

蛇毒精氨酸酯酶 Agkhipin 对人鼻咽癌 CNE-2 细胞系 MRP1 表达的影响

许淑茹¹, 马 军¹, 袁志刚¹, 黄勇奇², 苏上贵², 胡启平¹

Effect of Agkhipin-an Arginine Esterase from Venom on Expression of MRP1 in CNE-2 Cells

XU Shu-ru¹, MA Jun¹, YUAN Zhi-gang¹, HUANG Yong-qi², SU Shang-gui², HU Qi-ping¹

1. Department of Cell Biology and Genetics, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China, 2.

Department of Biochemistry and Molecular Biology

Corresponding Author: HU Qi-ping, E-mail: gxmucbghq07@yahoo.com.cn

Abstract: Objective To explore the effect of Agkhipin on the expression of multidrug resistance associated protein 1(MRP1) in nasopharyngeal carcinoma CNE-2 cell line, and try to describe the mechanism of Agkhipin inhibiting CNE-2. **Methods** The cultured cells were treated with different concentrations of Agkhipin for 72 h. The expression level of MRP1 in CNE-2 cell line was assayed by immunocytochemistry, Western blot and RT-PCR. **Results** Comparing with Agkhipin absent group, the MRP1 expression levels in CNE-2 cells were reduced significantly after the treatment of different concentrations of Agkhipin ($P < 0.05$), in a concentration-dependent manner, which shows that Agkhipin could significantly down-regulate the expression of MRP1 in CNE-2 cells. **Conclusion** Agkhipin can inhibit the expression of MRP1 in CNE-2 cells, which is likely to be one of reasons for Agkhipin inhibiting the cellular vitality of nasopharyngeal carcinoma cell, and be likely to enhance the sensitivity of CNE-2 cells to chemotherapeutic drugs to some extent.

Key words: Multidrug resistance associated protein 1; Arginine Esterase; Nasopharyngeal carcinoma cell

摘要:目的 探讨蛇毒精氨酸酯酶 Agkhipin 对人鼻咽癌 CNE-2 细胞系中多药耐药相关蛋白 MRP1 表达的影响,并试图阐明 Agkhipin 抑制 CNE-2 细胞的机制。**方法** 用不同浓度的 Agkhipin 处理细胞 72 h 后,应用免疫细胞化学、Western blot、RT-PCR 法检测 MRP1 在 CNE-2 细胞中的表达。**结果** 不同浓度 Agkhipin 作用 CNE-2 细胞 72 h 后 MRP1 表达均降低,并呈现出一定的浓度依赖效应,显示 Agkhipin 可显著下调 CNE-2 细胞中 MRP1 表达。各加药组与不加 Agkhipin 组比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 在人低分化鼻咽癌 CNE-2 细胞系中,Agkhipin 能抑制 MRP1 的表达,并且随浓度的增大抑制作用增加,这可能是 Agkhipin 能降低鼻咽癌细胞活力的原因之一;Agkhipin 抑制 MRP1 的表达提示在一定程度上可提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感度。

关键词: 多药耐药相关蛋白 1;精氨酸酯酶;鼻咽癌细胞

中图分类号: R739.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2011)07-0731-05

0 引言

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是常见恶性肿瘤之一,在我国发病率较高,全世界约 80%的鼻咽癌患者在中国^[1]。许多临床研究显示,

放疗联合化疗治疗中后期的鼻咽癌能取得更高的治愈率。但肿瘤细胞对抗癌药物的耐药性是影响其疗效的重要因素^[2]。有文献报道在导致多药耐药的机制中,主要是由于多药耐药相关蛋白(multidrug resistance associated protein 1, MRP1)的过度表达,MRP1 通过 ATP 提供能量将进入细胞内某些化疗药物逆梯度泵出细胞外,从而降低肿瘤细胞内药物浓度,使药物的细胞毒作用减弱或消失,由此产生肿瘤耐药^[3-4]。精氨酸酯酶存在于某些种类的蛇毒中,近年来蛇毒的抗肿瘤作用重新引起了国内外学者的注意^[5-6]。以前的研究发现,Agkhipin 对人鼻咽癌细胞的活力、迁移、增殖有明显的抑制作

收稿日期:2010-07-27;修回日期:2011-01-14

基金项目:广西青年基金资助项目(桂科青 0728059);广西大型仪器协作共用网资助项目(700-2008-113)

作者单位:1. 530021 南宁,广西医科大学细胞生物学与遗传学教研室,2. 生化与分子生物学教研室

通信作者:胡启平, E-mail: gxmucbghq07@yahoo.com.cn

作者简介:许淑茹(1984-),女,硕士,助教,主要从事蛇毒蛋白抑癌细胞作用分析的研究

用^[7],本实验拟通过观察精氨酸酯酶 Agkhipin 对在体外培养条件下人低分化鼻咽癌细胞系 CNE-2 细胞系 MRP1 表达的影响,以探讨其对鼻咽癌细胞株的作用机制及其在鼻咽癌治疗中潜在的应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料

精氨酸酯酶 Agkhipin 为本项目组人员分离纯化并命名^[8]。人鼻咽癌细胞系 CNE-2 由广西医科大学肿瘤研究所惠赠。RPMI1640 购自 GIBCO 公司。0.25%胰酶购于索莱宝公司。新生牛血清购于杭州四季青公司。兔抗人 MRP1 多克隆抗体购于博奥森公司。羊抗兔 HRP 抗体购于北京中山公司。免疫组织化学试剂盒购于福州迈新生物技术开发有限公司。RNA 提取试剂盒购于天根公司。反转录试剂盒购于 Fermentas 公司。倒置显微镜为日本 Olympus 公司产品。PCR 扩增仪为 ABI 产品。凝胶成像系统为 DIO-RAD 产品。病理图像分析仪为 Leica 产品。

1.2 细胞培养

人鼻咽癌细胞系 CNE-2 用含 10%新生牛血清的 RPMI1640 培养液(添加 100 IU/ml 青霉素和链霉素),于 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养,2~3 d 换液一次,实验时选用对数生长期的细胞。

1.3 免疫细胞化学

细胞以 1×10⁵/ml 密度接种于预置盖玻片的 6 孔板中,每孔加 2 ml 的培养液,在 37℃、5% CO₂ 培养箱培养 24 h,细胞贴壁后分 4 组,置换新培养液,分别加入 Agkhipin,使其终浓度为 4.13、0.516、0.207、0 μg/ml 培养液,培养 72 h 后,PBS 洗涤 3 次,Elivison 二步法进行细胞染色:PBS 配置的 0.5% Triton X-100 室温培养 10 min,鼠抗人 MRP1 单克隆抗体 4℃培养过夜,PBS 洗涤三次,广谱二抗室温培养 30 min,PBS 洗涤三次,DAB 显色,以 PBS 代替一抗为空白对照。实验重复三次。

图像分析每个加药组,随机选取不重叠的 20 个高倍视野,由 Leica-Qwin 计算机图像分析系统,在相同灰度设定条件下测出 G_A(整个背景视野灰度值)、G_a(视野内 MRP1 蛋白免疫细胞化学阳性染色颗粒的灰度值)、A_{Aa}(MRP1 阳性细胞占视野面积的面积密度)。用 PU 值(positive unit,阳性单位)代表 MRP1 蛋白在 CNE-2 细胞的表达强度,255 为 Leica-Qwin 的最大灰度分级^[9]。

$$PU = |G_a - G_A| \times 100 / [(1 - A_{Aa}) \times 255]$$

下调率(Down-regulated rate,DRR)的计算依据下列公式:

$$DRR(\%) = (PU_{\text{control}} - PU_{\text{Agkhipin}}) / PU_{\text{control}} \times 100\%$$

1.4 Western blot 检测细胞中 MRP1 蛋白表达

细胞以 1×10⁵/ml 密度接种于 100 ml 培养瓶,37℃、5% CO₂ 培养箱培养 24 h。细胞贴壁后分 4 组,分别加入 Agkhipin 使其终浓度为 4.13、0.516、0.207、0 μg/ml 的培养液,培养 72 h 后,用 RAPI 裂解液提取蛋白,用 BCA 试剂盒测定蛋白含量。以每样品总量 20 μg 蛋白于 8% SDS-PAGE 凝胶电泳,采用半干式转印法将蛋白转印到 PVDF 膜上,0.5 mA 恒电流转移 30 min;滤膜经 5%脱脂奶粉于室温下封闭 1 h;加第一抗体 4℃孵育过夜;洗膜,辣根过氧化物酶标记的二抗与 PVDF 膜于室温下培养 2 h;充分漂洗,ECL 显色试剂盒显色,对显色条带进行吸光度分析,以目的基因与内参基因 β-actin 的吸光度比值作为 MRP1 蛋白的相对表达量。

1.5 RT-PCR 检测 MRP1 表达

按 RNA 提取试剂盒说明书提取实验组鼻咽癌细胞的总 RNA,经琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性,通过紫外分光光度计测定 260 nm 与 280 nm 处吸光度值计算 RNA 的纯度与浓度。根据 MBI 公司 RT 试剂盒操作说明,RNA 反转录为 cDNA,保存于 -70℃ 冰箱备用。使用 PCR 仪器扩增,引物:MRP1 上游引物 5' AATGCGCC AAGACTAG-GAAG 3',下游引物 5' ACAGCAGCACGGTG-TAGAAG 3',扩增产物 320 bp。β-actin:上游引物:5' AACTCCATCATGAAGTGTGA 3',下游引物:5' ACTCCTGCTTGCTGATCCAC 3',扩增产物 247 bp^[10]。反应体系为 25 μl:其中 10× buffer 2.5 μl,25 mM/L MgCl₂ 2 μl,10 mM/μl dNTP 2 μl,10 pmol/μl 上、下游引物各 1 μl,cDNA 模板 2 μl,Taq 聚合酶 0.3 μl,再用 ddH₂O 补足至 25 μl。PCR 循环参数为:95℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 30 s,60℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,扩增 35 个循环,72℃ 后延伸 5 min。取 RT-PCR 产物 5 μl,在 1.5% 琼脂糖凝胶上进行电泳,溴化乙锭显色,置自动凝胶成像分析系统中照相,分别取目的基因 MRP1 与内参基因 β-actin RT-PCR 产物电泳条带灰度比值,作为目的基因 mRNA 的相对含量。

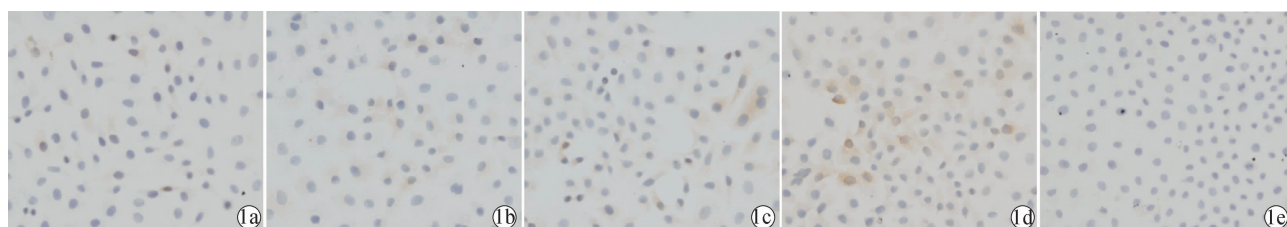
1.6 统计学方法

应用 SPSS13.0 软件进行统计学处理,计量资料两组比较采用 *t* 检验,多组比较经方差齐性检验,方差齐采用单因素方差分析(one-way ANOVA),LSD 法进行两两比较。

2 结果

2.1 免疫细胞化学检测

MRP1 阳性染色颗粒主要位于 CNE-2 细胞的



1a~1d: the final concentrations of Agkihin is 4.13, 0.516, 0.207, 0 μg/ml respectively. The positive brown-yellow granule for MRP1 protein mostly located in cytoplasm and membrane. 1e: negative control of MRP1 protein, which PBS replaced anti-MRP1 protein as the first antibody

图 1 免疫细胞化学检测不同处理组 CNE-2 细胞 MRP1 蛋白的表达 (Elivison × 400)

Figure 1 Expression of MRP1 protein in CNE-2 cells treated with different concentrations of Agkihin for 72 h detected with immunocytochemistry (Elivison × 400)

细胞膜和细胞质^[11],呈棕黄色或浅黄色颗粒。以 PBS 代替一抗的阴性对照染色结果显示无阳性,见图 1。不同剂量 Agkihin 处理 CNE-2 72 h 后,MRP1 表达强度随 Agkihin 浓度的升高而降低,各组间差异具有统计学意义,见表 1。

表 1 不同浓度 Agkihin 作用后 CNE-2 细胞 MRP1 蛋白的表达强度比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of Agkihin on expression intensity of MRP1 in CNE-2 cells ($\bar{x} \pm s$)

Groups	Concentration (μg/ml)	n	MRP1 expression intensity (PU value)	Down-regulated rate (%)
Agkihin	4.13	20	12.48 ± 3.67*▲	44.24
	0.516	20	17.23 ± 3.327*△	23.00
	0.207	20	17.21 ± 3.73*△	23.09
Control	0	20	22.373 ± 5.023	0.00

Note: * : $P < 0.01$ vs. control group, ▲ : $P < 0.01$ vs. another groups, △ : $P < 0.01$ vs. 4.13 μg/ml Agkihin

2.2 Western blot 检测结果

Western blot 检测 CNE-2 经不同浓度 Agkihin 处理 72 h 后蛋白表达变化,发现 MRP1 在各浓度处理组均有下降,其中浓度为 4.13 μg/L 处理 72 h 时,MRP1 的表达与空白对照组比较明显减少,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。0.516 和 0.207 μg/L 处理组与空白对照组比较有减少,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$);但两组间的差异不具有统计学意义 ($P > 0.05$),见表 2、图 2。

2.3 RT-PCR 检测

不同质量浓度的 Agkihin 处理 CNE-2 细胞 72 h 后,MRP1 mRNA 的相对转录水平有明显降低。各加药组与对照组相比差异均有统计学意义 ($P < 0.01$),但 0.516 与 0.207 μg/ml 组间的差异无统计学意义

($P > 0.05$),4.13 μg/ml 与 0.516 和 0.207 μg/ml 比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$),见表 3、图 3。

表 2 Agkihin 作用后 CNE-2 细胞 MRP1 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of Agkihin on expression of MRP1 in CNE-2 cells ($\bar{x} \pm s$)

Groups	Concentration (μg/ml)	n	Relative expression of MRP1	Down-regulated rate (%)
Agkihin	4.13	3	0.32 ± 0.67*▲	82.13
	0.516	3	1.05 ± 0.11*△	41.79
	0.207	3	1.06 ± 0.29*△	41.53
Control	0	3	1.81 ± 0.61	0.00

Note: * : $P < 0.01$, vs. control group, ▲ : $P < 0.01$, vs. other groups, △ : $P < 0.05$, vs. 4.13 μg/ml Agkihin group

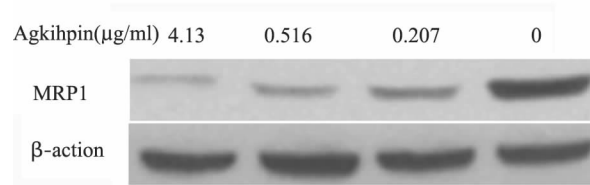


图 2 Western blot 检测不同处理组 CNE-2 细胞 MRP1 的表达

Figure 2 Expression of MRP1 in CNE2 cells treated with different concentrations of Agkihin, detected by Western blot

3 讨论

肿瘤耐药的形成机制较为复杂,其中 P 糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 和 MRP 等与耐药有关。P-gp 是一种能量依赖性的膜转运蛋白,可将摄入细胞内的药物转运出细胞,降低细胞内的药物浓度^[12]。MRP 基因是 Cole 等^[13]在 1992 年研究小细胞肺癌耐药株 H69AR 时发现的肿瘤化疗耐药基因,定位于人类染色体 16P13.1 上。本文研究的 MRP1 是

表 3 Agkhipin 作用后 CNE-2 细胞 MRP1 mRNA 的转录水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of Agkhipin on transcription of MRP1 mRNA in CNE-2 cells ($\bar{x} \pm s$)

Groups	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	n	mRNA relative expression	Down-regulation rate(%)
Agkhipin	4.13	3	0.2919 \pm 0.06700*	55.06
	0.516	3	0.4443 \pm 0.14509* Δ	31.60
	0.207	3	0.4817 \pm 0.08076* Δ	25.85
Control	0	3	0.6496 \pm 0.15726	0.00

Note: * : $P < 0.01$, vs. control group, Δ : $P < 0.01$, vs.

4.13 $\mu\text{g/ml}$ Agkhipin group

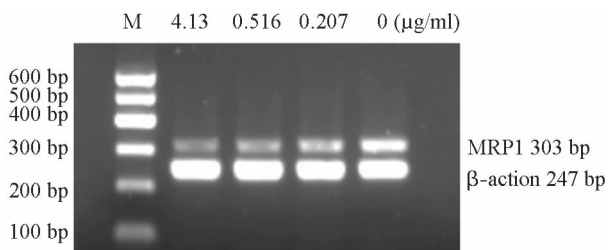


图 3 RT-PCR 检测不同处理组 CNE-2 细胞 MRP1 mRNA 的转录

Figure 3 Transcription of MRP1 mRNA in CNE2 cells treated with different concentrations of Agkhipin, detected by RT-PCR

ATP 结合的盒式(ATP binding cassette, ABC)运输蛋白家族成员,是非 P-gp 的膜转运蛋白。MRP1 又称 GS-X 泵,体内的谷胱甘肽先与化疗药物以非共价键结合形成 GSH-S 结合物,然后由 GS-X 泵水解 ATP 将结合物泵出细胞外或改变其在胞内的分布,从而实现化疗药物的解毒作用^[14]。MRP1 定位于上皮细胞,在正常细胞中呈低水平表达^[15],在肿瘤细胞中主要位于细胞膜和细胞质^[11]。其生理功能与细胞内解毒,氧化应激和炎症反应等有关,在化学致癌物质侵袭时对机体有保护作用^[16]。据报道,在结肠癌、乳腺癌等组织中都发现 MRP1 有高表达,同时在鼻咽癌、肝癌等细胞系中也有较高的表达^[17-18]。

蛇毒具有广泛的生物学活性,如抗凝血、止血和溶栓、抗肿瘤、抗菌、镇痛等,是新药研发的热点。早些年有学者研究发现从蝮蛇粗毒中分离出来的精氨酸酯酶活性峰(非电泳纯)对 SMC-1722 细胞(人肝癌细胞株)的杀伤能力(100 $\mu\text{g/ml}$)比蝮蛇粗毒(500 $\mu\text{g/ml}$)^[19]高 5 倍。可见,蛇毒 AEase 对人鼻咽癌和肝癌等肿瘤细胞存在一定的抑制作用。本实验采用的 Agkhipin 是从蛇毒中分离出的一种电泳纯的精氨酸酯酶^[8],单一成分的抑癌研究更有利于

弄清蛇毒抑癌的机制。

本研究发现,Agkhipin 加药组中,4.13、0.516 和 0.207 $\mu\text{g/ml}$ 浓度作用的 CNE-2 细胞中 MRP1 蛋白表达量均有下调($P < 0.05$),且下调率有差异;Western blot 检测 MRP1 蛋白表达结果与免疫细胞化学检测结果类似,但 MRP1 蛋白表达下调率更高。RT-PCR 结果显示,Agkhipin 加药组中,4.13、0.516 和 0.207 $\mu\text{g/ml}$ 浓度作用的 CNE-2 细胞中 MRP1 mRNA 均有明显下调($P < 0.01$),有明显的剂量依赖关系。同样是检测蛋白表达水平,本研究中,免疫细胞化学检测结果与 Western blot 检测结果 MRP1 的下调率相差较大,可能原因是免疫细胞化学检测时显微镜下目标视野的选定主观性较强,而 Western blot 检测的是所有培养细胞的蛋白表达水平,因此 Western blot 检测结果所得的 MRP1 下调率可能更接近事实,比免疫细胞化学检测结果更可信。

Agkhipin 下调 MRP1 表达的机制可能与 Agkhipin 的酶特性以及 MRP1 的表达位置有关。一方面 Agkhipin 属于胰蛋白酶家族中的 Ser 蛋白酶^[20],具有消化细胞表面蛋白的功能,而 MRP1 在癌细胞中的表达位于细胞膜上,表达到细胞膜表面的 MRP1 可能部分被 Agkhipin 消化分解,这也可能是 Western blot 检测的 MRP1 表达下调率比 MRP1 mRNA 转录水平下调率更大的原因之一;另一方面,部分精氨酸酯酶具有磷脂酶 A₂ (PLA₂) 特性^[21-22],人的多种组织细胞中均可检测到 PLA₂ M 受体^[23],一些蛇毒中无催化活性的 PLA₂ 产生各种的炎症反应、抗细菌感染、抗凝、抗肿瘤以及抗 HIV 等活性部分是通过 PLA₂ 与 PLA₂ M 型受体结合产生细胞因子、趋化因子和激素所致^[24-25]。Agkhipin 有可能作为一种 PLA₂ 与 CNE-2 细胞膜上的 PLA₂ M 型受体结合,使细胞内产生某些蛋白或多肽,并进一步调节 MRP1 的转录和翻译水平,使 MRP1 的转录和翻译水平都下调。具体的机制尚待下一步的研究。

综上所述,无论蛋白翻译水平或在 mRNA 转录水平,体外条件下 Agkhipin 均可显著下调 CNE-2 细胞 MRP1 的表达,并且呈一定的浓度依赖性。Agkhipin 作用后的 CNE-2 细胞 MRP1 表达量下调,降低了对细胞有害物质的排除能力,加强了有害物质对细胞的损伤,这可能是 Agkhipin 能降低鼻咽癌细胞活力的原因之一。此外,Agkhipin 作用后的 CNE-2 细胞 MRP1 表达量下调,提示了一定浓度的 Agkhipin 可减少肿瘤细胞内的抗肿瘤药物的排出,增加胞内抗肿瘤药物的有效浓度,从而提高肿瘤细

胞对化疗药物的敏感度。本实验为 Agkikpin 体内实验及临床应用提供了一定的实验依据。

参考文献:

- [1] 丘明生. 鼻咽癌的研究进展与经验教训[J]. 中国眼耳鼻喉科杂志, 2005, 5(2): 71-73.
- [2] 杨纯正, 许元富, 齐静. 应重视肿瘤耐药机制和耐药基因检测研究及应用[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(12): 1221-1224.
- [3] Vaidyanathan G, Zalutsky MR. Imaging drug resistance with radiolabeled molecules[J]. *Curr Pharm Des*, 2004, 10(24): 2965-2979.
- [4] Funato T, Harigae H, Abe S, et al. Assessment of drug resistance in acute myeloid leukemia[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2004, 4(5): 705-713.
- [5] Jokhio 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.
- [6] 李振南, 张小燕, 芮景. 蛇毒抗高凝状态酶对种植肝癌 H22 小鼠肿瘤抑制作用的研究[J]. 实用临床医药杂志, 2007, 11(3): 45-48.
- [7] 胡启平, 舒雨雁. 江浙蝮蛇毒精氨酸酯酶 Agkikpin 的研究: II. 对鼻咽癌细胞活力、增殖、迁移和细胞形态的影响[J]. 四川动物, 2006, 25(2): 257-260.
- [8] 胡启平, 舒雨雁. 江浙蝮蛇毒精氨酸酯酶 Agkikpin 的研究: I. 分离纯化和初步表征[J]. 四川动物, 2006, 25(2): 251-256.
- [9] 卢海英, 李继承, 梁晓岳, 等. 肝细胞癌 nm23H1 基因遗传不稳定性与临床病理特征的相关性研究[J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(9): 1732-1736.
- [10] 王菁, 黎丹戎, 李力. Integrin $\alpha 6$ 和 MKK4 基因在卵巢癌不同淋巴结转移能力细胞系中的表达及其意义[J]. 广西医科大学学报, 2009, 26(2): 165-169.
- [11] 吴敬波, 张建文, 范娟. 多药耐药相关蛋白在鼻咽癌中表达的临床意义[J]. 四川医学, 2005, 26(3): 270-272.
- [12] NI Xing-hao, XU Shen-hua, SHI Hong-qi, et al. Prognostic Value of P-gP and p27 in Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma[J]. *Chin J Cancer Res*, 2007, 19(1): 60-63.
- [13] Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, et al. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistance human lung cancer cell line[J]. *Science*, 1992, 258(5088): 1650-1654.
- [14] Kruh GD, Belinsky MG. The MRP family of drug efflux pumps[J]. *Oncogene*, 2003, 22(47): 7537-7552.
- [15] Flens MJ, Zaman GJ, van der Valk P, et al. Tissue distribution of the multidrug resistance protein[J]. *Am J Pathol*, 1996, 148(4): 1237-1247.
- [16] Kessel D. Exploring multidrug resistance using rhodamine 123[J]. *Cancer Commun*, 1989, 1(3): 145-149.
- [17] Kok JW, Veldman RJ, Klappe K, et al. Differential expression of sphingolipids in MRP1 overexpressing HT29 cells[J]. *Int J Cancer*, 2000, 87(2): 172-178.
- [18] Filipits M, Pohl G, Rudas M, et al. Clinical role of multidrug resistance protein 1 expression in chemotherapy resistance in early-stage breast cancer: the Austrian breast and colorectal cancer study group[J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23(6): 1161-1168.
- [19] 赵蓉, 游云, 高敏新, 等. 蛇毒对人及小鼠传代细胞的杀伤作用[J]. 福建医学院学报, 1988, 22(3): 204-206.
- [20] 袁盛凌, 张兆山. 蛇毒类凝血酶的分子生物学研究进展及其应用[J]. 生物技术通讯, 2003, 14(5): 419-421.
- [21] Zhang Q, Wang J, Han Y, et al. Identification of a novel thrombin-like phospholipase A2 from Gloydius ussuriensis snake venom[J]. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2007, 18(8): 723-729.
- [22] Lu QM, Jin Y, Wei JF, et al. Biochemical and biological properties of Trimeresurus jerdonii venom and characterization of a platelet aggregation-inhibiting acidic phospholipase A2[J]. *J Nat Toxins*, 2002, 11(1): 25-33.
- [23] Boskovic J, Arnold JN, Stilion R, et al. Structural model for the mannose receptor family uncovered by electron microscopy of Endo180 and the mannose receptor[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(13): 8780-8787.
- [24] Zuliani JP, Fernandes CM, Zamuner SR, et al. Inflammatory events induced by Lys-49 and Asp-49 phospholipases A2 isolated from Bothrops asper snake venom; role of catalytic activity[J]. *Toxicon*, 2005, 45(3): 335-346.
- [25] Santamaria C, Larios S, Angulo Y, et al. Antimicrobial activity of myotoxic phospholipases A2 from crotalid snake venoms and synthetic peptide variants derived from their C-terminal region[J]. *Toxicon*, 2005, 45(7): 807-815.

[编辑:刘红武;校对:贺文]