

• 制剂与质量 •

梅花鹿鹿茸中促进海马神经细胞增殖蛋白的分离纯化

严铭铭¹, 曲晓波¹, 钟英杰¹, 赵大庆^{1*}, 刘 宁², 刘志强², 刘淑莹²

(1. 长春中医药大学 研发中心, 吉林 长春 130117; 2. 中国科学院 长春应用化学研究所, 吉林 长春 130023)

摘 要:目的 研究梅花鹿鹿茸中蛋白的分离纯化和促进细胞增殖的生物活性。方法 采用硫酸铵分级沉淀法提取鹿茸蛋白, 蛋白组分经过 DEAE Sepharose Fast Flow、SepHacryl S-200 和 Affi-gel Blue Gel 柱色谱分离纯化。结果 分离得到 3 个单一蛋白化合物 CNTP I、CNTP II、CNTP III。结合激光解析电离飞行时间质谱和 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳确定其相对分子质量分别为 $6.701\ 8 \times 10^4$ 、 $4.374\ 9 \times 10^4$ 、 $2.385\ 5 \times 10^4$ 。分析了 CNTP III 的氨基酸组成, 采用 Edman 测序法测定 N 末端氨基酸序列为 GDRGTA AKHALDEEP。CNTP III 具有促进小鼠海马神经细胞 (HT22) 增殖的作用。结论 CNTP III 是具有促进细胞增殖的新蛋白。

关键词: 梅花鹿; 鹿茸; 蛋白; 生物活性**中图分类号:** R286.1**文献标识码:** A**文章编号:** 0253-2670(2007)08-1163-05

Separation and purification of protein promoting hippocampus nerve cell proliferation from pilose antler of *Cervus nippon*

YAN Ming-ming¹, QU Xiao-bo¹, ZHONG Ying-jie¹, ZHAO Da-qing¹, LIU Ning²,
LIU Zhi-qiang², LIU Shu-ying²

(1. Center of Research and Development, Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China; 2. Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130023, China)

Abstract: **Objective** To investigate the separation and purification of the proteins from pilose antler of *Cervus nippon* and their cell proliferation promoting bioactivities. **Methods** The pilose antler of *C. nippon* was extracted and purified by a combination of ammonium sulfate fractionation, ion-exchange chromatography DEAE Sepharose Fast Flow, gel filtration chromatography Sephacryl S-200, and Affi-gel Blue Gel chromatography. **Results** Three proteins named CNTP I, CNTP II, and CNTP III were isolated. Their relative molecular weights were $6.701\ 8 \times 10^4$, $4.374\ 9 \times 10^4$, and $2.385\ 5 \times 10^4$, which were assessed by MALDI-TOF-MS and SDS-PAGE. Amino acid compositions of protein CNTP III were analyzed. N-terminal Edman degradation of protein CNTP III showed its amino acid sequence GDRGTA AKHALDEEP. The bioactivity tests of protein CNTP III showed significantly stimulant effects on the proliferation of nerve cells HT22 in mice. **Conclusion** Protein CNTP III is a new protein promoting cell proliferation.

Key words: *Cervus nippon* Temminck; pilose antler; protein; bioactivity

鹿茸始载于《神农本草经》, 是我国的传统名贵中药, 具有增强体力, 提高机体免疫能力, 抗衰老, 改善性功能, 抗炎, 加速创伤和溃疡愈合, 促进骨质修补, 增强中枢神经系统和心血管系统的功能, 抗肿瘤, 增强胃肠功能和肾脏的利尿功能等作用^[1]。鹿茸中的化学成分复杂, 其中粗蛋白占干重的 50% 以上^[2], 梅花鹿茸中粗蛋白占干重高达 61.24%^[3]。相关报道仅有从鹿茸中分离了几个粗蛋白和粗多肽^[1,4,5], 以及从马鹿鹿茸中分离出两个相对分子质

量为 3 215.8 和 3 095.1 的多肽, 并做了初步的活性研究^[6,7]。本实验结合拟开发梅花鹿鹿茸抗衰老蛋白类制剂项目, 采用生物化学分离手段从梅花鹿茸中分离纯化蛋白, 为进一步开发鹿茸中高活性药物提供参考。

1 材料与仪器

鲜鹿茸由吉林东丰药业提供, 经长春中医药大学邓明鲁教授鉴定为梅花鹿 *Cervus nippon* Temminck 鹿茸; HT22 细胞株引自日本, MTT 购自瑞士

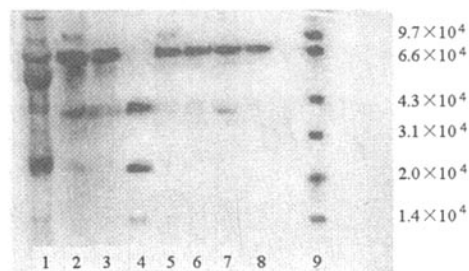
收稿日期: 2006-12-13**基金项目:** 国家科技部十五攻关重大项目 (2004BA907A17)**作者简介:** 严铭铭, 女 (满族), 哈尔滨人, 博士, 研究方向为中药化学及新药开发。Tel: (0431) 86172421*** 通讯作者** 赵大庆 E-mail: yanmm595@yahoo.com.cn

Fluka 公司,胰蛋白酶购自 Sigma 公司,相对分子质量标准蛋白、Affi-gel Blue Gel 购自 Bio-Rad 公司, DEAE-Sephacryl S-200HR 和 Sephacryl S-200HR 购自 Pharmacia 公司,其他试剂均为分析纯或生化试剂。

J-25 高速冷冻离心机 (Beckman 公司), Baselin 810 氨基酸自动分析仪, Millipore 超滤器, 冷冻干燥机 (丹麦), 多用电泳仪 (北京六一仪器厂), 高效液相色谱仪 (Shimadzu 公司), 酶标测定仪 (Bio-Rad 公司), LDI-1700 激光解析电离飞行时间质谱仪 (Biomolecular 公司)。

2 方法与结果

2.1 鹿茸粗总蛋白的提取分离:取新鲜梅花鹿茸 500 g, 洗净, 胶体磨匀浆, 不断加入预冷的匀浆液 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.0), 4 500r/min 离心 30 min, 离心液以 80% 硫酸铵沉淀, 取沉淀以大量 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.0 缓冲液透析除去硫酸铵, 内透液冻干, 得梅花鹿茸蛋白粗提物 33.258 g, 于 -20 °C 保存。粗总蛋白呈黄白色粉状, 易溶于水。采用 Folin-酚法^[8]测定得蛋白质的纯度为 47.81%。采用不连续胶系统, 5% 浓缩胶和 15% 分离胶, 以考马斯亮蓝法染色, SDS-PAGE 电泳结果见图 1。



1-鹿茸蛋白粗提物 2-组分 D1 3-组分 D2 4-组分 D3
5-组分 D2S1 6-组分 D2S2 7-组分 D2S3 8-蛋白 CNTP I
9-低相对分子质量标准蛋白

1-protein crude extract of pilose antler 2-component D1
3-component D2 4-component D3 5-component D2S1
6-component D2S2 7-component D2S3 8-protein CNTP I
9- standard protein with lower relative molecular weight

图 1 蛋白 CNTP I 分离纯化电泳图

Fig. 1 SDS-PAGE Analysis of separated and purified CNTP I

2.2 鹿茸蛋白 CNTP I 的分离纯化及理化性质:取蛋白粗提物冻干品 5 g, 溶于 20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0 缓冲液, 0.22 μm 膜滤过, 采用 DEAE-Sephacryl S-200HR 阴离子交换色谱分离纯化。色

谱条件: DEAE-Sephacryl S-200HR 柱 (20 cm × 2.6 cm); 体积流量: 0.8 mL/min; 流动相: 20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0 缓冲液, 100 mmol/L NaCl-20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0 缓冲液, 200 mmol/L NaCl-20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0 缓冲液。结果得到 3 个洗脱峰, 分别收集, 透析, 冻干, 分别命名为组分 D1 (4.753 g)、D2 (3.538 g)、D3 (7.834 g) (图 2)。Folin-酚法测定纯度分别为 53.27%、67.71%、68.29%。组分 D1、D2、D3 的 SDS-PAGE 电泳结果见图 1, 可见组分 D2、D3 较纯净。

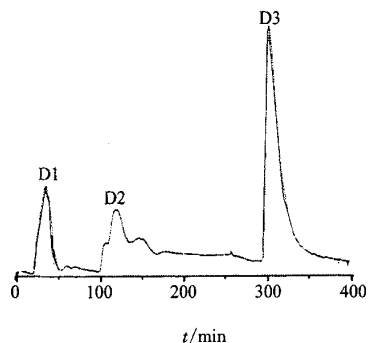


图 2 鹿茸粗总蛋白的 DEAE-Sephacryl S-200HR 洗脱色谱图

Fig. 2 Elution chromatogram of protein crude extract of pilose antler on DEAE-Sephacryl S-200HR

取组分 D2 1 g 溶于 0.5 mL 20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0 缓冲液中, 0.22 μm 膜滤过, 采用 SepHacryl S-200HR 凝胶过滤色谱分离纯化。色谱条件: SepHacryl S-200HR 柱 (50 cm × 1.0 cm); 体积流量: 0.5 mL/min; 流动相: 50 mmol/L NaCl-20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0 缓冲液。收集洗脱峰峰尖部分, 透析, 冻干, 得到 3 个组分 D2S1 (64 mg)、D2S2 (156 mg)、D2S3 (89 mg) (图 3)。Folin-酚法测定纯度分别为 84.12%、90.34%、83.76%。各峰冻干样品的 SDS-PAGE 电泳结果见图 1, 可见组分 D2S2 较纯净。

取组分 D2S2 0.156 g, 溶于 0.3 mL 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.0 缓冲液中, 0.22 μm 膜滤过, 采用 Affi-gel Blue Gel 色谱分离纯化。色谱条件: Affi-gel Blue Gel 柱 (15 cm × 2.5 cm); 体积流量: 0.5 mL/min; 流动相: 1.0 mol/L NaCl-20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.0 缓冲液。收集洗脱峰峰尖部分, 透析, 冻干, 得冻干品 21 mg, 命名为 CNTP I。Folin-酚法测定纯度为 98.98%。SDS-PAGE 电泳结果见图 1, 表明 CNTP I 为单一成分。

CNTP I 为白色絮状物,极易溶于水。SDS-PAGE 电泳中在 6.7×10^4 左右为一条带,表明其纯度很高。采用激光解析电离飞行时间质谱仪,以芥子酸为基质,取 $1 \mu\text{L}$ 样品进样分析,见图 4。结果其相对分子质量为 6.7018×10^4 , m/z 67 018.25 为蛋白 CNTP I 质子化分子离子峰 $[M+H]^+$, m/z 33 432.35 为蛋白 CNTP I 的双电荷离子峰 $[M+2H]^{2+}$ 。

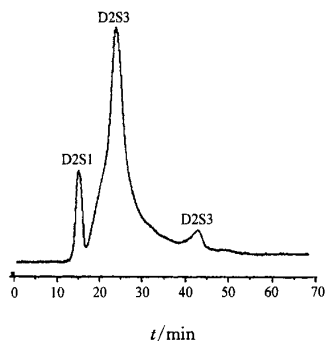


图 3 组分 D2 的 Sephacryl S-200HR 柱色谱图

Fig. 3 D2 Elution chromatogram of Sephacryl S-200HR

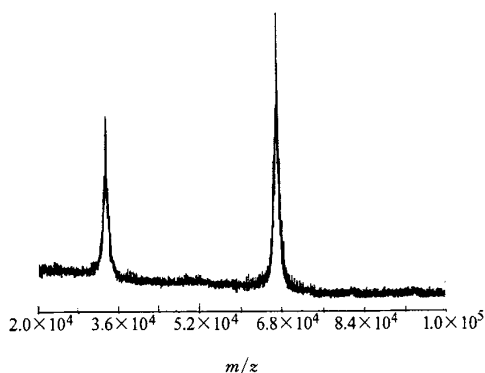


图 4 蛋白 CNTP I 激光解析电离飞行时间质谱

Fig. 4 MALDI-TOF MS of CNTP I

2.3 鹿茸蛋白 CNTP II 的分离纯化及理化性质:取组分 D3 1 g 溶于 0.5 mL 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.40 缓冲液中, $0.22 \mu\text{m}$ 膜滤过,采用 SepHacryl S-200HR 凝胶过滤色谱分离纯化。色谱条件: SepHacryl S-200HR 柱 ($50 \text{ cm} \times 1.0 \text{ cm}$); 体积流量: 0.5 mL/min ; 流动相: 100 mmol/L NaCl-20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.40 缓冲液。收集洗脱峰峰尖部分,透析,冻干,得到 3 个组分 D3S1 (107 mg)、D3S2 (197 mg)、D3S3 (84 mg) (图 5)。Folin-酚法测定纯度分别为 91.49%、92.56%、84.74%。各组分电泳结果见图 6,表明组分 D3S1、D3S2 较纯净。

取组分 D3S1 0.107 g,溶于 0.2 mL 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.0 缓冲液中, $0.22 \mu\text{m}$ 膜滤过,采用 Affi-gel Blue Gel 色谱分离纯化。色谱条件: Affi-gel

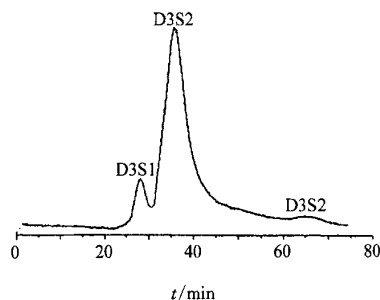
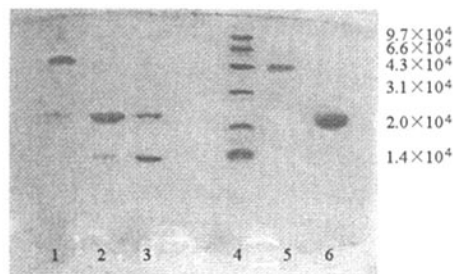


图 5 组分 D3 Sephacryl S-200HR 柱色谱图

Fig. 5 D3 Elution chromatogram of Sephacryl S-200HR

Blue Gel 柱 ($15 \text{ cm} \times 2.5 \text{ cm}$); 体积流量: 0.5 mL/min ; 流动相: 1.0 mol/L NaCl-20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.0 缓冲液。收集洗脱峰峰尖部分,透析,冻干,得冻干品 28 mg,命名为 CNTP I。Folin-酚法测定纯度为 98.15%。SDS-PAGE 电泳结果见图 6,表明 CNTP I 为单一成分。CNTP I 为白色絮状物,极易溶于水。SDS-PAGE 电泳中在 4.3×10^4 左右为一条带,表明其纯度很高。激光解析电离飞行时间质谱见图 7,显示其相对分子质量为 4.3749×10^4 , m/z 43 749.21 为 CNTP I 质子化分子离子峰 $[M+H]^+$, m/z 21 615.14 为 CNTP I 的双电荷离子峰 $[M+2H]^{2+}$ 。



1-组分 D3S1 2-组分 D3S2 3-组分 D3S3 4-低相对分子质量标准蛋白 5-蛋白 CNTP I 6-蛋白 CNTP II

1-component D3S1 2-component D3S2 3-component D3S3 4- standard protein with lower relative molecular weight 5-protein CNTP I 6-protein CNTP II

图 6 蛋白 CNTP I 和 CNTP II 分离纯化电泳图

Fig. 6 SDS-PAGE Electrophorogram of separated and purified CNTP I and CNTP II

2.4 鹿茸蛋白 CNTP III 的分离纯化及理化性质:取组分 D3S2 0.197 g,溶于 0.4 mL 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.0 缓冲液中, $0.22 \mu\text{m}$ 膜滤过,用 Affi-gel Blue Gel 色谱分离纯化。色谱条件: Affi-gel Blue Gel 柱 ($15 \text{ cm} \times 2.5 \text{ cm}$); 体积流量: 0.5 mL/min ; 流动相: 1.0 mol/L NaCl-20 mmol/L Tris-

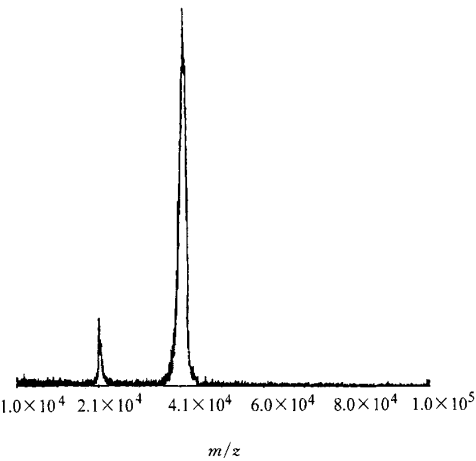


图 7 蛋白 CNTP II 激光解析电离飞行时间质谱

Fig. 7 MALDI-TOF MS of CNTP II

HCl, pH 7.0 缓冲液。弃去流穿峰,收集洗脱峰峰尖部分,透析,冻干,得冻干品 57 mg,命名为 CNTP III。Folin-酚法测定纯度为 99.77%。SDS-PAGE 电泳结果见图 6,表明 CNTP III 为单一成分。CNTP III 为白色絮状物,极易溶于水。SDS-PAGE 电泳中在 2.3×10^4 左右为一条带,表明其纯度很高。激光解析电离飞行时间质谱见图 8,显示其相对分子质量为 2.3855×10^4 , m/z 23 854.98 为 CNTP III 质子化分子离子峰即 $[M+H]^+$ 峰, m/z 11 824.83、18 653.76、47 060.36 分别对应于 CNTP III 的双电荷离子峰 $[M+2H]^{2+}$ 、四聚体五电荷离子峰 $[4M+5H]^{5+}$ 和二聚体离子峰 $[2M+H]^+$ 。

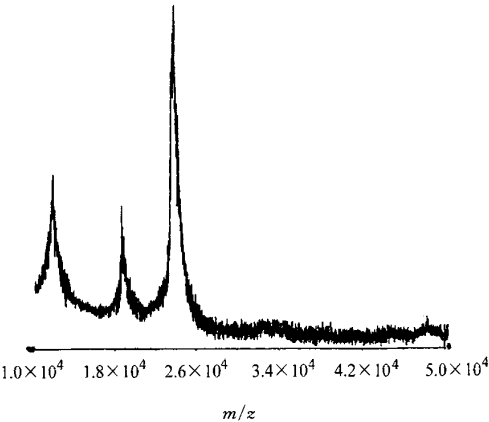


图 8 蛋白 CNTP III 激光解析电离飞行时间质谱

Fig. 8 MALDI-TOF MS of CNTP III

以 6 mol/L HCl, 105 ℃ 水解 24 h, 采用 PICO-TAG 法在 BASELIN 810 氨基酸自动分析仪上检测 CNTP III 的氨基酸组成^[9], 结果见表 1。结果表明, CNTP III 主要含甘氨酸、谷氨酸、丙氨酸、天冬氨酸。采用 Edman 测序法测定 N 末端氨基酸序列,

表 1 蛋白 CNTP III 的氨基酸组成分析

Table 1 Amino acid composition analysis of CNTP III

氨基酸	物质的量比例/%	氨基酸	物质的量比例/%
Tyr	2.51	Pro	4.46
Asp	10.19	Ala	10.27
Glu	13.07	Val	4.97
Ser	4.55	Ile	4.02
His	7.98	Leu	7.53
Arg	4.08	Phe	3.36
Gly	13.82	Lys	2.06
Thr	6.25		

对蛋白质从 N 末端开始进行逐步降解,对降解的氨基酸用 HP G1000 蛋白测序仪进行分离鉴定,结果 CNTP III N 末端氨基酸序列为 GDRGTAA KHALDEEP。

2.5 鹿茸蛋白 CNTP III 药理活性的测定

2.5.1 培养条件:小鼠海马细胞 HT22 细胞培养于含 10% 小牛血清(FBS)的 IMDM 培养基中, 37 ℃, 5% CO₂ 培养。每周更换培养基 2~3 次,用 0.25% 胰蛋白酶工作液消化分散细胞,进行传代培养。

2.5.2 体外促细胞增殖活性的测定:取对数生长期的 HT22 细胞,用 0.25% 胰蛋白酶消化后,用培养液(含 10% 小牛血清的 IMDM)调细胞密度为 5×10^5 /mL,接种于 96 孔板,每孔接种 0.1 mL,于 37 ℃, 5% CO₂ 中培养 4 h。取 0.1 mL 不同质量浓度待测样品加入到 IMDM 培养液中。每种样品 10 个复孔,对照为不含药物的 IMDM 培养液。继续培养 36 h 后,每孔加入 20 μL 5 mg/mL MTT,继续孵育 4 h。将孔内液体吸干净后,每孔加入 0.15 mL DM-SO,微孔震荡仪上震荡至颗粒完全溶解,在 BIO-RAD 680 酶标仪上测定 490 nm 波长处吸光度(A)值,结果见表 2。鹿茸蛋白 CNTP III 能够明显促进小鼠海马神经细胞增殖,并且这种促进作用具有量效关系,即随着质量浓度的提高,促生长活性增加。

表 2 鹿茸蛋白 CNTP III 对 HT22 的体外作用

Table 2 Effect of CNTP III on HT22 cell in vitro

组别	剂量/(μg · mL ⁻¹)	A 值($\bar{x} \pm s$)
对照	0	0.927 ± 0.186
CNTP III	100	1.417 ± 0.098**
	50	1.304 ± 0.242**
	20	1.169 ± 0.196*
	10	1.113 ± 0.089*

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group

3 讨论

Swiss-Prot 和 GenBank 蛋白序列库检索结果表明 CNTP III 蛋白序列与已知蛋白序列的同源性远远小于 50%,提示其可能是源于鹿茸的新蛋白,

序列中所含的丙氨酸比例占 15%，预示着此蛋白二级序列结构为一个普通的 α 螺旋结构。

鹿茸蛋白 CNTP III 对于生长状态不良的细胞的促生长作用更明显，如处于复苏期的细胞等，但是平行实验研究表明鹿茸蛋白 CNTP I 对小鼠海马神经细胞有微弱增殖作用，蛋白 CNTP II 则无作用。

电泳实验表明，蛋白 CNTP I 反复冻融后会少量分解为蛋白 CNTP II 和 CNTP III。结合激光解析电离飞行时间质谱所测定的三者的相对分子质量可以看出，CNTP I 的相对分子质量 (6.7018×10^4) 为 CNTP II (4.3749×10^4) 与 CNTP III (2.3855×10^4) 之和，提示蛋白 CNTP II 和 CNTP III 可能为蛋白 CNTP I 的两个亚基。

References:

- [1] Yang L L, Chi C, Qin F, et al. The velvet chemical compositions and pharmacological action [J]. *J Yunnan Coll Tradit Chin Med* (云南中医学院学报), 1995, 18(4): 19-23.
- [2] Li H P. The velvet chemical compositions of velvet-deer breeds or strains in China [J]. *J Northeast Forest Univ* (东北林业大学学报), 2003, 31(4): 26-29.
- [3] Yang R M. Study on comparison of nutrients between three kinds of velvet antlers [J]. *Guangdong Micro Element Sci* (广东微量元素科学), 2000, 7(12): 47-51.
- [4] Huo Y S, Huo H. The differential expression of nerve growth factors from fresh Pilose antler [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol* (中药新药与临床药理), 1997, 8(2): 79-81.
- [5] Fan Y. Study on the extraction separation and anticancer activity [J]. *J Econom Anim* (经济动物学报), 1998, 2(1): 27-31.
- [6] Weng L, Zhou Q L, Wang B X, et al. A new polypeptide promoting epidermal cells and chondrocytes proliferation from *Cervus elaphus* Linnaeus [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2001, 36(12): 913-916.
- [7] Wang F, Zhou Q L, Wang B X, et al. Research on the purification and characterization of polypeptide from velvet antler [J]. *J Jilin Univ: Sci Ed* (吉林大学学报:理学版), 2003, 41(1): 111-114.
- [8] Wang J H, Li Q, Lu Z Q, et al. The extraction and nature of collagen from deer skin [J]. *J Jilin Univ: Nat Sci* (吉林大学自然科学学报), 2001(1): 106-108.

大孔吸附树脂分离纯化黄连总生物碱的工艺研究

徐晓宏¹, 张铁军^{2*}, 廖茂梁², 刘可越³, 王文芳⁴, 吴延吉⁴

(1. 天津中医药大学, 天津 300193; 2. 天津药物研究院 中药现代研究部, 天津 300193;
3. 九江学院, 江西 九江 332005; 4. 天津大学, 天津 300072)

摘要:目的 研究大孔吸附树脂纯化黄连总生物碱的工艺。方法 采用 LD605、D101、DA201、NKA-9、AB-8 大孔吸附树脂对黄连总生物碱进行吸附纯化。以总生物碱的收率、质量分数为考察指标综合评价。结果 AB-8 大孔吸附树脂具有最佳的吸附洗脱参数, 其动态饱和和吸附-洗脱量达 1.23 mg/g, 2 倍体积蒸馏水、2 倍体积 40% 乙醇依次洗脱, 总生物碱收率为 85%, 质量分数为 80%。结论 AB-8 大孔吸附树脂对总生物碱综合性能较好, 适合于黄连总生物碱的分离纯化。

关键词: 黄连; 总生物碱; AB-8 树脂; 分离纯化

中图分类号: R286.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2007)08-1167-04

Separation and purification of total alkaloid from *Rhizoma Coptidis* by macrorreticular adsorbent resin

XU Xiao-hong¹, ZHANG Tie-jun², LIAO Mao-liang², LIU Ke-yue³, WANG Wen-fang⁴, WU Yan-ji⁴

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China; 2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China; 3. Jiujiang University, Jiujiang 332005, China; 4. Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: **Objective** To study the technology for purification of total alkaloids from *Rhizoma Coptidis* by macrorreticular adsorbent resin. **Methods** LD605, D101, DA201, NKA-9, and AB-8 types of macrorreticular adsorbent resins were used to separate and purify the total alkaloid from *Rhizoma Coptidis*. The yields and purities of the products were compared as indexes. **Results** AB-8 Type macrorreticular adsorbent resin had optimum adsorption and elution parameters with its dynamic saturated adsorption ratio up to 1.23 mg/g. After eluted with 2 BV of distilled water and 2 BV 40% ethanol, the yields of total alka-

收稿日期: 2006-10-08

作者简介: 徐晓宏, 女, 在读硕士, 主要方向为中药研究与开发。

* 通讯作者 张铁军 Tel: (022)23006848