昆明山海棠诱导 Jurkat 等 3 个细胞株 发生细胞凋亡

曹 佳 Michael Nüsse^④

(第三军医大学预防医学系分子毒理室, 重庆 400038; ④National Research Center for Environment and Health,
Flow Cytometry Lab, Munich D-85758, Germany)

摘要 为研究昆明山海棠(THH)的药理和毒理作用,通过流式细胞仪检测发现THH对Jurkat, CHE和NIH3T3细胞均有较强的致凋亡作用,但Jurkat淋巴瘤细胞更为敏感,每皿50 μL THH作用48 h后,可使93%的肿瘤细胞凋亡. 使用Annexin-V-Fluos检测Jurkat细胞,结果发现THH作用0.5 h后即可出现早期细胞凋亡(细胞膜损伤),4~6 h后150~200 μL THH组膜损伤率可高达85%,证明THH首先是损伤细胞膜,再发展为细胞凋亡的. 上述发现有助于阐明THH治疗自身免疫性疾病和潜在抗肿瘤的作用机理.

关键词 细胞凋亡 昆明山海棠

昆明山海棠(*Tripterygium hypoglaucun* (Levl) Hutch, THH)属卫矛科雷公藤属,在祖国医学中被广泛用于治疗许多自身免疫性疾病,如类风湿关节炎、系统性红斑狼疮等^[1],也有用于肿瘤治疗的少数报道^[2]. 近年来我室^[3]和汪旭等人^[4~6]的系列研究表明,THH在一系列致突变试验和非整倍体检测中均表现出一定的基因毒性和较强的非整倍体毒性. 由于近年来自身免疫性疾病被认为属于细胞凋亡不足症^[7]. 因此,我们设想THH对自身免疫性疾病有效的原因,除对细胞具有一定的遗传毒性外,是否还具有诱导细胞凋亡作用? 对此,我们对THH诱导人淋巴瘤Jurkat细胞、中国仓鼠胚胎细胞(CHE)和小鼠NIH3T3成纤维细胞株发生细胞凋亡进行了研究.

1 材料与方法

() 昆明山海棠水提液制备. THH购自昆明市中药材公司. 制备时称取20 g THH粉碎物,以400 mL去离子水浸泡过夜,文火煮沸3次,过滤去渣,浓缩至30 mL,离心去除沉淀,上清液用孔径为0.8和0.45 μm的滤膜分别过滤,浓缩的水提取液以0.67 g/mL生药计,4℃保存.

() 细胞培养. Jurkat淋巴瘤细胞株使用RPMI 1640培养基, CHE细胞使用MEM培养基, NIH3T3细胞使用DMEM培养基. 细胞初始浓度 1×10^5 个/mL, 5 mL/皿, 5% CO₂ 条件下37℃培养24 h, 然后加入THH处理,并在各采样时相点终止培养,收获细胞.

() 细胞核形态学观察. 使用DNA荧光染料Hoechst 33258,以2 μg/mL终浓度37℃染色未固定的细胞15 min, PBS洗细胞1次和离心沉淀细胞后,用细胞悬液滴片,紫外光激发,荧光显微镜下观察细胞核形态(图1).

() 细胞凋亡亚G₁峰的流式仪检测. 按照Nüsse等人^[8]的方法制备细胞核悬液. 离心收获细胞,70%乙醇4℃固定细胞,然后加入溶液iv 1 mL (584 mg/L NaCl, 1 g/L 枸橼酸钠, 10 mg/L RNA酶, 0.3 mL/L NP40, 25 mg/L 溴化乙啶)重新悬浮细胞,室温避光保育1 h,再加入溶液⑤ 1 mL (15 g/L 枸橼酸钠, 0.25 mol/L 蔗糖, 40 mg/L 溴化乙啶). 使用FACS⁺流式细胞仪检

测, 以亚 G_1 峰细胞数目(S_{sub}) 与所有细胞核数目($S_{\text{sub}} + N_n$) 之比作为细胞凋亡率(图2).

图1 NIH3T3 细胞 THH 100 μL / 皿作用 48 h 后细胞核凋亡的形态学改变

图2 流式细胞仪测定的细胞凋亡亚 G_1 峰

(a) CHE 细胞, THH 200 μL / 皿作用 48 h, 细胞凋亡 15%; (b) NIH3T3 细胞, THH 150 μL / 皿作用 48 h, 细胞凋亡 35%;
(c) Jurkat 细胞, THH 100 μL / 皿作用 48 h, 细胞凋亡 76%

() 早期凋亡细胞细胞膜损伤的流式细胞仪检测. 使用 Annexin-V-Fluos 试剂盒(德国宝灵曼公司), 检测 Jurkat 细胞膜损害的凋亡早期表现. 离心收获 1×10^6 细胞后, 用 PBS 洗 1 次, 离心后仅保留细胞沉淀, 细胞不固定, 直接加入含 20 μL Annexin-V-Fluos 和 20 μL 能区分活细胞和死亡细胞的碘化丙啶(PI), 室温下染色 10~15 min, 然后上流式细胞仪检测, 即可同时检测到活细胞、早期凋亡细胞(细胞膜损伤)和死亡细胞(图3).

2 结果

2.1 THH 诱导细胞核出现明显的凋亡特征

对 THH 诱导 3 个细胞株细胞核形态改变做了显微镜下观察, 均发现较多细胞出现明显的凋亡特征性改变. 图1显示了 NIH3T3 细胞 THH 100 μL / 皿作用 48 h 后, 细胞核染色质由均一状态(图1(a))变为不规则凝集(图1(b)), 最后形成荧光较强的小球状颗粒即凋亡小体(图1(c))的过程.

2.2 通过流式细胞仪亚 G₁ 峰检测细胞凋亡率

流式细胞仪检测的 THH 诱导 3 个细胞株的凋亡量效和时效曲线见图 4. 从图中可以看出, THH 对 3 个细胞株致凋亡作用均呈良好的量效和时效反应关系, 其凋亡率均随 THH 剂量增大而升高. 但 3 个细胞株对 THH 表现出不同的敏感性, NIH3T3 高于 CHE, 而 Jurkat 细胞凋亡率最高. 加入 25 $\mu\text{L}/\text{皿}$ THH 作用仅 12 h, Jurkat 细胞凋亡率即显著升高 ($P < 0.01$), 在 200 μL 可诱导近一半的细胞凋亡 (46%), 作用 24 和 48 h 后仅 50 μL 就达到细胞凋亡高峰 (48 h 时可诱导 93% 细胞凋亡). 以后随着剂量增大, 细胞凋亡一直保持在一个高平台水平 (60% ~ 80%). 而 THH 诱导 NIH3T3 细胞和 CHE 细胞出现最高凋亡的剂量在各时相点均是 200 μL , 而且即使在凋亡率最高的 48 h 时相点 NIH3T3 和 CHE 细胞的凋亡率也仅为 75% 和 12%. 在时效反应关系中, 细胞凋亡率均是随着作用时间的延长而逐渐升高, 48 h 达到凋亡高峰.

图3 Annexin-V 荧光染色后流式细胞仪检测的早期凋亡细胞(膜损伤)二维点阵图

Jurkat 细胞, THH 50 $\mu\text{L}/\text{皿}$, 8 h. 窗口 1 为活细胞, 窗口 2 为早期凋亡细胞(细胞膜损伤), 窗口 3 为死亡细胞

图4 流式细胞仪检测的 THH 在不同时相点(12, 24, 48 h)诱导的 3 个细胞株凋亡的剂量反应曲线

2.3 通过流式细胞仪细胞膜损伤检测的早期细胞凋亡率

共进行了 2 次 THH 诱导 Jurkat 细胞膜损伤的试验, 所得结果基本相同. 第 1 次实验结果见图 5(a) 和 (b) (第 2 次实验结果略). Jurkat 细胞在 THH 作用后仅 0.5 h, 100 μL 剂量组早期

图5 THH 诱导 Jurkat 细胞早期凋亡和死亡细胞的量效和时效反应曲线

(a) 早期凋亡细胞; (b) 死亡细胞, Annexin V 荧光染色, 流式细胞仪检测

凋亡细胞即从空白对照的5%升至10%,而此时200 μ L THH 致凋亡率可达27%。在作用4~6 h后,这种早期凋亡细胞迅速达到高峰,25 μ L 剂量也达到26.4%,而200 μ L 组可达到85%(图5(a))。以后随着THH作用时间的延长,由于膜损伤而导致死亡细胞的比例开始增加,从图5(b)可以看出,在THH作用6 h前死亡细胞率均小于10%,但6 h后开始显著增加,8 h时100 μ L 以上剂量组可高达30%~50%。

3 讨论

最近有报道认为,自身免疫疾病属于细胞凋亡不足症^[7]。这是从一个新的角度来看待此类疾病的发病机理。那么在临床上对自身免疫疾病有效的昆明山海棠,是否是通过诱导细胞凋亡而起作用?本研究通过凋亡细胞形态学观察、亚G₁峰测定、早期凋亡细胞膜损伤测定等实验,首次证明了THH水提取液对体外培养细胞具有很强的诱导细胞凋亡作用,并认为这可能是THH治疗自身免疫性疾病有效的原因。同时,在本研究中,发现Jurkat肿瘤细胞比其他2株胚胎细胞和成纤维细胞株更为敏感,50 μ L/皿THH诱导凋亡,Jurkat细胞在48 h时可致93%细胞凋亡,而此时同等剂量条件下CHE和NIH3T3仅4.2%和9%的细胞凋亡,与Jurkat细胞相比相差约22倍和10倍,这提示THH有可能发展成为一种新的杀肿瘤药物,这为临床上将THH用于白血病治疗并显效^[2],提供了理论依据。

本次实验中使用的THH水提取液浓度并不高。但却表现出了很强的促细胞凋亡作用。如在Jurkat细胞中(细胞初始浓度5 mL/皿 $\times 10^5$ 个/mL)加入仅50 μ L THH水提取液,作用12 h后细胞凋亡率可达17.6%,24 h后可达68%,48 h时可高达93%,也即50 μ L THH作用48 h后几乎全部Jurkat肿瘤细胞发生了凋亡。如此强的诱导细胞凋亡作用,这在天然药物成分中是不多见的。有报道认为THH显效的主要成分是其生物碱和内酯成分^[2],我们将进一步分离该药有效成分或单体进行深入研究。

为了进一步检查THH诱导细胞凋亡的作用,我们在本实验中还使用了Annexin-V检测细胞早期凋亡的新方法。目前认为在凋亡的早期阶段,虽然细胞膜的完整性尚还维持,但膜磷脂已失去平衡。此时位于细胞膜上的磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)会从细胞膜的内层转移到外层。而Annexin-V是一种与磷脂具有高度亲合力的蛋白,它可与转移到膜外的磷脂酰丝氨酸结合,从而在这些早期凋亡细胞还未出现形态学改变和DNA降解以前,即通过Annexin-V-荧光染色而检测到。我们使用这一方法,发现THH作用于Jurkat细胞仅0.5 h即开始出现细胞膜损害,200 μ L高剂量组作用0.5 h后细胞膜受损率可达27%。在THH作用4~6 h后,细胞膜损伤率达到高峰,此时200 μ L高剂量组可高达85%。以后随着作用时间延长,死亡细胞的比例不断增加。在6 h后凋亡早期细胞与死亡细胞相加,均大于80%以上。上述结果说明Jurkat细胞对THH非常敏感,并且首先是通过细胞膜的损害而走向凋亡的。

目前有关凋亡的研究已深入到分子水平,但有关中药诱导凋亡的研究还不多^[11, 12]。我们将在本研究基础上,进一步研究THH是如何通过信号传导启动凋亡,以及与凋亡相关的一些基因(如p53, bcl-2, c-myc)是如何进行调控和表达的。

致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号:39400114)和德国BMBF奖学金资助项目。

参 考 文 献

- 1 舒尚义. 昆明山海棠治疗类风湿关节炎 600 例临床疗效观察. 中草药通讯, 1978, 12: 27~ 29
- 2 舒尚义. 昆明山海棠毒性及毒性成分的研究. 云南中医杂志, 1983, 4(6): 43~ 44
- 3 曹佳, 胡斌, 程天民, 等. 昆明山海棠在微核实验中非整倍体毒性的研究. 遗传, 1997, 19(1): 1~ 3
- 4 汪旭, 周汝敏, 严勇, 等. 昆明山海棠遗传毒性评价: iv致突变效应的研究. 遗传, 1993, 15(6): 13~ 16
- 5 汪旭, 合正基, 刘素清. 昆明山海棠诱发果蝇生殖细胞非整倍体的研究. 遗传, 1995, 17(5): 34~ 36
- 6 汪旭, 合正基, 刘素清. 5-溴脱氧尿嘧啶核苷标记法检测哺乳动物体细胞染色体异常分离的研究. 癌变·畸变·突变, 1994, 6(4): 1~ 5
- 7 曾庆平, 郭勇. 细胞凋亡异常及其药物疗法. 中国药理学杂志, 1997, 32(12): 733~ 735
- 8 Nusse M, Marx K. Flow cytometric analysis of micronuclei in cell cultures and human lymphocytes: advantages and disadvantages. Mutation Research, 1997, 392: 109~ 115
- 9 Vermes I, Haanen C. Reutetingsperger CPM, a novel assay for apoptosis: flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescence labelled annexin V. J Immunol Methods, 1995, 180: 39~ 52
- 10 Engeland M, Rmaekers F C E, Schutte B, et al. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. Cytometry, 1996, 24: 131~ 139
- 11 Chen G Q, ZHU J, Shi X G, et al. *In vitro* studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As_2O_3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia: As_2O_3 induces NB4 cell apoptosis with downregulation of *bcl-2* expression and modulation of PML-RAR α /PML proteins. Blood, 1996, 99(3): 1052~ 1061
- 12 方敏, 张鸿卿, 薛绍白. 白尖杉酯碱诱导 HL-60 细胞程序性死亡. 科学通报, 1994, 39(12): 1125~ 1129

(1998-06-25 收稿, 1998-12-08 收修改稿)

利用激光共聚焦扫描显微镜研究大鼠脑片的缺血缺氧损伤

王晓英 邢虹 何其华^④ 徐家鸽 吴本玠

(北京医科大学生物物理学系; ④北京医科大学医药分析中心, 北京 100083)

摘要 采用荧光探针乙酰乙酸盐-2, 7-二氯氢化荧光素(2, 7-dichlorofluorescein diacetate, D-399)和碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)双标记, 激光共聚焦扫描显微镜(Laser confocal scanning microscope, LCSM)断层光切扫描观察脑缺血缺氧损伤时脑片脂质过氧化水平和细胞坏死程度. L-NG-硝基-精氨酸(L-NG-nitro-arginine, L-NNA)、N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)预保护可显著减轻大鼠脑片缺氧和/或复氧损伤, 说明一氧化氮(NO)和其他自由基在脑缺氧复氧损伤中起重要作用.

关键词 激光共聚焦扫描显微镜 脑缺血缺氧损伤 脂质过氧化物 乙酰乙酸盐-2, 7-二氯氢化荧光素

脑缺血缺氧损伤的病理机制, 主要有兴奋性氨基酸神经毒性, 细胞内钙超载, 氧自由基损伤 3 个主要病理机制或学说, 三者也并非独立存在和有序, 而是相互关联相互促进的. 脑缺血缺氧后, 尤其在再灌期, 继发性氧自由基的增加, 是造成脑损伤的一个主要方面^[1].

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb1999-44-11-1169>