

浙江蝮蛇毒诱导人白血病 Jurkat 细胞 凋亡的体外实验研究*

董庆华 郑 树 吕庆华 何立明

内容提要 目的:研究浙江蝮蛇毒诱导人白血病 Jurkat 细胞凋亡的作用及机理。方法:采用 MTT 法测定 IC_{50} 值及生长曲线,流式细胞仪(FCM)Annexin V FITC/PI 法检测细胞凋亡发生率,PI 染色法检测细胞周期,同时用流式细胞汁 FCM 及 Western-blot 检测 Bcl-2 蛋白表达。结果:浙江蝮蛇毒能抑制 Jurkat 细胞生长,且呈剂量依赖关系,并能诱导人白血病 Jurkat 细胞凋亡,48h 时作用最强,此时 Bcl-2 蛋白表达下降,随后此作用减弱,低浓度作用下细胞逐渐恢复生长。结论:浙江蝮蛇毒能诱导人白血病 Jurkat 细胞凋亡,且呈剂量依赖关系,此作用与 Bcl-2 蛋白表达下调有关。

关键词 浙江蝮蛇毒 人白血病 Jurkat 细胞 凋亡 Bcl-2 蛋白表达

Effect of Snake Venom of *Agkistrodon Halys Pallas* in Inducing Human Leukemic Jurkat Cell Apoptosis DONG Qing-hua, ZHENG Shu, LU Qing-hua, et al *Cancer Institute, Zhejiang University, Hangzhou (310009)*

Objective: To study the effect and mechanism of snake venom of *Agkistrodon Halys Pallas* in Zhejiang in inducing human leukemic Jurkat cell apoptosis. **Methods:** IC_{50} and growth curve of Jurkat cells were detected by MTT; percentage of apoptotic cells was analyzed by flow cytometry (FCM) using Annexin V FITC/PI staining method; cell cycle was also detected by FCM and protein expression of Bcl-2 gene was detected by FCM and Western-blot. **Results:** Zhejiang viper venom could inhibit the growth of Jurkat cells dose-dependently, induce the cell apoptosis, with the Bcl-2 protein expression down-regulated. The strongest effect was shown at 48 hrs, it weakened gradually, and the Jurkat cells restored slowly in low concentration of snake venom. **Conclusion:** Zhejiang viper venom could induce apoptosis of human leukemic Jurkat cell in dose-dependent manner, the effect is related to the down-regulation of Bcl-2 protein expression.

Key words snake venom of *Agkistrodon halys Pallas*, human leukemia Jurkat cell, apoptosis, Bcl-2 protein expression

蛇毒含有多种酶类和不同生理与药理活性蛋白。国内外许多研究证实,金环蛇、银环蛇、眼镜蛇等蛇毒具有抗肿瘤作用,能对多种肿瘤细胞有杀伤和抑制生长的作用,其中以眼镜蛇毒的研究最多,有关蝮蛇毒的研究较少^(1,2)。自从 1993 年 Araki S 等首次报道蛇毒能诱导血管内皮细胞凋亡以来,陆续有研究报道蛇毒能诱导肿瘤细胞凋亡,并试图分离其中的有效成分^(3,4)。有关蝮蛇毒诱导白血病细胞凋亡的研究未见报道。我们研究浙江蝮蛇毒诱导白血病细胞凋亡,并探讨其可能的作用机理。

材料与方 法

1 药物及试剂 浙江蝮蛇(*Agkistrodon Halys Pallas* in Zhejiang)蛇毒(ASV)由浙江龙图蛇业集团有

限公司提供, - 20℃ 保存;MTT 及碘化丙啶(PI)为 Sigma 公司产品;RPMI 1640 为美国 Hyclone 公司产品;Annexin V FITC/PI 试剂及鼠 IgG1-FITC 同型对照为 Immunotech 公司产品;Bcl-2-FITC 为美国 Ancell 公司产品;鼠抗 Bcl-2 购自 Boehringer Mannheim Biochemica 公司;羊抗鼠 IgG-HRP 购自华美公司;蛋白浓度分析液购自 Bio-Rad 公司。

2 细胞系及培养 Jurkat 细胞购自上海细胞生物所,细胞入含有 10% 小牛血清、5% CO_2 、37℃ 孵箱中常规培养。

3 主要仪器 Wallac 酶标仪;美国 BD 公司 FACSCan 流式细胞仪。

4 IC_{50} 值及生长曲线测定 采用 MTT 法。取对数生长期细胞,接种于 96 孔培养板内,设 6 个复孔,每孔 3×10^4 /ml 细胞,加入不同浓度的 ASV(0~50 μ g/ml,用无血清培养基临用前配制 1mg/ml 储存液),总体积 200 μ l,培养 48h 后,每孔加入 1mg/ml MTT 工作

* 浙江省卫生厅资助课题(No. 2002A106);浙江省科委资助课题(No. 2002D3007)

浙江大学附属第二医院肿瘤研究所(杭州 310009)

液 50 μ l, 37 $^{\circ}$ C 放置 4h, 2000r/min, 离心 5min, 弃上清, 每孔加入 150 μ l DMSO, 震荡溶解结晶, 在 570nm 波长比色, 求出半数抑制浓度 IC₅₀。测生长曲线则设空白孔和加药孔(4 μ g/ml、8 μ g/ml), 连续测 7 天, 检测前 4h 加 MTT。

5 细胞凋亡检测 1 $\times 10^5$ /ml 细胞悬液 1ml 用 PBS 洗 2 次后, 加入缓冲液 490 μ l、Annexin-V 5 μ l 和 PI 5 μ l, 暗处冰上反应 10min, 上机检测, CellQuest 软件分析。另取 2 $\times 10^6$ 细胞, 70% 冰乙醇固定, 24h 后 PBS 洗 2 次, 加入 200 μ l RNase A (1mg/ml), 37 $^{\circ}$ C 水浴 30min, 再加 PI 染色液避光反应 30min, 上机检测, Multicycle 软件分析。

6 Bcl-2 表达检测 取 2 $\times 10^6$ 细胞用 PBS 洗 2 次, 加入 0.25% 甲醛固定 15min, 75% 甲醇 1h 破膜后按试剂盒说明操作, 同时用鼠 IgG1-FITC 设立阴性同型对照, 上机检测, CellQuest 软件分析。

7 细胞总蛋白的提取 采用 Western-blot 方法, 蛋白浓度测定按试剂说明操作, 测 OD₇₅₀ 值, 以牛血清白蛋白(BSA)为标准样品绘制标准曲线。电泳上样蛋白总量为 30 μ g, 200mA 3h 转膜, 转膜后凝胶染色证实转膜完全, 一抗、二抗反应后 ECL 盒显色拍照。

结 果

1 ASV 细胞毒作用 见图 1。正常 Jurkat 细胞生长迅速, 在第 6 天增殖倍数可达 12 倍。经 ASV 处理后, 细胞增殖受到明显抑制, 且呈明显剂量依赖关系。第 1、2 天细胞数略有升高后, 第 3 天降至最低。随后, 经 4 μ g/ml ASV 处理的细胞逐渐恢复生长, 增殖速度较快, 而 8 μ g/ml ASV 处理的细胞生长速度依然较慢。48h IC₅₀ 值为 (9.78 $\pm$ 0.38) μ g/ml。

2 Annexin V/PI 双染色法分析 Jurkat 细胞凋亡 正常 Jurkat 细胞自发凋亡率低(约 5%)。ASV 5 μ g/ml 作用 1 天后, 凋亡发生率略有升高; 作用 2 天后早期凋亡细胞率达到 68.76%, 晚期凋亡细胞达到 15.44%, 此时显微镜下可见部分细胞形成凋亡小体; 作用 3 天后活细胞比率升高, 达到 39.89%, 早期凋亡细胞率降低为 53.16%, 晚期凋亡细胞率降低为 6.42%; 作用 4 天后活细胞率进一步升高为 79.80%, 早期凋亡细胞率和晚期凋亡细胞率明显降低, 总计为 9.18%, 死细胞达到 11.02% (图略)。

3 ASV 作用后 Jurkat 细胞周期变化 见图 2。5 μ g/ml ASV 作用后, 细胞 S 期水平随着作用时间的延长而逐渐降低, 由未加药的 53.3% 降为 26.2%。同时 G₀/G₁ 期比率逐渐增高, G₂/M 期比率变化不大。

4 ASV 作用后 Jurkat 细胞 Bcl-2 蛋白表达变化 正常 Jurkat 细胞 Bcl-2 蛋白表达量为 22.25%, 加 ASV 5 μ g/ml 作用 48h 后, 表达量降低为 2.19%。Western-blot 结果亦表明 ASV 5 μ g/ml 作用 48h 后 Bcl-2 蛋白表达明显降低(图略)。

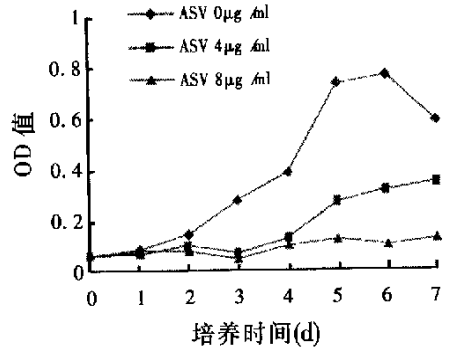


图 1 Jurkat 细胞生长曲线

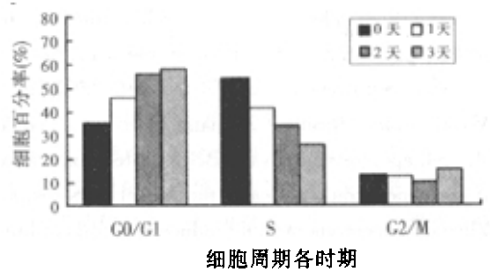


图 2 5 μ g/ml ASV 作用后 Jurkat 细胞周期变化

讨 论

肿瘤的发生是细胞增殖与细胞凋亡平衡失调的结果⁽⁵⁾, 通过诱导肿瘤细胞凋亡可能达到治疗肿瘤的目的。蛇毒含有多种酶类和生理与药理活性蛋白, 如心脏毒素(cardiotoxin)、直接溶解因子(direct lytic factor)、细胞毒素(cytotoxin)等。近年来, 国内外对蛇毒抗肿瘤作用的研究日趋重视⁽⁶⁾, 其中对眼镜蛇毒的研究最多, 而对蝮蛇毒的研究报道较少。

我们应用浙江蝮蛇毒作用于人白血病 Jurkat 细胞, 发现浙江蝮蛇毒具有强烈的抑制白血病细胞增殖的作用, 能明显抑制细胞生长, 且呈时效、量效依赖关系。检测 5 μ g/ml 浙江蝮蛇毒作用不同时间细胞周期变化, 细胞 S 期比率下降明显, 表明细胞生长明显受抑制。同时检测细胞凋亡率, 5 μ g/ml 作用 48h 达到峰值, 随后细胞凋亡率逐渐减低, 两者结果相符。因为细胞早期凋亡时, 最早发生的分子事件之一有细胞膜上磷脂酰丝氨酸(PS)外翻, 可与 Annexin-V 结合从而被 FCM 检测到, 此时细胞膜仍完整⁽⁷⁾。作用 5 天后幸存

细胞恢复生长,此时 Annexin-V 法检测到的凋亡细胞率为 9.18%,与正常对照 5% 相差不多。从本实验结果看,低浓度作用后 Jurkat 细胞虽有凋亡特征出现,如 PS 外翻,但幸存细胞能恢复生长,提示加药时间以 72h 为周期,可达到较好杀肿瘤效果。

凋亡抑制基因 Bcl-2 不仅能抑制多种凋亡信号引起的细胞凋亡,而且能抑制药物引起的细胞凋亡,其表达产物主要定位于线粒体外膜,参与在线粒体膜上形成离子传导通路^[8],当 Bcl-2 过量表达时,可干扰传导途径的形成,抑制凋亡;Bcl-2 表达降低后,可能改变对线粒体的调控,导致凋亡相关活性物质释放,激活 caspase 酶系而促进凋亡^[9]。浙江蝮蛇毒作用后 Jurkat 细胞 Bcl-2 蛋白表达明显降低是引起细胞凋亡的原因之一。

(致谢:浙江龙图蛇业集团有限公司)

参 考 文 献

1. 谭 获,余清声,应红光,等.眼镜蛇毒组分对白血病细胞株的毒性作用.中华血液学杂志 1999;20(11):598—599.
2. JIANG Jian-fei, LIU Wei-jun, DING Jian. Regulation of telomerase activity in camptothecin-induced apoptosis of human leukemia HL-60 cells. Acta Pharmacol Sin 2000; (21) 8:

759—764.

3. Araki S, Ishida T, Yamamoto T, et al. Induction of apoptosis by hemorrhagic snake venom in vascular endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 1993;190(1):148—153.
4. Suhr SM, Kim DS. Identification of the snake venom substance that induces apoptosis. Biochem Biophys Res Commun 1996;224(1):134—139.
5. Cerard Evan, Trevor Littlewood. A matter of life and cell death. Science 1998;281:1317—1321.
6. Kang IC, Lee YD, Kim DS. A novel disintegrin salmosin inhibits tumor angiogenesis. Cancer Res 1999;59(15):3754—3760.
7. Boersma AW, Nooter K, Ostrum RG, et al. Quantification of apoptosis cells with fluorescein isothiocyanate-labelled annexin-V in Chinese hamster ovary cell cultures treated with cis-platin. Cytometry 1996;24:123—130.
8. Taven WH. To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. JAMA 1998;279:300—307.
9. Minn AJ, Velez P, Schendel SL, et al. Bcl-x forms an ion channel in synthetic lipid membranes. Science 1997; 385: 353—357.

(收稿:2002-05-12 修回:2002-07-15)

自拟清肠饮加减辅助治疗肛窦炎 100 例

成柱明¹ 韩 英²

1998 年 3 月~2001 年 3 月,笔者用自拟清肠饮加减辅助西药治疗肛窦炎 100 例,并与单用西药治疗的 100 例作对照,现报告如下。

临床资料

1 病例选择 肛窦红肿,轻压肛窦有少量分泌物溢出,其周围充血;排除直肠后间隙脓肿,直肠粘膜下脓肿及直肠癌。

2 一般资料 全部病例均为门诊患者,按就诊顺序随机分为两组。治疗组 100 例,男 42 例,女 58 例;年龄 23~41 岁,平均 31.5 岁;病程 3 天~1 年,平均 176 天。对照组 100 例,男 44 例,女 56 例;年龄 21~45 岁,平均 32.4 岁;病程 2 天~11 个月,平均 157 天。两组资料比较,差异无显著性,具有可比性。

治疗方法 两组患者在治疗期间均口服环丙沙星 0.5g,每天 2 次,甲硝唑 0.4g,每天 3 次,连续 7 天为 1 个疗程。治疗组同时用自拟清肠饮:金银花 24g 当归尾 9g 地榆 15g 玄参 15g 薏苡仁 15g 黄芩 10g 枳壳 10g 黄芪 15g 升麻、柴胡各 3g 乳香、没药、炙甘草各 6g。随证加减:湿重去玄参,加茯苓、泽泻;热重加牛膝、黄柏、栀子;热毒盛加白芷、石膏、炒皂角刺;阴虚内热去薏苡仁、金银花、黄芩,加生地、麦冬、沙参、鳖甲、地骨皮;气虚下陷去黄芩、金银花、薏苡仁,重用黄芪、升麻、

柴胡,加党参、白术。每天 1 剂,连续 7 天为 1 个疗程,两组一般用 1~3 个疗程。治疗期间忌食辣椒、酒等辛辣刺激食物,每天便后及睡前温水坐浴。

结 果

1 疗效标准 治愈:症状消失,肛窦无充血肿胀,无分泌物溢出;有效:症状基本消失,肛窦轻度充血,无分泌物溢出;无效:未达到有效标准。

2 疗效 治疗组治愈 81 例,有效 17 例,无效 2 例,总有效率 98%;对照组治愈 66 例,有效 13 例,无效 21 例,总有效率 79%。两组总有效率比较,差异有显著性($\chi^2 = 15.92, P < 0.01$)。治疗组未见不良反应。

讨 论 中医学认为本病发生多因饮食不节、过食膏粱厚味及辛辣刺激食物所致;或因肠燥热结,便秘蕴热肛门;或因湿毒热结、下注肛门所致。方中君药金银花清热解毒、凉血消痈;臣药黄芩清热燥湿、泻火解毒,薏苡仁清热利湿;佐药玄参、地榆滋阴凉血止血,黄芪、枳壳、升麻、柴胡益气升阳,当归尾、乳香、没药活血行气、祛瘀消肿;使药炙甘草调和药性。诸药合用,共奏清热泻火、解毒化湿、凉血滋阴、益气升阳、行气活血、化瘀消肿等功效。同时配合西药抗菌消炎,发挥中西药的协同作用,标本兼治,可提高疗效,缩短疗程,值得基层推广应用。

1. 攀枝花武警医院(四川 617000);2. 攀枝花钢铁总医院

(收稿:2002-05-12 修回:2002-07-15)