

385:260-265.

[21] David DG, 1997, *Neuron*, 18:183-186.[22] Lu, K. P., and Means, A. R., 1993, *Endocrine. Rev.*, 14:40-58.[23] Widing, M., et al., 1996, *J. Cell Biol.*, 135:191-199.[24] Bellomo, G., et al., 1992, *Cancer Res.*, 52:1342-1346.[25] Yamaguchi, M., and Oishi, K., 1995, *Mol. Cell. Biochem.*, 148:33-37.[26] Kong, S. K., et al., 1997, *Oncology*, 54:55-62.

研究工作

眼镜蛇毒直接溶解因子对人肝癌细胞株细胞内游离钙动态变化的影响*

龚海云 乐毅**余清声 管锦霞

(广州医学院广州蛇毒研究所 广州 510182 **第一军医大学生生化教研室 广州)

眼镜蛇毒直接溶解因子(direct lytic factor, DLF)又名心脏毒素(cardiotoxin, CTX)、膜毒素,对多种肿瘤细胞有溶胞作用。其机制认为是 DLF 与细胞膜上蛋白质结合产生跨膜通道;激活内源性钙通道;抑制 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶和 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶的活性,细胞内钙离子浓度增加是 DLF 作用的最终途径^[1]。关永源等^[2]用 Fura-2 荧光技术测定心脏毒素对大鼠泪腺细胞胞浆 Ca^{2+} 浓度的影响。现有报道多是测定一群细胞内的 Ca^{2+} 浓度,未见研究在 DLF 作用下单个细胞内 Ca^{2+} 的动态变化。570 型粘附式细胞仪的应用,使有可能在以秒计的短时间内测得单个细胞内 Ca^{2+} 的动态变化^[3]。本文研究 DLF 刺激下单个肝癌细胞胞浆内 Ca^{2+} 的动态变化。

材料和方法

1. 直接溶解因子

从广东产中华眼镜蛇(*Naja naja atra*)毒柱层析分离,由本所提供。

2. 人肝癌细胞株 H₇₄₀₂ 的培养

人肝癌细胞株 H₇₄₀₂ 蒙广州珠江医院血液科郑景熙教授惠赠。

将细胞用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液调整细胞浓度为 $10^6/\text{ml}$, 加至底部有孔的 Petri 培养皿内(直径为 35mm 的 Petri 培养皿,底部有一直径为 10mm 的圆孔,将一片 22mm² 的一级盖玻片粘于圆孔底部),每皿 2ml。在 37℃ 5%CO₂ 培养箱内培养 24h 后,测定细胞内游离钙水平。

3. 肝癌细胞内游离钙水平的动态变化测定

弃去培养皿中培养液,用 pH7.4 磷酸缓冲液(PBS)洗涤 3 次后,加入 $1\mu\text{mol/L}$ 荧光染料 Fluo-3-AM(美国 Molecular Probes 公司产品)0.5ml,于 37℃ 水浴中温育 1h,弃去染液,用 PBS 轻洗 2 次,再滴入 PBS 0.5ml,形成薄层液膜覆盖细胞。将培养皿置于 570 型粘附式细胞仪(Adherent Cell Analysis and Sorting Cytometer,简称 ACAS 570,美国 Meridian 公司产品)的显微镜载物台上,用 488nm 波长可见光激发荧光染料。细胞内游离的 Fluo-3 经激发后发出 520nm 波长的荧光,其荧光值反映了细胞内 Ca^{2+} 的水平。确定待测细胞后,用激光连续扫描程序,每隔 20s 扫描一次,扫描 3 次后迅速加入 $2\mu\text{g/ml}$ 去离子水的 DLF $10\mu\text{l}$ 溶于去离子水,继续扫描观察细胞内 Ca^{2+} 动态变化。用荧光强度的变化来表示细胞内游离钙的相对值,对所存储的图像进行定量分析统计观察荧光值变化。每种条件下实验共做 3 次,每次每组做 2 个培养

* 广东省科委资助课题。

皿,每皿测4—8个细胞。各组细胞图像处理过程中主要参数均相同,将6次实验所测细胞在各指定时间点的荧光值进行方差分析(ANOVA)处理,比较加入DLF前后的统计学差异。

结 果

1. 细胞外环境无 Ca^{2+} 时,加入 DLF 对肝癌细胞内游离钙动态变化的影响。

加入 DLF $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 后,测得细胞胞浆 Ca^{2+} 迅速升高,达到峰值后很快下降,见图1。在第70s的荧光值与加 DLF 前有非常显著的差异, $P < 0.01$ 。其余时间点均无显著差异。

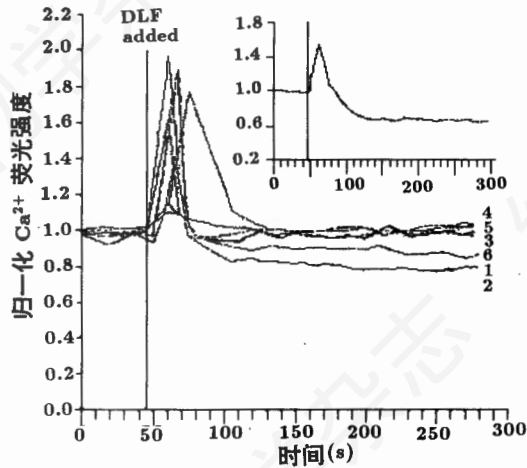


图1 细胞外无 Ca^{2+} 时,DLF 对 H_{7402} 细胞内 Ca^{2+} 动态变化影响的1次实验记录 (每条曲线表示一个细胞内 Ca^{2+} 的水平。右上小图为大图的平均值曲线。)

2. 细胞外环境加入 $1\text{mmol}/\text{L}$ CaCl_2 , DLF 对肝癌细胞内游离钙动态变化的影响。

这种浓度的 Ca^{2+} 为生理性细胞外 Ca^{2+} 浓度。加入 DLF $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 后,胞浆 Ca^{2+} 迅速上升,并持续在较高水平,加入 DLF 后 Ca^{2+} 荧光强度与加 DLF 前(第50s)相比,均有显著性差异,第100s $P < 0.05$,第200s,300s,400s,500s P 均 < 0.01 。见图2。

3. 细胞外环境加入 $10\text{mmol}/\text{L}$ CaCl_2 , DLF 对胞浆 Ca^{2+} 动态变化的影响。

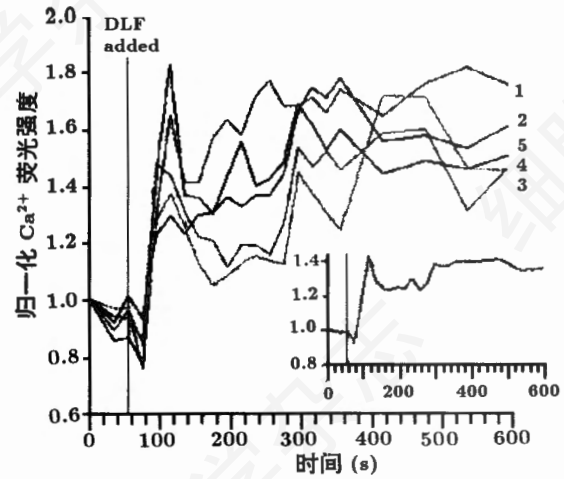


图2 细胞外加入 $1\text{mmol}/\text{L}$ CaCl_2 , DLF 对 H_{7402} 细胞内 Ca^{2+} 动态变化影响的1次实验记录 (每条曲线表示一个细胞内 Ca^{2+} 的水平。小图为大图的平均值曲线。)

加入 DLF $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 后,胞浆 Ca^{2+} 无显著变化, $P > 0.05$,见图3。

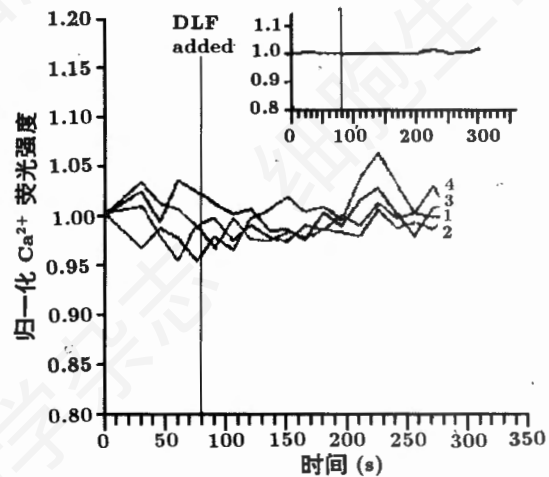


图3 细胞外加入 $10\text{mmol}/\text{L}$ CaCl_2 , DLF 对 H_{7402} 细胞内 Ca^{2+} 动态变化影响的1次实验记录 (每条曲线表示一个细胞内 Ca^{2+} 的水平。小图为大图的平均值曲线。)

讨 论

荧光染料 Fluo-3 是钙整合剂 EGTA 的衍生物,对 Ca^{2+} 具有较高的特异性和亲和力。它本身不能通过细胞膜,但被乙酰甲酯化(Fluo-

3-AM)后即可进入细胞,经细胞内非特异性酯酶水解,释放出染料分子 Fluo-3 与 Ca^{2+} 结合,激发波长为 488nm,发射波长为 520nm。加入 DLF 后荧光值升高表示胞浆 Ca^{2+} 增多。

细胞外液 Ca^{2+} 浓度约为胞质内的 10 000 倍,细胞内钙稳态的调节有 2 个方面:① 调节跨胞质膜钙的流动,此过程靠膜上 Ca^{2+} -ATP 酶的活性将胞质内 Ca^{2+} 泵出、 Na^{+} - Ca^{2+} 交换、以及质膜钙通道开放使细胞外的 Ca^{2+} 进入细胞;② 胞内钙库与胞质之间的 Ca^{2+} 交换。本实验用 570 型粘附式细胞仪检测单个细胞内 Ca^{2+} 的动态变化,结果显示 DLF 使胞浆 Ca^{2+} 浓度升高的原因是既通过影响细胞内 Ca^{2+} 释放又通过胞外 Ca^{2+} 内流,与以往关永源等^[2]在大鼠泪腺细胞的研究结果一致。

肝癌细胞标记上 Fluo-3 后,用 PBS 清洗并覆盖细胞,使细胞处在无钙环境(图 1),加入 DLF 后细胞内 Ca^{2+} 荧光强度升高,其 Ca^{2+} 的来源不可能是细胞外,只能是来自胞内钙库,此时胞浆 Ca^{2+} 增加迅速而短暂,达到峰值后很快下降,可能是随后 Ca^{2+} 被内质网等细胞器重新摄取,或被泵出细胞外而使胞浆内 Ca^{2+} 降低。

在细胞培养皿加入 1mmol/L CaCl_2 ,以模拟生理性细胞外 Ca^{2+} 浓度,DLF 使胞浆 Ca^{2+} 迅速增加,稍下降后又持续升至较高水平(图 2)。与图 1 的曲线对照,可能首先是内质网释放 Ca^{2+} ,使胞浆 Ca^{2+} 增加,接着细胞膜上 Ca^{2+} 通道开放,使胞外 Ca^{2+} 内流,少许的 Ca^{2+} 内流即触发内质网释放更大量的钙,导致胞浆 Ca^{2+} 进一步升高。顾本贤等^[4]发现膜毒素 C 对狗的心肌浆网和艾氏腹水瘤细胞质膜 Ca^{2+} -ATP 酶有抑制作用,可能也是此时胞浆钙持续升高的一个原因。

在细胞培养皿内加入 10mmol/L CaCl_2 ,加入 DLF 后胞浆 Ca^{2+} 无显著变化,其胞浆 Ca^{2+} 水平与图 1、图 2 中加入 DLF 前胞浆 Ca^{2+} 水平近似,在细胞外高钙情况下 DLF 对胞浆 Ca^{2+} 没有影响,提示细胞外高浓度钙可阻断 DLF 使胞内 Ca^{2+} 升高的作用。已有报道表明,

细胞外高浓度 Ca^{2+} (还有 La^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 等多价阳离子)在 5—10mmol/L 时,对蛇毒心脏毒素的种种生理效应均有拮抗作用,包括阻断豚鼠心脏乳头肌条收缩^[5]、骨骼肌收缩、溶血、血小板聚集^[6]等。其机制可能是:心脏毒素是强碱性多肽,含有许多碱性的灰水性氨基酸残基,带正电荷。在细胞膜上的结合位点可能是带多量负电荷的磷脂酰丝氨酸。多价阳离子存在时,与心脏毒素竞争性结合胞质膜上的结合位点,使毒素与胞质膜结合减少而阻断毒素的生物效应。心脏毒素剂量增加时,多价阳离子的拮抗作用减弱,提示其作为竞争性抑制^[2,5~7]。我们还观察了不同浓度的 DLF 对细胞内 Ca^{2+} 动态变化的影响。0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DLF 加入细胞外无钙及生理 Ca^{2+} 浓度的 H_{7402} 细胞中,荧光值无变化。200s 后加入 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DLF,即发生与图 1 和图 2 相似的变化。加入 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DLF, Ca^{2+} 变化的动态曲线与 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DLF 的无明显不同。表明 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 左右的 DLF 浓度是本实验中的最适浓度。

已知细胞内 Ca^{2+} 浓度增加是细胞损伤以至死亡的重要因素^[8]。我们在另外的研究中观察到 DLF 对 H_{7402} 细胞具有杀伤作用, IC_{50} 为 2.47 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ^[9]。本研究表明,蛇毒对一些肿瘤细胞的杀伤和生长抑制作用,与它增加细胞内 Ca^{2+} 有重要关系。

摘 要

用荧光染料 Fluo-3 标记人肝癌细胞株 H_{7402} 细胞内游离钙,在粘附式细胞仪观察检测单个细胞内游离钙水平的动态变化,细胞在无钙环境中,直接溶解因子(DLF)刺激下细胞内游离钙迅速升高,达到峰值后下降;在细胞培养皿中加入 1mmol/L CaCl_2 , DLF 使胞浆游离钙持续升高;加入 10mmol/L CaCl_2 , DLF 刺激后胞浆游离钙水平无明显变化,表明 DLF 能引起胞内 Ca^{2+} 释放和胞外 Ca^{2+} 内流,细胞外高浓度 Ca^{2+} 能阻断 DLF 升高细胞内 Ca^{2+} 浓度的

作用。

关键词: 眼镜蛇毒 直接溶解因子 细胞内游离钙 人肝癌细胞株 粘附式细胞仪

参 考 文 献

- [1] 李秋菊等, 1991, 动物学杂志, 26: (1): 49-52.
- [2] 关永源等, 1990, 中国药理学通报, 6(5): 296-299.
- [3] 张薇等, 1994, 第一军医大学学报, 14(1): 43-45.
- [4] 顾本贤等, 1989, 生物化学与生物物理学报, 21(1): 27-33.
- [5] Huang SJ et al., 1996, *Life science*, 59(4): PL55-60.
- [6] Huang SJ et al., 1996, *Res Commun Molecular Pathol Pharmacol.*, 94(2): 103-110.
- [7] Fletcher JE et al., 1993, *Toxicol.*, 31(6): 669-695.
- [8] Schanne FAX et al., 1979, *Science*, 206(4419): 700-702.
- [9] 龚海云等, 中国病理生理杂志, 1998, 14: (1).

EFFECT OF DIRECT LYTIC FACTOR FROM NAJA NAJA ATRA VENOM ON INTRACELLULAR FREE CALCIUM DYNAMIC CHANGES IN HUMAN HEPATIC CANCER CELL LINE

GONG Hai Yun LE Yi* YU Qing Sheng GUAN Jing Xia

(Guangzhou Research Institute of Snake Venom, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182,

* Department of Biochemistry, First Military Medical University, Guangzhou)

ABSTRACT

The free calcium in human hepatic cancer cell line H₇₄₀₂ was labelled with fluorescent dye Fluo-3 and its dynamic changes were observed by using Adherent Cell Analysis and Sorting Cytometer 570 (ACAS 570). When the cells were in a calcium-free environment, the level of intracellular Ca²⁺ elevated rapidly after the stimulation of direct lytic factor (DLF). When it reached the peak, then soon decreased. The level of intracellular Ca²⁺ elevated constantly after the stimulation of DLF when 1 mmol/L CaCl₂ was added into the culture dish. No obvious elevation could be seen in the level of intracellular Ca²⁺ after the stimulation of DLF when 10 mmol/L CaCl₂ was added into the culture dish. The results show that DLF can cause intracellular Ca²⁺ release and extracellular Ca²⁺ influx, and the effect of the elevation of intracellular Ca²⁺ caused by DLF can be blocked by high level of extracellular Ca²⁺ concentration.

Key words: Cobra snake venom Direct lytic factor Intracellular free calcium Human hepatic cell line Adherent cell analysis and sorting cytometer

NO 供体(SIN-1)损伤内皮细胞的实验研究*

杨自力 白涛 吴恒义

(广州军区总医院危重病研究所 广州 510010)

王正国 朱佩芳

(第三军医大学野战外科研究所 重庆 400042)

研究表明,一氧化氮是一种活性很强的自由基,具有广泛的生物学作用,既是细胞信使分子,又是细胞毒性分子^[1]。一氧化氮作用的多样性,决定了其在内皮细胞损伤中的复杂性。炎性刺激下内皮细胞产生大量 NO,可与超氧阴离子(O₂⁻)等氧自由基反应,生成毒性更强的过氧亚硝基阴离子(ONOO⁻),是为 NO 毒性作用的

主要机制^[2]。研究一氧化氮对内皮细胞的毒性作用有助于进一步探讨内皮细胞的损伤机制。

材 料 和 方 法

一、主要材料与试剂

* 国家、广东自然科学基金资助项目。