

胰蛋白酶处理眼镜蛇科蛇毒中毒的实验研究

熊郁良 邹如金 侯意帝
刘次全 周瑾良 李靖炎*

(云南省动物研究所)

摘 要

在农业生产和野外工作中常可遇到毒蛇咬伤,对劳动人民健康有很大危害。对蛇伤的治疗,本文提出了一种新的局部注射胰蛋白酶的有效方法。实验表明,在给小鼠和狗皮下注射致死量的眼镜蛇科蛇毒以后,15分钟内局部注射胰蛋白酶,实验动物全都存活下来,且不致出现全身性的中毒症状。在注毒20—50分钟后给酶,也可以有50—90%的小鼠免于死亡。即使在蛇咬后已经过相当长的时间,注射胰蛋白酶也可以破坏咬伤部位组织中积存的蛇毒。胰蛋白酶的制造比较容易,保存也不需要特殊的条件,并可装在随身携带的急救自动注射器中,因此用胰蛋白酶比用抗蛇毒血清治疗的优点要多。

毒蛇蛇毒中的毒性成分是蛋白质,因此可能为蛋白酶类所分解。当蛇毒注入人、畜体内以后,如在注射部位注入蛋白酶,从理论上来说,应该有可能把毒液中的毒性蛋白加以分解,而使人、畜免于中毒。

胰蛋白酶是强有力的蛋白水解酶,且长期以来就已经应用于临床,用以治疗各种炎症和清创^[1]。在生物化学的研究中,也曾有人用以分解蛇毒蛋白,但尚未见到有用以治疗蛇伤的报道。

从1971年冬开始,我们在这方面作了一系列实验。本文总结了我们以胰蛋白酶处理眼镜蛇科蛇毒中毒方面所得到的主要结果。

一、实验材料与方法

蛇毒:眼镜蛇(*Naja naja*)蛇毒为中山医学院和广西医学院提供,金环蛇(*Bungarus fasciatus*)蛇毒、银环蛇(*B. multicinctus*)蛇毒、眼镜王蛇(*Ophiophagus hannah*)蛇毒为广西医学院提供。胰蛋白酶为上海生物化学研究所研制的注射用结晶胰蛋白酶(羊胰蛋白酶),每安瓿含750单位,另一种为西德E. Merck厂出品(非精制品),出厂时间已在10年以上。小白鼠为本所饲养繁殖,体重18—22克。实验狗购自云南农村,体重10公斤左右。

小白鼠皮下注射实验(系按蛇药实验治疗初筛常规进行):于小白鼠鼠蹊部注射溶于0.1或0.2毫升蒸馏水中的致死量蛇毒——眼镜蛇毒为40微克或50微克,金环蛇毒为160微克,

本文1974年5月20日收到。

* 杨大同、匡溥人同志以及四川省生物研究所费樑、江跃明同志曾参加本研究工作。

银环蛇毒为 20 微克,眼镜王蛇毒为 25 微克。注毒后随即或间隔一定时间,于注毒部位皮下注射胰蛋白酶溶液,剂量见实验结果。对照组在注毒后不给酶,也不注射其它溶液。

小白鼠肌肉注射实验:于小白鼠臀部肌肉中注入溶于 0.2 毫升蒸馏水中的眼镜蛇毒 33 微克或 36 微克,随后在注毒部位肌肉中注射胰蛋白酶溶液。对照组在注毒后不给酶,也不注射其它溶液。注毒后观察 24 小时内的死亡结果。

狗的实验:在狗的后肢踝关节上方皮下注射全数致死量的眼镜蛇毒(每公斤体重给毒 0.9 毫克),随即在离注毒部位 1—2 厘米处注射结晶胰蛋白酶溶液 3 毫升(每毫升含结晶胰蛋白酶 1000 单位)和 E. Merck 厂的非精制胰蛋白酶粉混悬液 3 毫升(每毫升含酶粉 0.17 克),对照组于注毒部位注射蒸馏水 3 毫升。观察 24 小时内狗的死亡结果。

二、实验结果

我们的工作结果表明,在给小白鼠皮下注射致死量蛇毒以后,立即在该部位注射结晶羊胰蛋白酶溶液,对于眼镜蛇科的四种毒蛇的蛇毒中毒动物都有明显的疗效,实验组动物全数存活,对照组动物在 1 至 3 小时内除个别的以外都死亡(表 1)。

表 1 小白鼠皮下注射眼镜蛇科蛇毒后立即注射胰蛋白酶的结果

蛇毒种类	注 毒 量	用 酶 量	实验次数	实 验 组			对 照 组		
				动物数 (只)	死亡数 (只)	死亡率 (%)	动物数 (只)	死亡数 (只)	死亡率 (%)
眼镜蛇毒	40微克/0.2毫升	113单位/0.3毫升	4	50	0	0	50	50	100
眼镜王蛇毒	25微克/0.1毫升	71单位/0.1毫升	3	60	0	0	60	58	97
金环蛇毒	160微克/0.1毫升	160单位/0.2毫升	1	10	0	0	10	10	100
银环蛇毒	20微克/0.1毫升	50—142单位/0.1毫升	4	65	0	0	65	65	100

为了进一步探索胰蛋白酶对治疗蛇伤的价值,又以结晶胰蛋白酶和非精制的胰蛋白酶粉用狗作了实验,每只狗注毒剂量为眼镜蛇每公斤体重 0.9 毫克,每只实验狗伤口局部封闭注射酶溶液 3 毫升,计结晶胰蛋白酶 3000 单位或酶粉 0.51 克,对照组每只狗则注射蒸馏水 3 毫升。对照组在 3—4 小时内全数死亡。实验组在注射结晶胰蛋白酶的 6 只狗全数存活,未见明显全身症状,当日即可进食,在注射非精制酶粉的 9 只狗中仅死去 1 只,8 只存活狗中,除 1 只狗有明显的全身中毒症状外,其余均未出现明显的全身中毒症状,所有存活狗当天即可进食。

除皮下注射实验外,又作了肌肉注射,实验结果见表 2。

表 2 小白鼠肌肉注射眼镜蛇毒后立即注射胰蛋白酶的结果

注 毒 量	用 酶 量	实验次数	实 验 组			对 照 组		
			动物数 (只)	死亡数 (只)	死亡率 (%)	动物数 (只)	死亡数 (只)	死亡率 (%)
33—36 微克/0.2 毫升	50 单位/0.2 毫升	4	60	8	13.3	60	59	98.3

蛇伤的治疗最好是在被咬后立即用药,但这点往往不能做到,在病人得到治疗以前,一般总要延误相当长的时间。为此我们进行了在给动物注射蛇毒后,推迟给酶时间的实验,结果证

明在给小白鼠注毒后隔 10 分钟再给酶,仍然有效(表 3)。

表 3 小白鼠皮下注射蛇毒后 10 分钟注射胰蛋白酶的结果

蛇毒种类	注 毒 量	用 酶 量	实验次数	实 验 组			对 照 组		
				动物数 (只)	死亡数 (只)	死亡率 (%)	动物数 (只)	死亡数 (只)	死亡率 (%)
眼镜蛇毒	50 微克/0.1 毫升	130 单位/0.2 毫升	1	20	0	0	20	17	85
眼镜蛇毒	50 微克/0.1 毫升	90 单位/0.2 毫升	1	20	0	0	20	17	85
眼镜王蛇毒	25 微克/0.1 毫升	71 单位/0.1 毫升	2	40	3	7.5	40	38	95
眼镜王蛇毒	25 微克/0.1 毫升	142 单位/0.1 毫升	1	20	1	5	20	19	95
金环蛇毒	160 微克/0.1 毫升	71 单位/0.1 毫升	2	50	16	32	50	49	98
金环蛇毒	160 微克/0.1 毫升	180 单位/0.2 毫升	1	20	6	30	20	20	100
银环蛇毒	20 微克/0.1 毫升	140 单位/0.1 毫升	1	16	4	25	16	16	100

在实验过程中,我们发现动物的存活率与给酶剂量有关(表 4)。

表 4 小白鼠皮下注射金环蛇毒后立即注射不同剂量胰蛋白酶的结果

蛇毒种类	注 毒 量	用 酶 量	实验次数	实 验 组			对 照 组		
				动物数 (只)	死亡数 (只)	死亡率 (%)	动物数 (只)	死亡数 (只)	死亡率 (%)
金环蛇毒	160 微克/0.1 毫升	71 单位/0.1 毫升	3	60	8	13.3	60	59	98.3
金环蛇毒	160 微克/0.1 毫升	160 单位/0.2 毫升	1	10	0	0	10	10	100

在推迟给酶时间的实验中,在给小白鼠眼镜王蛇蛇毒 25 微克后,过 10 分钟给胰蛋白酶 142 单位,动物可存活 95%,但如只给 71 单位则存活 92.5%(对照组存活 5%)。为了确定用

表 5 小白鼠皮下注射银环蛇毒后 10 分钟注射胰蛋白酶的结果

组 别	给 毒 量	用 酶 量	实验次数	动物数(只)	存活数(只)	存活率(%)
对照组 1	20 微克/0.2 毫升		2	40	0	0
对照组 2	20 微克/0.1 毫升		3	70	0	0
实验组 1	20 微克/0.1 毫升	50 单位/0.2 毫升	1	25	2	8
实验组 2	20 微克/0.1 毫升	71 单位/0.1 毫升	1	40	9	22.5
实验组 3	20 微克/0.2 毫升	100 单位/0.1 毫升	1	20	10	50
实验组 4	20 微克/0.1 毫升	142 单位/0.1 毫升	1	16	12	75

表 6 小白鼠皮下注射眼镜蛇毒 10 分钟后注射不同剂量的胰蛋白酶的结果

组 别	给 毒 量	用 酶 量	实验次数	动物数(只)	存活数(只)	存活率(%)
1	50 微克/0.2 毫升	140 单位/0.2 毫升	1	20	20	100
2	“	120 单位/0.2 毫升	1	20	20	100
3	“	119 单位/0.2 毫升	1	20	20	100
4	“	93.9 单位/0.2 毫升	1	20	20	100
5	“	89.3 单位/0.2 毫升	1	20	20	100
6	“	71 单位/0.2 毫升	1	20	18	90
7	“	53 单位/0.2 毫升	1	20	17	85
8	“	对 照 组	1	20	3	15

酶量与存活率之间的关系是否有一定规律,进行了改变用酶量的实验。结果表明,在一定范围内用酶量越大,存活率就越高(表 5, 6;图 1, 2)。

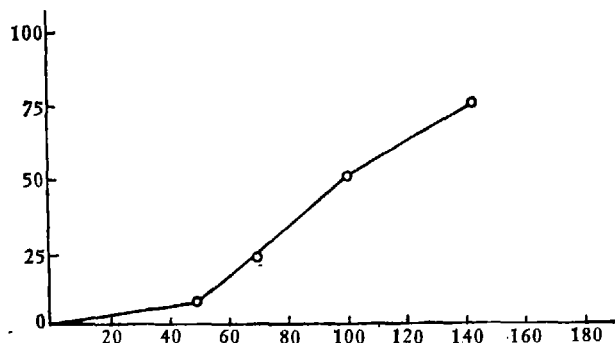


图 1 小白鼠皮下注射银环蛇毒 10 分钟后用酶量与存活率的关系

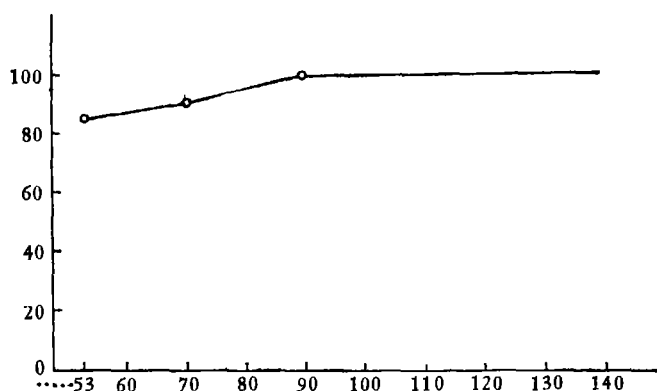


图 2 小白鼠皮下注射眼镜蛇毒 10 分钟后用酶量与存活率的关系

在得出以上结果以后,我们又进行了关于推迟给酶时间的最长有效时间的研究。结果表明,在给小白鼠全数致死量的眼镜蛇蛇毒以后,过 15 分钟再注射 100 单位注射用结晶胰蛋白酶,小白鼠可全部存活,过 20—30 分钟再注射结晶胰蛋白酶则存活 70—90%。过了 35 分至 50 分钟再注射时,存活 50—60%,见表 7。

表 7 小白鼠皮下注射眼镜蛇毒后不同时间内注射胰蛋白酶的结果

组 别	注 毒 量	用 酶 量	动 物 数 (只)	死 亡 数 (只)	存 活 率 (%)
对 照 组	50 微克/0.1 毫升		10	10	0
注毒后 10 分钟注酶	”	100 单位/0.2 毫升	10	0	100
” 15 ”	”	”	20	0	100
” 20 ”	”	”	20	5	75
” 25 ”	”	”	10	1	90
” 30 ”	”	”	10	3	70
” 35 ”	”	”	10	5	50
” 40 ”	”	”	10	4	60
” 50 ”	”	”	10	5	50

为了给应用胰蛋白酶于临床时作参考,用小白鼠进行了胰蛋白酶分解眼镜蛇毒最低有效量的测定实验。取小白鼠全数致死量的眼镜蛇毒 50 微克,置试管中再加结晶胰蛋白酶溶液(表 8),摇匀后立即作小白鼠鼠蹊部皮下注射。结果表明,15 单位的胰蛋白酶,即可使 50 微克眼镜蛇毒失去毒力,而使实验动物全数存活;10 单位则动物存活 83.4%,5 单位则存活 15%(表 8)。

表 8 眼镜蛇毒与胰蛋白酶溶液混合后立即给小白鼠皮下注射的结果

组 别	蛇毒+酶	实验次数	动物数(只)	死亡数(只)	死亡率(%)
1	50 微克/0.1 毫升+117 单位/0.2 毫升	2	20	0	0
2	50 微克/0.1 毫升+ 90 单位/0.2 毫升	1	10	0	0
3	50 微克/0.1 毫升+ 70 单位/0.2 毫升	1	10	0	0
4	50 微克/0.1 毫升+ 50 单位/0.2 毫升	2	20	0	0
5	50 微克/0.1 毫升+ 30 单位/0.2 毫升	1	10	0	0
6	50 微克/0.1 毫升+ 15 单位/0.2 毫升	3	30	0	0
7	50 微克/0.1 毫升+ 10 单位/0.2 毫升	3	30	5	16.6
8	50 微克/0.1 毫升+ 5 单位/0.2 毫升	2	20	17	85

三、讨 论

目前治疗蛇伤的口服药物一般用量较大,疗效较慢,需经消化、吸收后方能起到治疗效果,因此治疗所需时间较长,对备战及野外工作人员急救、携带等方面存在一定缺点。而抗蛇毒血清具有它的优越性,它可以针对蛇毒起中和作用,而且是用注射的方法直接注入体内,可以立即起作用,疗效较快。但利用抗蛇毒血清相应地也存在一些缺点:(1)专特性高,不符合“广谱”的要求;(2)往往引起剧烈的过敏反应,以致国外有些人甚至主张病人没有出现明显的广泛系统性中毒症状时,就不要使用抗蛇毒血清^[2];(3)大量生产有一定的困难;(4)血清的保存要求低温。

在咬伤部位注射胰蛋白酶的方法,可以认为是治疗蛇伤的一条较好的途径,与抗蛇毒血清相似,它可以对蛇毒中毒的毒性成分直接起作用,注入体内,可以立即见效。与抗蛇毒血清相比,优点首先是“高效、速效、广谱”,从分子作用原理上来说,胰蛋白酶可以分解赖氨酸及精氨酸的羧基,与其它氨基酸的氨基所形成的肽链。而赖氨酸与精氨酸这两种碱性氨基酸在蛋白质类中的分布是广泛的,这就使我们可以推测,胰蛋白酶有可能使蛇毒中的毒性蛋白失效,特别是那些在毒性中心部分含有较多的碱性氨基酸的种类。从这个角度来看,胰蛋白酶对眼镜蛇、眼镜王蛇、银环蛇、金环蛇蛇伤有高度疗效是可以理解的。眼镜蛇、海蛇毒素等许多神经毒蛋白的毒性中心都不止含一个精氨酸^[3]。根据我们另外的实验工作,说明注射胰蛋白酶的方法,对于蝮蛇科蛇伤也有明显的效果。

从副作用来看,胰蛋白酶也比抗蛇毒血清优越得多。胰蛋白酶早已被用来治疗炎症和清创。在作皮下或肌肉注射时,没有大的副作用(不能静脉注射),一般只会在注射部位引起疼痛,有时会引起皮疹^[1]。在我们的实验中,在注毒并注胰蛋白酶的局部范围会出现溃斑,但是 2—3 天就可痊愈(注射眼镜蛇毒后不注胰蛋白酶也会有溃斑)。

从生产制造与保存上来看,胰蛋白酶生产比较容易,它的保存也不需要什么特殊的条件。

根据我们的工作,已经出厂十几年的胰蛋白酶粉(非精制品),未经任何特殊的保存,在实验中还是有效。与此直接相关的是胰蛋白酶很容易制成可供随身携带的急救注射针剂,可供蛇伤严重地区的劳动人民在被毒蛇咬伤之后立即使用。这是抗蛇毒血清现在还达不到的。

从动物实验的效果上来看,胰蛋白酶高于现今所使用的几种口服蛇药,而可以跟抗蛇毒血清相比。

与抗蛇毒血清相同,胰蛋白酶也是使用得越早,效果越好。根据上海生物制品研究所和浙江医科大学有关蛇类研究资料的报道,在给家兔注射全数致死量的蝮蛇蛇毒后,过15分钟注射抗蝮蛇蛇毒血清可使动物全数存活。在给小白鼠皮下注射全数致死量的眼镜蛇毒后15分钟注射胰蛋白酶,也可得到同样的结果。在注毒后20至30分钟才给胰蛋白酶则可存活70—90%。但是从给酶量与存活率之间的关系上来看,如果加大酶的剂量,成活率也会随之提高。此外,既然用药越早越好,制成随身携带的急救注射针剂,胰蛋白酶的使用肯定比抗蛇毒血清的使用在时间上要早得多。至少在目前要把抗蛇毒血清制成随身携带的急救注射针剂,还是不易做到的。

从狗的实验结果来看,如果人在被毒蛇咬伤后立即在咬伤部位注射胰蛋白酶,是有可能根本不出出现明显的全身中毒症状的。

胰蛋白酶不仅可供咬伤后的急救,从我们所作的另一实验来看,注射胰蛋白酶还应成为处理蛇伤的一项重要措施。在给小白鼠注射五步蛇毒后5小时,从注毒部位的组织液中仍可检视出有五步蛇毒成分的存在。国外报道,有一人被虎蛇 *Notechis Scutatus* 咬伤,第四天死亡后尸检时,将咬伤部位的组织提取液,给豚鼠皮下注射,结果豚鼠麻痹死亡^[4]。这些事实表明人和动物被毒蛇咬伤后,在相当长的时间内,被咬部位的组织液中,还积存着一定分量的蛇毒的有效成分,形成一种毒素“仓库”,毒性成分由此不断地向全身各部扩散。从这一点来看,在被咬部位注射胰蛋白酶来清除这种“毒库”,即使在被咬伤后相当长的时间里也仍然是有意义的。在咬伤部位注射胰蛋白酶,看来应被当作一种必要的常规措施。

用胰蛋白酶治疗蛇伤也有其局限性。从理论上来分析,对于那些已经扩散开来的毒蛋白分子,胰蛋白酶由于缺乏专特的亲和力而不能追踪它们加以分解。对于毒蛋白分子,具有高度专特性的抗体蛋白或者能够起到作用。但是对于那些已经遭到损伤的脏器,其正常机能的恢复在治疗上,抗蛇毒血清与胰蛋白酶一样起不了什么作用^[5],这时各种口服蛇药可能起到促使有关脏器恢复正常机能的作用。由此看来,在人被毒蛇咬伤而未能立即注射胰蛋白酶的情况下,在后来注射胰蛋白酶时,同时服用口服蛇药效果应该更好。

根据我们的实验,胰蛋白酶可作为蛇伤治疗药物。在临床上也是较好的途径。特别是用于早期治疗将是一条新的途径。

参 考 资 料

- [1] Clifton, E. E., 临床酶学, 人民卫生出版社, 1965, 199—245.
- [2] Davidson, R. A., *Br. Med. J.*, 4(1970), 660.
- [3] Lee, C.-Y., *Snake Venoms and Envenomation*, Marcel Dekker Inc., New York, 1971, 111—126.
- [4] Trethewie, E. R., *Snake Venoms and Envenomation*, Marcel Dekker Inc., New York, 1971, 99—109.
- [5] Russell, F. E. & Puffer, H. W., *Snake Venoms & Envenomation*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1971, 87—93.