

蝎毒多肽提取物对白血病小鼠 Bcl-2 SDF-1 α 与 TGF- β 1 表达的影响*

杨文华 杨向东 史哲新 高 宏 汤 毅 于文俊^① 吕俊秀^① 郝 征^①

摘要 目的:探讨蝎毒多肽提取物(PESV)对白血病小鼠 Bcl-2、SDF-1 α 与 TGF- β 1 表达的影响,探究 PESV 对白血病细胞增殖和浸润的影响与机制。方法:NOD-SCID 小鼠 60 只,按本课题前期研究方法,建立人白血病 NOD-SCID 小鼠髓外浸润模型。选取造模成功的小鼠 40 只,随机分为 4 组,每组 10 只,分别为高、中、低剂量组和模型组,另设同周龄正常 NOD-SCID 小鼠 10 只为空白对照组。高、中、低剂量组每只分别尾静脉注射 PESV 1.2mg/(kg·d)、0.6mg/(kg·d)、0.3mg/(kg·d),模型组和空白组每只均尾静脉注射 0.9% 的生理盐水 0.3mL/d,35d 后全部处死,取血清和骨髓细胞培养液上清,用 ELISA 法进行 Bcl-2、SDF-1 α 与 TGF- β 1 的检测。结果:高、中、低剂量组存活率均高于模型组,高、中、低剂量组小鼠血清以及骨髓的 Bcl-2、SDF-1 α 均明显低于模型组 ($P < 0.05$),而 TGF- β 1 均高于模型组,均以高剂量组效果最为明显 ($P < 0.05$)。结论:蝎毒多肽提取物可以有效的降低白血病小鼠血清及骨髓中 Bcl-2、SDF-1 α 的表达,提高 TGF- β 1 的表达,具有较好的阻抑白血病细胞增殖和浸润的作用。

关键词 蝎毒多肽提取物 白血病 Bcl-2 SDF-1 α TGF- β 1

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2010.08.003

The Effect of PESV on Bcl-2, SDF-1 α and TGF- β 1 Expression in Leukemia in Mice

YANG Wenhua¹, YANG Xiangdong¹, SHI Zhixin¹, GAO Hong¹, TANG Yi¹, YU Wenjun², LV Junxiu², HAO Zheng²

Corresponding author: YANG Wenhua, E-mail: tcmwh@yaho.com.cn

¹Department of Hematology, First Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

²Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Grant support: National Natural Science Foundation of China (30672743); The Science and Technology Development Program of Tianjin (07JCYBJC11500)

Abstract Objective: To investigate the effect of PESV on the expression of Bcl-2, SDF-1 α and TGF- β 1 and the multiplication and infiltration of leukemic cells in leukemia in mice. **Methods:** A total of 60 NOD-SCID mice were used for model establishment of human leukemia with extra-marrow infiltration. Forty successful models were randomly divided into 4 groups, with 10 in each group (high-dose group, medium-dose group, low-dose group and model group). Another 10 normal NOD-SCID mice of the same age were used as the blank control group. In high-, medium- and low-dose groups, the mice were injected through tail vein with PESV at 1.2 mg/kg·d, 0.6 mg/kg·d, 0.3 mg/kg·d, respectively. Mice in the model group and the blank control group received treatment of 0.9% physiological saline at 0.3 mL/d. The mice were sacrificed at 35 days after treatment. Elisa was used to detect Bcl-2, SDF-1 α and TGF- β 1 in cell culture supernatant of serum and bone marrow. **Results:** The survival of mice in high-, medium- and low-dose groups was higher than that in the model group. Bcl-2 and SDF-1 α expression in serum and bone marrow of the mice in high-, medium- and low-dose groups was significantly lower than that in model group ($P < 0.05$). TGF- β 1 expression was higher in serum and bone marrow of the mice in high-, medium- and low-dose groups than in model group ($P < 0.05$). **Conclusion:** PESV can effectively reduce the expression of Bcl-2 and SDF-1 α in serum and bone marrow of mice with leukemia and enhance TGF- β 1 expression, and thus has inhibitory effect on multiplication and infiltration of leukemia cells.

Keywords PESV; Leukemia; Bcl-2; SDF-1 α ; TGF- β 1

白血病是造血干细胞克隆性增殖的肿瘤性疾病,严重威胁着人类健康和生命。虽然现在白血病的诊断和治疗取得了长足进步,但是白血病细胞的髓外浸润和侵袭仍是导致复发和死亡的重要原因。因此,有关白血病细胞浸润机制和阻抑浸润的研究

是目前白血病研究中的热点问题。我们在长期的科研和临床中发现蝎毒水煎液对阻抑白血病细胞增殖和诱导白血病细胞凋亡有较好的作用^[1]。蝎毒的有效成分经过分子筛层析技术提纯,得到的是一组分子量 6 000 ~ 7 000Da 的多肽混合物,是其抗肿瘤作用

作者单位:天津中医药大学第一附属医院血液科(天津市 300193); ①天津中医药大学

* 本文课题受国家自然科学基金(编号:30672743)和天津市应用基础研究项目基金资助(编号:07JCYBJC11500)

通讯作者:杨文华 tcmwh@yaho.com.cn

的主要细胞毒成份,称为蝎毒多肽提取物(PESV)^[2]。本课题通过研究 PESV 对白血病小鼠 Bcl-2、SDF-1 α 与 TGF- β 1 表达的影响,探索 PESV 对白血病细胞增殖和髓外浸润的影响与机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 药物制备 PESV 系将蝎毒粗毒应用分子筛层析技术提纯所得,为分子量 6 000~7 000Da 的多肽混合物,纯度为 89.1%,使用前用生理盐水溶解稀释到所需浓度。

1.1.2 实验动物及预处理 SPF 级 NOD/SCID 小鼠 60 只,5~6 周龄,雌雄各半,购于中国医学科学院实验动物研究所,饲养于中国医学科学院血液学研究所动物实验中心 SPF 级层流室。接种前将小鼠置于无菌透气木盒中,外罩无菌消毒巾,在 ¹³⁷Cs 源环境下照射 270cGy,预处理后 24h 内接种细胞。对小鼠所有操作均在无菌层流室内进行。

1.1.3 白血病患者 BMMNC 制备 选择 2008 年 5 月间于中国医学科学院血液学研究所就诊的急性白血病患者或慢性粒细胞白血病急变患者 60 例(外周血白细胞 $\geq 20\times 10^9$ /mL,外周血涂片原始细胞加幼稚细胞数 $\geq 60\%$)。常规无菌采集骨髓 5mL,肝素抗凝,注入 5mL 淋巴细胞分离液,以 1 800r/min 转速离心 10min;吸取中间白色单个核细胞悬浮层,PBS 液洗 2 遍,2%台盼蓝计数活细胞,将活细胞终浓度调至 5×10^7 /mL 备用。

1.2 试剂和仪器

RPMI-1640 培养基、PBS 缓冲液(美国 GIBCO 公司产品),特级胎牛血清(美国 Hyclone 公司),淋巴细胞分离液(中国医学科学院血液病研究所科技公司),小鼠 Bcl-2、SDF-1 α 、TGF- β 1 Elisa 试剂盒(美国 R&D 公司),酶标仪(芬兰 Thermo Wellscan MK 3),洗板机(芬兰 Thermo Wellwash 4 MK2),倒置显微镜(日本奥林巴斯 IX71),低速自动平衡离心机(北京医用离心机厂),CO₂培养箱(美国 THERMO 公司)。

1.3 方法

1.3.1 造模与分组 预处理后的 NOD-SCID 小鼠 60 只,24h 内尾静脉注射白血病患者骨髓单个核细胞(BMMNC) 1×10^7 /只,30d 后,取经过验证成功建立人白血病 NOD-SCID 小鼠髓外浸润模型^[3]的小鼠 40 只,随机分为 4 组,每组 10 只,分别为高、中、低剂量组和

模型组,另设同周龄正常 NOD-SCID 小鼠 10 只为空白对照组。

1.3.2 用药 高、中、低剂量组分别尾静脉注射 PESV 1.2mg/(kg·d)、0.6mg/(kg·d)、0.3mg/(kg·d),注射剂量为 0.3mL/只;模型组和空白组均注射 0.9%的生理盐水 0.3mL/d,治疗 35d。记录各组小鼠一般状态和存活状况。

1.3.3 取材 治疗期满处死所有存活小鼠。摘眼球取血 0.5mL,静置 15min,2 000r/min 离心 10min,收集上清,冻存待测;取小鼠双侧股骨,用 PBS 液冲洗至骨髓腔发白,加入 5mL RPMI-1640 培养液和 0.5mL 胎牛血清,于 37℃、5% CO₂饱和湿度条件下常规培养,2 天后离心取上清,冻存待测。

1.3.4 检测 采用 Elisa 法检测小鼠血清和骨髓培养液上清的 Bcl-2、SDF-1 α 与 TGF- β 1 含量,用酶联仪在 450nm 波长依序测量各孔的光密度(OD 值),绘制标准曲线,计算出样品浓度,乘以稀释倍数,得到样品的实际浓度。

1.4 统计学方法

各组数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,应用 SPSS 13.0 软件分析,组间比较采用方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠存活状态

小鼠注射 PESV 1 周后竖毛、弓背开始改善,体重略微增加或减轻较慢,活动力增强,进食和饮水量增加,模型组则出现竖毛明显,运动迟缓,食欲不振。35d 后高、中、低治疗组分别存活 9 只、7 只、7 只,模型组存活 5 只,空白对照组存活 10 只。治疗各组与模型组存活率有明显差异($P<0.05$)。

2.2 Bcl-2 检测结果

检测各组小鼠血清 Bcl-2 的结果, F 值为 22.556,高、中、低剂量组和模型组比较均为 $P=0.000$,高、中、低治疗组和空白组比较 P 值分别为:0.587,0.022,0.024。说明高、中、低剂量组对白血病小鼠均有效,其中以高剂量组效果最为明显,其和空白组比较 $P>0.05$,无统计学意义。

检测各组小鼠骨髓培养液上清 Bcl-2 的结果, F 值为 13.059,高、中、低剂量组和模型组比较 P 值分别为:0.000,0.008,0.000;高、中、低各治疗组和空白组比较 P 值分别为:0.408,0.002,0.024。其结果和血清中 Bcl-2 表达的检测结果相似,结论相同(表 1)。

表 1 Bcl-2 检测结果 $\bar{x}\pm s$

Table 1 Results Bcl-2 detection

BCL-2	高剂量组	中剂量组	低剂量组	模型组	空白对照组
血清	514.5 $\pm$ 153.4	1 104.7 $\pm$ 464.6	1 096.1 $\pm$ 435.7	2 985.1 $\pm$ 1 016.4	342.3 $\pm$ 69.7
培养液	177.1 $\pm$ 43.4	330.9 $\pm$ 179.1	331.6 $\pm$ 88.8	494.5 $\pm$ 63.3	129.5 $\pm$ 31.7

2.3 SDF-1 α 检测结果

检测各组小鼠血清中 SDF-1 α 的结果, F 值为 21.541, 高、中、低剂量组和模型组比较, 均为 $P=0.000$, 有统计学意义; 高、中、低剂量组和空白组比较, P 值分别是 0.423, 0.141, 0.047, 说明高、中、低剂量组均有效, 效果随着剂量的增加而增强。

检测各组小鼠骨髓培养液上清 SDF-1 α 的结果, F 值为 2.437, 高、中、低剂量组和模型组 P 值分别为: 0.014, 0.115, 0.165, 说明高剂量组和模型组比较有统计学意义, 但是中、低剂量组和模型组比较却无统计学意义, 考虑 SDF-1 α 在骨髓中变化没有在血清中灵敏; 但是各治疗组效果依然是随着剂量的增加而增强(表2)。

2.4 TGF- β 1 检测结果

检测各组小鼠血清中 TGF- β 1 的结果, F 值为 13.605, 高、中、低剂量组和模型组比较, 均为 $P=0.000$, 有统计学意义; 高、中、低剂量组和空白组比较, P 值分别是 0.137, 0.065, 0.026, 说明高、中、低剂量组均有效, 高、中剂量组和空白组比较已无统计学意义。

检测各组小鼠骨髓培养液上清 SDF-1 α 的结果, F 值为 9.679, 高、中、低剂量组和模型组 P 值分别为: $P=0.000$, $P=0.001$, $P=0.003$, 说明各治疗组和模型组比较差异有统计学意义; 高、中、低剂量组和空白组比较, P 值分别是 0.299, 0.052, 0.016, 说明高、中、低剂量组均有效, 高、中剂量组和空白组比较已无统计学意义, 和前述血清的检测结论相同(表3)。

表2 SDF-1 α 检测结果 $\bar{x} \pm s$

Table 2 Results of SDF-1 α detection

SDF-1a	高剂量组	中剂量组	低剂量组	模型组	空白对照组
血清	121.4 $\pm$ 26.2	148.3 $\pm$ 63.0	170.1 $\pm$ 47.9	404.5 $\pm$ 121.5	90.3 $\pm$ 11.5
培养液	73.1 $\pm$ 21.7	84.6 $\pm$ 25.7	86.9 $\pm$ 13.2	103.1 $\pm$ 20.6	72.5 $\pm$ 13.6

表3 TGF- β 1 检测结果 $\bar{x} \pm s$

Table 3 Results of TGF- β 1 detection

TGF- β 1	高剂量组	中剂量组	低剂量组	模型组	空白对照组
血清	7 148.1 $\pm$ 1 053.1	6 900.3 $\pm$ 888.6	6 629.6 $\pm$ 1 669.7	3 750.1 $\pm$ 629.1	8 115.3 $\pm$ 922.7
培养液	143.0 $\pm$ 13.7	132.4 $\pm$ 20.5	126.6 $\pm$ 23.8	91.8 $\pm$ 5.4	154.4 $\pm$ 23.2

3 讨论

Bcl-2 基因是 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因的缩写形式, 属于一类新的癌基因家族成员, 通过有效抑制许多不同类型细胞中不同类型的凋亡刺激诱导的细胞凋亡, 延长细胞活力而发挥其生物学作用, 对细胞周期的进程不发生影响。这说明它在细胞凋亡调控机制中起着十分重要的作用, 可能是许多因子作用的共同分子基础。一般认为细胞凋亡调节失衡是白血病等恶性肿瘤性疾病发病的重要机制之一^[4]。Bcl-2 蛋白高表达在 AL 中起重要作用, 与化疗的效果密切相关。Bcl-2 蛋白阳性表达率及表达强度愈高, 则患者化疗达完全缓解的几率愈低, 提示 Bcl-2 高表达者化疗敏感性较差, 对标准化疗方案不敏感, 白血病细胞易产生耐药^[5]。唐成和等^[6]研究 Bcl-2 在成人 ALL 患者中表达, 结果发现 Bcl-2 高表达, 且影响 ALL 疗效和预后, 可能与其抑制细胞凋亡, 增加细胞抗性导致细胞耐药性有关。隋雪梅等^[7]发现加速/急变期 CML 的凋亡率明显低于慢性期, 可能与 Bcl-2 基因的抗凋亡功能有关, 随着 CML 进展, Bcl-2 基因表达水平增高, 其抑制细胞凋亡的作用加强。本研究表明

模型组白血病小鼠 Bcl-2 高表达, 高、中、低剂量 PESV 均可以调低白血病小鼠的 Bcl-2 基因表达水平, 尤其是高剂量组效果更为明显, 与其他组有统计学差异($P<0.05$)。PESV 可能通过调低 Bcl-2 的表达, 解除了其对白血病细胞凋亡的抑制而发挥作用。

SDF-1 是由骨髓基质细胞或其它组织的一种基质细胞产生的一种趋化因子, 是趋化因子 CXC 亚家族的重要成员之一, SDF-1 α 是组织中 SDF-1 的最主要形式^[8]。SDF-1 及其受体结合发挥的生物学作用, 具有对白血病细胞促迁移、归巢以及抗凋亡作用, 对白血病细胞在骨髓基质层移动和定位起到重要作用, 这可能是血液肿瘤细胞增殖、浸润、耐药的重要原因之一^[9]。SDF-1 在维持髓内白血病细胞存活并进一步增殖过程中具有重要的生物学作用^[10]。本研究中观察到各治疗组 PESV 均可以显著调低血清和骨髓中的 SDF-1 α 的水平($P<0.05$), 说明高、中、低剂量组均有效, 效果随着剂量的增加而增强。PESV 通过调低 SDF-1 α 的表达水平, 起到抑制白血病细胞的增殖和浸润、延长白血病小鼠存活时间的作用。

参与体内造血的细胞因子可分为正、负两大类

调控因子,做为负调控因子的TGF- β 1能够抑制细胞增殖,诱导细胞凋亡。白血病细胞株持续表达多种刺激增殖的正调控因子及其受体,而导致正负调控因子的失衡可能是白血病发病的重要机制之一^[11]。有研究表明急性白血病初诊患者血清及骨髓TGF- β 1水平明显低于正常对照组($P<0.05$),完全缓解期TGF- β 1水平恢复正常,未缓解和复发患者TGF- β 1水平与初诊患者无明显差异^[12]。本研究结果显示白血病小鼠TGF- β 1水平明显低于正常值,而PESV可以调高TGF- β 1的表达,使其水平得到一定恢复。其机制可能是在一定程度上纠正了正负调控因子的失衡,抑制白血病细胞的增殖,诱导其凋亡。

全蝎,又名全虫,是中药里常用的一种虫类药,具有息风镇痉,攻毒散结,通络止痛的功效。现代药理研究显示具有抗癌活性,对多种肿瘤细胞有较强的抑制作用^[13]。PESV是全蝎粗毒经过提纯后得到一组分子量在6 000~7 000Da之间的多肽混合物。本课题通过体内实验,研究PESV对白血病小鼠血清和骨髓培养液上清Bcl-2、SDF-1 α 与TGF- β 1表达的影响,发现PESV不仅可以显著降低白血病小鼠的死亡率,提高其存活质量;并且可以很好的下调Bcl-2、SDF-1 α 的表达,上调TGF- β 1的表达。PESV发挥作用的机制可能是通过多种途径多靶点地作用于白血病细胞,通过干预细胞因子及其配体生物效应,从而达到阻抑白血病细胞的浸润,抑制白血病细胞增殖的作用。

参考文献

- 1 万增智,杨文华,史哲新,等.全蝎对人白血病HL-60细胞的研究[J].天津中医药,2005,22(1):65-67.
- 2 张文萍.蝎毒抗癌多肽的研究进展[J].中草药,2002,33(12):1143-1145.
- 3 杨文华,于文俊,史哲新,等.人白血病-NOD/SCID小鼠髓外浸润模型的建立与鉴定[J].临床与实验病理学杂志,2009,25(2):178-182.
- 4 Plaetzer K, Kiesslich T, Oberdanner CB, et al. Apoptosis following photodynamic tumor therapy: induction, mechanisms and detection [J]. Curr Pharm Des, 2005, 11(9): 1151-1165.
- 5 陶红芳,胡群,张柳清,等.SODD和Bcl-2蛋白表达在儿童急性白血病中的意义及相关性探讨[J].中国肿瘤临床,2007,34(3):136-139.
- 6 唐成和,李树军,张文林,等.抗凋亡基因Bcl-2在儿童急淋白血病中表达与早期治疗反应关系的初步研究[J].中国小儿血液与肿瘤杂志,2006,11(3):104.
- 7 隋雪梅,苏力,褚建新,等.Bcl-2基因表达在慢性粒细胞白血病急变中的意义[J].中华血液学杂志,1999,1(20):27-29.
- 8 Gleichmann M, Gillen C, Czardybon M, et al. Cloning and characterization of SDF-1 gamma, a novel SDF-1 chemokine transcript with developmentally regulated expression in the nervous system [J]. Eur J Neurosci, 2000, 12(6): 1857-1866.
- 9 曾东风,孔佩艳,陈幸华.SDF-1及其受体CXCR4在急性白血病与淋巴瘤表达的初步研究[J].中国实验血液学杂志,2005,13(2):274-277.
- 10 魏立,孔佩艳,陈幸华,等.抗CXCR-4单克隆抗体对与正常骨髓基质细胞共培养的HL-60细胞增殖活性的影响[J].中国肿瘤临床,2004,31(19):1084-1087.
- 11 陈元仲,吴勇,梁敏,等.白血病和正常血细胞的一些细胞因子及受体表达的比较研究[J].中国病理生理杂志,2002,18(12):1482-1485.
- 12 万楚成,夏云金,刘瑜,等.急性白血病患者血清及骨髓TGF- β 1水平测定的临床意义[J].邵阳医学院学报,2005,24(2):90-92.
- 13 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):708-711.

(2009-05-20收稿(2009-10-15修回)

(杨红欣校对)

(上接第428页)

- al insertion during apoptosis[J]. Apoptosis, 2007, 12(5): 887-896.
- 3 Singh S, Chhipa RR, Vijayakumar MV, et al. DNA damaging drugs-induced down-regulation of Bcl-2 is essential for induction of apoptosis in high-risk HPV-positive HEP-2 and KB cells[J]. Cancer Lett, 2006, 236(2): 213-221.
- 4 Raisova M, Hossini AM, Eberle J, et al. The Bax/Bcl-2 ratio determines the susceptibility of human melanoma cells to CD95/Fas mediated apoptosis[J]. J Invest Dermatol, 2001, 117(2): 333-340.
- 5 Zhang M, Zhang P, Zhang C, et al. Prognostic significance of Bcl-2 and Bax protein expression in the patients with oral squamous cell carcinoma[J]. J Oral Pathol Med, 2009, 38(3): 307-313.
- 6 Chen WL, Guo XF, Quan CS, et al. The expression and significance of bcl-2 and bax in each phase of the cell cycle in laryngeal carcinoma[J]. Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi, 2004, 39(3): 157-161.
- 7 Anagnostopoulos GK, Stefanou D, Arkoumani E, et al. Expression of Bax protein in gastric carcinomas. A clinicopathological and immunohistochemical study[J]. Acta Gastroenterol Belg, 2007, 70(3): 285-289.
- 8 Fan J, Li R, Zhang R, et al. Effect of Bcl-2 and Bax on survival of side population cells from hepatocellular carcinoma cells[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(45): 6053-6059.
- 9 Jeong SH, Lee HW, Han JH, et al. Low expression of Bax predicts poor prognosis in resected non-small cell lung cancer patients with non-squamous histology[J]. Jpn J Clin Oncol, 2008, 38(10): 661-669.
- 10 Qiu H, Yashiro M, Shinto O, et al. DNA methyltransferase inhibitor 5-aza-CdR enhances the radiosensitivity of gastric cancer cells [J]. Cancer Sci, 2009, 100(1): 181-188.
- 11 张晔,曲秀娟,刘云鹏,等.5-aza-2'-deoxycytidine影响胃癌细胞MGC823对奥沙利铂敏感性及其机制[J].中国肿瘤临床,2009,36(9):519-522.

(2009-05-26收稿)(2009-11-25修回)

(杨红欣校对)