

猪皮胶原肽的分离纯化及结构鉴定

宋景, 刘长龙, 高鹏*, 代龙
(山东中医药大学, 济南 250355)

[摘要] **目的:** 分离纯化猪皮胶原肽并鉴定其活性成分的相对分子质量分布及结构。**方法:** 采用胃蛋白酶和胰蛋白酶酶解猪皮, 酶解液超滤, 电渗析除盐, 冻干得猪皮胶原肽, 利用 Sephadex-G25 凝胶柱色谱对酶解产物进行分离纯化, 分析各部位对 L929 细胞增值作用的影响, 运用 ESI-Q-TOF2 质谱仪对活性部位进行肽序列分析。**结果:** 分离纯化得到 2 个活性部位(部位 I, II), 二者对 L929 细胞的增殖率分别为 162%, 179%。活性部位 II 相对分子质量主要分布于 800 ~ 2 000 Da, 首次发现 GLGAGGGRGSDGNPG, PAGAHGPAGL 共 2 个序列。**结论:** 猪皮胶原肽具有显著的细胞增殖作用, 符合 G-X-Y 胶原排列组合, 具有一定专属性。

[关键词] 猪皮胶原肽; 分离纯化工艺; 仿生酶解法

[中图分类号] R283.6; R284.1; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)11-0023-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2014110023

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140324.1542.005.html>

[网络出版时间] 2014-03-24 15:42

Separation and Identification of Collagen Peptides from Pigskin

SONG Jing, LIU Chang-long, GAO Peng*, DAI Long

(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To isolate and purify collagen peptides from pigskin, then identify relative molecular mass distribution and structure of its active ingredients. **Method:** Pigskin was digested by pepsin and trypsin, enzyme solution received ultrafiltration, electro dialysis desalination and lyophilization to get collagen peptides from pigskin, Sephadex G-25 gel column was adopted to separate and purify hydrolyzate, effects of each part of collagen peptides on L929 cell multiplication were analyzed, ESI-Q-TOF2 mass spectrometer was employed to analyze amino acid sequence of collagen peptides from pigskin. **Result:** Two parts were separated as part I and II, both of them on L929 cell multiplication rates were 162% and 179%, respectively. Relative molecular mass of activity part II were 800-2 000 Da, two amino acid sequence were first discovered, they were GLGAGGGRGSDGNPG and PAGAHGPAGL. **Conclusion:** Collagen peptides from pigskin had a significant cell proliferation with some specificity, which met permutations of G-X-Y.

[Key words] collagen peptides from pigskin; separation and purification technology; bionic enzymatic method

[收稿日期] 20131113(027)

[基金项目] 山东省自然科学基金项目(ZR2011HM051); 国家“十一五”科技支撑计划项目(2008BAI53B073)

[第一作者] 宋景, 在读硕士, 从事中药制剂工艺及质量标准研究, Tel: 15254199560, E-mail: grey1234@126.com

[通讯作者] * 高鹏, 博士, 副教授, 从事中药新药开发及新剂型研究, Tel: 0531-68684868, E-mail: gaopenggaopeng@126.com

猪皮为猪科动物猪 *Sus scrofa domestica* Brisson 的皮肤, 始载于《汤液本草》, 云: 猪皮, 味甘, 寒。猪, 水畜也, 其气先入肾。解少阴客熟, 是以猪肤解之, 加白蜜, 以润燥除烦; 白粉, 以益气断痢。化学成分研究表明猪皮含水分、羟脯氨酸、灰分及硫酸皮肤素(硫酸软骨素 B)等; 其中蛋白质主要为胶原蛋白(约 87.7%), 同时还有少量角质蛋白和弹性蛋白^[1]。猪皮与人皮肤具有较多的组织同源性^[2], 从

猪皮中提取的组织材料利于人体的吸收、利用。文献报道胶原蛋白具有降血压^[3-4]、抗氧化^[5]、抗菌^[6]、促创伤愈合^[7]等活性,已被用于外科临床,但关于其分离纯化和结构鉴定的报道极少。本实验采用仿生酶解法(胃蛋白酶、胰蛋白酶)制备猪皮胶原肽,利用 Sephadex G-25 柱色谱凝胶进行分离纯化并鉴定其结构,得到了具有一定专属性的肽序,可为猪皮胶原肽的制剂开发提供参考。

1 材料

DS204 型电渗析器(沧州市众邦水处理技术有限公司),BT300-2J 型恒流泵(保定兰格恒流泵有限公司),3111 型 CO₂ 培养箱(美国 Forma scientific 公司),680 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司),SW-CJ-1C 型超净工作台(苏州净化设备厂),Q-TOF2 型正交加速电喷雾串联质谱仪(英国 Micromass 公司)。

96 孔培养板(北京 Costar 公司),Sephadex G-25 凝胶(90 cm × 1.6 cm,柱体积 160 cm³,美国 GE 公司),胃蛋白酶、胰蛋白酶(上海蓝季科技发展有限公司),牛血清白蛋白(中国食品药品检定研究院),L929 实验细胞株(中国医学科学院),二甲基亚砜(DMSO)、噻唑蓝液(MTT,美国 Sigma 公司),0.25% 胰酶-乙二胺四乙酸(EDTA,上海生物制药有限公司),胎牛血清(杭州四季青生物材料研究所),链霉素、青霉素、DMEM(美国 Gibco 公司),猪皮购自当地市场,水为纯净水或蒸馏水,试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 猪皮胶原肽的制备 通过前期研究确定制备工艺为取新鲜猪皮 100 g,切片,剪碎,脱脂,匀浆,加 8 倍量水和胃蛋白酶 2.0 g,调 pH 1.5 ~ 2.0,于 40 °C 保温酶解 2 h,调 pH 7.5 ~ 8.0,加入胰蛋白酶 2.0 g,于 40 °C 保温酶解 4 h;酶解液经截留相对分子质量 3 kDa 的中空纤维超滤膜超滤,超滤液过电渗析器除盐,冷冻干燥,即得猪皮胶原肽酶解产物。

2.2 猪皮胶原肽的分离纯化 称取一定量猪皮胶原肽酶解物,加水配成 20 g·L⁻¹ 溶液。经 Sephadex G-25 凝胶柱色谱分离,加水洗脱,控制流速 3 mL·min⁻¹,通过自动接收器收集洗脱液,每管接收 2 mL,洗脱液于 220 nm 处检测,以洗脱体积为横坐标,吸收度(A)为纵坐标,绘制洗脱曲线,见图 1。结果表明猪皮胶原肽被分离为 2 个部位,适量上样洗脱,收集 37 ~ 41 管洗脱液作为部位 I,收集 65 ~ 70 管洗脱液作为部位 II,冷冻干燥,于 -20 °C 保存^[8]。

2.3 不同洗脱部位对 L929 细胞增殖的影响 取处

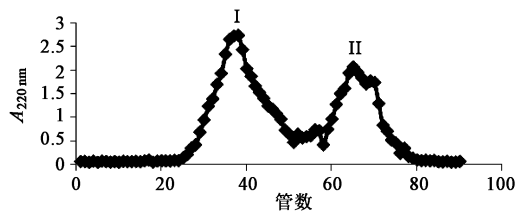


图 1 猪皮胶原肽 Sephadex G-25 柱分离洗脱曲线

于对数生长期的 L929 细胞,用 5% DMEM 和 0.25% 胰酶 0.5 mL 消化成单细胞混悬液。细胞计数 4.3 × 10⁵ 个,将混悬液稀释 1 倍,精密量取 100 μL,按细胞量 2 × 10⁴/孔接种于 96 孔板,设 5 个复孔,待细胞贴壁后(24 h),各孔依次加入各洗脱部位的溶液(2 g·L⁻¹)20 μL,以 PBS 溶液 20 μL 作为空白对照组,以不加细胞仅加培养基作为校正孔。加样时枪头紧贴孔一侧缓缓打下去,每加 1 个孔均要吹打混匀,静置 30 min,放入 CO₂ 培养箱,分别于 24,48 h 观察细胞增殖情况。取出 96 孔板,每孔加入 MTT 溶液 20 μL,放回培养箱继续培养 4 h 进行显色反应,终止培养,吸取孔内培养液或者在培养板上铺一层滤纸,快速将培养板翻转,每孔加入 DMSO 150 μL,震荡 10 min,将甲臞充分溶解,于 490 nm 测定空白组、部位 I 和部位 II 的 A 分别为(0.486 ± 0.046),(0.788 ± 0.047),(0.868 ± 0.052)。结果表明与空白组比较,部位 I,II 均对 L929 细胞具有极显著增殖作用,增殖率分别为 162%,179%,部位 II 与部位 I 比较 P < 0.05,以部位 II 活性最强。

2.4 相对分子质量分布及结构鉴定 以对 L929 细胞增殖作用最强的部位 II 作为供试品,利用注射泵直接进样,所有测定均在正离子方式下进行;质谱仪用 Glu-fib 的串联质谱碎片校正,质量准确度 < 0.1 Da;雾化气氮气,碰撞气氩气,源温 80 °C,锥孔电压 50 V,TOF 加速电压 9.1 kV,MCP 检测器电压 2 150 V,毛细管电压 3 000 V,ESI-MS 分析的质量扫描范围 100 ~ 1 000 Da。根据本品测定结果显示,大部分肽段二重质子化(带 2 个单位正电荷),通过选择信号强的母离子进入 MS/MS 分析,对得到的 MS/MS 碎片信息进行分析,获得氨基酸序列组成见表 1^[9],ESI-MS/MS 分析见图 2 ~ 4。

表 1 猪皮胶原肽分离部位 II 中部分肽的相对分子质量及序列组成

| m/z | 相对分子质量 | 氨基酸序列组成 |
|--------|----------|-----------------|
| 614.77 | 1 227.54 | GLGAGGGRGSDGNPG |
| 424.20 | 846.40 | PAGAHGPAGL |

由图 4 可知,本样品小肽的相对分子质量集中于 800 ~ 2 000 Da,所得 2 个太序列均为首次发现。

