

穿山甲高温砂炒炮制增效机制研究

刘 逊¹, 刘 睿², 赵呈雷³, 吴芝园¹, 朱 晔¹, 谈如蓝¹, 刘竞天¹, 张 迪^{1*}

1. 苏州卫生职业技术学院, 江苏 苏州 215009

2. 南京中医药大学, 江苏 南京 210023

3. 江苏省中医药研究院, 江苏 南京 210028

摘要:目的 穿山甲传统生品不入药,需炮制后方可入药,因此对穿山甲高温砂炒的炮制机制进行研究。方法 采用 TLC、Nano LC-Q Exactive Orbitrap MS 对穿山甲炮制前后的脂溶性成分及蛋白成分的变化进行分析,同时,对炮制过程中显著增加的环二肽成分的形成进行模拟炮制。并对 *L*-丝-*L*-酪环二肽的活性进行筛选。结果 穿山甲经砂炒炮制后,脂溶性成分无显著变化、蛋白成分显著减少,环二肽显著增加。环二肽的形成主要与炮制过程中的受热有关,在低温条件下,直链肽 N 端可环化生成 *L* 构型的环二肽,在高温环境下,直链肽 N 端及 C 端均可快速环化生成环二肽。*L*-丝-*L*-酪环二肽可延长凝血时间并增加奶牛乳腺上皮细胞增殖率和乳蛋白合成相关基因表达,同时还具有显著的镇痛活性,这与穿山甲传统功效相一致。结论 穿山甲经炮制后产生的 *L*-丝-*L*-酪环二肽可能是穿山甲炮制增效的物质基础。这对揭示穿山甲药效物质基础、寻找穿山甲替代资源、保护穿山甲具有重要意义。

关键词: 穿山甲; 炮制机制; Nano LC-Q Exactive Orbitrap MS; 脂溶性成分; 蛋白成分; *L*-丝-*L*-酪环二肽; 模拟炮制; 凝血时间; 镇痛活性

中图分类号: R283.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)07-1603-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.07.016

Study on synergistic mechanism of pangolin in high temperature sand-fried processing

LIU Xun¹, LIU Rui², ZHAO Cheng-lei³, WU Zhi-yuan¹, ZHU Ye¹, TAN Ru-lan¹, LIU Jing-tian¹, ZHANG Di¹

1. Suzhou Health College, Suzhou 215009, China

2. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

3. Jiangsu Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

Abstract: Objective Traditional raw pangolin products are not used as medicine, which can only be used as medicine after processing. Therefore, the processing mechanism of high temperature sand-fried pangolin was studied. **Methods** The changes of liposolubility and protein composition of pangolin before and after processing were analyzed by TLC and Nano LC-Q Exactive Orbitrap MS. Meanwhile, the simulation processing of cyclic dipeptides, which were significantly increased during processing, was performed. The activity of *L*-serine-*L*-tyrosine cyclic dipeptide was screened. **Results** The results showed that there was no significant change in fat-soluble components, significant decrease in polypeptides and significant increase in cyclic dipeptides after the sand-fried processing of pangolin. The formation of cyclic dipeptides was mainly related to the heating of the processing. At low temperature, the N-terminal of the linear peptide could be cycled to form L-shaped cyclic dipeptides. At high temperature, the N-terminal and C-terminal of the linear peptide could be rapidly cycled to form cyclic dipeptides. *L*-serine-*L*-tyrosine cyclic dipeptide could prolong coagulation time and increase the proliferation rate of mammary epithelial cells and the expression of genes related to milk protein synthesis in dairy cows. It also had significant analgesic activity, which was consistent with the traditional efficacy of pangolin. **Conclusion** These results suggested that large amounts of *L*-serine-*L*-tyrosine cyclic dipeptide produced by the processing of pangolin may be one of the material bases for enhancing the processing efficiency of pangolin. It was of great significance for

收稿日期: 2019-01-17

基金项目: 苏州市科学技术局民生科技项目“基于酪氨酸肽类同系物的炮山甲通乳物质基础研究”(SYS201787)

作者简介: 刘 逊(1983—), 讲师, 研究方向为穿山甲炮制机制研究。Tel: 15050151677 E-mail: 24411650@qq.com

*通信作者 张 迪(1985—), 讲师, 研究方向为鳞甲类中药药效研究。Tel: 18362663297 E-mail: 16150731@qq.com

revealing the material basis of pharmacodynamics of pangolin, searching for alternative resources and protecting pangolin.

Key words: Pangolin scales; processing mechanism; Nano LC-Q Exactive Orbitrap MS; liposoluble constituents; protein; *L*-serine-*L*-tyrosine cyclic dipeptide; simulation processing; coagulation time; analgesic activity

穿山甲来源于鲛鲤科动物中华穿山甲 *Manis pentadactyla* Linnaeus 的鳞甲, 味咸, 性微寒, 入肝、胃经, 具有通经下乳、活血消癥、消肿排脓、搜风通络的功效^[1]。临床常用于产妇乳汁不下、心绞痛、风湿痹痛等^[2]。虽然穿山甲临床疗效确切, 但由于资源的濒危, 引起了国内外的高度关注^[3-4], 造成了不良影响^[5]。穿山甲传统需炮制入药, 一般需在 210~250 °C 温度下砂炒数分钟, 高温是穿山甲炮制的核心。但穿山甲炮制机制不清, 其炮制科学内涵有待揭示与阐明。在前期研究中, 本课题组通过经典分析及分离手段, 从炮山甲中成功分离得到了 18 碳直链脂肪酸、二十三酰丁胺、胆固醇、胆固醇(磺酸盐)、*L*-丝-*L*-酪环二肽、*D*-丝-*L*-酪环二肽、*L*-甘-*L*-酪环二肽等成分。并发现穿山甲药材仅含有微量的 *L*-丝-*L*-酪氨酸环二肽, 不存在 *D*-丝-*L*-酪环二肽及 *L*-甘-*L*-酪环二肽; 但按《中国药典》2015 年版规定炮制后, 3 种环二肽均可测出, 其中 *L*-丝-*L*-酪氨酸环二肽含量最高, 可达 0.2%, 还是不同来源穿山甲炮制品的共有成分。

环二肽又称为二酮哌嗪类成分, 具有广泛的生物活性, 如抗氧化、保护神经元及改善脑功能、抗凝、镇痛、免疫调节及神经递质类活性等^[6-8]。其中从穿山甲中分离得到的 *L*-丝-*L*-酪氨酸环二肽不仅能够提高小鼠常压缺氧的耐受能力^[9], 还具有活血化瘀的活性^[10], 但目前对于 *L*-丝-*L*-酪氨酸环二肽的活性缺乏进一步的研究。环二肽可由游离氨基酸在高温下缩合成环二肽^[11], 也可在天然产物的发酵、回流等过程中, 由直链肽 N 端支链在极性溶剂中长时间受热, 在环境的诱导下缩合形成, 但时间长达数日或数周^[12]。而穿山甲在炮制过程中仅需要数分钟甚至数十秒就可以形成大量环二肽, 但目前对穿山甲干热、高温炮制过程中环二肽的快速形成机制及其活性作用的机制探讨甚少, 对 *L*-丝-*L*-酪氨酸环二肽的生成机制及活性进行深入研究, 以期对炮制增效提供科学依据, 同时对于穿山甲新替代资源也有重大的现实意义。

1 材料

1.1 仪器

TLC Scanner4 System 薄层系统, 瑞士 CAMAG 公司; DGLC-3600 UltiMate® 3000 高效液相色谱仪、

MSC-ADVANTAGE 生物安全柜、Thermo Q Exactive Orbitrap 质谱仪, 美国 Thermo Fisher 公司; SepaxBio-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 中国赛分公司; 戴安 U3000 NanoRSLC 纳升液相系统, 美国 Thermo Fisher 公司; Reprosil C₁₈AQ 色谱柱 (150 mm×75 mm, 5 μm), 德国迈克公司; 垂直板电泳装置, 美国 Bio-Rad 公司; HF240 二氧化碳恒温培养箱, 上海力康公司; CYTORECON 细胞计数仪, 美国 GE 公司; Synergy H4 BioTek 全自动酶标仪, 美国 BioTek 公司。

1.2 试剂

穿山甲样品为苏州卫生职业技术学院馆藏标本, 经苏州卫生职业技术学院讲师刘逊鉴定为鲛鲤科动物中华穿山甲 *Manis pentadactyla* Linnaeus 的鳞甲; *L*-丝-*L*-酪环二肽、*D*-丝-*L*-酪环二肽、*L*-甘-*L*-酪环二肽、丝-酪-甘氨酸三肽, 质量分数均>99%, 由实验室自制; 乙腈为质谱纯, 甲醇、乙醇、三氟乙酸均为色谱纯, 美国 Thermo Fisher 公司; 质谱测序级胰蛋白酶, 美国 Promega 公司; 活化部分凝血激酶时间 (APTT) 试剂盒、凝血酶时间 (TT) 试剂盒均购自上海太阳生物技术有限公司; PBS 溶液 (HyClone) 购自北京化学试剂公司; 胎牛血清、胰岛素转铁蛋白溶液、胰蛋白酶/EDTA、双抗、白细胞介素-1ra (IL-1ra)、表皮生长因子、氢化可的松、催乳素购自 Sigma 公司; 标准蛋白 Marker、5×蛋白上样缓冲液、考马斯亮蓝快速染色液购自南京碧云天生物技术有限公司。

1.3 实验动物

SPF 级 ICR 小鼠, 雌雄各半, 体质量 18~22 g, SPF 级日本大耳白兔, 雄性, 体质量 1.8~2.2 kg, 购自上海斯莱克实验动物有限公司, 许可证号 SCXK (沪) 2017-0005。

2 方法与结果

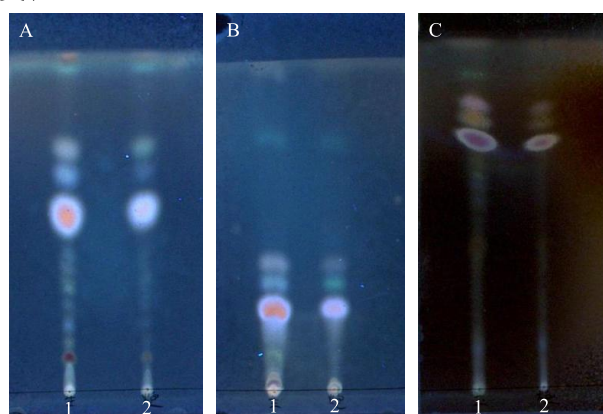
2.1 穿山甲炮制

取净穿山甲, 大小分开, 照烫法用砂烫至鼓起, 洗净, 干燥^[1]。

2.2 穿山甲炮制前后成分变化研究

2.2.1 炮制前后脂溶性成分分析 称取穿山甲药材粗粉 2 g, 置 250 mL 圆底烧瓶中, 加入二氯甲烷 60 mL, 回流 2 h, 放冷, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加二

氯甲烷 1 mL 使溶解, 即得供试品溶液。另取穿山甲炮制品(炮山甲)粗粉 2 g, 同法制成炮山甲溶液。用毛细管各吸取穿山甲药材溶液和炮山甲溶液, 点于同一硅胶 G 薄层板上, 分别以苯-丙酮(20:1)、石油醚-乙醚-冰醋酸(10:10:0.5)、正己烷-醋酸乙酯-冰醋酸(7:2:0.5)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 在 105 ℃ 加热数分钟, 置紫外光灯(365 nm)下检视。穿山甲药材色谱中, 与炮山甲色谱在相同的位置上, 显示相同的荧光斑点, 见图 1。结果表明, 穿山甲的脂溶性成分在炮制前后基本相同, 在炮制过程中未发生显著变化。



A-苯-丙酮(20:1) B-石油醚-乙醚-冰醋酸(10:10:0.5) C-正己烷-醋酸乙酯-冰醋酸(7:2:0.5) 1-穿山甲药材 2-炮山甲
A-benzene-acetone (20:1) B-petroleum ether-ether-acetic acid (10:10:0.5) C-hexane-ethyl acetate-acetic acid (7:2:0.5) 1-*Manis Squama* 2-product of *Manis Squama*

图 1 穿山甲炮制前后脂溶性成分的 TLC 图谱

Fig. 1 TLC of liposoluble constituents before and after pangolin processing

2.2.2 炮制前后蛋白类成分分析^[13]

(1) 质谱条件: Nano LC-Q Exactive Orbitrap MS 质谱仪, 使用 Reprosil C18AQ (150 mm×75 mm, 5 μm) 色谱柱, 体积流量 400 nL/min, 流动相 A 为乙腈-甲酸-水(2:0.2:98), 流动相 B 为乙腈-甲酸-水(80:0.2:20), 2%~30% B 梯度洗脱 150 min。喷雾电压 2.5 kV, 离子传输毛细管温度为 200 ℃, 质谱一级全扫描范围为 m/z 300~2 000, 分离宽度为 3, 串联质谱分析采用一级质谱数据依赖的二级质谱扫描模式。采用 Xcalibur 软件进行数据采集。

(2) 穿山甲蛋白酶解液样品的制备: 称取穿山甲药材及炮山甲粉末 20 mg (200 目), 按文献方法将穿山甲粉末加入蛋白提取液进行处理^[13], 提取液上样, SDS-PAGE 垂直凝胶电泳, 将凝胶切条, 酶

解, 脱盐, 得蛋白质胶内酶解液, 进行测定, 穿山甲炮制前后蛋白总离子流图见图 2。

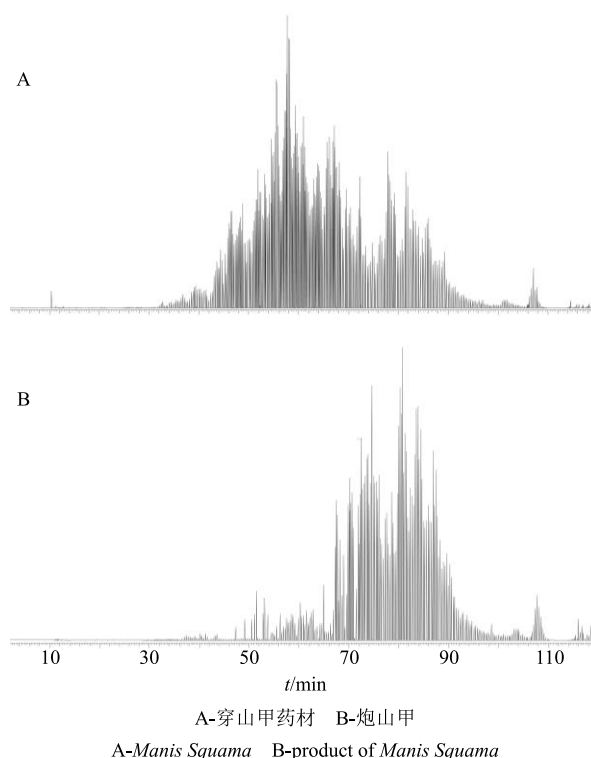


图 2 穿山甲炮制前后蛋白成分 Nano MS 的总离子流图
Fig. 2 Nano MS total ion flow diagram of protein constituents before and after pangolin processing

(3) 分析结果: 通过鉴定发现穿山甲炮制前后蛋白成分差异显著, 穿山甲药材鉴定出 136 个蛋白成分, 但经高温砂炒后仅鉴定出 36 个蛋白成分。

在鉴定的蛋白质类成分中, 穿山甲药材主要有角蛋白(keratin) 16 个、桥粒蛋白(desmoplakin) 6 个、结合蛋白(binding protein) 7 个、肌动蛋白(actin) 5 个、凝集素(lectin) 3 个、富含亮氨酸重复序列蛋白(leucine rich repeat containing) 2 个等蛋白成分; 炮山甲主要有角蛋白(keratin) 8 个和其他蛋白成分。穿山甲药材及炮山甲含有 20 个共有蛋白成分。

穿山甲药材中 48 个蛋白含有丝氨酸-酪氨酸或甘氨酸-酪氨酸肽段序列, 其中蛋白 AGA (id P30919.2) 所含的丝氨酸-酪氨酸-甘氨酸(SYG)片段在炮山甲中未鉴定出, 表明本片段可能在炮制过程中环化成小肽; 由于课题组前期研究发现, 在穿山甲炮制过程中 L-丝-L-酪环二肽、D-丝-L-酪环二肽、L-甘-L-酪环二肽显著增加, 并呈规律性变化, 因此本研究以 SYG 为设定模版进行合成, 用于模拟环二肽形成机制。

2.3 环二肽形成机制研究

2.3.1 色谱条件 Sepax Bio-C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1%三氟乙酸水溶液, 2%乙腈等度洗脱; 柱温 30 °C; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 210 nm; 进样量 10 μL。

2.3.2 对照品溶液制备 精密称取 *L*-丝-*L*-酪环二肽、*D*-丝-*L*-酪环二肽、*L*-甘-*L*-酪环二肽对照品适量, 加“2.3.1”项色谱条件下的流动相制成含 *L*-丝-*L*-酪环二肽 10.89 μg/mL、*D*-丝-*L*-酪环二肽 12.31 μg/mL、*L*-甘-*L*-酪环二肽 11.77 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液制备 精密称取丝氨酸-酪氨酸-甘氨酸肽段 10 mg, 置 250 mL 圆底烧瓶中, 精密加

入 100 mL 水, 分别回流 0.5、1、2、3、4、5、6、8、16 h, 放冷至室温, 再称定质量, 用水补足减失的质量, 摇匀, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得水热回流供试品溶液。精密称取丝氨酸-酪氨酸-甘氨酸肽段 10 mg, 置坩埚中, 210 °C 分别加热 1、2、3、4、5、6、8、10 min, 放冷至室温, 精密加入 100 mL 水使溶解, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得 210 °C 加热供试品溶液。同法制成 230、250 °C 加热条件下的供试品溶液。

2.3.4 峰面积测定 按“2.3.1”项色谱条件对各样品进行 HPLC 测定, 样品中 *L*-丝-*L*-酪环二肽、*D*-丝-*L*-酪环二肽、*L*-甘-*L*-酪环二肽峰面积随着炮制温度和炮制时间的变化规律见图 3。

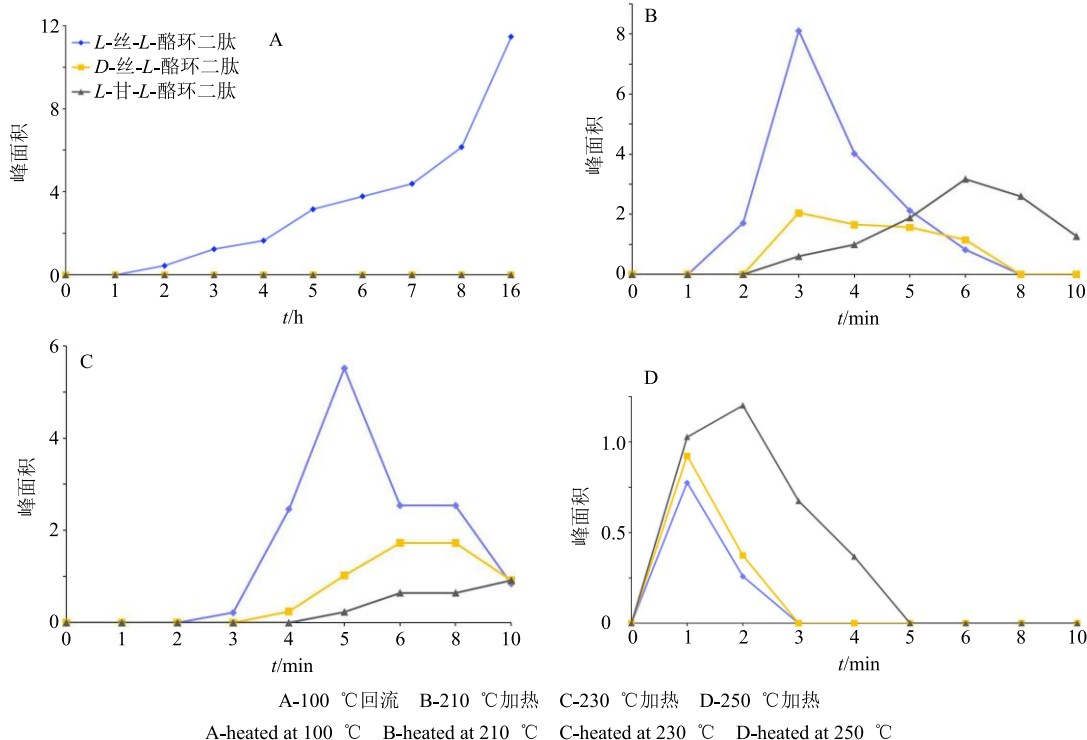


图3 模拟炮制过程中环二肽的变化曲线

Fig. 3 Change curve of cyclic dipeptide during simulation processing

2.3.5 结果分析 直链丝-酪-甘氨酸三肽 100 °C 条件下缓慢环化生成环二肽, 且仅生成 N 端 *L* 构型的环二肽, 在 210~250 °C 高温条件下可快速环化生成环二肽, 其中在 210~230 °C 时首先生成 N 端 *L* 构型的环二肽, 再生成 *D* 构型的环二肽, 随后生成 C 端的环二肽。在 250 °C 条件下, N 端和 C 端可同时环化生成环二肽, 且以 C 端环二肽和 *D* 构型环二肽为主要生成物, 三者稳定性 *L*-丝-*L*-酪环二肽 < *D*-丝-*L*-酪环二肽 < *L*-甘-*L*-酪环二肽。环二肽的形成机制见图 4。

2.4 *L*-丝-*L*-酪环二肽活性研究

2.4.1 醋酸扭体实验^[14] ICR 小鼠 60 只, 随机分成 5 组, 依次为对照组 (生理盐水), 阿司匹林组 (100 mg/kg, ig), *L*-丝-*L*-酪环二肽低、中、高剂量组 (10、20、40 mg/kg, ig), 每日给药 1 次, 连续给药 3 d。小鼠末次给药 1 h 后, 每只小鼠均 ip 0.6% 冰醋酸 0.2 mL, 计数其在 30 min 内的扭体次数。*L*-丝-*L*-酪环二肽对小鼠扭体反应的抑制率结果见表 1, 与对照组比较, *L*-丝-*L*-酪环二肽低剂量组能减少小鼠扭体次数 ($P < 0.05$), 中、高剂量组能显著减少小鼠扭

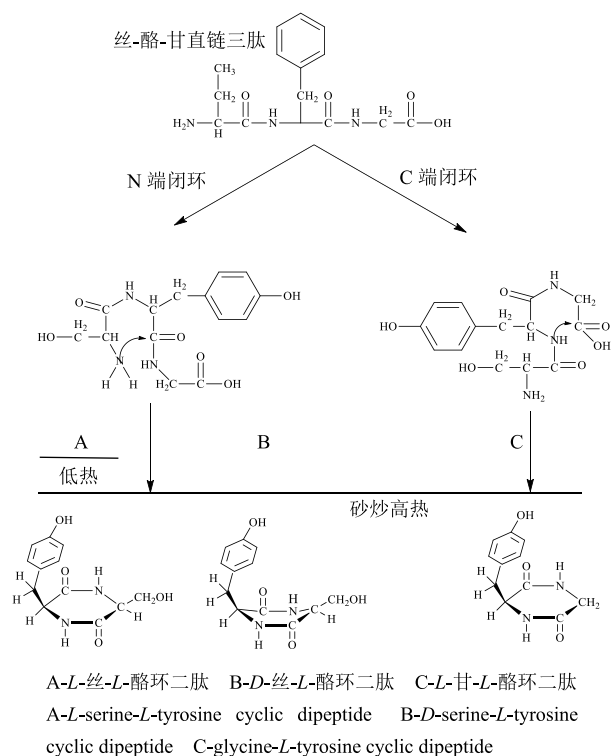


图 4 环二肽在炮制过程中的形成机制

Fig. 4 Formation mechanism of cyclic dipeptide

表 1 *L*-丝-*L*-酪环二肽对冰醋酸致小鼠扭体反应的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 1 Dose-related analgesic effects of administration of *L*-serine-*L*-tyrosine cyclic dipeptide in mouse writhing test ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	扭体次数	抑制率/%
对照	—	41.21 ± 5.81	—
阿司匹林	100	23.83 ± 3.83**	42.17
<i>L</i> -丝- <i>L</i> -酪环二肽	40	19.27 ± 3.26**	53.23
	20	18.75 ± 4.68**	54.50
	10	32.53 ± 5.42*	21.03

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

体次数 ($P < 0.01$), 显示较好的镇痛效果。

2.4.2 抗凝活性实验^[15] 家兔耳缘静脉取血 4.5 mL, 迅速与浓度为 0.109 mol/L 的柠檬酸钠溶液混匀(血液体积与柠檬酸钠溶液体积比为 9 : 1)。将混合液用离心机以 3 000×*g* 离心 15 min, 收集上层黄色血浆, 血浆随机分成 4 组, 依次为对照组(生理盐水), *L*-丝-*L*-酪环二肽低、中、高剂量组(0.25、0.50、1.00 mg/mL), 每组平行 8 次; 按试剂盒说明方法测定 APTT、TT。*L*-丝-*L*-酪环二肽的抗凝活性结果见

表 2, 由结果可知, 与对照组比较, *L*-丝-*L*-酪环二肽高质量浓度(1.00 mg/mL)可延长家兔血浆 APTT 值 ($P < 0.05$), *L*-丝-*L*-酪环二肽中、高质量浓度(0.50、1.00 mg/mL)可延长家兔血浆 TT 值 ($P < 0.05$)。

表 2 *L*-甘-*L*-酪环二肽凝血时间 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of *L*-serine-*L*-tyrosine cyclic dipeptide on rabbit plasma APTT and TT ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ (mg·mL ⁻¹)	APTT/s	TT/s
对照	0	24.3 ± 2.32	35.39 ± 2.68
<i>L</i> -丝- <i>L</i> -酪环二肽	1.00	29.5 ± 3.88*	41.52 ± 3.56*
	0.50	26.7 ± 3.41	40.16 ± 2.03*
	0.25	26.1 ± 1.71	37.77 ± 2.91

与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

2.4.3 奶牛乳腺上皮细胞(BMECs)增殖率和乳蛋白合成相关基因表达^[16] 奶牛乳腺组织取自健康的黑白花奶牛乳腺组织, 迅速带回实验室, 剪去外层组织, 取里层组织块装入含 3×双抗的 PBS 缓冲液的贮液瓶中, 转入超净台中经含 3×双抗的 PBS 清洗 3 遍、75%医用酒精(30 s)清 1 遍、含 1×双抗的 PBS 清洗 3 遍后, 用眼科剪剪去乳腺组织块的表面部分, 于深层腺泡多的地方剪取 1 mm³ 大小的小块装入 5 mL 的离心管中, 充分剪碎后加入等体积的 0.5%的 II 型胶原酶, 置于 37 °C 的培养箱中消化 1 h, 每隔 20 分钟拿出轻轻摇晃离心管 1 次, 使小组织块充分消化。消化液用 80 目的细胞滤网滤过, 收集滤液于 15 mL 的离心管中, 1 300 r/min 离心 5 min 后, 移去上清。然后用 PBS 溶液重新悬浮细胞, 1 300 r/min 离心 3 min 后, 再次吸弃上清, 培养液重新悬浮细胞后接种于 25 cm² 的培养瓶中, 置于培养箱(37 °C、5% CO₂)中培养。

将上述分离纯化后的第 3 代 BMEC 密度调整为 5×10⁵ 个/孔, 接种于 25 cm² 的培养瓶中, 每瓶接种 5 mL; 密度调整为 3×10⁵ 个/孔, 接种于 6 孔细胞培养板上, 每孔接种 2.5 mL; 密度调整为 1×10⁴ 个/孔, 接种于 96 孔细胞培养板上, 每孔接种 200 μL。分别于每孔加入含 10%胎牛血清的 DMEM/F12 完全培养液(含 1 μg/mL 氢化可的松、0.5%胰岛素转铁蛋白硒钠、10 ng/mL 表皮生长因子、5 μg/mL 催乳素)直至 80%~90%细胞贴壁, 弃去培养基, 然后于无血清培养基中饥饿培养 24 h。

第 3 代 BMEC 贴壁处理 24 h 后, 用无 FBS 的 DMEM/F12 培养基饥饿过夜, 然后用 *L*-丝-*L*-酪氨酸环二肽分别代替 0%、25%、50% 和 100% 的游离 Ser 和 Tyr, 进行筛选。每组处理 6 个重复, 每组实验重复 2 次。BMECs 的增殖率 (RGR) 采用 MTT 法测定。基因表达采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法进行检测。*L*-丝-*L*-酪氨酸环二肽对 BMECs 增殖率和乳蛋白合成相关基因表达的影响见表 3。

乳蛋白基因包括 β -酪蛋白 (CSN2)、 α s1-酪蛋白 (CSN1S1)、 κ -酪蛋白 (CSN3), 乳蛋白合成相关基因包括 II 型小肽转载体基因 (PEPT2)、氨肽酶基因 (APN), 内参基因为 GAPDH、 β -actin 和 RN18S1, 引物序列见表 4。

表 3 *L*-丝-*L*-酪氨酸环二肽替代游离 Ser 和 Tyr 对 BMECs 增殖率和乳蛋白合成相关基因表达的影响 ($n = 6$)

Table 3 Effects of substitution of free amino acids with *L*-serine-*L*-tyrosine cyclic dipeptide on gene expressions of milk protein, PEPT2, and APN in BMECs ($n = 6$)

组别	RGR/%	基因相对表达量				
		CSN1S1	CSN2	CSN3	PEPT-2	APN
0%替代	100.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
25%替代	111.89*	8.52*	1.51*	1.49*	1.40*	1.20
50%替代	112.89*	1.90	1.16	0.88	1.13	0.91
100%替代	99.48	1.65	0.95	0.69*	0.92	0.89

与 0% 替代比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs 0% replacement

表 4 引物序列

Table 4 Primer sequences and parameters

基因	GenBank 编号	引物序列 (5'→3')
GAPDH	XM_001252479	F: GGTCATCATCTCTGCACCT
		R: GGTCATAAGTCCCTCCACGA
β -ACTIN	NM_173979.3	F: AACTCCATCATGAAGTGTGACG
		R: GATCCACATCTGCTGGAAGG
RN18S1	AC_000182.1	F: GTAACCCGTTGAACCCCAT
		R: CCATCCAATCGGTAGTAGCG
CSN1S1	NM_181029	F: ACATCCTATCAAGCACCAAGGACTC
		R: GACGAAATGCTTTCAGCTTCCA
CSN2	M-64755.1	F: TCTGCCTCTGCTCCAGTCTT
		R: AGGAGGGGCATTCACTTT
CSN3	NM_174294	F: CCAGGAGCAAAACCAAGAAC
		R: TGCAACTGGTTTCTGTGTGGT
PEPT-2	NM-001079582	F: ATGGCAATGCCCAATGAAG
		R: CACCAACACAGCAACAAACAAA
APN	NM_001075144	F: TCCTCCAGCAGCAACAAAGA
		R: TCAGCCACAGGTCATTCCAC

由结果可知, *L*-丝-*L*-酪氨酸环二肽在低浓度 25% 替代游离 Ser 和 Tyr 时可显著增加 CSN1S1、CSN2、CSN3、PEPT-2 的基因表达量 ($P < 0.05$), 对 APN 表达的促进效果趋于显著, 高浓度则有抑制趋势。

3 讨论

本研究首次考察了穿山甲炮制过程中脂溶性成分和蛋白类成分的变化及环二肽的形成过程和活性, 结果表明, 穿山甲炮制前后的脂溶性成分未发生显著变化, 穿山甲鳞片中的蛋白富含丝氨酸-酪氨酸、甘氨酸-酪氨酸等肽段, 这可能与蛋白 C 端或 N 端含有涉及特定功能的结构域有关。经炮制后蛋白显著减少, 丝氨酸-酪氨酸等环二肽明显增加, 因此通过设定直链 SYG 三肽, 模拟炮制过程中的环二肽形成机制, 通过模拟炮制, 验证了穿山甲高温砂炒快速环化生成环二肽的形成机制。这与穿山甲炮制过程中 *L*-丝-*L*-酪氨酸环二肽先升高后降低, *D*-丝-*L*-酪氨酸环二肽、*L*-甘-*L*-酪氨酸环二肽均随温度的升高而增加相一致。

在高温快速环化过程中, 与直链肽相比, 环化提供了一定程度的结构预组织, 可以提高结构刚性, 或者其他有利影响, 如代谢稳定性和增强活性^[17]。环二肽是最小的环肽化合物, 六元船式构型是其最为稳定的构型。但生成船式构型的能量要高于平面构型^[18], 通过模拟炮制发现, 平面型的 *L*-丝-*L*-酪氨酸环二肽较船式构象的 *D*-丝-*L*-酪氨酸环二肽更易生成, 但 *D*-丝-*L*-酪氨酸环二肽更稳定。同时, 在高温条件下, 环化不仅发生在 N 段, 还发生在 C 端, 且 C 端环化需要的能量更高。

穿山甲具有较好的通乳、镇痛、抗凝等药理活性。穿山甲提取物能显著降低大鼠血液黏度, 增强心肌收缩功能, 还能显著抑制血小板聚集, 延长凝血时间^[19]。穿山甲水提物具有镇痛效果, 其镇痛作用的机制可能与神经递质去甲肾上腺素 (NA) 和疼痛介质前列腺素 E_2 (PGE₂) 的含量变化有关^[20]; 穿山甲还能在机体缺乳的状况下对泌乳素进行调节, 提高催乳激素水平及泌乳量, 保护乳腺组织^[21]。但这些镇痛、通乳等活性与炮制新增成分之间的联系未见探讨。

本研究发现 *L*-丝-*L*-酪氨酸环二肽具有广泛的活性, 可以延长凝血时间, 并可增加奶牛乳腺上皮细胞增殖率和乳蛋白合成相关基因表达; 但镇痛活性更为显著。含酪氨酸的二肽常有阿片样镇痛效果, 是一类非常具有临床应用潜力的镇痛药物。这主要是由

于阿片肽序列中最为保守的是其 N 末端第 1 位的 Tyr 残基, 酪氨酸可能是阿片肽构效关系中的关键基团, 例如人工合成的酪氨酸二肽即可以通过外周系统又可以透过血脑屏障在中枢神经系统发挥有效的镇痛作用^[22]; L-酪-L-精二肽(京都啡肽)作为第 1 种被发现内源性阿片肽, 具有明确的镇痛作用^[23], 而环 L-酪-L-精二肽较直链肽则有着更强的镇痛效果^[24]。L-酪-L-精二肽的镇痛作用机制, 可能是选择性地与脑啡肽能神经元特异受体结合, Ca^{2+} 内流或调动胞内结合钙为游离 Ca^{2+} , 从而促进脑啡肽释放发挥镇痛作用^[25]。提示 L-丝-L-酪环二肽也可能是通过类似的通路起到镇痛效果或是通过影响 NA、5-羟色胺、多巴胺等神经递质起到镇痛效果。

本研究与穿山甲前期药理活性研究相吻合, 这对解释其炮制增效物质基础具有指导作用。本研究对穿山甲砂炒增效机制的探讨, 对保护穿山甲资源, 寻找炮制机制类似、功效相近的穿山甲替代资源具有重要意义。但由于穿山甲基础研究相对薄弱, 相关作用机制, 有待于进一步科学实验验证, 这也将成为本课题组后期研究的重点。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 王 妍, 张国民, 哈 伟. 穿山甲应用及炮制研究进展 [J]. 中国现代中药, 2015, 17(3): 280-284.
- [3] 姜 南, 王邱文, 晁明娣. 区域合作治理跨境穿山甲犯罪对策研究 [J]. 野生动物学报, 2018, 39(4): 978-984.
- [4] Gaubert P, Antunes A, Meng H, *et al.* The complete phylogeny of pangolins: Scaling up resources for the molecular tracing of the most trafficked mammals on Earth [J]. *J Hered*, 2018, 109(4): 347-359.
- [5] 郭珊珊, 彭建军, 刘 双, 等. 中国境内野生穿山甲现状及非法贸易概况 [J]. 重庆师范大学学报: 自然科学版, 2019, 36(1): 48-54.
- [6] 贾 斌, 马养民, 陈 镒, 等. 天然产物吡啶二酮哌嗪生物碱的结构及生物活性 [J]. 化学进展, 2018, 30(8): 1067-1081.
- [7] 李文利, 夏 娟. 二酮哌嗪类化合物生物合成研究进展 [J]. 微生物学通报, 2014, 41(1): 111-121.
- [8] Martins M B, Carvalho I. Diketopiperazines: Biological activity and synthesis [J]. *Tetrahedron*, 2007, 63(40): 9923-9932.
- [9] 马雪梅, 秦永祺. 穿山甲化学成分的研究 [J]. 药学报, 1988, 23(8): 588-592.
- [10] 马雪梅, 秦永祺, 郭启栋. 穿山甲活性成分丝-酪环二肽的合成 [J]. 中草药, 1993, 24(3): 162.
- [11] Dalai P, Pleyer H L, Strasdeit H, *et al.* The influence of mineral matrices on the thermal behavior of glycine [J]. *Orig Life Evol Biosph*, 2017, 47(4): 427-452.
- [12] Hayasaka F, Yamamoto S, Sakai Y. Production method for cyclic dipeptide derived from native collagen [J]. *Food Sci Technol Res*, 2016, 22(4): 477-483.
- [13] 刘 睿, 朱振华, 吴 佳, 等. 羚羊角与山羊角蛋白质类成分比较研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(16): 3329-3334.
- [14] Park H J, Cha D S, Jeon H. Antinociceptive and hypnotic properties of *Celastrus orbiculatus* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 137(3): 1240-1244.
- [15] 刘 贝, 王淑美, 王佰灵, 等. 三棱的环二肽类成分抗凝活性 [J]. 中成药, 2015, 37(1): 34-39.
- [16] 陈 璐, 常晨城, 史彬林, 等. 含蛋氨酸二肽影响奶牛乳腺上皮细胞乳蛋白合成相关基因表达 [J]. 动物营养学报, 2016, 28(12): 4036-4043.
- [17] Borthwick A D, Costa N C D. 2,5-diketopiperazines in food and beverages: Taste and bioactivity [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2017, 57(4): 718-742.
- [18] Li Y, Li F, Zhu Y, *et al.* DFT study on reaction mechanisms of cyclic dipeptide generation [J]. *Struct Chem*, 2016, 27(4): 1165-1173.
- [19] 文秀英, 徐保国, 刘 浩. 穿山甲对心脏收缩功能和血小板聚集性的影响 [J]. 中国中药杂志, 1999, 24(1): 52-53.
- [20] 吴 珊, 农彩丽, 何显科, 等. 穿山甲水提物镇痛作用的实验研究 [J]. 广西医学, 2012, 34(1): 7-9.
- [21] 侯士良, 赵 晶, 董秀华, 等. 比较猪蹄甲、穿山甲泌乳作用实验研究 [J]. 中国中药杂志, 2000, 25(1): 46-48.
- [22] 刘 鑫, 赵 龙, 王 媛, 等. 一类全新阿片样二肽的设计合成及镇痛活性研究 [J]. 化学学报, 2016, 74(1): 44-48.
- [23] Takagi H, Shiomi H, Ueda H, *et al.* A novel analgesic dipeptide from bovine brain is a possible Met-enkephalin releaser [J]. *Nature*, 1979, 282(5737): 410-412.
- [24] Sato T, Sakurada S, Sakurada T, *et al.* Comparison of the antinociceptive effect between the cyclic dipeptide cyclo[Tyr(Et)-homoarginine] and the linear dipeptide Boc-Tyr(Et)-homoarginine-OMe in rats [J]. *Jpn J Pharmacol*, 1984, 34(1): 1-8.
- [25] Perazzo J, Castanho M A, Sa Santos S. Pharmacological potential of the endogenous dipeptide kyotorphin and selected derivatives [J]. *Front Pharmacol*, 2017, doi: 10.3389/fphar.2016.00530.