DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.17.011
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)17-1521-03

论著

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

赵钦军[1],杨录军[1],刘晋[illegible][1],杨学森[2],曹 佳[1],肖 卫[3] (第三军医大学预防医学系:[1]卫生毒理学教研室,[2]劳动卫生学教研室,重庆 400038;[3]兰州医学院劳动卫生与环境卫生学教研室,兰州 730000)

提 要:目的 探讨 Fas、caspase-8 在昆明山海棠碱(THH 碱)对 Jurkat 淋巴瘤细胞的凋亡诱导中的变化,以进一步研究 THH 碱诱导凋亡的分子机制。方法 采用 Annexin-V 标记和流式细胞术检测细胞的凋亡发生率,采用 western blotting 分析 FasL、caspase-7、caspase-8、Bid 等蛋白表达的变化。结果 THH 碱能有效诱导 Jurkat 细胞凋亡;在其凋亡过程中,FasL 逐渐表达增强、caspase-7、caspase-8、Bid 剪切激活,并呈时间依赖性。结论 THH 碱通过 Fas 受体-配体介导激活 caspase-8,caspase-8 再激活 caspase-7 和 Bid 等网络途径诱导 Jurkat 细胞凋亡。

关键词:昆明山海棠;细胞凋亡;caspase-7;caspase-8;Fas;Bid
中图法分类号:R282.71;R285.5;R730.263 文献标识码:A

Tripterygium hypoglaucum (Levl) Hutch alkaloids induce apoptosis of Jurkat lymphoma cells *via* the Fas receptor-mediated pathway

ZHAO Qin-jun, YANG Lu-jun, LIU Jin-yi, YANG Xue-sen, CAO Jia, XIAO Wei (Department of Hygiene Toxicology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the changes of Fas ligand (FasL) and caspase-8 during the apoptotic process of human lymphoma Jurkat T cells induced by Tripterygium hypoglaucum (Levl) Hutch (THH) alkaloids to study the molecular mechanisms of the apoptosis. Methods After Jurkat cells were induced by THH alkaloids, translocated phosphatidylserine was labeled with Annexin-V-Fluorescence; the apoptotic incidence was measured by flow cytometry; changes of the expressions of FasL, Bid, caspase-7 and caspase-8 proteins were determined by Western blotting. Results THH alkaloids could effectively induce the apoptosis of Jurkat cells. FasL expression was increased and caspase-8, caspase-7 and Bid were activated in a time-dependent manner after treatment with THH alkaloids. Conclusion THH alkaloids induce the apoptosis of Jurkat cells *via* the activation of caspase-7 and Bid through the FasL-mediated activation of caspase-8.

Key words: Tripterygium hypoglaucum (Levl) Hutch; apoptosis; caspase-7; caspase-8; Fas; Bid

已有的研究表明,THH 碱可通过线粒体途径诱导细胞凋亡,本研究将探讨 THH 碱通过 Fas 死亡受体途径的可能性。

1 材料与方法

1.1 THH 碱的提取

昆明山海棠总生物碱(简称 THH 碱)按文献[1]的方法提取。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。

1.2 主要试剂

Annexin-V-FLUOS,罗氏公司产品;碘化丙碇(Propidium Iodide, PI)、胰蛋白酶肽(Aprotinin)、亮抑制肽(Leuptetin)、胃蛋白酶抑制剂 A(Pepstain A)均为 Sigma 公司产品;兔抗人 FasL 多克隆抗体为 Santa Cruz 公司产品;兔抗人 Bid 多克隆抗体、兔抗人 caspase-7 多克隆抗体、鼠抗人 caspase-8 单克隆抗体、羊抗兔 IgG 抗体、羊抗鼠 IgG 抗体均为 Cell Singnaling Technology 公司产品;LumiGLOTM Reagent and peroxide 化学发光试剂盒为 PIERCE 公司产品。

1.3 细胞培养

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(杭州市四季青公司)。培养条件:37 ℃,相对湿度 90%,CO_2 浓度为 5%。细胞初始密度为 3.0×10^5/ml。

1.4 Annexin-V/PI 双标记

标记方法按说明书进行,步骤为:每样本收集 5×10^5 个细

基金项目: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:赵钦军(1974-),男,甘肃省通渭县人,硕士研究生,主要从事遗传毒理学方面的研究,现在兰州医学院劳动卫生与环境卫生学教研室,兰州 730000。
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

胞，离心去培养基，PBS 洗 1 次，加入含 PI 的 Annexin-V-Fluorescence 标记液，暗处室温标记 15 min，进行流式细胞仪（EPICS XL，Bekman Coulter 公司）检测。

1.5 总蛋白提取

细胞悬液离心，用冰冷的 PBS 洗涤细胞 1 次，细胞沉淀溶解于 RIPA 裂解液（1% NP40、10 mmol/L DOC、0.1% SDS、100 mmol/L NaCl、50 mmol/L Tris-Hcl、1 mmol/L PMSF、1 μg/ml Leupeptin、1 μg/ml Aprotinin、1 μg/ml Pepstatin A）中冰浴 20 min，离心（12 000× g，10 min）收集上清分装并保存于－80 ℃；Folin-Phenol 试剂分光光度法测定蛋白质浓度。

1.6 Western blotting 分析

40 μg 样品和相等体积上样缓冲液（100 mmol/ml Tris-HCl pH 6.8、200 mmol/ml DTT、4% SDS、2% 溴酚蓝、20% 甘油）混匀并在 100 ℃变性 5 min 后上样于 10%、12%或 15% SDS-PAGE 电泳分离，电转移至 PVDF 膜上，含有 5%脱脂奶粉的 0.1%TTBS 室温封闭 1 h，加一抗与膜在 4 ℃下共孵育过夜，室温下加 HRP 连接的羊抗兔或羊抗鼠二抗孵育 1 h，增强化学发光法检测。

2 结果

2.1 THH 碱对 Jurkat 细胞的凋亡效应

THH 碱诱导 Jurkat 细胞后，采用 Annexin-V-Fluorescence/PI 双标记的流式细胞仪检测结果可见有 3 个细胞群体，第 1 个群体是 PI 和 Annexin-V-Fluorescence 均低染（PI-、Fluorescence-），是正常细胞；第 2 个群体是 Fluorescence 高染而 PI 低染（PI-、Fluorescence+），属凋亡细胞；第 3 个细胞群体是 PI 和 Fluorescence 均高染（PI+、Fluorescence+），属凋亡后发展导致的坏死的细胞。

THH 碱在 5、10、25、50 μg/ml 等不同剂量下诱导 18 h 后，可见各剂量下均可有效诱导 Jurkat 细胞凋亡，10 μg/ml 组比 5 μg/ml 组有较大幅度的增加，具有良好的剂量依赖性，见图 1。THH 碱在 50 μg/ml 剂量下诱导后，随着处理时间的延长，细胞凋亡率呈直线型增加，18 h 时达到高峰，之后由于凋亡后继发坏死细胞增加，凋亡细胞率开始下降，见图 2。

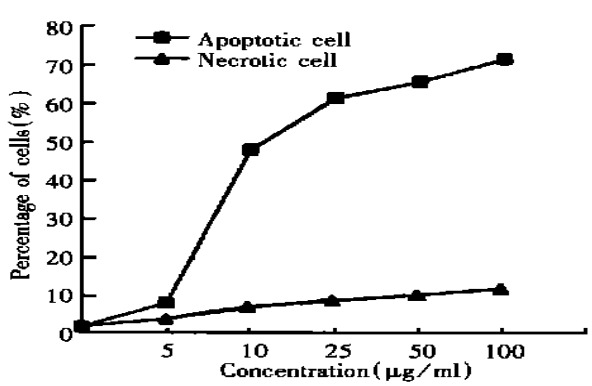


图 1 THH 碱诱导 Jurkat 细胞株凋亡的剂量依赖性（THH 碱均处理 18 h）

Fig 1 Dose-dependent apoptosis of Jurkat cells induced by THH alkaloids (18 h after treatment)

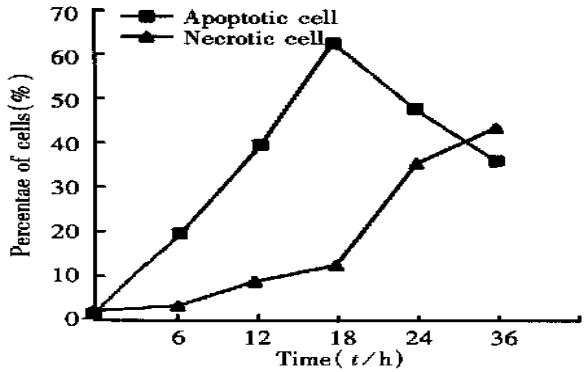


图 2 THH 碱（50 μg/ml）诱导 Jurkat 细胞凋亡的时间依赖性

Fig 2 Time-dependent apoptosis of Jurkat cells induced by THH alkaloids (50 μg/ml)

2.2 THH 碱对 FasL 和 caspase-8 蛋白表达的影响

50 μg/ml THH 碱处理细胞后，不同时间点检测的实验结果显示，胞浆内 FasL 蛋白的表达量随着 THH 碱处理时间的延长而增加。6 h 开始明显增加，18 h 时有大幅度增加，之后至 36 h 一直保持在高水平。

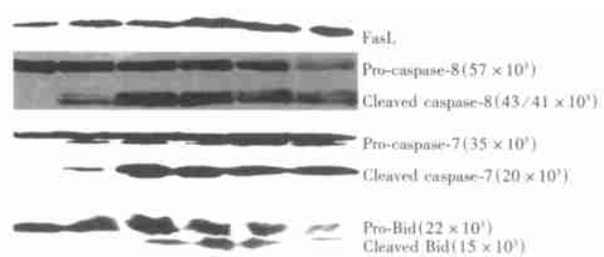


图 3 THH 碱在诱导 Jurkat 细胞凋亡过程中对 FasL 蛋白表达以及 caspase-8、caspase-7 和 Bid 剪切激活的变化

Fig 3 Effects of THH alkaloids on FasL, caspase-7, caspase-8 and Bid during the apoptotic process of Jurkat cells

Caspase-8 也随着 THH 碱处理时间的延长而增加。6 h 开始明显剪切活化，12 h 达最高峰并持续至 18 h，Pro- caspase-8（未剪切活化的 caspase-8 酶原）的量相应地减少；之后至 36 h，Pro-caspase-8 和其剪切活化产物均减少。

2.3 THH 碱对 Bid 蛋白表达和 caspase-7 剪切激活的影响

THH 碱诱导后，caspase-7 在 6 h 开始少量剪切活化，12 h 达最高峰，之后至 36 h 剪切活化的 caspase-7 含量逐渐降低。Bid 在 12 h 开始少量剪切活化，18 h 达最高峰，之后至 36 h 剪切活化的 Bid 含量逐渐降低。

3 讨论

近年来的研究积累了大量天然产物药物活性的资料，特别是对肿瘤的化学防治作用，这些化合物的作用包括抑制增生、抗炎、抗突变、诱导细胞分化和凋亡[2]。THH 是卫茅科雷公藤属植物，其主要成份有生物碱、色素剂类和萜类，其中生物碱在临床治疗上疗效最好

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

且毒副作用最小,因此研究其药理作用具有更为重要的实际意义[3]。本研究用 Annexin V/PI 双标记法[3]同样证实了 THH 碱具有很强的诱导 Jurkat 细胞凋亡的能力,呈明显的剂量和时间依赖性,且引起的细胞死亡具有不可逆性。

现认为凋亡蛋白酶通过两条途径被激活:受体介导途径(FasL 或 TNFα 介导)和线粒体途径[5],在受体介导途径中,Fas 配体与细胞膜上的 Fas 受体结合,受体-配体聚合后,死亡适配分子(Death adapter molecule)在细胞膜内面聚集形成聚合物,pro-caspase-8 随后也集聚在此聚合物上,并同时被激活。激活的 caspase-8 可剪切激活 caspase-3、caspase-7、Bid 蛋白等凋亡相关分子。Caspase-7 和 caspase-3 一样是主要的效应凋亡蛋白酶,它们剪切激活细胞内多种凋亡相关分子,包括依赖 caspase 激活的 DNA 酶[6],caspase-8 也可通过水解活化 Bid 蛋白作用于线粒体,诱导线粒体释放多种凋亡因子。

Fas 与 FasL 相结合是细胞凋亡的一条重要途径,已经发现,FasL 在淋巴系细胞中呈广泛表达,用临床治疗剂量的抗癌药物可诱导 FasL 的表达,FasL 通过与 Fas 受体交联以自分泌或旁分泌的方式介导细胞凋亡[7]。Fas 受体寡聚化可以诱导其与调节分子如 FADD 和 Pro-cspase-8 形成死亡诱导效应复合体(DISC),DISC 诱导 Pro-caspase-8 发生构象改变,引起 caspase-8 的自主水解激活,启动凋亡的蛋白酶级联[8]。

本研究结果显示,THH 碱在诱导 Jurkat 细胞凋亡的早期阶段(6 h),FasL 蛋白表达和 caspase-8 剪切激活均开始增加,说明 THH 碱诱导 Jurkat 淋巴瘤细胞凋亡中通过了 Fas/L、caspase-8 途径。

在 THH 生物碱诱导 Jurkat 细胞后 6 h,caspase-7 与 caspase-8 同期开始剪切激活;且于 12 h 与 caspase-8 同期达高峰,揭示 caspase-7 也被 caspase-8 剪切激活并参与其凋亡过程。Caspase-7 于 12 h 后呈降低趋势,这主要是由于随着凋亡的进一步发展,坏死细胞的数量增加所致。然而不同的是 Pro-caspase-7 蛋白的表达量并没有随着活性剪切形式 caspase-7 的上升而下降,推测 THH 可能通过别的途径诱导 Pro-caspase-7 蛋白的转录或翻译过程所致。

Caspase-8 也可通过水解活化 Bid 蛋白作用于线粒体从而激活线粒体途径。本研究结果显示,随着凋亡细胞比例的增加,Bid 酶原表达量明显地降低而 Bid 剪切激活则明显增加;12 h 后 Bid 开始激活,较 caspase-8 的激活启动延迟一个实验时间间隔 6 h;其剪切在 18 h 达到高峰并维持至 24 h。我室前期的结果也发现 THH 碱诱导 Jurkat 细胞凋亡的过程中线粒体参与了调控。

综上所述,THH 碱首先通过 Fas/L、caspase-8 途径启动 Jurkat 淋巴瘤细胞株的凋亡机制,随后 caspase-8 剪切激活凋亡效应蛋白酶 caspase-7 和线粒体凋亡途径的前期蛋白 Bid,Bid 参与启动线粒体凋亡途径。

参考文献:

[1] 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.

[2] Inayat-Hussain S H, Osman A B, Din L B, *et al*. Caspase-3 and -7 are activated in goniothalamin-induced apoptosis in human Jurkat T-cells[J]. FEBS Letter, 1999, 456(1): 379－383.

[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] Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, *et al*. A novel essay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V[J]. J Immunol Methods, 1995, 184(1): 39－51.

[5] Gottlieb R A. Mitochondria: execution central[J]. FEBS Lett, 2000, 482(1－2): 6－12.

[6] Liu X, Zou H, Slaughter C, *et al*. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis[J]. Cell, 1997, 89(2): 175－184.

[7] Friesen C, Herr I, Krammer P H, *et al*. Involvement of the CD95(APO-1/FAS) receptor /ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells[J]. Nat Med, 1996, 2(5): 574－577.

[8] Hengartner M O. The biochemistry of apoptosis[J]. Nature, 2000, 407(6085): 770－776.

(编辑　汪勤俭)

(上接 1520 页)

颈部结核冷脓肿,后出院行抗结核治疗。

讨论

儿童颈部正中出现结核性冷脓肿很少见。从我科收治的小儿颈部包块来看,甲状舌骨囊肿最多见[1],次为甲状腺囊肿,最后为颈部结核脓肿。甲状舌骨囊肿最常见的部位在舌骨附近。有时上端借小管通向舌盲孔,下端延伸到甲状腺,通过 B 超及同位素扫描不难作出诊断。但要确诊为颈部结核性冷脓肿却相当有难度。首先,耳鼻咽喉结核发生率低,原发性甚少,多继发于较严重的肺结核或其它器官的结核,通过接触,血行或淋巴途径传播。仔细询问患者病史(均无卡介苗接种,无盗汗)及胸片,均未提示结核感染;其次:只有条件比较好的医院才能进行聚核酶链反应(PCR)扩增筛选 TB-DNA,快速诊断结核,因为 PCR 具有极高敏感性和特异性。

从这两例病例,我们认识到近几年耳鼻咽喉结核发病率有上升趋势,遇到小儿颈部包块应详细体检(局部病变、耳、鼻、咽喉),进行胸片、PPD、血沉、痰及穿刺抽脓培养查找抗酸杆菌检查,B 超、同位素扫描,必要时利用 PCR 技术高度特异性排除 TB－DNA 存在,避免误诊误治,减轻患者身体、精神及经济损失。

关键词:结核冷脓肿;误诊;骨囊肿;舌骨
中图法分类号:R529.8　　文献标识码:B

参考文献:

[1] 黄选兆, 汪吉宝. 实用耳鼻咽喉科学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1998. 40－42.

(编辑　王　红)

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