

北部湾金黄水母 *Chrysaora helvola* Brandt 刺细胞毒液溶血活性*

An *in vitro* Study on the Erythrocytes Hemolytic Activity of the Nematocysts Venom from *Chrysaora helvola* Brandt

屈啸声^{1**}, 钟桃珍¹, 樊兰兰¹, 夏祥华¹, 李刚¹, 陈莹²

QU Xiaosheng¹, ZHONG Taozhen¹, FAN Lanlan¹, XIA Xianghua¹, LI Gang¹, CHEN Ying²

(1. 广西药用植物园, 西南濒危药材资源开发国家工程实验室, 广西南宁 530023; 2. 百洋水产集团股份有限公司, 广西南宁 530004)

(1. National Engineering Institute for the Research and Development of Endangered Medicinal Resources in Southwest China, Guangxi Medicinal Plant Garden, Nanning, Guangxi, 530023, China; 2. Baiyang Aquatic Products Group Limited Company, Nanning, Guangxi, 530004, China)

摘要:【目的】探讨金黄水母 *Chrysaora helvola* Brandt 刺细胞毒液(nematocysts venom, NV)的红细胞溶血活性特征及可能机制。【方法】通过分光光度法测定红细胞溶解释放血红蛋白的量来确认不同条件和药物对 NV 诱导红细胞溶血行为的影响。【结果】NV 诱导的红细胞溶血与其总蛋白浓度存在依赖关系。溶液 pH 值、大分子非电解质渗透压保护剂 PEGs 均能显著影响其溶血活性;非电解质小分子糖类渗透压保护剂 D-甘油和 D-半乳糖对溶血活性影响很小,但 D-葡萄糖能显著延缓溶血。NV 同时具有 Ca^{2+} 依赖的弱磷酸酯酶 A_2 (PLA₂)活性,且受组氨酸烷基化试剂 *p*-BPP 抑制。这一 PLA₂ 活性可能对其红细胞溶血活性也有贡献。【结论】NV 的红细胞溶血活性可能由膜穿孔机制和所含 PLA₂ 酶成分造成,并受到含葡萄糖单元结构的糖受体调节。

关键词: 红细胞 溶血 刺细胞毒液 磷酸酯酶 A_2 金黄水母

中图分类号:R99 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2016)01-0079-07

Abstract:【Objective】The characterization and possible mechanisms of the erythrocytes hemolysis induced by nematocysts venom from the *Chrysaora helvola* Brandt jellyfish were discussed. 【Methods】The hemoglobin content released from hemolysis was calorimetrically determined in the presence of NV only or NV and other reagents. 【Results】A concentration-dependent hemolytic effect of the NV was revealed. The solution pH as well as non-electrolytic osmotic protectants with high molecular weight, such as PEGs, can significantly affect the hemolysis induced by the NV. Non-electrolytic osmotic protectants, D-glycerol and D-galactose, have no significant effect on the hemolysis, while D-glucose can effectively retard it. Weak enzymatic activity of phospholipase A_2 was also detected in the NV. This PLA₂ activity is Ca^{2+} -needed and can be inhibited by the alkylating reagent *p*-BPP. Inhibition of the PLA₂ enzymatic activity can partially inhibit the hemolysis induced by the NV.

收稿日期:2015-10-16

作者简介:屈啸声(1981-),男,博士,助理研究员,主要从事蛋白质活性、功能和结构方面的研究。

* 广西科技攻关计划项目(桂科攻 11107011-3,1222015-3A)

资助。

** 通讯作者。

【Conclusion】The hemolysis induced by NV from *C. helvola* is possibly caused by the membrane pore-forming mechanism and its PLA₂ ingredient, and mediated by glucose-containing receptors.

Key words: erythrocyte, hemolysis, nematocysts venom, PLA₂, *Chrysaora helvola* Brandt

DOI:10.13656/j.cnki.gxkx.20160315.007

0 引言

【研究意义】金黄水母 (*Chrysaora helvola* Brandt) 是生长于北部湾海域的一种有毒水母, 隶属刺胞动物门 (Cnidaria) 水螅虫纲 (Hydrozoa) 钵水母亚纲 (Siphonophorae) 游水母目 (Pelagiidae)。成熟 *C. helvola* 触腕上有大量刺细胞 (nematocysts, NC), 内含蛋白类质毒素, 渔民和游人裸露皮肤与之接触会被蛰伤, 伤势轻微时被蛰处立即红肿、灼痛; 严重者皮肤溃烂, 流血, 甚至有人因严重蛰伤而死亡。为公众安全鉴, 有必要明确其作用机制。**【前人研究进展】**据报道, 水母触腕非刺细胞组织中含有与刺细胞毒素结构相异而活性相似的化合物, 而水母蛰伤人时注入人体内的有毒物质主要来自于其刺细胞^[1-5], 有多种因素会影响水母毒液 (素) 的溶血活性^[6-9], 如溶液 pH 值和不同类型的细胞渗透压保护剂等。多方研究认为其所研究的水母毒素能在细胞膜上形成孔道, 溶质分子等可经由此孔道进入细胞内, 并破坏细胞膜内外渗透压平衡, 从而引起细胞胀裂, 故渗透压保护剂对水母毒素活性有影响^[8-12]。此外, 有文献报导水母触腕匀浆中含有 PLA₂ (文献[9]), PLA₂ 包含多个性质不同的亚家族, 其区别主要在于催化所需的辅因子和氨基酸残基不同^[13]。**【本研究切入点】***C. helvola* 刺细胞毒液 (nematocysts venom, NV) 毒害作用的物质基础、毒性类型及其作用机制迄今未有研究报导。**【拟解决的关键问题】**通过测定 pH 值、渗透压保护剂 (PEGs, 单糖)、EDTA 和 *p*-BPB 对 NV 溶血活性的影响, 以及 EDTA 和特异性抑制剂 *p*-BPB 对 NV 的 PLA₂ 活性的影响, 研究 *C. helvola* 刺细胞毒液的体外红细胞溶血活性特点, 探讨金黄水母毒素引发溶血的可能机制等。

1 材料和方法

1.1 NV 的提取

C. helvola 样本采自广西北部湾海域。采集到后立即剪下触手并以保鲜袋分装后冰镇运回实验室处理。NC 提取参照 Bloom 等^[14]的方法, 即按体积比 1:1 的比例加入人工海水。经缓慢搅拌后于 4℃ 静置自解。每 24 h 过滤, 残余固形物在 4℃ 继续以等体积人工海水自解。连续自解 4 d 后, 3 000×g 离心

收集沉淀, 以真空冷冻干燥机干燥后所得即为含毒 NC。分装后置于 -80℃ 保存。按照质量体积比 (g:mL) 1:100 取 NC 与指定 pH 值的 PBS 缓冲液 (总磷酸盐浓度 0.01 mol/L) 混合, 冰浴下以超声波破碎 (500 W, 8 s 超声, 12 s 间歇, 90 循环) 后在 13 000×g, 4℃ 下离心 1 h, 所得上清即为 NV。置于 4℃ 冰箱中备用。NV 的蛋白质总浓度采用 Bradford 测定。

1.2 红细胞溶血活性分析

1.2.1 NV 的溶血活性分析

抽取鸡血液, 加入等体积含 5% (W:W) 柠檬酸钠的生理盐水溶液, 400×g, 4℃ 下离心 5 min, 弃去上清并重新用生理盐水吹散。如此重复离心 3 次直到上层清液无明显红色, 下层即为鸡红细胞。溶血活性测定参照 Chung 等^[6]的方法: 取上述红细胞并用 0.01 mol/L 的 PBS 溶液 (pH 值为 7.4) 配制成 0.8% (V:V) 的悬液。取上述红细胞悬液 0.3 mL, 加入不同量 NV, 并补充 PBS 调节溶液总体积为 3 mL。将此混合体系置于 37℃ 水浴中恒温 30 min 后立即取出并冰浴 5 min, 随后在 400×g, 4℃ 下离心 5 min。取上层清液并测定其在 414 nm 处的吸光度 A。取 PBS 代替 NV 作为空白对照, 取 0.1% (V:V) Triton X-100 的 PBS 溶液代替 NV 作为 100% 阳性对照。各实验用溶液的配制全部采用去离子水。

将样品吸光度扣除空白对照吸光度后对混合体系中 NV 的最终浓度作图。上述吸光度差值与 NV 诱导的溶血红细胞数, 溶血的红细胞百分数及其释放出来的血红蛋白的量成正比。

1.2.2 pH 值和药物对 NV 溶血活性的影响

pH 值的影响: 制备 NV 及红细胞-NV 混合体系时均采用相应 pH 值 (5.4, 6.4, 7.4 和 8.4) 的 PBS 溶液。

渗透压保护剂 (PEGs, 单糖) 的影响: 混合体系 pH 值均为 7.4。定容前分别加入适量高浓度的 PEG-1000, PEG-2000, PEG-3000 和 PEG-6000 溶液, 以及 D-甘油、D-半乳糖和 D-葡萄糖溶液, 使其最终浓度为 20 mmol/L。

EDTA 的影响: 混合体系 pH 值均为 7.4。定容前加入适量高浓度 EDTA 溶液, 使其最终浓度分别为 1 mmol/L、5 mmol/L、10 mmol/L。取相应浓度的 EDTA 与红细胞反应作为空白对照。

组氨酸烷基化试剂 *p*-BPB 的影响:预先取溶于 DMSO 的 *p*-BPB 与 NV 在 25℃ 下分别共孵育 2 h, *p*-BPB 的浓度分别为 0.05 mmol/L、0.1 mmol/L 和 1 mmol/L。随后以 0.22 μm 孔径的半透膜过滤去除 *p*-BPB,滤液用于测定 NV 的溶血活性。取相应浓度的 *p*-BPB 与红细胞反应作为空白对照。

其余方法与 1.2.1 节同。各实验用溶液的配制全部采用去离子水。

1.2.3 磷酸酯酶 A₂(PLA₂)活性的测定

PLA₂ 活性测定采用 sPLA₂ 试剂盒(Cayman, #765001)进行。PLA₂ 酶能水解特异性底物 diheptanoyl thio-PC (DHPE) sn2 位置上的脂肪酸而释放巯基。该巯基与 5,5-dithiobi(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) 反应生成在 405 nm 处有特征性光吸收的化合物。通过测定吸光度增加的速率可以计算得到反应的速率。

测定时先向 96 孔板每孔中加入含有 10 μL DTNB (10 mmol/L)的 Tris-HCl 溶液(0.4 mol/L, pH 值为 8.0), 10 μL NV 和 5 μL 测试缓冲液(10 mmol/L CaCl₂, 100 mmol/L KCl, 0.3 mmol/L Triton X-100, 25 mmol/L Tris-HCl, pH 值为 7.5), 最后加入 200 μL 含 1.66 mmol/L DHPE 的测试缓冲液启动反应。振荡 5 s 后立即用酶标仪(Infinite® M200 PRO, Switzerland)测定反应体系 25℃ 下在 405 nm 处的吸光度,每分钟测定一次,每样品连续测定不低于 15 次。阳性对照采用试剂盒提供的蜂毒 PLA₂(100 μg/mL), 空白对照以测试缓冲液代替 NV。测定所得 PLA₂ 活性表现速率常数 *k* 以 NV 中每克总蛋白每分钟水解的磷脂胆碱的微摩尔数表示。

1.2.4 Ca²⁺ 和特异性抑制剂 *p*-BPB 对 NV 的 PLA₂ 活性的影响

Ca²⁺ 的影响:方法同 1.2.3 节所述,但所采用测试缓冲液不含 CaCl₂, 其它实验用溶液的配制全部采用去离子水。NV 在测试前分别滴加 EDTA 溶液至 10 mmol/L 和 20 mmol/L,并在 25℃ 下混匀孵育 30 min,使 NC 带入的痕量 Ca²⁺ 被不同程度地螯合屏蔽。

p-BPB 的影响:向 NV 中滴加预先溶于 DMSO 的 *p*-BPB,使 *p*-BPB 的最终浓度分别达 0.1 mmol/L 和 1 mmol/L。25℃ 下混匀并分别孵育 2 h 后代替 NV 用于 PLA₂ 活性测试。方法同 1.2.3 节所述。

2 结果与分析

2.1 NV 的溶血活性

金黄水母 NV 诱导的鸡红细胞溶血如图 1 所示。图 1 显示吸光度与混合体系中 NV 的浓度之间存在依赖关系,并表现为典型的 S 型曲线。根据曲线计算表明引起红细胞半数溶血的 NV 总蛋白浓度为 (4.6 ± 0.20) μg/mL。

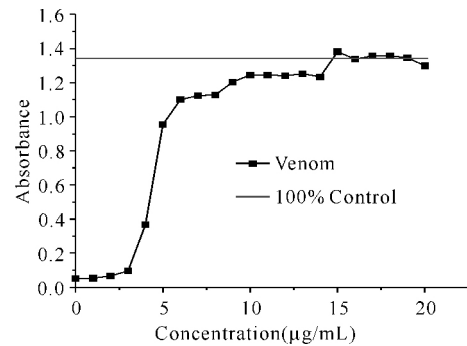


图 1 NV 诱导的红细胞溶血效应

Fig. 1 Erythrocyte hemolysis induced by NV

2.2 溶液 pH 值对 NV 溶血活性的影响

鉴于人体血液的正常 pH 值约为 7.4,其它大部分组织的正常生理 pH 值为 4.0~8.4,我们测定 pH 值分别为 5.4,6.4,7.4 和 8.4 时 NV 诱导鸡红细胞溶血的效果而不考虑极端 pH 值。结果如图 2 所示,在所测 pH 值范围内,NV 均能诱导鸡红细胞溶血。相应 pH 值条件下 NV 诱导鸡红细胞的半数溶血浓度分别为 (3.1 ± 0.3) μg/mL、(4.5 ± 0.6) μg/mL、(4.6 ± 0.2) μg/mL 和 (6.2 ± 0.9) μg/mL。即 NV 的溶血活性随环境 pH 值的降低而增强。

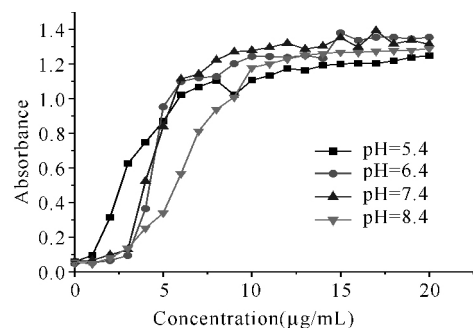


图 2 溶液 pH 值对 NV 红细胞溶血效应的影响

Fig. 2 Effects of solution pH on the erythrocyte hemolysis induced by NV

2.3 渗透压保护剂(PEGs、单糖)对 NV 溶血活性的影响

PEGs 能显著影响 NV 的溶血活性。分子量最小的 PEG-1000 虽然不能完全抑制 NV 诱导的红细胞溶血,但不同浓度 NV 诱导的溶血被强烈抑制;更大分子量的 PEG-2000,PEG-3000 和 PEG-4000 则能

完全抑制 NV 诱导鸡红细胞溶血(图 3a)。D-甘油和 D-半乳糖对 NV 诱导的鸡红细胞溶血影响较小,当 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 D-甘油、D-半乳糖存在时,NV 诱导半数红细胞溶血的浓度分别为 $(7.3 \pm 0.5)\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $(5.8 \pm 0.2)\mu\text{g}/\text{mL}$ 。20 mmol/L D-葡萄糖能强烈抑制较低浓度的 NV 诱导的红细胞溶血,但随 NV 浓度升高,D-葡萄糖对红细胞溶血的抑制作用逐渐减弱。在所测 NV 浓度范围内,高浓度的 NV 仍可诱导全部红细胞溶血。当 20 mmol/L D-葡萄糖存在时,NV 诱导半数红细胞溶血的浓度为 $(11.2 \pm 0.7)\mu\text{g}/\text{mL}$ (图 3b)。

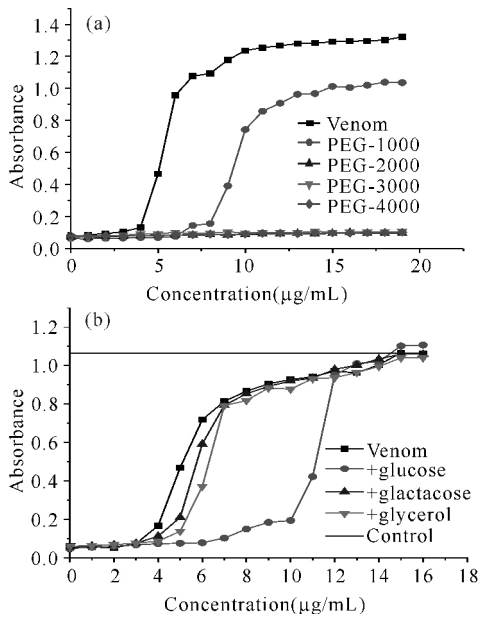


图 3 PEGs 和小分子量左旋糖对 NV 溶血效应的影响

Fig. 3 Effects of PEGs and D-carbohydrates on the erythrocyte hemolysis induced by NV

2.4 NV 的 PLA₂ 活性

如图 4 所示,NV 能诱使反应混合物的吸光度不断增大,表明 NV 确实具有 PLA₂ 活性;但 NV 使反应混合物吸光度增大的速率相对阳性对照很小,表明 NV 的 PLA₂ 活性远低于蜂毒 PLA₂ 酶的活性。计

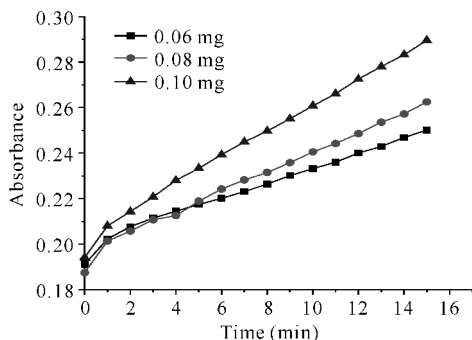


图 4 NV 的 PLA₂ 活性

Fig. 4 The PLA₂ activity of NV

算结果表明,NV 的 PLA₂ 活性表观速率常数 $k = (1267.0 \pm 12.6)\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ 蛋白。

2.5 Ca²⁺ 和 p-BPB 对 NV 的 PLA₂ 活性影响

对比无 EDTA 的 NV,10 mmol/L 和 20 mmol/L EDTA 存在时,反应混合物吸光度增加的速率显著降低;且随 EDTA 浓度升高,降低的程度增大(图 5a)。计算结果表明,10 mmol/L 和 20 mmol/L EDTA 存在时,NV 的 PLA₂ 活性的表观反应速率常数 k 分别为 $(367.4 \pm 5.3)\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ 总蛋白和 $(103.6 \pm 1.2)\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ 总蛋白,表明 EDTA 能够显著抑制 NV 的 PLA₂ 活性。这可能是因为 EDTA 整合了可能由 NC 带入 NV 中的痕量生物 Ca²⁺,也进一步说明 NV 中含有的 PLA₂ 可能是 Ca²⁺ 依赖的。如图 5b 所示,与不同浓度组氨酸烷基化试剂 p-BPB 孵育相同时间后,NV 的 PLA₂ 活性均有显著降低。计算结果表明,分别与 0.1 mmol/L 和 1 mmol/L 的 p-BPB 共孵育 2 h 后,NV 的 PLA₂ 活性的表观反应速率常数 k 变为 $(950.1 \pm 0.5)\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ 总蛋白和 $(709.4 \pm 0.6)\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ 总蛋白,即 p-BPB 也可抑制 NV 的 PLA₂ 活性。

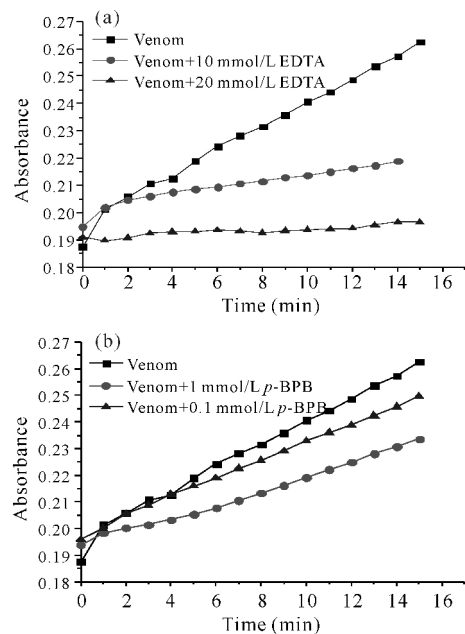


图 5 EDTA 和 p-BPB 对 NV 的 PLA₂ 活性的影响

Fig. 5 Effects of EDTA and p-BPB on the PLA₂ activity of NV

2.6 EDTA 和 p-BPB 对 NV 溶血活性的影响

如图 6a 所示,不同浓度的 EDTA 存在时,NV 仍旧具有强烈的溶血活性。计算结果表明,当存在 0 mmol/L,1 mmol/L,5 mmol/L,10 mmol/L 的 EDTA 时,NV 的半数溶血浓度分别为 $(4.6 \pm 0.2)\mu\text{g}/\text{mL}$, $(4.7 \pm 0.4)\mu\text{g}/\text{mL}$, $(5.9 \pm 0.3)\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $(7.6 \pm 0.8)\mu\text{g}/\text{mL}$ 。这说明 EDTA 对 NV 的溶血活

性具有较弱的抑制作用,且抑制作用随着 EDTA 浓度的升高而增强。由图 6b 可知,不同浓度的 *p*-BPB 存在时,NV 表现出强烈的溶血活性,但溶血活性的改变与 *p*-BPB 的浓度之间无明确关系。

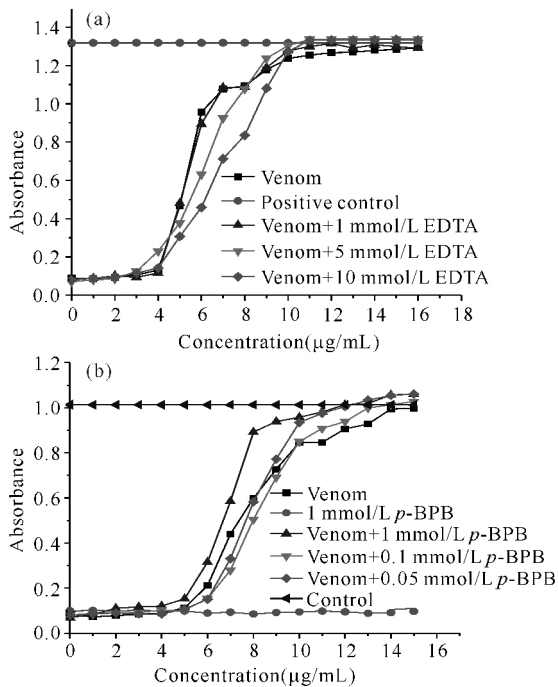


图 6 EDTA 和 *p*-BPB 对 NV 的溶血效应的影响

Fig. 6 Effects of EDTA and *p*-BPB on the erythrocyte hemolysis induced by NV

3 讨论

多数有毒水母毒液均能诱导红细胞溶血。这一现象既可用于初步评估水母是否有毒,也可用于比较不同水母毒性强弱,还可以用于快速检测和追踪毒液或毒素成分。此外,红细胞溶血还可用于探讨水母毒液(素)的作用机制,是一种非常有价值的研究模型。

水母毒素均为蛋白质。而溶液的 pH 值能显著影响到蛋白质的荷电状态,也极有可能影响其活性。因人体被水母叮蛰不同组织部位的 pH 值存在差异,本文选择在常见生理 pH 值范围内考察溶液 pH 值对 NV 溶血活性的影响。结果发现随 pH 值降低 NV 的溶血活性增强。这表明在 *C. helvola* 叮蛰后,应避免采用酸性物质处理伤口以免恶化伤势,或用碱性溶液清洗,缓解毒素的伤害。同时这一结果与李鹏程等^[9]对 *Cyanea nozakii* Kishinouye 水母毒液溶血活性的研究结果相反,表明南北方两种不同水母所含毒素存在性质上的巨大差异。

本文选择考察并比较了两种不同类型的渗透压保护剂对金黄水母 NV 的溶血活性的影响,一为高分子聚合物类型的聚乙二醇(PEG-1000, PEG-2000, PEG-3000 和 PEG-6000),一为几种常用小分子量的

D 构型糖(D-甘油,D-半乳糖,D-葡萄糖)。结果表明,高分子类渗透压保护剂能强有效地抑制 NV 诱导的红细胞溶血。虽然分子量最低的 PEG-1000 仅能部分抑制溶血,但更高分子量的 PEGs 则可完全抑制溶血。而 3 种小分子量糖类渗透压保护剂中,D-甘油和 D-半乳糖几乎不能抑制溶血的发生。因两类渗透压保护剂均为非电解质,所用溶液均为稀溶液,它们的活度系数可近似为 1,根据 Van't Hoff 的非电解质稀溶液渗透压理论^[15],它们使溶液渗透压升高的量相等,故红细胞内外渗透压平衡/失衡导致细胞胀裂说并不足以解释两类不同渗透压保护剂保护效果的差异。

Marino 等^[8,12]指出 PEGs 等高分子化合物在水溶液中以无规线团形式存在,可以“堵”住水母毒素蛋白在细胞膜上形成的“孔”,阻止溶质分子等进入细胞,从而制止红细胞因内压过大而胀裂溶血。从两类不同分子量范围的渗透压保护剂的实际效果看,这一假设备有一定的合理性。但分子量为 2 000~8 000 的 PEGs 也是良好的蛋白沉淀剂,它们通过破坏蛋白质的水化层,减少蛋白质与水结合的能力使蛋白聚沉^[16],也经常用于蛋白质沉淀富集。若水母毒素蛋白是一种膜结合蛋白,可预期该蛋白为高度疏水的分子,被 PEGs 破坏水化后更易于聚沉而极大降低其在溶液中的浓度。这一机制也可解释本研究观察到的 PEG 对 NV 溶血活性的抑制作用。总而言之,PEGs 对水母刺细胞毒液和毒素蛋白溶血活性的机制仍旧有待进一步设计实验检验和讨论。

进一步比较 D-葡萄糖和 D-半乳糖对 NV 红细胞溶血活性的影响可知:D-葡萄糖和 D-半乳糖化学式和分子量相同,分子结构相似,大小相近,区别仅为 C(2)和 C(4)位置的旋光异构不同,但相同浓度下它们对 NV 溶血活性的影响存在显著区别。这也是渗透压机制和孔径堵塞机制所不能解释的。同时,这也与李鹏程等^[9]对我国北方水母 *Cyanea nozakii* Kishinouye 毒液的研究结论相反,再次显示 *C. helvola* 与上述北方水母的毒性差异。

本文拟用一个新假设来解释葡萄糖对金黄水母 NV 溶血活性的抑制,即 NV 中所含毒素蛋白与红细胞的相互作用需要由含糖链的受体分子来介导,糖链中的葡萄糖单元是 *C. helvola* 毒素和受体识别与结合的关键结构。*C. helvola* 毒素蛋白首先通过该葡萄糖单元与受体识别并结合,再与红细胞膜相互作用。这一假设可较好地解释 D-葡萄糖对 NV 溶血活性的影响。当溶液中存在游离葡萄糖分子时,它将与红细胞表面受体竞争结合 NV 中的毒素蛋白分子。NV

浓度较低时,因大部分毒素蛋白与溶液中的葡萄糖分子结合,与红细胞结合的毒素蛋白较少,导致溶血红细胞也减少,溶血被抑制。随着 NV 浓度升高,溶液中的葡萄糖逐步被饱和,过量的毒素蛋白分子与红细胞结合,从而导致溶血红细胞逐渐增多。

本文首次在 *C. helvola* 的 NV 中检测出 PLA₂ 活性,这确证 *C. helvola* 的 NV 中含有 PLA₂,对 NV 所含 PLA₂ 的活性进行初步探讨发现,在无 Ca²⁺ 条件下(无 Ca²⁺ 反应液或以 EDTA 螯合可能由 NC 带入 NV 中的痕量生物 Ca²⁺)NV 的 PLA₂ 活性被大幅削弱,削弱程度随 EDTA 浓度增大而提高,这表明 NV 中含有的 PLA₂ 可能是 Ca²⁺ 依赖的。PLA₂ 的特异性抑制剂——组氨酸烷基化试剂 *p*-BPB 也能有效抑制 NV 的 PLA₂ 活性。这表明 NV 中含有的 PLA₂ 是依赖于组氨酸催化其反应的。

但有关水母 PLA₂ 对溶血活性的贡献迄今未见有讨论。众所周知,PLA₂ 能够水解磷脂从而破坏细胞膜,多种生物毒液中含有的 PLA₂ 均能诱导红细胞溶血^[13]。本文分别比较以 EDTA 和 *p*-BPB 抑制 PLA₂ 活性后 NV 溶血活性的变化。在 EDTA 抑制 90% 的 PLA₂ 活性时,NV 的半数溶血浓度从 4.6 μg/mL 增加到 7.6 μg/mL,这表明 NV 所含 PLA₂ 对其溶血活性有部分贡献,NV 还含有除 PLA₂ 之外的其它溶血因子。此外,由于 EDTA 可螯合溶液中的绝大多数二价金属离子,这也表明 NV 诱导红细胞溶血可能不需要二价金属离子如 Ca²⁺ 等的辅助。但 *p*-BPB 抑制实验表明,抑制 NV 的 PLA₂ 活性对其溶血活性似乎无明确关联。有关 NV 所含 PLA₂ 酶对其红细胞溶血活性的贡献仍需进一步研究。

4 结论

本文对金黄水母 *C. helvola* 刺细胞毒液的溶血活性进行研究,讨论 pH 值和两种不同类型的渗透压保护剂对该刺细胞毒液溶血活性的影响。结果表明,*C. helvola* 刺细胞毒液具有浓度依赖的溶血活性和弱 PLA₂ 活性,其溶血活性在正常生理 pH 值范围内随 pH 值降低而增强,高分子非电解质渗透压保护剂 PEGs 对溶血具有显著的抑制作用,但小分子糖类非电解质渗透压保护剂 D-甘油和 D-半乳糖对溶血影响很小,而 D-葡萄糖能显著延缓溶血。*C. helvola* 刺细胞毒液的 PLA₂ 催化中心以组氨酸残基为催化基团,需钙离子辅助。EDTA 抑制实验表明该 PLA₂ 活性对溶血活性具有部分贡献。这提示 *C. helvola* 刺细胞毒液中可能含有除 PLA₂ 外的其它溶血成分,为快速测定和跟踪,以及分离纯化刺细胞毒液中的溶血活

性蛋白提供必要知识。

参考文献:

- [1] BRINKMAN D L, BURNELL J N. Biochemical and molecular characterization of cubozoan protein toxins [J]. *Toxicon*, 2009, 54: 1162-1173.
- [2] NAGAI H, TAKUWA K, NAKAO M, et al. Novel proteinaceous toxins from the box jellyfish (sea wasp) *Carybdea rastoni* [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 275: 582-588.
- [3] NAGAI H, TAKUWA K, NAKAO M, et al. Isolation and characterization of a novel protein toxin from the Hawaiian box jellyfish (sea wasp) *Carybdea alata* [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 275: 589-594.
- [4] NAGAI H, TAKUWA-KURODA K, NAKAO M, et al. A novel protein toxin from the deadly box jellyfish (Sea wasp, Habu-kurage) *Chiropsalmus quadrigatus* [J]. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2002, 66(1): 97-102.
- [5] NAGAI H. Recent progress in jellyfish toxin study [J]. *Journal of Health Science*, 2003(5): 337-340.
- [6] CHUNG J J, RATNAPALA L A, COOKE I M, et al. Partial purification and characterization of a hemolysin (CAH1) from Hawaiian box jellyfish (*Carybdea alata*) venom [J]. *Toxicon*, 2001, 39: 981-990.
- [7] YU H, LI C, LI R, et al. Factors influencing the hemolytic activity of venom from the jellyfish *Rhopilema esculentum* Kishinouye [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2007, 45(7): 1173-1178.
- [8] MARINO A, MORABITO R, PIZZATA T, et al. Effect of various factors on *Pelagia noctiluca* (Cnidaria, Scyphozoa) crude venom-induced haemolysis [J]. *Comparative Biochemistry and physiology, Part A Mol Integr Physiol*, 2008, 151(1): 144-149.
- [9] FENG J, YU H, XING R, et al. Partial characterization of the hemolytic activity of the nematocyst venom from the Jellyfish *Cyanea nozakii* Kishinouye [J]. *Toxicology in Vitro*, 2010, 24(6): 1750-1756.
- [10] 王涛. 发形霞水母触手提取物致红细胞与 NRK-52E 细胞损伤机制 [D]. 上海: 第二军医大学, 2013.
WANG T. Study on the Mechanism of Erythrocyte and NRK-52E Cell Injury Induced by Tentacle Extract from the Jellyfish *Cyanea capillata* [D]. Shanghai: The Second Military Medical University, 2013.
- [11] BADRÉ S. Bioactive toxins from stinging jellyfish [J]. *Toxicon*, 2014, 91: 114-125.
- [12] MARINO A, MORABITO R, LA SPADA G. Factors altering the haemolytic power of crude venom from

- Aiptasia mutabilis* (Anthozoa) nematocysts[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A Mol Integr Physiol, 2009, 152(3): 418-422.
- [13] KUDO I, MURAKAMI M. Phospholipase A2 enzymes [J]. Prostaglandins & Other Lipid Mediators, 2002, 68/69: 3-58.
- [14] BLOOM D A, BURNEET J W, ALDERSLADE P. Partial purification of box jellyfish (*Chironex fleckeri*) nematocysts venom isolated at the beachside[J]. Toxicon, 1998, 36: 1075-1085.
- [15] 傅献彩. 物理化学[M]. 5版. 北京: 高等教育出版社, 2006: 249.
- FU X C. Physical Chemistry [M]. 5th ed. Beijing: Higher Education Press, 2006: 249.
- [16] 张焱, 闭静秀, 周卫斌, 等. PEG 沉淀结合层析分离重组乙肝病毒表面抗原[J]. 过程工程学报, 2006, 6(1): 100-103.
- ZHANG Y, BI J X, ZHOU W B, et al. Purification of recombinant hepatitis B virus surface antigen with PEG precipitation and chromatography [J]. The Chinese Journal of Process Engineering, 2006, 6(1): 100-103.

(责任编辑: 陆雁)

(上接第 78 页 Continue from page 78)

- [12] 林雄平, 陈晓清, 苏育才, 等. 金银花和苦丁茶多糖提取物抗菌活性研究[J]. 亚热带植物科学, 2008, 37(1): 51-53.
- LIN X P, CHEN X Q, SU Y C, et al. Antimicrobial activities of polysaccharide extracts from *Flos ionicerae* and *Ilex kudingcha* [J]. Subtropical Plant Science, 2008, 37(1): 51-53.
- [13] 黄国霞, 李军生, 阎柳娟. 几种中药提取物的抑菌作用及机理研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(2): 425-426.
- HUANG G X, LI J S, YAN L J. Study on antibacterial activity and mechanism of several Chinese herbal medicine extracts[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2011, 22(2): 425-426.
- [14] 解军波, 李萍. 冬青属植物化学成份及药理活性研究进展[J]. 中草药, 2002, 33(1): 85-88.
- XIE J B, LI P. Advances in research of chemistry and pharmacology of *Ilex* L. [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2002, 33(1): 85-88.

(责任编辑: 米慧芝)