

半夏、掌叶半夏及禹白附凝集素蛋白的刺激性研究

刘先琼^{1,2}, 吴皓^{1*}, 郁红礼¹, 潘耀宗¹

(1. 南京中医药大学药学院, 南京 210046; 2. 湖北中医药大学药学院, 武汉 430065)

[摘要] 目的: 研究半夏凝集素(*Pinellia ternata* agglutinin, PTA), 掌叶半夏凝集素(*Pinellia pedtalsecta* agglutinin, PPA), 禹白附凝集素(*Typhonium giganteum* agglutinin, TGA) 的刺激性作用。方法: SD 雄性大鼠随机分为空白组, PTA, PPA 及 TGA 高中低剂量组(300, 200, 100 mg·L⁻¹), ip 给药, 4 h 后处死大鼠, ip 生理盐水, 取腹腔液测中性粒细胞迁移数目, 测定腹腔液中总蛋白, 一氧化氮(NO), 前列腺素 E₂(PGE₂) 的含量; 家兔随机分为空白组, 半夏, 掌叶半夏及禹白附的凝集素组及毒针晶组, 半夏, 掌叶半夏及禹白附的针晶加其凝集素组, 观察家兔眼结膜充血, 水肿及分泌物, 考察 PTA, PPA, TGA 的刺激性作用。结果: 大鼠 ip PTA, PPA, TGA 后, 与空白组腹腔液中中性粒细胞迁移数目(633.33 ± 233.81) × 10⁶/L 比较, 100 mg·L⁻¹ 组 PTA (1 083.33 ± 116.9) × 10⁶/L, PPA (1 033.3 ± 150.55) × 10⁶/L 及 TGA (1 133.33 ± 103.28) × 10⁶/L 均具极显著性差异(P < 0.01), 均可引起严重的中性粒细胞向腹腔迁移, 且浓度升高, 作用增强; 大鼠腹腔液的总蛋白, NO 及 PGE₂ 的含量显著升高, 均可加重针晶刺激家兔眼结膜强烈水肿。结论: 天南星科中具有刺激性毒性作用的半夏, 掌叶半夏及禹白附所含凝集素蛋白具有刺激性作用, 是其毒性刺激性成分。

[关键词] 半夏凝集素; 掌叶半夏凝集素; 禹白附凝集素; 刺激性作用

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)18-0244-04

Irritability of Agglutinin from *Pinellia ternata* Breit, *Pinellia pedtalsecta* Schott and *Typhonium giganteum* Engl.

LIU Xian-qiong^{1,2}, WU Hao^{1*}, YU Hong-li¹, PAN Yao-zong¹

(1. Pharmacology College of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine(TCM), Nanjing, 210046, China; 2. Hubei University of TCM, Wuhan, 430065, China)

[Abstract] **Objective:** To study the irritability of agglutinin from *P. ternate* Breit, *P. pedtalsecta* Schott and *Typhonium giganteum* Engl. **Method:** Male SD rats were designed to control group, low dose group(100 mg·L⁻¹), medium dose group(200 mg·L⁻¹) and high dose group(300 mg·L⁻¹) randomly. The control group received the same volume of saline in substitution of the lectin solution. Four hours later, rats were sacrificed and peritoneal cells harvested by washing each peritoneal cavity with saline. The irritation effect of *P. ternata* agglutinin (PTA), *P. pedtalsecta* agglutinin(PPA) and *T. giganteum* agglutinin(TGA) was observed in model of rat neutrophil migration *in vivo* by measurement of the number of neutrophils and the content of protein, NO and PGE₂ of peritoneal fluid. Rabbits were designed to control group, Raphides of *P. ternate* group, *P. pedtalsecta* group and *T. giganteum* group, PTA and Raphide of *P. ternate* group, PPA and Raphide of *P. pedtalsecta* group, TGA and Raphide of *T. giganteum* group. Conjunctival congestion of rabbit was observed. **Result:** After injection of PTA, PPA and TGA,

[收稿日期] 20110516(009)

[基金项目] 江苏省 2011 年度研究生培养创新工程; 国家自然科学基金项目(NO. 30973939); 国家“十一五”科技支撑计划课题(2006BAI09-10)

[第一作者] 刘先琼, 讲师, 硕士, 2009 级博士生, E-mail: liuxianqiong@tom.com

[通讯作者] * 吴皓, Tel: 025-86798163, E-mail: whao5795@vip.sina.com

compared with control group (633.33 ± 233.81) $\times 10^6/L$ the number of neutrophil migration in the low-dose group of PTA ($1\ 083.33 \pm 116.9$) $\times 10^6/L$, PPA ($1\ 033.3 \pm 150.55$) $\times 10^6/L$ and TGA ($1\ 133.33 \pm 103.28$) $\times 10^6/L$ was significant increased ($P < 0.01$). Neutrophil migration was induced and the content of protein, NO and PGE₂ was elevated by PTA, PPA, TGA. PTA, PPA, TGA that showed obvious irritation effects on conjunctival congestion of rabbit. **Conclusion:** Agglutinin is the irritative component from *P. ternata*, *P. pedtalsecta* and *Typhonium giganteum*.

[**Key words**] *Pinellia ternata* agglutinin (PTA); *Pinellia pedtalsecta* agglutinin (PPA); *Typhonium giganteum* agglutinin(TGA); irritant effect

天南星科的部分植物具有强烈的刺激性毒性,临床使用一般均需炮制入药。作为常用有毒中药,安全性一直倍受关注,国内外对其毒性刺激性成分众说纷云。课题组前期研究证明,天南星科有毒中药的毒针晶是其主要刺激性毒性成分^[1],毒针晶中主要含有草酸钙、蛋白和微量糖类成分^[2],而且针晶中的蛋白类成分与针晶的刺激性毒性密切相关。半夏中含有半夏凝集素^[3],掌叶半夏^[4],禹白附^[5]均含有凝集素蛋白。有报道半夏凝集素(*Pinellia ternata* agglutinin,PTA)具有抗早孕^[6]、抗虫作用^[7],掌叶半夏凝集素(*Pinellia pedtalsecta* agglutinin,PPA)具有抑制小鼠肉瘤 S180 瘤株的作用^[8],抗棉蚜和桃蚜的作用^[9],禹白附凝集素(*Typhonium giganteum* agglutinin,TGA)作为探针,探索人精细胞膜凝集素受体变化,用于避孕药的研究^[10]。关于半夏凝集素、掌叶半夏凝集素、禹白附凝集素蛋白的毒性研究未见报道,本课题对半夏、掌叶半夏及禹白附的凝集素类蛋白刺激性作用进行研究。

1 材料

1.1 仪器 AKTA purifier 蛋白液相色谱纯化系统(美国 GE 公司), BeckMan J-25 离心机(美国 BeckMan 公司), Labconco (6L) 冷冻干燥机(美国 Labconco 公司), Bayer 120 细胞分析仪, Spectra Max190 酶标仪(美国 AD 公司), PHS-3C 型酸度计(国产理达), SP-754PC 紫外-可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司)。

1.2 试剂 Thermo 蛋白含量检测试剂盒(批号 LL152118),一氧化氮(NO)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 20110303),透析袋(7000, BIOSHARP, Lot: 2011/08),肝素钠(12 500 U/0.3 g,常州千红生化制药),其他试剂均为国产分析纯。所有溶液均用去离子水配制。

1.3 药物 半夏鲜品采自江苏省泰州高港半夏

GAP 基地,掌叶半夏鲜品及禹白附鲜品均购自河南禹州,经本校中药鉴定教研室王春根教授鉴定半夏为天南星科半夏属植物三叶半夏 *Pinellia ternata* (Thunb) Breit 的新鲜块茎,掌叶半夏为天南星科半夏属植物掌叶半夏 *Pinellia pedtalsecta* Schott 的新鲜块茎,禹白附为天南星科植物独角莲 *Typhonium giganteum* Engl. 的新鲜块茎。

1.4 动物 SD 大鼠,雄性,体质量(200 ± 20)g,上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,许可证号 SCXK(沪)2007-0005。大耳白种家兔,雌雄不拘,体质量(2 ± 0.5)kg 健康,双眼无红肿,由南京中医药大学实验动物中心提供,许可证号 SCXK(苏)2007-0008。

2 方法

2.1 PTA,PPA,TGA 的提取分离纯化^[9]

2.1.1 粗提液的制备 将新鲜半夏、掌叶半夏、禹白附块茎 50 g 洗净加去离子水 100 mL,匀浆捣碎,冷冻离心($4\ 000\ r \cdot \min^{-1}$, 30 min)取上清液,加饱和硫酸铵至 40% 饱和度,离心取沉淀,得半夏、掌叶半夏及禹白附蛋白粗提产物。

2.1.2 PTA,PPA,TGA 分离纯化 将蛋白粗提物加 20 mL $0.6\ mol \cdot L^{-1}$ 的硫酸铵溶液(pH 7.0)溶解, $12\ 000\ r \cdot \min^{-1}$ 高速离心后经 HiPrep™ Phenyl FF (High sub) 疏水柱层析,以 $0.6\ mol \cdot L^{-1}$ 的硫酸铵溶液梯度洗脱,主峰收集液经 Hitrap™ Q FF 离子交换柱层析,以 $1\ mol \cdot L^{-1}$ 的氯化钠溶液,线性梯度洗脱,收集主峰脱盐,透析,冷冻干燥,得到 PPA,PTA,TGA 白色粉末于 $-80\ ^\circ C$ 保存备用。

2.2 凝集素对大鼠中性粒细胞向腹腔迁移的影响^[11]

2.2.1 样品制备 精密称取 PTA,PPA,TGA 适量加生理盐水,采用 BCA 法测定蛋白含量,加生理盐水配制成蛋白含量为 100,200,300 $mg \cdot L^{-1}$ 的溶液,

生理盐水作空白。

2.2.2 分组与给药 大鼠随机分成 10 组, 每组 10 只, 分别为空白组, PTA, PPA 及 TGA 凝集素低中高剂量组(100, 200, 300 mg·L⁻¹), 分别 ip 不同浓度的 PTA, PPA 及 TGA 1 mL, 空白组 ip 相同体积的生理盐水, 4 h 后处死, ip 10 mL 生理盐水(含肝素钠 8 U·mL⁻¹), 轻揉大鼠腹部 2~3 min, 使大鼠体倾向一侧, 用注射器抽取腹腔液, 采用 Bayer 120 全自动血球分析仪对白细胞分类计数。计算中性粒细胞数。

2.2.3 对大鼠腹腔液总蛋白及 NO 含量的影响 取 2.2.2 项的大鼠腹腔液, 采用 BCA 法测定其总蛋白含量, 按一氧化氮试剂盒方法(硝酸还原酶法)测定大鼠腹腔液中 NO 含量。

2.2.4 对大鼠腹腔液 PGE₂ 含量的影响^[12] 取 2.2.2 项下的腹腔液于 3 500 r·min⁻¹ 离心 10 min, 精密量取 1 mL 上清液, 加入 1 mL 氢氧化钾甲醇溶液(0.5 mol·L⁻¹), 混匀, 于 50 °C 水浴 20 min 异构化, 取混合溶液 1 mL 加 4 mL 甲醇稀释摇匀。以 0.5 mol·L⁻¹ 氢氧化钾甲醇溶液作为空白对照, 于波长 278 nm 处测定其吸光度(A), 以 A 表示 PGE₂ 含量。

2.3 PTA, PPA, TGA 与针晶对家兔眼结膜刺激性试验

2.3.1 半夏针晶样品制备 掌叶半夏针晶组, 禹白附针晶组: 提取半夏、掌叶半夏及禹白附的毒针晶^[13]一定量, 加生理盐水配制成含针晶 10 g·L⁻¹ 的混悬液。

2.3.2 凝集素组样品制备 PTA, PPA, TGA 一定量, 加生理盐水配制成含凝集素 200 mg·L⁻¹ 的混悬液。

2.3.3 针晶 + 凝集素组样品制备 含 PTA, PPA, TGA 蛋白为 200 mg·L⁻¹ 的生理盐水溶液, 加针晶配制成含针晶为 10g·L⁻¹ 的混悬液。

2.3.4 分组给药与检测 家兔随机分组, 固定于兔笼内, 试验时翻起上下眼睑, 使成杯状, 将药液分滴到兔的左右眼中, 每组样品用兔眼 6 只, 每只眼给药 50 μL。给药后, 轻轻使上下眼睑被动闭合 5~10 s, 使药液和眼充分接触, 2 min 后立即用 4~5 mL 生理盐水冲洗眼睛至眼中无任何异物, 观察 1.5 h 时兔眼情况, 并拍照记录家兔眼的刺激反应情况, 以生理盐水作空白, 按照文献^[13]的眼刺激评分标准。

3 结果

3.1 对中性粒细胞向腹腔迁移的影响 从半夏、掌

叶半夏及禹白附块茎中提取分离纯化分别得到的 PTA, PPA, TGA 凝集素蛋白可引起严重的中性粒细胞向腹腔的迁移, 与空白组比较均呈极显著性差异($P < 0.01$), 半夏与掌叶半夏同属天南星科半夏属植物, 其凝集素诱导中性粒细胞向腹腔迁移的结果一致, 即 PTA 与 PPA 在一定范围内(100 mg·L⁻¹ ~ 200 mg·L⁻¹) 随着凝集素浓度升高, 促进中性粒细胞迁移的作用增强, 当凝集素浓度达到一定范围(> 200 mg·L⁻¹), 其促进中性粒细胞向腹腔迁移的作用降低, 可能是这种蛋白高剂量的浓度引起全身效应^[11]。在一定浓度范围内(100 mg·L⁻¹ ~ 300 mg·L⁻¹), 禹白附凝集素随浓度的升高, 其促进中性粒细胞向腹腔迁移的作用呈线性增强, 可能与禹白附毒性表现缓慢持久有关^[14]。见表 1。

表 1 PTA, PPA, TGA 不同浓度 ip 对大鼠中性粒细胞向腹腔迁移的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/μg/只	中性粒细胞/ $\times 10^6 \cdot L^{-1}$
空白	0	633.33 ± 233.81
PTA	100	1 083.33 ± 116.9 ²⁾
	200	2 116.67 ± 160.21 ²⁾
	300	1 550.00 ± 104.88 ²⁾
PPA	100	1 033.3 ± 150.55 ²⁾
	200	1 833.3 ± 121.11 ²⁾
	300	1 000.00 ± 141.42 ²⁾
TGA	100	1 133.33 ± 103.28 ²⁾
	200	1 783.33 ± 354.49 ²⁾
	300	2 116.67 ± 147.19 ²⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.2 对大鼠腹腔液总蛋白, NO 及 PGE₂ 含量的影响 大鼠 ip PTA, PPA, TGA 后, 可促进中性粒细胞迁移从而导致炎症反应发生, 腹腔液中总蛋白及炎症介质 NO 和 PGE₂ 的含量升高, 与空白组比较呈极显著性差异($P < 0.01$), 表明 PTA, PPA, TGA 均可引起炎症反应。见表 2。

3.3 PTA, PPA, TGA 与针晶对家兔眼结膜刺激性试验 与空白组比较, 针晶组以及针晶加凝集素组具有显著性差异, 与针晶组比较, 针晶加凝集素后具有显著性差异, 表明凝集素可增强毒针晶所致家兔眼结膜强烈水肿, 而单独使用凝集素未见明显刺激性, 说明毒针晶的刺激性毒性可能是针晶的机械刺入与毒针晶中凝集素蛋白的双重作用。见表 3。

表2 PTA,PPA,TGA 不同浓度 ip 对大鼠腹腔液总蛋白, NO 及 PGE₂ 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /μg/只	总蛋白含量 /g·L ⁻¹	NO		PGE ₂	
			/μmol·L ⁻¹	/A	/A	/A
空白	0	1.499 ± 0.277	8.595 ± 0.722	0.624 ± 0.055		
PTA	100	1.883 ± 0.146 ²⁾	11.889 ± 0.62 ²⁾	1.014 ± 0.043 ²⁾		
	200	3.954 ± 0.524 ²⁾	13.833 ± 0.537 ²⁾	1.589 ± 0.039 ²⁾		
PPA	100	1.988 ± 0.128 ²⁾	12.773 ± 0.408 ²⁾	1.108 ± 0.086 ²⁾		
	200	4.802 ± 0.523 ²⁾	14.507 ± 0.539 ²⁾	1.654 ± 0.072 ²⁾		
TGA	100	1.8432 ± 0.264 ¹⁾	11.830 ± 0.781 ²⁾	1.032 ± 0.046 ²⁾		
	200	3.937 ± 0.547 ²⁾	13.673 ± 0.538 ²⁾	1.555 ± 0.067 ²⁾		

表3 PTA,PPA,TGA 与针晶对家兔眼结膜刺激性得分($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/μg	得分			平均得分
		充血	水肿	分泌物	
空白	生理盐水	0	0	0	0 ± 0
PTA	10	0	0	0	0
半夏针晶	500	6	27	6	6.5 ± 0.5 ¹⁾
半夏针晶 + PTA	500 + 10	12	33	12	9.5 ± 0.5 ¹⁾
PPA	10	0	0	0	0
掌叶半夏针晶	500	7	29	8	7.3 ± 0.5 ¹⁾
掌叶半夏针晶 + PPA	500 + 10	10	40	10	10 ± 0 ¹⁾
TGA	10	0	0	0	0
禹白附针晶	500	6	27	6	6.5 ± 0.5 ¹⁾
禹白附针晶 + TGA	500 + 10	7	36	9	8.7 ± 0.5 ¹⁾

注:与空白组及 PTA,PPA,TGA 组比较¹⁾P < 0.01。

4 讨论

急性炎症反应发生会导致白细胞募集,使白细胞快速地、部位导向地到达损伤部位,在细胞迁移过程中会有炎症介质如 NO, PGE₂ 等介导或放大这些反应。致炎物可诱导或增加局部 NO 的合成和释放,环氧酶经过催化生成稳定的 PGE₂,促进炎症反应,使血管扩张、水肿及产生细胞毒性等炎症反应。本研究证明以白细胞游走为主要特征的炎症模型,天南星科部分有毒药物半夏、掌叶半夏及禹白附凝集素可诱导大鼠腹腔中性粒细胞迁移,引起炎症反应,使腹腔液中的总蛋白含量及炎症因子 NO 和 PGE₂ 含量显著性增加,说明天南星科部分具刺激性毒性的中药的凝集素具有刺激性作用。

通过家兔眼刺激性试验表明,凝集素对家兔眼本身不具刺激作用,可通过针晶的刺入而加重家兔眼结膜强烈水肿,推断天南星科的毒针晶的毒性刺激性作用是针晶的机械刺激与凝集素蛋白的协同作用。通过大鼠腹腔炎症模型试验,测定腹腔液中性粒细胞迁移、总蛋白含量及炎症因子 NO 和 PGE₂ 的

含量,凝集素可加重毒针晶刺激家兔眼强烈水肿,证明凝集素蛋白是半夏、掌叶半夏及禹白附等天南星科植物的共性刺激性物质之一。关于半夏、掌叶半夏、禹白附等的凝集素蛋白刺激性作用机制正在进行中。

[参考文献]

- [1] 吴皓,葛秀允,郁红礼,等.天南星科4种有毒中药针晶的晶型结构和其毒性的比较[J].中国中药杂志,2010,35(9):1152.
- [2] 葛秀允,吴皓.天南星科有毒中药毒针晶的组成成分分析[J].药物分析杂志,2010,30(2):190.
- [3] 王克夷,郭猛.半夏凝集素的分离纯化和在植物中的分布[J].生物化学杂志,1993,9(5):544.
- [4] 孙光星,丁声颂,钱瑶君.掌叶半夏凝集素A的分离纯化及分析[J].上海医科大学学报,1995,22(4):299.
- [5] 肖智雄.白附子凝集素的亲和纯化及其理化性质的研究[J].四川大学学报,1986,4,135.
- [6] 陶宗晋,徐琴钰,吴克佐,等.半夏蛋白的分离、结晶、生物活力和一些化学性质[J].生物化学与生物物理学报,1981,13(1):77.
- [7] 张红宇,吴先军,唐克轩,等.半夏凝集素基因导入水稻及其表达的初步研究[J].遗传学报,2003,30(11):1013.
- [8] 孙光星,丁声颂,钱瑶君,等.掌叶半夏总蛋白的提取、化学分析和对小鼠S180瘤株的抑制作用[J].上海医科大学学报,1992,19(1):17.
- [9] 潘映红,张淑香,曹景萍,等.掌叶半夏凝集素的分离纯化及抗蚜活性研究[J],自然科学进展,1998,8(4):502-505.
- [10] 肖智雄.人精细胞膜表面白附子凝集素受体的研究[J].四川大学学报,1987,24(3):329.
- [11] Veruska B. M. Alencar a, Nylane M. N. Alencar a, Ana M. S. Assreuy b, et al. Pro-inflammatory effect of Arum maculatum lectin and role of resident cells, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2005,37, 1805.
- [12] 吴勇杰,李新芳,何琳,等.甘草次酸钠的抗炎作用机理.中国药理学通报,1991,7(1):46
- [13] 吴皓,钟凌云.天南星科有毒中药刺激性作用比较研究[J].中国中药杂志,2008,33(4):80.
- [14] 吴连英,全燕,程丽萍,等.关白附、禹白附抗炎及毒性比较研究[J].中国中药杂志.1991.16(10):595.

[责任编辑 聂淑琴]