

65% to 99% and the purified Ca^{2+} -ATPase exhibited higher ATP hydrolysis activity.

Key words sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -

ATPase, reactive red-120 agrose, affinity gel filtration

北寄生凝集素的分离和性质研究

李格娥 刘 庆 袁小妹

(防化研究院, 北京 102205)

摘要 采用酸处理 Sepharose 6B 亲和层析和 Sephacryl S-200 凝胶过滤, 首次从中药北寄生中分得一种有毒凝集素, 称为北寄生凝集素 (*Viscum coloratum* lectin, VCL), 是一种高毒性的植物毒蛋白, 对小鼠静脉给药的 LD_{50} 为 $4.4 \mu\text{g}/\text{kg}$, 其粗提物 also 具有很强的毒性, 对小鼠腹腔给药的 LD_{50} 为 $0.2 \text{ g}/\text{kg}$, 分子量 52 000, 等电点 10.5.

关键词 北寄生, 槲寄生, 有毒凝集素

北寄生 (*Viscum coloratum*, Beijisheng) 是桑寄生科槲寄生属植物, 枝、叶、茎入药, 能祛风湿、补肝肾、强筋骨, 并有降压和抗肿瘤作用, 用于风湿脾痛、高血压和癌症等疾病的治疗.

1981年, Franz从欧洲槲寄生 (*V. album*) 中分得凝集素 (mistletoe lectin) I、II、III, 分子量分别为 115 ku、60 ku、50 ku, 它们的糖专一性不同^[1]. 1982年 Olsnes 从欧洲槲寄生分得一种有毒蛋白质槲寄生毒素 (viscumin), 分子量 60 ku, 其性质与蓖麻毒素相似^[2].

北寄生与桑寄生 (*Loranthus parascticus*) 是不同属植物, 所含成分不同, 但中医临床将两者混用, 均未见中毒报道. 我们从北寄生中分得一种高毒性凝集素 (*Viscum coloratum* lectin, VCL), 并对其性质进行了初步分析.

1 材料和方法

1.1 材料

北寄生生长在大果榆 (*Ulmus macrocarpa*) 树上, 由辽宁省中药研究所孙传奇同志协助采集. Serharose 6B、Sephacryl S-200 和 Pharma-

lyte 3~10, pharmacia 公司产品. 三羟甲基氨基甲烷、考马斯亮蓝 R250, Fluka 公司产品. 低分子量标准蛋白, 购自上海生化所东风生化试剂厂. 其它试剂均为分析纯.

1.2 方法

1.2.1 分子量测定: SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 按 Faibanks 等^[3]方法进行. 凝胶浓度为 6%.

1.2.2 等电点测定: 聚丙烯酰胺等电聚焦电泳, 参照 Wrigley 方法^[4]进行. 蛋白质样品和两性电解质载体聚合于 7.5% 的凝胶中. 正极电泳液为 5% 磷酸, 负极电泳液为 5% 乙醇胺^[5], 恒压 160 V, 聚焦约 1.5 h, 电流接近零.

1.2.3 含糖量测定: 参照酚-硫酸法^[6]进行, 以甘露糖为其计算标准.

1.2.4 氨基酸组成分析: 由中国医学科学院北京药物研究所仪器分析室分析. 样品 ($0.65 \text{ g}/\text{L}$) 于玻璃封管中用 $6 \text{ mol}/\text{L}$ HCl 在 110°C 水解 24 h, 加样量 $10 \mu\text{l}$, 用日立 L-8500 型氨基酸自动分析仪进行分析.

1.2.5 毒性测定: 样品溶于生理盐水中, 将

18~24 g 的小鼠分为 4~5 组, 每组 4~6 只, 腹腔和静脉给药后观察在 3 d 内出现的死亡数, 用来计算 LD_{50} 值。

1.2.6 血球凝集活性测定: 按参考文献[7]进行。肝素化兔全血用生理盐水洗涤 3 次, 贮存于冰箱备用。实验时的血球最终浓度为 2%, 加入不同量的有毒凝集素, 在 4℃ 冰箱中放置 4 h 后在显微镜下观察对血球的凝集作用, 以能引起血球凝集的最小浓度表示。

2 结 果

2.1 有毒凝集素的纯化和鉴定

参照 Ziska 等^[8]的方法, 称取 100 g 植物干叶(带小枝)粉碎, 用 750 ml PBS (0.15 mol/L NaCl, 0.005 mol/L 磷酸缓冲液, pH7.2) 浸泡过夜。过滤, 得滤液约 600 ml, 加入固体硫酸铵达 70% 饱和度, 放入 4℃ 冰箱, 离心 (10 000 g, 20 min), 取沉淀溶于少量水中, 用蒸馏水透析, 换水 3 次, 再对 PBS 透析, 离心去沉淀, 上清液上经酸处理的 Sepharose 6B 柱, 先用 PBS 洗柱, 再用含 0.15 mol/L 半乳糖的 PBS 洗脱 (图 1)。收集

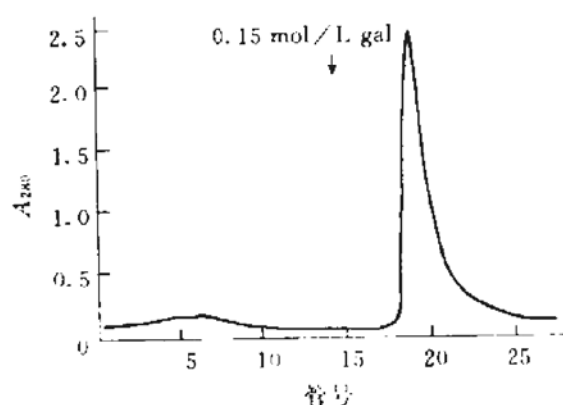


图 1 北寄生提取物在酸处理 Sepharose 6B 上亲和层析

柱 20 cm×1.6 cm; 流速 30 ml/h; 5 ml/管。

PAGE 检测为一条蛋白区带。加 1% 的 2-巯基乙醇分解为两个亚基 (图 3)。

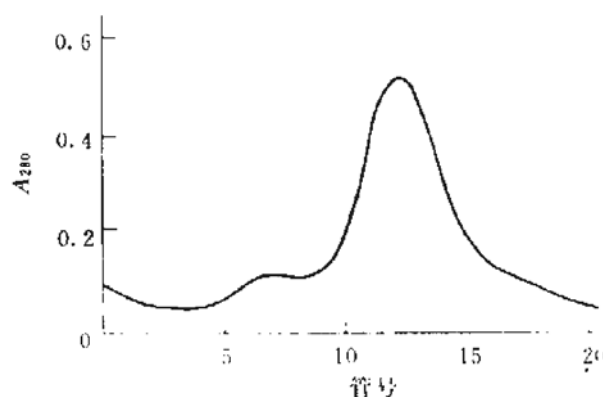


图 2 含蛋白组分在 Sephacryl S-200 柱上的层析

柱 80 cm×1.6 cm; 流速 25 ml/h; 4 ml/管。

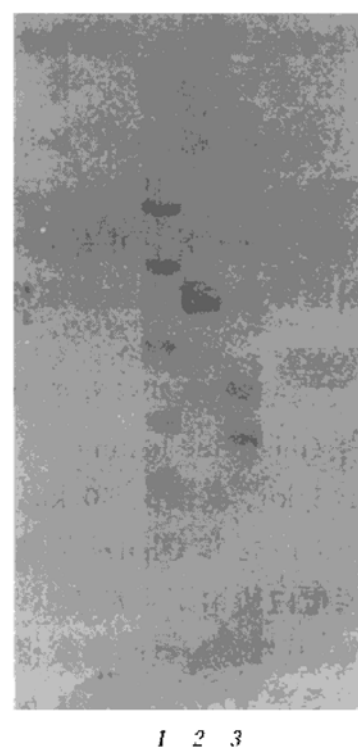


图 3 有毒凝集素的 SDS-PAGE 图谱

1: 标准蛋白; 2: VCL; 3: VCL 的 A、B 亚基。

含蛋白组分 (18~23 管), 透析, 浓缩, 再上 Sephacryl S-200 柱, 用 PBS 洗脱, 得两个峰 (图 2), 收集峰 II (11~15 管), 浓缩, 冻干, 得淡黄色粉末约 4 mg, 产率 0.004%。经 SDS-

2.2 理化性质

用 SDS-PAGE 测得 VCL 的分子量为 52 000, 由两个亚基组成, 其分子量分别为 29 000 和 35 000 (图 4), 等电聚焦电泳在

pH10.5 和 6.2 各有一条带, 含糖量为 1.3%. 氨基酸组成见表 1, 其组成与槲寄生凝集素 I (mistletoe lectin I, ML I) 相似, 含天冬氨酸、天冬酰胺、谷氨酸、谷氨酰胺、亮氨酸和甘氨酸较多.

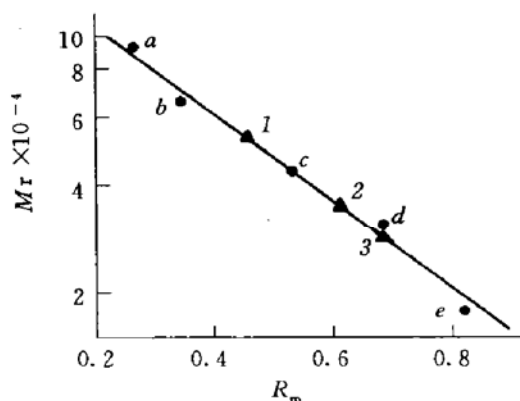


图 4 有毒凝集素及其亚基的分子量测定
a: 磷酸化酶 B; b: 牛血清白蛋白; c: 肌动蛋白; d: 碳酸酐酶; e: 烟草花叶病毒外壳蛋白, 1: VCL; 2: B 亚基; 3: A 亚基.

表 1 VCL 和 MLI 的氨基酸组成

氨基酸	VCL	ML I
Asp (Asn)	48.2	67
Thr	31.9	46
Ser	32.4	44
Gln (Glu)	49.0	53
Gly	35.1	49
Ala	28.4	37
Cys	3.0	12
Val	24.9	36
Met	4.5	9
Ile	22.8	33
Leu	37.5	49
Tyr	15.4	18
Phe	14.9	19
His	5.3	5
Lys	7.3	8
Arg	29.3	40
Pro	21.6	32

2.3 生物学性质

从北寄生叶分得的 VCL 对小鼠静脉注射 LD_{50} 为 $4.4 \mu\text{g/kg}$, 给药后动物无明显中毒症状, 一般在 72 h 内出现死亡, 随着中毒剂量的增大, 出现死亡的时间缩短. 对兔红血球的最低凝集浓度约为 5 mg/L , 而从茎分得 VCL 对小鼠静脉和腹腔注射的 LD_{50} 分别为 $8 \mu\text{g/kg}$ 和 $34 \mu\text{g/kg}$. 茎叶的粗提物腹腔注射生药的 LD_{50} 为 0.2 g/kg .

3 讨 论

与蓖麻和相思子不同, 从北寄生中没能分得毒素和凝集素两种, 而是一种与蓖麻毒素 (ricin) 和相思子毒素 (abrin) 相似的有毒凝集素 (VCL). 实验证明, 从植物的不同部位分得的 VCL 其性质也有明显不同, 如含糖量, 来自叶的 VCL 为 1.3%, 而茎为 8%; 另外, 对小鼠静脉给药的毒性, 来自叶的 VCL ($4.4 \mu\text{g/kg}$) 大于茎的 VCL ($8.0 \mu\text{g/kg}$). 我们参照 Franz 等^[1]的方法, 未能从北寄生中分得分子量为 11 500 的 ML I, 但在靠近 VCL 电泳带的上方有一条很弱的蛋白带, 此带在从茎中提取的样品中比叶更明显. 我们分得的 VCL, 其毒性强度比 viscumin ($2.4 \mu\text{g/kg}$) 和 ricin ($2.7 \mu\text{g/kg}$) 略低, 但仍属于高毒性的植物蛋白. 北寄生的粗提物也具有很强的毒性, 对小鼠腹腔给予生药的 LD_{50} 为 0.2 g/kg . 如果人的敏感性是小鼠的 5 倍, 那么一个体重 70 kg 的人接受未经煮沸的生药 2.8 g, 即可引起严重中毒甚至死亡.

参 考 文 献

- 1 Franz H, Ziska P, Kindt A. Biochem J, 1981; **195**: 481
- 2 Olsnes S, Stirpe F, Sandvig K *et al.* J Biol Chem, 1982; **257** (22): 13263
- 3 Faibanks G, Steck T L, Wallach D F H. Biochemistry, 1971; **10** (13): 2606
- 4 Wrigley C W. In: Jakaby W B ed. Methods in enzymology, New York and London: Academic Press, 1971; (22): 559
- 5 Catsimopoulos N. Anal Biochem, 1968; **26**: 480
- 6 鲁子贤. 蛋白质和酶学研究方法 (第一册). 北京: 科学出版社, 1989: 37

- 7 Cawley D B, Hedblom M L, Houston L L. Arch Biochem Biophys, 1978; **190** (2): 744
8 Ziska P, Franz H, Kindt A. Experientia, 1978; **34**: 123
9 Franz H. Oncology, 1986; **43** (suppl 1): 23

Isolation and Properties of Toxic Lectin from *Viscum coloratum* (Beijisheng). Li Gee, Liu Qing, Yuan Xiaomei (*Research Institute of Chemical Defense, Beijing 102205, China*).

Abstract A *Viscum coloratum* lectin (VCL) was first separated from extracts of the stems and leaves of *Viscum coloratum* Chinese, an ordinary traditional medicine bejisheng, by

affinity chromatography on acid-treated Sepharose 6B and gel filtration on Sephacryl S-200, with $M_r = 52\ 000$, $pI = 10.5$. The LD_{50} was $4.4\ \mu\text{g}/\text{kg}$ for mice by intravenous injection. It's a toxic protein obtained from the plant with higher toxicity to mice. The crude extracts of the plant also have strong toxicity, because it's LD_{50} was $200\ \text{mg}/\text{kg}$ for mice by intraperitoneal injection and to be expressed as the amount of dry materials.

Key words Beijisheng, mistletoe, toxic lectin

高苯丙氨酸血症大鼠脑内单胺类递质的研究

万福生 南国华

(江西医学院生物化学教研室, 南昌 330006)

摘要 以 3 d 龄 Sprague-Dawley 大鼠腹腔注射苯丙氨酸 (Phe) 诱导高苯丙氨酸血症. 荧光法测定大脑皮层及其突触体中去甲肾上腺素 (NE)、多巴胺 (DA) 和 5-羟色胺 (5-HT) 含量; Y 型电迷宫法测其学习记忆能力. 结果显示: 高苯丙氨酸血症大鼠大脑皮层 NE、DA 及 5-HT 含量降低 38.6%~67.4%, 突触体中 NE、DA 和 5-HT 含量降低 51.9%~70.2%, 学习记忆能力明显低于对照组. 结果提示, 苯酮尿症智力障碍可能与大脑皮层及其突触体中某些单胺类递质含量降低相关.

关键词 高苯丙氨酸血症, 智力障碍, 单胺类递质, 行为测定, 对比研究

已知苯酮尿症 (phenylketonuria, PKU) 的智力障碍是由高苯丙氨酸血症所致, 但其影响机理至今尚未阐明. 据报道^[1,2], PKU 病人脑内单胺类递质含量有一定下降, 但 PKU 动物大脑皮层及其突触体中单胺类递质含量变化与智力关系的报道甚少. 本实验观测了高苯丙氨酸血症大鼠大脑皮层及其突触体中去甲肾上腺素 (NE)、多巴胺 (DA) 和 5-羟色胺 (5-HT) 含量及其与学习记忆能力的关系, 旨在探讨大脑皮层中单胺类递质的改变与智力障碍的关系.

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

多巴胺盐酸盐购自 FLUKA 公司; 去甲肾

上腺素酒石酸盐和 5-羟色胺硫酸肌酐为瑞士产品; L-苯丙氨酸为第二军医大学药学系产品. 其它试剂均为国产分析纯或优级纯. 日产 CS-930 型双波长薄层扫描仪; 日立 65-PT 型超速离心机; 美国 PERKIN-ELMER 公司的 MPF-66 型荧光分光光度计.

1.2 高苯丙氨酸血症诱导^[1]

选 3 d 龄 Sprague-Dawley 大鼠 (由本院动物室供给), ♂ ♀ 兼有. 随机分为对照组、实验组 I、实验组 II 和实验组 III. 实验组大鼠仅腹腔注射 3% Phe 液 (I 组: $0.8\ \text{g}/\text{kg}$; II 组: $1.0\ \text{g}/\text{kg}$; III 组: $1.2\ \text{g}/\text{kg}$), 一天两次, 连续