

小叶三点金不同萃取相对尖吻蝮蛇毒主要酶类的抑制作用*

熊艳¹, 李恒², 余晓东¹, 龙敏¹, 陈春妮¹, 向柏林¹, 朱晓艳¹, 和七一¹

(1. 重庆师范大学 生命科学学院 教育部活性物质生物技术工程研究中心 重庆市生物活性物质工程研究中心, 重庆 401331;
2. 重庆市公安局物证鉴定中心, 重庆 400021)

摘要:【目的】考察小叶三点金(*Desmodium microphyllum*)乙醇提取物不同萃取相对尖吻蝮蛇(*Deinagkistrodon acutus*)毒主要酶类的抑制作用。【方法】采用不同极性溶剂对小叶三点金乙醇提取物进行萃取,检测各萃取相对尖吻蝮蛇毒中蛋白水解酶、磷脂酶 A₂、透明质酸酶和类凝血酶的抑制作用,再结合气相色谱-质谱法(GC-MS)对抑制作用最强的萃取相进行组分分析。【结果】乙酸乙酯萃取相能够明显抑制尖吻蝮蛇毒中的蛋白水解酶、磷脂酶 A₂ 和透明质酸酶和类凝血酶的活性,经 GC-MS 分析检测出 26 种成分,其中正十六烷酸、十八碳烯酸、豆甾醇和谷甾醇具有抑制蛇毒活性的作用。【结论】小叶三点金醇提取物乙酸乙酯萃取相对尖吻蝮蛇毒中主要酶类具有明显抑制作用,能够作为有效部位用于抗蛇毒功效组分的筛选研究。

关键词:小叶三点金;尖吻蝮蛇毒;萃取;酶类;气相色谱-质谱法

中图分类号:Q599

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2018)06-0105-07

尖吻蝮蛇(*Deinagkistrodon acutus*)又称五步蛇,隶属于蝰蛇科(Viperidae)蝮亚科(Crotalinae)尖吻蝮属(*Deinagkistrodon*),仅分布于中国南方和越南部分地区,是引起中国蛇伤事故高发的主要毒蛇之一^[1]。研究发现尖吻蝮蛇毒含有蛋白水解酶、磷脂酶 A₂、透明质酸酶等酶类,能引起出血、肿胀、局部组织坏死等症状^[2]。目前,抗蛇毒血清被认为是治疗蛇伤的有效药物,但价格昂贵且不利于长时间保存。同时,抗蛇毒血清通过免疫动物制备而来,因而其中的杂蛋白可能引起过敏性休克、致热反应、血清病等副作用^[3],因此在应用时有较大的局限性。目前国内外已有研究证实不少中草药及提取物具有抑制蛇毒的作用^[4-5],这为新型治疗蛇伤药剂的研究开发提供了理论支撑。小叶三点金(*Desmodium microphyllum*)为豆科(Leguminosae)山蚂蝗属(*Desmodium*)植物,该属植物具有良好的镇痛、消炎、抗氧化、保护血管等作用;在民间也被广泛用于治疗蛇伤^[6,7],然而相关治疗效果和作用机制鲜有报道。为此,本研究对小叶三点金醇提取物不同萃取相抑制尖吻蝮蛇毒主要酶类进行研究,探究抗蛇毒活性组分的有效部位,为后期抗蛇毒组分的筛选提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

小叶三点金于 2017 年 6 月购于重庆市沙坪坝区,经植物分类学鉴定后烘干备用。该植物留样保存于重庆师范大学动物毒素与新药及保健食品研究实验室。成年尖吻蝮蛇购自湖南湘西自治州乌龙山,采用咬皿法制备蛇毒,经冷冻干燥后-20℃低温保存备用。

1.2 仪 器 与 试 剂

主要仪器为:Trace-ISQ 气相色谱-质谱仪(Thermo Fisher Scientific);TGL-20 高速冷冻离心机(四川蜀科仪器有限公司);RVC2-18 真空离心浓缩仪(Christ 公司);RE-52A 旋转蒸发器(巩义市宇翔仪器有限公司);恒温水浴锅(上海跃进医疗器械有限公司);DHG-9023A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);M1-211A 型微波炉(广东美的厨房电器制造有限公司)。

* 收稿日期:2018-01-29 修回日期:2018-10-07 网络出版时间:2018-10-25 10:41

资助项目:重庆市社会民生科技创新专项(No. cstc2015shmszx120052);重庆市自然科学基金(No. cstc2016jcyjA0224)

第一作者简介:熊艳,女,研究方向为生物毒素与药物开发,E-mail:863223470@qq.com;通信作者:和七一,高级实验师,E-mail:hqy7171@126.com

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20181025.1041.008.html>

主要试剂为:无水乙醇、石油醚(成都市科龙化工试剂厂);三氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇和丙酮(重庆川东化工(集团)有限公司);色谱级甲醇(瑞典 Oceanpak 公司);琼脂糖(Biosharp 公司);Casein from bovine milk (Switzerland 公司);透明质酸钠(XiyaReagent 公司);新生牛血浆(武汉纯度生物科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 小叶三点金的提取 取小叶三点金全株 500 g,粉碎,用体积分数为 75%的乙醇回流提取 3 次,每 2 h 提取 1 次。合并提取液并过滤,将过滤后的提取液旋转蒸发除去其中的乙醇,最终浓缩成浸膏。将所得膏状物加适量蒸馏水溶解后再依次用石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取,将 4 个萃取相及萃取后所得水相使用真空离心浓缩仪干燥后低温保存备用。进行酶活抑制实验时,先取低温保存的各萃取相干粉,用体积分数为 5%的丙酮溶解,即可配制成实验样品。

1.3.2 抑制蛋白水解酶活力检测 采用武金霞等人^[8]的方法进行检测。称取 0.2 g 琼脂糖,加入 0.05 mol·L⁻¹, pH 7.5 的磷酸缓冲溶液 16 mL,微波炉加热至琼脂糖溶解;再加入 4 mL 质量分数为 1.25%的酪蛋白溶液混匀后均匀倒板;待平板凝固后用直径为 4 mm 打孔器打孔。取 50 μg 的蛇毒与小叶三点金各萃取相样品配制质量比为 1:0.5,1:1,1:2,1:5 和 1:10 的混合溶液,37 °C 水浴 30 min 后上样,恒温 37 °C 孵育 12 h 后观察测量透明圈大小。以生理盐水和体积分数为 5%丙酮代替上述样品为对照,重复上述步骤。实验重复进行 3 次。

1.3.3 抑制磷脂酶 A₂ 活力检测 采用 Habermann 等人^[9]的方法进行检测。称取 0.2 g 琼脂糖,加入 0.05 mol·L⁻¹, pH 6.5 的醋酸钠溶液 20 mL,微波炉加热至琼脂糖溶解;待琼脂糖溶液温度降低至 50 °C 左右,加入 800 μL 蛋黄液(蛋黄与质量分数为 0.85%氯化钠溶液以 1:3 的体积比混合后,于 3 000 r·min⁻¹ 条件离心 5 min,取上清即得)和 0.01 mol·L⁻¹的氯化钙溶液 400 μL,混匀后均匀倒平板;待平板凝固后用直径为 4 mm 打孔器打孔。取 4 μg 的蛇毒与小叶三点金各萃取相样品配制质量比为 1:10,1:25,1:50,1:100 和 1:200 的混合溶液,37 °C 水浴 30 min 后上样,恒温 37 °C 孵育 9 h 后观察测量透明圈大小。以生理盐水和体积分数为 5%丙酮代替上述样品为对照,重复上述步骤。实验重复进行 3 次。

1.3.4 抑制透明质酸酶活力检测 采用 Singer 等人^[10]的方法进行检测。称取 0.2 g 琼脂糖,加入 0.2 mol·L⁻¹, pH 5.0 的醋酸钠溶液 10 mL,微波炉加热至琼脂糖溶解;称取 0.02 g 透明质酸加入 10 mL 醋酸钠溶液(0.2 mol·L⁻¹, pH 5.0)于 50 °C 水浴溶解。将上述两者混匀后倒平板;待平板凝固后用直径为 4 mm 打孔器打孔。取 50 μg 的蛇毒与小叶三点金各萃取相样品配制质量比为 1:0.5,1:1,1:2,1:5 和 1:10 的混合溶液,37 °C 水浴 30 min 后上样,恒温 37 °C 孵育 15 h,然后用质量分数为 0.75%的十六烷基三甲基溴化铵(Cetyltrimethyl ammonium bromide,CTAB)染色至出圈并测量透明圈大小。以生理盐水和体积分数为 5%丙酮代替上述样品为对照,重复上述步骤。实验重复进行 3 次。

1.3.5 抑制类凝血酶活力检测 采用 Francis 等人^[11]的方法进行检测。称取 15 μg 的蛇毒与小叶三点金各萃取相样品配制质量比为 1:5,1:10,1:25,1:50 和 1:100 的混合溶液,以生理盐水和 5%丙酮为对照,混合溶液及对照体积均为 40 μL;37 °C 孵育 30 min 后,将它们全部加到洁净的培养皿中,再加入预热到 37 °C 的牛血浆 160 μL;以加入血浆开始计时,再用移液枪枪头轻轻挑动,以能成团挑起为计时终点。整个操作在 37 °C 水浴下进行,进行 3 次重复实验。

1.3.6 GC-MS 条件 GC 条件为:色谱柱 Thermo TG-SQC GC column (15 m×0.25 mm ID×0.25 μm);载气为高纯度氦气(纯度大于或等于 99.999%);柱内载气流量 1 mL·min⁻¹,程序升温(柱初始温度 60 °C,保留 2 min;以 10 °C·min⁻¹的速率升至 120 °C,再以 5 °C·min⁻¹的速率升至 150 °C,保留 2 min;以 5 °C·min⁻¹的速率升至 280 °C,保留 5 min),分流进样,分流比为 1:1;进样量为 1 μL。MS 条件为:质谱的离子源为 EI,离子源温度 250 °C,电子能量 70 eV,传输线温度 300 °C,发射电流 50 μA,倍增电压 1 200 V,扫描范围 50~550 amu/s。

2 结果

2.1 对蛋白水解酶活性的影响

以尖吻蝮蛇毒加生理盐水对照中蛋白水解酶活力为 100%计,得到小叶三点金不同萃取相对蛇毒中蛋白水解酶活性的影响,其中:体积分数为 5%的丙酮对蛇毒中的蛋白水解酶活力无抑制作用;当蛇毒与小叶三点金乙酸乙酯萃取相质量比为 1:2 时,尖吻蝮蛇毒蛋白水解酶的活性能够被完全抑制;当蛇毒与小叶三点金三氯甲烷

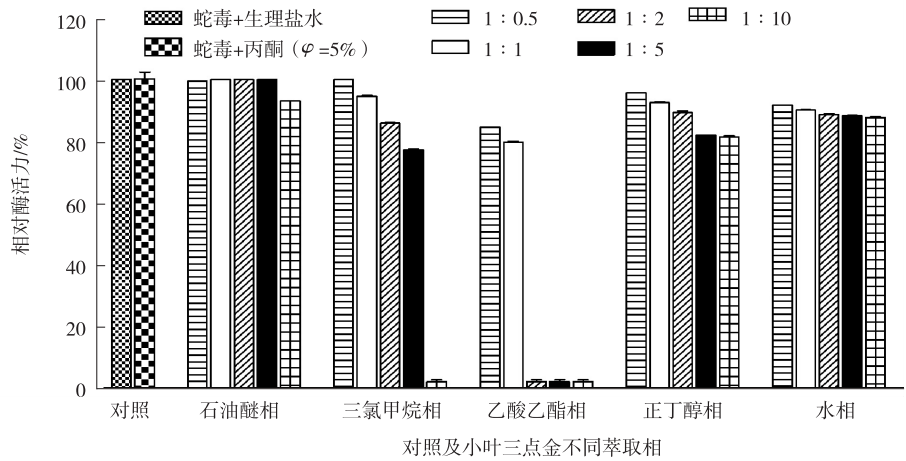
萃取相质量比达 1 : 10 时,尖吻蝮蛇毒蛋白水解酶的活性被完全抑制;而石油醚相、正丁醇相、水萃取相各质量比对蛋白水解酶活性几乎没有抑制作用(图 1)。

2.2 对磷脂酶 A₂ 活性的影响

以尖吻蝮蛇毒加生理盐水对照中磷脂酶 A₂ 活力为 100%计,得到小叶三点金不同萃取相对蛇毒中磷脂酶 A₂ 活性的影响如图 2 所示。结果显示:体积分数为 5%的丙酮对蛇毒中的磷脂酶 A₂ 无明显抑制作用;当蛇毒与小叶三点金石油醚萃取相质量比达 1 : 200 时,尖吻蝮蛇毒磷脂酶 A₂ 的活性被完全抑制;当蛇毒与小叶三点金的三氯甲烷萃取相、正丁醇萃取相和水萃取相质量比达 1 : 50 时,尖吻蝮蛇毒磷脂酶 A₂ 的活性被完全抑制;当蛇毒与小叶三点金乙酸乙酯萃取相质量比达 1 : 10 时,尖吻蝮蛇毒磷脂酶 A₂ 的活性被完全抑制。

2.3 对透明质酸酶活性的影响

以尖吻蝮蛇毒加生理盐水对照组中透明质酸酶活力为 100%计,得到小叶三点金不同萃取相对蛇毒中透明质酸酶活性的影响。从图 3 可知:体积分数为 5%的丙酮对蛇毒中的透明质酸酶无明显抑制作用;当蛇毒与小叶三点金石油醚萃取相质量比达 1 : 10 时,尖吻蝮蛇毒透明



注:图例中的比值表示蛇毒与小叶三点金样品的质量比,下同

图 1 小叶三点金不同萃取相对尖吻蝮蛇毒蛋白水解酶活性的抑制作用

Fig. 1 Inhibitory effects of different extracts of *D. microphyllum* on proteolytic enzyme activity from *D. acutus* venom

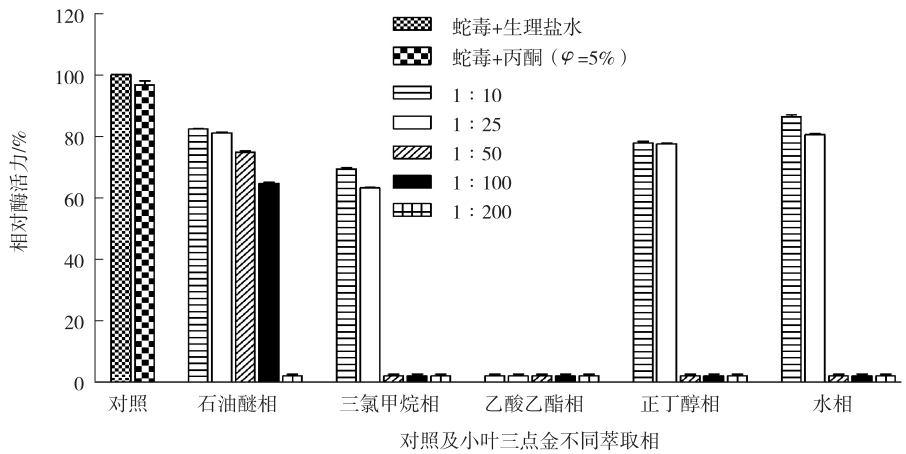


图 2 小叶三点金不同萃取相对尖吻蝮蛇毒磷脂酶 A₂ 活性的抑制作用

Fig. 2 Inhibitory effects of different extracts of *D. microphyllum* on phospholipase A₂ activity from *D. acutus* venom

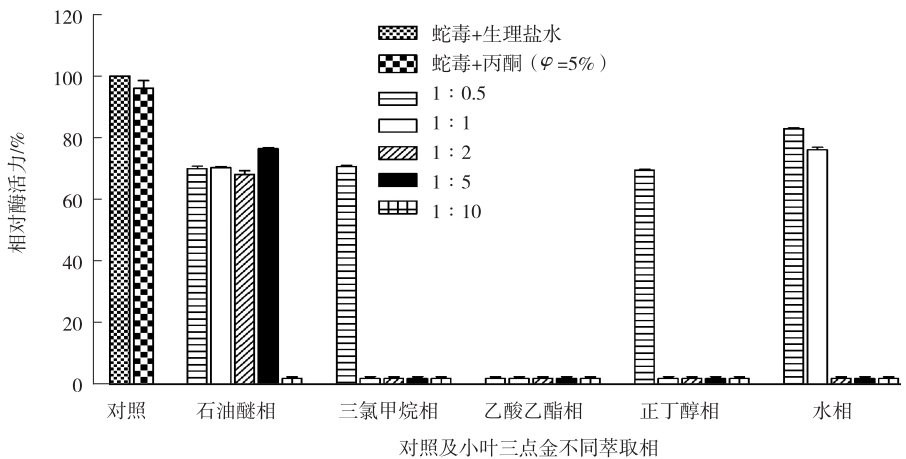


图 3 小叶三点金不同萃取相对尖吻蝮蛇毒透明质酸酶活性的抑制作用

Fig. 3 Inhibitory effects of different extracts of *D. microphyllum* on hyaluronidase activity from *D. acutus* venom

质酸酶的活性被完全抑制;当蛇毒与小叶三点金水萃取相质量比达 1:2 时,尖吻蝮蛇毒透明质酸酶的活性被完全抑制;当蛇毒与小叶三点金的三氯甲烷萃取相和正丁醇萃取相质量比达 1:1 时,尖吻蝮蛇毒透明质酸酶的活性被完全抑制;当蛇毒与小叶三点金乙酸乙酯萃取相质量比达 1:0.5 时,尖吻蝮蛇毒透明质酸酶的活性被完全抑制。

2.4 对类凝血酶活性的影响

由表 1 可知:与尖吻蝮蛇毒加生理盐水对照相比,体积分数为 5% 的丙酮对蛇毒中的类凝血酶活性无抑制作用,两者均在较短时间促使血浆出现凝聚。当蛇毒与小叶三点金正丁醇萃取相质量比为 1:100 时,在 300 s 时还未出现凝集现象;在两者质量比为 1:50,1:25,1:10 和 1:5 时,平均凝血时间依次减少,分别为 255,205,134 和 105 s。当蛇毒与小叶三点金水萃取相质量比为 1:100 时,在 300 s 时还未出现凝集现象;在两者质量比为 1:50,1:25,1:10 和 1:5 时,平均凝血时间依次减少,分别为 120,107,80 和 61 s。当蛇毒与小叶三点金石油醚萃取相质量比为 1:100 时,平均凝血时间为 97 s。当蛇毒与小叶三点金三氯甲烷、乙酸乙酯萃取相质量比为 1:25 时,在 300 s 时都还未出现凝集现象,在蛇毒与小叶三点金萃取相质量比为 1:10 时,三氯甲烷相中的平均凝血时间(53 s)少于乙酸乙酯相中的平均凝血时间(138 s)。

表 1 小叶三点金不同萃取相对尖吻蝮蛇毒类凝血酶活性的抑制作用

Tab. 1 Inhibitory effects of different extracts of *D. microphyllum* on thrombin-like enzymes activity from *D. acutus* venom

<i>m</i> 蛇毒 : <i>m</i> 萃取相	生理盐水	丙酮($\varphi=5\%$)	石油醚萃取相	三氯甲烷萃取相	乙酸乙酯萃取相	正丁醇萃取相	水相
1:0	54.0±3.0	55.0±3.5					
1:5			47.0±5.0	49.0±3.5	104.0±4.5	105.0±4.1	61.0±3.2
1:10			48.0±5.0	53.0±2.0	138.0±7.0	134.0±6.5	80.0±3.6
1:25			50.0±3.0	>300.0	>300.0	205.0±7.5	107.0±4.7
1:50			52.0±3.5	>300.0	>300.0	255.0±8.0	120.0±5.1
1:100			97.0±4.0	>300.0	>300.0	>300.0	>300.0

注:表中数据为凝血时间(单位:s)的平均值±标准差($n=3$),凝血时间测定总计时为 300 s

2.5 小叶三点金乙酸乙酯萃取相的 GC-MS 成分分析

鉴于乙酸乙酯萃取相对尖吻蝮蛇毒主要酶类具有明显抑制效果,因此选择该萃取相进行 GC-MS 成分分析,得到总离子谱图(图 4)。经过质谱数据库(National institute standard and technology, NIST)检索,用峰面积归一法计算乙酸乙酯萃取相中各成分的相对质量分数,得到如结果表 2 所示。在乙酸乙酯萃取相中检测出 26 种成分,包括烯酸、烷酸、甾醇等。其中相对含量最高的成分是三氟乙酸丁酯(12.29%),其次是芥酸酰胺(8.77%)。此外相对含量较高的还有十一烷(8.74%)、邻苯二酚(7.5%)、2,4-二叔丁基苯酚(4.57%)、 β -谷甾醇(4.22%)等。

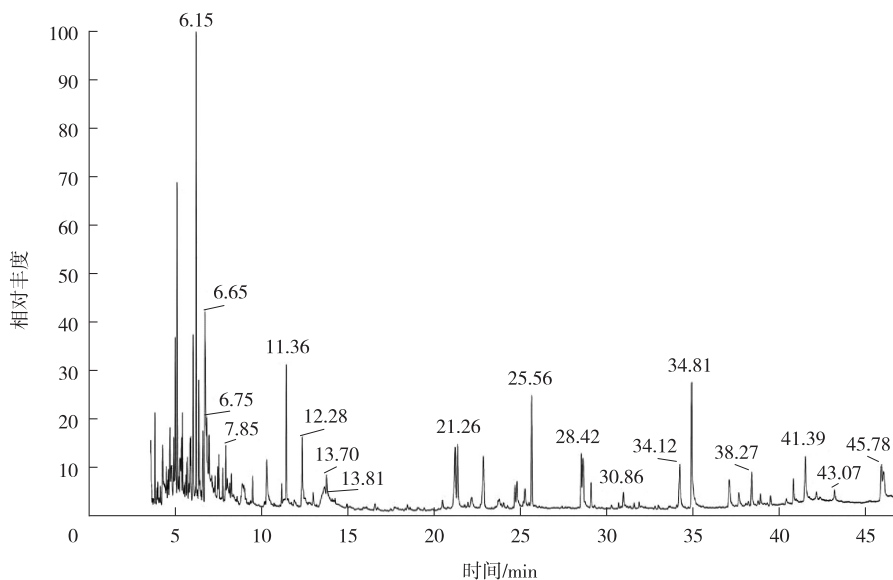


图 4 小叶三点金乙酸乙酯萃取相总离子流图

Fig. 4 Total ion chromatogram of ethyl acetate extract of *D. microphyllum*

表2 小叶三点金乙酸乙酯萃取相中各成分的相对质量分数

Tab. 2 Relative compound concentrations of ethyl acetate extract from *D. microphyllum*

保留时间/min	化学名称	分子式	相对分子质量	相对含量%
3.76	乙酸已酯	C ₈ H ₁₆ O ₂	144.115 0	1.88
4.93	4,7-亚甲基八氢茛	C ₁₀ H ₁₆	136.125 2	3.57
5.05	十一烷	C ₁₁ H ₂₄	156.187 8	8.74
5.97	1,2,3,4-四氢萘	C ₁₀ H ₁₂	132.093 9	5.21
6.15	三氟乙酸丁酯	C ₆ H ₉ C ₁₃ O ₂	217.966 8	12.29
6.29	萘	C ₁₀ H ₈	128.062 6	3.31
6.65	邻苯二酚	C ₆ H ₆ O ₂	110.036 8	7.5
7.85	1,2,3,4-四氢-6-甲基-萘	C ₁₁ H ₁₄	146.109 6	1.47
8.17	2-甲氧基-4-乙烯基苯酚	C ₉ H ₁₀ O ₂	150.068 1	0.91
9.41	十四烷	C ₁₄ H ₃₀	198.234 8	0.72
10.22	2-羟基-6-甲基-苯甲醛	C ₈ H ₈ O ₂	136.052 4	3.41
11.36	2,4-二叔丁基苯酚	C ₁₄ H ₂₂ O	206.167 1	4.57
12.28	6,6-二甲基-5-戊氧基环己-4-烯-1,3-二酮戊二酸戊酯	C ₁₃ H ₂₀ O ₃	224.141 2	3.52
21.12	3-溴-6-碘-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-羧酸甲酯	C ₈ H ₇ NO ₂ S	181.019 8	3.41
21.26	正十六烷酸	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256.240 2	2.89
22.77	苔黑酚,TBDMS 衍生物	C ₁₃ H ₂₂ O ₂ Si	238.138 9	4.49
25.56	棕榈酸丁酯	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	312.302 8	5.52
28.42	丁基-9,12-十八碳二烯酸酯	C ₂₂ H ₄₀ O ₂	336.302 8	1.58
28.52	顺式-十八碳烯酸	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282.255 9	1.91
28.99	硬脂酸丁酯	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	340.334 1	1.2
34.12	阿法沙龙	C ₂₁ H ₃₂ O ₃	332.235 1	3.78
34.81	芥酸酰胺	C ₂₂ H ₄₃ NO	337.334 5	8.77
38.27	2,6-二(1,1-二甲基乙基)-1,4-对苯二酚	C ₁₄ H ₂₂ O ₂	222.162 0	2.05
40.70	豆甾醇	C ₂₉ H ₄₈ O	412.370 5	1.28
41.39	β -谷甾醇	C ₂₉ H ₅₀ O	414.386 2	4.22
45.78	苯丙酸,3,5-二(1,1-二甲基乙基)-4-羟基-十八烷基酯	C ₃₅ H ₆₂ O ₃	530.469 9	1.78

3 讨论

尖吻蝾蛇毒含有蛋白水解酶、磷脂酶 A₂、透明质酸酶、类凝血酶等酶类^[2]。其中:蛋白水解酶含量最高,能降解胞外基质或基质膜引起组织坏死,破坏血管壁导致血液溢出,引起局部出血,释放血管活性物质引起血压剧烈下降^[12];磷脂酶 A₂ 则表现出突触前神经毒性、肌肉毒性、心脏毒性、溶血活性、抗血小板聚集、水肿等众多毒理作用^[13];透明质酸酶的主要作用是加速蛇毒向机体组织扩散^[14];蛇毒类凝血酶具有精氨酸酯酶活性直接水解纤维蛋白原 α 链或 β 链,释放血纤肽 A 或血纤肽,使得纤维蛋白单体首尾聚合而不发生侧链交联,由此形成的血凝块对纤溶酶十分敏感而易被网状内皮系统或正常的纤溶系统所清除或降解,从而表现出止血或降纤、抗凝两种作用^[15]。蛇伤发生后,上述组分单独或协同发挥作用,导致受袭动物出现中毒症状。本研究采用回流萃取法制备小叶三点金醇提物,再通过不同有机溶剂进行萃取得到各萃取相,并采用体积分数为 5% 的丙酮溶解各萃取相。研究结果显示,与生理盐水的对照相比,体积分数为 5% 的丙酮未对蛇毒主要酶类活性造成影响。酶活力抑制实验结果显示,小叶三点金乙酸乙酯萃取相能够明显抑制尖吻蝾蛇毒中的蛋白水解酶、磷脂酶 A₂、透明质酸酶和类凝血酶的活性,提示这一萃取相中存在能够与尖吻蝾蛇毒主要酶类相互作用的活性组分,从而起到治疗蛇

伤的作用。

通过 GC-MS 分析,本研究从乙酸乙酯萃取相中共检测出 26 种成分,与已有文献报道相比,发现其中含有大量具有抑制蛇毒活性的组份,如正十六烷酸、顺式-十八碳烯酸、豆甾醇、谷甾醇、邻苯二酚和 2,4-二叔丁基苯酚。其中正十六烷酸属于饱和脂肪酸,谷甾醇和豆甾醇属于植物类固醇,这两类物质具有抗氧化、抗炎的作用,能够有效地抑制蛇毒磷脂酶 A₂ 的活性,减缓并控制蛇毒引起的溶血、水肿等症状^[16-18]。十八烯酸及相关衍生物属于不饱和脂肪酸类化合物,具有维持细胞完整性、保护血管壁的作用,能够控制蛇伤引起的局部出血症状,降低蛇伤造成的氧化损伤^[16]。邻苯二酚和 2,4-二叔丁基苯酚属于酚类物质,具有抗炎、抗血管生成等药理作用,抗癌、抗真菌以及抗氧化等生物活性,推测它们可能通过抑制蛇毒引起的氧化损伤而发挥治疗功效^[19]。

总之,本研究对小叶三点金醇提物不同萃取相抑制尖吻蝮蛇毒主要酶类进行了研究,结果证实乙酸乙酯萃取相具有明显的蛇毒抑制活性,这为后期小叶三点金抗蛇毒功效组分的筛选提供了理论依据。

参考文献:

- [1] LIU Q, ZHANG X, YIN W, et al. A catalog for transcripts in the venom gland of the *Agkistrodon acutus*: identification of the toxins potentially involved in coagulopathy[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006, 341(2): 522-531.
- [2] 黄春洪, 孔毅, 吴杰连, 等. 尖吻蝮蛇毒素组双向电泳和二维液相色谱研究[J]. 中国药科大学学报, 2006, 37(2): 169-173.
HUANG C H, KONG Y, WU J L, et al. Venomics analysis of *Agkistrodon acutus* by two-dimensional electrophoresis combined with two-dimensional liquid chromatography[J]. Journal of China Pharmaceutical University, 2006, 37(2): 169-173.
- [3] GUTIERREZ J M, LEON G, BURNOUF T. Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings: the road ahead [J]. Biologicals Journal of the International Association of Biological Standardization, 2011, 39(3): 129-142.
- [4] 顾海峰, 梁晋鄂, 李春美, 等. 柿子单宁对几种蛇毒中主要酶的抑制作用及其机理初探[J]. 中国农业科学, 2008, 41(3): 910-917.
GU H F, LIANG J E, LI C M, et al. Study on inhibitory effects of persimmon tannins on activities of major enzymes from several snakevenoms and its mechanism[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2008, 41(3): 910-917.
- [5] ALCARAZ M J, HOULT J R. Effects of hypolaetin- 8-glucoside and related flavonoids on soybean lipoxygenase and snake venom phospholipase A₂ [J]. Archives Internationales De Pharmacodynamie Et De Thérapie, 1985, 278(1): 4-12.
- [6] 南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006.
Nanjing University of Chinese Medicine. Great dictionary of Chinese medicine [M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 2006.
- [7] 吴征镒. 新华本草纲要[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991.
WU Z Y. Xinhua outline of materia medica [M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1991.
- [8] 武金霞, 赵晓瑜. 酪蛋白平板法检测蚯蚓纤溶酶活性[J]. 自然杂志, 2004, 26(3): 184-185.
WU J X, ZHAO X Y. Casein-plate method for determination of earthworm fibrinolytic enzyme [J]. Chinese Journal of Nature, 2004, 26(3): 184-185.
- [9] HABERMANN E, HARDT K L. A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipases [J]. Analytical Biochemistry, 1972, 50(1): 163-173.
- [10] SINGER R, SAGIV M, ALLALOUF D, et al. Estimation of hyaluronidase activity of human semen and its relationship with sperm density by means of a simplified method [J]. International journal of fertility, 1981, 27(3): 176-180.
- [11] MARKLAND F S, DAMUS P S. Purification and properties of a thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus adamanteus* (eastern diamondback rattlesnake) [J]. Journal of Biological Chemistry, 1971, 246(21): 6460-6473.
- [12] 覃公平. 中国蛇毒学[M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 1998: 7-9.
QIN G P. China poisonous snake research [M]. Nanning: Guangxi Science and Technology Press, 1998: 7-9.
- [13] WANG Q, SHU Y, ZHUANG M. Purification and characterization of an acidic phospholipase A₂ from Guangxi *Ophiophagus hannah* [J]. Journal of Guangxi Medical University, 2001, 18(1): 1-3.
- [14] XU X, WANG X S, XI X T, et al. Studies on snake venom of *Agkistrodon acutus*- II. purification and partial characterization of hyaluronidase [J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 1983(6): 80-85.
- [15] BELLW R. Defibrinogenating enzymes [J]. Drugs, 1997, 54(sup3): 18-31.
- [16] APARNA V, DILEEP K V, MANDAL P K, et al. Anti-inflammatory property of *n*-hexadecanoic acid: structural evidence and kinetic assessment [J]. Chemical Biology &

- Drug Design, 2012, 80(3):434-439.
- [17] GOMES A, SAHA A, CHATTERJEE I, et al. Viper and cobra venom neutralization by beta-sitosterol and stigmasterol isolated from the root extract of *Pluchea indica* Less (Asteraceae)[J]. Phytomedicine International Journal of Phytotherapy & Phytopharmacology, 2007, 14(9): 637-643.
- [18] MORS W B, NASCIMENTO M C D, PEREIRA B M R, et al. Plant natural products active against snake bite-the molecular approach[J]. Phytochemistry, 2000, 55(6): 627-642.
- [19] BELGHIT S, DRICHE E H, BIJANI C, et al. Activity of 2,4-di-tert-butylphenol produced by a strain of *Streptomyces mutabilis* isolated from a Saharan soil against *Candida albicans* and other pathogenic fungi[J]. Journal De Mycologie Medicale, 2016, 26(2): 160-169.

Inhibitory Effects of Different Extractions of *Desmodium microphyllum* on Activities of Major Enzymes from *Deinagkistrodon acutus* Venom

XIONG Yan¹, LI Heng², YU Xiaodong¹, LONG Min¹, CHEN Chunni¹,
XIANG Bolin¹, ZHU Xiaoyan¹, HE Qiyi¹

- (1. Chongqing Engineering Research Center of Bioactive Substance, Ministry of Education Engineering Research Center of Active Substance and Biotechnology, College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331;
2. Institute of Forensic Science, Criminal Police Crops of Chongqing Public Security Bureau, Chongqing 400021, China)

Abstract: [Purposes] To explore inhibitory effects of different extraction portions of *Desmodium microphyllum* ethanol extracts on activities of major enzymes from *Deinagkistrodon acutus* venom. [Methods] The 75% ethanol extracts obtained from *D. microphyllum* were further fractionated by solvents with increasing polarity into five portions including petroleum ether extracts, trichloromethane extracts, ethyl acetate extracts, butyl alcohol extracts, and water extracts. The inhibitory effects of all extracts on proteolytic enzymes, phospholipase A₂, hyaluronidase, and thrombin-like enzyme from *D. acutus* venom were detected, and the extracts with the strongest inhibitory effect was analyzed using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). [Findings] The ethyl acetate extracts significantly inhibited the activities of proteolytic enzyme, phospholipase A₂, hyaluronidase, and thrombin-like enzyme from *D. acutus* venom. Based on the analysis of GC-MS, 26 components were found in the extracts. Among which, several components were associated with inhibitory activity against snake venom, including *n*-hexadecanoic acid, vaccenic acid, sitosterol, and stigmasterol. [Conclusions] The ethyl acetate portion of ethanol extracts from *D. microphyllum* significantly inhibited major enzymes from *D. acutus* venom, and it can be used as an effective source for screening of anti-sanke venom components.

Keywords: *Desmodium microphyllum*; *Deinagkistrodon acutus* venom; extraction; enzymes; gas chromatography-mass spectrometry

(责任编辑 方 兴)