

银环蛇粗毒若干有效组分对 SWO 细胞的作用

刘洁生^{1*}, 邢少璜², 陈勇¹, 杨维东¹

(1. 广州暨南大学生命科技学院, 2. 广州暨南生物医药研究开发基地, 广东 广州 510632)

摘要: 目的 测定银环蛇毒素组分是否抑制人神经胶质瘤细胞 SWO 的生长, 以及确定抑制的原因是诱导凋亡或是杀伤。方法 用 MTT 和流式细胞术等方法探讨银环蛇粗毒及其有效组分对人神经胶质瘤细胞 SWO 的作用。结果 MTT 试验结果显示, SWO 细胞对银环蛇粗毒、第Ⅲ峰毒素、 α -银环蛇毒素(α -BTX)的作用比较敏感, 同时 SWO 细胞比 3T3 细胞更敏感。SWO 对其他组分的作用不敏感。3 种毒素作用于 SWO 细胞, 流式细胞术检测未见凋亡峰。结论 银环蛇粗毒、第Ⅲ峰毒素、 α -BTX 对 SWO 细胞有杀伤作用, 无凋亡作用。

关键词: 银环蛇; 银环蛇毒素类; 神经胶质瘤

中图分类号: R979.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2003)04-0286-03

银环蛇毒是神经毒, 其抗肿瘤作用已有许多研究^[1,2], 但研究主要集中在对消化道和呼吸系统恶性肿瘤的作用方面文献, 研究对于神经胶质瘤的作用作者目前尚未见报道。本研究的目的主要在于确定银环蛇毒素是否能诱导神经胶质瘤细胞 SWO 凋亡, 或者只是杀伤作用, 以及查找出银环蛇粗毒中导致 SWO 细胞凋亡或杀伤的毒素组分。

1 材料与方 法

1.1 细胞与试剂

SWO 神经胶质瘤细胞、K562 和 3T3 细胞由暨南大学医学院病理实验室提供。银环蛇粗毒购自江西樟树养蛇场, α -银环蛇毒素(α -bungarotoxin, α -BTX)

标准品购自美国 Sigma 公司。羧甲基-纤维素 52 购自美国 Whatman 公司, 分离纯化蛋白 Sephadex G-100 购自 Pharmacia 公司。低分子量标准蛋白从 Gibco BRL 公司购得。细胞培养基 RPMI 1640, 美国 HyClone 公司, 小牛血清则购自杭州四季青公司。显色剂噻唑蓝(MTT)、碘化丙啶(PI)染料均购自 Sigma 公司。

1.2 α -银环蛇毒素的分离、纯化及鉴定

羧甲基-纤维素 52 柱分离银环蛇粗毒^[3], 收集各峰毒素, 浓缩, 脱盐。Sephadex G-100 分离纯化第Ⅲ峰毒素, 收集各峰毒素, 浓缩, 脱盐。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺电泳技术(SDS-PAGE)测定蛋白质分子量, Lowry 法测定蛋白含量。昆明小鼠, 18~22 g, ♀♂各半, 每组 10 只, 改良寇氏法测定 LD₅₀。

1.3 银环蛇粗毒及其有效组分 α -银环蛇毒素对 SWO 细胞的体外实验

MTT 法测定 IC₅₀: 将终浓度 $5 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 对数生长期的细胞接种于 96 孔细胞培养板, 每孔 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$, 体积分数为 0.05 的 CO₂ 孵箱培养 24 h。空白对照组(不加任何液体)、阴性对照组(不加药物)、阳性对照组[5 mg·L⁻¹ 的放线菌酮环己酰亚胺, (cycloheximide, CHX) 加到 K562 细胞中]及银环蛇毒素组(按不同浓度加样, 银环蛇粗毒的始浓度为 1 g·L⁻¹, 各峰毒素的始浓度为 0.6 g·L⁻¹, α -BTX 的始浓度为 0.1 g·L⁻¹, 然后均按 5 倍递减稀释)。CO₂ 孵箱继续培养 12, 24, 36, 48 或 72 h。取出培养板, 每孔加 5 g·L⁻¹ MTT 10 μL , 4 h 后每孔加 10% SDS 100 μL , CO₂ 孵箱培养过夜, 取出测吸光度值(A), 测量波长为 570 nm, 参比波长为 630 nm, 计算癌细胞生长抑制率, 绘制曲线, 求出细胞生长抑制 50% 时的药物浓度, 即 IC₅₀, 表示细胞对药物的药敏性。

1.4 流式细胞仪实验

分组方法同 MTT 实验, 收集细胞, 2000 × g 离心 5 min, 弃上清, PBS 洗 2~3 次, 70% 乙醇固定 30 min 以上。将固定的细胞以 4000 × g 离心 5 min, PBS 洗 1~2 次, 沉淀物悬浮于 0.5 mL 的 PI(含 RNA 酶)中, 避光放置 10 min, 200 目筛网过滤, 上流式细胞仪。

收稿日期: 2002-08-07 接受日期: 2003-02-26

作者简介: 刘洁生(1957-), 男, 江西省九江市人, 工学博士, 教授, 主要从事神经生物学研究。

* 联系作者 E-mail: xingjs@163.net (020)85222706-

1.5 统计学处理

实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异采用成组 t 检验。

2 结果

2.1 银环蛇粗毒的分离纯化及鉴定

江西产银环蛇粗毒经羧甲基纤维素 CM-52 柱层析共得到 10 个峰, SDS-PAGE 电泳, 可得到 10 多条蛋白带, 分子量最小的为 6.5 ku, 最大蛋白带的则为 40 ku^[3]。所用的银环蛇粗毒及其若干毒素组分(Ⅲ峰、Ⅳ峰、Ⅵ峰、Ⅶ峰和Ⅷ峰)的 LD₅₀ 与 Chang 等^[4]所分离毒素的 LD₅₀ 相似, 提示粗毒及各组分毒性保持良好(表 1)。

2.2 毒素对 SWO 细胞株杀伤的时效关系

随着毒素对 SWO 细胞作用时间的延长, 粗毒、

第Ⅲ峰的时效关系较为显著, α -BTX 最为显著, 其 IC₅₀ 12 h 的量是 48 h 的 3.24 倍, 而其他毒素的 IC₅₀ 与作用时间长短无明显依存关系, 部分毒素(Ⅵ峰、Ⅶ峰、Ⅷ峰、Ⅸ峰毒素)由于毒性甚小, 无法得出 IC₅₀ (表 2 中未列出)。72 h 时毒素 IC₅₀ 与 48 h 没有很大差异(表 2)。

正常纤维细胞 3T3 细胞无论对银环蛇粗毒还是经分离提纯的第Ⅲ峰毒素, 其药敏性均低于 SWO 细胞。说明银环蛇毒素对不同细胞的杀伤力不同。

2.3 流式细胞仪检测

图 1A 中箭头 a 所指为坏死细胞, 箭头 b 所指为凋亡细胞, 可以看出, 凋亡细胞数量明显少于坏死细胞, 图 1B 中未见凋亡峰。表明 24 mg·L⁻¹ 第Ⅲ峰毒素只杀伤细胞, 不诱导细胞凋亡。而且增殖峰也很低, 提示杀伤细胞的同时抑制细胞增殖。

图 1C 为 40 mg·L⁻¹ 粗毒毒素 DNA 含量分布组方图, 图 1D 为 4 mg·L⁻¹ α -BTX DNA 含量分布组方图。不同浓度、不同毒素作用于 SWO 细胞, 作用 12, 24, 36, 48 或 72 h, 取其 R2 区域作图, 均得到类似于上述 3 种浓度毒素 DNA 含量分布组方图(图略)。

Tab 1. The LD₅₀ of crude venom and its components

Component	LD ₅₀ /μg·g ⁻¹
Crude venom	0.176 ± 0.022
Peak Ⅲ	0.149 ± 0.054
Peak Ⅳ	0.130 ± 0.052
Peak Ⅵ	0.151 ± 0.064
Peak Ⅶ	0.251 ± 0.121
Peak Ⅷ	0.418 ± 0.260
Peak Ⅸ	0.516 ± 0.102
Peak X	0.135 ± 0.052

Kunming mice were given ip crude venom or its components. LD₅₀ of each peak protein was calculated by Karber's. $\bar{x} \pm s$, $n = 10$.

3 讨论

本实验所用的阳离子交换剂为羧甲基纤维素 52, 分离得到 10 个蛋白峰, 采用凝胶层析从第Ⅲ峰毒素分离纯化得到 α -BTX。各种毒素纯度较高, 毒性保持良好。MTT 比色法和流式细胞术分析结果显示, 银环蛇毒素组分可能不诱导 SWO 细胞凋亡, 只诱导杀伤, 其杀伤死亡率是药物成分纯度和药物剂量依赖的, 而且对不同细胞有不同的杀伤作用。

Tab 2. IC₅₀ of different toxin incubated with SWO cells for different time

Toxin	IC ₅₀ /g·L ⁻¹				
	12	24	36	48	72(h)
Crude venom	1.321 ± 0.096	0.961 ± 0.078	0.782 ± 0.028	0.461 ± 0.052* (2.120 ± 0.019)	0.462 ± 0.033
Peak Ⅲ	0.791 ± 0.035	0.613 ± 0.021	0.436 ± 0.033	0.290 ± 0.031* (0.794 ± 0.081)	0.288 ± 0.022
Peak Ⅳ	-	2.893 ± 0.082	2.546 ± 0.121	2.502 ± 0.143	2.220 ± 0.098
Peak X	-	-	4.720 ± 0.124	4.562 ± 0.133	4.672 ± 0.126
α -BTX	0.068 ± 0.011	0.044 ± 0.009	0.038 ± 0.006	0.021 ± 0.002** (0.203 ± 0.024)	0.020 ± 0.003

MTT bioassay was used to test the cytotoxicity. 5×10^4 cells incubated with the crude venom, peak Ⅲ, peak Ⅳ, peak X, α -BTX standard respectively for 12, 24, 36, 48 and 72 h. IC₅₀ values were calculated from curves constructed by plotting inhibitory rate of cell (%) versus the semilogarithm of drug concentration. The data in parentheses are the IC₅₀ values on 3T3 cell. $\bar{x} \pm s$, $n = 5$.

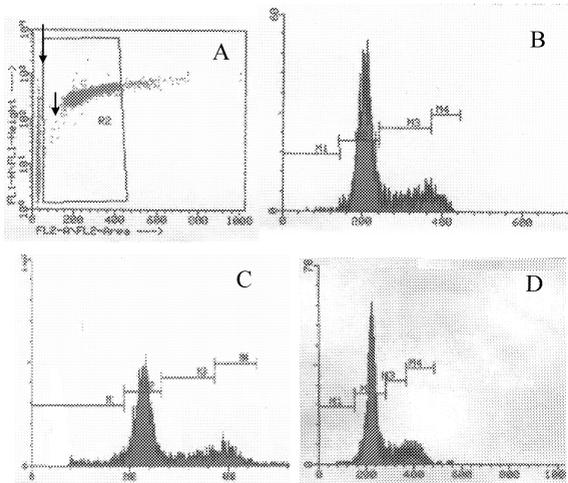


Fig 1. DNA analysis of the peak III-induced apoptosis on SWO cells by flow cytometry after incubation for 48 h. A, B: $24 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ peak III toxin; C: $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ crude venom; D: $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ α -BTX.

上述结果提示,银环蛇毒素是通过杀伤 SWO 细胞而不是诱导细胞凋亡来抑制其增殖,其杀伤作用可能是有选择性的。正在进行的实验发现,毒素作用后的细胞表面出现许多小孔,提示毒素可能通过改变细胞膜的构象,造成物质泄漏,导致肿瘤细胞死

亡。这与毒素只杀伤细胞的结果相符。但这还需要进一步的实验证明。毒素对不同细胞杀伤力不同,这可能与不同细胞表面受体不同或细胞表面受体种类数量差异有关。

4 参考文献:

[1] Apel C, Ricny J, Wagner G, Wessler I. α -Bungarotoxin, κ -bungarotoxin, α -cobratoxin and erabutoxin-b do not affect [^3H]acetylcholine release from the rat isolated left hemidiaphragm [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1995, **352**(6):646 - 652.

[2] Grant GA, Luetje CW, Summers R, Xu XL. Differential roles for disulfide bonds in the structural integrity and biological activity of κ -bungarotoxin, a neuronal nicotinic acetylcholine receptor antagonist [J]. *Biochemistry*, 1998, **37**(35):12166 - 12171.

[3] Liu JS, Chang XB, Wang ZF, Chang H, Chen SQ. κ -Neurotoxin basic component of *Bungarus multicinctus* venom [J]. *J Jinan Univ (Nat Sci)* [暨南大学学报(自然科学版)], 1994, **15**(3):129 - 136.

[4] Chang CC, Lee CY. Isolation of neurotoxins from the venom of *Bungarus multicinctus* and their modes of neuromuscular blocking action [J]. *Arch Int Pharmacodyn*, 1963, **144**:241 - 254.

Effect of several venom components of *Bungarus multicinctus* on SWO cells

LIU Jie-Sheng¹, XING Shao-Jing², CHEN Yong¹, YANG Wei-Dong¹

(1. Life Science and Technology College, Jinan University, 2. Guangzhou (Jinan) Bio-Medicine Research and Development Centre, Guangzhou 510632, China)

Abstract: **AIM** To determine the cytotoxicity of the venom components, and if it is induced by apoptosis. **METHODS** MTT bioassay was used to test the growth of the tumor cell. The apoptotic effect was detected by flow cytometry. **RESULTS** SWO cells were sensitive to crude venom, peak III toxin and standard α -bungarotoxin, whereas other venom components showed no effect on SWO cells. IC_{50} of three effective toxins on SWO cells was lower than IC_{50} on control NIH3T3 cells. The

sub-G1 (apoptosis) peak did not appear in flow cytometry. **CONCLUSION** The crude venom and peak III toxin from *Bungarus multicinctus* showed cytotoxicity on glioma cells, but no apoptosis was observed.

Key words: *Bungarus multicinctus*; bungarotoxins; glioma

(本文编辑 乔虹)