

【篇名】蝎毒素选择性诱导非霍奇金淋巴瘤细胞凋亡及其作用机制的研究

【作者】高芳

【学位类型】博士

【授予单位】山东大学,

【导师】陈学良

【年份】2009.

【摘要】研究背景和研究目的：恶性淋巴瘤是淋巴结或淋巴结外部分淋巴组织的免疫细胞肿瘤，一般分为霍奇金淋巴瘤(Hodgkin's Lymphoma)和非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's Lymphoma, NHL)两大类。我国霍奇金淋巴瘤的发病率总体较低，非霍奇金淋巴瘤是最常见的淋巴系统恶性肿瘤。据世界卫生组织统计，在我国近年来非霍奇金淋巴瘤的发病率呈上升趋势，在过去20年，它的发病率增加了75%，在发病率增长最快的肿瘤中位居第3位。因此NHL的防治工作一直是我国医药卫生领域的重点，寻找安全有效的药物是肿瘤治疗中的重要课题。近年来动物来源药物越来越受重视，充分利用我国动物资源开发新的抗肿瘤药物，成为肿瘤研究领域的重要内容。蝎毒作为中医传统药材已经应用几千年了。在中国第一部药典《本草纲目》中，全蝎被用于治疗多种疾病。蝎毒为传统药材全蝎的主要活性物质，存在于蝎尾部毒囊内，螫刺时由螫针排出。现代药理学研究表明，蝎毒主要由蛋白质和非蛋白质两部分组成，蝎毒的主要活性成分是蛋白质。蝎毒具有广泛的药理学性质，近年来国外对蝎毒的研究主要集中在膜通道阻滞的作用和抗毒素方面，罕见关于蝎毒抗肿瘤方面的研究报道，国内的研究侧重其抗肿瘤、抗风湿、抗癫痫、抗炎、纤溶、镇痛以及对心血管病的作用等方面；国内学者对蝎毒的抗肿瘤作用进行了较多研究，从蝎及蝎毒的抗肿瘤作用、蝎毒的成分和主要成分的药理作用、全蝎及蝎毒抗肿瘤的临床应用等方面分析，结果与结论显示，蝎毒可抑制多种人类肿瘤细胞生长，诱导肿瘤细胞凋亡。但是，蝎毒素对肿瘤细胞杀伤或生长抑制具有一定的肿瘤差异性，有一定的肿瘤谱；而且有关蝎毒抗肿瘤作用与靶细胞基因表达的关联问题目前未见文献报道，其诱导细胞凋亡的具体分子机制至今尚未完全阐明，这是一个值得探讨的领域。肿瘤的发生通常被认为是由于细胞原癌基因的激活和抑癌基因的失活，扰乱了正常的增殖、分化和凋亡的调控，导致细胞增殖过度而凋亡不足。PTEN(第10号染色体缺失性磷酸酶—张力蛋白同源性基因)基因是一种新发现的肿瘤抑制基因。它的蛋白产物具有脂磷酸酶活性，其主要作用底物是磷脂酰肌醇-3, 4, 5-三磷酸(PIP3)。PIP3是PI3K/Akt信号转导通路的关键性组分，负责刺激正常细胞生长以及抑制肿瘤细胞的生长。PTEN使PIP3形成PIP2，降低PIP3水平，抑制了Akt的活性，因此降低了Bad磷酸化，导致细胞的凋亡；促进了p27的表达，引起细胞周期停滞。已发现这种基因在淋巴瘤细胞中5%可发生突变，导致对肿瘤的生长失去抑制作用。非霍奇金淋巴瘤(NHL)作为我国最常见淋巴系统的恶性肿瘤，近年来虽然放疗、化疗及造血干细胞移植的有了极大发展，淋巴瘤的死亡率并没有降低。人们致力于寻找新的、疗效肯定、毒副作用小的化疗药物，尤其是作用于肿瘤发生环节的药物。为了探讨蝎毒在NHL，淋巴瘤治疗中的应用价值，我们研究了蝎毒对NHL，淋巴瘤细胞株Raji和Jurkat细胞及正常人外周血淋巴细胞增殖、细胞周期和凋亡的影响。通过采用分子生物学技术检测凋亡相关蛋白PTEN、Akt、p-Akt、Bad、p-Bad、p27和PTEN mRNA的改变，以进一步阐明蝎毒的抗肿瘤作用的分子机制。研究内容：1、蝎毒素诱导NHL细胞株Raji和Jurkat细胞凋亡的作用；2、蝎毒素对Raji和Jurkat细胞周期分布的影响；3、蝎毒素诱导Raji和Jurkat细胞凋亡的重要分子及信号通路；4、蝎毒素对Raji和Jurkat细胞周期相关蛋白的影响。研究方法：1. 甲基四唑蓝(MTT)法检测不同浓度、不同时间点蝎毒素(BmK)对NHL细胞株及人正常外周血淋巴细胞的抑制作用 选用NHL细胞株Raji和Jurkat及人正常外周血淋巴细胞为研究对象，采用台盼蓝染色，细胞计数仪计数，MTT法检测细胞存活率，由此确定各组的IC50值。2. 细胞凋

亡检测方法如下

- 2.1 倒置相差显微镜观察药物作用后细胞形态学变化;
- 2.2 Hoechst3342 荧光染色并利用荧光显微镜, 观察细胞核形态学变化;
- 2.3 Annexin V-FITC 和 PI 染色, 流式细胞仪 (FCM) 检测细胞凋亡情况, 计算细胞凋亡率;
- 2.4 LY294002 联合蝎毒素对细胞凋亡的影响

在蝎毒素作用细胞前 20 分钟加入终浓度对  $20\text{ }\mu\text{M}$  的 LY294002, 然后蝎毒素处理细胞 48 h, FCM 检测细胞凋亡率。

3. PI 染色流式细胞仪 (FCM) 检测细胞周期分布情况。
4. Western blot 进一步检测蝎毒素处理前后细胞周期、细胞凋亡及信号转导途径的相关蛋白 PTEN、Akt、p-Akt、Bad、p-Bad、p27 蛋白水平变化。
5. 半定量逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测 PTEN mRNA 的表达。
6. 统计学处理: 本实验所有数据用均数 $\pm$ 标准差表达, 实验组与对照组比较用 t 检验, 组间均数比较采用单因素方差分析。

研究结果:

1. 台盼蓝染色, 细胞计数仪计数和 MTT 法均显示: 蝎毒素对 NHL 细胞株 Raji 和 Jurkat 细胞具有生长的抑制作用, 呈浓度、时间相关性。蝎毒素对 NHL 细胞株和人外周血淋巴细胞 (PBLs) 作用 48 h 后, IC<sub>50</sub> 分别为  $275.40\text{ }\mu\text{g/ml}$  (Raji)、 $360.60\text{ }\mu\text{g/ml}$  (Jurkat) 和  $1110\text{ }\mu\text{g/ml}$  (PBLs), 各组间经统计学处理有显著性差异 ( $p<0.05$ )。以上结果提示: 蝎毒素对 NHL 细胞株 Raji 和 Jurkat 细胞的增殖抑制作用强于人外周血淋巴细胞 (PBLs), 低浓度 ( $\leq 500\text{ }\mu\text{g/ml}$ ) 时对 PBLs 细胞的生长抑制作用不明显。两种 NHL 细胞株中, Raji 细胞对蝎毒素较敏感, 强于 Jurkat 细胞。
2. 蝎毒对淋巴瘤细胞凋亡的影响:

- 2.1 倒置相差显微镜观察发现: 蝎毒处理 Raji 和 Jurkat 细胞 48 h 后, 细胞大小不一, 呈现细胞碎片及胞浆内颗粒增多等特征, 并最终死亡。
- 2.2 Hoechst3342 染色荧光显微镜检测发现: 与对照组相比, 蝎毒素处理组中 Raji 和 Jurkat 细胞核均呈现碎块状致密浓染, 荧光染色增强; 随着浓度增高, 凋亡小体产生, 符合凋亡的形态学改变。
- 2.3 Annexin V-FITC/PI 染色 FCM 检测显示: 蝎毒素能够诱导 Raji 和 Jurkat 细胞株凋亡, 其凋亡率随用药剂量增加而增加, 并且 Raji 细胞的早期凋亡率 ( $43\pm 7\%$ ) 明显高于 Jurkat 细胞 ( $24\pm 5\%$ ), 有统计学意义 ( $P<0.05$ )。蝎毒素作用 PBLs 细胞 48 小时后, 各浓度组凋亡率较空白对照组的差异未显示统计学意义 ( $P>0.05$ )。以上结果提示: 蝎毒素可选择性作用于 NHL 细胞株诱导其凋亡, 而对人正常外周血淋巴细胞影响较小。
3. PI 染色流式细胞仪 (FCM) 检测发现: 蝎毒素引起 NHL 细胞株 Raji 和 Jurkat 细胞 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期阻滞。
4. Western blot 检测发现: 蝎毒素促使 Raji 细胞 PTEN 蛋白表达增加, 同时 p-Akt、p-Bad 蛋白表达减少; 而对 Jurkat 细胞以上蛋白表达无影响。提示蝎毒素诱导 PTEN 蛋白表达上调, 且该 PTEN 蛋白为功能性蛋白, 可下调 Akt、Bad 磷酸化水平, 从而影响 PI3K/Akt 信号转导通路, 这可能是蝎毒素诱导 Raji 细胞凋亡的重要机制。
5. 为了进一步验证 PI3K/Akt 信号转导通路在蝎毒素诱导 Raji 细胞凋亡中的作用, LY294002 (PI3K 特异抑制剂) 联合蝎毒素对 Raji 细胞的影响。发现联合用药呈现叠加效应, 不仅使 Raji 细胞凋亡率明显增加, 同时使 Akt 磷酸化水平进一步降低。由此我们判断, 蝎毒素通过上调 PTEN 表达水平, 激活 PI3K/Akt 信号转导通路是蝎毒素诱导 Raji 细胞凋亡的重要机制之一。
6. RT-PCR 法测 PTEN mRNA 的表达水平, Raji 细胞中发现 PTEN mRNA 表达呈蝎毒素浓度依赖性增加, 说明蝎毒素是在 PTEN 基因转录水平影响 PTEN 蛋白表达。
7. Western blot 检测发现: 蝎毒素作用 Raji 和 Jurkat 细胞 48 h 后, 伴随着 G<sub>1</sub> 期阻滞, p27 蛋白表达呈蝎毒素浓度依赖性增加。提示蝎毒素促使 Raji 和 Jurkat 细胞凋亡的机制还与上调 p27 蛋白进而导致 G<sub>1</sub> 期细胞阻滞有关。

结论: 蝎毒素能够抑制 NHL 细胞株 Raji 和 Jurkat 细胞的增殖, 并且呈时间、浓度依赖性。可以诱导 Raji 和 Jurkat 细胞凋亡和细胞周期 G<sub>1</sub> 期阻滞的能力。可能是通过以下的机制发挥作用的: 1、在 PTEN 基因转录水平促进 Raji 细胞 PTEN 蛋白表达, 抑制 Akt、Bad 的磷酸化, 从而激活 PI3K/Akt 信号转导通路, 这可能是蝎毒素诱导 Raji 细胞凋亡的重要机制之一。2、还可以通过非 PTEN 依赖途径, 上调 p27 蛋白的表达, 引起 G<sub>1</sub> 期细胞周期停滞, 这是蝎毒诱导 Raji 和 Jurkat 细胞凋亡的共同通道。

【DOI】 10.7666/d.y1566281