DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.13.004
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)13-1127-04

论著

硫芥淋巴细胞毒性作用与 caspase-3 表达

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 探讨硫芥对淋巴细胞的毒性作用方式和分子机制。方法 利用硫芥诱导的体外培养淋巴细胞,采用荧光分光光度法检测 DNA 的损伤,运用逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)和 Western blot 方法检测胱氨酸蛋白酶 caspase-3 的基因和蛋白表达及活化。结果 硫芥可导致淋巴细胞 DNA 损伤,Caspase-3 在基因水平和蛋白水平上表达增加,同时发生活化作用,具有时间依赖效应。结论 硫芥通过 caspase 依赖途径诱导淋巴细胞毒作用,Caspase-3 的表达与活化参与该过程,影响着淋巴细胞的毒性作用。

关键词:硫芥;淋巴细胞;胱氨酸蛋白酶-3;凋亡
中图法分类号:R392.12;R394-33;R827.17+4 文献标识码:A

Cytotoxic action of sulfur mustard on cultured lymphocytes and their caspase-3 expression

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

Abstract: **Objective** To investigate the manner and molecular mechanism of lymphocyte cytotoxic action induced by sulfur mustard. **Methods** Lymphocytes were separated from the spleen of Wistar rats and were cultured. DNA strand breaks were detected by fluorospectrophotometry. RT-PCR and Western blotting were employed to detect the gene and protein expressions of caspase-3 and its activation. **Results** Sulfur mustard induced DNA strand breaks in the lymphocytes. Gene and protein expressions of caspase-3 were increased in a time-dependent manner. **Conclusion** Sulfur mustard induces lymphocyte cytotoxic action by means of depending on the expression and activation of caspase-3.

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

硫芥是一种糜烂作用很强的化学毒剂,中毒后很快引起皮肤溃烂、空腔脏器粘膜脱落、造血功能抑制、精神障碍和高热等全身反应。白细胞急剧下降和继发感染是硫芥中毒致免疫系统抑制的突出表现,其机制尚未完全阐明,治疗上也无特效药物[1]。业已证明,淋巴细胞对硫芥极为敏感,中毒后呈进行性减少[2]。杨清武等[3]报道,硫芥作用于淋巴细胞,4 h 即出现 DNA ladder,提示细胞凋亡参与了硫芥对淋巴细胞的毒性作用。细胞凋亡发生及其调控机制是烃化剂导致 DNA 损伤领域中的一个研究热点。近来研究显示,Caspases 与凋亡效应器、细胞色素 C(Cyto-C)和 Bcl 2 蛋白家族间相互作用,参与细胞凋亡的调控和执行,是影响细胞凋亡的重要因素。其中 caspase-3 在凋亡的执行阶段起作用。Caspase-3 在凋亡过程中可被其它 caspases 所激活,参与染色质的凝聚和核酸的激活,促使细胞凋亡[4]。本研究探讨硫芥对淋巴细胞 caspase-3 表达与活化的影响,以便为硫芥的细胞毒作用提供实验依据,同时也可为硫芥中毒的早期检测和防治提供参考。

1 材料和方法

1.1 试剂

硫芥(军事医学科学院六所提供,纯度为 97.5%);RPMI1640 培养液,D-Hanks 液等(Hyclone 公司);淋巴细胞分离液(TBD 生物技术发展中心);Tris Base,过硫酸铵,SDS,TEMED,甘氨酸,低分子质量蛋白 Marker,琼脂糖等(Sigma 公司);Caspase-3 兔单抗,SP-9002 Histain™-Plus Kits,DAB 显色试剂盒等(Santa Cruze 公司);PCR marker,焦碳酸二乙酯,RNA 酶抑制剂,AMV 逆转录酶,dNTPs,Taq DNA 聚合酶,Oligo(dT)$_{15}$ 等(Promega 公司);溴化乙锭 EB,考马斯亮蓝 R-250,丙烯酰胺,双甲叉丙烯酰胺等由华美生物公司采购;其它试剂均为国产分析纯。

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:2003-04-29

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

1.2 仪器设备

Uv-2200型紫外分光光度计(日本岛津);电转印装置,电源装置,水平式电泳槽和垂直式电泳槽(北京六一仪器厂);荧光分光光度计(上海分析仪器厂);凝胶图像扫描系统(美国UVP);Matercyclegradient PCR仪,低温冷冻离心机等均为美国进口产品。

1.3 淋巴细胞的分离和培养

原代大鼠脾脏淋巴细胞的培养及处理:健康成年Wistar大鼠50只,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[2]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凋亡的影响,收集非粘附细胞(淋巴细胞),调整细胞密度为2×10^6~2×10^7/ml,加入一定体积的硫芥,使其终浓度为100 μmol/L,分别培养至3、6、9、12、24 h,并设立实验对照。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,进行检测。

1.4 检测指标

1.4.1 荧光分光光度法检测硫芥诱导淋巴细胞DNA损伤

分别取各组淋巴细胞,提取细胞基因组DNA,采用荧光分光光度法检测DNA损伤,具体方法参照文献[5]进行略加改进,直接在含有20 μg DNA的200 μl 0.2 mol/L PBS(pH 7.0)中加入10 μg EB,温育15 min,以520 nm为激发波长,测定600 nm时的DNA-EB结合物的相对荧光强度。

1.4.2 逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)

实验方法参照文献[6]略加改进,用Tripure试剂盒提取RNA;采用紫外分光光度法测定RNA纯度及其浓度;通过变性琼脂糖凝胶电泳检测RNA完整性,证明无RNA降解。使用总RNA逆转录合成cDNA,逆转录反应体系总体积为20 μl,反应体系中主要成分的浓度为:5×逆转录反应缓冲液4 μl,dNTPs 2 μl,Oligo(dT)$_{15}$引物1 μl,RNA酶抑制物0.5 μl及AMV逆转录酶1 μl,DEPC-水补至20 μl。逆转录反应在PCR仪中进行,步骤为:70 ℃ 5 min,37 ℃ 60 min,72 ℃反应10 min。逆转录产物置于4 ℃待用。

1.4.3 cDNA的扩增

引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成,Caspase-3:Fwd(5′-to-3′):TAA GGA AGA TCA CAG CAA AAG G;Rev(5′-to-3′):TGA GCA TTG ACA CAA TAC ACG;β-actin:Fwd(5′-to-3′):TCA TGA AGT GTG ACG TTG ACA TCC GTA AAG;Rev(5′-to-3′):CCT AGA AGC ATT TGC GGT GCA CGA TGG AGG。PCR反应体系总体积为50 μl。反应体系中主要成分为:$MgCl_2$,10×PCR缓冲液,200 μmol/L dNTPs,上、下游引物,模板cDNA。97 ℃变性5 min,迅速加入Taq酶0.5 U(热启动法),然后按下述步骤进行扩增:94 ℃变性45 s,57.5 ℃退火1 min,72 ℃延伸1 min。共扩增30个循环,其中最后一个循环后72 ℃继续延伸10 min,4 ℃保存。取PCR产物10 μl,与5 μl加样缓冲液混合,1.8%琼脂糖凝胶电泳(60 V,0.5 h)。电泳完毕,取出凝胶,将凝胶置于凝胶图像扫描系统进行扫描。

1.4.4 Western blot分析

caspase-3蛋白的表达及活化 参照文献[5]略有改进,收集培养的淋巴细胞,PBS洗涤,按10^6/ml的细胞浓度加入细胞裂解缓冲液,置冰上孵育30 min,于4 ℃ 12 000× g离心15 min,取上清液,Lowry法蛋白定量,每组取50 μg蛋白,用15%聚丙烯酰氨凝胶电泳,考马斯亮蓝染色标记Marker,然后转移至PVDP膜上,于封闭液中进行封闭,经封闭洗涤后加入兔半胱天冬酶IgG单抗(1∶800)中40 ℃过夜孵育,洗涤,然后分别与过氧化物酶标记的链霉卵白素(Streptavidin/Peroxidase)染色试剂盒中的生物素标记的羊抗兔IgG,辣根酶标记链霉卵白素工作液(S-A/HRP)常温孵育,DAB显色液中显色,蒸馏水清洗中止反应,图像扫描。

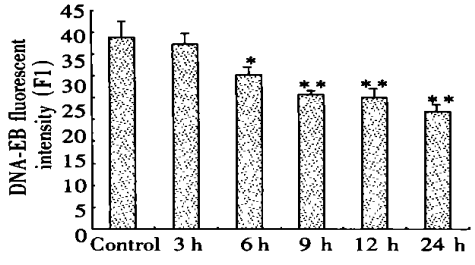
1.5 统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 10.0统计软件包单因素方差分析,所有图像结果用成像扫描仪扫描后图像分析计算机软件处理。

2 结果

2.1 硫芥作用于淋巴细胞DNA的损伤

见图1,硫芥(100 μmol/L)作用于淋巴细胞后,与对照组比较,染毒3 h DNA损伤差异无显著性,染毒6 h差异有显著性($P<0.05$),染毒9、12、24 h DNA损伤差异非常显著($P<0.01$),硫芥可诱导淋巴细胞DNA损伤且具有时间依赖性。



*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control

图1 荧光分光光度法检测硫芥诱导淋巴细胞DNA损伤

Fig 1 DNA strand breaks induced by sulfur mustard detected by fluorospectrophotometry

2.2 硫芥诱导淋巴细胞凋亡相关基因caspase-3 mRNA的表达

见图2、3,硫芥(100 μmol/L)作用于淋巴细胞0~6 h,Caspase-3 mRNA的表达量迅速增高并达到峰值,随后呈现下降趋势。根据实验结果可推测caspase-3表达在硫芥中毒早期即发生变化,Caspase-3有可能为硫芥淋巴细胞毒作用的一个早期变化指标。

2.3 硫芥诱导淋巴细胞凋亡相关蛋白caspase-3蛋白质的表达及活化

Caspase-3蛋白酶以非活性的前体形式(pro-caspase-3)存在于正常的细胞中,分子质量为32×10^3,要经过活化降解成分子质量为20×10^3和11×10^3两个亚单位,形成$(P20+P11)_2$四聚

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

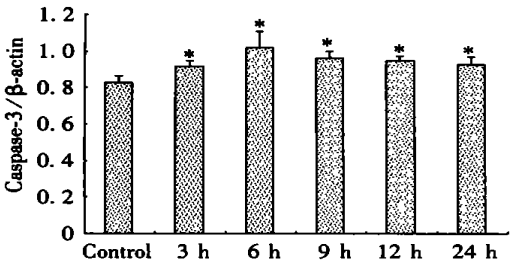
体才能发挥酶切活性。本实验通过免疫印迹检测, 见图 4, 实验对照组中仅可看到 caspase-3 酶原, 无活性亚单位片段的出现。实验组用 100 μmol/L 硫芥处理细胞后, Caspase 酶原被激活, Caspase-3 前体蛋白(32× 10^3)表达量逐渐增高, 其活化亚单位(20× 10^3)也出现表达并呈上升趋势。



M: PCR marker; 1: Negative control; 2: 3 h; 3: 6 h; 4: 9 h; 5: 12 h; 6: 24 h; 7: Positive control

图 2　RT-PCR 检测硫芥(100 μmol/L)诱导淋巴细胞凋亡相关蛋白 caspase-3 基因 mRNA 表达

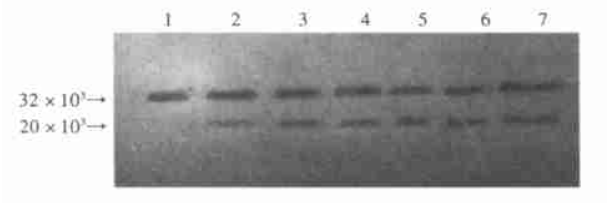
Fig 2　mRNA expression of caspase-3 on lymphocyte induced by sulfur mustard (100 μmol/L) detected by RT-PCR



*: $P<0.05$ *vs* control

图 3　RT-PCR 产物密度扫描比值(Caspase-3/β-actin)

Fig 3　Ratio of RT-PCR products caspase-3 to β-actin



1: Negative control; 2: 3 h; 3: 6 h; 4: 9 h; 5: 12 h; 6: 24 h; 7: Positive control

图 4　Western blot 检测 caspase-3 基因蛋白的表达

Fig 4　Protein expression of caspase-3 gene detected by Western blotting

3　讨论

实验表明烷化剂硫芥可诱导淋巴细胞凋亡, 造成 DNA 损伤, 且具有时间依赖效应, 现普遍认为一种依赖天门冬氨酸的半胱氨酸酶, 称之为 caspase (Cysteiny-lasparate specific proteinase)的特异性蛋白酶参与凋亡的发生[7]。在许多分子介导的细胞凋亡信号传导过程中作为效应分子的 caspase-3 参与了细胞凋亡的共同通路[8], 被认为是细胞凋亡发生的标志酶。正常情况下所有的 caspases 酶都以非活性的酶原形式存在, 当凋亡刺激信号出现后可通过膜表面死亡受体途径和线粒体途径传递至 caspases, 导致级联反应——"瀑布式"激活[9], 使正常细胞中以无活性酶原形式存在的 caspase-3 被上游的 caspases 激活, 然后以亚单位形式释放, 降解维持基因组稳定的蛋白质, 调控细胞周期的蛋白质或结构蛋白, 以及 DNA 片段产生因子等[10], 其结果阻止细胞进程, 丧失基因组稳定及 DNA 损伤修复机制。

Caspases 是细胞凋亡信号转导中的重要分子, 其切割与活化发生在细胞凋亡早期[11]。尽管大多数学者认为 caspases 在细胞凋亡的信号传导通路中处于核心地位, 细胞凋亡的共同通路, 然而现在研究显示, 细胞凋亡可能存在 caspases 非依赖性途径[12]。为进一步探讨硫芥诱导淋巴细胞凋亡的 caspase 依赖性, 我们利用 RT-PCR 和 Western blot 进行了 caspase-3 的表达活化研究。实验结果显示在硫芥作用早期, Caspase-3 转录加强, 同时 caspase-3 酶原活化形成 P20 片段, 活化的 caspase-3 识别并切割 DNA 片段化因子, 激活内源性 DNA 酶, 降解细胞染色体 DNA, 导致 DNA 的片段化, 形成细胞凋亡的一个显著特征[13]。DNA 损伤检测与 caspase-3 的表达活化比较, DNA 损伤较 caspase-3 表达增加及活化明显滞后, 进一步说明 caspase-3 基因确实在细胞凋亡的早期即被激活, Caspase-3 作用位点在凋亡级联反应的较上游环节, 故而其反应终点——由 Ca^{2+}/Mg^{2+} 依赖的核酸内切酶导致的细胞基因组 DNA 断裂之间存在时间差异。

该实验虽然不能排除 caspases 非依赖性途径的存在, 但是这一结果仍然可提示 caspase-3 在硫芥导致细胞 DNA 损伤的过程中发挥了重要的信号转导作用, 硫芥诱导的 caspase-3 的活化不可能是其细胞毒作用的一种伴随现象, 而是 caspase-3 的活化介导了硫芥的淋巴细胞毒作用, 导致细胞 DNA 损伤, Caspase-3 可能在硫芥早期细胞毒作用具有重要意义, 其活化的具体作用机制还有待于后续工作的进行。

参考文献:

[1] Persson S A, Sellstrom A. Chemical warfare agents-current review on protection and treatment[J]. Lakartidningen, 1991, 88(42): 3477—3481.

[2] Gross C L, Giles K C, Smith W J. L-oxothiazolidine 4-carboxylate pretreatment of isolated human peripheral blood lymphocytes reduces sulfur mustard cytotoxicity[J]. Cell Biol Toxicol, 1997, 13(3): 167—173.

[3] 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.

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

[4] Quan L T, Tewari M, O' Rourke K, *et al*. Proteolytic activation of the cell death protease Yama/CPP32 by granzyme B[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(5): 1972—1976.
[5] 余 斌, 李 芸, 盛 齐, 等. 超氧阴离子自由基 NIH3T3 细胞 DNA 损伤与 c-myc 基因的表达[J]. 中国医学科学院学报, 2000, 22(3): 259—262.
[6] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术实验技术[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999. 458—475.
[7] Green D R. Apoptotic pathways: the road to ruin[J]. Cell, 1998, 94(6): 695—698.
[8] Martin D A, Siegel R M, Zheng L, *et al*. Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8(FLICE/MACH alpha1) death signal[J]. J Biol Chem, 1998, 273(8): 4345—4349.
[9] Nagata S. Apoptosis by death factor[J]. Cell, 1997, 88(2): 355—365.
[10] Vincenz C, Dixit V M. Fas-associated death domain protein interleukin-1β-converting enzyme 2(FLICE2), an ICE/Ced-3 homologue is proximally involved in CD95- and p55-mediated death signaling[J]. J Biol Chem, 1998, 272(10): 6578—6583.
[11] Rosen A, Casciola-Rosen L. Autoantigens as substrates for apoptotic proteases: implications for the pathogenesis of systemic autoimmune disease[J]. Cell Death Differ, 1999, 6(1): 6—12.
[12] Kitanaka C, Kuchino Y. Caspase-independent programmed cell death with necrotic morphology[J]. Cell Death Differ, 1999, 6(6): 508—515.
[13] Galvan V, Brandimarti R, Roizman B. Herpes simplex 1 blocks caspase-3-independent pathways to cell death[J]. J Virol, 1999, 73(4): 3219—3226.

(编辑 汪勤俭)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2003)13-1130-01

以喘息发作为主要表现的气胸误诊分析

Misdiagnosis of pneumothorax with asthma as the main manifestation

姚洪英 (重庆广播电视大学医务室, 重庆 400039)

自发性气胸是内科常见疾病之一, 一般不难诊断。以喘息发作为主要表现的气胸, 由于肺部基础疾病表现突出, 往往掩盖气胸的症状与体征, 给诊断带来一定的困难, 常常误诊为其他急症。重庆永川市二人民医院自 1997 年 1 月至 2001 年 1 月共收治以喘息发作为主要表现的气胸患者 38 例, 其中 14 例被误诊, 误诊率达 36.8%, 现报告如下。

1 临床资料

本组 14 例患者中男性 10 例, 女性 4 例, 年龄 32~67 岁, 平均 57.5 岁。左侧气胸 8 例占 57.1%, 右侧气胸 4 例占 28.6%, 双侧气胸 2 例占 14.3%。

基础疾病: 有喘息型支气管炎、肺气肿、肺心病 8 例, 支气管哮喘 5 例, 妊娠期喘息 1 例。

临床表现: 诱发因素, 剧烈咳嗽 7 例, 用力提物 3 例, 激动 1 例, 无确切诱因 3 例。起病急骤者 11 例, 表现为突发气喘、端坐呼吸、大汗淋漓。3 例缓慢起病, 表现为在原有症状如咳嗽、呼吸困难等基础上出现气喘逐渐加重。14 例均无典型气胸体征。气胸类型: 闭合型气胸 8 例占 57.1%, 交通型气胸 3 例占 21.4%, 张力型气胸 2 例占 14.3%, 局限性气胸 1 例占 7.2%。气胸发作 1 次者 10 例, 发作 2 次者 3 例, 发作 3 次者 1 例。

X 线胸片检查: 显示肺压缩程度 10%~50%。其中 1 例因病情严重未做。

误诊: 误诊时间 3~48 h, 均误诊为喘息急性发作, 其中 5 例误诊为喘息持续状态。

治疗: 所有病例均给予补液、抗感染、激素、氨茶碱及吸氧等处理后病情无缓解, 胸片检查或诊断性穿刺显示胸腔内压明显升高而确诊为气胸。经胸穿抽气减压或胸腔闭式引流治疗后肺复张, 肺部喘鸣消失, 14 例病人全部治愈。

2 讨论

误诊原因主要有: ①该类患者临床表现以呼吸困难、气喘为主, 颇似哮喘急性发作。②查体不够仔细, 因该类患者既往有反复哮喘发作史, 未仔细查体先入为主的做出哮喘发作之诊断[1]。③因哮喘反复发作者, 合并有严重肺气肿, 双肺呼吸音低, 致使气胸体征不典型。④气胸发作时, 支气管扭曲或被压迫产生喘鸣而掩盖气胸征象。

避免误诊的措施: ①突然发生的呼吸困难、喘息, 尤其是曾经发生过气胸者, 应仔细查体, 了解有无气管偏移或两侧呼吸音不一致[2]。②凡慢性阻塞性肺病患者呼吸困难呈进行性缓慢加重而正规治疗症状不缓解者, 需首先考虑自发性气胸。③若气胸体征不典型, 经正规治疗哮喘不好转, 应及早行 X 线胸片检查或诊断性穿刺。

关键词: 喘息; 气胸; 误诊
中图法分类号: R561.4 文献标识码: B

参考文献:

[1] 柏 华, 马原野. 自发性血气胸误诊结核性胸膜炎 1 例[J]. 中国实用内科杂志, 1998, 18(5): 276.
[2] 陈灏珠. 内科学[M]. 第 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 1995. 123—125.

(编辑 薛国文)

作者简介: 姚洪英(1966—), 女, 四川省岳池县人, 主治医师, 主要从事呼吸内科临床诊治方面的研究。电话: (023)68583175

收稿日期: 2003-01-17; 修回日期: 2003-03-20

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