

· 基础研究 ·

基于肽键热振荡理论对僵蚕炮制前后体外
抗帕金森活性的研究[△]

李晶峰, 王亚萍, 边学峰, 张辉*, 孙佳明*

长春中医药大学, 吉林 长春 130117

[摘要] 目的: 筛选僵蚕抗帕金森病作用活性组分, 对比僵蚕传统热炮制加工前后活性, 研究僵蚕天然寡肽与酶解寡肽抗帕金森病作用活性, 并对比炮制前后天然与酶解寡肽收率, 为僵蚕合理开发应用提供依据。方法: 将僵蚕应用石油醚、乙酸乙酯、甲醇、水分别提取, 得到僵蚕不同极性溶媒提取物, 应用6-羟基多巴胺(6-OHDA)诱导的人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y)细胞损伤模型对其全成分进行系统研究; 进而将僵蚕水提取物经过超滤离心, 分别得到>10 kDa、3~10 kDa、1~3 kDa、<1 kDa组分, 再应用乙酰胆碱酯酶(AchE)抑制率及对6-OHDA诱导SH-SY5Y细胞损伤的保护作用进行活性组分筛选; 基于肽键热振荡理论对炮制前后僵蚕不同组分活性进行对比研究; 酶解僵蚕>10 kDa组分, 对天然及酶解<1 kDa组分进行活性对比研究。结果: 僵蚕水提取物较其他极性溶媒提取物活性强, 水提取物中<1 kDa组分的活性最佳, 因此确定僵蚕<1 kDa组分为活性组分; 炒僵蚕<1 kDa组分寡肽含量高于生品; 酶解<1 kDa组分的活性略低于天然寡肽, 但酶解<1 kDa组分寡肽收率高于天然<1 kDa组分。结论: 本文确定了<1 kDa组分为僵蚕体外抗帕金森的药效物质; 基于肽键热振荡理论阐明了僵蚕经麸炒后, 由于肽键的断裂, 生成了更多的小分子寡肽类成分; 由酶解得到收率更高的活性寡肽, 解决了天然寡肽收率较低难于产业化的问题, 为僵蚕开发应用提供了可靠的依据。

[关键词] 僵蚕; 肽键热振荡; 帕金森; 炮制

[中图分类号] R282.74; R283; R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2019)09-1229-07

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20190215001

Anti-Parkinson Activity of Bombyx Batryticatus *in vitro* before and after Processing Based on Thermal Oscillation Theory of Peptide Bond

LI Jing-feng, WANG Ya-ping, BIAN Xue-feng, ZHANG Hui*, SUN Jia-ming*

Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China

[Abstract] **Objective:** To screen the active components of Bombyx Batryticatus against Parkinson's disease, and contrast the activity of Bombyx Batryticatus before and after traditional hot processing, and to compare the anti-Parkinson's disease activity and oligopeptide yield of natural oligopeptide and enzymatic oligopeptide of Bombyx Batryticatus, so as to provide reliable basis for rational development and application of Bombyx Batryticatus. **Methods:** Bombyx Batryticatus was extracted with petroleum ether, ethyl acetate, methanol and water respectively to obtain four different polar extracts. The whole components of the extracts were systematically studied using SH-SY5Y cell damage model induced by 6-hydroxydopamine(6-OHDA). The water extracts of Bombyx Batryticatus were centrifuged by ultrafiltration to obtain components larger than 10, 3-10 kDa, 1-3 and less than 1 kDa. Then the inhibition rate of acetylcholinesterase and the protective effect of SH-SY5Y cells were screened. Based on the theory of thermal oscillation of peptide bond, the activity of different components of Bombyx Batryticatus before and after processing was compared, and the activity of natural and enzymatic hydrolysis components of Bombyx Batryticatus was compared. **Result:** The water extract of Bombyx Batryticatus had stronger activity than other polar solvents, and the component less than 1 kDa had the best activity, so it was determined that the component less than 1 kDa of Bombyx Batryticatus was the active component; the oligopeptide content of the component less than 1 kDa of bran fried Bombyx Batryticatus was higher than that of raw products; The activity of enzymatic oligopeptides less than 1 kDa fraction were slightly lower than that of

[△] [基金项目] 公益性行业科研专项(201507002)

* [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
孙佳明, 教授, 研究方向: 中药有效成分与应用开发; E-mail: sun_jiaming2000@163.com

natural oligopeptides, but the yield of oligopeptides with enzymatic hydrolysis less than 1 kDa fraction was higher than that of natural oligopeptides with enzymatic hydrolysis less than 1 kDa fraction. **Conclusion:** Components less than 1 kDa are identified as effective substances of *Bombyx Batryticatus*. The processing mechanism of *Bombyx Batryticatus* is clarified based on the theory of thermal oscillation of peptide bond, which indicates that after processing, more small molecular oligopeptides are produced due to the breakage of peptide bond. The active oligopeptides with higher yield are obtained by enzymatic hydrolysis. The problem that the yield of natural oligopeptides is low and difficult to industrialize is solved, which provides a reliable basis for the development and application of *Bombyx Batryticatus*.

[**Keywords**] *Bombyx Batryticatus*; the theory of thermal oscillation of peptide bond; Parkinson; processing

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^[1]。僵蚕具有息风止痉、祛风止痛、化痰散结的功效^[2], 临床上常用于肝阳上亢、高热、痰浊、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。并且, 僵蚕的辛散之力较强, 有腥臭气味^[3,4], 患者直接服用生品会产生恶心、呕吐等反应, 故僵蚕服用前需要对其炮制来降低其腥臭味和刺激性。肽键热振荡理论认为, 动物类药材中活性肽在加热炮制过程中, 肽键的热振荡作用, 导致肽键断裂产生更多小分子肽段, 其结构发生不同程度的改变, 生理活性发生相应的变化。本文基于僵蚕的传统功效, 重点针对体外抗帕金森病作用, 依据肽键热振荡理论对僵蚕炮制前后的体外抗帕金森活性进行系统研究。

1 材料

1.1 试药

6-羟基多巴胺(6-OHDA)、维生素 C、乙酰胆碱酯酶(AchE)、石杉碱甲、5, 5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸, DTNB)、碘化硫代乙酰胆碱(ATCI)(Sigma 公司); 磷酸缓冲盐(PBS)、胎牛血清、DMEM 培养液、0.25% 胰酶(美国 Gibco 公司); 牛血清蛋白(北京鼎国昌盛生物技术有限公司); 二甲基亚砷(DMSO)、氢氧化钠(NaOH)、三氯乙酸、酒石酸钾钠($C_4O_6H_4KNa$)、硫酸铜($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)、磷酸氢二钠($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)、磷酸二氢钠($NaH_2PO_4 \cdot 12H_2O$)(北京化工有限公司); 麦麸(市售); 水为实验室自制纯化水。

僵蚕购买自吉林省百草大药房, 经长春中医药大学张辉教授鉴定为僵蚕。人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y)购买自中科院上海细胞库。

1.2 仪器

恒温加热烫板(常普天仪器制造有限公司); 红外温度检测仪(华盛昌仪器实业有限公司); KQ3200B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); SPECORD®200 PLUS 紫外可见分光光度计(德国耶拿分析仪器股份公司); HH-6 型数显恒温水浴锅(常州国华电器有限公司); GL-20G-II型低温超速离心机(上海安亭科学仪器厂); 电子天平(Sartorius); Model 680 型酶标仪(美国 BIO-RAD); DSHZ-300A 旋转式恒温振荡器(江苏太仓设备厂); GZLY-0.4 型药用真空冷冻干燥机(北京速原中天科技有限公司)。

2 方法

2.1 僵蚕样品的制备

2.1.1 僵蚕不同极性溶媒提取物的制备 僵蚕药材粉碎过三号筛, 得到药材粗粉。称取 10 g 僵蚕药材粗粉加 10 倍量(100 mL)石油醚超声提取 1 h, 过滤, 滤液 80 °C 水浴蒸干(石油醚提取物, S1); 待药渣溶剂挥发干后加 8 倍量(80 mL)乙酸乙酯超声提取 1 h, 过滤, 滤液蒸干(乙酸乙酯提取物, S2); 同上操作得到甲醇提取物(S3)、水提取物(S4)。

2.1.2 僵蚕不同组分的分离 依次使用截留量为 10、3、1 kDa 超滤离心管对僵蚕水提取液超滤, 分别收集不同分子质量的天然肽溶液, 分级为 > 10 kDa、3~10 kDa、1~3 kDa、< 1 kDa 组分, 冷冻干燥。

2.1.3 炒僵蚕的制备 称取 100 g 僵蚕, 将恒温烫板的温度设置为 180 °C, 待温度上升至所设温度时倒入 10 g 麦麸, 翻炒至麦麸起烟后, 加入称量好的僵蚕, 炒制 15 min。筛出麦麸, 将炒制好的僵蚕放凉, 粉碎过三号筛, 得到炒僵蚕样品, 备用^[3]。

2.1.4 僵蚕酶解品的制备 取僵蚕 > 10 kDa 冻干粉 5 mg 溶于蒸馏水中, 底物浓度为 3%, 100 °C 水浴加热 15 min, 待温度降至 60 °C, 置于恒温磁力搅拌

器中, 调至 pH 为 9.0, 加入酶底比为 6% 的胰蛋白酶, 水解 5 h 后迅速转入沸水浴中煮沸 15 min 灭酶, 冷却至室温, $3600 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 收集上清液冻干。

2.2 对 6-OHDA 诱导的人神经母细胞瘤细胞 (SH-SY5Y) 细胞保护作用的筛选研究

2.2.1 药物的制备 僵蚕不同极性溶媒提取物及水提取物不同组分用 DMEM 培养液溶解, 分别配成质量浓度为 0.1、0.05、0.025 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液, 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 备用。

2.2.2 SH-SY5Y 细胞培养 用含 10% 新生胎牛血清、100 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 链霉素、100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素的 DMEM 培养液, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度的培养箱中培养细胞^[5]。细胞呈贴壁生长, 待 SH-SY5Y 细胞进入对数生长期后选取生长状态良好的细胞, 用 0.25% 的胰蛋白酶消化, 使细胞从瓶壁上分离下来, 以 1:3 ~ 1:4 比例传代。当传代细胞进入对数生长期即进行实验。

2.2.3 实验方法

2.2.3.1 对 6-OHDA 损伤的 SH-SY5Y 细胞增殖率的影响实验 将对数生长期的 SH-SY5Y 细胞接种到 96 孔板, 调节细胞浓度为 1×10^4 每孔。在培养箱中培养 12 h 后, 吸出旧的培养基, 给药组每孔加入 100 μL 不同浓度的样品溶液, 空白对照组每孔加入 100 μL 完全培养基, 再置于培养箱中培养 3 h, 除去培养基, 样品组每孔加入 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 6-OHDA, 空白对照组每孔加入 100 μL DMEM 培养液^[6], 置于培养箱中培养 24 h, 每孔加 20 μL 四唑盐 (MTT)^[7] 试液 (5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, PBS 溶解), 继续于培养箱中培养 4 h, 将孔内液体吸出, 每孔加入 100 μL DMSO, 置于酶标仪振荡 10 min, 在 490 nm 波长下测定吸光度 A。

$$\text{细胞增殖率}(\%) = \frac{(A_{\text{给药组}} - A_{\text{空白对照组}})}{A_{\text{空白对照组}}} \times 100 \quad (1)$$

2.2.3.2 对 SH-SY5Y 细胞毒性实验 将生长期的 SH-SY5Y 细胞接种到 96 孔板, 调节细胞浓度为 1×10^4 每孔。在培养箱中培养 12 h, 吸出旧的培养基, 然后每孔加入 100 μL 不同浓度的样品溶液 (DMEM 培养液溶解), 空白对照组每孔加入 100 μL DMEM 培养液^[6], 置于培养箱中培养 24 h, 每孔加 20 μL MTT 试液, 继续于培养箱中培养 4 h, 将液体吸出, 每孔加入 100 μL DMSO, 置于酶标仪振荡 10 min, 在 490 nm 波长下测定吸光度 A。

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{A_{\text{给药组}}}{A_{\text{空白对照组}}} \times 100 \quad (2)$$

2.3 对抑制 AchE 活性的筛选

在 96 孔板中依次加入 40 μL 样品溶液, 80 μL PBS (0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH = 8.0), 20 μL 5, 5'-二硫代双-(2-硝基苯甲酸) (DTNB, 2.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 及 20 μL 乙酰胆碱酯酶 (AchE, 0.25 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$, pH = 8.0 PBS 溶解稀释)。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min 后, 加 20 μL 硫代乙酰胆碱 (ATCI, 1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min 后, 用酶标仪在 405 nm 下测定其吸光度^[8], 根据下式计算抑制率。

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{[(A_{\text{空白}} - A_{\text{完全抑制}}) - (A_{\text{样品}} - A_{\text{样品空白}})]}{(A_{\text{空白}} - A_{\text{完全抑制}})} \times 100 \quad (3)$$

其中, 空白组用 40 μL PBS (pH8.0) 代替 40 μL 样品溶液; 完全抑制组用 40 μL 石杉碱甲 (10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 代替 40 μL 样品溶液。样品空白组用 20 μL PBS (pH8.0) 代替 20 μL AChE (0.25 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$, pH8.0 PBS 溶解稀释)。

2.4 三氯乙酸处理法测定寡肽含量

取僵蚕样品 1 mg 溶于 1 mL 蒸馏水中, 加入 15% 三氯乙酸溶液 1 mL, 摇匀, 放置 10 min, 沉淀酸不溶性蛋白质, 置离心管中, 4000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液 1 mL 样品溶液为粗蛋白溶液^[9]。

$$\text{寡肽含量}(\%) = \frac{\text{离心上清液粗蛋白含量}}{\text{样品总蛋白含量}} \times 100 \quad (4)$$

2.5 双缩脲试剂法测定蛋白含量

2.5.1 溶液配制 双缩脲试剂: 称取 0.075 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.25 g 酒石酸钾钠, 用 25 mL 水溶解, 再加 10% NaOH 15 mL, 溶解后用水定容至 50 mL, 粗蛋白溶液见 2.4。

2.5.2 实验步骤 见表 1。

表 1 双缩脲法测定蛋白含量操作步骤

组别	试剂/mL			
	蒸馏水	牛血清蛋白 (1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	双缩脲	粗蛋白溶液
空白管	1	—	4	—
标准管	—	1	4	—
测定管	—	—	4	1

注: 一为不加任何试剂。

混匀, 放置 30 min 后, 用分光光度计在 540 nm 波长处比色, 以空白管调零点, 测定各管吸光度值。

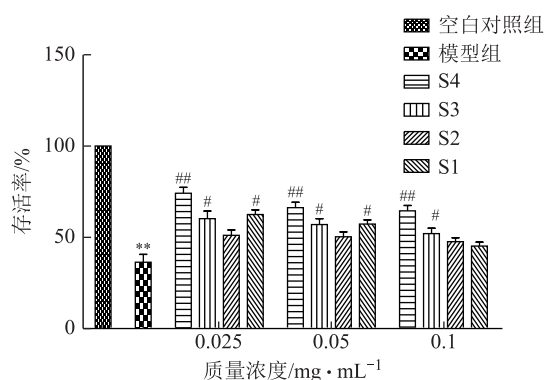
$$\text{蛋白含量}(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}) = \frac{A_{\text{测定}}}{A_{\text{标准}}} \times C_{\text{标准}} \quad (5)$$

$$\text{寡肽收率}(\%) = \frac{\text{冻干粉质量} \times \text{寡肽含量}}{\text{药材质量}} \times 100 \quad (6)$$

3 实验结果与分析

3.1 僵蚕不同极性溶媒提取物对 6-OHDA 诱导损伤的 SH-SY5Y 细胞保护作用筛选

模型组与空白对照组比较,存活率显著降低($P < 0.01$),S1 在质量浓度分别为 0.025、0.05 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,S3 在 3 个浓度下与模型组比较存活率差异有统计学意义($P < 0.05$),不同浓度 S4 对细胞保护作用与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),可见水提取物对 6-OHDA 诱导损伤的 SH-SY5Y 细胞保护作用最强,结果见图 1。



注:与空白组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$, $n = 5$ 。

图1 僵蚕不同极性溶媒提取物对 6-OHDA 诱导损伤 SH-SY5Y 细胞的保护作用

3.2 僵蚕活性组分筛选

3.2.1 僵蚕不同组分对 AchE 抑制活性的筛选 僵蚕水提取物各组分在质量浓度为 2.5 ~ 10 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时对 AchE 均有一定的抑制力,且有剂量依赖性,其抑制作用从大到小依次为: < 1 kDa、1 ~ 3 kDa、3 ~ 10 kDa、水提取物、> 10 kDa,结果见图 2。

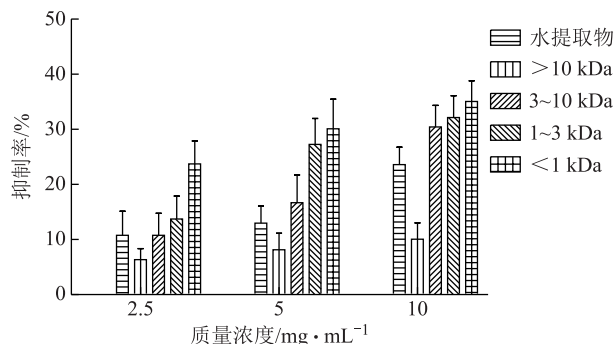
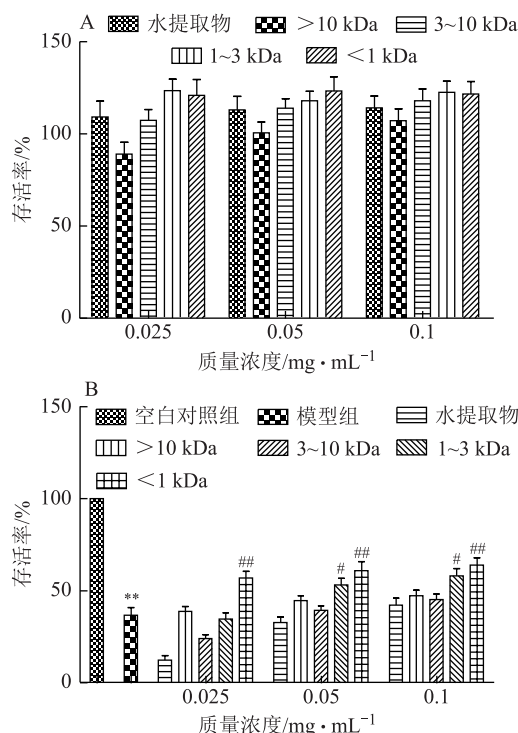


图2 僵蚕不同组分对 AchE 抑制率的影响

3.2.2 僵蚕不同组分对 6-OHDA 诱导损伤 SH-SY5Y 细胞保护作用的筛选 根据僵蚕提取物的不同组分综合考虑,除 > 10 kDa 组分在 0.025 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时有明显毒性,其他组分质量浓度在 0.025 ~ 0.1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时有明显的增殖作用,见图 3A,故将僵蚕提取物的质量浓度定在 0.025、0.05、0.1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 进行对 6-OHDA 损伤的 SH-SY5Y 细胞增殖率影响实验。模型组与空白对照组比较细胞增殖率显著性降低($P < 0.05$),与模型组比较,< 1 kDa 组分在质量浓度为 0.05 ~ 0.1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时细胞增殖率有显著性升高($P < 0.01$),1 ~ 3 kDa 组分在质量浓度为 0.05、0.1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时有显著性升高($P < 0.05$),对细胞的保护作用最强的为 < 1 kDa 组分,结果见图 3B。



注:A. 僵蚕不同组分对 SH-SY5Y 细胞的毒性实验;B. 僵蚕不同组分对 6-OHDA 损伤的 SH-SY5Y 细胞的保护作用;与空白组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$, $n = 5$ 。

图3 僵蚕不同组分对 SH-SY5Y 细胞的影响

3.3 炮制前后僵蚕毒性对比

取僵蚕 5 个不同组分分别配制成质量浓度为 0.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的样品,僵蚕 > 10 kDa 组分在 0.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度下,SH-SY5Y 细胞的存活率为 79.52%,对细胞有明显的杀伤作用;炒僵蚕 > 10 kDa 组分在 0.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度下 SH-SY5Y 细胞的存活率为 91.42%,对细胞没有明显的杀伤作用,并有一定的

增殖作用,其他组分在质量浓度为 $0.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时对SH-SY5Y细胞均无明显杀伤作用,通过在相同浓度下对细胞造成的损伤程度比较,结果表明,僵蚕经过炮制后毒性降低,符合炮制使其减毒的目的,实验结果见图4。

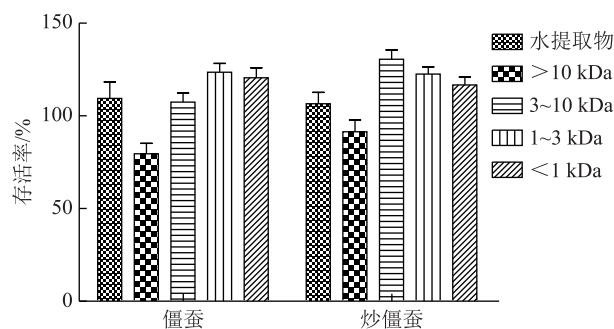
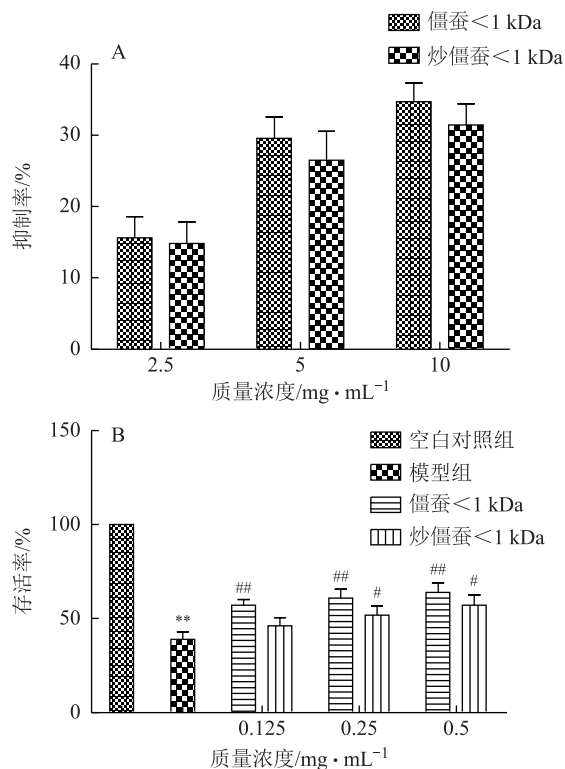


图4 僵蚕与炒僵蚕对SH-SY5Y细胞毒性实验

3.4 炮制前后僵蚕<1 kDa组分活性对比

僵蚕及炒僵蚕<1 kDa组分在质量浓度为 $2.5\sim 10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,对AChE有一定的抑制作用。相同浓度下僵蚕寡肽对AChE的抑制率略高于炒僵蚕寡肽,结果见图5A。僵蚕对SH-SY5Y保护作用实验中,



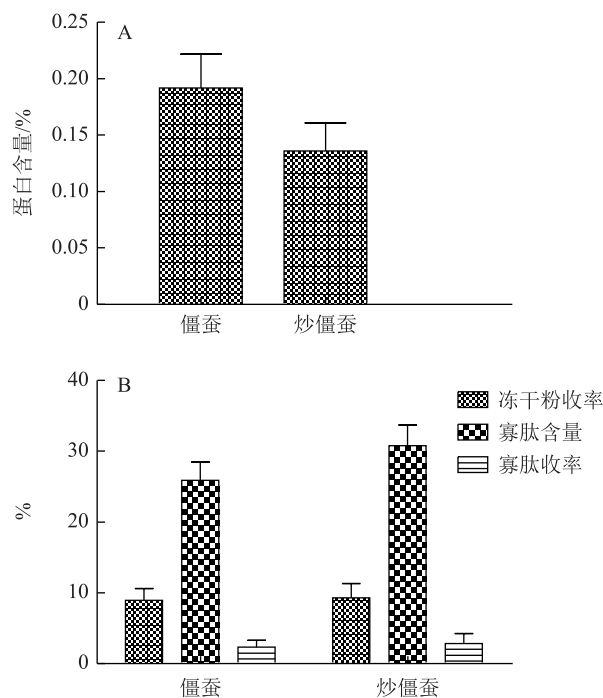
注: A. 僵蚕及炒僵蚕寡肽对AChE的抑制率; B. 僵蚕及炒僵蚕寡肽对6-OHDA诱导的SH-SY5Y细胞保护作用;与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$, $n=5$ 。

图5 僵蚕炮制前后不同组分对SH-SY5Y细胞的影响

与空白对照组比较,模型组细胞增殖率显著降低($P<0.01$),与模型组比较,僵蚕<1 kDa组分在质量浓度为 $0.125\sim 0.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时对损伤SY5Y细胞有显著的增殖作用($P<0.01$),在质量浓度为 $0.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时有增殖率最大,达到63.95%;炒僵蚕<1 kDa组分在质量浓度为 $0.25\sim 0.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时对损伤SY5Y细胞有显著的增殖作用($P<0.05$),综上所述,炒僵蚕<1 kDa组分对细胞的保护作用弱于僵蚕,结果见图5B。

3.5 炮制前后僵蚕寡肽含量的对比

分别对僵蚕炮制前后总提取物蛋白含量及<1 kDa组分寡肽含量进行比较,僵蚕炮制后蛋白含量降低,但炒僵蚕<1 kDa组分的寡肽含量及收率均高于僵蚕,推测原因可能是经过肽键热振荡作用使蛋白质的肽键发生断裂,生成小分子肽段,炮制后活性下降可能是>10 kDa蛋白含量下降和<1 kDa寡肽含量升高的综合作用结果。



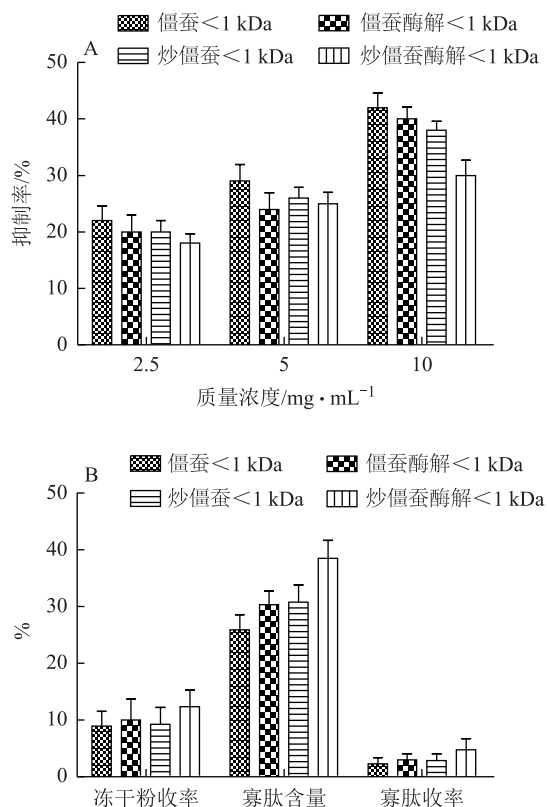
注: A. 炮制前后蛋白含量对比; B. 炮制前后寡肽收率比较。

图6 僵蚕炮制前后蛋白含量、寡肽收率的比较

3.6 炮制前后僵蚕天然与酶解<1 kDa组分活性及寡肽含量对比

炮制前后僵蚕天然与酶解<1 kDa组分质量浓度为 $2.5\sim 10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,随着浓度的增加对AChE的抑制率随之增加,在相同浓度下进行对

比,天然<1 kDa组分对AChE的抑制率强于酶解<1 kDa组分,但差别不大,结果见图7A。炮制前后僵蚕天然<1 kDa组分的活性均高于酶解<1 kDa组分,但酶解寡肽的收率高于天然寡肽,僵蚕酶解寡肽为天然寡肽的1.31倍,炒僵蚕酶解寡肽收率为天然寡肽的1.67倍,结果见图7B。



注: A. 炮制前后僵蚕天然与酶解<1 kDa组分对AChE的抑制率影响; B. 炮制前后天然寡肽与酶解寡肽含量对比。

图7 僵蚕炮制前后天然与酶解<1 kDa组分活性及寡肽含量比较

4 讨论

僵蚕是一种虫类动物药,研究多集中在僵蚕品质、炮制工艺等方面^[10-12],对其活性研究较少。其具有息风止痉、祛风止痛、化痰散结的功效,结合相关症状,有文献报道^[13-14]僵蚕与其他中药配伍治疗帕金森的经验,为了进一步研究僵蚕治疗帕金森疾病的物质基础,本文筛选了僵蚕体外抗帕金森的活性部位。

6-OHDA诱导体外细胞SH-SY5Y损伤模型最常

用于帕金森(PD)的发病机制和药物疗效的研究^[15-19]。细胞凋亡被认为是帕金森病病理机制中神经元死亡的病因之一,AChE可以在胆碱能神经突触部位和神经肌肉接头终止胆碱能神经信号的传递,并且在诱导各种类型的细胞系凋亡的过程中,都有AChE的表达增加,提示AChE可能参与了PD发病过程中的神经元凋亡。故本文应用上述两个指标来筛选活性成分^[20-22]。

为了筛选僵蚕治疗帕金森病活性组分,本文应用6-OHDA诱导的SH-SY5Y细胞损伤模型对其全成分(僵蚕不同极性溶媒提取物)进行系统研究,经活性筛选表明,其水提取物活性最强。进而根据不同分子量对僵蚕水提取物进行分析,结果表明,5个组分中的活性最强的为<1 kDa组分。

本文基于肽键热振荡理论对僵蚕炮制前后的化学成分与毒性、活性变化规律进行研究。结果表明,僵蚕麸炒后,总蛋白含量下降,总寡肽含量升高,表明经肽键热振荡作用肽键断裂,产生了更多的寡肽成分,且僵蚕>10 kDa组分对SH-SY5Y细胞具有抑制增殖作用,但炒僵蚕>10 kDa组分对SH-SY5Y无明显抑制增殖作用。说明炮制后毒性降低,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。将天然与酶解<1 kDa组分进行AChE抑制及寡肽收率方面进行比较。实验结果表明,天然寡肽的活性略强于酶解寡肽,但酶解寡肽的收率要高于天然寡肽,在工业上酶解寡肽可代替天然寡肽。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:375.
- [2] 程锁明,李国玉,王航宇,等. 白僵蚕化学成分的基础研究[J]. 中国现代中药,2013,15(7):544-547.
- [3] 胡美变. 麸炒僵蚕的炮制工艺规范化及质量相关研究[D]. 成都:成都中医药大学,2017.
- [4] 马莉,王玄,马琳,等. 动物药僵蚕高温麸炒的科学合理性[J]. 中国中药杂志,2015,40(23):4629-4633.
- [5] 田明秀,常明,朱本清,等. 多巴胺诱导SH-SY5Y细胞帕金森病模型中GRP78的表达[J]. 吉林大学学报(医学版),2010,36(1):76-80,216.
- [6] 胡雅琼. 茶叶提取物对6-OHDA诱导的SH-SY5Y细胞保护作用[D]. 重庆:西南大学,2014.

- [7] 秦婷婷,唐东平. MTT 方法体外应用新进展[J]. 现代肿瘤医学,2008,16(10):1835-1837.
- [8] 任晋. 药用植物中乙酰胆碱酯酶和单胺氧化酶抑制剂的筛选[D]. 兰州:兰州理工大学,2012.
- [9] 张俊,吕小东,于伟,等. 水解珠蛋白粉中寡肽含量及分子量分布的测定方法研究[J]. 饲料与畜牧,2013(5):53-55.
- [10] 石莉,赵焯清,欧阳臻,等. 僵蚕药材商品规格等级标准研究[J]. 时珍国医国药,2018,29(12):3015-3018.
- [11] 邢东旭,杨琼,廖森泰,等. HPLC 指纹图谱法评价市售僵蚕的品质[J]. 蚕业科学,2018,44(5):810-814.
- [12] 石莉. 僵蚕药材商品规格等级标准及 ACE 抑制肽的研究[D]. 镇江:江苏大学,2018.
- [13] 张丽萍,陆佳宁,李婷,等. 裘昌林运用角药治疗帕金森病经验[J]. 中医杂志,2018,59(23):1996-1999.
- [14] 张改,沈晓明,马云枝. 马云枝教授从肝辨治帕金森病经验简析[J]. 中医药学报,2016,44(3):86-88.
- [15] 潘燕. MeCP2、TH 蛋白在正常 SH-SY5Y 细胞和帕金森病细胞模型中的表达及其意义研究[J]. 国际检验医学杂志,2018,39(5):526-529.
- [16] XICOY H, WIERINGA B, MARTENS G. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review[J]. Mol Neurodegener, 2017, 12(1):10.
- [17] CHU J F, HAN W. Punicalagin Exerts Beneficial Functions in 6-Hydroxydopamine-Treated SH-SY5Y Cells by Attenuating Mitochondrial Dysfunction and Inflammatory Responses[J]. Med Sci Monit, 2018, 24:5905-5913.
- [18] 王胜男,王少男,蔺明焮,等. 甘松对 6-OHDA 诱导 SH-SY5Y 细胞损伤的保护作用及成分分析[J]. 环球中医药,2018,11(5):645-650.
- [19] 崔宁珊. 刺参多糖对 6-OHDA 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤的保护作用及机制研究[D]. 济南:山东大学,2016.
- [20] 张雪瑾. 乙酰胆碱酯酶的表达对帕金森病及细胞周期的影响[D]. 北京:中国科学院大学,2013.
- [21] 姜玉艳,尹雅芙,罗晓光,等. 烟碱型乙酰胆碱受体在帕金森病认知功能障碍中的作用[J]. 中国临床医学影像杂志,2014,25(12):887-889.
- [22] 杨彭,黄健,韩敏,等. 石杉碱甲对帕金森病模型大鼠乙酰胆碱酯酶及 ATP 酶活性的影响[J]. 重庆医学,2017,46(22):3132-3135.

(收稿日期: 2019-02-15 编辑: 王笑辉)