

蝎毒多肽干预慢性粒细胞白血病小鼠模型 P210 及 JAK1 表达

郝 征¹, 杨文华²

(1. 天津中医药大学中医学院, 天津 300193;
2. 天津中医药大学第一附属医院血液科, 天津 300193)

摘要: 目的: 观察蝎毒多肽 (peptide extract from scorpion venom, PESV) 干预 NOD/SCID 小鼠模型体内慢性粒细胞白血病 (chronic myelocytic leukemia, CML) P210, JAK1 表达水平变化。方法: 应用 K562 细胞注入经过¹³⁷源照射的 NOD/SCID 小鼠体内, 建立 CML NOD/SCID 小鼠模型; 对实验小鼠随机分组, 用 Western blotting 检测 PESV 治疗后小鼠体内融合蛋白 P210 表达水平, ELISA 法检测小鼠 JAK1 表达水平。结果: PESV 能够降低模型小鼠体内融合蛋白 P210 表达水平, 抑制 JAK1 过度表达, 其抑制效果与 PESV 浓度具有相关性。结论: PESV 通过干预 CML 融合蛋白 P210 及 JAK1 表达, 有效地阻断了 CML 传变进展, 揭示了 PESV 阻抑 CML 传变的微观机理。

关键词: 中医内科学; 蝎毒多肽; 慢性粒细胞白血病; P210; JAK1

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1674-2850(2015)17-1776-05

Influence of peptide extracts from scorpion venom on P210 and JAK1 expression in chronic myelocytic leukemia mice

HAO Zheng¹, YANG Wenhua²

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China;
2. Department of Hematology, First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

Abstract: Objective: To investigate the peptide extract from scorpion venom (PESV) producing effects on P210, JAK1 expression in chronic myelocytic leukemia (CML)-NOD/SCID mice. Methods: K562 cells were injected into NOD/SCID mice, and the mice were irradiated on body by ¹³⁷Cs beforehand in order to establish the animal model of CML-NOD/SCID mice. Then, we randomly divided the mice of model establishment into several groups, and we used Western blotting method to examine P210 expression in mice, and simultaneously used ELISA method to examine JAK1 expression. Results: PESV could suppress P210 expression and inhibit JAK1 expression, the inhibiting effect depends on PESV concentration. Conclusion: PESV can inhibit CML cell transmutation by influencing the expression of P210 and JAK1, which reveals the microscopic mechanism on PESV inhibiting CML transmutation.

Key words: internal medicine of traditional Chinese medicine; peptide extract from scorpion venom; chronic myelocytic leukemia; P210; JAK1

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金 (20121210110004)

作者简介: 郝征 (1977—), 男, 讲师, 主要研究方向: 中西医结合血液学基础实验

通信联系人: 杨文华, 主任医师, 主要研究方向: 中西医结合血液学临床与实验. E-mail: 1225346511@qq.com

0 引言

CML 是起源于多能干细胞的恶性增殖性疾病。尽管应用伊马替尼治疗 CML 取得了重大效果,但由于疗效局限性及耐药问题无法解决,故探究治疗 CML 的新药依然具有重大意义^[1]。目前,研究证实 PESV 具有多靶点治疗白血病作用^[2],这里通过观察 PESV 干预 CML NOD/SCID 小鼠模型体内的融合蛋白 P210, JAK1 表达水平变化,探究 PESV 干预 CML 传变的作用靶点。

1 材料与方法

1.1 动物来源与预处理

5 周龄雌性 NOD/SCID 小鼠 56 只,体质量 15~18 g[动物合格证号: SCXK(京)2009-0004],同批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[饲养设备合格证号: SVXK(津)2009-0002]。小鼠适应性饲养 14 d 后,除预留空白对照组外,其余小鼠在同位素铯-137 源环境下照射总剂量 270 cGy,照射时间 4 min,目的是进一步清除动物体内可能残存的免疫功能,为移植 K562 细胞做好前期准备。

1.2 试剂与仪器

主要试剂: RPMI 1640 (美国 GIBCO 公司, 11875093); PBS 缓冲液 (美国 GIBCO 公司, 20012-027); 特级胎牛血清 (美国 Hyclone 公司, SH30070.01); 小鼠 P53 ELISA 试剂盒 (美国 R&D); FK2856B, SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (5X), SDS-PAGE 电泳液, PVDF 膜, 丽春红染色液, 考马斯亮蓝快速染色液, Western blotting 洗涤液, Western blotting 封闭液, Western blotting 一抗稀释液, Western blotting 二抗稀释液, 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H+L), BeyoECL Plus, Western blotting 及 IP 细胞裂解液, BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (均购于江苏碧云天生物技术研究所); Western P210 抗体, Western actin 抗体 (美国 SANTA); 辣根过氧化物酶标记兔抗山羊 IgG (H+L) (北京中山金桥生物技术有限公司)。

主要仪器: 酶标仪 (美国伯乐 BIO-RAD 680 型酶标仪); 洗板机 (美国伯乐 BIO-RAD 1575); 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); 高速离心机 TLL-D (军事医学科学院实验仪器厂); CO₂ 培养箱 (美国 THERMO 公司); 电子称量仪 MP200-I (上海第二天平仪器厂); 恒温振荡摇床 (中国科学院武汉科学仪器厂); 电泳仪 PS3000 (美国 Hoefer Scientific Instruments); 恒温水浴箱 HXS-H (哈尔滨东联公司)。

1.3 细胞株

人 CML K562 细胞系由中国医学科学院血液学研究所提供,用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液培养,均在 37℃, 5% CO₂, 饱和湿度环境孵育,每 2 d 换液传代。用 2% 台盼蓝计数活细胞数, PBS 液调整浓度至 5×10⁷ 细胞/mL。

1.4 药品制备

PESV 是东亚钳蝎毒中具有抗肿瘤作用的有效成分,制备方法是电刺激采集法从东亚蝎尾采集新鲜毒液,经高速离心分离,真空干燥制成蝎毒干粉, -20℃ 保存。提取 PESV 时,取蝎毒冻干粉溶解 (1 g/40 mL, pH=7.4), 800 r/min 离心 5 min, 0.45 μm 和 0.22 μm 微孔滤膜过滤,将超滤物冻干。取蝎毒冻干粉 400 mg 加 PBS 缓冲液上样,经葡聚糖凝胶,收集蝎毒 III-IV 蛋白峰,再进行阳离子交换层析,紫外分光光度计 (吸收波长 280 nm) 检测,收集 PESV 蛋白峰。PESV 在高效液相色谱显示有 4 个峰 (高效液相色谱条

件, 流动相: A 液为 10 g/L TFA, B 液为 10 g/L TFA, Acetonitrile; 洗脱速度: 1 mL/min, 280 nm; 梯度洗脱程序: 0~60 min B 液, 0~100%; 61~70 min A 液, 100%), 主峰面积占总面积的 41.4%。PESV 为含 50~60 个氨基酸的多肽混合物, 纯度 89.1%, 分子量 6~7 ku, 耐热, pH 值稳定^[3]。之后, 用 0.9%氯化钠溶液溶解稀释到所需浓度。

1.5 模型制备

在小鼠接受照射后 24 h 内采用尾静脉注射方式将浓度为 5×10^7 细胞/mL K562 细胞随机注入 46 只小鼠体内。观察 14 d 后, 有 44 只小鼠外周血白细胞均明显升高, 外周血涂片经瑞氏-吉姆萨染色光镜下放大 1 000 倍可见原始幼稚细胞达 30%以上。从 44 只小鼠中随机选取 4 只处死, 病理解剖, 组织 HE 染色光镜下分析^[4]。

1.6 分组与给药

将造模成功的 40 只小鼠随机分为 4 组, 每组 10 只, 用 0.9%氯化钠溶液将 PESV 干粉剂稀释调配成相应浓度, 采用尾静脉注射方式注入小鼠体内。I 组: 每只每天注射 PESV 1.2 mg/kg; II 组: 每只每天注射 PESV 0.6 mg/kg; III 组: 每只每天注射 PESV 0.3 mg/kg; IV 组: 作为模型对照, 每只每天注射 0.9%氯化钠溶液 0.3 mL; V 组: 另设 10 只同批 NOD/SCID 小鼠作为空白对照, 每只每天注射 0.9%氯化钠溶液 0.3 mL。连续给药观察 28 d。

1.7 检测指标与方法

28 d 后眼眶动脉放血处死各组小鼠, 抗凝离心血清。采用 ELISA 法检测小鼠血清 JAK1 含量, 用酶联仪在 450 nm 波长依序测量各孔的吸收度 (OD 值), 绘制标准曲线, 计算样品实际浓度。

应用 Western blotting 检测 P210 蛋白。选取小鼠肝脏组织, 把组织剪切成细小的碎片。取适量的裂解液, 在使用前数分钟内加入 PMSF。按照每 20 mg 组织加入 100~200 μ L 裂解液的比例加入裂解液, 用玻璃匀浆器匀浆, 直至充分裂解。10 000~14 000g 离心 3~5 min, 取上清备用。采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测蛋白浓度, 用 SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒配制凝胶。在蛋白样品中加入适量浓缩 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液。100 $^{\circ}$ C 水浴加热 5 min 以充分变性蛋白。冷却到室温后, 用注射器把蛋白样品直接上样到 SDS-PAGE 胶加样孔内, 以 8 V/cm 凝胶进行恒压电泳, 当染液前沿进入分离胶时, 以 15 V/cm 继续电泳直到溴酚蓝到达分离胶底部。按凝胶面积裁剪 whatman 滤纸和 PVDF 膜, 逐张叠放, 膜上平铺 SDS-PAGE 凝胶, 并排除气泡。以恒流 2.5 mA/cm² 凝胶电泳转移 30 min。用考马斯亮兰对 SDS-PAGE 凝胶染色, 以检查蛋白质转移是否完全。用丽春红染液对 PVDF 膜的蛋白质进行染色, 以检查蛋白质转移效果和标出条带的位置。转膜完毕后, 立即把蛋白膜放置到预先准备好的 Western blotting 洗涤液中, 漂洗 1 min, 洗去膜上的转膜液。用滴管吸尽洗涤液, 加入 Western blotting 封闭液, 在摇床上缓慢摇动, 室温封闭 1 h。用滴管吸尽封闭液, 立即加入用 Western blotting 一抗稀释液稀释好的一抗, 室温在摇床上缓慢摇动孵育 1 h 后用洗涤液洗涤。结果选用 β -actin 抗体, 进行内参检测。用 Western blotting 二抗稀释液稀释辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗。用滴管吸尽洗涤液, 立即加入二抗, 室温在侧摆摇床上缓慢摇动孵育 1 h。加入 Western blotting 洗涤液, 在摇床上缓慢摇动洗涤 5 min。吸尽洗涤液后, 再加入洗涤液洗涤 5 min, 共洗涤 3 次, 用 BeyoECL Plus 检测蛋白。使用紫外凝胶图像分析系统显色成像, 分析蛋白表达。

1.8 统计学方法

使用 SPSS 13.0 统计软件包进行统计学分析。计量资料数据用 $\bar{X} \pm S$ 表示, 采用单因素方差分析 (one

way ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 造模病理结果

从 44 只小鼠中随机选取 4 只处死, 病理解剖光镜下显示: 肝脏组织内白血病细胞浸润, 脾脏结构完全破坏且白血病细胞呈团块状浸润, 股骨骨髓组织可见白血病细胞, 腹腔内瘤块呈现白血病细胞浸润灶, 验证造模成功 (如图 1~图 4 所示)。

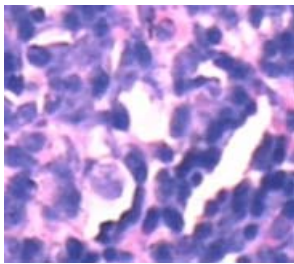


图 1 HE 染色后光镜下小鼠脾组织形态观察 ($\times 1\,000$)
Fig. 1 Mouse spleen morphology in mouse by HE staining ($\times 1\,000$)

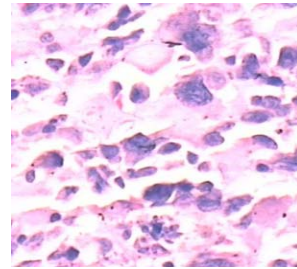


图 2 HE 染色后光镜下小鼠股骨组织形态观察 ($\times 1\,000$)
Fig. 2 Mouse femoral morphology in mouse by HE staining ($\times 1\,000$)



图 3 肉眼下小鼠腹腔最大肿块
Fig. 3 Mouse peritoneal tumor morphology in mouse under the naked eye

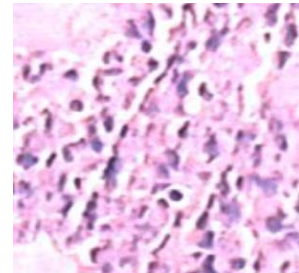


图 4 HE 染色后光镜下小鼠腹腔瘤块组织形态观察 ($\times 1\,000$)
Fig. 4 Mouse peritoneal tumor morphology in mouse by HE staining ($\times 1\,000$)

2.2 小鼠体内 JAK1 表达水平比较

如表 1 所示, 小鼠体内 JAK1 表达 IV 组显著高于 V 组; I~III 组显著低于 IV 组 ($P < 0.05$), 且随给药浓度增加而呈减少趋势。

2.3 小鼠肝脏 P210 表达水平比较

Western blotting 法检测模型小鼠体内 P210 蛋白表达水平显示, I~III 组小鼠体内 P210 蛋白表达低于 IV 组, 如图 5 所示。

3 讨论与结论

中药全蝎为钳蝎科动物东亚钳蝎的干燥体。东亚钳蝎属原始肉食性蛛形纲、蝎目、钳蝎科节肢动物,

表 1 PESV 给药 28 d 后各组小鼠体内 JAK1 表达水平比较 ($\bar{X} \pm S, n=10$)

Tab. 1 Comparison of JAK1 expression in mouse blood serum after treatment with PESV for 28 d ($\bar{X} \pm S, n=10$)

组别	JAK1(ng/L)
I 组	135.32 \pm 15.35 [▲]
II 组	189.67 \pm 20.28
III 组	217.14 \pm 23.01
IV 组	287.34 \pm 12.19*
V 组	108.56 \pm 14.16

注: *为与 V 组比较, $P < 0.05$; ▲为与 III 组比较, $P < 0.05$



图5 Western blotting 法检测小鼠体内 P210 蛋白表达水平

Fig. 5 Investigation on P210 expression in mice by Western blotting

因其毒性较弱故可以入药,多于秋季饲养春季捕捉,置清水中待吐出泥土置沸水或盐水中,煮至僵硬捞出,置通风处阴干。其性味咸、辛、平、有毒,归肝经,具有息风止痉、攻毒散结、通络止痛之功效,是以毒攻毒之药。临床上,全蝎具有镇痛、止痉、调节免疫、抗肿瘤等作用。全蝎的药用成分主要是蝎毒,蝎毒是存在于蝎尾部毒囊内的毒液,螫刺时由螫针排出。蝎毒是一种成分复杂的混合物,由蛋白质和非蛋白质两部分组成。蝎毒经分离提纯,可从中获得一种分子量在 6~7 ku 之间含 50~60 个氨基酸的多肽混合物,是蝎毒抗肿瘤作用的有效成分,被称为蝎毒多肽。实验研究表明,蝎毒多肽具有抗白血病的作用,可以抑制 CML 细胞过度增殖^[5]。

9 号染色体长臂上 *c-abl* 原癌基因易位至 22 号染色体长臂的断裂点簇集区 *bcr*, 形成 *bcr/abl* 融合基因,其编码的蛋白主要为 P210,具有酪氨酸激酶活性,导致 CML 的发生。JAK1 是 Janus 激酶家族成员之一,是许多细胞因子、生长因子的重要信号传感器。细胞因子与受体结合,激活 JAKs, JAKs 活化后激活其传导通路的下游信号,参与体内多种疾病的发生发展。研究表明, JAKs 参与了一条极为快速的、从膜到核的信号转导系统,广泛参与细胞的增殖、分化、凋亡以及免疫调节等过程^[6]。JAK1 激活酪氨酸激酶途径,实现细胞的持续增殖,进而抑制细胞凋亡的发生。研究结果显示,蝎毒多肽具有抑制 P210 蛋白表达的作用,从源头抑制慢性粒细胞白血病的发生。蝎毒多肽还可以有效抑制 JAK1 表达,促进白血病细胞凋亡。这与蝎毒多肽干预 K562 细胞株体外实验研究的结论相吻合^[5]。由此可见,蝎毒多肽不仅能够抑制 P210 蛋白表达,而且可以阻断 P210 蛋白对细胞凋亡信号传导通路的调节作用,抑制白血病细胞过度持续增殖,促进白血病细胞发生凋亡,稳定基因组内在特性,预防本病向加速期、急变期发展。

[参考文献] (References)

- [1] CLARK R E. Antisense therapeutics in chronic myeloid leukemia: the promise, the progress and the problem[J]. *Leukemia*, 2000, 14(3): 347.
- [2] 郝征, 杨文华. 蝎毒多肽干预急性白血病髓外浸润转变的机制[J]. *中华中医药杂志*, 2012, 27 (4): 1106-1110.
HAO Z, YANG W H. Study of molecular mechanism on PESV in inhibiting acute leukemic cell extramedullary infiltration and transmutation[J]. *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 2012, 27(4): 1106-1110. (in Chinese)
- [3] 赵灿国, 董伟华, 孔天翰. 蝎毒及其分离组分对 4 种肿瘤细胞生长的抑制作用[J]. *广州医学院学报*, 2006, 34 (1): 26-29.
ZHAO C G, DONG W H, KOMG T H. Inhibitory effects of scorpion venom and its components on four kinds of tumor cell lines[J]. *Academic Journal of Guangzhou Medical College*, 2006, 34(1): 26-29. (in Chinese)
- [4] 张佳, 杨文华, 杨向东, 等. 尾静脉注射 K562 细胞建立慢性髓系白血病小鼠模型及其鉴定[J]. *中国实验血液学杂志*, 2012, 20 (3): 773-776.
ZHANG J, YANG W H, YANG X D, et al. Establishment and identification of CML model via injection of K562 cells into the murine caudal vein[J]. *Journal of Experimental Hematology*, 2012, 20(3): 773-776. (in Chinese)
- [5] 郝征, 杨文华. 蝎毒多肽干预慢性粒细胞性白血病转变的机制[J]. *中华中医药杂志*, 2013, 28 (12): 3642-3644.
HAO Z, YANG W H. Study of molecular mechanism on PESV in inhibiting chronic myelocytic leukemia cell transmutation[J]. *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 2013, 28(12): 3642-3644. (in Chinese)
- [6] LINGLEY E, KLINKEN S P. Cross-regulation of JAK and Src kinases[J]. *Growth Factor*, 2006, 24(1): 89-95.