

氯化羟胺/盐酸胍裂解蜂毒的实验研究

★ 郑成峰¹ 万泱² 徐彭² (1.江西中医学院 2004 级中药班 南昌 330004;2.江西中医学院药学院 南昌 330004)

摘要:目的:研究氯化羟胺/盐酸胍裂解蜂毒的效果。方法:用氯化羟胺、氯化羟胺/盐酸胍两组溶液裂解蜂毒,以溶血实验检测反应后的溶液与新配制的蜂毒溶液的溶血活性,最后进行比较。结果:氯化羟胺/盐酸胍裂解蜂毒溶液的溶血活性明显弱于新配制的同样浓度的蜂毒溶液的溶血活性。讨论:氯化羟胺/盐酸胍溶液裂解蜂毒时破坏了磷脂酶 A₂。

关键词:蜂毒;蜂毒肽;磷脂酶 A₂;氯化羟胺;溶血活性

中图分类号:R 285.5 **文献标识码:**A

蜂毒在临床上被用于治疗风湿性疾病、类风湿性疾病、高血压、哮喘、多发性硬化病、艾滋病等,其治疗范围十分广泛^[1]。但蜂毒传统的使用方法,活蜂注射和蜂毒注射剂注射对患者都存在很大的副作用,并阻碍了其使用的推广。其原因是蜂毒中存在磷脂酶 A₂ (PLA₂) 等过敏原。蜂毒中的蜂毒肽(melittin)约占蜂毒干重的 50%,是蜂毒中主要发挥作用的物质,它具有抗菌、抗病毒、消炎、抗辐射等作用^[2]。因此,从蜂毒中提取蜂毒肽就显的十分有必要。而目前用柱色谱又很难将蜂毒肽和磷脂酶 A₂ 分开,这是因为在溶液中蜂毒肽主要以四聚体的形式存在,而四聚体的大小与磷脂酶 A₂ 相似,同时它们都有强碱性和疏水性^[3]。本论文探讨的是一种既能破坏掉磷脂酶 A₂,又能保留蜂毒肽的裂解蜂毒的方法。

1 材料

1.1 试剂

蜂毒(为意蜂工蜂的蜂毒,由浙江缙云县养蜂场购进)、氯化羟胺(分析纯,国药集团化学试剂有限公司生产)、盐酸胍(含量:99%;北京钧尧伟业生物技术公司生产)、CHES 缓冲液(北京钧尧伟业生物技术公司生产)、氯化钠(分析纯,上海南汇彭镇化工厂生产)、氢氧化钠(分析纯,广州市珠海区华安化工厂生产)、三(羟甲基)氨基甲烷(以下简称“Tris”分析纯,天津市福晨化学试剂厂生产)、盐酸(分析纯,含量:36%~38%,广东光华化学厂有限公司生产)。

1.2 仪器

PL203 电子天平(实际分度 0.001g,梅特勒托利多仪器上海有限公司生产)、HH—S 精密恒温水浴锅(中国江苏金坛市医疗仪器厂生产)、0412 1 离心机(上海手术器械厂生产)

1.3 动物

家兔(取血用,由江西中医学院实验动物中心提供)。

2 方法与结果

2.1 化学裂解

2.1.1 实验前准备 参考文献^[4],配制氯化羟胺裂解缓冲液(以下简称“Ⅰ溶液”)和 10mmol/L Tris-Cl(pH8.0),150 mmol/L NaCl 溶液(以下简称“Ⅱ溶液”)备用。称取 4 份等量的蜂毒和 3 份等量的盐酸胍备用。

2.1.2 水浴反应 用 4 支试管,按表 1 中的剂量分别配制 A、B、C、D 四组溶液,并将其放在 45℃ 的恒温水浴锅中反应 24h。取出,放入 5℃ 的冰柜中储存备用。

表 1 进行水浴反应的四组溶液配制组分

编号	Ⅰ溶液/ml	Ⅱ溶液/ml	蜂毒/mg	盐酸胍/g
A	5	5	200	0
B	5	5	200	5.730、
C	5	5	0	0
D	5	5	0	5.730

2.2 溶血实验

2.2.1 实验前准备 配制生理盐水备用;取兔血离

心(1000r/min, 5min, 3次), 用其红细胞配制2%的红细胞悬液备用; 配制E溶液(含5 ml I溶液、5 ml II溶液和200 mg 蜂毒)备用; 配制F溶液(含5 ml I溶液、5 ml II溶液、200 mg 蜂毒和5.730g 盐酸胍)备用。

2.2.2 溶血实验 用生理盐水把A、B、E、F四种溶液各稀释成4种不同的浓度。各取等量稀释后的溶液, 使加入等量的2%红细胞悬液(蜂毒浓度如表2所示), 1h后观察溶血结果。

表2 不同蜂毒浓度的溶血实验结果

组别	稀释后的溶液 /ml	红细胞悬液 /ml	蜂毒浓度 /g·ml ⁻¹	溶血结果
A1	2.5	2.5	4×10^{-5}	溶血
A2	2.5	2.5	2×10^{-5}	溶血
A3	2.5	2.5	1×10^{-5}	不溶血
A4	2.5	2.5	0.5×10^{-5}	不溶血
B1	2.5	2.5	4×10^{-5}	溶血
B2	2.5	2.5	2×10^{-5}	不溶血
B3	2.5	2.5	1×10^{-5}	不溶血
B4	2.5	2.5	0.5×10^{-5}	不溶血
E1	2.5	2.5	4×10^{-5}	溶血
E2	2.5	2.5	2×10^{-5}	溶血
E3	2.5	2.5	1×10^{-5}	不溶血
E4	2.5	2.5	0.5×10^{-5}	不溶血
F1	2.5	2.5	4×10^{-5}	溶血
F2	2.5	2.5	2×10^{-5}	溶血
F3	2.5	2.5	1×10^{-5}	溶血
F4	2.5	2.5	0.5×10^{-5}	不溶血

取等量的C溶液、D溶液、生理盐水、蒸馏水, 各加入等量的2%红细胞悬液做溶血实验对照组。1h后观察溶血结果, 具体情况见表3。

表3 溶血实验对照组各组组成及溶血结果

组别	红细胞悬液 /ml	C溶液 /ml	D溶液 /ml	生理盐水 /ml	蒸馏水 /ml	溶血结果
C溶液组	2.5	2.5	0	0	0	不溶血
D溶液组	2.5	0	2.5	0	0	不溶血
生理盐水组	2.5	0	0	2.5	0	不溶血
蒸馏水组	2.5	0	0	0	2.5	溶血

3 分析与讨论

据资料^[5], 氯化羟胺或氯化羟胺/盐酸胍可以裂解蛋白质中的天冬酰胺-甘氨酸键(ASN-GLY)。蜂毒肽由26个氨基酸组成, 其序列如下: NH₂-GLY-ILE-GLY-ALA-VAL-LEU-LYS-VAL-LEU-THR-THR-GLY-LEU-PRO-ALA-LEU-ILE-SER-TRP-ILE-LYS-ARG-LYS-ARG-GLN-GLN-COOH。可以看出蜂毒肽中不存在天冬酰胺-甘氨酸键(ASN-GLY)。而磷脂酶A₂是由128个氨基酸组成, 其前15位的序列如下^[6]:

H₂N-ILE-ILE-TRY-PRO-GLY-THR-LEU-TRP-CYS-GLY-HIS-GLY-ASN-LYS-SER
1 5 10 12 13 15

由上图可以看出, 磷脂酶A₂的氨基酸结构中(12号与13号氨基酸之间)存在天冬酰胺-甘氨酸键(ASN-GLY)。依上述理论, 该实验裂解反应时能保留蜂毒肽, 而破坏掉磷脂酶A₂及其他也含有天冬酰胺-甘氨酸键的蛋白质和多肽。

蜂毒有很强的溶血活性, 其溶血成分主要为蜂毒肽和磷脂酶A₂, 并以蜂毒肽的溶血作用最强。蜂毒肽溶血的作用机理是胶体渗出性溶血, 即蜂毒肽使红细胞壁通透性增强, 细胞内胶体大量渗出, 红细胞因内部渗透压降低而破裂^[7]。磷脂酶A₂不能直接作用于细胞壁脂类, 而要靠蜂毒肽的协同作用, 或与底物复合后, 依靠底物接近细胞使之溶解, 产生溶血现象^[8]。对照组实验中的C溶液组、D溶液组均不溶血, 说明用来裂解蜂毒的溶液本身不具有溶血活性。实验组中的E溶液组和F溶液组, 为新配制的蜂毒溶液未经水浴反应, 它们的溶血活性最强, 所以它们之中必定既含有蜂毒肽, 又含有磷脂酶A₂; 比较A溶液组与E溶液组, 它们的溶血活性相同, 由此可以断定A溶液在裂解反应时既没有破坏蜂毒肽也没有破坏磷脂酶A₂; 比较B溶液组与F溶液组, B溶液的溶血活性比F溶液的溶血活性明显要弱, 由此可以断定B溶液在裂解反应时保留了蜂毒肽, 但破坏了磷脂酶A₂。

综合上述, B溶液即含有氯化羟胺/盐酸胍的溶液裂解蜂毒时既能破坏磷脂酶A₂及其他也含有天冬酰胺-甘氨酸键的蛋白质和多肽, 又能保留蜂毒肽。此方法操作简便、安全可靠, 为从蜂毒中提取蜂毒肽指明了一条新的途径。

参考文献

- [1] 夏隆江. 蜂毒的现代药理研究及临床应用概况[J]. 四川生理科学杂志, 2005, 27(3): 133.
- [2] 王关林, 邢卓. 蜂毒肽的研究及展望[J]. 辽宁师范大学学报(自然科学版), 2005, 28(1): 87.
- [3] 李大力, 王关林, 方宏筠. 蜂毒溶血肽的研究进展[J]. 中国现代应用药学杂志, 2003, 20(2): 115.
- [4] [美] F M 奥斯伯主编. 马学军译校. 精编分子生物学实验指南[M]. 第4版. 北京: 科学出版社, 2005: 707, 983.
- [5] [德] R M 坎普主编. 施蕴渝. 蛋白质结构分析: 制备、鉴定与微量测序[J]. 北京: 科学出版社, 2000: 45.
- [6] 陈远聪, 袁士龙. 毒素的研究与利用[J]. 北京: 科学出版社, 1988: 128-142.
- [7] 刘红云, 童富淡. 蜂毒的研究进展及其临床应用[J]. 中药材, 2003, 26(6): 456.
- [8] 李英华, 胡福良, 刘艳荷. 蜂毒过敏原磷脂酶A₂[J]. 生命化学, 2001, 21(4): 300-301.

(收稿日期: 2007-01-09)