

体外血小板聚集,其作用与加入药物的质量浓度呈剂量依赖关系,且质量浓度为 25.0 μg/L 的 VSRN 对血小板聚集的抑制作用与 40 mg/L 的 LAS 相近。见表 3。

表 3 VSRN 对大鼠体外血小板聚集的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=10)

Table 3 Effect of VSRN on *in vitro* platelet aggregation of rats ($\bar{x} \pm s$, n=10)

组别	$\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	血小板聚集率/%	聚集抑制率/%
NS	—	68.74±5.13	—
VSRN	6.25	56.06±3.87**	18.5
	12.50	50.48±4.85**	26.6
	25.00	38.56±4.67**	44.0
	50.00	29.07±4.81**	57.8
LAS	40 000	39.25±3.67**	43.0

与 NS 组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs NS group

3 讨论

本实验研究采用经典的电刺激诱发大鼠颈总动脉血栓形成模型和瘀血诱发大鼠下腔静脉血栓形成模型以评价 VSRN 的抗动脉、静脉血栓作用。结果表明:VSRN 具有显著的血栓形成抑制效能和强大的抗血栓强度。本研究组在以往研究 VnA 时,曾发现其抗血栓有效剂量为 7.2~42.9 μg/kg,本次实验发现 VSRN 的抗栓有效剂量为 1.25~5 μg/kg。由此可见 VSRN 的抗栓作用强于 VnA^[8]。这些结果可以说明:VSRN 为 VnA 中重要抗栓活性成分。本研究中还发现 VSRN 在 5.00~20.00 μg/kg 剂量,其抗动脉血栓作用随剂量增加不仅不增加,反而降

低;但其抗静脉血栓作用强度与其剂量呈依赖关系,该现象的机制有待阐明。

本研究还表明 VSRN 尚具有强大的体内外血小板聚集抑制活性,这提示该活性成分的抗血栓作用与其抗血小板聚集作用有关。以上结果表明:乌苏瑞宁为乌苏里藜芦总碱中重要的抗栓活性成分之一。

References:

- [1] Han G Z, Li X Y, Lu L, et al. Pharmacokinetic profiles of *Veratrum nigrum* L. var. *ussuriense* Nakai alkaloids in rats [J]. *Asian J Drug Metab Pharmacokin*, 2001, 1(3): 169-174.
- [2] Jin X Y, Han G Z, Huang S S. Pharmacokinetics and cumulative toxicity of *Veratrum nigrum* var. *ussuriense* alkaloids in mice [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 2006, 22(3/4): 51-53.
- [3] Zhao W J, Tezuka Y, Kikuchi T, et al. Studies on the constituents of *Veratrum nigrum* L. var. *ussuriense*. Structure and ¹H- and ¹³C- nuclear magnetic resonance spectra of a new alkaloid, Verussurinine, and related alkaloids [J]. *Chem Pharm Bull*, 1991, 39(3): 549-554.
- [4] Tezuka Y, Kikuchi T, Zhao W J, et al. (+)-Verussurinine, a new steroidal alkaloid from the roots and rhizoma *Veratrum* var. *ussuriense* and structure revision of (+)-Verussurinine [J]. *J Nat Prod*, 1998, 61(11): 1397-1399.
- [5] Hladovec J. Experimental arterial thrombosis in rats with continuous registration [J]. *Throm Diath Haemorrhag*, 1971, 26: 407-410.
- [6] Reyers I. Failure of aspirin at different dose to modify experimental thrombosis in rats [J]. *Thromb Res*, 1980, 18: 669-675.
- [7] Born G V R. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal [J]. *Nature*, 1962, 194: 927.
- [8] Han G Z, Li X Y, Lü L, et al. Antithrombotic effects of *Veratrum nigrum* var. *ussuriense* alkaloids [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 349(12): 1107-1110.

眼镜蛇毒细胞毒素 CTX-d 诱导 NB4 细胞凋亡及其机制研究

陈 纯,陈崇宏*

(福建医科大学药学院 药理系,福建 福州 350004)

摘要:目的 探讨眼镜蛇毒细胞毒素 CTX-d 诱导 NB 细胞凋亡的机制。方法 MTT 法测定 CTX-d 体外细胞毒作用,电镜、流式细胞仪观察 CTX-d 对 NB4 细胞的诱导凋亡作用,流式细胞仪检测 NB4 细胞线粒体膜电位的变化,Western-blotting 测定胞浆细胞色素 C 及 caspase-9、caspase-3 的变化。结果 CTX-d 作用 NB4 细胞 6、12 h 的 IC₅₀ 分别为 1.8、1.35 μg/mL;CTX-d 引起 NB4 细胞线粒体肿胀、核固缩等形态学改变;诱导 NB4 细胞出现亚 G₁ 期的凋亡峰,且有时效及量效关系;CTX-d (1.0 μg/mL) 作用 0.5 h,NB4 细胞线粒体膜电位已开始下降,同时在胞浆中检测到细胞色素 C,显示细胞色素 C 已由线粒体释放入胞浆;caspase-9 酶原的量在 CTX-d (1.0 μg/mL) 作用 1 h 时开始下降,而活化的 caspase-3 片断在 0.5 h 即检测到,表明除了通过 caspase-9,CTX-d 还可能通过其他途径激活 caspase-3。结论 CTX-d 可通过降低线粒体膜电位、细胞色素 C 释放,激活 caspase-9 和 caspase-3,从而诱导 NB4 细胞凋亡,还可能通过其他途径激活 caspase-3,参与凋亡作用。

收稿日期:2007-05-17

作者简介:陈 纯(1972—),女,博士,讲师,专业方向为抗肿瘤药物药理。

Tel: (0591) 83756200 Fax: (0591) 83756200 E-mail: chenchun-0428@163.com

* 通讯作者 陈崇宏 E-mail: chench2008@163.com

关键词:眼镜蛇毒;细胞毒素(CTXs);凋亡;线粒体

中图分类号:R286.91

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)12-1838-05

Induction of CTX-d from cobra venoms on NB4 apoptosis and its mechanism

CHEN Chun, CHEN Chong-hong

(Department of Pharmacology, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of CTX-d from venoms of cobra (*Naja naja atra*) on inducing NB4 apoptosis and its mechanism. **Methods** MTT was used to detect the antitumor effect of CTX-d *in vitro*; Electron microscope and flow cytometry were used to observe the apoptotic inducing effect of CTX-d in NB4 cells; Mitochondrial transmembrane potential change ($\Delta\psi_m$) was analyzed by flow cytometry; The levels of caspase-9, caspase-3, and cytochrome C in the cytosol fraction were analyzed by Western blotting. **Results** The IC_{50} values of CTX-d affected on NB4 cell for 6 and 12 h were 1.8 and 1.35 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. CTX-d could induce morphological changes, such as condensed chromatin and swelling mitochondria in NB4 cells. Analyzed by flow cytometry, CTX-d induced apoptosis in NB4 cells evidenced by increasing sub G_1 cell population in a dose- and time-dependent manner. The mitochondrial membrane potential of NB4 cells had already decreased when incubated with CTX-d (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 0.5 h, and cytochrome C in the cytosol was detected simultaneously, which indicated the release of cytochrome C from mitochondria to cytosol. The caspase-9 was activated initially at 1 h after 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CTX-d treatment, whereas the cleavage of caspase-3 was detected at 0.5 h. This suggested that some other mechanism may be involved in caspase-3 activation. **Conclusion** The results suggest that the loss of mitochondrial membrane potential and the release of cytochrome C from the mitochondria into the cytosol are the early events of CTX-d on NB4 apoptosis. Once release into the cytosol, cytochrome C precedes the activation of caspase-9 and -3 to leading to the apoptosis and there are maybe some other mechanism involved in caspase-3 activation.

Key words: venoms of *Naja naja atra*; cytotoxins (CTXs); apoptosis; mitochondria

眼镜蛇毒细胞毒素(cytotoxins, CTXs)又称膜毒素,来源丰富,抗肿瘤作用强,在蛇毒抗肿瘤作用的研究中占首要地位^[1~3],但其作用机制仍不清楚。多数学者认为 CTXs 与细胞膜结合,依赖其特征性的空间结构“三指”插入细胞膜中形成孔道,可能影响细胞内外离子的平衡,引起细胞肿胀、破裂^[4~7]。最近由不同研究室的学者在激光共聚焦显微镜下分别观察到,CTX 在数分钟内进入线粒体并破坏线粒体结构^[8],以及 CTX 轻易进入活的肿瘤细胞内并浓集于溶酶体(Arseniev AS)^[9],且其中的量与 CTXs 的细胞毒作用密切相关,表明 CTXs 作为小分子多肽,确实能轻易地通过细胞膜,在极早期作用于胞内膜结构,由此提示 CTXs 影响线粒体及溶酶体等胞内膜结构的功能可能是其早期主要作用机制。研究显示线粒体是细胞凋亡调控的中心环节之一。线粒体感受多种刺激发生线粒体渗透性转变孔(MPTP)开放,释放膜间隙中的促凋亡蛋白细胞色素 C 和凋亡诱导因子 AIF 等。释放到细胞浆的细胞色素 C 在 dATP 存在的条件下能与凋亡蛋白酶激活因子-1 (Apaf-1) 结合,从而召集 caspase-9 形成凋亡体,被激活的 caspase-9 能激活下游的凋

亡效应分子 caspase-3,经蛋白水解级联作用引起细胞凋亡。

CTXs 在数分钟内即进入细胞内与线粒体结合,是否对线粒体信号通路有影响还不清楚。本研究从眼镜蛇毒中分离纯化得到不含磷脂酶 A_2 (PLA_2) 的 CTX-d,观察 CTX-d 对人早幼粒细胞白血病细胞株 NB4 的致凋亡作用,着重研究 CTX-d 对 NB4 细胞线粒体膜电位、细胞色素 C 的释放、caspase-9 及 caspase-3 的活性变化的影响,从线粒体信号途径入手,探讨 CTX-d 的细胞内作用机制。

1 材料

1.1 药物:CTX-d,经 CM-Sepharose FF 阳离子交换和 RP-HPLC (C_{18} 柱),从眼镜蛇粗毒中分离提纯获得不含 PLA_2 的 CTX-CTX-d,相对分子质量 6 800,质量分数为 98.4%。

1.2 细胞株:NB4 细胞株,福建医科大学附属协和医院血液研究所提供。

1.3 主要试剂:RPMI-1640 培养基,Gibco 公司;小牛血清,杭州江滨生物技术有限公司;MTT、NC 膜,上海华美产品;Rhodamine 123,Sigma 产品;一抗:细胞色素 C (sc-13560),Santa Cruz 产品;

caspase-3 (sc-7148), caspase-9 (sc-8355), Actin (sc-1616), 碱性磷酸酶标记的二抗及显色剂 BCIP/NBT 等均为北京中山产品;考马斯亮蓝蛋白定量试剂盒,南京建成生物工程研究所;其他生化制剂均为上海生工产品。

1.4 主要仪器:CO₂培养箱,SHEL LAB;趋净工作台;酶标仪,Thermo Labsystems;J2-21 低温高速离心机,Beckman;流式细胞仪 Epics XL, Coulter 公司。EC 250-90 电泳仪,DY CZ-40B 型转移电泳槽,北京六一仪器厂。

2 方法

2.1 MTT 法测定 CTX-d 对 NB4 细胞的抑制作用:NB4 细胞生长于含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液,于 37 °C、5% CO₂ 的饱和湿度条件下培养。取对数生长期的细胞以 2×10⁵/mL 的初始浓度接种于 96 孔培养板中,每孔 160 μL,加入 40 μL 不同质量浓度的 CTX-d (dH₂O 稀释),细胞对照组只加等量 RPMI-1640 培养液,空白对照组加 RPMI-1640 和等量 dH₂O,每组设 3 个平行孔。培养 6、12 h,每孔加 5 mg/mL MTT 20 μL,混匀后继续培养 4 h,每孔加裂解液 (10% SDS,5% 异丁醇,12 mmol/L HCl) 100 μL,混匀,裂解过夜,以空白对照组调零,在 492 nm 波长下测定各孔吸光度 (A) 值,计算细胞生长抑制率,再以线性回归方程计算其 IC₅₀。

生长抑制率 = (1 - 药物组平均 A 值 / 细胞对照组平均 A 值) × 100%

2.2 电镜观察超微结构:NB4 细胞经加药处理后,离心 (2 000×g, 10 min) 收集细胞,加电镜固定液,常规包埋、超薄切片、染色后,在透射电镜下观察。

2.3 流式细胞仪 DNA 倍体分析:NB4 细胞加药后分别培养 3、6 h,各组细胞均用 4 °C PBS 洗两次,70% 乙醇 4 °C 固定过夜,再用 PBS 洗涤 1 次,离心,弃上清,碘化丙啶 (PI) 染色,室温避光孵育 20 min,流式细胞仪检测,用 Multicycle for Windows 软件进行 DNA 分析,以 DNA 的量低于 G₁ 期的亚 G₁ 期细胞为凋亡细胞。每组样本数 3。

2.4 线粒体膜电位测定:Rhodamine 123 是一种阳离子亲脂性荧光染料,能选择性地为线粒体所吸收,其吸收值随线粒体跨膜电位的改变而改变,因此根据细胞的荧光强度可反映线粒体跨膜电位的变化。实验方法参考文献方法^[10],NB4 细胞加药作用,不同时间点离心收集细胞,PBS 清洗两次,重悬细胞,

加入 Rhodamine 123 (终质量浓度为 10 μg/mL),37 °C 共同孵育 30 min,PBS 清洗 2 次,上流式细胞仪检测荧光强度。每组重复 3 次。

2.5 Western blotting 测定:NB4 细胞经药物作用后,收集细胞,以 PBS 洗两次,转入 EP 管,3 000×g 离心 5 min,弃上清,加入裂解缓冲液 (3×10⁶ 细胞加 100 μL 裂解液),轻吹打,于 4 °C 裂解 30 min,细胞色素 C 以 12 000×g 离心 30 min,caspase-3、caspase-9 以 10 000×g 离心 10 min,吸出上清,蛋白定量,每个样品加等量 2×上样缓冲液,沸水浴 5 min 后备用,按照每个样品上样蛋白量为 30 μg,均以 1×上样缓冲液调节至 20 μL,上 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (浓缩胶 4%,分离胶 12%)。电泳后转膜,140 mA 4 h,NC 膜以丽春红染色观察转膜效果,并标出各标准相对分子质量的位置,以蒸馏水漂洗脱色,再加入含 5% 脱脂奶粉的封闭液 4 °C 封闭过夜,加一抗,室温作用 2 h,PBS 洗 2 次,TBS 洗 1 次,加碱性磷酸酶标记的二抗,室温作用 1 h,TBS 洗 3 次,加入底物 BCIP/NBT 显色。结果用图像分析仪进行条带密度分析,并计算与 β-actin 的密度比。

细胞色素 C 所用裂解液:250 mmol/L Sucrose,20 mmol/L Hepes-KOH,pH 7.5,10 mmol/L KCl,1.5 mmol/L MgCl₂,1 mmol/L EDTA,1 mmol/L DTT,0.1 mmol/L PMSF,用于胞质蛋白提取。

Caspase-9、caspase-3 所用裂解液:50 mmol/L Tris-HCl,pH 8.0,150 mmol/L NaCl,1 mmol/L PMSF,1 mmol/L Aprotinin,1% NP-40,用于总蛋白提取。

2.6 统计分析:实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 DAS 软件进行 *t* 检验。

3 结果

3.1 CTX-d 体外细胞毒作用:CTX-d 对 NB4 细胞株具有明显的生长抑制作用,6、12 h 的 IC₅₀ 分别为 1.8、1.35 μg/mL,结果见表 1。

表 1 CTX-d 对 NB4 细胞的生长抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, n=3)

Table 1 Growth inhibition of CTX-d on NB4 cell lines ($\bar{x} \pm s$, n=3)

药物质量浓度/ (μg · mL ⁻¹)	生长抑制率/%	
	6 h	12 h
4	88.1	95.8
2	51.6	65.2
1	28.3	37.4
0.5	11.3	19.3
IC ₅₀	1.80	1.35

3.2 形态学观察:CTX-d (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 作用 3 h, 部分细胞核染色质凝聚、边缘化等(图 1-A) 典型凋亡改变;线粒体肿胀明显,内嵴消失(图 1-B),显示 CTX-d 可早期作用于 NB4 细胞线粒体,并引起凋亡样改变。

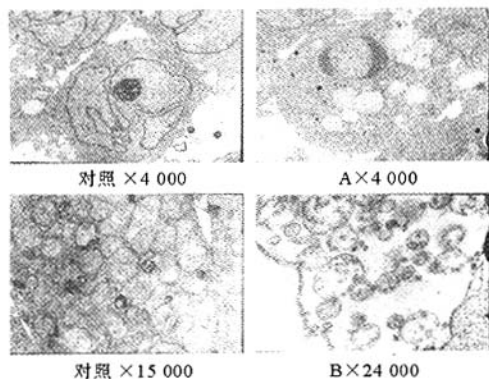
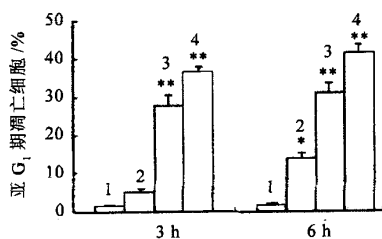


图 1 CTX-d (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 作用 3 h NB4 细胞电镜图

Fig. 1 Electron micrograph of NB4 cells treated by CTX-d (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 3 h

3.3 流式细胞仪 DNA 分析结果:各组 NB4 细胞经处理后上流式细胞仪进行 DNA 分析 (Multicycle 软件处理) 显示:0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CTX-d 作用 3 h,亚 G₁期细胞增多不明显;1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CTX-d 作用 3 h,出现明显的亚 G₁期凋亡峰。CTX-d (0.5、1.0、1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 作用 6 h 均出现亚 G₁期凋亡峰,并与剂量成正相关,与对照组比较差异显著(图 2)。



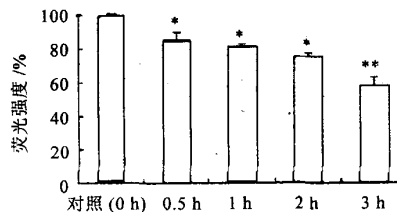
1-对照组 2~4-CTX-d 0.5、1.0、1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$
1-control group 2~4-CTX-d 0.5, 1.0, and 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$
与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

图 2 CTX-d 对 NB4 细胞的诱导凋亡作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Induction of CTX-d on NB4 apoptosis ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.4 线粒体膜电位的变化:MPTP 的开放常通过检测线粒体跨膜电位的变化来反映。采用流式细胞仪检测 NB4 细胞内 Rhodamine 123 的荧光强度,以荧光强度反映跨膜电位的变化,结果显示,CTX-d

(1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 作用 0.5 h,NB4 细胞跨膜电位已开始下降,随着作用时间延长,下降程度逐渐加大,3 h 最明显 (41.9% \pm 6.7% 的细胞荧光强度降低,见图 3),表明 CTX-d 作用在线粒体上,引起线粒体跨膜电位下降,MPTP 开放。



与对照组 (0 h) 比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

图 3 CTX-d (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 作用不同时间 NB4 细胞线粒体膜电位的变化 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Mitochondrial membrane potential changes of NB4 cells treated by CTX-d (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for different times ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.5 Western blotting 结果:见图 4。经 CTX-d (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 处理 0.5 h,NB4 细胞胞浆中检测到细胞色素 C,且在 3 h 内随着作用时间延长,胞浆中的量逐步增多。显示在 CTX-d 作用早期,细胞色素 C 即由线粒体释放入胞浆,发生时间及变化趋势与线粒体膜电位的下降相符。

NB4 细胞中 caspase-9 酶原的量在 CTX-d 作用 0.5 h 时无明显变化。作用 1 h caspase-9 酶原的量开始下降,表明 caspase-9 被活化。活化的 caspase-3 片段 (17 000) 在 CTX-d 作用 0.5 h 即检测到;作用 3 h,活化片段明显增加。表明 CTX-d 作用 0.5 h 时,caspase-9 尚未被活化,caspase-3 已激活。

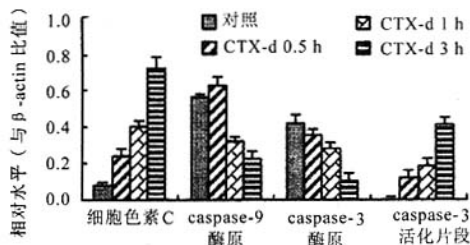


图 4 CTX-d (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 作用 0.5、1、3 h 对 NB4 细胞中 caspase-9、caspase-3 及胞浆细胞色素 C 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Effect of CTX-d (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) on caspase-9, caspase-3, and cytochrome C in cytosol fraction of NB4 cells treated for 0.5, 1, and 3 h ($\bar{x} \pm s, n=3$)

4 讨论

本实验结果显示 CTX-d 对人早幼粒白血病细胞 NB4 具有促凋亡作用。本实验在电镜下观察到, CTX-d (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 作用于 NB4 细胞 3 h, 即出现典型凋亡改变及线粒体结构改变。NB4 细胞经不同剂量 CTX-d 处理后上流式检测, 作用 3 h, 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CTX-d 出现明显的亚 G_1 期凋亡峰; 作用 6 h, CTX-d (0.5、1.0、1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 均出现亚 G_1 期凋亡峰, 并与剂量成正相关。可见, 诱导凋亡是 CTX-d 对 NB4 细胞的早期主要作用, 且 CTX-d 对 NB4 细胞的诱导凋亡作用具有剂量依赖及时间依赖关系。Chia 等^[11]报道, CTX 对神经元细胞的作用以凋亡为主, 对心肌细胞和胶质细胞以坏死为主。Feofanov^[12]等从眼镜蛇毒中分离的 CTX 可致 HL60 细胞坏死。本实验结果显示 CTX-d 作用早期, NB4 细胞以凋亡为主。

近年来的研究还表明, 诱导肿瘤细胞凋亡是许多抗癌药物的作用机制之一。凋亡主要有两条途径: 一条是胞外信号激活细胞膜表面 Fas/FasL 受体 (CD95), 从而激活 caspases 酶级联反应; 另一条是通过线粒体途径激活 caspases。本实验首次证实 CTX-d 对 NB4 细胞线粒体信号通路的影响: CTX-d (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 作用 0.5 h, NB4 细胞线粒体膜电位已开始下降, 细胞色素 C 由线粒体释放入胞浆, 膜电位的下降与细胞色素 C 的释放两者变化趋势相符。另外, caspase-9 酶原的量在 CTX-d (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 作用 1 h 时开始下降, 而活化的 caspase-3 片断 (17 000) 在 0.5 h 即检测到, 表明除了通过 caspase-9, CTX-d 还可能通过其他途径激活 caspase-3。结果显示, CTX-d 可通过降低线粒体膜

电位、细胞色素 C 释放、caspase-9 被活化、激活 caspase-3 等诱导凋亡, 还可能通过其他途径激活 caspase-3, 参与凋亡作用。

References:

- [1] Chaim-Matyas A, Borkow G, Ovadia M. Isolation and characterization of a cytotoxin P4 from the venom of *Naja nigricollis nigricollis* preferentially active on tumor cells [J]. *Biochem Int*, 1991, 24: 415-421.
- [2] Kaneda N, Hayashi K. Separation of cardiotoxins (cytotoxins) from the venoms of *Naja naja* and *Naja naja atra* by reversed-phase high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr*, 1983, 281: 389-392.
- [3] Ohkura K, Inoue S, Ikeda K, et al. Amino-acid sequences of four cytotoxins (cytotoxins I-IV) purified from the venom of the Thailand cobra, *Naja naja siamensis* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1988, 954(2): 148-153.
- [4] Efremov R G, Volynsky P E, Arseniev A S, et al. Interaction of cardiotoxins with membranes: a molecular modeling study [J]. *Biophys J*, 2002, 83(1): 144-153.
- [5] Forouhar F, Huang W N, Liu J H, et al. Structural basis of membrane-induced cardiotoxin A3 oligomerization [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 21980-21988.
- [6] Dubovskii P V, Lesovoy D M, Arseniev A S, et al. Interaction of three-finger toxins with phospholipid membranes: comparison of S- and P-type cytotoxins [J]. *Biochem J*, 2005, 387: 807-815.
- [7] Sue S C, Chen K Y, Huang W N, et al. Heparin binding stabilizes the membrane-bound form of cobra cardiotoxin [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 2666-2673.
- [8] Wang C H, Wu W G. Amphiphilic beta-sheet cobra cardiotoxin targets mitochondria and disrupts its network [J]. *FEBS Lett*, 2005, 579(14): 3169-3174.
- [9] Feofanov A V, Sharonov G V, Arseniev A S, et al. Cancer cell injury by cytotoxins from cobra venom is mediated through lysosomal damage [J]. *Biochem J*, 2005, 390(1): 11-18.
- [10] Zhu Y G, Chen X C, Chen Z Z, et al. Curcumin attenuates tert-butyl hydroperoxide induced oxidative damage in cortical neurons [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2004, 20(10): 1153-1157.
- [11] Chia H W, Robert M, Shao C L, et al. Cobra cardiotoxin-induced cell death in fetal rat cardiomyocytes and cortical neurons: different pathway but similar cell surface target [J]. *Toxicol*, 2005, 46: 430-440.
- [12] Feofanov A V, Sharonov G V, Dubinnyi M A, et al. Comparative study of structure and activity of cytotoxins from venom of the Cobras *Naja oxiana*, *Naja kaouthia*, and *Naja haje* [J]. *Biochemistry*, 2004, 69: 1148-1157.

甜菜碱对 HepG₂ 人肝癌细胞 [Ca²⁺]_i 和细胞膜电位的影响

季宇彬, 杨红丹, 高世勇, 何立巍

(哈尔滨商业大学 生命科学与环境科学研究中心 药物研究所博士后科研工作站, 黑龙江 哈尔滨 150076)

摘要:目的 研究甜菜碱对肝癌 HepG₂ 细胞内游离 Ca²⁺ 浓度 ([Ca²⁺]_i) 和细胞膜电位的影响。方法 Fluo-3/AM 标记, 激光扫描共聚焦显微镜观察 HepG₂ 细胞 [Ca²⁺]_i, TMRE 标记, 激光扫描共聚焦显微镜测定细胞膜电位的影响。结果 甜菜碱能够升高 HepG₂ 细胞 [Ca²⁺]_i, 降低细胞膜电位。升高 [Ca²⁺]_i 的强度具一定的剂量依赖性, 随甜菜碱剂量的增大而升高。甜菜碱 50、25 mg/mL 组与对照组比较差异非常显著 ($P < 0.01$), 甜菜碱 12.5 mg/mL 组

收稿日期: 2007-06-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30400352); 教育部重点项目 (205045); 黑龙江省自然科学基金资助项目 (D200611); 黑龙江省研究生创新基金资助项目 (YJSCX2006-0077HSD)

作者简介: 季宇彬 (1956—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为肿瘤药理学研究。

眼镜蛇毒细胞毒素CTX-d诱导NB4细胞凋亡及其机制研究

作者: 陈纯, 陈崇宏, CHEN Chun, CHEN Chong-hong
作者单位: 福建医科大学药学院, 药理系, 福建, 福州, 350004
刊名: 中草药 **ISTIC** **PKU**
英文刊名: CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS
年, 卷(期): 2007, 38(12)
被引用次数: 2次

参考文献(12条)

1. Chaim-Matyas A;Borkow G;Ovadia M Isolation and characterization of a cytotoxin P4 from the venom of Naja nigricollis nigricollis preferentially active on tumor cells 1991
2. Kaneda N;Hayashi K Separation of cardiotoxins (cytotoxins) from the venoms of Naja naja and Naja naja atra by reversed-phase high-performance liquid chromatography[外文期刊] 1983
3. Ohkura K;Inoue S;Ikeda K Amino-acid sequences of four cytotoxins (cytotoxins I-IV) purified from the venom of the Thailand cobra, Naja naja siamensis 1988(02)
4. Efremov R G;Volynsky P E;Arseniev A S Interaction of cardiotoxins with membranes:a molecular modeling study[外文期刊] 2002(01)
5. Forouhar F;Huang W N;Liu J H Structural basis of membrane-induced cardiotoxin A3 oligomerization [外文期刊] 2003(24)
6. Dubovskii P V;Lesovoy D M;Arseniev A S Interaction of three-finger toxins with phospholipid membranes:comparison of S-and P-type cytotoxins[外文期刊] 2005(part 3)
7. Sue S C;Chen K Y;Huang W N Heparin binding stabilizes the membranebound form of cobra cardiotoxin [外文期刊] 2002
8. Wang C H;Wu W G Amphiphilic beta-sheet cobra cardiotoxin targets mitochondria and disrupts its network[外文期刊] 2005(14)
9. Feofanov A V;Sharonov G V;Arseniev A S Cancer cell injury by cytotoxins from cobra venom is mediated through lysosomal damage[外文期刊] 2005(01)
10. Zhu Y G;Chen X C;Chen Z Z Curcumin attenuates tert-butyl hydroperoxide induced oxidative damage in cortical neurons[期刊论文]-中国药理学通报 2004(10)
11. Chia H W;Robert M;Shao C L Cobra cardiotoxininduced cell death in fetal rat cardiomyocytes and cortical neurons:different pathway but similar cell surface target 2005
12. Feofanov A V;Sharonov G V;Dubinnyi M A Comparative study of structure and activity of cytotoxins from venom of the Cobras Naja oxiana, Naja kaouthia, and Naja haje[外文期刊] 2004

本文读者也读过(10条)

1. 朱蔚云, 梁敏仪 中华眼镜蛇毒膜毒素对荷瘤小鼠S180细胞增殖和Bcl-2表达的影响[期刊论文]-广州医学院学报 2003, 31(2)
2. 庄权权, 许云禄, Zhuang Quanquan, Xu Yunlu 眼镜蛇毒细胞毒素类免疫毒素研究进展[期刊论文]-中国药业 2008, 17(17)
3. 卢康荣, 孔天翰, 董伟华, LU Kang-rong, KONG Tian-han, DONG Wei-hua 眼镜蛇毒组分抑制人神经胶质瘤U251细胞增殖及其机制研究[期刊论文]-中国病理生理杂志2011, 27(7)

4. 陈瑜, 王玥, 黄燕愉, 许云禄, CHEN Yu, WANG Yue, HUANG Yan-yu, XU Yun-lu 舟山眼镜蛇毒细胞毒素的克隆及原核表达[期刊论文]-海峡药学2010, 22(5)
5. 陈志奎, 林礼务, 林琦, 庄权权, 何以救, 薛恩生, CHEN Zhi-kui, LIN Li-wu, LIN Qi, ZHUANG Quan-quan, HE Yi-mi, XUE En-sheng 眼镜蛇毒细胞毒素缓释微球制备及体外性质研究[期刊论文]-中国生化药物杂志2008, 29(3)
6. 李晓东, 徐建良, 姜楠, 盛国光 内毒素对大鼠肝细胞线粒体膜电位的影响及黄芪注射液的干预作用[期刊论文]-中西医结合肝病杂志2005, 15(6)
7. 陈瑜 舟山眼镜蛇毒细胞毒素的克隆、表达及免疫学活性鉴定[学位论文]2009
8. 王计良, 蔺俊文, 史泽晋, 台英杰, 任洁, 何毅刚, 黄华元, 何世勇, WANG Ji-liang, LIN Jun-wen, SHI Ze-jin, TAI Ying-jie, REN Jie, HE Yi-gang, HUANG Hua-yuan, HE Shi-yong 水飞蓟素对同型半胱氨酸诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡的抑制作用[期刊论文]-中国病理生理杂志2007, 23(3)
9. 曾源, 龙超良, 慕邵峰, 李艳芳, 汪海 二氮嗪对大鼠心肌线粒体膜电位及呼吸功能的影响[期刊论文]-中国临床药理学与治疗学2004, 9(5)
10. 紫芪方对IEC-6小肠上皮细胞缺氧复氧损伤后细胞凋亡及线粒体膜电位的影响[期刊论文]-中国药业2005, 14(10)

引证文献(2条)

1. 王志东, 李宗芳, 张澍, 代志军, 李君, 梁容瑞, 王宝太, 袁爱华 野菊花提取物对人肝癌MHCC97H细胞增殖和凋亡的影响[期刊论文]-中华肝胆外科杂志 2010(4)
2. 李胜杰, 胡忠良, 郭向莹, 徐幸莲 细胞凋亡对肌肉宰后嫩化的贡献[期刊论文]-食品工业科技 2010(4)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zcy200712028.aspx