

湿法超微粉碎-超滤法快速提取浓缩全蝎蛋白可行性考察

田晓然,付廷明*,郭立玮

(南京中医药大学中药复方分离工程重点实验室,南京 210029)

[摘要] **目的:**考察湿法超微粉碎-超滤法快速提取浓缩全蝎蛋白的可行性。**方法:**利用大鼠体内抗凝血、抗血栓药效试验比较湿法超微粉碎-超滤法、胃蛋白酶酶解法 2 种提取工艺所得全蝎蛋白的药效差异,以考察湿法超微粉碎-超滤法用于全蝎蛋白提取浓缩的可行性。**结果:**2 种提取方法所得全蝎蛋白均能明显延长大鼠凝血时间、血浆活化部分凝血酶时间、凝血酶原时间、凝血酶时间,并对大鼠动静脉血栓干、湿重均有明显减轻作用,与生理盐水对照组比较,均有统计学差异。**结论:**经大鼠体内抗凝血、抗血栓药效试验验证,采用湿法超微粉碎-超滤法快速提取浓缩全蝎蛋白是可行的。

[关键词] 全蝎;湿法超微粉碎;超滤法;抗凝血;抗血栓

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)22-0013-04

Feasibility Investigation of Extraction and Concentration Technology for Protein from *Buthus martensii* Rapidly by Wet Superfine Grinding-Ultrafiltration Method

TIAN Xiao-ran, FU Ting-ming*, GUO Li-wei

(Key Laboratory of Isolation Engineering for Compound Chinese Materia Medica, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate feasibility of extraction and concentration technology for protein from *Buthus martensii* rapidly by wet superfine grinding-ultrafiltration method. **Method:** Pharmacodynamic difference of protein from *B. martensii* was compared by *in vivo* anticoagulant and *in vivo* antithrombotic experiments in rats, which were prepared by two different extraction technology (wet superfine grinding-ultrafiltration method and pepsin enzymatic hydrolysis method), in order to investigate feasibility of extraction and concentration for protein from *B. martensii* by wet superfine grinding-ultrafiltration method. **Result:** Protein from *B. martensii* through two kinds of extraction methods could both significantly prolong blood coagulation time and plasma APTT, PT, TT of rats. Furthermore, they could reduce dry and wet weight of rat arteriovenous thrombosis significantly, compared with physiological saline control group, there were statistically significant difference. **Conclusion:** After approved by *in vivo* anticoagulant and *in vivo* antithrombotic experiments in rats, it was feasible of wet superfine grinding-ultrafiltration method used to extract and concentrate protein from *B. martensii* rapidly.

[Key words] *Buthus martensii*; wet superfine grinding; ultrafiltration method; anticoagulation; antithrombotic

全蝎性味辛、平,有毒,归肝经,具有息风镇痉、攻毒散结、通络止痛的功效^[1]。临床多入丸、散剂,其次入水煎剂。现代研究表明,全蝎主要药效成分

为全蝎蛋白^[2],具有抗肿瘤、镇痛、抗癫痫、抗血栓^[3]等药理作用。目前全蝎蛋白的提取采用水煎煮、醇提法及酶解法等,其中酶解法应用最广。将湿

[收稿日期] 20120625(003)

[基金项目] 十二五重大新药创制项目(2011ZX09401-308-8)

[第一作者] 田晓然,硕士,从事中药新剂型与新技术研究,Tel:025-86798399,E-mail:mumumu1021@126.com

[通讯作者] *付廷明,副研究员,从事新型给药系统及生物药剂学研究,Tel:025-85811317,E-mail:ftming2000@yahoo.com.cn

法超微粉碎提取技术应用于全蝎蛋白提取目前尚无文献报道,将超滤法应用于全蝎蛋白的浓缩过程亦无报道。本试验尝试将湿法超微粉碎提取法和超滤法耦合应用于全蝎蛋白的提取、浓缩过程中,通过比较该法与酶解法所得蛋白在大鼠体内的抗凝血、抗血栓活性,确定湿法超微粉碎-超滤法快速提取浓缩全蝎蛋白的可行性。

1 材料

Anke TGL-16C 型离心机(上海安亭科学仪器厂),湿法超微粉碎机(自制),聚醚砜膜(PES, sepro 公司),LG-PAPER-1 型血小板聚集及凝血因子分析仪(北京世帝科学仪器公司),LIBROR AEL-40SM 型精密电光分析天平(日本岛津)。全蝎购自安徽省亳州市永刚饮片有限公司,经南京中医药大学药学院药用植物鉴定教研室刘训红教授鉴定为钳蝎科动物东亚钳蝎 *Buthus martensii* Karsch 的干燥体,置于 30 ℃ 真空干燥箱干燥备用。华法林钠(上海信谊药厂有限公司,批号 111003),胃蛋白酶(1:3 000,国药集团化学试剂有限公司),TT 试剂(10 mL × 2 mL,南京建成生物工程有限公司),PT 试剂(10 mL × 2 mL,南京建成生物工程有限公司),APTT 试剂(10 mL × 2 mL,南京建成生物工程有限公司),生理盐水(南京小营药业股份有限公司),人工胃液(取盐酸 9 mL,加蒸馏水稀释成 1 L),硫酸铵(南京化学试剂有限公司)。SD 大鼠,雌雄各半,体重约 180 ~ 220 g,上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,符合国家健康一级动物标准,动物许可证号 SCXK(沪)2007-0005。

2 方法与结果

2.1 全蝎蛋白的提取

2.1.1 湿法超微粉碎-超滤法 取全蝎粗粉,加 12 倍量水浸泡 1 h,湿法超微粉碎 5 min,10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,将离心液输入超滤膜设备中,超滤浓缩至 1 g·mL⁻¹ 的浓缩液(中空纤维膜选择外压式 PES 膜,膜孔径相对分子量 6 000,压力 0.5 MPa,流速 500 mL·min⁻¹)。向浓缩液中缓慢加入 (NH₄)₂SO₄ 饱和液至其质量分数为 75%,放置过夜。10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,保留沉淀蛋白。加水将沉淀蛋白溶解至 1 g·L⁻¹,备用。

2.1.2 胃蛋白酶酶解法 取全蝎细粉,加入人工胃液(固液比 1:20),密闭,于 37 ℃ 恒温水浴 30 min,加 3.0% 胃蛋白酶水解 3 h,酶解液用 0.1 mmol·L⁻¹ NaOH 溶液调节 pH 7.4,终止酶解反应。10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液,加热浓缩至 1 g·

mL⁻¹。向浓缩液中缓慢加入 (NH₄)₂SO₄ 饱和液至其质量分数为 75%,放置过夜。10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,保留沉淀蛋白。加水将沉淀蛋白溶解至 1 g·L⁻¹,备用。

2.2 全蝎蛋白对凝血系统的影响比较

2.2.1 凝血时间(CT)比较^[4] 取 SD 大鼠 50 只,雌雄各半,随机分为 5 组,每组 10 只。分生理盐水对照组、华法林钠阳性对照组、湿法超微粉碎-超滤法组(低、高剂量组)、胃蛋白酶酶解组。阳性对照组给药质量浓度为 0.073 3 g·L⁻¹,湿法组给药质量浓度分别为 0.5(湿法低剂量组),1 g·L⁻¹(湿法高剂量组),胃蛋白酶酶解组(酶解组)给药质量浓度为 1 g·L⁻¹,空白对照组给予同体积生理盐水,按 20 mL·kg⁻¹ 灌胃给药,每天 1 次,连续 7 d。末次给药 1 h 后,用内径 1 mm 的玻璃毛细管插入大鼠眼眶内眦静脉丛取血,至毛细管血柱达 30 mm,每隔 30 s 折断毛细管一段,检查有无出现凝血丝,记录毛细管采血到出现凝血丝的时间,结果凝血时间分别为 (39.4 ± 6.7), (145.2 ± 7.8), (70.2 ± 8.2), (135 ± 7.2), (106 ± 20.0) s。说明与生理盐水组相比,湿法组与酶解组对大鼠 CT 的延长均有非常显著性差异 ($P < 0.01$)。且湿法组对大鼠 CT 的延长呈量效依赖关系,确定其对大鼠的抗凝血机制产生明显的影响。

2.2.2 凝血酶时间(TT)比较 取 SD 大鼠 50 只,雌雄各半,随机分为 5 组,每组 10 只。分生理盐水对照组、华法林钠阳性对照组、湿法超微粉碎-超滤法组(分低、高剂量)、胃蛋白酶酶解组。按 2.2.1 项下方法给药,大鼠给药 7 d,颈总动脉取血,3000 r·min⁻¹ 离心 10 min,得贫血小板血浆(PPP),即待测血浆。取待测血浆 100 μL 放入凝血因子血小板聚集仪上的测试槽中,与 37 ℃ 保持 3 min,加入 37 ℃ 已预温凝血酶 100 μL,立即开始测定,记录凝固时间。每只大鼠血浆平行做 8 次,取平均值分别为 (13.2 ± 1.0), (120 ± 30.7), (26.0 ± 0.6), (30.5 ± 1.4), (27.2 ± 1.3) s。说明湿法组和酶解组均能明显延长大鼠血浆 TT,与生理盐水组相比有非常显著性差异 ($P < 0.01$)。同时,湿法组对大鼠血浆 TT 的延长有量效依赖关系,影响了凝血机制的共同途径。

2.2.3 凝血酶原时间(PT)比较 取 2.2.2 项下待测血浆 50 μL 放入测试槽中,37 ℃ 保持 3 min,加入 37 ℃ 已预温 PT 试剂 50 μL,立即开始测定,记录凝固时间。每只大鼠血浆平行做 8 次,取平均值依次为 (12.0 ± 0.46), (123.1 ± 20.1), (15.0 ± 0.66),

(20.7 ± 0.53), (18.9 ± 0.99) s。说明湿法组和酶解组均能明显延长大鼠血浆 PT,与生理盐水组相比呈显著性差异($P < 0.01$)。湿法组对大鼠血浆 PT 的延长有量效依赖关系,对外源性凝血途径有显著作用。

2.2.4 活化部分凝血酶时间(APTT)比较 在测试槽中,将已预温 APTT 试剂 100 μL ,与预温 3 min 的 **2.2.2** 项下待测血浆混合,孵育 3 min 后加入预温 37 $^{\circ}\text{C}$ 的 CaCl_2 100 μL ,立即开始测定,记录凝固时间。每只大鼠血浆平行做 8 次,取平均值分别为 (22.1 ± 0.73), (128.7 ± 23.3), (33.5 ± 2.6), (41.4 ± 2.1), (39.8 ± 0.78) s。说明湿法组和酶解组均能明显延长大鼠血浆 APTT,与生理盐水组相比均有显著性差异($P < 0.01$)。湿法组对大鼠血浆 PT 的延长有量效依赖关系,并对抑制了凝血途径中的内源性凝血过程。

2.3 全蝎蛋白体内抗血栓作用比较

2.3.1 大鼠动静脉环路血栓模型的制备及给药 取 SD 大鼠 50 只,雌雄各半,随机分为 5 组,每组 10 只。分生理盐水对照组、华法林钠阳性对照组、湿法

超微粉碎-超滤法组(分低、高剂量)、胃蛋白酶酶解组。按 **2.2.1** 项下方法给药,大鼠灌胃 7 天,每天 1 次。将大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛(按 0.35 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)麻醉,参照文献[5]制作动静脉环路血栓模型。大鼠于仰卧位固定后分离右侧颈总动脉和左侧颈外静脉,并将 2 根管内注满肝素生理盐水(25 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)的聚乙烯管分别插入右颈总动脉及左颈外静脉,在动-静脉旁路的连接管中放入 1 根长为 8 cm 的 7 号手术线(已称重),建立动静脉旁路,用药 40 min 后开放动静脉环路 15 min,中断血流形成血栓。**2.3.2 动静脉环路血栓测定** 15 min 后取下套管,取出血栓,在湿润的滤纸上滚动,去除多余浮血,置已称重的载玻片上称重,并减去载玻片和手术线的质量,即得血栓湿重,计算得血栓抑制率。于 70 $^{\circ}\text{C}$ 干燥箱中 1 h,待其冷却后称取干重,求出血栓抑制率^[6]。数据采用 SPSS 17.0 软件经计算机处理,结果见表 1。

血栓抑制率 = (对照组血栓湿重 - 实验组血栓湿重) / 对照组血栓湿重 × 100%。

表 1 湿法组与酶解组对大鼠动静脉环路血栓形成的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	血栓湿重/mg	血栓湿重抑制率/%	血栓干重/mg	血栓干重抑制率/%
生理盐水	0	923.7 ± 32.8	-	443.1 ± 38.1	-
阳性对照	0.073 3	331.0 ± 28.2	64.17	166.2 ± 11.4	62.49
湿法	0.5	541.8 ± 21.4	41.34	218.9 ± 14.9	50.60
	1	478.6 ± 12.8	48.19	190.0 ± 7.6	57.12
酶解	1	511.4 ± 43.0	44.64	203.0 ± 14.7	54.19

结果显示,湿法低剂量组、高剂量组及酶解组均能显著抑制动静脉环路血栓的形成,使血栓形成的湿、干重明显减轻,与生理盐水组相比差别有显著性,其中湿法组抗血栓作用呈现浓度依赖性。

3 讨论

全蝎的主要有效成分为蛋白质,全蝎中发挥抗凝血作用的成分为全蝎蛋白^[7]。本研究组发现,全蝎蛋白成分本身的体外抗凝血、抗血栓作用并不明显,但其酶解后产物则具有明显的体外抗凝血和抗血栓作用。本研究通过大鼠体内试验,证明全蝎提取蛋白经大鼠口服给药后,均能发挥明显的体内抗凝血、抗血栓作用。

本试验另辟蹊径地探索全蝎蛋白提取的新方法-湿法超微粉碎提取技术,将全蝎和与水一起加入粉碎机,应用强大机械振动研磨,使全蝎达到细胞级粉碎,全蝎蛋白快速溶解于水中。所得全蝎蛋白大鼠体内药效抗凝血、抗血栓作用明显,证明该提取方法可应用于全蝎蛋白提取。该方法应用于全蝎提取

过程的主要优势有提取时间缩短为 10 min,提取效率高,采用常温提取法,避免了加热对全蝎蛋白的破坏,有效、全面地保留了全蝎蛋白质类成分。

全蝎蛋白的浓缩大部分采用了加热浓缩法,易导致蛋白质变性,从而失去其活性。本试验采用 PES 中空纤维膜,对全蝎蛋白进行浓缩,操作时间短,并且避免了加热对蛋白质的破坏,保留了大部分分子量的全蝎蛋白,通过大鼠体内药效试验证明了其抗凝血和抗血栓作用,为膜浓缩全蝎蛋白方法的应用提供了一定的依据。本试验对膜浓缩过程的参数进行了考察,筛选出最优组合参数。

凝血时间是观察各提取方法所得全蝎蛋白对凝血机制有无影响进行的第一步试验,是研究药物抗凝血机制的前提。结果表明湿法组提取所得全蝎蛋白同酶解组一样,均对大鼠全血 CT 有明显延长作用。湿法组提取所得全蝎蛋白能显著延长大鼠血浆的 TT,PT,APTT,表明该提取方法所得蛋白对大鼠血浆凝血系统有明显影响,对内源性、外源性以及共

基于生物转化的附子减毒增效考察

孙鹏,李玲*,吴丽,童永鑫
(西华大学生物工程学院,成都 610039)

[摘要] **目的:**通过固态发酵筛选能使附子减毒增效的微生物,并初步探讨其生物转化机制。**方法:**选用附子粉为原料,以菌种生长情况、双酯型生物碱含量变化及物质成分变化为评价指标,通过固态发酵方式筛选适合附子生物转化的菌种。采用 HPLC-MS 初步鉴定新增物质的结构,为附子生物转化的可行性提供理论依据。**结果:**采用黑曲霉对附子进行生物转化,可使乌头碱含量减少,新增 1 种毒性较小的苯甲酰乌头原碱。**结论:**黑曲霉发酵附子实现了减毒增效的目的,为附子炮制新方法的深入研究提供理论依据。

[关键词] 生物转化;附子;黑曲霉;减毒增效

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)22-0016-04

Research on Attenuated Efficiency of *Aconitum carmichaeli* Based on Biotransformation

SUN Peng, LI Ling*, WU Li, TONG Yong-xin
(School of Bioengineering, Xihua University, Chengdu 610039, China)

[Abstract] **Objective:** To screen microbial with attenuated efficiency for *Aconitum carmichaeli* by solid-state fermentation, and preliminary explore its biotransformation mechanism. **Method:** With *A. carmichaeli* powder as raw material, bacteria growth, the content of diester alkaloid and material composition changes as

[收稿日期] 20120718(012)

[基金项目] 教育部春晖计划项目(Z2010102);四川省中医药管理局项目(2010-69)

[第一作者] 孙鹏,硕士,Tel:15882189401,E-mail:793243748@qq.com

[通讯作者] *李玲,博士,副教授,从事药物新制剂与新剂型研究,Tel:028-87720584,E-mail:lily1188@126.com

同途径凝血均有明显的抑制作用。湿法组提取所得蛋白能明显抑制大鼠体内血栓的形成,表现出了其体内抗血栓作用。通过以上分析,湿法超微粉碎-超滤法快速提取浓缩所得全蝎蛋白口服后对大鼠有明显的抗凝血和抗血栓作用,从药效学上证明了该方法可应用于全蝎蛋白的提取浓缩过程。本研究为湿法超微粉碎-超滤法应用于全蝎蛋白的快速提取浓缩过程提供了药效学依据,大大地简化了全蝎蛋白提取浓缩过程,为全蝎粗蛋白的提取和富集提供了新方法。

[参考文献]

[1] 中国药典.一部[S]. 2010:133.

[2] 王晶娟,张贵君,李奇豫.全蝎蛋白药效组分的生物鉴

定法研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(8):94.

[3] 黄小英,赵海梅,左志琴,等.全蝎蜈蚣对 CIA 大鼠外周血协同刺激分子 B7-1,B7-2 表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(14):132.

[4] 代龙.全蝎不同工艺提取物抗凝血及溶栓作用的比较研究[J].西北药学杂志,2009,24(2):114.

[5] O'Neill E E, Brock C J, von Kriesheim A F, et al. Towards complete analysis of the platelet proteome[J]. Proteomics,2002,2(3):288.

[6] 陈洲,黄自强,许建华,等.葡萄球菌激酶对大鼠颈动脉血栓的溶栓作用[J].心血管康复医学杂志,2006,15(1):33.

[7] 彭延古,雷田香,付东云,等.全蝎抗凝活性成分的定性分析[J].湖南中医学院学报,2005,25(6):10.

[责任编辑 仝燕]