DOI:10.11721/cqnuj20190607

中华眼镜蛇血清对自身蛇毒中主要酶类活性的抑制作用*

王 萍[1],李 恒[2],和七一[1],胡先成[1],熊 艳[1],彭建军[1],余晓东[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 动物生物学重庆市市级重点实验室,重庆 401331;2. 重庆市公安局 物证鉴定中心,重庆 400021)

摘要:【目的】探究中华眼镜蛇(*Naja atra*)血清对自身蛇毒中主要酶类活性的抑制作用。【方法】不同稀释倍数的中华眼镜蛇血清与蛇毒于 37 ℃孵育 30 min 后,检测蛇毒中磷脂酶 A_2、透明质酸酶、乙酰胆碱酯酶、L-氨基酸氧化酶和 5′-核苷酸酶活性的变化情况。【结果】中华眼镜蛇血清对自身蛇毒中磷脂酶 A_2 和 5′-核苷酸酶具有明显的抑制作用:当血清稀释 2 倍时,可以使蛇毒磷脂酶 A_2 活性降低 28.44%($p<0.001$);当血清稀释 8 倍时,可以使蛇毒中 5′-核苷酸酶活性活性降低 23.44%($p<0.001$)。中华眼镜蛇血清对自身蛇毒中的透明质酸酶、乙酰胆碱酯酶和 L-氨基酸氧化酶均无抑制作用。【结论】中华眼镜蛇血清中存在蛇毒磷脂酶 A_2 和 5′-核苷酸酶的抑制剂,该结果为后期蛇毒抑制剂的筛选提供了理论依据。

关键词:中华眼镜蛇;血清;蛇毒;抑制作用

中图分类号:Q599 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-6693(2019)06-0132-07

毒蛇咬伤是一个严重的公众健康问题。2009 年,世界卫生组织首次将毒蛇咬伤认定为一种长期被忽视的人类健康问题。在中国,每年约有 10 万人被毒蛇咬伤,蛇伤致死率高达 5%~10%[1-2]。目前,抗蛇毒血清被认为是最为有效的蛇伤治疗药物,然而该药物主要通过免疫马(*Equus caballus*)等动物制备而来,价格昂贵且程序繁琐,同时容易引起淋巴结肿大、呕吐、关节痛、注射部位出现红斑等过敏反应[3-4]。因此,寻求新的蛇伤治疗制剂或蛇毒抑制剂显得尤为重要。

近些年来,能够抑制多种蛇毒的活性组分在无毒蛇和有毒蛇血清中被大量发现[5-6]。在有毒蛇中,有研究者通过使用离子交换层析与亲和层析的方法在美洲矛头蝮(*Bothrops jararaca*)血清中分离出 γ 型磷脂酶 A_2 抑制剂,该抑制剂具有抑制磷脂酶 A_2 的活性,能有效控制水肿和肌坏死等症状[7];Gimenes 等人[8]通过阴离子交换层析与亲和层析在南美响尾蛇 (*Crotalus durissus collilineatus*)血清中分离纯化出磷脂酶 A_2 抑制剂;Huang 等人[9]在龟壳花蛇(*Trimeresurus mucrosquamatus*)血清中分离纯化出新型的蛋白酶抑制剂;Omori-Satoh 等人[10]通过超速离心、凝胶电泳、圆盘电泳、免疫电泳和等电聚焦的方法在黄绿烙铁头(*Trimeresurus flavoviridis*)血清中分离出抗出血因子;Soares 等人[11]在慕杰僧矛头蝮(*Bothrops moojeni*)血浆中发现磷脂酶 A_2 肌毒性抑制剂,该抑制剂能够广泛地抑制矛头蝮属的碱性与酸性的磷脂酶 A_2。在无毒蛇中,Zhong 等人[12]在颈棱蛇(*Macropisthodon rudis*)血清中人发现 γ 型磷脂酶 A_2 抑制剂,具有抑制体外磷脂酶 A_2 的活性;Okumura 等人[13]在日本四线锦蛇(*Elaphe quadrivirgata*)中发现 β 型磷脂酶 A_2 抑制剂,该抑制剂广泛抑制第Ⅱ类磷脂酶 A_2 中的碱性磷脂酶 A_2;Shiraia 等人[14]在日本锦蛇 (*Elaphe climacophora*)血清中发现磷脂酶 A_2 抑制剂,该抑制剂能特异性地抑制短尾蝮(*Gloydius brevicaudus*)中碱性磷脂酶 A_2。这些研究结果提示,蛇类血清中存在多种抑制蛇毒的活性组分,可作为蛇毒抑制剂筛选的资源库。

中华眼镜蛇(*Naja atra*)隶属眼镜蛇科(Elapidae)眼镜蛇亚科(Elapinae)眼镜蛇属(*Naja*),广泛分布于中国南方,属于大型前沟牙类毒蛇,是中国十大毒蛇之一[15]。中华眼镜蛇蛇毒中含有磷脂酶 A_2、透明质酸酶、乙酰胆碱酯酶、5′-核苷酸酶、L-氨基酸氧化酶等酶类[16]。中华眼镜蛇造成的蛇伤能导致局部皮肤及软组织肿胀、坏死,并造成头晕、眼花、胸闷等全身中毒症状[17]。目前,国内外尚无关于中华眼镜蛇血清对自身蛇毒抑制作用的研究。为此,本研究以中华眼镜蛇血清为研究对象,探究它对自身蛇毒中主要酶类活性的抑制作用,以期为从该蛇

* **收稿日期:**2019-04-18 **修回日期:**2019-06-10 **网络出版时间:**2019-11-25 10:35

资助项目:国家自然科学基金(No. 31470570);重庆市科技局社会事业与民生保障科技创新专项(No. cstc2017shms-xdny80077)

第一作者简介:王萍,女,研究方向为生物毒素与药物开发;E-mail:2405363586@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.20191125.1034.030.html

血清中分离出蛇毒抑制剂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

用于采集血清和蛇毒的中华眼镜蛇为重庆师范大学毒蛇养殖与深加工协同创新中心饲养。取 3 条体质量为 1～2 kg 的成体蛇，2 条雄蛇，1 条雌蛇，断头取血，将血液在 4 ℃过夜；随后以 3 000 r・min^{-1}在 4 ℃下离心 15 min，取上清液，即为该蛇的血清；然后分装，并于－20 ℃下保存备用。采用咬皿挤压法采集中华眼镜蛇毒，蛇毒冷冻干燥后于－20 ℃密闭保存备用。

1.2 方法

1.2.1 血清对蛇毒中磷脂酶 A_2活性的影响　中华眼镜蛇蛇毒中磷脂酶 A_2活性的检测参考 Habermann 等人[18]的方法。称取 0.2 g 琼脂糖，加入 0.05 mol・L^{-1}且 pH 为 6.5 的醋酸钠溶液 20 mL，放入微波炉中加热至琼脂糖融化，待温度降至 50 ℃时，加入 800 μL 蛋黄液和 400 μL 质量分数为 2％的氯化钙溶液，混合均匀后铺板。蛋黄液的制作方法为：将鸡蛋黄与质量分数为 0.85％的氯化钠溶液以 1∶3 的体积比混合后，3 000 r・min^{-1}离心 5 min，取上清液即可。待平板凝固后，使用直径为 3 mm 的打孔器打孔。每孔分别加入 10 μL 不同质量浓度的蛇毒样品使其中的蛇毒质量分别为 0，10，20，40，60，80 和 100 μg，置于湿盒中密封，37 ℃恒温孵育 5 h 后取出，测量并记录透明圈的直径。用生理盐水作为阴性对照，每个剂量重复 3 次，选取能产生直径约为 10 mm 的透明圈所需的蛇毒剂量作为中华眼镜蛇血清中和蛇毒中磷脂酶 A_2的基础用量。将基础用量的蛇毒与稀释 0，2，4，8 和 16 倍的中华眼镜蛇血清分别混合，37 ℃下水浴 30 min，随后 5 000 r・min^{-1}离心 5 min，取上清液加入卵黄平板点样孔中，再对各孔中磷脂酶 A_2的活性进行检测，重复 3 次。以不加入血清的基础用量蛇毒样品所产生的透明圈作为对照，它的磷脂酶 A_2酶相对活性设定为 100％。

1.2.2 血清对蛇毒中透明质酸酶活性的影响　中华眼镜蛇蛇毒中透明质酸酶活性的检测参考王晓玉等人[19]的方法。分别将含有 0，187.5，375，750，1 500 和 3 000 μg 蛇毒的样品溶液各 30 μL 与 30 μL 质量分数为 0.5％透明质酸溶液混合，37 ℃水浴 30 min 后，加入沸水浴中煮沸 5 min 终止反应，5 000 r・min^{-1}离心 5 min。取 24 μL 上清液，随后加入 48 μL DNS 试剂混匀后煮沸 5 min，冷却后于 540 nm 处读取吸光值。用磷酸钠缓冲液作为对照，每个剂量重复 3 次。选取吸光值为 0.25 时所对应的蛇毒剂量作为中华眼镜蛇血清中和蛇毒中透明质酸酶的基础用量。将基础用量的蛇毒与稀释 0，2，4，8 和 16 倍的中华眼镜蛇血清分别混合，37 ℃下水浴 30 min，随后 5 000 r・min^{-1}离心 5 min，取上清液 30 μL，检测其中透明质酸酶的活性，重复 3 次。以不加入血清的基础用量蛇毒样品在 540 nm 处吸光值作为对照，将其中的透明质酸酶相对活性设定为 100％。

1.2.3 血清对蛇毒中 5′-核苷酸酶活性的影响　中华眼镜蛇蛇毒中 5′-核苷酸酶活性的检测参考左凤琼等人[20]的方法，分别将含有 0，62.5，125，250，500，750 和 1 000 μg 蛇毒的样品溶液各 10 μL 与 10 μL 的 0.5 mol・L^{-1}氯化镁溶液、100 μL 的 7 mmol・L^{-1}且 pH 为 7.8 的腺苷一磷酸溶液混合，37 ℃下孵育 30 min，随后加入 17.5 μL 的 2.5 mol・L^{-1}硫酸溶液终止反应，5 000 r・min^{-1}离心 5 min。取上清液 100 μL 与 5 μL 显色液混合，随后 30 ℃下水浴 45 min，于 690 nm 处的读取吸光值。用磷酸钠缓冲液作为对照，每个剂量重复 3 次。选取吸光值为 0.25 时所需的蛇毒剂量作为中华眼镜蛇血清中和蛇毒中 5′-核苷酸酶的基础用量。将基础用量的蛇毒与稀释 0，2，4，8 和 16 倍的中华眼镜蛇血清分别混合，37 ℃下水浴孵育 30 min，随后 4 000 r・min^{-1}离心 5 min，取 10 μL上清液检测其中 5′-核苷酸酶的活性，重复 3 次。以不加入血清的基础用量蛇毒样品在 690 nm 处的吸光值作为对照，将其中的 5′-核苷酸酶相对活性设定为 100％。

1.2.4 血清对蛇毒中乙酰胆碱酯酶活性的影响　参考 Ellman 等人[21]的方法检测中华眼镜蛇蛇毒中乙酰胆碱酯酶活性。分别将含有 0，0.49，0.98，1.95，3.90，7.81 和 15.63 μg 蛇毒的样品溶液各 25 μL 与 50 μL 的 3 mmol・L^{-1}碘代硫代乙酰胆碱溶液混合，37 ℃下孵育 20 min，随后加入 25 μL 的 1.2 mol・L^{-1}三氯乙酸终止反应，以 4 000 r・min^{-1}离心 6 min。取 75 μL 的上清液与 350 μL 的 0.76 mmol・L^{-1} 5，5′-二硫代双(2-硝基苯甲酸)混合，于 414 nm 读取吸光值。用磷酸钠缓冲液作为对照，每个剂量重复 3 次。选取吸光值为 0.25 时所需的蛇毒剂量作为中华眼镜蛇血清中和蛇毒中乙酰胆碱酯酶的基础用量。将基础用量的蛇毒与稀释 0，2，4，8 和 16 倍的中华眼镜蛇血清分别混合，37 ℃下水浴 30 min 后，随后 5 000 r・min^{-1}离心 5 min，取 25 μL 上清液，检测其中乙酰胆碱酯酶的活性，重复 3 次。以不加入血清的基础用量蛇毒样品在 414 nm 处的吸光值作为对照，将其中的乙酰胆碱酯酶相对活性设定为 100％。

1.2.5 血清对蛇毒中L-氨基酸氧化酶酶活性的影响　中华眼镜蛇蛇毒中L-氨基酸氧化酶活性参考文献[16]的方法进行检测，分别将含有0，125，250，500，1 000，1 500和2 000 μg蛇毒的样品溶液各20 μL与100 μL的0.1 mol·L^{-1} L-亮氨酸溶液混合，37 ℃孵育2 h，随后加入100 μL质量分数为27%的三氯乙酸终止反应，5 000 r·min^{-1}离心5 min。取100 μL上清液与100 μL蒸馏水和300 μL的奈氏试剂混匀后，于430 nm读取吸光值。以25 mmol·L^{-1}且pH为7.8的Tris-HCl溶液作为对照，每个剂量重复3次。选取吸光值为0.25时所需的蛇毒剂量作为中华眼镜蛇血清中和蛇毒中L-氨基酸氧化酶的基础用量。将基础用量的蛇毒与稀释0，2，4，8和16倍的中华眼镜蛇血清分别混合，37 ℃下水浴30 min，随后5 000 r·min^{-1}离心5 min。取20 μL的上清液，检测其中L-氨基酸氧化酶的活性，重复3次。以不加入血清的基础用量蛇毒样品在430 nm处的吸光值作为对照组，L-氨基酸氧化酶相对活性设定为100%。

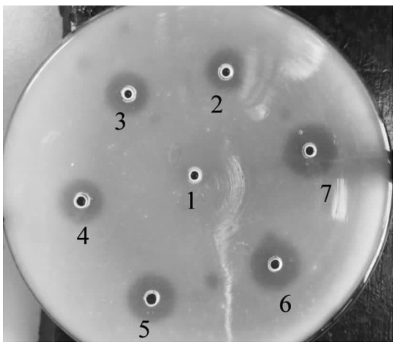
1.3 数据分析

所得数据均用$\bar{x}\pm s$表示。采用Excel 2007软件就透明圈直径或吸光值对蛇毒质量制作工作曲线，采用SPSS 18.0软件对数据进行单因素方差分析，当$p<0.05$时，分析结果具有统计学意义。

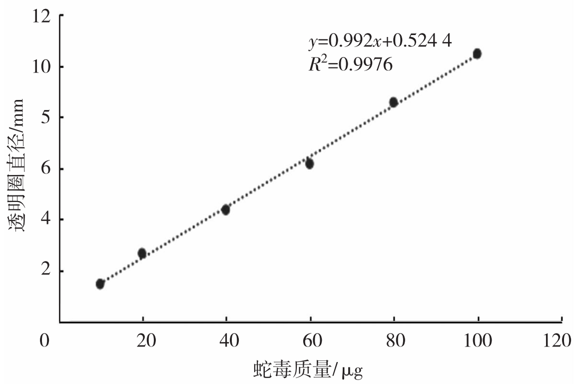
2 结果

2.1 中华眼镜蛇血清对自身蛇毒中磷脂酶A_2活性的影响

结果显示，中华眼镜蛇毒中磷脂酶A_2水解产物)产生的透明圈(图1a)直径大小与蛇毒质量呈剂量依赖关系(图1)，即：随着蛇毒质量的增加，蛇毒中磷脂酶A_2水解产物产生的透明圈直径也逐渐增加。通过测量透明圈直径，以透明圈直径对蛇毒用量作图，各点之间所确定的直线具有线性相关性($R^2=0.997\ 6$，$p<0.05$)。经计算，形成的透明圈直径约为10 mm所对应的蛇毒质量为130 μg，故以此作为衡量中华眼镜蛇血清中和自身蛇毒中磷脂酶A_2的基础用量。



注：1~7孔中蛇毒质量分别为0，10，20，40，60，80和100 μg。

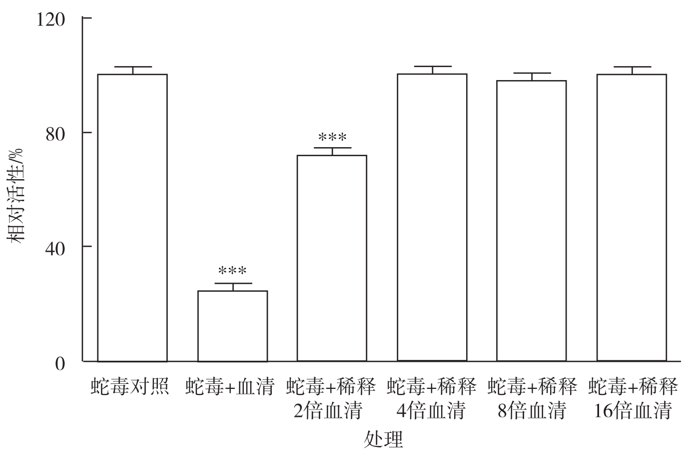


a　磷脂酶A_2产生透明圈效果　　b　蛇毒剂量与透明圈直径之间的量效关系

图1　中华眼镜蛇蛇毒中磷脂酶A2活性测定

Fig.1　Determination of phospholipase A_2 activity in *N. atra* venom

不同稀释倍数的中华眼镜蛇血清对自身蛇毒中磷脂酶A_2酶活性的抑制作用如图2所示。随着血清稀释倍数的减小，蛇毒中磷脂酶A_2酶活性明显降低。与蛇毒对照相比，未稀释血清、稀释2倍血清可分别导致蛇毒磷脂酶A_2酶活性降低75.4%，28.44%，且差异均具有统计学意义($p<0.001$)。此外，其余稀释倍数的血清对蛇毒中磷脂酶A_2酶活性均无统计学意义上的抑制作用。



注：***表示在$p<0.001$水平上与蛇毒对照相比数据差异具有统计学意义，下同。

图2　不同稀释倍数的中华眼镜蛇血清对自身蛇毒中磷脂酶A_2活性的影响

Fig.2　Effect of different dilution ratios of *N. atra* serum on phospholipase A_2 activity from *N. atra* venom

2.2 中华眼镜蛇血清对自身蛇毒中透明质酸酶活性的影响

封三彩图3a显示，当中华眼镜蛇蛇

毒质量的增加时，透明质酸酶的水解产物与 DNS 试剂反应后所显示的颜色加深。读取波长为 540 nm 处的吸光值，以吸光值对蛇毒质量作图（封三彩图 3b），各点之间所确定的直线具有线性相关性（$R^2 = 0.994$，$p < 0.05$）。将吸光值为 0.25 时所对应的蛇毒质量即 1 584 μg 作为衡量中华眼镜蛇血清中和自身蛇毒中透明质酸酶的基础用量。

不同稀释倍数的中华眼镜蛇血清对自身蛇毒中透明质酸酶活性的抑制作用如图 4 所示。与蛇毒对照相比，不同稀释倍数的血清对蛇毒中透明质酸酶酶活性均统计学意义上的无抑制作用。

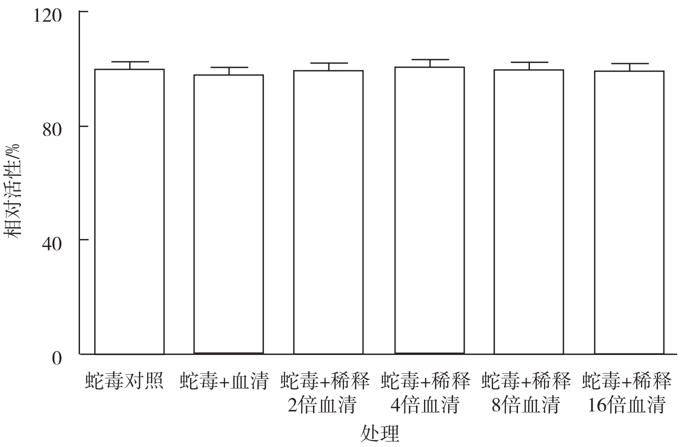


图 4　不同稀释倍数的中华眼镜蛇血清对自身蛇毒中透明质酸酶活性的影响

Fig. 4　Effect of different dilution ratios of *N. atra* serum on hyaluronidase activity from *N. atra* venom

2.3 中华眼镜蛇血清对自身蛇毒中 5′-核苷酸酶活性的影响

中华眼镜蛇毒中 5′-核苷酸酶的水解产物与显色液反应，颜色变化如封三彩图 5a 所示。随着蛇毒质量增加，显色反应后所显示的颜色也逐渐加深。在波长为 690 nm 处读取溶液的吸光度值，以吸光度值对蛇毒质量作图，如封三彩图 5b 所示。由该图可知，吸光度与蛇毒质量成量效关系（$R^2 = 0.995\ 1$，$p < 0.05$）。选取吸光值为 0.25 时所对应的蛇毒质量即 1 038 μg 作为基础用量，用于中华眼镜蛇血清中和自身蛇毒中 5′-核苷酸酶的分析研究。

不同稀释倍数的中华眼镜蛇血清对自身蛇毒中 5′-核苷酸酶活性的抑制作用如图 6 所示。随着血清稀释倍数的减少，蛇毒中 5′-核苷酸酶活性逐渐降低。与蛇毒对照相比，未稀释血清以及稀释 2，4，8 倍血清可导致蛇毒中 5′-核苷酸酶活性分别降低 35.73%，28.63%，28.04% 和 23.44%，且差异均具有统计学意义（$p < 0.001$）。此外，加入稀释 16 倍的血清的处理与蛇毒对照相比，两者的 5′-核苷酸酶活性并无统计学意义上的差异，即该稀释倍数的血清对蛇毒中 5′-核苷酸酶活性无明显抑制作用。

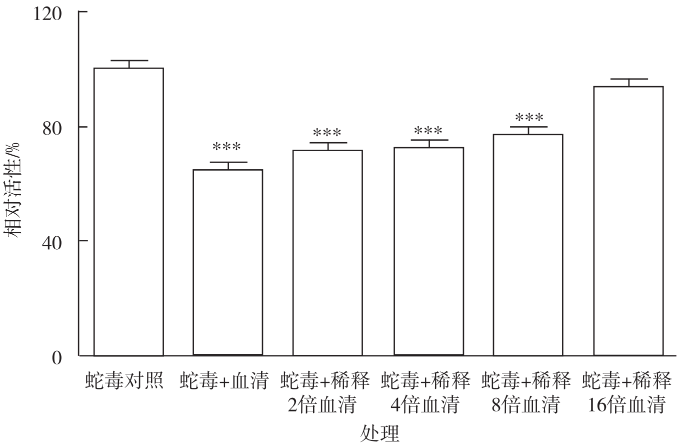


图 6　不同稀释倍数的中华眼镜蛇血清对自身蛇毒中 5′-核苷酸酶活性的影响

Fig. 6　Effect of different dilution ratios of *N. atra* serum on 5′-nuclease activity from *N. atra* venom

2.4 中华眼镜蛇血清对自身蛇毒中乙酰胆碱酯酶活性的影响

眼镜蛇毒中乙酰胆碱酯酶对溴代硫代乙酰胆碱水解生成的硫代胆碱产物与 DTNB 反应产生有色阴离子，眼镜蛇毒与反应的显色深浅成剂量关系（封三彩图 7a），即随着蛇毒质量增加，产生的水解产物越多，显色反应后所显示的颜色也逐渐加深。在波长为 414 nm 处读取溶液的吸光度值，以吸光度值对蛇毒值量作图，如封三彩图 7b 所示。该图显示，吸光度与蛇毒用量成量效关系（$R^2 = 0.998\ 5$，$p < 0.05$）。选取吸光值为 0.25 时所对应的蛇毒质量即 2.1 μg 作为基础用量，用于中华眼镜蛇血清中和自身蛇毒中乙酰胆碱酯酶的分析研究。

不同稀释倍数的中华眼镜蛇血清对自身蛇毒中乙酰胆碱酯酶活性的抑制作用如图 8 所示。从图 8 可见，与蛇毒对照相比，无论加入的血清稀释倍数如何，蛇毒中乙酰胆碱酯酶活性均未有统计学意义上的变化，即血清对蛇毒中乙酰胆碱酯酶活性无明显的抑制作用。

2.5 中华眼镜蛇血清对自身蛇毒中 L-氨基酸氧化酶活性的影响

蛇毒中 L-氨基酸氧化酶的水解产物与奈氏试剂显色反应结果见封三彩图 9a。随着蛇毒质量的增加，显色反应后所显示的颜色也逐渐加深。在波长为 430 nm 处读取吸光值，以吸光度值对蛇毒质量作图（封三彩图 9b）。由该图可知，吸光值与蛇毒用量成量效关系（$R^2 = 0.997\ 4$，$p < 0.05$）。选取吸光值为 0.25 时所需的蛇毒质量即

174.4 μg 作为基础用量,用于分析中华眼镜蛇血清对自身蛇毒中 L-氨基酸氧化酶活性的影响。

不同稀释倍数的中华眼镜蛇血清对自身蛇毒中 L-氨基酸氧化酶活性的抑制作用如图 10 所示。该图显示,与蛇毒对照相比,加入不同稀释倍数的血清并未让对蛇毒中 L-氨基酸氧化酶活性发生统计学意义上的变化,因此对该酶的活性均无明显抑制作用。

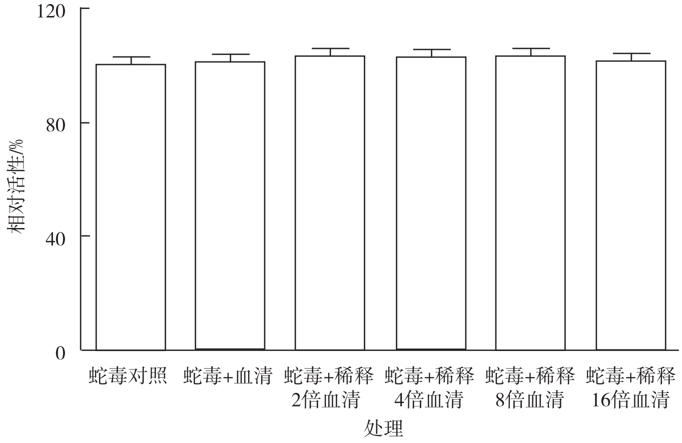


图 8 不同稀释倍数的中华眼镜蛇血清对自身蛇毒中乙酰胆碱酯酶活性的影响

Fig. 8 Effect of different dilution ratios of *N. atra* serum on acetylcholinesterase activity from *N. atra* venom

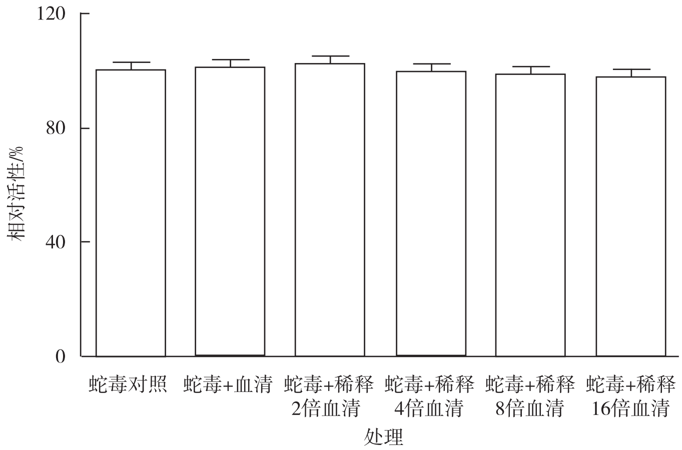


图 10 不同稀释倍数的中华眼镜蛇血清对自身蛇毒中 L-氨基酸氧化酶活性的影响

Fig. 10 Effect of different dilution ratios of *N. atra* serum on L-amino acid oxidase activity from *N. atra* venom

3 讨论

中华眼镜蛇毒中含有磷脂酶 A_2、透明质酸酶、5′-核苷酸酶、乙酰胆碱酯酶、L-氨基酸氧化酶等酶类[16]。蛇伤发生后,蛇毒组分单独或协同发挥作用,导致被咬伤的人或动物出现中毒症状[22]。其中,蛇毒磷脂酶 A_2 具有多种毒理作用,包括神经毒性、肌肉毒性和心脏毒性;该酶能直接或间接地影响血小板聚集,造成溶血、水肿等症状[23-24]。本研究结果显示,中华眼镜蛇血清对自身蛇毒中磷脂酶 A_2 具有明显的抑制作用。同样地,在其他有毒蛇和无毒蛇的血清中,多种类型的磷脂酶 A_2 抑制剂已经被发现。可以推测,这可能与磷脂酶 A_2 广泛存在于蛇毒中有关,这是蛇类为了免受同类攻击而进化出来的一种保护机制。蛇毒中 5′-核苷酸对血小板聚集具有诱导作用,促进 ADP 诱导的血小板聚集[25]。本研究结果显示,中华眼镜蛇血清对自身蛇毒中 5′-核苷酸酶具有明显的抑制作用。透明质酸酶又称为“扩散因子”,能够水解透明质酸导致局部的细胞外基质的结构完整性变形,加速毒素的扩散[26-27];L-氨基酸氧化酶能够引起蛇伤动物出现水肿和溶血[28];乙酰胆碱酯酶能降解神经递质乙酰胆碱,终止神经递质对突触后膜的刺激作用[29-30]。本研究结果显示,中华眼镜蛇血清对自身蛇毒中的透明质酸酶、乙酰胆碱酯酶和 L-氨基酸氧化酶活性均无明显的抑制作用,这提示中华眼镜蛇血清中可能不存在这些酶类的抑制剂。

总之,本研究初步探究了中华眼镜蛇血清对自身蛇毒中主要酶类的抑制作用,结果证实该蛇的血清对自身蛇毒中磷脂酶 A_2 和 5′-核苷酸酶的活性具有明显抑制作用,这为为后期蛇毒抑制剂的筛选提供了理论依据。

参考文献:

[1] 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 envenomingand deaths[J]. Public Library of Science Medicine, 2008, 5(11): 1591-1604.

[2] GUTIÉRREZ J M, THEAKSTON R D G, WARRELL D A. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership[J]. Public Library of Science Medicine, 2006, 3(6): 727-731.

[3] 龙春萍,杨伟艳,黄善华,等.毒蛇咬伤早期程序化综合救治与护理[J].护理实践与研究,2015,12(8):34-35.
LONG C P, YANG W Y, HUANG S H, et al. Early procedural comprehensive treatment and nursing of snake bites [J]. Nursing Practice and Research, 2015, 12(8): 34-35.

[4] GUTIÉRREZ J M, LEÓN G, BURNOUF T. Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings: the road a-

head[J]. Biologicals,2011,39(3):129-142.

[5] STRIGHT R,GLENN J L,SNYDER C C. Antivenom activity of rattlesnake blood plasma[J]. Nature,1976,261(5557):259-260.

[6] CLARK W C,VORIS H K. Venom neutralization by rattlesnake serum albumin[J]. Science,1969,164(3886):1402-1404.

[7] SERINO-SILVA C,MORAIS-ZANI K,HIKARI TOYAMA M,et al. Purification and characterization of the first γ-phospholipase inhibitor (γPLI) from *Bothrops jararaca* snake serum[J]. Public Library of Science ONE,2018,13(3):1-16.

[8] GIMENES S N C,FERREIRA F B,SILVERIA A C P,et al. Isolation and biochemical characterization of a γ-type phospholipase A_2 inhibitor from *Crotalus durissus collilineatus* snake serum[J]. Toxicon,2014,81:58-66.

[9] HUANG K F,CHOW L P,CHIOU S H. Isolation and characterization of a novel proteinase inhibitor from the snake serum of Taiwan habu (*Trimeresurus mucrosquamatus*)[J]. Biochemical and Biophysical Research Communi-cations,1999,263(3):610-616.

[10] OMORI-SATOH T,SADAHIRO S,OHSAKA A. et al. Purification and characterization of an antihemorrhagic factor in the serum of *Trimereserus jiavovlrldis*,a crotalid[J]. Biochimica Biophysica Acta,1972,285(2):414-426.

[11] SOARES A M,MARCUSSI S,STÁBELI R G,et al. Structural and functional analysis of BmjMIP,a phospholipase A_2 myotoxin inhibitor protein from *Bothrops moojeni* snake plasma[J].Biochemical and Biophysical Research Communications,2003,302(2):193-200.

[12] ZHONG L P,HUANG C H. Isolation and biochemical characterization of a gamma-type phospholipase A_2 inhibitor from *Macropisthodon rudis* snake serum[J]. Toxicon,2016,122(1):1-6.

[13] OKUMURA K,INOUE S,IKEDA K,et al. Identification of β-type phospholipase A_2 inhibitor in a nonvenomous snake,*Elaphe quadrivirgata*[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics,2002,408(1):124-130.

[14] SHIRAIA R,TORIBAB M,HAYASHIA K,et al. Identification and characterization of phospholipase A_2 inhibitors from the serum of the Japanese rat snake,*Elaphe climacophora*[J]. Toxicon,2009,53(6):685-692.

[15] WALLACH V,WüSTER W,BROADLEY D G. In praise of subgenera:taxonomic status of cobras of the genus *Naja Laurenti* (Serpentes:Elapidae)[J]. Zootaxa,2009,2236(2236):26-36.

[16] 云南省动物研究所第四研究室.蛇毒的研究和利用Ⅰ.我国几种常见毒蛇的蛇毒酶活力的测定[J].生物化学与生物物理学报,1976,8(2):151-156.
Yunnan Provincial Institute of Zoology,Fourth Research Laboratory. Study and utilization of snake venom I. determination of snake enzyme activity of several common viper snakes in China[J]. Journal of Biochemistry and Biophysics,1976,8(2):151-156.

[17] 林正奎,罗毅.中华眼镜蛇咬伤治疗研究概况[J].蛇志,2018,30(2):327-330.
LIN Z K,LUO Y. Survey of *Naja atra* bites treatment research[J]. Journal of Snake,2018,30(2):327-330.

[18] HABERMANN E,HARDT K. A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipases[J]. Analytical Biochemistry,1972,50(1):163-173.

[19] 王晓玉,刘飞,张莉,等.重组人透明质酸酶3种活性测定方法的比较[J].食品与药品,2011,13(1):5-8.
WANG X Y,LIU F,ZHANG L,et al. Comparison of three methods for determination of recombinant human hyaluronidase[J]. Food and Medicine,2011,13(1):5-8.

[20] 左凤琼,李虹,吴艳红,等.孔雀绿比色法测定5'-核苷酸酶的活性[J].华西药学杂志,2004,19(6):435-436.
ZUO F Q,LI H,WU Y H,et al. Determination of 5'-nucleotidase activity by malachite green colorimetry[J]. Huaxi Pharmaceutical Journal,2004,19(6):435-436.

[21] ELLMAN G L,COURTNEY K D,ANDRES V,et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity[J]. Biochemical Pharmacology,1961,7(2):88-95.

[22] 张迎征.野生与人工养殖的中华眼镜蛇(*Naja atra*)毒液的比较研究[D].重庆:重庆师范大学,2016.
ZHANG Y Z. Comparative study on venom of wild and artificially cultured *Naja atra*[D]. Chongqing:Chongqing Normal University,2016.

[23] KINI R M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A_2 enzymes[J]. Toxicon,2003,42(8):827-840.

[24] HARRIS J B. Phospholipases in snake venoms and their effects on nerve and muscle[J]. Pharmacology & Therapeutics,1985,31(1/2):79-102.

[25] 张秉怡.白眉毒蛇蛇毒5'-核苷酸酶分离纯化及理化性质研究[D].昆明:昆明理工大学,2010.
ZHANG B Y. Isolation, purification and physicochemical properties of 5'-nucleotidase from the snake venom[D]. Kunming:Kunming University of Science and Technology,2010.

[26] GIRISH K S,KEMPARAJU K. Inhibition of *N. naja* venom hyaluronidase by plant-derived bioactive components and polysaccharides[J]. Biochemistry,2005,70(8):948-952.

[27] GIRISH K S,SHASIDHARAMURTHY R,NAGARAJU S,et al. Isolation and characterization of hyaluronidase a

"spreading factor" from Indian cobra (*N. naja*) venom [J]. Biochimie, 2004, 86(3): 193-202.

[28] IZIDORO L F M, RIBEIRO M C, SOUZA G R L, et al. Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2006, 14(20): 7034-7043.

[29] LEWIS R L, GUTMANN L. Snake venom and the neuromuscular junction [J]. Seminars in Neurology, 2004, 24 (2): 175-179.

[30] 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 snake venoms and its mechanism[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2008, 41(3): 910-917.

Inhibitory Effect of *Naja atra* Serum on the Activities of Major Enzymes from Its Venom

WANG Ping[1], LI Heng[2], HE Qiyi[1], HU Xiancheng[1], XIONG Yan[1], PENG Jianjun[1], YU Xiaodong[1]

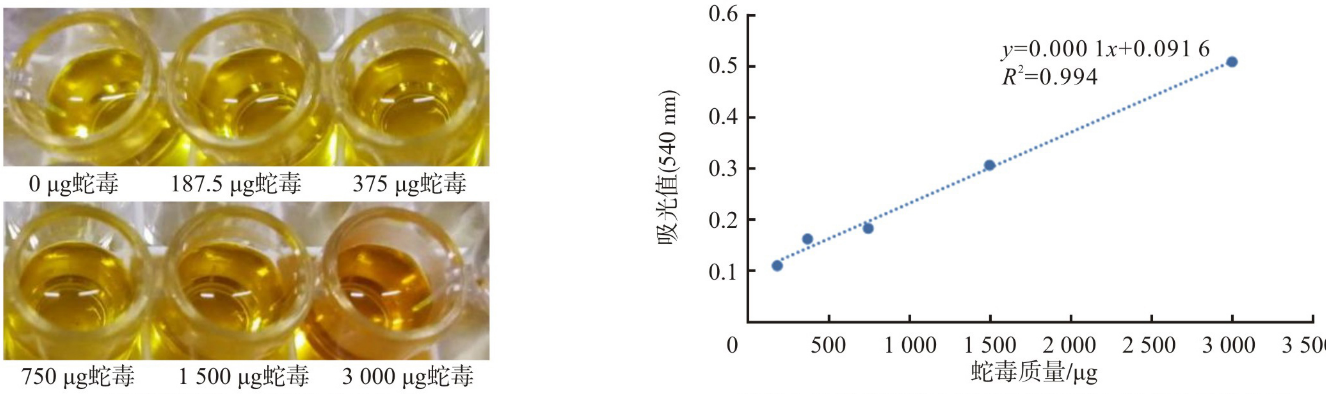
(1. Chongqing Key Laboratory of Animal Biology, Chongqing Engineering Research Center of Bioactive Substance, Ministry of Education Engineering Research Center of Active Substance and Biotechnology, College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331; 2. Institute of Forensic Science,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

Abstract: [**Purposes**]To investigate the inhibitory effect of *Naja atra* serum on the activities of major enzymes from its venom. [**Methods**]The activities of phospholipase A_2, hyaluronidase, acetylcholinesterase, L-amino acid oxidase and 5′-nucleotidase from *N. atra* venom were detected after preincubation the venom with a series of diluted serum samples at 37 ℃ for 30 min. [**Findings**] The *N. atra* serum significantly inhibited the activities of phospholipase A_2 and 5′-nucleotidase from its venom. The activity of phospholipase A_2 was decreased by 28.44% ($p<0.001$) when serum was diluted by 2 times. The 5′-nucleotidase activity was decreased by 23.44% ($p<0.001$) when the serum was diluted by 8 times. However, the serum did not inhibit the activities of hyaluronidase, acetylcholinesterase and L-amino acid oxidase from *N. atra* venom. [**Conclusions**]There are inhibitors of phospholipaseA_2 and 5′-nucleotidase of *N. atra* venom in its serum, which provides a theoretical basis for the screening of venom inhibitors.

Keywords: *Naja atra*; serum; snake venom; inhibition

(责任编辑　方　兴)

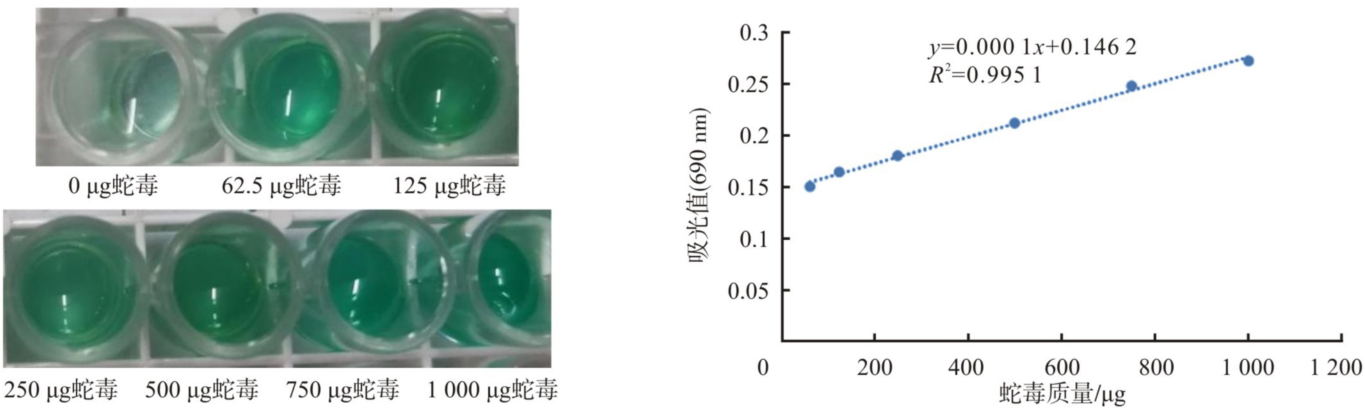
（接正文134~135页）



a　透明质酸酶水解产物显色效果　　b　蛇毒中透明质酸酶水解产物吸光值与蛇毒的量效关系

图3　中华眼镜蛇蛇毒中透明质酸酶活性检测

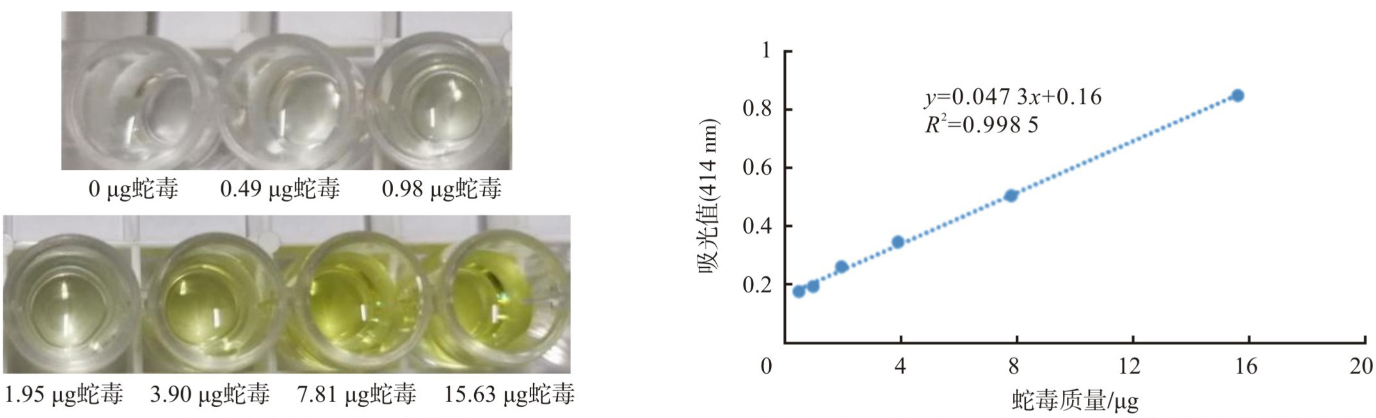
Fig. 3　Detection of hyaluronidase activity from *N. atra* venom



a　5′-核苷酸酶水解产物显色效果　　b　蛇毒中的5′-核苷酸酶水解产物吸光值与蛇毒的量效关系

图5　中华眼镜蛇蛇毒中5′-核苷酸酶活性测定

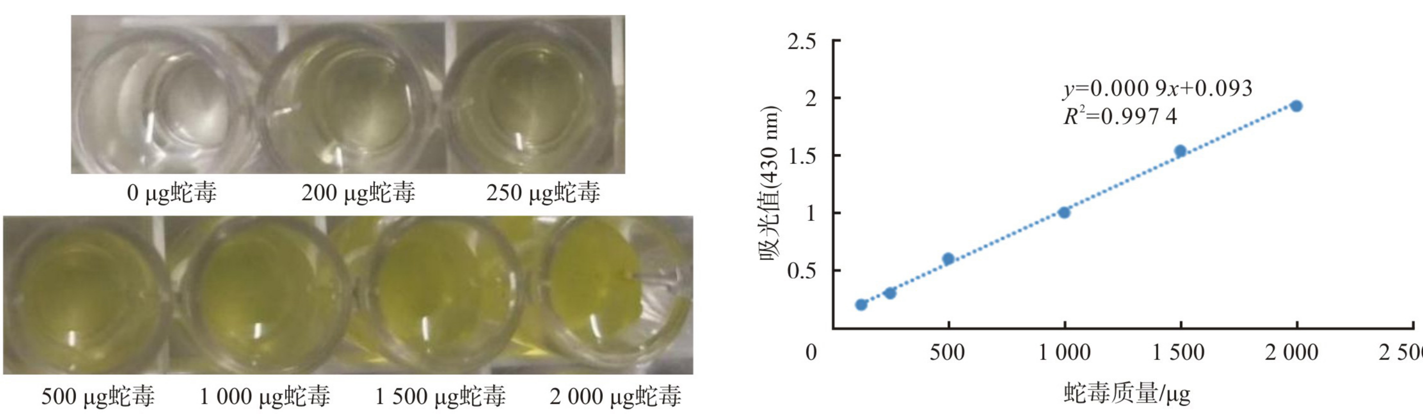
Fig. 5　Determination of 5′-nucleotidase activity in *N. atra* venom



a　乙酰胆碱酯酶水解产物显色效果　　b　蛇毒中的乙酰胆碱酯酶水解产物吸光值与蛇毒的量效关系

图7　中华眼镜蛇蛇毒中乙酰胆碱酯酶活性检测

Fig. 7　Detection of acetylcholinesterase activity in *N. atra* venom



a　L-氨基酸氧化酶水解产物显色效果　　b　蛇毒中的L-氨基酸氧化酶水解产物吸光值与蛇毒的量效关系

图9　中华眼镜蛇蛇毒中L-氨基酸氧化酶活性的测定

Fig. 9　Determination of L-amino acid oxidase activity in *N. atra* venom