

# 广西虎纹捕鸟蛛毒诱导 U251 胶质瘤细胞凋亡 及 Caspase-3 的激活

刘圆圆<sup>1</sup>, 黄新<sup>2</sup>, 甄汉深<sup>1\*</sup>, 黄小秋<sup>1</sup>

(1. 广西中医学院药学院, 南宁 530001; 2. 广西中医学院附属瑞康医院, 南宁 530001)

**[摘要]** 目的:探讨虎纹捕鸟蛛毒抑制体外脑胶质瘤细胞系 U251 生长并诱导其凋亡,激活半胱天冬酶-3 (Caspase -3) 的作用。方法:将 U251 细胞分为 3 组:空白组、顺铂组、加药组(虎纹捕鸟蛛毒素浓度为 37.5, 50, 75, 100, 150 mg·L<sup>-1</sup>), 毒素作用 24, 48 h 后用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测细胞活性并与顺铂组、空白组做对比;流式细胞仪 AnnexinV-FITC 检测细胞凋亡率;Caspase-3 分光光度法检测 Caspase-3 的相对活性。结果:虎纹捕鸟蛛毒素剂量为 37.5, 50, 75, 100, 150 mg·L<sup>-1</sup>时,对 U251 细胞的增殖有显著性抑制作用( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), IC<sub>50</sub> 为 53.48 mg·L<sup>-1</sup>。虎纹捕鸟蛛毒素可诱导 U251 胶质瘤细胞凋亡并呈浓度依赖关系。在剂量为 150 mg·L<sup>-1</sup>诱导 48 h, 细胞早期凋亡率 84.1%, 晚期凋亡率 4.48%。用不同浓度分别处理细胞, Caspase-3 活性于 48 h, 150 mg·L<sup>-1</sup>时达高峰, 对细胞中的执行分子 Caspase-3 的激活速度快, 活化程度为 9.23, 并存在剂量依赖关系和浓度依赖性的升高。结论:虎纹捕鸟蛛毒素明显抑制 U251 细胞生长并诱导其发生凋亡, 凋亡过程中有 Caspase-3 的激活。

**[关键词]** 虎纹捕鸟蛛毒;胶质瘤 U251;细胞凋亡;半胱天冬酶-3

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)06-0184-04

## Research on Induction of Apoptosis of Neurogliocytoma U251 and Activation of Caspase-3 by Toxin of *Selenocosmia huwena* in Guangxi

LIU Yuan-yuan<sup>1</sup>, HUANG Xin<sup>2</sup>, ZHEN Han-shen<sup>1\*</sup>, HUANG Xiao-qi<sup>1</sup>

(1. College of Pharmacy, Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530001, China;

2. Ruikang Hospital, Affiliated Hospital of Guangxi Traditional Chinese  
Medical University, Nanning 530001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the *in vitro* effect of the toxin of *Selenocosmia huwena* on inhibiting the growth and inducing the death of cells of neurogliocytoma, and activating caspase-3. **Method:** MTT was applied to obtain the growth curves of cell affected by different concentrations of toxin of *S. huwena* for 24 h and 48 h. AnnexinV-FITC was used to test the death rate. Absorption spectrometry was adopted to measure the relative activity of caspase-3. **Result:** The toxin of *S. huwena* evidently inhibited the growth of U251, and it could induce the death of cells neurogliocytoma with concentration-dependent manner. With cells affected by different concentrations of toxin for 24 h, we found that the activity of caspase-3 reached the maximum at 48 h with concentration-dependent manner. **Conclusion:** The toxin of *S. huwena* evidently inhibits the growth of U251 and induces the death of U251, and the process include the activation of caspase-3.

**[Key words]** toxin of *Selenocosmia huwena*; gliocytoma U251; cell apoptosis; caspase-3

**[收稿日期]** 20100927(010)

**[基金项目]** 广西自然科学基金项目(桂科自 0728189)

**[第一作者]** 刘圆圆, 在读硕士, 专业方向: 药物分析, Tel: 13481063938, E-mail: 275189113@qq.com

**[通讯作者]** \* 甄汉深, 本科, 教授, 从事中药分析和药物分析研究, Tel: 13557719981, E-mail: 8zhen@163.com

胶质瘤是颅内最常见的恶性肿瘤,由于其具有多质性和浸润性的特点,手术难以完全切除,放射治疗不太敏感,化学治疗也极易产生耐药。广西南宁一带的虎纹捕鸟蛛 *Selenocosmia huwena*,最近被鉴定为蜘蛛新种,属于捕鸟蛛科<sup>[1]</sup>。作为一种天然的毒素,它是由神经毒性肽、蛋白质和低相对分子质量物质所构成的复杂混合物,具有多种活性,在生物医学和药理学研究领域中具有较高的应用研究价值。目前已有研究报道证明这一毒素对体内恶性肿瘤有明显的抑制作用<sup>[2]</sup>,其抑制机制是阻断释放能促进或加速肿瘤生长的生长因子信号的 Ca 通道,可有助于肿瘤的治疗。本文通过研究旨在证明虎纹捕鸟蛛毒对培养的人脑胶质瘤 U251 细胞生长有抑制作用,并探讨其诱导凋亡的过程,为临床应用提供必要的实验基础。

## 1 材料

**1.1 细胞株** 人类神经脑胶质瘤细胞株 U251 购自南京凯基生物科技发展有限公司。

**1.2 药物** 广西虎纹蛛粗毒 *Selenocosmia huwena* Toxin(螫肢末端的毒腺分泌的毒液提取)粉末购自广州中医药大学,用 GIBICO 公司的 DMEM 培养基配制成毒素质量浓度  $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,置  $-20^\circ\text{C}$  冻存,临用前再稀释至所需浓度。

**1.3 试剂** PBS(磷酸缓冲液)配制:NaCl(8 g),KCl(0.2 g), $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (1.44 g), $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (0.24 g),调 pH7.4,定容 1 L,高压消毒后置  $4^\circ\text{C}$  保存;DMEM 高糖培养基(批号 NVH0297)和胰蛋白酶(0.25% EDTA)购自 GIBICO 公司;胎牛血清(批号 20090711)购自杭州四季青生物工程材料有限公司;四甲基偶氮唑蓝(MTT)、青霉素、链霉素均为美国 Sigma 公司产品;Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(批号 20090924),Caspase-3 分光光度法检测试剂盒均购自南京凯基生物科技发展有限公司(批号 20090809);BCA 蛋白浓度测定试剂盒购于碧云天(Beyotime)生物试剂公司。

**1.4 仪器** 流式细胞仪(美国贝克曼—特公司型号 EPICSXL);高速离心机(德国 Eppendorf 5804 型);水套式  $\text{CO}_2$  培养箱(美国 Forma 3111);紫外-可见分光光度计(日本岛津 UV-1700 型);酶标仪(BIO-RAD 公司);TDZ5-WS 多管架自动平衡离心机。

## 2 方法

**2.1 细胞培养** 胶质瘤 U251 细胞以含 12% 的胎

牛血清,  $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  青霉素,  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  链霉素, 0.2%  $\text{NaHCO}_3$  和 0.47% HEPES 的 DMEM 培养液,放置  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养,隔天用 0.25% 胰蛋白酶消化传代,实验时取对数期生长细胞。

**2.2 MTT(四甲基偶氮唑蓝法)检测细胞活性** 加药诱导,实验时取对数期生长细胞以 0.25% 胰蛋白酶消化,  $800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min 后,弃上清液。加入培养液,稀释成  $1 \times 10^4$  个/mL 的单细胞悬液,接种至 96 孔板内,每个孔为 100  $\mu\text{L}$ 。细胞培养 24 h 后实验分为 3 大组:阴性对照组(不加药),阳性对照组(顺铂质量浓度为  $37.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ),加药组(作用 24, 48 h):  $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  蛛毒素稀释至终浓度分别为 150, 100, 75, 50,  $37.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,并以空白孔调零,实验中每个亚组设 5 个复孔。药物作用 24 h(或 48 h)后,每孔加入 20  $\mu\text{L}$  MTT 溶液( $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,即 0.5% MTT),继续培养 4 h 后小心吸去孔内培养液。每孔加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO(二甲基亚砷),置摇床上低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解。在酶标分析仪检测  $A_{490 \text{ nm}}$  处测量各孔的吸光值,计算细胞抑制率并以对数概率单位法求  $\text{IC}_{50}$ 。

细胞抑制率 = (对照组 A - 实验组 A) / 对照组 A  $\times 100\%$

**2.3 流式细胞仪 Annexin V-FITC 检测细胞凋亡率**

取对数期生长 U251 细胞,用培养液稀释成  $2 \times 10^5$  个/mL 的单细胞悬液,接种于 6 孔板内,将各浓度蛛毒素对细胞作用 24, 48 h,并设立对照组细胞,每个浓度设立 3 个复孔。收集经药物作用的细胞及对照组细胞,用 PBS(pH7.4)漂洗 2 次,离心( $2000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 5 min),以去除细胞碎片,弃上清,置冰浴;加入 500  $\mu\text{L}$  结合缓冲液重悬细胞,经过滤筛过滤至另一试管,加入 5  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC 和 5  $\mu\text{L}$  PI 于细胞悬液中,轻轻混匀;将试管置于常温避光染色 15 min;流式细胞仪进行检测,分析药物作用后细胞凋亡的百分比。

**2.4 Caspase-3 活性测定** 将 U251 细胞分为 3 组,每个样品细胞量约为  $(3.5 \sim 5) \times 10^6$ : 阴性对照组(未加药);阳性对照组(顺铂  $37.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ),加药组(150, 100, 75, 50,  $37.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的蛛毒诱导 24, 48 h),各组均设 4 个复孔。消化收集细胞,用 PBS 洗涤细胞 2 次,离心( $2000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 5 min),尽量去除 PBS 上清。在收集的沉淀细胞中加入 50  $\mu\text{L}$  冰冷 Lysis Buffer(每 50  $\mu\text{L}$  Lysis Buffer 加入 0.5  $\mu\text{L}$  DTT),吹打均匀,冻融 3 次;  $4^\circ\text{C}$  离心

(10 000 r·min<sup>-1</sup>, 1 min);小心吸取上清转移至新的管中,放置在冰上。取上清 2 μL,BCA 法测定其中的蛋白浓度。吸取 50 μL 含 100 ~ 200 μg 蛋白的细胞上清,加入 50 μL 的冰冷 Lysis Buffer;再加入 50 μL 的 2 × Reaction Buffer (每 50 μL 2 × Reaction Buffer 加入 0.5 μL DTT);最后加入 5 μL Caspase-3 Substrate 并置于 37 ℃ 避光孵育 4 h;用酶标仪在 λ = 405nm 测定吸光值。通过计算  $A_{\text{诱导剂}}/A_{\text{阴性对照组}}$  的倍数来确定凋亡诱导剂组 Caspase-3 活化程度。

**2.5 统计学方法** 采用  $F, q, \chi^2$  检验,并做剂量效应和时间效应的直线回归和相关分析(相关系数用  $t$  检验),对数概率单位法求 IC<sub>50</sub>。统计软件 SPSS11.0。

3 结果

**3.1 蛛毒素对 U251 细胞作用的 MTT 活性检测** 细胞增殖抑制实验比较了蛛毒素的各浓度对 U251 细胞作用 24 h 有不同的抑制效果,求出 IC<sub>50</sub> 为 53.48 mg·L<sup>-1</sup>。结果显示,随着蛛毒素浓度的升高和时间的延长,细胞增殖抑制越明显,并呈现一定的量效依赖关系。见表 1。

表 1 虎纹蛛毒素对 U251 细胞作用 24 h 的抑制作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

| 组别  | 终质量浓度<br>/ mg·L <sup>-1</sup> | A             | 抑制率<br>/% |
|-----|-------------------------------|---------------|-----------|
| 空白  | —                             | 0.633 ± 0.023 | —         |
| 顺铂  | 37.5                          | 0.338 ± 0.024 | 46.4      |
| 蛛毒素 | 37.5                          | 0.447 ± 0.022 | 29.39     |
|     | 50                            | 0.365 ± 0.038 | 42.38     |
|     | 75                            | 0.335 ± 0.04  | 47.06     |
|     | 100                           | 0.298 ± 0.019 | 52.91     |
|     | 150                           | 0.285 ± 0.026 | 54.84     |

**3.2 流式细胞分析仪检测细胞的凋亡率** 经 150, 100, 75, 50, 37.5 mg·L<sup>-1</sup> 的蛛毒素处理 24, 48 h 后与空白组的凋亡率(包括早期及晚期凋亡),如表 2。从表中看出蛛毒素在 150 mg·L<sup>-1</sup> 使胶质瘤细胞的凋亡率最大;随着浓度增大,时间延长至 48 h,细胞死亡率增大;相对于顺铂组,凋亡率相当,死亡率却比之要大。虎纹蛛毒素对 U251 细胞产生显著性凋亡作用,并有浓度依赖和时效关系。见表 2。

**3.3 Caspase-3 活性测定分析** 从表 3 可以看出随着药物浓度增大、作用时间延长, Caspase-3 的活化程度增大; 37.5, 50 mg·L<sup>-1</sup> 的蛛毒素在诱导细胞

| 表 2 蛛毒素各个浓度作用 U251 细胞 24, 48 h<br>对细胞凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ ) |            |                              |                            |             |
|-----------------------------------------------------------------------|------------|------------------------------|----------------------------|-------------|
| 组别                                                                    | 作用时间<br>/h | 终质量浓度<br>/mg·L <sup>-1</sup> | 凋亡率/%                      | 死亡率/%       |
| 空白                                                                    | 24         | —                            | 11.43 ± 2.14               | 1.47 ± 0.81 |
| 顺铂                                                                    | 24         | 37.5                         | 92.00 ± 3.78               | 2.32 ± 2.70 |
| 蛛毒素                                                                   | 24         | 37.5                         | 31.11 ± 3.87 <sup>1)</sup> | 1.03 ± 1.19 |
|                                                                       |            | 50                           | 61.49 ± 5.37 <sup>2)</sup> | 5.30 ± 0.72 |
|                                                                       |            | 75                           | 72.65 ± 4.72 <sup>2)</sup> | 4.57 ± 3.58 |
|                                                                       |            | 100                          | 63.46 ± 2.85 <sup>2)</sup> | 2.09 ± 2.28 |
|                                                                       |            | 150                          | 69.33 ± 7.67 <sup>2)</sup> | 4.64 ± 4.74 |
| 空白                                                                    | 48         | —                            | 11.41 ± 4.06               | 2.51 ± 0.82 |
| 顺铂                                                                    | 48         | 37.5                         | 43.99 ± 6.02               | 2.77 ± 0.59 |
| 蛛毒素                                                                   | 48         | 37.5                         | 58.32 ± 5.3 <sup>1)</sup>  | 5.63 ± 1.55 |
|                                                                       |            | 50                           | 65.08 ± 7.9 <sup>2)</sup>  | 6.00 ± 4.01 |
|                                                                       |            | 75                           | 72.7 ± 2.26 <sup>2)</sup>  | 5.84 ± 5.59 |
|                                                                       |            | 100                          | 77.40 ± 2.13 <sup>1)</sup> | 7.52 ± 7.59 |
|                                                                       |            | 150                          | 83.29 ± 8.58 <sup>2)</sup> | 7.77 ± 6.75 |

注:与空白组对照比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。  
48 h 时的活化程度是 24 h 的大约 2 倍;随着质量浓度增大到 75, 100 mg·L<sup>-1</sup>, 作用 48 h 的活化程度是 24 h 的大约 1.5 倍;浓度再增大到 150 mg·L<sup>-1</sup>, 两个作用时间的活化程度几乎相同。这表明蛛毒素在 50 mg·L<sup>-1</sup> 时对细胞中的执行分子 Caspase-3 的激活速度快,并存在剂量依赖关系。

4 讨论

胶质瘤是颅内最常见的恶性肿瘤,其发病率在国内占颅内肿瘤的 35.26% ~ 60.96%, 平均 44.69%<sup>[3]</sup>。因其多质性和浸润性的特点,手术切除难以完全彻底,化疗多产生耐药,复发率高,预后差,是目前临床治疗的难题。

虎纹捕鸟蛛毒素作为一种天然的毒素,在生物和人类医学研究中占据重要的地位。它是由神经毒性肽、蛋白质和低相对分子质量物质所构成的复杂混合物,具有多种活性。虎纹捕鸟蛛毒素具多种生理作用,有研究表明对食管癌细胞株具有诱导凋亡作用<sup>[4]</sup>, 蜘蛛毒素是一种新型的体内和体外均有疗效的抗肿瘤药。我们进行的抑瘤实验表明虎纹捕鸟蛛毒素能明显抑制胶质瘤 U251 株生长, 24 h 质量浓度为 75 mg·L<sup>-1</sup> 的抑制率为 47.06%, 48 h 质量浓度为 75 mg·L<sup>-1</sup> 的抑制率为 49.68%, 有明显的量-效和时-效关系;应用流式细胞分析方法测得在浓度为 75 mg·L<sup>-1</sup> 对比空白组时胶质瘤细胞的凋亡率最大,随

表 3 蛛毒素对 U251 细胞作用 24,48 h 的 Caspase-3 活性检测 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

| 组别  | 终质量浓度<br>/mg·L <sup>-1</sup> | 药物作用 24 h |                  |                   | 药物作用 48 h |                  |                   |
|-----|------------------------------|-----------|------------------|-------------------|-----------|------------------|-------------------|
|     |                              | 蛋白量/μg    | A <sub>405</sub> | Caspase-3<br>活化程度 | 蛋白量/μg    | A <sub>405</sub> | Caspase-3<br>活化程度 |
| 空白  | —                            | 60.5      | 0.131            | —                 | 60.5      | 0.131            | —                 |
| 顺铂  | —                            | 236       | 1.298            | 9.9               | 236       | 1.298            | 9.9               |
| 蛛毒素 | 37.5                         | 115.6     | 0.244            | 1.86              | 119       | 0.604            | 4.61              |
|     | 50                           | 124.9     | 0.348            | 2.65              | 126.5     | 0.864            | 6.6               |
|     | 75                           | 125.2     | 0.618            | 4.72              | 140.5     | 0.924            | 7.05              |
|     | 100                          | 162.9     | 0.677            | 5.17              | 158       | 0.937            | 7.15              |
|     | 150                          | 212.3     | 1.125            | 8.59              | 229       | 1.21             | 9.23              |

着浓度增大和时间延长,细胞死亡率增大;倒置显微镜下观察,随着蛛毒素浓度的增加细胞数目逐渐减少,细胞形态逐渐变圆,折光性减弱,贴壁细胞减少,浮起细胞增多,并可见细胞膜突起呈小泡样,少数细胞发生崩解破裂,呈坏死状,结果表明细胞有明显的调亡征象。Caspase-3 在介导细胞调亡的过程中起着非常重要的作用,在脑肿瘤细胞调亡过程也扮有重要角色,被称为终结者。脑组织内 Caspase-3 表达水平较高,与神经元细胞调亡关系密切但通常情况下 Caspase-3 以无活性的酶原形式存在,只有在调亡因素刺激下,被上游蛋白酶切割才能活化,裂解相应的胞浆胞核底物,最终导致细胞调亡。本实验针对 Caspase-3 的表达水平进行了 Caspase-3 分光光度法实验,测定了 Caspase-3 的活化程度,此研究结果表明该虎纹捕鸟蛛毒对人神经胶质瘤 U251 细胞具有很强的诱导调亡作用并存在剂量依赖关系。虎纹捕鸟蛛毒素可能成为新的治疗人胶质瘤或辅助治疗的药物,这为今后进一步研究蜘蛛毒素抗肿瘤作用机

理提供了试验依据。虎纹捕鸟蛛毒素诱导 U251 胶质瘤细胞调亡的前景较好,但具体的主要活性成分和蛛毒抑制胶质瘤生长并诱导调亡的具体机制还需更深入探讨。

[参考文献]

[ 1 ] 王家福,彭贤锦,谢莉萍. 我国南方捕鸟蛛一新种 [J]. 湖南师范大学自然科学学报,1993,16 (1):72.

[ 2 ] Gao L, Shan B E, Chen J, et al. Effects of spider Macrothele raven venom on cell proliferation and cytotoxicity in HeLa cells [ J]. Acta Pharmacol Sin, 2005,26(3):369.

[ 3 ] 王忠诚. 神经外科学 [M]. 武汉:湖北科学技术出版社. 1998:430.

[ 4 ] Gao L, Feng W, Shan B E, et al. Inhibitory effect of the venom of spider Macrothele raveni on proliferation of human hepatocellular carcinoma cell line BEL-7402 and its mechanism [J]. Ai Zheng,2005,24(7):812.

[责任编辑 聂淑琴]