

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.19.001

文章编号: 1005-8982 (2019) 19-0001-07

基础研究·论著

中华眼镜蛇膜毒素 12 对膀胱癌细胞增殖、凋亡及自噬的影响*

孙王宏, 陈柳, 冯相鑫, 夏成兴, 王海峰, 杨德林

(昆明医科大学第二附属医院 泌尿外科, 云南 昆明 650101)

摘要: **目的** 探讨中华眼镜蛇膜毒素 12 (MT-12) 对膀胱癌细胞的增殖、凋亡及自噬的影响。**方法** ①采用 CCK-8 法检测不同浓度 (0.10、0.25 和 0.50 $\mu\text{g/ml}$) 的 MT-12 处理膀胱癌 RT4、T24 细胞 0、24、48、72、96 和 120 h 后, 对膀胱癌 RT4、T24 细胞增殖能力的影响; ②采用流式细胞术检测 MT-12 处理膀胱癌 RT4、T24 细胞 6 及 24 h 后, 对膀胱癌 RT4、T24 细胞凋亡的影响, 主要观察细胞凋亡率的变化; ③ Pan-Caspase 抑制剂和 MT-12 处理膀胱癌细胞后通过 MTT 法检测细胞活力; ④通过 GFP-LC3 转染, 观察自噬小体形成, 通过 Western blotting 检测自噬标志物的表达情况。**结果** CCK-8 检测结果显示, 不同浓度的 MT-12 处理膀胱癌 RT4、T24 细胞 0、24、48、72、96 和 120 h 后, MT-12 能抑制膀胱癌 RT4、T24 的细胞增殖。流式细胞术检测细胞凋亡的结果显示, MT-12 处理膀胱癌 RT4、T24 细胞 6 及 24 h 后, 实验组可以增加凋亡细胞的比例。Pan-Caspase 抑制剂 V-ZAD-FMK 对 2 株膀胱癌细胞系进行处理后, MT-12 并未完全失去对膀胱癌的抑制效果。Western blotting 和 GFP-LC3 转染检测结果显示, LC3-II/LC3-I 比值增大, GFP-LC3 转染结果自噬体 (绿色荧光点) 增多。**结论** MT-12 以浓度-时间依赖的方式抑制膀胱癌 RT4、T24 细胞的增殖能力, 并诱导其凋亡; MT-12 能够引起细胞的自噬, 并且自噬性的死亡可能发生在 MT-12 对膀胱癌细胞的抑制作用过程中。

关键词: 膀胱肿瘤; 蛇毒素; 凋亡; 自噬

中图分类号: R737.14

文献标识码: A

Effects of membrane toxin 12 on proliferation, apoptosis, and autophagy of bladder cancer cells*

Wang-hong Sun, Liu Chen, Xiang-xin Feng, Cheng-xing Xia, Hai-feng Wang, De-lin Yang
(Department of Urology, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University,
Kunming, Yunnan 650101, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of membrane toxin 12 (MT-12), as one of the extracts from *Naja naja atra* venom, on the proliferation, apoptosis and autophagy of bladder cancer cells. **Methods** We Used CCK8 method to detect the proliferation of bladder cancer RT4 and T24 cells after 0, 24, 48, 72, 96 and 120 h treatment of different concentrations of MT-12 (0.10, 0.25 and 0.50 $\mu\text{g/ml}$). The effect of MT-12 treatment of bladder cancer RT4 and T24 cells (after 6 or 24 h) on the apoptosis was determined by flow cytometry. The cell viability was detected by MTT assay after bladder cancer cells were treated with pan-caspase inhibitor and MT-12. Autophagic body formation was observed after GFP-LC3 transfection and the expression of autophagic markers was detected by Western blotting. **Results** The results of CCK8 showed that MT-12 could inhibit proliferation ability of bladder

收稿日期: 2019-04-03

* 基金项目: 国家自然科学基金 (No: 81860453, 81460385); 昆明医科大学研究生创新基金 (No: 2018S136)

[通信作者] 杨德林, E-mail: ydelin@163.com

cancer RT4 and T24 cells after 0, 24, 48, 72, 96 and 120 h treatment of different concentrations of MT-12. The results of flow cytometry showed that the experimental group can increase the apoptotic rates of bladder cancer RT4 and T24 cells after 6-and 24-hour treatment of MT-12. After treatment of pan-caspase inhibitor V-ZAD-FMK, MT-12 did not completely lose its inhibitory effect on bladder cancer. Western blotting and GFP-LC3 transfection assay results showed LC3-II/LC3-I ratio increased and autophagosome transfected by GFP-LC3 (green fluorescence point) increased. **Conclusions** MT-12 can inhibit the proliferation of bladder cancer RT4 and T24 cell lines in a concentration-time-dependent manner and induce apoptosis. MT-12 can induce autophagy and autophagic death may occur in cells in the process of bladder cancer inhibited by MT-12.

Keywords: urinary bladder neoplasms; snake venoms; apoptosis; autophagy

膀胱癌是全球第 9 大常见癌症, 是泌尿系统肿瘤中最常见的恶性肿瘤之一^[1]。根据 2015 年中国国家癌症登记中心的数据, 膀胱癌发病率在男性癌症中位居第 6, 在中国的发病率及病死率呈上升趋势^[2]。在对现有治疗手段进行规范和改进的同时, 探究新的肿瘤治疗药物及靶点成为当今学界的研究热点。

眼镜蛇膜毒素 12 (membrane toxin 12, MT-12) 是从中华眼镜蛇毒粗毒中提取出来的一种碱性膜活性多肽, 主要是通过破坏细胞膜来发挥其毒性, 故称为膜毒素^[3]。根据毒性生物学效应不同, 又可以命名为心脏毒素、细胞毒素。研究人员发现蛇毒对多种癌细胞均有明显的抑制作用^[4-5]。蛇毒抗肿瘤机制尚未明确, 目前研究认为其与对肿瘤细胞膜结构的破坏、干扰肿瘤细胞的 DNA 合成、诱导肿瘤细胞死亡等有关^[6]。动物毒液诱发自噬能力的研究是毒素学领域的一个新兴趋势, 文献中关于这一问题的研究较少^[7]。故本实验探究 MT-12 对膀胱癌细胞株 RT4 和 T24 细胞增殖、凋亡的影响及与细胞自噬的关系, 为进一步分析动物毒素 MT-12 与膀胱癌细胞自噬相关分子机制的研究提供一定的实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

膀胱癌细胞株 RT4 细胞、T24 细胞 (昆明医科大学第二附属医院实验室), MT-12 (分子质量约为 6 700 kD, 中国科学院昆明动物所动物毒素研究室), RPMI 1640 培养基、二甲基亚砷 (DMSO)、胎牛血清 (FBS)、胰蛋白酶 (含 EDTA) (美国 Gibco 公司), 青霉素、链霉素、Western blotting 配胶、电泳及转膜液试剂盒、V-ZAD-FMK 和氯喹 (上海碧云天生物技术有限公司), CCK-8 试剂盒 (上海东仁化学科技公司), Annexin-V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒 (南京凯基生物科技发展有限公司), 甲基噻唑基四唑 (MTT)、LC3b 一抗 (美国 Sigma 公司), Lipofectamine 2000 (美国

Invitrogen 公司), 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗 (北京中杉金桥公司), 内参抗体 β -actin (北京博奥森生物技术有限公司), 全自动凝胶图像分析系统 (美国 Bio-Rad 公司), 荧光倒置显微镜 (日本 Nikon 公司), FACS Calibur 流式细胞仪 (美国 BD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 2 株膀胱癌细胞 RT4 及 T24, 于含 10% FBS、1% 双抗的 RPMI 1640 培养基, 5% 二氧化碳 CO₂ 培养箱中培养, 实验细胞均处于对数生长期。

1.2.2 CCK-8 法检测细胞增殖 取处于对数生长期的膀胱癌细胞, 计数后调节细胞浓度为 5×10^4 个/ml, 加入 96 孔培养板, 每组设 5 个复孔, 200 μ l/孔, 待细胞贴壁后丢弃原培养液再加入药物。实验组分别加入浓度为 0.10、0.25 和 0.50 μ g/ml MT-12 的 RPMI 1640 完全培养基 200 μ l; 对照组加入 0.00 μ g/ml MT-12 的 RPMI 1640 完全培养基 200 ml, 无细胞的空白对照加入 200 μ l RPMI 1640 完全培养基。加药后细胞在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中分别孵育 0、24、48、72、96 及 120 h, 然后加入 CCK-8 10 μ l/孔, 置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱 2 h 后, 用酶标仪在 490 nm 处检测各孔的光密度 (OD) 值。每组实验重复 3 次。

1.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡 取处于对数生长期状态良好的膀胱癌细胞, 常规消化、分离、收集细胞及细胞计数, 接种于 6 孔板中, 每组设 3 个复孔, 培养 24 h 后加药处理, 实验组加入 0.50 μ g/ml MT-12 的 RPMI 1640 完全培养基, 对照组加入 0.00 μ g/ml MT-12 的 RPMI 1640 完全培养基, 同时设置 NC 溶媒对照组。消化收集 MT-12 处理 6 及 24 h 的膀胱癌细胞, 离心弃上清液, 用预冷的磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤。用 $1 \times$ Annexin-binding Buffer 液重悬细胞, 调整细胞浓度为 1×10^6 个/ml, 每份标本体积为 100 μ l; 5 μ l AnnexinV-FITC 和 5 μ l 碘化丙啶染色溶液, 室温下避光反应 10 min, 加入 400 μ l $1 \times$ Annexin-binding Buffer, 在冰面上轻轻摇匀, 上流式细胞仪进行检测分析。

1.2.4 细胞活性检测 取处于对数生长期的膀胱癌细胞, 计数后调节细胞浓度为 5×10^4 个/ml, 细胞接种于 96 孔板培养贴壁 12 h 后加药处理: 实验一组分组为 (200 μ l MT-12 0.50 μ g/ml 组、200 μ l V-ZAD-FMK 50.00 μ mol/L 组、100 μ l MT-12 0.50 μ g/ml 组 +100 μ l V-ZAD-FMK 50.00 μ mol/L 组), 对照组加入 200 μ l RPMI 1640 完全培养基; 实验二组 (200 μ l MT-12 1.00 μ g/ml 组、100 μ l MT-12 1.00 μ g/ml+100 μ l 氯喹 5.00 μ mol/L 组、100 μ l MT-12 1.00 μ g/ml+100 μ l 氯喹 10.00 μ mol/L 组), 对照加入 200 μ l RPMI 1640 完全培养基, 设 5 个复孔, 设置空白对照组。置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱 24 h, 离心弃培养液, PBS 清洗后, 加入 10 μ l 5 mg/ml 的 MTT 溶液培养 4 h, 弃原培养基, 加入 DMSO 100 μ l, 用酶标仪在 490 nm 处测定各孔的 OD 值。每组实验重复 3 次。

1.2.5 GFP-LC3 转染实验 收集膀胱癌细胞, 以 6×10^5 个/孔接种于 6 孔板, 孵育 24 h 后用无血清无双抗的 RPMI 1640 培养液进行培养; 混合含 GFP-LC3 质粒和 Lipofectamine 2000 的培养液, 室温孵育 30 min 后并缓慢倒入 6 孔板, 培养箱孵育 6 h, 换含血清的 RPMI 1640 培养液。将对照组和 MT-12 (0.50 μ g/ml) 作用于经 GFP-LC3 转染后的膀胱癌细胞, 且按 1×10^5 个/ml 种植爬片, 待细胞贴壁。细胞贴壁后用 PBS 洗涤细胞 2 次, 4 $^{\circ}$ C 丙酮 5 min 固定后自然干燥。在荧光倒置显微镜下观察绿色荧光斑点并拍照。

1.2.6 Western blotting 检测蛋白表达情况 收集膀胱癌细胞, 以 6×10^5 个/孔接种于 6 孔板, 孵育 24 h 后, 对照组和 MT-12 (0.50 μ g/ml) 处理 24 h, 用细胞裂解液 RIPA 充分提取蛋白并检测蛋白浓度, 均衡每组蛋白浓度后, 以 12% SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 90 V 条件下电泳, 然后 100 V 4 $^{\circ}$ C 电转膜 2 h, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, TBST 漂洗, 加入 LC3b 一抗 (1 : 1 000), 4 $^{\circ}$ C 过夜, TBST 洗 3 次, 再分别加入辣根过氧化酶标记的

羊抗鼠二抗 (1 : 5 000) 室温 1 h, TBST 洗 3 次, 化学发光显色后胶片成像。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 21.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较用单因素方差分析, 多个时间点的比较采用重复测量设计的方差分析, 多组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, 两个时间点的比较采用配对 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MT-12 对膀胱癌细胞增殖的影响

不同浓度的 MT-12 处理后 0、24、48、72、96 和 120 h 的细胞 OD 值比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点的细胞 OD 值有差异 (RT4 : $F = 7\ 208.771$, $P = 0.000$; T24 : $F = 4\ 778.191$, $P = 0.000$); ②实验组与对照组的细胞 OD 值有差异 (RT4 : $F = 264.599$, $P = 0.000$; T24 : $F = 243.995$, $P = 0.000$), 实验组较对照组细胞 OD 值降低, 抑制作用增强, 细胞生存率降低。③实验组与对照组的细胞 OD 值变化趋势有差异 (RT4 : $F = 173.869$, $P = 0.000$; T24 : $F = 143.520$, $P = 0.000$)。不同浓度 MT-12 组处理后细胞 OD 值均呈下降趋势, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 即时间因素和分组因素存在交互作用; 不同浓度 MT-12 组在同一时间 48 h 前, 细胞 OD 值无差异 ($P > 0.05$); 48 h 后细胞 OD 值有差异 ($P < 0.05$)。见图 1 和表 1、2。

2.2 MT-12 对膀胱癌细胞凋亡的影响

用 0.50 μ g/ml MT-12 处理 RT4、T24 细胞 6 h 后, 可观察到 RT4、T24 细胞凋亡的增加 (见图 2)。在 6 及 24 h 时, 对照组与 NC 溶媒组凋亡率比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。MT-12 组细胞凋亡率与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 24 h 凋亡率较

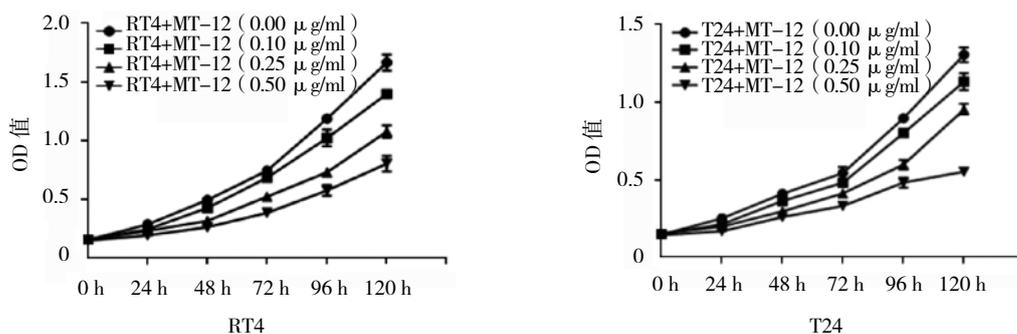


图 1 不同浓度的 MT-12 对膀胱癌细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

表 1 不同浓度 MT-12 作用不同时间的膀胱癌 RT4 细胞增殖情况 ($\bar{x} \pm s$)

MT-12 浓度	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
0.00 μ g/ml	0.20 \pm 0.00	0.27 \pm 0.06	0.51 \pm 0.01	0.72 \pm 0.03	1.24 \pm 0.05	1.62 \pm 0.04
0.10 μ g/ml	0.20 \pm 0.00	0.26 \pm 0.01	0.43 \pm 0.03	0.67 \pm 0.01	1.11 \pm 0.00	1.40 \pm 0.04
0.25 μ g/ml	0.20 \pm 0.00	0.23 \pm 0.03	0.30 \pm 0.01	0.46 \pm 0.04	0.70 \pm 0.02	1.12 \pm 0.01
0.50 μ g/ml	0.20 \pm 0.00	0.22 \pm 0.02	0.31 \pm 0.02	0.40 \pm 0.02	0.59 \pm 0.01	0.76 \pm 0.01

表 2 不同浓度 MT-12 作用不同时间的膀胱癌 T24 细胞增殖情况 ($\bar{x} \pm s$)

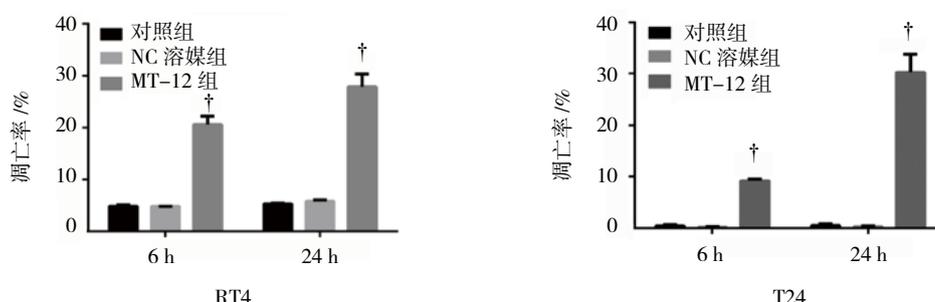
MT-12 浓度	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
0.00 μ g/ml	0.20 \pm 0.00	0.26 \pm 0.01	0.42 \pm 0.03	0.60 \pm 0.02	0.83 \pm 0.02	1.33 \pm 0.03
0.10 μ g/ml	0.20 \pm 0.00	0.26 \pm 0.01	0.39 \pm 0.01	0.51 \pm 0.02	0.72 \pm 0.02	1.17 \pm 0.06
0.25 μ g/ml	0.20 \pm 0.00	0.25 \pm 0.01	0.28 \pm 0.03	0.47 \pm 0.03	0.58 \pm 0.02	0.90 \pm 0.02
0.50 μ g/ml	0.20 \pm 0.00	0.23 \pm 0.01	0.26 \pm 0.02	0.32 \pm 0.02	0.48 \pm 0.02	0.53 \pm 0.03

6 h 大幅度增加 (见表 3)。MT-12 能够诱导 T24 细胞的早期和晚期凋亡,而 RT4 则是主要发生早期凋亡 (见图 3)。

2.3 V-ZAD-FMK 和 MT-12 对膀胱癌细胞活性的影响

用 0.50 μ g/ml MT-12 和 pan-Caspase 抑制剂 V-ZAD-FMK 50.00 μ mol/L 处理膀胱癌 RT4 和 T24 细胞

后,各组的 RT4、T24 细胞活性率分别为:V-ZAD-FMK 组 (1.07 \pm 0.12) %、(1.09 \pm 0.12) %;MT-12 组 (0.59 \pm 0.03) %、(0.31 \pm 0.05) %;MT-12+V-ZAD-FMK 组 (0.71 \pm 0.04) %、(0.55 \pm 0.06) %;各组 RT4、T24 细胞活性率比较,差异有统计学意义 (RT4: $F=49.505$, $P=0.000$; T24: $F=95.447$, $P=0.000$)。RT4、T24 细胞对照组与 V-ZAD-FMK 组间比较差异无统计学意



† 与对照组比较, $P < 0.05$ 。

图 2 0.50 μ g/ml MT-12 对膀胱癌细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$)

表 3 各组 RT4、T24 细胞凋亡情况 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	T24 凋亡率		RT4 凋亡率	
	6 h	24 h	6 h	24 h
对照组	0.46 \pm 0.23	0.55 \pm 0.34	4.89 \pm 0.25	5.35 \pm 0.12
NC 溶媒组	0.22 \pm 0.12	0.35 \pm 0.12	4.84 \pm 0.02	5.86 \pm 0.23
MT-12 组	9.22 \pm 0.31 [†]	30.27 \pm 3.50 [†]	20.63 \pm 1.54 [†]	27.93 \pm 2.41 [†]
F 值	1 449.344	215.448	306.230	254.634
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注: † 与对照组比较, $P < 0.05$ 。

义 ($t=1.427$ 和 1.696 , $P=0.179$ 和 0.116); RT4、T24 细胞对照组与 MT-12 组间比较差异有统计学意义 ($t=8.942$ 和 12.859 , 均 $P=0.000$); RT4、T24 细胞 MT-12 组与 MT-12+V-ZAD-FMK 组间比较差异有统计学意义 ($t=2.592$ 和 4.452 , $P=0.024$ 和 0.001)。见图 4。

2.4 MT-12 对膀胱癌细胞自噬的影响

GFP-LC3 转染膀胱癌 RT4 和 T24 细胞后表达绿色荧光蛋白 GFP, 细胞无自噬时 GFP-LC3 广泛分布在细胞中。与对照组比较, MT-12 处理的膀胱癌 RT4

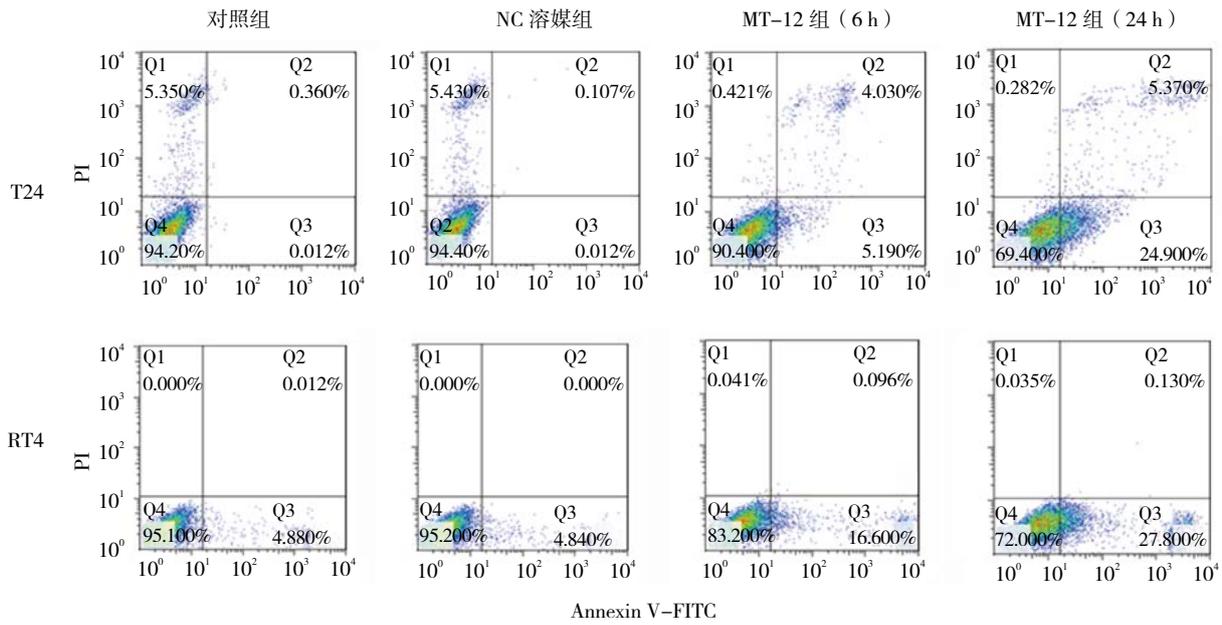


图 3 MT-12 对膀胱癌 T24、RT4 细胞凋亡的影响

和 T24 细胞在荧光显微镜下表现为绿色荧光点聚集现象。见图 5。

2.5 MT-12 对膀胱癌细胞自噬蛋白 LC3- II 的表达影响

在自噬过程中, LC3 的胞质形式 (LC3- I) 转化

为磷脂酰乙醇胺结合形式 (LC3- II)。因此, LC3 通常被用作监测自噬水平的分子标记。0.50 $\mu\text{g/ml}$ MT-12 处理膀胱癌细胞 RT4 和 T24 后, LC3- II /LC3- I 蛋白表达量分别为: 对照组 (0.05 ± 0.00) 和 (0.79 ± 0.04); 实验组 (0.97 ± 0.08) 和 (0.29 ± 0.03); 实验组 RT4 和 T24 均较对照组差异有统计学意义 ($t = 18.847$ 和 16.154 , 均 $P = 0.000$)。见图 6。

2.6 氯喹和 MT-12 对膀胱癌细胞活性的影响

用 1.00 $\mu\text{g/ml}$ MT-12 和自噬抑制剂氯喹 5.00 和 10.00 $\mu\text{mol/L}$ 处理膀胱癌细胞, 各组的细胞活性率分别为 (0.30 ± 0.02)%、(0.45 ± 0.05)% 和 (0.62 ± 0.03)%, 各组细胞活性率比较, 差异有统计学意义 ($F = 403.501$, $P = 0.000$)。两两比较发现, 1.00 $\mu\text{g/ml}$ MT-12+ 氯喹

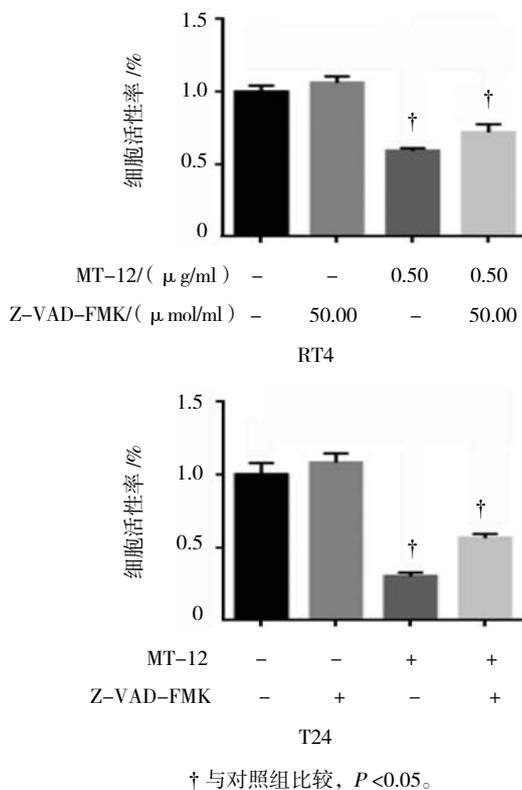


图 4 MT-12 和 Z-VAD-FMK 对膀胱癌细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$)

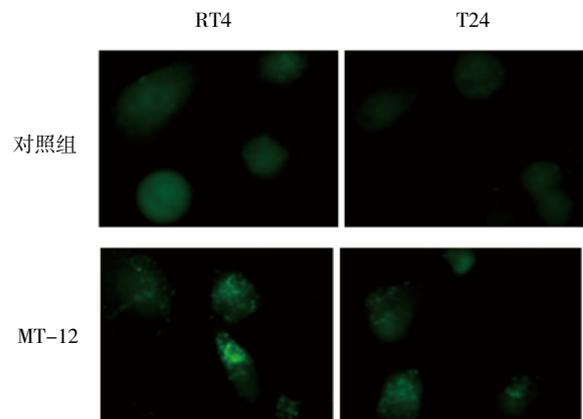


图 5 GFP-LC3 质粒转染膀胱癌 RT4 和 T24 细胞荧光图及斑点 (荧光倒置显微镜 $\times 400$)

5.00 和 10.00 $\mu\text{mol/L}$ 组相对单独 1.00 $\mu\text{g/ml}$ MT-12 处理组差异有统计学意义 ($t=7.056$ 和 15.174 , 均 $P=0.000$)。见图 7。

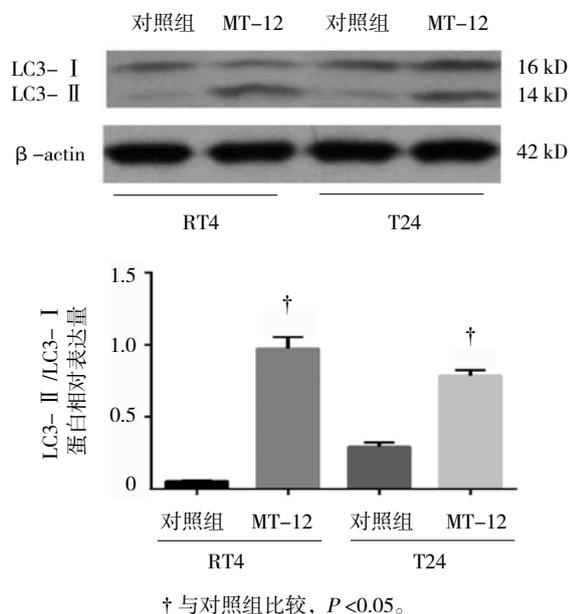


图 6 MT-12 处理膀胱癌细胞 RT4 和 T24 后 LC3-II 与 LC3-I 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

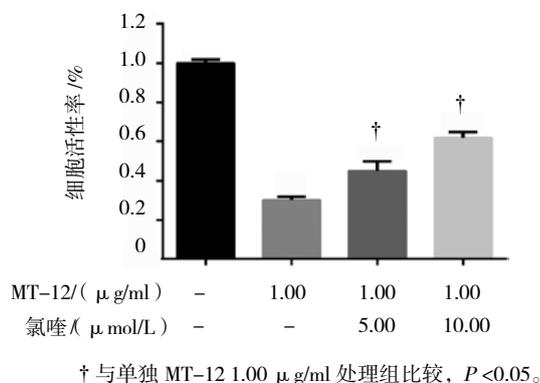


图 7 氯喹和 MT-12 对膀胱癌细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

3 讨论

膀胱癌是泌尿道最常见的恶性肿瘤, 预估 2018 年, 美国将有 81 190 例新病例和 17 240 例死亡病例^[1]。临床上, 膀胱癌被分类为非肌层浸润性膀胱癌和肌肉浸润性膀胱癌。目前, 约有 75% 的病例初诊时局限于黏膜或黏膜下层, 然而, 大约 50% ~ 70% 非肌层浸润性膀胱癌的患者有肿瘤复发, 大约 10% ~ 30% 的病例进展为肌肉浸润性膀胱癌^[8]。故寻找更加有效的膀胱癌治疗药物, 并充分了解其治疗机制成为临床治疗膀胱癌的热点。

自然产物是新型抗肿瘤药物的重要来源, 许多物质均被证实有药用价值, 对肿瘤的药物治疗有巨大贡献^[5]。动物毒液是蛋白质和肽的混合物, 主要的毒液成分通常包括神经毒素、真菌毒素、心脏毒素、苏木精及催化酶, 毒液成分的药理活性作为潜在治疗剂的来源, 一些动物毒素表现出深远的抗癌作用, 影响癌细胞增殖、迁移、侵入、凋亡活性及新血管形成^[5]。MT 是眼镜蛇毒的主要毒性成分之一, 既具有心脏毒性, 又具有细胞毒性, 尤其是对肿瘤细胞有毒性的组分, 在蛇毒抗肿瘤作用的研究中占首要地位^[9]。MT-12 是从蛇毒中分离出的一种膜活性多肽, 其毒性是通过破坏细胞膜结构而实现。相对分子质量为 6 000 ~ 7 000 kD, 对热稳定。MT-12 已被证明对多种体外肿瘤有选择性杀伤作用, 对正常细胞的杀伤作用较小^[3]; 在体内能引起肿瘤体积缩小, 延长荷瘤小鼠的存活时间, 并抑制肿瘤的转移^[4]。MT 属于三指毒素家族, 其 4 对高度保守的二硫键使得 MT 的空间结构呈三指状^[10]。通过阻断烟碱和毒蕈碱性乙酰胆碱受体的活性, 三指折叠毒素干扰与神经肌肉接头运作, 为潜在特异性的治疗剂提供突破口^[11]。

自噬是细胞体内平衡和适应环境改变的基本功能, 如饥饿和细胞内蛋白质的清除和异常细胞器^[12]。自噬对肿瘤发生、发展具有双刃剑的作用, 在不同的条件和实验体系中存在差异。一方面能够通过降解细胞中非必需的蛋白质或器官, 保持细胞内的代谢, 为细胞提供必要的能量, 维持细胞内平衡, 从而促进肿瘤细胞对化疗和放疗的抵抗; 另一方面, 自噬还能够与细胞凋亡、细胞周期阻滞或相互作用, 直接造成肿瘤细胞自噬性死亡, 抑制癌症的发展^[13]。

本实验首先检测不同浓度的 MT-12 对两种恶性程度不同的膀胱癌细胞 RT4 和 T24 的增殖影响。CCK-8 结果显示 0.10 $\mu\text{g/ml}$ MT-12 对 2 株细胞的生长增殖影响小, 而 0.25 和 0.50 $\mu\text{g/ml}$ MT-12 能抑制 RT4 和 T24 细胞的增殖。MT-12 能够抑制膀胱癌 RT4、T24 细胞的增殖, 且具有时间 - 剂量依赖性。随着时间的变化, MT-12 能够促进 RT4 和 T24 细胞的凋亡。结果与增殖实验的结果趋势一致, MT-12 作用于 T24、RT4 细胞后, 细胞凋亡水平呈时间依赖性上升。

研究 MT-12 在抑制膀胱癌细胞增殖的分子机制时, 发现采用 Pan-Caspase 抑制剂 V-ZAD-FMK 对 2 株膀胱癌细胞系进行处理后, MT-12 并未完全失去对膀胱癌的抑制效果, 暗示细胞死亡可能并不完全依赖

于 Caspase 途径。自噬会大量降解胞内细胞器和大分子, 诱导细胞死亡, 有学者称其为 II 型程序性死亡^[14], 其特征是自噬体的出现, 不依赖于 Caspase 途径。实验对可能的自噬性死亡做初步检测发现, 通过 MT-12 作用于膀胱癌细胞株后, LC3- II /LC3- I 比值增大, GFP-LC3 转染结果自噬体 (绿色荧光点) 增多。检测结果表明 MT-12 能够引起细胞的自噬。氯喹被认为是自噬抑制剂之一, 为进一步明确 MT-12 与自噬关系, 实验用氯喹和 MT-12 同时处理膀胱癌, 结果发现氯喹能够消除 MT-12 对膀胱癌细胞增殖的抑制作用。这说明自噬性的死亡可能发生在 MT-12 对膀胱癌细胞的抑制作用过程中。

综上所述, MT-12 对 RT4 和 T24 细胞增殖具有抑制作用, 诱导细胞凋亡及自噬, 其中具体分子机制及体外研究尚待进一步研究探讨。

参 考 文 献:

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2018[J]. CA: a Cancer Journal for Clinicians, 2018, 68(1): 7-30.
- [2] PANG C, GUAN Y, LI H, et al. Urologic cancer in China[J]. Japanese Journal of Clinical Oncology, 2016, 46(6): 497-501.
- [3] YANG D, WANG J, LI J, et al. Effect of membrane toxin 12 isolated from *Naja naja* atra on proliferation and invasion of human bladder cancer EJ cells[J]. Molecular Medicine Reports, 2012, 5(1): 266-269.
- [4] POINTON A, ABI-GERGES N, CROSS M J, et al. Phenotypic profiling of structural cardiotoxins in vitro reveals dependency on multiple mechanisms of toxicity[J]. Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology, 2013, 132(2): 317-326.
- [5] CHAISAKUL J, HODGSON W C, KURUPPU S, et al. Effects of animal venoms and toxins on hallmarks of cancer[J]. Journal of Cancer, 2016, 7(11): 1571-1578.
- [6] 金夕琳, 张洁, 江海龙, 等. 蛇毒毒素的抗肿瘤作用及其在医药领域的应用[J]. 药学实践杂志, 2015(6): 502-504.
- [7] STRANSKY S, COSTAL-OLIVEIRA F, LOPES-DE-SOUZA L, et al. In vitro assessment of cytotoxic activities of *lachesis muta muta* snake venom[J]. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2018, 12(4): e6427.
- [8] KAMAT A M, HAHN N M, EFSTATHIOU J A, et al. Bladder cancer[J]. Lancet (London, England), 2016, 388(10061): 2796-2810.
- [9] WU M Y, MING W, TANG Y, et al. The anticancer effect of cytotoxin 1 from *Naja atra* Cantor venom is mediated by a lysosomal cell death pathway involving lysosomal membrane permeabilization and cathepsin B release[J]. The American Journal of Chinese Medicine, 2013, 41(3): 643-663.
- [10] GORAI B, SIVARAMAN T. Delineating residues for haemolytic activities of snake venom cardiotoxin 1 from *Naja naja* as probed by molecular dynamics simulations and in vitro validations[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 95: 1022-1036.
- [11] KESSLER P, MARCHOT P, SILVA M, et al. The three-finger toxin fold: a multifunctional structural scaffold able to modulate cholinergic functions[J]. Journal of Neurochemistry, 2017, 142(Suppl 2): 7-18.
- [12] RYTER S W, MIZUMURA K, CHOI A M K. The impact of autophagy on cell death modalities[J]. International Journal of Cell Biology, 2014, 2014: 502676.
- [13] RASHID H, YADAV R K, KIM H, et al. ER stress: Autophagy induction, inhibition and selection[J]. Autophagy, 2015, 11(11): 1956-1977.
- [14] BRAHMBHATT H, OPPERMAN S, OSTERLUND E J, et al. Molecular pathways: leveraging the Bcl-2 interactome to kill cancer cells-mitochondrial outer membrane permeabilization and beyond[J]. Clinical Cancer Research: an Official Journal of the American Association for Cancer Research, 2015, 21(12): 2671-2676.

(张西倩 编辑)