

人参中 ACE 抑制蛋白的提取

宋晶,李海涛,程海涛,张秋菊,张爱华,张连学
(吉林农业大学中药材学院,长春 130118)

摘要:从人参粉中提取纯化人参蛋白,以检测人参蛋白对血管紧张素转换酶(ACE)的抑制活性。将人参粉加水(pH 9.0)搅拌,3000 r/min 离心 20 min。用连续的色谱柱分离:D101 大孔树脂分离色谱,离子交换色谱,凝胶过滤色谱。以体外 ACE 抑制率为指标确定提取的人参蛋白具有抑制 ACE 的作用。结果表明:人参蛋白对 ACE 酶具有很高的抑制效果,通过连续的色谱分离方法可将 ACE 抑制蛋白分离,得到具有较高抑制率的 ACE 抑制蛋白,该抑制蛋白的抑制率可达 92.5%。

关键词:人参;血管紧张素 I 转换酶抑制剂;抑制率;活性蛋白

中图分类号:Q503

文献标志码:A

论文编号:2011-0180

Extraction of Angiotensin I-converting Enzyme Inhibitory Protein from Ginseng

Song Jing, Li Haitao, Cheng Haitao, Zhang Qiuju, Zhang Aihua, Zhang Lianxue
(College of Tradition Chinese Medicine, Jilin Agricultural University, Changchun 130118)

Abstract: The ginseng protein was extracted from ginseng powder, and the inhibitory activity of angiotensin I-converting enzyme (ACE) was detected. Ginseng powder was prepared by stirring in water (pH 9.0), followed by centrifugation at 3000 r/m for 20 min. An ACE inhibitor was purified by using consecutive chromatographic methods, including: D101 macroporous resin chromatography, ion-exchange chromatography, and gel filtration chromatography. The inhibitory activity of ACE was determined as ACE inhibitory activity *in vitro* of ginseng protein. The ginseng protein had inhibitory activity for ACE, the ACE inhibitor could be extracted by using consecutive chromatographic methods, and the ACE inhibitory ratio could achieve 92.5%.

Key words: ginseng; angiotensin I-converting enzyme inhibitor; inhibitory ratio; bioactive peptide

0 引言

近年来,生物活性蛋白越来越受重视。生物体具有抗高血压活性是通过抑制血管紧张素 I 转换酶(ACE)转换成 II,后者能使末梢血管收缩从而导致血压升高,抑制 ACE 酶就能降低血压^[1]。几乎所有的天然降血压 ACE 抑制剂都是肽类物质,是因为它具有和 ACE 活性部位高度亲和性^[2]。1971 年从巴西蝮蛇的蛇毒提取液中首次发现和分离了 ACE 抑制剂^[3]。随后 Oshima 报道通过水解食物,从其蛋白中生产 ACE 抑制剂^[4]。之后在食物蛋白或酶解蛋白中发现抑制剂。这些食物包括鱼^[5],甘蓝^[6],燕麦麸^[7],大豆^[8],米糠^[9]和乳清

蛋白^[10]等。ACE 用于体外降血压模拟的检测原理,早在 1969 年被 Cushman 和 Cheung 发现,主要利用 ACE 酶解三肽马尿酸组氨酰亮氨酸(HHL)生成马尿酸(hippuric acid, Hip)和二肽(His-Leu, HL)来定量的,其中多以马尿酸的生成量定量,1970 年,他们建立了 ACE 活性紫外(228 nm)分光光度测定法^[11]。

人参为五加科植物人参(*Panax ginseng* C.A. Mey)的干燥根。人参主要化学成分为多种人参皂苷、挥发油、糖类、氨基酸、有机酸及酯、维生素以及多种微量元素等^[12]。现代药理研究表明,人参在抢救休克、治疗心率失常、冠心病、糖尿病、扩张末梢血管、促进血液循

基金项目:国家科技支撑计划“平地栽参关键技术研究”(NO. 2007BAI38B01)。

第一作者简介:宋晶,女,1984 年出生,内蒙古扎兰屯人,硕士研究生,研究方向:中药活性成分。通信地址:130118 吉林农业大学中药材学院 224 实验室, E-mail: songjingabc627@126.com。

通讯作者:张连学,男,1955 年出生,吉林长春人,博士,教授,博士生导师,研究方向:中药材 GAP 规范化种植及中药活性成分的研究。通信地址:130118 吉林农业大学中药材学院, Tel: 0431-84533087, E-mail: zlx863@163.com。

收稿日期:2011-01-19,修回日期:2011-03-18。

环、促使组织再生和增加免疫作用等方面具有较好疗效^[13]。

国内外关于生物活性蛋白对 ACE 酶影响血压的研究报道很多,但暂时没有人参蛋白对 ACE 酶的影响的相关报道,国内虽有做人参肽对血管舒张的相应研究^[14],故研究人参蛋白对 ACE 酶的影响,以验证人参蛋白具有降血压的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品 人参采自于吉林省集安县,均为6年生人参,经吉林农业大学中药材学院张连学教授鉴定为人参。

1.1.2 仪器与试剂 RE-52-05 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);真空冷冻干燥机(德国 CHRIST 公司);DK-98- I 型电子恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司);HQ-60 旋涡混合器(北方同正生物技术发展公司);LG10-2.4A 型高速离心机(北京医用离心机厂);UV-754 型紫外可见分光光度计(山东高密彩虹分析仪器有限公司)。

ACE(家兔肺脏丙酮提取物)、HHL(Sigma 公司,美国);香草醛(惠世生化试剂有限公司,中国);D101 大孔树脂柱(上海摩速科学器材有限公司,中国);732 型阳离子交换树脂(上海树脂厂有限公司,中国);Sephadex G-10(上海如吉生物科技发展有限公司,中国);Sephadex LH-20(上海如吉生物科技发展有限公司,中国);其他试剂均为分析试剂。

1.2 实验方法

1.2.1 人参提取物的制备 人参粉(100目)1 kg,加入 10 L 水(1 mol/L NaOH 调整, pH 为 9.0),搅拌 12 h, 3000 r/min 下离心 20 min,取上清液,上清液经过冷冻干燥,用于 ACE 抑制蛋白分离的实验。

1.2.2 ACE 抑制活性测定 100 μ L 反应混合物包括: 20 mmol/L HHL 作为底物,溶于 0.2 mol/L 硼酸盐缓冲液(pH 8.3)的 ACE 酶(5 munit), 50 μ L 样品溶液。在 37 $^{\circ}$ C(水浴)下反应 3 h,加入 250 μ L 的 1 HCL 和 1.5 mL 乙酸乙酯(冷冻)结束反应。旋涡震荡 2 min, 4000 r/min 离心 15 min。静置 10 min,用移液器吸取 1.0 mL 乙酸乙酯层液体于另外试管中,挥干溶剂,加入 3.0 mL 蒸馏水将其溶解,在 228 nm 处测定该溶液的吸光值^[15]。

$$\text{ACE 抑制率} = \frac{A - B}{A - C} \times 100\%$$

在公式中, A 为不存在抑制剂时的吸光度, B 为存在抑制剂与酶时的吸光度, C 为抑制剂与酶都不存在时的吸光度。

1.2.3 分离 ACE 抑制蛋白 冷冻干燥后的人参提取物依次经过连续色谱: D101 大孔树脂柱、732 型阳离子交换树脂、Sephadex G-10 和 Sephadex LH-20 进行分离。

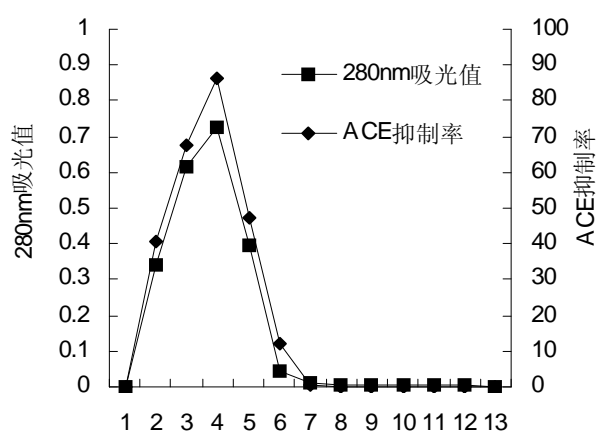
人参提取物依次经过 D101 大孔树脂柱(3.3 \times 40 cm),水平衡,流速 5 mL/min。样品被以下洗脱液依次洗脱: 1200 mL 水和 1500 mL 80%乙醇,收集的成分分别于 280 nm 和 228 nm 下检测吸光值。最高抑制成分用 732 型阳离子交换树脂(3.0 \times 16 cm)分离,水平衡,流速 5 mL/min。样品被以下洗脱液依次洗脱: 500 mL 水, 400 mL 1 mol/L 氨水, 400 mL 1.5 mol/L 氨水, 400 mL 2 mol/L 氨水,收集的成分分别于 280 nm 和 228 nm 下检测吸光值。最高抑制成分继续用 Sephadex G-10(0.8 \times 70 cm)分离,水洗脱,流速 2 mL/min,收集的成分分别于 280 和 228 nm 下检测吸光值。最高抑制成分继续用 Sephadex LH-20(0.8 \times 80 cm)分离,用 10% 甲醇平衡,甲醇洗脱,流速 4 mL/h,收集的成分分别于 280 nm 和 228 nm 下检测吸光值。228 nm 下的吸光值用于测定 ACE 的抑制活性, 280 nm 下的吸光值用于计算蛋白的含量。

2 结果与分析

通常植物蛋白可以通过水提得到,之后检测其生物活性指标。人参比较特殊,皂苷是人参最重要的活性成分之一,也是水溶、醇溶性物质。故人参水提粗提物通过 D101 大孔树脂滤过,用水和 80%乙醇梯度洗脱,将人参蛋白和皂苷成分分开(图 1),水洗脱的成分是人参的总蛋白(编号 1—7),而 80%乙醇洗脱的就是人参总皂苷成分(编号 7—13),同时包含部分多糖等其他成分,收集此部分可用于皂苷的其他活性研究。经过 D101 大孔树脂洗脱,分子量大的 人参蛋白先被洗脱,分子量小的人参蛋白后洗脱。从图 1 可看出人参蛋白对 ACE 的抑制活性最高可达 86.5%,并且低分子量人参蛋白比高分子量人参蛋白的抑制活性高。经过 D101 大孔树脂滤过的人参蛋白溶液(编号 1—7),经过真空冷冻干燥,浓缩。浓缩物经过 732 型阳离子交换树脂柱进行分级洗脱,洗脱液主要分成 4 部分成分(图 2),分别为 500 mL 水洗脱液(编号 1—6), 400 mL 1 mol/L 氨水洗脱液(编号 7—11), 400 mL 1.5 mol/L 氨水洗脱液(编号 11—16), 400 mL 2 mol/L 氨水洗脱液(编号 16—20),其中 1.5 M 氨水洗脱液(编号 11—16)部分具有最高的抑制活性,抑制率可达到 89%,故收集此部分,将其经过 Sephadex G-10 进行进一步除糖,除杂质。洗脱物分成 3 部分,分子量大的 人参蛋白先被洗脱下来,图 3 可以看出,最高抑制活性的部分(编号 1—5)含有相对大分子量的蛋白,抑制率可达到 91%,

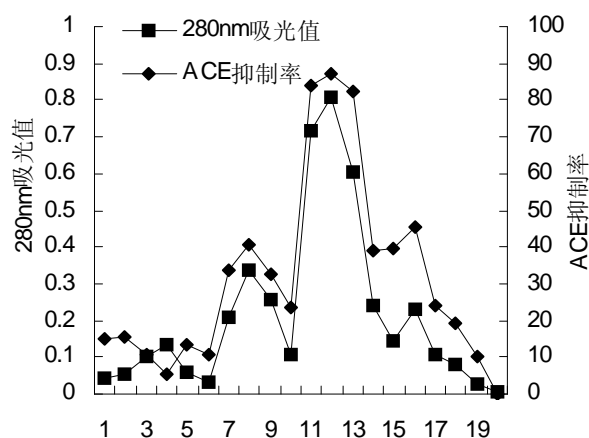
其他两部分也有一定的抑制活性,但抑制率不高,故推测在分子量在一定范围内,分子量大的的人参蛋白比分子量小的人参蛋白对ACE的抑制率要高。这也与Min-Suk Ma关于荞麦蛋白ACE抑制剂的报道相符合^[16]。洗脱液中抑制率最高的部分经过Sephadex LH-20柱色谱,除盐,分子量大的部分先被洗脱下来。

在洗脱的3个峰中,具有相对大分子量的部分(编号2—7)部分的抑制活性最高,可达92.5%。另一方面,低分子量的部分只有低的抑制活性,随着分子量的降低抑制活性也越来越低(图4)。此部分也证实分子量在一定范围内,对ACE的抑制效果,大分子量的人参蛋白较小分子量的人参蛋白抑制效果更好。



粗提物滤过的总蛋白的抑制活性,阶梯式洗脱: 1200 mL水, 1500 mL 80%乙醇洗脱, 流速5 mL/min

图1 D101大孔树脂柱色谱图

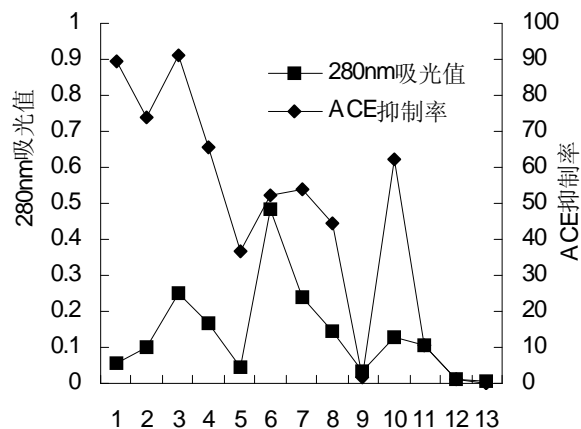


水平衡, D101大孔树脂滤过的蛋白液的抑制活性。

阶梯式洗脱: I: 500 mL水, II: 400 mL 1 mol/L氨水,

III: 400 mL 1.5 mol/L氨水, IV: 400 mL 2 mol/L氨水, 流速5 mL/min

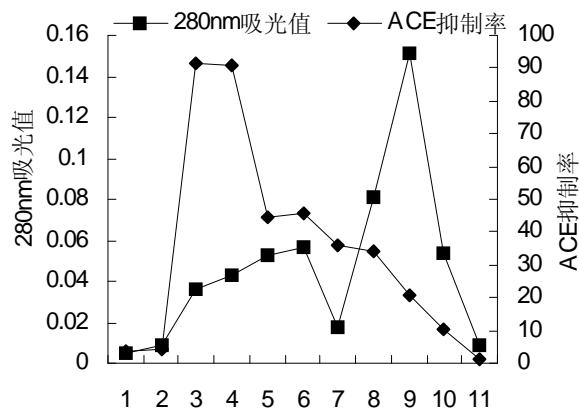
图2 732型阳离子交换树脂色谱图



从732型阳离子交换树脂柱洗脱下的11-16部分的抑制活性。

水洗脱, 流速2 mL/min

图3 Sephadex G-10色谱图



从Sephadex G-10色谱柱洗脱下的1-5部分的抑制活性。

甲醇洗脱, 流速4 mL/h

图4 Sephadex LH-20色谱图

3 结论与讨论

本研究是首次研究人参蛋白对ACE酶的影响,其中得到的抑制结果与相关报道比较吻合,通过对ACE酶的抑制活性检测,验证了人参蛋白对ACE的确有很明显的抑制效果,为人参蛋白生物活性尤其是ACE酶的抑制活性方面的研究奠定了基础。

本研究采用一系列的色谱柱分离,最终分离得到ACE抑制剂,且抑制率最高可达92.5%。其中加入

D101大孔树脂将人参皂苷分离用于人参皂苷的研究,可以减少人参资源的浪费。实验的色谱分离过程对人参蛋白逐级纯化,但是得到的抑制蛋白成分中仍有少部分杂质,还需要对其进行进一步纯化、鉴定且应对蛋白质的分子量和结构做出进一步分析。本研究只是对ACE酶的抑制活性紫外分光法进行了研究,还需通过细胞实验和动物体内实验予以证明,该抑制蛋白在体内仍具有抑制ACE的能力。

参考文献

- [1] Ondetti M A, Rubin B, Cushman D W. Design of specific inhibitors of angiotensin converting enzyme: a new class of orally active antihypertensive agents[J]. Science, 1977, 196:441 - 444.
- [2] 吴炜亮, 吴国杰, 梁道双, 等. ACE抑制肽的生理功能和研究进展[J]. 现代食品科技, 2006, 89(3):251-254.
- [3] Ondetti M A, Williams N J, Sabo E F, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitors from the venom of *Bothrops jararaca*: isolation, elucidation of structure and synthesis [J]. Biochemistry 1971, 10: 4033 - 4039.
- [4] Oshima G, Shimabukuro H, Nagasawa K. Peptide inhibitors of angiotensin I-converting enzyme in digests of gelatin by bacterial collagenase [J]. Biochimica et Biophysica Acta 1979, 566:128-137.
- [5] Zhang F X, Wang Z, Xu S Y. Macroporous resin purification of grass carp fish (*Ctenopharyngodon idella*) scale peptides with in vitro angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory ability [J]. Food Chemistry 2009, 117:387-392.
- [6] Lee J E, Bae I Y, Lee H G. Tyr-Pro-Lys, an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from broccoli (*Brassica oleracea italica*) [J]. Food Chemistry 2006, 99:143-148.
- [7] 管晓, 姚惠源. 燕麦麸蛋白ACE抑制肽的制备及性质研究[J]. 中国粮油学报, 2007, 22(6):58-63.
- [8] 张晓梅. 降血压和降胆固醇大豆肽的分离纯化[D]. 镇江: 江南大学, 2006, 24-32.
- [9] 赵志国, 吴琼, 吕铃肖, 等. 酶解米糠蛋白分离提取ACE抑制肽及其结构研究[J]. 食品科学, 2007, 28(3): 223-227.
- [10] 李朝慧, 罗永康, 王全宇. 乳清蛋白酶解制备ACE抑制肽的研究[J]. 中国乳品工业, 2005, 33(2):8-11.
- [11] Cushman D W, Cheung H S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin converting enzyme of rabbit lung [J]. Biochemical Pharmacology, 1971, 20:1637-1648.
- [12] 郑宏钧, 詹亚华. 现代中药材鉴别手册[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2001:33.
- [13] 阴健, 郭力弓. 中药现代研究与临床应用[M]. 北京: 学苑出版社, 1994:1.
- [14] 王德彬. 人参肽的提取分离及活性研究[D]. 长春: 吉林大学, 2005, 20-43.
- [15] 玄国东. 米糟蛋白提取及酶法制备抗氧化活性肽及降血压活性肽的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2005:63.
- [16] Ma M S, Bae I Y, Lee H G, et al. Purification and identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from buckwheat [J]. Food Chemistry, 2006, 96:36-42.