维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2004)03-0367-03

蝮蛇毒神经毒素的分离

魏有东,谢 鹏,左 联

(重庆医科大学临床学院神经内科,重庆 400016)

【摘 要】目的:从蛇毒中提取出神经毒素。方法:采用 DEAE-sephadex A50 柱及 sephadex G-50 柱层析出神经毒素,并通过生理记录仪等方法鉴定。结果:不仅有效地分离出神经毒素,而且保留了其较好的生物活性。结论:本实验方法是可行的。

【关键词】蝮蛇;蛇毒;神经毒素

【中国图书分类法分类号】R996.3 【文献标识码】B 【收稿日期】2003-09-16

The separation of neurotoxin from snake venom of agkistrodon

WEI Youdong, et al

(*Department of Neurology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To separate neurotoxin from the snake venom. *Methods*: The neurotoxin was separated by using DEAE-Sephadex A-50 chromatography and Sephadex G-50 gel filtration, then identified by the physiological recorder and so on. *Results*: The neurotoxin was not only separated effectively, but also had good biological activities. *Conclusion*: This experimental method can be applied.

【Key words】Agkistrodon; Neurotoxin; Snake venom

蛇毒中 90%-95%是蛋白质,蛇毒的蛋白部分包括各种毒素,非毒性蛋白,酶以及活性多肽。非蛋白成分包括金属离子,无机阴离子和有机小分子化合物。非蛋白成分一般很少具有生物活性,而生物活性物质大部分是蛋白质。蛇毒神经毒素是蛇毒中毒性最大的成分,能使动物产生弛缓性麻痹和呼吸衰竭[1]。我们拟从蛇毒中提取出有效的神经毒素成分,用于临床上某些神经疾病的治疗。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 蝮蛇(Agkistrodon blomhoffi brevicandus Sfeineger)

产地浙江,粗毒购自广州鑫嘉益公司,为冷冻干燥桔黄色粉末。

1.1.2 主要试剂

Tris 碱为香港 FARCO CHEMICAL SUPPLIES 产品。BSA(牛血清白蛋白)为 AMRESCO 产品。

1.1.3 主要仪器

岛津紫外分光光度计为日本导津制研所产品。DEAE-Sephadex A50 和 Sephadex G-50 均为美国 SIGMA 公司产品。MS-302 多媒体化生物信号分析仪为广东药学院产品。SDS-PAGE 电泳装置及夹子玻璃板,灌胶支架,缓冲液槽等附件均为 Hoefer Pharmacia Biotech 公司产品。多通道电子蠕动泵为浙江象山石浦海天电子仪器厂产品。

1.1.4 昆明种小鼠,蟾蜍均由重庆医科大学动物实验中心提供。小鼠体重 20~21g。

1.2 方法

1.2.1 蝮蛇毒中神经毒素的分离纯化

1.2.1.1 DEAE-Sephadex A50 柱层析 选用 2.0cm×40cm 层析柱,用浓度为 0.01mol/L 的 Tris-HCL 缓冲溶液(pH 为 7.8,缓冲液甲)平衡过夜。取粗毒 2g 溶于 20ml 缓冲液甲中,3000r/min 离心 15min 后,取上清液上柱,用缓冲液甲洗脱。期间通过多通道电子蠕动泵调节流出液的速度,保证流速不能过快或过慢。流速约为 60ml/h,人工收集,每管 4ml。第二步换用 0.1,0.2,0.4mol/LNaCL 的 Tris—HCL 缓冲溶液进行分段洗脱。将各试管液在紫外分光光度计测定 280nm 光吸收,记录各洗脱峰。通过小鼠急性毒性试验测定各峰洗脱液的毒性,收集对小鼠具有神经毒性的洗脱液,经透析袋浓缩后保存。

1.2.1.2 Sephadex G-50 柱层析 选用 2.0cm×40cm 层析柱,用浓度为 0.01mol/L Tris—HCL 缓冲液(pH:7.6,缓冲液乙)平衡过夜。取神经毒性峰浓缩液上柱,用缓冲液乙洗脱。洗脱液用试管来收集,每管 4ml,每小时 60ml。然后将

作者介绍:魏有东(1973-),男,住院医师,硕士,主要研究方向:脑血管疾病。

维普资讯 http://www.cqvip.com

各试管液在紫外分光光度计下测定 280nm 光吸收,记录各洗脱峰。通过小鼠急性毒性试验测定各峰洗脱液的毒性,收集对小鼠具有神经毒性的洗脱液。

1.2.2 蝮蛇毒中神经毒素的鉴定

1.2.2.1 小鼠急性毒性试验 针对神经毒活性,通过小鼠神经行为功能来测定。如步态,翻正反射,前肢握力,后肢握力等[2]。实验中,各取神经毒素峰 0.2ml,分别腹腔注入 10 只小鼠,观察小鼠的毒性反应。

1.2.2.2 蟾蜍的坐骨神经——腓肠肌标本试验 参照文献的方法制备标本,固定于平板肌槽上。调节 MS-302 多媒体化生物信号分析仪,间断给予任氏液,保证标本机能良好。用 MS-302 多媒体化生物信号分析仪记录蟾蜍腓肠肌运动的曲线,待曲线稳定后加入样品,继续观察蟾蜍腓肠肌运动的曲线[3,4]。

1.2.2.3 神经毒素 LD_{50}的测定[5] 按点斜计算法,将小鼠分为 7 组,每组小鼠 20 只,观察小鼠的死亡情况,记录死亡数,计算半数致死量(LD_{50})。

1.2.3 蝮蛇毒中神经毒素检验

1.2.3.1 神经毒素蛋白浓度的测定 按 Folin—phend 法[6]测定,以牛血清白蛋白作标准。

1.2.3.2 神经毒素纯度鉴定 采用碱性不连续系统聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)[7]。浓缩胶浓度 5%(pH6.8),分离胶浓度 12%(pH18.8),交联度 3%,电泳起始条件:40V,9.8mA,2Avh;终止条件:120V,9.8mA,100Avh。电泳结束 0.1%考马斯亮蓝 R_{250} 50℃染色 4h,10%乙酸脱色。

2 结 果

2.1 蝮蛇毒中神经毒素的分离

2.1.1 DEAE-Sephadex A50 柱层析,结果见图 1

将峰 1-9 洗脱液分别腹腔注入小鼠各 5 只(见表 1),结果峰 3 与峰 8 洗脱液注射后,小鼠全部死亡;峰 6 洗脱液注射后,小鼠 4 只死亡;而其余各峰洗脱液对小鼠无毒性,小鼠均存活。

2.1.2 Sephadex G-50 柱层析,结果见图 2

将峰 1-5 洗脱液分别腹腔注入小鼠各 5 只(见表 2),结果注射峰 2 洗脱液后,小鼠全部死亡,而其余各峰洗脱液均无毒性,小鼠均存活。

表 1 小鼠的神经毒性实验

小鼠 \ 峰	1	2	3	4	5	6	7	8	9
死亡数	0	0	5	0	0	4	0	5	0
存活数	5	5	0	5	5	1	5	0	5
总 数	5	5	5	5	5	5	5	5	5

表 2 小鼠的神经毒性实验

小鼠 \ 峰	1	2	3	4	5
死亡数	0	5	0	0	0
存活数	5	0	5	5	5
总 数	5	5	5	5	5

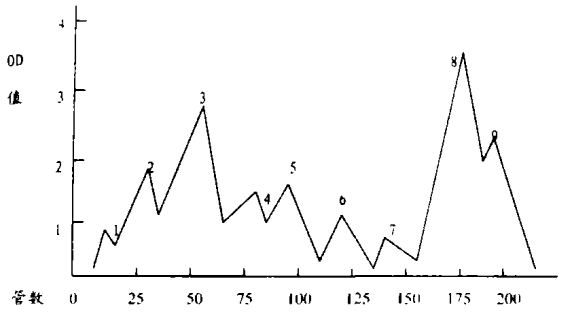


图 1 DEAE-Sephadex A-50 柱层析蛇毒图

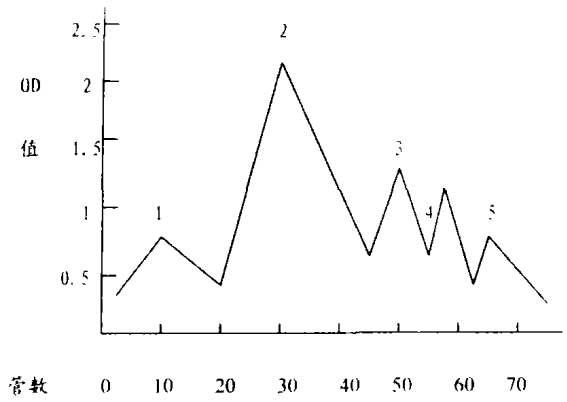


图 2 Sephadex G-50 柱层析蛇毒图

2.2 蝮蛇毒中神经毒素的鉴定

2.2.1 小鼠急性毒性试验 将峰 2 洗脱液(图 2)分别腹腔注射入小鼠,均表现为:注射 10~20min 后,小鼠烦躁不安,活动减少,步态不稳。20~40min 后,小鼠活动明显减少。40~60min 后,小鼠站立不稳,并呈跳跃式前进,前肢较后肢有力。60~70min 时,小鼠四肢无力,不能行走,双下肢向后翻,翻正反射消失,并且头不停地抖动。约 1.5~2h 后,小鼠死亡。将死亡小鼠进行解剖,可见其腹腔中未有出血。

将峰 8 洗脱液成分(图 1)分别腹腔注射小鼠,表现为:注射 5~8min 后,小鼠烦躁不安,头不停地抖动。9~15min,小鼠毛发竖立,皮肤发皱,不能行走。16~25min 后,小鼠死亡。将死亡小鼠进行解剖,可见腹腔大量出血,其中有血凝块。

以下将提纯的峰 2(图 2)洗脱液定为样品。

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.2.2 蟾蜍的坐骨神经——腓肠肌标本试验,结果见图 3,4:

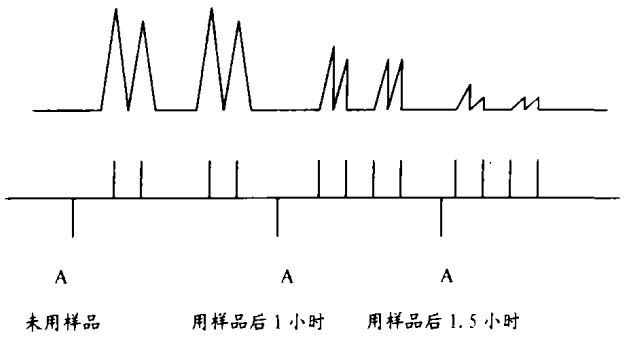


图 3 异常腓肠肌收缩曲线

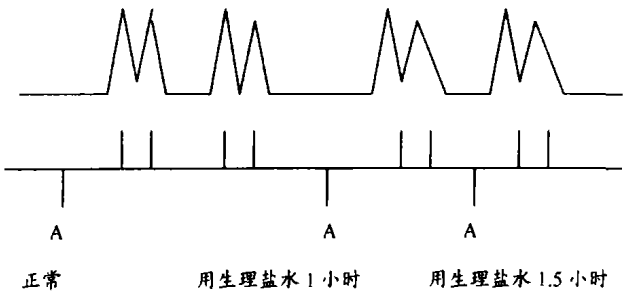


图 4 正常腓肠肌收缩曲线

图 3 中腓肠肌收缩曲线逐渐减低。而用图 1 中峰 8 进行试验,可见曲线没有降低的趋势,与生理盐水组(图 4)相同。

综合小鼠急性毒性试验和 MS-302 多媒体化生物信号分析仪鉴定结果,表明样品为神经毒素。

2.2.3 神经毒素 LD_{50} 的测定,见表 3。

表 3 实例测定的实验数据

量(mg/kg)	4.0	2.8	2.0	1.4	1.0	0.7	0.5
死亡数(r/n)	20/20	20/20	18/20	17/20	7/20	3/20	0/20

$LD_{50} = \log^{-1}[Xm - i(p - 0.5)]$

$= 1.11 mg/kg$

2.3 蝮蛇毒中神经毒素检验

2.3.1 神经毒素蛋白的浓度 按 Folin—phend 法测算蛋白质的浓度:0.0138g/ml。

2.3.2 神经毒素纯度鉴定 在碱性不连续系统聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)的凝胶条带上仅有一条区带。

3 讨 论

从蛇粗毒中单独分离出神经毒素,目前国内外已有大量报道。如徐彭等采用 CM-Sephadex G50 柱,SP-Sephadex G50 柱从江西眼镜蛇毒中分离神经毒素[8]。陈清澄等采用 DEAE-Sephadex A50 柱从浙江蝮蛇毒中分离神经毒素[9]。刘一平等采用 Sephadex G100 柱,CM-纤维素柱从广东眼镜蛇毒中分离神经毒素[10]。本文采用 DEAE-Sephadex A50 柱,Sephadex G50 柱从浙江蝮蛇毒中分离出纯度高的神经毒素。蛋白质的种类很多,性质上的差异很大,同时又处于不同的体系中,因此不可能有一个固定的程序适用于各类蛋白质的分离工作。但多数分离工作中的关键部分,其基本手段是共同的。本研究在离子交换(DEAE)基础上加用分子筛(Sephadex)层析蛇毒,不仅可分离得到活性较好的神经毒素,而且还有效地分离出其它致死毒性的物质,从而保证了神经毒素的纯度。

目前在全国医科大学的生理实验中,蟾蜍的坐骨神经——腓肠肌标本试验已广泛地被应用。该实验方法操作简单,方便,并且准确性好。本实验研究首次采用 MS-302 多媒体化生物信号分析仪对神经毒素进行鉴定,结果较满意。

本实验不仅仅只用于提纯神经毒素,我们拟将神经毒素进行修饰,改变其毒性,使之有效地用于神经疾病的治疗。

(本实验得到重庆医科大学生化教研室廖飞副教授大力支持)

参 考 文 献

[1] 覃公平. 中国毒蛇学[M]. 广西科学技术出版社,1998;215-226.

[2] 孙敬方. 动物实验方法学[M]. 人民卫生出版社,2001;360-361.

[3] 莫书荣. 实验生理科学[M]. 科学出版社,2001;61-66.

[4] 董 岩,汤云贵,蒋伍玲,等. 纯化眼镜蛇毒蛋白对乙酰胆碱受体通道的阻断作用[J]. 中国应用生理学杂志,1995;11(2):113-116.

[5] 黄 敏,李冬冬. 医学机能实验学[M]. 科学出版社,2002;78-82.

[6] 杨安钢,毛积芳,药立波. 生物化学与分子生物学实验技术[M]. 高等教育出版社,2000;245-248.

[7] 盛龙生,何丽一,徐连连,等. 药物分析[M]. 化学工业出版社,2003;382-386.

(下转第 385 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

iNOSmRNA[5]；2、促进 HSP70 表达[6]；3、抑制 CPP32/caspase－3mRNA 表达[7]；4、促进 CREB 磷酸化，CREB 基因缺陷时，动物可出现学习与记忆障碍。研究发现，电刺激 FN 与 P－CREB(磷酸化 CREB)阳性表达明显增多，CREB 磷酸化率增高，这提示 FNS 可使 CREB 磷酸化过程增强，从而介导长时记忆的形成；5、调节神经递质的释放[2]：我们研究发现 FNS 后缺血区 5－HT 含量增加亦有一定关系。另外，还可能通过其他机制，如激活静息神经元或神经胶质，改善神经纤维的电子传递等发挥快速效应。

综上，对不同病因致脑损害而引起意识障碍的患者，在病因基础上治疗无效应用电刺激小脑顶核进行治疗，疗效显著，但由于治疗例数尚不多，值得进一步扩大治疗例数，从而进一步说明其疗效，以寻求治疗的有效途径。

参 考 文 献

[1] Nakai M, Ladecoldc, Ruggiero DA, et al. Electrical stimulation of cerebellar fastigial nucleus increases cerebral cortical blood flow without change in local metabolism: Evidence for an intrinsic system in brain for primary vasodilation[J]. Brain Res, 1983;260:35－49.

[2] 齐 力，董为伟. 电刺激小脑顶核改善缺血性脑损害的研究进展[J]. 国外医学脑血管疾病分册，1996;4:33－35.

[3] 杨 军，董为伟. 电刺激后颅窝治疗脑血管病的初步临床评价[J]. 重庆医科大学学报，1998;23:126－129.

[4] 夏一鲁，罗 勇，董为伟，等. 电刺激小脑顶核对脑卒中大鼠治疗作用与机制[J]. 中风与神经疾病杂志，1999;16:3－5.

[5] 帅 杰，董为伟. 一氧化氮与缺血性脑损害[J]. 国外医学内科学分册，1996;23(8):333－334.

[6]Zeng Jinqi, Dong Weiwei. Effects of cerebral vascular function treatment instrument(CVFT) on the expression of HSP70 and NF－κB in rat brain after experimental hemorrhagic stroke [J]. Newslett Neurochem, 2000;13(1):70－71.

[7] 刘 雁，董为伟. cpp32/caspase－3mRNA 表达在自发瓶压大鼠条件性神经源性神经保护机制中的作用[J]. 神经生化学通讯，2000;13(1):35－37.

[8] BoteZ MI, Lveill J, Lambert R, et al. Single photon emission computed tomography (SPECT) in cerebellar disease; cerebello－cerebral disaschisis[J]. Eur Neurol, 1991;31:405－407.

(上接第 369 页)

[8] 徐 彭，欧阳永伟，楼兰英，等. 江西眼睛蛇毒神经毒素的提纯及部分性质鉴定[J]. 药物生物技术，2000;7(4):225－228.

[9] 陈清澄，刘广芬，王晴川. 蝮蛇蛇毒柱层析分离及生化药理作用[J]. 福建医学院学报，1994;28(2):134－136.

[10] 刘一平，李 虹，王锡峰. 眼睛蛇毒中神经再生因子和神经毒素的分离[J]. 中国生化药物杂志，1994;15(2):111－114.

(上接第 374 页)

Pacing Clin Electrophysiol, 1999;22:1640－1647.

[4] Wijns W, Serruys PW, Slager CJ, et al. Effects of coronary occlusion during percutaneous coronary angioplasty in humans on left ventricular chamber stiffness and regional diastolic pressure－radius relations[J]. J Am Coll Cardiol, 1986;7:455－463.

[5] Sigwart U, Grbic M, Goy JJ, et al. Left atrial function in acute transient left ventricular ischaemia produced during percutaneous transluminal coronary angioplasty of the anterior descending artery[J]. Am J Cardiol, 1990;65:282－286.

[6] Myrianthefs MM, Ellestad MH, Startt－Selvester RH, et al. Significance of the signal－averaged p wave changes during exercise in patients with coronary artery disease and correlation with angiographic findings[J]. Am J Cardiol, 1991;68:1619－1624.

[7] Nazir SA, Lab MJ. Mechanoelectric feedback in the atrium of the isolated guinea－pig heart[J]. Cardiovasc Res, 1996;32:112－119.