DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.17.005
第25卷第17期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 17
1508 2003年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)17-1508-03

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

杨录军[1],敖 琳[1],Nuesse Michael[2],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)

提 要:目的 探讨昆明山海棠碱诱导淋巴瘤细胞凋亡过程中 caspase-3 和 PARP 酶的作用,以了解 THH 碱诱导细胞凋亡的机制。方法 THH 碱诱导 Jurkat T 淋巴瘤细胞后,FAM-DEVD-FMK 荧光标记活化的 caspase-3,免疫细胞化学方法荧光标记 PARP 酶剪切后的 89×10^3 片段,均以流式细胞术检测。结果 THH 碱能有效诱导 caspase-3 激活和 PARP 酶剪切。结论 提示在THH 碱能诱导 JurkatT 淋巴瘤细胞凋亡过程中 caspase-3 和 PARP 酶参与调控,它们可能抑制了受损伤 DNA 的修复,从而导致 DNA 片段化。

关键词:昆明山海棠;细胞凋亡;PARP; DNA 修复;caspase-3
中图法分类号:R282.71;R394.6;R730.263 文献标识码:A

Tripterygium Hypoglaucum (Levl) Hutch alkaloids induce PARP cleavage and caspase-3 activation in Jurkat T lymphoma cells

YANG Lu-jun[1], AO Lin[1], Nuesse Michael[2], 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 explore the roles of caspase-3 and poly (ADP ribose) polymerase (PARP) in the apoptotic process of Jurkat T lymphoma cells induced by Tripterygium Hypoglaucum (Levl) Hutch alkaloids to understand the mechanisms of the apoptosis. Methods After induction by the alkaloids, the activated caspase-3 was fluorescenc-labelled with FAM-DEVD-FMK and PARP cleavage was detected immunocytochemically using antibody which can recognize its 89×10^3 fragment. Then determination by flow cytometry was performed. Results The THH alkaloids could effectively induce PARP cleavage as well as activation of caspase-3. Conclusion We conclude that caspase-3 and PARP take part in the modulation of apoptosis induced by THH alkaloids, resulting in DNA fragmentation by means of inhibition of the repair of the damaged DNA.

Key words: Tripterygium Hypoglaucum (Levl) Hutch; apoptosis; poly (ADP ribose) polymerase; DNA repair; caspase-3

Caspase-3 是凋亡过程中的中心执行器或称为中心效应器,它可与凋亡效应期的诸多事件关联,如染色体凝聚、DNA 断裂等形态学变化[1]。多聚 ADP 核糖多聚酶[Poly (ADP ribose) polymerase, PARP]是一个高度保守的核酶,可被 DNA 损伤所激活并在 DNA 修复机制中起重要作用。在凋亡的早期阶段,PARP 被效应 caspase 剪切[2]。Caspase-3 可将未活化形式的 PARP 蛋白剪切成 89×10^3、24×10^3 两个片段,PARP 蛋白的剪切被认为是细胞凋亡过程的一个特征[1],其特异的剪切片段是细胞凋亡重要事件。

昆明山海棠[Tripterygium Hypoglaucum (Levl) Hutch, THH]的水提取液和其生物碱均能有效诱导细胞凋亡[3~5],其中其生物碱是毒性小、药效好的成分[6]。

本研究采用免疫细胞化学方法和流式细胞术技术对THH 碱诱导的 Jurkat T 淋巴瘤细胞凋亡进行了单细胞水平上的PARP 剪切和 caspase-3 活化细胞率的多剂量多时间点的检测,以探明它们在 THH 诱导凋亡机制中的作用。

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

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

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%。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　PARP 剪切片断的测定

抗 PARP 抗体为兔多克隆抗 PARP 的 89×10^3 片段抗体, 剪切位点 214/215, FITC 连接(BioSource 公司产品, 美国), 标记按试剂盒提供的方案进行, 步骤为: 取 1×10^6 个细胞的细胞悬液入 12 mm× 75 mm 的流式仪试管中, 室温离心去上清, 加 2 ml FBS(含 1% FCS 的 PBS)洗涤细胞 1 次, FIX 固定液(50 mmol/L PBS 中含 4% 多聚甲醛, pH7.3) 冰上固定细胞 10 min, 离心去上清, 1 ml PERM 缓冲液(50 mmol/L PBS 含 1% FCS、1% 叠氮钠和 0.1% 皂角苷, PH 7.3)洗涤细胞 2 次, 加 40μl PERM 缓冲液、10μl 标有 FITC 的 PARP 抗体重悬浮细胞沉淀, 冰上孵育 30 min; 2 ml PERM 缓冲液洗涤细胞 1 次, 加 0.5～0.3 ml PBS 重新悬浮细胞并上流式仪检测。

1.4　凋亡蛋白酶 caspase-3 活性分析

FAM-DEVD-FMK 是标记有羧基荧光素 FAM 的 caspase-3 抑制剂(DEVD: benzyloxycarbonyl aspartyl glutamylvalylaspartic acid, 天冬-谷-缬-天冬氨酸; FMK: fluoromethyl ketone, 氟甲酮), FAM-DEVD-FMK 进入细胞后能被活化的 caspase-3 不可逆地剪切后发出绿色荧光。

Caspase-3 活性检测按试剂盒(Intergen 公司, 美国)提供的方案进行, 步骤为: 取 300μl 含 3×10^5 个细胞的样品细胞悬液, 直接加入 10 μl 10× 的 FAM-DEVD-FMK 工作液, 置入 37 ℃、5% CO_2 的培养箱中孵育 1 h, 用 2 ml 洗液洗涤细胞 2 次, 加入 400 μl 含适量 PI 的洗液重新悬浮细胞沉淀, 染色后进行流式细胞仪分析。

1.5　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 的绿色荧光和剪切后的 FAM-DEVD-FMK 的绿色荧光, 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[7] 进行数据分析。

2　结果

2.1　THH 碱对凋亡蛋白酶 caspase-3 活性的影响

在流式细胞仪检测结果图中, 正常未凋亡细胞, 即 caspase-3 阴性细胞, 为低绿色荧光、低红色荧光, 分布在窗口 1; caspase-3 活化细胞, 即 caspase-3 阳性细胞, 为高绿色荧光、低红色荧光, 分布在窗口 2; 窗口 1 和窗口 2 之外是 PI 阳性的坏死细胞, 坏死细胞的细胞膜破损后, PI 可通过细胞膜染上细胞核。

caspase-3 在 25、50 μg/ml THH 碱诱导后均在 4 h 后活性迅速增加, 12 h 时已达到较高活性, 之后至 28 h 活性仍在小幅度增加, 保持在一个高平台水平。见图 1。

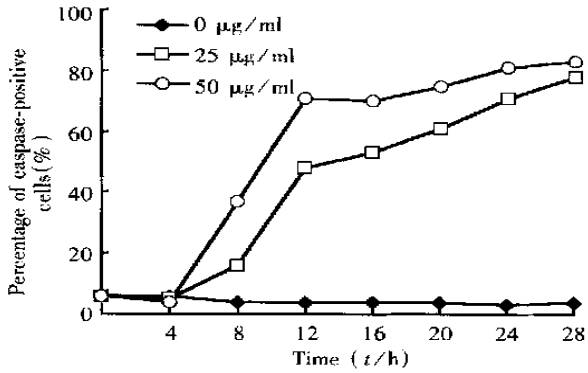


图 1　THH 碱对 Jurkat 细胞 caspase-3 活性的影响

Fig 1　Effects of THH alkaloids on caspase-3 activity of Jurkat cells

2.2　THH 碱对 PARP 剪切的影响

Jurkat 细胞在 THH 诱导 4 h 后 PARP 剪切片段开始增加, 8 h 时 10、25、50 μg/ml 剂量下均有显著增加($P<0.01$); 之后随着时间的延长, 仍持续增加至 28 h。

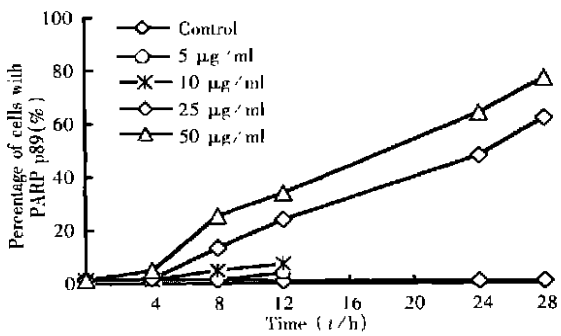


图 2　THH 碱诱导 Jurkat 细胞 PARP 剪切发生率

Fig 2　Percentage of Jurkat cells with PARP p89 induced by THH alkaloids

3　讨论

目前认为, 细胞凋亡可分为 3 个期: 启动期(Initiation phase)、效应期(Effector phase)和降解期(Degradation phase)。在启动期, 细胞收到诱导细胞死亡的信号和刺激, 如必要的存活因子缺乏、新陈代谢支持不足、死亡信号受体-配体结合、外来毒物、高温、辐射造成亚致死性损伤等就会启动细胞凋亡。在效应期, 上述反应转到常规的新陈代谢反应中发生效应, 然后执行细胞"自杀"程序。在降解期, 细胞激活异化性酶, 放弃进行进一步的修正, 在这期细胞出现凋亡的形态学和生化特征性变化, 如 DNA 片段化、大量蛋白分解[8]。

Caspase 家族在介导细胞凋亡的过程中起着非常

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

重要的作用，其中 caspase-3 为关键的效应分子，它可催化多种细胞内特异蛋白的激活。它在凋亡信号传导的许多途径中发挥着重要功能。Caspase-3 可经细胞色素C、caspase-9 途径激活，也可以通过另外的途径激活。Caspase-3 正常以酶原（32×10^3）的形式存在于胞浆中，活化的 caspase-3 由两个大亚基（17×10^3）和两个小亚基（12×10^3）组成，裂解相应的胞浆胞核底物，最终导致细胞凋亡[9]。但在细胞凋亡的晚期和死亡细胞，caspase-3 的活性明显下降，这应该是本研究中 THH 碱诱导 12 h 后激活速度减慢的原因。

正常情况下 DNA 损伤后细胞内可发生一个即刻反应，即 PARP 酶合成 Poly（ADP-核糖）用于 DNA 断裂的修复。PARP 酶和其激活的后翻译修正（Post-translational modification）机制，长期以来被认为是细胞遭受遗传毒物损伤后细胞修复存活的主要功能，PARP 酶对维持基因组的完整性方面起着关键性的作用（包括基本的切除修复、坏死和凋亡）[1]。在细胞凋亡过程中，激活的 caspase 能够依次地相互激活，以至使 DNA 修复机制失效，其中 caspase-3 能将 PARP 酶剪切成 p89×10^3 和 p24×10^3 两个片段，使其失去 PARP 原酶的正常功能[10]。

本研究结果显示 THH 碱诱导 Jurkat 细胞后能有效地诱导 caspase-3 激活，以及引起 PARP 酶剪切，使其失去正常的维持 DNA 完整性的功能。Caspase-3 激活和 PARP 剪切均在 4 h 后几乎同时开始反应，但 caspase-3 激活反应在这期间更剧烈。因此本研究表明 THH 碱诱导了 caspase-3 活化并很快参与了 PARP 酶的剪切。

（感谢新桥医院临床药理基地徐颖硕士在昆明山海棠碱的制取中给予的热情帮助。）

参考文献：

[1] Oliver F J, de la Rubia G, Rolli V, *et al*. Importance of poly（ADP-ribose）polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant[J]. J Biol Chem, 1998, 273(50): 335－339.

[2] Smith S. The world according to PARP[J]. Trends Biochem Sci, 2001, 26(3): 174－179.

[3] 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.

[4] 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.

[5] 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, 23(11): 1273－1275.

[6] 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.

[7] 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.

[8] Croemer G, Zamzami N, Susin S A. Mitochondrial control of apoptosis[J]. Immunol Today, 1997, 18(1): 44－51.

[9] Porter A G, Janicke R U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis[J]. Cell Death Differ, 1999, 6(2): 99－104.

[10] Li X, Darzynkiewicz Z. Cleavage of Poly（ADP-ribose）polymerase measured in situ in individual cells: relationship to DNA fragmentation and cell cycle position during apoptosis[J]. Exp Cell Res, 2000, 255(1): 125－132.

（编辑 汪勤俭）

（上接 1504 页）

2.2.2 扭体法 按文献[3, 4]，取小鼠 40 只，随机均分为 4 组，2/d，连续 3 d，末次给药后腹腔注射 0.6%醋酸溶液 0.1 ml，观察 30 min 内扭体反应的次数。

结果表明，五味风湿灵对醋酸引起的小鼠扭体反应均有显著的抑制作用（$P<0.01$）。

3 讨论

五味祛风湿消痛灵作为抗风湿药应用于临床，主要治疗类风湿性关节炎（Rheumatoid arthritis, RA）等病症。RA 的基本病理大致包括滑膜炎症（渗出、浸润）、增生、肉芽组织形成诸阶段。主要临床表现以关节肿胀、疼痛、压痛、晨僵为突出症状。病因至今尚未完全明确。因此，对 RA 的治疗目前仍侧重于改善症状和控制关节结构受损这两个方面[5]。

五味祛风湿消痛灵通过本次动物试验研究证明，能够明显地抑制急性、亚急性炎症反应，而作用于病变的不同阶段。首先它对二甲苯诱发小鼠耳部水肿、角叉菜胶致大鼠足肿胀有明显地抑制作用，这无疑对疾病早期阶段的炎症反应（渗出、浸润）有较好的治疗作用。其次，它对肉芽肿的形成和囊内渗出液也有明显的抑制作用，这就大大减缓了病证的发展趋势。通过上述作用，来达到消炎的目的。

通过本次研究还可看出，五味祛风湿消痛灵在缓解疼痛方面，也有较强的作用。它对热板法和扭体法刺激小鼠引起的疼痛均有明显抑制作用。可以说，该药有较强镇痛作用，并以此来改善临床症状，减轻病人痛苦。

五味祛风湿消痛灵是藏医经典方，为纯植物药，因毒副作用小而倍受患者欢迎。本研究说明其有较强的抗炎、镇痛作用，为本药的临床应用提供了初步的实验依据。

关键词：五味祛风湿消痛灵；抗炎；镇痛
中图法分类号：R289.5 文献标识码：B

参考文献：

[1] 郭鹏举. 青海地区地产药材[M]. 西安：陕西科学技术出版社, 1996.7, 156, 298.

[2] 张均田. 现代药理实验方法[M]. 北京：北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998 1382－1384.

[3] 梅学仁, 王宇伟, 申秀萍. 消肿止痛膏的抗炎、镇痛作用[J]. 中草药, 2001, 32(8): 724－727.

[4] 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 北京：人民卫生出版社, 1994.693－699.

[5] 董 怡, 赵 岩. 抗风湿新药的概述[J]. 中国新药杂志, 2001, 10(1): 10－14.

（编辑 薛国文）

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