

破壁前 破壁后

图1 山茶花粉(放大1000倍)

籽到动物角、皮、骨以及矿物盐、土、砂等等。其中大部分是干性、具有一定脆性的物料,但也有不少属于韧性、柔性、粘性及刚柔混合型的物料。面对五花八门的中药材,如何选择合适的设备和工艺是十分关键的。中药材的超细粉碎从工艺流程上可大致分为如下几个加工单元(图2)

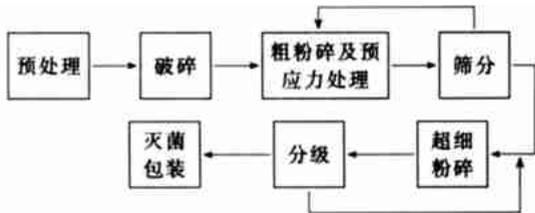


图2 中药材的超细粉碎工艺

预处理包括挑选出杂质、清洗、干燥等过程。破碎过程主要针对大块、大片状的生药进行切片、斩段、锤碎等处理,确保处理后的物料径长小于2cm。粗粉碎及预应力处理可使物料进行常规粉碎并使物料内部出现微裂纹,有利于下一步超细粉碎工序的进行。粗粉碎后的物料要进行筛分,一般用60~120目的筛网即可,料头重新粉碎直至通过筛网,因为超细粉碎设备对进料的细度都有较高的要求,过筛的目的是确保超细粉碎工序的顺序进行。超细粉碎过程的关键是根据生药的物理特性判断合适的粉碎力场从而选择最有效的超细粉碎设备,因为能进行超细粉碎的设备品种很多,最常见的有气流粉碎机、高速旋转式粉碎机、介质搅拌式碾磨机、辊碾式粉碎机以及最近开发的液流式粉碎机和激波粉碎机等。

一般来说,粒度较大或中等的坚硬物料采用压碎、冲击的方式,粉碎工具具有形状不同的结构;粒度较小坚硬的物料采用压碎、冲击、碾磨的方式,粉碎工具的表面无齿牙,是光滑的;粉状或泥状的物料采用剪切、压碎、碾磨的方式;韧

性材料采用剪切或快速打击的方法;多成分的物料采用冲击作用下的选择粉碎,也可将多种力场组合使用。

目前我国超细粉体工程正处在向中药业引进、推广的阶段,其中已经得到较好解决的技术是:1)针对各种物性不同的生药,纤维型、刚柔混合型、粘性和韧性生药的不同特性,选择合适的手段,有效解决粗碎和超细粉碎问题。2)粉碎安全技术,因为对于植物根茎类生药,粉料中有大量的植物纤维、淀粉等易燃物,在静电火花以及摩擦火星引发下容易发生粉尘爆炸,一定要加以控制,以及对那些具有一定毒性的药物采取有效的措施,防止粉碎过程的污染和扩散。(3)超细粉碎后药材粉体的研究,药材微粉化后在制药作业中将带来一些不利因素,如粉尘的飞扬,粉体的团聚和流动性问题等,这些都基本上得到有效解决。今后粉体工程在中药业中发展的重点是药粉的复合和如何有效地使用粉体,发挥药效。据国外文献报道药物微粉通过粒子复合以后可以具有很好的缓释效果^[3,4],粉体处理还可使一些难溶性药物的溶解性增强^[5]。“粒子设计”是目前国际粉体界的热点,通过粒子设计可使粉体具有各种功能,从而可使药物粒子具有缓释、靶向性、控释等诱人的功能。

4 结束语

中药超细粉体技术的引入将带来中药传统剂型的革新和发展。以生药入药的传统剂型有汤剂、丸剂、丹剂、膏剂、散剂等,随着超细粉碎技术的应用,可以拓宽以生药入药的剂型,如片剂、胶囊剂、颗粒剂、软膏剂、吸入剂、膜剂等,也可促进先进剂型技术(如固体分散技术、药物缓释技术等)在这些“生药”剂型中的应用。

参考文献:

- [1] 李凤生. 超细粉体技术 [M]. 北京: 国防工业出版社, 2000.
- [2] 胡黎明, 古宏晨, 李春忠. 化学工程的前沿——超细粉末制备 [J]. 化工进展, 1996, (2): 1-12.
- [3] Makio Naito, Akira Kondo, Toyokazu Yokoyama. Applications of comminution techniques for the surface modification of powder materials [J]. ISIJ International, 1993, 33(9): 915-924.
- [4] Koishi M, Ishizaka T. A new method for controlling release in pharmaceutical [J]. Appl Biochem Biotech, 1984, (10): 259-263.
- [5] 小石真纯. 难溶性物质处理方法 [P]. 日本专利: 平 2-115030, 1990-04-27.

蜂毒素的研究新进展

李绍祥, 李琦, 凌昌全

(第二军医大学附属长海医院 中医科, 上海 200433)

摘要: 蜂毒素是一种昆虫抗菌肽, 具有抗菌、消炎、抗辐射、抗关节炎及对心血管方面等作用, 论述了近年来在研究蜂毒素的结构、构效关系及抗肿瘤、抗病毒作用等诸方面的最新进展。

收稿日期: 2000-11-04

作者简介: 李绍祥 (1968-), 男, 河北省邯郸人, 现职称为医师。1992年毕业于河北医科大学预防医学系, 获学士学位, 从事临床4年后于1996年考取河北医大组胚专业研究生, 1999年毕业于获硕士学位, 同年考取上海第二军医大学中西医结合临床专业博士研究生, 课题方向为肝癌防治。Tel (021) 25072108; 25070720 E-mail shlx@263.net

关键词: 蜂毒素; 构效关系; 抗肿瘤; 抗病毒

中图分类号: R994.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2001)10-942-04

New progress in study on melittin

LI Shao-xiang, LI Qi, LING Chang-quan

(Department of TCM, Affiliated Changhai Hospital of Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Key words melittin; structure-effective relationship; antitumor; antiviral

蜂毒素是意大利蜜蜂蜂毒的主要成分之一,占蜂毒干重的50%,具抗菌、消炎、抗辐射、抗关节炎作用及对心血管方面等作用。近年来发现尚有抗肿瘤及抗艾滋病毒作用,引起了人们的极大关注,但是因蜂毒素具有溶血的副作用而限制了其应用。如何减小或消除其溶血作用保留甚至增强其抗菌、抗肿瘤作用成为医药学家研究的热点。

1 蜂毒素结构

1.1 一级结构: 蜂毒素由26个氨基酸组成,相对分子量为2849,氨基酸的排列顺序为:甘-异亮-甘-丙-缬-亮-赖-缬-亮-苏-苏-甘-亮-脯-丙-亮-异亮-丝-色-异亮-赖-精-赖-精-谷-谷,强碱性,兼性分子,溶于水。

1.2 二级结构: 蜂毒素在水中存在两种形式即在低浓度、低离子强度形成单体的自由结构;在高浓度、高离子强度则形成四聚体。蜂毒素的构象通过X射线晶体衍射观察呈螺旋-弯曲-螺旋结构,弯曲部位于第11-15氨基酸残基,1-10残基与16-26残基形成的二螺旋的轴线间的交角约为120°。从氨基末端起前20个残基中只有7位的K残基带电荷,此部分呈高度疏水性。相反,羧基末端的6个氨基酸残基部分呈高度阳离子化,有两个K残基,两个R残基,两个Q残基;氨基末端的螺旋则是兼性的。

2 构效关系

据报道1968年发现蜂毒素具有广谱抗菌作用,但对其结构与抗菌及溶血作用之间关系的研究近些年方见诸报道。

全右旋蜂毒素的溶血和抗菌作用与其左旋对映体相当,表明显现生物学活性毋须手性识别^[1]。结构-功能研究表明将14位的P残基换成A,可使弯曲消失,溶血作用比蜂毒素强2.5倍,但形成的电压依赖性通道的稳定性降低,从而说明通道形成并不一定意味着溶血^[2]。1-20残基区域中的兼性螺旋在蜂毒素的活性中似乎仅起构成作用,因为代以其它与之同源性很小而能形成兼性螺旋的序列,分子的活性并无降低。1-20残基部分虽有膜活性,但无裂解作用,阳离子化的20-26片段也是没有作用的。

从蜂毒素中删除单个氨基酸可得到24个蜂毒素的类似物,分析它们的抗菌活性和溶血作用,发现去掉L(6),K(7),V(8),L(9),L(13),L(16),I(17)和W(19),溶血活性下降相当大,而去掉弯曲区的氨基酸则不影响溶血作用。上述改变也导致抗菌作用降低,但此种降低较之溶血作用的降低,程度轻微得多。令人注意的是,去掉羧基末端片段中的单个氨基酸对活性没有影响。HPLC保留时间分析表明,去掉那些能使溶血活性降低的氨基酸,则兼性程度也降低(兼性程度降低与早期保留时间相关),提示对于溶血作用来说是需要

有兼性结构的。各种类似物的抗菌力表明,抗菌作用对兼性结构的需要程度与溶血作用相比为弱^[3]。

W19在蜂毒素生物学活性中作用至关重要,对删除单个氨基酸的蜂毒素类似物的研究揭示,不论是化学修饰抑或是代以L都使得活性大降,从而证实了此残基的重要性^[4]。进一步的荧光研究提示W残基位于脂质双分子层头部基团之下^[5],可以认为这一方向对活性来说是很重要的。但W在序列中的位置对活性显得并非很重要,因为W残基分别位于9位,11位或17位的蜂毒素的类似物也具有溶血作用,它们的强度依次为mel-W17>mel-W19=mel-W11>mel-W9。

K7对活性似乎也很重要,蜂毒素以四聚体存在于溶剂中时,其7位的K是完全暴露的,对K7被替换后的各种类似物的构象、聚集性及生物学作用进行观察发现,当代之以I,L或V残基则导致抗菌与溶血作用大减;代之以A,D,E或G则溶血作用较之蜂毒素轻度下降,抗菌力也有下降;K7被W代替,溶血作用仍与蜂毒素相当,而抗菌活性相当低。

兼性螺旋对溶血活性是必要的,而抗菌作用并非如此,此点在研究蜂毒素的非对映异构体、反式和反式对映体中业已证实^[6,7]。非对映异构体蜂毒素螺旋性很低,不具溶血性,但有抗菌作用。

1-7片段在调控蜂毒素的生理学及生物学特性方面似乎很重要,而8-26肽片段就不增加脂质模型的通透性(此片段的抗菌和溶血作用尚不清楚)。

在研究蜂毒素的各种片段和天蚕抗菌肽组合成的杂合肽时,发现由蜂毒素的1-13区域和天蚕抗菌肽A的1-10位N端兼性片段组合成的杂合肽,具有广谱抗菌作用和很低的溶血作用。

3 抗肿瘤作用

目前使用蜂毒素抗肿瘤主要有以下几种方式:

3.1 直接使用蜂毒素作用于肿瘤细胞: 主要是研究其分子机制。Saini发现蜂毒素裂解人单核细胞性白血病细胞U937是通过激活内源性磷脂酶D而致^[8]。Arora证明蜂毒素激活磷脂酶A₂(PLA₂),解除肝癌细胞对缺氧的抵抗^[9]。Kubo发现蜂毒素可杀伤K562和HL-60细胞^[10],蜂毒素插入K562细胞的胞膜中形成孔道,引起Ca²⁺内流,胞内Ca³⁺浓度升高,细胞裂解^[11]。蜂毒素可诱导大鼠神经胶质瘤C6细胞HSP27和HSP70的表达^[12],HSPs是CN8+T细胞应答诱导辅助分子^[13],参与抗肿瘤T细胞应答,有望成为抗肿瘤T细胞免疫疗法的靶分子^[14]。蜂毒素通过增加Ca³⁺内流高度

激活 *ras* 转化细胞的 PLA_2 , 选择抑制其 *ras* 蛋白表达水平和 *ras* 基因的拷贝数, 同时使其向正常形态逆转。也有谓蜂毒素优先激活 *ras* 癌基因转化细胞的 PLA_2 , 致其选择性破坏^[15]。

蜂毒素的作用也受细胞组织学来源的影响, 蜂毒素在 $1 \mu\text{mol/L}$ 浓度时阻止肿瘤细胞的增生, 而不抑制正常细胞的生长和克隆率^[16]。

蜂毒素抗肿瘤的作用机制众说纷纭, 目前尚无定论, 也提示可能是多种机制共同起作用的结果。

3.2 将蜂毒素分子加以改型: 参见构效研究

3.3 将蜂毒素分子与肿瘤特异性抗体偶联成免疫毒素: Dunn-RD 将编码抗体片段 (scFv) 的基因和编码蜂毒素的寡核苷酸构建成复合基因 (svFv-mel), 将其插入载体 pPOW 并使其在大肠杆菌 (TOPP2) 中表达。重组的免疫毒素具有与抗体特异性一致的结合和杀伤特性, 此外, 其裂解细胞作用显著大于天然的蜂毒素^[17]。将蜂毒素与抗体片段相联克服了蜂毒素的非特异毒性, 同时重组的免疫毒素对携有抗原的靶细胞具有特异的毒性。免疫毒素的细胞毒作用比游离的毒素要强, 这意味着此种方法有望成为一种有效的疗法。

3.4 将蜂毒素或其前体的基因导入肿瘤细胞: 蜂毒素具有抗肿瘤作用, 但为了达到治疗水平需要反复给药。Winder 将编码蜂毒素两种前体 (蜂毒素原与前蜂毒素原) 的基因导入人膀胱癌细胞系, 得到的细胞克隆注入裸鼠体内分析其致癌性, 发现肿瘤生长减慢, 或无肿瘤生长, 提示通过载体将蜂毒素基因引入肿瘤细胞, 可使某些克隆的致癌性减弱或丧失, 在癌症的治疗上不失为一种有用的方法^[18]。

3.5 将蜂毒素与其它抗菌肽组合成杂合肽分子: 目前主要是与天蚕抗菌肽组合成杂合肽分子, 天蚕抗菌肽 A(1-8) 和蜂毒素 (1-12) 的杂合肽 CA(1-8)-ME(1-12) 具有很强的抗肿瘤和抗菌作用^[19]。

Shin 用 3 个小细胞肺癌细胞系来评估 CA(1-8)-ME(1-12) 的结构与抗肿瘤作用的关系, 发现当肽的 16 位残基是疏水的 L 或 V, 18 和 19 位残基均是碱性的 K 时, 具有更强的抗肿瘤作用; 第 12 位残基与溶血作用有关而与抗肿瘤作用无关; 第 4 位的 P 使兼性程度增加从而增强了溶血作用, 但抗肿瘤作用无明显改变^[20]。

4 其它作用

4.1 抗艾滋病病毒作用: 抗菌肽是先天性免疫的效应器, 使宿主对寄生物迅速产生非特异性的抵抗力。蜂毒素以剂量依赖方式减少持续感染人类免疫缺陷病毒 1 (HIV-1) 的 T 淋巴瘤细胞 HIV-1 产物的量, 蜂毒素减小病毒感染性并非由于其对病毒颗粒的作用, 而是该肽的胞内作用。蜂毒素易被摄入胞内, 使 gag/pol 前体的加工被削弱^[21]。

Wachinger 等评估了蜂毒素在亚中毒剂量时, 对 HIV-1 在急性感染细胞中的复制和基因表达的影响, 分析表明蜂毒素对细胞相关病毒产物的作用是降低 gag 抗原和 HIV-1 mRNA 的水平。含报告基因 (由 HIV 长末端重复序列 LTR 驱动) 的质粒一过性转染试验显示, 蜂毒素对 HIV LTR 的活性有直接的抑制作用; 用表达蜂毒素的逆转录病毒质粒稳

定转染的人细胞中 HIV LTR 的活性也减低。由此可认为蜂毒素通过抑制 HIV-1 基因的表达而抑制 HIV LTR 的细胞相关性产物^[22]。

4.2 对细胞膜跨膜离子转运的作用: 蜂毒素能与胞膜相互作用引起细胞功能发生巨大变化, 如红细胞溶血、血管通透性增加以及肌肉收缩性改变。蜂毒素以其阳电荷羧基末端结合在带负电荷的磷脂上, 对可兴奋组织的电生理特性影响很大, 并在脂膜中形成电压依赖性阴离子选择性孔道^[23]。蜂毒素能抑制各种组织中的 ATP 酶特别是 Na^+ , K^+ -ATP 酶和 H^+ , K^+ -ATP 酶的活性, 许多证据显示蜂毒素可跟 PLA_2 肌钙蛋白和钙-钙调素等结合, 近来研究表明蜂毒素也可影响 Na^+ - Ca^{2+} 交换系统^[24]。

5 存在问题

蜂毒素直接肌注, 即使有抗肿瘤作用, 也是通过免疫调节起作用, 而用介入法行瘤体内注射也有造成溶血的危险。

蜂毒素改型保留抗肿瘤作用, 去除溶血作用, 理论上可行实际也难两全。有人认为抗肿瘤作用与溶血作用都是通过裂解细胞膜, 没有溶血作用也就没有了抗肿瘤作用。

因为抗体本身是蛋白, 也具抗原性, 制成免疫毒素会引致抗抗体的产生, 重复使用有致敏的可能, 且易被抗-抗体结合, 不易到达肿瘤局部。

基因疗法在有些肿瘤前景很好, 如对 AFP 阳性肝癌, 可将蜂毒素基因置于 AFP 调控元件之下, 以病毒为载体转染, 因 AFP 调控元件只在 AFP 阳性肝癌细胞中起作用, 也只有 AFP 阳性细胞方能合成蜂毒素, 使该细胞被选择性杀伤, 如再有旁观者效应效果当会更好。且蜂毒素基因序列短小, 易于转染。此外, 即使无其它因子协助, 蜂毒素单独也具有杀伤作用。

6 结语

目前对蜂毒素的研究多是基础性研究, 且体内实验尚少, 临床实验几乎没有, 因此体内实验与临床实验将是今后研究的重点。

参考文献:

- [1] Wade D, Boman A, Wahlin B, *et al.* All-D amino acid-containing channel-forming antibiotic peptide [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990, 87(12): 4761-4765.
- [2] Dempsey C E. The action of melittin on membranes [J]. *Biochem Biophys Acta*, 1990, 1031(2): 143-161.
- [3] Blondelle S E, Houghten R A. Hemolytic and antimicrobial activities of the twenty-four individual omission analogues of melittin [J]. *Biochemistry*, 1991, 30(19): 4671-4678.
- [4] Blondelle S E, Houghten R A. Probing the relationships between the structure and hemolytic activity of melittin [J]. *Pept Res*, 1991, 4(1): 12-18.
- [5] Ghosh A K, Rukmini R, Chattopadhyay A. Modulation of tryptophan environment in membrane bound melittin by negative charged phospholipids: implications in membrane organization and function [J]. *Biochemistry*, 1997, 36(47): 14291-14305.
- [6] Juvvadi P, Vumman S, Merifield R B, *et al.* Hydrophobic effects on antibacterial and channel-forming properties of cecropin A-melittin hybrids [J]. *J Pept Sci*, 1996, 2(4): 223-232.
- [7] Oren Z, Shai Y. Selective lysis of bacteria but not mammalian cells by diastereomers of melittin structure and function study [J]. *Biochemistry*, 1997, 36(7): 1826-1835.

- [8] Saini S S, Chopra A K, Peterson J W. Melittin activates endogenous phospholipase D during cytolysis of human monocytic leukemia cells [J]. *Toxicol*, 1999, 37(11): 1605-1619.
- [9] Aroa A S, de Groen P C, Cmall D E, *et al.* Hepatocellular carcinoma cells resist necrosis during anoxia by preventing phospholipase-mediated calpain activation [J]. *J Cell Physiol*, 1996, 167(3): 434-442.
- [10] Kubo H, Loegering D A, Adolphson C R, *et al.* Cytotoxic properties of eosinophil granule major basic protein for tumor cells [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 1999, 118(2-4): 426-428.
- [11] Reiter Y, Ciobotariu A, Jones J, *et al.* Complement membrane attack complex, perforin, and bacterial exotoxins induces in K562 cells calcium-dependent cross-protection from lysis [J]. *J Immunol*, 1995, 155(4): 2203-2210.
- [12] Ito H, Hasegawa K, Inaguma Y, *et al.* Enhancement of stress-induced synthesis of hsp27 and alpha B crystallin by modulators of the arachidonic acid cascade [J]. *J Cell Physiol*, 1996, 166(2): 332-339.
- [13] Blachere N E, Li Z, Chandawarkar R Y, *et al.* Heatshock protein-peptide complexes, reconstituted in vitro, elicit lymphocyte response and tumor immunity [J]. *J Exp Med*, 1997, 186(8): 1315-1322.
- [14] Harada M, Kimura G, Nomoto K. Heat shock proteins and the antitumor T cell response [J]. *Biotherapy*, 1998, 10(3): 229-235.
- [15] Sharma S V. Melittin resistance: a counterselection for ras transformation [J]. *Oncogene*, 1992, 7(2): 1993-201.
- [16] Zhu H G, Tayeh I, Israel L, *et al.* Different susceptibility of lung cell lines to inhibitors of tumor promotion and inducers of differentiation [J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 1991, 5(2): 52-58.
- [17] Dunn R D, Weston K M, Longhurst T J, *et al.* Antigen binding and cytotoxic properties of a recombinant immunotoxin incorporating the lytic peptide melittin [J]. *Immunotechnology*, 1996, 2(3): 229-240.
- [18] Winder D, Gunzburg W H, Erfle V, *et al.* Expression of antimicrobial peptides has an antitumor effect in human cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 242(3): 608-612.
- [19] Oh D, Shin S Y, Kang J H, *et al.* NMR structural characterization of cecropin A(1-8)-magainin 2(1-12) and cecropin A(1-8)-melittin(1-12) hybrid peptides [J]. *J Pept Res*, 1999, 53(5): 578-589.
- [20] Shin S Y, Lee M K, Kim K L, *et al.* Structure-antitumor and hemolytic activity relationships of synthetic peptides derived from cecropin A-magainin 2 and cecropin A-melittin hybrid peptides [J]. *J Pept Res*, 1997, 50(4): 279-285.
- [21] Wachinger M, Saermark T, Erfle V. Influence of amphipathic peptides on the HIV-1 production in persistently infected T lymphoma cells [J]. *FEBS Lett*, 1992, 309(3): 235-241.
- [22] Wachinger M, Kleinschmidt A, Winder D, *et al.* Antimicrobial peptides melittin and cecropin inhibit replication of human immunodeficiency virus 1 by suppressing viral gene expression [J]. *J Gen Virol*, 1998, 79(Pt 4): 731-740.
- [23] Shin S Y, Lee M K, Kim K L, *et al.* Structure-antitumor and hemolytic activity relationships of synthetic peptides derived from cecropin A-magainin 2 and cecropin A-melittin hybrid peptides [J]. *J Pept Res*, 1997, 50(4): 279-285.
- [24] Okamoto J, Isoda N, Kubota N, *et al.* Melittin cardiotoxicity in cultured mouse cardiac myocytes and its correlation with calcium overload [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1995, 133: 150-163.

滇白珠及其同属药用植物研究进展

马小军¹, 赵玲^{1*}, 杜程芳¹, 施冰玉^{1*}, 郑俊华¹, 陈新滋²

(1. 北京大学药学院 天然药物学系, 北京 100083; 2. 香港理工大学 应用生物及化学科技学系, 香港)

摘要: 综述民族药滇白珠及同属药用植物的资源、化学、药理、临床、产品开发等方面的研究。国内外对同属 15 种药用植物, 特别是平铺白珠树和芳香白珠进行过研究。今后应着重在治疗风湿性关节炎方面进行药理和临床研究, 以便开发成中药新药。

关键词: 滇白珠; 白珠树属; 药用植物

中图分类号: R282.71 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2001)10-0945-05

Advances in studies on *Gaultheria leucocarpa* var. *yunnanensis* and medicinal plants of *Gaultheria* L.

MA Xiao-jun¹, ZHAO Ling¹, DU Cheng-fang¹, SHI Bing-yu¹, ZHENG Jun-hua¹, CHEN Xin-zhi²

(1. Department of Natural Medicines, School of Pharmaceutical Sciences, Beijing University, Beijing 100083, China; 2. Department of Applied Biology and Chemical Technology, Hong Kong Polytechnic University, Hong Kong, China)

Key words *Gaultheria leucocarpa* Bl. var. *yunnanensis* (Franch.) T. Z. Hsu & R. C. Fang; *Gaultheria* L.; medicinal plant

滇白珠 *Gaultheria leucocarpa* Blume var. *yunnanensis* (Franch.) T. Z. Hsu & R. C. Fang 是杜鹃花科白珠树属

一种药用植物^[1], 为西南地区白族、佤族、傣族等 9 个民族习用, 始载于明初兰茂所著的《滇南本草》^[2], 我国已有 540