

·研究简报·

荧光标记鹿茸蛋白提取物胃肠道吸收离体实验研究

张 倩^{1,2}, 胡剑江¹, 周秋丽², 王新月², 王 毅^{1*}

(1. 中国中医科学院医学实验中心, 北京 100700; 2. 吉林大学药学院, 吉林 长春 130021)

关键词: 鹿茸蛋白提取物; 荧光标记; 人工胃液; 人工肠液; 肠囊外翻实验

中图分类号: R965

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 12-1526-04

***In vitro* study on gastrointestinal absorption of FITC labeled
Pilose Antler protein extraction**ZHANG Qian^{1,2}, HU Jian-jiang¹, ZHOU Qiu-li², WANG Xin-yue², WANG Yi^{1*}

(1. Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. School of Pharmaceutical Sciences, Jilin University, Changchun 130021, China)

Abstract: An *in vitro* detection method of the gastrointestinal absorption of Pilose Antler protein was established for mixed protein activity. Five bands of protein with molecular weight of 17.8–160 kD derived from the Pilose Antler were extracted and sufficiently labeled with FITC (FITC-PE). The stability and variation of FITC-PE in gastrointestinal circumstances were detected by native polyacrylamide gel electrophoresis and confocal laser scanning microscope. Results showed that the main component of FITC-PE kept invariant after being reacted with artificial gastric fluid and artificial intestinal fluid. The fluorescence signal was detected 20 min after administration in the valvulus intestinal purse experiment, and three kinds of protein, with molecular weight of 45, 25, and 17.8 kD, were detected in the mixture of absorbent protein. The research laid the foundation for the further *in vivo* study of Pilose Antler protein. Meanwhile, it would be an *in vitro* screening method for the absorption, distribution and metabolism of mixed protein from traditional Chinese medicine.

Key words: Pilose Antler protein extraction; fluorescence labeling; artificial gastric fluid; artificial intestinal fluid; valvulus intestinal purse experiment

鹿茸是一种名贵的中药, 含有丰富的蛋白质及多肽等活性成分, 对神经、心血管、免疫、生殖系统有显著的调节作用^[1]。鹿茸的传统给药方式为口服给药, 给药后经消化道相关酶的降解发生一系列的变化, 然而, 由于检测方法的限制, 目前还没有成熟的技术可以对鹿茸中大分子混合物实现活性示踪和综合分析, 不能阐明其作用机制及药代动力学信息, 因而不能被充分开发利用。

荧光标记技术是借助荧光探测方法在分子水平上进行实时检测的重要手段, 这种技术灵敏性高, 可视性强, 生物体系中的背景噪音对其干扰少, 具有传统检测方法所不具备的优势。通过与电泳、色谱等方法的联用, 可多参数、实时获得更多的信息, 取长补短, 为在活细胞及整体层次动态追踪生物大分子结构变化提供新的、有效的研究手段^[2]。

本文以鹿茸作为模式研究对象, 提取鹿茸蛋白混合物, 用异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 对其进行荧光标记^[3], 用人工胃液及人工肠液观察其在消化道中的稳定性, 同时通过半离体肠囊外翻实验模拟标记物透过肠黏膜的吸收行为, 初

收稿日期: 2011-06-29.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30600842); 中国中医科学院基本科研业务费自主选题 (zx-zzxt-2006-005).

*通讯作者 Tel: 86-10-64014411-2560, Fax: 86-10-64020477,

E-mail: wangyi02@gmail.com

步确定胃肠道吸收蛋白的范围, 缩小检测目标, 为进一步在体活性追踪奠定基础, 同时也为同类大分子物质的吸收、分布、代谢检测建立离体筛选模型。

材料与方法

药品及试剂 鲜梅花鹿茸购自四平种鹿厂; 盐酸购自国药集团化学试剂有限公司; 胃蛋白酶为 Solarbio 公司产品 (Lot No. P8160); FITC 为 Sigma 公司产品 (Lot No. F7250); 胰蛋白酶为 Amresco 公司产品 (Lot No. 0458); Sephadex G-25 为 Pharmacia 公司产品 (Lot No. 17-0360-01); BCA 蛋白定量试剂盒为 SUNBIO 公司产品 (Lot No. SP2001); 非变性蛋白 Marker 为 SERVA 公司产品 (Lot No. 39064); 玻璃底黑壁 96 孔板购自 In Vitro Scientific 公司。

实验动物 雄性 Wistar 大鼠, 体重(250 ± 20) g, 动物许可证号: SCXK (京) 2006-0009, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司。

实验仪器 美国 CHRIST 冷冻干燥机; 美国 Hoefer 垂直电泳仪; 美国基因公司生产 G-Box 凝胶成像系统; 激光扫描共聚焦显微镜 (Olympus, FV1000, 日本)。

鹿茸蛋白粗提及纯化 参照王丰等^[4]的方法, 使用 pH 3.5 的醋酸提取鹿茸蛋白, 再经凝胶过滤层析法进行纯化, 冻干, 得到鹿茸蛋白粗提物。按 BCA 蛋白含量测定试剂盒操作, 绘制标准曲线, 计算鹿茸提取物蛋白含量。

荧光素标记鹿茸蛋白的制备 精密称取鹿茸提取物 120 mg, 按照李玉华等^[5]的标记方法, 将鹿茸提取物用 pH 9.5 的 PBS 配制成蛋白质质量浓度为 $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液。于搅拌器上搅拌, 缓缓加入 FITC, 使每毫克蛋白含有 FITC 0.01 mg, 4°C 条件下反应 24 h。葡聚糖凝胶柱上样, 除去未标记的 FITC 和盐类小分子, 得到标记的荧光蛋白 (FITC-protein extraction, FITC-PE)。根据标记率公式: $F/P = 2.8 \times (A_{280 \text{ nm}} - A_{495 \text{ nm}}) / A_{495 \text{ nm}}$, 计算标记率 (F/P 在 1~2 之间为充分标记^[6])。所得样品冻干, -20°C 保存。

鹿茸蛋白及 FITC-PE 的组分确定及分子量分析 按照文献^[7]的方法进行非变性蛋白电泳, 鹿茸提取物和 FITC-PE 的上样量为 $100 \mu\text{g}$ 、上样体积为 $20 \mu\text{L}$ 。电泳结束后, 先用 G-box 在 488 nm 下观测荧光条带, 再经考马斯亮蓝染色在 595 nm 下观察蛋白条带, 依据荧光条带及蛋白条带与标记条带 (marker) 的相对位置确定被标记荧光蛋白的分子量。

FITC-PE 在人工胃液及人工肠液中的稳定性分析 人工胃液的配制: 10% 稀盐酸 1.64 mL , 加水约 80 mL 及胃蛋白酶 1 g , 混匀后定容至 100 mL 。将 FITC-PE 溶解于人工胃液中, 使其质量浓度为 $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 于 37°C 培养箱中反应, 反应时间分别为 30、60 和 120 min, 配制同浓度的 FITC-PE 水溶液为对照, 一起进行非变性电泳。

人工肠液的配制: 磷酸二氢钾 0.68 g , 加水 50 mL , 用 0.4% 氢氧化钾调 pH 至 6.8; 胰酶 1 g 加水适量使溶解, 两液混合后定容至 100 mL 。将 FITC-PE 溶解于人工肠液中, 使其浓度为 $40 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 于 37°C 培养箱中反应, 反应时间分别为 30、60 和 120 min, 配制同浓度的 FITC-PE 水溶液为对照, 一起进行非变性电泳。

肠囊外翻实验^[8]观察 FITC-PE 透过肠黏膜吸收情况 大鼠禁食 12 h, 乙醚麻醉, 打开腹腔, Treitz 韧带以下 5 cm 取两段小肠肠段, 长度均为 10 cm , 用 37°C 生理盐水冲洗小肠黏膜内侧直至无污物, 将小肠外翻, 黏膜侧向外, 浆膜侧向内, 于 37°C 生理盐水中孵育 20 min, 通 $95\% \text{ O}_2$ 及 $5\% \text{ CO}_2$, 孵育后用生理盐水冲洗数次。将小肠一端扎紧, 另一端接到圆口中空玻璃管上, 肠囊内加入台氏液 1 mL , 浸泡于 5 mL 、含 $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ FITC-PE 的 37°C 台氏液中, 通 $95\% \text{ O}_2$ 及 $5\% \text{ CO}_2$, 分别于 0、10、20、30、40、50 及 60 min 在肠囊内取样 $100 \mu\text{L}$ (同时补回同体积台氏液), 置于玻璃底 96 孔板中, 激光共聚焦显微镜下检测荧光强度。1 h 后, 收集肠囊内所有台氏液; 空白对照以同样方法将小肠浸泡于空白台氏液中, 实验结束后收集肠囊内台氏液, 进行非变性电泳。

结果

1 鹿茸提取物的蛋白含量测定及荧光标记

鹿茸蛋白粗提物为黄白色粉末, 易溶于水, 易潮解, 故冻干后需要在 -20°C 冰箱保存; BCA 蛋白含量测定试剂盒操作测得鹿茸提取物的蛋白含量为 21.12% ; 根据标记率公式测得荧光标记蛋白 FITC-PE 的标记率为 1.11, 即充分标记。

2 鹿茸提取物及 FITC-PE 的蛋白组分确定及分子量分析

从图 1a 中可以看出, 鹿茸提取物含有 5 条蛋白带, 编号为 A、B、C、D、E, 分子质量分别为 160、67、45、25 和 17.8 kD , 标记过程对蛋白组分无明显影响 (图 1a, 3); 在 488 nm 下, FITC-PE 组分中, A、C、

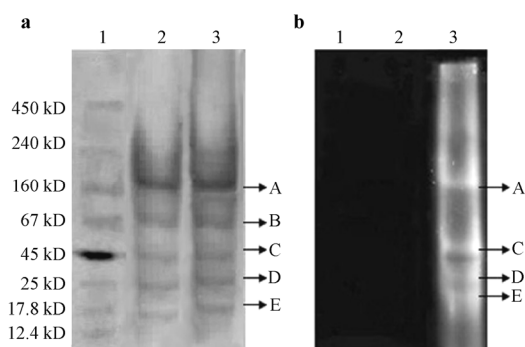


Figure 1 Native-PAGE of protein extraction and FITC-PE from Pilose Antler. 1: Marker; 2: Extraction of the Pilose Antler; 3: FITC-PE. a: 595 nm; b: 488 nm

D、E 被标记了荧光。

3 FITC-PE 在人工胃液及人工肠液中的稳定性分析

从图 2a 中可以看出, 经人工胃液作用后 FITC-PE 的蛋白含量随作用时间延长而减少, 对应图 2b 的荧光条带强度也逐渐减弱。其中, 胃蛋白酶出现的蛋白条带位置与蛋白 D 的位置相近, 蛋白 D 难以从图 2a 上识别, 但是从对应的荧光图中可观察到其存在 (图 2b)。

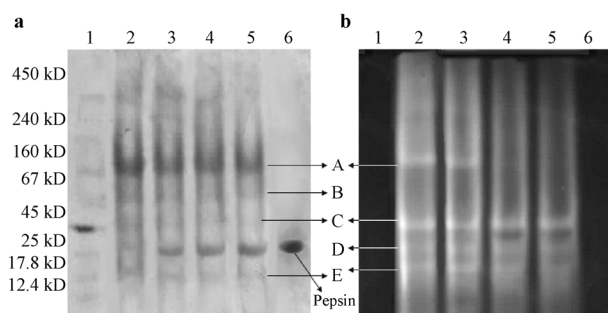


Figure 2 Native-PAGE of FITC-PE after reacted with artificial gastric fluid. 1: Marker; 2: Control of FITC-PE; 3: 30 min; 4: 60 min; 5: 120 min; 6: Control of artificial gastric fluid. a: 595 nm; b: 488 nm

由图 3a 中可以看出, 经人工肠液作用后 FITC-PE 的蛋白含量随作用时间延长而逐渐减少, 但主要组分无明显变化。对应荧光图的荧光条带减弱 (图 3b), 其减弱强度与时间关系不明显; 其中, 荧光蛋白 A 的荧光带消失, 说明人工肠液可能淬灭了荧光蛋白 A 的荧光, 但其所对应的蛋白依然存在。

4 肠囊外翻实验观察 FITC-PE 透过肠黏膜吸收情况

图 4 记录了于不同时间点在肠囊液中所检测到的 FITC-PE 的平均荧光强度变化图。使用 *t* 检验比较各组差异可以看出, 与空白对照组相比, 从 20 min 起肠囊中台氏液有荧光出现, 40 min 时荧光最强, 60 min 后仍持续吸收, 说明 FITC-PE 可透过小肠壁吸收。

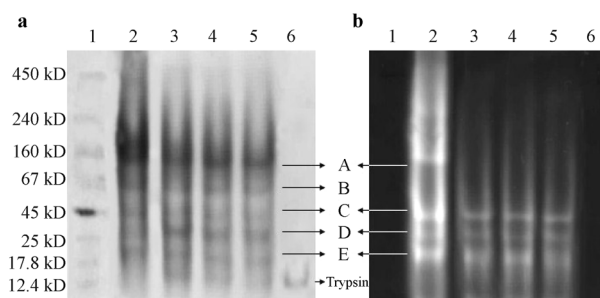


Figure 3 Native-PAGE of FITC-PE after reacted with artificial intestinal fluid. 1: Marker; 2: Control of FITC-PE; 3: 30 min; 4: 60 min; 5: 120 min; 6: Control of artificial intestinal fluid. a: 595 nm; b: 488 nm

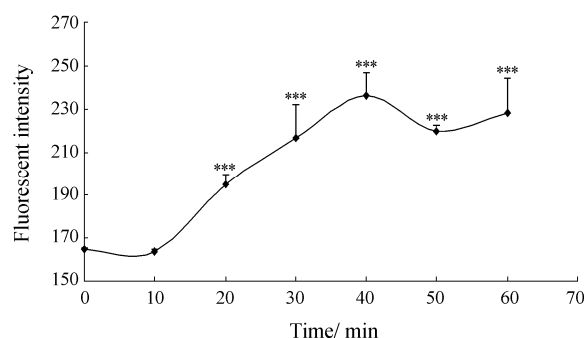


Figure 4 Time-varying of FITC-PE absorption through intestinal mucosa detected by confocal laser scanning microscope (compared with 0 min, *** $P < 0.001$, $n = 4$)

从图 5a 中可以看出, 与对照组相比, 给药组出现 3 个新条带, 通过与图 5b 比对, 鉴定其为组分 C、D、E。该结果提示, 分子质量小于 45 kD 的蛋白可透过肠壁吸收。

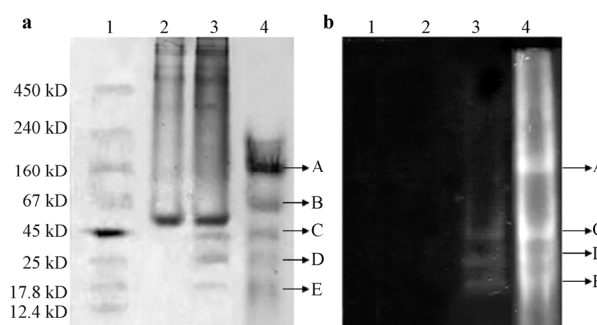


Figure 5 Native-PAGE of FITC-PE absorption through intestinal mucosa 1 h after treatment. 1: Marker; 2: Control of Tyrode in intestinal purse; 3: The fluorescent protein translated through the intestinal wall; 4: Control of FITC-PE. a: 595 nm; b: 488 nm

讨论

中药在我国有几千年的历史, 并在近几年结合现代科研技术有了更广阔的发展空间, 然而, 由于检测方法的限制, 目前还没有成熟的技术可以对中药

大分子混合组分实现活性示踪和综合分析, 甚至有一些极为有效的中药因为其活性成分难于分析检测的大分子物质而不能进行现代开发。已有的抗体检测方法和同位素标记法因为其使用的局限性和高成本等缺点而不能被广泛应用。中医药研究领域迫切需要一种能有效追踪中药大分子有效成分、代谢途径、作用部位及分子结构变化的可普遍推广的检测手段。作者选择了荧光标记的方法对鹿茸蛋白进行荧光标记, 通过离体和半离体实验探究荧光蛋白在胃肠道的稳定性及吸收情况, 是荧光蛋白在体实验研究的基础。

FITC 是目前应用最广泛的一种荧光素衍生物, 它的相对分子质量为 389.4, 最大吸收光波长为 490~495 nm, 最大发射光波长为 520~530 nm, 呈现明亮的黄绿色荧光^[9], 能在碱性条件下非特异性地与蛋白质的氨基末端结合, 并广泛应用于离体及在体实验中, 对机体没有明显毒性。故选择此荧光探针标记从鹿茸中提取的大分子混合未知组分蛋白。

非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (native-PAGE) 是在不加入 SDS 巯基乙醇等变性剂的条件下, 对保持活性的蛋白质进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 可以使生物大分子在电泳过程中保持其天然的形状和电荷^[10]。与变性电泳 (SDS-PAGE) 相比, 非变性电泳大大降低了蛋白质变性发生的几率, 避免了误差, 所以该方法适用于蛋白质混合物原位追踪分析。

激光扫描共聚焦显微镜 (confocal laser scanning microscope, CLSM) 具有高时空分辨率和高灵敏度, 在检测荧光蛋白透过肠黏膜吸收情况实验中, 可以实时动态地记录荧光蛋白透过肠黏膜的吸收时相, 具有简便易行的优点。在下一步的研究中, 作者将结合生物光子学的方法, 对荧光信号进行进一步的分析, 结合生物化学的方法将得到更多的信息。

在本研究中可以看出, 即使在简单的体系内 (人工胃液及人工肠液), 体系内的蛋白 (如胃蛋白酶和胰蛋白酶) 也会影响具有相同分子量的外源蛋白的检测 (图 2), 这也突显出使待测蛋白带有特异性标识的重要性。与荧光标记电泳联用后, 通过对照分析荧光图像和染色后的蛋白图像, 能更准确地确定吸收后的蛋白条带。该方法可进一步应用到吸收入血蛋白代谢产物的检测, 具有独特的优势。

通过模拟 FITC-PE 在胃肠道中的稳定性和吸收情况得到的实验结果, 可以做出如下假设: 在整体实验中, FITC-PE 口服后, 其荧光信号和蛋白含量在胃液中随作用时间的延长荧光信号少量减弱, 蛋白少量水解, 但主要组分保持不变; 进入小肠后, FITC-PE

的荧光信号和蛋白含量受到进一步破坏, 主要组分仍保持不变, 其中 67 kD 蛋白没有被标记上荧光, 与肠液作用 90 min 后蛋白依然存在 (含量有所削减), 160 kD 蛋白的荧光被淬灭 (但蛋白还存在), 分子质量小于 45 kD 的鹿茸蛋白在 20 min 后即可透过肠黏膜吸收。此结果为下一步整体实验提供明确的检测目标, 使得对鹿茸蛋白的在体吸收检测成为可能, 是实现鹿茸蛋白活性示踪的十分重要的基础工作。

本研究通过对鹿茸蛋白混合物进行荧光标记, 用离体和半离体实验观察了荧光蛋白在胃液和肠液中的稳定性和吸收情况的信息, 为进一步进行鹿茸蛋白的在体分析检测和活性示踪奠定基础。同时也为同类大分子物质的吸收、分布、代谢检测建立离体筛选模型。

References

- [1] Qu YY, Gao L, Liang C, et al. Research on the extraction of the Pilose Antler protein [C]//The 17th National Chromatographic Academic Report (第十七届全国色谱学术报告会论文集). Changsha: Chinese Chemical Society, 2009: 983-984.
- [2] Zhang CY, Ma H, Nie SM, et al. Quantum dot labeled trichosanin [J]. Analyst, 2000, 125: 1029-1030.
- [3] Byung SK, Jae MO, Kyung SK, et al. BSA-FITC-loaded microcapsules for *in vivo* delivery [J]. Biomaterials, 2009, 30: 902-909.
- [4] Wang F, Mei ZQ, Zhou QL, et al. Research on the purification and characterization of polypeptide from Velvet Antler [J]. J Jilin Univ (吉林大学学报), 2003, 41: 111-114.
- [5] Li YH, Zhang M, Wang JC, et al. Effects on absorption enhancers on intestinal absorption of lumbrokinase [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2006, 41: 933-934.
- [6] Mo L, Huang DM, Tang FQ. Molecular dynamics simulation and the application in biological macromolecules [J]. Chem Life, 2007, 27: 243-245.
- [7] Tian XL, Ren XW, Dong SL, et al. The primary studies on the zymograms of digestive isozyme in tongue-sole cynoglossus semilaevis [J]. Biotechnol Bull, 2008, supplement: 315-319.
- [8] Yang ZG, Meng H, Zhang X, et al. Effect of quercetin on the acyclovir intestinal absorption [J]. J Peking Univ (北京大学学报), 2004, 36: 309-312.
- [9] Li Y, He J, Dan DZ, et al. Labeling of human serum albumin with fluorescein isothiocyanate [J]. West China J Pharm Sci (华西药杂志), 2001, 16: 25-26.
- [10] Zhu HX, Chen R, Jin GH, et al. The application of nondenature PAGE on separating proteins of hippocampal tissue in rat [J]. Acta Acad Med Nantong (南通医学院学报), 2003, 23: 373-374.