

含羞草酸及 3,4-雙羥基吡啶在生體外 及生體內對細胞呼吸的效應

Effects of Mimosine and 3,4-Dihydroxypyridine on the Cell Respiration both *In Vitro* and *In Vitro*

黃達三

摘要

本文是研究含羞草酸 (β -N(3-hydroxy-4-pyridone)- α -amino propionic acid) 及 3,4-雙羥基吡啶(含羞草酸水解的產物) 在生體外及生體內對細胞呼吸作用的效應。

含羞草酸是由銀合歡的種子單離純化得來。3,4-雙羥基吡啶是把含羞草酸經稀酸水解而來。細胞呼吸作用是利用韋伯氏檢壓裝置 (Precision Scientific Co.) 測定氧的消耗量, 以 OO_2 表示之。

由測定的結果發現: 含羞草酸及 3,4-雙羥基吡啶在生體外及生體內對細胞的呼吸作用都有顯著性的抑制效應 ($P < 0.01$)。含羞草酸 3,4-雙羥基吡啶的毒害效應沒有什麼區別, 可見含羞草酸上的胺基酸側鏈對毒性效應並非必須的。

含羞草酸及 3,4-雙羥基吡啶可以把酶蛋白的硫氫基氧化為雙硫化物, 使酶蛋白失去生物活性; 可以和酶作用所必須的金屬離子結合形成複合物, 而抑制酶的反應; 也可能抑制酶蛋白的合成。含羞草酸及 3,4-雙羥基吡啶可能經由以上三種可能的機構而抑制細胞的呼吸作用。

緒言

含羞草酸 (Mimosine, β -N(3-hydroxy-4-pyridone)- α -amino propionic acid) 是存在於含羞草屬 (*Mimosa*) 及銀合歡 *Leucaena* 植物種子中的非蛋白質性胺基酸 (non-protein amino acid) (1, 2), 對實驗及飼養的動物會造成生長阻滯, 禿毛 (alopecia) (3), 白內障 (cataract) (4) (5), 及無生殖能力 (infertility) (6) 等毒害作用。

含羞草酸共有三個或四個酸基 (acid groups, quadridentate), 是一種螯形劑 (chelating

agent), 可以和金屬離子形成複合物 (complex), 也可以把蛋白質的硫氫基 (sulfhydryl group, HS-) 氧化為雙硫化物 (disulfide, —S—S—), 而蛋白質中的硫氫基是蛋白質具有生物活性 (biological activity) 所必須的 (1), 如果糖 1,6-雙磷酸縮醛酶 (FDP aldolase); 金屬離子是許多酶反應的致活劑 (activator), 如甘油醛磷酸去氫酶 (glyceraldehyde-p-dehydrogenase) (7)。因此, 含羞草酸對於細胞呼吸的影響是值得去探討的, 本研究即以兔子為材料來研究含羞草及其水解產物, 3,4-雙羥基吡啶 (3,4-dihydroxypyridine) 對細胞呼吸的效應。

*本研究承蒙 行政院國家科學委員會的獎助。

材料及方法

1. 材 料：

含羞草酸的單離 (isolation) 利用 Chen 的方法 (8)，由銀合歡 (*Leucaena glauca* Beuth) 的種子中提取，把它溶解在 1 N 的 HCl (調整到 pH 4.7 使之沉澱) 再結晶三次，溶解在水中再結晶三次。3,4-雙羥基吡啶是由稀酸水解含羞草酸而來，經紙色層分析法 (paper chromatography) 確定沒有含羞草酸的污染。其他的化學藥劑都是用分析級 (analytical grade) 試藥。

2. 方 法：

細胞呼吸率的測定，利用韋伯氏檢壓裝置 (Warburg Manometric Apparatus Precision Scientific Co.) 來測定，以 Q_{O_2} ($\mu l O_2 / mg$ dry wt./hr.) 來表示之。所有的藥品都溶解於 pH 4.7, 0.04 M 的磷酸鹽緩衝溶液 (phosphate buffer) 中，磷酸鹽緩衝溶液利用 Umbreit 的配製法 (9)。

鮮組織的製備，把兔子殺死後，取出骨骼肌，肝臟及腎臟去除其他結締組織後，在 4°C 之下，利用 Stadie - Rigg Microtome (Precision Scientific Co.) 切成 0.3 mm 左右的薄片，作為測定細胞呼吸之用。

在生體外 (*In Vitro*) 的實驗，測定 Q_{O_2} 時，

每種組織分為四組：第一組為對照組，磷酸鹽緩衝溶液不加含羞草酸或 3,4-雙羥基吡啶。第二組、第三組、第四組在磷酸鹽緩衝溶液中分別加入含羞草酸或 3,4-雙羥基吡啶，使它分別成為 3 mM、5 mM、7 mM 的含羞草酸或 3,4-雙羥基吡啶的溶液。

在生體內 (*in Vivo*) 的實驗，取 7~8 個月，體重 2.4~2.6 公斤的兔子 32 隻以隨機分配 (random allocation) 分成四組：第一組為對照組，第二組、第三組、第四組分別每天每隻，由靜脈注射 2 ml 的 3mM、5 mM、7 mM 的含羞草酸或 3,4-雙羥基吡啶溶液。處理一週、二週、三週、四週後，每組每次各殺二隻，取出骨骼肌、肝臟及腎臟，去除其他結締組織後，在 4°C 之下，利用 Stadie - Rigg Microtome 切成 0.3 mm 左右的薄片，作為測定細胞呼吸之用。

結 果

1. 含羞草酸在生體外對細胞呼吸率的影響：

含羞草酸會降低生體外組織氧消耗量 (oxygen consumption)，亦即降低細胞的呼吸率 (表一，圖一)。經單向變方分析 (one-way analysis of variance) (10)，發現這種抑制的效應是有顯著性的作用 ($P < 0.01$) (表二)。

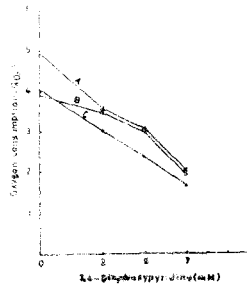
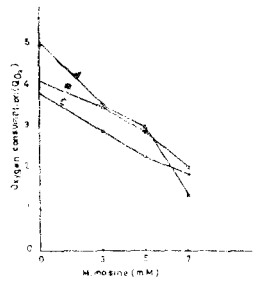
表一：含羞草酸對細胞呼吸率的影響 (生體外)

	處 理 劑 量			
	0 mM	3 mM	5 mM	7 mM
骨 骼 肌	5.04 ± 0.23	3.51 ± 0.25	3.01 ± 0.21	1.35 ± 0.13
肝 組 織	3.86 ± 0.21	2.91 ± 0.11	2.54 ± 0.16	1.87 ± 0.12
腎 組 織	4.15 ± 0.14	3.54 ± 0.17	2.99 ± 0.24	2.01 ± 0.18

2. 3,4-雙羥基吡啶在生體外對細胞呼吸率的影響

3,4-雙羥基吡啶會降低組織的氧消耗量，即降低細胞的呼吸率 (表三，圖二)。這能降低的效

應經單向變方分析，可以確定是有顯著性的影響 ($P < 0.01$) (表四)。



圖一：含羞草酸在生體外對細胞呼吸的影響。

- A：骨骼肌
- B：腎組織
- C：肝組織

圖二：3,4-雙經基吡啶在生體外對細胞呼吸的影響。

- A：骨骼肌
- B：腎組織
- C：肝組織

表二：含羞草酸對細胞呼吸率影響的變方分析表（生體外）

	MS		F	Significance
	T	SE		
骨 骼 肌	0.3178	0.0104	30.56 **	P<0.01
肝 組 織	0.5359	0.0211	25.40 **	P<0.01
腎 組 織	0.3020	0.0112	26.96 **	P<0.01

表三：3,4-雙經基吡啶對細胞呼吸率的影響（生體外）

	處 理 劑 量			
	0mM	3mM	5mM	7mM
骨 骼 肌	4.96 ± 0.34	3.58 ± 0.21	3.09 ± 0.12	2.01 ± 0.19
肝 組 織	4.02 ± 0.25	3.01 ± 0.11	2.40 ± 0.16	1.65 ± 0.15
腎 組 織	3.91 ± 0.15	3.50 ± 0.20	3.01 ± 0.21	1.91 ± 0.18

3. 含羞草酸在生體內對細胞呼吸率的影響：

兔子注射含羞草酸後，細胞呼吸率會降低（表五，圖三，四，五）。經雙方變方分析（two-way analysis of variance）（10），發現這種效應很顯著（P<0.01），且隨處理時間的增加，而增加抑制細胞呼吸的效應（P<0.01）（表六）。

4. 3,4-雙經基吡啶在生體內對細胞呼吸率的影響

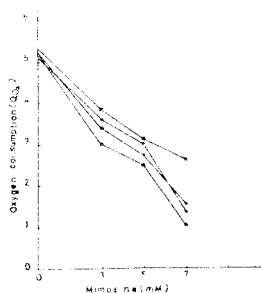
兔子注射雙經基吡啶後，細胞呼吸率降低（表七，圖六、七、八）。經雙向變方分析後，確定這種效應很顯著（P<0.01）且隨處理時間的增加，而增加對細胞呼吸的抑制效應（P<0.01）（表八）。

表四：3,4-雙羥基吡啶對細胞呼吸率影響的變方分析表(生體外)

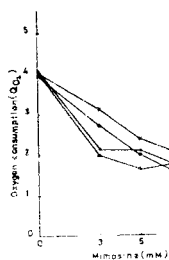
	MS		F	Significance
	T	SE		
骨 髂 肌	0.4058	0.0156	26.01 **	P<0.01
肝 組 織	0.3525	0.0142	24.12 **	P<0.01
腎 組 織	0.3618	0.0151	23.96 **	P<0.01

表五：含羞草酸對細胞呼吸率的影響(生體內)

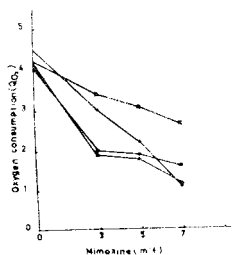
組 織	時間(週)	處 理 劑 量			
		0mM	3mM	5mM	7mM
骨 髂 肌	1	5.31 ± 0.15	3.81 ± 0.11	3.14 ± 0.18	2.62 ± 0.19
	2	5.07 ± 0.17	3.61 ± 0.18	3.01 ± 0.22	1.32 ± 0.20
	3	5.23 ± 0.13	3.42 ± 0.16	2.71 ± 0.17	1.51 ± 0.23
	4	5.20 ± 0.12	3.01 ± 0.23	2.50 ± 0.19	1.05 ± 0.18
肝 組 織	1	4.01 ± 0.15	3.15 ± 0.19	2.40 ± 0.14	2.01 ± 0.11
	2	4.12 ± 0.21	2.16 ± 0.14	2.21 ± 0.16	1.71 ± 0.17
	3	3.98 ± 0.26	2.75 ± 0.11	2.05 ± 0.23	1.46 ± 0.12
	4	4.05 ± 0.18	2.01 ± 0.21	1.41 ± 0.19	1.81 ± 0.10
腎 組 織	1	4.23 ± 0.21	3.40 ± 0.16	3.08 ± 0.17	2.15 ± 0.15
	2	4.50 ± 0.23	3.01 ± 0.15	2.21 ± 0.13	1.09 ± 0.14
	3	4.05 ± 0.12	2.01 ± 0.21	1.90 ± 0.21	1.61 ± 0.11
	4	4.17 ± 0.14	1.91 ± 0.23	1.81 ± 0.26	1.15 ± 0.16



(圖三)



(圖四)



圖三：含羞草酸在生體內對骨骼肌細胞呼吸的影響。
處理時間為×—×一週，·—·二週，○—○三週，△—△四週。

圖四：含羞草酸在生體內對肝組織細胞呼吸的影響。
處理時間分別為×—×一週，·—·二週，○—○三週，△—△四週。

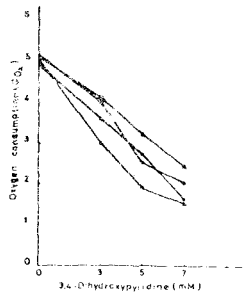
圖五：含羞草酸在生體內對腎組織細胞呼吸的影響。
處理時間分別為×—×一週，·—·二週，○—○三週，△—△四週。

表六：含羞草酸對細胞呼吸率影響的變方分析表(生體內)

SV.	SS.	MS	F	Significance
骨 髓 肌 T	1.2933	0.4311	31.06 **	P<0.01
骨 髓 肌 D	0.3468	0.1156	8.14 *	P<0.01
骨 髓 肌 SE	0.1278	0.0142		
肝 組 織 T	0.7965	0.2655 **	22.31 **	P<0.01
肝 組 織 D	0.2553	0.0722	6.15 *	P<0.01
肝 組 織 SE	0.1071	0.0119		
腎 組 織 T	1.5642	0.5214	24.71 **	P<0.01
腎 組 織 D	0.5074	0.1691	8.01 *	P<0.01
腎 組 織 SE	0.1987	0.0211		

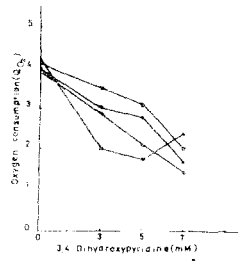
表七：3,4-雙經基吡啶對細胞呼吸率的影響(生體內)

	時間(週)	處 理 劑 量			
		0mM	3mM	5mM	7mM
骨 骼 肌	1	5.07 ± 0.11	4.11 ± 0.24	3.21 ± 0.11	2.42 ± 0.21
	2	4.91 ± 0.21	3.58 ± 0.19	2.71 ± 0.13	1.61 ± 0.22
	3	5.11 ± 0.23	4.01 ± 0.18	2.52 ± 0.21	2.01 ± 0.12
	4	5.01 ± 0.24	3.01 ± 0.16	1.91 ± 0.18	1.52 ± 0.11
肝 組 織	1	4.11 ± 0.12	3.51 ± 0.24	3.11 ± 0.11	2.01 ± 0.21
	2	3.98 ± 0.13	3.01 ± 0.11	2.81 ± 0.14	1.71 ± 0.15
	3	3.98 ± 0.21	2.87 ± 0.13	2.11 ± 0.22	1.44 ± 0.14
	4	4.21 ± 0.19	2.01 ± 0.14	1.78 ± 0.11	2.41 ± 0.12
腎 組 織	1	4.05 ± 0.18	3.55 ± 0.21	3.11 ± 0.19	2.54 ± 0.21
	2	4.11 ± 0.21	2.98 ± 0.23	2.67 ± 0.27	1.91 ± 0.17
	3	4.01 ± 0.12	2.54 ± 0.11	2.71 ± 0.14	1.71 ± 0.14
	4	3.93 ± 0.11	2.40 ± 0.14	2.11 ± 0.15	1.17 ± 0.11



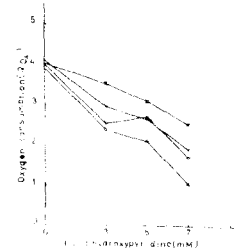
(圖六)

圖六：3,4-雙經基吡啶在生體內對骨骼肌細胞呼吸的影響。
處理時間分別為×—×一週，。—。二週，○—。三週，△—△四週。



(圖七)

圖七：3,4-雙經基吡啶在生體內對肝組織細胞呼吸的影響。
處理時間分別為×—×一週，。—。二週，○—。三週，△—△四週。



(圖八)

圖八：3,4-雙經基吡啶在生體內對腎組織細胞呼吸的影響。
處理時間分別為×—×一週，。—。二週，○—。三週，△—△四週。

表八：3,4-雙羥基吡啶對細胞呼吸率影響的變方分析表（生體內）

SV.		SS.	MS.	F	Significance
骨 骼 肌	T	2.1750	0.7250	28.16 **	P<0.01
	D	0.5439	0.1813	11.16 *	P<0.01
	SE	0.2349	0.0261		
肝 組 織	T	1.5511	0.5170	26.11 **	P<0.01
	D	0.5551	0.1558	6.36 *	P<0.01
	SE	0.1782	0.0198		
腎 組 織	T	3.0685	1.0228	27.57 **	P<0.01
	D	1.1253	0.3380	9.11 *	P<0.01
	SE	0.3339	0.0371		

討 論

本研究中，含羞草酸及 3,4-雙羥基吡啶的毒害效應非常相似，表示含羞草酸上的胺基側鏈（amino acid side chain）對毒性效應並非必須的，這種結果和 Smith 及 Fowden 的結果一樣（11），這也表示細胞膜對含羞草酸及 3,4-雙羥基吡啶的滲透性一樣（12）。

細胞呼吸作用包括糖解作用（glycolysis），克勒伯氏循環（Krebs cycle）及呼吸鏈磷酸脂化作用（respiratory-chain phosphorylation）（13），每一步驟反應的進行都需要酶來催化。含羞草酸及 3,4-雙羥基吡啶會把酶蛋白中的硫基氧化為雙硫化合物，使酶蛋白失去其生物活性（1）。例如果糖 1,6-雙磷酸縮醛酶具有 4~5 個必須的硫基，每一個活性點（active site）大約有 1~2 個硫基（14）。細胞呼吸一連串的生化反應中，任何一步驟的反應受到阻滯，都會引起迴饋抑制（feed back inhibition）而抑制整個呼吸作用的進行，這是含羞草酸及 3,4-雙羥基吡啶抑制細胞呼吸的可能機構。

含羞草酸及 3,4-雙羥基吡啶又是一種螯合劑，可以和二價及三價的金屬離子形成複合物（4），

（15），（16），（17）。而一些金屬離子如 Zn^{+2} ， Al^{+3} ， Fe^{+2} ， Mn^{+2} ， Mg^{+2} 是酶反應所必須的，這也可以解釋含羞草酸及 3,4-雙羥基吡啶抑制細胞呼吸作用的原因。

根據 Tsai 及 Ling（12）的研究，含羞草酸及 3,4-雙羥基吡啶會抑制細胞內 DNA 的合成。他們認為，含羞草酸及 3,4-雙羥基吡啶和 DNA 或 DNA 前驅物（precursors）合成有關的金屬離子結合，而抑制 DNA 的合成。雖然他們的研究，發現含羞草酸及 3,4-雙羥基吡啶對 RNA 及蛋白質的合成沒有顯著的抑制效應，但有可能含羞草酸及 3,4-雙羥基吡啶也以同樣的機構（mechanism）抑制蛋白質合成時，mRNA 的轉錄（transcription）及解讀（translation）作用，所以酶蛋白的合成受到抑制，這是含羞草酸及 3,4-雙羥基吡啶抑制細胞呼吸作用的另一可能的機構。我們也可以反過來解釋 DNA 的合成受含羞草酸及 3,4-雙羥基吡啶的抑制，是因含羞草酸及 3,4-雙羥基吡啶抑制細胞呼吸作用，供應 DNA 合成所需的 ATP 不足所致。

誌 謝

本研究承蒙台東師專校長劉效騫先生的鼓勵與

支持，及業師中央研究院研究員萬家茂博士的指導，台大動物系副教授郝道宏老師提供資料始得完成，謹在此誠申謝意。

參考文獻

1. Huang, J. S. and K.G. Ling, Proceeding of the National Science Council. No. 6 Part II, P. 57-63, 1973. Study on the mechanism of the toxicity of mimosine: The oxidation of L-cysteine in the presence of mimosine and the related compounds.
2. Hegarty, M. P., P. G. Schinckel and R.D. Court, Anat. J. Agric. Res. 15: 153, 1964. Reaction of sheep to the consumption of *Leucaena glauca* and to toxic principle mimosine.
3. Crouse, R. S., J. D. Maxwell and H. Blank, Nature. 194: 694, 1962. Inhibition of growth hair mimosine.
4. Matsumoto, H., E.G. Smith and G. D. Sherman, Archs Biochem. Biophys. 33: 201, 1951. The effect of elevated temperature on the mimosine content and toxicity of Koa Hoale (*Leucaena glauca*).
5. Sallman, L.V., Grimes, P. and B. Collins, Am. J. Ophthalmol. 47, Part, P. 107, 1959. Mimosine cataract.
6. Hylin, J.W. and I.J. Lichton, Biochem. Pharmacol. 14: 1167, 1965. Production of reversible infertility in rats by feeding mimosine.
7. Mahler, H.R. and E.H. Cordes, 1968. Basic Biological Chemistry, P. 262. Harper & Row, New York.
8. Chen, C.S., 1968. I - Study on acid hydrolysis of mimosine; II - Toxicity of 3,4-dihydroxypyridine to rats. M. Sc. Thesis, National Taiwan University.
9. Umbreit, W.W., R.H. Burris and J.F. Stauffer, 1964. Manometric Techniques P. 132, Burgess Publish Co., U. S. A.
10. Geoge, W.S. and G.C. William, 1965. Statistical Methods. P. 258-337. Iowa State College Press. U. S. A.
11. Smith, I.K. and L. Fowden, J. Exp. Bot. 17: 750, 1966. Study of mimosine toxicity in plants.
12. Tsai, W.C. and K.H. Ling, Toxicol. 9: 241, 1971. Toxic action of mimosine-I Inhibition of mitosis and DNA Synthesis of H. EP-2 Cell by mimosine and 3,4-dihydroxypyridine.
13. Racker, E., Sci. Amer., 218: 32, 1968. The membrane of mitochondria.
14. Kobashi Kyoichi and E.L. Horecker. Archs Biochem. Biophys., 121: 178, 1967. Reversible inactivation of rabbit muscle aldolase by O-Phenanthroline.
15. Lin, J-Y. and K.H. Ling, J. Formosan Med. Ass., 60: 657, 1961. Studies on free amino acid in the seeds of *Leucaena glauca* Benth- III Biological Study of mimosine.
16. Koss, E. and J.A. Springhall, Australian Vet. J., 39: 394, 1963. Evaluation of ferrous sulfate as detoxifying agent for mimosine in *Leucaena glauca* ratios for chicken.
17. Ling, K.H., W.N. Wen and W.I. Ling, J. Formosan Med. Ass., 68: 510, 1969. Study on the mechanism of the toxicity of mimosine, toxic effect of mimosine on the growth of mung bean (*Phaseolus aureus*).

Summary

Effects of Mimosine and 3,4-Dihydroxypyridine on the Cell

Respiration both *In Vitro* and *In Vivo*.

The effects of mimosine (β -N(3-hydroxy-4-pyridone)- α -amino propionic acid) and 3,4-dihydroxypyridine on the cell respiration were studied both *In Vitro* and *In Vivo*.

Mimosine was isolated from seeds of *Leucaena glauca* Benth and recrystallized by dissolving in 1 N HCl and Water. 3,4-dihydroxypyridine was obtained by diluted acid hydrolysis of mimosine, and no mimosine contamination was observed by paper chromatography. Cell respiration rate was determined by oxygen consumption of tissue measured with Warburg Manometric Apparatus (Precision Scientific Co.).

In this study we were sure that mimosine and 3,4-dihydroxypyridine inhibited the oxygen consumption of tissue, lowered the cell respiration, both *In Vitro* and *In Vivo*. The toxic effect of mimosine and 3,4-dihydroxypyridine on the cell respiration were very similar, suggested that the amino acid side chain in mimosine was not necessary for its toxicity.