

· 药理与临床 ·

雷氏大疣蛛毒素对人肝癌细胞 SMMC-7721
细胞增殖及细胞周期的影响孙 捷¹, 高 莉^{2*}, 沈永青³, 单保恩⁴

(1. 河北医科大学科技总公司, 河北 石家庄 050017; 2. 河北师范大学生命科学学院, 河北 石家庄 050016;
3. 河北省人民医院 肿瘤科, 河北 石家庄 050051; 4. 河北医科大学第四医院 科研中心, 河北 石家庄 050011)

摘要: 目的 探讨雷氏大疣蛛 *Macrothele raveni* 毒素对人肝癌细胞 SMMC-7721 增殖及细胞周期的抑制作用, 进一步探讨其作用的分子机制。方法 采用 MTT 法测定雷氏大疣蛛毒素对 SMMC-7721 细胞增殖作用的影响; 采用 [³H]-TdR 掺入法检测雷氏大疣蛛毒素作用前后 SMMC-7721 细胞 DNA 合成的变化; 采用流式细胞术 (FCM) 探讨雷氏大疣蛛毒素对 SMMC-7721 细胞凋亡率和细胞周期的影响; 采用 Western Blot 方法研究雷氏大疣蛛毒素对细胞周期相关 c-myc 蛋白表达的影响。结果 MTT 方法表明雷氏大疣蛛毒素对 SMMC-7721 细胞增殖有较强的抑制作用 ($P < 0.05$), 时效和量效关系良好。雷氏大疣蛛毒素可以抑制 SMMC-7721 细胞 DNA 的合成。流式细胞仪检测结果发现雷氏大疣蛛毒素作用后 SMMC-7721 细胞凋亡率增加, 细胞周期阻滞在 G₂/M 期。Western Blot 方法进一步检测到雷氏大疣蛛毒素作用 SMMC-7721 细胞 72 h 后, c-myc 蛋白表达减弱。结论 雷氏大疣蛛毒素可以抑制人肝癌细胞 SMMC-7721 的增殖和 DNA 的合成, 其机制可能是诱导细胞凋亡, 使细胞周期相关 c-myc 蛋白表达减弱, 导致细胞周期的变化。

关键词: 雷氏大疣蛛毒素; SMMC-7721 细胞; c-myc 蛋白

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)01-0074-04

Effect of spider venom from *Macrothele raveni* on proliferation and cell cycle
of human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721SUN Jie¹, GAO Li², SHEN Yong-qing³, SHAN Bao-en⁴

(1. Science and Technology Company, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; 2. College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China; 3. Department of Oncology, People's Hospital of Hebei Province, Shijiazhuang 050051, China; 4. Research Centre, The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of spider venom from *Macrothele raveni* on proliferation and cell cycles of human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 and the molecular mechanism of the effect. **Methods** Proliferation of SMMC-7721 cells was determined by MTT assay. DNA synthesis of SMMC-7721 cell pre- and post-treatment with spider venom from *M. raveni* was tested by [³H]-TdR assay. The induction of apoptosis and the change of cell cycle in SMMC-7721 cells treated with spider venom from *M. raveni* were investigated by Flow Cytometry. The effect of spider venom from *M. raveni* on expression of c-myc protein in SMMC-7721 cells was studied by Western Blot. **Results** MTT assay showed that the proliferation of SMMC-7721 cells *in vitro* was inhibited by spider venom from *M. raveni* ($P < 0.05$) in time-dependent and concentration-dependent manners. The DNA synthesis of SMMC-7721 cells was inhibited by spider venom from *M. raveni*. The apoptosis and inhibition of SMMC-7721 cells in the G₂/M phase were induced after treated with the spider venom from *M. raveni*. Expression of c-myc protein in SMMC-7721 cells treated with spider venom from *M. raveni* for 72 h was obviously down-regulated. **Conclusion** Spider venom from *M. raveni* could inhibit the proliferation and DNA synthesis of SMMC-7721 cells. The potential mechanisms are to induce cell apoptosis, activate the lower expression of c-myc protein and change the cell cycle of SMMC-7721 cells.

Key words: spider venom from *Macrothele raveni* Zhu, Li & Song; SMMC-7721 cells; c-myc protein

收稿日期: 2005-05-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30371753); 河北省教育厅科研项目 (2004110); 河北师范大学科研基金资助

作者简介: 孙 捷(1969—), 女, 江苏徐州人, 医学硕士, 主管药师, 主要从事抗肿瘤药理学研究。

* 通讯作者 高 莉 Tel: (0311) 6268655 6033941-290 Fax: (0311) 6992004 E-mail: gao10823@yahoo.com.cn

近年来,在动物毒素的抗肿瘤作用研究中,关于蛇毒的研究比较多。而关于蜘蛛毒素对肿瘤细胞的作用的研究很少。仅有赵维勒等^[1]报道穴居狼蛛毒的某些组分对培养的人肺腺癌细胞(SPC-A)的致伤作用明显但却没有探讨作用机制。本研究的目的在于研究雷氏大疣蛛 *Macrothele raveni* Zhu, Li & Song 毒素对人肝癌细胞株 SMMC-7721 增殖的抑制作用和对细胞周期的阻滞作用及利用 MTT 法、 $[^3\text{H}]$ -TdR 掺入法、流式细胞术和 Western Blot 方法从细胞水平和分子水平探讨其作用机制。

1 材料

人肝癌细胞株 SMMC-7721,由河北医科大学第四医院科研中心提供。RPMI-1640 培养基和胰蛋白酶为 Gibco 公司产品;胎牛血清为杭州四季青生物工程材料有限公司产品; $[^3\text{H}]$ -TdR 购自中国原子能研究所;MTT、SDS、Triton X-100、戊二醛、2-巯基乙醇、EDTA、木瓜蛋白酶抑制剂和碘化丙啶(PI)均购自 Sigma 公司;第一抗体为 c-myc、GAPDH 鼠抗人单克隆抗体(Santa Cruz, 美国);第二抗体为辣根过氧化物酶标记的抗鼠 IgG 抗体,购自中山生物技术公司。滤器为 Nippon Millipore Ltd 产品;96 孔培养板为美国 Costar 公司产品;TC2323 型 CO₂培养箱为美国 Sheldon 公司产品;LH50A 型倒置相差显微镜为日本 Olympus 产品;SW-CJ-IF 型净化工作台为苏净集团苏州安泰空气技术有限公司产品;酶标仪为 Bio-Rad 公司产品;Backman CoulterTM 型液闪仪(LS6500 型,美国);流式细胞仪 FACSscan, Becton-Dickinson, 美国。ECL 增强化学发光系统和硝酸纤维素膜购自英国 Amersham 公司。

雷氏大疣蛛毒素购于广西南宁市南方蜘蛛研究所。其制备方法是:用空心软管诱导雷氏大疣蛛,待其螯牙扎入软管排毒后,用一次性注射器吸取。立即放入冷冻干燥机中冻干。实验时,用 RPMI-1640 培养基溶解,一次性小滤器滤过除菌。

2 方法

2.1 肿瘤细胞悬液制备:将 SMMC-7721 细胞从液氮中取出经复苏后,培养在 RPMI-1640 完全培养液中(含 10%~20% 胎牛血清,青霉素和链霉素各 100 U/mL 及 0.03% 谷氨酰胺)。置于 37℃、饱和湿度、5% CO₂培养箱中培养,隔日换液,待细胞进入对数生长期后,贴壁细胞弃去上清液,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗两遍,用 0.25% 胰蛋白酶消化,传代细胞。

2.2 雷氏大疣蛛毒素对人肝癌细胞 SMMC-7721 的体外抑制作用(MTT 法)^[2]:将 1×10^5 /mL SMMC-7721 细胞悬液接种于 96 孔培养板,每孔 100 μL ,分别加入 PBS(阴性对照)及不同终质量浓度(10、20、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的蜘蛛毒素各 10 μL ,每组均设 6 个复孔。置于饱和湿度、37℃、5% CO₂培养箱中培养 72 h,各培养孔加入 5 mg/mL MTT 10 μL ,4 h 后,弃去培养上清液,每孔加入 15% SDS 100 μL ,过夜。次日用酶联免疫检测仪检测各孔吸光度(A)值,测定波长为 570 nm,参考波长为 630 nm,计算生长抑制率。

$$\text{生长抑制率} = (1 - A_{\text{实验}}/A_{\text{对照}}) \times 100\%$$

2.3 $[^3\text{H}]$ -TdR 掺入试验:接种 SMMC-7721 细胞至 24 孔培养板,培养 4 h 使细胞贴壁生长,无血清 DMEM 培养 24 h 使细胞生长同步化于 G₀/G₁期。细胞分成 4 组,每组设 4 个复孔。24 h 后每孔加入 10 μL $[^3\text{H}]$ -TdR (3.7×10^4 Bq),继续培养 12 h。加入不同终质量浓度(0、10、20、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的雷氏大疣蛛毒素继续培养 24、48、72 h。培养结束后,弃去培养液,用 PBS 100 μL 洗涤 3 次,0.1 mol/L NaOH 裂解细胞。用 ZT—型微量细胞收集仪抽滤 96 孔板底部的细胞,收集至 G49 型玻璃纤维滤纸上,用磷酸盐缓冲液洗涤 2 次。将玻璃纤维滤纸在 90℃下烘干后放入含 5 mL 闪烁液的闪烁瓶内,暗处静置 24 h。于 BACKMAN—L1600 型液闪仪中,测定脉冲数(cpm)。

2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡率和细胞周期:采用 PI 染色法。实验组 10、20、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 雷氏大疣蛛毒素作用 SMMC-7721 细胞 72 h 后(阴性对照组只加等量 PBS),分别收集各组细胞,每组各设 6 个复孔,PBS 清洗 1 遍。注入预冷 70% 乙醇,固定 18 h。离心弃乙醇后用 PBS 洗 1 次。加入 RNA 酶 37℃作用 1~2 h,加入 Triton X-100 PI (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 100 μL ,混匀置冰上 30 min 后,在流式细胞仪上检测。每组实验重复 3 次。

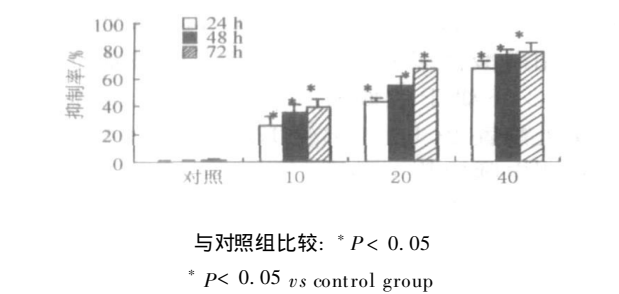
2.5 Western Blot 试验:细胞处理同 2.2 项方法。用细胞刮刮下各实验组及对照组(只加 PBS),PBS 洗 2 次,弃去洗液并吸干残液;以 200 μL 裂解液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 g/L SDS, 1 mmol/L DTT)裂解细胞,离心收集上清液。用改良的 RIPA 缓冲液(含 2 mmol/L EDTA、50 mmol/L 氟化钠、0.1 mmol/L 钒酸钠,1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 亮抑制肽和 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 木瓜蛋白酶抑制剂)稀释,测定蛋白的量。每个样品取 10 μL 蛋白质,加入 1×凝胶电泳缓冲

液 100 μL , 沸水煮 5 min。将定量的蛋白提取物上清液至 15% SDS-PAGE 80 V 电泳 3 h, 经 100 V 转移 2 h 至硝酸纤维素膜, 用 10% 脱脂奶粉封闭 1 h, 然后用相应的一抗 (c-myc), 4 $\times$ 孵育 12 h, 用辣根过氧化物酶标记的二抗进行标记, 使用增强化学发光系统检测反应蛋白, X 线胶片显影。采用凝胶成像分析仪 (GDS8000, 英国 UVP) 对 X 线胶片上的条带进行峰下体积相对密度分析。

2.6 统计学处理: 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较用 t 检验, 组间数据用双因素方差分析 (F 检验)。应用 The SAS system 6.12 统计软件计算。所有实验结果均重复 3 次。用凝胶成像及分析系统软件分析基因在雷氏大疣蛛毒素作用 SMMC-7721 细胞前后表达情况的差异。

3 结果

3.1 雷氏大疣蛛毒素对 SMMC-7721 细胞的增殖抑制作用的时效和量效关系: 图 1 结果显示, 与阴性对照组比较, 雷氏大疣蛛毒素对 SMMC-7721 细胞的增殖具有抑制作用, 并有良好的量效和时效关系, 随着药物质量浓度的降低和时间的减少, 抑制率逐渐下降。



与对照组比较: * $P < 0.05$
* $P < 0.05$ vs control group
图 1 雷氏大疣蛛毒素对 SMMC-7721 细胞增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 1 Inhibition of spider venom from *M. raveni* on SMMC-7721 cell proliferation ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

3.2 雷氏大疣蛛毒素对 SMMC-7721 细胞 DNA 合成的影响: 采用 [^3H]-TdR 掺入法观察不同质量浓度的雷氏大疣蛛毒素作用 SMMC-7721 细胞 24、48、72 h 后, 对细胞 DNA 合成的影响。结果见表 1。雷氏大疣蛛毒素作用 24 h 能明显抑制 SMMC-7721 细胞 DNA 的合成, 差异显著 ($P < 0.05$)。作用 48、72 h 没有显著抑制作用。

3.3 雷氏大疣蛛毒素对 SMMC-7721 细胞凋亡率的影响: 经过雷氏大疣蛛毒素作用 72 h 后, 用流式细胞仪检测, SMMC-7721 细胞凋亡率明显增加 (表 2), 与对照组比较差异显著 ($P < 0.05$)。

3.4 雷氏大疣蛛毒素对 SMMC-7721 细胞周期的

影响: 雷氏大疣蛛毒素对 SMMC-7721 细胞的周期分布均有影响, SMMC-7721 细胞 G_2/M 期明显升高, G_0/G_1 期升高不明显, S 期明显下降 (表 2)。

表 1 雷氏大疣蛛毒素对 SMMC-7721 细胞 DNA 合成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 1 Effect of spider venom from *M. raveni* on SMMC-7721 cell DNA synthesis ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组 别	ρ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	[^3H]-TdR 掺入量 (cpm)		
		24 h	48 h	72 h
对照	—	3 907 $\pm$ 73.24	4 232 $\pm$ 121.59	4 967 $\pm$ 110.31
雷氏大疣蛛毒素	10	3 116 $\pm$ 83.09*	4 029 $\pm$ 118.36	4 784 $\pm$ 131.51
	20	2 472 $\pm$ 51.63*	3 923 $\pm$ 94.38	4 529 $\pm$ 143.79
	40	2 006 $\pm$ 91.47*	3 651 $\pm$ 101.46	4 482 $\pm$ 117.58

与对照组比较: * $P < 0.05$
* $P < 0.05$ vs control group

表 2 雷氏大疣蛛毒素对 SMMC-7721 细胞凋亡和细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of spider venom from *M. raveni* on apoptosis and cell cycles of SMMC-7721 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组 别	ρ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	细胞周期分布/%			细胞凋亡率/%
		G_0/G_1	S	G_2/M	
对照	—	60.3 $\pm$ 2.1	26.5 $\pm$ 1.7	13.0 $\pm$ 2.4	0.7 $\pm$ 0.16
雷氏大疣蛛毒素	10	63.0 $\pm$ 2.3	20.3 $\pm$ 2.6*	16.5 $\pm$ 3.1*	3.6 $\pm$ 0.24*
	20	65.8 $\pm$ 3.1	11.9 $\pm$ 2.0*	22.3 $\pm$ 2.1*	7.2 $\pm$ 0.30*
	40	66.2 $\pm$ 2.5	6.0 $\pm$ 1.5*	27.6 $\pm$ 1.9*	14.0 $\pm$ 0.22**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

3.5 雷氏大疣蛛毒素对 SMMC-7721 细胞 c-myc 蛋白表达的影响: Western Blot 分析发现, 经 10、20、40 $\mu\text{g/mL}$ 雷氏大疣蛛毒素作用 72 h 后, 以灰度分析比较, SMMC-7721 细胞中的 c-myc 蛋白表达受到抑制, 且表现为明显的质量浓度依赖关系。结果见表 3。

表 3 雷氏大疣蛛毒素对 SMMC-7721 细胞中 c-myc 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of spider venom from *M. raveni* on expression of c-myc protein in SMMC-7721 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组 别	ρ / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	c-myc/GAPDH
对照	—	0.9 $\pm$ 0.07
雷氏大疣蛛毒素	10	0.7 $\pm$ 0.14*
	20	0.5 $\pm$ 0.08*
	40	0.4 $\pm$ 0.11*

与对照组比较: * $P < 0.05$
* $P < 0.05$ vs control group

4 讨论

雷氏大疣蛛是于 2000 年发现的一个新种^[3], 目前仅有关于雷氏大疣蛛毒素— 的分离纯化与利用

大鼠蛛网膜下腔给药方式进行初步的神经毒素鉴定的报道^[4]。迄今还没有关于雷氏大疣蛛毒素对肿瘤细胞抑制作用的研究报道。本研究使用人肝癌细胞株 SMMC-7721 作为腺源性代表细胞株,用雷氏大疣蛛毒素进行体外抑瘤实验。结果表明,雷氏大疣蛛毒素对人肝癌细胞株 SMMC-7721 有增殖抑制作用,且抑制作用有浓度依赖性。

细胞分裂增殖的实质就是 DNA 的复制,通过细胞不断经历细胞周期来实现。而细胞周期受细胞内信号传导和多种因素的精细调节。特别是 G₂/M 期细胞对外界环境因素敏感并能被刺激,从而加快或减缓细胞增殖。当细胞周期发生障碍时,细胞增殖将受到抑制,而 DNA 合成障碍是细胞周期发生障碍的较常见的原因。本研究中流式细胞仪测定结果显示,经雷氏大疣蛛毒素作用后, SMMC-7721 细胞周期发生了变化,其中 G₂/M 期细胞增多, S 期细胞减少,说明雷氏大疣蛛毒素的作用在 G₂/M 期。用同位素 [³H]-TdR 作为 DNA 合成的前身物质,加入到培养液中,从细胞摄取 [³H]-TdR 的多少,借助放射性活性测定方法来确定雷氏大疣蛛毒素对 SMMC-7721 细胞 DNA 合成的影响。实验结果表明雷氏大疣蛛毒素明显抑制 SMMC-7721 细胞 DNA 的合成。以上结果提示,雷氏大疣蛛毒素抑制

SMMC-7721 细胞的增殖,是通过抑制细胞 DNA 合成,作用于 SMMC-7721 细胞株的 G₂/M 期,从而阻滞细胞周期的进程来实现的。

以 Western Blot 实验进行检测与细胞增殖周期关系密切的 c-myc 蛋白的表达情况,发现 c-myc 蛋白表达减弱,浓度关系依赖性明显。所以可进一步推测:雷氏大疣蛛毒素药理作用机制之一可能是使 SMMC-7721 细胞周期相关蛋白 c-myc 表达减弱,导致细胞周期阻滞。

经过本研究证实,蜘蛛毒素抑制肝癌细胞的增殖确实是一个崭新的科研领域,具有基础理论与医疗实践双重意义。

References:

- [1] Zhao W L, Ji H F, Xu K. Cytopathic action of spider (*Lycosa singoriensis*) venom and its fraction on the cultured human lung adenocarcinoma cell (SPC-A₁) [J]. *Zool Res* (动物学研究), 1991, 1: 67-71.
- [2] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application and cytotoxicity assay [J]. *J Immunol Methods*, 1983, 65: 55-63.
- [3] Zhu M S. A species of Genus *Macrothele* (Araneae: Hexathekidae) from China [J]. *J Hebei Univ* (河北大学学报), 2000, 4: 358-361.
- [4] Zheng X Z, Liang S P. Purification and preliminary toxin research of raven toxin-₁, a neurotoxic peptide from the venom of the spider *Macrothele raveni* [J]. *Life Sci Res* (生命科学研究), 2001, 3: 217-220.

四逆汤有效部位抗心肌缺血-再灌注损伤作用

孙慧兰, 吴伟康*, 罗汉川, 梁天文

(中山大学 中西医结合研究所、中山大学基础医学院病理生理教研室, 广东 广州 510080)

摘要:目的 考察四逆汤有效部位抗心肌缺血-再灌注损伤的作用。方法 实验动物随机分为正常组、模型组、四逆汤组、四逆汤有效部位组。大鼠心脏进行 Langendorff 灌流,通过控制灌流液流量建立心肌缺血-再灌注损伤模型,用药组在灌流液中加入相应药液,测定再灌注后 50 min 的冠脉流量、心肌收缩力和再灌注 1 min 内心律失常发生率。小鼠 ig 给药 3 d 后 ip 垂体后叶素 (20 U/kg) 造模,记录 0~8 min 的心电图,并取心肌测 SOD 活性、MDA 及 LA 水平。结果 四逆汤和四逆汤有效部位均可不同程度地提高大鼠心肌缺血-再灌注损伤心肌收缩力恢复率、降低再灌注 1 min 心律失常发生率,四逆汤有效部位对心肌收缩力的恢复作用较好,四逆汤对心律失常发生的抑制较好;四逆汤和四逆汤有效部位均可明显地降低小鼠心肌缺血-再灌注损伤过程中的心电图 J 点抬高,明显提高心肌组织 SOD 活性,降低 MDA 和 LA 水平,四逆汤和四逆汤有效部位作用无明显差异。结论 四逆汤有效部位可以显著地改善心肌缺血-再灌注损伤过程中的氧化损伤和抑制无氧酵解,改善心肌收缩功能和心律失常。

关键词: 四逆汤;有效部位;心肌缺血-再灌注损伤;垂体后叶素

中图分类号: R 286.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)01-0077-05

* 收稿日期: 2005-05-30

基金项目: 211 工程“重点建设项目课题 (98176); 广东省高教厅资助; 广东省中医药管理局科研基金资助项目 (100118)

作者简介: 孙慧兰 (1972—), 女, 山西太原人, 中山大学中西医结合研究所、中山大学基础医学院病理生理教研室讲师, 博士, 主要从事中西医结合及心血管病理生理学研究。Tel: (020) 87331624 E-mail: hanna_sun@163.com

* 通讯作者 吴伟康 Tel: (020) 87331624 Fax: (020) 87331779