

海葵的蛋白毒素

于 力

(山东省海洋药物科学研究所)

海葵属腔肠动物, 常见于大潮退后礁石间的浅水洼里, 也有些品种生活在深海或埋入较深的沙层中, 在太平洋和印度洋热带区域的海葵常常生活在珊瑚礁中。海葵的身体呈圆筒状, 口盘周围生有许多触手, 当触手伸展时, 象一朵朵小菊花。海葵体重大小不一, 小到几克, 大到上斤。当触手受到刺激时立即缩成一团并放出毒素, 一些弱小的海洋生物则因毒素引起麻痹而被捕食。在海葵的触手和肠系膜细丝中含有刺胞毒, 通称为海葵毒素。海葵毒素除极少部分属非蛋白质外(如沙海葵毒素), 绝大部分均属蛋白毒素, 其中又以多肽的形式为主。这些毒素有着广泛的生物活性, 目前对海葵蛋白毒素研究主要在三方面。一是在搞清这些毒素一级结构的基础上, 找出其活性片断, 或进行一定的化学修饰, 从而探讨结构与功能的关系。二是在研究其药理学性质的基础上, 寻找有药物价值的活性物质。三是将海葵毒素做为研究膜特性和神经生理的重要工具。现将部分海葵的蛋白毒素及其性质做一简要的介绍。

一、槽沟海葵

从槽沟海葵中分离出三个具有神经毒和心脏毒的多肽, 即 ATX I、ATX II 和 ATX III。其分子量分别为 4702 (46 个氨基酸)、4770 (47 个氨基酸) 和 2678 (27 个氨基酸)。N-端分别为甘氨酸、甘氨酸和精氨酸。分子内含有较多的二硫键, 因此分子结构比较紧密, 三种毒素的氨基酸排列顺序如下:

ATX I $\text{GA}^{\text{P}}_{\text{A}}\text{CLCKSDGPNTRCNSMSGTI-}$
 $\text{WVFGCPSGWNNCEGRAIIGYCC-}$
 KQ

ATX II $\text{G}^{\text{I}}_{\text{V}}\text{PCLCDSGPSVRGNTLSGHIW-}$
 $\text{LAGCPSGWHNCKKHGPTIGWCC-}$

KQ

ATX III $\text{RSCCPCYWGGCPWQNCYPEGG-}$
 SGPKV

ATX II 类似于眼镜蛇的神经毒, 在肽链中间有一色氨酸残基, 这是一个与毒性有关的残基; 在 ATX I 和 ATX II 中, 精氨酸-14 用环己二酮处理后, 便破坏了毒性, 当用 BNPS-Skaol 处理 ATX II 的色氨酸残基时, 其毒性也几乎全部消失。ATX II 有很高的表面活性, 并对磷脂酶 A₂ 有一个强的增效作用。ATX I 和 ATX II 对小鼠静脉注射的 LD₅₀ 分别为 7.7 及 0.31 mg/Kg。

ATX 在极低的浓度下对钠通道有高度专一的亲和力, 现已成为研究兴奋膜的一个重要工具, 用以研究兴奋膜中钠通道的特性、极化和去极化机制及离子通过的方式。以 ATX II 对神经肌肉接头的肌膜电位的试验表明, ATX II 在 10^{-7} — 3.2×10^{-6} M 的浓度下, 对离体隔膜的小终板电位频率随剂量增加而增加, 同时发生肌膜的去极化作用。这种去极化作用可被洗涤而慢慢恢复, 并可被河豚毒素所抑制, 但 ATX II 所引起的去极化作用不被 d-筒箭毒碱所抑制。对正常和去神经的离体趾长伸肌, ATX II 能减少其膜电位并产生收缩活性。以 ATX II 对兔正常的和去神经的骨骼肌的作用机制和生理效应也进行过研究, 当 ATX II (10^{-8} — 10^{-6} M) 加到兔的偏隔膜制剂中时, 能加强和延长直接或间接引起的颤搐反应; 同时增加了制剂的静息期涨力, 这种静息期涨力的增加不被箭毒碱所阻止, 但可被河豚毒素所恢复。ATX II 对哺乳动物的心脏有显著的正心肌收缩效应, 其作用与钙-结合磷脂和 Na/K-ATP 酶无关。

二、长海葵和黄海葵

从长海葵中分离出两种海葵多肽, 即海葵

毒素A (AP-A) 和海葵毒素B (AP-B)。从黄海葵中分离出第三种海葵多肽, 即海葵毒素C (AP-C)。AP-A和 AP-C 分别由49个和47个氨基酸组成, AP-A的分子量为5500。这两种多肽在结构上与ATX II极为相似。其氨基酸排列顺序如下:

AP-A GVSCLCSDGPSVRGNTLSGTLW-
LYPSGCPGWHNCKAHGPTIGW-
CCKQ

AP-C GVPCICDSDGPSVRGNTLSGILW-
LAGCPGWHNCKAHGPTIGWCC-
KQ

AP-A、AP-B 和 AP-C 都有相同的强心作用, 其强心活性是箭毒甙的200—1000倍。在Norton的文章中指出, AP-A对多种动物的在体或离体心脏都有强烈的正心肌收缩效应, 但不影响心率。进一步的药理学作用研究证明, 其作用机制不影响肾上腺素能系统, 对血管组织无影响, 即不影响血压。认为细胞间钙的转移量高于钙通过肌纤维膜流入量可能是 AP-A 的作用机制。Kodama的实验指出, AP-A ($5 \times 10^{-9}M$, $1 \times 10^{-8}M$) 能引起离体兔心肌动作电位持续时间 (APD) 的延长和收缩力的加强。在2.0—0.2赫兹的频率范围内, AP-A 可增加APD的延长和正心肌收缩效应。当AP-A 处于一个非常低的频率下 (0.017赫兹) 便不再增加收缩, 但能引起明显的APD延长。离体心肌在较低的频率下 (0.02赫兹), 甚至在钙对抗物的存在下, AP-A 的正心肌收缩效应也还能较好的维持。河豚毒素和利多卡因能显著的抑制AP-A对APD的延长和正心肌收缩效应。当在ryanodine的存在下, 阻止了钙从细胞内活化池 (activator pool) 的释放, 结果AP-A 便失去了正心肌收缩效应; 但APD仍有明显的延长。以上结果提示了AP-A 对心肌的作用是通过加快钠的内流而间接实现的。

AP-B 可通过肾上腺素能神经末梢释放去甲肾上腺素的间接作用而使血管有节奏的收缩。AP-B 是刺激血管释放去甲肾上腺素的最有效的物质。这种作用可被河豚毒素所消除,

AP-B 还能刺激胆碱能神经末梢释放乙酰胆碱。

三、*Aiptasia pallida*

A. pallida 的刺丝囊毒对红细胞膜磷脂显示了磷脂酶A活性, 从中提取的磷脂酶A可转换四种膜磷脂为各自的溶血衍生物, 即为水溶性的磷化物。毒中磷脂酶A对膜磷脂的水解程度可以直接测定磷脂成分的减少或测可溶性磷化物中溶血卵磷脂的增加。后经DEAE-纤维素柱层析将具有磷脂酶A活性的部分分为四个组份, 即I、II、III、IV, 组份III和IV具有磷脂酶A活性, 能微弱地溶解红血球。组份I和II无磷脂酶A活性, 但能明显地增加III和IV的溶血活性。组份I类似于蛇毒和蜂毒的直接溶血因子。组份I和III一起能发挥最高的溶血活性 (表1); 两者对完整的红细胞的作用见表2。目前认为该刺丝囊毒的溶血机制可分为两个阶段: 第一阶段是膜被刺丝囊毒的直接溶血因子所改造, 使其易被刺丝囊毒的磷脂酶A所作用。第二阶段是刺丝囊毒磷脂酶A对红细胞膜磷脂的作用, 这里仅仅是水解膜的磷脂, 而对膜的溶解是不充分的, 溶解是直接溶血因子对被改造了的红细胞膜的进一步作用而实现的。钙离子对以上两种作用是必需的; 而蔗糖能使其溶血活性下降。

最近发现 *A. pallida* 的刺丝囊毒能使兔子产生一种特异性的抗体, 已被血清学实验所证明。

四、*Actinia equina* 和 *A. cari*

从 *A. equina* 中分离出一个电泳均一的蛋白毒素——equinatoxin。此蛋白呈强碱性, 等电点为12.5, 分子内含有较多的门冬氨酸, 没有半胱氨酸, N-端为丝氨酸。分子量约为20,000, 每个蛋白分子是由147个氨基酸残基组成的。该毒素用溴化氰切割其肽链获得了4个多肽, 这四个多肽不显示毒性, 分子量均在5,000以上。圆二色性测定研究指出, 这个分子内含有约30—40%的 α 螺旋, 其中仅有6个脯氨酸。以上事实得出这样一个结论: 非共价键维持了这个分子的活性。该毒素对小鼠静脉

表 1 非溶血组份 I 和 II 对组份 III、IV 溶血作用的增强

组 份 ^a	I	II	III	IV	I + II	I + III	I + IV	II + III	II + IV	III + IV
溶血速度 ^b	0	0	19	11	0	85	35	45	13	15
增加 (%)	—	—	—	—	0	347	218	79	18	0

a. 每个毒性组份均采用相等的量 (0.25 μ g/ml)

b. 溶血速度的测定是在570nm下观察每分钟吸收值的变化。

表 2 组份 I 和 III 对完整的红细胞膜的作用

磷 脂	未处理	组 份 I		组 份 III		组份 I + III	
	(%P)	(%P)	(Δ P)	(%P)	(Δ P)	(%P)	(Δ P)
卵磷脂	45.0	46.8	1.8	43.1	-2.0	25.9	-19.1
磷脂酰乙醇胺	21.3	22.8	-0.3	22.3	-0.8	11.6	-11.5
磷脂酰丝氨酸	11.7	12.0	0.3	11.9	0.2	5.6	-6.1
磷脂酰肌醇	4.4	3.3	-1.1	4.2	-0.2	3.1	-1.3
(神经)鞘磷脂	10.3	10.4	0.1	10.9	0.6	9.2	-1.1
溶血卵磷脂	2.1	2.7	0.6	3.7	1.6	9.9	7.8
溶血磷脂酰乙醇胺	0	0	0	0	0	2.8	2.8
溶血磷脂酰丝氨酸	0	0	0	0	0	0.6	0.6
磷脂的总变化	0		0.7		-2.7		-38.1
溶血磷脂的总变化	0		0.6		1.6		11.2
伴随溶血的百分率	5.0		5.2		8.2		70.3

注射的LD₅₀为33.3 μ g/Kg。在80 $^{\circ}$ C下加热15分钟毒性仅有微弱的下降,100 $^{\circ}$ C下加热15分钟活性完全消失。胃蛋白酶和胰蛋白酶可使其水解而丧失活性。

equinatoxin 对红细胞和癌细胞有显著的溶解作用。毒素在 1×10^{-10} M的水溶液中就会引起全溶血,溶血活性的最适pH为8.8。对溶血活性和各种离子的关系进行了实验,当浓度为10mM时,Ca²⁺对溶血的刺激作用最强。与对照相比, Ca²⁺的刺激倍数为2.6, Mg²⁺为2, Ba²⁺为1.7; Li 和 EDTA 能减少溶血活性30%,而Sn²⁺和Mn²⁺则无影响。虽然上述几种离子能刺激毒素的溶血活性,但这些离子对毒素与红细胞膜的结合并不是必需的。离子对溶血速度的加快是由于膜磷脂物化性质的改变所致。

从 *A. equina* 中提取的粗毒能引起蛙腹直肌的显著收缩。

从 *A. cari* 中分离出三种溶血致死毒素 (CT I、CT II、CT III), 室温下三种毒素在 pH 3—8 的范围内都是稳定的。CT I 的分子量约为20,000—25,000,等电点为10.7,三种毒素皆为碱性蛋白。CT I 对小鼠静脉注射的LD₅₀为22 μ g/Kg,并具有高的溶血活性,其活性可被鞘磷脂有效而不可逆地抑制。 β -巯基乙醇和二硫苏糖醇不影响其溶血活性,但很大程度上能影响毒素的产量。

五、*Bolocera tuediae*

这是一种大海葵,体重10—500克,其肠系膜细丝和触手的刺丝囊中含有能致死小鼠和溶解人红血球的蛋白毒素。肠系膜细丝毒能加速人的全血凝固,并能引起皮下出血和皮肤起

表3 触手刺丝囊毒和肠系膜细丝毒的药理学活性比较¹⁾

肠系膜细丝毒					触手毒	
蛋白 (mg/ml)	凝固因子的 凝固时间 (秒)	溶血 (630 O.D)	皮下坏死 (直径mm)	起泡 (直径mm)	蛋白 (mg/ml)	溶血 (630 O.D)
2.62	0	1.20	7	8	2.34	0.48
1.31	—	—	3	5	1.67	0.22
0.26	0	1.71	0	0	0.78	0.24
0.09	45	0.45	0	0	0.57	0.22
0.05	45	0.20	0	0		
0.04	120	0.28	0	0		
0.03	180	0.22	0	0		
盐水	300	0.22			盐水	0.22
蒸馏水	—	1.20			蒸馏水	1.20
水					水	

1) 在溶血比色分析中, 毒、蒸馏水、水和盐均用0.3ml的体积; 在加速凝固、皮下坏死和起泡的检验中, 盐和毒均注射0.1ml。

泡。两种毒素中含有碱性蛋白酶、酸性蛋白酶及氨基酸酯酶。触手毒中还含有ATP酶、ADP酶和AMP酶。

肠系膜细丝毒(0.03mg/ml蛋白)在pH 6.4的磷酸缓冲液中, 能抑制20个单位的肝素对1ml全血的抗凝作用(表3)。该毒素经蒸馏水透析后仍有活性, 其凝固作用亦不受EDTA的影响, 但不能凝固加入草酸盐的血液。肠系膜细丝毒引起皮下坏死和皮肤起泡的剂量阈值是1.31mg(表3)。起泡活性是不耐热的, 而致死活性则对热有很强的抵抗力。毒素的起泡、皮下坏死、凝固和溶血作用都不被胰蛋白酶所破坏。

六、*Condylactis gigantea*和*C. aurantiaca*

*C. gigantea*是一种常见的大型海葵, 触手的刺丝囊中含有能使甲壳类麻痹的水溶性蛋白毒素。部分纯化的毒素干粉在-15°C的真空贮藏14个月活性不变。初步纯化的毒素可被蛋白酶水解而失活。对蒸馏水透析, 毒蛋白可发生可逆性沉淀; 而对中性缓冲液透析, 毒性可丧失30—90%。振荡也会引起部分失活。该毒素的分子量在10,000—15,000之间, 是一种不稳定的碱性蛋白。

从*C. aurantiaca*中分离出四种多肽毒素, 即毒素I、II、III、IV, 这四种毒素各含有49—51个氨基酸, 分子量5400—5630, 四种多肽的N-端皆为甘氨酸。都是很强的神经毒, 特别是对甲壳类。对蟹的LD₅₀在2—6.6 μg/Kg的范围内。从这种海葵中还纯化出一个细胞溶素, 这种细胞溶素的毒性相对是比较低的, 小鼠静脉注射的致死剂量高于2.5mg/Kg。对接种艾氏腹水癌小鼠的存活期有明显的延长作用。实验组小鼠的存活期长达65天, 而对照组平均只有21天。说明该细胞溶素对癌细胞有一定的溶解作用。

七、*Metridium senile*

从*M. senile*的刺丝囊中分离出一种细胞毒素, 该毒素可被二硫苏糖醇所活化, 其活性与二硫键有关, 并可被低浓度的胆固醇所抑制。该毒素的溶血机制被认为是毒蛋白与膜胆固醇形成了一个复合物, 从而引起胆固醇的转移或封闭, 以此导致细胞的溶解。从*M. senile*中还纯化出一种能水解4-硝基苯磷酸(4-NPPP)的酯酶, 此酶不具有5'-核苷酸酶活性和磷酸单酯酶活性。被EDTA失活之后加入Zn²⁺可恢复其活性。硫醇试剂和苯甲基磺酰氟对其活性无影响; 而二硫苏糖醇却能使失活。从氨乙

基磷酸 (AEP) 是 4-NPPp 的竞争性抑制剂来看, 此酶可能具有 AEP 磷酸单酯酶活性。

八、*Stoichatis helianthus*

从 *S. helianthus* 中分离出一个蛋白毒素, 并纯化为一个单一的成分, 分子量为 16,000, 等电点为 9.8, 分子中含有 3.7% 的碳水化合物。该毒素对多种动物的红细胞都有强的溶血作用, 其敏感顺序是: 猫 > 兔 > 羊 > 狗 > 鼠 > 人 > 马 > 豚鼠。体外实验证明该毒素还能溶解兔子的血小板和培养的人成纤维细胞。毒素的溶血活性可被鞘磷脂专一的抑制。所以认为毒素的受体就是膜磷脂。这一观点又被以下发现所支持: 当酶破坏了膜鞘磷脂后, 就妨碍了红细胞膜对溶血作用的抵制, 即红细胞膜失去了对毒素溶血作用的抵抗。目前认为该毒素的溶血机制是由于毒素对磷脂的特殊亲和力而使膜鞘磷脂发生位移所致。伴刀豆球蛋白可使该毒素发生沉淀, 从而使毒素失去活性。

九、*Rhodactis howesii*

这种海葵煮熟可供食用, 但活体却有剧毒。其毒性成分是不耐热和非透析性的, 可被胰蛋白酶所失活, 推测该毒素是蛋白或多肽。粗毒中含有神经毒、溶血因子和抗凝组份。该

毒素不具有胆碱酯酶和蛋白水解酶活性。其神经毒和溶血因子均对热不稳定, 而抗凝组份却对热有很强的抵抗力。

粗毒首先作用于中枢神经系统, 误食后意识很快消失, 接着出现麻痹, 严重时可导致死亡。有人将粗抽提物的血浆凝固时间与肝素进行了对比, 700 μg 干重的粗抽提物与 3.3 μg 的肝素比较, 其凝固时间比肝素延长了十倍。进一步的实验证明其抗凝机制与钙系统无关。

十、*Tealia felina* (L.)

从 *T. felina* 中分离出一个蛋白毒素, 该毒素很不稳定, 反复冰冻后活性很快降低, 在室温下仅在数小时内是稳定的, 一经搅动活性迅速下降。毒素的分子量为 12,000—14,000, 给小鼠静脉注射的 LD_{50} 为 69mg/Kg。毒素能抑制由组胺和乙酰胆碱引起的豚鼠迴肠收缩, 并具有溶血活性。抑制组胺作用的量效线性关系在 30—80Au 之间, 溶血活性在 5—40Au 之间。在 0.03Au/ml 的浓度下就能减少由乙酰胆碱引起的豚鼠迴肠收缩, 比对组胺的抑制效应强。当浓度为 0.8Au/ml 时, 不能减弱由 5-羟色胺引起的收缩, 而能加强氯化钾引起的收缩效应。