

蜈蚣粗毒的生物活性

汪猷 陈耀全 韩友娣 张云岩 徐寿龙 谢慧琴

(中国科学院上海有机化学研究所)

在我国少棘蜈蚣 (*Scolopendra subspinipes mutilans* Koch) 作药用已有两千多年历史。《本草纲目》载蜈蚣主治小儿惊痫、风搐脐风、口噤丹毒、秃疮瘰疬等症^[1]。但对少棘蜈蚣毒素的性质,则未见研究报道。蜈蚣毒液是由它的第一对颚足分泌的。在捕捉活动物为食时,以锋利的毒颚刺入捕猎对象的身体,分泌出毒液使猎获物麻痹然后咬食^[2]。据生物学工作者和产地群众反映,人被少棘蜈蚣叮咬后产生剧痛,伤口周围红肿,波及附近淋巴,产生硬结,疼痛可持续数小时,但未发现致命事例。

国外对蜈蚣毒素的研究报道不多。Bücherl^[3]曾对5个品种蜈蚣的毒颚提取液对小鼠等实验动物进行毒性试验,报道其中毒现象为不安、呼吸加速、惊厥、呼吸衰竭最后死亡,认为死亡原因是呼吸中枢麻痹,因而推测蜈蚣毒是属于神经毒。Mohamed等^[4]报道了蜈蚣 (*S. morristans*) 的毒颚提取液对某些动物离体器官的作用,观察到毒颚提取液对蟾蜍心脏有抑制作用;对兔小肠最初抑制,继而引起显著的兴奋,最后是长时间的抑制;引起未孕的兔子宫松弛,抑制怀孕兔子宫的正常收缩。蜈蚣毒颚提取液还引起兔高血糖症。小西真尚^[5]报道蜈蚣 (*S. japonica*) 的毒颚提取液有组胺样作用和溶血作用。

本文报道少棘蜈蚣粗毒(毒颚分泌液冻干物)的制备及其生物活性。

实 验

材料 活少棘蜈蚣(体长10至14cm)采集于浙江省岱山县。昆明种小白鼠(雌雄不分,体重15g左右)购自中国科学院上海实验动物中心。无菌绵羊血为上海洋泾西华医用羊血供应站产品。酶底物 N-苯甲酰酪氨酸乙酯和磷酸二对硝基苯酯钠盐为上海东风生化试剂厂产品,磷酸对硝基苯酯二钠盐为 E. Merck 产品,酪蛋白为上海化学试剂厂产品。

所有溶液均用二次蒸馏水配制。

比色测定使用岛津 UV-365 紫外可见分光光度计。

方法 蜈蚣粗毒制备:将蜈蚣毒颚尖端1至2mm处剪断,即有小滴无色透明毒液分泌出,用玻璃毛细管收集,冻干。从1950条(6500g)蜈蚣得到白色粗毒粉末650mg。产率为0.1mg/g体重。

LD₅₀:将小白鼠分为4组,每组6只。粗毒用生理盐水溶解,按每kg体重18、24、26和42mg剂量腹腔注射,观察24小时。

蛋白质含量按 Itzhaki 和 Gill^[6]的方法测定。蛋白水解酶活力按 Rick 的方法(酶活力单位 TU^{ca}按 Kunitz)^[7],酯酶活力按 Walsh 和 Wilcox^[8]的方法,碱性磷酸单酯酶活力按 Malamy

本文1984年4月10日收到。

和 Horecker^[9] 的方法,磷酸二酯酶的活力按 Richards 等^[10]的方法测定。每单位为每 mg 粗毒每分钟水解相应底物生成的水解产物的 μmol 数。

溶血活性: 参考 Vaughan 等^[11]的方法。绵羊红细胞用生理盐水洗涤,2000 转离心 5 分钟,将红细胞制成 5%(V/V) 在 0.01M 磷酸盐(含 0.9% NaCl)缓冲液(pH7.1)中的悬液。在总体积为 0.7ml 的反应液中,含 0.5ml 红细胞悬液和 0.2ml 含不同量粗毒的缓冲液(分别含粗毒 2.5、5、7.5、10、12.5、15、17.5、20、22.5、25 和 30 μg)。完全溶血组用 0.2ml 含 1mg 皂甙的缓冲液代替毒素。空白组含 0.5ml 红细胞悬液和 0.2ml 缓冲液。35 $^{\circ}\text{C}$ 振荡 2 小时(振荡速度为 60—70 次/分钟),然后 2000 转离心 5 分钟,分取上清液,测定 540nm 吸收值。每组毒素含量同时做三份,取平均值。

按 Von Krogh^[12]法,用 $\text{LogLog } C$ (C — 粗毒浓度, $\mu\text{g/ml}$) 对 $\log \frac{y}{1-y}$ ($100y$ — 溶血百分数)作图, $\log \frac{y}{1-y} = 0$ 处的粗毒浓度即是在实验条件下 50% 溶血所需粗毒浓度, HU_{50} ($\mu\text{g/ml}$)。

结果和讨论

过去对蜈蚣毒的研究^[1-3]都只使用毒颚的水提液,并不能真正反映毒液的情况,而且不能定量地进行研究。我们制备了少棘蜈蚣的粗毒粉末,定量地研究了它的一些性质。少棘蜈蚣粗毒的性质见表 1。

少棘蜈蚣粗毒的主要成份是蛋白质,它对小鼠显示中等程度的毒性。在毒性试验中,我们

表 1

粗毒产率	0.1mg/g 体重
N 含量	11.89%
蛋白质含量	87%
LD_{50} (小鼠, ip)	22.5mg/kg 体重
溶血活性(HU_{50})	18 $\mu\text{g/ml}$
酶活性	
底物	活力单位 $\times 10^3$
酪蛋白	2.5
N-苯甲酰酪氨酸乙酯	4100
磷酸对硝基苯酯	430
磷酸对硝基苯二酯	350

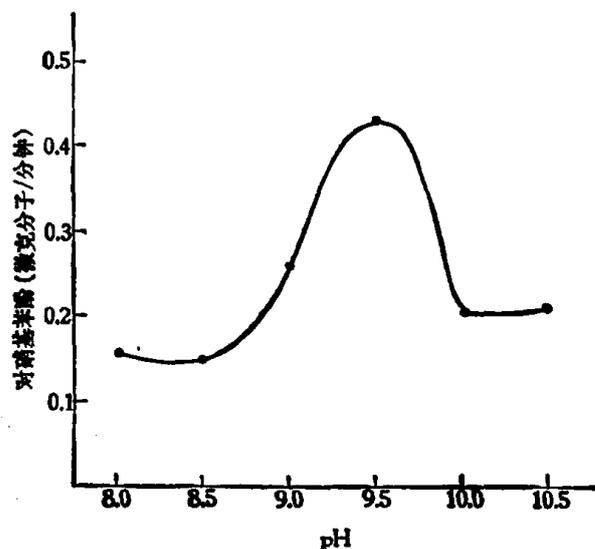


图 1 pH 对粗毒碱性磷酸单酯酶活力的影响

观察了小鼠的中毒现象。在腹腔注射较大剂量粗毒溶液后,小鼠立即表现极度不安、跳跃,在数分钟内即抽搐、死亡。当给予较小剂量粗毒溶液时,主要中毒现象是不安、喘息、蜷伏、呼吸减弱、抽搐,最后死亡或逐渐恢复,过程可持续数小时。这些现象和 Bücherl 所报道的^[2]相似。

用磷酸对硝基苯酯作底物时,在测定的 pH 范围(8.0—10.5)内都显示碱性磷酸单酯酶活力,其水解最适 pH 是 9.5(图 1)。镁离子对此酶活力有增强作用,在 pH9.5,水解体系中含 MgCl_2 时,水解速度约为不含 MgCl_2 时的 3 倍(图 2)。

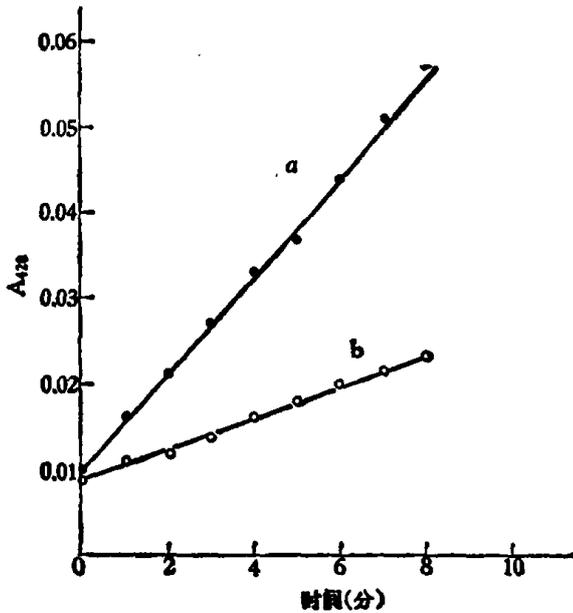


图2 镁离子对粗毒碱性磷酸单酯酶活力的影响
a. 缓冲液含 10mM MgCl₂; b. 缓冲液不含镁离子

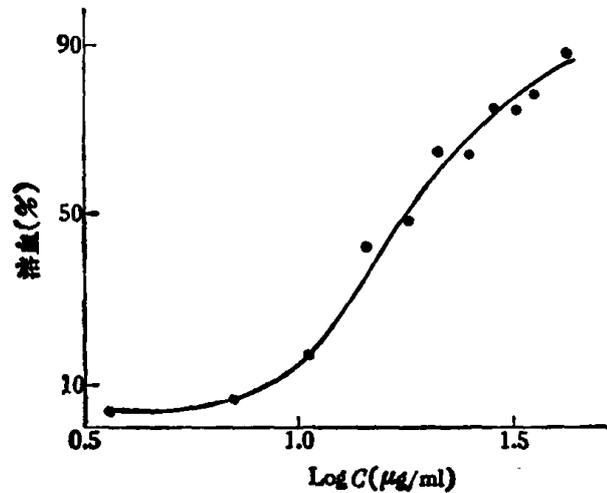


图3 蜈蚣粗毒浓度 $C(\mu\text{g/ml})$ 和绵羊红细胞溶解百分数的关系

在溶血活力测定中,以皂甙为 100% 溶血,求得各粗毒浓度的溶血百分数。将粗毒浓度的对数 ($\log C$) 对溶血%作图,得到 S 形曲线(图 3),和 De Hurtado 等^[12]报道的蛇毒的溶血曲线相似。

结 语

本文的测定结果,说明少棘蜈蚣粗毒具有一定的蛋白水解酶、酯酶、磷酸酯酶活力和溶血活力,并对小鼠具有中等程度的毒性。

参 考 文 献

- [1] 李时珍,本草纲目,人民卫生出版社影印,北京,42(1957), 1562.
- [2] 张崇洲、李志英,动物学杂志, 1979,1: 20—22.
- [3] Bucherl, W., in *Venomous Animals and Their Venoms* (Eds. Bücherl, W. and Buckley, E. E.), Academic Press, New York, 3(1971), 169—196.
- [4] Mohamed, A. H. et al., *Toxicon*, 18(1980), 581—589.
- [5] 小西真尚,岡山医学杂志(日), 48(1936), 1309—1315.
- [6] Itzhaki, R. F. and Gill, D. M., *Anal. Biochem.*, 9(1964), 401—410.
- [7] Rick, W., in *Methods of Enzymatic Analysis* (Ed. Bergmeyer, H. U.), Academic Press, New York, 1963, 813—814.
- [8] Walsh, K. A. and Wilcox, P. E., in *Methods in Enzymology* (Eds. Perlmann, G. E. and Lorand, L.), Academic Press, New York, 19(1970), 38—39.
- [9] Malamy, M. and Horecker, B. L., *ibid.* (Ed. Wood, W. A.), 9(1970), 639.
- [10] Richards, G. M. et al., *Biochemistry*, 4(1965), 501—503.
- [11] Vaughan, G. T. et al., *Toxicon*, 19(1981), 95—101.
- [12] De Hurtado, I. and Layrisse, M., *ibid.*, 2(1964), 43—49.