

尖吻蝮蛇毒提取物 ACPC1、ACPC2 对 人肝癌细胞抑制作用的研究^{*}

【作 者】 张志友¹ 芮景²

1 安徽省芜湖市高教园区纬六路皖南医学院研究生部 (芜湖市 241002)

2 皖南医学院附属弋矶山医院普外六科 (芜湖市 241000)

【摘 要】 目的 探讨从中国皖南尖吻蝮蛇(*agkistrodon acutus*)蛇毒中提取的 ACPC1, ACPC2 对人肝癌 BEL-7404 细胞株的抑制作用。方法 通过 DEAE-sepharose fast flow 阴离子交换层析、SP-sepharose fast flow 阳离子交换层析、Sephadex G-75 凝胶过滤层析及 Butyl-S Sepharose 6 FF 疏水柱从皖南尖吻蝮蛇蛇毒(*Wannan agkistrodon acutus venom*)中分离纯化出两个抗凝蛋白组分 ACPC1、ACPC2; 用 MTT 法检测 ACPC1、ACPC2 对人肝癌细胞 Bel-7404 的抑制作用。结果 人肝癌细胞 BEL-7404 经 ACPC1 或 ACPC2 处理 72h 后, 当 ACPC1 浓度 $\geq 3.125 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, ACPC2 浓度 $\geq 1.563 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 显示出明显的抑瘤作用, 且呈剂量依赖关系。结论 ACPC1、ACPC2 对体外培养的人肝癌细胞 BEL-7404 均具有明显的抑制作用。

【关 键 词】 尖吻蝮蛇; 蛇毒; 抗肿瘤; 肝癌

【中图分类号】 R979.1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1672-3384(2011)-03-0020-04

Research on agkistrodon acutus venom extracts ACPC1 and ACPC2 in inhibiting hepatocarcinoma cells

【Writers】 Zhang Zhi-you Rui Jing

【Abstract】 **Aim** To investigate the antitumor activity of ACPC1 and ACPC2 from *Agkistrodon acutus* on human hepatocellular carcinoma BEL-7404 cells. **Methods** The ACPC1 and ACPC2 were isolated and purified from the venom of *Wannan agkistrodon acutus* with the use of ion-exchange chromatography of DEAE-Sepharose FF and SP-Sepharose FF, molecular sieve filtration through Sephadex G75 and hydrophobic chromatography of Butyl-S Sepharose 6 FF. The tumor-inhibitory effect of ACPC1 and ACPC2 on the human hepatocarcinoma BEL-7404 cells were detected by MTT assay. **Result** BEL-7404 cells were treated with ACPC1 or ACPC2 for 72 hours. When the concentration of ACPC1 was $3.125 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ or more and the concentration of ACPC2 was $1.563 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ or more, there was obvious inhibition on proliferation of human hepatocarcinoma BEL-7404 cell line. **Conclusion** Both of ACPC1 and ACPC2 have obvious inhibition on the human hepatocellular carcinoma BEL-7404 cells in vitro.

蛇毒作为一种天然的药用资源, 含有多种活性组分, 大量研究表明, 其中一些活性组分具有抗肿瘤

作用^[1-6]。从皖南山区的尖吻蝮蛇粗毒中提取一种抗凝蛋白组分(anti-clotting protein compo-

• 安徽省教育厅自然科学基金项目 (KJ2007A039)

安徽省科技厅重点科研项目 (07021018)

nent, ACPC), 前期研究显示其对多种肿瘤具有很强的抑制作用, 在抗肿瘤方面显示了广阔的前景^[5-12]。本实验进一步对该抗凝蛋白组分进行分离纯化, 得到两种新的抗凝蛋白组分 (ACPC1、ACPC2), 并以人肝癌细胞 BEL-7404 为对象, 利用细胞体外培养技术, 观察该 ACPC1 和 ACPC2 对 BEL-7404 细胞的作用, 并初步探讨其作用机制。

1 1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 药品 ACPC1、ACPC2 从皖南山区的尖吻蝾蛇粗毒中提取。

1.1.2 瘤株 人肝癌细胞 BEL-7404, 购自南京凯基生物科技发展有限公司。

1.1.3 主要试剂 DEAE Sepharose Fast Flow、SP Sepharose Fast Flow、Sephadex G75 凝胶 (瑞典法玛西亚公司); Butyl-S Sepharose 6 FF (中国科学院过程工程研究所); 噻唑蓝 (MTT, sigma 公司); Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (南京凯基生物科技发展有限公司) 等。

1.1.4 主要仪器 CO₂ 培养箱 (美国 Thermo-Forma); 酶标仪 (美国 BIO-RAD); OLYMPUS IX50 倒置显微镜 (日本奥林巴斯); 流式细胞仪 (FACS Calibur Becton-Dickinson) 等。

1.2 方法

1.2.1 ACPC1、ACPC2 的分离纯化及相对分子质量的鉴定 皖南尖吻蝾蛇粗毒经 DEAE-Sepharose FF 阴离子交换层析柱后, 用 APTT 法检测各峰的抗凝活性, 将抗凝活性最强的组分上 SP-Sepharose FF 阳离子交换层析柱, 同法依次上 Sephadex G75 柱及 Butyl-S Sepharose 6 FF 疏水柱, 用 SDS-PAGE 垂直电泳分析各抗凝组分的相对分子质量, BCA 法测蛋白含量。

1.2.2 ACPC1、ACPC2 对 BEL-7404 体外增殖影响的测定 Bel-7404 细胞经不同浓度 ACPC1、ACPC2 处理 72 h 后, 用倒置显微镜观察细胞的形态; 采用 MTT 法测定各种药物在不同浓度下的光密度值 (optical density, OD) 值并计算抑制率 [inhibitory

rate, IR = (1 - 试验组 OD 值/阴性组 OD 值) × 100%], 同时设阴性对照组 (不加药物)、阳性对照组 (20 μg · mL⁻¹, 5-FU); 用 Annexin V-FITC-PI 双染法检测细胞凋亡。

1.3 统计学处理

采用 SPSS (Statistics Package for Social Science) 11.5 统计软件进行分析, 计量数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间差异用方差分析, 均数间两两比较用 *q* 检验, *P* ≤ 0.05 表示差异有统计学意义。半数抑制浓度 (median inhibition concentration, IC₅₀) 通过 Bliss 法计算。

2 结果

2.1 ACPC1、ACPC2 的分离纯化及相对分子质量的鉴定

中国皖南尖吻蝾蛇粗毒依次经 DEAE-Sepharose FF 阴离子交换层析柱、SP-Sepharose FF 阳离子交换层析柱、Sephadex G75 分子筛过滤结合 APTT 法筛选, 分离出一种抗凝蛋白组分, 前期实验已将其命名为 ACPC (anti-clotting protein component); 继续将 ACPC 上 Butyl-S Sepharose 6 FF 疏水层析柱, 获得两种新的抗凝蛋白组分 ACPC1 和 ACPC2。

将 ACPC1、ACPC2 上 SDS-PAGE 电泳, 对照 Marker 显示: ACPC1 由 2 种蛋白组分组成, 相对分子质量分别约为 31 500、55 000; ACPC2 由 3 种蛋白组分组成, 相对分子质量分别约为 31 500、38 000、55 000。

采用 BCA 法测得组分 ACPC1 的蛋白含量约为 76.4%, ACPC2 的蛋白含量约为 79.3%。

2.2 ACPC1、ACPC2 对 BEL-7404 体外增殖的影响

2.2.1 细胞形态 抗凝蛋白各组分干预人肝癌 BEL-7404 细胞 72 h 后用倒置显微镜观察, 阴性对照组和溶剂对照组细胞贴壁良好, 呈不规则形; ACPC1 组、ACPC2 组随着浓度增加 (6.25、12.5、25 μg · mL⁻¹), 细胞数减少, 细胞渐变圆, 细胞体积缩小, 成团分布, 贴壁差, 悬浮细胞增多; 阳性对照组细胞变圆, 大部分仍贴壁生长。

2.2.2 MTT 法检测结果 ACPC1、ACPC2 对 BEL-7404 细胞具有明显的抑制作用,不同浓度 ACPC1 和 ACPC2 作用 BEL-7404 细胞后 72h 光密度(OD)值和抑制率(IR)见表 1 和表 2。经统计学处理显示 ACPC1、ACPC2 浓度分别在 $3.125\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组、 $1.563\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组与对照组 OD 值比较差异显著($P < 0.05$),具有剂量依赖性。应用 SPSS 软件通过 Bliss 法计算 ACPC1、ACPC2 作用 BEL-7404 细胞 72h 的 IC_{50} 分别为 $34.805\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $23.632\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

表 1 Bel-7404 细胞经不同浓度 ACPC1 处理 72h 后的 OD 和 IR

组别	浓度($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	OD 值($\bar{x} \pm s$)	IR(%)
阴性对照组	—	0.957 ± 0.054	—
溶剂对照组	1000.000	0.990 ± 0.038	-3.47
阳性对照组	20.000	$0.380 \pm 0.045^{**}$	60.33
ACPC1 试验组	100.000	$0.222 \pm 0.026^{**}$	76.84
	50.000	$0.429 \pm 0.030^{**}$	55.19
	25.000	$0.526 \pm 0.028^{**}$	44.99
	12.500	$0.736 \pm 0.026^{**}$	23.09
	6.250	$0.807 \pm 0.024^{**}$	15.67
	3.125	$0.899 \pm 0.032^{*}$	6.06
	1.563	0.917 ± 0.035	4.14
	0.782	0.932 ± 0.055	2.65
	0.391	0.955 ± 0.074	0.21

* 表示与阴性对照组比较 $P < 0.05$, ** 表示与阴性对照组比较 $P < 0.01$

2.3 细胞凋亡检测(Annexin V-FITC-PI 双染法)

由表 3 可以看出 ACPC1、ACPC2 作用于 BEL-7404 细胞 72 h,随着剂量增加,凋亡率逐渐增加($P < 0.01$);各组与对照组相比,均提示具有明显促凋亡作用,具有明显统计学意义($P < 0.01$);在相同浓度下 ACPC2 促凋亡作用强于 ACPC1($P < 0.01$)。

表 2 Bel-7404 细胞经不同浓度 ACPC2 处理 72h 后的 OD 和 IR

组别	浓度($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	OD($\bar{x} \pm s$)	IR
阴性对照组	—	0.987 ± 0.031	—
溶剂对照组	1000.000	0.970 ± 0.034	1.76
阳性对照组	20.000	$0.395 \pm 0.038^{**}$	60.02
ACPC2 试验组	100.000	$0.229 \pm 0.016^{**}$	76.80
	50.000	$0.383 \pm 0.029^{**}$	61.22
	25.000	$0.409 \pm 0.028^{**}$	58.58
	12.500	$0.600 \pm 0.036^{**}$	39.19
	6.250	$0.792 \pm 0.015^{**}$	19.78
	3.125	$0.844 \pm 0.018^{**}$	14.49
	1.563	$0.916 \pm 0.027^{**}$	7.15
	0.782	0.952 ± 0.043	3.57
	0.391	0.994 ± 0.035	-0.69

* 表示与阴性对照组比较 $P < 0.05$, ** 表示与阴性对照组比较 $P < 0.01$

表 3 BEL-7404 细胞经 ACPC1、ACPC2 处理 72h 后的凋亡率

组别	浓度($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	凋亡率($\bar{x} \pm s$)%
阴性对照组	—	5.38 ± 1.32
ACPC1 试验组	6.25	21.67 ± 3.60
	12.5	30.40 ± 2.15
	25	51.57 ± 2.74
ACPC2 试验组	6.25	32.75 ± 3.07
	12.5	49.92 ± 3.09
	25	71.97 ± 2.78

注:各试验组与对照组比较 $P < 0.01$

3 讨论

3.1 皖南尖吻蝮蛇毒抗凝蛋白组分的分离纯化

根据生物分子的不同特性,可以用层析技术

进行分离:根据生物电荷的不同,可采用离子交换层析;根据生物分子大小的不同,可采用凝胶过滤层析;根据生物分子配基的特异性,可采用亲和层析;根据疏水性的不同,可采用疏水相互作用层析或反相层析。前期研究根据生物分子电荷和大小的不同对尖吻蝥蛇粗毒进行分离,并分离出抗凝蛋白组分 ACPC。本次实验根据生物分子的另一特性疏水性的不同,采用疏水性最弱的介质 Butyl-S Sepharose 6 FF 对 ACPC 进一步分离纯化(经过预实验证实 ACPC 是一组疏水性很强的物质),并获得出两个抗凝组分(ACPC1、ACPC2)和一个非抗凝蛋白组分。

3.2 皖南尖吻蝥蛇毒抗凝蛋白组分 ACPC 抗肿瘤研究回顾

本课题组已对 ACPC 作了深入的研究,在不同的研究阶段对 ACPC 有不同的命名,如抗高凝固状态酶(anti hypercoagulability state enzyme, AH-CSE)^[5-9]、蛇毒金属蛋白酶-X(snake venom metalloproteinase-X, SVMP-X)^[10]、抗凝蛋白组分-7221^[11]、抗凝蛋白组分^[12],其实均为相同组分。大量体内外研究中证实该抗凝组分对多种肿瘤细胞具有较强的抑制作用,尤其是抑制肝癌细胞的作用^[5-9],诱导细胞凋亡是其抑制肿瘤的作用机制之一^[6-7,9,12],并发现还有免疫改善和骨髓保护作用^[13]。

3.3 皖南尖吻蝥蛇毒抗凝蛋白组分 ACPC1、ACPC2 抗肿瘤活性及机制的研究

ACPC1、ACPC2 是进一步分离纯化抗凝蛋白组分 ACPC 所得的两个新的组分。前期研究证实 ACPC 对肝癌细胞的抑制作用很强,诱导肿瘤细胞凋亡是其作用机制之一,故本次实验采用人肝癌 BEL-7404 细胞株作为 ACPC1、ACPC2 体外抗肿瘤活性的检测对象,并进一步检测其诱导细胞凋亡的作用。

本实验通过 MTT 法检测不同浓度 ACPC1、ACPC2 对人肝癌 BEL-7404 细胞株的抑制作用。结果显示 ACPC1、ACPC2 浓度分别在 $3.125\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组、

$1.563\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组与对照组 OD 值比较,差异显著($P < 0.05$),随着 ACPC1 或 ACPC2 浓度的增加,对人肝癌 BEL-7404 细胞株抑制率增加,表现为剂量依赖性。我们也对非抗凝组分进行了抗肿瘤活性检测,未显示该组分具有抗肿瘤活性。

细胞凋亡是区别于细胞坏死的另一种细胞死亡方式,其形态学和生物化学改变具有自身特点。大量研究表明,肿瘤的发生不仅与细胞增殖异常有关,而且与细胞凋亡异常有着密切关系。本研究通过 Annexin V-FITC-PI 双染法检测 BEL-7404 细胞经 ACPC1、ACPC2 处理 72h 后的凋亡率,结果显示随着 ACPC1、ACPC2 浓度的增加,人肝癌 BEL-7404 细胞株的凋亡率增加,表现为剂量依赖性,各组与阴性对照组比较均有明显差异。

3.4 进一步研究方向

需进一步实验研究尖吻蝥蛇毒抗凝蛋白 ACPC1、ACPC2 各自的抗瘤谱、机制、毒性及抗肿瘤最佳剂量等;需进一步分离纯化 ACPC1、ACPC2,力争取得更单一的蛋白组分。在抗肿瘤的治疗中,ACPC1、ACPC2 都可能具有广阔的应用前景。

【参考文献】

- [1] Rodrigues RS, Izidoro LF, de Oliveira RJ Jr, et al. Snake venom phospholipases A2: a new class of antitumor agents[J]. Protein Pept Lett, 2009, 16:894-898.
- [2] 逢朝霞, 鲁文清, 翟瑞仁, 等. 五步蛇毒抗肿瘤组分 X 对小鼠生殖毒性及 F1 子代的影响[J]. 实用医药杂志, 2010, 27:251-253.
- [3] 涂艳阳, 付建芳, 王伯良, 等. 尖吻蝥蛇小分子多肽对 U251 荷瘤鼠体内抑制实验研究[J]. 陕西医学杂志, 2010, 39:263-264, 273, 385.
- [4] Xie Q, Tang N, Wan R, et al. Recombinant snake venom cystatin inhibits the growth, invasion and metastasis of B16F10 cells and MH-CC97H cells in vitro and in vivo[J]. Toxicon, 2011 Feb 15. [Epub ahead of print]
- [5] 芮景, 程明荣, 徐永强, 等. 不同剂量蛇毒抗高凝状态酶对小鼠肝癌 H22 生长作用的实验研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9:157-161.

磺脲类促泌药在 2 型糖尿病治疗中的地位和作用

【作者】 于冬妮 郭立新

卫生部北京医院内分泌科 (北京 100730)

【摘要】 磺脲类促泌药在 2 型糖尿病治疗中有着重要的地位, 目前被广泛的应用于 2 型糖尿病患者。其降糖机制主要是刺激胰岛素的分泌, 目前应用较多的是第二代药物, 与第一代药物相比, 第二代药物增强了降糖效果同时减少了不良反应的发生率。磺脲类促泌药的主要不良反应有低血糖、对心肌缺血预适应的影响及体重增加, 在使用过程中, 我们应严格掌握其适应证和禁忌证, 尤其是对老年患者, 更应该谨慎, 避免严重不良反应, 控制好血糖, 使糖尿病患者得到更多的获益。

【关键词】 磺脲类促泌药; 2 型糖尿病; 不良反应

【中图分类号】 R587.1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1672-3384 (2011) -03-0024-04

2 型糖尿病的治疗是目前和今后相当长一段时期内所面临的严峻挑战, 不仅因为全球糖尿病的患病率逐年增高, 而且由于糖尿病的发病机制非常复杂, 需要更加个体化的治疗方案。磺脲类促泌药是一类重要的口服降糖药物, 已有 50 多年的发展历史, 它由于含有 $-SO_2-NH-CO-NH-$ 基团而被命名。由于其价格低廉, 降糖作用显著, 不良反应较少, 而且有广泛的循证医学证据如 UKPDS 和 ADVANCE 的支持, 所以多个国内外的糖尿病治疗指南中都将磺脲类药物作为 2 型糖尿病的一线治疗药物, 广泛应用于 2 型糖尿病患者。

1 磺脲类药物的作用机制

磺脲类促泌药的降糖机制主要是刺激胰岛素

的分泌。磺脲类促泌药可结合胰岛 B 细胞的相应受体, 引起 ATP 敏感的钾离子通道关闭, 细胞膜去极化, 使电压敏感性的钙离子通道开放, 引起钙离子内流, 促进胰岛素的分泌。长期应用磺脲类药物可以增加大约 25% 的第 2 时相的胰岛素分泌^[1], 同时, 它也有很多胰腺外的作用, 它可以增加脂肪细胞和胰岛素的结合, 放大胰岛素的外周作用, 同时可以减少肝糖的输出^[2]。磺脲类药物中的格列齐特, 除了具有降糖作用外, 还可以减少血小板的反应, 刺激血管内皮前列环素的合成, 增加纤溶作用, 改善血管内皮功能^[3-4]。上述作用可能是格列齐特具有独特的氨基氮杂双环辛烷结构, 具有清除自由基的能力, 从而减少了氧化应激反应。

[6] 柴智明, 张正明, 芮景. 蛇毒抗高凝状态酶对人肝癌细胞及肝细胞作用的研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2006, 13: 266-270.
[7] 张正明, 芮景, 柴智明. 蝮蛇毒抗高凝状态酶对小鼠肝癌抑制作用及 p53、c-myc 表达的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2007, 12: 778-781.
[8] 柴智明, 陈永攀, 钱大青. 蛇毒抗高凝状态酶合用氟尿嘧啶对肝癌细胞、肝细胞作用的实验研究[J]. 实用肿瘤杂志, 2008, 23: 49-51.
[9] 柴智明, 芮景. AHCSE 对人肝癌细胞 BEL-7404 的抑瘤研究[J]. 皖南医学院学报, 2005, 24: 245-247.

[10] 陈冬云, 潘学兵, 吉兆宁. 皖南尖吻蝮蛇毒提取物体外抗肿瘤活性的实验研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2009, 14: 37-41.
[11] 怀建国, 芮景. 皖南尖吻蝮蛇毒抗凝蛋白组分的分离纯化及其急性毒性实验研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2009, 14: 274-278.
[12] 汪德明, 芮景. 蝮蛇毒抗凝蛋白组分对人结肠癌细胞株 SW480 凋亡的实验研究[J]. 实用肿瘤学杂志, 2009, 23: 406-410.
[13] 朱伟杰, 张正明, 许力, 等. 蛇毒抗高凝状态酶对小鼠骨髓造血系统的影响[J]. 皖南医学院学报, 2007, 26: 83-88.