

中华眼镜蛇蛇毒组分 C 诱导白血病细胞 凋亡作用的研究*

谭 获¹ 郝玉书² 应红光² 林振桃³ 管锦霞³ 张广森⁴

内容提要 目的:研究眼镜蛇蛇毒组分 C 诱导白血病细胞凋亡的作用及机制。方法:应用光学显微镜、透射电镜、脱氧核糖核酸(DNA)电泳、流式细胞仪、逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)等方法,观察白血病细胞经过眼镜蛇蛇毒组分 C 处理后,形态学、生物化学及 Bcl-2/Bax 基因表达水平的变化。结果:眼镜蛇蛇毒组分 C 能诱导人粒细胞白血病细胞系(HL₆₀)发生凋亡形态学和生物化学变化;流式细胞仪分析发现眼镜蛇蛇毒组分 C 能使一定比例的人粒单细胞白血病细胞系(J6-1)、人红白血病细胞系(K₅₆₂)、HL₆₀ 细胞及取自患者骨髓的白血病细胞发生凋亡,而且凋亡率随蛇毒浓度的增高而增加;RT-PCR 方法检测发现眼镜蛇蛇毒组分 C 能使 HL₆₀ 细胞 Bcl-2 基因的表达下调,而 Bax 变化不明显。结论:眼镜蛇蛇毒组分 C 能诱导白血病细胞发生凋亡,此作用与 Bcl-2 基因的表达下调有关。

关键词 眼镜蛇蛇毒 白血病 细胞株 凋亡 Bcl-2/Bax 基因

Study on Human Leukemia Cell Apoptosis Inducing Effect of Fraction C of *Naja naja* Actra Venom TAN Huo, HAO Yushu, YING Hongguang, et al *The Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou (510260)*

Objective: To study the effect and mechanism of fraction C isolated from *Naja naja* Actra Venom (FCNNAV) in inducing apoptosis of human leukemia cells. **Methods:** Light microscope, transmission electron microscope, DNA electrophoresis, flow cytometry and RT-PCR assay were used to observe the changes of human leukemia cells in morphology and biochemistry, and Bcl-2/Bax expression after exposing to FCNNAV. **Results:** FCNNAV could induce HL₆₀ cells apoptosis demonstrated by the typical morphological and biochemical changes. Flow cytometry showed that J6-1, K₅₆₂, HL₆₀ and fresh leukemia cells apoptosis could be induced by FCNNAV, and the apoptosis rate was dose-dependent. RT-PCR detection showed the Bcl-2 gene expression of HL₆₀ cells was down-regulated by FCNNAV, whereas the Bax expression was unaffected. **Conclusion:** FCNNAV could induce apoptosis of human leukemia cells and this effect is related to down-regulation of Bcl-2 gene expression level.

Key words *Naja naja* Actra Venom, leukemia, cell strain, apoptosis, Bcl-2/Bax gene

眼镜蛇蛇毒组分 C(Fraction C from *Naja naja* Actra Venom, FCNNAV)是中华眼镜蛇粗毒(产于广东省阳春市嘉华养殖场)经 DEAE Sephadex A-50、CM Sephadex C-25 离子交换柱、Sephadex G-75 分子筛柱层析分离、纯化而来,在聚丙烯酰胺凝胶电泳中呈单一区带,电位滴定法不能检出磷脂酶 A₂ 活性;其主要成分为膜毒素,LD₅₀为(2.88±0.41)mg/kg⁽¹⁾。FC-

NNAV 已制成可供人静脉内注射的制剂。

实验研究证明 FCNNAV 有明显的抗癌活性⁽¹⁾,为了进一步探讨眼镜蛇蛇毒对白血病细胞的作用机制,我们对 FCNNAV 能否诱导白血病细胞凋亡及其机制进行了研究,现将结果报告如下。

材料和方法

1 材料

1.1 FCNNAV 为广州蛇毒研究所产品,每次使用前新鲜配制成不同浓度。

1.2 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)引物 由上海生工公司合成。

1.3 细胞系 人粒细胞白血病细胞系(HL₆₀)、

* 广东省卫生厅医学科研基金立项课题(No. A1999249);广东省中医药管理局立项课题(No. 99583)

1. 广州医学院第二附属医院(广州 510260);2. 中国医学科学院血液病研究所;3. 广州医学院蛇毒研究所;4. 湖南医科大学第二附属医院

人粒单细胞白血病细胞系(J6-1)、人红白血病细胞系(K₅₆₂)等均为中国医学科学院血液病研究所提供。

1.4 患者骨髓细胞 患者 10 例,男 6 例,女 4 例,中位年龄 40 岁(16~74 岁);其中急性非淋巴细胞性白血病(ANLL)6 例(M_{2a}2 例, M_{2b}1 例, M₃ 3 例),急性淋巴细胞性白血病(ALL)3 例,慢性髓细胞性白血病(CML)1 例。均为 1998 年 8 月~1999 年 1 月在中国医学科学院血液病医院住院及门诊患者。

2 方法

2.1 细胞凋亡的形态学观察 取对数生长期的 HL₆₀ 细胞,接种于灭菌的培养瓶中,每瓶内含细胞数 5×10^6 个,与 15% 新生牛血清、RPMI 1640 培养液、青霉素 100u/ml、链霉素 100μg/ml、谷氨酸 30μg/ml 及对照组(生理盐水, NS)或实验组(FCNNAV 稀释液)混合后总体积为 10ml,在 37℃、5% CO₂、全湿条件下孵育 3h, PBS 洗 2 遍后立即离心涂片, Wright 染色,光学显微镜下观察。收集经同样处理的 HL₆₀ 细胞 1×10^7 个,立即离心(2000r/min, 10min),弃上清, NS 洗涤 2 次,常规脱水、包埋、超薄切片、醋酸铀和枸橼酸铅双重染色后,在透射电镜下观察。

2.2 细胞凋亡的流式细胞仪(EPICS-CS, 美国 Coulter 公司)分析 按上述方法培养和培养 HL₆₀、K₅₆₂、J6-1 细胞;取白血病患者的骨髓液,肝素抗凝,淋巴细胞分离液分离新鲜白血病细胞(原代白血病细胞), PBS 洗涤后用上述培养液培养 3h。制备 HL₆₀、K₅₆₂、J6-1 及原代白血病细胞的流式细胞仪检测标本, 4℃ 冰箱保存, 1 周内测试。测试前采用一步法碘化丙啶(PI)染色⁽²⁾或 Annexin V 染色⁽³⁾。

2.3 细胞凋亡的 DNA 变化观察 DNA 样本采用酚氯仿法提取⁽⁴⁾;DNA 电泳染色后在紫外光下观察并摄影。

2.4 细胞凋亡调控基因 Bcl-2/Bax 检测

2.4.1 采用一步法提取 RNA⁽⁵⁾。

2.4.2 cDNA 合成 取 5μl RNA 作模板,加 5× 逆转录缓冲液 4μl, 10mmol/L dNTP 2μl, Rnasin 40U, MMLV 逆转录酶 200U, 反义链引物 50pmol, 补无菌去离子水至 20μl, 42℃ 反应 60min, 95℃, 5min, 冰浴速冷后保存于 4℃ 或直接用于 PCR。

2.4.3 PCR 应用 PE2400-PCR 仪(PE 公司, 美国)。50μl 总反应体系中含 cDNA 模板 10μl, 10× PCR 缓冲液 5μl, 正义链及反义链引物各 50pmol、10mmol/L 的 dNTP 2μl, Taq 酶 2U。Bcl-2 和 β-Actin 的热循环条件: 94℃ 预变形 7min, 然后 94℃ 变性 1min, 72℃ 退火及延伸各 30s, 30 个循环后, 72℃ 再延

伸 7min。Bax 循环条件改退火条件为 60℃ 45s, 延伸 72℃ 45s, 循环数为 35 个, 余同 Bcl-2。

2.4.4 琼脂糖凝胶电泳 取 10μl PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶中电泳, 90V, 60min。EB 染色后于紫外透射仪下观察并照相。

3 统计学方法 t 检验。

结 果

1 凋亡的形态学变化

1.1 光镜下可见 HL₆₀ 细胞经终浓度为 10μg/ml 的 FCNNAV 处理后, 细胞出现皱缩, 胞浆内有空泡及典型的凋亡小体形成, 但细胞膜仍保持完整。

1.2 电镜下每组分别计数 100 个细胞, 对照样本中凋亡细胞约占 1%; 用终浓度为 10、20μg/ml 的 FCNNAV 处理后凋亡细胞分别占 4% 和 7%; 实验组细胞既有染色质在核膜下聚集的早期凋亡形态结构特点, 也有典型的核小体和核膜髓鞘样变性改变, 见图 1~4。

2 流式细胞仪分析

2.1 用 FCNNAV(10μg/ml)处理 3h 后, 能诱导白血病细胞株及新鲜白血病细胞发生凋亡, 与对照组比较, 各实验组的凋亡细胞百分率明显增高(P 均 < 0.01)。见表 1。

表 1 FCNNAV 对不同白血病细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	细胞凋亡(%)			
		J6-1	K ₅₆₂	HL ₆₀	原代白血病细胞
对照	10	7.94 ± 3.12	2.20 ± 2.10	8.00 ± 4.34	4.93 ± 3.99
FCNNAV	10	28.09 ± 7.98 *	40.52 ± 10.43 *	22.77 ± 6.97 *	19.88 ± 9.80 *

注:与对照组比较, * $P < 0.01$

2.2 固定作用时间为 3h, FCNNAV 浓度为 0、5、10、20μg/ml 时, 诱导的 HL₆₀ 细胞凋亡数(%)分别为 7.94 ± 0.58、11.56 ± 0.78、17.80 ± 0.64、34.07 ± 19.22。说明 FCNNAV 的作用具有良好的量效关系($r = 0.99$, $P < 0.05$)。

2.3 固定作用终浓度为 10μg/ml, FCNNAV 诱导 HL₆₀ 细胞凋亡的高峰时间为作用后 3h, 其后继发坏死的细胞增多。见表 2。

表 2 FCNNAV 处理不同时间对 HL₆₀ 细胞凋亡的影响

组别	蛇毒处理时间	n	凋亡细胞 (%)	凋亡继发坏死细胞 (%)	坏死细胞 (%)
对照		3	4	0	1
FCNNAV	1h	3	14	1	1
	3h	3	33	16	0
	5h	3	5	45	10

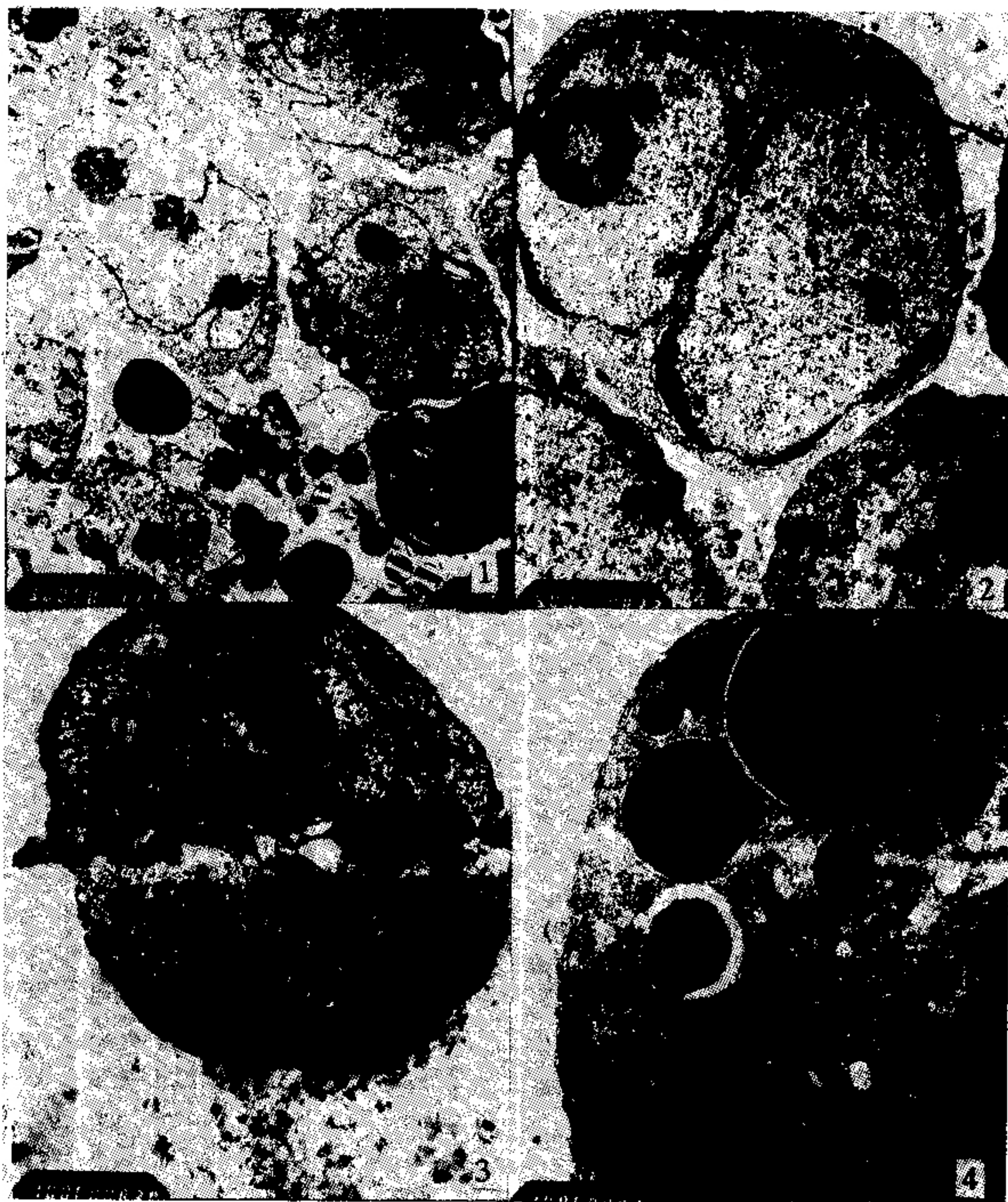


图1 未经 FCNNNAV 处理的 HL₆₀ 细胞(3000×) 图2 经 10 μ g/ml FCNNNAV 处理后的早期凋亡的 HL₆₀ 细胞:染色质聚集于核膜下(5000×)
图3 经 20 μ g/ml FCNNNAV 处理后的 HL₆₀ 细胞,可见凋亡小体、胞膜囊样变形,但胞浆内结构基本完整(10 000×) 图4 经 20 μ g/ml FCNNNAV 处理后的 HL₆₀ 细胞,有典型的凋亡小体,外有界膜包裹,胞浆内结构完整(10 000×)

3 DNA 电泳分析 琼脂糖电泳 DNA 显示,与对照组比较,FCNNNAV 能诱导 HL₆₀ 细胞凋亡形成典型的“梯状”DNA 条带(DNA Ladder)。

4 Bcl-2/Bax 基因表达 与对照组比较,FCNNNAV 能诱导 HL₆₀ 细胞的 Bcl-2 基因表达下调;而 Bax 表达变化不明显。

讨 论

近年来,国内外对蛇毒抗肿瘤作用的研究日趋重视^[6]。但蛇毒抗癌的许多复杂机制有待进一步阐明。

细胞凋亡是一种主动的、非炎症性的、能量依赖性的细胞死亡形式,1972 年由 Kerr 最先提出。近 10 年

来发现许多抗肿瘤药物是通过诱导细胞凋亡而发挥作用的⁽⁷⁾。我们应用细胞形态学、生物化学和分子生物学等手段对眼镜蛇蛇毒是否诱导白血病细胞凋亡进行了检测,结果发现白血病细胞与 FCNNAV 共同孵育后,出现细胞皱缩、染色体固缩以及凋亡小体形成等变化;DNA 电泳可见明显的“梯状”条带;流式细胞仪检测显示,经眼镜蛇蛇毒处理后的白血病细胞发生了 DNA 含量及磷脂酰丝氨酸(PS)外翻(externalization of phosphatidylserine)这两方面的变化。由于眼镜蛇蛇毒可使白血病细胞的基因组 DNA 断裂,并从细胞浆漏出,致使凋亡细胞余下的 DNA 少于 G_1 期细胞的含量,表现为亚二倍体($0.2C \sim 1.6C$)明显增多⁽⁸⁾;许多类型的细胞在发生凋亡的早期,原位于细胞膜内表面的 PS 会转位到细胞膜的外表面。PS 发生外翻后便易于与 Annexin V 结合而被标记,利用这种技术能检测到早期的凋亡细胞⁽⁹⁾。我们的实验显示,眼镜蛇蛇毒与 HL₆₀ 细胞作用 1h 后即可见早期凋亡的细胞增多;3h 后早期凋亡的细胞达高峰;5h 后晚期凋亡的细胞明显增多,并出现坏死细胞。说明眼镜蛇蛇毒对 HL₆₀ 细胞诱导凋亡的作用发生迅速,长时间作用后亦可引起细胞坏死。

许多基因均参与了凋亡的调控,其中 Bcl-2/Bax 是一对重要的凋亡调节基因。Bcl-2 不仅能抑制多种凋亡信号引起的细胞凋亡,并能抑制化疗药物引起的肿瘤细胞凋亡,与耐药形成有关⁽¹⁰⁾。Bax 则能促进细胞凋亡。Bcl-2 家族成员位于线粒体的外膜上,它们能以不同的配对结合形成异源或同源二聚体,从而在线粒体膜上形成离子传导途径。抗凋亡的 Bcl-2 家族成员可形成使细胞器内电化学内环境稳定的离子孔;而促凋亡家族成员则可干扰传导途径的形成。线粒体膜电位的改变可使其内容物(如细胞色素 C 等)漏入细胞浆,激活 caspases 而执行凋亡⁽¹¹⁾。当细胞内 Bcl-2 过量表达时, Bcl-2/Bax 大于 Bax/Bax, 凋亡被抑制;反之,凋亡被促进⁽¹²⁾。我们的实验表明,FCNNAV 能使 HL₆₀ 细胞的 Bcl-2 表达下调,表现为 RT-PCR 所得 DNA 电泳条带明显弱于对照组;而对 Bax 的表达影响

不大。使得 Bcl-2/Bax 的比例小于 Bax/Bax, 结果引起细胞凋亡。

参 考 文 献

1. 林振桃,赵路宁,植 飞,等.眼镜蛇毒组分 C 对小鼠实验性肝癌细胞生长影响的探讨.蛇志 1997;9(1):3—6.
2. 宋平根,李素文.流式细胞术的原理和应用.北京:北京师范大学出版社,1992:55—59.
3. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, et al. A novel assay for apoptosis flowcytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. J Immunol Meth 1995;184:39.
4. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis, et al. Molecular cloning, a laboratory manual. 2th ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989:22—31.
5. Chomzynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 1987;162:156—169.
6. 张于平.国内 20 年蛇毒与肿瘤文献分析.蛇志 1998;10(2):20—22.
7. Kamesaki H. Mechanisms involved in chemotherapy-induced apoptosis and their implications in cancer chemotherapy. International Journal of Hematology 1998;68:29—43.
8. Steven WH. To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. JAMA 1998;279:300—307.
9. Boersma AW, Nooter K, Oostrum RG, et al. Quantification of apoptotic cells with fluorescein isothiocyanate-labelled annexin V in Chinese hamster ovary cell cultures treated with cisplatin. Cytometry 1996;24:123—130.
10. Minn AJ, Velez P, Schendel SL, et al. Bcl-xl forms an ion channel in synthetic lipid membranes. Science 1997;385:353—357.
11. Bellosillo B, Dalmau M, Colomer D, et al. Involvement of CED-3/ICE proteases in the apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. Blood 1997;89:3378—3384.
12. Kitada S, Andersen J, Akar S, et al. Expression of apoptosis regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with in vitro and in vivo chemoresponses. Blood 1998;91:3379—3389.

(收稿:1999-06-02 修回:2000-01-03)