

夏广清,刘伟,秦佳梅. 长白山道地药材接骨木、苦碟子纤溶酶分离及活性检测[J]. 江苏农业科学,2014,42(11):315-317.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.11.112

长白山道地药材接骨木、苦碟子纤溶酶分离及活性检测

夏广清,刘伟,秦佳梅

(通化师范学院生命科学院,吉林通化 134002)

摘要:从具有活血化瘀功能的长白山道地药材接骨木、苦碟子中分离纤溶酶,并利用纤维平板法对分离的纤溶酶进行活性鉴定。结果表明:从接骨木和苦碟子中可以分离到具有溶栓活性的纤溶酶,其含量分别为 1 842 $\mu\text{g/g}$ 及 1 976 $\mu\text{g/g}$ 。尿激酶法测定其比活力分别为 0.795 U 及 0.837 U,SDS-PAGE 电泳检测其大小约为 36 ku,该酶在高温下失活,在 70%~90% 硫酸铵饱和溶液中活性最高。

关键词:接骨木;苦碟子;纤溶酶;分离;活性检测

中图分类号:S567.01 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)11-0315-02

心脑血管疾病是危害人类健康的主要疾病之一。近 30 年来,我国人群心血管疾病的发病率及危险因素水平呈不断上升趋势。据卫生部心血管病防治中心发布的《中国心血管疾病调查报告 2011》:目前,我国包括冠心病、脑中风、心力衰竭和高血压在内的心血管病人估计已达 2.3 亿^[1-2]。因此研发高效、特异、安全、副作用小的溶栓药物,一直是近年来医药界的热门课题^[3]。随着对中医药认识的发展,溶栓中草药的研究也在不断发展,已有部分中药被制成了单味注射液,如刺五加、川芎、丹参、灯盏花、葛根素、红花等^[4];同时,一些学者也在不断研究新的溶栓药用植物。接骨木、苦碟子作为长白山道地药材,具有祛风、活血,治风湿筋骨疼痛,抗病毒、抗菌、抗炎、抗氧化、抗骨质疏松及免疫活性等药理作用^[5-6],但有关其在溶栓方面的研究尚未见相关报道。因此本研究以长白山道地药材接骨木、苦碟子为试验材料,采用硫酸铵沉淀,透析除去小分子物质,用纤维平板法初步判断接骨木、苦碟子粗提物中的溶纤成分,并对其活性做初步研究,为进一步开发具有溶栓功能的长白山道地药材提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 中草药 接骨木、苦碟子采自通化师范学院生命科学院实验教学基地,经生命科学院秦佳梅教授鉴定。

1.1.2 主要试剂 纤维蛋白原、纤维蛋白溶酶原、凝血酶购自中国药品生物制品检定所,标准尿激酶、牛血清白蛋白、胰蛋白酶、胃蛋白酶购自天津生物化学制药厂。

1.2 试验方法

1.2.1 接骨木、苦碟子蛋白质的提取 称取接骨木、苦碟子干粉 2 g,浸于 200 mL PBS 缓冲液中,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存过夜,间隔时

间振荡,离心(4 $^{\circ}\text{C}$,4 000 r/min)10 min,取上清,加入 80% 饱和硫酸铵溶液,离心(4 $^{\circ}\text{C}$,8 000 r/min)10 min,沉淀用 PBS 溶解,得到蛋白粗提液,装入透析袋用 PBS 缓冲液透析,每隔 2 h 换 1 次溶液,取透析后的蛋白溶液冷冻干燥,-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存,备用。

1.2.2 样品蛋白提取物浓度的测定 采用考马斯亮蓝(G-250)法^[7]测定蛋白质含量:取待测粗酶蛋白样品溶液 0.1 mL,加入 5.0 mL 考马斯亮蓝溶液,测定 595 nm 处吸光度,计算供试样品的蛋白浓度。

1.2.3 蛋白提取物的体外纤溶活性鉴定 纤维平板的配制及尿激酶标准曲线制作参照夏广清等的方法^[8]。

1.2.3.1 判断纤溶成分是否为蛋白质 将供试品在沸水浴中加热 10 min,点纤维蛋白板,若活性丧失,可初步判断起溶纤作用的物质为蛋白质。

1.2.3.2 样品蛋白溶液酶活力测定 分别取 10 μL 接骨木、苦碟子蛋白质提取液,加入纤维平板中,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养 18 h,观察,如点样孔周围出现透明的溶圈,则证明被加样品有溶栓效果,测量溶圈直径,对照标准曲线可得到样品溶液相对尿激酶活力。

1.2.3.3 蛋白提取物的溶纤比活力测定 蛋白比活力(U/mg)=相对尿激酶活力(U)/[蛋白浓度(mg/mL) \times 点样体积(mL)]。

1.2.4 接骨木、苦碟子纤溶酶的 SDS-PAGE 检测 按汪家政等的方法^[9],对蛋白质进行 12% SDS-PAGE 检测,考马斯亮蓝 G-250 染色。

2 结果与分析

2.1 接骨木、苦碟子粗酶提取液蛋白质含量的测定

根据标准蛋白的吸光度,绘制蛋白质浓度的标准曲线(图 1),由标准曲线得到蛋白质浓度的计算公式为: $y = 0.0074x - 0.0102$ 。依据公式通过吸光度测得接骨木、苦碟子粗酶蛋白含量分别为 1 842 $\mu\text{g/g}$ 及 1 976 $\mu\text{g/g}$ 。

2.2 接骨木、苦碟子粗酶提取物蛋白成分鉴定及溶纤活力、比活力

根据尿激酶溶圈直径的平方绘制尿激酶标准曲线(图

收稿日期:2013-12-25

基金项目:吉林省教育厅科研项目(编号:吉教科字[2010]第210号)。
作者简介:夏广清(1972—),女,吉林长春人,博士,教授,从事生物化学与分子生物学研究和教学工作。E-mail:qingguangx@163.com。

通信作者:秦佳梅,教授,硕士生导师,主要从事药用植物栽培及育种的研究和教学工作。E-mail:th_qjm@163.com。

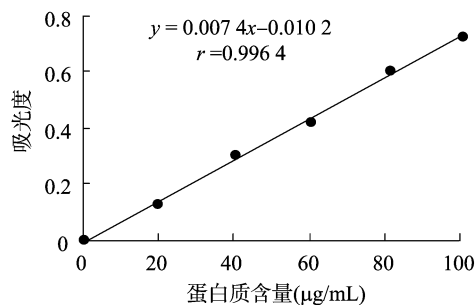


图1 蛋白质标准曲线

2), 由标准曲线得到酶活力计算公式为 $y = 0.0102x + 0.032$ 。根据公式, 由样品蛋白在纤维平板上的溶圈直径计算出接骨木及苦碟子粗提物蛋白比活力为分别 0.795 U 及 0.837 U。

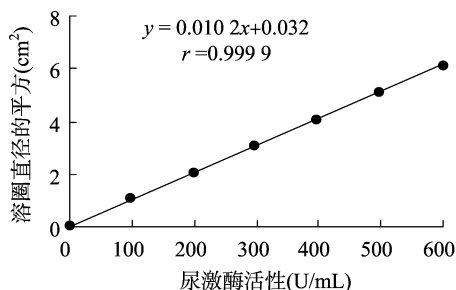
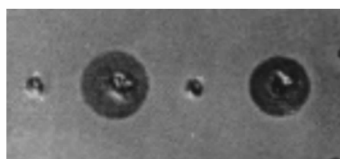


图2 尿激酶活性测定

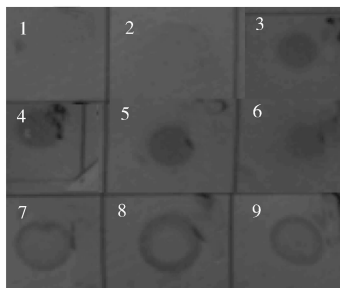
2.3 接骨木、苦碟子粗酶提取物硫酸铵分级沉淀及体外溶栓试验

由图 3-A 可见, 从接骨木、苦碟子中可以分离出具有溶纤活性的纤溶蛋白。硫酸铵沉淀试验结果表明, 当硫酸铵饱和度在 0~40% 时, 沉淀物无纤溶活性; 当硫酸铵饱和度在 50%~60% 时, 沉淀物活性较低; 而当硫酸铵饱和度为 70%~90%, 沉淀物活性最高 (图 3-B), 因此, 后续试验均采用 70%~90% 饱和硫酸铵沉淀。

CK 接骨木 CK 苦碟子



A. 纤溶酶活性鉴定



B. 硫酸铵分级沉淀(1~9硫酸铵饱和度从10%到90%)

图3 接骨木、苦碟子的纤溶酶活性鉴定及硫酸铵分级沉淀

2.4 接骨木、苦碟子粗酶提取物蛋白成分鉴定

将提取到的接骨木、苦碟子粗酶提取物在沸水中煮沸 5 min, 将煮沸后的样品进行溶纤试验, 纤维平板上未见任何溶解现象, 表明接骨木、苦碟子中具有溶栓作用的为蛋白质。

2.5 接骨木、苦碟子纤溶酶的 SDS-PAGE 检测

对得到的接骨木、苦碟子粗酶进行 SDS-PAGE 电泳, 结果表明, 从这 2 种长白山道地药材中可分离到分子量为 15~45 ku 的蛋白质 (图 4), 经离子交换层析后, 得到分子量大约为 36 ku 的明显条带 (图 5), 因此, 初步判断接骨木、苦碟子纤溶蛋白酶的分子量大约为 36 ku。

接骨木 苦碟子 marker

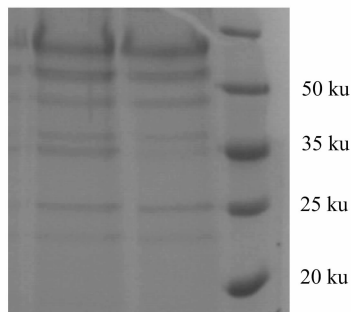


图4 接骨木、苦碟子粗酶提取液SDS-PAGE电泳

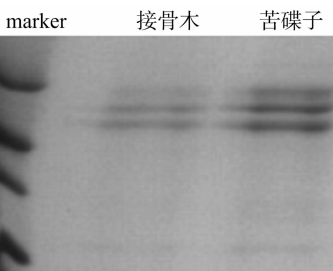


图5 离子交换层析后接骨木、苦碟子SDS-PAGE电泳

3 讨论

随着人们生活水平的不断提高, 血栓性疾病已成为常见病、多发病, 尤其是心脑血管疾病, 严重影响人类的健康和寿命。目前预防和治疗血栓性疾病主要有 3 种方式: 一是针对一些有高凝状态病人用药物预防血栓; 二是对已有血栓形成的患者给予抗凝治疗, 以防止血栓的延伸、扩大, 避免栓塞并发症; 三是采用手术或服用溶栓药物, 消除血栓, 疏通血管, 恢复正常血液流动, 减少组织和脏器的损伤。前 2 种方式对于已经形成的血栓无法消除, 而手术取血栓技术的难度和风险都较大, 所以在临床上多采用溶栓药物法。溶栓药物以溶解纤维蛋白多聚体为主, 使血栓纤维蛋白降解, 形成可溶性的纤维蛋白降解产物, 及时使血管再通, 减轻脏器损害的范围和程度, 大大提高病人的存活率。纤溶系统对纤维蛋白的溶解、对血液的循环有重要的影响, 纤溶酶活性的降低是导致血栓形成的主要原因之一。目前纤溶酶主要来源于动物和微生物, 源于植物的纤溶酶很少^[10]。本试验从接骨木、苦碟子中分离得到纤溶酶并对其酶学性质进行了初步研究, 表明可以从接骨木、苦碟子中分离出分子量约为 36 ku 的具有溶栓活性的纤溶酶, 有望将其开发成新型的溶栓类药物。

参考文献:

- [1] 徐淑云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1347-1348.

朱德艳. β -环糊精辅助提取葛根黄酮的工艺研究[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(11): 317-318.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.11.113

β -环糊精辅助提取葛根黄酮的工艺研究

朱德艳

(荆楚理工学院生物工程学院, 湖北荆门 448000)

摘要:为研究 β -环糊精辅助提取葛根黄酮的新工艺, 以 β -环糊精(β -CD)为辅助材料, 提取葛根中葛根黄酮, 同时测定葛根黄酮的提取率, 并与传统提取工艺进行比较。结果表明, β -CD 辅助提取新工艺的葛根黄酮提取率明显优于传统提取工艺。 β -CD 辅助提取新工艺具有安全性高、无污染、成本低等特点, 具有广阔的应用前景。

关键词:葛根; 总黄酮; β -环糊精; 提取工艺

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)11-0317-02

葛根含有葛根苷、葛根苷元、葛根素等黄酮类物质, 具有抗菌、活血化痰、扩张冠状动脉血管和脑血管、降低心肌耗氧量、改善心肌收缩功能、促进血液循环、增强机体免疫力等药理与保健作用^[1-3]。葛根黄酮作为许多药物与保健品的主要功能成分, 具有重要的价值, 其提取与功能应用的研究是目前的热点之一。为了增加葛根黄酮在水中的溶解性能, 本试验采用 β -环糊精来作为葛根黄酮类水提取辅助剂。 β -环糊精是由 7 个葡萄糖残基以 -1,4-糖苷键连接成环状, 呈上宽下窄、两端开口、中空“桶状”结构, 葛根黄酮类可以进入 β -环糊精的筒状结构内形成溶解度较大的包合物, 有文献报道, 采用 β -环糊精作为辅助性材料提取银杏、金银花、沙棘、丹参、虎杖和广枣等物质中的黄酮成分, 取得了较好的结果^[4-9]。

1 材料与方法

1.1 试验材料与化学试剂

葛根来自湖北省仙之灵食品有限公司(自然晾干, 粉碎); β -环糊精, 化学纯(河南省孟州市华兴生物化工有限责任公司); 芸香苷标准品(中国药品生物制品检定所), 批号为 100080-200707, 其他试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器与设备

754E 型紫外-可见分光光度计(上海第三分析仪器有限公司); 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司); 电热恒温

鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 总黄酮含量的测定 芸香苷标准溶液的配制^[10]: 精确称取干燥至恒重的无水芸香苷对照品 10.0 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 加 30% 乙醇适量, 超声波使其溶解, 放冷后加 30% 乙醇至刻度, 摇匀, 即得浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 的芸香苷标准溶液。

供试品溶液的制备: 取葛根粗粉 2 g, 加 60% 乙醇溶液 40 mL, 加热回流 2 h, 提取 2 次, 过滤, 合并 2 次滤液, 用 60% 乙醇定容至 100 mL, 即得供试品溶液。

测定波长的选择: 取芸香苷标准溶液 2.0 mL, 加 30% 乙醇至 6 mL, 加 5% 亚硝酸钠溶液 1.0 mL, 摇匀, 放置 10 min, 加 10% 硝酸铝溶液 1.0 mL, 摇匀, 放置 10 min, 再加 10% 氢氧化钠溶液 10 mL, 加 30% 乙醇至 25 mL, 摇匀, 放置 10 min, 以相应试剂作空白, 于分光光度计在 370~700 nm 波长范围进行扫描, 结果表明在 500 nm 处有最大光吸收。

标准曲线的绘制: 精确量取芸香苷标准溶液 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL, 分别置于 25 mL 量瓶中, 各加 30% 乙醇至 6.0 mL, 加 5% 亚硝酸钠溶液 1.0 mL, 混匀, 放置 6 min, 加 10% 硝酸铝溶液 1.0 mL, 摇匀, 放置 6 min, 加 10% 氢氧化钠溶液 10 mL, 摇匀, 放置 10 min, 以 30% 乙醇溶液为空白, 按照紫外-可见分光光度法, 在 500 nm 处测定吸光度, 以吸光度为横坐标, 浓度为纵坐标, 绘制标准曲线。

供试品溶液中总黄酮含量的测定: 吸取供试品溶液 1 mL, 置于 25 mL 量瓶中, 按照标准曲线制备项下的方法测定吸光度, 利用标准曲线计算出供试品溶液中总黄酮含量。

1.3.2 β -环糊精对葛根总黄酮提取率的影响

取葛根粗

收稿日期: 2014-01-14

基金项目: 湖北省荆门市科技项目(编号: 2012YD05)。

作者简介: 朱德艳(1977—), 女, 湖北恩施人, 硕士, 副教授, 研究方向为生物制药技术。E-mail: zhudeyan@163.com。

[2] 郑红花, 罗德生, 罗丽芳, 等. 大鼠实验性肝损伤时山梨醇脱氢酶 SOD 活性及 MDA 含量变化[J]. 咸宁医学院学报, 2000, 14(4): 232-234.

[3] 顾毅, 时德, 赵渝. 肿瘤与静脉血栓形成的关系研究进展[J]. 中国癌症杂志, 2002, 12(1): 85-88.

[4] 何叶喧. 中草药牛膝、茜草纤溶酶的筛选与分离纯化[D]. 保定: 河北大学, 2006.

[5] 欧阳富, 刘远, 肖辉辉, 等. 接骨木中木脂素类化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 3(10): 1225-1227.

[6] 秦岐行. 苦碟子治疗心血管疾病活性成分筛选[D]. 长春: 长春理工大学, 2012.

[7] 肖能庚, 余瑞元, 袁明秀, 等. 生物化学实验原理和方法[M]. 2版. 北京: 北京大学出版社, 2005: 262-270.

[8] 夏广清, 宋金枝, 刘伟. 穿龙薯蓣纤溶酶分离及活性检测[J]. 通化师范学院学报: 自然科学, 2013, 34(2): 42-43, 86.

[9] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000.

[10] 顾昌玲, 朱宝成, 周艳芬, 等. 延胡索纤溶酶的分离纯化及部分性质[J]. 中国生化药物杂志, 2008, 29(2): 81-84, 88.