

性 FIIIC - insulin - 5 - Fu对正常肝细胞和肝癌细胞的体外结合的研究发现,肝癌细胞组具有明显的荧光染色,而正常细胞未见明显荧光。说明在体外,偶联物能够与肝癌细胞特异性的结合。同时发现,偶联物与肝癌细胞的结合十分迅速,加药 15 min后,肝癌细胞即呈现出较明显的荧光,4 h时最大;48 h时,荧光强度基本稳定。在测试 $4.00\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1} \sim 0.04\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,不同浓度荧光标记物的荧光强度无明显变化。

2 讨论

体外细胞亲和性实验中,由于肝癌细胞上胰岛素受体高度表达,以胰岛素为靶向载体的偶联物能与其识别并被内吞进入细胞,从而呈现明显的荧光。体外细胞毒性实验中,偶联物对正常肝细胞和肝癌细胞具有一定的选择性。因为正常细胞不存在癌细胞上胰岛素受体的高表达;与原药组相比,偶联物的分子量增大,不利于其穿透细胞膜进入细胞内部;与癌细胞组相比,正常细胞的酰胺酶浓度较低,也不利于药物从偶联物上释放出来而产生毒性。当 12 h时,偶联物与原药的抑瘤效果好。由于初期胰岛素主动靶向作用占主导,加速了药物进入细胞抑制肿瘤细胞生长。随着时间的延长,insulin - 5 - Fu与 5 - Fu在细胞内外的量达到动态平衡,使两者在胞内的浓度基本一致,故抑瘤效果相同。实验结果还证明,偶联物进入细胞后,由于细胞内酰胺酶降解胰

岛素,可以释放出与原药具有同等抑瘤活性的 5 - Fu,保证了偶联物主动靶向的抑瘤效果。高浓度的偶联物在体外的细胞毒性较大,可能是由于 5 - Fu与胰岛素相连所引入的连接桥具有一定细胞毒性的缘故。

从胰岛素 - 5 - 氟尿嘧啶偶联物的体外细胞毒性和细胞亲和性的实验可以说明,以胰岛素为靶向载体的偶联物能够靶向到肿瘤细胞,在低浓度时即可达到与原药相近的抑瘤效果,且对正常细胞的毒性较小,但在高浓度时,则具有一定的细胞毒性。

参考文献:

[1] Leroith D, Charles T, Roberts JR. The insulin - like growth factor system and cancer [J]. Cancer Lett, 2003, 195 (2): 127 - 137.
[2] Kurtaran A, Li SR, Raderer M, *et al* Technetium - ^{99m} - galactocyl - neoglyco - albumin combined with iodine - ¹²³ Tyr (A14) insulin visualized human hepatocellular carcinomas [J]. J Nucl Med, 1995, 36 (10): 1875 - 1881.
[3] Huang J, Wang JW, Gong T, *et al* Synthesis and characterization of insulin - 5 - Fu conjugate, enable insulin as multi - drug carrier via dendritic approach [J]. Chin Chem Lett, 2007, 18 (3): 247 - 250.
[4] 李勇,何竣,但德忠,等.异硫氰酸荧光素标记人血清白蛋白 [J]. 华西药学杂志, 2001, 16 (1): 25 - 26.
[5] 李超英. 肝靶向给药系统的研究及展望 [J]. 中国中医急症, 2001, 10 (6): 354 - 355.

收稿日期: 2006 - 11

眼镜蛇神经毒素的规模化制备及其镇痛作用的研究

朱天新¹,袁彩君²,任晚琼¹

(1. 中泰药业有限公司, 河南 驻马店 463000; 2 驻马店市第三人民医院, 河南 驻马店 463000)

摘要: 目的 建立一种快速、规模化制备眼镜蛇神经毒素的方法。方法 采用 CM - sephadex C - 25和 CM - sepharose fast flow离子交换柱层析纯化经初步处理的眼镜蛇毒; SDS - PAGE和 HPLC检测产物的纯度;离体蛙心和红细胞溶血试验检查产物的心脏毒性和溶血性;小白鼠热板模型、醋酸扭体模型和大白鼠电刺激嘶叫模型评价产物的镇痛作用。结果 制备的产物可达到电泳纯和 HPLC单一峰,无心脏毒性和溶血活性,镇痛作用强,但起效慢。结论 所用工艺适合眼镜蛇神经毒素工业化制备的需要。

关键词:眼镜蛇神经毒素;制备;镇痛作用

中图分类号: R965

文献标识码: A

文章编号: 1006 - 0103(2007) 03 - 0247 - 04

Preparation of neurotoxin from cobra venom on a large scale and its analgesic effect

ZHU Tian - xin¹, YUAN Cai - jun², REN Wan - qiong¹

(1. Zhong Tai Pharmaceutical Co Ltd, Zhumadian 463000, China; 2 The Third People's Hospital of Zhumadian, Zhumadian 463000, China)

作者简介:朱天新(1973 -),男,湖北襄樊,硕士,从事生物制品的研发工作。E - mail: zhutx1@126. com

Abstract: OBJECTIVE To establish a method to prepare the cobra neurotoxin (CNT) on a large scale. **METHODS** The cobra venom was isolated and purified by successive CM - sephadex C - 25 and CM - sepharose fast flow ion exchange chromatography. The purity of the product was determined by SDS - PAGE and HPLC. The cardiotoxicity and hemolytic activity of the product were investigated via the frog heart perfusion by Straub method and the hemolysis experiment, respectively. The analgesic activity of the product was also estimated by the models of hot - plate test, writhing response in mice and electrical stimulation - vocalization in rats. **RESULTS** The cobra neurotoxin obtained was proved to be electrophoretic pure and produced only one peak in HPLC examination. Neither cardiotoxicity nor hemolytic activity existed. Its analgesic effect on the experimental animals was strong, but with a slow onset time. **CONCLUSION** This method can meet the need of industrial preparation of cobra neurotoxin.

Key words: Cobra neurotoxin; Preparation; Analgesic

CLC number: R965

Document code: A

Article ID: 1006 - 0103 (2007) 03 - 0247 - 04

眼镜蛇毒神经毒素 (cobra neurotoxin, CNT) 是眼镜蛇毒中的一种碱性多肽, 具有镇痛作用, 临床上主要用于治疗各种慢性、持续性疼痛、晚期癌痛。其镇痛作用时间长, 强度与临床剂量的吗啡相当, 且无成瘾性、不良反应少, 连续使用不产生耐受性^[1,2]。但文献报道的制备工艺生产能力小、周期长, 难以满足制剂生产的需要。因此, 在综合文献和 CNT 特性的基础上, 建立了一种规模化制备工艺, 并评价其产品的镇痛活性。

1 实验部分

1.1 试剂、仪器和动物

眼镜蛇毒冻干品 (湖南文家冲蛇场); 平衡缓冲液 (pH6.5 的 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液)。层析系统 (上海沪西分析仪器厂); CM - sephadex C - 25、CM - sepharose fast flow (瑞士 Pharmacia); 低温大容量离心机 (武汉科学仪器厂); LC - 10P 高效液相色谱仪 (大连江申分离科学技术有限公司)。昆明种小鼠 (18 ~ 22 g, ♂ ♀ 兼用); Wistar 大鼠 (220 ~ 280 g, ♂ ♀ 兼用) (郑州大学医学院实验动物中心)。

1.2 方法与结果

1.2.1 眼镜蛇毒上柱前的预处理 取 8 g 眼镜蛇毒溶于平衡缓冲液中, 配成 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 离心; 上清液进行初步处理后, 再离心。取上清液备用, 测定其蛋白浓度为 $5.3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 检测蛇毒溶液和上清液对小鼠的最小全数致死剂量分别为 1.613 、 $0.765 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

1.2.2 CM - Sephadex C - 25 离子交换色谱 将溶胀的 CM - sephadex C - 25 装于色谱柱 ($500 \text{ mm} \times 35 \text{ mm}$), 用平衡缓冲液平衡。将“1.2.1 项”所得上清液上柱, 用直线梯度 ($0 \sim 0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 的平衡缓冲液) 洗脱, 流速 $0.7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 共 550 管, 每管 7 mL。测定各管洗脱液在 280 nm 的吸光度。以吸光度为纵坐标, 管数为横坐标绘制层析图。取各峰洗脱液适量, 稀释成 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 取 0.2 mL; 取可致供试小鼠全部死亡的组分, 用蛙坐骨神经 - 腓肠肌

标本进行神经毒鉴定。洗脱后分出 12 个峰 (图 1)。第 6 ~ 9 峰洗脱液为 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 的剂量, 均可使供试小鼠全部死亡, 用蛙坐骨神经 - 腓肠肌标本鉴定显示, 这 4 个峰样品均为突触后神经毒素。

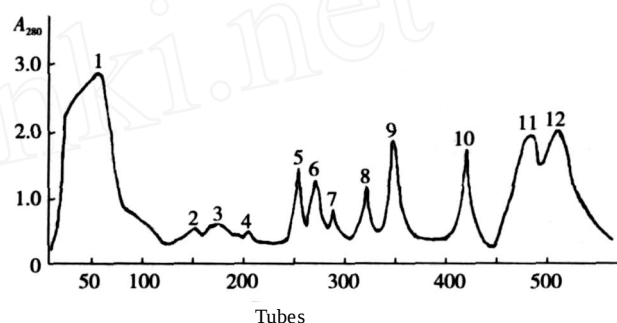


图 1 眼镜蛇毒的 CM - Sephadex C - 25 离子交换色谱图

Fig 1 CM - sephadex C - 25 ion exchange chromatography of cobra venom

1.2.3 CM - sepharose fast flow 离子交换色谱柱 收集“1.2.2 项”第 9 峰的洗脱液, 用 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH6.5 的磷酸盐缓冲液稀释后, 上 CM - sepharose fast flow 离子交换色谱柱, 直线梯度 ($0 \sim 0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 的 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH6.5 磷酸盐缓冲液) 洗脱, 流速 $8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 共收集 120 管, 每管 8 mL。按“1.2.2 项”绘制洗脱图 (图 2)。收集、合并主峰洗脱液, -20°C 冻存或冻干成粉于冷暗处贮存, 即为纯化的 CNT。

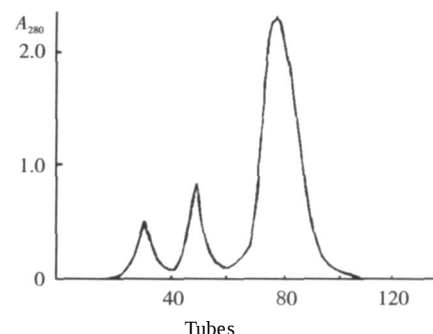


图 2 CM - Sephadex C - 25 CNT 组分经 CM - Sepharose fast flow 的纯化层析图

Fig 2 CM - sepharose fast flow ion exchange chromatography of CNT fraction separated by CM - sephadex C - 25 chromatography

1.2.4 蛋白质含量的测定 用 Folin - 酚法测定蛋白浓度,以牛血清白蛋白作为标准蛋白^[3]。

1.2.5 CNT纯度的测定 采用 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳法 (SDS - PAGE), 4.5%浓缩胶和 16%分离胶,凝胶厚度 1 mm,垂直板电泳,上样量 10 μg ,稳压 200 V、4 下电泳,考马斯亮蓝 R - 250 染色,7%醋酸脱色。所得 CNT 组分在凝胶图谱中只有一条带 (图 3)。

取 CNT 溶液,用 0.1 mol·L⁻¹ HCl 制成 0.3 mg·mL⁻¹ 的溶液,作为供试品溶液。按文献^[3]的 HPLC 法进行测定,结果仅出现单一洗脱峰 (图 4)。

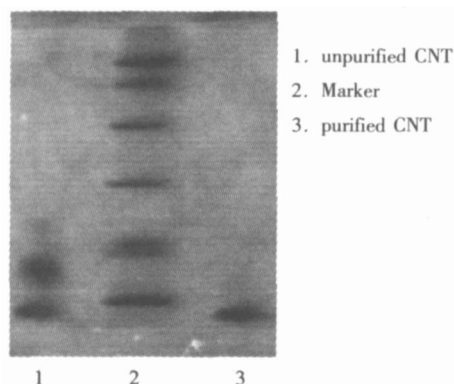


图 3 CNT SDS - PAGE 的电泳图

Fig 3 SDS - PAGE of CNT

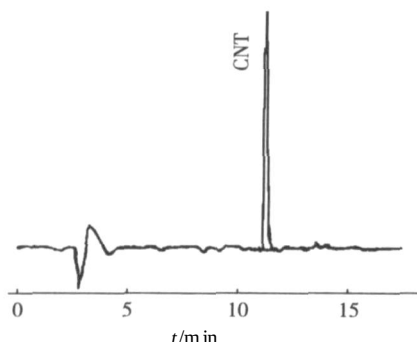


图 4 CNT 的 HPLC 图

Fig 4 Chromatogram of CNT purity analysis

1.2.6 心脏毒素的检查 按徐叔云《药理实验方法学》中 Straub 法制备离体蛙心标本,待心脏活动稳定,描记一段正常心脏活动曲线后,将第 10 ~ 12 峰洗脱液 (40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和所得 CNT 溶液 (120 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 分别注入 4 只离体蛙心内,记录收缩幅度、心率的变化。结果第 10 ~ 12 峰洗脱液组的蛙心 6 min 内均停止于收缩期;而 CNT 组的蛙心收缩无明显的变化,显示纯化所得 CNT 中不含心脏毒素。

1.2.7 溶血性实验 将 CNT 冻干粉用生理盐水制成 5 mg·mL⁻¹ 的供试品溶液,生理盐水作为阴性对照液,纯水作为阳性对照液。取家兔心脏血 15 mL,置盛有玻璃珠的三角烧瓶中,同一方向振摇 10 min,除去纤维蛋白原。加约 10 倍量氯化钠注射液,摇

匀,离心,弃上清液,沉淀的红细胞用氯化钠注射液洗涤 3 ~ 4 次,至离心后上清液不显红色为止。将所得红细胞用氯化钠注射液配成 2% 的混悬液,备用。取 3 支试管,分别加入 2.5 mL 2% 红细胞悬液,再分别加入 2.5 mL 生理盐水、纯水或供试品溶液。摇匀后,置 37 °C 水浴中,每隔 15 min 观察 1 次;1 h 后,每隔 1 h 观察 1 次,共 4 次。如溶液呈透明红色,即表示溶血;如溶液中有棕红色或红棕色絮状沉淀则表示有红细胞凝聚。纯水组在纯水加入后即出现溶血;生理盐水组和 CNT 样品组在 4 h 内均未出现溶血。显示 CNT 样品无溶血作用。

1.2.8 镇痛活性的测定 参照徐叔云的《药理实验方法学》进行扭体法实验。取小鼠 240 只,随机均分为 6 组。各组小鼠分别 sc 生理盐水、5 mg·kg⁻¹ 吗啡及 0.0750、0.0500、0.0250、0.0125 mg·kg⁻¹ 科博肽,给药量均为 0.2 mL。给药 (含 NS) 后 1 h,从中随机抽取 20 只 ip 醋酸,计数 5 ~ 15 min 的扭体次数,计算药物对小鼠的扭体抑制率 [扭体抑制率 = (对照组平均扭体次数 - 给药组平均扭体次数) / 对照组平均扭体次数 × 100%]。剩余小鼠在给药后 3 h 进行实验。

将入选的 240 只小鼠随机均分为 6 组,热板法测定未给药时的舔足潜伏期。各组小鼠的给药方法、剂量同扭体法。给药 1、3 h 后,分别测定舔足潜伏期,计算各组小鼠的痛阈提高率。将给药后各时间测定值的均数与给药前均数用 *t* 检验法进行显著性检验。

盐水组痛阈提高率 = (注射后 - 注射前) 舔足潜伏期 / 注射前舔足潜伏期 × 100%

用药组痛阈提高率 = (给药后 - 给药前) 舔足潜伏期 / 给药前舔足潜伏期 × 100% - 盐水组痛阈提高率

将入选的 120 只大鼠随机均分为 6 组。电刺激嘶叫法测定给药前的嘶叫阈,随后 in 给予试验药物,给药方法同扭体法,给药体积均为 0.5 mL。于给药 1、3 h 后分别测定 1 次嘶叫阈,计算痛阈提高率。将给药后不同时间测定值均数与给药前均数用 *t* 检验法进行差异显著性检验。

盐水组的痛阈提高率 = (注射后 - 注射前) 嘶叫电压 / 注射前嘶叫电压 × 100%

用药组痛阈提高率 = (给药后 - 给药前) 嘶叫电压 / 给药前嘶叫电压 × 100% - 盐水组痛阈提高率

3 种方法均显示 CNT 具有较强的镇痛效应,且呈明显的剂量效应关系。小鼠扭体法试验中,0.025 mg·kg⁻¹ 组的扭体抑制率于药后 3 h 达 51.2%,降低剂量可使效果明显下降,增加剂量时可使效果增强,但增强的幅度不大 (表 1)。CNT 的镇痛作用较吗啡

起效缓慢,给药 3 h后才产生明显的镇痛作用,而吗啡虽起效快,但给药 3 h后,效果已明显下降。小鼠热板试验和大鼠电嘶叫试验的结果与小鼠扭体试验结果基本一致,显示 CNT具有较强的镇痛作用,且呈现明显的量效关系和具有起效缓慢的特点(表 2、表 3)。

表 1 CNT对醋酸致小鼠扭体的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, n = 20)
Table 1 Inhibitory effect of cobra neurotoxin on the writhing response in mice induced by acetic acid($\bar{x} \pm s$, n = 20)

Groups	药后小鼠的扭体次数 (扭体抑制率 /%)		
	Dose/mg·kg ⁻¹	1 h/times	3 h/times
NS	-	28.10 ± 4.0 (0)	26.35 ± 7.26 (0)
Morphine 5.0000		0.00 ± 0.00 (100%)	12.54 ± 4.74 (52.4%)
CNT ₁	0.0750	19.90 ± 6.13 (29.1%)	9.10 ± 3.60 (65.4%)
CNT ₂	0.0500	20.45 ± 5.68 (27.1%)	9.90 ± 4.33 (62.5%)
CNT ₃	0.0250	22.10 ± 6.29 (21.2%)	12.85 ± 4.70 (51.2%)*
CNT ₄	0.0125	24.60 ± 7.53 (12.3%)	17.30 ± 4.82 (34.3%)**

Compared with CNT₂: * P < 0.05; compared with CNT₃: ** P < 0.01

表 2 CNT在小鼠热板试验中的镇痛作用 ($\bar{x} \pm s$, n = 40)
Table 2 Analgesic effect of cobra neurotoxin in the hot-plate test in mice($\bar{x} \pm s$, n = 40)

Groups	Dose/ mg·kg ⁻¹	药前 痛阈值	药后痛阈值 (痛阈提高率 /%)	
			1 h/s	3 h/s
NS	-	16.4 ± 3.6	17.0 ± 3.1	16.6 ± 4.0
Morphine 5.0000		17.0 ± 5.2	26.6 ± 6.5 (56.1)	24.4 ± 6.1 (43.4)
CNT ₁	0.0750	18.3 ± 4.1	23.7 ± 4.6 (29.5)*	28.7 ± 4.3 (56.4)*
CNT ₂	0.0500	17.9 ± 3.5	21.5 ± 3.2 (20.2)*	27.7 ± 5.0 (54.8)*
CNT ₃	0.0250	16.1 ± 4.3	18.7 ± 5.2 (15.7)*	24.3 ± 6.1 (50.6)*
CNT ₄	0.0125	17.2 ± 5.0	18.7 ± 5.6 (8.6)	23.3 ± 6.2 (35.1)*

Compared with before administration: * P < 0.01

表 3 CNT在大鼠电刺激试验中的镇痛作用 ($\bar{x} \pm s$, n = 20)
Table 3 Analgesic effect of cobra neurotoxin in the electrical stimulating-vocalization test in rats($\bar{x} \pm s$, n = 20)

Groups	Dose/ mg·kg ⁻¹	药前	嘶叫阈 (提高率 /%)	
			药后 1 h	药后 3 h
NS	-	4.6 ± 0.5	1.5 ± 0.4	4.7 ± 0.4
CNT ₁	0.0750	4.6 ± 0.4	5.6 ± 0.4 (22.1)**	7.5 ± 0.4 (61.3)
CNT ₂	0.0500	4.5 ± 0.4	5.5 ± 0.4 (20.6)**	7.1 ± 0.4 (56.7)**
CNT ₃	0.0250	4.7 ± 0.4	5.3 ± 0.4 (11.8)*	7.2 ± 0.4 (52.2)**
CNT ₄	0.0125	4.7 ± 0.4	4.9 ± 0.4 (4.4)	5.8 ± 0.5 (22.9)**
Morphine 5.0000		4.7 ± 0.3	8.4 ± 0.4 (79.0)	7.5 ± 0.4 (60.7)

Compared with before administration: * P < 0.05, ** P < 0.01

2 讨论

文献报道的眼镜蛇毒性神经毒素 (CNT)制备工艺^[4,5]采用两步纯化法,将眼镜蛇毒溶液直接上离

子交换柱进行一次纯化,用冷冻干燥法将所得 CNT活性成分浓缩,再上离子交换色谱或凝胶色谱进行二次纯化。工艺中,一次纯化的样品均需浓缩、冻干且生产周期长;二次纯化采用的 CM - sephadex C - 25或 Sephadex G - 25柱层析介质允许的流速较低,也使其周期 (5 ~ 6 d)延长,增加了产品污染的机会,不适合 CNT的工业化生产。

文中根据 CNT的理化特性,对眼镜蛇毒进行初步处理,除去部分非 CNT蛋白组份,以提高后续工序的效率。CNT为眼镜蛇毒中毒性最大的组份。预处理后,眼镜蛇毒溶液对小鼠的最小全数致死剂量降低一倍以上,显示蛇毒中的 CNT得到了有效保留;同时蛋白浓度下降 47%,使同样层析柱的蛇毒处理能力提高近一倍,大大提高了效率。

选用 CM - Sephadex fast flow 作为二次纯化的介质,一次纯化的样品不需浓缩,稀释后直接上柱洗脱,省去了冻干浓缩步骤,制备的样品纯度达到电泳纯,HPLC检测为单一组份。蛙坐骨神经 (腓肠肌标本)鉴定结果显示,第 6 ~ 9的洗脱峰样品均为突触后神经毒素。心脏毒素和溶血性检查结果表明,样品中不含原料蛇毒中的心脏毒素及细胞毒素,保证了产品的安全性。由于 CM - Sephadex fast flow 允许的流速高,在数小时内即可获得单一纯度的 CNT成分,缩短了生产周期。与文献^[5]的工艺相比,一次性蛇毒处理量提高一倍,生产周期缩短两天,收率相当,适合 CNT的工业化生产。

镇痛活性的测定结果显示,文中工艺制备的样品对供试动物有较强的镇痛效应,呈现明显的量效关系,并具有起效缓慢的特点,与文献^[1,2]报道一致,显示产品的药理活性未发生明显的变化。

参考文献:

[1] 李琦,许韵民. 科博肽用于晚期癌痛止痛疗效观察七例 [J]. 中国疼痛医学杂志,2003,9(1): 40 - 43.
[2] 朱天新,刘国良,吉天鹏,等. 新标准“注射用克痛宁”临床应用镇痛效果观察 [J]. 蛇志,1999,11(4): 43 - 46.
[3] 国家药品监督管理局. 国家药品标准 [S]. WS1—XG—009 2000.
[4] 王春晓,李新宇,王起振,等. 浙江眼镜蛇 (Naja naja atra)蛇毒镇痛多肽的分离纯化及其性质的研究 [J]. 药物生物技术,2003,10(2): 159 - 164.
[5] 余俊良,胡本荣. 大白鼠脑皮质中眼镜蛇神经毒素结合部位的研究 [J]. 中国核医学杂志,1983,3(1): 32 - 34.

收稿日期: 2006 - 07