

原矛头蝮蛇毒的抗凝作用

李亚男^{1,2}, 孙黔云²

(1. 贵州大学生命科学学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵州 贵阳 550002)

摘要: 目的 研究原矛头蝮蛇毒(PMV)对血液系统的作用。方法 将 PMV 0.2 mg·kg⁻¹ 一次性尾静脉注射给予 SD 大鼠。注射后 0.5, 1, 3, 6 和 24 h 分别取下腔静脉血, 制备抗凝全血、抗凝血浆和富血小板血浆(PRP)。利用血细胞计数板对抗凝全血和 PRP 进行血小板计数; 将抗凝血浆用生理盐水稀释 5 倍, 在 412 nm 测定血红蛋白含量; 采用凝血酶时间(TT)、凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)和纤维蛋白原(FIB)含量测定试剂盒分别测定抗凝血浆的 TT, APTT, PT 和 FIB 含量; 用发色底物法测定抗凝血浆酶切发色底物 S-2251 的活性。给昆明小鼠一次性尾静脉注射 PMV 0.28 mg·kg⁻¹, 在 0.5, 1, 3, 6 和 24 h 测定尾部出血时间。结果 给予 PMV 0.2 mg·kg⁻¹ 30 min 大鼠抗凝全血血小板计数减少至正常对照组的 1/3 ($P < 0.01$), PRP 中血小板计数减少至正常对照组的 1/20 ($P < 0.01$), 抗凝血浆血红蛋白含量增加约 6 倍 ($P < 0.01$); 给予 PMV 6 h APTT 明显延长 ($P < 0.05$), 3 和 6 h TT 明显延长 ($P < 0.01$), 1 和 3 h PT 明显缩短 ($P < 0.01$); FIB 含量和抗凝血浆酶切发色底物 S-2251 的活性无明显变化。给予小鼠 PMV 0.28 mg·kg⁻¹ 30 min 小鼠尾部出血时间达(2341 ± 742)s, 较正常对照组小鼠(81 ± 11)s 明显延长 ($P < 0.01$), 1 h 逐渐缩短 ($P < 0.01$), 24 h 仍未恢复至正常水平 ($P < 0.05$)。结论 PMV 具有明显的抗凝作用。

关键词: 原矛头蝮蛇毒; 血小板; 凝血功能

中图分类号: R973.2 文献标志码: A 文章编号: 1000-3002(2013)04-0646-04

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2013.04.007

原矛头蝮蛇, 又称烙铁头蛇, 属于蝰蛇科原矛头蝮属, 主要分布于我国长江以南和台湾地区, 是常见的剧毒蛇, 其蛇伤较为常见。蛇伤的临床表现主要为皮下出血、血尿、全身内脏出血甚至失血性休克^[1-2]。迄今, 对原矛头蝮蛇毒 (*Protobothrops mucrosquamatus* venom, PMV) 的研究主要集中于诱导血小板聚集的蛋白^[4-5]和纤溶蛋白^[3,6-7], 关于 PMV 对血液系统的作用尚缺少较全面的研究。本研究观察 PMV 冻干粉对血液系统的作用, 为临床蛇伤防治和相关新药研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 动物、药物、试剂和仪器

SPF 级 SD 大鼠, 雄性, 体质量 250 ~ 270 g;

基金项目: 国家自然科学基金项目(81260494); 贵州省社会发展攻关项目[黔科合 SY(2010)3050 号]

作者简介: 李亚男(1985 -), 女, 硕士研究生, 主要从事天然药物成分和药理活性研究; 孙黔云(1968 -), 男, 博士, 研究员, 硕士生导师, 主要从事心血管药理与新药研究。

通讯作者: 孙黔云, E-mail: sunqy@hotmail.com

昆明种小鼠, 雌雄各半, 体质量 25 ~ 33 g, 均购自重庆腾鑫生物有限公司, 合格证号: SCXK(渝)2007-2005。实验动物饲养于室温 20 ~ 25℃, 湿度 60% ~ 70% 环境中, 实验前均自由进食饮水。动物福利和实验均符合相关实验动物管理条例和实验动物伦理要求。PMV 冻干粉购自湖南省沅陵县徐氏蛇场。凝血酶时间(thrombin time, TT)、凝血酶原时间(prothrombin time, PT)、活化部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT)和纤维蛋白原(fibrinogen, FIB)含量测定试剂盒均购自上海太阳生物技术有限公司; 发色底物 S-2251 为意大利 Chromogenix 公司产品。Gene Quant 紫外分光光度计(瑞典 Amersham Pharmacia Biotech 公司); Spectra MAX-190 连续波长酶标仪(美国 MD 公司); 5810R 冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司)。

1.2 动物处理和标本制备

将 36 只 SD 大鼠随机分为正常对照组、PMV 处理 0.5, 1, 3, 6 和 24 h 组, 每组 6 只。PMV 冻干粉溶于 PBS, 将 PMV 0.2 mg·kg⁻¹ 一次性尾静脉注射给予 PMV 处理组大鼠, 正常对照组注射同体积 PBS。PMV 处理组大鼠分别在注射后 0.5, 1, 3, 6 和 24 h 再 ip

给予 1% 戊巴比妥钠麻醉条件下,经下腔静脉取血,抗凝全血 $130 \times g$ 离心 10 min,取上清得到富血小板血浆 (platelet rich plasma, PRP); 并取部分抗凝全血 $960 \times g$ 离心 15 min 取上清制备抗凝血浆。

1.3 血小板计数和血红蛋白含量测定

分别取抗凝全血和 PRP $20 \mu\text{l}$ 加入 0.78 ml 血小板稀释液,轻微振荡并混匀 1 min。取血小板悬液充入血细胞计数板计数池中,静置 15 min,在显微镜下进行血小板计数。将抗凝血浆用生理盐水稀释 5 倍,取 $200 \mu\text{l}$ 加入 96 孔板,测定 412 nm 吸光度 ($A_{412 \text{ nm}}$) 值,表示血红蛋白相对含量。

1.4 抗凝血浆酶切发色底物 S-2251 活性测定^[8]

取 $50 \mu\text{l}$ 抗凝血浆和 $50 \mu\text{l}$ S-2251 底物 $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 加入 96 孔板,在水平摇床轻轻摇动 10 s 后避光 37°C 孵育,每 10 min 测定 $A_{405 \text{ nm}}$,连续 5 h,取最大 $A_{405 \text{ nm}}$ 。

1.5 血浆 TT,PT,APTT 和 FIB 含量测定

按照试剂盒说明书方法测定。TT 测定:取 37°C 预温 3 min 的抗凝血浆 $200 \mu\text{l}$,加入 $200 \mu\text{l}$ TT 试剂,测定凝固时间。APTT 测定:取抗凝血浆 $100 \mu\text{l}$,加入 37°C 预温的 APTT 试剂 $100 \mu\text{l}$, 37°C 孵育 5 min,再加入 37°C 预温的 CaCl_2 $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶液 $100 \mu\text{l}$,测定凝固时间。PT 测定:取抗凝血浆 $100 \mu\text{l}$, 37°C 孵育 3 min,加入 37°C 预温的 PT 试剂 $200 \mu\text{l}$,测定凝固时间。FIB 测定:将抗凝血浆用缓冲液作 1:10 稀释,取 $200 \mu\text{l}$, 37°C 预温 3 min,加入凝血酶溶液 $100 \mu\text{l}$,测定凝固时间,同时用标准品测定标准曲线,根据标准曲线计算 FIB 含量。

1.6 出血时间测定

参照文献^[9]方法加以改动。昆明种小鼠随机分成 6 组,每组 6 只,雌雄各半。PMV 处理组一次性尾静脉注射给予 PMV $0.28 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,正常对照组注射等体积 PBS,分别在注射 0.5, 1, 3, 6 和 24 h 后,距尾部末端 1.0 cm 处切深度 $1 \sim 2 \text{ mm}$ 的伤口,将尾部放在预温 37°C 的生理盐水中,记录出血时间。

1.7 实验结果数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 16.0 进行单因素方差分析。 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 PMV 对大鼠血小板计数的影响

图 1 结果表明,与对照组相比,大鼠尾静脉一次性注射给予 PMV 后 0.5, 1, 3, 6 和 24 h,全血和 PRP 中血小板计数明显减少 ($P < 0.01$),PRP 中血小板计数比全血中减少更明显。

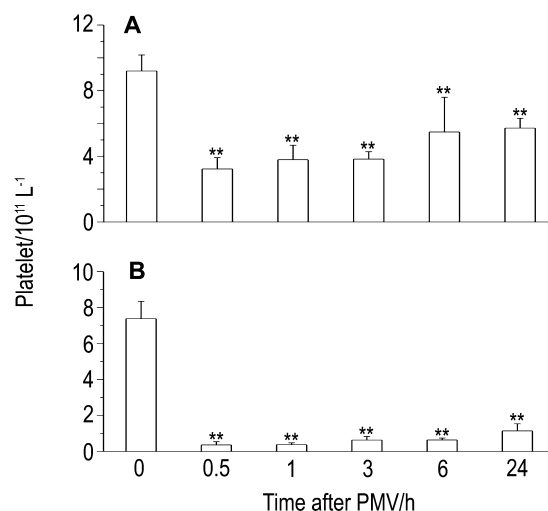


Fig. 1 Effect of *Protobothrops mucrosquamatus* venom (PMV) on platelet count in whole blood (A) and platelet rich plasma (B) of rats. A single dose of PMV $0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ was injected to rats by tail vein. After 0.5, 1, 3, 6 and 24 h, the platelets were counted with haemocytometer. $\bar{x} \pm s$, $n = 6$. ** $P < 0.01$, compared with normal control (0 h) group.

2.2 PMV 对大鼠血红蛋白含量的影响

图 2 结果表明,PMV 体内给药 30 min 大鼠血浆中血红蛋白含量升高最为明显 ($P < 0.01$),随后下降,6 h 时降至正常水平。

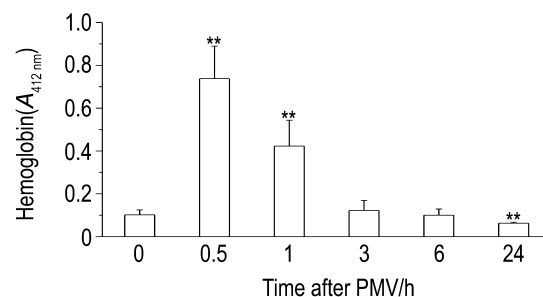


Fig. 2 Effect of PMV on content of hemoglobin in rat plasma. See Fig. 1 for the rat treatment. $\bar{x} \pm s$, $n = 6$. ** $P < 0.01$, compared with normal control (0 h) group.

2.3 PMV 对大鼠血浆酶切发色底物 S-2251 活性的影响

图 3 结果表明,各组血浆酶切发色底物 S-2251 的活性无显著变化。

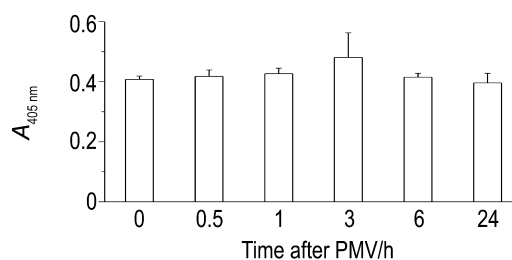


Fig. 3 Effect of PMV on hydrolyzing substrates S-2251 in rat plasma. See Fig. 1 for the rat treatment. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$.

2.4 PMV 对大鼠凝血功能的影响

表 1 结果表明,与正常对照组相比,大鼠一次性尾静脉注射给予 PMV 0.5, 1 和 3 h 时 PT 明显缩短 ($P < 0.01$); 3 和 6 h 时 TT 明显延长 ($P < 0.01$); 6 和 24 h 时 APTT 明显延长 ($P < 0.05$); FIB 无明显变化。

Tab. 1 Effect of PMV on thrombin time (TT), prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT) and fibrinogen (FIB) content of rats

Time/h	TT/s	PT/s	APTT/s	FIB/g·L ⁻¹
0	32.3 ± 2.1	17.0 ± 1.8	33 ± 9	1.10 ± 0.21
0.5	32.8 ± 0.7	14.8 ± 1.3*	32 ± 6	1.11 ± 0.25
1	33.8 ± 2.9	14.2 ± 0.8**	31 ± 9	1.11 ± 0.37
3	37.0 ± 1.2**	13.7 ± 1.6**	38 ± 4	1.10 ± 0.23
6	42.0 ± 3.6**	16.2 ± 2.2	50 ± 10*	1.05 ± 0.33
24	34.3 ± 1.6	16.8 ± 1.5	45 ± 6*	1.10 ± 0.10

See Fig. 1 for the rat treatment. $\bar{x} \pm s$, $n = 6$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with control (0 h) group.

2.5 PMV 对小鼠尾部出血时间的影响

图 4 结果表明,与正常对照组相比,小鼠一次性尾静脉注射给予 PMV 30 min 尾部出血时间明显延长 (> 2300 s) ($P < 0.01$), 1 h 后逐渐缩短, 24 h 仍未恢复至正常水平 ($P < 0.05$)。

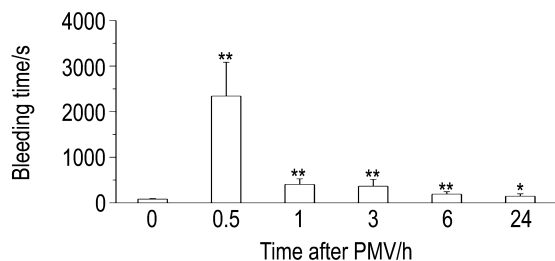


Fig. 4 Effect of PMV on bleeding time of mice. PMV 0.28 mg·kg⁻¹ was administrated to mice by tail vein. After 0.5, 1, 3, 6 and 24 h, bleeding time was measured. $\bar{x} \pm s$, $n = 6$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with normal control (0 h) group.

3 讨论

据报道, PMV 中 C 型凝集素^[4-5]、L-氨基酸氧化酶^[10]和磷脂酶 A₂^[11]等多种蛋白质组分可激活血小板并诱导其聚集。激活的血小板随后被机体清除, 导致血小板计数明显下降。值得注意的是, 全血和 PRP 中血小板计数存在明显差异, 其原因可能是制备 PRP 过程中活化聚集的血小板在离心时被除去所致。TT 是 FIB 转化为纤维蛋白的时间, APTT 反映了内源性凝血系统状况。本研究结果表明, 一次性给予 PMV 可引起 TT 和 APTT 延长, 提示 PMV 影响内源性凝血途径, PMV 具有抗凝作用。

PT 是反映外源性凝血系统状况的重要指标, 给予 PMV 0.5, 1 和 3 h PT 缩短, 推测 PMV 可能会激活 X 因子成为 Xa, 从而表现为 PT 缩短, 随着 Xa 因子的消耗, PT 又逐渐恢复正常水平。文献报道, PMV 中含有不同的纤溶酶^[3,6-7], 在体外具有明显的纤溶活性。本研究结果表明, 大鼠抗凝血浆中 FIB 含量基本无变化, 且抗凝血浆酶切底物 S-2251 的活性也无显著变化。发色底物 S-2251 是一种人工合成的小肽, 可以检测样品中纤溶活性或纤溶酶原激活剂。综合以上两方面的实验结果提示, 在本研究的给药剂量下, PMV 在体内无明显的纤溶活性。小鼠尾部出血时间主要反映了血小板的聚集功能。给予 PMV 后引起小鼠尾部出血时间极显著延长, 推测出血时间极显著延长可能是血小板减少和凝血功能丧失综合作用的结果。

本研究发现, 大鼠注射 PMV 后约 15 min 出现血尿现象, 3 h 后血尿逐渐消失; 注射 PMV 0.5 h 时血红蛋白水平显著上升, 3 h 后逐渐恢复正常。据报道, 原矛头蝮蛇伤会出现血尿等临床表现^[1], 本研究结果与其一致。推测注射 PMV 后引起的溶血作用很可能是由 PMV 中 L-氨基酸氧化酶和磷脂酶 A₂ 等毒性成分破坏红细胞膜所造成的。上述结果提示, PMV 的毒性作用还可能表现在其引起溶血后影响机体携氧能力等方面。

综上所述, 一次性给予 PMV 可引起大鼠全血和 PRP 中血小板计数下降、TT 和 APTT 延长、血红蛋白含量升高以及小鼠尾部出血时间明显延长, 表现出显著的抗凝作用。

参考文献:

- [1] Luo GP, Yue DY, Xu ZQ. Clinical analysis of delayed hemorrhage following *Trimeresurus mucrosquamatus* bite [J]. *J Snake (蛇志)*, 2012, **24**(3):254-255, 257.
- [2] Chen YS, Huang CH, Chiou SH. Characterization and molecular cloning of one novel C-type lectin from the venom of Taiwan habu (*Trimeresurus mucrosquamatus*) [J]. *Toxicon*, 2010, **55**(4):762-772.
- [3] Ouyang C, Teng CM. Fibrinogenolytic enzymes of *Trimeresurus mucrosquamatus* venom [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1976, **420**(2):298-308.
- [4] Wang WY, Yang CJ, Yang SC, Xiong YL, Wu XF, Lin NQ, et al. Studies on biochemical properties of the platelet aggregation inducer from *Trimeresurus mucrosquamatus* venom [J]. *Zool Res (动物学研究)*, 1987, **8**(Sup): 1-8.
- [5] Wei Q, Lu QM, Jin Y, Li R, Wei JF, Wang WY, et al. Purification and cloning of a novel C-type lectin-like protein with platelet aggregation activity from *Trimeresurus mucros-*

- quamatus venom[J]. *Toxicon*, 2002, **40**(9):1331-1338.
- [6] Zhang Y, Xiong YL. Purification and characterization of a new fibrinogenase from the venom of the Chinese Habu snake (*Trimeresurus mucrosquamatus*) [J]. *Zool Res* (动物学研究), 1991, **12**(2):199-207.
- [7] Ji RS, Sun QY, Yi Y. Purification and characterization of a novel double-stranded serine protease from *Protobothrops mucrosquamatus* venom[J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2011, **27**(6):818-823.
- [8] Zhang Y, Wisner A, Xiong Y, Bon C. A novel plasminogen activator from snake venom. Purification, characterization, and molecular cloning[J]. *J Biol Chem*, 1995, **270**(17):10246-10255.
- [9] Hung CC, Chiou SH. Fibrinolytic proteases isolated from the snake venom of Taiwan habu: serine proteases with kallikrein-like and angiotensin-degrading activities [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **281**(4):1012-1018.
- [10] Wei JF, Wei Q, Lu QM, Tai H, Jin Y, Wang WY, et al. Purification, characterization and biological activity of an L-amino acid oxidase from *Trimeresurus mucrosquamatus* venom[J]. *Acta Biochim Biophys Sin* (生物化学与生物物理学报), 2003, **35**(3):219-224.
- [11] Liu CS, Chen JM, Chang CH, Chen SW, Teng CM, Tsai IH. The amino acid sequence and properties of an edema-inducing Lys-49 phospholipase A2 homolog from the venom of *Trimeresurus mucrosquamatus* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1991, **1077**(3):362-370.

Anticoagulation effect of *Protobothrops mucrosquamatus* venom

LI Ya-nan^{1,2}, SUN Qian-yun²

(1. College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. Key Laboratory of Chemistry for Natural Products, Guizhou Province and Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002, China)

Abstract: **OBJECTIVE** To investigate the effect of *Protobothrops mucrosquamatus* venom (PMV) on the hematological system. **METHODS** A single dose of PMV $0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ was injected to rats by tail vein. After 0.5, 1, 3, 6 and 24 h, the anticoagulant whole blood, anticoagulant plasma and platelet rich plasma (PRP) were prepared. The platelets were counted with a hemocytometer in whole blood and PRP. Anticoagulant blood plasma was diluted with saline water, while the hemoglobin level was determined through 412 nm absorbance value. The thrombin time (TT), activated partial thromboplastin time (APTT), prothrombin time (PT), and fibrinogen (FIB) were assayed with kits. The activity of the plasminogen activator was assayed by hydrolyzed S-2251. The bleeding time of mice was measured with a single dose $0.28 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ of PMV. **RESULTS** Compared with normal control group, platelet count in whole blood decreased to 1/3 ($P < 0.01$) and platelet count in PRP decreased to 1/20 ($P < 0.01$) in groups that received PMV. The hemoglobin level rose significantly ($P < 0.01$) at 30 min point, APTT was significantly prolonged at 6 h point ($P < 0.05$), TT was significantly prolonged at 3 and 6 h points ($P < 0.01$), and PT was significantly shortened at 1 and 3 h points ($P < 0.01$). The content of FIB and activity of plasminogen activator had no obvious change. The tail bleeding time of mice which received PMV was (2341 ± 742)s at 30 min point, longer than (81 ± 11)s of the control group ($P < 0.01$), but was shortened gradually at 1 h point ($P < 0.01$) and didn't return to normal at 24 h point ($P < 0.05$). **CONCLUSION** PMV possesses significant anticoagulant activity.

Key words: *Protobothrops mucrosquamatus* venom; platelets; coagulation function

Foundation item: The project supported by National Natural Science Foundation of China (81260494); and Key Program for Social Development of Guizhou Province [QKHSY(2010)3050]

Corresponding author: SUN Qian-yun, E-mail: sunqy@hotmail.com, Tel: (0851)3805095

(收稿日期: 2013-03-05 接受日期: 2013-07-08)

(本文编辑: 齐春会)