

血根碱对钉螺肝脏细胞凋亡的影响*

谢琳¹, 杨双¹, 郭婧玮², 彭飞², 刘年猛², 袁仕善² *

1 湖南师范大学第一附属医院, 湖南省人民医院检验科(长沙 410002); 2 湖南师范大学医学院(长沙 410013)

[摘要] **目的** 分析血根碱(SAN)对钉螺肝脏细胞凋亡的影响, 并探讨其杀螺作用机理。**方法** 配制 6 mg/L SAN, 25 °C浸泡钉螺 48 h, 设清水对照组, 解剖各组活钉螺, 分离肝脏; 将钉螺肝脏匀浆, 测定肝脏过氧化物酶(POD)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)活性和谷胱甘肽(GSH)含量; 分离钉螺细胞, 流式细胞术检测钉螺肝脏细胞凋亡; 采用独立样本 *t* 检验对测定结果进行统计学分析。**结果** SAN 组钉螺肝脏的 POD、T-SOD 活性分别为(12.750±0.889) U/mgprot、(6.200±1.043) U/mgprot; 清水对照组分别为(4.903±0.086) U/mgprot、(0.776±0.553) U/mgprot, 两组间 POD、T-SOD 活性的差异均具有统计学意义(*P* 均<0.05)。SAN 组钉螺肝脏 GSH 含量为(2.512±0.022) mg/gprot, 清水对照组为(0.588±0.086) mg/gprot, 差异有统计学意义(*P*<0.05); SAN 组和清水对照组钉螺肝脏细胞的早期凋亡率分别为 4.633%±0.058%和 3.500%±0.173%, 晚期凋亡率分别为 3.400%±0.100%和 1.400%±0.200%, 差异均有统计学意义(*P* 均<0.05)。**结论** SAN 使钉螺肝脏 POD、T-SOD 活性和 GSH 含量升高, 诱导钉螺肝脏细胞凋亡。

[关键词] 血根碱; 钉螺; 肝脏; 细胞凋亡

Influence of sanguinarine on cell apoptosis of *Oncomelania hupensis* liver

XieLin¹, YangShuang¹, Guojing-wei², Peng Fei², Liu Nian-meng², Yuan Shi-shan² *

1.clinical laboratory, The First Affiliated Hospital in Hunan Normal University, Changsha 410002, China;2, Medical College in Hunan Normal University, Changsha 410013, China,*Corresponding author

[Abstract] **Objective** To analyze the effects of Sanguinarine(SAN) on cell apoptosis of *Oncomelania hupensis*(*O.hupensis*) liver and explore its molluscicidal mechanism. **Methods** *O. hupensis* were immersed in 6 mg/L SAN or clean water at 25 °C for 48 h, the livers were isolated from live snails. Activities of peroxidase(POD), Total superoxide dismutase(T-SOD) and glutathione(GSH) content were determined with biochemical methods Cell apoptosis of *O. hupensis* liver were determined by flow cytometry respectively. The experimental data in two groups were analyzed by independent *t* test. **Results** The activities of POD and T-SOD in the SAN group were (12.750±0.889) U/mgprot and (6.200±1.043) U/mgprot respectively, the activities of these enzymes in the control group were (4.903±0.086) U/mgprot and (0.776±0.553) U/mgprot respectively, the activities of POD and T-SOD between the SAN group and the control group was significant (All *P* values<0.05). The GSH content of snail livers in the SAN group and the control group were (2.512±0.022) mg/gprot and (0.588±0.086) mg/gprot respectively, the difference between the two groups was significant(*P*<0.05). The percentage of early apoptotic cells in the SAN group and the control group were 4.633%±0.058% and 3.500%±0.173% respectively, and the percentage of late apoptotic cells were 3.400%±0.100% and 1.400%±0.200% respectively, the difference between the two groups was significant(*P*<0.05).

*[基金项目] 湖南省自然科学基金资助项目(11JJ3121)

作者简介: 谢琳(1990-), 女, 湖南人, 硕士在读, 研究方向为临床检验诊断; E-mail:1257192262@qq.com

* 通信作者 E-mail: yuanshishan@aliyun.com, 电话:0731-88912458

0%±0.100% and 1.400%±0.200% respectively, the differences between the two groups were significant (All P values<0.05). **Conclusion** SAN can result in cell apoptosis and the elevation of POD and T-SOD activity and the GSH content in *O. hupensis* liver cell.

[Key words] Sanguinarine; *Oncomelania hupensis*; Liver; Cell apoptosis

日本血吸虫病是一种严重危害人类健康的寄生虫病, 流行于我国长江流域及其以南 12 个省(市、自治区)^[1]。钉螺是日本血吸虫唯一的中间宿主, 在血吸虫病的传播中起着重要作用, 杀灭钉螺是血吸虫病控制的有效手段。常用灭螺药物主要是化学灭螺药和植物灭螺药。植物灭螺药因具有低毒、易降解等优点而倍受重视, 其中研究比较多的有皂苷类、生物碱类、(异)黄酮类植物灭螺剂^[2,3]。血水草血根碱(SAN)是一种季铵型生物碱, 在医学、生物农药、动物药品及食品等领域均得到了广泛应用^[4,5], 研究发现血水草生物碱具有好的杀灭钉螺、螺卵的作用。本研究分析血根碱对钉螺肝脏细胞凋亡的影响, 为揭示血根碱杀螺作用机制提供新的实验依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 过氧化物酶(POD)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)、谷胱甘肽(GSH)的检测试剂盒及考马斯亮蓝蛋白定量试剂盒均购自南京建成生物工程研究所; FITC Annexin V 细胞凋亡检测试剂盒购自美国 BD 公司。722 S 型可见分光光度计为上海精密科学仪器有限公司产品; Cytomics FC500 MPL 型流式细胞仪购自美国贝克曼公司; 血根碱购自成都思科华生物技术有限公司, 纯度≥98%。

1.2 血根碱浸泡钉螺 称取血根碱, 配制 6.0 mg/L 的血根碱溶液 500 mL, 分别倒入 1 000 mL 烧杯中, 每烧杯投入 50 只钉螺, 25 °C 浸泡钉螺 48 h, 另设清水对照组。水养法和敲击法鉴别钉螺死活, 选活螺, 按李赋京法^[6]解剖钉螺, 切取肝脏, 根据不同实验要求进行不同的处理。

1.3 钉螺肝脏细胞的分离 取 SAN 组和清水对照组活钉螺肝脏, 生理盐水洗净, 补加生理盐水研磨, 并用 200 目钢丝筛网双层过滤, 去除组织残渣。低速离心, 收集细胞, 生理盐水洗涤, 低速离心, 收集细胞沉淀, 即为肝细胞。

1.4 钉螺肝脏酶活性测定 准确称取钉螺肝脏, 按重量(g):体积(mL)=1:9 的比例加入 9 倍体积的生理盐水, 冰浴匀浆, 6 000 r/min 离心 10 min, 取上清液即为 10% 的匀浆液, 用于酶活性和蛋白质含量的测定。考马斯亮蓝法测定蛋白质含量, 按

[在此处键入]

试剂盒说明分别进行 POD 和 T-SOD 的测定。

1.5 GSH 含量的测定 同步骤 1.5 制备 10%肝脏匀浆液。按试剂盒操作说明测定钉螺肝脏组织匀浆液的 GSH 含量。

1.6 钉螺肝脏细胞凋亡检测 按照 FITC Annexin V 细胞凋亡检测试剂盒操作说明进行。取 SAN 组和清水对照组钉螺肝细胞，用流式细胞仪专用 PBS 洗涤细胞，离心，将细胞沉淀重悬于 600 μL 1 \times binding buffer，细胞浓度约 10^6 个/ mL ，取 100 μL 细胞悬液，加 5 μL FITC Annexin V，再加 5 μL PI，轻轻涡旋混匀，避光孵育 15 min，加 400 μL 1 \times binding buffer，轻轻涡旋混匀，上 Cytomics FC500 MPL 型流式细胞仪检测。各组均设置未加染料的空白对照。

1.7 数据分析 采用 SPSS 17.0 软件对结果进行统计分析。采用独立样本 t 检验比较两组间酶活性/GSH 含量及细胞凋亡的差异。

2 结果

2.1 钉螺肝脏酶活性的测定 钉螺肝脏 POD、T-SOD 酶活性结果见表 1。由表 1 可知，SAN 组与清水对照组相比，POD、T-SOD 酶活性升高，差异有统计学意义(P 均 <0.05)。

表 1 钉螺肝脏酶活性测定($\bar{x} \pm s$)

组别	POD(U/mgprot)	T-SOD(U/mgprot)
SAN 组	12.750 \pm 0.889 [#]	6.200 \pm 1.043 [#]
对照组	4.903 \pm 0.086	0.776 \pm 0.553

[#]与清水对照组比较，差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 谷胱甘肽的测定 钉螺肝脏 GSH 测定结果见表 2。由表 2 可知，SAN 组与清水对照组相比，GSH 含量升高，差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 2 钉螺肝脏 GSH 的测定($\bar{x} \pm s$)

	SAN 组	对照组
GSH(mg/gprot)	2.512 \pm 0.022 [#]	0.588 \pm 0.086

[#]与清水对照组比较，差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 钉螺肝脏细胞凋亡的检测 SAN 组和清水对照组肝脏细胞凋亡情况见图 1 至图 4，与图 4 对比，图 2 右上象限晚期凋亡细胞散点明显多于图 4，右下象限早期凋亡细胞

[在此处键入]

散点比图 4 多且大，由于凋亡百分率数据不是很大，需要仔细观察，但经统计学分析，差异具有统计学意义 ($P<0.05$)，根据检测图谱计算的肝脏细胞凋亡的结果见表 3。由表 3 可知，SAN 组和清水对照组肝脏细胞早期凋亡百分率分别为 $4.633\%\pm0.058\%$ 和 $3.500\%\pm0.173\%$ ，晚期凋亡百分率分别为 $3.400\%\pm0.100\%$ 和 $1.400\%\pm0.200\%$ 。与清水对照组相比，SAN 组钉螺肝脏细胞早期凋亡和晚期凋亡百分率均与清水对照组具有统计学意义 ($P<0.05$)。

图 1. SAN 组空白

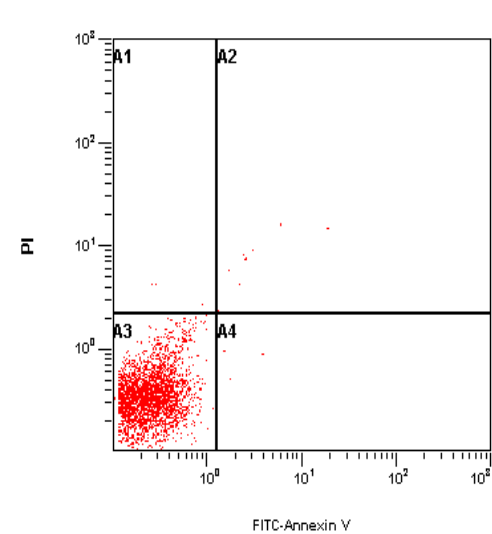


图 1. SAN 组空白
(未加染料，以消除本底荧光)

图 2. SAN 组

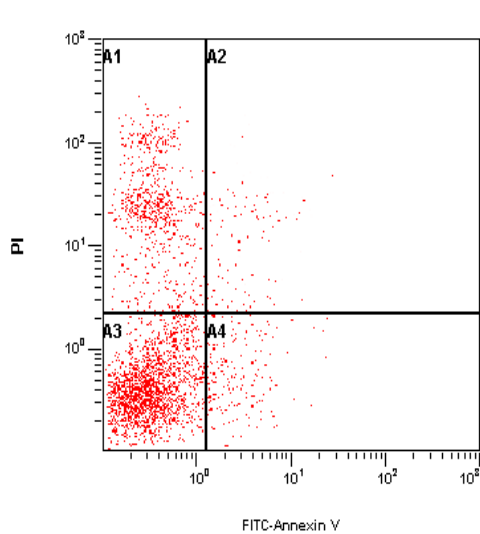
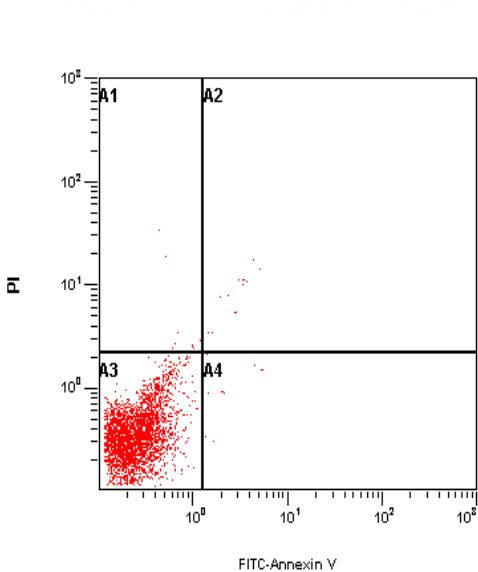


图 2. SAN 组
(Annexin V-PI 双染法，右下早期凋亡，右上晚期凋

亡)



[在此处键入]

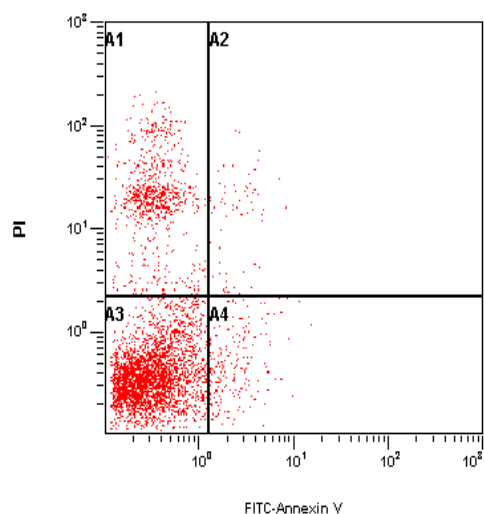


图 3.清水对照组空白

(未加染料, 以消除本底荧光)

图 4. 清水对照组

(Annexin V-PI 双染法, 右下早期凋亡, 右上晚期凋

亡)

表 3 钉螺肝脏细胞凋亡百分率($\bar{x} \pm s$)

组别	早期凋亡	晚期凋亡
SAN 组	4.633%±0.058% [#]	3.400%±0.100% [#]
对照组	3.500%±0.173%	1.400%±0.200%

[#]与清水对照组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

SAN 是一种低毒、低残留、无环境污染的植物灭螺药。国内外研究表明, SAN 可促进鱼类生长, 诱导细胞凋亡, 并具有抗菌、抗寄生虫和抗肿瘤效应 [5,7,8]。肝脏是钉螺解毒和物质代谢的一个重要器官, 也是最容易受毒害的器官之一。文献报道, 植物杀螺剂能引起钉螺肝功能异常、酶活性改变、细胞器和膜系统受损, 干扰细胞代谢和信号转导, 影响 DNA 合成和基因表达, 阻断细胞周期, 从而导致肝中毒, 肝器质损害, 功能衰竭, 最终导致钉螺中毒死亡 [9,10]。

POD 和 SOD 都是生物氧化酶类, 在体内催化氧化反应。POD 普遍存在于真核生物的各类细胞中, 在肝、肾细胞中数量特别多, 具有消除过氧化氢和酚类、胺类毒性的双重作用, 对细胞起保护作用。SOD 广布于各组织, 以肝含量最高, 可催化超氧阴离子自由基发生歧化反应, 对平衡机体氧化与抗氧化系统、免除自

[在此处键入]

由基损伤起着至关重要的作用。GSH 具有抗氧化和解毒作用，尤其是肝细胞内的 GSH 能参与生物转化作用，把机体内有害的毒物转化为无害的物质，排出体外，维持机体的正常功能。有研究表明，SAN 是一种有效的抗癌剂，通过诱导自由基的产生介导线粒体功能障碍和细胞凋亡，抑制癌细胞的生长^[9,13]。本研究中经 SAN 浸泡后，钉螺肝脏细胞 POD、T-SOD 活性及 GSH 含量均升高，可能是由于 SAN 对肝脏的毒害作用，激活肝脏细胞的氧化应激系统，产生过氧化氢和超氧离子，SOD 可催化超氧离子生成过氧化氢和氧气，POD 可利用和消除细胞内的过氧化氢和过氧化物，防止其含量过高而起保护作用。GSH 是一种由三个氨基酸组成的小分子肽，是体内重要的抗氧化剂和自由基清除剂，在肝脏的代谢和生物转化中起重要作用。因此，随 SAN 作用时间延长，钉螺肝脏酶活性系统可能失平衡，最终诱导肝脏细胞凋亡。

细胞凋亡是由自身基因主动调控的一种细胞死亡过程。许多理化和生物因素都能诱导凋亡，SAN 在许多转化和恶变细胞中能阻止细胞增殖，诱导凋亡^[11]。有关细胞凋亡的研究在生物医学研究中起到越来越重要的作用，但钉螺细胞凋亡研究起步较晚且内容较少，彭玲等^[12]尝试运用琼脂糖凝胶电泳观察钉螺细胞凋亡，但是效果不理想。本研究采用 Annexin V-PI 双染法检测钉螺肝脏细胞凋亡情况。在正常细胞中，磷脂酰丝氨酸（PS）只分布在细胞膜脂质双层的内侧，而在凋亡早期，细胞膜中的 PS 由脂膜内侧翻向外侧。Annexin V 是一种 Ca^{2+} 依赖性磷脂结合蛋白，与 PS 有高度亲和力，故可通过细胞外侧暴露的 PS 与凋亡早期细胞的胞膜结合。将 Annexin V 进行绿色荧光（FITC）标记，以标记了的 Annexin V 作为探针，利用流式细胞仪可检测细胞凋亡的发生。碘化丙啶（Propidium Iodide, PI）是一种核酸染料，它不能透过正常细胞或早期凋亡细胞的完整的细胞膜，但对凋亡中晚期的细胞和坏死细胞，PI 能够透过细胞膜而使细胞核染红。因此将 Annexin V 与 PI 匹配使用，就可以将处于不同凋亡时期的细胞区分开来。在双变量流式细胞仪的散点图上，左上象限为机械损伤坏死或粘附聚集的细胞及细胞碎片，左下象限显示活细胞，右下象限为早期凋亡细胞，右上象限是凋亡晚期细胞和坏死细胞。本研究中 SAN 组钉螺肝脏细胞早、晚期凋亡百分率均高于清水对照组，且差异具有统计学意义，表明 SAN 能诱导钉螺肝脏细胞的凋亡。

本文研究结果提示，SAN 可能影响与氧化应激损伤有关的酶的活性及还原型

谷胱甘肽的水平，诱导钉螺肝脏的氧化应激损伤，导致钉螺肝细胞凋亡。本次研究中仅检测了单一剂量、单一时间点的血根碱的杀螺作用机制，未能全面探讨药物剂量与时间效应的关系，下一步研究将分析 SAN 在不同时间与不同剂量时的杀螺作用，探讨 SAN 杀螺作用的时间剂量关系，并系统阐明 SAN 的杀螺作用机制，为血根碱作为植物杀螺剂的应用提供新的实验依据。

参考文献

- [1]李石柱,郑浩,高婧,等.2012 年全国血吸虫病疫情通报[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2013,25(6):557-563.
 - [2]顾文彪,张仪,夏尚光,等.苦楝叶对钉螺酶组织化学的影响[J].中国病原生物学杂志,2014,9(1):16-18.
 - [3]黄炳生, 李明亚.植物源灭钉螺药的研究进展[J].中草药,2012,35(6):1010-1013.
 - [4] Rosenkranz V, Wink M. Alkaloids induce programmed cell death in bloodstream forms of trypanosomes (*Trypanosoma b. brucei*) [J]. *Molecules*,2008,13(10):2462-2473.
 - [5]孙文霞,袁仕善,黄琼瑶,等.血水草生物碱及其血根碱抑菌作用的研究[J].实用预防医学,2010,17(9):1864-1865.
 - [6]李赋京.钉螺的解剖与比较解剖[M].武汉: 湖北人民出版社,1956:1-17.
 - [7]Moroni N,Pica F,Balestrieri E, et al. Antitumor effects of the benzophenanthridine alkaloid sanguinarine in a rat syngeneic model of colorectal cancer[J]. *Anticancer drugs*, 2012,23(1):32-42.
 - [8]Kapoor S.Sanguinarine and its Potent Antineoplastic Effects in Systemic Malignancies [J]. *Nucleic Acid Therapeutics*,2013,23(2):166.
 - [9] Han MH, Kim GY, Yoo YH, et al. Sanguinarine induces apoptosis in human colorectal cancer HCT-116 cells through ROS-mediated Egr-1 activation and mitochondrial dysfunction [J].*Toxicol Lett*, 2013,220(2):157-166.
 - [10] 柯文山,杨金莲,熊治廷.天南星(*Arisaema erubescens*Schott)对钉螺(*Oncomelania hupensis*)的毒杀作用[J].*生态毒理学报*,2006,1(3): 283-288.
 - [11] Xu JY,Meng QH,Chong Y,et al.Sanguinarine inhibits growth of human cervical cancer cells through the induction of apoptosis[J].*Oncol Rep*, 2012,28(6):2264-2270.
 - [12]彭玲,袁仕善,杨盛清,等.血水草生物碱致钉螺肝脏损伤机制研究[J].中草药, 2011,42(1):60-62.
- [在此处键入]

[13] Han MH, Park C, Jin CY, et al. Apoptosis Induction of Human Bladder Cancer Cells by Sanguinarine through Reactive Oxygen Species-Mediated Up-Regulation of Early Growth Response Gene-1[J]. PLoS One, 2013,8(5):e63425.