

猪血源抗高血压活性肽考察

任艳, 万德光, 卢先明, 国锦琳*

(成都中医药大学药学院, 中药材标准化教育部重点实验室, 中药资源系统
研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137)

[摘要] **目的:** 获取猪血中具有抗高血压活性的多肽成分。**方法:** 通过体外模拟体内代谢, 采用酶解法、超滤法、凝胶柱色谱法进行分离, 通过基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)进行结构鉴定。检测猪血源抗高血压活性肽对血管紧张素转换酶(ACE)的抑制作用, 并进行体外活性跟踪; 检测其对自发性高血压大鼠(SHR)尾动脉收缩压(SBP)的影响, 并进行体内活性验证。**结果:** 获得活性多肽 pep4, 氨基酸序列 VVLLGDV, 相对分子质量 714 Da, 具有较强的体外 ACE 抑制活性, $IC_{50} = 0.325 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 多肽 pep4 在 1 ~ 36 h 内对 SHR 具有显著的降血压作用 ($P < 0.05$), 给药后 15 h 抗高血压效果最为明显, SBP 降低 10 ~ 25 mmHg, ($P < 0.05$)。**结论:** 从猪血中分离多肽 pep4, 具有明显抗高血压作用, 以猪血源寻找抗高血压活性肽, 具有新型降压药物的开发前景, 值得进一步研究。

[关键词] 猪血; 药用; 抗高血压肽; 血管紧张素转换酶

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)11-0051-03

[doi] 10.11653/syfy2013110051

Investigation of A New Antihypertensive Active Peptide from Porcine Blood

REN Yan, WAN De-guang, LU Xian-ming, GUO Jin-lin*

(Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicines, Ministry of Education, Breeding Base of State Key Laboratory of Resources Systems Research and Development Utilization of Chinese Hebal Medicines

Constructed by Ministry of Science and Technology and Sichuan Province, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To get anti-hypertensive activity polypeptides from porcine blood. **Method:** Through *in vitro* simulation of *in vivo* metabolism, enzymatic hydrolysis, ultrafiltration and gel column chromatography were adopted to separate polypeptides, and MALDI-TOF-MS was used to identify structures. Inhibition of anti-hypertensive activity polypeptides from porcine blood to angiotensin-converting enzyme (ACE) was detected, and *in vitro* activity tracking adopted; Effect of these activity polypeptides on systolic blood pressure (SBP) of spontaneously hypertensive rats (SHR) was detected, and adopted *in vivo* activity verification. **Result:** An active polypeptide pep4 was obtained from porcine blood, its amino sequence was VVLLGDV with relative molecular mass of 714 Da, it had a strong *in vitro* ACE inhibitory activity with $IC_{50} = 0.325 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. During 1-36 h after administration, pep4 had a significant reduction ($P < 0.05$) in blood pressure on SHR and SBP decreased 10-25 mmHg, antihypertensive effect after administrating 15 h was the most obvious. **Conclusion:** Polypeptide pep4 was first obtained from porcine blood, it had a significant antihypertensive effect. As a active peptide source for looking for antihypertensive activity peptides, it had prospects for development of new antihypertensive drugs, and it was worth of further study.

[Key words] porcine blood; medicinal; antihypertensive peptide; angiotensin converting enzyme

[收稿日期] 20130117(013)

[第一作者] 任艳, 在读博士, 从事动植物药与中药生物技术研究, Tel:13438071722, E-mail:rennee_yan@163.com

[通讯作者] * 国锦琳, 副教授, 从事动植物药与中药生物技术研究, E-mail:guo596@163.com

猪血在我国药用历史悠久,资源非常丰富。自汉代起,历代医家已用其治疗以高血压为临床主要表现的中风、眩晕证^[1-4]。《名医别录》最早记载猪血的药用功效:“主豨豚暴气,中风头眩,淋漓”^[5]。现代研究表明猪血化学成分较为单一,主要富含蛋白质,含量占固态成分 86%^[6]。猪血在体内发挥作用往往被消化道酶降解成相对分子质量小、化学性质稳定的小肽类,小肽能直接被小肠黏膜细胞吸收进入血液循环,从而发挥作用^[7]。国内外已有猪血降血压活性多肽的报道^[8]。

目前,猪血除少部分被加工成血粉等低附加值产业外,大多作为废弃物浪费掉,其药用价值往往被忽略。本实验通过体外酶解模拟体内代谢获得降血压活性肽,采用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)进行分子量和一级结构测定,并对自发性高血压大鼠(SHR)进行体内抗高血压活性的测定,为猪血抗高血压功效的物质基础研究提供依据。

1 材料

Anthelie 紫外-可见分光光度计(法国 Secoman 公司),X-22R 型冷冻离心机(德国贝克公司),UFC 900396 型超滤筒(美国默克密理博公司),LC-20D 型高效液相色谱仪(日本岛津公司),Shim-pack VP-ODSC₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm,美国 Waters 公司),Sephadex G-25 型葡聚糖凝胶(安玛西亚公司),BP-6 型动物无创血压测试仪(成都泰盟科技有限公司)。

猪血(采集于温江屠宰场),胃蛋白酶、粉末活性炭(重庆吉元化学有限公司),马尿酸组氨酰亮氨酸(HHL)、血管紧张素转换酶(ACE)、三硝基苯磺酸(TNBS)(Sigma 公司),卡托普利对照品(批号 100318-200602,成都市药检所),多肽 pep4(上海 Bootech 生物科技有限公司合成,纯度 > 95%),乙腈、甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

自发性高血压大鼠(SHR)雄性,180 ~ 220 g,由上海斯莱克动物中心提供,许可证号 SCXK(沪)2007-0005。

2 方法与结果

2.1 活性肽分离 取新鲜猪血加入柠檬酸三钠抗凝,离心取下层,加 8.0% 胃蛋白酶酶解,底物质量分数 18.0%,调 pH 至 3.0,于 45 °C 酶解 0.5 h,加 4% 活性炭脱色于 55 °C 保持 30 min。将脱色液离心,取上清液,补足至加酶量同一体积。再向脱色液中加入 6% 胃蛋白酶,底物质量分数 12%,于 40 °C

恒温反应 6 h。在 90 °C 反应 30 min 灭活酶,取出,离心,超滤筒(相对分子质量 3 kDa)离心超滤(4 000 × g,40 min),取下层液体,即相对分子质量 < 3 kDa 酶解液。酶解液过 Sephadex G25 色谱柱,流动相乙酸-乙酸钠(0.05 mol·L⁻¹,pH 5.0)进行洗脱,上样量 3.3%,检测波长 210 nm,按每管 1.6 mL·min⁻¹收集。分离得到的组分采用 RP-HPLC 进行分离鉴定,柱温 37 °C,检测波长 215 nm,流动相水-乙腈(95:5,A),乙腈-水(95:5,B)梯度洗脱(0 ~ 60 min,1% ~ 100% B)。

2.2 体外血管紧张素酶(ACE)抑制活性检测 采用 T. Matsue 等^[9]的方法。1 单位酶活定义为于 37 °C 在 1 min 内催化 HHL 形成 1 μmol 马尿酸的酶量。

2.3 活性肽一级结构鉴定 采用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)进行鉴定。超滤得到的酶解液通过凝胶色谱初步分离得到一系列多肽组份,见图 1;其中组份 I 活性非常强,抑制率达 100%;组份 I 通过 RP-HPLC 分离检测含有 6 个多肽,其中 pep4 的 ACE 抑制活性明显,IC₅₀ = 0.325 g·L⁻¹。结构鉴定可知 pep4 氨基酸序列 VVLLGDV,相对分子质量 714 Da,见图 2。

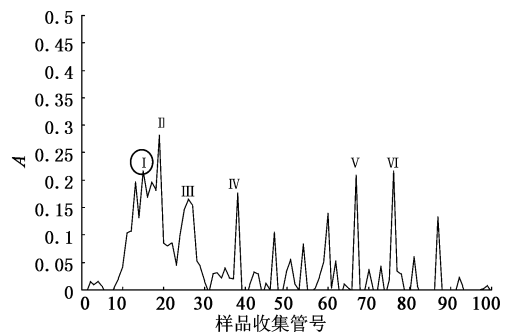


图 1 猪血酶解液 Sephadex G-25 分离

2.4 活性肽 pep4 对 SHR 大鼠血压的影响^[10] 将 SHR 随机分成 3 组。pep4 给药组:1 g·L⁻¹ pep4,按 10 mL·kg⁻¹ 剂量给药;阳性对照组:1 g·L⁻¹ 卡托普利,按 10 mL·kg⁻¹ 给药;空白组:以等体积纯净水给药。分别在给药前和给药后 3,15,24,36 h 测定各组 SHR 的尾动脉血压 SBP,记录血压值。所有数据采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析。重复测量资料采用重复测量设计的方差分析,有统计学意义时,进一步作两两比较, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义,结果见表 1 和图 3。

由表 1 可知,多肽 pep4 在给药后 3 ~ 36 h 对 SHR 大鼠有明显降血压作用;在给药 3 h 后,多肽 pep4 抗高血压效果明显,给药 15 h 后,pep4 组的

表1 给药前后各组 SBP 值变化比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

mmHg

时间	空白组	阳性对照组	pep4 给药组	F _{组别}	P _{组别}
给药前	164.50 ± 1.87	166.50 ± 3.02	165.33 ± 5.05	0.477	0.630
给药后 3 h	167.17 ± 5.49	131.50 ± 1.52 ^{Aa}	148.33 ± 3.78 ^{Aab}	122.621	<0.001
给药后 15 h	164.67 ± 1.63	148.50 ± 3.15 ^{ABa}	137.33 ± 1.63 ^{ABab}	223.162	<0.001
给药后 24 h	164.50 ± 1.38	162.83 ± 1.72 ^{BC}	152.00 ± 2.61 ^{ACab}	71.071	<0.001
给药后 36 h	165.83 ± 2.64	167.33 ± 6.62 ^{BC}	162.33 ± 3.45 ^{BCD}	1.890	0.185
F _{时间}	0.893	125.624	67.878		
P _{时间}	0.427	<0.001	<0.001		

注: ^A 与给药前比较 $P < 0.05$; ^B 与给药后 3 h 比较 $P < 0.05$; ^C 与给药后 15 h 比较 $P < 0.05$; ^D 与给药后 24 h 比较 $P < 0.05$; ^a 与空白组对照比较 $P < 0.05$; ^b 与阳性对照组比较 $P < 0.05$ 。

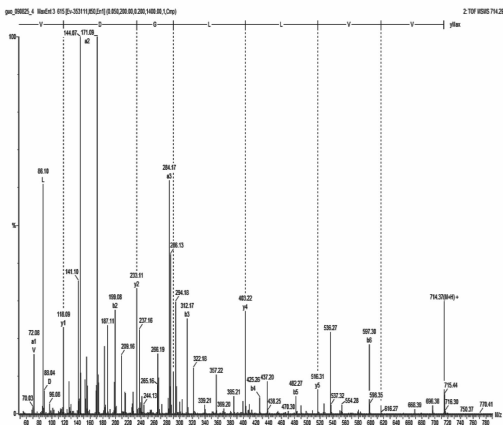
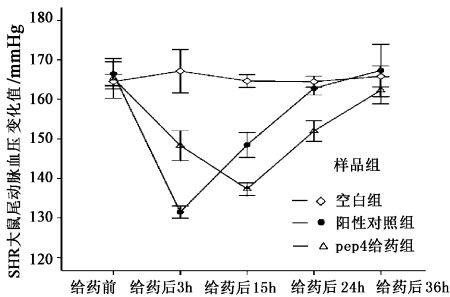


图2 多肽 pep4 MALDI-TOF-MS 结构鉴定

图3 各组给药后不同时间 SHR 血压变化比较($\bar{x} \pm s$)

SBP 值下降至最低,给药 24 h 后,血压有回升趋势,此时仍有明显效果,给药 36 h 后,血压基本恢复初始水平,表明多肽在口服一次性给药在体内持续药用时间 36 h。由图 3 可知,pep4 与阳性对照药卡托普利在体内发挥效应的时间均从给药 3 h 后开始显著,阳性对照组在给药 3 h 后即血压降低到最大值,而空白在 15 h 后 SBP 降低到最大值,阳性对照组在给药 24 h 后血压就恢复到起始水平,而 pep 给药组则在 36 h 后,说明多肽 pep4 的抗高血压作用相对阳性对照药更平缓,持续时间更长。

3 讨论

由于多肽 pep4 相对分子质量小,且由消化酶胃蛋白酶酶解得到,对体内主要消化酶相对较稳定,有

利于口服给药。药理试验表明,其对 SHR 具有显著的抗高血压作用,能够在给药后 1 ~ 36 h 内发挥药效,初步证实了该活性肽的抗高血压效果,与常用降压药卡托普利(阳性对照)比较,pep4 的降压作用显效迅速,在一次性给药后 15 h 达到最大值,在 36 h 后基本代谢完成,说明多肽 pep4 在体内降压作用的效果更为平缓,持续时间更长,具有新型降压药物的开发前景。

[参考文献]

- [1] 李时珍. 本草纲目[M]. 2 版. 北京: 华夏出版社, 2004: 1773.
- [2] 李连景. 高血压的中医认识[J]. 天津中医药, 2009, 26(6): 509.
- [3] 孙思邈. 千金·食治[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 623.
- [4] 姚可成. 食物本草点校本[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994: 782.
- [5] 陶弘景. 名医别录[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 623.
- [6] 钱冬明. 猪血凝血酶、免疫球蛋白等 5 种蛋白质和血红素的分离提取[D]. 西安: 陕西科技大学, 2007.
- [7] 李勇. 肽营养学[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2007: 23.
- [8] 余奕珂. 以猪血为蛋白源的生物活性肽的研究进展[J]. 精细与专用化学品, 2004, 12(18): 11.
- [9] Toshiro M, Hiroshi M, Yutaka O. Colorimetric measurement of angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity with trinitrobenzene sulfonate[J]. Biosci Biotech Biochem, 1992, 56(3): 517.
- [10] Michio M, Abdulatef M A, Kazunori K, et al. Identification of pro-drug type ACE inhibitory peptide sourced from porcine myosin B; Evaluation of its antihypertensive effects *in vivo*[J]. Food Chem, 2009, 114(2): 516.

[责任编辑 全燕]