

血水草生物碱致钉螺肝脏损伤机制研究

彭玲, 袁仕善, 杨盛清, 彭飞, 刘年猛, 黄琼瑶*

湖南师范大学医学院, 湖南长沙 410006

摘要:目的 分析血水草生物碱(ECA)对钉螺肝脏蛋白质和糖原水平、酶活性变化及脂质过氧化的影响,探讨血水草杀灭钉螺机制。方法 10 mg/L ECA药液浸泡钉螺36 h,解剖活钉螺,分离肝脏,测定总蛋白质和糖原、丙二醛(MDA)水平及丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)和乳酸脱氢酶(LDH)的活性。结果 ECA浸泡后钉螺肝脏总蛋白质和糖原的量均显著降低, AKP、ALT、AST、LDH酶活性明显下降,与清水对照组相比,均存在显著差异($P < 0.05$ 、 0.01);而 ACP及MDA水平差异不显著。结论 ECA抑制钉螺肝脏 AKP、ALT、AST、LDH酶活性,影响钉螺肝脏糖及蛋白质代谢,破坏代谢平衡,导致肝功能紊乱,从而引起钉螺死亡。

关键词: 血水草; 生物碱; 钉螺; 糖原; 脂质过氧化

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)01-0127-03

Injury mechanism of *Eomecon chionantha* alkaloids in liver of *Oncomelania hupensis*

PENG Ling, YUAN Shi-shan, YANG Sheng-qing, PENG Fei, LIU Nian-meng, HUANG Qiong-yao

Medical College of Hunan Normal University, Changsha 410006, China

Key words: *Eomecon chionantha* Hance; alkaloid; *Oncomelania hupensis* Gredler; glycogen; lipid peroxidation

血水草 *Eomecon chionantha* Hance 为罂粟科白屈菜族血水草属植物,是我国独属、独种特有物种,广泛分布于长江流域、华南、华东和西南地区,西北秦岭也有分布,资源丰富,具有多种药理作用。生物碱类化合物是血水草的主要成分,包括白屈菜红碱、血根碱、原阿托品碱、别隐品碱、氧化血根碱、白屈菜红默碱^[1]。本课题组研究发现,血水草根及根茎中提取的生物碱具有良好杀灭钉螺作用,经质谱鉴定证实血水草生物碱(*Eomecon chionantha* alkaloid, ECA)浸泡钉螺,钉螺的肝脏蛋白质表达发生改变^[2]。为探讨 ECA 杀螺的作用机制,本实验研究 ECA 对钉螺肝脏相关酶活性、糖原与蛋白质水平、脂质过氧化水平的影响。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Hitachi—7180 全自动生化分析仪(日本), K30H 高速冷冻自动平衡离心机(美国 Sigma), SHP—250 型生化培养箱为上海精宏实验设备有限公司产品。

考马斯亮蓝 G-250 系美国 Amresco 产品, 葱酮系国药集团化学试剂有限公司产品。丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)和乳酸脱氢酶(LDH)测定试剂盒均为日立自动生化分析仪配套试剂。丙二醛(MDA)试剂盒购自南京建成生物工程研究所。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 ECA 的制备

血水草采自湖南省桃江县人形山,经湖南中医学院周天达教授鉴定为血水草 *Eomecon chionantha* Hance。取完全干燥的血水草根及根状茎粉碎,按文献方法提取 ECA^[3]。ECA 得率为 1.009%。

1.3 药物浸泡钉螺实验

湖北钉螺 *Oncomelania hupensis* Gredler 由湖南省血吸虫病防治研究所提供,置实验室饲养 1~2 d,选择活力强、无感染、7~8 旋的成螺进行实验。设 10.0 mg/L ECA 药物组和清水对照组,每 500 mL ECA 药液或清水中投放装有 50 只活螺的

收稿日期: 2010-05-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(307718720); 长沙市科技局项目(K070733-31); 湖南师范大学校青年基金项目(医 080626)

作者简介: 彭玲(1983—),女,湖南岳阳人,硕士,现工作单位为中南大学湘雅医院肾内科。Tel: (0731)89753255 E-mail: pengling39@163.com

*通讯作者 黄琼瑶 Tel: (0731)88912429 E-mail: hqycs@yahoo.com.cn

尼龙袋 1 只, 25 °C 光照培养箱中分别浸泡 36 h 后, 各组钉螺均用清水洗净, 水养法检测存活情况后, 选活螺解剖^[4], 快速分离肝脏, 待测或 -80 °C 冻存备用。

1.4 蛋白质水平测定

取钉螺肝脏, 冷冻干燥, 研碎成粉末。称取干粉 10 mg, 加生理盐水 1 mL, 充分混合, 并匀浆, 10 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液。采用考马斯亮蓝染色法, 以牛血清白蛋白为标准, 测定各组蛋白质的量。

1.5 糖原测定

按蛋白质定量测定方法制备钉螺肝脏干粉。称取干粉 10 mg, 加 30%KOH 溶液 2 mL, 置沸水浴 20 min, 冷却后加入 95%乙醇 10 mL, 离心, 沉淀物即为糖原。采用蒽酮显色法, 以葡萄糖为标准, 在 620 nm 处测定吸光度值, 测定各组糖原水平。

1.6 丙二醛 (MDA) 测定

30 个钉螺肝脏为一个样本, 每个样本称质量, 每 0.1 g 钉螺肝脏加入 10%三氯乙酸 0.4 mL, 冰浴

匀浆, 6 500 r/min, 离心 15 min, 收集上清液。考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度后, 按照试剂盒说明测定肝脏中 MDA 水平。

1.7 酶活性测定

30 个钉螺肝脏为一个样本, 每只钉螺肝脏加入预冷 PBS 溶液 (pH 7.2) 50 μ L, 冰浴匀浆, 6 500 r/min 离心 15 min, 离心 3 次, 收集上清液。酶活性测定均在 Hitachi—7180 型全自动生化分析仪上完成。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用独立样本 *t* 检验进行组间统计。

2 结果

ECA 对钉螺肝脏总蛋白质、糖原、MDA 水平及 ALT、AST、ACP、AKP、LDH 活性的影响结果见表 1。ECA 浸泡后钉螺肝脏总蛋白质和糖原水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), AKP、ALT、AST、LDH 酶活性明显下降, 与清水对照组相比, 均存在显著差异 ($P < 0.05$); 而 ACP 及 MDA 水平差异不显著。

表 1 ECA 对钉螺肝脏蛋白质、糖原、MDA 水平及相关酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 30$)

Table 1 Effect of ECA on protein, glycogen, MDA level, and relative enzymatic activity in liver of *O. hupensis* ($\bar{x} \pm s, n = 30$)

组别	总蛋白/(mg·g ⁻¹)	糖原/(mg·g ⁻¹)	MDA/(nmol·mg ⁻¹)	ALT/U
清水对照	168.11 ± 12.21	22.61 ± 0.35	6.08 ± 0.29	81.50 ± 7.78
ECA	70.60 ± 10.21**	10.72 ± 0.06*	5.40 ± 0.69	60.33 ± 3.21*
组别	AST/U	ACP/U	AKP/U	LDH/U
清水对照	771.00 ± 33.94	129.23 ± 25.29	635.50 ± 40.30	5.33 ± 1.53
ECA	612.33 ± 49.01*	119.50 ± 16.02	396.00 ± 53.74*	2.67 ± 0.58*

与清水对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs water control group

3 讨论

植物杀螺剂因具有可就地取材、易生物降解、对环境污染小、资源分布广泛等优点而成为药物灭螺研究的重要内容。本课题组在进行植物杀螺剂的研究中, 发现并证实了从我国特有物种罌粟科血水草属植物血水草的根及根茎中提取的 ECA 具有很好的杀灭钉螺作用, 可能是一种具有发展潜力的植物灭螺剂, 值得对其灭螺机制进行进一步研究。

糖是生物机体重要的能源物质, 蛋白质是生物机体细胞重要的结构和功能成分, 二者在维持生物机体正常的生命活动中起着非常重要的作用。Tiwari 等^[5]发现绿玉树乳胶提取物引起椎实螺糖和蛋白质明显减少, 并呈剂量依赖性, 国内也有学者观察到

植物杀螺剂引起湖北钉螺糖原降低^[6-7]。王宏等^[8]认为, 植物提取物使钉螺软体糖原减少的原因可能有: ①影响钉螺的肝功能, 直接影响糖原合成; ②激活或钝化糖原代谢过程中的某些酶; ③影响消化道功能, 细胞摄取葡萄糖减少, 糖原合成下降。糖原是动物机体的重要能源储备, 其量的下降将会对机体的生理机能产生影响, 于是引起钉螺整体活性的降低。同时, 药物处理螺类后, 由于应激条件下需要大量能量以解除毒性和克服应激, 在消耗有限糖的同时使蛋白质分解以提供能量, 从而导致蛋白质减少^[5]。ECA 处理后钉螺肝脏糖原和蛋白质的量均明显降低, 说明在 ECA 作用下肝脏的糖代谢和蛋白质代谢发生变化, 证明肝脏功能受到损害。

植物杀螺剂对酶活性的影响与剂量和作用时间有关。ALT、AST 是钉螺体内两种最重要的转氨酶，是联系蛋白质合成和糖代谢的桥梁，是反映肝损伤的一个很灵敏的指标。据报道^[9]，植物杀螺剂对钉螺肝脏转氨酶影响明显，并且药物浓度越高，转氨酶活性升高越明显，然而当钉螺肝功能严重受损甚至肝细胞坏死时，转氨酶活性明显下降。本实验结果观察到 ALT、AST 两种转氨酶活性均下降，推测药物在 10 mg/L 的质量浓度下作用 36 h 后，钉螺肝脏已遭到严重实质损害。AKP 是细胞膜标志酶，在钉螺体内，AKP 主要分布在钉螺的消化系统和头足部上皮，ECA 处理后 AKP 酶活性的降低，可能阻碍钉螺吸收和运输营养物质。陈盛霞等^[6]在研究银杏外种皮对钉螺的杀灭机制时也发现用药组的 AKP 酶活性明显受到抑制。尹蔚琳等^[10]在探讨珙桐科植物喜树灭螺机制时，也认为 AKP 是钉螺对外界反应最为强烈的酶之一。LDH 在钉螺体内广泛分布，它是无氧酵解途径的重要酶之一。关于植物杀螺剂对 LDH 的影响，目前有两种结论：第一种认为植物杀螺剂作用于螺类的无氧酵解途径，明显抑制 LDH 酶的活性^[11-12]；第二种认为无氧酵解不是植物杀螺剂的作用位点，LDH 酶活性变化不大^[6]。本研究结果与第二种结论吻合。

综上所述，本研究结果提示，ECA 抑制钉螺肝脏 AKP、ALT、AST、LDH 酶活性，影响钉螺肝脏糖及蛋白质代谢，破坏代谢平衡，导致肝功能紊乱是钉螺死亡的重要原因之一。

参考文献

- [1] 杜方麓, 陈胜璜, 阳长明. 血水草化学成分研究 [J]. 中草药, 1993, 24(4): 177-179.
- [2] 彭玲, 黄琼瑶, 刘建军, 等. 血水草生物碱致钉螺肝脏蛋白质差异表达分析 [J]. 中草药, 2010, 41(3): 431-435.
- [3] 杨华中, 黄琼瑶, 刘年猛, 等. 血水草杀螺成分-生物碱的提取 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2003, 15(6): 450-451.
- [4] 李赋京. 钉螺的解剖与比较解剖 [M]. 武汉: 湖北人民出版社, 1956.
- [5] Tiwari S, Singh A. Alterations in carbohydrates and the protein metabolism of the harmful fresh water vector snail *Lymnaea acuminata* induced by the *Euphorbia tirucalli* latex extract [J]. *Environ Res*, 2005, 99: 378-386.
- [6] 陈盛霞, 吴亮, 杨小明, 等. 银杏外种皮对钉螺的杀灭机理 [J]. 动物学报, 2007, 53(1): 190-194.
- [7] 陈仟, 王万贤, 柯文山, 等. 百部总碱对钉螺酯酶同工酶活性及糖原含量的影响 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2008, 20(2): 130-132.
- [8] 王宏, 蔡伟民, 王万贤, 等. 生态工程中群落模型植物灭螺机理研究 [J]. 长江流域资源与环境, 2005, 1(1): 119-122.
- [9] 刘年猛, 黄琼瑶, 彭飞, 等. 血水草生物碱对钉螺肝脏酶活性的影响 [J]. 中药材, 2005, 28(1): 42-44.
- [10] 尹蔚琳, 王万贤, 吴明煜, 等. 珙桐科植物喜树灭螺机理研究 [J]. 湖北大学学报: 自然科学版, 2009, 31(2): 184-187.
- [11] 谭苹, 杨建明, 肖瑞芬, 等. 紫红链霉菌对钉螺酶组织化学的影响 [J]. 动物学报, 2006, 52(1): 109-114.
- [12] El-Ansary A K, Al Daihan S K. Effect of sublethal concentration of *Solanum nigrum* on transaminases and lactate dehydrogenase of *Biomphalaria arabica*, in Saudi Arabia [J]. *J Egypt Soc Parasitol*, 2007, 37(1): 39-50.