DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.17.009
第25卷第17期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 17
1518 2003年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)17-1518-03

THH碱不通过钙离子信号通道诱导Jurkat淋巴瘤细胞株凋亡

杨录军[1],Grundler Werner[2],Nuesse Michael[2],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 探讨昆明山海棠碱在凋亡中对细胞内游离钙离子浓度的影响。方法 THH碱诱导Jurkat细胞后,采用Indo-1 AM及PI进行细胞染色、流式细胞术等手段在单细胞水平上检测细胞内钙离子浓度的变化。结果 THH碱诱导后细胞内钙离子浓度未见明显变化。结论 THH碱不通过钙离子信号通道诱导Jurkat细胞凋亡。

关键词:昆明山海棠碱;细胞凋亡;钙离子;流式细胞术
中图法分类号:R282.71;R285.5;R730.263 文献标识码:A

Role of [Ca^{2+}]i in the apoptosis of Jurkat T lymphoma cells induced by Tripterygium Hypoglaucum (Levl) Hutch alkaloids

YANG Lu-jun[1], Grundler Wernera[2], Nuesse Michael[2], 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 roles of [Ca^{2+}]i in the apoptosis of Jurkat cells induced by Tripterygium Hypoglaucum (Levl) Hutch alkaloids. **Methods** After Jurkat cells were stained with Indo-1 AM and PI, changes of [Ca^{2+}]i were assessed by flow cytometry at the single-cell level. **Results** THH alkaloids could induce no changes of [Ca^{2+}] inside cytoplasm. **Conclusion** THH alkaloids induce the apoptosis of Jurkat cells *via* other pathways rather than *via* the [Ca^{2+}] pathway.

Key words: Tripterygium Hypoglaucum (Levl) Hutch alkaloids; apoptosis; calcium; flow cytometry

细胞内游离钙离子浓度([Ca^{2+}]i)稳态是维持细胞各项代谢活动的必要条件,正常静息状态下,细胞内Ca^{2+}浓度为10^{-7} mol/L,而胞外为10^{-3} mol/L,内外浓度相差一万倍。细胞内Ca^{2+}作为细胞内重要的第二信使,其浓度的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[1]。我室大量的研究表明[2],THH碱可诱导细胞凋亡,但在THH水提取液诱导HL-60细胞凋亡的实验中并未看到胞内钙离子浓度变化[3],为进一步探讨和验证THH碱对胞内钙离子的影响,我们以Jurkat细胞株为对象,采用流式细胞术长时间动态地在单细胞水平上对THH碱诱导后的胞内钙离子进行了检测。

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。

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/ml。

1.3 胞内游离钙离子浓度分析

Indo-1 AM(简称Indo-1,购自Sigma公司,美国)是一种可以特异与胞内钙离子结合的、用于流式细胞术分析胞内钙离子的荧光染料。胞内游离型Indo-1在365 nm激光激发下发射530 nm荧光(FL3),与钙离子结合后的结合型Indo-1在365 nm激光激发下发射395nm荧光(FL4);同时记录细胞在488 nm激光激发下波长530 nm的细胞自发荧光(FL1)和>560 nm的PI红色荧光(FL2)。

由于细胞内的钙离子浓度对温度、振荡等外界条件变化非常敏感,故在流式细胞仪检测过程中采用一套特制的恒温、可重复加样的装置,检测不间断,详图见文献[4]。

本研究采用3种实验方法检测THH碱诱导后细胞胞浆内的钙离子浓度改变。

第1种实验方法(动态法):每管取含5×10^5个细胞的细胞

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

悬液, 离心去上清, 加 1 ml Indo-1/PI 溶液(不含酚红, 含 5μmol/L Indo-1、2μg/ml PI 的 RPMI 1640 全培养基), 室温避光孵育 20 min, 以给细胞加载 Indo-1; 置样品于流式细胞仪上, 再加 THH 碱于细胞悬液中, 观察胞内钙离子的动态变化。以 TBT 为阳性对照。

第 2 种实验方法(终点法): 先给细胞加载 Indo-1, 再加 THH 碱处理细胞 0～2.75 h 后(0.5 h 间隔), 进行流式细胞仪检测。

第 3 种实验方法(终点法): THH 碱诱导处理细胞 4 h 和 8 h 后, 取含 5×10^5 个细胞的细胞悬液, 给细胞加载 Indo-1。过滤去细胞团块, 离心去上清, 加 1 ml Indo-1/PI 溶液, 上流式细胞仪检测。

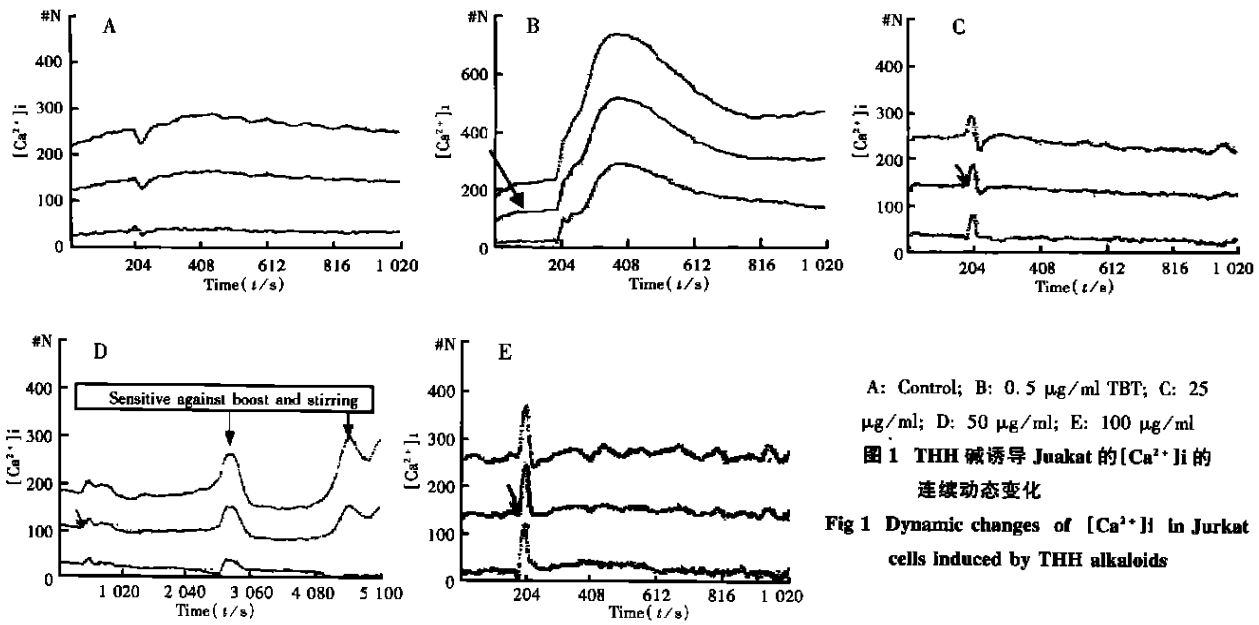
1.4　流式细胞仪检测及数据分析

使用 FACStar+ 流式仪, 双激光源激发: 氩激光, 波长 488 nm; UV 激光, 波长 365 nm。每个样本记录 10 000 个细胞。采用 DAS4.40 软件进行数据分析。

2　结果

2.1　THH 碱对胞浆内钙离子的影响

第 1 种作用方式实验结果见图 1。结果表明, 空白对照的钙离子的平均浓度为 150 相对单位; 阳性对照(TBT: 0.5μmol/L)的钙离子的浓度从加 TBT 后 3.5 min 开始迅速上升, 升高至 700 相对单位后开始下降, 一直保持在 250 相对单位; 25 μg/ml、100 μg/ml THH 碱处理后一直至 17 min 钙离子的浓度均没有增加, 保持在 150 相对单位的空白对照水平, 50 μg/ml THH 碱加后一直至 85 min 钙离子的浓度也没有增加, 保持在 100 相对单位的起始水平。实验显示[Ca^{2+}]i 对样品试管的震动非常敏感, 见图 1D。

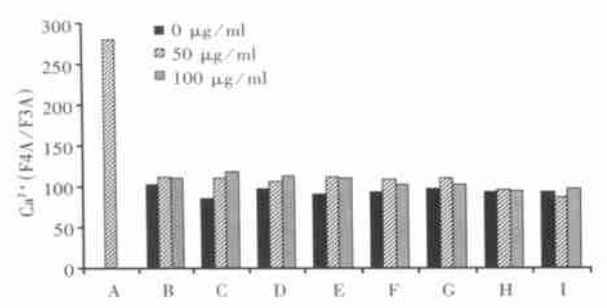


A: Control; B: 0.5 μg/ml TBT; C: 25 μg/ml; D: 50 μg/ml; E: 100 μg/ml

图 1　THH 碱诱导 Juakat 的[Ca^{2+}]i 的连续动态变化

Fig 1　Dynamic changes of [Ca^{2+}]i in Jurkat cells induced by THH alkaloids

第 2 种作用方式实验结果: 为观察 THH 碱作用更长时间的效应, 又做了第 2 次实验, 最长作用时间延长至 2.75 h。结果显示, 作为阳性对照物的 TBT(0.5μmol/L) 在加入细胞中后钙离子浓度迅速升高, 升高时间与幅度与第 1 种结果几乎一致; 而 THH 碱处理后只有非常轻微的升高, 见图 2。



A: TBT (0.5μmol/L); B: 0 h; C: 0.5 h; D: 1 h; E: 1.5 h; F: 2 h; G: 2.75 h; H: 4 h; I: 8 h

图 2　THH 碱对 Jurkat [Ca^{2+}] i 的作用

Fig 2　Effects of THH alkaloids on [Ca^{2+}] i in Jurkat cells

第 3 种作用方式实验结果: 为排除 THH 碱作用还不够长的可能性, 又检测 THH 碱作用 4 h 和 8 h 时间点的钙离子浓度, 结果仍未见有明显的钙离子浓度升高, 结果合并在图 2 中。

3　讨论

许多凋亡诱导剂是通过升高细胞内游离钙离子浓度([Ca^{2+}]i)来启动凋亡, 其钙离子来源主要有二: 一是细胞外钙离子内流, 主要是通过 Ca^{2+} 通道开放引起 Ca^{2+} 内流; 二是细胞内贮存于线粒体、内质网中的钙离子释放。细胞内钙离子的含量依靠细胞膜、线粒体膜和内质网膜上的三种钙泵的作用保持相对稳定[5]。胞内钙离子增加可活化 caspase、激活核酸内切酶、促进细胞膜上磷脂酰丝氨酸从膜内面外翻至膜外面等凋亡相关的反应[6]。

也有越来越多的证据证明, 通过胞内游离钙离子浓度的升高引发细胞凋亡反应并非普遍现象。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

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

应[7]。Kluck 等用 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，而起决定作用的因素可能在于维系某一细胞生存的钙离子浓度的失衡[8]。Stewart 等[9]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。

本研究用 3 个不同的实验方法均未发现 THH 碱诱导后胞内游离钙离子浓度发生变化，因此 THH 碱诱导 Jurkat 细胞凋亡可能是通过另外的途径。许多实验显示，线粒体膜通透性转变孔道(Permeability transition pore, PTP)开放可造成线粒体膜电位的消散，引起线粒体内的高浓度钙离子外逸，进而造成胞内游离钙离子浓度增高[10]，然而本课题的另外的试验显示 THH 碱确实可以诱导线粒体膜电位降低，对这一非常有兴趣的问题值得进一步研究。

(感谢新桥医院临床药理基地徐颖硕士在昆明山海棠碱制取工作中给予的热情帮助。)

参考文献：

[1] 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.
[2] 杨录军，敖 琳，Nuesse Michael，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.
[3] 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.
[4] Grundler W，Dirscherl P，Beisker W，*et al*. Early functional apoptotic responses of thymocytes induced by Tri-n-butyltin[J]. Cytometry，2001，44(1)：45－56.
[5] 程锦轩. 钙的代谢及生理功能[A]. 见：刘景生 主编. 细胞信息与调控[M]. 北京：北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社，1998. 356－363.
[6] 敖 琳，曹 佳. 细胞凋亡中 Ca^{2+} 昆的分子靶点[J]. 癌变·畸变·突变，2001，13(3)：196－199.
[7] 彭黎明，王曾礼. 细胞凋亡的基础与临床[M]. 北京：人民卫生出版社，2000. 41－43.
[8] 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.
[9] 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.
[10] Francois Ichas，Jean-Pierre Mazat. From calcium signaling to cell death：two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high-conductance state[J]. Biochim Biophys Acta，1998，1366(1)：33－50.

(编辑 汪勤俭)

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2003)17-1520-01

小儿颈部结核冷脓肿误诊为甲状舌骨囊肿 2 例

Tuberculous abscess of the neck in children misdiagnosed as thyro hyoid cyst：Report of 2 cases

王 进[1]，柯振武[2] (成都军区总医院：[1] 耳鼻咽喉科；[2] 放射科，成都 610083)

患者，女性，汉族，13 岁，发现颈前区中下部包块 1 月，无发热，无咽喉疼痛及声音嘶哑。当患者后仰及扭颈时疼痛，且包块有渐增大趋势。入院查体：颈前正中环状软骨下可触及一包块，质中，约 2.5 cm×2.5 cm 大小，可推动，无压痛。彩超示甲状腺峡部上份一肿物，与甲状腺无明确关系。诊断为甲状舌骨囊肿。准备后局麻下行甲状舌骨囊肿摘除术，术中舌骨无关，在剥离囊肿时有白色稠状液体流出；吸净后，将囊肿摘除送病检。报告为炎性病变，后行 PCR 检测，证实为结核。后再次查体，又发现患者左侧胸锁乳突肌上段深面有一包块，约 2.5 cm×2.5 cm，质中等硬，表面光滑，可移动。鼻咽顶壁有一分叶状、凸凹不平物，活检示结核性肉芽肿。后患者转院行抗结核治疗。

患者，女性，汉族，6 岁，15 d 前某晚发现颈正中一包块，质软，疼痛拒触摸。患儿昼夜哭闹不止，伴咳嗽，但无发热及盗汗。查体：颈正中甲状舌骨膜处有一包块，约 2 cm×2 cm 大小，质软，穿刺抽出白色液体 25 ml，培养未见细菌生长，初步诊断甲状舌骨囊肿，术前心电图、胸片、血常规、肝、肾功检查未见异常，在全麻下手术，术中剥离囊肿时囊壁破裂，有白色液体溢出，吸净后摘除囊肿，发现与舌骨无关。术后伤口愈合差，一直有脓液流出，再次于 2 月 16 日取伤口内脓液培养未见细菌，血常规复查无异常，血沉：29 mm/h，抗酸刮片染色未见抗酸杆菌。后将脓液进行 PCR 检测，发现 TB-DNA 阳性特异片段，确定为

(下转 1523 页)

作者简介：王 进(1972－)，男，四川省遂宁市人，硕士，主治医师，主要从事耳鼻喉科方面的研究，发表论文 13 篇。电话：(028)6570392

收稿日期：2002-09-01；修回日期：2003-01-05

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