

文章编号: 1004-0374(2012)02-0113-05

猪笼草消化液成分及其应用价值研究进展

胡 博, 黄春洪*, 赵文亭

(南昌大学基础医学院生物化学教研室, 南昌 330006)

摘 要: 猪笼草是一类食虫植物, 通过捕虫囊内消化液分解猎物, 为自身生长提供营养。猪笼草消化液中含天冬氨酸蛋白酶、几丁质酶等水解酶类, 还有萘醌、自由基及一些无机离子。猪笼草消化液具有抗真菌, 治疗创伤、头痛等药用功能, 并有抗肿瘤、降血压、抗疟疾等潜在药用开发价值。对猪笼草消化液的成分及活性进行归纳, 为其药用开发提供思路。

关键词: 猪笼草; 消化液; 药用功能

中图分类号: Q949.749.3

文献标志码: A

Research progress on the compositions and applications of the digestive fluid of *Nepenthes*

HU Bo, HUANG Chun-Hong*, ZHAO Wen-Ting

(Department of Biochemistry, Faculty of Basic Medical Science, Nanchang University, Nanchang 330006, China)

Abstract: *Nepenthes* belongs to the family of carnivorous pitcher plant, which preys insects by its pitchers and uses pitcher fluid to digest preys as their nutrition source. The bioactive pitcher fluid was proven to be proteolytic enzymes by literatures, such as aspartic proteinase and chitinase. Besides, inorganic chemical components such as naphthoquinones, free radicals and inorganic ions were also found in the pitcher fluid. The pitcher fluid was found possessing diverse medicinal functions known as antifungal, anticephalalgic, wound healing, anticancer, anti-hypertensive and anti-malaria, etc. In this article, we reviewed recent research progress on *Nepenthes* pitcher fluid compositions and biological activities, to the benefit of medical application.

Key words: *Nepenthes*; digestive fluid; medicinal function

猪笼草 (*Nepenthes mirabilis* (Lour.) Druce) 属于猪笼草科 (Nepenthaceae)、猪笼草属 (*Nepenthes*), 是一种食虫植物, 主要分布于亚洲中南半岛至太平洋北部, 目前发现的猪笼草有 100 多种^[1]。猪笼草具有特殊的吸取营养器官——捕虫囊, 通过捕食昆虫为植株生长提供营养, 因此猪笼草可以生长在营养物质匮乏的地区。捕虫囊依靠口部蜜腺吸引猎物, 通过体部蜡质内壁防止猎物外逃, 而底部内壁的消化腺可以分泌消化液, 用于消化食物及吸收营养^[2]。猪笼草消化液中包含多种水解酶^[3]。对于消化液中的酶类、小分子次生产物以及各组分药理作用, 国内外已有一些研究报道^[4-6]。本文对猪笼草消化液中的已知成分及应用价值作一归纳和总结。

1 猪笼草消化液成分

猪笼草消化液含氧丰富, 呈酸性, pH 值为 5~6, 黏度较大。研究表明, 消化液稀释至 7% 时捕虫率仍为 100%, 稀释至 4% 时捕获飞虫的成功率为 70% 左右, 稀释至 2% 时对蚂蚁的捕获率为 60% 左右^[7]。消化液的主要成分为蛋白质, 随着捕虫囊的年龄增长, 蛋白质浓度略有变化。未开放捕虫囊中消化液蛋白质浓度为 0.6552 mg/mL, 成熟的捕虫囊消化液浓度是 0.8680 mg/mL, 而衰老期浓度

收稿日期: 2011-06-06; 修回日期: 2011-07-23

*通信作者: E-mail: merlynhuang@sohu.com; Tel: 0791-86360581

为 1.0024 mg/mL^[4]。

1.1 酶

捕虫囊消化腺分泌的消化液中含多种消化酶(表 1), 包括蛋白水解酶、肽酶、酸性及碱性磷酸酶、酯酶、核糖核酸酶^[8]、磷酸胺酶^[7,9]、脂肪酶^[10]与几丁质酶^[11]等, 以下对其中部分酶的特性作一综述。

1.1.1 蛋白水解酶

多数猪笼草消化液都具蛋白水解活性, 其中以 *N. thorelii* 的蛋白水解活性最高, 这种活性主要是由蛋白酶引起的, 但该种猪笼草的蛋白酶种类尚未确定。消化液中的蛋白酶来自于消化腺分泌或寄生微生物合成^[9]。目前已知消化液中含有一种酸性蛋白酶 nepenthesin, 性质与胃蛋白酶类似, 属于新型

表1 猪笼草消化液中已发现的酶类

种类	分型	来源	功能	猪笼草种类	参考文献
蛋白酶	天冬氨酸蛋白酶(nepenthesin I/II)	消化腺分泌	降解食物蛋白	<i>N. gracilis</i> <i>N. distillatoria</i> <i>N. alata</i> <i>N. ventricosa</i>	[13-14] [8]
几丁质酶	半胱氨酸蛋白酶 Nkchit 1b Nkchit 2b	消化腺分泌	降解甲壳及真菌细胞壁	<i>N. khasiana</i>	[11, 18]
磷酸酶	酸性磷酸酶 碱性磷酸酶 磷酸胺酶	微生物合成	分解磷酸化合物	<i>N. tobaica</i> <i>N. hybrida</i>	[7, 9, 19]
核糖核酸酶	无	消化腺分泌	降解核酸	<i>N. ventricosa</i>	[8]
脂肪酶	未明	消化腺分泌	降解脂类	<i>N. macferlanei</i>	[10]
酯酶	C4、C8	微生物合成	分解酯类	<i>N. hybrida</i>	[9]

天冬氨酸肽链内切酶, 是目前唯一已知的植物源性胞外分泌的天冬氨酸蛋白酶^[12]。An 等^[13]发现 *N. alata* 消化液中存在天冬氨酸蛋白酶的活性, 并克隆出其 cDNA。从 *N. gracilis* 中也克隆得到了编码 nepenthesin I/II 的序列, 推测到的氨基酸序列比对表明 nepenthesin I/II(约 359 aa)与胃蛋白酶型天冬氨酸蛋白酶同源, 并且也对胃蛋白酶抑制剂敏感。与胃蛋白酶不同的是, nepenthesin I/II 具有丰富的半胱氨酸, 因此猪笼草 nepenthesin I/II 二硫键数量较多, 这可能也与其稳定性有关^[14]。Hatano 和 Hamada^[1]通过研究发现 *N. alata* 与 *N. gracilis* 的 nepenthesin I 氨基酸序列具有 94.7% 的一致性, 提示不同种的猪笼草 Nepenthesin 的差异不大。Athauda 等^[14]利用柱色谱法首次从 *N. distillatoria* 中分离出了 nepenthesin I 和 nepenthesin II。两种酶最适 pH 值约为 2.6, 并具有很强的温度和 pH 稳定性, 活性实验表明这两种酶在 50℃ 可维持活性不变。Nepenthesin I 在 pH 值为 3~10 环境中保持稳定 30 d 以上^[14], 这种异常的稳定性可能是猪笼草食虫习性的进化结果。Kubota 等^[15]将 nepenthesin 与猪胃蛋白酶三级结构进行比较, 发现 nepenthesin I/II 与胃蛋白酶活性中心结构相似: 即含有 2 个 Asp 和 1 个 Tyr, 猪胃蛋白酶与 nepenthesin I 的 Asp 分别位于第 32、215 与第

35、237 位, Tyr 分别位于第 75、96 位。Nepenthesin 分子具有 6 个二硫键, 与其热稳定性有关; 而其分子中酸性氨基酸残基含量少(天冬氨酸+谷氨酸)则与其酸稳定性有关。Nepenthesin 对天冬氨酸的羧基端与氨基端具特异性, 同时也对丙氨酸和酪氨酸的羧基端具特异性, 但其特异性与胃蛋白酶显著不同^[16](图 1)。此外, *N. ventricosa* 的消化液中还存在半胱氨酸蛋白酶^[8]。

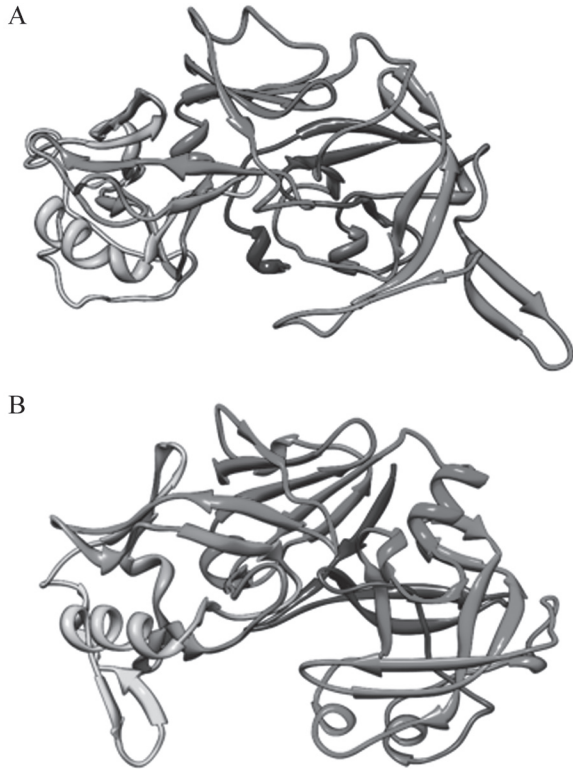
1.1.2 几丁质酶

几丁质是昆虫骨骼及多种真菌细胞壁的成分。Amagase 等^[17]最早提出猪笼草消化液中存在几丁质酶。几丁质酶在消化液内主要用于分解食物及抗菌^[1]。Eilenberg 等^[11]向闭合捕虫囊内注射可溶性胶体几丁质, 结果诱导了几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶的合成。*N. khasiana* 的消化液主要有 Nkchit 1b 和 Nkchit 2b 两种几丁质酶, 分别由四种基因(*Nkchit1b-1* 和 -2, *Nkchit2b-1* 和 -2)编码。Rottloff 等^[18]从多种猪笼草中鉴定了第三种几丁质酶; Hatano 和 Hamada^[1]从 *N. alata* 中鉴定了第四种几丁质酶, 这些酶可能在植物消化食物以及吸收营养方面发挥作用。

1.1.3 磷酸酶

Plachno 等^[19]用荧光标记的方法, 在 *N. tobaica* 的消化腺细胞壁上发现了磷酸酶的活性。而消化液

中的磷酸酶由其中的微生物产生, 有助于使食物降解出无机磷。这对于生长在营养匮乏的土地上的猪笼草具有重要意义, 增加了植物的适应性。



A: nepenthesin; B: 猪胃蛋白酶A。Nepenthesin I三级结构通过Swiss model的方法预测获得, 猪胃蛋白酶A为晶体结构。

图1 *N. gracilis*的nepenthesin I与猪胃蛋白酶A三级结构

1.1.4 其他

运用蛋白质组学的方法, Hatano 和 Hamada^[1]发现在 *N. alata* 的捕虫囊内含 β -1,3- 葡聚糖酶和 β -D- 木糖苷酶。此外, 猪笼草消化液内部分酶如 β -1,3- 葡聚糖酶、几丁质酶又属于病程相关蛋白 (pathogenesis-related proteins, PR 蛋白) 家族, 具有保护植株免受病原体侵害的功能^[20]。

1.2 次生代谢物

猪笼草消化液中含的次生代谢物以醌类最多见, 如白花丹醌^[21]。此外, Eilenberg 等^[22]在猪笼草的消化液中发现茅膏醌及其衍生物 5- 甲氧基茅膏醌的存在。以上各物质均属于萘醌类 (表 2), 表现出抗疟疾和杀真菌等各种作用, 并对人胚肾细胞 (293T) 显示出相对低毒性, 提示其对人体细胞毒性较小, 后面将详述。

1.3 自由基

Chia 等^[23]用磁共振 (EPR) 的自旋捕获技术在猪笼草消化液中发现了氧自由基。氧自由基是由消化腺产生, 通过降解昆虫的肌红蛋白, 修饰肌球蛋白, 使得这些蛋白更容易被蛋白酶分解, 协助植物消化食物。

1.4 其他

猪笼草消化液中含有多种微生物, 包括细菌、原生动物、藻类、真菌、轮虫等^[6]。猪笼草消化液中的微生物仅存于开放捕虫囊中^[24]。*N. mastersi* 和 *N. mirabilis* 的消化液中均发现细菌及真菌源性的蛋白

表2 猪笼草消化液中的萘醌类物质

名称	猪笼草种类	结构	参考文献
白花丹醌(Plumbagin)	<i>N. insignis</i>		[21]
茅膏醌 (Droserone)	<i>N. khasiana</i>		[22]
5-甲氧基茅膏醌(5-O-methyldroserone)	<i>N. khasiana</i>		[22]

酶^[25]。目前已从消化液中分离出具有可把氨基酸降解为 NH_4^+ 及酪蛋白水解能力的细菌^[9]。此外,消化液中还含有一些昆虫降解产物、无机盐、糖类、酸等。昆虫降解产物主要由氨基酸、肽类、铵盐组成。无机盐主要包括铵盐、柠檬酸盐、草酸盐、苹果酸盐,还有 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cl^- 等无机离子^[26],其中氯的主要功能是维持消化酶的活性。而糖类为直链多聚糖^[2]。另消化液呈酸性,与消化腺细胞膜上的质子泵有关^[9]。

2 猪笼草消化液药用功能

2.1 萘醌类物质

猪笼草消化液中的萘醌类物质如白花丹醌能广泛抑制微生物的生长,对肺结核、博代氏杆菌感染、支气管肺部感染及麻风病均有治疗作用,同时也具备抗疟疾、抗哮喘、抗肿瘤、抗动脉粥样硬化、解除痉挛、增强粒细胞功能、免疫调节、强心、避孕等功能^[21]。在*N. khasiana*中诱导产生的茅膏醌及5-甲氧基茅膏醌,具有杀真菌活性且毒性低,其通过抑制孢子发芽以及菌丝生长来抑制真菌,与现行的抗真菌药物的作用机制不同,对植物致病性及人类致病性真菌均有杀灭作用^[22]。

2.2 其他

猪笼草消化液中含长链几丁质水解酶,长链几丁质水解产物N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)寡聚物可用于治疗伤口^[27]。在印度尼西亚,猪笼草消化液还被用作洗眼水,也可治疗头痛、哮喘和烧伤^[28]。*N. madagascariensis*消化液的气味会致人头痛,提示其可能具有吸入性麻醉剂的功能^[29]。

3 猪笼草消化液开发价值

3.1 抗肿瘤及降血压药物开发潜力

猪笼草消化液中的nepenthesin属于天冬氨酸蛋白酶中的胃蛋白酶亚型。同时,组织蛋白酶D、肾素也属于该亚型^[30]。组织蛋白酶D可以阻止血管生成,抑制肿瘤生长^[31];肾素通过将血管紧张素原转化为血管紧张素I而在人类高血压及心脏疾病的发病中起重要作用,而肾素本身的激活则有赖于其他蛋白酶的参与^[32]。猪笼草消化液中的nepenthesin与这些天冬氨酸蛋白酶属同一家族,结构上可能具备一定的同源性,从而具备潜在的抗肿瘤活性;其与肾素的结构具有同源性,与其形成竞争,从而影响活化肾素的蛋白酶对肾素的活化作用,减少肾素的生成;同时由于其具备强大的稳定性,因此,利

用nepenthesin开发长效降压制剂、抗肿瘤药物的潜力非常巨大。

3.2 抗真菌药物的开发潜力

猪笼草消化液中含多种几丁质酶,几丁质酶对多种植物致病性真菌具抑制作用,其机制为降解菌丝末端新合成的几丁质,破坏菌丝端部正常生长,以达到抑制菌丝生长的目的,其对植物致病性真菌的抑制作用已得到证实^[33],动物致病性真菌如白色念珠菌的细胞壁主要成分也为几丁质,因此猪笼草消化液内的几丁质酶可能具有潜在的抗动物致病性真菌的活性,有一定的开发潜力。此外,萘醌类物质的抗真菌作用确切,具备很大的抗真菌药物开发价值。

3.3 对血细胞的作用

利用多种酶处理红细胞有助于研究其表面抗原结构。Kamesaki等^[34]发现猪笼草*N. alata*的捕虫囊组织萃取物可削弱红细胞膜表面抗原的抗原性,并从萃取液中分离出具血型抗原水解作用的酶,但其活性较弱,提示萃取物尚具其他血型抗原水解酶的活性。这些酶可能同时存在于消化液中,开发消化液中的血型抗原水解酶将有助于研究红细胞膜表面抗原结构。

3.4 其他

在马来西亚等地,当地人利用*N. ampullaria*茎中的汁液用于抗疟疾^[35];此外在*N. thorelii*根部组织萃取的萘醌可显著抑制恶性疟原虫^[36],表明猪笼草抗疟疾组分分布较广泛,故推测猪笼草消化液具抗疟药开发潜力。另据报道,某些种的猪笼草叶片捣碎后可用作止血剂,*N. ventricosa*叶片的正己烷提取物对植物致病性真菌具抑制作用^[37],其消化液是否具类似活性尚待开发。猪笼草在我国有全草入药之说,可用于清热利尿、消炎止咳、降压。以上这些均提示猪笼草有着广泛的药用开发前景。此外,有研究认为可通过转基因技术培育一种无菌猪笼草捕虫囊,并且用其提取目标重组蛋白^[38]。

4 小结与展望

研究猪笼草消化液的成分一方面对新药的开发有重要意义,另一方面也对阐明猪笼草生理机能有帮助。猪笼草消化液中的蛋白质含量低,糖类含量高,对其中蛋白质的分离及活性的分析造成很大困难,至今猪笼草消化液中完整的蛋白质组成尚不完全清楚。消化液中所含的物质对人类或猪笼草本身的作用尚待深入研究,对消化液中中小分子物质的研究尚处于起步阶段,关于其中物质的分离与鉴定、

结构与功能、药用价值、开发潜力的研究与评估尚有待进一步开展。

[参 考 文 献]

- [1] Hatano N, Hamada T. Proteome analysis of pitcher fluid of the carnivorous plant *Nepenthes alata*. *J Proteome Res*, 2008, 7(2): 809-16
- [2] Gorb E, Kastner V, Peressadko A, et al. Structure and properties of the glandular surfaces in the digestive zone of the pitcher in the carnivorous plant *Nepenthes ventrata* and its role in insect trapping and retention. *J Exp Biol*, 2004, 207(17): 2947-63
- [3] Heslop-Harrison Y. Enzyme release in carnivorous plants. *Front Biol*, 1975, 43(4): 525-78
- [4] 唐历波, 姬可平, 王燕, 等. 猪笼草消化液中蛋白酶的活性初探. *基因组学与应用生物学*, 2010, 29(2): 293-7
- [5] Mithöfer A. Carnivorous pitcher plants: Insights in an old topic. *Phytochemistry*, 2011, 72(13): 1678-82
- [6] Adlansnig W, Peroutka M, Lendl T. Traps of carnivorous pitcher plants as a habitat: composition of the fluid, biodiversity and mutualistic activities. *Ann Bot*, 2011, 107(2): 181-94
- [7] Gaume L, Forterre Y. A viscoelastic deadly fluid in carnivorous pitcher plants. *PLoS One*, 2007, 2(11): e1185
- [8] Stephenson P, Hogan J. Cloning and characterization of a ribonuclease, a cysteine proteinase, and an aspartic proteinase from pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes ventricosa* Blanco. *Int J Plant Sci*, 2006, 167(2): 239-48
- [9] Higashi S, Nakashima A, Ozaki H, et al. Analysis of feeding mechanism in a pitcher of *Nepenthes hybrida*. *J Plant Res*, 1993, 106(1): 47-54
- [10] Tökés ZA, Woon WC, Chambers SM. Digestive enzymes secreted by the carnivorous plant *Nepenthes macfarlanei* L. *Planta*, 1974, 119(1): 39-46
- [11] Eilenberg H, Pnini-Cohen S, Schuster S, et al. Isolation and characterization of chitinase genes from pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes khasiana*. *J Exp Bot*, 2006, 57(11): 2775-84
- [12] Jentsch J. Enzymes from carnivorous plants (*Nepenthes*). Isolation of the protease nepenthacin. *FEBS Lett*, 1972, 21(3): 273-6
- [13] An CI, Fukusaki E, Kobayashi A. Aspartic proteinases are expressed in pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes alata* Blanco. *Planta*, 2002, 214(5): 661-7
- [14] Athauda SB, Matsumoto K, Rajapakshe S, et al. Enzymatic and structural characterization of nepenthesin, a unique member of a novel subfamily of aspartic proteinases. *Biochem J*, 2004, 381(1): 295-306
- [15] Kubota K, Metoki Y, Athauda SB, et al. Stability profiles of nepenthesin in urea and guanidine hydrochloride: comparison with porcine pepsin A. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2010, 74(11): 2323-6
- [16] Amagase S, Nakayama S, Tsugita A. Acid protease in *Nepenthes*. II. Study on the specificity of nepenthesin. *J Biochem*, 1969, 66(4): 431-9
- [17] Amagase S, Mori M, Nakayama S. Digestive enzymes in insectivorous plants. IV. Enzymatic digestion of insects by *Nepenthes* secretion and *Drosera peltata* extract: proteolytic and chitinolytic activities. *J Biochem*, 1972, 72(3): 765-7
- [18] Rottloff S, Stieber R, Maischak H. Functional characterization of a class III acid endochitinase from the traps of the carnivorous pitcher plant genus, *Nepenthes*. *J Exp Bot*, 2011, 62(13): 4639-47
- [19] Plachno BJ, Adamec L, Lichtscheidl IK, et al. Fluorescence labelling of phosphatase activity in digestive glands of carnivorous plants. *Plant Biol (Stuttg)*, 2006, 8(6): 813-20
- [20] Van Loon LC. Pathogenesis-related proteins. *Plant Mol Biol*, 1985, 4(2-3): 111-6
- [21] Schlauer J, Nerz J, Rischer H. Carnivorous plant chemistry. *Acta Botanica Gallica*, 2005, 152(2): 187-95
- [22] Eilenberg H, Pnini-Cohen S, Rahamim Y, et al. Induced production of antifungal naphthoquinones in the pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes khasiana*. *J Exp Bot*, 2010, 61(3): 911-22
- [23] Chia TF, Aung HH, Osipov AN, et al. Carnivorous pitcher plant uses free radicals in the digestion of prey. *Redox Rep*, 2004, 9(5): 255-61
- [24] Shivas RG, Brown JF. Yeasts associated with fluid in pitchers of *Nepenthes*. *Mycol Res*, 1989, 93(1): 96-100
- [25] Okahara K. Physiological studies on *Drosera* IV: on the function of microorganisms in the digestion of insect bodies by insectivorous plants. *Sci Rep Tohoku Imp Univ*, 1933: 151-68
- [26] Smith JG. Recent studies of carnivorous plants. *Am Naturalist*, 1893, 27(317): 413-20
- [27] Schwaitzberg SD, Chan MW, Cole DJ, et al. Comparison of poly-N-acetyl glucosamine with commercially available topical hemostats for achieving hemostasis in coagulopathic models of splenic hemorrhage. *J Trauma*, 2004, 57(1 suppl): S29-32
- [28] Schoenwetter T, Lyon LM, Hardesty LH, et al. The use of *Nepenthes madagascariensis* in traditional medicine and healing among the people of Fort Dauphin, Madagascar. 6th Conference of the International Carnivorous Plant Society, 2006
- [29] Ratsirarson J, Silander JA. Structure and dynamics in *Nepenthes madagascariensis* pitcher plant microcommunities. *Biotropica*, 1996, 28(2): 218-27
- [30] 吕刚, 韩笑, 张秀娟, 等. 天冬氨酸蛋白酶的研究进展. *吉林化工学院学报*, 2008, 25(1): 13-18
- [31] Benjannet S, Reudelhuber T, Mercure C, et al. Proprotein conversion is determined by a multiplicity of factors including convertase processing, substrate specificity, and intracellular environment. Cell type-specific processing of human prorenin by the convertase PC1. *J Biol Chem*, 1992, 267: 11417-23
- [32] Jensen JM, Djian P, Proksch E. Disturbed permeability barrier function in transgenic involucrin deficient mice. *J Invest Dermatol*, 1999, 112: 542-3
- [33] 陈爱葵, 庄文宋, 陈冬梅. 植物几丁质酶及其基因工程研究进展. *广东教育学院学报*, 2010, 30(2): 47-53
- [34] Kamesaki T, Kajii E, Ikemoto S. Purification of the decomposing enzyme from *Nepenthes alata* against glycophorin B of human red blood cells by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, 1989, 489(2): 384-9
- [35] Perry LM. Medicinal plants of East and Southeast Asia: attributed properties and uses[M]. Cambridge: the MIT Press, 1980: 58
- [36] Likhitwitayawuid K, Kaewamatawong R, Ruangrungsi N, et al. Antimalarial naphthoquinones from *Nepenthes thorelii*. *Planta Med*, 1998, 64(3): 237-41
- [37] Shin KS, Lee S, Cha BJ. Suppression of phytopathogenic fungi by hexane extract of *Nepenthes ventricosa* x maxima leaf. *Fitoterapia*, 2007, 78(7-8): 585-6
- [38] Rosa BA, Malek L, Qin W. The development of the pitcher plant *Sarracenia purpurea* into a potentially valuable recombinant protein production system. *Biotechnol Mol Biol Rev*, 2009, 4(5): 105-10