

蝎毒中的昆虫神经毒素的生化研究

吉 永 华

(中国科学院上海生理研究所)

提 要

开展对蝎毒中昆虫神经毒素的研究是近几年国内外同行较关注的课题之一。本文扼要地介绍了蝎昆虫神经毒素在一般理化特性,结构与功能的关系及作用的专一性和机理等基础理论研究方面上的一些进展概况。

关键词 蝎昆虫神经毒素,收缩或松弛麻痹,二硫键变位,钠离子通道

蝎属蛛形纲,节肢动物门,以苍蝇一类的小昆虫为食。一般地认为,在蝎毒(scorpion venom)中应以昆虫毒素为主,但事实上,迄今在被研究的各种蝎毒中均发现其主要的毒性成分却是对哺乳动物具有很强致死效应的神经毒素(MTx),其在蝎粗毒中的含量高达10%—50%,相反,昆虫神经毒素(ITx)的含量却低于1%。因此,人们对蝎 MTx 的了解,无论是在其理化特性,结构与功能的关系,药理与免疫性质以及作用机制等方面都远比对蝎 ITx 的要广泛、深入的多。有关对蝎MTx 的生化研究概况已在前言作了一般的综述^[1]。本文将简要地介绍近年来对蝎 ITx 的一些研究进展及动态情况。

一、定义及生物鉴定

对蝎哺乳动物,昆虫及甲壳虫神经毒素(CTx)的划分是根据把一定剂量的来自蝎毒中的多肽物质注射进不同实验动物的体内,即

哺乳动物为小鼠,昆虫为苍蝇的幼虫和一种陆地生长的小甲壳虫(isopod)或给药在不同的离体动物标本中后,引起其中某一动物或离体标本的明显麻痹中毒反应,相应地将其物质定称为哺乳动物,昆虫或甲壳虫神经毒素。可是现有的研究资料表明,对蝎 MTx 和 CTx 的定义似乎并不严格分明,即这两类毒素对上述三种动物或离体的动物标本均有不同程度的毒性作用,只不过对哺乳动物或甲壳虫的麻痹作用更敏感些而已。而蝎 ITx 则比较专一性地作用于昆虫的神经系统^[2]。因此,相对而言,对蝎 ITx 的定义较为合理些。

蝎 ITx 的生物鉴定方法最早是由 Zlotkin 等人建立并用此法首次从非洲蝎 *Androctonus australis* Hector 毒中筛选到了一个昆虫神经毒素(AaH IT)^[3]。鉴定的材料为一种食肉的苍蝇幼虫,体重约100—200mg。此外,蟋蟀,蟑螂和蝗虫等活体昆虫也可用来鉴定蝎 ITx。不

- 12 Banyal L, Varadi A, Patthy L. *FEBS Lett*, 1983; 163: 37
- 13 Muller-Esterl W, Fritz H, Kellerman J et al. *FEBS Lett*, 1985; 191: 221
- 14 Ripoche J A, Day J, Willis A C et al. *Biosci Rep*, 1986; 6: 65
- 15 Sottrup-Jensen L, Folkersen J, Kristensen T et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984; 81: 7353
- 16 DeScipio R G, Gehring M R, Podack E R et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984; 81: 7298

- 17 Stanley K K, Kocher H P, Luzio J P et al. *EMBO J*, 1985; 4: 375
- 18 Derynck R, Roberts A B, Winkler M E et al. *Cell*, 1984; 38: 287
- 19 Brown J P, Twardzik D R, Marquardt M et al. *Nature*, 1985; 313: 491
- 20 Lee M Y, Huebers H, Martin A W et al. *J Comp Physiol*, 1978; 127B: 349

[本文于1989年1月3日收到]

表1 从蝎毒中纯化出的部分昆虫神经毒素

蝎昆虫神经毒素	毒性 (CPU, ng/100mg)	等电点 (pI)	含量(%)	参考文献
AaH IT	1	—	—	[3]
AaH CII T ₁	1	—	—	[8]
AaH CII T ₂	2.7	—	—	[8]
Amm IT	0.53--0.61	7.0	0.35	[4]
Bj IT ₁	9.7	8.2	2	[5]
Bj IT ₂	10.4(FPU)	8.3	1	[5]
Be I ₂	1000 ¹⁾	—	—	[6]
BmK IT	7	—	0.1	[7]
Bom CII T ₁	3	—	—	[8]
Bom CII T ₂	6	—	—	[8]
Bom CII T ₃	7.5	—	—	[8]
Lqq I T ₁	1.4	8.5	0.2	[9]
Lqq I T ₂	240(FPU)	8.3	0.7—0.8	[9]
Lqq CII T ₁	1.6	—	—	[8]
Lqq CII T ₂	3	—	—	[8]
Lqq CII T ₃	7	—	—	[8]
Lqq CII T ₄	50	—	—	[8]

AaH: *Androctonus australis* Hector, Amm; *Androctonus mauretanicus mauretanicus*, Bj: *Buthus judaicus*, Be: *Buthus epeus*, BmK: *Buthus martensi* Karsch, Bom: *Buthus occitanus mardochei*, Lqq: *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*.

1) 蟑螂 (*Nauphoeta cinerea*).

表2 部分蝎昆虫神经毒素的氨基酸组成

氨基酸	AaH		Lqq					Bom			Bj		Be I ₂	BmK IT	Amm IT
	IT	CII T ₂	IT ₁	IT ₂	CII T ₁	CHI T ₁	CHI T ₂	CHI T ₁	CHI T ₂	CHI T ₃	IT ₁	IT ₂			
Asp	12	10	9	8	9	5	4	9	9	9	8	7	11	12	11
Thr	4	3	2	5	4	3	2	3	3	3	3	4	2	3	3
Ser	6	6	5	5	6	15	12	8	8	7	3	4	6	5	5
Glu	3	3	4	7	4	10	8	5	5	4	4	4	1	2	3
Pro	1	2	1	0	1	3	2	1	1	1	4	0	2	0	1
Gly	4	5	4	13	6	14	11	6	7	7	7	10	7	4	4
Ala	3	3	4	1	4	5	5	4	4	4	4	4	2	4	3
Val	3	3	6	1	3	2	2	3	4	4	3	4	1	5	4
1/2Cys	8	N.D	8	8	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	6	6	8	8	8
Ile	3	3	2	1	3	1	1	2	2	2	4	3	3	4	3
Leu	6	6	6	4	5	1	1	3	3	3	2	2	3	6	4
Tyr	6	6	7	4	4	1	1	4	3	4	5	3	4	7	6
Phe	1	1	1	1	2	1	1	2	1	2	1	2	1	1	1
His	1	1	2	0	1	2	2	1	1	1	1	1	0	0	1
Lys	8	8	9	7	9	1	4	9	9	7	8	5	8	8	7
Arg	1	1	1	3	1	1	1	1	2	2	1	2	0	0	1
Trp	0	N.D	0	4	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	3	8	3	0	1
Met	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1
总计	70	—	71	72	—	—	—	—	—	—	67	69	62	69	67

注: N.D: 未测定

过苍蝇幼虫作为鉴定的材料,除了微量敏感外,其优点还能明显地观察到动物所呈现出的收缩麻痹(CP)和松弛麻痹(FP)两种不同的中毒症状,并且毒素的毒性也可以通过CPU(contraction paralysis unit)和FPU(flaccid paralysis unit)来表示。而用蟋蟀或蟑螂等活体昆虫则较难以观察到动物松弛麻痹的中毒症状。

二、纯化及一般理化性质

到目前为止,已有约17个蝎ITx先后从7种分布在北非的蝎和中国东亚钳蝎(*Buthus martensi* Karsch, 简称BmK),分类上均属钳蝎科的毒中分离和纯化(见表1)^[4-9]。其中大多数是通过分级凝胶过滤和离子交换柱层析得到的。前不久,Dianous等尝试用免疫亲和的方法并用HPLC分别对*Buthus occitanus mardoechei* (Bom)和*Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* (Lqq)蝎毒中的昆虫毒素进行分离,纯化同样获得了成功^[8]。我们用HPLC也从中国东亚钳蝎毒中纯化出了一个昆虫神经毒素(BmK IT)^[7]。经昆虫毒性鉴定,这些毒素中的15个(包括BmK IT)均为具有CP效应的神经毒素。另两个具有FP效应的神经毒素被分别发现在北非蝎*Buthatus judaicus* (Bj)和Lqq毒中(Bj IT₂和Lqq IT₂)。它们对苍蝇幼虫的毒性,前者的CPU均在10ng以下,后两个的FPU分别为10.4和240ng。与蝎MTx一样,蝎ITx也是一类由62—70个氨基酸残基组成,含有3或4对二硫键一条单链的小分子多肽。等电点均在8.0左右。从表2列出的蝎ITx的氨基酸组成中可以看出,具有昆虫CP效应的毒素,其Lys和Tyr残基的含量较高,但缺乏或含量很少的Met, His, Pro, Phe和Trp残基。而在具有昆虫FP效应的毒素中Gly和Trp残基的含量却很高。

除以上表1列出的蝎ITx外,这里需要提

到的是,八十年代初苏联学者Grishin等曾从中亚亚种蝎*Buthus eupeus*(Be)毒中不但筛选出了一个62肽的昆虫毒素(Be I₂),而且还找到了两个分别为35肽(Be I₅)和36肽(Be I₁),对蟑螂的最小麻痹剂量均为1μg的短链昆虫毒素^[6,10]。与此同时,法国Lazarovici等从另一蝎科*Scorpio maurus palmatus* (Smp)的蝎毒中分离到了两个分别为28肽(Smp IT₁)和36肽(Smp IT₂),含有2和3对二硫键的昆虫神经毒素^[11]。当合并这两个毒素并鉴定其对蝗虫的毒性时,半致死效应约为10μg,而这两个多肽各自对蝗虫的半致死效应却高于45μg。另一位法国学者Rosso等也从摩洛哥黑蝎*Androctonus mauretanicus mauretanicus* (Amm)毒中得到了一个与Be I₁和Be I₅结

表3 部分短链蝎昆虫神经毒素的氨基酸组成

氨基酸	Smp IT ₁	Smp IT ₂	Be I ₁	Be I ₅	Amm P ₂
Asp	2	3	2	5	2
Thr	0	4	2	2	4
Ser	1	2	0	0	1
Glu	3	1	3	1	2
Pro	3	2	3	3	3
Gly	2	2	4	4	5
Ala	1	2	2	1	1
1/2Cys	4	6	8	8	8
Val	2	2	0	0	1
Met	0	0	3	3	0
Ile	1	3	0	0	1
Leu	2	1	1	1	1
Tyr	1	2	1	0	1
Phe	0	0	2	2	1
His	0	0	0	0	0
Lys	4	3	2	3	2
Arg	2	3	3	2	2
Trp	0	0	0	0	0
总计	28	36	36	35	35

构同源,对苍蝇幼虫的CPU约3.6μg,称之为Amm P₂的35肽物质^[12]。表3列出了这些短

Be I₁ MCMPCFTTRPDMAQQCRACCKGRGKCFGPQCCLCGYD
Amm P₂ -G D YTESK AT G V NR1
Be I₅ D N NK D G GK NR-

图1 短链蝎昆虫神经毒素的氨基酸排列顺序

链昆虫毒素的氨基酸组成,其中 Be I₁, Be I₂ 和 Amm P₂ 已被确定了其分子的氨基酸排列顺序(图 1)。但是以后 Rosso 等对 Amm P₂ 的进一步研究工作基本上否定了在蝎毒中存在着一类短链昆虫毒素的可能性。其根据有以下几点: 1. 比较上述短链昆虫毒素与表 1 中长链毒素的毒性,两者相差甚远,至少在 100 倍以上(除 Lqq IT₂ 外),并且他们曾从 AaH 毒中纯化出一个 Amm P₂ 的同源物,但经鉴定表明这一物质对哺乳动物,昆虫和甲壳虫均无毒性效应, 2. 以上被发现的所有短链昆虫毒素均是来自于用电刺激法采集的蝎粗毒,他们认为,此法采集的粗毒通常是用于纯化的目的,而用手工采集到的粗毒则较接近于蝎毒生理的自然分泌。但他们用 2g 手工采集的 Amm 粗毒进行同样程序的分离后,却并未找到 Amm P₂ 物质。 3. 也是最主要的依据,当他们用与 Amm IT 氨基酸组成相近的 AaH IT 的抗血清与 Amm P₂ 互相反应时,发现其抗血清能拮抗 Amm P₂ 的毒性,于是他们通过准确地计算血清的用量,推断出, Amm P₂ 呈现出的微弱昆虫毒性可能是来自 Amm IT 的污染,污染的比例大概在 1mol/5000mol。据此,他们认为,所谓 Amm P₂ 事实上是根本不存在于 Amm 天然毒液中的一个非活性物质。这一否定,自然地会引起人们对其它类似 Amm P₂ 短链昆虫毒素的存在真实性产生疑问。因此,有关蝎毒中究竟是否确实存在着的一类短链昆虫神经毒素还有待于进一步地去证实。

三、结构与功能的关系

在已被纯化的 17 个蝎 ITx 中,目前只有 AaH IT 和 Be I₂ 被测定了其完整的蛋白初级结构^[6,13]。并且 AaH IT 还被确定了其四对二硫键的位置。蝎 ITx 与蝎 MTx 两者间的一个明显差异是反映在 AaH IT 中的四对二硫键,其中的三对相应地与蝎 MTx 同源,唯有一对产生了变位(图 2)。也许正是由于这一变位,导致了蝎 ITx 在空间构型上的改变,进而在其功能上反映出与蝎 MTx 不同的特性。关

于蝎 FP 昆虫毒素的蛋白初级结构尚未见到正式报道,不过最近法国 Kopeyan 对 Lqq IT₂ 的蛋白质顺序初步测定结果表明,这是一个即与蝎 MTx 又与蝎 CP 昆虫毒素都截然不同的新型多肽物质。

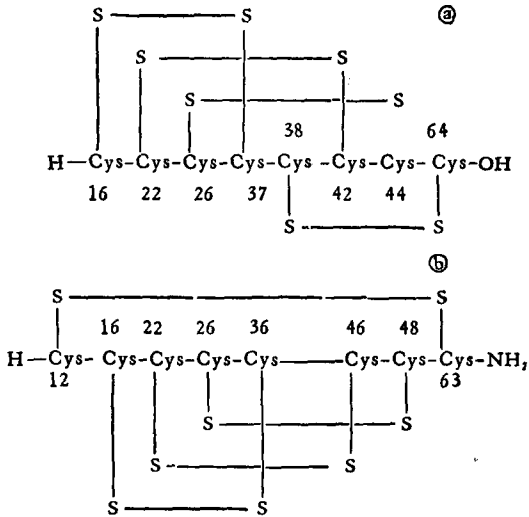


图 2 蝎昆虫神经毒素与蝎哺乳动物神经毒素的二硫键位置的比较

② 蝎 *Androctonus australis* Hector 昆虫神经毒素 (AaH IT) 的二硫键位置。③ 蝎 *Androctonus australis* Hector 哺乳动物神经毒素 II (AaH II) 的二硫键位置

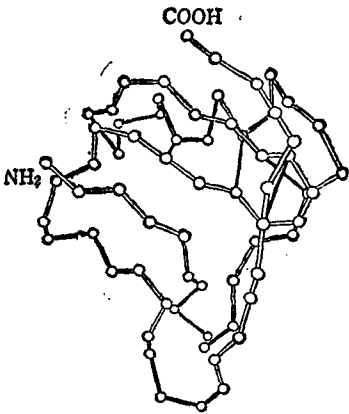


图 3 蝎 *Androctonus australis* Hector 昆虫神经毒素 (AaH IT) 的空间构型推导图

我们在对中国东亚钳蝎毒中昆虫毒素的研究过程中,没有筛选到类似 Amm P₂ 或 Be I₁ 等一类短链多肽物质^[14],只得到了一个即对蟋蟀具有较强的致死效应,又对苍蝇幼虫能产生 CP 效应,其 CPU 约为 7ng,由约 70 个氨基酸

组成的昆虫毒素 (BmK IT)。其氨基酸组成与非洲蝎 AaH IT 和 Lqq IT₁ 是极为相似的。并且对其初步的氨基酸排列顺序的测定表明, 该毒素与 AaH IT 在蛋白结构上至少具有70%的同源性^[7,15]。有意义的是, 我们已经知道, 在蝎 MTx 中第58位和62位等部位上带有正电荷残基的存在对于促进毒素与其受体的亲合作用是相当重要的^[16,17]。同样, 有人在对 AaH IT 中的第34位和第52位上的赖氨酸残基分别进行修饰后, 发现并不影响毒素的毒性。而在 BmK IT 中相应这两个部位上的残基却是丝氨酸和丙氨酸, 这样看来, 这两个部位上的正电荷存在与否对于蝎 ITx 的活性似乎并不是特别重要的。那么, 蝎 ITx 蛋白分子的活性中心在何部位上, 是否也与蝎 MTx 一样在某一部位上带有正电荷的残基? 此外, 法国 Darbon 等根据 AaH IT 的蛋白初级结构, 并通过圆二色性的观察, 推导出了这个毒蛋白分子的空间构型图(图3)。在蝎 ITx 的晶体结构未被揭示前, 对这个空间结构图的准确阐明, 另一个结构与功能都与其相似的中国 BmK IT 完整蛋白初级结构的最终确立, 无疑具有其特别的参考价值。进一步而言, 中国 BmK IT 的活性中心部位的尽早确定及空间构型的研究, 对于探讨蝎 ITx 结构与功能的相互关系, 在科研上有一定的重要意义。

四、专一性及作用机制

Dianous 等通过重新验证 AaH IT 对不同动物的毒性进一步表明^[18]: 1. AaH IT 对哺乳动物没有特征的毒性作用。在小鼠脑室注射 (i.v.c) 或皮下注射 (s.c) 的条件下, 即使 AaH IT 的剂量分别达到 0.05mg 或 1mg/20g 体重, 也未能观察到动物的中毒麻痹症状。相比 AaH 哺乳动物神经毒素 AaH I, AaH II 和 AaH III, 其小鼠的 LD₅₀ 却分别为 10, 0.5 和 7ng (i.v.c) 或 0.35, 0.24 和 0.48 μg (s.c)。两者相差至少在 2000 倍以上, 甚至高达 10 万倍。2. AaH IT 对甲壳虫具有较弱的毒性作用。对陆栖甲壳虫 *Armadillidium vulgare* 和 *Porcellio*

leavis 及水生甲壳虫 *Acanthonyx lunulatus* 的 LD₅₀ 均为 3—9 μg/100mg 体重。作为这一现象的一种解释, 也许是因为甲壳虫体内的神经系统较相近于昆虫体内的缘故。3. AaH IT 并不是对所有不同的昆虫动物都具有绝对的毒性专一性。换言之, AaH IT 对家蝇 *Musca domestica* 的毒性最敏感, 其 LC₅₀ 为 2ng/100mg 体重, 而对缘蝇 *Sarcophaga argyrostoma* 的为 15ng, 对美国蟑螂 *Periplaneta americana* 的为 46ng, 对蟋蟀 *Cryllus domesticus* 的在 289—373ng 之间, 而对棉叶虫 *Spodopera littoralis* 则最不敏感高达 1.3 μg。这些资料与早期 Zlotkin 等一些电生理的实验观察结果是相一致的。此外, ¹²⁵ 碘-AaH IT 的标记结合实验也证实^[2], AaH IT 只特征地结合在昆虫的突触体标本上却并不与甲壳虫神经组织或大鼠脑突触体标本相结合。然而有关蝎 ITx 的作用专一性问题仍存在着一些很有趣的现象, 尚不能被清楚地解释。特别是最近发现一些来自南美洲的 β 型蝎 MTx 同样对苍蝇的幼虫具有较高的 CP 效应^[19], 同时又发现, ¹²⁵ 碘-AaH IT 对蟋蟀中枢神经系统, 苍蝇幼虫腹部及神经系统的均一结合常数与上述昆虫的生物毒性鉴定所观察到的不均一 LD₅₀ 数据并不相一致^[2,18]。因此, 要准确地解答蝎 ITx 作用的专一性问题, 除了要在分子水平上进一步去揭示这类毒素的作用机制外, 今后也许会更多地涉及到不同动物标本中神经细胞膜以及毒素受体特性的探讨和研究。

在电生理实验条件下, Lester 和 Zlotkin 等还曾分别观察了 Bj IT₁, Bj IT₂ 和 Lqq IT₁, Lqq IT₂ 对蟑螂离体轴突标本的作用机制^[5,9], 发现具有 CP 效应的 Bj IT₁ 和 Lqq IT₁ 能引起轴突动作电位的重复发放, 并增强峰钠电流, 延缓峰钠传导的关闭。而具有 FP 效应的 Bj IT₂ 和 Lqq IT₂ 则能引起被诱发的动作电位的封闭, 并降低峰钠电流, 进而逐渐地抑制了钠电流。这些结果表明, 蝎 ITx 与已被证实的蝎 MTx 一样^[20], 其靶受体是在昆虫神经膜上依赖于电压的钠离子通道上。对昆虫突触体小泡

油菜素类甾醇的存在、生理活性、构效关系及其它

宋 任 华

(桂林医学院, 桂林)

提 要

油菜素类甾醇是近年来人们首次从植物中发现并分离到的一种具生理活性的甾体类植物生长激素。由于它具有较高生理活性,且实验证明它能使水稻等农作物及蔬菜增产,是一种很有应用价值的植物生长激素,因而近年来对它的研究日渐增多。本文就油菜素类甾醇的存在、生理活性及构效关系等进行了较为系统、全面的综述。

关键词 油菜素类甾醇,植物生长激素,生理活性,构效关系

在七十年代末,人们首次从植物中分离到一种以甾核为母体、具有生理活性的植物生长激素——油菜素内酯 (Brassinolide, BR), 由于它具有独特的生理作用,引起了世界上许多植物生理学家和生物化学家的关注。近年来,人们不断从植物中发现并分离出了一系列在结

构、活性和作用等方面与油菜素内酯类似的激素(统称为 Brassinosteroids, BS)。为了更好地研究这一类激素,还进行了人工合成。油菜素内酯的发现,在生理和生化领域都具有很大的意义,被称为是“自赤霉素以来,植物生理学家和生物化学家最重要的发现”^[1]。

标本的结合实验还表明^[2], Lqq IT₁ 和 Lqq IT₂ 均能竞争性地取代¹²⁵碘-AaH IT 的结合,这一结果又提示,无论是具有 CP 或 FP 效应的蝎 ITx 在昆虫神经膜上可能共享一个共同的钠离子通道的结合部位。

参 考 文 献

- 1 吉永华,施玉梁,徐科. 毒素的研究与利用. 北京: 科学出版社,1988; 145—158
- 2 Gordon D, Zlotkin E, Catterall W A. *Biochim Biophys Acta*, 1985; 821: 130
- 3 Zlotkin E, Rochat H, Kopeyan C *et al.* *Biochimie (paris)*, 1971; 53: 1073
- 4 Zlotkin E, Teitelbaum Z, Rochat H *et al.* *Insect Biochem*, 1979; 9: 347
- 5 Lester D, Lazarovici P, Pelhate M *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 1982; 701: 370
- 6 Grishin E V. *Int J Quantum Chem*, 1981; XIX: 291
- 7 吉永华,木村能章,徐科等. *Comp Biochem Physiol*, 1988; 90C (1):237
- 8 De Dianous S, Kopeyan C, Rochat H. *Toxicon*, 1987; 25(7): 731
- 9 Zlotkin E, Kadouri D, Gordon D *et al.* *Arch Biochem Biophys*, 1985; 240: 877
- 10 Grishin E V, Volkova T M, Soldatova L N. *Bioorg Khim*, 1982; 8: 155
- 11 Lazarovici P, Yanai P, Pelhate M *et al.* *J Biolog Chem*, 1982; 257(14): 8397
- 12 Rosso J P, Rochat H. *Toxicon*, 1985; 23(1): 113
- 13 Darbon H, Zlotkin E, Kopeyan C *et al.* *Int J Peptide Protein Res*, 1982; 20: 320
- 14 吉永华,徐科. 生物化学与生物物理学报, 1983;6(15): 517
- 15 吉永华, Mansuelle P, Rochat H. 广西桂林国际毒素会议论文摘要集,中国: 1989; 60
- 16 Darbon H, Jover E, Couraud F *et al.* *Int J Peptide Protein Res*, 1983; 22: 179
- 17 吉永华, Mansuelle P, Rochat H. 广西桂林国际毒素会议论文摘要集,中国: 1989; 61
- 18 De Dianous S, Hoarau F, Rochat H. *Toxicon*, 1987; 25(4): 411
- 19 De Lima M E, Martin M F, Diniz C R *et al.* *Biochem Biophys Res Comm*, 1986; 139(1): 296
- 20 徐科,吉永华,寺川进. 中日双边生物物理学术讨论会论文摘要集,中国无锡: 1985; 460

[本文于1989年2月27日收到]