

· 专论 ·

# 基于肽键热振荡理论和酶工程技术的动物药 肽类化合物研究<sup>△</sup>

李晶峰, 边学峰, 孙佳明, 林喆\*, 张辉\*

长春中医药大学, 吉林 长春 130117

**[摘要]** **目的:** 筛选与动物药功能主治相关活性组分, 探讨其传统炮制加工机理, 验证肽键热振荡理论。**方法:** 以4类动物药为代表, 包括虫类、胶类、角类、贝壳类, 对动物药连续用石油醚、乙酸乙酯、甲醇、水超声提取, 得到4个不同极性溶媒提取物, 对其进行系统活性对比研究。进一步将动物药水提液经超滤技术分为>10 kDa、3~10 kDa、1~3 kDa、<1 kDa组分。以相关活性指标, 筛选活性组分; 对炮制前后动物药<1 kDa组分的活性及寡肽收率进行对比研究; 以动物药蛋白>10 kDa部分为底物进行酶解, 以相关活性指标对天然和酶解<1 kDa组分进行对比研究。**结果:** 动物药各极性溶媒提取物活性最强的为水提取物, 水提取物各组分中<1 kDa或1~3 kDa的小肽段活性明显强于蛋白、多肽部位, 因此确定动物药<1 kDa或1~3 kDa的小肽段为活性组分; 炮制品的寡肽含量高于生品; 酶解<1 kDa组分活性略低于天然<1 kDa组分, 但酶解寡肽的寡肽收率远高于天然寡肽。**结论:** 确定了<1 kDa或1~3 kDa的小肽段组分为动物药的药效物质基础; 动物药经炮制之后, 由于肽键的断裂, 生成了更多的小分子寡肽类成分, 进而可以发挥更强活性; 进一步阐明了动物药热炮制机理, 验证了课题组提出的肽键热振荡理论; 此外, 由蛋白酶解得到更多的活性寡肽, 解决了天然寡肽收率较低难于产业化的问题, 为动物药小肽段类物质开发应用提供了可靠的依据。

**[关键词]** 肽键热振荡理论; 酶工程技术; 动物药; 肽类化合物

**[中图分类号]** R282.74; R284 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2019)09-1147-10

**doi:**10.13313/j.issn.1673-4890.20190215002

## Study on Peptides of Animal Drugs Based on Thermal Oscillation Theory of Peptide Bond and Enzyme Engineering Technology

LI Jing-feng, BIAN Xue-feng, SUN Jia-ming, LIN Zhe\*, ZHANG Hui\*

Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China

**[Abstract]** **Objective:** To screen the active components related to the main functions of animal drugs, explore the mechanism of traditional thermal processing, and verify the theory of thermal oscillation of peptide bonds. **Methods:** Four kinds of animal medicines, including insects, colloids, horns and testacean, were extracted by ultrasound with petroleum ether, ethyl acetate, methanol and water. Four different polar solvent extracts were obtained and their activities were compared. Ultrafiltration technology was used to divide the aqueous extracts of animal medicines into four components: more than 10 kDa, 3-10 kDa, 1-3 kDa and less than 1 kDa, and the active components were screened by the related activity indexes. The activity and oligopeptide yield of less than 1 kDa component of animal medicine before and after processing were compared. The enzymatic hydrolysis was carried out on the part of animal drug greater than 10 kDa, and the natural and enzymatic components less than 1 kDa were compared with the related activity indexes. **Result:** The most active component of the polar solvent extracts of animal medicine was aqueous extract. The activity of small molecular weight peptides less than 1 kDa or 1-3 kDa in each component of aqueous extract was obviously stronger than that of protein and polypeptide parts. Therefore, the

<sup>△</sup> [基金项目] 公益性行业科研专项(201507002); 国家自然科学基金面上项目(81373936)

\* [通信作者] 张辉, 教授, 研究方向: 中药有效成分与应用开发; E-mail: zhanghui\_8080@163.com  
林喆, 教授, 研究方向: 中药药理; E-mail: linzhe1228@163.com

small molecular weight peptides of animal medicine less than 1 kDa or 1-3 kDa were determined as active components, and the oligopeptide content of processed products was higher than that of raw products. The activity of oligopeptides with enzymatic hydrolysis less than 1 kDa were slightly lower than those with natural hydrolysis less than 1 kDa, but the yield of oligopeptides with enzymatic hydrolysis was much higher than that of natural oligopeptides. **Conclusion:** The small molecular weight peptides of 1 kDa or 1-3 kDa were identified as the basis of pharmacodynamic substances of animal drugs, and after processing more small molecular oligopeptides were produced due to the breakage of peptide bonds, which could play a more active role. The mechanism of thermal processing of animal drugs was further clarified, and the theory of thermal oscillation of peptide bonds proposed by the research group was verified. In addition, more active oligopeptides were obtained by proteolysis, which may solve the problem that the yield of natural oligopeptides is low and difficult to industrialize, and it provides a reliable basis for the development and application of small molecular peptides in animal medicine.

[ **Keywords** ] thermal oscillation theory of peptide bond; enzyme engineering technology; animal medicine; peptide compounds

我国拥有丰富的动物药资源, 占中药资源的12%, 在医疗、保健等方面具有重要的经济意义和科学价值。蛋白质是一类与生命直接相关的生物大分子, 在正常情况下以紧密折叠结构存在。天然蛋白质分子受到某些物理因素(加热、紫外线照射、高压、表面张力)、化学因素(酶、有机溶剂、脲、胍、酸、碱)等的影响时, 不对称性增高以及物理化学常数发生改变, 这种过程称为蛋白质的变性, 生物活性发生改变。蛋白质伸展时的热力学特性研究发现其变性过程可以用 Eyring 和 Lumry 模型描述: native  $\rightleftharpoons$  unfolded reversible  $\rightarrow$  unfolded irreversible。

据此, 课题组提出了肽键热振荡理论, 认为动物类中药中的蛋白质在热炮制过程中, 经过肽键的热振荡作用, 导致其结构发生不同程度的改变, 产生更多的活性肽, 生理活性发生相应的变化<sup>[1]</sup>。肽是人体生命活动必不可少的生命物质和营养元素, 被誉为生命之源, 现代科学表明, 肽能够很好地改善多种慢性疾病<sup>[2]</sup>, 现将本课题组的相关研究报道如下。

## 1 虫类动物药

虫类药因其走窜通达、破血行血、化痰散结、疏逐搜剔之特性<sup>[3-4]</sup>, 深得广大临床医生的重视。本课题组对虫类动物药蜈蚣、僵蚕、水蛭生品进行了全成分分析, 石油醚、乙酸乙酯、甲醇、水超声提取, 得到4个不同极性溶媒提取物(见图1), 根据其功能主治、相关活性筛选最佳活性部位。对水提取物按不同分子量进行分离研究, 将虫类动物药材水提取物经过超滤离心技术, 得到>10 kDa的蛋白、3~10 kDa多肽、1~3 kDa多肽以及<1 kDa寡肽组分(见图2), 相关活性进行筛选, 并比较虫类动物

药炮制前后与酶解<1 kDa组分的活性, 按分式(1)和(2)计算冻干粉收率、寡肽收率。

$$\text{冻干粉收率} = \frac{\text{冻干粉质量}}{\text{药材质量}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{寡肽收率} = \frac{\text{冻干粉质量} \times \text{寡肽含量}}{\text{药材质量}} \times 100\% \quad (2)$$

### 1.1 蜈蚣

蜈蚣为蜈蚣科动物少棘巨蜈蚣 *Scelopendra subspinipes mutians* L. Koch 的干燥全体。具有熄风镇痉、通络止痛、攻毒散结、活血化瘀疗效<sup>[5-6]</sup>。用于治疗疮疡肿毒、瘰疬结核等, 改善机体高黏状态, 现多用于抗肿瘤治疗, 影响肿瘤细胞的扩散和新生血管的生成, 直接抑制肿瘤增生, 促进细胞凋亡<sup>[7]</sup>。中药炮制学中记载焙蜈蚣多用于急慢惊风、破伤风等症的痉挛抽搐、癫痫, 蜈蚣炮制后毒性降低, 矫味矫臭。本课题组以活化部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT)为指标筛选蜈蚣活血化瘀活性成分。

通过 APTT 对比实验结果显示, 与 0.9% 氯化钠溶液比较, 不同极性溶媒提取物 ATPP 均有显著升高 ( $P < 0.01$ ), 水提取物活性最佳(见图 3A)。进一步筛选水提取物不同组分的活性, 与 0.9% 氯化钠溶液比较, 蜈蚣不同组分、焙蜈蚣及其酶解 <1 kDa 组分 APTT 均有显著提高 ( $P < 0.01$ ), 其中 <1 kDa 的活性要优于其他组分, 且蜈蚣经炮制后 <1 kDa 组分寡肽含量增加, 活性增强(见图 3B、C)。<1 kDa 组分为蜈蚣的活性最佳部分, 且天然寡肽产率低, 故本实验将蜈蚣 >10 kDa 蛋白部分进行酶解, 得到酶解寡肽, 天然 <1 kDa 较酶解 <1 kDa 的组分活性好, 但酶解寡肽收率更高, 可以考虑作为天然寡肽替代品(见图 3C)。

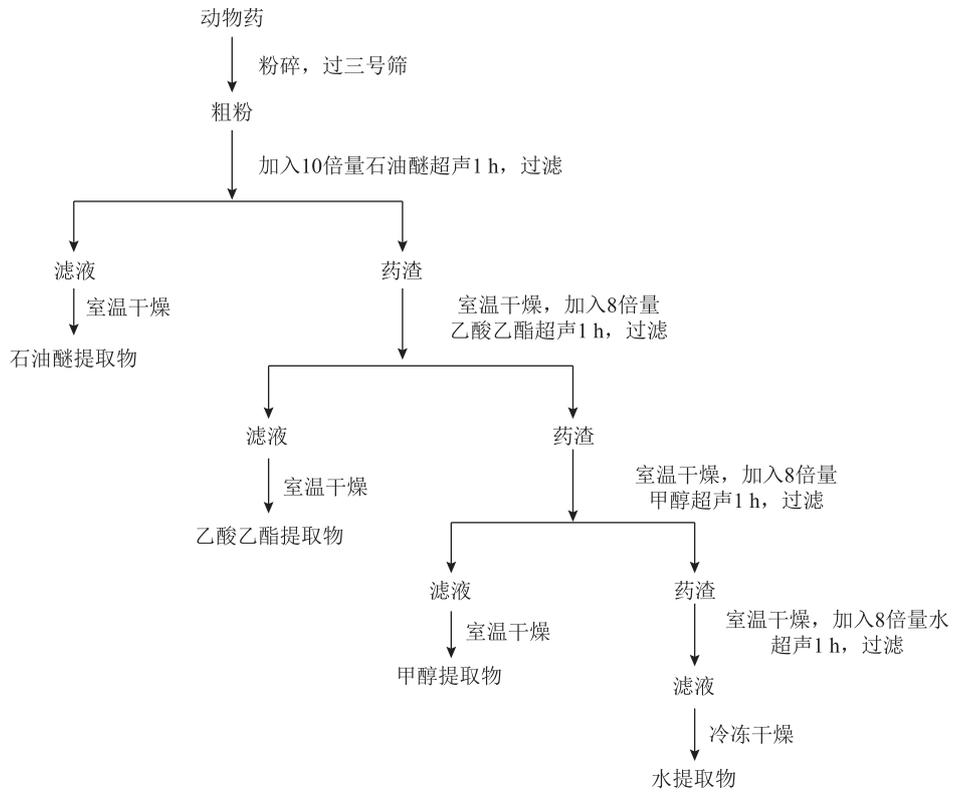


图1 动物药不同极性溶媒提取物的提取流程

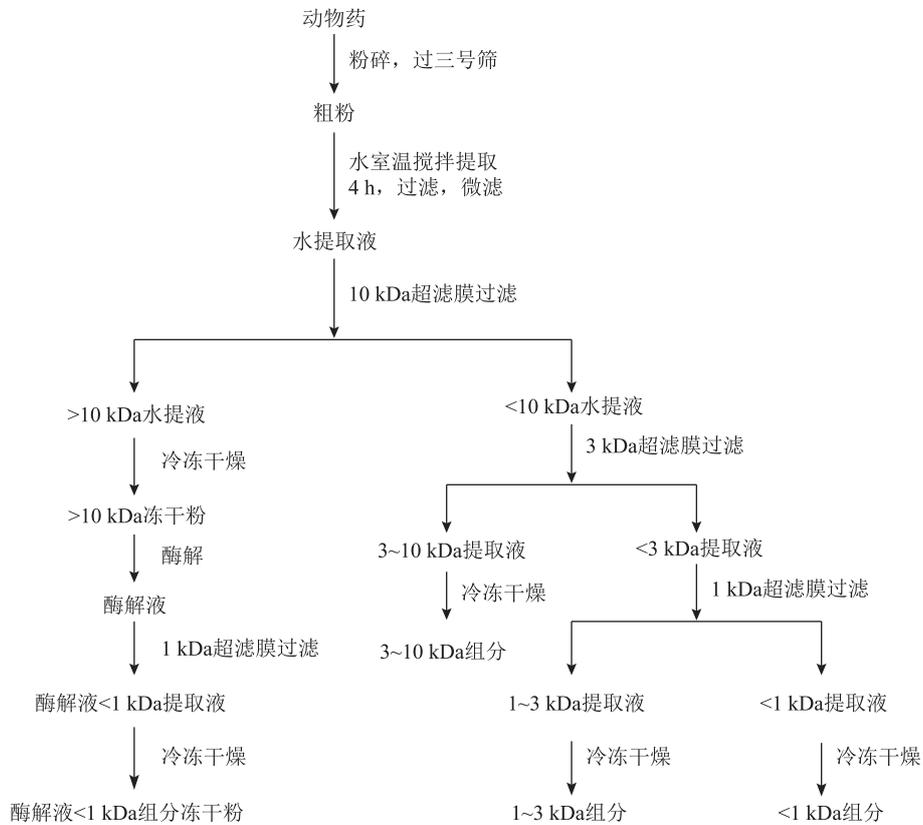
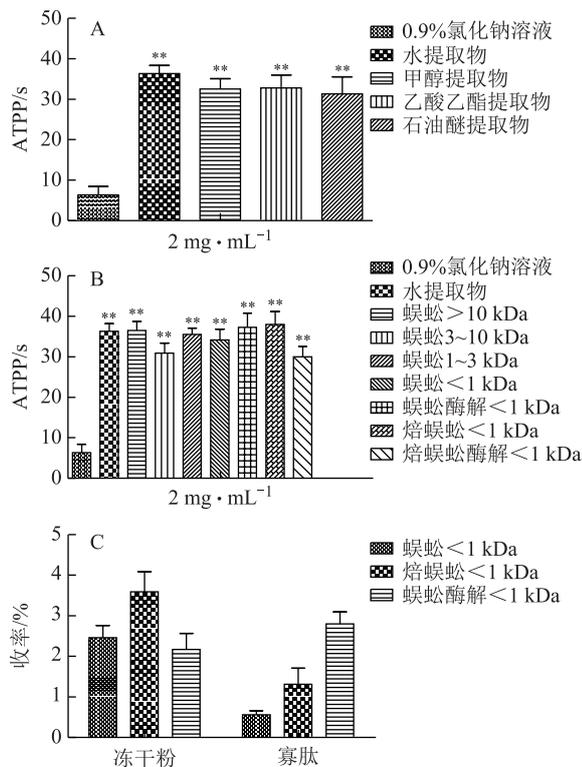


图2 动物药酶解及水提取物不同组分的提取流程图



注: A. 蜈蚣不同极性溶媒提取物抗凝血酶活性; B. 蜈蚣不同组分、焙蜈蚣及其酶解 <1 kDa 组分抗凝血酶活性; C. 蜈蚣不同来源(生品、炮制品、酶解) <1 kDa 组分的收率比较; 与 0.9% 氯化钠溶液比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

图3 蜈蚣抗凝血酶活性及 <1 kDa 组分的收率比较( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=5$ )

## 1.2 僵蚕

僵蚕为蚕蛾科昆虫家蚕 *Bombyx mori* Linnaeus 4~5 龄的幼虫感染(或人工接种)白僵菌 *Beauveria bassiana*(Bals.) Vuillant 而致死的干燥体。据《神农本草经》中记载,其具有息风止痉、祛风止痛的功效<sup>[8]</sup>,临床上常用于肝阳上亢、血虚、阴虚等所致的以肢体痉挛、抽搐、颤动等为特点的证候,该证候与帕金森病的临床表现(静止性震颤、运动迟缓、肌强直和姿势步态障碍)相似。僵蚕的辛散之力较强,有腥臭气味,患者直接服用生品会产生恶心、呕吐等反应,因此僵蚕服用前需要将其麸炒炮制来降低其自身的腥臭味和刺激性。故本课题组基于僵蚕的传统功效,重点针对抗帕金森病作用,依据肽键热振荡理论对麸炒僵蚕的炮制机理进行系统研究。

首先,为了筛选僵蚕治疗帕金森病活性组分,应用 6-OHDA 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤模型<sup>[9-10]</sup>对其全成分进行了系统研究。提取僵蚕 4 个不同极性溶媒提取物,与空白对照组比较,模型组细胞存活

率显著降低( $P < 0.01$ );与模型组比较,不同质量浓度的水提取物及甲醇提取物均有显著提高( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),石油醚提取物在质量浓度为 0.05、0.1  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  时有显著升高( $P < 0.05$ ),水提取物活性最强(见图 4A),进而按不同分子量对水提取物进行分离研究,应用对 6-OHDA 诱导 SH-SY5Y 细胞损伤的保护作用进行筛选;与空白对照组比较,模型组细胞存活率显著性降低( $P < 0.05$ );与模型组比较,僵蚕 >10 kDa、<1 kDa 及麸炒僵蚕 <1 kDa 在不同质量浓度细胞存活率均有显著升高( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),僵蚕在质量浓度为 0.25、0.5  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  下细胞存活率有显著提高( $P < 0.05$ ),5 个组分的活性最佳为 <1 kDa 组分(见图 4B)。采用三氯乙酸沉淀法结合双缩脲比色法测定僵蚕炮制前后蛋白及寡肽含量。

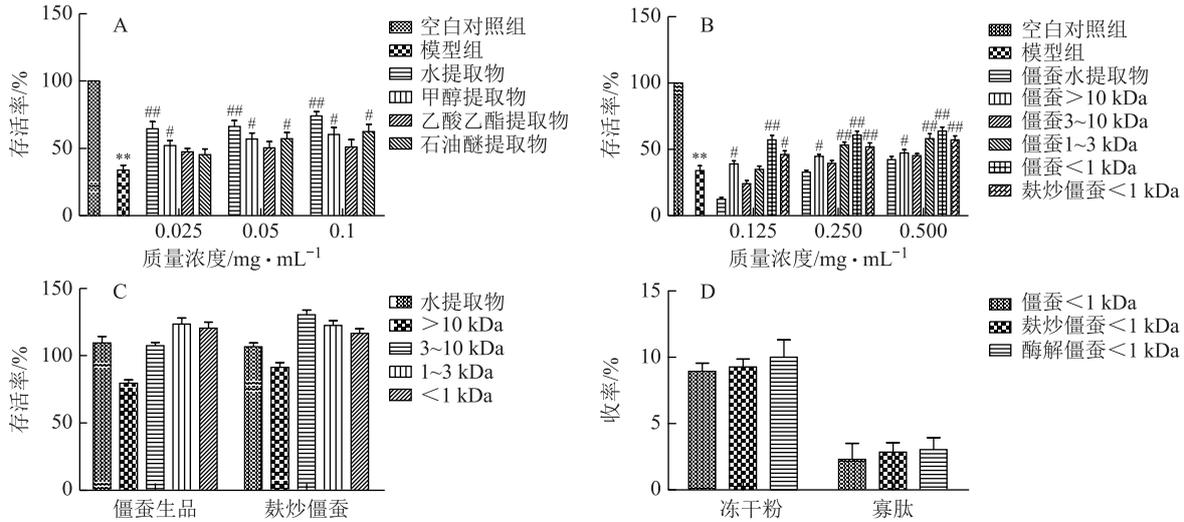
僵蚕麸炒后,腥臭味下降,总蛋白含量下降,由 0.192  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  下降为 0.136  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,总寡肽含量升高,且生品 >10 kDa 组分对 SH-SY5Y 细胞具有抑制增殖作用,但麸炒僵蚕 >10 kDa 组分对 SH-SY5Y 无明显抑制增殖作用(见图 4C)。说明炮制后毒性显著降低,同时活性略有下降,这可能是具有一定毒性的蛋白含量下降和活性寡肽含量升高的综合作用结果。僵蚕酶解寡肽收率为天然寡肽的 1.31 倍,麸炒僵蚕寡肽收率为天然寡肽的 1.67 倍(见图 4D)。

## 1.3 水蛭

本品为水蛭科动物蚂蟥 *Whitmania pigra* Whitman、水蛭 *Hirudo nipponica* Whitman 或柳叶蚂蟥 *Whitmania acranulata* Whitman 的干燥全体,是我国传统的特种药用水生动物,其干制品炮制后入药,2015 版《中华人民共和国药典》中表明水蛭用滑石粉烫,具有治疗清瘀、中风、高血压等功效<sup>[11]</sup>。本课题组采用抗凝血活性为指标,针对水蛭生品不同极性溶媒提取物及其不同组分进行活性筛选,与 0.9% 氯化钠溶液比较,水蛭不同极性溶媒提取物及水提取物不同组分 ATTP 均显著升高( $P < 0.01$ ),水蛭的主要活性部位为水层中的 1~3 kDa 组分,且砂烫水蛭活性高于水蛭(见图 5A、B)。水蛭经过加热炮制过程,组织变得疏松,某些大蛋白肽键断裂导致 1~3 kDa 中寡肽含量有所增加,活性随之增加,有力证明了肽键热振荡理论。为了考察炮制前后水蛭天然和酶解 <1 kDa 组分活性和寡肽收率的差异,本课题组以水蛭、砂烫水蛭和酶解水蛭为研究对象,以抗凝血活

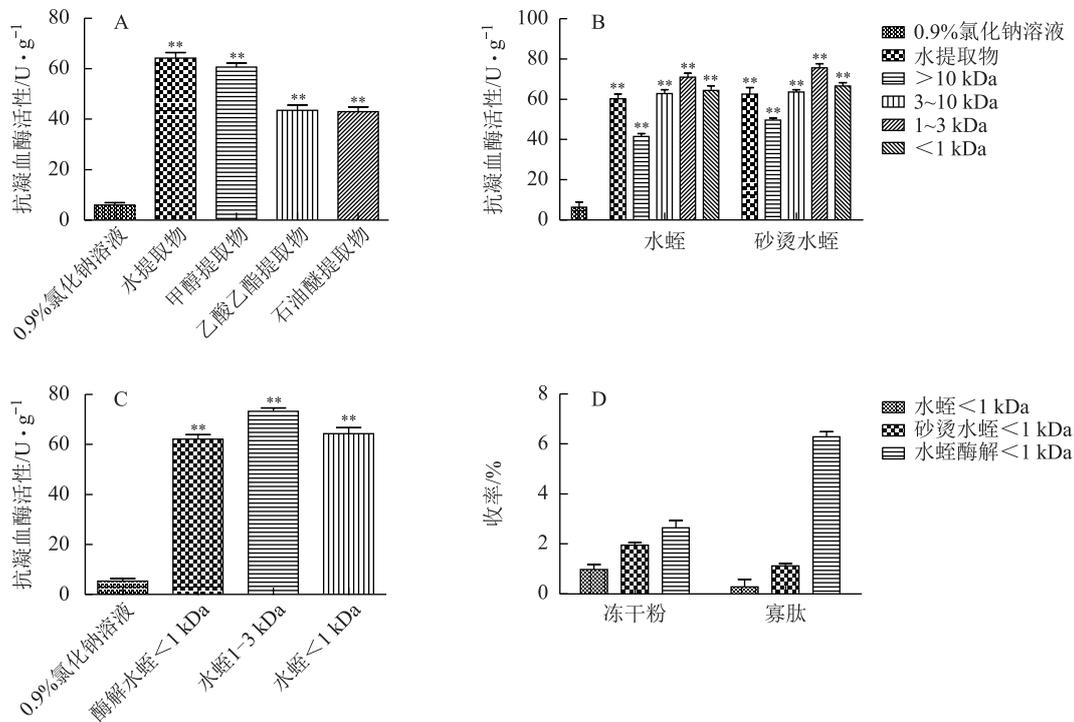
性为指标进行对比研究, 并比较三者的寡肽收率。与0.9%氯化钠溶液比较, 水蛭酶解与炮制前后天然小肽段 ATPP 均显著升高( $P < 0.01$ ), 砂烫水蛭寡肽

收率高于水蛭; 水蛭天然小肽段活性略高于酶解肽, 而酶解肽收率远高于天然寡肽, 是天然寡肽的3.9倍(见图5C、D)。



注: A. 僵蚕不同极性溶媒提取物对6-OHDA诱导SH-SY5Y细胞损伤的保护作用; B. 僵蚕不同组分对6-OHDA诱导SH-SY5Y细胞损伤的保护作用; C. 僵蚕炮制前后对SH-SY5Y细胞存活率的影响; D. 僵蚕不同来源(生品、炮制品、酶解) <1 kDa组分的收率比较; 与空白组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与模型组比较, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ 。

图4 僵蚕对SH-SY5Y细胞的影响及<1 kDa组分的收率比较( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )



注: A. 水蛭生品不同极性溶媒提取物抗凝血酶活性; B. 水蛭不同组分及其炮制品抗凝血酶活性; C. 水蛭酶解寡肽与天然小肽段抗凝血酶活性; D. 水蛭不同来源(生品、炮制品、酶解) <1 kDa组分的收率比较; 与0.9%氯化钠溶液比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

图5 水蛭抗凝血酶活性及<1 kDa组分的收率比较( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

## 2 胶类动物药

胶类药材是以动物的皮、骨、甲、角等为原料,用水煎煮浓缩制成<sup>[12]</sup>,是我国特有传统中药,大多都具有滋阴润燥、补血、止血等功效,在保健、食品行业受到认可与欢迎<sup>[13]</sup>。

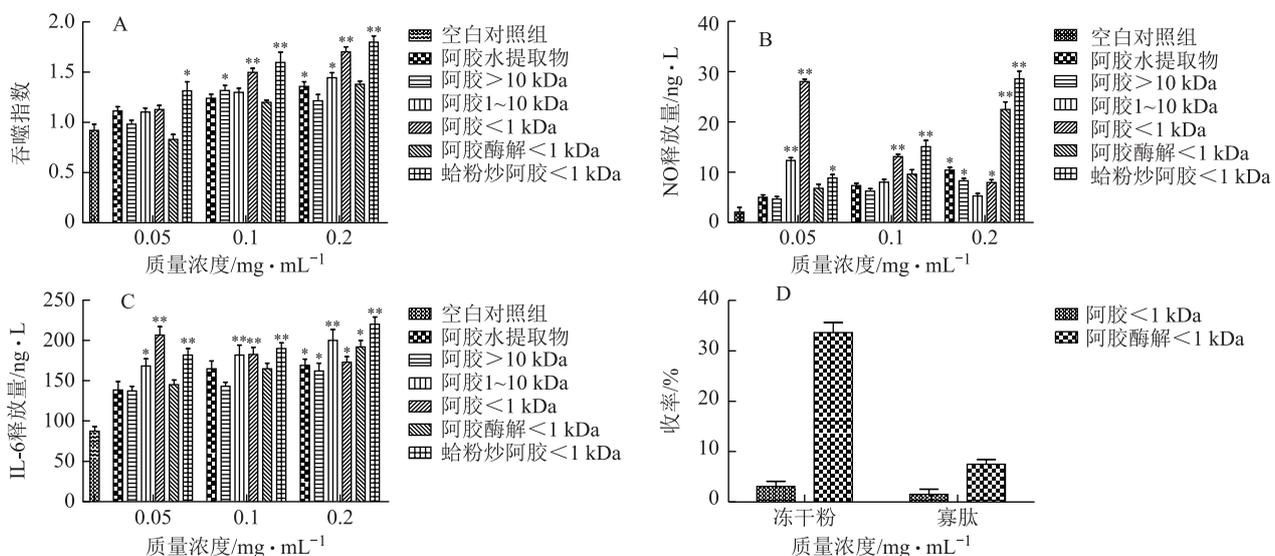
本课题组应用超滤技术将胶类动物药材阿胶、鹿角胶水提取物分为不同分子量:总提取物、>10 kDa的蛋白、1~10 kDa多肽以及<1 kDa寡肽组分进行分析,根据其功能主治相关性筛选最佳活性部位,并比较胶类动物药材炮制前后<1 kDa组分的活性,天然与酶解<1 kDa组分的活性与寡肽含量。

### 2.1 阿胶

阿胶是采用马科动物驴 *Equus asinus* L. 的鲜皮或干燥皮经去毛漂泡、煎煮、浓缩,并加入冰糖、豆油等辅料制成的固体胶类药物<sup>[14]</sup>,也被称为驴皮胶,具有补血、止血、增强免疫的作用<sup>[15-16]</sup>。阿胶生品一般呈块状、质地坚硬,虽然有较好的稳定性,但是不便于调配和使用,且由于其滋腻之性,久服会对脾胃的消化功能产生不良影响,而经炮制后,较生品易于消化吸收,大大提高了阿胶的生物利用度,传统炮制法主要有蛤粉炒、蒲黄炒。

为了明确阿胶寡肽免疫增强作用的物质基础,对阿胶总提取物进行膜分离,得到不同分子量的组分,基于肽键热振荡理论对炮制前后阿胶寡肽的收率及免疫增强活性进行对比研究,以 RAW264.7 细胞吞

噬中性红指数、RAW264.7 细胞释放 NO 的量及细胞因子 IL-6 分泌量为免疫增强活性指标筛选活性组分。RAW264.7 细胞吞噬中性红指数实验中,与空白对照组比较,阿胶水提取物在  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , >10 kDa 在  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 1~10 kDa 在  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 生品 <1 kDa 在 0.1、 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 蛤粉炒阿胶天然 <1 kDa 组分在  $0.05 \sim 0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  时有显著升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ) (见图 6A); 阿胶不同组分 NO 释放量与空白对照组比较,水提取物在  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、>10 kDa 在  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、1~10 kDa 在  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、<1 kDa 在  $0.05 \sim 0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、阿胶酶解 <1 kDa 在  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、蛤粉炒阿胶天然 <1 kDa 在  $0.05 \sim 0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  均有显著提升 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ) (见图 6B)。测定 RAW264.7 细胞分泌 IL-6 实验中,与空白对照组相比,阿胶水提取物在  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、>10 kDa 在  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 1~10 kDa 在 0.1、 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , <1 kDa 在 0.1、 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 蛤粉炒阿胶 <1 kDa 在  $0.05 \sim 0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  差异有统计学意义 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ) (见图 6C), 上述 3 种结果均显示蛤粉炒阿胶 <1 kDa 活性强于阿胶与酶解 <1 kDa 组分,蛤粉炒阿胶寡肽收率及活性高于阿胶。为了考察阿胶天然寡肽和酶解寡肽收率的差异,以阿胶天然与酶解 <1 kDa 组分为研究对象,分析比较了二者的寡肽收率。结果显示酶解 <1 kDa 组分寡肽收率是天然寡肽的 4.9 倍(见图 6D),虽然酶解 <1 kDa 组分寡肽活性略低于天然肽,但收率远远高于天然寡肽。



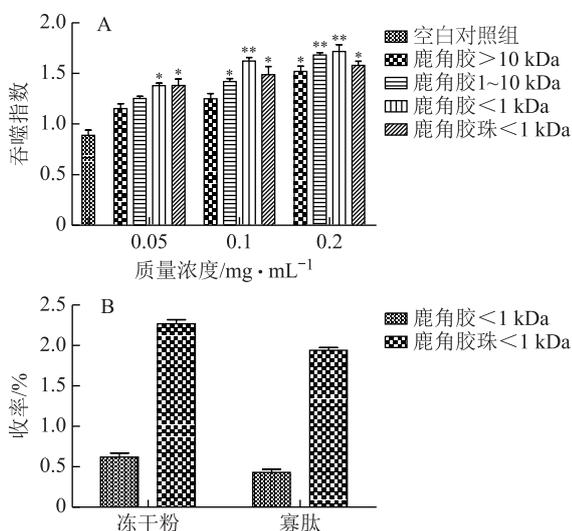
注: A. 阿胶不同组分及其炮制品对 RAW264.7 细胞吞噬指数的影响; B. 阿胶不同组分及其炮制品对 RAW264.7 细胞释放 NO 量的影响; C. 阿胶不同组分及其炮制品对 RAW264.7 细胞分泌 IL-6 的影响; D. 阿胶不同来源(生品、酶解)<1 kDa 组分的收率比较; 与空白对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

图 6 阿胶对 RAW264.7 细胞的影响及 <1 kDa 组分的收率比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ )

## 2.2 鹿角胶

鹿角胶为马鹿 *Cervus elaphus* Linnaeus 或梅花鹿 *Cervus nippon* Temminck 的角经煎煮、浓缩制成的固体胶,具有补肾壮阳、增强免疫力等功效。传统的鹿角胶块存在不易烊化、口感不佳、服用不便等问题,蛤粉与鹿角胶共制可除去药物的腥味,降低其滞腻之性,增强疗效<sup>[17]</sup>。鹿角胶的应用领域不断拓展,在保健和许多疾病治疗中发挥着重要的作用。

对鹿角胶水提取物不同组分免疫增强活性及炮制前后寡肽的收率进行对比研究。以 RAW264.7 细胞吞噬中性红指数为免疫增强的指标,筛选鹿角胶炮制前后 <1 kDa 寡肽为活性组分,与空白对照组比较,鹿角胶 >10 kDa 在 0.2 mg·mL<sup>-1</sup>,鹿角胶 1~10 kDa 在 0.1、0.2 mg·mL<sup>-1</sup>,鹿角胶与鹿角胶珠在 0.05~0.2 mg·mL<sup>-1</sup> 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ) (见图 7A),炮制后,鹿角胶珠 <1 kDa 组分的寡肽收率高于鹿角胶 (见图 7B)。



注: A. 鹿角胶不同组分及其炮制品对 RAW264.7 细胞吞噬指数的影响; B. 炮制前后 <1 kDa 组分的收率比较; 与空白对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

图 7 鹿角胶对 RAW264.7 细胞的影响及 <1 kDa 组分的收率比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ )

## 3 角类动物药

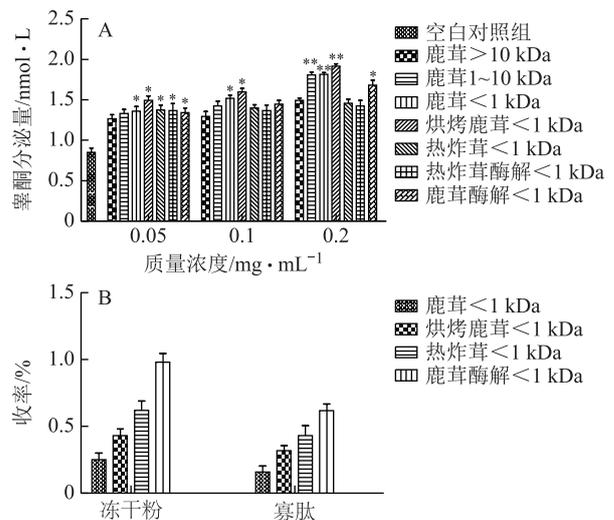
角类药材是动物药的重要组成部分之一,多为名贵中药,如《神农本草经》中就记载了犀角、羚羊角、鹿茸等<sup>[18]</sup>。角类由角质细胞组成,具有活性强、疗效好、不良反应小、潜力大、应用广的特点。

本课题组将角类动物药材鹿茸、山羊角水提取物按不同分子量 (>10 kDa 的蛋白、1~10 kDa 多肽

以及 <1 kDa 寡肽组分) 进行分析,根据其功能主治相关活性筛选最佳活性部位。并比较其炮制前后及其酶解、天然 <1 kDa 组分的活性与寡肽收率。

### 3.1 鹿茸

鹿茸为马鹿 *Cervus elaphus* Linnaeus 或梅花鹿 *Cervus nippon* Temminck 的雄鹿未骨化而带茸毛的幼角,是我国常用中药材,具有壮肾阳,益精血,强筋骨等功效<sup>[19]</sup>。本实验对鹿茸鲜品应用超滤离心技术分为 >10 kDa、1~10 kDa、<1 kDa 组分。以睾丸间质细胞睾酮分泌量为体外壮肾阳活性指标,筛选鹿茸炮制前后的壮肾阳活性部位,与空白对照组相比,鹿茸 1~10 kDa 在 0.2 mg·mL<sup>-1</sup>、鹿茸 <1 kDa 在 0.05~0.2 mg·mL<sup>-1</sup>、烘烤鹿茸 <1 kDa 在 0.05~0.2 mg·mL<sup>-1</sup>、热炸茸 <1 kDa 在 0.05 mg·mL<sup>-1</sup>、热炸茸酶解 <1 kDa 在 0.05 mg·mL<sup>-1</sup>、鹿茸酶解 <1 kDa 在 0.05~0.2 mg·mL<sup>-1</sup> 时睾酮分泌量有显著增加 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),其中烘烤茸 <1 kDa 组分活性最强 (见图 8A),因此确定鹿茸 <1 kDa 为壮肾阳活性部位。为了考察鹿茸天然寡肽和酶解寡肽的收率差异,本课题组以鲜茸、热炸茸和烘烤茸为研究对象分析了鹿茸炮制前后的天然和酶解 <1 kDa 寡肽含量。结果显示,鹿茸天然 <1 kDa 组分活性及寡肽含量均略高于酶解 <1 kDa 组分,其中烘烤茸 <1 kDa 组分壮肾阳活性最强,寡肽含量最高,为 89.24%。而酶解寡肽收率远高于天然寡肽,是天然寡肽的 3.8 倍 (见图 8B)。

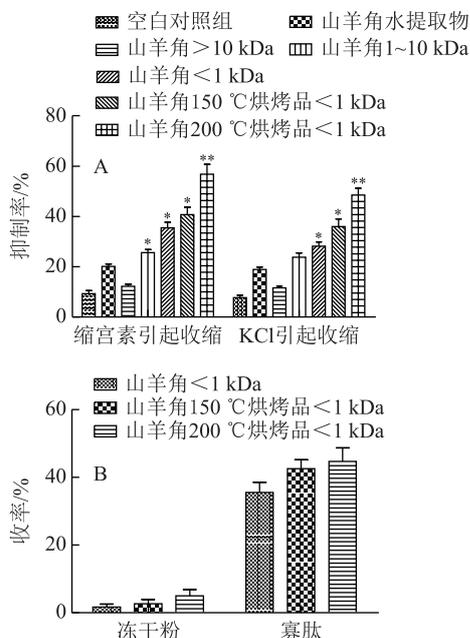


注: A. 鹿茸不同组分及其炮制品对睾丸间质细胞分泌睾酮量的影响; B. 鹿茸不同来源 (生品、炮制品、酶解) <1 kDa 组分的收率比较; 与空白对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

图 8 鹿茸对睾丸间质细胞的影响及 <1 kDa 组分的收率比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ )

### 3.2 山羊角

山羊角为牛科动物青羊 *Naemorhedus goral* Hardwicke 的角。《吉林中草药》指其能“镇静，退热，明目，止血”<sup>[20]</sup>，《医林纂要》记载“功用近羚羊角”。山羊角药材加工炮制应用具有历史考证，《中药大辞典》山羊角项下记载：“磨粉或烧焦研末”。为阐明山羊角经炮制后化学成分及药理活性的变化，本课题组从山羊角活性成分筛选入手，以治疗痛经与免疫调节为目标活性，考察山羊角的活性成分，采用超滤膜分离技术将山羊角水提取液分离为不同组分，通过考察对多种子宫收缩促进剂所致离体子宫平滑肌收缩的影响考察其活性，对山羊角不同组分及150℃烘烤品和200℃烘烤品<1 kDa组分进行了比较分析，与空白对照组相比，山羊角1~10 kDa可显著抑制由缩宫素引起的收缩( $P < 0.05$ )，山羊角<1 kDa、150℃烘烤品、200℃烘烤品可显著抑制由缩宫素与KCl引起的收缩( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )，结果表明<1 kDa组分为山羊角治疗痛经活性成分，且呈现200℃烘烤品>150℃烘烤品>山羊角生品的趋势(见图9A)，山羊角炮制前后<1 kDa组分中寡肽收率趋势同上(见图9B)。



注：A. 山羊角不同组分及其炮制品对缩宫素与KCl引起大鼠子宫平滑肌条收缩的影响；B. 山羊角不同来源(生品、酶解)<1 kDa组分的收率比较；与空白对照组比较，\*  $P < 0.05$ ，\*\*  $P < 0.01$ 。

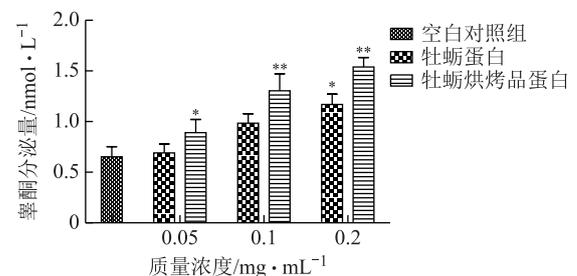
图9 山羊角对大鼠子宫平滑肌条收缩的影响及<1 kDa组分的收率比较( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ )

### 4 贝壳类动物药

贝壳类药材是临床常用中药，具有宁心安神、平肝潜阳、清肝明目、软坚散结等功效<sup>[21]</sup>，是一类同时具有动物药和矿物药特性的特殊类药材<sup>[22]</sup>，虽然贝壳类药材临床应用广泛，但其研究相对较少。课题组以临床常用贝壳类药材牡蛎、石决明为代表，比较煅制前后的相关活性。

#### 4.1 牡蛎

牡蛎是长牡蛎 *Ostrea gigas* Thunberd、大连湾牡蛎 *Ostrea talienwanensis* Crosse 或晋江牡蛎 *Ostrea rivularis* Gould 的贝壳，具有壮阳作用<sup>[23]</sup>。与空白对照组相比，牡蛎蛋白在0.2 mg·mL<sup>-1</sup>、牡蛎烘烤品蛋白在0.05~0.2 mg·mL<sup>-1</sup>时能够显著提高睾丸间质细胞分泌的睾酮能力( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )，牡蛎烘烤品蛋白对睾丸间质细胞分泌睾酮的作用强于牡蛎蛋白(见图10)。

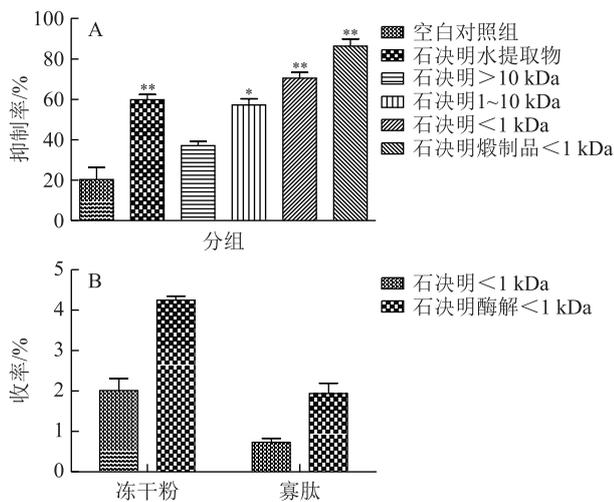


注：与空白对照组比较，\*  $P < 0.05$ ，\*\*  $P < 0.01$ 。

图10 牡蛎与其炮制品对睾丸间质细胞分泌睾酮量的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ )

#### 4.2 石决明

石决明 *Sea-ear Shell* 为鲍科动物，多为杂色鲍、皱纹盘鲍、耳鲍、羊鲍等的贝壳，具有抗高血压、增强抗氧化的功能。本课题组体外测定石决明对血管紧张素转化酶(ACE)的抑制作用，在37℃条件下，ACE能催化分解血管紧张素I的模拟物马尿酸组氨酸亮氨酸(HHL)产生马尿酸<sup>[24]</sup>，而当加入不同质量浓度的石决明提取液时，ACE抑制活性受到不同程度的抑制，马尿酸的生成量减少。与空白对照组比较，石决明水提取物、1~10 kDa、<1 kDa、煅制品<1 kDa组分对ACE均有显著抑制( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )，石决明对ACE抑制率的强弱顺序为：石决明煅制品<1 kDa、石决明<1 kDa、石决明总提取物、石决明1~10 kDa(见图11A)。酶解寡肽收率高于天然1 kDa组分(见图11B)。



注: A. 石决明不同组分及其炮制品对 ACE 抑制作用的影响; B. 石决明不同来源(生品、酶解) <1 kDa 组分的收率比较; 与空白对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

图 11 石决明对 ACE 抑制作用的影响及 <1 kDa 组分的收率比较( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ )

## 5 讨论

我国药用动物资源极其丰富, 药用动物资源是生产动物药的物质基础, 是中药资源的重要组成部分。动物药是传统中药的重要组成部分, 历史悠久, 临床疗效明显。动物药含有丰富的蛋白质成分, 蛋白质不是仅以氨基酸形式吸收, 而更多以肽的形式吸收, 且肽具有更好的活性。牡蛎肽及扇贝裙边肽具有较好的降血压效果<sup>[25-26]</sup>; 三文鱼胸鳍肽、鹿茸肽可通过抑制脂多糖诱导的 RAW264.7 巨噬细胞中一氧化氮的产生来表现出抗炎活性<sup>[27-28]</sup>; 羊骨髓肽及其螯合物可促进体外培养成骨细胞的增殖并增强其成骨活性<sup>[29]</sup>。

中药炮制后可以改变药物的成分和功能, 提高药效, 降低毒性和副作用<sup>[30-32]</sup>, 如盐杜仲可破坏生杜仲中的胶质, 增强临床疗效; 如草乌、川乌炮制能够解其毒性; 在炮制过程中可加入辅料, 如蛤粉炒阿胶、砂烫水蛭、麸炒僵蚕。

本文以虫类、胶类、角类、贝壳类 4 类动物药为代表, 以功能主治相关活性对其进行全成分分析, 结果显示水提取物活性最佳, 水提取物中 <1 kDa 组分效果最优; 为了明确动物药传统热炮制加工机理, 本文基于肽键热振荡理论对炮制前后寡肽含量及活性进行对比研究。经过加热炮制过程, 组织变得疏松, 易于有效成分溶出, 小肽段 <1 kDa 或 1 ~

3 kDa 组分中寡肽含量增加, 且活性增强, 这是由于高温后在肽键热振荡的作用下肽键产生裂解生成了更多小分子量的寡肽。天然寡肽较酶解寡肽活性好; 但酶解寡肽收率较高, 可作为天然寡肽的补充品。本研究为其开发和利用提供科学依据, 解决了天然寡肽收率较低、难于产业化的问题。今后应加大对动物药材小肽类物质开发力度, 以创新产品为龙头, 不断丰富祖国医学和天然、绿色、保健产物的宝库。

## 参考文献

- [1] 李影, 孙佳明, 杜鹤, 等. 炮制方法对珍珠母总蛋白质含量及凝胶电泳特征谱带的影响[J]. 吉林中医药, 2013, 33(12): 1250-1252.
- [2] 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.
- [3] 叶丽红, 蒋建玲, 王敬卿. 虫类中药的临床应用[J]. 中国微循环, 2002, 6(3): 190-191.
- [4] 梁浩东, 潘建科, 洪坤豪, 等. 刘军教授运用虫类药物治疗骨关节退行性疾病经验探析[J]. 中医药导报, 2016, 22(14): 18-20, 35.
- [5] YI K, HAO C, XIN M, et al. A Novel Factor Xa-Inhibiting Peptide from Centipedes Venom[J]. Int J Pept Res Ther, 2013, 19(4): 303-311.
- [6] 王程. 蜈蚣提取物抗肝损伤、抗肿瘤、抗凝血作用及其急性毒性研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2018.
- [7] 王彦多, 方园, 刘颖, 等. 蜈蚣酶解工艺优化及抗肿瘤活性研究[J]. 四川中医, 2018, 36(10): 49-52.
- [8] 程雪娇. 僵蚕粉末饮片炮制工艺与质量标准研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2018.
- [9] 王胜男. 甘松对 6-OHDA 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤的保护作用及机制研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.
- [10] 胡雅琼. 茶叶提取物对 6-OHDA 诱导的 SH-SY5Y 细胞保护作用[D]. 成都: 西南大学, 2014.
- [11] 莫超, 史伟, 王夏青, 等. 中药水蛭对肾病血瘀证的研究及应用[J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(1): 130-132.
- [12] 左华丽, 赵洁, 杨丰庆, 等. 胶类中药材质量控制方法的研究进展[J]. 中国药房, 2013, 24(23): 2203-2206.
- [13] 陈蕊, 袁千, 王凌. 动物胶类药材质量评价方法研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(11): 1749-1753.
- [14] 崔金玉. 阿胶炮制工艺及质量控制研究[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2008.
- [15] LIU M, TAN H, ZHANG X, et al. Hematopoietic effects and mechanisms of Fufang E jiao Jiang on radiotherapy and

- chemotherapy-induced myelosuppressed mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 152(3):575-584.
- [16] 李志,陈壁锋,黄俊明,等. 阿胶口服液对小鼠细胞免疫和体液免疫功能的影响[J]. *中国卫生检验杂志*, 2008, 18(7):1426-1427.
- [17] 燕娜娜,熊素琴,陈鸿平,等. 阿胶炮制历史沿革与现代研究进展[J]. *中药材*, 2018, 41(12):2948-2952.
- [18] 孙宝森. 动物角类的药用研究概况[J]. *中医药信息*, 2004, 21(3):25-26.
- [19] ZONG Y, WANG Y, LI H, et al. Simultaneous quantification and splenocyte-proliferating activities of nucleosides and bases in Cervi cornu Pantotrichum [J]. *Phcog Mag*, 2014, 10(40):391-397.
- [20] 康馨元,刘睿,李春楠,等. 山羊角药材的 HPLC 指纹图谱研究[J]. *中国现代中药*, 2015, 17(5):453-457.
- [21] 徐国兴,林媛,王婷婷. 石决明药理研究及眼科应用进展[J]. *国际眼科杂志*, 2009, 9(12):2389.
- [22] 杨丽,刘友平,韦正,等. 贝壳类药材牡蛎石决明珍珠母的研究进展[J]. *时珍国医国药*, 2013, 24(12):2990-2992.
- [23] 童远明. 含海洋中药补益方剂的配伍规律研究[D]. 南宁:广西中医药大学, 2018.
- [24] 马爱翠. 海洋平肝潜阳中药石决明对血管紧张素转化酶抑制作用研究. [J] *中国海洋大学学报*, 2012, 42(7):135-137.
- [25] 张可佳,张胜男,祁艳霞,等. 牡蛎 ACE 抑制肽对原发性高血压大鼠的降压效果及其性质研究[J]. *大连海洋大学学报*, 2018, 33(6):788-794.
- [26] 李晶晶,尤海琳,张亚飞,等. 扇贝裙边 ACE 抑制肽的分离鉴定及其降血压活性研究[J]. *大连海洋大学学报*, 2018, 33(6):782-787.
- [27] AHN C B, CHO Y S, JE J Y. Purification and anti-inflammatory action of tripeptide from salmon pectoral fin byproduct protein hydrolysate [J]. *Food Chem*, 2015, 168(1):151-156.
- [28] ZHAO L, WANG X, ZHANG X L, et al. Purification and identification of anti-inflammatory peptides derived from simulated gastrointestinal digests of velvet antler protein (*Cervus elaphus* Linnaeus) [J]. *J Food Drug Anal*, 2016, 24(2):376-384.
- [29] 金淑秀,王钰慧,霍乃蕊,等. 羊骨髓肽及其钙螯合物对成骨细胞增殖和活性的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2018, 49(12):2745-2752.
- [30] ZHAO J, WANG M, AVULA B, et al. Effect of Processing on the Traditional Chinese Herbal Medicine Flos Lonicerae: An NMR-based Chemometric Approach [J]. *Planta Med*, 2015, 81(9):754-764.
- [31] SHUYA X, XINFANG X, SHAOXIONG Y, et al. Identification and analysis of amygdalin, neoamygdalin and amygdalin amide in different processed bitter almonds by HPLC-ESI-MS/MS and HPLC-DAD [J]. *Molecules*, 2017, 22(9):1425.
- [32] 陈磊,夏星,何博赛,等. 近5年国家自然科学基金中药炮制学科资助与结题项目情况分析[J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(9):1639-1643.

(收稿日期: 2019-02-15 编辑: 王丽英)