

· 综 述 ·

蛇毒毒素的抗肿瘤作用及其在医药领域的应用

金夕琳¹, 张 洁², 江海龙³, 陆一鸣³ (1. 第二军医大学学员旅临床二队, 上海 200433; 2. 国防大学第二门诊部, 北京 100039; 3. 第二军医大学药学院生化药理学教研室, 上海 200433)

[摘要] 目的 探讨蛇毒毒素的抗肿瘤作用及其在医药领域的应用。方法 综述蛇毒毒素的抗肿瘤组分、抗肿瘤作用及其机制的研究进展。结果 蛇毒毒素对多种肿瘤均有抑制作用, 具有直接杀伤肿瘤细胞、诱导肿瘤细胞凋亡、抑制血管再生等作用。结论 对蛇毒毒素抗肿瘤组分及其作用机制进行深入研究, 是当前抗肿瘤药物研究的重要方向。

[关键词] 蛇毒毒素; 抗肿瘤

[中图分类号] R931.74; R73

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2015)06-0502-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2015.06.006

The antitumor effect of snake venom toxins and its application in medical field

JIN Xilin¹, ZHANG Jie², JIANG Hailong³, LU Yiming³ (1. Second Team of Clinical Medicine, Student Brigade, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Second Out-patient Department, National Defence University, Beijing 100039, China; 3. Department of Biochemical Pharmacy, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To discuss the antitumor effect of snake venom toxins and its application in medical field. **Methods** To review the research progress of composition, the antitumor effect and mechanism of snake venom toxins. **Results** It was demonstrated that the snake venom toxins can stop various tumor cells from growing, and have the functions of killing the tumor cells, inducing cell death, and inhibition of angiogenesis. **Conclusion** It is an important direction in antitumor drug research and development to deeply research the composition and the mechanisms of action of the snake venom toxins.

[Key words] snake venom toxins; antitumor

蛇毒毒素是一种包含蛋白质、多肽、金属离子、糖类、核苷、氨基酸和脂质的复杂混合物。近年来, 利用蛇毒毒素中的天然活性成分, 探讨其抗肿瘤、抗凝、溶栓、镇痛、抗炎反应等作用^[1], 并用于治疗高血压、血栓和癌症等疾病。蛇毒或其初步提取物具有抗肿瘤作用的研究国内外早有报道, 但其有效成分及其作用机制尚不清楚, 本文主要对蛇毒毒素的抗肿瘤作用及其在医药领域的应用前景作一综述。

1 蛇毒毒素的抗肿瘤作用及其机制

蛇毒是一种毒性较强的生物毒素, 对多种肿瘤

均有抑制作用。目前已从蛇毒中分离、纯化出不同的组分用于肿瘤的治疗研究, 蛇毒毒素通过 3 种组分(解离素、细胞毒素以及诱导凋亡的组分)起抗肿瘤作用, 而这 3 种组分并不是完全彼此孤立的, 有时某一毒素提取物从两方面协同起到抗肿瘤作用。

1.1 直接作用于肿瘤细胞膜 细胞毒素带正电荷的阳离子头端与细胞膜磷脂双分子层极性层的阴离子部位结合而定位, 疏水性基团部分插入细胞中而破坏细胞膜。由于 Ca^{2+} 能使胞膜致密、完整和稳定, 故能抑制膜毒素的毒性^[2]。这与缺钙介质中细胞毒素对体外肿瘤细胞有很强的杀伤作用, 而生理钙浓度下这种杀伤作用被显著抑制相一致。

1.2 抑制肿瘤细胞的核酸代谢 癌基因一般为单拷贝基因, 有其编码的蛋白质, 在肿瘤细胞内的一些癌基因在 DNA 复制过程中产生多个拷贝, 形成双微粒染色体和均染区, 这种基因的扩增常产生基因产物过表达, 表现为 mRNA 和蛋白质量的增加。Jokhio 等^[3]研究发现, 眼镜蛇毒能显著抑制乳腺癌组织 DNA 和 RNA 的合成, 抑制细胞的增殖从而起

[基金项目] 国家自然科学基金项目(No. 81274162, 30500093); 国家科技部“重大新药创制”专项(No. 2009ZX09103-690); 上海市科委重点项目(No. 04JC14002); 军队“十一五”计划(No. 06Q042); 上海市高校优秀青年教师科研专项基金(No. ejd09011)

[作者简介] 金夕琳, 硕士研究生。研究方向: 蛇毒毒素抗肿瘤研究。Tel: 18801765079; E-mail: hljinxilin@sina.com

[通讯作者] 陆一鸣, 副教授。研究方向: 活性蛋白及小肽类药物的发现、效应评价和作用机制研究。E-mail: bluesluyi@sina.com

到抗肿瘤作用。Xie 等^[4]从蛇毒中分离出的 Sv-cystatin, 可以改变一些参与细胞黏附、迁移、免疫调节、增殖、分化、凋亡、转录和细胞内信号传导的基因, 从而起到抗肿瘤作用。

1.3 影响机体免疫功能 蛇毒可通过激活补体系统溶解肿瘤细胞。Vogel 等^[5]发现眼镜蛇蛇毒因子与单克隆抗体形成的复合物(McAb-CVF)对黑色素瘤细胞显示了特有的溶细胞活性, 其机制可能为 McAb-CVF 复合物形成稳定的 C3/C5 转换酶, 通过替代补体途径最终形成膜攻击单位, 导致肿瘤细胞的溶解。此外, 膜毒素可通过自然杀伤细胞活性, 非特异性杀伤肿瘤细胞。干扰素是机体特异免疫因素之一, 它对同种细胞具有广泛的免疫作用、广谱抗病毒作用和调节免疫作用。da Silva 等^[5]证实巴西具窝蝮蛇毒能抑制接种艾氏腹水癌细胞的小鼠分泌白介素-6(IL-6), 从而可以提高机体干扰素水平, 调节免疫功能, 对治疗肿瘤及某些免疫疾病有一定作用。

1.4 抑制肿瘤细胞生长 最近研究发现, 黏附分子受体能介导血小板和内皮细胞与中性粒细胞、单核细胞及肿瘤细胞之间的相互作用, 它们在炎症、血栓形成及肿瘤转移等过程中起重要作用。其中, 肿瘤细胞恶性生长并从原发灶中脱离是肿瘤转移的关键, 而肿瘤细胞与内皮细胞、细胞外基质黏附是肿瘤血行转移不可缺少的环节, 肿瘤细胞在血循环中与血小板等结合可使癌细胞免受吞噬细胞的清除。蛇毒抗栓酶能明显降低血液黏度, 减少血小板数量, 抑制其黏附和聚集, 可改变肿瘤患者血液的高凝状态并改善微循环, 从而起到抗癌和防止癌细胞转移的作用^[6]。从巴西窝面蝮蛇蛇毒中提取的一种凝集素 BJcuL, 已经被证实具有连接乳糖和红细胞凝集的作用。凝集素 BJcuL 不仅能抑制这些细胞黏附到细胞外基质纤连蛋白、层粘连蛋白和 I 型胶原, 更重要的是, 凝集素 BJcuL 可以降低肿瘤细胞的生存活力。这一发现表明, 凝集素 BJcuL 可通过抑制肿瘤细胞和内皮细胞的生长作为对抗肿瘤的武器^[7]。

1.5 诱导细胞凋亡 近来有学者将蛇毒抗肿瘤作用机制的研究转到了细胞凋亡上。日本的 Torri 等^[8]从西部菱纹背响尾蛇蛇毒中发现的一种 apoxin-I 具有 L-氨基酸氧化酶(LAAO)活性。目前, LAAO 的抗癌作用研究主要集中于它对肿瘤细胞的介导凋亡的作用上, LAAO 表现出了在肿瘤研究和肿瘤治疗中的潜在应用, 表现出明显的细胞毒性和介导脐静脉内皮细胞、胚胎肾细胞、单核细胞、前骨髓细胞癌 HL60 细胞、卵巢癌 A2780 细胞、胃

癌 CRL5971 细胞、人 T 淋巴细胞、小鼠内皮 KN-3 细胞的凋亡功能^[9]。在 HeLa 细胞内注射 2.5~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 极北蝮的 LAAO 后 7~24 h 细胞凋亡。普遍观点认为 H_2O_2 在蛇毒毒素的 LAAO 介导细胞凋亡过程中发挥重要作用, 并且这一作用可被过氧化氢酶和其他 H_2O_2 清除剂抑制。LAAO 可直接连接到细胞表面, 释放的 H_2O_2 累积在局部, 细胞膜上 H_2O_2 发生氧化应力链反应, 这一机制可通过荧光标记实验验证, 并且这一活性可被抗氧化剂抑制, 而不能被水溶性抑制剂抑制^[10]。表明蛇毒毒素中的 LAAO 介导细胞凋亡的机制和外源性的 H_2O_2 不同, 两者引起的细胞形态学变化也不同。抗氧化剂和过氧化氢酶可以抑制蛇毒毒素 LAAO 介导的细胞凋亡而不能抑制外源性 H_2O_2 介导的细胞凋亡。换句话说, 蛇毒毒素 LAAO 介导的细胞凋亡不仅需要 H_2O_2 作为媒介, 它还是一个酶促反应。除了蛇毒毒素的 LAAO 产生的 H_2O_2 , 半胱天冬酶(caspase)介导的凋亡途径也可能涉及细胞凋亡过程^[11]。五步蛇和巴西矛头蝮蛇的 LAAO 介导 HL60、Jurkat、B16F10 和 PC12 细胞凋亡时, 通过产生 H_2O_2 来活化 caspase-3 和 caspase-9^[12]。 H_2O_2 还能够人在内皮细胞通过增加酪氨酸蛋白激酶的活性来增加 Fas 的表达。

新出现的证据证明, 一些蛇毒毒素的 LAAO 会干扰肿瘤细胞的细胞周期状态。用流细胞分析计数法分析得知, 巴西矛头蝮蛇 LAAO 可以在 G0/G1 期阻断 HL60 细胞, 延长 S 期和 G2/M 期^[13]。五步蛇 LAAO 介导明显增加了 G1 期, 表明这种酶能够介导凋亡和有效抑制肿瘤生长, 从而有研发成为一种抗癌药物的可能^[14]。另外, 眼镜蛇抑制恶性肿瘤增殖是通过阻断它从 S 期到 G2 期^[15]。蛇毒毒素的 LAAO 可能作为一种新型的抗癌药物归因于其独特的、清除肿瘤细胞的凋亡机制。

1.6 抑制血管再生 血管生成对肿瘤的持续生成、血管内皮细胞增殖、迁移和分化具有重要作用^[16]。恶性肿瘤转移的每一步都与肿瘤的血管生成密切相关。Golubkov 等^[17]从铜头蝮蛇毒中分离出一个二聚体解离素(contortrostatin), 每日给患有乳腺癌 MDA-MB-435 的裸鼠注射, 可明显抑制肿瘤生长和血管再生。能够抑制血管生成的还有从红口蝮蛇中提取的新的解离素 rhodostomin, 它通过阻断血管内皮细胞的整合素 $\alpha_5\beta_3$ 和胞外基质的作用, 抑制血管的形成, 并且对肿瘤组织内的血管具有选择性, 对正常生长的细胞无效^[18]。目前已经从各种蛇毒中提取了数十种解离素, 具有明显的体内或体外抗肿

瘤活性。近年来大量研究结果显示^[19],蛇毒毒素 L-氨基酸氧化酶(SV-LAAO)不仅具有诱导人脐静脉内皮细胞 HUVEC 凋亡的作用,同时还具有影响血小板、促使小鼠出血等特性,提示其可能通过抑制血管的形成而达到治疗肿瘤的目的。由于肿瘤生长和转移都依赖于新生血管的形成,因此抑制血管内皮细胞(VEC)的增殖、迁移及小血管形成是抑制肿瘤生长的关键步骤。

1.7 诱导肿瘤细胞坏死 El-Refael 等已经调查得知角蝰蛇毒素 CCV 在体外实验对生长速率的影响和对乳房肿瘤病毒介导的乳房肿瘤细胞(R III/Sa-MT)的形态变化。角蝰蛇毒素(*Cerastes cerastes* venom,CCV)是一种细胞毒素,由美洲、亚洲、欧洲的蛇毒毒素进行粗加工或是提取其中某些成分所得,已证实能够抑制小鼠和人类的肿瘤细胞生长。研究结果显示,7 μg/ml 的 CCV 在体外实验中 48 h 内杀死约 55% 的肿瘤细胞;若直接将 1 μg CCV 注入生长中的肿瘤,每周 1 次,持续 4 周,发现肿瘤负荷减少 54%。结果显示,用 CCV 治疗的小鼠比空白对照组小鼠多活了 35 d。根据组织学检查、细胞超微结构检查、核染色和 DNA 片段化学说,得出 CCV 体内和体外均抑制小鼠乳房肿瘤细胞生长的基本机制是坏死的结论。El-Refael 等^[20]对细胞注射 7 μg/ml 的 CCV 48 h 后,进行组织化学分析发现,注射 CCV 的细胞死亡率 > 70%,但是这些细胞的重组 DNA 和对照组一样完整,并出现线粒体肿胀、断裂,细胞核未见损伤等现象,还有肿瘤组织病理学观察显示明显坏死区域。综上考虑,坏死是 CCV 介导细胞死亡的主要原因。只有一小部分(< 3%)核出现片段化,这些细胞可能是由于通过凋亡导致细胞死亡的副成分在 CCV 准备阶段就已经出现。但 El-Refael 等还不知道 CCV 是如何介导乳房肿瘤细胞坏死的。

2 蛇毒毒素的抗肿瘤作用在医药领域的应用

2.1 CCV 的研究前景 如果 CCV 中确实存在前文提到的能使线粒体中产生液泡的物质,那么研究者可从 CCV 中分离这一组分并检测它的效力,作为一种新的抗癌药物。另外,CCV 对乳房肿瘤细胞系 R III/Sa-MT 嫁接到同基因鼠体内产生生长的影响仍值得研究。

2.2 解离素的研究前景 解离素的变化是研究人员把从锯鳞蝰蛇中分离的锯鳞肽的 C 末端嫁接到解离素上^[21],这样锯鳞肽的 C 末端序列可以提高连接到整合素 α5β1 的可能性,这是新药研究的一个方

向,也是新药设计的基础。因此,解离素将会成为未来蛇毒毒素抗肿瘤研究的先驱。血管生成抑制剂是被大量研发的肿瘤治疗方法之一^[22]。蛇毒毒素的裂合素亲族(disintegrins)系为具有不同功能、不同效价、不同特异性的大分子库,并且为通过抗血管生成来抑制癌症提供了一个良好的研究开端。

2.3 SV-LAAO 的研究前景 目前对 SV-LAAO 发挥抗肿瘤作用的机制尚未明了。一些研究表明,SV-LAAO 反应生成的 H₂O₂ 激发细胞内活性氧和 P53 蛋白的表达,从而引起细胞凋亡。还有人认为 SV-LAAO 可能通过释放一些氧自由基并促使一些蛋白溶解酶等介质释放而损伤内皮细胞。另外,SV-LAAO 还通过诱导血管内皮细胞凋亡和抑制血小板聚集等抗凝机制导致出血。因此,更多研究可进一步揭示其在抗肿瘤方面的作用,并有可能成为抗肿瘤治疗的新药物,在抗肿瘤的实验和治疗中将发挥重要作用。

2.4 凝集素的研究前景 已有研究证实凝集素 BJcuL 对肿瘤细胞具有强有力的抑制作用,因此它可能被用于临床上减缓肿瘤的发展,但仍需要更多的研究以证实凝集素 BJcuL 在凋亡和抗血管生成方面的细胞内作用机制。

【参考文献】

- [1] Matsui T, Fujimura Y, Koiti T. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1477(1-2):146-156.
- [2] Lauterwein J, Wuthrich K. A possible structural basis for the different models of action of neurotoxins and cardiotoxins from snake venom[J]. *FEBS Lett*, 1978, 93(2):181-184.
- [3] Jolkio R, Ansari AF. Cobra snake venom reduces significantly tissue nucleic acid levels in human breast cancer[J]. *J Pak Med Assoc*, 2005, 55(2):71-73.
- [4] Xie Q, Wan R, Lin X, et al. Effects of snake venom cystatin gene on gene expression profiles in mouse melanoma cell line B16F1[J]. *Chin Cancer*, 2008, 27(7):716-722.
- [5] da Sliva RJ, da Sliva MG, Vilela LC, et al. Antitumor effect of *Bothrops jararaca* venom[J]. *Mediators Inflamm*, 2002, 11(2):99-104.
- [6] Kini RM. Platelet aggregation and exogenous factors from animal sources[J]. *Curr Drug Targ Cardiovasc Haematol Disord*, 2004, 4(4):301-325.
- [7] de Carvalho DD, Schmitmeier S, Novello JC, et al. Effect of BJcuL (a lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*) on adhesion and growth of tumor and endothelial cells[J]. *Toxicon*, 2001, 39(10):1471-1476.
- [8] Torii S, Naito M, Tsuruo T. Apoxin I, a novel apoptosis inducing factor with L-amino acid oxidase activity purified from

油、水、乳化剂三相中的分布等指标与药物 log *P* 值的关系,考察难溶性药物对载药特性的影响;难溶性药物的 log *P* 值越大,脂溶性越强,在油相中分布越多,乳剂稳定性越好,载药量越高。可以综合难溶性药物的 log *P* 值及 PEG400 中的溶解度,确定载药乳剂的载药量范围、体外释药特性及相分布,从而初步判断载药乳剂的载药特性。

【参考文献】

- [1] Jing X, Deng L, Gao B, *et al.* A novel polyethylene glycol mediated lipid nanoemulsion as drug delivery carrier for paclitaxel[J]. *Nanomedicine*, 2014, 10(2): 371-380.
- [2] 张婷婷,徐文,胡生亮,等.水飞蓟宾在不同介质中平衡溶解度和表观分配系数的测定[J].*中国药学杂志*,20006,41(20): 1569-1571.
- [3] Setthacheewakul S, Mahattanadul S, Phadoongsombut N, *et al.* Development and evaluation of self-microemulsifying liquid and pellet formulations of curcumin, and absorption studies in rats[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2010, 76(3): 475-485.
- [4] Shaikh J, Ankola DD, Beniwal V, *et al.* Nanoparticle encapsulation improves oral bioavailability of curcumin by at least 9-

fold when compared to curcumin administered with piperine as absorption enhancer[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2009, 37(3-4): 223-230.

- [5] 高晓黎,孙殿甲,程利勇,等.去氢骆驼蓬碱注射用乳剂中药物的相分布和体外释放研究[J].*中成药*,2000,22(2):111-115.
- [6] Korinth G, Wellner T, Schaller K. H, *et al.* Potential of the octanol-water partition coefficient (log*P*) to predict the dermal penetration behaviour of amphiphilic compounds in aqueous solutions[J]. *Toxicol Lett*, 2012, 215(1): 49-53.
- [7] 苏德森,王思玲.物理药剂学[M].北京:化学工业出版社,2004:78-92.
- [8] Maiti K, Mukherjee K, Gantait A, *et al.* Curcumin-phospholipid complex: preparation, therapeutic evaluation and pharmacokinetic study in rats[J]. *Int J Pharm*, 2007, 330(1-2): 155-163.
- [9] Zanotto-Filho A, Coradini K, Braganhol E, *et al.* Curcumin-loaded lipid-core nanocapsules as a strategy to improve pharmacological efficacy of curcumin in glioma treatment[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2013, 83(2): 156-167.

【收稿日期】 2015-06-08 【修回日期】 2015-10-08

【本文编辑】 李睿旻

(上接第 504 页)

- western diamondback rattlesnake venom [J]. *Biol Chem*, 1997, 272(14):9539-9542.
- [9] Guo CM, Liu SQ, Yao YW. Past decade study of snake venom *L*-amino acid oxidase[J]. *Toxicon*, 2012, 60(3): 302-311.
- [10] Samel M, Vija H, Rönnholm G, *et al.* Isolation and characterization of an apoptotic and platelet aggregation inhibiting *L*-amino acid oxidase from *Vipera berus berus* (common viper) venom[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1764(4):707-714.
- [11] Kanzawa N, Shintani S, Ohta K, *et al.* Achacin induces cell death in HeLa cells through two different mechanisms [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2004, 422(1): 103-109.
- [12] Alves RM, Antonucci GA, Paiva HH, *et al.* Evidence of caspase mediated apoptosis induced by *L*-amino acid oxidase isolated from *Bothrops atrox* snake venom[J]. *Comp Biochem Physiol A*, 2008, 151(4):542-550.
- [13] de Melo Alves Paiva R, de Freitas Figueiredo R, Antonucci GA, *et al.* Cell cycle arrest evidence, parasiticidal and bactericidal properties induced by *L*-amino acid oxidase from *Bothrops atrox* snake venom[J]. *Bchimie*, 2011, 93(5): 941-947.
- [14] Zhang L, Wu WT. Isolation and characterization of ACTX-6; a cytotoxic *L*-amino acid oxidase from *Agkistrodonacutus* snake venom[J]. *Nat Prod Res*, 2008, 22(6): 554-563.
- [15] Chen X, Lv P, Liu J, *et al.* Apoptosis of human hepatocellular carcinoma cell (HepG2) induced by cardiotoxin III

through spase arrest [J]. *Toxicol Pathol*, 2009, 61(4): 307-315.

- [16] Zhang L, Cui L. A cytotoxin isolated from *Agkistrodonacutus* snake venom induces apoptosis *via* Fas pathway in A549 cells[J]. *Toxicol In Vitro*, 2007, 21(6): 1095-1103.
- [17] Golubkov V, Hawes D, Markland FS. Anti-angiogenic activity of eontortrostatin, a disintegrin from *Agkistrodon contortrix* snake venom[J]. *Angiogenesis*, 2003, 6(3):213-224.
- [18] Yeh CH, Peng HC, Yang RS, *et al.* Rhodostomin, a snake venom disintegrin, inhibits angiogenesis elicited by basic fibroblast growth factor and suppresses tumor growth by a selective alpha(v)beta(3) blockade of endothelial cells[J]. *Mol Pharmacol*, 2001, 59(5):1333-1342.
- [19] Zhang L, Cui L. A cytotoxin isolated from *Agkistrodonacutus* snake venom induces apoptosis *via* Fas pathway in A549 cells[J]. *Toxicol In Vitro*, 2007, 21(6): 1095-1103.
- [20] El-Refaei MF, Sarkar NH. Snake venom inhibits the growth of mouse mammary tumor cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Toxicon*, 2009, 54(1): 33-41.
- [21] de Melo Alves Paiva R, de Freitas Figueiredo R, Antonucci GA, *et al.* Cell cycle arrest evidence, parasiticidal and bactericidal properties induced by *L*-amino acid oxidase from *Bothrops atrox* snake venom[J]. *Bchimie*, 2011, 93(5): 941-947.
- [22] Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target [J]. *Nature*, 2005, 438(7070): 967-974.

【收稿日期】 2013-09-01 【修回日期】 2014-03-31

【本文编辑】 李睿旻