DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.17.002
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)17-1501-04

论著

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

杨录军[1],敖 琳[1],Nuesse Michael[2],郭乔楠[3],徐 颖[4],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;第三军医大学:[3]附属西南医院病理学研究所,重庆 400038,[4]附属新桥医院临床药理基地,重庆 400037)

提 要:目的 检测昆明山海棠碱(THH碱)诱导Jurkat T淋巴瘤细胞的凋亡效应。方法 THH碱多剂量多时间点诱导Jurkat T淋巴瘤细胞细胞后,采用Annexin-V-Fluorescence标记膜外翻磷脂酰丝氨酸(Phosphatidylserine, PS)的凋亡细胞,同时荧光素PI标记坏死细胞,流式细胞术检测分别检测其阳性细胞率。同时采用判断凋亡发生的"金标准"——形态学观察方法观察其超微结构的改变。结果 THH碱诱导后磷脂酰丝氨酸外翻的细胞显著增加,有明显的时间和剂量相关性,超微结构观察可见大量细胞明显发生细胞体积缩小、核固缩、胞浆浓缩、凋亡小体形成等凋亡典型的形态特征。结论 THH碱能非常显著地诱导Jurkat T淋巴瘤细胞发生凋亡。

关键词:昆明山海棠;细胞凋亡;显微镜;电子;磷脂酰丝氨酸
中图法分类号:R282.71;R730.21;R730.263 文献标识码:A

Tripterygium Hypoglaucum (Levl) Hutch alkaloids induce the translocation of phosphatidylserine and ultrastructural changes of Jurkat T lymphoma cells

YANG Lu-jun[1], AO Lin[1], Nuesse Michaela[2], GUO Qiao-nan[3], XU Ying[4], 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 detect the apoptotic effect of Tripterygium Hypoglaucum (Levl) Hutch (THH) alkaloids on Jurkat T lymphoma cells. Methods After Jurkat cells were induced by THH alkaloids at different time points and different concentrations, translocated phosphatidylserine (PS) was labeled with Annexin-V-Fluorescence and the dead cells labeled with propidium iodide (PI). PS translocated cells and dead cells were measured with flow cytometry. The morphological changes, including ultrastructural changes, were observed. Results THH alkaloids could effectively induce the translocation of phosphatidylserine in time- and dose-dependent manners. Observation of the ultrastructural changes showed that there were a series of typical apoptotic changes, including decreased cell volume, apoptotic bodies, pyknosis and condensed cytoplasm. Conclusion THH alkaloids can effectively induce the apoptosis of Jurkat T lymphoma cells.

Key words: Tripterygium Hypoglaucum (Levl) Hutch; apoptosis; microscope; electron; phosphatidylserine

细胞凋亡(Apoptosis),是特殊的细胞死亡形式,是在基因控制下的主动死亡。细胞凋亡在许多人类疾病和治疗方面有着重要作用,凋亡失调是多种类型疾病的一个共同特征,因此凋亡机制研究越来越受到人们的重视[1]。

昆明山海棠[Tripterygium Hypoglaucum (Levl) Hutch,简称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以及其它种类的疾病,其毒性远小于雷公藤[2]。近年我室的研究首次发现THH水提取液能诱导多种细胞凋亡[3,4]。昆明山海棠的主要成分有生物碱、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[2],因此本研究进一步采用检测早期凋亡的敏感方法——细胞膜磷脂酰丝氨酸外翻[5]和凋亡"金标准"——显微和超微形态学观察研究昆明山海棠生物碱(THH碱)的凋亡效应。

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

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

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 T淋巴瘤细胞(Nuesse博士惠赠)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 Annexin-V + PI (Propidium Iodide)染色

该染色方法的基本原理是:磷脂酰丝氨酸(Phosphatidylserine, PS)在正常情况下位于胞膜的内侧;当细胞凋亡后,PS从胞膜的内侧翻转至外侧,即外翻。PS外翻后可与标记有Fluorescence的Annexin-V(Annexin-V-Fluorescence)高度亲和,从而被荧光标记。凋亡后继发坏死细胞因其胞膜的完整性遭到破坏,荧光素PI可进入细胞将细胞核标记。通过该方法染色后,凋亡细胞在488nm光激发下胞膜发绿色荧光,胞核无荧光;凋亡后继发坏死细胞的胞膜发绿色荧光,胞核发红色荧光。

Annexin-V-Fluorescence试剂盒购于Roche公司(Annexin-V-FLUOS, Cat. No.1 828 681))。染色方法按说明书进行,步骤为:每样本收集5×10^5个细胞,离心去培养基,PBS洗1次,加含PI(碘化丙啶,Sigma公司产品)的Annexin-V-Fluorescence标记液,暗处室温标记15 min,进行流式细胞仪检测,同时进行荧光显微观察。

1.4 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。

1.5 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。

1.6 超微结构观察

Jurkat细胞经25 μg/ml THH碱诱导后,分别在12 h和24 h时间点取样。取样后,离心去掉上清,4 ℃ PBS洗1次,4%戊二醛固定,1%锇酸后固定,然后进行常规的乙醇、丙酮梯度脱水和Epon-812浸透包埋,超薄切片,铅铀双染色后置透射电镜(JEM-2000型)下观察、摄影。

2 结果

2.1 检测磷脂酰丝氨酸外翻

2.1.1 流式细胞仪检测结果 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10、25、50、100 μg/ml等4个剂量均可诱导PS外翻和凋亡。10 μg/ml剂量下处理12 h后细胞PS外翻的阳性率已显著增加,高于10 μg/ml的其它3个剂量处理下6 h后细胞的阳性率已显著增加;之后,随着处理时间的增加,细胞的阳性率也继续增加。而正常对照一直保持在3%左右的本底水平。

THH碱处理细胞后可诱导细胞从凋亡走向坏死。各剂量组在12 h时其坏死细胞的阳性率即有明显增加,之后各剂量组的坏死细胞阳性率几乎直线增加。而正常对照一直保持在3%的本底水平。具有强烈的时间和剂量依赖关系,见图1。

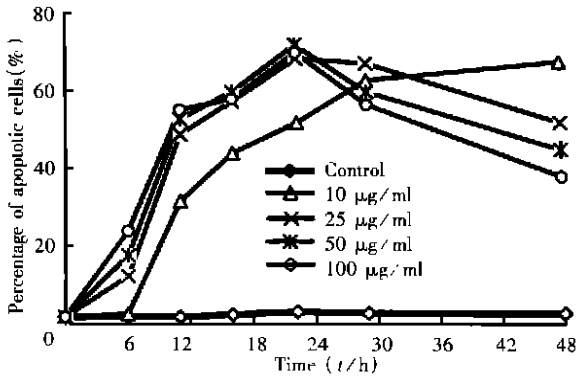


图1 THH碱诱导Jurkat细胞后凋亡后继发坏死的细胞百分率

Fig 1 Cell percentage of necrosis after apoptotic Jurkat T lymphoma cells induced by THH alkaloids

THH碱处理细胞后凋亡和凋亡后继发坏死的细胞总和的百分率随着处理时间的延长呈持续增加,在48 h后几乎全部死亡(凋亡+坏死),见图2。

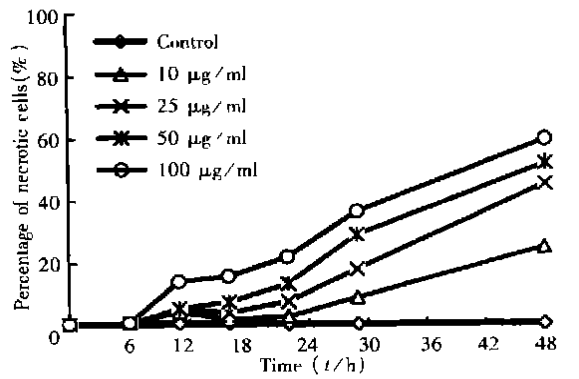


图2 THH碱诱导Jurkat细胞后凋亡细胞合并坏死细胞的百分率

Fig 2 Percentage of apoptotic and necrotic Jurkat T lymphoma cells induced by THH alkaloids

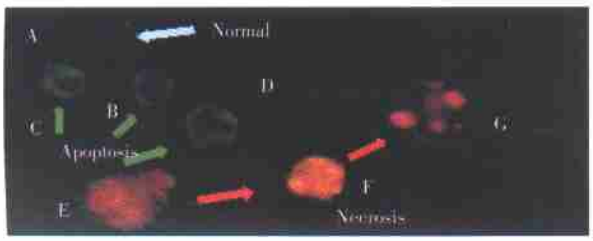
2.1.2 荧光显微镜观察 经THH碱处理后的细胞在荧光显微镜下可见磷脂酰丝氨酸外翻的细胞增加,即细胞膜标记上绿色荧光,细胞皱缩、染色质凝集等凋亡特征;随着诱导时间的延长,坏死细胞逐渐增加,即细胞膜破损后PI可进入细胞染胞核为红色荧光,核碎裂细胞增加。见图3。

2.2 超微结构观察

THH碱25 μg/ml诱导Jurkat细胞后,在0(对照)、12、24 h时相点取样进行透射电镜观察。除0 h(对照)外,THH碱诱导后电镜下可见细胞体积缩小、核固缩、异染色质结块边集呈新月形,胞浆浓缩,电子密度增大,核裂解,凋亡小体形成等多种典

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

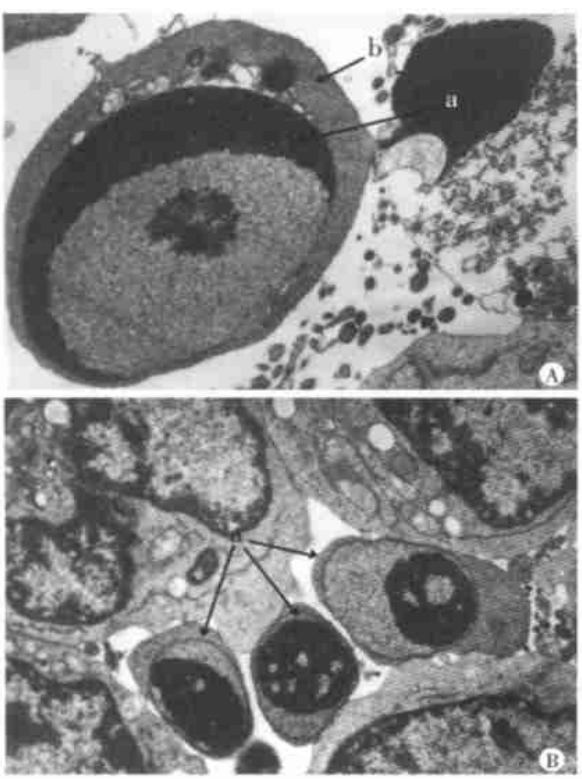
型的凋亡形态学变化, 见图 4。镜下可见 24 h 时间点样本比 12h 时间点样本的细胞凋亡率更高。



A: Normal cell, which can not be seen because of no fluorescence in the cell; B-D: Apoptotic cells: plasma membrane is stained with green fluorescence due to phosphatidylserine expression in apoptotic cells; C and D: Shrinking membrane; E-G: Necrotic cells after apoptosis(stained by PI); F: Condensed nucleus; G: Fragmentary nucleus. The changes from E to G show the apoptotic process (red arrow) instead of the gradually changing process of one cell(Laser scan cytometer, × 40)

图 3　THH 碱诱导 Jurkat 细胞后凋亡形态学特征, Annexin-V-Fluorescence (green) / PI(red)

Fig 3　Morphological features of apoptotic Jurkat T lymphoma cells induced by THH alkaloids (25 μg/ml, 24h). Cells are stained with Annexin-V-Fluorescence (green) and Propidium Iodide (PI, red)



A: (a) marginate chromatin to form a crescent; (b) condensed cytoplasm (TEM× 6 000); B: (a) typical apoptotic cells with condensed cytoplasm and chromatin (TEM× 4 000)

图 4　THH 碱诱导 Jurkat 细胞后的超微结构变化

Fig 4　Ultrastructural changes of Jurkat T lymphoma cells induced by THH alkaloids

3　讨论

机体细胞的增殖与死亡(坏死、凋亡)过程达到动态平衡是维护其自身恒定的必要条件, 细胞凋亡过度或不足可导致多种疾病: ①肿瘤: 如 B 淋巴细胞瘤、白血病、前列腺癌、乳腺癌、原发性肝癌等; ②神经系统疾病: 如 Alzheimer 病、肌萎缩、侧索硬化症等; ③心脏疾患: 如局部缺血性心脏损伤, 化疗诱导的心肌抑制等; ④免疫系统疾病: 如艾滋病(AIDS)、Ⅰ型糖尿病、红斑狼疮、Sjogren 综合征、肾小球肾炎等[1]。这些疾病严重困扰着人类的生存和健康, 而传统的治疗药物在根治方面效果甚微, 多数情况下仅是一种姑息治疗, 而它们强烈的毒副作用又是一个难以解决的问题, 这些不仅给患者带来很大痛苦, 而且给患者家庭和社会带来多方面的损失。

在世界范围内, 药物的研究已逐渐转向天然动植物, 我国传统的中医中药已越来越受到人们的青睐, 中医中药治疗肿瘤和其它疾病已成为治疗领域的一大特色。但是中医治疗开展扶正培本、清热解毒、活血化瘀等治疗理论必须与现代生物学技术相结合, 才能为治疗和预防提供可靠的科学机制。

现已发现许多中药和其它天然动植物具有强烈诱导细胞凋亡的作用。如砷剂、喜树碱、紫杉醇等, 它们不仅在国内受到重视, 而且在国外也开始受到关注, 显示出诱人的前景。研究表明抗白血病药物砷剂(As_2O_3)对急性早幼粒细胞白血病(APL)细胞有促进细胞凋亡、诱导分化的作用, 经临床观察 CR(完全缓解)率高, 且不引起出血和骨髓抑制, 能下调 bcl-2 基因表达[6,7]。紫杉醇能诱导多种细胞凋亡[8], 在临床上用于治疗卵巢癌、乳腺癌、肺癌等多种肿瘤[9]; 喜树碱能诱导 Hale 宫颈癌细胞等细胞凋亡, 在临床上用于治疗胃癌、宫颈癌、卵巢癌等。对这类植物药成分的分离分析和生物机制研究推动这类药物的临床应用, 开辟了肿瘤治疗的新领域, 如喜树碱、紫杉醇已被美国 FDA 批准在临床上使用, 而且已用于治疗其它药物无效的肿瘤[10]。

THH 是一种有毒中药, 与雷公藤同属, 但毒性较雷公藤小得多, 具有抗炎、抗肿瘤等作用。我室前期实验发现 THH 水提取液能有效诱导 Jurkat 细胞、CHE 细胞、NIH_3T_3 细胞和 HL-60 细胞凋亡, THH 碱可诱导 HL-60 细胞 bcl-2 mRNA 表达下调和凋亡[11]。本研究结果证实 THH 碱在诱导 T 淋巴瘤细胞凋亡的早期阶段细胞膜发生 PS 外翻, 并且随着凋亡的进一步发展, 细胞逐渐发生胞膜破损、胞体皱缩、染色质凝聚、核裂解、凋亡小体形成等一系列非常典型的凋亡特征性改变, 有

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

非常明显的量效和时效关系，是一种非常强烈的凋亡诱导剂，提示 THH 碱通过进一步研究有可能开发成为一种抗肿瘤新药。

参考文献：

[1] Nicholson D W. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents[J]. Nature, 2000, 407(6805): 810－816.
[2] 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.
[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] 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.
[6] 李 晔, 刘春艳. 含砷中药癌灵 1 号治疗早幼粒细胞性白血病的研究进展[J]. 中医药学报, 1999, 3(1): 56－57.
[7] 安 艳, 高增林. 砷作用机制研究进展[J]. 国外医学卫生学分册, 2001, 28(2): 79－81.
[8] 王海燕, 李运曼, 刘国卿. 紫杉醇抗癌机制研究进展[J]. 药学进展, 1999, 23(4): 209－214.
[9] 运乃茹, 秦 俭. 紫杉醇类抗癌药的临床研究进展[J]. 天津中医学院学报, 2000, 19(1): 53－54.
[10] 郭 鹏. 喜树碱类抗癌药的研究进展[J]. 武警医学院学报, 2001, 10(3): 255－258.
[11] 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.

（编辑 汪勤俭）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2003)17-1504-02

五味祛风湿消痛灵抗炎、镇痛作用的实验研究

Experimental study on anti-inflammatory and analgesic action of WWFSL

王利彦[1]，车胜荣[1]，周军兰[2]，王津慧[1]（[1] 青海医学院药理学教研室，西宁 810001；[2] 北京大学医学院，北京 100083）

五味祛风湿消痛灵（简称五味风湿灵，用符号 WWFSL 表示）是由雪莲、多刺绿绒蒿、伸筋草、骨碎补、刺五加等中藏药配伍组成[1]，方中各药均有祛风利湿、舒筋活络、强筋骨、抗炎镇痛作用，为验证该配方的药效学，我们进行了抗炎、镇痛等动物实验研究。现报告如下。

1 材料

药品与试剂：五味祛风湿消痛灵，制备方法：用 90％乙醇回流 3 次提取其活性物，提取液放冷，过滤，滤液减压下浓缩至糖浆状，然后将其放到 80 ℃水浴中浓缩成浸膏剂（3.8 g 生药/g），临用前用蒸馏水稀释至所需浓度；跌打丸（青海三普药业股份有限公司生产，批号：010216）；角叉菜胶（美国 Sigma 公司生产，批号：150400）；巴豆油（本院植化室协助制备）。

动物：Wistar 大鼠，雌雄兼用，体质量（140±20）g；昆明种小鼠，雌雄兼用，体质量（20±2）g（青海省实验动物中心提供）。

统计学方法：两组间比较采用 t 检验。

2 方法与结果

2.1 抗炎实验

2.1.1 对二甲苯致小鼠耳壳肿胀的影响实验 参照文献[2,3]取小鼠 40 只，随机均分为 4 组，即：生理盐水组、阳性药跌打丸组、五味风湿灵高、低剂量组，口服，1/d，连续 5 d，末次给药后将二甲苯 0.04 ml 涂于小鼠左耳壳两面致炎，30 min 后处死小鼠，剪耳，打孔、称重，求其抑制率。

结果表明，五味风湿灵对二甲苯引起的耳部肿胀有明显抑制作用，可使充血、水肿减轻（$P<0.01$）。

2.1.2 观察对大鼠角叉菜胶致足跖肿胀的影响 参照文献[2,3]取大鼠 32 只，随机均分为 4 组（同上），口服，1/d，连续 5 d。致炎前测定大鼠足跖体积，末次给药后，于各组鼠右后足跖皮下注射 1％角叉菜胶 0.1 ml，于致炎后 1、2、3、4、5、6 h 测右后足跖体积，用致炎前、后体积之差作为肿胀度。

结果表明，五味风湿灵对角叉菜胶引起的足跖肿胀急性炎症有明显的抑制作用，疗效至少能维持 6 h 以上（$P<0.01$）。

2.1.3 对大鼠肉芽肿的影响[2,3] 用巴豆油气囊法（N_2），取大鼠 40 只，随机均分为 4 组，每鼠于背部肩胛区皮下注射 20 ml N_2 形成气囊，并向气囊内注入 1％巴豆油 0.5 ml，致炎 24 h 后口服给药，连续 6 d，第 7 天处死。

结果表明，五味风湿灵对肉芽肿和囊内渗出液有明显抑制作用（$P<0.01$）。

2.2 镇痛实验

2.2.1 热板法 参照文献[3,4]，用（55±0.5）℃热板筛选合格的雌性小鼠 40 只，随机均分 4 组，重测痛阈值，口服，连续 7 d，末次给药后 1、2、3、4、5、6 h 测痛阈值。

结果表明，五味风湿灵能延长小鼠热板法的疼痛反应时间，而且高剂量组作用强于阳性对照组（$P<0.01$）。

（下转 1510 页）

作者简介：王利彦（1963－），女，天津人，副教授，主要从事中藏药药理研究工作，发表论文 20 余篇。电话（0971）6152718

收稿日期：2003-01-21；修回日期：2003-05-06

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