

土鳖虫多肽的分离纯化及溶栓活性

张晓丽^{1*}, 李坤^{2,3}

(1. 山东省交通医院, 济南 250031; 2. 山东省医学科学院附属医院, 济南 250062;
3. 山东省医学科学院, 济南 250031)

[摘要] 目的: 对土鳖虫多肽进行分离纯化, 并对其溶栓活性进行研究。方法: 采用仿生酶解工艺制备土鳖虫复合多肽, 以溶栓活性为指标, 采用 Sephadex G-25, SP Sephadex C-25 凝胶柱和 RP-HPLC C₁₈ 半制备色谱柱对复合多肽进行分离纯化, 并测定目标多肽组分 (Peak b) 的溶栓活性、肽含量和相对分子质量。结果: 目标多肽组分的溶栓活性为 814 430 U·mg⁻¹, 肽含量为 95.7%, 相对分子质量分布在 3 211 ~ 3 547。结论: 利用仿生酶解制备的土鳖虫多肽, 经分离纯化后, 可得到具有较强溶栓活性的多肽组分。

[关键词] 土鳖虫; 多肽; 分离纯化; 溶栓活性; 仿生酶解

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)14-0053-03

[doi] 10.11653/syjf2013140053

Purification and Thrombolytic Activity of Polypeptide from *Eupolyphaga Sinensis*

ZHANG Xiao-li^{1*}, LI Kun^{2,3}

(1. Shandong Traffic Hospital, Ji'nan 250031, China;

2. Affiliated Hospital of Shandong Academy of Medical Sciences, Ji'nan 250062, China;

3. Shandong Academy of Medical Sciences, Ji'nan 250031, China)

[Abstract] **Objective:** To purify polypeptide from *Eupolyphaga sinensis* and investigate its thrombolytic activity. **Method:** With thrombolytic activity as index, polypeptide was obtained by bionic enzymatic, which was purified by Sephadex G-25, SP Sephadex C-25 and RP-HPLC C₁₈ semi-preparation column. Thrombolytic activity, peptide content and relative molecular weight of target component were determined. **Result:** Thrombolytic activity of target polypeptide component was 814 430 U·mg⁻¹, peptide content was 95.7% and relative molecular weight was in the range of 3 211-3 547. **Conclusion:** Polypeptide from *E. sinensis* could be prepared by bionic enzymatic, and a component of polypeptide with strong thrombolytic activity could be obtained through separation and purification.

[Key words] *Eupolyphaga sinensis*; polypeptide; purification; thrombolytic activity; bionic enzymatic

土鳖虫最早记载于《神农本草经》, 又名地鳖

虫、土元、土鳖子等, 其性寒、味咸, 具有破血逐瘀, 续筋接骨之功效, 可用于跌打损伤、筋伤骨折、血瘀经闭、产后瘀阻腹痛、癥瘕痞块等^[1], 现在临床常用于中风患者的溶栓治疗。虽然土鳖虫溶栓疗效显著, 但是其溶栓成分却尚未明确, 本研究从土鳖虫仿生酶解液中分离纯化得到一具有较强溶栓活性的多肽组分。

[收稿日期] 20130321(108)

[基金项目] 山东省自然科学基金项目(ZR2009CL027); 济南市科技局科技明星计划项目(20100118); 山东省医学科学院医学基金项目(201023)

[通讯作者] * 张晓丽, 主管药师, 从事临床药学工作, Tel: 15953188198, E-mail: 52239346@qq.com

1 材料

PH1050 增强型高效液相色谱仪(美国惠普公

司,包括自动进样器、DAD 检测器、362 型工作站), CO₂ 培养箱(上海一恒科技有限公司), AKTA Expelorer 100 型快速工艺开发系统(通用公司), SHA-C 型水浴恒温振荡器(金坛市天竟实验仪器厂), AL104 型电子天平(METTLER TOLEDO), DL-4C 型离心机(上海安亭科学仪器厂)。

凝血酶(500 U,浙江杭康药业有限公司),琼脂糖(北京奥博星生物技术有限公司),考马斯亮蓝 R-250(上海化学试剂公司),纤维蛋白原、尿激酶(万华生化制品公司),胃蛋白酶(1:10 000)、胰蛋白酶(1:250)、牛血清白蛋白(A7030)均购自 Sigma 公司, Sephadex G-25 和 SP Sephadex C-25(通用公司),抑肽酶、细胞色素 C、维生素 B₁₂ 均购自国药集团化学试剂有限公司,土鳖虫(购自建联中药店,经南京中医药大学陈建伟教授鉴定为鳖蠊科昆虫地鳖 *Eupolyphaga sinensis* Walker 的雌虫干燥体),甲醇为色谱纯,水为重蒸水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶栓活性测定法(纤维蛋白板法)^[2-3]

2.1.1 纤维蛋白板法的制备 取琼脂糖 0.8 g,加入磷酸盐缓冲液(pH 7.6)100 mL,加热使溶解,冷却至 55 ℃,加入纤维蛋白原溶液(7 g·mL⁻¹)8 mL 及凝血酶溶液(10 U·mL⁻¹)5 mL,混匀,立即倒入已预热的培养皿中,待冷却后转移至 7 ℃ 冰箱中放置 20 min,用直径 0.5 cm 打孔器打孔,备用。

2.1.2 标准曲线的绘制 将尿激酶配制成为 20,40,60,80,100 U·mL⁻¹ 5 个浓度,在制备好的纤维蛋白板上点样,各 10 μL。于 37 ℃ 培养箱中培养 22 h,取出,用考马斯亮蓝 R-250 染色 20 min,脱色液脱色,测定溶圈直径。以溶栓活性的对数为横坐标(X),溶圈直径的对数为纵坐标(Y)绘制标准曲线为 $Y = 0.2296X + 0.5011 (r = 0.9938)$,尿激酶点样量在 0.2 ~ 1 U 线性关系良好。

2.1.3 溶栓活性测定 将待测样品点于孔中,其余操作同 2.1.2,测定溶圈直径,从标准曲线上计算出溶栓活力。

2.2 土鳖虫多肽的制备^[4] 采用仿生酶解法制备。称取蜈蚣药材细粉 2 g,于 50 mL 圆底烧瓶,加入 40 mL 人工胃液,加入 60 mg 胃蛋白酶,密闭,于 37 ℃ 水浴恒温振荡器中水解 3 h 后,用 1 mol·L⁻¹ NaOH 溶液调节酶解液的 pH 7.0,加入 100 mg 胰蛋白酶酶解 4 h,于 85 ℃ 水浴灭酶 15 min,5 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,取上清液,75 ℃ 真空干燥,得复合多肽。

2.3 土鳖虫多肽的纯化^[5-6] 将土鳖虫复合多肽溶于纯化水中(0.50 g·mL⁻¹),用 Sephadex G-25 凝胶柱(1.6 cm × 30 cm)进行分离纯化。样品上样后用 0.01 mol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)进行洗脱,流速 0.5 mL·min⁻¹,测定 A_{220 nm},绘制洗脱曲线(图 1),收集各峰,分别标记为 Peak1, Peak2, Peak3, Peak4,经 Sephadex G-10 脱盐后,检测溶栓活性。结果显示,Peak3 > Peak4 > Peak2 > Peak1。取 Peak3,用 SP Sephadex C-25 阳离子交换柱(1.6 cm × 30 cm)进一步分离纯化,用 20 mmol·L⁻¹ 的醋酸缓冲液(pH 4.0)充分平衡后,上样,用含 NaCl(0 ~ 1 mol·L⁻¹)的醋酸缓冲液进行线性梯度洗脱,流速 0.5 mL·min⁻¹,同样测定 A_{220 nm},绘制洗脱曲线(图 2),收集各峰,分别标记为 Peak①, Peak②, Peak③。脱盐后测定溶栓活性,结果为 Peak① > Peak② > Peak③。将 Peak① 用 RP-HPLC C₁₈ 半制备色谱柱(9.4 mm × 250 mm)进行纯化。以甲醇-水(10:90)进行洗脱,流速 1 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃,在 220 nm 下收集各峰(图 3),分别标记为 Peak a 和 Peak b,溶栓活性检测结果表明,Peak a 几无活性,Peak b 的溶栓活性为 814 430 U·mg⁻¹,较土鳖虫复合多肽的溶栓活性(36 342 U·mg⁻¹)提高了 21.4 倍。

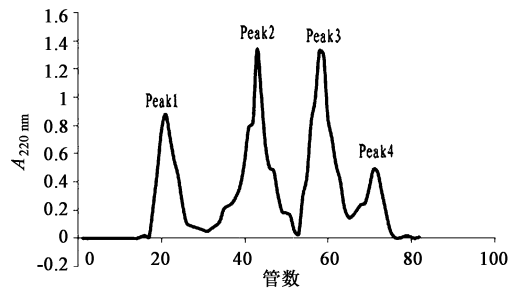


图 1 Sephadex G-25 凝胶柱洗脱曲线

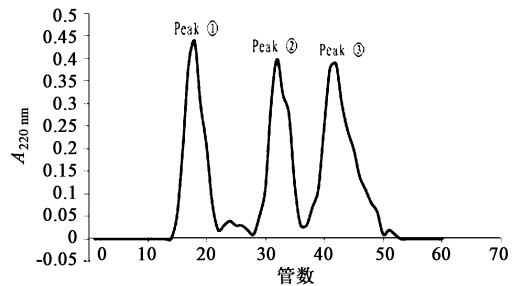


图 2 SP Sephadex C-25 凝胶柱洗脱曲线

2.4 多肽含量测定 采用福林酚比色法测定 Peak b 多肽含量^[7]。取牛血清白蛋白对照品适量,精密称定,加水溶解并制成每 1 L 含牛血清白蛋白 0.252 g 的溶液,精密量取 0.0,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mL 分别置试管中,加水至 1.0 mL,加碱性铜试液 1.0 mL,

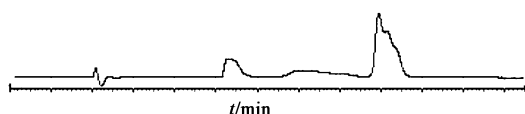


图 3 RP-HPLC C₁₈ 半制备柱洗脱曲线

摇匀,加入福林酚试剂液 4.0 mL,立即混匀,置 55 ℃ 水浴中准确反应 5 min,置冷水浴 10 min,在照紫外-可见分光光度法,在 650 nm 的波长处测定吸光度,以牛血清白蛋白加入量为横坐标(X),吸光度为纵坐标(Y)绘制标准曲线,回归方程为 $Y = 2.5512X + 0.0138$ ($r = 0.9991$),线性范围为 0.05008 ~ 0.2504 mg,本方法的重复性良好,RSD 1.4%,回收率为 97.5%。RSD 1.8%。由 Peak b 的吸光度 0.668 计算出其多肽含量为 95.7%。

2.5 相对分子质量测定 用高效凝胶过滤色谱法测定^[8]。选取细胞色素 C (12.400 kD),抑肽酶 (6.700 kD)和维生素 B₁₂ (1.355 kD)为 Marker,分别加水溶解并制成 0.5 g·L⁻¹的溶液。

色谱条件:TSK-GEL2000SW 色谱柱(7.5 mm × 300 mm,10 μm),流动相 0.1 mol·L⁻¹叠氮化钠(pH 6.8),流速 0.5 mL·min⁻¹,检测波长 254 nm,进样量 10 μL。记录保留时间(t_R),以 $\log Mr$ 对 t_R 进行线性回归,得回归方程为 $\log Mr = 6.598 - 0.087t_R$ ($r = 0.9025$)。根据 Peak b 组分的 t_R 计算出 Mr 为 3 211 ~ 3 547。

3 讨论

经仿生酶解制得土鳖虫多肽复合物,先后采用 Sephadex G-25, SP Sephadex C-25 凝胶柱和 RP-HPLC C₁₈ 半制备色谱柱对其进行分离纯化,溶栓活性跟踪检测,最终分离得到的多肽组分具有较强的溶栓活性(814 430 U·mg⁻¹),经检测,其纯度为 95.7%,相对分子质量分布在 3 211 ~ 3 547。

土鳖虫为中医临床常用动物药,其主要组成为蛋白,但是由于蛋白的多肽组成片段不同,因此不同的动物药起到不同的临床作用。土鳖虫蛋白为大分子物质,只有到达胃肠道后,经消化酶、酸、碱等作用被酶解或水解成肽或其他小分子物质后方可吸收入血而发挥药效^[4],鉴于此,本实验采用模拟胃肠环境的仿生酶解过程提取土鳖虫多肽,使得从中分离

出的溶栓肽更具有临床研究指导价值。

蛋白相对分子质量的测定方法常用 SDS-PAGE 蛋白电泳^[9],蛋白电泳所用的丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺单体都是有毒性的,丙烯酰胺主要引起神经毒性,甲叉双丙烯酰胺对末梢神经系统有很强的破坏性,另外在配胶中使用的过硫酸铵也有一定毒性,对皮肤黏膜有刺激性和腐蚀性。因此为避免身体伤害,本实验采用高效凝胶过滤色谱法^[10]测定肽的相对分子质量,原理是利用凝胶的分子筛作用,大相对分子质量物质保留时间短,小相对分子质量物质保留时间长,且相对分子质量的对数与保留时间呈线性关系。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:18.
- [2] 蔡立涛,徐祥,王婷婷,等. 纳豆激酶基因在毕赤酵母中的表达纯化及抗体制备[J]. 中国生化药物杂志, 2010,31(1):10.
- [3] 陈丽艳,张迎,綦菲,等. 地龙的鲜品和干品可溶性蛋白及纤溶酶活性的对比研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(8):89.
- [4] 黄能听,王玉蓉,许文博,等. 仿生酶解法提取蜈蚣的工艺研究[J]. 北京中医药大学学报,2009,32(10):706.
- [5] 张及禄,文慧民,孙德军. 蝮蛇毒小分子多肽的分离、纯化及其抗肿瘤作用研究[J]. 中国生化药物杂志, 2009,30(4):217.
- [6] 董江涛,周婷婷,李燕,等. 抗氧化大豆多肽纯化的研究[J]. 大豆科学,2010,29(4):677.
- [7] 刘玉军,代龙,魏永利. 天龙仿生酶解制备小分子肽优选工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(22):4.
- [8] 王超英,周如真,戴国华,等. 胸腺肽注射液分子量测定[J]. 中国生化药物杂志,2000,21(1):33.
- [9] 王晶娟,张贵君,李奇. 全蝎蛋白药效组分的生物鉴定法研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(8):94.
- [10] 董炎,史新元,乔延江. 高效凝胶过滤色谱法测定沙漠噶多糖的重均相对分子质量[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(6):11.

[责任编辑 仝燕]