

肌肽的提取分离与生物活性的研究进展

Research and development of isolation and biological roles of carnosine

何 雄¹, 薛长湖², 杨文鸽³, 徐大伦³

(1. 浙江医药高等专科学校 应用生物系, 浙江 宁波 315000 ; 2. 中国海洋大学 水产学院, 山东 青岛 266003; 3. 宁波大学 生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211)

中图分类号: Q516 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096 (2007) 05-0085-05

肌肽(carnosine)是一种水溶性二肽,天然存在于多种脊椎动物的骨骼肌以及新陈代谢旺盛的脑中。1900年,俄国学者 Gulewitsch 最早发现了肌肽。他从 Liebig 的肉提取物中分离了肌肽,后来被证实这种物质的结构为 β -丙氨酰-L-组氨酸。肌肽的结构如图 1 所示。这是从天然原料中分离得到的第一个具有代表性的生物活性肽。

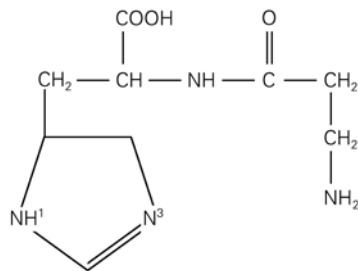


图 1 肌肽的结构示意图

自从 Gulewitsch 首次分离肌肽 100 多年来,各国学者在不同的肌肉组织中提取分离了组氨酸二肽,如鹅肌肽(β -丙氨酰-1-甲基-L-组氨酸, Anserine)、鲸肌肽(β -丙氨酰-3-甲基-L-组氨酸, Balenine, 又称蛇肌肽, Ophidine)、N-乙酰-肌肽等二肽。

不同动物的肌肽含量也不同。日本学者 Mano 等^[1]对一些鱼及贝中的肌肽含量进行了比较,发现鳗

鲷、鲣鱼中肌肽含量非常丰富,在海鳗、墨鱼中肌肽含量也较高,而在鲭、沙丁鱼、比目鱼、海鲤等中含量甚微。同种物种不同的肌肉组织中其含量也有差异,如金枪鱼的背部肌肉中肌肽含量就比腹部肌肉中高^[2],猪的腿肉的肌肽浓度比肩胛的高^[3],白肌中肌肽的浓度比红肌中高^[4]。

而且,不同物种之间组氨酸二肽的含量及各种二肽含量的比例(如 Ans/Bal, Car/Ans)也不一样,具有一定的特异性。由于组氨酸二肽受蒸煮等过程的影响不大,故可以通过测定组氨酸二肽的含量及各种二肽间的比例来间接鉴定一些肉制品中所用的原料。曾有人用 Ans/Car 的比例来鉴定午餐肉中鸡肉的含量,用蛇肌肽的含量来鉴定罐头火腿及香肠中瘦肉的含量^[5]。

另外,除了在肌肉组织中存在着组氨酸二肽以外,这些二肽还存在于别的组织中^[6]。经过生物化学分析,发现在低等脊椎动物的神经系统中存在着肌肽等二肽。免疫细胞化学研究显示,在爬行类和两栖类动物的大脑中,与肌肽有关的二肽存在于神经胶质细胞中;而在有尾目的动物大脑中,它们只存在于神经元细胞中。在爬行类动物中,这些二肽也存在于嗅觉感受器神经元中。在哺乳动物中,肌肽在嗅球中含量

收稿日期: 2004-06-10; 修回日期: 2004-11-12

作者简介: 何雄 (1979-), 女, 硕士, 研究方向为水产化学, E-mail: heshirley@sina.com



很高,而在脑及脊髓中含量相对较低。

随着对肌肽研究深入,学者们纷纷研究了肌肽的生物学特性。迄今为止,肌肽的许多生物学活性已被证实,如生理 pH 缓冲作用、螯合金属离子、清除自由基、抗氧化等。

1 肌肽的生物学性质

1.1 生理 pH 缓冲作用

Bate Smith 首先提出了肌肽具有生理 pH 缓冲功能,这也是肌肽被发现的第一个所具有的生物学功能。1938年,Bate Smith 首次报道了肌肽的 pK 值为 6.9,鹅肌肽的 pK 值为 7.1。这说明这两种化合物是理想的生理 pH 缓冲液。这种 pH 缓冲能力对于游泳能力强的鱼类及鲸具有重要的意义。在捕食或逃避等激烈的厌气运动时,由于糖酵解反应过程中生成的 ATP 进一步水解生成的氢离子会使肌肉 pH 值下降。而组氨酸二肽能维持肌肉内部的酸碱平衡,使厌气运动能力维持在一定水平。白色肉中起缓冲能力的主要是无机磷酸盐、肌肽、鹅肌肽、鲸肌肽等,60%以上是由咪唑化合物支持形成的。日本学者 Abe 等^[7]研究了温度对鱼类及鲸肌肉中 L-组氨酸及相关化合物的缓冲能力的影响。结果表明,无机磷酸盐、肌肽、鹅肌肽、鲸肌肽的缓冲能力在 pH6.5~7.5 之间较高,在 5~40 范围内受温度的影响较小。

1.2 螯合金属离子

肌肽具有螯合金属离子的能力,如能有效结合 Zn(II)、Co(II)、Cu(II)、Fe(II)等,形成络合物。因为肌肽的分子结构中有 5 个潜在的结合金属离子的位点:咪唑基上的 2 个 N 原子、羧基、氨基以及肽键。这种络合物的形成类型与金属阳离子的固有性质、金属离子与配位体结合的摩尔比及体系的 pH 等有很大关系^[8]。

在体内,铜离子催化由 H₂O₂ 引起的 NADH 的氧化,铁离子促进产生氧自由基(ROS)和引起过氧化反应,而肌肽能有效结合这些二价金属离子,从而抑制了这类反应的发生。而且肌肽与 Cu(II)的络合物还具有类似超氧化物歧化酶(SOD)的活性,在肌肽与 Co(II)、Zn(II)的络合体系中也发现有此功能。肌肽与 Zn(II)的络合物还具有药理学功能,如能削弱胃黏膜损伤、治疗胃溃疡,有效抑制幽门螺旋杆菌的生长繁殖,而且还能促进伤口愈合等。

1.3 清除自由基

肌肽侧链上的组氨酸残基可以作为氢的受体,具有捕捉羟基自由基、单线态氧和过氧化自由基的作用。这些特性已得到实验证明。如 Beom 等^[9]建立了一个由铁催化产生羟基自由基以使脱氧核糖降解的体系,发现肌肽可以有效抑制脱氧核糖的降解,表明它具有捕捉羟基自由基的能力。Chan 等^[10]建立了一个铁离子-过氧化氢体系来产生羟基自由基,在肌肽及相关的含组氨酸的二肽与羟基自由基直接相互作用后,用 EPR 来监测非羟基自由基的形成。结果显示,肌肽等二肽能猝灭由铁离子和过氧化氢产生的 49.1%~94.9%的羟基自由基。

1.4 抗氧化功能

肌肽具有抗氧化作用。现在肌肽的抗氧化机理已基本达到共识:(1)肌肽具有缓冲生理 pH 的能力,减少因体系 pH 变化而产生的脂过氧化。(2)肌肽具有螯合金属离子的能力,能够抑制由金属离子引起的,特别是铜离子引起的脂肪氧化作用。(3)肌肽具有捕捉羟基自由基、猝灭单线态氧和清除过氧化自由基的作用,可以抑制由非金属引起的脂肪氧化作用。

Gopalakrishnan 和 Decker^[11,12]在研究肌肽的抗氧化特性方面做了广泛的研究。他证实肌肽不仅具有抗氧化的功能,而且还可以抑制肉类酸败气味的形成和颜色的变化。脂肪氧化会产生一些影响感官质量的不良风味物质,肌肽可以与这些物质的初级产物作用,改善肉制品的风味。肌肽可以使肌红蛋白中的原血红素铁作为氢的受体而处于亚铁状态,从而防止肌红蛋白的形成,而起到护色的作用。因此肌肽具有很大潜力来用作天然的抗氧化剂。

1.5 抗衰老功能

肌肽是一种多功能的生理二肽,除了上述的一些功能特性外,还具有抗衰老的功能。实验证明,肌肽能使衰老的人体纤维原细胞恢复活力,重新得到再生。肌肽的抗衰老机理还没有完全搞清楚。肌肽在体内抗氧化、清除自由基及螯合金属离子的特性部分地解释肌肽的延缓衰老的现象,但不能完全解释。至少同样具有抗氧化特性的 V_E 或 V_C 就没有使纤维原细胞返老还童的能力。已经证实,肌肽能与小分子的含羰基化合物(如醛、酮等)反应,阻止生物大分子之间的相互交联。

蛋白质氧化及无酶条件下的糖基化作用(glycation)



与细胞或组织的老化现象有关。蛋白质的无酶条件下糖基化作用最终将产生高度复杂交联的分子,称为AGE_s,而且在AGE_s分子上往往含有有活性的羰基基团。蛋白质上的羰基也可以由任何有活性的醛,包括脂质过氧化产物丙二醛(MDA)与活性氧自由基ROS(reactive oxygen species)如-OH、HClO⁻自由基直接反应产生。而衰老与蛋白质上羰基的过多积累有关。

据报道^[13-15]肌肽能竞争性地与醛糖或酮糖发生糖基化,从而保护了蛋白质和其他一些肽类;肌肽能与由MDA、HClO⁻引起产生的C=O反应,从而避免蛋白质与蛋白质或蛋白质与DNA之间发生交联作用,也起到了保护细胞的作用(因为MDA对细胞会产生毒性);肌肽能与被氧化或糖基化的蛋白质上的C=O反应,从而起到延缓衰老的作用。这类反应被称作肌肽化(carnosinylation)。

1.6 其他

肌肽还具有神经调节功能,是体内重要的神经肽。对控制细胞动态平衡、稳定细胞膜等起着重要作用^[16]。另外,肌肽还可能具有抗疲劳的功能。氧自由基及其引发的脂质过氧化反应可以攻击细胞及线粒体等生物膜造成离子、能量代谢紊乱,从而导致机体运动能力下降,产生运动性疲劳;乳酸是糖无氧酵解的产物,长时间剧烈运动使肌体内乳酸过多积累,其解离出的H⁺使肌细胞pH值下降,导致疲劳的发生。而肌肽一方面能清除氧自由基,另一方面又能缓冲生理pH,维持细胞pH在生理水平上,因此具有抗疲劳的潜力。但还需要有实验进一步证明和研究。

2 肌肽的分离提取及含量测定

由于肌肽是一种水溶性的二肽,因此可以用水提取法对肌肽进行提取。原料经采肉等预处理后加入一定体积比的蒸馏水或缓冲液,匀浆,纱布过滤,滤液进行冷冻离心,上清液经微孔过滤后即得提取物。

当然,可以根据不同的目的对滤液进行不同处理,如加热处理、去离子处理、超滤处理等,但据报道,这些处理均会引起提取物中肌肽含量的降低^[1]。肌肽的损失可能是在处理过程中肌肽受到破坏或被沉淀的蛋白质吸附。

肌肽能在传统的AA分析仪上得到分离。Carnegie^[17]曾利用AA分析仪对猪肉的不同组织中鹅肌肽、肌肽及蛇肌肽的含量进行了测定。采用阳离子

交换柱,用0.35 mol/L的柠檬酸缓冲液进行洗脱。在此基础上研究了不同温度、缓冲液的不同pH值对洗脱时间、分离效果的影响。结果表明:缓冲液的pH值越低,分离效果越差,洗脱时间也长;温度越低,洗脱时间越长,但随着温度的升高,AA与二肽峰重叠,导致分离效果下降。因此最终选择了pH值为5.52,前162 min温度为35℃,而后上升至51℃。但是,洗脱时间长。

后来采用HPLC来分离这些二肽。如NaKamura等应用Partisil-10 SCX柱,以柠檬酸为洗脱液,分析时间为30 min左右。但是,在高温下,柠檬酸对磺化的硅胶柱有一定的影响,从而造成柱效的降低。

Carnegie等^[3]对上述方法进行了改进,提供了一种快速检测、分离二肽的方法。用pH值为2.9的甲酸锂缓冲液平衡、洗脱。洗脱液用OPA(邻苯二甲醛)衍生,衍生物经荧光检测器检测,可间接得到肌肽含量。该实验对猪、羊、马等动物的肌肉中提取的组氨酸二肽进行了分离,具有洗脱时间短,分离效果好,且分析范围广等优点。

现在较多的仍旧采用HPLC法对肌肽进行含量测定,不同的是大多采用柱前衍生法。如Gopalakrishnan等^[11]从未被利用的猪骨架上将肉分离来制备提取物,然后检测该提取物中肌肽的含量。

取一定体积的提取液与1 mol/L高氯酸等体积混合,煮沸5 min以充分沉淀蛋白。离心上清液用0.45 μm的Syringe滤纸过滤,收集滤液。取滤液75 μL与36 μL OPA混合进样。用已知浓度(10~50 mg/L)的肌肽纯品作一标准曲线,然后通过对照,测得肌肽的质量浓度。

HPLC的条件为:柱子选用较常用的ODS柱(C₁₈);流动相选用醋酸钠(0.3 mol/L, pH=5.5):甲醇=3:1;流速为1.5 mL/min;采用荧光检测器,其中激发波长=310 nm,发射波长=375 nm。

3 肌肽的合成与水解

3.1 肌肽的水解

组织中肌肽的含量受到一系列酶的影响,在酶的作用下,肌肽会转化成各种相关的化合物或降解成氨基酸(组氨酸、L-丙氨酸),如肌肽经过脱羧作用转化成脱羧肌肽,经乙酰化作用转化成N-乙酰-肌肽,经甲基化作用则转化成鹅肌肽等等,人们把这些肌肽的衍生物通称为CRCs。

肌肽的水解主要是由组织肌肽酶 (EC 3.4.13.3) 和血清肌肽酶 (EC 3.4.13.20) 引起的。前者在不同的组织中广泛分布,后者主要从灵长类动物或人的血清以及脑中分离得到。在相同的实验条件下,这两种酶对肌肽的作用能力比对 CRC₅ 强^[18]。肌肽的水解速率是鹅肌肽的 3~4 倍。推测可能是肌肽经修饰化作用后能增强其对肌肽分解酶的抵制作用。因此,可以对肌肽的结构进行修饰,从而延长其在组织体内的半衰期。而且研究显示,肌肽的衍生物也显示了不同的生物学活性,如脱羧肌肽能调节心跳速率,N-乙酰-肌肽能保护心脏免受缺血性损伤,鹅肌肽具有许多类似于肌肽的生物学活性,因此,可以设想把对肌肽分解酶有着较强抵抗作用的肌肽衍生物 CRC₅ 作为肌肽的代用品应用于临床试验中。

3.2 肌肽的生物合成

肌肽可以由 β -丙氨酸和 L-组氨酸通过肌肽合成酶 (EC 6.3.2.11) 合成。 β -丙氨酸是肝脏的尿嘧啶和胸腺嘧啶降解的最终代谢产物。能生物合成肌肽的细胞必须具有这种氨基酸的传递体系。体外实验证明,肌肽的生物合成仅局限于一些肌肉细胞、脑中的少突细胞、脊髓、以及嗅球的内鞘细胞^[19]。

4 展望

自 1900 年 Gulewitsch 发现肌肽以来,100 多年的研究确实取得了很大进展。肌肽的许多生理特性如缓冲生理 pH、螯合金属离子、清除自由基等已经基本得到共识。肌肽有着很大的潜力被广泛地应用到食品、医药、化妆品等行业中。在体外能抑制铁、血红蛋白、脂质氧化酶及单线态氧催化的脂质氧化作用,可作为一种天然的抗氧化剂;具有细胞膜保护功能,对控制细胞动态平衡起着重要的作用,可用作免疫调节剂和抗炎症、治疗表皮烧伤、促进伤口愈合的良药;保护心肌细胞免受缺血性损伤,促进心肌细胞损伤修复,改善心脏的收缩能力;具有神经调节功能,是一种天然的神经营养剂;具有延缓衰老的功能,可制成抗衰老的药剂;另外据报道肌肽还具有抗血压、抗肿瘤等功能^[20-23]。

虽然肌肽的许多生理学特性已得到广泛研究,但不同组织中肌肽的有些生物学功能仍未完全搞清楚,而且可能还有些生物学活性还未被发现。因此,还将进一步探索肌肽的生理功能。

无论是从天然原料中分离肌肽还是用化学或生

物的方法来合成肌肽,都存在着一个问题,就是获得肌肽的成本较高,从而也就在一定程度上限制了它的应用。那么,如何降低这个成本将是未来研究的一个重要内容。如进一步优化提取工艺或是寻找肌肽含量相对较高而本身经济价值较低天然原料,如水产品中的一些低值鱼。合成肌肽的研究还刚刚起步,许多问题有待于摸索与探讨,当然更需要发展新的研究工具(如界定合成位点的分子探针)与新的研究方法。

参考文献:

- [1] Mano T, Senju T. Distribution of carnosine in several species of fish and shellfish[J]. *Journal of the Japanese Society of Food and Nutrition*, 1969,22(3):164-167.
- [2] Abe H. Distribution of free L-histidine and its related compounds in marine fishes[J]. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1983,49(11):1 683-1 687.
- [3] Carnegie P R. Improved high-performance liquid chromatographic method for analysis of histidine dipeptides anserine, carnosine and balenine present in fresh meat[J].*Journal of Chromatography*, 1983,261:153-157.
- [4] 张梦寒,徐幸莲.肌肽对肌肉中脂类氧化的抑制作用[J].*肉类研究*,2001,4:16-18.
- [5] Abe H, Okuma E. Discrimination of meat species in processed meat products based on the ratio of histidine dipeptides [J]. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*,1995, 42(10):827-834.
- [6] Marchis S D, Modena C. Carnosine-related dipeptides in neurons and glia[J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2000,65: 824-834.
- [7] Abe H, Okuma E. Effect of temperature on the buffering capacities of histidine-related compounds and fish skeletal muscle[J].*Nippon Suisan Gakkais*,1991,57(11) : 2 101-2 107.
- [8] Baran E J. Metal complexes of carnosine[J]. *Biochemistry (Moscow)*,2000, 65:789-798.
- [9] Beom J L, Deloy G. Antioxidant effects of L-Carnosine on liposomes and beef homegenates[J]. *J Food Sci*,1997, 5: 931.
- [10] Chan K M, Decker E A. EPR spin-trapping studies of the hydroxyl radical scavenging activity of carnosine and related dipeptides[J].*J Agric Food Chem*,1994,42:1 407-1 410.
- [11] Gopalakrishnan J, Decker E A, Means W J. Antioxidant

- activity of mechanically separated pork extracts[J]. **Meat Science**,1999,52(1):101-110.
- [12] Decker E A, Livisay S A. A Re-evaluation of the antioxidant activity of purified carnosine[J]. **Biochemistry (Moscow)**, 2000,65:766-771.
- [13] Brownson C , Hipkiss A R. Carnosine reacts with a glycated protein[J].**Free Radical Biology and Medicine**, 2000,28(10):1 564-1 570.
- [14] Hipkiss A R. Carnosine and protein carbonyl groups: A possible relationship[J].**Biochemistry (Moscow)**, 2000,65: 771-779.
- [15] Hipkiss A R, Brownson C ,Carrier M J. Carnosine,the Anti-ageing,Anti-oxidant dipeptide,may react with protein carbonyl groups[J].**Mechanisms of Ageing and Development**, 2001,122:1 431-1 445.
- [16] Holliday R , McFarland G A.A role for carnosine in cellular maintenance[J].**Biochemistry (Moscow)**,2000,65:843-849.
- [17] Carnegie P R, Hee K P. Ophidine and other histidine dipetidies in pig muscles and tinned hams[J].**J Sci Food Agric**,1982,33:795-801.
- [18] Pegova A, Abe H, Boldyrev A. Hydrolysis of carnosine and related compounds by mammalian carnosinases. comparative biochemistry and physiology part b[J].**Biochemistry and Molecular Biology**,2000,127:443-446.
- [19] Bakardjiev A, Bauer K. Biosynthesis, release, and uptake of carnosine in primary cultures[J]. **Biochemistry (Moscow)**, 2000,65:779-783.
- [20] Stvolinsky S L, Dobrota D. Anti-ischemic activity of carnosine[J]. **Biochemistry (Moscow)**, 2000,65:849-856.
- [21] Gallant S, Semyonova M, Yuneva M. Carnosine as a potential Anti-senescence drug[J]. **Biochemistry (Moscow)**, 2000,65: 866-869.
- [22] Soliman K, Ansary A E, Mohamed A M. Effect of carnosine administration on metabolic parameters in bilharzias-infected hamsters[J]. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B** ,2001,129:157-164.
- [23] Horning M S,Blakemore L J,Trombley P Q. Endogenous mechanisms of neuroprotection:role of zinc,copper,and carnosine[J]. **Brain Research**, 2000,852:56-61.

(本文编辑 : 张培新)

(上接第 79 页)

- [24] Vethanayagam J G G, Green E H, Rose R C, *et al.* Glutathione dependent ascorbate recycling activity of rat serum albumin[J]. **Free Rad Biol Med** , 1999,26: 1 591– 1 598.
- [25] Hamre K, Hjeltmes B, Kryvi H, *et al.* Decreased concentration of hemoglobin accumulation of lipid oxidation products and unchanged skeletal muscle in Atlantic salmon *Salmo salar* fed low dietary vitamin E[J]. **Fish Physiol Biochem**, 1994,12: 421–429.
- [26] Poston H A, Livingston D L. Effects of massive doses dietary vitamin E on fingerling brook trout[J]. **Fish Res Bull**, 1969,9–12.
- [27] Ortun J, Esteban M A, Meseguer J. High dietary intake of a-tocopherol acetate enhances the nonspecific immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata*) [J]. **Fish Shellfish Immunol**, 2000,10: 293– 307.
- [28] Satoh S, Takeuchi T , Watanabe T. Requirement of tilapia for a-tocopherol[J]. **Nippon Suisan Gakkaishi**. 1987,53: 119– 124.
- [29] Roem A J, Kohler C C, Stickney R R. Vitamin E requirements of blue tilapia, *Oreochromis aureus* (Steindachner), in relation to dietary lipid level[J]. **Aquaculture**, 1990, 87: 155–164.
- [30] Shiau S Y, Shiau L F. Re-evaluation of the vitamin E requirement of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. **aureus Anim Sci**, 2001,72: 477– 482.
- [31] Gabaudan J, Hardy R W. Vitamin sources for fish feeds[A]. Stickney R R. Encyclopedia of Aquaculture[C]. New York :Wiley,2000.961– 965.

(本文编辑 : 刘珊珊)