蝎皮蛋白质组分对正常小鼠免疫功能的影响

张 莉, 吴 立, 吕 扬, 杜冠华*

(中国医学科学院 中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050)

摘要:目的 研究蝎皮蛋白质组分对正常小鼠免疫功能的影响, 为蝎皮开发利用和发现新的活性物质提供实验依据。方法 采用刃天青和 MTT 法检测蝎皮水溶性总蛋白 (STP)、总角蛋白 (STKP) 及水溶性蛋白组分 II (STP II) 对正常小鼠 T、B 淋巴细胞转化、NK 细胞杀伤活性的作用。结果 STP 和 STKP ig 给药后, 小鼠脾 T 淋巴细胞增殖反应高于正常对照组, 但只有 STP 小剂量组与对照组比较差异显著 ($P < 0.001$)。B 淋巴细胞增殖反应结果显示 STKP 大、小剂量均可加强增殖反应, 与对照组比较差异极显著 ($P < 0.05, 0.01$)。STP 和 STKP 大、小剂量组 NK 细胞杀伤活性与对照组相比有升高趋势。STP II 两个剂量组 100、200 mg/kg ig 给药均能明显抑制正常小鼠 T、B 淋巴细胞增殖反应, 与对照组相比差异极显著。STP II 大剂量组 NK 细胞杀伤活性与对照组相比有降低趋势, 但无统计学意义。结论 STP 和 STKP 具有一定的提高免疫功能的作用, STP II 则具有抑制免疫功能的活性。揭示蝎皮蛋白质组分具有免疫调节药理活性, 值得深入研究。

关键词: 蝎皮蛋白质组分; 正常小鼠; 免疫功能

中图分类号: R286.95

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)08-1197-04

Effects of scorpion tegument protein on immune function in normal mice

ZHANG Li, WU Li, LÜ Yang, DU Guan-hua

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract; Objective To study effects of scorpion tegument protein (STP) on immunological function in normal mice and provide experimental data for searching new compounds. **Methods** Resazurin and MTT assay were used to detect the effects of scorpion tegument water-soluble protein, scorpion tegument keratin protein (STKP) and STP component II (STP II) on the transformation of T and B lymphocytes, and NK cell activity in normal mice. **Results** By ig STP and STKP, the proliferation response of T lymphocyte in murine spleen was higher than that in normal control group, while only there was significant difference between low-dose of STP group compared with the normal control group ($P < 0.001$). Administration of STKP by ig in both large- and small-dose groups also significantly increased B lymphocytes proliferation response ($P < 0.05, 0.01$). Activity of NK cells had raising trend in high- and low-dose of STP and STKP groups compared with the normal control group. However, STP II (100 and 200 mg/kg) showed extremely inhibitory effects on T and B lymphocyte proliferation response. STP II (200 mg/kg) could inhibit activity of NK cell, but there was no significant difference compared with the control group. **Conclusion** STP and STKP possess potential immuno-improving effects and STP II has immuno-suppressive effects. It indicates that STP has the immuno-regulating activity that should be studied furtherly.

Key words: scorpion tegument protein (STP); normal mice; immunological function

全蝎是传统医学中常用中药, 主要是指东亚钳蝎 *Buthus martensii* Karsch 的干燥体, 性味辛平, 具有熄风止痉、攻毒、散结、通络止痛之功效。蝎毒或全蝎具有抗惊厥、抗癫痫、抗肿瘤、镇痛、抗血栓、促进心率加快等多方面的作用。而关于东亚钳蝎在生长过程中主要代谢产物蝎皮所含成分及其药理活性尚

未见报道。本课题组从蝎皮中提取到相对分子质量大于 8 000 的水溶性总蛋白和总角蛋白, 并进一步分离得到 13 个组分, 体外药理实验发现均能显著促进 T、B 淋巴细胞增殖反应和 NK 细胞活性^[1]。为了进一步探讨蝎皮蛋白质组分的药理活性, 以期从中发现新的活性物质, 本实验观察东亚钳蝎的蝎皮

收稿日期: 2004-11-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30171148, 3001161940); 国家中医药管理局中医药科技研究专项 (02-03ZP08)

作者简介: 张 莉 (1972—), 女, 河南安阳市人, 副研究员, 博士, 研究方向为药物发现与中药机制研究。

Tel: (010) 63165184 Fax: (010) 63165184 E-mail: zhangli@imm.ac.cn

* 通讯作者 杜冠华 Tel: (010) 63165184 Fax: (010) 63165184 E-mail: dugh@imm.ac.cn

蛋白质组分体内给药对正常小鼠免疫功能的影响。

1 材料

1.1 药品与试剂:2~6 年生蝎子皮由江苏海门市家养蝎子技术咨询服务站提供。葡聚糖凝胶 Sephadex G-50 填料,中国医学科学院血液学研究所生产。伴刀豆球蛋白 A (Con A),Sigma 公司产品。脂多糖 (LPS) 购自华美生物有限公司。RPMI-1640 培养液,BIBCL 公司产品,完全 1640 培养液含青霉素 100 U/mL、链霉素 100 μ g/mL、谷氨酰胺 2 mmol/L、10% 胎牛血清。其余试剂均为市售分析纯。

1.2 动物和细胞株: BALB/c 小鼠,雌性,体重 18~22 g,购自中国医学科学院动物研究所繁育场。Yac-1 细胞、小鼠 NK 敏感细胞株,购自中国医学科学院基础医学研究所细胞中心。

1.3 仪器:Flustar 微板多功能测定仪,德国 BMG 公司生产。

2 方法

2.1 蝎皮蛋白质组分的制备:蝎皮粉碎,加蒸馏水搅拌 4 h,静置沉淀,上清液于 4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 10 min。取上清液抽滤,得透明液体。沉淀经反复水抽提至提取液硫酸铵盐析呈阴性。合并上清液得总蛋白液,加入硫酸铵至 90% 进行盐析,4 $^{\circ}$ C 下静置 48 h,可见淡黄色絮状沉淀。总蛋白液经 6 000 r/min 离心 10 min,收集沉淀,去离子水溶解,18 $^{\circ}$ C 下温和搅拌 3 h 促溶,待蛋白质完全溶解后离心,条件同上,收集上清蛋白液,下层沉淀加入蒸馏水继续溶解,搅拌促溶、离心,收集上层蛋白溶液。合并上清蛋白溶液,4 $^{\circ}$ C 下透析除盐,透析完全后,浓缩冻干得水溶性总蛋白(简称 STP)。以牛血清白蛋白为标准品,Foline 酚法测定 STP 质量分数为 49.76%。

另取 STP 1 g,加去离子水溶解后,分多次加样到 Sephadex G-50 凝胶色谱柱上,蛋白质量浓度为 10 mg/mL。以去离子水洗脱,体积流量 1.0 mL/min。洗脱组分于紫外检测仪 280 nm 处检测,按检测峰分部收集流出组分,获得水溶性蛋白组分 II (STP II),冻干待用。以牛血清白蛋白为标准品,Foline 酚法测定 STP II 质量分数为 64.18%。

提取水溶性蛋白剩余的全部残渣烘干,得到淡黄色粉末,加入巯基乙酸 (14 mol/L)-尿素 (8 mol/L) 溶液,NaOH 调节溶液 pH 值至 10,室温搅拌 48 h。静置沉淀弃上清液,8 000 r/min 离心 8 min,抽滤,滤液用醋酸调节 pH 至中性后透析去除尿素,每天换水 3 次,3 d 后透析完全,浓缩冻干得总角蛋白粉末(简称 STKP)。以牛血清白蛋白为标准品,Fo-

line 酚法测定 STKP 质量分数为 50.31%。

2.2 T、B 淋巴细胞转化实验:实验分两批进行。第一批:取 50 只 BALB/c 小鼠,随机分为正常对照组、STP 大、小剂量 (200、100 mg/kg)、STKP 大、小剂量 (200、100 mg/kg) 组,每组 10 只小鼠。第二批:取 30 只 BALB/c 小鼠,随机分为正常组、STP II 大、小剂量 (200、100 mg/kg) 组,每组 10 只小鼠。两批动物均 ig 给药,连续两天,每 12 h 1 次,共 3 次。实验结束后,常规无菌取小鼠脾脏,轻轻研磨,过 200 目钢网,RPMI 1640 培养液洗 1 次,2 000 r/min 离心 5 min,弃上清液。细胞沉淀用双蒸水、双盐水 (1.8% NaCl 溶液) 各洗 1 min,破坏红细胞,离心后弃上清液。完全 1640 培养液调细胞浓度至 2.5×10^6 /mL,每孔 100 μ L,种于 96 孔板,同时加 ConA (终质量浓度 5 μ g/mL) 或 LPS (终质量浓度 5 μ g/mL),每孔 100 μ L。另设空白对照孔 (未加诱导剂),37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵育 72 h,培养结束前 4 h,加刃天青 10 μ L (终质量浓度 5 μ mol/L),培养结束后,测定荧光强度 (激发波长 530 nm,发射波长 590 nm),并按下列公式计算淋巴细胞刺激指数:

$$\text{刺激指数} = \frac{\text{实验孔荧光值}}{\text{对照孔荧光值}}$$

2.3 NK 细胞杀伤活性测定:实验分组及给药方式同 2.2 项。实验结束后,按上述方法获取脾细胞,用完全 1640 培养液调细胞浓度至 5×10^6 /mL,另取 Yac-1 细胞,完全 1640 培养液调细胞浓度至 5×10^5 /mL,分别种于 96 孔板。设以下组别:效应细胞组 (脾细胞,每孔 100 μ L)、靶细胞组 (Yac-1 细胞,每孔 100 μ L),实验 (效应细胞和靶细胞) 组 (脾细胞和 Yac-1 细胞,每孔各 100 μ L)。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵育 24 h 后,培养结束前 4 h 加 MTT (终质量浓度 500 μ g/mL),培养结束后测吸光度 (A) 值。按下列公式计算杀伤率:

$$\text{NK 细胞杀伤率} = \frac{A_{\text{效应细胞}} + A_{\text{靶细胞}} - A_{\text{实验组}}}{A_{\text{靶细胞}}} \times 100\%$$

2.4 统计:数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。

3 结果

3.1 STP 和 STKP 对正常小鼠免疫功能的影响:见表 1。STP 和 STKP ig 给药后,小鼠 T 淋巴细胞增殖反应高于正常组,但只有 STP 小剂量组与正常组比较差异极显著 ($P < 0.01$)。B 淋巴细胞增殖反应结果显示 STKP 大、小剂量均可加强增殖反应,与正常组比较差异显著 ($P < 0.05, 0.01$)。表 1 结果还表明 STP 和 STKP 有提高 NK 细胞杀伤活性的趋势。

3.2 STP II 对正常小鼠免疫功能的影响:见表2。STP II 两个剂量组 ig 给药均能明显抑制正常小鼠 T、B 淋巴细胞增殖反应,与正常组相比差异极显著。STP II 大剂量组 NK 细胞杀伤活性与正常组相比有降低趋势,但无统计学意义。

表1 STP 和 STKP 对正常小鼠免疫功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Effects of STP and STKP on immunological function of normal mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	T 细胞 刺激指数	B 细胞 刺激指数	NK 细胞 杀伤率/%
正常	—	1.13±0.12	1.10±0.06	36.52±15.00
STP	100	1.36±0.08***	1.06±0.17	26.87±10.66
	200	1.23±0.17	1.05±0.09	43.39±17.65
STKP	100	1.11±0.12	1.25±0.17*	41.28±12.48
	200	1.24±0.13	1.27±0.10**	40.04±19.04

与正常对照组比较: *P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001

*P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001 vs normal group

表2 STP II 对正常小鼠免疫功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effects of STP II on immunological function of normal mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	T 细胞 刺激指数	B 细胞 刺激指数	NK 细胞 杀伤率/%
正常	—	1.23±0.15	1.09±0.06	27.45±10.41
STP II	100	1.02±0.09**	1.03±0.07**	28.31±10.17
	200	0.99±0.17**	0.98±0.10**	19.36±8.75

与正常组比较: **P<0.01

**P<0.01 vs normal group

4 讨论

早在宋代《开宝本草》中记载全蝎已应用于临床,言其性喜走窜,凡肝经诸风,疮疡肿毒及风湿痛等皆可用之。现代临床上也多用全蝎治疗疼痛、癫痫、肿瘤等。研究认为全蝎抗肿瘤或镇痛的主要活性成分为蝎毒,采用有机溶剂超声提取,离子交换柱色谱,提纯后,发现蝎毒为多肽类成分,相对分子质量为 18 000、26 000、28 000^[2],包括神经毒素 I、神经毒素 II、抗癫痫活性的多肽、镇痛性多肽如蝎毒素 III 等。药理实验表明蝎毒对急性渗出性炎症作用明显,对慢性增生性炎症有一定作用,但对以过敏反应为主的炎症作用不明显^[3,4]。蝎毒中提取的抗癌多肽可提高 H₂₂ 荷瘤小鼠的免疫功能、增加 NK 细胞活性、淋转指数。蝎毒提取物尚能促进神经受损修复和再生^[5]。目前除蝎毒外未见全蝎其他活性成分的报道,蝎皮是东亚钳蝎生长过程中的代谢产物,每隔一段时间钳蝎就要蜕一次皮,每蜕一次皮增加一龄,7 龄蝎才为成蝎,因此在东亚钳蝎长成成蝎的过程中可获得大量蝎皮。为了探讨蝎皮是否含有活性物质,

本实验对提取的蝎皮蛋白质组分在免疫功能方面的影响作了初步研究。

本实验结果表明,从蝎皮中提取的 STP 和 STKP 体内给药后,对小鼠 T 淋巴细胞增殖反应有促进作用,但只有 STP 小剂量组与正常对照组比较差异显著。对小鼠 B 淋巴细胞增殖反应,STKP 100、200 mg/kg 均有促进活性,与正常组小鼠比较差异显著,STP 组作用不显著。STP 和 STKP 各剂量组 NK 细胞杀伤活性与对照组相比有升高趋势。STP II 两个剂量组体内给药后能明显抑制正常小鼠 T、B 淋巴细胞增殖反应,与对照组相比差异极显著,STP II 大剂量组 NK 细胞杀伤活性与对照组相比也有降低趋势。ConA 诱导的 T 淋巴细胞增殖反应代表了机体的细胞免疫功能,而 LPS 刺激的 B 淋巴细胞增殖反映了机体的体液免疫功能。由此可见,STP 和 STKP 在一定程度上对正常小鼠免疫功能,特别是细胞免疫功能显示增强活性,而 STP 中分离的组分 STP II 则具有较强的免疫抑制作用。

前期的体外实验结果显示,从蝎皮中获得的 13 个蛋白质组分均可显著促进 T、B 淋巴细胞的增殖反应,其中 STP II 的促进作用与对照组相比较差异极显著^[1]。结合体内外实验结果可见,STP 和 STKP 能够增强免疫功能,所分离的组分可能也多具有免疫促进作用。STP II 体外提高淋巴细胞增殖反应而体内抑制淋巴细胞转化,分析可能与其代谢后产物发挥免疫抑制活性等原因有关,但尚需进一步验证。另有研究表明全蝎和蝎身煎剂能够抑制小鼠网状内皮系统对碳粒的廓清作用和血清溶血素的形成,说明全蝎对非特异性免疫和体液免疫有抑制作用^[6],全蝎乙醇提取物 ig 给药具有抗大鼠足趾肿胀、肉芽肿的作用^[7]。分析认为全蝎的抗炎作用可能与蝎皮内含有免疫抑制成分有关。本实验结果提示,蝎皮蛋白质组分既含有免疫促进成分也含有免疫抑制成分,值得深入研究,有望从中发现新的免疫活性物质。

References:

- [1] Wu L, Zhang L, Du G H, et al. Study on the active protein fractions from *Scorpius tegument* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2005, 30(14):1083-1087.
- [2] Xiao W, Zhao W C, Yu D Q. Primary study of anticancer component from scorpion [J]. *J Pract Oncol* (实用肿瘤学杂志), 2000, 14(1): 18-19.
- [3] Ye H Y, Li W D, Lin Z B. Anti-inflammatory effect of Buthotoxin [J]. *J Gannan Med Coll* (赣南医学院学报), 2001, 21(3): 248-251.
- [4] Du G J, Xu Y, Mou X S, et al. Analgesic effects and anti-inflammatory effects of scorpion peptide [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 1998, 15(20): 106-108.

[5] Li N, Wang Z Z, Han H R, et al. Effects of extract in scorpion venom on regeneration and repair process in injured nerves [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2003, 19(8): 957-958.

[6] Wu Y L, Liu C M, Chen L L. Effects of *Buthus martensii* Karsch and decoction on immune function in mice [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 1994, 6(2): 13-14.

[7] Zhou M, Song C Y, Wang L. Effects of ethanol extract from *Buthus martensii* Karsch on anti-inflammatory swell and granuloma weight in rats [J]. *Inf Tradit Chin Med* (中医药信息), 1998(6): 45-46.

龙葵碱对荷瘤小鼠肿瘤细胞 DNA 和 RNA 的影响

季宇彬, 王宏亮, 高世勇

(哈尔滨商业大学药物研究所 博士后科研工作站, 黑龙江 哈尔滨 150076)

摘要:目的 观察龙葵碱对 S₁₈₀和 H₂₂荷瘤小鼠肿瘤细胞 DNA 和 RNA 的影响。方法 将 S₁₈₀和 H₂₂荷瘤小鼠分为龙葵碱 37.50、18.75、9.37 mg/kg 组、阴性对照组和环磷酰胺 (30 mg/kg) 组, 各组 sc 给药。利用激光共聚焦扫描显微镜, 分别测定各组肿瘤细胞中的 DNA 和 RNA。结果 龙葵碱 (37.50、18.75 mg/kg) 组对 S₁₈₀和 H₂₂小鼠肿瘤细胞 RNA 和 DNA 的比值均有明显的降低作用。结论 龙葵碱降低 S₁₈₀和 H₂₂小鼠肿瘤细胞 RNA 和 DNA 的比值可能是其抗肿瘤作用机制之一。

关键词:龙葵碱; 肿瘤细胞; DNA; RNA

中图分类号:R286.91 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2005)08-1200-03

Effect of solanine on DNA and RNA in tumor cell of tumor-bearing mice

JI Yu-bin, WANG Hong-liang, GAO Shi-yong

(Postdoctoral Programme, Institute of Materia Medica, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

Abstract; Objective To observe the effects of solanine on DNA and RNA level in tumor cell of S₁₈₀ and H₂₂ tumor-bearing mice. **Methods** S₁₈₀ and H₂₂ mice were divided into solanine (37.50, 18.75, and 9.37 mg/kg) groups, negative control group and cytoxan (30 mg/kg) group, whom were given drugs by sc. Levels of RNA and DNA in tumor cell membrane in every groups were examined, respectively by laser scanning confocal microtechnic technology. **Results** Solanine (37.50, 18.75 mg/kg) groups reduced the ratio of RNA and DNA in tumor cell of both S₁₈₀ and H₂₂ mice. **Conclusion** Solanine can reduce the ratio of RNA and DNA in tumor cell of S₁₈₀ and H₂₂ mice, which may be one of the mechanisms of solanine's antitumor effect.

Key words: solanine; tumor cell; DNA; RNA

龙葵碱是从茄科植物龙葵 *Solanum nigrum* L. 的全草或未成熟的果实中提取分离出的一种生物碱。前期研究发现龙葵碱能显著延长 H₂₂荷瘤小鼠的生存时间^[1], 并能显著降低 H₂₂荷瘤小鼠肿瘤细胞膜流动性及膜蛋白水平^[2]。为进一步研究龙葵碱抗肿瘤作用机制, 本实验研究龙葵碱对荷瘤小鼠肿瘤细胞 RNA 和 DNA 的影响。

1 材料

1.1 药物: 龙葵碱 (质量分数 99.5%), 由黑龙江省药品检验所提供; 环磷酰胺, 江苏恒瑞医药股份有限公司, 批号: 03081321。

1.2 动物及瘤株: 昆明种小鼠, 体重 (20±2) g, 雌雄各半, 购于哈尔滨医科大学动物中心, 许可证号 001010006。S₁₈₀和 H₂₂瘤株购于黑龙江省肿瘤医院。

1.3 试剂及仪器: 吖啶橙 (AO, Molecular Probes, Inc.); 生理盐水; 细胞计数板; 激光扫描共聚焦显微镜, 德国 Leica; HH-S 恒温水浴; LD₄-2A 型台式低速离心机 (北京医用离心机厂); QL-861 型涡旋混合振荡器 (上海博停经贸有限公司); 尤尼柯紫外可见分光光度计。

2 方法

2.1 分组、给药与造模: 选用成熟昆明种小鼠 50

收稿日期: 2004-12-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30400591, 30271598); 黑龙江省自然科学基金资助项目 (D2004-13, C0309); 哈尔滨市青年科学基金资助项目 (2004AFQXJ035); 哈尔滨市科学研究基金 (2004AFQXJ034)

作者简介: 季宇彬 (1956—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为分子药理学与肿瘤药理学。