



蝎毒多肽提取物对 A549 细胞增殖抑制作用机制研究

王晓慧¹, 王兆朋¹, 张月英¹, 贾青¹, 王朝霞¹, 张捷², 张维东^{1*}

(1. 山东省医学科学院 基础医学研究所 病理室, 山东 济南 250062;

2. 山东省立医院 中心实验室, 山东 济南 250001)

[摘要] 目的: 观察蝎毒多肽提取物(PESV)对非小细胞肺癌细胞株 A549 的增殖抑制作用及可能的作用机制。方法: 采用噻唑蓝(MTT)法观察不同浓度 PESV 对 A549 细胞生长与增殖的影响, 下游实验将对数生长期的 A549 细胞分为阴性对照组、PESV 低、中、高剂量组, 应用流式细胞术、免疫细胞化学法、Western blot 法检测 PESV 干预后细胞周期及 VEGF, HIF-1 α 和 PTEN 蛋白表达的变化。结果: MTT 结果显示, PESV 在一定浓度范围内对 A549 细胞的增殖活性有明显抑制作用($P < 0.01$)。流式细胞法、免疫细胞化学法及 Western blot 法结果显示, PESV 干预后能使 A549 细胞阻滞于 G₀/G₁ 期, 并显著下调 HIF-1 α , VEGF 表达, 上调 PTEN 表达。结论: PESV 能够抑制 A549 细胞的增殖, 其作用机制可能与影响血管生成因子 VEGF, HIF-1 α 和 PTEN 的表达而直接抑制细胞增殖、阻滞细胞周期和抑制血管生成有关。

[关键词] 蝎毒多肽提取物; 非小细胞肺癌; 血管生成因子; 细胞周期; 细胞增殖

肺癌死亡率自 20 世纪 70 年代至 90 年代上升幅度达 111.85%, 为所有恶性肿瘤中最高。其中非小细胞肺癌占肺癌总数的 80%, 为最常见的肺癌病理类型^[1], 目前临床上常用中西医结合治疗非小细胞肺癌。近年来的研究已经证明, 蝎毒多肽提取物(PESV)对多种肿瘤细胞有直接抑制作用及抗肿瘤血管生成作用^[2-3], 但对于非小细胞肺癌细胞生长与增殖的影响尚未见文献报道, 本文检测 PESV 干预后 A549 细胞增殖、细胞周期和血管生成信号通路中 VEGF, HIF-1 α 和 PTEN 蛋白表达的变化, 研究 PESV 抑制非小细胞肺癌细胞增殖的作用及机制。

1 材料

1.1 药物与细胞的培养 取蝎毒冻干粉溶解(pH 7.4), 离心, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 将超滤物冻干。蝎毒冻干粉 400 mg 加磷酸缓冲液上样后经葡萄糖凝胶, 收集蝎毒 III ~ IV 蛋白峰, 再进行阳离子交换色

谱, 最后经紫外分光光度计(吸收波长 280 nm)检测, 收集 PESV 的蛋白峰。HPLC 图显示 PESV 有 4 个峰, 主峰占总面积的 41.4%。PESV 为含有 50 ~ 60 个氨基酸的多糖混合物, 纯度约为 89.1%, 相对分子质量 6 000 ~ 7 000, pH 稳定^[2]。PESV 用 RPMI-1640 完全培养基溶解稀释。人肺腺癌 A549 细胞株购自中国医学科学院, 培养在含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养液中, 培养条件为 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂ 饱和湿度的培养箱。

1.2 试剂与仪器 MTT, DMSO 为 Sigma 公司产品; RPMI-1640, 新生小牛血清和胰酶购于美国 Gibco 公司。VEGF 和 HIF-1 α 多克隆抗体购于北京博奥森生物技术有限公司, PTEN 单克隆抗体和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术有限公司, 山羊抗兔 IgG/辣根酶标记二抗, DAB 和 SABC 试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司。美国 Spectramax 酶标仪, 德国 Leica 倒置显微镜, 德国 LeicaDM4000B 光学显微镜, 德国 LeicaDM 公司 QwinV₃ 图像分析软件, 日本 Image Reader LAS-4000 凝胶成像仪, Multi gaugeV3.2 图像分析软件。

2 方法

2.1 MTT 法检测不同药物浓度对 A549 细胞增殖的抑制情况 取对数生长期细胞制成细胞悬液 1×10^5 个/mL, 接种于 96 孔板中, 每孔加细胞 1×10^4

[稿件编号] 20110914008

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81073102, 30873408); 山东省自然科学基金项目(ZR2010HQ003, 2009ZRC03044); 济南市科学技术发展计划(201004012)

[通信作者] *张维东, 研究员, Tel: (0531) 82919939, E-mail: zhangweidongkui@163.com

[作者简介] 王晓慧, 硕士研究生, E-mail: xiaohui_12345777@ sina.com



个。实验分阴性对照组(培养液和单细胞悬液)和实验组(培养液、单细胞悬液和 PESV), PESV 质量浓度为 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 150, 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 每组设 6 个复孔。细胞接种 24 h 后, 实验组加入不同浓度的 PESV, 阴性对照组细胞加入相同体积的培养液。继续培养 48 h 后, 加入 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MTT 20 μL , 继续培养 4 h 后弃上清, 每孔加入 150 μL DMSO 溶解液, 并在振荡器上振荡 5 min, 待结晶物质充分溶解后, 用酶标仪于 570 nm 波长下读取吸光度 A , 将空白孔调零, 细胞生长抑制率 = $(A_{\text{对照组}} - A_{\text{实验组}}) / A_{\text{对照组}} \times 100\%$ 。

2.2 流式细胞法检测 PESV 对 A549 细胞周期的影响 根据 MTT 实验结果, 选取 IC_{50} 下游的 3 个实验浓度。实验分阴性对照组, PESV 低、中、高剂量组 (50, 75, 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。细胞经过不同药物浓度处理 48 h 后, 消化离心收集细胞, PBS 液清洗, 收集细胞后微型振荡器打散细胞, 加入 600 μL PI 染液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光染色 30 min, 400 目尼龙网过滤后用 480 nm 波长光束分析细胞 DNA 总量, 每组至少分析 1×10^5 个细胞。

2.3 免疫细胞化学法检测 VEGF, HIF-1 α 及 PTEN 蛋白水平 实验分组同 2.2 项。染色过程按照 SABC 试剂盒说明书操作。

2.4 Western blotting 检测 将收集的肺癌细胞株提取总蛋白, BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白定量。每个加样孔上样量为 60 μg , SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白后转移到 PVDF 薄膜上, 经 5% 脱脂奶粉进行抗原封闭, 加入一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, HIF-1 α 和 VEGF 按 1:500 稀释, PTEN 按 1:1 000 稀释。TBST 洗膜后, 加入相应的二抗, 化学发光剂 ECL 显影。

2.5 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行数据处理。所有计量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。数据采用单因素方差分析两两比较法 (SNK 法) 以及 Pearson 相关性分析方法分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞形态学观察 A549 细胞株是常用的人肺癌细胞株, 未给药组细胞贴壁生长, 增殖较快, 镜下细胞形态呈多边形铺展状态, 排列规整, 细胞间隙明显。12.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上组细胞贴壁差, 细胞变圆变小, 且随剂量增大漂浮细胞亦增多, 细胞生长缓慢。

3.2 MTT 试验 与阴性对照组相比, PESV 以

6.25 ~ 12.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 作用于 A549 细胞 48 h 后, 抑制增殖作用不明显。但当 PESV 升到 25 ~ 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 抑制增殖作用明显增强 (图 1, $P < 0.01$)。25 ~ 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 剂量组之间两两比较差异显著 ($P < 0.01$), 总体呈剂量-效应关系, $r = 0.966$ 。

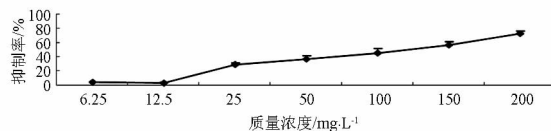


图 1 PESV 对 A549 细胞的增殖抑制作用

Fig. 1 Inhibit effect of PESV on proliferation of A549 cell lines

3.3 PESV 对 A549 细胞周期的影响 不同浓度 PESV 作用 A549 细胞 48 h 后, 随 PESV 浓度的升高, G_0/G_1 期细胞所占比例由对照组的 $(45.80 \pm 1.05)\%$ 逐渐增高至 $(68.30 \pm 0.53)\%$, S 期及 G_2/M 期细胞所占比例数也发生了明显变化 (表 1), 各浓度组与对照组相比有显著性差异 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 各浓度组间比较差异显著 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。提示 PESV 能使细胞周期阻滞于 G_0/G_1 期, 减少 S 期及 G_2/M 期的细胞比例, 且对细胞周期的影响具有剂量依赖性。

表 1 不同浓度的 PESV 作用 A549 细胞株 48 h 后细胞周期的改变 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

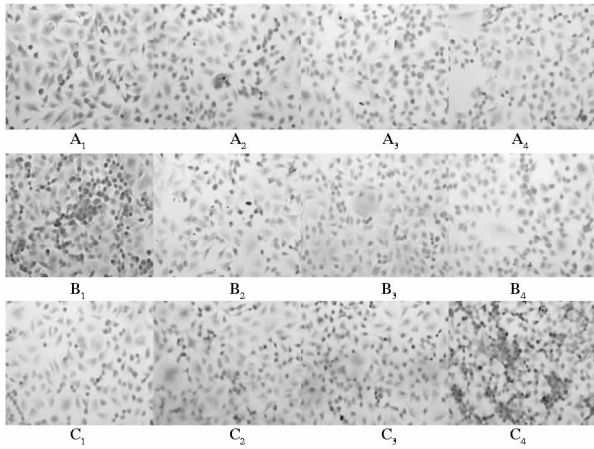
Table 1 The change of cell cycle in A549 cell lines after PESV interferent 48 h at different concentrations ($\bar{x} \pm s, n = 6$) %

组别	G_0/G_1	S	G_2/M
对照	45.80 ± 1.05	36.30 ± 1.13	17.90 ± 2.10
低剂量	$51.57 \pm 0.93^{2)}$	$34.43 \pm 0.47^{1)}$	$13.90 \pm 0.46^{2)}$
中剂量	$60.97 \pm 0.61^{2)}$	$28.03 \pm 1.45^{2)}$	$10.90 \pm 0.87^{2)}$
高剂量	$68.30 \pm 0.53^{2)}$	$23.20 \pm 0.26^{2)}$	$8.50 \pm 0.26^{2)}$

注: 与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

3.4 免疫细胞化学法检测 PESV 对 VEGF, HIF-1 α 和 PTEN 表达的影响 经 PESV 作用后, VEGF 阳性细胞表达百分比由 $(54.63 \pm 2.78)\%$ 下降为 $(39.33 \pm 1.55)\%$, 灰度值由 (96.83 ± 5.73) 上调至 (155.95 ± 7.62) ; HIF-1 α 阳性细胞表达百分比由 $(45.53 \pm 2.21)\%$ 下降为 $(31.57 \pm 1.10)\%$, 灰度值由 (102.87 ± 4.98) 逐渐上调至 (163.51 ± 5.97) , 各浓度组间比较差异显著 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且

VEGF 与 HIF-1 α 表达呈正相关($r = 0.912, P < 0.01$)。PTEN 蛋白表达水平由 (22.37 ± 1.46)% 上升至 (31.93 ± 1.80)%, 灰度值由 (170.40 ± 9.06) 下降至 (109.32 ± 11.11), 各组间比较差异显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。且 PTEN 的表达与 VEGF 和 HIF-1 α 显著负相关($r = -0.916, P < 0.01; r = -0.870, P < 0.01$) (图 2,3)。



1. 对照组; 2. PESV 低剂量组; 3. PESV 中剂量组; 4. PESV 高剂量组 (图 4 同); A. VEGF; B. HIF-1 α ; C. PTEN。

图 2 免疫细胞化学法示 PESV 干预后 VEGF, HIF-1 α 和 PTEN 表达的变化

Fig. 2 Immunocytochemical method show the express change of VEGF, HIF-1 α and PTEN after PESV interference

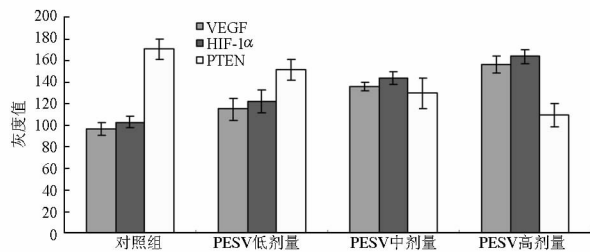


图 3 PESV 干预后 VEGF, HIF-1 α 和 PTEN 表达的灰度值

Fig. 3 Grey analysis of VEGF, HIF-1 α and PTEN expression after PESV interference

3.5 Western blotting 检测 VEGF, HIF-1 α 和 PTEN 表达的变化 与对照组相比, 经 PESV 不同浓度作用后, VEGF 和 HIF-1 α 的表达呈下降趋势, 而 PTEN 的表达呈上升趋势, 各浓度组间比较差异显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 验证了免疫细胞化学法的结果。PTEN 的表达与 VEGF 和 HIF-1 α 显著负相关($r = -0.947,$

$P < 0.01; r = -0.973, P < 0.01$) (图 4)。

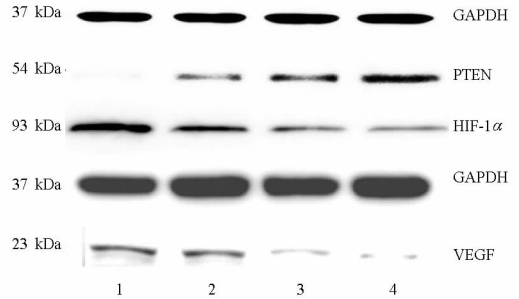


图 4 Western blotting 法结果示 VEGF, HIF-1 α 和 PTEN 表达的变化

Fig. 4 Western blotting method show the express change of VEGF, HIF-1 α and PTEN

4 讨论

肿瘤细胞快速增长导致低氧微环境, 低氧状态下肿瘤细胞内 HIF-1 α 水平急剧增加^[4], 对低氧应激反应产生的 HIF-1 α 表达能够在转录水平调节 VEGF 的表达^[5]。VEGF 是肿瘤及正常组织一个主要血管生成刺激因子, 可刺激内皮细胞脱离临近血管向刺激处迁移、增殖, 形成一个新的毛细血管网, 血管生成后有利于肿瘤的转移^[6], 它还可通过自分泌循环刺激肿瘤细胞增殖^[7], 其高表达与肿瘤患者的生存时间、浸润、转移及预后有关。HIF-1 α 对 VEGF 的调节主要是通过增强 VEGF 的转录活性与增加 VEGF mRNA 的稳定性, 它能够在基因水平上激活 VEGF 及其受体的表达, 在血管生成中的作用比单独的 VEGF 作用更重要。HIF-1 α 与 VEGF 之间存在着正相关性, 一个因子的表达会同时伴有另外因子的高表达, 它们的共表达随着肿瘤临床分期越晚, 其共表达率越高。Giattomanolaki 等^[8] 研究证实, HIF-1 α 和 VEGF 在多发骨髓瘤中的表达明显升高并相互影响。Hanze 等^[9] 报道, 利用 RNA 干扰技术沉默肺癌 A549 细胞 HIF-1 α 基因可使 VEGF mRNA 的表达明显减少。本实验研究结果也表明了 PESV 干预后 A549 细胞 HIF-1 α 和 VEGF 的表达同步减少且呈正相关。

PTEN 是一个肿瘤抑制基因, 可以通过抑制细胞周期、抑制肿瘤细胞侵袭和转移、抑制肿瘤血管形成等途径发挥其抑癌作用。它可阻断内皮细胞 VEGF mRNA 的表达^[10], 还可通过抑制 PI3K/Akt 途径, 抑制细胞生长和增殖, 并下调前列腺癌细胞和组织中 HIF-1 α 的表达^[11]。本研究结果也表明 PTEN



与 VEGF 和 HIF-1 α 的表达呈负相关。PTEN 抑制细胞周期的作用表现为诱导细胞 G₁ 期阻滞和凋亡, 抑制细胞生长和增殖。其阻滞细胞周期是通过抑制 PI3K/Akt 途径特异性诱导 p21, p27, p57 3 个 CDK 抑制蛋白实现的^[12]。各类细胞因子调控细胞增殖、细胞周期和血管生成的作用互相影响, 相互交错, 又极为复杂, PESV 调控血管生成因子对 A549 细胞增殖抑制的作用机制仍需进一步研究。

综上所述, PESV 能通过调控血管生成因子 VEGF, HIF-1 α 和 PTEN 的表达, 实现阻滞细胞周期、抑制血管生成而达到对肿瘤细胞的增殖抑制作用, 而抑制 VEGF 的表达也直接抑制了肿瘤细胞的增殖, 这可能是 PESV 抗肿瘤细胞增殖的作用机制。以上结果提示, PESV 中含有抑制肿瘤细胞增殖活性分子和抗血管生成因子。

[参考文献]

[1] Abidoye O, Ferguson M K, Salgia R. Lung carcinoma in African Americans[J]. Nat Clin Pract Oncol, 2007, 4(2):118.
[2] 张维东, 崔亚洲, 姚成芳, 等. 蝎毒多肽提取物抗肿瘤血管生成作用的实验研究[J]. 中国药理学通报, 2005, 21(6):708.
[3] 张维东, 崔亚洲, 贾青, 等. 蝎毒多肽提取物对小鼠 S180 肉瘤和 H22 肝癌血管生成抑制作用的实验研究[J]. 山东中医药大学学报, 2005, 29(2):152.
[4] Semenza G L. O₂-regulated gene expression: transcriptional control of cardio respiratory physiology by HIF-1[J]. J Appl Physiol,

2004, 96(3):1173.
[5] Bian C X, Shi Z, Meng Q, et al. P70S6K 1 regulation of angiogenesis through VEGF and HIF-1 α expression[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 398(3):395.
[6] Benest A V, Augustin A G. Cancer: blood vessels kept quiet[J]. Nature, 2009, 465(7234):41.
[7] Al-Dissi A N, Haines D M, Singh B, et al. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 in canine simple mammary gland adenocarcinomas[J]. Can Vet J, 2010, 51(10):1109.
[8] Giatromanolaki A, Bai M, Margaritis D, et al. Hypoxia and activated VEGF/receptor pathway in multiple myeloma[J]. Anticancer Res, 2010, 30(7):2831.
[9] Hanze J, Enl B G, Savai R, et al. RNA interference for HIF-1 α inhibits its downstream signaling and affects cellular proliferation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 312(3):571.
[10] Li Y M, Zhou B P, Deng J, et al. A hypoxia-independent hypoxia-inducible factor-1 activation pathway induced by phosphatidylinositol-3 kinase/Akt in HER2 overexpressing cells[J]. Cancer Res, 2005(8):3257.
[11] Fang J, Ding M, Yang L, et al. PI3K/PTEN/AKT signaling regulates prostate tumor angiogenesis[J]. Cell Signal, 2007, 19(12):2487.
[12] Yamada K M, Araki M. Tumor suppressor PTEN, modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis[J]. Cell Sci, 2001, 114(13):2375.

Mechanisms for inhibition effects of polypeptide extract from scorpion venom (PESV) on proliferation of A549 cell lines *in vitro*

WANG Xiaohui¹, WANG Zhaopeng¹, ZHANG Yueying¹, JIA Qing¹, WANG Zhaoxia¹, ZHANG Jie², ZHANG Weidong^{1*}
(1. Department of Pathology, Institute of Basic Medicine, Shandong Academy of Medical Science, Ji'nan 250062, China;
2. Department of Central Laboratory, Shandong Provincial Hospital, Ji'nan 250001, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanisms for inhibition effects of PESV on proliferation of non-small cell lung cancer cell line A549. **Method:** MTT was used to observe cell growth and proliferation of A549 at different concentrations of PESV. Flow cytometry (FCM) was applied to analyze cell cycle distribution. Immunocytochemistry and western blot assay was recruited to detect the expression of VEGF, HIF-1 α , PTEN after the intervention of PESV. **Result:** A549 cells may be arrested mainly in G₀/G₁ phase and cell proliferation was significantly inhibited ($P < 0.01$) after PESV intervention in a certain range of concentration. PESV can significantly reduce the expression of HIF-1 α , VEGF and increase the expression of PTEN. **Conclusion:** PESV can block cell cycle and inhibit angiogenesis directly to inhibit cell proliferation of non-small cell lung cancer cell line A549 mainly through reducing the expression of HIF-1 α , VEGF and increasing the expression of PTEN.

[Key words] PESV; non-small cell lung cancer; angiogenesis factor; cell cycle; cell proliferation

doi:10.4268/cjmm20121124