

地龙的鲜品和干品可溶性蛋白及纤溶酶活性的对比研究

陈丽艳, 张迎, 綦菲, 宋芳婷, 王伟明*
(黑龙江省中医研究院, 哈尔滨 150036)

[摘要] **目的:**对比研究地龙的鲜品和干品的可溶性蛋白及纤溶酶活性。**方法:**采用 Bradford 方法测定蛋白含量, SDS-PAGE 进行蛋白谱带的分析, 并采用琼脂糖-纤维蛋白平板法进行纤溶酶活性的测定。**结果:**以干燥品计, 鲜品的蛋白提取率为 $(13.89 \pm 0.86)\%$, 蛋白含量为 $(63.14 \pm 0.38)\%$, 体外纤溶酶活性为 $(8\ 743 \pm 17)\text{IU} \cdot \text{g}^{-1}$; 干品蛋白提取率为 $(9.82 \pm 0.75)\%$, 蛋白含量为 $(45.16 \pm 0.12)\%$, 体外纤溶酶活性为 $(206 \pm 14)\text{IU} \cdot \text{g}^{-1}$; SDS-PAGE 凝胶电泳结果显示, 鲜品共显示 12 条蛋白谱带, 干品的谱带较少, 且不清晰。**结论:**鲜地龙的可溶性蛋白提取率、含量及体外纤溶酶活性均明显高于干品, 且蛋白组分有较大的差异。

[关键词] 鲜地龙; 干地龙; 可溶性蛋白; 纤溶酶活性

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)08-0089-04

Compared with the Dissolubility Proteins and Activity of Fibrinolytic Enzyme between Fresh Earthworm and Dry Earthworm

CHEN Li-yan, ZHANG Ying, QI Fei, SONG Fang-ting, WANG Wei-ming*
(Heilongjiang Academy of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150036, China)

[Abstract] **Objective:** To study the dissolubility proteins and activity of fibrinolytic enzyme of fresh and dry earthworm comparably. **Method:** Bradford method was used to detect protein content, SDS-PAGE was used to analyze the protein compositions, and the agarose-fibrin plate was used to detect the activity of fibrinolytic enzyme. **Result:** On dried basis, the protein extraction rate of fresh earthworm was $(13.89 \pm 0.86)\%$, the protein content was $(63.14 \pm 0.38)\%$, the activity of enzyme led to $(8\ 743 \pm 17)\text{IU} \cdot \text{g}^{-1}$; compared with dry earthworm, the protein extraction rate was $(9.82 \pm 0.75)\%$, the protein content and enzyme activity were $(45.16 \pm 0.12)\%$ and $(206 \pm 14)\text{IU} \cdot \text{g}^{-1}$. The SDS-PAGE result showed that there were 12 protein bands in fresh earthworm and only several bands in dry earthworm. **Conclusion:** The extraction rate, content and enzyme activity of the dissolubility proteins at fresh earthworm were higher than dry earthworm, and the constituents exhibited obvious difference.

[Key words] fresh earthworm; dry earthworm; dissolubility protein; activity of fibrinolytic enzyme

地龙, 民间上又称蚯蚓, 是常用中药之一, 其性味咸寒, 有清热、熄风、降压、平喘、通络、利尿之功效^[1]。现代药理研究表明, 地龙具有溶栓、抗肿瘤、

增强免疫力、降压、镇静等作用^[2-3]。《中国药典》中规定地龙是钜蚓科动物参环毛蚓或缟蚯蚓的干燥体, 而地龙的鲜品并没有列入。近几年来, 鲜地龙在现代临床研究中也常有应用, 如用于砂眼、急性结膜炎、带状疱疹等感染性疾病^[4]。地龙的主要活性成分是蛋白质, 其所含的纤溶酶和蚓激酶已被证实具有较好的纤溶活性^[5-6], 然而, 鲜地龙在炮制过程中, 由于受温度等因素的影响, 蛋白质组分会不同程度的破坏。本研究针对地龙的鲜品和干品可溶性蛋白的含量、组分及纤溶酶活性进行对比研究, 为地龙在临床上应用提供理论依据。

[收稿日期] 20110831(006)

[基金项目] 哈尔滨市科技创新人才研究专项资金项目 (2011RFQYS080)

[第一作者] 陈丽艳, 硕士, 副主任药师, 从事中药新药及保健食品的研究与开发工作, Tel: 0451-55665478, E-mail: cly9998@163.com

[通讯作者] * 王伟明, 博士, 研究员, 硕士生导师, 从事中药新产品开发, Tel: 0451-55665478, E-mail: zyyjy@163.com

1 仪器与试剂

LD5-10 型低速离心机(北京京立离心机厂)、GT16-3 型高速台式离心机(北京时代北利离心机有限公司),JJ-2B 型电动高速捣碎机(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司),DYY-12 型电泳仪(北京六一仪器厂),DYCZ-24D 型垂直板电泳槽(北京六一仪器厂),4 000 MP 凝胶成像系统(BIO-RAD),WD-9405B 型脱色摇床(北京六一仪器厂),UV-160A 型紫外分光光度计(日本岛津)。

尿激酶、凝血酶和牛纤维蛋白原(中国药品生物制品检定所),标准蛋白(14.4 ~ 116 kD 碧云天生物技术研究所),琼脂糖(上海东海制药厂),牛血清白蛋白(中国医药上海化学试剂公司),丙烯酰胺、过硫酸铵、四甲基乙二胺、 β -巯基乙醇、甘油、十二烷基磺酸钠(SDS)、考马斯亮蓝 G-250 和甘氨酸(均购于哈尔滨博润生物制剂有限公司)。

鲜地龙于 2010 年 9 月购于辽宁沈阳同德蚯蚓养殖场,经黑龙江省中医研究院付克志研究员鉴定鉴定为 *Eisenia foetida*。药材标本保存于黑龙江省中医研究院中药标本室。

2 方法

2.1 地龙的炮制 取新鲜蚯蚓,剖开腹部,除去内脏泥沙等杂质,洗净,文火炒制。

2.2 蛋白质的提取^[7] 干地龙蛋白的提取:取炮制的干地龙粗粉 100 g,加 pH 6.8 的磷酸盐缓冲液 500 mL,于 4 °C 冷浸 36 h,3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,取上清液,加 95% 乙醇至体积分数为 75%,置 4 °C 静置过夜,离心,收集沉淀物,沉淀物用无水乙醇洗涤 3 次,于 40 °C 减压干燥,即可。

鲜地龙蛋白的提取:将鲜地龙先用水洗净,并浸泡清肠,取洗净的鲜地龙 600 g 绞碎,其他同干地龙蛋白的提取。

水分测定:参照《中国药典》2010 年版一部附录 IX H 水分测定法^[8],测得鲜地龙和干地龙的水分分别为(86.34 ± 0.15)% 和(4.96 ± 0.15)%。

2.3 蛋白含量测定 采用 Bradford 法(考马斯亮兰可溶性蛋白微量测定法)测定^[9-10]。

标准蛋白质溶液的制备:精密称取牛血清白蛋白(BSA)10 mg,至于 10 mL 量瓶中,加生理盐水至刻度,配制成 1.0 g·L⁻¹ 的标准蛋白质溶液。

供试品溶液的制备:取供试品 0.1 g,用生理盐水溶液稀释至 10 mL,离心备用。

考马斯亮兰 G-250 显色剂的配制:称 100 mg 考马斯亮兰 G-250,溶于 50 mL 95% 的乙醇后,再加入

120 mL 85% 的磷酸,用去离子水稀释至 1 L,待充分溶解后,过滤,滤液置棕色瓶内避光保存备用。

测定方法及结果:按表 1 中顺序,在试管中分别加入样品、水和显色剂,每加完一管,立即混匀,并在 595 nm 处测定光吸收值。以标准蛋白质含量(mg)为横坐标,以吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,实验重复 3 次。

表 1 鲜地龙与干地龙蛋白质含量测定加样量 mL

	标准蛋白质溶液	水	G-250
1	0	0.2	10
2	0.02	0.18	10
3	0.04	0.16	10
4	0.08	0.12	10
5	0.12	0.08	10
6	0.16	0.04	10
7	0.2	0	10
S _{样品}	0.2	0	10

2.4 SDS-PAGE 分析 SDS-PAGE 分析采用 12% (m/v) 聚丙烯酰胺凝胶进行的,蛋白的分子量通过 SDS-PAGE 后凝胶标准蛋白对比进行评估。经考马斯亮蓝染色,脱色,即可观察到凝胶条带^[11]。

样品制备:取地龙蛋白样品 0.2 g 溶于 2 mL 的电极缓冲液中,震荡混匀,溶解充分后,取适量样品溶液与 2 × SDS 上样缓冲液按 3:1 的比例混匀。100 °C 水浴加热 5 min,15 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,取上清液作为供试品溶液。

电泳:用微量进样器吸取供试样品溶液 20 μL,缓缓注入加样孔底部,开始电泳。电泳开始阶段恒定电压 70 V,样品到达分离胶后,电压调整至恒压 130 V。待示踪指示剂行至距电泳槽底部约 1 cm 时,关闭电源,终止电泳。

染色和脱色:电泳结束后,打开电泳槽,取出胶板,切去浓缩胶,保留分离胶并标记溴酚蓝前沿。将分离胶轻轻于玻璃胶板分离。浸于考马斯亮蓝染色液中染色 2 h,再浸于脱色液中脱色、固定。

凝胶成像数据分析:采用 Quantity one 软件进行 SDS-PAGE 数据分析。

2.5 纤溶酶活性测定 采用琼脂糖-纤维蛋白平板法。根据 Liu^[12] 方法稍做改进制备纤维蛋白琼脂平板。

对照品溶液的配制:取尿激酶 1 支(1 000 IU/支),用 0.9% 氯化钠溶液配成每 1 mL 中含 100,80,60,40,20 IU 的 5 个浓度溶液。

样品溶液的配制:分别精密称取 100 mg 鲜地龙和干地龙提取物,加 0.9% 的生理盐水 1 mL 冷浸过夜,离心,取上清液,再用生理盐水倍比稀释。

测定法:用微量进样器分别吸取尿激酶标准品溶液及经处理的不同浓度的样品液各 10 μL ,滴在打孔后的同一平板加盖,并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 18 h,取出后用千分尺测量溶圈垂直两径,以两直径乘积为纵坐标(Y),尿激酶标准品单位数(X)为横坐标,绘制标准曲线,并用回归的方法计算样品效价单位数。

2.6 统计学处理 所得数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 13.0 软件进行统计处理,计量资料用 t 检验,以 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 鲜地龙与干地龙提取的蛋白性状及提取率 经观察与分析,鲜地龙提取的蛋白颜色为红褐色粉末,提取率为 $(13.89 \pm 0.86)\%$;干地龙蛋白的颜色为淡黄色粉末,提取率为 $(9.82 \pm 0.75)\%$ (均以干重计)。

3.2 蛋白含量测定 经分析,得到蛋白含量测定标准曲线 $Y = 0.07174X + 0.0249$ ($r = 0.9985$),表明蛋白质含量在 $0.096 \sim 0.96 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 呈良好线性关系。根据样品的吸光度值计算蛋白质含量,结果鲜地龙提取物中蛋白质含量为 $(63.14 \pm 0.38)\%$,干地龙提取物中蛋白质含量为 $(45.16 \pm 0.12)\%$ 。

表 2 地龙纤溶酶活性的平均溶酶圈直径测定 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

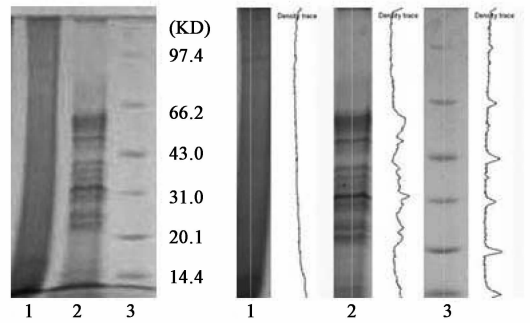
试样名称	溶圈直径/mm	溶圈直径/mm	直径乘积/ mm^2	酶活/ $\text{IU} \cdot \text{g}^{-1}$
鲜地龙	16.86 ± 0.58	16.51 ± 0.62	278.3586 ± 0.3596	8743 ± 17
干地龙	9.65 ± 0.76	9.72 ± 0.58	93.7980 ± 0.4408	206 ± 14

4 讨论

通过对鲜地龙与干地龙可溶性蛋白的对比研究,结果发现不仅鲜地龙的可溶性蛋白含量及纤溶酶活性明显高于干地龙,而且鲜地龙的蛋白组分明显多于干地龙。

在中药制剂生产及临床应用中,地龙常以干燥体的形式入药。由于地龙鲜品腥味太重,故入药一般需经炮制,药典中地龙的炮制方法为晒干或低温干燥,其他方法还包括药制、醋制、熬制、酒制、油制、蛤粉炒制、盐制等法^[13],这些炮制方法不论炮制的温度高低,都可能使地龙的蛋白质组分遭到不同程度地破坏,从而使其纤溶酶活性也有不同程度地降低。

蚓激酶是鲜地龙中含有的一种具有溶栓药效的纤维蛋白水解酶,对温度极其敏感,高温会受到破



1. 干地龙蛋白; 2. 鲜地龙蛋白; 3. 标准蛋白

图 1 地龙可溶性蛋白 SDS-PAGE 及蛋白密度分布图

3.3 SDS-PAGE 结果分析 地龙可溶性蛋白的电泳图谱及各条带密度分布如图 1 所示。

经 Quantity one 软件分析,鲜地龙与干地龙的蛋白组成差异显著,鲜地龙可溶性蛋白图谱中(2)有 12 条带,相对分子量从 14.866 ~ 60.784 kD,而干地龙可溶性蛋白图谱中(1)的条带明显少于鲜地龙,且蛋白谱带不清晰,通过与标准蛋白图谱(3)的密度分布图相比,也可以看出鲜地龙蛋白密度分布明显高于干地龙。

3.4 纤溶酶活性测定 表 2 为地龙纤溶酶活性的测定结果,经分析得到尿激酶标准曲线为 $Y = 1.6751X + 90.887$ ($r = 0.9965$),表明尿激酶在 $20 \sim 100 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 呈良好线性关系。根据标准曲线及样品的溶酶圈直径,计算出鲜地龙提取物酶活为 $(8743 \pm 17) \text{ IU} \cdot \text{g}^{-1}$,干地龙提取物的酶活为 $(206 \pm 14) \text{ IU} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

坏,且地龙自身蛋白也在加工过程中受其他蛋白酶的作用而发生降解,导致地龙炮制品的纤溶酶活性降低^[14],蛋白组分也明显减少。因此,在临床上应用地龙治疗血栓性疾病时可以选择鲜品或采用不需高温处理的方法对地龙进行炮制后再使用。

[参考文献]

- [1] 木海鸥,苏孝共. 地龙的药理研究概要[J]. 中国药业,2007,16(1): 61.
- [2] 吴畏,阳崇德,刘才平. 地龙药理作用的研究新进展[J]. 中药药理与临床,2002,18(2): 48.
- [3] Xie J B, He W G, Weng N, et al. Extraction and isolation of the anti-tumor protein components from earthworm (eisenia fetida Andrei) and the anti-tumor activity[J]. Chin J Bio Mol Biol, 2003, 19(3): 359.

陈皮膳食纤维对亚硝酸盐的吸附作用

王志宏¹, 薛建斌², 平晓丽², 张桂荣^{2*}

(1. 长春中医药大学基础医学院, 长春 130117; 2. 吉林大学生命科学学院, 长春 130012)

[摘要] 目的: 观察比较中药陈皮和陈皮纤维对亚硝酸盐的吸附作用。方法: 采用比色法、红外光谱法检测酸性环境下陈皮和陈皮纤维对亚硝酸盐的吸附作用。结果: 5 min 后吸附速率陈皮和陈皮纤维分别为 8.64, 18.6 mg·min⁻¹。3 h 后吸附程度陈皮和陈皮纤维分别为 71.9%, 94.8%。结论: 陈皮纤维对亚硝酸盐的吸附效果很好, 有效的降低了亚硝酸中毒的风险, 可以对亚硝酸盐早期中毒患者起到解毒作用, 减少亚硝酸对组织的损害。

[关键词] 陈皮; 膳食纤维; 亚硝酸盐; 吸附

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)08-0092-04

Research on the Absorption of Pericarpium Citri Reticulatae Dietary Fiber on Nitrite

WANG Zhi-hong¹, XUE Jian-bin², PING Xiao-li², ZHANG Gui-rong^{2*}

(1. Basic Medical College, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China;
2. Life Science College, Jilin University, Changchun 130012, China)

[Abstract] **Objective:** To observe and compare the absorption effects of Pericarpium Citri Reticulatae and its fibers on nitrite. **Method:** Colorimetry and infrared spectroscopy are adopted to detect the absorption effects of Pericarpium Citri Reticulatae and its fibers on nitrite under the acid environment. **Result:** In five minutes, the absorption rate of Pericarpium Citri Reticulatae and its fibers are, respectively, 8.64 and 18.6 mg·min⁻¹. In

[收稿日期] 20111031(012)

[基金项目] 自然科学基金项目(30870251, 31070309); 教育部 985 平台

[第一作者] 王志宏, 副教授, 从事中医药及生化药物方面的研究, Tel: 13614309657, E-mail: wzh1965@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 张桂荣, 教授, 博士, 从事分子生物学及生物化学方面的研究, Tel: 13504429313, E-mail: zgr@jlu.edu.cn

- [4] 陈随清, 崔瑛, 靖慧军, 等. 地龙抑菌作用初步观察 [J]. 中药材, 2003, 26(5): 354.
- [5] 张大禄, 陈百泉. 地龙的纤溶、抗凝、溶栓和血流变作用研究 [J]. 中药材, 2003, 26(6): 448.
- [6] ZHAO R, JI J G, TONG Y P, et al. Isolation and identification of proteins with anti-tumor and fibrinolysin kinase activities from *Eisenia foetida* [J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2002; 34(5): 576.
- [7] 房泽海, 冯怡, 徐德生. 鲜地龙平喘活性蛋白提取工艺研究 [J]. 中成药, 2007, 29(8): 1143.
- [8] 中国药典. 一部 [S]. 2010: 附录 52.
- [9] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72(1): 248.
- [10] 李晓琳, 邵爱娟, 陈敏, 等. 酸浆种子蛋白提取方法的比较研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(1): 14.
- [11] Fu Y J, Chen L Y, Zu Y G, et al. The antibacterial activity of clove essential oil against *Propionibacterium acnes* and its mechanism of action [J]. Arch Dermatol, 2009, 145(1): 86.
- [12] 刘向辉, 戈峰. 蚯蚓纤溶酶活性影响因子的研究 [J]. 中国中药杂志, 2002, 27(6): 423.
- [13] 张文斌, 校合香. 地龙不同炮制品中琥珀酸含量的比较 [J]. 中国药事, 2001, 15(3): 216.
- [14] 王厚伟. 斑点免疫印迹法快速测定地龙炮制品中蚓激酶及其水解产物 [J]. 中草药, 2008, 39(11): 1652.

[责任编辑 蔡仲德]