

DOI:10. 3724/SP. J. 1008. 2008. 00083

• 研究快报 •

发形霞水母毒素分离产物溶血活性的比较及其影响因素分析

聂菲<sup>1△</sup>,肖良<sup>1△</sup>,张静<sup>2</sup>,贺茜<sup>3</sup>,樊军文<sup>1</sup>,李玥<sup>1</sup>,张黎明<sup>1\*</sup>

1. 第二军医大学海军医学系防化医学教研室,上海 200433
2. 第二军医大学药学院药理学教研室,上海 200433
3. 第二军医大学长海医院妇产科,上海 200433

**[摘要]** **目的:**分离发形霞水母刺丝囊毒素(nematocyst venom, NV)与无刺丝囊触手提取物(tentacle-only extract, TOE),比较二者的溶血活性,分析其影响因素。**方法:**采用自溶、离心方法分离发形霞水母 NV 和 TOE,比较二者的溶血活性,观察提取物浓度、温度和 pH 值等因素对二者溶血活性的影响。**结果:**成功分离到 NV 与 TOE;二者浓度相关溶血活性曲线均呈“S”形,溶血分数 50%时所对应的质量浓度(HU<sub>50</sub>)分别为 8 μg/ml 和 67 μg/ml,前者溶血活性强度约为后者的 8.4 倍;温度对二者溶血活性影响较大,最大溶血活性都出现在 40℃;pH 值对二者溶血活性也有影响,在 pH 8 处二者都具有最大的溶血活性,但后者较前者更为敏感。**结论:**发形霞水母毒素分离产物 NV 和 TOE 均具有溶血活性,且前者强于后者;二者溶血活性受浓度、温度和 pH 值的影响。

**[关键词]** 发形霞水母;刺丝囊毒素;无刺丝囊触手提取物;溶血活性

**[中图分类号]** Q 586 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)01-0083-04

Comparison of haemolytic activities of venom separations from jellyfish *Cyanea capillata* and their influencing factors

NIE Fei<sup>1△</sup>, XIAO Liang<sup>1△</sup>, ZHANG Jing<sup>2</sup>, HE Qian<sup>3</sup>, FAN Jun-wen<sup>1</sup>, LI Yue<sup>1</sup>, ZHANG Li-ming<sup>1\*</sup>

1. Department of Chemical Defense Medicine, Faculty of Naval Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433
3. Department of Gynecology and Obstetrics, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433

**[ABSTRACT]** **Objective:**To separate the nematocyst venom (NV) and tentacle-only extract (TOE) from the jellyfish *Cyanea capillata* and to analyze the difference between their haemolytic activities and the influencing factors. **Methods:** NV and TOE were separated by autolysis and centrifugation. The influence of concentration, temperature and pH value on the haemolytic activities of NV and TOE were observed. **Results:** NV and TOE were successfully separated. The concentration-associated haemolytic curves were “S” shaped for both NV and TOE. The HU<sub>50</sub> of NV and TOE were 8 μg/ml and 67 μg/ml, respectively; and the haemolysis of NV was about 8.4 times of that of TOE. Temperature had great influence on haemolysis of both and the highest haemolysis were both at 40℃. pH value also had influence on haemolysis. The strongest haemolysis activity was found both at pH 8 and TOE was more sensitive. **Conclusion:** NV and TOE both have haemolysis activity, with the activity of NV stronger than that of the latter. The haemolysis activity is influenced by concentration, temperature and pH value.

**[KEY WORDS]** *Cyanea capillata*; nematocyst venom; tentacle-only extract of jellyfish; haemolysis activity

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(1): 83-86]

发形霞水母(*Cyanea capillata*)属刺胞动物门 (Semaestomeae)霞水母科(Cyaneidae),系全球广

(Coelenterata)钵水母纲(Scyphozoa)旗口水母目 布性大型水母,是我国东南沿海的主要致伤水母。

**[收稿日期]** 2007-09-05

**[接受日期]** 2007-11-05

**[基金项目]** 全军“十一五”专项资助项目(06Z020);上海市自然科学基金(06ZR14111);第二军医大学军事医学专项基金(05JS04). Supported by the Foundation of the “Eleventh Five-Year Plan” for Medical Science Development of PLA (06Z020), Natural Science Foundation of Shanghai Municipal Government (06ZR14111) and Military Medical Foundation of Second Military Medical University(05JS04).

**[作者简介]** 聂菲,硕士生,助理实验师.肖良,硕士生.△共同第一作者(Co-first authors).

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel:021-25070354, E-mail: lmzhang1969@yahoo. com. cn

既往研究<sup>[1-3]</sup>发现水母毒液具有心血管、溶血及神经毒性,但实验所采用的毒液都是将水母触手直接匀浆、离心后获取的上清,未将水母刺丝囊毒素(nematocyst venom, NV)与无刺丝囊触手提取物(tentacle-only extract, TOE)分开研究。

溶血活性是水母毒素最为常见的一种生物学活性。因此,本研究选择 *C. capillata* 水母,进行 NV 与 TOE 溶血活性的比较研究,并探讨浓度、温度和 pH 值等因素对二者溶血活性的影响,同时也为提取溶血蛋白、研究溶血蛋白的分泌机制等后续工作奠定基础。

## 1 材料和方法

**1.1 NV 和 TOE 的提取及分离** *C. capillata* 样品采自浙江三门湾(由福建集美大学水产学院洪惠馨教授鉴定)。捕捉到水母后迅速剪下触手并于干冰冻条件下运回上海, -70℃ 备用。250 g 样品加入等体积自配海水(NaCl 8 g, MgCl<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O 5 g, KCl 0.8 g, CaCl<sub>2</sub> 1.033 g, 加蒸馏水至 1 000 ml), 自溶 4 d, 磁力搅拌器每日搅拌 2 次, 每次 10 min。100 目细胞筛网过滤 3 次, 滤液 10 000×g 离心 3 次, 每次 15 min, 收集上清即为 TOE, 沉渣为刺丝囊(nematocyst)。刺丝囊加入等体积 PBS, 玻璃匀浆器匀浆, 再加入 5 倍体积 PBS (0.01 mol/L, pH 7.4), 10 000×g 离心取上清即为 NV。Bradford 法<sup>[4]</sup>测 NV 与 TOE 蛋白浓度。所有操作在 4℃ (或冰水混合物) 条件下完成, 所得 NV 与 TOE -70℃ 保存, 用前 PBS 4℃ 透析过夜。

### 1.2 溶血活性分析

**1.2.1 红细胞悬液的配制及总反应体系的建立** SD 大鼠股动脉插管取动脉血, 等体积 Alsever 溶液抗凝, PBS 漂洗数次, 每次漂洗后 3 000×g 离心 5 min, 弃上清, 直至上清清亮为止。红细胞与 PBS 按 1:1 500 稀释(0.067%), 保证 414 nm 波长处最大溶血光密度( $D_{414}$ )值在 0.20 左右。反应总体积 1.5 ml, 其中红细胞悬液 0.5 ml, PBS 与 NV 或 TOE 共 1.0 ml。每组另设阴性对照(不加毒素)、阳性对照(25 μg/ml saponin 0.1 ml)及不加红细胞的内参。加样后 37℃ 水浴振荡 30 min, 120 次/min, 然后 3 000×g 离心 5 min, 测  $D_{414}$  (重复 3 次)。溶血分数 = [(样品管  $D$  值) - (阴性对照管  $D$  值) - (内参管  $D$  值)] / [(阳性对照管  $D$  值) - (阴性对照管  $D$  值)]。

**1.2.2 浓度、温度和 pH 值等因素对提取物溶血活性的影响** TOE 0.02~0.20 ml (NV 0.002~0.020

ml) 等比分成 10 组, 并设内参、阴性对照和阳性对照; 37℃ 水浴 30 min, 3 000×g 离心 5 min 后测定  $D_{414}$ , 计算溶血分数; TOE 取 0.02、0.04、0.08、0.16 ml (NV 取 0.002、0.004、0.008、0.016 ml) 样品管计算  $HU_{50}$  (溶血分数为 50% 时所对应的溶液质量浓度),  $HU_{50} = \log^{-1}[X_m - i(\sum P - 0.5)]$  ( $X_m$  为最大剂量组的对数值,  $\sum P$  为各组溶血分数总和,  $i$  为公比的対数)。

TOE 取 0.08 ml (NV 取 0.008 ml), 自 0~100℃ 共分 11 组, 各组毒素先在各温度条件下放置 30 min, 再加红细胞悬液和 PBS, 37℃ 水浴 30 min, 3 000×g 离心 5 min 后测  $D_{414}$ 。

TOE 取 0.08 ml (NV 取 0.008 ml), 每组包括阴性对照、阳性对照以及内参, 建立 pH 值相关溶血反应体系; 自 pH 1~12 共分 12 组, 各组毒素先在各 pH 值条件下放置 30 min, 再加红细胞悬液和 PBS, 37℃ 水浴 30 min, 3 000×g 离心 5 min 后测  $D_{414}$ 。

**1.3 统计学处理** 所有数据均采用 SAS 统计软件进行分析处理, 计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示。

## 2 结果

**2.1 NV 与 TOE 的提取及分离结果** 成功获取 NV 与 TOE, 蛋白浓度分别为 1.42 mg/ml 和 1.49 mg/ml。光学显微镜下观察到多种不同类型的刺丝囊(图 1A), 个体小、数量多的为无鞭毛刺丝囊, 个体大、带鞭毛的为鞭毛刺丝囊, 而鞭毛实际上是水母捕食或防卫时刺丝囊发出的刺丝(图 1B)。

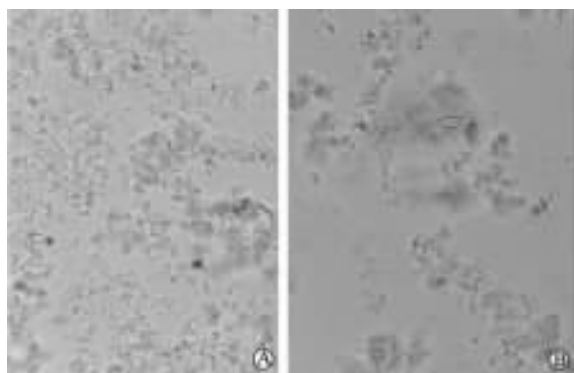


图 1 *C. capillata* 触手不同种类的刺丝囊

Fig 1 Morphology of nematocysts from *C. capillata* tentacle under microscope

A: Various kinds of nematocysts and the nematocyst with un-emitted trichite; B: The nematocysts with emitted trichite. Original magnification: ×400

**2.2 提取物浓度对溶血活性的影响** NV 与 TOE 都对大鼠红细胞有明显溶血活性, 且随着毒素浓度

增加而溶血分数逐渐增大,溶血活性曲线都呈“S”形(图 2);TOE 与 NV 的  $HU_{50}$  分别为  $67\ \mu\text{g/ml}$  和  $8\ \mu\text{g/ml}$ ,对比  $HU_{50}$  可知 NV 的溶血活性更大,约为 TOE 的 8.4 倍。

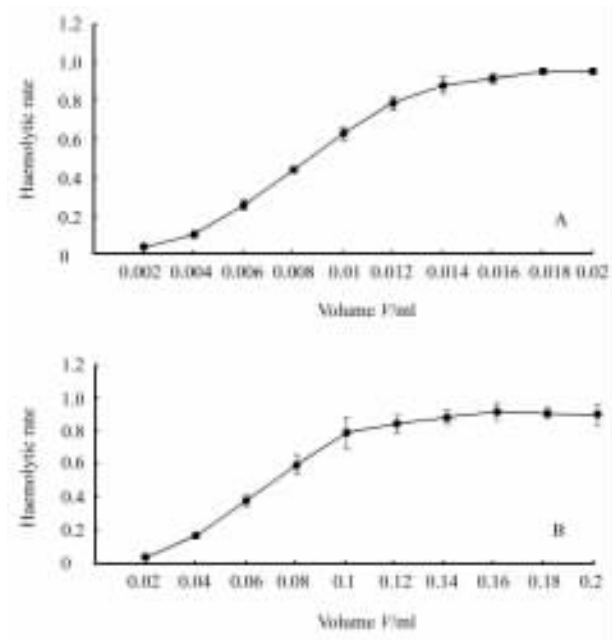


图 2 *C. capillata* 提取物 NV(A)及 TOE(B)浓度相关溶血活性曲线

Fig 2 Concentration associated haemolytic curve of *C. capillata* NV (A) and TOE(B)  
 $n=3, \bar{x} \pm s$

2.3 温度对溶血活性的影响 不同温度条件下溶血活性各不相同(图 3),但两者反应趋势相似,最大溶血反应出现在  $40^{\circ}\text{C}$ ,  $30\sim 50^{\circ}\text{C}$  溶血活性较大,小于  $30^{\circ}\text{C}$  溶血活性下降缓慢,  $50\sim 70^{\circ}\text{C}$  时溶血反应下降剧烈,大于  $80^{\circ}\text{C}$  活性变化趋于平缓。

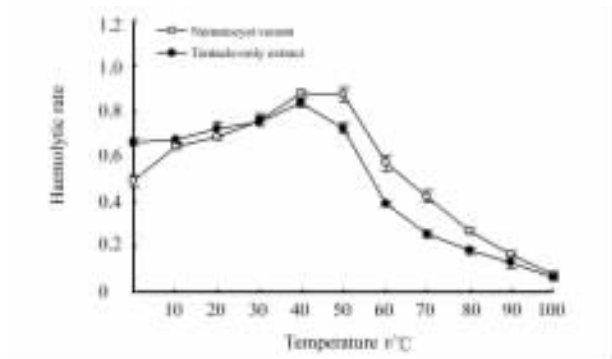


图 3 *C. capillata* 提取物 NV 与 TOE 温度相关溶血活性曲线

Fig 3 Temperature associated haemolytic curve of *C. capillata* NV and TOE  
 $n=3, \bar{x} \pm s$

2.4 pH 值对溶血活性的影响 不同 pH 值条件下溶血活性有变化(图 4),TOE 与 NV 变化趋势有明显差异,TOE 变化更为明显,而 NV 变化则相对缓和。TOE 最大溶血反应出现在 pH 8 时,从 pH 1~8,溶血活性随 pH 增加而增大;pH 8~10,溶血活性剧烈下降,pH 超过 10 变化趋于平缓。NV 最大溶血反应也出现在 pH 8 时,最小溶血活性出现在 pH 1 时,此时溶血分数也达 61.96%,从 pH 1~8 溶血活性缓慢增加,而 pH 值超过 9 溶血活性则缓慢下降,总的趋势各组溶血反应变化均不大。

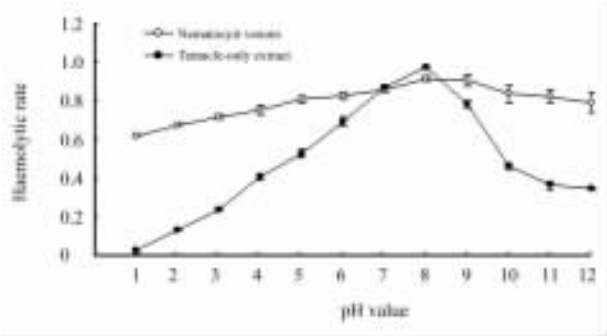


图 4 *C. capillata* 提取物 NV 与 TOE pH 相关溶血活性曲线

Fig 4 pH value associated haemolytic curve of *C. capillata* NV and TOE  
 $n=3, \bar{x} \pm s$

3 讨论

水母毒素中普遍含有溶血活性组分,因此溶血活性的检测是水母毒素活性检测的首选方法。自 2000 年 Nagai 等<sup>[1,5]</sup>首次从 *C. rastonii* 分离出溶血活性蛋白 CrTX-A 和 CrTX-B 以来,世界各地的科学家从不同水母中提取到多种不同的溶血毒素,并对部分毒素蛋白进行了测序。Chung 等<sup>[6]</sup>利用阴离子交换树脂结合 SDS-PAGE 成功分离到相对分子质量为 42 000 的溶血毒素 CAH1,并测定其 N 末端序列 XAADAXSTDIDD/GIIG; Sanchez-Rodriguez 等<sup>[2]</sup>利用低压液相色谱法对 *C. marsupiali* 毒液进行分离,成功提取出 1 种神经毒素和 3 种溶细胞毒素,相对分子质量分别是 120 000、220 000、139 000、36 000。对于溶血活性的作用机制,一般认为是由于水母毒液中含有磷脂酶、皂素等溶血素直接作用引起的;而 Ishikawa 等<sup>[7]</sup>研究发现溶血毒素可能通过补体的激活,在红细胞膜上形成补体复合物而产

生溶血效应。也有学者认为水母毒素可以在细胞膜上形成膜通道复合物而导致细胞的溶解<sup>[8-9]</sup>,其具体的作用机制仍有待进一步的研究探讨。

Yu等<sup>[10-11]</sup>研究了温度、pH值、二价阳离子等因素对中国北方沿海广泛分布的水母*R. esculentum*毒素溶血活性的影响,但其研究的水母毒素是将整个触手直接匀浆、离心后的上清,并未将NV与TOE区别开来。而且,人们一直认为水母触手毒素即指NV,TOE对于触手毒性没有影响。但近年的研究<sup>[3]</sup>表明TOE具有多种生物学活性,包括与NV相同或不同的活性。本研究对*C. capillata*分离物NV和TOE的溶血活性分别进行了相关影响因素的研究,结果发现NV和TOE对大鼠红细胞均具有较强的溶血活性,且NV的溶血活性更强,约为TOE的8.4倍。

本研究在采用阴离子交换树脂分离、纯化*C. capillata*溶血毒素的过程中发现,NV和TOE都至少存在2个溶血组分(数据另文报道);在更低剂量( $NV \leq 9.9 \times 10^{-4}$  mg/ml,  $TOE \leq 9.5 \times 10^{-3}$  mg/ml)的溶血反应中,样品管光密度值比阴性对照组要小,表明*C. capillata*毒素中可能存在低浓度的溶血负调节因素;100℃煮沸30 min后NV和TOE的溶血活性并不完全丧失,将煮沸后的NV和TOE放置在4℃条件一段时间后,其溶血活性可部分恢复,表明*C. capillata*存在耐热熔血组分并可以部分复性。

总之,*C. capillata*分离物NV和TOE中都存在多个不同的溶血组分,值得进一步研究,其溶血活性的检测为后续研究奠定了基础。

## [参考文献]

- [1] Nagai H, Takuwa K, Nakao M, Sakamoto B, Crow G L, Nakajima T. Isolation and characterization of a novel protein toxin from the Hawaiian box jellyfish (sea wasp) *Carybdea alata* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 275: 589-594.
- [2] Sanchez-Rodriguez J, Torrens E, Segura-Puertas L. Partial purification and characterization of a novel neurotoxin and three cytolytins from box jellyfish (*Carybdea marsupialis*) nematocyst venom[J]. *Arch Toxicol*, 2006, 80: 163-168.
- [3] Ramasamy S, Isbister G K, Seymour J E, Hodgson W C. Pharmacologically distinct cardiovascular effects of box jellyfish (*Chironex fleckeri*) venom and a tentacle-only extract in rats [J]. *Toxicol Lett*, 2005, 155: 219-226.
- [4] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein dye binding[J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254.
- [5] Nagai H, Takuwa K, Nakao M, Ito E, Miyake M, Noda M, et al. Novel proteinaceous toxins from the box jellyfish (sea wasp) *Carybdea rastoni* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 275: 582-588.
- [6] Chung J J, Ratnapala L A, Cooke I M, Yanagihara A A. Partial purification and characterization of a hemolysin (CAH1) from Hawaiian box jellyfish (*Carybdea alata*) venom[J]. *Toxicon*, 2001, 39: 981-990.
- [7] Ishikawa T, Vucenic I, Shamsuddin A, Niculescu F, Burnett J W. Two new actions of sea nettle (*Chrysaora quinquecirrha*) nematocyst venom: studies on the mechanism of actions on complement activation and on the central nervous system[J]. *Toxicon*, 2004, 44: 895-899.
- [8] Edwards L P, Whitter E, Hessinger D A. Apparent membrane pore-formation by Portuguese Man-of-war (*Physalia physalis*) venom in intact cultured cells [J]. *Toxicon*, 2002, 40: 1299-1305.
- [9] Bailey P M, Bakker A J, Seymour J E, Wilce J A. A functional comparison of the venom of three Australian jellyfish—*Chironex fleckeri*, *Chiropsalmus sp.*, and *Carybdea xaymacana*—on cytosolic  $Ca^{2+}$ , haemolysis and *Artemia sp.* lethality [J]. *Toxicon*, 2005, 45: 233-242.
- [10] Li C, Yu H, Liu S, Xing R, Guo Z, Li P. Factors affecting the protease activity of venom from jellyfish *Rhopilema esculentum* Kishinouye [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2005, 15: 5370-5374.
- [11] Yu H, Xing R, Liu S, Li C, Guo Z, Li P. Studies on the hemolytic activity of tentacle extracts of jellyfish *Rhopilema esculentum* Kishinouye: application of orthogonal test [J]. *Int J Biol Macromol*, 2007, 40: 276-280.

[本文编辑] 尹 茶