

蛇毒心脏毒素诱导肺癌 A549 细胞的凋亡机制研究[△]

李凤君*, 袁 进, 韩丽萍#, 蒋琳兰, 李玉华(广州军区广州总医院药剂科, 广州 510010)

中图分类号 R285;R549 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)07-0583-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.07.03

摘要 目的:研究眼镜蛇心脏毒素(CTX)诱导肺癌 A549 细胞凋亡的机制。方法:MTT 法测定 CTX 体外细胞毒性作用;吉姆萨染色法观察 CTX 对 A549 细胞形态学的影响;线粒体膜电位(JC-1)法检测 CTX 诱导 A549 细胞后细胞 JC-1 的变化;流式细胞仪检测 CTX 对 A549 细胞凋亡的影响;Western blot 法测定细胞色素 C、凋亡蛋白酶前体(Procaspase)-3、Procaspase-9 的表达;通过 S180 小鼠肉瘤模型检测 CTX 体内抗肿瘤活性。结果:CTX 作用于 A549 细胞的半数抑制浓度(IC₅₀)为 0.770 μg/ml;0.5、1.0、2.0 μg/ml CTX 可引起 A549 细胞明显缩小,在高倍镜下可观察到胞核皱缩,形成染色质边集等形态学改变;流式细胞仪检测到 CTX 使 A549 细胞出现凋亡,并且具有量效关系;5 μg/ml CTX 作用于 A549 细胞 0.5 h 可使细胞 JC-1 降低;胞浆中检测到细胞色素 C 时,Procaspase-9 的含量没有明显变化,随后逐渐减少,CTX 诱导细胞凋亡具有时效关系;体内抑瘤实验显示在剂量为 0.5、1.0、2.0 mg/kg 时 CTX 对 A549 细胞有明显的抑制作用。结论:CTX 对 A549 细胞有细胞毒性,可以使线粒体内细胞色素 C 释放,并激活 Procaspase-9 和 Procaspase-3 诱导 A549 细胞的凋亡。

关键词 A549 细胞;眼镜蛇蛇毒;心脏毒素;凋亡

Study on the Mechanism of Snake Venom Cardiotoxin (CTX) Induced A549 Cell Apoptosis

LI Feng-jun, YUAN Jin, HAN Li-ping, JIANG Lin-lan, LI Yu-hua (Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the mechanism of snake venoms cardiotoxin (CTX) induced A549 cell apoptosis. METHODS: MTT was used to detect the in vitro cytotoxicity of CTX. Giemsa stain was employed to examine the effects of CTX on morphology of A549 cells. JC-1 assay was used to detect the change of mitochondrial membrane potential of A549 cells induced by CTX. Flow cytometry was used to detect the effects of CTX on the apoptosis of A549 cells. The expressions of cytochrome C, procaspase-3 and procaspase-9 in the cytosol fraction were analyzed by Western blotting. S180 mouse sarcoma model was used to check in vivo anti-tumor activity of CTX. RESULTS: IC₅₀ of CTX to A549 cells was 0.770 μg/ml. CTX 0.5, 1.0, 2.0 μg/ml could induce morphological changes, such as condensed chromatin and chromatin margination in A549 cells. Flow cytometry showed CTX induced the apoptosis of A549 cells in a dose-dependent. The mitochondrial membrane potential of A549 cells was reduced at 0.5 h (CTX 5 μg/ml) manner. The Procaspase-9 was not activated initially, then gradually reduced, whereas the cleavage of Cytochrome C was detected. The apoptosis of cells was induced in pragmatic relation. Inhibitory rates of CTX 0.5, 1.0 and 2.0 mg/kg on S180 cell tumor were inhibition respectively. CONCLUSIONS: CTX can significantly inhibit the growth of A549 cells. Once cytochrome C release from the mitochondria, cytochrome C activate Procaspase-9 and Procaspase-3 to leading to the apoptosis.

KEYWORDS A549 cell; Snake venom; Cardiotoxin; Apoptosis

蛇毒是毒蛇腺分泌的一种天然的蛋白质毒液,新鲜毒液呈蛋清样,具有特殊的腥味,其化学成分非常复杂,其中含 5~15 种酶、3~12 种非酶蛋白质和多肽等^[1-4]。心脏毒素(CTX)是一种单一、高度疏水的短链肽,一般由 60~63 个氨基酸组成,等电点多在 10 以上,可引起心肌、骨骼肌及平滑肌的去极化和挛缩,也能引起神经元的去极化和兴奋性的消失,同时具有细胞毒性尤其是对肿瘤细胞有毒性,在抗肿瘤方面具有一定的应用前景。相关文献报道,CTX 具有明显的镇痛活性^[5-6],且毒性较小,长期给药对肝脏药物代谢功能无影响,不具有身体依赖性 & 精神依赖性^[7-8]。本研究从舟山眼镜蛇中分离纯化所得

CTX,观察其对 A549 细胞的致凋亡作用。

1 材料

1.1 仪器

超净工作台(苏州安泰空气有限公司);5410 型细胞培养箱(美国 Napco 公司);CK40-F200 型倒置显微镜、IX700 型荧光相差显微镜(日本 Olympus 公司);流式细胞仪(德国 Thermo 公司);电泳仪、转移电泳槽(北京市六一仪器厂)。

1.2 药品与试剂

顺铂(齐鲁制药有限公司,批号:20110706);RPMI1640 培养基(上海拜力生物科技有限公司);胎牛血清(美国 Gibco 公司);0.25% 胰酶(杭州吉诺生物医药技术有限公司);2,2'-联喹啉-4,4'-二甲酸二钠(BCA)蛋白质测试盒(德国 Thermo 公司);舟山眼镜蛇蛇毒粗毒(广州新源毒蛇养殖场,产地:广东,批号:20081005,分离纯化得 CTX);天冬氨酸蛋白水解酶凋亡蛋白前体(Procaspase)-3 一抗(北京博奥森生物技术有限公司);Procaspase-9 一抗(美国 Santa Cruz 公司);线粒体膜电位(JC-1)

△ 基金项目:全军医学科学技术研究“十一五”计划课题项目(No.06MA125)

* 硕士研究生。研究方向:天然药物化学。E-mail: lifengjunhuo@126.com

通信作者:主任药师。研究方向:天然药物有效成分。E-mail: hanliping@163.com

测试盒、细胞色素C抗体(AC909)、 β -Actin一抗、 β -Actin二抗(上海碧云天生物技术研究所)。

1.3 动物与细胞

SPF级KM小鼠40只,♀,体质量(20 ± 1.0)g,由广东省医学实验动物中心提供[实验动物使用许可证号:SCXK(粤)2008-0002]。肺癌A549细胞、S180细胞均由广州军区总医院医学实验科提供。

2 方法

2.1 A549细胞培养

将A549细胞接种于含10%灭活胎牛血清的RPMI1640培养液中,在37℃、5%CO₂饱和湿度下培养,每2~3天换液1次,取对数生长期的细胞进行实验。

2.2 细胞生长抑制率的测定

采用MTT还原法进行检测。取对数生长期的A549细胞,调整细胞密度为 $1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$,分装于96孔板中,每孔加入上述细胞悬液100 μl ,第2天取出旧培养基分别加入含有0、1、2、3 $\mu\text{g/ml}$ CTX的RPMI1640培养基,每个质量浓度设6个平行孔。细胞培养24 h,然后每孔加入MTT(5 mg/ml)10 μl ,再继续培养4 h后取出,吸去上清液,每孔加入150 μl DMSO,再将培养板震荡均匀5 min左右,显微镜下观察着色颗粒消失后的20 min内,以570 nm为检测波长,490 nm为参比波长,读取光密度(OD)。根据下式计算细胞生长抑制率:抑制率=[(对照组OD-实验组OD)/对照组OD $\times 100\%$]。

2.3 吉姆萨染色法观察CTX诱导后A549细胞形态

取不同质量浓度的培养液培养A549细胞,用不同质量浓度的CTX(0、0.5、1、2 $\mu\text{g/ml}$,即阴性对照组与CTX低、中、高质量浓度组)对A549细胞处理24 h,按吉姆萨染色试剂盒处理诱导后,置于荧光倒置显微镜下观察细胞形态。

2.4 细胞凋亡率检测

取对数生长期的A549细胞培养,加入药物刺激之后消化A549细胞,PBS洗涤之后重悬细胞;取($0.5 \sim 1.0$) $\times 10^4$ 个重悬的细胞,1 000 $\times g$ 离心5 min,弃上清液,加入195 μl Annexin V-FITC结合液轻轻重悬细胞;加入5 μl Annexin V-FITC,轻轻混匀;室温20~25℃避光孵育10 min;1 000 $\times g$ 离心5 min,弃上清液,加入190 μl Annexin V-FITC结合液轻轻重悬细胞;加入10 μl 碘化丙啶染色液,轻轻混匀,冰浴避光放置。采用流式细胞仪检测A549细胞的凋亡率。实验分组与给药同“2.3”项下方法。

2.5 线粒体膜电位(JC-1)法检测CTX对A549细胞JC-1的影响

取对数生长期的A549细胞,用0.25%胰酶蛋白酶消化,加入含10%胎牛血清的RPMI1640培养基重悬细胞,轻轻吹打后制备单细胞悬液,计数并调整细胞密度为 $1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$,接种于6孔板内进行细胞爬片,置37℃、5%的CO₂培养箱中培养24 h后加入不同质量浓度的CTX,使其终质量浓度为5 $\mu\text{g/ml}$ (即为CTX组);实验设阴性对照组(加入相同体积的RPMI1640培养液)、阳性对照组[5 $\mu\text{g/ml}$ 羟基氰氯苯胺(CCCP)]。继续培养24 h(阳性对照组处理细胞20 min),吸除培养液,用PBS洗涤细胞,加入1 ml细胞培养液,加入1 ml JC-1染色工作液,充分混匀,细胞培养箱中37℃孵育20 min,按照1 ml JC-1染色缓冲液(5 $\times$)加入4 ml蒸馏水的比例,配置适当的JC-1染色缓冲液(1 $\times$),并放置于冰浴中。37℃孵育结束后吸除上清液,用

JC-1染色缓冲液(1 $\times$)洗涤2次,加入2 ml细胞培养液,荧光显微镜观察。检测JC-1单体时,激发光设置490 nm波长,发射光设置530 nm波长;检测JC-1聚合物时,激发光设置为525 nm波长,发射光设置为590 nm波长,拍照。

2.6 Western blot法检测A549细胞凋亡的线粒体途径

A549细胞经药物作用后,收集细胞,以PBS洗2次,转入离心管,1 000 $\times g$ 离心5 min,弃上清液,加入裂解液(5×10^6 个细胞加入100 μl 细胞裂解液),轻轻吹打,于4℃裂解30 min,细胞色素C、Procaspase-3、Procaspase-9以10 000 $\times g$ 离心30 min,吸出上清液,BCA法进行蛋白质定量,每个蛋白加入上样缓冲液(5 $\times$),沸水浴5 min后置于-20℃冰箱内贮藏,备用。按照每个蛋白质样品上样蛋白质量为30 μg ,上十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(浓缩胶5%,分离胶12%)。电泳后转膜,200 mA,2.5 h。加入5%脱脂奶粉的封闭液室温下封闭1 h,加Procaspase-3、Procaspase-9一抗4℃下孵育过夜,TBST洗3次,每次10 min,加HRP标记的 β -Actin二抗37℃下孵育1 h,TBST洗3次,每次10 min,加入ECL,显影、定影。细胞色素C所用裂解液为胞质蛋白质提取,Procaspase-3、Procaspase-9所用裂解液为总蛋白提取。实验分组与给药同“2.3”项下方法。

2.7 体内肿瘤抑制实验

取KM♀小鼠,腋下接种S180细胞以复制体内实体瘤模型。实验分为阳性对照组(顺铂2 mg/kg)组、模型(等容生理盐水)组与CTX高、中、低剂量(1、0.5、0.25 mg/kg)组。S180细胞接种后24 h ip给药,每天1次,连续10 d。第11天称小鼠体质量,处死小鼠,剥离瘤块,称瘤块质量。计算瘤质量抑制率(%):抑制率=(模型组肿瘤平均质量-用药组肿瘤平均质量)/模型组肿瘤平均质量 $\times 100\%$ 。

3 结果

3.1 体外细胞毒性实验结果

CTX对A549细胞株生长有明显的抑制作用,半数抑制浓度(IC₅₀)为0.770 $\mu\text{g/ml}$ 。

3.2 A549细胞形态学观察

阴性对照组A549细胞生长状况良好,细胞核膜完整,细胞核内染色质正常,细胞呈长梭性;CTX低剂量组的凋亡细胞形态为圆形或椭圆形,细胞缩小,细胞核内染色质浓缩成块状,呈现典型的细胞凋亡的形态;CTX中剂量组部分A549细胞染色质块状聚集在核膜边缘或是贴近核膜,染色质逐渐发生断裂;CTX高剂量组A549细胞处于凋亡状态,细胞明显变圆且缩小,染色质浓缩,形成细胞染色质的边集,部分核膜逐渐崩解,细胞形态与阴性对照组形成显著差异。光学显微镜观察吉姆萨染色A549细胞的形态(200 $\times$)见图1。

3.3 细胞凋亡率检测

阴性对照组与CTX低、中、高质量浓度组的A549细胞凋亡率分别为0.759 7%、2.857 14%、12.365 4%、17.645 1%,CTX高、中、低剂量组A549细胞凋亡率均高于阴性对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),且用药组随着药物质量浓度的增加凋亡率不断加大。A549细胞凋亡率检测结果见图2。

3.4 JC-1法检测CTX对A549细胞JC-1的影响

阴性对照组A549细胞产生的绿色荧光较少,主要是产生红色荧光,表示JC-1正常;阳性对照组A549细胞主要产生绿色荧光,表明JC-1下降;CTX组A549细胞数量少,同时产生绿色荧光,红色荧光弱,表明JC-1下降,与阴性对照组比较差异有统计学

意义($P<0.05$)。CTX对A549细胞JC-1的影响(100×)见图3。

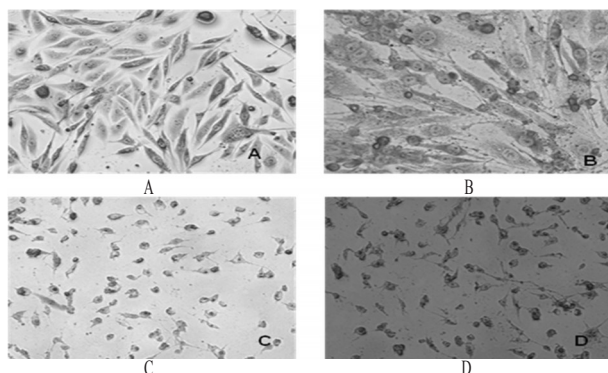


图1 光学显微镜观察吉姆萨染色A549细胞的形态(200×)
A. 阴性对照组; B. CTX 低浓度组; C. CTX 中浓度组; D. CTX 高浓度组

Fig 1 The morphology of A549 cells after Giemsa staining observed by light microscope(200×)

A. negative control group; B. CTX low concentration group; C. CTX medium concentration group; D. CTX high concentration group

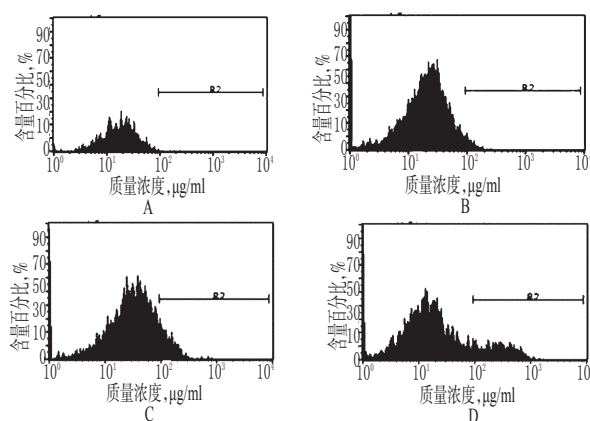


图2 A549细胞凋亡率检测结果

A. 阴性对照组; B. CTX 低浓度组; C. CTX 中浓度组; D. CTX 高浓度组

Fig 2 Results of apoptotic rate of A549 cells

A. negative control group; B. CTX low concentration group; C. CTX medium concentration group; D. CTX high concentration group

3.5 Western Blot 实验结果

经CTX处理后0.5 h, A549细胞胞浆中检测到细胞色素C, 说明随着药物作用时间的延长胞浆中细胞色素C的量逐渐增加, 表明在细胞凋亡时, 细胞色素C由线粒体释放到了胞浆中。Procaspase-9在药物作用开始的一段时间内, 含量变化不明显, 随着作用时间的延长, 其在A549细胞中的含量不断地减少, 说明随着药物作用药物时间的延长, Procaspase-9被激活。活化Caspase-3抗体在作用时间为0.5 h时被检测到, 且随着时间的延长而含量增加, 但Procaspase-3含量不断减少。Procaspase-3、Procaspase-9与细胞色素C蛋白的表达见图4。

3.6 体内肿瘤抑制实验结果

与模型组比较, CTX高、中、低剂量组肿瘤生长抑制率升高, 差异有统计学意义($P<0.01$)。CTX对S180小鼠肉瘤的抑制作用见表1。

4 讨论

细胞凋亡的途径主要有两条, 一条是通过胞外信号激活细胞内的凋亡酶Caspase; 另一条是通过线粒体释放凋亡酶激

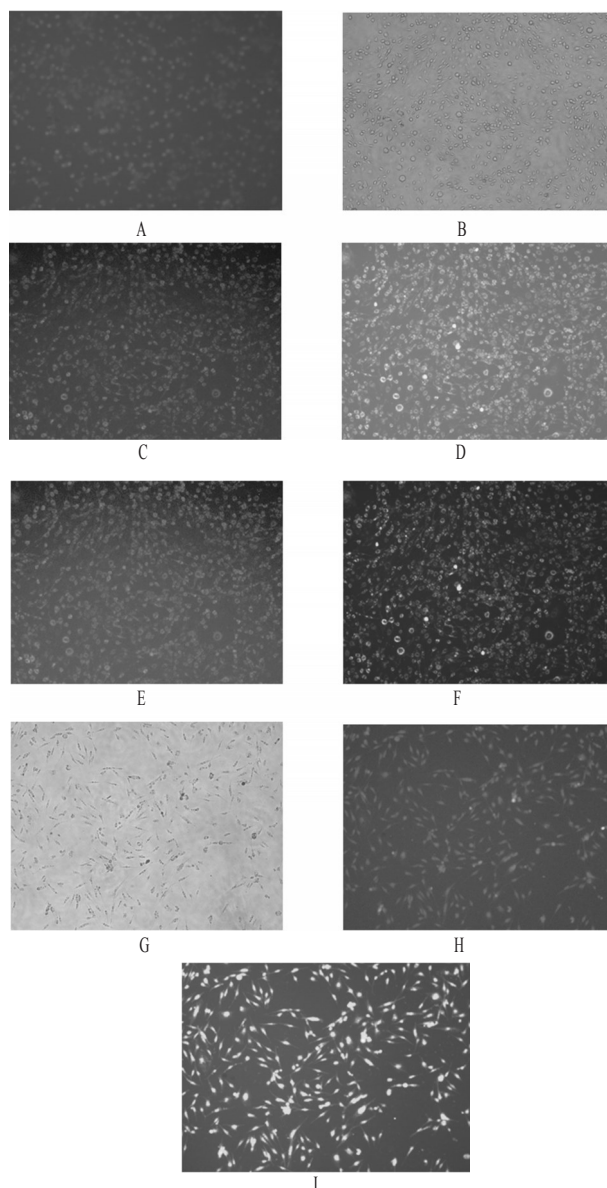


图3 CTX对A549细胞JC-1的影响(100×)

A~C. 阴性对照组; D~F. 阳性对照组; G~I. CTX 组

Fig 3 Effects of CTX on the mitochondrial membrane potential of A549 cells(100×)

A-C. negative control group; D-F. positive control group; G-I. CTX group

活因子激活Caspase。这些活化的Caspase可将细胞内的重要蛋白降解, 从而引起细胞凋亡。内源性凋亡途径主要在细胞内稳态的破坏下发生, 而细胞内线粒体在细胞凋亡时起到重要的作用, 其中细胞JC-1的下降在细胞凋亡早期发生^[9-10]。当JC-1发生变化时, 细胞即出现不可逆转的凋亡, 同时JC-1下降时, 细胞膜通透性增加而引起下一步凋亡的发生^[11-12]。细胞应激反应或凋亡信号能引起线粒体细胞色素C释放, 作为凋亡诱导因子, 细胞色素C能与Apaf-1、Caspase-9、三磷酸腺苷(ATP)/dATP形成凋亡体, 然后召集并激活Caspase-3, 进而引发Caspases级联反应, 导致细胞凋亡。

本研究结果显示, CTX对A549细胞具有促凋亡作用。吉姆萨染色法观察到CTX使A549细胞出现典型细胞凋亡的形

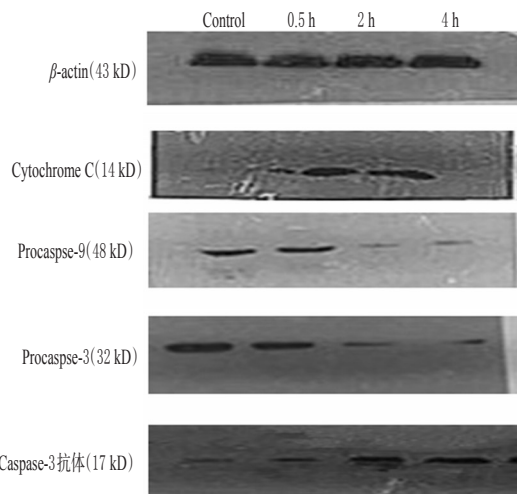


图4 Procaspase-3、Procaspase-9与细胞色素C蛋白的表达
Fig 4 Expression of protein of Procaspase-3, Procaspase-9 and cytoplasm C

表1 CTX对S180小鼠肉瘤的抑制作用($\bar{x} \pm s$, $n=10$)
Tab 1 Inhibition effects of CTX on sarcomatoid carcinoma in S180 mice

组别	<i>n</i>	肿瘤质量, g	抑制率, %
模型组	10	2.337 ± 0.378	
阳性对照组	10	0.573 ± 0.048	75.48*
CTX低剂量组	10	1.376 ± 0.229	41.12*
CTX中剂量组	10	0.935 ± 0.090	59.99*
CTX高剂量组	10	0.34 ± 0.101	85.45*

与模型组比较: * $P < 0.01$

vs. model group: * $P < 0.01$

态学改变。研究证实,CTX对A549细胞的凋亡作用通过线粒体通路实现。CTX诱导A549细胞中线粒体释放细胞色素C到胞浆中,引起Caspase-9活性改变,继而引起Caspase-3发生变化,但活化Caspase-3抗体在Procaspase-9含量下降之前被检测到,表明CTX对A549细胞凋亡作用不仅仅是通过线粒体途径,还有可能通过其他途径影响Caspase家族引起A549细胞的凋亡。

参考文献

[1] Escalante T, Ortiz N, Rucavado A, *et al.* Role of collagens and perlecan in microvascular stability: exploring the mechanism of capillary vessel damage by snake venom

metalloproteinases[J]. *PLoS One*, 2011, 6(12):e28 017.
[2] Lomonte B, Tsai WC, Bonilla F, *et al.* Snake venomics and toxicological profiling of the arboreal pitviper *Bothriechis supraciliaris* from Costa Rica[J]. *Toxicon*, 2012, 59(5):592.
[3] Barber CM, Isbister GK, Hodgson WC. Isbister solving the 'brown snake paradox': in vitro characterisation of Australasian snake presynaptic neurotoxin activity[J]. *Toxicol Lett*, 2012, 10(3):1 016.
[4] Shi Y, Ji MK, Xu jw, *et al.* High-level expression, purification, characterization and structural prediction of a snake venom metalloproteinase inhibitor in *Pichia pastoris* [J]. *Protein J*, 2012, 31(3):212.
[5] Liang YX, Han LP, Jiang WJ, *et al.* Isolation and pharmacological properties of analgesic fraction from venom of *Naja Naja atra*[J]. *Zhong Yao Cai*, 2009, 32(7):1 022.
[6] 郝彩, 韩丽萍, 蒋琳兰. 广东舟山眼镜蛇(*Naja naja atra*)蛇毒心脏毒素和磷脂酶A₂的分离纯化与性质鉴定[D]. 广州:华南理工大学, 2010.
[7] 崔超伟, 孔天翰. 舟山眼镜蛇毒细胞毒素CTXn的分离纯化及其镇痛作用研究[D]. 广州:广州医学院, 2010.
[8] Estaquier J, Vallette F, Vayssiere JL. The mitochondrial pathways of apoptosis[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 942: 157.
[9] 缪明永, 林敏, 伍石华, 等. 活性氧在EGCG诱导人胃癌MGC803细胞凋亡中的作用[J]. *中国癌症杂志*, 2010, 20(5):344.
[10] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社, 2006: 1 757.
[11] Wang CH, Monette R, Lee SC, *et al.* Cobra cardio toxin-induced cell death in fetal rat cardiomyocytes and cortical neurons: different pathway but similar cell surface target [J]. *Toxicon*, 2005, 46(4):430.
[12] Qian YF, Wang H, Yao WB, *et al.* Aqueous extract of the Chinese medicine, Danggui-Shaoyao-San, inhibits apoptosis in hydrogen peroxide-induced PC12 cells by preventing cytochrome C release and inactivating of caspase cascade[J]. *Cell Bio Int*, 2008, 32(2):304.

(收稿日期:2013-03-29 修回日期:2013-04-15)

国家卫生和计划生育委员会副主任王培安赴吕梁山片区开展“三下乡”慰问及调研活动

本刊讯 2014年1月12日至14日,国家卫生和计划生育委员会(以下简称国家卫生计生委)副主任王培安带队赴吕梁山集中连片特殊困难地区开展“三下乡”慰问及调研活动。

王培安一行深入国家卫生计生委定点扶贫县——山西大宁县、陕西清涧县、子洲县慰问困难群众,前往贫困县山西吉县调研百万亩有机山地苹果项目实施进展情况,调研卫生计生机构,看望干部职工,慰问困难的卫生计生干部职工家庭。

2013年以来,国家卫生计生委在吕梁山片区组织国家级医疗队巡回医疗、开展“健康快车进片区”活动、启动“健康暖

心”工程、动员社会力量支持片区,着力推动片区扶贫开发和卫生计生事业又好、又快发展。此次“三下乡”慰问及调研,实地了解了片区扶贫开发工作取得的成效,深入分析了定点扶贫县经济社会发展,特别是卫生计生事业发展中存在的困难与问题,计划重点研究推动百万亩有机山地苹果等产业项目,协调支持卫生计生机构发展建设,加大培训培养贫困地区卫生计生专业技术人员力度,通过采取一系列有效帮扶措施,促进贫困地区经济社会全面发展。