酶解胶原蛋白制备血管紧张素转化酶抑制肽的研究

孔 青[1]，李 晶[1]，毕 涛[1]，管 斌[1]，陈 峰[2]
(1.中国海洋大学食品科学与工程学院，山东 青岛 266003；
2.克莱姆森大学食品科学与营养系，美国 南卡罗莱那州 克莱姆森市 SC 29634)

摘 要：血管紧张素转化酶(angiotensin-converting enzyme，ACE)抑制剂是目前用于治疗高血压的重要药物。本实验采用胃蛋白酶(pepsin)和胰蛋白酶(trypsin)组合酶解胶原蛋白制备水解液。使用1kD超滤膜对水解液进行超滤，超滤液采用葡聚糖凝胶Sephadex G-15凝胶过滤层析得到多种组分。各组分经酶活力和蛋白浓度测定，筛选出有较高ACE抑制率的两个样品。继续使用反相高效液相色谱进一步分离筛选出样品，对分离出的不同组分进行蛋白浓度和抑制率测定，通过分析实验数据，筛选出具有最高活性组分。最终样品经脱盐和冷冻干燥后进行高抑制活性的血管紧张素转化酶抑制肽的分子量的测定。

关键词：血管紧张素转化酶；抑制肽；凝胶过滤层析；反相高效液相色谱；高血压

Preparation of Angiotensin-converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Enzymatic Hydrolysates of Collagen

KONG Qing[1], LI Jing[1], BI Tao[1], GUAN Bin[1], CHEN Feng[2]
(1. School of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;
2. Department of Food Science and Human Nutrition, Clemson University, Clemson SC 29634, USA)

Abstract: Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors are very important drugs for clinical treatment of hypertension. Pepsin and trypsin were used together to prepare the hydrolysates from collagen. Ultrafiltrations (UF) with 1 kD membrane and gel filtration chromatography (GFC) with Sephadex G-15 were used to separate the hydrolysates into different components. By measuring the inhibitory activity and protein concentration of the components, two samples with the greatest inhibitory activity were selected. The samples were then taken to further separate by reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). Different components of the samples were collected. The same methods as that mentioned above were taken to screen the optimum component. After desalting and freezing drying, the molecular mass of component with the greatest inhibitory activity was determined at last.

Key words: angiotensin-converting enzyme; inhibitory peptides; gel filtration chromatography; reverse phase high performance liquid chromatography; hypertension
中图分类号：Q555 文献标识码：A 文章编号：1002-6630(2008)05-0298-05

高血压是最常见的心血管病，是全球范围内的重大公共卫生问题。血管紧张素转化酶(angiotensin-converting enzyme，ACE)在血压调节过程中起关键作用，在人体内通过肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system，简称RAS)和激肽释放酶-肽酶系统(kallikrein-kinin system，简称KKS)参与血压的调节[1-3]。RAS是升压系统，通过ACE使血管紧张素Ⅰ(angiotensin Ⅰ，Ang Ⅰ)从其C末端去掉His-Leu生成血管紧张素Ⅱ(angiotensin Ⅱ，Ang Ⅱ)，Ang Ⅱ是一种强效的血管收缩剂，它作用于小动脉，使血管平滑肌收缩，迅速引起升压效应；而KKS是降压系统，又称抗高压因子，其中舒缓激肽(bradykinin)是降压物质。ACE在该系统中又作为肽激酶Ⅱ，使具有降压作用的舒缓激肽失去C末端的Phe-Arg或Ser-Pro，从而使之降解成为失活片断，

收稿日期：2007-07-31
作者简介：孔青(1979-)，男，讲师，博士，主要从事发酵工程、食品化学的研究。E-mail：kongqing@ouc.edu.cn

也引起血压升高。由此可见，ACE通过作用RAS和KKS系统，共同使血压升高。

不难发现，如果找出ACE抑制剂，从理论上来说，可以有效地对高血压进行治疗。1965年Ferreira从巴西蝮蛇(*Bathrops jararaca*)蛇毒里分离出多肽物质，能增强舒缓激肽的舒张血管作用，称为“缓激肽增强肽(bradykinin-potentiating peptide)”[4]。后来发现此肽类也能抑制ACE而具有降压作用，这是最早发现的具有ACE抑制活性的天然多肽。随着了解的深入，食物蛋白被越来越多的列入研究范围，并且能够从中获得许多具有较高抑制活性的多肽，研究较为深入的有：酪蛋白(casein)[5]、乳清蛋白(whey protein)[6]、鱼蛋白(fish protein)[7]、大豆蛋白(soybean protein)[8]、动物明胶(animal gelatin)[9]等。

胶原蛋白是很多脊椎动物和无脊椎动物体内含量最丰富的蛋白质，能使腱、软骨、骨、牙、皮和血管等结缔组织具有机械强度。胶原是哺乳动物体内含量最多的蛋白质，占体内蛋白质总量的25%～30%[10]。一些研究表明，很多从食物蛋白中获得的非常有效的ACE抑制肽在多肽链的C-端都是Pro。如Pro-Leu-Ile-Tyr-Pro[5]、Phe-Phe-Gly-Arg-Cys-Val-Ser-Pro[11]、Leu-Tyr-Pro[12]、Leu-Arg-Pro[13]等。由于胶原蛋白中Pro(包括Hyp)含量高达25%，远远高于其它常见的蛋白质，所以，理论上来说，经过适当的酶解，胶原蛋白水解得到具有高抑制活性的多肽几率会非常的大。

另外，世界上对胶原蛋白制备降血压肽的研究正处于起步阶段，通过本课题的研究，有助于加深对胶原蛋白酶解的了解，超滤、凝胶过滤、高效液相色谱等分离纯化条件的确定和操作方法也可为胶原蛋白水解产生降血压肽的工业化生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与设备

胶原蛋白粉(来源于猪皮) 四川铭让生物科技有限公司；胃蛋白酶(Pepsin)、血管紧张素转化酶(ACE)、马尿酰组氨酰亮氨酸(HHL)、Sephadex G-15 美国Sigma公司；胰蛋白酶(Trypsin)、结晶牛血清白蛋白 上海国药集团；考马斯亮蓝G-250 美国Sanland-Chem International公司。

超滤杯和超滤膜(1 kD和10 kD) 上海亚东核级树脂有限公司；乙腈 韩国SK Chemicals公司；HiTrap预装脱盐柱 瑞典Pharmacia公司；高效液相色谱设备 美国安捷伦公司；FDU-1200冷冻干燥器；S.A.S.超纯水设备 法国Millipore公司；电喷雾四极杆飞行时间串联质谱仪(ESI-Q-TOF-MS) 美国LS公司。

1.2 方法

1.2.1 胶原蛋白的水解

称取8.23g活性胶原蛋白粉溶于100ml蒸馏水中。待蛋白充分溶解后，调溶液的pH2.0，加入准确称取的胃蛋白酶0.1646g。混匀后置于37℃恒温水浴锅内保温3h 49min。然后，取出反应液，调节pH8.0，加入胰蛋白酶0.1646g。混匀后置于37℃恒温水浴锅内保温4h。将最终反应液煮沸10min灭酶。

1.2.2 水解液的超滤

该步骤为降血压肽提取的第一步。有资料显示[14]，目前研究较为深入的降血压肽多含有2～12个氨基酸残基。由于氨基酸残基的平均分子质量大约为110D，选取1kD的超滤膜作为操作介质时，可以滤过含有10个氨基酸残基左右的多肽，符合以上分析。正确安装好超滤装置(分别采用截留分子量为1kD和10kD的两种超滤膜)，将水解液倒入超滤杯。常温下，采用氮气(N_2)作为加压气体，以0.2MPa(表压)进行操作。

1.2.3 凝胶过滤层析

该步骤为降血压肽提取的第二步。Sephadex G-15葡聚糖凝胶能有效分离分子量在1500D以下的组分，本实验采用该种凝胶。

为使超滤液充分分离，将流速定为0.6ml/min，洗脱液为磷酸盐缓冲液(0.15mol/L，pH7.4)。打开凝胶柱上端封口，加入样品1ml，开始进行样品的凝胶过滤分离。部分收集器中每管收集时间5min，收集体积3.0ml，检测波长为280nm。共收集120管。凝胶过滤完成后，根据自动记录仪所记录的峰形，对相应管号的洗脱液进行收集，收集到的组分进行多肽浓度和ACE抑制率的测定。

1.2.4 高效液相色谱分离、制备ACE抑制肽

洗脱液流速：0.9ml/min；洗脱液A(100%乙腈)浓度梯度变化：0～60%；洗脱液B(0.05%三氟乙酸)浓度梯度变化：100%～40%；洗脱温度：30℃；VWD检测器波长：220nm；泵压：75～85bar；洗脱时间：50min[15]。样品先经过微滤膜过滤，然后从进样阀中注入1000μl样品。分离出各组分采用1.5ml离心管收集，50min分离结束。

1.2.5 样品的脱盐

样品分子量测定前预处理的步骤，采用HiTrap预装脱盐柱。取2.5ml注射器，吸取1.0ml样品，然后吸取0.5ml洗脱液(30mmol/L NaCl溶液)，使总体积为1.5ml。充分混匀注射器内液体，排除气泡，接上专用转换接口。并把转换接口旋入脱盐柱，控制脱盐柱排液口流速为每秒钟两滴，将样品全部推入脱盐柱，脱盐柱流出液排入废液缸。然后用注射器吸取2ml洗脱液全部推

入脱盐柱，脱盐柱排液口流出的2ml洗脱液即为经过脱盐处理的样品。

1.2.6 样品的分子量测定

最终样品真空冷冻干燥后，送北京大学医学部采用电喷雾四极杆飞行时间串联质谱仪进行分子量测定。质谱条件为：毛细管电压3000V；锥孔电压50V；去溶剂气体为氮气；源温80℃；飞行管电压9100V；MCP电压2200V；去溶剂气体流速9L/min；ESI源流速10μl/min。

1.2.7 蛋白浓度测定

采用考马斯亮蓝法[16]。蛋白质含量测定标准曲线为：y=347.58x（y为蛋白浓度，μg/ml；x为A_{595nm}），R^2=0.9934。

1.2.8 ACE抑制率测定[17]

取已编号的A、B、C三支离心管(1.5ml)，依次加入100μl (5mmol/L)马尿酰组氨酰亮氨酸、50μl硼酸-硼砂缓冲液、50μl待测样品和20μl ACE酶(2mU)，然后放37℃恒温水浴1h后，立即加入100μl的1mol/L盐酸使反应终止。然后加入1ml乙酸乙酯，漩涡振荡器振荡2min，静置10min，使有机溶剂分层。吸取上层乙酸乙酯层700μl并移入另一干燥离心管(1.5ml)，置于鼓风干燥箱90℃烘干40min。最后，用3ml蒸馏水溶解残留物。在228nm处测定该溶解液的吸光度(A_{228})。

计算公式：

$$\text{ACE抑制率}(\%)=\frac{A_A-A_B}{A_A-A_C}\times 100$$

式中，A_A为A管中反应液所测得的吸光度，是在无抑制剂存在条件下，ACE与HHL反应所得结果。视为完全反应；A_B为B管中样品液所测得的吸光度；是在有抑制剂(样品)存在条件下，ACE与HHL反应所得结果；A_C为C管中反应液所测得的吸光度；不存在ACE与HHL的反应，作为空白对照。

2 结果与分析

2.1 超滤组分的选择

对100ml水解液首先采用10kD超滤膜超滤，超滤完成后用100ml蒸馏水反洗超滤膜，反洗液作为分子量大于10kD的蛋白溶液(标记为样品H)，然后将超滤液继续采用1kD超滤膜超滤，完成后用100ml蒸馏水反洗超滤膜，反洗液作为分子量介于1kD和10kD之间的蛋白溶液(标记为样品M)，1kD超滤膜超滤液作为分子量小于1kD的蛋白溶液(标记为样品L)。对H、M和L三部分分别测定ACE抑制率和蛋白浓度，结果见表1。

由表1的数据可知，样品L的抑制率达到了92.07%，但是蛋白浓度64.06μg/ml却是三个样品中最低的。可以看出，分子量MW＜1kD的组分抑制活性最高，选取分子量MW＜1kD的组分继续进行后续实验是正确的，这与前述理论分析相吻合。

表1 样品H、M、L的蛋白浓度和ACE抑制率

Table 1 Protein concentration and ACE inhibitory activity of sample H, M and L

样品编号	蛋白浓度(μg/ml)	A_{228}*	A_{228}**	A_{228}平均值	抑制率(%)
H	72.06	0.366	0.296	0.331	64.98
M	74.73	0.476	0.373	0.425	53.19
L	64.06	0.056	0.087	0.072	92.07
空白对照C	—	—	—	0	—
参照样A	—	—	—	0.908	0

注：* 代表测定第一次；** 代表测定第二次。

2.2 凝胶过滤层析

凝胶过滤层析得到三个有效峰，见图1。

峰Ⅰ从第14管开始流出，保留时间与测定凝胶柱外水体积时，标准蛋白的保留时间接近，可能是由于较大分子的多肽相对分子质量过高，超出了Sephadex G-15的分离范围，致使多肽与凝胶没有相互作用，而直接被洗脱液洗脱。

峰Ⅱ和峰Ⅲ虽然峰高较小，但是峰形良好，分离度高，处于凝胶的有效分离范围之内，作为样品被收集。峰Ⅱ收集范围：78管～95管；峰Ⅲ收集范围：98管～110管。

收集到的峰Ⅱ经过旋转蒸发，浓缩至5ml(蛋白浓度为47.13μg/ml，ACE抑制率为80.71%)；峰Ⅲ经过旋转蒸发，浓缩至2.5ml(蛋白浓度为45.26μg/ml，ACE抑制率为72.39%)。

根据蛋白浓度和ACE抑制率分析，选取峰Ⅱ和峰Ⅲ(分别标记为样品A和样品B)进入下一步的制备过程。其中以样品A为研究重点，因为样品A的浓度相对较高，而且抑制活性高，有利于高活性的ACEIP制备和

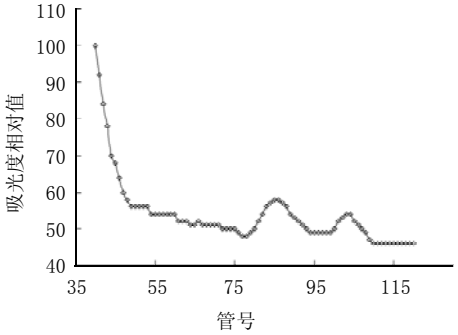


图1 样品凝胶过滤(Sephadex G-15)保留时间曲线(局部)

Fig.1 Retention time of gel filtration chromatography on Sephadex G-15 column

纯化。

2.3 高效液相色谱分离、制备ACE抑制肽

经HPLC分离，样品A和样品B各得到了多种组分，分别见图2和图3。

取样编号方法：样品号+保留时间。选取A10.887、A12.381、A14.225、A20.494、A21.046、A31.738、B13.155、B14.677、B20.987共9个峰进一步研究。选取依据为：A10.887、A12.381、A14.225、B13.155、B14.677五个峰的峰形良好，受干扰较小，峰面积大，有效浓度高；A21.046、A31.738、A31.738、B20.987四个峰的峰形较好，受干扰不大，有一定的代表性。舍弃其它峰的原因：单个峰的面积小，与周围峰都存在一定程度的重合，干扰大；有的虽然面积较大，但为几个峰相互叠加而成(如B13.155前面一个峰)，纯度达不到要求。

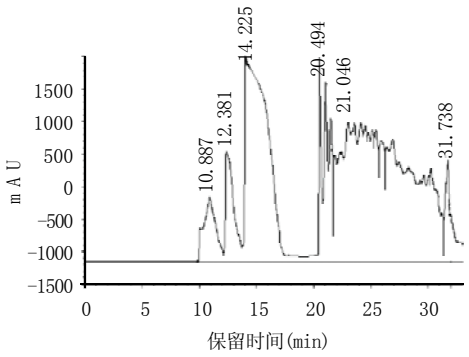


图2 样品A的HPLC保留曲线

Fig.2 Retention time of sample A

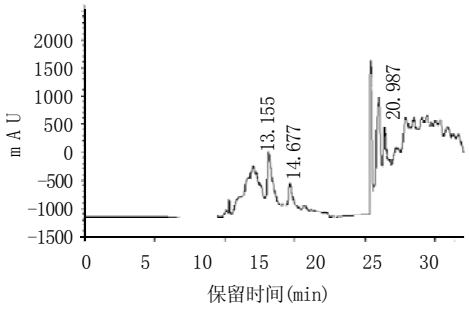


图3 样品B的HPLC保留曲线

Fig.3 Retention time of sample B

对选取的9个样品进行蛋白浓度和ACE抑制率测定，结果见表2。从表2中不难发现，9个样品的ACE抑制率有很大的差异。有较高抑制活性的样品有四个，分别是：A10.887、A14.225、A21.046和B20.987；而样品A12.381和A20.494仅有较弱的抑制活性；其余三个样品A31.738、B13.155和B14.667没有抑制活性。总体上可以看出：样品A的抑制活性要高于样品B的抑制活性，加之样品A的浓度高于样品B的浓度，有利于后期测序工作的展开。

表2 9组样品蛋白(多肽)浓度和ACE抑制率

Table 2 Protein concentrationand ACE inhibitory activity of 9 samples

样品编号	多肽浓度(μg/ml)	A_{228}*	ACE抑制率(%)
A10.887	24.82	0.151	83.76
A12.381	2.51	0.690	25.81
A14.225	11.12	0.172	81.51
A20.494	21.55	0.797	14.30
A21.046	24.33	0.162	82.58
A31.738	26.76	1.120	0
B13.155	13.90	0.954	0
B14.667	5.56	0.916	1.51
B20.987	23.29	0.120	87.10

注：A_{228}* 指测ACE抑制率时，波长228nm处的吸光度。

综上分析，初步筛选得到三个样品：A14.225、A21.046、B20.987。三个样品的浓度：A14.225为11.12μg/ml；A21.046为24.33 μg/ml；B20.987为23.29μg/ml。尽管三个样品的ACE抑制率相近，但是样品A14.225的浓度却仅为样品A21.046的45.7%，样品B20.987的47.7%。其结果是，样品A14.225在较低浓度下即具有很高的抑制活性。最终选取样品A14.225进一步研究。

2.4 样品的分子量测定

利用HPLC分离制备的样品A14.225总体积为2.5ml，经脱盐和冷冻干燥后，采用电喷雾四极杆飞行时间串联质谱仪进行分子量测定，结果见图4。

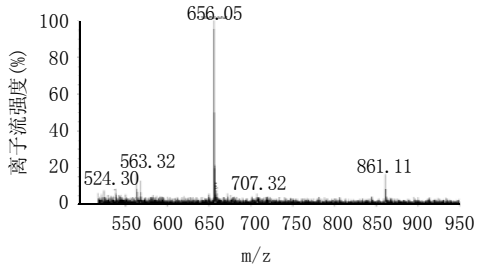


图4 样品A14.225的分子量质谱图

Fig.4 Determination of molecular weight of sample A14.225 by ESI-Q-TOF-MS

从图4中可以看出，质荷比(m/z)为656.05的峰强度最大。由此推测，该峰即为样品的$[M+H]^+$型离子，而656.05就是该型离子的质荷比。m/z小于656.05的峰可能是样品被碰撞形成的碎片离子，m/z大于656.05的峰可能是样品与碎片离子结合形成的复合离子。从碰撞和裂解的几率推断，两类离子含量不会很高。质谱峰相对强度也证实了本推测。由此得出，样品的分子质量为：

656.05－1.0079 = 655.04。此样品可能是含有6～7个氨基酸残基的多肽。

参考文献：

[1] KOIKE H, ITO K, MIYAMOTO M, et al. Effects of long-term blockade of angiotensin-converting enzyme with captopril (SQ14,225) on hemodynamics and circulating blood volume in SHR[J]. Hypertension, 1980, 2 (3): 299-303.

[2] ONDETTI M A, RUBIN B, CUSHMAN D W. Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents[J]. Science, 1977, 4288: 441-444.

[3] 上海医科大学. 实用内科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1986.

[4] FERREIRA S H. A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bathrops jararaca*[J]. British Journal of Pharmacology, 1965, 24:163-169.

[5] KOHMURA M, NIO N, KUBO K, et al. Inhibition of angiotensin-converting enzyme by synthetic peptides of human β-casein[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1989, 53 (8): 2107-2114.

[6] ABUBAKAR A, SAITO T, KITAZAWA H, et al. Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion[J]. Journal of Dairy Science, 1998, 81: 3131-3138.

[7] MATSUI T, MATSUFUJI H, SEKI E, et al. Inhibition of angiotensinI-converting enzyme by *Bacillus licheniformis* alkaline protease hydrolysates derived from sardine muscle[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 1993, 57: 922-925.

[8] WU J P, DING X L. Hypotensive and physiological effect of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2001, 49: 501-506.

[9] BYUN H G, KIM S K. Structure and activity of angiotensinI-converting enzyme inhibitory peptides derived from Alaskan Pollack skin[J]. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2002, 35: 239-243.

[10] 李二凤, 何小维, 罗志刚. 胶原蛋白饲料粉的制备、组成分析及在饲料中的应用[J]. 粮食与饲料工业, 2006 (6): 33-34.

[11] FUJITA H, YOKOYAMA K, YOSHIKAW A M. Classification and antihypertensive activity of angiotensin Ⅰ-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins[J]. Journal of Food Science, 2000, 65 (4): 564-569.

[12] YOKOYAMA H, CHIBA H, YOSHIKAWA M. Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from thermolysin digest of dried bonito [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 1992, 56 (10): 1541-1545.

[13] MIYOSHI S, ISHIKAWA H, KANEKO T, et al. Structures and activity of angiotensin-converting enzyme inhibitors in zein hydrolysate[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1991, 55 (3): 1313-1318.

[14] LI G H, LE G W, SHI Y H, et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects[J]. Nutrition Research, 2004, 24 (7): 469-486.

[15] JANG A, LEE M. Purification and identification of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from beef hydrolysates[J]. Meat Science, 2005, 69 (4): 653-661.

[16] 刘箭. 生物化学实验教程[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 17-19.

[17] CUSHMAN D W, CHEUNG H S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin I-converting enzyme of rabbit lung[J]. Biochemical Pharmacology, 1971, 20 (7): 1637-1648.