

东亚钳蝎粗毒蛋白质热稳定性的研究

倪伊婷¹ 马伟康¹ 齐先福¹ 张连祺¹ 王君德² 辛毅^{1△}

(1 大连医科大学生物技术系 辽宁 大连 116044; 2 大连医科大学国有资产管理处 辽宁 大连 116044)

摘要 目的 通过蝎毒热溶解性和毒性实验,探索蝎毒蛋白稳定性与分子量间的关系。方法 对蝎毒粗毒煮沸后的可溶成分进行急性毒力实验和 SDS-PAGE 电泳分析。结果 蝎毒粗毒加热处理组的 LD₅₀ 为 16.228mg/kg, 粗毒对照组的 LD₅₀ 为 3.66mg/kg, 显示蝎毒经加热后毒力明显降低,但仍具有一定的毒性。SDS-PAGE 结果显示,经加热处理的粗蝎毒之沉淀主要为大分子蛋白质,在可溶成分中含有小分子肽类。结论 蝎毒的大分子蛋白质热稳定性差,而小分子多肽部分耐热性强,而且蝎毒的小分子多肽组分具有相对稳定的毒性。

关键词 蝎毒 热稳定性 聚丙烯酰胺凝胶电泳 半数致死量(LD₅₀)

中图分类号 Q95-3, R285 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2012) 10-1846-03

Thermal Stability Of Scorpion Venom Proteins From Bathus Martiensii (BMSV)

NI Yi-ting¹, MA Wei-kang¹, QI Xian-fu¹, ZHANG Lian-qi¹, WANG Jun-de², XIN Yi^{1△}

(1 Biotechnology Department; 2 Stated-owned Assets Management Bureau, Dalian Medical University, Dalian, 116044)

ABSTRACT Objective: To investigate the relationship between the thermal stability and protein molecular weight of scorpion venom from *Bathus martiensii* (BMSV) by detecting the solubility and toxicity after boiling. **Methods:** Boiled and non-boiled BMSV were centrifuged, and the supernatants were detected by SDS-PAGE analysis and toxicity detection. **Results:** Supernatant from boiled BMSV showed higher LD₅₀ than that from non-boiled BMSV, and most proteins with high molecular weight were precipitated and exhibited low toxicity. Supernatant from boiled samples maintained certain toxicity. **Conclusion:** The proteins with high molecular weight from BMSV had low thermal stability while the small peptides from BMSV had high thermal stability.

Key words: BMSV; Thermal stability; SDS-PAGE; Median lethal dose(LD₅₀)

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R285 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)10-1846-03

前言

全蝎是一味传统中药,其主要有效成分是蝎毒^[1],对人肿瘤细胞具有显著的细胞毒作用^[2]。蝎毒的主要成分蛋白质含有多种生物活性,但因其毒副作用而使其应用受到很大限制。为降低蝎毒的毒性并保留其功效,除对蝎毒有效成分进行纯化外,加热法也被用于降低其毒性,以往对蝎毒的热稳定性的实验结果存在分歧。研究显示蝎毒蛋白的某些活性组分具有耐热特点^[3];且其耐热蛋白对人肿瘤细胞具有细胞毒作用^[4,5],也与抗癫痫有关^[6]。但另一些实验则表明,蝎毒蛋白一般不具有耐热性^[7]。为探讨蝎毒蛋白在煮沸条件下的溶解性变化,以及对小鼠毒性的影响,本实验通过测定煮沸的蝎毒的溶解性和毒性变化,分析蝎毒中不同分子量蛋白质的耐热性,为深入研究蝎毒的稳定性以及推测蝎毒有效部位提供必要的实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验药材 东亚钳蝎毒冷冻干粉,大连医科大学生理学

作者简介: 倪伊婷 (1988),女,大连医科大学 2007 级生物技术专业学生, E-mail: shirleyniyiting@hotmail.com

△通讯作者: 辛毅,教授, E-mail: jimxin@hotmail.com

(收稿日期 2011-09-06 接受日期 2011-09-29)

教研室惠赠,体重 25~35g 雄性昆明小鼠,由大连医科大学动物实验中心 (SPF) 提供。

1.1.2 仪器及试剂 GL20A 全自动高速冷冻离心机 (湖南仪器仪表厂离心机厂) , MV-III 型小型单垂直式电泳槽 (大连竞迈生物科技有限公司) 型号酶标仪 (美国 Thermal 公司) pH 计 (意大利 HANNA 公司) 。丙烯酰胺, 甲叉双丙烯酰胺, 过硫酸铵, 四甲基乙二胺, 2- 巯基乙醇, Tris base, 十二烷基硫酸钠等 (美国 Sigma 公司) 。

1.2 方法

1.2.1 蝎毒毒力测定 自体重为 25~35g 的 100 只雄性昆明小鼠中, 随机取 54 只用于蝎毒剂量的确定, 余之用于毒力实验。取雄性小鼠 54 只, 随机分 18 组 (每组 3 只) , 腹腔注射给药, 蝎毒剂量从 0 mg/ml-10 mg/ml, 获得 Dm (小鼠全部死亡的最低剂量) 和 Dn (小鼠全部未死亡的最高剂量) 。依据上述结果, 配制不同浓度的蝎毒溶液 (0.18mg/ml, 0.36mg/ml, 0.72mg/ml, 0.90mg/ml, 1.80mg/ml, 2.70mg/ml, 3.60 mg/ml, 5.40 mg/ml) , 每组两份, 每份 3ml。取每个剂量组中的一份煮沸 1 h, 12,000 rpm, 离心 10min, 分别保留沉淀和上清液。取雄性小鼠 45 只, 随机均分 9 组, 分别取蝎毒粗毒及蝎毒粗毒煮沸 1 h 后的离心上清液, 经腹腔注射测定急性毒性。其中蝎毒粗毒的腹腔注射剂量分为 4 个剂量组, 从 1.2mg/kg 剂量开始, 剂量组组距为 1.2mg/kg。加热煮沸处理分为 5 个剂量组, 从 6mg/kg 剂量开

始,剂量组组距为 6 mg/kg。给药后观察小鼠中毒表现,记录小鼠死亡数,计算每组死亡率。观察时间为 24 h。使用 SPSS statistics V18.0 软件对实验数据进行 Bliss 法处理分析,计算 LD_{50} ^[8]。取蝎毒冻干粉 100 mg,常温下溶于 1ml 三蒸水中,在 4℃ 下 12,000g 离心 15min (除去蝎毒中粘稠的不溶成分),取上清液。将上清液加入预先用三蒸水平衡好的 Sephadex G-50 层析柱 (直径 0.8cm,长 4cm),洗脱剂为三蒸水。得到 4ml 洗脱液。为进一步除去蝎毒中的杂质,将经过凝胶过滤预处理的蝎毒加入透析袋中 (MCO 7000 Da, 10 cm × 2 cm),在 2L 无菌去离子水中,4℃ 搅拌过夜。经透析的蝎毒用低温离心浓缩仪浓缩至 0.5ml,-20℃ 储存备用。分别取 40μl 预处理的蝎毒样品,煮沸 1 h,2 h,3 h,12,000 g 离心,10 min,取沉淀和上清液,用考马斯亮蓝法检测蛋白质浓度,以 BSA 制备标准曲线^[9]。将未煮

沸的蝎毒样品、煮沸处理样品的上清液、煮沸处理样品的沉淀悬浮液分别加入 5× 上样缓冲液,煮沸、离心,取上清液,调节蛋白质浓度,使 3 种样品的上样量相同,分别加入到 12% 的 SDS-PAGE 凝胶中进行电泳。考马斯亮蓝染色、脱色、照相^[10]。

2 结果

2.1 蝎毒粗毒和煮沸 1 h 蝎毒的 LD_{50} 测定

小鼠经腹腔注射蝎毒及加热煮沸 1h 的蝎毒上清液后,早期出现跳跃,竖尾,口鼻及眼分泌物增多,随后出现后肢强直性麻痹,呼吸加速,昏迷而死亡。且两组均表现出随剂量的增加死亡率增高的趋势,蝎毒粗毒的 LD_{50} 为 3.66 mg/kg,粗蝎毒加热煮沸 1 h 后的 LD_{50} 为 16.228 mg/kg,提示加热对蝎毒的减毒有良好作用。各剂量组数据见表 1,表 2。

表 1 粗蝎毒腹腔注射结果

Table 1 The results of non-boiled BMSV(IP)

组别 (Group)	剂量(Dose)	动物数(The number of animal)	死亡数(Death doll)	死亡率(Mortality)
	(mg/kg)	(只) (Number)	(阳性反应数) (The number of positive reaction)	(阳性反应率) (The rate of positive reaction)
1	1.20	5	0	0%
2	2.40	5	1	20%
3	4.80	5	3	60%
4	6.00	5	5	100%

注 粗蝎毒腹腔 LD_{50} 为 3.66 mg/kg 95%的可信区间为 (1.764~5.565)。

表 2 煮沸 1 小时蝎毒上清液腹腔注射结果

Table 2 The results of BMSV supernatant boiled one hour(IP)

组别 (Group)	剂量(Dose)	动物数(The number of animal)	死亡数(Death doll)	死亡率(Mortality)
	(mg/kg)	(只) (Number)	(阳性反应数) (The number of positive reaction)	(阳性反应率) (The rate of positive reaction)
1	6.00	5	0	0%
2	12.00	5	2	40%
3	18.00	5	3	60%
4	24.00	5	3	60%
5	36.00	5	5	100%

注 粗蝎毒加热煮沸 1 h 后腹腔注射的 LD_{50} 为 16.228 mg/kg,95%的可信区间为 (8.577~25.045)。

2.2 蝎毒溶解性测定

经凝胶过滤及透析预处理的蝎毒蛋白质浓度为 6.81 mg/ml。经煮沸 2 h 处理及离心后,上清液和沉淀中的蛋白质浓度分别是 0.84 mg/ml 和 5.97 mg/ml,即分别占总蝎毒的 12.5 % 和 87.5 %。显示多数蛋白质在煮沸后转变为不溶的成分。聚丙烯酰胺凝胶电泳结果 (图 1) 显示,加热后蝎毒的大分子蛋白质的含量大幅度减少,而小分子多肽部分 (电泳底部指纹状染色区) 存留在加热上清中。在加热后的沉淀中主要含有大分子量的蛋白质。

3 讨论

蝎毒主要由非蛋白质部分和蛋白质部分组成,而其疗效和

毒性主要决定于蛋白质部分^[11],其中蝎毒毒素中的多肽部分在毒理、离子通道研究工具等领域已得到广泛研究^[12]。小剂量的蝎毒在抑制肿瘤、镇痛、抗癫痫及增强机体免疫力等方面有明显作用,但是大剂量的蝎毒会产生强烈的毒副作用^[13]。1983 年中国科学院吉永华首次从蝎毒中分离出神经毒素 I 和 II^[14,15]。但蛋白质部分却因其不稳定性,而并未得到深入的分析研究。对于蝎毒蛋白质的热稳定性研究,有助于了解蝎毒的基本物理学特性和构效关系,也为确定蝎毒的保存条件提供实验证据。将蝎毒的热稳定性和毒性的研究相结合,对于推测蝎毒成分中的活性部位具有重要的参考价值和提示作用。

本实验中蝎毒粗毒经加热煮沸 1 h 后,上清液毒性变小,其 LD_{50} 由粗毒的 3.66mg/kg 增加到 16.228mg/kg。结合

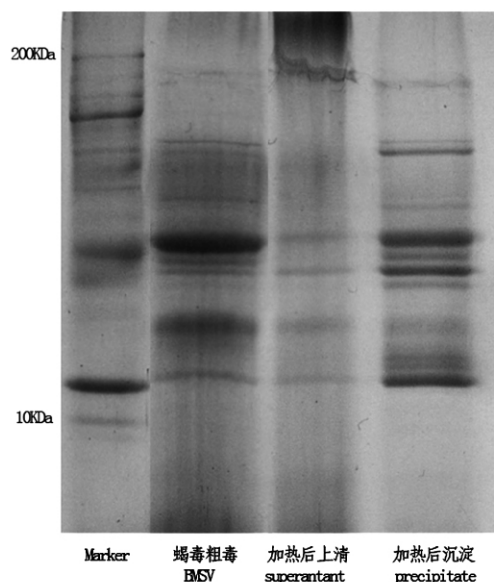


图1 蝎毒及离心后不同组分的 SDS-PAGE 电泳

Figure 1 SDS-PAGE electrophoresis of BMSV and different centrifuged components

SDS-PAGE 电泳结果,提示蝎毒的毒性主要来自于小分子的多肽成分。根据本实验结果可以推测,如果蝎毒在煮沸后绝大多数蛋白质变为沉淀,其毒性及其它生物学活性有可能主要来自于小分子的多肽。换言之,如果蝎毒的某些生物活性在煮沸后仍然保持,这些活性有可能来自于多肽,而不是大分子的蛋白质。

由于蝎毒的组成复杂,生物活性多样,本实验结果提示,在没有得到蝎毒单一成分并确定其热稳定性之前,仍然需要在较低的温度下进行分离纯化以及功能学研究。

本实验结果还表明,经煮沸的蝎毒仍然具有某些生物学功能,但需要采用较低的浓度以降低毒副作用^[12]。因此,不同的小分子的多肽是否各自具有药性和毒性,还是同一种多肽同时具有药性和毒性的系列问题有必要进行深入地研究。

参考文献(References)

- [1] 江苏新医学院.中药大词典[M].上海:上海科学技术出版社,1985:934
Jiangsu new medical college. Chinese medicine dictionary [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1985: 933-934
- [2] 赵灿国,董伟华,孔天翰.蝎毒及其分离组分对4种肿瘤细胞生长的抑制作用[J].广州医学院学报,2006,34(10):26-29
Zhao Can-guo, Dong Hua-wen, Kong Tian-xiang. Inhibitory Effects of Scorpion Venom and Its Components on Four Kinds of Tumor Cell Lines [J]. Academic journal of Guangzhou medical college, 2006,34(10):26-29
- [3] 朱心强,郑一凡,黄幸舒.新鲜蝎毒汁的急性毒性及其热稳定研究[J].卫生毒理学杂志,1996,10(4):282
Zhu Xin-qiang, Zheng Yi-fan, Huang Xin-shu. Acute toxicity and thermal stability of fresh scorpion poison [J]. Journal of Health Toxicology, 1996, 10(4):282
- [4] 封梅.蝎毒耐热蛋白对体外培养乳腺癌细胞凋亡及其机制研究[D].中国优秀硕士论文,2010,4

- [5] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global Cancer statistics, 2002[J]. CAS Canner J Clin, 2005, 55(2): 74-108
- [6] 封艳辉,赵杰,于德钦,等.蝎毒耐热蛋白对大鼠海马内前脑啡肽表达的影响[J].中国药理学通报,2009,25(4):556-557
Feng Yan-hui, Zhao Jie, Yu De-qin, et al. Effect of scorpion venom heat resistant protein on expression of proenkephalin in the rats hippocampus [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2009, 25(4): 556-557
- [7] 孔天翰,韩雪飞,陈华艳,等.注射用蝎毒抗癌多肽热稳定性研究[J].河南医科大学学报,1999,34(1):49-51
Kong Tian-han, Han Xue-fei, Chen Hua-yan, et al. Thermal stability of injectable antineoplastic polypeptide from Buthus martensii venom (APBMV)[J]. Journal of Henan medical university,1999,34(1):49-51
- [8] 周一平.用SPSS软件计算新药的LD50[J].药学进展,2003,27(5):314-316
Zhou Yi-ping. The calculation of LD50 in New Drugs with Software SPSS[J]. progress in pharmaceutical science, 2003, 27(5): 314-316
- [9] 陈晓梅,刘雅文,孙静,等.考马斯亮蓝法蛋白定量标准曲线稳定性观察[J].中国公共卫生,2006,22(3):380-381
Chen Xiao-mei, Liu Ya-wei, Sun Jing, et al. The stability observation of protein standard curve by Bradford method [J].Chinese Journal of Public Health, 2006, 22(3): 380-381
- [10] 郭晓君.蛋白质电泳实验技术[M].北京:科学出版社,2005:123-157
Guo Xiao-jun. The experiment technology of protein electrophoresis (The second edition)[M]. Beijing: Science Press, 2005: 123-157
- [11] 王燕平,吕欣然.东亚钳蝎蝎毒分离纯化及药理作用的研究进展[J].中草药,2000,31(1):59-61
Wang Yan-ping, Lv Xin-ran. The Research of purification and Pharmacological effects on Buthus Martensi Toxins [J].Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2000, 31(1): 59-61
- [12] 曹征宇.东亚钳蝎蝎毒多肽的分离纯化,结构鉴定,活性测定以及基因表达研究[D].北京:中国医学科学院,中国协和医科大学药物研究所,2004,5
Cao Zheng-yu. Purification, Identification, activity assay and Gene Expression of Buthus scorpion peptides [D]. Beijing: Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, 2004, 5
- [13] 刘世吟,朱明生,董震.彼得异蝎蝎毒的毒力测定[J].大理学院学报,2008,7(4):7-8,14
Liu Shi-ning, Zhu Ming-sheng, Dong Zhen. Toxicity Determination of Heterometreus Peterii Venom[J]. Journal of Dali University, 2008, 7(4):7-8,14
- [14] 吉永华,徐科.马氏钳蝎的哺乳动物神经毒素的分离与纯化[J].生物化学与生物物理学报,1983,15(6):20-25
Ji Yong-hua, Xu Ke. Isolation and purification of mammalian neurotoxins from venom of the scorpion buthus martensi kirsch [J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 1983, 15(6): 20-25
- [15] 李万忠,何群,严守升.蝎毒的采集,提取,分离,鉴定研究[J].中成药,2004,26(7):574-575
Li Wan-zhong, Liu Qun, Yan Shou-sheng. Collection, Extraction, Isolation and Identification of Scorpion Poison[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2004, 26(7): 574-575