



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103819552 B

(45) 授权公告日 2016.01.13

(21) 申请号 201410052489.7

(22) 申请日 2014.02.17

(73) 专利权人 中国人民解放军第二军医大学
地址 200433 上海市杨浦区翔殷路 800 号

(72) 发明人 张黎明 常银龙 肖良 郑杰民
王蓓蕾 王倩倩 尹慢慢 周永红
刘丹 刘甜甜

(74) 专利代理机构 上海元一成知识产权代理事
务所(普通合伙) 31268

代理人 赵青

性的比较及其影响因素分析.《第二军医大学学报》.2008,第29卷(第1期),第83-86页.

Xiao L. 等.Cyanea capillata
tentacle-only extract as a potential
alternative of nematocyst venom: its
cardiovascular toxicity and tolerance to
isolation and purification procedures.
《Toxicon》.2009,第53卷(第1期),第146-152
页.

审查员 蔡苗

(51) Int. Cl.

C07K 14/475(2006.01)

C07K 1/20(2006.01)

C07K 1/16(2006.01)

A61K 38/18(2006.01)

A61P 17/02(2006.01)

(56) 对比文件

CN 101302251 A, 2008.11.12, 全文.

CN 103232979 A, 2013.08.07, 全文.

CN 103255113 A, 2013.08.21, 全文.

聂菲等.发形霞水母毒素分离产物溶血活

权利要求书1页 说明书5页

序列表1页 附图3页

(54) 发明名称

一种发形霞水母多肽生长因子及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明属于海洋生物技术领域,本发明提供了一种发形霞水母多肽生长因子,命名为Cc-GRN-1,其氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。本发明还提供了上述发形霞水母多肽生长因子的制备方法及其应用。本发明的发形霞水母多肽生长因子具有显著的促细胞增殖作用,在研制损伤修复药物方面有良好的应用前景。

CN 103819552 B

1. 一种发形霞水母多肽生长因子,其特征在于,该多肽生长因子的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示。

2. 一种如权利要求 1 所述的发形霞水母多肽生长因子的制备方法,其特征在于,该方法的具体步骤如下:

A、准备水母刺丝囊毒素

取冻存的发形霞水母触手解冻,加入 2-6 倍体积预冷的蒸馏水,用搅拌器缓慢连续搅拌 5 小时以上;混悬液用孔径为 450 μm 的 40 目分样筛过滤,收集滤液,3000 \times g 离心 5min,移去上清液,沉淀用无菌人工海水洗涤 2-3 次,即得刺丝囊;向洗净的刺丝囊加入 50mmol/L、pH 3.0 的乙酸,转移至破碎管中,然后利用组织研磨器 Mini-Beadbeater 在转速为 4600rpm 条件下破碎 3-6min,每破碎 30s,将破碎管取出置于冰水中冷却 1min,破碎完毕后 10000 \times g 离心 10min,收集上清即为水母刺丝囊毒素;

上述操作都在 0-4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下进行;

所述的无菌人工海水,是用以下方法配制得到的:称取 NaCl 28g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5g, KCl 0.8g, CaCl_2 1.033g,加蒸馏水至 1L,混匀后用孔径为 0.20 μm 的微孔滤膜过滤;

B、Superdex 30 柱凝胶过滤层析

将上述水母刺丝囊毒素用孔径为 0.45 μm 的微孔滤膜过滤,滤液上 Superdex30 柱进行分离纯化,采用 50mmol/L、pH 3.0 的乙酸洗脱,流速为 1mL/min,280nm 波长的紫外检测器同步检测并收集洗脱体积 110-115mL 组分的洗脱峰 SE2;

C、C8 柱反相高效液相层析

将上述流出体积 110-115mL 组分以含 0.1% 三氟乙酸的水和含 0.1% 三氟乙酸的乙腈构成的洗脱系统进行线性梯度洗脱,收集 HPLC 反相 C8 柱层析峰,即得到多肽生长因子 Cc-GRN-1 组分。

3. 根据权利要求 2 所述的发形霞水母多肽生长因子的制备方法,其特征在于,该方法还包括以下步骤:

D、C18 柱反相高效液相层析

将步骤 C 含多肽生长因子 Cc-GRN-1 组分用反相 C18 柱进行二次纯化,以含 0.1% 三氟乙酸的水和含 0.1% 三氟乙酸的乙腈构成的洗脱系统进行线性梯度洗脱,收集 HPLC 反相 C18 柱层析峰,即得到多肽生长因子 Cc-GRN-1 单体。

4. 一种如权利要求 1 所述的发形霞水母多肽生长因子在制备损伤修复药物中的应用。

一种发形霞水母多肽生长因子及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于海洋生物技术领域,具体涉及一种发形霞水母多肽生长因子及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 水母(jellyfish)是一类胶质状的浮游动物,种类繁多,数量巨大,分布广泛,在海洋生态系统中占有重要地位。水母的基本结构是由伞体、缘膜、口腕、触手、附属器等组成,伞体呈扁平圆盘形或球形,伞体腹面有口,口下悬垂口腕,伞体边缘和口腕上长有许多触手,长者达数十米,其上密布刺丝囊。刺丝囊是触手上一种特化细胞——刺细胞的特化细胞器,状如小囊,内含毒液,是刺胞动物的防御与进攻武器。当触手触及其他动物时,立即缠绕受害者,刺丝囊发射刺丝穿入人体皮肤或小动物体内,同时释放出毒液。

[0003] 水母生殖腺发达,繁殖能力强,生长发育速度极快,同时也具有非常强的再生能力。水母捕食或防御天敌进攻的过程中,一方面,细长丝状的触手容易出现断裂、脱落或者被天敌咬去许多,但受损部位很快可长出新的触手,以维持水母个体的正常活动与功能,水母触手表现出了超强的损伤修复能力;另一方面,水母触手上刺丝囊数量巨大,需经细胞快速、大量增殖产生,而且捕食、防御过程会消耗大量刺丝囊,损耗的刺丝囊也需要及时补充,因此推测触手中存在着刺细胞快速增殖和刺丝囊补充的动态过程。水母触手的超强损伤修复能力和刺细胞的快速增殖能力提示,水母触手,特别是刺细胞中,可能存在高活性生长因子。

[0004] 颗粒体蛋白前体(Progranulin, PGRN)是一种参与发育调节、伤口愈合、血管发生、神经元细胞生长和维持以及炎症反应等多种生理病理过程的分泌型生长因子,亦称为颗粒体蛋白/上皮肤前体(GEP)、PC细胞衍生的生长因子(PCDGF)、acroganin或G80。它首先作为生长因子从条件组织培养基中纯化得到,是一种含593个氨基酸残基的分泌性糖蛋白,表观分子量88kDa。PGRN包括1个信号肽序列和7.5个颗粒体蛋白(granulin, GRN)模序($X_2_3CX_5_6CX_5CCX_8CCX_6CCXDX_2HCCPX_4CX_5_6CX_2$),每个模序都含有12个半胱氨酸并形成6对二硫键,在空间结构上,4个 β -折叠的“发夹”结构依次呈梯状折叠。共有序列的C末端包含保守序列CCXDX₂HCCP,被认为具有金属酶结合位点以及参与调节功能。PGRN可以被细胞外的蛋白酶如嗜中性粒细胞分泌的弹性蛋白酶水解成小的多肽片段GRN,这些多肽片段的分子量从6kDa到25kDa大小不等,均保留生物学活性:可促进细胞生长,并可能与炎症有关(参见文献:Lu R, G Serrero, et al. Inhibition of PC cell-derived growth factor(PCDGF, ephelin/granulin precursor)expression by antisense PCDGF cDNA transfection inhibits tumorigenicity of the human breast carcinoma cell line MDA-MB-468. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(8):3993-3998)。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种来源于发形霞水母,新的多肽生长因子;本发明的另

一目的在于提供该多肽生长因子的制备方法,以及在制备损伤修复药物中的应用。

[0006] 为了实现本发明的目的,本发明采用如下技术方案:

[0007] 本发明从发形霞水母刺丝囊毒素中分离得到的一种促进细胞增殖的单链多肽 Cc-GRN-1,生物信息学分析提示其属于颗粒体蛋白(GRN)家族,查询蛋白质/多肽公共数据库无该多肽序列,尚未见相关文献报道。

[0008] 本发明的第一方面,是提供了一种发形霞水母多肽生长因子,命名为 Cc-GRN-1,其氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示。

[0009] 本发明的多肽生长因子是从发形霞水母刺丝囊毒素中分离得到的一种单链多肽,58 个氨基酸,分子量 5782.9Da,多肽氨基酸全序列一级结构如下:Asn - Val - Ile - Cys - Pro - Asp - Gly - Thr - Ser - Phe - Cys - Ala - Ser - Gly - Gln - Thr - Cys - Cys - Lys - Leu - Ser - Ser - Gly - Ser - Tyr - Gly - Cys - Cys - Pro - Leu - Pro - Asn - Ala - Val - Cys - Cys - Ser - Asp - Gly - Val - His - Cys - Cys - Pro - Ser - Gly - Thr - Thr - Cys - Asp - Val - Ser - Gln - Gly - Thr - Cys - Leu - Arg (SEQ ID NO:1)

[0010] 本发明的第二方面,是提供了上述的发形霞水母多肽生长因子的制备方法。

[0011] 本发明将活体发形霞水母触手剪下,-70℃冻存,采用自溶法制备发形霞水母刺丝囊,利用组织研磨器破碎提取得到水母粗毒素,再经凝胶过滤层析和两次反相高效液相层析(RP-HPLC)分离纯化后即得到。

[0012] 本发明的发形霞水母多肽生长因子 Cc-GRN-1 的制备方法,具体步骤如下:A、准备水母刺丝囊毒素

[0013] 取冻存的发形霞水母触手解冻,加入 2-6 倍体积预冷的蒸馏水,用搅拌器缓慢连续搅拌 5h 以上;混悬液用孔径为 450 μm 的 40 目分样筛过滤,收集滤液,3000×g 离心 5min,移去上清液,沉淀用无菌人工海水洗涤 2-3 次,即得刺丝囊;向洗净的刺丝囊加入 50mmol/L、pH3.0 的乙酸,转移至破碎管中,然后利用组织研磨器 Mini-Beadbeater 在转速为 4600rpm 条件下破碎 3-6min,每破碎 30s,将破碎管取出置于冰水中冷却 1min,破碎完毕后 10000×g 离心 10min,收集上清即为水母刺丝囊毒素;

[0014] 上述操作都在 0-4℃(如冰水混合物)条件下进行。

[0015] 所述的无菌人工海水,是用以下方法配制得到的:称取 NaCl28g, MgCl₂·6H₂O5g, KCl0.8g, CaCl₂1.033g,加蒸馏水至 1L,混匀后用孔径为 0.20 μm 的微孔滤膜过滤。

[0016] B、Superdex30 柱凝胶过滤层析

[0017] 将上述水母刺丝囊毒素用孔径为 0.45 μm 的微孔滤膜过滤,滤液上 Superdex30 柱进行分离纯化,采用 50mmol/L、pH3.0 的乙酸洗脱,流速为 1mL/min,280nm 波长的紫外检测器同步检测并收集洗脱体积 110-115mL 组分的洗脱峰 SE2。

[0018] 我们用基质辅助激光解析电离-飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)分析得知,其中流出体积 110-115mL 内的组分(参见图 1 洗脱峰 SE2)含有多肽生长因子 Cc-GRN-1。

[0019] C、C8 柱反相高效液相层析(RP-HPLC)

[0020] 将上述流出体积 110-115mL 组分以含 0.1% 三氟乙酸的水和含 0.1% 三氟乙酸的乙腈构成的洗脱系统进行线性梯度洗脱,收集 HPLC 反相 C8 柱层析峰(参见图 2 洗脱峰 RP2),即得到多肽生长因子 Cc-GRN-1 组分。

[0021] 本发明的发形霞水母多肽生长因子 Cc-GRN-1 的制备方法,还包括以下步骤:

[0022] D、C18 柱反相高效液相层析 (RP-HPLC)

[0023] 将步骤 C 含多肽生长因子 Cc-GRN-1 组分用反相 C18 柱进行二次纯化,以含 0.1% 三氟乙酸的水和含 0.1% 三氟乙酸的乙腈构成的洗脱系统进行线性梯度洗脱,收集 HPLC 反相 C18 柱层析峰(参见图 3 洗脱峰 Cc-GRN-1),即得到多肽生长因子 Cc-GRN-1 单体。

[0024] 本发明采用 MALDI-TOF 质谱测定分子量,用全自动蛋白质多肽测序仪测定多肽氨基酸序列一级结构。

[0025] 本发明也可通过人工方法合成如 SEQ ID NO:1 所示的多肽。

[0026] 本发明的第三方面,是提供了上述的发形霞水母多肽生长因子在制备损伤修复药物中的应用。

[0027] 所述的损伤,指外力作用于身体使某部组织或器官发生结构破坏或功能障碍,如机械性、物理性或化学性损伤。

[0028] 所述的修复,指受损害或缺损的组织由周围健康组织来再生、修补恢复的过程。它是机体的一种适应能力和抗损害的防御机能。组织修复主要通过血管、结缔组织、上皮组织等的再生而完成。

[0029] 用本发明的发形霞水母多肽生长因子 Cc-GRN-1 的细胞增殖实验结果来证明本发明的促细胞增殖作用。本发明的 Cc-GRN-1 有显著的促细胞增殖作用,可作为研制损伤修复药物的应用。

[0030] 采用 CCK-8 法来检测样品的促细胞增殖作用。A549 细胞(人肺腺癌细胞)在 37°C, 5%CO₂条件下的培养箱内培养,将浓度分别为 1 μg/mL、2 μg/mL、3 μg/mL 和 4 μg/mL 多肽生长因子 Cc-GRN-1 加入预培养的 96 孔培养板中,每个浓度 6 个复孔,将培养板在培养箱孵育 48h,向每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,将培养板在培养箱孵育 1.5h,用酶标仪测定在 450nm 处的吸光度,计算细胞增殖率。同样,HUVEC 细胞(人脐静脉内皮细胞)在 37°C, 5%CO₂条件下的培养箱内培养,将浓度分别为 0.125 μg/mL、0.25 μg/mL、0.5 μg/mL 和 1 μg/mL 多肽生长因子 Cc-GRN-1 加入预培养的 96 孔培养板中,每个浓度 6 个复孔,将培养板在培养箱孵育 72h,向每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,将培养板在培养箱孵育 1.5h,用酶标仪测定在 450nm 处的吸光度,计算细胞增殖率。结果表明,发形霞水母多肽生长因子 Cc-GRN-1 具有显著的促细胞增殖作用,而且促细胞增殖作用随着剂量的递增而增强。

[0031] 本发明的发形霞水母多肽生长因子 Cc-GRN-1 是一种首次从刺胞动物发形霞水母中得到的具有显著促细胞增殖作用的新的多肽。本发明的发形霞水母多肽生长因子 Cc-GRN-1 具有显著的促细胞增殖作用,在研制损伤修复药物方面有良好的应用前景。本发明的多肽也具有序列高度保守性、促细胞增殖作用显著等优点。本发明为海洋药物的研发提供了新的思路。

附图说明

[0032] 图 1 为本发明发形霞水母颗粒体蛋白 Cc-GRN-1 的 Superdex30 柱凝胶过滤层析图。

[0033] 图 2 为本发明发形霞水母多肽生长因子 Cc-GRN-1 的 C8 柱反相高效液相层析图。

[0034] 图 3 为本发明发形霞水母多肽生长因子 Cc-GRN-1 的 C18 柱反相高效液相层析图。

[0035] 图 4 为本发明发形霞水母多肽生长因子 Cc-GRN-1 的 MALDI-TOF 质谱图。

[0036] 图 5 为本发明发形霞水母多肽生长因子 Cc-GRN-1 对 A549 细胞的细胞增殖活性检测。

[0037] 图 6 为本发明发形霞水母多肽生长因子 Cc-GRN-1 对 HUVEC 细胞的细胞增殖活性检测。

具体实施方式

[0038] 下面结合实施例和附图对本发明进行详细描述。但下列实施例不应看作对本发明范围的限制。

[0039] 本发明选择的发形霞水母(*Cyanea Capillata*) 采集自浙江省三门湾海域, 并经集美大学水产学院洪惠馨教授鉴定(Xiao L, He Q, et al. *Cyanea capillata* tentacle-only extract as a potential alternative of nematocyst venom: Its cardiovascular toxicity and tolerance to isolation and purification procedures. *Toxicon*, 2009, 53(1):146-152)。

[0040] A549 细胞、HUVEC 细胞购自中科院细胞所。

[0041] 下述实施例中的实验方法, 如无特殊说明, 均为常规方法。

[0042] 实施例 1: 制备水母刺丝囊毒素

[0043] 取 200g 冻存的水母触手置于烧杯中解冻, 加入 5 倍体积预冷的蒸馏水, 用搅拌器缓慢连续搅拌 10h; 混悬液用孔径为 450 μm 的 40 目分样筛过滤, 收集滤液, 3000 \times g 离心 5min, 移去上清液, 沉淀用无菌人工海水洗涤 3 次, 即得刺丝囊; 向洗净的刺丝囊加入少量 50mmol/L、pH3.0 的乙酸, 转移至含有破碎用钢珠的破碎管中, 然后利用组织研磨器 Mini-Beadbeater 在转速为 4600rpm 条件下破碎 6min, 每破碎 30s, 将破碎管取出置于冰水中冷却 1min, 破碎完毕后 10000 \times g 离心 10min, 收集上清即为水母刺丝囊毒素。上述操作都在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下进行。

[0044] 实施例 2: 水母刺丝囊毒素的分离纯化

[0045] (1) Superdex30 柱凝胶过滤层析

[0046] 将水母刺丝囊毒素用孔径为 0.45 μm 的微孔滤膜过滤, 滤液上 Superdex30 柱进行分离纯化, 采用 50mmol/L、pH3.0 乙酸洗脱, 流速为 1mL/min, 按固定体积收集洗脱峰, MALDI-TOF 质谱分析得知, 其中流出体积 110-115mL 内的组分(参见图 1 洗脱峰 SE2)含有多肽生长因子 Cc-GRN-1。

[0047] (2) C8 柱反相高效液相层析(RP-HPLC)

[0048] 将上述流出体积 110-115mL 组分以含 0.1% 三氟乙酸的水和含 0.1% 三氟乙酸的乙腈构成的洗脱系统进行线性梯度洗脱, 收集 HPLC 反相 C8 柱层析峰(参见图 2 洗脱峰 RP2), 即得到多肽生长因子 Cc-GRN-1 组分。

[0049] (3) C18 柱反相高效液相层析(RP-HPLC)

[0050] 将上述颗粒体蛋白 Cc-GRN-1 组分用反相 C18 柱进行二次纯化, 以含 0.1% 三氟乙酸的水和含 0.1% 三氟乙酸的乙腈构成的洗脱系统进行线性梯度洗脱, 收集 HPLC 反相 C18 柱层析峰(参见图 3 洗脱峰 Cc-GRN-1), 即得到多肽生长因子 Cc-GRN-1 单体。

[0051] 实施例 3: 发形霞水母多肽生长因子 Cc-GRN-1 测序

[0052] 用高效液相色谱(HPLC)方法鉴定发形霞水母多肽生长因子 Cc-GRN-1 的纯度,

MALDI-TOF 质谱测定其分子量(参见图 4),用全自动蛋白质多肽测序仪测定其氨基酸序列。

[0053] 通过上述方法制备的发形霞水母多肽生长因子 Cc-GRN-1,是我们从发形霞水母刺丝囊毒素中分离得到的一种单链多肽,分子量 5782.9Da,多肽氨基酸全序列一级结构为:天冬酰胺-缬氨酸-异亮氨酸-半胱氨酸-脯氨酸-天冬氨酸-甘氨酸-苏氨酸-丝氨酸-苯丙氨酸-半胱氨酸-丙氨酸-丝氨酸-甘氨酸-谷氨酰胺-苏氨酸-半胱氨酸-半胱氨酸-赖氨酸-亮氨酸-丝氨酸-丝氨酸-甘氨酸-丝氨酸-酪氨酸-甘氨酸-半胱氨酸-半胱氨酸-脯氨酸-亮氨酸-脯氨酸-天冬酰胺-丙氨酸-缬氨酸-半胱氨酸-半胱氨酸-丝氨酸-天冬氨酸-甘氨酸-缬氨酸-组氨酸-半胱氨酸-半胱氨酸-脯氨酸-丝氨酸-甘氨酸-苏氨酸-苏氨酸-半胱氨酸-天冬氨酸-缬氨酸-丝氨酸-谷氨酰胺-甘氨酸-苏氨酸-半胱氨酸-亮氨酸-精氨酸(SEQ ID NO:1)。

[0054] 实施例 4:发形霞水母多肽生长因子 Cc-GRN-1 的细胞增殖活性检测

[0055] (1)在 96 孔板中接种 100 μ L A549 细胞(人肺腺癌细胞)和 HUVEC 细胞(人脐静脉内皮细胞)悬液,将培养板在培养箱中于 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂的条件下预培养 24h。

[0056] (2)移去原培养基,向培养板加入 100 μ L 含不同浓度 Cc-GRN-1 的培养基,将培养板在培养箱分别孵育 48h 和 72h。

[0057] (3)向每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液,将培养板在培养箱孵育 1.5h。

[0058] (4)用酶标仪测定在 450nm 处的吸光度,计算细胞增殖率。细胞增殖率=[(处理组 A 值-空白组 A 值)/空白组 A 值] \times 100%。

[0059] 实验结果参见图 5、图 6,随着多肽生长因子 Cc-GRN-1 浓度的增加,细胞增殖率逐渐增大,且与空白对照相比有显著性差异。

[0060] 可见,发形霞水母多肽生长因子 Cc-GRN-1 具有显著的促细胞增殖作用,可作为研制损伤修复药物的应用。

[0061] 以上显示和描述了本发明的基本原理、主要特征和本发明的优点。本行业的技术人员应该了解,本发明不受上述实施例的限制,上述实施例和说明书中描述的只是说明本发明的原理,在不脱离本发明精神和范围的前提下本发明还会有各种变化和改进,这些变化和改进都落入要求保护的本发明范围内。本发明要求保护范围由所附的权利要求书及其等同物界定。

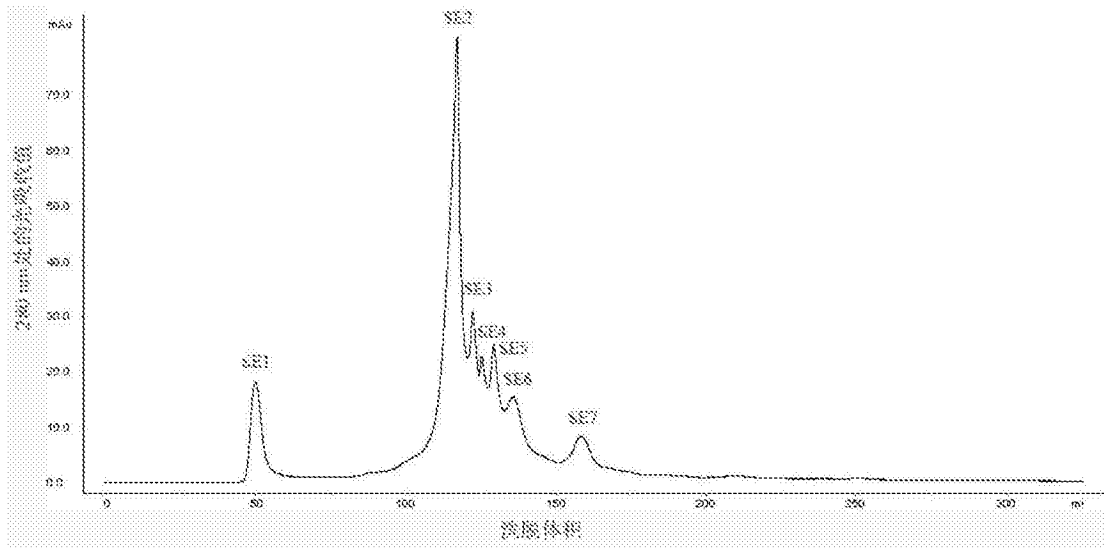


图 1

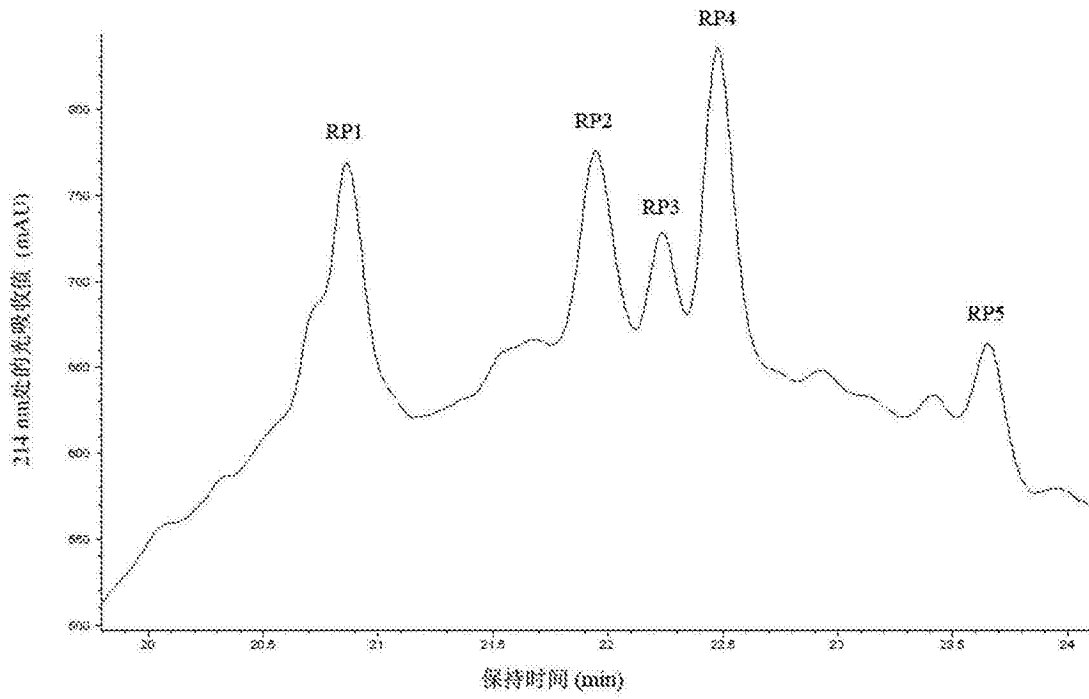


图 2

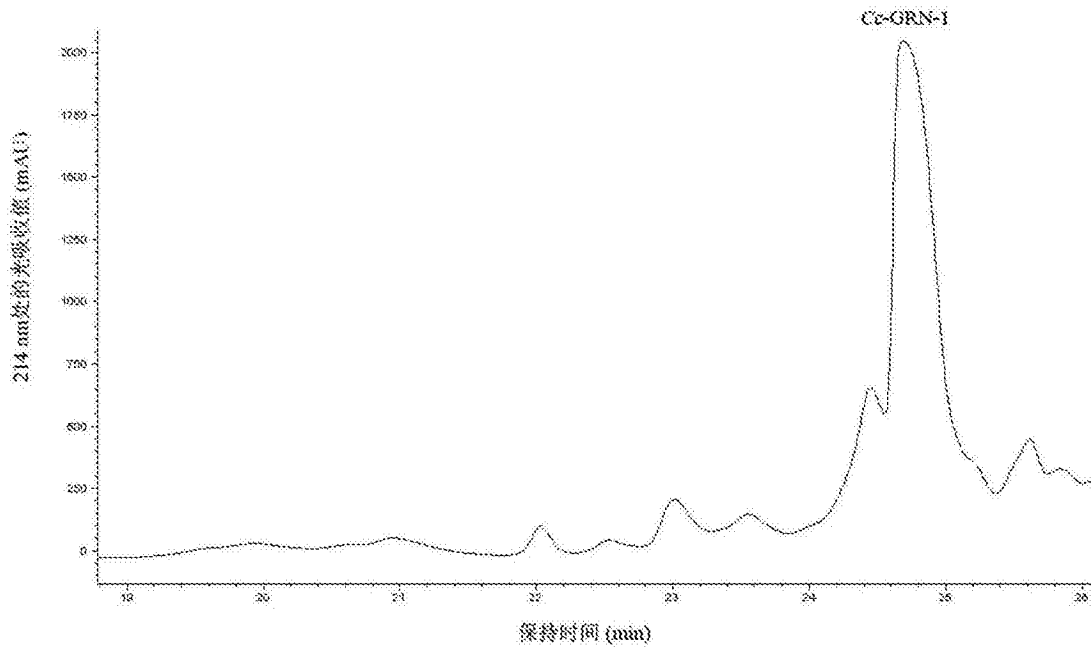


图 3

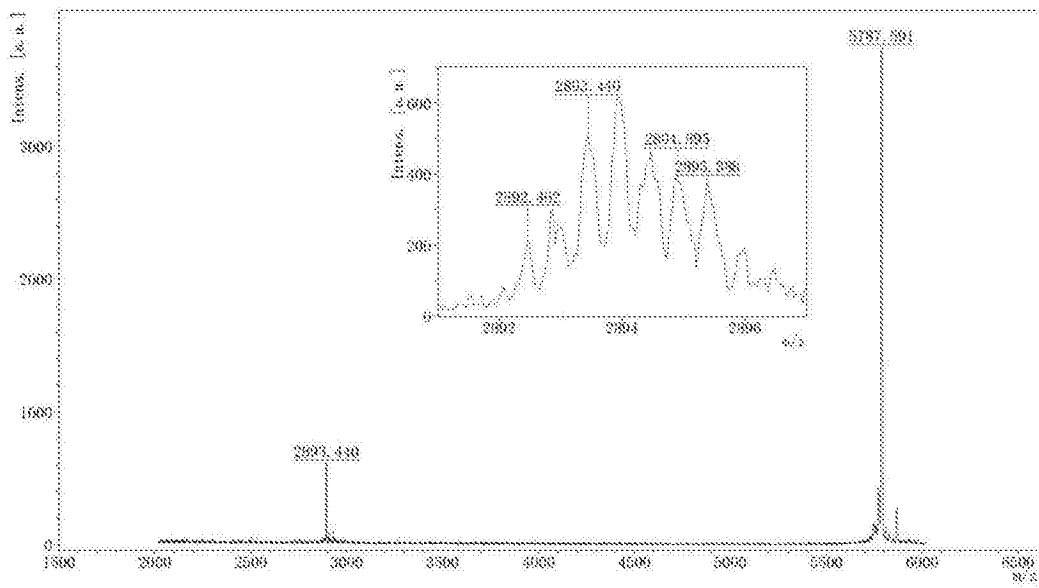


图 4

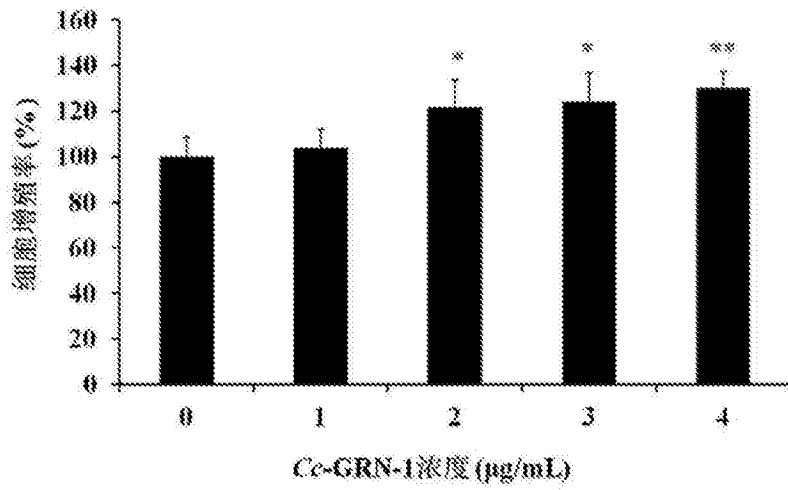


图 5

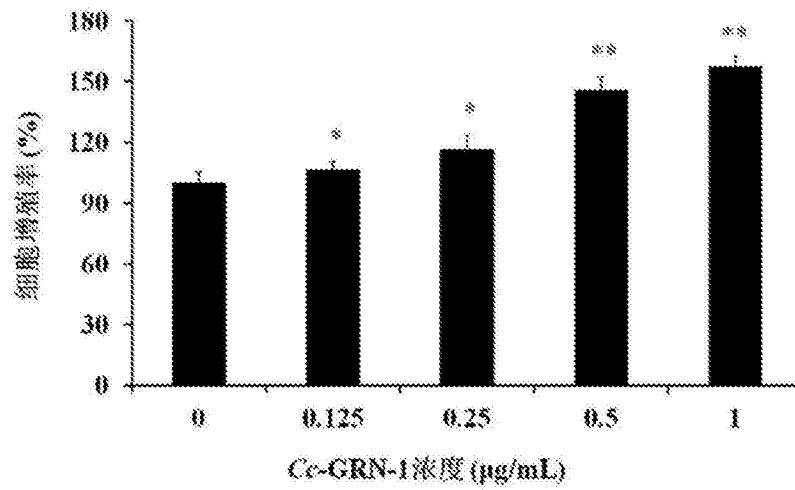


图 6