

蛇莓乙醇提取物抑制尖吻蝮蛇毒蛋白水解酶活性初探^{*}

向柏林,熊艳,陈春妮,龙敏,朱晓艳,和七一

(重庆师范大学 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)

摘要:【目的】初步探究蛇莓(*Duchesnea indica*)对尖吻蝮(*Deinagkistrodon acutus*)蛇毒蛋白水解酶的抑制作用。【方法】采用不同极性有机溶剂对蛇莓乙醇提取物进行分级萃取,结合硅胶薄层层析(TLC)进行分离,再利用气相色谱-质谱法(GC-MS)对抑制蛋白水解酶作用最强的活性部位进行组分分析。【结果】乙酸乙酯萃取相具有较强的抑制尖吻蝮蛇毒蛋白水解酶活性;经硅胶 TLC 分离从中获得条带1、条带2、条带3和条带4共4个条带,且条带4的尖吻蝮蛇毒蛋白水解酶抑制活性最强。通过 GC-MS 分析检测出条带4中存在15种成分,其中2,4-二叔丁基苯酚、正十六烷酸、十八烷酸、十六烷酸,2-羟基-1-(羟甲基)乙酯、硬脂酸-2-羟基-1-(羟甲基)乙酯和10,13-十八碳二炔酸甲酯可能与抑制蛇毒活性相关。【结论】蛇莓中存在抑制尖吻蝮蛇毒蛋白水解酶的功效组分,可以作为蛇伤药物开发的资源。

关键词:蛇莓;尖吻蝮蛇毒;蛋白水解酶;薄层层析;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(2019)03-0105-06

全世界共有蛇类2500种,其中毒蛇约650余种。有研究报道,目前全球每年被毒蛇咬伤的人数在30万以上,死亡率高达10%左右^[1],且毒蛇咬伤被世界卫生组织列为一种“被忽视的疾病”^[2-3]。尖吻蝮(*Deinagkistrodon acutus*)又称五步蛇、七步蛇、蕲蛇、百花蛇、中华蝮等,为蛇亚目(Serpentes)蝰蛇科(Viperidae)蝮亚科(Crotalinae)尖吻蝮属(*Deinagkistrodon*)动物,主要分布于中国南方各省如福建、江西、浙江等^[4]。尖吻蝮是引起中国蛇伤事故的主要毒蛇之一^[5-6],它的毒液含有丰富的蛋白水解酶,主要作用于血液系统,导致咬伤部位短时间内出现肿胀疼痛、出血不止、局部组织坏死等症状^[7-8]。目前,抗蛇毒血清被认为是治疗蛇伤的有效药物^[9],但它有着生产工艺复杂、价格昂贵、保存不便等不足之处,同时易造成过敏性休克、热原反应、血清病、低血压等副作用^[10],因此在蛇伤治疗方面的应用存在极大限制。

中草药作为一种含有多种药理学功效成分的天然资源库,长期以来被用于多种疾病的治疗^[11-12]。特别是在中国广大农村及偏远地区,因交通不便、经济状况不济等原因,中草药常被当地民众作为治疗蛇伤的首选药物^[13]。蛇莓(*Duchesnea indica*)作为蔷薇科(Rosaceae)蛇莓属(*Duchesnea*)植物,主要生长于辽宁以南各省区,性味甘、苦、寒,可用于散瘀消肿、收敛止血、清热解毒等^[14]。在中国民间,蛇莓被广泛应用于毒蛇咬伤事故的救治^[15],而关于它的治疗效果和作用机制的研究鲜有报道。笔者所在研究团队前期研究发现,蛇莓乙醇提取物能够明显抑制尖吻蝮蛇毒引起的小鼠(*Mus musculus*)皮下出血症状,提示蛇莓可能含有某些可以通过抑制蛇毒蛋白水解酶而发挥治疗功效的组分。为此,本研究采用不同极性有机溶剂对蛇莓乙醇提取物进行分级萃取,利用硅胶薄层层析(TLC)对萃取物进行分离,再结合气相色谱-质谱法(GC-MS)对其中活性部位的化学组分进行分析鉴定,以便为蛇莓在蛇伤救治中的进一步应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料及主要试剂、仪器

实验用蛇莓于2017年7月购于安徽省亳州市,并通过植物分类学鉴定,于60℃烘干至恒质量备用。该植物

^{*} 收稿日期:2018-04-26 修回日期:2019-04-04 网络出版时间:2019-05-09 19:30

资助项目:重庆市社民生科技专项(No. cstc2015shmszx120052);重庆市自然科学基金(No. cstc2016jcyjA0224);大学生创新创业训练项目(No. 201810637019);重庆师范大学第二届“三春湖杯”项目(No. 201801075)

第一作者简介:向柏林,女,研究方向为生物毒素与药物开发,E-mail:1031751717@qq.com;通信作者:和七一,男,高级实验师,博士,E-mail:hqy7171@126.com

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20190509.1930.032.html>

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。

色谱级甲醇购自 Oceanpak 公司;无水乙醇和石油醚购自成都市科龙化工试剂厂;三氯甲烷、乙酸乙酯和正丁醇购自重庆川东化工(集团)有限公司;琼脂糖购自 Biosharp 公司;规格为 $2.5\text{ cm} \times 7.5\text{ cm} \times 0.25\text{ mm}$ 和 $10\text{ cm} \times 10\text{ cm} \times 0.5\text{ mm}$ 的高效硅胶板 GF-254 分别购自青岛海洋化工厂和青岛邦凯高新技术材料有限公司。

Trace-ISQ GC-MS 仪购自 Thermo Fisher Scientific 公司;恒温水浴锅购自上海跃进医疗器械有限公司;RE-52A 旋转蒸发器购自巩义市宇翔仪器有限公司;RVC2-18 真空离心浓缩仪购自 Christ 公司;TGL-20 高速冷冻离心机购自四川蜀科仪器有限公司;DHG-9023A 型电热恒温鼓风干燥箱购自上海精宏实验设备有限公司;WD-9403X 蓝光观察仪购自北京六一生物科技有限公司;KS-100DE 液晶超声波清洗器购自昆山洁力美超声仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 尖吻蝮蛇毒的制备 成年尖吻蝮采用咬皿法取毒,毒液经冷冻干燥后置于密封安培瓶中, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。使用前,将蛇毒用 pH 为 7 的磷酸盐缓冲液溶解, $3\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后取上清备用。蛇毒蛋白质含量采用考马斯亮蓝法进行测定^[16]。

1.2.2 蛇莓乙醇提取物不同萃取相的制备 取干燥蛇莓全株 300 g,粉碎处理后,加入 3 000 mL 溶质体积分数为 75% 的乙醇溶液,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下每 8 h 进行 1 次浸提,共 2 次。合并 2 次滤液,在 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, 0.09 MPa 的条件下,减压浓缩除去滤液中的乙醇溶液,得到浸膏。浸膏加适量蒸馏水混悬后,依次用 3 倍体积不同极性的有机溶剂石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯和正丁醇分别萃取 3 次^[17],各萃取相分别减压浓缩为浸膏,最后冷冻干燥为粉状物质,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.3 不同萃取相抑制蛋白水解酶活性的检测 蛋白水解酶活性检测参考武金霞和 Okoroma 等人^[18-19]的方法,稍作修改。取 1.25 g 酪蛋白加到 100 mL 浓度为 $0.05\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 为 8.9 的 Tris-HCl 缓冲液中,沸水浴使之完全溶解制得酪蛋白溶液。称取 0.4 g 琼脂糖,加入 32 mL 浓度为 $0.05\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 为 7.5 的磷酸缓冲液,微波炉加热至琼脂糖溶解,再加入 8 mL 酪蛋白溶液混匀,趁热均匀倒入平板中,于室温下凝固后用直径为 4 mm 的打孔器打孔。

将蛇莓乙醇提取物的石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇和水萃取相分别用生理盐水溶解,与 $20\text{ }\mu\text{g}$ 尖吻蝮蛇毒配制成 $m_{\text{蛇毒}} : m_{\text{萃取相}}$ 分别为 $1 : 1, 1 : 5, 1 : 10, 1 : 25, 1 : 50, 1 : 100$ 的 $10\text{ }\mu\text{L}$ 混合溶液, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min 后,上样于酪蛋白琼脂糖平板;恒温 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 h 后,使用考马斯亮蓝 R-250 染色,7% 冰乙酸脱色,测量透明圈大小。以尖吻蝮蛇毒与生理盐水的混合溶液($m_{\text{蛇毒}} : m_{\text{生理盐水}} = 1 : 3.6$)作为阴性对照。上述实验重复 3 次。

1.2.4 TLC 分离与检测 将上述实验测得的对尖吻蝮蛇毒蛋白水解酶活性抑制作用最强的萃取相溶解于甲醇中,配置成溶质质量分数为 5% 的溶液,使用毛细管点样于经 $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ 活化 45 min 的硅胶板底线 1 cm 处^[20],点样直径为 1~2 mm,点样距离 1.5 cm,重复 3 次。待彻底干燥后,使用 $V_{\text{三氯甲烷}} : V_{\text{甲醇}}$ 为 8 : 2 的混合液作为展开剂,在饱和状态下室温展开;待展开剂前沿走至距板顶 1 cm 时,取出,自然晾干,在发射光波长为 254 nm 的紫外灯下检测荧光斑点^[21-22]。

用刮刀刮下硅胶板上的荧光斑点,分别收集于 EP 管中,用甲醇混悬,超声波处理 10 min, $8000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min。将获得的上清液用滤孔直径为 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 的滤膜过滤后,置于真空离心浓缩仪中干燥至粉末,分别溶于生理盐水配置成 $40\text{ }\mu\text{g}$ 的溶液。将 $10\text{ }\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的尖吻蝮蛇毒与各样品按照质量比为 $1 : 16$ 混匀, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min 后上样于酪蛋白琼脂糖平板; $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 h 后,使用考马斯亮蓝 R-250 染色,7% 冰乙酸脱色,测量透明圈大小。以尖吻蝮蛇毒和生理盐水混合液($m_{\text{蛇毒}} : m_{\text{生理盐水}} = 1 : 3.6$)作为阴性对照;以尖吻蝮蛇毒和萃取相混合液($m_{\text{蛇毒}} : m_{\text{萃取相}} = 1 : 16$)作为阳性对照。上述实验重复 3 次。

1.2.5 活性部位的 GC-MS 检测 取 TLC 分离检测后活性最强部位,用甲醇溶解配成质量浓度为 $100\text{ }\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 溶液,经滤孔直径为 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 的滤膜过滤后进行 GC-MS 检测。GC 条件为:色谱柱 Thermo TG-SQC GC column ($15\text{ m} \times 0.25\text{ mm ID} \times 0.25\text{ }\mu\text{m}$);载气为高纯度氦气(纯度大于或等于 99.999%);柱温 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$;进样口温度 $280\text{ }^{\circ}\text{C}$;柱内载气流量 $1\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;程序升温(柱初始温度 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$,恒温 2 min;以 $10\text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速率升至 $120\text{ }^{\circ}\text{C}$,再以 $5\text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速率升至 $150\text{ }^{\circ}\text{C}$,恒温 2 min;然后以 $5\text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速率升至 $280\text{ }^{\circ}\text{C}$,恒温 5 min);分流比为 $1 : 50$;溶剂延迟 3.25 min;进样量 $1\text{ }\mu\text{L}$ 。MS 条件为:质谱的离子源为 EI,离子源温度 $250\text{ }^{\circ}\text{C}$,电子能量 70 eV,倍增电压 1 200 V,发射电流 $50\text{ }\mu\text{A}$,传输线温度 $300\text{ }^{\circ}\text{C}$,扫描范围 $50 \sim 550\text{ m} \cdot \text{z}^{-1}$ 。

2 结果

2.1 蛇莓乙醇提取物不同萃取相的制备

本研究共制得蛇莓乙醇提取物墨绿色浸膏 33.5 g,提取率为 11.17%。进一步制备该提取物的不同萃取相,得到石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇和水的萃取相分别为 2.6,4.2,5.9,5.6 和 3.4 g。

2.2 不同萃取相对尖吻蝥蛇毒蛋白水解酶活性的影响

以琼脂糖-酪蛋白作为底物,检测不同萃取相对尖吻蝥蛇毒中蛋白水解酶活性的抑制作用。图 1 显示,乙酸乙酯萃取相对蛇毒中蛋白水解酶有明显的抑制作用,当 $m_{\text{蛇毒}}:m_{\text{萃取相}}=1:50$ 时,可以完全抑制蛇毒中蛋白水解酶活性;当 $m_{\text{蛇毒}}:m_{\text{萃取相}}=1:25$ 时,可以抑制 39.5% 的蛋白水解酶活性。石油醚、三氯甲烷、正丁醇和水的萃取相对蛇毒中蛋白水解酶抑制作用较低,当 $m_{\text{蛇毒}}:m_{\text{萃取相}}=1:100$ 时,也未能完全抑制蛇毒蛋白水解酶活性。

2.3 乙酸乙酯萃取相的 TLC 分离与检测

乙酸乙酯萃取相的 TLC 分离结果如封三彩图 2 所示,在 TLC 上呈现出 4 个清晰条带。各条带的 R_f 值(V_{Rf})用公式 $V_{Rf}=X/L$ 计算得到,其中: X 为荧光斑点中心与起点的距离,本研究中条带 1~4 的这一距离分别为 2.44,1.97,1.54 和 1.13 cm; L 为展开剂移动的距离,在本研究中为 5.50 cm。因此,条带 1~4 的 R_f 值分别为 0.44,0.36,0.28 和 0.21。

采用酪蛋白琼脂糖平板检测不同条带对蛇毒蛋白水解酶活性的抑制作用。由封三彩图 3 和图 4 知,条带 4 可以完全抑制尖吻蝥蛇毒蛋白水解酶活性;条带 2 无抑制效果;条带 1 和条带 3 对尖吻蝥蛇毒蛋白水解酶活性的抑制作用较低,抑制率分别为 10.07% 和 14.73%。

2.4 GC-MS 成分分析

由以上结果可知,TLC 条带 4 对尖吻蝥蛇毒蛋白水解酶活性抑制效果最明显,采用 GC-MS 对条带 4 中物质组成进行分析鉴定,得到的总离子流图如图 5 所示。经质谱数据库(National institute standard and technology,NIST)及文献标准谱图核对分析,逐个解析各峰相应的质谱图,采用气相色谱峰面积归一化法得出条带 4 中各化学成分的相对含量。结果显示,条带 4 中共鉴定出 15 种化合物,它们的化学名称、相对含量等具体信息如表 1 所示。

3 讨论

尖吻蝥为蝰蛇科蝥亚科下的一个有毒单型蛇^[23],90% 的种群分布于中国,是中国十大毒蛇之一^[24]。尖吻蝥蛇毒中含有大量蛋白水解酶,如金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶等。这些酶类能够裂解纤维蛋白分子,降解毛细血管基底膜或基底膜蛋

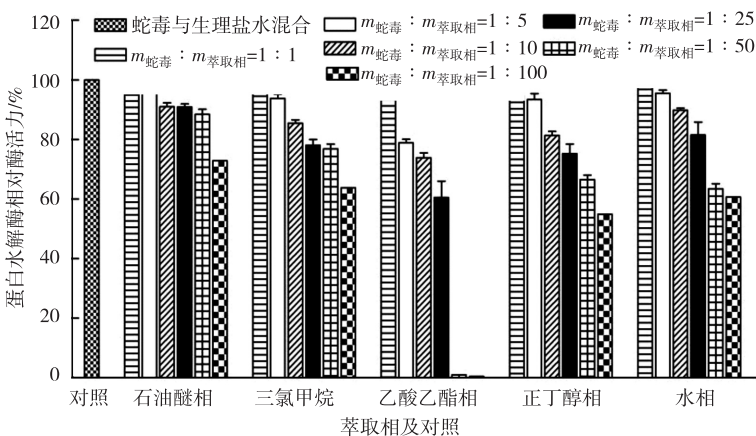


图 1 蛇莓不同萃取相对尖吻蝥蛇毒蛋白水解酶活性的抑制作用

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

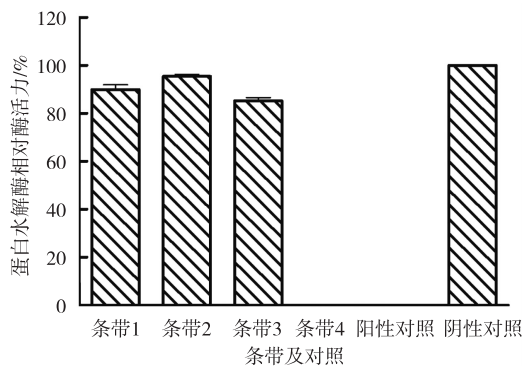


图 4 薄层层析不同条带对尖吻蝥蛇毒蛋白水解酶的相对酶活力

Fig. 4 The relative enzyme activity of different bands of thin layer chromatography on the proteolytic enzyme from *D. acutus* venom

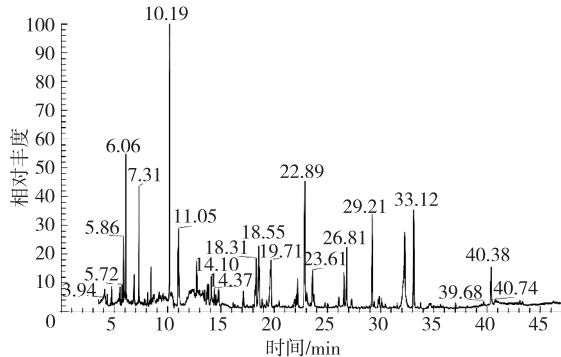


图 5 薄层层析条带 4 总离子流图

Fig. 5 Total ion chromatogram of band 4 from thin layer chromatography

白,破坏血管壁导致血液溢出,引起蛇伤患者局部或全身出血和血液不凝症状,严重危及患者的生命^[25-26]。因此,筛选开发出对蛇毒蛋白水解酶具有高效特异抑制作用的药物成分,对尖吻蝮咬伤的救治具有重要临床意义。

表 1 TLC 条带 4 的 GC-MS 分析
Tab. 1 GC-MS analysis of band 4 from TLC

保留时间/min	化学名称	分子式	相对分子质量/Da	相对含量/%
6.06	4-乙烯酚乙酸酯	C ₁₀ H ₁₀ O ₂	162	3.60
7.31	2-甲氧基-4-乙烯基苯酚	C ₉ H ₁₀ O ₂	150	3.64
10.19	2,4-二叔丁基苯酚	C ₁₄ H ₂₂ O	206	11.09
11.05	3-叔丁基-4-羟基茴香醚	C ₁₁ H ₁₆ O ₂	180	1.73
12.74	4-(6,6-二甲基-2-环己烯-3-烯亚基)-戊-2-酮	C ₁₄ H ₂₂ O	206	1.45
18.31	7,9-二叔丁基-1-氧杂螺(4,5)癸烯二酮	C ₁₇ H ₂₄ O ₃	276	4.19
18.55	7,9-二叔丁基-1-氧杂螺(4,5)癸烯二酮	C ₁₇ H ₂₄ O ₃	276	6.58
19.71	正十六烷酸	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	6.69
22.89	双-2,2'-(十二烷基亚氨基)-乙醇	C ₁₆ H ₃₅ NO ₂	273	11.71
23.61	十八烷酸	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284	2.68
26.56	2-(4-苯基苯基)-苯并呋喃	C ₂₀ H ₁₄ O	270	2.18
26.81	单胺-十六烷基葵酯-碳酸	C ₂₇ H ₅₅ NO ₂	425	3.89
29.21	十六烷酸,2-羟基-1-(羟甲基)乙酯	C ₁₉ H ₃₈ O ₄	330	6.53
32.26	硬脂酸-2-羟基-1-(羟甲基)乙酯	C ₂₁ H ₄₂ O ₄	358	13.23
33.12	芥酸酰胺	C ₂₂ H ₄₃ NO	337	7.33
40.38	10,13-十八碳二炔酸甲酯	C ₁₉ H ₃₀ O ₂	290	3.25

结合民间蛇伤治疗经验及与本研究相关的前期研究,发现蛇莓具有治疗蛇伤的功效,且它的乙醇醇提物能够抑制蛇毒出血活性。为了验证蛇莓中存在能与蛇毒蛋白水解酶相互作用的组分,本研究采用不同极性有机溶剂对蛇莓乙醇提取物进行分级萃取,并对不同萃取相抑制尖吻蝮蛇毒蛋白水解酶的活性进行了检测。结果显示,乙酸乙酯萃取相具有较强的蛋白水解酶抑制活性。基于硅胶 TLC,乙酸乙酯萃取相被分离为 4 个条带,活性检测显示条带 4 对蛋白水解酶具有明显的抑制作用。通过 GC-MS 分析,从条带 4 中共鉴定出 15 种化学成分,与已有文献报道相比,本研究发现条带 4 中可能存在 6 种具有抑制蛇毒的组分,包括:2,4-二叔丁基苯酚、正十六烷酸、十八烷酸、十六烷酸,2-羟基-1-(羟甲基)乙酯、硬脂酸-2-羟基-1-(羟甲基)乙酯和 10,13-十八碳二炔酸甲酯。其中,2,4-二叔丁基苯酚属于酚类物质,具有抗癌、抗疟、抗真菌以及抗氧化等多种生物活性,推测该物质可能通过抑制蛇毒引起的氧化损伤而发挥治疗功效^[27]。正十六烷酸及其衍生物属于饱和脂肪酸类化合物,具有抗氧化、抗炎的作用,减缓并控制蛇毒引起的溶血、水肿等症状^[28]。十八烷酸及其衍生物属于饱和脂肪酸类化合物,对蛇毒毒素造成的损伤具有缓解作用^[29]。

综合上述,本研究证实了蛇莓中存在抑制尖吻蝮蛇毒蛋白水解酶的功效组分,然而单一功效组分的分离、鉴定及作用机制尚需进一步研究。

参考文献:

[1] WILLIAMS D, GUTIÉRREZ J M, HARRISON R, et al. The global snake bite initiative: an antidote for snake bite [J]. Lancet, 2010, 375(9708): 89-91.

[2] KASTURIRATNE A, WICKREMASINGHE A R, De SILVA N, et al. The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths [J]. Plos Medicine, 2008, 5(11): 1591-1604.

[3] WARRELL D A. Snake bite [J]. Lancet, 2010, 375(9708): 77-88.

- [4] SONG H, HE S P, PENG Z G, et al. Molecular phylogeography of endangered sharp-snouted pitviper (*Deinagkistrodon acutus*; Reptilia, Viperidae) in mainland China[J]. Molecular Phylogenetics & Evolution, 2007, 44(3): 942-952.
- [5] LIU Q H, ZHANG X W, 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 & Biophysical Research Communications, 2006, 341(2): 522-531.
- [6] 罗刚, 邓立普. 蛇毒与细胞因子研究进展[J]. 蛇志, 2009, 21(2): 123-125.
- LUO G, DENG L P. Advances in snake venom and cytokines[J]. Serpentine, 2009, 21(2): 123-125.
- [7] REID H A, THEAKSTON R D. The management of snake bite[J]. Medical Journal of Australia, 1983, 61(6): 885-895.
- [8] 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.
- [9] GUTIÉRREZ J M, LEON G, LOMONTE B, et al. Antivenoms for snakebite envenomings[J]. Inflammation & Allergy-Drug Targets, 2011, 10(5): 369-380.
- [10] KARLSON-STIBER C, PERSSON H. Antivenom treatment in *Vipera berus* envenoming: report of 30 cases[J]. Journal of Internal Medicine, 2010, 235(1): 57-61.
- [11] JIANG W Y. Therapeutic wisdom in traditional Chinese medicine: a perspective from modern science[J]. Discovery Medicine, 2005, 26(11): 558-563.
- [12] KOEHN F E, CARTER G T. The evolving role of natural products in drug discovery[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2005, 4(3): 206-220.
- [13] SAMY R P, THWIN M M, GOPALAKRISHNAKONE P, et al. Ethnobotanical survey of folk plants for the treatment of snakebites in southern part of Tamilnadu, India[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2008, 115(2): 302-312.
- [14] 吴培楠, 段宏泉, 姚智, 等. 蛇莓中具有抗癌活性的三萜类成分[J]. 中草药, 2007, 38(9): 1311-1313.
- WU P N, DUAN H Q, YAO Z, et al. Triterpenoids with anticancer activity in raspberry[J]. Chinese Medicinal Herb, 2007, 38(9): 1311-1313.
- [15] 王强. 中药蛇莓的化学成分研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2006.
- WANG Q. Study on the chemical constituents of the traditional Chinese medicine snake raspberry[D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2006.
- [16] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1/2): 248-254.
- [17] 张振东, 吴兰芳, 景永帅, 等. 仙茅提取物体外抗氧化活性研究[J]. 中国老年学, 2009, 29(24): 3201-3203.
- ZHANG Z D, WU L F, JING Y S, et al. Study on antioxidant activity of fescue extract *in vitro*[J]. Chinese Gerontology, 2009, 29(24): 3201-3203.
- [18] WU J X, ZHAO X Y. Casein-plate method for determination of earthworm fibrinolytic enzyme[J]. Ziran Zazhi, 2004, 26(3): 184-185.
- [19] OKOROMA E A, GARELICK H, ABIOLA O O, et al. Identification and characterisation of a *Bacillus licheniformis*, strain with profound keratinase activity for degradation of melanised feather[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2012, 74(10): 54-60.
- [20] CHATTERJEE I, CHAKRAVARTY A K, GOMES A. Antisnake venom activity of ethanolic seed extract of *Strychnos nux vomica* Linn[J]. Indian Journal of Experimental Biology, 2004, 42(5): 468-475.
- [21] SHRIKANTH V M, JANARDHAN B, MORE S S. *In vitro* neutralization of *Eachis carinatus* and *Naja naja* venom by *Canthium parviflorum* and its GC-MS analysis[J]. Bangladesh Journal of Pharmacology, 2016, 11(4): 920-927.
- [22] 周斌, 程丹, 李洁, 等. 二次展开薄层色谱法同时分析山蜡梅中8种化合物[J]. 中成药, 2013, 35(12): 2752-2754.
- ZHOU B, CHENG D, LI J, et al. Simultaneous determination of eight compounds in *Sargassum chinensis* by TLC with secondary development[J]. Chinese Patent Drug, 2013, 35(12): 2752-2754.
- [23] WANG Y M, WANG J H, TSAI I H. Molecular cloning and deduced primary structures of acidic and basic phospholipases A2 from the venom of *Deinagkistrodon acutus*[J]. Toxicon, 1996, 34(10): 1191-1196.
- [24] 胡建国. 尖吻蝮蛇毒研究进展[J]. 蛇志, 2012, 24(1): 56-57.
- HU J G. Research progress of *Agkistrodon acutus* venom[J]. Serpentine, 2012, 24(1): 56-57.
- [25] ESCALANTE T, SHANNON J, MOURA-DA-SILVA A M, et al. Novel insights into capillary vessel basement membrane damage by snake venom hemorrhagic metalloproteinases: a biochemical and immunohistochemical study[J]. Archives of Biochemistry & Biophysics, 2006, 455(2): 144-153.
- [26] 覃公平. 中国毒蛇学[M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 1998.
- QIN G P. China poisonous snake research[M]. Nanning: Guangxi Science and Technology Press, 1998.
- [27] 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.
- [28] 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.
- [29] GOPI K, RENU K, JAYARAMAN G. Inhibition of *Naja naja*, venom enzymes by the methanolic extract of *Leucas aspera* and its chemical profile by GC-MS[J]. *Toxicology Reports*, 2014, 1: 667-673.

A Preliminary Study on Inhibition of the Ethanol Extract from *Duchesnea indica* on Proteolytic Enzymes from *Deinagkistrodon acutus* Venom

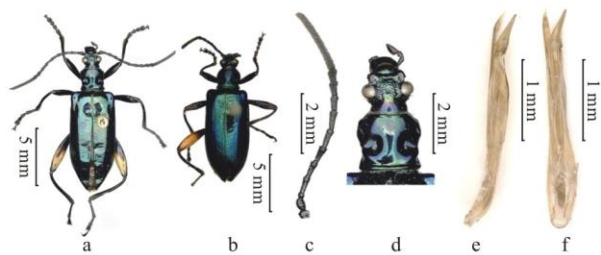
XIANG Bolin, XIONG Yan, CHEN Chunni, LONG Min, ZHU Xiaoyan, HE Qiyi
(Chongqing Engineering Research Center of Bioactive Substance,
Ministry of Education Engineering Research Center of Active Substance and Biotechnology,
Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: [Purposes] To explore inhibitory effects of *Duchesnea indica* on proteolytic enzymes from *Deinagkistrodon acutus* venom. [Methods] The ethanol extract from *Duchesnea indica* was fractionated by liquid-liquid extraction with solvents of increasing polarity, followed by silica gel thin-layer chromatography (TLC) for separation. The components of the band with strong inhibitory effect on proteolytic enzymes were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). [Findings] The activities of proteolytic enzymes from *D. acutus* venom were significantly inhibited by the ethyl acetate extract. The ethyl acetate extract was further separated using silica gel TLC, and four bands were found. Among which, the fourth band remarkably inhibited proteolytic enzymes of the venom. Based on the analysis of GC-MS, 15 components were found in the fourth band. Most importantly, 6 components were associated with inhibitory activity against snake venom, including 2,4-di-tert-butylphenol, *n*-hexadecanoic acid, octadecanoic acid, hexadecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl ester, octadecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl ester, 10,13-octadecadienoic acid, methyl ester. [Conclusions] The extract of *Duchesnea indica* could inhibit proteolytic enzymes from *D. acutus* venom, and it could be used as a resource for the development of snakebite drugs.

Keywords: *Duchesnea indica*; *Deinagkistrodon acutus* venom; proteolytic enzymes; silica gel thin-layer chromatography; gas chromatography-mass spectrometry

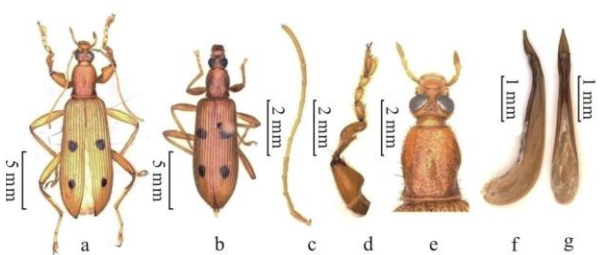
(责任编辑 方 兴)

(接正文52~54页)



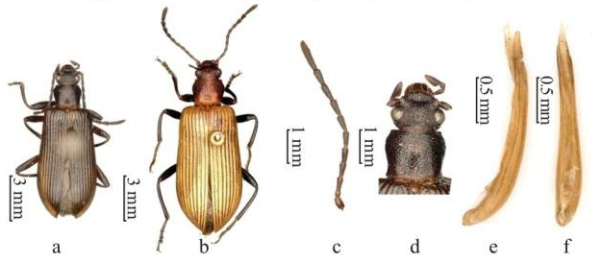
注：a~f分别为雄性(成虫)，雄性(刚羽化)，雄性触角，雄性的头、前胸背板和小盾片，雄性外生殖器侧面观和雄性外生殖器正面观

图1 印管伪叶甲
Fig. 1 *Donaciolagria impressipennis* Pic, 1914



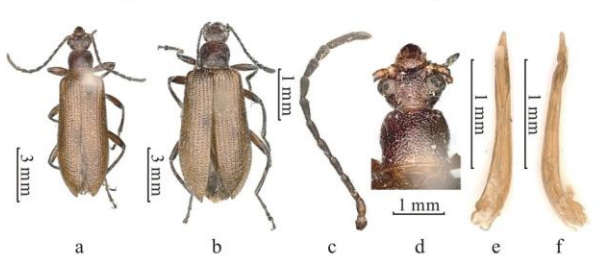
注：a~g分别为成虫雄性，成虫雌性，雄性触角，雄性前足，雄性的头、前胸背板和小盾片，雄性外生殖器侧面观和雄性外生殖器正面观

图2 四斑外伪叶甲
Fig. 2 *Exostira bisbimaculata* Pic, 1935



注：a~f分别为成虫雄性，成虫雌性，雄性触角，雄性的头、前胸背板和小盾片，雄性外生殖器侧面观和雄性外生殖器侧面观

图3 富士大伪叶甲
Fig. 3 *Macrolagria fujisana* Lewis, 1895



注：a~f分别为成虫雄性，成虫雌性，雄性触角，雄性的头、前胸背板和小盾片，雄性外生殖器正面观和雄性外生殖器侧面观

图4 粗头大伪叶甲
Fig. 4 *Macrolagria robusticeps* (Lewis, 1895)



注：a~f分别为成虫雄性，成虫雌性，雄性触角，雄性的头、前胸背板和小盾片，雄性外生殖器正面观和，雄性外生殖器侧面观

图5 紫色丘伪叶甲
Fig. 5 *Sora purpureipennis* Borchmann, 1930

(接正文107页)

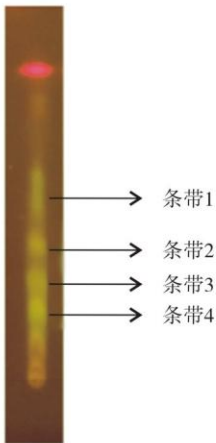


图2 蛇毒乙酸乙酯萃取相的薄层层析分离
Fig. 2 Thin layer chromatography separation of ethyl acetate extract from *D. indica*

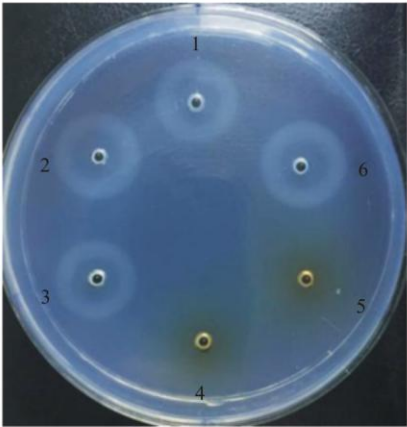


图3 薄层层析不同条带对尖吻蝮蛇毒蛋白水解酶活性的酪蛋白平板检测结果
Fig. 3 The casein plate test results of different bands from thin layer chromatography on the proteolytic enzyme activity of *D. acutus* venom

注：1, 2, 3和4号孔分别为薄层层析条带1, 条带2, 条带3和条带4的上样孔；5号孔为阳性对照即尖吻蝮蛇毒和萃取相混合液(两者质量比为1:16)上样孔；6号孔为阴性对照即尖吻蝮蛇毒和生理盐水混合液(两者质量比为1:3.6)上样孔