

式中 C_N 是最低空穴分子轨道上的酰胺氮 (N^1) 的原子轨道系数, Q_N 是 N^1 的净电荷值。

参 考 文 献

- [1] Ariëns, E.: *Drug Design* (Academic Press, New York), 1, p. 2, 1971.
- [2] Streitwieser, A.: *Molecular Orbital Theory for Organic Chemists*, New York, Chap. 5, 1961.
- [3] 刘若庄: 《化学通报》1977年, 第6期, 第50页。

- [4] Mulliken, R. S.: *J. A. C. S.*, 72, 600, 1950; 74, 811, 1952.
- [5] Ariëns, E.: *Drug Design*, 1, 434, 1971.
- [6] Merrill, C. R. et al.: *Biochem Biophys. Acta*, 118, 316, 1966.
- [7] Hirano, K. et al.: *Bull. Chem. Soc. Jap.*, 40, 2229, 1967.
- [8] Foerzler, E. C., Martin, A. N.: *J. Pharm. Sci.*, 56, 608, 1967.
- [9] Cammarata, A.: *J. Med. Chem.*, 11, 1111, 1968.

[本文于1978年8月24日收到]

蛇 毒 的 生 物 化 学 (续)

蛇毒对血液和心血管系统的作用及临床应用

涂 光 传 阮 长 耿

(云南省动物研究所) (苏州医学院血研室)

以前曾^[1]综述了蛇毒神经毒素、膜活性多肽以及蛇毒酶的有关研究资料, 本文将着重介绍作用于血液和心血管系统的酶和蛋白质的生物化学性质及其在临床上的应用。

一、蛇毒对凝血系统的作用

蛇毒对凝血系统的作用早已为人们所注意, 两百年前, 把蛇毒分成促凝和抗凝两大类, 但实际上许多蛇毒同时兼有这两类活性。蛇毒对凝血系统的作用可以归结为图1。

1. 蛇毒的促凝作用

蛇毒的促凝作用主要表现为凝血酶样作用、凝血酶原激活作用和第X因子激活作用。

凝血酶样作用 蝮亚科 (Crotalidae) 蛇毒含有一种氨基酸酯酶, 由于它能转换纤维蛋白原为纤维蛋白, 因而被称为“凝血酶样酶 (Thrombin-like Enzyme)”。

凝血酶样酶已在蝮蛇属、矛头蝮属、响尾蛇属、巨蝮属以及烙铁头属的十几种毒蛇的蛇毒中找到(见表1), 其中以红口蝮蛇 (*Agkistrodon rhodostoma*)^[2]、矛头蝮蛇 (*Bothrops atrox*) 以及东部菱斑响尾蛇 (*Crotalus adamanteus*)^[4] 蛇毒的

凝血酶样酶研究最为深入。

纯化的凝血酶样酶与凝血酶的相似之处是: (1) 能水解纤维蛋白原, 生成纤维蛋白单体; (2) 能水解胰蛋白酶专一性的底物对甲苯磺酰精氨酸甲酯 (TAME) 和苯甲酰精氨酸乙酯 (BAEE), 其最适 pH 为 8.5—9; (3) 能使血小板的形态发生变化释放 ADP 和 5-羟色胺 (Serotonin); (4) 能为二异丙基磷酰氟 (DFP) 抑制, 是一个以丝氨酸为活性中心的酶; (5) 物理化学性质相近(表2)。

它与凝血酶的不同之处是: (1) 水解纤维蛋白原时仅释放一种纤维蛋白多肽 A (或 B), 而不是同时释放两种纤维蛋白多肽 A 和 B (见图2); (2) 不激活凝血因子 II、V、VII、VIII、IX、X、XI、XII 及 XIII; (3) 由于不激活第 XIII 因子, 生成的纤维蛋白单体不能聚合, 因而容易分解和从血循环中消除; (4) 不为肝素、人血清凝血酶抑制剂、卵白蛋白以及大豆胰蛋白酶抑制剂所抑制; (5) 即使在低浓度 (1 微克/1 毫升) 对热已很稳定。

第X因子激活作用 圆斑蝥蛇 (*Russells viper*) 蛇毒 (简称 RVV) 是人们最熟悉和作用最

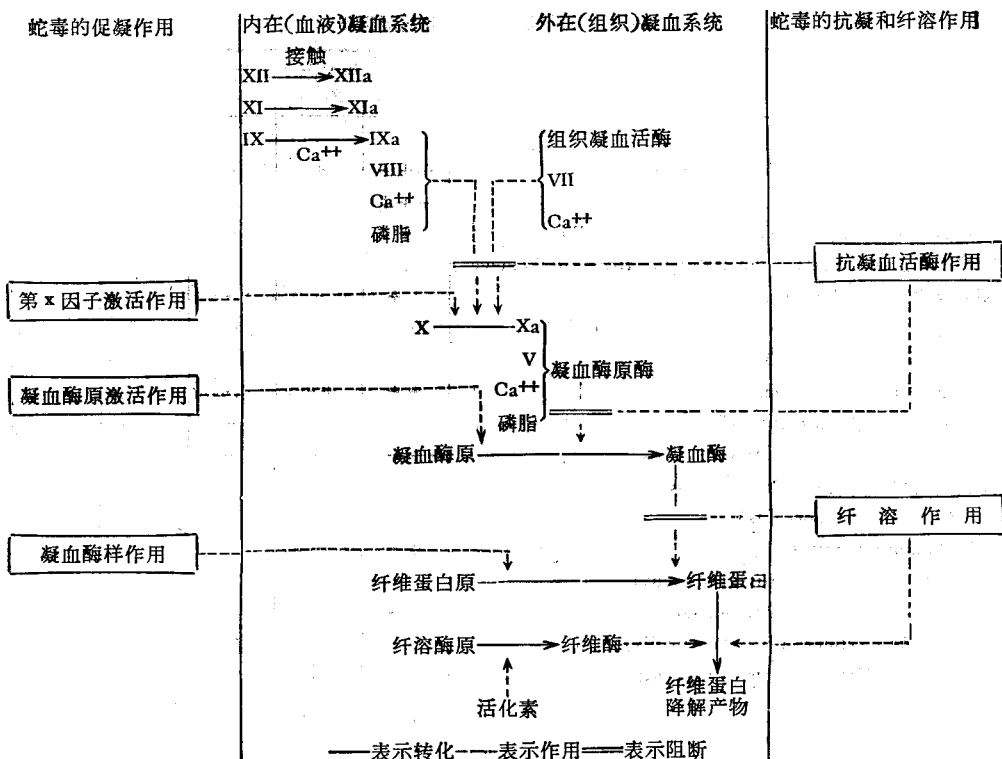


图1 蛇毒对凝血系统的作用和正常凝血机制

强的一种促凝剂,它含有几种活性成份,其中最主要的是第X因子激活酶^[5]。这种活性成份已经纯化,证明是一种氨基酸酯酶,它在Ca²⁺和磷脂的存在下激活第X因子, S_{20,w}为5.8 S, D_{20,w}为4.66 × 10⁻⁷ 厘米²/秒, $\bar{v}$ = 0.720, 分子量104,700, 对TAME的K_M为5.9 × 10⁻⁴ M, 最适pH为8—8.5, 不为大豆胰蛋白酶抑制剂所抑制^[6]。

RVV的第X因子激活酶对凝血因子X的激活作用已被研究清楚, 这些研究对于凝血机制的阐明起了很大的推动作用^[7]。它首先切断因子X (一种分子量为55,000的糖蛋白) 重链N-末端部分的Arg-Ileu肽键, 产生有活性的因子X_{aa} (分子量44,000), 后者再自身催化从C-末端释放出片段, 形成一个分子量较小而活性相等的因子X_{aβ} (图3)。

最近从美洲矛头蝮蛇 (Bothrops jararaca) 蛇毒 (简称BJV) 中亦纯化了一个第X因子激活酶^[8], 它是一个分子量为83,000的, 更为酸性的 (等电点4.9) 的酶蛋白。它对凝血因子X的激

活作用较弱, 且作用方式与RVV的第X因子激活酶不同。它首先作用于凝血因子X重链的C-末端, 形成一个无活性的中间产物 (因子X_β), 然后再慢慢地转变为活化型X_{aβ} (图3)。

第X因子激活酶在其它一些蛇毒中亦有发现, 如锯鳞蝮蛇、彩鳞蝮蛇、红口蝮蛇蛇毒 (详见表1), 但作用都不如RVV。

蛇毒对第X因子的激活作用可为肝素所阻断, 因此, 由于具有第X因子激活酶的毒蛇咬伤所引起的弥漫性血管内凝血, 用肝素治疗是有效的。

凝血酶原激活作用 蛇毒对凝血酶原的激活作用分为两类, 一类是“不完全凝血酶原激活”, 一类是“完全”凝血酶原激活。前者如虎蛇和棘蛇蛇毒, 它们的激活作用与活化的第X因子相似, 即需要在第V因子, 磷脂及Ca²⁺的存在下, 才能将凝血酶原活化为凝血酶; 后者如泰攀蛇和棕网澳蛇蛇毒, 它们不需要第V因子和磷脂的存在, 能直接激活凝血酶原。锯鳞蝮蛇蛇毒已含有一种“完全”凝血酶原激活酶, 它与

表 1 各种蛇毒的促凝和抗凝组份

	凝血酶样酶	第X因子激活酶	凝血酶原激活酶	抗凝血活酶	纤溶组份	血小板凝聚因子
蝮亚科 (Crotalinae)						
红口蝮蛇 (<i>Agkistrodon rhodostroma</i>)	+++	+	-			+
五步蛇 (<i>Agkistrodon acutus</i>)	+++			+	+	
蝮蛇日本亚种 (<i>Agkistrodon halys blomhoffii</i>)	+	+	-			
蝮蛇短尾亚种 (<i>Agkistrodon halys brevicaudus Stejneger</i>)				++	+	
铜头蝮北方亚种 (<i>Agkistrodon contortrix mokeson</i>)	++	-	-			
墨西哥蝮 (<i>Agkistrodon bilineatus Guernther</i>)	+		-			
矛头蝮 (<i>Bothrops atrox</i>)	+	+++	-			+++
美洲矛头蝮 (<i>Bothrops jararaca</i>)	++	++	-			++
东部菱斑响尾蛇 (<i>Crotalus odamanteus</i>)	++++	-	-			
南美响尾蛇 (<i>Crotalus durissus</i>)	++++	-	-			
南美响尾蛇恐怖亚种 (<i>Crotalus duvissus terrificus</i>)	++++	-	-			
响尾蛇 (<i>Crotalus horridus</i>)	++	-	-			
巨蝮 (<i>Lahcesis mutus</i>)	++					
棕点竹叶青 (<i>Trimeresurus gramineus</i>)	++					
紫棕烙铁头 (<i>Trimeresurus purpureomaculatus</i>)	++	-				±
黄绿烙铁头 (<i>Trimeresurus flavoriridis</i>)						
冲绳烙铁头 (<i>Trimeresurus okinavensis</i>)						+
蝰亚科 (Viperinae)						
圆斑蝰 (<i>Vipera russelli</i>)	-	++++	-	+		+++
巴勒斯坦蝰蛇 (<i>Vipera palestinae</i>)					+	
彩锯鳞蝰 (<i>Echis coloratus</i>)	-	++	+			+
锯鳞蝰 (<i>Echis carunatus</i>)	-	++	+		+	
角蝰 (<i>Cerastes cerastes</i>)					+	
犀噬蝰 (<i>Bitis nasicornis</i>)				+	+	
加蓬噬蝰 (<i>Bitis gabonica</i>)				+	+	
眼镜蛇科 (Elapidae)						
虎蛇 (<i>Notechis scutatus</i>)	-	-	+++			
棘蛇 (<i>Acanthophis antarcticus</i>)	-	-	+			
泰攀蛇 (<i>Oxyuranus scutellatus</i>)	-	-	+++			
棕网澳蛇 (<i>Demansia textilis</i>)	-	-	++			
黑颈眼镜蛇 (<i>Naja nigricollis</i>)	-	-	++	+		
黑唇眼镜蛇 (<i>Naja melanoleuca</i>)		-	+	+		
眼镜王蛇 (<i>Ophiophagus hannah</i>)				+		
白唇曼巴 (<i>Dendroaspis angusticeps</i>)				+		
曼巴 (<i>Dendroaspis jamesoni</i>)				+		
黑曼巴 (<i>Dendroaspis polylepis</i>)				+		
绿曼巴 (<i>Dendroaspis viridis</i>)				+		

表 2 蛇毒凝血酶样酶的物化性质

	红口蝮蛇毒	蝮蛇日本亚种蛇毒	牛凝血酶
分子量	约30,000	28,800	33,700
S _{20,w}	3.35S	3.80S	3.76S
D _{20,w}	4.81×10 ⁻⁷ 厘米 ² /秒	—	8.76×10 ⁻⁷ 厘米 ² /秒
pI	0.690	—	0.690
电泳迁移率	3.9×10 ⁻⁵ 厘米 ² /秒×伏特	—	3.14×10 ⁻⁵ 厘米 ² /秒×伏特
糖含量(%)	约 20	13-15	9-10

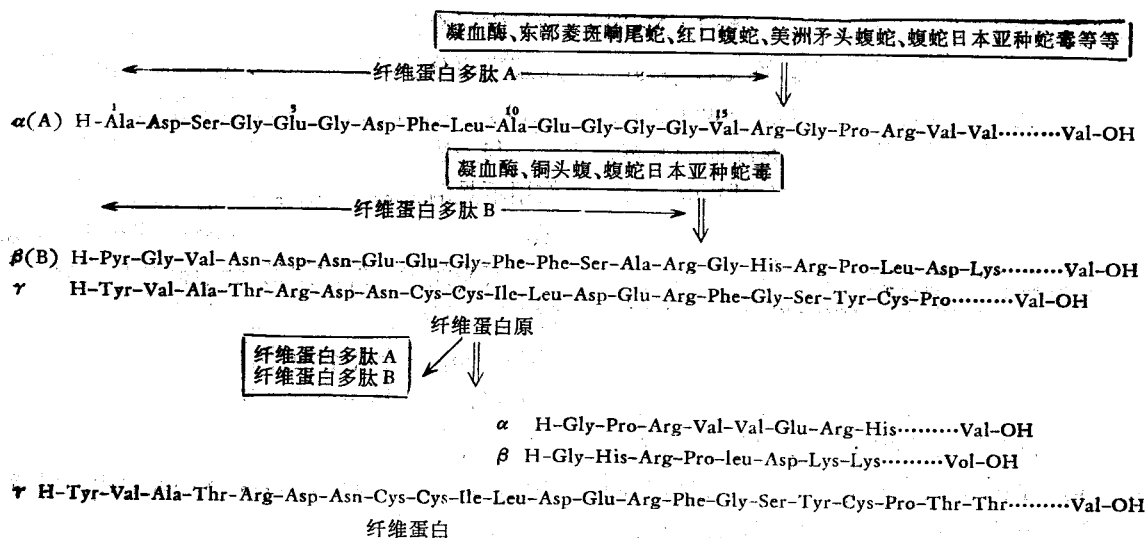


图 2 蛇毒凝血酶样酶水解纤维蛋白原的作用位置

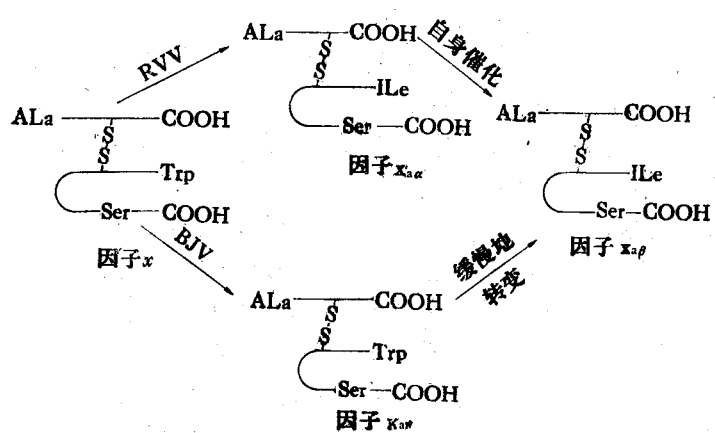


图 3 RVV 和 BJV 对 X 因子的激活作用

酶原激活酶激活牛凝血酶原的反应过程(图 4)。

与活化的第 X 因子激活凝血酶原的过程不同,锯鳞蛙蛇毒的凝血酶原激活酶首先裂解牛凝血酶原的 Arg-Ileu 键,形成一个由两条肽链组成的衍生物,这个衍生物释放出一个 N-端片段,自动转换成“ECV-中间产物”,这个“ECV-中间产物”具有酯酶活性,对 DFP 和苯甲脒敏感,但凝血活性小,它在长时间保温后再释放出一个内部片段,生成 α -

泰攀蛇毒不同,激活作用连 Ca^{2+} 也不需要,但活性比泰攀蛇毒在有 Ca^{2+} 存在时低 1,000 倍。

1976 年, Motita 等^[8]运用 SDS-聚丙烯酰胺盘电泳监视了锯鳞蛙蛇毒的高度纯化的凝血

凝血酶。

但是,当等当量的凝血酶强有力的抑制剂水蛭素(hirudin)存在时,牛凝血酶原同锯鳞蛙蛇毒的凝血酶原激活酶保温即使长达两小

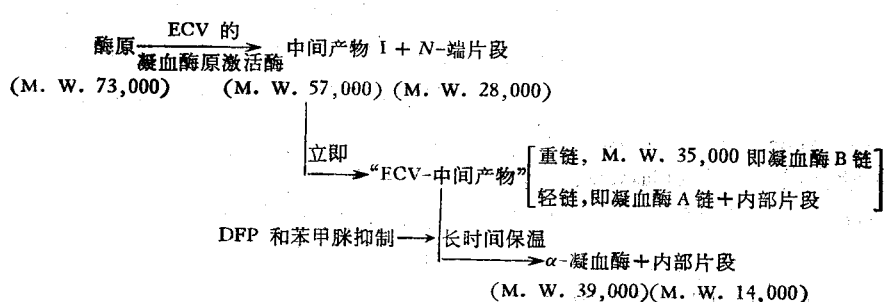


图 4 锯鳞蛙蛇毒的凝血酶原激活酶激活牛凝血酶的反应过程

时,在反应混合物中也没有中间产物 I, N-端片段和 ECV-中间产物的积聚,而是转换为一个给出两个分子量各为 51,000 和 34,000 的片段的衍生物,其中一个片段好像是凝血酶 B 链,另一个片段则由 N-端片段,内部片段和凝血酶 A 链所组成。

2. 蛇毒的抗凝作用

对于蛇毒的抗凝作用研究得还不够深入。有人将眼镜蛇毒的抗凝作用归结于磷脂酶 A 的作用,该酶除了可能引起溶血外,亦可能破坏体内的磷脂,而磷脂在正常凝血过程中起着表面激活作用,至少在两大凝血反应中发挥作用(即第 X 因子的激活过程和凝血酶原转变过程)。同时,磷脂酶 A 作用后生成的产物溶血卵磷脂亦是凝血反应的竞争性抑制剂。

然而,眼镜蛇科的其它一些蛇毒的抗凝作用则主要是由于它们的抗凝血活酶作用。例如三种曼巴蛇(Manba)、黑颈眼镜蛇、黑唇眼镜蛇及眼镜王蛇蛇毒都能显著地干扰凝血活酶的形成。由于这些蛇毒都含有蛋白水解酶,作者把这些蛇毒的抗凝作用归因于蛋白水解酶破坏了刚生成的凝血活酶。除此之外,这些蛇毒还抑制血小板的聚集和血小板对 ADP 的反应性。

除了眼镜蛇科蛇毒外,某些蝰亚科和蝮亚科的蛇毒亦有类似的抗凝活性,即能抑制血液和组织凝血活酶的作用。犀蝰蛇、五步蛇、浙江产蝮蛇(Agkistrodon halys brevicaudus Stejneger)蛇毒都有这种抗凝血活酶作用。对纯化的五步蛇毒的抗凝组份进一步作体内和体外试验说明,这种抗凝组份主要是干扰了凝血酶原与其激活因子之间的相互作用。

3. 蛇毒的纤溶作用

在蝰科和蝮亚科蛇毒中都发现了纤溶组份(Eibrinolytic principle)。

犀蝰蛇蛇毒的纤溶组份被认为是一种蛋白水解酶,它能够活化血浆素原(Plasminogen),增强链激酶(Streptokinase)对血浆素原的作用,亦加强血浆素(Plasmin)的作用。

对锯鳞蝰蛇毒的研究说明,这种蛇毒增强尿激酶(Urokinase)对血浆素原的作用主要是

由于它对血浆素原分子的蛋白水解作用改变了血浆素原分子的三级结构,使其暴露出更多的 Arg-Lys 键、易于为尿激酶所活化^[9]。

与上述蛇毒不同,五步蛇和蝮蛇毒的纤溶作用不是活化素的作用,而是对纤维蛋白的直接溶解,即血纤溶酶样作用(Plasmin-like Action)。

五步蛇毒的纤溶组份已经提纯^[10],微量区带电泳,聚丙烯酰胺电泳和超离心均一,分子量 24,000,分子中含有丰富的谷氨酸和门冬氨酸残基,因而是一个酸性蛋白,等电点为 3.8。它能直接水解纤维蛋白,比活比粗毒高四倍,纤溶作用的最适 pH 值为 7.4,这种纤溶作用显著地为抑肽酶(Trasylol 和大豆胰蛋白酶抑制剂)所抑制,而临床上常用的一种抗纤溶药物,主要抑制血浆素原的活化的 ϵ -氨基己酸(ϵ -Aminocaproic acid)则对其抑制作用较小。

五步蛇毒纤溶组份除了能够直接水解纤维蛋白外,还能水解酪蛋白和纤维蛋白原,但不水解精氨酸酯 TAME。应用 SDS-聚丙烯酰胺电泳观察了纤溶组份对纤维蛋白原亚基的作用,实验结果表明,纤溶组份对纤维蛋白原分子的 α (A) 链(分子量 70,000)专一性地裂解,生成分子量各为 46,000 和 24,000 的 α' 、 α'' 链,而对纤维蛋白原分子的 β (B) 链和 γ 链则无作用^[10]。

纯化的五步蛇毒纤溶组份在低剂量具有比粗毒高两倍的出血毒性;而在高剂量,其出血毒性与粗毒相近。另外, $5 \times 10^{-3} M$ CySH 和 $5 \times 10^{-4} M$ EDTA 完全抑制它的纤溶作用和出血活性,这既表明它是一个“金属蛋白”,也暗示其纤溶活性与出血毒素是密切相关的。

我们实验室研究了浙江产蝮蛇毒的纤溶作用,结果表明蝮蛇毒的纤溶作用不完全是一种活化素的作用,而是能够直接溶解纤维蛋白,即血浆素(血纤溶酶)样作用。1 毫克/毫升的蝮蛇毒对纤维蛋白标准平板的溶解作用与 50 单位/毫升的链激酶和 10 微克/毫升的结晶胰蛋白酶的作用近乎相等,但与链激酶不同的是,蝮蛇毒对加热平板亦有一定的作用,虽不如对标准平板的作用大。体内实验亦表明蝮蛇毒具有“血纤溶酶样作用”。家兔静注蝮蛇毒后凝血酶时间

延长,纤维蛋白原减少,优球蛋白溶解时间亦明显缩短。纤溶产生的纤维蛋白降解产物(FDP)又具有抗凝血酶作用,因此蝮蛇毒表现出显著的抗凝性。

纯化的浙江产蝮蛇毒纤溶组份是一个具有蛋白水解酶活力的酸性蛋白,它没有明显的出血活性和溶血活性。

4. 蛇毒对血小板的作用

血小板在止血时起很重要的作用,某些蛇毒能引起血小板的凝集,血小板的形态也发生变化,同时释放出5-羟色胺及组胺。由于在体内凝血酶也显示上述作用,因而开始曾认为这是由于蛇毒的凝血酶样物质所引起的。1965年Davey和Lischer发现12种具有凝血酶样作用的蛇毒中仅6种对血小板有凝集作用,因而认为有与凝血酶样物质不同的成份存在。后来

Davey和Esnouf^[11]从冲绳烙铁头蛇毒中提纯了血小板凝集因子,分子量 4×10^6 ,含有10%的多肽,85%的中性糖和5%的己糖,不具有蛋白水解酶、精氨酸酯酶、凝血酶以及已在蛇毒中发现的其它酶活力,当血小板凝集时,释放ADP。但关于它凝集的机制还不十分清楚。

二、蛇毒对心血管系统的作用

毒蛇咬伤,特别是蝰科和蝮亚科毒蛇咬伤的病人,常常出现广泛出血、血压下降以及致死性休克的症状。这些症状的产生是由于蛇毒中一些作用于血管和微循环的毒蛋白或酶所引起的。它们是:出血毒素、舒缓激肽释放酶、激肽和强因子和毛细血管通透性增加因子。

1. 出血毒素

出血毒素主要分布至蝰科和蝮亚科蛇毒

表3 各种蛇毒出血活性、致死活性与蛋白水解活性之比较

	出血活性 MHD (微克)*	致死活性 L. D ₅₀ (微克)	蛋白水解活性 (u/毫克)	致死活性与出血 活性之比 (L. D ₅₀ /MHD)
蝮亚科				
铜头蝮	1.90	200	33.7	105
铜头蝮北方亚种	1.20	125	48.1	104
食鱼蝮	0.80	60	41.5	75
蝮蛇	0.14	16	35.8	114
矛头蝮	2.11	5.6	44.5	2.7
美洲矛头蝮	0.75	18.5	74.0	25
东部菱斑响尾蛇	0.04	18.5	9.76	462
西部菱斑响尾蛇	0.43	45.0	83.6	105
草原响尾蛇	18.0	3.6	39.2	0.2
黄绿烙铁头	0.56	21	39.5	38
琉球烙铁头	0.20	54	33	270
冲绳烙铁头	0.30	71	13	237
蝰亚科				
圆斑蝰	21.0	2.2	5.56	0.1
沙蝰	0.47	7.4	41.7	16
巴勒斯坦蝰	0.54	7.1	4.96	13
夜蝰	0.81	>250	0.26	>309
噬蝰	0.15	15.0	18.7	100
加蓬噬蝰	0.04	13.0	11.7	338
眼镜蛇科				
眼镜王蛇	0.84	54.0	12.0	64
金环蛇	>>100	18.5	0.06	<<0.18
黑唇眼镜蛇	>>100	6.0	7.00	<<0.06
眼镜蛇舐亚种	>>100	8.0	0.12	<<0.08
眼镜蛇	>>100	5.6	2.85	<<0.06

* MHD 最小出血量

中,眼镜蛇科蛇毒仅眼镜王蛇蛇毒含有出血毒素(表3)。

由于蝰科和蝮亚科蛇毒的蛋白水解酶含量较高(表3),所以早期曾认为蛇毒的出血活性是由于蛋白水解酶所引起的。最近十几年,由于出血毒素纯化、鉴定的进展,证明出血毒素是一种不具有酶活性的毒蛋白,而且在某些蛇毒中还是蛇毒的主要毒性成份。

研究得较为深入的是黄绿烙铁头蛇毒和日本蝮蛇蛇毒的出血毒素^[12-13]。

黄绿烙铁头蛇毒含有两个出血毒素 HR₁ 和 HR₂, 后者又可分为 HR_{2a} 和 HR_{2b}, 都已高度纯化。纯化的 HR₁ 虽然在超离心时峰形不精确对称,但免疫电泳仅一条沉淀线,等电点聚焦也只有一个峰。纯化的 HR_{2a} 和 HR_{2b} 超离心、免疫电泳和醋酸纤维素薄膜电泳都是均一的,无酶活性。关于黄绿烙铁头蛇毒的出血毒素 HR₁、HR_{2a} 和 HR_{2b} 的某些物化和生化性质详见表4。

表4 黄绿烙铁头蛇毒出血毒素的某些物化和生化性质

	HR ₁	HR ₂	
		HR _{2a}	HR _{2b}
最小出血剂量(MHD)	0.0058 微克	0.066 微克	0.066 微克
静注 L. D. ₅₀	4.6 微克	144 微克	144 微克
S _{20,w}	5.8S	2.4S	~2.0S
分子量	~100,000	未定	未定
等电点	4.3	碱性	碱性
pH 稳定范围	8.0—10.0	7.0—9.5	7.0—9.5
热稳定性	45℃以下稳定	45℃以下稳定	45℃以下稳定
EDTA 抑制	+	+	+
CySH 抑制	+	+	+
DFP 抑制	—	—	—
大豆胰蛋白酶抑制剂抑制	—	—	—

与黄绿烙铁头相似,日本蝮蛇蛇毒也含有两个出血毒素,HR₁ 和 HR₂。两个出血毒素都已高度纯化,几种鉴定指标都证明是均一的。二者的氨基酸组成已分析清楚,都是酸性糖蛋白,但是,日本蝮蛇蛇毒的出血毒素 HR₁ 无酶活性,而 HR₂ 则与蛋白酶 b 分不开。它们的某些物化和生化性质详见表5。

关于出血毒素的作用机理,不同的实验室

表5 日本蝮蛇蛇毒出血毒素的某些物化和生化性质

	HR ₁	HR ₂ (蛋白酶 b)
S _{20,w}	6.08	5.54
D _{20,w}	5.40	5.26
分子量	85,000	95,000
等电点	4.70	4.18
电泳迁移率 (在 pH8.5)	-3.55×10^{-5} 厘米 ² /秒×伏	-5.82×10^{-5} 厘米 ² /秒×伏
280 毫微米 A1%(厘米)	10.32	7.4
蛋白性质	酸性糖蛋白	酸性糖蛋白
MHD	0.0012 微克	0.19 微克
L. D. ₅₀	0.36 微克	4.96 微克
蛋白酶活性	无	52.5
冰冻干燥	稳定	稳定
pH 稳定性	酸不稳	酸不稳
热失活	65℃, 3'	75℃, 3'
EDTA 抑制	$1 \times 10^{-4} M$	$5 \times 10^{-3} M$
CySH 抑制	$1 \times 10^{-3} M$	$5 \times 10^{-3} M$
DFP 抑制	不抑制	不抑制

的结论不尽相同。Okasaka 等应用 16 毫米电影摄影机记录了黄绿烙铁头蛇毒的出血毒素对微循环系统的作用,他们观察到出血毒素对末梢血管的作用,早期是比较大的血管(200—300 微米)激烈收缩,继之扩张,进而红血球从毛细血管内皮细胞的间隙一个一个地漏出。他们认为,点状出血多见于极细静脉的再分枝的地方,而不在细动脉,而且毛细血管也不损伤。

Fulton 等观察了北美食鱼蝮(Agkistrodon piscivorus piscivorus)全毒对细静脉的作用,他们声称已记录了红血球是由于血管内皮细胞开裂才从血管壁上一滴滴漏出的过程。而 McKay 却又认为红血球是通过血管内皮细胞的细胞质漏出的。由此看来,出血毒素的作用机理的最终结论仍需继续探讨。

2. 舒缓激肽释放酶

虽然人们早就注意到,为蝮亚科蛇毒咬伤的病人的一个最突出的病理特征就是血压的突然下降,但是直到 1949 年才由 Rochae Silva 等证明,这是由于在蛇毒的作用下,从血浆中的蛋白前体迅速释放出一种新的生理活性物质——舒缓激肽的缘故(图5)。

而后对舒缓激肽进行大量研究的结果表明,它的生理活性是多方面的,除了能够引起肿

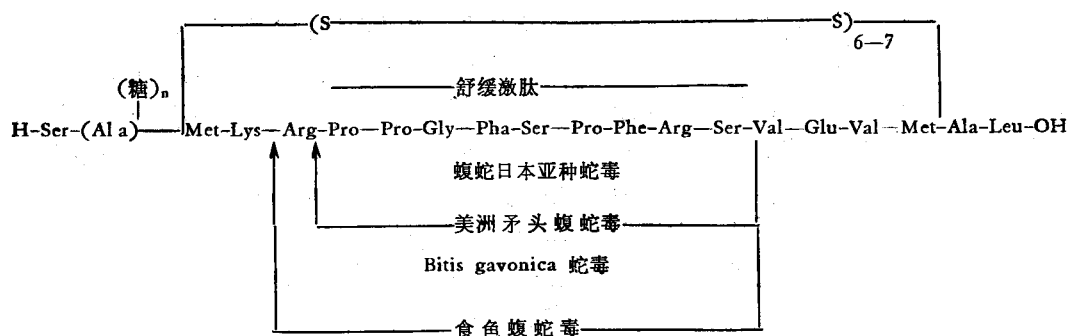


图 5 蛇毒舒缓激肽释放酶水解牛舒缓激肽原 II (分子量 48,500) 的作用位置

胀和疼痛、收缩平滑肌、增加毛细血管的通透性和兴奋副交感中枢外,还能扩张末梢血管,这就是某些蝮亚科蛇毒造成血压突然下降的主要原因。

由于蝮亚科蛇毒的蛋白水解酶的活力较高,开始曾把舒缓激肽的释放归因于蛋白水解酶的作用。1955年,Deutsch和Diniz指出二者并无确定关系。Rocha Silva也指出,蛇毒经热处理后,其蛋白水解酶活力完全丧失,但仍保留舒缓激肽释放酶的活力。他们认为舒缓激肽释放酶的活力与对热不稳定的蛋白水解酶无关,而与对热稳定的氨基酸酯酶有关。

然而并不是所有具有精氨酸酯酶活力的蛇毒都有舒缓激肽释放酶活性,例如黄绿烙铁头和五步蛇毒。

Bitis gavanica 和蝮蛇日本亚种的舒缓激肽释放酶研究得较为深入。它们的某些生化性质列在表 6。

表 6 蛇毒舒缓激肽释放酶的某些生化性质

性 质	<i>Bitis gavanica</i> 毒蝮蛇日本亚种蛇毒		猪胰 Kalli- krein
激肽释放活性	30.3 微克激肽/分×毫克	4.7	57.0
BAEE 水解活性	3.81 μ M/分×毫克	3.9	—
TAME 水解活性	0.47 μ M/分×毫克	1.7	31.7
蛋白水解活性	几乎没有	几乎没有	几乎没有
DFP 抑制	抑 制	抑 制	抑制
Trasyllol 抑制	不 抑制	抑 制	抑制
大豆胰蛋白酶抑制剂抑制	不 抑制	不 抑制	不抑制
最适 pH	9.5	8.5—9.2	8.5
分子量	33,500	—	32,800

3. 激肽加强因子

1965年 Ferreira 发现美洲矛头蝮蛇毒的多肽混合物能够通过抑制激肽水解酶从而加强激肽的活性,因而被称为激肽加强因子(Bradykinin potentiating factor, 简称 BPF)。后来 Bakhle 发现,粗的 BPF 不仅能抑制激肽的水解,而且还能抑制血管紧张素 I (Angiotensin I) 转换为血管紧张素 II。表 7 列出了 7 个美洲矛头蝮蛇的 BPF 的氨基酸排列次序。

表 7 蛇毒 BPF 的氨基酸排列次序

美洲矛头蝮蛇毒的 BPF	
V-3-A	Pyr-Lys-Trp-Ala-Pro
V-2	Pyr-Trp-Pro-Arg-Tbr-Pro-Glu-Ile-Pro-Pro
V-6-1	Pyr-Ser-Trp-Pro-Gly-Pro-Asn-Ile-Pro-Pro
V-6-2	Pyr-Asn-Trp-Pro-Arg-Pro-Glu-Ile-Pro-Pro
V-7	Pyr-Asn-Trp-Pro-His-Pro-Glu-Ile-Pro
V-8	Pyr-Trp-Pro-Arg-Pro-Glu-Ile-Pro-Pro
V-9	Pyr-Gly-Gly-Trp-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro-Glu-Ile-Pro-Pro
蝮蛇日本亚种蛇毒的 BPF	
Pot. A	Pyr-Gly-Arg-Pro-Pro-Gly-Pro-Pro-Ile-Pro
Pot. B	Pyr-Gly-Leu-Pro-Pro-Arg-Pro-Lys-Ile-Pro-Pro
Pot. C	Pyr-Gly-Leu-Pro-Pro-Gly-Pro-Pro-Ile-Pro-Pro
	Pyr-Gly-Gly-Pro-Pro-Arg-Pro-Pro-Ile-Pro-Pro
Pot. E	Pyr-Lys-Trp-Asp-Pro-Pro-Pro-Val-Ser-Pro-Pro
舒缓激肽	Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg
血管紧张素 I	Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu

在这 7 个 BPF 当中, V-3-A 的氨基酸次序首先被测定并为人工合成所证实,体外和体内实验表明,它能抑制舒缓激肽的降解以及血管紧张素的转换,还能改善实验性肾性高血压。其它 6 个 BPF 是后测定氨基酸顺序和人工合成的,证明具有 5V-3-A 相同的药理作用。

后来在蝮蛇日本亚种蛇毒中也找到5个BPF,其氨基酸排列次序也列在表7。

比较一下蛇毒BPF和舒缓激肽,血管紧张素I的氨基酸排列次序可以看出,它们具有一定的结构相似性,因而不难理解,为什么蛇毒BPF对激肽水解酶和血管紧张素转换酶有很高的亲和力以及为什么它们是强有力的竞争性抑制剂。

另外,由于这些蛇毒BPF具有封闭的N-端和Pro-Pro二肽的C-端,使得它们不为氨肽酶、羧肽酶以及血管紧张素转换酶所水解,这也能够解释为什么蛇毒BPF V-3-A比V-6-1在体内保持活性的时间短以及为什么在Pot. A的C-端加一个Pro残基就增加它对豚鼠回肠的舒缓激肽增强活性200倍。

最近,为了进一步研究蛇毒BPF的作用机理,人工合成了五十几种BPF的类似物,这些类似物对酶的亲和力和在体内的稳定性都与蛇毒的BPF有所不同。

4. 毛细血管通透性增加因子

蛇毒对毛细血管通透性增加的影响是多方面的。舒缓激肽释放酶,磷脂酶A和透明质酸酶作用于许多器官,引起某些介质如舒缓激肽、组织胺和5-羟色胺的释放以及细胞间质的破坏,从而显著地增加了毛细血管的通透性。

除此而外,Sato等人^[4]还在蝮蛇日本亚种、东部菱斑响尾蛇和黄绿烙铁头等蛇毒中找到一种“毛细血管通透性增加因子”。蝮蛇日本亚种蛇毒的毛细血管通透性增加因子已经纯化,比活提高10倍,超离心均一, $S_{20,w}$ 为2.65,分子量30,000,是个糖蛋白,它具有精氨酸酯酶的活力但不具有舒缓激肽释放酶,凝血酶样酶以及蛇毒中的其它酶活力。其作用最适pH值为8.5,不为EDTA、O-二氮杂菲、大豆胰蛋白酶抑制剂以及某些还原剂如半胱氨酸,谷胱甘肽和抗坏血酸所抑制,但为DFP所抑制。

三、临床应用

由于蛇毒对于血液和心血管系统的多种多样的作用,不少蛇毒或其纯化组份被用于临床

诊断和治疗各种血液和心血管疾病,还有一些蛇毒或其纯化组份则展示了新的应用前景。

红口蝮蛇,矛头蝮蛇和东部菱斑响尾蛇蛇毒的凝血酶样酶都已高度纯化并已作为正式药品出售,它们的商品名称分别为“Ancrod(亦称Arvin)”、“Reptilase”和“Crotalase”^[2,4]。由于这三种药品在体内能够降解纤维蛋白原,生成不稳定的、易从血循环中除去的纤维蛋白单体,从而降低了血液的粘度和产生“脱纤维蛋白症(Defibrination Syndrome)”,造成一种显著的低凝状态。动物实验和临床应用的结果表明,这三种药品静脉注射的抗原反应和毒副作用都不大,与肝素相比,无出血的危险。上述这些性能使得这三种药品成为一类新型的抗凝剂而用于血栓栓塞的预防和治疗。关于这方面的临床应用报告日见增多,引起了临床医生的广泛重视。

矛头蝮蛇毒的Reptilase除用于预防和治疗血栓栓塞之外,还用于临床诊断。Reptilase较凝血酶稳定且不为肝素所抑制,因此含有肝素的血浆标本会延长凝血酶时间,而不影响Reptilase时间,另外,纤维蛋白降解产物对Reptilase时间仍有影响,故对于试用肝素治疗的“弥漫性血管内凝血”患者,进行Reptilase时间测定可以代替凝血酶时间测定,估计纤维蛋白降解产物对凝血酶抑制的程度。

圆斑蝰蛇毒(RVV)和美洲矛头蝮蛇毒(BJV)由于含有第X因子激活酶,在临床上已用于诊断第X因子缺乏症。

泰攀蛇毒和棕网澳蛇毒由于它们不需要第V因子和磷脂的存在能够直接激活凝血酶原,在临床上已用于检查少量凝血酶原的存在和诊断凝血酶原缺乏症。

锯鳞蝰和犀咝蝰蛇毒的活化素样组份,由于能够增强链激酶和尿激酶对血浆素原的作用,因而可以作为一种链激酶和尿激酶的辅佐药物,用以加强血栓溶解和促进血管的清除^[9]。

浙江产蝮蛇毒的纤溶组份既能够溶解纤维蛋白凝块,又能够降解纤维蛋白原,假若它没有明显的毒副作用的话,将是一个很好的血栓栓塞的预防和治疗的新药。

虽然蛇毒出血毒素对外周血管具有高度专一的而且是有害的作用，但是纯化的出血毒素对于研究微循环的结构与功能的关系以及阐明红血球和蛋白如何从微循环系统渗出的机理将是一个十分有价值的工具。

蛇毒激肽加强因子已经证明能够显著地改善实验性肾性高血压。它们对人体的作用已经开始研究。将来能否用于人体肾性高血压的诊断和治疗，还是一个令人感兴趣的课题。

参 考 文 献

[1] 涂光伟:《生物化学与生物物理进展》, 1977 年, 第 2 期, 第 43 页。
 [2] Biggs, R.: Human Blood Coagulation, Haemostasis and Thrombosis, p. 429, 579, 1972.
 [3] Funk, C. et al.: Brit. J. Haematol., 21, 43,

1971.
 [4] Francis, S. et al.: Thrombosis res., 10(3), 487, 1977.
 [5] Schiffman, S. et al.: Biochemistry, 8, 1397, 1969.
 [6] Esnouf, M. P. and Williams, W. J.: Biochem. J., 84, 62, 1962.
 [7] Davie, E. W. et al.: Ann. Rev. Biochem., 44, 799, 1975.
 [8] Motita, T. et al.: Thrombosis res., 8(11), 59, 1976.
 [9] Forbes, C. D. et al.: Nature, 211, 989, 1966.
 [10] Ouyang, C. et al.: B. B. A. 439, 146, 1976.
 [11] Davey, M. and Esnouf, M. P.: B. J. 111, 733, 1969.
 [12] Ohsaka, A. et al.: Toxins of Animal and Plant Origin, v. 1, p. 369.
 [13] Oshima, G. et al.: J. B. (Tokyo), 72, 1483, 1972.
 [14] Sato, T.: J. B. (Tokyo), 57, 380, 1965.

[本文于 1978 年 2 月 21 日收到]

1979 年第 3、4 期勘误表

期	页	行	误	正
第 三 期	2	左 18	从而根本的革新;	从而根本的革新了,
	4	左 17	光谱变化的定重分析	光谱吸收变化的定量分析
	5	右倒 5	* 最大消光, 波长 $\epsilon_{\max}$	最大消光 $\epsilon_{\max}$ 的波长
	6	公式 9	* $+ [Ra] * \left(\frac{\epsilon_{R_0}}{\epsilon_{MII}} \right)_1 [R_0]$	$+ [Ra] * + \left(\frac{\epsilon_{R_0}}{\epsilon_{MII}} \right)_1 [R_0]$
	9	图 10	* 500nm 单色光透视率的变化	500nm 单色光透射率的变化
	12	倒 1	* 不归宿于	不归属于
	15	图注 3	* 来自综合资料, 如离体眼、视杯	来自综合资料, 如离体眼, 眼杯
	16	图注⑥	* Harawa-Matsuura	Hanowa-Matsuura
	17	左 5	* Desensitization	Desensitization
	17	左 16	[B2P.523]	[B2, P. 523]
	17	左 19	在 Rh 合成保持恒定浓度	在 Rh 合成时保持恒定浓度
	17	文献[4]	New Biology	Nature New Biology
	2	右 30	Rigment epithelium	Pigment epithelium
	2	右倒 4	t_d	td
第 四 期	3	左倒 15	(Porphropsins, Phs)	(Porphyrropsins, Phs)
	6	图 6	* 温度 21℃. 曲线, 实测值; 小黑点	温度 21℃. 小黑点, 实测值; 曲线
	7	图 8	$A+Ra$ $B+Ra$	$A\blacktriangle(\blacktriangle)=MIII, O=MII+Ra$ $B\bullet=MIII, O=MII+Ra$ pH7.3
	10	图注 11	* 通过各实测的实线	通过各实测值的实线
	10	图 12	* $Trans - Ra \xrightleftharpoons{(8)} 11 - Cis - Ra$ $\swarrow \quad \searrow$ $\quad \quad +OP$ $\quad \quad \swarrow \quad \searrow$ $\quad \quad \quad Rh$	$Trans - Ra \xrightleftharpoons{(1)} 11 - Cis - Ra$ $\swarrow \quad \searrow$ $\quad \quad +OP$ $\quad \quad \swarrow \quad \searrow$ $\quad \quad \quad Rh$
	60	左 12	P 和漂白时程的点系曲线	P 和漂白时程的关系曲线
	60	右公式	$P + (P_0 - P)e^{-t/t_0P}$	$P + (P_0 - P)e^{-t/t_0P}$

* 系原稿有误