

鲨鱼降钙素的分离纯化及性质研究*

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF CALCITONIN FROM *Carcharhinus menisorrh*

郑微云¹ 余群¹ 翁妍² 郑森林²

(¹ 教育部厦门大学海洋环境生态开放实验室 361005)

(² 厦门大学环境科学研究中心, 361005)

关键词 黑印真鲨, 降钙素, 分子量, 高效液相色谱, 分离, 纯化

降钙素 (Calcitonin, CT) 是 Copp 在 1961 年发现并命名的。随后研究发现, 降钙素广泛存在于哺乳动物的甲状腺、甲状旁腺、胸腺以及肾上腺组织和鱼类的鳃后体组织中。在各种降钙素中鱼类的活性最高, 且半衰期最长。鲑鱼降钙素的活性是人降钙素活性的几十倍, 半衰期比人的长 3~6 倍。降钙素的主要生理作用是调节体内钙、磷的代谢, 它不仅是治疗变形性骨炎 (Paget 氏病) 的首选药物, 而且还能治疗各种原因引起的高血钙症, 尤其是近年发现在治疗老年性骨质疏松方面的疗效显著, 给降钙素临床应用带来更广泛的前景^[1]。人、鲑鱼、鸡的降钙素已经在临床上使用多年。在国外已有降钙素商品出售。我国这方面的工作到目前为止尚未见报道。本研究以黑印真鲨为原料, 初步建立了分离纯化天然来源鲨鱼降钙素的方法, 并对其性质进行了研究, 这对深入了解降钙素结构和性质以及为医学上的临床应用提供理论依据。

1 材料与方方法

1.1 材料与试剂

黑印真鲨 (*Carcharhinus menisorrh*) 鳃后体由厦门农贸市场购买。葡聚糖凝胶 (Sephadex G75) 为

Pharmacia Co. 产品; CMCellulose-52 为 Brown Co. 产品。标准降钙素为 Sigma Co. 产品, 维生素 B₂ 和细胞色素 Merck Co. 产品, 胰高血糖素和促肾上腺皮质激素为 Sigma Co. 产品。其他化学试剂均为国产 A. R 级。

1.2 方法

1.2.1 活力检测 采用大鼠血清钙降低实验, Wister 胸性大白鼠 (重量为 70~100 g), 禁食过夜, 不限饮水。将待测样品 (或标准样品) 溶于 0.1 mol/L 醋酸钠的缓冲液为对照, 同时进行尾静脉注射。给药 1 h 后, 乙醚麻醉大鼠, 腋静脉取血, 离心, 取血清。血钙浓度由 PE-703 型原子吸收分光光度法测定。以鲑鱼降钙素为标准, 比活力以每毫克蛋白含有 MRC (Medical Research Council unit) 为单位。

* 国家自然科学基金资助项目 29677014 号; 高等学校博士点专项科研基金项目。

收稿日期: 1998-12-07; 修回日期: 1999-11-23



次(1 000 r/min),15 min,除去脂肪,沉淀部分以 20 倍 1.2.2 降钙素分离纯化 取黑印真鲨鳃后体组织适量,制成匀浆,4℃下加入冷丙酮洗涤,离心 3 体积丁醇-醋酸-水(75:7.5:21)于 4℃下抽提 2 次,离心(10 000 r/min)15 min,取上清液加丙酮,离心,沉淀物于 20℃用少量 0.2 mol/L HCl 抽提,经冷冻干燥后即得酸性提取物(粗制品)。将粗制品溶于 0.05 mol/L 甲酸氨水缓冲液(pH3.0)中,进行 Sephadex G75 柱层析(柱经缓冲液预平衡),用平衡洗脱,合并所有活力部分得溶液,透析 12 h,超滤浓缩(膜包截留相对分子量为 5 000),保留滤过液,继续进行 CMCellulose-52 柱层析用相同缓冲液洗脱,合并活力峰,超滤浓缩(膜包截留相对分子量为 1 000),保留截留下的样品,冷冻干燥,即得 CT 结晶样品,保留于 -20℃备用。

1.2.3 蛋白质测定 根据 Folin 酚试剂法^[2](Lowry 法)测定蛋白质浓度,以牛血清白蛋白为标准。

1.2.4 分子量测定 采用葡聚糖凝胶层析法^[3]测定。

1.2.5 高效液相色谱测定 采用美国 Waters 公司 208 型高效液相色谱仪,M481 紫外检测器和 C18 色谱柱(2.1 mm×200 mm),进行分析。准确称取最终纯化的冷冻干燥样品和鲑鱼降钙素标准品各 0.050 g 于小烧杯中,溶解后移入 50 ml 棕色容量瓶中,用(石英玻璃蒸馏器蒸馏两次)蒸馏水定容至刻度,以微量进样器分别移取 20 μl 进行分析。

2 结果

2.1 鲨鱼降钙素的分离纯化

鲨鱼降钙素的纯化主要有 3 个步骤:(1)正丁醇-醋酸-水抽取的粗品;(2)Sephadex G75 柱层析。粗品经 Sephadex G75 柱层析,每管洗脱液均用紫外分光光度计于波长 278 nm 处测紫外吸收值,得 5 个峰形。经活力测定表明,降钙素的活力部分在峰 III 和峰 IV,如图 1 所示。合并活部分,经透析、超滤浓缩,获得初级纯化 CT 样液。(3)将初级纯化的 CT 样液,继续进行 CMCellulose-52 柱层析,洗脱结果显示单一峰,如图 2,经测定显示其活力较强。将这一部分洗脱液再度进行超滤以脱盐、浓缩,并除去相对分子质量小于 1 000 的杂质,保留截留下的样品,冷冻干燥,即得白

色结晶。有关各部分结果见表 1。

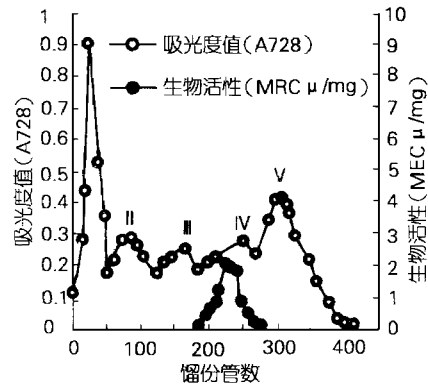


图 1 Sephadex G75 柱层析洗脱图谱

柱规格 12 cm×130 cm;洗脱液用 0.05 mol/L pH3.0 甲酸氨水缓冲液,流速为 100 ml/h,每 5.0 ml 收集一管

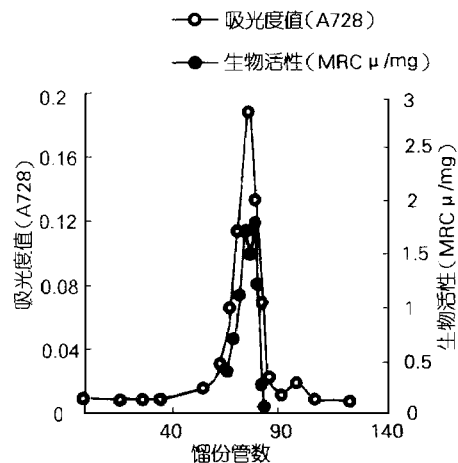


图 2 CMCellulose column 52 柱洗脱图谱

柱规格 1.0 cm×25 cm;用氨水醋酸缓冲液的线性梯度洗脱液,从 0.01 mol/L (pH5.0)到 0.1 mol/L (pH6.0),流速为 15 ml/h,每 4 ml 收集一管。

鲨鱼降钙素纯化倍数:第三步比活力/第一步比活力 = 4 983/40.7 = 122.4(倍)

2.2 鲨鱼降钙素的分子量

经 Sephadex G75 分子筛层析测定该降钙素的分子量为 3 680,见图 3。

表 1 鲨鱼降钙素纯化结果

步骤	蛋白 (mg)	活力 (MRC U)	比活力 (MRC/mg)
正丁醇-醋酸-水(75:7.5:21) 抽提物(酸性粗制品)	70	2 850	40.7
Sephadex G75	40	3 100	77.9
CM Cellulose-52	0.18	897	4 983

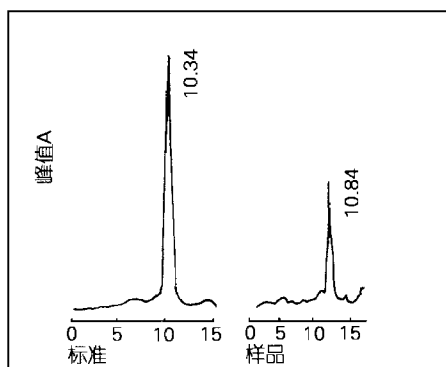


图 3 Sephadex G75 柱层析洗脱体积对分子量对数图
(A) 维生素 B₂ (MW1357); (B) 胰高血糖素 (MW3435); (C) 促肾上腺皮质激素 (MW4542); (D) 细胞色素 c (MW12400); (E) 样品。

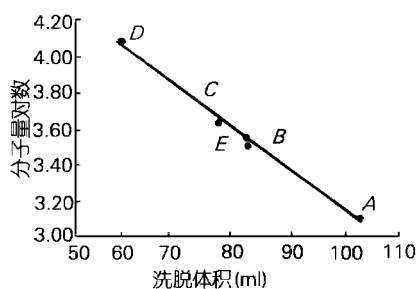


图 4 降钙素高效液相色谱
分析柱为 5 μ m, 2.1 mm \times 200 mm; 流动相为 0.03 mol/L, pH5.5 的醋酸铵缓冲液; 流速为 0.5 ml/min, 柱温 40 $^{\circ}$ C, 压力 16 ~ 20 MPa, 进样量 20 μ l; 紫外检测波长为 235 nm。

2.3 高效液相色谱分析

合并 CM Cellulose-52 柱层析的活力峰, 经过超滤, 浓缩冷冻干燥后的样品和鲑鱼标准品按上述条件进行了 HPLC 分析。结果表明(图 4), 样品在 10.84 min 处有一显著吸收峰, 与标准样品 (Salmon) 保留时间 10.34 min 处的吸收峰基本一致。积分面积比保留时间为例表明纯度为 76.7%, 因此, 可以确认, 样品含有与鲑相似的降钙素。

3 讨论

降钙素是人体内调节钙磷代谢的一种重要激素, 可维持内环境稳定通过抑制骨细胞作用, 达到降低血清中游离氨基酸的水平, 从而起到保护骨骼的作用。根据文献[4,5]报道, 到目前为止, 降钙素可分为四类: 灵长类(如人)和啮齿类(如大鼠), 偶蹄类(如猪、狗和羊), 以及硬骨鱼类(如鲑鱼和鳗鱼)。它们都是由 32 个氨基酸组成, 氨基末端有保守的 1, 7 位半胱氨酸生成的二硫键, 羧基末端为脯氨酰胺的肽激素。种内较保守, 而种间差异较大, 四类降钙素之间只有几个氨基酸是相同的, 与抗体反应也不具备交叉免疫原性。虽然来自不同动物的降钙素的氨基酸顺序有差异, 对人体却有效, 不存在种属特异性, 而且鲑降钙素的生物活性比人降钙素高 50 倍左右。本研究以鲨鱼后鳃体为原料, 从天然的废弃物中进行分离纯化和性质研究。实验结果表明, 本提取物对大鼠血清钙的调节有显著的降低作用, 它的分子量与人、鲑和鸡的降钙素相接近。因此可以初步确定本研究已经分离获得了具有一定纯度的活性鲨鱼降钙素。

参考文献

- 刘忠厚等. 骨质疏松症. 北京: 化学工业出版社, 1992. 213 ~ 214
- 张龙翔等. 生化实验方法和技术. 北京: 高等教育出版社, 1997. 137 ~ 138
- 张龙翔等. 生化实验方法和技术. 北京: 高等教育出版社, 1997. 122 ~ 124
- 杨彬、丁振国. 中国药学杂志, 1995, 30(11): 643 ~ 646
- Zaidi Mone et al.. Endocrine, 1995, 2(6): 459 ~ 467

(本文编辑: 刘珊珊)