

蛇毒中生物活性酶的研究进展

刘秉宜¹,王庆鹏¹,王正平^{1,2},张瑞岩¹,韩 军^{1,2}

(1.聊城大学 生物制药研究院,山东 聊城 252059;2.聊城高新生物技术有限公司,山东 聊城 252059)

摘要 蛇毒是一类包含蛋白质、多肽和金属离子等成份的混合物。蛇毒中的多种生物活性酶决定了其功能的多样性,例如凝血、溶栓、止痛和抗肿瘤作用等。然而,由于蛇粗毒免疫原性强和副作用多等缺点,其临床应用受到了一定的限制。随着新技术和分离纯化方法的发展,越来越多蛇毒产品的新功能被开发出来。针对蛇毒成分的分离纯化技术和分析鉴定方法,对研究较多的蛇毒中存在的活性酶及其生物学功能进行了总结,尤其阐述了蛇毒纤溶酶的种类及其在溶栓作用方面的机制,旨在对蛇毒中生物活性酶药用功能的技术开发进行全面和深入的了解。

关键词 蛇毒;分离纯化方法;纤溶酶;溶栓;生物活性

中图分类号 R969

文献标识码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



Progress on Bioactive Enzymes in Snake Venom

LIU Bingyi¹, WANG Qingpeng¹, WANG Zhengping^{1,2},
ZHANG Ruiyan¹, HAN Jun^{1,2}

(1. Institute of biopharmaceutics of LiaoCheng university, LiaoCheng 252059, China;
2. Liaocheng High-Tech Biotechnology Co.Ltd, Liaocheng 252059, China)

Abstract Snake venom is a kind of mixture including protein, polypeptide and metal ion. The diversity of protease in snake venom determines its multiple functions, such as coagulation, antithrombotic, analgesic and antitumor. However, the clinical applications of crude extracts from snake venom are limited by strong immunogenicity and other side effects. With the development of new technologies and purification methods, more and more new functions of snake venom protease have been developed. In order to further understand the biological functions and the corresponding active mechanisms of the snake venom components, the methods of separation, purification, analysis and identification of snake venom components were reviewed, and the active enzymes which have been detailly studied were summarized, especially the types and mechanism of fibrinolytic enzyme of snake venom.

Key words snake venom; protein purification; plasmin; thrombolysis; biological activity

收稿日期:2020-05-10

基金项目:国家自然科学基金项目(21807056);山东省科技计划项目(2014GSF118121);山东省自然科学基金项目(ZR2013HZ002);山东省抗体制药协同创新中心开发课题(CIC-AD1834, CIC-AD1829);聊城大学博士及高层次人才科研启动基金项目(318051827, 318051738);聊城大学科研基金项目(318011907)资助

通讯作者:韩军,男,汉族,博士,教授,研究方向:药物新剂型, E-mail: junhanmail@163.com;张瑞岩,男,汉族,博士,讲师,研究方向:蛋白质结构与功能, E-mail: zry147896@163.com。

0 引言

蛇毒是一味中药,早在唐开元 29 年的《本草拾遗》一书中就有记载。书中描述了蛇毒的功效为“主破血,止血痢”。古人通过经验和大胆的尝试,发现蛇毒是止血的良药。从现代医学的角度上解释,蛇毒中的某类蛋白酶具有凝血的功能,能够激活人的凝血系统。事实上,蛇毒的功能很多,止血作用只是其中之一。现代医学要求我们不能像古人一样凭借经验使用蛇毒,再去发掘蛇毒的功能,而是需要应用先进的技术手段对其进行评估,还要不断地分离、纯化、鉴定蛇毒蛋白或小分子肽,从而发现蛇毒的新价值并对其标准化生产进行可行性分析。本文以蛇毒类药物研究的过程为线索,从蛇毒生物活性酶的功能分析到分离纯化、鉴定,并对已上市的蛇毒药物进行综述,并以此概括蛇毒药物的研究进展。

1 蛇毒生物活性酶的分离纯化方法

蛋白酶类样品的分离和纯化方法的选择要根据其性质和具体的研究目的来决定。常用于初步提取和浓缩蛋白质的方法主要有吸附法、超滤法、沉淀法(如盐析、有机溶剂沉淀、等电点沉淀和选择性沉淀等)和透析法等。随着科学技术的发展,色谱法(如凝胶过滤、离子交换、亲和色谱和共价色谱等)和电泳法(如等电聚焦、双向电泳、毛细管电泳和免疫电泳等)也被广泛应用于蛋白质的分离和纯化中。这些分离纯化方法的原理主要是基于蛋白质的溶解性、带电荷性、分子量大小和亲和特异性等方面的差异。1980 年 Schmaier AH 等人应用凝胶过滤法在响尾蛇毒液中分离纯化出 Crotalocytin 蛋白,并且研究了被响尾蛇咬后病人血小板数量下降、深静脉凝血、纤维蛋白原含量急剧降低等症状与 Crotalocytin 蛋白的关系。其实验数据表明,响尾蛇 Crotalocytin 蛋白具有聚集血小板和降解纤维蛋白原的功能^[1]。

此外,离子交换层析是以离子交换树脂或化学键合离子交换剂为固定相,利用被分离组分离子交换能力的差别而实现样品分离的色谱方法。按照可交换离子所带电荷的不同又可分为阳离子交换色谱法和阴离子交换色谱法。1998 年,钱亚雯等人使用离子交换色谱法分离了腹蛇毒液中的蛋白质,他们观察到蛇毒毒液中有多种活性较高的组分^[2]。另外,Qiao XX 团队用阳离子交换层析法分离出一种活性很高的蛋白 TJUQ1^[3],并对其广谱抗菌活性进行了评价。

随着科学技术的进步和研究的不断深入,单一的分方法并不能满足科研人员的需求,很多团队使用多种方法相组合的策略对蛇毒样品进行分离纯化。例如,钟读波等人使用 DEAE-Sephadex A-25 及 Sephadex G-25 层析的方法对长白山白眉蝮蛇蛇毒中类凝血酶进行分离纯化,得到一个分子量为 35.5 ku、体外比活力为 12.57 IU·mg⁻¹的凝血酶^[4]。另外,Soares TG 团队使用 RP-HPLC 和 SEC-HPLC 方法分离蛇毒中的组分,结果用 SEC-HPLC 方法得到的 MipLAAO-SEC 蛋白有活性,而用 RP-HPLC 法得到的蛋白却没有活性^[5]。由此可见,在进行目标蛋白的分离纯化时应该考虑被分离蛋白的性质后再确定分离方法,并且应该多种分离法同时使用,选出最适合目标蛋白的分离方法进行后续实验。

2 蛇毒生物活性酶的分析鉴定方法

蛇毒粗毒经过分离纯化后可获得高纯度的活性蛋白酶,为了对该组分进行更深入的研究,需要进一步对其理化性质、氨基酸序列信息和高级结构等进行分析。蛇毒组分的详细信息包括分子量大小、等电点、氨基酸序列、蛋白质的高级结构(通过 CD、IR、NMR、X-ray、TEM 等技术进行分析)和是否含有金属离子等。1992 年,Burakhart W 发表了一篇关于 Ancord(安克洛酶)活性成分 Viprinex 的研究文章,他们发现 Viprinex 是由 234 个氨基酸组成的分子量为 26570 u 的多肽。经仪器测量分析 Viprinex 的氨基酸序列后,作者推断出 Viprinex N 端有 5 个糖基化位点、两个二硫键、无金属结合位点等相关信息^[6]。

对于分离纯化的已知蛋白,则可以使用 western blotting 来确定被分离的蛋白是否是目标蛋白。2016 年,Collaço RC 等人使用 western blotting 考察了市售的抗蛇毒血清(CAv)与不同种类腹蛇的粗毒液的结合情况。发现 CAv 可以与不同浓度的腹蛇粗毒液结合,证明了 CAv 在中和蛇毒毒液上有显著作用^[7]。

蛇毒蛋白酶二级结构的确定多使用圆二色谱法(CD)确定。Vishwanath BS 等人通过圆二色谱在 320 nm 处观察到从蛇毒中提取的 phospholipase A2(PLA2)与从马铃薯中提取到的马兜铃酸(aristolochic acid)

有额外的结合条带。并且两者结合后观察到 PLA2 的 α 螺旋的含量显著增加,磷脂酶 A2 的活性下降。因此得出马兜铃酸是蛇毒磷脂酶 A2 的非竞争型抑制剂的结论^[8]。

在蛋白质二级结构的研究中通常需要结合氨基酸序列、残基信息、圆二色谱、核磁共振等信息来推断蛋白质可能的二级结构及其位置。蛋白质高级结构十分复杂,解析三级结构需要有昂贵的设备支撑。X-ray 可以检测到蛋白质的各原子组成的官能团的电子云,根据电子云的分布可以计算出肽链的折叠情况。

3 蛇毒中生物活性成分的分类及功能

蛇毒粗毒由多种生物活性酶组成,根据蛋白酶作用部位的不同可分为细胞毒素、神经毒素和肌肉毒素。蛇毒中分子的多样性决定蛇毒功能的多样性。蛇毒蛋白酶的生物学功能主要包括抗栓溶栓、止血、降血压、止痛和抗肿瘤等。表 1 汇总了各个功能对应的生物活性蛋白的结构和活性等信息。

3.1 蛇毒蛋白酶的凝血功能

凝血酶的本质是一类凝血因子,主要的功能是通过凝血因子 Xa 的作用将凝血酶原转化为有活性的凝血酶,凝血酶裂解纤维蛋白原(如图 1 所示)的 A、B 链形成纤维蛋白,之后纤维蛋白结合血小板达到凝血的效果,需要指出的是,凝血酶的副作用是形成血栓。还有研究表明凝血酶通过活化血小板细胞膜上的蛋白酶活化受体来促进血小板的活化和聚集^[9]。对于人源凝血酶研究较多的是凝血酶与细胞膜上受体的结合后触发的细胞内信号通路调控的机理研究。但是 2019 年 Kacmaz C 等人开发出凝血酶的新价值,他们研究了凝血酶在脂肪移植领域的作用。通过组织学和统计学评估表明,凝血酶减少了移植脂肪的重量和体积损失,增加了活脂肪细胞的数量,并降低了接受部位的炎症发生率^[10]。不同于人源凝血酶的凝血机制,蛇毒凝血酶的凝血机制主要依赖一类丝氨酸蛋白酶的成分。例如,研究较多的安克洛酶(Ancrod)和巴曲酶(Batroxobin)。Mattock 等人研究发现,用 Ancrod 活化的凝血因子 XIII(凝血酶原酶)能产生少量的 γ 二聚体,作者认为丝氨酸蛋白酶(Ancrod)可以将无活性凝血酶原酶转换为有活性的凝血酶,进而生成少量的纤维蛋白(γ 二聚体), γ 二聚体再与血小板等成分结合达到凝血的作用。1977 年 Rizza C 等人在 Mattock 的研究基础上发现 Ancrod 和 Batroxobin 可能是将凝血因子 XIII 转化为一个中间体,这个中间体有类似 XIIIa 的活性,进而催化 γ 二聚体的形成。2016 年 Nielsen VG 等人研究发现,由蛇毒诱导的血栓形成速度接近凝血酶诱导的凝血速度的两倍。并且,在脑中风患者中发现纤维蛋白原被铁和一氧化碳修饰,这可能是安克洛酶对脑中风患者不起作用的原因,他们进而提出消耗纤维蛋白原治疗脑中风的方案^[11]。同为凝血酶的 Batroxobin 也从蛇毒中提取的生物活性酶。Stocker K 等人通过比较不同蛇毒来源 Batroxobin 的物理化学性质发现, Batroxobin 不同的糖基化程度使其所带电荷量不一样,所以不同来源的 Batroxobin 凝血速度也会有差异。另外, Batroxobin 的凝血机制是通过裂解纤维蛋白原 α 链的 Arg-Gly 键来释放纤维蛋白 A,加入咪唑和苯酚能加快 Batroxobin 的凝血作用。因为 Batroxobin 不受凝血酶抑制剂的影响,所以将 Batroxobin 分类为类凝血酶^[12]。2019 年, Masuda H 等人通过对后肢缺血型小鼠模型腹腔注射 Batroxobin,观察到随着注射天数的增加,小鼠体内 Arg-1, Plgf, Myog 等生长因子的逐渐上调和肌纤维的成熟等现象,表明 Batroxobin 还有加速组织修复的功能^[13]。

3.2 蛇毒蛋白酶的抗栓溶栓功能

蛇毒蛋白酶中的抗栓溶栓组分可以抑制血小板之间的聚集,影响机体凝血和血栓的生成。例如,王晴川等人在尖吻蝮蛇毒液中提取出蕲蛇酶,并观察到蕲蛇酶可以裂解纤维蛋白原的 α 链从而降低血液的纤维蛋白原,还能抑制血小板的聚集^[15]。2014 年 Tsai IH 等人通过基因敲除蕲蛇酶的特定糖基化位点,考察了蕲蛇酶糖基化对酶降纤维蛋白原的影响。结果表明,敲除氨基酸序列中 229 位的天冬氨酸后蕲蛇酶的活性发生显著变化。与正常的蕲蛇酶相比,突变蛋白不再特异性水解纤维蛋白原的 A α 链,变得没有特异性了。同时发现,敲除 77、81 和 100 位天冬氨酸后,蕲蛇酶蛋白不能正确折叠。除此之外,在功能探索方面,有报道

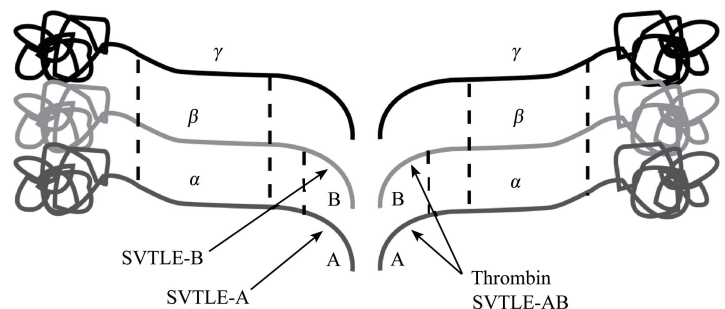


图 1 纤维蛋白原的结构图^[14]

同时发现,敲除 77、81 和 100 位天冬氨酸后,蕲蛇酶蛋白不能正确折叠。除此之外,在功能探索方面,有报道

指出,蕲蛇酶有降低脑动脉缺血对脑损伤的功能^[16]。

血栓块一般由不溶性纤维蛋白、血小板、白细胞和红细胞混合组成,可分为静脉血栓和动脉血栓。血栓可由凝血酶活性过高、或者是内源自发性、或是细胞脂肪过多等原因使血管管道变窄生成。溶栓是在血栓已经生成的情况下,纤溶酶降解由纤维蛋白等组成的血栓块的过程。蛇源的纤溶酶分为单链金属蛋白酶、单链丝氨酸蛋白酶和双链丝氨酸蛋白酶。蛇毒双链丝氨酸蛋白酶对纤维蛋白原表现为非特异性作用,其优先降解纤维蛋白原 B 链(FGB),释放纤维蛋白肽 B,并表现出较低的降解纤维蛋白原 A 链(FGA)活性,释放纤维蛋白肽 A(如图 1)。也可以破坏纤维蛋白之间的结合力,使不溶性的纤维蛋白块降解。单链丝氨酸蛋白酶降解纤维蛋白原的 A 链,单链金属蛋白酶则表现出相反的活性,它优先降解纤维蛋白的 B 链,再对 A 链和 γ 链起作用。蛇毒纤溶酶的蛋白水解活性低于人源纤溶酶,但是它对蛋白激酶 C,凝血因子 XI α 和凝血酶都有很强的活性,表现为纤溶、抗凝的作用^[17]。研究发现,大部分纤溶酶的副反应表现为出血。但科研人员在眼镜蛇蛇毒中发现有专一性很强的纤溶酶抑制剂,能够很好地抑制纤溶酶的副反应的发生^[18]。

3.3 蛇毒蛋白的降血压功能

蛇毒中存在一类小分子降压肽,包括血管舒缓激肽强化肽、尿钠排泄肽(利钠肽)、Sarafo 毒素、中性磷脂酶 A2 和 L 型钙离子通道阻滞剂等。这些小分子降压肽通过不同的方式达到降压的效果,其中一类蛇毒是血管紧张素 I 转换酶的抑制剂(如图 2 所示),使血管紧张素 I 不能转换成血管紧张素 II,从而无法起到收缩血管的作用,发挥降血压的功能。此外,血管紧张素 II 可以使血管舒缓激肽失活从而抑制血管的舒张使血压上升。并且,血管紧张素 II 还可以使肾小管重吸收钠离子,进而重吸收水达到升压效果。因此,蛇毒降压肽抑制了血管紧张素 II 的生成,发挥降压作用。

3.4 蛇毒神经毒素的止痛功能

神经毒素是蛇毒中重要的一类麻痹猎物神经的蛋白,在眼镜蛇和海蛇的毒液中含量较丰富,毒性较大。由于蛇毒神经毒素能阻断神经递质的传递和释放过程,具有止痛药成药的可能性,而且蛇毒神经毒素发挥镇痛作用的同时,没有耐受性和成瘾性。又因为蛇毒神经毒素对神经细胞后膜受体的高特异性,强亲和性,也被开发用于分离神经递质受体的探针。根据其阻断的部位不同,可分为突触前神经毒素和突触后神经毒素。突触后神经毒素又可根据其三指蛋白的二硫键个数分为 I 型和 II 型, I 型神经毒素又被称为短链神经毒素(Short chain neurotoxin), II 型神经毒素称为长链神经毒素(Long chain neurotoxin)。大多数的神经毒素属于 I 型神经毒素,拥有 4 个二硫键,作用于肌肉细胞烟酰胺乙酰胆碱受体,竞争性的抑制神经递质乙酰胆碱与受体结合,因此阻断神经与肌肉的信号传递。II 型神经毒素拥有 5 个二硫键。I 型和 II 型神经毒素都能结合肌肉烟酰胺乙酰胆碱受体,但只有 II 型神经毒素可以与神经元之间的 $\alpha 7$ 烟酰胺乙酰胆碱结合,阻断神经元之间的信号传递。又因为神经毒素的强亲和性,且结合能力强于神经递质与受体的结合,所以神经毒素是神经递质的强抑制剂。这也是它能用来缓解恶性肿瘤疼痛,神经性疼痛,关节痛等疾病的原因。蛇毒突触前神经毒素大多数具有磷脂酶 A2 的活性,作为钙离子依赖性蛋白酶家族的成员,其可以结合到突触前膜上,抑制神经递质的释放,从而阻断神经原之间的信号传递,使肌肉麻痹^[19,20]。

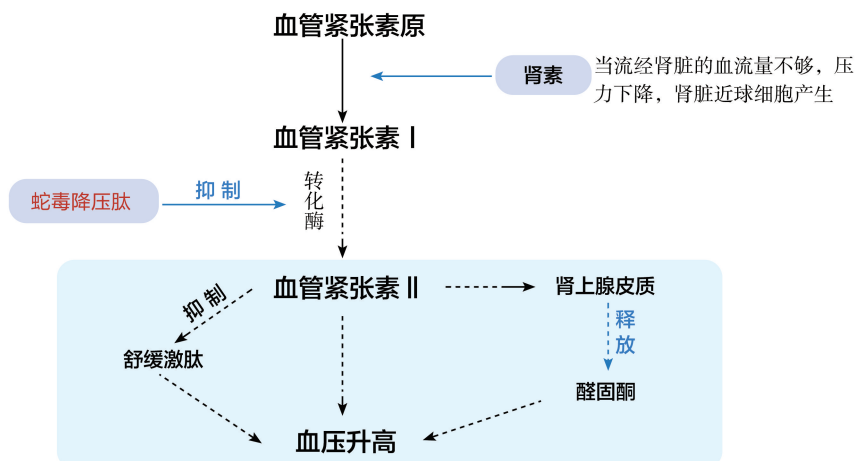


图 2 蛇毒降压肽参与血压调节的过程图(虚线箭头表示血管紧张素 I 转化酶被抑制后的下游通路)

3.4.1 突触前神经毒素。酸性磷脂酶是作用于突触前膜的一类蛇毒神经毒素。在小鼠体内毒性表现为浮肿、神经毒素和间接溶血等。例如,蛇毒磷脂酶 A2(BthA-I-PLA2)可以诱导水肿的发生,还可以抑制磷脂依赖性胶原/ADP(二磷酸腺苷)诱导的血小板聚集,具有降压和抗凝的功能。此外,蛇毒磷脂酶 A2 会破坏大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的细胞结构,因此具有杀菌的功能^[21]。

表 1 蛇毒生物活性物的功能汇总

名称	来源	条件及活性	结构特征	功能	参考文献
Ancrod	Malayan pit viper venom	酶活裂解纤维蛋白原的 α 链,对 β 链作用	26 570 Da,PI:8.6 6 个二硫键 N 端 5 个糖基化	降纤,凝血,溶解深静脉血栓	[6,11]
Batroxobin	Venom of a pit viper,Bothrops atrox moojeni	酶活裂解纤维蛋白原的 α 链,对 β 链有弱作用	27 415 Da,6 个二硫键,PI:7.51 3 个 α 螺旋,5 个 β 折叠, 3 个 β 转角,N 端两个糖基化	降纤,凝血,组织修复	[12,13]
Atroxase	Crotalus atrox	金属蛋白酶(结合 zn) 酶活裂解纤维蛋白原的 α,β 链,pH:9.0 T:55°C	23 203 Da PI:6.79 N 端 1 个糖基化	降纤 溶栓 不抗凝	[31]
Disintegrin	Protobothrops mucrosquamatus (Taiwan habu)	金属蛋白酶(结合 zn) 酶活裂解纤维蛋白原的 α,β,γ 链	54 178 Da,PI:5.53 9 个二硫键,9 个 α 螺旋 6 个 β 折叠,3 个 β 转角 N 端封闭	降纤,出血(抗凝)凋亡	[32]
Serine protease harobin	Hydrophis hardwickii (Lapemis hardwickii)	非金属蛋白酶,先裂解 β 链再裂解 α,γ 链 pH:8.0, T:65°C	28 996 Da,pI:5.81 7 个二硫键 2 个糖基化 1 个亚基	降纤,降血压,裂解血管紧张素 2,没有出血活性	[33]
Beta-fibrinogenase brevinase	Gloydus blomhoffii (Mamushi) (Agkistrodon halys blomhoffii)	非金属蛋白酶,先裂解 β 链再裂解 α 链,对 γ 链不起作用, pH:5.5-8.5	25 725 Da,pI:5.51 6 个二硫键 3 个糖基化 2 个亚基	降纤溶栓,降血压,不聚集纤维蛋白原	[34]
Cobrotoxin	Chinese cobra	N/A	9 262 Da,4 个二硫键 5 个 β 折叠	止痛	[26]
SVPLA2 homolog	Oxyuranus scutellatus scutellatus	LD50 2 g/kg	16 008 Da,7 个二硫键 7 个 α 螺旋,2 个 β 转角 3 个 β 折叠	抑制突触前膜递质释放回收(麻痹)	[35]
Cardiotoxin1	Naja kaouthia	静脉注射 LD(100) 0.75 mg/kg	6 701 Da 4 个二硫键	释放钙离子及胰岛素神经毒性	[29]
Cytotoxin NN-32	Indian cobra	腹腔注射 LD50 4 mg/kg	6 758 Da	调控细胞凋亡和抗氧化活性达到抗癌的功能	[28]

3.4.2 突触后神经毒素。响尾蛇毒素低剂量使用有镇痛效果,高剂量使用出现肌肉坏死的症状。响尾蛇毒素同时拥有 β -干扰素和 α 蝎毒神经毒素的部分活性,因为它们在三级结构上部分作用位点的相似性、在二级结构上存在 30% 的同源性以及活性的强弱和它们的三级结构表面的净正电荷成正比。响尾蛇毒素可在肌细胞表面聚集成网状泡阻断信号的传递与转化,进而使肌坏死。因为响尾蛇毒素的 α 螺旋序列较短,不能形成稳定的半胱氨酸 α 螺旋基序,所以响尾蛇毒素可以阻断细胞膜上的钠离子通道的开放^[22]。响尾蛇毒素是富含精氨酸和赖氨酸的短肽。这类富含精氨酸和赖氨酸的多肽称为细胞穿透肽,带大量正电荷的多肽和细

胞表面带负电荷的细胞外基质结合从而介导响尾蛇毒素的内吞,表现为在体内和体外被细胞快速内化。响尾蛇毒素这一特性使其可以作为细胞内基因传递、药物传递和诊断探针的载体。另外,响尾蛇毒素还可以作为一种细胞穿透性蛋白用于细胞核定位和研究细胞分裂的动态过程^[23]。

蛇毒心脏毒素属于细胞毒素,对心肌细胞有较强的毒性,如 β -心脏毒素是肾上腺素 β 受体的阻断剂。根据肾上腺素受体对去甲肾上腺素的不同反应情况,分为肾上腺素 α 受体和 β 受体,皮肤、肾、胃肠的血管平滑肌以 α 受体为主,而骨骼肌、肝脏的血管平滑肌以及心脏以 β 受体为主,去甲肾上腺素主要作用于 α 受体,而肾上腺素则作用于 β 受体。因为 β -心脏毒素能特异性的聚集在肾上腺素 β 受体上,从而阻断心肌等细胞的电信号传递,所以会产生心率下降、运动减缓、对刺激不敏感等毒副作用^[24]。还有一类心脏毒素的作用靶点是细胞表面粘附受体的一个超家族——整合素 $\alpha_v\beta_3$ 。它们在多种细胞上表达,介导许多生理过程,包括炎症、迁移、粘附和增殖等。例如细胞毒素A5(cytotoxinA5)是一类不表现溶血溶细胞活性的非细胞毒性蛋白,对整合素 $\alpha_v\beta_3$ 有高亲和性,抑制破骨细胞差异化和骨吸收^[25]。

3.5 蛇毒蛋白细胞毒素的功能

细胞毒素可分为P型和S型蛋白。P型蛋白包括cardiotoxin、cytotoxin6、7和A5,S型蛋白包括cytotoxin1、2、3、4和5。标准的P型蛋白是氨基酸序列的第31位有1个脯氨酸,P型蛋白大多数通过与心肌细胞表面上的受体结合而起作用。S型蛋白的特征是氨基酸序列的第29位有1个丝氨酸。cytotoxin1、3单体对部分细胞(C2Cl2)表现出溶解细胞的活性,也可以促使钙离子释放和促进胰岛素分泌。S型蛋白在无葡萄糖存在的条件下可以促进胰岛素的分泌,如果在有葡萄糖存在的条件下,cytotoxin1.3活性会随葡萄糖的浓度升高而升高。然而,细胞毒素多聚体并不表现溶解细胞活性,大部分多聚体表现为 α -眼镜蛇毒活性,这种毒活性可与 α -真菌素竞争结合 $\alpha 7/CHRNA7$ 受体。Cytotoxin2、4、5通过结合硫化物聚集在磷脂细胞膜上形成小孔裂解细胞,也能作用于线粒体膜导致线粒体肿大或破碎。还有一种从印度眼镜蛇毒液中分离纯化得到的特殊细胞毒素因子(Cytotoxin NN-32),它既不属于P型也不属于S型蛋白,但能通过影响细胞凋亡的过程而达到抗癌的效果^[24-29]。

表2 国内外蛇毒类药物

名称	来源	条件及活性	功能	不良反应	公司
抗五步蛇毒血清	经胃酶消化后的马抗五步蛇毒免疫球蛋白	2000效价	用于五步蛇咬伤者的治疗	1.过敏休克 2.血清病	上海赛伦生物技术股份有限公司
注射用白眉蛇毒血凝酶	从长白山白眉蝮蛇冻干蛇毒中提取分离得到的血凝酶	1单位(KU)	可用于需减少流血或止血的各种医疗情况;也可用来预防出血	过敏性休克、发热、呼吸困难、胸闷、头晕、头痛、呕吐、心悸、皮疹、瘙痒。	锦州奥鸿药业有限责任公司
蛇毒血凝酶注射液	从蝰蛇科蛇毒中提取的蛇毒血凝酶	1 mL:1单位	本品可用于需减少流血或止血的各种医疗情况;也可用来预防出血。	过敏性休克、呼吸困难、胸闷、头晕、头痛、恶心、呕吐、心悸、皮疹、瘙痒	兆科药业有限公司
注射用白眉蛇毒血凝酶	从长白山白眉蝮蛇冻干蛇毒中提取分离得到的凝血酶	1单位(KU)	本品可用于需减少流血或止血的各种医疗情况;也可用来预防出血。	不良反应发生率较低,偶见过敏反应。	沈阳新马药业有限公司
蕲蛇酶注射液	蕲蛇毒中提取的凝血酶样酶	1 mL:0.75单位	急性脑梗塞	抑制血小板聚集、皮疹	福建汇天生物药业有限公司
纤溶酶注射液	长白山白眉蝮蛇毒中提取的纤溶酶	100单位/支	用于脑梗死、高凝血状态及血栓性脉管炎等。	发生创面、注射部位、皮肤及黏膜出血、头晕、头疼	北京赛升药业股份有限公司
CAPTOPRIL	CAPTOPRIL	12.5 MG	高血压	头晕、头痛、失眠、疲乏、恶心呕吐、腹泻便秘	PUREPAC PHARM

3.6 蛇毒蛋白抗肿瘤的功能

蛇毒抗肿瘤大致可分为三大类:一类是细胞毒素介导的溶解细胞功能,可直接杀死肿瘤细胞;第二类是

蛇毒成分诱导的细胞凋亡;第三类是蛇毒的解离素成分通过抑制肿瘤细胞血管的生成,从而达到抑制肿瘤细胞的生长。蛇毒 S 型单体蛋白 cytotoxin1 和 cytotoxin3 可以直接溶解细胞从而发挥抗肿瘤功能。大部分的金属蛋白酶具有纤溶酶活性,表现出水解层黏连蛋白、纤连蛋白和胶原的功能,从而破坏细胞间的连接,诱导肿瘤细胞凋亡的进行。解离素有两种酶活性:一种是解离素通过自身的 RGD(精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸)结构特异性识别并结合肿瘤细胞外基质的 RGD 三肽,从而限制肿瘤细胞的转移;解离素的另一种活性是专一地限制肿瘤细胞周围的血管生成,从而抑制肿瘤细胞的生长。有研究表明通过 Vascular endothelial growth factor(VEGF)途径抑制血管生成的策略存在的问题是它不仅损害肿瘤血管,也损害健康血管,导致严重的出血和血栓事件的发生^[30]。

4 已上市的蛇毒类药物及存在的问题

蛇毒类药物大部分产自中国、印度、韩国、日本等亚洲国家。欧美等国的蛇毒类上市药偏少(表 2),原因可能是蛇毒的免疫原性强,用药安全性得不到保障等。但是,欧美国家对蛇毒功能的研究却一直在进行。例如,蛇毒类药物 Ancord 和 Batroxobin 酶开展了临床 III 期研究,因为用药不安全而宣告临床实验失败。蛇毒产品的价值在于活性高并起效迅速,如何降低蛇毒类产品的免疫原性问题、优化神经毒素的分子结构以及深入研究其活性作用机理是科研人员面临的挑战。另一方面,大部分的野生蛇类都已列入国家二级保护动物行列,对于蛇毒研究人员来说,获取蛇毒原材料相对困难。这需要借助基因重组的手段,从基因开始,在宿主中表达想要研究的生物活性酶。但通过基因转录翻译出的蛋白酶相比于直接从蛇毒中提取的蛋白酶来说,前者活性低,效果不能达到预期。再者,限制蛇毒类药物发展的因素还有提取纯化的效率低,很难达到量产的要求。

5 结论和展望

蛇毒是药用价值十分高的一类原材料,经过提取分离后可以获得有凝血功能、降压功能、抗血栓功能、止痛功能和抗癌功能的生物活性酶。本文从作用机制出发,概述了各类生物活性酶是如何发挥相应的功能,并列出了各类生物活性酶的研究情况。蛇毒生物活性酶也存在许多问题,例如免疫原性强,纯度不高等。这些因素限制了理论研究向产业实践的转化。蛇毒生物活性酶的前景在于理论向实践的转化,比较成功的案例是卡托普利。它的前身是小分子降压肽,通过化学全合成之后,可以达到量产,而不依赖原材料。然而大部分生物活性酶都属于大分子物质,且结构复杂,难以标准化,因此全合成很难实现。科研人员应该把重心放在生物学的手段上,提高通过基因重组出的生物活性酶的活性,使之不依赖原材料而达到量产成为可能。

参 考 文 献

- [1] SCHMAIER A H, CLAYPOOL W, COLMAN R W. Crotalocytin: recognition and purification of a timber rattlesnake platelet aggregating protein[J]. *Blood*, 1980, 56: 1013-1019.
- [2] 钱亚雯, 寿晓海, 承新, 等. 高效离子交换色谱法分离皖南尖吻蝮蛇毒活性组分[J]. *色谱*, 1998, 25(1): 77-78.
- [3] QIAO X, DU R, WANG Y, et al. Purification, characterization and mode of action of enterocin, a novel bacteriocin produced by enterococcus faecium Tjuq1[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 144: 151-159.
- [4] 钟读波, 吴远双, 余旭亚, 等. 长白山白眉蝮蛇毒中类凝血酶的分离纯化方法研究[J]. *中国药房*, 2007, 36(3): 2825-2828.
- [5] SOARES T G, SANTOS J L D, ALVARENGA V G, et al. Biochemical and functional properties of a new L-amino acid oxidase(Laao) from micrurus lemniscatus snake venom[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 154: 278-286.
- [6] BURKHART W, SMITH G F, SU J L, et al. Amino acid sequence determination of ancrod, the thrombin-like α -fibrinogenase from the venom of akistrodon rhodostoma[J]. *FEBS Letters*, 1992, 297: 297-301.
- [7] COLLACO R C, RANDAZZO-MOURA P, TAMASCIA M L, et al. Bothrops fonsecai snake venom activities and cross-reactivity with commercial bothropic venom[J]. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2017, 191: 86-100.
- [8] VISHWANATH B S, APPU RAO A G, GOWDA T V. Interaction of phospholipase A2 from vipera russelli venom with aristolochic acid: a circular dichroism study[J]. *Toxicon*, 1987, 25: 939-946.
- [9] CRAWLEY J, ZANARDELLI S, CHION C, et al. The central role of thrombin in hemostasis[J]. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2007, 5: 95-101.
- [10] KAO MAZ C, GIDEROGLU K, GUVERCIN E, et al. The effects of different amounts of thrombin application on fat graft viability in rats:

- an experimental study[J]. *Turkish Journal of Plastic Surgery*, 2019, 27: 49-52.
- [11] NIELSEN V G. Ancrod revisited: viscoelastic analyses of the effects of calloselasma rhodostoma venom on plasma coagulation and fibrinolysis[J]. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 2016, 42: 288-293.
- [12] STOCKER K, BARLOW G. The coagulant enzyme from bothrops atrox venom (batroxobin) in: *methods in enzymology*[J]. Elsevier, 1976, 45: 214-223.
- [13] MASUDA H, SATO A, SHIZUNO T, et al. Batroxobin accelerated tissue repair via neutrophil extracellular trap regulation and defibrinogenation in a murine ischemic hindlimb model[J]. *PloS one*, 2019, 14: 1-6.
- [14] CASTRO H C, ZINGALI R B, ALBUQUERQUE M G, et al. Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2004, 61: 843-856.
- [15] WANG Q C, LIU G F. Pharmacokinetics of acutobin healthy volunteers[J]. *Toxicon*, 1997, 4: 503-509.
- [16] TSAI I H, WANG Y M, HUANG K F. Effects of single n-glycosylation site knockout on folding and defibrinogenating activities of acutobin recombinants from Hek293t[J]. *Toxicon*, 2015, 94: 50-59.
- [17] CARONE S E, MENALDO D L, SARTIM M A, et al. Bjsp, a novel serine protease from bothrops jararaca snake venom that degrades fibrinogen without forming fibrin clots[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2018, 357: 50-61.
- [18] MASCI P, WHITAKER A, SPARROW L, et al. Textilins from pseudonaja textilil textilil. characterization of two plasmin inhibitors that reduce bleeding in an animal model[J]. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 2000, 11: 385-393.
- [19] BARNETT D, MEH H A. Neurotoxin of novel structural type from the venom of the Australian common brown snake[J]. *Naturwissenschaften* 1980, 11: 25-36.
- [20] ROSSETTO O, MONTECUCCO C. Presynaptic neurotoxins with enzymatic activities. in: *pharmacology of neurotransmitter release*[J]. Springer, 2008, 8: 129-170.
- [21] ROBERTO P G, KASHIMA S, MARCUSSI S, et al. Cloning and identification of a complete cDNA coding for a bactericidal and antitumoral acidic phospholipase A2 from bothrops jararacussu venom[J]. *The Protein Journal*, 2004, 23: 273-285.
- [22] NICASTRO G, FRANZONI L, DE CHIARA C, et al. Solution structure of crotamine, a Na⁺ channel affecting toxin from crotalus durissus terrificus venom[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2003, 270: 1969-1979.
- [23] KERKIS A, KERKIS I, RADIS-BAPTISTA G, et al. Crotamine is a novel cell-penetrating protein from the venom of rattlesnake crotalus durissus terrificus[J]. *The FASEB Journal*, 2004, 18: 1407-1409.
- [24] RAJAGOPALAN N, PUNG Y F, ZHU Y Z, et al. B-Cardiotoxin: A new three-finger toxin from ophiophagus hannah (King Cobra) venom with beta-blocker activity[J]. *The FASEB Journal*, 2007, 21: 3685-3695.
- [25] CHIEN K Y, CHIANG C M, HSEU Y C, et al. Two distinct types of cardiotoxin as revealed by the structure and activity relationship of their interaction with zwitterionic phospholipid dispersions[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269: 14473-14483.
- [26] CHANG L S, LIN J, CHOU Y C, et al. Genomic structures of cardiotoxin 4 and cobrotoxin from naja naja atra (Taiwan Cobra)[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997, 239: 756-762.
- [27] CHIOU S H, RAYNOR R L, ZHENG B, et al. Cobra venom cardiotoxin (cytotoxin) isoforms and neurotoxin: comparative potency of protein kinase C inhibition and cancer cell cytotoxicity and modes of enzyme inhibition[J]. *Biochemistry*, 1993, 32: 2062-2067.
- [28] DAS T, BHATTACHARYA S, HALDER B, et al. Cytotoxic and antioxidant property of a purified fraction (nn-32) of Indian Naja Naja venom on Ehrlich ascites carcinoma in Balb/C mice[J]. *Toxicon*, 2011, 57: 1065-1072.
- [29] OSIPOV A V, KASHEVEROV I E, MAKAROVA Y V, et al. Naturally occurring disulfide-bound dimers of three-fingered toxins: a paradigm for biological activity diversification[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283: 14571-14580.
- [30] VERHEUL H M, PINEDO H M. Possible molecular mechanisms involved in the toxicity of angiogenesis inhibition[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2007, 7: 475-485.
- [31] WILLIS T W, TU A T. Purification and biochemical characterization of atroxase, a nonhemorrhagic fibrinolytic protease from western diamondback rattlesnake venom[J]. *Biochemistry*, 1988, 27: 4769-4777.
- [32] HUANG K, HUNG C, PAN F, et al. Characterization of multiple metalloproteinases with fibrinolytic activity from the venom of Taiwan habu (Trimeresurus mucrosquamatus): protein microsequencing coupled with cDNA sequence analysis[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1995, 216: 223-233.
- [33] HE J, CHEN S, GU J. Identification and characterization of harobin, a novel fibrinolytic serine protease from a sea snake (Lapemis hardwickii)[J]. *FEBS Letters*, 2015, 581: 2965-2973.
- [34] LEE J W, SEU J H, RHEE I K, et al. Purification and characterization of brevinase, a heterogeneous two-chain fibrinolytic enzyme from the venom of Korean snake, Agkistrodon blomhoffii brevicaudus[J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 1999, 260: 660-670.
- [35] CENDRON L, MIETI I, LAURETO P P D, et al. Structural analysis of trimeric phospholipase A2 neurotoxin from the Australian Taipan snake venom[J]. *FEBS Journal*, 2013, 279: 3121-3135.