

## 蛇毒神经毒素和肌肉毒素研究进展\*

刘刚, 和七一, 王文文, 余晓东

(重庆师范大学 生命科学学院 重庆市动物生物学重点实验室 重庆市生物活性物质工程研究中心  
教育部活性物质生物技术工程研究中心, 重庆 401331)

**摘要:**对蛇毒中神经毒素和肌肉毒素的分类、理化性质、结构及药理学活性进行了综述。当前研究表明,蛇毒神经毒素可分为3类:突触前神经毒素、突触后神经毒素和类神经毒素;前两者主要抑制运动终板处的神经肌肉传导,造成肌肉麻痹和呼吸衰竭;而后者可以阻断平滑肌收缩和离子通道,表现出类神经毒活性。蛇毒肌肉毒素主要分为3类:响尾蛇毒素、心脏毒素和肌肉毒 $PLA_2$ ;它们主要表现为破坏肌细胞膜,降解肌纤维,造成肌肉坏死。近年来,大量的蛇毒神经毒素和肌肉毒素的结构与功能得以确定,其在临床医学及研究领域中将有重要的应用前景。随着在作用机制等方面研究的不断深入,蛇毒神经毒素和肌肉毒素的用途也将越来越广泛。

**关键词:**蛇毒;神经毒素;肌肉毒素

**中图分类号:**Q51

**文献标志码:**A

**文章编号:**1672-6693(2015)04-0038-06

蛇毒是毒蛇腺分泌的一种复杂混合物,其中大部分是蛋白质和多肽,具有广泛的药理学及生物学活性。神经毒素和肌肉毒素分别是蛇毒中致死率和致残率最高的组分,它们不仅破坏动物正常生理过程及生化活动,严重时还可导致死亡<sup>[1]</sup>。1963年Chang和Lee<sup>[2]</sup>在银环蛇(*Bungarus multicinctus*)粗毒中发现一种能抑制神经传导的神经毒素即 $\beta$ -bungarotoxin,这是有关蛇毒神经毒素研究的首次报道。神经毒素分为突触前和突触后神经毒素,大多数突触前神经毒素不仅具有磷脂酶 $A_2$ ( $PLA_2$ )活性,同时部分还具有肌肉毒活性。蛇毒神经毒素已成为医药研究领域的热点之一,目前在临床上的应用主要有诊断重症肌无力、治疗神经性疼痛及神经硬化症等;作为重要的分子探针,蛇毒在研究神经系统中也被广泛使用<sup>[3]</sup>。本文主要对蛇毒神经毒素和肌肉毒素的分类、结构、生物活性及机制等方面的研究进展进行综述,为治疗蛇伤、开发先导药物等进一步研究提供的参考。

### 1 神经毒素种类与生物学活性

蛇毒神经毒素主要存在于眼镜蛇科(Elapidae)和海蛇科中(Hydrophiidae),在蝰蛇科(Viperidae)、响尾蛇科(Crotalidae)及游蛇科(Colubridae)中的少数几种毒蛇也有发现<sup>[4-7]</sup>。根据作用方式的不同,蛇毒神经毒素可分为突触前神经毒素( $\beta$ -神经毒素)和突触后神经毒素( $\alpha$ -神经毒素)<sup>[1]</sup>。骨骼肌标本经常被用于鉴定蛇毒和毒素对神经肌肉传导的影响,其中小鸡颈二腹肌(Chick biventer cervicis nerve-muscle)和小鼠膈神经膈肌(Mouse phrenic nerve-diaphragm)标本被研究者广泛使用<sup>[8-9]</sup>。小鸡颈二腹肌具有一个显著的优势,即它含有局灶性(Focally)和多重性(Multiply)神经支配肌肉纤维:前者主要介导由电刺激引起的抽搐,而后者可以由外源性的烟碱激动剂诱导收缩,如乙酰胆碱(Ach)或卡巴胆碱(CCh)<sup>[1]</sup>。基于小鸡颈二腹肌以上优点,科研人员经常用此标本来筛选蛇毒中的突触前和突触后毒素。

#### 1.1 突触前神经毒素

蛇毒突触前神经毒素大部分具有 $PLA_2$ 活性,所以又称之为蛇毒突触前磷脂酶 $A_2$ 神经毒素(Snake presynaptic phospholipase  $A_2$  neurotoxins, SPANs)。SPANs属于 $Ca^{2+}$ 依赖酶活性蛋白大家族,作用于突触前膜,抑制乙酰胆碱的释放,阻断神经肌肉传导并造成肌肉麻痹<sup>[10]</sup>。从结构上看,SPANs既可以是单聚体也可以是多聚体复合物<sup>[11]</sup>。多聚体复合物至少含有1个活性 $\alpha$ -亚基,此亚基在神经毒性和 $PLA_2$ 活性中起主要作用,但与完整

的复合物相比活性相对较弱。除了  $\alpha$ -亚基外,其余的亚基通常由 PLA<sub>2</sub>、PLA<sub>2</sub> 类似物或其他蛋白通过共价键或非共价键相连。这些附加的亚基虽然不具有神经毒或酶活性,但可以增强  $\alpha$ -亚基的药理活性<sup>[12]</sup>。SPANs 根据四级结构的差异,主要被分为 4 类<sup>[13]</sup>。

1.1.1 第一类 此类 SPANs 是单链多肽,分子量在 13~15 kD 之间,由 7 对二硫键组成。这类毒素主要包括来自蝮蛇属(*Agkistrodon*)的 Agkistrodotoxin、沙蝰(*Vipera ammodytes ammodytes*)的 Ammodytoxin、虎蛇(*Notechis scutatus scutatus*)的 Notexin、砂膨蝰(*Bitis caudalis*)的 Caudotoxin、太攀蛇(*Oxyuranus scutellatus scutellatus*)的 OS toxin 等。

1.1.2 第二类 此类 SPANs 由 2 个非共价键相连的同源亚基组成,其中至少有 1 个亚基具有 PLA<sub>2</sub> 活性。响尾蛇属(*Crotalus*)的 Crotoxin 和另一个响尾蛇神经毒素(24 kD)均由一个碱性酶活性亚基(2 种 12 kD 亚型)和一个酸性亚基(4 种 12 kD 亚型)组成的二聚体。类似的二聚体神经毒素在许多其他毒蛇中也有发现<sup>[14]</sup>。

1.1.3 第三类 此类 SPANs 是由非相关的亚基构成的异源二聚体,如研究最为透彻的银环蛇毒素  $\beta$ -bungarotoxin<sup>[15]</sup>;它由一个 PLA<sub>2</sub>(120 个氨基酸)和一个 7 kD 的蛋白共价相连,与一种曼巴蛇(*Dendroaspis polylepis*)毒素 Dendrotoxin 高度相似。研究表明,7 kD 的蛋白不具有酶活性,但可以作为识别亚基特异性的结合靶细胞膜阻断电压门控 K<sup>+</sup> 通道。有研究发现, $\beta$ -bungarotoxin 的序列和结构与 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂及 TeNT 受体结合域的三叶子域非常相似。目前已经分离出不同的  $\beta$ -bungarotoxin,虽然它们的 PLA<sub>2</sub> 亚基都一样,但结合亚基都不尽相同<sup>[16]</sup>。

1.1.4 第四类 此类 SPANs 是由非共价键结合的同源亚基寡聚体组成。Taipoxin 是由 1 个强碱性 PLA<sub>2</sub> 亚基(120 个氨基酸)、1 个非毒亚基(120 个氨基酸)和 1 个糖蛋白亚基(135 个氨基酸,有 8 对二硫键)组成,其中糖蛋白亚基虽然没毒性但具有 PLA<sub>2</sub> 活性。Textilotoxin 是这类毒素中最为复杂的,它存在于东部拟眼镜蛇(*Pseudonaja textilis textilis*)的毒液中,是一个 70 kD 的同源亚基五聚体——这 5 个亚基都具有磷脂酶 A<sub>2</sub> 活性,其中两两通过二硫键相连<sup>[17]</sup>。Textilotoxin 的 PLA<sub>2</sub> 活性低于单个亚基的活性,但动物毒性是单体的 100 多倍。两种虎蛇毒素 Notexins 和  $\beta$ -bungarotoxin 的高分辨率结构已经测定,结果显示这 3 种 SPAN 的结构与胰腺 PLA<sub>2</sub> 非常相似,都是由 6 个保守的二硫键维持分子的紧密和稳定<sup>[18-19]</sup>。Notexin 的结构揭示了它有 3 个  $\alpha$  螺旋和 2 个  $\beta$  折叠,同样需要结合 Ca<sup>2+</sup> 来激活和维持结构的稳定。Ca<sup>2+</sup> 结合位点的保守序列为 Tyr-Gly-Cys-Tyr/Phe-Cys-Xaa-Gly-Gly。许多二价离子如 Sr<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup> 和 Zn<sup>2+</sup> 都可以结合相同的位点但不能取代 Ca<sup>2+</sup> 的催化活性。事实上,它们都是 PLA<sub>2</sub> 活性的抑制剂。

## 1.2 突触后神经毒素

突触后神经毒素与箭毒毒素作用机制十分相似,故又称之为类箭毒毒素,它能竞争性抑制烟碱型乙酰胆碱受体(nAChRs)。这类神经毒素可以高亲和力地、特异地结合在骨骼肌烟碱受体上的乙酰胆碱结合位点,抑制与该受体有关的离子通道开放,阻断神经信号传递,从而造成猎物麻痹<sup>[5,20]</sup>。该类毒素都是非酶类蛋白,一般由 60~74 个氨基酸残基组成,为碱性蛋白,主要存在于眼镜蛇科中如眼镜蛇(*Naja* spp.)、环蛇(*Bungarus* spp.)和曼巴蛇(*Dendroaspis* spp.),还存在于海蛇科(Hydrophiidae spp.)和游蛇科(Colubridae spp.)中<sup>[21]</sup>。与其他蛇毒蛋白一样,突触后神经毒素也富含二硫键。它们有 4 到 5 对二硫键,其中 4 对二硫键在所有突触后神经毒素中都很保守。这些毒素有一个独特的结构特征,即通过 4 对二硫键交叉形成一个微小、致密和疏水的内核,从中伸出 3 个相邻的环(Loop),形如手指,故又被称为三指毒素<sup>[22]</sup>。根据分子量和结构的不同,突触后神经毒素的主要分为 4 类:短链神经毒素、长链神经毒素、 $\kappa$ -神经毒素和非传统神经毒素(封二彩图 1)。短链和长链神经毒素都能结合在肌肉 nAChR 上的同一位点,它们之间存在着相互竞争。但是,只有长链神经毒素可以高亲和力地结合在神经元( $\alpha 7$ )nAChR。因此,长链神经毒素和短链神经毒素在作用靶点上有着明显的不同,这种不同可能与 loop 2 上的第 5 对二硫键有关。这些三指神经毒素都可以结合肌肉 nAChR,但只有一小部分毒素可以作用 nAChR 的其他亚型。非传统毒素由于仍未鉴定完全,因此很有可能存在着其他未知的分子靶标<sup>[23]</sup>。

1.2.1 短链神经毒素 短链神经毒素是一个由 60~62 氨基酸残基组成的多肽单链,通过 4 对二硫键连接而成,位于 Cys-3 和 Cys-24, Cys-17 和 Cys-45, Cys-49 和 Cys-60, Cys-61 和 Cys-66 上。它们的分子量为 6~7 kD,通常可以抑制由神经介导的小鸡颈二腹肌的收缩。许多短链神经毒素的 N 端序列或全序列已有报道,典型的短链神经毒素都有相似的 N 端序列如 MTCYNQSSSE,其中第 3 或 4 位的半胱氨酸尤为关键<sup>[5]</sup>。东部拟眼镜蛇(*Pseudonaja textilis*)毒素中 Pt-snx1 和 Pt-sntx2 与典型的短链神经毒素明显不同,主要表现为较低的序列同源

性。一级结构的差异严重影响这些神经毒素在体内和体外的活性,这有可能解释被这种毒蛇咬伤的人很少出现神经毒症状,即“棕蛇悖论”<sup>[24]</sup>。然而,这个观点还需要用大量的实验进一步加以证明。

1.2.2 长链神经毒素 长链神经毒素的分子量为 7~9 kD,有 70~74 个氨基酸残基,第 5 个二硫键位于 loop 2 顶端的 Cys-30 和 Cys-34 间,其他 4 对二硫键和短链神经毒素的位点一致。相对于短链神经毒素,长链神经毒素有一个小 loop 1 和一个长的 C 端尾巴。此外与短链神经毒素不同,长链神经毒素的一级结构有许多改变,如:4~16 个氨基酸缺失;第 32、第 34、第 35 和第 36 位点存在额外的氨基酸;Ala46-Ala47-Thr48 序列置换位于 Cys-45 和 Cys-49 之间的 Gly-48,而 Gly-48 位于短链神经毒素中;存在一个由 5~9 个氨基酸组成“C 端尾巴”。Pseudonajatoxin 的分子量为 12.280 kD,这明显高于其他突触后神经毒素的相对分子量。加上它有 117 个氨基酸和 7 对二硫键,这些特征说明它可能是一个新的突触后神经毒素。Barnett 等人<sup>[25]</sup>用小鼠膈神经膈肌作为鉴定活性的标本,发现这个毒素可以阻断由 Ach 引起的肌肉收缩,说明对突触后 nAChR 有抑制作用。

1.2.3  $\kappa$ -神经毒素  $\kappa$ -神经毒素是蛇毒神经毒素的一个新家族,它与长链神经毒素的结构相似。 $\kappa$ -神经毒素有 66 个氨基酸残基和 5 对二硫键,与长链神经毒素相比,它在 16~20 位有氨基酸缺失;在 36~40 位有氨基酸插入;第 5 对二硫键位于 loop 2 的顶端<sup>[26]</sup>。此外, $\kappa$ -神经毒素在 62 位还有 1 个独特的氨基酸残基<sup>[26]</sup>。与其他突触后神经毒素不同, $\kappa$ -神经毒素在溶液中主要以非共价键结合的二聚体形式存在,主链与主链之间是通过氢键和范德瓦尔斯力相互连接。功能上, $\kappa$ -神经毒素可以特异的结合神经元( $\alpha_3\beta_4$ )乙酰胆碱受体,还能识别  $\alpha_3\beta_2$  和  $\alpha_4\beta_2$  亚型<sup>[27]</sup>。虽然它们与长链神经毒素结构相似,但是它不能识别  $\alpha_1$  亚型。

1.2.4 非传统神经毒素 非传统神经毒素又称为弱神经毒素,有 66~65 氨基酸残基和 5 对二硫键,第 5 对二硫键位于 N 端 loop 1 上,这点与长链神经毒素和  $\kappa$ -神经毒素的 loop 2 相反。不同于上面所描述的神经毒素,非传统神经毒素既能结合在肌肉( $\alpha_1$ )nAChR,同时又能结合神经( $\alpha_7$ )nAChR,虽然只是在微摩尔浓度水平上<sup>[28]</sup>。而马来环蛇(*Bungarus candidus*)毒素 Candoxin 在纳摩尔浓度就可以结合在肌肉( $\alpha_1$ )和神经( $\alpha_7$ )nAChR。有意思的是,结合在肌肉 nAChR 上的毒素是可逆的;而结合在神经 nAChR 上的毒素却是部分可逆的,24 h 清洗约可恢复 60%<sup>[29]</sup>。

### 1.3 类神经毒素

富含半胱氨酸分泌蛋白(CRISPs)是一类分子量为 20~30 kD 的单链多肽,它们有很高的同源性,其中 16 个半胱氨酸残基在进化上非常保守,之所以如此命名是因为在该蛋白质的 C 端有 10 个半胱氨酸。CRISPs 家族分布广泛,在哺乳动物、爬行动物以及软体动物中都有发现。蛇毒 CRISPs 是一类来源于蛇毒的单链多肽,分子量一般在 23~26 kD 之间,包括 16 个半胱氨酸残基形成 8 对二硫键<sup>[30-31]</sup>。至今,科研人员已经从蛇毒中分离出的 CRISPs 有 30 种,通过生物学功能鉴定,发现它们具有类神经毒活性。

1.3.1 阻断平滑肌收缩 Yamazaki 等人<sup>[32]</sup>在研究虎斑颈槽蛇(*Rhabdophis tigrinus tigrinus*)杜氏腺的凝血酶原激活剂时,发现 1 个 30 kD 的单链蛋白 Tigrin。Tigrin 有 219 个氨基酸残基,与哺乳动物 CRISPs 家族蛋白如 AEG 和 SGP28 相比,有 50% 的序列相似性。用抗 Tigrin 血清又从其他蛇毒中分离出另外 3 种 25 kD 的蛋白,分别为来自日本蝮蛇(*Agkistrodon blomhoffi*)的 Ablomin(221 个氨基酸)、来自白唇竹叶青(*Trimeresurus flavoviridis*)的 Triflin(221 个氨基酸)和来自半扁环海蛇(*Laticauda semifasciata*)的 Latisemin(217 氨基酸)。这 4 种蛋白具有高度同源性,所有的半胱氨酸都完全保守。与从蜥蜴中分离出的 CRISP——Helothermine 的生物学功能一样,它们也能阻断离子通道。此外这 4 种蛋白中,Tigrin 既不能阻断去极化也不能使咖啡因引起平滑肌收缩;其他 3 种蛋白能阻断去极化,但是咖啡因不能引起平滑肌收缩,说明它们是 L 型钙离子通道阻断剂。

1.3.2 阻断环腺苷酸门控离子通道 目前,已经对两个源自澳洲棕伊奥蛇(*Pseudechis australis*)的和红腹伊奥蛇(*Pseudechis porphyriacus*)的环腺苷酸门控通道阻断剂进行克隆和鉴定,它们分别为 Pseudechetoxin(PsTx, 211 个氨基酸)和 Pseudecin(210 个氨基酸)<sup>[33-34]</sup>。通过膜片钳研究,科研人员发现 PsTx 和 Pseudecin 能阻断嗅觉(CNGA2)和视觉(CNGA1)细胞的  $\alpha$ -亚基同源四聚体通道。经实验鉴定,它们都是强碱性蛋白,预测它们的等电点分别为 10.0 和 9.69,这与其他 CRISPs 明显不同,并且大部分的 Lys(赖氨酸)和 Arg(精氨酸)聚集在近 N 和 C 端。PsTx 和 Pseudecin 的 N 端区域比其他 CRISPs 都要短。

## 2 肌肉毒素种类与生物学活性

肌肉毒素通常被定义为能破坏骨骼肌致使肌肉退化的毒素。肌肉退化包括骨骼肌纤维体系分解、肌小节破坏和肌原纤维降解。它能引起肌肉细胞中的线粒体肿胀,失去原来特有的结构,微核变成絮片状继而凝缩,最后

肌肉破坏成片段化。许多严重的肌肉坏死通常可以破坏肌肉细胞膜,导致血液和尿液中的肌酸激酶和肌红蛋白的增加,这可以为作为判断肌肉毒素的诊断基础<sup>[35]</sup>。

蛇毒中的肌肉毒素主要有3种<sup>[36]</sup>(封二彩图2):第一种为响尾蛇毒素(Crotamine)又叫做“小”肌肉毒素,它是一种短链碱性多肽,由42个氨基酸残基和3对二硫键组成,没有酶活性。目前为止,只在响尾蛇蛇毒中发现。这些肽能使骨骼肌细胞去极化,引起 $\text{Na}^+$ 内流,当加入河豚(*Tetraodontidae*)毒素(TTX)和减少细胞外 $\text{Na}^+$ 浓度时可以避免去极化的产生,表明Crotamine可以作用于细胞膜钠离子通道,但是导致骨骼肌降解的具体机制还没有完全阐明<sup>[37]</sup>。

第二种肌肉毒为细胞溶素也叫心脏毒素,只存在于眼镜蛇中,属于三指毒素超家族。心脏毒素在结构上与短链神经毒素类似,一般呈碱性有59~62个氨基酸残基和4对二硫键,没有酶活性。它们主要表现为使细胞膜渗透性增加,引起骨骼肌的损坏<sup>[38]</sup>。

第三种是磷脂酶 $\text{A}_2$ ,它在蛇毒中分布最广且最具有代表性。根据水解活性不同,肌肉毒 $\text{PLA}_2$ 分为催化型(D49)和非催化型(K49)。4种肌肉毒 $\text{PLA}_2$ (Pa-1G、Pa-5、Pa-12C和Pa-15)已从西部拟眼镜蛇(*Pseudechis australis*)毒素中分离得到。它们能抑制直接刺激引起的小鼠膈神经膈肌的收缩和由KCl诱导小鸡颈二腹肌的收缩<sup>[39]</sup>。相反,新几内亚太攀蛇(*Oxyuranus scutellatus canni*)和南棘蛇(*Acanthophis*)粗毒对直接刺激引起的小鸡颈二腹肌收缩无明显作用,说明这些蛇毒无肌肉毒活性<sup>[40]</sup>。

有研究表明,肌肉毒 $\text{PLA}_2$ 首先结合在肌肉纤维膜上,除了在过度损坏的肌肉纤维内,并没发现细胞内有结合位点。在肌纤膜损坏后, $\text{PLA}_2$ 以非特异性的方式结合在细胞内。 $\text{PLA}_2$ 结合后,随即酶解肌纤膜上的磷脂,引起细胞膜的损坏,接着导致 $\text{Ca}^{2+}$ 内流、肌丝过度收缩,造成细胞膜的进一步破坏,最终致使细胞产生严重的功能紊乱,形成肌肉坏死<sup>[35]</sup>。

另一种具有肌肉毒的组分是出血性金属蛋白酶。在体内注射不同的出血性金属蛋白酶会导致急性肌细胞损坏如肌肉坏死<sup>[41]</sup>。蛇毒金属蛋白酶引起肌肉损伤的机理目前还没有完全阐明。然而,Gutiérrez等人<sup>[42]</sup>研究出血性金属蛋白酶BaH1的活性时,发现肌肉损坏是局部缺血的继发病。许多观察结果都支持这个结论:1)肌肉坏死只发生在体内,当BaH1和离体腓肠肌在体外孵育时不会出现损坏;2)作为一种局部缺血的生化指示剂,肌肉中乳酸的含量会增加;3)组织切片证明在BaH1注射6h后出现肌肉坏死,而出血在几分钟内就会出现;4)受试肌肉细胞的超微结构特征与实验模型中肌肉局部缺血的特征非常相似,却与肌肉毒素或其他直接破坏细胞膜的药剂作用于肌肉细胞的超微结构明显不同。

### 3 结束语

综上所述,尽管典型的神经毒素和肌肉毒素结构已初步确定,但它们具体的作用机制仍未完全阐明,它们的结构与功能的关系仍需进一步的研究。由于神经毒素具有高选择性、高效性等特点,使得这些毒素可作为研究靶受体分布及结构与功能的宝贵分子探针。事实上,蛇毒中许多神经毒素的特异性分子靶标仍没有被确定,这直接导致这些毒素不能科学的分类,如Orphan three-finger toxins。

除了作为研究工具,蛇毒神经毒素还广泛应用于临床及其他领域。目前,美国食品药品监督管理局(FDA)已经批准生产两种蛇毒神经毒素制剂(Cobroxin和Nyloxin)作为药物,用于治疗顽固性神经痛和癌痛。中国科学院昆明动物研究所从眼镜蛇毒中研制出“克痛宁”,临床用于治疗各种疼痛性疾病,同样取得了良好的镇痛效果。复方克痛宁不但能治疗神经性疼痛而且在戒毒方面也显示出很好的疗效。另外,SYN-AKE是基于蛇毒神经毒素Waglerin-1研发的美容产品,可以达到皱纹淡化等效果。相信随着对神经毒素和肌肉毒素研究的不断深入,相关研究成果在临床及医学领域上的应用会得到更多的发掘,并为寻找中和毒素及治疗蛇伤的方法提供更可靠的理论依据。

### 参考文献:

- [1] Hodgson W C, Wickramaratna J C. *In vitro* neuromuscular activity of snake venoms [J]. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 2002, 29(9): 807-814.
- [2] Chang C C, Lee C Y. Isolation of neurotoxins from the venom of *Bungarus multicinctus* and their modes of neuromuscular blocking action [J]. *Archives Internationales De Pharmacodynamie Et De Therapie*, 1963, 144: 241-257.
- [3] 李凤君, 韩丽萍, 蒋琳兰, 等. 蛇毒神经毒素的研究进展 [J]. *药物生物技术*, 2013(6): 564-568.
- [4] Li F J, Han L P, Jiang L L, et al. Research progress in

- snake venom neurotoxin[J]. *Pharm Biotechnol*, 2013(6): 564-568.
- [4] Balhara K S, Stolbach A. Marine envenomations[J]. *Emergency Medicine Clinics of North America*, 2014, 32(1): 223-243.
- [5] Barber C M, Isbister G K, Hodgson W C. Alpha neurotoxins[J]. *Toxicon*, 2013, 66(3): 47-58.
- [6] Petrova S D, Atanasov V N, Balashev K. Vipoxin and its components: structure-function relationship[J]. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 2012, 87: 117-153.
- [7] Lumsden N G, Fry B G, Ventura S, et al. The *in vitro* and *in vivo* pharmacological activity of *Boiga dendrophila* (mangrove catsnake) venom[J]. *Autonomic & Autacoid Pharmacology*, 2004, 24(4): 107-113.
- [8] Harvey A L, Barfaraz A, Thomson E, et al. Screening of snake venoms for neurotoxic and myotoxic effects using simple *in vitro* preparations from rodents and chicks[J]. *Toxicon*, 1994, 32(3): 257-265.
- [9] Barfaraz A, Harvey A L. The use of the chick biventer cervicis preparation to assess the protective activity of six international reference antivenoms on the neuromuscular effects of snake venoms *in vitro*[J]. *Toxicon*, 1994, 32(3): 267-272.
- [10] Rossetto O, Montecucco C. Presynaptic neurotoxins with enzymatic activities[J]. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 2008, 184: 129-170.
- [11] Doley R, Kini R M. Protein complexes in snake venom[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2009, 66(17): 2851-2871.
- [12] Marcon F, Purtell L, Santos J, et al. Characterization of monomeric and multimeric snake neurotoxins and other bioactive proteins from the venom of the lethal Australian common copperhead (*Austrelaps superbus*) [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2013, 85(10): 1555-1573.
- [13] Schiavo G, Matteoli M, Montecucco C. Neurotoxins affecting neuroexocytosis [J]. *Physiological Reviews*, 2000, 80(2): 717-766.
- [14] Faure G, Bon C. Crotoxin, a phospholipase A<sub>2</sub> neurotoxin from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*: purification of several isoforms and comparison of their molecular structure and of their biological activities[J]. *Biochemistry*, 1988, 27(2): 730-738.
- [15] Kondo K, Narita K, Lee C Y. Amino acid sequences of the two polypeptide chains in beta1-bungarotoxin from the venom of *Bungarus multicinctus* [J]. *Journal of Biochemistry*, 1978, 83(1): 101-115.
- [16] Chu C C, Chu S T, Chen S W, et al. The non-phospholipase A<sub>2</sub> subunit of beta-bungarotoxin plays an important role in the phospholipase A<sub>2</sub>-independent neurotoxic effect: characterization of three isotoxins with a common phospholipase A<sub>2</sub> subunit[J]. *Biochemical Journal*, 1994, 303(Pt 1): 171-176.
- [17] Pearson J A, Tyler M I, Retson K V, et al. Studies on the subunit structure of textilotoxin, a potent presynaptic neurotoxin from the venom of the Australian common brown snake (*Pseudonaja textilis*). 3. the complete amino-acid sequences of all the subunits[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1993, 1161(2/3): 223-229.
- [18] Carredano E, Westerlund B, Persson B, et al. The three-dimensional structures of two toxins from snake venom throw light on the anticoagulant and neurotoxic sites of phospholipase A<sub>2</sub> [J]. *Toxicon*, 1998, 36(1): 75-92.
- [19] Westerlund B, Nordlund P, Uhlin U, et al. The three-dimensional structure of notexin, a presynaptic neurotoxic phospholipase A<sub>2</sub> at 2.0 Å resolution [J]. *FEBS letters*, 1992, 301(2): 159-164.
- [20] Phui Yee J S, Nanling G, Afifiyan F, et al. Snake postsynaptic neurotoxins: gene structure, phylogeny and applications in research and therapy [J]. *Biochimie*, 2004, 86(2): 137-149.
- [21] Endo T, Tamiya N. Current view on the structure-function relationship of postsynaptic neurotoxins from snake venoms [J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 1987, 34(3): 403-451.
- [22] Kini R M, Doley R. Structure, function and evolution of three-finger toxins: mini proteins with multiple targets [J]. *Toxicon*, 2010, 56(6): 855-867.
- [23] Nirthanan S, Gwee M C. Three-finger alpha-neurotoxins and the nicotinic acetylcholine receptor, forty years on [J]. *Journal of Pharmacological Sciences*, 2004, 94(1): 1-17.
- [24] Barber C M, Isbister G K, Hodgson W C. Solving the 'brown snake paradox': *in vitro* characterisation of Australasian snake presynaptic neurotoxin activity [J]. *Toxicology letters*, 2012, 210(3): 318-323.
- [25] Barnett D, Howden M E H, Spence I. A neurotoxin of novel structural type from the venom of the Australian common brown snake [J]. *Die Naturwissenschaften*, 1980, 67(8): 405-406.
- [26] Fiordalisi J J, Al-Rabee R, Chiappinelli V A, et al. Site-directed mutagenesis of kappa-bungarotoxin: implications for neuronal receptor specificity [J]. *Biochemistry*, 1994, 33(13): 3872-3877.
- [27] Chiappinelli V A, Weaver W R, Conti-Fine B M, et al. The binding site for κ-neurotoxins on neuronal nicotinic receptors probed with snake-venom-derived and recombinant toxins [J]. *Toxicon*, 1996, 34(3): 290.
- [28] Nirthanan S, Gopalakrishnakone P, Gwee M C E, et al. Non-conventional toxins from Elapid venoms [J]. *Toxicon*, 2003, 41(4): 397-407.

- [29] Nirthanan S, Charpantier E, Gopalakrishnakone P, et al. Candoxin, a novel toxin from *Bungarus candidus*, is a reversible antagonist of muscle ( $\alpha$ -bungarotoxin) but a poorly reversible antagonist of neuronal  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(20):17811-17820.
- [30] Ramazanova A S, Starkov V G, Osipov A V, et al. Cysteine-rich venom proteins from the snakes of Viperinae subfamily—molecular cloning and phylogenetic relationship[J]. *Toxicon*, 2009, 53(1):162-168.
- [31] Yamazaki Y, Morita T. Structure and function of snake venom cysteine-rich secretory proteins[J]. *Toxicon*, 2004, 44(3):227-231.
- [32] Yamazaki Y, Koike H, Sugiyama Y, et al. Cloning and characterization of novel snake venom proteins that block smooth muscle contraction[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2002, 269(11):2708-2715.
- [33] Brown R L, Haley T L, West K A, et al. Pseudechatoxin: a peptide blocker of cyclic nucleotide-gated ion channels[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(2):754-759.
- [34] Yamazaki Y, Brown R L, Morita T. Purification and cloning of toxins from elapid venoms that target cyclic nucleotide-gated ion channels[J]. *Biochemistry*, 2002, 38(38):11331-11337.
- [35] Harris J B. Phospholipases in snake venoms and their effects on nerve and muscle[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 1985, 31(1/2):79-102.
- [36] Lomonte B, Rangel J. Snake venom Lys49 myotoxins: from phospholipases A<sub>2</sub> to non-enzymatic membrane disruptors[J]. *Toxicon*, 2012, 60(4):520-530.
- [37] Oguiura N, Boni-Mitake M, Radis-Baptista G. New view on crotoxin, a small basic polypeptide myotoxin from South American rattlesnake venom[J]. *Toxicon*, 2005, 46(4):363-370.
- [38] Ownby C L, Fletcher J E, Colberg T R. Cardiotoxin 1 from cobra (*Naja naja atra*) venom causes necrosis of skeletal muscle *in vivo* [J]. *Toxicon*, 1993, 31(6):697-709.
- [39] Geh S L, Rowan E G, Harvey A L. Neuromuscular effects of four phospholipases A<sub>2</sub> from the venom of *Pseudechis australis*, the Australian king brown snake[J]. *Toxicon*, 1992, 30:1051-1057.
- [40] Wickramaratna J C, Hodgson W C. A pharmacological examination of venoms from three species of death adder (*Acanthophis antarcticus*, *Acanthophis praelongus* and *Acanthophis pyrrhus*) [J]. *Toxicon*, 2001, 39(2/3):209-216.
- [41] Gutierrez J M, Rucavado A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage[J]. *Biochimie*, 2000, 82(9/10):841-850.
- [42] Gutiérrez J M A, Romero M, Núñez J, et al. Skeletal muscle necrosis and regeneration after injection of BaH1, a hemorrhagic metalloproteinase isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo) [J]. *Experimental and Molecular Pathology*, 1995, 62(1):28-41.

## Animal Sciences

### Research Progress in Snake Neurotoxin and Myotoxin

LIU Gang, HE Qiyi, WANG Wenwen, YU Xiaodong

(Engineering Research Center of Active Substance and Biotechnology of Ministry of Education,

Chongqing Engineering Research Center of Bioactive Substance, Chongqing Key Laboratory of Animal Biology,

College of Life Science, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

**Abstract:** In this paper, the classification, property, structure as well as the pharmacological activity of snake venoms is all briefly reviewed. Current studies show that snake neurotoxins could be classified into three categories: presynaptic neurotoxins, postsynaptic neurotoxins as well as neurotoxin-like proteins. The first two types mainly inhibit neuromuscular transmission at the motor end plate, which could cause muscle paralysis and respiratory failure while the later could block smooth muscle contraction and ion channel. Snake myotoxins broadly fall into three types: crotoxin, cardiotoxins and myotoxic PLA<sub>2</sub>s, which could damage muscle cell membrane and degrade muscle fibers, leading to muscle necrosis. In recent years, an increasing number of snake neurotoxins and myotoxins' structures and functions have been determined, which makes the toxins have broad application prospect in clinical medicine and research filed. With further research in the aspect of the mechanism of action, the use of snake neurotoxins and myotoxins will be more and more extensive.

**Key words:** snake venom; neurotoxin; myotoxin