

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2020.01.031

# 土鳖虫活性肽组分对急性血瘀模型大鼠血液流变学、血脂四项指标及血液因子含量的影响

Effects of active peptide components of *Eupolyphaga steleophaga* on blood rheology, four indicators of blood lipids and blood factor levels in rats with acute blood stasis

姜珊<sup>1,2</sup> 王少平<sup>1</sup> 代龙<sup>1</sup> 张加余<sup>1</sup>

JIANG Shan<sup>1,2</sup> WANG Shao-ping<sup>1</sup> DAI Long<sup>1</sup> ZHANG Jia-yu<sup>1</sup>

高鹏<sup>2</sup> 刘子菡<sup>3</sup> 王喻淇<sup>3</sup>

GAO Peng<sup>2</sup> LIU Zi-han<sup>3</sup> WANG Yu-qi<sup>3</sup>

(1. 滨州医学院, 山东 烟台 264003; 2. 山东中医药大学, 山东 济南 250300;

3. 北京中医药大学, 北京 102488)

(1. School of Pharmacy, Binzhou Medical University, Yantai, Shandong 264003, China; 2. School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan, Shandong 250300, China; 3. School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China)

**摘要:**用胃蛋白酶和胰蛋白酶复合酶系对土鳖虫药材进行仿生酶解,产物经除盐、超滤、纳滤、DA201-C型大孔吸附树脂、葡聚糖凝胶 G-25 层析、反相高效液相色谱以及半制备液相色谱分离纯化,获得纤溶活力最强的土鳖虫活性肽组分。并研究其对急性血瘀模型大鼠的血液流变学指标、血脂四项指标和血清内一氧化氮(NO)、超氧化物歧化酶(SOD)、组织性纤溶酶原激活物(t-PA)和纤维蛋白(FIB)含量等的影响。结果表明:土鳖虫活性肽组分 F2 能显著降低血液黏度、红细胞压积、血小板计数( $P < 0.05$ );与模型组相比,土鳖虫活性肽组分 F2 能显著降低大鼠血液内甘油三酯(TG)、胆固醇(T-CHO)、高密度脂蛋白(HDL)和低密度脂蛋白(LDL)的含量( $P < 0.05$ );大鼠血液中 NO、SOD、t-PA 含量较模型组明显升高,血清内 FIB 含量明显减少,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。土

鳖虫经仿生酶解、分离纯化后制备的土鳖虫活性肽组分 F2 具有改善急性血瘀模型大鼠血液流变学指标,降低血脂四项指标和改变血液因子含量的作用。

**关键词:**土鳖虫活性肽;急性血瘀模型;大鼠;血液流变学;血脂;血液因子

**Abstract:** Pepsin and trypsin complex enzymes were used for biomimetic enzymatic hydrolysis of *Eupolyphaga steleophaga*. In order to obtain the most active fibrinolytic activity of the soil aphid active peptide component F2, the product was subjected to desalting, ultrafiltration, nanofiltration, DA201-C macroporous adsorption resin, dextran gel G-25 chromatography, reverse high performance liquid chromatography and semi-preparative liquid chromatography. Moreover, its effects on hemorheology index, blood lipids and serum nitric oxide (NO), superoxide dismutase (SOD), tissue plasminogen activator (t-PA) and fibrin (FIB) content of rats with acute blood stasis were also studied. *E. steleophaga* active peptide component F2 could significantly reduce blood viscosity, hematocrit and platelet count ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the *Eupolyphaga steleophaga* active peptide component F2 can significantly reduce the content of triglyceride (TG), cholesterol (T-CHO), high-density lipoprotein (HDL) and low-density lipoprotein (LDL) in rat blood ( $P < 0.05$ ). The levels of NO, SOD and t-PA in the blood of rats were significantly higher than those in the model group, and sig-

**基金项目:**国家自然科学基金(编号:81073031);名贵中药资源可持续利用能力建设项目(编号:2060302);滨州医学院2019年科研启动基金(编号:BY2018KYQD11, 2019KYQD05, 2019KYQD06)

**作者简介:**姜珊,女,山东中医药大学在读硕士研究生。

**通信作者:**王少平(1989—),男,滨州医学院讲师,博士。

E-mail: wsp.0104@163.com

代龙(1964—),男,滨州医学院教授,硕士。

E-mail: 2665275709@qq.com

**收稿日期:**2019-10-18

nificant differences in the levels of FIB between the experimental group and the model group ( $P < 0.05$ ) were also found. The *E. steleophaga* active peptide component F2 prepared by biomimetic enzymatic hydrolysis and purification had the functions of improving blood rheology index, reducing blood lipid levels and changing blood factor content in acute blood stasis model rats.

**Keywords:** *Eupolyphaga steleophaga* active peptide; acute blood stasis model; rats; blood rheology; blood lipids; blood factor

土鳖虫为鳖蠊科昆虫地鳖或冀地鳖的雌虫干燥体,为中医临床传统用药。其最早记载于《神农本草经》<sup>[1]</sup>,又称土元、土鳖子、地乌龟,能活血逐瘀、续筋接骨,临床主要用于跌打损伤、筋损骨折、血瘀经闭以及产后血瘀腹痛等症<sup>[2]</sup>。土鳖虫蛋白质含量占总虫体质量的 60%,且所含的氨基酸种类完整,几乎包括构成蛋白质的所有氨基酸<sup>[3]</sup>。但是,大分子蛋白无法被人体吸收,只能经过胃肠道蛋白消化酶的作用转变为小分子活性肽后方能发挥药效<sup>[4-7]</sup>。仿生酶解动物蛋白制备的活性物质主要以小肽或寡肽形式存在,被认为是动物类中药真正起效的物质基础<sup>[8-10]</sup>。

中医“血瘀证”是一类疾病的统称,主要包括高血脂、高血压、血管狭窄、动脉粥样硬化和脑血栓等病症。其病理表现为全血黏度上升、血细胞压积升高、血小板聚集性增强、电泳时间加长、血管功能失调、促血管生成因子减少、自由基增加和局部组织缺血造成坏死等<sup>[11-12]</sup>。

据报道<sup>[13]</sup>,土鳖虫体内含有具有纤溶活性的物质,具有显著的活血化瘀功效。目前大部分研究<sup>[14-16]</sup>是关于土鳖虫干粉和土鳖虫蛋白质具有纤溶活性的报道,土鳖虫乙醇(水)提取物均可以改善大鼠机体凝血因子、抗氧化/氧化因子的水平,并促进血管生成。韩雅莉等<sup>[17]</sup>从地鳖虫中分离出 3 种具有纤溶活性的蛋白质 EFF1、EFF2 和 EFF3,其中 EFF2 活性最强。而土鳖虫活性肽是由土鳖虫蛋白质经仿生酶解而来,结合蛋白质体内消化过程,推断土鳖虫活性肽具有纤溶活性。但是以土鳖虫活性肽为材料研究其对“血瘀证”的作用机制未见报道。同时对于土鳖虫活性肽中存在的活性小肽组分也没有明确信息。

试验拟以土鳖虫活性肽为研究材料,基于多种分离方式联合检测手段并行的原则,分离纯化获得土鳖虫活性肽组分,并探讨分离组分对急性血瘀模型大鼠血液流变学、血脂四项指标及血液因子含量的影响,为动物药治疗血瘀证提供新的研究思路和试验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物、材料与试剂

土鳖虫药材:中华冀地鳖 [*Steleophaga plancyi* (Bo- leny)],山东省长清土元养殖公司;

SD 大鼠:8 周龄,体重 180~200 g,许可证号 SCXK (鲁)20140007,山东济南朋悦实验动物有限公司;

凝血酶:500 U/g,深圳生化试剂厂;

牛血纤维蛋白原:纯度 95.3%,沈阳拜英生物科技有限公司;

胃蛋白酶(2 500 U/mg)、胰蛋白酶(5 000 U/mg):上海国药试剂集团有限公司;

大孔吸附树脂:DA201-C 型,沧州宝恩树脂有限公司;

Sephadex G25:南京海克尔生物科技有限公司;

T-CHO、TG、HDL 和 LDL 试剂盒:南京建成生物工程研究所有限公司;

NO、SOD、t-PA 和 FIBELISA 试剂盒:上海酶联生物科技有限公司。

### 1.2 仪器与设备

恒温培养箱:BPH-9082 型,上海一恒科学仪器有限公司;

恒温水浴锅:HH-601 型,镇江瑞祥仪器有限公司;

十万分之一天平:MS104 型,梅特勒—托利多国际贸易(上海)有限公司;

超声振荡仪:KQ2200DV 型,杭州法兰特超声波科技有限公司;

全自动血细胞分析仪:LH 750 型,贝克曼库尔特中国仪器公司;

恒温旋转仪:N-1100VEYeLa 型,日本东京理化仪器公司;

多功能电导仪:FE30 型,梅特勒—托利多(上海)精密仪器公司;

小型电渗析仪:LH320 型,辽宁金科水处理有效公司;

膜处理设备:DKH-43 型,上海陶氏膜处理集团。

### 1.3 方法

1.3.1 土鳖虫活性肽的制备 根据课题组<sup>[18]</sup>前期的研究,取土鳖虫药材(过 80 目筛)500 g,加 10 倍量去离子水,加热至沸,放至室温。用稀盐酸调 pH 至 2.0,加 1% 胃蛋白酶,37 °C 酶解 1.0 h;再用氢氧化钠溶液调 pH 至 9.0,加 1% 胰蛋白酶,酶解 3.0 h 后加热灭酶 15 min,放凉后冷藏 12 h,离心,收集上清液。调整上清液浓度到 500 mg/mL,pH 值至 6.5,分装入电渗析仪器内,平衡 15 min 后进行除盐操作 2.5 h,收集土鳖虫活性肽溶液,备用。

1.3.2 纤溶活性测定 采用尿激酶为对照药物进行体外纤溶活性测定<sup>[19]</sup>,以溶圈面积为纵坐标,尿激酶活力(U)的对数为横坐标进行线性回归,建立标准曲线。

1.3.3 土鳖活性肽的分离纯化

(1) 超滤和纳滤分离:取土鳖虫活性肽溶液,用截留

分子量为 3 kDa 的超滤膜和截留分子量为 1 kDa 纳滤膜进行分段,收集分子量  $>3, 1\sim 3, <1$  kDa 的酶解液,经冷冻干燥后进行纤溶活力测定,筛选出纤溶活力最高的组分。

(2) DA201-C 型大孔吸附树脂分离:根据文献[20]修改如下,将 1.3.3(1)获得的纤溶活性最高的组分离心过滤后,调整 pH 值至 6.0,上样质量浓度为 20 mg/mL,上样体积为 0.02 BV,上样流速 2 BV/h;上样结束后吸附 3 h。再依次用去离子水、25%乙醇溶液、50%乙醇溶液、75%乙醇溶液进行洗脱,收集各洗脱液后分别冻干后测定纤溶活性。

(3) 葡聚糖凝胶 G-25 分离:将 1.3.3(2)获得的纤溶活性最高的组分用去离子水溶解后上样,上样质量浓度为 10 mg/mL,上样体积为 0.02 BV,用去离子水进行洗脱,流速为 0.2 mL/min,每 1.0 mL 收集一试管,采用可见—紫外分光光度仪检测每个试管在 220 nm 下的吸光度(A),至最后几个试管的吸光度和去离子水相同时停止洗脱。将各洗脱峰分别冻干并测定纤溶活性。

(4) RP-HPLC 分离:将 1.3.3(3)获得的纤溶活性最高组分采用 RP-HPLC 进行分离纯化。色谱条件:色谱柱为 Agilent BOZAX300SB-C<sub>18</sub> 肽色谱柱;检测波长 220 nm;流速 1.0 mL/min;流动相 A 为乙腈(含 0.1%三氟乙酸),流动相 B 为纯水(0.1%三氟乙酸),梯度洗脱方法为 0~50 min,95% B~50% B;50~65 min,50% B~95% B;进样量 50  $\mu$ L。对各洗脱峰进行制备,冻干后进行纤溶活性测定。

### 1.3.4 土鳖虫活性肽对急性血瘀模型大鼠的影响

(1) 急性血瘀大鼠造模及给药:根据文献[21]修改如下,90 只雄性 SD 大鼠适应性饲养 7 d 后随机分为 5 组,即空白组、模型组、尿激酶阳性组、土鳖活性肽组分 F2 高剂量组、土鳖活性肽组分 F2 低剂量组。除空白组以外,其他组大鼠每天定量给予 50 g 高脂饲料和 4.0 mL 高脂乳剂,空白组大鼠给予普通饲料,持续 45 d。同时,用高脂饲料和高脂乳剂饲养 15 d 后,每只老鼠肌肉注射 0.2 mL 盐酸肾上腺素注射液(除空白组)。注射 30 min 后冷水浴(4  $^{\circ}$ C)15 min,持续 30 d 造模。按照体表面积方法计算,尿激酶组给药剂量  $1.0 \times 10^5$  U/kg,土鳖活性肽组分 F2 高、低剂量组按照预试验结果确定的给药浓度分别为 50,25 mg/kg,模型组和空白组给予生理盐水。所有样品均用生理盐水溶解,肌内注射给药 15 d,给药期间持续给予高脂饲料。

(2) 血液取样:末次给药 5 h 后,于大鼠腹主动脉取血 3.0 mL,注入肝素钠的玻璃硅化管内,离心取血浆;同时取 5.0 mL 血液注入未加入抗凝剂的 EP 管,离心取血清。

(3) 生化指标测定:采用全血液自动分析仪、血流变分析仪对各组大鼠血浆进行血液流变指标检测,并测定血清中 HDL/LDL、TG、T-CHO、SOD、NO、t-PA 和 FIB

的含量。

### 1.4 数据统计与分析

所有数据采用 SPSS 20.0 和 Graphpad Prism 进行处理,试验数据为 3 个平行样品的平均值,以 Mean $\pm$ SD 表示,LSD 检验两两比较;若方差不齐,检验其差异性则采用 H-G 检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 纤溶活性测定标准曲线

以溶圈面积为纵坐标,尿激酶活力的对数为横坐标得到的线性方程为  $Y=1.564X-1.8635, R^2=0.9972$ ,线性范围为 1.3376~5.9871  $\text{cm}^2$ 。

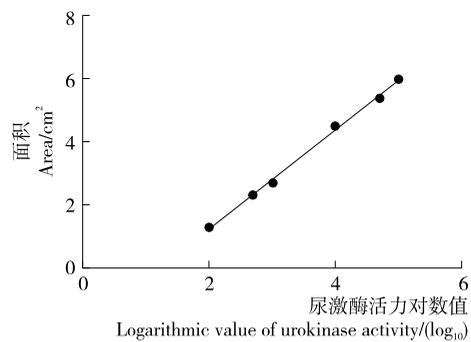


图1 标准曲线测定结果

Figure 1 Standard curve measurement results

### 2.2 土鳖活性肽分离纯化

2.2.1 超滤和纳滤分离的活性肽 超滤试验结果表明,分子量  $>3$  kDa 活性肽溶液无纤溶活性,而分子量  $<3$  kDa 活性肽溶液具有明显活性,因此对分子量  $<3$  kDa 活性肽溶液进行纳滤分离。如表 1 所示,分子量  $1\sim 3$  kDa 活性肽溶液和分子量  $<1$  kDa 活性肽溶液均有纤溶活性,但是分子量  $1\sim 3$  kDa 活性肽溶液纤溶活性更强,对结果进行分析得出: $<1$  kDa 活性肽溶液多为游离氨基酸,氨基酸并不能直接发挥活性作用,而  $>3$  kDa 活性肽溶液多为灭活后残留的胰蛋白酶、胃蛋白酶,几乎没有活性。 $1\sim 3$  kDa 活性肽溶液多为活性肽集中存在区域,故选定该分子质量范围的酶解液进行分离纯化。

表 1 超滤和纳滤分离土鳖虫活性肽溶液纤溶活力

Table 1 Determination of fibrinolytic activity of *E. steleophaga* active peptide solution obtained by ultrafiltration and nanofiltration

土鳖活性肽溶液 分子量/kDa	溶圈面积/ $\text{cm}^2$	活力/ (U $\cdot$ g <sup>-1</sup> )
$>3$	0.000 0	0.00
$<3$	1.539 4	2 997.76
$<1$	1.105 3	1 582.12
$1\sim 3$	2.006 1	5 959.35

2.2.2 DA201-C 型吸附树脂、葡聚糖凝胶 G-25 和 RP-HPLC 分离的活性肽 DA201-C 型吸附树脂处理后的去离子水洗脱液纤溶活性为 0,可直接舍弃;其他 3 个洗脱组分的纤溶活性顺序为 50%乙醇洗脱液(13 159.89 U/g) > 25%乙醇洗脱液(4 107.95 U/g) > 75%乙醇洗脱液(515.87 U/g)。说明 DA201-C 树脂分离的活性较强的肽多为中等极性。然后采用葡聚糖凝胶 G-25 对 50%乙醇洗脱液进行分离纯化,获得的 P1、P2 和 P3 洗脱峰(图 2)的纤溶活性分别为 1 674.33,62 044.61,8 615.63 U/g,因此选定活性最强的 P2 洗脱组分继续分离纯化。由图 3 可知,经过 RP-HPLC 色谱柱分离后,可获得 5 个色谱峰(F1~F5)。其中,F2 的纤溶活性(167 808.97 U/g)远大于其他峰,故选择土鳖虫生物活性肽 F2 进行药理试验。

2.3 土鳖虫活性肽组分 F2 对急性血瘀模型大鼠影响

2.3.1 血细胞、血液流变指标 如表 2 所示,尿激酶组大

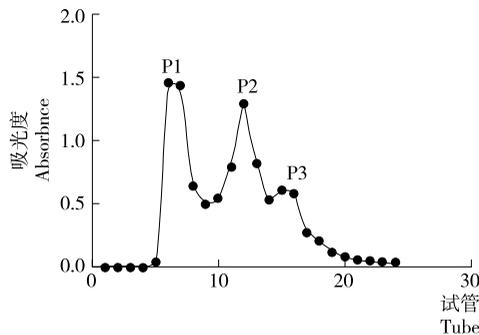


图 2 葡聚糖凝胶 G-25 层析分离纯化结果

Figure 2 Sephadex gel G-25 chromatography separation and purification results

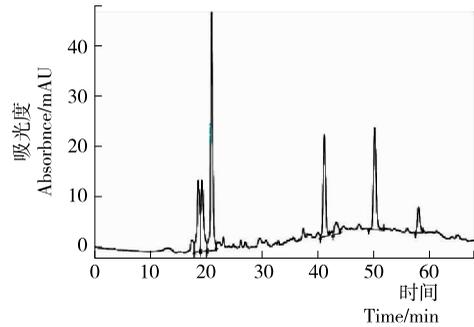


图 3 RP-HPLC 分离图谱

Figure 3 RP-HPLC liquid phase separation spectrum

鼠红细胞压积、血小板计数明显降低,并与模型组比较具有显著性差异,说明尿激酶可以明显改善血液流动。土鳖虫活性肽组分 F2 高、低剂量组也具有使两项指标降低的作用,其中高剂量组与模型组差异显著(P<0.05)。对表 3 中血流变试验结果分析得出,尿激酶组对其改善效果较佳且与模型组比较具有极显著性差异(P<0.01)。土鳖虫活性肽组分 F2 高、低剂量组均能降低急性“血瘀证”大鼠在高、中、低切度下的血流变值,且与模型组相比具有极显著性差异(P<0.01),说明土鳖虫活性肽组分 F2 具有改善急性“血瘀证”大鼠的血液流变指标的作用。土鳖虫活性肽组分 F2 高、低剂量组除低切下具有差异外,其他切度下没有显著性差异,说明治疗效果和剂量间没有关系。

2.3.2 血脂四项指标的检测 由图 4 可知,经过长期给予高脂喂养后,模型组大鼠血液内 TG、T-CHO、HDL-C 和 LDL-C 的含量较空白组明显上升,具有极显著性差异

表 2 血细胞检测结果<sup>†</sup>

Table 2 Blood cell test results

组别	血红蛋白	红细胞压积	血小板计数	血小板比积	红细胞
空白组	140.00±9.23	36.16±1.95	465.33±37.99	0.46±0.12	7.10±0.43
模型组	116.37±6.51**	42.00±4.40**	630.13±68.23**	0.59±0.06**	5.96±0.27**
尿激酶组	133.12±9.25△△	36.74±0.80△	504.37±66.32△△	0.49±0.12△	6.21±0.41
F2 高剂量组	122.44±7.62	38.19±2.48△	555.55±61.36△	0.55±0.03△	6.17±0.50
F2 低剂量组	119.89±9.56	40.68±3.49	579.60±53.75	0.56±0.09	6.10±0.83

† \*\* . 与空白组比有极显著性差异(P<0.01);△. 与模型组比有显著性差异(P<0.05),△△. 与模型组比有极显著性差异(P<0.01)。

表 3 血液流变指标检测结果<sup>†</sup>

Table 3 Blood rheology index test results

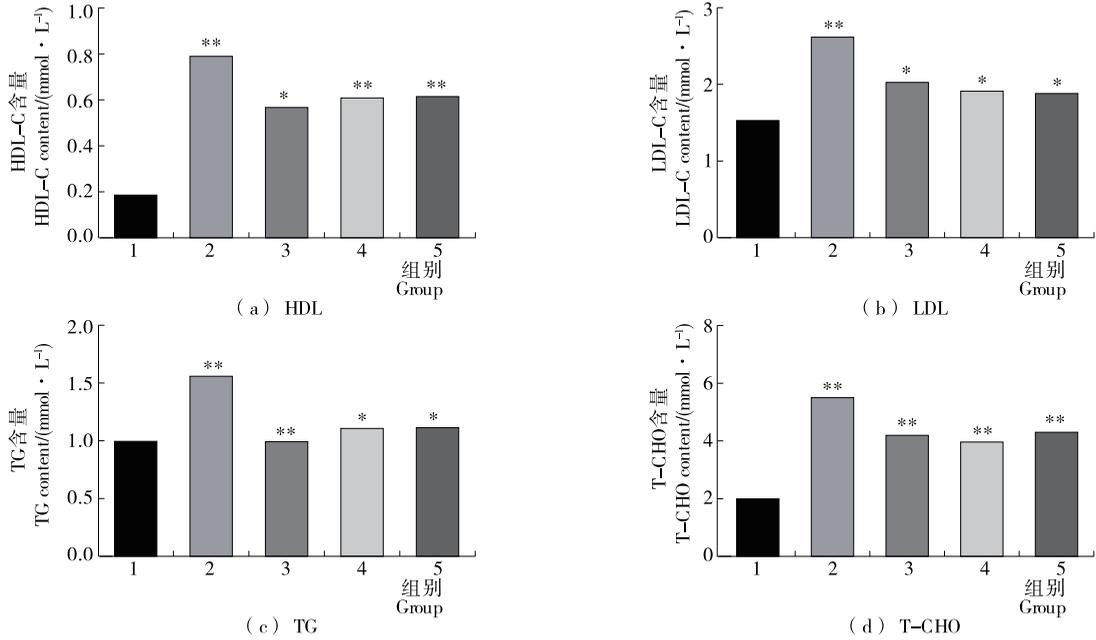
组别	1 s <sup>-1</sup>	30 s <sup>-1</sup>	150 s <sup>-1</sup>
空白组	90.818±4.607	11.383±0.498	6.904±1.084
模型组	117.623±10.697**	18.448±0.629**	9.119±0.564**
尿激酶组	91.059±4.748△△	12.237±2.910△△	7.075±0.941△△
F2 高剂量组	93.856±2.911△△●	13.450±3.148△△	8.312±1.244△△
F2 低剂量组	100.718±2.761△△	13.957±2.698△△	7.792±1.361△△

† \*\* . 与空白组比有极显著性差异(P<0.01);△. 与模型组比有显著性差异(P<0.05),△△. 与模型组比有极显著性差异(P<0.01);●. 与低剂量组比有显著性差异(P<0.05)。

( $P < 0.01$ )。阳性药物尿激酶组明显降低大鼠血液内 TG、T-CHO、HDL-C 和 LDL-C 的含量。土鳖虫活性肽组分 F2 高、低剂量给药后,血脂四项均有下降趋势,与模型组比较具有显著性差异( $P < 0.05$ )。说明土鳖虫活性

肽可下调高脂血大鼠血液内 TG、T-CHO、HDL-C 和 LDL-C 的含量。土鳖虫活性肽组分 F2 高、低剂量组之间差异不显著,说明治疗效果和剂量间相关性不明显。

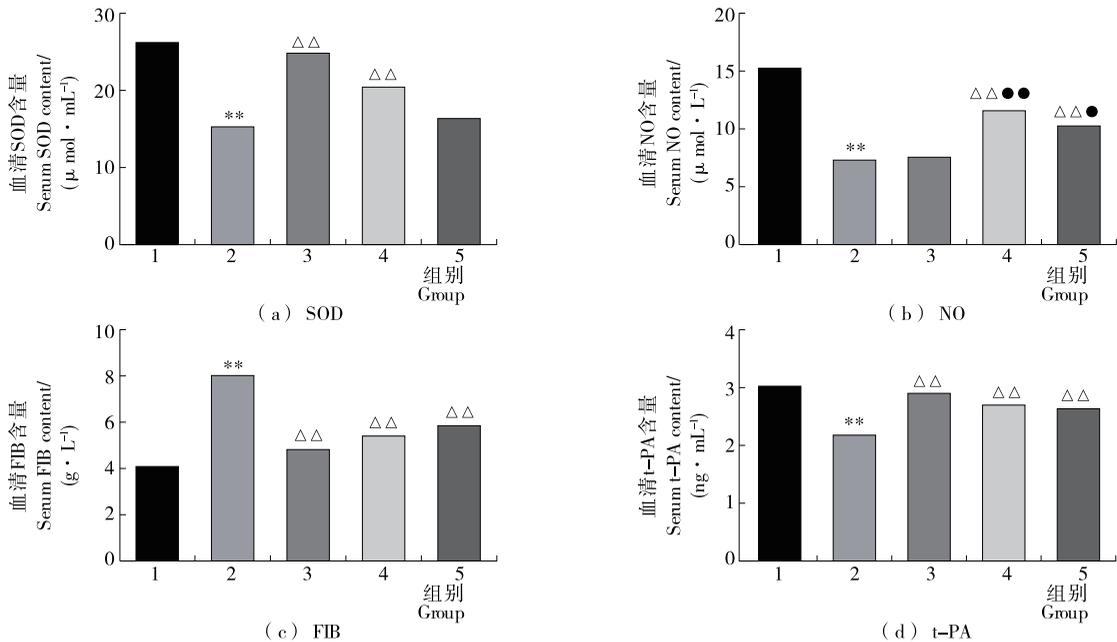
2.3.3 血液因子含量的测定 如图 5 所示,血清 SOD 含



1. 空白组 2. 模型组 3. 尿激酶组 4. F2 高剂量组 5. F2 低剂量组 \* . 与空白组相比有显著性差异( $P < 0.05$ ) \*\* . 与空白组相比有极显著差异( $P < 0.01$ )

图 4 各样本血清 HDL、LDL、TG 和 T-CHO 含量测定结果

Figure 4 Results of serum HDL, LDL, TG and T-CHO determination in each sample



1. 空白组 2. 模型组 3. 尿激酶组 4. F2 高剂量组 5. F2 低剂量组 \* . 与空白组相比有显著性差异( $P < 0.05$ ) \*\* . 与空白组相比有极显著差异( $P < 0.01$ )  $\Delta\Delta$ . 与模型组比有显著性差异( $P < 0.05$ ) ● . 与尿激酶组比有显著性差异( $P < 0.05$ ) ●● . 与尿激酶组比有极显著差异( $P < 0.01$ )

图 5 各样本血清 SOD、NO、FIB 和 t-PA 含量测定结果

Figure 5 Results of determination of serum SOD, NO, FIB and t-PA in each sample

量测定结果表明,造模后模型组大鼠血清中 SOD 含量降低,只有 $(15.511 \pm 0.884 \ 3) \ \mu\text{mol}/\text{mL}$ ,与空白组比具有极显著差异( $P < 0.01$ )。连续给药后,尿激酶组和土鳖虫活性肽组分 F2 高、低剂量组大鼠血清中 SOD 含量均升高。其中,土鳖虫活性肽组分 F2 高剂量组与模型组大鼠相比具有极显著性差异( $P < 0.01$ )。

NO 在体内作为血管扩张机动因子,主要起到扩张血管、降低血压、降低血黏度作用,为血瘀证改善的主要评价指标。血清中 NO 含量结果表明,急性血瘀证模型组大鼠血清 NO 含量比空白组大鼠 NO 含量降低明显,具有极显著性差异( $P < 0.01$ );连续给药治疗 15 d 后,各组大鼠血清 NO 含量均有升高,除尿激酶组外,其他各组与模型组均具有显著性差异( $P < 0.05$ )。考虑到尿激酶属于直接纤溶剂,并不具有调节血清 NO 功能。

血液内 t-PA 含量下降,造成 FIB 含量增加,使得大鼠具有形成血栓的潜在危险性。连续给药后,试验各组大鼠血清内 t-PA 含量增加,对应的纤维蛋白 FIB 含量减少,与模型组比,均具有显著性差异( $P < 0.05$ ),说明恢复效果良好。其中,尿激酶作为 t-PA 直接作用药物,尿激酶组大鼠血清中 t-PA 含量恢复最好,基本达到了空白组水平,与模型组比较具有极显著性差异( $P < 0.01$ )。

以上说明,土鳖虫活性肽组分 F2 治疗“血瘀证”的机理可能是上调 NO、t-PA,使血液内 FIB 含量减少,从而降低血液黏度,使血细胞指数下降。

### 3 结论

试验将分离纯化得到的纤溶活性肽进行药效研究,采用高脂乳剂灌胃+高脂饲料饲养并结合注射盐酸肾上腺素与冰水冷浴方法,复制大鼠急性血瘀证模型,以大鼠血细胞和血液流变分析,血脂四项(HDL、LDL、T-CHO、TG)为指标衡量土鳖虫活性肽组分 F2 的治疗作用,结果显示 F2 组分能显著降低大鼠血清内 TG、T-CHO、HDL 和 LDL 的含量,上调 NO、t-PA 使得 FIB 含量减少,从而降低血液黏度,改善血液流动性,土鳖虫活性肽 F2 组分对急性血瘀模型大鼠产生了影响。说明采用上述工艺对土鳖虫活性肽进行分离是可行的。同时也证明,土鳖虫活性肽可能是土鳖虫“活血化痰”作用的重要物质。

试验过程也存在一些不足,如:最终分离组分 F2 的氨基酸组成是否与活性之间存在紧密联系,目前尚未知;分离组分 F2 究竟是通过哪种途径或者通路来调控相关因子含量,试验没有涉及。针对存在的问题,后期会对 F2 组分进行 LC-MS 分析,获得其氨基酸序列。并进行更加深入的研究,揭示其作用机制。

#### 参考文献

[1] 王鹏程,吕文纲.土鳖虫质量控制及药理作用研究进展[J].山东中医杂志,2016(9):846-848.  
[2] 刘梦云,毕晓黎,陈伟韬,等.金边土鳖 HPLC 指纹图谱及氨基酸含量测定[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(14):

63-68.

- [3] 王立娜,王颖,朱明珠,等.土鳖虫的活性成分及药理研究进展[J].化工时刊,2017,31(6):34-36.  
[4] MONTONE C M, CAPRIOTTI A L, CAVALIERE C, et al. Peptidomic strategy for purification and identification of potential ACE-inhibitory and antioxidant peptides in *Tetrademus obliquus microalgae*[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2018, 410(15): 3 573-3 586.  
[5] SEPPO L J, TIINA P T, KORPELA R. A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects[J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 2003, 77(2): 326-330.  
[6] NASIM M, ALIREZA S M, FARAH H, et al. Production of antioxidant peptide fractions from a by-product of tomato processing: Mass spectrometry identification of peptides and stability to gastrointestinal digestion[J]. Journal of Food Science and Technology, 2018, 55(9): 3 498-3 507.  
[7] INTIQUILL A, JIMENEZ A, KARIM, et al. Novel antioxidant peptides obtained by alcalase hydrolysis of, *Erythrina edulis*, (pajuro) protein[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2018, 99(5): 2 420-2 427.  
[8] 蒋雨晴,迟玉杰.卵白蛋白源抗菌肽的分离纯化与结构鉴定[J].食品与机械,2019,35(7):1-6,86.  
[9] 袁亮,戴军,陈尚卫,等.丝蛋白肽醒酒活性组分分离纯化及其构效关系研究[J].食品与机械,2018,34(8):5-9.  
[10] 程云辉,毛田米,黄璐,等.大米肽中压离子交换色谱分离及其免疫活性评价[J].食品与机械,2018,34(3):151-155.  
[11] 赵方舟.血瘀证的发展与古今诊断依据的对比研究[D].北京:北京中医药大学,2016:12-17.  
[12] 秦林,彭欣,王栋先,等.血瘀证与出血证的辨治关系与特点[J].山东中医药大学学报,2015(4):299-300.  
[13] 黄明星.地鳖虫和黄粉虫纤溶活性蛋白的分离纯化、性质研究及其基因克隆[D].广州:广东工业大学,2012:13-17.  
[14] 白秀娟,王慧,苏双良,等.土鳖虫粉对高脂血症家兔肝脏指数及血脂的影响[J].东北农业大学学报,2014(5):87-91.  
[15] 王征,陈晓光,吴岩.土鳖虫提取物对高脂血症大鼠的降脂作用[J].中国实用医药,2009,4(33):3-4.  
[16] 李友宾,张健,段金殿,等.土鳖虫与日本医蛭提取物抗凝血酶活性的比较研究[J].时珍国医国药,2006,17(3):350-351.  
[17] 韩雅莉,李张伟.地鳖虫纤溶成分的分离纯化和活性测定[J].中药材,2006,29(8):765-767.  
[18] 李亚男,胡祥昊,董丹华,等.雄性土鳖虫中不同分子量多肽活性研究[J].辽宁中医杂志,2019,46(9):1 922-1 925.  
[19] 王佳茜,王少平,刘万卉.地龙抗血栓肽分离研究[J].天津药学,2019,31(3):1-4.  
[20] 毛跟年,贺磊,周亚丽,等.大孔吸附树脂分离魔芋飞粉中 ACE 抑制肽工艺研究[J].粮食与油脂,2017,30(10):93-96.  
[21] 王宏,曲绍春,于晓凤,等.血栓心脉宁片对急性血瘀模型大鼠血小板功能及血液流变学的影响[J].中国老年学杂志,2010,30(22):3 335-3 337.