

# 眼镜蛇毒心脏毒素的毒理及机制

李秋菊\* 黄守坚 孙家钧

(中山医科大学药理教研室)

眼镜蛇毒中含丰富的心脏毒素 (Cardiotoxin, 简称 CT<sub>x</sub>), 已分离提纯近 60 种, 每种蛇毒中含 2—4 种 CT<sub>x</sub>。1984 年杜雨苍从广东产中华眼镜蛇毒 (*Naja Naja atra*) 中分离出该毒的第五种 CT<sub>x</sub>, 并命名为“细胞膜毒素 D<sub>1</sub>”。<sup>[1]</sup> 各种 CT<sub>x</sub> 的理化性质和毒理作用基本相同, 是强碱性的小分子单链多肽, 由 15—17 种氨基酸的 60—62 个残基组成, 分子量 6000—7000, 等电点 11—12, 含有较多的赖氨酸和亮氨酸, 有 25 个疏水氨基酸, 8 个半胱氨酸交叉联结成四对二硫键, 使 CT<sub>x</sub> 形成四个环。多数 CT<sub>x</sub> 的 LD<sub>50</sub> (iv, 小鼠) 为 750—2000 μg/Kg 体重, 是粗毒的 2—4 倍, 并远高于神经毒素。

眼镜蛇毒中的 CT<sub>x</sub> 对机体有广泛的毒理作用, 在体外可直接溶解洗涤过的红细胞及多种肿瘤细胞, 如吉田肉瘤细胞、腹水中的肝癌细胞、KB 细胞和 HeLa 细胞; 引起可兴奋细胞持续去极化, 导致神经纤维的传导阻滞, 骨骼肌挛缩, 心肌收缩力先增加后抑制, 最后强直性挛缩; 抗胆碱酯酶活性, 抑制甲状腺聚碘等。不同的作者曾根据 CT<sub>x</sub> 的某一作用或某一理化特征将它命名为“心脏毒素”(Cardiotoxin, CT<sub>x</sub>)、 “细胞毒素”(Cytotoxin)、 “直接溶血因子”(Direct Lytic Factor)、 “横纹肌除极化因子”(Skeletal Muscle Depolarization Factor)、 “眼镜胺”(Cobramine)、 “毒素丙”(Toxin r) 等。对心脏的毒性是主要的致死原因, 现多采用心脏毒素这一名称。

尽管对 CT<sub>x</sub> 的作用进行了广泛研究, 但膜上与 CT<sub>x</sub> 结合成分的性质及 CT<sub>x</sub> 作用方

式仍不清楚。近年来人们进一步研究了 CT<sub>x</sub> 的毒理作用及可能机制, 本文就这些方面的新进展作一综述。

## 一、心脏毒素的结合部位

由于 CT<sub>x</sub> 能作用于多种组织、细胞, 其分子中带大量碱性基团, N 端主要含疏水氨基酸, 与去污剂类似, 许多实验比较了 CT<sub>x</sub> 与非特异性的去污剂样毒素的作用特点。实验证明 CT<sub>x</sub> 与细胞膜的作用不是简单的去污剂样作用, 它对细胞膜的作用是高度特异性的, 有赖于一定的、有序的蛋白质构型。因此必须重新检验 CT<sub>x</sub> 与脂质、蛋白质和碳水化合物的结合。

(一) 与磷脂结合 强碱性的 CT<sub>x</sub> 带 +10 个净电荷, 可通过离子键与表面带负电荷的分子结合。Dufourcq & Faucon 和 Vincent 分别首次描述了这种类型的结合<sup>[10,20]</sup>。CT<sub>x</sub> 对磷脂小泡或混合磷脂的作用表明它特异地与带负电的磷脂结合, 形成稳定的复合物<sup>[3,11]</sup>。用荧光技术测得 CT<sub>x</sub> 与磷脂酰丝氨酸的结合常数大于  $10^6 \text{ M}^{-1}$ , 每个毒素可与 7—10 个脂质结合。CT<sub>x</sub> 与负磷脂静电结合后, 疏水的第一环 Leu<sub>1</sub>-Thr<sub>19</sub> 插入脂质层。在单层负电脂质层中, CT<sub>x</sub> 的外表面积取决于表面张力, 只有两个特征性值:  $1400 \text{ \AA}^2$  ( $\pi < 20 \text{ dynes} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) 和  $420 \text{ \AA}^2$  ( $\pi > 30 \text{ dynes} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 两者在非常窄的表面张力范围内出现转变, 这两种构象的互变导致膜排列紊乱, 最终导致靶细胞溶解<sup>[4,11]</sup>。

\* 现在北京医科大学药学院工作。

CTx 与中性磷脂的结合远比酸性磷脂低<sup>[11,29]</sup>,但红细胞、纤维母细胞和可兴奋细胞的细胞膜的负磷脂含量少于 15%,事实上这些负磷脂都位于细胞膜的胞浆面<sup>[24]</sup>,在表面张力接近  $30 \text{ dynes} \cdot \text{cm}^{-1}$  时,这些细胞膜的外表面主要是中性磷脂<sup>[9]</sup>。CTx 完全不能与只含 5% 的磷脂酰丝氨酸的脂质结合<sup>[10]</sup>。即使负性磷脂的不对称分布是不完全的,它们在细胞膜外层的浓度不可能达到与 CTx 进行明显静电结合所需的水平。因此细胞膜的脂质不可能是 CTx 的结合成分。

**(二) 与细胞膜上的蛋白质-碳水化合物结合** 蛋白质和碳水化合物是细胞膜完整性的一部分,起跨膜转运和支持细胞的骨骼作用。因此蛋白质和碳水化合物是细胞膜上与 CTx 的结合成分。

CTx 通过静电与细胞膜结合,在引起细胞膜上大分子排列紊乱的过程中,其带正电荷的性质起了重要的作用。肝素可抑制 CTx 的溶血、溶细胞和引起骨骼肌、心肌挛缩的作用,可能是肝素分子中的大量负电荷中和了 CTx 分子中的正电荷,使之不能与细胞膜结合<sup>[3]</sup>。在细胞膜的外表面有许多类型的膜蛋白,其末端与带负电荷的碳水化合物相连,但甲状腺切片、红细胞或心房肌用神经氨酸酶处理,去掉细胞膜外表面的唾液酸后对 CTx 的作用无影响,表明膜蛋白末端的碳水化合物与 CTx 的结合成分关系不大<sup>[7,10]</sup>。

尽管 CTx 的作用与膜蛋白终端的碳水化合物无关,却与多肽链本身的阴离子区有关。在细胞膜的外表面有成簇的带负电荷的氨基酸残基,并且多肽链的阴离子区通常位于脂质双层的外层,其周围是一个疏水的环境,这也补充了 CTx 的疏水特性。

CTx 可结合到纤维母细胞膜上的特异受体分子上,导致细胞膜形成一定大小的损伤。已证明 <sup>125</sup>I-CTx 在小肌二腹肌细胞和人羊膜细胞上有高亲和力的结合部位<sup>[20,27]</sup>。因此 CTx 与细胞膜外表面一定数量的膜蛋白结合。

## 二、心脏毒素溶细胞的作用机理

**(一) 跨膜通道的形成** CTx 与红细胞结合后出现溶血之前有约 20 分钟的潜伏期,此时细胞膜松散,脆性增加<sup>[3]</sup>。渗透脆性增加表明跨膜离子漏的增加,可能 CTx 在细胞膜上形成了新的离子通道而引起溶血。当 CTx 与红细胞在 37°C 培养时,随着时间增加细胞的肿胀率增加。水内流增加几乎一定与存在跨膜钠离子漏有关,而与钾离子及阴离子的通透性增加关系不大。

阿拉霉素 (Alamethicin) 簇的抗菌素分子能形成多聚跨膜通道。阿拉霉素带一个负电荷,它形成的多聚体通道带电荷不多,阴阳离子均可通过,导致跨膜离子流增加而引起红细胞溶解<sup>[14]</sup>。在 20—40°C 的温度范围内,从 *Naja mossambica mossambica* 及 *Hemachatus hama-chates* 分离出的两个 CTxs 引起细胞溶解的激活能是  $60 \text{ KJmol}^{-1}$ <sup>[22]</sup>,阿拉霉素在 0—25°C 时引起红细胞溶解的激活能是  $62 \text{ KJmol}^{-1}$ <sup>[23]</sup>,它们的激活能相似。比较 38 种 CTxs 对纤维母细胞的作用时,发现 CTx 可引起一定大小的膜损伤<sup>[28]</sup>,促进氨基异丁酸的跨膜内流,提示 CTx 与膜受体蛋白结合后产生了一定大小的跨膜通道,并允许两性离子氨基异丁酸通过,也允许阴阳离子通过,最终导致溶血。

**(二) 引起蛋白质聚集** Condrea 报道细胞膜上 CTx 的结合部位为  $2-3 \times 10^5$ /每个细胞<sup>[6]</sup>,每个细胞膜上的阴离子交换蛋白 Band 3 及糖蛋白的含量分别是  $10^6$  及  $5 \times 10^5$ ,如前述,糖蛋白不是 CTx 的结合部位,因此 Band 3 蛋白是细胞膜上与 CTx 的结合成分。

在红细胞膜上,Band 3 蛋白形成二聚体及四聚体,这些多聚体的重组形成非特异的离子通道<sup>[30]</sup>,在蛋白质表面产生液孔。第 491—507 段氨基酸残基组成 Band 3 蛋白的外部区,带 4 个净负电荷<sup>[19]</sup>,可能强碱性的 CTx 结合到这些部位,使它们的亲水特性转变成疏水性,导致四聚体或更多聚体的形成,产生新的跨膜蛋白-蛋白交界面。如果这些表面的堆积不完全,就

会产生非特异性的跨膜孔,它将以与阿拉霉素多聚孔的相同方式导致细胞溶解。

这个作用机制可解释 CTx 引起溶血的温度敏感特性。低于 20°C 时, Band 3 蛋白的转移运动非常低,多聚体的形成减少<sup>[25]</sup>。相反 Melittin 和阿拉霉素直接作用于脂质双层,在 0°C 时仍可引起快速溶血<sup>[22]</sup>。

### (三) 心脏毒素与磷脂酶 A<sub>2</sub> 的协同作用

磷脂酶 A<sub>2</sub> (Phospholipidase A<sub>2</sub>, 简称 PL A<sub>2</sub>) 增加 CTx 溶血速度,但即使 PL A<sub>2</sub> 的浓度增加 10—20 倍仍不能改变引起最大溶血的 CTx 浓度<sup>[25]</sup>。两者协同作用的机理是正常情况下 PL A<sub>2</sub> 不能接近膜上的磷脂底物,CTx 与细胞膜结合后导致 PL A<sub>2</sub> 的底物暴露,PL A<sub>2</sub> 水解脂质,使细胞膜渗透性和脆性增加,促进 CTx 与细胞膜结合并引起膜结构的改变<sup>[2]</sup>。另一种解释基于 Band 3 蛋白的聚集。CTx 引起红细胞膜 Band 3 蛋白聚集后,形成一些无蛋白区,这些区域易与磷脂酶 A<sub>2</sub> 结合<sup>[22]</sup>。

## 三、心脏毒素对可兴奋细胞的作用

CTx 可引起心肌、骨骼肌和平滑肌去极化,神经元的兴奋性丧失。与溶细胞的作用不同,1 μM CTx 即可引起上述作用,并与 PL A<sub>2</sub> 无协同作用<sup>[27]</sup>。因此可兴奋细胞的 CTx 结合蛋白是细胞膜的一部分,它们不存在于红细胞膜上或浓度非常低。Sun 根据观察 CTx 对大鼠心肌的作用也提出这些组织有特异性 CTx 结合部位<sup>[26]</sup>。已提出的 CTx 结合部位包括:

(一) ATP-依赖的阳离子泵 CTx 可抑制多种细胞的 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 活性<sup>[2,29]</sup>,它可通过取消该泵的作用而触发去极化。但仅抑制钠泵不可能使这些细胞快速去极化;哇巴因抑制骨骼肌和心肌的钠泵,其效应与 CTx 不同,并且哇巴因不影响 CTx 的作用<sup>[16]</sup>,从莫桑比克眼镜蛇 (*Naja mossambica mossambica*) 毒中分离的 CTx 不抑制钠泵的活性,但该毒中的 PL A<sub>2</sub> 却具有强大的抑制钠泵作用<sup>[10]</sup>。钠泵活性下降的原因是 CTx 引起膜排列紊乱,导致钠泵活性下降,或是 CTx 内微量的 PL A<sub>2</sub>

抑制钠泵活性。

CTx 抑制红细胞和肌组织的 Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup> 激活 ATPase 活性<sup>[13]</sup>。细胞内 Ca<sup>2+</sup> 水平增高可触发肌收缩,并通过 Ca<sup>2+</sup>-依赖 ATPase 同时引起细胞膜去极化。但 CTx 抑制此酶活性需要较高的浓度 (10<sup>-6</sup>M CTx 引起 50% 抑制),因此很难设想 CTx 引起肌强直性挛缩是非特异性跨膜钙通道的结果。

(二) 置换膜结合钙 Shiau 提出 CTx 可影响膜钙结合点,通过释放膜结合 Ca<sup>2+</sup> 引起骨骼肌挛缩<sup>[20,21]</sup>。但这个机制对骨骼肌和神经组织是不可能的,因为它们的膜结合钙量非常小或甚至不存在。此外用镧 (Lanthanum) 预先处理心肌使细胞膜释放膜结合钙,不能抑制 CTx 引起的收缩<sup>[16]</sup>;另外 CTx 引起小鸡二腹肌挛缩与细胞外钙有关而不是细胞内钙<sup>[16]</sup>。

(三) 内源性钙通道的激活 CTx 与膜结合而引起去极化,此时部分电压依赖性钙通道将被激活。但去极化不是 CTx 引起收缩的基础,因为 CTx 能在低钠溶液中引起肌收缩<sup>[16]</sup>,说明 CTx 能直接促进细胞膜对 Ca<sup>2+</sup> 的通透性。Dufton 提出内源性钙通道的激活是 CTx 引起肌收缩的机制<sup>[23]</sup>。

中华眼镜蛇 (*Naja naja atra*) 毒中的 CTx III 促进骨骼肌细胞的 <sup>45</sup>Ca 内流,细胞外低水平的 Ca<sup>2+</sup> (10<sup>-6</sup>mol/L) 或高浓度 Mg<sup>2+</sup> (10mmol/L) 增强 CTx 的作用;相反细胞外的 Ca<sup>2+</sup> 浓度增加时 (12mmol/L), <sup>45</sup>Ca 内流速率明显被抑制<sup>[24]</sup> 10mmol/L Ca<sup>2+</sup> 抑制 <sup>125</sup>I-CTx (*Naja naja atra*) 与完整肌细胞结合,表明 Ca<sup>2+</sup> 和 CTx 竞争相同的结合部位。

钙通道由许多膜结合的亚单位组成,它们聚集形成激活的通道。这个聚集过程受严格的生理控制。多肽类激素与受体结合可导致细胞膜上的许多蛋白质-蛋白质结合。CTx 能促进蛋白质聚集速率或使聚集更稳定,然后导致 Ca<sup>2+</sup> 内流增加。但是戊脉安不影响 CTx 的作用<sup>[15]</sup>,不支持此观点。

如果细胞内钙浓度维持在较高水平,钙依赖的蛋白水解酶和前列腺素合成能导致许多不

可逆损伤。因此细胞内钙离子浓度增加是CTX作用的最终途径。

### 参 考 文 献

- [1] 孙家钧等 1985 眼镜蛇心脏毒对大白鼠心脏的作用 两栖爬行动物学报 4(4): 257
- [2] 杜雨苍等 1985 一个新的蛇毒细胞膜毒素 D<sub>1</sub> 的分离及鉴定 生物化学与生物物理学报 17(2): 199
- [3] Bernard E. et al. 1982 Interaction of basic proteins with charged phospholipids followed by fluorescence, DSC, and Raman spectroscopy. *Biophys. J.* 37(1): 61—62
- [4] Bougis P. et al. 1982 A possible orientation change of cardiotoxin molecule during its interaction with phospholipid monolayer. *Toxicon* 20(1): 187—190
- [5] Chen Y. H. et al. 1984 Membrane disintegration and hemolysis of human erythrocyte by snake venom cardiotoxin (A membrane-disruptive polypeptide). *Biochem. Int.* 8(2): 329—338
- [6] Condrea E. et al. 1965 Binding of Ringers venom direct hemolytic factor to erythrocytes and osmotic ghosts of various animal species. *Experientia* 21(8): 461—462
- [7] Condrea E. et al. 1971 Action of cobra venom lytic factor on sialic acid-depleted erythrocytes and ghosts. *Nannyn Schmied. Arch. Pharmak.* 268: 458—461
- [8] Condrea E. et al. 1974 Membrane-active polypeptides from snake venom: cardiotoxin and hemocytotoxins. *Experientia* 30(2): 121—126
- [9] Demel R. A. et al. 1975 Relation between various phospholipase actions on human red cell membranes and the interfacial phospholipid pressure in monolayers. *Biochim. Biophys. Acta* 406(1): 97—107
- [10] Dufourcq J. et al. 1978 Specific binding of a cardiotoxin from *Naja mossambica mossambica* to charged phospholipids detected by intrinsic fluorescence. *Biochemistry* 17(7): 1170—1176
- [11] Dufourcq J. et al. 1982 Structure-function relationships for cardiotoxins interacting with phospholipids. *Toxicon* 20(1): 165—174
- [12] Dufton M. J. et al. 1988 Structure and pharmacology of elapid cytotoxins. *Pharmac. Ther.* 36(1): 1—40
- [13] Fourie A. M. et al. 1983 The effect of cardiotoxin on Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATPase of the erythrocyte and sarcoplasmic reticulum. *Biochem. Intern.* 6(5): 581—591
- [14] Hanke W. et al. 1980 The lowest conductance state of the alamethicin pore. *Biochim. Biophys. Acta*, 598(3): 456—462
- [15] Hartman N. R. 1983 Paralyzing effects of cardiotoxin on skeletal muscle are not caused by influx of extracellular Ca<sup>2+</sup>. *Fed. Proc.* 42(3): 569
- [16] Harvey A. L. et al. 1982 Effects of purified cardiotoxin from the Thailand cobra (*Naja naja siamensis*) on isolated skeletal and cardiac muscle preparation. *Toxicon* 20(2): 379—396
- [17] Harvey A. L. et al. 1983 Effect of phospholipase A on action of cobra venom cardiotoxins on erythrocytes and skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* 728(2): 215—221
- [18] Khelif A. et al. 1985 Modulation of ouabain sensitive Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity by elapidae snake venom constituents. *Toxicon* 23(4): 582
- [19] Kojito R. R. et al. 1985 Primary structure and transmembrane orientation of murine anion exchange protein. *Nature (London)* 316(3): 234—238
- [20] Lin-Shiau S. Y. et al. 1975 Mechanism of action of cobra cardiotoxin in the skeletal muscle. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 196(3): 758—770
- [21] Lin-Shiau S. Y. et al. 1976 Mechanism of action of cobra cardiotoxin. *Toxicon* 14(6): 418
- [22] Louw A. I. et al. 1977 Kinetics of erythrocyte lysis by snake venom cardiotoxins. *Biochim. Biophys. Acta* 498(1): 143—153
- [23] Louw A. I. et al. 1978 The synergism of cardiotoxin and phospholipase A<sub>2</sub> in hemolysis. *Biochim. Biophys. Acta* 512(1): 163—171
- [24] Michaelson D. M. et al. 1983 Asymmetry of lipid organization in cholinergic synaptic vesicle membranes. *Biochem. J.* 211(1): 155—162
- [25] Nigg E. A. et al. 1979 Influence of temperature and cholesterol on the rotational diffusion of band 3 in the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 18(16): 3457—3465
- [26] Sun J. J. et al. 1986 Action of cardiotoxins from the Southern Chinese cobra (*Naja naja atra*) on rat cardiac tissue. *Toxicon* 24: 233—245
- [27] Takechi M. et al. 1986 Binding of cardiotoxin analogue III from Formosan cobra venom to FL cells. *FEBS Lett.* 205(1): 143—146
- [28] Thelespam M. et al. 1979 Classification of microbial, plant and animal cytotoxins based on their membrane-damaging effects on human fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* 557(1): 156—169
- [29] Vincent J. P. et al. 1976 Molecular mechanism of cardiotoxin action on axonal membranes. *Biochemistry* 15(15): 3171—3175
- [30] Van Hoogevest P. et al. 1984 The influence of lipid composition on the barrier properties of band 3-containing lipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 777(2): 241—252