

• 制剂与质量 •

液氮快速冷冻对地龙中水溶性蛋白组成和活性的影响

王厚伟

(山东中医药大学药学院, 山东 济南 250014)

摘要:目的 探讨低温炮制工艺对地龙水溶性蛋白质组成以及溶栓与抗肿瘤活性的影响。方法 地龙的炮制采用传统与低温两种工艺,低温炮制采用液氮快速冷冻与冷冻干燥技术;采用 SDS-PAGE 与 ImageTool 软件,对两种炮制工艺的地龙蛋白质组成的差异进行定性与定量分析;应用纤维蛋白平板法与体外溶栓试验,定性定量分析两种炮制工艺的纤溶活性的差异;应用显微观察与 MTT 法,对两种炮制工艺体外抑制人肝癌细胞增殖活性进行定性与定量比较分析。结果 低温炮制工艺地龙的水溶性蛋白组成比传统炮制工艺丰富,SDS-PAGE 的蛋白条带数与浓度明显高于传统工艺;两种炮制工艺的地龙蛋白液均具有显著的抗人肝癌细胞与纤溶活性,但低温炮制工艺的两种活性显著高于传统工艺。结论 不同炮制工艺对地龙水溶性蛋白组成及其抗肿瘤与溶栓活性有显著影响;在保全地龙的蛋白质类药效成分的生物活性方面,低温炮制工艺优于传统炮制工艺。

关键词:地龙;炮制;SDS-PAGE;纤溶活性;抗肿瘤活性

中图分类号:R284.1; R286.91

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)07-0999-05

Effect of liquid nitrogen rapid freezing technology on components of water-soluble proteins in ground dragon and their activities

WANG Hou-wei

(College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of cold-processing technology on the composition of water-soluble proteins in ground dragon and their activities of thrombolysis and anti-tumor activity. **Methods** Ground dragon was respectively processed by traditional processing technology and cold-processing technology. The latter was done by the liquid nitrogen rapid freezing technology and lyophilizing technology. By means of qualitative and quantitative tests, SDS-PAGE and the software of ImageTool were applied to analyzing the difference of protein components in ground dragon from the two processing techniques. Fibrin plate method and thrombolysis test *in vitro* were carried out to determine the difference of the two processing techniques for the fibrinolytic activity. Micro-observation and MTT methods were used to assess the differences of antihepatic cancer activity between the traditional and the cold-processing groups. **Results** Compared with the traditional group, the components of water-soluble proteins in the ground dragon processed by cold-processing technique were more abundant than traditional one, and the number of protein bands and concentration in SDS-PAGE gel were more and much higher. Although the two kinds of protein solution from the different processing techniques had the visible fibrinolytic activity and antihepatic cancer activity, both activities of cold-processing technique were markedly higher than those in the traditional group. **Conclusion** Effects of different processing techniques of ground dragon on fibrinolytic activity and anti-tumor activity are significant. On protecting the bioactivity of proteins in ground dragon, the cold-processing techniques is advantage to the traditional processing technology.

Key words: ground dragon; processing; SDS-PAGE; fibrinolytic activity; anti-tumor activity

地龙又称蚯蚓,味咸,性寒,归肝、脾、膀胱经,具有清热平肝、消炎止痛、活血化瘀及主治高热狂燥等功效。已从蚯蚓中提取分离出多种药理活性成分,包

括纤溶酶、纤溶酶激活剂、钙调素、钙调素结合蛋白、胆碱酯酶、过氧化氢酶、促髓系细胞增殖组分,抗微生物蛋白,收缩血管蛋白,溶血蛋白,免疫球蛋白样

收稿日期:2006-10-08

基金项目:山东省教育厅资助项目(J06L17)

作者简介:王厚伟(1973-),男,山东日照人,讲师,博士,主要研究方向中药生物工程。

Tel: (0531)82613129 E-mail: houweiw@163.com

黏连物和抗肿瘤等成分^[1]。这些蛋白质类活性成分在传统晒干、蒸、煮等炮制工艺条件下容易降解、变性、失活,引起药效降低。针对蛋白质类药物的特点,本实验采用液氮迅速冷冻和冷冻干燥技术对地龙进行低温炮制,并对低温与传统两种炮制工艺下的地龙中水溶性蛋白的组成、溶栓活性以及抗肿瘤活性进行了比较研究。

1 仪器与试剂

美国 Labconco 77530—01 冷冻干燥机,美国 Bio-Rad 蛋白质电泳系统,AET—40SM 十万分之一电子天平,美国 NU—4750 型 CO₂ 培养箱,苏州 CJ—1F 型医用超净台,美国 Beckman 公司酶联免疫分析仪,日本 Olympus 倒置显微镜。

新鲜参环毛蚓 *Pheretima aspergillum*, E per-
rier;人肝癌 SMC721 细胞株由本实验室传代保种,
常规传代培养。

纤维蛋白原、凝血酶、丙烯酰胺、*N,N*-亚甲基双丙烯酰胺、SDS、 β -巯基乙醇(Sigma);Tris 碱、溴酚兰、甘油、考马斯亮蓝 R-250、冰醋酸、甲醇(上海巴斯德生物工程公司);胰酶、DMEM 培养基、胎牛血清(Gibco.);MTT(Sigma)。

2 方法与结果

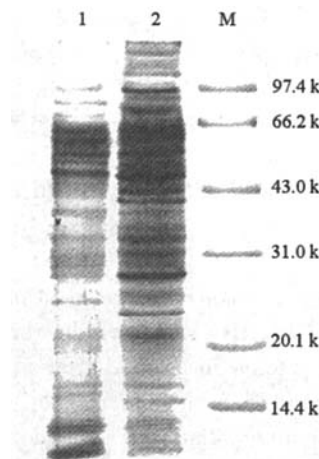
2.1 传统炮制工艺:参照《中国药典》2005 年版一部地龙项下方法,取新鲜蚯蚓,剖开腹部,除去内脏泥沙等杂质,洗净切段,晒干。

2.2 低温炮制工艺:新鲜地龙 1 条(17 g),剖开腹部,除去内脏泥沙等杂质,洗净切段;放置研钵,加入适量液氮(5~10 mL/g),迅速冷冻,将冻块压力粉碎,并将碎末转移至研钵研磨,边研磨边加液氮(每次加液氮 1~2 mL/g),直至成细末(粒度 70~120 目),并转移至冻干瓶中,冷冻干燥,制成地龙冻干粉,4℃冰箱保存备用。

2.3 蛋白质溶液的制备:准确称量 10 mg 传统炮制工艺制备的地龙药材粉末与低温炮制工艺制备的冻干粉,分别溶入 1 mL 0.05 mol/L Tris-HCl (pH 7.6)缓冲液中,充分溶解,10 000×*g* 离心 10 min,取上清液,于 4℃冰箱保存备用。

2.4 蛋白质溶液的 SDS-PAGE^[2]:配制 12%SDS-PAGE 凝胶,各取 20 μ L 两种炮制工艺所得地龙蛋白质溶液,与 5 μ L 缓冲液充分混合,水浴煮沸 2 min,10 000×*g* 离心 2 min,取上清液电泳。先以 10 mA 恒流电泳至分离胶,再调为 15 mA 恒流到电泳结束;将聚丙烯酰胺凝胶用固定液固定 2 h;倾去固定液,以考马斯亮蓝染色液染色 4 h;倾去染色液,

加入脱色液,缓慢摇动脱色,脱色到获得蓝色条带及干净的背景为宜,见图 1。结果表明,低温炮制工艺所得水溶性蛋白组成比传统炮制工艺的更加复杂,主条带数明显多于传统炮制工艺。特别是相对分子质量在 $1.44 \times 10^4 \sim 4.30 \times 10^4$ 与相对分子质量大于 6.62×10^4 以上的凝胶区段,传统炮制工艺组未见明显的主带,而低温炮制工艺组则含有至少 15 条左右的蛋白主带;相对分子质量在 $4.30 \times 10^4 \sim 6.62 \times 10^4$ 区,两种炮制工艺的蛋白条带数相近,但低温炮制工艺组条带的浓度明显高于传统炮制工艺;在 1.44×10^4 以下的低相对分子质量区,传统炮制工艺组有两条明显高于低温炮制工艺组的主带。



1-传统炮制工艺 2-低温炮制工艺 M-标识

1-traditional processing technique

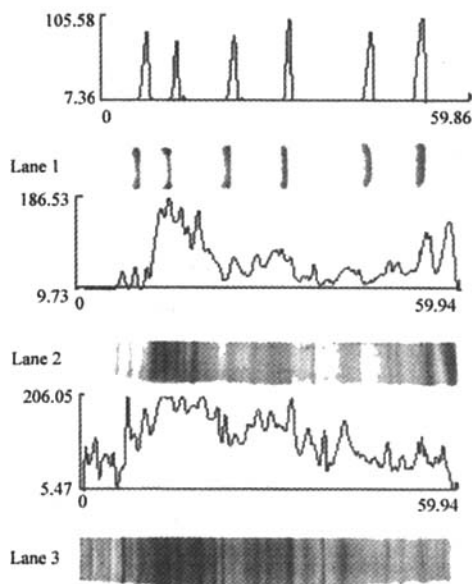
2-cold processing technique M-marker

图 1 地龙水溶性蛋白 SDS-PAGE

Fig. 1 SDS-PAGE of water-soluble proteins
in ground dragon

应用 Scion Image 分析软件对地龙的 SDS-PAGE 凝胶图像做定量扫描分析,见图 2。根据 Lane1 相对分子质量标记的蛋白峰大小,对照相应条带的蛋白的量,可以定量估测 Lane2、3 各蛋白峰的蛋白质的量。低温炮制工艺组蛋白峰数(30 ± 4)明显多于传统炮制工艺(21 ± 4);沿电泳方向,在凝胶的 25~50 mm 区段,低温炮制工艺组有 15 个左右的蛋白峰,而传统炮制工艺组在此区间内,仅有几个较小的蛋白峰;在凝胶 50 mm 以外的低相对分子质量区,传统炮制工艺组有两个较大的蛋白峰,除此之外,低温炮制工艺组的蛋白峰值均高于传统炮制工艺组的相应峰,该分析结果与图 1 结果一致。

2.5 纤维蛋白平板测定纤溶活性:纤溶酶活力测定方法参照文献报道^[3,4],稍加修改。8.1 mL 1%琼脂



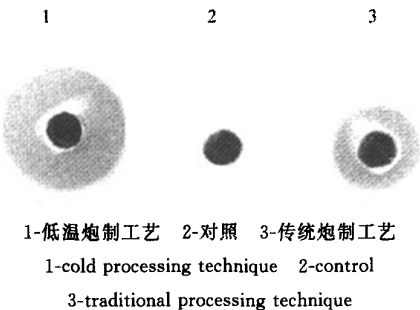
Lane 1-标识 Lane 2-传统工艺 Lane 3-低温炮制
Lane 1-marker Lane 2-traditional processing
technique Lane 3-cold-processing technique

图 2 地龙水溶性蛋白 SDS-PAGE 图像分析
Fig. 2 Gel analysis of SDS-PAGE of water-soluble
proteins in ground dragon

糖于 55℃时加入 8.1 mL 0.3%纤维蛋白原溶液和 0.65 mL 凝血酶(1BP/mL),混匀倒入平板中,静置冷却。在平板上打孔,取 10 μL 适当稀释的蛋白溶液,加入到孔中,将平板置于 37℃培养箱中培养 15 h,取出平板,测量其清晰的溶圈面积。对照加 10 μL 纤维蛋白平板缓冲液。纤溶酶活力与溶圈面积的大小成正比。可直接用溶圈面积的大小表示纤溶酶的相对活力。用尿激酶制作标准曲线,计算出纤溶酶活力大小,见图 3。可见对照孔没有出现纤维蛋白水解圈;传统炮制工艺组与低温炮制工艺组在加样孔周围出现明显的水解圈;低温炮制工艺组的水解圈面积显著大于传统炮制工艺组,显示出较强的纤溶活性。将尿激酶标准品用缓冲液依次稀释为 100、50、25、12.5、5 U/mL,分别取 10 μL 点在纤维蛋白平板上,加盖后 37℃保温 18 h,以尿激酶浓度的对数为横坐标,以尿激酶水解纤维蛋白在纤维蛋白平板上形成的水解圈面积的对数为纵坐标,制成标准曲线,回归得方程 $Y=0.8728X-0.6593$, $R^2=0.997$ 。根据标准曲线方程,得出两种炮制工艺条件下地龙水溶性蛋白组分相对于尿激酶的纤溶活力,见表 1。可见低温炮制工艺组的纤溶活性约为 480 U/mL,是传统炮制工艺组(160 U/mL)的 3 倍。

2.6 体外溶栓实验^[5]:在冰浴中混合 250 μL 血浆

和 750 μL TNTC 缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, 0.16 mol/L NaCl, 0.001% 聚山梨酸酯-80, 30 mmol/L CaCl₂, pH 7.4),迅速混匀后分装到小的 Ep 管中,每管 100 μL。37℃保温 30 min 凝块形成后,编号称定质量,小心加入 100 μL 待测样品,37℃保温 12 h,吸净 Ep 管中溶液,称定质量,2 次质量之差即为血凝块溶解的质量。采用 SPSS 10.0 统计软件包对表 1 中各组数据进行单因素方差分析。结果表明,低温炮制工艺组的体外溶栓指数为 70%左右,传统炮制工艺的溶栓指数为 24%左右,低温炮制工艺组的纤溶活性是传统炮制工艺组的 3 倍左右,与纤维蛋白平板法测定结果一致。



1-低温炮制工艺 2-对照 3-传统炮制工艺

1-cold processing technique 2-control
3-traditional processing technique

图 3 地龙水溶性蛋白纤溶活性检测结果

Fig. 3 Determination of fibrinolytic activity of water-soluble proteins in ground dragon

表 1 地龙水溶性蛋白组分的纤溶活性检测
与体外溶栓试验结果($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Results of fibrinolytic activity and thrombolysis
test *in vitro* of water-soluble protein in ground
dragon ($\bar{x}\pm s$)

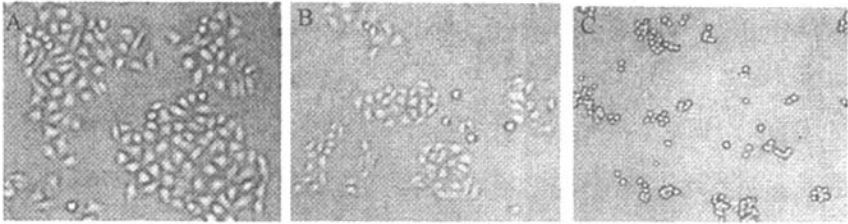
组别	纤溶活性/(U·mL ⁻¹)	体外溶栓/%
对照	0	0
低温炮制工艺	480±3.6	70±1.2
传统炮制工艺	160±1.4	24±0.2

2.7 水溶性蛋白组分抗肿瘤活性的显微观察:按产品说明配制 DMEM 培养基,用 0.1 mol/L 盐酸调 pH 值至 7.2~7.4,4℃保存;胎牛血清于 56℃灭活 30 min,-20℃保存;胰蛋白酶用 0.01 mol/L, pH 7.4 PBS 配制成 2.5 g/L 的溶液,4℃保存;MTT 溶液用生理盐水配制,使用质量浓度为 5 g/L,0.22 μm 微孔滤器滤过除菌,分装,4℃保存。人肝癌细胞株 SMC721 在含 10%精制小牛血清、双抗(青霉素 100 U/mL,链霉素 100 μg/mL)的 DMEM 培养基中于 37℃,5% CO₂ 培养箱培养,每日显微镜下观察,细胞呈单层生长,铺满培养瓶时,经胰酶消化后传代。待分瓶的 SMC721 细胞停止消化后,加入 DMEM 培养液,进行细胞计数,并调节细胞密度至

2×10⁵/mL(含 5 % FBS),分入 3 个小培养皿中,每皿 1.8 mL,置 37 ℃,5% CO₂ 培养箱培养 12 h 后,给药,除对照外,每皿加入 200 μL 不同炮制工艺所得 1 mg/mL 地龙水溶性蛋白组分,继续培养 24 h 后,应用倒置显微镜观察,见图 4。可见,对照组 SMC721 细胞贴壁生长良好;传统炮制工艺组给药

24 h 后,部分细胞浮起,虽然贴壁的细胞尽管在形态上仍然较为完整,但数量显著减少,细胞体积明显比对照小,生长缓慢,近乎停止生长和分裂;低温炮制工艺给药组的细胞大量浮起死亡,少数仍然贴壁的细胞皱缩变圆,胞质回缩、细胞间隙增大。

2.8 水溶性蛋白组分抗肿瘤活性的MTT比色实



A-对照 B-传统炮制工艺 C-低温炮制工艺
A-control B-traditional processing technique C-cold processing technique
图 4 不同炮制工艺对地龙水溶性蛋白抗人肝癌细胞(SMC721)活性的影响

Fig. 4 Effect of water-soluble proteins in ground dragon processed by different techniques on activity of anti-hepatic cancer SMC721

验^[6]:取对数生长期的 SMC721 细胞,以 1×10⁵/mL 密度接种于 96 孔板,每孔 100 μL,埋板 12 h 后加药。不同炮制工艺的地龙水溶性蛋白组分设 5 个剂量,分别为 1 250、250、50、10 μg/mL,每个剂量均设 3 个复孔。给药 24 h 后,小心吸弃孔内培养上清,每孔以 PBS 洗 1 次,再将上清吸弃。每孔加完全 DMEM 培养液 100 μL,MTT 液 10 μL,37 ℃/5% CO₂ 饱和继续孵育 4 h 后中止培养,小心吸弃孔内培养上清。每孔加入 150 μL DMSO,振荡 10 min,充分溶解后,用酶标定量测试仪测定 490 nm 处的吸光度(A)值,计算细胞生长抑制率[细胞生长抑制率=(对照组平均 A 值-用药组平均 A 值)/对照组平均 A 值×100%],见表 2。可见两种炮制工艺所得地龙水溶性蛋白组分对体外培养的人肝癌细胞(SMC721)均具有显著的增殖抑制作用;在给药后 24 h,给以 1.25 mg/mL 低温炮制工艺所得地龙蛋白组分对 SMC721 细胞增殖抑制率(36%左右)显著高于传统炮制工艺组(15%左右)。

3 讨论

动物药活性成分以多肽和蛋白质为主,受历史技术条件的限制,传统动物药的炮制以简单的在常温或高温条件下获得药材的干燥品为主。然而,自然晒干或高温蒸煮的炮制工艺容易引起药材中蛋白质类活性成分的降解和变性。针对蛋白质类活性成分易降解、变性的特点,本研究采用液氮快速冷冻技术和冷冻干燥技术对地龙进行低温炮制。对低温与传统炮制工艺下的地龙水溶性蛋白的组成、溶栓活性

表 2 不同炮制工艺的地龙水溶性蛋白组分对 SMC721 细胞的增殖抑制作用($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Inhibitory effect of water-soluble proteins in ground dragon processed by different techniques on SMC721 proliferation ($\bar{x}\pm s$)		
剂量/(μg·mL ⁻¹)	细胞生长抑制率/%	
	低温炮制工艺	传统炮制工艺
10	2.52±0.45	1.44±0.25
50	10.38±1.37	3.15±0.89
250	22.24±0.96	8.53±1.14
1 250	36.57±2.21	14.48±1.07

以及抗肿瘤活性的比较分析结果表明:在保全蛋白质类药效成分的生物活性方面,低温炮制工艺优于传统炮制工艺。

地龙溶栓与抗肿瘤活性成分主要是蛋白类的蚓激酶和地龙肽^[1]。在传统炮制工艺条件下,新鲜地龙自然晒干为干燥品的历时较长,其间,由于组织和细胞逐渐被破坏而释放出的蛋白酶容易引起蛋白类活性成分的降解;另外地龙蛋白组分在外界不良理化因素的长时间作用下容易变性,导致相应生物活性的丧失。进一步研究证实,采用晒干工艺制备的地龙干燥体中蚓激酶的量很低,纤溶活性几乎完全被破坏。相反低温炮制工艺将新鲜地龙用液氮迅速冷冻,可以在短时间内冻结内部组织细胞的生物酶活性,进而在低温条件下研制成粉末后,采用冷冻干燥技术制成冻干粉。整个炮制工艺在低温下完成,历时短暂,可以有效阻止生物酶的活性,避免蛋白类活性成分的降解与变性。结果表明,传统炮制工艺所得地龙

蛋白组分的 SDS-PAGE 条带数明显少于低温炮制工艺,溶栓活性与抗肿瘤活性也显著低于低温炮制工艺。

在传统炮制工艺条件下,地龙部分蛋白组分被降解为小分子肽或游离的氨基酸,该类产物或在 SDS-PAGE 凝胶的低相对分子质量区积聚成带,或较早跑出凝胶进入电泳缓冲液而不能在凝胶上显示;变性的蛋白组分在电泳上样前,经离心沉淀而被除去;低温炮制工艺与之不同,使用液氮将新鲜的地龙快速冷冻,在低温下研制成粉末后,应用冷冻干燥技术制成冻干粉,整个工艺流程在低温下进行,蛋白酶的活性极低,可有效阻止蛋白组分的降解和变性,更好的保全其活性。因此,低温炮制工艺的 SDS-PAGE 总条带数多于传统炮制工艺,但在低相对分子质量区,传统炮制工艺明显多出两条主带。另外两种炮制工艺所得地龙的水溶性蛋白组成都很复杂,多种相对分子质量相近的组分在 SDS-PAGE 中没有有效分开,导致凝胶图像扫描分析结果的蛋白峰型不规则,峰间距小,甚至重叠,明显的蛋白峰数低

于电泳的实际条带数。理论上,本研究提出的低温炮制工艺也适用于活性成分以多肽和蛋白质为主的其他动物类中药的炮制。

References:

- [1] Wang H Q, Liang X W, Fan X Y. Studies on bio-engineering technology of earthworm [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31(5): 386-387.
- [2] Ausubel F, Brent R, Kingston R E, et al. *Concise Guidebook of Experiment Molecular Biology* (精编分子生物学实验指南) [M]. Beijing: Science Press. 1995.
- [3] Lee S K, Bae D H, Kwon T J, et al. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. KDO-13 isolated from soybean paste [J]. *J Microbiol Biotechnol* (微生物生物技术学报), 2001, 11: 845-852.
- [4] Park Y S, Cha M H, Yong W M, et al. The purification and characterization of *Bacillus subtilis* tripeptidase (pepT) [J]. *J Biochem Mol Biol* (生物化学与分子生物学学报), 1999, 32: 239-246.
- [5] Zhang Y B, Xu C F. Construction, expression, purification and characterization of a thrombin activated single chain Urokinase type Plasminogen activator [J]. *Chin J Biotechnol Biochem Molecular Biol* (中国生物化学与分子生物学报), 1999, 15: 403-408.
- [6] Xu S Y. *Methodology in Pharmacological Experiment* (药理实验方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002.

超临界 CO₂ 反相微乳萃取人参中人参皂苷的研究

罗登林, 聂英, 刘建学, 郭金英

(河南科技大学食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471003)

摘要:目的 提高超临界 CO₂ 萃取人参中人参皂苷的萃取率。方法 采用二-(2-乙基己基)磺基琥珀酸钠(AOT)/乙醇/水/超临界 CO₂ 反相微乳对人参皂苷的萃取进行研究。结果 在萃取压力 25 MPa、温度 45 ℃、时间 4 h、CO₂ 流量为 2 L/h 条件下,超临界 CO₂ 反相微乳萃取的人参皂苷萃取率是乙醇/水/超临界 CO₂ 萃取的 3.2 倍。人参皂苷的萃取率随加入的水量、萃取压力的增大而增大,随 AOT 浓度、萃取温度的升高先增大后减小。萃取人参皂苷时,采用适量水先浸泡物料与萃取过程中加入水相比,人参皂苷的萃取率要提高 30%。结论 结合实验结果与理论探讨,超临界 CO₂ 反相微乳萃取人参皂苷的机制主要是其形成的极性水池增大了对人参皂苷的溶解度。

关键词:人参;人参皂苷;超临界 CO₂ 反相微乳萃取;超临界 CO₂ 萃取

中图分类号:R284.2; R286.02

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)07-1003-04

Ginsenosides from *Panax ginseng* by supercritical CO₂ reverse microemulsion extraction

LUO Deng-lin, NIE Ying, LIU Jian-xue, GUO Jin-ying

(Food and Bioengineering College, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

Abstract: Objective To raise ginsenosides yield from *Panax ginseng* by supercritical CO₂ reverse microemulsion extraction. **Methods** Bis-(2-ethylhexyl) sodium sulphosuccinate (AOT)/ethanol/water/supercritical CO₂ reverse microemulsion extraction was carried out to extract ginsenosides. **Results** The ginsenosides extracting rate by supercritical CO₂ reverse microemulsion extraction was 3.2 times that of by ethanol/water/supercritical CO₂ extraction in extracting pressure 25 MPa, extracting temperature 45 ℃,

收稿日期:2006-11-29

作者简介:罗登林(1976—),男,湖北麻城人,博士,主要从事天然产物生化技术、超临界流体技术和食品营养与安全的研究。

Tel:(0379)64282342 E-mail:luodenglin@sohu.com