DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.17.008
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)17-1515-03

论著

# 昆明山海棠碱诱导 Jurkat 淋巴瘤细胞核 DNA 链断裂和 DNA 片段化

杨录军[1],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 探讨昆明山海棠碱对淋巴瘤细胞核 DNA 的影响,以了解 THH 碱诱导细胞凋亡的机制。方法 THH 碱诱导 Jurkat 细胞后,TUNEL 荧光标记 DNA 链断裂,细胞 DNA 含量分析方法分析 DNA 片段化,均以流式细胞术检测。结果 THH 碱能诱导 Jurkat 淋巴瘤细胞 DNA 链断裂,之后 DNA 发生片段化。结论 提示在 THH 碱诱导 Jurkat 凋亡过程中,核 DNA 发生重要变化。

关键词:昆明山海棠;细胞凋亡;DNA 含量;DNA 断裂;TUNEL
中图法分类号:R282.71;R730.21;R730.263 文献标识码:A

# Tripterygium Hypoglaucum (Levl) Hutch alkaloids induce DNA strand breaks and DNA fragmentation in Jurkat T lymphoma cells

YANG Lu-jun[1], Nuesse Michael[2], AO Lin[1], CAO Jia[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 investigate the effects of Tripterygium Hypoglaucum (Levl) Hutch alkaloids on the nuclear DNA strand breaks and DNA fragmantation in Jurkat T lymphoma cells to understand the mechanisms of the apoptosis. Methods After Jurkat cells were induced by the alkaloids, DNA stand breaks were labeled by TUNEL assay and DNA fragmentation was analyzed by DNA content analysis. Flow cytometry was performed to determine these phenomena. Results THH alkaloids could effectively induce DNA stand breaks and DNA fragmentation. Conclusion There are great changes in nuclear DNA in the apoptosis of Jurkat T lymphoma cells induced by THH alkaloids.

**Key words**: Tripterygium Hypoglaucum (Levl) Hutch; apoptosis; DNA content; DNA strand breaks; TUNEL

细胞凋亡启动后,细胞将会发生一系列生化和形态方面的特征性变化,其下游事件中,DNA 断裂并出现DNA 片段化是凋亡的一个重要特征。本研究将以 Jurkat T 淋巴瘤细胞株为对象,分析昆明山海棠[Tripterygium Hypoglaucum (Levl) Hutch, THH]碱对 DNA 断裂和片段化的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 THH 碱的准备

昆明山海棠碱的提取在第三军医大学附属新桥医院药理基地完成。实验前将昆明山海棠碱干粉先溶于 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 T 淋巴瘤细胞株进行实验。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%。每培养样本采用含 4ml 细胞悬液的细胞培养皿,细胞初始密度为 $3.0\times10^5$/ml。

### 1.3 DNA 断裂检测

采用末端脱氧核苷转移酶介导的脱氧尿苷缺口末端标记法[TUNEL, Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)mediated BrdUTP Nick End Labeling],按试剂盒(Pharmingen 公司,APO-BRDUTM, CAT. No. 6576KK)提供的方案进行,步骤为:取含 $1\times10^6$ 个细胞的细胞悬液,离心去上清,4 ml PBS 洗 1 次,0.5 ml PBS 重新悬浮细胞沉淀,加 1%多聚甲醛固定液固定至少 24 h,离心去固定液,5 ml PBS 洗涤细胞 2 次,加 Br-dUTP (溴脱氧尿苷)和 TdT(末端脱氧核苷转移酶),37 ℃水浴 1 h,Rinsing 缓冲液洗涤细胞 1 次,加标有 FITC 的抗 Br-dUTP 二抗室温孵育 30 min,Rinsing 缓冲液洗涤细胞 1 次,加含适量 RNA 酶和 PI(碘化丙啶)缓冲液孵育细胞 30 min,随即进行流式细胞仪检测。

### 1.4 DNA 片段化的检测

按 Nüsse[11] 的方案进行,步骤为:取含 $1\times10^6$ 个细胞的细胞悬液,离心去上清,加 1 ml 溶液 I (584 mg/L NaCl, 1 g/L Natrium Citrate, 10 mg/L RNase, 0.3 ml/L NP-40, 25 mg/L EB)重悬细胞,室温孵育 1 h,加 1 ml 溶液 II (15 g/L Natrium Citrate, 0.25 mol/L

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

Sucrose, 40 mg/L EB), 室温孵育 1 h, 置于 4 ℃暂时保存后进行流式仪检测。

### 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 的荧光, 以 575 nm 带通滤光片接收 PI 或 EB 的荧光。每个样本记录 10 000 个细胞。采用 DAS4.40 软件[2] 进行数据分析。

## 2 结果

### 2.1 DNA 断裂分析

在 THH 碱多剂量诱导后的多时间点进行了检测。12 h 前各剂量组均未发生 DNA 断裂, 处于本底水平。12 h 后 DNA 断裂开始逐渐增加; 18 h 可见明显增加; 18～24 h 时大幅度增加; 24 h 后仍继续增加且逐渐具有良好的剂量依赖关系。36 h 后高剂量 THH 碱诱导后的细胞已大量死亡和破裂, 故未再进行检测。结果见图 1。

### 2.2 DNA 片段化的测定

对单剂量(50 μg/ml)THH 碱诱导后的多时间点进行了检测。THH 碱诱导 4 h 后 DNA 片段化开始发生, 但发生率很低, 之后大幅度增加, 至 6 h 时发生率增加到 7.7%, 再之后增加缓慢, 至 12 h 达到高峰(10.9%), 其后进入平台期, 保持在 11% 左右。见图 2、3。

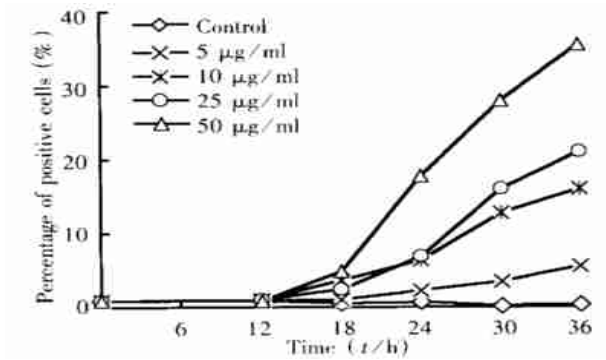
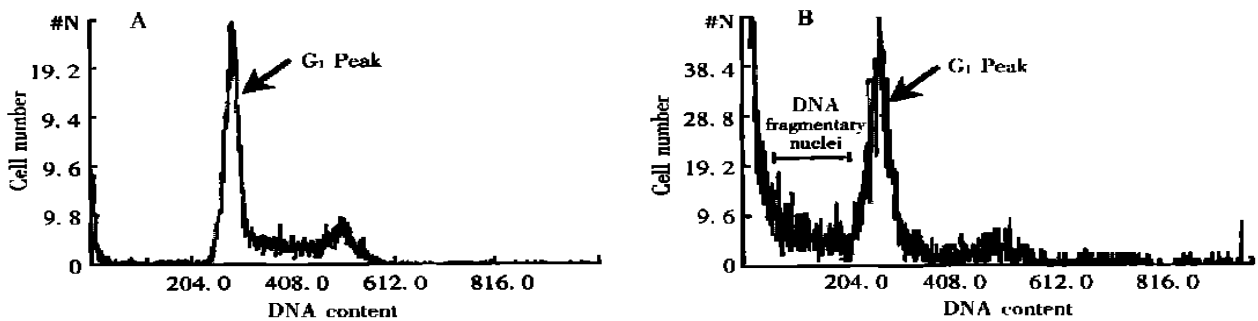



图 1 THH 碱诱导 Jurkat T 淋巴瘤细胞后的 DNA 断裂细胞率的变化

**Fig 1 Percentage of positive cells in Jurkat T lymphoma cells with DNA strand breaks after induction of the cells by THH alkaloids**




A: Control; B: THH(50 μg/ml, 20 h)

图 2 流式细胞仪检测 THH 碱诱导 Jurakt T 淋巴瘤细胞发生 DNA 片段化分析结果图

**Fig 2 Flow cytometric analysis of DNA fragmentation in Jurkat T lymphoma cells induced by THH alkaloids**

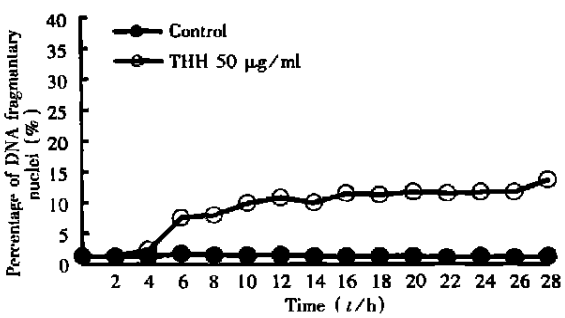



图 3 THH 碱诱导 Jurkat T 淋巴瘤细胞 DNA 片段化

**Fig 3 The DNA fragmentation of Jurkat T lymphoma cells induced by THH alkaloids**

## 3 讨论

细胞凋亡是细胞内在固有的"自杀"消亡方式, 具有特异的形态、生化和分子生物学特征, 其中典型的形态学特征包括染色质和胞质的凝聚, 随后发生的细胞核碎解, 含有核物质、胞质和完整细胞器的凋亡小体形成, 凋亡小体由胞膜包裹。凋亡过程关键生化事件是细胞核的裂解: $Ca^{2+}$/$Mg^{2+}$ 依赖性的内源性核酸内切酶的激活导致染色质 DNA 在核小体连接部位断裂, 继而形成单倍或多倍于 180～200 bp 的寡核苷酸片段, 这在琼脂糖凝胶电泳中可检测到典型的梯状带(DNA ladder)[3]。DNA 断裂和片段化是细胞凋亡的下游事件, DNA 断裂是不可逆的致死性损伤, 之后细胞形成凋亡小体, 走向生命的终点。

DNA 断裂的大量发生主要在凋亡过程中, 而不是细胞坏死的过程中, 因而 TUNEL 可用来检测细胞凋亡[4]。TUNEL 标记法能检测 DNA 断裂, TdT 酶可将脱氧核苷 dUTP 加到 DNA 的断端 3′OH 上, 然后用荧光素标记的抗体来检测(间接法)。本试验采用的间接法比

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

直接将荧光素标记在 dUTP 上的直接法具有更高的敏感性[5]。通过分析核 DNA 含量来检测 DNA 片段化是一个简单的经典方法, 细胞膜打孔后 DNA 片段化形成的寡核苷酸片段可逸出细胞, 因而其 DNA 含量比正常核 DNA 含量减少[6]。

本研究的 2 个实验结果显示 THH 碱能显著地诱导 Jurkat T 淋巴瘤细胞 DNA 断裂和 DNA 片段化, 提示在其凋亡过程中 DNA 在 caspase 等凋亡因子的作用下发生了不可逆转的变化。

在凋亡的效应阶段, 胞内核酸内切酶剪切核 DNA 形成大量 DNA 单链和双链断裂, 之后断裂的 DNA 游离至胞浆中, 即发生 DNA 片段化。由于剪切位点在核小体之间的连接区(Linker DNA), 因此片段为单体或寡聚核小体 DNA 片段。我室前期研究已观察到 THH 碱诱导的 DNA 典型梯状带[7], 本研究 TUNEL 结果显示, 见图 1, 50 μg/ml 等剂量的 THH 碱诱导后 12 h DNA 断裂开始大幅度增加, 而 DNA 含量分析结果显示, 见图 3, 在 50 μg/ml 剂量 THH 碱诱导后 4 h 即开始大幅度增加, 可见在 THH 碱诱导凋亡的早期, DNA 断裂点较少, TUNEL 还不足检测到, 但此时已有部分细胞的 DNA 断裂成较大 DNA 的片段。在 TUNEL 的实验结果中还显示, 在细胞已死亡的末期(36 h 时)仍有 50%以上的细胞未发生大量 DNA 断裂, 说明部分细胞的凋亡在非大量 DNA 断裂的情况下进行。DNA 含量分析结果显示, 凋亡核(失去部分 DNA 的核)发生率在 12h 以前不断增加, 但 12 h 后趋于一个平台期, 可能是凋亡后期细胞大量破解, 形成凋亡小体和细胞碎片, 以致这部分细胞逃逸检测范围, 在流式细胞仪结果图, 见图 2 可看到大量细胞碎片位于低荧光强度的一侧可证明这一点。

我们报道 THH 碱在 50 μg/ml 剂量下诱导后 6 ~ 8 h 后凋亡的早期标志细胞膜磷脂酰丝氨酸外翻显著增加(发生率为 18%)、caspase-3 活化(发生率为 37%)[8,9], 而 TUNEL 的实验结果显示 18 h 后 DNA 断裂才开始发生(发生率为 4.8%), 提示 THH 碱是先启动细胞膜磷脂酰丝氨酸外翻和 caspase-3 活化, 之后发生 DNA 断裂, 细胞走向死亡。

(致谢: 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] Nüsse M, Marx K. Flow cytometric analysis of micronuclei in cell cultures and human lymphocytes: advantages and disadvantages[J]. Mutat Res, 1997, 392(1—2): 109—115.

[2] Beisker W. A new combined integral-light and slit-scan data analysis system (DAS) for flow cytometry[J]. Comput Methods programs Biomedi, 1994, 42: 15—26.

[3] Martin S J, Green D R, Cotter T G. Dicing with death: dissecting the components of the apoptosis machinery[J]. Trends Biochem Sci, 1994, 19(1): 26—30.

[4] Gold R, Schmied M, Giegerich G, *et al*. Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of in situ tailing and nick translation techniques[J]. Lab Invest, 1994, 71(2): 219—225.

[5] Darzynkiewicz Z, Juan G, Li X, *et al*. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis)[J]. Cytometry, 1997, 27(1): 1—20.

[6] Bertho A L, Santiago M A, Coutinho S G. Flow cytometry in the study of cell death[J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2000, 95(3): 429—433.

[7] 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.

[8] 杨录军, 敖　琳, Nuesse M, 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.


(编辑　汪勤俭)

(上接 1514 页)

肠多见, 共 8 例, 空肠 3 例, 十二指肠 1 例。

## 3　讨论

下消化道出血要明确病因和部位非常困难, 而出血又以小肠多见, 出血源以肿瘤和血管扩张多见, 不同年龄其出血的部位也多不同。诊断的主要方法为钡灌肠法和内镜, 选择性腹腔动脉造影是诊断胃肠道出血的有效手段, 但其适于正在出血且出血量大于 0.5 ml/min, 核素扫描虽可检出小量出血(大于 3 ml/h), 但其定性及定位诊断的阳性率不高, 消化道钡餐和气钡双重造影也是一种重要的检查手段, 范围局限易漏诊。而术中肠镜检查不仅能发现小肠出血的病变部位, 同时也可立即取活检组织送冰冻切片病理检查以明确病变性质及范围, 有助于决定手术方式。因此, 认为术中肠镜检查是一种准确、安全而实用的检查方法, 在小肠出血的诊断中有一定的临床价值。

关键词: 纤维结肠镜; 诊断; 小肠出血
中图法分类号: 574.504　文献标识码: B

## 参考文献:


[1] 蔡伟耀. 原因不明的消化道出血诊断基础及进展[A]. 见: 吴云林. 胃肠病学临床进展[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1999. 103—108.

[2] 黎忠信. 胃癌所致上消化道出血的临床分析[J]. 腹部外科, 1991, 1(4): 17.

[3] 黄小荣, 张　齐. 消化道溃疡并发出血 1316 例临床分析[J]. 中华消化内镜杂志, 1999, 16(3): 18—19.

[4] Lala A K, Sitara V, Perakath B, *et al*. Intraoperative enteroscopy in obscure gastrointestinal hemorrhage[J]. Hepatogastroentrology, 1998, 45(5): 597—602.


(编辑　郭建秀)

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