

五步蛇蛇毒的分离及凝血酶样酶等活性测定

滕国强 乐培恩 范文斌 (安徽祁门蛇伤研究所, 祁门 245600)

提要 用 DEAE-纤维素 DE₂₂ 柱层析分离皖南山区五步蛇蛇毒, 得 15 个蛋白峰. 分别测定了各组分如精氨酸酯酶、蛋白水解酶、磷脂酶 A 等酶的活力及其与促凝、抗凝、纤溶、溶血、出血、致死等生理活性的关系. 结果表明: 纤溶与蛋白水解酶活力相关; 溶血与磷脂酶 A 活力相关; 抗凝组分和出血、致死相关. 分离的凝血酶样酶的促凝作用与牛凝血酶的对比试验表明: 前者的促凝血作用是直接作用于纤维蛋白原, 且与精氨酸酯酶活性相伴, 其性质类似马来亚红口蝮蛇的凝血毒素制剂 Ancrod.

关键词 五步蛇蛇毒; 凝血酶样酶; 精氨酸酯酶; 磷脂酶 A; Ancrod; 凝血酶

五步蛇 (*Agkistrodon acutus*) 是我国特有的一种毒蛇, 其排毒量大且毒性剧烈, 被其咬

伤者可引起全身广泛性出血, 局部组织严重坏死, 甚至死亡. Ouyang 等曾分离并纯化了台湾产五步蛇蛇毒的促凝、抗凝和纤溶等成分, 分别研究了它的理化特性和毒理⁽¹⁻³⁾. 近年来国内对这方面工作亦引起注意⁽⁴⁻⁸⁾. 我们应用 DEAE-纤维素 DE₂₂ 柱层析分离了皖南山区五步蛇蛇毒, 分别测定了各组分的几种酶活力和一些生理活性, 并将分离的凝血酶样酶 (thrombin-like enzyme, TLE) 与牛凝血酶作了凝血作用特点的对比观察.

1981年3月20日收稿 1981年7月25日修回.

材 料 和 方 法

1. **蛇毒** 五步蛇蛇毒采自本所蛇池，经真空干燥为白色无定形粉末。

2. **实验动物** 小白鼠体重 18-22 g，家兔体重 1.5-2.5 kg，♀♂ 兼用。

3. **仪器和试剂** 层析玻璃柱 80×1.5 cm，CS-1 实验型超过滤器、QY 系列超滤膜(上海轻工所)；XWX 型超过滤器(上海生化所)；CXA 系列超滤膜(上海医工院)；DEAE-纤维素 DE₂₂ (Whatman)；对甲苯磺酰精氨酸甲酯(上海生化所东风厂)；酪蛋白标准试剂(中国科技大学赠)；凝血酶(Sigma)；卵磷脂(上海禽蛋二厂)；纤维蛋白原(上海生物制品所)。

4. **DEAE-纤维素层析法** 取干燥粗毒粉末 0.85 g，溶于 Tris-HCl 0.01 M，pH 8.0 缓冲液 5 ml，经 DEAE-纤维素 DE₂₂ 柱层析(床体积 74×1.5 cm)用上述缓冲液混加 0.5 M NaCl 进行凹梯度洗脱，贮液瓶与混合瓶按 800:0 及 2500:2000 ml (总积 5300 ml)，操作压 40 cm，每管收集 6 ml，在波长 280 nm 下测定蛋白含量。

5. **酶活力及生理效应的测定** 粗毒溶于 0.01 M Tris-HCl，pH 8.0 缓冲液中，配成 0.12 mg/ml，各组分含 A₂₈₀ 0.12 U/ml，分别测定其蛋白水解酶、精氨酸酯酶、磷脂酶 A 等酶活力；同时，通过动物体外和体内试验分别

测定各组分的促凝、抗凝、纤溶、出血、直接溶血和致死毒性等生理活性。测定方法参照文献⁽⁶⁻⁹⁾。

TLE 组分的某些理化特性测定，参照文献^(4,8,9)，设计了 TLE 和凝血酶的凝血情况对比试验(包括复 Ca、纤维蛋白原直接作用、肝素抑制、尿素溶解等试验)，TLE 的不同稀释度对血浆的凝结试验及热稳定性测定等。

结 果

皖南山区五步蛇蛇毒经 DEAE-纤维素柱层析后的图谱(图 1)。共收集检测 680 管，分出 15 个蛋白峰。蛋白回收率以 A₂₈₀ 计算达 106%。

分离的各组分的酶活力及生理活性测定的结果见表 1。

精氨酸酯酶主要分布在 VII，VIII 和 XI 三个峰，以 VIII 峰活力最高；

蛋白水解酶主要分布在 I 和 II 峰，以 I 峰活力最高；

磷脂酶 A 主要分布在 III，IV 和 V 峰；

促凝活性主要分布在 V，VI，VII 和 VIII 峰，以 VIII 峰活性为最强；

抗凝活性主要分布在 XIV 和 XV 峰，以 XIV 峰为最强，其次是 II，XII 和 XIII 峰；

纤溶活性主要分布在 I 峰，次是 III，V 和 XIII 峰；

直接溶血作用分布在 II，III，IV 和 V 峰；

出血毒性分布在 XII 和 XIV 峰，次为 I 峰；

致死毒性以 XIV 峰为最强。

对 TLE 组分与凝血酶的一系列对比试验结果表明：TLE 的促凝机制是直接作用于纤维蛋白原，而不需其它任何凝血因子的参与，不被肝素抑制，且对凝

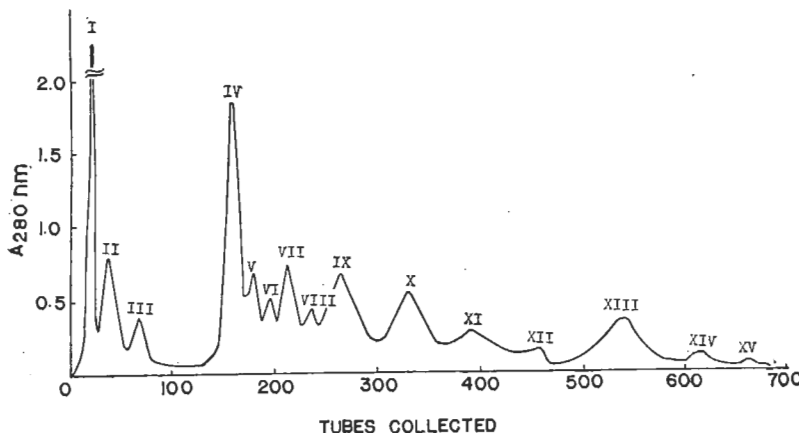


Fig 1. Column chromatogram of *Agkistrodon acutus* venom

Table 1. Enzymatic activities and physiological effects of protein peaks of *Agkistrodon acutus* venom

Peak No.	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	Crude venom
Content in crude venom(%)	9.4	2.8	4.1	14.9	3.6	1.6	9.1	2.3	13.3	11.8	6.4	2.95	16.2	1	0.3	
Content of protein (A ₂₈₀ /ml)	1.47	0.31	0.10	0.28	0.57	0.49	0.55	0.36	0.45	0.34	0.21	0.14	0.15	0.04	0.02	
Arginine esterase*							+++	++			++					++
Proteinase**	+++						+++									+++
Phospholipase A (hemolysis)	+++	+++				+		+				+				+++
Procoagulant Action	++	++	+++	+++	+++		++	12"	2'		2'	++	++	+++	+++	20"
Anticoagulant Action	+	++						18"		+	+	++	++	+++	+++	++
Fibrinolysis	+++		++		++											+
Direct Hemolysis	+	++	++	+++	++	+	+	+	++	++		++			+++	+++
Bleeding	+															+++
Toxicity												++	++	2/5		LD ₅₀ 3.5 mg/kg

* Each + for OD₅₄₀ decreasing 0.008 of ester. ** Each + for OD₂₈₀ increasing 0.1 tyrosine

血 XIII 因子无激活作用, 因而它所造成的凝块易被尿素溶解(见表 2); 将 TLE 按不同温度加热 1/2 h, 分取 0.2 ml 与 0.5 ml 兔血浆混合, 观察其促凝活性变化, 加热 50 °C 可在 2 min 凝结, 加热到 70 °C, 15 min 凝结, 煮沸 1/2 h 仍然可在 6 h 凝结。

将 TLE 组分稀释到 ppm 浓度, 取 0.1 ml 仍可使 0.5 ml 血浆在 4 h 内凝固。同时发现, 夏季室温在 25—35 °C 置于冰箱 4 °C 内 4 个月多的 TLE 溶液, 尚具有较强的凝血活性。该组分经过超滤浓缩, 真空抽干, 可得到白色针状结晶。

讨 论

用 DEAE-纤维素 DE₂₂ 柱层析分离五步蛇毒, 效果稳定, 重复性好。

从皖南山区五步蛇毒分离所得的 15 个组分及其酶活力和生理效应的测定结果看, 该蛇毒进入体内对血液系统的毒害作用可大体归纳为促凝、抗凝、纤溶、出血和溶血等 5 个主要方面。其中, 促凝血作用强的组分表现为 TLE 作用, 与精氨酸酯酶相重叠, 其活性强烈而稳定; 纤溶组分同时表现了较强的蛋白水解酶活力; 直接溶血组分表现了较强的磷脂酶 A 的活力; 抗凝组分似与出血作用紧密相连, 而出血严重的组分又是死亡率最高的组分。实 Table 2. Comparison of blood coagulations by TLE fraction with that by thrombin

Reaction Solution	Tube No.							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Rabbit plasma	1		1		1		1	
Fibrinogen		1		1		1		1
Heparinum	0.1	0.1			0.1	0.1		
Thrombin	0.1	0.1	0.1	0.1				
TLE					0.1	0.1	0.1	0.1
Coagulation	-	-	+	+	+	+	+	+
Dissolution of coagulum by urea		-	+	+	+	+	+	+

验明显证明, 给动物局部注射蛇毒引起的组织坏死与蛋白水解酶有直接关系, 种种的生理效应表明, 五步蛇蛇毒在体内的各项毒害作用相互协同进行, 致病机理十分复杂, 尚待深入研究。

分离的 TLE 组分和凝血酶的一些对比实验初步证实, 该组分能专一地作用于纤维蛋白原而使血浆凝结, 且不需其它凝血因子参与, 不受肝素抑制, 从而表明其凝血机理与凝血酶不同而与马来亚红口蝮蛇凝血毒素制剂 An-crod^(4,7) 相似, 它只使纤维蛋白原的 α 链释放多肽 A, 而不能使其 β 链释放多肽 B, 仅以 $[\alpha, \beta(B), \gamma]_2$ 的形式形成纤维蛋白单体; 并由于它对 XIII 因子无激活作用, 它致成的单体亦只构成非交联的不稳固的纤维蛋白聚合物, 在活体血液内易于纤溶而被去除。不难设想, 分离的 TLE 组分在进入血液循环后, 将会产生单一地减少纤维蛋白原而降低血液粘度的作用; 将它经过纯化处理, 便可制成一种治疗血栓性疾病的良药——去纤维蛋白制剂。这对于发掘祖国医药宝库, 开发利用本地区富有

的五步蛇资源, 具有重大的现实意义和经济意义。

致谢 得到中国科学院上海生化所陈远聪同志、成都生物所赵尔宓同志、中国科技大学八系的老师们及上海医械公司吴英同志等热忱支持和帮助

参 考 文 献

- 1 Cheng HC, Ouyang C. *Toxicon* 1967 Feb; 4(4): 235
- 2 Ouyang C, Huang TF. *Biochim Biophys Acta* 1976 Jul 19; 439(1):146
- 3 Ouyang C, Teng CM. *Toxicon* 1978; (6):583
- 4 吴秀荣、邓成仁、孙家钧、曾婉云、张木生、洪息君。蛇毒。成都生物所等编。中国的毒蛇及蛇伤防治。第1版, 上海: 上海科技出版社, 1979:117-74
- 5 云南动物所第四研究室。生物化学与生物物理学报 1976年6月; 8(2):152
- 6 刘广芬、邱淑玉、李斌、涂光传。生物化学与生物物理学报 1980年6月; 12(2):154
- 7 阮长耿。1979年2月, 江苏医药 (1-2):17
- 8 阮长耿。国外医学参考资料(内科分册) 1974年11月; 1(11):479
- 9 福州部队总医院。临床医学检验。第1版。上海: 上海科技出版社, 1978年:112-28

Acta Pharmacologica Sinica 1982 Mar; 3 (1): 21-25

ISOLATION OF VENOM FROM *AGKISTRODON ACUTUS* AND ASSAY OF BIOLOGICAL ACTIVITIES OF THROMBIN-LIKE ENZYME AND OTHER FRACTIONS

TENG Guo-qiang, YUE Pei-en, FAN Wen-bin
(Anhui Qimen Snake-bite Institute, Qimen 245600)

ABSTRACT By DEAE-cellulose DE₂₂ column chromatography the venom of *Agkistrodon acutus* from the mountainous area of southern Anhui Province was separated into 15 protein peaks. The enzymatic activities and the effects of procoagulant, anticoagulant, fibrinolysis, hemolysis, bleeding and lethal actions of the fractions were assayed. The fibrinolysis was related to the activity of proteinase, the

hemolysis was related to the activity of phospholipase A, and the anticoagulant action was related to bleeding and lethal toxicity. The procoagulant action was coincident with the arginine esterase activity.

The TLE fraction acted directly on fibrinogen and possessed arginine esterase activity. Its procoagulant action was similar to that of Ancrod, the coagulant toxin

of Malayan pit viper (*Agkistrodon rhodostoma* "Boie").

KEY WORDS venom of *Agkistrodon acutus*; thrombin-like enzyme; arginine esterase; phospholipase A; Ancrod; thrombin

*

*

*

*

*

*