

鳖甲中抑制单胺氧化酶活性肽筛选模型的建立

徐士勋, 安亚文, 韩秋俊, 程亚涛, 王艳慧, 绪扩, 汪林, 李强, 雷海民*

(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

[摘要] **目的:**建立单胺氧化酶(MAO)活性筛选模型,以该模型指导鳖甲活性肽的分离,并检验分离单体活性。**方法:**参照 MAO 试剂盒方法,以优降宁为阳性药进行 MAO 活性筛选模型;对鳖甲水提液依次调节乙醇体积分数为 20%、40%、60%、80%、90%,得到各醇沉部位,再以该模型筛选各醇沉部位,选取活性最优部分继续分离,然后将分得的单体以该模型检验活性。**结果:**该 MAO 活性筛选模型中,阳性药优降宁质量浓度在 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,抑制率为 98.30% ~ 103.05%;各部位质量浓度为 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,鳖甲水提液部位 MAO 抑制率为 $(23.34 \pm 9.66)\%$,20% 醇沉部位 $(28.16 \pm 5.78)\%$,40% 醇沉部位 $(30.69 \pm 7.17)\%$,60% 醇沉部位 $(41.60 \pm 8.03)\%$,80% 醇沉部位 $(64.91 \pm 2.94)\%$,90% 醇沉部位 $(53.34 \pm 7.76)\%$;在 80% 醇沉部位分得鳖甲七肽(GAGPHGC),质量浓度在 $0.1 \sim 1.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,鳖甲七肽 MAO 抑制率为 15.30% ~ 54.84%。**结论:**发现 MAO 活性筛选模型优降宁抑制效果显著,提示该模型成功;以该模型成功指导了鳖甲七肽的分离,且鳖甲七肽具有较明显 MAO 抑制活性。

[关键词] 鳖甲; 单胺氧化酶; 活性肽

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)22-0170-04

[doi] 10.11653/syfy2013220170

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130917.1615.007.html>

[网络出版时间] 2013-09-17 16:15

Establishment of the Screening Model for Active Peptide in Trionycis Carapax with Monoamine Oxidase-inhibitory Activity

XU Shi-xun, AN Ya-wen, HAN Qiu-jun, CHEN Ya-tao, WANG Yan-hui, XU Kuo,

WANG Ling, LI Qiang, LEI Hai-ming*

(Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** The monoamine oxidase (MAO) activity screening model is established to guide the separation of Trionycis Carapax active peptides, and inspect the activity of the monomer. **Method:** Pargyline was used as positive drug with reference to the method of MAO kit to establish the monoamine oxidase activity screening model; the ethanol concentration of Trionycis Carapax water extraction liquid was adjusting to 20%, 40%, 60%, 80%, 90% in turn to get the alcohol precipitated parts, then screen the alcohol sink parts in this model, and continue the separation of optimal selection activity part, finally MAO inhibitory activity of the monomer was tested in the model. **Result:** The pargyline's concentration was $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, the inhibition rate on MAO was remarkable, which could amount to 98.30% -103.05%; when the concentration was at $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, the inhibitory rate of Trionycis Carapax water extraction liquid part on MAO was $(23.34 \pm 9.66)\%$, 20% alcohol precipitated part was $(28.16 \pm 5.78)\%$, 40% alcohol precipitated part was $(30.69 \pm 7.17)\%$, 60% alcohol precipitated part was $(41.60 \pm 8.03)\%$, 80% alcohol precipitated part was $(64.91 \pm 2.94)\%$, 90% alcohol precipitated part was

[收稿日期] 20130504(019)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81073017);北京中医药大学科研创新团队项目(2011-CXTD-15)

[第一作者] 徐士勋,从事中药先导化合物的发现与开发研究,Tel:18810614378,E-mail:xushixun432@163.com

[通讯作者] *雷海民,博士,教授,博士生导师,从事中药先导化合物的研发和药理学研究,Tel:010-8473640,E-mail:leihaimin@126.com

(53.34 ± 7.76)%。We get the Trionycis Carapax peptide from the 90% alcohol precipitated part. The Trionycis Carapax peptide's inhibition rate on MAO was obvious when the concentration ranged from 0.1-1.6 g · L⁻¹, which ranged from 15.30% to 54.84%. **Conclusion:** The pargyline's inhibitory effect on MAO is remarkable, which suggests the model is successful and can guide separation of Trionycis Carapax, which has obvious inhibitory activity on MAO.

[**Key words**] Trionycis Carapax; MAO; active peptide

鳖甲及其复方在防治肝纤维化方面具有重要意义^[1]。肝纤维化与单胺氧化酶(MAO)有密切关系,MAO是反映肝纤维化及肝细胞损耗的重要指标,血清中MAO的活性大致可反映肝纤维化的程度,血清MAO水平与肝纤维化程度呈正相关^[2],随着肝纤维化进展以及假小叶形成,MAO明显升高^[3]。本实验以优降宁建立MAO活性筛选模型,对鳖甲水提液,20%醇沉,40%醇沉,60%醇沉,80%醇沉,90%醇沉6个部位以MAO作为筛选靶位酶筛选有效部位^[4-5],进一步结合732-阳离子交换树脂、凝胶LH20从鳖甲90%醇沉部位分离出鳖甲七肽^[6],同时以该MAO筛选模型初探了其抗肝纤维化机制及相关物质基础。

1 材料

1.1 动物 雄性昆明种小鼠,体重20~25 g,SPF级,北京维通利华动物技术有限公司提供,实验动物生产许可证SCXK(京)2012-0001。

1.2 试剂与仪器 鳖甲七肽[(M:551.5 GAGPHGG)实验室从醋炙鳖甲Trionycis Carapax,(经中国药材公司戴中博士鉴定)中分离纯化确证结构,委托上海科肽生物科技有限公司合成];优降宁(阿拉丁试剂,20110913),单胺氧化酶试剂盒(南京建成生物试剂有限责任公司,批号20120415)。

TU-1810紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);Sartorius-BS124S型电子分析天平(德国赛多利股份有限公司);KQ-500DE型数控超声波清洗仪(北京医疗设备二厂);高速离心机(飞鸽牌,TDL-5-Acentrfuge);XW-80A漩涡混合仪(海口市其林雨仪器制造有限公司);202型电热恒温干燥箱(北京中兴伟业仪器有限公司)。

2 方法

2.1 供试药品制备 优降宁用纯净水为溶剂配制成质量浓度为0.1 g · L⁻¹溶液。鳖甲七肽用纯净水为溶剂配制成质量浓度为0.1~1.6 g · L⁻¹溶液。鳖甲水提及各醇沉部位均用纯净水为溶剂配制成质量浓度为1.0 g · L⁻¹溶液。供试品配好后,均以0.22 μm滤膜滤过;4℃贮存。

2.2 单胺氧化酶粗提液制备 依据王豪^[5]等工作,按以下方法制备单胺氧化酶:小鼠颈椎脱臼处死,取肝脏,称重,加9倍量0℃生理盐水,制成匀浆,3 000 r · min⁻¹离心10 min,取上清液备用^[7]。

2.3 组别设计 空白组:依次按顺序加入300 μL粗酶液,300 μL试剂三(酶灭活剂),50 μL纯净水,300 μL试剂一(作为底物),3 mL试剂二,温孵3 h,加入5 mL试剂四,连续涡旋2 min,离心,取上清。阴性组:相对于空白组将其他试剂加入完毕温孵3 h后,再加入试剂三(酶灭活剂)。药物反应组:相对于空白组将其他试剂加入完毕温孵3 h后再加入试剂三(酶灭活剂);不加入50 μL纯净水而是50 μL不同药物溶液。药物对照组:相对于空白组不加入50 μL纯净水而是50 μL不同药物溶液。

2.4 MAO活性测定 依据MAO试剂盒操作说明进行,在242 nm下测定各组样品吸光度(A)。根据以下公式计算出抑制率,以EXCEL软件制作抑制率-浓度关系图。

抑制率计算公式:

$$\text{抑制率} = \frac{(A_{\text{阴性组}} - A_{\text{空白组}}) - (A_{\text{药物反应组}} - A_{\text{药物空白组}})}{(A_{\text{阴性组}} - A_{\text{空白组}})} \times 100\%$$

2.5 鳖甲七肽提取分离流程 见图1。

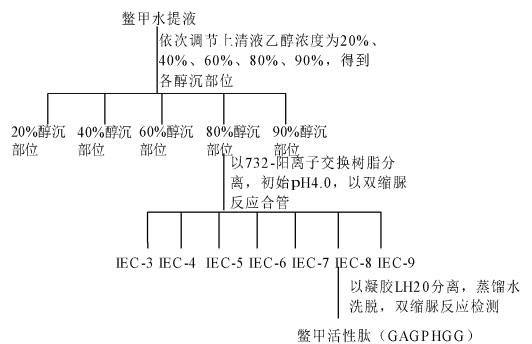


图1 鳖甲七肽提取分离流程

2.6 数据处理 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,方差齐性检验采用F检验,两组间差异用t检验(方差不齐时采用t检验校正公式)。P < 0.05有统计学意义。

3 结果

3.1 优降宁对 MAO 抑制活性 优降宁在 1.0 g·L⁻¹ 质量浓度时,3 次测试,均对 MAO 有强的抑制作用,抑制率为(100.7 ± 2.01)%,说明该方法可以测试 MAO 抑制活性。

3.2 鳖甲水提液及各醇沉部位对 MAO 活性抑制率比较 鳖甲水提液及各醇沉部位对 MAO 活性影响,可以发现 20% 醇沉部位、40% 醇沉部位、60% 醇沉部位、80% 醇沉部位、90% 醇沉部位均比鳖甲水提液 MAO 抑制率提高,提示醇沉处理可以使有效成分部位更加集中,使 MAO 抑制效果更好;而经过统计比较可以发现 80% 醇沉部位 MAO 抑制率最高,与 90% 醇沉部位比较有显著性差异,继续分离该部位。见表 1。

表 1 鳖甲水提液及各醇沉部位对 MAO 活性影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

测试药物	质量浓度/g·L ⁻¹	抑制率/%
鳖甲水提液	5.0	23.34 ± 9.66 ²⁾
20% 醇沉部位	5.0	28.16 ± 5.78 ²⁾
40% 醇沉部位	5.0	30.69 ± 7.17 ²⁾
60% 醇沉部位	5.0	41.60 ± 8.03 ^{1,2)}
80% 醇沉部位	5.0	64.91 ± 2.94 ¹⁾
90% 醇沉部位	5.0	53.34 ± 7.76 ²⁾

注:与鳖甲水提液组比较¹⁾ P < 0.05;与 80% 醇沉部位组比较²⁾ P < 0.05。

3.3 80% 醇沉部位各 IEC 组分对单胺氧化酶活性的影响 根据 80% 醇沉部位各 IEC 组分对单胺氧化酶活性抑制率的比较,发现 CIE-8 部分 MAO 抑制活性最高,与除 CIE-8 部位 MAO 抑制率比较有显著性差异,以此笔者选择以 MAO 抑制率最高的部位继续纯化。见表 2。

表 2 80% 醇沉部位各 IEC 组分对 MAO 活性抑制率比较 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

80% 醇沉 IEC 部位	质量浓度/g·L ⁻¹	抑制率/%
IEC-3(1)	5.0	39.10 ± 3.92 ^{1,2)}
IEC-4(2)	5.0	33.32 ± 6.84 ^{1,2)}
IEC-5(3)	5.0	26.47 ± 2.95 ^{1,2)}
IEC-6(4)	5.0	46.65 ± 1.45 ^{1,2)}
IEC-7(5)	5.0	32.05 ± 5.65 ^{1,2)}
IEC-8(6)	5.0	67.91 ± 1.66 ¹⁾
IEC-9(7)	5.0	56.02 ± 11.24 ²⁾

注:与 IEC-9 组比较¹⁾ P < 0.05;与 IEC-8 组比较²⁾ P < 0.05。

3.4 鳖甲七肽量效关系 根据表 2 继续分离 IEC-8 部分得到鳖甲七肽;表 3 为进一步研究鳖甲七肽在

0.1 ~ 1.6 g·L⁻¹ 的量效关系,其 MAO 抑制活性在 0.2 ~ 0.8 g·L⁻¹ 时较优,抑制率大于 50%。

表 3 鳖甲七肽 MAO 抑制活性量效关系 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品名称	质量浓度/g·L ⁻¹	相对抑制率/%
鳖甲七肽	0.1	15.30 ± 2.05
	0.2	53.06 ± 2.21
	0.4	54.84 ± 1.67
	0.8	54.08 ± 2.01
	1.6	34.69 ± 1.98

4 讨论

MAO 为一组作用于不同单胺类化合物的酶,广泛存在于肝、肾、脑等组织中,在有氧的情况下,催化各类单胺的氧化脱氨反应。在胶原形成过程中参与胶原成熟最后阶段的架桥形成,促进胶原分子内及分子间的交联,使胶原和弹性硬蛋白结合。肝脏组织学检查,MAO 增高的程度与肝脏的结缔组织增生和小叶节后扭曲密切相关^[8],当肝细胞受到损伤时,线粒体崩溃 MAO 就会释放到血浆导致血清 MAO 活性升高^[9],在临床上是肝病常用指标^[10]。

由此可见 MAO 与肝纤维化之间有密切关系,而优降宁为已知对 MAO 有显著抑制活性药物,本实验以优降宁建立 MAO 抑制模型,发现优降宁对 MAO 确有显著抑制活性,说明该模型较为成功。

在该模型基础上对鳖甲水提液、各醇沉部位及鳖甲七肽进行 MAO 抑制效果评价,由以上表及鳖甲七肽提取流程图可知,鳖甲不同醇沉部位对单胺氧化酶活性均有较明显抑制效果,抑制率大于 50% 的有 80% 醇沉,90% 醇沉,IEC-8 部分,IEC-9 部分;抑制率在 30% ~ 50% 的有 20% 醇沉部位,40% 醇沉部位,60% 醇沉部位,IEC-3 部分,IEC-4 部分,IEC-6 部分,IEC-7 部分,可以发现鳖甲粗提物对 MAO 抑制效果均较为显著。

由鳖甲水提及醇沉各部位选择活性最佳的 80% 醇沉部位;由 80% 醇沉部位过 732-阳离子交换树脂分成各部位对 MAO 的抑制活性发现 ICE-8 部分活性最佳;继续将该部位经羟丙基葡聚糖凝胶(LH20)分得鳖甲七肽,且鳖甲七肽对 MAO 抑制活性较好。

总结以上,MAO 抑制活性筛选模型指导分离鳖甲活性肽类有效的,可以推测鳖甲抗肝纤维化的机制与 MAO 抑制活性有关;而且在醇沉的过程中,除了大部分糖类、蛋白类,保留了大部分肽类,细分的部位对 MAO 活性抑制作用有所提高,一定程度

菩人丹对高糖诱导的 INS-1 细胞凋亡、 BAD 和 FOXO1 蛋白表达的影响

杜子亮,鲁碧楠,陈书,白永飞,德力格玛,庞宗然*

(中国少数民族传统医学国家民委-教育部重点实验室,北京 100081)

[摘要] 目的:观察菩人丹(Puren Dan, PRD)对高糖诱导的 INS-1 细胞凋亡、Bal-xl/Bcl-2 相关死亡促进因子(BAD)和叉头框转录因子 O 亚族 1(FOXO1)蛋白表达的影响,探讨 PRD 恢复 INS-1 细胞分泌功能的相关分子机制。**方法:**采用血清药理学方法制备菩人丹含药血清,建立高浓度葡萄糖(33.3 mmol·L⁻¹)诱导 INS-1 细胞损伤模型,以菩人丹药物血清干预 24 h;实验分为 5 组,即正常对照组(control 组)、高糖模型组(HG 组)、菩人丹药物血清高剂量组(H-PRD 组)、菩人丹药物血清低剂量组(L-PRD 组)和二甲双胍药物血清对照组(MF 组);采用 CCK8 试剂盒检测细胞活力,流式 Annexin V-FITC/PI 双染法考察细胞凋亡水平,Western blotting assay 检测 BAD 和 FOXO1 蛋白表达水平及其磷酸化水平。**结果:**与正常组比较高糖能够显著降低 INS-1 细胞活力、诱导细胞凋亡、降低 INS-1 细胞 BAD、FOXO1 丝氨酸磷酸化水平;与模型组比较菩人丹含药血清(终体积分数 10%)则能抑制 INS-1 细胞凋亡,增加细胞活力,下调 FOXO1 表达,促进 BAD 和 FOXO1 丝氨酸磷酸化。**结论:**菩人丹药物血清能够减少高糖诱导的 INS-1 细胞凋亡,这种作用与上调 BAD 和 FOXO1 蛋白丝氨酸磷酸化水平直接相关。

[关键词] 菩人丹;高糖;大鼠胰岛素瘤细胞系细胞;凋亡;Bal-xl/Bcl-2 相关死亡促进因子;叉头框转录因子 O 亚族 1

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)22-0173-05

[doi] 10.11653/syjf2013220173

[收稿日期] 20130625(015)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81072963)

[第一作者] 杜子亮,医学学士,在读硕士研究生,从事 2 型糖尿病病理机制与中医药干预研究,Tel:010-68933254, E-mail: katinaka@163.com

[通讯作者] *庞宗然,医学博士,研究员,博士生导师,从事糖尿病及其并发症发病机制与传统医药干预研究,Tel:010-68939090, E-mail: zrpang@163.com

上说明了鳖甲功效的物质基础在于活性肽类;而且鳖甲七肽对 MAO 抑制效果较好,提示鳖甲七肽在抗肝纤维化方面有较大应用前景,具有开发价值。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:361.
- [2] 杨清,王星云,关向荣,等. 病毒性肝纤维化酶谱变化的相关性研究[J]. 中国实验诊断学,2006,10(10):1146.
- [3] Batalle R, Brenner D A. Liver fibrosis [J]. J Clin Invest,2005,115(2):209.
- [4] 杨青,张国成,关向荣. 清肝饮对大鼠肝纤维化单胺氧化酶活性的影响[J]. 长春中医药大学学报,2006,22(4):13.

- [5] 王豪,郭本恒,吴正钧,等. 一株具有抑制单胺氧化酶作用的干酪乳杆菌筛选[J]. 微生物学报,2010,50(2):197.
- [6] 雷海民. 抗乙肝病毒肽类及其衍生物,申请号:201010187949.9,实质审查的生效.
- [7] 王豪,周凌华,徐致远,等. 单胺氧化酶的制备及活性测定[J]. 江苏农业科学,2011,19(3):372.
- [8] 江绍基. 临床肝胆系病学[M]. 上海. 上海科学技术出版社,1992:106.
- [9] 宋金香,杨文东,安振国. 肝硬化患者血清单胺氧化酶和透明质酸与 Child-Pugh 分级的关系[J]. 江西医学检验,2004,22(2):142.
- [10] 李洪. 肝硬化患者血清前白蛋白、胆碱酯酶、单胺氧化酶的变化[J]. 内蒙古中医药,2011,30(3):23.

[责任编辑 聂淑琴]