DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.14.003
第25卷第14期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 14
2003年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2003

文章编号:1000-5404(2003)14-1223-04

论著

四肽AC-DEVD-CHO对硫芥诱导淋巴细胞凋亡的干预作用

赛 燕[1],刘 勇[1],朱明学[2],张黎明[2],董兆君[1] ([1]第三军医大学预防医学系军事毒理学教研室,重庆 400038;[2]第二军医大学海医系,上海 200433)

提 要:目的 探讨caspase-3活性在硫芥诱导淋巴细胞凋亡中的变化和其四肽抑制剂AC-DEVD-CHO对细胞凋亡的干预作用。方法 荧光分光光度法检测caspase-3活性变化,琼脂糖凝胶电泳和流式细胞仪分别检测DNA ladder,细胞凋亡率。结果 硫芥可诱导淋巴细胞caspase-3活性升高,其多肽抑制剂可部分阻断细胞凋亡,主要表现在抑制剂作用下DNA ladder现象减弱,细胞凋亡百分数下降。结论 硫芥通过激活caspase-3诱导淋巴细胞凋亡,其多肽抑制剂对淋巴细胞凋亡具有干预作用。

关键词:四肽;硫芥;凋亡;胱氨酸蛋白酶-3
中图法分类号:R341.6;R392.12;R827.17+4 文献标识码:A

Interventional effect of tetrapeptide on sulfur mustard-induced lymphocyte apoptosis

SAI Yan, LIU Yong, ZHU Ming-xue, ZHANG Li-ming, DONG Zhao-jun (Department of Military Toxicology, Third Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the changes of caspase-3 activity and the interventional effect of tetrapeptide AC-DEVD-CHO on sulfur mustard-induced apoptosis of lymphocyte. **Methods** The activity of caspase-3 was detected by fluorospectrophotometry. DNA ladder and apoptosis were detected by DNA agarose gel electrophoresis and flow cytometry. **Results** Sulfur mustard enhanced the activity of caspase-3 and its polypeptide inhibitor (AC-DEVD-CHO) partially blocked apoptosis, which was mainly presented as an obscure phenomenon of DNA ladder and a decrease in percentage of apoptosis. **Conclusion** Sulfur mustard can induce the apoptosis of lymphocyte by means of activating caspase-3. The inhibitor may have an interventional effect on lymphocyte apoptosis induced by sulfur mustard.

Key words: tetrapeptide; sulfur mustard; apoptosis; caspase-3

免疫系统抑制在硫芥的细胞毒作用机制中具有重要意义,诱导过量淋巴细胞凋亡是该作用的主要原因。近几年许多研究表明天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(Caspases)在细胞的凋亡机制中具有重要意义。至今为止,已有编码10余种caspases酶的cDNA被克隆,是近年来发现的与细胞凋亡关系极为密切的一组蛋白酶。Caspases家族的各成员的底物识别序列具有差异性,根据半胱天冬氨酸蛋白酶caspase-3的特异性底物识别序列Asp-Glu-Val-Asp设计合成的AC-DEVD-CHO,可选择性地抑制caspase-3。该物质的化学结构主要部分为四肽,N末端连接乙酰化基团,可增加其稳定性;C末端连有醛基,可保证其抑制活性[1,2]。本实验利用大鼠脾脏淋巴细胞中毒模型,以caspase-3特异性四肽抑制剂AC-DEVD-CHO阻断其细胞凋亡信号传导通路,以评价该四肽对硫芥诱导淋巴细胞凋亡的干预效果,为寻找硫芥中毒损伤的防治措施提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

硫芥(军事医学科学院六所提供,纯度为97.5%);淋巴细胞分离液(北京TBD生物技术中心),RPMI1640培养液,D-Hanks液等(Hyclone公司);PI,蛋白酶K, Rnase A,AC-DEVD-CHO等(Sigma公司);caspase-3荧光检测试剂盒(Clontech公司);其他药品及试剂均为美国Sigma公司产品或国产AR级试剂。

1.2 仪器设备

Calibur流式细胞仪(BD公司);细胞培养箱(美国);低温高速冷冻离心机(武汉);全自动天平(上海);电泳仪、电泳槽(北京六一仪器厂);紫外分光光度计(日本岛津);电泳凝胶成像系统(美国UVP);荧光分光光度计(上海分析仪器厂)。

基金项目:全军"十五"重点课题(01L054)
作者简介:赛 燕(1976-),女,山东省威海市人,硕士研究生,主要从事军事毒理学方面的研究。电话:(023)68752285
通信作者:董兆君,电话:(023)68752285
收稿日期:2003-03-12;修回日期:2003-05-20

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

1.3 淋巴细胞的培养及处理

健康成年Wistar大鼠，雌雄各半，体质量(250±50)g，由第三军医大学实验动物中心提供，无菌剖腹取脾，淋巴细胞的分离培养参照文献[3]略加改进。大鼠称重，戊巴比妥钠麻醉，无菌剖腹取脾，剪碎后用适量D-Hanks液冲洗，100目尼龙网过滤，1 500 r/min 5 min离心，加适量的红细胞裂解液，置冰上5 min，离心弃上清，再加入适量的RPMI1640培养液制成脾细胞悬液，淋巴细胞分离液分离，2 000 r/min 20 min离心，用吸管吸取中层细胞，适量培养液洗3次。用台盼蓝检测细胞活性>95%，调整细胞密度培养于RPMI1640培养液中，置于含有5% CO_2、37 ℃恒温培养箱内孵育。分离的淋巴细胞培养至对数生长期，为除去所含单核细胞对淋巴细胞的影响，收集非粘附细胞(淋巴细胞)，调整细胞密度为$2\times10^6\sim2\times10^7$/ml。

1.4 检测指标

1.4.1 细胞内caspase-3活性检测 实验方法参照试剂盒说明书进行，具体操作如下。

1.4.1.1 细胞凋亡的诱导 培养细胞加入一定体积的硫芥，使其终浓度为100 μmol/l，分别培养至24、9、3 h，并设立正常实验对照，抑制剂组对照。根据实验要求每个时相点设立3组平行对照。培养细胞至各组时相点后收集洗涤细胞，检测细胞。

1.4.1.2 Caspase-3含量的检测 将上述各组细胞分别转移至1.5 ml EP管中，以1 500 r/min离心5 min。弃上清，再加50 μl冰冷的细胞裂解液重悬细胞。冰浴10 min，取出，以12 000 r/min，4 ℃离心3 min沉淀细胞碎片。将上清液转至另1个新的EP管中，置冰上孵育。此时，在抑制剂组的淋巴细胞管，加入50 μl，2× 反应缓冲液(临用前加入0.5 μl，1 mol/l的DTT，使其终浓度为10 mmol/L)，和1 μl的caspase-3抑制剂AC-DEVD-CHO，37 ℃水浴30 min，作为对照。其余样本仍置于冰上孵育。随后，向上述冰浴中的剩余样本，加入50 μl，2× 反应缓冲液(临用前加入0.5 μl，1 mol/L的DTT，使其终浓度为10 mmol/L)。最后向每个样本管中，加终浓度为50 μmo/L的结合底物(DEVD-AFC)5 μl，置37 ℃水浴60 min。

1.4.1.3 Caspase-3荧光单位的测定 将水浴后的各管待测样本，于荧光光度计上读取荧光强度。测定中所用激发波长(Ex)为400 nm，发射波长(Em)为505 nm，狭缝宽度为5 nm，每孔读取的时间为0.3 s。

1.4.1.4 AFC标准曲线的制作 AFC(7-氨基-4-三氟甲基香豆素)，其结合态DEVD-AFC(蓝色荧光)能被caspase-3酶解为游离AFC(黄绿色荧光)。将80 μmol/L的AFC溶液(试剂盒提供)用细胞裂解液稀释成0、0.5、1.0、2.0、4.0 μmol/L的储存液，于Ex 380 nm，Em 505 nm读取荧光强度值，以AFC的μmol数为横坐标，荧光强度为纵坐标绘制标准曲线。

1.4.1.5 Caspase-3的活性确定 根据caspase-3的酶活性单位=荧光强度值×1/标准曲线斜率(activity/μmol/L-AFC)，计算caspse-3的活性。

1.4.2 DNA片段分析(DNA ladder) 实验分为单纯中毒组(硫芥)，抑制剂保护组(硫芥+AC-DEVD-CHO)：单纯中毒组分别只加入一定体积的硫芥，使其终浓度为100 μmol；抑制剂保护组在加入硫芥前1 h分别加入一定体积的四肽AC-DEVD-CHO，使其终浓度为50 μmol/L，分别培养至24、12、9、6 h，培养细胞至各组时相点后离心收集细胞，提取细胞基因组DNA[4]，PBS洗两次，加50 μl的细胞裂解液(10 mmol/L Tris-HCl，pH 8.0，10 mmol/L NaCl，10 mmol/L EDTA，100 μg/ml蛋白酶K，1% SDS)，37 ℃孵育保温至混合物变的清亮，离心取上清，经酚-氯仿抽提，经醋酸钠和冷乙醇－20 ℃沉淀过夜，加入1 μl RNA酶保温1 h，溶于TE缓冲液中，加到含有0.4 μg/ml溴化乙啶的1.2%的琼脂糖凝胶的样品孔中，室温，60 V电压，电泳0.5～1 h。凝胶电泳成象系统扫描。

1.4.3 流式细胞仪定量细胞凋亡 实验分为单纯中毒组，抑制剂保护组：单纯中毒组分别只加入一定体积的硫芥，使其终浓度为100 μmol；抑制剂保护组在加入硫芥前1 h分别加入一定体积的四肽AC-DEVD-CHO，使其终浓度为50 μmol/L，分别培养至24、12、9、6 h。根据实验要求每个时相点设立3组平行对照，培养细胞至各组时相点后收集细胞，实验方法参照文献[5]略加改进，1 000 r/min离心5 min，2次，400目筛网过滤，2次，70%乙醇固定单细胞悬液，4 ℃保存，染色前用PBS进行离心沉淀去除固定液，加200 μl Rnase A 37 ℃水浴30 min，再加入800 μl PI染色液混匀，至4 ℃避光保存30 min，上机测试，记录488 nm处的红色荧光。

1.5 统计学分析

采用SPSS 10.0统计软件包进行数据统计，实验数据以$\bar{x}\pm s$表示，采用单因素分析，并对AFC标准曲线进行直线相关与回归拟合。所有图像结果用凝胶成象系统扫描后图像分析计算机软件处理。

2 结果

2.1 细胞内caspase-3活性变化

标准曲线的参数如下：Curve slope=100.885，Intercept=19.685，Correlation=0.9 798，Y=19.685+100.885X。Caspase-3酶活性单位确定结果显示caspase-3活性3 h已显著升高($P<0.01$)，9 h最高，24 h时有所下降，但仍高于正常和抑制剂组($P<0.01$)，见表1。从实验结果分析，硫芥诱导淋巴细胞凋亡，凋亡相关蛋白caspase-3被激活，且该蛋白酶的激活具有时间依赖性。

表1 硫芥(100 μmol/L)染毒淋巴细胞不同时间后caspase-3活性改变($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Changes of activity of caspase-3 of lymphocyte induced by (100 μmol/L) sulfur mustard($\bar{x}\pm s$)

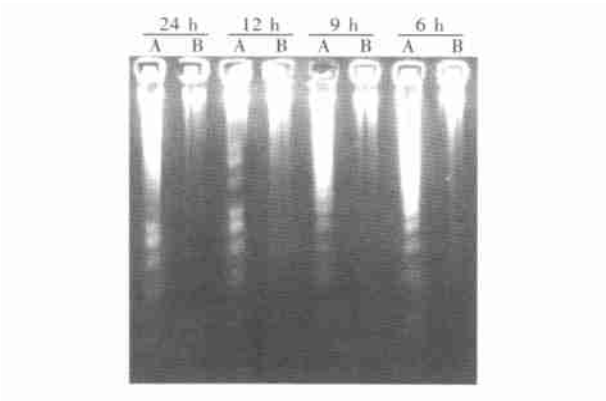
Group	Fluorescence intensity	Multiplication value	Activity (activity/μmol/L-AFC)
N	54.348 7±3.956 8	1.000 0±0.000 0	0.538 7±0.039 3
3 h	210.263 0±16.046 3	3.873 6±0.263 5	2.084 1±0.159 0 *
9 h	620.672 0±31.324 3	11.488 2±1.385 2	6.505 4±0.298 9 *
24 h	316.296 0±14.527 4	5.849 3±0.561 1	3.135 1±0.144 0 *

*: $P<0.01$ *vs* N group

2.2 淋巴细胞凋亡DNA片段分析

见图1，单纯硫芥中毒6、9、12、24 h电泳结果显示明显的DNA片段化(DNA ladder)，表现为细胞凋亡的特异性指征；硫芥中毒前给予四肽抑制剂电泳DNA片段(DNA ladder)现象不明显。该电泳结果可初步提示四肽抑制剂对硫芥诱发的淋巴细胞凋亡具有干预作用。

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



A: Cell+ sulfur mustard; B: Cell+ sulfur mustard+ inhibitor(AC-DEVD-CHO)

图 1　硫芥(100 μmol/L)诱导淋巴细胞凋亡 DNA ladder 电泳

Fig 1　DNA electrophoretogram of lymphocyte induced by sulfur mustard(100 μmol/L)

2.3　流式细胞仪检测细胞凋亡

100 μmo/L 的硫芥作用于淋巴细胞, 上机检测, cellQuest 软件获取细胞, 进行凋亡细胞计数。实验结果如表 2: 硫芥中毒 6 h, 9 h, 12 h 各组细胞, 在中毒前前给予四肽抑制剂较未给予四肽抑制剂相应中毒时间组的淋巴细胞, 凋亡率下降, 具有显著性差异($P<0.05$); 24 h 是否给予抑制剂凋亡率无显著性差异。

表 2　四肽(AC-DEVD-CHO)对硫芥诱导淋巴细胞凋亡的影响 ($n=3$, $\bar{x}\pm s$, %)

Tab 2　Effect of tetrapeptide(AC-DEVD-CHO) on sulfur mustard-induced lymphocyte apoptosis($n=3$, $\bar{x}\pm s$, %)

	Time after sulfur mustard treatment (h)			
	6	9	12	24
N(cell+SM)	53.32±5.86	42.60±4.78	40.20±7.89	41.50±6.89
NI(cell+SM+AC-DEVD-CHO)	13.70±1.25 *	20.20±1.10 *	14.68±2.08 *	22.57±3.76 *

*: $P<0.05$ *vs* N group

3　讨论

细胞凋亡同细胞增殖、分化一样, 是多细胞生命活动的基本特征之一, 不仅与许多正常的生理过程有关, 而且参与机体的病理反应过程。硫芥诱导的淋巴细胞凋亡即参与了硫芥的淋巴细胞毒病理反应过程[6]。

半胱天冬酶为一组在细胞凋亡中起重要作用的同源蛋白, 它们共同具有半胱氨酸蛋白酶活性, 能在天冬氨酸之后切割蛋白, 对细胞凋亡起着关键性的作用。半胱天冬酶-3 是细胞凋亡过程中激活的关键激酶, 也是细胞凋亡的主要效应因子。激活的半胱天冬酶-3 作用于底物 PARP(Poly-ADP-ribosepolymerase), 使之发生水解, 其水解产物促进细胞骨架降解和 DNA 片段化。Caspase-3 是细胞凋亡过程中最重要的 caspases 之一, 又被称为细胞凋亡的执行者。抑制 caspase-3 活性, 调控细胞凋亡的信号转导, 在干预细胞凋亡中具有一定的可行性。目前已经合成的 caspase-3 抑制剂 AC-DEVD-CHO 是基于 caspase-3 的底物序列设计的人工合成的四肽物质, 可从底物水平特异性抑制 caspase-3 的活性, 它具有较高的选择性、膜渗透性和不可逆性[7]。本实验中我们利用荧光底物法测定硫芥诱导细胞凋亡时半胱天冬酶-3 活性的变化, 发现淋巴细胞经 100 μmol/L 的硫芥作用 3h, 半胱天冬酶 3 活性即有上升, 表明半胱天冬酶-3 在这一凋亡过程中被激活。在硫芥染毒之前给予 caspase-3 抑制剂 AC-DEVD-CHO 可以使细胞凋亡的特异性指标 DNA ladder 现象消失或模糊, 同时淋巴细胞凋亡较相对应的单纯中毒各时相点减少, 提示抑制 caspase-3 活性可部分缓解硫芥的淋巴细胞毒作用。应用 caspase-3 抑制剂 Ac-DEVD-CHO 对硫芥的细胞毒作用进行干预, 抑制了 caspase-3 活性, 终止 caspases 级联反应, 使部分淋巴细胞避免凋亡, 从而减轻硫芥染毒淋巴细胞由于大量凋亡而导致的免疫功能低下或抑制, 提示该多肽对硫芥淋巴细胞凋亡的部分干预作用。

DNA ladder 及细胞凋亡指数的实验结果显示硫芥染毒淋巴细胞前给予 caspase-3 抑制剂只能在一定条件下缓解细胞凋亡现象, 其干预作用是不完全的。其原因除与实验操作和检测敏感性等影响, 更可能在于 caspase-3 抑制剂虽然在我们应用的剂量范围内被认为是特异性和选择性的抑制 caspase-3 的活性, 但这种特异性和选择性是相对的[8]。

我们的研究表明, 硫芥染毒淋巴细胞凋亡模型中, 有 caspase-3 蛋白酶活性的增加, 即 caspase-3 蛋白酶参与了这一过程, 在硫芥染毒之前给予 caspase-3 抑制剂 AC-DEVD-CHO 可以抑制其活化同时减轻细胞凋亡。Caspase-3 四肽抑制剂 AC-DEVD-CHO 抑制凋亡的机制主要抑制 caspase-3 对其底物蛋白的降解或灭活, 但是该抑制剂同时还可能对其他 caspases 的激活产生抑制。最新的研究也提示该抑制剂有可能会对生物体内的其他蛋白酶, 例如钙激活蛋白酶(Calpain)和组织蛋白酶 B(Cathepsin B), 因为很多实验证明这些蛋白酶和 caspase-3 的结构有相似之处, 这些蛋白酶不仅参与了凋亡也参与了坏死[9]。所以虽然 caspase-3 抑制剂可部分抑制或改善淋巴细胞的凋亡, 但是由于该抑制剂底物特异性的相对性, 及凋亡相关蛋白酶是否在维持细胞功能中是否发挥作用及如何作用等复杂性目前尚不清楚, 所以多肽抑制剂尽管可以抑制细胞凋亡但是是否可以长期改善细胞生存和维持免疫功能实施, 目前还存在争议, 这种干预作用是否可认为具有保护作用及其确切机制也有待于进一步研究证实。但该实验至少可以提示我们可以通过基因转染, 人工合成针对某

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

种基因的反义核苷酸，或合成 caspase-3 特异性的抑制物和激活物等手段，直接或间接地影响硫芥染毒淋巴细胞的凋亡，从而为硫芥的淋巴细胞毒作用早期防治提供新的启示。

参考文献：

[1] Thornberry N A, Rano T A, Peterson E P, *et al*. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B: functional relationships established for key mediators of apoptosis[J]. J Biol Chem, 1997, 272(29): 17907－17911.

[2] Nicholson D W, Ali A, Thornberry N A, *et al*. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis[J]. Nature, 1995, 376(6535): 37－43.

[3] 朱立平，陈学清. 免疫学常用实验方法[M]. 北京：人民军医出版社，2000.155.

[4] 鄂 征. 组织培养和分子细胞学技术[M]. 北京：北京出版社，1995. 271－273.

[5] 姜 泊，张亚力，周殿员. 分子生物学常用实验方法[M]. 北京：人民军医出版社，1996. 75－76.

[6] 杨清武，董兆君，魏相德 等. 硫芥对大鼠淋巴细胞毒性作用的研究[J]. 第三军医大学学报，2001，23(1)：27－30.

[7] Ruetten H, Badorff C, Ihling C, *et al*. Inhibition of caspase-3 improves contractile recovery of stunned myocardium, independent of apoptosis——inhibitory effects[J]. J Am Coll Cardiol, 2001, 38(7): 2063－2070.

[8] Schotte P, Declercq W, Van Huffel S, *et al*. Non-specific effects of methyl ketone peptide inhibitors of caspases[J]. FEBS Lett, 1999, 442(1): 117－121.

[9] Iwamoto H, Miura T, Okamura T, *et al*. Calpain inhibitor-1 reduces infarct size and DNA fragmentation of myocardium in ischemia/reperfused rat heart[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 1999, 33(4): 580－586.

（编辑 汪勤俭）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2003)14-1226-01

手术学教学中小型猪的麻醉

Anesthetization for miniature pigs during teaching operative surgery

左艳芳，郭光金，张天飞，张集建 （第三军医大学基础医学部外科应用解剖与手术学教研室，重庆 400038）

我室自 1999 年 5 月至 2002 年 6 月对 76 例实验小型猪采用戊巴比妥钠静脉麻醉，取得了良好效果。现报告如下。

1 材料与方法

我校实验动物中心提供贵州小型香猪 76 只，雌雄不限，体质量 25～30 kg。麻药用 3% 戊巴比妥钠 1.3 ml/kg，选用 20 ml 空针及 7 号针头抽取 20 ml 麻药，经小型猪的耳缘静脉注射，速度为 5 ml/min，注射时观察猪的呼吸、脉搏和睫毛反射，一般给药 2～3 min 后，猪便进入浅麻醉期，继续注射麻药 3～5 ml，约 5 min 后麻药起效进入中麻醉期，总用药量控制在 40 ml 之内，通常为 30 ml。使用同期教学用犬 83 只作为对照组，麻醉选用犬的后肢小隐静脉注射 3 %戊巴比妥钠。手术同样开设有清创术、静脉切开插管术、剖腹探查术和胃肠修补术，操作考试的主要项目相同，小型猪手术组和犬手术组具有可比性。

统计学处理：计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间采用 t 检验，计数资料用 χ^2 检验。

2 结果

麻醉成功率：小型猪麻醉成功率 96%，犬麻醉成功率 78%，两组间比较有显著差异（$P<0.05$），见表 1。

耐手术创伤的能力：犬经受 3 次以上手术占 26%，而小型猪为 92%，小型猪耐受力明显优于犬，见表 1。

术后存活情况：小型猪中途死亡及术后感染死亡均低于犬，术后存活时间两组有显著差异，见表 1。

表 1 小型猪与犬麻醉成功率、耐手术创伤的能力、术后存活情况比较

	n	麻醉成功数(%)	麻醉过深死亡数(%)	术中死亡数(%)	感染死亡数(%)	承受 3 次手术以上数(%)	术后存活时间($\bar{x} \pm s$, d)
小型猪	76	73(96) **	3(4) **	4(5) **	2(3) **	70(92) **	54.3±6.1 *
犬	83	65(78)	18(21)	26(31)	28(33)	22(26)	19.5±7.8

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ 与犬组比较

3 讨论

猪的组织结构非常接近人类，特别是做“组织切开、缝合术”时，皮肤、皮下组织、筋膜、肌肉等解剖层次与人类极为相似，缝合时层次清晰，手感良好。猪盲肠粗而长，术中容易寻找，对学生施行盲肠切除术练习“荷包缝合”等基本操作非常有利。小型猪术后恢复较快，对食欲影响小，重复使用因衰竭死亡的情况少见，因而降低了教学成本，而犬术后恢复较慢，长时间食欲不振，日见衰竭，死亡率高达 33%，相对提高了教学成本。猪个体之间对麻药的耐受力较稳定，以公斤体质量计算麻药量，因麻醉致死率只有 4%。这可能与有计划地繁殖饲养、动物质量提高有关，而犬主要向社会购买，个体差异较大，仍然以公斤计算麻药量；给药途径都是静脉，经常出现术中生命体征不

（下转 1232 页）

作者简介：左艳芳(1963－)，女，四川省眉山市人，实验师，主要从事动物麻醉方面的研究。电话：(023)68752251

收稿日期：2002-08-29；修回日期：2002-12-20

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