

## 广东圆斑蝥蛇毒组分的分离及其对血液凝固的影响

杨晓光 李家增 (中国医学科学院血液学研究所病理生理室, 天津 888031)

管锦霞 赵廷德 (广州医学院药理教研室, 广州 550066)

**提要** 经 DEAE-Sephadex A-50 柱层析梯度洗脱, 将圆斑蝥蛇毒粗分为 8 个组分, 组分 II 有抗凝血活酶作用。又将具有促凝效应的组分 V, VI, VII, VIII 分别再次柱层析, 各得 3 个组分, 其中组分 VI<sub>1</sub>, VI<sub>2</sub>, VIII<sub>1</sub> 有较强的促凝效应, 而组分 V<sub>2</sub>, VIII<sub>2</sub>, VIII<sub>3</sub> 有抗凝血酶作用。

**关键词** 圆斑蝥蛇; 蛇毒; 组分; 促凝作用; 抗凝血活酶; 抗凝血酶

蝥蛇毒粗毒含有几种对血液系统有影响的酶, 各作者采用不同的分离方法所得结果有所不同。用 DEAE 纤维素分离圆斑蝥蛇毒得到 9

个组分, 其中第 7 组分有促凝作用<sup>(1)</sup>。用 Sephadex G-75 分得 5 个组分, 其中第 3 组分有促凝作用, 第 4 组分有抗凝作用<sup>(2)</sup>。用 CM-Sephadex C-50 分离福建产圆斑蝥蛇毒得到 12 个组分, 其中第 8, 9, 11, 12 组分具有抗凝作用, 第 3, 5 组分具有促凝作用<sup>(3)</sup>。

我们通过试管内和动物试验观察到广东圆斑蝥蛇 *Vipera russelli siamensis* (Smith) 粗毒有强效促凝作用<sup>(4)</sup>。为了研究其作用组分和作用机理, 我们用 DEAE-Sephadex A-50 柱层析分离蝥蛇毒各组分并测定其对血液凝固的影响。

## 材料与方 法

**圆斑蝥蛇毒** 取自广东省高鹤县蛇场, 经真空干燥为白色结晶干粉。

**试剂** DEAE-Sephadex A-50 (Pharmacia 厂); Dextran gel G-10(上海长征制药厂); 牛纤维蛋白原(Sigma 厂); 人纤维蛋白原(上海生物制品研究所); 牛凝血酶(血液学研究所); 胰蛋白酶、硫酸鱼精蛋白注射液、肝素(上海生物化学制药厂); 正常人混合血浆: 5 名献血员全血以 3.8% 枸橼酸钠溶液 9:1 抗凝, 分离血浆后混合, 小瓶分装, 储于  $-40^{\circ}\text{C}$  备用。

### 圆斑蝥蛇毒的柱层析分离

1. 柱层析 取粗毒结晶干粉 30 mg 溶于 0.02 M, pH 6 磷酸盐缓冲液 0.5 ml 中, 经 DEAE-Sephadex A-50 柱层析(床体积  $36.5 \times 1$  cm), 用上述缓冲液 110 ml 洗脱, 继用不含 NaCl 和含 1 M NaCl 的上述缓冲液各 100 ml 进行直线梯度洗脱(总容量 310 ml)。

2. 再次柱层析 将具有较强促凝作用的组分 V, VI, VII, VIII 再次分别进行 DEAE-Sephadex A-50 柱层析(床体积  $18 \times 1$  cm), 各组分分别以含 NaCl 0.3-0.5 M, 0.35-0.6 M, 0.4-0.7 M, 0.5-0.8 M 的上述缓冲液进行直线梯度洗脱, 洗脱容量分别为 100, 100, 100, 80 ml。

3. 脱盐 按常规方法进行 Dextran gel G-10 装柱(床体积  $18 \times 1$  cm), 将组分 V<sub>2</sub> 上柱进行脱盐处理, 洗脱液为蒸馏水。

在首次柱层析, 再次柱层析和脱盐过程中, 皆用紫外吸收分析仪检测、自动电位差计记录仪描记曲线, 以微量恒流泵控制流速, 柱下端联接自动部分收集器, 3 ml/管, 12 管/h。

### 体外凝血活性测定

1. 部分凝血活酶时间 (partial thromboplastin time) 简称 PTT、凝血酶时间(thrombin time)简称 TT, 按常规方法<sup>(5)</sup>进行测定。

2. 纤维蛋白原凝固时间 (fibrinogen clotting time) 简称 FT, 系纤维蛋白原溶液与凝血酶混合后测定凝固时间。将被测样品分别与纤

维蛋白原和凝血酶混合保温一定时间, 可初步反映样品对这两种制剂的作用。

以上凝血试验均在表面玻璃皿中进行, 以玻璃棒挑出纤维蛋白丝为终点。

## 结 果

广东圆斑蝥蛇毒经 DEAE-Sephadex A-50 柱层析后的图谱(图 1)为 8 个蛋白峰, 组分 V-VIII 再次柱层析后的图谱(图 2)各为 3 个蛋白峰, 组分 V<sub>2</sub> 脱盐后的图谱(图 3)为 1 个蛋白峰, 1 个盐峰。除盐峰系电导仪检测后画出

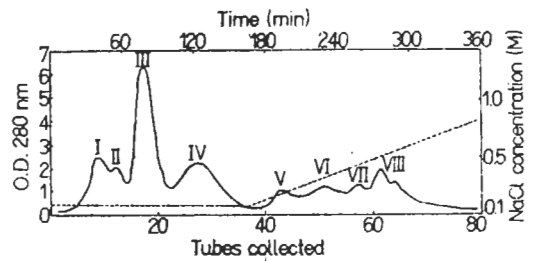


Fig 1. Column chromatogram of venom of *Vipera russelli siamensis* (Smith)

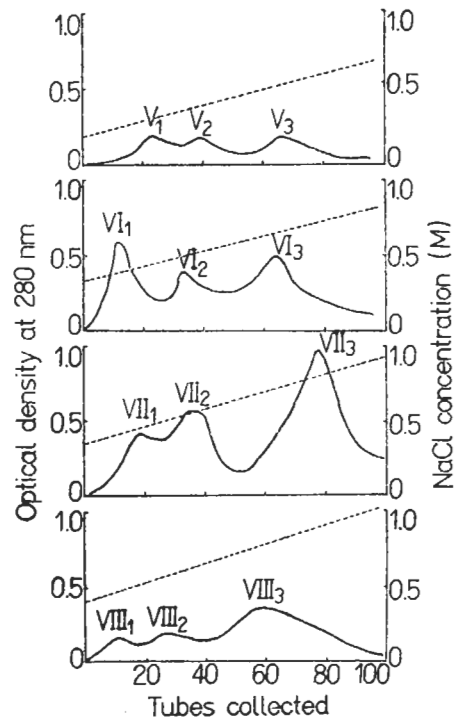


Fig 2. Column rechromatogram of fractions V-VIII from venom of *Vipera russelli siamensis* Smith

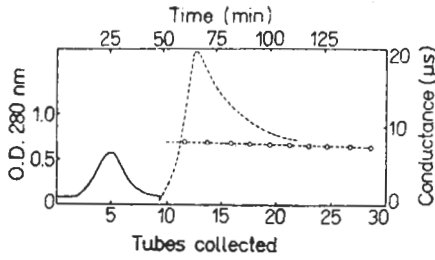


Fig 3. Desalted chromatogram of fraction  $V_2$

的曲线外, 蛋白峰均为记录仪描记曲线, 再以国产 751-G 分光光度计在波长 280 nm 下检测蛋白含量, 画出座标。

由表 1 可见各组分对凝血的作用。组分 II 有抗凝血活酶作用, 组分  $VI_1, VI_2, VI_3, VII_1, VIII_1$  有明显促凝活性, 而以  $VI_1, VI_2, VIII_1$  促凝作用最强, 组分  $V_2, VIII_2, VIII_3$  有抗凝血酶活性, 各组分均无类凝血酶作用。

组分  $VIII_2$  的纤维蛋白原凝固时间, 未稀释时为 3 min 不凝, 稀释 5 倍、25 倍时分别为 78 s, 31 s, 稀释至 125 倍时为 16.5 s, 与对照组基本相同, 再增加稀释倍数达 625, 1250,

Tab 1. Effects of fractions on blood coagulation

	Partial thrombo- plastin time (s)	Thrombin time (s)	Fibrinogen clotting time
Control	88.5	17	15 s
I	92.5	29	>0.5 h
II	136	28	"
III	78	33	"
IV	85	50	"
V	23.4	27.5	"
VI	14.3	33	"
VII	26	"	"
VIII	23	44	"
$V_1$	25	130	"
$V_2$	69	>180	"
$V_3$	51	32	"
$VI_1$	15	32	"
$VI_2$	16	64	"
$VI_3$	20	25	"
$VII_1$	19	26	"
$VII_2$	33	26	"
$VII_3$	42	35	"
$VIII_1$	16	22	"
$VIII_2$	41	>180	"
$VIII_3$	69	>180	"

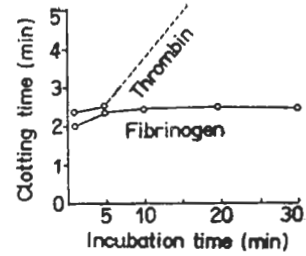


Fig 4. Antithrombin activity of fraction  $V_2$  after incubation with thrombin or fibrinogen

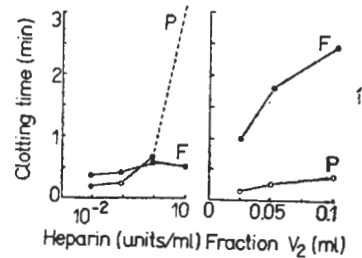


Fig 5. Antithrombin activity of heparin and fraction  $V_2$  tested by human plasma (P) and fibrinogen (F) solutions

2500 时, 纤维蛋白原凝固时间不变, 说明组分  $VIII_2$  稀释至原液浓度的 1/125 时, 其抗凝血酶作用即不明显。组分  $V_2$  与凝血酶温育随着时间延长, 抗凝效力有所加强, 而纤维蛋白原组无此情况(图 4), 组分  $V_2$  的抗凝血酶作用与肝素者不同(图 5)。

## 讨 论

圆斑蝥蛇毒组分对血液凝固的影响十分复杂。许多作者曾报道过组分 II 那样抗凝血活酶作用的组分, 组分  $VI_1, VI_2, VIII_1$  能明显缩短 PTT, 却不能缩短反而延长 TT, 说明这些组分的促凝作用可能是通过激活因子 X 以上的凝血阶段而促凝, 有可能是 RVV-X 的作用(即圆斑蝥蛇毒促因子 X 活化酶), 组分  $V_2, VIII_2, VIII_3$  能使 TT 大大延长(大于 3 min 不凝), 而不延长 PTT, 说明它们干扰血酶转变纤维蛋白原为纤维蛋白的过程, 组分 VIII 在再次柱层析前对血凝的效应是促凝, 而再次柱层析后除得到 1 个促凝组分外, 还得到 2 个作用很强的

抗凝血酶组分, 尽管在柱层析和再次柱层析过程中样品已被稀释, 但组分 VIII<sub>2</sub> 被稀释 125 倍后其抗凝血酶效力才不明显。将组分 V<sub>2</sub> 与凝血酶和纤维蛋白原分别混合并以不同时间温育, 1 min 时其抗凝作用即出现, 但凝血酶组随着温育时间延长, 抗凝效力有所增强, 纤维蛋白原组则无此种情况, 说明组分 V<sub>2</sub> 的抗凝效力主要作用于凝血酶。组分 V<sub>2</sub> 的抗凝作用与肝素者不同, 后者作用的发挥依赖血浆中的辅因子(抗凝血酶 III), 因而其在纯纤维蛋白原溶液中抗凝血酶作用不明显。而组分 V<sub>2</sub> 在纯纤维蛋白原溶液中作用更强, 说明其抗凝血酶作用不需血浆中的辅因子。迄今文献上未报

道过圆斑蝥蛇毒中存在抗凝血酶组分, 我们的实验结果主要从生物学测定说明其具有这种作用。

**致谢** 本文工作曾得到血研所刘泽扬同志的大力支持。

### 参 考 文 献

- 1 Williams WJ, Esnouf MP. *Biochem J* 1962; 84: 52
- 2 Dimitrov G, Kankonkar RC. *Toxicon* 1968; 5: 213
- 3 刘广芬、邱淑玉、李 斌、涂光涛. 生物化学与生物物理学报 1980; 12: 153
- 4 管锦霞、赵延德、杨晓光、李家增. 中华血液学杂志 1984; 5: 157
- 5 徐福燕. 出血性疾病. 第 1 版. 上海: 上海科技出版社, 1979: 312

*Acta Pharmacologica Sinica* 1984 Sep; 5 (3) : 192-195

## FRACTIONATION OF VENOM FROM *VIPERA RUSSELLI SIAMENSIS* AND THEIR EFFECTS ON BLOOD COAGULATION

YANG Xiao-guang, LI Jia-zeng

(Dept Pathophysiology, Inst Hematology, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 888031)

GUAN Jin-xia, ZHAO Yan-de (Dept Pharmacology, Guangzhou Medical College, Guangzhou 550066)

**ABSTRACT** By gradient elution from DEAE-Sephadex A-50 column the venom of *Vipera russelli siamensis* (Smith) was separated into 8 fractions. Fraction II showed an antithromboplastin effect. Rechromatography of fractions V, VI, VIII and VII, all having procoagulant action, obtained 3 fractions from each. Fractions

VI<sub>1</sub>, VI<sub>2</sub> and VIII<sub>1</sub> had stronger effects of procoagulant action than others; whereas fractions V<sub>2</sub>, VIII<sub>2</sub> and VIII<sub>3</sub> had antithrombin effects.

**KEY WORDS** viper venoms; fractionation; coagulants; thromboplastin; antithrombins