

水牛角中含巯基肽类成分的富集及抗氧化、抗炎活性研究

汤佳瑶¹, 黄思莹¹, 武文星¹, 朱悦¹, 郭盛¹, 赵明^{1,2}, 段金廛^{1,2*}, 刘睿^{1,2*}

1. 南京中医药大学/江苏省中药资源产业化过程协同创新中心/中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程研究中心/国家中医药管理局中药资源循环利用重点研究室, 江苏 南京 210023
2. 动物类中药与功能肽国际合作联合实验室, 江苏 南京 210023

摘要: 目的 富集水牛角 *Bubali Cornu* 中含巯基肽类成分 (thiols-rich peptide fractions, SHPF) 并探讨其抗氧化、抗炎活性。方法 通过巯基亲和树脂 Thiopropyl Sepharose 6B 从水牛角提取液中富集得到 SHPF, 并采用 Ellman 法测定游离巯基 (-SH) 含量; 应用单因素实验法优选富集工艺; 基于 Nano LC-MS/MS 技术鉴定 SHPF。体外通过 H₂O₂ 诱导小鼠脑微血管内皮细胞 bEnd3 氧化损伤, 采用细胞增殖检测试剂盒 (CCK-8) 和乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 试剂盒检测 SHPF 抗氧化活性; 通过脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导小鼠巨噬细胞 RAW264.7 炎症损伤, 采用实时荧光定量 PCR 法测定炎症因子白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 的分泌。结果 优化 SHPF 富集工艺为上样量 10 μ mol 游离-SH、吸附时间 1 h、洗脱剂为含 β -巯基乙醇 (β -mercaptoethanol, β -Me) 洗脱剂。从水牛角富集液中共鉴定到 704 条肽段, 其中 154 条含半胱氨酸 (cysteine, Cys) 肽段, 占总肽段的 21.9%, 主要来源于角蛋白和角蛋白相关蛋白。体外细胞实验结果表明, SHPF 能够提高氧化损伤 bEnd3 细胞的存活率, 同时降低其 LDH 的泄露, 并减少炎症损伤 RAW264.7 细胞炎症因子 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的分泌。结论 采用优选富集工艺能明显提高 SHPF 的富集效率, SHPF 具有良好抗氧化和抗炎活性, 为水牛角“清热解毒”功效物质基础的研究提供了研究思路 and 方向。

关键词: 水牛角; 含巯基肽类; 富集; 抗氧化; 抗炎; Nano LC-MS/MS 技术; 乳酸脱氢酶; 实时荧光定量 PCR 法; 白细胞介素-6; 肿瘤坏死因子- α ; 角蛋白; 清热解毒

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)09-2741-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.09.006

Antioxidant and anti-inflammatory activity of thiols-rich peptide fractions enriched from *Bubali Cornu* (water buffalo horn)

TANG Jia-yao¹, HUANG Si-ying¹, WU Wen-xing¹, ZHU Yue¹, GUO Sheng¹, ZHAO Ming^{1,2}, DUAN Jin-ao^{1,2}, LIU Rui^{1,2}

1. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, National and Local Collaborative Engineering Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine, National Administration of Traditional Chinese Medicine Key Laboratory for Chinese Medicine Resources Recycling Utilization, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China
2. Animal-Derived Chinese Medicine and Functional Peptides International Collaboration Joint Laboratory, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To enrich the thiols-rich peptide fractions (SHPF) from *Shuiniujiao* (*Bubali Cornu*, water buffalo horn) and investigate its antioxidant and anti-inflammatory activities. **Methods** SHPF was enriched from *Bubali Cornu* extract by Thiopropyl Sepharose 6B, and the content of free -SH was determined by Ellman method. The enrichment process was optimized by single factor experiment. SHPF was identified based on Nano LC-MS/MS technology. Oxidative damage of bEnd3 cells were induced by H₂O₂ *in vitro*, and cell proliferation assay kit (CCK-8) and lactate dehydrogenase (LDH) kit were used to determine the antioxidant activity of SHPF. The secretions of cytokines interleukin-6 (IL-6), IL-1 β and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were determined by qPCR after

收稿日期: 2022-10-12

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81973450); 国家重点研发计划资助 (2018YFC1706100); 江苏省高校“青蓝工程”中青年学术带头人; 江苏省农业科技自主创新项目 [CX(22)3173]; 南京中医药大学中药学一流学科开放课题 (2020YLXK009)

作者简介: 汤佳瑶 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药资源与鉴定。E-mail: jiayao_127@163.com

*通信作者: 段金廛, 教授, 博士生导师, 主要从事中药资源化学与方剂功效物质基础研究。E-mail: dja@njucm.edu.cn

刘睿, 教授, 博士生导师, 主要从事动物药资源化学研究。E-mail: liurui@njucm.edu.cn

LPS induced inflammatory damage of RAW264.7. **Results** The optimized SHPF enrichment process was as follows: loading volume of 10 μmol free -SH, adsorption time of 1 h, and eluent containing β -mercaptoethanol (β -Me). A total of 704 peptides were identified from the *Bubali Cornu* enrichment solution, among which 154 thiols-contained peptides, accounting for 21.9% of the total peptides, mainly derived from keratin and keratin-related proteins. SHPF can improve the survival rate of oxidatively damaged bEnd3 cells, reduce the leakage of LDH, and reduce the secretion of inflammatory factors IL-6, IL-1 β and TNF- α in RAW264.7 cells. **Conclusion** The optimized enrichment process can significantly improve the enrichment efficiency of SHPF, and SHPF has good antioxidant and anti-inflammatory activities, which provides a research idea and direction for the study of the material basis of *Bubali Cornu* efficacy. **Key words:** *Bubali Cornu*; thiols-rich peptide fractions; enrichment; anti-oxidant; anti-inflammatory; Nano LC-MS/MS technology; lactate dehydrogenase; real-time quantitative PCR; interleukin-6; tumor necrosis factor- α ; keratin; clearing heat-toxicity

水牛角 *Bubali Cornu* 为牛科动物水牛 *Bubalus bubalis* Linnaeus 的角, 是我国传统的动物类中药, 始载于《名医别录》, 云: “治时气寒热头痛”^[1], 具有清热解毒、凉血定惊的功效, 主要用治温病高热、神昏谵语、发斑发疹、吐血衄血、惊风、癫狂等疾病^[2], 《中国药典》2020 年版中关于水牛角的鉴别缺少水牛角功效物质的鉴别, 水牛角现代药理研究基本都以水牛角提取液或提取液部位为研究对象, 鲜有确切活性功效成分及其作用机制的系统研究, 不利于水牛角质量标准体系的完善和进一步的市场开发应用。因此, 水牛角的功效物质基础及其作用机制亟待阐明。

关于中药传统功效与现代药理作用之间关系的研究发现, 与“清热解毒”功效密切相关的药理作用主要有抗炎、抗氧化、抗细菌、解热等^[3-6]。研究发现水牛角提取液中含有大量角蛋白, 其通过二硫键 (-S-S-) 交联形成稳定结构, 在特定条件下, 如高温煎煮、酶解等, 打开-S-S-, 可得到游离的含巯基 (-SH) 肽段^[7-8]。半胱氨酸 (cysteine, Cys) 作为肽段的基本单位, 结构中含有 1 个-SH, *L*-半胱氨酸 (*L*-Cys) 在机体内能够通过胱硫醚 β -合酶 (cysteine sulfide β -synthase, CBS) 和胱硫醚 γ -裂解酶 (cysteine sulfide γ -lyase, CSE) 催化产生内源性 H_2S , 调节体内的系列氧化应激反应, 治疗与内皮功能障碍相关的疾病, 如高血压、高血脂等^[9]。课题组前期通过荧光衍生法测定水牛角中的-SH 含量为 18.3~38.3 $\mu\text{mol/g}$ ^[7], 从水牛角提取液分离得到的活性肽 YEDCTDCGN 中也含有 2 个-SH^[10]。此外, 本课题组还发现, 水牛角的解热作用与基于半胱氨酸缓解氧化应激过程密切相关^[11]。因此, 水牛角中的含巯基肽类成分 (thiols-rich peptide fractions, SHPF), 极有可能作为水牛角清热解毒功效的活性成分, 通过抗氧化、抗炎作用发挥清热解毒功效。

因此, 本实验优化水牛角中 SHPF 的富集工艺,

富集并鉴定水牛角中 SHPF, 验证其对 H_2O_2 诱导 bEnd3 细胞氧化损伤的保护作用和对脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导 RAW264.7 细胞炎症损伤的保护作用, 以期进一步推动水牛角功效物质基础研究的发展, 并为水牛角作用机制研究的开展提供科学依据。

1 材料与仪器

1.1 材料与试剂

水牛角购自江苏淮安, 经南京中医药大学刘圣金教授鉴定为牛科动物水牛 *B. bubalis* Linnaeus 的角。乙二胺四乙酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA, 分析纯)、人工小肠液, 上海源叶生物科技有限公司; BCA 试剂盒、5,5'-二硫代双-2-硝基苯甲酸 [5,5'-dithio bis-(2-nitrobenzoic acid), DTNB, 分析纯]、二硫苏糖醇 (dithiothreitol, DTT), 南京翼飞雪生物科技有限公司; 巯基亲和树脂 Thiopropyl Sepharose 6B (TS6B), 美国 Ge Healthcare 公司; Sep-pak C₁₈ 柱, 美国 Waters 公司; 细胞增殖检测试剂盒, 翌圣生物科技股份有限公司; 胎牛血清、DMEM 高糖培养基、bEnd3 细胞株、RAW264.7 细胞株, 武汉普诺赛生命科技有限公司; 基因引物, 生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 逆转录试剂盒、ChamQ SYBR qPCR Master Mix, 诺唯赞生物科技股份有限公司; 0.01 mol/L pH 7.2~7.4 磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS), 森贝伽生物科技有限公司; β -巯基乙醇 (β -mercaptoethanol, β -Me), 上海麦克林生化科技有限公司; NaCl、Cys、谷胱甘肽 (glutathione, GSH), 分析纯, 上海阿拉丁试剂有限公司; 碘乙酰胺 (iodoacetamide, IAA), 合肥博美生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

TDZ4-WS 型台式低速自动平衡离心机, 长沙湘智离心机仪器有限公司; 3-16PK 型高速冷冻离心机, 美国 Sigma 公司; 7810040 型真空浓缩蒸发仪,

美国 Labconco 公司; MO-AOR 型培养箱, 美国 Major Science 公司; BB 150 型二氧化碳培养箱、1510 型全波长酶标仪, 美国 Thermo Scientific 公司; SW-CJ-2FD 型洁净工作台, 苏州净化设备公司; 戴安 U3000 Nano RSLC 型纳升液相系统, 美国 Dionex 公司; Thermo Q Exactive Plus Orbitrap 型质谱仪, 美国 Thermo Fisher 公司; LS-P96G PCR 仪, 美国 LabServ 公司; CFX Connect 型实时荧光定量 PCR 仪, 美国 BIO RAD 公司。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 水牛角提取液的制备 称取 50 g 过 45 目筛的水牛角粉末, 加入 200 mL 人工小肠液, 在 37 °C 下恒温水浴, 磁力搅拌 5 h, 连续提取 2 次, 用纱布滤过, 合并滤液, 5000 r/min 离心 (离心半径为 12 cm) 10 min, 合并上清, 得水牛角提取液, 通过 Ellman 法^[12]测定其游离-SH 浓度为 0.637 mmol/L。

2.1.2 结合缓冲液 (binding buffer solution, BBS) 的配制 称定 29.220 g NaCl、372.24 mg EDTA 溶于 1000 mL 的 0.01 mol/L PBS 溶液 (pH 7.2~7.4) 中制备成含 0.5 mol/L NaCl、1 mmol/L EDTA 的 BBS。

2.1.3 洗脱缓冲液 1 (elution buffer solution 1, EBS1) 的配制 称定 372.24 mg EDTA, 量取 3.519 0 mL β -Me 溶于 1000 mL 的 0.01 mol/L PBS 溶液 (pH 7.2~7.4) 中制备成含 1 mmol/L EDTA、50 mmol/L β -Me 的 EBS1。

2.1.4 洗脱缓冲液 2 (elution buffer solution 2, EBS2) 的配制 称定 372.24 mg EDTA、15.366 g 还原型 GSH 溶于 1000 mL 的 0.01 mol/L PBS 溶液 (pH 7.2~7.4) 中制备成含 1 mmol/L EDTA、50 mmol/L GSH 的 EBS2。

2.1.5 洗脱缓冲液 3 (elution buffer solution 3, EBS3) 的配制 称定 372.24 mg EDTA、3.856 0 g DTT 溶于 1000 mL 的 0.01 mol/L PBS 溶液 (pH 7.2~7.4) 中制备成含 1 mmol/L EDTA、25 mmol/L DTT 的 EBS3。

2.2 水牛角中 SHPF 的富集工艺考察

2.2.1 考察洗脱剂的影响 分别取 EBS1、EBS2、EBS3 各 10 mL, 用 C_{18} 柱脱盐后, 通过 Ellman 法^[12]测定其游离-SH 浓度。结果如表 1 所示, 含 DTT 的洗脱剂中-SH 残留最多, 含 GSH 的洗脱剂次之, 含 β -Me 的洗脱剂基本没有残留。还原剂残留的-SH 将影响后续样品中游离-SH 浓度的测定。因此含 β -Me

表 1 不同洗脱剂脱盐后游离-SH 含量 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Free -SH content before desalting with different eluents ($\bar{x} \pm s, n=3$)

洗脱液	成分	游离巯基浓度/(mmol·L ⁻¹)
EBS1	β -Me	0.041 $\pm$ 0.038
EBS2	GSH	1.491 $\pm$ 0.098
EBS3	DTT	6.975 $\pm$ 0.264

的洗脱剂为水牛角中 SHPF 富集的最佳洗脱剂。

2.2.2 考察上样量的影响 称取 10 mg 巯基亲和树脂 TS6B, 加入 5 mL 纯水, 室温静置 30 min 活化树脂, 3000 r/min 离心 (离心半径为 12 cm) 10 min, 弃去上清; 加入 5 mL BBS, 振摇 5 min 平衡树脂, 3000 r/min 离心 (离心半径为 12 cm) 10 min, 弃去上清; 向树脂中分别加入含 0.5、2.5、10.0、40.0、80.0 μ mol 游离-SH 的水牛角提取液, 振摇 2 h, 3000 r/min 离心 (离心半径为 12 cm) 10 min, 弃去上清; 加入 7.5 mL BBS, 振摇 10 min, 3000 r/min 离心 (离心半径为 12 cm) 10 min, 弃去上清, 重复 5 次; 加入 7.5 mL EBS1, 振摇 10 min, 3000 r/min 离心 (离心半径为 12 cm) 10 min, 取上清, 重复 3 次, 合并上清, 得水牛角富集液, 用 C_{18} 柱脱盐后, 使用 BCA 试剂盒测定其总蛋白质量浓度, 通过 Ellman 法^[12]测定其游离-SH 浓度。结果如表 2 所示, 当上样量为 0~10 μ mol 时, 富集得到的含游离-SH 浓度/蛋白质量浓度比值呈上升趋势, 当上样量为 10~80 μ mol 时, 富集得到的含游离-SH 浓度/蛋白质量浓度比值呈下降趋势, 即当上样量为 10 μ mol 时, 10 mg 树脂达到饱和状态。因此, 含 10 μ mol 游离-SH 的水牛角提取液为 10 mg 树脂富集水牛角中 SHPF 的最佳上样量。

2.2.3 考察上样时间的影响 称取 10 mg 巯基亲和树脂 TS6B, 活化平衡后, 向树脂中加入等量水牛角提取液, 分别振摇 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、

表 2 上样量对 SHPF 富集的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of sample loading on enrichment of SHPF ($\bar{x} \pm s, n=3$)

上样量/ μ mol	游离-SH 浓度/ (mmol·L ⁻¹)	蛋白质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	(游离-SH 浓度/蛋白 质量浓度)/(mmol·g ⁻¹)
0.5	0.056 $\pm$ 0.021	0.132 $\pm$ 0.006	0.420 $\pm$ 0.145
2.5	0.136 $\pm$ 0.044	0.309 $\pm$ 0.011	0.438 $\pm$ 0.136
10	0.164 $\pm$ 0.023	0.298 $\pm$ 0.018	0.549 $\pm$ 0.043
40	0.277 $\pm$ 0.019	0.666 $\pm$ 0.010	0.416 $\pm$ 0.034
80	0.462 $\pm$ 0.039	1.276 $\pm$ 0.014	0.362 $\pm$ 0.033

10.0、12.0 h, BBS 淋洗后, 加入 EBS1 洗脱, 分别收集上清, 得水牛角富集液, 脱盐后测定其总蛋白质量浓度和游离-SH 浓度, 具体实验步骤见“2.2.2”项。结果如表 3 所示, 当水牛角提取液吸附时间为 0.5~1.0 h 时, 富集得到的含游离-SH 浓度/蛋白质量浓度比值呈上升趋势; 当水牛角提取液吸附时间为 1.0~12.0 h 时, 富集得到的含游离-SH 浓度/蛋白质量浓度比值变化趋势不显著。因此, 考虑富集工艺的时间成本, 确定 1.0 h 为水牛角提取液的最佳吸附时间。

表 3 上样时间对 SHPF 富集的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of sample loading time on enrichment of SHPF ($\bar{x} \pm s, n=3$)

上样 时间/h	游离-SH 浓度/ (mmol·L ⁻¹)	蛋白质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	(游离-SH 浓度/蛋白 质量浓度)/(mmol·g ⁻¹)
0.5	0.195±0.013	0.373±0.011	0.522±0.025
1.0	0.249±0.023	0.425±0.030	0.589±0.082
2.0	0.196±0.040	0.395±0.006	0.495±0.094
4.0	0.207±0.013	0.432±0.031	0.480±0.040
6.0	0.241±0.030	0.454±0.025	0.531±0.066
8.0	0.237±0.031	0.457±0.014	0.519±0.069
10.0	0.218±0.031	0.421±0.111	0.539±0.136
12.0	0.305±0.037	0.700±0.117	0.440±0.063

2.3 水牛角提取液与富集液中总蛋白和游离-SH 的含量测定

按照优化后的富集工艺, 采用巯基亲和树脂 TS6B 对水牛角提取液进行富集, 分别测定水牛角提取液和水牛角富集液中总蛋白含量和游离-SH 含量, 结果如表 4 所示。水牛角提取液中游离-SH 浓度与蛋白质量浓度的比值为 0.021 mmol/g, 水牛角富集液中游离-SH 浓度与蛋白质量浓度的比值为 0.552 mmol/g, 约为水牛角提取液中游离-SH 浓度与蛋白质量浓度比值的 27 倍, 说明采用优化后富集工艺, TS6B 能够有效地从水牛角提取液中富集得到 SHPF。

表 4 水牛角提取液和富集液中 SHPF 的蛋白和游离-SH 含量 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Protein and free -SH content of SHPF in extracts and enrichment of Bubali Cornu ($\bar{x} \pm s, n=3$)

样品	游离-SH 浓度/ (mmol·L ⁻¹)	蛋白质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	(游离-SH 浓度/蛋白 质量浓度)/(mmol·g ⁻¹)
提取液	0.637±0.042	31.991±0.198	0.020±0.001
富集液	0.164±0.023	0.298±0.018	0.549±0.043

2.4 基于 Nano LC-MS/MS 技术鉴定水牛角 SHPF

2.4.1 样品前处理 分别向水牛角提取液和富集液中加入 0.2 mol/L IAA 溶液, 避光放置 30 min 封闭游离-SH, 分别采用 Zip Tip C₁₈ 固相萃取小柱脱盐后浓缩挥干, 加入初始流动相 0.1% 甲酸溶解, 配制多肽质量浓度为 1.0 μg/μL 的样液。

2.4.2 水牛角含巯基肽类的 Nano LC-MS/MS 分析

(1) 色谱条件: 色谱柱为 Reprosil C₁₈ AQ 柱 (150 mm×75 μm, 5 μm); 进样量为 1 μL, 体积流量为 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 线性梯度洗脱 90 min。

(2) 质谱条件: 喷雾电压为 2.5 kV; 离子传输毛细管温度为 200 °C; 质谱一级全扫描范围为 m/z 300~2000; 分离宽度为 3。串联质谱分析获得总离子色谱图 (total ion chromatogram, TIC), 通过碰撞诱导解离 (collision-induced dissociation, CID), 产生一系列二级串联质谱图。串联质谱数据使用 PEAKS 8.5 软件进行搜库分析, 选择牛科蛋白质数据库 (Bovidae, 2021 年 1 月下载于 <http://www.uniprot.org>); 设置检索参数: 前体离子误差 1.0×10^{-5} , 子离子误差 m/z 1; 翻译后修饰: 半胱氨酸的氨甲酰甲基化 (+57.2), 甲硫氨酸的氧化 (+15.99), 脯氨酸的羟基化 (+15.99), 天冬氨酸和谷氨酰胺的脱酰胺 (+0.98); 酶切方式: 胰蛋白酶酶切 (trypsin); 允许 2 个位点误切, 假阳性率 (FDR) ≤1%; 其他为默认参数, 在上述检索条件下所得的分值有显著性意义 ($P<0.05$) 被认为有效的鉴定结果。

由 Cys 的结构可知, 每个 Cys 中含有 1 个-SH, 即 Cys 的数量能直接反映-SH 的数量。分析串联质谱数据的搜库结果, 从水牛角提取液中共鉴定到 209 条肽段, 其中含 Cys 肽段有 1 条, 占总肽段的 0.478%, 其含有 1 个 Cys 残基, 来源于肌动蛋白; 从水牛角富集液中共鉴定到 704 条肽段, 共鉴定到 154 条含 Cys 肽段, 占总肽段的 21.875%, 其中含 1 个 Cys 残基的肽段有 93 条, 含 2 个 Cys 残基的肽段有 43 条, 含 3 个 Cys 残基的肽段有 17 条, 含 5 个 Cys 残基的肽段有 5 条, 这些含半胱氨酸肽段主要来源于角蛋白 (57.79%)、角蛋白相关蛋白 (10.39%)、肌动蛋白 (7.79%) 等。因此, 水牛角富集液中含-SH 肽段明显多于水牛角提取液中含-SH 肽段, 即本实验富集工艺能有效富集水牛角中含-SH 肽段。已知蛋白可信度得分值 ($-10 \lg P$) 越大,

表明该蛋白包含的可信肽段越多,给出 $-10\lg P$ 值从大到小排序的前 20 条含半胱氨酸肽段的信息,如表 5 所示,以期后续水牛角含-SH 肽段活性验证实验开展提供参考。其中 $-10\lg P$ 值最大的含半胱氨酸肽段氨基酸序列为 LCYVALDFEQEMATAASSS-SLEK,其 MS/MS 图谱如图 1 所示。

2.5 水牛角 SHPF 的抗氧化、抗炎活性验证

2.5.1 细胞的培养 bEnd3 细胞、RAW264.7 细胞分别用 DMEM 高糖培养基(含 10%胎牛血清、1%链霉素和青霉素)培养传代,于 37℃、5%CO₂培养箱中培养。选择生长良好的 3~10 代细胞,待细

胞长至 80%~90%融合时进行实验。

2.5.2 水牛角提取液和水牛角 SHPF 的细胞毒性测定 将处于对数生长期的 bEnd3 细胞、RAW264.7 细胞分别以 1×10^4 /孔的密度接种于 96 孔板上,培养 24 h 后进行分组处理。对照组:不含胎牛血清的 DMEM 培养基培养 24 h; SHPF 组:分别用蛋白质质量浓度为 1.562 5、3.125、6.25、12.5、25、50、100 $\mu\text{g/mL}$ SHPF 分别处理 bEnd3 细胞、RAW264.7 细胞 24 h; 提取液组:分别用蛋白质质量浓度为 1.562 5、3.125、6.25、12.5、25、50、100 $\mu\text{g/mL}$ 水牛角提取液分别处理 bEnd3 细胞、RAW264.7 细胞 24 h。最

表 5 $-10\lg P$ 值自大到小排序前 20 条含半胱氨酸肽段的信息

Table 5 $-10\lg P$ Values from large to small order of top 20 cysteine-containing peptide information

序号	氨基酸序列	$-10\lg P$	相对分子质量	蛋白来源
1	LCYVALDFEQEMATAASSS-SLEK	61.10	2 549.17	肌动蛋白
2	MGDSGGPLVCQK	55.44	1 247.56	糜蛋白酶原 B
3	GLLDS-EDCKLPCNPC	54.31	1 776.75	角蛋白
4	CGSGPVHISGQ	51.42	1 097.49	核磷脂素
5	CKLAGLEEALQK	51.06	1 358.72	角蛋白
6	GGVVCGLCVSGSRPVTG	50.79	1 775.83	角蛋白
7	DSEDCKLPCNPC	50.28	1 493.56	角蛋白
8	DSCQGDSGGPVVC	49.66	1 336.50	丝氨酸蛋白酶 1
9	CVSGSRPVTGSVC	49.12	1 364.62	角蛋白
10	VVTA-ACHGVTT	48.36	1 114.54	糜蛋白酶原 A
11	HAVEGDCDIH	48.22	1 151.47	α -2-HS-糖蛋白
12	SEDCKLPCNPC	47.67	1 378.53	角蛋白
13	EAECVEADSGR	47.47	1 221.49	角蛋白
14	GDLCVSGSRPVTGSVC	47.25	1 649.75	角蛋白
15	KCGSGPVHISGQ	46.31	1 225.59	核磷脂素
16	DNCPP-CHIPQPC	46.27	1 590.64	角蛋白相关蛋白 3-3
17	VSGSRPVTGSVC	45.29	1 204.59	角蛋白
18	FLEGGKDSCQGDSGGPV	45.20	1 708.74	阴离子胰蛋白酶
19	SGGVGGLSPPCIT	44.86	1 200.58	角蛋白
20	RREAECVEADSGR	44.58	1 533.70	角蛋白

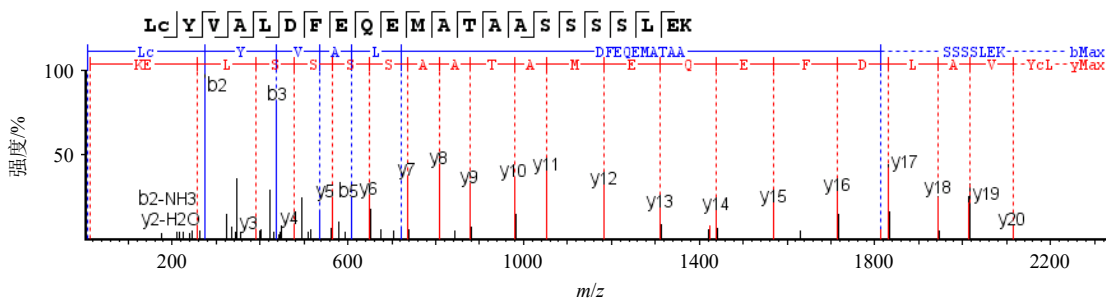


图 1 LCYVALDFEQEMATAASSS-SLEK 的 MS/MS 图谱

Fig. 1 MS/MS map of LCYVALDFEQEMATAASSS-SLEK

后每孔加入 10% CCK-8 溶液, 37 °C 孵育, 酶标仪检测 450 nm 波长处的吸光度 (A) 值, 按照公式计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

结果如表 6 所示, 与对照组相比, 当水牛角提取液中蛋白质量浓度为 1.562 5~100 $\mu\text{g/mL}$ 时, 提取液对 bEnd3 细胞的增殖无促进或者抑制作用; 结果如表 7 所示, 与对照组相比, 当 SHPF 蛋白质量浓度为 1.562 5~50 $\mu\text{g/mL}$ 时, SHPF 对 bEnd3 细胞的增殖无促进或者抑制作用, 当 SHPF 蛋白质量浓度达到 100 $\mu\text{g/mL}$ 时, SHPF 明显促进 bEnd3 细胞增殖 ($P < 0.01$)。如表 8 所示, 与对照组相比, 当水牛角提取液中蛋白质量浓度为 1.562 5~100 $\mu\text{g/mL}$ 时, 提取液对 RAW264.7 细胞的增殖无促进或者抑制作用; 如表 9 所示, 与对照组相比, 当 SHPF 蛋白质量浓度为 1.562 5~100 $\mu\text{g/mL}$ 时, SHPF 对 RAW264.7 细胞的增殖无促进或者抑制作用。

综上, 后续细胞实验中采用 1.562 5~50 $\mu\text{g/mL}$

表 6 水牛角提取液对 bEnd3 细胞的细胞毒性 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 6 Cytotoxicity of extracting solution to bEnd3 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	细胞存活率/%
对照	—	100.00 $\pm$ 15.50
提取液	1.562 5	101.07 $\pm$ 9.66
	3.125	115.35 $\pm$ 12.95
	6.25	104.91 $\pm$ 9.86
	12.5	110.90 $\pm$ 9.85
	25	120.50 $\pm$ 6.23
	50	93.63 $\pm$ 12.45
	100	102.26 $\pm$ 5.60

表 7 SHPF 对 bEnd3 细胞的细胞毒性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Cytotoxicity of SHPF to bEnd3 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	细胞存活率/%
对照	—	100.00 $\pm$ 5.07
SHPF	1.562 5	85.08 $\pm$ 4.39
	3.125	88.32 $\pm$ 1.67
	6.25	92.72 $\pm$ 4.01
	12.5	96.62 $\pm$ 3.21
	25	92.33 $\pm$ 5.50
	50	106.58 $\pm$ 5.92
	100	135.61 $\pm$ 7.85 ^{##}

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$

^{##} $P < 0.01$ vs control group

表 8 水牛角提取液对 RAW264.7 细胞的细胞毒性 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 8 Cytotoxicity of extracting solution to RAW264.7 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	细胞存活率/%
对照	—	100.00 $\pm$ 5.32
提取液	1.562 5	93.80 $\pm$ 9.23
	3.125	102.37 $\pm$ 10.74
	6.25	102.58 $\pm$ 9.36
	12.5	102.02 $\pm$ 6.01
	25	108.24 $\pm$ 6.27
	50	97.88 $\pm$ 8.63
	100	91.58 $\pm$ 2.73

表 9 SHPF 对 RAW264.7 细胞的细胞毒性 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 9 Cytotoxicity of SHPF to RAW264.7 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	质量浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	细胞存活率/%
对照	—	100.00 $\pm$ 6.10
SHPF	1.562 5	103.15 $\pm$ 5.71
	3.125	100.10 $\pm$ 3.87
	6.25	100.66 $\pm$ 8.84
	12.5	100.21 $\pm$ 6.72
	25	114.48 $\pm$ 10.34
	50	110.57 $\pm$ 5.65
	100	105.32 $\pm$ 6.54

SHPF、50 $\mu\text{g/mL}$ 水牛角提取液处理 bEnd3 细胞和 RAW264.7 细胞。

2.5.3 水牛角 SHPF 对 H_2O_2 刺激 bEnd3 细胞活力的影响 将处于对数生长期的 bEnd3 细胞以 1×10^4 /孔的密度接种于 96 孔板上, 培养 24 h 后进行分组处理。对照组: 不含胎牛血清的 DMEM 培养基培养 16 h; H_2O_2 组: 不含胎牛血清的 DMEM 培养基培养 12 h 后, 用 1.1 mmol/L H_2O_2 持续刺激细胞 4 h; SHPF 组: 分别用蛋白质量浓度为 1.562 5、3.125、6.25、12.5、25、50 $\mu\text{g/mL}$ SHPF 处理细胞 12 h 后, 用 1.1 mmol/L H_2O_2 持续刺激细胞 4 h; 提取液组: 用蛋白质量浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 水牛角提取液处理细胞 12 h 后, 用 1.1 mmol/L H_2O_2 持续刺激细胞 4 h。最后每孔加入 10% CCK-8 溶液, 37 °C 孵育, 酶标仪检测 450 nm 波长处的 A 值, 按照“2.5.2”项下公式计算细胞存活率。

结果如表 10 所示, 与对照组相比, H_2O_2 组 bEnd3 细胞存活率显著下降 ($P < 0.001$); 与 H_2O_2 组相比, 1.562 5、3.125、6.25 $\mu\text{g/mL}$ SHPF 组 bEnd3

表 10 SHPF 对 H₂O₂ 诱导 bEnd3 氧化损伤的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Table 10 Effects of SHPF on H₂O₂-induced bEnd3 oxidative damage ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组别	质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	细胞存活率/%
对照	—	100.00 $\pm$ 6.10
H ₂ O ₂	1.1 mmol·L ⁻¹	51.27 $\pm$ 3.36 ^{###}
SHPF	1.562 5	48.90 $\pm$ 7.62
	3.125	54.71 $\pm$ 7.30
	6.25	55.41 $\pm$ 3.04
	12.5	73.81 $\pm$ 10.64 [*]
	25	69.89 $\pm$ 5.92 ^{**}
	50	79.22 $\pm$ 6.98 ^{***}
提取液	50	48.59 $\pm$ 3.95 ^{ΔΔΔ}

与对照组比较: ^{###} $P < 0.001$; 与 H₂O₂ 组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

^{***} $P < 0.001$; 与 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ SHPF 组比较: ^{ΔΔΔ} $P < 0.001$

^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs

H₂O₂ group; ^{ΔΔΔ} $P < 0.001$ vs 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ SHPF group

细胞存活率无明显变化, 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SHPF 组 bEnd3 细胞存活率上升 ($P < 0.05$), 25、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SHPF 组 bEnd3 细胞存活率显著上升 ($P < 0.01$); 与 H₂O₂ 组相比, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 提取液组 bEnd3 细胞存活率无明显变化。因此, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SHPF 对 H₂O₂ 诱导 bEnd3 氧化损伤后的细胞增殖具有促进作用, 且效果显著优于提取液 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $P < 0.001$)。

2.5.4 水牛角 SHPF 对 bEnd3 细胞分泌 LDH 的影响 bEnd3 细胞分组给药具体操作见“2.5.3”项。给药造模后分别取各组细胞培养液 1 mL, 2500 $\times$ g 离心 10 min, 取上清, 按照 LDH 试剂盒说明操作, 测定各组细胞上清液中 LDH 的水平。当细胞发生氧化应激损伤时, 出现 LDH 水平升高的现象。如表 11 所示, 与对照组相比, H₂O₂ 组 LDH 水平显著增加 ($P < 0.001$); 与 H₂O₂ 组相比, 12.5、25、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SHPF 组 LDH 水平显著减少 ($P < 0.001$); 与 H₂O₂ 组相比, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 提取液组 LDH 水平减少 ($P < 0.05$), 因此, SHPF 对 H₂O₂ 诱导 bEnd3 导致的氧化损伤具有保护作用, 且相同质量浓度下, SHPF 抗氧

表 11 SHPF 对 H₂O₂ 诱导 bEnd3 氧化损伤后分泌 LDH 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 11 Effects of SHPF on LDH secretion after H₂O₂-induced oxidative damage to bEnd3 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LDH/(U·L ⁻¹)
对照	—	33.69 $\pm$ 13.05
H ₂ O ₂	1.1 mmol·L ⁻¹	109.02 $\pm$ 6.80 ^{###}
SHPF	12.5	64.74 $\pm$ 3.82 ^{***}
	25	61.94 $\pm$ 4.86 ^{***}
	50	64.99 $\pm$ 2.65 ^{***}
提取液	50	89.92 $\pm$ 6.90 ^{*ΔΔ}

与对照组比较: ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{***} $P <$

0.001; 与 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ SHPF 组比较: ^{ΔΔ} $P < 0.01$

^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group;

^{ΔΔ} $P < 0.01$ vs 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ SHPF group

化效果显著优于提取液 ($P < 0.01$)。

2.5.5 实时荧光定量 PCR 测定 RAW264.7 细胞炎症因子分泌 将处于对数生长期的 RAW264.7 细胞以 5×10^5 /孔的密度接种于 6 孔板上, 培养 12 h 后进行分组处理。对照组: 不含胎牛血清的 DMEM 培养基培养 36 h; LPS 组: 不含胎牛血清的 DMEM 培养基培养 12 h 后, 50 ng/mL LPS 持续刺激细胞 24 h; SHPF 组: 分别用蛋白质量浓度为 12.5、25、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SHPF 处理细胞 12 h 后, 50 ng/mL LPS 持续刺激细胞 24 h; 提取液组: 用蛋白质量浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 水牛角提取液处理细胞 12 h 后, 50 ng/mL LPS 持续刺激细胞 24 h。

提取各组细胞总 RNA, 用微量分光光度计测定 RNA 含量和纯度, 按照反转录试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA, 进行实时荧光定量扩增, 测定 RAW264.7 细胞中白细胞介素-6 (interleukin-6, *IL-6*)、*IL-1 β* 、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , *TNF- α*) 的基因表达。根据阈值循环数 (cycle threshold, C_t, 表示每个反应管内的荧光信号到达设定阈值时所经历的循环数), 以 β -actin 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对目的基因进行相对定量分析。引物序列详见表 12。当细胞受到外部刺激, 会进一步释放

表 12 基因引物序列

Table 12 Gene primer sequences

基因	上游引物序列 (5'-3')	下游引物序列 (5'-3')
<i>β-actin</i>	GTACCACCATGTACCCAGGC	AACGCAGCTCAGTAACAGTCC
<i>IL-6</i>	ATCCAGTTGCCTTCTTGGGACTGA	TAAGCCTCCGACTTGTGAAGTGGT
<i>IL-1β</i>	TCATTGTGGCTGTGGAGAAG	AGGCCACAGGTATTTTGTCG
<i>TNF-α</i>	CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA	TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC

炎症因子 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 等, 引发更严重的炎症反应。如表 13 所示, 与对照组相比, LPS 组 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 均显著增加 ($P<0.01$ 、 0.001), 造成炎症损伤; 与 LPS 组相比, SHPF 组 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 均显著减少, 且具有剂量相关关系, SHPF 高剂量组 ($50\text{ }\mu\text{g/mL}$) 减少炎症因子分泌的效果最明显 ($P<0.05$ 、 0.001), 且效果优于同等剂量的提取液组。因此, SHPF 能够通过减少炎症损伤细胞中炎症因子 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的分泌从而缓解炎症, 起到抗炎作用。

表 13 SHPF 对 LPS 诱导 RAW264.7 炎症损伤后炎症因子分泌的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 13 Effect of SHPF on the secretion of inflammatory factors after LPS-induced RAW264.7 inflammatory injury ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	IL-6/ β -actin	IL-1 β / β -actin	TNF- α / β -actin
对照	—	1.00 $\pm$ 0.05	1.00 $\pm$ 0.05	1.00 $\pm$ 0.03
LPS	0.05	3.53 $\pm$ 0.35 ^{###}	2.22 $\pm$ 0.10 ^{###}	1.94 $\pm$ 0.29 ^{##}
SHPF	12.5	2.37 $\pm$ 0.23 ^{**}	2.65 $\pm$ 0.27	1.67 $\pm$ 0.12
	25	1.14 $\pm$ 0.07 ^{***}	2.25 $\pm$ 0.15	1.47 $\pm$ 0.11
	50	0.52 $\pm$ 0.04 ^{***}	1.36 $\pm$ 0.04 ^{***}	1.39 $\pm$ 0.12 [*]
提取液	50	2.84 $\pm$ 0.69 ^{ΔΔ}	2.39 $\pm$ 0.09 ^{ΔΔΔ}	1.59 $\pm$ 0.06

与对照组比较: ^{##} $P<0.01$ ^{###} $P<0.001$; 与 LPS 组比较: ^{*} $P<0.05$

^{**} $P<0.01$ ^{***} $P<0.001$; 与 $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ SHPF 组比较: ^{ΔΔ} $P<0.01$

^{ΔΔΔ} $P<0.001$

^{##} $P<0.01$ ^{###} $P<0.001$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ ^{***} P

<0.001 vs LPS group; ^{ΔΔ} $P<0.01$ ^{ΔΔΔ} $P<0.001$ vs $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ SHPF

group

3 讨论

水牛角作为具有清热解毒功效的重要动物类中药, 在医药行业中应用广泛, 但是目前水牛角的药理研究基本都以水牛角提取液或水牛角提取液不同分子量部位为研究对象展开研究^[13-16], 尚未找到确切的功效物质成分, 为深入研究水牛角功效活性物质成分及其效应机制, 完善水牛角的质量标准评价体系, 推动水牛角在医药行业的进一步应用, 本实验围绕“传统功效-生物活性-物质成分”的研究思路对水牛角展开研究。

根据文献报道, 目前用于富集含巯基肽类的材料主要有羧甲基壳聚糖@5MP 衍生物(O-CMC-PBS-5MP)^[17]、核壳型 Fe₃O₄@PDA@Au 纳米材料^[18]、巯基亲和树脂 TS6B^[19]等, 由于前 2 种材料均未商品化且制备过程较为复杂, 因此, 本研究采用巯基

亲和树脂 TS6B 从水牛角提取液中富集得到水牛角 SHPF。上样量是影响富集效果的因素之一, 在树脂达到饱和状态前, 随着上样量的不断增加, 树脂中富集得到的含游离-SH 浓度/蛋白质质量浓度也会随之增加; 在树脂达到饱和状态后, 此时上样量的增加对富集得到的含游离-SH 浓度/蛋白质质量浓度影响较小; 洗脱剂是洗脱效率的影响因素之一, β -Me、GSH 或 DTT 在不同洗脱剂中的都可以作为还原剂, 打开二硫键, 使水牛角提取液中含-SH 的肽类成分与树脂结合。 β -Me、GSH 和 DTT 的自身结构含有-SH 基团, 因此使用它们作为还原剂时, 需要考虑到它们自身的-SH 的残留; 此外, 上样时间也会影响富集效果。因此, 采用单因素法考察上样量、上样时间、洗脱剂对富集效果的影响, 筛选得到最佳上样量为 $10\text{ }\mu\text{mol}$ 游离-SH、最适吸附时间为 1.0 h 、最适洗脱剂为含 β -Me 洗脱剂。

通过 Nano LC-MS/MS 技术从水牛角富集液中鉴定到 704 条肽段, 这些肽段主要来源于角蛋白和角蛋白相关蛋白 (53.69%); 其中有 154 条含半胱氨酸肽段, 占总肽段的 21.875%, 这些含半胱氨酸肽段也主要来源于角蛋白和角蛋白相关蛋白 (68.18%)。相关文献报道, 角蛋白具有良好生物活性, 羽毛角蛋白具有良好的体外抗氧化作用^[20]; 角蛋白生物材料能够促进影响巨噬细胞极化为 M2 抗炎表型, 促进抗炎细胞因子的产生和减少促炎细胞, 起到缓解炎症的作用^[21-22]。因此, 角蛋白和角蛋白相关蛋白是水牛角中的关键活性部位, 更是功效物质——含-SH 肽段的重要来源蛋白。

机体中存在氧化应激的生理过程, 正常情况下, 处于氧化应激动态平衡状态, 通过给予 H₂O₂ 刺激机体, 打破氧化应激平衡, 将导致细胞凋亡或机体病理损伤。LDH 是一种氧化还原酶, 催化丙酮酸与乳酸之间的相互转化, 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中, 细胞凋亡或坏死而造成细胞膜结构的破坏会导致细胞浆内的 LDH 释放到培养液里, 由于其活酶活性稳定, LDH 释放被看做细胞膜完整性的重要指标, 通过检测从质膜破裂的细胞中释放到培养液中的 LDH 的活性, 实现对细胞毒性的定量分析。在本实验中, SHPF 能够促进 H₂O₂ 诱导 bEnd3 细胞氧化损伤后的细胞增殖, 同时对 H₂O₂ 诱导 bEnd3 细胞氧化损伤引起的 LDH 分泌增加具有显著的抑制作用。因此, SHPF 对 H₂O₂ 诱导 bEnd3 氧化损伤具有保护作用。炎症是机体对于刺激的一

种防御反应,炎症反应伴随着局部肥大细胞和巨噬细胞的脱粒和激活,释放多种促炎介质,如 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 等。通过给予致炎因子 LPS,诱导炎症反应,使 RAW264.7 中炎症因子 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 等分泌增多,给予 SHPF 处理后,IL-6、IL-1 β 、TNF- α 分泌水平均下调,有效缓解炎症反应,这与实验室前期研究发现水牛角提取液发挥解热作用时,降低发热大鼠血浆中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 等炎症因子分泌水平的结果一致^[13]。在氧化模型和炎症模型中,水牛角 SHPF 较水牛角提取液均表现出较优的抗氧化、抗炎活性,因此,水牛角 SHPF 极可能作为水牛角清热解热功效活性物质,发挥抗氧化、抗炎作用。

本实验优化水牛角 SHPF 的富集方法,结合实验室前期研究基础^[7,12-13,15],研究分析“水牛角 SHPF-抗氧化/抗炎活性-清热解热”三者间的关联,为研究水牛角功效活性物质及其效应研究提供依据和基础,“传统功效-生物活性-物质成分”的研究模式,也将为后续揭示水牛角及其他角类动物药功效物质基础提供了新的研究思路 and 方向。在此工作基础上,有必要开展:①进一步表征具有抗氧化活性的水牛角含巯基肽类,合成、筛选活性肽段,为后续实验奠定基础;②系统评价水牛角 SHPF 的生物效应,深入研究其作用机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 梁·陶弘景撰. 尚志钧辑校. 尚元胜, 尚元藕, 黄自冲整理. 名医别录: 辑校本 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2013: 142-143.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 84.
- [3] 张婷, 宋厚盼, 林也, 等. 黄连解毒汤之“清热解热”药效与作用机制研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(11): 135-139.
- [4] 武琦, 林娟, 刘耀晨, 等. 基于网络药理学的三七传统功效作用机制研究 [J]. 中草药, 2020, 51(14): 3717-3727.
- [5] 苗雨露, 张雯霞, 王玉娥, 等. 清热解热类中药抗炎机制研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(9): 228-234.
- [6] 王雅琪, 杨园珍, 伍振峰, 等. 中药挥发油传统功效与现代研究进展 [J]. 中草药, 2018, 49(2): 455-461.
- [7] 王春雪, 刘睿, 钱大玮, 等. 角类中药的游离巯基含量测定 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(6): 1216-1219.
- [8] Lee Y J, Rice R H, Lee Y M. Proteome analysis of human hair shaft: From protein identification to posttranslational modification [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2006, 5(5): 789-800.
- [9] Citi V, Martelli A, Gorica E, et al. Role of hydrogen sulfide in endothelial dysfunction: Pathophysiology and therapeutic approaches [J]. *J Adv Res*, 2021, 27: 99-113.
- [10] Liu R, Wang M, Duan J A, et al. Purification and identification of three novel antioxidant peptides from *Cornu Bubali* (water buffalo horn) [J]. *Peptides*, 2010, 31(5): 786-793.
- [11] Liu R, Huang Q, Shan J J, et al. Metabolomics of the antipyretic effects of *Bubali Cornu* (water buffalo horn) in rats [J]. *PLoS One*, 2016, 11(7): e0158478.
- [12] 刘睿, 陈建亚, 朱振华, 等. 山羊角中巯基的测定及山羊角对体内巯基的干预研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2018, 34(6): 617-620.
- [13] Liu R, Wang M, Duan J N. Antipyretic and antioxidant activities of the aqueous extract of *Cornu bubali* (water buffalo horn) [J]. *Am J Chin Med*, 2010, 38(2): 293-306.
- [14] 吴晓莹. 羚羊角和水牛角的解热作用及其成分研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2019.
- [15] 刘睿, 段金殿, 李友宾, 等. 水牛角主要药效学评价及解热活性物质基础研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2007, 23(5): 297-301.
- [16] 李宝国, 黄丽华, 杜雪, 等. 水牛角不同相对分子质量酶解液的药理作用研究 [J]. 中国当代医药, 2009, 16(13): 16-17.
- [17] 万曼曼. 基于 pH 响应的巯基寡肽富集系统的构建与应用 [D]. 无锡: 江南大学, 2022.
- [18] 刘婷, 韩疏影, 康安, 等. 核壳型 Fe₃O₄@PDA@Au 纳米材料对水牛角含巯基肽类成分的富集研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2020, 36(3): 396-400.
- [19] 孙媛, 孔祥珍, 华欲飞. 小麦面筋蛋白含半胱氨酸小麦肽的富集与表征 [J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(19): 64-69.
- [20] Sharma S, Gupta A, Chik S M S T, et al. Characterization of keratin microparticles from feather biomass with potent antioxidant and anticancer activities [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 104: 189-196.
- [21] Waters M, van de Vord P, van Dyke M. Keratin biomaterials augment anti-inflammatory macrophage phenotype *in vitro* [J]. *Acta Biomater*, 2018, 66: 213-223.
- [22] Fearing B V, Van Dyke M E. *In vitro* response of macrophage polarization to a keratin biomaterial [J]. *Acta Biomater*, 2014, 10(7): 3136-3144.

[责任编辑 郑礼胜]