

响应面法优化龟甲蛋白提取工艺 及其对 MC3T3-E1 细胞增殖活性

李晶峰, 郅 慧, 杨小倩, 高 旭, 张 辉*, 孙佳明*

(长春中医药大学, 吉林长春 130117)

摘 要:目的:优化龟甲蛋白提取工艺,筛选龟甲促成骨细胞(MC3T3-E1)增殖活性组分。方法:以蛋白含量及对 MC3T3-E1 细胞增殖率为指标筛选龟甲蛋白提取方法;以料液比、提取温度、时间为自变量,龟甲蛋白含量为因变量,进行单因素提取研究,结合响应面试验设计,获得提取龟甲蛋白最佳工艺;通过超滤技术将龟甲蛋白按分子量分为 5 个不同组分:总提组分(组分 1), $M_w > 10$ kDa 组分(组分 2), $M_w: 3 \sim 10$ kDa 组分(组分 3), $M_w: 1 \sim 3$ kDa 组分(组分 4), $M_w < 1$ kDa 组分(组分 5),CCK8 法测定不同浓度龟甲蛋白(12.5、25、50、100、200 $\mu\text{g/mL}$)及其不同组分对 MC3T3-E1 细胞增殖率的影响。结果:磁力搅拌方法得到的龟甲蛋白含量最高,且活性最佳,龟甲蛋白最佳提取条件为料液比 1:13 (g/mL)、提取温度 30 $^{\circ}\text{C}$ 、提取 3 h,此条件下测得龟甲蛋白含量为 15.16%;龟甲蛋白不同组分均能促进 MC3T3-E1 前成骨样细胞增殖,并呈浓度依赖性,在浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 时,组分 1~5 对细胞的增殖率分别为 20.58%、25.30%、30.24%、37.89%、38.15%,分子量小于 1 kDa 的组分促 MC3T3-E1 细胞增殖活性最佳。结论:本研究为龟甲蛋白的制备工艺提供参考,并证明龟甲蛋白及其不同组分均具有较好的促成骨细胞增殖活性,其中分子量小于 1 kDa 组分对 MC3T3-E1 细胞增殖的效果最佳。

关键词:龟甲蛋白,响应面优化,成骨细胞,活性组分

Optimization of Extraction Process from Tortoise Shell Protein by Response Surface Methodology and Its Proliferation Activity on MC3T3-E1 Cells

LI Jingfeng, ZHI Hui, YANG Xiaoqian, GAO Xu, ZHANG Hui*, SUN Jiaming*

(Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

Abstract: Objective: To optimize the extraction process of tortoise shell protein, screen the active constituent of tortoise shell, and explore the effect of tortoise shell on the proliferation of osteoblasts (MC3T3-E1). Methods: The contents of protein and the proliferation rate of MC3T3-E1 cells were used as the index to screen the extraction method of tortoise shell protein. The ratio of material to liquid, extraction temperature and time were used as independent variables, and the contents of tortoise shell protein was used as dependent variable to carry out single factor extraction research. According to the design of response surface test, the best extraction technology of tortoise shell protein was obtained. By ultrafiltration technology, the tortoise shell protein was divided into different constituent: Total extract (Component 1), $M_w > 10$ kDa (Component 2), $M_w: 3 \sim 10$ kDa (Component 3), $M_w: 1 \sim 3$ kDa (Component 4), $M_w < 1$ kDa (Component 5). CCK8 method was used to determine the effect of different concentrations (12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$) of tortoise shell protein and its different constituent on the proliferation rate of MC3T3-E1 cells. Results: The contents of tortoise shell protein peptide obtained by magnetic stirring method was the highest, and the osteogenic activity was the best. The best extraction condition of tortoise shell protein was at 30 $^{\circ}\text{C}$ and the ratio of material to liquid was 1:13 (g/mL) for 3 hours, under this condition, the contents of tortoise shell protein peptide was 15.16%. At the concentration of 200 $\mu\text{g/mL}$, the proliferation rate of fraction 1~5 to MC3T3-E1 cells was 20.58%, 25.30%, 30.24%, 37.89% and 38.15%, respectively. Among them, fraction < 1 kDa had the best proliferation activity. Conclusion: This study would provide a reference for the preparation of tortoise shell protein, and prove that tortoise shell protein and its different components have better proliferation promoting activity in MC3T3-E1 cells, in which the molecular weight less than 1 kDa had the best effect on MC3T3-E1 cells proliferation.

收稿日期:2020-03-23

作者简介:李晶峰(1989-),女,博士,研究方向:中药化学,E-mail:lijingfeng8161@163.com。

*通信作者:张辉(1958-),男,本科,教授,研究方向:中药化学,E-mail:zhanghui_8080@163.com。

孙佳明(1976-),男,博士,研究员,研究方向:中药化学,E-mail:sun_jiaming2000@163.com。

基金项目:国家中医药行业专项(201507002)。

Key words: tortoise shell protein peptide; response surface optimization; osteoblasts; active constituent

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2021)02-0302-08

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2020030281

引文格式: 李晶峰, 邓慧, 杨小倩, 等. 响应面法优化龟甲蛋白提取工艺及其对 MC3T3-E1 细胞增殖活性研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(2): 302-309.

LI Jingfeng, ZHI Hui, YANG Xiaoqian, et al. Optimization Extraction of Protein Peptide from Tortoise Shell by Response Surface Methodology and Its Proliferation Activity on MC3T3-E1 Cells[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(2): 302-309. (in Chinese with English abstract) <http://www.spagyk.com>

龟甲是中医临床常用的抗骨质疏松药物, 具有滋养肾阴之功效, 可生髓益肾强骨, 固经止血, 补心安神, 其主要含有蛋白、氨基酸等成分。醋龟甲散剂可显著提高骨质疏松小鼠股骨的钙、磷含量, 灰质量, 灰质量/去脂干质量^[1]; 龟板可显著提高激素性骨质疏松小鼠的骨密度、骨小梁厚度、骨矿物质含量、骨表面积等^[2], 龟甲胶可促进软骨细胞增殖, 抑制其凋亡^[3], 并可促进骨髓间充质干细胞增殖并分化为成骨细胞^[4-5]。成骨细胞活性失衡导致的骨量减少可导致骨质疏松^[6], MC3T3-E1 细胞系是从新生的 C57BL/6 小鼠颅顶骨中分离培养的成骨细胞系, 其具有碱性磷酸酶活性、胶原合成及基质矿化等成骨细胞的生物学特性, 并能够表达一定水平的成骨分化相关基因和蛋白。该细胞系是体外研究成骨细胞分化的良好模型, 也是研究药物对成骨细胞活性影响的理想细胞模型^[7-8]。

闪式提取(Flash extraction, FE)技术可以使药材细胞组织在高速的剪切作用下快速破碎^[9-10], 利于蛋白的溶出, 能有效保留提取物活性成分^[11]; 超声提取(Ultrasound extraction, UE)技术对于天然物质的提取速度快^[12], 蛋白的溶出效率提高, 已广泛应用于动植物源蛋白质和多肽的提取^[13-14]; 磁力搅拌提取(Magnetic stirring extraction, MSE)不产生高温, 且操作以及设备的要求较简单, 是值得推广的辅助提取方式^[15]。超滤技术在医药领域应用广泛^[16], 可用于蛋白质的脱醇、脱盐、浓缩与分级分离^[17-18]。超滤是利用膜两侧压力动力, 机械筛分的分离过程^[19-20], 操作简便, 成本低^[21], 生物大分子不会因温度、pH 改变被破坏^[22]。待超滤样品溶液在蠕动泵的压力下流入超滤器中, 分子量小于膜孔的成分成为透过液, 大于膜孔的成分被截留^[23], 达到将样品溶液按分子量分离的目的。

动物类中药含有的主要成分是蛋白质、肽类物质, 且其具有较好的活性^[24-25], 因此蛋白成分的提取方法逐渐被重视, 吴庆等^[26]通过研究不同提取方法对地龙蛋白的比较, 确定了地龙蛋白的最佳提取方法, 公维洁等^[27]应用响应面法优化了马面鱼皮胶原蛋白的超声辅助提取工艺, 樊晓盼等^[28]应用响应面法研究热压浸提牛骨蛋白提取工艺, 但目前关于龟甲蛋白质的提取工艺鲜见报道。

本实验以对 MC3T3-E1 细胞的增殖作用为指标筛选龟甲中蛋白类物质提取方法, 并采用响应面法(Box-Behnken Design, BBD)对龟甲蛋白提取方法进行优化, 进一步将龟甲蛋白提取物经过超滤技术, 选用 1、3、10 kDa 超滤膜按分子质量分为不同组分, 筛

选龟甲促进成骨细胞增殖的活性组分。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

龟甲(Tortoise shell, TS) 吉林省长春市百草大药房; 小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心; 考马斯亮蓝 北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; 牛血清白蛋白 上海源叶生物科技有限公司; a-MEMHyClone、新生胎牛血清 美国 Gibco 公司; Cell Counting Kit-8CCK8 北京博奥森; 其他试剂 均为分析纯。

CKX41 倒置显微镜 日本奥林巴斯公司; BT125D 十万分之一电子天平 德国 Sartorius; JHBE-50S 闪式提取器 西安太康生物科技有限公司; KS-250DE 超声波清洗器 洁力美超声仪器有限公司; DF101-S 磁力加热搅拌器 金坛市水北康辉实验仪器厂; Alpha 1-2 LDplus 冷冻干燥机 德国 Christ; SPEPORD® 200 紫外可见分光光度计 德国耶拿分析仪器股份公司; MASTERFLEX® L/P® 超滤系统, 1、3、10 kDa 超滤膜包 Millipore。

1.2 实验方法

1.2.1 龟甲前处理 将 TS 砸成小块后粉碎过 3 号筛, 置于密封袋内保存。

1.2.2 龟甲中蛋白类物质提取方法的筛选 探讨提取方法对龟甲中蛋白类物质的蛋白含量及其成骨活性的影响。

1.2.2.1 超声提取 准确称取 1.2.1 中龟甲粉末置于锥形瓶内, 按 1:10 倍量加入蒸馏水, 在 20℃ 下超声 2 h, 提取液于 3600 r/min 离心 20 min, 取上清液过滤, 冻干, 得到龟甲蛋白冻干粉(UEP)。

1.2.2.2 闪式提取 准确称取 1.2.1 中龟甲粉末置于锥形瓶内, 按 1:10 倍量加入蒸馏水, 在 20℃ 条件下采用闪式提取器提取 2 min, 提取液于 3600 r/min 离心 20 min, 取上清液过滤, 冻干, 得到龟甲蛋白冻干粉(FEP)。

1.2.2.3 磁力搅拌提取 准确称取 1.2.1 中龟甲粉末置于圆底烧瓶内, 按 1:10 倍量加入蒸馏水, 在 20℃ 条件下置恒温水浴磁力搅拌下提取 2 h, 提取液于 3600 r/min 离心 20 min, 取上清液过滤, 冻干, 得到龟甲蛋白冻干粉(MSEP)。

1.2.3 龟甲蛋白含量测定

1.2.3.1 标准曲线的测定 考马斯亮蓝溶液的配制: 准确称取 100 mg 考马斯亮蓝(G-250)溶于 50 mL 95% 乙醇溶液中, 加入 100 mL 85% 磷酸溶液混合摇匀, 用蒸馏水补充至 1000 mL, 混匀, 过滤, 备用。分

别精密量取牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)标准溶液(0.1 mg/mL) 0、100、200、300、400、500 μ L置于试管中,用蒸馏水补足至1 mL,加入5 mL考马斯亮蓝溶液,混匀,室温静置5 min。以加入0 μ L牛血清白蛋白标准溶液管为参比,于测定595 nm处吸光度A值。标准蛋白质量浓度(μ g/mL)作为横坐标(x),将 $A_{595\text{ nm}}$ 作为纵坐标(y),绘制标准曲线。

1.2.3.2 样品溶液蛋白含量的测定 分别称取龟甲蛋白冻干粉UEP、FEP、MSEP,配制质量浓度为1 mg/mL样品溶液,1 mL样品溶液加入5 mL考马斯亮蓝溶液,混匀,室温反应5 min,测定595 nm处A值,根据1.2.3.1得到的标准曲线计算样品中蛋白含量,计算公式如下。

$$\text{蛋白含量}(\%) = \frac{c \times D \times V}{W_{\text{样}}} \times 100$$

式中:c为供试品(样液)溶液中的蛋白质浓度(μ g/mL);V为供试品(样液)体积;D为样品溶液的稀释倍数; $W_{\text{样}}$ 为样品质量(μ g)。

1.2.4 对MC3T3-E1细胞增殖率的影响

1.2.4.1 MC3T3-E1细胞的培养 将冻存的MC3T3-E1细胞复苏后,用含10%胎牛血清的 α -MEM培养液于37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 饱和湿度的培养箱内培养,当MC3T3-E1细胞贴壁时,吸去培养液,用PBS洗3次至无漂浮细胞,加入含10%胎牛血清的 α -MEM培养液继续培养。待细胞长至培养瓶80%~90%时,进行传代培养,隔2~3 d传代一次,取对数生长期细胞用于实验。

1.2.4.2 CCK8检测细胞增殖活性 以每孔 5×10^3 个细胞接种于96孔板,培养24 h后加入不同浓度的样品,使各组的终浓度分别为12.5、25、50、100、200 μ g/mL,每组5个复孔,空白对照组(Control)不加药只加含10%胎牛血清的 α -MEM培养液,于37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中,继续培养24 h后,每孔加入10 μ L CCK8试剂,37 $^{\circ}$ C避光孵育2 h,在酶标仪上450 nm检测各组OD值。根据所测得吸光度,计算每组细胞增殖率,计算公式如下。

$$\text{细胞增殖率}(\%) = \frac{(A_{\text{给药组}} - A_{\text{空白对照组}})}{A_{\text{空白对照组}}} \times 100$$

1.2.5 响应面法优化龟甲水溶性蛋白的蛋白含量提取工艺

1.2.5.1 单因素实验 采用磁力搅拌方法,分别考察提取时间、温度、液料比3个因素对龟甲蛋白含量的影响。提取时间,固定温度及液料比:20 $^{\circ}$ C、1:12 (g/mL),时间设定为1、2、3、4、5 h;提取温度,固定提取时间及液料比:3 h、1:12 (g/mL),温度设定为20、25、30、35、40 $^{\circ}$ C;料液比,固定提取温度及时间:20 $^{\circ}$ C、3 h,料液比设定为1:10、1:12、1:14、1:16、1:18 (g/mL)。实验均重复三次,实验结果以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

1.2.5.2 响应面试验设计 以蛋白含量为响应指标,选择提取时间、温度、液料比3个因素为优化对象,进行三因素三水平的响应面试验设计-BBD分析,得到龟甲蛋白提取的适宜工艺参数。实验因素水平如

表1所示,Design-Expert 10.0.4软件进行响应面试验设计分析。

表1 响应面优化试验因素水平设计

Table 1 Factor and level of response surface experiment

水平	因素		
	A 料液比 (g/mL)	B 提取温度 ($^{\circ}$ C)	C 提取时间 (h)
1	1:10	20	2
0	1:12	30	3
1	1:14	40	4

1.2.6 超滤膜分级不同分子量 依次使用截留分子量为10、3和1 kDa的超滤膜包对龟甲蛋白溶液进行超滤分离。分别收集不同相对分子质量范围的天然蛋白溶液,冻干,以对MC3T3-E1细胞的增殖活性影响筛选活性组分。

1.3 数据处理

所有数据均为3次平行试验的平均值,采用SPSS 21.0软件进行数据的显著性分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析和t检验。

2 结果与分析

2.1 牛血清白蛋白标准曲线

标准蛋白质量浓度(μ g/mL)作为横坐标(x),将 $A_{595\text{ nm}}$ 作为纵坐标(y),绘制得到的标准曲线见图1,得线性回归方程: $y = 0.0066x + 0.0016$, $R^2 = 0.9991$,表明在质量浓度为0~50 μ g/mL范围内时,BSA标准溶液的质量浓度与吸光度线性关系良好。

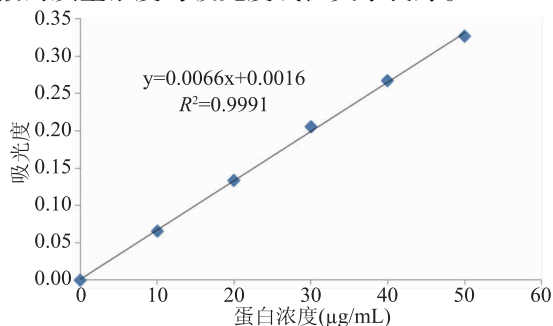


图1 牛血清白蛋白标准曲线

Fig.1 Standard curve of BSA

2.2 不同提取方法对TS蛋白提取的影响

2.2.1 不同提取方法对TS蛋白含量的影响 UE、FE、MSE 3种方法提取的TS蛋白含量如图2所示,采用不同提取方法得到的龟甲蛋白量的差异性大,其中MSEP的龟甲蛋白含量最大8.86%,就蛋白含量而言,3种提取方法得到的蛋白含量顺序为:MSE > FE > UE。

2.2.2 不同提取方法对TS蛋白活性的影响 由图3可知,经3种方法不同浓度的龟甲蛋白干预后MC3T3-E1细胞的增殖率均较空白对照组升高,且呈浓度依赖性,闪提方法得到的蛋白提取物在质量浓度25~200 μ g/mL范围内与空白对照组间细胞增殖率有显著性差异($P < 0.05$),增殖率为7.39%~11.20%;超声方法得到的蛋白提取物在质量浓度12.5~100 μ g/mL范围内与空白对照组间的细胞增殖

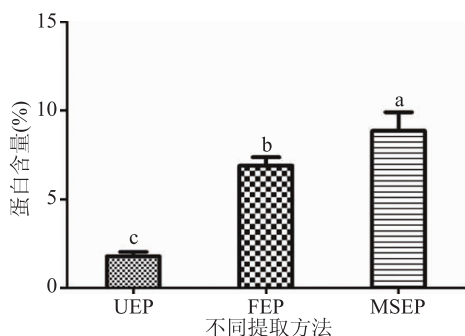


图2 不同提取方法对 TS 蛋白含量的影响

Fig.2 Effect of methods on the extraction content of protein

注:不同方法之间的显著差异

由不同的小写字母表示($P < 0.05$)。

率差异性具有统计学意义($P < 0.05$),且对细胞的增殖率为9.39%~14.26%,质量浓度200 $\mu\text{g/mL}$ 时增殖率极显著升高($P < 0.01$),此时细胞增殖率达至17.74%;与空白对照组相比,磁力搅拌方法得到的蛋白提取物在质量浓度12.5~50 $\mu\text{g/mL}$ 范围内MC3T3-E1细胞增殖率显著升高($P < 0.05$),增殖率分别为11.35%、13.47%、14.04%,质量浓度100、200 $\mu\text{g/mL}$ 时增殖率极显著升高($P < 0.01$),为18.93%、23.46%,在质量浓度100、200 $\mu\text{g/mL}$ 时,磁力搅拌得到的蛋白对MC3T3-E1细胞增殖率显著($P < 0.05$)高于超声,其比超声增加32.75%、32.24%。就蛋白活性而言,3种提取方法得到的蛋白活性顺序为:(质量浓度为200 $\mu\text{g/mL}$)。实验结果证明磁力搅拌方法得到的龟甲蛋白含量最高,活性最好,故进一步对磁力搅拌提取工艺进行优化。

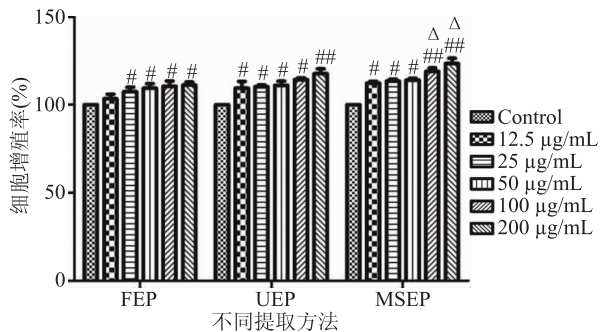


图3 不同提取方法对 TS 蛋白活性的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.3 Effect of methods on the extraction activity of protein($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:#表示与空白对照组相比,数据差异显著, $P < 0.05$,

##表示数据差异极显著, $P < 0.01$;Δ表示与超声相比,

磁力搅拌得到样品数据差异显著, $P < 0.05$ 。

2.3 单因素实验结果

2.3.1 不同提取时间对 TS 蛋白提取的影响 由图4可知,在提取时间1~3 h范围内,随着时间的延长,TS蛋白含量随之增加,推测是由于起初蛋白还未充分溶解于水中,导致溶液中蛋白含量较低^[29],随着提取时间的延长,蛋白质分子更多的亲水基团暴露^[30],使其溶解度增大,从而提高了溶液中的蛋白含量。当提取时间3 h时,蛋白含量达到最高值8.16% ($P <$

0.05);3 h后,TS蛋白含量随着时间的增加而下降,可能提取时间过长,溶液中蛋白质分子间相互作用增强而形成聚集、沉淀,溶解在提取液中的蛋白质含量减少^[31-32],3与4 h无显著差异,为了节约时间,选择反应时间3 h用于响应面试验设计。

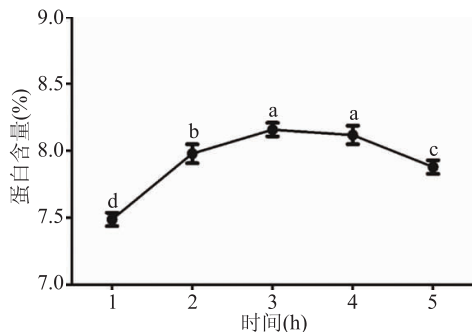


图4 提取时间对蛋白含量的影响

Fig.4 Effect of time on the extraction content of protein

注:不同数据的显著差异由不同的小写字母表示($P < 0.05$);图5~图6同。

2.3.2 不同提取温度对 TS 蛋白提取的影响 由图5可知,随着提取温度的升高,蛋白含量增加,可能是由于温度升高使水溶性蛋白质与水分子相互作用增强,进而蛋白质的溶解度增加、含量升高^[33]。当提取温度为30 $^{\circ}\text{C}$ 时蛋白含量为最高8.49%,发现其蛋白含量显著高于其他样品组($P < 0.05$),温度高于30 $^{\circ}\text{C}$ 时,可能随着提取温度进一步升高,蛋白的结构展开,导致其疏水性增加,引起蛋白交联聚集,溶解度降低^[34]。

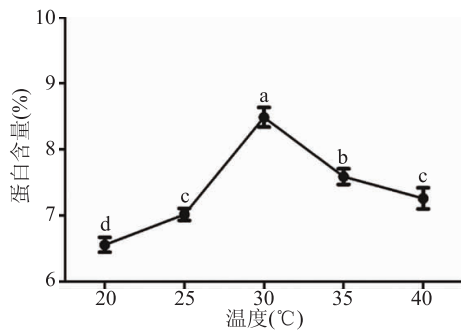


图5 提取温度对蛋白含量的影响

Fig.5 Effect of temperature on the extraction content of protein

2.3.3 不同料液比对 TS 蛋白提取的影响 由图6可知,TS蛋白含量受料液比影响显著。料液比在1:10~1:12 (g/mL)范围内,料液比的增加使溶质体系分布得更加均匀,蛋白的溶出量上升^[35],当料液比为1:12 (g/mL)时蛋白含量达到最大10.65%,相比于其他料液比有显著性差异($P < 0.05$),可溶性蛋白的溶解度达到饱和,当超过1:12 (g/mL)时,蛋白含量随着料液比的增加而下降,由于液料比过大使提取液浓度过低,提取液中蛋白质浓度降低^[36],同时过多的溶剂使样品在溶液中过于分散^[37],不利于蛋白成分的溶出。因此,选择料液比用于1:12 (g/mL)响应面试验设计。

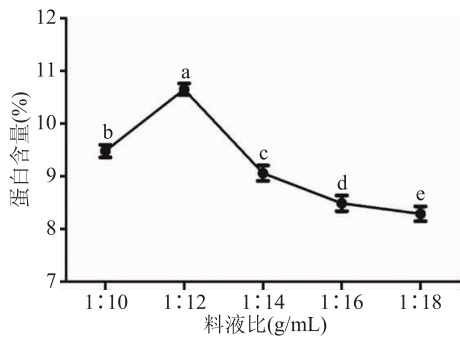


图6 料液比对蛋白含量的影响

Fig.6 Effect of solid-liquid ratio on the extraction content of protein

2.2.1~2.2.3 中在相同条件下:料液比 1: 12, 3 h, 20 ℃, 蛋白含量分别为 7.94%、6.52%、10.65%, 具有一定的实验误差, 可能是由于实验不在同一天进行, 龟甲样品处理后, 未及时测定, 其中的蛋白成分在室温条件下不稳定发生了降解, 故使蛋白含量产生了差异性, 后续实验应避免此类问题。

2.4 响应面试验结果

2.4.1 响应面模型的建立与分析 根据 2.3 单因素实验结果, 通过 Design-Expert 10.0.4 软件, 以 TS 蛋白含量(Y)为指标, 对料液比(A)、提取温度(B)、提取时间(C), 进行 3 因素 3 水平响应面优化试验-BBD, 共 17 个试验点。设计方案及结果如表 2 所示。

运用 Design-Expert 10.0.4 软件对表 2 的数据进行二次多元回归拟合, 以 TS 蛋白含量(Y)为响应值的回归方程: $Y = 15.11 + 1.24A + 0.79B + 0.59C - 0.51AB + 0.65AC - 0.69BC - 2.13A^2 - 3.41B^2 - 4.09C^2$, 方差分析结果见表 3。

从方差分析结果可知, 二次多项式回归模型项极显著($P < 0.001$), 失拟项不显著($P > 0.05$), 表明试验误差小, 试验结果与模型拟合度好。模型的的决定系数 $R^2 = 0.9785$, 校正决定系数 $R^2_{Adj} = 0.9510$, 表

表2 响应面优化试验设计及结果

Table 2 Response surface experiment design and results

实验号	A	B	C	Y(%)
1	1	0	1	11.44
2	1	0	1	11.2
3	-1	0	-1	7.82
4	0	0	0	15.13
5	0	1	-1	8.72
6	0	0	0	15.09
7	1	-1	0	10.85
8	1	0	-1	9.62
9	-1	-1	0	7.51
10	1	1	0	11.2
11	0	-1	1	7.89
12	1	0	-1	7.82
13	-1	0	1	7.91
14	0	0	0	15.11
15	-1	1	0	9.32
16	0	1	1	8.31
17	-1	-1	0	6.44

明实验结果与模型预测结果一致性良好, 二者数值均较高, 证明该模型结果可靠^[38], 可对工艺优化的 TS 蛋白含量进行分析和预测^[39]。通过比较 F 值可知, 各因素的影响大小为 A(料液比) > B(提取温度) > C(提取时间), 一次项、二次项及交互项的方差分析显示, A 对 Y 影响高度显著($P < 0.001$), AC、B、C 对 Y 影响显著($P < 0.05$), A^2 、 B^2 、 C^2 对 Y 影响高度显著($P < 0.001$)。

2.4.2 响应面交互作用分析与优化 利用 Design-Expert 10.0.4 软件做不同因素间响应面分析图及等高线图, 响应面图和等高线图可反映各因素间的相互作用及最佳参数^[40]。

图 7a 坡度陡峭说明料液比与提取温度对蛋白含

表3 回归模型显著性检验及方差分析

Table 3 Significant test and variance analysis for the regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	123.49	9	13.72	35.47	<0.0001	***
A	15.22	1	15.22	39.33	0.0004	***
B	3.83	1	3.83	9.90	0.0162	*
C	2.36	1	2.36	6.10	0.0428	*
AB	1.22	1	1.22	3.15	0.1191	
AC	2.34	1	2.34	6.04	0.0436	*
BC	1.00	1	1.00	2.59	0.1514	
A ²	14.78	1	14.78	38.20	0.0005	***
B ²	39.19	1	39.19	101.29	<0.0001	***
C ²	53.96	1	53.96	139.48	<0.0001	***
残差	2.71	7	0.39			
失拟项	0.49	2	0.24	0.55	0.6099	
纯误差	2.22	5	0.44			
总和	126.20	16				

注: * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$; $R^2 = 0.9785$; 校正决定系数 $R^2_{Adj} = 0.9510$ 。

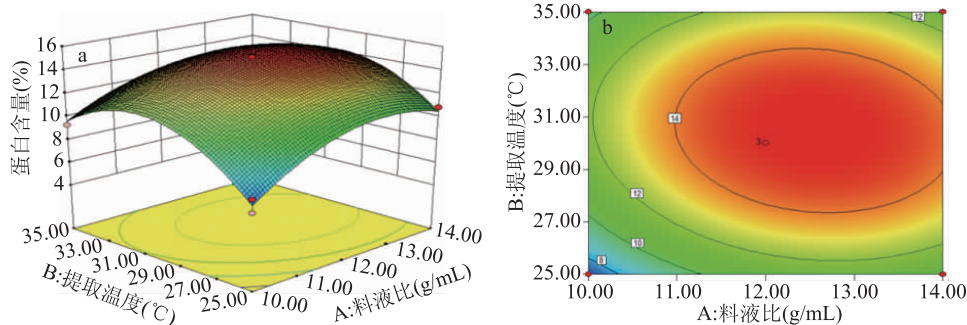


图7 料液比与提取温度交互作用

Fig.7 Interactive effect between solid-liquid ratio and extraction temperature

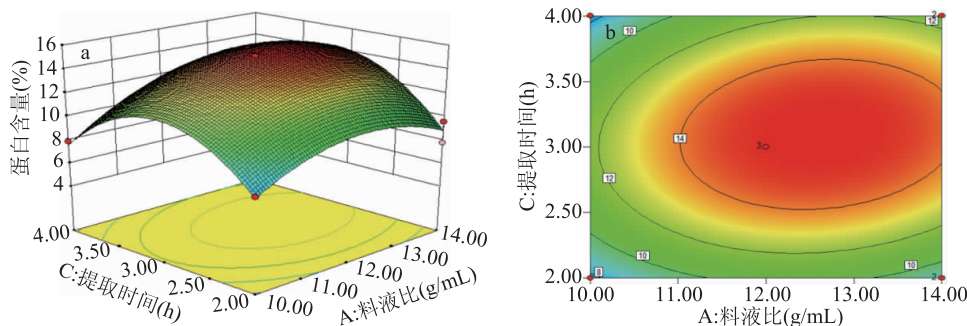


图8 料液比与提取时间交互作用

Fig.8 Interactive effect between solid-liquid ratio and extraction time

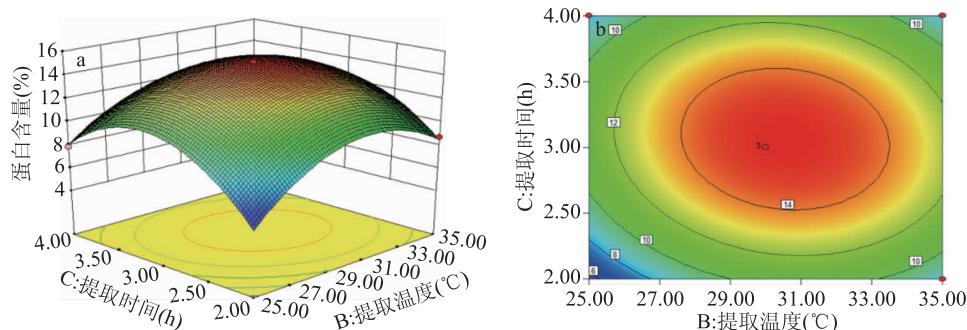


图9 提取温度与提取时间交互作用

Fig.9 Interactive effect between extraction temperature and extraction time

量有显著影响,但二者间交互作用对响应值的影响不显著;由图8a可知,蛋白含量随料液比及提取时间的增加呈现先上升后下降的趋势,二者的陡峭程度说明均对蛋白含量有显著影响,图8b等高线呈椭圆形且曲线较密集,说明料液比与提取时间两因素交互作用对响应值的影响显著,如图9a所示随着提取温度及时间的升高,蛋白含量先升高后降低,图9b等高线较密集但呈近圆形,说明提取温度与提取时间两因素之间交互作用不明显,这与方差分析结果一致。

2.4.3 验证试验 通过软件 Design-Expert 10.0.4 求解方程,计算得到蛋白得率达到最大值时的最优提取工艺条件为:料液比 1:12.88 (g/mL),温度 30.58 °C,时间 3.08 h,蛋白含量预测值 15.35%。结合实际条件,对该条件进行修正:料液比 1:13 (g/mL),提取温度 30 °C,提取时间 3 h。该条件下进行三次重复验证实验,取平均值,得龟甲蛋白含量为 15.16%,与预测值相接近,为龟甲蛋白的提取提供了良好的技术支撑。

2.5 不同分子质量的 TS 对 MC3T3-E1 细胞增殖活性结果

TS 不同组分对 MC3TC-E1 细胞增殖的影响结果见图 10。由图 10 可知,与空白对照组比较,TS 组分 1 在质量浓度为 12.5~100 $\mu\text{g/mL}$ 时细胞增殖率显著升高 ($P < 0.05$),质量浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 时细胞增殖率极显著升高 ($P < 0.01$);与空白对照组比较,组分 2 在质量浓度为 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 时细胞增殖率有显著差异性 ($P < 0.05$),质量浓度为 25~200 $\mu\text{g/mL}$ 时极显著升高 ($P < 0.01$);组分 3 与空白对照组比较在质量浓度为 12.5~50 $\mu\text{g/mL}$ 时细胞增殖率差异具有统计学意义 ($P < 0.01$),质量浓度为 100、200 $\mu\text{g/mL}$ 时高度显著 ($P < 0.001$);与空白对照组比较,组分 4 在质量浓度为 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 时细胞增殖率显著升高 ($P < 0.05$),质量浓度为 25~100 $\mu\text{g/mL}$ 时细胞增殖率极显著升高 ($P < 0.01$),质量浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 时细胞增殖率高度显著 ($P < 0.001$);组分 5 与空白对照组比较,在质量浓度为 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 时细胞增殖率

差异明显($P < 0.05$),对细胞的增殖率为 10.24%,质量浓度为 25~50 $\mu\text{g/mL}$ 时细胞增殖率极显著升高($P < 0.01$),此时的细胞增殖率是 19.65%、30.71%,质量浓度为 100、200 $\mu\text{g/mL}$ 时细胞增殖率差异高度显著($P < 0.001$),增殖率至 35.24%、38.15%,结果表明 TS 不同组分均能促进 MC3T3-E1 前成骨样细胞增殖,并呈剂量依赖效应,结果见图 10。

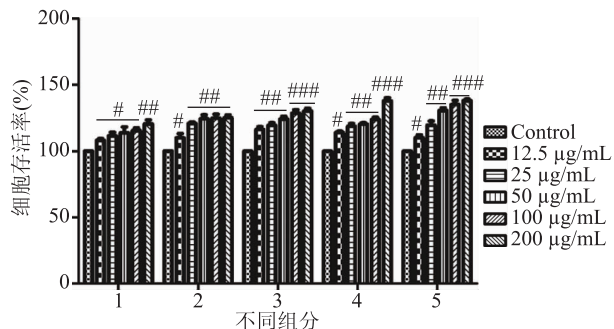


图 10 TS 不同组分对 MC3T3-E1 细胞增殖影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig.10 Effects of different components of TS on the proliferation of MC3T3-E1 cells($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注:通过超滤技术将龟甲提取液分为总提组分(组分 1), $M_w > 10 \text{ kDa}$ (组分 2), $M_w: 3 \sim 10 \text{ kDa}$ (组分 3), $M_w: 1 \sim 3 \text{ kDa}$ (组分 4), $M_w < 1 \text{ kDa}$ (组分 5);#表示与空白对照组相比差异显著, $P < 0.05$,##表示差异极显著;###表示差异高度显著。

实验数据显示,在质量浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 时,TS 不同组分对 MC3T3-E1 增殖程度顺序为:组分 5 > 组分 4 > 组分 3 > 组分 2 > 组分 1,即组分 5($< 1 \text{ kDa}$ 组分)对 MC3T3-E1 细胞增殖效果最佳。

3 讨论与结论

龟甲滋阴补肾,强肾健骨,可促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞方向分化^[41],并对骨质疏松有较好的治疗效果^[42],本文以蛋白含量及对 MC3T3-E1 细胞增殖活性影响为指标筛选龟甲蛋白的提取方法,研究表明磁力搅拌得到的蛋白含量得率高,且促进成骨细胞增殖作用最强,进而以单因素实验的结果为基础,采用响应面分析法对提取条件进行优化,增加龟甲水溶性的蛋白含量,得到最佳提取工艺为:料液比 1:13 (g/mL),提取温度 30 $^{\circ}\text{C}$,提取时间 3 h,在此条件下龟甲蛋白含量为 15.16%,为提高龟甲利用率提供依据。

张玉卓等^[43]探讨了龟甲水提取液对 MC3T3-E1 的增殖活性影响,其中在质量浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 时,细胞增殖率为 13.93%,本实验中相同浓度下的龟甲水提取液对成骨细胞的增殖活性为 20.58%,相较而言增殖率略大,可能是龟甲的提取方法不同,且对细胞增殖活性的检测方法也不同,上述报道研究的龟甲水提取液是对分化成骨细胞的增殖作用,本文探讨的是对未加分化诱导剂 MC3T3-E1 的增殖作用影响。

超滤技术可以将蛋白提取液按不同分子量分离,选择的超滤膜规格越小,得到超滤液分子量越小越稳定,溶液中的蛋白质以稳定的方式存在^[44]。杨

康^[45]将牦牛血超滤分级得到的低于 1 kDa 低聚肽与商品化大豆低聚肽的体外抗氧化能力进行比较,前者优于后者;张建友等^[46]分析得到酱油中分子质量小于 2 ku 的肽段抗氧化能力较强;陈发河等^[47]发现海地瓜小于 1 ku 的肽类成分相较于大分子量的蛋白、肽类成分表现出更强的 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力,青维等^[48]研究不同分子量的大鲵肽抗氧化活性,结果表明小分子量的 0.3~2 ku 的大鲵肽抗氧化活性最高。本文采用膜过滤手段对龟甲蛋白分离为 5 个不同组分:总提组分、 $M_w > 10 \text{ kDa}$ 组分、 $M_w: 3 \sim 10 \text{ kDa}$ 组分、 $M_w: 1 \sim 3 \text{ kDa}$ 组分、 $M_w < 1 \text{ kDa}$ 组分,不同组分在质量浓度为 12.5~200 $\mu\text{g/mL}$ 范围内,对 MC3T3-E1 细胞均有一定的增殖能力,且活性随着浓度的升高而升高,有剂量依赖性,分子量低于 1 kDa 的组分活性最佳,其中主要成分为寡肽,故 $M_w < 1 \text{ kDa}$ 寡肽组分的龟甲促进成骨细胞 MC3T3-E1 增殖活性最佳,这与上述文献的研究结果一致,分子量小的肽类化合物活性优于分子量大的蛋白肽类化合物。

参考文献

- [1] 王新雨,谭晓梅,陈飞龙,等. HPLC-ELSD 法测定醋龟甲中羟脯氨酸[J]. 中草药, 2011, 42(7): 1338-1340.
- [2] 于洋洋,朴勇洙. 鹿角、龟板治疗膝骨关节炎的临床观察[J]. 世界最新医学信息文摘, 2016, 16(A2): 111-112.
- [3] 林嘉辉,陈炳艺,龙美兵,等. 龟甲胶和鹿角胶含药血清对豚鼠骨关节炎软骨细胞 JNK 及 p38 MAPK 基因表达的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2016, 24(10): 1-4.
- [4] 王春燕,曾和平,陈薇. 调控鼠骨髓间质干细胞增殖的中药龟板化学成分 GC-MS 测定[J]. 华南师范大学学报(自然科学版), 2007(1): 89-97.
- [5] 侯秋科. 维生素 D 受体介导龟板诱导的骨髓间充质干细胞向成骨分化[D]. 广州: 广州中医药大学, 2010.
- [6] Kuriya K, Nishio M, Wada S, et al. Antiosteoporotic effects of acer palmatum extract on osteoclastogenesis and osteoblastogenesis[J]. Journal of Medicinal Food, 2019, 22(4): 365-373.
- [7] Wang L, Cheng J, Hua Z, et al. α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH) promotes osteoblast differentiation of MC3T3-E1 cells[J]. European Journal of Pharmacology, 2019, 844: 1-8.
- [8] Cheng J, Wang H, Zhang Z, et al. Stilbene glycoside protects osteoblasts against oxidative damage via Nrf2/HO-1 and NF- κ B signaling pathways[J]. Archives of Medical Science: AMS, 2019, 15(1): 196-203.
- [9] 李雅松,蔺立杰,呼娜,等. 栗叶蛋白闪式提取工艺优化[J]. 食品工业科技, 2013, 34(11): 243-247, 250.
- [10] 冯雪花,陶阿丽,谢伟. 木瓜籽油闪式提取工艺优化及不同产地木瓜籽得油率比较[J]. 中国油脂, 2018, 43(3): 10-12, 16.
- [11] 张雄,肖志勇,黄群,等. 猴头菇多糖和蛋白质闪式联合提取工艺优化及结构鉴定[J]. 食品与机械, 2019, 35(10): 117-121, 83.
- [12] 潘风光,侯力箫,王莹,等. 超声波辅助碱法提取鸡副产物和大豆粕混合蛋白工艺优化[J]. 中国食品学报, 2019, 19(7): 108-118.

- [13] 任海伟, 石菊芬, 蔡亚玲, 等. 响应面法优化超声辅助酶解制备藏系羊胎盘肽工艺及抗氧化能力分析[J]. 食品科学, 2019, 40(24): 265-273.
- [14] 冯结铎, 姜华, 钟先锋, 等. 响应面分析法优化亚麻籽粕水解工艺研究[J]. 中国调味品, 2019, 44(8): 99-104.
- [15] 周景丽. 虾蛄盐溶蛋白性质的研究[D]. 天津: 天津商业大学, 2016.
- [16] 王超, 白卫东, 曾晓房. 超滤技术在各领域的应用与发展[J]. 中国酿造, 2017, 36(9): 15-18.
- [17] Wan Y, Lu J, Cui Z. Separation of lysozyme from chicken egg white using ultrafiltration [J]. Separation and Purification Technology, 2006, 48(2): 133-142.
- [18] 肖兰艳, 何颖, 刘雪婷, 等. 重组大肠杆菌表达的 Bere1 纯化工艺中去除内毒素效果研究[J]. 热带医学杂志, 2015, 15(5): 583-586.
- [19] 焦建聪. 膜分离在低温甲醇洗中的应用探讨[J]. 化学工程与装备, 2019(5): 18-19, 281.
- [20] 汤建萍. 中药荔枝核活性成分的分离制备新工艺及其药效活性研究[D]. 长沙: 中南大学, 2007.
- [21] 李华勇, 胡居吾. 膜分离技术纯化蔓三七叶多糖的研究[J]. 生物化工, 2019, 5(6): 7-11.
- [22] 李贺敏, 彭国平, 郑云枫, 等. 不同材质及不同截留分子量超滤膜对三七总皂苷热原去除及成分的影响[J]. 中药材, 2011, 34(12): 1943-1946.
- [23] 彭菲, 叶正良, 李德坤, 等. 不同材质及不同截留分子量超滤膜对人参皂苷类成分的影响[J]. 中成药, 2013, 35(5): 937-940.
- [24] 陈银芳, 章常华, 魏学鑫, 等. 动物药中蛋白质、氨基酸检测分析研究进展[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(1): 186-189.
- [25] 杨彬, 高文远, 张艳军. 基于转录组学-蛋白质组学-多肽组学整合关联分析策略的动物药蛋白多肽类成分研究思路及方法[J]. 中草药, 2019, 50(5): 1033-1038.
- [26] 吴庆, 曹云娥, 方海田, 等. 鲜地龙可溶性蛋白不同提取方法的比较[J]. 中成药, 2018, 40(8): 1878-1882.
- [27] 公维洁, 卓先勤, 许环浪. 响应面优化超声波辅助提取马面鱼皮胶原蛋白工艺研究[J]. 食品工业, 2018, 39(7): 92-96.
- [28] 樊晓盼, 张伯男, 张甜, 等. 响应面法优化热压浸提牛骨蛋白提取工艺[J]. 天津农学院学报, 2017, 24(2): 58-62.
- [29] 柳芬芳, 李迎秋. 绿豆蛋白提取工艺的响应面法优化[J]. 轻工学报, 2020, 35(2): 7-16.
- [30] Cai W, Gu X, Tang J. Extraction, purification, and characterization of the polysaccharides from *Opuntia milpa alta* [J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 71(3): 403.
- [31] 张晶晶, 李萧, 姚广龙, 等. 响应面法优化腰果蛋白提取工艺[J]. 食品工业科技, 2016, 37(22): 305-308, 314.
- [32] 洪晶, 陈涛涛, 唐梦茹, 等. 响应面法优化韭菜籽蛋白质提取工艺[J]. 中国食品学报, 2013, 13(12): 89-96.
- [33] 王江, 王术荣, 郭富宽, 等. 鳞杯伞可溶性蛋白提取工艺的优化及其营养评价[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(5): 40-46.
- [34] Yuan L, Liu Y A, Ge J, et al. Effects of heat treatment at two temperatures on the myosin cluster of bighead carp for gel formation[J]. CYTA-Journal of Food, 2017, 15(4): 574-581.
- [35] Kim E O, Lee J Y, Choi S W. Quantitative changes in phenolic compounds of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seeds during growth and processing[J]. Preventive Nutrition and Food Science, 2006, 11(4): 311.
- [36] 李永武. 绿豆清蛋白的提取及功能特性和理化性质的研究[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2014.
- [37] 周茜, 韩雪, 韩晓梅, 等. 响应面试验优化乌梅熊果酸提取工艺及其对大肠杆菌的抑制作用[J]. 食品科学, 2016, 37(8): 67-73.
- [38] 张伟, 张琦, 阮馨怡, 等. 响应曲面法优化小麦秸秆纤维素酶水解条件[J]. 生物质化学工程, 2015, 49(2): 39-46.
- [39] 王瑞琪, 陈钢, 阙发秀, 等. 响应面法优化粗糙脉孢菌番茄红素的皂化提取工艺及其抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2020, 41(11): 207-213, 220.
- [40] 程正军. 运用响应曲面法优化有机污染物吸附过程参数及其吸附平衡和动力学研究[D]. 成都: 西南石油大学, 2015.
- [41] 侯秋科. 维生素 D 受体介导电板诱导的骨髓间充质干细胞向成骨分化[D]. 广州: 广州中医药大学, 2010.
- [42] 王新雨, 谭晓梅, 张文新, 等. 醋龟甲不同剂型对血虚或骨质疏松小鼠的防治作用比较[J]. 中国药房, 2017, 28(19): 2661-2665.
- [43] 张玉卓, 尚奇, 沈耿杨, 等. 龟甲水提液调控 NF- κ B 炎症微环境对 MC3T3-E1 成骨分化的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(8): 89-94.
- [44] 梁琼, 张培正, 朱丽梅. 鸡胚酶解液通过不同分级超滤膜理化性质研究[J]. 食品科技, 2011, 36(1): 102-104.
- [45] 杨康. 牦牛血抗氧化低聚肽制备工艺的优化及抗缺氧活性的初探[C]//营养研究与临床实践——第十四届全国营养科学大会暨第十一届亚太临床营养大会、第二届全球华人营养科学家大会, 2019: 444.
- [46] 张建友, 陈志明, 王芳, 等. 大豆酱油分子质量超滤分级及抗氧化活性研究[J]. 中国食品学报, 2019, 19(1): 48-54.
- [47] 陈发河, 李真, 吴光斌. 海地瓜多糖和多肽提取纯化工艺及抗氧化活性[J]. 集美大学学报(自然科学版), 2018, 23(2): 105-118.
- [48] 青维, 孙强, 白鑫华, 等. 超滤对大鲵多肽抗氧化活性的影响[J]. 食品工业科技, 2016, 37(18): 139-142.

(上接第 301 页)

- [26] Song X, Liu Z, Zhang J, et al. Antioxidative and hepatoprotective effects of enzymatic and acidic-hydrolysis of *Pleurotus geesteranus* mycelium polysaccharides on alcoholic liver diseases[J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 201: 75-86.
- [27] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2007, 39(1): 44-84.
- [28] Del Rio D, Stewart A J, Pellegrini N, et al. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress [J]. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases, 2005, 15(4): 316-328.
- [29] Hall M E, Blount J D, Forbes S, et al. Does oxidative stress mediate the trade-off between growth and self-maintenance in structured families? [J]. Functional Ecology, 2010, 24(2): 365-373.