



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105622720 B

(45)授权公告日 2020.09.08

(21)申请号 201610098099.2

A61P 1/16(2006.01)

(22)申请日 2016.02.23

A61P 17/00(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

A61P 9/10(2006.01)

申请公布号 CN 105622720 A

A61P 3/10(2006.01)

(43)申请公布日 2016.06.01

A61P 3/04(2006.01)

(73)专利权人 浙江海洋学院

A61P 39/06(2006.01)

地址 316022 浙江省舟山市临城街道长峙
岛海大南路1号

A23L 33/18(2016.01)

(72)发明人 王斌 赵玉勤 孙坤来

(56)对比文件

CN 103524596 A, 2014.01.22

(74)专利代理机构 杭州浙科专利事务所(普通
合伙) 33213

CN 103524597 A, 2014.01.22

代理人 吴秉中

US 2011217249 A1, 2011.09.08

审查员 王雨方

(51)Int.Cl.

C07K 7/06(2006.01)

权利要求书1页 说明书3页

A61K 38/08(2019.01)

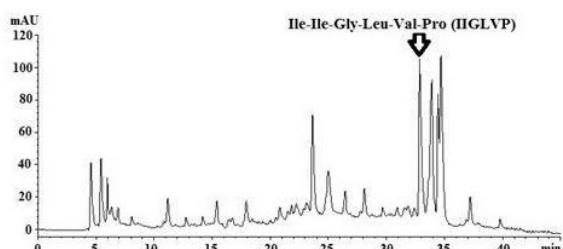
序列表1页 附图1页

(54)发明名称

一种激活Nrf2-ARE通路的双髻鲨鱼肉抗氧化肽

(57)摘要

本发明公开了一种激活Nrf2-ARE通路的双髻鲨鱼肉抗氧化肽。本发明以双髻鲨鱼肉为原料，通过双酶解得酶解液，酶解液采用超滤、大孔树脂纯化、凝胶柱层析和反相高效液相色谱分离纯化得到抗氧化肽Ile-Ile-Gly-Leu-Val-Pro(IIGLVP)，ESI-MS测定分子量为610.77 Da；制备的高活性抗氧化肽对DPPH自由基、羟自由基和超氧阴离子自由基具有良好的清除作用；同时亦可促进Nrf2蛋白质积累，激活Nrf2-ARE通路，可用作治疗肝损伤、皮肤光老化、动脉硬化、中风、糖尿病和肥胖等与Nrf2-ARE通路密切相关疾病治疗的药物和功能产品。



B

CN 105622720

1. 一种激活Nrf2-ARE通路的双髻鲨鱼肉抗氧化肽,氨基酸序列为Ile-Ile-Gly-Leu-Val-Pro,ESI-MS测定分子量为610.77Da。

一种激活Nrf2-ARE通路的双髻鲨鱼肉抗氧化肽

技术领域

[0001] 本发明涉及一种抗氧化活性肽，具体涉及一种激活Nrf2-ARE通路的双髻鲨鱼肉抗氧化肽。

背景技术

[0002] 鲨鱼全身是宝，有的种类肉质鲜美，是餐桌上常见的菜肴。鱼皮具有良好的韧性，是皮革加工业的原料。现代医学证明鲨鱼软骨也具有很大的药用价值，1992年美国首先将鲨鱼软骨粉直接用于临床治疗肿瘤。

[0003] 双髻鲨 (*Sphyrna lewini*) 为软骨鱼纲，真鲨目，双髻鲨科，在我国主要分布于黄海、东海和南海。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题是提供一种具有激活Nrf2-ARE通路的双髻鲨鱼肉抗氧化肽。

[0005] 本发明为解决上述技术问题所采取的技术方案为：一种具有激活Nrf2-ARE通路的双髻鲨鱼肉抗氧化肽，该抗氧化肽为六肽化合物，氨基酸序列为Ile-Ile-Gly-Leu-Val-Pro (IIGLVP)，ESI-MS测定分子量为610.77Da。

[0006] 该双髻鲨鱼肉抗氧化肽的制备方法为：

[0007] 1) 双髻鲨鱼肉的预处理：取双髻鲨鱼肉用高速组织捣碎机处理成匀浆，加热至90～95℃后保温5～10min，然后按照料液比1g:2～4mL加入异丙醇，于25～30℃、功率450～500W超声提取2～3h，然后于4℃、9000～10000rpm离心10～15min除去异丙醇，收集脱脂双髻鲨鱼肉固体物；

[0008] 2) 脱脂双髻鲨鱼肉固体物的酶解：取脱脂双髻鲨鱼肉固体物，按固液比1g:10mL～15mL加入甘氨酸—氢氧化钠缓冲液(0.05mol/L, pH 9.5)，用0.1mol/L HCl或0.1mol/L NaOH调节pH到9.0～10.0，得混合液；将混合物温度调至55～65℃，按照脱脂双髻鲨鱼肉固体物质量的1.2%～1.5%加入碱性蛋白酶(酶活力 $\geqslant 1.95 \times 10^5$ U/g)，酶解时间2h～2.5h后，酶解液于90～95℃保温10～15min，灭酶活；将酶解液温度调至35～45℃，按照脱脂双髻鲨鱼肉固体物质量的1.0%～1.2%加入胰蛋白酶(酶活力 $\geqslant 2.5 \times 10^4$ U/g)，酶解时间3h～4h，酶解液于90～95℃保温10～15min后降至室温，于10000～12000rpm离心10～15min，取上清液。

[0009]) 双髻鲨鱼肉抗氧化肽的分离制备：将上述上清液依次经超滤、大孔树脂纯化、凝胶柱层析和RP-HPLC纯化，得双髻鲨鱼肉抗氧化肽。

[0010] 作为优选，所述步骤3)的超滤、大孔树脂纯化、凝胶柱层析和RP-HPLC纯化的具体过程为：

[0011] 超滤：将上述酶解上清液采用1kDa超滤膜进行超滤处理，收集分子量小于1kDa部分，得超滤酶解液。

[0012] 大孔树脂精制:将超滤酶解液配成15~20mg/mL的溶液,缓慢加入到超滤酶解液与D101大孔树脂比为1:10~15的玻璃柱中,用3~5倍柱体积的双蒸水洗脱除去杂质,再用3~4倍柱体积的95%乙醇洗脱,收集95%乙醇洗脱物,喷雾干燥,即为大孔树脂精制多肽。

[0013] 凝胶柱层析:将上述大孔树脂精制多肽溶于双蒸水配成浓度为20~30mg/mL的溶液,经过葡聚糖凝胶Sephadex G-25柱层析分离,用双蒸水进行洗脱,流速为0.8~1.2mL/min,洗出溶液每3min收集一管并于220nm检测,按峰合并试管内溶液,比较各峰的羟基自由基的清除活性,选择活性最强组分冻干,即为凝胶层析酶解物;

[0014] RP-HPLC纯化:将上述凝胶层析酶解物用双蒸水配成90~100 μ g/mL的溶液,利用RP-HPLC进行纯化,根据对羟基自由基的清除活性得1个高抗氧化活性多肽Ile-Ile-Gly-Leu-Val-Pro (IIGLVP),ESI-MS测定分子量为610.77Da。

[0015] 再优选,所述RP-HPLC条件为:进样量15~20 μ L;色谱柱Zorbax SB-C₁₈ (250mm×4.6mm,5 μ m);流动相:水-乙腈梯度洗脱(0~45min乙腈浓度由0匀速升至45%);洗脱速度0.8~1.0mL/min;紫外检测波长220nm。

[0016] 本发明所提供的一种激活Nrf2-ARE通路的双髻鲨鱼肉抗氧化肽,Ile-Ile-Gly-Leu-Val-Pro (IIGLVP) 对DPPH自由基、羟基自由基和超氧阴离子自由基具有良好的清除作用;同时Ile-Ile-Gly-Leu-Val-Pro (IIGLVP) 还可促进Nrf2蛋白质积累,激活Nrf2-ARE通路,进而上调抗氧化酶和II相解毒酶清除有害物,保护机体免受毒物的损伤。因此,Ile-Ile-Gly-Leu-Val-Pro (IIGLVP) 可用作治疗肝损伤、皮肤光老化、动脉硬化、中风、糖尿病和肥胖等与Nrf2-ARE通路密切相关疾病治疗的药物或功能产品。

附图说明

[0017] 图1是本发明的葡聚糖凝胶Sephadex G-25层析图。

[0018] 图2葡聚糖凝胶Sephadex G-25制备酶解物的RP-HPLC色谱图。

[0019] 图3Ile-Ile-Gly-Leu-Val-Pro (IIGLVP) 对Nrf2蛋白质水平的影响。

具体实施方式

[0020] 以下结合附图实施例对本发明作进一步详细描述。

[0021] 实施例:

[0022] 双髻鲨鱼肉抗氧化肽的制备方法,制备工艺流程如下:双髻鲨鱼肉→双酶酶解→酶解物→超滤→大孔树脂纯化→凝胶过滤层析→高效液相色谱制备→抗氧化肽。

[0023] 1)双髻鲨鱼肉的预处理:取双髻鲨鱼肉用高速组织捣碎机处理成匀浆,加热至95℃后保温8min,然后按照料液比1g:3mL加入异丙醇,于25℃、功率500W超声提取3h,然后于4℃、10000rpm离心10min除去异丙醇,收集脱脂双髻鲨鱼肉固体;

[0024] 2)脱脂双髻鲨鱼肉固体的酶解:取脱脂双髻鲨鱼肉固体,按固液比1g:12mL加入甘氨酸-氢氧化钠缓冲液(0.05mol/L,pH 9.5),用0.1mol/L HCl或0.1mol/L NaOH调节pH到9.5,得混合液;将混合物温度调制60℃,按照脱脂双髻鲨鱼肉固体质量的1.2%加入碱性蛋白酶(酶活力 $\geq 1.95 \times 10^5$ U/g),酶解时间2.5h后,酶解液于95℃保温15min,灭酶活;将酶解液温度调至40℃,按照脱脂双髻鲨鱼肉固体质量的1.0%加入胰蛋白酶(酶活力 $\geq 2.5 \times 10^4$ U/g),酶解时间34h,酶解液于95℃保温15min后降至室温,于12000rpm离心10min,

取上清液。

[0025]) 双髻鲨鱼肉抗氧化肽的分离制备:将上述上清液依次经超滤、大孔树脂纯化、凝胶柱层析和RP-HPLC纯化,得双髻鲨鱼肉抗氧化肽。

[0026] ①超滤:将上述酶解上清液采用采用1kDa超滤膜进行超滤处理,收集分子量小于1kDa部分,得超滤酶解液。

[0027] ②大孔树脂精制:将超滤酶解液配成20mg/mL的溶液,缓慢加入到滤酶解液与D101大孔树脂重量体积比(mg/mL)为1:15的玻璃柱中,用3倍柱体积的双蒸水洗脱除去杂质,再用4倍柱体积的95%乙醇洗脱,收集95%乙醇洗脱物,喷雾干燥,即为大孔树脂精制多肽。

[0028] ③凝胶柱层析:将上述大孔树脂精制多肽溶于双蒸水配成浓度为25mg/mL的溶液,经过葡聚糖凝胶Sephadex G-25柱层析分离,用双蒸水进行洗脱,流速为1.0mL/min,洗出溶液每3min收集一管并于220nm检测,按峰合并试管内溶液,比较各峰的羟基自由基的清除活性,选择活性最强组分冻干,即为凝胶层析酶解物Fr.3(图1);

[0029] ④RP-HPLC纯化:将上述凝胶层析酶解物用双蒸水配成95μg/mL的溶液,利用RP-HPLC进行纯化(再优选,所述RP-HPLC条件为:进样量20μL;色谱柱Zorbax SB-C₁₈(250mm×4.6mm,5μm);流动相:水-乙腈梯度洗脱(0~45min乙腈浓度由0匀速升至45%);洗脱速度0.8mL/min;紫外检测波长220nm),根据对羟基自由基的清除活性得1个高抗氧化活性多肽(图2)。

[0030] ⑤结构检测:收集羟自由基清除活性最高的多肽DCPE-B,经RP-HPLC检测为单一峰,利用蛋白/多肽序列分析仪测定氨基酸序列为Ile-Ile-Gly-Leu-Val-Pro(IIGLVP),ESI-MS测定分子量为610.77Da。

[0031] 自由基清除实验:将制得的双髻鲨鱼肉抗氧化肽Ile-Ile-Gly-Leu-Val-Pro(IIGLVP)进行自由基清除实验。实验结果表明:Ile-Ile-Gly-Leu-Val-Pro(IIGLVP)对DPPH自由基(EC₅₀ 1.89mg/mL)、羟基自由基(EC₅₀ 0.28mg/mL)和超氧阴离子自由基(EC₅₀ 0.13mg/mL)具有良好的清除作用。

[0032] 抗氧化肽对激活Nrf2/ARE通路的作用:取对数生长期的人胚肾细胞株HEK293细胞接种于60mm皿24小时后,分别加入10μM的酶解液和Ile-Ile-Gly-Leu-Val-Pro(IIGLVP),继续培养4小时。弃去上清,细胞用RIPA缓冲液(上海碧云天生物技术有限公司)裂解,BCA法测定蛋白浓度。每个样品取20μg蛋白经SDS-PAGE分离,然后按常规免疫印迹方法检测Nrf2的蛋白水平。结果表明Ile-Ile-Gly-Leu-Val-Pro(IIGLVP)可促进Nrf2蛋白质积累(图3),激活Nrf2-ARE通路,进而上调抗氧化酶和II相解毒酶清除有害物,保护机体免受毒物的损伤。因此,Ile-Ile-Gly-Leu-Val-Pro(IIGLVP)可用作治疗肝损伤、皮肤光老化、动脉硬化、中风、糖尿病和肥胖等与Nrf2-ARE通路密切相关疾病的治疗药物或功能产品。

[0033] 最后,还需要注意的是,以上列举的仅是本发明的一个具体实施例。显然,本发明不限于以上实施例,还可以有许多变形。本领域的普通技术人员能从本发明公开的内容直接导出或联想到的所有变形,均应认为是本发明的保护范围。

[0001] SEQUENCE LISTING
[0002] <110> 浙江海洋学院
[0003] <120> 一种激活Nrf2-ARE通路的双髻鲨鱼肉抗氧化肽
[0004] <130> zjou-wb-201512-101
[0005] <160> 1
[0006] <170> PatentIn version 3.5
[0007] <210> 1
[0008] <211> 6
[0009] <212> PRT
[0010] <213> 人工序列
[0011] <400> 1
[0012] Ile Ile Gly Leu Val Pro
[0013] 1 5

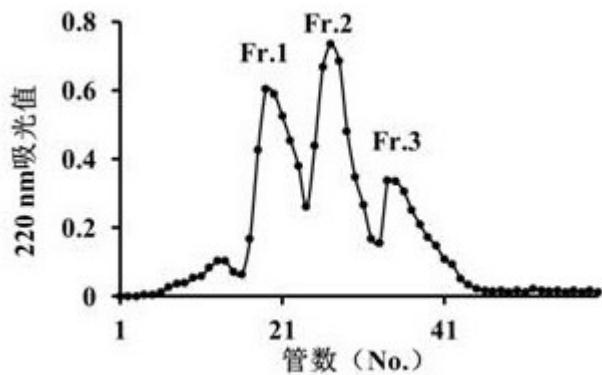


图 1

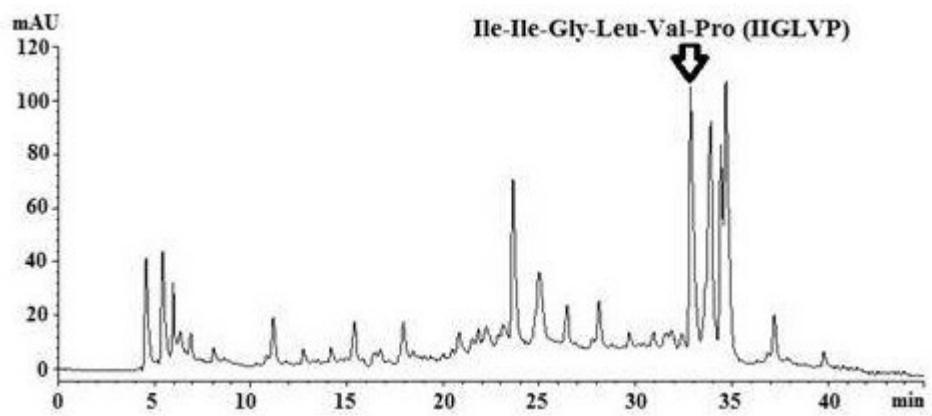


图 2

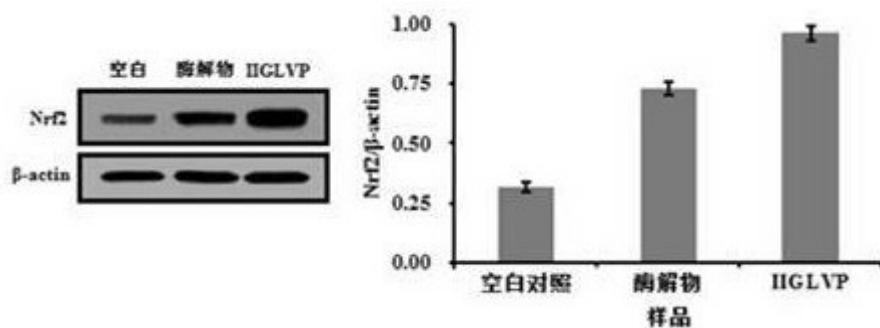


图 3