

蛇毒半胱氨酸蛋白酶抑制剂重组蛋白诱导肿瘤细胞体内外凋亡及其分子机制

谢群^{1,2}, 林扬元^{1,2}, 林建银^{3*} (1.莆田学院基础医学院, 福建 莆田 351100; 2.莆田学院肿瘤转化医学福建省高校重点实验室, 福建 莆田 351100; 3.福建医科大学消化道恶性肿瘤教育部重点实验室, 福州 350004)

摘要: 目的 探讨蛇毒半胱氨酸蛋白酶抑制剂(snake venom cystatin, sv-cystatin)重组蛋白对肿瘤细胞凋亡的影响及其分子机制。方法 将sv-cystatin重组蛋白(10, 25, 50, 100, 200 mg·L⁻¹)作用于B16F10和MHCC97H细胞, C57BL/6小鼠尾静脉注射B16F10细胞建立黑色素细胞瘤模型并给予25, 50 mg·kg⁻¹的sv-cystatin重组蛋白干预, 建立MHCC97H细胞BALB/c-nude裸鼠皮下皮内成瘤模型并给予25, 50, 100 mg·kg⁻¹的sv-cystatin重组蛋白干预, 分别检测体内外细胞凋亡, 检测重组蛋白体外作用后肿瘤细胞Bcl-2、Bcl-w和Bax的基因与蛋白表达, 检测Cyto C蛋白表达和caspase-2、caspase-3酶活性。结果 与对照组相比, 25, 50, 100, 200 mg·L⁻¹的sv-cystatin重组蛋白能够增强2种肿瘤细胞的体外凋亡能力($P<0.05$); C57BL/6小鼠肺转移结节中B16F10细胞(50 mg·kg⁻¹)和BALB/c-nude皮下皮内肿瘤组织中MHCC97H细胞(100 mg·kg⁻¹)的凋亡增强($P<0.05$); 体外处理B16F10和MHCC97H细胞后Bcl-2和Bcl-w的基因与蛋白表达均下降, Bax表达则增强($P<0.05$), Cyto C蛋白表达增强($P<0.05$), caspase-2和caspase-3的活性上调($P<0.05$)。结论 Sv-cystatin重组蛋白能够促进肿瘤细胞凋亡, 从而发挥抗肿瘤作用。

关键词: 蛇毒; 半胱氨酸蛋白酶抑制剂; 肝癌细胞; 小鼠黑色素瘤细胞; 凋亡

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2021)18-2193-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.18.001

引用本文: 谢群, 林扬元, 林建银. 蛇毒半胱氨酸蛋白酶抑制剂重组蛋白诱导肿瘤细胞体内外凋亡及其分子机制[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(18): 2193-2199.

Recombinant Snake Venom Cystatin Promotes Tumor Apoptosis *in Vitro* and *in Vivo* and Its Molecular Mechanism

XIE Qun^{1,2}, LIN Yangyuan^{1,2}, LIN Jianyin^{3*} (1.College of Basic Medical Sciences, Putian University, Putian 351100, China; 2.Key Laboratory of Translational Cancer Medicine of Fujian Province University, Putian University, Putian 351100, China; 3.Key Laboratory of Ministry of Education for Gastrointestinal Cancer, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effect of recombinant snake venom cystatin(sv-cystatin) on apoptosis of tumor cells and its molecular mechanism. **METHODS** B16F10 and MHCC97H cells were incubated with recombinant sv-cystatin(10, 25, 50, 100, 200 mg·L⁻¹). Melanoma tumor-bearing mice model was established by inoculating in the lateral tail vein of C57BL/6 mice with B16F10 cells, and recombinant sv-cystatin was administered at 25, 50 mg·kg⁻¹. MHCC97H cells were inoculated subcutaneously(s.c.) into BALB/c-nude mice, and recombinant sv-cystatin was administered at 25, 50, 100 mg·kg⁻¹. TUNEL analysis was used to detected the apoptosis of B16F10 and MHCC97H cells. The mRNA and protein expression of Bcl-2, Bcl-w and Bax, and protein expression of Cyto C were measured, respectively. Activity of caspase-2 and caspase-3 were assessed. **RESULTS** Compared with control group, the apoptosis of B16F10 and MHCC97H cells was significantly upregulated by treatment with recombinant sv-cystatin at 25, 50, 100, 200 mg·L⁻¹($P<0.05$). The apoptosis of B16F10 cells in the lung colonization of C57BL/6 mice(50 mg·kg⁻¹), and the apoptosis of MHCC97H cells in the primary tumor tissues of BALB/c-nude mice(100 mg·kg⁻¹) were higher than those in control mice($P<0.05$). The mRNA and protein expression of Bcl-2 and Bcl-w in B16F10 and MHCC97H cells were decreased following treatment with recombinant sv-cystatin, compared to controls($P<0.05$), while the expression of Bax and Cyto C was significantly raised($P<0.05$). Activity of caspase-2 and caspase-3 was significantly increased($P<0.05$). **CONCLUSION** Recombinant sv-cystatin can promote the apoptosis of tumor cells, which contribute to anti-tumor effect.

KEYWORDS: snake venom; cystatin; hepatocellular carcinoma cell; melanoma cells; apoptosis

基金项目: 国家自然科学基金项目(30371747)

作者简介: 谢群, 女, 博士, 教授 Tel: (0594)2768812 E-mail: xqptu@163.com *通信作者: 林建银, 男, 硕士, 教授 Tel: (0591)83569132 E-mail: jylin@mail.fjmu.edu.cn

课题组前期研究从眼镜蛇蛇毒中分离纯化出小分子的蛇毒半胱氨酸蛋白酶抑制剂(snake venom cystatin, sv-cystatin), 并通过基因工程表达系统生产 sv-cystatin 重组蛋白, 已在体内外实验中证实该重组蛋白可以通过抑制肿瘤血管生成、细胞增殖、侵袭与转移而达到抗肿瘤效应^[1-3]。分析 sv-cystatin 基因转染小鼠黑色素瘤(B16F10)细胞后的蛋白质与基因表达谱的变化, 发现一些参与调控细胞凋亡的蛋白质或基因表达出现了较为明显的改变^[4], 推测 sv-cystatin 重组蛋白诱导细胞凋亡可能参与其抗肿瘤作用过程。为此, 本研究拟通过体内外实验进一步探讨 sv-cystatin 重组蛋白对肿瘤细胞凋亡的影响, 并揭示其可能的分子机制, 以期 sv-cystatin 抗肿瘤作用的研究提供新思路。

1 材料

1.1 细胞株

人肝癌 MHCC97H 细胞(复旦大学肝癌研究所), 小鼠黑色素瘤细胞 B16F10(武汉中国典型培养物保藏中心, 批号: GDC0038), 分别用 DEME 和 RPMI1640 培养基(均含 10%胎牛血清)常规培养。

1.2 动物

C57BL/6 小鼠, ♀, 6 周龄, 45 只, 体质量(18±2)g; BALB/c 裸鼠, ♂, 6 周龄, 32 只, 体质量(18±2)g, 购自中国科学院啮齿动物研究中心上海斯莱克斯有限公司, 动物生产许可证号: SCXK(沪)2007-0005。

1.3 试剂与仪器

Sv-cystatin 重组蛋白按照课题组前期研究方法表达纯化获得^[2]; TUNEL 检测试剂盒(Roche 公司, 批号: 11684817910); caspase-2(货号: K117-100)和 caspase-3(货号: K106-100)检测试剂盒为 Biovision 公司产品; β -Tubulin(货号: sc-5274)、Bcl-2(货号: ssc-509)、Bcl-w(货号: ssc-11422)和 Cytochrome C(Cyto C, 货号: ssc-7159)抗体购自 Santa Cruz 公司; Bax 抗体(BD 公司, 货号: s554104); 反转录试剂盒(Epicentre, 货号: sMS041050)。

DYC-SCZ7 垂直蛋白电泳仪(Pharmacia Biotech 公司); CytoFLEX S 流式细胞仪(Backman Coulter); Rotor-Gene 3000 real-time PCR 扩增仪(Corbett Research); Model 550 酶标仪(Bio Rad 公司); Hu-12A 型透射电镜(日立)。

2 方法

2.1 Sv-cystatin 重组蛋白体外处理肿瘤细胞

根据实验要求将 B16F10 及 MHCC97H 细胞分

别接种于细胞培养板, 分别加入终浓度为 10, 25, 50, 100, 200 mg·L⁻¹ 的 sv-cystatin 重组蛋白体外作用 2 h 后, 进行后续试验。

2.1.1 亚二倍体细胞检测 细胞接种于 6 孔板, 每孔 1×10⁶ 个, 加入 5 种浓度重组蛋白作用 2 h 后, 加碘化丙啶染液, 流式细胞术进行检测。

2.1.2 TUNEL 法检测 每孔 3×10⁵ 个细胞接种于 12 孔板中, 加入 5 种浓度重组蛋白作用 2 h 后, 收集细胞涂布于多聚赖氨酸预处理的载玻片上, 按照 TUNEL 法试剂盒操作方法, 依次滴加 TUNEL 反应混合物、Coverter-AP(vial 3)和 NBT/BCIP, 镜下观察蓝色阳性细胞出现, 计算凋亡指数(apoptotic index, AI) = (阳性细胞数/细胞总数)×100%。

2.1.3 凋亡形态学变化观察 6 孔培养板中接种 1×10⁶ 个细胞, 5 种浓度重组蛋白作用 2 h 后, 戊二醛(体积分数 0.03)+多聚甲醛(质量分数 1.5 g·L⁻¹)行前固定, 饿酸(质量分数 1 g·L⁻¹)-亚铁氰化钾(质量分数 1.5 g·L⁻¹)行后固定, 经脱水、包埋、超薄切片、染色后透射电镜下观察。

2.1.4 Caspase-2、caspase-3 活性测定 细胞接种于 24 孔细胞培养板, 加入 5 种浓度的重组蛋白作用 2 h 后, 收集细胞裂解液上清, 依照试剂盒进行操作, 酶标仪上测定波长 405 nm 的吸光度(A), 分析酶活性。

2.1.5 实时定量 PCR 检测 Bcl-2、Bax 和 Bcl-w 的基因表达 细胞接种于 6 孔细胞培养板, 加入 5 种浓度的重组蛋白作用 2 h 后, 提取总 RNA, 进行逆转录, PCR 扩增仪上扩增, 内参照基因为甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH), 2^{-ΔΔCt} 法分析 mRNA 相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 实时定量 PCR 实验用引物序列

Tab. 1 Primer sequence of real time PCR

基因	引物序列	片段长度/bp
<i>GAPDH</i>	F:5'-AAGAAGGTGGTGAAGCAGGC-3' R:5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	203
<i>Bcl-2(human)</i>	F:5'-AGGATTGTGGCTTCTTTGA-3' R:5'-TGCCGGTTCAGTACTCAG-3'	116
<i>Bcl-w(human)</i>	F:5'-TTCACCCTACCCTCTACCACA-3' R:5'-CAAGCCCTTTACCCTTTTCAG-3'	166
<i>Bax(human)</i>	F:5'-GGCAGACCGTGACCATCTTT-3' R:5'-CCTCAGCCCATCTTCTTCCA-3'	73
<i>Bcl-2(mouse)</i>	F:5'-CGCCTCTTACCTTTTCAGC-3' R:5'-TGCAGGTACCAATGGCACTTC-3'	294
<i>Bcl-w(mouse)</i>	F:5'-CACCCAGGTTTCCGACGA-3' R:5'-GTCCACCAAAGGCTCCAT-3'	125
<i>Bax(mouse)</i>	F:5'-CAGGATGCGTCCACCAAG-3' R:5'-CAAAGTAGAAGAGGGCAACCAC-3'	196

2.1.6 Western blotting 测定 Cyto C、Bcl-2、Bcl-w 和 Bax 蛋白表达 细胞接种于 6 孔细胞培养板, 加入 5 种浓度重组蛋白作用 2 h 后, 提取胞质蛋白检测 Cyto C, 常规提取细胞总蛋白检测其他蛋白, 凝胶电泳分离后转移至转印膜, 加入第一抗体 4 ℃ 孵育过夜, 免疫印迹分析, 内参照选用 β -Tublin, ImageQuant TLv 2003.03 软件分析目的蛋白相对表达量。

2.2 动物体内肿瘤细胞凋亡变化的检测

2.2.1 C57BL/6 小鼠 B16F10 细胞肺转移瘤动物试验 试验分为对照组及 25, 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 重组蛋白治疗组, 每组 15 只。以生理盐水重悬 B16F10 细胞至每毫升 1×10^6 个, 每只小鼠尾静脉处注射 0.2 mL 细胞悬液, 两剂量组各进行 3 次重组蛋白治疗性注射: 于造模前 24 h、造模后 2 h 及造模后 24 h 分别进行腹腔注射、尾静脉注射和腹腔注射各 1 次。造模 21 d 后处死, 取肺组织进行凋亡检测。

2.2.2 BALB/c 裸鼠腋下皮内成瘤试验 试验分对照组及 25, 50, 100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 重组蛋白治疗组, 每组 8 只。吸取 0.2 mL 细胞悬液(含 1×10^7 个 MHCC97H 细胞)于裸鼠右上肢腋下皮内进行接种造模, 重组蛋白治疗从造模后第 2 天起每天腹腔注射 1 次, 连续 5 d, 造模 6 周后取腋下皮内肿瘤组织进行检测。

2.2.3 TUNEL 凋亡检测 取 C57BL/6 小鼠肺组织及 BALB/c 裸鼠腋下皮内肿瘤组织行常规石蜡切片, TUNEL 法检测, DAB 显色, 镜下观察至棕色阳性细胞出现, 计算 AI。

2.3 统计学分析

SPSS 22.0 软件包内进行数据处理分析, 多组间采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 法, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 Sv-cystatin 重组蛋白处理肿瘤细胞后亚二倍体细胞数的变化

5 个剂量组的 B16F10 细胞及除 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 外的 4 个剂量组的 MHCC97H 细胞, 在 G0/G1 峰前出现亚二倍体细胞核型峰, 与对照组相比, 亚二倍体细胞数明显上升($P<0.05$)。结果见表 2 和图 1。

3.2 Sv-cystatin 重组蛋白对肿瘤细胞体外凋亡的影响

与对照组相比, 除了 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 剂量组外其余 4 组 2 种细胞体外 AI 均显著增加($P<0.05$)。结果见表 3 和图 2。

表 2 Sv-cystatin 重组蛋白处理后 B16F10 和 MHCC97H 细胞亚二倍体细胞数的变化($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Tab. 2 Changes of hypodiploid number in B16F10 and MHCC97H cells treated with recombinant sv-cystatin($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

组别	亚二倍体细胞比例/%	
	B16F10	MHCC97H
对照组	1.09 $\pm$ 0.06	1.32 $\pm$ 0.035
重组蛋白治疗组		
10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	3.70 $\pm$ 0.05 ¹⁾	1.66 $\pm$ 0.05
25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	5.74 $\pm$ 0.06 ¹⁾	5.85 $\pm$ 0.08 ¹⁾
50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	7.11 $\pm$ 0.06 ¹⁾	11.20 $\pm$ 0.03 ¹⁾
100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	11.76 $\pm$ 0.21 ¹⁾	15.64 $\pm$ 0.07 ¹⁾
200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	16.21 $\pm$ 0.31 ¹⁾	19.22 $\pm$ 0.60 ¹⁾

注: 与对照组相比, ¹⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$.

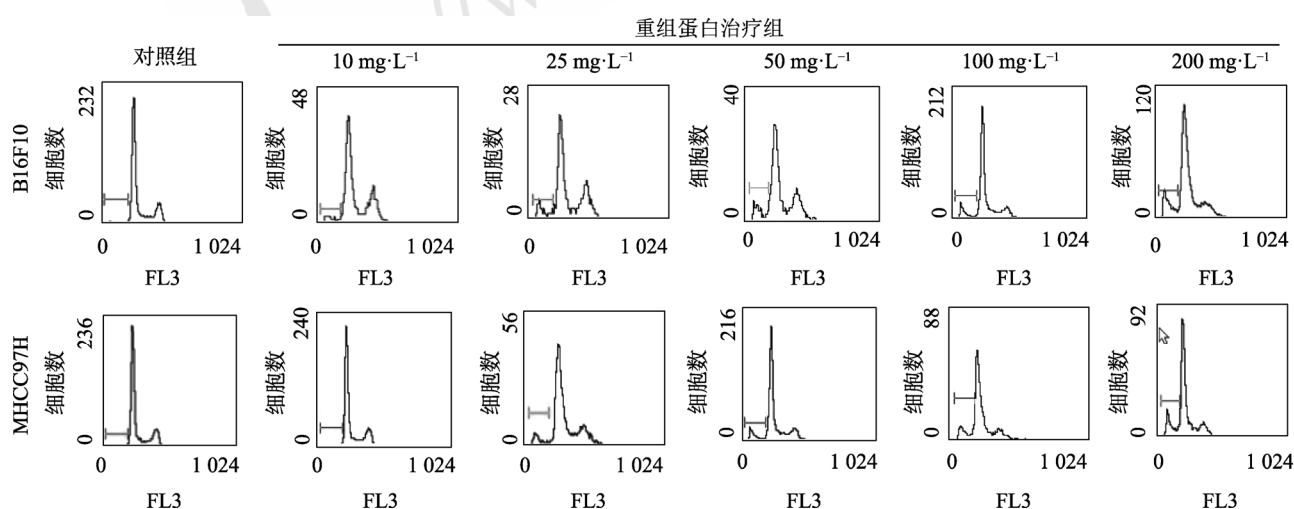


图 1 Sv-cystatin 重组蛋白处理 B16F10 和 MHCC97H 细胞对亚二倍体细胞数的影响

Fig. 1 Effect of recombinant sv-cystatin on the number of hypodiploid cells in B16F10 and MHCC97H

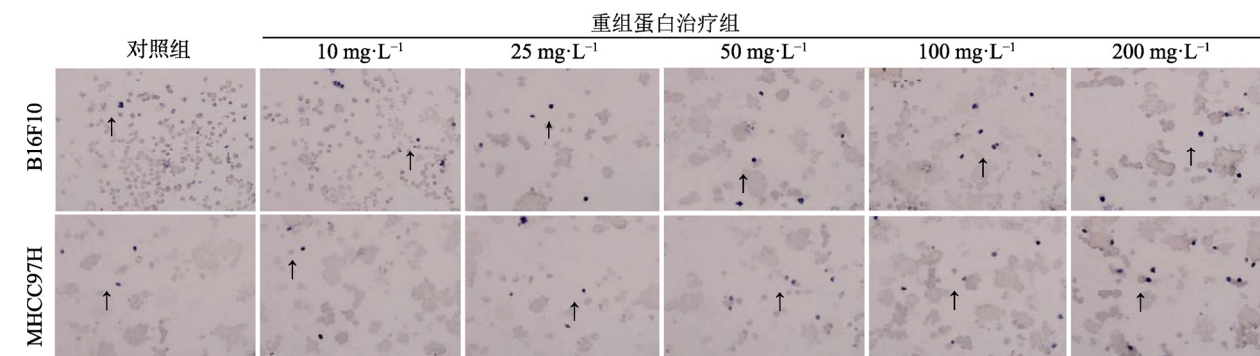


图2 Sv-cystatin 重组蛋白处理后 B16F10 和 MHCC97H 细胞的凋亡变化(TUNEL, 200×)

↑ 表示阳性细胞。

Fig. 2 Changes of apoptotic cells in B16F10 and MHCC97H cells treated by recombinant sv-cystatin(TUNEL, 200×)

↑ meant positive cells.

表3 Sv-cystatin 重组蛋白处理后 B16F10 和 MHCC97H 细胞体外 AI 的变化($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Tab. 3 Changes of AI in B16F10 and MHCC97H cells treated by recombinant sv-cystatin($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	AI/%	
	B16F10	MHCC97H
对照组	1.33±1.03	1.67±0.82
重组蛋白治疗组		
10 mg·L ⁻¹	1.83±0.75	2.32±0.52
25 mg·L ⁻¹	2.84±0.75 ¹⁾	3.50±0.55 ¹⁾
50 mg·L ⁻¹	3.67±1.03 ¹⁾	4.50±1.05 ¹⁾
100 mg·L ⁻¹	5.33±0.82 ¹⁾	6.17±0.76 ¹⁾
200 mg·L ⁻¹	6.00±1.27 ¹⁾	7.16±1.17 ¹⁾

注: 与对照组相比, ¹⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$.

3.3 Sv-cystatin 重组蛋白对肿瘤细胞凋亡形态学变化的影响

通过透射电镜观察肿瘤细胞凋亡形态变化, 相比对照组细胞, 重组蛋白处理后肿瘤细胞出现凋亡现象: 早期细胞缩小, 胞质出现空泡样结构, 微绒毛稀少, 细胞器结构异常, 内质网呈片状扩张, 线粒体轻度肿大, 密度增大, 细胞核固缩, 核染色质凝聚、沿核膜边集; 晚期凋亡可见线粒体明显肿胀, 嵴变少且结构模糊, 内腔扩大, 核染色质浓缩、边集、碎裂, 可见芽状凋亡小体。结果见图3。

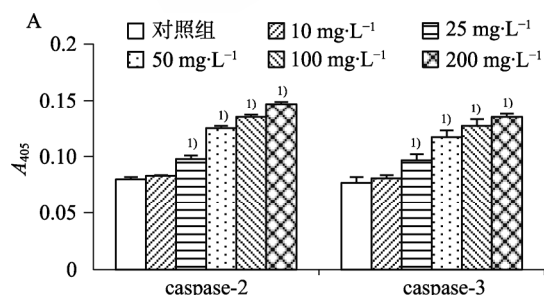


图4 Sv-cystatin 重组蛋白处理后 B16F10 和 MHCC97H caspase-2、caspase-3 活性变化($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

A-B16F10; B-MHCC97H; 与对照组相比, ¹⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 4 Changes of activity of caspase-2 and caspase-3 treated by recombinant sv-cystatin in B16F10(A) and MHCC97H(B) cells($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

A-B16F10; B-MHCC97H; compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$.

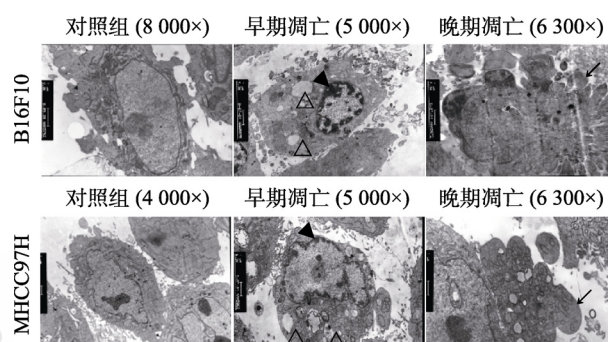


图3 Sv-cystatin 重组蛋白处理后 B16F10 和 MHCC97H 细胞超微结构变化

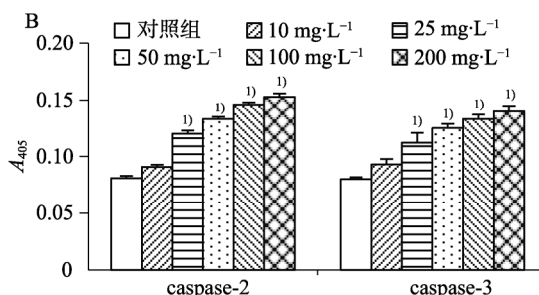
早期凋亡-50 mg·L⁻¹ 剂量组; 晚期凋亡-200 mg·L⁻¹ 剂量组; Δ -胞质空泡样结构; $\blacktriangle$ -细胞核固缩, 核染色质凝聚, 沿核膜边集; $\uparrow$ -芽状凋亡小体。

Fig. 3 Changes of ultrastructural features of B16F10 and MHCC97H cells treated by recombinant sv-cystatin

Early apoptosis-group of 50 mg·L⁻¹; late apoptosis-group of 200 mg·L⁻¹; Δ -cytoplasmic vacuole-like structure; $\blacktriangle$ -nucleus shrunk, nuclear chromatin condensed and gathered along the edges of the nuclear membrane; $\uparrow$ - bud-shaped apoptosis body.

3.4 肿瘤细胞 caspase-2、caspase-3 活性变化

与对照组相比, 除了 sv-cystatin 重组蛋白 10 mg·L⁻¹ 剂量组外, 其余剂量组的 2 种肿瘤细胞 caspase-2、caspase-3 活性均明显升高($P<0.05$)。结果见图4。



3.5 Sv-cystatin 重组蛋白对肿瘤细胞 Bcl-2、Bcl-w 及 Bax 基因转录水平的影响

50, 100, 200 mg·L⁻¹ 剂量组作用后 2 种细胞的 Bcl-2 表达均显著下降($P<0.05$); 5 个剂量组作用后 B16F10 中 Bcl-w 表达均显著下降($P<0.05$), 除 10 mg·L⁻¹ 剂量组外 MHCC97H 细胞中其余 4 个剂量组 Bcl-w 表达均显著下降($P<0.05$)。25, 50, 100, 200 mg·L⁻¹ 剂量组作用后 2 种肿瘤细胞的 Bax 表达均显著上调($P<0.05$)。结果见图 5。

3.6 Sv-cystatin 重组蛋白对肿瘤细胞 Cyto C、Bcl-2、Bcl-w 及 Bax 蛋白表达的影响

2 种肿瘤细胞 Cyto C、Bcl-2 和 Bax 表达变化类似: 与对照组相比, 50, 100, 200 mg·L⁻¹ 剂量组 Bcl-2 表达显著下调($P<0.05$); 25, 50, 100, 200 mg·L⁻¹ 剂量组 Cyto C 和 Bax 表达显著上调($P<0.05$); B16F10 细胞的 5 个剂量组 Bcl-w 表达均显著下降($P<0.05$), MHCC97H 细胞除了 10 mg·L⁻¹ 剂量外其余 4 组 Bcl-w 表达量明显减少($P<0.05$)。结果见图 6。

3.7 Sv-cystatin 重组蛋白对体内肿瘤细胞凋亡的影响

25, 50 mg·kg⁻¹ 重组蛋白治疗 C57BL/6 小鼠后, 肺转移灶中 B16F10 细胞 AI 值分别是 2.08±0.19 和 2.96±0.53, 与对照组(1.85±0.19)相比, 50 mg·kg⁻¹

组显著增加($P<0.05$); 25, 50, 100 mg·kg⁻¹ 重组蛋白治疗裸鼠后, 其腋下皮内肿瘤组织中 MHCC97H 细胞 AI 值分别是 2.02±0.17, 2.183±0.48 和 2.85±0.37, 与对照组(1.88±0.21)相比, 100 mg·kg⁻¹ 组 AI 值显著增加($P<0.05$)。结果见图 7。

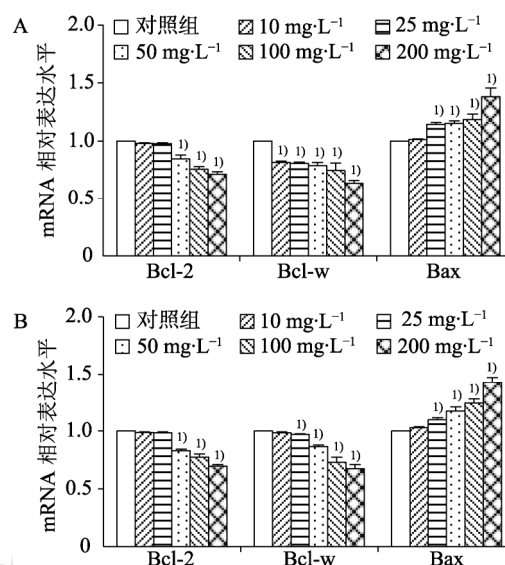


图 5 Sv-cystatin 重组蛋白处理后 B16F10 和 MHCC97H 细胞 Bcl-2、Bcl-w 和 Bax 转录水平的变化($\bar{x} \pm s$, $n=5$)
A-B16F10; B-MHCC97H; 与对照组相比, ¹⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 5 Expression of Bcl-2, Bcl-w and Bax mRNA treated by recombinant sv-cystatin in B16F10(A) and MHCC97H(B) cells ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

A-B16F10; B-MHCC97H; compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$.

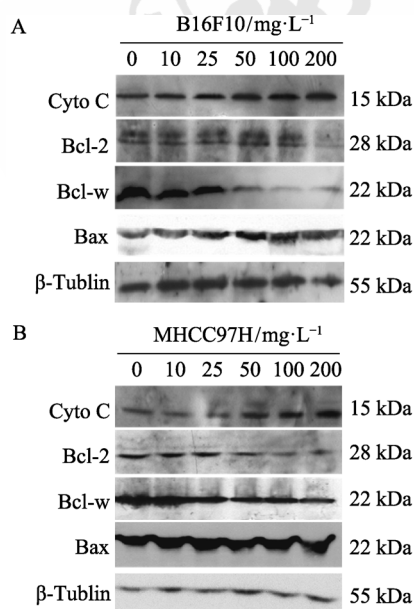
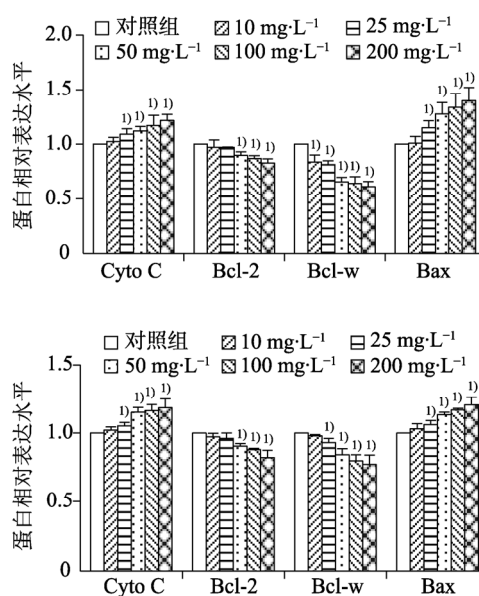


图 6 Sv-cystatin 重组蛋白处理后 B16F10 和 MHCC97H 细胞 Cyto C、Bcl-2、Bcl-w 和 Bax 蛋白相对表达量($\bar{x} \pm s$, $n=5$)
A-B16F10; B-MHCC97H; 与对照组相比, ¹⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 6 Relative expression of Cyto C, Bcl-2, Bcl-w and Bax protein treated by recombinant sv-cystatin in B16F10(A) and MHCC97H (B) cells ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

A-B16F10; B-MHCC97H; compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$.



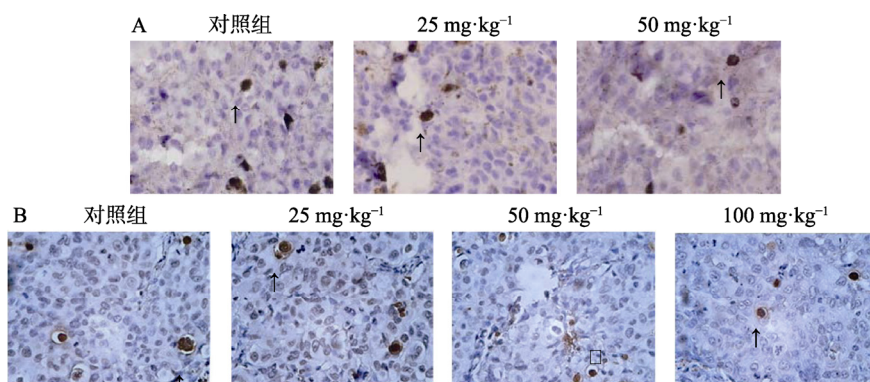


图7 Sv-cystatin 重组蛋白治疗 C57BL/6 小鼠肺转移(A)和裸鼠腋下皮内成瘤(B)后细胞凋亡情况(TUNEL, 400×)
↑表示阳性细胞。

Fig. 7 Cell apoptosis of lung colonization in C57BL/6(A) and intradermal tumors in BALB/c-nude(B) treated by recombinant sv-cystatin(TUNEL, 400×)

↑ meant positive cells.

4 讨论

资料表明半胱氨酸蛋白酶抑制剂(cystatin)家族的许多成员具有促进肿瘤细胞凋亡、阻断细胞生长及抑制侵袭转移等功能^[5]。Sv-cystatin 是一种新型的 II 型 cystatin, 其携带的 N 端 Gly 和中部 Gln-Xaa-Val-Xaa-Gly 序列与 cystatin M、cystatin C 等 cystatin 家族成员的氨基酸序列保守区高度同源^[6]。生物学活性分析证实了 sv-cystatin 同样具有 cystatin 的特性,通过基因工程纯化获得 sv-cystatin 重组蛋白体外处理肿瘤细胞,证明其具有类似于许多 cystatin 家族成员的抗恶性肿瘤增殖、侵袭和转移等作用^[7]。但是,sv-cystatin 是否可以通过诱导肿瘤细胞凋亡来实现抗肿瘤效应还未明确。本研究中,体外培养的 B16F10 和 MHCC97H 细胞经 sv-cystatin 重组蛋白作用后,亚二倍体细胞数及 AI 显著增加;形态学观察中发现肿瘤细胞内分别出现早期和晚期凋亡的电镜结构变化。建立 2 种肿瘤细胞动物模型,采用 sv-cystatin 重组蛋白进行体内实验性治疗,在 C57BL/6 小鼠黑色素瘤细胞肺转移灶和 BALB/c-nude 裸鼠人肝癌细胞腋下皮内肿瘤组织中均发现肿瘤细胞出现明显的凋亡现象。结合前期的研究结果^[2]: 50, 100, 200 mg·L⁻¹ 的 sv-cystatin 重组蛋白能够显著抑制 B16F10(抑制率: 31.0%, 38.0%, 47.3%)和 MHCC97H 细胞(抑制率: 21.2%, 30.3%, 40.9%)体外侵袭转移;动物模型体内试验中,25, 50 mg·kg⁻¹ 重组蛋白能够显著抑制 C57BL/6 小鼠黑色素瘤细胞肺转移(抑制率: 34.9%, 41.6%)和肺转移瘤的生长(抑制率: 27.9%, 31.1%); 25, 50, 100 mg·kg⁻¹ 重组蛋白能够显著抑制裸鼠腋下皮内肿瘤的肺转移(抑制率:

25.7%, 32.8%, 35.7%), 100 mg·kg⁻¹ 剂量组能够显著抑制裸鼠腋下皮内肿瘤的生长(抑制率: 31.0%),可以看出本研究结果中重组蛋白诱导凋亡的趋势与前期其抑制肿瘤增殖侵袭转移的趋势相似,推测 sv-cystatin 重组蛋白抗肿瘤作用可能与其诱导肿瘤细胞凋亡紧密相关。

进一步探讨 sv-cystatin 重组蛋白诱导肿瘤细胞凋亡的效应分子变化,明确其诱导肿瘤细胞凋亡的相关机制。前期研究构建小鼠黑色素瘤 B16F1 细胞稳定转染 sv-cystatin 基因后,发现细胞 Bcl-w、Raidd、caspase-11、caspase-1 和 caspase-2 等许多参与细胞凋亡调控的基因表达发生变化^[4]。本研究中,对 sv-cystatin 重组蛋白体外处理后肿瘤细胞 caspase-2、caspase-3 和 Cyto C 等凋亡效应指标的变化进行检测:除了 10 mg·L⁻¹ 低剂量外,其他较高剂量 sv-cystatin 重组蛋白均能够促进线粒体内 Cyto C 释放到胞质内,从而上调胞质内 Cyto C 蛋白表达,2 种细胞的 caspase-2 和 caspase-3 酶活性均随着重组蛋白的作用剂量增加而升高。线粒体内 Cyto C 释放进入胞质内,是芽状凋亡小体突起等凋亡超微结构改变及启动 caspase 级联反应的重要前提。Caspase-2 作为 caspase 级联信号转导的关键启动者,在 Cyto C 等上游信号分子的激活下,剪切活化下游的凋亡执行者 caspase-3、caspase-6 及 caspase-7 等,完成对相应底物的水解,进入胞核内降解核内结构,从而引发凋亡反应^[8]。研究表明 cystatin C 可以通过上调 Bcl-2 家族成员 Bid 活性表达,增强对线粒体释放 Cyto C 的调控,从而激活 caspase 级联信号来促进细胞凋亡^[9-10];将 cystatin A 基因转染肺非小细胞癌细胞,发现其可

以通过增加 cleaved caspase-3 和 cleaved PARP1 表达来促进肺癌凋亡, 抑制肿瘤生长及上皮间质转化^[11]。本研究中, sv-cystatin 重组蛋白体外处理后的肿瘤细胞 caspase-2 酶活性增加, 导致线粒体 Cyto C 释放, 胞质 Cyto C 表达增加, caspase-3 得以激活介导凋亡发生, 这与上述列举的 cystatin 家族许多成员促进细胞凋亡的研究结果类似。

运用 Real-time PCR 和 Western blotting 对 Bcl-2、Bcl-w 和 Bax 等凋亡调控蛋白的表达水平进行检测, 体外培养的 B16F10 和 MHCC97H 细胞经 sv-cystatin 重组蛋白作用后, Bcl-2 和 Bcl-w 表达下降, Bax 表达增强。作为 Bcl-2 家族重要成员的 Bcl-2 是研究最广泛的抗凋亡基因之一, 其作为通道蛋白广泛参与了细胞凋亡, Bcl-w 是 Bcl-2 家族的另外一类重要成员, Bcl-w 和 Bcl-2 主要分布在线粒体、内质网及细胞核外膜等部位, 能够下调线粒体膜通透性, 导致线粒体释放 Cyto C 能力下降, 细胞凋亡受到抑制^[12]。Bax 能够促进凋亡, Bax 激活后 Bcl-2 蛋白活性受到抑制, 线粒体释放 Cyto C 能力增强, 从而诱导细胞凋亡, Bax 和 Bcl-2 相互结合又彼此抑制, Bax/Bcl-2 表达失衡可能导致线粒体膜电位丧失和 Cyto C 释放^[13]。研究发现 cystatin C 等 cystatin 成员可以通过下调 Bcl-2 表达, 上调 Bax 表达, 激活 caspase-9、caspase-3 活性等一系列线粒体凋亡信号分子来诱导神经元细胞凋亡^[14-15]。本研究中, sv-cystatin 重组蛋白可以抑制 2 种肿瘤细胞 Bcl-w 和 Bcl-2 表达, 逆转 Bcl-w 和 Bcl-2 对线粒体释放 Cyto C 的抑制, 同时又能上调促凋亡蛋白 Bax 表达, 从而导致 Bax/Bcl-2 比值增加, 促进线粒体外膜通道开放, 线粒体释放 Cyto C 进入细胞质内, 启动 caspase 凋亡级联信号, 诱导肿瘤细胞凋亡。

由此可见, sv-cystatin 重组蛋白可以在细胞水平与动物水平同时诱导 B16F10 和 MHCC97H 细胞的细胞凋亡, 其调控机制可能通过抑制 Bcl-2 和 Bcl-w 表达, 促进 Bax 表达, 调控 Cyto C 释放, 激活 caspase-2 和 caspase-3 等 caspase 级联反应信号转导途径实现的。研究结果为 sv-cystatin 抗肿瘤作用的研究提供新思路。

REFERENCES

[1] 郑海音. 蛇毒 cystatin 分离及其合成基因在 COS7 细胞中的表达[D]. 福州: 福建医科大学, 2004.

- [2] XIE Q, TANG N H, WAN R, et al. Recombinant snake venom cystatin inhibits the growth, invasion and metastasis of B16F10 cells and MHCC97H cells *in vitro* and *in vivo*[J]. *Toxicon*, 2011, 57(5): 704-711.
- [3] XIE Q, TANG N H, WAN R, et al. Recombinant snake venom cystatin inhibits tumor angiogenesis *in vitro* and *in vivo* associated with downregulation of VEGF-A165, Flt-1 and bFGF[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2013, 13(4): 663-671.
- [4] XIE Q, WAN R, LIN X, et al. Effects of snake venom cystatin gene on gene expression profiles in mouse melanoma cell line B16F₁[J]. *Chin J Cancer(癌症)*, 2008, 27(7): 716-722.
- [5] BREZNIK B, MITROVIĆ A, T LAH T, et al. Cystatins in cancer progression: More than just cathepsin inhibitors[J]. *Biochimie*, 2019(166): 233-250.
- [6] BRILLARD-BOURDET M, NGUYÊN V, FERRER-DI MARTINO M, et al. Purification and characterization of a new cystatin inhibitor from Taiwan cobra (*Naja naja atra*) venom[J]. *Biochem J*, 1998, 331(Pt 1): 239-244.
- [7] TANG N H, XIE Q, WANG X Q, et al. Inhibition of invasion and metastasis of MHCC97H cells by expression of snake venom cystatin through reduction of proteinases activity and epithelial-mesenchymal transition[J]. *Arch Pharm Res*, 2011, 34(5): 781-789.
- [8] PROKHOROVA E A, KOPEINA G S, LAVRIK I N, et al. Apoptosis regulation by subcellular relocation of caspases[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 12199.
- [9] MORI J, TANIKAWA C, FUNAUCHI Y, et al. Cystatin C as a p53-inducible apoptotic mediator that regulates cathepsin L activity[J]. *Cancer Sci*, 2016, 107(3): 298-306.
- [10] ZI M T, XU Y K. Involvement of cystatin C in immunity and apoptosis[J]. *Immunol Lett*, 2018(196): 80-90.
- [11] MA Y X, CHEN Y, LI Y, et al. Cystatin A suppresses tumor cell growth through inhibiting epithelial to mesenchymal transition in human lung cancer[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(18): 14084-14098.
- [12] YE H N, CHE J. Mechanism of synergistic effect of YM-155 on cis plantin-induced cytotoxicity against NSCLC[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2019, 36(17): 2160-2165.
- [13] ZHONG D C, CHEN C, LI T, et al. Study on the caspase 3/Bax/Bcl-2 signal pathway mechanism of induction apoptosis effect of piperine in human pancreatic cancer PANC-1 cell[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2020, 37(14): 1687-1691.
- [14] KIM H, NOH M, BAE O N, et al. Pre-elafin is involved in Ultraviolet-induced keratinocyte apoptosis via Pro-caspase-3 activation associated with cystatin-A down-regulation[J]. *Acta Derm Venereol*, 2017, 97(5): 578-585.
- [15] KIM E M, JUNG C H, SONG J Y, et al. Pro-apoptotic Bax promotes mesenchymal-epithelial transition by binding to respiratory complex-I and antagonizing the malignant actions of pro-survival Bcl-2 proteins[J]. *Cancer Lett*, 2018(424): 127-135.

收稿日期: 2020-11-19
(本文责编: 曹粤锋)