

- [10] 曹青云, 李琦, 王敏, 等. 鲁斯可皂苷元制备方法研究[J]. 中国药业, 2017, 26(4): 6-8.
- [11] Rashid S N, Hizaddin H F, Hayyan A, et al. A kinetic study of *ex-situ* soil remediation by nickel extraction using natural deep eutectic solvent[J]. *Environ Technol*, 2024, 45 (23): 4820-4833.
- [12] 贺欣宇, 赵晋彤, 吕思琪. 积雪草多酚的提取工艺优化及抗氧化活性评价[J]. 化学工程师, 2025, 39(3): 87-91.
- [13] 任静, 刘旭泽, 詹云妮, 等. 醇辅助酸性低共熔溶剂预处理促进纤维素酶水解[J]. 林业工程学报, 2024, 9(6): 86-92.
- [14] 肖钱, 孙宇昊, 李佳杰, 等. 酸性低共熔溶剂分离制备粗纤维素及理化性质分析[J]. 林产工业, 2023, 60(2): 9-15.
- [15] 张春霞. 鲁斯可皂苷元的制备工艺[D]. 成都: 成都理工大学, 2016.
- [16] 程婉婷, 陈世钰, 贤凤, 等. 酸性低共熔溶剂的理化特性及其与虾青素溶解度的相关性研究[J]. 化学试剂, 2023, 45(2): 106-113.
- [17] 朱琳. 酸性低共熔溶剂特性及其水解芦丁制备槲皮素的应用[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2022.
- [18] Ruan Q, Wang C J, Zhang Y F, et al. Ruscogenin attenuates cartilage destruction in osteoarthritis through suppressing chondrocyte ferroptosis via Nrf2/SLC7A11/GPX4 signaling pathway[J]. *Chem Biol Interact*, 2024, 388: 110835.
- [19] 马海波. 麦冬化学成分的研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2013.
- [20] Watanabe Y, Sanada S, Ida Y, et al. Comparative studies on the constituents of ophiopogonis tuber and its congeners. I. Studies of the constituents of the subterranean part of *Liriope platyphylla* Wang et Tang. [J]. *Chem Pharm Bull*, 1983, 31(6): 1980-1990.

僵蚕醇溶蛋白质制备血管紧张素转换酶抑制肽工艺优化

喻勇飞¹, 王巧宇¹, 张云晓¹, 冯硕¹, 夏振欣宇¹, 闻崇炜^{1*}, 汤建^{2*}

(1. 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013; 2. 亳州学院中药学院, 安徽 亳州 236800)

摘要: 目的 优化僵蚕醇溶蛋白质制备血管紧张素转换酶(ACE)抑制肽工艺。方法 以菠萝蛋白酶为工具酶, 在单因素试验基础上, 以酶解时间、酶解pH、酶解温度、酶底比为影响因素, 酶解产物ACE抑制率为评价指标, Box-Behnken响应面法优化制备工艺, 并对酶解产物进行SDS-PAGE分析、分子量分布检测及IC₅₀测定。结果 最优条件为酶底比6.1%, 酶解温度50.0℃, 酶解时间72.0 min, 酶解pH6.34, 酶解产物ACE抑制率为80.43%, IC₅₀为0.3 mg/mL。在酶解产物中, 76.45%肽段的分子量低于500 Da。结论 该方法稳定可靠, 可用于制备高活性ACE抑制肽, 为僵蚕治疗高血压、高血脂的药效物质基础研究提供依据, 也为其他动物类药材蛋白质的开发利用提供思路。

关键词: 僵蚕; 醇溶蛋白质; 血管紧张素转换酶(ACE)抑制肽; 制备工艺; Box-Behnken响应面法

中图分类号: R284.3

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2025)12-4140-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2025.12.040

僵蚕具有息风止痉、祛风止痛、化痰散结等功效, 临常用于治疗肝风夹痰、惊痫抽搐、小儿急惊等症状^[1]。周仲瑛、朱良春等名老中医的临床实践表明, 僵蚕可治疗高血压高血脂或所致头胀痛剧烈、视物模糊、目赤抽搐、呕吐烦躁、神志不清^[2-3], 但由于其现有化学成分研究存在局限性, 治疗高血压的有效物质尚未被揭示^[4-5]。

血管紧张素转化酶(ACE)可促血管紧张素Ⅱ生成, 并使缓激肽失活, 导致血压升高, 故抑制其活性可有效防

治高血压及相关疾病^[6-7]。研究表明, 酸性蛋白酶、风味蛋白酶、碱性蛋白酶等可水解中华鳖、仿刺参、玉米胚芽、南极磷虾、核桃粕、桑叶、牡丹籽、酸枣仁等来源蛋白质, 释放ACE抑制肽, 为开发安全有效、低副作用的相关抑制剂提供了重要思路^[8-16]。由于僵蚕可溶性蛋白质是否含有ACE抑制肽尚无研究, 本实验探讨以菠萝蛋白酶水解僵蚕醇溶蛋白质制备ACE抑制肽的可行性, 并优化其制备工艺, 以期为其他动物类药材蛋白质的开发利用提供思路。

收稿日期: 2025-06-04

基金项目: 江苏省镇江市重点研发计划(社会发展)项目(SH2024096, SH2021010); 安徽省高等学校自然科学研究项目(2022AH052416); 江苏大学第二十二批大学生科研项目(Y22A732, Y22A425)

作者简介: 喻勇飞(1998—), 男, 硕士研究生, 从事分子生药学研究。E-mail: 18012170207@163.com

*通信作者: 闻崇炜(1971—), 男, 博士, 副教授, 从事分子生药学研究。E-mail: wenchw@ujs.edu.cn

汤建(1977—), 男, 博士, 教授, 从事中药鉴定及中药化学成分活性筛选研究。E-mail: 763051336@qq.com

1 材料

1.1 仪器 Pico 17 型微量离心机 (美国 Thermo 公司); 凝胶成像系统 (上海勤翔科学仪器有限公司); SHZ-82 型气浴恒温振荡箱 (江苏中大仪器科技有限公司); VE-180 型垂直电泳槽 (上海天能科技有限公司); Flex-200 型酶联免疫分析仪 (杭州盛奥仪器有限公司); Agilent 1200 型高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); UV-2550 型紫外分光光度计 (日本 Shimadzu 公司)。

1.2 药材 僵蚕药材购自亳州中药材市场, 经亳州学院中药学院汤建教授鉴定为蚕蛾科昆虫家蚕 *Bombyx mori* Linnaeus 4~5 龄的幼虫感染 (或人工接种) 白僵菌 *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillant 而致死的干燥体。

1.3 试剂 菠萝蛋白酶 (批号 RH11Y49G, 300 U/mg)、马尿酸 (批号 EC03BA0043)、牛血清白蛋白 (批号 K429DB0003) 均购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; BeyoColor 彩色预染蛋白 (批号 11100254) 购自上海碧云天生物技术有限公司; 马尿酰-组胺酰-亮氨酸 (批号 H6240119ES) 购自德国 Sigma-Aldrich 公司; 乙醇 (批号 20240418)、硫酸铵 (批号 20230521)、氯化钠 (批号 2017021401)、丙酮 (批号 20240102)、乙酸乙酯 (批号 20230721)、Triton X-100 (批号 T20231017)、硼酸 (批号 20221018)、乙腈 (批号 20230615)、甲酸 (批号 20220128)、盐酸 (批号 20230905) 均购自国药集团有限公司; 其他试剂均为分析纯; 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 ACE 抑制肽制备 药材打粉过 70 目筛后, 与丙酮按 1:4 比例混合, 振摇 3 h, 抽滤, 滤饼挥干丙酮, 再按料液比 1:4 加入 80% 乙醇, 振摇 3 h, 抽滤, 滤饼在 50 °C 下挥干, 最后按料液比 1:4 加入 40% 乙醇, 振摇 3 h 后抽滤, 得醇溶蛋白质样品。以牛血清白蛋白为标准品, Lowry 法测定样品浓度, 稀释至 1 mg/mL, 加适量菠萝蛋白酶水解, 沸水浴 10 min, 7 900 r/min 离心 20 min, 取上清, 即得。

2.2 ACE 提取 按吴琼英等^[17] 报道的方法提取 ACE, 新鲜猪肺剪碎后按 1:2 比例加入组织缓冲液 (含 0.9% NaCl 的 0.5% Triton X-100 溶液), 冰浴匀浆后静置 5 h, 4 °C、7 900 r/min 离心 15 min, 取上清, 得粗酶液, 将以 36% 粗酶液与 64% 饱和度硫酸铵进行分部盐析, 所得沉淀用 Sephadex G-50 柱脱盐, 收集酶活力较强的部分, 冷冻干燥。

2.3 ACE 抑制率测定 按 Ko 等^[18] 报道的方法, 基础缓冲液 (含 0.3 mol/L NaCl 的 0.1 mol/L 硼酸缓冲液) 稀释 ACE 抑制肽样品及 ACE, 取酶解样品、ACE 各 30 μL, 在 37 °C 下保温 5 min, 加入 10 μL 反应底物 (含 5 mmol/L HHL 的基础缓冲液), 在 37 °C 下反应 30 min, 加入 130 μL 1 mol/L HCl 中止反应, 再加入 800 μL 乙酸乙酯, 充分涡旋混匀, 7 900 r/min 离心 10 min, 吸取 800 μL 上清, 高温挥干乙酸乙酯, 冷却, 加入 80 μL ddH₂O 充分混匀, 溶解完全后采用 HPLC 检测马尿酸含量。

2.4 色谱条件 参考吴琼英等^[19] 报道的方法, WondaSil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相水 (含 0.1% 甲酸) (A) - 乙腈 (含 0.1% 甲酸) (B), 梯度洗脱 (0~10 min, 10% B; 10~50 min, 10%~42% B); 体积流量 0.5 mL/min; 柱温 30 °C; 检测波长 228 nm; 进样量 20 μL。以马尿酸为对照, 计算 ACE 抑制率, 公式为 ACE 抑制率 = $\frac{A_a - A_b}{A_a} \times 100\%$, 其中 A_a 为空白组马尿酸峰面积, A_b 为样品组马尿酸峰面积。

2.5 单因素试验

2.5.1 酶底比 固定酶解 pH 6.5, 酶解温度 50 °C, 酶解时间 80 min, 考察不同酶底比 (1%、3%、5%、7%、9%) 的影响, 结果见图 1A。由此可知, 醇溶蛋白质酶解程度及酶解产物 ACE 抑制率随酶底比增加而升高, 为 5% 时抑制率达到最大值 (71.43%); 但进一步增加酶底比时醇溶蛋白质发生过度酶解, 酶解产物 ACE 抑制能力反而降低, 故选择 5%。

2.5.2 酶解温度 固定酶解 pH 6.5, 酶底比 5%, 酶解时间 80 min, 考察不同酶解温度 (40、45、50、55、60 °C) 的影响, 结果见图 1B。由此可知, 菠萝蛋白酶活性随酶解温度增加而升高, 醇溶蛋白质酶解程度及酶解产物 ACE 抑制能力也随之加强, 为 50 °C 时抑制率达到最大值 (77.87%); 但进一步增加酶解温度时菠萝蛋白酶因热变性而失活, 导致醇溶蛋白质酶解产物的 ACE 抑制能力反而降低, 故选择 50 °C。

2.5.3 酶解时间 更低酶解 pH 6.5, 酶解温度 50 °C, 酶底比 5%, 考察不同酶解时间 (20、40、60、80、100、120、240、360、480 min) 的影响, 结果见图 1C。由此可知, 醇溶蛋白质酶解程度及酶解产物 ACE 抑制能力随着酶解时间延长而升高, 为 80 min 时抑制率达到最大值 (75.72%); 但进一步延长酶解时间时 ACE 抑制肽被降解, 导致其 ACE 抑制率反而降低, 故选择 80 min。

2.5.4 酶解 pH 值 设置酶底比 5%, 酶解温度 50 °C, 酶解时间 80 min, 考察不同酶解 pH (5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5) 的影响, 结果见图 1D。由此可知, 菠萝蛋白酶活性随着酶解 pH 增加而升高, 醇溶蛋白质酶解程度及酶解产物 ACE 抑制能力也加强, 为 6.5 时抑制率达到最大值 (82.83%); 但进一步增加酶解 pH 时菠萝蛋白酶活性减弱, 导致其 ACE 抑制率反而降低, 故选择 6.5。

2.6 Box-Behnken 响应面法 在单因素试验基础上, 分别选择酶底比 (A)、酶解温度 (B)、酶解时间 (C)、酶解 pH (D) 为影响因素, ACE 抑制率 (Y) 为评价指标, 设计四因素三水平试验, 中心点重复 3 次, 共运行试验 29 次, 因素水平见表 1, 结果见表 2。

通过 Design-Expert 8.0.6 软件对表 2 数据进行拟合, 得方程为 $Y = 79.36 + 4.03A - 2.03B - 0.83C - 0.81D + 0.050AB - 2.75AC + 1.60AD - 1.15BC - 0.95BD + 1.13CD - 4.20A^2 - 8.75B^2 - 3.29C^2 - 0.49D^2$, 方差分析见表 3。由此可知, 因

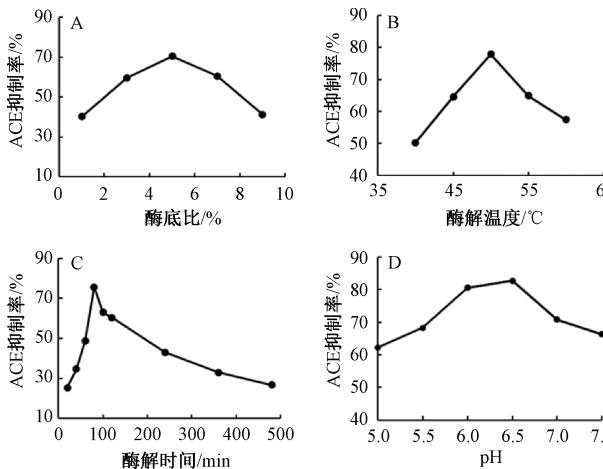


图1 单因素试验结果

表1 Box-Behnken响应面法因素水平

因素	水平		
	-1	0	1
A 酶底比/%	3	5	7
B 酶解温度/°C	45	50	55
C 酶解时间/min	60	80	100
D 酶解 pH	6	6.5	7

表2 Box-Behnken响应面法设计与结果

试验号	A 酶底比/%	B 酶解温度/°C	C 酶解时间/min	D 酶解 pH	Y ACE 抑制率/%
	-1	-1	0	0	64.30
1	-1	-1	0	0	64.30
2	1	-1	0	0	72.90
3	0	-1	0	1	72.30
4	0	0	-1	1	75.00
5	1	0	1	0	72.10
6	0	0	1	1	73.90
7	-1	0	-1	0	66.10
8	0	0	0	0	82.60
9	0	0	0	0	78.80
10	0	0	1	-1	75.30
11	1	0	0	-1	78.10
12	1	0	-1	0	79.00
13	1	1	0	0	70.00
14	0	-1	-1	0	70.00
15	-1	1	0	0	61.20
16	0	1	-1	0	63.50
17	0	0	0	0	80.20
18	-1	0	0	-1	73.20
19	0	1	0	-1	69.80
20	0	0	0	0	78.20
21	0	-1	1	0	72.10
22	0	0	0	0	77.00
23	0	-1	0	-1	68.30
24	0	1	1	0	61.00
25	-1	0	0	1	66.70
26	1	0	0	1	78.00
27	0	1	0	1	70.00
28	-1	0	1	0	70.20
29	0	0	-1	-1	80.90

素 A、 A^2 、 B^2 、 C^2 有极显著影响 ($P<0.01$)，B、AC 有显著影响 ($P<0.05$)，其他因素无显著影响 ($P>0.05$)。

表3 方差分析结果

来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	887.32	14.00	63.38	9.91	<0.0001
A	195.21	1.00	195.21	30.52	<0.0001
B	49.61	1.00	49.61	7.76	0.0146
C	8.17	1.00	8.17	1.28	0.2774
D	7.84	1.00	7.84	1.23	0.2868
AB	0.01	1.00	0.01	0	0.9690
AC	30.25	1.00	30.25	4.73	0.0473
AD	10.24	1.00	10.24	1.60	0.2264
BC	5.29	1.00	5.29	0.83	0.3785
BD	3.61	1.00	3.61	0.56	0.4649
CD	5.06	1.00	5.06	0.79	0.3886
A^2	114.47	1.00	114.47	17.90	0.0008
B^2	496.72	1.00	496.72	77.67	<0.0001
C^2	70.14	1.00	70.14	10.97	0.0051
D^2	1.55	1.00	1.55	0.24	0.6305
残差	89.53	14.00	6.40	—	—
失拟项	71.10	10.00	7.11	1.54	0.3591
误差	18.43	4.00	4.61	—	—
总和	976.85	28.00	—	—	—

注: $R^2=0.9083$, $R_{adj}^2=0.8167$ 。

响应面分析见图2, 得最优工艺为酶底比 6.1%, 酶解温度 49.64 °C, 酶解时间 72.06 min, 酶解 pH 6.34, ACE 抑制率为 80.8316%, 结合实际情况, 将其修正为酶底比 6.1%, 酶解温度 50.0 °C, 酶解时间 72.0 min, 酶解 pH 6.34。

按上述优化工艺进行3批验证试验, 测得ACE平均抑制率为80.43%, 与预测值80.8316%接近(相对误差在±1%以内), 表明该工艺准确可靠, 具有实际指导意义。

2.7 Tricine-SDS-PAGE分析 取醇溶蛋白质酶解前后样品适量, 三氯乙酸及丙酮沉淀后加入适量裂解液与上样缓冲液, 沸水浴10 min, 得电泳样品, 按常规方案进行Tricine-SDS-PAGE电泳^[20], 电泳结束后剥取凝胶, 染色脱色后用凝胶成像仪采集凝胶图像并以Quantity One软件进行分析, 根据各条带的灰度值计算各蛋白质含量, 结果见图3。由此可知, 菠萝蛋白酶在优化酶解条件下水解了82.6%醇溶蛋白质。

2.8 分子量分布测定 酶解样品经0.2 μm聚四氟乙烯膜过滤, 通过高效凝胶过滤色谱法测定其分子量分布, 分析采用TSKgel G2000 SWXL色谱柱(75 mm×300 mm, 8 μm); 流动相乙腈-水(含0.1%三氟乙酸)(45:55); 体积流量0.5 mL/min; 柱温30 °C; 检测波长220 nm; 进样量20 μL。以细胞色素C(MW12400)、杆菌酶(MW1450)、乙氨酸-乙氨酸-酪氨酸-精氨酸(MW451)、乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸(MW189)为分子量标准品, 根据不同洗脱时间计算各组分分子量, 根据峰面积计算各组分相对含量, 结果见图4。由此可知, 酶解样品中有76.45%肽段分子量低于500 Da, 16.89%肽段分子量为500~2 000 Da, 4.69%肽段

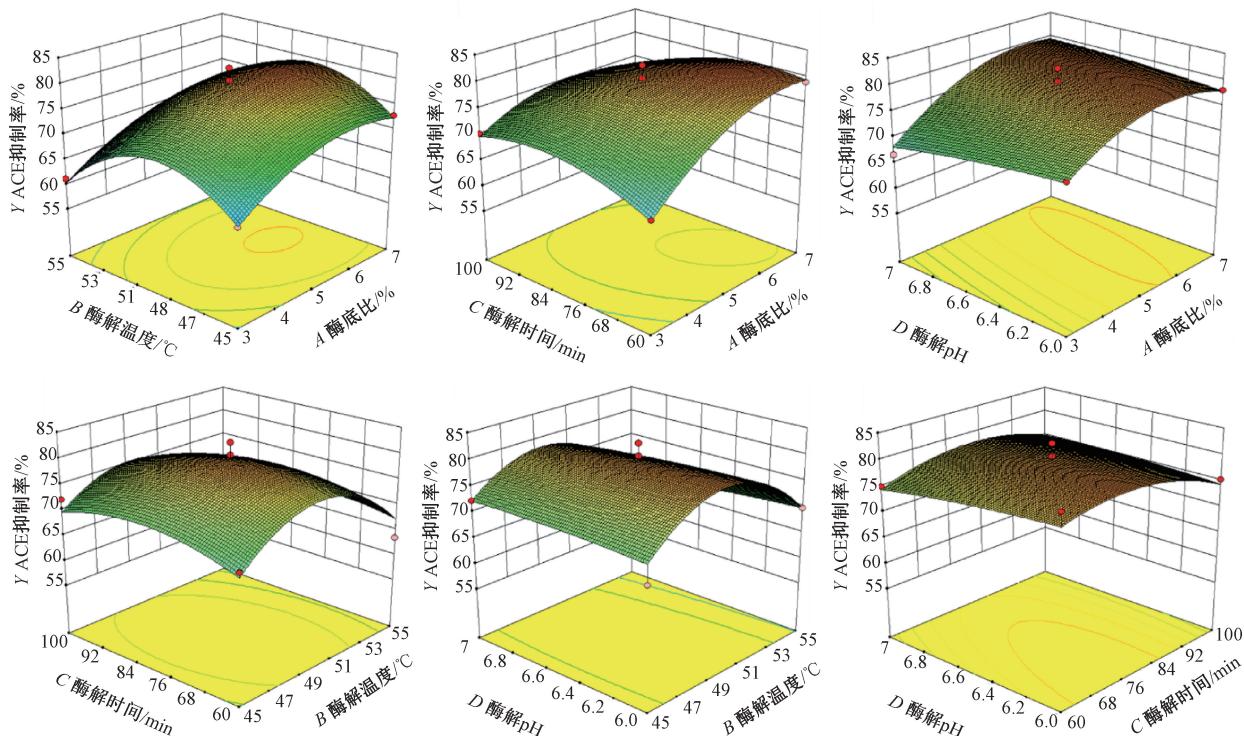
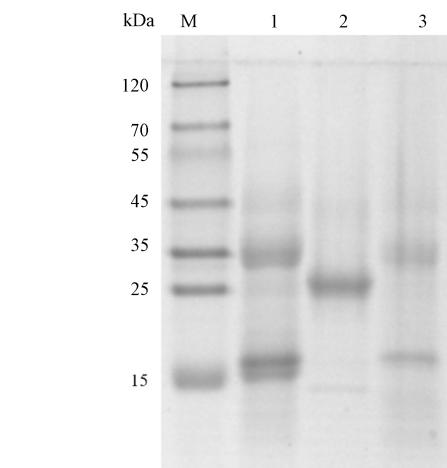


图2 各因素响应面图



注: M 为蛋白质标准分子量, 1 为酶解前僵蚕醇溶蛋白, 2 为菠萝蛋白酶, 3 为酶解后僵蚕醇溶蛋白。

图3 僵蚕醇溶蛋白质酶解前后 SDS-PAGE 图

分子量为 2 000~5 000 Da, 还有 1.97% 肽段分子量大于 5 000 Da, 故酶解产物主要为 2~4 个氨基酸残基构成的寡肽, 能轻松穿过小肠黏膜, 故易于被机体吸收利用, 具有较高的生物活性潜能。

2.9 IC₅₀ 测定 制备质量浓度分别为 0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8 mg/mL 的 ACE 抑制肽样品, 按“2.3”项下方法测定其抑制率, 计算其 IC₅₀ 为 0.3 mg/mL。

3 讨论

动物药是我国传统医药的重要组成部分, 其特有功效在中药临床应用中具有不可替代性。但因动物药富含大分子类蛋白质成分, 鲜有小分子类次生代谢成分, 导致相关

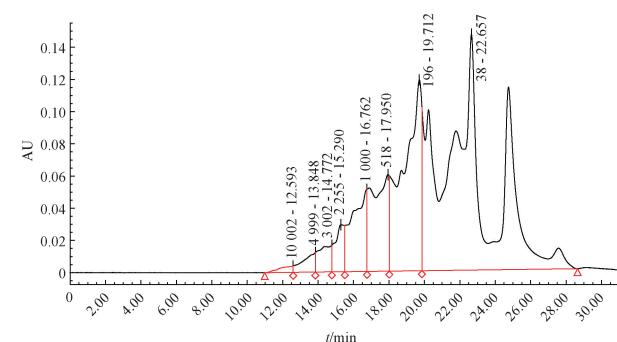


图4 僵蚕醇溶蛋白质酶解产物分子量分布色谱图

研究存在药效物质基础不明、资源开发不充分等关键问题。研究表明, 食源性蛋白质可通过酶释放出所含的活性肽段, 在炎症反应、糖脂代谢、抗菌消炎、缓解疲劳等方面发挥积极作用, 相关实验结果为动物药源性蛋白质研究提供了新思路。

酶解法为当前制备生物活性肽段的主流方法, 具有条件温和、反应特异、产物可控、安全性高等优点, 但由于酶解反应为动态过程, 水解不足可能导致大分子蛋白残留, 水解过度则可能影响酶解产物活性, 因此控制水解度具有重要意义。前期通过响应面法、正交试验等手段确定酶浓度、温度、pH 值、时间等参数的最佳组合是实现水解度精细化调控的核心策略。本实验建立菠萝蛋白酶酶解僵蚕醇溶蛋白质的优化工艺并测定酶解产物活性, 发现僵蚕蛋白质中含有具 ACE 抑制活性的肽段, 为其临床治疗高血压、高血脂的药效物质基础研究提供参考, 也为开发结构新颖的降血压药物及相关资源的高值化利用提供研究思路。

参考文献:

- [1] 国家药典委员. 中华人民共和国药典: 2020年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [2] 施建勇. 周仲瑛治疗高血压高脂血症经验介绍[J]. 中医杂志, 1989(6): 13-14.
- [3] 杨铭, 付海强. 朱良春教授妙用僵蚕经验[J]. 中医研究, 2014, 27(7): 46-48.
- [4] 徐冲, 商思阳, 刘梅, 等. 僵蚕化学成分和药理活性的研究进展[J]. 中国药房, 2014, 25(39): 3732-3734.
- [5] 李晶峰, 孙佳明, 张辉. 僵蚕的化学成分及药理活性研究[J]. 吉林中医药, 2015, 35(2): 175-177.
- [6] 吴楠, 双全, 许伟瀚. ACE抑制肽的制备及其结构对活性的影响[J]. 中国酿造, 2016, 35(11): 54-58.
- [7] 林凯, 韩雪, 张兰威, 等. ACE抑制肽构效关系及其酶法制备的研究进展[J]. 食品科学, 2017, 38(3): 261-270.
- [8] 孙雪芹, 廖彭莹, 刘华宇, 等. 中华鳖肉水溶蛋白酶解工艺优化[J]. 食品科技, 2022, 47(11): 121-128.
- [9] 王扬铎, 苏永昌, 王晓燕, 等. 仿刺参不同部位ACE抑制活性分析及活性肽制备工艺优化[J]. 食品工业科技, 2024, 45(10): 187-197.
- [10] 宋凯强, 刘鹏莉, 郑振佳, 等. 大蒜降压肽的制备及超滤分离[J]. 食品工业科技, 2019, 40(19): 73-80.
- [11] 高泽汝, 宁梦茹, 刘昆仑, 等. 酶法制备玉米胚芽ACE抑制肽的研究[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2020, 41(5): 44-49.
- [12] 谭力铭, 曹妍, 裴海生, 等. 酸枣仁ACE抑制肽酶解工艺优化[J]. 食品工业科技, 2022, 43(2): 182-194.
- [13] 李爽, 刘小芳, 李福后, 等. 南极磷虾ACE抑制肽的酶解制备工艺优化及其稳定性研究[J]. 食品工业科技, 2023, 44(21): 243-250.
- [14] 陈秋銮, 陈雪芹, 马倩, 等. 酶解法制备牡丹籽ACE抑制肽及其稳定性[J]. 食品工业科技, 2020, 41(19): 149-156.
- [15] 卢蔼纯, 苏嘉毅, 杨迅, 等. 富硒核桃粕蛋白降血压肽的酶解制备及硒含量分析[J]. 现代食品科技, 2023, 39(2): 161-169.
- [16] 贾漫丽, 范伟, 李娜, 等. 桑叶蛋白血管紧张素转换酶抑制肽的酶解制备[J]. 蚕业科学, 2021, 47(4): 351-357.
- [17] 吴琼英, 马海乐, 崔恒林, 等. 猪肺血管紧张素转化酶的提取纯化及其性质研究[J]. 食品科学, 2004, 25(9): 71-74.
- [18] Ko J Y, Kang N, Lee J H, et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from an enzymatic hydrolysate of flounder fish (*Paralichthys olivaceus*) muscle as a potent anti-hypertensive agent[J]. *Process Biochem*, 2016, 51(4): 535-541.
- [19] 吴琼英, 马海乐, 骆琳, 等. 高效液相色谱法测定血管紧张素转化酶抑制剂的活性[J]. 色谱, 2005, 23(1): 79-81.
- [20] 刘莹, 王巧宇, 朱锐灵, 等. 僵蚕药材蛋白质电泳指纹图谱条件及特征分子鉴定研究[J]. 中药材, 2021, 44(11): 2554-2558.