

## 尖吻蝮蛇血清的抗蛇毒作用

黄接棠 任筱兰 张梅 滕国强 (安徽省祁门县蛇伤研究所, 祁门 245600)

**提要** 尖吻蝮蛇血清具有显著的对抗尖吻蝮蛇毒的作用。小鼠 iv 尖吻蝮蛇血清  $LD_{50} > 2.5 \text{ g/kg}$ 。麻醉狗 iv 200 mg/kg 对呼吸、血压、ECG、外周血象和肝、肾功能无影响。自尖吻蝮蛇血清中分离纯化得到一个抗毒因子, 其抗毒活力可提高10倍, 分子量约7万, 等电点4.0。尖吻蝮蛇血清的抗蛇毒作用不是免疫反应。

**关键词** 尖吻蝮蛇血清; 蛇毒; 抗毒作用; 小鼠  $ED_{50}$ ; 抗毒因子; 聚丙烯酰胺凝胶电泳; 琼脂免疫扩散

某些毒蛇与无毒蛇的血清具有抗蛇毒活性<sup>(1-3)</sup>。本文报道尖吻蝮(*Agkistrodon acutus*)蛇血清的抗蛇毒作用、毒性反应和抗毒因子的纯化与有关性质。

### 材料与方 法

**尖吻蝮蛇血清** 尖吻蝮蛇是本所蛇池饲养, 自背主动脉穿刺取血, 分离血清, 置冰箱4℃保存备用(下称原血清)。取原血清用35-55%硫酸铵的沉淀部分(上清液弃去), 制成无菌注射液, 蛋白量为80 mg/ml, 批号801214(下称蛇血清)。

**蛇毒** 尖吻蝮蛇毒、竹叶青蛇毒、蝮蛇毒和银环蛇毒均由本所自制, 经真空干燥成干粉, 保存备用。称取一定量干粉, 以生理盐水配成所需浓度供用, 用简化机率单位法测得上述各蛇毒的小鼠 iv  $LD_{50}$  及95%可信限分别为  $3.10 \pm 0.46$ ,  $1.40 \pm 0.29$ ,  $0.79 \pm 0.07$  和  $0.0294 \pm 0.0003 \text{ mg/kg}$ 。

**兔抗蛇血清抗体** 取蛇血清对家兔免疫, 首次 iv 100 mg/kg, 第4, 5周分别 ip 10 mg

/kg, 第6周从心脏取血, 分离血清, 封于1 ml 安瓶中存冰箱。

DEAE-Sephadex A-50(瑞典), 丙烯酰胺(比利时), 甲撑双丙烯酰胺、 $\beta$ -巯基乙醇、考马斯兰 R-250、CM-celluloses C-32 和牛血清清蛋白(英国), 琼脂、半透膜透析袋(日本), 醋酸纤维薄膜(浙江黄岩), 精制抗五步蛇毒血清(上海生物制品研究所), 卵白蛋白、马心细胞色素C(上海生化所东风厂), 十二烷基磺酸钠(CP)重结晶后使用, 其他试剂均为国产(AR 或 CP)。

血清蛋白用 Lowry 氏法测定, 以牛血清清蛋白作标准。

### 结 果

**体内抗毒试验** 取  $20 \pm 2 \text{ g}$  小鼠 ♀ ♂ 兼有, 匀分8组, 每组10—20只, 对照组仅 ip 4种蛇的蛇毒, 给药组 iv 蛇血清 250 mg/kg, 10 min 后 ip 蛇毒, 记录48 h 死亡数, 结果 ip 4种蛇的蛇毒的各对照组70—100%死亡, 而给药组给血清后对尖吻蝮蛇毒和竹叶青蛇毒有显著的对抗作用, 对银环蛇和蝮蛇蛇毒无对抗作用(见表1)。

#### 治疗试验

1. 对中毒小鼠的治疗作用 体重  $20 \pm 2 \text{ g}$  小鼠, 分对照组和治疗组, 各10只, ip 尖吻蝮蛇毒 5 mg/kg, 20 min 后治疗组 ip 蛇血清 250 mg/kg, 记录48 h 死亡数, 结果对照组14 h

Table 1. Mortality of mice from ip snake venom 10 min after iv snake-serum

Venom (mg/kg)	Serum (mg/kg)	Mice died/ Mice dosed
<i>Agkistrodon acutus</i> Guenther (5)	---	20/20 0/20***
<i>Trimeresurus stejnegeri</i> Schmidt (1.5)	---	14/20 0/20***
<i>Agkistrodon halys</i> Pallas (1.25)	---	18/20 12/20*
<i>Bungarus multicinctus</i> Blyth (0.2)	---	10/10 10/10*

Compared with control \* $P > 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.01$

内全部死亡, 治疗组 48 h 死亡 30% ( $P < 0.025$ ), 足见蛇血清对 ip 致死量尖吻蝮蛇毒的小鼠有显著的治疗作用。

2. 对中毒家兔的治疗作用 取  $2.0 \pm 0.5$  kg 的家兔 6 只, 对照和治疗组各 3 只, 分别于股四头肌 im 尖吻蝮蛇毒 8.5 mg/kg, 2 h 后治疗组自耳缘静脉 iv 蛇血清 150 mg/kg, 观察 48 h 死亡情况及局部组织的损害程度, 并对各组兔的肾脏做病理剖检。结果对照组家兔 48 h 内全部死亡, 局部组织高度肿胀, 出血面及溃疡面蔓延至腹股沟及臀部, 肾组织镜见淤血明显, 以髓质为甚, 近曲小管上皮轻度浊肿, 多数集合管上皮肿胀, 核呈固缩状, 肾盂脂肪组织显著水肿。治疗组兔全部存活, 局部无明显溃疡, 注毒部位有绿豆大疤痕, 解剖见组织损伤和出血远比对照组为轻, 肾组织切片检查, 除有轻度水肿外, 无其他实质性病变, 可见蛇血清对中毒家兔有明显的治疗作用。

### 蛇血清对注射尖吻蝮蛇毒的小鼠和家兔血液系统的影响

1. 小鼠凝血时间的测定  $20 \pm 2$  g 小鼠 20 只, 匀分 2 组, 给药组先 ip 蛇血清 0.25 g/kg, 10 min 后同部位 ip 尖吻蝮蛇毒 2.0 mg/kg, 对照组只给蛇毒, 1 h 后用洁净的毛细管自眼眶脉络丛取血, 测定其凝血时间, 结果给药组的小鼠凝血时间  $< 3$  min, 而对照组凝血时间  $> 1$  h。

2. 对中毒家兔血液系统的保护作用<sup>(4)</sup> 2 kg 左右家兔 9 只匀分 3 组, 对照组不作处理; 蛇毒组自耳缘静脉 iv 尖吻蝮蛇毒 2 mg/kg; 蛇血清组 iv 蛇血清 100 mg/kg, 20 min 后同部位 iv 尖吻蝮蛇毒 2 mg/kg。分别在 iv 蛇毒前和后 1, 4, 24 h 心脏取血, 测定全血凝固时间、RBC、Hb、复钙时间、凝血酶元时间、BUN、纤维蛋白元, 结果蛇毒组在 iv 蛇毒 1 h 后上述各项指标均不正常, 且在 24 h 左右全部死亡; 蛇血清组注蛇毒后凝血时间均  $< 7$  min, 纤维蛋白元、RBC 计数、Hb 有所下降, 复钙时间及凝血酶元时间有所延长, 但在 24 h 均恢复正常(表 2)。

### 蛇血清的 ED<sub>50</sub> 和抗毒效价的测定

1. ED<sub>50</sub> 的测定  $21 \pm 2$  g 小鼠 40 只, 匀分 4 组, ip 2 LD<sub>50</sub> 尖吻蝮蛇毒后, 随即分别 iv 含等比级数的蛇血清, 记录各组小鼠 48 h 内的死亡数, 用简化机率单位法求得蛇血清的抗尖吻蝮蛇毒的 ED<sub>50</sub> 及 95% 可信限为  $46.5 \pm 5.4$  mg/kg。

2. 抗毒效价的测定 取试管 5 支, 每管加蛇血清 1.0 ml, 然后以 1 mg 递增量的尖吻蝮蛇毒依次加入各管中, 根据蛇毒加量补加生理盐水, 使总量为 4 ml, 置 37°C 保温 30 min 取出, 每稀释度用 6 只  $19 \pm 1$  g 小鼠, ip 上述混合物 0.2 ml/只, 观察 48 h, 以完全不死亡的最高稀释度为该血清的效价。测得结果蛇血清每 ml 可中和尖吻蝮蛇毒 12.5 mg, 同法测得精制抗五步蛇毒血清每 ml 可中和尖吻蝮蛇毒 10.5 mg。

### 蛇血清的毒性试验

1. 急性毒性试验 用上下法测得蛇血清小鼠 iv LD<sub>50</sub>  $> 2.5$  g/kg。

2. 蛇血清对狗肝肾功能、外周血象的影响及肝肾等脏器的组织学与形态学观察 狗 6 只, 体重 10-15 kg, ♀♂ 兼有, 匀分两组, 对照组不予处理, 给药组于狗后肢小隐静脉抽血后, iv 蛇血清 200 mg/kg, 分别在 iv 后 5 h 3 d, 7 d 抽血检查 GPT, BUN, RBC, WBC,

Table 2. Changes of erythrocytes, hemoglobin, time of calcipexis, thrombinogen time, fibrinogen and blood urea nitrogen in rabbits 0-24 h after iv *Agkistrodon acutus* venom (2 mg/kg) which was given 20 min after iv its  $\bar{x}$  serum 100 mg/kg ( $\bar{x} \pm SD$ )

		Control group	Snake-venom	Snake-serum
RBC ( $\times 10^{-4}/\text{mm}^3$ )	0 h	438 $\pm$ 12	470 $\pm$ 47	442 $\pm$ 28
	1 h	431 $\pm$ 8	408 $\pm$ 14	407 $\pm$ 46
	4 h	440 $\pm$ 13	375 $\pm$ 54	397 $\pm$ 40
	24 h	423 $\pm$ 6	210 $\pm$ 79	440 $\pm$ 36
Hb (g/l)	0 h	96 $\pm$ 11	107 $\pm$ 3	97 $\pm$ 11
	1 h	96 $\pm$ 11	94 $\pm$ 5	95 $\pm$ 16
	4 h	96 $\pm$ 10	87 $\pm$ 11	88 $\pm$ 14
	24 h	95 $\pm$ 4	58 $\pm$ 14	97 $\pm$ 8
Time for calcipexis (s)	0 h	86 $\pm$ 6	90 $\pm$ 3	85 $\pm$ 8
	1 h	90 $\pm$ 3	>360	88 $\pm$ 10
	4 h	80 $\pm$ 3	>360	110 $\pm$ 13
	24 h	85 $\pm$ 7	>360	85 $\pm$ 10
Thrombinogen time (s)	0 h	12 $\pm$ 1	13 $\pm$ 1	11 $\pm$ 2
	1 h	9 $\pm$ 3	>60	13 $\pm$ 1
	4 h	13 $\pm$ 1	>60	15 $\pm$ 1
	24 h	11 $\pm$ 1	>60	10 $\pm$ 1
Fibrinogen (g/l)	0 h	2.87 $\pm$ 0.09	2.87 $\pm$ 0.09	2.97 $\pm$ 0.17
	1 h	2.85 $\pm$ 0.06	1.34 $\pm$ 0.17	2.27 $\pm$ 0.15
	4 h	2.88 $\pm$ 0.08	0.90 $\pm$ 0.12	1.98 $\pm$ 0.18
	24 h	2.89 $\pm$ 0.05	0.47 $\pm$ 0.13	3.02 $\pm$ 0.12
BUN (mmol/l)	0 h	6.8 $\pm$ 0.8	7.4 $\pm$ 0.2	6.7 $\pm$ 0.4
	1 h	6.9 $\pm$ 0.3	7.2 $\pm$ 0.3	6.9 $\pm$ 0.7
	4 h	6.4 $\pm$ 1.1	10.9 $\pm$ 1.7	6.7 $\pm$ 0.5
	24 h	6.9 $\pm$ 0.6	22.3 $\pm$ 5.0	6.9 $\pm$ 1.0

Hb. 最后一次取血后, 用戊巴比妥钠麻醉, 放血至死, 进行病理观察, 结果蛇血清对狗的 GPT, BUN, RBC, WBC, Hb 均无影响 (表 3). 给药组狗肝、肾、肺、心、肠、胃、脑切片未见病理改变.

3. 蛇血清对狗呼吸、血压及 ECG 的影响  
用体重 10 kg 的狗, 戊巴比妥钠麻醉后, 自股静脉缓慢 iv 蛇血清 200 mg/kg, 观察 0.5, 1, 2 h 时呼吸、血压及 ECG 无明显变化.

4. 蛇血清的抗原性试验 按中国药典介绍的方法做豚鼠致敏试验, 经 3 次 ip 蛇血清

致敏的豚鼠在 iv 蛇血清时均产生致敏反应而死亡, 证明蛇血清是抗原性蛋白质.

### 蛇血清抗毒因子的分离纯化与性质

#### 1. 蛇血清抗毒因子的纯化

1.1 硫酸铵分步沉淀 取尖吻蝮原血清 15 ml (含蛋白 900 mg), 在电磁搅拌下缓慢加入饱和硫酸铵液, 使含硫酸铵浓度达 35%, 离心去沉淀, 上清液继续加入固体硫酸铵至含硫酸铵达 55%, 4°C 放置 5 h, 吸滤, 滤饼透析除盐后供继续分离用.

#### 1.2 DEAE-Sephadex A-50 柱层析分离

Table 3. Effects of snake-serum on leucocytes, erythrocytes, hemoglobin, liver and kidney functions of 3 dogs 0 h-7 d after iv snake-serum 200 mg/kg ( $\bar{x} \pm SD$ )

		Control group	Snake serum group
WBC ( $\times 10^{-3}/\text{mm}^3$ )	0 h	14.3 $\pm$ 0.6	13.4 $\pm$ 0.3
	5 h	14.5 $\pm$ 0.5	13.6 $\pm$ 0.4
	3 d	14.7 $\pm$ 0.4	13.7 $\pm$ 0.5
	7 d	14.0 $\pm$ 0.5	13.8 $\pm$ 0.4
RBC ( $\times 10^{-4}/\text{mm}^3$ )	0 h	695 $\pm$ 30	705 $\pm$ 25
	5 h	680 $\pm$ 15	710 $\pm$ 20
	3 d	720 $\pm$ 28	738 $\pm$ 15
	7 d	712 $\pm$ 21	698 $\pm$ 20
Hb (g/l)	0 h	138 $\pm$ 12	139 $\pm$ 6
	5 h	130 $\pm$ 15	135 $\pm$ 12
	3 d	138 $\pm$ 8	139 $\pm$ 10
	7 d	132 $\pm$ 10	137 $\pm$ 8
GPT (U)	0 h	37 $\pm$ 2	35 $\pm$ 1
	5 h	36 $\pm$ 4	37 $\pm$ 2
	3 d	38 $\pm$ 3	34 $\pm$ 3
	7 d	33 $\pm$ 6	32 $\pm$ 7
BUN (mmol/l)	0 h	6.5 $\pm$ 0.4	6.5 $\pm$ 0.2
	5 h	6.4 $\pm$ 0.3	6.3 $\pm$ 0.5
	3 d	6.3 $\pm$ 0.7	6.5 $\pm$ 0.3
	7 d	6.5 $\pm$ 0.5	6.1 $\pm$ 0.6

经硫酸铵初步纯化的蛇血清对 0.01 M Tris-HCl pH 8.0 缓冲液平衡过夜, 上 DEAE-Sephadex A-50 柱 (2.2 $\times$ 46 cm), 分别以含 0.1, 0.15, 0.22, 0.5 M NaCl 的起始缓冲液分步洗脱, 分管收集, 5 ml/管, 30 ml/h, 于 751 分光光度计 280 nm 处检测, 得 5 个蛋白峰 (图 1), 下柱后各蛋白峰经浓缩并脱盐后测定抗毒活力存在第 5 峰, 继之测定峰 5 中和尖吻蝮蛇毒的 mg 数。

1.3 CM-celluloses C-32 柱层析分离  
取经 DEAE-Sephadex A-50 柱层分出的第 5 个峰的浓缩液与 0.01 M pH 3.0 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液平衡过夜, 上 CM-Celluloses C-32 柱 (1.5 $\times$ 40 cm), 以含 0-0.5 M NaCl 的

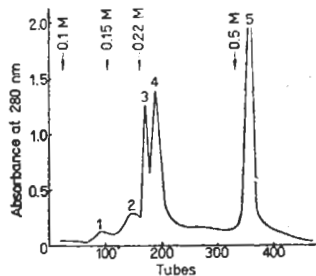


Fig 1. DEAE-Sephadex A-50 column-chromatography elution print

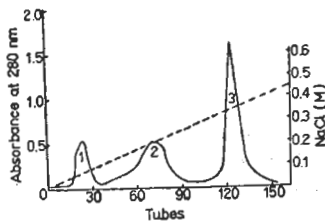


Fig 2. CM-celluloses C-32 column-chromatography elution print

起始缓冲液进行直线梯度洗脱, 分管收集, 每管 3 ml, 18 ml/h, 得 3 个洗脱峰 (图 2)。

1.4 不连续聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳<sup>(5)</sup> 电泳装置自制, 分离胶浓度 8%, 浓缩胶浓度 3%, 分别用 pH 8.9 与 pH 6.7 Tris-HCl 缓冲液配胶, 凝胶板 0.2 $\times$ 5 $\times$ 15 cm, 经 CM-celluloses C-32 分离的第 3 个峰的浓缩液 1 ml (含蛋白 10 mg), 适量蔗糖, 溴酚兰溶液 1 滴, 加到凝胶上部, 以甘氨酸-Tris pH 8.3 缓冲液电泳, 负极在上, 正极在下, 电流强度在浓缩胶时 40 mA, 分离胶时 60 mA, 电泳 100 min. 电泳毕, 取下凝胶, 两边分别切下 3 mm 一段, 以 30% 三氯醋酸显色后, 与原凝胶对齐, 切下第 2 带, 弄碎, 用水于 4 $^{\circ}$ C 浸泡提取 24 h, 吸滤, 滤液经聚丙烯酰胺凝胶电泳检查后, 将凝胶电泳均一的抽提液合并, 浓缩, 脱盐, 真空干燥成干粉, 得纯抗尖吻蝮蛇毒因子 15 mg. 自硫酸铵沉淀开始以后各步纯化结果总结于表 4。

## 2. 蛇血清抗毒因子的有关性质

2.1 聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定 取抗毒因子 0.1 mg, 于 0.5 $\times$ 7 cm 凝胶中电泳,

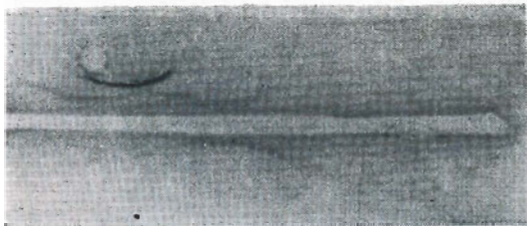
Table 4. Purification of the antitoxin factor in the serum of *Agkistrodon acutus* (Guenther)

Procedure	Total protein (mg)	<i>Agkistrodon acutus</i> venom neutralized	Rate of recovery of protein(%)	Rate of recovery of anti-lethal activity (%)	Purification multiple
Normal serum	900	75	100	100	1
Precipitate by 35-55% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	405	62	45.6	82.7	1.8
DEAE-Sephadex A-50 peak 5	90	30	10	40	4
CM-celluloses C-32 peak 3	42	21	4.7	28	6
Gel plate electrophoresis antitoxin factor	15	12.5	1.7	16.7	10

Fig 3. Polyacrylamide gel-electrophoresis of *Agkistrodon acutus* serum antitoxin factor

凝胶配制及缓冲液电泳条件均与凝胶板电泳同,电流强度为3 mA/管,电泳80 min,图3可看出抗毒因子呈现单一的染色带。

2.2 琼脂免疫电泳鉴定 按常规方法进行。以巴比妥——巴比妥钠缓冲液(0.05 M, pH 8.6)配制1%琼脂板(7.5×2.5 cm),取0.1 mg 抗毒因子和0.5 mg 原血清分别加入琼脂板小孔内,以7 V/cm电泳30 min,电泳毕,中心槽放适量兔抗蛇血清,在37°C扩散24 h,氨基黑10 B染色,7%醋酸脱色(图4),抗毒因子与兔抗蛇血清仅形成1条沉淀线。

Fig 4. Agar immune electrophoresis of *Agkistrodon acutus* serum protein (upper) and the serum antitoxin factor (lower)

2.3 分子量的测定<sup>(9)</sup> SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳方法测定,丙烯酰胺浓度7.5%,测得抗毒因子的分子量约7万(图5)。

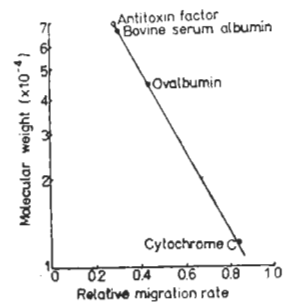


Fig 5. Molecular weight measured by gel electrophoresis

2.4 等电点的测定<sup>(7)</sup> 在0.1 M的pH 3.72, 4.05, 5.57 醋酸盐缓冲液中分别测定抗毒因子在醋酸纤维薄膜上的迁移率,以迁移率与各自相应的pH值作图,迁移率为零时的pH值为该蛋白质的等电点,测得抗毒因子的等电点为4.0。

### 蛇血清抗毒机理的初步探讨

1. 补体结合试验 按常规方法进行,以尖吻蝮蛇毒为抗原,做蛇血清的补体结合试验,结果未发现抗体存在。

2. 琼脂免疫扩散试验 用蛇血清与尖吻蝮蛇毒进行免疫扩散,未见沉淀线产生。

蛇血清的抗蛇毒作用不是免疫反应。

### 讨 论

蛇血清能对抗尖吻蝮蛇毒对小鼠和家兔的致死作用,且对中毒家兔的局部组织有抗坏死作用,iv 200 mg/kg 蛇血清对狗无明显毒性反应。蛇血清是抗原性蛋白质,但经过纯化精

制用蛇血清的抗毒成分制成抗毒制剂,可以减少抗原性,提高抗毒活力,对蛇咬伤病人的急救和治疗将是有用和安全的。

蛇血清的抗蛇毒作用不是免疫反应,亦不是酶的激活作用,我们将蛇血清与尖吻蝮蛇毒混合物在 37°C 保温 1 h 与不保温的分别测定抗毒效价,两者无差别。Ovadia 等<sup>(2)</sup>证实在巴勒斯坦蝮蛇血中存在抗神经毒因子,可与神经毒素形成稳定的复合物使神经毒素失活。我们推想,蛇血清的抗毒作用亦可能是蛇血清抗毒因子与蛇毒毒素成分结合成复合物使之失活,进一步机制探讨正在进行中。

**致谢** 淮南市卫生防疫站朱向秀同志做补体结合试验,徽州地区医院车希愚同志做病理切片检查,北京大学

生物系和中国科技大学生物系惠赠标准蛋白,本所黄坤成和黄福良同志参加部分工作。

### 参 考 文 献

- 1 Omori-Satoh T, Sadahiro S, Ohsaka A, Murata R. *Biochim Biophys Acta* 1972 Dec; 285(2):414
- 2 Ovadia M, Kochva E, Moav B. *Ibid* 1977 Apr; 491(2): 370
- 3 安徽省祁门县蛇伤医疗所. 中草药通讯 1979年3月; 10(3):35
- 4 福州部队总医院编. 临床医学检验. 第1版. 上海:上海科技出版社, 1978:3, 106, 229, 301
- 5 中国科学院微生物研究所酶结构与功能研究组. 生物化学与生物物理进展 1976年11月; (4):36
- 6 王杨声. 微生物学通报 1978年12月; 5(6):33
- 7 刘培楠, 梁植权, 宋振玉, 梁晓天, 周同惠, 金大勋编. 仪器分析及其在分子生物学中的应用. 第3册. 第1版. 北京:科学出版社, 1978:278

*Acta Pharmacologica Sinica* 1982 Dec; 3 (4): 245—250

## ANTI-OPHIDIC TOXIN ACTION OF *AGKISTRODON ACUTUS* SERUM

HUANG Jie-tang, REN Xiao-lan, ZHANG Mei, TENG Guo-qiang  
(Qimen Snake-bite Institute, Qimen 245600)

**ABSTRACT** The lethal effect of the venom of *Agkistrodon acutus* was protected by its serum. The serum alleviated the tissue necrosis and protected the blood system of rabbits when given a lethal dose of the snake venom.

In mice the LD<sub>50</sub> of snake serum > 2.5 g/kg. In anesthetized dogs iv the snake serum 200 mg/kg caused no influence on respiration, blood pressure, ECG, peripheral blood picture, hepatic and renal functions. No pathologic changes were found after 7 d.

By ammonium sulfate fractional precipitation, DEAE-Sephadex A-50 column chromatography, CM-Celluloses C-32

column chromatography and polyacrylamide gel plate electrophoresis, an antitoxin factor was purified from the snake serum. Its isoelectric pt = 4.0 and its mol wt = c 70,000. The activity of this factor against *Agkistrodon acutus* venom was increased by 10 times.

Complement fixation tests and agar immunodiffusion tests proved that the antitoxic action of *Agkistrodon acutus* serum manifested no antigen-antibody reaction.

**KEY WORDS** *Agkistrodon acutus* serum; ophidic toxin; antitoxic action; ED<sub>50</sub> in mice; antitoxin factor; polyacrylamide gel electrophoresis; agar immunodiffusion