DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.17.004
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)17-1505-03

论著

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

杨录军[1],敖 琳[1],Nuesse Michael[2],徐 颖[3],曹 佳[1] ([1]第三军医大学预防医学系卫生毒理学教研室,重庆 400038;[2]GSF-National Research Center for Environment and Health, Neuherberg, Germany, D-85764;[3]第三军医大学附属新桥医院临床药理基地,重庆 400037)

提 要:目的 探讨昆明山海棠(THH)碱对 Jurkat T 淋巴瘤细胞的细胞毒性、细胞周期和凋亡时相特异性的影响,以了解 THH 碱诱导细胞凋亡的机制。方法 台盼蓝染色法检测细胞生长和细胞活力;DNA 染色法、TUNEL 标记结合流式细胞术检测细胞周期和凋亡时相特异性。结果 THH 碱能有效抑制 Jurkat 细胞增殖、细胞活力下降,细胞在增殖周期中被阻滞于 G_1 期。THH 碱首先能诱导 S、G_2/M 期细胞凋亡,同时能诱导 G_1 期细胞凋亡。结论 提示 THH 碱能抑制 Jurkat 细胞的 DNA 合成,抑制细胞增增殖,并可显著诱导各期相细胞发生凋亡。

关键词:昆明山海棠;细胞凋亡;G_1 期阻滞;细胞增殖;TUNEL
中图法分类号:R282.71;R730.21;R730.263 文献标识码:A

Effects of Tripterygium Hypoglaucum (Levl) Hutch alkaloids on cell cycle and time-dependent apoptosis of Jurkat T lymphoma cells

YANG Lu-jun[1], AO Lin[1], Nuesse Michael[2], XU Ying[3], CAO Jia[1] ([1]Department of Hygiene Toxicology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China; [2]GSF-National Research Center for Environment and Health, Neuherberg, Germany, D-85764)

Abstract: **Objective** To study the effects of the cytotoxicity, cell cycle and time-dependent apoptosis of Jurkat T lymphoma cells induced by Tripterygium Hypoglaucum (Levl) Hutch (THH) alkaloids so ad to explore the mechanisms of the apoptosis induced by the THH alkaloids. **Methods** Cell vitality and cell proliferation were measured by Typan blue staining. Cell cycle and the time-dependent apoptosis were determined by DNA staining, TUNEL labeling and flow cytometry. **Results** THH alkaloids could effectively inhibit cell proliferation of Jurkat cells and induce the G_1 arrest and could induce apoptosis in G_2/S phase first and then G_1 phase. **Conclusion** THH alkaloids can inhibit DNA synthesis, cell proliferation and can also induce apoptosis of Jurkat T lymphoma cells in all phases.

Key words: Tripterygium Hypoglaucum (Levl) Hutch; apoptosis; G_1 arrest; cytotoxicity; TUNEL

昆明山海棠[Tripterygium Hypoglaucum (Levl) Hutch, THH]是中国传统中药,为卫矛科雷公藤属植物,分布在我国西南地区,临床上主要用于治疗类风湿性关节炎、红斑狼疮等自身免疫病。

近年发现 THH 水提取液能诱导多种细胞凋亡[1,2]。昆明山海棠的主要成份有生物碱、色素剂类和萜类,其中生物碱在临床上治疗自身免疫病等疾病的疗效最好且毒副作用最小[3]。我们已报道,THH 碱更高效地诱导 Jurkat 多种肿瘤细胞凋亡。凋亡诱导剂诱导凋亡的机制实际上就是抑制细胞增殖生长、促使细胞死亡的过程。凋亡诱导剂可在其中一个或多个时期进行阻滞,抑制其细胞周期的进行,同时或尔后诱导一系列其它的凋亡相关和生化机制,如激活 caspase 酶、DNA 断裂等。不同的凋亡诱导剂对细胞周期的影响和诱导周期时相凋亡特异性并不相同,本研究将探明 THH 碱对细胞周期的影响和诱导凋亡的周期时相特异性。

1 材料和方法

1.1 THH 碱的准备

昆明山海棠总生物碱(THH 碱)由第三军医大学附属新桥医院药理基地提取。实验前将 THH 碱干粉先溶于 DMSO,再用无菌去离子水调制各个实验用浓度,DMSO 在细胞培养液中的含量均小于 1/1 000。

1.2 细胞培养和 THH 碱处理

使用处于对数生长期的 Jurkat 细胞进行实验。细胞培养采用 RPMI1640 培养基(Gibco 公司,美国),10% 的 FCS(Hyclone 公司,美国)。培养条件:37 ℃,相对湿度 90%,CO_2 浓度为 5%。

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);第三军医大学中青年科研基金资助项目(2000-2001)
作者简介:杨录军(1967-),男,河南省辉县人,博士研究生,主要从事遗传毒理学方面的研究,发表论文 20 余篇。电话:(023)68752295
通信作者:曹 佳,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

每培养样本采用为含 4 ml 细胞悬液的细胞培养皿，细胞初始密度为 3.0×10^5 个/ml。

1.3 THH 碱对细胞增值和细胞活力影响的测定

使用常规台盼蓝染色法，台盼蓝终浓度为 0.4%。样本染色后，置于细胞记数板内在显微镜下测定活细胞密度和活力（即活细胞百分率），测定活细胞密度时记数 9 个大方格，测定活力时记数 200 个总细胞数。

1.4 细胞周期分析

样品准备按Nüsse 的方案进行[4]。步骤为：取含 1×10^6 个细胞的细胞悬液，离心去上清，加 1ml 溶液Ⅰ（584 mg/L NaCl，1 g/L Natrium Citrate，10 mg/L RNase，0.3 ml/L NP-40，25 mg/L EB）重悬细胞，室温孵育 1 h，加 1 ml 溶液Ⅱ（15 g/L Natrium Citrate，0.25 mol/L Sucrose，40 mg/L EB），室温孵育 1 h，置于4 ℃暂时保存后进行流式细胞仪检测。

1.5 凋亡的周期时相分析

使用 TUNEL/PI 双染法，TUNEL 标记凋亡细胞，同时 PI 标记细胞的 DNA 含量。标记按试剂盒（Phamingen 公司，APO-BRDUTM，CAT. No. 6576KK）提供的方案进行，步骤为：取含 1×10^6 个细胞的细胞悬液，离心去上清，4 ml PBS 洗 1 次，0.5 ml PBS 重新悬浮细胞沉淀，加 1%多聚甲醛固定液固定至少 24 h，离心去固定液，5 ml PBS 洗涤细胞 2 次，加 Br-dUTP（溴脱氧尿苷）和 TdT（末端脱氧核苷转移酶），37 ℃水浴 1 h，Rinsing 缓冲液洗涤细胞 1 次，加标有 FITC 的抗 BrdUTP 二抗室温孵育 30 min，Rinsing 缓冲液洗涤细胞 1 次，加含适量 RNA 酶和 PI（碘化丙啶）缓冲液孵育细胞 30 min，随即进行流式细胞仪检测。

1.6 流式细胞仪检测及数据分析

使用 FACStar+ 流式仪，激光源为氩离子激光，激发波长 488 nm，515 nm 的带通滤光片接收 FITC 的发射荧光，以 575 nm 带通滤光片接收 PI 的发射荧光。每个样本记录 10 000 个细胞。采用 DAS4.40 软件[5] 进行数据分析。

2 结果

2.1 THH 碱对细胞活力的影响

空白对照组和 DMSO 溶剂对照组中，细胞培养物中的细胞活力一直维持在 90%以上，而 40、80、160 μg/ml 剂量的 THH 碱处理后，细胞活力迅速下降，至 60 h 时基本降到了 0 点，即细胞全部死亡，结果具有良好的剂量和时间相关性。见图 1。

2.2 THH 碱对细胞增殖密度的影响

空白对照组和 DMSO 溶剂对照组中，细胞基本处于对数生长期，细胞密度持续增加；而 40、80、160 μg/ml 剂量的 THH 碱处理后，细胞密度不但不增加，反而逐渐降低，至 60 h 时基本降到了 0 点，结果具有良好的剂量和时间相关性。见图 2。

2.3 THH 碱对细胞增殖周期的影响

THH 碱单剂量（50 μg/ml）多时间点（0～28 h，2 h 间隔）诱导后，进行长时间检测（长于 Jurkat 细胞的细胞周期 24 h），结果显示在开始时期，空白对照组的细胞很快进入正常增殖状态，而 THH 处理组细胞被阻滞在 G_1 期，S 期细胞减少，G_2/M 期无明显变化，并且不随处理时间的延长而进一步变化，其中 G 期细胞百分率随 THH 诱导时间的变化结果，见图 3。

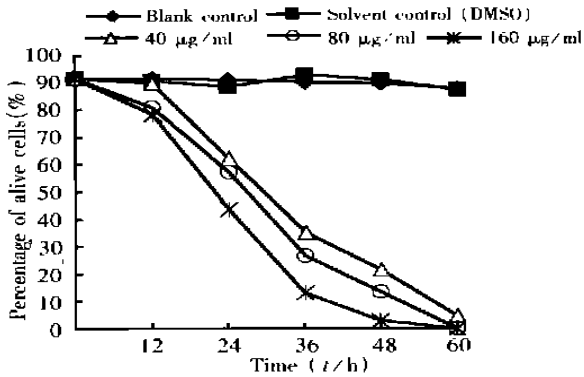


图 1 THH 碱诱导 Jurkat 淋巴瘤细胞后的细胞活力变化

Fig 1 Vitality of Jurkat T lymphoma cells after treatment with the THH alkaloids

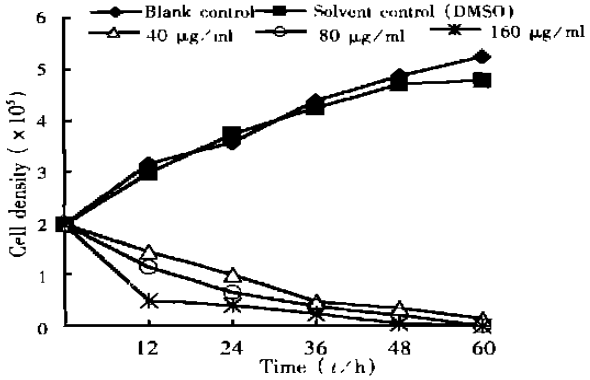


图 2 THH 碱诱导 Jurkat 淋巴瘤细胞后的生长密度变化

Fig 2 Cell density of Jurkat T lymphoma cells after treatment with THH alkaloids

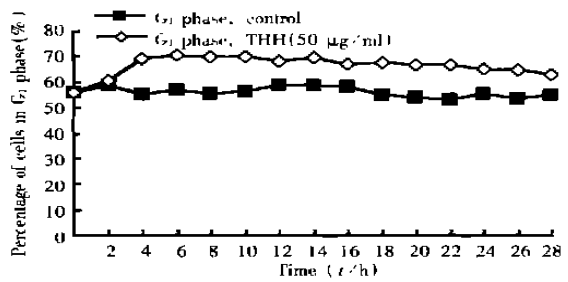


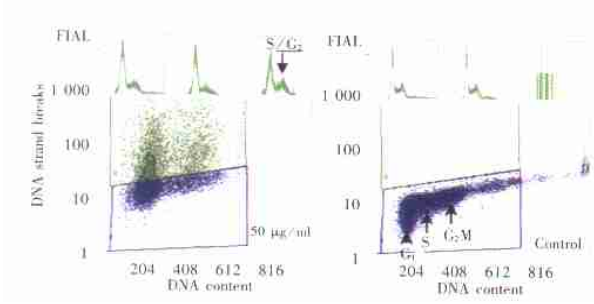
图 3 THH 碱诱导 Jurkat 淋巴瘤细胞后的 G_1 期细胞的百分率

Fig 3 G_1 phase analysis in Jurkat T lymphoma cells induced by THH alkaloids

2.4 THH 碱诱导的凋亡的周期时相特异性分析

THH 碱多剂量多时间点诱导后结果显示，THH 碱在 5、10、25、50 μg/ml 等各剂量下均可诱导各个期相的细胞 DNA 断裂凋亡，但 S 期和 G_2/M 期的细胞对 THH 碱更加敏感，即 S 期和 G_2/M 期细胞比 G_1 期细胞首先发生 DNA 断裂凋亡。其中，50 μg/ml THH 碱诱导 36 h 时间的流式细胞术结果如图 4 所示。

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



The left, middle and right inserts, in each of the respective panels, represent DNA content frequency histograms of total cells, DNA strand breaks cells and no DNA strand breaks cells, respectively

图 4　**Jurkat** 细胞在 **THH** 碱诱导 **36 h** 后的 **DNA** 断裂在增殖周期中的位置

Fig 4　Cell position in the cell cycle in Jurkat T lymphoma induced by the Tripterygium Hypoglaucum (Levl) Hutch alkaloids

3　讨论

本研究的细胞增殖实验结果显示出 THH 碱可快速、有效抑制 Jurkat T 淋巴瘤细胞的生长, 降低细胞活力, 诱导细胞走向凋亡, 因此, THH 碱对 T 淋巴瘤细胞有高度的细胞毒作用, 能强烈抑制其生长, 诱导细胞凋亡。

细胞周期分析结果显示, THH 碱诱导后细胞大量阻滞于 G_1 期, 不能进入 S 期, 进而不能进入细胞分裂阶段。但阻滞于 G_1 期的细胞百分率并不随着 THH 碱诱导时间的延长而继续增加, 在 55% ~ 60%保持稳定, 并且细胞在这期间逐渐死亡, 因此可以推断各期相的细胞都在按一种相对稳定的比率进行凋亡, 进而死亡。凋亡时相特异性的流式细胞仪检测结果也发现 THH 碱能诱导各期细胞凋亡, 这正好印证了细胞周期分析的结果, 尽管在 THH 碱作用的早期阶段 S /G_2 期细胞凋亡率较 G_1 期高, 但由于其数量在整个细胞群体所占的分额很小而不足反映出其权值。

细胞周期的正常进行受到细胞周期检查点(Checkpoints)的监控。这些检查点对 DNA 突变等异常事件进行检查, 通过检查后才能进入下一时相(Phase), 否则细胞将被阻滞于这些检查点之前的时相, 以进行: ①细胞损伤的修复; ②避去外源性严重不利影响; ③得到必要的生长因子、激素或营养物质的支持。在损伤不能得到合适修复的情况下, 这些检查点可调控细胞走向死亡或凋亡[6]。

研究表明不同的凋亡诱导剂(包括多种中药)可特异性地作用于某个细胞周期检查点和阻滞细胞于不同的细胞周期时相。有阻滞细胞于 G_1 期的, 如补中益气汤(Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang)对 Hep3B 等肝细胞系的作用[7]; 有阻滞细胞于 S 期的, 如 5-氟脱氧尿嘧啶的一个新合成的异二核苷酸磷酸二聚体对人前列腺癌细胞的作用[8]; 有阻滞细胞于 G_2 /M 期的, 如紫杉醇对卵巢癌细胞的作用[9]。

在细胞周期检查点中, G_1 /S 检查点是其中重要的一个。G_1 期周期素/Cdk 复合物的负调控对 G_1 /S 检查点的功能启动起关键作用。Cdk 的负调控受 Cdk 抑制剂的调节, 这些 Cdk 抑制剂分为两大家族: INK4 抑制剂家族和 Cip/Kip 抑制剂家族[10]。INK4 家族可特异性地在 G_1 期抑制 Cdk4 或 Cdk6 的活性, 而 Cip/Kip 族可在细胞各时相抑制 Cdk 的活性。这两族均能对 G_1 /S 细胞周期检查点进行调控, 导致细胞阻滞于 G_1 期[11]。

本研究结果显示 THH 碱主要是将细胞阻滞于 G_1 期, 提示 THH 碱诱导 Jurkat 细胞的增殖受阻于 G_1 /S 检查点, 并进而诱导增殖周期的各期相细胞均走向凋亡, 因此 THH 碱很可能是启动了 INK4 蛋白家族的成员, 使细胞不能正常完成启动组蛋白 mRNA 的表达、从而启动细胞凋亡机制。

参考文献:

[1] 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.

[2] 敖　琳, 曹　佳, 孙华明, 等. 昆明山海棠诱导 HL-60 细胞凋亡的初步研究[J]. 中草药, 2001, 32(4): 913－916.

[3] 舒尚义. 昆明山海棠的毒性及毒性成分的研究[J]. 云南中医杂志, 1983, 4(6): 43－44.

[4] Nüsse M, Marx K. Flow cytometric analysis of micronuclei in cell cultures and human lymphocytes: advantages and disadvantages[J]. Mutat Res, 1997, 392(1－2): 109－115.

[5] Beisker W. A new combined integral-light and slit-scan data analysis system (DAS) for flow cytometry[J]. Comput Methods programs Biomed, 1994, 42(1): 15－26.

[6] Pietenpol J A, Stewart Z A. Cell cycle checkpoint signaling: Cell cycle arrest versus apoptosis[J]. Toxicology, 2002, 181－182(27): 475－481.

[7] Kao S T, Yeh C C, Hsieh C C, *et al*. The Chinese medicine Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang inhibited proliferation of hepatoma cell lines by inducing apoptosis via G_0 /G_1 arrest[J]. Life Sci, 2001, 69(13): 1485－1496.

[8] Rosanna M C, Cattaneo-Pangrazzi, Herbert Schott, *et al*. Induction of cell cycle-dependent cytotoxicity and apoptosis by new heterodinucleoside phosphate dimers of 5-fluorodeoxyuridine in PC-3 human prostate cancer cells [J]. Biochem Pharmacol, 2000, 60(12): 1887－1896.

[9] Sarosy G, Kohn E, Stone D A, *et al*. Phase I study of taxol and granulocyte colony-stimulating factor in patients with refractory ovarian cancer[J]. J Clin Oncol, 1992, 10(7): 1165－1170.

[10] Xiong Yue. Why are there so many CDK inhibitors[J]? Biochim Biophys Acta (BBA) - Reviews on Cancer, 1996, 1288(1): 1－5.

[11] Sherr C J, Roberts J M. Inhibitors of mammalian G_1 cyclin-dependent kinases[J]. Genes Dev, 1995, 9(10): 1149－1163.

(编辑　张　宁)

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