

中华眼镜蛇毒细胞毒素 14 的纯化及其抗癌活性

R 996.3

仲晓燕¹, 刘广芬, 王晴川² (福建医学院蛇毒研究室, 福州 350004, 中国)Purification and anticancer activity of cytotoxin-14 from venom of *Naja naja atra*

ZHONG Xiao-Yan, LIU Guang-Feng, WANG Qing-Chuan (Laboratory of Venom Research, Fujian Medical College, Fuzhou 350004, China)

ABSTRACT Ion-chromatography of lyophilized cobra (*Naja naja atra*) venom on SP-Sephadex C-50 yielded 14 fractions, of which 7, 8, 9, and 10 possessed neurotoxic actions and 11, 12, 13, and 14 had cytotoxic activities. Chromatography of fraction 14 on SP-Sephadex C-25 gave cytotoxin-14. It was homogeneous on polyacrylamide gel electrophoresis with $m = 7448$ Da. It was a typical cytotoxin without phospholipase A₂ activity and had a selective cytotoxic action on human cancer cell lines.

KEY WORDS cytotoxins; neurotoxins; cobra venoms; chromatography; cultured tumor cells; polyacrylamide gel electrophoresis

摘要 应用 SP-Sephadex C-50 色谱法, 从中华眼镜蛇毒中分离到 14 个组分, 组分 7, 8, 9 和 10 具有神经毒活性, 组分 11, 12, 13 和 14 具有细胞毒活性. 应用 SP-Sephadex C-25 色谱法, 从组分 14 中分离到一个不含磷脂酶 A₂, 分子量为 7448 Da 的电泳纯品 cytotoxin-14. Cytotoxin-14 是典型的细胞毒素, 对体外培养的人癌细胞有选择性的杀伤作用.

关键词 细胞毒素类; 神经毒素类; 眼镜蛇毒类; 色谱法; 培养的肿瘤细胞; 聚丙烯酰胺凝胶电泳

眼镜蛇毒细胞毒素具有广泛的生物学活性, 对体外培养的多种动物实验性肿瘤细胞有破坏作用⁽¹⁻²⁾, 但对人癌细胞的作用报道很少, 我们已证实中华眼镜蛇(*Naja naja atra*)

粗毒对体外培养的人癌细胞有很强的杀伤作用或明显抑制其生长繁殖⁽³⁾.

本文在此基础上用色谱法从中华眼镜蛇粗毒中分离纯化出 cytotoxin-14, 测定其理化性质、药理学特性及抗癌活性.

MATERIALS

蛇毒 浙江产中华眼镜蛇蛇毒, 为淡黄色冰冻干粉.

试剂 SP-Sephadex C-50, SP-Sephadex C-25, Sephadex G-50 和 Sephadex G-15 (Pharmacia, Sweden); *N,N'*-methylene bisacrylamide (Fluka, Switzerland); acrylamide (Serva, Germany); trypsin (1:250) (Difco, USA); RPMI 1640 (Nissui, Japan); 四甲基乙二胺(TEMED) (上海前进农场试剂厂); 卵磷脂(上海禽蛋三厂生化试剂); 眼镜蛇毒抗血清(上海生物制品研究所); 其它试剂均为国产 AR.

仪器 M-750A 型多功能紫外/可见分光光度计(泰州无线电仪器厂); YDS-4 药理生理多用仪(蚌埠无线电仪器厂); LMS-2A 型二道生理记录仪(成都仪器厂).

METHODS AND RESULTS

粗毒的分离及其组分的药理学特性

1 粗毒的分离 SP-Sephadex C-50 用 NH₄Ac 0.05 mol · L⁻¹, pH 5.0 的缓冲液浸泡平衡并装柱(3.5 × 64 cm). 中华眼镜蛇粗毒 3 g, 溶于 20 ml 缓冲液中, 上柱后用不同离子强度和 pH 梯度的上述缓冲液洗脱, 流速 20 ml · h⁻¹. 测定洗脱液在光波长 280 nm 处的 A, 并绘出其曲线(Fig 1), 共洗出 14 个蛋白峰.

2 各组分对离体大鼠膈神经-肌肉标本⁽⁴⁾的影响 将标本置于 Tyrode 液 24℃ 的浴槽中, 用 YDS-4 多用仪以 0.5 ms 超强方波每 10 s 一次交替刺激神经和肌肉, 用 LMS-2A 记录仪记录收缩曲线, 组分 7, 8, 9 和 10 抑制刺

Received 1990-10-30

Accepted 1992-10-09

¹ Now in National Institute of Pharmaceutical Research and Development, Beijing 102206, China

² To whom correspondence should be addressed

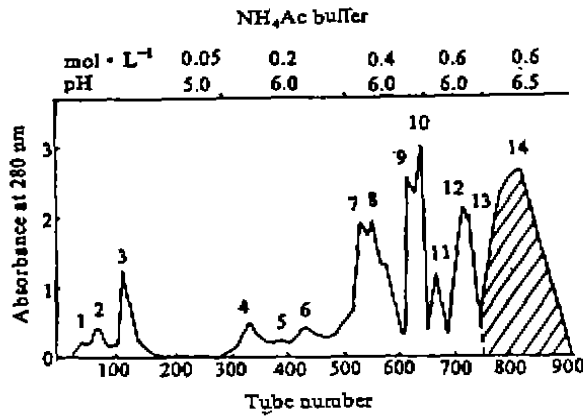


Fig 1. Chromatography of *Naja naja atra* venom on SP-Sephadex C-50 column. Lyophilized venom (3 g) was applied to SP-Sephadex C-50 column (3.5 × 64 cm) and eluted with NH₄Ac buffer at 20 ml · h⁻¹.

激神经引起的收缩,但不影响直接刺激肌肉引起的收缩,组分 11, 12, 13 和 14 对二者均有抑制作用;其它组分对膈神经-肌肉标本无影响。

3 各组分对离体大鼠心脏⁽⁵⁾的影响 制备 Langendorff 心脏标本,用 38℃ 的 O₂ 饱和的 Locke-Ringer 液,平衡后向主动脉套管内注入样品,用 LMS-2A 记录仪记录心肌收缩曲线。组分 11, 12, 13 和 14 使心肌收缩力短暂增强后迅速减弱,心率减慢,心脏挛缩,最后停搏;其它组分对心脏无明显影响。

CT-14 的纯化及其生化药理学特性

1 CT-14 的纯化 将组分 14 上 Sephadex G-50 凝胶柱 (3.5 × 80 cm), 用双蒸水洗脱,流速 20 ml · h⁻¹。测定洗脱液在波长 280 nm 处的 A 并作图 (Fig 2A)。收集峰 3 上 SP-Sephadex C-25 (3 × 68 cm) 柱进一步纯化。用 pH 7.0 磷酸缓冲液 0.1 mol · L⁻¹ 洗脱得一主峰 (Fig 2B), 称之为 cytotoxin-14 (CT-14)。

2 纯度鉴定

2.1 盘状 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳⁽⁶⁾ 采用 pH 4.3 的酸性不连续系统。电极缓冲液为 pH 4.5 的 β-丙氨酸-冰乙酸缓冲液,结果显示 CT-14 为单一条带。

2.2 SDS-15% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (垂直

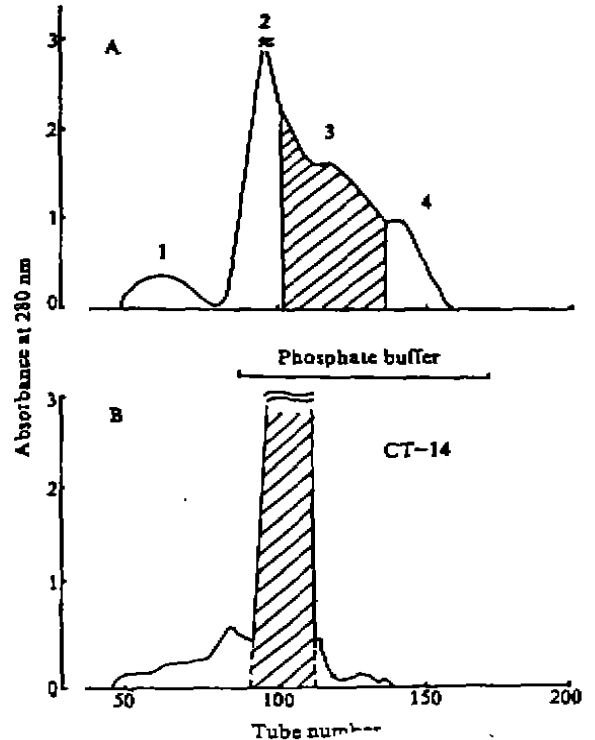


Fig 2. Purification of cytotoxin-14. (A) Chromatograph of peak 14 in Fig 1 on Sephadex G-50 column (3.5 × 80 cm) was eluted with redistilled water at 20 ml · h⁻¹. (B) Chromatograph of peak 3 in (A) on SP-Sephadex C-25 column (3 × 60 cm) was eluted with phosphate buffer (0.1 mol · L⁻¹, pH 7.0) at 12 ml · h⁻¹.

板)⁽⁷⁾ 电极缓冲液为 pH 8.3 的 Tris-甘氨酸缓冲系统 (含 1% SDS), 结果显示 CT-14 为单一条带。

2.3 双向免疫琼脂扩散试验⁽⁸⁾ 中央孔内加入抗眼镜蛇毒血清, 周围孔内加入 CT-14, 结果出现一条沉淀线。

3 磷脂酶 A₂ (phospholipase A₂, PLA₂) 活力以卵磷脂为底物⁽⁹⁾, 滴定酶所释放的脂肪酸, 计算 PLA₂ 的比活力。结果发现 CT-14 的 PLA₂ 活力为 0。

4 氨基酸组成 CT-14 按常规进行酸水解后, 在日立-835 型氨基酸自动分析仪上定量测定。结果发现由 15 种氨基酸组成, 氨基酸残基总数为 60, 分子质量为 7448 Da (Tab 1)。

Tab 1. Amino acid compositions of cytotoxin fractions from *Naja naja atra* venom.

	A ⁽¹⁾	B ⁽²⁾	C ⁽¹⁾	D ₁ ⁽¹⁾	D ₂ ⁽²⁾	CT-14
Ala	2	2	2	1	2	5
Arg	2	2	2	3	3	3
Asp	8	8	6	7	8	6
Cys	8	8	8	8	8	8
Gly	2	2	2	2	2	2
Ile	4	1	1	1	1	1
Leu	6	6	6	6	5	5
Lys	8	8	9	9	8	8
Met	3	2	2	3	2	2
Phe	1	2	2	2	2	2
Pro	4	4	5	4	4	4
Ser	3	2	2	3	2	2
Thr	3	3	3	2	3	3
Tyr	2	3	3	3	3	2
Val	4	7	7	7	7	5
Total	60	60	60	60	60	60

5 LD₅₀ 测定 iv CT-14 小鼠的近似 LD₅₀⁽¹⁾ 为 1.88 ± 0.22 mg · kg⁻¹. 按简化法⁽²⁾ 测定小鼠 ip CT-14 的 LD₅₀ 为 2.9 mg · kg⁻¹, 95%可信限为 2.7-3.2 mg · kg⁻¹. sc 的 LD₅₀ 为 23.2 mg · kg⁻¹, 95%可信限 21.8-24.5 mg · kg⁻¹.

6 对离体大鼠膈神经-肌肉标本的作用 CT-14 能阻断刺激神经和直接刺激肌肉引起的肌肉收缩(Fig 3).



Fig 3. Effect of CT-14 on isolated rat phrenic nerve-diaphragm. Twitches were elicited by electric stimulation on nerve (N) or diaphragm (M) with supermaximal voltage (90 V), 0.1 Hz, and 0.5 ms pulse duration.

7 对离体大鼠心脏⁽⁶⁾的影响 CT-14 使离体大鼠 Langendorff 心脏心肌收缩力短暂增强后迅速减弱, 心率减慢, 心脏挛缩, 最后停搏(Fig 4).

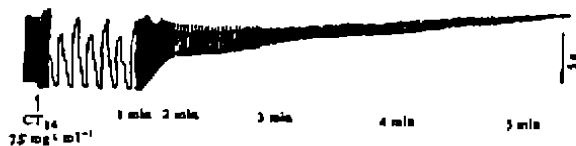


Fig 4. Effect of CT-14 on isolated rat heart.

CT-14 对体外培养的人癌细胞的杀伤作用 MGC-803 (人胃癌细胞株)细胞、CNE (人鼻咽癌细胞株)细胞、HeLa 细胞和乳鼠心肌细胞单层生长于含灭活新生小牛血清 15%及青霉素 100 IU · ml⁻¹, 链霉素 100 µg · ml⁻¹的 RPMI 1640 培养液中, 37℃培养, 每 2-3 d 用 0.25%胰蛋白酶消化传代一次. 将上述细胞悬液 10⁵ · ml⁻¹接种于聚苯乙烯微量反应板内, 培养 24 h 后, 加入 CT-14 作用 4 h, 用台盼蓝排染试验 (trypan blue exclusion test) 计数活细胞数. 结果表明 CT-14 对这四种细胞的破坏作用均呈量-效关系. 它们的 IC₅₀ 分别为 MGC-803 细胞 1.78 µg · ml⁻¹, CNE 细胞 1.52 µg · ml⁻¹, HeLa 细胞 2.59 µg · ml⁻¹, 乳鼠心肌细胞 5.92 µg · ml⁻¹(Fig 5).

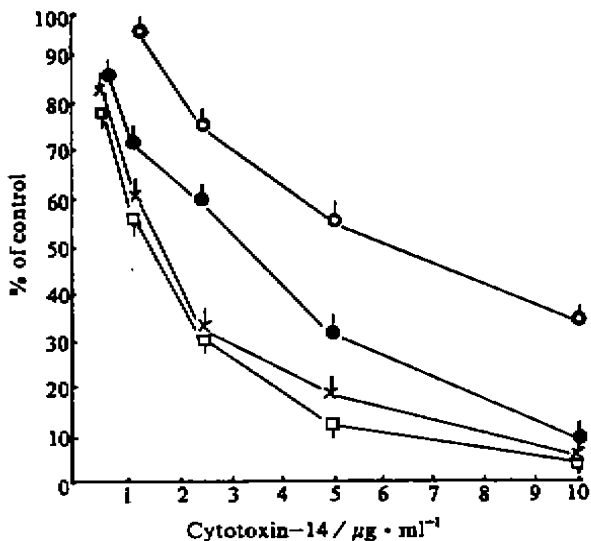


Fig 5. Inhibitory effects of CT-14 on myocardial cells of newborn mice (○), HeLa cells (●), MGC-803 cells (×) and CNE cells (□) cultured for 4 h. % of control = numbers of living cells of treated/numbers of living cells of control. $\bar{x} \pm s$. n=9.

DISCUSSION

广东眼镜蛇毒经 SP-Sephadex C-25 分离, 以 NaCl 0-0.5 mol · L⁻¹ (磷酸缓冲液) 直线梯度洗脱得到 15 个蛋白峰, 其中组分 9 为神经毒素, 组分 10, 11, 13 和 14 为细胞毒素⁽¹⁰⁾. 用 CM-Sephadex C-25 和 NaCl 直线梯度洗脱 (磷酸缓冲液) 的方法, 对中华眼镜蛇毒进行了柱层析分离, 获得 14 个蛋白峰, 组分 6, 7, 8 和 9 有神经毒活性, 组分 12 和 13 具有细胞毒活性⁽²⁾. 本文的分离方法与上述分离方法相比既可分开神经毒素组分, 又可分开细胞毒素组分.

纯化了的 CT-14 经聚丙烯酰胺凝胶电泳, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和双向免疫琼脂扩散试验证明是均一的, 且不含磷脂酶 A₂, 其氨基酸组成与已报道的中华眼镜蛇毒的细胞毒素 C 相似⁽¹⁰⁾, 由 60 个氨基酸残基组成, 含四对二硫键.

本文测定了 CT-14 对 MGC-803 细胞, CNE 细胞和 HeLa 细胞的细胞毒活性, 结果表明 CT-14 对三种人癌细胞株均有明显的杀伤作用. CT-14 对正常小鼠心肌细胞也有破坏作用, 但敏感性比人癌细胞低得多.

REFERENCES

1 Kaneda N, Sasaki T, Hayashi K. Primary structures of cardiotoxin analogues I and N from the venom of *Naja naja atra*. *Biochim Biophys Acta* 1977; 491 : 53-66.

2 Braganca BM, Patel NT, Badrinath PG. Isolation and properties of a cobra venom factor selectively cytotoxic to Yoshida sarcoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1967; 136 : 508-20.
3 Zhao R, Liu GF, Wang QC. Cytocidal action of snake venoms on cell lines derived from human and mice cancer cells. *J Fujian Med Coll* 1988; 22 : 204-6.
4 Bulbring E. Observation on the isolated phrenic nerve-diaphragm preparation of the rat. *Br J Pharmacol* 1946; 1 : 38-61.
5 Staff of the Department of Pharmacology, University of Edinburgh. *Pharmacological experiments on isolated preparations*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1970; 116-7.
6 莽克强, 徐乃正, 方荣祥. 聚丙烯酰胺凝胶电泳. 北京: 科学出版社, 1975; 26-43.
7 Weber K, Osborn M. The reliability of molecular weight determinations by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* 1969; 244 : 4406-12.
8 Ouchterlony O Nilsson L-A. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In: Weir DM, Herzenberg LA, Blackwell C, editors. *Handbook of experimental immunology*. 4th ed. London, Blackwell Scientific Publ, 1986; 1-50.
9 Wu GL, Chen YC. A comparison of phospholipase A₂ activity from the snake venoms of ten species in China. *Zool Res* 1981; 2 : 23-6.
10 Du YC, Wu WY, Wu CR, Wang KZ, Gu BX, Shen JH. Purification and characterization of a new cytotoxin D₁ from Chinese cobra (*Naja naja atra*) venom. *Acta Biochim Biophys Sin* 1985; 17 : 199-206.
11 Meir J, Theakston RDG. Approximate LD₅₀ determinations of snake venoms using eight to ten experiment animals. *Toxicol* 1986; 24 : 395-401.
12 Litchfield JTJ, Wilcoxon F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J Pharmacol Exp Ther* 1949; 96 : 99-113.

《新药与临床》征稿与征订

《新药与临床》报道全球新药的进展, 着重于国内新药的临床研究. 双月刊, 国内外发行, 国内订价每期 2.30 元. 投稿与订购请至 200040 上海市愚园路 532 弄 50 号《新药与临床》编辑部. 电话(021) 252-5690.