

· 论 著 ·

## 可溶性猪软骨 II 型胶原蛋白的提取与鉴定\*

宁志刚, 王富友, 崔运利, 熊娟, 杨柳<sup>△</sup>

(第三军医大学西南医院关节中心, 重庆 400038)

**摘要:**目的 从猪膝关节软骨中提取纯化 II 型胶原蛋白, 并对其鉴定。方法 选择猪膝关节软骨为提取原料, 用盐酸胍去除蛋白多糖、胃蛋白酶两步消化、氯化钠盐析、超纯水透析、离心浓缩等方法提取纯化 II 型胶原蛋白; 采用 SDS-PAGE、氨基酸成分分析对提取的 II 型胶原蛋白进行鉴定; 利用冻干的方法计算提取的浓度。结果 SDS-PAGE 电泳结果显示提取的 II 型胶原蛋白分子量约 120 kD; 氨基酸成分分析显示甘氨酸、脯氨酸和丙氨酸含量最高, 并且可以检出羟脯氨酸、羟赖氨酸, 符合 II 型胶原特征; 该法提取的 II 型胶原蛋白浓度为 66 mg/mL。结论 从猪关节软骨提取的 II 型胶原蛋白纯度高, 方法简便, 提取的胶原蛋白浓度更高。

**关键词:** II 型胶原蛋白; 软骨; 电泳; 聚丙烯酰胺凝胶

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.10.008

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)10-0954-02

## Isolation and identification of soluble collagen type II from porcine articular cartilage\*

Ning Zhigang, Wang Fuyou, Cui Yunli, Xiong Juan, Yang Liu<sup>△</sup>

(The Center of Joint Surgery, Southwest Hospital, Chongqing 400038, China)

**Abstract: Objective** To isolate and purify collagen type II from porcine articular cartilage and identify its purity. **Methods** The porcine articular cartilage was selected as raw material. Guanidine hydrochloride was chosen to withdraw the proteoglycans. Two-step digestion of pepsin, salting of sodium chloride, dialyzing of ultrapure water, centrifuge enrichment were applied for extracting; The identification was done by SDS-PAGE and amino acid analysis; The concentration of extracted collagen type II was measured by cool-dry. **Results** It was found that the molecular weight of extracted collagen type II was about 120KD by SDS-PAGE; The content of GLY, PRO and ALA were highest by amino acid analysis, and Hypro, Hylys can be detected, which accorded with the characteristics of collagen type II; the concentration of extracted collagen type II was 66mg/ml by cool-dry. **Conclusion** The results suggest that the extracted collagen type II has the high purity and concentration with a more convenient method.

**Key words:** collagen type II; cartilage; electrophoresis, polyacrylamide gel

II 型胶原蛋白(collagen type II, C II)是软骨基质的主要有机成分,是关节软骨的主要结构蛋白。近年有研究表明,类风湿性关节炎的发病与 II 型胶原蛋白自身免疫反应有关<sup>[1-2]</sup>,美国、英国、法国、中国等国家正在进行 II 型胶原蛋白治疗类风湿性关节炎的动物及 II~III 期临床研究<sup>[3-5]</sup>,因此,II 型胶原蛋白的提取纯化与鉴定具有较大价值。国外的 II 型胶原蛋白价格昂贵,国内报道的提取方法条件不一,操作复杂。本研究选择新鲜猪膝关节软骨为原料,用盐酸胍去除蛋白多糖、胃蛋白酶两步消化、氯化钠盐析、超纯水透析、低温高速离心除水等步骤,制备出高纯度及浓度的 II 型胶原蛋白;采用聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)、氨基酸成分分析,对其进行了纯度鉴定;运用低温冻干测定了提取胶原浓度,现报道如下。

## 1 材料与方

**1.1 主要试剂** 胃蛋白酶(Amersco 分装);29~205 kD 蛋白质分子量标志物(上海华舜生物工程有限公司);LB 培养基(Applichem 德国)。

**1.2 主要仪器** 电泳仪(Bio-Rad, 美国),全自动图像分析系统(Gene Genius, 澳大利亚),低温高速离心机(Beckman J-30I, 美国),121MB 型氨基酸分析仪(Beckman, 美国),摇床(NBS, 美国),低温冻干机(Savant, 美国),超纯水净化器(Aquapro, 中国台湾)。

## 1.3 方法

**1.3.1 II 型胶原蛋白的提取与纯化** 从新鲜屠宰的猪双膝关

节收集透明软骨,剥去骨膜,生理盐水洗净沥干后切成薄片,10 倍体积 4 mol/L 盐酸胍(pH 7.5, 0.05 mol/L Tris-HCl 配制)混悬,匀浆机粉碎,80 目筛过滤,于 4℃ 下搅拌 48 h,4℃、12 000 r/min 离心 30 min。沉淀用 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液和 0.5 mol/L 乙酸充分洗涤后,用 5 倍体积的胃蛋白酶消化液(0.5 mol/L 乙酸配成 1 g/L)混悬,4℃ 下搅拌 48 h。同上离心,收集上清液;将沉淀加 5 倍体积的胃蛋白酶消化液,用匀浆机粉碎后,重复酶解一次。用 2 mol/L NaOH 迅速调节上清液至 pH 7.3,加入 NaCl 使其终浓度为 3.0 mol/L,4℃ 盐析 36 h 得到沉淀;低温离心机 4℃、12 000 r/min 离心 30 min,弃上清;用超纯水作透析液,透析袋(DM-16 MWCO;3 500)4℃ 下透析 48 h,超纯水 6 h 换液一次;将透析产物低温离心机 4℃、14 000 r/min 离心 30 min,弃上清;以超纯水清洗沉淀物,4℃、12 000 r/min 离心 30 min,重复清洗、离心 1 次。即得精制胶原。

**1.3.2 SDS-PAGE 电泳检测** 主要条件如下:浓缩胶浓度 3%(pH 6.8),分离胶浓度 7.5%(pH 8.8),电泳电压 100~120 V。电泳结束后,凝胶用考马斯亮蓝染色 3 h,脱色后用数码相机照相和 Gene Genius 全自动图像分析系统进行图像分析。

**1.3.3 氨基酸成分分析** 委托西北农林科技大学生命科学院实验中心检测。将提取的 II 型胶原蛋白冻干后,置水解管中,加入 6 mol/L HCL,封管 110℃ 水解 22 h,中和定容离心后,用

121MB 型氨基酸分析仪专用注射器吸取上清液 50  $\mu$ L 于样品储存螺旋管中, 上机分析。

**1.3.4 液态 II 型胶原蛋白浓度测定** 将提取的胶原蛋白溶于 0.1mol/L HCL 中制得液态胶原蛋白, 冻干后, 根据冻干前、后质量比测定所得液态胶原蛋白浓度。

**1.3.5 摇菌试验** 将制备的液态 II 型胶原蛋白 1 mL 与 8 mL 无菌 LB 培养基混合作实验组, 共 5 管; 单纯 LB 培养基作空白组, 置摇床上固定后, 37  $^{\circ}$ C、250 r, 72 h。

**2 结 果**

**2.1 SDS-PAGE 电泳** 纯化胶原蛋白提取液电泳图谱见图 1; 从图谱中得出 II 型胶原蛋白分子量约为 120 kD, 条带集中, 无杂质。

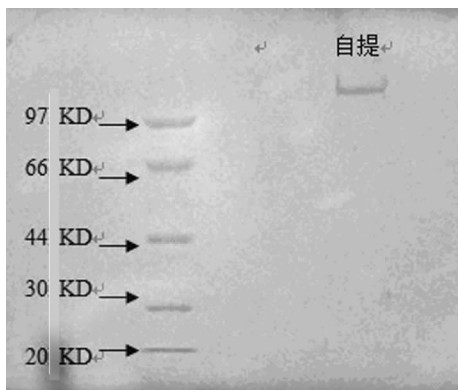


图 1 提取胶原蛋白的 SDS-PAGE 电泳图谱

**2.2 氨基酸成分分析** 将 II 型胶原蛋白酸解后, 氨基酸成分分析见表 1。甘氨酸、脯氨酸和丙氨酸含量最高, 并且可以检出羟脯氨酸、羟赖氨酸, 符合 II 型胶原蛋白特征。

表 1 II 型胶原蛋白氨基酸成分分析

氨基酸名称	所占比例 (g/100 g)	氨基酸名称	所占比例 (g/100 g)	氨基酸名称	所占比例 (g/100 g)
Asp	3.773	Gly	2.530	Ileu	1.054
Thr	1.558	Ala	7.792	Leu	2.136
Ser	1.880	Cyr	0.124	Tyr	0.290
Glu	7.741	Val	1.363	Phe	1.443
Pro	7.011	Met	0.189	Lys	2.149
His	0.391	Arg	5.014	Hypro	3.452
Hylsy	3.111				

**2.3 II 型胶原蛋白浓度测定** 通过比较冻干前、后胶原溶胶质量的变化, 测得 II 型胶原蛋白-HCL 溶液的浓度为 66 mg/mL。

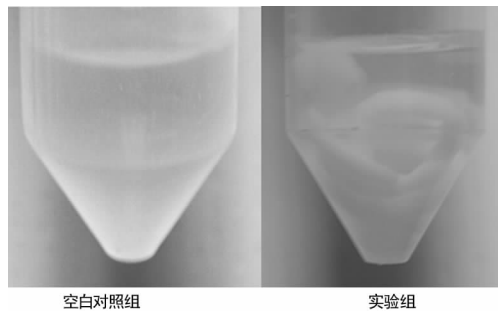


图 2 摇菌实验结果

**2.4 摇菌实验** 单纯 LB 培养基作空白对照组, 66 mg/mL 胶

原蛋白与 LB 培养基混悬作实验组, 置摇床 37  $^{\circ}$ C、250 r, 72 h 后, 均无混浊 (图 2)。

**3 讨 论**

胶原蛋白是许多动物体内含量最丰富的蛋白质<sup>[6]</sup>, 由于其低毒性、低抗原性、低免疫性、引导细胞再生和与人体相容性较好等特点, 已被广泛应用于生物医学材料和临床医疗<sup>[7-8]</sup>。II 型胶原蛋白是软骨的结构蛋白, 对维持透明软骨的结构及促进软骨细胞的迁移和分化具有重要作用。目前, II 型胶原蛋白是从鸡、猪、牛、兔<sup>[9-12]</sup>等动物的透明软骨中提取, 但动物来源不同, 提取方法、浓度及纯度均存在差异。在 II 型胶原蛋白提取过程中, I 型胶原蛋白污染是一大困难, 组织取材要尽可能取出非透明软骨成分。

本研究选用新鲜猪膝关节透明软骨为提取原料, 主要原因: (1) 猪 II 型胶原蛋白与人关节内的 II 型胶原蛋白同源性较高; (2) 选用现屠宰的新鲜猪膝关节, 未经冷冻直接取材, 透明软骨层较厚, 胶原蛋白活力保持好, 可以提高提取蛋白浓度; (3) 选用的肉食猪来源广泛, 适合将来临床产业化生产。

课题组通过改进提取步骤, 提高了胶原蛋白提取产物的浓度: (1) 均在 4  $^{\circ}$ C 下进行操作, 保持胶原蛋白活力, 可以防止胶原蛋白变性, 影响产量。 (2) 延长盐酸胍反应时间, 可以充分的去除软骨中的蛋白多糖, 提高胶原蛋白纯度。 (3) 运用胃蛋白酶两步消化法, 将第 1 步消化时没有跟胃蛋白酶接触的软骨深层进一步匀浆粉碎消化, 可以使软骨中的胶原蛋白与胃蛋白酶充分接触反应, 提高胶原蛋白产量。 (4) 运用超纯水作透析液, 多次换液透析, 彻底去除胶原初提液中的离子。课题组前期试验结果显示, 更换超纯水透析液 6 次, 每次连续透析 4 h 后, 透析液的电导率逐渐降低, 说明胶原初提液中的离子正在析出, 6 次更换以后, 继续换液, 透析液的电导率无变化, 说明胶原初提液的离子已全部析出。 (5) 课题组选用 DM-16 (MWCO: 3 500) 作透析膜, 它可以在充分析出离子的基础上防止胶原蛋白析出, 使提取的胶原蛋白充分去除离子, 更好地模拟关节腔内透明软骨环境。 (6) 将透析产物低温高速离心, 排出多余水分, 提高了胶原蛋白提取浓度。 (7) 课题组考虑到 Cl<sup>-</sup> 是体内正常离子, 所以选用 0.1 mol/L HCL 作胶原蛋白溶液的溶剂, 从组织工程仿生角度优于文献报道的利用醋酸或者枸橼酸溶解胶原蛋白<sup>[13]</sup>。通过提取方法的改良, 课题组提取的胶原蛋白-HCL 溶液浓度平均可以达到 66 mg/mL, 高于文献报道的 4~20 mg/mL, 且纯度与传统方法一致。此外, 课题组对制得的胶原蛋白溶液进行摇菌试验, 结果显示制备的胶原蛋白溶液无常见细菌污染, 适合长期保存。

因限于条件, 作者提取的 II 型胶原蛋白氨基酸成分未与正常人关节软骨胶原蛋白氨基酸成分进行对比, 而且胶原蛋白鉴定除已采用的氨基酸含量分析和 SDS-PAGE 电泳外, 还有紫外分光吸收检验、羟脯氨酸含量测定等<sup>[14]</sup>, 本研究也未能进行, 难以对标本中胶原的性质和含量作进一步分析。

**参考文献:**

[1] 宋新强, 骆媛, 王丹, 等. 鸡 II 型胶原基因疫苗 pcDNA-CCOL2A1 能有效治疗大鼠类风湿性关节炎[J]. 中国科学 C 辑生命科学, 2006, 36(6): 534-542.  
 [2] 张海荣, 李沙, 傅颖媛, 等. 胶原诱导的关节炎和佐剂诱导的关节炎大鼠模型的制备[J]. 江西医学院学报, 2009, 49(12): 17-26.  
 [3] Xi CX, Liu N, Liang F, et al. Molecular cloning, characterization and localization of chicken type II collagen (下转第 958 页)

固定于理想位置。Shelbourne 等<sup>[15]</sup>和 Salar 等<sup>[16]</sup>的研究表明,Elmslie-Trillat 手术矫正后的效果不随时间的推移而减弱,手术治疗后取得满意疗效。在本组病例的治疗中,对 Elmslie-Trillat 术式进行了改良,在胫骨结节骨片截骨时,游离其远端蒂,再用螺钉将截取的整个骨片骨向下、向内固定于理想的位置。骨片远端游离可使骨片有更大的移动空间,可以根据患者髌股关节对线不良的严重程度更准确地调整其位置,以恢复髌股关节的正常轨迹。

#### 参考文献:

- [1] Kraus VB, McDaniel G, Worrell TW, et al. Association of bone scintigraphic abnormalities with knee malalignment and pain[J]. *Ann Rheum Dis*, 2009, 68(11):1673-1679.
- [2] Ward SR, Terk MR, Powers CM. Association with patellofemoral alignment and changes in contact area during weight-bearing[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2007, 89(8):1749-1755.
- [3] Gigante A, Enea D, Greco F, et al. Distal realignment and patellar autologous chondrocyte implantation: mid-term results in a selected population[J]. *Knee Surg Sport Tr A*, 2009, 17(1):2-10.
- [4] Alemdaroglu KB, Cimen O, Aydogan NH, et al. Early results of arthroscopic lateral retinacular release in patellofemoral osteoarthritis[J]. *Knee*, 2008, 15(6):451-455.
- [5] Calpur OU, Ozcan M, Gurbuz H, et al. Full arthroscopic lateral retinacular release with hook knife and quadriceps pressure-pull test: long-term follow-up [J]. *Knee Surg Sport T A*, 2005, 13(3):222-230.
- [6] Casscells S. The arthroscope in the diagnosis of disorders of patellofemoral joint[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 1979, 144(1):45-50.
- [7] Grelsamer RP, Dejour D, Gould J. The pathophysiology of patellofemoral arthritis[J]. *Orthop Clin N Am*, 2008, 39(3):269-274.

- [8] Wittstein JR, Bartlett EC, Easterbrook J, et al. Magnetic resonance imaging evaluation of patellofemoral malalignment[J]. *Arthroscopy*, 2006, 22(6):643-649.
- [9] Incavo SJ, Coughlin KM, Pappas C, et al. Anatomic rotational relationships of the proximal tibia, distal femur, and patella: implications for rotational alignment in total knee arthroplasty[J]. *J Arthroplasty*, 2003, 18(5):643-648.
- [10] Cowan S, Bennell KL, Hodges PW. Therapeutic patellar taping changes the timing of vasti muscle activation in people with patellofemoral pain syndrome [J]. *Clin J Sport Med*, 2002, 12(6):339-347.
- [11] 赵金忠, 何耀华, 王建华. 关节镜下髌骨支持带调整术联合 Fulkerson 截骨治疗复发性髌骨脱位[J]. *中华骨科杂志*, 2005, 25(6):220-230.
- [12] Nakajima A, Watanabe H, Rokkaku T, et al. The Elmslie-Trillat procedure for recurrent patellar subluxation after total knee arthroplasty [J]. *J Arthroplasty*, 2010, 25(7):1170-1172.
- [13] Carney JR, Mologne TS, Muldoon M, et al. Long-term evaluation of the Roux-Elmslie-Trillat procedure for patellar instability: a 26-year follow-up[J]. *Am J Sports Med*, 2005, 33(8):1220-1223.
- [14] Hughston JC, Deese M. Medial subluxation of the patella as a complication of lateral retinacular release[J]. *AM J Sports Med*, 1996, 24(4):486-491.
- [15] Shelbourne KD, Porter DA, Rozzi W. Use of a modified Elmslie-Trillat procedure to improve abnormal patellar congruence angle[J]. *Am J Sports Med*, 1994, 22(3):318-323.
- [16] Salari N, Horsmon GA, Cosgarea AJ. Rehabilitation after anteromedialization of the tibial tuberosity[J]. *Clin Sports Med*, 2010, 29(2):303-305.

(收稿日期:2010-12-25 修回日期:2011-01-25)

(上接第 955 页)

- II procollagen gene[J]. *Gene*, 2006, 36(1):67-76.
- [4] 赵金霞, 李茹, 何菁, 等. II 型胶原变构肽鼻黏膜给药治疗胶原诱导性关节炎的实验研究[J]. *北京大学学报:医学版*, 2008, 40(6):562-567.
- [5] 刘兰涛, 徐玉东, 宫慧玲, 等. II 型胶原蛋白和雷公藤多甙对佐剂性关节炎治疗作用的实验研究[J]. *解剖学研究*, 2007, 29(4):256-259.
- [6] Eyre D. Collagen of articular cartilage[J]. *Arthritis Res*, 2002, 4(1):30-35.
- [7] 顾其胜. 胶原蛋白的临床应用[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2006, 20(10):1052-1058.
- [8] 刘慧玲, 王栋, 章金刚. 胶原蛋白在临床医学中的应用 [J]. *北京生物医学工程*, 2005, 24(3):239-241.
- [9] Deyl Z, Miksik I, Eckhardt A. Preparative procedures and purity assessment of collagen proteins[J]. *J Chromatogr*

B, 2003, 790(1-2):245-275.

- [10] 李斯明, 叶春婷, 邹海燕, 等. 高纯度猪软骨 II 型胶原的制备与检测[J]. *生物医学工程学杂志*, 2001, 18(4):592-594.
- [11] 姜旭金, 陈盛霞, 王开放, 等. 可溶性 II 型胶原蛋白提取纯化条件的研究[J]. *临床检验杂志*, 2006, 24(6):418-420.
- [12] 王彦宏, 朱平, 冷南. II 型胶原蛋白的提取纯化和鉴定 [J]. *第四军医大学学报*, 2002, 23(19):1820-1821.
- [13] Pieper JS, Hafmans T, Veerkamp JH, et al. Crosslinked type II collagen matrices: preparation, characterization, and potential for cartilage engineering[J]. *Biomaterials*, 2002, 23(15):3183-3192.
- [14] 肖建德. 胶原的生物化学特性及其在外科的应用[J]. *国外医学创伤与外科基本问题分册*, 1987, 13(2):75-77.

(收稿日期:2010-12-25 修回日期:2011-01-25)