

蓝萼香茶菜中具有吲哚胺 2,3-双加氧酶 (IDO) 抑制活性成分的研究

王辉俊^{1,2,3}, 朱加明⁴, 韩俊琦⁴, 田浩威⁴, 陈炜⁴, 叶冠^{1*}

1. 上海医药集团股份有限公司中央研究院, 上海 201203
2. 上海中医药大学中药研究所中药标准化教育部重点实验室, 上海 201203
3. 上海中药标准化研究中心, 上海 201203
4. 杭州胡庆余堂药业有限公司, 浙江 杭州 311199

摘要: 目的 基于活性导向分离蓝萼香茶菜 *Rabdosia japonica* 中具有吲哚胺 2,3-双加氧酶 (IDO) 抑制作用的成分。方法 蓝萼香茶菜地上部分经水提醇沉后得粗多糖 XPS, 其经活性跟踪测定、DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换树脂分离和 Superdex-75 系列凝胶纯化后得 XPS10-1, 并对 XPS10-1 进行 HPGPC 法分析、单糖组成测定、氨基酸组成分析和 IDO 抑制活性检测。**结果** 从蓝萼香茶菜中得到一种具有 IDO 抑制作用的均一糖蛋白成分 XPS10-1, 相对分子质量为 8 852, 糖基部分主要由鼠李糖基和葡萄糖基组成, 物质的量比为 10.0 : 2.2, 蛋白部分主要由谷氨酸、丝氨酸和甘氨酸组成, 物质的量比为 37.3 : 16.9 : 45.8, XPS10-1 表现出较强的 IDO 抑制活性, 半数抑制浓度 (IC₅₀) 值为 (46.6 ± 3.4) μg/mL, XPS10-1 对入宫颈癌 HeLa 细胞中 IDO 酶也有抑制作用, IC₅₀ 值为 (139.0 ± 8.7) μg/mL。**结论** 从蓝萼香茶菜中成功分离到具有 IDO 抑制作用的糖蛋白, 为蓝萼香茶菜的化学物质基础提供依据。

关键词: 蓝萼香茶菜; 糖蛋白; 活性导向分离; 吲哚胺 2,3-双加氧酶 (IDO); 抑制作用

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)17-4419-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.17.008

Isolation and purification of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) inhibitory constituents from *Rabdosia japonica*

WANG Hui-jun^{1,2,3}, ZHU Jia-ming⁴, HAN Jun-qi⁴, TIAN Hao-wei⁴, CHEN Wei⁴, YE Guan¹

1. Central Research Institute, Shanghai Pharmaceuticals Group Holding Co., Ltd., Shanghai 201203, China
2. Key Laboratory for Standardization of Chinese Medicines of Ministry of Education, Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China
3. Shanghai R&D Center for Standardization of Chinese Medicines, Shanghai 201203, China
4. Hangzhou Huqingyutang Pharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou 311199, China

Abstract: Objective To isolate indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) inhibitory constituents from *Rabdosia japonica* based on bioactivity tracking separation. **Methods** The overground part of *R. japonica* was extracted with boiling water and precipitated by ethanol, the precipitation was collected and lyophilized to obtain XPS, then successively separated by DEAE Sepharose Fast Flow anion-exchange and Superdex-75 gel permeation chromatographic steps to give XPS10-1. A combination of HPGPC, monosaccharide and amino acid composition analysis and IDO inhibitory studies was performed to investigate the structure and bioactivity of XPS10-1. **Results** A IDO inhibitory glycoprotein, XPS10-1, was obtained from *R. japonica* based on activity tracking, its average molecular weight was estimated to 8 852, monosaccharide composition analysis showed the glycosyl part of XPS10-1 was mainly composed of rhamnose and glucose with the ratio of 10.0:2.2, and the protein part was mainly composed of glutamic acid, serine and glycine with mass ratio of 37.3:16.9:45.8. XPS10-1 showed potent IDO inhibitory effect with IC₅₀ of (46.6 ± 3.4) μg/mL, and IC₅₀ of IDO inhibitory effect of XPS10-1 on HeLa cells was (139.0 ± 8.7) μg/mL. **Conclusion** In this study, a glycoprotein with IDO inhibitory

收稿日期: 2020-01-23

基金项目: 上海市科委科研项目 (15DZ1900100); 上海市科委科研项目 (15DZ1900104); 上海市自然科学基金 (20ZR1458100); 上海市青年科技启明星计划资助 (19QB1406500)

作者简介: 王辉俊 (1985—), 男, 副研究员, 博士, 从事中药和天然药物的研发工作。Tel: (021)61871700-8253 E-mail: huijun.wang@outlook.com

*通信作者 叶冠 (1974—), 男, 教授级高级工程师, 博士, 从事中药和天然药物的研发工作。Tel: (021)61871700-8088 E-mail: yeg@sphchina.com

effect was isolated from *R. japonica*, which could lay the foundation for the substance basis study of *R. japonica*.

Key words: *Rabdosia japonica* (Burm. f.) Hara; glycoprotein; activity tracking isolation; IDO; inhibitory effect

蓝萼香茶菜 *Rabdosia japonica* (Burm. f.) Hara 为毛叶香茶菜的原变种, 为唇形科 (Labiatae) 香茶菜属 *Rabdosia* (Bl.) Hassk. 植物^[1]。胃复春片是由杭州胡庆余堂药业有限公司研制的中药制剂, 处方含有香茶菜、枳壳及红参, 以香茶菜(质量占比 86.8%) 为主^[2-3], 蓝萼香茶菜为胃复春中香茶菜的主要药材来源之一。胃复春片具有健脾益气、活血解毒, 主治胃癌的前期病变, 对慢性萎缩性胃炎、肠腺化生、肠上皮不典型性增生有治疗作用, 此外还有助于胃癌术后辅助治疗^[2-3]。胃复春片是国内唯一经药品监督部门批准的、治疗胃癌前期病变的国家中药保护品种。鉴于胃复春片良好的药效作用, 但物质基础尚不明确。目前对蓝萼香茶菜的化学成分研究也主要集中在小分子上, 如从蓝萼香茶菜中分离出二萜^[1,4-8]、三萜^[1,6-8,10]、黄酮^[4-8,11]、有机酸^[1,6-7,9,12]、甾醇^[7,9]类成分, 但蓝萼香茶菜中大分子成分却鲜有报道。

吡啶胺 2,3-双加氧酶 (IDO) 是一种免疫抑制酶, 是通过鸟嘌呤途径催化 *L*-色氨酸分解代谢的限速酶^[13]。在哺乳动物中, 通过裂解色氨酸吡啶环的 2,3-双键发生的反应由 IDO1、IDO2 和 TDO 独立催化, 这些酶存在组织表达和底物特异性的差异^[14-15]。目前 IDO 介导的免疫耐受被广泛接受作为肿瘤进化得以逃逸免疫监视的重要机制之一, 并且 IDO 抑制剂已被认为是癌症治疗的潜在突破方法^[16-17]。本研究以 IDO 抑制活性为前提对蓝萼香茶菜进行活性跟踪分离, 发现一种新的 IDO 抑制剂 XPS10-1, 其为均一糖蛋白, 相对分子质量为 8 852, 糖基部分主要由鼠李糖基和葡萄糖基组成, 物质的量比为 10.0 : 2.2, 蛋白部分主要由谷氨酸、丝氨酸和甘氨酸组成, 物质的量比为 37.3 : 16.9 : 45.8, 为阐明蓝萼香茶菜及胃复春片的化学物质基础提供依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换树脂和 Superdex 系列分子筛凝胶柱购自通用电气 GE Healthcare; 普鲁兰多糖 P-82 标准品套装: P-5、P-10、P-20、P-50、P-100、P-200、P-400、P-800、Shodex; 水为超纯水 (实验室自制); 阳性化合物 INCB024360 购自 MedChemExpress 公司; 抗坏血酸 (V_C)、色氨酸、亚甲蓝、Catalase、二甲氨基苯

甲醛、三氯乙酸、单糖标准品 (*D*-葡萄糖、*D*-阿拉伯糖、*L*-岩藻糖、*L*-鼠李糖、*D*-甘露糖、*D*-木糖、*D*-半乳糖) 和三氟乙酸购自 Sigma 公司; IDO 酶购自 BPS 公司, 384 孔化合物板购自 Nunc 公司; HeLa 细胞为南京大学李尔广教授处提供, 其购自 ATCC (货号 CCL-2); DMEM、丙酮酸钠、*L*-glutamine、非必需氨基酸、青链霉素购自 Life Technologies 公司; FBS 购自 Gibco 公司; IFN- γ 购自 P&D; 96 孔细胞培养板和 96 孔显色板购自 Corning Costar 公司; 乙醇和氯化钠均购自国药集团上海试剂有限公司; 其他的试剂均为分析纯。

香茶菜地上部分 (5.0 kg) 来源于安徽凤阳 (收集于 2015 年 11 月 20 日), 经上海中医药大学中药研究所吴立宏研究员鉴定为蓝萼香茶菜 *Rabdosia japonica* (Burm. f.) Hara。

1.2 仪器

安捷伦 1260 系列高效液相色谱仪 (包括自动进样器、输液泵、脱气机、DAD 检测器、IR 检测器及安捷伦 Cirrus GPC 软件) (Agilent 公司); 安捷伦 7890B 型气相色谱仪配备 7693 型三重四级杆质谱仪 (Agilent 公司), Rxi[®]-1ms 毛细管柱 (30 m \times 0.25 mm, 0.25 μ m) 购自 Restek 公司; 利穗科技多糖分离系统 [利穗科技 (苏州) 有限公司] 配置 Shodex 示差折光检测器 (日本昭和电工株式会社); 赛多利斯-SECURA225D 电子天平 (德国赛多利斯集团); SIGMA-3K15 离心机 (美国 Sigma 公司); BUCHI-Rotavapor R-300 旋转蒸发器 (瑞士步琪公司); LABCONCO-4.5L 冷冻干燥机 (美国 Labconco 公司); 密理博 REFERENCE 纯水仪 (美国默克 Millipore 公司)。

2 方法

2.1 蓝萼香茶菜多糖的提取及分离纯化

蓝萼香茶菜地上部分 5.0 kg, 加水 50 L, 煎煮 3 h, 滤过, 将滤渣加水 50 L, 重复煎煮 3 h, 滤过, 合并 2 次滤液, 滤液浓缩至适当体积, 加 4 倍体积 95% 乙醇醇沉, 过夜。上清液减压浓缩, 真空干燥, 打粉铝箔分装; 乙醇沉淀物冷冻干燥得粗多糖 XPS (315 g, 得率 6.3%), 酶学活性检测数据得粗多糖 XPS 活性强于醇沉上清液。

XPS 经 DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换树脂, 以水和 0.2、0.5、1.0 mol/L NaCl 溶液作为流

动相进行洗脱, 体积流量 8.0 mL/min, 分别对应得到洗脱组分 XPSW、XPS2、XPS5 和 XPS10 洗脱部位; 活性最强洗脱组分 XPS10 再以 0.2 mol/L NaCl 溶液为流动相, 采用利穗科技多糖分离系统, 经 Superdex 75 分子筛凝胶柱进行分离, 得到多糖 XPS10-1。

2.2 XPS10-1 纯度和相对分子质量的测定

参考文献报道方法^[18], 采用 HPGPC 法测定 XPS5-1 的纯度及相对分子质量, 通过安捷伦 Cirrus GPC 软件数据处理计算相对分子质量。

2.3 单糖组成分析

采用文献报道的还原水解法^[19]和 GC-MS 检测方法进行糖组成分析。

2.4 氨基酸的组成分析

2.4.1 多肽蛋白的水解 取一定量的多肽蛋白样品, 转移至水解管中, 加入 1 mL 6 mol/L 盐酸, 充入 N₂ 约 10 min, 密封后放置于 Block Heater 干式加热器模中, 110 °C 水解反应 24 h。反应完毕后, 将游离氨基酸溶液转移至 1.5 mL EP 管中, 抽真空浓缩至干。

2.4.2 氨基酸的衍生化 混合氨基酸对照品的衍生化处理: 取 25 μL 混合氨基酸对照品溶液, 加入 12.5 μL 1 mol/L 三乙胺溶液, 混匀, 加入 12.5 μL 0.1 mol/L 异硫氰酸苯酯 (PITC), 混匀, 室温静置 1 h, 加入 100 μL 正己烷剧烈震荡混合后静置 10 min, 取下层溶液 20 μL, 加入 180 μL 流动相 A, 混合后用 0.22 μm 滤膜滤过, 即得。

样品溶液的衍生化处理: 取一定量的游离氨基酸冻干样品, 加入适量流动相 (0.05 mol/L 乙酸钠水溶液), 复溶。取 25 μL 样品氨基酸溶液, 加入 12.5 μL 1 mol/L 三乙胺, 后续操作同混合氨基酸标准品的衍生化处理。

2.4.3 样品的检测 将氨基酸衍生物通过高效液相色谱仪进行分离、检测, 相关参数如下: Diamonsil AAA 氨基酸分析柱 (Dikma, 250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相 A: 0.05 mol/L 乙酸钠水溶液, 流动相 B: 甲醇-乙腈-水 (20:60:20); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 35 °C, 紫外检测波长 254 nm。仪器系统平衡后, 取待测样品注入高效液相色谱仪, 按如下条件进行梯度洗脱: 0~39 min, 5%~48% B; 39~40 min, 39%~100% B; 40~45 min, 100% B; 45~46 min, 100%~5% B; 46~60 min, 5% B。

2.4.4 高效液相色谱数据处理 高效液相色谱

LC-20AT 产生的原始数据由仪器自带软件 Labsolution 进行手动积分标峰处理, 首先对氨基酸混合对照品进行积分标峰并建立外标法对应方法, 之后调用建立方法对样品色谱图进行自动积分标峰处理, 并得到样品的氨基酸组成物质的量比值。

2.5 IDO 酶的体外抑制作用检测

2.5.1 化合物的配制与转移

(1) 阳性对照溶液的配制: 将阳性化合物 INCB024360 用 DMSO 配制为 10 mmol/L 的储备液, 取储备液适量, 稀释至 INCB024360 浓度为 5 000.00、1 667.67、555.56、185.19、61.73、20.58 nmol/L 的溶液, 稀释后的 DMSO 浓度为 2.5%; 酶反应时, 阳性化合物的终浓度为 1 000.000、333.333、111.111、37.037、12.346、4.115 nmol/L, DMSO 终浓度为 0.5%。

(2) 样品溶液的配制: XPSW、XPS2、XPS5、XPS10、XPS10-1 用灭菌水配制成溶液, 质量浓度为 5.0 mg/mL, 取部分储存液稀释到 1.0 mg/mL 为初始质量浓度, 用灭菌水将之再进行多次 3 倍梯度稀释, 测试活性最大的半数抑制浓度 (IC₅₀)。酶反应时, 样品溶液的终质量浓度为 200.0、66.7、22.2、7.4、2.5、0.8 mg/mL。

2.5.2 酶反应阶段

(1) 配制底物混合液: 取 0.4 mol/L Tris pH 8.0 配 80 mmol/L VC 得 1a; 取 800 μmol/L L-色氨酸、9 000 U/mL 过氧化氢酶和 40 μmol/L 亚甲蓝, 用 MES Buffer 配制为抗氧化酶保护液得 1b; 等体积混合 1a 和 1b 得底物混合液 1c, 各成分浓度如下: 40 mmol/L VC、400 μmol/L L-色氨酸、4 500 U/mL 过氧化氢酶、20 μmol/L 亚甲蓝。

(2) 酶反应: 用一水合 2-吗啉乙磺酸 (MES) 将 IDO1 或 IDO2 酶稀释至质量浓度为 13.33 ng/μL; 384 孔板中加入 12.5 μL 底物混合液 c; 再加入 5 μL 5×各浓度化合物, 并设置 DMSO 和灭菌水对照组; 各孔加入 7.5 μL IDO1 或 IDO2 酶; 37 °C 反应 60 min 后向 384 孔板中加入 5 μL 三氯乙酸, 50 °C 作用 30 min, 将产物 N-甲酰犬尿氨酸转化为犬尿氨酸。

2.5.3 反应终止阶段 每孔加入 30 μL 2% 对二甲氨基苯甲醛 (2 g 对二甲氨基苯甲醛溶于 100 mL 水中), 终止反应。

2.5.4 数据处理 将 384 孔板放于 MD Flexstation 3 上, 测定 480 nm 处吸光度 (A) 值; 采用 Graphpad Prism 5.0 软件对数据进行 Log (inhibitor) vs. response-

Variable slope (four parameters) 曲线拟合, 计算相应的 IC_{50} 。

2.6 XPS10-1 在细胞水平上对 IDO 酶的抑制作用

2.6.1 细胞培养与接种 实验第 1 天, 取对数生长期的第 16 代 HeLa 细胞, 800 r/min 离心 5 min; 移去培养基, 加入完全培养基重悬细胞, 计数, 每孔铺 7 000 个细胞, 100 μ L 体积, 培养过夜。

2.6.2 给药和孵育 第 2 天, 加入终质量浓度为 50 ng/mL IFN- γ 诱导, 同时加入不同质量浓度化合物, 加干扰素- γ (IFN- γ) 及化合物过程如下。

弃去细胞上清, 加入 100 μ L 质量浓度为 100 ng/mL IFN- γ , 并设置不含 IFN- γ 的空白组, 将 10 mmol/L 阳性化合物 INCB024360 稀释成浓度为 2 000.00、666.67、222.22、74.07、24.69、8.23、2.74、0.91、0.30 nmol/L 的溶液。

将 10 mg/mL 的 XPS、XPS10 和 XPS10-1 分别用灭菌水 3 倍浓度倍比稀释 9 个质量浓度梯度, 用完全培养基将不同质量浓度的 XPS、XPS10 和 XPS10-1 进行 25 倍稀释, 初始质量浓度均为 400 μ g/mL, 每孔加入 100 μ L 不同质量浓度待测物, 并设置只加入 DMSO 和灭菌水的对照组; 不含 IFN- γ 的空白组, 加入 1% DMSO 和灭菌水。

细胞给药后于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 条件下培养 48 h; 第 4 天, 转移 140 μ L 细胞培养上清至新的 96 孔显色板中, 每孔加入 10 μ L 三氯乙酸, 50 $^{\circ}$ C 反应 30 min, 2 500 r/min 离心 10 min, 之后取 100 μ L 上清至另一 96 孔显色板中。

2.6.3 显色 每孔中加入 100 μ L 2% 二甲氨基苯甲醛显色, 2 min 后于 MD Flexstation 3 上测定 480 nm 处 A 值。

2.6.4 数据分析 按下列公式对化合物的体外抑制活性进行计算, 并根据各浓度的细胞 IDO 酶抑制率, 采用 Graphpad Prism 5.0 对各浓度下的 A 值进行 Log (inhibitor) vs. response-Variable slope (four parameters) 曲线拟合, 计算相应的 IC_{50} 。

$$\text{抑制率} = 1 - (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

3 结果

3.1 XPS10-1 的分离纯化

蓝萼香茶菜地上部分粗多糖样品 XPS 经 DEAE Sepharose Fast Flow 分别以蒸馏水和 0.2、0.5、1.0 mol/L NaCl 溶液洗脱分离后, 得到 4 个部分 XPSW、XPS2、XPS5 和 XPS10 (图 1); 活性最强的部位 XPS10 再经 Superdex 75 凝胶柱进一步纯化, 收集

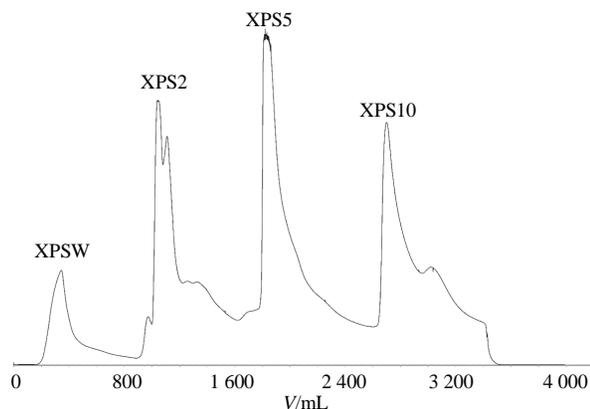


图 1 XPS 经 DEAE Sepharose Fast Flow 离子交换柱分离图谱

Fig. 1 Profile of XPS in DEAE Sepharose Fast Flow ion exchange column

馏分, 经浓缩、脱盐和冷冻干燥后得 XPS10-1, 苯酚硫酸法检测 XPS10-1 显色明显, 表明 XPS10-1 含糖类成分, BCA 法检测 XPS10-1 显色明显, 表明含蛋白或肽段, 含量测定得蛋白含量为 73.2%, 表明 XPS10-1 为糖蛋白成分。

3.2 纯度和相对分子质量测定结果

XPS10-1 的纯度和相对分子质量采用高效液相凝胶渗透色谱法 (HPGPC) 进行测定, 结果显示 XPS10-1 的 HPGPC 谱图呈单一峰 (图 2), 表明 XPS10-1 为均一糖蛋白。以不同相对分子质量的普鲁兰多糖为标准品, 经 Cirrus GPC 软件分析测得 XPS10-1 平均相对分子质量为 8 852。

3.3 单糖组成分析

采用还原水解法对单糖组成进行分析, GC-MS

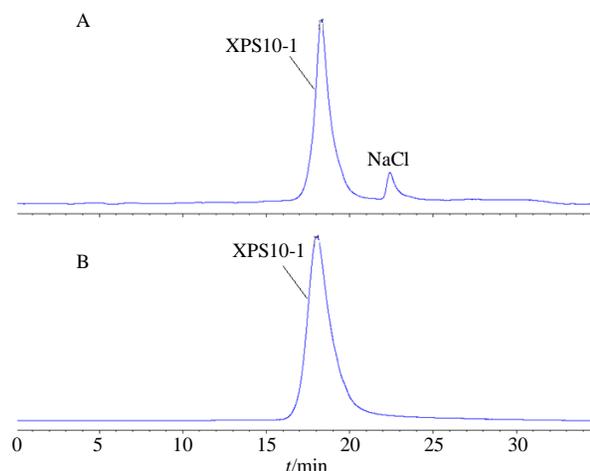


图 2 XPS10-1 的 HPGPC (A) 和 UV (B) 图谱

Fig. 2 Profile of XPS10-1 in HPGPC (A) and UV (B)

结果表明 XPS10-1 主要含鼠李糖和葡萄糖, 物质的量比为 10.0 : 2.2。

3.4 氨基酸组成分析

XPS10-1 样品水解后游离的氨基酸经 PITC 衍生化处理后, 经过高效液相色谱 LC-20AT 设备的分析, 得到的原始数据经过 Labsolution (Shimadzu) 经外标法自动积分标峰, 计算得氨基酸物质的量比值, 结果表明氨基酸主要由谷氨酸、丝氨酸和甘氨酸组成, 物质的量比为 37.3 : 16.9 : 45.8。

3.5 IDO1 和 IDO2 酶活性的抑制作用检测

IDO 为催化色氨酸沿犬尿酸途径分解代谢的限速酶。生理条件下, IDO 催化色氨酸生成 *N*-甲酰犬尿酸。后者在三氯乙酸存在条件下, 转化为犬尿酸。在二甲氨基苯甲醛溶液中, 犬尿酸于 480 nm 处有吸收峰, 因而可以通过检测产物犬尿酸的量反映 IDO 酶活性。本实验在 IDO1 和 IDO2 酶上进行了香茶菜样品及阳性对照物对酶活性抑制的 IC₅₀ 检测, 以评价其对 IDO1 和 IDO2 酶活性的抑制

作用。

对香茶菜水提醇沉上清液和粗多糖 XPS 分别进行 IDO1 和 IDO2 酶抑制活性 IC₅₀ 测试, 实验结果显示香茶菜水提醇沉沉淀部分-粗多糖 XPS 对 IDO1 酶的抑制活性较好, IC₅₀ 为 114.1 μg/mL, XPS 对 IDO2 酶的抑制活性较差, 醇沉上清部分对 IDO1 和 IDO2 酶的抑制活性均较差, 因此本研究以 IDO1 抑制活性为前提, 对粗多糖 XPS 进行进一步的活性跟踪研究, 对 XPSW、XPS2、XPS5 和 XPS10 进行 IDO1 酶抑制活性测试, 实验结果显示 XPS5 和 XPS10 表现出较强的 IDO1 抑制活性, 其中 XPS10 的活性最强, IDO1 酶抑制的 IC₅₀ 为 165.9 μg/mL (表 1), XPS10 经 Superdex75 凝胶纯化后的均一糖蛋白 XPS10-1 经 IDO1 酶抑制活性检测后, 计算得 IC₅₀ 为 46.6 μg/mL (表 1)。

3.6 HeLa 细胞中 IDO 酶活性的抑制作用检测

L-色氨酸在 IDO 酶的催化作用下生成 *L*-甲酰犬尿酸, *L*-甲酰犬尿酸经三氯乙酸催化后生成犬

表 1 蓝萼香茶菜样品及阳性对照物对 IDO1 和 IDO2 酶活性的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 IDO1 and IDO2 inhibitory effects of samples from *R. japonica* and positive control ($\bar{x} \pm s$)

样品	酶学水平 IC ₅₀		细胞水平 IC ₅₀
	IDO1 酶	IDO2 酶	IDO1 酶
INCB024360	(41.8 ± 3.7) nmol·L ⁻¹	(1 155.0 ± 95.9) nmol·L ⁻¹	(36.2 ± 2.3) nmol·L ⁻¹
醇沉上清物	(459.2 ± 12.1) μg·mL ⁻¹	(317.2 ± 23.5) μg·mL ⁻¹	
粗多糖 XPS	(114.1 ± 6.9) μg·mL ⁻¹	(416.3 ± 18.4) μg·mL ⁻¹	>200 μg·mL ⁻¹
XPSW	>1 000.0 μg·mL ⁻¹	—	
XPS2	>1 000.0 μg·mL ⁻¹	—	
XPS5	(231.7 ± 32.8) μg·mL ⁻¹	—	
XPS10	(165.9 ± 9.7) μg·mL ⁻¹	—	(183.2 ± 13.1) μg·mL ⁻¹
XPS10-1	(46.6 ± 3.4) μg·mL ⁻¹	—	(139.0 ± 8.7) μg·mL ⁻¹

尿酸。犬尿酸经二甲氨基苯甲醛显色后在 480 nm 处有明显吸收峰。所以可以根据这一特点确定犬尿酸的量, 进而反映 IDO 酶催化反应产物 *L*-甲酰犬尿酸的量。HeLa 细胞经 IFN-γ 诱导后表达 IDO 酶, 而 HeLa 细胞在正常培养条件下, IDO 表达量较少, 所以可以通过 IFN-γ 诱导 HeLa 细胞表达 IDO, 筛选有效抑制 IDO 活性的化合物。本实验在 480 nm 下检测化合物对 IFN-γ 诱导下 HeLa 细胞表达 IDO 酶活性的影响。在 HeLa 细胞株上对 XPS、XPS10 和 XPS10-1 进行 IDO 酶抑制活性测试, 以评价其对 IDO 酶活性的抑制活性。结果表明在细胞水平上 XPS 对 IDO 酶没有抑制作用, XPS10 和

XPS10-1 对 IDO 酶的抑制 IC₅₀ 分别为 (183.2 ± 13.1) μg/mL 和 (139.0 ± 8.7) μg/mL。

4 讨论

IDO1 是一种单体血红素酶, 是通过犬尿酸途径催化 *L*-色氨酸分解代谢的限速步骤^[13]。通过裂解色氨酸吡啶环的 2,3-双键发生的反应由 IDO1、色氨酸 2,3-双加氧酶 (TDO) 和 IDO2 独立催化^[17]。IDO1 和 IDO2 酶在全身组织中均有表达, 研究表明 IDO 至少可以通过以下 3 种途径抑制肿瘤局部免疫功能: (1) 色氨酸耗竭机制: 色氨酸是 T 细胞增殖所必须的氨基酸, IDO 过度表达后必然导致色氨酸缺乏, T 细胞发生凋亡^[20]; (2) 色氨酸代谢物毒性

机制: IDO 催化色氨酸降解产生的代谢物可抑制活化 T 细胞功能, 甚至诱导 T 细胞凋亡^[20-21]; (3) IDO 还可以通过诱导 Treg 细胞的增殖来抑制活化 T 细胞的免疫功能^[22-23]。基于上述 IDO 功能和实验研究发现抑制 IDO 能够一定程度上抑制肿瘤的生长, 并且增强化疗和抗体药物的抗肿瘤作用, 通过抑制 IDO 可增强 T 细胞的功能, 从而成为一种治疗肿瘤的有效方法。临床研究也发现胃复春片可以有效治疗胃癌前期病变, 并有助于胃癌术后辅助治疗^[3]。本研究采用活性跟踪方法, 成功从蓝萼香茶菜中得到一种具有 IDO1 抑制作用的均一糖蛋白成分 XPS10-1, 相对分子质量为 8 852, 糖基部分主要由鼠李糖基和葡萄糖基组成, 物质的量比为 10.0 : 2.2, 氨基酸主要由谷氨酸、丝氨酸和甘氨酸组成, 物质的量比为 37.3 : 16.9 : 45.8, XPS10-1 表现出较强的 IDO 抑制活性, IC₅₀ 为 (46.6 ± 3.4) μg/mL, 对 HeLa 细胞中 IDO 酶也有抑制作用, IC₅₀ 为 (139.0 ± 8.7) μg/mL, HeLa 细胞 IDO 抑制活性较酶学水平差, 可能是由于 XPS10-1 的相对分子质量较大, 与其进入细胞的量相关。本发现为蓝萼香茶菜的化学物质基础提供依据, 鉴于香茶菜为胃复春片的主要药材, 本研究也为胃复春片治疗胃癌前期病变和胃癌术后辅助治疗的适应症提供了依据。

参考文献

- [1] 杨秀伟, 赵静. 蓝萼香茶菜化学成分的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2003, 15(6): 490-493.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [3] 陈曦, 赵亚红, 张也青, 等. 胃复春的临床应用和现代研究进展 [J]. 江西中医药, 2016, 47(9): 77-80.
- [4] 沈晓丹, 王冰, 刘春宇, 等. 蓝萼香茶菜的化学成分研究 (I) [J]. 中草药, 2009, 40(12): 1883-1885.
- [5] 白素平, 马兴科, 张积霞. 蓝萼香茶菜化学成分的研究 [J]. 新乡医学院学报, 2005, 22(4): 297-299.
- [6] 董婧婧, 王大成, 李玉山, 等. 蓝萼香茶菜化学成分的研究 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(10): 2346-2348.
- [7] 王福东, 丁兰, 汪汉卿. 蓝萼香茶菜三萜成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(24): 1929-1932.
- [8] 项昭保, 陈海生, 王光利, 等. 蓝萼香茶菜化学成分研究 (II) [J]. 中成药, 2010, 32(9): 1622-1623.
- [9] 任茜茜, 周慧超, 贺爽, 等. 蓝萼香茶菜化学成分及抗肿瘤活性研究 [J]. 新乡医学院学报, 2016, 33(4): 261-266.
- [10] 桂明玉, 金永日, 王宝珍. 蓝萼香茶菜化学成分研究 [J]. 中国药理学杂志, 1999, 34(8): 516-518.
- [11] 苏永庆, 汤建, 陈海生, 等. 蓝萼香茶菜萜类和黄酮类化合物的研究新进展 [J]. 中国野生植物资源, 2017, 36(3): 50-52.
- [12] 高长久, 于双双, 梁启超. 蓝萼香茶菜研究新进展 [J]. 牡丹江医学院学报, 2011, 32(1): 54-56.
- [13] Takikawa O, Yoshida R, Kido R, *et al.* Tryptophan degradation in mice initiated by indoleamine 2,3-dioxygenase [J]. *J Biol Chem*, 1986, 261(8): 3648-3653.
- [14] Bessede A, Gargaro M, Pallotta M T, *et al.* Aryl hydrocarbon receptor control of a disease tolerance defence pathway [J]. *Nature*, 2014, 511(7508): 184-190.
- [15] Austin C J, Rendina L M. Targeting key dioxygenases in tryptophan-kynurenine metabolism for immunomodulation and cancer chemotherapy [J]. *Drug Discov Today*, 2015, 20(5): 609-617.
- [16] Munn D H, Mellor A L. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(5): 1147-1154.
- [17] Coluccia A, Passacantilli S, Famigliani V, *et al.* New inhibitors of indoleamine 2,3-dioxygenase 1: Molecular modelling studies, synthesis and biological evaluation [J]. *J Med Chem*, 2016, 59(21): 9760-9773.
- [18] Wang H, Wang H, Shi S, *et al.* Structural characterization of a homogalacturonan from *Capparis spinosa* L. fruits and anti-complement activity of its sulfated derivative [J]. *Glycoconjugate J*, 2012, 29(5): 379-387.
- [19] Wang H, Shi S, Bao B, *et al.* Structure characterization of an arabinogalactan from green tea and its anti-diabetic effect [J]. *Carbohydr Polym*, 2015, 124: 98-108.
- [20] Mellor A. Indoleamine 2,3 dioxygenase and regulation of T cell immunity [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 338(1): 20-24.
- [21] Fallarino F, Grohmann U, Vacca C, *et al.* T cell apoptosis by tryptophan catabolism [J]. *Cell Death Differ*, 2002, 9(10): 1069-1077.
- [22] Fallarino F, Grohmann U, You S, *et al.* The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells [J]. *J Immunol*, 2006, 176(11): 6752-6761.
- [23] Curti A, Pandolfi S, Valzasina B, *et al.* Modulation of tryptophan catabolism by human leukemic cells results in the conversion of CD25⁻ into CD25⁺ T regulatory cells [J]. *Blood*, 2007, 109(7): 2871-2877.