

· 制剂与质量 ·

# 梅花鹿鹿茸中促 PC12 细胞增殖蛋白的分离和活性研究

柯李晶<sup>1</sup>, 聂毅磊<sup>1</sup>, 叶秀云<sup>1</sup>, 霍玉书<sup>2</sup>, 饶平凡<sup>1</sup>, 周建武<sup>1\*</sup>

(1. 福州大学生物工程研究所, 福建 福州 350002; 2. 美国德州大学胜安托尼奥健康科学中心, 德州 78229-3900, 美国)

**摘要:**目的 对冻干鹿茸水溶性组分进行分离, 并考察鹿茸水溶性组分及其分离组分对 PC12 细胞的促增殖活性。方法 应用 S-200 分子筛凝胶液相色谱和 DEAE 阴离子交换液相色谱分离鹿茸水溶性组分, 进行蛋白质 SDS-PAGE 电泳分析, Folin-酚法测定鹿茸样品中的蛋白, 并用 MTT 法测定 PC12 细胞增殖率。结果 鹿茸水溶性组分在 13.3 mg/mL 能促进 PC12 细胞增殖 47% ( $P < 0.01$ ), 其蛋白质量分数为 84.2%; 经分子筛色谱分离的 S200-P2 组分具显著促 PC12 细胞增殖活性 (46.0%, 97.0  $\mu\text{g/mL}$ ,  $P < 0.01$ ); 经离子交换色谱进一步分离的 DEAE-P1 组分在 51.0  $\mu\text{g/mL}$  下的 PC12 细胞的增殖率为 111.5% ( $P < 0.001$ )。DEAE-P1 组分的蛋白主要集中分布于 Mr 56 000 和大于 Mr 100 000 处。结论 冻干鹿茸的水溶性组分及其液相色谱分离的一个大分子蛋白组分具有显著的促 PC12 细胞增殖活性, 提示这个组分与鹿茸的神经生长因子样活性相关。

**关键词:**鹿茸; 分子筛色谱; 阴离子交换色谱; PC12 细胞; 细胞增殖

**中图分类号:** R284.2; R286.02 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2009)05-0715-04

## Isolation and PC12 cell proliferative protein fraction from pilose antler and its activity

KE Li-jing<sup>1</sup>, NIE Yi-lei<sup>1</sup>, YE Xi-yun<sup>1</sup>, HUO Yu-shu<sup>2</sup>, RAO Ping-fan<sup>1</sup>, ZHOU Jian-wu<sup>1</sup>

(1. Institute of Biotechnology, Fuzhou University, Fuzhou 350002, China; 2. Health Science Center at San Antonio, The University of Texas, Texas 78229-3900, USA)

**Abstract : Objective** The lyophilized pilose antler water extract (PAE) was isolated, and their cell proliferation on PC12 cells was observed. **Methods** S-200 Size-exclusive gel and DEAE negative ion-exchange liquid chromatograph were employed to fractionate the PAE. SDS-PAGE was employed to analyze the proteins composition of PAE. The protein concentration was determined by Folin-Phenol assay. The proliferation rates of PC12 cells were measured by MTT assay. **Results** The proliferation rate of PAE on PC12 cells at 13.3 mg/mL was 47% ( $P < 0.01$ ). PAE's protein content is 84.2%. The PAE was fractionated and obtained two active fractions: S200-P2 and DEAE-P1, whose cells proliferation rates were 46% (97.0  $\mu\text{g/mL}$ ,  $P < 0.01$ ) and 111.5% (51.0  $\mu\text{g/mL}$ ,  $P < 0.001$ ), respectively. DEAE-P1 mainly had proteins of Mr 56 000 and higher than Mr 100 000 molecular weight. **Conclusion** The cell proliferation of PAE and its chromatographic fraction indicate that this fraction may attribute to pilose antler's nerve growth factor-like activity.

**Key words:** pilose antler; size-exclusive chromatography; negative ion-exchange chromatography; PC12 cells; cell proliferation

鹿茸系脊索动物门哺乳纲动物梅花鹿 *Cervus nippon* Temminck 或马鹿 *C. elaphus* L. 的雄性未骨化密生茸毛的幼角<sup>[1]</sup>。鹿茸的神经生长迅速, 且每年进行周期性替换, 推测鹿茸中可能含有丰富的神经生长因子。Garcia 等<sup>[2]</sup>采用半定量的 RT-PCR 法发现 N T-3 (neurotrophin-3) mRNA 在鹿茸顶部的表皮层的表达最高, 而在软骨层最低, 这与上述组

织的神经分布情况一致。霍玉书等<sup>[3]</sup>发现冻干梅花鹿鹿茸的相对分子质量大于 10 000 超滤组分具有神经生长因子样活性, 能刺激神经纤维的生长和分化, 其对 PC12 细胞的促分化作用的最佳质量浓度为 18.5  $\mu\text{g/mL}$ 。虽然已知鹿茸含有氨基酸、多胺、核酸、酯类、激素、多糖以及维生素等成分<sup>[4]</sup>, 但鹿茸中的神经生长因子样活性分子还未得到分离和鉴

\* 收稿日期: 2008-09-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20672021)

作者简介: 柯李晶 (1977-), 男, 福建省福州市人, 福州大学生物工程研究所所长助理, 研究实习员, 英国爱丁堡大学在读生物医药专业博士生, 多年从事蛋白质生化和中草药有效成分研究工作, 已发表相关论文 7 篇, 并多次参加相关国际学术会议及做大会报告。Tel: (0591) 87893047 Fax: (0591) 83732462 E-mail: fzkj@fzu.edu.cn

\* 通讯作者 周建武

定。本研究对冻干鹿茸水溶性组分的促 PC12 细胞增殖作用进行测定,并对其活性成分进行液相色谱分离和活性评价。

## 1 材料与仪器

鹿茸二杠茸冻干粉为美国德州大学胜安东尼奥健康科学中心前大连药物研究所所长霍玉书教授馈赠并鉴定,采自辽宁省新宾县加禾天山种鹿厂 4 岁雄性梅花鹿。PC12 大鼠肾上腺嗜铬细胞 (pheochromocytoma cells, 上海生物化学研究所细胞库)。

Sephacryl S-200HR (瑞典 Pharmacia 公司); 0.02% EDTA 和 0.25% 胰蛋白酶;培养基 RPMI 1640;小牛血清;MTT (1 mg/mL, 溶于 PBS 中);二甲亚砜(DMSO);丙烯酰胺(超级纯,上海生化所中华公司);指示剂溴酚蓝(超级纯);SDS、*N,N*-甲双丙烯酰胺、1,4-二硫代苏糖醇、甘氨酸、TRIS、TEMED、溶菌酶(LYS)、碳酸酐酶(CA)、兔磷酸化酶 B、卵白蛋白(OVA)、牛血清白蛋白(BSA)、 $\beta$ -半乳糖苷酶( $\beta$ -gal)均为生化级试剂;其余试剂均为分析纯。

WXJ-9388 型核酸蛋白检测仪(浙江康特高科生物仪器有限公司);SJ-1211 型蠕动泵(日本 ATTO 公司);BD112 型记录仪(荷兰 Kipp & Zonen 公司);Bio  $\lambda$ -10 型可见紫外分光光度计(美国 PE 公司);Mini Protein II 电泳槽(美国 BIO-RAD 公司);DF-C 恒压恒流电泳仪(东方特力科贸中心);1285 型超净工作台(美国 Thermo Forma 公司);3111 型二氧化碳培养箱(美国 Thermo Forma 公司);DG5031 型酶联免疫检测仪(国营华东电子管厂);37XA 倒置显微镜(上海光学仪器厂);AG204 电子分析天平(北京赛多利斯天平有限公司)。

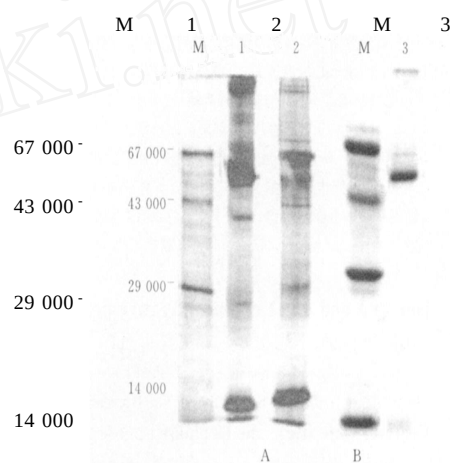
## 2 方法与结果

2.1 鹿茸水溶性组分的制备:取二杠茸,切片冻干磨粉,取粉 15 g 溶于 100 mL 去离子水,于 4 °C 下磁力搅拌器搅拌抽提过夜。所得抽提样品在 4 °C 下 12 000 r/min 离心 15 min,收集上清液,冻存于 -20 °C。

2.2 鹿茸水溶性组分蛋白质的测定和 SDS-PAGE 电泳分析:以牛血清白蛋白为标准蛋白,按 Lowry 法测定蛋白质的质量浓度,计算得鹿茸冻干粉中蛋白的质量分数为 84.2%。

2.3 鹿茸水溶性组分的 SDS-PAGE 电泳分析:参照 Laemmli 方法<sup>[5]</sup>进行电泳,不连续胶系统,4%浓缩胶和 7.5%或 12.5%分离胶,考马斯亮蓝法染色。标准蛋白(Marker MBI 公司)为兔磷酸化酶 B (Mr

97 400)、牛血清白蛋白(Mr 66 200)、卵清蛋白(Mr 43 000)、碳酸酐酶 (Mr 29 000)、溶菌酶 (Mr 14 400),结果见图 1。可知鹿茸中蛋白质的相对分子质量分布范围较广,从小于 14 000 到大于 100 000,但主要集中在 10 000~56 000 和大于 100 000 处。加入还原剂  $\beta$ -巯基乙醇后,位于约 Mr 56 000 的蛋白上移到约 Mr 70 000 处,说明它们含有链内二硫键;而大于 100 000 处的蛋白的量显著减少,说明这些蛋白内含有链间二硫键。



M-标准蛋白 1-鹿茸(非还原)  $\beta$ -巯基乙醇 2-鹿茸(还原)  
3-S200-P2(非还原)

M-Marker 1-pilose antler (non-reduced)  $\beta$ -mercaptoethanol  
2-pilose antler (reduced) 3-S200-P2 (non-reduced)

图 1 冻干鹿茸水提物及其分离组分银染(A)和考马斯亮蓝染色(B)的 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 1 SDS-PAGE of PAE and its liquid chromatographic fractions argentation (A) and Commassie Blue Staining (B)

2.4 鹿茸水溶性组分的液相色谱分离:首先用 Sephacryl S-200HR 分子筛凝胶过滤色谱对 PAE 进行分离。Sephacryl S-200HR 凝胶柱(500 mm  $\times$  16 mm),用 0.05 mol/L, pH 6.7 的磷酸盐(含 0.2 mol/L NaCl)缓冲液充分平衡。取鹿茸水溶性组分样品,解冻后用 80%硫酸铵沉淀蛋白组分,后用平衡缓冲液重融得到可溶性蛋白组分。取此蛋白组分 3 mL,上样,流量 0.5 mL/min,以含 0.2 mol/L  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  的平衡缓冲液进行分离,收集各个色谱峰,结果见图 2。可见共分成 P1~P5 5 个组分,其 SDS-PAGE 电泳图谱见图 1,蛋白带主要集中在约 Mr 56 000(P2 组分)和大于 Mr 100 000 处。

将 P2 组分即 S200-P2 用截留相对分子质量为 8 000~10 000 的透析膜,在去离子水中过夜透析除盐,期间换水 1 次。所得透析样品进行 DEAE-

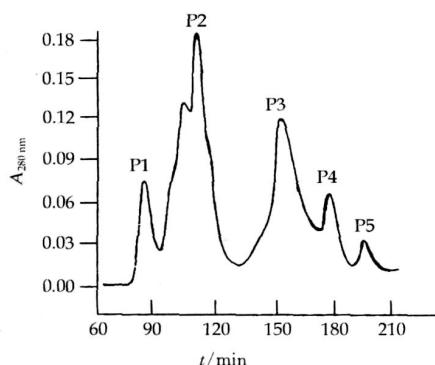


图 2 鹿茸水溶性组分 PAE 的 S-200 分子筛色谱图

Fig. 2 S-200 Size-exclusive chromatogram of PAE

TOYOPEARL 650M 阴离子交换色谱分离, DEAE-TOYOPEARL 650M 色谱柱 (100 mm × 10 mm), 取 5 mL S200-P2 透析后样品, 加入 45 mL 0.02 mol/L 磷酸盐平衡缓冲液 (pH 6.7) 稀释 10 倍, 流动上样, 充分平衡并收集未吸附组分, 再以含 1 mol/L NaCl 的磷酸盐缓冲液连续梯度洗脱, 流量 1.0 mL/min, 收集各洗脱峰, 结果见图 3。可见分为 3 个组分, 经 SDS-PAGE 电泳分析 (图 4), DEAE-P1 组分的蛋白主要集中在  $M_r$  56 000 和大于  $M_r$  100 000 处, 在  $M_r$  97 000 处也有一条电泳带, 且各分离组分的蛋白质相对分子质量的组成较为相似 (数据未列出)。

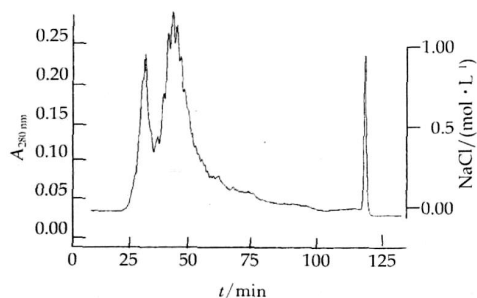


图 3 S200-P2 组分的 DEAE-TOYOPEARL 650M 阴离子交换色谱分离

Fig. 3 DEAE-TOYOPEARL 650M Ion-exchange chromatogram of S200-P2

## 2.5 鹿茸水溶性组分原样和各个色谱分离组分的促 PC12 细胞增殖活性测定

2.5.1 PC12 细胞培养: 于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养, 每周更换培养基 2~3 次, 用 0.25% 胰蛋白酶-0.2% EDTA 工作液消化分散细胞, 进行传代或接种培养。

2.5.2 体外促细胞增殖活性的测定<sup>[6,7]</sup>: 对数生长期的 PC12 细胞, 0.25% 胰蛋白酶-0.02% EDTA 工

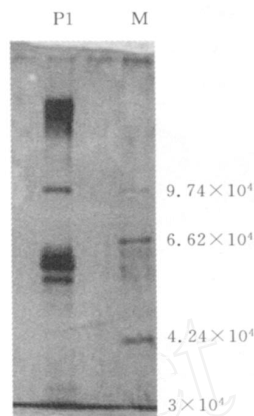


图 4 DEAE-P1 组分的 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 4 SDS-PAGE of DEAE-P1 fraction

作液消化, 加入适量培养基 (含热灭活的小牛血清), 吹打分散, 300 × g 离心 5 min, 再以适量无血清 RPMI 1640 培养基清洗细胞 3 次, 并孵育 1 h 后, 重新悬浮细胞, 浓度为  $4 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4$  /mL, 接种至 96 孔培养板 (每孔 190 μL), 每孔加入待测样品 50 μL, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h, 移除培养液, 每孔加入 MTT 溶液 50 μL (1 mg/mL 溶于 PBS 中), 37 °C、3 h, 移除 MTT 溶液, 每孔加入二甲亚砜 150 μL, 充分振荡, 待所形成的结晶物完全溶解后, 用酶联免疫检测仪测定 A<sub>590 nm</sub> 值, 计算细胞增殖率 [细胞增殖率 = (实验组平均 A<sub>590 nm</sub> - 空白对照 A<sub>590 nm</sub>) / 空白对照 A<sub>590 nm</sub> × 100%]。

用 Excel 2002 软件对所有的实验数据进行双尾、异方差假设 *t* 检验, 对鹿茸水溶性组分各分离组分影响 PC12 细胞增殖的结果进行配对检验。将色谱分离各组分透析、经 0.22 μm 滤膜滤过除菌后, 测定其对 PC12 细胞的促增殖作用, 结果见表 1 和 2。可见鹿茸原样在 13.3 mg/mL 时的促 PC12 细胞的增殖率为 47% ( $P < 0.01$ ), 证明鹿茸中具有较为明显的促 PC12 细胞增殖的活性; S200 凝胶色谱分离的 S200-P2 组分在 97 μg/mL 时的 PC12 细胞的增殖率为 46% ( $P < 0.01$ ); DEAE 阴离子交换色谱分离的 DEAE-P1 组分在 51.0 μg/mL 时的 PC12 细胞的增殖率为 111.5% ( $P < 0.001$ ), 明显高于 S200-P2 组分的促增殖活性, 故 DEAE-P1 为活性组分。其余分离组分对细胞增殖的影响皆无显著性差异。

## 3 讨论

本研究采用冷冻干燥鹿茸, 最大限度的保留其生长因子活性。蛋白质量分数约为 84.2%, 是冻干鹿茸的主要成分。鹿茸或其饮片中已知的成分未能

表 1 鹿茸 S200 各收集峰促 PC12 细胞增殖活性检测( n = 4)  
Table 1 PC12 Cell proliferation rate of S200 chromatographic fractions of pilose antler ( n = 4)

| 组 别      | 细胞增殖率/ %     |
|----------|--------------|
| 空白对照     | 0.0 ±3.0     |
| PAE 蛋白原样 | 47.3 ±7.5**  |
| P1       | 15.5 ± 9.2   |
| P2       | 45.9 ± 8.6** |
| P3       | 17.8 ± 5.4   |
| P4       | 13.5 ± 6.7   |
| P5       | 0.5 ±10.1    |

与空白对照组比较: \*\*P < 0. 01

\*\*P < 0. 01 vs blank control group

表 2 S200-P2 的 DEAE 色谱分离各组分促 PC12 细胞增殖活性检测( n = 5)  
Table 2 PC12 Cell proliferation rate of DEAE chromatographic fractions from S200-P2 fraction ( n = 5)

| 组 别      | 细胞增殖率/ %       |
|----------|----------------|
| 空白对照     | 0.0 ± 8.1      |
| PAE 蛋白原样 | 8.9 ± 9.6      |
| P1       | 111.5 ±22.6*** |
| P2       | - 5.4 ±7.0     |
| P3       | 0.0 ±6.1       |
| P4       | - 9.9 ±27.1    |

与空白对照组比较: \*\*\*P < 0. 001

\*\*\*P < 0. 001 vs blank control group

充分解释鹿茸的药理作用,作为鹿茸中含的最多的物质蛋白质及其衍生物可能对鹿茸的药理作用有重要贡献或影响。

冻干鹿茸水溶性组分具有促大鼠成骨样细胞 UMR-106 增殖活性,增殖率为 499. 6 %,其分子筛色谱分离的一个组分对该细胞的生长有调节作用,在 9. 72 mg/ mL 时促大鼠成骨样细胞增殖率为 477. 9 %<sup>[8]</sup>;从中纯化得到的鹿血清白蛋白相对分子质量为 56 300,在 0. 014 9~14. 9 μg/ mL 具有促 UMR-106 细胞增殖活性<sup>[9]</sup>。而本研究中的 DEAE-P1 组分具有促 PC12 细胞增殖作用,其蛋白主要分布在相对分子质量 56 000 和大于 100 000 两处。由于相对分子质量为 56 000 左右的蛋白很可能就是前述鹿血清白蛋白,未发现促 PC12 细胞增殖活性。据此推测相对分子质量大于 100 000 的蛋白可能是促 PC12 细胞增殖的活性因子。

本研究所用的鹿茸水溶性组分对 PC12 细胞的促增殖率为 47. 0 %,活力远低于同样组分在同样浓度下对 UMR-106 细胞的 499. 6 %<sup>[8]</sup>。由于冻干鹿茸提取物含有促 PC12 细胞分化因子<sup>[3]</sup>,故推测鹿

茸水溶性组分对 PC12 细胞促增殖活性可能受到促分化活性因子的抑制。鹿茸水溶性组分的凝胶色谱分离组分在 97. 0 μg/ mL 下对 PC12 细胞的促增殖活性为 46. 0 % (P < 0. 01), 与其对 UMR-106 细胞的活性相近(62. 6 %, P < 0. 05),提示经过凝胶色谱分离,除去了鹿茸水溶性组分中抑制 PC12 细胞增殖的因子。对该组分进一步用阴离子交换液相色谱进行分离后,所得活性组分促 PC12 细胞增殖活性提高了约 2. 4 倍,且有效作用浓度(51. 0 μg/ mL)降低了近 1 倍,比活性提高了近 5 倍,而该分离步骤的蛋白纯度仅提高 1 倍。据此推断,S200 组分中的细胞增殖抑制因子得以进一步去除。

鹿茸多肽能促进大鼠坐骨神经和周围神经损伤后的神经再生、分化和功能恢复<sup>[10,11]</sup>。本研究报道鹿茸活性蛋白在体外具有促 PC12 细胞增殖的作用,其相对分子质量可能大于 100 000,提示鹿茸对神经损伤的疗效也可能与其蛋白组分有关,但这种关联性还有待进一步体内动物模型实验来证实。

本研究证明了冻干鹿茸中水溶性蛋白组分对 PC12 细胞的促增殖活性,并初步分离得到了活性蛋白组分,但活性蛋白还有待进一步纯化和鉴定。此外,对促增殖活性蛋白与 PAE 中的促分化活性因子的协调作用关系的深入研究,也将为鹿茸治疗神经系统疾病的疗效提供更全面的药理解释。

参考文献:

[1] 中国药典[S]. 一部. 2005.  
[2] Garcial R L. Expression of NT-3 in the growing valver antler of the red deer cervus elaphus [J]. J Mol Endocrinol, 1997,19(2):173-182.  
[3] 霍玉书,霍虹. 鹿茸神经生长因子活性及促分化作用的研究[J]. 中药新药与临床药理,1997,6(8):79-81.  
[4] 李和平. 中国茸鹿品种(品系)的鹿茸化学成分[J]. 东北林业大学学报, 2003,4: 28-30.  
[5] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227(259): 680.  
[6] Rusell C A, Vindelov L L. Optimization and comparision of the MTT assay and the 3H-TdR assay for the detection of IL-2 in Helper T cell precursor assays [J]. J Immunol Methods,1998, 217(122): 165.  
[7] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survial: application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. J Immunol Methods,1983,65:55.  
[8] 陈晓超,柯李晶,陈躬瑞,等. 鹿茸粗提液对大鼠成骨肉瘤细胞增殖的调节作用[J]. 中国中药杂志,2004,28(1):74-77.  
[9] 林冬云,黄晓南,柯李晶,等. 鹿茸中促大鼠成骨样细胞增殖活性组分的纯化与表征[J]. 中国中药杂志,2005,30(11):851-855.  
[10] 王克利,路来金,宫旭,等. 鹿茸多肽-PLGA 复合膜促进大鼠周围神经再生 [J]. 吉林大学学报:医学版,2006,32(2): 199-202.  
[11] 李立军,路来金,陈雷. 鹿茸多肽促进大鼠坐骨神经再生的实验研究[J]. 辽宁中医杂志,2004,31(4):343-344.