

白色霞水母刺细胞毒素对小鼠的毒性作用研究

冯金华¹, 于华², 李丽娜¹, 姜帅³, 郑文静⁴ (1.河北农业大学海洋学院, 河北秦皇岛 066003; 2.中国科学院海洋研究所, 山东青岛 266071; 3.上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306; 4.青岛科技大学环境与安全工程学院, 山东青岛 266042)

摘要 通过研究白色霞水母刺细胞毒素(CNV)对小鼠的毒性作用,探索CNV的毒性特征。结果发现,CNV致小鼠出现多种中毒反应、多组织器官超微结构发生形态学改变、甚至死亡,小鼠皮内注射LD₅₀为33.64 mg/kg。注射33.64 mg/kg CNV 4 h后,小鼠皮肤坏死、肺细胞水肿样改变、肾损伤严重,肾小管细胞趋向坏死、心脏和肝脏超微结构变化小。该研究结果可为白色霞水母蜇伤的救治及蜇伤药物的研制提供参考依据。

关键词 白色霞水母;毒素;致死活性;皮肤坏死;超微结构

中图分类号 R 282.77 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2022)14-0076-05

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2022.14.019



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Study on the Toxicity of the Nematocyst Venom from *Cyanea nozakii* Kishinouye on Mice

FENG Jin-hua¹, YU Hua-hua², LI Li-na¹ et al (1.Ocean College, Hebei Agricultural University, Qinhuangdao, Hebei 066003; 2.Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, Shandong 266071)

Abstract The toxicity effects induced by nematocyst venom of *Cyanea nozakii*(CNV) on mice were studied, and the toxic characteristics of CNV was explored. The results showed that CNV induced multiple toxic reactions, morphological changes in the ultrastructure of multiple tissues and organs, and even death in mice. LD₅₀ of mice for intradermal injection was 33.64 mg/kg. After 33.64 mg/kg CNV was injected 4 h, skin necrosis, edema-like changes of lung cells, severe kidney injury, tubular cell necrosis, and small changes of ultrastructure of heart and liver were observed. The research results could provide reference basis for the treatment of jellyfish stings and the development of stinging drugs.

Key words *Cyanea nozakii* Kishinouye; Venom; Lethal activity; Skin necrosis; Ultrastructure

水母是刺胞动物在浮游生物中的代表,广泛分布于温带、亚热带及热带海域。刺细胞是刺胞动物特有的细胞器,是刺胞动物赖以捕食和御敌的武器,当刺细胞受到物理、化学、生物等因素的刺激时可释放出毒液^[1]。海洋中的水母有10 000余种,其中100余种对人类有毒性,当人类与其接触时刺细胞中的毒液成分可经管状的刺丝注入皮内,引起蜇伤。

不同水母所含刺细胞的种类各异^[2],其释放的毒液成分及其活性特征各不相同^[3-4]。不同水母造成的蜇伤症状复杂多样^[5]。目前已报道的水母蜇伤症状最常见的是局部炎症反应,严重的还包括休克、脏器衰竭,甚至死亡^[6-7]。随着全球水母暴发,水母蜇伤已经成为危害严重的海洋生物伤害之一^[8]。目前,国内外对水母蜇伤的研究着重于临床症状观察以及治疗、护理等方面^[7,9]。由于水母毒素中致病性物质及其致病机理还不明确,水母蜇伤后的急救治疗缺乏理论依据。

白色霞水母是典型的有害水母种类,既无经济价值,又对接触者有较大的蜇伤毒性。自20世纪末起,东海北部至黄海、渤海水域连续发生白色霞水母暴发现象,且有愈演愈烈之势。被白色霞水母蜇伤后,往往引起严重的皮肤损伤,受伤皮肤出现红斑、瘀斑、出血等荨麻疹斑块;同时,还可能伴有呼吸道症状和全身症状,比如剧烈咳嗽、呼吸困难,甚至丧失意识^[10-11]。研究表明,白色霞水母刺细胞内毒素具有溶血活性、神经毒性、金属蛋白酶和磷脂酶A₂活性等^[4,12-14]。

目前,虽然对白色霞水母毒素的毒性成分越来越了解,但是白色霞水母毒素对哺乳动物的毒理特性还未见报道。笔者研究了白色霞水母刺细胞毒素对小鼠的毒性作用,检测刺细胞毒素对小鼠的致死毒性、对皮肤和内脏组织的病理损害,探索白色霞水母毒素蜇伤的中毒机理,旨在为白色霞水母蜇伤治疗和蜇伤特效药物的研制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料。白色霞水母(*Cyanea nozakii* Kishinouye)于2010年8月采自青岛第一海水浴场附近,由中国科学院海洋研究所高尚武教授进行品种鉴定。触手从水母伞盖处人工切除后,立即于-80℃下冷冻保存,备用。

1.1.2 主要仪器。GL-20B-II高速冷冻离心机,由上海安亭科学仪器厂生产;3110BXEUR美国Mini Beadbeater珠磨机,由上海上碧实验仪器有限公司生产;PMS-100解剖镜,由浙江托普仪器有限公司生产;XSZ-G光学显微镜,由重庆光学仪器厂生产;722S紫外可见分光光度计、FD-5N真空冷冻干燥仪,由上海精密科学仪器有限公司生产;H-7000透射式电镜,由日立高新技术公司生产;HH-2恒温水浴锅,由常州国华电器有限公司生产;902-ULTS超低温冰箱,由美国Thermo公司生产。

1.1.3 主要试剂。硫酸钠(AR)、三羟甲基氨基甲烷(AR)、磷酸氢二钠(AR)、磷酸二氢钠(AR),由国药集团化学试剂有限公司生产;牛血清白蛋白BSA(AR)由北京索莱宝科技有限公司生产;戊二醛(AR)由天津欧博凯化工有限公司生产;盐酸(AR)由上海环发化工有限公司生产。

1.1.4 实验动物。SPF级KM(昆明)小鼠,平均体重(20±

基金项目 河北省高等学校科学技术研究项目(yd2013030);河北省自然科学基金资助项目(D2014204127)。

作者简介 冯金华(1981—),女,山东泰安人,讲师,博士,从事海洋生物天然产物的制备及应用研究。

收稿日期 2021-07-17

2)g,购于青岛市药品检验所。

1.2 方法

1.2.1 刺细胞毒素的制备。

1.2.1.1 刺细胞的制备。冷冻的白色霞水母触手用无菌海水 4℃下浸泡(体积比 1:4),每 24 h 换 1 次新鲜海水(保留沉淀,在此期间可用玻璃棒轻轻搅拌几次)。4 d 后,用 54 μm 孔径的滤筛过滤,去除未溶解的触手组织和较大的组织碎片,滤液离心并收集沉淀。沉淀用 0.9% NaCl 溶液悬浮,13 000 r/min 离心 15 min 后,去掉上清液;通过显微镜观察,用小勺轻轻将沉淀上层破碎的刺细胞和小的组织碎片去除,底层的沉淀重新用 0.9% NaCl 溶液悬浮,13 000 r/min 离心;显微镜观察发现沉淀中刺细胞含量在 90%以上时,将沉淀收集、冷冻干燥后即得水母刺细胞样品,-80℃下保存,备用。

1.2.1.2 刺细胞毒素的提取。使用 Mini Beadbeater 珠磨机破碎刺细胞;破碎管中加入 1/2 体积直径 0.5 mm 的玻璃珠,再加入冷冻干燥的刺细胞和 Tris-HCl 缓冲液(50 mmol/L,pH 7.8),4 600 r/min 转速下振荡破碎,每次 1 min,共 4~5 次,每破碎 1 次冰水预冷 1 min。将破碎液 13 000 r/min 下冷冻离心 15 min,所得上清液即为白色霞水母刺细胞毒素(CNV),-80℃下保存备用。

1.2.1.3 蛋白质含量的测定。以牛血清白蛋白(BSA)作为标准,采用 Bradford 法^[15]测定 CNV 中总蛋白的含量。

1.2.2 CNV 对小鼠的致死毒性检测。用昆明种清洁级小鼠,设置 5 个试验组(A、B、C、D、E),每组 6 只,雌雄各半,皮内注射不同浓度的 CNV 溶液 200 μL;对照组 6 只小鼠,注射 200 μL Tris-HCl 缓冲液(50 mmol/L,pH 7.8)。观察并记录各组小鼠的表现,记录死亡时间并统计 24 h 后的死亡数,计算 LD₅₀。

1.2.3 CNV 致皮肤坏死作用观察。清洁级昆明小鼠 10 只,对照组和试验组各 5 只。试验前 1 d,用 8%硫化钠将小鼠背部脱毛。在备毛处,采用皮内注射的方法,试验组注射 1 个 LD₅₀剂量的毒素样品 200 μL,对照组注射相同体积的 Tris-HCl 缓冲液(50 mmol/L,pH 7.8),观察注射毒素 1 h、1 d、2 d 后小鼠皮肤的变化。

1.2.4 CNV 致小鼠组织病理变化的透射电镜观察。试验前 1 d,将小鼠背部的被毛先用剪刀剪去,尽量剪短,但不要剪破皮肤。然后,用温水将该部位润湿,再用纱布包扎棉球的小棒蘸脱毛剂(8%Na₂S 溶液),在需脱毛部位涂 1 层,2~3 min 后用温水洗去该部位脱下的毛,自然晾干,备用。

将小鼠完全随机分为试验组和对照组 2 组,每组 5 只。试验组在小鼠背部备皮处皮内注射 1 个 LD₅₀剂量的毒素样品 200 μL;对照组注射相同体积的 Tris-HCl 缓冲液(50 mmol/L,pH 7.8)。

配制含 5%戊二醛的 PBS 缓冲液(150 mmol/L,pH 7.3~7.4)及生理盐水,置于 4℃下预冷,作为固定液。

注射毒素样品 4 h 后,立即将小鼠解剖,取对照组和试验组注射部位皮肤、心、肺、肝、肾。取材时,先在解剖盘上滴 2 滴固定液,在 5%固定液中迅速用双面刀片切取小块样品

放入固定液中,1 h 内迅速将小块样品切成体积 0.5 mm³ 的小块,放入盛有固定液的样品瓶(置于 4℃冰箱中预冷)。由于肺组织内部有气体无法彻底排放,导致肺组织悬浮于固定液表面,固定液不能及时渗透进组织内部,从而导致大部分组织固定不良,所以取纱布条压于肺组织小块上,使组织沉底,全部浸泡在固定液中保存。应用解剖镜,将心脏组织小块沿肺纤维方向修成长条状。为了防止采集过程中细胞快速死亡自溶,环境温度应保持在 0~10℃。将上述固定好的样品用 1%OsO₄ 作后固定,经乙醇梯度脱水、国产 618 环氧树脂包埋、超薄切片机切片,用醋酸双氧钠和柠檬酸铅染色,最后使用日立 H-7000 型透射电镜进行观察。

2 结果与分析

2.1 小鼠 CNV 中毒后的表现 小鼠皮内注射毒素后开始观察,发现小鼠出现静伏少动、竖毛、蜷缩、后肢伸展、松弛、走路蹒跚、感觉稍迟钝、行动缓慢、睁眼困难,食欲减退,严重者出现全身抽搐、呼吸急促、死亡等中毒症状。

如表 1 所示,CNV 致小鼠死亡率呈现出明显的剂量依赖性。当毒素剂量为 43.65 mg/kg 时可致小鼠快速死亡,小鼠出现全身抽搐、呼吸急促,1~4 h 内死亡 4 只,24 h 后死亡 6 只;当毒素剂量为 38.80 mg/kg 时,小鼠 4 h 内死亡 2 只,另有 3 只出现静伏少动、不食、呼吸急促、睁眼困难等症状,24 h 后死亡 5 只。随着毒素剂量的降低,注射毒素后小鼠越活泼,症状越不明显,存活时间越长。

经观察发现,全部动物均表现为呼吸先完全停止,待肉眼观察到小鼠呼吸停止后再打开胸腔,暴露出心脏,心脏仍维持跳动 2~10 min。

参照熊浩明等^[16]的方法,按表 1 数据计算得出,CNV 致小鼠死亡的 LD₅₀为 33.64 mg/kg。

表 1 CNV 对小鼠的致死作用
Table 1 The lethal effect of CNV on mice

组别 Group	剂量 Dosage mg/kg	小鼠数 Number of mice // 个	死亡小鼠数 Number of dead mice // 个	死亡率 Mortality rate %
A	43.65	6	6	100
B	38.80	6	5	83.3
C	33.95	6	3	50.0
D	29.10	6	1	16.7
E	24.25	6	0	0

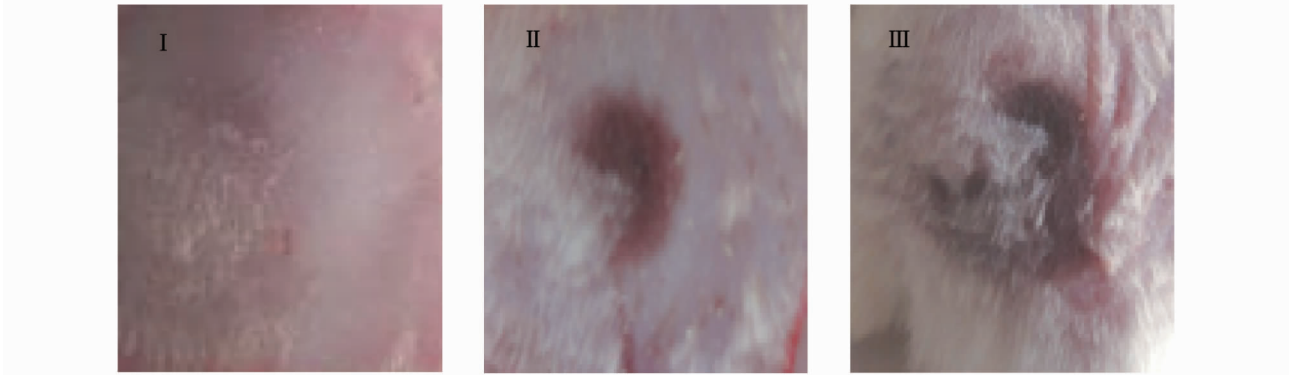
2.2 CNV 致皮肤坏死作用 如图 1 所示,试验组小鼠皮内注射 33.64 mg/kg 的毒素样品 200 μL,1 h 后注射部位开始隐现红色区域,随着时间的推移,皮肤损伤症状逐渐明显;1 d 后,注射部位皮肤中央凹陷,出现暗红色斑块,周围出现小鼠抓伤的痕迹;随着时间的延长,斑块继续向外沿扩展,颜色变为紫褐色,表面皮肤变硬;2 d 后,注射部位形成焦痂,呈坏死症状。随着时间的延长,深褐色焦痂继续增厚甚至溃烂。对照组小鼠皮肤没有观察到明显病理变化。

2.3 CNV 致小鼠组织细胞超微结构变化

2.3.1 皮肤超微结构变化。图 2 为注射 33.64 mg/kg 的 CNV 4 h 后对照组(Control)和试验组(A)小鼠注射部位皮肤的超

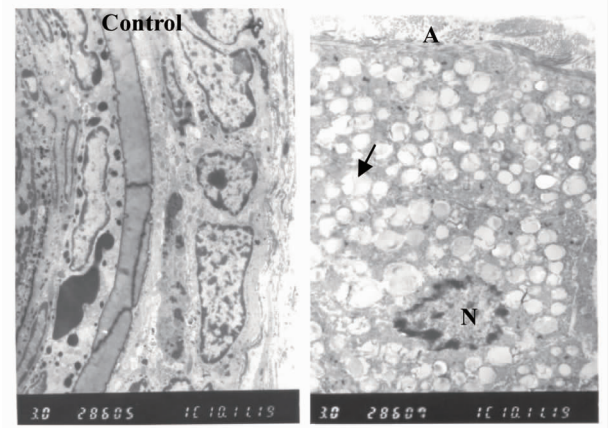
微结构图。从图 2 可以看出,对照组细胞器超微结构正常,细胞核核膜完整,可见核仁。试验组小鼠皮肤腺体细胞的超微结构出现多种明显结构变化,腺体颗粒囊泡化(黑色箭头所示为白色泡状结构);细胞呈溶解状态;电子密度明显降低;细

胞核皱缩,细胞核的核膜溶解(N 所示);染色质浓缩,边缘化凝集成板块样,分布于核膜处。从超微结构图可以看出,细胞变性,出现坏死特征。



注:I.SPF 级小鼠皮内注射 33.64 mg/kg 的 CNV 1 h 后;II.SPF 级小鼠皮内注射 33.64 mg/kg 的 CNV 1 d 后;III.SPF 级小鼠皮内注射 33.64 mg/kg 的 CNV 2 d 后
Note:I.After SPF mice were injected 33.64 mg/kg CNV by intradermal injection 1h;II.After SPF mice were injected 33.64 mg/kg CNV by intradermal injection 1 d;III.After SPF mice were injected 33.64 mg/kg CNV by intradermal injection 2 d

图 1 CNV 致小鼠皮肤坏死作用
Fig.1 The skin necrosis of mice induced by CNV



CNV 的作用使小鼠肺泡细胞出现自溶现象,且表现出明显的水肿特征。

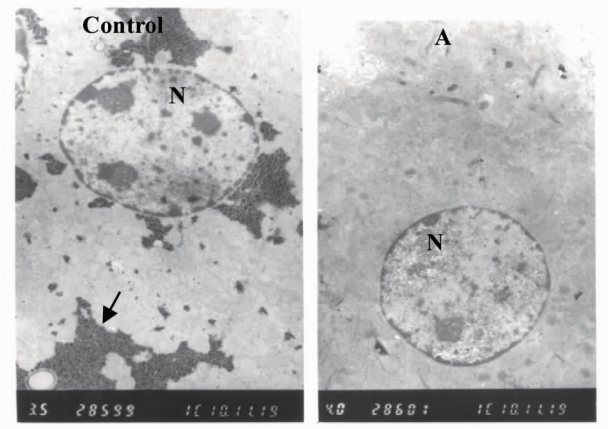


图 2 CNV 致小鼠皮肤超微结构变化

图 3 CNV 致小鼠肝脏细胞超微结构变化

Fig.2 Ultrastructural changes of mice skin induced by CNV

Fig.3 Ultrastructural changes of mice liver cells induced by CNV

2.3.2 肝脏细胞超微结构变化。如图 3 所示,注射 33.64 mg/kg 的 CNV 4 h 后,对照组(Control)小鼠肝脏组织细胞超微结构清晰、正常,肝细胞核呈圆形,胞质中糖原颗粒丰富(黑色箭头所示),内质网和线粒体丰富。试验组(A)小鼠肝细胞细胞器最显著的变化为肝糖原颗粒大量减少,甚至消失;其他变化包括核膜有部分溶解,核内基质略有减淡,染色质向核膜聚集,线粒体有肿胀现象;但细胞核大小、形状正常。此外,肝脏细胞超微结构无其他明显变化。

2.3.3 肺细胞超微结构变化。如图 4 所示,A₁、A₂、A₃ 为试验组小鼠肺上皮黏膜细胞超微结构图,与对照组(Control)相比,试验组小鼠肺细胞出现了明显损伤性变化。主要变化包括部分细胞核固缩、变形,形态不规则,核膜溶解破坏,双层膜间产生水肿液(⇨所指);细胞膜破坏,胞浆崩解;线粒体多数肿胀,基质减淡,嵴减少或消失,个别线粒体破裂;板层小体出现空泡样改变;内质网扩张形成小泡。这些变化表明

2.3.4 肾脏细胞超微结构变化。从图 5 可以看出,与对照组(Control)相比,受毒素的影响,试验组小鼠肾脏细胞超微结构发生明显的病理变化。主要表现如下:细胞核发生皱缩,染色质凝集程度增加、呈边缘化聚集,部分区域板块样聚集(A₂),核内电子密度明显降低(A₁)并出现核膜溶解(A₁);部分内质网扩张水肿,呈现泡状结构(黑色箭头所指);大量线粒体肿胀、基质减淡,嵴减少,有空泡化现象,外膜部分溶解,部分线粒体内开始出现无定形电子致密物(A₁、A₂),并出现髓样结构。这表明毒素使小鼠肾脏组织受到严重损伤,细胞有坏死迹象。

2.3.5 心脏细胞超微结构变化。如图 6 所示,与对照组相比,试验组小鼠的肌浆网和肌原纤维没有明显变化;细胞核出现微皱缩;线粒体完整,部分线粒体出现肿胀,但内嵴有微

溶解现象;细胞内出现髓样结构。整个心脏向功能衰弱的方

向发展,但并未出现衰竭的迹象。

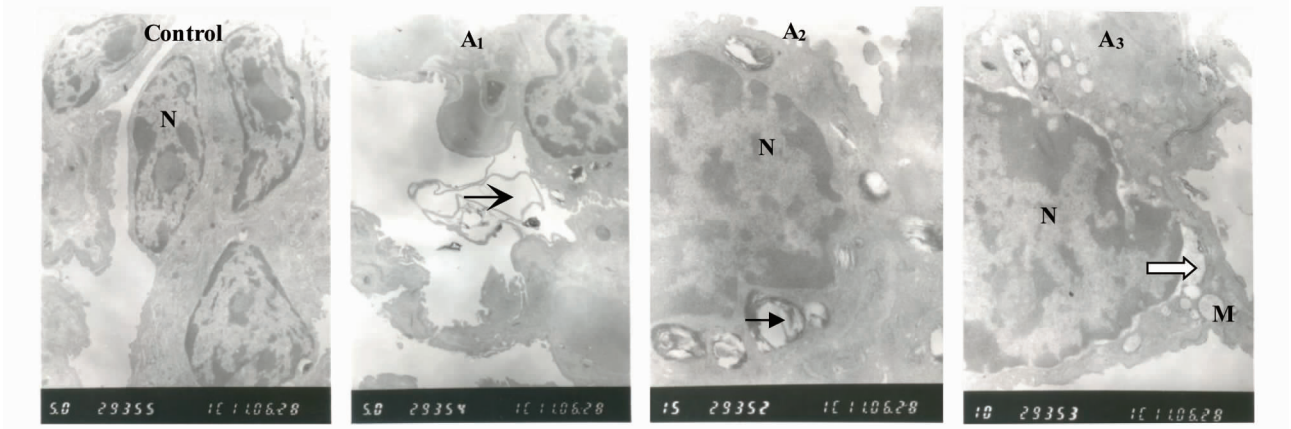
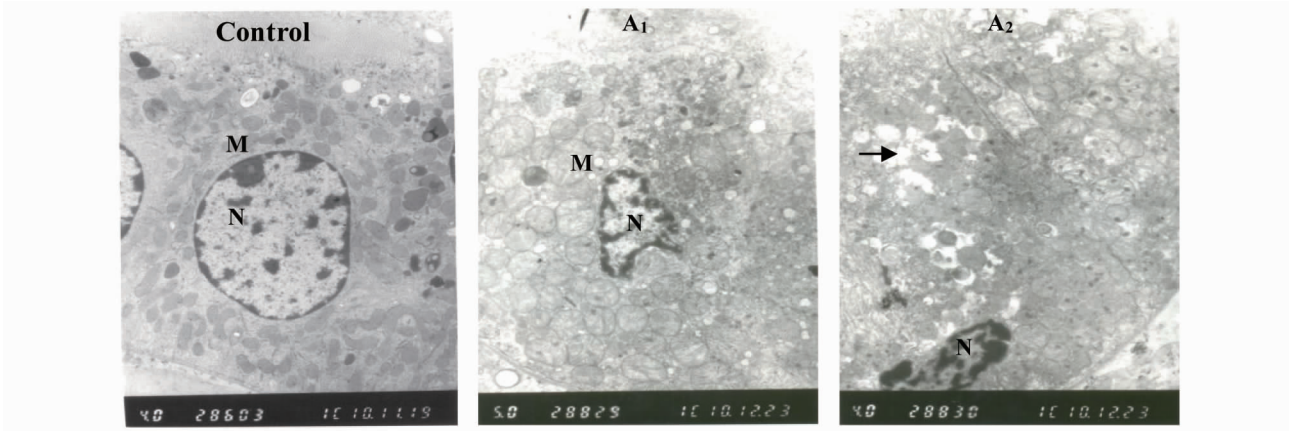


图4 CNV 致小鼠肺细胞超微结构变化

Fig.4 Ultrastructural changes of mice lung cells induced by CNV



注:A₁、A₂ 为试验组小鼠肾小管细胞的超微结构

Note:A₁ and A₂ were the ultra-structure of tubular cells in mice in the experimental group

图5 CNV 致小鼠肾脏细胞超微结构变化

Fig.5 Ultrastructural changes of mice kidney cells induced by CNV

3 讨论

该研究结果表明 CNV 可引发小鼠明显的中毒反应,甚至死亡。CNV 皮内注射对小鼠的 LD₅₀ 为 33.64 mg/kg,属于高度危害毒性。王蓓蕾^[17]采用尾静脉注射的方式进行检测,发现狮鬃水母(*Cyanea capillata*)的触手提取液对小鼠的 LD₅₀为5.484 mg/kg;Li 等^[18]研究发现沙蜚(*Stomolophus meleagris*)对小鼠静脉注射的 LD₅₀为2.92 μg/g。通过不同水母毒素的 LD₅₀大小可以看出毒性的强弱。由此可见,白色霞水母毒素相对于我国常见大型蜇人水母毒性较弱,可能这也是目前尚未见到关于白色霞水母致重症蜇伤患者报道的原因。

注射 1 个 LD₅₀剂量的 CNV 4 h 后,超微结构观察发现小鼠注射部位皮肤细胞线粒体、基质、细胞核、染色质等都发生明显坏死。1~2 d 后,小鼠皮肤表现出坏死症状,注射部位颜色变深,随着时间的延长,出现结痂和溃烂现象。据报道,水母蜇伤后的局部症状以红斑、丘疹为主,严重蜇伤时可导致色素沉着、瘢痕形成、坏疽。这与该研究报道的 CNV 具有皮肤坏死活性相吻合^[19]。

小鼠皮内注射 33.64 mg/kg 的 CNV 4 h 后,对皮肤及脏器的超微结构观察发现小鼠的皮肤和脏器表现出不同程度的损伤。其中,比较明显的损伤出现在皮肤、肺脏和肾脏,而肝脏和心脏的损伤相对较轻。注射狮鬃水母的触手提取液 2.4 mg/kg 1 h 后致大鼠模型引起严重的心肺损伤,但其对肝、肾的损伤较轻^[17]。沙蜚毒素可引起肺水肿和恶性胸腔积液,病理切片分析显示肾脏和肝脏受到严重损伤,但心脏、脾、胃未见明显改变^[18]。由于不同水母中所含毒性成分的差异,其引起的中毒症状、作用部位及中毒机理等有所差别。

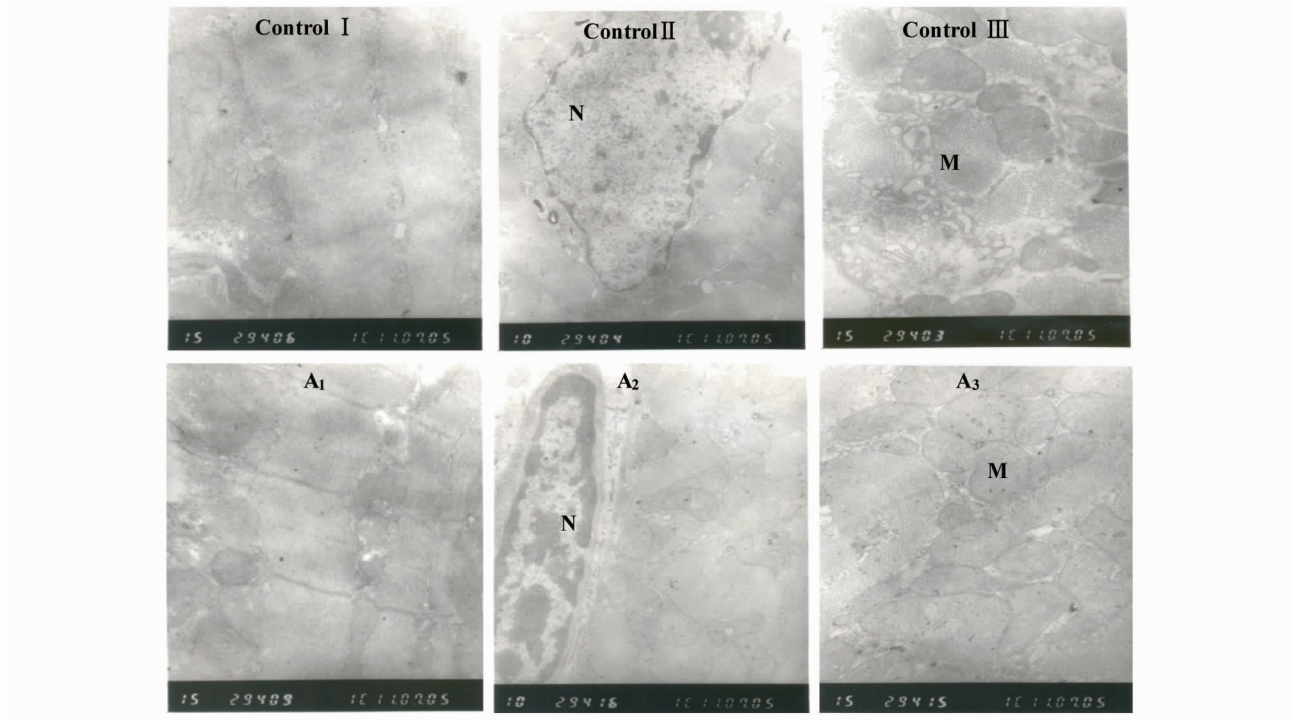
CNV 致小鼠肺组织细胞病变严重,出现明显水肿样变化,肺水肿病变会直接引起呼吸困难。从 CNV 致小鼠肺组织病变可以看出,白色霞水母蜇伤严重者可能会出现严重的肺水肿。多篇文献记载水母蜇伤致患者出现呼吸困难、咳大量泡沫样痰等急性肺水肿表现,最终导致的呼吸循环衰竭也被认为是致死的常见原因之一^[20-21]。肺水肿可能是多种水母蜇伤严重患者出现的共有症状。

肾功能衰竭可能是 CNV 引起小鼠死亡的又一重要原因。毒素除了引起小鼠肺脏细胞超微结构发生明显病变外,也引起肾脏严重的病理变化,肾细胞超微结构出现坏死。肾

细胞的严重病变可能导致肾功能衰竭。目前已有关于海月水母、海蜇蜇伤致急性肾功能衰竭的报道^[22-23]。

据报道,水母毒素有心脏毒性,可能是发状霞水母蜇伤致死的主要原因^[24]。但是,CNV 在致死剂量下对小鼠心脏

细胞超微结构的影响不明显,且解剖发现小鼠呼吸停止但心脏仍能维持跳动一段时间。这说明心脏毒性可能不是白色霞水母毒素致死的主要原因。



注:Control I、II、III 为对照组小鼠心肌细胞的超微结构,A₁、A₂、A₃ 为试验组小鼠心肌的超微结构

Note: Control I, II, III were the ultra-structure of the myocardial cells in mice in the control group, A₁, A₂, A₃ were the ultra-structure of the myocardial cells in mice in the experimental group

图6 CNV 致小鼠心脏细胞超微结构变化

Fig.6 Ultrastructural changes of mice heart cells induced by CNV

该研究揭示了白色霞水母毒素的部分毒性特征,为白色霞水母蜇伤的救治提供了试验依据。若要进一步了解其毒理特性,还需要明确毒素中每一种毒性成分及其功能。

参考文献

- [1] 任淑仙.无脊椎动物学[M].2 版.北京:北京大学出版社,2007:65-66.
- [2] 王文樵,许振祖.厦门港几种水母的刺胞研究[J].台湾海峡,1990,9(2): 161-165.
- [3] RICE N E,POWELL W A.Observations on three species of jellyfishes from Chesapeake Bay with special reference to their toxins.I. *Chrysaora* (Dactylometra) *quinquecirrha*[J].Biol Bull,1972,143(3):617-622.
- [4] YUE Y,YU H H,LI R F,et al.Biochemical and kinetic evaluation of the enzymatic toxins from two stinging scyphozoans *Nemopilema nomurai* and *Cyanea nozakii*[J].Toxicon,2017,125:1-12.
- [5] KAWAHARA M,UYE S,BURNETT J,et al.Stings of edible jellyfish (*Rhopilema hispidum*,*Rhopilema esculentum* and *Nemopilema nomurai*) in Japanese waters[J].Toxicon,2006,48(6):713-716.
- [6] 邵月竹,王进荣,高淑香,等.急性海月水母蜇伤对心脏的影响[J].中华急诊医学杂志,2001,10(3):194-195.
- [7] 王丹,王迎莉,蒲杰,等.海蜇蜇伤致中毒性休克及多脏器功能衰竭的救治与护理[J].护理研究,2008,22(23):2159-2160.
- [8] WARRELL D A.Venomous bites, stings, and poisoning: An update[J].Infect Dis Clin N Am,2019,33(1):17-38.
- [9] 闻卓岩,刘建丽,康晓华,等.儿童海蜇蜇伤 630 例临床分析[J].山东医药,2014,54(23):53-55.
- [10] 李荣锋,李鹏程.白色霞水母伤人之谜[J].大自然,2019(3):62-64.
- [11] 秦士德,李明.霞水母皮炎[J].青岛医学院学报,1988,24(4):300.
- [12] RIYAS A,KUMAR A,CHANDRAN M,et al.The venom proteome of three common scyphozoan jellyfishes (*Chrysaora caliparea*,*Cyanea nozakii* and *Lycnorchiza malayensis*) (Cnidaria: Scyphozoa) from the coastal waters of India[J].Toxicon,2021,195:93-103.
- [13] FENG J H,YU H H,LI C P,et al.Isolation and characterization of lethal proteins in nematocyst venom of the jellyfish *Cyanea nozakii* Kishinouye [J].Toxicon,2010,55(1):118-125.
- [14] FENG J H,YU H H,XING R E,et al.Partial characterization of the hemolytic activity of the nematocyst venom from the jellyfish *Cyanea nozakii* Kishinouye[J].Toxicol In Vitro,2010,24(6):1750-1756.
- [15] BRADFORD M M.A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J].Anal Biochem,1976,72(1/2):248-254.
- [16] 熊浩明,魏柏青,魏荣杰,等.用 SPSS 软件计算鼠疫菌半数致死量(LD₅₀) [J].中国人兽共患病学报,2013,29(11):1127-1130.
- [17] 王蓓蕾.致命性水母蜇伤综合征的机制及药物干预研究[D].上海:第二军医大学,2014.
- [18] LI R F,YU H H,YUE Y,et al.In depth analysis of the *in vivo* toxicity of venom from the jellyfish *Stomolophus meleagris*[J].Toxicon,2014,92:60-65.
- [19] 张重阳,孟庆义,邱泽武.2014 年中国海蜇蜇伤救治专家共识[J].临床误诊误治,2014,27(10):1-5.
- [20] 杨丽娜.1 例海蜇刺伤后致过敏性休克患者的护理[J].中国伤残医学,2012,20(11):216-217.
- [21] 贺海山,吕岩.海蜇蜇伤致过敏性肺水肿的救治体会[J].河北医药,1993,15(3):156-157.
- [22] 王丽静,王爱娜.重型海蜇蜇伤 18 例救治体会[J].中国综合临床,2002,18(3):271.
- [23] 王丽静,赵丽华,高淑香.海月水母蜇伤致急性肾功能衰竭一例[J].中华肾脏病杂志,2001(5):297.
- [24] XIAO L,HE Q,GUO Y F,et al.*Cyanea capillata* tentacle-only extract as a potential alternative of nematocyst venom: Its cardiovascular toxicity and tolerance to isolation and purification procedures [J].Toxicon,2009,53(1):146-152.