

小花棘豆生物碱对 α -甘露糖苷酶活性的影响

张建军¹ 韩敏^{1*} 王宇¹ 白颖² 刘国娟¹ 郭宇航¹ 孙晓磊¹ 刘建新¹

1. 内蒙古农业大学兽医学院农业部动物临床诊疗技术重点实验室, 呼和浩特 010018;

2. 内蒙古自治区鄂尔多斯市东胜区动物疫病预防控制中心, 内蒙古鄂尔多斯 017000

摘要 为探讨小花棘豆的中毒机理, 采用苦马豆素、黄花碱以及这 2 种生物碱的混合物分别对小白鼠进行传统灌胃, 并于试验开始后第 7、14、21、28 和 35 天分别从各组中随机取 4 只小白鼠, 眼球采血, 肝素钠抗凝, 利用紫外可见分光光度计检测血清中 α -甘露糖苷酶的活性。结果表明: 低浓度的 SW 具有提高血清中 α -甘露糖苷酶活性的作用, 中等浓度和高浓度的 SW 在短时间内也可以提高血清中 α -甘露糖苷酶的活性, 但时间过长会严重降低血清中 α -甘露糖苷酶的活性; Ts 在整个试验过程中不影响血清中 α -甘露糖苷酶的活性; 混合生物碱组表现出与 SW 组类似的结果。

关键词 小花棘豆; 中毒机理; α -甘露糖苷酶活性; 紫外可见分光光度计; 苦马豆素; 黄花碱

小花棘豆 (*Oxytropis glabra*) 俗称醉马草, 属豆科棘豆属 (*Oxytropis*) 多年生草本植物, 是疯草 (*Locoweed*) 的一种, 全草有毒^[1]。疯草是豆科棘豆属和黄芪属 (*Astragalus*) 2 属中能引起动物以慢性神经机能障碍、机体消瘦为特征的中毒的有毒植物的总称。Molyneux 等^[2]认为苦马豆素 (Swainsonine, SW) 是疯草的主要毒性成分。杨桂云等^[3]及于荣敏等^[4]曾对小花棘豆的毒性成分进行过研究, 确定其毒性成分主要为生物碱, 并从中提取出多达 8 种的生物碱, 其中黄花碱是主要生物碱之一。苦马豆素属于多羟基吡啶里西啶类生物碱, 是一种极强的 α -甘露糖苷酶 (α -mannosidase, AMA) 竞争抑制剂, 可使机体甘露糖的代谢发生异常, 大量蓄积在细胞内致细胞空泡变性, 造成器官组织损害和功能障碍, 并最终导致细胞死亡^[5-6]。黄花碱 (Thermopsine, Ts) 属于多羟基喹诺里西啶类生物碱, 对动物的神经节有中度抑制作用, 对延髓及大脑皮层亦有抑制作用^[7]。

本试验选用苦马豆素、黄花碱及这 2 种生物碱

的混合物, 通过紫外可见分光光度计对小白鼠血清中 α -甘露糖苷酶的活性进行研究, 以探讨小花棘豆的中毒机理。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1) 试验仪器。TU-1901 紫外可见分光光度计, 由北京普析仪器有限责任公司生产; Sartorius 精密电子分析天平, 由德国赛多利斯公司生产; 数显恒温水浴锅 (HH-4), 由金坛市杰瑞尔电器有限公司生产。

2) 试验药品。苦马豆素和黄花碱, 由内蒙古农业大学兽医学院“小花棘豆中毒机理的研究”课题组提供; 4-硝基苯基- α -D-甘露糖吡喃糖苷, 购于美国 Sigma 公司; 对硝基酚, 购于成都艾科达化学试剂有限公司; 甘氨酸, 购于 BIOSHARP 公司; 醋酸钠, 购于天津市永大化学试剂有限公司; 醋酸和氢氧化钠, 购于天津市化学试剂三厂。

3) 试验动物。260 只昆明系小白鼠, 雌雄各半,

收稿日期: 2013-04-09

基金项目: 内蒙古自治区高等学校科学研究项目 (NJ10063); 内蒙古自然科学基金 (2012MS0404)。

* 通讯作者

张建军, 男, 1985 年生, 硕士。

体重(20±2) g,购于内蒙古大学实验动物中心。小白鼠标准日粮,购于内蒙古大学实验动物中心。

1.2 试验方法

1)小花棘豆生物碱中毒动物模型的建立。试验小白鼠适应性饲养 1 周后,随机分为 4 个大组:A 组为 SW 组、B 组为 Ts 组、C 组为 2 种生物碱的混合组、D 组为对照组,A、B、C 组每组 80 只小白鼠,D 组 20 只小白鼠。前 3 组又分为 4 个小组,分别为 A1、A2、A3、A4 组和 B1、B2、B3、B4 组以及 C1、C2、C3、C4 组,每小组 20 只小白鼠。将生物碱用去离子水稀释成不同的浓度,A1~A4 组胃内灌服 SW,浓度分别为 0.020、0.100、0.300 和 0.600 mg/mL;B1~B4 组胃内灌服 Ts,浓度分别为 0.040、0.060、0.080 和 0.100 mg/mL;C1~C4 组胃内灌服 SW 和 Ts 的混合物,浓度分别为 0.005、0.010、0.020 和 0.030 mg/mL;D 组胃内灌服去离子水。

2)试剂的配制。反应缓冲液:为 0.1 mol/L pH 4.60 的醋酸盐缓冲液(1.8 g 醋酸钠,980 μL 冰醋酸,加水至 100 mL);反应中止缓冲液:为 0.1 mol/L pH 10.14 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液(80 mL 0.1 mol/L 的氢氧化钠与 120 mL 0.1 mol/L 的甘氨酸混合);底物溶液:为 4.0 mmol/L 的 4-硝基苯基-α-D-甘露糖吡喃糖苷溶液(准确称取 4-硝基苯基-α-D-甘露糖吡喃糖苷 24.1 mg,溶解在 20 mL 的去离子水中)。

3)试验过程。将小白鼠适应性饲养 1 周后,空腹称重并记录。每天早晨 9:00 添加鼠粮,任小白鼠自由采食和饮水。对每只小鼠按 0.01 mL/g 体重胃内灌服生物碱,每隔 3 d 称 1 次体重,以调整灌服生物碱的量。于试验的第 7、14、21、28 和 35 天,从每组分别随机取 4 只小白鼠,眼球采血,肝素钠抗凝。

4)标准曲线的绘制。用 0.1 mol/L 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液(pH 10.14),将对硝基酚(分析纯)配成 1 mmol/L 的母液,然后稀释成 10、20、40、80、120 和 160 μmol/L 的标准对硝基酚溶液,并用紫外可见分光光度计在 λ=405 nm 处测定其 OD 值。然后以 OD 值为横坐标、对硝基酚的浓度为纵坐标,绘制标准曲线。

5)α-甘露糖苷酶活性的测定方法。在 5 mL 的一次性塑料试管中分别依次加入血清、反应缓冲液和底物溶液(分别为 50、200 和 50 μL),缓缓震荡

摇匀,37 °C 水浴 1 h^[8];加入反应终止缓冲液,充分震荡摇匀;室温静置 5 min,在 λ=405 nm 处测定 OD 值,结果查标准曲线。α-甘露糖苷酶活性以每升血清(浆)每秒钟水解产生的对硝基酚的纳摩尔数表示。

1.3 数据处理

结果以“平均值±标准差”表示,采用 SPSS 18.0 软件对数据进行单因素方差分析,进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 标准曲线的绘制

用紫外可见分光光度计测得的与对硝基酚的浓度相应的 OD 值,见表 1。

表 1 对硝基酚的浓度与相应 OD 值

| 对硝基酚的浓度/(μmol/L) | OD 值 |
|------------------|-------|
| 10 | 0.114 |
| 20 | 0.203 |
| 40 | 0.366 |
| 80 | 0.743 |
| 120 | 1.123 |
| 160 | 1.468 |

根据表 1 中的数据,以 OD 值为横坐标、对硝基酚的浓度为纵坐标,绘制标准曲线,见图 1。

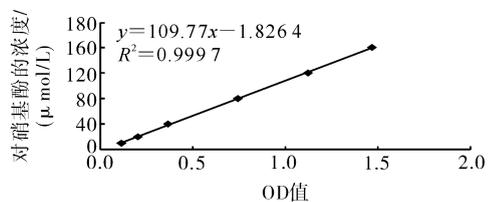


图 1 对硝基酚的浓度与相应 OD 值的标准曲线

从图 1 中可知标准方程为 $y = 109.77x - 1.8264$, $R^2 = 0.9997$,表示线性关系良好。可依据此标准方程,计算对硝基酚的浓度,从而得出血清中 α-甘露糖苷酶的活性。

2.2 苦马豆素组与对照组血清中 α-甘露糖苷酶活性的测定

不同剂量的 SW 连续灌服后,小白鼠血清中 α-甘露糖苷酶活性的测定结果见表 2。

由表 2 可知,A1 组只有在第 35 天时 α-甘露糖苷酶活性显著高于 D 组($P < 0.05$);A2 组的 α-甘露糖苷酶活性在整个试验过程中一直在增加,在第 21 和 28 天时显著高于 D 组($P < 0.05$),在第 35 天时极显著高于 D 组($P < 0.01$);A3 组的 α-甘露

糖苷酶活性在整个试验期间一直在降低,在试验第 7 天时显著高于 D 组($P < 0.05$),而在第 28 和 35 天时极显著低于 D 组($P < 0.01$);A4 组的 α -甘露糖苷酶活性在整个试验期间也一直在降低,在第 14 天时显著低于 D 组($P < 0.05$),在第 21、28 和 35 天时极显著低于 D 组($P < 0.01$)。

2.3 黄花碱组与对照组血清中 α -甘露糖苷酶活性的测定

不同剂量的 Ts 连续灌服后,小白鼠血清中 α -

甘露糖苷酶活性测定结果见表 3。

由表 3 可以看出,在整个试验期间,灌服黄花碱的小鼠血清中 α -甘露糖苷酶活性与对照组比较差异均不显著($P > 0.05$)。

2.4 混合物组与对照组血清中 α -甘露糖苷酶活性的测定

不同剂量的 2 种生物碱的混合物连续灌服后,小白鼠血清中 α -甘露糖苷酶活性测定结果见表 4。

表 2 SW 组与对照组血清中 α -甘露糖苷酶活性的测定结果

nmol/(s · L)

| 组别 | α -甘露糖苷酶活性 | | | | |
|----|-------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | 第 7 天 | 第 14 天 | 第 21 天 | 第 28 天 | 第 35 天 |
| A1 | 422.40±0.39 | 428.80±1.17 | 425.60±0.98 | 437.50±0.39 | 445.30±0.74 a |
| A2 | 435.50±1.34 | 447.60±0.84 | 458.70±0.48 a | 465.30±0.99 a | 474.50±1.11 A |
| A3 | 439.50±0.64 a | 418.60±0.05 | 417.50±0.57 | 408.40±1.53 A | 397.90±1.34 A |
| A4 | 414.30±0.83 | 405.30±0.26 a | 387.40±1.43 A | 386.40±0.78 A | 377.60±0.56 A |
| D | 423.00±0.37 | 428.90±0.28 | 419.10±0.85 | 423.90±0.29 | 424.60±0.84 |

注:同一列标有小写字母表示与 D 组比较差异显著($P < 0.05$),标有大写字母表示与 D 组比较差异极显著($P < 0.01$),未标注字母表示与 D 组比较差异不显著($P > 0.05$)。下同。

表 3 Ts 组与对照组血清中 α -甘露糖苷酶活性测定结果

nmol/(s · L)

| 组别 | α -甘露糖苷酶活性 | | | | |
|----|-------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | 第 7 天 | 第 14 天 | 第 21 天 | 第 28 天 | 第 35 天 |
| B1 | 419.20±0.28 | 428.80±0.45 | 423.20±1.43 | 430.30±1.11 | 424.40±0.78 |
| B2 | 422.60±0.99 | 425.80±0.73 | 424.40±0.33 | 421.50±0.41 | 426.40±0.38 |
| B3 | 426.40±1.57 | 424.10±0.14 | 424.40±0.51 | 417.50±0.22 | 419.80±0.24 |
| B4 | 430.90±0.98 | 430.30±0.23 | 418.60±0.87 | 423.70±0.96 | 425.40±0.53 |
| D | 423.00±0.37 | 428.90±0.28 | 419.10±0.85 | 423.90±0.29 | 424.60±0.84 |

表 4 混合物组与对照组血清中 α -甘露糖苷酶活性测定结果

nmol/(s · L)

| 组别 | α -甘露糖苷酶活性 | | | | |
|----|-------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | 第 7 天 | 第 14 天 | 第 21 天 | 第 28 天 | 第 35 天 |
| C1 | 421.40±0.49 | 427.40±0.46 | 425.20±1.98 | 438.70±0.42 | 435.30±0.74 |
| C2 | 434.70±1.54 | 448.60±1.44 | 452.60±0.78 a | 459.50±0.54 a | 460.90±0.81 a |
| C3 | 436.40±0.74 a | 428.20±0.48 | 407.70±0.37 a | 410.40±0.54 a | 392.60±1.21 A |
| C4 | 424.50±0.75 | 415.80±0.74 a | 394.20±0.93 a | 382.60±0.64 A | 381.30±0.85 A |
| D | 423.00±0.37 | 428.90±0.28 | 419.10±0.85 | 423.90±0.29 | 424.60±0.84 |

从表 4 可以看出,C1 组的 α -甘露糖苷酶活性在整个试验期间有增加的趋势,但与 D 组比较差异均不显著($P > 0.05$);C2 组的 α -甘露糖苷酶活性在整个试验期间不断升高,其中在第 21、28 和 35 天时显著高于 D 组($P < 0.05$);C3 组的 α -甘露糖苷酶活性在试验过程中一直在降低,在第 7 天时显著高于 D 组($P < 0.05$),在第 21 和 28 天显著低于 D 组($P < 0.05$),而在第 35 天时极显著低于 D 组

($P < 0.01$);C4 组的 α -甘露糖苷酶活性在试验过程中一直在降低,在第 14 和 21 天时显著低于 D 组($P < 0.05$),而在第 28 和 35 天时极显著低于 D 组($P < 0.01$)。

3 讨 论

甘露糖苷酶是机体合成和代谢糖蛋白途径中的一种重要的生化作用酶,对机体正常功能的维持至

关重要。研究表明,动物采食疯草类植物后细胞的空泡变性是由 α -甘露糖苷酶受到抑制所致,影响了糖蛋白的正常代谢,导致甘露糖苷在细胞内聚积,最终导致细胞空泡变性。SW 抑制 α -甘露糖苷酶活性的原理是,其与甘露糖苷水解产物的甘露糖阳离子半椅状结构相似,为 α -甘露糖苷酶的竞争性抑制剂。

本试验研究结果表明,SW 能够影响血清中 α -甘露糖苷酶的活性,在低剂量(A1、A2 组)时,能够提高血清中 α -甘露糖苷酶的活性,且随着试验时间的延长,差异极显著($P < 0.05$);在中等剂量(A3 组)和高剂量(A4 组)时,在试验的初期均能够提高血清中 α -甘露糖苷酶的活性,但随着时间的延长却显著降低血清中 α -甘露糖苷酶的活性($P < 0.05$),且随着试验时间的进一步延长,差异极显著($P < 0.01$);Ts 剂量的增加和时间的延长都对血清中 α -甘露糖苷酶的活性没有显著影响($P > 0.05$);而 2 种生物碱的混合效果却出现了与 SW 类似的结果。综上所述,低剂量的 SW 能够提高血清中 α -甘露糖苷酶的活性;中等剂量或高剂量的 SW 短时间内也能够提高 α -甘露糖苷酶的活性,但随着时间的延长却能够显著降低血清中 α -甘露糖苷酶的活性;Ts 不影响血清中 α -甘露糖苷酶

的活性,这与赵宝玉^[9]报道的结果一致。

参 考 文 献

- [1] 王金妞. 内蒙古棘豆属(*Oxytropis* DC.)植物的分类学研究[D]. 呼和浩特:内蒙古师范大学生命科学与技术学院,2005.
- [2] MOLYNEUX R J, JAMES L F. Loco intoxication: indolizidine alkaloids of spotted locoweed(*astragalus lentiginosus*)[J]. Science, 1982, 216(4542): 190-191.
- [3] 杨桂云, 于荣敏. 小花棘豆的有毒成份及互毒性测定[J]. 动物毒物学, 1989, 4(2): 8-10.
- [4] 于荣敏, 李铤, 宋丽艳, 等. 小花棘豆毒性生物碱的研究[J]. 中国中药杂志, 1991, 16(3): 160-163.
- [5] 卢围, 路浩, 赵宝玉, 等. 小花棘豆产苦马豆素内生真菌的筛选与鉴定[J]. 畜牧兽医学报, 2011, 42(3): 429-436.
- [6] ROCES D P, LULLMANN-RAUCH R, PENG J H, et al. Efficacy of enzyme replacement therapy in α -mannosidosis mice: a preclinical animal study[J]. Human Molecular Genetics, 2004, 13(18): 1979-1988.
- [7] 李培峰, 耿久荣, 关红. 黄花碱对小白鼠中枢神经系统中毒机理的研究[J]. 畜牧与饲料科学, 2005(3): 25-27.
- [8] 孔祥雅, 荆新堂, 张丽慧, 等. 苦马豆素抑制 α -甘露糖苷酶的剂量效应关系[J]. 动物医学进展, 2011, 32(1): 43-46.
- [9] 赵宝玉. 疯草(甘肃棘豆)生物碱系统分析及其毒性的比较病理学研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学动医学院, 2001.

(责任编辑:郭会田)

国家收储冻猪肉扭转生猪生产亏损局面

据国家发展和改革委员会 5 月 22 日介绍,自 3 月初生猪生产出现亏损后,有关部门以略高于市场的价格,先后 2 次在全国 20 多个省份开展中央储备冻猪肉收储。近期,生猪价格趋稳回升,快速下跌的趋势得到初步遏制。

据国家发展和改革委员会提供的数据,截至 5 月 15 日,全国平均生猪出场价格为每千克 12.79 元,连续 3 周出现小幅上涨,每千克较前期低点回升 0.18 元;猪粮比价为 5.33:1,连续 4 周小幅回升。

3 月初,猪粮比价跌破 6:1 盈亏平衡点后,国家迅速启动缓解生猪市场价格周期性波动调控预案,发布预警信息,建议广大养殖户合理调整生产,避免大的亏损;4 月份以来,以略高于市场的价格,先后 2 次在全国 20 多个省份收储冻猪肉;10 余个省份还按照当地预案要求,及时开展了地方冻猪肉收储。

国家发展和改革委员会表示,下一步,国家有关部门将密切跟踪生猪生产和市场价格变化,准确研判生产和市场价格走势,认真执行好缓解生猪市场价格周期性波动调控预案,根据市场价格变化,适时适度组织收储。建议广大养殖户加快调整养殖结构,以充分发挥市场调节和政府调控合力,促进生猪生产和市场尽快恢复平衡。

来源:新华网