

半夏蛋白抗早孕研究的回顾与展望

王玉东 李大金

上海医科大学妇产科医院自 20 世纪 70 年代起, 致力于三叶半夏抗早孕的研究, 并于 20 世纪 80 年代与中国科学院上海生化研究所合作分离了半夏结晶蛋白。此后, 由于技术条件的限制, 该研究有所停滞, 随着高效液相色谱(HPLC)技术与在线 HPLC 系统的联用, 以及结构分析仪和分子生物学技术的迅速发展, 使得蛋白质的研究获得新的契机, 现综述如下。

1 半夏的古代文献

半夏为天南星科多年生小草本植物, 药用半夏属三叶半夏(*Pinellia ternata* Breit.) 搓去外皮的干燥块茎, 以江苏、安徽等地质优。尚有同属植物掌叶半夏(*pinellia pedatisecta* schott) 块茎, 和新种鹞落坪(*yao luo ping* genesis) 半夏的报道, 在个别地区亦作为半夏入药^[1]。古代医家多认为半夏(三叶半夏)有毒, 对生半夏有所顾忌, 故临床多用制半夏, 如清半夏、法半夏和姜半夏等, 以降低半夏的毒副作用。但周凤梧^[2]认为, 法半夏的制法使有效成分几乎全部消失, 人为地造成资源浪费, 故提倡取消炮炙。关于半夏用药的生熟问题, 张仲景的《伤寒杂病论》中没有炮制的说明, 只提到洗, 仲景后也有人主张半夏生用, 但指出必须与等量生姜同用。

对于孕妇是否可用半夏一直持有异议。《本草纲目》曾载“半夏, 孕妇忌之”, 《名医别录》载“消痈肿, 堕胎……生令人吐, 熟令人下”。但《药》认为: “孕妇忌半夏, 为其燥津液也。不思之甚矣。有故无殒, 此证而用此药, 夫何忌之有。妊娠呕吐不止, 仲景用干姜人参半夏丸, 母子无害也。”一般认为, 孕妇慎用半夏, 但如属对症, 也可应用; 或主张将半夏如上炮制, 消除其毒性。但是, 对于传统的炮制方法能否破坏半夏的有效成分, 值得进一步的研究。

2 半夏蛋白的提取、纯化及化学分析

陶宗晋等^[3]于 20 世纪 80 年代首次从三叶半夏鲜汁中分离出半夏蛋白。通过硫酸铵盐析、过滤、离子交换水透析多次, 待沉淀完全后取出离心, 上清液在 28~30℃ 放置, 1 周后结晶完全, 将所得结晶每克用 0.1 饱和度硫酸铵 25ml 溶解, 对同浓度的硫酸铵溶液透析平衡, 清液在稀磷酸缓冲液, pH6.8, 28~30℃ 放置, 晶体自上

而下沿透析袋壁析出。用凝胶渗透色谱分析法测定该蛋白分子量为 44000 和 10500, 在十二烷基硫酸钠或胍盐存在下, 半夏蛋白能解聚成亚基; 凝胶渗透色谱和 SDS-凝胶电泳结果表明这一组蛋白似乎是由分子量相近, 又能解聚成类似大小亚基组分的蛋白所组成; 半夏蛋白不含己糖, 其 N 端氨基酸残基不止一个, 以氨基酸组成计算半夏蛋白的最低分子量为 7200, 低于凝胶电泳法测定的亚基分子量。

孙光星等^[4]将新鲜掌叶半夏匀浆、离心, 丙酮提取, 蒸馏水透析, 真空干燥, 也分离出蛋白成分(总蛋白), 经化学分析证实总蛋白不是核蛋白, 也不是脂蛋白, 含有糖成分, 经聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 总蛋白中含有十余种蛋白, 蛋白质含量为 96.1%。

Tao ZJ 等^[5]对半夏蛋白的结构作了研究, 将半夏蛋白结晶后, 经 X 线衍射得出该蛋白的立体构像, 发现这种蛋白富含 β -sheet(约 40%) 及少量的 α -helix 结构, 在 pH4~10 时, 其结构较稳定, 若长期储存在碱液(如 pH12)中, 半夏蛋白会发生不可逆变性; 热变性在 55℃~68℃ 过渡, 若从 80℃ 冷却到室温, 则会有部分变性。

3 半夏蛋白作用机理的研究

继上海医科大学妇产科医院初步证实半夏抗早孕作用后, 陶宗晋等^[6]给孕 7 天的小白鼠每只皮下注射 250 μ g 半夏蛋白, 造成 50% 的小白鼠流产, 并证实半夏蛋白是一种植物凝集素, 它与兔血红蛋白有专一的血凝活力, 浓度低至每毫升 2 μ g 仍有凝集作用。孙册等^[7]认为半夏蛋白与甘露聚糖有很高的专一性结合。继之, 陶宗晋等^[6]用辣根过氧化物酶标记定位技术对半夏蛋白抗小鼠早孕的作用机制进一步研究, 结果显示小鼠子宫内膜和腺管上皮以及胚胎外胚盘锥体部分呈现明显的酶标显色颗粒, 它们的产生能被未用酶标的半夏蛋白所抑制, 认为这些部位很可能是半夏蛋白抗早孕的作用部位。陈惠玲等^[8]选用妊娠第 5 天的雌兔, 一侧子宫角注入半夏蛋白溶液 0.2ml, 另一侧作对照, 注入同体积对照液, 于妊娠第 11 天在直视下检查胚泡着床数。当于兔子宫内注射 500 μ g 的半夏蛋白时, 抗着床率达 100%; 当注射 250 μ g 时, 2 只注药子宫角有一只出现胚泡着床, 剂量降到 100 μ g 或 50 μ g 时, 3 只注药子宫均见到发育良好的胚胎。说明半夏蛋白直接注入子宫角能产生明显的抗着床效应, 所需的剂量

很低,剂量与效应之间有一定关系。而且,当半夏蛋白作肌肉注射时,即使剂量很大亦无抗着床作用。夏林纳等^[9]给妊娠 6~7 天的小鼠皮下注射 30mg/kg 半夏蛋白,抗早孕率可达 100%,但对着床、中晚期妊娠无明显抑制作用。半夏蛋白本身无雌激素活性,能使早孕小鼠的孕酮浓度明显下降,伴有蜕膜坏死,而补充外源性孕酮可逆转其对蜕膜的影响,维持妊娠继续进行,外源性绒毛膜促性腺激素(HCG)可完全拮抗半夏蛋白的抗早孕作用,抗早孕剂量的半夏蛋白并不影响小鼠子宫胞浆孕酮受体含量及其与孕酮结合的亲和力。表明半夏蛋白不是通过影响孕酮与孕酮受体的结合,而是通过使孕酮分泌量下降来干扰孕酮维持早孕的作用。

孙光星等^[10]每天给每只小鼠腹腔注射 1% 的掌叶半夏总蛋白生理盐水液 0.1ml,对小鼠 S₁₈₀瘤株的抑制率为 50.1%~67.0%,平均为 58.3%。经病理切片观察,试验组和对照组 S₁₈₀瘤块细胞在细胞坏死数、核分裂数和细胞变性数三个指标上均有显著性差异。表明掌叶半夏总蛋白对小鼠 S₁₈₀癌细胞生长具有明显的抑制作用。

Shen ZW^[11]和 Wang KY^[12]等认为,从三叶半夏分离出的结晶半夏蛋白具有凝集和致有丝分裂的活性,同时也是一种毒素,具种系和细胞类型特异性,能够将细胞穿孔,形成离子通道。

4 半夏蛋白的研究意义

目前的主要节育措施(宫内节育器、避孕药及避孕失败后的补救措施——药物流产或人工流产)存在不规则阴道流血,干扰生殖内分泌及其它生殖生理功能等缺点,中药天花粉蛋白中止早孕有其实际应用价值,但有历时长,过敏反应等严重副作用,因此,进一步研究半夏蛋白的抗早孕作用显得尤为迫切^[13]。

影响中药学的应用和发展,尤其是中医药进入国际市场的极为重要的因素是中药的质量问题。由于中药发挥疗效的物质基础是中药的有效成分,而一味中药的有效成分可能是几种成分,也可能是几十种成分,中药的质量控制只有首先解决这一复杂样品的组分分析,才有可能建立起质量标准^[14]。西方科学家越来越多地从单一的化学合成转向从天然植物资源来发现新药。从数百种(或几千种)药用植物出发来发现新药,其命中率比从几十万种植物出发要高得多,因为这几百种中药药用植物是经过几千年来中华民族的“临床试验”验证,有肯定的疗效,且大都是低毒、副作用^[15]。因此,进一步完善半夏蛋白亚基的分离提纯、作用机制以及分析其抗生育的组分和结构,将在中药现代化研

究与药物设计开发中发挥积极作用。随着中国加入 WTO,从天然中药植物有效成分出发来设计开发新药,将同争夺基因战一样有意义。

天花粉蛋白曾用于治疗输卵管妊娠^[16]和用于流产^[17]。患者不仅可见头痛、咽痛、四肢酸痛及发热症状,其严重的全身过敏反应是影响其临床应用的一大障碍。如前所述,半夏的毒性可能具有细胞特异性,对证的妊娠患者亦可应用。另外,半夏块茎的止吐的有效成分是多糖 PI-F2-I;半夏生药煎剂镇吐效果与制品煎剂相同,无明显的毒性又能保持疗效^[18]。Kim SH^[19]报道了 1 例三叶半夏引起的职业性哮喘,认为这种半夏提取物含有过敏原,能引起 IgE 介导的支气管收缩。而且在特异结合血清 IgE 的半夏提取物中,用 SDS-PAGE 和免疫印迹分析了 7 种成分,分子量分别是 6.5, 22, 24, 32, 34, 40 和 48kDa。如果致敏、止吐与抗早孕的有效成分是各自独立的成分,进一步明确半夏蛋白的结构并将其分离提纯,将有助于指导半夏在妊娠呕吐、先兆流产等妊娠相关疾病中的应用。

5 回顾与展望

中药的研究开发需遵照中医学理论的指导,首先要明确,半夏的地域性差异有可能产生质、效不同的品种,即表现型=基因型+环境饰变,道地药材是基因型与环境间相互作用而产生的质优效佳的药材^[20]。因此,我们在研究半夏时要重视半夏来源地,即“道地产地”。另外,三叶半夏蛋白的抗早孕作用与掌叶半夏蛋白的抗肿瘤作用机制有无相似之处,三叶半夏蛋白与掌叶半夏蛋白的结构有无相同点,也值得研究。

从以前的研究可知,半夏蛋白是一种植物凝集素,作用部位在子宫内膜,可引起内源性孕酮下降而造成早孕小鼠流产,并可通过外源性绒毛膜促性腺激素或孕酮逆转其作用。然而,半夏蛋白如何介导内膜局部或通过其它的途径调节孕酮的下降,尚值得探讨。

随着分子生物学技术和分析化学的发展,及中药成份的结构、生物活性数据库的建立,能够进一步提纯半夏蛋白抗早孕的有效成分,逐渐明确该成分的结构,使药物设计成为可能^[21]。目前,通过分离、提取对机体病理生理过程有重要影响的天然活性物质,作为模型先导化合物,经定量构效关系(quantitative structure-activity relationship, QSAR),将结构剖析和简化,以确定其基本结构,或进而推测其受体结构,是寻找和发展新药的一个重要途径^[22]。结构生物学是现今研究蛋白类大分子物质及其对人体作用的分子机制的重要手段,用此手段研究半夏有效成分结构及其对人体作用的构效关系,以此为突破点,将奠定新型学科——

中药生物学。

总之,目前对半夏蛋白抗早孕的研究还是初步的,尚需在作用机制和结构分析等方面进一步深入,这不仅对于计划生育工作是有益的,尤为重要,该研究的深入将为单味中药开发及新药开发提供途径。

参 考 文 献

- 1 刘嘉森主编. 中药研究文献摘要. 北京:中国中医药科技出版社,1993:229.
- 2 周凤梧主编. 实用中药学. 济南:山东科学技术出版社,1981:445.
- 3 陶宗晋,徐琴钰,吴克佐,等. 半夏蛋白的分离、结晶、生物活性和一些化学性质. 生物化学与生物物理学报 1981;13(1):78—82.
- 4 孙光星,丁声颂,钱瑶君. 掌叶半夏总蛋白的提取、化学分析和对小鼠 S-180 瘤株的抑制作用. 上海医科大学学报 1992;19(1):17—19.
- 5 Tao ZJ, Shen ZM, Yang JT. Conformation of the abortifacient protein: a circular dichroic study. J Protein Chem 1993;12(4):387—391.
- 6 陶宗晋,陈惠玲,孙册,等. 半夏蛋白在小鼠早期妊娠子宫结合部位的检测. 生理学报 1983;35(1):107—111.
- 7 孙册,徐建华,翟世康,等. 半夏蛋白的若干生物学性质. 生物化学与生物物理学报 1983;15(4):333—342.
- 8 陈惠玲,宋锦芳,陶宗晋. 半夏蛋白的抗兔胚泡着床作用. 生理学报 1984;36(4):388—391.
- 9 夏林纳,李超荆. 半夏蛋白对小鼠的抗生育作用及抗早孕的机理探讨. 上海医科大学学报 1985;12:193—198.
- 10 孙光星,丁声颂,钱瑶君. 掌叶半夏总蛋白的提取、化学分析

和对小鼠 S-180 瘤株的抑制作用. 上海医科大学学报 1992;19(1):17—19.

- 11 Shen-ZW. Membrane glycoproteins and plant and animal proteins with lectin or lectin-like properties. Adv Exp Biol 1988;228:187—203.
- 12 王克夷,许强. 凝集素和毒素. 生物化学与生物物理学报 2000;32(3):201—205.
- 13 汪猷主编. 天花粉蛋白. 北京:科学出版社,1990:142—145.
- 14 汪尔康主编. 21 世纪的分析化学. 北京:科学出版社,1999:156.
- 15 周家驹,王亭. 药物设计中的分子模型化方法. 北京:科学出版社,2001:46—47.
- 16 刘淳,刘晓媛,金毓翠. 宫颈注射天花粉蛋白治疗输卵管妊娠. 上海第二医科大学学报 2000;20(5):447—449.
- 17 王静,金毓翠. 三种药物终止中孕的比较研究. 上海第二医科大学学报 2001;21(3):264—266.
- 18 Maki T, Takahashi K, Shibata S. An anti-emetic principle of Pinellia ternata tuber. Planta Med 1987;53(5):410—414.
- 19 Kim SH, Jeong H, Kim YK, et al. IgE-mediated occupational asthma induced by herbal medicine, Banha (Pinellia ternata). Clin Exp Allergy 2001;31(5):779—781.
- 20 黄璐琦. 分子生物学. 北京:北京医科大学出版社,2000:12—14.
- 21 李永明,赵玉琪,李电东,等. 实用分子生物学方法手册. 北京:科学出版社,1998:387—388.
- 22 徐文方主编. 新药设计原理与方法. 北京:中国医药科技出版社,2000:87—88.

(收稿 2002-06-07 修回 2003-03-10)

(上接第 474 页)

- 20 蒋士生,贺双腾,蔡光先,等. 补肾醒脑解毒方对大鼠单纯疱疹病毒脑炎脑内 NGF、BDNF 表达的影响. 中国中医基础医学杂志 2000;6(6):40—43.
- 21 朱健,蔡文伟,陈朝婷,等. 丹参对衰老鼠海马神经细胞凋亡作用的研究. 中国老年学杂志 2001;21(1):46—48.
- 22 蔡庆,刘红中,王哲,等. 碱性成纤维细胞生长因子和丹参对反复高 + Gz 暴露大鼠脑组织 bcl-2 和 p53mRNA 表达的影响. 空军总医院学报 2000;16(3):130—133.
- 23 张金涛,吴卫平,刘洁晓,等. 丹参对脑缺血再灌注后白细胞介素-1 β 转化酶表达的影响. 中华老年心脑血管病杂志 2000;2(2):123—125.
- 24 张金涛,李义召,赵书平,等. 脑缺血再灌注后 ICE、bcl-2 的表达及丹参的神经保护作用. 卒中与神经疾病 2000;8(1):26—28.
- 25 宋春风,尹桂山,孙素菊,等. 右归饮对肾虚大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴钙调素 mRNA 表达的影响. 中国中医基础

医学杂志 2001;7(3):180—182.

- 26 Watanabe CM, Walffram S, Ader P, et al. The in vivo neuromodulatory effects of the herbal medicine ginkgobiloba. Proc Natl Acad Sci USA 2001;98(12):6577—6580.
- 27 方肇勤,司富春,张伯讷,等. 二仙汤及其拆方对老龄大鼠下丘脑 GnRH 基因转录与表达的调节作用. 中国中医基础医学杂志 1998;4(1):27—29.
- 28 韩恩奎. 海风藤以致淀粉样前体蛋白基因表达的研究. 中国中药杂志 1998;23(11):691—693.
- 29 钱亦华,胡海涛,杨杰,等. 川续断对 Alzheimer 病模型大鼠海马内淀粉样前体蛋白表达的研究. Chin J Neurosci 1999;15(2):134—138.
- 30 Sugaya A. Cellular mechanism of seizure discharge and its normalization by a herbal mixture prescription "Saikokeishito-Ka-Shakayaka" (SK). Yakugoku Zasshi 2001;121(5):295—317.

(收稿 2002-08-16 修回 2002-10-25)