

中国毛虾酶解多肽降压作用的初步探讨

付雪艳¹, 薛长湖¹, 宁岩², 许萍¹, 苗本春³

(1. 中国海洋大学 食品工程系, 山东 青岛 266003; 2. 青岛太东制药, 山东 青岛 266003; 3. 中国海洋大学 海洋药物与食品研究所, 山东 青岛 266003)

摘要: 初步探讨从中国毛虾 (*Acetes chinensis*) 经碱性及中性蛋白酶降解获得的多肽 (AP、NP) 的降压作用及相关机制。采用 Cushman-Cheung 方法测定酶解多肽体外对血管紧张素酶 (ACE) 活性的影响; 采用两肾一夹型建立肾血管性高血压大鼠模型, 分别长期预防给药及急性治疗给药; 应用 GY-6088 型多道生理参数分析记录仪和张力传感器测定、记录血压和呼吸; 采用均相竞争法测定大鼠血浆中血管紧张素 II (Ang II) 的含量。结果表明, 2 种酶解多肽体外均能明显抑制 ACE 的活性, AP 和 NP 的半数抑制浓度 (IC₅₀) 分别为 15.61 mg/L 和 16.95 mg/L; 无论是长期预防给药还是急性治疗给药, 二者均能显著地降低肾血管性高血压大鼠的动脉血压; 经口服预防给药能明显降低高血压大鼠血浆中的 Ang II 水平; 给药大鼠的呼吸频率随血压的变化呈正相关变化; 碱性酶解多肽的降压作用及抑制 ACE 生成的作用均强于中性酶解多肽, 其中, 200 μg/g 的 AP 降压效果最好, 与 14 μg/g 的卡托普利相当。中国毛虾酶解多肽无论是长期预防给药还是急性治疗给药对肾性高血压大鼠均有显著的降压作用, 抑制 Ang II 的生成可能是其降压机制之一。

关键词: 多肽; 肾血管性高血压; 大鼠; 血管紧张素 II (Ang II); 降压作用

中图分类号: Q516 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2005)03-0020-05

血管紧张素转换酶抑制剂 (ACEI) 能有效地降血压, 是抗高血压药物中非常有效的一类。近年来, 已有大量血管紧张素转换酶抑制剂成功地应用于临床, 如卡托普利、苯那普利、福辛普利等。目前, 国内外已着手从天然产物、食物中提取分离血管紧张素转换酶抑制剂^[1, 2]。作者以中国毛虾为原料, 选用不同的蛋白酶, 经过不同的酶解工艺, 筛选出抑制活性最高的 2 种活性肽, 分别为碱性酶解和中性酶解获得的活性肽 (AP、NP), 观察了 2 种多肽体外对血管紧张素酶 (ACE) 活性的影响及体内对肾性高血压大鼠血压、呼吸及血管紧张素 II 含量的影响, 以初步探讨其降压作用及机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

中国毛虾 (*Acetes chinensis*): 滨州水产研究所提供; 黄杆菌低温碱性蛋白酶、中性蛋白酶: 中国水产科学院黄海水产研究所提供; 血管紧张素 II (Ang II) 放射性免疫试剂盒: 北京北方生物医学工

程公司产品。

雄性 Wistar 大鼠 (180 g ± 20 g): 青岛市药物检验所提供; GY-6088 型多道生理参数分析记录仪和张力传感器: 中美合资开封华南仪器有限公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 毛虾酶解多肽的制备

取新鲜中国毛虾, 去除杂质, 称质量, 分别加入适量的黄杆菌低温碱性蛋白酶和中性蛋白酶, 在各自的最适 pH 条件下降解毛虾。酶解完成后, 升温灭活酶, 提取分离后获得降解多肽, 200 目尼龙筛过滤, 灭菌后密封, -20℃ 保存。

1.2.2 毛虾酶解多肽体外抑制 ACE 活性的测定

采用 Cushman-Cheung 方法^[3]测定酶解多肽对 ACE 活性的抑制作用。于含马尿酸三肽的 Tris-HCl

收稿日期: 2003-11-16; 修回日期: 2004-03-20

作者简介: 付雪艳 (1977-), 女, 浙江义乌人, 研究方向: 水产品加工, E-mail: snowful@163.net

(pH 8.0) 缓冲体系中加入适量的酶解液启动反应, 37℃ 恒温水浴放置 30 min, 加入 1 mol/L HCl 终止反应。再用乙酸乙酯混合离心, 酯层真空蒸干后, 溶于去离子水中, 于 228 nm 测定 *A* 值。规定对 ACE 抑制率达到 50% 时, 抑制剂浓度即为半数抑制浓度 (IC₅₀)。

1.2.3 酶解多肽预防给药慢性降压作用的测定

雄性 Wistar 大鼠用戊巴比妥钠 (40 μg/g) 麻醉后, 腹部切口, 小心分离左肾动脉后, 于其下横穿一条线, 并根据肾动脉的粗细程度选用 0.2~0.3 mm 针灸针, 以血管循环方向放于其上, 结扎后将针灸针抽出, 缝合腹部切口, 用酒精消毒, 术后给予青霉素 (10 000 U/只) 以预防感染。大鼠造模后第 2 天开始灌胃给药, 每日 1 次, 连续给药 1 个月。模型组给同量的生理盐水。大鼠随机分为假手术组、模型组、卡托普利组 (14 μg/g) 和 3 个剂量给药组 (50、100、200 μg/g), 每组 6 只。灌胃给药 1 个月, 用 40 μg/g 的戊巴比妥钠麻醉后, 颈总动脉插管, 通过 YH-4 血压换能器, 连 GY-6088 型多道生理参数分析记录仪, 以记录动脉血压^[4~7]。

1.2.4 Ang II 含量的测定

大鼠口服给药 1 个月后经颈总动脉取血, 分别置于预冷的含有抑肽酶, 依地酸二钠的抗凝管内, 于 4℃ 条件下 3 000 r/min 离心 10 min, 分离获得血浆, 采用均相竞争法测定 Ang II 的含量。

1.2.5 酶解多肽急性降压作用及对呼吸影响的测定

雄性 Wistar 大鼠用戊巴比妥钠 (40 μg/g) 麻醉后, 在左侧腹部手术找到左肾动脉, 用动脉夹阻断血流 8~9 h, 再将动脉夹放开而建立急性高血压模型, 颈总动脉插管, 通过 YH-4 血压换能器, 连 GY-6088 型多道生理参数分析记录仪, 以记录动脉血压, JXH-5 传感器连于记录仪, 以描记呼吸运动曲线。动脉插管稳定 15 min 后将动脉夹放开, 开夹 15 min 待血压稳定后舌下静脉给药, 观察记录放夹前后及给药前后的血压、呼吸及其变化^[7], 实验分组同上。

1.2.6 数据处理

实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间分析采用 *t* 检验。

2 实验结果

2.1 酶解多肽体外对 ACE 的抑制作用

实验结果表明, 2 种酶解多肽体外对 ACE 均有较强的抑制作用, 且碱性酶解多肽 (AP) 对 ACE 的抑制作用强于中性酶解多肽 (NP), AP 和 NP

的 IC₅₀ 分别为 15.61mg/L 和 16.95mg/L。

2.2 酶解多肽预防给药的慢性降压作用

采用两肾一夹型手术后 1 个月, 与假手术组相比, 模型组大鼠的收缩压 (SBP) 和舒张压 (DBP) 均明显升高 ($P < 0.01$), 说明 RHR 大鼠模型是成功的。口服预防给药 1 个月, 给药组 RHR 大鼠的收缩压及舒张压较模型对照组均有明显下降, 呈剂量依赖性, 且 AP 的降压作用比 NP 的作用强, 其中 200 μg/g 剂量 AP 的降压效果与卡托普利 (14 μg/g) 相当 (表 1)。

表 1 酶解多肽预防给药的慢性降压作用 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)
Tab.1 Chronic antihypertensive effects of polypeptides on BP of RHR

组别	剂量 (μg/g)	SBP (kPa)	DBP (kPa)
假手术组	-	16.0±0.4	11.6±0.8
模型组	-	24.4±1.1 ^{△△}	18.6±0.7 ^{△△}
AP	50	21.5±0.7 ^{**}	17.3±0.7 ^{**}
	100	18.7±1.0 ^{**}	16.0±0.4 ^{**}
	200	17.2±0.6 ^{**}	14.2±0.6 ^{**}
NP	50	22.9±0.8 [*]	17.9±0.9 [*]
	100	21.1±0.8 ^{**}	17.4±0.7 ^{**}
	200	18.1±0.6 ^{**}	15.4±0.9 ^{**}
卡托普利	14	17.0±0.6 ^{**}	14.5±1.3 ^{**}

与假手术组比, ^{△△} $P < 0.01$; 与模型组比, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$

3.3 酶解多肽对 Ang II 水平的影响

从实验结果看, 口服预防给药 1 个月, 50, 100, 200 μg/g 的 AP 剂量组、100、200 μg/g 的 NP 剂量组大鼠血浆中的 Ang II 含量均明显低于模型组, 表明二者均能显著降低大鼠血浆中的 Ang II 水平, 呈剂量依赖性, 且 AP 的作用强于 NP, 其中, 100、200 μg/g 的 AP 剂量组大鼠血浆中的 Ang II 含量与卡托普利 (14 μg/g) 组相当 (图 1)。

3.4 酶解多肽的急性降压作用

从实验结果看, 开夹后 15 min 收缩压与舒张压都明显增高, 收缩压高于 21.2 Pa (160 mmHg), 属于高血压模型^[4]。50, 100, 200 μg/g 剂量的 AP, 100、200 μg/g 剂量的 NP 均能显著地降低肾血管性高血压大鼠的动脉血压, 呈剂量依赖性, 且 AP 的降压作用比 NP 的作用强。其中, 200 μg/g 剂量的两种酶解多肽能将收缩压降低接近至正常值, 降压效果与 14 μg/g 的卡托普利相当 (表 2、表 3)。

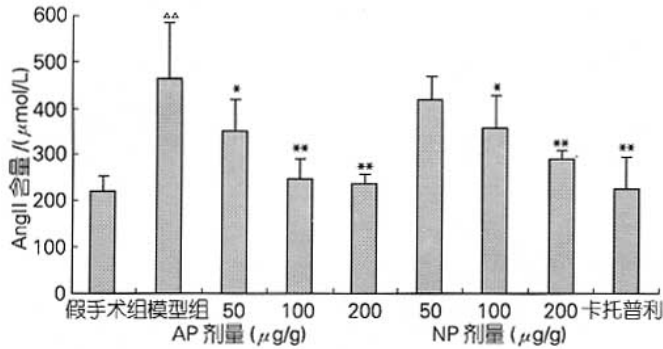


图1 酶解多肽对大鼠 Ang II 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig.1 Effects of polypeptides on plasma Ang II in RHR

与假手术组比, $\Delta\Delta P<0.01$; 与模型组比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

表2 酶解多肽对高血压大鼠收缩压 (SBP) 的急性降压作用 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab.2 Acute antihypertensive effects of polypeptides on SBP of RHR

组别	剂量 (μg/g)	放夹前 15 min (kPa)	放夹后 15 min (kPa)	给药后 30 min (kPa)
假手术组	-	15.7±0.6	16.0±0.9	16.0±0.7
模型组	-	17.0±1.3	21.8±1.0	21.7±0.8 ^{ΔΔ}
AP	50	17.0±0.5	22.0±1.0	19.1±0.8*
	100	17.6±0.5	21.6±0.7	17.2±0.6**
	200	16.7±0.7	21.9±0.6	16.2±1.1**
NP	50	17.4±0.6	21.7±0.5	20.3±1.2
	100	17.0±0.8	21.8±0.7	18.6±1.0*
	200	17.0±0.6	21.8±0.8	16.5±0.8**
卡托普利	14	16.4±0.7	21.3±0.6	16.0±0.6**

与假手术组比, $\Delta\Delta P<0.01$; 与模型组比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

表3 酶解多肽对高血压大鼠舒张压 (DBP) 的急性降压作用 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab.3 Acute antihypertensive effects of polypeptides on DBP of RHR

组别	剂量 (μg/g)	放夹前 15 min (kPa)	放夹后 15 min (kPa)	给药后 30 min (kPa)
假手术组	-	11.9±0.8	12.1±0.7	12.2±0.6
模型组	-	13.4±1.0	15.6±0.7	16.2±0.9 ^{ΔΔ}
AP	50	13.0±0.7	15.6±1.0	15.5±1.2
	100	13.1±0.6	15.4±0.6	14.0±0.7**
	200	13.5±0.5	16.1±0.7	13.7±0.9**
NP	50	13.3±0.8	16.4±0.6	15.8±0.6
	100	13.5±0.6	16.3±0.7	14.6±0.7*
	200	13.1±0.9	16.0±0.4	13.7±1.1**
卡托普利	14	12.9±0.6	16.1±0.8	12.7±0.6

与假手术组比, $\Delta\Delta P<0.01$; 与模型组比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

3.5 酶解多肽对呼吸的影响

以 200 μg/g 的酶解多肽剂量组为例, 观察了酶解多肽急性静脉注射给药后对大鼠呼吸的影响。从实验结果看, 大鼠的呼吸频率随血压的变化呈正相

关变化, 即当血压升高时, 呼吸加快, 当血压降低时, 呼吸减慢。给药 5min 内呼吸缓慢, 以后趋于正常。其中 NP 对呼吸的影响更小些 (图 2)。

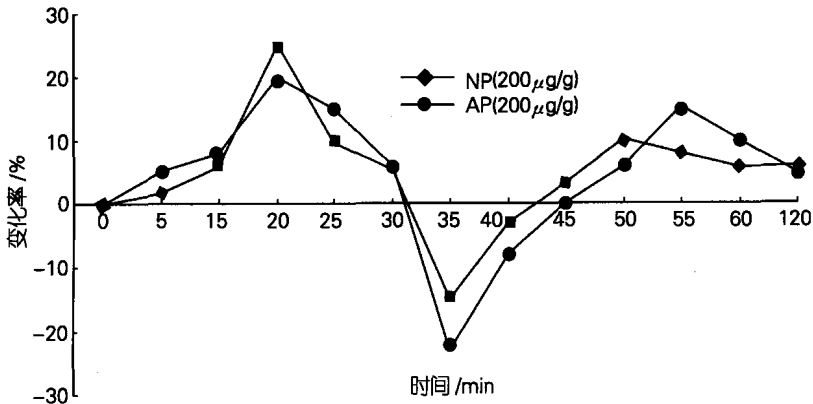


图2 酶解多肽对高血压大鼠呼吸的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig.2 Effects of AP and NP on respiration of RHR in the acute therapeutic experiment

4 讨论

血管紧张素转换酶 (ACE) 是肾素-血管紧张素系统的重要成分, 它能将血管紧张素 I (Ang I) 转化为有很强收缩血管作用的 Ang II, 并裂解具有很强舒张血管作用的缓激肽 C 末端二肽使之失活, 对血压的调节具有十分重要的作用。ACEI 一方面使 Ang II 生成减少, 减少醛固酮和儿茶酚胺的分泌, 同时又延缓激肽的降解灭活, 从而使血压下降^[8, 9]。

中国的毛虾年产量上百万吨, 资源极其丰富, 有很大的开发潜力, 而关于毛虾中多肽的降压活性尚未见报道, 作者首次对毛虾酶解多肽的降压作用及相关机制进行了初步探讨。实验结果表明, 中国毛虾酶解多肽体外能明显抑制 ACE 的活性, 无论是长期预防给药还是急性治疗给药, 二者均能显著地降低肾血管性高血压大鼠的动脉血压, 具有较好的降压效果, 且碱性酶解多肽的降压作用强于中性酶解多肽, 推测由于酶解位点及所含活性片段的差异所致。急性静脉给药后大鼠的呼吸频率随血压的变化呈正相关变化。Ang II 是体内最强有力的升压物质, 它的主要作用是提高平滑肌对加压物质的反应性, 引起血管收缩, 产生血压升高。ACEI 作用机制是通过抑制肾素-Ang II 的转化过程的抑制, 而达到降低 Ang II 的浓度, 控制血压的升高。经长期口服预防给药后, 毛虾酶解多肽能降低大鼠血浆中的 Ang II 水平, 血压的高低与 Ang II 的含量体现出正相关性, 且碱性酶解多肽的作用强于中性酶解多肽。毛虾酶解多肽能

抑制 ACE 的活性, 阻止 Ang II 的形成, 从而起到降压作用, 因此推测其属于 ACEI。通过抑制 Ang II 的生成是其降压机制之一。其活性成分及其它相关降压机制还有待于进一步探讨。

参考文献:

- [1] Kohama Y, Matsumoto S, Oka H, *et al.* Isolation of angiotensin-converting enzyme inhibition from tuna muscle[J]. *Biochem Biophys Res Comm*, 1988,55:332-339.
- [2] Karak H, Karark H, Doi K, *et al.* Antihypertensive effect of tryptic hydmylate of milk casein in spontaneously hypertensive rats[J]. *Comp Biochem Physiol-c*, 1990,96(2):367-378.
- [3] Cushman DW, Cheung HS. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin converting enzyme of rabbit lung [J]. *Biochem Pharmacol*, 1971,20:1 637-1 648.
- [4] 徐叔云, 卡如濂, 陈修. 药理实验方法学(第二版)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991. 804-829.
- [5] 陈修. 心血管药理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1989. 237-242.
- [6] 尹时华, 金延安, 化长林. 建立肾性高血压大鼠实验模型的一种新方法[J]. *咸宁医学院学报*, 1999, 13(3):15-17.
- [7] Zhu H B, Geng M Y, Guan H S, *et al.* Antihypertensive Effects of D-polymannuronic Sulfate in Renovascular Hypertensive Rats[J]. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 2000,30(3):463-469.
- [8] 刘绵林, 舒雨雁. 五步蛇毒的血管紧张素转换酶抑制剂与卡托普利对大鼠高血压的影响[J]. *广西医科大学学报*, 1996,13(2):4-6.
- [9] 杨尚印, 胡作英, 曹蕾, 等. 缬沙坦对自发性高血压大鼠组织内肾素-血管紧张素的影响[J]. *中国循环杂志*, 2000, 15(1):56-57.

Study of antihypertensive effect of polypeptides from *Acetes chinensis* on renovascular antihypertensive rats

FU Xue-yan¹, XUE Chang-hu¹, NING Yan², XU Ping¹, MIAO Ben-chun³

(1. Department of Foods Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Pharmacy of Taidong, Qingdao 266003, China; 3. Department of Pharmacology, Marine Drug and Food Institute, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Received: Nov., 16, 2003

Key words: polypeptides; renovascular hypertensive rats; Ang II; antihypertensive effect

Abstract: To investigate the antihypertensive effects of polypeptides prepared from *Acetes chinensis* on renovascular hypertensive rats (RHR) and related mechanisms, polypeptides were prepared from *Acetes chinensis* with alkaline and neutral proteases, and the effects of these two polypeptides on the activity of ACE were measured by Cushman-Cheung assay *in vitro*. RHR models were made with two-kidney one clip assay, and antihypertensive effects were studied in RHR pretreated with polypeptides for long course or by acute venous injection. Arterial blood pressure, respiration and plasma angiotensin II (Ang II) were measured respectively. The twopolypeptides markedly inhibited the activity of ACE *in vitro* with IC₅₀ of AP (15.61 mg/L) and NP (16.95 mg/L). They remarkably reduced the arterial blood pressure in the two cases referred above. Plasma Ang II of RHR greatly decreased after pretreated with the polypeptides. Respiration of RHR had the same variation trend as blood pressure. Moreover, AP showed stronger antihypertensive and Ang II -reducing effects than that of NP. The effects of 200 μg/g AP were similar to that of 14 μg/g captopril. Polypeptides from *Acetes chinensis* showed strong antihypertensive effects in RHR. One possible mechanisms underlying the antihypertensive effects may be associated with its actions on decreasing the production of Ang II.

(本文编辑: 张培新)

(上接第 19 页)

Screening of bioactive materials in *Spartina anglica*

XU Nian-jun, YAN Xiao-jun, XU Ji-lin, MA Hong-hui

(Key Laboratory of Marine Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Received: Mar., 28, 2004

Key words: *Spartina anglica*; antioxidant; antibacterial; antitumor

Abstract: *Spartina anglica* is a common marsh plant along coast of China. To explore its ecological and economic values, we screened more than 40 fractions of the extracts were screened by DPPH, paper disc and MTT methods, after *S. anglica* was methanol extracted of and isolated by silicon column chromatography, for antioxidant, antibacterial and antitumor activities. Results showed that 5 fractions could fight to antioxidant activities, 2 to bacteria, and 3 to tumor cells.

(本文编辑: 张培新)