

· 综述 ·

## 广西虎纹捕鸟蛛毒的研究概况

刘圆圆<sup>1</sup>, 黄新<sup>2\*</sup>, 甄汉深<sup>1</sup>, 黄小秋<sup>1</sup>, 李数霞<sup>1</sup>

(1. 广西中医学院药学院, 南宁 530001; 2. 广西中医学院附属瑞康医院, 南宁 530001)

**[摘要]** 在各种蜘蛛毒素中发现有多种酶类以及对哺乳动物, 昆虫神经系统有选择性作用的一些神经毒素。虎纹捕鸟蛛是在云南、广西一带发现的一个捕鸟蛛科新种, 其粗毒中主要含有 HWTX-I, HWTX-II, HWTX-V, HWTX-XI 等几种神经毒素, 还有一些多肽类(毒液的主要成分都为相对分子质量  $2 \times 10^3 \sim 9 \times 10^3$  的多肽)、蛋白质和低相对分子质量物质所构成的复杂混合物, 具有多种活性及生理作用, 在治疗癫痫病、癌症、脑溢血、神经肌肉疼痛等方面有着广泛应用前景, 作者对虎纹捕鸟蛛的来源、毒性成分及其应用、毒性成分的药理及研究展望进行了文献整理。

**[关键词]** 虎纹捕鸟蛛; 毒素; 成分; 应用研究

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)08-0280-04

## Research on Toxin of *Selenocosmia huwena* in Guangxi

LIU Yuan-yuan<sup>1</sup>, HUANG Xin<sup>2\*</sup>, ZHEN Han-shen<sup>1</sup>, HUANG Xiao-qiu<sup>1</sup>, LI Shu-xia<sup>1</sup>

(1. College of Pharmacy, Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530001, China;

2. Ruikang Hospital, Affiliated Hospital of Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530001, China)

**[Abstract]** Through experiments, we find, in all kinds of toxins of spiders, many enzymes and some neurotoxins that have selective effect on the nervous system of mammals and insects. *Selenocosmia huwena* is a new spider of Theraphosidae found in Yunan and Guangxi, whose toxin contains SLH-1, four neurotoxins (namely HWTX-I, HWTX-II, HWTX-V and HWTX-XI) and some complicated mixtures consisted of polypeptides (mainly those of molecular  $2 \times 10^3 \sim 9 \times 10^3$ ), proteins and low-molecular-weight substances. With many activated and physiological effects, the toxin of *selenocosmia huwena* will be used intensively in curing epilepsy, cancers, cerebral hemorrhage, diabetes and hepatitis.

**[Key words]** *selenocosmia huwena*; toxin; ingredient; application research

蜘蛛是世界上进化最为成功的物种之一, 至今已经鉴定的蜘蛛物种约为4万种。几乎所有的蜘蛛都分泌毒液, 其成分复杂。对蜘蛛毒的研究, 由于采毒较困难, 因而不如蛇毒和蝎毒的研究那样广泛深入。国外蛛毒研究较为深入的有

漏斗蛛 *Atrax robustus* 和 *Agelenopsis aperta*、平甲蛛 *Loxosceles reclusa* 和黑寡妇蛛 *Latrodectus mactans tredecimguttatus*。本文将阐述对广西虎纹捕鸟蛛科 *Selenocosmia* 属的蜘蛛毒的成分及药用价值。

### 1 来源和体形

在广西宁明县的丘陵地带所发现的虎纹捕鸟蛛 *S. huwena*, 最近被鉴定为蜘蛛新种, 属于捕鸟蛛科 Theraphosidae<sup>[1]</sup>, 该蛛穴居地下, 是世界上个体最大的蜘蛛之一, 毒性强。雌性体长6~9 cm, 步足长6~10 cm。步足间距27 cm, 螯肢长约1 cm, 坚硬锋利, 螯肢末端有一对毒腺, 当蜘蛛捕食时, 通过螯爪把毒液注入猎物的体内<sup>[2]</sup>。虎纹捕鸟蛛体重约20~30 g, 身体多毛, 头胸部背面有辐射状斑纹, 腹部

**[收稿日期]** 20100927(009)

**[基金项目]** 广西自然科学基金项目(桂科自0728189)

**[第一作者]** 刘圆圆, 在读硕士, 专业方向: 药物分析, Tel: 13481063938, E-mail: 275189113@qq.com

**[通讯作者]** \*黄新, 本科, 教授, 研究方向: 神经外科学, Tel: 13597003003, E-mail: nnhuangxin@163.com

背面有虎皮状花纹,有强烈的攻击性,常捕食各种小型动物:如昆虫、老鼠、小鸟、青蛙及小蛇等<sup>[3]</sup>。甚则大型动物如牛的口鼻被咬伤后也会导致死亡。

## 2 毒素的成分及应用

蜘蛛毒素成分复杂,多呈酸性,主要含有蛋白质、酶<sup>[7]</sup>、多胺、氨基酸、和核苷酸。根据其化学结构上的特点可分为两大类,一类是相对分子质量较大的蛋白质与富含二硫键多肽类神经毒素<sup>[8]</sup>,另一类是相对分子质量较小的非肽类神经毒素。其中以蛋白质及多肽类神经毒素研究的较多,目前已探明一级结构的蛋白质、多肽类神经毒素中,除黑寡妇蜘蛛毒素( $\alpha$ -latrotoxin)是一个相对分子质量很大的蛋白,其余皆为相对分子质量1万以下的多肽,按氨基酸残基的数目又可分为含33~40个氨基酸残基的短链神经毒素及含62~77个氨基酸残基的长链神经毒素<sup>[9]</sup>。

虎纹捕鸟蛛粗毒含有多种酶类以及能使小鼠呼吸迅速麻痹而致死的神经活性成分<sup>[6]</sup>。应用反相色谱和离子交换高效液相色谱分离纯化,从该粗毒中分离了2种神经毒素:HWTX-I和HWTX-II<sup>[10]</sup>。其中1种为huwentoxin-I(HWTX-I),是粗毒中含量最大的成分,与目前已知的多肽类神经毒素基本上无同源性,仅其N末端部分与 $\mu$ -agatoxin有一定的同源性,但性质上与 $\mu$ -agatoxin差别很大,完成了氨基酸排列顺序测定并确定了其3对二硫键的位置。这是目前含3对二硫键的蜘蛛毒素中第1个完成了二硫键定位的毒素。HWTX-I含有33个氨基酸残基,6个半胱氨酸,相对分子质量为3750,含有较多的赖氨酸,等电点8.95<sup>[11-12]</sup>。HWTX-I能有效地阻断小鼠膈神经膈肌神经肌接头传递,进一步的药理学实验证明HWTX-I作用于突触前膜是一种有效的N型钙离子通道阻断剂<sup>[13]</sup>。此种粗毒对昆虫毒性小,对哺乳动物毒性较大,对小鼠经腹腔和脑内注射的半致死量分别为0.70 mg·kg<sup>-1</sup>和9.4  $\mu$ g·kg<sup>-1</sup>。该毒素在1×10<sup>6</sup> g·mL<sup>-1</sup>质量浓度下能阻断小鼠膈神经膈肌传递,阻断时间平均为13.4 min。为了进一步探明其结构与功能的关系,王贤纯、梁宋平<sup>[14]</sup>采用以固相多肽合成为核心技术的蛋白质工程方法直接构建了Ala取代Lys13的单残基突变体13A-HWTX-I,并同时合成了HWTX-I的全序列sHWTX-I作实验对照。活性测定结果表明,氧化复性后,sHWTX-I与天然HWTX-I的生物学活性完全相同,而K13A-HWTX-I的生物学活性下降了87%,提示Lys13是与HWTX-I的生物学活性密切相关的重要残基。王贤纯等<sup>[15]</sup>用苄甲氧羰基(Fmoc)固相多肽合成的方法在自制自动蛋白质化学工作站上合成了用酪氨酸(Y)替代虎纹捕鸟蛛毒素-I(HWTX-I)第1位丙氨酸(A1)的突变体A1Y-HWTX-I。合成的突变体用Edman降解和电喷雾质谱法进行鉴定,A1Y-HWTX-I在含有谷胱甘肽的缓冲体系中氧化折叠后显示出与天然HWTX-I完全相同的生物学活性,提示Y替代HWTX-I的A1后并不明显影响HWTX-I的活性部位和空间构象;A1与HWTX-I生物学活性无关。从结构和性质来看,HWTX-I是一种新型神经毒素,对

其深入的生理机制研究正在进行中。

Huwentoxin-II(HWTX-II)是从该毒液中纯化的另一种毒素,由37个氨基酸残基组成,含6个cys形成3对硫键。其生物学活性研究表明HWTX-II能使昆虫产生可逆的麻痹作用,对小鼠膈神经膈肌接头传递有弱的阻断作用,与HWTX-I有协同作用,能加强HWTX-I对突触传递的阻断<sup>[16]</sup>。此外,从该蛛毒中还发现1种凝集活性肽SHL-I<sup>[11]</sup>,这是迄今发现的相对分子质量最小的凝集素分子。由32个氨基酸残基组成,含有6个cys,形成了对二硫键。SHL-I能使小鼠和人血红细胞产生明显的凝集反应<sup>[13]</sup>,最低质量浓度分别为125,31 mg·L<sup>-1</sup>,与甘露糖胺专一性结合。

Huwentoxin-XI(HWTX-XI)是从虎纹捕鸟蛛粗毒中纯化得到的一种双功能多肽毒素,兼有丝氨酸蛋白酶抑制活性和钾离子通道阻断活性。MALDI-TOF质谱鉴定和Edman降解测序结果表明:HWTX-XI由55个氨基酸残基组成,相对分子质量为6166.2<sup>[17]</sup>。HWTX-XI对DRG细胞上的钙通道和钠通道没有作用,但能够抑制DRG上的外向延迟整流钾电流<sup>[18]</sup>。HWTX-XI属于BPTI/Kunitz型丝氨酸蛋白酶抑制剂家族,它的抑制活性比BPTI强。邓星灿<sup>[19]</sup>利用RACE的方法获得的HWTX-XI的cDNA序列,使用载体pVT102U实现了在酿酒酵母中的表达。HWTX-XI在酵母中的表达产率为12.5 mg·L<sup>-1</sup>。我们建立了一种腹腔分次大剂量注射L-Arg诱导的小鼠急性胰腺炎模型,通过研究不同的剂量、不同的治疗时间对治疗效果的影响以及同抑肽酶治疗作用的比较得出,HWTX-XI是一种有效的治疗急性胰腺炎的药物。

Huwentoxin-V(Huwentoxin-V,HWTX-V)是从虎纹捕鸟蛛粗毒中分离得到的1种多肽神经毒素,它含有35个氨基酸,其中6个半胱氨酸形成了3对二硫键(分别以1-4,2-5,3-6的方式连接,可能属于抑制剂胱氨酸结模体(ICK))。HWTX-V的相对分子质量(M)是4111.5,其氨基酸序列为NH<sub>2</sub>-ECRWYLGGSQDGDCKHLQCHSNYEWCVWDGT-FS-COOH。HWTX-V能可逆地麻痹蝗虫和蜚蠊数小时,对蝗虫的半有效剂量是(16±5)  $\mu$ g,大剂量的虎纹毒素-V可使昆虫致死<sup>[20]</sup>。

结合离子交换和反相高效液相色谱从虎纹捕鸟蛛粗毒分离纯化到2种虎纹捕鸟蛛毒素,命名为虎纹捕鸟蛛毒素-VII(HWTX-VII)和虎纹捕鸟蛛毒素-VIII(HWTX-VIII)<sup>[21]</sup>。经质谱测定这2种毒素的相对分子质量分别为3981.02和4171.12。氨基酸序列分析发现,这2种虎纹捕鸟蛛毒素同源性非常高,只有6个残基位点的不同。HWTX-VII经Edman降解序列测定共有35个氨基酸残基,含6个半胱氨酸,其理论相对分子质量为3986.83,比质谱测得的相对分子质量多了6个质子,证明6个半胱氨酸形成3对二硫键。HWTX-VIII经Edman降解序列测定共有36个氨基酸残基,含6个半胱氨酸,其理论相对分子质量为4177.03,也说明6个半胱氨酸形成3对二硫键。

从虎纹捕鸟蛛粗毒中经高效液相色谱分离纯化出1种

组分,<sup>[22]</sup>通过场解吸质谱(FDMS)和电子电离质谱(EIMS)鉴定为次黄嘌呤核苷,其相对分子质量为 268,含量为 3.9%。同时,进一步用标准样品进行紫外、液相色谱对照验证,毒液中的次黄嘌呤核苷有相近的保留时间。

### 3 虎纹捕鸟蛛毒素的药理作用

HWIX-I 对全脑缺血再灌注等引起的大鼠大脑神经细胞损伤有明显的保护作用,毛海峰等<sup>[23]</sup>观察虎纹捕鸟蛛毒素(HWIX-I)对全脑缺血再灌注大鼠海马 CA1 区锥体细胞 Nissl 染色形态学变化、脑组织超氧化物歧化酶(SOD),过氧化氢酶(CAT)活力、丙二醛(MDA)浓度变化的影响,HWIX-I 能明显减轻全脑缺血大鼠海马锥体细胞的损伤;能使全脑缺血再灌注大鼠脑组织 SOD, CAT 活力明显升高,MDA 浓度明显降低。

HWIX-VII 和 HWIX-VIII 的生物学功能相似,都能对蝗虫起到麻痹作用;对小鼠的中枢神经作用高剂量能使小鼠产生致死,但低剂量 HWIX-VIII 能使小鼠产生惊厥反应,而低剂量 HWIX-VII 不能使小鼠产生惊厥反应;这 2 种毒素都能阻断小鼠离体膈神经膈肌的神经肌肉传递,且与 HWIX-I 混合后都具协同作用<sup>[21]</sup>。

虎纹捕鸟蛛毒素还具有抗菌和抗癌作用,从蜘蛛毒素中提取出的抗菌活性肽,对草芽孢杆菌 *Subtilis bacillus*、短小芽孢杆菌 *Pumilus bacillus* 及大肠埃希菌 *E. coli* 有明显的抑菌作用。而从蜘蛛毒素中提取的抑抗性多肽,也已证明其对肺癌和鼻咽癌传代细胞的生长抑制作用。有文献报道,脑恶性胶质瘤向周围脑组织的浸润性与细胞膜的  $K^+$ ,  $Cl^-$ ,  $Ca^{2+}$  离子流有关,通过离子流影响肿瘤细胞的形态改变,并在狭小的脑组织间隙生长<sup>[24-25]</sup>。当肿瘤侵入组织时,周围的正常细胞变形,并释放能促进或加速肿瘤生长的生长因子,其中 Ca 通道可能是正常细胞释放生长因子的信号,因此阻断该通道可有助于肿瘤的治疗。靳神等<sup>[26]</sup>采用四甲基偶氮唑盐比色法(MTT 法)测定虎纹蛛毒能够诱导人胃腺癌细胞 BGC-823 凋亡。黄新等<sup>[27]</sup>通过体外抑制试验的方法,证明虎纹捕鸟蛛毒素能抑制脑胶质瘤 U251 细胞的增殖。高莉等<sup>[28]</sup>采用细胞克隆形成试验,测定海南捕鸟蛛及虎纹捕鸟蛛等毒素对人肝癌 BEL-7402 细胞增殖有抑制作用,并呈良好的量效和时效关系,即随着药物浓度的降低,抑制率降低;在同为  $40 g \cdot L^{-1}$  的 4 种蛛毒 24, 48, 72 h 后,随着时间的延长,抑制率增加。

医学家已从虎纹捕鸟蛛毒中分解一种多肽神经毒素,发现其有很强的镇痛作用,命名为虎纹镇痛肽,其作用机制是通过钙离子通道与抑制阻断痛觉传递,由于其作用机制不同于吗啡,因而没有吗啡类镇痛药的成瘾性等副作用<sup>[29]</sup>。虎纹镇痛肽对于癌症和手术后疼痛病人将是一种很有前景的多效低毒镇痛药。

蛛毒中含有杀虫肽,因而具有较强的杀虫作用,可迅速杀死农林害虫<sup>[30]</sup>。另外,蛛毒也具有抗原性,可根据其抗原作用生产出抗毒血清。据调查,美国科学家已经从蛛毒中提取出抗心律失常药物。

虎纹蛛毒中次黄嘌呤核苷的作用 次黄嘌呤核苷作为毒液中的一种成分,它与许多生命现象有关,有些病人的相关组织中的次黄嘌呤的含量与正常人明显不同,这可能与能量代谢有关;它与心脏的功能也有一定的关系。现在,次黄嘌呤核苷已应用于临床,它可以促使白细胞增生,具有赋活细胞刺激代谢作用,用于防治各种急慢性肝脏疾病、白细胞或血小板减少症以及中心性视网膜炎等多种疾病<sup>[22]</sup>。

### 4 研究展望

虎纹捕鸟蛛的毒量大,毒性强。广西作为其主产区,应利用地理及资源优势,加强虎纹捕鸟蛛的研究开发工作。其毒液成分丰富,要全面理解蜘蛛毒素的结构与功能,仍然有很多工作要做:在神经生物学基础理论研究中,由于某些是与  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$  通道或 Ach 受体特异性结合的配体,它们将成为探讨这些受体蛋白成分及其调控神经细胞活动机制的新的强有力工具。另外,在阐明蜘蛛毒素与受体结合机制的基础上,运用基因工程方法,对其分子结构进行定向改造。也可设计生产出不同于天然毒素的新型药物,有望在某些疑难神经系统疾病治疗中得到更广泛的应用。

### [参考文献]

- [1] 王家福,彭贤锦,谢莉萍.我国南方捕鸟蛛一新种[J].湖南师范大学:自然科学学报,1993,16(1):72.
- [2] 潘红平,蒙健宗,蕴丽.虎纹捕鸟蛛毒素的提取及毒力的测定[J].广西农业生物科学,1999,12(4):274.
- [3] 钱锐.有毒动物及其毒素——中毒的防治和毒素的应用[M].昆明:云南科技出版社,1996:66.
- [4] 唐显.毒蜘蛛活体诱导取毒[J].技术与市场,2002,8:29.
- [5] 皮建辉,曾雄智,全妙华,等.不同采毒方法所获蜘蛛粗毒组分的比较分析[J].怀化学院学报,2008,27(2):40.
- [6] 梁宋平,覃于宾,张东裔.虎纹捕鸟蛛毒的生物学活性鉴定[J].动物学研究,1993,14(1):61.
- [7] 李顺意,梁松平.虎纹捕鸟蛛毒液中透明质酸酶的纯和部分性质的研究[J].生物化学杂志,1995,11(2):155.
- [8] 康晖,李敏,梁宋平.蜘蛛多肽类神经毒素分子生物学研究的若干进展[J].生命科学,1999,11(6):81.
- [9] 马保华.蜘蛛毒素的毒性毒理及开发利用[J].动物毒理学,2000,15(1):70.
- [10] 何小珍,胡卫军,曹税,等.虎纹捕鸟蛛毒素-I 天然突变体的分离纯化与鉴定[J].湖南师范大学自然科学学报,2005,28(3):76.
- [11] Liang S P, Zhang D Y, Pan X, et al. Properties and amino acid sequence of Huwentoxin-I, a neurotoxin purified from the venom bird spider selenocosmia huwena [J]. Toxicon, 1993,31:969.
- [12] Zhang f Y, Liang S P. Assignment of the three disulfide bridges of Huwenfoxin-I, a neurotoxin from the spider

- selenocosmia huwena [J]. Protein Chen, 1993, 12 (6):733.
- [13] Liang S, Chen X, Shu Q, et al. The presymptotic activity of humaentoxin-I. Aneurotoxin from the venom of the Chinese bird spider selenocosmia hunena[J]. Toxicon, 2000, 38:1237.
- [14] 王贤纯,梁宋平. 虎纹捕鸟蛛毒素-ILys13 突变对生物学活性的影响[J]. 自然科学进展, 2004, 14(2):227.
- [15] 王贤纯,梁宋平,罗泽民. 虎纹捕鸟蛛毒素-I 突变体 A1Y-HWTX-I 的固相合成和生物学活性测定[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2000, 16(3):357.
- [16] 涂庆华. 蜘蛛毒素的研究和利用[J]. 中国临床医药研究杂志, 2004, 117:12321.
- [17] 梁宋平,袁春华. 虎纹捕鸟蛛毒素组学分析与几种蜘蛛多肽毒素的结构功能关系研究[D]. 长沙:湖南师范大学, 2007:4.
- [18] 王婉灵,刘中华,钱万强,等. 虎纹捕鸟蛛毒素-X 的化学合成及其鉴定[J]. 生命科学研究, 2008, 12(3):213.
- [19] 邓星灿. 虎纹捕鸟蛛毒素 XI(HWTX-XI)对急性胰腺炎的治疗作用[D]. 长沙:湖南师范大学, 2008:5.
- [20] Zhang P F, Xiao S Y, Ling S P, et al. Reversed-phase high performance liquid chromatographic behavior of unfolding procedure of Huwentoxin-V [J]. Chin J Chromatography, 2004, 22(4):391.
- [21] 戴捷,梁宋平. 两种虎纹捕鸟蛛昆虫毒素的分离纯化及生物学活性鉴定[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2003, 19(4):488.
- [22] 余益民,徐秉坤,梁宋平,等. 虎纹捕鸟蛛毒中次黄嘌呤核苷的分离与鉴定[J]. 分析化学, 1995, 23(9):1081.
- [23] 毛海峰,陈嘉勤,梁宋平,等. HWTX-I 对全脑缺血大鼠脑组织自由基及海马神经元损伤的保护作用研究[J]. 北京体育大学学报, 2007, 30(3):351.
- [24] Michael B McFerrin, Harald Sontheimer. Arole for ion channels in glioma cell invasion[J]. Neuron Glia Bid, 2006, 2(1):39.
- [25] Penk K, Chen X D, Liang S P. The effect of Huwentoxin-on channels in-differential NG108-15 cell, a patch-claln study[J]. Toxion, 2001, 39(4):491.
- [26] 靳神,鲍娜. 蜘蛛毒素对人胃腺癌细胞株 BGC-823 增殖的抑制作用[J]. 河北农业大学学报, 2007, 30(2):90.
- [27] 刘绵林,黄新,叶远良,等. 广西虎纹捕鸟蛛毒素对胶质瘤细胞株 U251 抑制作用的实验研究[C]. 南宁:中国生物毒素学术研讨会, 2007:83.
- [28] 高莉,鲍娜,单保恩,等. 四种蛛毒抑制人肝癌 BEL-7402 细胞增殖作用的实验研究[J]. 山东医药, 2005, 45(11):25.
- [29] Sutton K G. Inhibition of neuronal calcium channels by a novel peptide spider toxin. D W13.3 [J]. Mol Pharmacol, 1998, 54(2):407.
- [30] 邱晓燕. 抗菌肽的分布及其应用前景[J]. 生物学通报, 2002, 37(5):4.

[责任编辑 邹晓翠]