参环毛蚓中溶栓活性蛋白酶的纯化和检测

张东方[1],周美环[2],全 巍[3],杨松松[1*]

(1. 辽宁中医学院药学院 植化教研室,辽宁 沈阳 110032; 2. 东药集团公司供销公司,辽宁 沈阳 110002;
3. 沈阳军区陆军总医院,辽宁 沈阳 110016)

参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E. Perrier)为《中华人民共和国药典》2000年版一部中收载的地龙药材来源之一。地龙始载于《神农本草经》,具有通络、利尿、清热、定惊、平喘之功,临床常用于高热神昏、惊厥抽搐、关节痹痛、半身不遂、高血压等。日本学者从赤子爱胜蚓中提取出类似尿激酶的物质,用于治疗血栓性疾病[1]。近年来,随着分离技术的飞速发展及其广泛应用,对不同品种蚯蚓溶栓活性蛋白酶进行了一系列的研究,但参环毛蚓(广地龙)作为药典品种及市场上流通最广的地龙药材研究相对较少。本实验对其抗栓活性部位进行了考察,采用凝胶柱色谱法在溶栓活性部位中分离得到一种溶栓活性的蛋白酶。

1 仪器与材料

HD-3型紫外检测器(上海沪西仪器厂),培养箱,DYY-10型三恒电泳仪(北京六一仪器厂),LC-10A高效液相色谱仪(日本岛津)。

药材购于海南,经辽宁中医学院鉴定教研室纪俊元教授鉴定为参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E. Perrier)。

凝血酶、纤维蛋白原、尿激酶等均购自中国药品生物制品检定所。Sephacryl-S200, DEAE-Sephadex-A50及 Sepharose F. F. (Amersham Pharmacia Biotech AB, Sweden)

2 方法与结果

2.1 溶栓活性蛋白酶的纯化:新鲜参环毛蚓 4 kg,加 4倍量 0.02 mol/L磷酸盐缓冲液,匀浆,冷冻离心 10 min (6 000 r/min)。取上清液用硫酸铵盐析,离心,取沉淀加在自制 Sephacryl-S200色谱柱上,用 0.1 mol/L氯化钠溶液洗脱,紫外检测器检测,在台式记录仪上可见 2个分离峰,见图 1。用所得流份分别做纤维平板试验,结果只有峰 2具有溶栓活性,在此部位用自制 DEAE-Sephadex-A50及 Sepharose F. F. 色谱柱分离纯化,得到一种较纯的溶栓活性蛋白酶。

2.2 酶纯度色谱检测:色谱柱:TSK-Gel (30 cm× 7.8 cm, 10μm);流动相:0.1 mol/L磷酸盐(pH 8.0)-0.1 mol/L硫酸钠-0.5%叠氮钠;体积流量:0.6 mL/min;柱温:28℃。吸取纯化后的蛋白酶 10μL,注入高效液相色谱中,得到流出曲线,见图 2。

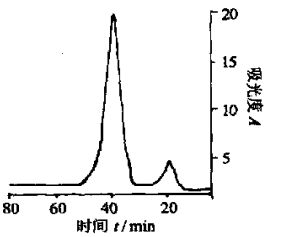

图 1 Sephacryl-S200流出曲线

Fig. 1 Sephacryl-S200 effluent curve

2.3 相对分子质量测定:按 SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳,该成分相对分子质量为 28 000左右,见图 3。

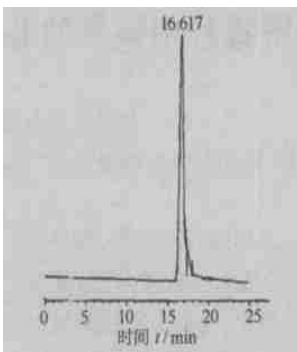

图 2 HPLC归一化纯度

Fig. 2 Purification of normality by HPLC

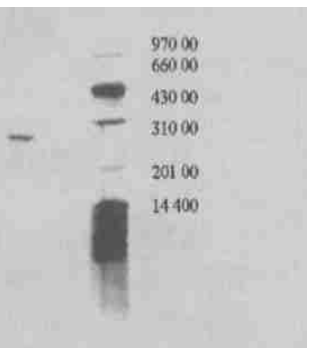

图 3 相对分子质量测定

Fig. 3 Determination of relative molecular weight

2.4 pH值对蛋白酶活性的影响:分别精密吸取蛋白酶 0.5 mL 6份,分别精密加入 1 mL pH值分别为 4、5、6、7、8、9的 HCl-Tris缓冲液,摇匀,于 37℃培养箱中放置 24 h,精密量取 20μL,点于同一块预先制好的平板上,放入 37℃培养箱中放置 18 h,取出,测量,以两直径之积表示溶圈面积。结果见表 1。可见该蛋白酶在 pH 5时活性最强,pH值大于 9及小于 4时活性下降。

* 收稿日期:2003-11-14
作者简介:张东方(1975-),男,辽宁人,讲师,博士,研究方向为中药活性成分和动物蛋白酶,在国家级期刊发表论文 10篇。
Tel (024) 86237503 E-mail: lneastzhang@163.com

表 1 pH值对酶活性的影响

Table 1 Effect of pH value on enzyme activity

pH值	溶圈 /mm²	pH值	溶圈 /mm²
4	256	7	317
5	375	8	298
6	329	9	158

2.5 温度对酶活性的影响: 分别精密吸取蛋白酶 0.5 mL 6份,分别于 20、30、40、50、60℃放置 3 h,分别精密量取 20μL,点于同一块预先制好的平板上,放入 37℃培养箱中放置 18 h,取出,测量,以两直径之积表示溶圈面积。结果见表 2,可见温度高于 50℃,活性下降,而低于 40℃相对稳定。

表 2 温度对酶活性的影响

Table 2 Effect of temperature on enzyme activity

温度 /℃	溶圈 /mm²	温度 /℃	溶圈 /mm²
20	343	50	214
30	325	60	106
40	316		

3 讨论

中风是常见的多发病,尤其是中老年高血压患者,并呈逐年上升趋势。溶栓是治疗中风病常用的方法之一,以往治疗主要选用尿激酶、链激酶等静脉给药,但不良反应也很明显,如出血、抗原性等,另外价格也比较昂贵。因此一直寻找新的抗栓药。蚯蚓类药物自 20世纪 80年代开始研究,于 1992年正式投入临床使用,主要用于治疗脑血栓,目前在国内上市的品种也比较多,如保健品类的龙舒泰、龙寿丹、龙津、龙福地龙胶囊、地宝胶囊等,国家的准字号的药品有博洛克、普恩复、溶栓胶囊、复方地龙胶囊等[2]。此类产品多延续了国外研究的方向,多用正蚓科爱胜属的蚯蚓,产品中均含有蚓激酶成分,但其纯度不一,对于血栓病均有一定的治疗效果。而参环毛蚓作为药典收载品种,前期工作表明也具有相似的活性,进一步开展本品的研究同样具有广阔前景。

References:

[1] Mihara H, Sumi H, Yoneta T, *et al*. A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earth worm, Lumbricus rebellus [J]. *Jpn J Physiol*, 1991, 44: 461.

[2] Guo H F, He Z Z, Zhang L. Propress in the clinical application of lumbrokinase [J]. *Pharm Biotechnol* (药物生物技术), 2001, 9(1): 57.

银翘解毒片中挥发油β-环糊精包结工艺的研究

刘振华[1],李忠思[2],曾艳芳[1*]

(1. 承德医学院附属医院 药剂科,河北 承德 067000; 2. 承德颈复康药业集团有限公司,河北 承德 067000)

银翘解毒片由金银花、连翘、荆芥、薄荷、淡豆豉等组成,其中荆芥、薄荷挥发油为有效成分,但其有较强的挥发性,遇光和热不稳定。为避免在制剂过程中挥发油的损失,增加稳定性,提高挥发油的利用率,本实验采用饱和水溶液制备荆芥、薄荷挥发油β-环糊精包结物,以挥发油利用率为指标筛选最佳工艺条件。

1 仪器与材料

DF-101B型集热式恒温磁力搅拌器 (浙江乐清市乐成电器厂),挥发油提取器 (天津玻璃仪器公司),荆芥、薄荷挥发油 (100 g生药 /mL),β-环糊精 (陕西志丹生物技术有限公司)。

2 方法与结果

2.1 正交试验因素水平[1]: 根据包结物的影响因素,选择挥发油与 β-环糊精投料比 (A)、包结温度 (B)、搅拌时间 (C) 3个主要因素,每个因素选择 3个水平,因素与水平见表 1。

表 1 因素水平表

Table 1 Factors and levels

水 平	因 素		
	A /(mL· g⁻¹)	B /℃	C /h
1	1∶10	50	2
2	1∶8	40	1.5
3	1∶6	30	1

2.2 包结物的制备[2]: 称取β-环糊精 (50℃恒温干燥 1.5 h) 20.00 g,加入 400 mL蒸馏水,加热溶解,按正交试验设计,缓缓加入一定量的挥发油,调至一定温度,搅拌一定的时间,静置冷却至室温,放入冰箱冷藏 24 h,抽滤。用 10 mL 95% 乙醇洗涤滤渣,晾置,在干燥箱内 50℃干燥 1 h,即得。

2.3 包结物中挥发油的提取: 精密称定干燥的包结物置于挥发油测定器中,并照《中华人民共和国药典》2000年版附录 XD挥发油测定法 (一法) 进行操

* 收稿日期: 2003-12-06