

沙蜚(*Stomopholus meleagris*)刺胞毒素对戒断小鼠超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性的作用*

苏秀榕¹ 杨春² 邢沈阳³ 黄晓春¹

(1. 宁波大学生命科学与生物工程学院 宁波 315211; 2. 宁波效实中学 宁波 315012;

3. 吉林大学畜牧兽医学院 长春 130012)

提要 通过腹腔注射沙蜚刺胞毒素于吗啡依赖型戒断小鼠,检测小鼠肝脏、肾脏、心脏和脑的SOD、CAT、NOS酶活力和MDA含量的变化情况,并进行统计学分析,研究沙蜚刺胞毒素对纳洛酮催促吗啡依赖小鼠的戒断作用。结果表明,沙蜚刺胞毒素对吗啡依赖小鼠各组组织酶活力的恢复有明显的促进作用。出现戒断症状的小鼠肝脏的SOD和CAT活性比对照组明显降低,注射沙蜚刺胞毒素后两种酶活性逐渐恢复,但还是略低于对照组。相反MDA含量吗啡组最高,沙蜚刺胞毒素次之,沙蜚刺胞毒素最低。通过小鼠戒断前后肝脏、肾脏、心脏、脑等组织中SOD和CAT活性酶的检测结果,证明了沙蜚刺胞毒素可改善小鼠由于吗啡作用而产生的机体的抗性下降、逐渐恢复正常生理功能,能抑制吗啡依赖小鼠戒断反应的发生,对吗啡依赖小鼠的戒断起到积极的治疗作用。

关键词 沙蜚刺胞毒素,超氧化物歧化酶,过氧化氢酶,戒断小鼠

中图分类号 Q346

沙蜚(又称海蜇、口冠海蜇),属于腔肠动物门(Coelentera)、钵水母纲(Scyphozoa)、口冠水母科(Stomolophidae)动物,是生活在冷、暖水间的大型食用水母,其触手上分布有大量的刺细胞(nematocysts),故而又称为刺胞动物(cnidarians)(张明良等,1991)。刺胞毒液成分主要是蛋白质、多肽和有毒的酶类,相对分子量在6—10kD之间,其毒素蛋白具有凝集作用(廖永岩等,2001;于华等,2005;Anderson *et al.*,2004)。海蜇具有治病功效在我国古代早就有记载,但利用海蜇刺胞素对戒断小鼠的抗氧化活性的研究目前还未见报道。作者在本研究中通过建立吗啡依赖小鼠的模型,研究注射沙蜚刺胞素后各组小鼠内脏中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性、过氧化氢酶(catalase, CAT)活性、丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量及脑内一氧化氮合酶(nitric oxide synthetase, NOS)等几种生化指标的变化,旨在证明海蜇刺胞素抗氧化活性。

1 材料与方法

1.1 材料

沙蜚(*Stomopholus meleagris* L. Agassiz)取于渤海湾海域,去除胶质后的刺胞迅速放入液氮中,冷冻状态带回实验室,贮于-70℃冰箱保存备用。实验用ICR小鼠是由美国癌症研究所(Institute of Cancer Research, ICR)分送各国饲养的经选育后的Swiss小鼠,40只,各半,体重为(25±2)g,购于浙江省实验动物中心。盐酸吗啡(morphine, Mor)注射液,沈阳第一制药厂生产,批号002747。盐酸纳洛酮(naloxone, Nal)注射液,北京四环制药厂生产,批号为0201221。NOS试剂盒购自南京建成生物工程研究所;其他试剂均为分析纯,购自宁波市奥博公司。

1.2 方法

1.2.1 沙蜚刺胞毒素的提取 沙蜇触手经研磨、12000r/min冷冻离心10min,取上清液,用考

* 浙江省自然科学基金资助项目, Y304358号;宁波市科技局重点资助项目, 00120041号。苏秀榕, 教授, E-mail: suxiurong@nbu.edu.cn

收稿日期: 2005-08-23, 收修改稿日期: 2006-03-12

马斯亮蓝方法检测蛋白含量(Abdul *et al*, 1997),以蛋白浓度作为毒素定量标准进行实验。

1.2.2 小鼠吗啡依赖模型的建立 将小鼠随机分为4组:对照组(NS)、吗啡组(Mor)、沙蜚刺胞毒素1组(ST1)、沙蜚刺胞毒素2组(ST2)各10只,采用5天剂量递增法皮下注射吗啡并加以改进,建成吗啡依赖小鼠模型(徐淑云等,1991)。除生理盐水对照组外,各组小鼠5天共分别接受10次吗啡注射。每天皮下注射2次(9:00am, 16:00pm),给药剂量分别为:第1天25、第2天50、第3天100、第4天150、第5天200mg/kg。小鼠自由饮水、进食。

生理盐水对照组小鼠以等体积的生理盐水代替吗啡,各组小鼠于末次给药后3h内分别腹腔注射纳洛酮8mg/kg催促戒断反应。注射纳洛酮后15—30min内除对照组外各组小鼠腹腔注射0.2ml, 0.02mg/kg沙蜚刺胞毒素(浓度为151.2mg/ml),其中吗啡组、对照组和沙蜚刺胞毒素1组小鼠于60min后眼球取血处死小鼠,解剖小鼠取肝脏、肾脏、心脏、全脑于预冷生理盐水中漂洗、称重后在-20℃冰箱保存。沙蜚刺胞毒素2组小鼠于第2天腹腔注射等剂量的沙蜚刺胞毒素后60min眼球取血后处死,处理方法同上。

1.2.3 各项指标的测定方法 蛋白质(Protein)浓度测定采用考马斯亮蓝法;超氧化物歧化酶(SOD)活性测定参照徐淑云等(1991)的邻苯三酚自氧化法;过氧化氢酶(CAT)活性测定参照钼酸铵显色法(程鲁京等,1994);丙二醛(MDA)含量测

定参照刘葆琴等(1996)的硫代巴比妥法;一氧化氮合酶(NOS)的测定按照南京生物工程研究所提供的试剂盒法。

2 结果

2.1 小鼠吗啡依赖症状

皮下注射吗啡第1天,小鼠竖尾兴奋跑动,有时四肢离地蹿起,但持续时间较短(约为30min)。随着皮下注射吗啡剂量的递增,小鼠竖尾跑动的时间也延长。皮下注射吗啡第4天,小鼠异常的兴奋,走路时竖尾、打颤,时而吱吱乱叫地跑动,时而安静的聚在一起抽搐,尾巴随着身体的不断抽搐而上下抖动,当受到惊吓时小鼠四肢离地窜起。注射吗啡后小鼠四肢离地跳起次数频繁,腹泻、洗脸,打颤等症状与文献报道的小鼠戒断症状表现相同(Radwan *et al*, 2005)。

2.2 小鼠抗氧化活性

从表1可以看出,吗啡组与对照组肝脏内SOD、MDA、CAT三种酶活力存在显著差异($P<0.05$);沙蜚刺胞毒素1组与吗啡组酶活力差异不显著;沙蜚刺胞毒素1组与对照组亦存在显著差异;而沙蜚刺胞毒素2组与对照组差异不显著,与吗啡组对比表现出显著的差异。从表2可以看出,各组小鼠肾脏与心脏中的SOD、CAT两种生化指标也存在明显的差异,吗啡组SOD和CAT活力明显低于对照组,沙蜚刺胞毒素组酶活力高于吗啡组,与对照组无差异。而脑中的NOS活力在吗啡组低于对照组,沙蜚刺胞毒素组NOS活力高于吗啡组,但整体上无统计学意义。

表1 腹腔注射沙蜚刺胞毒素后吗啡依赖小鼠肝脏内生化指标的变化
Tab.1 Biochemical changes of liver in morphine-dependent mice treated with toxin of *S. meleagris*

指标	SOD (IU/mg protein)	CAT (IU/mg protein)	MDA ($\mu\text{mol/mg protein}$)
NS	5.94 \pm 0.32	4.46 \pm 0.18	1.30 \pm 0.23
Mor	2.26 \pm 0.18*	1.25 \pm 0.55**	2.42 \pm 0.76*
ST1	2.71 \pm 0.47*	2.78 \pm 0.14*	2.13 \pm 0.39*
ST2	3.80 \pm 0.13	3.79 \pm 0.18	2.02 \pm 0.79

* $P<0.05$ 显著差异, ** $P<0.01$ 极显著差异(与对照组比较)。 $P<0.05$ 显著差异

表2 腹腔注射沙蜚刺胞毒素后吗啡依赖小鼠心脏、肾脏及脑内生化指标的变化
Tab.2 Biochemical changes of heart, kidney and brain in morphine-dependent mice treated with toxin of *S. meleagris*

指标	H _{SOD}	H _{CAT}	K _{SOD}	K _{CAT}	B _{NOS}
NS	9.34 \pm 3.78	5.85 \pm 1.08	2.33 \pm 0.68	3.30 \pm 0.49	3.13 \pm 0.91
Mor	4.70 \pm 1.88	1.54 \pm 0.57**	1.6 \pm 0.27*	0.98 \pm 0.30*	1.76 \pm 1.10
ST1	7.17 \pm 3.6	4.02 \pm 1.34	1.76 \pm 0.35	1.12 \pm 0.21*	2.79 \pm 1.96
ST2	9.21 \pm 4.23	4.79 \pm 1.69	1.85 \pm 0.26	2.69 \pm 0.57	3.14 \pm 1.32

表中数据单位均为(IU/mg protein)。H_{SOD}: 心脏内超氧化物歧化酶, H_{CAT}: 心脏内过氧化氢酶, K_{SOD}: 肾脏内超氧化物歧化酶, K_{CAT}: 肾脏内过氧化氢酶, B_{NOS}: 脑内一氧化氮合酶。* $P<0.05$ 显著差异, ** $P<0.01$ 极显著差异(与对照组比较); $P<0.05$ 显著差异, $P<0.01$ 极显著差异(与吗啡组比较)

3 讨论

3.1 在人体中氧自由基产生过多或机体清除氧自由基能力减弱时,就会造成机体的损伤。SOD是体内重要清除超氧阴离子自由基(O_2^-)的特异性抗氧化酶,是机体免疫调节网络的重要组成部分,在防御活性氧的毒性、消炎、抗突变、抗肿瘤、抗辐射、抗自身免疫、预防衰老等方面起着重要作用。SOD对疾病的病因学探讨、诊断、治疗、疗效观察有着重要的意义(赵元凤,2003)。本研究结果显示,在肝脏和肾脏组织中,吗啡组SOD活力明显低于对照组($P<0.05$),而在心脏组织中,吗啡组SOD活力也明显低于对照组(表2),这表明吗啡组小鼠机体抗氧化能力降低。而皮下注射沙蜚刺胞毒素可提高吗啡依赖小鼠各组织SOD活性,随着注射次数的增多,体内各组织SOD活性均有明显的提高($P<0.05$)。

3.2 CAT能将细胞代谢产生的毒性物质 H_2O_2 迅速分解,是机体重要的去氧自由基酶之一(孙虎山等,2000)。研究结果显示,吗啡组小鼠各组织(肝、肾、心)的CAT活力显著低于对照组($P<0.05$),皮下注射沙蜚刺胞毒素可提高吗啡依赖小鼠各组织CAT活性,随着注射次数的增多,体内各组织CAT活性均有明显的提高($P<0.05$),这与各组小鼠的SOD活力变化相似。

3.3 MDA是脂质过氧化反应的终产物,如产生过多,对细胞膜的流动性、结构功能都会产生有害的影响,引起细胞代谢及功能障碍,甚至导致细胞广泛性坏死。因此,动态性检测SOD、MDA对判断病情具有重要价值。在建立吗啡依赖小鼠模型、经注射沙蜚刺胞毒素处理后,测得各组织MDA含量有改变。吗啡组小鼠肝脏组织中MDA含量明显高于对照组($P<0.05$),这可能是肝组织损害所致。研究发现皮下注射沙蜚刺胞毒素能明显降低MDA含量,与吗啡组比较差异显著($P<0.05$)。

综上所述,沙蜚刺胞毒素对吗啡依赖小鼠肾脏、心脏、肝脏的SOD活力、CAT活力、肝脏的MDA含量均呈现相同的作用趋势,即改善吗啡依赖小鼠各组织的酶活力,随着沙蜚刺胞毒素注射次数的增加,酶活性越接近对照组水平。但药物依赖后产生的戒断综合征的临床表现复杂,本文作者仅从沙蜚刺胞毒素单一剂量阐明了其对吗啡依赖小鼠的免疫影响,对于沙蜚刺胞毒素的最佳剂量和注射次数等指标的确定,还有待进一步研究。

参 考 文 献

- 于华华,刘希光,邢荣娥等,2005.水母毒素蛋白凝聚现象的初步研究.海洋与湖沼,36(5):413—416
- 刘葆琴,陈雨安,刘雅伶,1996.人参、黄芪、附子及其组方对大鼠肝匀浆过氧化脂质生成的影响.时珍国药研究,7(4):209
- 孙虎山,李光友,2000.栉孔扇贝血淋巴中超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性及其性质的研究.海洋与湖沼,30(3):254—265
- 张明良,秦士德,1991.刺胞动物蜇伤.中国海洋药物,10(3):35—38
- 赵元凤,2003.海洋污染对毛蚶超氧化物歧化酶影响的研究.海洋学报(中文版),25(3):78—82
- 徐淑云,卞如濂,1991.药理实验方法学.北京:人民卫生出版社,502—504
- 程鲁京,孟泽,1994.钼酸铵显色法测定血清过氧化氢酶.临床检验杂志,12(1):6—8
- 廖永岩,徐安龙,2001.中国蛋白、肽类毒素海洋动物名录及其分布.中国海洋药物,20(5):47—57
- Abdul K, Liu H, 1997. Interference of anthracycline derivatives with measurement of proteins with BCA. Clinical Chemistry, 43: 2201—2202
- Anderson P A, Thompson L F, Moneypenny C G, 2004. Evidence for a common pattern of peptidergic innervation of cnidocytes. Biol Bull, 207: 141—146
- Radwan F Y, Roman L G, Baksi K S *et al*, 2005. Toxicity and mAChRs binding activity of *Cassiopea xamachana* from Puerto Rican coasts. Toxicol, 45: 107—112

EFFECT OF CNIDOPHORIN OF *STOMOLOPHUS MELEAGRIS* ON MORPHINE DEPENDENT MICE

SU Xiu-Rong¹, YANG Chun², XING Shen-Yang³, HUANG Xiao-Chun¹

(1. Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo, 315211; 2. Ningbo Xiaoshi High School, Ningbo, 315012; 3. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun, 130012)

Abstract For exploring the use of marine animal toxin for drug addiction treatment and developing new side-effect-free anti-drug medicines, the effect of cnidophorin extracted from *Stomopholus meleagris* was tested on morphine-dependent mice. In our study, 4 experimental groups were set: 1. Control Group injected with normal saline (NS); 2. Morphine Group (Mor) injected with morphine in a designed strategy for setting up a morphine-dependent model; 3. Cnidophorin Group I injected with cnidophorin once (ST1); and 4. Cnidophorin Group II injected with cnidophorin twice (ST2). For observing drug-withdrawal syndrome, the Mor mice were injected with naloxone (Nal) after morphine and saline treatment for NS and Mor mice, and then the contents of superoxide dismutase, nitric oxide synthetase, catalase and malondiadehyde were measured. Results show that for morphine-treated mice, the activities of superoxide dismutase and catalase in liver, kidney and heart were reduced, the activity of nitric oxide synthetase in brain was also decreased, and radical cleaning in antioxidation was weakened as well. However, the ST1 and ST2 mice regained the activity of the enzymes and the mice resumed normal function gradually after the cnidophorin treatment. Therefore *S. meleagris* cnidophorin can be utilized to cure morphine dependent mice, which may have medical potential for treading drug-addiction for human patient in future.

Key words Cnidophorin of *Stomopholus meleagris*, Superoxide dismutase, Catalase, Morphine dependent mice