DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.17.001
第25卷第17期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 17
2003年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2003 

文章编号:1000-5404(2003)17-1499-02

专家论坛

# 昆明山海棠碱诱导白血病细胞株凋亡的分子机制

# Molecular mechanisms of apoptosis in leukemia cells induced with Tripterygium Hypoglaucum (Levl) Hutch alkaloids

曹 佳 (第三军医大学预防医学系卫生毒理学教研室,重庆 400038)

目前在世界范围内,新药的寻找已逐渐转向天然动植物,在这一过程中,我国传统的中医中药已越来越受到人们的青睐。昆明山海棠[Tripterygium Hypoglaucum (Levl) Hutch,简称THH]是我国的传统中药,属卫矛科雷公藤属,但毒性远比雷公藤小。临床上主要用来治疗类风湿性关节炎、红斑狼疮、肿瘤,并具有镇痛、抗炎、抗雄性生育和致突变作用[1]。1999年我室首次报道THH水提取液具有诱导肿瘤细胞凋亡的效应后[2],又分离了其主要活性成分——昆明山海棠生物碱(THH碱),近期又对其诱导Jurkat淋巴瘤细胞株和HL-60急性骨髓白血病细胞株凋亡的分子机制进行了系统研究,现综合报告如下。

## 1 抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡

实验显示THH碱作用Jurkat淋巴瘤等细胞株后可有效抑制细胞增殖并将细胞阻滞于$G_1$期[3],此时,大于25 μg/ml剂量的THH碱即可显著诱导作为凋亡早期的标志之一的细胞膜磷脂酰丝氨酸(Phosphatidylserine)从正常状态下的膜内面翻转到细胞膜的外面[4],在22 h时相这一比例可高达70%以上。凋亡过程中关键生化事件是凋亡蛋白酶caspase的激活和细胞核DNA断裂,25 μg/ml THH碱诱导细胞4 h后,可显著激活起效应作用的凋亡蛋白酶caspase-3和caspase-7,从而激活$Ca^{2+}$/$Mg^{2+}$依赖性的内源性核酸内切酶,导致染色质DNA在核小体连接部位断裂,形成单倍或多倍于180~200 bp的寡核苷酸片段,在琼脂糖凝胶电泳中形成凋亡现象特有的特征——DNA梯状带(DNA ladder)[5~7]。另外,THH碱活化的caspase-3还裂解多聚ADP核糖多聚酶(PARP),从而抑制和阻断DNA的损伤修复机制[5]。

作为判断细胞凋亡的"金标准",我们观察到THH碱诱导Jurkat细胞株后细胞出现多种形态学凋亡特征变化,在电子显微镜下可见细胞浆浓缩、细胞核固缩、异染色质边集、凋亡小体形成等[4]现象。

## 2 通过线粒体途径诱导细胞凋亡

近年研究显示线粒体在细胞凋亡过程中起重要作用,线粒体的凋亡变化主要受控于Bcl-2家族成员,包括Bid、Bcl-2、Bax等,这些成员之间组成一个相互制约、相互协调的网络来调控细胞凋亡[8]。活化后的Bid和Bax可促进线粒体膜通透性性转运孔道(Permeability transition pore, PTP)开放,线粒体膜电位下降和崩溃,从而使多种凋亡相关蛋白从线粒体中溢出,如细胞色素C(Cyto-C),凋亡诱导因子(AIF)、凋亡蛋白酶诱导因子1(Apaf-1)等。而Bcl-2则具有能抑制线粒体释放细胞色素C、AIF到胞浆中,进而抑制细胞凋亡[8]。

我们的研究表明,THH碱能有效通过线粒体途径诱导细胞凋亡。THH碱首先诱导Jurkat细胞膜线粒体膜电位($\Delta\Psi m$)下降,膜电位下降会导致线粒体停止产生ATP,进而导致内膜损伤,同时还可引起PTP开放,导致线粒体肿胀[9]。在这一过程中THH碱还诱导线粒体膜蛋白APO2.7分子表达增强,呈明显的量效和时效反应关系[9]。已有的研究表明,APO2.7分子表达增强是细胞凋亡启动的早期标志之一,其出现提示通过线粒体途径的启动[10]。THH碱还能诱导Bcl-2 mRNA显著下调,蛋白表达下降,抑制细胞凋亡作用减弱,从而进一步促进了线粒体启动的凋亡作用[9]。

## 3 通过 Fas 受体介导途径诱导细胞凋亡

启动细胞凋亡的另一条途径是由Fas配体或TNFα家族介导的死亡受体介导途径。大量实验表明Fas配体可与细胞膜上的相应的受体结合,导致受体聚合,死亡适配分子(Death adapter molecule)在细胞膜内面聚集形成聚合物,前caspase-8和/或前caspase-10随后也集聚在此聚合物上,然后被激活[11]。激活的caspase-8可剪切激活caspase-3、caspase-7、Bid等凋亡效应相关分子。caspase-3和caspase-7是主要的效应凋亡蛋白酶,其中caspase-3是凋亡过程中的中心效应器,它剪切激活细胞内许多凋亡的相关分子,包括依赖caspase激活的DNase(DNA酶)。caspase-8也通过水解活化Bid蛋白作用于线粒体,从而启动了凋亡的另一条途径——线粒体途径[8]。因此,Bid蛋白活化将Fas受体介导途径和线粒体途径联系起来。

我们的研究表明,THH碱能诱导Jurkat细胞FasL表达增加、caspase-8和caspase-7剪切激活、Bid表达增加[6]。激活的caspase-8、7除可直接剪切激活caspase-3外,活化的Bid蛋白还可作用于线粒体,从而将两条凋亡主要途径联系在一起[6]。

## 4 不通过钙离子信号途径诱导细胞凋亡

细胞内$Ca^{2+}$作为细胞内重要的第二信使,其浓度的异常变化将引起细胞损伤,$Ca^{2+}$内流和聚集被认为是细胞凋亡的一条重要的途径[12],然而许多实验发现游离钙离子浓度的降低同样可引发细胞凋亡反应,如Kluck等[13]用C螯合剂EGTA、EDTA、BAPTA-AM等处理NS-1鼠骨髓瘤细胞系,发现细胞内钙离子浓

基金项目:德国联邦教育科学研究技术部(BMBF)基金资助项目;国家自然科学基金资助项目(C30100241)

作者简介:曹 佳(1962—),男,四川省江油市人,博士,教授,主要从事遗传毒理学和分子毒理学方面的研究,电话:(023)68752271;E-mail:caojia@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2003-05-13;修回日期:2003-07-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

度和整个细胞内钙含量都下降，但细胞仍可进行凋亡，因而其认为不只是细胞内钙离子浓度的升高或下降引发细胞凋亡反应。但我们的实验结果显示，在 THH 碱诱导 Jurkat 细胞凋亡的过程中，胞内游离钙离子浓度（$[Ca^{2+}]i$）未见明显变化[14]，不在上述钙离子浓度升高或下降两种情况之列。Stewart 等[15]人也发现神经酰胺（C2-ceramide）可通过诱导酪氨酸激酶活性增加——不通过钙离子动员，来诱导细胞凋亡，他们认为可能是通过 Raf 激酶信号传导途径诱导了细胞凋亡；因此，THH 碱可能与它们有相同或相似的机制，我们将进一步予以证实。

综上所述，在 THH 碱诱导 Jurkat 等白血病细胞凋亡的上游阶段，THH 碱通过以下两条途径启动凋亡：①“线粒体膜电位下降、APO2.7 分子表达增强、PTP 开放→释放 Cyto-C、AIF、Apaf-1 等多种凋亡相关蛋白”的线粒体途径；②“Fas 配体、受体结合→caspase-8 活化→caspase-7、Bid 活化”的 Fas 受体介导途径；Fas 受体介导途径可通过活化 Bid 激活线粒体途径，从而将两条途径联系起来。钙离子信号途径不是 THH 碱的主要诱导途径；Bcl-2 家族参与了 THH 碱诱导细胞凋亡的调控。在凋亡下游发生了 caspase 活化、核 DNA 断裂和片段化等凋亡反应。THH 碱诱导白血病细胞的凋亡途径见图 1 所示。我们有关 THH 碱诱导凋亡分子机制的系列研究为探讨 THH 碱对肿瘤的诱导凋亡作用并将其用于临床提供了重要的理论基础。

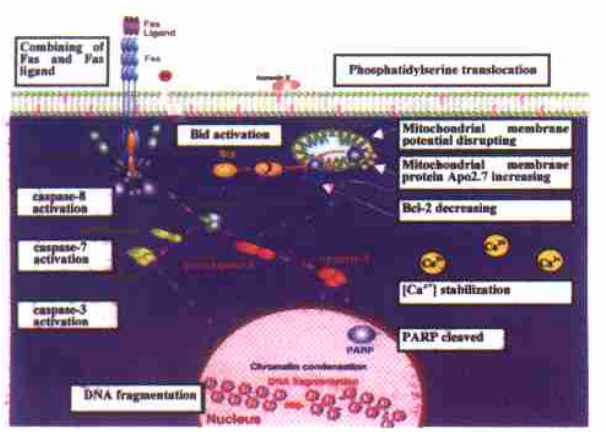



图 1 THH 碱诱导 Jurkat T 淋巴细胞的凋亡分子机制示意图

**Fig 1 Schematic drawing of the apoptotic pathway in Jurkat cells induced with Tripterygium Hypoglaucm (Levl) Hutch (THH) alkaloids**

关键词：昆明山海棠碱；细胞凋亡
中图法分类号：R730.52 文献标识码：A

## 参考文献：

[1] 邓文龙，聂仁吉，刘家玉. 昆明山海棠的药理作用研究. Ⅰ. 抗炎作用及对垂体—肾上腺皮质系统功能的影响[J]. 中草药，1981，12(8)：22—26.

[2] 曹 佳，Nusse M. 昆明山海棠诱导 Jurkat 等 3 种细胞株发生细胞凋亡[J]. 科学通报，1999，44(11)：1169—1173.

[3] 杨录军，敖 琳，Nuesse M，等. 昆明山海棠碱对 Jurkat 淋巴瘤细胞株的细胞周期和凋亡时相的影响[J]. 第三军医大学学报，2003，25(17)：1505—1507.

[4] 杨录军，敖 琳，Nuesse M，等. 昆明山海棠碱诱导 Jurkat 淋巴瘤细胞膜磷脂酰丝氨酸外翻及瘤细胞超微结构改变的研究[J]. 第三军医大学学报，2003，25(17)：1501—1504.

[5] 杨录军，敖 琳，Nuesse M，等. 昆明山海棠碱诱导 Jurkat 淋巴瘤细胞株的 PARP 酶剪切和 caspase-3 激活[J]. 第三军医大学学报，2003，25(17)：1508—1510.

[6] 赵钦军，杨录军，刘晋[illegible]等. 昆明山海棠碱通过 Fas 受体介导途径诱导 Jurkat 淋巴瘤细胞株凋亡[J]. 第三军医大学学报，2003，25(17)：1521—1523.

[7] 敖 琳，曹 佳，徐 颖，等. 昆明山海棠总生物碱诱发 HL-60 细胞凋亡的观察[J]. 第三军医大学学报，2001，22(11)：1273—1275.

[8] Finkel E. The mitochondrion：is it central to apoptosis？[J] Science，2001，292(5517)：624—626.

[9] 杨录军，Nuesse M，余厚勇，等. 昆明山海棠碱通过线粒体途径诱导 Jurkat 淋巴瘤细胞株细胞凋亡[J]. 第三军医大学学报，2003，25(17)：1511—1514.

[10] Zhang C，Ao Z，Seth A，*et al*. A mitochondrial membrane protein defined by a novel momoclonal antibody is preferentially detected in apoptotic cells[J]. J Immunol，1996，157(9)：3980—3987.

[11] Muzio M，Stockwell B R，Stennicke H R，*et al*. An induced proximity model for caspase-8 activation[J]. J Biol Chem，1998，273(5)：2926—2930.

[12] 郑 倩，骆云鹏. 钙稳态紊乱和细胞凋亡[J]. 川北医学院学报，2001，16(4)：142—144.

[13] Kluck R M，McDougall C A，Harmon B V，*et al*. Calcium chelators induce apoptosis- evidence that raised intracellular ionised calcium is not essential for apoptosis[J]. Biochim Biophys Acta (BBA) - Molecular Cell Research，1994，1223(2)：247—254.

[14] 杨录军，Grundler W，Nuesse M，等. THH 碱不通过钙离子信号通道诱导 Jurkat 淋巴瘤细胞株凋亡[J]. 第三军医大学学报，2003，25(17)：1518—1520.

[15] Stewart C E H，Mihai R，Holly J M P. Increased tyrosine kinase activity but not calcium mobilization is required for ceramide-induced apoptosis [J]. Exp Cell Res，1999，250(2)：329—338.

（编辑 汪勤俭）

# 作者书写数字须知

根据《关于出版物上数字用法的规定》，本刊实行三位分节法（即从小数点算起，向左向右每 3 位分一节，节间留出一定空隙），废除千分撇分节法（如 2,431 改为 2 431）。但年份、页数、部队著号、仪表型号、标准号不用三位分节法。中文出现的数字，凡属计数数值，一律用阿拉伯数字表示。

本刊编辑部

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net