

[文章编号] 1007-3949(2009)17-10-0793-04

• 实验研究 •

眼镜蛇毒细胞毒素 13 诱导人脐静脉内皮细胞凋亡及对 Bcl-2 家族基因表达的影响

张明芳¹, 许云禄², 林默君¹

(福建医科大学 1. 基础医学院生理学与病理生理学系, 2. 蛇毒研究所, 福建省福州市 350004)

[关键词] 眼镜蛇毒; 细胞毒素; 人脐静脉内皮细胞; 细胞凋亡; Bcl-2

[摘要] 目的 研究眼镜蛇毒细胞毒素 13 诱导人脐静脉内皮细胞凋亡作用及其对 Bcl-2 家族基因表达的影响。

方法 CCK-8 法测定细胞毒素 13 对人脐静脉内皮细胞增殖的影响; Annexin V-FITC/PI 双染法观察细胞凋亡形态学改变; 流式细胞术分析 DNA 倍体及细胞凋亡率; 逆转录聚合酶链反应检测 Bcl-2、Bax 和 Bcl-x_L 基因表达的变化, Western blotting 检测 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的变化。结果 细胞毒素 13 对人脐静脉内皮细胞增殖具有显著的抑制作用, 并可诱导其发生凋亡, 其抑制作用呈剂量依赖性。细胞毒素 13 可上调促凋亡蛋白 Bax 而对抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bcl-x_L 的表达无明显影响。结论 细胞毒素 13 可能通过上调 Bax 表达诱导细胞凋亡, 抑制人脐静脉内皮细胞增殖。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Cobra Cardiotoxin Induced Apoptosis in Human Umbilical Vein Endothelial Cells and Affected the Expression of Bcl-2 Family

ZHANG Ming-Fang¹, XU Yun-Lu², and LIN Mo-Jun¹

(1. Department of Physiology and Pathophysiology, 2. Laboratory of Venom Research, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China)

[KEY WORDS] Cobra Venom; Cardiotoxin; Human Umbilical Vein Endothelial Cells; Apoptosis; Bcl-2

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of cobra cardiotoxin-13 (CTX-13) on the apoptosis of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and the expression of Bcl-2 family. **Methods** The effect of CTX-13 on HUVEC proliferation was analyzed by CCK-8 assay. The morphological changes were observed with Annexin V-FITC/PI staining.

The DNA ploidy analysis and apoptotic rates assay were performed by flow cytometry. The expression level of Bcl-2 gene family was measured by RT-PCR and Western blotting. **Results** CTX-13 caused a dose-dependent decrease of cell viability and displayed several features of apoptosis including translocation of membrane phosphatidylserine and increase of sub G1 hypodiploid cell population. The apoptotic rates of HUVEC treated with CTX-13 concentrations of 0.3, 0.75, 1.5 $\mu\text{mol/L}$ were $20.50\% \pm 6.2\%$, $54.20\% \pm 4.9\%$ and $93.40\% \pm 6.4\%$. CTX-13 up-regulated the mRNA expression of Bax about 4-fold as well as its protein expression, but did not affect the expression of Bcl-2 and Bcl-x_L.

Conclusions CTX-13 suppressed HUVEC proliferation significantly and induced apoptosis in a dose-dependent manner.

CTX-13 up-regulated Bax in mRNA and protein level. It was probable the CTX-13 suppressed proliferation and induced apoptosis by up-regulating Bax.

细胞毒素 (cardiotoxin, CTX) 是蛇毒三指蛋白家族的一员^[1], 是眼镜蛇毒的主要毒性成分之一, 具有心脏毒、抑制骨吸收、引起可兴奋组织去极化、抗菌等多种生物学活性^[2], 并可诱导多种肿瘤细胞凋亡^[3,4]。内皮细胞是构成血管的重要成分, 与血管形成、凝血、动脉硬化等生理学及病理学过程密切相关, 也在肿瘤血管新生过程中起关键作用。本实

验室前期从中华眼镜蛇毒中分离得到 4 个 CTX, 并已对它们的理化性质、氨基酸序列和生物活性进行了系列研究^[5]。为观察 CTX 对血管内皮细胞增殖、凋亡的影响, 本研究选取 CTX-13 为研究对象, 在人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 模型上研究 CTX 的生物学活性, 并对其可能的分子机制进行探讨。

1 材料和方法

1.1 材料

CTX-13 由本实验室从舟山眼镜蛇毒中纯化得到^[5]。HUVEC 细胞株由本实验室保存。RPMI 1640 培养基购自美国 GIBCO 公司; 胎牛血清购自杭州四

[收稿日期] 2009-09-09 [修回日期] 2009-10-12

[基金项目] 国家自然科学基金 (30670772); 福建医科大学青年教师科研基金 (FGXQ04010); 福建省自然科学基金 (C0620002)

[作者简介] 张明芳, 博士研究生, 讲师, 研究方向为蛇毒蛋白药理学, Email 为 karsu@126.com。许云禄, 教授, 研究方向为心血管药理学。通讯作者林默君, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管生理学, Email 为 limojun@gmail.com。

季青生物工程材料有限公司; CCK-8试剂盒购自日本 Dojindo 同仁化学研究所; Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司; M-MLV 逆转录酶购自美国 Promega 公司; 2 × Premix Taq 购自大连宝生物工程有限公司; 鼠抗 Bcl-2 抗体、鼠抗 Bax 抗体、兔抗 GAPDH 抗体购自美国 Santa Cruz 公司; ECL 化学发光试剂盒购自美国 Invitrogen 公司; 其余试剂均为国产分析纯。生物净化工作台 (苏州净化设备有限公司); CO₂ 培养箱 (日本 SANYO 公司); 荧光显微镜 (德国 Zeiss 公司); 550 型酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司); 流式细胞仪 (美国 Beckman-Coulter 公司)。

1.2 细胞培养

使用含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基, 37℃ 和 5% CO₂ 常规培养。

1.3 CCK-8 法测定细胞毒素对细胞增殖的影响

取对数生长期的细胞, 制成单细胞悬液 (1×10^5 /L), 接种至 96 孔板, 每孔 100 μL, 每组细胞设 5 个复孔。37℃ 和 5% CO₂ 实验条件下常规培养。第二天加药处理, 24 h 后每孔加入 CCK-8 10 μL, 37℃ 培养 1 h 后, 酶标仪上检测 450 nm 处的光吸收度, 按下列公式计算生长抑制率。生长抑制率 = $(1 - \text{用药组平均 OD 值} / \text{对照组平均 OD 值}) \times 100\%$ 。

1.4 Annexin V-FITC/PI 双染法观察细胞凋亡

细胞以每孔 4×10^5 个接种于 6 孔板中, 24 h 后加药处理。用 PBS 洗两遍, 在 500 μL Binding buffer 中加入 2 μL Annexin V-FITC、5 μL 碘化丙啶 (PI) 混匀, 避光室温反应 5 min。荧光显微镜下观察凋亡细胞形态。荧光显微镜下, 凋亡细胞发绿色荧光, 坏死细胞发红色荧光, 正常细胞不发光。

1.5 流式细胞仪检测细胞凋亡率

凋亡率用 Annexin V-FITC/PI 试剂盒测定, 不同浓度药物处理的细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化, 制成单细胞悬液, 调细胞密度为 $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个/L。取 1 mL 细胞用 PBS 洗涤, 2000 r/min × 5 min 重复 3 次, 弃上清液。将细胞重悬于 200 μL 结合缓冲液。加入 10 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI 轻轻混匀, 避光室温反应 15 min。流式细胞仪上检测。

1.6 流式细胞仪分析 DNA 倍体

细胞以每孔 4×10^5 个接种于 6 孔板中, 第二天加药处理, 24 h 后消化收集经不同浓度药物处理的细胞, 用冰预冷 PBS 离心洗涤, 2000 r/min × 5 min 重复 3 次, 弃上清液。然后用冰预冷的 70% 乙醇固定, 4℃ 过夜。染色前加入 RNase A (终浓度 100 mg/L), 加入 PI 染色液至终浓度 50 mg/L, 室温避光

染色 20 min。流式细胞仪上检测。

1.7 逆转录聚合酶链反应检测 Bcl-2 家族基因的表达

细胞以每孔 4×10^5 个接种于 6 孔板中, 第二天加药处理, 24 h 后用 Trizol 提取 RNA, 紫外分光光度法测定 RNA 浓度及纯度, 常规进行 RT-PCR, 1.5% 琼脂糖电泳, 紫外灯下拍照。用 Phoretix 1D V2003.02 软件分析图像, 以 GAPDH 基因为内参照计算目的基因的相对表达。引物序列见表 1。

表 1 逆转录聚合酶链反应检测的基因及使用的引物

基因	引物	扩增片段 (bp)
Bax	上游: 5'-CCAAGAAGCTGAGCGAGTGT-3'	250
	下游: 5'-CAGCCCATGATGGTTCGAT-3'	
Bcl-2	上游: 5'-TGTGGAGAGCGTCAACCGGGA-3'	216
	下游: 5'-ATGCAAGCTCCACACGAGGC-3'	
Bcl-x _L	上游: 5'-GGATCCAGGAGAACGGCGGC-3'	451
	下游: 5'-CCTCCTGCCCCAGCCACAA-3'	
GAPDH	上游: 5'-CTCTGCTCTCTCTGTCGAC-3'	451
	下游: 5'-TTGATTTTGGAGGATCTCG-3'	

1.8 Western blotting 检测 Bcl-2 家族蛋白的表达

细胞加药处理 24 h 后, 用 PBS 洗 2 次, 加入 RIPA 细胞裂解液提取总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, 取 40 μg 总蛋白进行 Western blotting 实验。10% SDS-PAGE 电泳后转膜, 分别用鼠抗 Bcl-2、Bax 抗体或兔抗 GAPDH 抗体与膜上的抗原结合, 然后用相应的 HRP 偶联的二抗与其反应, 用 ECL 化学发光试剂检测, 经压片曝光后, 显影和定影。采用 Phoretix 1D V2003.02 图像分析软件测定和比较各组 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达情况。

1.9 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 细胞毒素对细胞增殖的影响

CTX-13 处理 24 h 对 HUVEC 的生长有明显的抑制作用, 抑制率为 20.2% ~ 76.0%, 不同浓度处理组与对照组比较有显著性差异 ($P < 0.01$; 表 2)。

2.2 细胞凋亡变化

不同浓度 CTX-13 处理的 HUVEC 可被 Annexin V-FITC 不同程度的染色, 其中凋亡细胞胞膜完整, 发绿色荧光, 表明细胞磷脂酰丝氨酸外翻, 细胞发生不同程度的凋亡; 而较高浓度 CTX-13 处理后, 许多细胞被 PI 染色呈红色荧光, 为晚期凋亡或坏死细胞

(图 1)。

表 2 不同浓度细胞毒素处理对 HUVEC 生长的抑制作用

分 组	A ₄₅₀	抑制率
对照组	0.813 ± 0.032	0
0.3 μmol/L CTX-13	0.649 ± 0.043 ^a	20.2% ^a
0.75 μmol/L CTX-13	0.314 ± 0.028 ^a	61.4% ^a
1.5 μmol/L CTX-13	0.195 ± 0.023 ^a	76.0% ^a

a为 $P < 0.01$ 与对照组比较。

2.3 细胞凋亡率

不同浓度 CTX-13 作用 24 h 后, 细胞凋亡百分率增加, 细胞凋亡率在对照组为 $3.42\% \pm 3.9\%$,

0.3 μmol/L CTX-13 组为 $20.50\% \pm 2.62\%$, 0.75 μmol/L CTX-13 组为 $54.20\% \pm 4.93\%$, 1.5 μmol/L CTX-13 组为 $93.40\% \pm 6.45\%$, 且这种抑制作用具有剂量依赖性 ($P < 0.01$; 图 2)。

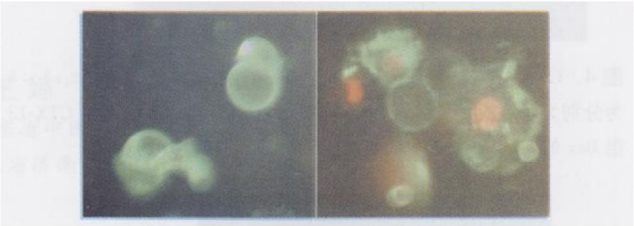


图 1 荧光染色观察 CTX-13 诱导 HUVEC 凋亡 左为早期凋亡细胞, 右为晚期凋亡或坏死细胞。

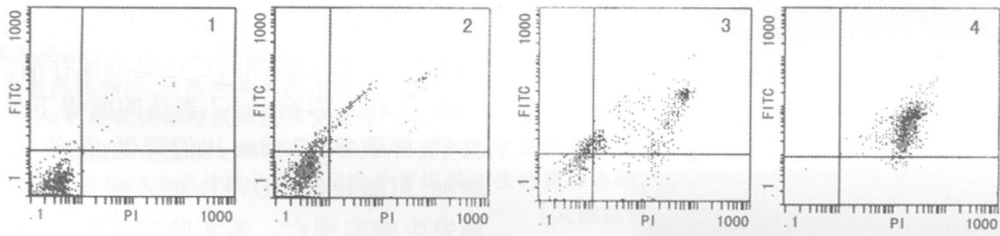


图 2 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡 1 为对照组, 2~4 分别为 0.3 μmol/L、0.75 μmol/L 及 1.5 μmol/L CTX-13 组。

2.4 DNA 倍体分析

0.3 μmol/L、0.75 μmol/L 及 1.5 μmol/L CTX-13 作用 24 h 可导致 HUVEC 出现亚 G1 期凋亡峰, 且呈明显的量效关系 (图 3)。

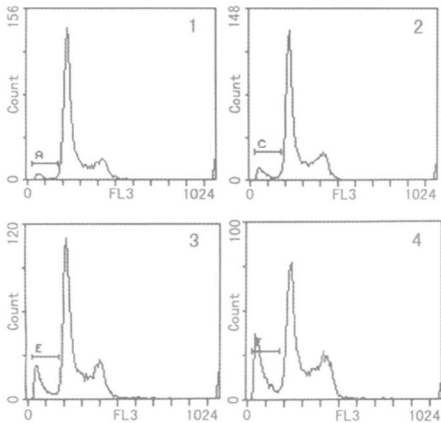


图 3 不同浓度 CTX-13 处理对 HUVEC 的 DNA 倍体分析 1 为对照组, 2~4 分别为 0.3 μmol/L、0.75 μmol/L 及 1.5 μmol/L CTX-13 组。

2.5 Bcl-2 家族基因的转录水平变化

经不同浓度的 CTX-13 处理 24 h 后, Bcl-2 和 Bcl-x_L 表达无明显变化, 而 Bax 表达增加 (表 3、图 4 和 5)

2.6 Bcl-2 家族蛋白的表达

0.3 μmol/L、0.75 μmol/L 及 1.5 μmol/L CTX-13 处理 24 h, Bcl-2 蛋白表达无明显变化, 而 Bax 蛋白的表达明显增加 (表 4 和图 6)。

表 3 CTX-13 对 HUVEC 的 Bcl-2、Bax 和 Bcl-x_L mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

基 因	Bax	Bcl-2	Bcl-x _L
对照组	0.422 ± 0.042	0.232 ± 0.062	0.388 ± 0.096
0.3 μmol/L CTX-13	0.841 ± 0.233 ^a	0.244 ± 0.009	0.365 ± 0.227
0.75 μmol/L CTX-13	1.180 ± 0.200 ^b	0.255 ± 0.115	0.313 ± 0.030
1.5 μmol/L CTX-13	1.869 ± 0.313 ^b	0.259 ± 0.125	0.395 ± 0.084

a为 $P < 0.05$ b为 $P < 0.01$ 与对照组比较。

表 4 CTX-13 对 HUVEC 的 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

	Bax	Bcl-2
对照组	0.448 ± 0.055	0.600 ± 0.102
0.3 μmol/L CTX-13	0.611 ± 0.031 ^a	0.543 ± 0.065
0.75 μmol/L CTX-13	0.884 ± 0.106 ^b	0.616 ± 0.024
1.5 μmol/L CTX-13	1.078 ± 0.128 ^b	0.578 ± 0.057

a为 $P < 0.05$ b为 $P < 0.01$ 与对照组比较。

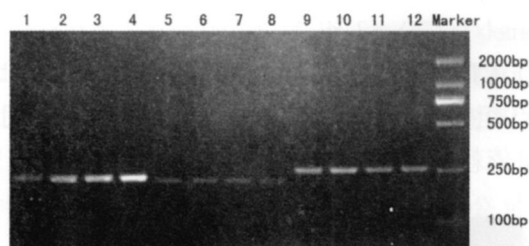


图4. CTX-13对HUVEC Bcl-2和Bax表达的影响 1~4为分别为对照组、0.3 $\mu\text{mol/L}$ 、0.75 $\mu\text{mol/L}$ 及1.5 $\mu\text{mol/L}$ CTX-13组 Bax 的表达,5~8、9~12为相应的 Bcl-2、GAPDH 的表达。

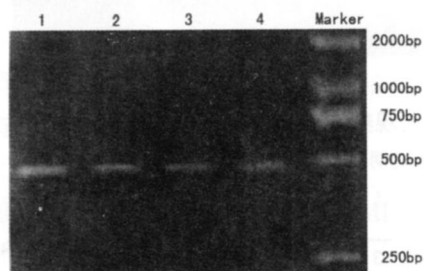


图5. CTX-13对HUVEC Bcl-x_L表达的影响 1~4为对照组、0.3 $\mu\text{mol/L}$ 、0.75 $\mu\text{mol/L}$ 及1.5 $\mu\text{mol/L}$ CTX-13组。

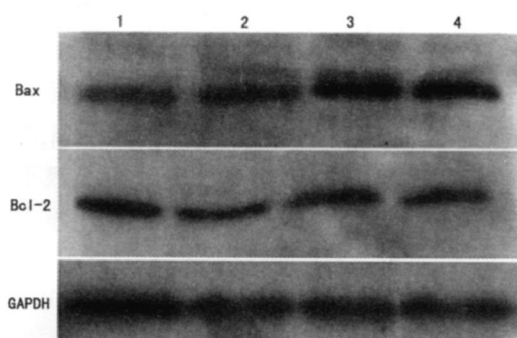


图6. CTX-13对HUVEC Bcl-2和Bax蛋白表达的影响 1~4为对照组、0.3 $\mu\text{mol/L}$ 、0.75 $\mu\text{mol/L}$ 及1.5 $\mu\text{mol/L}$ CTX-13组。

3 讨论

细胞毒素是眼镜蛇毒中功能最多样、作用机制最复杂的蛋白成分,它可诱导多种肿瘤细胞凋亡,其机制与调节细胞内钙水平、结合细胞膜糖脂、促进活性氧生成以及阻断细胞周期等相关^[3,4]。本研究发现,CTX-13对HUVEC有明显的生长抑制作用,这种作用有剂量依赖关系。同时,流式细胞仪DNA倍体检测也发现,随着CTX-13剂量的增加,凋亡率明显增高,且可出现明显的亚二倍体峰。这些结果说明CTX-13可以诱导HUVEC凋亡。

细胞发生凋亡时,磷脂酰丝氨酸从细胞膜的内侧转移到细胞膜的外侧,Annexin V可特异结合于细胞膜表面的磷脂酰丝氨酸,而使早期凋亡细胞染色;PI为膜非通透性核酸嵌入型染料,不能穿过完整的细胞膜,活细胞和早期凋亡细胞拒染,但PI能穿过死细胞膜,而使晚期凋亡或坏死细胞染色^[6]。本研

究中,低剂量的CTX-13处理可使细胞的细胞膜出现绿色荧光,为早期凋亡,而随着剂量的增加,细胞核被PI染为红色,说明细胞膜通透性增加,为晚期凋亡阶段。

本研究结果发现,CTX-13可上调HUVEC Bax的表达,而对Bcl-2和Bcl-x_L的表达无影响,导致细胞Bcl-2/Bax比值降低。Bcl-2家族是重要的细胞凋亡调控基因^[7],目前已发现多个家族成员,包括抗凋亡蛋白(Bcl-2、Bcl-x_L、Bcl-w等)和促凋亡蛋白(Bax、Bak、Bad、Bid等)^[8]。当细胞接受到凋亡信号时,促凋亡蛋白Bax转位到线粒体膜上形成孔洞,使细胞色素C转位到胞浆,激活Caspase-9而引发凋亡,抗凋亡蛋白Bcl-2可特异结合Bax而形成Bcl-2/Bax异二聚体,阻止线粒体孔洞的形成抑制细胞凋亡。因此Bcl-2和Bax的比值决定了在凋亡信号下,细胞究竟是选择凋亡还是继续存活。我们认为,CTX-13在不影响Bcl-2表达的前提下显著上调Bax含量,导致Bcl-2/Bax比值降低,使线粒体膜通透性增加,可能导致HUVEC进入线粒体凋亡信号途径而发生细胞凋亡。本实验室前期曾通过电镜发现CTX可引起鼻咽癌细胞线粒体肿胀破裂^[9],提示CTX诱导的肿瘤细胞凋亡与线粒体密切相关,是本研究认为CTX通过线粒体机制诱导HUVEC凋亡的重要旁证。

【参考文献】

- [1] Rajagopalan N, Pung YF, Zhu YZ, et al. β -Cardiotoxin: a new three-finger toxin from *Ophiophagus hannah* (king cobra) venom with beta-blocker activity [J]. *FASEB J*, 2007, **21**: 3685-695.
- [2] Wu PL, Lee SC, Chuang CC, et al. Non-cytotoxic cobra cardiotoxin A5 binds to $\alpha\beta 3$ integrin and inhibits bone resorption: identification of cardiotoxins as non-RGD integrin-binding proteins of the Ly-6 family [J]. *J Biol Chem*, 2006, **281**: 7937-945.
- [3] Chen KC, Lin SR, Chang LS. Involvement of mitochondrial alteration and reactive oxygen species generation in Taiwan cobra cardiotoxin-induced apoptotic death of human neuroblastoma SK-N-SH cells [J]. *Toxicol*, 2008, **52** (2): 361-368.
- [4] Tsai CH, Yang SH, Chien CM, et al. Mechanisms of cardiotoxin III-induced apoptosis in human colorectal cancer colo205 cells [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2006, **33** (3): 177-182.
- [5] 张明芳, 许云禄, 刘广芬. 福建产舟山眼镜蛇毒细胞毒素的快速分离纯化及鉴定 [J]. *福建医科大学学报*, 2004, **38** (1): 1-4.
- [6] 杨丽霞, 沈珠甫, 郭瑞威, 等. bcl-2在神经酰胺致人脐静脉内皮细胞凋亡中的作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, **16** (2): 132-134.
- [7] 赵宏, 丁丽颖, 刘国良. 酰基化 ghrelin抑制高糖诱导的人血管内皮细胞凋亡 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, **15** (11): 831-833.
- [8] Brunelle JK, Letai A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 Family [J]. *J Cell Sci*, 2009, **122** (4): 437-441.
- [9] 许云禄, 张明芳. 舟山眼镜蛇毒细胞毒素-F对鼻咽癌细胞和鼠心肌细胞的抑制作用 [J]. *福建医科大学学报*, 2004, **38** (2): 121-124.

(此文编辑 文玉珊)