

羊胎盘抗肿瘤活性蛋白多肽的制备分离

胡爱林^{1,2}, 赵新民³, 艾合米丁·外力¹, 高彦华¹, 阿吉艾克拜尔·艾萨¹, 阿布力米提·伊力^{1*}

(1. 中国科学院新疆理化技术研究所, 中国科学院干旱区植物资源化学重点实验室, 新疆乌鲁木齐 830011) (2. 中国科学院大学, 北京 100049) (3. 新疆生化药业有限公司, 新疆乌鲁木齐 830032)

摘要: 以羊胎盘为原料, 蛋白含量和 MTT 肿瘤抑制活性作为评价指标, 筛选羊胎盘抗肿瘤活性蛋白多肽组分的提取和制备工艺。结果表明, 混合磷酸盐缓冲溶液搅拌提取法可用于制备具有结肠癌抑制活性的羊胎盘提取物。其具体条件为: pH 值为 7.4 的混合磷酸盐缓冲溶液 (其中含 0.9 wt.% 的 NaCl 溶液, 50 mmol/L 常规 PBS 溶液, 0.5~1 mmol/L 苯甲基磺酰氟), 提取温度 4~10 °C, 提取 2 h, 总提取物得率为 37.91%, 蛋白含量为 55.62%。抗肿瘤活性结果表明当提取物质量浓度为 2 mg/mL, 作用于 HT-29 细胞和 HCT-116 细胞抑制率分别 56.88% 和 53.07%。总提取物经 Sephadex-G-25 凝胶柱层析分离纯化得到 2 个对结肠癌 HT-29 和 HCT-116 细胞株具有良好抑制活性的蛋白多肽组分 F2 和 F3。抗肿瘤活性测试 F2 组分的 IC₅₀ 值分别为 0.328 mg/mL 和 0.183 mg/mL, F3 组分的 IC₅₀ 值分别为 0.213 mg/mL 和 0.095 mg/mL。综上证实羊胎盘混合磷酸盐提取物经凝胶柱层析得到的活性蛋白多肽组分具有良好的抑制结肠癌细胞活性, 可为羊胎盘废弃物的有效开发, 综合利用提供理论与技术支持。

关键词: 羊胎盘; 抗肿瘤; 活性蛋白和多肽

文章编号: 1673-9078(2025)01-105-112

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.1.1504

Preparation and Isolation of Anti-tumor Active Proteins and Polypeptides from Sheep Placenta

HU Ailin^{1,2}, ZHAO Xinmin³, AHMIDIN·Wali¹, GAO Yanhua¹, HAJIAKBAR Aisa¹, ABULIMITI·Yili^{1*}

(1.State Key Laboratory of Xinjiang Indigenous Medicinal Plants Resource Utilization, Xinjiang Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, China)(2.University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)(3.Xinjiang Biochemical Pharmaceutical Co. Ltd., Urumqi 830032, China)

Abstract: Sheep placenta was used as the raw material to extract proteins and peptides. The protein content and MTT tumor inhibitory activity were used as the evaluation indexes to screen the extraction and fractions of sheep placenta with anti-tumor activity. The results showed that the stirred extraction method mixed phosphate buffer solution could be used to prepare sheep placenta extracts with inhibitory activity against a colon cancer cell lines. The specific conditions were as follows: mixed phosphate buffer solution (containing 0.15 mol/L NaCl solution, 50 mmol/L conventional PBS solution, and

引文格式:

胡爱林,赵新民,艾合米丁·外力,等.羊胎盘抗肿瘤活性蛋白多肽的制备分离[J].现代食品科技,2025,41(1):105-112.

HU Ailin, ZHAO Xinmin, AHMIDIN·Wali, et al. Preparation and isolation of anti-tumor active proteins and polypeptides from sheep placenta [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(1): 105-112.

收稿日期: 2023-12-18

基金项目: 新疆维吾尔自治区天山英才 - 科技创新领军人才项目 (2022TSYCLJ0008); 新疆维吾尔自治区天山雪松计划科技创新领军人才后备人选项目 (2020XS08); 新疆维吾尔自治区天池英才引进计划项目 (2024000051)

作者简介: 胡爱林 (1999-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 天然产物来源蛋白多肽的分离纯化, E-mail: huailin21@mails.ucas.ac.cn

通讯作者: 阿布力米提·伊力 (1971-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 天然产物来源生物大分子的物质基础研究、生物活性肽, E-mail: abu@ms.xjb.ac.cn

0.5~1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride) at pH value 7.4, extraction temperature of 4~10 °C, and extraction for 2 h. The total extract yield and the protein content were 37.91 and 55.62%, respectively. The results of antitumor activity showed that the inhibition rate was 56.88 and 53.07% in HT-29 and HCT-116 cells, respectively, when the concentration of the extract was 2 mg/mL. The total extract was isolated and purified using a Sephadex-G-25 gel column chromatography to obtain F2 and F3 fractions with good inhibitory activity against HT-29 and HCT-116 cells; the IC_{50} of F2 was 0.328 and 0.183 mg/mL, respectively, and the IC_{50} of F3 was 0.213 and 0.095 mg/mL, respectively. In conclusion, the active fractions obtained from the gel column chromatography of the mixed phosphate extract of sheep placenta had good inhibitory activity against colon cancer cell lines. The results provide theoretical and technical support for the effective development and comprehensive utilization of sheep placenta waste.

Key words: sheep placental; antitumor; activity protein and peptide

胎盘，亦称紫河车，《本草纲目》记载其具有丰富的药用价值，可用于舒缓精神压力、治疗焦虑、补血益气、提神、抗疲劳^[1]。现代医学研究表明：胎盘提取物在治疗心血管疾病、神经损伤、肝损伤和预防肿瘤等方面具有应用价值^[2-5]。由于伦理道德和安全问题的限制，研究人员将注意力转到羊、牛、猪、骆驼、鹿、驴等哺乳动物身上，发现动物胎盘中含有丰富的酶类、生长因子和多肽等物质，其提取物具有抗炎、抗氧化、抗疲劳、免疫调节和创伤修复等作用^[6-10]。

在所有的动物胎盘中，羊胎盘和人胎盘具有相似的营养结构、药理作用和中医功效^[10-13]。自20世纪突破性的从羊胎盘中提取出高活性的羊胎素以来，已经从羊胎盘中开发出了多种用于美容、医疗保健的产品，包含酶类和抗氧化肽提取物^[14]。现代药理学研究表明羊胎盘含有80%以上的蛋白质和多种氨基酸，具有很高的营养价值。羊胎盘提取物中的小分子肽具有抗氧化、抗疲劳、抗衰老和免疫调节等活性^[15-17]。新疆作为“丝绸之路经济带”核心枢纽，畜牧产业发达，羊存栏数多，每年都有大量的羊胎盘资源作为羊肉产业的副产物产生，对于生产羊胎盘提取物具有独特的地理和人文优势。目前获取羊胎盘提取物的方法主要有均质提取法、冻融辅助提取法、酶辅助提取法、溶剂提取法和超声辅助提取法等^[18]。在所有的提取方法中，其中仅超声辅助提取法被用于羊胎盘抗肿瘤活性物质的提取，超声波的空化作用在提高提取率的同时会产生局部高温不利于生物物质的提取，且超声波的能耗大，这都极大地限制了其在工业上的应用。由于缺乏有价值的温和提取工艺，大多数羊胎盘被当作废弃物丢掉。大量未利用的羊胎盘不仅在很大程度上造成了资源浪费，还引发了环境污染^[19]。因此，开发工业

上经济高效、温和的提取羊胎盘的工艺方法，进行羊胎盘抗肿瘤蛋白、多肽的物质基础和药用有效部位研究具有重要的药用和经济价值，可以为生产高值化的食用、药用产品提供参考。

本试验以羊胎盘为原料，在低温条件下，采用冻融辅助提取、溶剂搅拌提取和超声辅助提取等工艺，以得率、蛋白含量和抗肿瘤活性实验和工业实际操作难度初步筛选考察不同提取方法和缓冲溶液在提取抗肿瘤活性蛋白、多肽方面的差异。最终得到了有效的抗肿瘤活性部位，并对其进行了氨基酸分析，微观状态分析和生物活性评价，为羊胎盘源抗肿瘤活性蛋白、多肽的研究提供物质基础支持，拓展其在食品、药品中的应用，为发现更多的胎盘活性物质提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

羊胎盘冻干粉，购自新疆生化药业有限公司；BCA试剂盒，美国 Thermo Fisher Scientific 公司；10% 十二烷基硫酸钠 (SDS)、30% 丙烯酰胺，博士德生物工程有限公司；1.5 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 值 6.8, pH 值 8.8)，北京索莱宝科技有限公司；过硫酸铵 (AP)、溴酚蓝、考马斯亮蓝 R250，上海阿拉丁生化科技有限公司； β - 巯基乙醇、甘氨酸，上海麦克林生化科技有限公司；Sephadex G-25 美国 Cytiva(思拓凡) 有限公司；阿霉素 (DOX)，噻唑蓝，DMSO 美国 MedChemExpress 生物科技公司；HT-29、HCT-116 和 L-O2 细胞系，购自中国科学院上海细胞库；实验使用的其他化学品均为分析纯。

1.2 仪器设备

DF-10IS 恒温加热磁力搅拌器，郑州长城工

贸有限公司; FDU-2100 冷冻干燥机, 日本东京理化; ME204 电子天平, 梅特勒-托利多仪器公司; Unique AutoPure100 蛋白纯化系统, 苏州英赛斯智能科技有限公司; UV-2600 紫外分光光度计, 日本岛津有限公司; X mark 酶标仪, 上海新领生物科技发展有限公司; 凝胶成像仪, 北京六一生物科技发展有限公司; 165-8001 小型电泳仪, 伯乐生命医学产品有限公司; FDY2002-SUV 低有机物型超纯水机, 青岛富勒姆科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 羊胎盘的提取

本试验参考刘辉等^[18]提取水溶性蛋白的方法和陈朋等^[20]提取抗肿瘤羊胎盘提取物的专利方法, 根据课题组前期动物组织活性蛋白提取的研究基础^[21], 设计了5种提取方法。具体提取流程如下:

羊胎盘冻干粉 → 不同提取方法 → 离心取上清 → 透析 (48 h) → 冷冻干燥 → 羊胎盘蛋白粉末

称取羊胎盘冻干粉各5g, 按表1中的羊胎盘提取方法进行提取, 得到羊胎盘蛋白提取物, 于-20℃保存备用。

1.3.2 含量测定

以BCA法进行蛋白质含量的测定(参考BCA试剂盒说明书)。以蛋白含量为横坐标(mg/mL), 吸光度为纵坐标(A)进行线性回归绘制标准曲线, 测定多种方法制备的羊胎盘蛋白提取物的蛋白含量。

1.3.3 提取物的分离纯化

SMPBS中所得的羊胎盘粗提物以纯化水溶解, 离心机6000 r/min离心10 min。取上清上样到Sephadex-G-25凝胶层析柱上, 流速4 mL/min, 用纯化水洗脱, 在280 nm和220 nm处检测蛋白质的吸收, 收集洗脱液冻干进行分析。

1.3.4 SDS-PAGE分析

75 V条件下进行变性还原型SDS-PAGE分析。准确称取样品各1 mg, 溶解后离心取上清1:1加入蛋白上样缓冲液(2×)震荡混匀, 沸水浴10 min。以1.5 mm厚的12 wt.%分离胶和5 wt.%浓缩胶进行SDS-PAGE分析, 每个泳道上样30 μL。待电泳结束后, 依次进行固定、染色、脱色和凝胶图像采集。

1.3.5 SEM分析

采用扫描电镜(SEM)(Zeiss Supra55 VP)观察Sephadex-G-25柱层析部位的显微结构。取适量样品置于样品架上, 用离子溅射仪涂上一层金, 在加速电压下用扫描电镜观察样品显微结构, 并拍照。

1.3.6 氨基酸分析

取少量Sephadex-G-25柱层析组分, 以含0.1 wt.%苯酚的6 mol/L HCl在110℃下反应24 h进行样品酸水解, 然后2:1:1分别加入样品酸水解溶液, 1 mol/L三乙胺乙醇溶液和0.2 mol/L异硫氰酸苯酯乙醇溶液混匀室温反应1 h。待反应结束后1:1加入正己烷溶液, 震荡分层, 取下层溶液和水混合后过0.22 μm针式过滤器过滤。按照Diamonsil AAA氨基酸分析住使用说明书, 对衍生过的氨基酸混合标准品和样品进行HPLC分析, 以样品谱图中各峰峰面积比判断样品所含氨基酸相对摩尔比。

1.3.7 抗肿瘤活性测定

抗肿瘤活性筛选细胞模型为HT-29和HCT-116结肠癌细胞、A549肺癌细胞、HGC-27胃癌细胞和L-O2人正常肝细胞。样品用加入支原体去除剂的培养基配制, 0.45 μm滤膜过滤保存, 采用MTT方法测定细胞活力, 将处于对数生长期的细胞消化并重悬后, 以相应的细胞密度接种于96孔板, 每孔加入100 μL细胞液, 37℃、φ=5% CO₂和95%湿度的细胞培养箱中培养24 h后加入受试化合物, 每孔20 μL, 弃上清, 加入100 μL不同质量浓度的样品。

表1 羊胎盘蛋白提取方法

Table 1 The extraction methods of sheep placental protein

序号	提取方法	提取溶剂、条件	料液比	T/℃	时间/h	次数
FNS	反复冻融	0.9 wt.% NaCl, pH值7.4	1:10	-40	24	3
SNS	生理盐水搅拌	0.9 wt.% NaCl, pH值7.4	1:30	4~7	2	3
UPBS	超声辅助提取	PBS 50 mmol/L, pH值7.4, 300 W	1:30	4~7	2	3
SPBS	缓冲液搅拌	PBS 50 mmol/L, pH值7.4	1:30	4~7	2	3
SMPBS	混合盐搅拌	0.9 wt.% NaCl+(PBS 50 mmol/L, pH值7.4)	1:30	4~7	2	3

表 2 羊胎盘提取物提取方法对比表

Table 2 Comparison of extraction methods of sheep placental extract

序号	得率/%	蛋白含量/%	肿瘤细胞抑制率/%			
			HT-29	HCT-116	HGC-27	A549
FNS	27.36 ± 1.09 ^d	45.21 ± 1.41 ^{bc}	64.38 ± 0.59 ^a	58.92 ± 5.67 ^a	38.34 ± 4.17 ^c	30.59 ± 10.27 ^b
SNS	27.63 ± 1.27 ^d	33.26 ± 1.32 ^c	25.71 ± 13.06 ^b	21.52 ± 6.49 ^b	23.39 ± 8.14 ^c	24.21 ± 8.89 ^b
UPBS	39.65 ± 1.04 ^a	48.64 ± 1.17 ^b	62.63 ± 12.16 ^a	59.85 ± 9.98 ^a	59.91 ± 6.34 ^a	50.89 ± 0.74 ^a
SPBS	30.24 ± 1.07 ^c	39.26 ± 1.43 ^d	35.79 ± 4.37 ^b	27.32 ± 1.53 ^b	43.36 ± 4.17 ^{bc}	31.79 ± 1.95 ^b
SMPBS	37.91 ± 1.12 ^b	55.62 ± 1.24 ^a	56.88 ± 4.83 ^a	53.07 ± 4.92 ^a	48.61 ± 5.85 ^b	49.04 ± 6.99 ^a

注: 同列右肩不同的小写字母表示具有显著差异 ($P < 0.05$)。

设 3~6 个复孔; 另设无细胞本底组, 溶剂对照组及阳性对照组; 在温度 37 °C、 $\phi=5\%$ CO₂ 条件下继续培养 48 h 后弃去上清液, 加入噻唑蓝 (MTT) 液 (每孔 100 μ L), 继续培养 2~4 h; 弃去上清液, 每孔加入 150 μ L DMSO, 置摇床上低速振荡 10 min, 使结晶物充分溶解。待甲臜溶解后, 用酶标仪检测各孔 570 nm 的光吸收值 (OD)。然后用式 (1) 计算样品对不同癌细胞生长的抑制率。

$$C = \left(1 - \frac{OD_S - OD_B}{OD_C - OD_B}\right) \times 100\% \quad (1)$$

式中:

C——细胞生长抑制率, %;

OD_S——供试样品 570 nm 下的 OD 值;

OD_C——细胞对照 570 nm 下的 OD 值;

OD_B——空白组 570 nm 下的 OD 值。

1.3.8 数据分析

各实验重复 3 次, 实验结果用平均值 ± 标准差表示, 用 Origin 8.6 进行 ANOVA 方差分析和 Fisher's 检验, 数据分析作图。

2 结果与讨论

2.1 提取工艺的确定

不同提取方法制备的羊胎盘蛋白提取物中的蛋白含量、得率及其抗肿瘤活性如表 2 所示。结果表明, 羊胎盘中抗肿瘤活性蛋白、多肽的提取受提取方法和提取溶剂的双重影响, 且不同提取方法的得率、蛋白含量存在显著性差异。如图 1 所示, 电泳分析显示不同提取方法得到的提取物在 25~130 ku 范围内显出相应分子量的蛋白条带, SMPBS 法相比于 SNS 法提取, SDS-PAGE 图显示 25~50 ku 范围内具有明显的蛋白条带差异分布, 缓冲溶剂的存在具有优势。相比于其他 4 种方法, 超声辅助提取法具有

最优的得率, 其得率可达 39.65%, 这是由于超声波的空化作用, 增加了细胞的破碎, 使胞内蛋白质溶出释放变的更加容易^[22]。SMPBS 法提取物以 BCA 法测定其蛋白含量为 55.62%, 是 5 种方法中蛋白含量最高的, 因为缓冲液的存在为蛋白质的稳定存在提供良好的环境, 避免了因 pH 值的变化使得蛋白质沉淀随着相分离被除去, 这与杨子怡等^[23]的研究相似, 即缓冲液体系对肉蛋白提取效果影响明显, 增加了蛋白质的溶解度。混合磷酸盐缓冲溶液中 NaCl 的存在不仅增加了盐溶性蛋白的溶出释放, 还增强了蛋白质的稳定性, 改善了蛋白质的功能特性, 有益于食品开发^[24]。低浓度下, 随着 NaCl 提取浓度的增加, 增强了蛋白的表面疏水性、稳定性、起泡稳定性和溶解度^[24]。NaCl 的存在增强了疏水性氨基酸的释放, 有助于羊胎盘中抗氧化活性物质的释放。

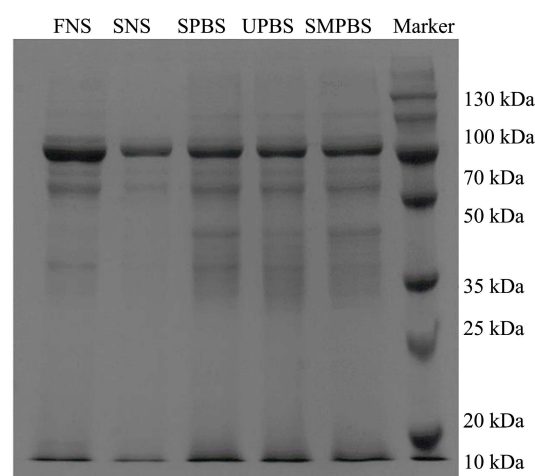


图 1 羊胎盘提取物 SDS-PAGE 对比

Fig.1 The SDS-PAGE of different sheep placental extract

如表 2 所示, 5 种方法制备的提取物对 4 种肿瘤细胞的增殖均具有不同程度的抑制作用, 且具有一定的显著性差异 ($P < 0.05$)。从表 2 可以判断出,

不同的提取方法适用于制备不同肿瘤细胞抑制活性的提取物。其中 SMPBS 和 FNS 同 UPBS 得到的羊胎盘蛋白质提取物在结肠癌细胞抑制活性方面差异不显著 ($P < 0.05$), 具有相似的结肠癌细胞抑制活性。UPBS 法得到的羊胎盘蛋白质提取物对多种肿瘤细胞的增殖具有抑制作用, 这得益于超声改变了蛋白质的构象, 使蛋白暴露出了更多的生物可及性位点, 从而提高了蛋白的生物活性^[25]。超声辅助提取蛋白质的普遍缺陷是超声对于蛋白质的影响不稳定, 整个提取过程受到超声功率和超声温度的多重影响^[25]。因此, 相比于耗时的反复冻融辅助提取、超声的不可控因素和实施难度, 混合磷酸盐缓冲溶液搅拌提取作为一种温和的传统溶剂提取法, 更适用于工业上生产具有结肠癌细胞抑制活性的羊胎盘提取物。

2.2 Sephadex-G-25凝胶柱层析部位分析结果

2.2.1 Sephadex-G-25凝胶柱层析部位分析结果

尺寸排阻色谱-凝胶柱层析作为工业上常用的柱层析手段, 不仅可以用于提取物的脱盐, 还可以用于提取物的分离纯化, 尤其是在多肽的分离纯化上。SMPBS 法制备的羊胎盘蛋白提取物的 Sephadex-G-25 凝胶柱层析洗脱曲线如图 2 所示, 得到 3 个洗脱峰, SDS-PAGE 染色条带表明其 F1 组分为大分子量蛋白和小分子多肽, F2 和 F3 组分为小分子量多肽条带, 但仍可见少量丰度的大分子量蛋白条带。

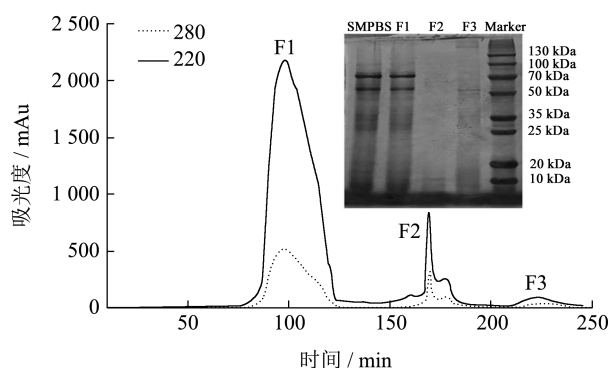


图 2 SMPBS 提取物的 Sephadex G-25 凝胶柱层析洗脱曲线

Fig.2 Elution curve of SMPBS extracts by Sephadex G-25

2.2.2 Sephadex-G-25凝胶柱层析部位抗肿瘤活性结果

Sephadex-G-25 凝胶柱层析洗脱组分的抗肿瘤活性测试结果如图 3 所示, 对于结肠癌 HT-29 和

HCT-116 细胞株, F2 组分的 IC_{50} 为 0.328 mg/mL 和 0.183 mg/mL, F3 组分的 IC_{50} 为 0.213 mg/mL 和 0.095 mg/mL。随着凝胶色谱的分离纯化, F2 和 F3 组分较 SMPBS 和 F1 组分具有更低的 IC_{50} 值。F2 和 F3 组分具有比阳性对照组 DOX (阿霉素) 更强的抑制能力, 且有显著性差异 ($P < 0.05$)。在细胞毒性方面, F2 和 F3 组分对于正常 L-O2 细胞的 IC_{50} 抑制活性为 0.206 mg/mL 和 1.412 mg/mL, 高于阳性对照组 DOX 的 0.076 mg/mL, 这表明 F2 和 F3 组分对于正常肝细胞 L-O2 毒副作用小于 DOX。且在实际测试中 F2 组分对于正常肝细胞 L-O2 毒副作用大于 F3 组分。陈朋等^[20]采用匀浆超滤法从羊胎盘中提取到的 50~100 ku 分子量组分对于 HCT-116 细胞株的 IC_{50} 值为 0.555 mg/mL。与陈朋等^[20]的结果相比, F2 和 F3 良好的抗肿瘤活性, 得益于组分中高占比的多肽, 这与 SDS-PAGE 的条带相互印证。除少量的环状刚性多肽外, 大多数小分子量的多肽具有比大分子量蛋白更高的柔性, 这些柔性多肽往往具有更加灵活的构象, 更容易暴露出活性位点, 以分子识别的方式与细胞膜相互作用或以相似相溶的方式透过细胞膜结合细胞中的靶点蛋白发挥作用^[26]。研究表明某些抗癌活性肽同样表现出抗氧化和免疫调节作用, 可以通过调节机体的免疫应答反应或氧化应激发挥其抗肿瘤作用^[27]。云皓琪等^[28]得到的骆驼胎盘提取物在肿瘤免疫逃避过程中的抑制作用证实了胎盘提取物基于免疫调节的抗肿瘤作用。

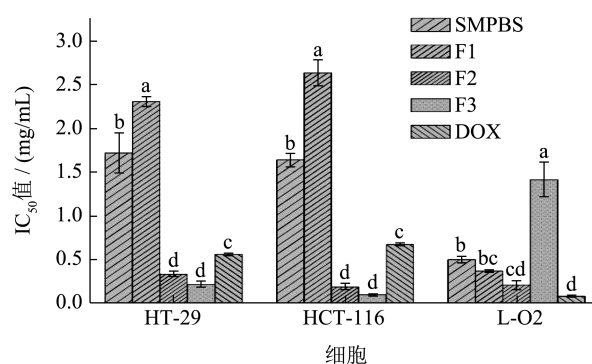


图 3 SMPBS 提取物及其凝胶柱层析组分抗肿瘤活性

Fig.3 Anti-tumor activity of SMPBS and its gel fraction

注: 柱状图上的小写字母表示具有显著差异 ($P < 0.05$)。

2.2.3 Sephadex-G-25凝胶柱层析部位分析

SMPBS 提取物及其 Sephadex-G-25 凝胶柱层析洗脱组分的 2 000 倍 SEM 分析如图 4 所示, 各组分蛋白微观结构存在差异。SMPBS 提取物的蛋白结

构主要为棍棒状或椭圆形蛋白质；F1组分的蛋白结构主要为椭圆形蛋白和少量的棍棒状蛋白；F2组分的蛋白多肽结构主要为球状蛋白，具有一定聚集性特征，这与Du等^[24]研究的相似；当带电离子与蛋白质的结合较弱时，蛋白质以团聚状存在，溶解度较差；F3组分为疏松多孔的蛋白、多肽，在其聚集表面具有不规则的疏松脊形凸起。在高分辨率电镜下，F2和F3表现出明显的聚集性结构特征得益于其表面氨基酸间密切的相互作用^[24]。

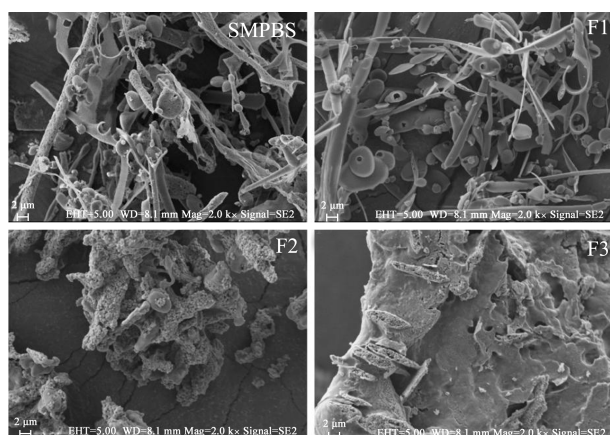


图4 SMPBS 提取物及其凝胶柱层析组分冻干粉未的扫描电镜图

Fig4. SEM of the SMPBS extract powder and its gel fraction lyophilized powder

2.2.4 Sephadex-G-25柱层析组分氨基酸分析

SMPBS 提取物及其 Sephadex-G-25 凝胶柱层析洗脱组分的氨基酸分析如表3所示，SMPBS和F1组分的氨基酸组成相似，Glu、Val、Gly和Lys的含量相对较高，符合常见羊胎盘提取物的氨基酸组成。生物活性肽具有抗癌特性^[29]，是因为它们的氨基酸可能具有增加细胞通透性的潜力^[30,31]。抗肿瘤活性肽的构效关系显示抗肿瘤生物活性和抗癌肽肽链中带正电的氨基酸（Lys、Arg和His）有关，因为癌细胞表面存在特异性表达的阴离子成分，肿瘤细胞相比于正常细胞更具负电性，带正电的氨基酸可以通过静电吸附而有效结合^[26]。同样的，抗癌肽表面的疏水区域可以和细胞膜脂质部分结合，改变细胞膜的通透性，进入细胞发挥作用^[32]。在柱层析的3个组分中，F2组分中His含量为4.13%，F3组分中Arg含量为0.84%，较SMPBS和F1组分更优。因为带正电且疏水的His和Arg形成的阳离子肽链可以更好地和癌细胞表面识别，进而破坏细胞的完整性，此外含有苯丙氨酸的肽可以增加肽链靶向癌细胞膜的亲和力^[33-35]。经凝胶柱层析纯化后，F2和

F3组分中Leu的含量分别为12.73%和17.3%，Ala的含量为10.31%和8.20%，较SMPBS和F1组分明显增多，这提示F2和F3组分除抗肿瘤活性外，可能具有一定的抗氧化活性^[14-16]，因此F2和F3可能同样基于氧化应激的方式发挥其抗肿瘤活性作用^[27]。F2组分对于正常肝细胞的毒性作用，可能来源于F2组分中某些肽的疏水氨基酸，过高的疏水性氨基酸会导致一定的毒性^[36]；F2组分中的Pro含量为8.19%，显著高于F3组分中Pro的含量，尽管Pro对于肽链和癌细胞的膜相互作用和构象灵活性很重要，但过量的Pro会加剧细胞毒性^[28]，这可能是F2组分对于正常L-O2细胞的毒性高于F3组分的潜在原因。

表3 SMPBS提取物及其凝胶柱层析组分氨基酸分析对比
Table 3 Comparison of amino acid analysis between SMPBS extract and its gel fraction

氨基酸	各组分氨基酸摩尔百分比/%			
	SMPBS	F1	F2	F3
Ser	7.51 ± 1.21	4.79 ± 0.56	7.14 ± 0.26	6.31 ± 0.67
Thr	1.72 ± 0.34	1.95 ± 0.12	0.93 ± 0.11	1.86 ± 0.21
Ala*	5.98 ± 0.86	5.19 ± 0.49	10.31 ± 1.09	8.20 ± 0.85
Tyr	3.52 ± 0.46	4.27 ± 0.36	1.83 ± 0.33	1.96 ± 0.24
Val*	9.37 ± 1.34	10.37 ± 1.06	2.35 ± 0.24	7.67 ± 0.99
Met*	2.03 ± 0.15	1.04 ± 0.26	1.27 ± 0.25	1.12 ± 0.34
Cys-Cys	0.67 ± 0.16	0.32 ± 0.16	0.48 ± 0.08	0.30 ± 0.13
Ile*	2.12 ± 0.24	3.22 ± 0.25	1.09 ± 0.26	0.59 ± 0.11
Leu*	8.83 ± 1.36	9.29 ± 0.98	12.73 ± 1.53	17.3 ± 3.26
Asp [#]	4.94 ± 0.68	7.56 ± 0.87	2.93 ± 0.52	7.45 ± 0.98
Glu [#]	11.73 ± 1.64	14.95 ± 1.59	11.54 ± 2.33	16.49 ± 0.58
Phe*	5.91 ± 0.59	4.77 ± 0.52	3.93 ± 0.58	3.54 ± 0.32
Lys [#]	12.11 ± 1.35	12.10 ± 1.52	8.95 ± 0.62	7.88 ± 0.78
Gly	12.90 ± 1.89	11.11 ± 1.27	16.76 ± 2.26	13.03 ± 1.09
His [#]	3.71 ± 0.37	3.30 ± 0.32	4.13 ± 0.98	2.49 ± 0.56
Arg [#]	0.62 ± 0.12	0.66 ± 0.11	0.45 ± 0.11	0.84 ± 0.14
Pro*	7.38 ± 0.98	5.13 ± 0.68	8.19 ± 0.59	2.97 ± 0.26

注：* 疏水氨基酸；# 带电氨基酸。

3 结论

本文通过得率、蛋白含量和抗肿瘤活性实验对5种提取方法的羊胎盘提取物进行筛选，发现混合磷酸盐溶液搅拌提取法可以作为工业上提取羊胎盘抗结肠癌活性成分有效方法。通过Sephadex G-25

凝胶柱层析手段,成功实现了羊胎盘混合磷酸盐提取物中抗结肠癌活性蛋白多肽的富集,得到了具有结肠癌 HT-29 和 HCT-116 细胞株抑制活性的组分 F2 和 F3。F2 组分的 IC₅₀ 分别为 0.328 mg/mL 和 0.183 mg/mL, F3 组分的 IC₅₀ 分别为 0.213 mg/mL 和 0.095 mg/mL。SEM 分析显示羊胎盘提取物纯化组分 F1, F2 和 F3 的微观结构具有明显差异。F2 组分和 F3 组分的氨基酸分析显示抗肿瘤活性与其中肽链上的疏水性氨基酸 Leu、Ala 和带电氨基酸 His、Arg 有关。本研究开发的羊胎盘抗肿瘤活性部位制备工艺简单,为副产物羊胎盘的有效开发,综合利用提供理论与技术支撑,为羊胎盘在食品、抗氧化和抗肿瘤药品等相关产品研发领域提供了新的研究方向。

参考文献

- [1] 苏晔.胎盘免疫调节因子的生物功能及临床应用进展[J].免疫学杂志,2002,S1:117-119.
- [2] 李静,周海燕,周萍萍,等.人胎盘提取物抑制结肠癌细胞的增殖及迁移[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2017,24(5):503-509.
- [3] MAMDOOH G, MOHAMED S A E-G. Human placental extract ameliorates methotrexate-induced hepatotoxicity in rats via regulating antioxidative and anti-inflammatory responses [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2021, 88(6): 961-71.
- [4] 睦荣春,肖云,胡庭国,等.人胎盘提取物药理作用研究进展[J].海峡药学,2021,33(8):99-101.
- [5] 王河,陆峥琳,谭蓓蓓,等.我国动物药研究现状及前景展望[J].亚太传统医药,2023,19(2):240-245.
- [6] 莫德格玛,陈香梅,苏日娜,等.动物胎盘的药效研究进展[J].中国民族医药杂志,2019,25(7):58-59.
- [7] 廖峰,樊雨梅,唐洁,等.水解驴胎盘提取物对UV诱导皮肤细胞损伤的保护作用[J].安徽农业科学,2022,50(12):153-157.
- [8] 佟臻昊.骆驼胎盘可溶性蛋白的提取及应用研究[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2019.
- [9] 高垚垚.猪胎盘抗衰老药物质基础及相关作用机制研究[D].扬州:扬州大学,2018.
- [10] 孙辞,边媛媛,吕永通,等.梅花鹿胎盘免疫调节因子制备工艺[J].食品科学,2012,33(24):107-110.
- [11] WANG L, SONG X B, CUI H T, et al. Antifatigue effects of peptide isolated from sheep placenta [J]. Chinese Herbal Medicines, 2018, 10(3): 279-284.
- [12] SHEN B, DENG L, LIU Y, et al. Effects of novel Fufang Biejia Ruangan Tablets with sheep placenta as substitute for Hominis Placenta on CCl₄-induced liver fibrosis [J]. Chinese Herbal Medicines, 2022, 14(1): 104-110.
- [13] LIU J, LUO S, YANG J, et al. The protective effect of sheep placental extract on concanavalin A-induced liver injury in mice [J]. Molecules, 2018, 24(1): 28.
- [14] 王炳祥,顾国生,李鑫雨,等.山羊胎盘小肽的分离及对小鼠抗氧化能力的影响[J].西南农业学报,2011,24(1):315-318.
- [15] 周洁静,侯银臣,刘旺旺,等.采用不同蛋白酶制备羊胎盘抗氧化肽的研究[J].食品工业科技,2015,36(5):156-161.
- [16] 张淑二,方富贵,谷玉,等.山羊胎盘复方制剂对小白鼠缓解疲劳和抗氧化功能的影响[J].中兽医医药杂志,2008,27(6):8-10.
- [17] HOU Y C, YANG S Y, HUANG J H, et al. Nutritional profile and *in vitro* immunomodulatory activity of protein extract from goat placenta and fermented extraction residual [J]. Journal of Food Process Engineering, 2021, 44: 13576
- [18] 刘辉.羊胎盘多肽的制备工艺及抗氧化活性研究[D].长春:吉林大学,2018.
- [19] MARIA L P, AHMED A Z, JOSE M L, et al. A review on bioactive peptides derived from meat and by-products: Extraction methods, biological activities, applications and limitations [J]. Meat Science, 2023, 204: 109278.
- [20] 陈朋,孙梦泽,陈昭名,等.大于50 kD分子量段羊胎盘提取物在制备抗肿瘤药物中的应用:中国,202210575279.0 [P].2022-08-02.
- [21] AMINA A, ZHAO X M, GAO Y H, et al. Biochemical characterization, and anti-inflammatory and antitumor activities of glycoprotein from lamb abomasum [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2023, 311: 116359.
- [22] HU H, WU J, LI CHAN E C Y, et al. Effects of ultrasound on structural and physical properties of soy protein isolate (SPI) dispersions [J]. Food Hydrocolloids, 2013, 30(2): 647-655.
- [23] 杨子怡,吴晗,张志胜,等.提取液成分及提取温度对羊肉香肠蛋白提取效果的影响[J].现代食品,2020,11:100-104.
- [24] DU Q H, WU Y H, XUE S, et al. Extraction concentration of NaCl on structural, physicochemical and functional properties of Moringa oleifera seeds protein [J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 155: 112988.
- [25] WU D, TU M, WANG Z, et al. Biological and conventional food processing modifications on food proteins: Structure, functionality, and bioactivity [J]. Biotechnology Advances, 2020, 40: 107491.
- [26] XIE M F, LIU D J, YANG Y F. Anti-cancer peptides: classification, mechanism of action, reconstruction and modification [J]. Open Biology, 2020, 10(7): 200004.
- [27] LUO Q, ZHANG L, LUO C, et al. Emerging strategies

- in cancer therapy combining chemotherapy with immunotherapy [J]. *Cancer Letters*, 2019, 454: 191-203.
- [28] 云皓琪. 骆驼胎盘提取物在小鼠肿瘤细胞免疫逃避中的作用研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2021.
- [29] SOK M, SENTJURE M, SCHARA M. Membrane fluidity characteristics of human lung cancer [J]. *Cancer Letters*, 1999, 139(2): 215-220.
- [30] WARARAT C, SOMCCHAI C, SURADEJ H. Anticancer peptide: Physicochemical property, functional aspect and trend in clinical application [J]. *International Journal of Oncology*, 2020, 57(3): 678-696.
- [31] SAMUEL R P, TIMOTHY A H, ALINE D de A, et al. Contiguous hydrophobic and charged surface patches in short helix-constrained peptides drive cell permeability [J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2018, 16(3): 367-371.
- [32] 乔雪, 王义鹏, 于海宁. 抗癌肽的作用机制研究进展[J]. *生物工程学报*, 2019, 35(8): 1391-1400.
- [33] KIYMET O S, BILAL C, TUGBA T A. Antiproliferative activity of whey and casein bioactive peptides on breast cancer: an *in vitro* and *in silico* study [J]. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 2022, 28(4): 1-12.
- [34] LIU X L, CAO R, WANG S, et al. Amphipathicity determines different cytotoxic mechanisms of lysine- or arginine-rich cationic hydrophobic peptides in cancer cells [J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2016, 59(11): 5238-5247.
- [35] DAI Y X, CAI X G, SHI W, et al. Pro-apoptotic cationic host defense peptides rich in lysine or arginine to reverse drug resistance by disrupting tumor cell membrane [J]. *Amino Acids*, 2017, 49(9): 1601-1610.
- [36] CHEN Y X, MICHAEL T GUARNIERI, et al. Role of peptide hydrophobicity in the mechanism of action of alpha-helical antimicrobial peptides [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2007, 51(4): 1398-1406.