

牛奶菜水提物对中华眼镜蛇毒神经毒性的抑制作用*

罗 聪, 和七一, 谭 佳, 曹雪婷, 聂学奎, 熊 艳, 王 萍, 黄达春, 余晓东

(重庆师范大学 生命科学学院 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
毒蛇养殖与深加工协同创新中心 重庆市动物生物学重点实验室, 重庆 401331)

摘要:【目的】考察牛奶菜(*Marsdenia sinensis*)水提物对中华眼镜蛇(*Naja atra*)毒神经毒性的抑制作用。【方法】利用四通道离体组织灌流系统和昆明小鼠(*Mus musculus*)离体回肠标本检测牛奶菜水提物对中华眼镜蛇毒神经毒性的抑制、即时中和与恢复作用。【结果】牛奶菜水提物对中华眼镜蛇毒神经毒性有一定抑制作用。【结论】研究结果揭示了牛奶菜用于治疗中华眼镜蛇咬伤的有效性,为后续开发抗蛇毒药物奠定了基础。

关键词:牛奶菜;中华眼镜蛇毒;颤动;离体回肠

中图分类号:Q599

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2019)03-0111-07

毒蛇咬伤是一个被忽视的公共健康问题。据估计,全世界每年有多达 250 万例毒蛇咬伤发生,其中至少造成 10 万人死亡,这些咬伤大多发生在热带和亚热带的国家和地区。在亚洲,每年有 100 多万人被毒蛇咬伤^[1-2],中国也是毒蛇咬伤高发地区之一。中华眼镜蛇(*Naja atra*)俗称吹风蛇或饭铲头,是中国十大毒蛇之一,主要分布在长江以南地区^[3-4];该蛇也是中国境内引起蛇伤事故高发的毒蛇种类之一^[5-6]。中华眼镜蛇的毒液主要为神经毒与血液毒的混合类型^[7],可导致患者局部出现疼痛、肿胀症状并引起皮肤及软组织坏死,并让患者感到头晕、眼花、胸闷、心悸等;受该蛇咬伤严重的患者还会出现呼吸肌麻痹、昏迷、呼吸心跳停止等症状,且一半以上的患者会出现单个或多个器官功能障碍^[8-12]。目前治疗蛇伤的主要方法是使用抗蛇毒血清,但抗蛇毒血清存在较多缺点,如生产成本高、保存不方便、血清中的杂蛋白引起的副作用(如过敏反应、血清病及一些并发症)等。近些年来,国内外学者发现大量中草药提取物或其中的组分具有抑制蛇毒的作用,从而为蛇伤药物的研究开发提供了新思路^[13-17]。牛奶菜(*Marsdenia sinensis*)为萝藦科(Asclepiadaceae)牛奶菜属(*Marsdenia*)植物,又被称为毛萝藦或月风藤^[18],分布于浙江、江西、湖北、湖南、江西、福建、江西、广西、四川、重庆等地。牛奶菜全株入药,具有强壮筋骨、行气止痛、舒筋活络的功效,在民间常用于治疗毒蛇咬伤等^[19-22]。然而,牛奶菜对中华眼镜蛇毒神经毒性的抑制及具体作用机制到目前为止鲜有报道。因此,本研究以昆明小鼠(*Mus musculus*)离体回肠为对象,采用四通道离体组织灌流系统研究了牛奶菜水提物对中华眼镜蛇毒神经毒性的抑制作用,以便为后期该物种抗蛇毒组分的筛选提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用牛奶菜于 2016 年 5 月在重庆市沙坪坝区购得,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。实验用中华眼镜蛇购自重庆市永川区蛇养殖场,采用咬皿法制备蛇毒,经冷冻干燥后于 -20 ℃ 低温保存备用。实验选用的 50 只体质量 40 g 左右、身体健康、雌雄不拘的昆明小鼠为陆军军医大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证号为 SCXK(渝)2017-0002。

1.2 试剂与仪器

实验用 Krebs 生理液(pH 为 7.4)由 6.919 g NaCl、0.35 g KCl、0.277 g CaCl₂、2 g 葡萄糖、2.1 g NaHCO₃、

* 收稿日期:2018-11-09 修回日期:2019-04-21 网络出版时间:2019-05-09 19:29

资助项目:重庆市自然科学基金(No. cstc2017chmsxdny0246; No. cstc2015shmszx120052)

第一作者简介:罗聪,男,研究方向为生物毒素与药物研发,E-mail:522083147@qq.com;通信作者:余晓东,男,教授,博士,E-mail:yxd@cqnu.edu.cn

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20190509.1929.016.html>

0.16 g KH_2PO_4 和 0.29 g MgSO_4 溶于 1 L 双蒸水中制成。上述试剂均购自重庆川东化工(集团)有限公司,此外实验用生理盐水(NaCl 质量分数为 0.9%)购自北京鼎国生物公司。

实验所用仪器中,Z513K 高速冷冻离心机购自 Hermle 公司,Modulyod 真空冷冻干燥机购自 Thermo Scientific 公司,LE13206 恒温器和 LE01.004 离体组织灌流系统购自 Panlab 公司,MP36 系统工作站和张力换能器购自 BIOPAC 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 回肠标本制备 参考文献[23-24]的方法,取小鼠若干只,雌雄兼用,实验前禁食 24 h,只提供饮水。将小鼠以断颈法处死,立即解剖,找到回盲结合部,取出回肠约 10 cm,放入通有 O_2 和 CO_2 混合气体($V_{\text{O}_2} : V_{\text{CO}_2} = 95\% : 5\%$)的 Krebs 液中。用 Krebs 液冲洗去除肠内容物,剪成 1.5~2 cm 数段,再剪去肠系膜,置于通有混合气体的 Krebs 液培养皿中待用。使用时取其中一段,一端固定于下钩上,另一端用线固定于张力换能器上,使肌肉达自然拉长状态。缓慢调节升降杆,稳定匀速地将肠段浸入有 12.5 mL Krebs 液的离体通道内,保持通道 37 °C 恒温,并持续通入混合气体。之后启动 Biopac 工作站,调节微型升降杆使拉力收缩位于 0.2~0.5 g 范围,计算机同步记录收缩曲线。等待回肠跳动平衡 30 min。若至 45 min 回肠跳动仍没有稳定,则直接更换新的肠段,并更换通道中的 Krebs 液。若平衡 30 min 稳定后,就可以加入待测样品,观察样品作用时间对回肠自发收缩运动的影响。采用 AcqKnowledge 4.2 软件记录和分析离体回肠自发性收缩拉力和幅度的变化。

1.3.2 牛奶菜水提物的制备 将牛奶菜洗净泥土,切碎,用双蒸水冲洗 3 次。取一部分牛奶菜直接放入 3 L 的大烧杯中,倒入双蒸水并浸没过牛奶菜,用保鲜膜封上大烧杯口,于 4 °C 放置 8 h 后,再医用纱布过滤,滤液保存于 4 °C 冰箱中,而滤渣倒回大烧杯。再向大烧杯中倒入双蒸水并浸没过牛奶菜,再按上述步骤重复 2 次。将所有滤液混合,经 45 °C 加热,真空旋转蒸发并浓缩后,封口并放入 -40 °C 的冰箱中。待滤液完全冻结后,快速放入冻干机中,于 -40 °C 的真空状态下冻干成粉。最后将此粉末保存于 -20 °C 冰箱中。实验时用生理盐水将该牛奶菜水提物配成溶质质量浓度为 $250 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的溶液。

1.3.3 中华眼镜蛇毒神经毒性测定 向离体通道中通入 12.5 mL 的 Krebs 生理液,固定小鼠离体回肠后,使它在通道中稳定 30 min,再分别加入溶解了不同质量蛇毒的生理盐水溶液。实验中蛇毒用量分别为 75,100,125,150,175,200,225,250,300,400 和 500 μg ,并保持溶解蛇毒的生理盐水溶液体积恒定为 180 μL ,从而使通道中蛇毒质量浓度分别为 6,8,10,12,14,16,18,20,24,32 和 40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。此外,设置 1 个实验中不加入任何溶液的空白对照组和 1 个实验中仅加入 180 μL 未溶解蛇毒的生理盐水的生理盐水对照组。在加入上述样品后持续观察回肠的收缩运动情况,并收集加入蛇毒后 5,10,15,20,25,30 和 35 min 时的有关数据。每一个质量浓度组分别重复 4 次实验,每次实验重复都更换新肠段。

1.3.4 牛奶菜水提物对中华眼镜蛇毒神经毒性的抑制作用 通过中华眼镜蛇毒神经毒性测定实验,可得它对小鼠离体回肠收缩运动抑制效果最佳时的剂量。以该剂量为基准,混合不同质量的牛奶菜水提物,使中华眼镜蛇毒与牛奶菜水提物的质量比分别为 1 : 50,1 : 100,1 : 150 和 1 : 200,此外,设置 1 个实验中只加入 180 μL 牛奶菜水提物溶液的水提物对照组。保持中华眼镜蛇毒与牛奶菜水提物混合液体积恒定为 180 μL ,在水浴锅中 37 °C 孵育 30 min。向离体通道中通入 12.5 mL 的 Krebs 生理液,并固定小鼠离体回肠,使之在通道中稳定 30 min;在混合液加入通道中后,持续观察回肠的收缩运动情况,并收集之后 35 min 的数据。实验重复数及肠段的更换同前文 1.3.3 部分。

1.3.5 牛奶菜水提物对中华眼镜蛇毒神经毒性的即时中和作用 在测得牛奶菜水提物对中华眼镜蛇毒神经毒性的抑制效果后,选取其中抑制效果最佳的牛奶菜水提物剂量并作为基准剂量。向离体通道中通入 12.5 mL 的 Krebs 生理液,固定小鼠离体回肠后,使之在通道中稳定 30 min,再向通道中加入抑制小鼠离体回肠收缩运动效果最佳的蛇毒剂量,分别等待 1,2,3,4,5,7,10 和 20 min 后,加入溶解了抑制中华眼镜蛇毒神经毒性最佳剂量的牛奶菜水提物的生理盐水(溶液总体积为 180 μL),持续观察回肠的收缩运动情况,并收集之后 35 min 的数据。实验重复数及肠段的更换同前文 1.3.3 部分。

1.3.6 牛奶菜水提物对中华眼镜蛇毒神经毒性的恢复作用 选取牛奶菜水提物对中华眼镜蛇毒神经毒性抑制效果最佳的剂量作为基准,向离体通道中通入 12.5 mL 的 Krebs 生理液,固定小鼠离体回肠后,待之稳定,向通道中加入抑制小鼠离体回肠收缩运动效果最佳的蛇毒剂量,等待小鼠离体回肠的收缩幅度被抑制且 5 min 内拉力

基本没有变化后,再加入不同剂量的牛奶菜水提物,使中华眼镜蛇毒与牛奶菜水提物的质量比分别为 1:50, 1:200, 1:300, 1:600 和 1:800, 观察小鼠离体回肠自发性收缩, 并收集记录之后 5, 10, 15, 20 和 25 min 时的有关数据。上述实验重复 3 次, 每次实验重复都更换新肠段。

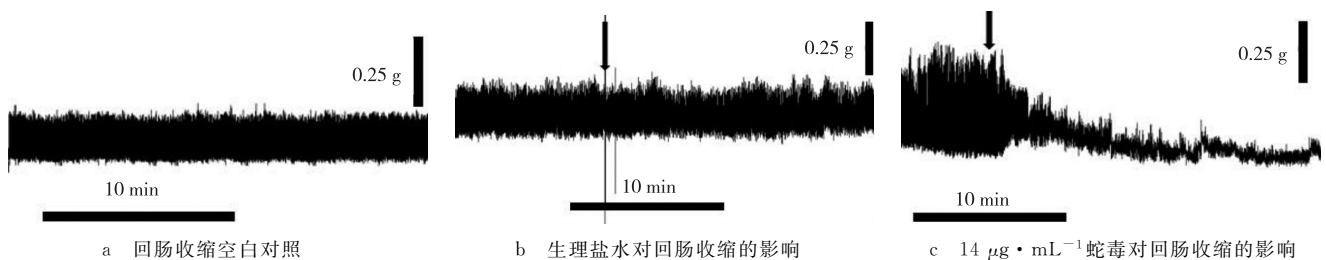
1.4 数据处理

以小鼠离体回肠收缩运动的抑制率(M)来衡量中华眼镜蛇毒的神经毒性和牛奶菜水提物对蛇毒神经毒的抑制效果, 具体计算公式为: $M = \frac{F_C}{F_P} \times 100\%$, 其中: F_C 为测定时段 5 min 内平均拉力; F_P 为加毒前 5 min 平均拉力。此外, 回肠收缩运动相对幅度(H)的计算方法为: $H = \frac{L_B}{L_A} \times 100\%$, 其中: L_A 为加毒前 5 min 回肠收缩运动的平均幅度; L_B 为测定时段 5 min 内回肠收缩运动的平均幅度。采用 Excel 2003 软件对数据进行常规计算, 并用 SPSS 19.0 软件进行独立样本 t 检验分析, 当 $p < 0.05$ 时, 检验结果具有统计学意义。

2 结果

2.1 中华眼镜蛇毒对小鼠离体回肠的抑制作用

中华眼镜蛇毒对小鼠离体回肠收缩运动的抑制作用如图 1 所示。与空白对照(图 1a)和加入生理盐水(图 1b)的处理相比, 质量浓度大于等于 $14 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的中华眼镜蛇毒确实对小鼠离体回肠收缩运动产生明显的抑制作用(图 1c), 且可以排除离体时间、生理盐水对回肠正常生理活动的影响。



注: 箭头表示加入蛇毒或生理盐水的时间点

图 1 小鼠离体回肠自发收缩示意图

Fig. 1 Schematic diagram of spontaneous contraction of mouse's isolated ileum

2.2 中华眼镜蛇毒抑制小鼠离体回肠的量效作用

不同剂量的中华眼镜蛇毒对小鼠离体回肠收缩运动的抑制率如表 1 所示。由表 1 可知, 中华眼镜蛇毒对小鼠离体回肠收缩运动的抑制率呈现一定量效趋势; 在不同剂量的蛇毒处理下, 蛇毒对回肠收缩运动的抑制率变化也具有一定时效趋势。特别地, 当中华眼镜蛇毒质量浓度达到 $14 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 与空白对照相比, 小鼠离体回肠收缩运动受到明显抑制; 而蛇毒质量浓度在 $16 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (共 $200 \mu\text{g}$ 蛇毒) 时, 蛇毒对回肠收缩运动的抑制率达到 25% 后, 再加入高于此剂量的蛇毒, 抑制率不再出现明显增长。因此, $200 \mu\text{g}$ 中华眼镜蛇毒对小鼠离体回肠收缩运动抑制作用最好。

2.3 牛奶菜水提物对中华眼镜蛇毒神经毒性的抑制作用

不同剂量的牛奶菜水提物与 $200 \mu\text{g}$ 中华眼镜蛇毒组成的混合液对小鼠离体回肠收缩运动的影响如表 2 所示。当中华眼镜蛇毒与牛奶菜水提物的质量比为 1:50 时, 牛奶菜水提物能部分抑制蛇毒神经毒性; 当二者比例为 1:100 时(牛奶菜水提物质量为 20 mg), 牛奶菜水提物几乎完全抑制蛇毒的神经活性。因此, 20 mg 的牛奶菜水提物对 $200 \mu\text{g}$ 中华眼镜蛇毒神经毒性抑制效果最好。

2.4 牛奶菜水提物对中华眼镜蛇毒神经毒性的即时中和作用

表 3 显示, 在 4 min 内加入 20 mg 牛奶菜水提物都可即时中和 $200 \mu\text{g}$ 中华眼镜蛇毒的神经毒性; 而 4 min 后, 这一即时中和作用渐渐减弱甚至消失。

2.5 牛奶菜水提物对受中华眼镜蛇毒神经毒性抑制回肠的恢复作用

由表 4 可知, 无论中华眼镜蛇毒与牛奶菜水提物质量比如何, 在 $200 \mu\text{g}$ 蛇毒已完全抑制小鼠离体回肠收缩运动后, 牛奶菜水提物都无法竞争性地与蛇毒神经毒素结合并恢复回肠的自发收缩。

表 1 不同剂量中华眼镜蛇毒对小鼠离体回肠收缩运动的抑制率

Tab. 1 Inhibition rate of different dosage of *N. atra* venom on contraction of mouse's isolated ileum

中华眼镜蛇 毒质量浓度	测定时间/min							%
	5	10	15	20	25	30	35	
6 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	151.30±0.94	150.10±2.05	129.05±1.4	124.78±0.95	111.83±0.88	115.45±1.24	112.12±0.62	
8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	125.76±1.52	97.72±2.61	77.40±1.56	68.01±1.64	66.11±1.59	64.65±1.67	64.06±1.48	
10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	149.08±1.34	96.72±0.65	70.56±0.13	64.12±5.69	56.66±5.79	48.23±5.81	46.30±6.28	
12 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	109.43±1.40	101.71±1.81	83.03±1.05	67.49±4.48	45.40±4.66	42.89±3.73	40.62±3.46	
14 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1*}$	145.28±1.15	82.11±1.09	40.75±3.07	40.77±1.50	35.42±2.13	32.16±2.27	28.19±1.86	
16 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1*}$	111.04±1.57	66.66±2.38	47.26±3.72	41.44±4.44	35.94±4.59	30.51±5.08	25.71±5.26	
18 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1*}$	112.66±1.21	70.52±1.47	62.83±2.81	55.92±4.52	45.99±3.28	35.84±2.40	24.88±3.77	
20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1*}$	100.10±1.64	62.63±2.12	54.11±1.82	56.90±1.95	44.45±1.89	35.63±2.13	28.12±2.37	
24 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1*}$	108.47±1.36	67.89±3.57	51.48±3.32	43.44±2.30	41.70±2.25	34.66±2.40	27.89±3.25	
32 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1*}$	98.97±2.24	61.35±3.13	40.41±4.22	41.34±3.39	33.18±3.07	28.17±4.30	24.94±4.22	
40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1*}$	67.30±2.09	55.6±2.22	39.50±2.73	33.28±2.60	27.20±2.46	26.17±2.90	22.71±3.15	
生理盐水对照	98.99±1.24	100.45±1.20	99.09±0.75	99.27±1.30	98.64±1.26	99.06±1.21	99.02±1.16	
空白对照	97.03±1.48	100.13±1.52	98.48±1.45	99.08±1.11	98.80±1.32	99.83±1.54	99.26±1.04	

注:标有星号标记的处理与生理盐水对照相比,数据差异具有统计学意义($p < 0.05$)

表 2 不同剂量比的牛奶菜水提取物与中华眼镜蛇毒混合液对小鼠离体回肠收缩运动的抑制率

Tab. 2 Inhibition rate of isolated ileum contraction movement in mice with different dosage ratios of *M. sinensis* aqueous extracts and *N. atra* venom

蛇毒与牛奶菜 水提取物质量比	测定时间/min							%
	5	10	15	20	25	30	35	
1 : 50 [*]	80.13±0.89	84.30±0.81	84.59±0.62	84.18±0.66	84.92±0.72	83.9±0.85	84.72±0.89	
1 : 100	91.49±0.70	91.96±2.14	97.21±2.15	97.62±1.26	97.54±1.64	97.79±1.32	97.39±1.71	
1 : 150	108.76±0.98	96.20±1.47	103.59±1.62	106.02±1.32	100.99±2.51	105.21±2.08	101.66±1.73	
1 : 200	104.21±0.96	101.17±0.98	101.86±1.36	103.21±1.58	103.69±1.96	103.41±1.81	102.88±1.97	
水提取物对照	101.30±0.03	103.01±0.02	103.95±0.37	100.91±0.56	101.08±1.18	100.91±0.40	100.81±0.28	

注:标有星号标记的处理与水提取物对照相比,数据差异具有统计学意义($p < 0.05$)

3 讨论

在中国,毒蛇咬伤是一种危害较严重的临床疾病之一。由于毒蛇咬伤多发于农村及偏远山区,而这些地区医疗条件往往较为简陋,且抗蛇毒血清匮乏,因此当地居民传统上多采用草药治疗蛇伤^[25]。但是,这些中草药的疗效缺乏科学实验证据,且治疗蛇伤的机制也不明确。因此,本研究以民间用于蛇伤治疗的草药牛奶菜为研究对象,检测和分析了牛奶菜水提取物对中华眼镜蛇毒神经毒性的抑制作用。许多研究表明,中华眼镜蛇毒是由具有生物活性和药理活性的多种分子构成

表 3 延时加入 20 mg 牛奶菜水提取物对 200 μg 中华眼镜蛇毒神经毒性的即时中和作用Tab. 3 Instantaneous neutralization of 200 μg *N. atra* venom neurotoxicity by adding 20 mg *M. sinensis* aqueous extract with time delay

牛奶菜水提取物 加入时间/min	对蛇毒神经毒性 的抑制率/%	牛奶菜水提取物 加入时间/min	对蛇毒神经毒性 的抑制率/%
1	94.03±6.18	5 [*]	44.03±4.84
2	89.87±2.33	7 [*]	47.07±6.16
3	98.97±3.22	10 [*]	16.14±4.14
4	90.11±6.32	20 [*]	11.27±4.72

注:标有星号标记的处理与生理盐水对照组比较后,数据差异具有统计学意义($p < 0.05$)

的复杂混合物,主要由几种蛋白质和多种活性肽组分构成,包括多种神经毒素、磷脂酶 A₂(PLA₂)、眼镜蛇毒因子(CVF)、心肌毒素、细胞毒素、类毒蕈碱型毒素、少量金属蛋白酶等。该蛇毒在致伤中主要体现神经毒性,主要涉及三指毒素(包括该蛇毒的大部分多肽毒素)和 PLA₂,且一部分表现为突触前神经毒素,另一部分表现为突触后神经毒素^[26-28]。本研究结果表明,中华眼镜蛇毒对小鼠离体回肠(神经肌肉突触)有明显的抑制作用,并呈现一定的量效趋势,因此该抑制作用与中华眼镜蛇毒的主要神经毒素有关,同时与有关研究的结果相吻合^[29-30]。

表 4 牛奶菜水提物对受中华眼镜蛇毒神经毒性抑制回肠的恢复作用

Tab. 4 Recovery of *M. sinensis* aqueous extracts against *N. atra* venom neurotoxicity

%

蛇毒与牛奶菜水提物质量比	回肠自然收缩幅度	受蛇毒完全抑制的回肠收缩幅度	加入牛奶菜水提物后经过时间/min				
			5	10	15	20	25
1:50	100.00	26.62±0.76	26.82±0.51	26.57±0.62	24.13±0.68	24.22±0.65	23.36±0.64
1:200	100.00	25.68±1.03	25.46±1.02	25.63±1.35	24.43±1.46	24.83±1.43	24.80±1.31
1:300	100.00	27.24±0.97	26.51±0.98	25.82±0.92	26.62±1.08	26.62±1.06	26.62±1.11
1:600	100.00	26.04±0.99	26.99±0.99	25.70±1.12	26.62±1.14	26.62±1.21	26.62±1.18
1:800	100.00	26.12±1.03	25.18±1.12	25.28±1.22	25.73±1.26	25.02±1.37	25.84±1.31

牛奶菜水提物含有多种活性物质。本研究结果表明,当中华眼镜蛇毒与牛奶菜水提物的质量比超过 1:100 时,中华眼镜蛇毒即无法抑制小鼠离体回肠的正常收缩,说明牛奶菜水提物确实能抑制中华眼镜蛇毒的神经毒性,并为中国传统医学中采用牛奶菜治疗眼镜蛇咬伤提供了实验证据。同时,牛奶菜水提物对中华眼镜蛇毒神经毒性的即时中和作用实验结果表明:蛇毒作用于回肠的时间低于 4 min 时,牛奶菜水提物可即时作用于蛇毒,发挥中和效果;但蛇毒作用时间超过 4 min 后,牛奶菜水提物对蛇毒即时中和作用趋于减弱,甚至消失。这一现象值得进一步研究,从而为临床用药提供参考。此外,牛奶菜水提物对中华眼镜蛇毒神经毒性抑制回肠的恢复作用实验结果表明,牛奶菜水提物并不能恢复已经被中华眼镜蛇毒所抑制的小鼠离体回肠自主收缩。该结果提示若中华眼镜蛇毒神经毒素已经与神经肌肉突触发生了作用,则牛奶菜水提物的加入似乎无法对这些神经毒素发挥抑制作用。这一发现对于临床治疗蛇伤具有重要的参考价值。

总之,本研究揭示了牛奶菜水提物对中华眼镜蛇毒神经毒性具有一定抑制作用,初步为中国传统医学采用牛奶菜治疗蛇伤提供了一些实验证据。但是,鉴于中华眼镜蛇毒成分及致毒机制上的复杂性,同时有关牛奶菜治疗蛇伤的组分也较为复杂^[31],因此有关研究还有待于进一步深入。本研究为有关牛奶菜水提物中抗蛇毒活性成分的深入研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] WHO. Snakebite envenoming[EB/OL]. (2018-02-20)[2018-11-09]. <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/snakebite-envenoming>.
- [2] WHO. WHO highlights critical need for life-saving antivenoms[EB/OL]. (2010-05-04)[2018-11-09]. http://www.who.int/mediacentre/news/notes/2010/antivenoms_20100504/en/.
- [3] 王威,李其斌,陈泉芳. 中华眼镜蛇咬伤中毒患者 256 例临床特点分析[J]. 山东医药,2012,52(33):46-48.
WANG W,LI Q B,CHENG Q F. Analysis of clinical characteristics of 256 cases of *Naja atra* bites poisoning patients[J]. Shandong Medical Journal,2012,52(33):46-48.
- [4] 王威,李其斌. 中华眼镜蛇咬伤的治疗[J]. 蛇志,2008,20(4):278-280.
WANG W,LI Q B. Treatment of *Naja atra* bites[J]. Journal of Snake,2008,20(4):278-280.
- [5] 王乃平,李其斌,李炳一,等. 广西 1990 年蛇伤流行病学研究[J]. 蛇志,1993,5(1):10-17.
WANG N P,LI Q B,LI B Y, et al. Epidemiological study on snake wounds in Guangxi in 1990[J]. Journal of Snake, 1993,5(1):10-17.
- [6] 张健,朱学. 国内救治毒蛇咬伤 17 年回顾[J]. 蛇志,1994,6(3):31-35.
ZHANG J,ZHU X. Chinese domestic treat snake bites 17-year review[J]. Journal of Snake,1994,6(3):31-35.
- [7] 贾艳,胡延春,张乃生. 蛇毒的毒性成分及其应用研究[J]. 蛇志,2004,16(2):23-32.
JIA Y,HU Y C,ZHANG N S. Toxic components and application research of snake venom[J]. Journal of Snake, 2004,16(2):23-32.
- [8] 高忠恩,惠仲华. 蝮蛇咬伤的中毒表现及中医辨证(附 960

- 例分析[J]. 蛇志, 1997, 9(3): 81-82.
- GAO Z E, HUI Z H. Poisoning performance of *Agkistrodon* bites and TCM syndrome differentiation (analysis of 960 cases)[J]. Journal of Snake, 1997, 9(3): 81-82.
- [9] 王威, 陈泉芳, 巫艳彬, 等. 广西境内两种常见神经毒类毒蛇咬伤中毒的临床特点与院前急救策略分析[J]. 中国全科医学, 2014, 17(14): 1671-1673.
- WANG W, CHENG Q F, WU Y B, et al. Clinical characteristics of two common neurotoxic snake bites poisoning in Guangxi and analysis of pre-hospital emergency strategies [J]. Chinese General Practice, 2014, 17(14): 1671-1673.
- [10] 王威, 李其斌, 陈泉芳. 广西境内两种竹叶青蛇咬伤中毒患者的临床特点分析[J]. 中国全科医学, 2013, 16(5C): 1798-1800.
- WANG W, LI Q B, CHENG Q F. Analysis of clinical characteristics of two kinds of *Trimeresurus stejnegeri* bites poisoning patients in Guangxi[J]. Chinese General Practice, 2013, 16(5C): 1798-1800.
- [11] 宾文凯, 邓立普, 周克兵, 等. 急诊蛇伤患者的流行特征和救治研究[J]. 中国急救医学, 2009, 29(5): 415-418.
- BING W K, DENG L P, ZHOU K B, et al. Emergency snakebite patient prevalent characteristics and clinical studies[J]. Chinese Journal of Critical Care Medicine, 2009, 29(5): 415-418.
- [12] 贺翠. 整体护理在蛇咬伤患者中的应用[J]. 现代医学, 2005, 21(19): 1589.
- HE C. Application of holistic nursing in patients with snake bites[J]. Modern Medical Journal, 2005, 21(19): 1589.
- [13] 和七一, 余晓东, 李博, 等. 小叶三点金醇提物对尖吻蝮蛇毒的抑制作用[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2018, 57(4): 128-135.
- HE Q Y, YU X D, LI B, et al. Inhibitory effects of ethanol extract of *Desmodium microphyllum* on *Deinagkistrodon acutus* venom[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2018, 57(4): 128-135.
- [14] 和七一, 熊广均, 李博, 等. 中草药徐长卿(*Cynanchum paniculatum*)治疗毒蛇咬伤的分子机制研究[J]. 中国科学: 生命科学, 2017, 47(2): 218-229.
- HE Q Y, XIONG G J, LI B, et al. Study on the molecular mechanism of Chinese herbal medicine *Cynanchum paniculatum* for treating snakebites[J]. Scientia Sinica Vitae, 2017, 47(2): 218-229.
- [15] GOMES A, DAS R, SARKHEL S, et al. Herbs and herbal constituents active against snake bite[J]. Indian Journal of Experimental Biology, 2010, 48(9): 865-878.
- [16] SOARES A M, TICLI F K, MARCUSSI S, et al. Medicinal plants with inhibitory properties against snake venom [J]. Current Topics in Medicinal Chemistry, 2005, 12(22): 2625-2641.
- [17] ASSAFIM M, De CORIOLANO E C, BENEDITO S E, et al. *Hypericum brasiliense* plant extract neutralizes some biological effects of *Bothrops jararaca* snake venom[J]. Journal of Venom Research, 2011, 2(2): 11-16.
- [18] 刘丽仙. 对牛奶菜原植物描述的补充和修正[J]. 湖南中医药大学学报, 1985(2): 37-38.
- LIU L X. Supplements and corrections to the description of *Marsdenia sinensis* Hemsl original plants[J]. Journal of Hunan University of Chinese Medicine, 1985(2): 37-38.
- [19] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1997.
- Editorial Committee of Flora of China of Chinese Academy of Sciences. Flora of China[M]. Beijing: Science Press, 1997.
- [20] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1978.
- National Chinese Herbal Medicine Compilation Group. National Chinese herbal medicine compilation[M]. Beijing: People's Medical Publishing House(PMPH), 1978.
- [21] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴第三册[M]. 北京: 科学出版社, 1974.
- Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences. Iconographia cormophytorum sinicorum tomus III [M]. Beijing: Science Press, 1974.
- [22] 酃县中药研究所. 毛茛藜治疗毒蛇咬伤 65 例临床观察 [J]. 湖南医药杂志, 1981(6): 11-12.
- Jixian Chinese Medicine Research Institute. Clinical observation of 65 cases of snake bite treated with Maoluomo [J]. Hunan Journal of Traditional Chinese Medicine, 1981(6): 11-12.
- [23] TULADHAR B R, WOMACK M D, NAYLOR R J. Pharmacological characterization of the 5-HT receptor-mediated contraction in the mouse isolated ileum [J]. British Journal of Pharmacology, 2000, 131(8): 1716-1722.
- [24] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
- XU S Y, BIAN R L, CHEN X. Experimental methodology of pharmacology[M]. 3rd edition. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002.
- [25] 邱泉. 中草药在蛇伤防治中的应用进展[J]. 蛇志, 2012, 24(1): 52-55.
- QIU Q. Progress in the application of Chinese herbal drug in the prevention and treatment of snake wounds[J]. Journal of Snake, 2012, 24(1): 52-55.
- [26] KARLSSON E, AMBERG H, EAKER D. Isolation of the

- principal neurotoxins of two *Naja naja* subspecies[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1971, 21(1):1-16.
- [27] EGGERTSEN P, LIND J, SJOQUIST J. Molecular characterization of the complement activating protein in the venom of the Indian cobra (*Naja naja siamensis*) [J]. *Molecular Immunology*, 1981, 18(2):125-133.
- [28] KUMAR T K, JAYARAMAN G, LEE C S, et al. Snake venom cardiotoxins-structure, dynamics, function and folding[J]. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 1997, 15:431-463.
- [29] 田文艺, 兰芳, 张昌平. 毛茛蓉注射液对蛇毒中毒动物保护作用的研究[J]. *湖南中医药大学学报*, 1985(1):54-55.
TIAN W Y, LAN F, ZHANG C P. Study on the protective effect of Maoluomo injection on venom poisoning animals [J]. *Journal of Hunan University of Chinese Medicine*, 1985(1):54-55.
- [30] 黄石根. 毛茛蓉治疗毒蛇咬伤 160 例报告[J]. *中国临床医生杂志*, 1986(3):17-18.
Huang S G. Report on 160 cases of snake bites treated by Maoluomo[J]. *Chinese Journal for Clinicians*, 1986(3):17-18.
- [31] 熊广均, 余晓东, 熊艳, 等. 基于 GC-MS 对牛奶菜治疗蛇伤作用机制的初步研究[J]. *重庆师范大学学报(自然科学版)*, 2019, 36(1):89-95.
XIONG G J, YU X D, XIONG Y, et al. Preliminary study of the therapeutic mechanism of *Marsdenia sinensis* on snakebite based on GC-MS[J]. *Journal of Chongqing Normal University (Natural Science)*, 2019, 36(1):89-95.

The Inhibition of Aqueous Extract from *Marsdenia sinensis* on the Neurotoxicity of *Naja atra* Venom

LUO Cong, HE Qiyi, TAN Jia, CAO Xueting, NIE Xuekui,
XIONG Yan, WANG Ping, HUANG Dachun, YU Xiaodong

(Chongqing Key Laboratory of Animal Biology, Collaborative Innovation Center of Venomous Snake Man-Culture and Deep Processing, Engineering Research Center of Active Substance and Biotechnology (Ministry of Education),
Chongqing Engineering Research Center of Active Substance, College of Life Sciences,
Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: [Purposes] To investigate the inhibitory effect of *Marsdenia sinensis* aqueous extract on the neurotoxicity of *Naja atra* venom. [Methods] *In vitro* using mouse isolated ileum fragments to detect the inhibitions, immediate neutralizations and recovery effects of the aqueous extract from Chinese herb *M. sinensis* against the neurotoxicity of *N. atra* venom. [Findings] The aqueous extract from Chinese herb *M. sinensis* has a certain inhibitory effect against the neurotoxicity of *N. atra* venom. [Conclusions] The study revealed there is some effectiveness of Chinese herb *M. sinensis* used for the treatment of *N. atra* bites, also laid a base for the future studying on the anti-venom medicines.

Keywords: *Marsdenia sinensis*; *Naja atra* venom; twitch; isolated ileum

(责任编辑 方 兴)