

刺毒鱼毒素研究进展

张龙霄^{1,2}, 刘珠果², 戴秋云^{2*}

(¹南华大学药物药理研究所, 衡阳 421001; ²军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071)

摘要: 刺毒鱼是具有发达棘刺的有毒鱼类, 其由表皮组织转化而成的毒腺能分泌毒液, 毒液通过棘刺注入猎物体体内, 引起剧痛、痉挛、红肿、呕吐、溶血、心肌麻痹和血压下降等症状。已发现的刺毒鱼毒素主要来自鲉鱼、鲀鱼、江魮、鲈鱼等, 其毒性组分主要为具有溶血活性、酶活性及神经毒性的蛋白质或多肽。目前仅有一种石头鱼(stonefish)抗毒素用于临床。本文就刺毒鱼的种类、毒素生化及药理特征的最新进展作一简要综述。

关键词: 刺毒鱼; 毒素; 生化特征; 毒理

Research progress in toxins of acanthotoxic fishes

ZHANG Longxiao^{1,2}, LIU Zhuguo², DAI Qiuyun^{2*}

(¹Institute of Pharmacy and Pharmacology, University of South China, Hengyang 421001, China;

²Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

Abstract: Acanthotoxic fishes possess developed spines. Their venomous glands around spines, differentiated from epithelial tissues, can produce venoms which are injected into victims through grooves in the spines. The envenomation symptoms include intense pain, spasm, swelling, vomiting, hemolysis, paralysis of myocardium, fall of blood pressure, etc. The reported acanthotoxic toxins have been mainly derived from scorpionfish, catfish, stingray, weever, and belong to hemolytic, enzymatic and neural toxic proteins or peptides. Currently, only one stonefish antivenom is clinically available. In this review, we summarize the recent advance on the categories of acanthotoxic fishes, biochemical and pharmacological features.

Key words: acanthotoxic fishes, toxins, biochemical features, toxicology

据统计, 世界上鱼类有2万多种, 其中有毒鱼类约1100种。根据毒棘(即通常所说的鱼刺)的有无, 可将有毒鱼分为两大类: 刺毒鱼类和毒鱼类^[1]。刺毒鱼类一般生活于浅海, 营底栖生活, 行动都较缓慢, 体态往往与周围环境相似, 不易被发觉, 其毒性装置包括背鳍棘、腹鳍棘、臀鳍棘以及分布于背鳍棘旁的毒腺。当背鳍棘被压迫时, 毒液便会从毒囊中挤压出来, 沿着背鳍棘上的沟槽或沟管注入猎物体体内, 引起中毒。世界上刺毒鱼类约有500余种, 中国约有100余种, 分属10大

类: 虎鲨类、角鲨类、魮类、银鲛类、鲀类、蓝子鱼类、刺尾鱼类、鲭类、鳐鱼类及鲈类等^[2]。

刺毒鱼粗毒液除含有多种具有溶血活性的毒素蛋白质外, 还含有多种酶类及小分子化合物, 如玫瑰毒鲉(*Synanceia verrucosa*)粗毒液具有透明质酸酶(hyaluronidase, HAase)、酯酶(esterase)、氨肽酶(aminopeptidase)等, 粗毒鲉(*Synanceia horrida*)则含有透明质酸酶、碱性磷酸单酯酶(alkaline phosphatase)、5'-核苷酸酶(5'-nucleotidase)、识别精氨酸的酰胺酶(amidase)、蛋白酶等, 二者均含有

收稿日期: 2013-02-23

基金项目: 国家高技术研究发展计划(“863”计划)(2013AA092904); 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)(2010CB529802)

第一作者: 张龙霄(1988-), 男, 硕士生, E-mail: 1034868636@qq.com

*通信作者: 戴秋云(1963-), 男, 博士, 研究员, E-mail: qy_dai@yahoo.com

去甲肾上腺素(norepinephrine)、多巴胺(dopamine)、色氨酸等小分子物质。粗毒液具有心血管毒性、神经毒性和细胞毒性,有的单一毒素表现出与粗毒液相似的综合毒性,如引起毛细血管扩张、水肿、血压下降、心律失常、心脏停搏等心血管毒性,以及剧痛、肌肉无力、痉挛、呕吐、幻觉等神经毒性和溶血(细胞毒性)^[3]。

刺毒鱼对海洋渔业人员、海洋旅游等带来危害。美国每年约有1 500例魮鱼刺伤,300例鲉鱼刺伤,英国每年的鲈鱼科刺伤达几百例,石头鱼刺伤在东南亚地区频繁出现^[4]。目前,仅有一种刺毒

鱼抗毒素上市,为澳大利亚联邦血清学实验室(Commonwealth Serum Laboratories, CSL)开发的石头鱼抗毒素(stonefish antivenom, SFAV)^[5]。虽然人类很早就发现刺毒鱼毒素的毒性,但直至20世纪90年代才开展其毒素基因、蛋白质及药理特性研究,最近刺毒鱼毒素研究日趋活跃。

目前已从多种刺毒鱼(石头鱼、狮子鱼、鲉属、赤鲉、鲉鱼、江魮、鲈鱼等)中分离纯化了毒素蛋白或克隆其基因(表1)^[6-17]。本文就主要刺毒鱼毒素的种类、生化及毒理特性等研究最新进展作一简要综述。

表1 刺毒鱼毒素的来源及生化特征

刺毒鱼	种属	毒素	亚基组成	氨基酸数量	亚基相对分子质量	糖基	GenBank序列号	参考文献
石头鱼	<i>S. horrida</i>	Stonustoxin	α	703	71 000	无	AAC60022.1	[6]
			β	700	79 000		AAC60021.1	
	<i>S. verrucosa</i>	Verrucotoxin	2个 α	708	83 000	有	CAA69254.1	[7]
			2个 β	696	78 000		Q98993.3	
	<i>S. verrucosa</i>	Neoverrucotoxin	α	703	75 000	无	BAF41221.1	[8]
			β	700	80 000		BAF41222.1	
日本鬼鲉	<i>I. japonicus</i>	IjTx	α	703			BAM74457.1	[10]
			β	700			BAM74458.1	
	<i>P. antennata</i>	PaTx	α	699			BAK18812.1	[11]
			β	698			BAK18813.1	
	<i>P. volitans</i>	PvTx	α	699			BAK18814.1	[10]
			β	698			BAK18815.1	
狮子鱼属	<i>P. lunulata</i>	PlTx	α	699			BAM74455.1	[10]
			β	698			BAM74456.1	
赤鲉	<i>H. rubripinnis</i>	HrTx	α	704			BAM74459.1	[10]
			β	698			BAM74460.1	
		Karatoxin	单亚基		110 000	有		[12]
鲉属	<i>S. plumieri</i>	Sp-CTx	2个相同的亚基		65 000	有		[13]
鲉鱼	<i>P. lineatus</i>	PlTx-I	单亚基	317	35 000	无	BAK19070.1	[14]
	<i>P. lineatus</i>	PlTx-II	单亚基	315	37 000	无	BAK19071.1	
江魮	<i>P. orbignyi</i>	Orpotrin	无亚基	9	1 000	无	P85159.1	[15]
	<i>P. orbignyi</i>	Porflan	无亚基	18	2 000	无	P86295.1	[16]
鲈鱼	<i>T. draco</i>	Dracotoxin	单亚基		105 000			[17]

1 鲉鱼毒素

鲉鱼属于辐鳍鱼纲(Actinopterygii)鲉形目(Scorpaeniformes)鲉科(Scorpaenidae),该科在全世界有1270余种^[18]。目前已从石头鱼属(*Synanceia*)的粗毒鲉、玫瑰毒鲉、*S. trachynis*中发现了4种毒素,鬼鲉属(*Inimicus*)的日本鬼鲉(*I. japonicus*)中发现了1种毒素,狮子鱼属(*Pterois*)的触角蓑鲉(*P. antennata*)、魔鬼蓑鲉(*P. volitans*)和龙须蓑鲉(*P. lunulata*)发现了3种毒素,鲉属(*Scorpaena*)的普氏鲉(*S. plumieri*)发现了2种毒素,赤鲉属(*Hypodytes*)的红鳍赤鲉(*H. rubripinnis*)中发现了2种毒素。

1.1 石头鱼毒素

Stonustoxin (SNTX),由 α 、 β 两个亚基组成,分别含有703与700个氨基酸残基,等电点为6.9,晶体结构呈四角形,但其准确结构并未确定^[19]。SNTX具有多种生物活性,包括抑制神经肌肉接头功能、增强血管通透性、强烈的溶血作用、促进血小板凝集、引发水肿等,对小鼠的半数致死量LD₅₀为17 ng/g(静脉注射)^[20]。其表面的色氨酸残基是溶血作用的必需基团,协助SNTX在红细胞上打孔^[21]。SNTX还通过L-精氨酸—一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)信号转导途径使血管舒张,硫化氢与一氧化氮两种第二信使发挥了协同作用,从而使血压急剧下降^[6,20]。目前已制备SNTX抗体,发现有些能够中和其致死性的抗体不能中和其溶血性,表明SNTX不同生物活性所对应的结构域不同^[22]。

Verrucotoxin (VTX),为高相对分子质量糖蛋白,由两个 α (相对分子质量83 000)和两个 β (相对分子质量78 000)亚基组成。 β 亚基与SNTX的 β 亚基具有相同的N末端,且具有96%的同源性。VTX对小鼠的半数致死量LD₅₀为40 ng/g(静脉注射),还能裂解兔红细胞和降低大鼠动脉血压。在青蛙心房肌肉模型上,VTX不仅可以通过 β -肾上腺素受体-cAMP-PKA信号转导途径,激活蛋白激酶A(protein kinase A, PKA),使钙通道蛋白磷酸化,钙离子内流^[7]。VTX还可以通过激活毒蕈碱受体M₃(muscarinic acetylcholine receptor M3)抑制对ATP敏感的钾离子通道(ATP-sensitive potassium channel, K_{ATP}),使得K_{ATP}无法抑制钙离子过度内流,从而使心肌细胞内钙离子浓度进一步增大,从而导致心

律失常、加剧心肌缺血,促使心血管系统崩溃^[23]。

Neoverrucotoxin (neoVTX),由 α 、 β 两个亚基组成,分别含有703与700个氨基酸残基,neoVTX的 α 和 β 亚基与SNTX的 α 和 β 亚基分别具有高达87%和95%的同源性。neoVTX的 β 亚基与VTX的 β 亚基同源性为90%。neoVTX也具有溶血活性和致死性,对小鼠的半数致死量LD₅₀为47 ng/g(静脉注射),其溶血活性可以被阴离子脂类抑制,心磷脂(cardiolipin)的抑制作用尤其强烈^[8]。

Trachynilysin (TYL),目前还没有测定出全部序列,具有溶血活性、致死性及增加血管通透性的作用^[24]。TYL介导了可溶性N-乙基顺丁烯二酰亚胺敏感型融合蛋白结合蛋白受体(soluble N-ethylmaleimide sensitive fusion protein attachment protein receptor, SNARE)依赖的儿茶酚胺(catecholamine)在嗜铬细胞中的释放^[25],还增加了乙酰胆碱在神经肌肉接头的运动神经末梢及心房胆碱能神经末梢的释放^[26]。膜片钳技术研究结果显示,TYL是通过插入细胞膜形成离子孔道的方式,实现在未分化的神经母细胞瘤与胶质瘤的杂交系NG108-15上打孔,导致溶血^[27]。

从已鉴定出序列的3种毒素SNTX、VTX、neoVTX的特征来看,这些石头鱼毒素具有较高的序列同源性,尤其是 β 亚基,功能上也高度类似,均具有致死性、溶血活性。

1.2 狮子鱼(lionfish)、日本鬼鲉和红鳍赤鲉毒素

Kiriake等^[10,11]根据石头鱼毒素的氨基酸序列设计简并引物,从触角蓑鲉、魔鬼蓑鲉、龙须蓑鲉、日本鬼鲉和红鳍赤鲉中钓取了10段cDNA,并推导出所对应的毒素PaTx、PvTx、PlTx、IjTx和HrTx的亚基序列。PaTx、PvTx、PlTx的 α 、 β 亚基均分别含有699和698个氨基酸残基,IjTx的 α 、 β 亚基分别含有703和700个氨基酸残基,HrTx的 α 、 β 亚基则分别含有704和698个氨基酸残基。

从红鳍赤鲉中分离到的趋化性凝集素Karatoxin可以使兔红细胞发生凝集,该凝集作用可以被D-甘露糖抑制。Karatoxin不仅对鼠的脾脏细胞表现出有丝分裂原的作用,还使豚鼠的中性粒细胞和巨噬细胞表现趋化作用^[12]。

1.3 普氏鲉毒素

粗毒液具有致痛、致水肿、降低血压、降低心率和呼吸频率、溶血、致出血的作用。目前已

分离的毒素Sp-CTx具有强溶血活性、舒张血管和降低血压的作用^[28]。其血管舒张作用可以被内皮一氧化氮合酶抑制剂消除,提示一氧化氮参与了其信号转导途径^[13]。

2 鲶鱼 (catfish) 毒素

鲶鱼属于辐鳍鱼纲鲶形目(Siluriformes),其口部具有触须,皮肤表面没有真正的鱼鳞。值得注意的是,某些鲶鱼毒素不仅存在于毒腺中,还存在于皮肤粘液中。目前已从线纹鳗鲶(*Plotosus lineatus*)的皮肤粘液中分离到pltx-I和pltx-II,二者序列具有高达86%的同源性,等电点分别为6.5和5.1,都有致死、引发水肿和致疼痛作用,pltx-I的作用更强^[14]。

3 江魮毒素

江魮属于软骨鱼纲(Chondrichth)有板鳃类总目(Elasmobranchii)燕魮目(Myliobatiformes)江魮科(Potamotrygonidae)。目前已从奥氏江魮(*Potamotrygon orbignyi*)中发现了两种多肽类毒素Orpotrin和Porflan。Orpotrin氨基酸残基序列为HGGYKPTDK,与肌酸激酶的97-105位残基具有同源性,推测其可能是肌酸激酶的蛋白水解产物,Orpotrin具有强烈的收缩血管的作用^[15]。Porflan氨基酸残基序列为ESIVRPPVVEAKVEETPE,与已发现的多肽无同源性。Porflan可与细胞膜磷脂相互作用,表明该类毒素是一类新的鱼类毒素,与江魮毒素的诱导过敏反应的作用有紧密关系^[16]。

4 鲈鱼毒素

鲈鱼属于鲈形目(Perciformes)鲈亚目(Trachinoidei)鲈鱼科(Trachinidae)。目前仅在大龙魮(*Trachinus draco*)中分离到一种毒素Dracotoxin,可以溶解兔红细胞。将Dracotoxin与兔形骸细胞预混,或与血型糖蛋白预混都会减弱其溶血活性,Dracotoxin甚至可以在4℃发挥溶血作用,但不与胆固醇相互作用^[17]。

5 结语

目前已鉴定的刺毒鱼毒素,除了Karatoxin为凝集素外,均具有相似的药理学作用,如溶血性、致死性,有些还具有神经毒性。溶血作用是

毒素在红细胞膜上穿孔所致,比如SNTX可以在红细胞膜上打出直径约为3.2 nm的孔^[29],这一点与蛇毒素的溶血活性有明显不同,蛇毒素的溶血活性主要依赖磷脂酶A₂ (phospholipase A₂, PLA₂)的水解细胞膜磷脂作用^[30]。致死性的主要原因在于其降血压作用,毒素通过L-精氨酸—一氧化氮合酶信号转导途径使血管舒张,导致血压下降^[29];SNTX、VTX、TLY均具有神经毒性,作用机理可能是阻断神经肌肉接头的功能、激活β肾上腺素受体、M₃毒蕈碱受体,促进儿茶酚胺类、胆碱类神经递质的释放等。来源于亲缘关系较近的刺毒鱼毒素具有高度保守的氨基酸残基序列,如石头鱼的各种毒素和鲶鱼的各种毒素,均具有较高的相似性,有些毒素还伴有复杂的糖基化修饰。

目前,国内外对刺毒鱼毒素研究较少,靶点不太清楚,发现的有毒成分不多,一些已发现的毒素未鉴定出序列,糖基化修饰方式不清楚。随着基因组学、蛋白质组学、糖生物学和药理学新技术的发展,将有更多的毒素得到分离、鉴定及靶点确认。刺毒鱼毒素的毒性多样性及新颖性为复杂毒理研究提供了模板,其结构的进一步改造可能为生命科学提供很好的研究工具。

参 考 文 献

- [1] 伍汉霖. 中国有毒及药用鱼类新志. 北京: 中国农业出版社, 2002: 2-3
- [2] 廖永岩, 徐安龙, 卫剑文, 等. 中国蛋白、肽类毒素海洋动物名录及其分布. 中国海洋药物, 2001, 5: 47-57
- [3] Church JE, Hodgson WC. The pharmacological activity of fish venoms. *Toxicon*, 2002, 40: 1083-1093
- [4] Warrell DA. Venomous bites, stings, and poisoning. *Infect Dis Clin N Am*, 2012, 26: 207-223
- [5] Church JE, Hodgson WC. Stonefish (*Synanceia trachynis*) antivenom: *in vitro* efficacy and clinical use. *J Toxicol Toxin Rev*, 2003, 22: 69-76
- [6] Liew HC, Khoo HE, Moore PK, *et al.* Synergism between hydrogen sulfide (H₂S) and nitric oxide (NO) in vasorelaxation induced by stonustoxin (SNTX), a lethal and hypotensive protein factor isolated from stonefish *Synanceja horrida* venom. *Life Sci*, 2007, 80: 1664-1668
- [7] Yazawa K, Wang JW, Hao LY, *et al.* Verrucotoxin, a stonefish venom, modulates calcium channel activity in guinea-pig ventricular myocytes. *Br J Pharmacol*, 2007, 151: 1198-1203

- [8] Ueda A, Suzuki M, Honma T, *et al.* Purification, properties and cDNA cloning of neoverrucotoxin (neoVTX), a hemolytic lethal factor from the stonefish *Synanceia verrucosa* venom. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1760: 1713-1722
- [9] Colasante C, Meunier FA, Kreger AS, *et al.* Selective depletion of clear synaptic vesicles and enhanced quantal transmitter release at frog motor nerve endings produced by trachynilysin, a protein toxin isolated from stonefish (*Synanceia trachynis*) venom. *Eur J Neurosci*, 1996, 8: 2149-2156
- [10] Kiriake A, Suzuki Y, Nagashima Y, *et al.* Proteinaceous toxins from three species of scorpaeniform fish (lionfish *Pterois lunulata*, devil stinger *Inimicus japonicus* and waspfish *Hypodytes rubripinnis*): close similarity in properties and primary structures to stonefish toxins. *Toxicon*, 2013, 70: 184-193
- [11] Kiriake A, Shiomi K. Some properties and cDNA cloning of proteinaceous toxins from two species of lionfish (*Pterois antennata* and *Pterois volitans*). *Toxicon*, 2011, 58: 494-501
- [12] Shinohara M, Nagasaka K, Nakagawa H, *et al.* A novel chemoattractant lectin, karatoxin, from the dorsal spines of the small scorpionfish *Hypodytes rubripinnis*. *J Pharmacol Sci*, 2010, 113: 414-417
- [13] Andrich F, Carnielli JB, Cassoli JS, *et al.* A potent vasoactive cytolytic isolated from *Scorpaena plumieri* scorpionfish venom. *Toxicon*, 2010, 56: 487-496
- [14] Tamura S, Yamakawa M, Shiomi K. Purification, characterization and cDNA cloning of two natterin-like toxins from the skin secretion of oriental catfish *Plotosus lineatus*. *Toxicon*, 2011, 58: 430-438
- [15] Conceição K, Konno K, Melo RL, *et al.* Orpotrin: a novel vasoconstrictor peptide from the venom of the Brazilian stingray *Potamotrygon* gr. *orbignyi*. *Peptides*, 2006, 27: 3039-3046
- [16] Conceição K, Santos JM, Bruni F M, *et al.* Characterization of a new bioactive peptide from *Potamotrygon* gr. *orbignyi* freshwater stingray venom. *Peptides*, 2009, 30: 2191-2199
- [17] Chhatwal I, Dreyer F. Isolation and characterization of Dracotoxin from the venom of the greater weever fish *Trachinus draco*. *Toxicon*, 1992, 30: 87-93
- [18] Haddad V Jr, Martins IA, Makyama HM. Injuries caused by scorpionfishes (*Scorpaena plumieri* Bloch, 1789 and *Scorpaena brasiliensis* Cuvier, 1829) in the Southwestern Atlantic Ocean (Brazilian coast): epidemiologic, clinic and therapeutic aspects of 23 stings in humans. *Toxicon*, 2003, 42: 79-83
- [19] Yew WS, Kolatkar PR, Kuhn P, *et al.* Crystallization and preliminary crystallographic study of stonustoxin, a protein lethal factor isolated from the stonefish (*Synanceja horrida*) venom. *J Struct Biol*, 1999, 128: 216-218
- [20] Low KS, Gwee MC, Yuen R, *et al.* Stonustoxin: a highly potent endothelium-dependent vasorelaxant in the rat. *Toxicon*, 1993, 31: 1471-1478
- [21] Yew WS, Khoo HE. The role of tryptophan residues in the hemolytic activity of stonustoxin, a lethal factor from stonefish (*Synanceja horrida*) venom. *Biochimie*, 2000, 82: 251-257
- [22] Yuen R, Cai B, Khoo HE. Production and characterization of monoclonal antibodies against stonustoxin from *Synanceja horrida*. *Toxicon*, 1995, 33: 1557-1564
- [23] Wang JW, Yazawa K, Hao LY, *et al.* Verrucotoxin inhibits KATP channels in cardiac myocytes through a muscarinic M3 receptor- PKC pathway. *Eur J Pharmacol*, 2007, 563: 172-179
- [24] Kreger AS. Detection of a cytolytic toxin in the venom of the stonefish (*Synanceia trachynis*). *Toxicon*, 1991, 29: 733-743
- [25] Sauviat MP, Meunier FA, Kreger A, *et al.* Effects of trachynilysin, a protein isolated from stonefish (*Synanceia trachynis*) venom, on frog atrial heart muscle. *Toxicon*, 2000, 38: 945-959
- [26] Meunier FA, Mattei C, Chameau P, *et al.* Trachynilysin mediates SNARE-dependent release of catecholamines from chromaffin cells via external and stored Ca^{2+} . *J Cell Sci*, 2000, 113: 1119-1125
- [27] Ouanounou G, Malo M, Stinnakre J. Trachynilysin, a neurosecretory protein isolated from stonefish (*Synanceia trachynis*) venom, forms nonselective pores in the membrane of NG108-15 cells. *J Biol Chem*, 2002, 277: 39119-39127
- [28] Gomes HL, Menezes TN, Carnielli JB, *et al.* Stonefish antivenom neutralises the inflammatory and cardiovascular effects induced by scorpionfish *Scorpaena plumieri* venom. *Toxicon*, 2011, 57: 992-999
- [29] Khoo HE. Bioactive proteins from stonefish venom. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2002, 29: 802-806
- [30] Fry BG, Casewell NR, Wüster W, *et al.* The structural and functional diversification of the Toxicofera reptile venom system. *Toxicon*, 2012, 60: 434-448