中草药徐长卿(*Cynanchum paniculatum*)治疗毒蛇咬伤的分子机制研究

和七一[†], 熊广均[†], 李博, 黄达春, 左添添, 邓秋平, 刘锦花, 张迎锋, 陈典成, 罗聪, 余晓东*

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, 重庆市动物生物学重点实验室, 毒蛇养殖与深加工协同创新中心, 重庆 400047

[†] 同等贡献

* 联系人, E-mail: yxd@cqnu.edu.cn

收稿日期: 2016-10-25; 接受日期: 2016-11-10; 网络版发表日期: 2017-01-10

重庆市社会民生科技创新专项(批准号: cstc2015shmszx120052)、重庆市自然科学基金(批准号: cstc2014YykfA110019, cstc2016jcyjA0224)、重庆市林业局渝林科研项目(批准号: 2015-5)、重庆师范大学国家基金预研项目(批准号: 14XYY022)和国家级大学生创新创业训练计划(批准号: 201410637006)资助

摘要 徐长卿(*Cynanchum paniculatum*)作为一种传统中草药, 被广泛应用于毒蛇咬伤治疗, 然而其疗效的科学实验证据缺乏, 治疗的分子机制也不清楚. 本文采用有机溶剂萃取、柱层析及高效液相色谱法(HPLC)相结合, 从徐长卿中筛选出和分离得到一个功效组分, 经质谱和核磁共振鉴定为丹皮酚原苷. 动物活体实验与组织病理切片观察表明, 该组分显著地抑制尖吻蝮(*Deinagkistrodon acutus*)蛇毒引起的出血、水肿及肌肉组织坏死等活性. 体外酶活检测显示, 丹皮酚原苷可以抑制尖吻蝮蛇毒水解纤维蛋白原活性和PLA₂活性. 进一步采用分子模拟软件技术, 揭示出丹皮酚原苷是通过与蛇毒中主要成分金属蛋白酶和PLA₂发生相互作用, 从而抑制尖吻蝮蛇毒发挥致伤作用. 本研究首次揭示了中草药徐长卿治疗蛇伤的分子机制, 为中医治疗毒蛇咬伤使用徐长卿找到了科学实验证据, 也为蛇伤药物的研发提供了新的思路.

关键词 徐长卿, 尖吻蝮蛇, 丹皮酚原苷, 毒蛇咬伤, 分子模拟

毒蛇咬伤(蛇伤)是被世界卫生组织(World Health Organization, WHO)列为一个易忽视的重要的热带疾病之一, 全球每年约有500万蛇伤事件发生, 造成约2.5万~12.5万人死亡^[1,2]. 我国每年因毒蛇咬伤患者达10万人次, 其中73%为中青年, 死亡率为5%~10%, 致残或丧失劳动能力者占25%~30%, 给家庭和社会带来了极大负担^[3]. 尖吻蝮蛇(*Deinagkistrodon acutus*)又

称五步蛇、百步蛇、七步蛇、蕲蛇等, 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, 是引起我国蛇伤事故高发的主要毒蛇之一^[4]. 尖吻蝮蛇毒主要作用于血液系统, 能在短时间内引起严重的局部损伤, 造成出血、水肿及肌肉组织坏死症状, 如不及时治疗, 将会导致永久性残疾或死亡^[5,6].

引用格式: 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. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 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. Sci Sin Vitae, 2017, 47: 218–229, doi: 10.1360/N052016-00228

自1894年世界上第一个商品化的抗蛇毒血清问世以来, 经过一个多世纪的发展, 已有超过80种商品化的抗蛇毒血清研制成功^[7,8]. 我国也有4种抗蛇毒血清用于蛇伤救治, 包括抗蝮蛇毒血清、抗银环蛇毒血清、抗眼镜蛇毒血清和抗五步蛇毒血清. 目前, 抗蛇毒血清被认为是治疗蛇伤的有效药物^[9]. 然而, 应用抗蛇毒血清治疗蛇伤也存在一些不足, 如价格昂贵、保存和使用不便, 很难在蛇伤发生后及时进行治疗; 抗蛇毒血清具有种间特异性, 在致伤的蛇种不明时很难用于伤者的救治; 抗蛇毒血清通过免疫动物制备而来, 血清中的杂蛋白可引起副作用, 如过敏性休克、致热反应及血清病等; 尤其是, 抗蛇毒血清很难中和蛇毒引起的局部损伤^[10]. 研究显示, 即使在毒蛇咬伤后及时注射抗蛇毒血清, 也仅能中和蛇毒引起的全身系统性毒性. 蛇伤患者康复后, 常因蛇毒造成的局部损伤而伴有短暂性或永久性残疾. 据估计, 约40万人因蛇伤造成了永久性残疾^[2,11]. 因此, 寻求新的治疗策略以弥补抗蛇毒血清存在的缺陷就显得尤为重要.

中草药作为一种丰富的自然资源, 含有大量天然抑制剂和药理学活性组分, 被应用于多种疾病的治疗^[12,13]. 近年来, 国内外学者对多种中草药及其活性组分抗蛇毒作用进行了研究, 证实其可以抑制蛇毒引起的局部损伤和系统性毒性^[14-16]. 同时, 中草药价格低廉、容易制备、便于保存, 对毒素的中和具有广谱性等优点^[17,18]. 可见, 中草药具有开发成抗蛇毒药物的潜力.

徐长卿(*Cynanchum paniculatum*)为萝藦科鹅绒藤属(*Cynanchum*)植物, 主产于我国江苏、浙江、安徽等地^[19]. 具有祛风、化湿、止痛、止痒等功效, 常用于治疗风湿痹痛、跌扑伤痛、风疹、湿疹等疾病^[20]. 在民间, 徐长卿的煎煮液被广泛应用于蛇伤治疗, 但对其治疗作用缺乏科学实验研究, 且其抗蛇毒分子机制也不清楚. 本课题组前期研究证实, 徐长卿提取物可以有效减缓尖吻蝮蛇毒引起的蛇伤症状, 尤其是局部损伤. 为此, 本研究采用有机溶剂分级萃取、柱层析及高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)相结合对徐长卿醇提提取物进行分离纯化, 从中筛选出具有抑制尖吻蝮蛇毒致伤活性的功效组分, 对其结构进行分析鉴定, 采用分子模拟技术对其作用机制进行了阐释, 为中医使用中草药徐长卿治疗蛇伤提供科学实验证据, 从而揭示其治疗的分子机制.

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

1D核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)谱由Bruker Ascend 400M型核磁共振仪(Bruker, 瑞士)测定, 质谱由岛津LCMS-2020型质谱仪(岛津, 日本)测定. 低压层析系统为AKTA purifier 100(GE, 美国), 高效液相色谱系统为岛津LC-20; 真空离心浓缩液为Christ RVC 2-18(Christ, 德国); 葡聚糖凝胶Sephadex LH-20为Pharmacia公司(美国)产品, HPLC层析柱Sepax HP-C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μ m)为Sepax Technologies公司(美国)产品.

徐长卿于2014年10月采于重庆市, 并经植物分类学专家鉴定后, 该植物标本现保存于重庆师范大学生命科学学院标本馆. 成年尖吻蝮蛇捕自湘西自治州乌龙山, 采用咬皿法制备蛇毒, 经冷冻干燥后低温保存.

1.2 功效组分的提取分离与结构鉴定

取干燥处理后的徐长卿根茎500 g, 粉碎, 以75%甲醇索氏回流萃取3 h(3 L×3), 合并滤液, 减压浓缩至浸膏(55 g), 加水混悬后依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇萃取. 各萃取组分经出血活性抑制实验检测后, 将正丁醇提取物(1.1 g)上样于Sephadex LH-20层析柱(1.6 cm×100 cm), 以75%甲醇洗脱, 流速1 mL/min. 活性部分经真空离心浓缩仪干燥后(700 mg), 溶于10%甲醇, 上样于Sephadex HP-C18色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μ m)进一步分离, 依次以10%, 22%, 24%, 80% B液浓度(A液: 10%甲醇; B液: 100%甲醇)进行阶段洗脱, 每个浓度阶段洗脱15 min, 分离峰经活性检测后, 采用HPLC进行纯度鉴定, 联合质谱和NMR对其结构进行分析鉴定.

1.3 体外酶活抑制实验

(1) 抑制蛋白水解酶活力检测. 蛋白水解酶活力参照Edgar和Prentice^[21]的方法进行检测. 取1 μ g/5 μ L尖吻蝮蛇毒与5 μ L不同浓度功效组分混合后, 37℃保温45 min, 加入10 μ L牛纤维蛋白原(2 mg/mL), 37℃继续保温15 min, 立即加入5 μ L终止液(含250 mmol/L pH 6.8 Tris-HCL, 10% SDS、0.5%溴酚蓝、50%甘油和5% β -巯基乙醇)终止反应, 100℃煮沸5 min, 采用15% (w/v)SDS-PAGE进行检测, 用Quantity One软件进行数

据采集、分析。

(2) 抑制磷脂酶A₂活力检测。 磷脂酶A₂活力检测参照Baman和Kaletta^[22]的方法进行, 略加改动。取4 μg/10 μL尖吻蝮蛇毒与10 μL不同浓度功效组分混匀, 37℃保温45 min, 加入新鲜制备的卵磷脂-红血球悬浮液(10 mg卵磷脂悬浮在10 mL 0.05 mol/L pH 7.2的磷酸缓冲液中, 再加入1 mL新鲜洗净压紧的大白鼠(*Rattus norvegicus*)红血球和0.1 mL 0.5 mol/L CaCl₂溶液) 0.1 mL。在37℃孵育30 min后, 加入0.88 mL预冷的生理盐水, 立即离心, 上清液吸光值在540 nm进行检测。蛇毒溶液和生理盐水分别作为阳性对照和阴性对照。

1.4 体内动物保护实验

(1) 抑制尖吻蝮蛇毒的出血活性实验。 出血活性检测参照Kondo等人^[23]的方法进行。选取健康昆明小鼠(*Mus musculus*)(20±2 g), 于小鼠背部皮下注射0.1 mL不同剂量尖吻蝮蛇毒溶液(0, 2.5, 5, 10, 20, 30 μg)。2 h后, 小鼠经乙醚麻醉处死, 取背部皮肤, 用游标卡尺测量注射点皮下出血斑的平均直径。以出血斑直径对蛇毒剂量做图, 最小出血剂量(minimum hemorrhagic dose, MHD)定义为引起出血直径达10 mm的蛇毒剂量。抑制出血活性实验: 将100 μL由不同剂量功效组分(20, 40, 80 mmol/L)与尖吻蝮蛇毒(MHD剂量)组成的混合液, 置于37℃水浴45 min后, 进行小鼠背部皮下注射; 小鼠背部皮下先注射尖吻蝮蛇毒(MHD剂量), 5 min后, 在相同部位注射80 mmol/L功效组分进行治疗。以蛇毒溶液和生理盐水分别作为阳性对照和阴性对照, 以MHD剂量引起的出血直径作为100%出血活性。

(2) 抑制尖吻蝮蛇毒的肌肉组织坏死活性实验。 肌肉坏死活性检测参照Mebs等人^[24]的方法进行。选取健康昆明小鼠30只(20±2 g), 随机分为6组。小鼠右腿肌肉注射50 μL尖吻蝮蛇毒溶液(30 μg)作为蛇毒组, 阴性对照组注射相同剂量的生理盐水。1 h后摘除小鼠眼球, 取血, 37℃孵育10 min, 8000×g离心10 min制备血清。血清中肌酸激酶(creatine kinase, CK)活性检测按照试剂盒说明进行操作(南京建成生物工程研究所)。以蛇毒组测得CK活力作为阳性对照, 定义为100%组织坏死活性。抑制肌肉组织坏死活性实验: 将50 μL由不同剂量功效组分(125, 250, 500 mmol/L)与尖吻蝮蛇毒(30 μg)组成的混合液, 置于37℃水浴45 min后, 采用肌肉注射至小鼠右后腿; 小鼠右后腿先

肌肉注射尖吻蝮蛇毒, 5 min后, 在相同部位注射500 mmol/L功效组分进行治疗。1 h后, 各处理组小鼠按上述方法进行CK活力检测。

(3) 组织病理学观察。 选取健康昆明小鼠30只((20±2) g), 随机分为6组。小鼠右腿腓肠肌注射30 μg/50 μL尖吻蝮蛇毒溶液作为阳性对照组, 阴性对照组注射相同剂量的生理盐水; 各实验组注射方法同(2)所述。24 h后, 实验小鼠被乙醚麻醉处死, 剪取一小块中心区域肌肉, 浸泡在10%甲醛溶液中固定, 经不同浓度乙醇脱水处理后用石蜡包埋, 制备2.5 μm厚切片, 再经0.25%(w/v)HE染色, 光学显微镜下观察。

(4) 抑制尖吻蝮蛇毒的水肿活性实验。 蛇毒水肿活性检测参照Rojas等人^[25]的方法进行。选取健康昆明小鼠30只((20±2) g), 随机分为6组。小鼠右后脚注射20 μL尖吻蝮蛇毒溶液(2 μg)作为阳性对照组, 阴性对照组注射相同剂量的生理盐水, 于注射后不同时间点(0, 30, 60, 90, 120, 150, 180 min), 用游标卡尺测量小鼠右后脚厚度, 计算肿胀率: 肿胀率=(不同时间点脚掌厚度-注射前脚掌厚度)÷注射前脚掌厚度×100%。抑制水肿活性实验: 将20 μL由不同剂量功效组分(20, 40, 80 mmol/L)与尖吻蝮蛇毒(2 μg)组成的混合液, 37℃水浴45 min后, 进行小鼠右后足趾皮下注射; 小鼠右后足趾皮下先注射尖吻蝮蛇毒, 5 min后, 在相同部位注射80 mmol/L功效组分进行治疗。各处理组小鼠按上述方法进行肿胀率检测。

1.5 分子对接分析与鉴定

分子对接采用LeDock软件(<http://lephar.com>), 尖吻蝮蛇毒蛋白质晶体结构(PDB code: 1BSW, 1YPI, 1IJL1 和 1MG6)由蛋白质晶体数据库(<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)下载作为受体结构, 丹皮酚原苷(CAS number: 72520-92-4)由<http://zinc.docking.org>下载作为配体结构。受体蛋白质通过LeDock软件中LePro模块自动删除水分子, 并添加极性氢原子。对于含有金属离子的蛋白质, 手动添加金属离子至pro.pdb文件中。其他对接参数均为默认值。配体受体间相互作用使用Pymol 1.5.x软件进行分析。

1.6 数据分析与处理

统计数据采用 $\bar{x} \pm SD$ 表示。采用SPSS13.0软件进行

one-way ANOVA分析. $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义.

2 结果与讨论

2.1 丹皮酚原苷的分离及结构鉴定

徐长卿根茎经干燥处理, 取500 g粉碎, 采用75% 甲醇粗提, 石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇逐级萃取, 正丁醇组分经Sephadex LH-20及RP-HPLC进一步分离得到300 mg化合物, 经HPLC检测为单一组分(图1). 该组分呈白色无定形粉末, 可溶于甲醇、乙醇、水等溶剂. 质谱显示 m/z : 483.00 ($[M+Na]^+$), 329.00 ($[M-Ara+H]^+$), 167.05 ($[M-Ara-Glc+H]^+$), 458.95($[M-H]^-$), 505.40 ($[M-H+HCOOH]^-$), 计算值

460.43, 推测其分子式为 $C_{20}H_{28}O_{12}$. 核磁数据显示(表1): 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.82 (1H, d, $J=9.0$ Hz, H-6), 6.89 (1H, d, $J=2.3$ Hz, H-3), 6.86 (1H, dd, $J=2.3, 8.7$ Hz, H-5), 5.33 (H, d, $J=7.7$ Hz, H-1'), 4.46 (1H, d, $J=7.7$ Hz, H-1''), 3.96 (3H, s, $-OCH_3$), 2.72 (3H, s, $-CH_3$); ^{13}C -NMR(100 MHz, CD_3OD) δ : 121.43 (C-1), 157.78 (C-2), 99.76 (C-3), 164.6 (C-4), 108.25 (C-5), 132.56 (C-6), 102 (C-1'), 75.5 (C-2'), 75.8 (C-3'), 69.38 (C-4'), 75.67 (C-5'), 68.6 (C-6'), 103.34 (C-1''), 72.79 (C-2''), 73.07 (C-3''), 69.22 (C-4''), 65.07 (C-5''), 55.84 ($-OCH_3$), 30.4 ($-CH_3$), 203.14 ($-COOCH_3$). 以上数据与文献报道基本一致^[26,27], 推测该化合物为丹皮酚原苷, 结构式为丹皮酚2- O -[α -L-吡喃阿拉伯糖基-(1 $\rightarrow$ 6)]- β -D-吡喃葡萄糖苷(图2).

图1 徐长卿中丹皮酚原苷的分离纯化(网络版彩图)

A: HPLC分离图谱. 所用层析柱为Sepax HP-C18 (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m); B: 丹皮酚原苷经HPLC进行纯度检测

图2 徐长卿中丹皮酚原苷的结构图(网络版彩图)

A: 丹皮酚原苷的分子结构(1H NMR和 ^{13}C NMR); B: 丹皮酚原苷的3D分子结构

表 1 丹皮酚原苷的¹H NMR, ¹³C NMR光谱数据^{a)}

位置	¹³ C NMR	¹ H NMR	位置	¹³ C NMR	¹ H NMR
1	121.43	—	2'	75.50	
2	157.78	—	3'	75.80	
3	99.76	6.89 d J=2.3 Hz	4'	69.38	
4	164.60	—	5'	75.67	
5	108.25	6.86 dd J=2.3, 8.7 Hz	6'	68.60	
6	132.56	7.82 d J=8.7 Hz	Ara-1"	103.34	4.46 d J=7.7 Hz
—CH ₃	30.90	2.72 s	2"	72.79	
—C=O	203.14	—	3"	73.07	
—OCH ₃	55.84	3.96 s	4"	69.22	
Glc-1'	102.00	5.33 d J=7.7 Hz	5"	65.07	

a) 溶剂: D₂O (¹H NMR 400 MHz和¹³C NMR 100 MHz)

2.2 丹皮酚原苷抑制尖吻蝮蛇毒致伤活性

根据毒液成分及药理学作用方式的不同,蛇毒可分为血循毒、神经毒、混合毒三大类。尖吻蝮蛇毒属典型的血循环毒素,主要成分为金属蛋白酶、磷脂酶A₂(phospholipase A₂, PLA₂)、C-型凝集素、丝氨酸蛋白酶、核苷酸酶及核酸酶以及其他蛋白质或多肽^[4]。其中,蛇毒金属蛋白酶是引起出血的主要成分,也是尖吻蝮蛇毒中表达丰度最高的酶类^[4,28],该酶能降解胞外基质或基质膜,破坏血管壁完整性,进而导致皮肤血液溢出,引起局部出血^[29]。动物实验结果显示(图3),终浓度为40 mmol/L的丹皮酚原苷与尖吻蝮蛇毒体外孵育45 min后,能使蛇毒出血活性降低94.06%;当终浓度为80 mmol/L时,可完全抑制小鼠皮下出血。单独注射蛇毒5 min后,采用丹皮酚原苷进行治疗处理,结果显示,丹皮酚原苷能够抑制蛇毒62.04%的出血活性,与孵育组20 mmol/L剂量抑制效果相当。大多数蛇毒金属蛋白酶都具有水解纤维蛋白原活性,能够降解纤维蛋白原A α 链和B β 链^[30]。体外酶活实验显示,丹皮酚原苷能够有效抑制尖吻蝮蛇毒水解纤维蛋白原B β 链(图4A),当其浓度达到80 mmol/L时,可使蛇毒水解活性降低3.58倍(图4B),提示丹皮酚原苷可能作用于蛇毒金属蛋白酶活性结合口袋区域,或者与蛇毒金属蛋白酶活性中心的Zn²⁺相互作用,而起到抑制蛇毒出血活性的作用。

蛇毒可以通过两条途径引发肌肉组织坏死,肌肉毒素PLA₂(碱性磷脂酶Lys49-PLA₂)直接作用于肌细胞

质膜,引起大量的肌肉组织损伤,进而导致疼痛、肌肉无法运动;或者蛇毒金属蛋白酶作用于微血管系统或肌肉动脉,导致血管明显受损,造成贫血,间接引起肌肉毒性^[31~33]。肌肉坏死是尖吻蝮蛇伤引起的至关重要损伤,可以导致永久性组织损伤、肢体残疾甚至截肢。不同浓度丹皮酚原苷与蛇毒孵育后进行肌肉损伤抑制实验,结果显示,丹皮酚原苷可显著地抑制尖吻蝮蛇毒造成的肌肉毒性(图5),当浓度达500 mmol/L时,可使肌肉毒性降低78.90%。当单独注射尖吻蝮蛇毒5 min后,采用丹皮酚原苷进行治疗,结果显示,500 mmol/L丹皮酚原苷能够抑制蛇毒55.83%的肌肉毒性(图5)。组织病理学切片分析显示,与蛇毒注射组相比,丹皮酚原苷孵育组(250和500 mmol/L)和治疗组均能降低蛇毒引起的肌肉毒性,出血、凋亡症状明显减弱(图6)。体外酶活实验显示,丹皮酚原苷能够有效抑制尖吻蝮蛇毒PLA₂活性,当浓度达200 mmol/L时,可完全抑制PLA₂活性(图7)。因此,丹皮酚原苷可能通过与蛇毒金属蛋白酶和肌肉毒素Lys49 PLA₂共同作用而起到抑制肌肉损伤的作用。

毒蛇咬伤后水肿的发生涉及多种毒素组分,如PLA₂、金属蛋白酶,这些组分诱导机体快速释放内源性炎症因子:激肽、组胺、5-羟色胺等物质,引起毛细血管通透性增加,组织间液的胶体渗透压上升,组织液生成增多,引起水肿^[33~35]。抑制实验结果显示,丹皮酚原苷孵育组和治疗组均能使尖吻蝮蛇毒引起的水肿症状明显减弱且趋于稳定,而蛇毒处理组水肿症状不断恶化;孵育组中,终浓度为80 mmol/L的丹皮酚

图3 丹皮酚原苷对尖吻蝮蛇毒所致小鼠皮下出血活性的影响(网络版彩图)

A: 蛇毒引起小鼠皮下出血活性(%), 孵育组表示蛇毒分别与20, 40, 80 mmol/L丹皮酚原苷孵育45 min后处理小鼠; 治疗组表示单独注射蛇毒5 min后, 采用80 mmol/L丹皮酚原苷处理小鼠. ***: 与蛇毒处理组比较, $P < 0.001$; B: 各处理组小鼠皮下出血代表图谱. a为PBS处理组; b为蛇毒处理组; c~e分别为蛇毒与20, 40, 80 mmol/L丹皮酚原苷孵育45 min后处理组; f为单独注射蛇毒5 min后, 采用80 mmol/L丹皮酚原苷处理组

图4 丹皮酚原苷对尖吻蝮蛇毒蛋白水解酶抑制活性(网络版彩图)

A: 尖吻蝮蛇毒水解纤维蛋白原电泳图谱. Fib为纤维蛋白原+生理盐水; 1为纤维蛋白原+蛇毒; 2~5分别为蛇毒与10, 20, 40, 80 mmol/L丹皮酚原苷孵育45 min后, 对纤维蛋白原的水解情况; B: 丹皮酚原苷对尖吻蝮蛇毒蛋白水解酶的相对抑制活性, *: 与蛇毒处理组比较, $P < 0.05$; ***: 与蛇毒处理组比较, $P < 0.001$

原苷在处理180 min, 可使水肿程度降低58.77%, 而治疗组也可使小鼠水肿程度明显降低(37.86%), 与孵育组20, 40 mmol/L效果相近(图8). 基于丹皮酚原苷具有的抗出血、抗肌肉毒性作用以及酶活抑制作用, 推测其可能通过作用于蛇毒中的PLA₂和金属蛋白酶而起到抑制水肿作用.

2.3 丹皮酚原苷抑制尖吻蝮蛇毒致伤活性的分子作用机制

随着蛋白质化学和结构生物学的发展, 许多蛋白

质或蛋白质与抑制剂复合物的三维结构已经被解析出来, 为研究其作用机理以及寻找新的先导化合物奠定了基础. 目前, 尖吻蝮蛇毒中已有20个蛋白质晶体结构被解析并上传至蛋白质晶体数据库. 基于蛇毒诱发组织损伤的发生情况, 选择两个金属蛋白酶(出血性金属蛋白酶1BSW和非出血性金属蛋白酶1YP1)和两个PLA₂(Asp49-PLA₂ 1IJL和Lys49-PLA₂ 1MG6)为研究对象, 通过分子对接模拟, 来探讨丹皮酚原苷抑制尖吻蝮蛇毒组织损伤的作用机制.

分子对接结果显示(图9A), 丹皮酚原苷位于金属

图5 皮酚原苷对尖吻蝮蛇毒所致小鼠肌肉毒素活性的影响(网络版彩图)

孵育组表示蛇毒分别与125, 250, 500 mmol/L丹皮酚原苷孵育45 min后处理小鼠; 治疗组表示单独注射蛇毒5 min后, 采用500 mmol/L丹皮酚原苷处理小鼠. ***: 与蛇毒处理组比较, $P < 0.001$

图6 小鼠右腓肠肌组织病理学分析(网络版彩图)

A: PBS处理组; B: 尖吻蝮蛇毒处理组; C~E: 分别为蛇毒与125, 250, 500 mmol/L丹皮酚原苷孵育45 min后处理小鼠; F: 单独注射蛇毒5 min后, 采用500 mmol/L丹皮酚原苷处理小鼠. H: 出血; N: 凋亡. A~F: 400×

蛋白酶1BSW的结合口袋处, 共形成10对氢键, 其中O1分别与Ile108残基和Gly109残基相互作用, 形成3对氢键, 距离为2.1, 2.4和2.3 Å; O8, H20, H21以及H22作用于Ala111残基, 氢键距离分别为2.2, 2.3, 1.8, 2.0 Å; O3与His142残基和His152残基形成2对氢键, 距离为3.5和2.7 Å; H25与Pro168残基形成1对氢键, 距离为1.9 Å. 丹皮酚原苷O3与 Zn^{2+} 距离为2.1 Å, 提示其可以与金属 Zn^{2+} 相互作用. 在与非出血性金属蛋白酶1YP1对接中

图7 丹皮酚原苷对尖吻蝮蛇毒PLA₂的抑制活性(网络版彩图)

***: 与蛇毒处理组比较, $P < 0.001$

(图9B), 丹皮酚原苷通过12对氢键结合于1YP1活性口袋处, 其中O1与Val108残基形成1对距离为2.3 Å的氢键, 与Gly109残基形成距离为2.3和2.7 Å的2对氢键; O8, H2, H22与Ala111残基形成3对氢键, 距离分别为2.5, 1.8和2.0 Å; O3与His142残基形成1对氢键, 距离为3.4 Å; O5和H22与His1146残基形成2对氢键, 距离均为2.9 Å; O5和O11与His152残基形成2对氢键, 距离分别为3.4和3.3 Å; H24与Pro167残基形成1对距离为2.2 Å的氢键; 丹皮酚原苷O3, O4, O5及O9与 Zn^{2+} 距离分别为2.4, 3.5, 2.4, 3.5 Å, 提示其可以与金属 Zn^{2+} 相互作用.

蛇毒金属蛋白酶属金属 Zn^{2+} 蛋白, 具有保守的 Zn^{2+} 结合域HEXXHXXGXXH, 酶活性所必需的锌离子与3个His残基形成配位键, 位于活性口袋中^[33,36]. 对接结果显示, 丹皮酚原苷可与蛇毒金属蛋白酶多个氨基酸残基形成氢键, 结合与活性口袋的裂隙, 阻遏底物的结合; 丹皮酚原苷可与活性中心的His残基相互作用, 研究显示, 当抑制剂与蛇毒金属蛋白酶活性中心3个His残基相互作用时, 将会使酶的催化活性降低或丧失^[37,38]; 同时, 丹皮酚原苷能与蛇毒金属蛋白酶中的金属 Zn^{2+} 相互作用, 形成配位键, 对其催化活性造成影响. 蛇毒金属蛋白酶是尖吻蝮蛇毒中含量最为丰富的组分, 也是引起出血、水肿等组织损伤的主要组分, 推测丹皮酚原苷可能通过以上途径起到抑制尖吻蝮蛇毒组织损伤的作用.

PLA₂ (EC 3.1.1.4)是一类广泛分布在蛇毒中的酶

图8 丹皮酚原苷对尖吻蝮蛇毒所致小鼠水肿活性的影响(网络版彩图)

孵育组表示蛇毒与丹皮酚原苷孵育45 min后处理小鼠; 治疗组表示单独注射蛇毒5 min后, 采用丹皮酚原苷处理小鼠. **: 与蛇毒处理组比较, $P < 0.01$; ***: 与蛇毒处理组比较, $P < 0.001$

类, 根据序列和结构同源性, 主要将其分为两大类, I 类为 Ca^{2+} 依赖性 PLA_2 , 包括Asp49-, Asn49-和Gln49- PLA_2 s; II 类为 Ca^{2+} 非依赖性 PLA_2 , 包括Lys49-, Arg49-以及部分Asp49- PLA_2 s^[17]. 1IJL属 I 类 PLA_2 , 能抑制血小板聚集, 引起出血; 依赖与 Ca^{2+} 催化甘油磷脂Sn-2位上的酰键发生水解反应, 产生溶血磷脂酸和花生四烯酸, 引起炎症和疼痛反应^[39,40]. 对接结果显示(图9C), 丹皮酚原苷O6, O7, O8与Gly31残基形成3对氢键, 距离分别为2.4, 2.2, 2.0 Å; H20, H22, H25分别与Asp48残基、Gly29残基、Try21残基形成氢键, 距离分别为1.8, 2.5以及1.8 Å; H23与Cys44残基和Asp48残基形成2对氢键, 距离为2.4和2.0 Å; O8与1IJL中 Ca^{2+} 距离最近, 为3.1 Å, 提示其可能与 Ca^{2+} 相互作用. 对接构想显示, 丹皮酚原苷处于1IJL活性口袋处, 可能通过阻碍底物与酶催化位点结合发挥抑制作用; Gly29残基、Gly31残基以及Asp48残基处于1IJL活性中心, 能够结合金属钙离子, 在酶催化过程中起着重要作用^[41], 提示丹皮酚原苷可能通过与这些残基作用而影响 PLA_2 酶活性.

1MG6为碱性肌肉毒素, 属于Lys49- PLA_2 , 具有较强的间接出血活性和抗聚集活性, 能够引起骨骼肌纤维不可逆性损伤^[17,42]. 对接结果显示(图9D), 丹皮酚原苷位于1MG6疏水结合区, O1与Try22残基和Gly30残

基形成距离为2.6和2.2 Å的2对氢键; O7, H20以及H22与Gly32残基形成3对氢键, 距离分别为2.3, 2.0, 2.0 Å; Gly30残基与H22形成一对距离为2.1 Å的氢键; O8与Lys49残基形成距离为2.8 Å的氢键; O12与His48残基上的苯环形成一对距离为3.3 Å的氢键. 研究发现, 大多数 PLA_2 -抑制剂复合物均有功能性基团与His48残基发生作用, 提示这一相互作用与 PLA_2 活性的抑制有着密切关联^[43,44], 丹皮酚原苷可能通过O12与His48残基相互作用而起到抑制1MG6活性的作用.

3 结论

总之, 采用有机溶剂萃取、柱层析以及HPLC法相结合, 从我国中医传统使用的抗蛇伤中草药徐长卿中分离得到单一组分丹皮酚原苷, 首次证明该组分可以有效抑制尖吻蝮蛇毒引起的出血、水肿以及肌肉组织坏死等活性; 体外酶活检测证实丹皮酚原苷可以抑制尖吻蝮蛇毒水解纤维蛋白原活性和 PLA_2 活性; 采用分子对接技术, 显示丹皮酚原苷是通过与蛇毒中金属蛋白酶和 PLA_2 发生相互作用, 而起到抑制尖吻蝮蛇毒组织损伤的作用. 本研究首次阐释了中草药徐长卿治疗蛇伤的分子机制, 为中医治疗蛇伤使用徐长卿找到了科学实验证据, 也为蛇伤药物的研发提供了新的思路.

图9 尖吻蝮蛇毒组分与配体paeonolide分子模拟构像(网络版彩图)

A: 出血性金属蛋白酶1BSW与配体paeonolide的相互作用; B: 非出血性金属蛋白酶1YP1与配体paeonolide的相互作用; C: 酸性磷脂酶1IJL与配体paeonolide的相互作用; D: 碱性磷脂酶1MG6与配体paeonolide的相互作用

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 envenoming and deaths. *PLoS Med*, 2008, 5: e218
- 2 Gutiérrez J M, Warrell D A, Williams D J, et al. The need for full integration of snakebite envenoming within a global strategy to combat the neglected tropical diseases: the way forward. *PLoS Negl Trop Dis*, 2013, 7: e2162
- 3 张志晓. 利用生物信息学方法制备尖吻蝮蛇蛇毒DNA疫苗. 硕士学位论文. 云南: 云南大学, 2010
- 4 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. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 341: 522–531
- 5 Reid H A, Theakston R D G. The management of snake bite. *Bull WHO*, 1983, 61: 885–895
- 6 Warrell D A. Clinical toxicology of snakebite in Asia. In: Meier J, White J, eds. *Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons*. Florida: CRC, 1995. 493–594
- 7 Hawgood B J. Doctor Albert Calmette 1863–1933: founder of antivenomous serotherapy and of antituberculous BCG vaccination. *Toxicon*, 1999, 37: 1241–1258
- 8 Theakston R D G, Warrell D A. Antivenoms: a list of hyperimmune sera currently available for the treatment of envenoming by bites and stings. *Toxicon*, 1991, 29: 1419–1470
- 9 Gutiérrez J M, Leon G, Lomonte B, et al. Antivenoms for snakebite envenomings. *IADT*, 2011, 10: 369–380
- 10 Gutiérrez J M, León G, Burnouf T. Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings: the road ahead. *Biologicals*, 2011, 39: 129–142
- 11 Lomonte B, Gutierrez J M. Local tissue damage induced by Bothrops snake venoms. A review. *Mem Inst Butantan*, 1989, 51: 211–223
- 12 Jiang W Y. Therapeutic wisdom in traditional Chinese medicine: a perspective from modern science. *Trends Pharmacol Sci*, 2005, 26: 558–563
- 13 Koehn F E, Carter G T. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, 4: 206–220
- 14 Mors W B, Célio do Nascimento M, M. Ruppelt Pereira B, et al. Plant natural products active against snake bite—the molecular approach. *Phytochemistry*, 2000, 55: 627–642
- 15 Soares A, Ticli F, Marcussi S, et al. Medicinal plants with inhibitory properties against snake venoms. *Curr Med Chem*, 2005, 12: 2625–2641
- 16 Dey A, De J N. Phytopharmacology of antiophidian botanicals: a review. *Int J Pharm*, 2012, 8: 62–79
- 17 Santhosh M S, Hemshekhar M, Sunitha K, et al. Snake venom induced local toxicities: plant secondary metabolites as an auxiliary therapy. *Mini Rev Med Chem*, 2013, 13: 106–123
- 18 Gomes A, Das R, Sarkhel S, et al. Herbs and herbal constituents active against snake bite. *India J Exp Biol*, 2010, 48: 865–878
- 19 中国医学科学院药物研究所. 中药志(第一册). 北京: 人民卫生出版社, 1993. 177–1881
- 20 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 北京: 中国医药科技出版社, 2015. 285–286
- 21 Edgar W, Prentice C R M. The proteolytic action of ancrod on human fibrinogen and its polypeptide chains. *Thromb Res*, 1973, 2: 85–95
- 22 Boman H G, Kaletta U. Chromatography of rattlesnake venom A separation of three phosphodiesterases. *Biochim Biophys Acta*, 1957, 24: 619–631
- 23 Kondo H, Kondo S, Ikezawa H, et al. Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. *Jpn J Med Sci Biol*, 1960, 13: 43–51
- 24 Mebs D, Ehrenfeld M, Samejima Y. Local necrotizing effect of snake venoms on skin and muscle: relationship to serum creatine kinase. *Toxicon*, 1983, 21: 393–404
- 25 Rojas E, Quesada L, Arce V, et al. Neutralization of four Peruvian *Bothrops* sp. snake venoms by polyvalent antivenoms produced in Peru and Costa Rica: preclinical assessment. *Acta trop*, 2005, 93: 85–95
- 26 付明, 王登宇, 胡兴, 等. 徐长卿化学成分研究. *中药材*, 2015, 38: 97–100
- 27 李顺林. 传统中草药徐长卿的化学成分、生理活性及指纹图谱的研究. 博士学位论文. 昆明: 中国科学院昆明植物研究所, 2004
- 28 Zhang B, Liu Q, Yin W, et al. Transcriptome analysis of *Deinagkistrodon acutus* venomous gland focusing on cellular structure and functional aspects using expressed sequence tags. *BMC Genomics*, 2006, 7: 152
- 29 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. *Arch Biochem Biophys*, 2006, 455: 144–153
- 30 Markland F S. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon*, 1998, 36: 1749–1800
- 31 Salvini T F, Amaral A C, Miyabara E H, et al. Systemic skeletal muscle necrosis induced by crotoxin. *Toxicon*, 2001, 39: 1141–1149
- 32 Gutiérrez J M, Lomonte B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon*, 1995, 33: 1405–1424
- 33 Gutierrez J M, Rucavado A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie*, 2000, 82: 841–850
- 34 Chaves F, Barboza M, Gutiérrez J M. Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo) in mice.

- [Toxicon](#), 1995, 33: 31–39
- 35 Huang H C, Lee C Y. Isolation and pharmacological properties of phospholipases A₂ from *Vipera russelli* (Russell's viper) snake venom. *Toxicon*, 1984, 22: 207–217
- 36 Marsh N. Inventory of haemorrhagic factors from snake venoms. Registry of Exogenous Hemostatic Factors. Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost*, 1994, 71: 793–797
- 37 Lingott T, Schleberger C, Gutiérrez J M, et al. High-resolution crystal structure of the snake venom metalloproteinase BaP1 complexed with a peptidomimetic: insight into inhibitor binding. [Biochemistry](#), 2009, 48: 6166–6174
- 38 Pithayanukul P, Leanpolchareanchai J, Saparpakorn P. Molecular docking studies and anti-snake venom metalloproteinase activity of Thai Mango seed kernel extract. [Molecules](#), 2009, 14: 3198–3213
- 39 Gu L, Zhang H, Song S, et al. Structure of an acidic phospholipase A₂ from the venom of *Deinagkistrodon acutus*. [Acta Crystallogr D Biol Crystallogr](#), 2002, 58: 104–110
- 40 Dennis E A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. *J Biol Chem*, 1994, 269: 13057–13060
- 41 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*. [Toxicon](#), 1996, 34: 1191–1196
- 42 Huang Q, Zhu X, Li N, et al. Characterization, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of acutohaemolysin, a haemolytic toxin from *Agkistrodon acutus* venom. [Acta Crystallogr D Biol Crystallogr](#), 2000, 56: 907–911
- 43 Watanabe L, Soares A M, Ward R J, et al. Structural insights for fatty acid binding in a Lys49-phospholipase A₂: crystal structure of myotoxin II from *Bothrops moojeni* complexed with stearic acid. [Biochimie](#), 2005, 87: 161–167
- 44 Ticli F K, Hage L I S, Cambraia R S, et al. Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A₂ inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. [Toxicon](#), 2005, 46: 318–327

Study on the molecular mechanism of Chinese herbal medicine *Cynanchum paniculatum* for treating snakebites

HE QiYi, XIONG GuangJun, LI Bo, HUANG DaChun, ZUO TianTian, DENG QiuPing, LIU JinHua, ZHANG YingFeng, CHEN DianCheng, LUO Cong & YU XiaoDong

Collaborative Innovation Center of breeding and deep processing of venomous snakes, Key Laboratory of Chongqing Animal Biology, Chongqing Engineering Research Center of Bioactive Substance, Ministry of Education Engineering Research Center of Active Substance and Biotechnology, School of Life Science, Chongqing Normal University, Chongqing 400047, China

C. paniculatum is a traditional Chinese herb and widely used in the remedy of venomous snakebites; however, its efficacy of snakebite envenoming lacks enough experimental evidence, and its underlying molecular mechanism remains unknown. In this study, one bioactive component was screened and isolated from *C. paniculatum* by organic solvent extraction, column chromatography and HPLC in combination, and finally identified as paenonlide by MS and NMR techniques. The animal experiments and histological pathological sections showed that paenonlide remarkably inhibited hemorrhage, edema and muscle tissue necrosis induced by *Deinagkistrodon acutus* venom; meanwhile, it exhibited potent inhibitory effects on the fibrinogenolytic and PLA₂ activities of *D. acutus* venom in *in vitro* tests. Furthermore, molecular simulation revealed that paenonlide interacted with the key components in *D. acutus* venom, including metalloproteinase and PLA₂, ultimately preventing the injury induced by snakebites. Taken together, this study revealed the molecular mechanism of snakebites treatment by using a traditional Chinese herb (*C. Paniculatum*), and experimentally evidenced its critical role in snakebites treatment. This may also shed light on developing new drugs in clinics.

***Cynanchum paniculatum*, *Deinagkistrodon acutus*, paenonlide, venomous snakebite, molecular simulation**

doi: [10.1360/N052016-00228](https://engine.scichina.com/doi/10.1360/N052016-00228)