

小叶三点金醇提物对尖吻蝮蛇毒的抑制作用*

和七一, 余晓东, 李博, 熊艳, 肖静

(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 401331)

摘要: 研究小叶三点金 *Desmodium microphyllum* 醇提物对尖吻蝮蛇 *Deinagkistrodon acutus* 蛇毒的抑制作用。将尖吻蝮蛇毒与不同比例小叶三点金醇提物在 37 °C 下孵育 30 min, 检测对蛇毒中主要酶活力以及体内毒性的抑制作用。小叶三点金醇提物对尖吻蝮蛇毒中蛋白水解酶、磷脂酶 A₂、透明质酸酶以及纤维蛋白原水解酶均具有明显的抑制作用, 对尖吻蝮蛇毒引起的小鼠出血、水肿、组织坏死以及致死毒性具有显著的中和作用, 且呈剂量效应关系。首次证实了小叶三点金具有抑制尖吻蝮蛇毒的功效, 为小叶三点金在蛇伤治疗中的应用提供了理论依据。

关键词: 小叶三点金 *Desmodium microphyllum*; 尖吻蝮蛇 *Deinagkistrodon acutus* 蛇毒; 醇提物; 抑制作用

中图分类号: Q599 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2018) 04-0128-08

Inhibitory effects of ethanol extract of *Desmodium microphyllum* on *Deinagkistrodon acutus* venom

HE Qiyi, YU Xiongdong, LI Bo, XIONG Yan, XIAO Jing

(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)

Abstract: To study the inhibitory effects of ethanol extract of *Desmodium microphyllum* on *Deinagkistrodon acutus* venom. The venom was incubated with the ethanol extract at different ratios at 37 °C for 30 min, the inhibitory effects of the extract on major enzymes activities of *D. acutus* venom were then measured in vitro and the neutralizing capacities to the venom were evaluated in vivo. The activities of proteolytic enzyme, phospholipase A₂, hyaluronidase and fibrinogenolytic enzyme were inhibited significantly, and the activities of hemorrhage, edema and tissue necrosis as well as lethal potency were neutralized obviously, all of which presented inhibitory effects in a dose-dependent manner. The study showed for the first time that the activities of *D. acutus* venom could be inhibited by the extract from *D. microphyllum*, which provided a theoretical basis for the application of *D. microphyllum* in the treatment of snakebite.

Key words: *Desmodium microphyllum*; *Deinagkistrodon acutus* venom; ethanol extract; inhibitory effect

* 收稿日期: 2017-10-17

基金项目: 重庆市社会民生科技创新专项 (cstc2015shmszx120052); 重庆市自然科学基金 (cstc2016jcyjA0224); 重庆师范大学国家基金预研项目 (14XY022)

作者简介: 和七一 (1979 年生), 男; 研究方向: 天然活性物质研究与开发; E-mail: hqy7171@126.com

毒蛇咬伤是一个严重的公众健康问题,尤其在热带和亚热带地区。据不完全统计,全球每年有超过500万蛇伤事件发生,造成约2.5万~12.5万人丧生^[1-2]。为此,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^[3]。在中国,每年有近10万人被毒蛇咬伤,蛇伤致死率高达5%~10%^[4]。尖吻蝮蛇 *Deinagkistrodon acutus* 是中国特有蛇种,蛇毒中富含金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、磷脂酶 A₂ 和去整合素家族,蛇伤后易造成组织水肿、坏死、出血、血液不凝等症状,并引发全身多器官功能衰竭,致死致残率极高^[5]。抗蛇毒血清作为一种有效的蛇伤治疗药物,在实际应用中,也暴露出一些不足,如保存不便、价格昂贵、适用范围狭窄、可能引起过敏反应等等^[6]。近年来,国内外学者发现大量中草药提取物或其组分具有抑制蛇毒的作用^[7-10],为蛇伤药物的研究开发提供了新的思路。小叶三点金 *Desmodium microphyllum* 为豆科三蚂蝗属植物,具有清热解毒、利湿通络、消炎止血、活血化瘀的功效,用于治疗尿路感染、糖尿病、泌尿系结石、慢性胃炎、慢性气管炎等症^[11]。在民间,小叶三点金常被用于治疗毒蛇咬伤,但其对蛇毒的抑制效果及其作用机制国内外尚无研究报道。本研究以尖吻蝮蛇毒为研究对象,重点研究小叶三点金醇提物在体外对蛇毒中蛋白质水解酶、磷脂酶 A₂、透明质酸酶、纤维蛋白水解酶活性的抑制作用;通过体内动物实验,研究小叶三点金醇提物对蛇毒引起的小鼠出血、水肿、组织坏死以及致死作用的中和能力。探究小叶三点金对尖吻蝮蛇毒体外、体内活性的抑制作用,为其治疗蛇伤作用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

小叶三点金采于重庆市北碚区,经鉴定为小叶三点金,阴干后保存备用。成年五步蛇采用咬血法取毒,冷冻干燥后低温保存备用。

1.2 试剂与仪器设备

CK 试剂盒,南京建成生物工程研究所;琼脂糖,酪蛋白,纤维蛋白原, Biosharp 公司;透明质酸钠, XiyaReagent 公司;溴代十六烷基三甲胺, Amresco 公司;丙烯酰胺,甲叉双丙烯酰胺,考马斯亮蓝 R250, 鼎国生物; SDS - PAGE 蛋白上样缓冲液 (5×), 上海碧云天生物技术有限公司。

主要仪器与设备:四川蜀科 TGL - 20 高速冷冻离心机, Christ RVC2 - 18 真空离心浓缩仪,北

京博医康 FD - 1A - 50 冻干机, 东莞大华 DH - HP80A 恒温恒湿培养箱, 北京君意东方 JY - SCZ2 + 电泳仪, 巩义宇翔 RE - 52A 旋转蒸发器。

1.3 实验方法

1.3.1 小叶三点金醇提物制备 称取小叶三点金 500 g, 切碎后浸泡于 1 000 mL $\varphi = 75\%$ 乙醇中, 加热回流萃取 1 h, 过滤得提取液, 重复提取 3 次。将 3 次提取液 10 000 r/min 转速离心 10 min, 得上清液低压旋转浓缩回收乙醇, 剩余浸膏冷冻干燥后, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3.2 对蛋白水解酶活力的抑制作用 蛋白水解酶活力检测参照 Okoroma 等^[12] 的方法进行。称取琼脂糖和酪蛋白各 1 g, 加入 100 mL PBS 缓冲液 (50 mmol/L pH 7.5), 溶解后倒板, 待平板冷却后打孔。取 10 μL 尖吻蝮蛇毒 (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 加入点样孔内, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。平板经考马斯亮蓝 R - 250 染色, 脱色液脱色后测量透明圈直径。抑制作用检测: 不同质量比的蛇毒与小叶三点金醇提物 [m (蛇毒) : m (提取物)]: 1:5、1:25、1:50、1:100] 预先在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 再按照上述方法进行活性检测, 重复 3 次。以单独蛇毒组作为阳性对照, 蛋白水解酶活力定义为 100%。

1.3.3 对磷脂酶 A₂ 活力的抑制作用 磷脂酶 A₂ 活力检测参照 Habermann 和 Hardt^[13] 的方法进行。称取 1 g 琼脂糖, 加入 100 mL 醋酸钠缓冲液 (50 mmol/L pH 6.5), 溶解后冷却至 50 $^{\circ}\text{C}$, 加入 $\varphi = 4\%$ 蛋黄液 (蛋黄与 $w = 0.85\%$ NaCl 溶液按 1:3 的比例混合, 然后于 3 000 r/min 离心 5 min, 取上清) 以及 $c = 2\%$ 10 mmol/L CaCl₂ 溶液, 混合后倒板, 待板凝固后, 打孔。取 10 μL 尖吻蝮蛇毒 (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 加入上样孔内, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 9 h 后测量透明圈直径。抑制作用检测: 不同质量比的蛇毒与小叶三点金醇提物 [m (蛇毒) : m (提取物)]: 1:5、1:10、1:25、1:50] 预先在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 再按照上述方法进行活性检测, 重复 3 次。以蛇毒组作为阳性对照, 磷脂酶 A₂ 活力定义为 100%。

1.3.4 对透明质酸酶活力的抑制作用 透明质酸酶活力参照 Singer 等^[14] 的方法进行。称取 2 g 琼脂糖, 加入 100 mL 醋酸钠缓冲液 (50 mmol/L pH 5.0), 溶解后 50 $^{\circ}\text{C}$ 孵育备用; 称取 0.2 g 透明质酸钠, 加入 100 mL 相同缓冲液溶解, 与琼脂糖溶液混匀后倒板, 待板凝固后, 打孔。取 10 μL 蛇毒 (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 加入孔内, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 h 后, 加入 $w = 0.75\%$ 溴代十六烷基三甲胺溶液, 放置 2 h 后观察透明圈大小。抑制作用检测: 不同质量比的蛇毒

与小叶三点金醇提取物 [m (蛇毒) : m (提取物)]: 1: 5、1: 10、1: 25、1: 50] 预先在 37 °C 孵育 30 min, 再按照上述方法进行活性检测, 重复 3 次。以蛇毒组作为阳性对照, 透明质酸酶活力定义为 100%。

1.3.5 对纤维蛋白原水解酶活力的抑制作用 纤维蛋白原水解酶活力参照 Edgar 和 Prentice^[15] 的方法进行检测。取 20 μL 尖吻蝮蛇毒 (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 与等体积牛纤维蛋白原 (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 37 °C 孵育 1 h, 加入 10 μL 5 \times 蛋白质变性电泳上样缓冲液, 混匀后沸水加热 5 min, 于 $w = 12\%$ SDS - PAGE 凝胶电泳检测。抑制作用检测: 不同质量比的蛇毒与小叶三点金醇提取物 [m (蛇毒) : m (提取物)]: 1: 5、1: 10、1: 25、1: 50、1: 100] 预先在 37 °C 孵育 30 min, 再按照上述方法进行活性检测, 重复 3 次。以纤维蛋白原组和蛇毒组作为对照, 对抑制结果进行判定。

1.3.6 对蛇毒出血活性的中和作用 蛇毒出血活性的测定参考 Roodt 等^[16] 的方法进行。取昆明小鼠 (20 \pm 2) g 30 只, 随机分为 5 组, 蛇毒组每只小鼠皮下注射 100 μL 尖吻蝮蛇毒 (0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); 对照组每只小鼠注射 100 μL 生理盐水, 注射后 3 h, 动物经乙醚深度麻醉致死, 解剖观察皮下出血情况; 抑制作用检测: 不同质量比的蛇毒与小叶三点金醇提取物 [m (蛇毒) : m (提取物)]: 1: 25、1: 50、1: 100] 预先在 37 °C 孵育 30 min, 再按照上述方法进行活性检测。以蛇毒组引起的出血活性定义为 100%。

1.3.7 对蛇毒水肿活性的中和作用 蛇毒水肿活性的测定参考 Maiorano 等^[17] 的方法进行。取昆明小鼠 (20 \pm 2 g) 30 只, 随机分为 5 组, 蛇毒组每只小鼠足趾注射 20 μL 尖吻蝮蛇毒 (0.15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 对照组每只小鼠注射 20 μL 生理盐水, 每隔 1 h 用游标卡尺测量小鼠脚掌厚度。抑制作用检测: 不同质量比的蛇毒与小叶三点金醇提取物 [m (蛇毒) : m (提取物)]: 1: 25、1: 50、1: 100] 预先在 37 °C 孵育 30 min, 再按照上述方法进行活性检测。小鼠脚掌的肿胀率 = (注射后某时刻脚掌厚度 - 注射前脚掌厚度) / 注射前脚掌厚度。

1.3.8 对蛇毒组织坏死活性的中和作用 蛇毒组织坏死活性的测定参考 Mebs 等^[18] 的方法进行。取昆明小鼠 (20 \pm 2) g 30 只, 随机分为 5 组, 蛇毒组每只小鼠肌肉注射 50 μL 尖吻蝮蛇毒 (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); 对照组每只小鼠注射 50 μL 生理盐水, 注射后 3 h, 小鼠眼球取血制备血清, 对肌酸激酶活性

进行检测。抑制作用检测: 不同质量比的蛇毒与小叶三点金醇提取物 [m (蛇毒) : m (提取物)]: 1: 25、1: 50、1: 100] 预先在 37 °C 孵育 30 min, 再按照上述方法进行活性检测。以蛇毒组引起的肌酸激酶活性定义为 100%。

1.3.9 蛇毒致死及中和作用研究 尖吻蝮蛇毒半致死剂量 (The median lethal dose, LD₅₀) 的测定根据 Meier 和 Theakston^[19] 的方法进行。选取 40 只昆明雄性小鼠 (20 \pm 2) g, 随机分为 5 组, 分别于腹腔注射 200 μL 不同质量分数的尖吻蝮蛇毒 (1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mg/kg), 观察 24 h 内小鼠死亡数。结果采用 SPSS 软件 Pbobit 模块进行统计分析。中和蛇毒致死作用的研究, 选取 48 只昆明雄性小鼠 (20 \pm 2) g, 随机分为 6 组。2LD₅₀ 尖吻蝮蛇毒分别与不同质量比的小叶三点金醇提取物 [m (蛇毒) : m (提取物)]: 1: 25、1: 50、1: 100] 在 37 °C 孵育 30 min, 按照上述方法进行注射, 以尖吻蝮蛇毒、生理盐水以及高剂量提取物作为对照, 记录小鼠 24 h 内的生存状况。

1.3.10 数据分析与处理 采用 SPSS 18.0 软件 one - way ANOVA 对数据进行分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 小叶三点金醇提取物对尖吻蝮蛇毒酶活力的抑制作用

2.1.1 对蛋白水解酶活力的抑制 尖吻蝮蛇毒中含有丰富的蛋白水解酶, 如金属蛋白酶, 丝氨酸蛋白酶, 这些酶类能破坏动物组织、导致血液系统紊乱, 引起水肿、出血以及组织坏死等症状^[20]。以酪蛋白为底物检测蛇毒中蛋白水解酶的活力, 结果显示, 小叶三点金醇提取物对尖吻蝮蛇毒中蛋白水解酶具有抑制作用, 且呈显著的剂量效应关系 (图 1)。当蛇毒与提取物质量比为 1: 25 时, 蛇毒蛋白水解酶活力降低 35.22%; 当蛇毒与提取物质量比为 1: 50 时, 蛇毒蛋白水解酶活力降低 55.15%; 蛇毒与提取物质量比为 1: 100 时, 提取物能够完全抑制蛇毒蛋白水解酶活性。

2.1.2 对磷脂酶 A₂ 活性的抑制 磷脂酶 A₂ 是一类广泛存在于蛇毒中的酶类, 表现出多种生理药理功能, 如出血毒性、肌肉毒性、神经毒性, 心脏毒性, 以及溶血活性, 水肿活性和抗血小板聚集等活性^[21]。卵黄琼脂糖平板结果显示 (图 2), 当蛇毒与提取物质量比在 1: 5 时, 可使蛇毒磷脂酶 A₂ 活力减低 21.98%。而当两者比例达到 1: 25 时, 可

以完全抑制磷脂酶 A₂ 活性，提示小叶三点金对蛇毒磷脂酶 A₂ 具有显著的抑制作用。

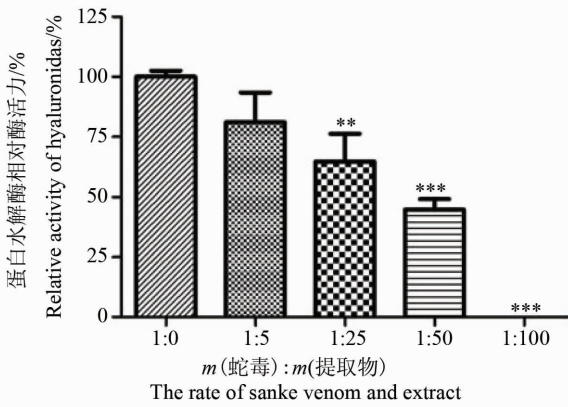


图 1 小叶三点金醇提取物对尖吻蝮蛇毒蛋白水解酶的抑制作用 (与蛇毒处理组比较, **: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$)

Fig. 1 Inhibitory effect of ethanol extract of *D. microphyllum* on proteolytic enzyme activity from *D. acutus* venom

取物质量比为 1:5 时, 可使蛇毒透明质酸酶活力降低 51.83% ; 而当两者比例达到 1:25 时, 可以完全抑制透明质酸酶活性。

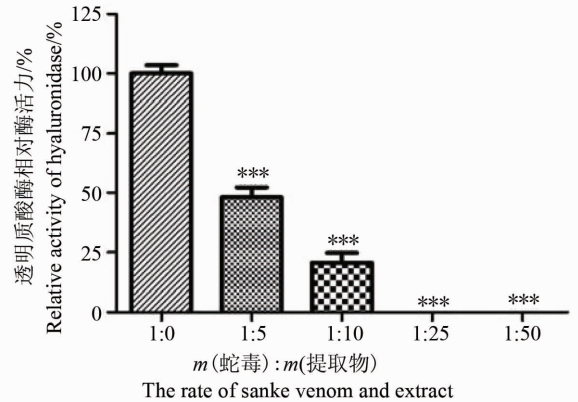


图 3 小叶三点金醇提取物对尖吻蝮蛇毒透明质酸酶的抑制作用 (与蛇毒处理组比较, ***: $P < 0.001$)

Fig. 3 Inhibitory effect of ethanol extract of *D. microphyllum* on hyaluronidase activity from *D. acutus* venom

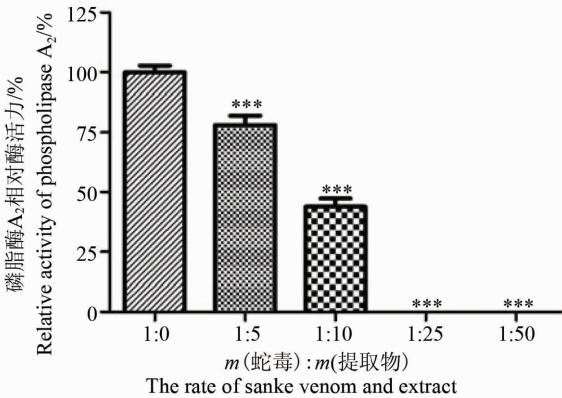


图 2 小叶三点金醇提取物对尖吻蝮蛇毒磷脂酶 A₂ 的抑制作用 (与蛇毒处理组比较, ***: $P < 0.001$)

Fig. 2 Inhibitory effect of ethanol extract of *D. microphyllum* on phospholipase A₂ activity from *D. acutus* venom

2.1.4 小叶三点金提取物抑制蛇毒水解纤维蛋白原活性 SDS - PAGE 结果显示 (图 4), 牛纤维蛋白原呈现 3 条蛋白质条带, 分别为 A α 、B β 、 γ 。在尖吻蝮蛇毒的作用下, 纤维蛋白原 A α 、B β 链被降解, 产生多条水解片段。当小叶三点金醇提取物与蛇毒孵育后, 可以有效抑制蛇毒对纤维蛋白原的降解, 随着提取物浓度的增加, 纤维蛋白原依次恢复正常的 3 条蛋白质条带, 且水解片段逐渐消失。当蛇毒与小叶三点金提取物质量比为 1:5 时, 可以保护部分 B β 链被降解; 当两者比例达到 1:10 时, 可以

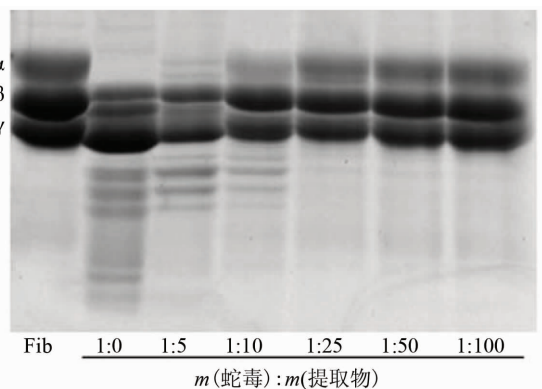


图 4 小叶三点金醇提取物对尖吻蝮蛇毒纤维蛋白原水解酶的抑制作用

Fig. 4 Inhibitory effect of ethanol extract of *D. microphyllum* on fibrinogenolytic activity from *D. acutus* venom

2.1.3 对透明质酸酶活力的抑制 透明质酸酶存在于多种蛇毒中, 尤其在蝰科蛇毒中含量较高。该酶能溶解细胞与纤维间质间的透明质酸, 破坏结缔组织的完整性, 促使蛇毒从局部向周围组织扩散, 扩大局部毒性; 同时, 该酶能促使蛇毒经淋巴管和毛细血管吸收进入血液循环, 加速蛇毒引发的系统性毒性, 因而也被称为“扩散因子”^[22]。透明质酸平板检测显示 (图 3), 小叶三点金提取物具有显著的抑制透明质酸酶活性。当蛇毒与小叶三点金提

完全抑制尖吻蝮蛇毒对纤维蛋白原 B β 链的降解, 保护部分 A α 被降解。

2.2 小叶三点金醇提物对尖吻蝮蛇毒体内毒性的中和作用

2.2.1 对出血活性的中和作用

金属蛋白酶是尖吻蝮蛇毒中含量最高的一类蛋白水解酶, 能够降解微血管基底膜, 引发微血管壁损伤造成局部出血症状^[20]。小鼠皮下出血结果显示 (图 5), 当蛇毒与小叶三点金提取物质量比为 1:25 时, 可以抑制尖吻蝮蛇毒 64.53% 的出血活性; 当两者质量比为 1:100 时, 可以抑制尖吻蝮蛇毒 91.73% 的出血活性。结合蛋白水解酶抑制实验结果, 我们推测小叶三点金中存在能够与蛇毒金属蛋白酶相互作用的功效组分。

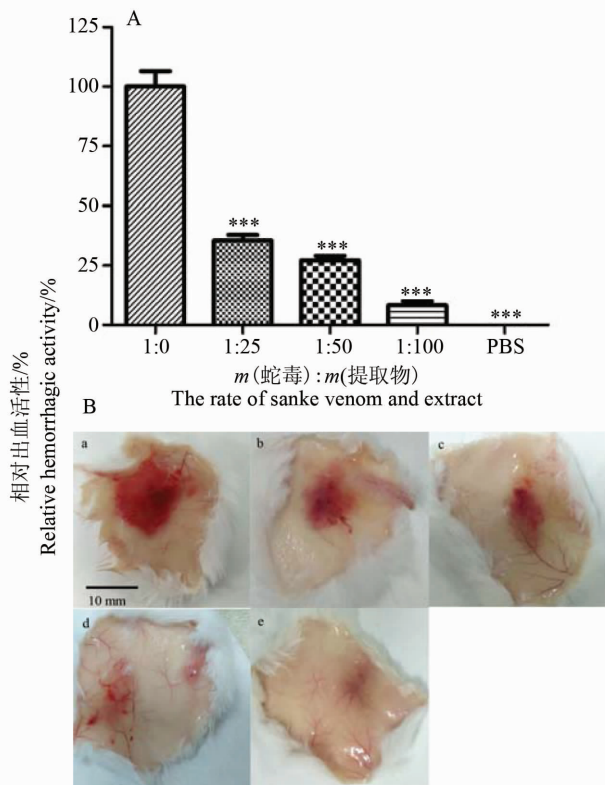


图 5 小叶三点金醇提物对尖吻蝮蛇毒出血活性的中和作用

Fig. 5 Neutralization of ethanol extract of *D. microphyllum* on hemorrhagic activity from *D. acutus* venom

A: 各处理组引起小鼠皮下相对出血活性. ***: 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: 蛇毒组; b-d: 分别为不同 $m(\text{蛇毒}):m(\text{提取物})$ (1:25, 1:50, 1:100) 孵育 30 min 后处理组; e: PBS 处理组

2.2.2 对水肿活性的中和作用

水肿是尖吻蝮蛇伤诱发的另一显著症状, 主要涉及金属蛋白酶和磷脂酶 A₂ 的参与, 引起内源性炎症因子释放从而导致水肿发生^[23-24]。小鼠脚趾水肿实验结果显示 (图 6), 小叶三点金提取物可以有效抑制尖吻蝮蛇毒引起的水肿症状, 且呈剂量效应关系。在单独注射蛇毒后 3 h, 小鼠脚掌肿胀度达到 75.17%; 当蛇毒与小叶三点金提取物质量比为 1:25 时, 可以使肿胀度降低 14.02%; 当蛇毒与提取物质量比为 1:50 时, 可以使肿胀度降低 22.30%; 当两者质量比为 1:100 时, 可以使肿胀度降低 28.82%。基于蛋白水解酶抑制实验和磷脂酶 A₂ 抑制实验, 我们推测小叶三点金可能通过作用于蛇毒中这两类酶起到抑制水肿作用。

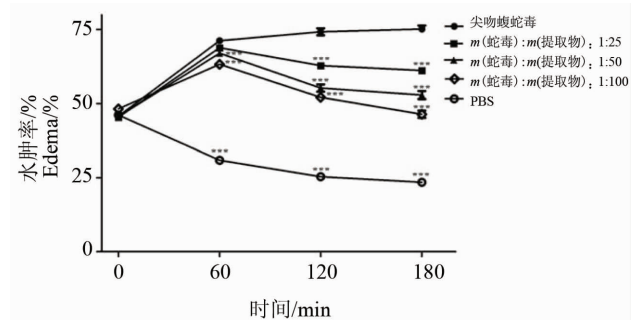


图 6 小叶三点金醇提物对尖吻蝮蛇毒水肿活性的中和作用 (与蛇毒处理组比较, ***: $P < 0.001$)

Fig. 6 Neutralization of ethanol extract of *D. microphyllum* on edema activity from *D. acutus* venom

2.2.3 对组织坏死活性的中和作用

肌酸激酶主要存在于细胞质和线粒体中, 在组织细胞内能量代谢与转运、肌肉收缩、ATP 再生等方面起着重要作用。蛇伤后引起动物肌肉组织损伤, 引起细胞膜破裂, 肌酸激酶释放到胞外, 通过检测血清中肌酸激酶含量可用来评价蛇毒导致组织损伤情况^[25]。结果显示 (图 7), 小叶三点金提取物各浓度组均能够显著的抑制尖吻蝮蛇毒诱导的肌肉毒性, 且呈剂量效应关系。当蛇毒与提取物质量比为 1:100 时, 其肌肉毒性可以完全被抑制。

2.2.4 致死保护性实验

经小鼠腹腔注射测得, 尖吻蝮蛇毒 LD₅₀ 为 2.88 mg/kg。以 2LD₅₀ 尖吻蝮蛇毒作为致死剂量, 分别与不同质量比的提取物孵育后注射动物, 结果显示 (图 8), 小叶三点金提取物能够显著增加小鼠存活时间, 且呈量效关系。单独注射蛇毒对照组, 小鼠在 5 h 内全部死亡; 当蛇

毒与提取物质量比为 1:25 时, 24 h 内小鼠存活率达到 57.14%; 当蛇毒与提取物质量比为 1:50 时, 24 h 内小鼠存活率达到 85.71%; 当蛇毒与提取物质量比为 1:100 时, 小鼠在 24 h 内全部存活。在生理盐水或高剂量提取物对照组中, 小鼠均未表现出中毒或者致死情况 (结果未显示), 提示小叶三点金可以作为一种安全的蛇伤治疗制剂。

3 讨论

在中国, 蛇伤是一种危害较严重的疾病, 频发于农村和偏远山区, 而这些地区抗蛇毒血清供应往往较为匮乏。因此, 中草药常被作为蛇伤救治的首选药物。在民间, 虽然大量的中草药被用于蛇伤治疗^[27], 然而其治疗效果缺乏科学的实验证据, 治疗机制尚不清楚, 难以得到大范围的推广应用。

本研究中, 我们选取常用于蛇伤治疗的中草药小叶三点金为研究对象, 体外酶活结果显示, 小叶三点金醇提取物能够有效抑制尖吻蝮蛇毒中蛋白水解酶、磷脂酶 A₂、透明质酸酶以及纤维蛋白原水解酶活性。体内动物实验中, 尖吻蝮蛇毒引起的小鼠皮下出血、水肿、组织坏死症状可以被小叶三点金醇提取物显著抑制。大量研究发现, 小叶三点金中除含有蛋白质、糖类外, 还含有黄酮类、酚类、生物碱类、苯丙素类以及苷类物质^[27-28]。目前, 研究人员已从小叶三点金中分离鉴定出 9 个黄酮类化合物^[27]。研究证实, 来源于不同植物中的黄酮类化合物能够抑制蛇伤引起的炎症和出血症状; 同时, 类黄酮物质, 如 Quercetin、kaempferol、luteolin 等, 还具有显著的抑制透明质酸酶活性^[29]。酚类化合物是植物中一类重要的代谢产物, 已经被发现具有抑制蛇毒中乙酰胆碱酯酶、蛋白水解酶、磷脂酶 A₂、透明质酸酶、L-氨基酸氧化酶的活性, 能够抑制蛇毒引起的出血、皮肤坏死症状^[7, 8, 10, 30]。生物碱是小叶三点金中含量较高的一种组分^[11], 该类物质也被证实具有抑制蛇毒磷脂酶 A₂ 的活性。部分植物来源的苯丙素类、苷类以及蛋白质也被发现能够通过与蛇毒中酶类或毒素相互作用发挥抗蛇毒功效^[7, 8, 31]。蛇伤后引起的动物致死是由蛇毒中多种组分 (蛋白酶类和毒素) 共同作用的结果, 保护性实验显示, 小叶三点金能够显著延长实验小鼠存活时间, 提示其可能通过多组分多途径发挥协同效应, 从而达到抑制蛇毒活性的作用。

本研究首次证实了小叶三点金具有抑制尖吻蝮蛇毒的功效, 为该中草药在蛇伤救治中的应用提供了科学依据。然而, 小叶三点金中抗蛇毒功效组分的筛选、鉴定及其作用机制尚需进一步研究。

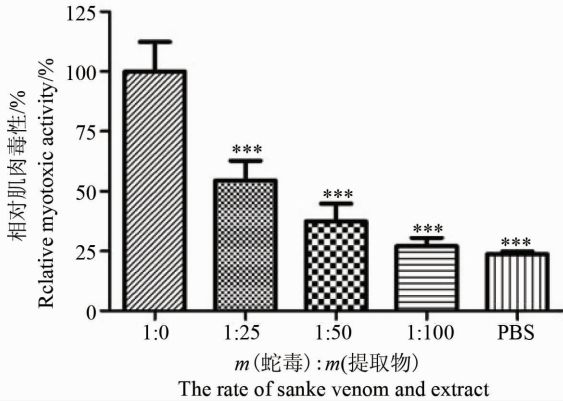


图 7 小叶三点金醇提取物对尖吻蝮蛇毒肌肉毒性的中和作用 (与蛇毒处理组比较, ***: $P < 0.001$)

Fig. 7 Neutralization of ethanol extract of *D. microphyllum* on myotoxic activity from *D. acutus* venom

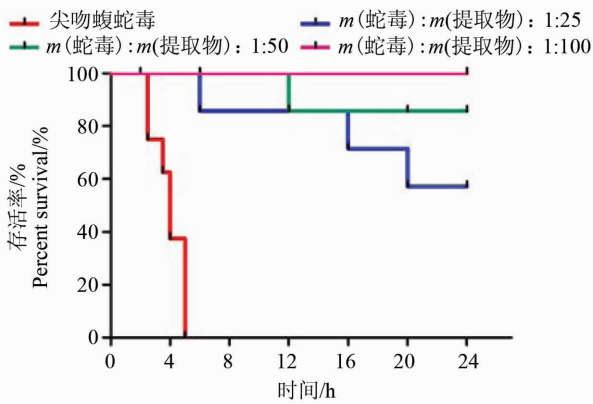


图 8 小叶三点金醇提取物对尖吻蝮蛇毒致死活性的中和作用

Fig. 8 Neutralization of ethanol extract of *D. microphyllum* on lethal potency from *D. acutus* venom

参考文献:

[1] KASTURIRATNE A, WICKREMASINGHE A R, DE S N, et al. The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths [J]. *PLoS Medicine*, 2008, 5 (11): 1591-1604.

[2] GUTIÉRREZ J M, THEAKSTON R D, WARRELL D A.

- Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership [J]. *PLoS Medicine*, 2006, 3(6): 727–731.
- [3] 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 [J]. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2013, 7(6): 2162–2165.
- [4] 覃公平. 中国蛇毒学 [M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 1998: 7–9.
QIN Gongping. China poisonous snake research [M]. Nanning: Guangxi Science and Technology Publishing House, 1998: 7–9.
- [5] WHITE J. Snake venoms and coagulopathy [J]. *Toxicon*, 2005, 45(8): 951–967.
- [6] GUTIÉRREZ J M, LEÓN G, BURNOUF T. Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings: the road ahead [J]. *Biologicals*, 2011, 39(3): 129–142.
- [7] GOMES A, DAS R, SARKHEL S, et al. Herbs and herbal constituents active against snake bite [J]. *Indian Journal of Experimental Biology*, 2010, 48(9): 865–878.
- [8] SOARES A M, TICLI F K, MARCUSSI S, et al. Medicinal plants with inhibitory properties against snake venoms [J]. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2005, 12(22): 2625–2641.
- [9] ASSAFIM M, DE E C, BENEDITO S E, et al. Hypericum brasiliense plant extract neutralizes some biological effects of *Bothrops jararaca* snake venom [J]. *Journal of Venom Research*, 2011, 2(2): 11–16.
- [10] 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 Haifeng, LIANG Jine, LI Chunmei, 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.
- [11] 邱泉. 小叶三点金的化学成分研究及其在蛇伤救治中的应用进展 [J]. *蛇志*, 2013, 25(2): 213–214.
QIU Quan. Study on chemical components of *Desmodium microphyllum* and its application progress on snakebites therapy [J]. *Journal of Snake*, 2013, 25(2): 213–214.
- [12] OKOROMA E A, GARELICK H, ABIOLA O O, et al. Identification and characterisation of a *Bacillus licheniformis* strain with profound keratinase activity for degradation of melanised feather [J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2012, 74(10): 54–60.
- [13] HABERMANN E, HARDT K L. A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipases [J]. *Analytical Biochemistry*, 1972, 50(1): 163–173.
- [14] SINGER R, SAGIV M, ALLALOUF D, et al. Estimation of hyaluronidase activity of human semen and its relationship with sperm density by means of a simplified method [J]. *International Journal of Fertility*, 1982, 27(3): 176–180.
- [15] RODRIGUES V M, SOARES A M, GUERRA – SÁ R, et al. Structural and functional characterization of neuwiedase, a nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* snake venom [J]. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 2000, 381(2): 213–224.
- [16] ROODT A R D, DOLAB J A, DOKMETJIAN J C, et al. A comparison of different methods to assess the hemorrhagic activity of *Bothrops* venoms [J]. *Toxicon*, 2000, 38(6): 865–873.
- [17] MAIORANO V A, MARCUSSI S, DAHER M A F, et al. Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata* [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005, 102(3): 364–370.
- [18] MEBS D, EHRENFELD M, SAMEJIMA Y. Local necrotizing effect of snake venoms on skin and muscle: Relationship to *Serum creatine kinase* [J]. *Toxicon Official Journal of the International Society on Toxinology*, 1983, 21(3): 393–404.
- [19] MEIER J, THEAKSTON R D. Approximate LD₅₀ determinations of snake venoms using eight to ten experimental animals [J]. *Toxicon*, 1986, 24(4): 395–401.
- [20] 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 [J]. *Bmc Genomics*, 2006, 7(1): 152–163.
- [21] ARNI R K, WARD R J. Phospholipase A₂—a structural review [J]. *Toxicon Official Journal of the International Society on Toxinology*, 1996, 34(8): 827–841.
- [22] GIRISH K S, JAGADEESHA D K, RAJEEV K B, et al. Snake venom hyaluronidase: An evidence for isoforms and extracellular matrix degradation [J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2002, 240(1): 105–110.
- [23] GUTIÉRREZ J M, RUCAVADO A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage [J]. *Biochimie*, 2000, 82(9/10): 841–850.
- [24] TEIXEIRA C F, LANDUCCI E C, ANTUNES E, et al.

- Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A₂ [J]. *Toxicon Official Journal of the International Society on Toxinology*, 2003, 42(8): 947 - 962.
- [25] LOMONTE B, GUTIÉRREZ J M. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms: A review [J]. *Memórias Do Instituto Butantan*, 1989, 51(4): 211 - 212.
- [26] 邱泉, 中草药在蛇伤防治中的应用进展 [J]. *蛇志*, 2012, 24(1): 52 - 55.
QIU Quan. Application progress of chinese medicinal herbs on snakebites therapy [J]. *Journal of Snake*, 2012, 24(1): 52 - 55.
- [27] 刘小辉, 王长虹, 俞桂新, 等. 小叶三点金的黄酮类成分研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 2010, 22(6): 976 - 978.
LIU Xiaohui, WANG Changhong, CHOU Guixin, et al. Flavonoids of *Desmodium microphyllum* [J]. *Natural Product Research and Development*, 2010, 22(6): 976 - 978.
- [28] 刘小辉, 华燕. 小叶三点金的苯丙素类成分分析 [J]. *西南林学院学报*, 2009, 29(2): 92 - 94.
LIU Xiaohui, HUA Yan. Study on the Phenylpropanoids Composition from *Desmodium microphyllum* [J]. *Journal of Southwest Forestry University*, 2009, 29(2): 92 - 94.
- [29] SANTHOSH M S, HEMSHEKHAR M, SUNITHA K, et al. Snake venom induced local toxicities: plant secondary metabolites as an auxiliary therapy [J]. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 2013, 13(1): 106 - 123.
- [30] PITHAYANUKUL P, RUENRAROENSAK P, BAVOVADA R, et al. Inhibition of *Naja kaouthia* venom activities by plant polyphenols [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005, 97(3): 527 - 533.
- [31] LANS C, HARPER T, GEORGES K, et al. Medicinal and ethnoveterinary remedies of hunters in Trinidad [J]. *Bmc Complementary & Alternative Medicine*, 2001, 1(1): 1 - 17.