

道。关于 I 型胶原抑制脂肪细胞分化的具体机制及其影响因素尚需深入研究。

本研究首次发现 I 型胶原抑制脂肪细胞分化进程, 其机制可能与降低脂肪细胞分化转录因子 PPAR γ 和 C/EBP α 的表达有关, 是否存在其他机制共同作用, 目前尚不明确, 进一步深入探讨将为肥胖症的发病机制提供新的理论依据, 并可能成为肥胖症治疗的新的药物靶点。

参考文献

- 1 Maquoi E, Munaut C, Colige A, *et al.* Modulation of adipose tissue expression of murine matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors with obesity[J]. *Diabetes*, 2002, 51(4): 1093 – 1101
- 2 Feldman BJ, Streeper RS, Farese RV, *et al.* Myostatin modulates adipogenesis to generate adipocytes with favorable metabolic effects [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(42): 15675 – 15680
- 3 Aratani Y, Kitagawa Y. Enhanced synthesis and secretion of type IV collagen and entactin during adipose conversion of 3T3 – L1 cells and production of unorthodox laminin complex[J]. *J Biol Chem*, 1998, 263(31): 16163 – 16169
- 4 Nakajima I, Yamaguchi T, Ozutsumi K. Adipose tissue extracellular

matrix; newly organized by adipocytes during differentiation[J]. *Differentiation*, 1998, 63(4): 193 – 200

- 5 Huang G, Greenspan DS. ECM roles in the function of metabolic tissues[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2012, 23(1): 16 – 22
- 6 Spiegelman BM, Ginty CA. Fibronectin modulation of cell shape and lipogenic gene expression in 3T3 – adipocytes[J]. *Cell*, 1983, 35(3 Pt2): 657 – 666
- 7 Han J, Luo T, Gu Y, *et al.* Cathepsin K regulates adipocyte differentiation: possible involvement of type I collagen degradation [J]. *Endocr J*, 2009, 56(1): 55 – 63
- 8 Ricard – Blum S. The collagen family. *Cold Spring Harb. Perspect Biol*, 2011, 3(1): a004978
- 9 Chun TH. A pericellular collagenase directs the 3 – dimensional development of white adipose tissue[J]. *Cell*, 2006, 125(3): 577 – 591
- 10 Farmer SR. Transcriptional control of adipocyte formation[J]. *Cell Metab*, 2006, 4(4): 263 – 273
- 11 Rosen ED. PPAR γ is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro[J]. *Mol, Cell*, 1999, 4(4): 611 – 617

(收稿日期: 2013 – 03 – 11)

(修回日期: 2013 – 04 – 01)

紫外 – 可见分光光度法测定巴豆中可溶性蛋白的含量

古炳明 曾 宝 熊艺花 易智彪 蔡海群 肖祖平 袁 捷

摘 要 **目的** 建立巴豆中可溶性蛋白含量的测定方法, 为其质量评价提供理论依据。**方法** 采用紫外 – 可见分光光度 (UV – VIS) 法, 检测波长为 593nm。**结果** 巴豆中可溶性蛋白在 0.0103 ~ 0.1030mg/ml 范围内线性关系良好 ($Y = 8.0871X + 0.1775$, $r = 0.9991$, $n = 6$), 平均回收率为 98.37%, RSD 为 1.01%。**结论** 本方法简单、方便、专属性强, 可为巴豆药材的质量控制提供参考。

关键词 巴豆 紫外 – 可见分光光度法 可溶性蛋白

Soluble Protein Content in Croton Tiglium L with Ultraviolet – Visible Spectrophotometry. Gu Bingming, Zeng Bao, Xiong Yihua, Yi Zhibiao, Cai Haiqun, Xiao Zuping, Yuan Jie. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangdong 510006, China

Abstract Objective Ultraviolet – Visible Spectrophotometry was established to determine the Soluble protein content in Croton tiglium L. **Methods** Reference standard method ($\lambda = 593\text{nm}$) was used to determine the content of Soluble protein in Croton tiglium L. **Results** The test of Soluble protein in croton tiglium L. was linear within the range of 0.0103 – 0.1030mg/ml ($Y = 8.0871X + 0.1775$, $r = 0.9991$, $n = 6$). The average recovery was 98.37%, RSD = 1.01%. **Conclusion** The method was simple and accurate. It can provide reference for croton tiglium L. materials quality control.

Key words Croton tiglium L.; Ultraviolet – visible spectrophotometry; Soluble protein

巴豆为大戟科植物巴豆 (croton tiglium L.) 的干燥成熟种子, 味辛、性热、有大毒。内服泻下寒积、逐

基金项目: 国家科技部重大新药创制专项基金资助项目 (2009ZX09103 – 388); 广东省科技计划基金资助项目 (2009A030100014)

作者单位: 510006 广州中医药大学 (古炳明、曾宝、熊艺花、易智彪、蔡海群、肖祖平、袁捷); 523808 东莞, 广州中医药大学中医药数理工程研究院 (熊艺花)

通讯作者: 袁捷, 研究员, 硕士生导师, 电子信箱: yuanjie16881688@vip.tom.com

水消肿、祛痰利咽、外用蚀疮,主治寒积便秘、乳食积滞、水肿腹胀、二便不通、喉风、喉痹、恶疮疥癣^[1]。文献报道称从巴豆中分离出巴豆毒蛋白质巴豆毒素 I、II (croton I、II)^[2]。

蛋白质是一类重要的高分子化合物,存在于所有的动植物中。近年来,随着基因工程学、分子生物学和现代分离技术的快速发展,蛋白质也成了一项中药质量和资源评价的指标。从中药蛋白质类成分中寻找新的药用活性物质是今后一个重要的发展方向,已有的研究表明植物蛋白具有多方面的生物活性。从蓖麻中分离得到的具有凝集素活性的毒蛋白,为最强烈天然毒素之一。蓖麻毒蛋白对所有哺乳动物真核细胞都有毒害作用,而对某些恶性肿瘤细胞毒性更强。这使它在医学上成为用于杀伤肿瘤细胞的首选毒素之一^[3]。巴豆毒蛋白和其他植物毒蛋白一样,也具有抑制真核细胞蛋白合成的作用,属于核糖体失活蛋白^[2]。然对巴豆可溶性蛋白的研究却鲜有报道,故本文建立紫外-可见分光光度法测定巴豆可溶性蛋白含量的方法,旨在为巴豆可溶性蛋白的进一步研究奠定基础,并为巴豆的合理应用提供一定的科学依据。

材料与方法

1. 仪器: TU-1810 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司), METTLER TOLEDO AB204-N 电子分析天平(十万分之一,塞多利斯科学仪器北京有限公司), IKA 新型 T25 数显高速匀浆机(IKA T25 digital ULTRA-TURRAX), L-530 多管架自动离心机。

2. 试验药品: 10 批巴豆药材分别来源于四川、广西、云南 3 个主产区,经广州中医药大学赖小平研究员鉴定为大戟科植物巴豆(croton tiglium L.)的干燥成熟果实。牛血清白蛋白(Sigma 公司,批号: 20110516),考马斯亮蓝 G-250(批号: 6104-58-1),95%乙醇、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、磷酸、氢氧化钠均为分析纯,水为自制超纯水。

3. 含量测定方法: 取牛血清白蛋白制成一定浓度梯度的标准品溶液,照 UV-VIS 法(中国药典 2010 版附录 IV A),全波长扫描后在最大吸收峰处测定吸光度并绘制标准曲线。另取供试品制成供试品溶液,同法测定,计算即得。

4. 供试品溶液的制备: 取不同产地共 10 批干燥巴豆种子,去壳后种仁粉碎,精密称取 1g,加入适量 PBS 缓冲液在转速为 8000r/min 高速匀浆提取 20min。(离心 15min、4000r/min),抽滤,定容备用。

5. 对照品溶液的制备: 精密称取牛血清白蛋白 103mg,溶于蒸馏水并定容至 100ml,配制成 1.03mg/ml 的牛血清白蛋白标准溶液。

6. 显色剂的制备: 精密称取考马斯亮蓝 G-250 100mg 用 95%乙醇 50ml 溶解,加入 85% H₃PO₄ 100ml 摇匀后,用蒸

馏水定容至 1000ml,常温避光保存。

7. 测定波长的选择: 精密吸取标准曲线项下供试品溶液与精密度考察项下对照品溶液各 1ml,分别加入重现性考察项下显色剂,涡旋均匀。于 400~800nm 处进行全波长扫描。

8. 标准曲线的绘制: 精密吸取精密度考察项下对照品溶液 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0ml 用蒸馏水定容至 100ml,使其浓度为 0.0103、0.0206、0.0412、0.0618、0.0824、0.1030mg/ml。分别取 1ml 加入 3ml 重现性考察项下显色剂,涡旋均匀。

结 果

1. 测定波长: 按显色稳定性考察方法于 400~800nm 处进行全波长扫描,对照品与供试品在 593nm 处均有最大吸收,选为测定波长,结果见图 1。

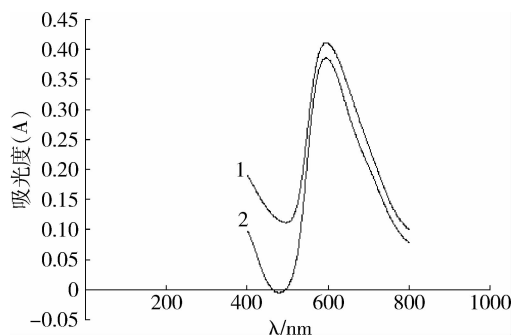


图 1 紫外-可见吸收图谱

1. 牛血清白蛋白溶液; 2. 供试品溶液

2. 标准曲线: 按测定波长的选择方法于 593nm 波长处测定吸光度。以对照品溶液浓度(C, μg/ml)为横坐标,吸光度(A)为纵坐标绘得标准曲线,得回归方程为 $Y = 8.0871X + 0.1775$ ($r = 0.9991$, $n = 6$)。结果表明,总蛋白浓度在 0.0103~0.1030mg/ml 范围内与吸光度呈良好的线性关系。

3. 精密度考察: 取对照品 1 份,按对照品溶液制备制备对照品溶液,按含量沉淀方法连续 6 次测定吸光度, $RSD = 1.8\%$,表明精密度良好。

4. 重现性考察: 称取供试品 6 份,按供试品溶液制备供试品溶液后,平行制备 6 份。按含量沉淀方法分别测定吸光度, $RSD = 2.1\%$,表明重现性良好。

5. 显色稳定性考察: 取供试品 1 份,按供试品溶液制备操作制备供试品溶液,按含量沉淀方法操作,每隔 15min 测定 1 次吸光度, $RSD = 2.9\%$,表明在 2h 内显色稳定性良好。

6. 加样回收试验: 精密称取批号为 20100420 的四川万县巴豆供试品 200mg,分别加入一定量的对照品。加入适量的 PBS 在转速为 8000r/min 高速匀浆提取 20min。离心 15min (4000r/min),抽滤,定容备用。按供试品溶液制备方法测定,结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果 (n = 6)

序号	取样量 (mg)	样品中 含量 (mg)	对照品 加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (mg)	平均回 收率 (%)	RSD (%)
1	200	13.08	13	25.82	98.00	98.37	1.01
2	200	13.13	13	25.88	98.08		
3	200	13.14	13	26.05	99.31		
4	200	13.11	13	25.68	96.69		
5	200	13.16	13	26.02	98.92		
6	200	13.05	13	25.95	99.23		

7. 样品测定:取不同批号的巴豆按供试品溶液制备操作制备成供试品溶液后,按含量沉淀方法操作对样品进行含量测定,结果见表 2。

表 2 样品中可溶性蛋白含量 (n = 10)

序号	批号	产地	购买公司	可溶性蛋白含量 (%)
1	20100418	四川宜宾	四川成都市五块石药市	9.84
2	20100420	四川万县	四川成都市五块石药市	6.54
3	20100423	四川宜宾	四川宜宾县观音镇	3.62
4	20101118	四川	云南向辉生物科技有限公司	5.28
5	20101125	四川	安徽亳州药市	5.35
6	20101128	四川	安徽亳州中药材总公司	3.91
7	20101201	云南	广西玉林国际中药港	7.86
8	20101220	云南	安徽亳州中药材总公司	3.16
9	20101108	广西	河北安国同利中药材公司	9.27
10	20101204	广西	安徽亳州中药材总公司	9.34

讨 论

近年来巴豆研究主要集中在生物碱和脂肪油方面,蛋白质作为生物大分子将会是今后中药活性成分研究的重要发展方向。据文献报道,巴豆毒蛋白为核糖体失活蛋白里只具有 A 链活性的单链蛋白,对完整细胞毒性低,但在无细胞系统或进入细胞内(如注射等)对蛋白质的合成具有强烈的抑制作用^[5]。由于核糖体失活蛋白生物学界具有抗增殖、抗肿瘤、抗病

毒、抗孕、抗真菌、抗昆虫、免疫调节及神经系统毒性作用,具有重要的理论和应用价值,结合更多、更高效的免疫毒素的研制,将会给人类带来意想不到的收获。可与单克隆抗体结合制成免疫毒素,可以专一地杀伤肿瘤细胞或病毒感染细胞,具有广泛的药用价值。

本文建立了紫外—可见分光光度法测定巴豆可溶性蛋白的方法,并对来自不同产地的 10 批药材进行了含量测定,发现产地不同,巴豆可溶性蛋白的含量有较大的差异。最高含量是最低含量的 2.7 倍。另外本研究还对果壳、种皮和种仁中可溶性蛋白的含量进行了对比,发现巴豆可溶性蛋白主要存在与果仁之中,果壳和种皮中含量极少。

巴豆蛋白作为核糖体失活蛋白具有较大的开发价值,测定巴豆蛋白的含量,完善巴豆品质评价体系。本实验建立测定巴豆可溶性蛋白含量的方法,样品制备简单,测定结果准确,回收率、线性、精密度均符合中药分析要求,且方法简单、快速准确且灵敏,为以后开发利用巴豆可溶性蛋白奠定基础,可作为巴豆药材的质量控制。

参考文献

1 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 74

2 陈明晃, 潘克祯. 巴豆毒蛋白的分离、结晶及其性质研究[J]. 生物化学杂志, 1993, 9 (1):104 - 108

3 郑成, 雷德柱, 雷雨, 等. 蓖麻毒蛋白提取[J]. 广东化工, 2003, 30 (5):1 - 4

4 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 23

5 赵婷, 姚大卫, 吴志斌, 等. 核糖体失活蛋白及其在生物医学领域的应用与研究进展[J]. 重庆医学, 2012, 34 (41): 3663 - 3665

(收稿日期:2013 - 03 - 22)

(修回日期:2013 - 06 - 12)

(上接第 17 页)

14 Ghosh D, Sachdev S, Hannink M, *et al.* Coordinate regulation of basal and cyclic 5' - adenosine monophosphate (cAMP) - activated expression of human chorionic gonadotropin - alpha by Ets - 2 and cAMP - responsive element binding protein[J]. Mol Endocrinol, 2005, 19(4):1049 - 1066

15 Chakrabarty A, Roberts MR. Ets - 2 and C/EBP - beta are important mediators of ovine trophoblast Kunitz domain protein - 1 gene expression in trophoblast[J]. BMC Mol Biol, 2007, 8:14

16 Loregger T, Pollheimer J, Kn6fler M, *et al.* Regulatory transcription factors controlling function and differentiation of human trophoblast a review[J]. Placenta, 2003, 24: S104 - S110

17 Daiter E, Omigbodun A, Wang S, *et al.* Cell differentiation and endogenous cyclic adenosine 3', 5' - monophosphate regulate osteopontin expression in human trophoblasts[J]. Endocrinology,

1996, 137(5): 1785 - 1790

18 Daiter E, Makrigiannakis A, Coukos G, *et al.* Inhibitory G protein alpha subunit (Gi alpha) expression and localization during human trophoblast differentiation[J]. Eur Obstet Gynecol Reprod Biol, 2000, 88(2): 165 - 169

19 Green KE, Thota C, Hankins GD, *et al.* Calcitonin gene - related peptide stimulates human villous trophoblast cell differentiation in vitro[J]. Mol Hum Reprod, 2006, 12(7): 443 - 450

20 Yoshie M, Kaneyama K, Kusama K, *et al.* Possible role of the exchange protein directly activated by cyclic AMP (Epac) in the cyclic AMP - dependent functional differentiation and syncytialization of human placental BeWo cells[J]. Hum Reprod, 2010, 25(9): 2229 - 2238

(收稿日期:2013 - 03 - 13)

(修回日期:2013 - 03 - 21)