

# 霞水母刺丝囊毒素溶血活性的稳定性研究

冯金华<sup>1,2</sup>, 于华<sup>1</sup>, 李荣锋<sup>1,2</sup>, 邢荣娥<sup>1</sup>, 刘松<sup>1</sup>, 李鹏程<sup>1</sup>

(1. 中国科学院海洋研究所, 山东青岛 266071; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

**摘要:**从霞水母 *Cyanea* sp. 中分离刺丝囊, 提取刺丝囊毒素(NV), 并研究了温度、pH 和几种化学组分对其溶血活性稳定性的影响。实验结果表明, 在 4~37℃ 范围内 NV 的溶血活性与温度变化密切相关, 毒素在 4℃ 以下几乎没有发生溶血反应, 在 37℃ 以下反应 45 min 以后, 溶血活性达到最大值; 毒素的溶血活性对 pH 敏感, 在 pH 7.8 时, 溶血活性最强, 溶血率为 93.53%。EDTA、NaCl 和还原型谷胱甘肽(GSH)对 NV 溶血活性都具有稳定作用。通过正交实验发现, GSH 对溶血活性的影响最大, 当提取液中含有 1.0 mmol/L GSH 和 5.0 mmol/L NaCl 时毒素的溶血活性最强。DTT(二硫苏糖醇)明显降低毒素的溶血活性, 说明毒素中溶血蛋白的活性很可能与分布在蛋白质表面的二硫键有关。Ca<sup>2+</sup> 虽然能够增强毒素的溶血活性但是对毒素并没有稳定作用, 所以 Ca<sup>2+</sup> 可能只是毒素溶血活性的活化剂。甘油对毒素的稳定作用不明显。

**关键词:**霞水母 *Cyanea* sp.; 刺丝囊毒素; 溶血活性; 稳定性

**中图分类号:** Q178.53

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-3096(2009)09-0049-08

水母(Jellyfish)是一类低等的浮游动物, 包括刺胞动物门 Cnidaria(腔肠动物门 Coelenterata)钵水母纲(Scyphozoa)的全部和水螅虫纲(Hydrozoa)的部分种类, 广泛分布于温带、亚热带及热带海域, 是沿海地区伤人动物中的一个重要类群<sup>[1]</sup>。水母通过触手上的刺丝囊发射刺丝注入毒液来捕食和进行防御。研究表明, 水母毒素不仅具有多种生物活性如心血管活性、溶血活性、肌肉毒性、神经毒性、酶活性、细胞毒性等<sup>[2~6]</sup>, 还具有独特的化学结构和特殊的药理作用机制, 是极具研究和开发价值的生物资源。但是由于水母种类的差别, 毒素的不稳定性(热不稳定性、蛋白质之间的相互结合及与介质之间的结合等)使得水母毒素的研究受到限制<sup>[7]</sup>。

霞水母是一种大型浮游生物, 中胶层较薄, 食用价值低。自 20 世纪末起, 东海南部至黄海、渤海水域连续发生霞水母爆发现象。因其繁殖、生长过程中分泌大量毒素, 大片海域海水遭受严重污染, 造成大量的海洋生物、微生物死亡, 对海洋渔业造成巨大负面影响<sup>[8]</sup>。

被霞水母蛰伤后, 往往引起严重的皮肤损伤, 伴有发热、震颤、刺痛, 皮肤刺痛后将伴随过敏或麻木。受伤皮肤成红斑、瘀斑、出血等荨麻疹斑块。同时, 还可伴有呼吸道症状和全身症状, 如剧烈咳嗽、呼吸困难, 甚至意识丧失<sup>[9]</sup>。

目前国内外对霞水母的研究主要集中在霞水母的形态结构、生活史、渔业生态学及对海洋渔业资源的危害等方面<sup>[10~13]</sup>, 对其毒素的研究还比较少。开展霞水母毒素的研究不仅有利于发现结构新颖独特

且具有特殊药理学活性的活性蛋白, 为霞水母资源的利用开拓新的途径, 也有利于对霞水母蛰伤的救治提供理论依据。作者提取了霞水母刺丝囊毒素(NV), 并研究了多种理化因素对其溶血活性的影响, 优化了霞水母刺丝囊毒素溶血活性的保存条件, 为进一步从霞水母刺丝囊毒素中分离溶血活性蛋白、研究其作用机理及药理奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 刺丝囊的分离

水母于 2006 年 8 月采自青岛第一海水浴场附近, 采集的样品由中国科学院海洋研究所高尚武教授鉴定为霞水母 *Cyanea* sp.。触手从水母伞盖处人工切除后, 立即于 -20℃ 冷冻保存, 备用。取部分冷冻保存的水母触手, 加入 4 倍体积的无菌海水, 放置在 4℃ 使触手自溶, 每 6 h 用玻璃棒轻轻搅拌 1 次, 每隔 1 天, 将容器上层溶液倒掉, 换上新鲜的海水。4 天后, 将上层溶液倒掉, 下层悬浊液通过滤筛(54 μm)过滤, 去除未溶解的触手组织和较大的组织碎片。收集滤液, 通过离心收集下层沉淀, 将沉淀重

收稿日期: 2009-04-02; 修回日期: 2009-05-10

基金项目: 山东省中青年科学家科研奖励基金项目(2006BS07003); 青岛市联合基金项目(08-1-3-51-jch)

作者简介: 冯金华(1981-), 女, 山东泰安人, 博士, 从事海洋活性物质的研究, E-mail: yuzhudeyun1981@163.com; 李鹏程, 通信作者, 博士, 教授, 博士生导师, 电话: 0532-82898707, E-mail: pcli@qdio.ac.cn

新悬浮在 0.9% NaCl 溶液中,13 000 r/min 离心 15 min,将上清液去掉,通过显微镜观察,离心管中的沉淀上层大部分为破碎的刺丝囊和触手组织碎片,用小勺轻轻将沉淀上层去除,底层的沉淀重新用 0.9% NaCl 溶液悬浮,13 000 r/min 离心,直到刺丝囊干净为止。然后将沉淀重新用 0.9% NaCl 溶液悬浮后在 5 000 r/min 离心 15 min,3~4 次后,将沉淀用蒸馏水悬浮洗涤,在 -20℃ 下冷冻后,冷冻干燥,-20℃ 保存,备用。

### 1.2 刺丝囊毒素的提取

用珠磨式组织研磨器破碎刺丝囊,在小型破碎管中,加入 1/2 体积的 0.5 mm 的玻璃珠,然后加入一定量冷冻干燥的刺丝囊,用 Tris-HCl 缓冲液 (50 mmol/L, pH 7.8) 浸没。在 4 600 r/min 下震荡破碎,每次 1 min,每次破碎之前,将破碎管在冰水中预冷至少 1 min,破碎 4~5 次后,将破碎液用胶头滴管转移入离心管中,在 13 000 r/min,4℃ 下高速冷冻离心 15 min,收集上清液,即为 *Cyanea* sp. 刺丝囊毒素(NV)。

### 1.3 红细胞的制备

红血球的制备参考李建武等<sup>[14]</sup>的方法,将新鲜鸡血收集在含有抗凝剂的容器中,每 6 mL 血液中加入 1 mL 肝素-pH 7.4 等渗 Tris-HCl 缓冲液。将血液于冷冻离心机中离心 20 min(4℃, 3 000 r/min),使红细胞沉淀。用吸管吸尽血浆及沉淀的红细胞表面的绒毛状沉淀层,加入 3 倍量预冷的 pH 7.4 等渗 Tris-HCl 缓冲液,用玻璃棒缓慢地搅拌悬浮,离心 15 min(4℃, 5 000 r/min),除去上清液及沉淀表层,重复洗涤 3 次。将制得的红细胞配制成体积比为 1% 的红细胞溶液。

### 1.4 数据分析

所有数据均采用 SAS 统计软件进行分析处理,计量资料采用平均值±SD 表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同温度对 NV 溶血活性的影响

溶血活性的测定参考 Rottini 等<sup>[15]</sup>的方法,取 0.5 mL 的红细胞悬浮液,加入 0.5 mL 不同的毒素样品,再加入 pH7.4 等渗 Tris-HCl 缓冲液使总体积为 5 mL。将上述溶血活性的反应体系分别在 4, 25, 37℃ 下放置不同时间 (5, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120 min) 后,离心 15 min (4℃, 3 000 r/min)。以未加毒素管为参比,低渗的水为 100% 溶血。在 414 nm 处测定上清液的吸光度。根据实验结果确定溶血活性的最佳测定条件。

由图 1 可见,培育温度对毒素的溶血活性影响

较大,表现出明显的温度相关性。在图 1 所示的 3 种温度下,随着温度的升高,NV 的溶血活性增强。在 4℃ 下,毒素基本不产生溶血作用,即使将培育时间延长至 120 min,仍然没检测到溶血活性。在 25℃ 和 37℃ 下,毒素都表现出明显的溶血活性。培育相同的时间,毒素在 37℃ 比在 25℃ 表现出更强的溶血活性。随着反应时间的延长,25、37℃ 温度组的溶血活性的差别越来越小。在 37℃,毒素的溶血活性在 45 min 后达到最大值,随着时间的继续延长,溶血活性基本不变。所以毒素溶血活性的大小可以通过测定毒素与红细胞在 37℃ 下培育 45 min 后释放出的血红蛋白的量来确定。

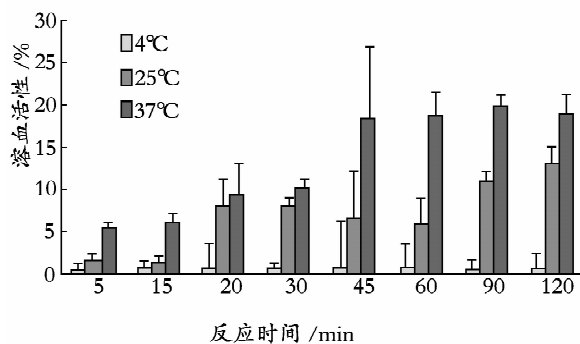


图 1 温度对 NV 溶血活性的影响

Fig. 1 The effect of temperature on the hemolytic activity of NV

### 2.2 pH 对 NV 溶血活性的影响

将 NV 用醋酸缓冲液调至不同的 pH 值 (8.63, 7.8, 7.0, 6.5, 5.0, 3.5), 在 4℃ 下放置 20 min 后,取适量的 NV 溶液加入到溶血活性的反应体系中,测定不同的 pH 对溶血活性的影响。

如图 2 所示,pH 对毒素溶血活性具有明显的影响。在弱碱性环境中,毒素溶血活性较强。在 pH 8.63 和 pH7.8 毒素的溶血活性分别为 83.85% 和 93.53%。随着 pH 的降低,毒素的溶血活性降低:在 pH 5.0 毒素溶血活性降为 40.48%;在 pH3.5,毒素的溶血活性基本消失,降为 4.29%。由以上结果可知:毒素在 pH8.63~5 时稳定性较强,最佳稳定 pH 位于 7.8 附近。

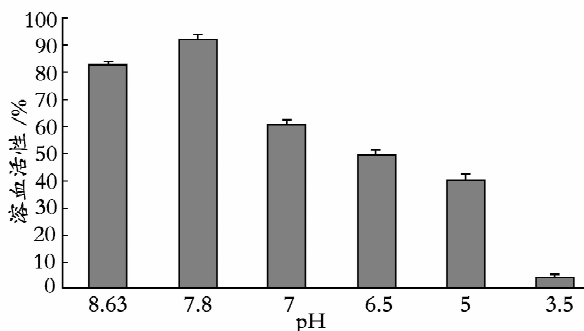


图 2 pH 对 NV 溶血活性的影响

Fig. 2 The effect of pH on the hemolytic activity of NV

### 2.3 DTT 对 NV 毒素溶血活性的影响

将 DTT(二硫苏糖醇)用 Tris-HCl 缓冲液配制成 100 mmol/L,取不同的量加入到毒素溶液中使毒素中的 DTT 浓度分别为 0.25,0.5,0.75,1.0,3.0,5.0,10.0,30.0,50.0 mmol/L,在 4℃ 下放置 30 min 后,测定各样品的溶血活性。

如图 3 所示,DTT 明显抑制毒素的溶血活性。当 DTT 的浓度为 0.25~1 mmol/L 时,随着 DTT 浓度的升高,毒素的溶血活性急剧降低。当毒素中 DTT 的浓度为 1 mmol/L 时,与毒素作用 30 min 后,毒素的溶血活性从 53.63% 降至 11.65%。

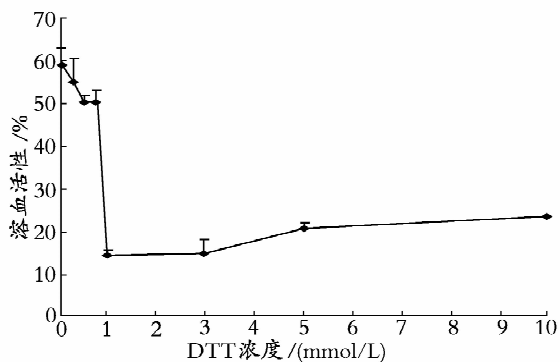


图 3 DTT 对 NV 溶血活性的影响

Fig. 3 The effect of DTT on the hemolytic activity of NV

### 2.4 GSH 对 NV 溶血活性的影响

将 GSH(还原型谷胱甘肽)用 Tris-HCl 缓冲液配制成 25 mmol/L,取不同的量加入到毒素溶液中,使毒素中的 GSH 浓度分别为 0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0 mmol/L,在 4℃ 下放置 3 d 后,测定各样品的溶血活性。如图 4 所示,NV 中加入一定量的 GSH 对溶血活性具有一定稳定作用。在 4℃ 放置 3 d 后,不含 GSH 的毒素的溶血率为 47.45%,而含 1.0 mmol/L GSH 的毒素的溶血率为 50.85%。在 0.5~1.5 mmol/L 条件下,GSH 对毒素溶血活性的稳定作用最明显,当 GSH 的浓度 > 2.5 mmol/L 时,毒素的溶血活性略有下降。

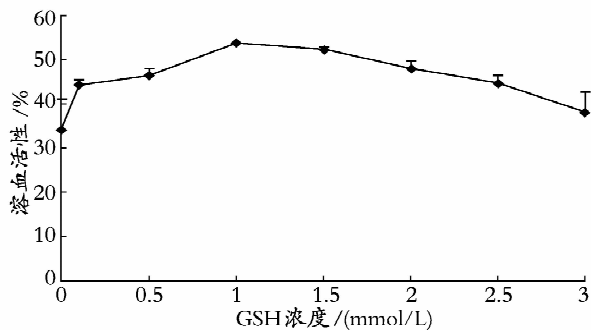


图 4 GSH 对 NV 溶血活性的影响

Fig. 4 The effect of GSH on the hemolytic activity of NV

### 2.5 EDTA 对 NV 溶血活性的影响

将毒素中分别加入不同浓度的 EDTA,使毒素中 EDTA 浓度分别为 0,0.5,1.0,1.5,2.0,2.5 mmol/L,4℃ 下保存 6 d 后,测定各样品的溶血活性。

实验发现,毒素中加入适量的 EDTA 对溶血活性具有稳定作用。如图 5 所示,添加 EDTA 的毒素样品比未添加 EDTA 的毒素样品的溶血活性强。不含 EDTA 的毒素样品溶血活性只有 47.45%,而含有 1.0 mmol/L 和 1.5 mmol/L EDTA 的毒素样品的溶血活性分别为 93.75% 和 87.75%。

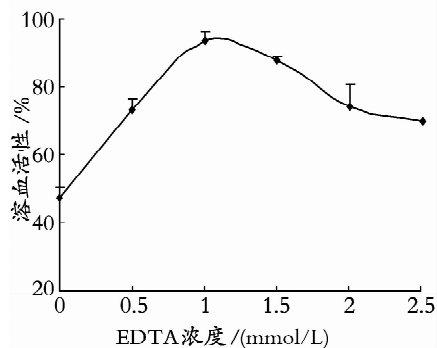


图 5 EDTA 对 NV 溶血活性的影响

Fig. 5 The effect of EDTA on the hemolytic activity of NV

### 2.6 NaCl 对 NV 溶血活性的影响

将毒素中分别加入不同浓度的 NaCl,毒素中的 NaCl 浓度分别为 0,1.0,5.0,10.0,15.0,20.0 mmol/L,4℃ 下保存 6 d 后,各样品表现出不同的溶血活性。如图 6 所示,不含 NaCl 的毒素样品的溶血率为 47.45%,而当毒素中 NaCl 浓度为 1 mmol/L 时,溶血率为 75.75%,当 NaCl 浓度升为 5 mmol/L 时,毒素的溶血活性迅速上升,达 93.85%。但当 NaCl 的浓度高于 10 mmol/L 时,NaCl 对毒素溶血活性的影响不大。所以毒素中添加适量的 NaCl 对毒素的溶血活性具有稳定作用。

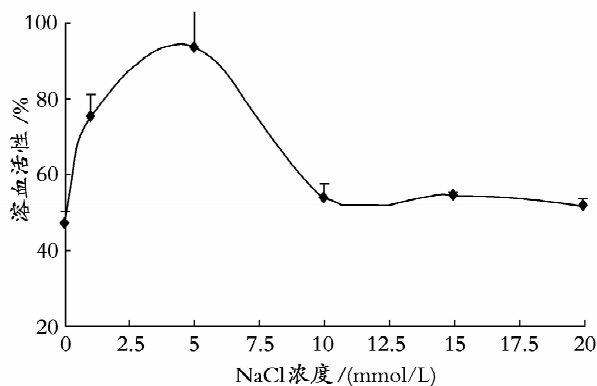


图 6 NaCl 对 NV 溶血活性的影响

Fig. 6 The effect of NaCl on the hemolytic activity of NV

## 2.7 甘油对 NV 溶血活性的影响

将甘油用 Tris-HCl 缓冲液配制成 25 mmol/L, 取不同的量加入到毒素溶液中, 使毒素中的甘油质量分数分别为 0, 0.5%, 1.0%, 2.0%, 3.0%, 4.0%, 5.0%, 在 4°C 下保存 6 d 后, 测定各样品的溶血活性。

甘油和多元醇不仅对蛋白质的非极性表面有很好的稳定作用, 还能诱导蛋白亚基的自我聚合并具有减轻器壁吸附和防冻的作用<sup>[16]</sup>。但是由图 7 所示, 甘油对 2 种浓度的 NV 样品都没有表现出明显的稳定作用。

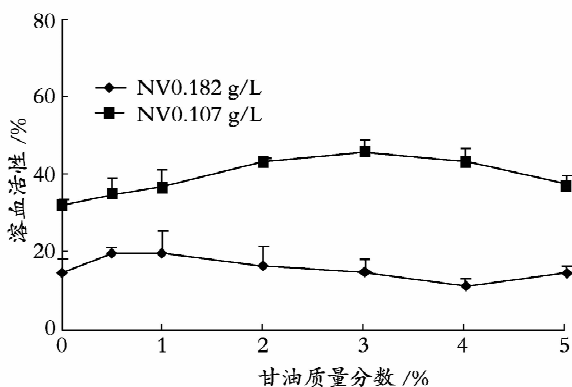


图 7 甘油对 NV 溶血活性的影响

Fig. 7 The effect of glycerin on the hemolytic activity of NV

## 2.8 Ca<sup>2+</sup> 对 NV 溶血活性的影响

将 Ca<sup>2+</sup> 用 Tris-HCl 缓冲液配制成 25 mmol/L, 取不同的量加入到毒素溶液中, 使毒素中的 Ca<sup>2+</sup> 浓度

表 1 正交试验安排表

Tab. 1 The experimental arrangement

试验号	因素		
	GSH	NaCl	EDTA
1	1(0 mmol/L)	1(0 mmol/L)	1(0 mmol/L)
2	1	2(4.0 mmol/L)	2(1.0 mmol/L)
3	1	3(5.0 mmol/L)	3(2.0 mmol/L)
4	1	4(6.0 mmol/L)	4(3.0 mmol/L)
5	2(0.5 mmol/L)	1	2
6	2	2	1
7	2	3	4
8	2	4	3
9	3(1.0 mmol/L)	1	3
10	3	2	4
11	3	3	1
12	3	4	2
13	4(1.5 mmol/L)	1	4
14	4	2	3
15	4	3	2
16	4	4	1

分别为 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mmol/L, 在 4°C 下保存 6 d 后, 测定各样品的溶血活性。

在以前的研究中发现, Ca<sup>2+</sup> 对 NV 的溶血活性具有活化作用。在本文中作者就 Ca<sup>2+</sup> 是否也可以作为毒素溶血活性的稳定剂进行了研究。如图 8 所示, 含有不同浓度 Ca<sup>2+</sup> 的两种浓度的毒素样品在 4°C 下放置 6 d 后, 与没有加入 Ca<sup>2+</sup> 的毒素样品相比, 溶血活性都没有增强。只有含 Ca<sup>2+</sup> 的毒素 NV(A) 的溶血活性略有升高, 可能是由于在溶血活性的检测中受 Ca<sup>2+</sup> 的活化作用的影响。

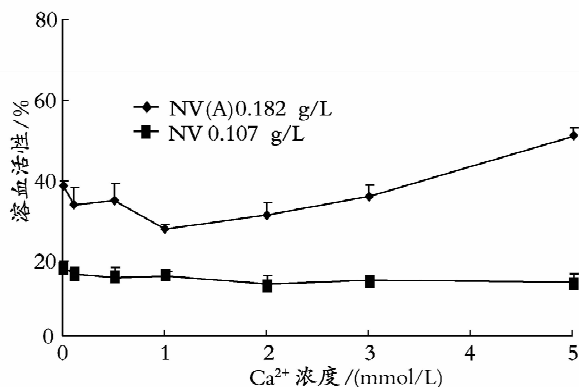


图 8 Ca<sup>2+</sup> 对 NV 溶血活性的影响

Fig. 8 The effect of Ca<sup>2+</sup> on the hemolytic activity of NV

## 2.9 正交试验

实验发现, 一定浓度的 GSH, NaCl, EDTA 对 NV 溶血活性都具有稳定作用, 设计三因素四水平试验(表 1), 确定溶血活性稳定存在的最佳条件。

通过正交试验发现(表 2),NV 在 4℃ 放置 6 d 后,提取液中含有 1.5 mmol/L GSH,5.0 mmol/L NaCl,0 mmol/L EDTA 时,毒素的溶血活性最强。不含上述任何保护剂时活性最小。在 3 个因素中,

GSH 对溶血活性的影响最高,多数含 GSH 的毒素样品的溶血活性明显高于未添加 GSH 的样品的溶血活性。在 3 种因素中,EDTA 对溶血活性的影响最小。

表 2 正交试验实验结果

Tab. 2 The experimental results

试验号	因素			溶血率(%)
	GSH	NaCl	EDTA	
1	1(0 mmol/L)	1(0 mmol/L)	1(0 mmol/L)	32.53
2	1	2(4.0 mmol/L)	2(1.0 mmol/L)	60.47
3	1	3(5.0 mmol/L)	3(2.0 mmol/L)	51.83
4	1	4(6.0 mmol/L)	4(3.0 mmol/L)	61.23
5	2(0.5 mmol/L)	1	2	53.87
6	2	2	1	67.67
7	2	3	4	67.87
8	2	4	3	60.10
9	3(1.0 mmol/L)	1	3	66.13
10	3	2	4	70.57
11	3	3	1	77.47
12	3	4	2	63.27
13	4(1.5 mmol/L)	1	4	74.10
14	4	2	3	65.33
15	4	3	2	65.60
16	4	4	1	76.50
K1(水平 1 之和)	206.06	226.63	254.17	
K2(水平 2 之和)	249.51	264.04	243.21	
K3(水平 3 之和)	277.44	262.77	243.39	
K4(水平 4 之和)	281.53	261.1	273.77	
极差 R	75.47	37.41	30.56	

表 3 正交试验分析结果

Tab. 3 The results of the orthogonal experiment analysis

	GSH(mmol/L)	NaCl(mmol/L)	EDTA(mmol/L)
溶血活性最强	1.0	5.0	0
溶血活性最弱	0	0	0
各因素的影响顺序	GSH>NaCl>EDTA		

### 3 讨论

刺丝囊是所有刺胞动物特有的细胞器<sup>[17]</sup>,刺胞动物接触人体时,刺胞刺入皮肤、注入毒液、引起刺胞皮炎,或经血液循环吸收,引起一系列全身症状甚至死亡,所以刺丝囊毒素是水母蛰伤引起人体免疫反应的根源,水母毒素一般是指刺丝囊毒素。目前国内通过对整个水母个体或水母触手的匀浆液的研究已经获得了水母毒素的多种性质<sup>[18,19]</sup>。但是就如 Hyman 所说:通过这两种方法的研究刺丝囊毒素的性质还是不能知道,因为这两种提取液中不仅包含

刺丝囊成分也包含多种其他组织细胞的成分<sup>[20]</sup>。研究表明,除主要分布于触手和口周围的刺丝囊外,水母其他部位(中胶层、无刺丝囊的触手提取物等)也含有一定量的毒性成分,并可产生相关的生物学效应<sup>[5,21]</sup>。因此,必须将刺丝囊与其他组织有效分离开来,才能获得关于刺丝囊毒素的真实性质。通过分离刺丝囊直接从刺丝囊中提取水母毒素不仅可以减少水母其他组织细胞对毒素的污染,也有利于水母粗毒及纯毒的制备和活性的保持,以及对毒理和药理等方面的进一步研究。

水母毒素中普遍含有溶血活性成分,溶血活性

的检测是水母毒素活性检测的首选方法。目前, Nagai 等<sup>[22~24]</sup> 已经从 *Chiropsalmus quadrigatus*, *Carybdea alata*, *Carybdea rastoni* 等水母的毒素中分离纯化出多种溶血活性蛋白。水母毒素的溶血成分不仅表现出致死作用, 而且能够引起皮肤红肿发炎, 是水母刺丝囊毒素中的重要毒性成分<sup>[22]</sup>。

本研究表明, 霞水母刺丝囊毒素溶血活性的发生需要一定的温度条件。在 4℃ 下, 毒素放置 2 h, 仍然没有检测到溶血活性, 在 37℃ 下反应 45 min 左右后, 毒素的溶血活性达到最大值。据报道, 细菌 *Vibrio metschnikovii* 的细胞毒素对红细胞的溶解作用分为三步: (1) 毒素以一种温度依赖性的方式附着在红细胞膜上; (2) 附着的毒素以一种温度依赖性的方式在细胞膜上形成孔洞; (3) 细胞破裂, 细胞内的血红蛋白释放出来<sup>[25]</sup>。所以或许是由于霞水母毒素在 4℃ 下不能附着在红细胞膜上, 所以不能产生溶血, 在 37℃ 等温度下毒素能对红细胞膜形成有效的附着, 从而有利于毒素对膜结构造成损害, 使细胞膜破裂, 产生溶血。

水母毒素对 pH 敏感。据报道, *Cyanea capillata* 刺丝囊毒素溶血活性的最佳 pH 在 8.0 附近<sup>[26]</sup>; *Rhopilema esculentum* 毒素在 pH 6~10 的范围内表现出比较强的溶血活性<sup>[3]</sup>; *Chironex fleckeri* 毒素溶血活性的最佳 pH 在 6.3~7 之间<sup>[27]</sup>; 而 *Carybdea marsupialis* 毒素的溶血活性存在于 pH 5.5~6.3 和 8.3~9.0 范围内, 在 pH 7.0 附近活性消失<sup>[28]</sup>。本研究中, 在 pH 5.0~8.63 范围内, 霞水母刺丝囊毒素表现出较强的溶血活性。由此可见, 不同的水母毒素对 pH 的稳定性不同, 这可能是由于不同的水母毒素中所含的溶血成分所带电荷及等电点不同所致。

一些分布于蛋白质表面的半胱氨酸(Cys)易被空气中的氧缓慢氧化为次磺酸或二硫化物, 使蛋白质的电荷或形状改变而失活<sup>[16]</sup>。DTT 常常被用于蛋白质中二硫键的还原, 可用于阻止蛋白质中的半胱氨酸之间所形成的蛋白质分子内或分子间二硫键。但 DTT 往往无法还原包埋于蛋白质结构内部(溶剂不可及)的二硫键, 这类二硫键的还原常常需要先将蛋白质变性。对于霞水母刺丝囊毒素, 被 DTT 作用 30 min 后, 溶血活性有了明显的降低, 所以可以推测, 毒素中的溶血活性成分的活性可能与二硫键有关, 而且这些二硫键分布于溶血素分子的表面, 使得 DTT 很容易与这些二硫键发生反应, 从而使毒素失活。

GSH 是属于含有巯基的小分子肽类物质, 能与铅、汞、砷等重金属盐络合而具有整合解毒作用, 同

时可以保护许多蛋白质和酶等分子中的巯基不被自由基等有害物质氧化, 使蛋白质或酶处于活性状态。GSH 能够在一定程度上稳定霞水母刺丝囊毒素的溶血活性, 可能由于霞水母毒素的溶血活性与巯基也有关系, 对巯基的保护有利于毒素活性的保持。

金属离子对蛋白质活性尤其是酶的影响是多方面的。有些金属离子作为酶分子的一部分, 影响酶的活性及酶的专一性, 有些金属离子起活化剂的作用, 如  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  等离子通常可以显著增加 D-葡萄糖异构酶的活性<sup>[29]</sup>。金属离子不仅可以影响酶的活性, 还可以影响酶的稳定性, 例如  $\text{Ca}^{2+}$  的存在可以稳定枯草杆菌蛋白酶、灰色链丝菌蛋白酶和胰蛋白酶等<sup>[16]</sup>。研究发现  $\text{Ca}^{2+}$  也能够增强霞水母毒素的溶血活性, 但是本文研究表明,  $\text{Ca}^{2+}$  对霞水母刺丝囊毒素的溶血活性并没有表现出稳定作用。所以  $\text{Ca}^{2+}$  似乎并不属于毒素中活性成分的特异性配基, 而只是溶血活性的一个催化剂。

另外对于许多蛋白质, 保存在高离子强度溶液中有利于非天然聚集物的形成。这是因为溶液中离子的电荷屏蔽降低了蛋白质分子之间的电荷-电荷排斥<sup>[30]</sup>。据报道, 水母 *Carbdea rastoni* 的溶血活性成分在 0.8 mol/L NaCl, 5 mmol/L 磷酸缓冲液中在 4℃ 下可以保存 6 个月<sup>[23]</sup>。在本实验中, NaCl 的加入也对霞水母刺丝囊毒素中的溶血活性具有稳定作用。

EDTA 作为一种整合剂能够去除毒素溶液中蛋白质氧化的催化剂——金属离子。同时活性蛋白质还常与重金属(如 Fe, Mn, Cu 等)结合而失活, 加入微量的 EDTA 可以防止这些活性蛋白的失活<sup>[31]</sup>。所以缓冲液中加入少量的 EDTA 有利于对毒素的保护。但是 EDTA 与 GSH 发挥的作用相类似。所以毒素中不含 EDTA, 只含有 1.0 mmol/L GSH, 5.0 mmol/L NaCl 时, 溶血活性也可以达到最大值。

## 4 结论

本研究提取了霞水母刺丝囊毒素, 并研究了温度, pH, GSH, NaCl, DTT, EDTA,  $\text{Ca}^{2+}$  等多种理化因素对霞水母刺丝囊毒素溶血活性的稳定性的影响。结果表明, 毒素的溶血活性与温度密切相关, 且具有 pH 敏感性, 巯基和二硫键可能是毒素中溶血活性成分的重要活性基团,  $\text{Ca}^{2+}$  有可能只是毒素溶血活性的活化剂而对毒素的稳定性没有影响。毒素中含有 1.0 mmol/L GSH 和 5.0 mmol/L NaCl 时对溶血活性的稳定作用达到最佳效果。这些研究使人们对霞水母毒素中的溶血活性成分的性质有了初步的了解。在以后的研究中将把对毒素中的溶血活性

成分进行分离纯化和结构鉴定, 并就其毒理及药理学等问题进行深入研究和探索。

参考文献:

- [1] 于华华, 刘希光, 刘松, 等. 水母毒素的研究现状 [J]. 海洋科学, 2003, **27**(1): 27-29.
- [2] Li C P, Yu H H, Liu S, *et al.* Factors affecting the protease activity of venom from jellyfish *Rhopilema esculentum* Kishinouye [J]. **Bioorg Med Chem Lett**, 2005, **15**(24): 5 370-5 374.
- [3] Yu H H, Li C P, Li R G, *et al.* Factors influencing hemolytic activity of venom from the jellyfish *Rhopilema esculentum* Kishinouye [J]. **Food Chem Toxicol**, 2007, **45**(7): 1 173-1 178.
- [4] Ishikawa T, Vucenic I, Shamsuddin A, *et al.* Two new actions of sea nettle (*Chrysaora quinquecirrha*) nematocyst venom; studies on the mechanism of actions on complement activation and on the central nervous system [J]. **Toxicon**, 2004, **44**(8): 895-899.
- [5] Ramasany S, Isbister G K, Seymour J E, *et al.* Pharmacologically distinct cardiovascular effects of box jellyfish (*Chironex fleckeri*) venom and a tentacle-only extract in rats [J]. **Toxicol Lett**, 2005, **155**(20): 219-226.
- [6] Rice N E, Powell W A. Observation on three species of jellyfishes from Chesapeake Bay with special reference to their toxins. I. *Chrysaora* (Dactylometra) quinquecirrha [J]. **Biol Bull**, 1970, 139: 180-187.
- [7] 于华华, 刘希光, 邢荣娥, 等. 水母毒素蛋白凝聚现象的初步研究 [J]. 海洋与湖沼, 2005, **36**(5): 413-417.
- [8] 董婧, 王彬, 刘春洋. 白色霞水母各发育阶段的形态 [J]. 水产学报, 2006, **30**(6): 761-765.
- [9] 秦士德, 李明. 霞水母皮炎 [J]. 青岛医学院学报, 1988, **24**(4): 300.
- [10] 董婧, 刘春洋, 李文泉, 等. 白色霞水母的形态与结构 [J]. 水产学报, 2005, **24**(2): 22-23.
- [11] Dong J, Liu C Y, Wang Y Q, *et al.* Laboratory observation on the life cycle of *Cyanea nozakii* (Semeostomida, Scyphozoa) [J]. **Acta Zoologica Sinica**, 2006, **52**(2): 389-395.
- [12] 卢振斌, 戴泉水, 颜尤明. 福建东山岛海域霞水母的渔业生物学研究 [J]. 应用生态学报, 2003, **14**(6): 973-976.
- [13] 仲霞铭. 霞水母暴发与海洋生态之关联性 [J]. 现代渔业信息, 2004, **19**(3): 15-17.
- [14] 李建武, 萧能更, 余瑞元, 等. 生物化学实验原理和方法 [M]. 北京: 北京大学出版社, 2000. 216-221, 147-148.
- [15] Rottin G, Gusmani L, Parovel E, *et al.* Purification and properties of a cytolytic toxin in venom of the jellyfish *Carybdea marsupialis* [J]. **Toxicon**, 1995, 33: 315-326.
- [16] 苏俊, 张国政, 刘忠华, 等. 蛋白质在分离纯化中保持稳定的方法及应用 [J]. 天津轻工业学院学报, 2002, 1: 21-24.
- [17] 李明, 秦士德. 刺胞皮炎 [J]. 中国海洋药物杂志, 1999, 1: 143-145.
- [18] Welsh J H. On the nature and action of coelenterate toxins [J]. **Deep Sea Research Supp**, 1955, 3: 287-297.
- [19] Endean R, Noble M. Toxic material from the tentacles of the cubomedusan *Chironex fleckeri* [J]. **Toxicon**, 1971, **9**(3): 255-264.
- [20] Phillips J H. Isolation of active nematocysts of *Metridium senile* and their chemical composition [J]. **Nature**, 1956, 178: 932.
- [21] Xiao L, He Q, Guo Y F, *et al.* *Cyanea capillata* tentacle-only extract as a potential alternative of nematocyst venom; its cardiovascular toxicity and tolerance to isolation and purification procedures [J]. **Toxicon**, 2009, 53: 146-152.
- [22] Nagai H, Takuwa K, Nakaw M. Novel proteinaceous toxins from the box jellyfish (sea wasp) *Carybdea rastoni* [J]. **Biochem Biophys Res Commun**, 2000, 275: 582-588.
- [23] Nagai H, Takuwa K, Nakaw M. Isolation and characterization of a novel protein toxin from the Hawaiian box jellyfish (sea wasp) *Carybdea alata* [J]. **Biochem Biophys Res Commun**, 2000, 275: 589-594.
- [24] Nagai H, Takuwa-Kuroda K, Nakao M, *et al.* A novel protein toxin from the deadly box jellyfish (sea wasp, Habu-kurage) *Chiropsalmus quadrigatus* [J]. **Biosci Biotechnol Biochem**, 2002, **66**(1): 97-102.
- [25] Miyake M, Honda T, Miwatani T. Effects of divalent cations and saccharides on *Vibrio metschnikovii* cytolysin-induced hemolysis of rabbit erythrocytes [J]. **Infect Immun**, 1989, **57**(1): 158-163.
- [26] 聂菲, 肖良, 张静. 发形霞水母毒素分离产物溶血活性的比较及其影响因素分析 [J]. 第二军医大学学报, 2008, **29**(1): 83-86.
- [27] Baxter E H, Marr A G M. Sea wasp (*Chironex fleckeri*) venom: lethal, haemolytic and dermonecrotic properties [J]. **Toxicon**, 1969, 7: 195-210.
- [28] Rottini G, Gusmani L, Parovel E. Purification and properties of a cytolytic toxin in venom of the jellyfish *Carybdea marsupialis* [J]. **Toxicon**, 1995, **33**(3): 315-326.
- [29] Blanchard J S. Buffers for enzymes [J]. **Meth Enzymol**, 1984, 104: 404-414.
- [30] Coligan J E. 精编蛋白质科学实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 2007. 86.
- [31] 冯小黎, 金业涛, 苏志国. 分离纯化中蛋白质的不稳定性及其对策 [J]. 生物工程进展, 2000, **20**(3): 67-70.

# The study on the stability of the hemolytic activity of the nematocyst venom from jellyfish *Cyanea* sp.

FENG Jin-hua<sup>1,2</sup>, YU Hua-hua<sup>1</sup>, LI Rong-feng<sup>1,2</sup>, XING Rong-e<sup>1</sup>, LIU Song<sup>1</sup>, LI Peng-cheng<sup>1</sup>

(1. Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Received:** Apr. , 2, 2009

**Key words:** *Cyanea* sp. ; nematocyst venom; hemolytic activity; stability

**Abstract:** In the present article, the nematocyst venom was extracted from the jellyfish *Cyanea* sp. and the effects of several physical and chemical factors on the stability of the NV hemolytic activity were analyzed. The results indicated that the hemolytic activity of NV was dependent on temperature: at 4°C, no hemolysis occurred; after about 45 min at 37°C, the hemolytic ratio reached the highest. pH value had an influence on the hemolytic activity and the strongest hemolytic activity was found at pH 7.8 and the hemolytic ratio was about 93.53%. The presence of EDTA, NaCl and GSH was benefit for the stability of the hemolytic activity. According to the results of orthogonal test, GSH had the strongest effect on the hemolytic activity. 1.0 mmol/L GSH and 5.0 mmol/L NaCl stabilized the hemolytic activity optimally. DTT significantly reduced the hemolytic activity, indicating that the hemolysis related with the disulfide bond(s). Ca<sup>2+</sup> might only be the activator for the hemolysis of NV since though Ca<sup>2+</sup> could increase the hemolytic power of NV, it could not protect the hemolytic activity in the long-term storage. Glycerin did not exhibit a significant effect on the stability of NV.

(本文编辑:张培新)