

基础研究

中华眼镜蛇毒致广西巴马小型猪坏死组织 渗出液中的蛇毒成分分析

肖曼琪¹, 关哲哲¹, 胡少聪¹, 李亚兰¹, 张子彦², 蒋宁静¹, 张学荣¹, 廖明¹

(1. 广西医科大学生命科学研究院, 南宁 530021; 2. 广西医科大学基础医学院, 南宁 530021)

摘要 目的:探究中华眼镜蛇毒致广西巴马小型猪坏死组织渗出液中的蛇毒成分及其蛋白表达的动态变化。**方法:**给予广西巴马小型猪注射中华眼镜蛇毒, 构建蛇伤中毒的局部组织坏死模型, 在注射毒素后的6 h、12 h、24 h、36 h和48 h取小猪坏死组织的渗出液, 采用无标记的蛋白质组学技术鉴定分析渗出液中蛇毒蛋白质组成及动态变化, 通过对所鉴定出的蛋白进行KEGG及GO通路富集分析, 以深入了解蛇毒蛋白相关的生物学功能。**结果:**通过蛇伤中毒后广西巴马小型猪的生物学行为、局部肌肉组织的病理结果、注射部位的伤口变化来评判动物模型, 广西巴马小型猪中毒后出现呼吸急促、肌肉组织坏死、局部伤口溃烂等症状, 均符合临床特征的实际情况, 表明成功构建了中华眼镜蛇毒导致局部组织坏死的广西巴马小型猪模型。在广西巴马小型猪的局部组织坏死渗出液中鉴定到40种蛇毒蛋白质, 涵盖三指毒素、磷脂酶A₂、富含半胱氨酸分泌蛋白、蛇毒金属蛋白酶、核苷酸焦磷酸/磷酸二酯酶等蛇毒蛋白家族, 并呈现出动态性数量变化。**结论:**在中华眼镜蛇毒致广西巴马小型猪过程中, 不同时间段的组织渗出液中均鉴定出多种三指毒素、磷脂酶A₂等蛇毒蛋白, 其可能在局部组织坏死中发挥着重要作用。

关键词 中华眼镜蛇毒; 渗出液; 广西巴马小型猪; 磷脂酶A₂; 细胞毒素; 蛋白质组学

中图分类号: R646 文献标志码: A 文章编号: 1005-930X(2024)08-1101-10

DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2024.08.001

Analysis of the venom components of necrotic tissue exudates from *Naja atra* venom-infected Guangxi Bama miniature pigs

XIAO Manqi¹, GUAN Zhezhe¹, HU Shaocong¹, LI Yalan¹, ZHANG Ziyang², JIANG Ningjing¹, ZHANG Xuerong¹, LIAO Ming¹. (1. Life Sciences Institute, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. School of Basic Medical Sciences, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

Abstract Objective: To investigate the components of snake venom and the dynamic changes in protein expression in the exudates of necrotic tissues affected by the *Naja atra* venom in Guangxi Bama miniature pigs. **Methods:** Guangxi Bama miniature pigs were injected with *Naja atra* venom to establish a local tissue necrosis model due to snakebite poisoning. Exudates from the necrotic tissues of the pigs were collected at 6 h, 12 h, 24 h, 36 h, and 48 h post-injection. Label-free proteomics techniques were employed to identify and analyze the composition and dynamic changes of snake venom proteins in the exudates. KEGG and GO pathway enrichment analyses were performed on the identified proteins to gain deeper insights into the biological functions related to snake venom proteins. **Results:** The biological behavior of the Guangxi Bama miniature pigs post-snakebite, pathological results of local muscle tissues, and changes at the injection site were used to evaluate the animal model. The pigs exhibited symptoms such as rapid respiration, muscle tissue necrosis, and local wound ulceration, consistent with clinical characteristics, indicating the successful establishment of a Guangxi Bama miniature pig model of local tissue necrosis induced by *Naja atra* venom. A total of 40 snake venom proteins were identified in the exudates of the local tissue necrosis in the Guangxi Bama miniature pigs, including three-finger toxins, phospholi-

[资助项目] 国家自然科学基金资助项目(No.82260386); 广西自然科学基金资助项目(No.2021GXNSFAA075025)

[通信作者] 廖明, E-mail: liaomingx@126.com

[收稿日期] 2024-06-14

pase A2, cysteine-rich secretory proteins, snake venom metalloproteinases, and nucleotidyl pyrophosphatase/phosphodiesterases, showing dynamic quantitative changes. **Conclusion:** Various snake venom proteins, including three-finger toxins and phospholipase A2, are identified in the exudates of the tissues at different time points during the poisoning process of Guangxi Bama miniature pigs by *Naja atra* venom, suggesting their important roles in local tissue necrosis.

Keywords *Naja atra* venom; exudate; Guangxi Bama miniature pig; phospholipase A2; cytotoxin; proteomics

毒蛇咬伤在全球范围内,尤其是在热带和亚热带地区,仍然是一个严重的公共卫生问题。全球每年约有180万至270万例毒蛇咬伤事件,其中导致约8.1万至13.8万人死亡,并可能给更多的人留下永久性的身体和心理后遗症^[1]。在我国,尤其是在南方的农村地区,由于这些地区的气候条件适宜蛇类生存,加之人们对毒蛇知识的匮乏和医疗救治的滞后,毒蛇咬伤的发生率和致残率较高。中华眼镜蛇(*Naja atra*)是我国南方常见的毒蛇之一,其咬伤后的毒性反应迅速且严重,临床表现包括局部组织坏死、神经系统症状和全身中毒反应。伤口附近局部肌肉组织的坏死是中华眼镜蛇咬伤后的主要严重并发症,其临床发生率较高,处理棘手,伤口往往形成经久不愈的溃疡,造成许多患者肢体残障,严重者甚至截肢,往往是致残的最主要原因,对受害者产生长期的病理生理、社会和心理影响,给家庭和社会带来了极大负担^[2]。因此,蛇伤导致的局部组织坏死,成为了当前蛇伤诊治的难题和蛇伤研究的重点,而中华眼镜蛇毒相关成分导致局部组织坏死过程中的变化尚无明确报道。近年来,采用蛋白质组学技术从伤口渗出物的角度研究蛇毒成分及变化,成为强有力的揭示蛇伤病理机制途径之一^[3-5]。该技术被广泛用于蛇毒蛋白质组学的分离和鉴定,其可以高效定量分析不同毒素蛋白质在蛇毒中的含量及其变化规律,有助于理解蛇毒的毒性机制。本研究采用中华眼镜蛇毒染毒广西巴马小型猪的模型,以无标记的液相色谱串联质谱技术(LC-MS/MS)定性定量蛋白质组学技术,系统地分析中毒猪的坏死组织渗出液中蛇毒成分及其蛋白表达的动态变化,奠定研究中华眼镜蛇毒导致局部组织坏死的蛇毒蛋白质组学的基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

广西巴马小型猪来源于广西大学小型猪繁育中心的封闭猪群,为普通级实验动物(11 kg, 3~4月

龄,雌雄各半),生产许可证编号为SCXK桂2023-0003。实验用广西巴马小型猪均饲养于广西医科大学动物中心,适应性喂养1周后,随机进行实验分组。动物实验经过广西医科大学动物伦理委员会审查和批准(伦理审查编号:202104012)。

1.2 主要试剂与材料

中华眼镜蛇蛇毒冻干粉来源于广西医科大学蛇毒研究所;STD(4%SDS, 100 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L DTT, pH7.6)组织裂解液;BCA浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司, P0010);C18除盐柱(美国Sigma-Aldrich公司, Empore™ SPE Cartridges C18, 66872-U);甲酸(美国Thermo Fisher公司, 28905);乙腈(德国Merck公司, 100029);碘乙酰胺(德国Merck公司, I6125);苏木精-伊红(HE)染色液(北京Solarbio公司, G1120);考马斯亮蓝R-250(北京Solarbio公司, C8430)。

1.3 主要仪器

高分辨质谱仪Q-Exactive(美国Thermo Fisher公司);Easy-nLC液相系统(美国Thermo Fisher公司);病理切片机(日本徕卡仪器有限公司);光学显微镜(日本OLYMPUS公司);组织包埋机(武汉俊杰电子有限公司);脱水机(意大利DIAPAT公司)。

1.4 方法

1.4.1 实验动物分组和模型制备 选15只健康广西巴马小型猪,按照设定的观察时间点随机分为注射中华眼镜蛇毒后6 h组、12 h组、24 h组、36 h组、48 h组,每组3只。以LD₅₀(2 mg/kg)^[6]的中华眼镜蛇毒剂量皮下注射于猪的后侧大腿处。在注射毒液后6 h、12 h、24 h、36 h和48 h,腹腔注射戊巴比妥钠150 mg/kg对广西巴马小型猪实施人道安乐死,从猪腿部的坏死部位收集肌肉组织样本与渗出液。

为评估广西巴马小型猪蛇伤模型,本研究对广西巴马小型猪的局部伤口变化作为评价模型的主要指标,并观察广西巴马小型猪整个中毒发病的过程,广西巴马小型猪的生物行为学、病理结果等变化与临床上中华眼镜蛇咬伤病人的全身和局部是

否表现一致,作为构建模型成功与否的依据。

1.4.2 广西巴马小型猪生物学行为和伤口变化观察 定期监测完成注射后猪的精神状态、饮食习惯、呼吸频率、行动次数等各种生理活动变化,重点观察注射部位伤口不同时间段的变化情况。

1.4.3 HE染色 从猪腿部坏死组织处收集组织后,将各组织剪为1.5 cm×1.5 cm×1.5 cm大小,生理盐水清洗3次后迅速放于4%多聚甲醛溶液中固定48 h,经脱水、浸蜡、石蜡包埋、轮转式切片机切片、摊片、50℃烘烤3 h、二甲苯和梯度酒精进行脱蜡,流水冲洗1 h后入蒸馏水片刻,在70%和90%酒精中脱水各10 min,放入酒精伊红染色液染色2~3 min,再经过修剪,脱水,透明和封片之后,在光学显微镜下观察组织结构。

1.4.4 渗出液蛋白质提取和消化 SDT缓冲液裂解渗出液样品并提取蛋白质,用BCA蛋白测定试剂盒定量检测蛋白质含量。蛋白质消化根据MatthiasMann描述的过滤辅助样品制备(FASP)程序,每个样品根据200 μg蛋白质加入30 μL SDT(4% SDS, 100 mmol/L DTT, 150 mmol/L Tris-HCl pH 8.0)缓冲液,用UA(8 mol/L 尿素, 150 mmol/L Tris-HCl pH 8.0)缓冲液重复超滤,去除洗涤剂、DTT和其他低分子量组分。然后加入100 μL碘乙酰胺(100 mmol/L IAA在UA缓冲液中)阻断还原半胱氨酸残基,黑暗孵育30 min。用100 μL UA缓冲液、100 μL 25 mmol/L NH₄HCO₃缓冲液洗涤2次。蛋白悬浮液用胰蛋白酶在40 μL 25 mmol/L NH₄HCO₃缓冲液中37℃消化过夜,收集得到的肽作为滤液。每个样品的肽段在C18套筒上脱盐,真空离心浓缩,最后在40 μL 0.1% (v/v)甲酸中重组。

1.4.5 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)电泳鉴定蛋白质 每个样品取20 μg蛋白质分别与5X蛋白质上样缓冲液混合,将混合溶液煮沸5 min。配制12.5% SDS-PAGE凝胶,恒压100 V分离蛋白质,考马斯蓝R-250染色观察蛋白质条带以确定蛋白质的丰度情况。

1.4.6 LC-MS/MS分析 LC-MS/MS分析在Q-Exactive质谱系统上进行。多肽装载到nanoViper C18预柱上,连接到C18反相色谱柱,用IntelliFlow技术控制流速为300 nL/min,用缓冲液A(0.1%甲酸)和缓冲液B(84%乙腈和0.1%甲酸)进行线性梯度分离。质谱仪在正离子模式下工作。MS数据采集采用数据依赖的top10方法,从调查扫描(300~1 800

m/z)中动态选择最丰富的前体离子用于HCD碎片。自动增益控制(AGC)目标设置为3e6,最大注入时间设置为10 ms。动态排除时间为40 s。测量扫描在200 m·z⁻¹分辨率为70 000下获得,HCD光谱分辨率在200 m·z⁻¹下设置为17 500,隔离宽度为2 m·z⁻¹。归一化碰撞能量为30 eV,底填充率(即在最大填充时间内可能达到的目标值的最小百分比)定义为0.1%。仪器在启用肽识别模式的情况下运行,最后得出原始质谱数据。

1.4.7 蛋白质的鉴定 合并每个样品的MS原始数据通过ProteoWizard工具msConvert转成MGF格式,并使用MaxQuant1.5.3.17软件进行搜索,以进行鉴定分析。进行质控分析的同时进行判断本次数据是否合格,最终选定的可信蛋白必须包含至少一个可信的特异性肽段。

1.4.8 基因本体(GO)和京都基因组百科全书(KEGG)通路富集分析 采用NCBI BLAST软件(NCBI-BLAST-2.2.28)和InterProScan对所鉴定出的蛋白序列进行局部搜索,寻找同源序列,通过BLAST GO软件绘制基因本体(GO)术语,并对序列进行注释。按照注释步骤,将所研究的蛋白质与KEGG数据库(<http://geneontology.org/>; 2022-12-05)进行比对鉴定,基于Fisher精确检验进行富集分析($P<0.05$)。其中GO通路富集分析通过微生信平台(<http://www.bioinformatics.com.cn/>)对富集结果进行可视化。

2 结果

2.1 中毒后广西巴马小型猪的生物学行为

与注射中华眼镜蛇毒前(图1A)相比,蛇毒组广西巴马小型猪在注射中华眼镜蛇毒6 h后出现眼睑下垂、精神不佳、寒颤、发热,开始行动不便等症状(图1B);12 h后广西巴马小型猪出现肌肉抽搐、站立不稳、刺激反应减弱、呼吸加快、口腔分泌物变多的症状(图1C);24 h后广西巴马小型猪表现为无法进食、角膜有不明分泌物、垂涎(图1D);36 h后广西巴马小型猪瞳孔散大、呼吸表浅(图1E),48 h后广西巴马小型猪全身瘫软、无法站立、卧倒在地(图1F)。

2.2 中毒后广西巴马小型猪的局部组织坏死变化

与注射中华眼镜蛇毒前相比(图2A),在注射中华眼镜蛇毒6 h后,广西巴马小型猪腿部注射部分的皮肤组织出现肿胀、出血(图2B);12 h后,肿胀部位继续扩大,可观察到有炎症反应,伤口仍然存在

出血(图2C);24 h后,可明显观察到皮肤组织处有强烈的炎症反应并伴有更加明显的肿胀并伴随坏死(图2D);36 h后,可观察到局部坏死组织进一步扩大并蔓延,在注射部位出现小块白色溃疡,皮肤组织出现糜烂性溃烂(图2E);48 h后,注射处部分皮肤向下凹陷,局部组织坏死、变硬(图2F)。

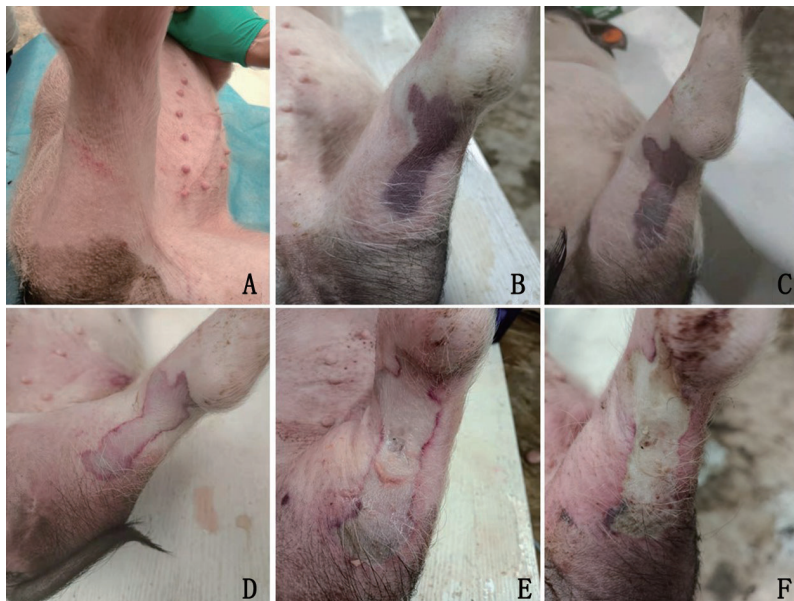
2.3 中毒后广西巴马小型猪的局部组织病理学分析

HE结果显示,正常组肌细胞着色均匀,界限清晰,胞核位于边缘,肌纤维紧密;注射蛇毒6 h后,可观察到肌纤维排列不规则,肌细胞核聚集,淋巴细胞浸润;12 h后,可见明显淋巴细胞浸润,间质水肿,细胞核固缩聚集;24 h后,可观察到大量淋巴细胞浸润,间质严重水肿,肌细胞边缘模糊,部分肌细胞溶解;36 h后,肌细胞继续溶解,逐渐出现空泡状;48 h后,肌细胞基本全部溶解,形成空泡状,见图3。



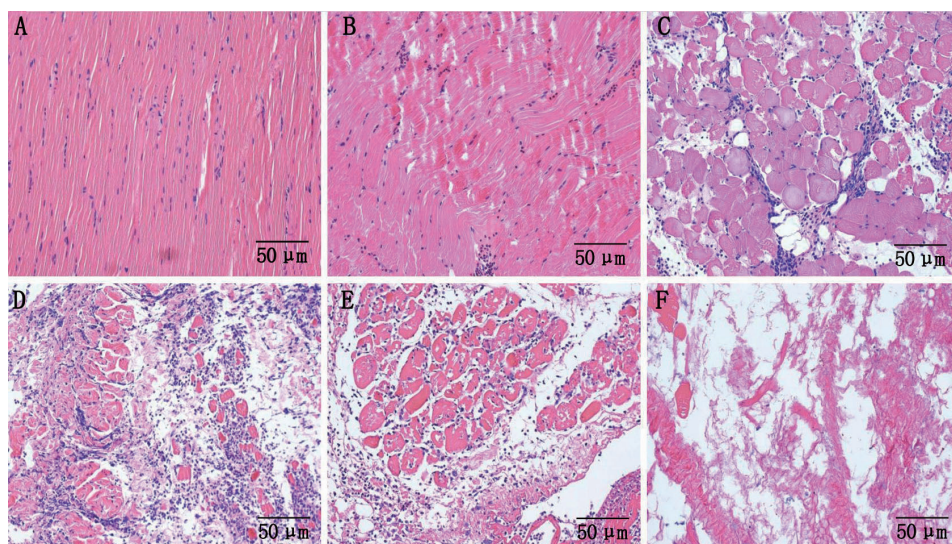
A:注射中华眼镜蛇毒前;B注射中华眼镜蛇毒6 h后 ;C:注射中华眼镜蛇毒12 h后;D:注射中华眼镜蛇毒24 h后;E:注射中华眼镜蛇毒36 h后;F:注射中华眼镜蛇毒48 h后。

图1 中华眼镜蛇毒致广西巴马小型猪的生物学行为变化



A:注射中华眼镜蛇毒前;B:注射中华眼镜蛇毒6 h后广西巴马小型猪局部组织变化; C:注射中华眼镜蛇毒12 h后广西巴马小型猪局部组织变化;D:注射中华眼镜蛇毒24 h后广西巴马小型猪局部组织变化;E:注射中华眼镜蛇毒36 h后广西巴马小型猪局部组织变化;F:注射中华眼镜蛇毒48 h后广西巴马小型猪局部组织变化。

图2 中华眼镜蛇毒致广西巴马小型猪的局部组织坏死变化



A:注射中华眼镜蛇毒前;B:注射中华眼镜蛇毒6 h后;C:注射中华眼镜蛇毒12 h后;D:注射中华眼镜蛇毒24 h后;E:注射中华眼镜蛇毒36 h后;F:注射中华眼镜蛇毒48 h后。

图3 中华眼镜蛇毒致广西巴马小型猪的局部肌肉组织HE染色结果(HE×200)

在整个蛇伤中毒过程中,广西巴马小型猪在注射蛇毒后,出现精神萎靡不振、呼吸急促、眼睑下垂等症状;局部伤口出现瘀青水肿,且伴有出血现象,随着毒素的蔓延,肿胀部位向四周迅速扩散,逐渐出现伤口坏死、溃烂等明显中毒症状;HE病理检查结果显示,肌肉组织逐渐凋亡、溶解最终坏死、空泡化。

综合以上所有结果,广西巴马小型猪的中毒体征均与临床上中华眼镜蛇咬伤病人的全身和局部表现、实验室检查结果一致,符合中华眼镜蛇咬伤特点,表明本研究成功构建中华眼镜蛇毒导致局部组织坏死的广西巴马小型猪模型。

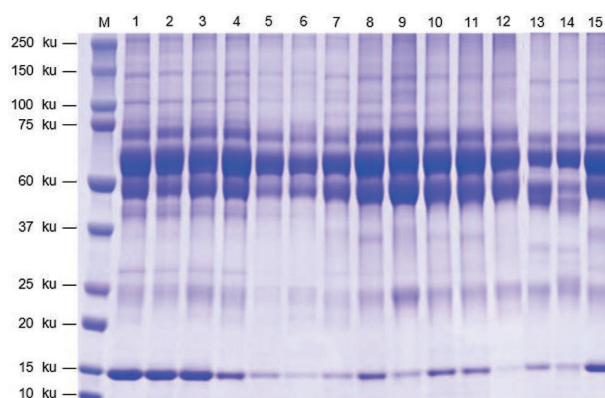
2.4 蛋白质定量及SDS-PAGE电泳结果

如图4所示,各组广西巴马小型猪坏死组织的渗出液样本中蛋白质均没有发生降解且存在高丰度蛋白,每组样品中蛋白质可以满足后续质谱需求。

2.5 渗出液中蛇毒蛋白质的鉴定结果

如表1所示,在注射中华眼镜蛇毒的广西巴马小型猪的大腿组织渗出液中,共鉴定出蛇毒蛋白质40种(表1仅列出鉴定出蛇毒中的主要蛋白质),分别属于三指毒素家族(Cytotoxin 2、Cytotoxin 3b),磷脂酶A₂家族(如Acidic phospholipase A2 1、Acidic phospholipase A2 D),富含半胱氨酸分泌蛋白家族(Cysteine-rich venom protein natrin-1、Cysteine-rich venom protein 25-A),蛇毒金属蛋白酶家族(如

Zinc metalloproteinase-disintegrin-like atrase-A、Zinc metalloproteinase-disintegrin-like atrase-B), β -神经生长因子家族(Venom nerve growth factor、Venom nerve growth factor 2)等。综合表1及图5所示,监测数据表明有20种蛋白质在各个观察时间点均有出现,如Acidic phospholipase A2 1、VC-1=CYTO-TOXIN、Cytotoxin 2等,但也发现一些蛋白质如Acidic phospholipase A2 D、Neurotoxin 3、Acidic phospholipase A2 2在6~24 h出现,而在24 h后未见。

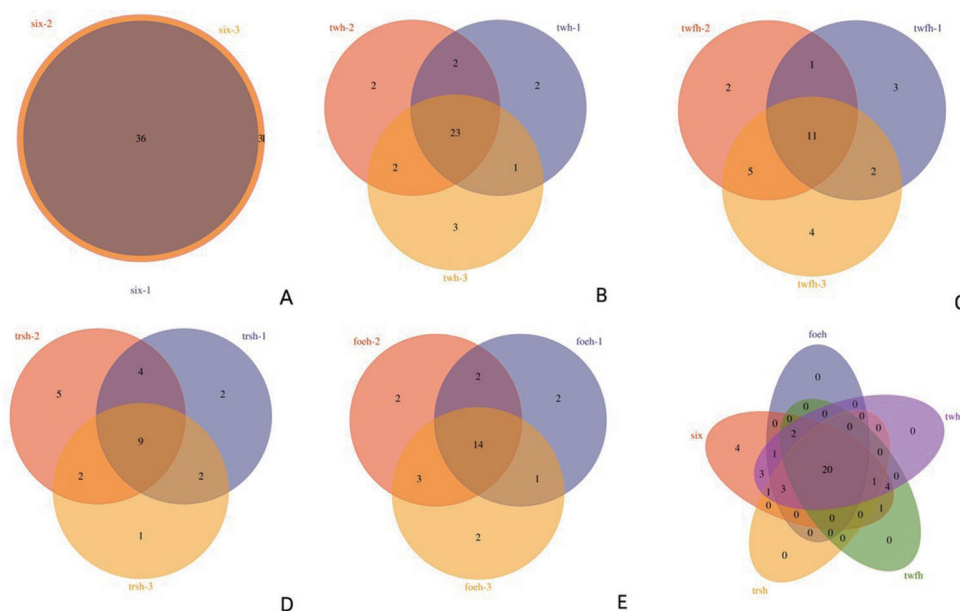


M:蛋白质Maker;1~3:注射蛇毒6 h后的渗出液样本;4~6:注射蛇毒12 h后的渗出液样本;7~9:注射蛇毒24 h后的渗出液样本;10~12:注射蛇毒36 h后的渗出液样本;13~15:注射蛇毒48 h后的渗出液样本。

图4 SDS-PAGE电泳鉴定广西巴马小型猪渗出液蛋白质丰度

表1 广西巴马小型猪组织坏死渗出液中蛇毒蛋白质的列表

蛋白质家族	蛋白质ID号	蛋白名称				
		6 h	12 h	24 h	36 h	48 h
三指毒素家族	Q9PS33	VC-1=CYTO-TOXIN	VC-1=CYTO-TOXIN	VC-1=CYTO-TOXIN	VC-1=CYTO-TOXIN	VC-1=CYTO-TOXIN
	P01442	Cytotoxin 2	Cytotoxin 2	Cytotoxin 2	Cytotoxin 2	Cytotoxin 2
	Q98960	Cytotoxin 3b	Cytotoxin 3b	Cytotoxin 3b	Cytotoxin 3b	Cytotoxin 3b
	P82463	Muscarinic toxin-like protein 2	Muscarinic toxin-like protein 2	Muscarinic toxin-like protein 2	Muscarinic toxin-like protein 2	Muscarinic toxin-like protein 2
	Q9DEQ3	Neurotoxin homolog NL1	Neurotoxin homolog NL1	Neurotoxin homolog NL1	Neurotoxin homolog NL1	Neurotoxin homolog NL1
	P62394	Cytotoxin 11	Cytotoxin 11	Cytotoxin 11	Cytotoxin 11	
	Q9PSN6	Neurotoxin 3	Neurotoxin 3	Neurotoxin 3		
	Q9YGI4	Probable weak neurotoxin NNAM2	Probable weak neurotoxin NNAM2	Probable weak neurotoxin NNAM2		
	P60774	Short neurotoxin 1	Short neurotoxin 1			
	P59275	Cobrotoxin-b	Cobrotoxin-b			
	P0DSM9	Weak toxin NWT		Weak toxin NWT		
	P0DSN0	Nakoroxin				
	P82462	Muscarinic toxin-like protein 1				
	Q802B3	Weak neurotoxin 8				
	磷脂酶A ₂ 家族	P00598	Acidic phospholipase A2 1	Acidic phospholipase A2 1	Acidic phospholipase A2 1	Acidic phospholipase A2 1
Q9I900		Acidic phospholipase A2 D	Acidic phospholipase A2 D	Acidic phospholipase A2 D		
P15445		Acidic phospholipase A2 2	Acidic phospholipase A2 2	Acidic phospholipase A2 2		
富含半胱氨酸分泌蛋白家族	Q7T1K6	Cysteine-rich venom protein natrin-1	Cysteine-rich venom protein natrin-1	Cysteine-rich venom protein natrin-1	Cysteine-rich venom protein natrin-1	Cysteine-rich venom protein natrin-1
	Q7ZZN8	Cysteine-rich venom protein natrin-2	Cysteine-rich venom protein natrin-2	Cysteine-rich venom protein natrin-2	Cysteine-rich venom protein natrin-2	Cysteine-rich venom protein natrin-2
	P84807	Cysteine-rich venom protein 25-A	Cysteine-rich venom protein 25-A	Cysteine-rich venom protein 25-A	Cysteine-rich venom protein 25-A	Cysteine-rich venom protein 25-A
蛇毒金属蛋白酶家族	D6PXE8	Zinc metalloproteinase-disintegrin-like atrase-B	Zinc metalloproteinase-disintegrin-like atrase-B	Zinc metalloproteinase-disintegrin-like atrase-B	Zinc metalloproteinase-disintegrin-like atrase-B	Zinc metalloproteinase-disintegrin-like atrase-B
	D3TTC2	Zinc metalloproteinase-disintegrin-like atragin	Zinc metalloproteinase-disintegrin-like atragin	Zinc metalloproteinase-disintegrin-like atragin	Zinc metalloproteinase-disintegrin-like atragin	Zinc metalloproteinase-disintegrin-like atragin
	D5LMJ3	Zinc metalloproteinase-disintegrin-like atrase-A	Zinc metalloproteinase-disintegrin-like atrase-A		Zinc metalloproteinase-disintegrin-like atrase-A	Zinc metalloproteinase-disintegrin-like atrase-A
β-神经生长因子家族	P61898	Venom nerve growth factor	Venom nerve growth factor	Venom nerve growth factor	Venom nerve growth factor	Venom nerve growth factor
	Q5YF89	Venom nerve growth factor 2	Venom nerve growth factor 2			
核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶家族	A0A2D0TC04	Venom phosphodiesterase	Venom phosphodiesterase	Venom phosphodiesterase	Venom phosphodiesterase	Venom phosphodiesterase
蛇毒5'-核苷酸酶家族	A0A2I4HXX5	Snake venom 5-nucleotidase (Fragment)	Snake venom 5-nucleotidase (Fragment)			
黄素单胺氧化酶家族	A8QL58	L-amino-acid oxidase	L-amino-acid oxidase			
蛇毒补体C3家族	Q91132	Cobra venom factor	Cobra venom factor	Cobra venom factor	Cobra venom factor	Cobra venom factor
珠蛋白家族	P22743	Hemoglobin subunit beta-2	Hemoglobin subunit beta-2	Hemoglobin subunit beta-2	Hemoglobin subunit beta-2	Hemoglobin subunit beta-2



A: 注射中华眼镜蛇毒 6 h 后渗出液中的蛋白质; B: 注射中华眼镜蛇毒 12 h 后渗出液中的蛋白质; C: 注射中华眼镜蛇毒 24 h 后渗出液中的蛋白质; D: 注射中华眼镜蛇毒 36 h 后渗出液中的蛋白质; E: 注射中华眼镜蛇毒 48 h 后渗出液中的蛋白质; F: 各观察时间点渗出液中共同鉴定出的蛋白。

图5 无标记蛋白质组学鉴定各观察时间点渗出液的蛋白质韦恩图

2.6 渗出液中蛇毒蛋白的KEGG通路富集分析

为了分析渗出液中蛇毒蛋白可能参与蛇伤中毒的代谢过程,实验对鉴定到的蛋白进行KEGG分析,通路富集表明渗出液中的蛋白参与RAS信号途径(RAS signaling pathway)、甘油磷脂代谢(glycerophospholipid metabolism)、乙醚脂质代谢(ether lipid metabolism)、花生四烯酸代谢(alachidonic acid metabolism)、血管平滑肌收缩(vascular smooth muscle contraction)等通路,其中参与脂质代谢通路最多,可能为蛇毒细胞毒性损伤的关键信号通路,见图6。

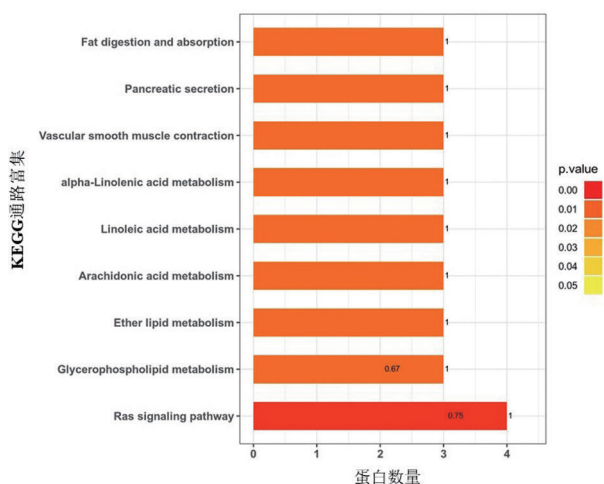


图6 渗出液中蛇毒蛋白KEGG通路富集分析

2.7 渗出液中蛇毒蛋白GO通路富集分析

为了明确鉴定到的40种蛇毒蛋白的生物学过程(Biological Processes)、细胞组分(Cellular Components)和分子功能分类(Molecular Functions),进行GO富集分析。结果显示:GO富集度较高的生物学过程主要包括囊泡定位的建立(establishment of vesicle localization)、跨膜转运的调节(regulation of transmembrane transport)、蛋白质磷酸化的正调控(positive regulation of protein phosphorylation)、细胞形态的形成(cell morphogenesis);细胞组分包括血液微粒(blood microparticle)、细胞骨架纤维(polymeric cytoskeletal fiber);分子功能有分子功能活性的抑制(molecular function inhibitor activity),见图7。

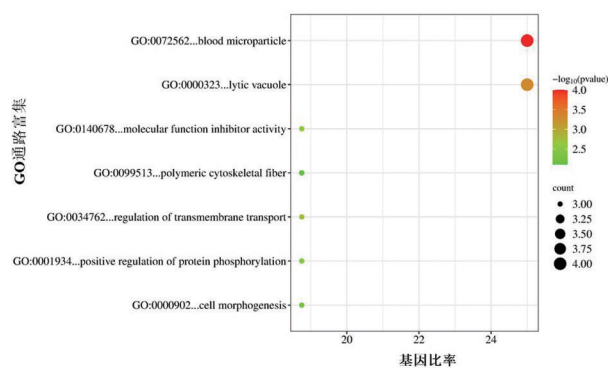


图7 渗出液中蛇毒蛋白GO通路富集分析

3 讨论

中华眼镜蛇毒成分十分复杂,主要包括三指毒素、磷脂酶A₂、蛇毒金属蛋白酶、蛇毒丝氨酸蛋白酶、富含半胱氨酸分泌蛋白、L-氨基酸氧化酶、眼镜蛇毒因子,还有一些多肽、酶类和小分子物质等^[7],三指毒素以及磷脂酶A₂构成了中华眼镜蛇毒素的主要组成部分,且两者总占比超过了80%。细胞毒素(cytotoxins, CTX)是构成三指毒素的主要成分,其占比更是超过了60%^[8-9]。蛇毒进入机体后往往立即与局部组织发生相互作用,毒液所致的局部组织损伤是一个复杂的病理生理过程,涉及到毒素介导的直接细胞损害、炎症反应加剧以及组织坏死。尽管中华眼镜蛇毒的许多成分已经得到分离纯化和鉴定,并广泛应用于理论研究和临床。然而,长期以来对中华眼镜蛇咬伤的病理机制,特别是毒液导致的局部组织损伤坏死机制方面研究却进展缓慢,已有研究表明,毒蛇咬伤后有很大部分的毒素聚集在伤口部位,而对伤口部位的组织坏死渗出物的蛋白质组学分析可助力揭示蛇毒损伤组织的关键蛋白。

在本研究中,我们成功通过广西巴马小猪来构建中华眼镜蛇毒导致局部组织坏死的动物模型,并能动态展示蛇伤所致的组织坏死的发生发展,为研究其局部组织坏死机制提供帮助。蛇伤中毒过程中对不同时间点收集的组织坏死渗出物进行了蛋白质组学分析,共鉴定出40种蛇毒蛋白,主要为三指毒素、磷脂酶A₂、富含半胱氨酸分泌蛋白、蛇毒金属蛋白酶、L-氨基酸氧化酶,这充分说明蛇伤后有不少毒素聚集在伤口部分发挥作用。KEGG通路富集及GO通路富集分析显示,鉴定出的蛇毒蛋白主要参与细胞脂质代谢、细胞形态、细胞内信号通路、花生四烯酸代谢、血管平滑肌收缩。

研究表明,CTX是导致中华眼镜蛇毒导致局部组织坏死的直接原因,其能够和质膜结合直接或间接损伤细胞^[10],可通过嵌入细胞膜的脂质双层,导致膜的通透性改变,最终引发细胞肿胀、破裂和死亡^[11],同时,其能进入细胞内部,诱导细胞凋亡或自噬^[12-13],CTX也可引发细胞氧化应激,增加活性氧(ROS),释放Ca²⁺、细胞色素C、凋亡诱导因子AIF,

使线粒体外膜破裂,进一步导致细胞凋亡、坏死^[14]。本研究发现,中华眼镜蛇毒染毒广西巴马小型猪的组织渗出液内存在多个CTX家族成员,如Cytotoxin 2、Cytotoxin 3b在不同观察时间点均有出现,表明其参与局部组织坏死以及中毒的整个过程。在注射中华眼镜蛇毒后,伤口部位发生出血症状、组织肿胀并伴有强烈的炎症反应,病理分析也可观察到伤口部位的肌细胞逐渐坏死、溶解,最后几乎无完整肌细胞,除了引起局部肿胀、疼痛等症状外,细胞毒素还可以抑制肌肉收缩、对细胞的破坏可使蛇毒毒素更易于经淋巴管和毛细血管吸收而进入血液循环,导致广西巴马小型猪产生眼睑下垂、呼吸困难、流涎、无法站立等全身中毒症状。这些中毒的病理特征应与CTX攻击密切相关。

蛇毒金属蛋白酶是一种特异性出血毒素,可以降解细胞外基质蛋白、基底膜蛋白、纤维蛋白原和纤维蛋白,对肌肉细胞周围结缔组织的蛋白水解,引起骨骼肌损伤^[15-16],并能诱导炎症反应^[17-19],促进蛇毒毒性成分在组织间的扩散。蛇毒金属蛋白酶家族如Zinc metalloproteinase-disintegrin-like atragin、Zinc metalloproteinase-disintegrin-like atrase-B在蛇毒诱导组织坏死整个过程中发挥着十分重要的作用。在注射中华眼镜蛇毒后12 h内,我们发现蛇毒金属蛋白酶出在渗出液中,可能其破坏作用部位的血管壁和抑制血小板聚集来引起出血,导致血管通透性增加,血浆渗出到周围组织中,形成水肿和局部炎症反应。在注射中华眼镜蛇毒后12~48 h内,渗出液中也能鉴定到蛇毒金属蛋白酶存在,说明其仍然继续破坏组织结构,降解细胞外基质和细胞间质,导致组织通透性增大,促进毒素的扩散,进一步加重炎症反应、组织损伤并逐渐出现全身中毒。渗出液中鉴定出的磷脂酶A₂家族蛋白尤其是Acidic phospholipase A2 1在蛇伤每个阶段都发挥着关键作用,这与中华眼镜蛇毒磷脂酶A₂主要属于I型磷脂酶A₂相符^[20],其结合并破坏肌纤维质膜结构完整性,能够抑制胶原蛋白诱导的血小板聚集,与蛇毒金属蛋白酶共同作用导致出血,膜损伤致Ca²⁺渗漏到细胞质中,导致肌丝过度收缩,线粒体功能障碍和其他退行性事件,导致不可逆的肌肉损伤,诱发急性骨骼肌坏死^[7]。KEGG通路富集结果显示,磷脂酶A₂家族蛋白参与甘油磷脂代谢、乙醚脂质代

谢、花生四烯酸代谢等通路,其通过作用于膜脂,影响脂质代谢,产生的脂质介质在炎症和组织损伤中发挥关键性作用。例如影响释放出花生四烯酸,进一步刺激巨噬细胞等细胞分泌以 COX-2、IL-1 β 、TNF- α 为主的促炎介质而诱发炎症反应^[21-23]。

本研究中,蛇毒 5'-核苷酸酶、L-氨基酸氧化酶仅在 6~12 h 被发现,研究表明,两者均能抑制 ADP、花生四烯酸、胶原诱导的血小板聚集,导致局部伤口早期出血^[24]。蛇毒磷酸二酯酶(Venom phosphodiesterase)属于核苷酸焦磷酸/磷酸二酯酶家族,其在我们观测的蛇伤整个过程中均有检测出,其可能的作用如文献报道的抑制 ADP 的形成,水解 DNA 和 RNA,释放腺苷及抑制血小板聚集,诱导各种病理效应,表现为出血、水肿、低血压、炎症^[25],表明蛇毒磷酸二酯酶通过降解核酸引起广西巴马小型猪低血压甚至出现休克。

富含半胱氨酸分泌蛋白主要起离子通道阻滞剂的作用^[26-27],可以抑制血管平滑肌细胞膜上电导钙激活的钾通道,促进细胞中炎症相关基因(IL-1 β 、TNF- α 、COX-2、MCP-1 和 IL-6)水平的显著升高,从而阻断血管平滑肌收缩,增加血管通透性,促进炎症反应(白细胞和中性粒细胞浸润)。本实验发现,渗出液中各个时间点均出现 Cysteine-rich venom protein natrin-1、Cysteine-rich venom protein natrin-2 等富含半胱氨酸分泌蛋白类蛋白,其与细胞毒素共同作用抑制平滑肌收缩、促进炎症,因此可观察到中毒广西巴马小型猪逐渐从肌肉麻痹、步履蹒跚发展到最终无法站立,在后期主要通过与其内皮细胞直接相互作用抑制新血管生成^[28],影响修复过程。

综上所述,中华眼镜蛇毒的磷脂酶 A₂、三指毒素、富含半胱氨酸分泌蛋白、蛇毒金属蛋白酶、L-氨基酸氧化酶等毒素,在蛇伤中毒导致组织坏死发生发展过程中,聚集蛇伤部位,发挥自身的毒性特点,相互协同作用,引起伤口部位剧烈疼痛、肿胀、组织坏死并随着蛇毒蔓延进一步引发了一系列全身性病理效应。

参考文献:

- [1] GUTIÉRREZ J M, CALVETE J J, HABIB A G, et al. Snakebite envenoming[J]. Nature reviews disease primers, 2017,3: 17063.
- [2] WANG W, CHEN Q F, YIN R X, et al. Clinical features and treatment experience: a review of 292 Chinese cobra snakebites[J]. Environmental toxicology and pharmacology, 2014, 37(2):648-655.
- [3] ESCALANTE T, RUCAVADO A, PINTO A F, et al. Wound exudate as a proteomic window to reveal different mechanisms of tissue damage by snake venom toxins[J]. Journal of proteome research, 2009,8(11): 5120-5131.
- [4] HERRERA C, ESCALANTE T, RUCAVADO A, et al. Metalloproteinases in disease: identification of biomarkers of tissue damage through proteomics[J]. Expert review of proteomics, 2018, 15(12): 967-982.
- [5] SANTOS W S, MONTONI F, EICHLER R A S, et al. Proteomic analysis reveals rattlesnake venom modulation of proteins associated with cardiac tissue damage in mouse hearts[J]. Journal of proteomics, 2022, 258: 104530.
- [6] HE D, HU S, HUANG Z, et al. Metabolomics analyses of serum metabolites perturbations associated with *Naja atra* bite[J]. PLOS neglected tropical diseases, 2023, 17(8): e0011507.
- [7] QIN W G, ZHUO Z P, HU H, et al. Proteomic characteristics of six snake venoms from the Viperidae and Elapidae families in China and their relation to local tissue necrosis[J]. Toxicon, 2023, 235:107317.
- [8] SHAN L L, GAO J F, ZHANG Y X, et al. Proteomic characterization and comparison of venoms from two elapid snakes (*Bungarus multicinctus* and *Naja atra*) from China[J]. Journal of proteomics, 2016, 138: 83-94.
- [9] HUS K K, MARCZAK Ł, PETRILLA V, et al. Different research approaches in unraveling the venom proteome of *Naja ashei*[J]. Biomolecules, 2020, 10(9):1282.
- [10] LIU C C, CHOU Y S, CHEN C Y, et al. Pathogenesis of local necrosis induced by *Naja atra* venom: Assessment of the neutralization ability of Taiwanese freeze-dried neurotoxic antivenom in animal models[J]. PLoS neglected tropical diseases, 2020, 14(2): e0008054.
- [11] HO C H, CHIANG L C, MAO Y C, et al. Analysis of the necrosis-inducing components of the venom of *Naja atra* and assessment of the neutralization ability of freeze-dried antivenom[J]. Toxins (Basel), 2021, 13(9):619.
- [12] EBRAHIM K, SHIRAZI F H, MIRAKABADI A Z, et al. Cobra venom cytotoxins; apoptotic or necrotic agents?[J]. Toxicon, 2015, 108: 134-140.
- [13] YANG S H, CHIEN C M, LU M C, et al. Cardiotoxin III

- induces apoptosis in K562 cells through a mitochondrial-mediated pathway[J]. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*, 2005, 32(7): 515-520.
- [14] TOH T B, CHEN M J, ARMUGAM A, et al. Antioxidants: promising neuroprotection against cardiotoxin-4b-induced cell death which triggers oxidative stress with early calpain activation[J]. *Toxicon*, 2008, 51(6):964-973.
- [15] TEKLEMARIAM T, SEOANE A I, RAMOS C J, et al. Functional analysis of a recombinant PIII-SVMP, GST-acocostatin; an apoptotic inducer of HUVEC and HeLa, but not SK-Mel-28 cells[J]. *Toxicon*, 2011, 57(5): 646-656.
- [16] ACHÊ D C, GOMES M S, DE SOUZA D L, et al. Biochemical properties of a new PI SVMP from *Bothrops pauloensis*: inhibition of cell adhesion and angiogenesis [J]. *International journal of biological macromolecules*, 2015,72: 445-453.
- [17] TEIXEIRA CDE F, FERNANDES C M, ZULIANI J P, et al. Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases[J]. *Memorias do instituto oswaldo cruz*,2005,100(Suppl 1):181-184.
- [18] PIDDE-QUEIROZ G, FURTADO MDE F, FILGUEIRAS C F, et al. Human complement activation and anaphylatoxins generation induced by snake venom toxins from *Bothrops* genus[J]. *Molecular immunology*, 2010, 47(16): 2537-2544.
- [19] LUCHINI L S G, PIDDE G, SQUAIELLA-BAPTISTÃO C C, et al. Complement system inhibition modulates the pro-inflammatory effects of a snake venom metalloproteinase[J]. *Frontiers in immunology*, 2019, 10: 1137.
- [20] DUNN R D, BROADY K W. Snake inhibitors of phospholipase A(2) enzymes[J]. *Biochimica et biophysica acta*, 2001, 1533(1): 29-37.
- [21] MOREIRA V, GUTIÉRREZ J M, SOARES A M, et al. Secretory phospholipases A(2) isolated from *Bothrops asper* and from *Crotalus durissus terrificus* snake venoms induce distinct mechanisms for biosynthesis of prostaglandins E2 and D2 and expression of cyclooxygenases[J]. *Toxicon*, 2008, 52(3): 428-439.
- [22] DEKA A, SHARMA M, SHARMA M, et al. Purification and partial characterization of an anticoagulant PLA(2) from the venom of Indian *Daboia russelii* that induces inflammation through upregulation of proinflammatory mediators[J]. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 2017, 31(10): e21945
- [23] CEDRO R C A, MENALDO D L, COSTA T R, et al. Cytotoxic and inflammatory potential of a phospholipase A (2) from *Bothrops jararaca* snake venom[J]. *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*, 2018, 24: 33.
- [24] TRUMMAL K, SAMEL M, AASPÖLLU A, et al. 5'-Nucleotidase from *Vipera lebetina* venom[J]. *Toxicon*, 2015, 93: 155-163.
- [25] OLIVEIRA I S, PUCCA M B, FERREIRA I G, et al. State-of-the-art review of snake venom phosphodiesterases (svPDEs)[J]. *Toxicon*, 2022, 217: 121-130.
- [26] YAMAZAKI Y, MORITA T. Structure and function of snake venom cysteine-rich secretory proteins[J]. *Toxicon*, 2004, 44(3): 227-231.
- [27] OSIPOV A V, LEVASHOV M Y, TSETLIN V I, et al. Cobra venom contains a pool of cysteine-rich secretory proteins[J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 2005, 328(1): 177-182.
- [28] LECHT S, CHIAVERELLI R A, GERSTENHABER J, et al. Anti-angiogenic activities of snake venom CRISP isolated from *Echis carinatus sochureki*[J]. *Biochimica et biophysica acta*, 2015, 1850(6):1169-1179.

本文引用格式:

肖曼琪, 关哲哲, 胡少聪, 等. 中华眼镜蛇毒致广西巴马小型猪坏死组织渗出液中的蛇毒成分分析[J]. *广西医科大学学报*, 2024, 41(8): 1101-1110. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2024.08.001

XIAO M Q, GUAN Z Z, HU S C, et al. Analysis of the venom components of necrotic tissue exudates from *Naja atra* venom-infected Guangxi Bama miniature pigs [J]. *Journal of Guangxi medical university*, 2024,41(8):1101-1110.DOI:10.16190/j.cnki.45-1211/r.2024.08.001