

蛇毒多肽 X 在巨噬细胞泡沫化过程中的 Ca^{2+} 拮抗作用

谭健苗, 杨永宗, 杨小毅

(南华大学心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 蛇毒/药理学; 巨噬细胞; 泡沫细胞; Ca^{2+} /拮抗剂

[摘要] 为研究由中华眼镜蛇毒分离纯化而得的蛇毒多肽 X 在巨噬细胞泡沫化过程中的 Ca^{2+} 拮抗作用。将 C57BL/6J 小鼠腹膜巨噬细胞置于 10 mg/L 氧化型低密度脂蛋白中培养, 制备泡沫样细胞; 应用 Ca^{2+} 荧光指示剂技术, 检测蛇毒多肽 X 对泡沫样细胞 Ca^{2+} 水平的缓慢与即刻影响。结果发现, 在 10 mg/L 蛇毒多肽 X 中孵育的泡沫样细胞 Ca^{2+} 水平为 3.61×10^{-7} mol/L, 为对照细胞的 40.2%; 而蛇毒多肽 X 对细胞 Ca^{2+} 水平的即刻影响不明显。结果提示, 在巨噬细胞泡沫化过程中, 蛇毒多肽 X 可拮抗细胞 Ca^{2+} 水平的增高, 从而阻止泡沫细胞的形成。

[中图分类号] R972

[文献标识码] A

Ca^{2+} Antagonizing Effect of Snake Venom Polypeptide X on Formation of Foamy Macrophages

TAN Jian- Miao, YANG Yong- Zong, and YANG Xiao- Yi

(Institute of Cardiovascular Diseases, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

MeSH Snake Venom/pharmacology; Macrophages; Foam Cells; Calcium/antagonists or inhibitors

ABSTRACT **Aim** Snake venom polypeptide X was isolated from *Naja naja atra* snake venom, its Ca^{2+} antagonizing effect on formation of foamy macrophages was explored in these studies. **Methods** Foam-like cells were induced by C57BL/6J mouse peritoneal macrophages incubated with 10 mg/L oxidized low density lipoprotein, and their intracellular Ca^{2+} levels influenced both slowly and instantly by snake venom polypeptide X were determined with the Ca^{2+} fluorescent indicator technique. **Results** The average intracellular Ca^{2+} level of the foam-like cells in 10 mg/L snake venom polypeptide X was 40.2% of the control ($P < 0.05$); While the instant influence of snake venom polypeptide X on the Ca^{2+} level was not considerable. **Conclusions** Snake venom polypeptide X exerted an antagonizing role to the increasing intracellular Ca^{2+} level, thus prevented the macrophage-derived foam cell formation.

蛇毒中含有大量活性较强、作用特异的酶类、毒素或其它生理性、药理性活性蛋白, 是自然界中较为集中的天然药物宝库。中华眼镜蛇 (*Naja naja atra*) 在分类学上属蛇目眼镜蛇科, 广泛分布于我国广东、广西、浙江、湖南、福建等省区。云南动物研究所^[1]早在 1976 年就对湖南产中华眼镜蛇毒作了色谱分离及各组分的酶活力鉴定, 1993 年仲晓燕等^[2]报道, 对浙江产中华眼镜蛇毒作色谱分析可以获得 14 个组分, 其中第 14 组分对某些人体癌细胞具有选择性杀伤效应。本实验室使用交换柱层析和凝胶过滤方法, 从湖南产中华眼镜蛇毒中提取到一个组分, 用反相高效液相色谱分析, 其纯度达 91%, 经光电二极管矩阵同步光谱分析, 该组分在 210 nm 和 278 nm

处有最大吸收峰, 表明其化学性质为肽, 电泳分析表明其分子量约为 7 000 Da。袁中华等^[3]发现该组分对 C57BL/6J 小鼠具有抗动脉粥样硬化作用。该组分暂命名为蛇毒多肽 X。本实验将应用细胞培养技术和 Ca^{2+} 荧光指示剂技术, 检测蛇毒多肽 X 对泡沫样细胞 Ca^{2+} 水平的缓慢与即刻影响, 从而探讨蛇毒多肽 X 对巨噬细胞源性泡沫细胞形成的作用及其意义。

1 材料与方法

实验所用试剂除注明者外, 均为国产分析纯。

1.1 低密度脂蛋白的制备、鉴定和定量分析

采 A 型血 220 mL, 室温下静置 1 h, 弃血凝块, 以 4℃、4 000 r/min 离心 30 min, 获血清 120 mL, 加入 NaN_3 24 mg、100 mg/L EDTA 0.6 mL 防腐、防氧化。血清在 Hitachi 80P-7 型全自动制备性超速离心

[作者简介] 谭健苗, 男, 1967 年 8 月出生, 湖南省耒阳市人, 1996 年病理生理学研究生毕业, 硕士, 讲师。杨永宗, 男, 1937 年 11 月出生, 福建省仙游县人, 病理生理学教授, 博士研究生导师。

机上作序列超速离心。以密度 1.019、4℃、30 000 r/min 离心 18 h, 弃上层乳白色液体、次层淡黄色液体, 以密度 1.063、4℃、40 000 r/min 离心 24 h, 取上层黄色液体(低密度脂蛋白部分), 经聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定为同一区带。低密度脂蛋白在 4℃、含 10 mg/L EDTA 的 PBS 中透析 72 h, 过滤除菌, 4℃保存。低密度脂蛋白的含量按 Lowry 方法, 在 Shimadzu UV-120-02 型分光光度计上测 700 nm OD 值获得。

1.2 低密度脂蛋白的氧化修饰及修饰程度鉴定

低密度脂蛋白在 37℃、含 10 μmol/L CuSO₄ 的 PBS 中氧化 12 h, 然后在 4℃、含 100 mg/L EDTA 的 PBS 中透析, 每 8 h 换液一次, 透析 24 h。用硫代巴比妥酸反应物质的含量来鉴定低密度脂蛋白的修饰程度。样品或丙二醛标准品 0.1 mL 加入到 2.9 mL 的复合液中(复合液含 0.92 mol/L CCl₃COOH, 0.026 mol/L C₄H₄N₂O₂S, 0.25 mol/L HCl), 100℃水浴中放置 30 min, 冷却后测定 532 nm OD 值得硫代巴比妥酸反应物质含量。用总胆固醇试剂盒(北京中生公司)测总胆固醇含量。脂蛋白的氧化修饰程度以每克胆固醇的硫代巴比妥酸反应物质含量来表示, 低密度脂蛋白为 1.3 μmol/g, 氧化型低密度脂蛋白为 18.4 μmol/g。

1.3 巨噬细胞的收集和培养

参考 Kritharides 等^[4]方法收集巨噬细胞。取 C57BL/6J 小鼠 30 只(♂, 10 w, 23.9±2.5 g, 中国医学科学院实验动物研究所繁育场提供), 腹腔注射 2 mL 无血清培养基 RPMI 1640 (Flow Laboratories, Irvine, Scotland), 96 h 后注射 4 mL RPMI 1640 收集腹膜巨噬细胞, 以 10⁹/L 密度种植在培养瓶中, 每瓶 2 mL, 在 37℃、5% CO₂ 培养箱(Cole-Parmer 产品)中培养 12 h, 弃培养液, PBS 冲洗掉未贴壁细胞组分, 重复 3 次。分别加入 4 mL 以下培养液: (1) 空白对照培养液(含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640, 胎牛血清购自中国医学科学院血液学研究所); (2) 10 mg/L 氧化型低密度脂蛋白; (3) 10 mg/L 氧化型低密度脂蛋白加 10 mg/L 蛇毒多肽 X。继续培养 96 h。

1.4 细胞 Ca²⁺ 水平的测定

用 Ca²⁺ 荧光指示剂法^[5], 在 Hitachi F-4010 型荧光分光光度计上测定细胞 Ca²⁺ 水平。作预实验, 选择最佳 Ca²⁺ 荧光指示剂及其导入液终浓度。以 1 μmol/L 的导入液终浓度将 Indo-1 乙酰甲酯(图 1, Figure 1)、或以 2 μmol/L 的导入液终浓度将 Fluo-3 乙酰甲酯导入细胞, 37℃继续孵育 1 h, 弃培养液, PBS 冲洗 3 次, 细胞悬孵在 1 mL PBS 中, 吸取样品

0.1 mL, 加入到 0.6 mL 的 PBS 中, 以 355 nm 为激发波长及 485 nm 为发射波长(Indo-1 最佳波长)、或以 504 nm 为激发波长及 526 nm 为发射波长(Fluo-3 最佳波长), 10 μL 1 g/L 蛇毒多肽 X 为即刻干预因素(图 1, Figure 1), 2 μL 的 A23187(Sigma 产品)为 Ca²⁺ 载体, 50 μL 10 mmol/L MnCl₂ 为荧光淬灭剂, 在荧光分光光度计上测定细胞的初始荧光强度 F、加入蛇毒多肽 X 后的即时荧光强度 F_x(图 1, Figure 1)、加入 A23187 后的最大荧光强度 F_{max}、加入 Mn²⁺ 后绝大部分细胞内荧光淬灭后的最小荧光强度 F_{min}。根据荧光指示剂的解离常数 K_d(Indo-1 为 224, Fluo-3 为 450), 可由下式获得细胞的 Ca²⁺ 水平: $[Ca^{2+}]_i = K_d \cdot (F - F_{min}) \cdot (F_{max} - F) - 1$ 。

2 结果

2.1 未经蛇毒多肽 X 干预的细胞 Ca²⁺ 水平

以 Indo-1 为 Ca²⁺ 荧光指示剂, 描记未经蛇毒多肽 X 作用的细胞的荧光强度变化曲线。分析曲线可知, 在 10 mg/L 氧化型低密度脂蛋白中孵育的 A 组细胞与对照的 B 组细胞比较, 细胞 Ca²⁺ 水平的相对大小为: A > B。根据 Indo-1 的解离常数 224, 计算出 A 组细胞 Ca²⁺ 水平为 $(7.92 \pm 0.64) \times 10^{-7}$ mol/L, B 组为 $(2.96 \pm 0.23) \times 10^{-7}$ mol/L, 两组比较, 差异有显著性统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 在蛇毒多肽 X 中孵育的细胞 Ca²⁺ 水平

以 Fluo-3 为 Ca²⁺ 荧光指示剂, 描记在蛇毒多肽 X 中培养的细胞荧光强度变化曲线。分析曲线可知, 在氧化型低密度脂蛋白和蛇毒多肽 X 中培养的 A 组细胞 Ca²⁺ 水平与对照的 B 组细胞比较: A < B。根据 Fluo-3 的解离常数 450, 可获得 A 组细胞的 Ca²⁺ 水平为 $(3.61 \pm 0.32) \times 10^{-7}$ mol/L, B 组为 $(8.98 \pm 0.93) \times 10^{-7}$ mol/L, $P < 0.05$ ($n = 5$)。

2.3 蛇毒多肽 X 对细胞 Ca²⁺ 水平的即刻影响

以 Indo-1 为 Ca²⁺ 荧光指示剂, 描记蛇毒多肽 X 即时影响细胞 Ca²⁺ 水平的荧光强度变化曲线(图 1, Figure 1)。由曲线可以看出, 加入蛇毒多肽 X 后, 两组细胞的荧光强度均变化不大, 蛇毒多肽 X 在短时间内对细胞 Ca²⁺ 水平无显著影响。

3 讨论

生物毒素抗动脉粥样硬化研究已有人作出尝试, 如 Stephen EE 等^[6]报道, 绿脓杆菌外毒素的细胞识别区域缺失后, 其 40 kDa 片断 PE40 与 α 转化生长因子交联, 可选择性抑制快速增殖的平滑肌细胞, 显示

出 PE 40 抗动脉粥样硬化的潜在倾向。本实验

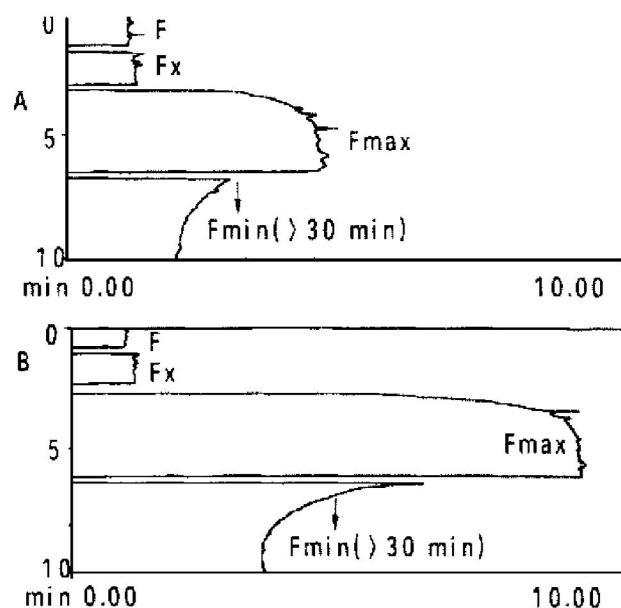


图 1. 蛇毒多肽 X 对细胞 Ca^{2+} 水平的即刻影响

Figure 1. Original curves for determining the instant influence of snake venom polypeptide X on intracellular Ca^{2+} level. A: C57BL/6J mouse peritoneal macrophages in 10 mg/L oxidized low density lipoprotein. B: The same cells in control medium. The detected curves showed that the instant influence of snake venom polypeptide X on intracellular Ca^{2+} level was not considerable.

室在前期工作中发现,从中华眼镜蛇毒中分离纯化的组分蛇毒多肽 X 也具有类似的效应^[3,7]。

本实验参照杨永宗等^[8]方法,在制备巨噬细胞源性泡沫样细胞的基础上,探讨了巨噬细胞转变为泡沫细胞过程中的 Ca^{2+} 变化以及蛇毒多肽 X 对这一过程的影响。许多实验表明, Ca^{2+} 拮抗剂具有抗动脉粥样硬化效应,能够阻止新近或早期动脉粥样硬化斑块的发生或发展,提示着 Ca^{2+} 可能参与了泡沫细胞的形成过程。本实验通过测定泡沫样细胞的 Ca^{2+} 水平,揭示了泡沫细胞的形成伴随有 Ca^{2+} 内流或释放,从而通过定量分析进一步证实了 Ca^{2+} 在动脉粥样硬化中的病理变化。

临床上应用 Ca^{2+} 拮抗剂治疗动脉粥样硬化,主要是通过扩张冠脉和周围血管,增加心脏血液供应,降低心脏前后负荷,并有助于防止微血栓形成等,从而起到抗动脉粥样硬化的作用。实验发现,蛇毒多肽 X 也具有 Ca^{2+} 拮抗效应,这种效应在分子水平表现为,在巨噬细胞转变为泡沫细胞的过程中具有 Ca^{2+} 阻滞作用,能拮抗在氧化低密度脂蛋白环境中的巨噬细胞 Ca^{2+} 水平的增高,从而阻滞巨噬细胞源性泡沫细胞的形成。

蛇毒多肽 X 的作用机理值得探讨。我们知道,

胞浆 Ca^{2+} 水平的增高经由两条途径:一是快速的细胞外 Ca^{2+} 内流或肌质网 Ca^{2+} 释放,为电压依赖性的 Ca^{2+} 变化;二是缓慢的 Ca^{2+} 内流或释放,主要是由水相途径介导^[9]引起 2 型 Ca^{2+} 通道中一些功能性巯基的氧化和结构改变,从而打开缓慢的 Ca^{2+} 通道,促使 Ca^{2+} 朝向胞浆的持续性内流。在上述两条途径中,慢相 Ca^{2+} 变化在巨噬细胞源性泡沫细胞的形成过程中、特别是后期过程中可能起着主导作用。实验提示,蛇毒多肽 X 对细胞 Ca^{2+} 水平的即刻影响不大,其 Ca^{2+} 拮抗效应可能主要是由慢相 Ca^{2+} 阻滞作用而产生的,即通过阻止 Ca^{2+} 通道结构或构象的改变,从而对持续性的细胞外 Ca^{2+} 内流或肌质网 Ca^{2+} 释放而产生抑制作用。

综上所述,中华眼镜蛇毒组分蛇毒多肽 X 可通过作用于慢 Ca^{2+} 通道阻滞巨噬细胞 Ca^{2+} 水平的增高,从而抑制巨噬细胞源性泡沫细胞的形成。

参考文献

- [1] 云南动物研究所. 湖南产眼镜蛇毒的柱层析分离及各组分的毒性和酶活力测定 [J]. 生物化学与生物物理学报, 1976, 8 (2): 157- 160
- [2] 仲晓燕, 刘广芬, 王晴川. 中华眼镜蛇毒细胞毒素 14 的纯化及其抗癌活性 [J]. 中国药理学报, 1993, 14 (3): 279- 282
- [3] 袁中华, 杨永宗, 杨小毅, 等. 消斑肽对 C57BL/6J 小鼠动脉粥样硬化斑块的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 1999, 7 (3): 215- 218
- [4] Kritharides L, Jessup W, Mander EL, et al. Apolipoprotein AI-mediated efflux of sterols from oxidized LDL-loaded macrophages [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995, 15 (2): 276- 289
- [5] Richard N. A practical guide to the study of calcium in living cells [M]. Published by Academic Press Inc, 1994, 155- 181
- [6] Stephen EE, Clay BS, Sadatoshi B, et al. Cytotoxic effects of a recombinant chimeric toxin on rapidly proliferating vascular smooth muscle cells [J]. Circ, 1991, 84 (2): 778- 787
- [7] 杨永宗, 杨小毅, 袁中华. 消斑肽能逆转平滑肌细胞源性泡沫细胞 [J]. 中国动脉硬化杂志, 1995, 3 (4): 275- 278
- [8] 杨永宗, 谭健苗, 杨小毅. 动脉粥样硬化敏感小鼠 C57BL/6J 腹膜巨噬细胞源性泡沫细胞模型的建立 [J]. 中国动脉硬化杂志, 1995, 3 (4): 279- 282
- [9] Chiamvimonvat N, O'Rourke B, Kamp TJ, et al. Functional consequences of sulfhydryl modification in the pore-forming subunits of cardiovascular Ca^{2+} and Na^{+} channels [J]. Circ Res, 1995, 76 (3): 325- 334
- [10] Menno PJ, Ko W, Bart JM, et al. Macrophage specific overexpression of the human macrophage scavenger receptor in transgenic mice, using a 180- kb yeast artificial chromosome, leads to enhanced foam cell formation of isolated peritoneal macrophages [J]. Atherosclerosis, 1999, 147 (2): 339- 347

(此文 2000- 10- 16 收到, 2001- 05- 19 修回)

(此文编辑 胡必利)