

尖尾芋凝集素的纯化及性质研究

侯学文¹ 吴伯良² 曾仲奎³ 郭勇¹

(1 华南理工大学生物工程系, 广州 510641; 2 暨南大学生物工程系; 3 四川联合大学生物系)

摘要 报道了从天南星科植物尖尾芋(*Alocasia eucullata* (Dour) Schott) 中分离出了一种凝集素(简称 AEL). AEL 对兔血有较强的凝集效果, 而对各型人血没有凝集作用; 在 3 种糖蛋白中, 粘液素胃粘蛋白对 AEL 的凝血活力抑制较强; AEL 对培养人外周血白细胞的转化率高达 88%, 超过对照 PHA 的转化率; 用 Sephadex G-200 柱(94 cm×1.6 cm)测得 AEL 的相对分子质量为 36 600; 用癌细胞体外培养的方法证明了 AEL 对肺腺癌细胞株 P18 没有直接杀伤能力. 此外, 还探讨了各种 pH、温度、变性剂等理化因子对 AEL 凝血活力的影响.

关键词 尖尾芋; 凝集素; 抗癌试验

中图分类号 Q 513.2

凝集素是多价的、非免疫来源的糖结合蛋白(Goldstein et al, 1980). 它能选择性地结合细胞表面的糖链, 从而导致细胞的凝聚. 虽然凝集素的生理功能尚待阐明, 但由于凝集素所具有的糖结合专一性、促有丝分裂活性、凝集恶变细胞能力、细胞毒特性等, 已使其在生物化学、免疫学、组织化学、临床诊断与治疗等方面发挥了广泛的作用(Allison, 1986).

尖尾芋(*Alocasia eucullata* (Dour) Schott) 是生长在我国南方的多年生常绿草本植物. 中草药中常作狼毒使用, 用于消肿散结(江苏新医学院, 1977). 本文从该植物中分离得到了一种凝集素 AEL, 并对它的部份物化性质及其对癌细胞的细胞毒展开了研究.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

尖尾芋采自野外并经暨南大学生物工程系吴伯良教授鉴定; Sephadex G-100, Sephadex G-200 为 Pharmacia 产品; 分子量标准蛋白为上海东风生化试剂厂产品; RPMI1640 为 Sigma 产品; 肺腺癌细胞株 P18 得自暨南大学医学院, 其余试剂均为分析纯.

1.2 尖尾芋凝集素的提取

将尖尾芋根剪碎后, 再经高速组织捣碎机打碎, 加入生理盐水浸提过夜, 共 3 次. 合并浸提液, 按 0%~30%, 30%~60%, 60%~90% (NH₄)₂SO₄ 分段盐析, 在 4℃, 5 000 r/min 离心 20 min 获得盐析沉淀, 将各段盐析沉淀分别溶于蒸馏水, 并装入透析袋对蒸馏水透析以除尽 (NH₄)₂SO₄, 经冷冻干燥得分段盐析粗品. 将 30%~60% 盐析物 200 mg 溶于 10 mL 生理盐水, 经 Sephadex G-100 柱层析(100 cm×2.6 cm), 以生理盐水洗脱, 流速为 0.5 mL/min, 分部收集 3 mL/管并检测 A₂₈₀, 共出现 4 个蛋白峰, 其中第 3 峰为活性峰, 收集 105~130 管, 共 90 mL, 将收集峰透析去盐, 冷冻干燥后得尖尾芋凝集素(AEL)部分纯化样品.

1.3 凝集素 AEL 的活力测定

按孙册等(1986)的方法, 活力单位定义为发生凝血作用的最低滴度的倒数为每毫克蛋白所含有的活力单位.

1.4 血型专一型检验

采用 2 倍系列稀释法(曾仲奎等, 1991).

1.5 寡糖的抑制作用

将 N-乙酰葡萄糖胺等 17 种寡糖分别配成 80 mmol/L, 然后按孙册等(1986)的方法进行糖抑制试验.

1.6 糖蛋白的抑制试验

分别把猪甲状腺球蛋白, 鸡卵类粘蛋白, 粘液素胃粘蛋白配成质量浓度为 10 g/L, 按孙册等的方法进行.

1.7 凝胶过滤法测定相对分子质量

采用 Sephadex G-200(94 cm×1.6 cm)层析柱, 按林卓坤等(1982)的方法进行.

1.8 促有丝分裂活性

采用健康人外周血白细胞, 按 Brown 等(1976)的方法进行, 以 PHA 为对照.

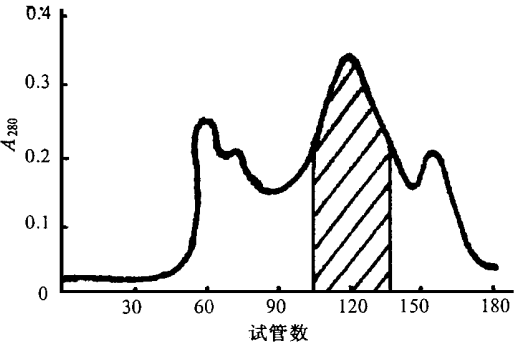
1.9 对培养癌细胞的直接杀伤活力(Avichezer et al, 1991)

采用肺腺癌细胞株 P18, 癌细胞经传代培养 1 d 后, 挑选细胞长势良好的培养瓶, 分别加入 AOL 至 4.2 g/L, 对照仅加入相应量的生理盐水.

2 结果与讨论

2.1 尖尾芋凝集素 AEL 的纯化

以 100 g 尖尾芋的根投料计, 经 3 步纯化后, 纯化倍数为 8 倍, 活力回收为 51.2%, 见表 1. 凝血活力主要存在于 30% ~ 60% (NH₄)₂SO₄ 盐析段中, 从尖尾芋粗蛋白的凝胶过滤图谱(图 1)来看, 尖尾芋根中富集了大量的 AEL.



阴影部分为活性峰(AEL)

图 1 尖尾芋粗提物的凝胶过滤图谱

表 1 从尖尾芋根中纯化 AEL 的结果

步骤	蛋白干粉/g	比活力/(U·g ⁻¹)	总活力/U	纯化倍数	产率(%)
生理盐水浸提	2.564	64 000	164 094	1	100
30% ~ 60% (NH ₄) ₂ SO ₄ 盐析	0.428	256 000	109 568	4	66.8
凝胶过滤	0.082	1 024 000	83 968	8	51.2

2.2 血型专一性试验

结果表明 AEL 对兔血具有相当高的凝血活力, 即在 AEL 为 0.9 mg·L⁻¹时就发生明显凝集. 而在高达 1 g/L 的浓度下, AEL 对人 A, B, O 3 种血型均无凝集作用, 这表明兔血球与人血球上的糖链有相当大的差异. 在凝血活力测定时, 以发生凝血作用的凝集素的最低浓度表示.

数值越小,表示凝集素的活力越高,以下的表示方法与此相同.所用的凝集素均为经凝胶过滤后的样品,活力单位为每蛋白含 1 024 000 U.鉴于此,以下各项试验均以免血为供试血球.

2.3 糖抑制试验

在所供试的 17 种单、双糖中,除了蜜二糖抑制作用稍强外,其余均为较弱或没有抑制作用(表 2),表明 AEL 可能属于仅对寡聚糖类作用的凝集素类.

表 2 寡糖对 AEL 凝血活力的抑制作用

寡糖	$\rho_{\text{AEL}}/(\text{mg}^{\circ}\text{L}^{-1})$	寡糖	$\rho_{\text{AEL}}/(\text{mg}^{\circ}\text{L}^{-1})$
N-乙酰葡萄糖胺	3.7	L-山梨糖	3.7
6-脱氧半乳糖	3.7	乳糖	0.9
D-甘露糖	1.8	麦芽糖	0.9
葡萄糖	0.9	D-半乳糖	0.9
棉子糖	7.5	鼠李糖	1.8
D-树胶酯糖	1.8	纤维二糖	0.9
N-乙酰半乳糖胺	1.8	蕈糖	3.7
蜜二糖	15.5	蔗糖	1.8
D-果糖	0.9	对照	0.9

2.4 糖蛋白的抑制作用

在所采用的 3 种糖蛋白中,猪甲状腺球蛋白(PTG)与猪胃粘蛋白对 AEL 的凝血活力抑制作用较强,而鸡卵粘蛋白的抑制作用较弱(见表 3).表明猪甲状腺球蛋白和猪胃粘蛋白上有可被 AEL 识别的糖链结构,故可将二者作为亲和层析的配基来纯化 AEL.

表 3 糖蛋白对 AEL 凝血活力的抑制作用

糖蛋白	猪甲状腺球蛋白	鸡卵粘蛋白	猪胃粘蛋白	对照
$\rho_{\text{AEL}}/(\text{g}^{\circ}\text{L}^{-1})$	250	7.8	500	0.9

2.5 AEL 的热稳定性

将 1 g/L 的 AEL 的分别在 20、40、60、80、100℃水浴保温 10 min,然后用 2%的兔血检查 AEL 的活力(Datta et al, 1991).结果表明,随着温度的升高,AEL 的活力逐渐降低,特别在 60℃保温 10 min 后,AEL 的活力出现较大损失,表明其热稳定性较差,仅在 40℃的范围内稳定(见表 4).

表 4 AEL 的温度稳定性

$t/^{\circ}\text{C}$	20	40	60	80	100
$\rho_{\text{AEL}}/(\text{g}^{\circ}\text{L}^{-1})$	0.9	0.9	125	250	—

2.6 AEL 的酸碱稳定性

将 1 g/L 的 AEL 分别在 0.1 mol/L 的磷酸氢二钠—柠檬酸缓冲液(pH 3~7)、0.1 mol/L 的磷酸氢二钠—磷酸二氢钾(pH 7~8)、0.1 mol/L 的碳酸钠—碳酸氢钠(pH 10)的 pH 梯度处理过夜,次日调 pH 至 7,然后用体积分数为 2%的兔血检查 AEL 的活力(Datta et al, 1991).结果表明(见表 5)AEL 较耐碱而不耐酸,特别是在 pH 5~6 之间活力出现剧烈变化.

表 5 AEL 的酸碱稳定性

pH	3	4	5	6	7	8	9	10
$\rho_{\text{AEL}}/(\text{g}^{\circ}\text{L}^{-1})$	125	125	62.5	0.9	0.9	0.9	0.9	3.9

2.7 AEL 对变性剂的稳定性

将盐酸胍和脲配制成以下各种浓度, 把 1 g/L 的 AEL 在此浓度下处理过夜, 然后用体积分数为 2% 的兔血检查 AEL 的活力. 实验结果表明 (见表 6), 随着温变性剂浓度的提高, AEL 的活力损失不大, 表明 AEL 对变性剂有良好的耐受性, 提示在亲和层析中, 如果没有很好的洗脱配体, 可以考虑采用变性剂洗脱.

表 6 AEL 对变性剂的稳定性

试剂	盐酸胍					脲				
$C_{\text{变性剂}}/(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	0.25	0.50	1.0	2.0		0.50	1.0	2.0	3.0	6.0
$\rho_{\text{AEL}}/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	3.9	3.9	7.8	15.6		0.9	0.9	3.9	3.9	62.5

2.8 凝胶过滤法测定相对分子质量

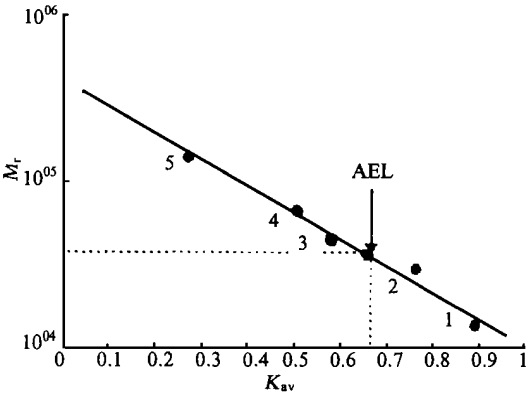
在 Sephadex G-200 (94 cm×1.6 cm) 上利用 5 种标准蛋白求出 $\lg M_r$ 与有效分配系数 (K_{av}) 的关系式: $K_{av} = 3.5227 - 0.6278 \lg M_r$, $r = 0.9898$. 在同样的层析条件下, 经实验得出 AEL 的 $K_{av} = 0.657$, 代入上式得相对分子质量为 36 600 (见表 7).

2.9 AEL 的促有丝分裂活性

结果表明 (见表 7) AEL 是一个比 PHA 还强的促有丝分裂原, 提示 AEL 可能在免疫学研究中有较好的应用前景.

2.10 AEL 对肺腺癌细胞株 P18 的直接杀伤活力

AEL 在所试验的两种浓度梯度, 均未表现出对肺腺癌细胞株 P18 的直接杀伤能力, 但这也不能排除 AEL 可能具有间接抗癌活性, 特别是当我们注意到 AEL 对人外周血白细胞的极高的转化率时, 更应考虑到这种可能性的存在, 因为 AEL 可能通过强化机体的免疫功能而间接地起到抗癌作用. 这一点可以通过在加入 AEL 时, 用癌细胞和脾细胞的共同培养来予以阐明 (Avichezer et al, 1991).



标准蛋白: 1. 乳酸脱氢酶(14 000) 2. 牛血清白蛋白(67 000) 3. 卵白蛋白(45 000) 4. 碳酸酐酶(30 000) 5. 核糖核酸酶(13 700)

图 2 凝胶过滤法测定相对分子质量

表 7 AEL 的促有丝分裂活性

凝集素	转化细胞数	分裂细胞数	总细胞数	转化率(%)	分裂率(%)
PHA(CK)	1 948	15	2 572	75.74	0.583
AEL	1 530	13	1 739	87.98	0.747

3 讨论

从尖尾芋的根中分离出了一种对兔红细胞具有高度凝集活性的凝集素 AEL, 将 AEL 初步纯化后, 对 AEL 的多种理化性质进行了研究. 表明这是一种热稳定性较差, 但对变性剂脲及盐酸胍、碱性环境比较稳定的一种活性蛋白质. 猪胃粘蛋白对 AEL 的凝血活力抑制最强, 表明猪胃粘蛋白上有 AEL 的识别糖链. 故可将猪胃粘蛋白与活化的 Sepharose-4B 偶联, 构

成亲和层析柱,作为纯化 AEL 的高效手段.从糖抑制试验中可以看出, AEL 的识别糖基位点可能较大,或可将 AEL 划入识别寡聚糖凝集素类.这样在亲和层析中就不具备廉价而有效的竞争性洗脱剂,鉴于 AEL 对豚稳定性较高,可以考虑采用 8 mol/L 豚进行变性洗脱,然后再透析去除豚.

促有丝分裂活性研究表明, AEL 是一个比 PHA 还要强的促有丝分裂原,有助于增强免疫功能低下的病人的免疫功能.实验中得到了较高的转率,而有丝分裂率却较低,这或许受到了观察时间及培养条件等多种因素的制约,经条件优化是可以得到较高的有丝分裂率.因为尖尾芋在医中临床上常作为抗癌药应用,也有报道部分凝集素对癌细胞有细胞毒作用,但本实验结果表明, AEL 对肺腺癌细胞株 P18 没有细胞毒作用,但不排除 AEL 对其它癌细胞有毒杀作用,这可通过扩大筛选癌细胞株来进一步研究.

参 考 文 献

- 江苏新医学院. 1977. 中药大辞典. 上海: 上海人民出版社, 18~19
- 孙 册. 1986. 凝集素. 北京: 科学出版社, 20~51
- 林卓坤. 1982. 色谱法(一). 北京: 科学出版社, 61
- 曾仲奎, 杨成勇, 洪 英, 等. 1991. Phaseolus lunatus linn vel aff 的种子中 A 型血专一性凝集素的研究. 四川大学学报(自然科学版), 28(2): 207~213
- Allison R T. 1986. Lectins in diagnostic histopathology; a review. Med Lab Sci, 43: 369~376
- Avichezer D, Nechama G G. 1991. Antitumoral effects of psedomonus aeruginosa lectins on lewis lung carcinoma cells cultured in vitro without and with murine splenocytes. Toxicon, 29: 1305~1313
- Brown J M, Leon M A. 1976. Isolation of a human lymphocyte mitogen from wheat germ wiyh N⁺ actyl- D — Glucosamine specificity. J Immunology, 117: 1976~1980
- Datta P K, Figueroa M O D C R, Lajolo F M, et al. 1991. Purification and characerization of two major lectins from *Araucaria brasiliensis* syn. *Araucaria angustifolia* seeds (Pinã o). Plant Physiology, 97: 856~862
- Goldstein I J, Hughes R C, Monsigny M, et al. 1980. What should be called a lectin? Nature, 285: 66

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A LECTIN FROM

Alocasia eucullata

Hou Xuewen¹ Wu Boliang² Zeng Zhongkui³ Guo Yong¹

(1 Dept. of Bioengineering, South China Univ. of Technol, GuangZhou, 510641;

2 Dept. of Bioengineering, JiNan Univ.; 3 Dept. of Biology, Sichuan United Univ.)

Abstract

The results reported that a lectin was purified from *Alocasia eucullata* (Dour) Schott. The AEL had a very strong agglutination to rabbit blood, but had no agglutination to various human blood, types at concentration of 1 g/L; Porcine gastrin had the strongest inhibition effect to AEL agglutination activity among three glycoproteins used. The transformed ratio of AEL to human lymphocytes was as high as 88%, but the PHA (CK) was only 75%. The relative

molecular weight of AEL was 36 600 determined by gel filtration; In vitro cell culture , no direct killing effect of AEL to lung adenoma strain P18 was found. The effects of various physical—chemical factors , such as pH、temperature and denatural reagents, to the stability of AEL were also discussed.

Key words *Alocasia eucullata* (Dour) Schott; lectin; anticancer test

(上接第 85 页)

STUDY ON THE RELATIONSHIP BETWEEN DROUGHT STRESS AND ACTIVATED OXYGEN METABOLISM OF FLOWERING CHINESE CABBAGE (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *utilis*) LEAVES

Yang Xian Guan Peicong

(Dept. of Hortic., South China Agric. Univ., Guangzhou, 510642)

Abstract

Effects of drought stress on plant growth, activities of AP, SOD, CAT and POD, ASA content, MDA level and autoxidation rate in flowering Chinese cabbage leaves were studied. The results showed that with the time and intensity of drought stress, activities of AP and POD, MDA content and autoxidation rate increased gradually, while activity of SOD and ASA content decreased gradually. Activity of CAT under lighter drought stress increased sharply, but under higher drought stress above 4 days it decreased rapidly. When the drought stress was removed and restored to supply water 2 days, activities of AP, POD and CAT, ASA content, MDA level and autoxidation rate decreased gradually, but activity of SOD increased rapidly. The data suggested that the equilibrium systems of activated oxygen eliminated were destroyed in flowering Chinese cabbage leaves because of drought stress, and membrane lipid peroxidation was enhanced and the growth and development of plant was inhibited markedly.

Key words flowering Chinese cabbage; drought stress; activated oxygen metabolism; membrane lipid peroxidation