

KHẢO SÁT CÁC CHẤT CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC TRONG NỌC BÒ CẠP *HETEROMETRUS LAOTICUS*

Đến Tòa soạn 20-3-2008

HOÀNG NGỌC ANH¹, PHẠM NGUYỄN ĐÔNG YÊN¹,
NGUYỄN THỊ MAI HƯƠNG¹, VÕ PHÙNG NGUYỄN²

¹Viện Khoa học Vật liệu ứng dụng, Tp. Hồ Chí Minh

²Đại học Y-Dược, Tp. Hồ Chí Minh

ABSTRACT

The scorpion *Heterometrus laoticus*, family Scorpionidae, are wide distributed in the west of the South of Vietnam. In the traditional medicine the alcohol extract of these scorpions is used as analgesic for muscle and bone pain. However, the venom of Vietnamese *H. laoticus* has not been studied until now, so we carried out this work. Venom was collected from *H. laoticus* scorpions distributed in the An Giang province. The crude venom of *H. laoticus* scorpions was separated into ten fractions by column chromatography on Bio-Gel P 10. These fractions have different physico-chemical and biological properties. Tests on mice showed that six of these fractions are toxic. The most toxic fractions have molecular weight in range of 3-5 kDa and 6-8 kDa, that similar to neurotoxins isolated from scorpions, family Buthidae. Beside of the neurotoxins, in the *H. laoticus* venom there is toxins causing bleeding when inject them into mice. The crude venom of *H. laoticus* scorpion has activities against various kinds of microorganisms such as *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. This venom can be used in further to isolate the toxins and anti-bacterium compounds.

I - MỞ ĐẦU

Khoảng hơn 30 năm trở lại đây, nọc bò cạp hấp dẫn sự nghiên cứu của các nhà khoa học vì nó chứa các polypeptide toxin tác dụng với các receptor và các kênh ion của các màng tế bào bị kích thích. Phụ thuộc vào tác dụng của các toxin với các kênh ion, người ta chia chúng làm 4 loại, đó là các toxin tác dụng với các kênh ion: kênh Na⁺, kênh K⁺, kênh Cl⁻, kênh Ca²⁺ [1].

Hiện nay trên cơ sở các toxin nọc bò cạp người ta đã chế ra nhiều loại thuốc chữa các bệnh hiểm nghèo như ung thư. Margatoxin tách từ nọc bò cạp *Centruroides margaritatus* đã được hãng Merck (Đức) đăng ký bản quyền như thuốc để điều trị bệnh tự miễn dịch và chống sự

loại bỏ trong quá trình ghép các cơ quan [2]. Chlorotoxin tách từ nọc bò cạp *Leiurus quinquestritus* đã được sử dụng để điều trị bệnh ung thư não [3]. Chế phẩm “Escozul” — sản xuất từ nọc *Rhopalurus junceus* được sử dụng ở Cuba để điều trị các bệnh ung thư và Pakingson [4]. Ngoài ra nhiều các polypeptide nọc bò cạp có hoạt tính kháng khuẩn [5] và việc nghiên cứu những polypeptide này sẽ mở ra một nguồn kháng sinh mới từ nọc côn trùng.

Bò cạp *Heterometrus* (họ Scorpionidae) phân bố chủ yếu ở vùng Nam và Đông nam Á. Độc tính của chúng rất thay đổi và thành phần nọc độc của chúng chỉ mới bắt đầu được khảo sát. Tác dụng độc tố của nọc bò cạp *H. longinatus* được công bố là do một chất giống

như catecholamine gây ra [6]. Trong khi đó các toxin từ nọc bọ cạp *H. spinifer* và *H. fulvipes* được xác định là các polypeptide có tác dụng lên các kênh kali [7, 8]. Ở Việt Nam có nhiều bọ cạp *Heterometrus*, đó là các bọ cạp đen hay bọ cạp rừng, bọ cạp loài *H. laoticus* được tìm thấy nhiều ở vùng nam bộ.

Tiếp theo những nghiên cứu về độc tính và tác dụng giảm đau của nọc bọ cạp nâu (*Lychas mucronatus* họ Buthidae) [9], trong bài báo này chúng tôi xin trình bày những khảo sát các chất có hoạt tính sinh học trong nọc bọ cạp đen (*Heterometrus laoticus*) với mục đích tìm kiếm các chất có hoạt tính sinh học mới để ứng dụng trong y dược.

II - NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu

Nọc thu từ bọ cạp *H. laoticus* được bắt ở vùng An Giang và nuôi trong phòng thí nghiệm của Viện Khoa học Vật liệu ứng dụng, thức ăn của bọ cạp là châu chấu và dế. Kích thích bọ cạp bằng phương pháp xung điện tại đốt thứ 5 hoặc đốt thứ 6 của bọ cạp để thu nọc và đem làm khô trong bình hút ẩm có chứa CaCl_2 khan cho đến khi có khối lượng không đổi, sau đó thu và giữ ở nhiệt độ -20°C cho đến khi dùng.

2. Phương pháp tách các hoạt chất của nọc bọ cạp *H. laoticus*

Các phân đoạn của nọc bọ cạp được tách ra từ nọc thô bằng phương pháp lọc qua gel trên máy FPLC (Bio-Rad, Mỹ) ở nhiệt độ phòng trên cột với Bio-Gel P 10 (1,5x100 cm). Cột đã được cân bằng trong đệm ammonium acetat 20 mM (pH 4,7), lượng nọc thô chạy mỗi lần 86-130 mg, tốc độ rửa cột 0,16 ml/phút, thể tích mỗi ống thu 4 ml.

Sự có mặt của protein trong các phân đoạn sắc ký được xác định theo mật độ quang tại bước sóng 280 nm.

Độc tính của các phân đoạn tách ra được thử lên chuột trắng DDY cả hai giống (18 - 20 g) bằng cách tiêm tĩnh mạch đuôi, tác dụng của các phân đoạn lên chuột được quan sát trong 24

giờ. Lượng protein mỗi lần tiêm cho mỗi chuột là 0,2 mg.

Tính kháng khuẩn của các phân đoạn tách ra được xác định trên vi khuẩn Gram(-) như *E. coli*, *P. aeruginosa*, và vi khuẩn Gram(+) như *B. subtilis*, *S. aureus*. Tính kháng nấm của các phân đoạn tách ra được xác định trên nấm men *C. albicans*.

Điện di được tiến hành trên gel polyacrylamit 14% theo Laemmli [10].

III - KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Tách các phân đoạn của nọc bọ cạp *H. laoticus*

Bọ cạp *H. laoticus* phân bố nhiều ở vùng An Giang, rượu ngâm bọ cạp này được sử dụng rộng rãi trong người dân Nam bộ làm thuốc xoa bóp giảm đau cơ, xương cốt. Tuy bọ cạp *H. laoticus* ứng dụng trong dân gian như vậy nhưng thành phần hoá học của nó cho đến nay vẫn chưa được khảo sát, với mục đích này chúng tôi đã tiến hành phân tích nọc bằng phương pháp sắc ký qua cột với Bio-gel P 10 (1,5 x 100 cm) và khảo sát tính chất của các phân đoạn tách ra.

Sử dụng cột với gel Bio-Gel P 10 để phân tích nọc bọ cạp *H. laoticus* cho thấy nọc thô được tách ra làm 10 phân đoạn với khối lượng phân tử khác nhau (hình 1). Thử độc tính của các phân đoạn tách ra trên chuột cho thấy 6 phân đoạn có độc tính còn các phân đoạn khác không có độc tính. Kết quả này cho thấy gel Bio-Gel P 10 phù hợp với mục đích phân tích nọc bọ cạp của chúng tôi, vì vậy chúng tôi dùng gel này để phân tách và khảo sát tính chất của nọc bọ cạp *H. laoticus*.

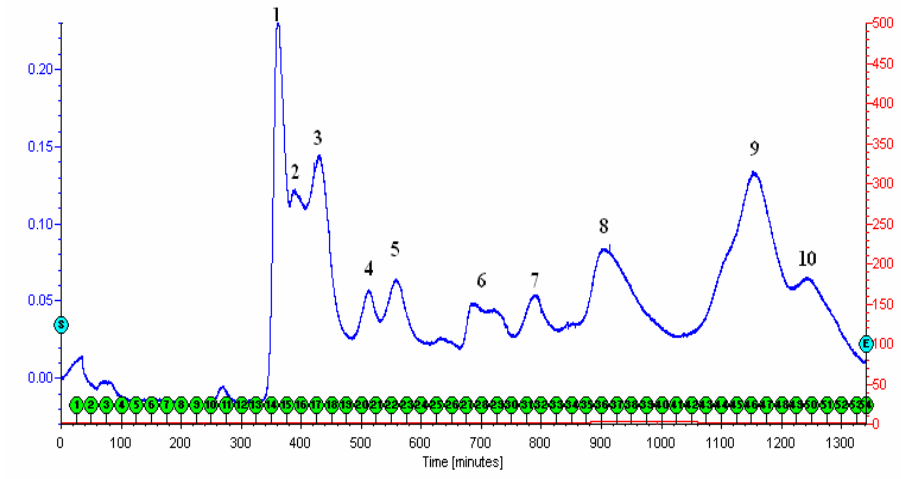
Bọ cạp *H. laoticus* thuộc họ Scorpionidae, loài bọ cạp này ít độc hơn loài bọ cạp *L. mucronatus* thuộc họ Buthidae mà trước đây chúng tôi đã nghiên cứu [11].

2. Khảo sát hoạt tính sinh học của các phân đoạn tách ra từ nọc bọ cạp *H. laoticus*

Hình 1 cho thấy nọc bọ cạp *H. laoticus* qua cột gel với Bio-Gel P 10 phân tách ra làm 10 phân đoạn với khối lượng phân tử khác nhau. Thử độc tính của các phân đoạn tách ra trên

chuột cho thấy các phân đoạn 2, 3, 4, 5, 6, 7 là độc còn các phân đoạn 1, 8, 9, 10 là không độc. Tuy trong nọc bò cạp *H. Laoticus* có sáu phân đoạn độc, nhưng độc tính của chúng rất khác nhau (xem bảng 1). Trong các phân đoạn độc này thì độc nhất là các phân đoạn 7 và 5. Sau khi tiêm phân đoạn 7, chuột thử gấp, co giật và chết sau 30 giây còn sau khi tiêm phân đoạn 5

chuột thử gấp, liệt, co giật và chết sau 2 phút đây là các biểu hiện tác dụng độc của các neurotoxin. Những khảo sát tiếp theo cho thấy sau khi tiêm phân đoạn 4 chuột bị chảy máu không dừng và chết sau 11 phút, còn sau khi tiêm phân đoạn 3 chuột nằm im và chết sau 23 phút. Những khảo sát độc tính của các phân đoạn tách ra được trình bày trong bảng 1.



Hình 1: Phân tách nọc bò cạp *H. laoticus* trên cột với Bio-Gel P 10

Bảng 1: Thử độc tính của các phân đoạn tách ra từ nọc bò cạp *H. laoticus*

Số phân đoạn	Quan sát trên chuột sau khi tiêm các phân đoạn tách ra	Nhận xét
1	Chuột bình thường sau khi tiêm	Không độc
2	Chuột nằm im và chết sau 24 giờ	Độc gây chết
3	Chuột nằm im và chết sau 23 phút	Độc gây chết
4	Chuột duỗi hai chân, chảy máu và chết sau 11 phút	Độc gây chết
5	Chuột liệt chân, co giật và chết sau 2 phút	Độc gây chết
6	Chuột liệt chân và chết sau 58 phút	Độc gây chết
7	Chuột co giật và chết sau 30 giây	Độc gây chết
8	Chuột bình thường sau khi tiêm	Không độc
9	Chuột bình thường sau khi tiêm	Không độc
10	Chuột bình thường sau khi tiêm	Không độc
Nước cất	Chuột bình thường sau khi tiêm	Không độc

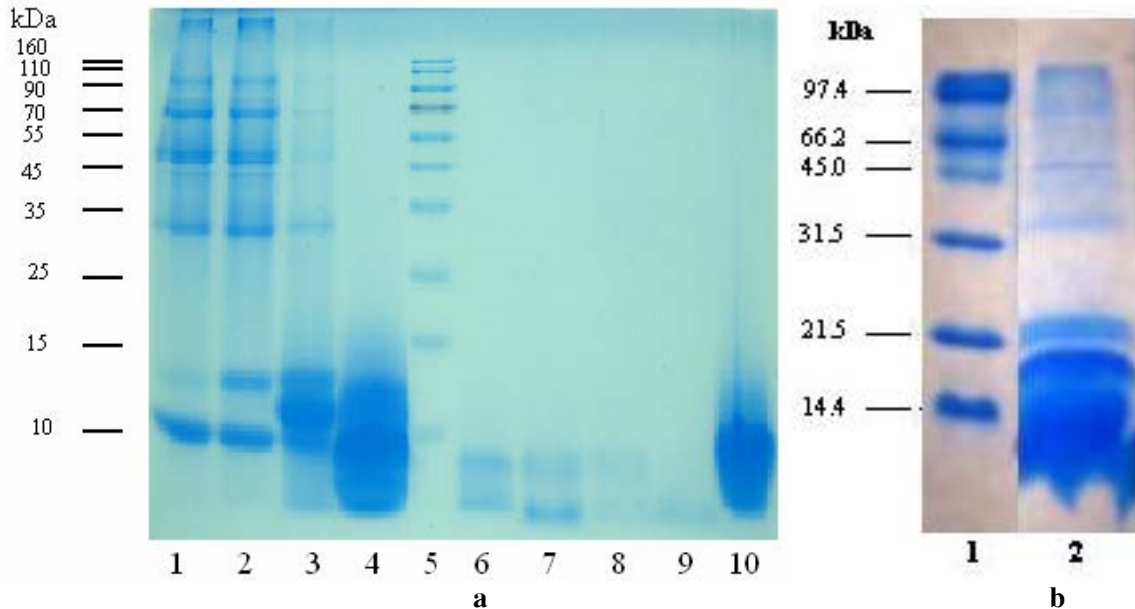
Để khảo sát thành phần protein của các phân đoạn tách ra chúng tôi đã tiến hành điện di. Kết quả điện di (hình 2a) cho thấy các phân đoạn

độc chứa các protein sau: phân đoạn 2 chứa các protein nằm chủ yếu trong các vùng có khối lượng phân tử 25 - 90 kDa và trong vùng 10 -

14 kDa, độc tố của phân đoạn này có lẽ là do các phospholipase (13 - 14 kDa) gây ra; phân đoạn 3 chứa các protein nằm trong vùng có khối lượng phân tử nằm trong vùng 10 - 14 kDa độc tố của phân đoạn này có lẽ do các phospholipase gây ra, phân đoạn 5 và 6 chứa các protein với khối lượng phân tử nằm trong các vùng 10 - 14 kDa và 3-8 kDa tương ứng với khối lượng phân tử của phospholipase và các neurotoxin nọc bò cạp; phân đoạn 7 chứa các protein có khối lượng phân tử nằm trong vùng 3-8 kDa tương đương với khối lượng phân tử của các neurotoxin nọc bò cạp như vậy độc tính của phân đoạn 7 là do các neurotoxin nọc bò cạp gây ra. Ngoài ra trong kết quả điện di (hình 2b) cho thấy phân

đoạn 4 chứa các protein có khối lượng phân tử nằm trong vùng 10-23 kDa và nó có tác dụng gây chảy máu không đông khi tiêm phân đoạn này vào chuột, tác dụng này có thể do protein có khối lượng phân tử khoảng 22 - 23 kDa gây ra, protein này không có trong các phân đoạn khác của nọc (hình 2).

Kết hợp điện di và thử độc tính cho thấy các neurotoxin nọc bò cạp *H. laoticus* nằm ở các vùng 3,5 - 5 kDa và 6 - 8 kDa tương đương với hai nhóm toxin ngắn và dài trong nọc bò cạp *Lychas mucronatus* mà chúng tôi đã khảo sát trước đây [12]. Các phân đoạn này sẽ được sử dụng để tách các neurotoxin từ nọc bò cạp *H. laoticus*.



Hình 2: Kết quả điện di các phân đoạn tách ra từ nọc bò cạp qua cột

- a) Điện di của các phân đoạn 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10 trong đó:
 1-phân đoạn No 1; 2-phân đoạn No 2; 3-phân đoạn No 3; 4-phân đoạn No 5; 5-marker; 6-phân đoạn No 7; 7-phân đoạn No 8; 8-phân đoạn No 9
 9-phân đoạn No 10; 10-phân đoạn No 6.
 b) Điện di của phân đoạn 4 trong đó: 1- marker; 2-phân đoạn No 4.

Như vậy phân tích nọc bò cạp *H. laoticus* qua cột Bio-Gel P 10 cho thấy ngoài các phospholipase và các neurotoxin có độc tính, trong nọc bò cạp còn chứa các toxin gây vỡ mạch máu như trong nọc rắn lục [13].

Ngoài ra chúng tôi đã thử hoạt tính kháng

khảo và kháng nấm của nọc bò cạp *H. laoticus*. Kết quả cho thấy nọc bò cạp có hoạt tính kháng vi khuẩn Gram (+): *Staphylococcus aureus* ở nồng độ 39,15 µg/ml và *Bacillus subtilis* ở nồng độ 71,84 µg/ml, và kháng vi khuẩn Gram (-) *Escherichia coli* ở nồng độ 39,44 µg/ml.

Những nghiên cứu hoạt tính này của nọc đã mở rộng thêm hướng nghiên cứu và sử dụng nọc bò cạp *H. laoticus* trong y dược.

IV - KẾT LUẬN

1. Sử dụng phương pháp sắc ký trên cột với Bio-Gel P 10, chúng tôi đã tách nọc bò cạp *H. laoticus* làm 10 phân đoạn. Thử độc tính của các phân đoạn đã tách ra trên chuột cho thấy có 6 phân đoạn độc. Trong số các phân đoạn độc có một phân đoạn chứa các toxin gây vỡ mạch máu và một phân đoạn chỉ chứa các neurotoxin.

2. Khảo sát hoạt tính của nọc thô trên hệ vi sinh vật cho thấy nó có tính kháng các khuẩn: *S. aureus*, *B. subtilis* và *E. coli*. Những nghiên cứu này đóng góp thêm vào hướng nghiên cứu chế tạo các chất kháng sinh từ nọc độc côn trùng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. L.D. Possani, B. Becerril, M. Delepierre, J. Tytgat. Eur. J. Biochem., Vol. 264, 287 - 300 (1999).
2. Merck, World patent application No WO95/0365 (1995).
3. J. Deshane, C. C. Crner, H. Sontheimer. J. Biol. Chem., Vol. 278(6), 4135 - 4144 (2003).
4. Cuban experts research on scorpion venom against cancer-Escozul. <http://havanajournal.com.culture>, (Anonymous 2004).
5. L. Kuhn-Nentwig. Cell. Mol. Life Sci., Vol. 60(12), 2651 - 2668 (2003).
6. M. C. Gwee, P. T. Wong, P. Gopalakrishnakone, L. S. Cheah, K. S. Low. Toxicon Vol. 31 (10), 1305 - 1314 (1993).
7. B. Lebrun, R. Romi-Lebrun, M. F. Martin-Eauclaire, A. Yasuda, M. Ishiguro, Y. Oyama, O. Pongs, T. Nakajima. Biochem. J., Vol. 328, 321 - 327 (1997).
8. K. N. Srinivasan, V. Sivaraja, I. Huys, T. Sasaki, B. Cheng, T. K. Kumar, K. Sato, J. Tytgat, C. Yu, B. C. San, S. Ranganathan, H. J. Bowie, R. M. Kini, P. Gopalakrishnakone. J. Biol. Chem., Vol. 277(33), 30040 - 30047 (2002).
9. Nguyễn Thị Phương Khuê, Võ Phùng Nguyên, Hoàng Ngọc Anh. Y học Tp. HCM, T. 12(1), 106 - 111 (2008).
10. U. K. Laemmli. Nature, Vol. 227, 680 - 685 (1970).
11. Hoàng Ngọc Anh, G. V. Maximov, B. B. Berezin, I. A. Yamskov. Tạp chí Sinh học, T. 25(1), 61 - 63 (2003).
12. Hoàng Ngọc Anh, E. V. Piskarev, B. B. Berezin, I. A. Yamskov. Tạp chí Sinh học, T. 24(2), 43 - 46 (2002).
13. S. Soogarun, V. Wiwanitkit, J. Suwansaksrit. Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis, Vol. 9(4), 337 - 339 (2003).