

地稔凝集素的提取及凝血活性的研究

邓政东¹,程爱芳¹,李秀丽²

(1. 武汉生物工程学院 生命科学与技术学院,湖北 武汉 430415;2. 福建师范大学 生命科学学院,福建 福州 350108)

摘要:为研究和利用地稔的促凝血活性物质,以地稔为试材,提取地稔凝集素,研究 pH、温度和糖等理化因素对凝血活性的影响。结果表明:经硫酸铵沉淀及透析提取的地稔凝集素具有红细胞凝集活性;碱性条件下,抑制作用明显,而酸性条件有较强促进作用;温度对凝集素凝血活性影响很小;半乳糖有明显促进作用。

关键词:地稔;凝集素;提取;凝血活性

中图分类号:Q946.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2015)02-0056-03 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2015.02.0056

地稔(*Melastoma dodecandrum* Lour),野牡丹科野牡丹属植物,又名铺地锦、山地稔,可观花、观果,易管理,耐践踏,是一种优良的地被植物^[1-2]。地稔全草可入药,具有清热解毒、收敛止血等功效^[3-4],在福建和贵州等地区常作为外伤止血的草药。关于地稔促凝血物质成分及其凝血活性的系统研究未见报道,现以地稔为试材,初步提取促凝血物质,研究凝血活性及其影响因素,以期在地稔凝血机制的研究以及合理开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

地稔采自福建省尤溪县,经武汉生物工程学院彭玲副教授鉴定,风干后制成供试材料。供试动物(鸡、兔)血液由武汉生物工程学院基础生物学实验室提供。

1.2 方法

试验于 2013 年 3-5 月在武汉生物工程学院基础生物学实验室进行。

1.2.1 地稔凝集素的提取 将地稔粉碎后,称取 10 g,用 100 mL 磷酸缓冲溶液(PBS,pH7.2)浸泡过夜。纱布过滤,滤液 4 000 r·min⁻¹,20 min,收集上清液。以固体硫酸铵在饱和度 20%~80%的条件下,分级沉淀,盐析产物经透析后,获得凝集素(*Melastoma dodecandrum* Lectin,简称 MDL)粗品^[5],4℃保存备用。

1.2.2 红细胞悬液的制备 根据红细胞的压积比,配制 2%鸡、兔红细胞悬液,4℃保存备用^[6]。

1.2.3 MDL 凝集效价的测定 参照孙册等的方法^[7],在 96 孔 V 型血凝板中,倍比稀释 MDL,再加入 2%红细胞悬液,室温下静置 1 h 后观察结果。凝集效价以出现凝集现象的最高稀释倍数表示^[5,8]。

1.2.4 蛋白质和多糖测定 蛋白质含量的测定采用考马斯亮蓝 G250 法,利用 Bradford 法做蛋白质含量标准曲线;多糖含量的测定采用蒽酮比色法。

1.2.5 理化因素对 MDL 凝血活性的影响 (1)酸碱处理^[5]:MDL 倍比稀释后,每列加入对应缓冲液(pH3.0~12.0),静置 30 min。再加入红细胞悬液,静置 1 h 后观察结果,未经酸碱处理的样品作为对照。

(2)温度^[5]:样液经适当稀释后,分装于 8 个 EP 管。在多孔恒温水浴锅中,以 70、80、90 和 100℃分别处理 30 和 60 min 后,冰浴处理。倍比稀释后,加入等量的红细胞悬液,室温静置 1 h,观察结果。未经温度处理的样品为对照。

(3)糖溶液^[5]:MDL 倍比稀释,各列加入对应的 0.1 mol·L⁻¹葡萄糖、半乳糖、果糖、木糖、乳糖、蔗糖、D-麦芽糖和甘露糖,静置 30 min,再加入红细胞悬液,静置 1 h 后观察。未经糖溶液处理的样品作为对照。

2 结果与分析

2.1 MDL 的提取及凝集效价

经不同饱和度的硫酸铵盐析和 PBS 透析除盐后,获得 MDL 粗品。血凝法检测凝血活性,MDL 对鸡红细胞的凝血活性更强。硫酸铵盐析处理对 MDL 的影响见表 1。在 20%~70%范围

收稿日期:2014-10-26

基金项目:武汉生物工程学院资助项目(2010J07)

第一作者简介:邓政东(1973-),男,广东省蕉岭县人,硕士,讲师,从事细胞生物学教学和科研工作。E-mail:dzzdoron@sina.com。

内,随着硫酸铵饱和度的增加,MDL 凝血活性增强,饱和度为 70%时,凝集效价达到最高,随后又开始下降。因此,后续实验均采用饱和度 70%硫酸铵提取 MDL。

表 1 硫酸铵饱和度对 MDL 凝血活性的影响
Table 1 Effect of different saturation of sulfate ammonium on agglutinating activity of MDL

硫酸铵饱和度/% Ammonium sulfate saturation	20	30	40	50	60	70	80
MDL 凝集效价 Agglutination titer	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁶	2 ⁷	2 ⁹	2 ¹⁰	2 ⁷

2.2 MDL 的化学性质

根据蛋白质含量标准曲线,测得 MDL 蛋白质含量为 0.635 mg·mL⁻¹。根据葡萄糖标线,测

表 2 pH 对 MDL 凝血活性的影响
Table 2 Effect of pH on agglutinating activity of MDL

pH	对照(CK)	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0	11.0	12.0
凝集效价 Agglutination titer	2 ⁵	2 ⁹	2 ⁹	2 ⁵	2 ⁵	2 ⁵	2 ⁵	2 ⁴	2 ³	2 ³	2 ³

2.4 MDL 的热稳定性

MDL 经高温处理 30 和 60 min 后,MDL 的热稳定性很强(见表 3),即使是 100℃ 处理

表 3 温度对 MDL 凝血活性的影响
Table 3 Effect of temperature on agglutinating activity of MDL

温度/℃ Temperature	对照(CK)	70℃		80℃		90℃		100℃	
		30 min	60 min	30 min	60 min	30 min	60 min	30 min	60 min
凝集效价 Agglutination titer	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴

2.5 糖对 MDL 凝血活性的影响

糖溶液对 MDL 凝血活性的影响见表 4,在供试糖类中,大部分对 MDL 的凝血活性没有影响,只有半乳糖表现出很强的促进作用。对照组在稀释梯度为 2⁵时,凝血活性消失,但通过半乳糖的

表 4 糖对 MDL 凝血活性的影响
Table 4 Effect of sugars on agglutinating activity of MDL

糖 Sugar	对照 (CK)	葡萄糖 Glucose	半乳糖 Galactose	果糖 Fructose	木糖 Xylose	乳糖 Lactose	蔗糖 Sucrose	D-麦芽糖 D-maltose	D-甘露糖 D-mannose
凝集效价 Agglutination titer	2 ⁵	2 ⁵	2 ⁷	2 ⁵	2 ⁵	2 ⁵	2 ⁵	2 ⁵	2 ⁵

3 结论与讨论

地稔是具有多种药理作用的中草药,近年对地稔的研究集中在活性成分如没食子酸和芦丁等

得样品中糖含量为 0.696 mg·mL⁻¹。试验结果表明:地稔中含有的促凝血活性物质为糖蛋白,具有较强的凝血活性,与植物凝集素类似。结合表 1 以及凝集素样品中蛋白质含量,可以计算出 MDL 的最低凝血浓度为 0.62 μg·mL⁻¹。

2.3 缓冲液 pH 对 MDL 凝血活性的影响

由表 2 可知,pH 为 5.0~8.0 时,MDL 的凝血活性较为稳定。pH>9.0 时,随 pH 的升高凝血活性下降明显,表明 MDL 在碱性条件下,结构不稳定,活性易受抑制。pH 为 3.0~4.0 时,MDL 的凝集活性很强,倍比稀释至 2⁹还具有凝集能力,表明酸性条件可以促进 MDL 的凝血活性。在中性范围内,凝集活性稳定,几乎不受 pH 的影响。

60 min,凝血活性依旧不减。在地稔制剂的加工过程中,利用其热稳定性,通过热处理去除杂蛋白,有利于纯化凝集素、保持其凝血活性。

处理后,稀释梯度至 2⁷时,还具有正常的凝血活性。凝集素分子结构不同,其对各种糖的专一性、特异性结合有所差别。本试验中,MDL 对多数供试糖类并无专一结合位点,因此本试验的糖类对 MDL 的凝集活性并无抑制作用。

的测定分析^[9-11],但对其止血活性成分及其止血机制的研究极少,临床报道地稔止血作用可能与其含有的鞣质及酚类有关^[12],而周添浓研究表

明,地稔注射液的止血有效成分可能为酚类物质^[13]。本试验结果表明,地稔促凝血物质可通过硫酸铵盐析获得,其化学性质为糖蛋白,具有较强的凝血活性,可以推断其为植物凝集素,对以往的研究做出有益的补充。

MDL 的酸碱稳定性较强。在酸性或中性环境,凝血活性增强或维持,而在碱性条件下,受到一定程度的抑制。MDL 本质为糖蛋白,糖蛋白的生理功能主要由蛋白质部分决定,但作为辅助的糖链结构也不容忽视。糖链结构组成的微小差异会导致其功能的显著差异^[14]。在碱性条件下,糖蛋白中 O-糖苷键被水解,糖蛋白结构改变,可能导致其凝血活性减弱。另外,MDL 的热稳定性极强,这可能与其化学组成有关。凝集素活性位点的性质决定凝集素的热稳定性,若位点为糖链,糖链对温度的敏感性相对较弱,热稳定性较好;若位点为蛋白质或多肽类物质,高温会使蛋白质构象改变、变性失活,则此类凝集素热稳定性差^[15]。推测 MDL 的活性位点为糖链,而且 MDL 中糖含量较高,有利于提高 MDL 的热稳定性。

本试验结果表明,地稔促凝血物质为凝集素,性质为糖蛋白。碱性条件可抑制 MDL,而酸性条件则有较强促进作用;温度对 MDL 影响很小;半乳糖则有明显促进作用。后期对 MDL 的分离纯化、凝血活性的深入研究,为揭示 MDL 凝血机制以及临床上应用地稔治疗出血症提供理论依据。

参考文献:

[1] 唐新霖,唐建平.地稔栽培技术及开发前景[J].特种经济动

植物,2007(6):27.

- [2] 何桂芳,夏宜平.优良野生观花地被植物——地稔[J].北方园艺,2005(3):39.
- [3] 黄秀珍,邹秀红.福建泉州野牡丹科药用植物的资源状况[J].福建中医药,2011,42(3):52-54.
- [4] 李丽,周芳,黄琼珍.地稔的化学成分和药理作用研究进展[J].广西中医学院学报,2011,14(6):73-75.
- [5] 唐海淑,宁雪飞,陈亮亮,等.骆驼蓬种子凝集素粗品活性的初步研究[J].西北植物学报,2010,30(4):0813-0820.
- [6] 安利国,邢维贤.细胞生物学实验教程[M].2版.北京:科学出版社,2010.
- [7] 孙册.谈谈凝集素作用的基本原理和糖蛋白的寡糖结构[J].生命的科学,1994,14(2):36-37.
- [8] 韩红艳,冀爱青,吕晨辰,等.相同生长条件下几种枣叶凝集素生物活性分析[J].北方园艺,2012(1):31-34.
- [9] 麻秀萍,张明昶,徐文芬,等.黔产地稔药材中没食子酸和芦丁含量的测定与评价[J].贵州农业科学,2012,40(4):59-61.
- [10] 黄仕清,徐文芬,王道平,等.地稔药材中挥发性成分的测定分析[J].贵州农业科学,2013,41(8):76-78.
- [11] 麻秀萍,张明昶,徐文芬,等.不同采收期对黔产地稔中多糖含量的影响[J].贵州农业科学,2012,40(5):45-46.
- [12] 江苏新医学院.中药大辞典(上册)[M].上海:上海人民出版社,1977:804.
- [13] 周添浓.地稔注射液对家兔血液的影响[J].广州中医学院学报,1995,12(1):40.
- [14] 尹恒,王文霞.植物糖生物学研究进展[J].植物学报,2010,45(5):521-529.
- [15] 胡新平,李智恩,徐祖洪.海藻凝集素研究进展[J].海洋科学,2000,24(8):34-37.

Study on the Extraction and Agglutination of Lectin from *Melastoma dodecandrum* Lour

DENG Zheng-dong¹, CHENG Ai-fang¹, LI Xiu-li²

(1. School of Life Science and Technology, Wuhan Institute of Bioengineering, Wuhan, Hubei 430415; 2. School of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350108)

Abstract: In order to study and utilize the procoagulant activity substances from *Melastoma dodecandrum* Lour, taking *Melastoma dodecandrum* Lour as material, extraction of lectin and the effect of physical and chemical agents on agglutinating activity were studied, such as pH, temperature and sugar. The results showed that the lectin extracted by ammonium sulfate precipitation and dialysis had agglutinating activity. Alkaline conditions had significantly inhibited the agglutinating activity. While acidic conditions had a strong role in promoting. The effect of temperature on agglutinating activity was little. Galactose had an obvious effect on promoting.

Keywords: *Melastoma dodecandrum* Lour; lectin; extraction; agglutinating activity