

平 颏 海 蛇(Lapemis hardwickii) 毒 的 分 离 和 毒 理

陈家树 吴秀荣

(药理学教研室)

提 要 用 CM-Sephadex C-50 柱层析, 醋酸铵缓冲液洗脱, 从平颏海蛇毒腺提取物中分得15个蛋白组分。其中2个有磷脂酶 A_2 活性的用免疫学的方法证实的肌肉毒组分。10个能作用突触后膜神经毒组分。肌肉毒的蛋白量占粗毒总蛋白量的32.2%。神经毒的蛋白量占粗毒总蛋白量的52.3%。神经毒的毒性比肌肉毒的毒性强。这些结果提示, 平颏海蛇毒有肌肉毒和神经毒, 神经毒是平颏海蛇毒的主要毒性成分。

关键词 平颏海蛇 神经毒 肌肉毒 磷脂酶 A_2 蛇毒

海蛇分布广, 数量大, 海蛇毒比陆地上的毒蛇的蛇毒更毒^[1]。海蛇毒中毒与陆地上的蛇毒中毒反应不同。Reid 等^[2,3]在临床观察到平颏海蛇等海蛇伤的病人有全身肌痛, 瘫痪, 肌红蛋白尿等症状, 认为海蛇毒是肌肉毒。Cheymol 等^[4]在实验室用粗毒研究, 未发现平颏海蛇毒对肌纤维有影响, 而对神经肌肉接头有阻断作用, 认为海蛇毒是神经毒。因此, 平颏海蛇毒的主要毒性成分是什么至今未有结论。本实验对此问题进行了研究。

材 料 和 方 法

试剂和仪器 平颏海蛇毒腺提取物系1983年广西医学院药理教研室提供。CM-Sephadex C-50为瑞典 Pharmacia 进口分装产品。323型紫外分光光度计为日本日立牌产品。卵磷脂为上海禽蛋二厂产品。肌红蛋白和抗肌蛋白血清为上海生物制品研究所产品。其它试剂均为国产化学纯产品

蛇毒的分离 用0.1M(PH6.5)醋酸铵缓冲液浸泡 CM-Sephadex C-50后装柱(2.0×75 cm), 平衡24h。1000mg 平颏海蛇毒腺提取物溶于5 ml 上述缓冲液中, 离心去沉渣后上柱。0.1M 至1.0M 醋酸铵缓冲液直线梯度洗脱。分

部收集洗脱液, 每管3 ml, 每小时4管, 共300管。洗脱液用280nm 波长测定其吸收度。各组分的蛋白量及百分比按下公式计算: 蛋白质浓度(mg/ml) = $1.45D_{280} \sim 0.74D_{260}$ 。每个组分脱盐干燥后, 腹腔注射于18~22g小白鼠($n=3$)检定其毒性。

肌肉毒的检定 用收集尿液和检定其中肌红蛋白的方法^[5]检定肌肉毒。取18~22g小白鼠($n=3$), 每个组分配成不同浓度, 腹腔注射。用滤纸收集小白鼠的尿液。若尿中有肌红蛋白可使滤纸染成咖啡色。再用肌红蛋白免疫扩散法^[6]检定这种尿液是否是肌红蛋白尿。方法为将含有咖啡色尿液的滤纸剪下, 溶于5 ml 生理盐水, 作为待测的样本, 取1%小白鼠红血球溶解离心后的血红蛋白作为阴性对照, 观察16~48h。

磷脂酶 A_2 的检定 按溶血法进行^[7]。酶的活力用半溶血剂量(HU_{50})表示。用溶血百分率对蛇毒磷脂酶 A_2 浓度的对数作图。求 HU_{50} 。

神经毒的检定 用小白鼠在体坐骨神经腓肠肌标本($n=3$)检定。以100 μ g/10g的剂量, 静脉注射于18~22g的小白鼠, 呼吸停止时制备坐骨神经及腓肠肌标本。分别用波宽0.5msec, 频率1 Hz, 电压5 V 的方波刺激神经和肌肉。

若有神经肌肉接头传递阻断作用的组分,再用小鸡颈二腹肌标本^[8]($n=6$)检定。将标本悬挂于持续通氧的Krebs液中,恒温 30°C 。以 0.5 msec 波宽, 0.1 Hz 的超强方波刺激神经、肌肉。神经肌肉接头传递完全阻断后,用Krebs液冲洗5次。每次停留 2 min ,观察 6 h 。在观察期间每 30 min 换液一次。对小鸡颈二腹肌标本有阻断作用的组分再用Straub氏法离体蛙心^[9]($n=3$)检定其对心脏是否有心脏毒作用(心肌挛缩)。蛙心用任氏液灌流。

表 1 平颞海蛇毒腺提取物分离组分蛋白含量及百分比、生物性质

组 分	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	合计
蛋白量 (mg)	3.0	60.5	138.6	43.4	50.0	2.7	53.1	45.8	114.5	38.6	37.5	11.3	6.1	3.3	11.7	620
百分比	0.5	9.8	22.4	7.0	8.1	0.4	8.6	7.4	18.5	6.2	6.0	1.8	1.0	0.5	1.9	100
生物性质	-	+	+	-	-	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	

(-) 未确定的组分

(+) 肌肉毒组分

(*) 神经毒组分

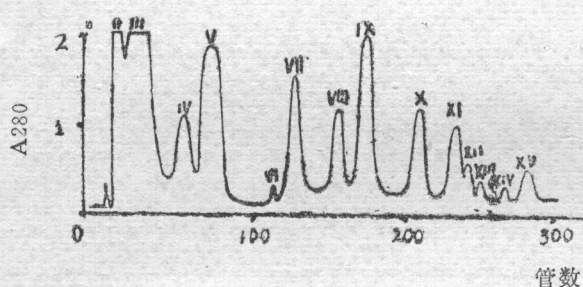


图 1 平颞海蛇毒腺提取物 CM-Sephadex C-50柱 (75×2.0cm) 层析图

肌肉毒及其特征

组分 II、III 以 $190\text{ }\mu\text{g}/10\text{ g}$ 的剂量在 6 h 内能使小白鼠产生浅咖啡色的尿液, $250\text{ }\mu\text{g}/10\text{ g}$ 的剂量能使小白鼠产生深咖啡色的尿液。抗肌红蛋白血清能与组分 II、III 诱发小白鼠产生的咖啡色尿液起沉淀反应, 确证为肌红蛋白, 如图 2。同时证实组分 II、III 均有磷脂酶 A_2 的活性。HU₆₀ 组分 II 为 $21.0 \pm 1.4(\text{S.D.})\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$, 组分 III 为 $23.0 \pm 3.0(\text{S.D.})\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 。组分 II、III 占粗毒总蛋白量的 32.2% 。

神经毒及其特征 组分 VI、VII、VIII、IX、X、XI、XII、XIII、XIV、XV 在小白鼠的坐神

平颞海蛇毒腺提取物的 LD_{50} 测定 用体重 $18\sim 22\text{ g}$ 小白鼠腹腔注射给毒, 按冠氏法计算。

结 果

平颞海蛇毒的分离及各组分的蛋白量 平颞海蛇毒腺提取物被 CM-Sephadex C-50 分得 15 个蛋白组分, 如图 1 所示。各组分的蛋白量、蛋白量的百分比如表 1。可溶性蛋白总回收率为 62.0% 。

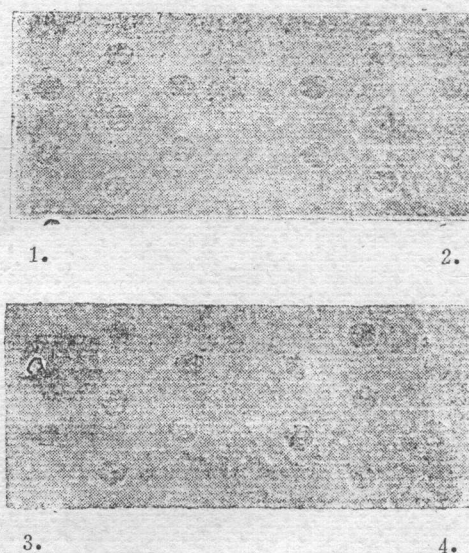


图 2 免疫扩散平板图

中央孔: 抗肌红蛋白血清

外周孔: 1. 标准肌红蛋白

2. 组分 II 诱发的小白鼠尿

3. 组分 III 诱发的小白鼠尿

4. 小白鼠的血红蛋白

经腓肠肌标本, 均能取消肌肉由刺激神经引起的收缩反应。在小鸡颈二腹肌标本, 以 $1.0\text{ }\mu\text{g}/$

ml 的剂量, 上述的10个组分均能取消由刺激神经和外源性乙酰胆碱引起的肌肉收缩反应。不能取消肌肉由直接刺激和氯化钾引起的收缩反应。确证这10个组分都是神经毒。组分Ⅶ、Ⅷ、Ⅸ、Ⅹ、Ⅺ、Ⅻ在神经肌肉传递阻断后观察6h未见肌肉对乙酰胆碱和刺激神经的反应恢复。组分Ⅵ、Ⅽ、Ⅾ在神经肌肉传递阻断后观察6h可见肌肉对乙酰胆碱和刺激神经的收缩反应恢复, 见图3, 表2、表3。这10组分对离体蛙心, 以100μg/ml 的浓度给毒后15min 未见肌力, 心率、房室传导有异常的变化, 未出现心肌挛缩。这10个组分的蛋白总量占粗毒的总蛋白量的52.3%。

表2 组分Ⅵ—Ⅾ阻断小鸡颈二腹肌神经肌肉传递的潜伏期

组 分	潜伏期 ($\bar{X} \pm SD_{min}$)	标本数
Ⅵ	48.0 ± 6.6	6
Ⅶ	29.9 ± 8.3	6
Ⅷ	19.8 ± 7.3	6
Ⅸ	14.8 ± 3.8	6
Ⅹ	9.3 ± 1.2	6
Ⅺ	30.0 ± 10.5	6
Ⅻ	14.0 ± 3.7	6
Ⅼ	56.0 ± 11.0	6
Ⅽ	30.5 ± 8.7	6
Ⅾ	17.6 ± 3.1	6

表3 神经毒组分神经肌肉传递阻断作用的可逆性

组分	可逆标本数/ 标本数	兴奋性恢复潜伏期 ($\bar{X} \pm SD_{min}$)	恢复幅度% ($\bar{X} \pm SD$)
Ⅵ	6/6	144.7 ± 11.0	32 ± 0.5
Ⅶ	0/6	0	0
Ⅷ	0/6	0	0
Ⅸ	0/6	0	0
Ⅹ	0/6	0	0
Ⅺ	0/6	0	0
Ⅻ	0/6	0	0
Ⅼ	6/6	23.7 ± 5.6	73 ± 16
Ⅽ	6/6	20.0 ± 2.2	100 ± 0
Ⅾ	6/6	159.3 ± 16.3	51 ± 14

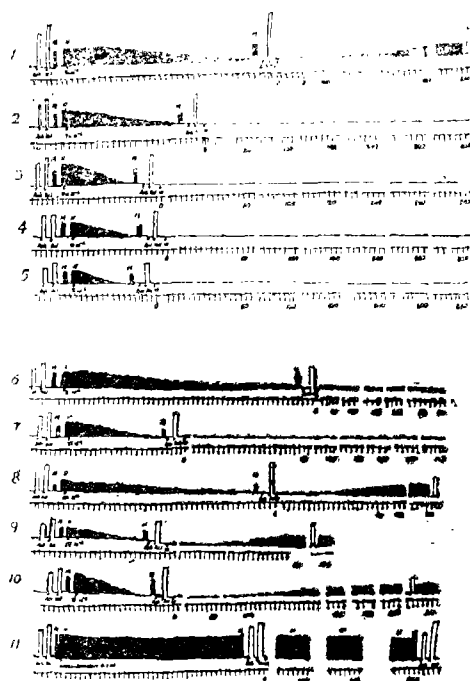


图3 组分Ⅵ—Ⅾμg/ml 对小鸡颈二腹肌标本的作用

1. 组分Ⅵ; 2. 组分Ⅶ; 3. 组分Ⅷ; 4. 组分Ⅸ; 5. 组分Ⅹ; 6. 组分Ⅺ; 7. 组分Ⅻ; 8. 组分Ⅼ; 9. 组分Ⅽ; 10. 组分Ⅾ; 11. Krebs液。
W: 冲洗 M: 刺激肌肉 N: 刺激神经

毒性 平颞海蛇毒腺提取物的i. P. LD₅₀为308μg/Kg, 95%的可信限: 299~316μg/Kg。中毒的症状有共济失调, 呼吸困难, 死前有惊厥, 死后解剖, 腹腔无出血, 膀胱无咖啡色尿液。组分Ⅱ、Ⅲ, 以250μg/10g 的剂量, 在48h内可使小白鼠死亡。死后解剖, 膀胱有咖啡色尿液, 内脏无出血。组分Ⅵ、Ⅶ、Ⅷ、Ⅸ、Ⅹ、Ⅺ、Ⅻ、Ⅼ、Ⅽ、Ⅾ, 以100μg/10g 均可使小白鼠60min 内死亡。死后解剖未见腹腔出血, 膀胱无咖啡色尿液。

讨 论

Reid 等^[2,3]根据临床观察, 平颞海蛇等海蛇伤的病人有全身肌痛、瘫痪、肌红蛋白尿等症状, 认为海蛇毒是肌肉毒。Chegmol 等^[4]根据实验用粗毒研究的结果, 发现平颞海蛇毒对

神经肌肉接头有不可逆的阻断作用,未发现对横纹肌纤维有影响,认为海蛇毒是神经毒。临床的观察和实验室的研究似乎有矛盾。本实验用 CM-Sephadex C-50 将平颏海蛇毒腺提取物分离得15个组分。组分Ⅱ、Ⅲ能诱发小白鼠产生咖啡色尿液。这种尿液能与抗肌红蛋白血清产生沉淀。证实这种咖啡色的尿液中存在肌红蛋白。提示组分Ⅱ、Ⅲ是能破坏横纹肌细胞,诱发肌红蛋白尿的肌肉毒。同时用溶血法证实这种肌肉毒在较高浓度时具有磷脂酶 A_2 活性。用小鸡颈二腹肌标本证实组分Ⅶ、Ⅷ、Ⅸ、X、Ⅺ、Ⅻ是不可逆的作用于突触后膜的神经毒;而组分Ⅵ、Ⅼ、Ⅽ、Ⅾ、Ⅿ是可逆性的作用于突触后膜的神经毒。这10个组分对离体蛙心均无影响。从上述的结果看来平颏海蛇毒同时有肌肉毒和神经毒。在蛋白质的含量上,能诱发小白鼠产生肌红蛋白尿的组分Ⅱ、Ⅲ占粗毒总蛋白量的32.2%,其毒性强度较弱,250 μ g/10g可使小白鼠在48h内死亡。能阻断神经肌肉接头传递的组分Ⅵ、Ⅶ、Ⅷ、Ⅸ、X、Ⅺ、Ⅻ、Ⅼ、Ⅽ、Ⅾ、Ⅿ占粗毒总蛋白量的52.2%,其毒性强度较强,100 μ g/10g能使小白鼠在60min内死亡。看来神经毒比肌肉毒含量多,毒性强。提示平颏海蛇毒对小白鼠的主要毒性成分应该是神经毒而不是肌肉毒。

由于平颏海蛇毒中的神经毒含量多,毒性强,较易阻断神经肌肉接头传递,引起肌肉瘫痪。同时肌肉毒也可通过肌肉的损害增强神经毒的肌肉瘫痪作用。这样看来,平颏海蛇毒的主要致死原因是横纹肌瘫痪所致的呼吸肌麻痹。提示用人工呼吸救治平颏海蛇伤引起的呼吸衰竭对于维持病人的生命是会十分有效的。

由于肌肉毒会引起横纹肌细胞损害释出钾离子和肌红蛋白,提示预防高血钾引起心脏抑制,碱化尿液,防止肌红蛋白堵塞肾小管引起急性肾功能衰竭是十分必要的。

参 考 文 献

- [1] Reid H A. Epidemiology and clinical aspects of sea snake bites. IN: Dunson W A, ed. The biology of sea snake. Baltimore. London. Tokyo 1975:417.
- [2] Reid H A. Sea snake bites. Brit Med J 1956; 2:73.
- [3] Reid H A and Lim K J. Sea snake bite: a survey of fishing villages in north-west Malaya. Brit Med J 1957; 2:1266.
- [4] Cheymol J, et al. Action neuromusculaire de trois venins d'hydrophile's. Toxicon 1967; 5:111.
- [5] Jan Fohlman and David Eaker. Isolation and characterization of a lethal myotoxic phospholipase A from the venom of the common sea snake Enhydra schistosa causing myoglobinuria in mice. Toxicon 1977; 15:385.
- [6] 上海市医学化验所主编。肌红蛋白免疫化学鉴定法。临床生化检验(上册)。上海科学技术出版社 1982; 155。
- [7] 云南省动物研究所第四室(昆明)。蛇毒的研究利用。I. 我国几种常见毒蛇的蛇毒酶的活力的测定。生物化学与生物物理学报 1976; 8:151。
- [8] Ginsborg B L and Warriner Joan. The isolated chick biventer cervicis nerve-muscle preparation. Brit J Pharmacol 1960; 15(3):410.
- [9] 徐叔云,等主编。心脏与冠状血管实验方法。药理实验方法学 人民卫生出版社 1982; 666。

Fractionation of the Venom of *Lapemis hardwickii* and Pharmacological Studies

Chen Jiashu Wu Xiurong

(Department of Pharmacology)

Abstract

Fifteen protein fractions were separated from the venom of sea snake, *Lapemis hardwickii* by means of CM-Sephadex C-50 column chromatography. Two (II, III) of them, composed of 32.2% of total protein, were proved to be myotoxic as evidenced by myoglobinuria in the envenomated mice. Both fractions exhibited phospholipase activity.

Ten fractions were proved as postsynaptic neurotoxins. They blocked the response of chick biventer cervicis muscle to both nerve stimulation and ACh, but left response to direct nerve stimulation and K^+ unaffected. No cardiotoxicity was demonstrated in isolated frog heart. They composed of 52.3% protein and had higher potency of toxicity.

The above experimental results suggest that the toxicity of venom of *Lapemis hardwickii* are both neurotoxic and myotoxic, but primarily neurotoxic. They act synergistically resulting in peripheral paralysis of respiration.

Key words: *Lapemis hardwickii* Neurotoxin Myotoxin Phospholipase A₂ Snake venom