



· 制剂与炮制 ·

蜈蚣胃蛋白酶解物体外抗凝活性肽类的分离与分析

姜丽¹, 王玉蓉^{1*}, 赵韶华², 黄能听¹

(1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100102;

2. 河北以岭医药集团, 河北 石家庄 050035)

[摘要] 目的:采用凝胶过滤色谱和 C₁₈反相色谱对蜈蚣胃蛋白酶解物的抗凝活性部位进行分离纯化,并检测其相对分子质量分布范围。方法:按色带及 280 nm 紫外光谱法收集凝胶色谱分离各流分;以活化部位凝血活酶时间(APTT)为指标,检测各流分体外抗凝活性;用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)检测其相对分子质量分布范围。结果:经凝胶过滤色谱和 C₁₈反相色谱纯化得到了抗凝活性组分,用 MALDI-TOF-MS 测得其相对分子质量分布范围为 597~1 146。结论:凝胶过滤色谱和 C₁₈反相色谱可用于蜈蚣胃蛋白酶解物抗凝活性组分的分离纯化,其抗凝活性组分为小分子肽类。

[关键词] 蜈蚣胃蛋白酶解物;凝胶过滤色谱;C₁₈反相色谱;抗凝;MALDI-TOF-MS

蜈蚣又名天龙、千年虫,为节肢动物门唇足纲整形目蜈蚣科动物,药用始载于《神农本草经》,已有 2 000 多年的药用历史;《本草纲目》载之于虫部第 42 卷;现已被纳入《中国药典》。其干燥虫体性辛,味温,有毒,归肝经,具息风止痉、解毒散结、通络止痛之功,张锡纯认为“其走窜之力最速,内而脏腑外而经络,凡气血凝聚之处皆能开之”^[1]。临床常用于治疗小儿惊风、疮疡、肿毒、烫伤、风痹等。据国内学者的报道,蜈蚣还具有心血管方面的作用。例如从内皮细胞功能角度探讨中药蜈蚣对动脉粥样硬化(AS)家兔一氧化氮(NO)、内皮素(ET)以及血管内皮细胞生长因子(VEGF)表达的影响,发现蜈蚣可调节 NO/ET 的平衡,抑制 VEGF 的表达,表明其具有保护血管内皮细胞,防止内皮细胞增生的作用^[2];蜈蚣有效部位能上调 eNOS mRNA 表达,促进 eNOS 蛋白合成和增加 NO 生成,进而使血管平滑肌舒张,改善冠脉供血^[3];研究发现蜈蚣提取液对在

体大鼠急性心肌缺血再灌注损伤的左心功能有明显保护作用,且存在一定的量效关系^[4]。但至今仍不清楚其抗凝活性的物质基础。

蜈蚣目前多以全粉入药,开展蜈蚣虫体化学组成的研究,弄清蜈蚣药效与其组成成分的关系,十分必要。鉴于动物类蛋白质、黏多糖等大分子物质只有到达胃肠道后,方可被酶解成小分子肽、低聚糖等物质,吸收入血发挥药效,本研究前期曾采用生物酶仿生提取方法,先进行胃蛋白酶酶解,继而用胰蛋白酶酶解,以活化部位凝血活酶时间(APTT)法、纤维蛋白原平板法为考察指标,通过比较,筛选出仿生酶解法为最佳的提取方法,尤以胃蛋白酶解物最佳^[5]。为此将蜈蚣胃蛋白酶解物作为本实验的研究对象。

葡聚糖凝胶色谱可按相对分子质量大小分离色谱蛋白质、肽类分子,C₁₈反相色谱法又可将相对分子质量相近但极性不同的物质加以分离。故本研究以体外 APTT 为指标筛选抗凝活性,选用葡聚糖凝胶色谱配合 C₁₈反向色谱法,对蜈蚣胃酶解物进一步分离纯化,确定该体外抗凝活性组分的相对分子质量分布范围,初步探索蜈蚣体内的抗凝物质基础。

1 材料

UV-2000 型分光光度计;800B 型离心机(上海安亭科学仪器厂);ES-120 型电子分析天平(长沙湘平科技发展有限公司);恒温水浴锅(余姚市东方电工仪器厂);DZ-1BC 型真空干燥箱(天津市泰斯特

[稿件编号] 20110705013

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09313-003);北京中医药大学复方中药制剂研究创新团队项目(2011-CXTD-13)

[通信作者] *王玉蓉,教授,博士生导师,主要从事中药新剂型创制研究,Tel:13641099103,E-mail:yurong.wang@163.com

[作者简介] 姜丽,博士研究生,主要从事中药新剂型创制研究,Tel:13601314494,E-mail:jerry858789@163.com



仪器有限公司), LG-RABER- I 型血小板聚集凝血因子分析仪(北京中勤世帝科学仪器公司), 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱[MALDI-TOF-M, AX-IMA-CFR TMPlus, 岛津国际贸易(上海)有限公司]。

蜈蚣胃酶解物(自制);牛血清白蛋白(Sigma A7906,北京环亚泰克生物医学技术有限公司);APTT试剂 $10 \times 1.5 \text{ mL}$ (111033,上海太阳生物试剂公司);Protein Assay Dye Rgnt(Bio-red 5000006;北京泽平科技有限责任公司);乙醇(分析纯);屈臣氏纯净水(广州屈臣氏食品饮料有限公司);Sephadax G-50 medium;Sephadax G-25 medium(北京环亚泰克生物医学技术有限公司); C_{18} 反相填料(北京慧德易科技有限责任公司);不同规格色谱柱(北京汇海科仪科技有限公司)。

健康日本大耳白兔(雄性),体重约 2 kg ,均由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,符合国家健康一级动物标准,动物许可证号SCXK(京)2009-0009。

2 方法与结果

2.1 APTT抗凝血药效试验^[6-7]

2.1.1 样品和空白对照品的制备 精密称取各样品干燥物适量,去离子水溶解,制成质量浓度为 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的样品,以生理盐水为空白对照。

2.1.2 血浆的制备 选用雄性日本大耳白兔,耳缘静脉注射戊巴比妥钠麻醉,颈动脉取血,加入 3.8% 枸橼酸钠抗凝($\bar{x} \pm s, n = 9$),混匀,离心 15 min ($3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$),取上清液,分离贫血小板血浆(PPP),备用。

2.1.3 测定步骤 取样品液 $10 \mu\text{L}$,PPP $100 \mu\text{L}$ 于测试槽中,按试剂盒说明,分别加入凝血活酶时间(APTT)试剂,采用血小板聚集凝血因子分析仪测定APTT值。

2.2 葡聚糖凝胶色谱分离

2.2.1 葡聚糖凝胶 G-50 柱色谱分离 分别称取适量 Sephadex G-50,预处理后填装于色谱柱,去离子水冲至柱体积(BV)恒定。取蜈蚣胃蛋白酶酶解液上清液,调整质量浓度至 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,上样,去离子水洗脱,流速 $4.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,按色带收集,由下至上颜色分别为浅棕色、深棕色、棕红色、黄色,将收集到的样品分别记为F1,F2,F3,F4。

双缩脲反应初步表明F1,F2,F3为蛋白或多肽

类成分,APTT药效显示F3具有抗凝活性,继用葡聚糖凝胶G25进一步分离。

2.2.2 葡聚糖凝胶 G-25 柱色谱分离 将F3浓缩至体积 20% , $0.8 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤后上样,去离子水洗脱,流速 $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,按色带收集,由下至上颜色分别呈浅棕色、棕色、桔红色、黄色,分别记为F3-1,F3-2,F3-3,F3-4。APTT药效表明,F3-3抗凝药效最好,双缩脲反应初步表明其为蛋白或多肽类成分。

2.3 C_{18} 反向柱色谱分离 C_{18} 填料用纯甲醇浸泡过夜,备用。使用玻璃棒沿壁连续缓缓注入填料,并用纯甲醇灌满色谱柱,打开底部活塞,冲柱至柱体积恒定,用3倍柱体积 10% 甲醇溶液平衡柱子。将样品F3-3经 $0.8 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤后,上样。用 10% 甲醇洗脱,流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,连接HD-3紫外检测仪,在线检测,检测波长为 280 nm ,BSZ-100自动部分收集器收集馏分,每管收集 10 min ,记录仪在线记录吸光度,纸速 $2 \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1}$ 。

结果表明,经 C_{18} 反相柱分离后,流分F3-3被分离成4个部分,按照出峰顺序,分别记为LF1,LF2(LF2-1,LF2-2),LF3,将4个流分冷冻干燥,粉体颜色分别呈乳白色、红色、红色、浅黄色。

2.4 样品分析

2.4.1 HPLC 测定 将LF1,LF2-1,LF2-2,LF3 4个流分采用HPLC测定。Agilent Zorbax 300SB- C_{18} 色谱柱($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$),流动相乙腈(含 0.1% TFA)-水(含 0.1% TFA) $1.5:98.5$;流速 $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;检测波长 280 nm ;进样量 $10 \mu\text{L}$,柱温室温。各流分HPLC图见图1。LF1,LF2-1,LF2-2并非单一成分,而是极性相近的混合组分;LF3虽显示单一峰,但其纯度并不能仅通过HPLC鉴定。

2.4.2 MALDI-TOF-MS 分析 采用MALDI-TOF-MS对LF1,LF2-1,LF2-2,LF3进行分析。基质CHCA,线性正离子谱模式, N_2 激光源,波长 337 nm ,真空度 $1.05 \times 10^{-5} \text{ Pa}$,离子源加速电压 25 kV ,脉冲速度 3 nm ,延迟时间 1700 ns ,叠加 100 次。结果见图2。LF1相对分子质量范围为 $656 \sim 893$,LF2-1相对分子质量范围为 $606 \sim 1146$,LF2-2相对分子质量范围为 $597 \sim 846$,LF3相对分子质量范围为 $630 \sim 1074$ 。

2.4.3 APTT抗凝血药效测定 经 C_{18} 柱色谱法分离得到的各流分APTT抗凝药效试验结果见表1。

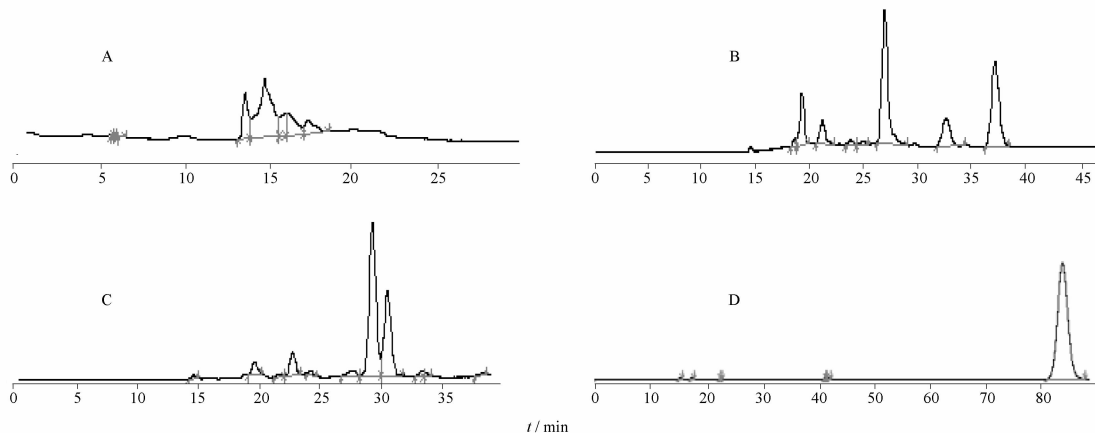


图1 LF1(A), LF2-1(B), LF2-2(C), LF3(D) 4个流分的HPLC图
Fig. 1 HPLC spectrums of LF1(A), LF2-1(B), LF2-2(C) and LF3(D)

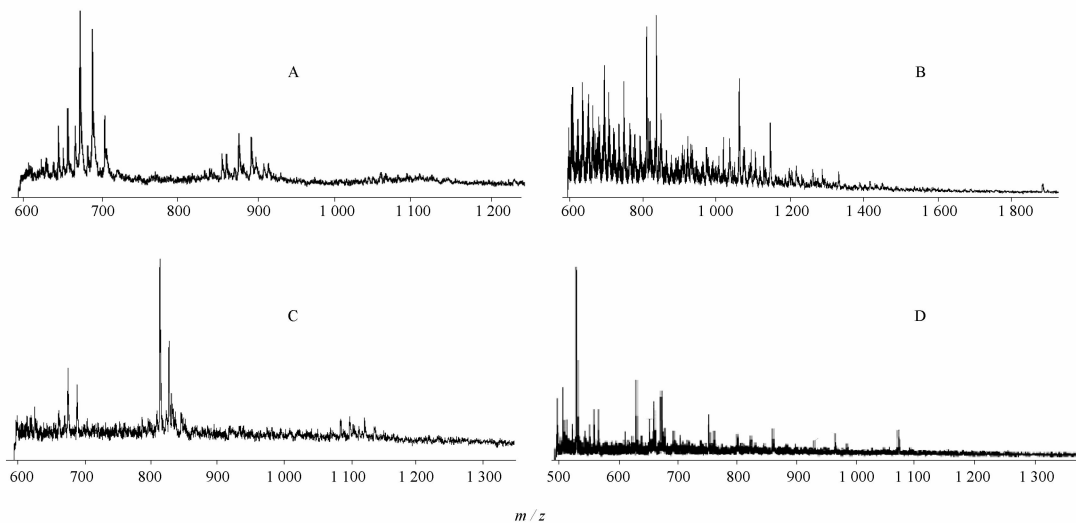


图2 LF1(A), LF2-1(B), LF2-2(C), LF3(D) 4个流分的质谱图
Fig. 2 MS spectrums LF1(A), LF2-1(B), LF2-2(C) and LF3(D)

经体外 APTT 分析, LF1, LF2 均为具有抗凝活性的组分, 其中 LF2-1, LF2-1 活性最强, 而 LF3 无抗凝活性。

3 讨论

动物药中主要含蛋白质、肽类和氨基酸等物质, 通过适当的酶解作用, 可将大分子蛋白水解为小分子肽类, 经葡聚糖凝胶过滤色谱和 C₁₈ 反相色谱分离纯化后, 得到具有一定活性的小分子肽类。小分子肽的界限划分迄今未有明确定义, 一般认为小分子肽的相对分子质量均在 3 000 以下^[8]。蜈蚣胃蛋白酶解液经 Sephadex G-50 和 G-25 柱分离后, 达到分级分离的目的, 相对分子质量范围有所缩小, 由

表1 F3-3 经 C₁₈ 柱所得流分 APTT 抗凝药效考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 APTT for different fractions of F3-3 separated by C₁₈ column *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n=3$)

样品名称	质量浓度(以干燥物计) /g · mL ⁻¹	凝血时间 /s
LF1	100	164.6 ± 6.5 ¹⁾
LF2-1	100	>999.0 ¹⁾
LF2-2	100	714.5 ± 45.0 ¹⁾
LF3	100	32.3 ± 1.4
生理盐水(阴性)	-	30.0 ± 0.8

注: 与生理盐水组比, ¹⁾P < 0.01。



<5 000缩小到 <1 000。从相对分子质量范围看,符合小分子肽的特点。

蜈蚣胃酶解液经葡聚糖凝胶过滤色谱 Sephadex G-50 和 G-25 柱分离后,经 APTT 抗凝血药效试验筛选,得抗凝活性最强的流分 F3-3,再经 C₁₈ 柱色谱法,依据洗脱图谱合并流分,得到 4 个组分。其中抗凝活性较强的 LF2-1 和 LF2-1 均呈粉红色。

MAILDIA-TOF-MS 分析结果表明,蜈蚣活性部位 LF2-1 和 LF2-2 的相对分子质量分布范围约在 597 ~ 1 146, HPLC 测定显示并非一纯物质,而是一类极性相近的混合组分,双缩脲反应初步表明其为小分子肽类。

[参考文献]

[1] 张明勤. 蜈蚣及全蝎在中医外科中的应用[J]. 黑龙江中医药, 1995 (1):46.

- [2] 王勇炫, 吴伟康, 吴以岭, 等. 蜈蚣有效部位抗心肌缺血的 NO 机制研究[C]. 贵阳:全国中药学术研讨会论文集, 2009: 386.
- [3] 司秋菊, 王鑫国, 王亚利, 等. 蜈蚣对动脉粥样硬化家兔血管内皮细胞生长因子的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2003, 1 (1):5.
- [4] 张明泉, 王亚利, 温瑞书, 等. 蜈蚣提取液对大鼠心脏血流动力学的作用研究[J]. 河北中医, 2004, 26 (9):716.
- [5] 黄能听, 许文博, 王玉蓉, 等. 仿生酶解法提取蜈蚣的工艺研究[J]. 北京中医药大学学报, 2009, 32 (10):706.
- [6] 许文博, 王玉蓉, 黄能听, 等. 全蝎胃蛋白酶酶解混合多肽体外抗凝活性研究及其组成分析[J]. 北京中医药大学学报, 2010, 33 (2):127.
- [7] 冯光军, 朱正光, 余传林, 等. 水蛭乙醇提取物体外抗凝活性研究[J]. 中药材, 2007, 8 (30):909.
- [8] 刘绛光, 张海鸿. 小分子肽分离方法研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2005, 26(4): 244.

Study on separation and analysis of anticoagulant compounds for anticoagulant activity *in vitro* on mixture of peptide from pepsin enzymolysis of centipede

JIANG Li¹, WANG Yurong^{1*}, ZHAO Shaohua², HUANG Nengting¹

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102, China;
2. Hebei Yiling Pharmaceutical Group, Shijiazhuang 050035, China)

[Abstract] **Objective:** To separate anticoagulant components from the pepsin enzymolysis of centipede by gel filtration and reverse-phase C₁₈ chromatography, and to detect the distribution range of their molecular mass. **Method:** Cingula and 280 nm ultraviolet spectrometry were used to detect and collect the chromatographic solutions. The components' anticoagulant activity *in vitro* was detected with activated partial thromboplastin time (APTT) as the index, and the molecular mass range of the active composition was detected by MALDI-TOF-MS. **Result:** Anticoagulant active compounds were produced by gel filtration and reverse-phase C₁₈ chromatography. The distribution range of relative molecular mass was determined to be from 597 to 1 146. **Conclusion:** Gel filtration and reverse-phase C₁₈ chromatography are feasible for separating and purifying the pepsin enzymolysis of Centipede. The anticoagulant active compounds are oligopeptides.

[Key words] pepsin enzymolysis of centipede; gel filtration chromatography; reverse-phase C₁₈ chromatography; anticoagulant effect; MALDI-TOF-MS

doi:10.4268/cjcm20120308

[责任编辑 马超一]