DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.13.016
第25卷第13期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 13
2003年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2003

文章编号:1000-5404(2003)13-1157-04

论著

苦瓜核糖体失活蛋白诱导HL-60细胞发生凋亡及其分子机制的研究

郎海滨,糜漫天,程天民,张乾勇,朱俊东 (第三军医大学预防医学系营养与食品卫生学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨苦瓜核糖体失活蛋白(Ribosomal inactivating protein, RIP)诱导HL-60细胞凋亡的活性,以及对HL-60细胞Bcl-2、Bax、caspase-3表达变化的影响及其分子机制。方法 以一定浓度苦瓜RIP处理HL-60细胞24~72 h,用TUNEL法检测细胞凋亡。运用RT-PCR和Western blot免疫印记法检测Bcl-2、Bax、caspase-3 mRNA和蛋白表达的变化。结果 苦瓜RIP在一定作用浓度下可使HL-60细胞发生凋亡,且随着作用时间的延长凋亡细胞比例逐渐升高。在此过程中,HL-60细胞的caspase-3 mRNA的表达及其胞内活性亚单位水平显著升高($P<0.05$),Bcl-2 mRNA表达变化虽不显著,但其蛋白水平明显降低($P<0.05$),与此同时,Bax mRNA和蛋白表达均有所上调。结论 在苦瓜RIP诱导的HL-60细胞凋亡中,caspase-3发挥了极为重要的作用,而Bcl-2和Bax可能通过其表达量的变化、转录后调节等方式对细胞凋亡发挥重要的调控功能。

关键词:核糖体失活蛋白;细胞凋亡;Bcl-2;Bax;caspase-3
中图法分类号:Q556$^+$.2;R329.2$^+$8;R394.2 文献标识码:A

Apoptosis-inducing effects of RIP extracted from bitter melon on HL-60 cells

LANG Hai-bin, MI Man-tian, CHENG Tian-min, ZHANG Qian-yong, ZHU Jun-dong (Department of Nutrition and Food Hygiene, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the apoptosis-inducing activity of RIP from bitter melon seeds and its effect on the expressions of Bcl-2, Bax and caspase-3. Methods After the treatment of HL-60 cells with 40 μg/ml type Ⅰ RIP, TUNEL test was employed to test the apoptosis. At the same time, mRNA and protein expressions of Bax, Bcl-2, Caspase-3 were determined by RT-PCR and Western blotting. Results TUNEL test showed 40 μg/ml type Ⅰ RIP induced apoptosis in a time-dependent manner. The expression of caspase-3 mRNA and the active subunit level increased significantly. Bcl-2 mRNA was not significant, but the protein expression decreased significantly. Bax mRNA and the protein expression were found to be up-regulated. Conclusion Type Ⅰ RIP is a sort of effective apoptosis-inducing agent and the caspase-3 is a vital molecule in the process of apoptosis induced by type Ⅰ RIP. At the same time, Bcl-2 and Bax may probably function as a regulator in the activation of apoptosis.

Key words: ribosomal inactivating protein; apoptosis; Bcl-2; Bax; caspase-3

核糖体失活蛋白(Ribosomal inactivating protein, RIP)是一组来源于植物的糖苷酶,主要富集在某些植物的种子、根、茎及叶中,能够使真核细胞核糖体28S rRNA的第4 323位腺嘌呤糖苷键水解、断裂,进而导致蛋白质合成受到不可逆的抑制。根据亚单位组成的不同可以将其分为Ⅰ型和Ⅱ型RIP。近年来,陆续有研究发现某些植物来源的Ⅰ型RIP能够诱导白血病细胞、肝癌细胞、黑色素瘤细胞等发生细胞凋亡,但以往的研究大多停留在对凋亡现象的观察,而对其具体分子机制缺乏深入的研究,从而限制了人们对Ⅰ型RIP抗肿瘤机制的深入了解。本研究通过用一定剂量的苦瓜RIP处理HL-60细胞,观察其能否诱导HL-60细胞发生凋亡,并在基因转录和蛋白表达水平上深入研究caspase-3、Bcl-2、Bax等凋亡相关分子的变化情况,以探讨苦瓜RIP诱导HL-60细胞凋亡的可能分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 苦瓜核糖体失活蛋白 运用假配基亲和层析、凝胶过滤层析等步骤得到(方法略)。

1.1.2 细胞株 HL-60细胞(人早幼粒白血病细胞株)由中科院上海细胞所提供。

1.1.3 主要试剂 RPMI1640培养基干粉、小牛血清为Hyclone公司产品;RNA酶抑制剂、Oligo-$(dT)_{18}$、dNTP、M-MuLV逆转录酶和Taq DNA聚合酶为上海生工生物工程技术服务有限公司的产品;TUNEL凋亡检测试剂盒为Roche公司产品;抗Bcl-2、抗Bax、抗caspase-3单克隆抗体、通用型S-P试剂盒(工作液)购

基金项目:重庆市院士基金资助项目(5687)
作者简介:郎海滨(1974-),男,山西省太原市人,博士研究生,助理实验师,主要从事营养与肿瘤方面的研究。电话:(023)68752291
通信作者:糜漫天,电话:(023)68752292
收稿日期:2002-11-19;修回日期:2003-04-21

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

自中山公司。

1.2 方法

1.2.1 TUNEL法检测细胞凋亡 本方法是通过对凋亡早期染色体DNA断裂后产生的5′-断端进行检测，并观察细胞核阳性染色的强度及比率来反映细胞凋亡的发生，而对照组细胞核染色应为阴性，具体步骤参照Roche公司TUNEL试剂盒说明书的方法。

1.2.2 RT-PCR检测Bcl-2、Bax mRNA的表达变化 Bcl-2引物参照Genebank序列设计，RT-PCR反应产物长度为282 bp，Bcl-2 FP1：5′-TGTGGCCTTCTTTGAGTTCG-3′；Bcl-2 RP2：5′-TCACTTGTGGCTCAGATAGC-3′。Bax引物参照文献[1]方法，RT-PCR产物长度为257 bp。bax FP1：5′-TCCACCAAGAAGCTGAGCGA-3′；bax RP2：5′-GTCCAGCCCATGATGGTTCT-3′。Caspase-3引物：参照文献[2]方法，RT-PCR产物长度为272 bp，Caspase-3 FP1：5′-CAAACTTTTTCAGAGGGGATCG-3′；Caspase-3 RP2：5′-GCATACTGTTTCAGCATGGCAC-3′。β-actin引物参照文献[3]方法，RT-PCR产物长度为202 bp。β-actin FP1：5′-AGGGGCCGGACTCGTCATACT-3′；β-actin RP2：5′-GGCGGCACCACCATGTACCCT-3′。β2-microglobulin(β2-MG)引物参照Genebank序列设计，RT-PCR产物长度为120 bp。β2-MG FP1：5′-ACCCCCACTGAAAAAGATGA-3′；β2-MG RP2：5′-ATCTTCAAACCTCCATGATG-3′。细胞总RNA的提取、逆转录制备cDNA、PCR方法见《现代分子生物学技术》，PCR扩增条件为：95 ℃，5 min→94 ℃，1 min；→60 ℃或61 ℃，1 min；→72 ℃，1 min；35个循环→72 ℃，10 min。

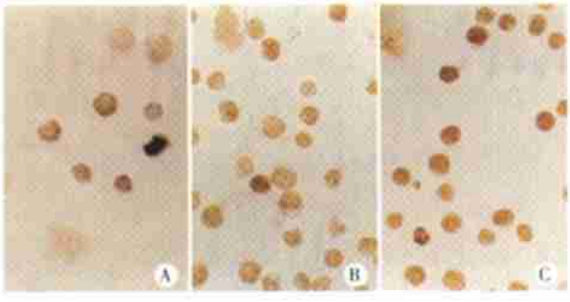
1.2.3 Western-blot检测Bcl-2、Bax、Caspase-3 P20活性亚单位蛋白表达的变化 参照《分子克隆》的方法进行。

1.2.4 统计学处理 采用 t 检验。

2 结果

2.1 苦瓜核糖体失活蛋白对HL-60细胞的促凋亡作用

原位凋亡检测(TUNEL)结果显示，用40 μg/ml苦瓜核糖体失活蛋白处理HL-60细胞24～72 h后，与对照组相比，处理组细胞核出现棕褐色的阳性染色，并且随着作用时间的延长，阳性染色也逐渐加深，证实苦瓜RIP能够诱导HL-60细胞发生凋亡，见图1。



A：24 h；B：48 h；C：72 h

图1 原位凋亡法检测HL-60细胞凋亡

Fig 1 TUNEL test of HL-60 cells treated with RIP

2.2 苦瓜核糖体失活蛋白处理HL-60细胞后Bax和Bcl-2 mRNA及其蛋白表达的变化

RT-PCR分析结果显示，苦瓜核糖体失活蛋白处理HL-60细胞后，Bax mRNA和蛋白表达均有所上升($P<0.05$)，与此相对应的是，Bcl-2 mRNA表达变化并不明显($P>0.05$)，而其蛋白表达则有所下降，见图2～5。

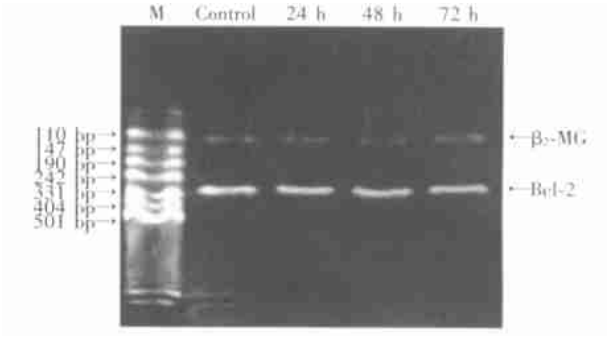


图2 苦瓜核糖体失活蛋白对HL-60细胞Bcl-2 mRNA表达的影响

Fig 2 Effect of RIP on the expression of Bcl-2 mRNA in HL-60 cells

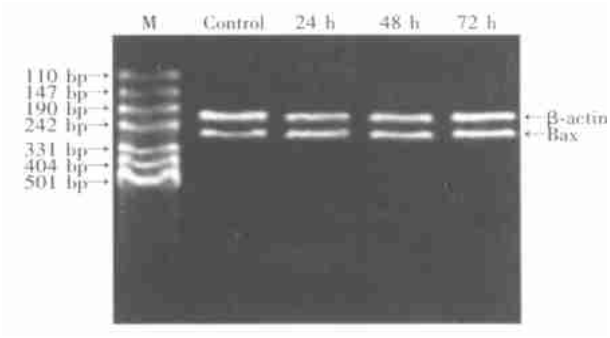


图3 苦瓜核糖体失活蛋白对HL-60细胞Bax mRNA表达的影响

Fig 3 Effect of RIP on the expression of Bax mRNA in HL-60 cells



图4 苦瓜核糖体失活蛋白对HL-60细胞Bcl-2蛋白表达的影响

Fig 4 Effect of RIP on the protein expression of Bcl-2 in HL-60 cells

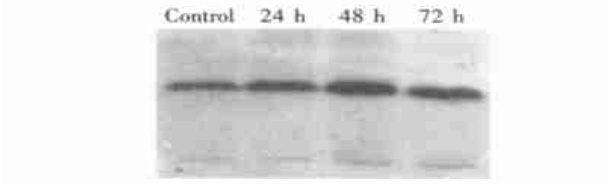


图5 苦瓜核糖体失活蛋白对HL-60细胞Bax蛋白表达的影响

Fig 5 Effect of RIP on the protein expression of Bax in HL-60 cells

2.3 苦瓜核糖体失活蛋白处理HL-60细胞后caspase-3 mRNA及其P20活性亚单位蛋白表达的变化

RT-PCR分析结果显示，与对照组相比，苦瓜核糖体失活蛋白能够显著上调caspase-3 mRNA的表达($P<0.05$)，并且使表

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

达量维持在一个较高的水平。同时, Western blot 结果也显示, 苦瓜核糖体失活蛋白能够使 caspase-3 活性亚单位水平显著升高($P<0.05$), 与 RT-PCR 结果基本吻合, 见图 6、7。

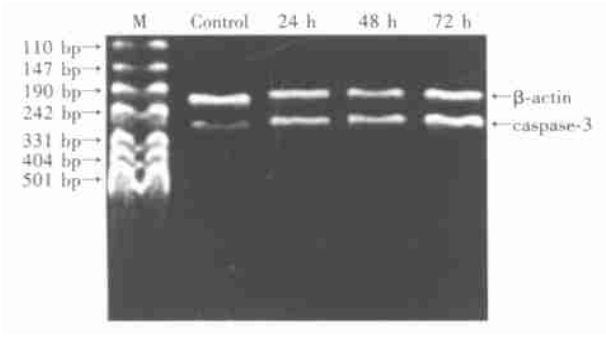


图 6　苦瓜核糖体失活蛋白对 **HL-60** 细胞 **caspase-3 mRNA** 表达的影响

Fig 6　Effect of RIP on the expression of caspase-3 mRNA in HL-60 cells

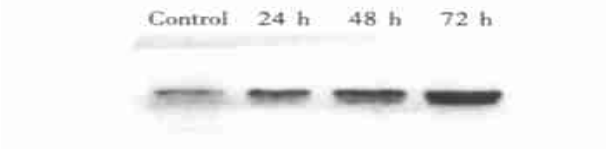


图 7　苦瓜核糖体失活蛋白对 **HL-60** 细胞 **caspase-3 p20** 亚单位蛋白表达的影响

Fig 7　Effect of RIP on the expression of caspase-3 p20 subunit in HL-60 cells

3　讨论

核糖体失活蛋白(Ribosomal inactivating proteins, RIPs)是一类来源不同的能抑制蛋白质生物合成的蛋白, 广泛存在于高等植物、某些细菌和真菌中。Chiu 等[4]用提取自麦仙翁种子的Ⅰ型核糖体失活蛋白-Agrostin 处理 HL-60 细胞后发现其不仅可以抑制细胞增殖并且能够诱导 HL-60 细胞发生凋亡。Poma 等[5]用肥皂草蛋白处理人外周血淋巴细胞后, 发现淋巴细胞活力下降并伴有胞浆寡核小体的出现, 提示肥皂草蛋白可以诱导靶细胞发生细胞凋亡。上述发现显示不同来源的植物Ⅰ型核糖体失活蛋白对于上皮来源和间质来源的肿瘤细胞都能够发挥其抑制、杀伤效应, 而诱导细胞凋亡的发生则是Ⅰ型核糖体失活蛋白发挥抗肿瘤功能的重要机制所在。本研究用一定剂量的苦瓜核糖体失活蛋白处理 HL-60 细胞后发现, 当以 40 μg/ml 作用浓度处理细胞后更能够诱导 HL-60 细胞发生凋亡, 流式细胞仪检测发现处理组细胞出现了明显的凋亡细胞所特有的亚 G_1 峰, 并呈现出剂量-效应和时间依赖的关系(未发表)。原位凋亡检测(TUNEL)的结果也显示, 用 40 μg/ml 作用浓度的苦瓜 RIP 处理 HL-60 细胞 24、48、72 h 后, 阳性细胞数明显增加, 与流式细胞仪检测结果相吻合, 从而证实苦瓜核糖体失活蛋白具有诱导 HL-60 细胞凋亡的功能。

细胞凋亡是机体清除多余细胞的主要方式, 在细胞凋亡中 caspase-3 起着承上启下的关键作用, 而 Bcl-2 家族蛋白可以通过不同的方式直接或间接调节 caspase-3 的活性, 进而对细胞凋亡进行调控。在 RIPs 诱导的细胞凋亡中, Caspase-3 的活性变化也同样起着非常重要的作用, Bussing 等[6]用槲寄生毒素处理人淋巴细胞后发现 caspase-3 被激活, 并且细胞发生了凋亡。此外, Caspase-3 酶原的激活对于 TCS 诱导的细胞凋亡也是必不可少的, Caspase-3 抑制剂 z-VAD-fmk 可以有效地抑制凋亡的发生, 提示 caspase-3 在 TCS 诱导的人绒毛膜癌细胞凋亡中同样发挥了关键的作用[7]。针对上述问题, 本研究以 HL-60 细胞株作为研究对象, 深入研究了 caspase-3 的 mRNA 表达和胞浆内 caspase-3 蛋白活性亚单位的变化情况, RT-PCR 结果显示以 40 μg/ml 作用浓度的苦瓜核糖体失活蛋白处理 HL-60 细胞 24 h 后, 其 caspase-3 的基因表达即显著增强, 同时, Westren-blot 免疫印记检测结果也显示, 与对照组相比处理组细胞胞浆中 caspase-3 活性亚单位(p20)的表达显著升高, 结合 RT-PCR 结果, 提示 caspase-3 的表达及活性变化在苦瓜核糖体失活蛋白诱导的 HL-60 凋亡过程中起着重要的作用。

目前, 对于 Bcl-2 家族蛋白如何对Ⅰ型核糖体失活蛋白 诱导的细胞凋亡进行调控的问题还缺乏比较深入的研究, Chiu 等[4]用 Agrostin 处理 HL-60 细胞后, 在检测到细胞凋亡发生的同时, 也发现胞内 Bcl-2 蛋白表达有所下降。此外, Hu 等[8]在研究中发现, 用 ricin 处理体外培养的肝癌 BEL7404 细胞株后检测到有明显的细胞凋亡发生, 同时伴有 Bak 表达的升高和 Bcl-xL 表达的降低。而当把外源 Bcl-2 基因转染到 BEL7404 细胞内后, BEL7404/Bcl-2 细胞便具有了抵抗 ricin 诱导的细胞凋亡的能力, 提示 Bcl-2 家族蛋白在核糖体失活蛋白诱导的细胞凋亡中发挥着重要的调控功能。本研究结果显示, 在苦瓜核糖体失活蛋白诱导的 HL-60 细胞凋亡中, 在 caspase-3 mRNA 和其活性亚单位蛋白表达显著增强的同时, Bax 的 mRNA 和蛋白表达也有明显的升高。另一方面, 虽然 Bcl-2 的 mRNA 表达变化并不明显, 但其蛋白表达亦有所下降, 显示胞内 Bax/Bcl-2 比例升高, 结合相关文献, 推测这一变化对细胞钙库内钙离子的释放、下游 caspase 的激活以及后续的凋亡事件具有促进作用。同时, 相关研究还指出, 在很多因素诱导的细胞凋亡过程中, Bcl-2 家族蛋白的转录后调控(尤其以活性基团的暴露、蛋白磷酸化和翻译后剪切为主)对其生物学活性有很大的影响, 有研究显示, Caspase-3 可以通过在特定的氨基酸残基剪切抗凋亡类 Bcl-2 蛋白, 从而使其变成促凋亡蛋白, 进而诱导细胞色素 c 的释放。结合相关文献及实验结果, 本研究认

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

为在苦瓜核糖体失活蛋白诱导的 HL-60 细胞凋亡中，Caspase-3 的表达增强和活化发挥了关键作用，而 Bax 和 Bcl-2 可能通过自身表达的变化以及一系列转录后调节等方式来参与对细胞凋亡的调控。

参考文献：

[1] 陈汉春，罗志勇，罗赛群，等. Hu 联合 GM-CSF 对 K562 细胞生长-凋亡相关基因表达的影响[J]. 癌症，2000，19(7)：627－630.

[2] Donoghue S, Baden H S, Lauder I, *et al*. Immunohistochemical localization of caspase-3 correlates with clinical outcome in B-cell diffuse large cell lymphoma[J]. Cancer Res, 1999, 59(20): 5386－5391.

[3] Batetta B, Pani A, Putzolu M, *et al*. Correlation between cholesterol esterification, MDR 1 gene expression and rate of cell proliferation in CEM and MOLT4 cell lines[J]. Cell Prolif, 1999, 32(1): 49－61.

[4] Chiu L C, Ooi V E, Sun S S. Induction of apoptosis by a ribosome-inactivating protein from Agrostemma githago is associated with down-regulation of anti-apoptotic bcl-2 protein expression[J]. Int J Oncol, 2001, 19(1): 137－141.

[5] Poma A, Zarivi O, Bianchini S, *et al*. The plant ribosome inactivating protein saporin induces micronucleus formation in peripheral human lymphocytes *in vitro*[J]. Toxicol Lett, 1999, 105(1): 67－73.

[6] Bussing A, Vervecken W, Wagner M, *et al*. Expression of mitochondrial Apo2 7 molecules and caspase-3 activation in human lymphocytes treated with the ribosome-inhibiting mistletoe lectins and the cell membrane permeabilizing viscotoxins[J]. Cytometry, 1999, 37(2): 133－139.

[7] Zhang C, Gong Y, Ma H, *et al*. Reactive oxygen species involved in trichosanthin-induced apoptosis of human choriocarcinoma cells[J]. Biochem J, 2001, 355(3): 653－661.

[8] Hu R, Zhai Q, Liu W, *et al*. An insight into the mechanism of cytotoxicity of ricin to hepatoma cell: roles of Bcl-2 family proteins, caspases, Ca^{2+}-dependent proteases and protein kinase C[J]. J Cell Biochem, 2001, 81(4): 583－593.

（编辑 陈聪连）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2003)13-1160-01

上颌窦异位牙 1 例

A case report of an ectopic tooth in maxillary sinus

张 纲，谭颖徽 （第三军医大学附属新桥医院口腔科，重庆 400037）

患者，男，15 岁，因“右侧上后牙疼痛伴流脓一月余”入院。患者因右上后牙疼痛，牙龈肿胀 1 月，在外院行脓肿切开引流术，术后伤口一直不愈合，切口处形成一瘘口，一直有脓性分泌物。检查见 A8 未萌出，A7 远中有一瘘口，约 0.2 cm 大小，瘘口有白色假膜覆盖。挤压有少量脓液流出，探针探查瘘口前上方向深入上颌窦，深约 3 cm。放射学检查大瓦氏位，可见 B8，C8，D8 牙胚在第二磨牙远中，A8 缺失，在右上颌窦顶壁有一高密度影，初步诊断为无牙根的 A8 异位。

常规术前检查无相对手术禁忌证后，于静脉复合麻醉下行右上颌窦根治术。手术根据瘘口的位置，从 A7 到 A4 粘膜前庭处切开，先将瘘口处炎性组织仔细搔刮，顺着瘘口去除部分上颌窦外侧骨壁，见上颌窦粘膜明显增厚。完整刮除上颌窦粘膜，体外检查可见异位牙位于上颌窦顶壁粘膜，牙冠向下，牙合面为磨牙的形态。粘膜包绕牙颈部，无牙根。与术前的诊断一致。生理盐水冲洗上颌窦后，严密缝合口内创缘，用油纱条从鼻腔引流。术后病理报告为上颌窦慢性炎症，异位牙 1 颗。

讨论

在牙齿发育性疾病中，目前最常见的是先天性缺牙和多生牙。其中先天性缺牙以上颌侧切牙和第三磨牙多见，而多生牙最常见于上颌中切牙之间的锥形多生牙，一般为骨埋伏阻生，引起中切牙排列不齐或因正畸需要而拔除[1]。而异位牙比较罕见，有报道异位牙位于鼻腔软组织中，Alexandrakis 等[2,3]报道两例因异位牙引起的鼻泪管阻塞，反复眼科治疗无效，通过口腔外科拔除异位牙而获得痊愈。

颌面部组织胚胎学中目前有关上颌窦发生的确切时间尚有不同看法，一般认为在胎儿第 3 个月左右，上颌骨体部内出现一中空的骨腔，此为最初的上颌窦。其粘膜来源于鼻道突入上颌骨的粘膜憩室。而恒牙在胚胎 4～5 月开始发生，在乳牙的成釉器形成后不久，牙板继续向深部结缔组织增殖，将来发育成恒牙的牙胚。而恒牙的第 1、2、3 磨牙将从第 2 前磨牙的远中侧恒牙板上延伸发育而来[4]。此患者异位牙伴感染发生的原因可能为恒牙板发育异常而延伸入上颌窦，而且形成一个与口腔相通的瘘道，导致上颌窦感染所致。

关键词：上颌窦；异位牙
中图法分类号：R781 文献标识码：B

参考文献：

[1] 尹 音，胡 敏. 儿童口腔学[M]. 北京：人民军医出版社，1995. 32－33.

[2] Alexandrakis G, Hubbell R N, Aitken P A. Nasolacrimal duct obstruction secondary to ectopic teeth[J]. Ophthalmology, 2000, 107(1): 189－192.

[3] 王瀚章. 口腔基础医学[M]. 成都：四川大学出版社，2002. 65－66.

（编辑 汪勤俭）

作者简介：张 纲(1971－)，男，湖南省邵东县人，硕士，主治医师，主要从事口腔颌面外科和口腔粘膜病方面的研究，发表论文 5 篇。电话：(023)65221246

收稿日期：2003-02-26；修回日期：2003-04-18

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