

· 药理实验与临床观察 ·

蜂毒素对肝癌细胞系 SMMC7721 增殖的影响

张 晨, 凌昌全, 李 柏, 彭永海*

(第二军医大学长海医院 中医科, 上海 200433)

摘 要:目的 了解蜂毒素对肝癌细胞生长、增殖的影响。方法 采用台盼蓝排染法测定细胞的生长曲线, MTT法测定细胞增殖的抑制率, 流式细胞仪检测细胞周期和细胞 PCNA 的表达。结果 蜂毒素可明显抑制肝癌细胞 SMMC7721 的生长、增殖, PCNA 阳性细胞表达率随着蜂毒素剂量的增加而降低, 对细胞周期的影响表现为 S 期细胞增加, G₂/M 期细胞减少。结论 蜂毒素可抑制肝癌细胞的生长、增殖, 并且减少 PCNA 阳性细胞的表达, 影响细胞周期的比率。

关键词: 蜂毒素; 肝癌; 增殖

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2003)01-0043-03

Effect of melittin on proliferation of hepatocarcinoma cell line SMMC7721

ZHANG Chen, LING Chang-quan, LI Bai, PENG Yong-hai

(Department of TCM, Changhai Hospital, Shanghai 200433, China)

Abstract **Object** To study the effect of melittin on growth and proliferation of hepatocarcinoma cells. **Methods** Hepatocarcinoma cell line SMMC7721 was treated by melittin. The growth and proliferation was observed by cell counting and MTT assay; necrosis was estimated by Trypan blue staining. The expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and cycle phase were detected by flow cytometer. **Results** Melittin could significantly inhibit the growth of SMMC7721 and block up cells progress through G₂/M. The percentage of PCNA positive cell was decreased gradually when concentration of melittin was increased. **Conclusion** Melittin could inhibit the proliferative activity of hepatocarcinoma cell line SMMC7721 and reduce of PCNA positive cell expression and arrest cells in S phase.

Key words melittin; hepatocarcinoma; proliferation

蜂毒素是蜂毒的主要活性成分, 约占蜂毒干重的 50%。近年来, 随着蜂毒分离、提取、纯化技术的不断提高, 对蜂毒素的功能及作用机制的研究也日益广泛。有研究表明蜂毒素可以通过多种途径影响细胞的信号传导系统, 诱导细胞凋亡, 并具有抗菌、抗病毒及抗肿瘤等广泛的生物学效应。我们研究室在提取高纯度蜂毒素的基础上, 开展了蜂毒素抗肿瘤的疗效及作用机制的研究, 本实验初步观察了蜂毒素体外对肝癌细胞系 SMMC7721 生长、增殖的影响, 为蜂毒素在抗肿瘤的临床应用及作用机制方面的深入探讨提供部分实验依据。

1 材料与方法

1.1 药物: 蜂毒素由本研究室分离、提纯(纯度 97.2%), 使用时用 RPMI1640 培养基稀释成 600 $\mu\text{g/mL}$ 备用。

1.2 细胞系: 肝癌细胞系 SMMC7721 由中国科学院上海细胞研究所引进, 常规接种于含 10% 小牛血清的 RPMI1640 完全培养基中, 37℃, 5% CO₂ 饱和湿度培养, 取生长期细胞进行实验。

1.3 细胞生长曲线测定: 将细胞以 2.5×10^4 接种于 6 孔板中, 24 h 细胞贴壁后加入终浓度为 4, 16 $\mu\text{g/mL}$ 的蜂毒素处理细胞, 逐日取对照及药物处理组细胞, 0.02% EDTA 消化细胞, 台盼蓝染色, 光镜下计活细胞数。

1.4 细胞增殖抑制率的测定: 采用 MTT 法, 96 孔板接种 1×10^4 细胞, 实验组加入 16, 8, 4, 2, 1, 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 终浓度的蜂毒素培养 72 h, 实验结束前 4 h 加 MTT 20 μL 继续培养。实验结束时倾去培养基, 每孔加 DMSO 150 μL , 震荡混匀, 10 min 后于酶联仪上测定波长为 490 nm 的吸光度值, 按下列公式

* 收稿日期: 2002-06-07

基金项目: 军队“九五”重点课题 (98DJ-3269)

作者简介: 张 晨 (1963-), 男, 吉林人, 主治医师, 1986年毕业于延边医学院, 1995年于大连医科大学获硕士学位, 现在第二军医大学长海医院攻读中西医结合学博士学位, 研究方向为携蜂毒素基因腺病毒对肝癌的靶向基因治疗。

计算细胞增殖抑制率

细胞增殖抑制率 (%) = (1- 实验组吸光度值 / 对照组吸光度值) × 100%

1. 5 细胞周期的测定: 细胞经 4, 16 μ g /mL 蜂毒素处理后于 48, 72 及 96 h 收集细胞, 70% 冷乙醇固定过夜, 弃乙醇, PBS 洗涤, 加入含 RNase 和 Triton X-100 碘化丙锭的染液, 避光染色 30 min, 用流式细胞仪 (BD 公司) 检测

1. 6 增殖细胞核抗原 (PCNA) 检测: 细胞经药物处理后, EDTA 消化收集细胞, 乙醇固定, 用含 0. 1% Triton X-100 的 PBS 预处理细胞, 用 FITC 标记的 PCNA 单克隆抗体直接进行染色, FITC 标记的小鼠 IgG₂ 作同型性对照 (英国 SEROTEC 公司), 流式细胞仪检测阳性细胞数。

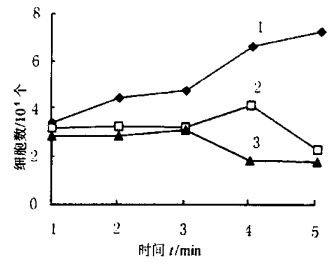
2 结果

2. 1 蜂毒素对细胞生长的影响: 由图 1 可见, 4 和 16 μ g /mL 蜂毒素对 SMMC7721 细胞的生长有明显的抑制作用。

2. 2 蜂毒素对增殖细胞的影响: 表 1 显示蜂毒素作用 72 h 对 SMMC7721 细胞增殖的影响, 随着蜂毒素浓度的升高, 对细胞增殖的抑制率明显上升。

2. 3 蜂毒素对细胞周期的影响: 表 2 显示不同时间及不同浓度蜂毒素作用后造成 SMMC7721 细胞周期的变化

2. 4 蜂毒素对细胞增殖核抗原的影响: 流式细胞仪



1-对照 2-蜂毒素 4 μ g /mL 3-蜂毒素 16 μ g /mL
1-control 2-melittin 4 μ g /mL 3-melittin 16 μ g /mL

图 1 蜂毒素对 SMMC7721 细胞生长的影响

Fig. 1 Inhibition on growth of SMMC7721 by melittin

表 1 蜂毒素对肝癌细胞 SMMC7721 的抑制率

Table 1 Proliferation inhibition of SMMC7721 by melittin

蜂毒素 /(μ g $\cdot$ mL $^{-1}$)	72 h 抑制率 /%
0. 5	15. 84 $\pm$ 3. 00
1. 0	18. 83 $\pm$ 2. 46
2. 0	22. 24 $\pm$ 3. 55
4. 0	28. 22 $\pm$ 1. 75
8. 0	35. 99 $\pm$ 3. 76
16. 0	54. 45 $\pm$ 4. 68

检测结果显示, 蜂毒素作用 4 d 后, 对照组及实验组的 PCNA 表达率分别为 57. 97%, 36. 80% 和 25. 95%。随着蜂毒素的浓度升高, SMMC7721 细胞的 PCNA 阳性细胞百分率逐渐下降 (图 2)。

3 讨论

有研究显示, 蜂毒素在体外对多种实验性肿瘤细胞有强烈的杀伤作用^[1, 2]。Zhu^[3]等研究发现蜂毒

表 2 蜂毒素对 SMMC7721 细胞周期的影响

Table 2 Effect on cycle phase of SMMC7721 by melittin

蜂毒素 /(μ g $\cdot$ mL $^{-1}$)	48 h			72 h			96 h		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
0	65. 50	23. 34	11. 15	65. 08	21. 12	13. 80	66. 43	20. 60	12. 96
4	67. 68	26. 18	6. 14	65. 83	32. 00	11. 17	59. 18	32. 88	7. 94
16	65. 59	34. 08	0. 33	67. 12	28. 55	4. 13	63. 75	30. 87	5. 38

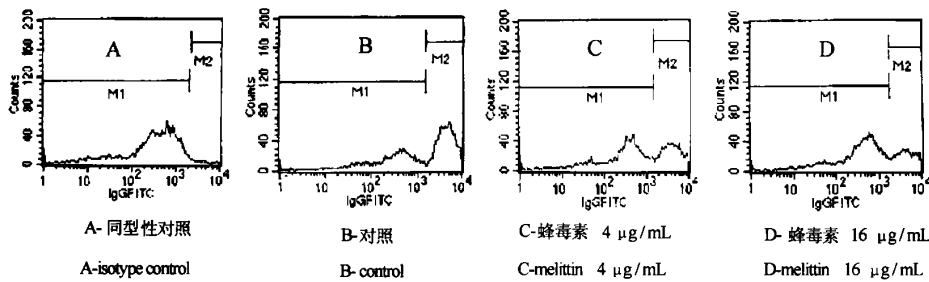


图 2 蜂毒素对 SMMC7721 细胞 PCNA 的影响

Fig. 2 Effect on proliferating cell nuclear antigen of SMMC7721 by melittin

素在 $1\mu\text{mol/L}$ 浓度时,阻止肿瘤细胞的增生,而不抑制正常细胞的生长和克隆率。以往的研究显示,大剂量蜂毒素在体外对多种肿瘤细胞有极强的杀伤作用,而小剂量蜂毒素具有明显诱导细胞凋亡的作用^[4,5]。本实验是在对蜂毒素的分离、提取、纯化及其抗肿瘤作用研究的基础上,观察蜂毒素对肝癌细胞系 SMMC7721 细胞体外生长、增殖的影响,结果显示 $4, 16\mu\text{g/mL}$ 蜂毒素对肝癌细胞的生长有明显的抑制作用,并且 $4\mu\text{g/mL}$ 蜂毒素处理组经台盼蓝染色发现细胞坏死率不足 1%,说明此浓度的蜂毒素对 SMMC7721 生长的抑制不是通过细胞毒作用,有可能是通过细胞凋亡途径。进一步研究表明蜂毒素可以显著降低 PCNA 的表达,并与浓度呈负相关。PCNA 对细胞周期有重要的调控作用,其合成和表达与细胞的增殖状态密切相关,蜂毒素对 SMMC7721 肝癌细胞生长的抑制有可能与 PCNA 的表达降低有关。

肿瘤的特征之一是细胞周期异常,使肿瘤细胞无限地增殖。细胞周期各时相的生化变化是一个连续的过程,细胞周期的任何一个时相的生物合成被阻断,都可使整个细胞周期中断,肿瘤治疗的中心环节就是干扰肿瘤细胞的细胞周期,从而影响细胞的生长、增殖或诱导细胞凋亡的产生。本实验通过流式细胞仪观察了蜂毒素处理后细胞周期变化,发现 $4, 16\mu\text{g/mL}$ 蜂毒素可影响 SMMC7721 细胞的细胞

周期正常移行,阻止 S 期细胞进入 G_2/M 期,造成 S 期细胞的聚集, G_2/M 期细胞的减少。

蜂毒来源丰富,作用广泛,生物活性强,是医药和生物工程方面的重要原料,其主要成分蜂毒肽对淋巴瘤、肉瘤有细胞毒作用,可通过阻抑氧化磷酸化对一些肿瘤产生抑制作用^[6]。但蜂毒在肿瘤临床应用方面尚受到一些毒副作用的限制,随着蜂毒素提纯技术的进步及对其结构、剂型改造工作的深入,蜂毒素在抗肿瘤的临床治疗方面的价值将会越来越大。

References

- [1] Saini S S, Chopra A K, Peterson J W. Melittin activates endogenous phospholipase D during cytolysis of human monocytic leukemia cells [J]. *Toxicol*, 1999, 37(11): 1605-1619.
- [2] Reiter Y, Giobotariu A, Jones J, *et al.* Fishelson-Z complement membrane attack complex, perforin, and bacterial exotoxins induce in K562 cells calcium-dependent cross-protection from lysis [J]. *J Immunol*, 1995, 155(4): 2203-2210.
- [3] Zhu H G, Tayeh I, Israel L, Castagna M. Different susceptibility of lung cell lines to inhibitors of tumor promotion and inducers of differentiation [J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 1991, 5(2): 52-58.
- [4] Ling C Q, Huang X Q, Liu L. The antitumor effect of melittin *in vitro* [J]. *Acad J Second Mil Med Univ* (第二军医大学学报), 2001, 22(7): 612-614.
- [5] Huang X Q, Ling C Q, Chen Z, *et al.* Apoptosis of human acute T lymphocyte leukemia cell line 6T-CEM induced by melittin [J]. *J Anhui Coll Tradit Chin Med* (安徽中医学院学报), 2001, 20(5): 39-41.
- [6] Wei Y, Yang S, Jiang M H. The present state of venom in pharmacological study, clinical application and exploitation [J]. *Chin J Hosp Pharm* (中国医院药学杂志), 2000, 20(11): 682-683.

泽泻不同溶剂提取物对大鼠尿草酸钙结石形成的影响

曹正国¹,刘继红¹,吴继洲²,鲁德曼¹,尹春萍²,叶章群^{1*}

(1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院 泌尿外科,湖北 武汉 430030; 2. 华中科技大学同济医学院药学院,湖北 武汉 430030)

摘要:目的 研究泽泻不同溶剂提取物对大鼠尿草酸钙结石形成的影响,并确定其抑制尿草酸钙结石形成的有效部位。方法 通过 ig 不同剂量的泽泻不同溶剂提取物对乙二醇和氯化铵诱导的大鼠肾草酸钙结石模型进行试验研究。结果 泽泻乙酸乙酯浸膏高剂量组大鼠的血清 Cr、BUN、肾 Ca^{2+} 含量,24 h 尿 Ca^{2+} 分泌量,肾组织的草酸钙晶体沉积均明显低于成石组 ($P < 0.05$)。结论 泽泻乙酸乙酯浸膏能抑制实验性高草酸尿症大鼠尿草酸钙晶体的形成,是泽泻抑制尿草酸钙结石形成的有效部位。

关键词: 泽泻;尿石;草酸钙

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)01-0045-04

* 收稿日期: 2002-06-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39970891)

作者简介: 曹正国 (1975-),男,湖北黄石人,博士研究生,现参与两项国家自然科学基金课题 (39970891 和 39970710) 的研究,主要从事泌尿外科尿石症和膀胱肿瘤的研究。Tel (027) 83663407 E-mail zgcao2002@ hotmail.com