

酪蛋白抗凝血肽的制备及其体外抗凝血、溶栓作用研究

苗艳丽¹, 刘卓勤¹, 孙瑞雄¹, 李卫东¹, 廖艳², 陈绍红^{2*}

1. 广东海洋大学理学院, 广东 湛江 524088

2. 广东海洋大学 现代生物化学中心, 广东 湛江 524088

摘要: **目的** 研究抗凝血肽的制备、分离方法及其体外抗凝血、溶栓效果。**方法** 用木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、中性蛋白酶和碱性蛋白酶对酪蛋白进行4酶混合水解制备抗凝血肽,以固定化凝血酶对抗凝血肽进行萃取,用新西兰兔进行体外抗凝血、溶栓实验。**结果** 实验确定的抗凝血肽制备条件为酪蛋白质量浓度15%,水解每克酪蛋白的木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、中性蛋白酶和碱性蛋白酶用量分别为1 500、2 400、1 000、1 250 U,水解温度50 ℃,pH 7.0,水解时间4 h。固定化凝血酶萃取抗凝血肽的初始浓度6 ATU/mL,萃取温度30 ℃,pH 5.0,萃取时间30 min。反萃取温度30 ℃,pH 7.6,反萃取时间40 min。抗凝血肽经高效体积排阻色谱分析,主要成分分子大小与马尿酸-组氨酰-亮氨酸相当。体外抗凝血时间超72 h,溶栓时间24 h。**结论** 酪蛋白抗凝血肽主要成分为3肽,体外抗凝血及溶栓实验效果良好。

关键词: 抗凝血肽;酪蛋白;抗凝血;溶栓;木瓜蛋白酶;菠萝蛋白酶;中性蛋白酶;碱性蛋白酶;凝血酶;高效体积排阻色谱;马尿酸-组氨酰-亮氨酸

中图分类号: R973.2; TS252.42

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2016)11-1875-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.11.011

Preparation of anticoagulant peptide from casein and study on thrombolysis and anticoagulation *in vitro*

MIAO Yan-li¹, LIU Zhuo-qin¹, SUN Rui-xiong¹, LI Wei-dong¹, LIAO Yan², CHEN Shao-hong²

1. College of Science, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China

2. Center of Modern Biochemistry of Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China

Abstract: Objective To study the preparation and separation method for anticoagulant peptide and the effect of anticoagulation and thrombolysis *in vitro*. **Methods** The casein was hydrolyzed to prepare anticoagulant peptide using the mixed four enzymes such as papain, pineapple proteinase, neutral protease, and alkali protease. The anticoagulant peptide was extracted using immobilized thrombin. The effect of haemolysis and anticoagulation *in vitro* was investigated through the New Zealand rabbits experiments. **Results** The conditions of preparation anticoagulant peptide were as follows: quality of casein was 15%, papain proteinase, pineapple proteinase, neutral protease, and alcalase dosage were 1 500, 2 400, 1 000, and 1 250 U/(g casein), respectively, temperature was 50 ℃, pH value was 7.0, and hydrolysis time was 4 h. The conditions for the extraction of anticoagulant peptide were as follows: the initial concentration was 6 ATU (Anti Thrombin Unit)/mL, temperature was 30 ℃, pH value was 5.0, and time was 30 min. Anti-extraction temperature was 30 ℃, pH value was 7.6, and time was 40 min. The purified anticoagulant peptide was analyzed via high performance size exclusion chromatography. The molecular weight of purified anticoagulant peptide was equal to *N*-Hippuryl-His-Leu hydrate and the main components were three peptides. The time of anticoagulation was more than 72 h and the time of hemolysis was 24 h *in vitro*. **Conclusion** The main components of anticoagulant peptides are three peptides. The effect of hemolysis and anticoagulation *in vitro* is good.

Key words: anticoagulant peptide; casein; anticoagulant activity; thrombolytic; papaya protease; pineapple protease; neutral protease; alkaline protease; thrombin; high performance size exclusion chromatography; *N*-Hippuryl-His-Leu hydrate

收稿日期: 2016-01-08

基金项目: 广东省湛江市科技计划项目(2013B01073); 广西科学研究与计划开发项目(桂科合14125008-1-10); 广东海洋大学创新强校项目(GDOU2015050209); 广东省教育厅2015年重点平台及科研项目(2015KTCX057)

作者简介: 苗艳丽(1978—),女,副教授,博士,研究方向为中药新产品的开发。Tel: (0759)2383300 E-mail: myl9831@163.com

*通信作者 陈绍红,女,硕士,高级实验师,研究方向为中药新产品的开发。Tel: (0759)2383477 E-mail: csh3788@163.com

心脑血管疾病已成为我国发病率、致死率最高的疾病,其中大部分疾病与血栓相关^[1]。血管内血栓形成的主要因素是凝血酶诱发的血液凝固^[2]。凝血酶分子表面有一个富含碱性氨基酸的活性部位(fibrinogen recognition site, FRS),能特异性与纤维蛋白原结合并将其裂解成为纤维蛋白导致血液凝固^[3]。天然水蛭素是从吸血水蛭唾液腺中分离出来的多肽^[4],C 端为活性部位,含较多酸性氨基酸,具有强烈的抗凝血酶活力,对防治多种血栓性疾病以及溶解术后形成的血栓都有较好效果^[5-6],国内外试图将其开发成新一代高效特异性抗凝、溶栓药物^[1]。水蛭素 C 端与凝血酶分子 FRS 在一定 pH 条件下按 1:1 结合,形成凝血酶-水蛭素复合物,抑制了凝血酶对纤维蛋白原的激活作用,避免了血液的凝固。根据该原理,利用凝血酶滴定改进法^[7]可以水蛭素标准液测定凝血酶的浓度,从消耗的水蛭素量得知凝血酶的量;或者以凝血酶标准液测定水蛭素的浓度,根据消耗的凝血酶量得知水蛭素的量。

固定化酶在保持高效专一及温和的催化特性的同时,又呈现稳定性高、分离回收容易、可多次重复使用等一系列优点^[8]。本实验采用脱胶家蚕丝素为载体、戊二醛为交联剂制备固定化凝血酶(immobilization of thrombin, IT)。

天然水蛭素的来源有限制约了其广泛使用。研究发现,酪蛋白分子中含有若干具有抗凝血酶活性的肽段[抗凝血肽(anticoagulant peptide, AP)、抗血栓肽]^[9-10],在合适的工艺条件下水解酪蛋白,可获得功能与水蛭素类似的 AP。研究发现,六肽及以下的小肽能被肠道直接吸收^[11]。为了获得可以被肠道直接吸收的 AP,本实验以酪蛋白为原料进行 AP 的制备、分离实验。过程先以木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、中性蛋白酶和碱性蛋白酶进行 4 酶混合水解,使酪蛋白中富含酸性氨基酸、能与 FRS 特异性结合的 AP 释放出来,然后用 IT 进行分离、纯化。在一定 pH 条件下用 IT 萃取水解物,AP 与 FRS 通过离子键特异性结合,形成 IT-AP 复合物,弃去液相收集复合物。在反萃取时,调节溶液 pH 改变 FRS 或 AP 的带电状态,使 IT 与 AP 之间的离子键断裂,复合物解体,AP 重新释放回滤液相,分离回收 IT 得 AP。通过凝血酶滴定改进法以凝血酶标准液测定 AP 的浓度,通过体外抗凝血、溶血栓实验,初步评价其活性的强弱,利用高效体积排阻色谱(HPSEC)法测定 AP 的相对分子质量(M_r)分

布范围。利用固定化凝血酶来分离纯化抗凝血肽目前国内外很少报道。本实验旨在为开发以酪蛋白为原料的防治血栓性疾病的口服小肽类药物或功能性食品提供理论及实验依据。

1 仪器与材料

凝血酶对照品,长春国奥药业有限公司,批号 110526-3,500 NIH/瓶;质量分数 25%戊二醛(分析纯)、酪蛋白(化学纯),国药集团试剂有限公司;木瓜蛋白酶(Pa) 4×10^5 U/g、菠萝蛋白酶(Br) 5×10^5 U/g、中性蛋白酶(NP) 2×10^5 U/g、碱性蛋白酶(AP) 4×10^5 U/g,广西庞博公司,食品级;牛血纤维蛋白原,美国 Biosharp 公司,进口分装;水蛭素对照品,广西科康公司,批号 110617,电泳纯;磷酸异构酶(triosephosphate-isomerase, M_r : 26 625)、肌球蛋白(myoglobin, M_r : 16 950)、抑肽酶(aprotinin, M_r : 6 512)、胰岛素 B (insulin-B, M_r : 3 496)、杆菌肽(bacitracin, M_r : 1 423)、马尿酸-组氨酸-亮氨酸(N-Hippuryl-His-Leu hydrate, M_r : 433),上海阳光试剂有限公司,色谱纯;其他试剂均购自国药集团试剂公司;蛭壳,广东省高州市丝绸公司提供。

实验采血用的新西兰兔体质量 2 450 g,雌性,购自湛江双林药业有限公司实验动物中心。

VirTis Benchtop V2K 冷冻干燥机,美国 VirTis 公司;LC-20A 高效液相色谱仪,日本岛津公司;CR22G 高速冷冻离心机,HITACHI 公司;TU-1901 双光束紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限公司;PHS-2F pH 计,上海雷磁新泾仪器有限公司;EL200 电子天平,日本岛津公司;JB-2 恒温磁力搅拌器,金坛市富华仪器有限公司;三用电热恒温水箱,北京长安科学仪器厂;F100 数码照相机,日本富士公司。

2 方法与结果

2.1 检测与分析方法

2.1.1 水蛭素浓度测定及标准溶液的制备 水蛭素浓度用单位体积溶液中抗凝血酶活力单位(ATU)数量多少(ATU/mL)表示,测定方法为凝血酶滴定改进法^[7]。取一定量水蛭素对照品用适量 pH 5.0 生理盐水溶解,配成浓度为 20 ATU/mL 的滴定液,即为水蛭素标准溶液。

2.1.2 凝血酶标准溶液的制备 凝血酶浓度用单位体积溶液中凝血酶活力单位(NIH)数量多少(NIH/mL)表示。取一定量凝血酶对照品用适量 pH

5.0 生理盐水溶解, 配成浓度 20 NIH/mL 的滴定液, 即为凝血酶标准溶液。

2.1.3 凝血酶溶液的活力测定及溶液系列的制备 本实验的凝血酶浓度测定以水蛭素标准溶液参照凝血酶滴定改进法进行^[7]。取一定量凝血酶对照品用合适 pH 值生理盐水溶解, 配制成不同 pH 值、不同浓度的凝血酶溶液系列, 备用。

2.1.4 脱胶丝素的制备与交联(活化) 茧壳剪碎称取一定质量, 参考文献方法^[12]制成活化丝素(载体)。

2.1.5 IT 的制备^[13] 取载体适量按 1:400 的量加入一定浓度的凝血酶溶液, 于不同 pH 值、不同温度下固定不同时间, 以确定制备 IT 的工艺条件。过滤收集 IT, 用 0.2 mol/L pH 7.6 磷酸缓冲液(含 0.5 mol/L NaCl)洗至洗脱液于 280 nm 波长处无吸收, 吸干, 于 50 °C 烘干, 备用。

实验确定的 IT 制备工艺条件为凝血酶起始浓度 6 NIH/mL、pH 7.6、30 °C 固定 6 h。凝血酶起始浓度高于 6 NIH/mL, 酶分子数量远超过载体中的活化基团数量, 被固定的酶比例低而造成浪费; pH 值偏离 7.6, 凝血酶分子及载体中活化基团的解离状况不利于酶分子的固定; 固定温度 30 °C 时间 6 h, 被固定的酶比例达到最大, 无须再提高温度和延长时间。

2.1.6 4 种蛋白酶的最适水解条件确定 Pa、Br、NP、AP 4 种蛋白酶分别在一定条件进行酪蛋白溶液水解的单因素实验, 以确定各自的最适温度、pH 值、水解时间、酶用量、底物浓度(质量分数), 为 4 酶混合水解提供依据。

单因素实验结果表明, 各酶的最适水解条件为 Pa: 温度 50 °C、pH 6.8、底物浓度 6%、每克酪蛋白的酶用量 5 000 U、时间 4 h; Br: 温度 55 °C、pH 7.0、底物浓度 4%、每克酪蛋白的酶用量 12 000 U、时间 3.5 h; NP: 温度 50 °C、pH 7.0、底物浓度 5%、每克酪蛋白的酶用量 4 000 U、时间 3 h; AP: 温度 50 °C、pH 8.0、底物浓度 5%、每克酪蛋白的酶用量 5 000 U、时间 4 h。

2.1.7 酪蛋白溶液的 4 酶混合水解 混合酶水解是指若干种酶按一定比例混合均匀后, 在一定的温度、pH 等条件下水解底物一定时间, 以获得所需物质的过程。

为了获得能被直接吸收的小分子 AP, 本实验利用 4 种蛋白酶进行酪蛋白水解。如果采用复合酶水解法则工艺过于复杂, 水解时间过长。为了简化

实验, 本实验选择了混合酶水解法处理底物。

4 种酶的最适底物浓度之和为 20%, 该浓度的酪蛋白溶液黏度大难以搅拌, 影响水解效果。预试验结果表明, 底物浓度之和 15% 时效果较好, 因此将底物浓度之和降至 15%。AP 的最适 pH 值为 8.0, 其余 3 种酶为中性或接近中性, 水解 pH 值选择 7.0 时虽然 AP 活力受到一定影响, 但较适合其余 3 种酶, 总体效果较佳; Br 的最适水解温度为 55 °C, 另外 3 种酶均为 50 °C, 温度选择 50 °C 对水解的总体效果较有利; Pa、AP 的水解时间均为 4 h, 而 Br、NP 的分别为 3.5 h 和 3.0 h, 为了确保各种酶的水解效果而又不浪费时间, 水解时间选择 4 h。综合考虑, 混合酶水解条件组合为底物浓度之和 15%, pH 7.0、温度 50 °C、水解时间 4 h, 每克酪蛋白的加酶量 Pa 1 500 U、Br 2 400 U、NP 1 000 U、AP 1 250 U。

酪蛋白溶液按上述条件水解后, 迅速升温至 100 °C 保持 10 min, 放冷至室温后, 于 4 °C, 15 000 r/min 离心 20 min, 取上清液, 即得含 AP 的酪蛋白混合酶水解液。测得活力为 260 ATU/mL。

2.1.8 混合酶水解物的抗凝血酶活力测定 混合酶水解物的活力用 ATU 表示, 测定方法为凝血酶滴定改进法^[7]。

2.2 AP 的 IT 萃取的指标考察

萃取是通过调节酪蛋白混合酶水解液至一定 pH 值, 使 FRS 带正电荷的同时 AP 带负电荷, 电性相反基团之间在静电引力作用下形成离子键, 将 AP 结合在 IT 上面, 形成 IT-AP 复合物, 使之与其他成分分离的过程。

将酪蛋白溶液的混合酶水解物用蒸馏水稀释成一定浓度, 在一定条件下进行 AP 的 IT 萃取实验, 测定萃取后液体部分的 ATU, 计算 ATU 萃取率。

ATU 萃取率 = (萃取前溶液中抗凝血酶总 ATU - 萃取后溶液中抗凝血酶总 ATU) / 萃取前溶液中抗凝血酶总 ATU

每个实验取 IT 0.10 g, AP 溶液 40 mL 分别观察温度、pH、时间、AP 浓度的影响。萃取完毕, 滤过, 收集 IT-AP 复合物。

2.2.1 温度对萃取的影响 实验在 AP 浓度 8 ATU/mL、pH 5.3, 温度 20、25、30、35、40 °C 下分别萃取 40 min。反应结束后测定液相的 ATU 并计算活力回收率, 确定最适温度。

不同温度对萃取的影响结果分别为回收率 43.33%、57.92%、66.25%、65.83%、66.25%。温度低于 30 °C 时, 萃取率随温度升高而增加, 30 °C 达

到最大，再升高温度萃取率也不会再增加。估计是温度低于 30 ℃，随温度升高 AP 分子获得的能量相应增加，成为活化分子的数量相应增加，生成的 IT-AP 复合物数量也越多，萃取率随之增加。温度达到 30 ℃时，成为活化分子的 AP 数量达到最大、足以与全部 IT 的 FRS 结合，萃取率达到最高。此后尽管升高温度，因体系中已无游离的 FRS，复合物数量不会再增加。温度选择 30 ℃合适。

2.2.2 pH 值对萃取的影响 AP 浓度 8 ATU/mL、pH 值分别为 4.4、4.7、5.0、5.3、5.6，以“2.2.1”项确定的最适温度分别进行实验，萃取结束后测定液相的 ATU 并计算回收率，确定最适 pH 值。

不同 pH 值对萃取的影响结果分别为回收率 17.5%、44.17%、65.42%、50.83%、32.5%。pH 值低于 5.0，萃取率随 pH 值升高而增加，pH 5.0 时达到最大，pH 值高于 5.0，随 pH 值升高而降低。原因是 pH 值影响 FRS 碱性基团和 AP 的酸性基团解离，只有处于某一 pH 值条件下，FRS 带正电荷的基团数量与 AP 带负电荷的基团数量均达到最大，二者结合形成 IT-AP 复合物数量达到最多，萃取率达到最高。偏离该 pH 值，FRS 与 AP 双方或某一方的解离受到影响，带电荷的基团数量减少，形成的复合物数量减少，萃取率下降。本实验萃取 pH 值选择 5.0。

2.2.3 时间对萃取的影响 AP 浓度 8 ATU/mL，采用上述实验确定的最适温度和 pH 值，分别萃取 20、25、30、35、40 min。反应结束后测定液相的 ATU 并计算回收率，确定最适萃取时间。

时间对萃取的影响结果分别为回收率 46.67%、59.17%、65.00%、64.58%、64.58%。萃取时间过短，与 IT 结合的 AP 不多，萃取率自然不高。只有达到足够的时间，IT 与 AP 充分结合，萃取率才会达到最高。因为 IT 与 AP 的结合属于可逆反应，存在一个平衡点。到达平衡点前，反应随时间增加向 IT-AP 复合物生成方向移动，萃取率相应增加。到达平衡点时复合物浓度达到最大，萃取率达到最高。之后再延长萃取时间，复合物生成量也不会增加。萃取时间应为 30 min。

2.2.4 AP 浓度对萃取的影响 采用上述实验确定的最适温度、pH 值、时间，分别对 4、5、6、7、8 ATU/mL 溶液萃取。反应结束后测定液相的 ATU 并计算回收率，确定最适 AP 浓度。

AP 浓度对萃取的影响结果分别为回收率

54.58%、58.75%、64.17%、65.00%、64.17%。在萃取体系中，IT-AP 复合物的生成与分解处于动态平衡，该平衡的移动方向与 AP 及复合物浓度有密切关系。反应开始复合物浓度为 0 ATU/mL，平衡朝正反应方向移动；AP 浓度低形成的复合物浓度低，萃取率也低；AP 浓度增加复合物的浓度相应提高，虽然此时后者分解生成 IT 与 AP 的速率相应增加，但属非主流方向；AP 浓度达到一定以后，IT-AP 复合物的生成与分解速率相等，萃取率达到最大；此后再提高 AP 浓度萃取率变化也不明显。可知 AP 起始浓度选择 6 ATU/mL 合适。

2.3 AP 的 IT 萃取的正交试验

以萃取时间 (A)、AP 浓度 (B)、萃取温度 (C) 及 pH 值 (D) 进行 5 因素 4 水平正交试验，优化萃取的工艺条件。

2.3.1 正交试验操作 萃取正交试验安排、各因素的影响效果见表 1，方差分析见表 2。

表 1 L₁₆(4⁵) 正交试验设计与结果
Table 1 Design and results of L₁₆(4⁵) orthogonal test

试验号	A/min	B/ (ATU·mL ⁻¹)	C/°C	D	E(空白)	ATU 回 收率/%
1	20 (1)	4 (1)	20 (1)	4.4 (1)	(1)	24.58
2	20 (1)	5 (2)	25 (2)	4.7 (2)	(2)	30.21
3	20 (1)	6 (3)	30 (3)	5.0 (3)	(3)	66.67
4	20 (1)	7 (4)	35 (4)	5.3 (4)	(4)	39.17
5	25 (2)	4 (1)	25 (2)	5.0 (3)	(4)	46.25
6	25 (2)	5 (2)	20 (1)	5.3 (4)	(3)	34.17
7	25 (2)	6 (3)	35 (4)	4.4 (1)	(2)	51.25
8	25 (2)	7 (4)	30 (3)	4.7 (2)	(1)	48.33
9	30 (3)	4 (1)	30 (3)	5.3 (4)	(2)	58.33
10	30 (3)	5 (2)	35 (4)	5.0 (3)	(1)	59.17
11	30 (3)	6 (3)	20 (1)	4.7 (2)	(4)	60.42
12	30 (3)	7 (4)	25 (2)	4.4 (1)	(3)	47.08
13	35 (4)	4 (1)	35 (4)	4.7 (2)	(3)	37.51
14	35 (4)	5 (2)	30 (3)	4.4 (1)	(4)	47.50
15	35 (4)	6 (3)	25 (2)	5.3 (4)	(1)	52.54
16	35 (4)	7 (4)	20 (1)	5.0 (3)	(2)	51.25
K ₁	160.63	166.67	170.42	170.41	184.62	
K ₂	180.00	171.05	176.08	176.47	191.04	
K ₃	225.00	230.88	220.83	223.34	185.43	
K ₄	188.80	185.83	187.10	184.21	193.34	
R	64.37	64.21	50.41	52.93	8.72	

表 2 方差分析

Table 2 Analysis of variance

误差来源	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	545.320	3	40.162	$P < 0.01$
B	646.050	3	47.581	$P < 0.01$
C	382.071	3	28.139	$P < 0.05$
D	426.038	3	31.377	$P < 0.01$
E(误差)	13.578	3		

$F_{0.05}(3, 3) = 9.28$ $F_{0.01}(3, 3) = 29.46$

从表 1 的极差分析可知, 影响效果的大小顺序为 $A > B > D > C$; 表 2 的方差分析结果表明, A、B、D 均达到了极显著 ($P < 0.01$) 水平, C 达到了显著 ($P < 0.05$) 水平; 优选工艺条件为 $A_3B_3D_3C_3$, 即萃取时间 30 min、AP 浓度 6 ATU/mL、pH 5.0、萃取温度 30 °C。

2.3.2 优选工艺条件的验证试验 按照“2.1.5”项下制备方法, 制备 IT, 按照正交试验优选的最佳工艺条件进行了 3 组抗凝血肽的萃取试验, 验证优选的萃取工艺条件, 进行了 3 组平行实验验证优选工艺条件, 测定活力回收率分别为 69.17%、68.75%、69.17%, 平均回收率为 69.03%, 结果表明该优选工艺稳定。

2.4 反萃取的指标考察

反萃取是通过改变溶液的 pH 值, 破坏 IT 与 AP 之间的离子键, 使 AP 重新溶解在溶液中的过程。反萃取以 ATU 回收率(反萃取率)为指标进行评价。

ATU 回收率 = 反萃取后溶液中抗凝血肽总 ATU / 反萃取前溶液中抗凝血肽总 ATU

每个试验各取 20 mL 不同 pH 值的 0.20 mol/L 磷酸缓冲液, 上述吸附了 AP 的 IT 于不同温度、pH 值、时间进行反萃取。

2.4.1 温度对反萃取的影响 在 pH 7.4, 温度 20、25、30、35、40 °C 分别反萃取 50 min。之后, 分离并回收 IT, 测定液体 ATU, 计算反萃取率, 确定最适温度。

温度为 20、25、30、35、40 °C 对反萃取的影响结果分别为回收率 45.83%、57.50%、62.50%、61.67%、62.50%。温度变化对反萃取的影响主要表现在: 温度较低时 IT-AP 复合物获得的能力较少, 分解生成 IT 和 AP 的速率低, 释放出来的 AP 数量不多, ATU 回收率低; 随着温度的升高, 复合物分解速度加快, 释放出来的 AP 数量增加, ATU 回收

率升高; 30 °C 时到达平衡点, ATU 回收率达到最大; 温度超过此值以后, 复合物分解与结合反应继续处于平衡点, ATU 回收率不再随温度的升高而增加。反萃取温度选择 30 °C 合适。

2.4.2 pH 值对反萃取的影响 以“2.4.1”项确定的最适温度为反萃取温度, 在 pH 7.2、7.4、7.6、7.8、8.0 分别作用 50 min。反萃取后, 分离并回收 IT, 测定液体 ATU, 计算反萃取率, 确定最适 pH 值。

pH 值为 7.2、7.4、7.6、7.8、8.0 对反萃取的影响结果分别为回收率 50.83%、57.5%、60%、59.17%、59.17%。pH 值影响 IT-AP 复合物中酸性基团及碱性基团的带电情况, 从而影响离子键的形成与破坏。AP 中的酸性氨基酸残基于酸性环境中不带电、碱性环境中带负电荷; IT 中的碱性氨基酸残基于酸性环境中带正电荷、碱性环境中不带电。当反萃取 pH 值处于中性偏碱时, FRS 与 AP 间的离子键断裂, AP 重新释放回液相被反萃取; pH 值继续升高, ATU 回收率不断提高; pH 7.6 处达到最大, 因此时复合物的分解与重新生成已达到平衡点, ATU 回收率达到最大; 之后再提高 pH 值, ATU 回收率也不会增加。反萃取 pH 值应选择 7.6。

2.4.3 时间对反萃取的影响 采取上述实验确定的最适温度、pH 值分别反萃取 30、35、40、45、50 min。完毕, 分离并回收 IT, 测定液体 ATU, 计算反萃取率, 确定最适时间。

时间为 30、35、40、45、50 min 对反萃取的影响结果分别为回收率 49.17%、57.50%、62.50%、62.50%、62.50%。反萃取属动态平衡反应, 需要一定时间才能达到平衡点。反应短于某一时间, IT-AP 分解进入反萃取液的 AP 数量随时间增加而提高; 到达某一时间, 进入反萃取液和离开反萃取液并与 IT 重新结合生成 IT-AP 的 AP 数量相等、反应达到平衡点时, ATU 回收率达到最大; 之后, ATU 回收率不因时间的增加而提高。因此反萃取时间应选择 40 min。

2.5 AP 的 IT 反萃取的正交试验

以反萃取时间 (A)、反萃取温度 (B) 及 pH 值 (C) 进行 4 因素 3 水平正交试验, 优化反萃取的工艺条件。

2.5.1 正交试验设计 反萃取正交试验安排、各因素的影响效果见表 3, 方差分析见表 4。

从表 3 的极差分析可知, 影响反萃取效果的因素大小顺序为 $C > B > A$; 表 4 的方差分析结果表明,

表 3 L₉(3⁴) 正交试验设计与结果

Table 3 Design and results of L₉(3⁴) orthogonal test

试验号	A/min	B/°C	C	D(空白)	回收率/%
1	30 (1)	20 (1)	7.2 (1)	(1)	42.08
2	30 (1)	25 (2)	7.4 (2)	(2)	50.02
3	30 (1)	30 (3)	7.6 (3)	(3)	62.92
4	35 (2)	20 (1)	7.4 (2)	(3)	50.42
5	35 (2)	25 (2)	7.6 (3)	(1)	55.04
6	35 (2)	30 (3)	7.2 (1)	(2)	52.08
7	40 (3)	20 (1)	7.6 (3)	(2)	59.17
8	40 (3)	25 (2)	7.2 (1)	(3)	47.08
9	40 (3)	30 (3)	7.4 (2)	(1)	61.25
K ₁	155.02	151.67	141.24	158.37	
K ₂	157.54	152.14	161.69	161.27	
K ₃	167.50	176.25	177.13	160.42	
R	12.48	24.58	35.89	2.90	

表 4 方差分析

Table 4 Analysis of variance

误差来源	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	29.034	2	19.591	P<0.05
B	131.743	2	88.895	P<0.05
C	216.076	2	145.800	P<0.01
D(误差)	1.482	2		

F_{0.05}(2, 2)=19.00 F_{0.01}(2, 2)=99.00

A、B 因素的影响均达到了显著 (P<0.05) 水平, C 因素的影响达到了极显著 (P<0.01) 水平。优选工艺条件为 A₃B₃C₃, 即 pH 7.6、30 °C、40 min。

2.5.2 优选工艺条件的验证试验 按照“2.1.5”项下制备方法, 制备 IT, 按照正交试验优选的最佳工艺条件进行了 3 组抗凝血肽的反萃取试验, 验证优选的反萃取工艺条件, ATU 回收率分别为 65.00%、65.42%、65.42%, 平均回收率为 65.28%, 表明该优选工艺稳定。

2.6 AP M_r 分布范围的 HPSEC 分析

用 HPLC 以 HPSEC 法测定 AP M_r 分布范围, AP M_r 分布范围的 HPSEC 分析结果如图 1。AP 溶液冻干后, 用超纯水配制成 10 ATU/mL 备用。分析柱为蛋白凝胶柱 Protein-Pak 60 (WAT085250)。流动相为 0.05 mol/L Tris-HCl (pH 7.2), 体积流量 0.7 mL/min, 检测波长 214 nm, 温度 25 °C。对照品为磷酸异构酶、肌球蛋白、抑肽酶、胰岛素 B、杆菌肽、马尿酸-组氨酸-亮氨酸。

从图 1 可知, 在约 18 min 时出现 AP 分子的特征吸收波长, 与马尿酸-组氨酸-亮氨酸接近, 提示其分子大小相当于 3 肽。

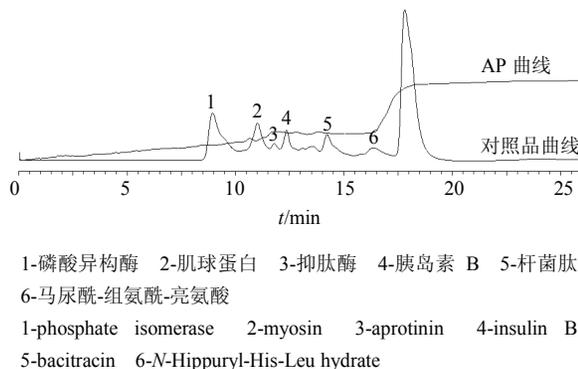
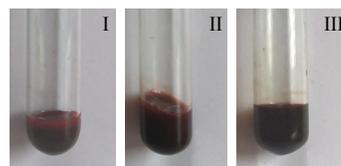


图 1 AP M_r 分布范围的 HPSEC 图
Fig. 1 HPSEC of AP M_r distribution range

2.7 AP 的体外抗凝血实验

体外抗凝血实验参照文献方法^[14]有改动。先将 0.2 mL 300 ATU/mL AP 溶液放入小试管中, 新西兰兔心脏取血, 趁未凝固立即加入 1.8 mL 血液, 轻轻混合均匀, 同时以 1.8 mL 兔原血为阴性对照、4% 柠檬酸三钠 (CATS) 取代 AP 为阳性对照, 于 15 °C 静置。昼夜观察、记录各管的血液凝固时间并拍照。

体外抗凝血实验结果见图 2 (均在凝固后拍摄)。新西兰兔原血在试管内 30 s 左右凝固, 兔原血与 4% CATS 以 9 : 1 比例的混合液经过 23.5~48.0 h 凝固, 而兔原血与 AP 溶液的 9 : 1 比例混合液经过 72~120 h 凝固, 可见 AP 的抗凝血效果远比 4% CATS 显著。



I-新西兰兔原血 II-新西兰兔原血与 4% CATS 的混合液 III-新西兰兔原血与 AP 的混合液
I-original blood of the New Zealand rabbit II-original blood of New Zealand rabbit with a mixture of 4% CATS III-a mixture of New Zealand rabbit blood and AP

图 2 体外抗凝血实验

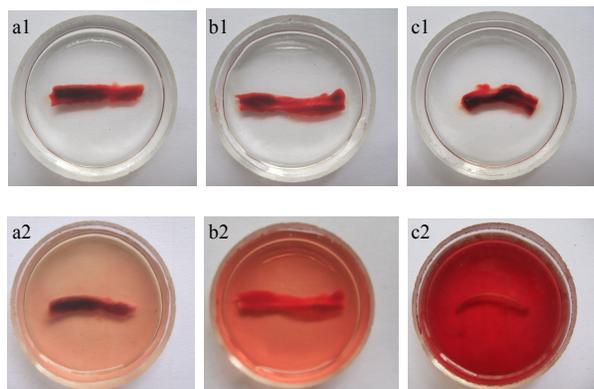
Fig. 2 In vitro anticoagulation experiment

2.8 AP 体外溶栓实验

体外溶栓实验参照文献方法^[15]有改动, 新西兰兔心脏取血, 滴在培养皿的棉线上, 静置 15 min 使血液充分凝固, 把棉线连上面的血栓一起轻轻拉出, 将棉线剪成约 2 cm 段置小培养皿内, 浸泡于 150

ATU/mL AP 溶液中, 同时以生理盐水为阴性对照、4% (质量分数, 后同) CATS 为阳性对照。于 26 °C 静置 24 h, 昼夜观察、记录各小培养皿内溶血时间并拍照。

体外溶栓实验进行 24 h 后, 结果如图 3 所示。可见浸泡于 150 ATU/mL AP 的血栓已完全溶解, 浸泡于 4% CATS 中的尚有部分未溶解, 而溶解于生理盐水中的只有极少量。说明 150 ATU/mL AP 溶栓效果好于 4% CATS。而后者又明显好于生理盐水。



a-浸泡于生理盐水 b-浸泡于 4% CATS c-浸泡于 150 ATU/mL AP
1-开始时的状态 2-结束时的状态
a-immersion in saline b-soaked in 4% CATS c-soaked in 150 ATU/mL AP 1-at beginning of state 2-at end of state

图 3 体外溶栓实验结果

Fig. 3 *In vitro* thrombolytic experiment

3 讨论

利用酶解制备抗凝血肽, 有 2 个问题需要注意: (1) 一般酶解制备各种功能活性肽都是以水解度为目标, 水解度越大越能得到满意的结果, 但本实验所要制备的抗凝血肽活性与其相对分子质量有显著关系, 因此不能光以水解度为参考, 而要严格控制反应时间; (2) 体外抗凝血活性的测定易受环境温度影响, 为了保证测定的准确性, 应在低温下进行, 以保持凝血酶的活力。本实验利用 Pa、Br、NP、AP 进行酪蛋白 4 酶混合水解可以产生具有抗凝血酶活力的肽, 工艺简单, 耗时少, 产物具有较强的抗凝血活力。

目前有关抗凝血肽的研究较多的是利用不同原材料 (菲牛蛭等) 进行抗凝血肽的制备, 然后初步测试其活性, 而关于抗凝血肽分离的研究很少报道。本实验利用固定化凝血酶来分离纯化抗凝血肽, 在一定 pH 值条件下, IT 可以有效用于酪蛋白水解物

中的 AP 萃取。萃取完毕, 分离 IT-AP, 用不同 pH 的溶液进行反萃取, AP 与 IT 分离, 滤去酶即可获得目的物。本实验确定的工艺简单, 条件温和, ATU 回收率较高, 工艺易放大。

参考文献

- [1] Whitaker I S, Rao J, Izadi D, *et al.* Hirudo medicinalis: ancient origins of and trends in the use of medicinal leeches throughout history [J]. *Brit J Oral Max Surg*, 2004, 42(2): 133-137.
- [2] 李天全, 万昌秀, 李倚剑, 等. 新一代高效特异抗凝药物—水蛭素 [J]. *医学工程学杂志*, 1998, 15(3): 306-310.
- [3] 刘纯古, 童张法. 水蛭素活性分析方法的研究 [J]. *当代化工*, 2004, 33(4): 243-245.
- [4] Scharf M, Engels J, Tripier D. Primary structures of new 'iso-hirudins' [J]. *FEBS Lett*, 1989, 255(1): 105-110.
- [5] Rydel T J, Ravichandran K G, Tulinsky A. The structure of a complex of recombinant hirudin and alpha-thrombin [J]. *Science*, 1990, 249(4966): 277-280.
- [6] Hein O V, von Heymann C, Lipps M, *et al.* Hirudin versus heparin for anticoagulation in continuous renal replacement therapy [J]. *Intens Care Med*, 2001, 27(4): 673-679.
- [7] 陈华友, 邢自力, 李媛媛, 等. 凝血酶滴定法测定水蛭素活性的改进 [J]. *生物技术*, 2002, 12(6): 24-25.
- [8] 刘海洲, 张媛媛, 张广柱, 等. 固定化酶制备技术的研究进展 [J]. *化学工业与工程技术*, 2009, 30(1): 21-23.
- [9] Fiat A M, Migliore-Samour D, Jollès P, *et al.* Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities [J]. *Dairy Sci*, 1993, 76(1): 301-310.
- [10] 刘 恭, 高维东, 纪银莉, 等. 牦牛乳酪蛋白抗凝血肽制备工艺研究 [J]. *食品研究与开发*, 2014, 35(17): 65-68.
- [11] 曹文红, 章超桦. 生物活性肽的吸收机制 [J]. *药物生物技术*, 2006, 13(5): 384-388.
- [12] 陈芳艳, 纪平雄. 家蚕丝素固定化木瓜蛋白酶 [J]. *华南农业大学学报*, 2004, 25(3): 83-86.
- [13] 苗艳丽, 余广仁, 徐银龙, 等. 丝素固定化凝血酶的工艺研究 [J]. *中国药师*, 2016, 19(4): 11-14.
- [14] 李京城, 王振英. 常用静脉注射剂的体外抗凝血试验 [J]. *中国兽医学报*, 1981(2): 77-79.
- [15] 陈少鹏, 韩雅莉, 郭 桅, 等. 少棘蜈蚣纤溶活性蛋白的抗血栓作用 [J]. *中国药理学通报*, 2007, 23(8): 1088-1092.