芫菁斑蝥素对几种动物蛋白磷酸酶 2A 的抑制作用*

李晓飞[1]** 侯晓晖[1] 陈祥盛[2] 娄方明[1] 刘 云[1]

(1. 遵义医学院基础医学院 遵义 563003; 2. 贵州大学昆虫研究所 贵阳 550025)

摘 要 研究斑蝥素对马、兔、猪、鸡、眼斑芫菁 *Mylabris cichorii*(L.)等几种动物体内 PP2A 的抑制作用。将斑蝥素作用于马、兔、猪、鸡、眼斑芫菁等几种动物体内的 PP2A,采用蛋白磷酸酶抑制法 - 比色法测定斑蝥素对 PP2A 的抑制率。斑蝥素对马、兔、猪等哺乳动物体内的 PP2A 有明显的抑制作用,IC_{50}分别为 0.07、0.12、0.23 g/L;斑蝥素对鸡体内的 PP2A 有一定的抑制作用,而对于眼斑芫菁体内 PP2A 抑制作用不明显。马、兔、猪体内的 PP2A 对斑蝥素很敏感,而鸡和眼斑芫菁体内的 PP2A 对斑蝥素较不敏感。

关键词 眼斑芫菁,斑蝥素,蛋白磷酸酶 2A,抑制中浓度,毒性

Inhibitory effect of cantharidin on PP2A in several kinds of animals

LI Xiao-Fei[1]** HOU Xiao-Hui[1] CHEN Xiang-Sheng[2] LOU Fang-Ming[1] LIU Yun[1]

(1. Basic Medicine School, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China;
2. Institute of Entomology, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract We used the colorimetric protein phosphatases inhibition assay to study the inhibitory effect of cantharadin extracted from meloids on PP2A in horses, rabbits, pigs, chickens and *Mylabris cichorii* (L.). Cantharidin had an inhibitory effect on horse, pig and rabbit PP2A with IC_{50} values of 0.07 g/L, 0.12 g/L and 0.23 g/L, respectively. The results suggest that although horses, pigs and rabbits are sensitive to cantharidin, chickens and *M. cichorii* are not.

Key words *Mylabris cichorii*, cantharidin, PP2A, IC_{50}, toxicity

斑蝥素(cantharidin)是芫菁科昆虫分泌的萜类防御物质,在多种芫菁体内可检测到斑蝥素的存在(李晓飞等,2007)。因其具有明显的抗癌活性,为人们所关注,并对其进行了大量的研究(李晓飞等,2004)。同时斑蝥素具有剧毒,可以杀死多数生物,国外报道马等大型动物被斑蝥素毒死的多起实例(Helman and Edwards, 1997),而相应的,作者却发现作为芫菁的天敌——鸡等禽类却可以取食芫菁而不会被毒死,这些现象颇为有趣,为了搞清楚这些现象的原因,以及为了研究斑蝥素的毒性作用机理,设计了本次实验。Honkanen (1993)报道,斑蝥素的作用靶标物质是生物体内的蛋白磷酸酶,特别是蛋白磷酸酶 1(protein phosphatases 1,简称 PP 1)和蛋白磷酸酶 2A(protein phosphatases 2A,简称 PP2A),其中以 PP2A 对斑蝥素最为敏感。

1 材料与方法

1.1 蛋白磷酸酶的来源材料

成年公鸡(贵州花溪),马(贵州惠水),猪(贵州花溪),兔(贵州花溪),在这些动物被杀死后迅速取出肝脏,放入 -20℃冰箱中,备用。眼斑芫菁(贵州榕江)活体放入 -20℃冰箱中,备用。

1.2 主要试剂

自制斑蝥素,由贵阳产的眼斑芫菁 *Mylabris cichorii* (L.)体内获得,纯度≥98%;DEAE - 纤维素 DE52,Tris 购自上海蓝季科技发展有限公司(进口分装); BSA, PNPP, DTT, PMSF 购自 Genebase 公司;二甲基甲酰胺(DMF),巯基乙醇,

* 资助项目:国家自然科学基金(30800111)、教育部科学技术研究重点项目(209109)、贵州省优秀科技教育人才省长专项基金(黔省专合字[2010]48 号)。

** E-mail: lixiaofei35@sohu.com

收稿日期:2011-04-18,接受日期:2012-06-18

考马斯亮兰 G-250 购自 Amresco 公司;乙二醇双(2-氨基乙基)四乙酸(EGTA)购自国药集团化学试剂有限公司;乙二胺四乙酸(EDTA)购自湘中地质实验研究所。

1.3　主要仪器设备

电子天平(精度:0.0001),Sartorius 公司;微量移液器,Eppendorf 公司;酶标仪,天美科技有限公司;3K30 型台式低温高速离心机,Sigma 公司;层析柱(16 mm × 200 mm),上海高欣玻璃厂;光度计,BIO-RAD 公司;带超滤膜的离心管,Millipore 公司。

1.4　蛋白磷酸酶抑制法 - 比色法测定斑蝥素对 PP2A 抑制作用实验

参考文献王晓峰等(2003)和 Heresztyn 和 Nicholson(2001)的方法,有改动。

1.4.1　蛋白磷酸酶液的获得　加含 0.25 mol/L 蔗糖的缓冲溶液 A(500 mmol/L Tris, pH7.4, 2 mmol/L EDTA, 2 mmol/L EGTA, 0.2 mmol/L PMSF, 2 mmol/L 巯基乙醇和 10% 甘油),匀浆,经离心(6 000 × g, 30 min)和高速离心(50 000 × g, 60 min),取上清液,即蛋白磷酸酶混合液,上清液过 DEAE 纤维素(DE-52)柱,用前先用缓冲液 A 平衡,用同样的缓冲液洗脱,至紫外检测无吸收,用含 0.1 mmol/L NaCl 的缓冲液 A 洗下 PP1,经超滤脱去小分子蛋白并浓缩,分装,贮存于 -20℃ 中,备用,继续洗脱,至紫外检测无吸收,用含 0.2 mmol/L NaCl 的缓冲液 A 洗下 PP2A,用带超滤膜的离心管 2 000 r/min 离心脱去小分子蛋白并浓缩,分装,贮存于 -20℃ 中,备用,长期保存在 -80℃ 中。以上操作均在 4℃ 下进行。

1.4.2　蛋白磷酸酶的反应体系　反应系统由 0.25 mol/L Tris HCl (pH8.1), 10 mmol/L $MnCl_2$, 0.2 mol/L $MgCl_2$ 和 5 mg/mL BSA 以体积比 50:4:26:20 于测定当日混合;底物溶液,由反应系统、60 mmol/L pNPP(当日配制)和 20 mmol/L DTT 以体积比 5:4:1 混合。将 10 μL PP2A(每组 PP2A 的蛋白量相当)和 10 μL 不同浓度的标准斑蝥素丙酮溶液(斑蝥素浓度范围 0.01 ~ 2 g/L,丙酮含量为 20%)混合于 96 孔板,每组根据情况设 6 ~ 7 个不同的浓度,放入 4℃ 中进行抑制反应,反应时间设定为 2 h,后加入 100 μL 底物溶液,开始显色反应,37℃,反应时间设定为 1 h,反应完成后用酶标仪测定 405 nm 处的光密度(OD 值),选用 600 nm 作参比光,每组设 6 次重复;分别设对照组(含 10 μL PP2A、10 μL 20% 的丙酮溶液和 100 μL 底物溶液)和空白对照组(由缓冲溶液 A 代替 PP2A 和斑蝥素液)

1.4.3　50%酶活性抑制率 IC_{50} 的获得　斑蝥素对 PP2A 的抑制率计算公式:

抑制率(%) = [1 -(斑蝥素组 OD_{405} - 空白对照 OD_{405}) / (对照 OD_{405} - 空白对照 OD_{405})] × 100,

用回归曲线求 50% 酶活性抑制率时的药物浓度(IC_{50})。

1.5　所用软件

采用 SPSS11.5 统计分析软件和 Excel 软件处理数据。采用邓肯氏新复极差法进行多重比较。

2　结果与分析

2.1　斑蝥素对马体内 PP2A 的抑制作用

斑蝥素对马体内 PP2A 的抑制率结果见表 1。

表 1 显示:斑蝥素对马 PP2A 有明显的抑制效果,并随斑蝥素浓度的增加其抑制率逐渐增加。斑蝥素浓度在 0.5 g/L 时,对马 PP2A 的抑制率最高,为 78.9%。斑蝥素浓度在 0.05 g/L 和 0.1 g/L 时,对马 PP2A 的抑制率分别为 43.26% 和 58.99%,斑蝥素对马 PP2A 的抑制中浓度应在 0.05 g/L 和 0.1 g/L 之间。

斑蝥素浓度在 0.04 ~ 0.5 g/L 时与马 PP2A 相对活性成对数关系,相关系数为 $R^2 = 0.975$,具有很好的相关性,对数曲线为 $y = 14.76\mathrm{Ln}(x) + 89.294$,经计算此时的斑蝥素 IC_{50} 的浓度为 0.07 g/L,在 0.05 g/L 和 0.1 g/L 之间。

2.2　斑蝥素对猪 PP2A 的抑制作用

斑蝥素对猪体内 PP2A 的相对活性的结果见表 2。

表 2 显示:斑蝥素对猪 PP2A 有明显的抑制效果,并随斑蝥素浓度的增加抑制效果增强。斑蝥素浓度在 0.5 g/L 时,对猪 PP2A 的抑制率最高,为 62.02%。斑蝥素浓度在 0.2 和 0.3 g/L 时,对猪 PP2A 的抑制率分别为 47.29% 和 52.71%,斑蝥素对猪 PP2A 的抑制中浓度应在 0.2 g/L 和 0.3 g/L 之间。

斑蝥素浓度在 0.05 ~ 0.5 g/L 时与猪 PP2A 相对活性成对数关系,相关系数为 $R^2 = 0.9882$,具有很好的相关性,对数曲线为 $y = 12.898\mathrm{Ln}(x) +$

68.831，经计算斑蝥素对猪的 PP2A 的半抑制浓度为 0.23 g/L，在 0.2 g/L 和 0.3 g/L 之间。

表 1 斑蝥素对马体内 PP2A 的抑制率

Table 1 Relative activities of cantharidin to PP2A of horse

处理组 Treatment group	斑蝥素浓度(g/L) Cantharidin concentrations	OD_{405} ($\bar{x} \pm SD$)	抑制率(%) Inhibition rate
空白对照 Blank control	0	0.35 ± 0.028e	
对照 CK	0	2.13 ± 0.258a	0
T1	0.04	1.41 ± 0.076b	40.23
T2	0.05	1.36 ± 0.109b	43.26
T3	0.1	1.08 ± 0.027c	58.99
T4	0.2	0.91 ± 0.045cd	68.54
T5	0.3	0.86 ± 0.012cd	71.35
T6	0.4	0.82 ± 0.031d	73.60
T7	0.5	0.74 ± 0.020d	78.90

注：空白对照 blank control：仅含缓冲液 only buffer solution A；对照 CK：无斑蝥素处理组 without treatment by cantharidin；T1–T7：斑蝥素处理的不同浓度组 treatments by cantharidin at different concentrations。数据后标有不同小写字母表示差异显著（$P<0.05$，邓肯氏新复极差测验）；下表同。Data followed by different small letters indicate significantly different at 0.05 level by Duncan's multiple range test. The same below.

表 2 斑蝥素对猪体内 PP2A 的抑制率

Table 2 Relative activities of cantharidin to PP2A of pig

处理组 Treatment group	斑蝥素浓度(g/L) Cantharidin concentrations	OD_{405} ($\bar{x} \pm SD$)	抑制率(%) Inhibition rate
空白对照 Blank control	0	0.28 ± 0.014e	
对照 CK	0	1.57 ± 0.413a	0
T1	0.05	1.17 ± 0.040b	31.01
T2	0.1	1.07 ± 0.037b	38.76
T3	0.2	0.96 ± 0.040bc	47.29
T4	0.3	0.89 ± 0.036c	52.71
T5	0.4	0.85 ± 0.028c	55.81
T6	0.5	0.77 ± 0.019d	62.02

2.3 斑蝥素对鸡 PP2A 的抑制作用

斑蝥素对鸡体内 PP2A 的相对活性的结果见表 3。

表 3 显示：斑蝥素对鸡 PP2A 的抑制作用较小，抑制率随斑蝥素浓度的增大而缓慢增加，对照组与斑蝥素浓度在 0.05 ~0.1 g/L 时 OD 值差异不显著，对鸡 PP2A 的抑制情况不明显；斑蝥素浓度在 0.2 g/L 时 OD 值差异显著，对鸡的 PP2A 有显著抑制作用，当浓度 0.4 ~1 g/L 时，斑蝥素对鸡 PP2A 的抑制率差异不显著，最大抑制率为 29.26%。抑制率没有超过 50%，无法获得斑蝥素对鸡 PP2A 的抑制中浓度。

2.4 斑蝥素对兔 PP2A 的抑制作用

斑蝥素对兔体内 PP2A 的相对活性的结果见表 4。

表 3　斑蝥素对鸡体内 PP2A 的抑制率

Table 3　Relative activities of cantharidin to PP2A of chook

处理组 Treatment group	斑蝥素浓度(g/L) Cantharidin concentrations	OD_{405} ($\bar{x} \pm SD$)	抑制率(%) Inhibition rate
空白对照 Blank control	0	0.32 ± 0.046e	
对照 CK	0	4.08 ± 0.110a	0
T1	0.05	3.98 ± 0.031a	2.66
T2	0.1	4.01 ± 0.070a	1.86
T3	0.2	3.71 ± 0.070b	9.84
T4	0.3	3.39 ± 0.124c	18.35
T5	0.4	3.21 ± 0.218cd	23.14
T6	0.5	2.99 ± 0.246d	28.99
T7	1	2.98 ± 0.098d	29.26

表 4　斑蝥素对兔体内 PP2A 的抑制率

Table 4　Relative activities of cantharidin to PP2A of rabbit

处理组 Treatment group	斑蝥素浓度(g/L) Cantharidin concentrations	OD_{405} ($\bar{x} \pm SD$)	抑制率(%) Inhibition rate
空白对照 Blank control	0	0.30 ± 0.010f	0
对照 CK	0	3.598 ± 0.201a	
T1	0.05	2.33 ± 0.084b	38.49
T2	0.1	1.91 ± 0.093c	51.21
T3	0.2	1.77 ± 0.159cd	55.45
T4	0.3	1.60 ± 0.147de	60.61
T5	0.4	1.51 ± 0.133e	63.33
T6	0.5	1.47 ± 0.141e	64.55

表 4 显示:斑蝥素对兔 PP2A 有明显的抑制效果,随斑蝥素浓度的增加抑制率有所增高。斑蝥素在 0.5 g/L 浓度时,对兔 PP2A 的抑制率有最高值,为 64.55%。斑蝥素浓度在 0.1 g/L 时,对兔 PP2A 的抑制率为 51.21%,斑蝥素对兔 PP2A 的抑制中浓度应在 0.1 g/L 附近。

斑蝥素浓度在 0.05 ~ 0.5 g/L 时与兔 PP2A 相对活性成对数关系,相关系数为 $R^2 = 0.9677$,具有很好的相关性,对数曲线为 $y = 10.899\mathrm{Ln}(x) + 73.265$,经计算斑蝥素对兔的 PP2A 的 IC_{50} 为 0.12 g/L,与 0.1 g/L 接近。

2.5　斑蝥素对眼斑芫菁 PP2A 的抑制作用

斑蝥素对眼斑芫菁体内 PP2A 的相对活性的结果见表 5。

表 5 显示:斑蝥素对眼斑芫菁 PP2A 的抑制率随斑蝥素浓度的增大而略有增加,对照组与斑蝥素浓度在 0.05 ~ 1 g/L 时的 OD 值差异不显著,对眼斑芫菁 PP2A 的抑制作用不明显,斑蝥素在 0.5 g/L 浓度时对眼斑芫菁 PP2A 的抑制率出现最大值,为 2.72%,在斑蝥素浓度为 1 g/L 时的抑制率下降为 2.04%,斑蝥素对眼斑芫菁 PP2A 几乎没有抑制作用。

表 5 斑蝥素对眼斑芫菁体内 PP2A 的抑制率

Table 5 Relative activities of cantharidin to PP2A of *Mylabris cichorii*

处理组 Treatment group	斑蝥素浓度(g/L) Cantharidin concentrations	OD_{405} ($\bar{x} \pm SD$)	抑制率(%) Inhibition rate
空白对照 Blank control	0	0.37 ± 0.074b	
对照 CK	0	1.84 ± 0.026a	0
T1	0.05	1.85 ± 0.109a	0
T2	0.1	1.84 ± 0.046a	0
T3	0.2	1.83 ± 0.049a	0.68
T4	0.3	1.82 ± 0.163a	1.37
T5	0.4	1.82 ± 0.085a	1.37
T6	0.5	1.80 ± 0.061a	2.72
T7	1.0	1.81 ± 0.067a	2.04

3 讨论

斑蝥素对马、兔、猪等哺乳动物体内的 PP2A 有明显的抑制作用，对它们的 IC_{50} 分别为 0.07、0.12、0.23 g/L，其中马、兔等草食动物体内的 PP2A 对斑蝥素最敏感，而猪等杂食动物体内的 PP2A 对斑蝥素较不敏感，而斑蝥素对鸡等禽类体内的 PP2A 机乎没有抑制作用。

在国外的报道中，有很多关于牲畜中斑蝥素毒的现象，其中以马最为突出（Helman and Edwards，1997），身体庞大的马竟然对小小的芫菁非常敏感，然而有些动物确较少被斑蝥素毒害，如此前观察到鸡等有取食芫菁而不会死亡的现象。马 PP2A 对斑蝥素最为敏感，IC_{50} 为 0.07 g/L，而可以取食芫菁的鸡体内 PP2A 对斑蝥素不敏感，在斑蝥素浓度为 1 g/L 时，相对活性还高达 70.74%，与斑蝥素浓度为 0.5 g/L 时差异不显著，以此认为鸡体内 PP2A 对斑蝥素相对不敏感，这一点可以为鸡取食了芫菁后不会死亡的现象提供初步的线索。马、兔、猪等哺乳动物对斑蝥素都比较敏感，而对于鸡却毒性不大，在此就揭示了自然界中一个有趣的问题：斑蝥素是芫菁体内的防御性剧毒物质，其作用显然是为了防御天敌的，现证实芫菁的天敌——鸡等动物对斑蝥素有较高的耐受性，而与芫菁关系较远的动物如草食动物——马和兔等对斑蝥素非常敏感，经常发生因误食草料中混合的芫菁而中毒死亡的现象。这些实验结果为进一步证实自然界中相生相克的原理提供了新的材料。

芫菁本身可以产生斑蝥素，这些产生的斑蝥素随着体内的血淋巴到达身体的各处，在这种情况下芫菁本身却不会中毒，这是一个有趣的现象。本次实验的结果显示：眼斑芫菁体内的 PP2A 对斑蝥素很不敏感，斑蝥素浓度为 1 g/L 时，对其没有显著的抑制作用，这可为解释这一奇特的现象提供初步的线索。

参考文献(References)

Helman RG, Edwards WC, 1997. Clinical features of blister beetle poisoning in equids: 70 cases (1983—1996). *J. Am. Med. Assoc.*, 211(8):1018—1021.

Heresztyn T, Nicholson BC, 2001. Determination of cyanobacterial hepatotoxins directly in water using a protein phosphatase inhibition assay. *Water Research*, 35(13): 3049—3056.

Honkanen RE, 1993. Cantharidin, another natural toxin that inhibits the activity of serine/ threonine protein phosphatases types 1 and 2A. *FEBS. Lett.*, 330(3): 283—286.

李晓飞，陈祥盛，国兴明，2004. 昆虫斑蝥素的研究与利用. 山地农业生物学报，23(2):169—175.

李晓飞，陈祥盛，王雪梅，侯晓晖，2007. 芫菁体内斑蝥素的含量及存在形式. 昆虫学报，50(7):750—754.

王晓峰，郭宗楼，王燕，徐立红，宋立荣，2003. 用蛋白磷酸酶抑制法—比色法检测水中微囊藻毒素类物质. 水生生物学报，27(4):431—433.