

蜗牛酶中一种人参皂苷 Rb₁ 水解酶的分离纯化

Purification of a Ginsenoside-Rb₁ Hydrolase from *Helix* Snailase

刘 欣², 崔 昱², 杨 凌^{1*}, 杨胜利¹

LIU Xin², CUI Yu², YANG Ling^{1*} and YANG Sheng-Li¹

1 中国科学院大连化学物理研究所药用资源开发研究组, 大连 116023

2 大连医科大学微生物学教研室, 大连 116027

1 Lab of Pharmaceutical Resource Discovery, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China

2 Department of Microbiology, Dalian Medical University, Dalian 116023, China

摘 要 通过 DEAE-Sephadex 离子交换分段层析, DEAE-Sephadex 离子交换梯度层析和 Sephadex G-100 凝胶过滤层析三种方法的联用从中华白玉蜗牛消化酶中分离出一种人参皂苷 Rb₁ 水解酶。分离后该酶在 SDS-PAGE 上呈单一蛋白质条带。应用 SDS-PAGE 和凝胶过滤层析对分子量的测定提示该酶是由 4 个分子量为 110 ~ 115 kD 的相同亚基组成的同源四聚体。Rb₁ 为底物的动力学参数 K_m 和 V_{max} 分别为 0.790 mmol/L 和 10.192 μ mol/min/mg。该酶对人参皂苷 Rb₁ 糖键进行有选择的水解, 可水解人参皂苷 Rb₁ C₂₀ 位的一个糖苷键生成人参皂苷 Rd。

关键词 人参皂苷 Rb₁, 生物转化, 人参二醇系皂苷

中图分类号 Q556 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2005)06-0929-05

Abstract Through a combination of twice DEAE chromatography by NaCl stepwise and gradient elution with gel filtration chromatography, a kind of ginsenoside-Rb₁ hydrolase from crude *Helix* snailase was separated. The hydrolase was purified to apparent homogeneity on SDS-PAGE. It was estimated that the purified hydrolase was consisted of four identical subunits with a molecular mass of 110 ~ 115kD by SDS-PAGE and gel filtration chromatography. The K_m and V_{max} values for ginsenoside-Rb₁ were calculated to be 0.790mmol/L and 10.192 μ mol/(min · mg) of protein respectively. The ginsenoside-Rb₁ hydrolase could only hydrolyze the glycosidic bond at the C₂₀ position of ginsenoside-Rb₁ into ginsenoside-Rd.

Key words ginsenoside-Rb₁, biotransformation, panaxadiol saponins

人参皂苷 Rb₁(ginsenoside-Rb₁)是人参二醇系皂苷(panaxadiol saponins, PDS)的一个单体, 在 C₂₀ 位及 C3 位上各连接两个 β -D-葡萄糖基, 是人参中的主要有效成分, 它具有促进记忆、改善疲劳、抑制肿瘤生长和诱导细胞凋亡等药理活性^[1]。目前已知 Rb₁ 在

人和大鼠肠道中的代谢通路: Rb₁ \rightarrow ginsenoside Rd (G-Rd) \rightarrow ginsenoside F₂ (G-F₂) \rightarrow compound K (C-K) \rightarrow 20(S)protopanaxadiol (Ppd)^[2-4]。现代研究表明皂苷上的糖链对其生物活性有重要影响, 去除部分糖基往往能改变或提高其肠道的吸收率和活性作用^[5-6]。

Received: June 13, 2005; Accepted: August 23, 2005.

This work was supported by grants from Major State Basic Research Projects of China(No. 2003CB716005) and DICP Innovation Fund of CAS(K2002A14).

* Corresponding author. Tel: 86-411-84379317; E-mail: yling@dicp.ac.cn

国家重点基础研究发展计划(No.2003CB716005)/中国科学院知识创新工程前沿领域项目(No. K2002A14)/大连市科学技术基金(No. 2002-229)资助。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

大量研究证实人参皂苷 compound K 在诱导细胞凋亡^[7]、逆转肿瘤耐药^[8]和抗肿瘤的浸润转移^[9]方面比 Rb_1 、 Rd 、 F_2 和 Ppd 具有更明显的药理作用。所以糖链的水解对人参皂苷生物活性的释放是至关重要的。

虽然现在糖链化学水解方法很多,但一般只形成皂苷元(如 Ppd),很难有选择地去除部分糖基生成次生代谢产物(如 Rd 和 F_2)^[10]。为了有选择性地部分水解人参皂苷糖基制备各级人参皂苷次生代谢产物,我们尝试了生物转化的方法。现有的人参皂苷生物转化法主要包括微生物发酵法和柚皮苷酶水解法两种,前者产物复杂、分离繁琐,后者水解时间长、酶用量大、成本高。为了克服上述生物转化法的缺陷,我们研究了中华白玉蜗牛的消化酶。中华白玉蜗牛是经人工多代繁殖后筛选出来的人工养殖的陆生贝类动物,产量大,易获得,其消化酶中含有纤维素酶、果胶酶、蛋白酶等 20 多种酶类,广泛用于细胞生物学和工程学的研究。

故我们以中华白玉蜗牛的消化酶(SE)为原料,从中分离提取出一种能够水解人参皂苷 Rb_1 的酶类,对人参皂苷 Rb_1 糖基进行有选择的水解。

1 材料和方法

1.1 材料

CR21G 冷冻高速离心机为日本 HITACHI 公司生产;V-530 型紫外分光光度计为日本 JASCO 公司生产;EZ550Q 冷冻干燥机为 FTS Systems 公司生产;Class-vp 色谱工作站、紫外和 ELSD 检测器为日本岛津公司生产;色谱柱 C_{18} 5μ $4.6 \times 200mm$ 和色谱柱 NH_2 10μ $4.6 \times 300mm$ 购于中国科学院大连化学物理研究所。

Sephadex G-25、Sephadex G-100、Sephadex G-200、DEAE-Sephadrose 中分子量标准蛋白购于 Pharmacia 公司。

SE 酶 购于北京经科公司;人参皂苷 Rb_1 及人参皂苷标准品 Ppd 为实验室自制;人参皂苷标准品 Rd 、 $C-K$ 由日本富山医药大学小桥恭一教授惠赠。

1.2 方法

1.2.1 酶的分离纯化:取 SE 原酶溶于 100mL Tris-HCl Buffer(0.05mol/L, pH = 8.2)中,上样于已用相同缓冲液平衡的 DEAE-Sephadrose 层析柱($\phi 5.0 \times 20cm$)。分别用 1500 mL 的 0.35mol/L NaCl 溶液(溶于平衡缓冲液)和 1500mL 的 0.40mol/L NaCl(溶于平

衡液缓冲液)进行洗脱,流速 3mL/min。测定 0.40mol/L NaCl 洗脱液各收集管中蛋白质含量及人参皂苷 Rb_1 水解酶活性,将人参皂苷 Rb_1 水解酶活性较高的各管合并。向上述 0.40mol/L NaCl 洗脱液合并液中加入平衡缓冲液,使样品稀释至 NaCl 浓度为 0.30mol/L。上样至 DEAE-Sephadrose 层析柱($\phi 1.2cm \times 24cm$)已用 pH = 8.2 0.05mol/L Tris-HCl Buffer(含 0.30mol/L NaCl)平衡,中进行梯度洗脱,起始和终止缓冲液分别为 0.35mol/L NaCl(溶于平衡缓冲液)和 0.40mol/L NaCl(溶于平衡缓冲液)各 150mL,流速 1mL/min。测定各收集管中蛋白质含量及人参皂苷 Rb_1 水解酶活性。将活性较高的人参皂苷 Rb_1 水解酶活性峰收集管合并,用透析袋在双蒸水中透析除盐后用冷冻干燥机干燥成白色粉末。取 1/10 溶解上样于 Sephadex-G 100 层析柱($\phi 1.0cm \times 100cm$)中,以双蒸水洗脱,流速 0.3mL/min。测定各收集管中蛋白质含量及人参皂苷 Rb_1 水解酶活性,将活性较高的人参皂苷 Rb_1 水解酶活性峰收集管合并,用冷冻干燥机干燥成白色粉末。

1.2.2 蛋白含量的测定方法:蛋白质含量采用 Bradford 法^[11]。取样品液和双蒸水(共 0.5mL),加入考马斯亮蓝染液(3mL, 150mg/mL),摇匀,室温静置 15min,分光光度计 595nm 处测定吸光度。以牛血清白蛋白(0 ~ 45 μ g)为标准制作标准曲线,计算样品液中的蛋白质含量。

1.2.3 水解人参皂苷 Rb_1 活性测定:取酶液 0.05mL,加入 Rb_1 (0.1mL, 16mg/mL, 溶于 pH = 4.5 0.15mol/L 磷酸-柠檬酸缓冲液)和磷酸-柠檬酸缓冲液(0.65mL, pH = 4.5, 0.15mol/L), 40℃ 水浴下分别反应 6min 后,沸水浴中煮沸 15min。6000r/min 离心 10min,取上清 HPLC 检测。在实验条件下,以每 min、每 mg 蛋白产生 1 μ mol 人参皂苷 Rd 被定义为 1 个活性单位。以人参皂苷 Rd 为标准制作标准曲线,计算样品液中的 Rb_1 水解酶活力。

1.2.4 HPLC 色谱条件:检测器:ELSD;色谱柱: C_{18} 5μ $4.6mm \times 200mm$;流动相:乙腈和水,0 ~ 15min, 30% ~ 70%; 15 ~ 30min, 30% ~ 5%; 30 ~ 45min 5%, 42.6 ~ 54min, 观察人参皂苷 Rb_1 、 Rd 和葡萄糖等出峰情况,流速 1.0mL/min。

1.2.5 电泳条件及染色方法:SDS-PAGE(分离胶 7%、浓缩胶 4%)根据文献[12]方法进行,用考马斯亮蓝法染色。

1.2.6 凝胶过滤层析测分子量:将蓝色葡聚糖

(2000kD),肌球蛋白(440kD),牛血清白蛋白(73kD),卵清蛋白(43kD),细胞色素 C(12kD)和分离出的蛋白质样品分别过 Sephadex-G200 层析柱(φ2.0 × 24cm),以双蒸水洗脱,流速 0.2mL/min。以 HPLC 联用 UV 检测器于 280nm 下检测。根据标准蛋白的 V_e/V_o 与 LogMW 作图得标准曲线,由蛋白质样品的 V_e/V_o 值在图上查得该酶的分子量。

1.2.7 酶解 Rb₁ 产物随时间的变化 :反应管中加入 Rb₁(0.2mL 16mg/mL)和 0.05mL 纯化的人参皂苷 Rb₁ 水解酶,分别于 40℃ 反应 30min、1h、4h、16h、24h、48h 和 72h 后,加乙醇 1mL 终止反应。6000r/min 离心 10min,取上清 HPLC 检测产物变化。

2 结果

2.1 酶的纯化

Sephadex-G100 层析酶的纯化图谱见图 1,人参

皂苷 Rb₁ 水解酶分离纯化各部分的结果见表 1。以 Rb₁ 为底物水解比活性从 0.34 增加到 15.17 μmol/min/mg,纯化倍数近 45 倍。通过 SDS-PAGE (Fig. 2)电泳,可见酶被分离和纯化至 SDS-PAGE 呈单一蛋白质条带。

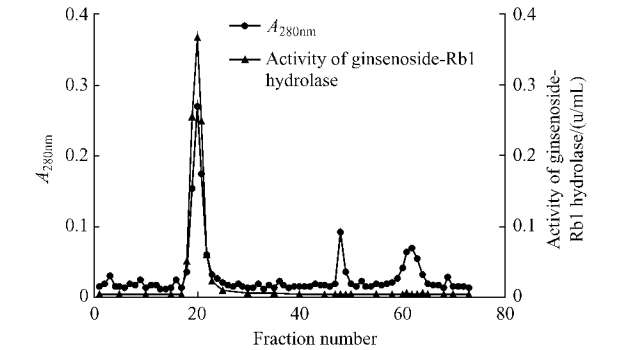


图 1 Sephadex-G100 层析图
Fig. 1 Separation of SE enzyme on G-100 Sephadex column

表 1 蜗牛酶中人参皂苷 Rb₁ 水解酶的纯化
Table 1 purification of ginsenoside-Rb₁ hydrolase from snailase

Step	Total protein /mg	Total activity /u	Specific activity (u/mg of protein)	Fold /purification	yield /%
Crude enzyme solution	9784.50	3275.28	0.34	1.00	100
DEAE by stepwise elution	44.52	197.66	4.44	13.24	6.03
DEAE-by NaCl gradient elution	4.28	43.80	10.23	30.52	1.34
Sephadex-G100	0.33	5.03	15.17	45.25	0.15

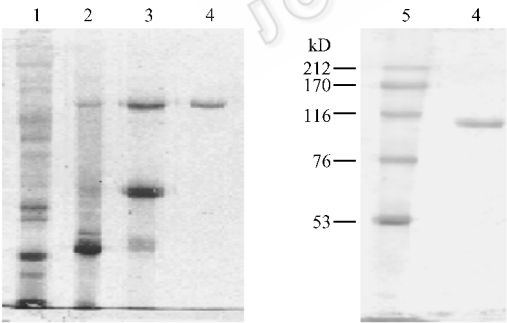


图 2 蛋白质纯化各步的 SDS 电泳分析图
Fig. 2 SDS-PAGE analysis of proteins at various purification steps

1: snailase; 2: protein eluted by DEAE gradient column; 3: protein eluted by DEAE gradient column; 4: protein eluted by gel filtration column 5: protein standards.

2.2 分子量的测定

通过 SDS-PAGE 和 Sephadex G-100 凝胶过滤法 (Fig. 3)测定纯化的人参皂苷 Rb₁ 水解酶的分子量分别为 460kD 和 110 ~ 115kD,提示该酶可能是由 4 个分子量为 110 ~ 115kD 的相同亚基组成的同源四聚体。

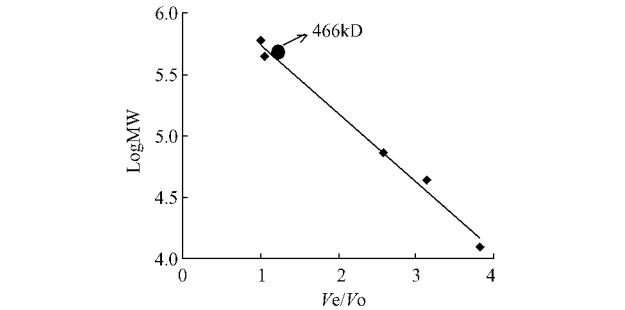


图 3 凝胶过滤 G-100 测分子量
Fig. 3 Molecular weight determination by G-100 Sephadex column

2.3 动力学参数的测定

以 Lineweaver-Burk 双倒数做图法 (Fig. 4)求得以 Rb₁ 为底物的酶动力学参数 K_m 和 V_{max} 分别为 0.790 mmol/L 和 10.192 μmol/min/mg。与人工底物 pNPG 相比,该酶对人工底物的亲和性更大(结果未显示)。

2.4 酶解 Rb₁ 产物随时间的变化

Rb₁ 经分离纯化的人参皂苷 Rb₁ 水解酶作用后数分钟开始出现产物 Rd,作用时间达 48 h 后,产物

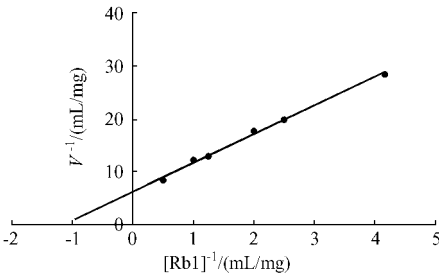


图 4 以 Rb₁ 为底物的 β-D 葡萄糖苷酶双倒数曲线

Fig. 4 Lineweaver-Burk diagram of β-glucosidase on Rb₁

Rd 的量达高峰,而体系中 Rb₁ 已几乎完全水解 (Fig. 5)。在反应全程的 HPLC 检测中,未检出与人参皂苷 F₂ 和 C-K 的标准品相同保留时间的产物峰,同时也未能观察到其它化合物峰的出现。可见从 SE 中分离纯化出的人参皂苷 Rb₁ 水解酶水解效率高、专一性强,只可选择性水解人参皂苷 Rb₁ C₂₀ 位的第一个糖苷键,但对 C₃ 位的两个糖苷键和 C₂₀ 位的第二个糖苷键无水解作用,这可能与人参皂苷 Rb₁ 糖苷键的空间构象和位阻有关。

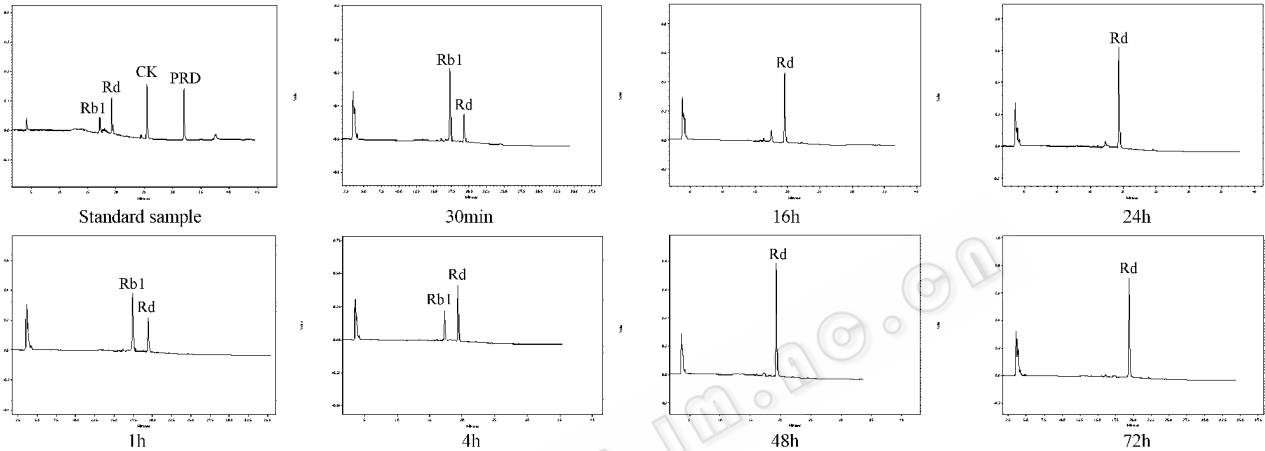


图 5 人参皂苷 Rb₁ 酶解图

Fig. 5 The hydrolysis process of ginsenoside Rb₁

3 讨论

通过 DEAE 离子交换层析和凝胶过滤层析的联合应用,我们从中华白玉蜗牛中分离纯化出了一种水解专一性强、高效的人参皂苷 Rb₁ 水解酶。纯化后该酶活性回收率和纯化倍数分别为 0.15% 和 45 倍。在预试验中我们用 0.05、0.10 ~ 0.40 共 8 个浓度的 NaCl 洗脱液在 DEAE-Sepharose 层析柱上对蜗牛酶进行分段分离,发现 5 个洗脱段含有大量的人参皂苷 Rb₁ 水解酶(结果未显示),说明蜗牛酶中有多种人参皂苷 Rb₁ 水解酶,这也是本试验人参皂苷 Rb₁ 水解酶活性回收率低的主要原因。分离出的人参皂苷 Rb₁ 水解酶在 SDS-PAGE 上呈单一蛋白质条带。应用 SDS-PAGE 和凝胶过滤层析对分子量的测定,提示该酶是由 4 个分子量为 110 ~ 115kD 的相同亚基组成的同源四聚体。这与 Sun-Young PARK 从梭菌 K-60 中分离出的 Rb₁ 水解酶的分子量不同^[13] (由 4 个分子量为 80kD 相同亚基组成和四聚体)。该酶水解专一性强,只可水解人参皂苷 Rb₁ C₂₀ 位的一个糖苷键生成人参皂苷 Rd,这可能与皂元和糖苷

键空间位阻的影响有关。这与文献 [9] 中纯化的人参皂苷 Rb₁ 水解酶可逐步降解 Rb₁ C₂₀ 位和 C₃ 位的 3 个糖基,依照 Rb₁-Rd-RF₂-CK 顺序生成终产物 CK 有明显不同。

生物催化和转化是 21 世纪生物制造中的关键和核心。生物催化剂——酶是核心的核心。在某些行业如医药工业中,已有多种酶的制剂应用于实践。通过对可以改变糖苷类化合物糖基的酶的研究可为我们提供新的天然活性产物,同时也为我们研究天然或非天然糖苷类化合物提供了一个有效的工具。

REFERENCES (参考文献)

[1] Anoja S, Attelle, Chun-Su Yuan *et al.* Multiple constituents and multiple actions. *Biochemical Pharmacology*, 1999, **58**: 1685 - 1693

[2] Eun-Ah BAE, Bae EA, Park SY *et al.* Constitutive β-glucosidases hydrolyzing ginsenoside Rb₁ and Rb₂ from human intestinal bacteria. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2000, **23**(12): 1480 - 1485

[3] Chen XC (陈昕), Zhou QL (周秋丽), Wang BX (王本祥). The metabolism of ginsenoside Rb₁ by intestinal bacteria. *Acta Pharmaceutica Sinica* (药学学报) 1999, **34**(6): 410 - 414.

- [4] Akao T. Appearance of compound K , a major metabolite of ginsenoside Rb₁ by intestinal bacteria , in rat plasma after oral administration measurement of compound K by enzyme immunoassay. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* , 1998 , **21** (3) : 245 - 249
- [5] Wang BX(王本祥). Development of Ginseng Research(人参研究进展). Tianjin : Tianjin Science and Technology Publishing House , 1991
- [6] Kimure S. The revelation of toxicity which is caused by poisonous derived from foodstuffs and its modification under nutritional condition. *Yukugaku Zasshi* , 1998 , **104** (5) : 423
- [7] Hasegawa H , Saiki I. Oleoyl triterpene glycoside biotransformed from ginseng suppresses growth and metastasis of murine B16-F10 melanoma via immunostimulation. *Journal of Traditional Medicines* , 2000 , **17** : 186 - 193
- [8] Lee SJ , Sung JH , Lee SJ *et al.* Antitumor activity of a novel ginseng saponin metabolite in human pulmonary adenocarcinoma cells resistant to cisplatin. *Cancer Lett* , 1999 , **144** (1) : 39 - 43
- [9] Suda K , Murakami K , Murata J *et al.* An intestinal bacteria metabolite (M1) of ginseng protopanaxadiol saponins inhibits tumor-induced neovascularization. *Journal of the Traditional Medicine* , 2000 , **17** : 144 - 150
- [10] Yao XS(姚新生). *Natural Drug Chemistry*(天然药物化学). Beijing : People ' s Education Publishing House , 1999
- [11] Dumn MJ. Determination of total protein concentration. *Protein purification methods* . Edited by Harris ELV and Angal S. Oxford University Press , 1989 , pp. 10 - 16
- [12] Dumn MJ. Electrophoretic Analysis Methods. *Protein purification methods* . Edited by Harris ELV and Angal S. Oxford University Press , 1989 , pp. 21 - 27
- [13] Park SY , Bae EA. Purification and characterization of ginsenoside Rb₁ -metabolizing β -glucosidase from *Fusobacterium* K-60 , a human intestinal anaerobic bacterium. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* , 2001 , **65** (5) : 1163 - 1169