

# 苦瓜抗生育活性成分的化学研究 (I)

贵阳医学院天然药物化学教研室 (550004) 常凤岗\* 李建梅

**摘要** 运用DEAE-纤维素柱层析和超速离心技术,从黔产葫芦科植物苦瓜 *Momordica charantia* L.果实的压榨汁中,分得一植物蛋白质,经化学和凝胶电泳鉴定,其分子量为34 000,等电点为pH8.4,由17种氨基酸组成,N-末端氨基酸为亮氨酸。动物实验结果表明,该蛋白质能抑制雄鼠精子发育,具有显著的抗生育活性,有效率达88%以上。

**关键词** 苦瓜 苦瓜蛋白 抗生育活性

苦瓜 *Momordica charantia* L. 为葫芦科苦瓜属植物,性味苦寒,具有清热解凉,滋养强壮,降低血糖等功效<sup>[1]</sup>。据贵阳医学院组织胚胎教研室通过动物实验证实,鲜苦瓜汁具有较强抗生育活性<sup>[2]</sup>。为寻找非激素类男性抗生育药物,我们从黔产鲜苦瓜果实的压榨汁中,运用DEAE-纤维素柱层析和超速离心技术分离得到一个分子量为34 000的均一植物蛋白质,收率约为0.005%。该蛋白成分经PC, UV, 琼脂平板电泳,氨基酸分析和聚丙烯酰胺凝胶电泳(等电聚焦和SDS-PAGE)鉴定,为单一多肽链的碱性蛋白质,等电点为pH 8.4,由17种氨基酸组成,其N-末端氨基酸以Dansyl法测定为亮氨酸。动物实验结果表明,该蛋白成分具有抗精子正常发育的作用,能使雄鼠睾丸缩小,曲细精管生精上皮细胞受损,细胞内RNA含量减少,实验组受孕率、产仔率与对照组比较有显著差异( $P < 0.01$ )<sup>[3, 4]</sup>。

## 1 仪器和试剂

超速离心用Prepspin-75超速离心机;氨基酸测定用835-50型氨基酸自动分析仪(日立);电泳鉴定用DYY-Ⅱ1型电泳仪(北京六一仪器厂);UV测定用751G分光光度计和HD-76-6核酸蛋白检测仪(上分);旋光测定用WZZ-1型自动指示旋光仪(上海光学仪器厂);荧光检测用3650 Å紫外分析仪(上海科艺光学仪器厂);冷冻干燥用LZG-1型冻干机;DEAE-Cellulose(Whatman产品)、Sephadex G75(Pharmacia产品)、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺和两性电解质(amphoine)等均为上海化学试剂采购供应站分装;聚酰胺薄膜为浙江黄岩化学试验厂产品;层析用滤纸为杭州新华造纸厂产品;标准蛋白为Sigma产品;其余试剂和试剂均为分析纯或化学纯。苦瓜购自贵阳市蔬菜公司,经本院生药教研室赛明兰副教授鉴定。

## 2 提取和分离

鲜苦瓜洗净、去籽并粉碎后,经压榨机压榨得绿色原汁,于2~5℃静置24h,滤过,滤液于5℃下缓缓加入1倍量乙醇,充分搅拌后置冰箱过夜。低温离心(4℃),上清液同法加入乙醇再进行2次分级沉淀,乙醇加入量分别为原汁的0.8倍和0.5倍。收集第3次离心后的沉淀物,用适量水溶解置冻干机中,于-25℃冷冻过夜后,继续冷冻至-45℃并减压至真空度0.1333kPa,48h后取出得白色粉末状固体。将此粉末用pH7.2的磷酸缓冲液配成50%溶液,上一预先用0.001mol/L pH7.2的磷酸缓冲液平衡过夜的Sephadex G75柱(4×60cm),以同一缓冲液洗脱至流出液中茚三酮反应为阴性。收集洗脱液置透析袋内,于2~4℃用蒸馏

\*Address: Chang Fanggang, Department of Medicinal Chemistry, Guiyang Medical College, Guiyang

水透析至无 $\text{Na}^+$ 和 $\text{PO}_4^{3-}$ 离子为止(以焰色反应和硝酸银反应鉴定之),透析内液冷冻干燥24h后得白色晶形粉末,即苦瓜总蛋白A。

将A配成1%水溶液进行分级超速离心,第1次离心用50 000r/min角头(Ti),真空度0.1333kPa,离心速度30 000r/min(80 000×g),样品液分装于10支离心管中(10×10ml)于-2℃离心2h。用定量吸管吸取上清液,分装于10支5ml离心管中进行第2次离心,用72 000r/min角头(Ti),真空度0.0666kPa,离心速度50 000r/min(180 000×g),于-4℃离心3h,收集沉淀用适量水溶解后-45℃冷冻干燥48h,得苦瓜蛋白B。

取B 0.2g溶于pH8.7 0.01mol/L Tris-HCl缓冲液5ml中,上一预先用相同缓冲液平衡24h的DEAE-cellulose柱(3×50cm)进行柱层析,用核酸蛋白检测仪(280nm)测定洗脱液蛋白浓度,以5ml/15min一管进行洗脱和分部收集,洗脱条件和层析结果见图1。收集峰2洗脱液,用蒸馏水透析24h后于-45℃冷冻干燥48h,得白色晶形粉末92mg(苦瓜蛋白C),得率约0.005%。

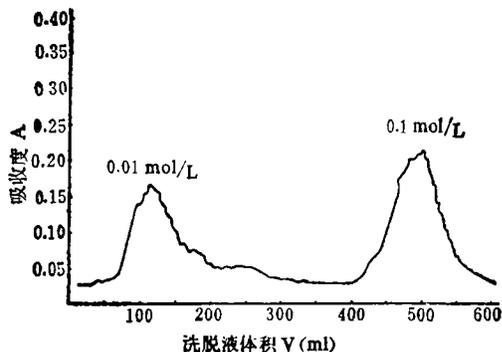


图1 苦瓜蛋白C的DEAE-Cellulose柱层析图谱

### 3 鉴定

苦瓜蛋白C为白色结晶性粉末,易溶于水,水溶液pH7.6,  $[\alpha]_D^{25} + 4^\circ$  (c, 0.68,  $\text{H}_2\text{O}$ ); UV  $\lambda_{\text{max}}^{280\text{nm}}$ ; 茚三酮,双缩脲反应均为阳性;PC鉴定为单一紫红色斑点(图2)。

将苦瓜蛋白进行琼脂平板电泳鉴定,琼脂平板用离子强度0.05, pH8.6的硼酸盐缓冲液配成1.2%的琼脂溶液制板,各组分蛋白用水配成4%溶液点样,电泳结果见图3。总蛋白A呈a、b、c、d 4个区带,c得单一向正极泳动的区带b。

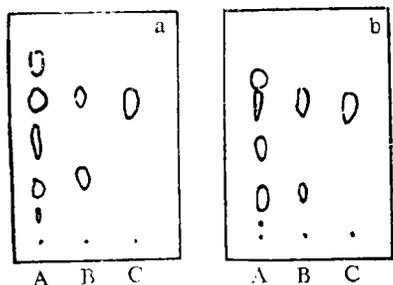


图2 苦瓜蛋白的PC图谱

展开剂: a-正丁醇-乙酸-乙醇-水(4:1:1:2)

b-正丁醇-冰乙酸-水(12:2:5)

显色剂: 0.5%茚三酮丙酮溶液

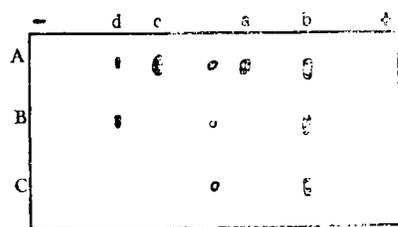


图3 苦瓜蛋白的琼脂电泳图谱

电泳电压: 200V 电泳时间: 5h

固定液: 2%醋酸/70%EtOH

染色剂: 氨基黑10B

苦瓜蛋白的聚丙烯酰胺凝胶电泳,按文献[5]及表1的方法制备凝胶并进行电泳。结果(图4)表明,苦瓜蛋白C呈单一区带。

分子量测定,以十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)法测定苦瓜蛋

白的分子量。按上法制备凝胶：另取苦瓜蛋白A、C和标准分子量蛋白，分别以pH 7.2的磷酸缓冲液配成10 $\mu$ g/ $\mu$ l的溶液，并各加入等量样品处理液(1%SDS 5ml, 0.1%巯基乙醇1ml, 蔗糖0.1g, 溴酚兰1mg, 加水至10ml)，于37 $^{\circ}$ C放置3h后上样。电泳电压60V(起始电压)，下层胶电压100V，电流30~50mA，电泳时间7h；剥胶后，于12.5%的三氯醋酸中固定30min，再以0.025%考马斯亮蓝R<sub>250</sub>染色。电泳结果见图5。

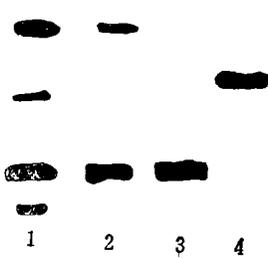


图4 苦瓜蛋白的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

电泳电压：200V 每管电流：2~4mA

电泳时间：3h 指示剂：溴酚兰

染色剂：0.025%考马斯亮蓝 R<sub>250</sub>的10%三氯醋酸溶液

样品液：1~3为苦瓜蛋白A~C, 4-胰岛素标准品

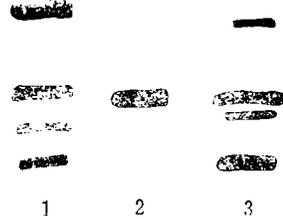


图5 苦瓜蛋白SDS-PAGE谱

1-标准蛋白：牛血清蛋白(66 000)、卵清蛋白(45 000)、 $\beta$ -乳球蛋白(35 000)、天花粉蛋白(24 000) 2-苦瓜蛋白C 3-苦瓜蛋白A

以标准蛋白质分子量的对数( $\log MW$ )和其相对迁移率( $m_{R\text{标}} = \text{标准品迁移率} / \text{指示剂迁移率}$ )计算，得直线回归方程： $\log MW = 5.46 - 1.6013m_{R\text{标}}$ ， $r = -0.9982$ 。将苦瓜蛋白C的相对迁移率代入方程计算，求出其分子量为34 000。由其电泳图谱中还可推断苦瓜蛋白C为单一多肽链结构<sup>[6]</sup>。

等电点测定：采用聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳技术测定苦瓜蛋白C的等电点为pH 8.4。分析条件见表1：取丙烯酰胺溶液(Acr 30g, Bis 1g溶于100ml H<sub>2</sub>O中)3份，40% ampholine溶液(pH 3~9.5)0.3份，水2.8份，甘油1份，1%过硫酸铵0.7份，0.1%苦瓜蛋白C水溶液1份，TMED 0.01份，混匀，装入玻璃管中，液柱高10cm，柱面加0.5cm H<sub>2</sub>O，室温静置聚合5h。聚合好的液柱装入电泳槽中，上槽为正极，内装0.2%硫酸水溶液，下槽为负极，内装0.4%乙二胺水溶液。电泳条件：电泳电压200V，每管起始电流2mA，终止电流0.1mA，电泳时间2h。聚焦结束后，取出液柱置固定液(12.5%三氯醋酸水溶液)中浸泡30min，平衡液(32ml冰醋酸，100ml 95%乙醇，268ml水)漂洗2次，以0.025%考马斯亮蓝R<sub>250</sub>的10%三氯醋酸液染色1h。以方格法计算苦瓜蛋白C的等电点约为pH 8.4<sup>[8]</sup>。

N-末端氨基酸测定：取苦瓜蛋白C 0.2mg置试管中，加1ml 0.5mol/L的碳酸氢钠溶液(含8mol/L脲)溶解，再加入2%二甲氨基萘磺酰氯(DNS-U)丙酮液1ml，混匀，37 $^{\circ}$ C放置20h，反应液置透析袋内于4 $^{\circ}$ C用蒸馏水透析脱盐后，冷冻干燥即得DNS-蛋白；将该蛋白置2ml安瓶中，加5.7mol/L HCl 1ml，抽真空并融封管口，于105 $^{\circ}$ C水解24h。水解后减压抽干，残留物加适量水溶解(pH 2.3)，乙酸乙酯萃取3次，合并乙酸乙酯液，减压浓缩至干后，用0.5ml甲醇溶解，行聚酰胺薄膜双向层析，层析条件及结果见图6。

经与文献报道DNS-氨基酸聚酰胺薄膜双向层析标准图谱<sup>[8]</sup>对照，初步推定苦瓜蛋白C的N-末端氨基酸为亮氨酸。另取亮氨酸标准品制备DNS-Leu后，单独点样及与上述样品液混合点样，相同条件下进行层析，所得图谱与图6一致，进一步给予证实。

表1 苦瓜蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳系统

贮备液		工作液混合比	
a	Tris 6.057g, EDTA 1.17g 水至100ml	a 1.2	1
b	Acr 19.6g, Bis 0.4g 水至100ml	b 2.4	
c	过硫酸铵 0.5g 水至5ml	c 0.15	
d	蔗糖 2.5g 水至10ml	e 0.05	0.2
e	TMED 2.5ml 水至5ml	水 7	
f	溴酚蓝 0.004g 水至0.1ml	a 1.2	
g	0.1%样品液	b 1.8	0.03
		c 0.15	
		e 0.05	
h	电极缓冲液(0.025mol/L)硼砂30.512g, 硼酸4.948g 水至1000ml	水 7	
		d 0.2	
		f 0.02	
		g 0.2	
		90ml水至1440ml, pH9.0	

Acr-丙烯酰胺; Bis-甲叉双丙烯酰胺; Tris-三羟甲基氨基甲烷; TMED-四甲基乙二胺; 分离胶-浓缩胶-样品液(1:0.2:0.03), pH8.9

氨基酸分析: 精密称取苦瓜蛋白C7mg, 加6mol/L HCl于117°C水解24h, 减压抽去残酸, 水解液稀释5倍后, 用氨基酸自动分析仪测定, 测定结果见表2。苦瓜蛋白C由17种氨基酸组成。

致谢: 中国科学院成都生物研究所代作氨基酸分析; 贵州省药检所代测紫外光谱; 本院药剂教研室代作冷冻干燥; 原贵州省生物研究基地徐章雄副研究员给予指导并提供部分标准品。

参 考 文 献

- 1 江苏新医学院, 中药大辞典, 上册, 上海, 上海科技出版社, 1986, 1231
- 2 覃国芳, 等, 贵阳医学院学报, 1985, 10(2); 121
- 3 覃国芳, 等, 贵阳医学院学报, 1985, 10(3); 167
- 4 Guofang Q, et al. Int Symposium on Advances in fertility Regulation Research, 1989, 132
- 5 Takacs B. In Immunological methods, (ed. by Lefkovits I, et al), New York,

- Academic press, 1979, 1: 81
- 6 Albert L. Proteins Structure and Function. New York, Pergamon Press, 1980, 64
- 7 中国科学院上海药物研究所, 中草药有效成分提取与分离, 第二版, 上海: 上海科技出版社, 1983, 189
- 8 蔡武城, 等, 生物物质常用化学分析法, 北京: 科学出版社, 1982, 104

(1990-12-30 收稿)

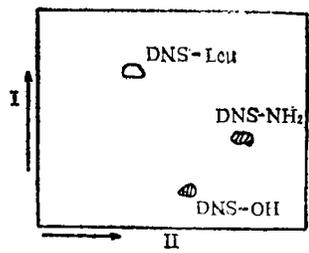


图6 苦瓜蛋白C N-末端的DNS-aa聚丙烯酰胺薄层析图谱

I向—1.5%甲酸 II向—苯-冰醋酸(9:1)  
检测: 紫外分析仪(365nm)下观察荧光定位

表2 苦瓜蛋白水解氨基酸种类及含量 (mg/g)

名称	含量	名称	含量
天冬氨酸	2.27	异亮氨酸	5.91
谷氨酸	4.51	亮氨酸	6.93
甘氨酸	3.53	蛋氨酸	4.83
苏氨酸	3.16	组氨酸	6.82
丙氨酸	4.91	酪氨酸	5.31
谷氨酰胺	5.16	苯丙氨酸	4.72
丝氨酸	5.68	赖氨酸	5.03
胱氨酸	0.92	精氨酸	4.06
缬氨酸	6.59		

上海市清华科技函授学院 中医函授院招生

经上海教育局批准面向全国招生, 免试入学, 学制2年, 选用全国高等中医院校函授教材, 确保大专水平。各科均由专家教授亲自执教, 精心辅导并负责解答学员提出的疑难问题, 与全国高等教育中医专业自学考试紧密结合。凡高、初中文化程度者均可报名。详见简章来函即赠, 地址: 200085上海085-314信箱中医函授院李琳收。

# ABSTRACTS OF ORIGINAL ARTICLES

## Studies on the Antifertility Chemical

### Constituents of Balsampear (*Momordica charantia*)

Chang Fenggang , Li Jianmei

A protein was isolated by DEAE-cellulose Chromatography and ultracentrifuge from the fruits of *Momordica charantia* L., and identified by chemical and polyacrylamide gel electrophoresis methods. The molecular weight was 34 000, isoelectric point pH 8.4, N-terminal amino acid was leucine. It was composed of 17 kinds of amino acids. The protein has been shown to have antifertility action in male rats.

(Original article on Page 281)

## Studies on the Chemical Constituents

### from the Root of Thistleleaf Adina (*Adina rubella*)

He Zhisheng, Fang Shiyue, Xu Chuanfeng

Eight compounds were isolated from the roots of *Adina rubella* Hance. They were identified as quinovic acid(I), 3-oxo-urs-12-ene-27, 28-dioic acid (II), quinovic acid-3 $\beta$ -O- $\beta$ -D-glucopyranoside(III), quinovic acid-3 $\beta$ -O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside(IV), noreugenin (V), 7-O- $\beta$ -D-glucosyl-noreugenin(VI), scopolin(VII), daucosterol(VIII), by means of spectral analysis and reactions, II, III and IV are isolated from the genus *adina* for the first time.

(Original article on page 285)

## Chemical Constituents of Traditional

### Chinese Drug Shunk Bugbane (*Cimicifuga foetida*)

Li Congjun, Chen Dihua, Xiao Peigen

Ten constituents have been isolated from the rhizomes of *Cimicifuga foetida* L.. Based on spectral evidence and by direct comparison with authentic samples, they were identified as isoferulic acid(I), 3-acetylcaffeic acid(II), caffeic ester glucoside(III), cimifugin(IV), cimifugin glucoside(V), 6-isoinosine(VI), cimidahurine(VII), cimidahurinine(VIII), D-glucose (IX) and sucrose(X).

(Original article on page 288)

## Determination of the Trace Elements

### Ox-gallstong from Three Sources with EDAX

Ye Yucong, Chen Qinge

Nine samples of OX-gallstong have been studied by scanning electron microscope and energy dispersive X-ray spectrometer. The determinative results indicated that calculus of *Bos taurus domesticus* Gmelin contained ten trace elements (Na, K, Ca, Mg, Zn, Fe, Cu, P, Cl, S), calculus of *B. grunniens* L. contained eight trace elements (Na, K, Ca, Fe, Cu,