谱图
(峰1、2 分别对应 1-24、25-46 残基片段)

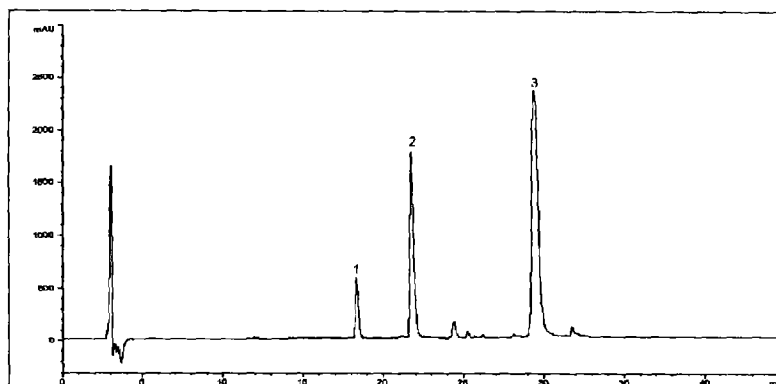


图4 用内切酶 Lys-C 酶切 B7 产物的液相色谱图
(峰1、2、3 分别对应 40-46、34-39、2-33 残基片段)

最后得出整个肽的氨基酸序列,结果见表2。

6号峰(viscotoxin B7)已测得的序列中第24位不是谷氨酸,而是脯氨酸,在已知的槲寄生多肽中除一种不太稳定的 viscotoxin U-PS 外,赖氨酸均分布在1、33、46位上,而且33位靠近已测得序列的末端,是较为理想的酶切位点,所以选择 Lys-C 内切酶。37℃反应1hr可以达到理想的酶切效果,见图4。分析峰1、2、3的平均分子量,分别为603.3、877.6、3893.8,3对应的是2~33的片段,分子量计算:603.3+877.6+3893.8+146-18×3=5467,与 MALDI-TOF-MS 测定的 B7 修饰产物的分子量5468相近。所以34~46残基片段被酶切为两段:1、2,分别测序,结果见表2。理论分子量与实测分子量相吻合。

3. 槲寄生多肽的细胞毒活性

部分槲寄生毒素对不同肿瘤细胞系的IC50值测定结果见表3。

三、讨论

根据序列同源性、二硫键连接方式及生理作用,槲寄生毒素被归属于III型硫堇家族。硫堇家族多肽存在于多种植物的种籽、叶、茎中,是一类含有40~50个氨基酸残基、3~4对二硫键的碱性多肽,具有保护植物防止微生物入侵的作用。这类多肽有着广泛的生物活性谱,对革兰氏阳性或阴性的细菌、真菌、酵母及各种哺乳动物细胞具有毒性^[8-9]。

目前从白果槲寄生中分离鉴定的槲寄生毒素有: viscotoxin A1、A2^[10]、A3、B^[11]、1-PS、U-PS、C1,见表4。它们的二硫键采取“同心模体”的排列方式:Cys4-

Cys32、Cys16-Cys26、Cys3-Cys40,这种方式可以稳定分子中能及膜结合的结构域^[12]。各种槲寄生毒素的一级序列高度保守,突变位点多发生在12~30残基形成的α螺旋结构域,所有荷电残基的变化都发生在此段上。18、28、43是保守性突变位点,突变方式分别为:F-L、K-S、D-N。中国槲寄生中的B2、B3、B4、B5、B6^[13]、B8在一级结构上与欧洲白果槲寄生非常相似,

表1 槲寄生多肽的分子量

序号	命名	分子量		
		MALDI-TOF	Q-TOF	理论值
1-1	viscotoxin B1	4757	4759.0	
1-2	viscotoxin B2	4971		4971.71
2	viscotoxin B3 (C1)	4939	4940.2	4940.65
3	viscotoxin B4 (B6)	4954		4954.68
4	viscotoxin B5	4917	4917.5	4918.59
5	viscotoxin B8	4889		4888.57
6	viscotoxin B7	5002	5002.5	5002.80

表2 槲寄生多肽的氨基酸序列测定

名称	1	10	20	30	40
viscotoxin B3(C1)	KSCCPNTTGR NIYNTCRFAG GSRERCAKLS GCKIISASTC PSDYP				
	K				
viscotoxin B4(B6)	KSCCPNTTGR NIYNTCRFAG ASRERCAKLS GCKIISASTC PSDYPK				
	KSCCPSTTGR NIYNTCRFTG SSRETCAKLS				
viscotoxin B5	TCAKLS GCKIISASTC PSDYPK				
	KSCCPSTTGR NIYNTCRFTG SSRETCAKLS GCKIISASTC PSDYPK				
viscotoxin B8	KSCCPSTTGR NIYNACRFTG SSRETCAKLS GCKIISASTC P				
	TCAKLS GCKIISASTC PSDYPK				
viscotoxin B7	KSCCPSTTGR NIYNACRFTG SSRETCAKLS GCKIISASTC PSDYPK				
	KSCCRNTTGR NCYNTCRLPG TPRPVCASLC DCKIISG				
	IISGSK				
	C PADYPR				
	KSCCRNTTGR NCYNTCRLPG TPRPVCASLC DCKIISGSKC PADYPR				

表3 槲寄生毒素对不同肿瘤细胞系的细胞毒活性(IC50/μg/mL)

槲寄生毒素	A549	Hela	SF126	BGC
总肽	3.7	1.5	2.1	31
B4	1.3	1.3	1.6	31
B7	12	1.3	6.0	69

只有 B7 的差别较大, 它的第 4、19、21、31、42、46 位残基与已知的均不相同, 而且 B7 是迄今为止分离鉴定的唯一含有 4 对二硫键的槲寄生毒素, 第四对为 Cys12-Cys40, 这种结构特殊性的产生原因以及对活性的影响都有待深入研究。

槲寄生毒素的最初发现源于寻找槲寄生中的降压成分, 而后来倍受关注的是其抗肿瘤活性。槲寄生毒素属于硫堇家族, 但对真核细胞的毒性比其它硫堇强得多, 对很多肿瘤细胞具有细胞毒活性, 如人骨髓瘤细胞 K562、人 T-细胞白血病细胞 Molt4、肉瘤细胞 Yoshida、人粒性白细胞、淋巴瘤细胞等^[2], 对于人 Hela 肿瘤细胞的 ED₅₀ 在 0.2~1.7 μg/mL 范围^[3], 而 *Pyrularia* 硫堇为 17 μg/mL^[14]。中国槲寄生中的毒素成分的初步活性测试结果见表 3。对于人肺癌细胞 A549、人宫颈癌细胞 Hela、人脑瘤细胞 SF126, 槲寄生毒素总肽、B4、B7 都有较好的活性, 其中 B4 活性最高。同时, 对不同的肿瘤细胞系, 这类毒素存在很好的选择性, 对人胃癌细胞 BGF 的活性不明显, IC₅₀ 值超过了 30 μg/mL。曾有报道, 北美槲寄生中存在类似的多肽, 对实体瘤的活性高于血液瘤, 其作用机制与一般的抗肿瘤药物不同, 这类多肽可能具有独特的作用机制。所以对槲寄生毒素进行体内外活性研究, 很可能找到一类对实体瘤具有更好活性的新的抗癌药物, 非常具有值得深入临床研究的潜力。

表 4 白果槲寄生与中国槲寄生的多肽成分一级结构比较

	10	20	30	40
viscotoxin A1	KSCCPSTTGR	NIYNTCRLTG	SSRETCAKLS	GCKIISASTC
viscotoxin A2	KSCCPNTTGR	NIYNTCRFGG	GSREVCASLS	GCKIISASTC
viscotoxin A3	KSCCPNTTGR	NIYNACRLTG	APRPTCAKLS	GCKIISGSTC
viscotoxin B	KSCCPNTTGR	NIYNTCRLGG	GSRERCASLS	GCKIISASTC
viscotoxin 1-PS	KSCCPNTTGR	NIYNTCRFGG	GSREVCARIS	GCKIISASTC
viscotoxin U-PS	KSCCPITTAR	NIYNTCRFGG	GSRPVCALSL	GCKIISGTHK
viscotoxin B2	KSCCKNTTGR	NIYNTCRFAG	GSRERCALSL	GCKIISASTC
viscotoxin B3(C1)	KSCCPNTTGR	NIYNTCRFAG	GSRERCALSL	GCKIISASTC
viscotoxin B4(B6)	KSCCPNTTGR	NIYNTCRFAG	ASRERCALSL	GCKIISASTC
viscotoxin B5	KSCCPSTTGR	NIYNTCRFTG	SSRETCAKLS	GCKIISASTC
viscotoxin B8	KSCCPSTTGR	NIYNACRFTG	SSRETCAKLS	GCKIISASTC
viscotoxin B7	KSCCRNTTGR	NCYNTCRLPG	TPRPVCASLC	DCKIISGSKC

参考文献

- 1 L A Anderson and J A Philipson. Mistletoe-The magic herb. Pharm. J, 1982, 16:437~439.
- 2 M L Jung, S Baudino, G Ribereau-Gayon and J P Beck. Characterization of cytotoxic proteins from mistletoe (*Viscum album* L.). Cancer Lett, 1990, 51: 103~108.
- 3 J Konopa, J M Woynarowski, and M Lewandowska-Gumieniak. Isolation of viscotoxins, cytotoxic basic polypeptides from *Viscum album* L. Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 1980, 361(10): 1525~533.
- 4 E Kovacs. The in vitro effect of *Viscum album* (VA) extract on DNA repair of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in cancer patients. Phytother Res, 2002, 16: 143~147.
- 5 G B Stein, G Schalle, U Prüller, et al. Characterisation of granulocyte stimulation by thionins from European mistletoe and from wheat. Biochim Biophys Acta, 1999, 1426: 80~90.
- 6 张卓然. 培养细胞学与细胞培养技术. 上海: 上海科学技术出版社, 2004: 310~311.
- 7 K Jinglin, D. Xiubao, F Chongxu, et al. Purification and primary structure determination of a novel polypeptide isolated from mistletoe *Viscum coloratum*. Chin Chem Lett, 2004, 15(11), 1311~1313.
- 8 P Eppele, K Apel and H Bohlmann. Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of Arabidopsis against *Fusarium oxysporum*. Plant Cell, 1997, 9: 509~520.
- 9 D E A Florack and W J Stiekema. Thionins: properties, possible biological roles and mechanisms of action. Plant Mol Bio, 1994, 26: 25~37.
- 10 T Olson and G Samuelsson. The amino acid sequence of viscotoxin A2 from the European mistletoe (*Viscum album* L., Lorantheaceae). Acta Chem Scand, 1972, 26(2): 585~595.
- 11 G Samuelsson and B Pettersson. The amino acid sequence of viscotoxin B from the European mistletoe (*Viscum album* L., lorantheaceae). Eur J Biochem, 1971, 21: 86~89.
- 12 S Orru, A Scaloni, M Giannattasio, K Urech, P Pucci and G Schaller. Amino acid sequence, S-S bridge arrangement, and distribution in plant tissues of thionins from *Viscum album*. Bio Chem, 1997, 378(9): 986~996.
- 13 孔景临. 槲寄生多肽和蛋白质的研究. 防化研究院博士学位论文, 2004 年.

- 14 A Coulon, E Berkane, A M Sautereau, K Urech, P Rouge and A Lopez. Modes of membrane interaction of a natural cysteine-rich

peptide: the Viscotoxine A3. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1559: 145~159.

Identification of Structure and Study of Cytotoxicity of Polypeptides Isolated From *Viscum Coloratum*

Liu Shilei, Du Xiubao, Kong Jinglin, Cao Ying and Fan ChongXu

(Institute of Chemical Defense, PLS, Beijing 102205)

Five polypeptides have been isolated from *Viscum coloratum* (Kom. Nakai) growing in the Northeast China, of which three are newly found and named visotoxin B5, B7 and B8. B7 is the only visotoxin which has 4 disulphide bonds according to the identification made so far. One visotoxin is confirmed as visotoxin C1 obtained first from *Viscum coloratum* in China and the other one is named B4, whose structure is the same to the primary structure of the already known B6, but whose retention time is greatly different from that of B6 by HPLC, and therefore it must be a new polypeptide. The following is the primary structure of the polypeptides involved: KSCCPSTTGR NIYNTRFTG SSRETCALSKLS GCKIISASTC PSDYPK of B5, KSCCPSTTGE NIYNACRFTG SSRETCALSKLS GCKIISASTC PSDYPK of B8, KSCCRNTTGRN CYNTCRLPG TPRPVCASLC DCKIISGSKC PADYPR of B7, KSCCPNTTGR NIYNTRCFAG GSRERCAKLS GCKIISASTC PSDYPK of C1 and KSCCPNTTGR NIYNTRCFAG ASRERCAKLS GCKIISASTC PSDYPR of B4. ALL the polypeptides mentioned above possess selective cytotoxic activity for different cancer clones. The IC₅₀ values of the total polypeptides of *Viscum coloratum* in the lung cancer cell A549, the cervical carcinoma cell Hela and the cerebral cancer cell SF126 of human beings are 3.7 µg/mL, 1.5 µg/mL and 2.1 µg/mL respectively. The IC₅₀ values of B4 in the cells as mentioned above are 1.3 µg/mL, 1.3 µg/mL and 1.6 µg/mL and those of B7 are 1.2 µg/mL, 13 µg/mL and 6.0 µg/mL respectively. Nevertheless, their result is not clear in the gastric cancer cell BGC of human beings.

Key Words: visotoxin of *Viscum coloratum* Polypeptide, structural identification, cytotoxicity

(责任编辑:周立东, 责任编审:果德安, 责任译审:秦光道)

(Continued from page 52)

process to get the final classification and the clinic characteristic of the sub-health crowd. Method: the sub-health epidemiological data is analyzed firstly by the whole data understanding and then by selecting variables and finally by choosing the appropriate model. Thus, the classification equation and the clinic characteristic of sub-health are obtained. Results: Two logistic regression models are established in two ways, each of which is also tested using testing data set to reach the classification accuracy. And the results are satisfying which show that the main clinic characteristics are body fatigue, sleep difficulty, bad memory, work efficiency declining, mental blankness, irascibility, etc. Conclusion: This method is superior to the traditional logistic regression method in dealing with the case with many explanation variables, showing great advantage.

Key words: Data mining, Logistic regression, Similarity, Clustering analysis

(责任编辑:张志华, 责任编审:王 阶, 责任译审:李羽阳)