



(21) 申请号 202210730263.2

(22) 申请日 2022.06.24

(71) 申请人 长春中医药大学

地址 130117 吉林省长春市净月开发区博
硕路1035号

(72) 发明人 连文慧 许宁 庞博 李婕

幸书杨 赵贵佳 孙天霞 冯琳

(74) 专利代理机构 苏州创元专利商标事务所有

限公司 32103

专利代理师 汪青 冯尚杰

(51) Int. Cl.

A61K 36/258 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

A61K 125/00 (2006.01)

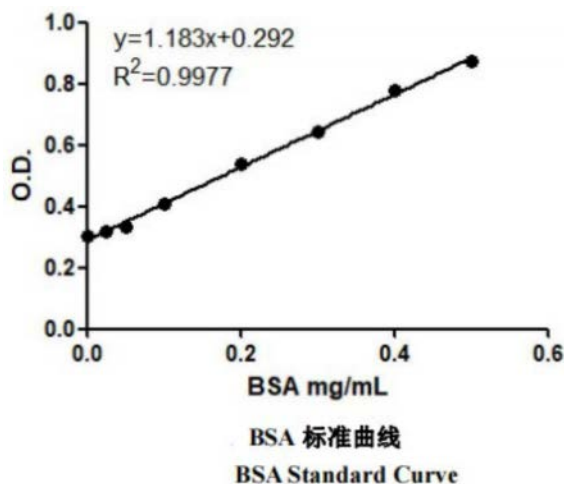
权利要求书1页 说明书8页 附图6页

(54) 发明名称

一种人参总蛋白的制备方法及其改善帕金森病的应用

(57) 摘要

本发明涉及一种人参总蛋白的制备方法及其改善帕金森病的应用,其包括以下步骤:(1)将人参干粉与水混合,调节pH值为7.0~9.0,在4℃条件下浸提4~12h,分离得到上清液和残渣;(2)将步骤(1)的残渣代替步骤(1)中的人参干粉重复步骤(1)1~3次;(3)合并步骤(1)和步骤(2)的上清液,调节pH值为3.0~5.0,在4℃条件下过夜,离心,取沉淀,加入水并调节pH值为7.0~9.0,复溶沉淀,超滤管截留超滤,取上液,冻干得到人参总蛋白。本发明能够最大化保留有效成分及有效成分群组不发生改变,方法稳定,经济环保,适合大规模工业化生产,该人参总蛋白可作为预防、缓解和治疗帕金森病的药物活性成分。



1. 一种人参总蛋白的制备方法,其特征在于,所述的制备方法包括以下步骤:

(1) 将人参干粉与8~12倍人参干粉体积的水混合,NaOH调节pH值为7.0~9.0,在4℃条件下浸提4~12h,分离得到上清液和残渣;

(2) 将步骤(1)所得的残渣代替步骤(1)中的人参干粉重复步骤(1)1~3次;

(3) 合并步骤(1)和步骤(2)中的上清液,HCl调节pH值为3.0~5.0,在2~6℃条件下过夜,低温离心,取沉淀,加入水并调节pH值为7.0~9.0,使沉淀复溶,采用超滤管截留低温超滤,取上液,冻干得到所述的人参总蛋白。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,调节步骤(1)中pH值为7.0~8.0;控制步骤(1)中浸提时间为6~10h。

3. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤(3)中加入水并调节pH值为7.0~8.0。

4. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤(3)中超滤管的截留分子量为2000~4000Da。

5. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,HCl调节步骤(3)中pH值为3.5~4.5。

6. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述的低温离心、所述的低温超滤以及提取后的分离的温度均低于25℃。

7. 由权利要求1~6中任一项所述的制备方法制备的人参总蛋白。

8. 根据权利要求7所述的人参总蛋白,其特征在于,所述的人参总蛋白中含量最高的8种蛋白为:核糖核酸酶样主要贮存蛋白、类黄素依赖型氧化还原酶FOX5、类β-淀粉酶、类乳胶蛋白、甘油醛3-磷酸脱氢酶、蛋氨酸合酶、铁氧还蛋白依赖的谷氨酸合酶1、前序列蛋白酶2。

9. 权利要求7或8所述的人参总蛋白作为活性成分在制备预防、缓解和治疗帕金森病的药物中的应用。

10. 一种用于预防、缓解和治疗帕金森病的药物,其特征在于,其包括权利要求7或8所述的人参总蛋白。

一种人参总蛋白的制备方法及其改善帕金森病的应用

技术领域

[0001] 本发明具体涉及一种人参总蛋白的制备方法及其改善帕金森病的应用。

背景技术

[0002] 人参是五加科植物人参 (*Panax ginseng* C.A.Mey) 的根及根茎, 是我国应用广泛的传统中药, 有保护神经系统、心血管系统、内分泌系统的作用。人参的活性成分复杂, 主要包括皂苷、多糖、挥发油、甾醇、有机酸、蛋白质和多肽、生物碱等。目前国内外关于人参的研究多集中于人参皂苷, 有关人参蛋白和多肽的相关研究较少。根据人参蛋白 (GP) 的性质, GP 常用的提取方法有以 Tris-HCl 溶液及 PBS 溶液为主的传统浸提法和有机试剂沉淀法。有机试剂沉淀法包括 Trizol 提取法、膜过滤法、沉淀法、快速溶剂萃取法等。目前报道的人参蛋白根据功能不同分为: 类 RNA 酶蛋白、核糖核酸酶、皂苷合成相关酶、几丁质样蛋白和木聚糖酶等, 这些蛋白与人参抗真菌、抗病毒、合成皂苷、影响细胞增殖和转录活性有关。

[0003] 随着对 GP 的研究的深入, 发现了 GP 的药理作用、抗氧化应激及老化、提升免疫的作用、耐缺氧和抗疲劳、调节血脂的作用、抗辐射的作用、有抗真菌作用、有镇痛、提高睡眠质量、改善记忆力、增强学习能力等作用。

[0004] 现有 GP 提取工艺中需使用 Tris-HCl 溶液、PBS 溶液以及有机试剂缓冲盐溶液等, 且提取液中不可避免的含有大量的小分子化合物, 对人体有毒副作用, 需要在保证蛋白活性的前提下进行繁琐的去溶剂步骤以及纯化步骤, 因此并不适合大规模工业化生产, 导致人参总蛋白制备成本高, 进而导致较高的用药成本。此外, 人参总蛋白并非单一的化合物, 具有功效的成分往往是一个大的有效成分群。复杂的提取工艺对人参总蛋白有效成分群的结构影响较大, 破坏各蛋白质活性, 且组成比发生改变, 对于同种病症的治疗效果也出现明显的差异性。

[0005] 帕金森病 (PD) 是一种进行性神经退行性疾病, 可引起运动和非运动症状。运动症状包括运动和身体任务: 震颤、僵硬、缓慢和不平衡。非运动 (nonmovement) 症状影响许多器官系统, 如胃窦和泌尿生殖系统。通常情况下, 患者可能不会主动自愿表明自己已经出现非运动症状, 因为这些症状使他们很尴尬, 导致治疗时间更多的集中在运动症状上, 也或者他们并不知道这些症状可能与帕金森病有关。被诊断为帕金森病的人通常在运动症状开始前几年会逐渐显示出非运动症状, 但通常他们不会主动提到这些症状, 除非特别询问。这些前驱非运动特征包括快速眼动睡眠行为障碍、嗅觉丧失、便秘、尿功能障碍、直立性低血压、白天过度嗜睡和抑郁。这些症状不是帕金森病的特异性, 但当它们同时发生时, 随后诊断出患有帕金森病的风险更大。快速眼动睡眠行为障碍与后续诊断出帕金森病的风险增加密切相关。超过 90% 的特发性快速眼动睡眠行为障碍的个体最终发展为突触核蛋白相关的神经退行性疾病, 通常是帕金森病或相关疾病 (痴呆伴路易体, 多系统萎缩), 初步估计有大约 30% 至 50% 的帕金森病患者有快速眼动睡眠行为障碍。一旦帕金森病的病史和体格检查特征得到证实, 临床医生排除了可能提示非典型帕金森病的特征 (“红色标志症状”), 并评估患者对左旋多巴 (或潜在的其他多巴胺能药物) 的反应, 以证实帕金森病。静息震颤的逐渐开始,

出现缓慢或广义(不是关节特异性)僵硬。仅有大约20%的帕金森病患者没有静息震颤。

[0006] 帕金森病运动交感神经的药理学治疗主要以多巴胺为基础。左旋多巴制剂、多巴胺激动剂和单胺氧化酶-B(MAO-B)抑制剂是有用的初始治疗方法。对于有明显震颤的年轻个体,抗胆碱能药物(如三羟苯基)是有用的,但由于可能发生不良事件,特别是与认知有关的不良事件,需要谨慎。有效的运动干预帕金森病包括步态和平衡训练,不同的运动方法可能有利于帕金森病的不同运动方面。跨学科治疗咨询的参考是帕金森病质量护理的重要组成部分。目前,没有药物疗法可以预防或延缓帕金森病的进展。最近的第二阶段随机临床试验高强度跑步机运动的个人新发帕金森病发现,运动功能的恶化在高强度运动组明显低于通常的护理组,需要进一步研究运动是否改变帕金森病的进展。开发能够预防、缓解和治疗帕金森病的药物一直是研究的重点和难点。

发明内容

[0007] 本发明的目的是提供一种适合工业化大规模生产的人参总蛋白的制备方法,通过该制备方法制备的人参总蛋白对人体无毒副作用,并对金森病的预防、缓解和治疗具有积极作用。

[0008] 为了达到上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0009] 一种人参总蛋白的制备方法,所述的制备方法包括以下步骤:

[0010] (1) 将人参干粉与8~12倍体积人参干粉体积的水混合,利用NaOH调节体系pH值为7.0~9.0,在4℃条件下浸提4~12h,分离得到上清液和残渣;

[0011] (2) 将步骤(1)的残渣代替步骤(1)中的人参干粉并重复步骤(1)1~3次;

[0012] (3) 合并步骤(1)和步骤(2)中的上清液,利用HCl调节pH值为3.0~3.5,在4℃条件下过夜,低温离心,取沉淀,加入水并调节pH值为7.0~9.0,使沉淀复溶,采用超滤管截留低温超滤,取上液,冻干得到所述的人参总蛋白。

[0013] 优选地,调节步骤(1)中pH值为7.0~8.0。

[0014] 优选地,控制步骤(1)中浸提时间为6~10h,例如6h、7h、8h、9h、10h。

[0015] 优选地,步骤(3)中,合并步骤(1)和步骤(2)中的上清液,调节pH值为3.5~4.5。

[0016] 优选地,步骤(3)中加入水并调节pH值为7.0~8.0。

[0017] 优选地,步骤(3)中超滤管的截留分子量为2000~4000Da,例如2000Da、2500Da、3000Da、3500Da、4000Da。

[0018] 根据一种优选的实施方式,所述的制备方法为:

[0019] 将人参干粉和人参干粉的十倍体积的已调节pH约为7.0的蒸馏水混合,调节终pH值6.5~7.5,5500~6500rpm离心25~35min,得到的上清液即为提取液,分离得到的残渣重复上述步骤,合并两次的提取液,之后将提取液调节pH至4.0以下,4℃过夜沉淀,之后离心分离上清与沉淀,重新加入适量蒸馏水并调节pH值为6.5~7.5,复溶沉淀,采用分子量为2800~3200的超滤管截留超滤,超滤管离心条件为4500~5500r/min离心25~35min,收集上液,将上液冻干即得所述的人参总蛋白。

[0020] 本发明还提供由所述的制备方法制备的人参总蛋白。

[0021] 具体地,所述的人参总蛋白中含量最高的8种蛋白为:核糖核酸酶样主要贮存蛋白、类黄素依赖型氧化还原酶FOX5、类β-淀粉酶、类乳球蛋白、甘油醛3-磷酸脱氢酶、蛋氨酸

合酶、铁氧还蛋白依赖的谷氨酸合酶1、前序列蛋白酶2。

[0022] 本发明还提供所述的人参总蛋白作为活性成分在制备预防、缓解和治疗帕金森病的药物中的应用。

[0023] 本发明还提供一种用于预防、缓解和治疗帕金森病的药物,其包括所述的人参总蛋白。

[0024] 由于采用上述技术方案,本发明与现有技术相比具有如下优点:

[0025] 通过本发明的制备方法获得的人参总蛋白可显著改善慢性PD模型小鼠的行为障碍、可显著改善小鼠脑海马体细胞分布、纹状体中间区分布、降低 α -Syn聚集、升高TH表达、减少肠组织炎症浸润以及增加肠组织杯状细胞,并且无毒副作用,可作为预防、缓解和治疗帕金森病的药物的活性成分。本发明的人参总蛋白制备方法工艺简单,无毒性,适合大规模工业化生产。

附图说明

[0026] 图1为BSA标准曲线;

[0027] 图2为纯化蛋白SDS-PAGE电泳图;

[0028] 图3显示各剂量组人参总蛋白对正常小鼠体重的影响;

[0029] 图4显示各剂量组人参总蛋白对正常小鼠海马体的影响;

[0030] 图5显示各剂量组人参总蛋白对正常小鼠纹状体的影响;

[0031] 图6显示各剂量组人参总蛋白对正常小鼠 α -Syn及TH表达的影响;

[0032] 图7显示各剂量组人参总蛋白对正常小鼠 α -Syn的IOD值;

[0033] 图8显示各剂量组人参总蛋白对正常小鼠TH的IOD值;

[0034] 图9显示各剂量组人参总蛋白对慢性PD模型小鼠悬挂绳实验的影响;

[0035] 图10显示各剂量组人参总蛋白对慢性PD模型小鼠海马体的影响;

[0036] 图11显示各剂量组人参总蛋白对慢性PD模型小鼠纹状体的影响;

[0037] 图12显示各剂量组人参总蛋白对慢性PD模型小鼠 α -Syn及TH表达的影响;

[0038] 图13显示各剂量组人参总蛋白对慢性PD模型小鼠 α -Syn的IOD值;

[0039] 图14显示各剂量组人参总蛋白对慢性PD模型小鼠TH的IOD值。

具体实施方式

[0040] 下面结合具体的实施案例对本发明的技术方案进一步描述,但本发明不只限于下面的实施例。实施例中采用的实施条件可以根据具体要求做进一步调整,未注明的实施条件通常为常规实验中的条件。

[0041] 本发明中,所使用的水均为蒸馏水。

[0042] 本发明中,所使用的人参干粉为五加科人参Panax ginseng C.A.Mey的干燥根部的粉末,粒径小于24目。

[0043] 以下实施例和对比例中,如无特殊说明,使用的仪器、原料和试剂均可通过市售获得。

[0044] 所有数据采用GraphPad Prism 5.0软件进行作图;SPSS 20.0统计软件进行统计分析处理,数据以mean $\pm$ SD表示,多组间均数比较采用One way-ANOVA方法, $P < 0.05$ 具有统

计学差异。

[0045] 人参药材(5年生晒参)购于吉林省靖宇县,经长春中医药大学中药鉴定教研室姜大成教授鉴定为五加科人参Panax ginseng C.A.Mey的干燥根部。

[0046] 实施例1

[0047] 取人参干粉10g,溶剂为蒸馏水,料液比为1:10,利用HCl及NaOH调节pH至7.0,采用4℃冷浸提取,6000rpm低温离心30min,得到的上清液即为提取液,提取后利用Bradford测定蛋白浓度,制备SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳,利用电泳对提取液进行监测,并将提取液冻干,称重计算收率。

[0048] 标准曲线的绘制:经Bradford试剂盒测定,以不含BSA的缓冲液的O.D.值作为空白对照,以蛋白浓度(单位:mg/mL)为横坐标,O.D.值为纵坐标,绘制标准曲线,结果如图1所示,标准曲线方程为 $y=1.183x+0.292$, R^2 为0.9977。

[0049] 本实施例中,提取率为29.4%,蛋白收率为3.2%。

[0050] 对比例1

[0051] 基本同实施例1,区别在于先采用4℃冷浸提取再将残渣煮沸热提。

[0052] 本对比例中,提取率为42.3%,蛋白收率为3.6%,相比实施例1,虽然提取率显著提高,但是基本都是杂质,残渣中蛋白收率仅为0.4%。

[0053] 实施例2

[0054] 取人参干粉1g,加入接近十倍体积的已调节pH值约至7.0的蒸馏水,加入人参粉末后,溶液pH值减小,随后调节pH至7.0,进行4℃冷提8h,6000rpm离心30min,得到的残渣重复上述步骤两次,共提取三次,合并提取液,制成蛋白样品,并测定蛋白浓度(测试方法同实施例1)计算蛋白质含量及冻干粉重量。

[0055] 本实施例中,蛋白质含量为24.1mg,冻干粉重量为448.2mg。

[0056] 实施例3

[0057] 取人参干粉1g,加入接近十倍体积的已调节pH值约至8.0的蒸馏水,加入人参粉末后,溶液pH值减小,随后调节pH至8.0,进行4℃冷提8h,6000rpm离心30min,得到的上清液即为提取液,分离得到的残渣重复上述步骤两次,共提取三次,合并提取液,制成蛋白样品,并测定蛋白浓度(测试方法同实施例1)计算蛋白质含量及冻干粉重量。

[0058] 本实施例中,蛋白质含量为23.9mg,冻干粉重量为469.1mg。

[0059] 对比例2

[0060] 取人参干粉1g,加入接近十倍体积的已调节pH值约至6.0的蒸馏水,加入人参粉末后,溶液pH值减小,随后调节pH至6.0,进行4℃冷提8h,6000rpm离心30min,得到的上清液即为提取液,分离得到的残渣重复上述步骤两次,共提取三次,合并提取液,制成蛋白样品,并测定蛋白浓度(测试方法同实施例1)计算蛋白质含量及冻干粉重量。

[0061] 本对比例中,蛋白质含量为18.7mg,冻干粉重量为448.2mg。

[0062] 对比例3

[0063] 取人参干粉1g,加入接近十倍体积的已调节pH值约至9.0的蒸馏水,加入人参粉末后,溶液pH值减小,随后调节pH至9.0,进行4℃冷提8h,6000rpm离心30min,得到的上清液即为提取液,分离得到的残渣重复上述步骤两次,共提取三次,合并提取液,制成蛋白样品,并测定蛋白浓度(测试方法同实施例1)计算蛋白质含量及冻干粉重量。

[0064] 本对比比例中,蛋白质含量为21.5mg,冻干粉重量为524.1mg。

[0065] 实施例4

[0066] 取人参干粉1g,加入接近十二倍体积的已调节pH值约至7.0的蒸馏水,加入人参粉末后,溶液pH值减小,随后调节pH至7.0,进行4℃冷提12h,6000rpm离心30min,得到的上清液即为提取液,分离得到的残渣重复上述步骤,共提取两次,合并提取液,制成蛋白样品,并测定蛋白浓度(测试方法同实施例1)计算蛋白质含量为25.46mg。

[0067] 实施例5

[0068] 取人参干粉1g,加入接近八倍体积的已调节pH值约至7.0的蒸馏水,加入人参粉末后,溶液pH值减小,随后调节pH至7.0,进行4℃冷提8h,6000rpm离心30min,得到的上清液即为提取液,分离得到的残渣重复上述步骤两次,共提取三次,合并提取液,制成蛋白样品,并测定蛋白浓度(测试方法同实施例1)计算蛋白质含量为26.89mg。

[0069] 实施例6

[0070] 取人参干粉1g,加入接近十倍体积的已调节pH值约至7.0的蒸馏水,加入人参粉末后,溶液pH值减小,随后调节pH至7.0,进行4℃冷提12h,6000rpm离心30min,得到的上清液即为提取液,分离得到的残渣重复上述步骤两次,共提取三次,合并提取液,制成蛋白样品,并测定蛋白浓度(测试方法同实施例1)计算蛋白质含量为28.96mg。

[0071] 实施例7

[0072] 取人参干粉1g,加入接近十二倍体积的已调节pH值约至7.0的蒸馏水,加入人参粉末后,溶液pH值减小,随后调节pH至7.0,进行4℃冷提4h,6000rpm离心30min,得到的上清液即为提取液,分离得到的残渣重复上述步骤两次,共提取三次,合并提取液,制成蛋白样品,并测定蛋白浓度(测试方法同实施例1)计算蛋白质含量为29.18mg。

[0073] 实施例8

[0074] 取人参干粉1g,加入接近十倍体积的已调节pH值约至7.0的蒸馏水,加入人参粉末后,溶液pH值减小,随后调节pH至7.0,进行4℃冷提8h,6000rpm离心30min,得到的上清液即为提取液,分离得到的残渣重复上述步骤三次,共提取四次,合并提取液,制成蛋白样品,并测定蛋白浓度(测试方法同实施例1)计算蛋白质含量为26.89mg。

[0075] 实施例9

[0076] 取人参干粉1g,加入接近十二倍体积的已调节pH值约至7.0的蒸馏水,加入人参粉末后,溶液pH值减小,随后调节pH至7.0,进行4℃冷提8h,6000rpm离心30min,得到的上清液即为提取液,分离得到的残渣重复上述步骤三次,共提取四次,合并提取液,制成蛋白样品,并测定蛋白浓度(测试方法同实施例1)计算蛋白质含量为28.44mg。

[0077] 实施例10

[0078] 取人参干粉10g,按人参干粉的十倍体积加入已调节pH约为7.0的蒸馏水后,调节终pH值7.0,6000rpm离心30min,得到的上清液即为提取液,分离得到的残渣重复上述步骤,合并两次的提取液,之后将提取液调节pH至4.0以下,4℃过夜沉淀,之后离心分离上清与沉淀,重新加入适量蒸馏水并调节pH值7.0,复溶沉淀,3000Da分子量超滤管截留超滤,超滤管离心条件为5000r/min离心30min,收集上液,冻干,称重,测试纯度,蛋白提取率为2.5%,蛋白纯度为80.80%。

[0079] 对比例4

[0080] 取人参干粉10g,按人参干粉的十倍体积加入已调节pH约为7.0的蒸馏水后,调节终pH值7.0,分离得到的上清液即为提取液,分离得到的残渣重复上述步骤,合并两次的提取液,之后将提取液调节pH至4.0以下,4℃过夜沉淀,之后离心分离上清与沉淀,重新加入适量蒸馏水调节pH值7.0,复溶,以3000Da分子量的透析袋透析,透析时间为24h,收集内液,经检测,冻干,称重,测试纯度,蛋白提取率为1.3%,蛋白纯度为67.9%。

[0081] 对比例5

[0082] 取人参干粉10g,按人参干粉的十倍体积加入已调节pH约为7.0的蒸馏水后,调节终pH值7,分离得到的上清液即为提取液,分离得到的残渣重复上述步骤,合并两次的提取液,之后将提取液调节pH至4.0以下,4℃过夜沉淀,之后离心分离上清与沉淀,重新加入适量蒸馏水调节pH值7.0,复溶,经检测,蛋白提取率为3.9%,蛋白纯度为53.3%。

[0083] 实施例11

[0084] 将实施例10的纯化后的人参蛋白样品进行SDS-PAGE电泳,结合胶内酶解和高分辨生物质谱技术,对胶条样品中的蛋白混合物进行分析,针对含量最高的9条蛋白进行切胶,分别测序,之后进行蛋白序列鉴定。纯化蛋白SDS-PAGE电泳图见图2,9条蛋白分子量及鉴定结果见表1(按照含量由高到低排列)。

[0085] 表1

电泳条带编号	分子量	蛋白名称
8	27.4 kDa	核糖核酸酶样主要贮藏蛋白 (RNase-like major storage protein)
4	59.3 kDa	类黄素依赖型氧化还原酶 FOX5 (predicted protein)
7	27.4 kDa	核糖核酸酶样主要贮藏蛋白 (RNase-like major storage protein)
5	56.3 kDa	类β-淀粉酶 (hypothetical protein)
9	16.3 kDa	类乳胶蛋白 (latex-like protein)
6	36.5 kDa	甘油醛 3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase)
3	84.7 kDa	蛋氨酸合酶 (methionine synthase)
1	176.6 kDa	铁氧还蛋白依赖的谷氨酸合酶 1 (ferredoxin-dependent glutamate synthase 1)
2	119.8 kDa	前序列蛋白酶 2 (presequence protease 2)

[0088] 表1显示,条带8和条带7为同一种蛋白,人参总蛋白中含量最高的8种蛋白为:核糖核酸酶样主要贮存蛋白、类黄素依赖型氧化还原酶FOX5、类β-淀粉酶、类乳胶蛋白、甘油醛 3-磷酸脱氢酶、蛋氨酸合酶、铁氧还蛋白依赖的谷氨酸合酶1、前序列蛋白酶2。

[0089] 实施例12

[0090] 人参总蛋白对正常C57BL/6小鼠脑组织的病理学影响

[0091] SPF级雄性C57BL/6小鼠,40只,体质量为 18 ± 2 g,由长春市亿斯实验动物技术有限责任公司提供,许可证号:SCXK(吉)2020-0002。在进行正式实验前,对小鼠进行适应性喂养

两周,将小鼠置于实验动物房间,保持室温在22℃-25℃之间,自由摄食和饮水。

[0092] 将40只小鼠随机分为空白组、人参总蛋白低、中、高剂量组,每组10只。人参总蛋白为实施例9的纯化后的人参总蛋白,人参总蛋白组给药按照2020版中国药典每人每日服用人参3-9g,以3g、6g、9g分别为低、中、高剂量组,以体表面积折算同时结合人参总蛋白的含量后人参总蛋白低、中、高剂量组给药浓度分别为以蒸馏水为溶剂16mg/kg、32mg/kg和48mg/kg。连续喂养4周,每日给药。空白对照组以同样给药方式给予等量蒸馏水。喂养过程中观察小鼠体貌特征,记录小鼠体重。

[0093] 经给药周期中对小鼠体态等进行监测,发现小鼠体态体征正常,毛色顺滑光亮。以周为节点在给药开始后将记录小鼠的体重数据进行汇总制图。结果如图3所示,与空白对照组相比,人参总蛋白低、中、高剂量组小鼠生长趋势基本一致,无明显差别,对各组相同时间点体重进行统计学分析,差异均无统计学意义。说明人参总蛋白并不会引起小鼠体重等生命指标的变化。

[0094] 待给药周期结束后,将小鼠脱颈处死。解剖其脑组织,置于固定液中,随后进行梯度脱水,石蜡包埋,切片,染色后脱水,用中性树脂胶封片,在光学显微镜下观察其海马体黑质及纹状体,拍照。对各剂量组人参总蛋白喂养的小鼠脑组织海马体进行H&E染色,结果如图4所示,经长期喂养各剂量组人参总蛋白小鼠海马CA1区锥体细胞分布均匀,细胞整齐排列,形态完整,锥体细胞顶状树突清晰可见,与空白对照组无明显差别。对各剂量组人参总蛋白喂养的小鼠脑组织纹状体进行H&E染色,结果如图5所示,纹状体细胞排列整齐,纹状质间区明显紧凑,基质间区界限清楚,与空白对照组无明显差别。

[0095] 将处死后取出的脑组织,置4%多聚甲醛固定。依次石蜡包埋切片、脱水、浸泡、冲洗;加入一抗、孵育、冲洗;加入二抗、孵育、冲洗;DAB显色、再次水洗、复染、脱水、透明、封片和观察。每张切片随机选取5个高倍视野,用Image J 6.0软件进行图像处理。获取累积光密度(IOD),进行数据分析。

[0096] 对各剂量组人参总蛋白喂养的小鼠脑组织进行免疫组化实验,结果如图6所示,各剂量组人参总蛋白对小鼠脑组织 α -Syn及TH表达无明显改变。量化IOD值结果如图7和图8所示,各组间 α -Syn及TH的表达差异均无统计学意义。

[0097] 实施例13

[0098] 人参总蛋白对C57BL/6小鼠慢性PD模型的改善作用

[0099] 将60只雄性C57BL/6小鼠随机分成6组,分别为空白对照组、模型对照组、阳性对照组和人参总蛋白低、中、高剂量组。当中除空白对照组外,其余5组小鼠分别每日腹腔注射35mg/kg MPTP,共给药4周,前两周每3天给一次药,后两周每2天给一次药。空白对照组给予相同方式相同体积的生理盐水4周后,阳性对照组灌胃给药70mg/kg的卡左双多巴缓释片,人参总蛋白各剂量组按照实施例11中给药量灌胃给药,连续给药4周。空白对照组和模型对照组给予相同给药方式相同体积的蒸馏水。取粗细适中的约80公分长的绳子分别固定两端,将小鼠平行于绳子放置在绳上倒置,纪录四爪抓握的情况,同时纪录小鼠悬挂的时间。模型对照组与空白对照组相比,有显著性差异($###P<0.01$),证明模型构建成功。

[0100] 各剂量组人参总蛋白对慢性PD模型小鼠脑组织H&E染色切片结果如图9和图10所示,结果表明,与空白对照组相比,慢性PD模型组小鼠CA1区锥体细胞混乱、松散,而阳性对照组和人参总蛋白组均可不同程度改善小鼠海马体细胞分布。与空白对照组相比,慢性PD

模型组小鼠纹状质间区稀疏,基质间区界限模糊,阳性对照组和人参总蛋白组均可改善纹状体质间区分布。各剂量组人参总蛋白对慢性PD模型小鼠肠组织H&E染色可看出,除模型对照组外,其他组小鼠肠绒毛完整,上皮细胞排列紧密,肠腺完整,无炎性细胞浸润。PAS染色可看出,其他组杯状细胞数明显多于模型对照组。

[0101] 免疫组化实验结果如图11~13所示,实验结果表明,与空白组相比,模型对照组 α -Syn表达明显增多,有显著性差异($###P<0.01$);与模型对照组相比,阳性对照组和中剂量人参总蛋白组有显著性差异($**P<0.01$),低剂量组与高剂量组人参总蛋白差异均有统计学意义($*P<0.05$)。图14显示,TH表达实验中,与空白对照组相比,模型对照组TH表达明显减少,有显著性差异($###P<0.01$);与模型对照组相比,阳性对照组有显著性差异($**P<0.01$),低、中、高各剂量组人参总蛋白差异均有统计学意义($*P<0.05$)。

[0102] 以上结果表明,通过本发明的制备方法获得的人参总蛋白无毒副作用,可显著改善慢性PD模型小鼠的行为障碍,可显著改善小鼠脑海马体细胞分布、纹状体质间区分布、降低 α -Syn聚集、升高TH表达、减少肠组织炎症浸润以及增加肠组织杯状细胞,可作为预防、缓解和治疗帕金森病的药物的活性成分。

[0103] 以上对本发明做了详尽的描述,目的在于让本领域内的技术人员了解本发明的内容并加以实施,并不能以此限制本发明的保护范围,且本发明不限于上述的实施例,凡根据本发明的精神实质所做的等效变化或修饰,都应涵盖在本发明的保护范围之内。

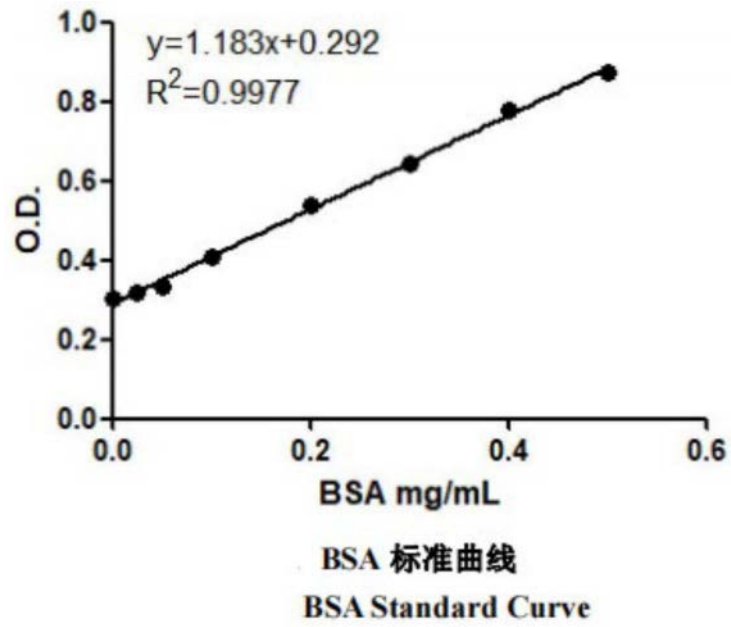


图1

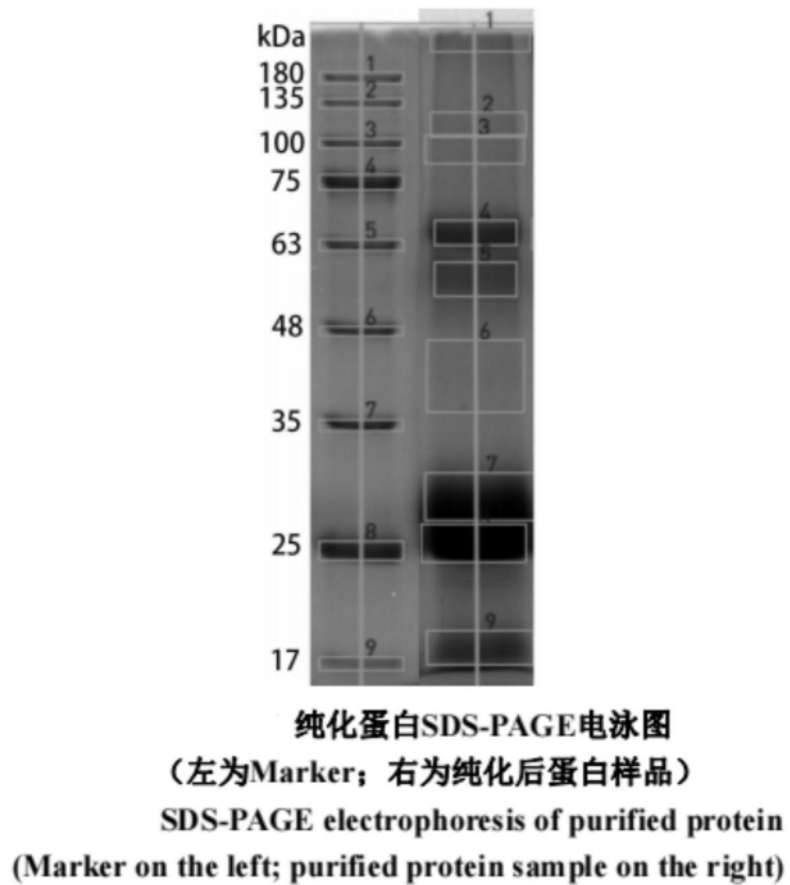


图2

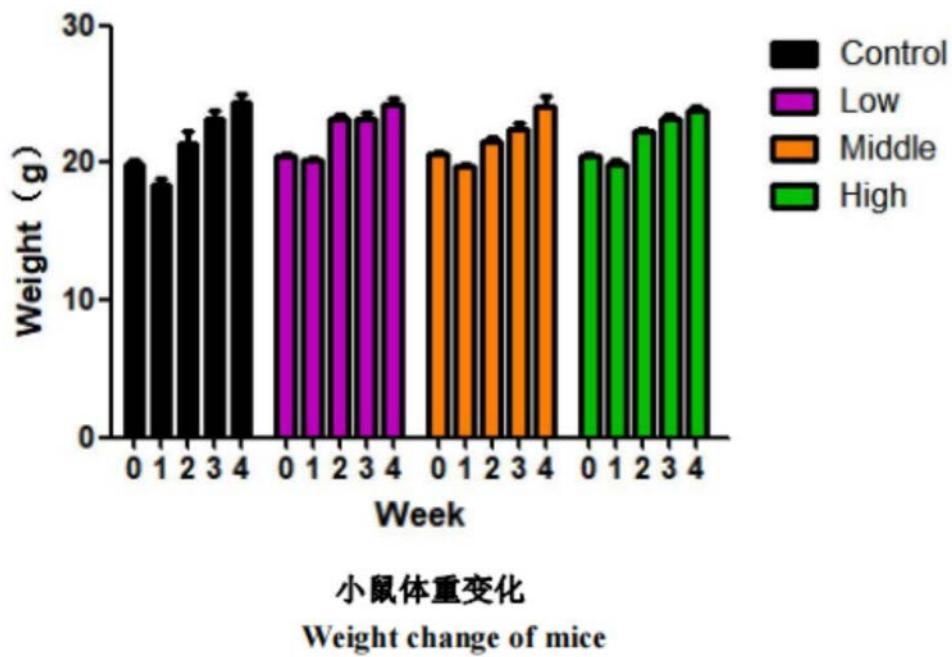


图3

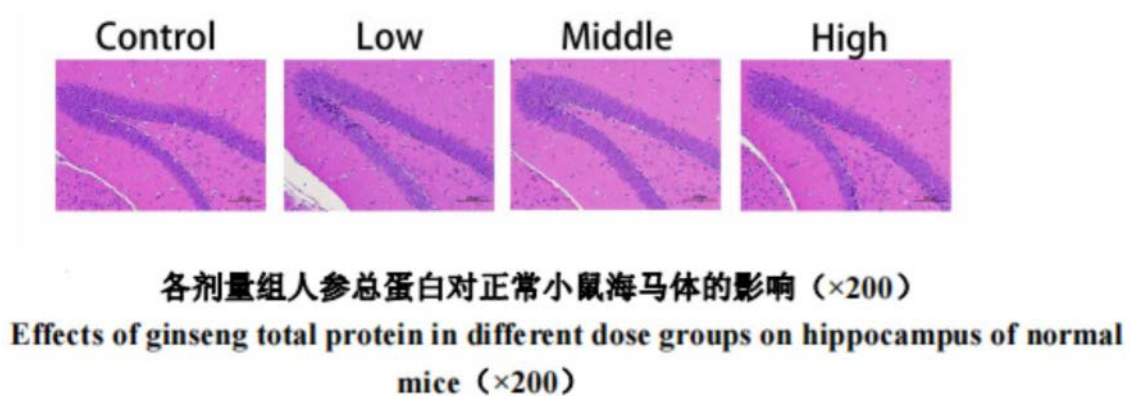


图4

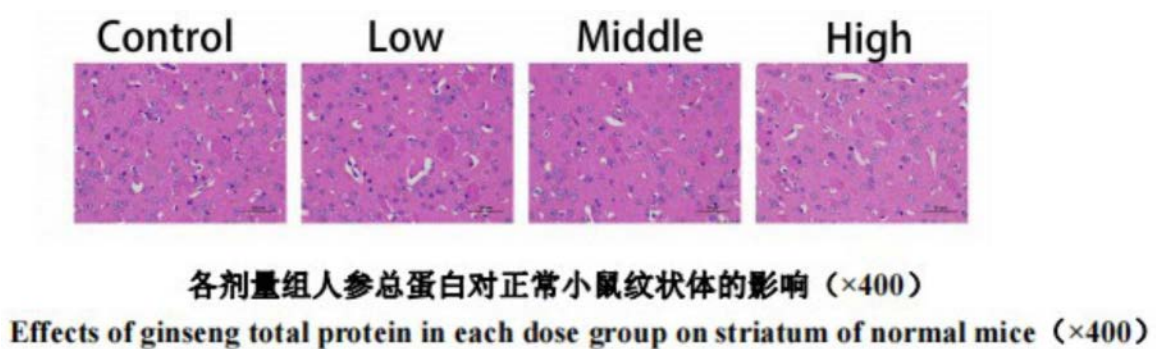
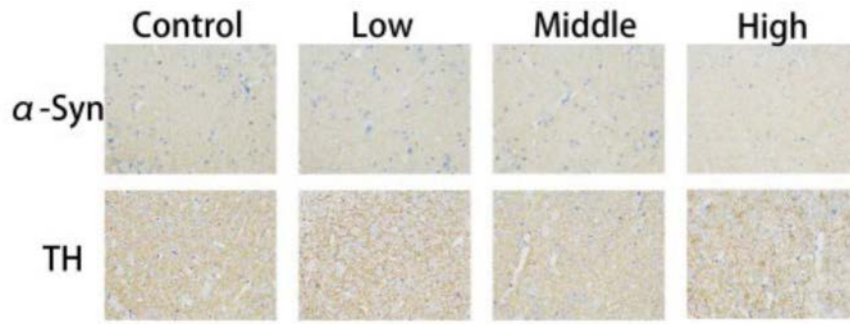


图5



各剂量组人参总蛋白对正常小鼠 α -Syn 及 TH 表达的影响 ($\times 400$)
Effects of ginseng total protein in each dose group on the expression of α -Syn and TH in normal mice ($\times 400$)

图6

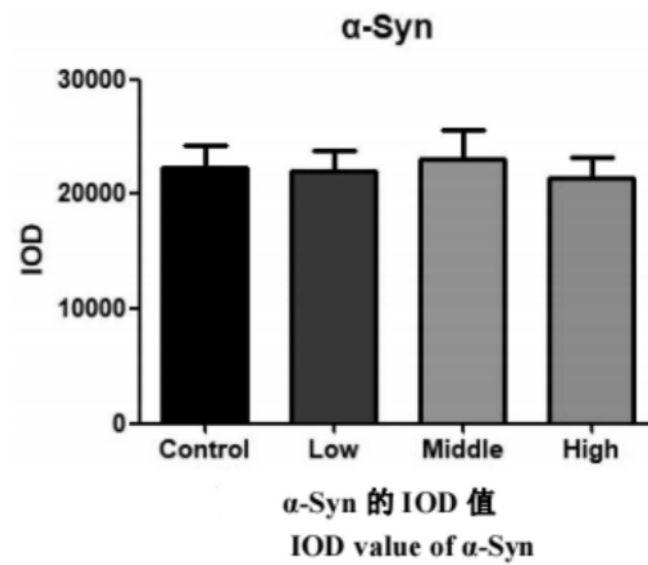


图7

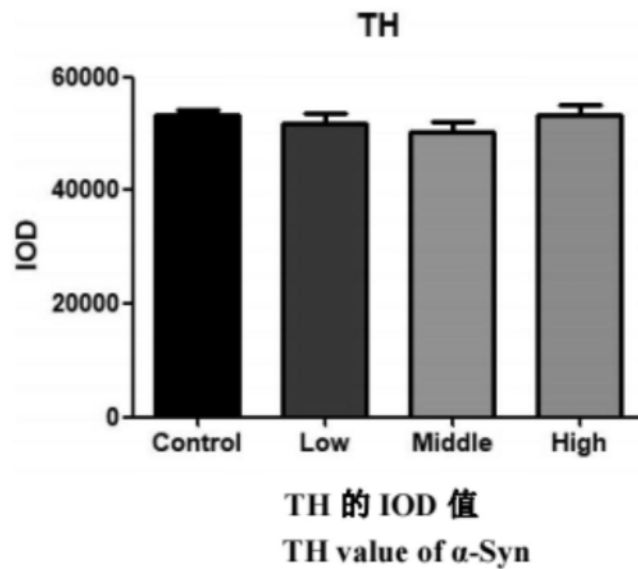
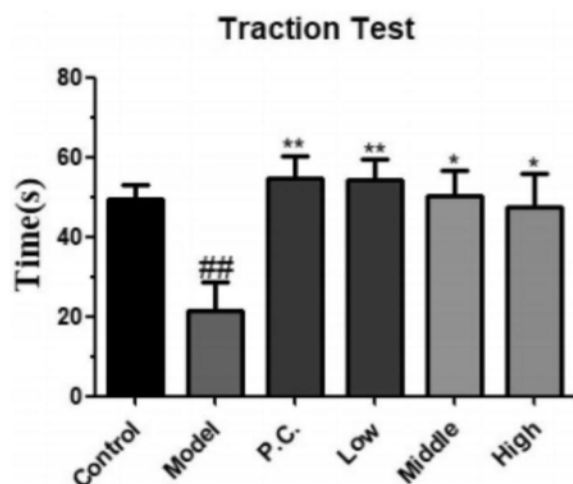
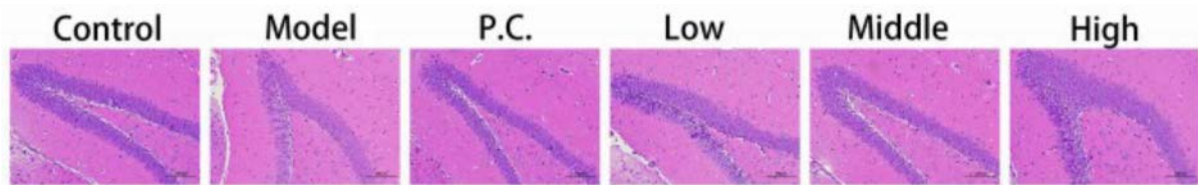


图8



各剂量组人参总蛋白对慢性 PD 模型小鼠悬挂绳实验的影响
(与空白对照组比较, ## $P < 0.01$; 与模型对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)
Effects of ginseng total protein in different dose groups on hanging rope test in chronic
PD model mice
(compared with the Control group, ## $P < 0.01$; compared with the Model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

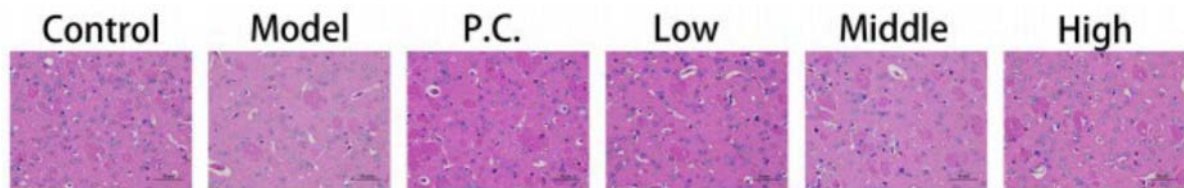
图9



各剂量组人参总蛋白对慢性 PD 模型小鼠海马体的影响 (×200)

Effects of ginseng total protein in different dose groups on hippocampus of chronic PD model mice (×200)

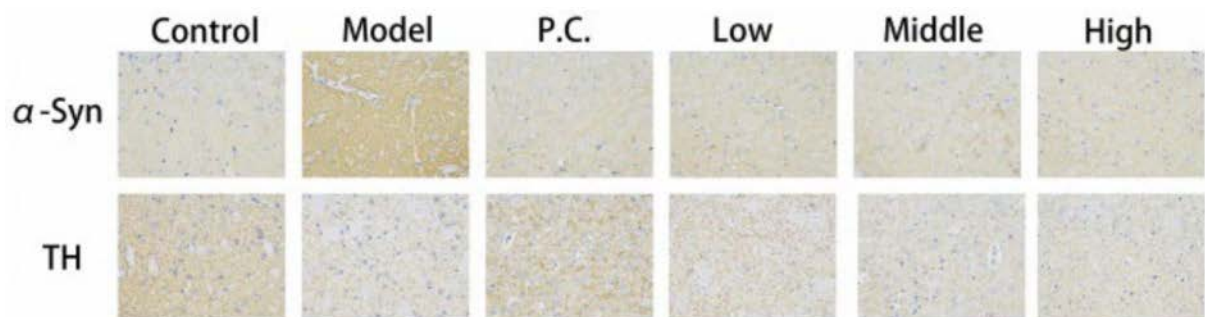
图10



各剂量组人参总蛋白对慢性 PD 模型小鼠纹状体的影响 (×400)

Effects of ginseng total protein in different dose groups on striatum of chronic PD model mice (×400)

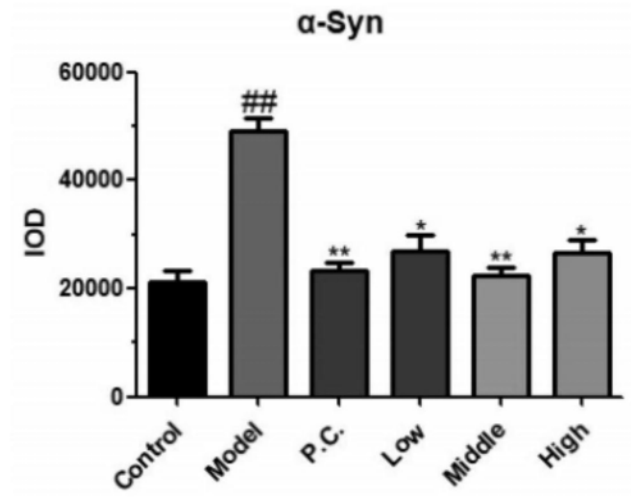
图11



各剂量组人参总蛋白对慢性 PD 模型小鼠 α -Syn 及 TH 表达的影响 (×400)

Effects of ginseng total protein in each dose group on the expression of α -Syn and TH in chronic PD model mice (×400)

图12



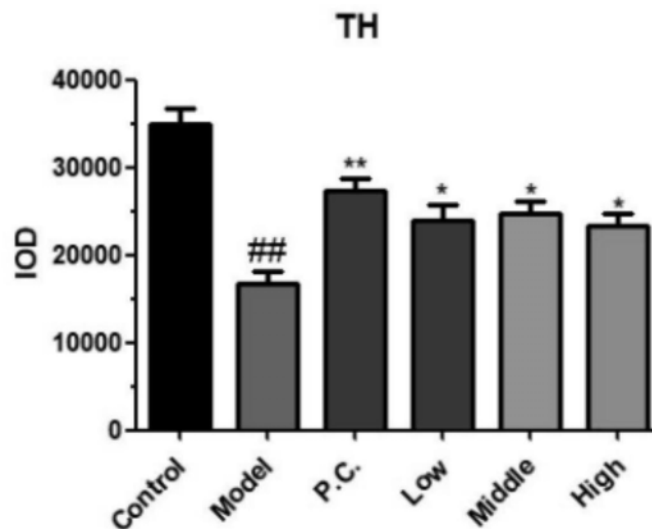
α -Syn 的 IOD 值

(与空白对照组比较, ## $P < 0.01$; 与模型对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

IOD value of α -Syn

(compared with the Control group, ## $P < 0.01$; compared with the Model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

图13



TH 的 IOD 值

(与空白对照组比较, ## $P < 0.01$; 与模型对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

IOD value of TH

(compared with the Control group, ## $P < 0.01$; compared with the Model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

图14