北醫學報 第十卷 1979年12月
p. 25-32

蜜蜂 *Apis Mellifera* 之毒的抗凝血作用之研究

林松洲

當以全血凝固時間（Whole blood clotting time）、血漿凝血酶原時間（Plasma prothrombin time）、部份凝血活素時間（Partial thromboplastin time）及鈣凝固時間（Calcium clotting time）來進行體外試驗時，歐洲種的蜜蜂 *Apis mellifera* 之毒具有顯著的抗凝血作用。在本實驗中，蜜蜂毒既不會被壞纖維蛋白原（Fibrinogen），不會使凝血酶（thrombin）不活性化，亦不會干擾凝血酶與纖維蛋白原之間的相互作用。將蜜蜂毒與凝血活素（Thromboplastin）之混合液在37°C的水浴中溫浸會延長血漿凝血酶原時間，而在溫浸之後，凝血活素的活性並不能經由稀釋而回復。

蜜蜂毒的抗凝血作用能競爭性地被組織凝血活素（tissue thromboplastin），腦磷脂（cephalin）及破裂的血小板（ruptured platelet）抑制。磷脂酶甲（Phospho-lipase A）的活性對於100°C之熱處理在pH7.4比在pH5.6更不安定。抗凝血活性比磷脂酶甲活性更能抵抗100°C之熱處理。以每公斤體重1.0毫克之劑量將蜜蜂毒注入兎子的耳緣靜脈內，則8隻中有4隻在10分鐘之內即死亡，不死的4隻，血液凝固時間亦只稍微延長。

許多種動物之毒，尤其是蛇毒，能顯著地影响血液凝固（Houssay，1930；Lee *et al.*，1955；Ouyang，1957；Boquet，1964；Meaume，1966；Rosenfeld *et al.*，1968；Jiménez-Porras，1970；Lee，1975；Tu，1977）. Joshua及I-shay 在1975年亦曾描述；由東方種蜜蜂 *Vespa orientalis* 的毒囊抽出之毒具有抗凝血作用。關於歐洲種蜜蜂 *Apis mellifera* 之毒的抗凝血作用，Habermann 曾於1954年報告此毒能由於使組織凝血活素（Tissue thromboplastin）不活性化而抑制血液凝固，此種作用或許是因含有磷脂酶甲（Phospholipase A）之成分。然而，此種蜂毒對於其他凝固因子的影响，尚未完全清楚。本篇論文乃爲了研究此種蜂毒的抗凝血作用，藉以探討其作用方式。

實驗材料及方法：

材料：*Apis mellifera* 之毒、腦磷脂（Cephalin）及混含鎖鏈蛇蛇毒（Russell's Viper venom）之粗製腦磷脂（Crude cephalin）均購自Sigma藥品公司。牛之凝血酶（Bovine thrombin）購自Park Davis公司後溶於50%甘油醇—生理食塩水（Glycerol-Saline）內製成1000 N.I.H.單位／毫升之貯存液（Seegers and Smith，1942）。牛之纖維蛋白原（Bovine fibrinogen）購自Pentex公司後溶於pH7.4之嘧唑—生理食塩水（imidazole-saline）中，而其20毫克／毫升之貯存液於臨用前被貯存於－70°C中，由兎腦取出的凝血活素（thromboplastin）乃依照1962年Biggs及Macfarlane之方法製備。

缺乏血小板之血漿（Platelet-poor Plasma）：檸檬酸血（Citrated blood；1容積：9容積）在4°C，每分鐘3000轉，離心20分鐘而製得。

破壞的血小板之製備：以0.1M Na_2EDTA當抗凝血劑，用19號注射針依1容積：14容積之比例自兎子的耳緣靜脈抽得的血液，立刻在室溫下，以每分鐘1000轉之轉速離心10分鐘，取含豐富血小板之上層血漿，在室溫下

台北醫學院藥理學科
民國68年7月6日受理

，以每分鐘 3000 轉之轉速，再離心 20 分鐘，然後以含有Na_2EDTA（3mM）、apyrase（ADPase 活性，0.5 單位／毫升）及牛之血清白蛋白（Bovine serum albumin，1 毫克／毫升）的Tris-緩衝塩液（Tris buffered saline，pH7.4）將血小板小粒（Platelet pellets）懸浮後照上法離心（Mustard *et al.*, 1972及Ardlie *et al.*, 1971之方法的修飾法）。此洗淨的步驟反復二次後將洗淨的血小板懸浮於Tris-緩衝塩液中，以攪拌機攪碎後再冷凍及解凍三次後使用。

血液凝固試驗：全血凝固時間（Whole blood clotting time）依Lee及White（1913）之方法。血漿之鈣凝固時間（Calcium clotting time）依Biggs及Macfarlane (1962) 之方法。血漿凝血酶原時間（Plasma prothrombin time）依Quick（1938）之一階段的方法（one stage method）。部份凝血活素時間（Partial thromboplastin time）採用Nye *et al*（1962）之方法。鎖鏈蛇蛇毒（Russell's viper venom；Stypven）之凝血時間的測定採用O'Brien（1958）之方法。抗凝血酶（Anti-thrombin）之作用的判定，採用Seegers *et al*（1952）之方法。纖維蛋白原溶解活性（Fibrinogenolytic activity）的測定採用Ouyang及Teng（1976）所敍述之方法。對於凝血酶（thrombin）與纖維蛋白原（Fibrinogen）之間的相互作用之影响依Seegers及Smith（1942）之方法。

溶血活性：對於洗淨的紅血球之間接的溶血活性之測定採用Brown及Boweles（1966）之方法。

結　果

蜜蜂毒對於血液凝固的影响：表1乃以血液凝固之各種試驗方法觀察蜜蜂毒的抗凝血作用。對於缺乏血小板的血漿很清楚地顯示此蜜蜂毒能很顯著地延長鈣凝固時間（Calcium clotting time）及部份凝血活素時間（Partial thromboplastin time），但對於血漿凝血酶原時間（Plasma prothrombin time）的延長並不顯著，對於鎖鏈蛇蛇毒之凝固時間（stypven time）的延長，只是中等程度。在小於10 微克／毫升之濃度，全血凝固時間不會延長，但是在300微克／毫升以上之濃度，不儘會顯著地延長，而且會產生溶血作用。在0.1 微克／毫升至1000 微克／毫升之濃度，此蜂毒並無促進血液凝固（即縮短凝固時間）之作用。

此蜜蜂毒即使以1毫克／毫升之濃度與纖維蛋白原（Fibrinogen）10 毫克／毫升在37°C 之水浴中共同溫浸1小時亦不會有意義地破壞纖維蛋白原，在此濃度對於凝血酶（thrombin）之不活性化亦無有意義的影响。在高至0.8 毫克／毫升之濃度，對於凝血酶與纖維蛋白原之間的相互作用亦無有意義的影响。

蜜蜂毒的抗凝血作用被凝血活素、腦燐脂及血小板中和的情形：凝血活素（Thromboplastin）具有很强的促進血液凝固的活性。即使將凝血活素稀釋至100至200倍，缺乏血小板的血漿之凝固時間亦只是延長3倍。凝血活素低濃度存在時，蜜蜂毒會延長血漿凝血酶原時間（Plasma prothrombin time），但是當凝血活素的濃度增加時，這些抗凝血作用能夠被對抗（圖1）

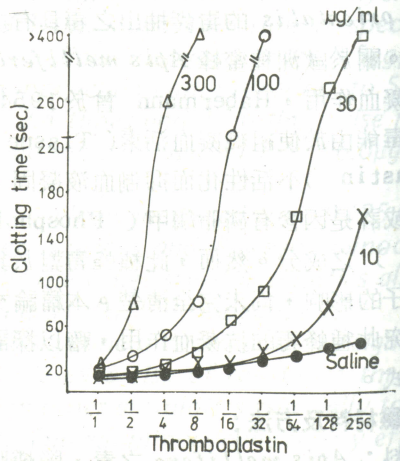

圖1 蜜蜂毒的抗凝血作用被兎腦之凝血活素中和的情形
凝血系統：0.1毫升缺乏血小板的血漿＋0.1毫升凝血活素＋0.1毫升蜜蜂毒（加入後之最後濃度如圖所示）＋0.1毫升Ca^{+}（25 毫摩爾濃度）。每一數據代表3～4個實驗結果之平均值。數據之變異在10 %內。

表 1 Apis mellifera 之蜜蜂毒對於兎子之缺乏血小板的血漿之 (A)血漿凝血酶原時間，(B)鎖鏈蛇蛇毒之凝血時間，(C)部份凝血活素時間及 (D)鈣凝血時間，以及對於 (E)全血凝凝固時間的影响。

試驗系統	A	B	C	D	E
蜂毒濃度（微克／毫升）	凝固時間				
	秒	秒	秒	秒	分
0	12.7 ± 0.2	15.6 ± 0.5	54.6 ± 4.0	79.8 ± 2.1	4.2 ± 0.3
0.1				82.5 ± 4.1	
0.3				91.1 ± 4.5	
1	13.9 ± 0.3		72.6 ± 3.4	96.4 ± 5.8	
3	19.9 ± 1.0	16.0 ± 0.4	98.2 ± 9.1	140.5 ± 7.2	
10	26.9 ± 1.1	18.2 ± 0.3	125.1 ± 11.6	154.5 ± 9.7	5.7 ± 0.5
30	30.6 ± 1.5	26.4 ± 0.6	＞600	＞600	11.7 ± 1.6
100	39.4 ± 4.8	48.3 ± 0.8			24.5 ± 4.6
300	51.1 ± 2.5	＞600			155.5 ± 21.4**
1000	98.9 ± 9.6*				

*顆粒狀的纖維蛋白凝塊　　**凝固以後溶血

凝血試驗系統：0.1毫升之缺乏血小板的血漿在水浴中加溫至 37°C，然後加入 0.1毫升之 pH7.4 的生理食塩水（作爲對照組）或各種濃度的蜜蜂毒。於此混合液中，分別加入 (A) 0.1毫升之組織凝血活素（5％），(B)混合鎖鏈蛇蛇毒之腦燐脂，(C)腦燐脂或 (D)生理食塩水。最後，再分別加入 0.1毫升之 25 毫摩爾濃度之氯化鈣溶液，隨即測定各種凝固時間。關於 (E)全血凝固時間的測定爲以預先裝有 0.1毫升之蜂毒或生理食塩水（作爲對照組）與自兎子的耳緣靜脈抽出之 0.9毫升的血液混合後測定其血液凝固時間。實驗次數 n＝4～6。

當腦燐脂（Cephalin）（圖 2）或破裂的血小板（圖 3）被使用時，蜜蜂毒之抗凝血作用被中和的情形亦相似。然而，腦燐脂及破裂的血小板之促凝血作用（Procoagulant）及對於蜜蜂毒的中和效果顯然弱於組織凝血活素（Tissue thromboplastin）。

凝血活素與蜜蜂毒在 37°C 的水浴中共同溫浸，對於血漿凝血酶原時間的影响：蜜蜂毒能迅速地使凝血活素、活性化，而使凝血活素之促凝血活性降低，在與凝血活素共同溫浸 30 分鐘之後，血漿凝血酶原時間可由 11.8 ± 1.1延長到 22.3 ± 1.5秒，而在對照組（生理食塩水）的情形，凝固時間並無改變。若將凝血活素與蜜蜂毒之共浸混合液稀釋 20 倍（稀釋後蜜蜂毒的濃度變爲 1.25 微克／毫升，而如表 1 所示，在此濃度下並無抗凝血作用），則血漿凝血酶原時間亦能有意義地延長（如表 2 所示）。

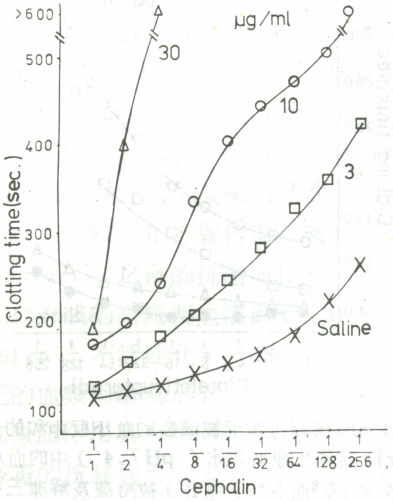

圖 2 蜜蜂毒的抗凝血作用被各種濃度的腦燐脂中和的情形。凝血系統：0.1毫升缺乏血小板的血漿＋0.1毫升腦燐脂＋0.1毫升蜜蜂毒（加入後之最後濃度如圖所示）＋0.1毫升 Ca^{2+}（25 毫摩爾濃度）。每一數據代表 4 至 6 個實驗結果之平均值。數據之變異在 10％內。

表2：凝血活素與蜂毒共浸，對於血漿凝血酶原時間（秒）的影响。

稀釋	處理方式	共浸時間（分）					
		0	5	10	15	20	30
無（n＝4）	生理食塩水	6.4 ± 0.2	6.0 ± 0.3	6.0 ± 0.2	6.3 ± 0.2	6.1 ± 0.2	6.2 ± 0.1
	蜂毒*	11.8 ± 1.1	16.5 ± 1.2	17.9 ± 1.8	18.8 ± 1.5	19.9 ± 1.7	22.3 ± 1.5
稀釋20倍（n＝3）	生理食塩水	15.1 ± 0.2	15.9 ± 0.1	16.0 ± 0.3	15.5 ± 0.2	15.7 ± 0.5	16.0 ± 0.2
	蜂毒**	31.7 ± 4.4	38.9 ± 2.8	46.9 ± 3.4	48.5 ± 3.7	53.5 ± 4.1	53.6 ± 4.1

*在共浸液中蜂毒的濃度爲50 微克／毫升，最後濃度則爲25 微克／毫升
**在共浸液中蜂毒的濃度爲50 微克／毫升，最後濃度則爲1.25 微克／毫升

試驗方法：0.6毫升之5％的凝血活素與0.6毫升之0.1毫克／毫升的蜜蜂毒或生理食塩水（作爲對照組）之混合液在37°C之水浴中共浸0，5，10，15，20，30分後，（取0.1毫升，以1.9毫升之生理食塩水稀釋20倍，然後取0.2毫升，加入0.1毫升之25 毫摩爾的Ca^{2+}溶液（預先置於37°C之水浴中），隨即測定血漿凝血酶原時間。數據之表示爲4至6個實驗結果之平均值±標準誤差。

100°C之熱處理對於蜜蜂毒之抗凝血活性的影响；如表3所示，在pH7.4及pH 5.6於100°C 加熱15 分鐘之後，以血漿凝血酶原時間來觀察，蜜蜂毒的抗凝血活性並未有意義地受到影响。然而，在加熱30 分鐘之後，此種抗凝血活性會進行性地減弱，但即使加熱180分鐘，亦不會完全喪失。

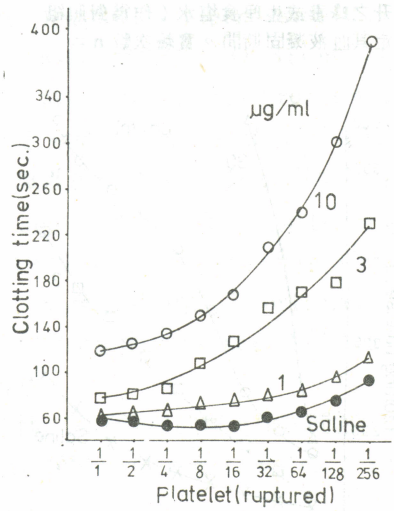

圖3 蜜蜂毒的抗凝血作用被破裂的血小板中和的情形。溶於Tris緩衝生理食塩水（pH7.4）中的血小板懸浮液（2×10^8血小板／毫升）被冷凍及解凍三次。凝血系統：0.1毫升缺乏血小板之血漿+0.1毫升各不同稀釋度之破裂的血小板＋0.1毫升之蜜蜂毒（最後濃度如圖所示）＋0.1毫升Ca^{2+}（25 毫摩爾濃度）。每一數據代表4至6個實驗結果之平均值。數據之變異在10％內。

100°C 之熱處理對於蜜蜂毒之間接的溶血活性之影响：在pH7.4加熱120分鐘之後，蜜蜂毒之間接的溶血活性完全被破壞。在pH 5.6 加熱180分鐘之後，蜜蜂毒之間接的溶血活性並無有意義地受到影响（圖4）。

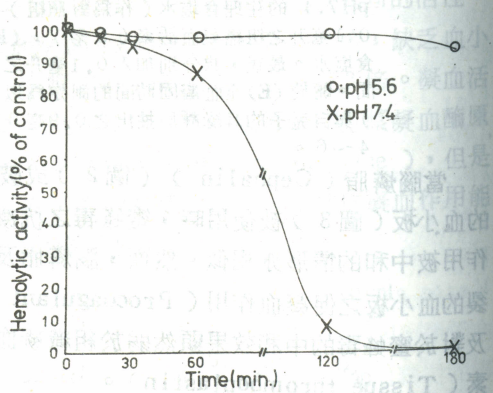

圖4 100°C 之熱處理對於蜜蜂毒之間接的溶血活性之影响。蜜蜂毒被以0.34 毫克／毫升之濃度溶於磷酸塩緩衝液（0.1摩爾濃度，pH 7.4）或醋酸鈉一醋酸緩衝液（0.1摩爾濃度，pH 5.6），然後加熱30，60，120，180分鐘，在熱處理之後，將蜜蜂毒稀釋，然後測定間接的溶血活性，所得結果以對照組之百分比表示（n＝4）。

蜜蜂毒經由靜脈注射對於兎子之全血凝固時間的影响：

蜜蜂毒被以0.5 毫克／公斤體重之劑量注入兎子的耳緣靜脈內，並不顯示全血凝固時間（Whole blood clotting time）的延長。但是，在以1 毫克／公斤體重之劑量靜注後，

表3：以血漿凝血酶原時間（秒）來觀察100°C 之熱處理對於蜜蜂毒之抗凝血活性的影响

pH	生理食塩水	蜜蜂毒之熱處理時間（分）					
		0	15	30	60	120	180
7.4	6.8 ± 0.1	22.5 ± 0.1	23.6 ± 1.0	21.6 ± 0.1	18.5 ± 0.9	12.5 ± 0.8	10.8 ± 0.4
		P ＜0.01	P ＜0.01	P ＜0.01	P ＜0.01	P ＜0.01	P ＜0.01
5.6	6.8 ± 0.1	35.0 ± 0.1	31.4 ± 0.6	20.2 ± 0.6	18.2 ± 1.1	12.8 ± 0.3	11.5 ± 0.1
		P ＜0.01	P ＜0.01	P ＜0.01	P ＜0.01	P ＜0.01	P ＜0.01

蜜蜂毒被以3毫克／毫升之濃度溶解在 pH 7.4或5.6之磷酸塩緩衝液（ Phosphate buffer ）內，在100°C 之水浴中各加熱15，30，60，120 及 180 分鐘。在熱處理及將蜜蜂毒稀釋之後，以血漿凝血酶原時間測定抗凝血活性。

血液凝固系統：0.1毫升缺乏血小板的血漿＋0.1毫升蜜蜂毒（1毫克／毫升）＋0.1毫升凝血活素（5％）＋0.1毫升Ca^{+}（25 毫摩爾濃度）。數據之表示爲平均值±標準誤差。而 P值之計算乃由蜜蜂毒所得的數據與由生理食塩水所得的數據互相比較而得。

8隻中有4隻在10 分鐘之內即死掉，不死的4隻之全血凝固時間亦只稍微延長，在注射之後15 分鐘達至最大（由3.3 ± 0.5 延長到9.1 ± 2.2分鐘），但在1小時內即回到最初值（表4）。

表4：經由靜脈注射蜜蜂毒後，兎子之全血凝固時間。

注射後時間	全血凝固時間（分）	
	0.5 毫克／公斤（n＝3）	1 毫克／公斤（n＝4）
注射前	3.4 ± 0.3	3.3 ± 0.5
5 min.	3.2 ± 0.1	7.6 ± 1.7
		（0.1 ＞P ＞0.05）
15	3.4 ± 0.2	9.1 ± 2.2
		（0.1 ＞P ＞0.05）
30	3.4 ± 0.3	6.3 ± 1.6
		（0.2 ＞P ＞0.1）
60	3.3 ± 0.1	2.9 ± 0.4

數據之表示爲平均值±標準誤差。P值之計算爲注射前及注射後的數據之比較。

討論

本篇研究顯示歐洲種的蜜蜂 *Apis mellifera* 之毒對於血漿或纖維蛋白原並無凝血活性，但具有抗凝血作用。既不會破壞纖維蛋白原（ Fibrinogen ），亦不會使凝血酶（ Thrombin ）不活性化，更不會干擾凝血酶與纖維蛋白原之間的相互作用，因此，其抗凝血作用必不是發生在血液凝固之最後的階段：即由纖維蛋白原轉變爲纖維蛋白（ Fibrin ）之階段

此蜜蜂毒能延長全血凝固時間，且以血漿凝血酶原時間（ Plasma prothrombin time ），鎖鏈蛇蛇毒之凝固時間（ Stypven time ），部份凝血活素時間（ Partial thromboplastin time ）及鈣凝固時間（ recalcification time ）來觀察，知悉此蜜蜂毒能延遲缺乏血小板之血漿的凝固時間，似乎此蜜蜂毒的抗凝血作用是由於抑制凝血酶原（ Prothrombin ）之活性化。組織凝血活素，腦燐脂及破裂的血小板能對抗蜜蜂毒的抗凝血作用。因爲血小板及組織凝血活素之促凝血活性主要是由於磷脂質（ Phospholipids ）的參與（ Vecchione 及 Zucker ，1975 ；Hvatum及 Prydz ，1969 ），故作者認爲蜜蜂毒的抗凝血作用主要是由於抑制磷脂質的促凝血活性。Joshua 及 Ishay 在1975 年亦報告東方種的蜜蜂 *Vespa orientalis* 之毒的抗凝血作用，主要是由於使已經形成的組織凝血活素（ Tissue thromboplaslin ）不活性化，且抑制內生的凝血活素自它的血漿前驅物形成。或許，此二種蜜蜂毒的抗凝血作用具有相同的作用機轉。

蜜蜂毒的抗凝血活性大部份是由於立即的拮抗效果，而不需要血漿或凝血活素與蜜蜂毒之預先共浸。將蜜蜂毒與兎腦的凝血活素混合則迅速地喪失部份的凝血活素之活性。然而，若將凝血活素與蜜蜂毒在37°C 之水浴中預先共浸，則凝血活素會更受破壞，而此顯然是發

生進行性的破壞。最近，Ouyang 等在1978年亦報告龜殼花蛇毒之相似的抗凝血作用，純化的抗凝血成分對於磷脂質之促凝血活性具有不活化作用，部份是由於蛇毒之與磷脂質結合的活性，部份是由於磷脂質受到酵素性的水解

關於蜜蜂毒之立即顯現的抗凝血作用，似乎凝血活素與蜜蜂毒形成很堅定的結合，因爲將此混合液稀釋後，並未能恢復組織凝血活素之促凝血活性。相反地，百步蛇蛇毒之抗凝血成分（Ouyang 及 Teng，1972）並不會堅定地與組織凝血活素或血漿凝血因子結合，故將抗凝血成分與凝血活素或血漿之混合液稀釋之後，能完全恢復凝血活素及血漿之促凝血活性（Ouyang 及 Teng，1973）。因爲預先共浸後所引起的凝固時間之延長較不顯著，故認爲抗凝血作用主要是由於立即的拮抗作用，而非較遲緩的酵素分解作用。

磷脂酶甲（Phospholipase A）與蛇毒及蜂毒之抗凝血活素的作用之相互關係是相當引起爭論的主題。大多數的作者認爲磷脂酶甲，因能使磷脂質（Phospholipid）崩解，而或許爲造成這些毒之抗凝血作用的主要原因物質（O'Brien，1956；Boquest *et al.* 1967；Brisbois *et al.*, 1968；Hecht 及 Slotta，1962；Habermann，1968）。*Apis mellifera* 之蜜蜂毒的抗凝血活性比磷脂酶甲（間接的溶血）活性更能抵抗100°C 的熱處理（表3及圖4）。目前尚未能確定蜜蜂毒中的磷脂酶甲爲主要的抗凝血成分。然而，有兩種可能性存在：1）除了磷脂酶甲之外，抗凝血作用或許是由來於另一種鹼性蛋白質，如melittin（Habermann，1968），2）抗凝血作用或許是由於磷脂酶甲，它會產生與磷脂質（Phospholipid）拮抗的作用，部份是由於磷脂酶甲與磷脂質結合的能力，部份是由於磷脂酶甲對磷脂質產生酵素性的水解。100°C 之熱處理可能會破壞酵素的活性，但並不會很顯著地影响磷脂酶甲與磷脂質結合的能力（Ouyang等，1978）

因爲1毫克／公斤體重之蜜蜂毒經由靜脈注射會使八隻兎子中的四隻在10分鐘之內即死亡，但並不會很顯著地延長全血凝固時間；故認爲在次於致死量的劑量（Sublethal dose），由蜜蜂毒所引起的低凝血狀態並無毒物學上或病理學上的意義。

以上部份實驗結果，我們曾以簡報（Short Communication）方式先行披露於1979年美國Toxicon雜誌17卷2號198～202頁。

誌　謝

本篇論文承蒙美國紐約中華醫學董事會（China Medical Board）資助，在國立台灣大學醫學院藥理學研究所歐陽兆和教授及鄧哲明副教授的指導下完成此項研究，謹此致謝。

REFERENCES：

1. Ardlie, N.G., Perry, D.W., Packham, M.A. & Mustard, J.F.（1971）: Influence of apyrase on stability of suspensions of washed rabbit platelets. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 136. 1021.
2. Bell, W.R. and Alton, H.G.（1954）: A brain extract as a substitute for platelet suspension in the thromboplastin generation test. Nature, London 174, 880.
3. Biggs, R. and Macfarlane, R.G.（1962）: Human blood coagulation and its disorders. 3rd ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford.
4. Boquet, P.（1964）: Venins de serpents（1ere partie）physio - pathologie de l'envenimation et proprieties biologigues des venins. Toxicon 2, 5.
5. Boquet, P., Izard, Y., Meaume, J. and Jouannet, M.（1967）: Recherche biochimiques et immunologigues sur de venin des serpents. Ann. Inst. Pasteur. 112. 213.
6. Brisbois, L., N. Rabinovitch-Mahler, P. Delori, and L. Gillo（1968）: J. Chromatography, 37 : 463.
7. Brown, J.H. and Boweles, M.E.（1966）: Studies on the phospholipase A activity of *Crotalus atrox* venom. Toxicon 3, 205.

8.Habermann, E. (1954) : Untersuchungen über die Hemmung der Blutgerinnung durch Bienengift. Arch. exptl. Pathol. Pharmakol. 223. 182.

9.Hecht, E. and Slotta, C.H.(1962) : The chemical nature of the lipid activator of blood coagulation. Acta physiol. pharmac. nerl. 10, 278.

10.Houssay, B.A. (1930) : Classification des actions des venins de serpents sur I'organisme animal. C.r. Seanc. Soc. Biol. 105, 308.

11.Hvatum, M. and Prydz. H. (1969) : Studies on tissue thromboplastin-its splitting into two separable parts. Thrombos. Diathes. haemorrh. 21, 217.

12.Jiménez-Porras, J.M. (1970) : Biochemistry of snake venom. Clin. Toxicol. 3. 389.

13.Joshua, H. and Ishay, J: (1975) : The anticoagulant properties of an extract from the venom sac of the oriental hornet Toxicon, 13, 11.

14.Lee, C.Y. (1975) : Pharmacological classification of toxic proteins from snake venoms. Jap. J. Trop. Med. Hyg. 3, 219.

15.Lee, R.I. and White, P.D. (1913) : A clinical study of the coagulation time of blood. Am. J. Med. Sci. 145, 495.

16.Lee, C.Y., Johnson, S.A. and Seegers. S.H. (1955) : Clotting of blood with Russell's viper venom. J. Mich. State med. Soc. 54. 801.

17.Meaume, J. (1966) : Les venins de serpents agents modificateurs da la coagulation sanguine. Toxicon 4, 25.

18.Mustard, J.F., Perry, D.W., Ardlie, N.G. and Packham, M.A. (1972) : Preparation of suspensions of washed platelets from humans. Brit. J. Haemat. 22, 193.

19.Nye, S.W., Graham, J.B. and Brinkhous, K.M. (1962) : The partial thromboplastin time as a screening test for the detection of latent bleedors. Am.J. med. Sci., 243 , 279.

20.O'Brien, J.R. (1957) : The effect of some fatty acids and phospholipids on blood coagulation. Brit. J. exp. Path., 12, 45.

21.Ouyang, C. (1957): The effects of Formosan snake venoms on blood coagulation in vitro. J. Formosan Med. Assoc. 56, 435.

22.Ouyang, C. and Teng, C.M. (1972) : Purification and properties of the anticoagulant principle of *Agkistrodon acutus* venom. Biochim. Biophys. Acta. 278, 155.

23.Ouyang, C. and Teng, C.M. (1973) : The effect of the purified anticoagulant principles of *Agkistrodon acutus* venom on blood coagulation. Toxicon, 11, 287.

24.Ouyang , C. and Teng, C.M. (1976) : Fibrinogenolytic enzymes of *Trimeresurus mucrosquamatus* venom. Biochim . Biophys. Acta, 420, 298.

25.Ouyang, C., Teng, C.M., Chen, Y.C. and Lin, S.C. (1978) : Purification and properties of the anticoagulant principle of *Trimeresurus mucrosquamatus* venom. Biochim. Biophys. Acta 541 : 394.

26.Quick, A.J. (1938) : The nature of bleeding in jaundice. J. Am. Med. Ass. 110, 1658.

27.Rosenfeld, G., Nahas. I. and Kelen, E.M.A (1968) : Coagulant, proteolytic and hemolytic properties of some snake venoms in venomous vertebrates. Vol. 1. P

231 (Bücherl. W., Buckely, E.E. and Deulofue, V. Eds.) London : Academic Press.

28. Seegers, W.H. and Smith, H.D. (1942) : Factors which influence the activity of purified thrombin. Am. J. physiol. 137. 348.

29. Seegers, W.H., Miller, K.O., Andrews, E.B. and Murphy, R.C. (1952) : Fundamental interactiors and the effect of storage , ether , adsorbants and blood clotting on plasma anti-thrombin activity. Am. J. physiol. 169, 700.

30. Tu, A.T. (1977) : Venoms : Chemistry and molecular biology, New York, John Wiley & Sons. P. 329.

31. Vecchione, J. and Zucker, M.B. (1975) : Procoagulant activity of platelets in recalcified plasma. Brit. J. Haemat. 31, 423.

Anticoagulant Properties of *Apis Mellifera* (Honey Bee) Venom

Song-Chow Lin

The venom of Apis mellifera (European Hornet) had marked anticoagulant action in vitro, when tested on whole blood clotting time, plasma prothrombin time, partial thromboplastin time and calcium clotting time. It did not destroy fibrinogen, inactivate thrombin nor interfere with the interaction between thrombin and fibrinogen. Incubation of the venom with thromboplastin increased the prolongation of plasma prothrombin time. The thromboplastic activity could not be restored by dilution after incubation with venom.

The anticoagulant action was competitively inhibited by tissue thromboplastin, cephalin and ruptured platelets. The phospholipase A activity was more heat-labile at pH 7.4 than at pH 5.6. The anticoagulant activity was more resistant to heat treatment as compared with phospholipase A activity . With i.v. dose of 1.0mg per kg body weight of the venom into rabbbits (4 out of 8 rabbits died within 10 min) caused only a slight prolongation of blood coagulation time.

Department of Pharmacology, Taipei Medical College.
Received for Publication: Jul. 6, 1979