

文章编号:1009-038X(2005)01-0049-03

苦瓜多肽-P 的分离及其降糖活性

盛清凯, 姚惠源

(江南大学食品学院, 江苏无锡 214036)

摘要: 采用硫酸、乙醇等提取, Sephadex G-50 及 RP-HPLC 技术纯化, 从苦瓜中分离出苦瓜多肽-P, 又称植物胰岛素, 该技术优于过去的薄层层析纯化方法。皮下注射该多肽可降低正常小鼠和四氧嘧啶模型小鼠的血糖, 口服无效。经胃蛋白酶、胰蛋白酶水解后, 该肽降糖活性丧失。

关键词: 苦瓜; 植物胰岛素; 分离; 血糖

中图分类号: S 642.5

文献标识码: A

Isolation and Hypoglycemic Activity of P-Polypeptide from *Momordica charantia*

SHENG Qing-kai, YAO Hui-yuan

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: P-polypeptide, that was so called "plant insulin", was extracted from *Momordica charantia* seeds with vitriol and ethanol and purified with Sephadex G-50 gel filtration and RP-HPLC. The technique was better than thin-layer chromatography technology. The peptide subcutaneously injected could lower blood glucose in normal mice and alloxan-induced diabetic mice, but not for the oral case. The peptide hydrolyzed by pepsin or trypsin lost its hypoglycemic function.

Key words: *Momordica charantia*; plant insulin; isolation; blood glucose

《本草纲目》、《滇南本草》等记载苦瓜具有明目、解毒等功能。现代医学证明苦瓜具有降低血糖、增强机体免疫等功能^[1]。苦瓜作为一种功能食品, 其安全降糖功能日益受到关切。国内外学者对其中的降血糖功能因子进行了大量研究, 报道苦瓜中存在植物胰岛素^[2]、皂苷^[3]等功能成分。

1981年, Khanna^[2]采用有机酸、醇提取, 薄层层析方法从苦瓜果实和苦瓜种子中分离出降糖多肽-P(P-polypeptide), 该肽皮下注射后可降低实验动物的血糖。苦瓜多肽-P有166个氨基酸残基, 相

对分子质量约为11 000。因提取方式与动物胰岛素相似, 且薄层层析相对迁移率与动物胰岛素一致, 故多肽-P又称植物胰岛素(P-insulin)。因苦瓜品种差异及分离提取工艺繁琐, 苦瓜植物胰岛素的研究仍处于实验室阶段。薄层层析方法分离度高, 但样品上样量低, 植物胰岛素难以回收, 不适于大规模制备。作者采用有机酸、醇提取, 凝胶柱层析和反相高效液相色谱技术进行纯化, 分离出苦瓜植物胰岛素, 为工业化生产提供了可能。此外, 作者还对该多肽的降糖活性进行了研究。

收稿日期: 2004-03-01; 修回日期: 2004-04-30。

作者简介: 盛清凯(1971-), 男, 山东陵县人, 助理研究员, 粮食、油脂与植物蛋白工程博士研究生。

1 材料与设备

1.1 材料

苦瓜种子:广西北生药业股份有限公司提供;小白鼠:江苏山禾药业有限公司提供;胰岛素注射液:南京新天生物制药有限公司产品;硅胶G:青岛海洋化工厂产品;胃蛋白酶:上海源聚生物科技有限公司产品;胰蛋白酶:Novo Nordisk 公司产品。

1.2 设备

Sephadex G-50:瑞典 Pharmacia 公司产品;7000D 透析袋:美国 Spectrum 公司产品;LC-2010 高效液相色谱仪:日本岛津公司产品;835-50 型氨基酸分析仪:日本日立公司产品;One Touch II 血糖仪:美国 Life 公司产品。

2 方法与结果

2.1 苦瓜多肽的分离

2.1.1 苦瓜多肽提取 将苦瓜子经丙酮脱脂后粉碎,按 Khanna 方法^[2],采用有机酸-醇提取,丙酮沉淀。沉淀物用相对分子质量为 7 000 的透析袋透析 48 h 后冷冻干燥,得苦瓜多肽粗提物。

2.1.2 凝胶柱层析 按常规方法将 Sephadex G-50 装柱,将苦瓜多肽粗提物溶于缓冲液中配成质量浓度 18 mg/mL 的溶液,进行凝胶柱分离,得到两个洗脱峰,分别收集冻干。由图 1 可知,收集的 P1, P2 两组分中,P2 为主要组分。凝胶层析条件为:缓冲液:pH 5.0,0.2 mol/L 醋酸-醋酸钠溶液,凝胶柱:80 cm×2 cm,UV 280 nm 检测。每管溶液体积为 3.2 mL。

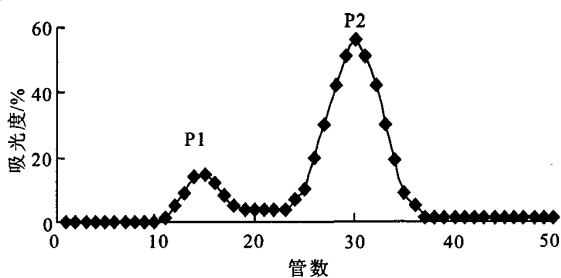


图 1 苦瓜多肽凝胶柱层析图

Fig. 1 Gel filtration of *Momordica charantia* polypeptides

将 P1, P2 冻干粉分别溶于水中,采用皮下注射正常小鼠和四氧嘧啶高血糖模型小鼠,进行降糖试验。结果表明,P1 无降血糖效果,P2 可显著降低正常小鼠、四氧嘧啶高血糖模型小鼠的血糖。

2.1.3 反相高效液相色谱纯化 将 P2 冻干粉溶于超纯水中,配成 5 mg/mL 的溶液,超声波脱气后

经 C_{18} 反相高效液相色谱纯化,线性梯度洗脱(见图 2)。收集组分 PA, PB, PC, PD, 冻干。实验条件为:上样量:10 μ L,体积流量:0.8 mL/min,洗脱液为 A 液:5% 乙腈、0.05% 三氟乙酸;B 液:80% 乙腈、0.05% 三氟乙酸(均为体积分数)。线性洗脱梯度为 0 \rightarrow 1 min, $V(A):V(B)=85:15$, 1 \rightarrow 40 min, $V(A):V(B)=50:50$, 温度 30 $^{\circ}$ C, 220 nm 检测。

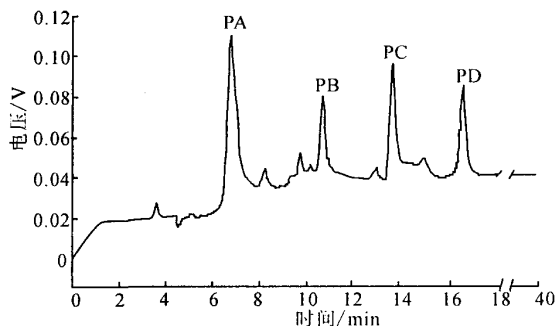


图 2 苦瓜多肽 C_{18} RP-HPLC 图

Fig. 2 C_{18} RP-HPLC of *Momordica charantia* peptide

将 PA, PB, PC, PD 溶于水,与胰岛素溶液一起进行硅胶 G 薄层层析。展开剂为 $V(\text{正丁醇}):V(\text{水}):V(\text{乙酸})=12:5:1$ 。结果显示 PA, PB, PC, PD, 胰岛素的相对迁移率分别为 0.19, 0.10, 0.0, 0.19。PA 的相对迁移率与胰岛素迁移率一致^[2]。

2.2 苦瓜多肽的氨基酸组成分析

将 PA 完全水解,进行氨基酸含量测定。氨基酸组成分析结果见表 1。

表 1 苦瓜多肽 PA 氨基酸组成

Tab. 1 Amino acid composition of *Momordica charantia* PA

氨基酸	含量/ $(\mu\text{mol}/\text{mg})$	分子数/个
天冬氨酸	0.273	17
苏氨酸	0.138	8.7
丝氨酸	0.195	12
谷氨酸	0.305	19
脯氨酸	0.159	10
甘氨酸	0.225	19
丙氨酸	0.240	15
缬氨酸	0.174	11
半胱氨酸	0.058	3.6
蛋氨酸	0.031	2
异亮氨酸	0.116	7
亮氨酸	0.207	13
酪氨酸	0.016	1
苯丙氨酸	0.082	5
组氨酸	0.066	4
赖氨酸	0.209	13
精氨酸	0.161	10
氨	0.431	27
总计		166

PA 氨基酸组成分析结果与 Khanna^[2] 报道一致, 根据 PA 的薄层层析和氨基酸组成分析结果判定, PA 即为植物胰岛素。

2.3 苦瓜植物胰岛素的降糖特性

2.3.1 样品处理 将苦瓜多肽 P2 按以下 3 种方案处理: 样品 1: 将 P2 溶于水, 多肽质量浓度为 1 mg/mL; 样品 2: 将 P2 溶于 pH 2.0 的盐酸水溶液, 多肽质量浓度为 1 mg/mL. 按体积比为 3 000 : 1 的比例加入胃蛋白酶, 37 °C 酶解 4 h 后低温保存; 样品 3: 将 P2 溶于 pH 8.0 的 NaOH 水溶液, 多肽质量浓度为 1 mg/mL. 按体积比为 200 : 1 的比例加入胰蛋白酶, 37 °C 酶解 4 h 后低温保存。

2.3.2 苦瓜多肽 P2 对正常小鼠血糖的影响 小鼠 50 只, 随机分为 5 组, 每组 10 只. 禁食过过夜后, 正常对照组皮下注射蒸馏水 0.2 mL, 其余 4 组小鼠中的 3 组分别皮下注射样品 1、样品 2、样品 3 各 0.2 mL, 最后 1 组口腔灌胃样品 1 0.2 mL. 2 h 后尾部取血, 测血糖值, 结果见表 2. 结果表明, 皮下注射多肽 P2 可极显著降低正常小鼠的血糖 ($P < 0.01$), 口服无效. 经胃蛋白酶、胰蛋白酶水解后, 苦瓜多肽降糖活性丧失。

表 2 苦瓜多肽对正常小鼠血糖的影响

Tab. 2 The effects of P-insulin on blood glucose in normal mice

实验分组	实验动物数/只	血糖值 ($\bar{x} \pm SD$) / (mmol/L)
正常对照组	10	5.12 ± 0.33
皮下注射组	10	3.20 ± 0.26*
口腔灌胃组	10	5.25 ± 0.30
胃蛋白酶组	10	4.79 ± 0.15
胰蛋白酶组	10	4.68 ± 0.22

注: 差异极显著 ($P < 0.01$).

2.3.3 苦瓜多肽 P2 对四氧嘧啶糖尿病小鼠血糖的影响 小鼠 60 只, 取 10 只小鼠作为正常对照组, 皮下注射. 其余的小鼠以每千克体重 200 mg 剂量腹腔注射质量分数 4% 的四氧嘧啶水溶液, 建立糖

尿病模型. 将模型小鼠分为 5 组, 每组 10 只, 其中一组为模型对照组, 皮下注射生理盐水. 另 4 组为实验组, 其中 3 组分别皮下注射样品 1 溶液、样品 2 溶液、样品 3 溶液, 剩余 1 组口腔灌胃样品 1 溶液. 皮下注射和口腔灌胃剂量皆为 0.2 mL, 第 6 天给样 2 h 后, 尾部取血, 测血糖值 (见表 3). 实验结果表明, 苦瓜多肽皮下注射后可极显著降低四氧嘧啶糖尿病小鼠的血糖 ($P < 0.01$), 口服无效. 胃蛋白酶、胰蛋白酶水解后, 多肽降糖活性丧失。

表 3 苦瓜多肽对糖尿病小鼠血糖的影响

Tab. 3 The effects of P-insulin on blood glucose in diabetic mice

实验分组	实验动物数/只	血糖值 ($\bar{x} \pm SD$) / (mmol/L)
正常对照组	10	6.24 ± 0.33
模型对照组	9	15.23 ± 0.42
皮下注射组	10	6.46 ± 0.24*
口腔灌胃组	8	14.9 ± 0.32
胃蛋白酶组	9	14.3 ± 0.26
胰蛋白酶组	9	13.05 ± 0.16

注: 差异极显著 ($P < 0.01$).

3 结 论

1) 用凝胶柱层析、反相高效液相色谱方法纯化苦瓜中的植物胰岛素, 该法优于薄层层析方法制备. 实验所用 C_{18} 柱为分析柱, 大量制备时可采用制备柱。

2) 苦瓜多肽经皮下注射, 可降低正常小鼠和四氧嘧啶糖尿病模型小鼠的血糖, 口服无效. 该多肽经胃蛋白酶或胰蛋白酶水解后, 其活性丧失。

3) 四氧嘧啶是一种特异性的细胞毒剂, 可破坏动物的胰岛细胞, 造成类似人的 1 型糖尿病^[4] 的动物模型. 苦瓜多肽可降低动物的血糖, 表明多肽对 1 型糖尿病有效, 对 2 型糖尿病的影响及降糖机理有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Lesile Taylor. Herbal Secrets of the Rainforest (2nd edition)[M]. Austin: Sage Press Inc., 2002.
- [2] Khanna Pushpa, Jain S C, Panagariya A, et al. Hypoglycemic activity of polypeptide from a plant source[J]. J Nat Prod, 1981, 44 (6): 648-655.
- [3] 王先远, 金宏, 许志勤, 等. 苦瓜皂甙降血糖作用及其机制初探[J]. 氨基酸和生物资源, 2001, 23(3): 42-45.
- [4] 孙子林, 葛祖铠. 糖尿病动物模型及其进展[J]. 中国糖尿病杂志, 1997, 7(4): 227-228.

(责任编辑: 朱明)