

文章编号: 1007-7847(2000)S0-0001-09

蜘蛛多肽神经毒素研究新进展*

黄仁槐, 梁宋平

(湖南师范大学 生命科学学院, 中国湖南 长沙 410081)

摘要: 对近年来蜘蛛肽类神经毒素结构与功能研究的新进展作了概述. 在蜘蛛毒液中发现含有丰富的肽类神经毒素. 至今已有近100种蜘蛛神经毒素的一级结构被测定, 除黑寡妇蜘蛛毒素为高分子量毒素外, 其它蜘蛛神经毒素的相对分子质量在 $3 \times 10^3 \sim 12 \times 10^3$ 之间, 不同种属来源的毒素同源性很小, 序列中含有较多的半胱氨酸. 这些毒素功能多样, 可与细胞膜上的 Na^+ 、 K^+ 或 Ca^{2+} 等离子通道相互作用. 由于它们对离子通道的选择性, 这些毒素在神经生物学和药理学研究上已得到了广泛的应用.

关键词: 蜘蛛; 神经毒素; 多肽; 一级结构; 离子通道

中图分类号: Q51 文献标识码: A

Advances in Spider Neurotoxic Peptide

HUANG Ren-huai, LIANG Song-ping

(College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, Hunan, China)

Abstract: Spider venom contains a variety of neurotoxic peptide components. The amino acid sequences of about 100 kinds of spider toxin have been determined so far. Their molecular weights were varied from 3×10^3 to 12×10^3 except for black widow spider toxins, which were high molecular mass types. There were plenty of cysteine residues in their sequences. Toxins from different genus share less sequence homology. They can interact with varying kinds of ion channels such as Na^+ , K^+ and Ca^{2+} . For their selectivity to ion channel, these toxins have appeared broader use in the field of neurobiology and pharmacology. This paper tried to introduce the new progress of spider neurotoxins in the last five years.

Key words: spider; neurotoxin; peptide; amino acid sequence; ion channel

蜘蛛属于节肢动物门, 蛛形纲, 全世界分布约36000种, 我国估计不少于3000种, 其中很多蜘蛛在防卫和捕食时能从螫爪尖端排放毒液^[1]. 蜘蛛毒液成分较多, 其中主要成分是多肽和蛋白质, 包括多肽神经毒素、细胞毒素、酶、激肽类似物、凝集活性肽和抗菌肽等. 此外蜘蛛毒液中还含有多胺类以及ATP、核苷酸、氨基酸、单胺类等低分子量物质和无机盐等. 神经

* 收稿日期: 2000-06-12

基金项目: 国家863项目资助(103-13-01-06)

作者简介: 黄仁槐(1972), 男, 湖南资兴人, 实验师, 硕士生, 蛋白质化学专业; 梁宋平(1946-), 男, 湖南安化人, 教授, 博士, 从事蛋白质化学研究. E-mail: liangsp@public.cs.hn.cn.

毒素依据其化学结构可分为多肽类与多胺类. 1994年, 梁宋平等已综述了多肽类神经毒素的研究进展^[1], 近年来由于研究方法的不断改进, 蜘蛛毒液的研究又取得了较大的进展, 本文着重介绍近5年来该领域的研究成果.

多肽神经毒素可分为高分子量毒素和低分子量毒素两类^[2]: 高分子量毒素主要来源于黑寡妇蜘蛛, 如 α -latrotoxin, 相对分子质量在 100×10^3 以上, 能作用于突触前膜, 并促使神经递质的大量释放; 低分子量毒素相对分子质量相对较小, 一般在 $3 \times 10^3 \sim 12 \times 10^3$ 左右, 可与 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 等各种离子通道相互作用. 至今已测定了近100种蜘蛛毒素的一级结构, 并在通道水平及分子水平对这些毒素的功能作了积极的探索, 表1列出了已研究的主要多肽类神经毒素, 这些研究主要集中于少数几种蜘蛛毒液, 下面分别对这些毒素进行介绍.

1 黑寡妇蜘蛛毒素

黑寡妇蜘蛛 *Latrodectus mactans tredisimuguttatus* 是目前世界上已知的最毒的蜘蛛之一, 其毒液中包含一个高分子量毒素蛋白家族. 从该毒液中已分离到 α -latrotoxin (α -LTX)、 α -latrocrustatoxin (α -LCT) 以及5种 latroinsectotoxins (LIT) (α - ϵ)^[2, 3]. 其中 α -latrotoxin 受到广泛的研究, 它对脊椎动物毒性很强, 对小鼠的 LD_{50} 为 $20 \mu\text{g}/\text{kg}$, 作用于突触前膜, 引起递质大量释放. LIT 和 LCT 分别作用于昆虫和甲壳类动物. 这些毒素含有1000个氨基酸残基以上, 相对分子质量大于 110×10^3 . 目前已克隆了编码 α -LTX, α -LIT, α -LIT, α -LCT 这4种毒素的 cDNA. 序列研究发现, 它们可明显分为四个结构域, 即假设的信号肽结构域、N端结构域、中间结构域和C端结构域. 其中N端结构域含有两个高度疏水性的保守片段, 可能与毒素的孔道形成活性有关, 中间结构域几乎完全由含33个氨基酸残基的 Ankyrin 重复序列组成, 这一结构域可能参与突触前膜成分的结合^[3].

α -latrotoxin 的作用机制研究很多, 目前认为 α -latrotoxin 的作用机制取决于细胞类型和毒素剂量可采取几条途径^[4], 在相对较高的浓度下, 主要在膜上形成一种非选择性的阳离子通道增加细胞内钙离子浓度, 引发分泌囊泡外排, 促使递质大量释放; 在较低浓度下, 则结合于钙离子依赖的膜受体 neurexin 和钙离子不依赖的膜受体 latrophilin/CIRL, 加强细胞对内源刺激的反应, 促使递质释放. 其确切的分子机理有待进一步研究.

2 美洲漏斗网蛛毒素

美洲漏斗网蛛 *Agelenopsis aperta* (*Agelenidae*) 毒液成分的研究较多, 至今从该蜘蛛的毒液中已分离到3种类型的神经毒素: α -agatoxins、 μ -agatoxins 和 ω -agatoxins.

α -agatoxins 是一组乙酰多胺类小分子毒素, 能引起昆虫迅速而可逆的麻痹, 作用于突触后膜谷氨酸受体. μ -agatoxins 包括6种^[5] (参见表1), 均由36-38残基组成, 序列同源性很高, 其中碱性氨基酸残基较多, 分子内含4对二硫键, 其中4种毒素的羧端残基被酰胺化, 这类毒素能作用于昆虫神经肌接头的突触前膜, 引起递质大量释放, 使钠通道激活曲线向负电位移动.

ω -agatoxins 是从 *Agelenopsis aperta* 毒液中纯化的作用于突触前膜钙离子通道的毒素, 其相对分子质量在 $5 \times 10^3 \sim 10 \times 10^3$ 间, 根据其结构和功能特性它们可分为四型^[1, 2]: ω -Aga-I、 ω -Aga-II、 ω -Aga-III、 ω -Aga-IV. ω -Aga-I 能阻断昆虫突触传递, 而不影响N-型钙通道阻断剂 ω -conotoxinGVIA 对突触小体的结合, ω -Aga-IA 含有两条肽链, 其长链为66个残基, 包括9

个 Cys, 形成四对链内二硫键, 另一 Cys 与一个三肽 Ser-Pro-Cys 形成链间二硫键^[6], ω -Agg-IA 能可逆地阻断昆虫运动神经元和神经分泌细胞突触前膜二氢吡啶敏感的 L 型钙通道电流^[7], 但对鸟类和哺乳类钙离子通道完全无活性^[6]。

表 1 蜘蛛多肽神经毒素的氨基酸排列顺序及作用位点

Table 1 Amino Acid Sequence and Active Site of Spider Neurotoxic Peptide

蜘蛛名 Spider name	毒素名 Toxin name	氨基酸排列顺序 Amino acid sequence	残基数 Residue number	作用位点 Active site	参考文献 References
<i>Agelenopsis aperta</i>	ω -Agg I A	AKALPPGSVCDGNESDQK CYGKWHKRCRPFWKHFTGEGPCTC EKGMKHTCTIKLHPNKAIEWGLDW	66	Ca ²⁺ Channel	6
	ω -Agg II A	GQIEGGDDGYQEKSYQCRRNNGFCS...	28	Ca ²⁺ Channel	8
	ω -Agg IIIA	SCIDIGDCDGEKDDCCRRNG YCSYSLFG YLKS GCKCVV GTSAEFQGIICRRKARQCVNSDPDK CESHNKPKRR	76	Ca ²⁺ Channel	9
	ω -Agg IV A	KKK CIA KDYG RQWGGTPCCRGRG CCSMGTNCECKPRLIM EGLGLA	48	Ca ²⁺ Channel	10
	ω -Agg IV B	EDNCLAEIDYG KCTWGGTK CCRGR PCRCMIGYNCECTPRLIM EGLSFA	48	Ca ²⁺ Channel	11
	μ -Agg I	ECVPEHCHQRDWYDECEGEFYCSCRQPKCICRNN-NH2	36	Na ⁺ Channel	5
<i>Hadronyche</i>	μ -Agg II	ECAIKNKRCADWAGPWCCDGLY CSCR SY PCCMCRPSS	37	Na ⁺ Channel	5
	μ -Agg III	ADCVGDGQR CADWAGPYCCSGYCSRSMPIY QRGRSDS-NH2	38	Na ⁺ Channel	5
	μ -Agg IV	ACVGENQCADWA GPHCDG YYCTCRYFPKCICRNN-NH2	37	Na ⁺ Channel	5
	μ -Agg V	ACVGENQCADWA GPHCDG YYCTCRYFPKCICRNN-NH2	37	Na ⁺ Channel	5
	μ -Agg VI	DCVGESEQCADWA GPHCDG YYCTCRYFPKCICVNNN	37	Na ⁺ Channel	5
	<i>Hadronyche</i>	ω -ACTX-Hv1a	SPTCIPSGQPCPYNENCCSQSCTFKENENGNVVKRCD	37	Ca ²⁺ Channel
<i>Veruta</i>	ω -ACTX-Hv1b	SPTCIPSGQPCPYNENCCSQSCTFKENENGNVVKRCD	37	Ca ²⁺ Channel	12
	ω -ACTX-Hv1c	SPTCIPSGQPCPYNENCCSQSCTFKENENGNVVKRCD	37	Ca ²⁺ Channel	12
	ω -ACTX-Hv1d	SPTCIPSGQPCPYNENCCSQSCTFKENENGNVVKRCD	37	Ca ²⁺ Channel	12
	ω -ACTX-Hv1e	SPTCIPSGQPCPYNENCCSQSCTFKENENGNVVKRCD	37	Ca ²⁺ Channel	12
	ω -ACTX-Hv1f	SAVCIPSGQPCPYNSKYCCSGSCTYKINENGNSVQRCD	37	Ca ²⁺ Channel	12
	δ -ACTX-Hv1	CAKRNWGGKNEDECCPMKCIYA WYNQ QGSCQTITIGLFKCK	42	Na ⁺ Channel	16, 17
<i>Hadronyche. Ifensa</i>	ω -ACTX-Hi1a	STCIPTDQPPYHESCCSGSCTFKANENGNVVKRCD	36	Ca ²⁺ Channel	12
	ω -ACTX-Hi1b	SPTCIPTQPPYENENCCSQSCTYKANENGNVVKRCD	37	Ca ²⁺ Channel	12
	ω -ACTX-Hi1c	SPTCIRTDPYENENCCSGSCTYKANENGNVVKRCD	37	Ca ²⁺ Channel	12
<i>Hadronyche</i>	ω -ACTX-Hf1	SPTCIRSGQPCPYNENCCSQSCTFKINENGNVVKRCD	37	Ca ²⁺ Channel	12
<i>farmabilis</i>					
<i>Atrax robustus</i>	ω -ACTX-Ar1	SSVCIPSGQPCPYNEHCCSGSCTYKINENGNVVKRCD	37	Ca ²⁺ Channel	12
	δ -ACTX-Ar1	CAKRNWGGKTEDECCPMKCVYAWYNEQGSCQSTISALWKKK	42	Na ⁺ Channel	16, 17
<i>Phonetrria</i>	PhTx1	AEITSCFPVGHEDGDASNCNCCGDDVYCGCGWGRWNCKCKV ADQSYAYGICKDKVNC	77		18
<i>nigriwenter</i>	PhTx2-1	ATCAQDQPKCKETCDCCGERGECV CALSYEGKYRCICRQGNF LIAW HKLASCKK	53	Na ⁺ Channel	20, 21
	PhTx2-5	ATCAQDQTKCVTCDCGERGECVCGGPCICRQGNFLIAAYK LASCKK	49	Na ⁺ Channel	20, 21
	PhTx2-6	ATCAQDQPKCKETCDCCGERGECVGGGPCICRQGYFWIAWYK LANCKK	48	Na ⁺ Channel	21, 21
	PhTx2-9	SFCIPFKPKSDENCCKKFKCKTTGIVKLCRW	32		21
	PhTx3-1	AECAAVYERGGKGYRQCEERPKCNVMDNCTCKKFISE	40	K ⁺ Channel	22, 27
	PhTx3-2	ACAGLYKGGK GASPCEDRPCKDLAMGNCKK	34	Ca ²⁺ Channel	22, 23

(续表 1)

蜘蛛名 Spider name	毒素名 Toxin name	氨基酸排列顺序 Amino acid sequence	残基数 Residue number	作用位点 Active site	参考文献 References
	PhTx3-3	G CANA YKSCNGPHTCCWGYNKYKACICSG? NWK...		Ca ²⁺ Channel	24, 25, 26
	PhTx3-4	SCINV GDFCDGKKDCQ CDRDNAFCSCSV IFGYKTNCRC E.....		Ca ²⁺ Channel	22, 26
	PhTx3-5	G GGRNESCKFDRHGCCWPWSCSCWHKEGQPIESDV W	36		22
	PhTx3-6	A GPRGEICTDDCECG; CINQCYCPG SSLG IFKCSCAHANK YFCN RKKEKCKKA	55		22
<i>Grammostda</i>	ω -SIA	D CVR FWG KCSQISD CCPLACKSKWPRNICVWDGSI	36	Ca ²⁺ Channel	30
<i>spatula</i>	HaTx1	E CRYLFGG CKTTSDCCKHLG CK FRDKYCAWDFTFS	35	K ⁺ Channel	31
	HaTx2	E CRYLFGG CKTAD CCKHLG CK FRDKYCAWDFTFS	35	K ⁺ Channel	31
<i>Selenocosmia</i>	HWTX-I	A CKGV FDA CTPGKN ECPN RVCS DKHK WCKWKL	33	Ca ²⁺ Channel	33, 34
<i>huana</i>	HWTX-II	L FECSFSEI/ QEK EG DKPGKKK KCK GKWKCK FNMCKVKV	37		36
	SHLP-I	G L GDKCDYNNGCCSG YVCSRTWKVCV LAGPW	32		37
<i>Hysteroocrates gigas</i>	SNX-482	G VDKAGCRYMFGGCSVNDCCPRLGCHSLFSYCAWDLTFS	41	Ca ²⁺ Channel	38
<i>Filistata hibernalis</i>	DW13.3	A ECLMIGDFSCVPRLGRR CYGA WCYCDQQLSRRRVG R K REC G WVEVNCKCGWSWSQ RIDDWRADYSCK GPEDQ	74	Ca ²⁺ Channel	39
<i>Segestria florentina</i>	SNX-325	G SCIESGK SCTHSRSMK NGLCCPKSRCNCRQIQHRHDI L GK R K YS CRCS	49	Ca ²⁺ Channel	40
<i>Heteropoda</i>	HpTx1	D GGTIWHYCGTDQSECEGWKCSRQLQKYVIDW	33	K ⁺ Channel	41
<i>venatoria</i>	HpTx2	D DGGK L FSGCD FNA DCCEGYV QRLWCK LCW	30	K ⁺ Channel	41
	HpTx3	E CGTILFSGCSIH ADCCEG FICKLWCRYERTW	31	K ⁺ Channel	41
<i>Parixotrichus</i>	PaTx1	Y QKWMWTCDSA RKCCBGLVCRWLWCKKII	29	K ⁺ Channel	42
<i>auratus</i>	PaTx2	Y QKWMWTCDEFERKCEGLVCRWLWCKRIINM	31	K ⁺ Channel	42

ω -Ag α -II 则既能阻断昆虫神经肌肉接头传递, 又能抑制 ω -conotoxinGVIA 对突触体的结合. 它含有 90~95 个氨基酸残基, 能阻断昆虫运动神经元以及鸟类和大鼠突触体中钙离子通道电流^[8]. 而 ω -Ag α -III 仅能抑制 ω -conotoxinGVIA 对突触体的结合, 却不影响昆虫运动神经元突触传递; 它由 76 个氨基酸残基组成, 主要作用于 N- 和 L- 型钙电流^[9]. 最有意义的是 ω -Ag α -IV 的发现, 包括 ω -Ag α -IVA 和 ω -Ag α -IVB, 它们专一性地作用于 P- 型钙通道, 序列同源性高达 71%, 均由 48 个残基组成, 含 8 个 Cys, 形成 4 对二硫键, 有趣的是 ω -Ag α -IVA 的 N- 端带正电荷, 而 ω -Ag α -IVB 的 N- 端带负电荷^[10, 11].

3 澳州漏斗网蛛毒素

澳州漏斗网蛛是分布于澳大利亚的漏斗网蛛属 (*Atrax*) 的总称, 至今已发现 33 种, 曾有 14 人被咬伤致死的记载. 从这些蜘蛛的毒液中已纯化了多种肽类神经毒素, 这些毒素可分为两大类: ω -atractoxins (ω -ACTX) 和 δ -atractoxins (δ -ACTX).

ω -ACTX 作用于钙离子通道, 主要包括 6 种 ω -ACTX-Hv1 (a, b, c, d, e 和 f)、3 种 ω -ACTX-Hi1 (a, b, c)、1 种 ω -ACTX-Hf1 和 1 种 ω -ACTX-Ar1 等. 它们分别从蜘蛛 *Hadronyche versutus*, *Hadronyche ifensa*, *Hadronyche formadabilis*, *Atrax robustus* 的毒液中纯化^[12] (见表 1), 均由 36~37 个氨基酸残基组成, 均含 3 对二硫键, 连接方式均为 1-4, 2-5, 3-6; 序列之间具有很高的同源性, 有些毒素之间仅有 1~2 个残基的差异. 应用 NMR 方法解析了 ω -atractoxin-

Hv1 溶液结构, 发现尽管它与其它 ω -毒素的序列同源性很小, 但与 ω -Aga-IVA 和 ω -conotoxins 具有明显的结构同源性, 然而 ω -atracotoxinHv1 仅作用于昆虫的钙离子通道, 对哺乳动物的钙电流无作用^[13].

δ -ACTX 能以类似于蝎毒 α -毒素的作用方式减慢钠通道的失活过程^[14]. δ -atracotoxins 包括 *Hadronyche versutus* 毒液中纯化的 δ -atracotoxinHv1(又称 versatoxin) 和从 *Atrax robustus* 毒液中纯化的 δ -atracotoxinAr1(又称 robustoxin). 上述两种蜘蛛神经毒素都由 42 个氨基酸残基组成, N-端和 C-端皆为 Cys, 分子内还存在一个三联 Cys, 两者在一级结构上同源性很高, 仅有 7 个残基的差异和 2 个非保守残基的替代(见表 1). 它们对小鼠腹腔注射的半致死剂量分别为 0.22 mg/kg 和 0.16 mg/kg. 进一步研究证明, δ -atracotoxins 仅作用于河豚毒(TTX)-敏感的钠电流, 主要以电压依赖的方式减慢或抑制钠通道的失活, 抑制钠通道从开放状态到关闭状态的转换^[15], 能在纳摩尔水平与蝎毒 α -毒素竞争结合大鼠大脑钠离子通道神经毒素受体位点 3, 也能以类似于 α -毒素的作用方式加强生物碱毒素³H[BTX] 对受体位点 2 的结合. 与蝎毒 α -毒素作用不同的是, δ -atracotoxins 可降低钠电流峰电位的幅度, 而且 δ -atracotoxins 既能作用于哺乳动物的钠通道电流, 也能作用于昆虫的钠通道电流^[16, 17].

4 巴西黑腹栉足蛛毒素

黑腹栉足蛛 *Phoneutria nigriventer* 分布于南美洲巴西东南部地区, 属于栉足蛛科 (*Stenidae*), 富有进攻性, 毒性强, 当地有儿童被咬伤致死的记录. Deniz 和 Cordeiro 等人对其毒液进行过较为详细的研究, 其毒液成分很多, 包括 1 种 PhTx1、至少 9 种 PhTx2、至少 6 种 PhTx3 和 7 种 PhTx4.

PhTx1 由 77 个氨基酸残基组成, 分子中含有 12 个 Cys, 对小鼠腹腔注射的 LD₅₀ 为 0.05 mg/kg^[18]. 它在 1~5 μ g 时并不影响间接刺激条件下小鼠膈神经膈肌的肌肉收缩, 不影响小终板电位的频率和幅度, 在 60 min 内也不改变其静息膜电位. 然而它能使肌纤维发生形态上的变化, PhTx1 可能的作用位点包括肌纤膜和轴膜, 引起水电解质紊乱^[19].

PhTx2 能增加细胞内的 $[Na^+]_i$ 和 $[Ca^{2+}]_i$, 能诱发谷氨酸递质和乙酰胆碱递质的释放, 这种作用依赖于细胞外的钙离子, 且能被河豚毒(TTX) 阻断; 这组成分能作用于钠通道, 能使钠通道电流电压曲线向负电位移动, 并使钠通道的失活过程减慢^[20]. PhTx2 至少包括 9 种毒素, Cordeiro 等人完成了其中 4 种组分的一级结构测定, 其氨基酸顺序见表 1. Tx2-1、Tx2-5 和 Tx2-6 均由 48~53 个氨基酸残基组成, 含有 10 个 Cys, 序列同源性高达 71%~85%, 能激活电压依赖的钠通道^[24].

随后 Cordeiro 等人又从 PhTx3 中纯化了 6 种毒素 PhTx3 (1~6), 并完成了 Tx3-1、Tx3-2 和 Tx3-6 的全部氨基酸排列顺序以及的 Tx3-3、Tx3-4 和 Tx3-5 的 N 端部分顺序(见表 1), 它们均含有较多的 Cys, 但序列同源性不明显^[22]. 其中 PhTx3-2 能抑制 GH₃ 细胞中记录的 L_T-型钙电流^[23]. PhTx3-3 也作用于钙通道, 能降低诱发谷氨酸递质释放的钙电流^[24], 能有效地抑制大鼠大脑皮层突触体中囊泡外排有关的 ω -Aga-IVA 敏感的钙电流^[25]. PhTx3-3 和 PhTx3-4 均能抑制大鼠皮层突触体中由蝎毒 tityutoxin 引起的 45Ca²⁺ 回摄^[26]. PhTx3-1 则专一性地阻断 A 型钾离子电流, 增加 GH₃ 细胞中 A 型 K⁺ 电流控制的自发的钙离子振荡频率, 而不影响其它的钾离子电流和钙电流^[27].

PhTx4 能引起昆虫过度活动(hyperactivity), 导致肌肉疲劳而产生麻痹, 并以一种剂量依

赖的方式抑制谷氨酸递质的回摄 (IC_{50} 为 2.35 mg/L). PhTx4 已被进一步纯化, 至少包括 7 种相关的毒素 Tx4(1~7), 这些毒素均具有与 PhTx4 相同的作用模式, 其中 Tx4-7 对谷氨酸递质回摄的抑制作用最强, 而 Tx4-1, 2 和 5 对小鼠也有毒性^[28].

此外, Cassola 等人从这种蜘蛛粗毒中还分离了一种钙离子通道阻断剂 ω -phonetoxin IIA, 由 76 个氨基酸残基组成, 相对分子质量为 8362.7, 含 14 个 Cys, 形成 7 对二硫键, 与 ω -Ag α -IIA 和 ω -Ag α -II 家族有较高的同源性. 它能够抑制大鼠背根神经节神经元的 N-型钙离子通道电流以及大鼠胰腺 β -细胞的 L-型钙通道电流, 但对后者亲和性低 40 倍. 而且还有证据说明该毒素还可作用于 P/Q-型通道, 但对低阈值钙通道(如 T-型)没有作用^[29].

5 智利 Tarantula 蜘蛛毒素

从智利 Tarantula 毒蜘蛛 *Grammostola spatula* 毒液中纯化了 3 种毒素. 其中 ω -grammotoxin SIA 由 36 个残基组成, 包括 6 个 Cys, 形成 3 对二硫键, C 端为酰胺化的 Val. 它能同时阻断 N-及 P/Q-型钙通道电流, 而对 L-型完全没有影响^[30]. 另外两种毒素 Hanatoxins (HaTx1 和 HaTx2) 均为钾离子通道阻断剂, 能在纳摩尔水平阻断钾离子通道 Kv2.1 电流, 它们均由 35 个残基组成, 包含 3 对二硫键, 与已知的钾离子通道阻断剂无明显的结构同源性, 但一级结构与 ω -Grammotoxin SIA 有 40% 以上的同源性^[31]. 近年研究表明 Hanatoxins 与 Grammotoxin 均影响钾通道和钙通道电流, 这一结果提示钾通道和钙通道中与毒素结合的部位实际上具有结构同源性^[32].

6 虎纹捕鸟蛛毒素

虎纹捕鸟蛛 *Selonicosmia huwena* 是我国南方发现的蜘蛛新种, 属于捕鸟蛛科 (*Theraphosidae*). 该蛛穴居地下, 个体大, 毒性强. 粗毒中含有多种酶类和使小鼠致死的活性成分. 应用离子交换色谱及反相色谱从该粗毒中已分离了两种神经毒素: Huwentoxin I (HWTX-I) 和 Huwentoxin II (HWTX-II). HWTX-I 是粗毒中含量最大的成分, 含有 33 个氨基酸残基, 6 个半胱氨酸, 形成三对二硫键, 其二硫键连接方式为 1-4, 2-5 和 3-6^[33,34]. 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^[35]. 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, 含有 6 个 Cys, 形成 3 对二硫键, 第 10 位残基表现出微观不均一性 (Ile/Glu), 有形成杂二聚体的趋势. 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, 对美洲蜚蠊的 ED_{50} 为 $127 \pm 54 \mu\text{g/g}$, 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^[39]. 此外, 从该蛛毒中还发现一种凝集活性肽 SHL-I^[37], 这是迄今发现的分子量最小的凝集素分子, 由 32 个氨基酸残基组成, 含 6 个 Cys, 形成 3 对二硫键, 二硫键的连接方式与 HWTX-I 相同, 其氨基酸顺序与一种蓖麻凝集素具有较高的同源性. SHL-I 能使小鼠和人红细胞产生明显的凝集反应, 最低浓度分别为: 125 mg/L 和 31 mg/L, 与甘露糖胺专一性结合. HWTX-I 及 SHL-I 的溶液构象研究结果表明它们具有相同的结构模体——三链反平行 β 折叠组成疏水核心以及三对二硫键形成胱氨酸结 (Cystine knot).

7 其它蜘蛛毒素

上述蜘蛛毒液成分的研究相对较多, 除此之外, 还有一系列来源于其它蜘蛛种类的毒素

被探明一级结构, 见表 1. 值得一提的是, 从非洲 tarantula 蜘蛛 *Hysteroocrates gigas* 毒液中纯化的一种钙通道阻断剂 SNX-482, 由 41 个残基组成, 它是首次发现的 E-型钙通道阻断剂(IC₅₀ 为 15~ 30 nmol)^[38]. 而从蜘蛛 *Filistata hibernalis* 毒液中纯化的 DW13.3 是一种广谱型的钙离子通道阻断剂, 它可以阻断除 T-型电流以外的所有钙离子电流, 对钙通道亚基的亲合性为: $\alpha 1A > \alpha 1B > \alpha 1C > \alpha 1E$ ^[39].

8 结语

蜘蛛种类繁多, 蜘蛛毒液成分丰富, 功能多样, 但对蜘蛛毒素的研究还很不充分, 要全面理解蜘蛛毒素结构与功能, 仍然有很多工作要做. 蜘蛛毒液中含有各种与 Na⁺、K⁺ 和 Ca²⁺ 等各种离子通道作用的成分, 由于它们对离子通道的选择性, 蜘蛛毒素在药理学、神经生物学和医学领域已展现出广阔的应用前景, 一些蜘蛛毒素(如 ω -Ag α -IVA) 已被广泛用作工具试剂, 而且蜘蛛毒素的进一步研究必将推动这些领域的进一步发展. 另外, 一些蜘蛛毒素对昆虫具有很强的毒性, 而对哺乳动物无毒性, 这些毒素为农业杀虫提供了新思路, 新方法.

致谢: 感谢北京大学生命科学学院舒芹博士在本文的写作过程中给予有益的帮助和宝贵的建议.

参考文献:

- [1] 梁宋平, 潘欣. 蜘蛛肽类神经毒素研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展(LIANG S P, PAN X. Progresses in spider neurotoxic peptide[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics), 1994, 21: 390-395.
- [2] GRINSHIN E V. Polypeptide neurotoxins from the spider venoms[J]. Eur J Biochem, 1999, 264: 276-280.
- [3] GRINSHIN E V. Black widow spider toxins: The present and the future[J]. Toxicon, 1998, 36: 1693-1701.
- [4] HENKEL A W, SANKARANARAYANAN S. Mechanisms of α -Latrotoxin action[J]. Cell Tissue Res, 1999, 296: 229-233.
- [5] SKINNER W S, ADAMS ME, QUISTAD C B, et al. Purification and characterization of two classes of neurotoxins from the funnel web spider, *Agelenopsis aperta* [J]. J Biol Chem, 1989, 264: 2156-2155.
- [6] SANTOS A D, IMPERIAL J S, CHAUDHARY T, et al. Heterodimeric structure of the spider toxins ω -agatoxin IA, revealed by precursor analysis and mass spectrometry[J]. J Biol Chem, 1992, 267: 20701-20705.
- [7] SCOTT R H, DOLPHIN A C, BINDOKAS V P, et al. Inhibition of neuronal Ca²⁺ channel currents by the funnel web spider toxin ω -Ag α -I A[J]. Mol Pharmacol, 1990, 38: 711-718.
- [8] ADAMS M E, BINDOKAS V P, HASEWAGA L, et al. ω -agatoxins: novel calcium channel antagonists of the subtypes from funnel web spider (*Agelenopsis aperta*) venom[J]. J Biol Chem, 1990, 265: 861-867.
- [9] ERTEL E A, WARREN V A, ADAMS M E, et al. Type-III ω -agatoxins—a family of probes for similar binding sites on L-type and N-type calcium channels[J]. Biochemistry, 1994, 33: 5098-5108.
- [10] MINTZ I M, VENEMA V J, SWUDEREK K M, et al. P-type calcium channels blocked by the spider toxin ω -Ag α -IVA[J]. Nature, 1992, 355: 827-829.
- [11] TERAMOTO T, KUWADA M, NIIDOME T, et al. A novel peptide from funnel web spider venom, ω -Ag α -TK, selectively blocks P-type calcium channels[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1993, 196: 134-140.
- [12] WANG X H, SMITH R, FLETCHER J I, et al. Structure-function studies of ω -atracotoxin, a potent antagonist of insect voltage-gated calcium channels[J]. Eur J Biochem, 1999, 264: 488-494.
- [13] FLETCHER J I, SMITH R, O'DONOGHUE S I, et al. The structure of a novel insecticidal neurotoxin, ω -atracotoxin HV1, from the venom of an Australian funnel web spider[J]. Nat Struct Biol, 1997, 4: 559-566.

- [14] BROWN M R, SHEUMACK D D, TYLER M I, *et al.* Amino acid sequence of versutoxin, a lethal neurotoxin from the venom of the funnel web spider *Atrax versutus* [J]. *Biochem J*, 1998, 250: 401-405.
- [15] NICHOLSON G M, WALSH R, LITTLE M J, *et al.* Characterization of the effects of robustoxin, the lethal neurotoxin from the Sydney funnel web spider *Atrax robustus*, on sodium channel activation and inactivation [J]. *Pflügers Arch*, 1998, 436: 117-126.
- [16] LITTLE M J, WILSON H, ZAPPIA C, *et al.* δ -atracotoxins from Australian funnel web spiders complete with scorpion α -toxin binding on both rat brain and insect sodium channels [J]. *FEBS Letters*, 1998, 439: 246-252.
- [17] LITTLE M J, ZAPPIA C, GILLES N, *et al.* δ -atracotoxins from Australian funnel web spiders complete with scorpion α -toxin binding but differentially modulate alkaloid toxin activation of voltage gated sodium channels [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273: 27076-27083.
- [18] DINIZ C R, CORDEIRO M N, JUNIOR L R, *et al.* The purification and amino acid sequence of the lethal neurotoxin Tx1 from the venom of the Brazilian armed spider *Phoneutria nigriventer* [J]. *FEBS Lett*, 1990, 263: 251-253.
- [19] MATTIELLO-SVERZUT A C, FONTANA M D, DINIZ C R, *et al.* Pathological changes induced by PhTx1 from *Phoneutria nigriventer* spider venom in mouse skeletal muscle in vitro [J]. *Toxicon*, 1998, 36: 1349-1361.
- [20] MOURA J R, PRADO M A, GOMEZ M V, *et al.* Investigation of the effect of PhTx2, from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer*, on the release of [3 H]-acetylcholine from rat cerebrocortical synaptosomes [J]. *Toxicon*, 1998, 36: 1189-1192.
- [21] CORDEIRO M N, VALENTIM A C, DINIZ C R, *et al.* Purification and complete amino acid sequences of four Tx2 type neurotoxins from the venom of the Brazilian 'armed' spider *Phoneutria nigriventer* (Keys) [J]. *FEBS Lett*, 1992, 310: 153-156.
- [22] CORDEIRO M N, FIGUEIREDO S G, VALENTIM A C, *et al.* Purification and amino acid sequences of six Tx3 type neurotoxins from the venom of the Brazilian 'armed' spider *Phoneutria nigriventer* (Keys) [J]. *Toxicon*, 1993, 31: 35-42.
- [23] KALAPOTHAKIS E, PENAFORTE C L, LEO R M, *et al.* Cloning, cDNA sequence analysis and patch clamp studies of a toxin from the venom of the armed spider (*Phoneutria nigriventer*) [J]. *Toxicon*, 1998, 36: 1971-1980.
- [24] PRADO M A, GUATIMOSIM C, GOMEZ M V, *et al.* A novel tool for the investigation of glutamate release from rat cerebrocortical synaptosomes: the toxin Tx3-3 from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer* [J]. *Biochem J*, 1996, 314: 145-150.
- [25] GUATIMOSIM C, ROMANO-SILVA M A, CRUZ J S, *et al.* A toxin from the spider *Phoneutria nigriventer* that blocks calcium channels coupled to exocytosis [J]. *Br J Pharmacol*, 1997, 122: 591-597.
- [26] MIRANDA D M, ROMANO-SILVA M A, KALAPOTHAKIS E, *et al.* *Phoneutria nigriventer* toxins block tityustoxin-induced calcium influx in synaptosomes [J]. *Neuroreport*, 1998, 9: 1371-1373.
- [27] KUSHMERICK C, KALAPOTHAKIS E, BEIRAO P S, *et al.* *Phoneutria nigriventer* toxin Tx3-1 blocks A-type K^+ currents controlling Ca^{2+} oscillation frequency in GH3 cells [J]. *J Neurochem*, 1999, 72: 1472-1481.
- [28] MAFRA R A, FIGUEIREDO D G, DINIZ C R, *et al.* PhTx4, a new class of toxins from *Phoneutria nigriventer* spider venom, inhibits the glutamate uptake in rat brain synaptosomes [J]. *Brain Res*, 1999, 831: 297-300.
- [29] CASSOLA A C, JAFFE H, FALES H M, *et al.* ω -phonetoxin II A: a calcium channel blocker from the spider *phoneutria nigriventer* [J]. *Pflügers Arch*, 1998, 436: 545-552.
- [30] LAMPE R A, DEFOO P A, DARISON M D, *et al.* Isolation and pharmacological characterization of ω -grammoxin SIA, a novel peptide inhibitor of neuronal voltage-sensitive calcium channel responses [J]. *Mol Pharmacol*, 1993, 44: 451-460.

- [31] SWARTZ K J, MACKINNON R. An inhibitor of the Kv2. 1 potassium channel isolated from the venom of a Chilean tarantula[J]. *Neuron*, 1995, 15(4): 941-949.
- [32] LI-SMERIN Y, SWARTZ K J. Gating modifier toxins reveal a conserved structural motif in voltage-gated Ca²⁺ and K⁺ channels[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 95(15): 8585-8589.
- [33] LIANG S P, ZHANG D Y, PAN X, *et al.* Properties and amino acid sequence of huwentoxin-I, a neurotoxin purified from the venom of the Chinese bird spider *Selenocosmia huwena*[J]. *Toxicon*, 1993, 31(8): 969-978.
- [34] ZHANG D Y, LIANG S P. Assignment of the three disulfide bridges of huwentoxin-I, a neurotoxin from the spider *Selenocosmia huwena* [J]. *J Protein Chem*, 1993, 12(6): 735-741.
- [35] LIANG S, CHEN X, SHU Q, *et al.* The presynaptic activity of huwentoxin-I, a neurotoxin from the venom of the Chinese bird spider *Selenocosmia huwena* [J]. *Toxicon* 2000, 38: 1237-1246.
- [36] SHU Q, LIANG S P. Purification and characterization of huwentoxin-II, a neurotoxic peptide from the venom of the Chinese bird spider *Selenocosmia huwena*. [J]. *J Peptide Res*, 1999, 53: 486-491.
- [37] LIANG S P, PAN X. A lectin-like peptide isolated from the venom of the Chinese bird spider *Selenocosmia huwena* [J]. *Toxicon*, 1995, 33(7): 875-882.
- [38] NEWCOMB R, SZOKE B, PALMA A, *et al.* Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula *Hysterocrates gigas*[J]. *Biochemistry*, 1998, 37: 15353-15362.
- [39] SUTTON K G, SIOK C, STEA A, *et al.* Inhibition of neuronal calcium channels by a novel peptide spider toxin, DW13. 3[J]. *Mol Pharmacol*, 1998, 54(2): 407-418.
- [40] NEWCOMB R, PALMA A, FOX J, *et al.* SNX-325, a novel calcium antagonist from the spider *Segestria florentina*[J]. *Biochemistry*, 1995, 34: 8341-8347.
- [41] SANGUINETTIM C, JOHNSON J H, HAMMERLAND L G, *et al.* Heteropodatoxins: peptides isolated from spider venom that block Kv4. 2 potassium channels[J]. *Mol Pharmacol*, 1997, 51(3): 491-498.
- [42] DIOCHOT S, DRICIM D, MOINIER D, *et al.* Effects of phrixotoxins on the Kv4 family of potassium channels and implications for the role of Ito1 in cardiac electrogenesis[J]. *Br J Pharmacol*, 1999, 126: 251-263.