

眼镜蛇毒神经生长因子抑制肝星状细胞增殖并诱导其凋亡*

赖允丽 张学荣[△] 张钦乐 胡仁统 罗小玲 廖明 班建东

(广西医科大学蛇毒研究所 广西南宁 530021)

摘要 目的:从眼镜蛇毒中分离纯化神经生长因子(Nerve Growth Factor, NGF),观察眼镜 NGF 对肝星状细胞 HSC-T6 增殖、凋亡活性的影响,进一步为蛇毒 NGF 在抗肝纤维化治疗提供依据。方法:采用 shephadex G-75 和 CM Sepharose CL-6B 二步柱色谱对眼镜蛇毒 NGF 进行纯化分离,PC12 细胞测定各洗脱峰的活性,再用 SDS-PAGE 鉴定具有 NGF 活性洗脱峰的纯度和相对分子质量。实验设立空白对照和 NGF 处理组,分别作用于 HSC-T6,培育相应时间,MTT 检测眼镜蛇毒 NGF 对 HSC-T6 细胞活力影响;HE 染色、紫外激光显微镜与透射电镜观察 HSC-T6 细胞的形态学变化;TUNEL、流式细胞技术检测眼镜蛇毒 NGF 对 HSC-T6 细胞凋亡的影响。结果:眼镜蛇毒经 PC-12 细胞鉴定第 1 峰具有 NGF 活性;SDS-PAGE 检测为电泳纯,相对分子质量为 22.3KD;NGF 对 HSC-T6 细胞增殖具有明显抑制作用(2 μg/ml NGF 的抑制率为 49.66% ± 6.50%, P<0.05, 6.25 μg/ml NGF 的抑制率为 71.33% ± 1.53%, P<0.05);TUNEL 法检测发现 NGF 干预组的凋亡率 28.71% ± 1.59%(2ug/ml NGF) 和 34.4% ± 2.49%(5 μg/ml NGF)明显高于对照组的 15.85% ± 1.58%(P<0.05);流式细胞仪也有同样的发现,NGF 干预组的凋亡率 16.12% ± 3.02%(2 ug/ml NGF) 和 21.15% ± 3.31%(5 μg/ml NGF) 明显高于对照组的 2.7% ± 1.55%(P<0.05)。结论:眼镜蛇毒 NGF 能抑制肝星状细胞 HSC-T6 增殖并诱导其凋亡。

关键词 眼镜蛇毒;NGF;凋亡;肝纤维化

中图分类号 R285, R575 **文献标识码** A **文章编号** :1673-6273(2012)06-1034-06

Cobra Venom NGF Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis of Hepatic Stellate Cell*

LAI Yun-li, ZHANG Xue-rong[△], ZHANG Qin-le, HU Ren-tong, LUO Xiao-ling, LIAO Ming, BAN Jian-dong

(Institutes of Snake Venom, Department of Biochemistry and Molecular Biology, GuangXi Medical University, NanNing 530021, China)

ABSTRACT Objective: Cobra venom NGF can be isolated and purified with a rapid method, and observe the effect of the proliferation and apoptosis after NGF added to the HSC-T6 cells. This provides the basis for the treatment of anti-liver fibrosis in the future. **Methods:** NGF is separated from Guangxi cobra venom through shephadex G-75 and CM Sepharose CL-6B column chromatography; PC12 cell assay the activity of the NGF elution peak, then identified NGF purity and relative molecular mass with SDS-PAGE; we established groups of control and NGF respectively, acting on the HSC-T6, nurturing the corresponding time points, MTT test HSC-T6 cells viability effected on cobra venom NGF; hematoxylin and eosin stain, PALM MicroBeam and transmission electron microscope Morphology observed the changes in HSC-T6 cells; TUNEL and flow cytometry detected HSC-T6 cell apoptosis after adding the cobra venom NGF; **Results:** The Cobra venom elution peak identified by PC-12 cells having NGF active; SDS-PAGE electrophoresis show the elution peak pure and the related molecular mass is 22.3KD; HSC-T6 cell proliferation is inhibited evidently (2 μg/ml NGF inhibition ratio is 49.66% ± 6.50%; 6.25 μg/ml NGF inhibition ratio is 71.33% ± 1.53%, P<0.05); TUNEL shows apoptosis ratio of HSC-T6 is 28.71% ± 1.59% (2 μg/ml NGF) and 34.4% ± 2.49% (5 μg/ml NGF) that is obviously higher than control 15.85% ± 1.58%, P<0.05; It is also founded in flow cytometry, apoptosis ratio of HSC-T6 is 16.12% ± 3.02% (2 μg/ml NGF) and 21.15% ± 3.31% (5 μg/ml NGF) that is obviously higher than control 2.7% ± 1.55%, P<0.05. **Conclusion:** The cobra venom NGF inhibits HSC-T6 proliferation and induces apoptosis.

Key words: Cobra venom; NGF; Liver fibrosis; Apoptosis

Chinese Library Classification (CLC): R285, R575 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)06-1034-06

肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)是 ECM 的主要来源, HSC 激活并转化为肌成纤维细胞样细胞(MFC),各种致纤维化因素均把 HSC 作为最终靶细胞。正常情况下肝星状细胞处于静止状态,当肝脏受到炎症或机械刺激等损伤时,肝星状细胞被激活,其表型由静止型转变为激活型(HSC-T6)。激活

的肝星状细胞通过增生和分泌细胞外基质参与肝纤维化的形成和肝内结构的重建,导致肝细胞不同程度的损伤。HSC 活化后其表型很难逆转,在肝损伤修复中,通过凋亡的方式使 HSCs 的数量减少,是肝纤维化逆转的主要策略^[1-2]。神经生长因子(Nerve growth factor, NGF)是神经营养因子的典型代表^[3],

* 基金项目:广西自然科学基金资助项目(2011GXNSFA018268), (KFJJ2010-43)

作者简介:赖允丽(1986-),女,硕士研究生,主要研究方向:眼镜蛇毒 NGF 与肝纤维化, E-mail:luckily877@163.com

[△]通讯作者:张学荣, E-mail:zxrsv@sina.com

(收稿日期:2011-09-04 接受日期:2011-09-28)

近年来 NGF 诱导 HSCs 凋亡为抗肝纤维化药物的研发提供了一个新的靶点^[4]。从眼镜蛇毒中纯化 NGF 得率很高,通常是从小鼠下颌腺提取的 100 倍以上,并且从蛇毒中提取的 NGF 还具有耐酸、耐碱、耐蛋白酶水解稳定性高的特点,充分开发这一资源具有重要意义。本试验从眼镜蛇毒中分离纯化 NGF,采用 MTT、TUNEL、透射电镜、流式方法检测纯化眼镜蛇毒 NGF 特性及其是否可诱导体外 HSC-T6 的凋亡,继而为蛇毒 NGF 对肝纤维化疾病的治疗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与细胞株

大鼠肾上腺嗜铬瘤细胞(PC-12)购于上海中科院细胞研究所;大鼠 HSC-T6 购于湖南湘雅医学院;眼镜蛇毒由广西医科大学蛇毒研究所提供;F12 培养基购 Sigma 公司;1640 培养基、10%胎牛血清购自 Hyclone 公司,马血清购自 GIBCO 公司,MTT 购自 Sigma 公司。PC-12 细胞用含体积分数为 10%的胎牛血清+5%马血清+1%的 Antibiotics & Antimycotics(Invitrogen 公司)的 F12 培养液;HSC-T6 细胞用含体积分数为 10%的胎牛血清+1%的 Antibiotics & Antimycotics(Invitrogen 公司)的 1640 培养液,置 CO₂ 培养箱(37 °C、5% CO₂)培养。

1.2 细胞培养及分组

取对数生长期 HSC-T6 细胞,接种于 96 孔板,2000 个/孔,药物处理 48 小时后进行 MTT 分析;消化细胞以 40-50%的密度接种于 6 孔板,次日贴壁后静止 24 h,加入纯化 NGF 处理相应时间点后固定细胞进行形态学及 TUNEL 观察;同法接种细胞后收集做电镜和流式鉴定;以下实验分为 2 组:空白对照组(PBS)、NGF 干预组。

1.3 实验方法

1.3.1 眼镜蛇 NGF 分离纯化及鉴定 眼镜蛇毒上 shephadex G-75 凝胶柱经 1%HAC 洗脱,进行初步分离,收集的各峰的溶液经 PC-12 测定 NGF 的活性。对活性峰再采用 CM Sepharose CL-6B 离子柱经 1mol/LNaCl 和 0.025mol/LNaHAC-HAC(PH5.8 buffer)混合液进行线性洗脱,将生长良好的 PC-12 细胞以 5×10⁵ 浓度接种于 24 孔板。次日贴壁后换成低血清培养液(2%胎牛血清的 F12K 培养液),并加入眼镜蛇 NGF,使其终浓度为 2μg/ml,培养 2-4 天。普通显微镜下观察对照组细胞成圆形,无突触,聚团生长。NGF 作用组,细胞成团平铺,边缘逐渐长出突触,甚至交集成网状;将分离纯化后鉴定具有 PC-12 细胞活性的 NGF 采用 SDS-PAGE 电泳测定,NGF 活性峰显示一条带为电泳纯;采用考马斯亮蓝法测蛋白浓度,将牛血清白蛋白标准品配成 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06mg/ml 的系列浓度;以牛血清白蛋白含量为横坐标,各管相应吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,求回归方程。待测 NGF 稀释相应倍数,使其浓度在标准曲线范围内,通过方程求其蛋白浓度。

1.3.2 MTT 法检测 HSC-T6 细胞的增值 HSC-T6 以初浓度为 1×10⁵/mL 对倍稀释成 8 个系列浓度(1×10⁵、5×10⁴、2.5×10⁴、1.25×10⁴、6×10³、3×10³、1.5×10³、7.5×10²) 接种于 96 孔板,每个浓度 3 个复孔,200μl/孔,重复接种 8 块板,完全培养基培养,采用酶标仪每天测定一块 96 孔板细胞 OD595,连续测定 8 天,绘制其生长曲线;将呈指数生长的 HSC-T6 以 5×10⁴/mL

的密度接种于 96 孔板,细胞同步化后,实验组在培养基中加 NGF(终浓度为 12.5、6.25、3.25、1.625、0.8125 μg/ml) 空白对照组加 RPMI-1640 培养基,200 μL/孔,每组 3 复孔。作用 48h,分别加 5 mg/mlMTT20μl,孵育 4 h,再加 150μlDMSO,微型振荡器上振荡 10 min,孵育 10min,酶标仪 595 nm 处测吸光度 OD 值。

1.3.3 HE 染色及紫外激光显微观察 HSC-T6 细胞形态 实验取对数生长 HSC-T6 细胞,设立对照组和 NGF 干预组(浓度分别为 2.0 μg/ml、5 μg/ml),作用 24 h。采用 HE 染色,普通光学显微镜下观察,胞核染成蓝色,胞浆呈紫色;采用 100 μg/ml 吖啶橙染色,PALM MicroBeam 激光下观察。胞核染成绿色,胞浆呈红色。

1.3.4 透射电镜、TUNEL 及流式细胞术法观察和测定 HSC-T6 细胞凋亡 实验取对数生长期 HSC-T6 细胞,设立对照组和 NGF 干预组(终浓度分别为 2.0 μg/ml、5.0 μg/ml)。把两组细胞悬浮离心 5 min 后(1000 r/min)去上清,沉淀细胞经戊二醛和锇酸双重固定,丙酮脱水,环氧树脂包埋,超薄切片,醋酸枸橼酸电子双重染色。透射电镜观察,摄片,凋亡细胞异染色质固缩,逐渐向胞核边集,并有凋亡小体形成,甚至出现细胞溶解现象;同上处理,将 HSC-T6 接种于 24 孔板,总体积 1 ml/孔。作用 24 h,胰酶消化并离心收集细胞。制备细胞涂片,室温自然晾干。涂片用 4%多聚甲醛固定 50 min,PBS 洗 2 分钟×2 次,经 3%H₂O₂ 灭活、蛋白酶 K 通透、TUNEL 反应混合物标记、信号转化及 DAB 显色后,苏木素衬染,酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封片,显微镜观察。胞核染成棕黄色为阳性细胞。随机取 5 个高倍视野,计数 200 个细胞中凋亡细胞数量,计算细胞凋亡率;同上处理,将 HSC-T6 接种于 6 孔板,2 ml/孔。培养箱孵育 24 h,胰酶消化离心收集细胞。用含 2%BSA 的 PBS 悬浮细胞,至于冰上,送于检测。将含细胞的 PBS 离心弃掉,加入流式上样缓冲液 300 μl,按实验要求相应加入 FITC5μl 或 PI5μl,混合均匀,5-15 min 避光反应。半小时内上机检测。

1.4 结果判定与统计学分析

细胞相对增殖活性和凋亡的结果以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)之柱状图来表示。采用 SPSS17.0 统计学软件进行 one way ANOVA 分析,P<0.05 视为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NGF 分离纯化

将眼镜蛇粗毒经过 Sephadex G-75 凝胶过滤后得到 5 个峰,其中峰前半部分有 NGF 活性;SephadexG-75 凝胶所得产物透析,用 CM Sepharose CL-6B 离子交换柱进一步分离得到 10 个峰,其中峰具有 NGF 活性,见图 1:

2.2 NGF 性质鉴定及含量测定

正常培养条件下的 PC12 细胞呈圆形或椭圆形,也有一些不规则形,无明显突起。2.0μg/mlNGF 作用下,可见细胞长出多个神经纤维样突触,有长有短,突触数目不等,有部分交织成网状,细胞分化程度与 NGF 呈时间和浓度依赖性,而对照组细胞体积缩小,呈球形,无突起。结果表明,从眼镜蛇毒提取的 NGF 能诱导 PC12 细胞分化,具有良好的生物学活性;所分离得到的有 NGF 活性的是第 1 峰,在还原条件下,经过 12.5%

SDS-PAGE 第 峰为一条带,证明为纯组分,将标准蛋白迁移率为横坐标,相应分子质量的对数值为纵坐标作标准曲线,所得公式为 $Y=1.7913X+2.3365$ $R=0.0306$ 。目的蛋白换算后测量其分子量为 22.3KD;实验以标准牛血清白蛋白的浓度为横坐

标,OD 值为纵坐标绘制标准曲线图,得 $Y=6.4036X+0.0012$ $R=0.9988$ 。NGF 原蛋白稀释 3 倍后取 0.06ml 测定其 OD 值为 0.375, $V=62ml$ 则 $M=180.95mg$,分离 2g 蛇毒得率为 9.04%。见图 2、3:

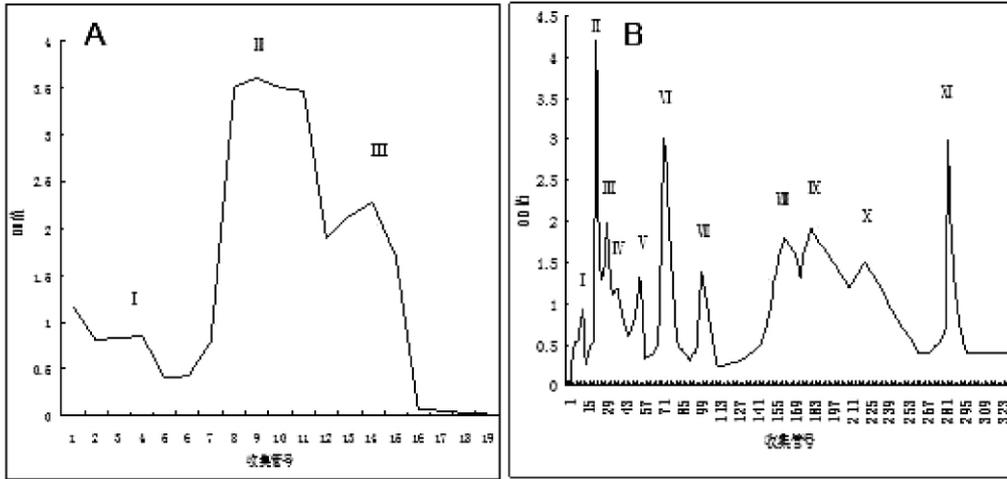


图 1 眼镜蛇粗毒的分离纯化。A 眼镜蛇粗毒经 Sephadex G-75 凝胶柱(2.6 cm× 100 cm)过滤层析图; B NGF 活性组分经 CM Sepharose CL-6B 离子交换柱(2.6 cm× 50 cm)层析图

Fig. 1 Crude Cobra venom isolate and purify. A :Gel filtration chromatography of Chinese cobra venom was fractioned on sephadex G-75 column(2.6 cm× 100 cm) ; B :Ion exchange chromatography of the peak 3 with NGF activity obtained from sephadex G-75 column was fractioned on CM-Sepharose CL-6B column(2.6 cm× 50 cm)

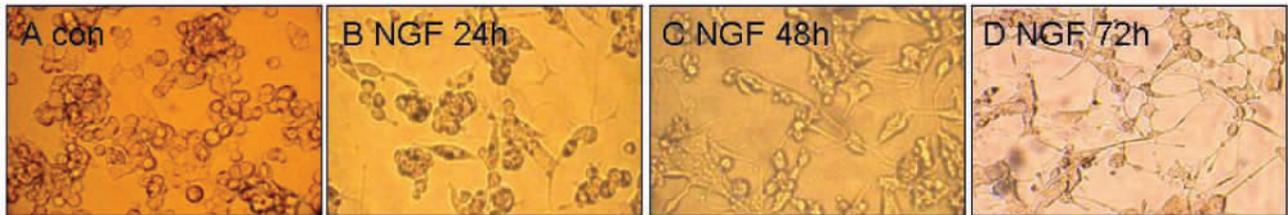


图 2 蛇毒 NGF 作用 PC-12 细胞活性检测
Fig. 2 The activity analysis of PC-12 cells treated with Cobra venom NGF

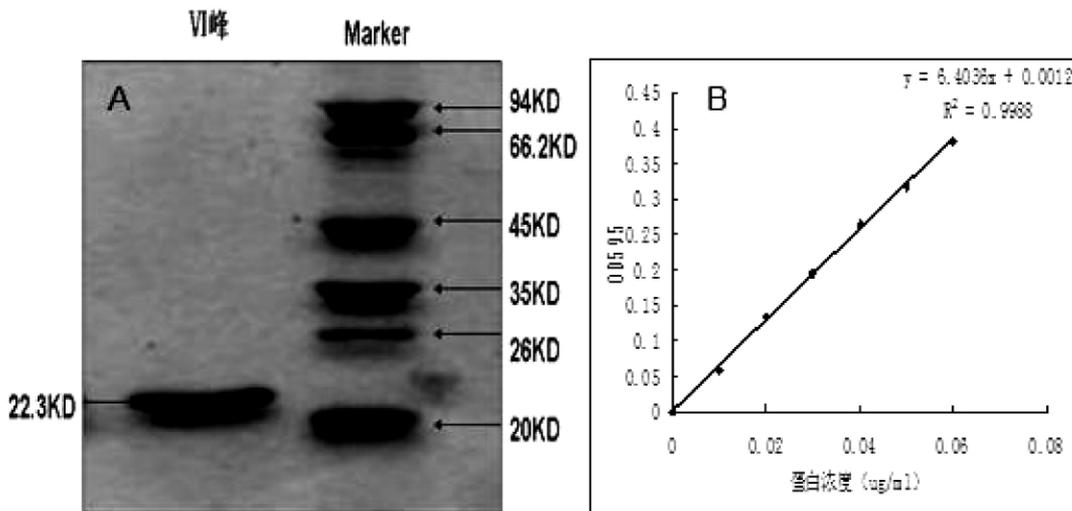


图 3 NGF 的分子量及纯度测定。A:SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (12.5%); B:牛血清白蛋白标准曲线

Fig. 3 Determination of NGF molecular weight and content. A:SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (12.5%); B:Bovine serum albumin standard curve

2.3 MTT 法检测 NGF 干预后 HSC-T6 增值率降低
HSC-T6 接种于 96 孔板,设置 8 个系列密度观察其密度与

生长天数关系,结果显示 HSC-T6 细胞培养 1-8 天以第 8 个接种密度(5×10^4)为宜,最佳生长期为接种后第 3 天,将对数生

长的 HSC-T6 以 1.25×10^4 接种于 96 孔板, 细胞处于同步化后, NGF 以浓度 12.5, 6.25, 3.25, 1.625, 0.8125 $\mu\text{g/ml}$ 作用细胞, 连续培养 48 h, 与对照组比较, 细胞增殖率降低, 由结果推断 NGF 作用 HSC-T6 半数抑制率 IC_{50} 约为 2 $\mu\text{g/ml}$ (相当于对照

组为 $49.66\% \pm 6.50\%$, $P < 0.05$)。其中以 6.25 $\mu\text{g/ml}$ 作用最显著, 抑制率达 70% (相当于对照组为 $71.33\% \pm 1.53\%$, $P < 0.05$)。见图 4:

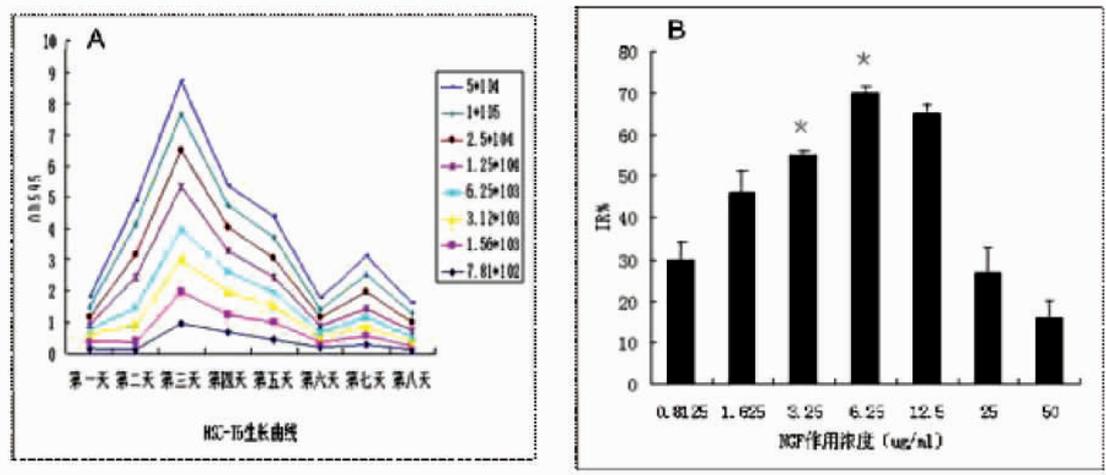


图 4 眼 MTT 法检测 NGF 对 HSC-T6 细胞增殖影响。A: HSC-T6 细胞生长曲线图; B: NGF 作用 HSC-T6 生长柱形图

Fig. 4 MTT assay HSC-T6 cells proliferation effected on cobra venom NGF. A: HSC-T6 cells growth curve;

B: HSC-T6 cells growth histogram treated with NGF

2.4 采用 HE 染色及吖啶橙染色对 NGF 作用 HSC-T6 进行形态学观察

HE 染色后, 普通显微镜下观察 HSC-T6 细胞胞核被染成蓝色, 胞浆染成紫色, 结果显示对照组细胞形态规则完整, 细胞均匀分布。而 NGF 处理组出现部分细胞核固缩, 细胞数量减少, 形态散乱。吖啶橙染色后, 采用 PALM MicroBeam 镜下观

察, HSC-T6 对照组细胞形态规则完整, 细胞生长均一, 胞核染色着淡绿色, 胞浆均匀染成淡红色, NGF 2 $\mu\text{g/ml}$ 作用浓度组细胞形态出现不规则, 细胞总数变少, 胞核被染成深绿色甚至黄色, 胞浆减少, NGF 5 $\mu\text{g/ml}$ 作用浓度组细胞形态不规则, 胞膜不完整, 胞质固缩, 胞浆消失, 细胞被染成深绿色和黄色, 并伴有细胞碎片生成。见图 5、6:

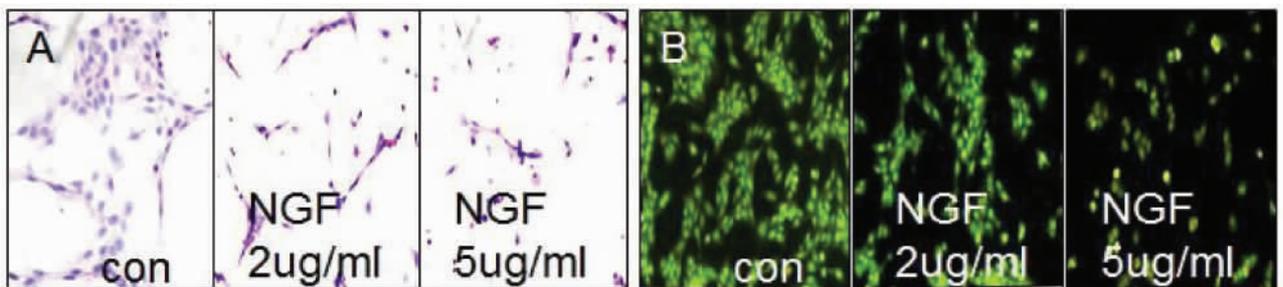


图 5 NGF 作用 HSC-T6 细胞形态学观察。A: HE 染色; B: 吖啶橙染色

Fig. 5 Morphology observe HSC-T6 cells after adding the cobra venom NGF. A: hematoxylin and eosin stain; B: acridine orange stain

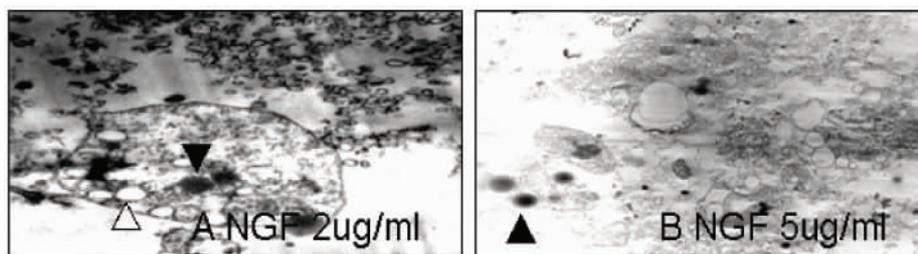


图 6 蛇毒 NGF 作用 HSC-T6 细胞电镜观察

Fig. 6 Electron microscope observe HSC-T6 cells after adding the cobra venom NGF

2.5 NGF 干预后 HSC-T6 凋亡的透射电镜观察及 TUNEL 检测
蛇毒 NGF 作用 HSC-T6 细胞, 电镜下可见细胞核固缩呈块状, 核染色质逐渐边集, 胞浆内充满呈空泡状的内质网(Δ),

并有凋亡小体形成(\blacktriangle)。NGF 高浓度组作用下, 细胞周围连接消失, 细胞逐渐降解, TUNEL 法检测显示实验组在 2.5 $\mu\text{g/ml}$ -NGF 干预下, 孵育 24 h, HSC-T6 凋亡率有所增高 ($28.71\% \pm$

1.59% VS 15.85% ± 1.58% ,P<0.01) ,5μg/mlNGF 作用下 ,孵育 24 h ,HSC-T6 凋亡率显著增高 (34.4% ± 2.49% VS 15.85% ± 1.58% ,P<0.01) ;经流式检测显示 ,实验对照组有少数细胞凋亡 ,而 NGF 干预组作用 24h 检测不同浓度组存在不同程度凋亡。其中 NGF2μg/ml 做药组与实验组凋亡率比较有明显差异

(16.12% ± 3.02% VS 2.7% ± 1.55% ,P<0.01) ,NGF5 ug/ml 与对照组凋亡率比较有显著性差异 (21.15% ± 3.31% VS 2.7% ± 1.55% ,P<0.01) ,经统计学处理有显著性差异,证明 NGF 可诱导 HSC-T6 凋亡 ,见图 7、8、9:

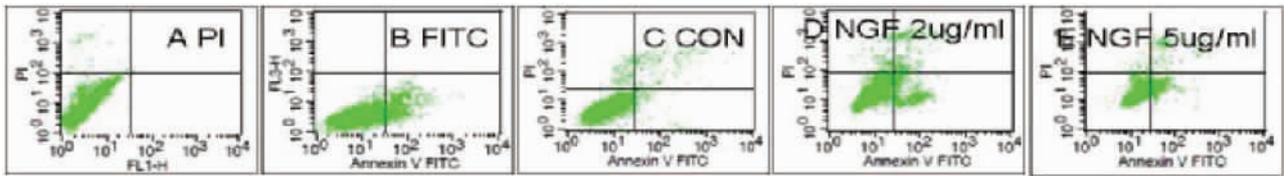


图 7 蛇毒 NGF 诱导 HSC-T6 细胞凋亡(TUNEL 400×)

Fig. 7 HSC-T6 cells apoptosis induced by Cobra venom NGF (TUNEL 400×)

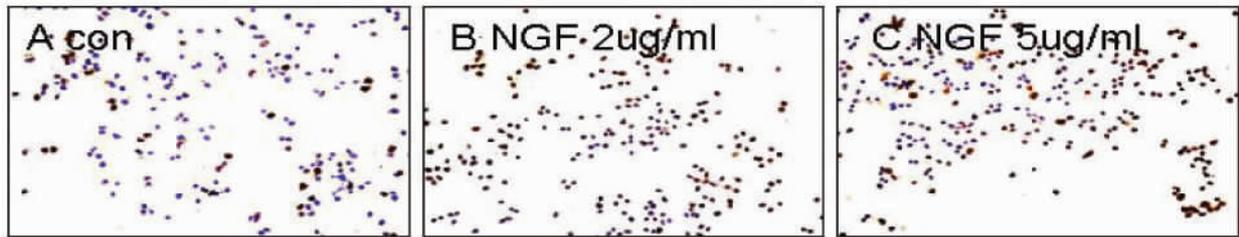


图 8 蛇毒 NGF 作用 HSC-T6 细胞流式检测

Fig. 8 Flow cytometry detecte HSC-T6 cells after adding the cobra venom NGF

3 讨论

近年来 ,人神经生长因子诱导 HSC-T6 凋亡现象的发现 ,使其从神经系统疾病领域应用到肝纤维化的治疗中。在本研究前我们已验证用聚合酶链反应(PCR)方法直接从眼镜蛇基因组 DNA 中扩增并克隆出 NGF 全长基因并进行全序列分析 ,所得序列与 Genbank 提供的序列(M61180)对比显示 ,眼镜蛇 NGF 与鼠、人的 NGF 同源性分别为 66%、68%。其中重要的氨基酸为 NGF 维持其空间结构、保证其生物活力所必需 ,尤其是 6 个特征性的半胱氨酸。眼镜蛇 NGF 在这些重要的区域及氨基酸与已知的人 NGF 具有严格的保守性。因此 ,眼镜蛇毒分离 NGF 体外诱导 HSCs 凋亡具有可行性。

实验采用蛋白质分离纯化系统 ,眼镜蛇毒先经 G-75 凝胶层析分离出三个峰 , 峰再通过 CM Sepharose CL-6B 离子交换层析 ,得第 峰鉴定具有 NGF 活性 ,该峰经 SDS-PAGE 电泳显示 1 条带 ,分子量为 22.3KD(如图 1-3) ,证明所得收集峰为纯组分。

NGF 的活性检测主要有 2 种方法: 鸡胚背根神经节组织培养检测法和 PC-12 细胞培养检测法。前者是最为常用的 NGF 活性测定方法^[6] ,但操作复杂 ,干扰因素多 ,重复性差。而 PC12 细胞培养检测法虽然实验条件要求较高并且需要有可靠的细胞株 ,但细胞培养检测法灵敏度高 ,重复性好 ,活性判断标准客观 ,即可用于定性分析^[6]。相关文献指出 ,NGF 诱导 PC-12 细胞生长突触可通过 Na⁺/K⁺/2Cl⁻cotransporter isoform 1 (NKCC1) ^[7] ,本实验分离出蛇毒 NGF 经 PC-12 细胞验证具有典型 NGF 活性 ,其中是否也通过 NKCC1 有待做进一步研究。并且伴随相应检测技术发展^[8] ,其作用机制将会得以更明确的

阐述。

本实验采用 MTT 法测定细胞活性和增殖情况 ,本方法灵敏度高 ,操作简单 ,快捷。近年来 ,Trim^[4]等将 100ng/mLNGF 与 HSCs 共同培养 24 小时后 ,发现凋亡 HSCs 数量显著增加 ,呈剂量依赖关系 ,而对 HSCs 增殖不产生影响 ,指出 NGF 对体外培养活化的 HSCs 凋亡有诱导作用。实验测定眼镜蛇 NGF 作用 HSC-T6 48 h 之后可明显抑制细胞增殖 ,药物最适浓度为 2 ug/ml ,与国内外研究报道的人 NGF100 ng/mL 浓度为最适浓度不一致。推测蛇毒来源的 NGF 对活化 HSC-T6 作用敏感性存在差异。同时在正常生理条件下 ,体内与内源性 NGF 结合的 NGF 受体不足 10%^[9]。因此推测 ,当肝纤维化发生时 ,给予高浓度的 NGF 可能获得较好的疗效。

HSCs 的增殖和凋亡在肝纤维化的形成和逆转起着关键作用^[10,11] ,此外 ,肝纤维化主要由基因过度表达或表达不足 ,凋亡是清除活化 HSCs 的主要途径 ,是肝纤维化治疗的重要策略 ,也是近年来肝纤维化的研究热点之一。肝损伤时肝细胞表达 NGF^[12] ,活化的 HSC 膜可以表达 p75^[2] ,体外实验证明 ,NGF 能通过与细胞表面低亲和力受体 p75 结合介导胞内信号传递而诱导活化的 HSCs 凋亡 ^[13]。而促凋亡受体 P75 与抗凋亡因子 TrkA 在细胞凋亡过程中扮演重要角色 ,研究表明^[14] ,当 P75 与高亲和力受体 TrkA 以合适的比例共表达时 ,可观察到大量的高亲和力结合位点存在 ,而 P75 突变后这些位点大大减少 ,p75 能降低 TrkA 对 NGF 反应的阈值 ,p75 或通过影响与 NGF 结合的亲和力 ,或通过影响 TrkA 下游信号传递途径而发挥作用。NGF 诱导 HSCs 凋亡现象的发现为抗肝纤维化药物的研发提供了一个新的靶点。其作用机制复杂^[15] ,有待作进一步的研究。

检测细胞凋亡有多种方法 ,原位缺口末端标一记法

(TUNEL)、流式细胞术 (FcM)、和电镜(EM)技术各有其特点。TUNEL 和 FCM 主要用于定量检测,流式细胞术检测细胞凋亡,具有快速、灵敏度高、可以定量等优点。本试验采用 HE 染色了解细胞基本形态,并观察到凋亡细胞核有固缩,细胞数量减少现象,吖啶橙荧光染色是一种简便和可靠的观察细胞凋亡方法,吖啶橙能够透过细胞膜,把细胞核内的 DNA 染成绿色,细胞浆内的 RNA 染成桔红色,本实验证明眼镜蛇 NGF 作用后,吖啶橙染色显示 HSCs 细胞数量减少,且细胞体积缩小、形态不规整,细胞核固缩或碎裂,因此呈现致密浓染的黄绿色,有的可见碎块状。透射电镜也可以见细胞体积较正常细胞明显缩小,核染色质浓缩,沿核膜排列,细胞器也发生浓缩,并可以见到凋亡小体形成,进一步证明了凋亡细胞形态学变化。应用 TUNEL 法,在给予一定浓度眼镜蛇 NGF 刺激 HSC-T6 后, HSC-T6 染色质固缩,细胞体积缩小,包膜完整。且在一定范围内呈剂量依赖性。流式细胞术被认为是检测细胞周期最敏感的方法,我们采用 2 μ g/ml 眼镜蛇 NGF 作用 HSCs 细胞,检测与对照组比较有明显凋亡发生,而采用 5 μ g/ml NGF 刺激,发现 HSC-T6 细胞有凋亡产生,但伴有活细胞总数下降,证明眼镜蛇 NGF 诱导凋亡在 2 μ g/ml 比较适宜。

以上实验提示眼镜蛇 NGF 可通过抑制 HSC 增殖、诱导 HSC 凋亡而产生抗肝纤维化作用。同时,我国蛇毒资源丰富,随着眼镜蛇养殖业的快速发展这一资源更加丰富,开发利用好这项资源具有重大意义。

参考文献(References)

- [1] Elsharkawy A, Oakley F, Mann D. The role and regulation of hepatic stellate cell apoptosis in reversal of liver fibrosis[J]. *Apoptosis*, 2005, 10(5): 927-939
- [2] Saile B, Matthes N, Knittel T, et al. Transforming growth factor beta and tumor necrosis factor alpha inhibit both Apoptosis and proliferation of activated rat hepatic stellate cells[J]. *Hepatology*, 1999, 30(1): 196-202
- [3] Paoletti F, Malerba F, Kelly G, et al. Conformational plasticity of proNGF[J]. *Plos one*, 2011, 6(7): 1-9
- [4] Trim N, Morgan S, Evans M, et al. Hepatic stellate cells express the low affinity nerve growth factor receptor p75 and undergo apoptosis in response to nerve growth factor stimulation[J]. *Am J Pathol*, 2000, 156(4): 1235-1243
- [5] 韦传宝. 蛇毒神经生长因子的应用研究进展 [J]. *实用医学杂志*, 2007, 23(13): 2106-2108
Wei ChB. The researching progression of venom nerve growth factor [J]. *J Pract Med*, 2007, 23(13): 2106-2108
- [6] Zhu Z, Friess H, Shi X, et al. Up-regulation of p75 neurotrophin receptor (p75NTR) is associated with apoptosis in chronic pancreatitis [J]. *Science*, 2003, 48(4): 717-725
- [7] Ken-ichi Nakajima, Naomi Niisato, Yoshinori Marunaka. Quercetin stimulates NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells via activation of Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2011, 28(1): 147-156
- [8] Yang X, Liu X, Zhang X, et al. Investigation of morphological and functional changes during neuronal differentiation of PC12 cells by combined hopping probe ion conductance microscopy and patch-clamp technique[J]. *Ulyramicroscopy*, 2011, 111(8): 1417-1422
- [9] Raivich G, Hellweg R, Kreutzberg G. NGF receptor-mediated reduction in axonal NGF uptake and retrograde transport following sciatic nerve injury and during regeneration[J]. *Neuron*, 1991, 7(1): 151-164
- [10] Lee M, Lee MK, Kim YC, et al. Antifibrotic constituents of *Alnus firma* on hepatic stellate cells [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 21(10): 2906-2910
- [11] Jin-Jin Zhang, You-Lei Wang, Xue-Bin Feng, et al. Rosmarinic acid inhibits proliferation and induces apoptosis of hepatic stellate cells[J]. *Bio Pharm Bull*, 2011, 34(3): 342-348
- [12] Oakhy F, Trim N, Constandinou CM, et al. Hepatocytes express nerve growth factor during liver injury: evidence for paracrine regulation of hepatic stellate cell apoptosis[J]. *Am J Pathol*, 2003, 163(5): 1849-1858
- [13] Rabizadeh S, Oh J, Zhong LT, et al. Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor[J]. *Science*, 1993, 261(5119): 345-348
- [14] Iakovos Lazaridis, Ioannis Charalampopoulos. Neurosteroid dehydroepiandrosterone interacts with nerve growth factor(NGF) receptors, preventing neuronal apoptosis[J]. *Plos Biology*, 2011, 9(4): 1-14
- [15] 张明明, 杨帅, 高福祿, 等. 硝普钠诱导肝星状细胞 HSC-T6 凋亡及其机制[J]. *世界华人消化杂志*, 2010, 18(8): 761-766
Zhang MM, Yang Sh, Gao FL, et al. Apoptosis of hepatic stellate cells (HSC-T6) induced by sodium nitroprusside and mechanisms involved [J]. *World J Gastroenter*, 2010, 18(8): 761-766