DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.17.006
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)17-1511-04

论著

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

杨录军[1],Nuesse Michael[2],余厚勇[1],敖 琳[1],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 研究昆明山海棠碱通过线粒体途径诱导细胞凋亡的作用。方法 THH碱多剂量多时间点诱导Jurkat细胞后,采用Western blotting检测细胞内Bcl-2表达的含量、采用JC-1原位染色方法、细胞免疫化学和流式细胞术等手段在单细胞水平分析细胞线粒体膜Apo2.7分子以及线粒体膜电位($\Delta\Psi_m$)的变化。结果 THH碱诱导后Bcl-2蛋白表达下调,线粒体膜电位明显下降,线粒体膜Apo2.7蛋白分子表达显著增加。结论 THH碱可通过线粒体途径诱导Jurkat T淋巴瘤细胞株发生凋亡,并且Bcl-2蛋白参与了线粒体凋亡功能的启动。

关键词:昆明山海棠;细胞凋亡;线粒体膜电位;Bcl-2;Apo2.7;流式细胞术
中图法分类号:R282.71;R285.5;R730.263 文献标识码:A

Tripterygium Hypoglaucum (Levl) Hutch alkaloids induce the apoptosis of T lymphoma cells *via* the mitochondrial pathway

YANG Lu-jun[1], Nuesse Michael[2], YU Hou-yong[1], AO Lin[1], 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 effects of Tripterygium Hypoglaucum (Levl) Hutch (THH) alkaloids on the apoptosis of Jurkat T lymphoma cells *via* the mitochondrial pathway. Methods After Jurkat cells were induced by THH alkaloids at different doses and at different time points, Bcl-2 expression was detected by Western blotting. Apo2.7 molecules on mitochondrial membrane and mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) were measured by JC-1 staining, immunocytochemistry and flow cytometry. Results THH alkaloids could effectively reduce mitochondrial membrane potential and Bcl-2 expression and increase Apo2.7 molecule expression in Jurkat cells. Conclusion THH alkaloids can induce the apoptosis of T lymphoma cells *via* the mitochondrial pathway. Bcl-2 takes part in the role of the starting of apoptotic function of mitochondria.

Key words: Tripterygium Hypoglaucum (Levl) Hutch; apoptosis; mitochondrial membrane potential; Bcl-2; Apo2.7; flow cytometry

已有的研究表明,细胞主要通过两条途径诱导凋亡(apoptosis):死亡受体介导途径(Fas配体或TNFα介导)和线粒体途径[1]。线粒体膜电位的破坏是线粒体参与调控中的早期重要事件:研究表明,线粒体膜电位受Bcl-2及其它Bcl-2家族成员调控,在凋亡的早期阶段,线粒体膜电位下降,导致细胞色素C等凋亡相关蛋白释放,从而激活下游的一系列凋亡反应发生。1996年发现一种线粒体膜蛋白分子Apo2.7(38×10^3),其产生被认为是细胞凋亡发生和线粒体参与调控凋亡过程的一个重要的早期事件[2]。为进一步研究线粒体在THH诱导凋亡机制中的作用和变化,我们在THH处理JurkatT淋巴细胞白血病细胞株的凋亡中对Bcl-2表达、线粒体膜电位、线粒体膜蛋白分子Apo2.7进行了观察和研究。

1 材料和方法

1.1 THH碱的准备

昆明山海棠总生物碱(简称THH碱)由第三军医大学附属新桥医院药理基地帮助提取。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(V/V))。

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

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

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/ml。

1.3 Bcl-2 的测定

使用常规 Western blotting 方法,结果显示采用化学发光法,X 线胶片上曝光,自动 X 线胶片洗印机冲洗。兔抗人 Bcl-2 抗体(一抗)和辣根过氧化物酶连接的鼠抗兔抗体(二抗)均购自 Santa-Cruz 公司。

1.4 Apo2.7 蛋白分子的检测

采用细胞免疫化学法。Apo2.7 分子单克隆抗体:7A6 克隆,小鼠 IgG1 型,荧光素 PE 连接,购于 Counter-Immunotech 公司。按试剂盒提供的方案进行,步骤为:5×10^5 个细胞的细胞悬液,离心(200× g,5 min),将细胞沉淀用 100 μl 的 0.1 mg/ml 的 digitonin 在冰上处理 20 min,2 ml 的 FBS(2.5% FCS 的 PBS)洗涤细胞沉淀 1 次,加抗体暗处、室温孵育 15 min,用 2 ml 的 FBS 洗涤细胞沉淀 1 次。样本处理后进行流式细胞仪检测和显微观察。

1.5 线粒体膜电位($\Delta\Psi m$)的测定

使用特异性阳离子染料 JC-1(Molecular Probe 公司,美国)染色。细胞经 THH 碱诱导后,在各剂量点、时间点取样入流式细胞仪测定管,加入 JC-1,(终浓度为 1.25 μmol/L),37 ℃,5% CO_2 孵育 30 min,然后进行流式细胞仪检测,同时在激光扫描细胞仪下检测、观察和摄影。

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 Fluorescence 的发射荧光,以 575 nm 带通滤光片接收 PE 和 PI 的发射荧光。每个样本记录 10 000 个细胞。采用 DAS4.40 软件进行数据分析。

1.7 荧光显微观察

使用激光扫描细胞仪(Laser scanning microscopy, CompuCyte 公司,美国),激光源为氩离子激光,激发波长 488 nm,显微镜下观察,CCD 相机进行显微照相。

2 结果

2.1 THH 碱对 Bcl-2 表达的影响

THH 碱(25 μg/ml)诱导 Jurkat 细胞后 24h 时显微观察已有大量凋亡细胞发生,线粒体膜电位已大量降低,因而在 0~24 h 间对 Bcl-2 蛋白表达进行检测。结果显示 THH 碱诱导 12 h 后 Bcl-2 表达逐渐减弱,见图 1。



图 1 THH (25 μg/ml) 诱导 Jurkat 细胞后 Bcl-2 蛋白表达

Fig 1 Bcl-2 protein expression in Jurkat cells induced by THH alkaloids (25 μg/ml)

2.2 THH 碱对线粒体膜 Apo2.7 蛋白分子的影响

THH 碱处理后,线粒体膜 Apo2.7 蛋白含量增加,见图 2。随着 THH 碱剂量的增加和处理时间的延长,Apo2.7 阳性细胞率逐渐增加,具有强烈的时间和剂量的依赖性。高剂量组 25 μg/ml 和 50 μg/ml 组为 4~8 h,Apo2.7 阳性细胞率陡然增加(从 8%左右升到 60%左右),之后继续上升直到最高值(70%~80%);50 μg/ml 高剂量组 8 h 后因大量细胞凋亡而进一步演变为死亡裂解,因而阳性率已不能再增加;10 μg/ml 中剂量组在 4~16 h 时间段内阳性细胞率大幅度增加(6% 升到 70%);5 μg/ml 低剂量组诱导 8h 后阳性细胞率才开始小幅度增加,最终(24 h)也只达到 30%的阳性率;空白对照组一直保持在 5%的背景水平。高剂量组后期已有大量细胞凋亡,许多细胞已裂解为细胞碎片。结果见图 2,3。



图 2 THH 碱(25 μg/ml, 12 h)处理 Jurkat 细胞后的线粒体膜蛋白分子 Apo2.7 增加。未凋亡细胞无荧光在此照片上不可见

Fig 2 THH alkaloids (25μg/ml, 12h) induce the increased Apo2.7 molecules in Jurkat cells. Apo2.7 positive cells are shown; the negative cells with no fluorescence are not visible

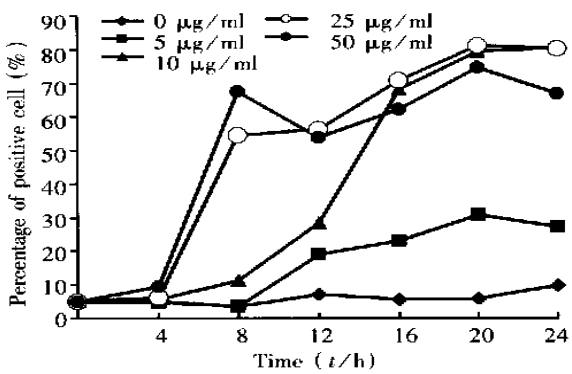


图 3 THH 碱诱导 Jurkat 细胞 Apo2.7 蛋白分子凋亡的时间和剂量依赖性

Fig 3 Time- and dose-dependent apoptosis of Apo2.7 in Jurkat cells induced by THH alkaloids

2.3 THH 碱对线粒体膜电位的影响

细胞经 JC-1 染色后,线粒体膜电位较高时线粒体呈橙色,膜电位较低时线粒体呈绿色,线粒体膜电位在去极化过程中红/绿色荧光的比率降低。实验中正常细胞经 JC-1 染色后线粒体呈橙色,THH 处理后细胞线粒体由橙色走向呈绿色,即线粒体膜电位下降;死亡细胞线粒体呈绿色。随着膜电位的降低,线

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

粒体体积增大。

流式细胞仪结果表明 THH 碱诱导 6 h 后, Jurkat 细胞线粒体开始绿色荧光分量增强, 红色荧光分量降低, 红/绿比率降低, 11 h 已有明显变化, 16 h 后有进一步改变。说明细胞线粒体膜电位 6 h 左右开始下降, 11 h 已经明显下降, 高剂量下 16 h 后线粒体膜电位已有大幅度的降低, 基本降至本底值, 即完全去极化。见图 4。

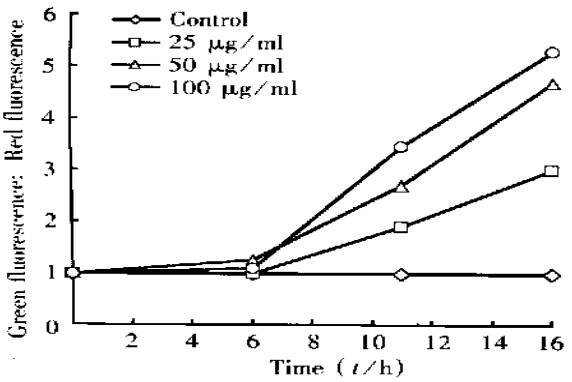


图 4　THH 碱处理 Jurkat 细胞和 JC-1 染色后细胞膜电位的动态变化

Fig 4　Dynamic changes of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi m$) in Jurkat cells treated with THH alkaloids induced by JC-1 staining

3　讨论

线粒体是一个有双层膜(内膜和外膜)包围的细胞器, 是细胞呼吸作用和产生能量的细胞器, 存在于大多数真核细胞中。1995 年以前人们普遍认为线粒体不参与凋亡过程, 其理由基于两个结果, 即: ①凋亡过程中线粒体在形态学上基本保持完整; ②缺乏线粒体 DNA 的细胞(ρ° 细胞) 同样能被诱导凋亡[3]。但随着分子生物学的发展, 一系列研究证实线粒体在凋亡中扮演着重要角色, 如在凋亡过程中发生线粒体膜电位降低、膜发生渗透性转换、线粒体释放凋亡特异性酶激活物等变化[4]。

到目前为止人们认为哺乳动物细胞凋亡有两条生物学通路, 死亡受体介导(Fas 配体或 TNFα 介导)的通路和线粒体通路, 之后激活下游的 caspase-3, 再激活 caspase 级联反应, 激活的 caspase 可导致 DNA 片段化[1]。前一个通路中, Fas 配体或 TNFα 激活 FADD (Fas-associated death domain, Fas 死亡结构域相关蛋白) 等后, 激活 caspase-8, 然后 caspase-8 激活 caspase-3。

线粒体途径可被细胞内的应激反应所启动, 这些应激反应包括 DNA 断裂、蛋白激酶、生存信号消失等。细胞内的应激反应等凋亡信号引起 Bcl-2 家族的 Bax 等成员接合到线粒体的外膜上, 引起线粒体释放凋亡特异性酶激活物等变化, 这些凋亡蛋白包括能激活 caspase 的诱导因子(Apoptosis inducing factor, AIF)、细胞色素 C (Cyt c, Apaf-2) 和凋亡蛋白酶激活因子 1 (Apaf-1) 等, Cyt-C 从线粒体的释放被认为是一个不可逆地启动细胞死亡的关键信号[4]。Bcl-2 拮抗 Bax 等成员的作用。细胞色素 C 和凋亡蛋白酶激活因子 1 (Apaf-1)、dATP 或 ATP、caspase-9 结合, 共同形成一个大的复合物(称为 apoposome), 导致 caspase-9 激活, 再进一步激活下游的 caspase-3 等, 之后引起细胞核 DNA 片段化等一系列凋亡反应[1]。

线粒体可在凋亡的早期发生膜电位降低。JC-1 是一种阳离子羰花青染料, 可特异性地进入和聚集在线粒体中, 在低浓度时呈单体形式, 发绿色荧光, 在高浓度时, 呈 J-聚合形式, 发橙色荧光。与若丹明及其它羰花青染料相比, JC-1 可以选择性地进入线粒体, 并且随膜电位的由高到低而呈现不同的由橙到绿的渐变过程, 因而流式细胞仪或激光扫描细胞仪可检测到其变化, 而不仅仅是阴性或阳性[5]。本研究中, THH 碱在诱导 Jurkat 淋巴瘤细胞株凋亡的早期阶段即可引起线粒体膜电位下降, THH 的中、高剂量诱导下 16h 时基本已下降到最低值, 反映出线粒体在 THH 碱诱导凋亡的早期即开始快速反应, 并且其调控反应一直持续进行。

线粒体膜电位的降低(即去极化)会导致线粒体停止产生 ATP, 进而导致内膜损伤。线粒体膜电位的降低可引起 PTP (Permeability transition pore, 渗透性转运孔)的开放, 在高传导开放状态, 线粒体膜允许水和较大分子进入有蛋白质富集的基质中, 这个过程导致线粒体肿胀[6], 从图 1 中可看到这一点, 即红色分量高的线粒体体积小, 而绿色分量高的线粒体体积大。

线粒体凋亡主要受制于 Bcl-2 和其它 Bcl-2 家族成员[7]。研究表明, Bcl-2 能抑制线粒体释放细胞色素 C、AIF 到胞浆中, 进而抑制凋亡的发生; 我室前期研究已发现 THH 碱能诱导 HL-60 细胞 bcl-2 mRNA 下调, 本研究在蛋白水平上也可见 bcl-2 表达下降, 因而可以肯定 THH 碱的凋亡涉及 bcl-2 基因的表达下调, 并启动线粒体的凋亡功能。

近年发现线粒体膜蛋白 Apo2.7 分子(38×10^3)是线粒体参与凋亡调控反应的早期标志, 并且此蛋白也可能参与凋亡分子的级联反应[2]。ARA-c、γ 射线和 Anti-CD95 等凋亡诱导剂均可诱导 Apo2.7 蛋白显著增加, 其增加常常伴随着线粒体膜电位下降、细胞色素 C 和 Apaf-1 释放、caspase-9 激活等一系列的线粒体与凋亡有关的生化事件发生[8~9]。本结果显示 THH 碱在诱导 Jurkat 细胞凋亡的过程中线粒体膜蛋白 Apo2.7 分子出现, 且具有强烈的剂量、时间依赖关系, 进一步证明线粒体参与其凋亡过程的调控和通过线粒体通路而诱导细胞凋亡的。

综上结果可见, 在 THH 碱诱导 Jurkat T 淋巴瘤细

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

胞凋亡的过程中，Bcl-2 蛋白调控线粒体即早反应，膜蛋白 Apo2.7 分子增加、膜电位快速降低并维持这种低电位至濒临死亡。并可以推断其可能通过释放细胞色素 C、AIF 等凋亡相关因子进一步调控下游的 caspase 活化、核 DNA 片段化等凋亡反应。

（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] Gottlieb R A. Mitochondria: execution central[J]. FEBS Lett, 2000, 482(1—2): 6—12.
[2] 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.
[3] Jacobson M D, Burne J F, King M P, *et al*. Bcl—2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA[J]. Nature, 1993, 361(6410): 365—369.
[4] Daugas E, Nochy D, Ravagnan L, *et al*. Apoptosis-inducing factor(AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis[J]. FEBS Letters, 2000, 476(3): 118—123.
[5] Salvioli S, Ardizzoni A, Franceschi C. JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess ΔΨ changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis[J]. FEBS Letters, 1997, 411(1): 77—82.
[6] Piana G L, Marzulli D, Consalvo M I, *et al*. Cytochrome c-induced cytosolic nicotinamide adenine dinucleotide oxidation, mitochondrial permeability transition, and apoptosis[J]. Arch Biochem Biophys, 2003, 410(2): 201—211.
[7] Finkel E. The mitochondrion: is it central to apoptosis?[J] Science, 2001, 292(5517): 624—626.
[8] Metivier D, Dallaporta B, Zamzami N, *et al*. Cytofluorometric detection of mitochondrial alterations in early CD95/Fas/APO-1-triggered apoptosis of Jurkat T lymphoma cells. Comparison of seven mitochondrion—specific fluorochromes[J]. Immunol Lett, 1998, 61(2—3): 157—163.
[9] Matthew G, Vander H, Navdeep S, *et al*. Bcl—xL Regulates the Membrane Potential and Volume Homeostasis of Mitochondria[J]. Cell, 1997, 91: 627—637.

（编辑 汪勤俭）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2003)17-1514-01

术中纤维结肠镜在诊断小肠出血中的价值

Diagnostic value of fibrocolonoscope for bleeding of small intestine during the operation

熊有志，石 彦，孙念绪，余佩武 （第三军医大学附属西南医院普通外科，重庆 400038）

屈氏韧带以下的消化道出血，常因出血部位不清楚，导致手术困难，而术中纤维结肠镜对不明原因的小肠出血能定位和明确原因。我科 2000-2001 年经术中纤维肠镜检查下消化道出血 12 例，报告如下。

1 材料和方法

1.1 一般资料

12 例中男性 7 例，女性 5 例，年龄 23～71 岁，平均年龄为 35 岁。

1.2 临床表现

主要表现为鲜血便、暗红色血便或黑便，此外尚有因血容量不足而引起的一系列临床表现，其中急性出血量估计在 1 500 ml 以上的 4 例，500～1 000 ml 的 3 例，间断发作性出血的 2 例，长期反复出血的 3 例。

1.3 术前检查

均行胃镜检查，在十二指肠降段以上未见有出血病灶和血迹，急诊行结肠镜检查 12 例，均未见全结肠及回肠末端内有新鲜血便，无活动性出血灶，8 例常规行结肠镜检查回肠末端和全结肠未见明显的异常。6 例行全消化道钡餐造影检查无异常发现，6 例 DSA 造影见 2 例小肠血管畸形，全部患者均行腹部 B 超检查，部分患者进行腹部 CT 检查，均无明显异常。

1.4 术中肠镜检查方法

应用 Olympus-2OI 型纤维结肠镜，剖腹后由手术医师在空肠末端做一小切口，操作者在手术医师的帮助下经此切口将肠镜插入小肠内，向内侧插入十二指肠内，降段向肛侧插至回盲瓣，对小肠逐段进行观察，操作中应注意切口保护，动作轻柔。

2 结果

12 例中手术前不明原因的小肠出血通过术中的肠镜和冰冻切片检查全部明确出血的原因和部位。出血原因：①以肿瘤和血管发育不良多见，其中肿瘤 6 例（平滑肌瘤 2 例，平滑肌肉瘤 1 例，淋巴瘤 2 例，腺瘤 1 例），血管发育不良 3 例（海绵状血管瘤 1 例，动静脉畸形 1 例，血管瘤 1 例），此外 Meckels 憩室，伤寒，Crohn 病例各一例；②出血部位：均为单一出血灶，部位以回

（下转 1517 页）

作者简介：熊有志（1973—），男，重庆市人，医师，主要从事消化道肿瘤生物治疗方面的研究，发表论文 10 篇。电话：(023) 76684131

收稿日期：2001-10-31；修回日期：2002-08-24

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