



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108752421 B

(45) 授权公告日 2022. 01. 18

(21) 申请号 201810511560.1

A23L 33/18 (2016.01)

(22) 申请日 2018.05.24

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

US 2010056458 A1, 2010.03.04

申请公布号 CN 108752421 A

CN 101481412 A, 2009.07.15

CN 106727626 A, 2017.05.31

(43) 申请公布日 2018.11.06

(73) 专利权人 华南理工大学

尚帅明. 河蚬多肽分离纯化、结构鉴定及其对乙醇诱导 L02 细胞损伤的保护机制研究.《中国优秀硕士学位论文全文数据库工程科技I辑》.2019,

地址 511458 广东省广州市南沙区环市大道南路25号华工大广州产研院

(72) 发明人 任娇艳 龚聪聪 尚帅明

Jiaoyan Ren等. Hepatoprotective peptides purified from Corbicula fluminea and its effect against ethanol-induced L02 cells injury.《International Journal of Food Science and Technology》.2020,

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102

代理人 何淑珍 江裕强

任娇艳等. 河蚬酶解物对乙醇诱导肝细胞 L02 损伤的保护作用.《华南理工大学学报》.2017, 第45卷(第12期),

(51) Int. Cl.

C07K 5/103 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 15/81 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

A61K 38/07 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

审查员 梁艳莉

权利要求书1页 说明书5页

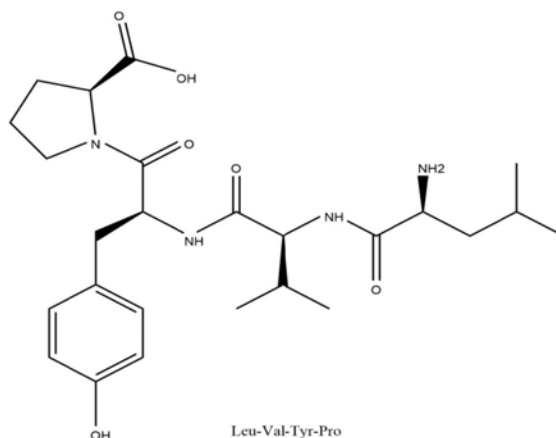
序列表1页 附图4页

(54) 发明名称

一种合成多肽及其合成方法与应用与编码该合成多肽的基因

(57) 摘要

本发明公开了一种合成多肽及其合成方法与应用与编码该合成多肽的基因。多肽的氨基酸序列为:Leu-Val-Tyr-Pro, 如序列表SEQ ID No: 1所示。本发明的多肽使用多肽合成仪, 采用固相合成法合成。本发明的多肽通过氧自由基吸收能力实验 (ORAC), 结果表明其具有一定抗氧化能力。将此多肽应用于乙醇诱导的肝损伤细胞模型, MTT检测法检验其对L02细胞的保护作用, 结果表明其可以抑制乙醇诱导的L02细胞存活率降低, 具有一定的护肝作用, 可应用于保护酒精性肝病方向。



1. 一种合成多肽在制备预防和治疗酒精性肝疾病药物中的应用,其特征在于所述合成多肽的氨基酸序列为: Leu-Val-Tyr-Pro,如序列表 SEQ ID No:1所示,其中,Leu为亮氨酸的氨基酸相应残基,Val为缬氨酸的氨基酸相应残基,Tyr为酪氨酸的氨基酸相应残基,Pro为脯氨酸的氨基酸相应残基。

2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于:该合成多肽具有供氢能力,ORAC活性,同时具有作用于乙醇诱导的L02肝细胞损伤模型的护肝作用。

3. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于:所述合成多肽的制备包括:首先通过树脂的筛选,然后采用标准Fmoc方案,采用2-氯三苯甲基氯树脂进行固相合成;或者通过基因工程技术合成,将编码基因接入到载体中,再将载体转录到原核表达体系大肠杆菌中或真核表达体系酵母中进行表达,然后对目标多肽进行分离纯化得到。

一种合成多肽及其合成方法与应用与编码该合成多肽的基因

技术领域

[0001] 本发明涉及预防和治疗酒精性肝病的技术领域,具体涉及一种对乙醇诱导肝细胞(L02)损伤具有保护作用的合成多肽及其应用与编码该合成多肽的基因。

背景技术

[0002] 酒精性肝病(alcoholic liver disease,ALD)是由于长期大量饮酒所致的慢性肝病。初期通常表现为脂肪肝,进而可发展成酒精性肝炎、酒精性肝纤维化和酒精性肝硬化。本病在欧美国家多见,近年中国的发病率也有上升。据一些地区流行病学调查发现,中国成人的酒精性肝病患病率为4%-6%,故严重影响着人类的身体健康。

[0003] 酒精性肝病发病机制比较复杂,研究发现其与乙醇及其代谢产物乙醛、氧化应激、内毒素、脂质过氧化、细胞凋亡等多种因素有关。肝脏是乙醇在人体内的最重要的代谢器官,研究表明乙醇脱氢酶(ADH),肝微粒体乙醇氧化系统(MEOS)以及过氧化氢酶(CAT)是参与乙醇代谢的三条途径。其中MEOS中核心的酶是细胞色素P4502E1(CYP2E1),该酶会被乙醇诱导而激活,参与大部分乙醇代谢,并产生过量的活性氧(ROS),细胞内累积的ROS会攻击细胞膜和线粒体,造成细胞的结构和功能上的损伤,使得细胞内的氧化还原失衡,从而导致肝细胞损伤或凋亡,进一步继续发展会发生肝细胞的炎症,以及肝脏纤维化,肝细胞坏死等病理变化。遗传因素被认为与酒精性肝病的发生密切相关,但具体的遗传标记尚未确定;性别因素也影响其发病率,同样的酒摄入量女性比男性易患酒精性肝病,与女性体内乙醇脱氢酶(ADH)含量较低有关。因此开发有效的解酒、醒酒药物成为国内外医药学者探讨和研究的重要课题。目前,酒精肝的治疗方法也逐渐增多,如采用秋水仙碱、丙基硫氧嘧啶、降脂药、抗内毒素剂等疗法皆有一定效果,但是这些药物都存在一定的毒副作用。

[0004] 生物活性肽是构成蛋白质的结构和功能片段,是对生物机体的生命活动有益或具有生理作用的肽类化合物。其来源非常广泛,可以来源于各种生物体内,也可以通过人工合成或者生物工程方法获得。一般肽类药物的来源有天然多肽、人工修饰多肽及人工合成多肽。人工合成多肽具有结构明确、易于修饰改良和定性的特点。而且许多的科学研究也证实了合成多肽在治疗一些疾病中有着很好的作用。其不仅具有易消化吸收、食用安全性高、毒副作用极小、加工性能良好等优点,而且还具有降血压、降血脂、改善免疫调节、激素调节等多种生理功能,是获取药物的天然资源宝库,对生物活性肽的研究得到了国内外的广泛关注,许多具有生物活性的多肽在生物制药、疫苗、保健品等领域已经广泛应用于实践中。

发明内容

[0005] 为了克服现有技术的缺点和不足,提高护肝药物的多样性和安全性,本发明的目的在于提供了一种合成多肽及其应用与编码该合成多肽的基因。该合成多肽是一种具有抗氧化活性、且可以降低乙醇对肝细胞(L02)的毒性,提高细胞存活率,该多肽可以作为功能因子应用到药品和保健品的开发。

[0006] 一种合成多肽,其氨基酸序列为:Leu-Val-Tyr-Pro,其中,Leu为亮氨酸的氨基酸

相应残基,Val为缬氨酸的氨基酸相应残基,Tyr为酪氨酸的氨基酸相应残基,Pro为脯氨酸的氨基酸相应残基,如序列表SEQ ID No:1所示。

[0007] 编码所述一种合成多肽的基因,对应基因的序列如序列表SEQ ID No:2所示。

[0008] 本发明提供的一种合成多肽能在制备预防和治疗精性肝疾病的食品、保健品及药物中应用。

[0009] 本发明所述的氨基酸序列多肽的合成,首先通过树脂的筛选,然后采用标准Fmoc方案,选用2-氯三苯甲基氯树脂(2-chlorotrityl chloride resin)进行固相合成;同时也可通过基因工程技术合成,将编码基因接入到载体中,再将载体转录到原核表达体系大肠杆菌中或真核表达体系酵母中进行表达,然后对目标多肽进行分离纯化。

[0010] 进一步的,本发明采用了氧自由基吸收能力实验(ORAC)检测了合成多肽的抗氧化活性,该合成多肽供氢能力强,具有较高ORAC活性,同时作用于乙醇诱导的肝细胞(L02)损伤模型,护肝效果显著。

[0011] 与现有技术相比,本发明具有如下优点和有益效果:

[0012] 本发明的多肽通过氧自由基吸收能力实验(ORAC),结果表明其具有一定抗氧化能力。将此多肽应用于乙醇诱导的肝损伤细胞模型,MTT检测法检验其对L02细胞的保护作用,结果表明其可以抑制乙醇诱导的L02细胞存活率降低,具有一定的护肝作用,可应用于保护酒精性肝病,且多肽是一种无毒性、健康安全的化合物,故在预防和治疗精性肝疾病的食品、保健品及药物的应用中具有十分广泛的前景。

附图说明

[0013] 图1为序列为Leu-Val-Tyr-Pro的多肽分子结构式图。

[0014] 图2为多肽的HPLC图。

[0015] 图3为多肽的ESI-MS图。

[0016] 图4为不同浓度下多肽对L02细胞存活率影响的对比图。

[0017] 图5为不同浓度下多肽对乙醇诱导L02细胞毒性影响的对比图。

[0018] 图6为多肽对乙醇诱导L02细胞线粒体膜电位影响的对比图。

具体实施方式

[0019] 本发明公开了一种多肽及其应用。本领域技术人员可以借鉴本发明内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明。以下就本发明所提供的一种合成多肽及其合成方法和应用做进一步说明。

[0020] 实施例1:多肽固相合成

[0021] 1、树脂选型

[0022] (1) 采用标准苄氧羰基(Fmoc)方案,其选用0.0125mmol,2-氯三苯甲基氯树脂(2-chlorotrityl chloride resin),按照氨基酸序列Leu-Val-Tyr-Pro的序列特征,加入0.3mol第一个Fmoc保护氨基酸,将DCC和5%(质量分数)DMAP加入到反应器振荡反应,用NMP冲洗树脂除去多余保护氨基酸。测定第一个氨基酸与树脂的连接效率即偶合率(如表1所示)。

[0023] (2) 选用0.0125mmol, 4- (羟甲基) 苯氧甲基聚苯乙烯树脂 (Wang树脂), 方法同上, 测定第一个氨基酸与树脂的连接效率即偶合率 (如表1所示)。

[0024] 表1

[0025]

树脂类型	偶合率 (%)
2-chlorotrityl chloride resin树脂	96.23±0.88
Wang树脂	90.89±1.01

[0026] 2、合成过程

[0027] 采用标准Fmoc方案, 选用偶合率较高的2-chlorotrityl chloride resin树脂, 按照氨基酸序列Leu-Val-Tyr-Pro的序列特征, 使肽链从C端逐个向N端延伸, 各氨基酸的用量为0.1mol, 加入0.3molFmoc保护氨基酸, 每步缩合都加入HOBT活化保护氨基酸的羧基, 每步缩合采用20%哌啶DMF溶液 (15ml/g), 处理20min, 去除Fmoc保护基。肽侧链合成后, 将含有树脂的肽链加入到如下反应液中: 二氯甲烷 (99%) 三氟乙酸 (1%) (体积分数), 将肽链从树脂上切割下来。再次将多肽加入到反应液: 三氟乙酸 (94.5%)、酒石酸乙二胺 (2.5%)、蒸馏水 (2%)、TIS (1%) (体积分数) 中反应2h, 脱去侧链保护基。所合成的多肽经高效液相色谱仪纯化, 纯度达到99%以上, 并经ESI-MS鉴定结构 (如图2和图3所示), 表2为图2中的出峰顺序对应的相关参数。

[0028] 表2

[0029]

出峰顺序	保留时间 (min)	峰面积	面积占比 (%)
1	8.438	69127	0.550561
2	9.207	6409	0.051044
3	9.336	12456748	99.21156
4	9.657	23459	0.186839

[0030] 实施例2: 合成多肽的ORAC值测定

[0031] 反应于75mmol/L磷酸钾缓冲液 (pH=7.4) 环境中进行, 具体实验操作如下: 在96孔板各微孔中分别加入20μL合成多肽、GSH溶液和Trolox标准液 (6.25、12.5、25、50μM), 每个孔加入200μL的FL溶液 (95.68μmol/mL), 于37℃孵育20min, 后用多道移液器迅速在各孔中加入20μL AAPH溶液 (119.4μmol/mL), 将微孔板置于微孔板检测仪中在37℃下激发波长485nm, 发射波长538nm进行连续测定, 每隔2min测定一次各孔荧光强度, 测定90次。ORAC实验需要设定两种对照组, 即没有添加自由基的FL荧光自然衰减对照 (-AAPH) 和没有抗氧化剂存在时的自由基作用对照 (+AAPH)。以Trolox作为标准物, 绘制标准曲线, 并以Trolox当量来表达样品的ORAC值, 如表3所示合成多肽、GSH的ORAC值。

[0032] 表3

[0033]

样品名称	ORAC值 (mol TE/mol)
GSH	0.32±0.06
Leu-Val-Tyr-Pro	2.18±0.28

[0034] 实施例3: 合成多肽作用于乙醇诱导肝细胞损伤模型的护肝应用

[0035] 取处于对数生长期的L02细胞接种于96孔细胞板中, 每孔 5×10^3 个细胞, 置于CO₂培养箱中培养24h后, 实验组加入合成多肽浓度分别为0.25、0.5、0.75、1、1.25mmol/L的培养

液,空白对照组加等量的培养液,每组设3个平行,放回培养箱继续培养24h。每孔加20 μ LMTT溶液(5mg/mL),于培养箱孵育4h,弃上清,每孔加入150 μ L DMSO,在490nm波长下测各孔的吸光值OD。计算不同乙醇浓度处理后各组细胞的存活率,如图4所示为多肽对乙醇诱导L02细胞毒性的影响,采用单因素ANOVA来检验合成肽与不含肽对照组统计学差异以及多肽不同剂量之间的统计学差异;其中,**表示 $P<0.01$,#表示 $P<0.05$ 。

$$[0036] \quad \text{细胞存活率(\%)} = \frac{\text{实验组OD} - \text{调零组OD}}{\text{空白组OD} - \text{调零组OD}} \times 100\%$$

[0037] 实施例3:合成多肽作用于乙醇诱导肝细胞损伤模型的护肝应用

[0038] 将处于对数生长期的L02细胞浓度调整为 5×10^3 个/mL后接种于96孔板,每孔100 μ L,置于细胞培养箱中铺板24h后,使其重新贴壁。实验组加入浓度为0.5mmol/L的合成多肽培养液预孵育24h,模型组加入等量的培养液,孵育24h,弃上清,实验组加入同时含有0.5mmol/L的合成多肽和0.8mol/L乙醇的培养液,模型组加入0.8mol/L乙醇的培养液,继续培养24h,空白对照组始终用培养液培养。每孔加20 μ L MTT溶液(5mg/mL),于培养箱孵育4h,弃上清,每孔加入150 μ L DMSO,在490nm波长下测各孔的吸光值OD。计算各组细胞的存活率,如图5所示。

[0039] 实施例4:合成多肽作用于乙醇诱导肝细胞损伤模型的护肝应用

[0040] 将处于对数生长期的L02细胞浓度调整为 5×10^3 个/mL后接种于96孔板,每孔100 μ L,置于细胞培养箱中铺板24h后,使其重新贴壁。实验组加入浓度为1mmol/L的合成多肽培养液预孵育24h,模型组加入等量的培养液,孵育24h,弃上清,实验组加入同时含有1mmol/L的合成多肽和0.8mol/L乙醇的培养液,模型组加入0.8mol/L乙醇的培养液,继续培养24h,空白对照组始终用培养液培养。每孔加20 μ L MTT溶液(5mg/mL),于培养箱孵育4h,弃上清,每孔加入150 μ L DMSO,在490nm波长下测各孔的吸光值OD,计算各组细胞的存活率,如图5所示。

[0041] 实施例6:线粒体膜电位检测评价多肽对乙醇致L02细胞的保护作用

[0042] JC-1是一种线粒体荧光探针,能够依赖电势能在线粒体基质聚合。在功能正常的线粒体中,线粒体跨膜电位较高,JC-1在电势能的作用下形成聚合物,发出橙红色荧光。当线粒体功能紊乱时,线粒体膜电位会下降甚至丧失,JC-1在线粒体基质中无法聚集,只能以单体形式分散于细胞中,呈现绿色荧光。可根据JC-1染色后的细胞荧光颜色变化来检测线粒体膜电位的变化。取处于对数生长期的L02细胞接种于12孔细胞板中,每孔 5×10^4 个细胞,置于CO₂培养箱中培养24h后,实验组1mmol/L的合成多肽预孵育24h,模型组加入等量的培养液,孵育24h,弃上清,实验组加入同时含有1mmol/L合成多肽和0.8mol/L乙醇的培养液,模型组加入0.8mol/L乙醇的培养液,继续培养24h,空白对照组始终用培养液培养。之后用胰酶消化并收集各孔细胞离心,加0.5ml JC-1染色工作液染色半小时,用PBS溶液洗2次,待测。检测JC-1单体时可以把激发光设置为490nm,发射光设置为530nm;检测JC-1聚合物时,可以把激发光设置为525nm,发射光设置为590nm,检测结果如图6所示。

[0043] 合成多肽的低剂量组(0.5mM)和高剂量组(1mM)对细胞模型进行干预后,与模型组相比,L02细胞的细胞存活率显著提高($P<0.01$),而且高剂量组的效果较低剂量组更为显著($P<0.05$),呈一定浓度依赖性。线粒体膜电位实验结果显示,乙醇组仅有36.5%细胞的线粒体跨膜电位较高,能使得JC-1形成聚合物,发出橙红色荧光,而经过合成多肽预孵育后,

72%的细胞可形成JC-1聚合物,发出橙红色荧光,表明合成多肽可保护乙醇诱导L02细胞所导致的线粒体膜电位下降,减缓由于乙醇造成线粒体功能紊乱影响。上述结果表明,本发明专利中的合成多肽可以抑制乙醇诱导的L02细胞存活率降低,具有一定的护肝作用,可应用于保护酒精性肝病方向。

[0001] 序列表
[0002] <110> 华南理工大学
[0003] <120> 一种合成多肽及其合成方法与应用与编码该合成多肽的基因
[0004] <140> 2018105115601
[0005] <141> 2018-05-24
[0006] <160> 2
[0007] <170> SIP0SequenceListing 1.0
[0008] <210> 1
[0009] <211> 4
[0010] <212> PRT
[0011] <213> 人工合成(人工序列)
[0012] <400> 1
[0013] Leu Val Tyr Pro
[0014] 1
[0015] <210> 2
[0016] <211> 12
[0017] <212> DNA
[0018] <213> 人工合成(人工序列)
[0019] <400> 2
[0020] ttagtatatc ca 12

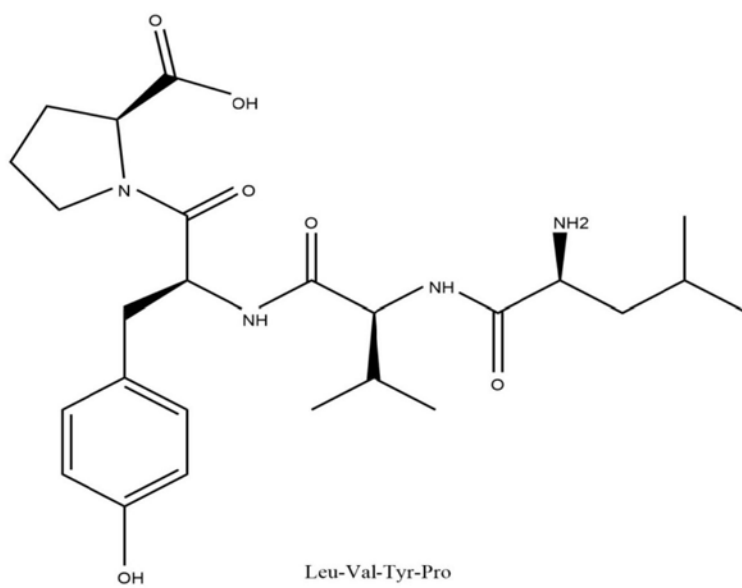


图1

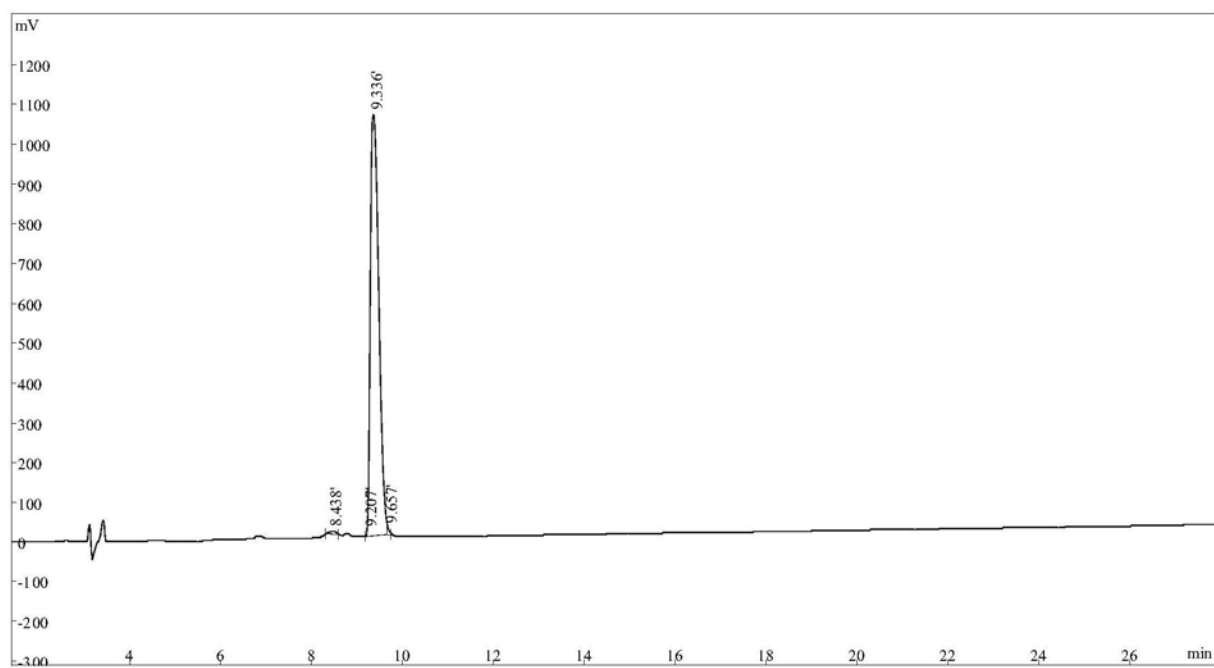


图2

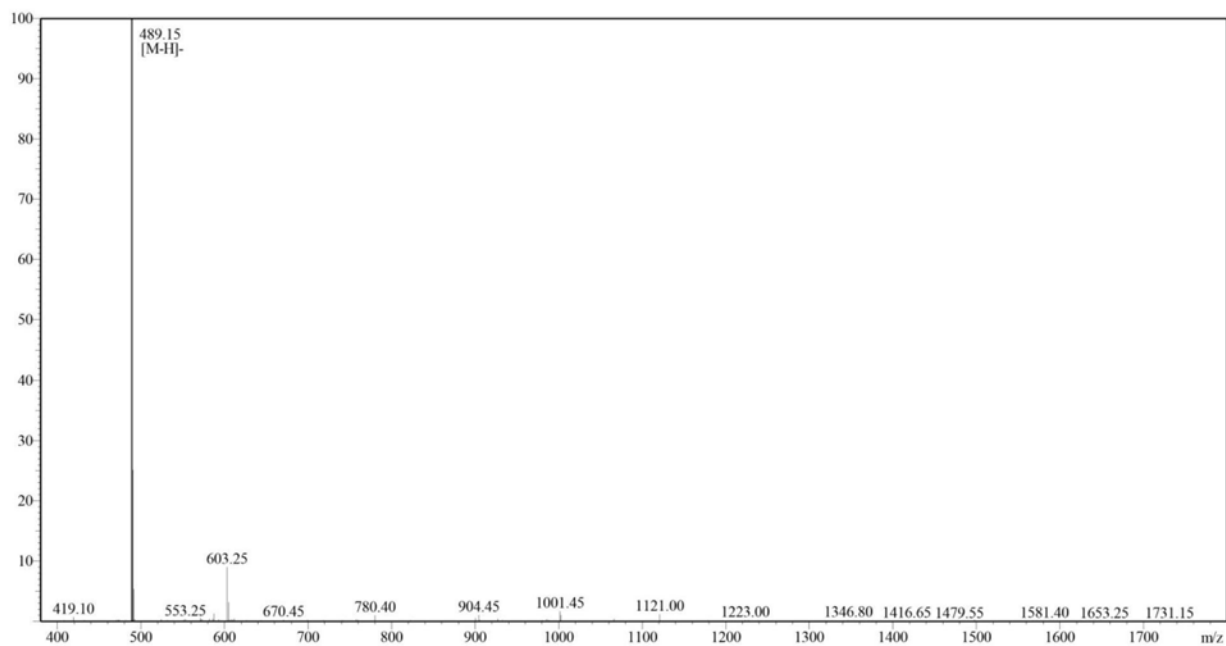


图3

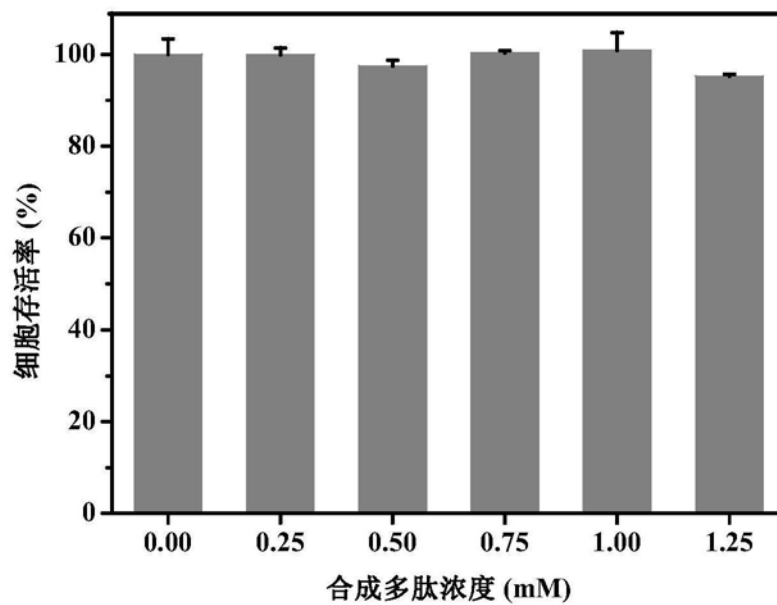


图4

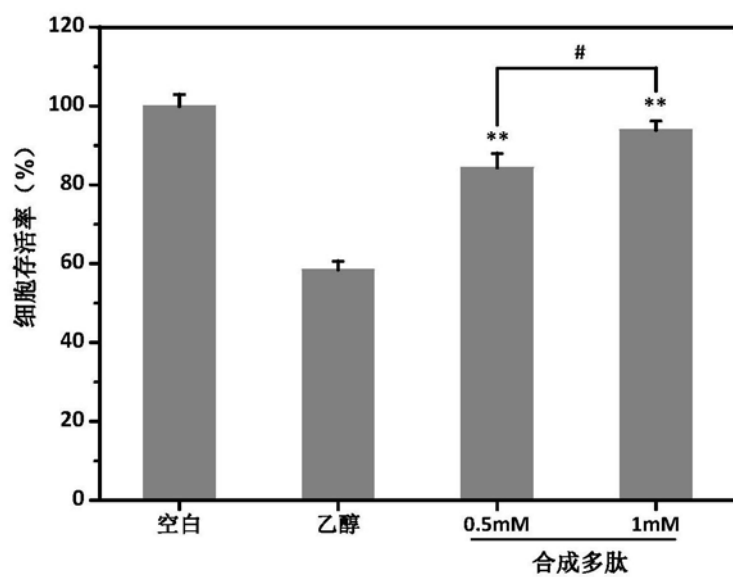


图5

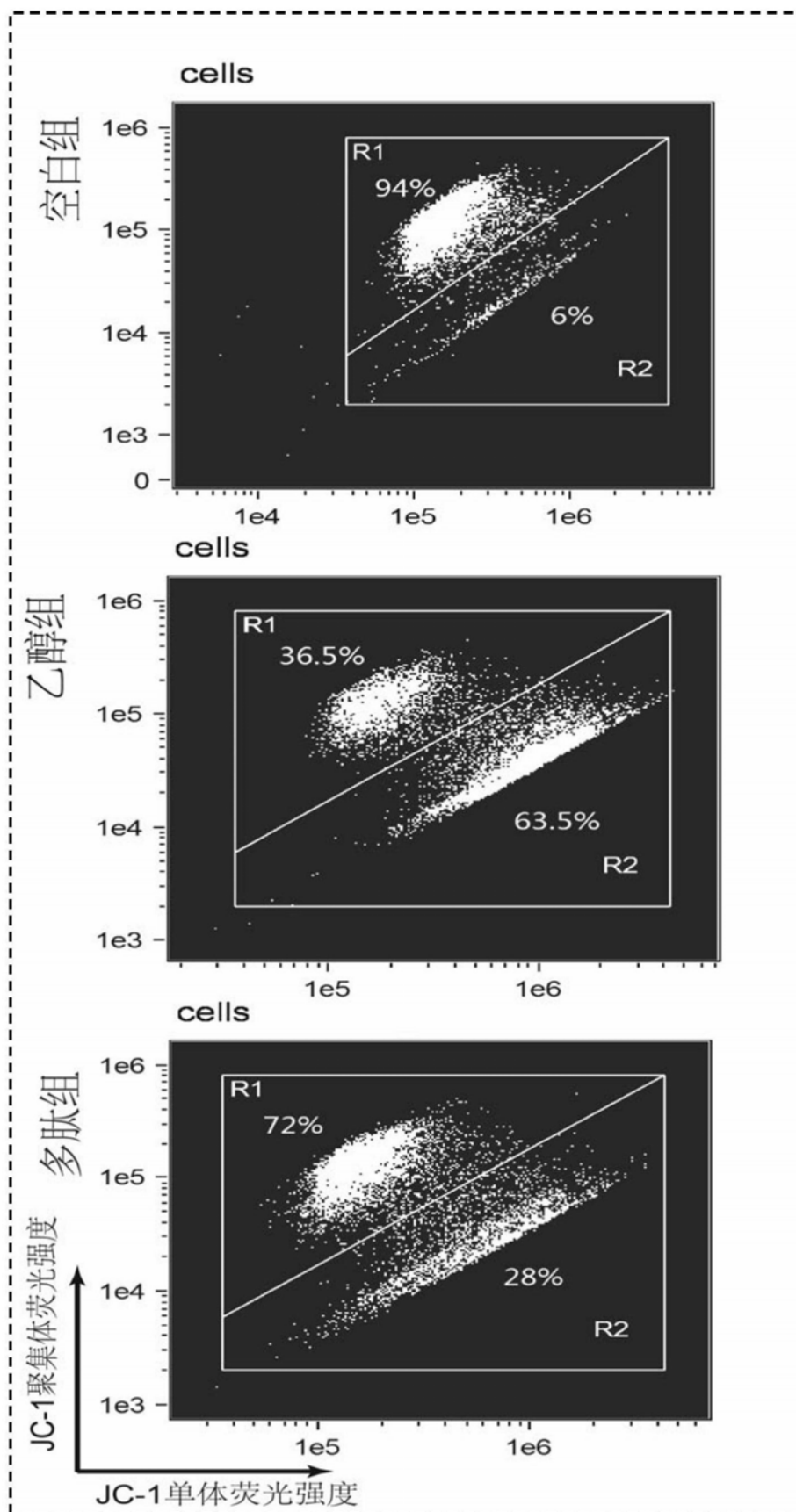


图6