

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.25.003

9 种蔬菜中红细胞凝集素的提取与凝集活性研究*

姜旭¹, 戚扬¹, 于子瑶¹, 闫婧¹, 刘佳¹, 张聪¹, 赵佳琪², 赵臣^{3△}

(1. 吉林医药学院 2011 级临床输血本科班, 吉林吉林 132013; 2. 吉林医学院 2014 级检验技术本科班, 吉林吉林 132013; 3. 吉林医药学院检验学院血液检验教研室, 吉林吉林 132013)

[摘要] **目的** 提取 9 种常见蔬菜中的凝集素, 对其凝集红细胞效应进行研究, 并分析温度和 pH 对其生物活性的影响。**方法** 以新鲜蔬菜为材料, 经硫酸铵沉淀、透析, 得到蛋白质提取液, 用人的 A 型、B 型和 O 型血细胞检测凝集活性。通过耐热、耐酸碱实验比较 9 种不同蔬菜的红细胞凝集素的生物活性。**结果** 除大白菜外其余蔬菜均可凝集人类红细胞, 且对不同血型红细胞的凝集活性各不相同; 其中, 豆角和土豆对人类红细胞的凝集强度最强, 且对 A、B 和 O 型红细胞都有较强的凝集作用; 植物凝集素活性对温度敏感, 随温度升高, 凝集活性明显降低; 此外, 不同种类植物凝集素对酸碱耐受程度不同, 碱性更适合凝集素的保存。**结论** 蔬菜“血型”并不同于人类红细胞血型, 可将植物凝集素的特性用于医学研究领域。

[关键词] 蔬菜; 血型抗原; 凝集素

[中图分类号] Q945 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2016)25-3466-03

Extraction and analysis of lectin in 9 vegetables and its biological activity*

Jiang Xu¹, Qi Yang¹, Yu Ziyao¹, Yan Jing¹, Liu Jia¹, Zhang Cong¹, Zhao Jiaqi², Zhao Chen^{3△}

(1. The 2011 Clinical Transfusion Professional of Jilin Medical University, Jilin, Jilin 132013, China;

2. The 2014 Medical Laboratory of Jilin Medical University, Jilin, Jilin 132013, China;

3. Department of Blood Test of Jilin Medical University, Jilin, Jilin 132013, China)

[Abstract] **Objective** To extract lectins from 9 kinds of vegetables and the red blood cell effect was studied, and the effects of temperature and pH on the biological activity were analyzed. **Methods** Crude proteins were extracted from fresh vegetable after ammonium sulfate precipitation and dialysis. Their agglutination activities were screened with type A, type B, and type O erythrocytes of human being. The biological activity were compared by serials of tests including heat-tolerance and pH-tolerance. **Results** In addition to the Chinese cabbage, the other eight kinds of vegetables can be aggregated human red blood cells, and the agglutination activity of red blood cells of different blood type was different. Among them, the beans and potatoes had the strongest agglutination on human red cells, and also had a strong aggregation effect on type A, B and O red blood cells. The activity of plant lectin was sensitive to temperature, with the increase of temperature, the aggregation activity was obviously decreased; In addition, different kinds of plant lectin was different to the degree of acid and alkali tolerance, and the alkaline was more suitable for the preservation of the lectin. **Conclusion** The vegetable "blood type" is different from the human red blood cell type, which can be used in the field of medical research.

[Key words] vegetables; blood group antigens; lectin

众所周知, 人类红细胞血型抗体可引起红细胞凝集^[1], 比如 A 型血人的血浆可以使 B 型红细胞发生凝集, 因为 A 型血人的血浆里含有抗-B 抗体, 这种抗体可以特异性的与 B 型红细胞表面抗原结合, 将多个红细胞聚集在一起, 从而引起红细胞凝集; 同理, B 型血人的血浆可以使 A 型红细胞发生凝集, O 型血人的血浆可以使 AB 型红细胞发生凝集, 而 O 型血人的红细胞不发生凝集, 这是人类 A、B、O 血型的遗传特点。但是研究发现, 每天吃的蔬菜、水果也可以引起红细胞的凝集, 与血型抗体引起的红细胞凝集非常相似, 说明在部分植物体内也存在能凝集红细胞的物质。日本法医山本茂对 150 种蔬菜和 500 多种水果进行化验, 发现其中有 79 种植物具有“血型”反应。例如桃树叶为 A 型, 枝状水藻等为 B 型, 苹果、草莓和西瓜等为 O 型, 李子、桃子和荞麦等为 A、B 型。本研究以日常生

活中常见的蔬菜为材料, 对其进行初步研究。

1 材料与方 法

1.1 材料 黄豆、西红柿、葱、土豆、小白菜、大白菜、豆角、香菇、茄子 9 种新鲜蔬菜均购自农贸市场; 2% 人标准红细胞悬液 (A 型、B 型、O 型) 由吉林医药学院血液检验教研室提供; 硫酸铵, 聚乙二醇 20000, 碳酸氢钠, 氯化钠, 磷酸氢二钠, 磷酸二氢钠, 柠檬酸, 磷酸氢二钾, 磷酸二氢钾, 氢氧化钠, 甘氨酸, EDTA 为国产分析纯试剂, 由吉林医药学院血液检验教研室提供。

1.2 方 法

1.2.1 蔬菜凝集素的分离和提取 蔬菜洗净、晾干 (土豆去皮, 豆角去皮取豆角豆), 各取 50 g 剪碎, 按 1:2 加入 0.9% 生理盐水, 用组织捣碎机捣碎匀浆, 4℃ 4 000 r/min 离心 40 min 取上清液, 加入硫酸铵达到 60% 饱和度, 4℃ 过夜。4℃ 4 000

* 基金项目: 吉林省科技厅自然科学基金项目 (20160101179JC); 吉林省卫生计生科研项目 (2015Z071)。 作者简介: 姜旭 (1993-), 本科, 主要从事临床输血研究。 △ 通讯作者, E-mail: s2209503@sina.com。

r/min 离心 50 min 后收集沉淀,用磷酸盐缓冲液(PBS)pH 7.4 溶解,4 000 r/min 离心 10 min 除去不溶物,取上清液在 PBS 中透析过夜,转入蒸馏水中透析 3 h,再置于聚乙二醇 20000 中吸水浓缩,得到粗品溶液,用 BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度,用 PBS 调整浓度至 10 mg/mL,置于 4 °C 备用^[2]。

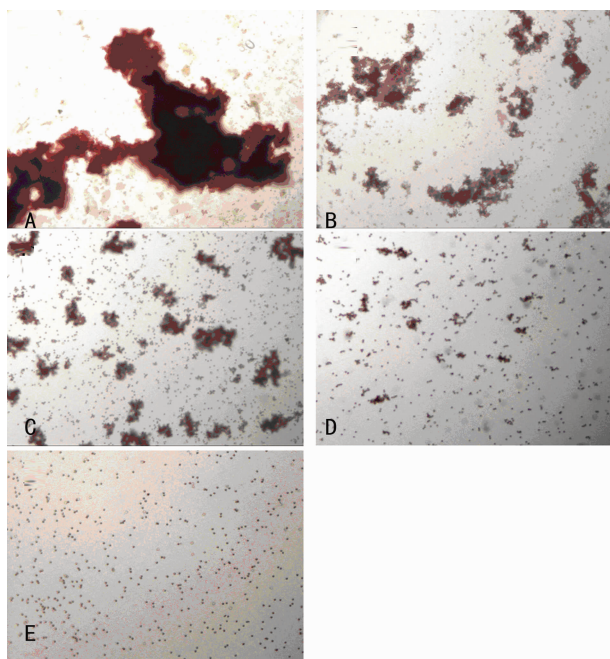
1.2.2 血细胞凝集活力试验 在 96 孔板中加入 30 μL PBS,在第 1 孔中加入凝集素样品 30 μL,混匀后取 30 μL 加入第 2 孔进行倍比稀释。每孔加入 15 μL 2% 人标准红细胞悬液(A 型、B 型、O 型),混匀静置 5 min 后观察凝集强度,肉眼观察与显微镜观察相结合判断结果。以样品稀释度最高且有显著凝集现象的稀释倍数判定为凝集效价,记录 2ⁿ。

1.2.3 凝集素热稳定性检测 在 96 孔板中加入 30 μL PBS,取凝集素样品 30 μL 进行倍比稀释后,置于 4 °C、20 °C、40 °C、60 °C、80 °C、100 °C 水浴中保温 5 min 后取出,待其冷却至室温,加入 15 μL 2% 人标准红细胞悬液(O 型),混匀静置 10 min 后,镜检观察凝集强度。以样品稀释度最高且有显著凝集现象的稀释倍数判定为凝集效价,记录 2ⁿ。

1.2.4 凝集素耐酸、碱能力检测 在 96 孔板中分别加入 30 μL 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(pH 5.0~6.0)或甘氨酸-氢氧化钠缓冲液(pH 8.5~9.0),取凝集素样品 30 μL 进行倍比稀释后,加入 15 μL 2% 人标准红细胞悬液(O 型),混匀静置 10 min 后,镜检观察凝集强度。以样品稀释度最高且有显著凝集现象的稀释倍数判定为凝集效价,记录 2ⁿ。

2 结 果

2.1 不同蔬菜中植物凝集素活力检测 除大白菜外其他蔬菜对人红细胞均产生凝集现象。黄豆、土豆、豆角、豆角豆、西红柿、小白菜和葱对 A 型、B 型和 O 型 3 种红细胞均产生凝集现象;以黄豆、土豆、豆角和西红柿的凝集强度最强,而小白菜和葱凝集活性较低;此外,香菇对 B 型和 O 型红细胞有弱凝集现象,对 A 型血细胞无凝集;茄子对 O 型红细胞有弱凝集现象,对 A 型和 B 型血细胞均无凝集。见图 1、表 1。



A:凝集强度 4+;B:凝集强度 3+;C:凝集强度 2+;D:凝集强度 1+;E:凝集强度-。

图 1 不同凝集强度图(×10)

2.2 植物凝集素的热稳定性分析 黄豆、土豆、西红柿、豆角中凝集素热稳定性较好,在 80 °C 高温仍有凝集活性;而葱、小白菜、香菇、茄子在 40 °C 即失去凝集活性,显示其热稳定性较差。见表 2。

表 1 植物凝集素对红细胞凝集活力的检测

蔬菜	A 型	B 型	O 型
黄豆	2 ⁹	2 ⁴	2 ⁷
西红柿	2 ⁵	2 ⁶	2 ⁵
葱	2 ¹	2 ¹	2 ¹
土豆	2 ⁹	2 ⁸	2 ⁹
小白菜	2 ¹	2 ¹	2 ¹
大白菜	—	—	—
香菇	—	2 ²	2 ¹
茄子	—	—	2 ¹
豆角	2 ⁸	2 ⁸	2 ⁸
豆角豆	2 ³	2 ⁴	2 ⁴

—:凝集反应阴性。

表 2 温度对植物凝集素凝集活力的影响

蔬菜	4 °C	20 °C	40 °C	60 °C	80 °C	100 °C
黄豆	2 ⁶	2 ⁷	2 ⁷	2 ⁵	2 ²	—
西红柿	2 ⁵	2 ⁵	2 ⁵	2 ⁴	2 ²	—
葱	—	2 ¹	—	—	—	—
土豆	2 ⁷	2 ⁹	2 ⁸	2 ⁶	2 ⁴	—
小白菜	2 ¹	2 ¹	—	—	—	—
香菇	2 ⁰	2 ¹	—	—	—	—
茄子	—	2 ¹	—	—	—	—
豆角	2 ⁷	2 ⁸	2 ⁷	2 ⁵	2 ³	—
豆角豆	2 ³	2 ⁴	2 ³	2 ¹	—	—

—:凝集反应阴性。

2.3 凝集素耐酸、碱能力分析 黄豆、土豆、西红柿和豆角、豆角豆中植物凝集素在 pH 为 5.0~6.0 和 8.5~9.0 的酸、碱环境中均保持较强凝集活性,具有较强的耐酸、碱能力;葱在 pH 为 5.0~6.0 的酸性环境中仍有凝集活性,但是在碱性环境下凝集活性消失;小白菜、香菇和茄子在酸、碱环境下凝集活性均完全消失,表明其耐酸、碱能力较差。见表 3。

表 3 pH 值对植物凝集素凝集活力的影响

蔬菜	pH 5.0~6.0	pH 8.5~9.0
黄豆	2 ⁶	2 ⁶
西红柿	2 ⁵	2 ⁵
葱	2 ¹	—
土豆	2 ⁸	2 ⁹
小白菜	—	—
香菇	—	—
茄子	—	—
豆角	2 ⁵	2 ⁸
豆角豆	2 ³	2 ³

—:凝集反应阴性。

3 讨 论

本研究中除大白菜外其余蔬菜都可以凝集红细胞,黄豆、西红柿、葱、土豆、小白菜、豆角和豆角豆均可凝集 A 型、B 型和 O 型红细胞,香菇能凝集 B 型和 O 型红细胞,茄子可以凝集 O 型红细胞,那是不是说明上述蔬菜就分别相当于人类的 A 型、B 型或者 O 型血呢?很显然不是,上述几种蔬菜凝集红细胞的特征不同于人类 A、B、O 血型的抗原抗体凝集的规律性,因而不能说某种蔬菜是 A 型血或者 B 型血。植物之所以能凝集红细胞是因为其体内存在着能与红细胞表面糖链结合的蛋白成分,称为植物凝集素^[3],与人类血型抗体功能类似,但并非同一种物质,也不具有人类血型遗传的规律性。

植物凝集素是来源于植物的一类能凝集细胞和沉淀单糖或多糖复合物的非免疫来源的非酶蛋白质^[4]。一个凝集素分子通常具有两个以上的糖结合位点,因而能同时与多个细胞结合,使游离的单细胞聚集成团,起到类似于红细胞血型抗体的作用。植物凝集素是一种天然生物活性物质,不但能凝集红细胞,还可凝集其他细胞,如精子、淋巴细胞、细菌等^[5],是分离纯化和研究糖复合物结构与功能的重要的工具,是阐明糖和蛋白质相互作用机制的理想模型。在免疫学上,植物凝集素是促淋巴细胞有丝分裂剂;在神经学科上,可用于研究神经元表面结构,外周神经损伤带来的后果及其修复机制,细胞神经递质受体等^[6];在生殖医学上,植物凝集素可通过降低精子生存期或导致精子完全制动并发生不可逆致死来达到避孕和抗早孕的目的^[7],还可通过引起胎盘组织组织坏死、细胞凋亡或凋亡途径达到终止小鼠中晚期妊娠^[8]。

植物凝集素还可用于构成免疫毒素和作为有效的免疫佐剂及靶向性运载工具等^[9]。此外,有报道称植物凝集素对小鼠骨髓细胞微核发生率有一定影响^[10-11]。

本研究通过对蔬菜的凝集素的研究发现,不同蔬菜中植物凝集素的水平不同,不同蔬菜的凝集素活力也不同。黄豆、西红柿、土豆和豆角的凝集强度最强,茄子、小白菜和葱的凝集活性最弱,大白菜则没有凝集红细胞的活力。本研究中,香菇对 A 型血细胞无凝集,茄子对 A 型、B 型血细胞均无凝;豆角豆对 O 型红细胞凝集强度最强,对 A 型和 B 型红细胞的凝集强度较弱,而完整的豆角对 A 型、B 型和 O 型红细胞都有较强的凝集现象,证明豆角和豆中都有凝集素,且豆角的凝集素活力比豆角豆的凝集活力强。在热稳定性方面,黄豆、土豆、西红柿和豆角在 80℃ 高温仍有凝集活性,表明其植物凝集素的热稳定性较好,而葱、小白菜、香菇、茄子在 40℃ 即失去凝集活性,显示其热稳定性较差。此外,西红柿、葱、土豆在酸、碱性环境下凝集活性无变化。豆角在酸性环境下变化较大,在碱性环境无变化,香菇在酸、碱性环境下凝集活性消失,黄豆在酸、碱性环境下凝集活性减弱。

有研究表明,有些凝集素对红细胞的凝集作用具有种属专一性,有的则没有种属专一性^[6]。例如,狗脊蕨凝集素对人的 A 型、B 型和 O 型血细胞的凝集活性相差不大,对其他种属来源的红细胞凝集活性有较大的差异,而红花菜豆凝集素对多种动物的红细胞具有凝集作用。在本研究中,不同蔬菜对 A 型、

B 型和 O 型红细胞表现出不同的凝集效应,黄豆对 A 型和 O 型红细胞凝集活力更强,香菇对 B 型和 O 型血细胞具有凝集效应,茄子只表现出对 O 型血细胞的凝集效应,而西红柿、葱、土豆、小白菜和豆角对 3 种红细胞凝集活力基本相同。上述结果表明,不同的植物凝集素凝集红细胞效应是基于其对红细胞表面不同糖链的结合,不同蔬菜之间具有不同的种属特异性,由于不同的凝集素的糖结合特异性不会因环境而异,因此其对于不同细胞的凝集能力的不同能表明不同细胞表面糖受体组成的差异,这与人类 A、B、O 血型抗体结合红细胞表面的 A 抗原或 B 抗原而产生的红细胞凝集效应类似,但并不不同于人类血型抗体。

总之,凝集素虽能凝集人红细胞,但并不不同于人类红细胞血型抗体。不同种类植物凝集素凝集红细胞的活力不同,糖结合位点也不同,对温度、酸碱度等变化的耐受程度也不同。明确其生物活性特质对其生物学功能及开发其医用、药用价值具有重要作用。

参考文献

- [1] 韩蕊,刘裔军,张明娟. A 亚型的血型鉴定与安全输血[J]. 中国卫生检验杂志,2015,25(14):2446-2448.
- [2] 王庆忠,张鹭,吴耘红,等. 14 种蔬菜中凝集素的提取和生物活性研究[J]. 中国热带医学,2008,8(5):749-752,757.
- [3] Peumans WJ, Vandamme EJ. Lectins as plant defense proteins[J]. Plant Physiol,1995,109(2):347-352.
- [4] 张广慧,吴红英,靳瑾,等. 植物凝集素 PHA-L 对小鼠急性辐射防护作用[J]. 辐射研究与辐射工艺学报,2016,34(2):1-6.
- [5] 鲍锦库. 植物凝集素的功能[J]. 生命科学,2011,23(6):533-540.
- [6] 董朝蓬,杜林方,段真. 植物凝集素研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2003,15(1):71-76.
- [7] 王昌梅,张丽芬,杨明洁. 白芸豆植物凝集素对不同物种精子的凝集作用与抗孕效果研究[J]. 中国计划生育学杂志,2010,18(5):272-276.
- [8] 杨成煊,杨姚,李阔. 红芸豆植物凝集素终止小鼠中晚期妊娠对胎盘组织的影响研究[J]. 中国计划生育学杂志,2010,23(8):524-529.
- [9] 王海燕,白晓春,罗深秋. 植物凝集素与医学应用[J]. 生命的化学,2003,23(3):224-226.
- [10] 牟龙妹,刘宜子,李佳楠. 菜豆植物凝集素对小鼠骨髓细胞微核发生率的影响[J]. 江汉大学学报(自然科学版),2014,42(6):78-81.
- [11] 王昌梅,张丽芬,杨明洁,等. 芸豆植物凝集素对小鼠骨髓细胞微核发生率的影响[J]. 毒理学杂志,2010,24(3):211-214.

(收稿日期:2016-03-14 修回日期:2016-06-01)