

· 基础研究 ·

不同产地鸦胆子球蛋白源生物肽体外
抗黑色素瘤活性研究[△]王惠芸¹, 陈佩瑶¹, 欧阳雨晴¹, 王冬^{2*}, 王灵芝^{1*}

1. 北京中医药大学 生命科学学院, 北京 100029; 2. 北京中医药大学 中医学院, 北京 100029

[摘要] 目的: 比较不同产地鸦胆子的主成分和球蛋白含量, 进而分析各产地鸦胆子球蛋白酶解物对人源恶性黑色素瘤细胞 A375 的细胞毒性。方法: 收集广东、广西、云南和福建 4 个产地鸦胆子, 分别采用凯氏定氮法、旋光法、索氏提取法、烘干法、马弗炉法测定其蛋白质、淀粉、粗脂肪、水分和灰分含量。胃蛋白酶水解鸦胆子球蛋白, 经超滤后收集滤过液, MTT 法测定多肽组分对人源恶性黑色素瘤细胞 A375 的细胞毒性。结果: 4 个产地鸦胆子各成分存在显著差异, 淀粉质量分数均在 45% 以上, 粗脂肪质量分数为 14.88% ~ 22.10%, 水分和灰分含量均符合《中华人民共和国药典》(2015 版) 规定; 蛋白质质量分数以广西产地最高, 为 17.23%; 福建产地最低, 为 12.61%。广西产地鸦胆子球蛋白含量为 $1.12 \text{ mg} \cdot (100 \text{ mg})^{-1}$, 占总蛋白的 6.52%, 显著高于其他产地。4 个产地鸦胆子球蛋白源小分子肽作用于 A375 细胞 72 h 后, 最小半数抑制浓度 (IC_{50}) 值分别为 8.16、5.54、8.34、2.78 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。结论: 不同产地对鸦胆子蛋白质含量存在一定影响, 且球蛋白源生物肽均具有显著体外抗黑色素瘤活性。

[关键词] 鸦胆子; 球蛋白; 黑色素瘤; 细胞毒性; 产地

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2020)01-0041-06

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20190409007

In vitro Anti-melanoma Activity of Peptides Derived from *Brucea javanica* Globulin in Different AreasWANG Hui-yun¹, CHEN Pei-yao¹, OUYANG Yu-qing¹, WANG Dong^{2*}, WANG Ling-zhi^{1*}

1. Beijing University of Chinese Medicine, School of Life Sciences, Beijing 100029, China;

2. Beijing University of Chinese Medicine, School of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

[Abstracts] **Objective:** To compare the principal components and globulin content of *Brucea javanica* from different producing areas and then analyze the cytotoxicity of globulin hydrolysate to human melanoma cell line A375 cells. **Methods:** *B. javanica* seeds was collected from Guangdong, Guangxi, Yunnan and Fujian province. Kjeldahl method, polarimetry method, Soxhlet extraction method, drying method and muffle furnace method were applied to determinate the protein, starch, crude fat, water and ash content, respectively. Globulin was digested by pepsin and then the hydrolysate was fractioned by using ultrafiltration membrane with 3 kDa molecular weight cut-off to collect the filtered solution. Finally the cytotoxicity of polypeptides against A375 cells was evaluated by MTT method. **Results:** For the principal components, significant difference was detected among *B. javanica* species from four areas. The starch contents were all above 45% and the crude fat content ranged from 14.88% to 22.10%. The water and ash content were in accord with *Pharmacopoeia of the People's Republic of China* (ChP, 2015 edition). The highest protein content of *B. javanica* was samples from Guangxi province accounting for 17.23%, while the lowest was 12.61% for the one from Fujian. The *B. javanica* globulin content from Guangxi was $1.12 \text{ mg} \cdot (100 \text{ mg})^{-1}$ accounting for 6.52% of total protein content, which was significantly higher than that of the other samples. The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values of small molecular peptides of globulin from Guangdong, Guangxi, Yunnan and Fujian regions on A375 cells were 8.16, 5.54, 8.34, 2.78 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. **Conclusion:** Origins had certain effect on protein content of *B. javanica* and bioactive peptides of *B. javanica* globulin existed certain anti-melanoma activity *in vitro*.

[Keywords] *Brucea javanica*; globulin; melanoma; cytotoxicity; producing areas

[△] [基金项目] 北京中医药大学青年教师项目(2018-JYB-JS005); 国家自然科学基金项目(81872972)

* [通信作者] 王冬, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 经方应用规律及机理研究; E-mail: wangdong_0701@126.com
王灵芝, 博士, 副研究员, 研究方向: 中药活性蛋白及多肽的功能研究; E-mail: wanglz@bucm.edu.cn

鸦胆子是苦木科植物鸦胆子属鸦胆子 *Brucea javanica* (L.) Merr. 的干燥成熟果实, 味苦, 性寒, 有小毒, 归大肠、肝经, 具有清热解毒、治疟、治瘰等功效, 主产于广东、广西、云南、福建等地^[1]。抗肿瘤是鸦胆子最显著的药理作用之一, 其中鸦胆子油及苦木内酯类化合物为重要有效成分^[2-3], 目前鸦胆子油已广泛应用于胃癌^[4]、非小细胞肺癌^[5]、宫颈癌^[6]、大肠癌^[7]、肝癌^[8]等疾病的治疗。生物肽在体内发挥着重要的生理调节作用, 肽类药物具有分子量小、对肿瘤敏感、成本低等传统化疗药物和大分子抗体药物所不具备的特点, 因而成为近年来国内外研究热点^[9]。该类物质可通过免疫调节、抑制肿瘤血管生成、促进细胞凋亡、影响细胞周期、抑制细胞内信号传导等机制来发挥抗肿瘤作用^[10]。课题组前期研究表明鸦胆子球蛋白源生物肽可抑制乳腺癌细胞 MCF-7 增殖^[11]。不同地理位置、气候条件等对中药材质量和功效均有一定程度的影响, 产地对鸦胆子蛋白质品质及相关药理作用是否存在影响, 尚未见详细报道, 本研究拟对其进行系统研究, 并对其球蛋白源小分子肽的细胞毒性进行评价。

1 材料与仪器

1.1 材料

鸦胆子分别采购自广东、广西、云南、福建 4 个产地, 产地信息见表 1, 经北京中医药大学刘春生教授鉴定为苦木科鸦胆子属植物鸦胆子 *Brucea javanica* (L.) Merr. 的干燥成熟果实。

表 1 不同产地鸦胆子来源

样品编号	产地	采购地
1	广东	北京同仁堂望京药店
2	广西	北京同仁堂望京药店
3	云南	亳州润鼎药业销售有限公司
4	福建	广东亿凡星医药科技有限公司

1.2 试剂

胃蛋白酶 (批号: 101644990, Sigma); DMEM 培养基 (批号: 1830761, Gibco); FBS (批号: 9080763, Vistech); 双抗 (批号: 30002283, Corning); 蛋白质标准品 (批号: 00544005, 普科利莱)。所有化学试剂均为分析纯。

1.3 仪器

FW-100 型高速万能粉碎机 (天津泰斯特仪器有

限公司); BP221S 型电子分析天平 (Sartorius 公司); 全自动旋光仪 (美国鲁道夫公司); TGL-20M 型台式高速冷冻离心机 (上海卢湘仪离心机仪器有限公司); GTR10-2 型高速冷冻离心机 (北京时代北利离心机有限公司); DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器 (巩义市予华仪器有限责任公司); FD-50 冷冻干燥机 (上海比朗仪器制造有限公司); DL-CJ-1N 高性能无菌工作台 (北京东联哈尔仪器制造有限公司); MCO-18AIC (UV) CO₂ 培养箱 (日本 SANYO 公司); Epoch 酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司); TE2000-S 倒置显微镜 (日本 NIKON 公司)。

2 方法

2.1 鸦胆子主成分含量测定

2.1.1 蛋白质含量和纯度测定 采用凯氏定氮法^{[12]96}: 不同产地的鸦胆子粉碎后, 过四号筛。精密称定鸦胆子粉末或量取蛋白溶液于凯氏烧瓶中, 依次加入浓硫酸和催化剂进行消化直至终点, 消化液定容后, 取适量溶液进行蒸馏, 进而用 0.005 mol·L⁻¹ 的硫酸滴定。按公式 (1) (2) 根据滴定所用硫酸量计算蛋白质含量。每个样品重复 3 次。

$$\text{固体样品中蛋白含量} = \frac{(A - B) \times 0.14 \times 6.25 \times N}{C \times 1000} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{液体样品中蛋白含量} [\text{mg} \cdot (100 \text{ mg})^{-1}] = \frac{(A - B) \times 0.14 \times 6.25 \times N}{C} \quad (2)$$

式中: A 为滴定样品所用稀硫酸的体积 (mL); B 为滴定空白样品所用稀硫酸的体积 (mL); N 为样品的稀释倍数; C 为粉末样品的质量 (g)。

2.1.2 水分含量测定 采用烘干法^{[12]103}: 称取 (2.00 ± 0.01) g 样品平铺于干燥至恒质量的称量瓶 (质量记为 m₀) 中, 精确称量其质量记为 m₁, 开口放置于 105 °C 的烘箱内 5 h, 取出冷却后称质量记为 m₂, 再次放入烘箱中重复上述步骤, 直至连续 2 次称量的质量相差不超过 0.005 g。每个样品重复 3 次。

$$\text{水分含量} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100\% \quad (3)$$

2.1.3 灰分含量测定 采用马弗炉法^{[12]105}: 精确称取样品平铺于干燥坩埚 (质量 m₀) 中, 精确称量其质量 m₁, 置于马弗炉内, 500 ~ 600 °C 使样品完全炭化, 取出冷却, 称量其质量 m₂, 再次放入马弗炉内至恒质量。

$$\text{灰分含量} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100\% \quad (4)$$

2.1.4 粗脂肪含量测定 采用索氏提取法^[13]: 精确称取样品放置于干燥滤纸筒(质量记为 m_0)内, 称质量(记为 m_1)后放入索氏提取器内, 石油醚回流 8~10 h, 烘干称质量(记为 m_2)。每个样品平行 3 份, 根据所得数据计算粗脂肪含量。

$$\text{粗脂肪含量} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100\% \quad (5)$$

2.1.5 淀粉含量测定 采用旋光法^[14]: 精确称取 3 份样品, 分多次加入 2.1 mL 稀盐酸($0.309 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 沸水浴加热 15 min, 冷却后, 依次加入亚铁氰化钾和醋酸锌溶液, 摇匀后定容过滤, 测定溶液旋光值 α_1 。另称取 3 份样品, 加入 40% 的乙醇室温放置 1 h, 定容后过滤, 取 50 mL 滤液加稀盐酸($7.7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 再依次加入亚铁氰化钾和醋酸锌溶液, 摇匀后定容过滤, 测定溶液旋光值 α_2 。样品淀粉含量见公式(6)。

$$\text{样品淀粉含量} = \frac{2000}{\alpha_D^{20}} \times \left(\frac{2.5\alpha_1}{m_1} - \frac{5\alpha_2}{m_2} \right) \times \frac{100\%}{\omega_1} \quad (6)$$

式中: m_1 为第 1 次称取的鸭胆子粉末的质量(g); m_2 为第 2 次称取的鸭胆子粉末的质量(g); α_D^{20} 为纯淀粉在 589.3 nm 波长下测得的比旋光度; ω_1 为样品中干物质质量分数(%), $\omega_1 = 100 - \omega_0$ (样品的水分含量)。

2.2 鸭胆子球蛋白提取

鸭胆子球蛋白提取方法参考文献[15]等。药材用双蒸水 4 ℃ 振荡 1 h, 4 ℃ $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心(离心半径 5 cm) 30 min, 弃上清液, 重复操作 1 次; 再加入 5% NaCl 溶液于 4 ℃ 振荡 1 h, $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min 获得鸭胆子球蛋白提取液, 重复操作 1 次, 合并 2 次提取液; 球蛋白提取液经布氏漏斗过滤后, 4 ℃ 透析(MWCO = 3 kDa) 24 h, 期间每 4 h 换 1 次水, 蛋白溶液冷冻干燥后备用。

2.3 SDS-PAGE 电泳

采用垂直不连续体系^[16]: 分离胶浓度为 12%, 浓缩胶浓度为 5%。蛋白样品溶液加入适量上样缓冲液后, 沸水浴变性 5 min, 冰浴 10 min, 上样量为 20 μg , 室温恒压电泳; 考马斯亮蓝 R-250 染色。

2.4 鸭胆子小分子肽($\leq 3 \text{ kDa}$)的制备

参考文献[17]将 4 个产地的鸭胆子球蛋白分别用胃蛋白酶进行水解(底物浓度 1%, 酶与底物浓度

比 1:10, 酶解液 pH = 2.0, 37 ℃), 酶解 48 h 后, 100 ℃ 水浴 5 min 以终止反应, 随即冰浴 10 min, 于 4 ℃, $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、离心(离心半径为 5 cm) 20 min, 取上清液并转移至超滤管(MWCO = 3 kDa)中, $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、4 ℃ 下超滤离心, 收集滤过液冷冻干燥。

2.5 鸭胆子小分子肽对 A375 的增殖抑制作用

取对数生长期的入源恶性黑色素瘤细胞 A375, 经胰酶消化后, 使其成均匀单细胞悬浮态, 调整细胞密度为 2×10^4 个/mL, 按 100 μL /孔接种于 96 孔细胞培养板, 放置于 CO_2 培养箱中培养 24 h 后弃去旧培养基, 给药组分别加入 150 μL 受试样品(质量浓度为 1、2、4、8、16 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 阴性对照组加入完全培养基。培养 72 h 后弃去培养基, 加入 100 μL MTT, 培养箱中孵育 4 h, 弃上清液, 加入二甲基亚砜(DMSO), 于 570 nm 处测定吸光值(A), 计算细胞增殖抑制率。

抑制率 =

$$\left(1 - \frac{\text{实验组平均 A 值} - \text{空白组平均 A 值}}{\text{阴性对照组平均 A 值} - \text{空白组平均 A 值}} \right) \times 100\% \quad (7)$$

2.6 数据分析

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析, 数据均用($\bar{x} \pm s$)表示, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 不同产地鸭胆子主成分含量比较

4 个产地鸭胆子主成分含量如表 2 所示。各产地鸭胆子蛋白质含量存在显著差异, 广西产地质量分数最高, 为 17.23%; 其次是云南产地, 为 14.20%; 福建和广东产地鸭胆子蛋白质量分数分别为 13.20% 和 12.61%。粗脂肪质量分数中, 广西产地最高, 为 22.10%, 广东产地质量分数最低, 仅占 14.88%。淀粉质量分数中, 广西产地最低, 为 46.73%, 广东产地最高, 为 56.41%。水分均不超过 10%, 总灰分均不超过 6.5%, 均符合《中华人民共和国药典》规定。

3.2 不同产地鸭胆子球蛋白含量比较

不同产地鸭胆子球蛋白含量及纯度结果见表 3。广西产地鸭胆子质量分数最高, 为 $1.12 \text{ mg} \cdot (100 \text{ mg})^{-1}$,

表 2 不同产地鸦胆子检查项目比较($\bar{x} \pm s, n = 3$)

产地	蛋白质	水分	灰分	粗脂肪	淀粉
广东	12.61 ± 0.29 ^d	7.76 ± 0.04 ^a	5.97 ± 0.05 ^a	14.88 ± 0.11 ^c	56.41 ± 2.07 ^a
广西	17.23 ± 0.05 ^a	6.84 ± 0.00 ^c	4.92 ± 0.03 ^c	22.10 ± 0.06 ^a	46.73 ± 3.00 ^d
云南	14.20 ± 0.04 ^b	6.69 ± 0.03 ^d	4.87 ± 0.05 ^c	20.20 ± 0.37 ^b	52.49 ± 1.63 ^b
福建	13.20 ± 0.30 ^c	7.53 ± 0.03 ^b	5.35 ± 0.07 ^b	21.84 ± 0.33 ^a	50.09 ± 0.72 ^c

注：同一列不同字母表示差异有统计学意义($P < 0.05$)；下同。

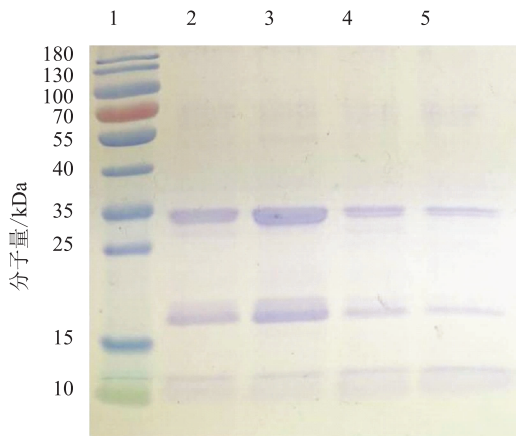
表 3 不同产地鸦胆子球蛋白含量($\bar{x} \pm s, n = 3$)

产地	质量分数/ $\text{mg} \cdot (100 \text{ mg})^{-1}$	占总蛋白 百分比/%	纯度/%
广东	0.34 ± 0.01 ^d	2.63 ± 0.04 ^c	94.56 ± 0.44 ^b
广西	1.12 ± 0.01 ^a	6.52 ± 0.03 ^a	96.58 ± 0.28 ^a
云南	0.58 ± 0.01 ^b	4.07 ± 0.06 ^b	87.03 ± 0.50 ^d
福建	0.54 ± 0.01 ^c	4.06 ± 0.04 ^b	90.21 ± 0.14 ^c

占总蛋白的 6.52%，显著高于其他 3 个产地鸦胆子($P < 0.05$)。同时，广西鸦胆子球蛋白纯度最高，为 96.58%，其次是广东、福建和云南，蛋白纯度依次为 94.56%、90.21% 和 87.03%，且差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3.3 不同产地鸦胆子球蛋白分子量分布

不同产地鸦胆子球蛋白电泳图谱如图 1 所示。产地对鸦胆子球蛋白条带分布未造成明显影响，主要分布在 33、19、11 kDa 附近，但不同产地蛋白条带丰度略有不同。



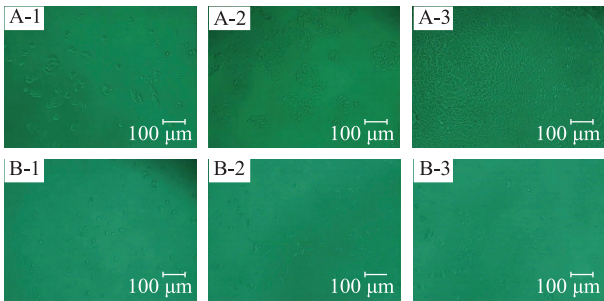
注：1. 标准蛋白；2. 广东产地；3. 广西产地；4. 云南产地；5. 福建产地。

图 1 不同产地鸦胆子球蛋白电泳图

3.4 不同产地鸦胆子小分子肽细胞毒性研究

不同产地的鸦胆子小分子肽作用于 A375 细胞，均呈现出一定的增殖抑制作用，且随着作用

时间的延长细胞数目逐渐减少，细胞均呈现出皱缩变圆、细胞膜破裂、细胞碎片增加的现象(见图 2)，而阴性对照组细胞数目随时间呈现正常增长趋势。



注：A. 阴性对照组；B. 广西产地鸦胆子球蛋白小分子肽给药组；1. 给药后 24 h；2. 给药后 48 h；3. 给药后 72 h；各组给药质量浓度均为 $8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

图 2 鸦胆子球蛋白小分子肽作用于 A375 细胞的形态学观察

不同产地鸦胆子球蛋白源小分子肽对人源恶性黑色素瘤 A375 细胞的增殖抑制率见图 3。结果表明，鸦胆子生物肽对 A375 细胞均呈现一定的增殖抑制作用，且呈时间依赖性和剂量依赖性。以广西产地鸦胆子生物肽为例，当药物质量浓度为 $4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时，给药 24、48、72 h 后，药物对 A375 细胞的抑制率分别为 19.29%、26.14%、41.01%，呈时间依赖性；当药物作用时间为 48 h 时，随着药物浓度的增加，对 A375 细胞的抑制率分别为 3.96%、8.48%、26.14%、48.98%、68.07%，呈递增趋势。

4 产地小分子肽作用细胞 72 h 后，计算其最小半数抑制浓度(IC_{50})值，由表 4 可知，福建产地的 IC_{50} 值最低，为 $2.78 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($P < 0.05$)，其次是广西产地($5.54 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)，云南和广东产地的 IC_{50} 值较高，分别为 8.34 、 $8.16 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，说明福建和广西产地的鸦胆子球蛋白酶解物对人源恶性黑色素瘤

细胞 A375 的细胞毒性较其他 2 个产地强。

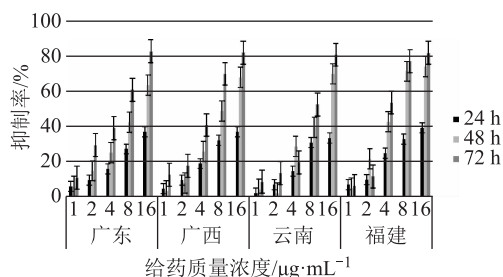


图3 不同产地质量浓度鸭胆子球蛋白小分子肽对 A375 细胞的增殖抑制率

表4 不同产地鸭胆子球蛋白小分子肽对 A375 细胞的半抑制浓度 (IC_{50})

产地	$IC_{50}/\mu g \cdot mL^{-1}$
广东	8.16 ± 0.01^c
广西	5.54 ± 0.03^b
云南	8.34 ± 0.04^c
福建	2.78 ± 0.03^a

4 讨论

黑色素瘤具有恶性程度高、转移早且广泛等特点,目前该病临床常用的药物治疗方法主要有干扰素、分子靶向和免疫治疗等,但均存在一定缺陷,如易产生耐药性^[18]、延迟反应等,且获益者有限^[19]。因此,寻找新型高效低毒抗黑色素瘤药物亟待解决。

生物肽是由少于 100 个的氨基酸通过肽键连接形成的、相对分子质量低于 10 000、对生命活动有益或具有一定生理活性的化合物^[20],可以通过酶解法、发酵法和化学合成法等来制备。目前已从多种动植物中获得抗肿瘤肽。Kannan 等^[21]从米糠中分离得到五肽 Glu-Gln-Arg-Pro-Arg 具有抑制结肠癌、乳腺癌、肺癌和肝癌细胞生长的作用。Wang 等^[22]从油菜籽制备得到的多肽 Trp-Thr-Pro 可引起 HepG2 细胞凋亡。Wang 等^[23]酶解牡蛎得到的多肽组分对 S180 荷瘤小鼠的抑瘤率可达 48%。Su 等^[24]等从山羊脾脏中分离得到的抗癌活性肽 (ACBP) 通过阻滞细胞周期和细胞凋亡信号通路抑制人胃癌细胞 (BGC-823) 生长。

产地对有效成分含量及药效有着重要影响。孙向阳等^[25]研究表明,不同产地黄芪的解热抗炎作用存在差异;刘英等^[26]研究表明云南不同产地人参皂苷总含量差异较大;罗宇东等^[27]比较了广西不同产地的滕苦参强心苷含量,发现钦州八寨沟产地含量

最高;卢聪^[28]等研究结果表明不同产地人参蛋白表达具有显著性差异,且与产地纬度相关。中药材中大分子的药效及物质基础逐渐引起科研工作者重视。本研究对不同产地鸭胆子蛋白质含量和小分子肽细胞毒活性进行了深入研究,结果显示广西产地鸭胆子总蛋白和球蛋白含量最高;且其小分子肽对人源恶性黑色素瘤细胞 A375 的增殖抑制作用仅次于福建产地,从而为该药的质量标准制定和临床应用提供进一步理论依据,也为恶性黑色素瘤药物的研发提供了新的候选材料。

参考文献

- [1] 赵学敏.本草纲目拾遗[M].北京:人民卫生出版社,1983:80.
- [2] 马青松,庞玉新,杨全,等.鸭胆子的药理作用和抗肿瘤机制研究进展[J].贵州农业科学,2015,43(2):137-140.
- [3] ZHAO L, LI C, ZHANG Y, et al. Phytochemical and Biological Activities of an Anticancer Plant Medicine: *Brucea javanica* [J]. Anti-Cancer Agent Me, 2014, 14 (3): 440-458.
- [4] 周九鹏,杨海霞.鸭胆子油乳注射液联合化疗治疗晚期胃癌的疗效及安全性 Meta 分析[J].中国中药杂志,2016,41(2):326-332.
- [5] 田丽,王翠英.鸭胆子油乳注射液联合 GP 方案治疗晚期非小细胞肺癌临床研究[J].中医学报,2017,32(3):339-341.
- [6] 刘凤勤,李丹,刘芳.鸭胆子油乳注射液对老年宫颈癌术后放疗患者细胞免疫功能的影响[J].中国老年学杂志,2015,35(9):2429-2431.
- [7] 刘梦琰,孙健,黄新恩,等.鸭胆子油乳注射液对大肠癌患者的临床疗效及可能机制研究[J].中药材,2016,39(11):2640-2642.
- [8] 刘应生,白钰,吕书勤,等.鸭胆子油乳联合 TACE 治疗中晚期原发性肝癌疗效和安全性 Meta 分析[J].中国中西医结合杂志,2017,37(9):1063-1068.
- [9] CHALAMAIAH M, YU W L, WU J P. Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins A review[J]. Food Chem, 2018, 245:205-222.
- [10] 陈泽锋,白丽.抗肿瘤多肽类药物的来源及其机制的研究进展[J].免疫学杂志,2018,34(12):1099-1104.
- [11] 冀会方,刘露,李开,等.鸭胆子蛋白质组成分析及其酶解物细胞毒性研究[J].中国中药杂志,2016,41(22):4210-4215.
- [12] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[M].北京:中国医药科技出版社,2015.
- [13] 龚正波.索氏测粗脂肪的两种改进方法[J].饲料与畜

- 牧,2017(19):59-60.
- [14] 卢林,段彬伍.旋光法测定大米淀粉含量的改进研究[J].中国稻米,2011,17(1):25-27.
- [15] 冀会方. 鸭胆子生物肽的分离纯化及其对人乳腺癌细胞MCF-7作用机制研究[D]. 北京:北京中医药大学,2017.
- [16] KRIZKOVA S,DOSTALOVA S,MICHALEK P,et al. SDS-PAGE as a Tool for hydrodynamic diameter-dependent separation of quantum dots[J]. Chromatographia,2015,78(11/12):785-793.
- [17] LI L L,LI B,JI H F,et al. Immunomodulatory activity of small molecular (≤ 3 kDa) Coix glutelin enzymatic hydrolysate[J]. CYTA-J FOOD,2017,15(1):1-8.
- [18] 文博,谭谦. 皮肤黑色素瘤一线治疗研究进展[J]. 东南大学学报(医学版),2018,37(3):524-529.
- [19] 任宇,刘宝瑞,邹征云. 晚期恶性黑色素瘤的靶向及免疫治疗研究进展[J]. 现代肿瘤医学,2018,26(12):1970-1974.
- [20] 周诗,胡慧媛,郝丽英. 多肽类药物在心血管疾病中作用的研究进展[J]. 生理科学进展,2017,48(6):428-434.
- [21] KANNAN A,HETTIARACHCHY N S,LAY J O,et al. Human cancer cell proliferation inhibition by a pentapeptide isolated and characterized from rice bran[J]. Peptides,2010,31(9):1629-1634.
- [22] WANG L,ZHANG J,YUAN Q,et al. Separation and purification of anti-tumor peptide from rapeseed (*Brassica campestris* L.) and the effect on cell apoptosis[J]. Food & Function,2016,7(5):2239-2248.
- [23] WANG Y K,HE H LU,WANG G F,et al. Oyster (*Crassostrea gigas*) hydrolysates produced on a plant scale have antitumor activity and immunostimulating effects in BALB/c mice[J]. Marine Drugs,2010,8(2):255-268.
- [24] SU L,XU G,SHEN J,et al. Anticancer bioactive peptide suppresses human gastric cancer growth through modulation of apoptosis and the cell cycle[J]. ONCOL REP,2010,23(1):3.
- [25] 孙向阳,罗小明,王琳萍. 甘肃不同产地甘肃黄芩解热、抗炎的研究[J]. 中医研究,2018,31(7):70-73.
- [26] 刘英,崔秀明,杨野,等. 不同产地三七茎叶的质量评价[J]. 中国医药工业杂志,2015,46(7):701-703.
- [27] 罗宇东,谭安蕾,陆施衡,等. 壮药藤苦参中强心苷的含量测定及不同产地、采收季节对药材含量的影响[J]. 中国当代医药,2018,25(12):14-17.
- [28] 卢聪,鲍勇刚,赵树民,等. 不同产地人参蛋白差异研究[J]. 中国现代中药,2015,17(1):6-10,14.

(收稿日期:2019-04-09 编辑:谢睿)

(上接第40页)

- [3] 董梅. 长春碱类抗肿瘤药物研究新进展[J]. 国外医学肿瘤学分册,1998,25(3):144-146.
- [4] OTERO L H,ROJAS-ALTUVE A,LLARRULL L I,et al. How allosteric control of Staphylococcus aureus penicillin binding protein 2a enables methicillin resistance and physiological function[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2013,110(42):16808-16813.
- [5] LAVANYA P,RAMAIHA S,ANBARASU A. A Molecular Docking and Dynamics Study to Screen Potent Anti-Staphylococcal Compounds Against Cefaroline Resistant MRSA[J]. J Cell Biochem,2016,117(2):542-548.
- [6] RANI N,VIJAYAKUMAR S,LAKSHMI P T V,et al. Allosteric site-mediated active site inhibition of PBP2a using Quercetin 3-O-rutinoside and its combination[J]. J Biomol Struct Dyn,2016,34(8):19.
- [7] RAO S N,HEAD M S,KULKARNI A,et al. Validation Studies of the site-directed docking program LibDock[J]. J Chem Inform Mod,2007,47(6):2159-2171.
- [8] 田应彪,陈泽慧,杨名慧,等. 16种中药水煎液对MRSA和MSSA体外抑菌试验观察[J]. 中国医院药学杂志,2009,29(11):897-899.
- [9] 黄文玉,周丽敏,唐敏,等. 27种清热解毒中药对葡萄球菌耐药菌株的实验研究[J]. 山东中医杂志,1991,10(3):40-41.
- [10] 谢大泽,湛学军,舒向荣,等. 黄连等中药对淋菌耐药菌株体外抗菌活性的研究[J]. 中华医院感染学杂志,2016,26(10):2193-2195,2322.

(收稿日期:2019-06-11 编辑:谢睿)