

参赛队员姓名：曾晨希

中 学：湖南省长沙市第一中学

省 份：湖南省

国 家：中 国

指导教师姓名：高建军

论文题目：山蛭消化液中一种新型镇痛活性肽研究

# 山蛭消化液中一种新型镇痛活性肽研究

曾晨希

**摘要：**山蛭俗称山蚂蝗，是一种吸血性环节动物。经查，山蛭的生物学特性与生殖生态已进行过研究，然而其体内镇痛活性成分研究未见报道。本文以活体广川山蛭(*Haemadipsa guangchuanensis* sp. nov.)消化道分泌液为材料，经凝胶过滤、超滤膜离心过滤、高效液相色谱分离纯化、质谱鉴定、显色反应、氨基酸序列测定、镇痛活性检测。实验结果表明：山蛭消化道分泌液中含有一种相对分子质量为3951.8的多肽，双缩脲反应显紫红色，将其命名为HGSN1。该肽含有34个氨基酸残基，分子中四个半胱氨酸残基形成了两对二硫键，鉴定全长氨基酸序列为：CPQVCPAIYQPVFDEFGRMYSNSCEMQRARCLRG；氨基酸同源序列比对显示HGSN1是一个新型活性肽。动物实验证明活性肽HGSN1对福尔马林引起的小鼠炎性疼痛具有明显的抑制作用。

目前的研究结果显示新型活性肽HGSN1是广川山蛭能够麻痹猎物完成吸血过程的重要内在因素。为研制新型镇痛药物提供了先导分子，对山蛭防治研究及药物开发具有重要意义。

**关键词：**山蛭；高效液相色谱；质谱；氨基酸序列测定；镇痛。

# 目 录

<b>1. 引言</b> .....	<b>6</b>
1.1 课题的由来.....	6
1.2 研究现状.....	8
<b>2. 实验材料与方法</b> .....	<b>8</b>
2.1 实验动物.....	8
2.2 实验试剂与仪器.....	8
2.3 技术路线 .....	9
2.4 山蛭消化道分泌液的提取制备.....	10
2.4.1 山蛭活体匀浆法.....	10
2.4.2 脉冲电刺激法.....	10
2.5 粗提物凝胶过滤层析.....	10
2.6 粗提物超滤离心分离.....	11
2.7 提取物反相高效液相色谱分离纯化.....	11
2.8 第二次反相高效液相色谱分析.....	12
2.9 质谱分析.....	13
2.10 显色反应.....	13
2.11 氨基酸序列测定.....	14
2.12 样品的变性酶解.....	14
2.13 制备小鼠镇痛实验模型.....	14
<b>3. 结果与讨论</b> .....	<b>15</b>
3.1 山蛭消化道分泌液的提取制备.....	15

3.2 粗提物凝胶过滤层析.....	15
3.3 洗脱峰 IV 超滤离心分离.....	16
3.4 样品组分的第一次反相色谱纯化.....	16
3.5 液相色谱洗脱峰镇痛活性筛选.....	17
3.6 目标组分第二次反相高效液相色谱分析.....	17
3.7 质谱分析.....	18
3.8 显色反应.....	19
3.9 目标组分氨基酸序列测定.....	20
3.10 目标肽镇痛活性测定.....	20
<b>4. 总结与创新.....</b>	<b>22</b>
4.1 总结.....	22
4.2 创新点.....	23
4.3 应用前景.....	23
<b>参考文献.....</b>	<b>24</b>
<b>致 谢.....</b>	<b>25</b>

## 1.引言

### 1.1 课题的由来

从小我就喜欢与大自然接触，对于自然界的各类生物与生物现象充满了好奇与兴趣。2015年9月，我和青竹湖湘一外国语学校17名同学赴湖南永州蓝山县开展探源湘江的活动。当我们走在探寻湘江源头的原始密林时，突然，听到了一名同学的尖叫，原来他发现与我们同行的家长郑叔叔的小腿上鲜血淋漓，血流不止，定睛一看，原来是一条可怕的、深褐色的蠕虫牢牢盯在上面，而更为可怕和蹊跷的是，郑叔叔却浑然不觉，仿佛被施了魔法！紧接着又有人尖叫起来，原来另外两位同学也中招了，都是在手臂或者脚上暴露的皮肤上发现了蠕虫，他们却丝毫没有察觉。这是什么虫子呀？大家七嘴八舌地议论着，“这叫山蚂蝗，学名是山蛭，我们南方山里好多呢。”蓝山县的环保志愿者宁老师向我们解释道。这是我第一次与山蛭亲密接触，我对这种会施魔法的山蛭产生了强烈的好奇心！查阅相关资料获悉：山蛭俗称山蚂蝗，也称为草蛭，拉丁学名(*Haemadipsa*)，在动物分类地位上属于环节动物门、蛭纲、颚蛭目、山蛭科、山蛭属。身体呈亚圆柱形，后端粗大，前半部渐尖，由27节组成，头尾处有吸盘，身体呈黄褐色，背面可见深褐色的纵纹。目前我国已报道的山蛭有近20种，大多分布于海南、湖南、广西、云南、四川、贵州、湖北、浙江、西藏等省区。常栖息于潮湿的山区草地或竹林里，常常用后吸盘吸附在乔木植物枝叶、大小石块或土壤表面，身体拉伸变长，身体后端与固定面几乎垂直，前端变尖变细，并向四周不停摆动晃荡，当有人畜在其间走动

时,由于气味变化与空气流动可以给山蛭提供新的化学和物理刺激,受此影响山蛭会迅速向寄主移动靠近。山蛭主要以温血哺乳动物如人、羊、牛、山狗、野猪、野兔等为吸血对象,少数山蛭会以青蛙、蟾蜍、蝾螈等冷血的两栖动物血液作为食物来源,常被称为山林中的“吸血鬼”。由于山蛭前端尖细似针,可以洞穿衣袜,当有人在山间行走时,即使穿着长衣、长裤、长袜,甚至绑上裤腿也难阻挡“吸血鬼”的叮吸。山蛭叮咬的部位主要针对人的小腿和脚面,有时也包括头颈部。被叮吸时所有人没有任何感觉,但吸血后叮咬部位会发红发痒。鉴于山蛭消化道能外排具有抗凝血作用的山蛭素,导致血液中血小板的凝血功能被破坏,所以被山蛭咬过后伤口常常出现血流不止的现象。

我非常好奇山蛭为了生存,进化出了怎样一类可以帮助完成吸血过程却不让寄主产生痛觉的功能?在山蛭的消化液中是否存在某类特殊物质可以抑制疼痛信号的传递从而麻痹自己的猎物?如果可以研制这样一种药物的话,那么局部镇痛和麻醉技术能不能有更大进步?由此我产生了要研究山蛭具有镇痛麻痹功能活性物质的强烈愿望。2016年,我通过在JHU的夏令营学习和入选长沙市一中生物奥赛兴趣组的机会,将这些想法向我的指导老师请教,老师对我的乐于思考和敢于提问给予了积极肯定和支持。于是,从2016年9月开始,指导老师就鼓励我利用课余时间深入开展这方面的研究性学习,给予我大力支持并及时带我请教了中南大学和湖南师范大学生命科学学院的老师,他们热情为我提供科学指导,为我开展相应的科研实验提

供了充足的条件，使得我从此顺利起步，开启了课题的研究。

## 1.2 研究现状

对于山蛭的研究，一方面是对生物学特性方面的研究，包括形态、分类、生殖、生态等<sup>[1-6]</sup>；其次是对山蛭基因组DNA研究，即利用PCR技术从海南山蛭体内分离山蛭素(抗凝血蛋白)基因,并获得完整的山蛭基因组DNA<sup>[7]</sup>；三是药用价值研究，发现山蛭唾液中含有抗凝血物质，可以特异性抑制凝血酶活性，从而抵制猎物本身血液的凝固<sup>[8]</sup>；同时山蛭注射液可以治疗脑出血和脑内血肿<sup>[9-10]</sup>；但是有关山蛭消化液中镇痛活性多肽的分离纯化与鉴定研究少有报道。

## 2. 实验方法与实验材料

### 2.1 实验动物

广川山蛭从湖南莽山国家森林公园野外捕获得到（见图 2-1）



图 2-1 广川山蛭的形态

## 2.2 实验试剂与仪器

试剂：乙腈、三氟乙酸、凝胶填料（葡聚糖 G-50）、Tris、NaCl、CCA( $\alpha$ -氰基-4 羟基-肉桂酸)、NaOH、CuSO<sub>4</sub>、福尔马林等均为分析纯。

仪器：反相高效液相色谱仪（Alliance 2695 与 1525 美国 Waters），C-4 色谱柱（250×10.00mm，5 $\mu$ m 美国 Lichrospher）和 C-18 色谱柱（250×4.60mm，5 $\mu$ m 美国 Lichrospher）；质谱仪（MALDI-TOF/TOF 德国 Bruker）；氨基酸序列测定仪（美国 Applied Biosystem）；超纯水仪（美国 Millipore）、打孔器、组织匀浆器、高速冷冻离心机（德国 Eppendorf）、脉冲电子刺激器、超净工作台、超低温冰箱、台式真空冷冻干燥仪、分析电子天平等均为国产仪器。

## 2.3 技术路线图

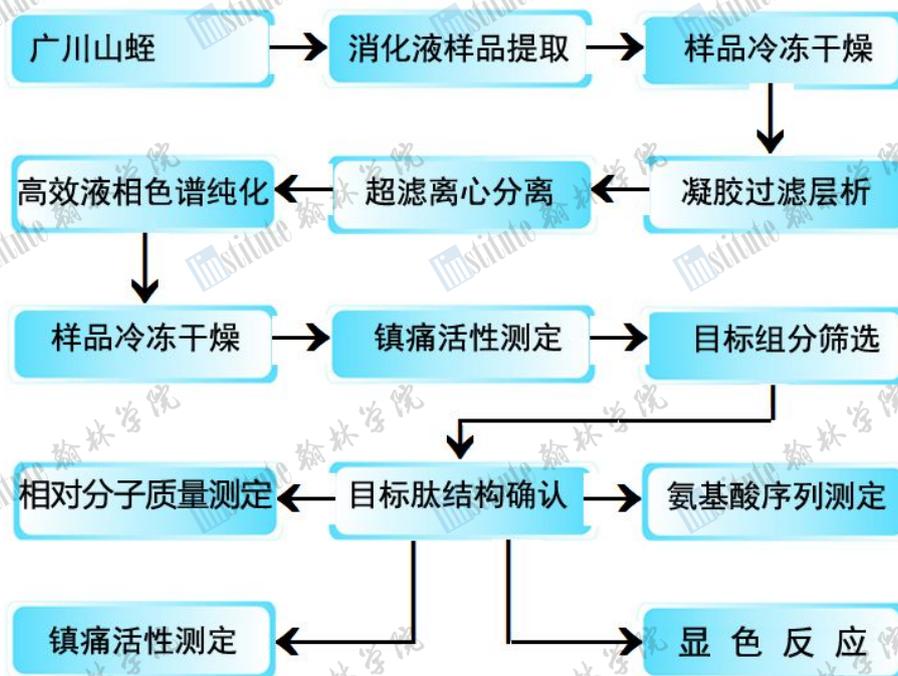


图 2-2 技术路线图

## 2.4 山蛭消化道分泌液提取制备

### 2.4.1 山蛭活体匀浆法

取液氮在研钵中直接速冻活体广川山蛭。在冰袋上，用医用纱布包裹山蛭，并用铁锤将山蛭敲打击碎成几段。把研碎的山蛭粉末、体积为 20.0 mL、浓度为 50.0 mmol/L 的 Tris(pH 值为 8.0)缓冲溶液进行混合匀浆，4℃、12000 转/分钟离心 40 分钟，收集离心上清溶液，得到广川山蛭匀浆液，经冷冻干燥后，于-80℃保存备用。

### 2.4.2 脉冲电子刺激器刺激法

实验前恒电压模式，先调节好脉冲电子刺激采集器的电压大小与刺激频率。然后用超纯水将活体山蛭清洗干净，采集分泌物时带上橡胶手套防止漏电流，将100条山蛭放在含50mL 0.9%NaCl溶液的烧杯中，采集人双手拿着电刺激器的两个电极分别接触烧杯内的溶液3-5秒，连续4-5次，见到山蛭吸盘口有白色泡状分泌物（图2-3）流出时，用0.9%的NaCl溶液冲洗，收集冲洗液，-80℃冷冻干燥备用。



图2-3 分泌液

## 2.5 粗提物凝胶过滤层析

取 2mL 山蛭匀浆液或电刺激样品溶液上样于用 Tris-HCl 缓冲液 (浓度为 0.02mol/L, pH 值为 7.8) 平衡过的葡聚糖 G-50 凝胶色谱柱 (26mm×100cm)。用同样浓度的平衡缓冲溶液进行洗脱, 设定流速为 0.3 mL/min, 自动馏分收集器采集速度为 3.0mL/管, 设定紫外检测器的检测波长为 280 nm 和 215nm, 收集各洗脱峰组分保存于-20°C 冰箱中备用。

## 2.6 粗提物超滤离心分离

挑选美国 Millipore 公司生产, 体积为 50mL, 分子量范围是 3K 和 10K 两种规格的超滤浓缩离心管, 用蒸馏水浸泡 60 分钟后, 加入 10 mL 凝胶过滤洗脱液, 6100 转/分钟离心 33 分钟, 收集离心浓缩分离样品备用。

## 2.7 粗提物反相高效液相色谱纯化

活性蛋白使用反相高效液相色谱, 在配备 1525 梯度泵和 2489 双波长检测器的半制备型色谱系统上进行纯化; 色谱柱采用分析型 C-4 色谱柱; 双流动相为度: 溶液 A 是含千分之一的三氟乙酸水溶液, 溶液 B 是含千分之一的三氟乙酸 乙腈溶液; 检测波长设定为 215nm 和 280nm; 柱温箱温度设定为 35°C; 样品纯化采用 C-4 色谱柱 (Lichrospher 公司, 大小 250mm×10.0 mm, 颗粒直径 5μm)。收集 280nm 处的各洗脱峰, 经冷冻干燥后得到粗提物目标样品, -80°C 保存备用。

表 2-1 山蛭分泌物粗提品的反相高效液相色谱洗脱梯度表

时间 (min)	流速(ml/min)	A 液(%)	B 液(%)	曲线
0.0	3.0	100.0	0.0	6.0
10.0	3.0	95.0	5.0	6.0
11.0	3.0	95.0	5.0	6.0
40.0	3.0	67.0	33.0	6.0
50.0	3.0	62.0	38.0	6.0
60.0	3.0	30.0	70.0	6.0
70.0	3.0	0.00	100.0	6.0

## 2.8 第二次反相高效液相色谱分析

在配备2489双波长检测器美国Waters公司的Alliance 2695反相色谱系统上进行二次纯化，色谱柱为C-18柱，为（250×4.60mm规格Lichrospher公司色谱柱）。检测双波长设定为215nm和280nm；柱温箱温度设定为37℃。洗脱梯度见表2-2。

表 2-2 目标肽第二次反相高效液相色谱洗脱梯度表

时间 (min)	流速(ml/min)	A 液(%)	B 液(%)	曲线
0.0	1.0	90.0	10.0	6.0
5.0	1.0	77.0	23.0	6.0
25.0	1.0	67.0	33.0	6.0
28.0	1.0	60.0	40.0	6.0
33.0	1.0	10.0	90.0	6.0
45.0	1.0	10.0	90.0	6.0

## 2.9 质谱分析

在美国爱博才思公司基质辅助激光解析超高分辨飞行时间质谱仪

上进行。辅助基质选择CCA( $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸), 检测模式设定为正离子反射模式; 爱博才思公司提供的控制软件和工作站上完成仪器操作和实验数据处理。用微量移液器移取样品1.0 $\mu$ L点在MALDI-TOF质谱板点样孔上, 然后再取饱和CCA基质1.5 $\mu$ L与该样品混合点样, 待样品结晶后实际测定目标肽的相对分子质量。

## 2.10 显色反应

### 2.10.1 双缩脲反应

配制1.0% CuSO<sub>4</sub> (硫酸铜) 溶液和10.0% NaOH (氢氧化钠) 溶液各10毫升。称取适量样品, 加蒸馏水配制浓度为0.1%的样品溶液。取二支干净玻璃试管, 分别加样品溶液和去离子水 (空白对照管) 各2.0毫升, 再分别加10%氢氧化钠溶液200 $\mu$ L及1%硫酸铜溶液100 $\mu$ L, 混匀, 观察样品管与空白对照管内溶液的颜色。

### 2.10.2 坂口反应

在两支干净玻璃试管中分别加入1.0 mL去离子水和样品溶液, 再加20% NaOH溶液, 1.0%的 $\alpha$ -萘酚溶液, 混合后再加次氯酸钠溶液, 观察样品管与空白对照管内溶液的颜色。

## 2.11 氨基酸序列测定

在日本岛津公司生产的蛋白质气相测序仪上进行测定。先配制标准 PTH 氨基酸溶液, 准备高效液相色谱系统流动相, 首先平衡色谱柱。然后向反应室加入新 PVDF 膜片, 再在 PVDF 膜片上分二次共计加入蛋白质样品 45 $\mu$ L, 氮气干燥后装入反应室固定。通过电脑编制测序的反应程序, 首先设置 1 个空白循环、一个标准 PTH 氨基酸循环, 再根据样品分子量设定氨基酸序列测定循环数目, 接着启动运行

测序程序，最后打印出测序图谱，确定样品的氨基酸序列。

## 2.12 样品的变性酶解

称取 0.1mg 的样品，用 200 $\mu$ L 蒸馏水溶解，100 $^{\circ}$ C 沸水浴变性 10 分钟后冷却到室温。在前述样品溶液中加入胰蛋白酶溶液 2 $\mu$ L，37 $^{\circ}$ C 水浴酶解 10 小时。

## 2.13 制备小鼠镇痛实验模型

首先配制 10mL 5.0% 的甲醛溶液。将 12 只 18 克左右的昆明种小白鼠，按每组 3 只随机分成 4 组，即变性酶解组、吗啡组、HGSN1 组与生理盐水组。其中吗啡组为阳性对照，生理盐水和变性酶解组为阴性对照。在小鼠后脚掌皮下注射 5.0% 福尔马林溶液建立福尔马林炎性疼痛模型，根据小鼠舔足时间判断疼痛强度与效果。

# 3. 结果与讨论

## 3.1 山蛭消化道分泌液提取制备

本研究中曾经尝试解剖山蛭的唾液腺组织，鉴于山蛭属于软体动物，其唾液腺细胞均被山蛭咽部的环肌与放射肌包裹，呈弥散分布，非常难以固定剥离，嗦囊和中肠难于解剖，所以改为整体匀浆。实验证明整体组织匀浆，由于生物成分极其复杂，后期样品的分离纯化挑战巨大。而脉冲电刺激的方法，由于简单快速，山蛭分泌的消化液样品比较纯，非常有利于目标组分的分离纯化，是一种理想的山蛭消化道分泌物提取制备方法。但是需要摸索实验条件如电流、电压、刺激时间、刺激频率等，刺激电流太小，频率太低，山蛭不吐消化液，电流太大，刺激频率太高、时间太长，山蛭非常容易死亡，也取不到样品。通过多次反复实验，发现山蛭的最佳脉冲电刺激参数为：电压

4-5V，电刺激时间 3-5s，间隔时间 2 分钟，连续刺激 4-5 次，发现在山蛭洗盘附件有白色液体或泡沫出现即可。

### 3.2 粗提物凝胶过滤层析

为了尽可能全面了解广川山蛭消化道分泌液中的生物活性组分，我们采用了凝胶过滤层析和反相高效液相色谱结合的方法进行分离纯化，粗提物先通过凝胶过滤层析得到四个洗脱峰（图 3-1），其中洗脱峰 IV 被选择用来进行超滤浓缩离心分离。

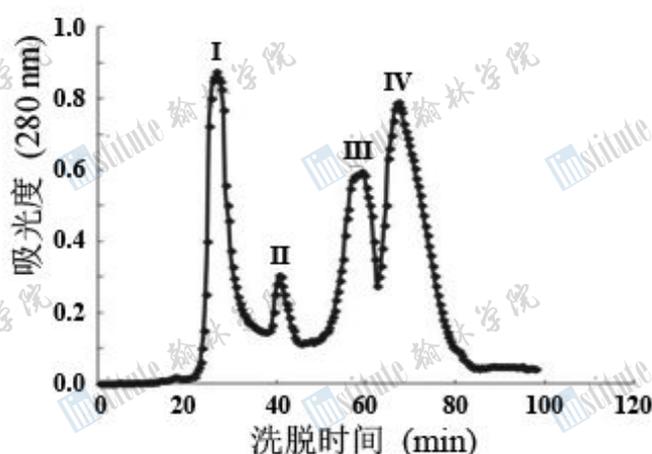


图 3-1 粗提样品凝胶过滤层析图

### 3.3 洗脱峰 IV 超滤离心分离

9.0 mL 上述凝胶过滤洗脱峰 IV 通过超滤浓缩离心（10K）40 分钟后，可以得到分子量 10000 以下的离心溶液约 5.1 mL，继续经超滤离心（3K）40 分钟后，可以得到分子量范围在 3000-10000 之间的超滤离心残留溶液约为 1.8 mL。

### 3.4 样品组分的第一次反相色谱纯化

经过前述两次超滤离心分离，相对分子质量范围在 3000-10000 之间的活性多肽样品经第一次反相高效液相色谱纯化，通过双波长紫外检测器在线检测，各组分洗脱峰保留时间见图 3-2。从图可知：在 280nm 检测条件下，广川山蛭超滤样品组分 IV 经高效液相色谱分离纯化，检测到 14 个较大的洗脱峰，其中保留时间最短为 2.05 分钟，最长为 39.75 分钟，收集各洗脱峰样品并经冷冻干燥备用。

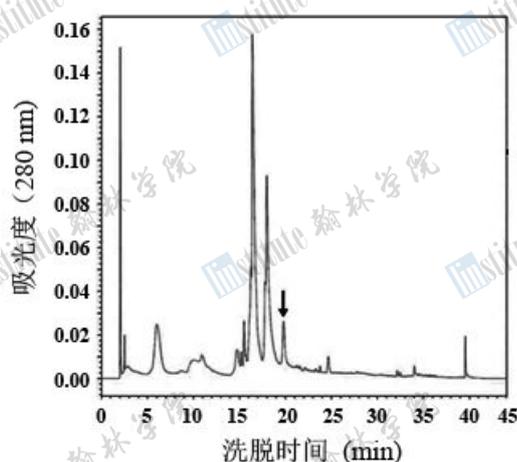


图3-2 超滤样品组分IV反相高效液相色谱图

### 3.5 液相色谱洗脱峰镇痛活性筛选

建立小鼠福尔马林致炎疼痛模型，采用腹腔注射法对图3-2中的洗脱峰样品组分所进行镇痛活性筛选统计，结果见表3-1。该样品中只发现保留时间为19.95分钟的洗脱峰对小鼠炎性疼痛模型有镇痛作用，而且与周边的洗脱峰能够基线分离，估计样品比较纯，故选择该洗脱峰为目标组分，进行第二次反相HPLC纯化和结构分析鉴定。

表 3-1 纯化组分对昆明种小鼠的镇痛活性

样品组	小鼠福尔马林致炎疼痛模型
生理盐水	-
洗脱峰 1	-
洗脱峰 2	-
洗脱峰 3	-
洗脱峰 4	-
洗脱峰 5	-
洗脱峰 6	-
洗脱峰 7	-
洗脱峰 8	-
洗脱峰 9	-
洗脱峰 10	-
洗脱峰 11	+
洗脱峰 12	-
洗脱峰 13	-
洗脱峰 14	-

“+”：阳性、有镇痛活性，“-”：阴性、无镇痛活性

### 3.6 目标组分第二次反相高效液相色谱分析

将目标组分样品在配备 2489 双波长紫外检测器的反相高效液相色谱系统上进行第二次纯化；其 A 洗脱溶液为含 0.1% 三氟乙酸水溶液、B 洗脱溶液为含 0.1% 三氟乙酸的乙腈；检测波长设为 280nm；柱温箱为 37℃；C-18 柱为 Lichrospher 色谱柱（大小为 4.6 mm × 250mm，填料颗粒直径为 5μm）。原保留时间为 19.95 分钟的洗脱峰，经第二次反相高效液相色谱纯化（见图 3-3），保留时间变为 27.45 分钟，主峰突出，旁边没有小的洗脱峰，说明样品已经较纯，该峰为目

标肽。

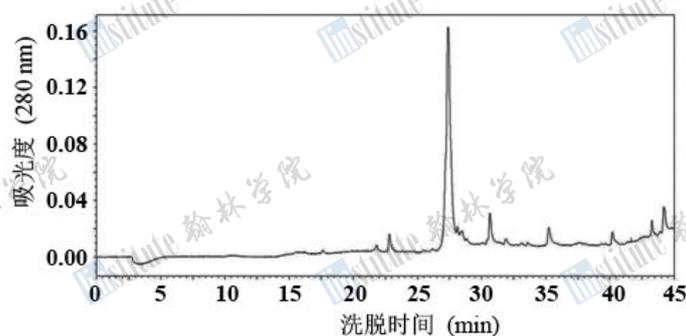


图 3-3 目标组分的第二次反相色谱纯化图

### 3.7 质谱分析

目标组分的质谱分析结果见图 3-4。从图可知：目标组分主峰的相对分子质量为 3952.8 ( $M+H^+$ )，据广川山蛭的学名，将该样品组分命名为 HGSN1；同时质谱鉴定图上没有出现其它较大的分子离子峰，说明目标肽样品纯度高。

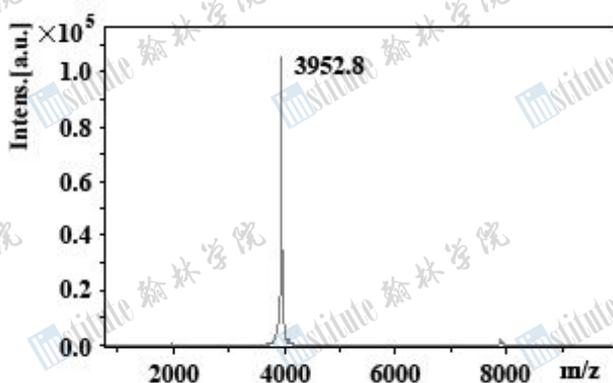


图 3-4 目标组分质谱鉴定图

### 3.8 显色反应

#### 3.8.1 双缩脲反应

向玻璃试管中加入 2.0 毫升样品溶液，再加入 100 微升 10% NaOH 溶液，样品此时呈碱性。再加入 100 微升 1.0% CuSO<sub>4</sub> 溶液，混匀后

观察样品管溶液呈紫色(见图 3-5)。而空白对照管内当加入硫酸铜溶液时，首先看到蓝色氢氧化铜沉淀出现，震荡后溶液颜色为淡淡的蓝色，推测目标组分是一个活性多肽。



图 3-5 目标组分双缩脲显色反应

### 3.8.2 坂口反应

在两支干净玻璃试管中分别加入1.0 ml去离子水和样品溶液，再加20%NaOH溶液4滴，1.0%的(-萘酚溶液2滴，加次氯酸钠溶液6滴混匀后，静置片刻，观察样品管溶液呈红色(见图3-6)，空白对照管内溶液的颜色无变化。由于坂口反应是蛋白质分子中精氨酸胍基的特征反应，所以推测目标组分是一个含有精氨酸残基的多肽。

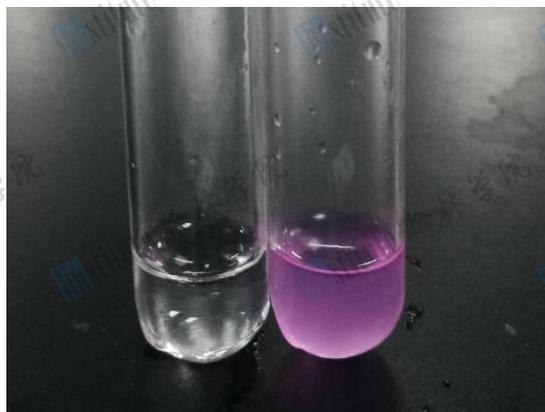


图 3-6 目标组分坂口显色反应

### 3.9 目标组分氨基酸序列测定

质谱鉴定显示目标组分的相对分子质量为3951.8，根据氨基酸的平均分子质量为110计算，推测目标肽可能含有35或36个氨基酸残基，因此在氨基酸序列测定实验中，设置了一个空白循环，一个标准PTH氨基酸循环，36个氨基酸序列测定循环，最终确定了HGSN1的全长氨基酸序列为：CPQVCPAIYQPVFDEFGRMYSNSCEMQRARCLRG。

根据氨基酸序列知道：目标肽由34个氨基酸残基组成，含有4个碱性氨基酸、3个酸性氨基酸、3个芳香族氨基酸、4个半胱氨酸。理论等电点为7.88，是一个碱性多肽。相对理论分子质量为：3956.58，比质谱实验测定值多4个Da,推测天然HGSN1分子中的4个半胱氨酸残基形成了两对二硫键。通过美国国家生物信息中心蛋白质序列数据库(网址[www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))，进行BLAST氨基酸同源序列比对搜索，没有发现有与HGSN1氨基酸序列同源性高于40%的多肽存在，证明目标组分HGSN1是一种全新的多肽。

### 3.10 目标肽镇痛活性测定

福尔马林注射液是世界通用的致炎物质，在急、慢性疼痛机制研究中得到广泛应用。其中高浓度福尔马林作用机体时，不仅可造成注射部位的组织损伤，产生持续的炎性疼痛反应，而且能够激活伤害性受体。进行动物实验时，在小鼠后脚掌皮下注射5.0%福尔马林注射液后，小鼠会马上显示躁动紧张不安的感觉，出现注射后足抬起离开地面，用舌头咬舔注射足，左右甩头或全身抖动等反应。其伤害疼痛行为出现典型的双相变化反应：0-5分钟为第I相痛，15-30分钟为第II痛。

福尔马林所致的第I相（急性期）痛，剂量在 $1.0\mu\text{mol/kg}$ 时，各组没有发现显著性差异（ $p>0.05$ ）；剂量达到 $2.0\mu\text{mol/kg}$ 和 $4.0\mu\text{mol/kg}$ 时，吗啡组与目标肽组（HGSN1）均存在统计学差异（ $p<0.05$ ），而且发现吗啡的效果更好（图3-7）。与生理盐水比较，吗啡组与目标肽组（HGSN1）II相伤害性反应显著减少（ $p<0.05$ ），吗啡组与目标肽组之间没有显著性差异，而且随着浓度的增加，镇痛活性存在明显的量效同步关系（见图3-8）。

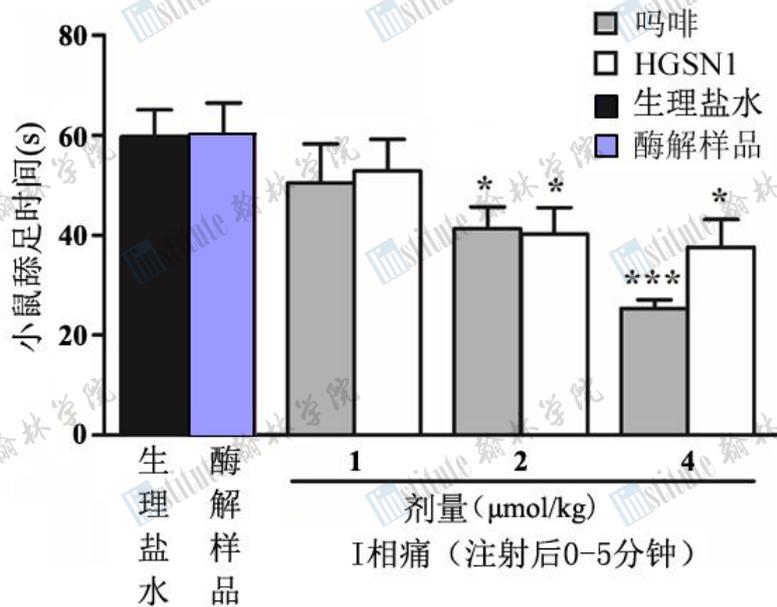


图 3-7 I 相痛量效反应柱状图

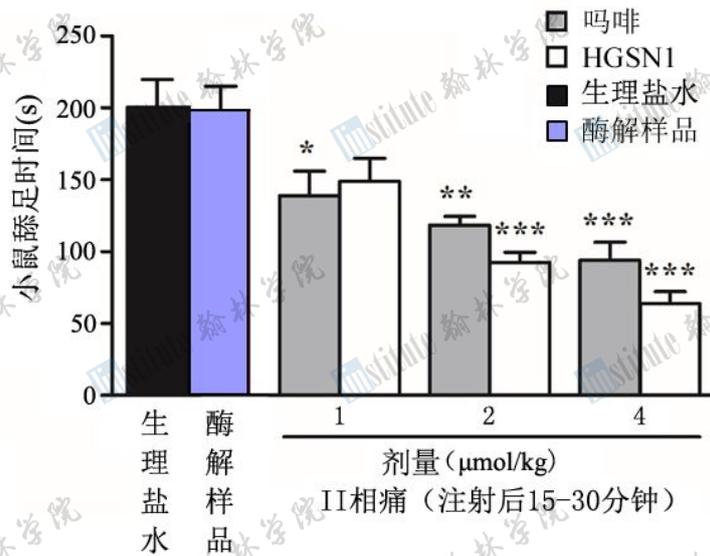


图 3-8 II 相痛量效反应柱状图

## 4. 总结与创新

### 4.1 总结

山蛭作为一种吸血性环节动物，为了确保可以成功从猎物身体吸食到血液，需要克服一系列困难如：刺穿皮肤、防止猎物凝血、快速完成吸血过程、绕开猎物的排斥、炎症反应等。对叮吸行为的已有研究证实，山蛭叮吸时猎物没有出现任何异样的感觉，吸血后会出现叮咬部位发红变色等反应，数分钟内会血流不止。这些现象提示山蛭在吸血的同时能够分泌让猎物产生麻痹作用的活性多肽，这是在亿万年进化过程中形成的，对于山蛭从猎物身体成功吸食血液、确保生存意义重大。

本项目采用脉冲电刺激法从广川山蛭采集消化道分泌液，结合葡聚糖G-50凝胶层析、超滤离心分离、反相高效液相色谱纯化技术，分离到一种相对分子质量为3951.8的活性多肽，命名为HGSN1。双缩脲

反应显紫红色，经Edman降解法序列测定确认其全长氨基酸序列为：CPQVCPAIYQPVFDEFGRMYSNSCEMQRARCLRG。HGSN1由34个氨基酸残基组成，分子内有两对二硫键。动物实验显示，2 $\mu$ mol/kg的HGSN1对小鼠福尔马林炎性疼痛具有明显的抑制作用。

目前的实验结果对于解释山蛭能够成功吸血却不产生疼痛感觉的作用机制，为开发与设计新型低副作用镇痛药物提供了一定的科学实验依据。

#### 4.2创新点

本研究的主要创新点是：

- 1.证明山蛭消化液中存在镇痛活性成分。
- 2.从山蛭消化液中分离纯化到一种相对分子质量为3951.8,由34个氨基酸残基组成的新型活性多肽HGSN1。
- 3.小鼠实验证明目标活性肽HGSN1具有明显的镇痛活性。

#### 4.3应用前景

为研制新型镇痛药物提供先导分子，对山蛭有害防治及药物开发具有重要意义。

## 参考文献

- [1] 谭恩光. 山蛭[J]. 自然杂志, 1980, 3(5): 375-377.
- [2] 谭恩光, 梁传精. 不同农药对海南山蛭毒力测定及其防治研究[J]. 应用生态学报. 2001, 12(2): 266-268.
- [3] 谭恩光, 潘夕观, 冯庆元. 四川省陆蛭二新种[J]. 动物分类学报. 1988, 13(1): 9-13.
- [4] 谭恩光, 钱月桃, 张一方, 陈鸣史. 海南岛山蛭生态分布的调查研究[J]. 生态学报. 1989, 9(4): 384-385.
- [5] 罗雅, 潘夕观, 王风林等. 薄层等电聚焦电泳技术应用于山蛭的分类研究[J]. 动物学研究. 9: 284-300.
- [6] 谭恩光. 广川山蛭一新亚种—川滇亚种记述[J]. 海南大学学报自然科学版. 2000, 18(1): 46-49.
- [7] 谭琳, 康由发, 施江, 郑学勤. 山蛭基因组 DNA 的提取及其 PCR 扩增产物的分析[J]. 生物技术. 2003, 13(3): 8-9.
- [8] 刘伟慧. 森林山蛭抗血栓多肽的分离纯化、结构与功能研究[D]. 南京农业大学, 2015.
- [9] 吴文斌, 胡常林, 吴碧华. 盐源山蛭注射液治疗脑出血的实验研究[J]. 脑与神经疾病杂志. 2002, 10(3): 146-149.
- [10] 吴文斌, 胡常林, 吴碧华. 盐源山蛭注射液治疗实验性脑内血肿的研究[J]. 临床神经病学杂志. 2001, 14(6): 336-338.

## 致 谢

400 多个日夜，在人生的长夜里，只是转瞬即逝。但是过去的这近两年时间，对我来说，不仅仅是以 6A 和英语千分之一的成绩通过中考完成了从初中生向高中生的转变，也不仅仅是通过无数次辛勤努力完成了这饱含着汗水与泪水的科研课题，更重要的是，我的内心的科学种子已经在这四百多个日子里不断的充盈、成长、开花，善于发现、勤于思考、敢于创新、乐于实践的科学种子已经在我十六岁的花季里牢牢驻扎下来。值此论文落笔之际，我的心中满是喜悦，更多的是感恩。

感恩一中集团。初中就读青竹湖湘一的校训“善勤健朴”和高中就读的长沙市一中的校训“公勇勤朴”，都给我深深地启迪，激发着我不断地去思考。尤其是指导老师勤勉授业，教导我夯实基础科学知识的学习，同时结合我的兴趣爱好，科学设计理论和实践课程，不断提升我生物学习的深度和广度，鼓励我挑战自我，超越自我。我所在的班级全部是有志于参与学科竞赛的同龄人，他们对科学的超级热爱和各种脑洞大开的思维方式以及精益求精的学习精神无时无刻都在感染着我。

感恩我的中国科协英才计划导师、中南大学陈翔教授和湖南师范大学生命学院的老师们。2016 年 9 月-2018 年 7 月期间，他们为我的课题研究给予了大力的支持，不仅为我提供了实验室和实验器材，更是常常给我讲述科学家的故事，以科学家的精神激励我多读无字之

书，勤于动手实践，弘扬湖南人“心忧天下敢为人先”的探求真理的科学精神。

感恩袁隆平爷爷。2017年夏天，我发起成立的走读湘江环保公益社荣获了中国第八届“母亲河奖”，爷爷亲切地接见了我们。当我去拜访爷爷，并好奇地咨询他是否在水稻田里遇到过蚂蟥并提出自己的疑问时，他高度肯定了我的观察能力并鼓励我进行项目研究，挑战一个不可能的任务。

感恩丘成桐中学科学奖这个国际性的竞赛平台。科技与创新永远是一个民族稳步前行的不竭动力。通过有机会参加这个比赛，鼓励我们中学生去尝试考试分数之外的学习，让我能够在更高更广阔的平台开阔眼界、展示自我、提升自我。

感恩我的家人。父母没有要求我“子承父业”，也没有要求我的分数和排名，而是始终支持我克服学习繁重的困难，遵从内心的爱好和兴趣去学习、探索与钻研。

最后，谨以美国约翰霍普金斯大学的校训结束我的论文：

**Veritas vos liberabit**（知识使人自由）！

### 参赛学生简历:

曾晨希，女，2002年2月出生，湖南省长沙市一中高二学生。对生物学习抱有浓厚的兴趣，2016年通过全球SCAT考试进入美国约翰霍普金斯大学CTY夏令营生物专业学习。2017年中考全A和英语全市千分之一进入湖南省长沙市一中，考入奥赛班。全国中学生英语能力竞赛（NEPCS）一等奖，托福110分，AP微积分BC和物理C力学均为满分5分。2018年5月获得全国生物奥赛湖南省一等奖，入选中国科协英才计划湖南省首批成员。2018年8月获得第33届全国青少年科技创新大赛二等奖、中国科学院大学专项奖和重庆大学专项奖（正在公示）。发起创办并担任社长的走读湘江环保公益社获评中国第八届“母亲河奖”，阿里巴巴2018年湖南江河卫士。

### 指导老师简历:

高建军，男，1963年9月出生，正高级教师，国家“万人计划”教学名师。现担任湖南省长沙市一中生物教研组长。教育部基础教育课程教材专家工作委员会委员，湖南省教育厅新课程学科专家组成员。湖南师范大学生命科学学院生物教育专业硕士研究生导师，长沙教育学院客座教授，同时担任湖南省教育学会生物专业委员会副理事长、湖南省生物竞赛委员会委员、长沙市生物学会理事长。辅导的学生参加国际中学生生物学奥林匹克竞赛获得金牌3枚，银牌3枚。辅导学生参加全国青少年科技创新大赛，获中国科协主席奖1项，全国一等奖3项。

## 声 明

本人声明所提交的论文是在指导老师指导下进行的研究工作和取得的研究成果。尽本人所知，除了文中特别加以标注和致谢中所列的内容以外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果。

若有不实之处，本人愿意承担一切相关责任。

参赛队员：

曾晨希

指导老师：

高建军

2018年9月14日