论著

文章编号:1000-5404(2005)15-1548-03

蝎素SVCⅢ对人皮肤T细胞淋巴瘤细胞系Hut-78增殖及凋亡的影响

田中伟[1,2],宋向凤[2],冯 捷[1] ([1]西安交通大学第二医院皮肤科,西安 710004;[2]河南省新乡医学院基础医学院免疫学教研室,新乡 453003)

提 要:目的 探讨中药蝎素SVCⅢ对人皮肤T细胞淋巴瘤Hut-78细胞增殖的抑制作用及其诱导凋亡作用。**方法** 将蝎素以不同浓度分别加入对数期生长的人皮肤T淋巴瘤细胞Hut-78细胞中,通过MTT法、DNA凝胶电泳和FACS分析其抑制作用和诱导凋亡作用。**结果** 蝎素对人皮肤T淋巴瘤细胞株有明显的抑制作用,DNA电泳显示有凋亡特征的"梯状"条带出现,经FACS检测发现细胞周期被阻止在G_1期。**结论** 蝎素能够抑制人皮肤淋巴瘤细胞的增殖并能诱导凋亡,提示蝎素可能有抗皮肤肿瘤的作用。

关键词: 蝎素;皮肤淋巴瘤细胞;细胞凋亡;MTT

中图法分类号: R282.74;R730.23;R733.4 **文献标识码:** A

Effect of SVCⅢ on the proliferation and apoptosis of human cutaneous T-cell lymphoma Hut-78 cells

TIAN Zhong-wei[1,2], SONG Xiang-feng[2], FENG Jie[1] ([1]Department of Dermatology, The Second Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, [2]Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Xinxiang Medical College, Xinxiang 453003, China)

Abstract: Objective To explore the inhibition and apoptosis of the human cutaneous T-cell lymphoma cell lines Hut-78 by traditional Chinese medicine SVCⅢ. **Methods** After Hut-78 cells were treated with SVCⅢ of different concentration, the inhibition and apoptosis of Hut-78 cells was determined by MTT, agarose gel electrophoresis of DNA fragment and FACS. **Results** SVCⅢ could inhibit remarkably Hut-78 cells growth and DNA ladder was seen by agarose gel electrophoresis. The proliferation of Hut-78 cells were inhibited in G_1 stage by FACS. **Conclusion** SVCⅢ can promote growth retardation and apoptosis of human cutaneous T-cell lymphoma cell lines Hut-78, which suggests SVCⅢ has antineoplastic function.

Key words: SVCⅢ;cutaneous lymphoma cells;apoptosis;MTT

研究表明中药全蝎及蝎毒有息风止痛、通经活络、攻毒散节等功效,其中起主要作用的是蝎毒中的蝎毒组分Ⅲ(scorpion venom crude Ⅲ,SVCⅢ),其含有蛋白质、透明质酸酶、生物胺等成分,主治风湿、心脑血管病、皮肤病、半身不遂、各类炎症。它对肝癌细胞、胃癌细胞及多种细胞系等有明显的抑制作用[1,2]。本研究探讨蝎素对人皮肤T细胞淋巴瘤Hut-78细胞的抑制作用及其诱导凋亡作用。

1 材料与方法

1.1 材料

蝎素SCVⅢ由新乡医学院分析与测试实验室提供,用生理盐水配制成相应的实验所需浓度。人皮肤T细胞淋巴瘤细胞株Hut-78来自中国科学院上海生物化学和细胞生物研究所。噻唑蓝(MTT)、RPMI1640购自GIBCO公司。

1.2 细胞培养

Hut-78细胞悬浮生长在10%小牛血清的RPMI 1640细胞培养液中,在5% CO_2、37 ℃、饱和湿度条件下培养,2~3 d传代1次。

1.3 MTT实验

取对数期生长的细胞,调整细胞浓度为1×10^6/ml,接种于24孔培养板中,每孔体积为1 ml。共分5组,每组设3个平行孔,1组加生理盐水作为对照,另3组分别加入不同浓度的蝎素SCVⅢ 0.1、1、10 μg/L,并设空白对照,然后将培养板移入5% CO_2、37 ℃的培养箱中继续培养72 h。培养72 h后,每孔加入MTT(5 mg/ml)100 μl,4 h后离心收集细胞,加入250 μl DMSO充分裂解细胞,用酶标仪在492 nm和620 nm波长下测定光密度值(A),重复3次。

抑制率(%)=[(A对照-A实验)/(A对照-A空白)]×100%

作者简介:田中伟(1971-),男,河南省驻马店市人,博士研究生,讲师,主要从事皮肤肿瘤及分子免疫病理学方面的研究,发表论文10余篇。电话:(0373)3029125,E-mail:zhonwt@163.com

收稿日期:2004-10-08;修回日期:2005-04-20

1.4　细胞 DNA 片段化分析

收集细胞，加入细胞裂解液（50 mmol/L Tris、40 mmol/L EDTA、1.6 g/L SDS），充分混匀，加入 RNA 酶 0.1 g/L，50 ℃孵育 30 min，再用蛋白酶 K 1 g/L，37 ℃孵育 4 h，70 ℃加热 10 min，然后 2.0% 琼脂糖凝胶进行电泳。

1.5　流式细胞仪检测凋亡细胞周期和凋亡率

不同浓度的蝎素 SCVⅢ作用于培养的细胞 48 h 后，离心收集细胞，70% 乙醇固定，4 ℃过夜，离心去上清，悬浮于 PBS 中，碘化丙啶（PI）处理后，于 EPSCI 流式细胞仪分析。

1.6　统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 11.0 统计软件，行 F 检验。

2　结果

2.1　蝎素抑制细胞的增殖

不同浓度的蝎素对 Hut-78 细胞有抑制作用，浓度越大，抑制作用越强，见表 1。

表 1　不同浓度的蝎素对 Hut-78 细胞增殖作用的影响

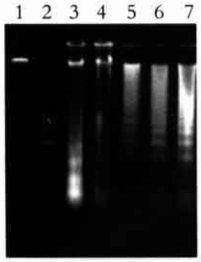
Tab 1　Effects of SVCⅢ of different concentration on Hut-78 cells

Group	D(570)	Inhibition rate(%)
Blank	0.34 ± 0.08	0
Control	2.36 ± 0.23	0
SVCⅢ		
0.1 μg/L	1.87 ± 0.18 *	24.37
1 μg/L	1.64 ± 0.21 *	36.63
10 μg/L	1.23 ± 0.17 *	55.94

*：F = 53.077，P < 0.01，*vs* control

2.2　凋亡 DNA 琼脂糖凝胶电泳

细胞基因组 DNA 提取后，1.8% 琼脂糖凝胶电泳可见凋亡 DNA 特征的“梯状”条带，浓度越高琼脂糖凝胶电泳凋亡 DNA 特征越明显，阴性对照仅在近电泳点样处出现基因组条带（图 1）。



1：Control；2：100 bp DNA marker；3，4：0.1 μg/L；5，6：1 μg/L；7：10 μg/L SVCⅢ

图 1　凋亡 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig 1　Agarose gel electrophoresis of DNA fragment

2.3　流式细胞仪检测凋亡细胞周期和凋亡率

FACS 检测结果显示，经不同浓度的蝎素处理后，细胞呈现典型的凋亡峰，细胞周期被阻止在 G_1 期，而且凋亡率随着药物浓度的增高而增高（表 2）。

表 2　不同浓度蝎素处理后的 FACS 的检测结果

Tab 2　FACS results of Hut 78 after treatment by SVCⅢ of different concentration

Group	Cell cycle(%)			Apoptosis rate (%)
	G_0/G_1	S	G_2/M	
Control	36.27 ± 3.36	22.28 ± 2.25	41.58 ± 2.38	5.2
SVCⅢ				
0.1 μg/L	44.34 ± 1.29	24.56 ± 1.63	31.52 ± 1.72 *	7.5
1 μg/L	49.26 ± 2.02	25.82 ± 2.78	25.02 ± 1.96 **	10.8
10 μg/L	52.45 ± 2.16	25.56 ± 1.73	22.21 ± 1.18	11.6

*：P < 0.05；**：P < 0.01，*vs* control

3　讨论

目前对于肿瘤的治疗除了手术和放疗以外，主要采用化疗方法，虽然生物治疗和基因治疗也在临床应用，但绝大部分仍处于实验阶段，皮肤肿瘤的治疗也是如此。临床上常用的化疗药物固然可使得大多数肿瘤患者得到缓解，但很大程度上病人都忍受着强度不等的毒副作用。因此从毒副作用较小的中药中寻找新的抗癌药物是一个发展方向，并且很多中草药已经临床证实有着较好的抗肿瘤作用。全蝎及蝎毒是临床上常用的一种中药，具有熄风止惊、解毒散结、消肿止痛的功效。其中起主要药理作用的蝎毒组分Ⅲ是从河南马氏钳蝎毒中分离出的一种成分，国内外学者已证实 SCVⅢ对人早幼粒白血病细胞株 HL60、人食管癌细胞 Eca109、人宫颈癌细胞 Hela 及人肝细胞癌细胞株 SMMC7721、人低分化鼻咽上皮癌细胞株 CNE2Z 和人胃癌细胞株 MGC803、白血病细胞等多种肿瘤细胞及细胞系有显著的细胞毒性作用。近期许多研究也表明蝎素不但具备细胞毒性作用，还有重要的生物应答调节剂的作用，可显著增强小鼠的免疫功能，促进 T 淋巴细胞的转化和 TNF-α 的分泌，使用药量显著减少并可增强其它抗肿瘤药物的效应[3~7]。

本研究选择皮肤 T 细胞淋巴瘤的细胞株 Hut-78 细胞为研究对象，将不同浓度的蝎素直接作用于 Hut-78 细胞。MTT 法检测显示，3 个不同浓度的蝎素对 Hut-78 细胞均有细胞毒作用，能明显抑制细胞的生长，引起细胞的凋亡，通过对细胞 DNA 琼脂糖凝胶电泳分析，可见有凋亡特征的“梯状”条带出现。经 FACS 法检测显示细胞的生长被阻止在 G_1 期，而且蝎素的这种作用还具有剂量依赖性，即随浓度的增加而显示出较强的抑制作用。但是在研究蝎素对肿瘤细胞的杀伤作用时，用药量较实际临床应用量要大得多，由于蝎毒在发挥抗肿瘤作用的同时，对人体正常细胞也存在一定的毒性，所以临床应用蝎毒治疗肿瘤的原则是采用高效的较低浓度，关于这方面的研究仍需做进

一步的探索。另外,迄今为止蝎毒的抗肿瘤作用机制尚未完全清楚。本研究结果提示:蝎素可以通过诱导肿瘤细胞发生凋亡而抑制其生长。为蝎素在皮肤肿瘤方面的临床治疗提供实验依据。

参考文献:

[1] 董伟华,韩雪飞,魏 玲,等. 蝎毒抗癌多肽对肝肿瘤的抑制作用研究[J]. 中国病理生理杂志,2000,16(2):123-127.

[2] 沈东海,高春芳,王元和,等. 蝎毒对人大肠癌细胞株体外抑制杀伤作用的观察[J]. 实用癌症杂志,2002,17(4):339-340,343.

[3] 卢 娜,王 辉,杨献军,等. 蝎毒组分Ⅲ对人头颈部鳞状细胞癌细胞生长的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学,2002,7(6):515-517.

[4] Liu Y F, Ma R L, Wang S L, *et al*. Expression of an antitumor-analgesic peptide from the venom of Chinese scorpion Buthus martensii karsch in *Escherichia coli*[J]. Protein Expr Purif, 2003, 27(2): 253-258.

[5] 杨建斌,李晓雯,董伟华,等. 东亚钳蝎毒抗癌多肽对H22荷瘤小鼠免疫调节作用[J]. 中国中药杂志,2000,25(12):736-739.

[6] Lyons S A, O'Neal J, Sontheimer H. Chlorotoxin, a scorpion-derived peptide, specifically binds to gliomas and tumors of neuroectodermal origin[J]. Glia, 2002, 39(2): 162-173.

[7] 王 辉,董 珂,孙书明,等. 蝎素SCVⅢ对荷瘤小鼠淋巴细胞转化及TNF-α水平的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2002,18(5):505-506.

(编辑 刘洪娥)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2005)15-1550-01

分娩启动宫缩时产妇血清及羊水中糖皮质激素改变

Glucocorticoid levels in serum and amniotic fluid at uterine contraction in delivery

陈 明,李正非,齐 心 (遵义医学院附属医院妇产科,遵义 563003)

分娩启动是一个十分复杂的生理过程,包括子宫体肌细胞及子宫内膜等在内的诸多因素已经被广为研究。大量研究表明,糖皮质激素是启动分娩的重要激素[1],成人血清中的糖皮质激素有着周期性的变化,本研究探讨足月妊娠妇女分娩启动宫缩时血清及羊水中糖皮质激素的变化。

1 资料与方法

1.1 研究对象及分组

选择2001年1月至2003年1月于我科住院的单胎足月妊娠妇女90例作为研究对象。根据产妇的宫缩情况不同分为:①无宫缩组($n=30$):产妇年龄(28±4)岁,孕周(39±1)周,孕妇无阵痛,胎心监护仪显示无宫缩,肛查宫口未开(无宫缩组因产道、胎位及社会因素行剖宫产手术);②宫缩正常组($n=30$):产妇年龄(27±3)岁,孕周(39±2)周,自然临产,胎心监护仪显示有规律宫缩,宫口扩张,产程进展顺利;③宫缩乏力组($n=30$):产妇年龄(27±3)岁,孕周(39±2)周,产妇于产程开始即出现宫缩乏力,每10 min宫缩1~2次,持续时间<30 s,强度(+),胎心监护仪显示宫内压<15 mmHg (1 mmHg=0.133 kPa),宫口扩张停滞。3组又根据采集标本的时间不同,分为上午组及下午组。3组产妇的年龄、孕周及新生儿体质量比较,差异无显著性意义($P>0.05$)。3组产妇均无病理妊娠及妊娠并发症,产程中无特殊用药。

1.2 方法

1.2.1 标本的采集 无宫缩组产妇于剖宫产麻醉用药前抽取前臂静脉血3 ml,剖宫产手术时抽取羊水3 ml,宫缩乏力组及宫缩正常组均于产程活跃期抽取前臂静脉血及经阴道各抽取羊水3 ml。

1.2.2 检测方法 应用化学发光免疫法测定3组产妇血清及羊水中的糖皮质激素水平。检测试剂盒由美国DPC公司提供。

1.2.3 统计学方法 采用SPSS 10.0统计学软件包行F检验、t及t'检验。

2 结果

在宫缩乏力组及宫缩正常组,血清及羊水中的糖皮质激素值上下午比较,均无显著性差异($P>0.05$),而在无宫缩组,有显著性差异($P<0.05$),结果见表1。

表1 各组血清及羊水中糖皮质激素的变化
(C_B/mmol·L^{-1}, $n=15$, $\bar{x}\pm s$)

组别	血清		羊水	
	上午	下午	上午	下午
无宫缩组	404.67±238.83	174.77±165.03*	364.00±238.98	56.73±22.84*
宫缩正常组	965.47±411.47	1045.77±282.0	689.29±265.88	643.19±243.01
宫缩乏力组	236.55±148.72	160.65±67.48	210.73±117.82	100.51±75.89

*:$P<0.05$,与上午比较

(下转1554页)

基金项目:贵州省卫生厅遵义市科学技术计划资助项目(E-012)
Supported by Science and Technology Research Plan of Health Bureau of Guizhou Province (E-012)

作者简介:陈 明(1963-),女,贵州省遵义市人,副主任医师,主要从事产科产力方面的研究。电话:(0851)8608466

收稿日期:2005-04-04;修回日期:2005-06-08