

夹竹桃对钉螺酯酶同工酶作用的初步分析*

柯文山 杨 毅 王万贤 马安宁 刘幼琪

(湖北大学生命科学学院 武汉 430062)

ANALYSIS ON THE EFFECT OF *NERIUM INDICUM*
LEAVES ON EST ISOZYMES IN *ONCOMELANIA HUPENSIS*

Ke Wenshan Yang Yi Wang Wanxian Ma Anning Liu Youqi

(School of Life Sciences, Hubei University Wuhan 430062)

关键词 夹竹桃水浸液, 钉螺, 酯酶同工酶

Key words Water extract of *Nerium indicum* leaves, *Oncomelania hupensis*, EST isozyme

中图分类号: Q 949.9 文献标识码: A 文章编号: 1000-470X(2000) 03-0257-03

夹竹桃(*Nerium indicum*) 为夹竹桃科(Apocynaceae) 常绿大灌木, 被广泛栽培用于观赏、绿化^[1]。因其资源广泛, 取材方便, 叶含强心苷、欧夹竹桃苷等有效成分, 可杀虫^[2, 3], 故被我们用作杀钉螺(*Oncomelania hupensis*) 试验材料。从试验结果发现其有较强的杀螺作用, 但其杀螺的机理尚不明。因此, 为探讨其杀螺的生理生化机制, 笔者从钉螺对外界环境反应强烈^[4]且具有解毒作用的酯酶^[5, 6]着手, 报道夹竹桃对钉螺酯酶同工酶的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

夹竹桃于 1998 年 4 月采自湖北大学校内, 取其当年萌生枝上部叶, 洗净, 凉干。称取其叶(带茎皮), 按材料(g)与清水(mL) 1 : 100 的比例浸 3 d 后配成母液, 然后稀释成 0.05%、0.1%、0.5%、1% 的浓度系列各 2 000 mL, 装于 2 500 mL 大烧杯中。

钉螺采自汉阳沌南洲江滩。选取 7~8 旋成螺, 逸蚰法剔去阳性螺, 即将每只螺放入盛清水小烧杯中, 静置 1~2 h, 看其是否有囊尾蚴逸出, 如有则为阳性螺。选好的钉螺用尼龙网袋封装浸于上述各浓度夹竹桃叶水浸液中处理, 用于电泳样品制备。每处理 20 只钉螺, 清水对照。同时, 以同样的处理方法作钉螺死亡率的测定。钉螺处理 24 h 后用清水静置 24 h, 玻片压碎方法看其死亡情况。实验重复 3 次。

1.2 样品制备

将上述处理的钉螺 24 h 后取出, 清水漂洗 3~4 h, 压碎去壳, 解剖镜下分取头足部和肝部, 分别加 0.2 mol/L pH7.4 的磷酸缓冲液(0.05 mL/每螺), 冰浴匀浆。0~4 °C 条件离心(650 r/min, 20 min), 取上清液-20 °C 冰箱保存备用。

收稿日: 1999-03-17, 修回日: 1999-05-20。第一作者: 男, 1965 年 10 月生, 硕士, 讲师, 从事植物生态和应用生态研究。

* 国家自然科学基金资助项目(No. 39670654)。

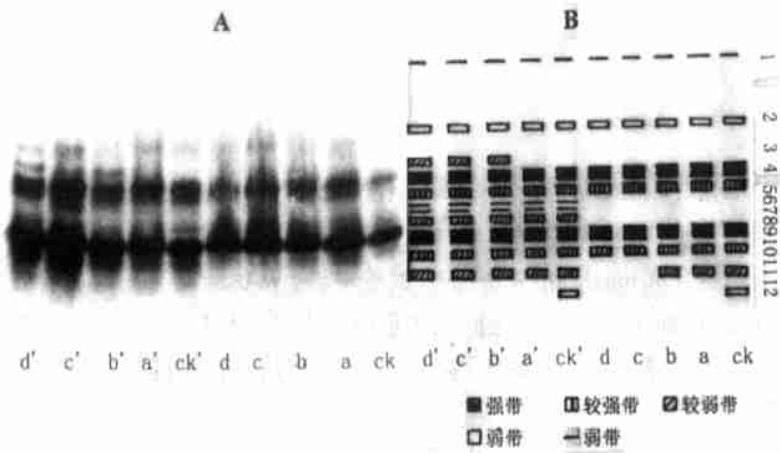
1.3 电泳

参照龙云翔^[7]的方法略加修改,即电极缓冲液由 6.0 g Tris+ 28.8 g gly 定溶至 1000 mL 改为 1.24g Tris+ 0.4 g gly 定溶至 1000 mL。采用聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳。每槽点样 60 μL, 恒流 30 mA, 0~4 条件下电泳。染色参照shaw^[8]的方法。凝胶于 37 水浴保温染色。待酶带显示后流水冲 30 min, 7% 醋酸固定, 拍照并画出模式图。日本岛津 CS-910 型双波长薄层扫描仪扫描。 $\lambda_{扫描}=490\text{ nm}$, $\lambda_{参比}=750\text{ nm}$, 狭缝 9 mm × 0.1 mm, 扫描速度 80 mm/min, 走纸速度 80 mm/min。

2 结果

2.1 夹竹桃对钉螺头足部肌肉酯酶同工酶的影响

钉螺经夹竹桃叶水浸液处理 24 h 后, 头足部肌肉经电泳得酯酶同工酶 7 条, 比水对照(8 条)少 1 条(带 12)(见图 1)。不同浓度处理中, 低浓度(0.05%、0.1%)处理得 7 条同工酶, 比对照少 1 条; 高浓度(0.5%、1%)得 6 条, 比对照少 2 条(带 11、带 12)。各带中, 带 9 染色最深最宽, 扫描面积也最大(图 2), 活性最强; 其次为带 4。这两条带在处理组比对照组染色深, 整个带谱的扫描面积也较对照大。上述分析表明, 处理组的酶活性比对照组高; 随处理浓度的升高, 近正极区的酶带有逐渐减少的趋势。



a~d. 0.05%~1% 浓度夹竹桃叶水浸液处理的钉螺头足部肌肉 EST; a'~d' .0.05%~1% 浓度夹竹桃叶水浸液处理的钉螺肝脏 EST; ck, ck' : 为水对照之头足部肌肉和肝脏 EST
a~d. EST in muscle of head and foot parts of *O. hupensis* treated with 0.05%~1.0% water extract of *N. indicum* leaves; a'~d' .EST in liver of *O. hupensis* treated with 0.05%~1.0% water extract of *N. indicum* leaves;
ck, ck' .EST in muscle of head and foot parts and liver of *O. hupensis* treated with water

图 1 钉螺酯酶(EST)同工酶酶谱(A)及模式图(B)
Fig. 1 EST isozymogram(A) and model figure(B) of *Oncomelania hupensis*

2.2 夹竹桃对钉螺肝脏酯酶同工酶的影响

钉螺肝组织经夹竹桃叶水浸液处理 24 h 后, 经电泳得酯酶同工酶 11 条, 与水对照相比, 酶带数相同, 但谱带类型略有差异(图 1 ck' a'~d')。不同浓度处理中, 0.05% 浓度得 10 条同工酶酶带, 比对照少 1 条带(带 12), 但 0.1%、0.5%、1% 浓度比低浓度及对照多 1 条带(带 3)。肝脏组织带谱中, 仍以带 9 染色最深最宽, 扫描面积也最大(图 3), 其次为带 4, 且均比相应的头足部肌肉深而宽。不同浓度处理中, 带 9、带 4 随浓度增加, 带染色深度、宽度有随之增加的趋势, 0.5% 浓度达高峰, 1% 浓度开始下降; 带 4、带 9 及整个带谱扫描面积也有随浓度增加而增大的趋势, 0.5% 浓度达高峰(图 3)。这些结果表明, 肝组织中酶活性有随浓度增加而增高的趋势, 以 0.5% 达到高峰, 1% 开始下降, 其规律性比头足部肌肉明显。这也许与有毒物质经过肝脏并由此解毒的作用有关。

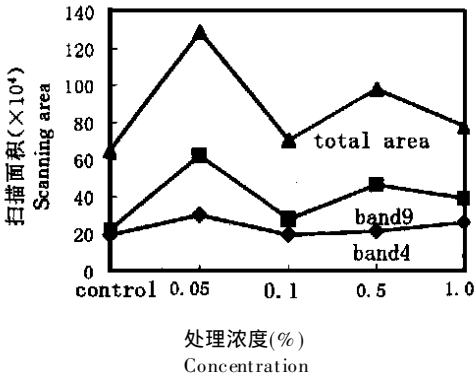


图 2 钉螺头足部肌肉 EST 扫描面积
Fig. 2 Scanning area of EST in muscle of head and foot of *O. hupensis*

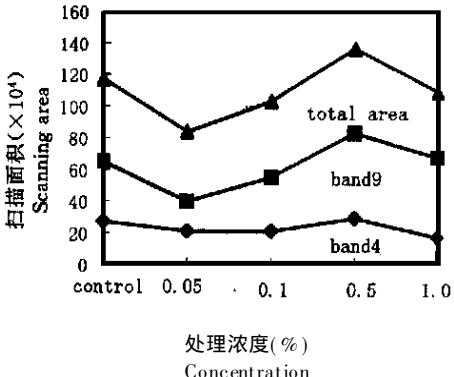


图 3 钉螺肝脏 EST 扫描面积
Fig. 3 Scanning area of EST in liver of *O. hupensis*

3 讨论

钉螺经夹竹桃叶水浸液处理, 其头足部肌肉所得酯酶同工酶均较肝脏少, 正常钉螺也如此。其结果与郭源华结论^[4]一致。头足部肌肉酯酶同工酶活性并未表现出随处理浓度增加而增高的趋势, 而肝脏则表现出这种趋势。肝脏中, 反应强烈活性最强的为带 9, 0.5% 浓度达到高峰, 1% 浓度略有下降。显然, 夹竹桃叶水浸液中的毒物进入钉螺体内后, 经肝脏解毒, 随浓度的增加进入肝脏的毒物增多, 其负担随之加重, 在某种程度上刺激了肝脏一些酯酶同工酶的活性, 使钉螺表现出应激性, 酶活性增高。从钉螺经处理后的死亡率看(表 1), 其死亡率随处理浓度的加大而增高。0.05% 和 0.1% 处理 24 h 后死亡率较低, 0.5% 处理突然增高至 51.7%, 1% 浓度处理则达 88.3%。虽然肝脏是重要的解毒器官, 酯酶具有一定的解毒作用^[5,6], 但其解毒作用毕竟是有限的, 一旦超过其解毒能力, 则会导致其中毒死亡。

表 1 夹竹桃叶水浸液 24h 的杀螺效果

Table 1 Effect of *O. hupensis* killed by water extract of *N. indicum* leaves in 24 h

| 处理浓度(%) Concentration | 对照 Control | 0.05 | 0.1 | 0.5 | 1.0 |
|-----------------------|------------|------|------|------|------|
| 死亡率(%) Mortality | 0 | 13.3 | 21.7 | 51.7 | 88.3 |

经电泳得肝脏酯酶同工酶酶谱中, 较高浓度处理(0.1%、0.5%、1%) 的酶谱在近负极区有新的酶带(带 4) 出现, 而近正极区某些酶带(如带 12) 消失, 也许夹竹桃叶水浸液的某些物质起到了开启或抑制这些位点基因酶合成的作用。然而是何种成分在起作用, 有待进一步研究。

参 考 文 献

1 孙可群, 张应麟, 龙雅宜等. 花卉及观赏树木栽培手册. 北京: 中国林业出版社, 1985. 431 ~ 432

2 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴(第 3 册). 北京: 科学出版社, 1974. 441

3 江苏新医学院. 中药大辞典. 上海: 上海科学技术出版社, 1979. 867 ~ 868

4 郭源华, 许学积, 陈国忠. 钉螺的同工酶及核酸的研究. 中国医学科学院学报, 1980, 2(3): 206 ~ 208

5 陈巧云, 姜家良, 邓启荣等. 农药混合剂对大鼠肠酯酶同工酶的抑制作用. 环境科学学报, 1990, 10(2): 207 ~ 211

6 刘文芳, 关文瑜, 肖翊华. 杂交水稻及三系在发育过程中的酯酶同工酶比较研究. 武汉植物学研究, 1987, 5(3): 267 ~ 274

7 龙云翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术. 北京: 人民教育出版社, 1982. 94 ~ 124

8 Shaw R C, Prasad R. Starch gel electrophoresis of enzymes—A compilation of recipes. *Biochem Genet*, 1969, 4: 297 ~ 320