

# 蛇毒抗肿瘤作用的研究进展

车 军,刘洁生\*,杨维东

(暨南大学 生物工程学系,广东 广州 510632)

摘要:介绍了近年来在蛇毒组分及其抗肿瘤作用方面的研究进展,并对其杀伤和诱导肿瘤细胞凋亡的分子机制进行了综述

关键词:蛇毒;抗肿瘤;凋亡

中图分类号:R282.74 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2001)08-0757-03

## Progress in studies on antitumor effect of Snake Venom

CHE Jun, LIU Jie-sheng, YANG Wei-dong

(Department of Biotechnology, Jinan University, Guangzhou Guangdong 510632, China)

**Key words** Snake Venom; antitumor; apoptosis

毒素的应用可以追溯到远古。我国早在古代就有利用“以毒攻毒”的手段来治疗“疑难杂症”的传统经验。早在两千年前的西汉即有利用蛇类的记载(《神农本草经》)。到明代,李时珍所著的《本草纲目》一书中详细地叙述了蝮蛇能治疗恶疮、半身枯死等重疾<sup>[1]</sup>。唐代药书《本草拾遗》中记载蛇的药用功能,可以祛风燥湿、通络活血,主治风湿痹痛、四肢麻木等。现在,通过对蛇毒各组分的进一步研究,人们发现蛇毒在治疗血栓、止血、镇痛以及抗癌和治疗肿瘤等方面很有潜力。笔者就蛇毒的组分和在抗肿瘤方面的进展做一综述。

### 1 组分及毒理学机制

1.1 组分及其分类:蛇毒是一类有酶活性和其他生物活性的蛋白和多肽的混合物。一般认为蛇毒含有4类组合:1)酶类:蛇毒中至少含有5~15种酶。例如磷脂酶 $A_2$ 、精氨酸酯酶、蛋白水解酶、凝血酶等,与蛇咬伤所造成的出血、红肿以及肌肉坏死、血凝失调有关。2)具有特殊药理活性的组分:如膜毒素、神经毒素等,能阻断生物体的信号传递。3)生物活性因子:如神经生长因子,它和其他生物中提取的神经生长因子一样,可以刺激神经的生长。4)其他:如一些糖类(半乳糖、甘露糖等)、唾液酸以及一些离子如 $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Na^+$ 等。

1.2 毒理学原理:蛇毒按毒理学分为作用于神经的神经毒,主要见于银环蛇、金环蛇、海蛇等;作用于血液循环的血液毒,如竹叶青蛇毒、尖吻蝮蛇毒等;有的蛇毒中两种都有,属混合毒,如眼镜蛇毒、蝮蛇毒等<sup>[2]</sup>。每种蛇的毒液成分各不相同,即使是同一种蛇,由于产地的不同,其毒液也有所差别。蛇神经毒作用于中枢神经、周围神经及植物神经系统,能抑制中枢神经系统,尤其是延髓呼吸中枢。对周围神经系统的作用十分重要,主要阻断神经-肌肉接头处冲动的传递,导致骨骼肌尤其是呼吸肌的瘫痪。根据其作用靶位不同,可分为两大类,即突触前神经毒素和突触后神经毒素<sup>[3]</sup>。蛇血液

毒种类丰富,含有心脏毒、凝血毒、抗凝血毒、溶血毒等。它主要引起心血管功能障碍;促进纤维蛋白原转变为纤维蛋白,形成凝血沉淀积于毛细血管;溶血毒素引起溶血,直接损伤肾小球及肾小管,引起急性肾功能不全等。心力衰竭也是造成死亡的原因。

### 2 抗肿瘤活性

2.1 膜毒素:眼镜蛇膜毒素(MT)是一类存在于眼镜蛇科多数蛇中的单链小分子毒蛋白。它们在粗毒中含量极为丰富,占全毒干重的25%~50%。迄今为止,已从眼镜蛇科的粗毒中分离出20多种膜毒素,它们是一类分子结构和作用机制都非常相似的同族毒蛋白,相对分子量为6000~7000,由60~62个氨基酸组成,对热稳定,对水解酶有抗性。由于其主要作用点在细胞膜上,故将其称为膜毒素<sup>[4]</sup>。梁敏仪<sup>[5]</sup>等报道了用3种不同剂量的膜毒素对小鼠体内 $S_{180}$ 腹水瘤细胞的作用。膜毒素在免疫毒素的研究中是个热点,目前用于构建抗肿瘤免疫毒素弹头的主要是细菌毒素和植物毒素,而膜毒素无论在生化特点还是作用方式上均优于二者,用膜毒素构建免疫毒素治疗肿瘤大有希望。

李钦章<sup>[4]</sup>等将膜毒素和鼠抗人鼻咽癌细胞(CN $E_2$ )的单克隆抗体相耦联制成免疫毒素,在体外进行抗癌实验。在无 $Ca^{2+}$ 的条件下,对靶细胞CN $E_2$ 有强烈的杀伤作用(杀伤率为78.6%),但对 $S_{180}$ 细胞只有很弱的杀伤力(杀伤率为21.3%)。表明此种免疫毒素在体外可以特异地杀伤癌细胞,效果良好。

膜毒素通过去极化作用而经膜发生效应,在提高介质中的钙浓度时,膜毒素的作用会受到抑制。缺钙介质中膜毒素在体外有很好的杀伤肿瘤细胞的作用,但在生理钙浓度时,这种杀伤作用明显受到抑制。这部分解释了蛇膜毒素在体内抗癌效果不明显的原因为<sup>[6]</sup>。

\* 收稿日期:2001-03-03

作者简介:车 军(1976-),男,陕西西安人,在读硕士研究生。主要从事分子毒理学和药理学研究。E-mail: jun-ch@21cn.com

\* 通讯联系人

## 2.2 诱导细胞凋亡组分

近 10年来发现许多抗肿瘤药物是通过诱导细胞凋亡而发挥作用的<sup>[7,8]</sup>,因此目前对蛇毒的抗癌研究主要集中在毒素对肿瘤细胞的诱导凋亡方面。

2.2.1 对血管内皮细胞 (VEC)诱导凋亡的组分: 1993年 Araki等发现蛇出血毒素 (Hemorrhagic Snake Venom)可以诱导血管内皮细胞发生凋亡,而神经毒素却不能诱导凋亡,只能引起坏死。但蛇出血毒素只能对培养的血管内皮细胞起凋亡作用,对其它的培养细胞没有凋亡作用<sup>[9]</sup>。1996年 Suhr根据 Araki的结果,从朝鲜蛇毒中发现一种具有细胞毒性的物质: L-氨基酸氧化酶 (LAO),正是这种组分引起细胞凋亡<sup>[10]</sup>。

日本的 Masuda于 1997年从西部菱斑响尾蛇 *Crotalus atrox* Baird et Girard蛇毒中提取一种血管凋亡诱导蛋白 (VAP) 它是一种同源二聚体蛋白,总相对分子量 110 000,等电点 8.5,加入这种蛋白后,培养的血管内皮细胞出现典型的凋亡特征<sup>[11]</sup>。1998年 Masuda又从西部菱背响尾蛇毒中提取到 VAP2 VAP2和 VAP的功能相同,但对 pH和温度更为敏感<sup>[12]</sup>。

Qing Zhou等从铜头蝮蛇 *Agkistrodon contortrix* (Linnaeus)中分离出一个二聚体去整和素 (contortrostatin),可以抑制血管再生,它是二硫键连接的同型二聚体多肽,相对分子量 13 500,具有 Arg-Gly-Asp序列。每日给患者乳腺癌 MDA-MB-435的裸鼠注射可以明显地抑制肿瘤生长和血管再生。在小鸡胚胎尿囊绒毛膜上,contortrostatin抑制由 MDA-MD-435细胞、成纤维生长因子、血管内皮生长因子所诱导的血管再生。抑制血管再生是 contortrostatin抗肿瘤活性的一个重要方面<sup>[13]</sup>。

2.2.2 对人早幼粒细胞白血病 HL-60细胞诱导凋亡的组分: 谭获等发现中华眼镜蛇毒组分 C (FCNNAV,主要成分是膜毒素)与白血病细胞共同孵育后,出现细胞皱缩、染色体固缩以及凋亡小体等变化,通过流式细胞仪的检测发现是白血病细胞凋亡,发现这种作用与 Bcl-2的表达下调有关<sup>[14]</sup>。

尽管 Araki等发现蛇出血毒素只能对培养的血管内皮细胞起凋亡作用,对其它的培养细胞没有凋亡作用。但 Souza却发现从蝮蛇中提取的 L-氨基酸氧化酶在人早幼粒细胞白血病 HL-60细胞中具有诱导凋亡的活性。加入 25 mg/mL的 LAO后 24 h,通过琼脂糖电泳可以看到凋亡细胞中典型的 DNA片段<sup>[15]</sup>。

1997年日本的 Torii从西部菱纹背响尾蛇毒中发现一种蛋白: apoxin-1,它可以诱导人早幼粒细胞白血病 HL-60细胞的凋亡。经过氨基酸序列分析,它与从红口蝮 *Calloselasma rhodostoma* (Boie)中提取的 L-氨基酸氧化酶序列相似<sup>[16]</sup>。1998年 Abe从饭匙倩 (*Habu*)蛇毒的 Superdex P-1组分中分离出一个相对分子量为 55 000的甘草皂苷结合蛋白 (gp55) 它是一个类 apoxin-1蛋白,同时也具有 L-氨基酸氧化酶活性<sup>[17]</sup>。

2.2.3 对其他几种细胞诱导凋亡的组分: Torii等发现

apoxin-1不仅可以诱导人早幼粒细胞白血病 HL-60细胞凋亡,而且能诱导人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial),人早幼粒细胞白血病 HL-60细胞、人卵巢癌 A2780细胞、小鼠内皮 NL-3细胞的凋亡。它能诱导肿瘤细胞的凋亡,可能是因为它具有 L-氨基酸氧化酶活性。纯化后的 apoxin-1可以氧化 L-氨基酸产生 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,但不能氧化 D-氨基酸产生 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>[16]</sup>。经过实验, Torii发现 apoxin-1活性与其成熟程度及分泌的过程有关<sup>[18]</sup>。

2.3 蛇毒的毒副作用: 蛇毒在诱导肿瘤细胞凋亡的同时,对细胞和机体有一定的毒副作用。在观察眼镜蛇科、蝮科和蝮科的蛇毒粗毒对 BALB/c An脾的 B和 T淋巴细胞的影响时发现: T淋巴细胞对粗毒的细胞毒性作用比 B淋巴细胞敏感,同时,经过有丝分裂原刺激的 B淋巴细胞对蛇毒粗毒的细胞毒性作用也很敏感<sup>[19]</sup>。小鼠腹腔注射蛇毒心脏毒素 (cardiotoxin, CTX)后,小鼠的精母细胞多倍体和非整倍体细胞数目增高。同时,CTX对孕鼠的胚胎发育有明显的毒性作用<sup>[20]</sup>。

## 3 结语

综上所述,蛇毒的抗肿瘤作用主要在于: (1)对癌细胞的直接杀伤作用; (2)抑制肿瘤组织内的血管再生,从而抑制肿瘤生长; (3)具有 L-氨基酸氧化酶作用,诱导细胞内局部 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度的升高,从而引起肿瘤细胞的凋亡。目前的研究主要集中在对能引起杀伤和凋亡的活性组分的分离及其体外实验,对于其具体的作用方式、机制等方面的研究较少。而且由于体外与体内实验之间有一定的差别,所以应用蛇毒治疗癌症还有很长的路要走。

## 参考文献:

- [1] 李时珍. 本草纲目 [M]. 下册 43卷. 北京: 人民卫生出版社, 1957.
- [2] 陈康德. 蛇毒研究和应用概述 [J]. 蛇志, 1997, 9(4): 47-50.
- [3] Tu A T. Overview of Snake Venom Chemistry. In: Natural Toxin 2 Structure, Mechanism of Action and Detection [M]. Singh B R, Tu A T ed. New York Plenum press, 1996.
- [4] 李钦章. 眼镜蛇毒素与单克隆抗体 (偶联物)对鼻咽癌细胞的特异性杀伤作用 [J]. 暨南大学学报 (自然科学版), 1998, 19(3): 94-99.
- [5] 梁敬仪, 陈家坤, 朱蔚云, 等. 蛇毒心脏毒素对荷瘤小鼠的抗肿瘤作用的初步研究 [J]. 蛇志, 1998, 10(2): 1-4.
- [6] 张愚, 秦妮, 高荣, 等. 眼镜蛇膜毒素 MT-1的生物学效应 [J]. 武汉大学学报 (自然科学版), 1999, 45(2): 195-199.
- [7] Kamesaki H. Mechanisms involved in chemotherapy-induced apoptosis and their implications in cancer chemotherapy [J]. Inter J Hematology, 1998, 68: 29-43.
- [8] 赵卫红, 寿长好, 闫福岭. 细胞凋亡 [M]. 河南: 河南医科大学出版社, 1997.
- [9] Araki S, Ishida T, Yamamoto T, et al. Induction of apoptosis by hemorrhagic snake venom in vascular endothelial cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1993, 190(1): 148-53.
- [10] Suhr S M, Kim D S. Identification of the snake venom substance that induces apoptosis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1996, 224(1): 134-139.
- [11] Masuda S, Araki S, Yamamoto T, et al. Purification of a vascular apoptosis-inducing factor from hemorrhagic snake venom [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 235(1): 59-63.
- [12] Shinako Masuda, Hiroshi Hayashi, Satohiko Arak. Two vas-

- cular apoptosis-inducing proteins from snake venom are members of the metalloprotease/disintegrin family [J]. Eur J Biochem, 1998, 253(1): 36-41.
- [13] Qing Zhou, Nakada M T, Catherine Arnold, *et al.* Contortrostatin, a dimeric disintegrin from *Agkistrodon contortrix contortrix*, inhibits angiogenesis [J]. Angiogenesis, 1999, 3(3): 259-269.
- [14] 谭 获,郝玉书,应红光,等. 中华眼镜蛇毒组分诱导白血病细胞凋亡作用的研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2000, 20(4): 272-275.
- [15] Souza D H, Eugenio L M, Fletcher J E, *et al.* Isolation and structural characterization of a cytotoxic L-amino acid oxidase from *Agkistrodon contortrix latincinctus* snake venom: preliminary crystallographic data [J]. Arch Biochem Biophys, 1999, 368(2): 285-290.
- [16] Toni S, Naito M, Tsuruo T. Apoxin I, a novel apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity purified from Western diamondback rattlesnake venom [J]. J Biol Chem, 1997, 272(14): 9539-9542.
- [17] Abe Y, Shimoyama Y, Munakata H, *et al.* Characterization of an apoptosis-inducing factor in Habu snake venom as a glycyrrhizin (GL)-binding protein potently inhibited by GL in vitro [J]. Biol Pharm Bull, 1998, 21(9): 924-927.
- [18] Toni S, Yamane K, Mashima T, *et al.* Molecular cloning and functional analysis of apoxin I, a snake venom-derived apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity [J]. Biochemistry, 2000, 39(12): 3197-3205.
- [19] Lewis G M, Minton S A, Slack J H. BALB/c An B cells and T cells have distinct susceptibilities to cytotoxic effects of snake venom [J]. Toxicon, 1990, 28(4): 351-358.
- [20] 梁敏仪,管锦霞,黄月玲,等. 蛇毒心脏毒素对动物细胞的遗传损伤和生殖毒性研究 [J]. 蛇志, 1998, 10(1): 7-10.

## 远志研究进展

姜 勇,屠鹏飞\*

(北京大学药学院 天然药物学系,北京 100083)

摘 要: 综述了近年来中药远志在炮制、化学成分和药理活性方面的研究进展,并对远志的应用前景进行了展望,为远志的进一步开发提供了依据。

关键词: 远志;炮制;化学成分;药理活性

中图分类号: R282.71 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2001)08-0759-03

### Progress in studies on *Polygala tenuifolia*

JIANG Yong, TU Peng-fei

(Department of Natural Medicines, School of Pharmaceutical Sciences, Beijing University, Beijing 100083, China)

**Key words** *Polygala tenuifolia* Willd.; processing; chemical constituents; pharmacological activity

远志为常见中药,始载于《神农本草经》,列为上品,被视为养命之要药。《中国药典》(2000版)收载了2种基源植物:远志 *Polygala tenuifolia* 和卵叶远志 *P. sibirica*,药用部位为根。本品味苦、辛、温,归心、肾、脾经,具有安神益智、祛痰、消肿功效,用于心肾不交引起的失眠多梦、健忘惊悸、神志恍惚、咳痰不爽、疮疡肿毒、乳房肿痛等<sup>[1]</sup>。现将远志近年来在炮制、化学成分和药理活性方面的文献作一综述,以便为其进一步的开发利用提供依据。

#### 1 炮制

历代远志的炮制方法有去心、甘草制、姜制、炒制、酒制、米泔水制、灯心草煮、复制法等等。无论哪种炮制方法,远志均需去心,但研究表明带心的远志不仅毒性和溶血作用较去心之远志皮低约50%,而且镇静作用略强,祛痰作用并不减弱,故远志并无必要去心<sup>[2]</sup>。高万山等<sup>[3]</sup>探讨了远志经炮制后内在质量和药理作用变化的情况和不同炮制方法之间的

关系,结果发现上海法制品优于药典法制品,药典的炮制方法又优于江苏省的炮制规范。李光巍<sup>[4]</sup>通过对远志炮制前后的层析、药理活性比较发现,生品与炙远志在药理、层析上看无显著差别。临床多用蜜炙、甘草水炙远志,其目的是为了减轻对胃肠道的刺激作用。

#### 2 化学成分

2.1 皂苷类:除 onjisaponin A<sup>-</sup>G(其中 A, B, E, F, G 的结构已经确定)外,最近彭汉铎<sup>[5,6]</sup>又报道了几种新的远志皂苷,它们与 A<sup>-</sup>G 具有相同的苷元,但糖的位置、数量和连接方式尚待确定。

2.2 糖及糖苷类: Miyase<sup>[7,8]</sup>从远志根中分离鉴定出16个新的寡糖多酯化合物,命名为 tenuifolioses A<sup>-</sup>P,它们是首次从远志属中分离得到的五糖链的多酯类(图1)。之后,该作者还报道了15种具有2个或更多乙酰酯残基的双糖和三糖的分离和结构鉴定,所有这些化合物的呋喃果糖残基上均

\* 收稿日期: 2001-02-28

作者简介:姜 勇(1972-),女,内蒙古赤峰人。1977年毕业于沈阳药科大学天然药物化学专业,随后于北京红惠生物医药股份有限公司药物研究所从事新药的研制、开发工作。2000年9月始在北京大学医学部药学院生药学专业攻读博士学位。研究方向:天然活性成分与新药研究。 Tel: (010) 62091702 E-mail: jy72520@sina.com