DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.06.042
第24卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 6
2002年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2002

文章编号:1000-5404(2002)06-0725-04

论著

九节龙皂甙对 Hela 细胞生长的抑制作用

梁克明[1],谢艳华[2],石 梅[1],王四旺[2],王晓娟[2] (第四军医大学:[1]西京医院放疗中心,[2]药物研究所,西安 710033)

提 要:目的 观察九节龙皂甙(Ardiusilloside)对人宫颈癌Hela细胞的抑制作用。方法 九节龙皂甙6.25 mg·L^{-1}处理Hela细胞0~72 h,在不同时间点采用光镜观察Hela细胞形态,以琼脂糖凝胶电泳检测Hela细胞凋亡DNA的梯形带;应用特异性Ca^{2+}荧光探测剂Fluo-3/AM在LSCM条件下检测不同时期细胞内Ca^{2+}分布情况。结果 光镜下体外培养的Hela细胞在九节龙皂甙作用24 h开始出现细胞质皱缩和细胞核凝缩等凋亡的形态学特征。60、72 h均检测出DNA梯形带等凋亡的生物化学特征。诱导Hela细胞48、60、72 h内Ca^{2+}严重超载且维持在较高浓度水平。结论 九节龙皂甙对体外培养的Hela细胞具有明显的抑制作用且诱导Hela细胞凋亡发生;细胞凋亡时细胞内[Ca^{2+}]增加且维持在较高水平。

关键词:九节龙皂甙;细胞凋亡;胞内钙;Fluo-3
中图法分类号:R730.21;R737.33;R979.1 文献标识码:A

Inhibitory effect of Ardipusillide on human cervical carcinoma cells

LIANG Ke-ming, XIE Yan-hua, SHI Mei, WANG Si-wang, WANG Xiao-juan (Radiotherapy Center, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China)

Abstract: Objective To observe the inhibitory effect of Ardipusillide on human cervical carcinoma cells (Hela cells). Methods Ardipusillide at 0.25 mg/L was added to the culture medium of Hela cells and cocultured for 0—72 h. The cells were observed at different time points. Apoptosis was detected with light microscope and DNA electrophoresis, while [Ca^{2+}]i was determined with confocal laser scanning microscopy. Results Changes of early apoptosis were found in Hela cells after treated with Ardipusillide for 24 h, and DNA ladder was found in 60 and 72 h samples [Ca^{2+}]i increased and sustained at arather high level after induced with Ardipusilliae for 60 and 72 h. Conclusion Ardipusillide has an inhibitory effect on Hela cells *in vitro* and could induce apoptosis. At different time points, intracellular free Ca2+ concentrations are maintained at a sustained increase.

Key words: Ardipusillide; apoptosis; intracellular calcium; Fluo-3

Ca^{2+}是细胞内最普遍且重要的信号分子,在调节细胞的功能上起重要作用。Ca^{2+}浓度([Ca^{2+}])能反映细胞的状态和药物、环境对细胞的影响[1]。川产九节龙(Ardisea pusilla A. PC)系紫金牛科紫金牛属植物的全草,九节龙皂甙(Ardipusilloside)是从该全草中分离出的单体,经初步药理试验表明九节龙皂甙具有提高免疫功能的作用[2]。我们应用细胞形态学观察,激光共聚焦显微镜,琼脂糖凝胶电泳分析九节龙皂甙抑制Hela细胞生长的机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 宫颈癌(Hela)细胞株为本校防原医学教研室提供。

1.1.2 试剂与药品 Fluo-3:美国BIO-RAD产品。二甲基亚砜(DMSO)和RPMI1640:SIGMA产品。胰蛋白酶:华美生物工程公司产品。小牛血清:杭州四季青生物工程材料研究所产品。九节龙皂甙:本校药物研究所提纯,批号:971017。

1.1.3 仪器 激光扫描共聚焦显微镜(Laser scanning confocal microscopy, LSCM),型号为Bio-Rad MRC-1024,激发波长488 nm,发射波长515 nm,共聚焦系统由Bio-Rad公司提供的软件控制,在pentium 90计算机中运行,显微聚焦旋钮由步进马达控制。图象采集的物镜镜头为Plan-Neofluar 40X油浸镜,数据孔径(NA)为1.3,图像存为512×512相素类型,扫描用激光值依据样本的不同可以在共聚焦系统提供的梯级值中选择。同期行荧光显微镜观察、照相。

1.2 方法

1.2.1 Hela细胞培养及处理 在含100 ml·L^{-1}小牛血清的RPMI1640培养液中传代,收集对数生长期细胞,调整浓度10^8·L^{-1},重新悬浮于培养液中,将细胞加入特制的50 mm培养皿内(培养皿下底部中央开一个直径为1 cm的孔,从下方粘贴一个盖玻片,在其内面预先涂多聚赖氨酸),置37 ℃,5% CO_2饱和度的二氧化碳培养箱培养4 h,使细胞贴壁。用含100 ml·L^{-1}胎牛血清RPMI1640培养液稀释九节龙皂甙,使其最终浓度为6.25 mg·L^{-1}。去除培养皿内上清液,实验组加入6.25 mg·L^{-1}的九节龙皂甙孵育液5 ml,对照组加入5 ml细胞培养液,继续培养48、60、72 h。

1.2.2 DNA梯形带的检测 用缓冲液PCD(NaCl 0.1 mol·L^{-1},EDTA 0.01 mol细胞,加0.1 g·L^{-1}SDS至终浓度为0.06 mg·L^{-1}。68 ℃孵育1 h。加8 mol·L^{-1} KAC至终浓度1.2 mol·L^{-1},冰浴1 h,12 000×g离心15 min。取上清加Rnase至终浓

作者简介:梁克明(1969—),男,吉林省通化市人,硕士研究生,医师,主要从事肿瘤药理方面的研究。电话:(029)3375540

收稿日期:2001-01-15;修回日期:2001-03-26

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

度 20 mg·L^{-1}, 37 ℃ 1 h。加等体积的苯酚:氯仿混合液,离心,取上清。加等体积的异丙醇并混合,于－20 ℃过夜。次日,离心回收 DNA 沉淀,0.7 L·L^{-1}乙醇洗涤,室温干燥,于 H_2O 中溶解 DNA,12 g·L^{-1}琼脂糖凝胶电泳分析结果。

1.2.3 检测原理及方法[3] LSCM 是近年来新出现的一种高技术产品,它能对样品的任一点清晰成像,图像对比度较普通显微镜有明显提高,还可以实现对细胞内部进行光学断层扫描成像,特别是它能对活细胞内部的离子分布及变化进行测量。选用钙荧光探针 Fluo-3Am,fluo-3Am 的游离酸形式有较强的亲水性,不易透过细胞膜,但与 Ca^{2+} 结合并产生荧光强度的变化。在 Fluo-3Am 上结合上亲脂的乙酰羧甲基酯(Acetoxymethyl esters, AM)后就成为 AM 衍生物形式,它可以透过细胞进入胞内,胞浆酯酶随后将它水解成游离酸形式在胞浆内与游离 Ca^{2+} 结合形成复合物[4],根据其产生的荧光图像即可测出胞内游离 Ca^{2+} 与 Ca^{2+} 结合的 Fluo-3 可以被 488 nm 的氩离子激光激发,可在 525 nm 处探测到荧光发射,其荧光强度的变化,可指示胞内游离钙浓度的相对变化。需预先制备的贮备液有 Fluo-3 Am (Molecular probes, Inc), 1 g·L^{-1}溶于二甲基亚砜(DMSO)中混匀后,于－20 ℃保存备用。负载前 30 min, Fluo-3Am 贮备液溶于 RPMI1640 液中振荡摇匀,将此孵育液滴加到含 Hela 细胞的特制培养皿中,Fluo-3Am 的最终浓度为 3 μmol·L^{-1},在 37 ℃水浴锅内避光孵育 1.5 h,用 RPMI1 640 液冲液 2 次,即可在 LSCM 下观察,运用数字传入式摄像机和高速度计算机处理软件得到清晰的细胞内 Ca^{2+} 分布图像。

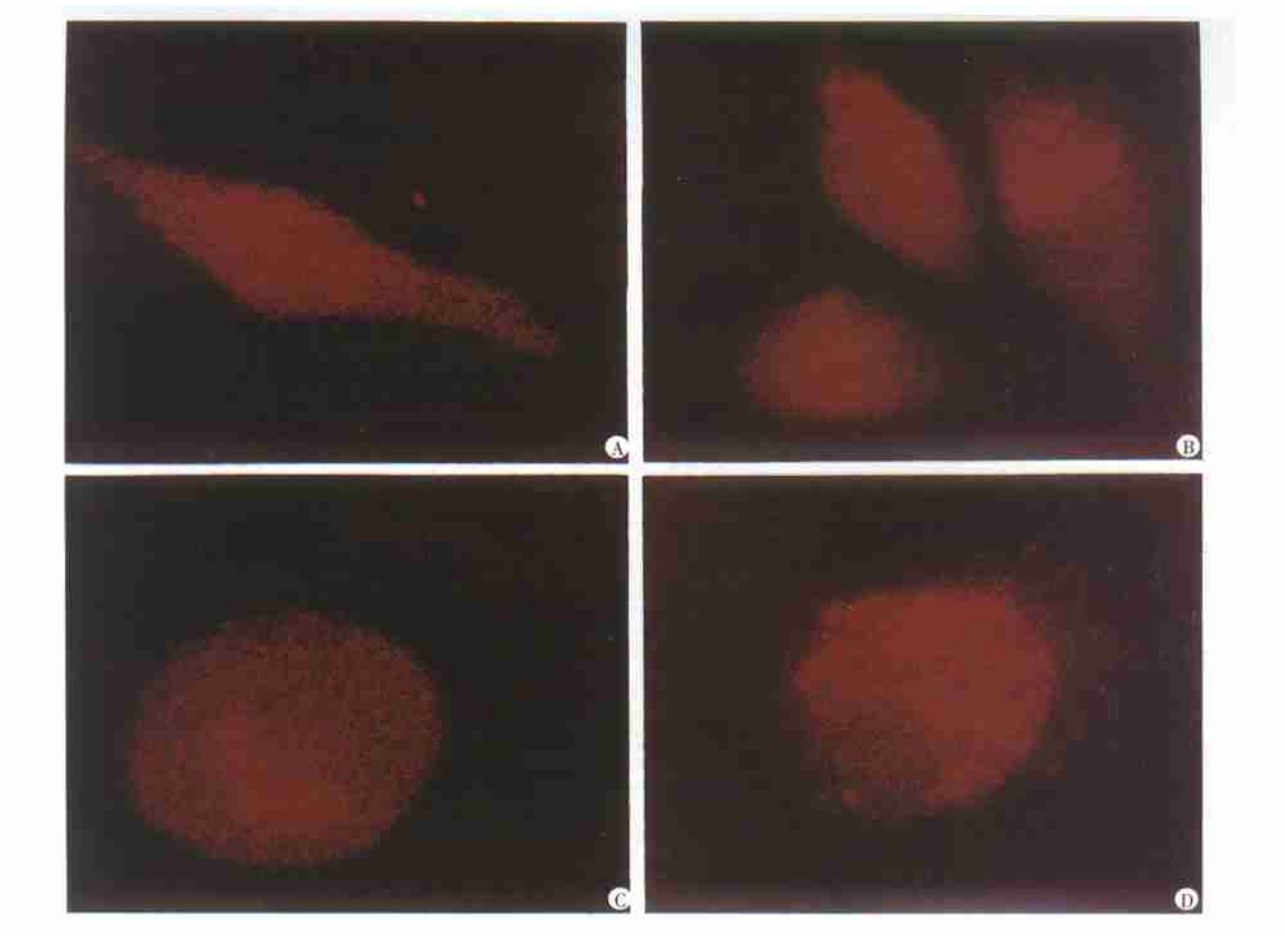
2 结果

2.1 体外人单 Hela 细胞的光镜观察结果

九节龙皂甙处理 0~72 h,细胞发生一系列变化,因细胞周期不同步,同一时间细胞有多种形态共存。倒置显微镜观察活细胞 24 h 后,细胞质皱缩和细胞核凝缩明显,体积大小不等,72 h 后大量细胞死亡、漂浮。对照组细胞形态正常。

2.2 LSCM 检测到

细胞核染色质聚集于核膜边缘成块状、环状或新月状,染色体散乱分布于细胞中,染色体聚集成团,核碎裂;胞浆皱缩,出现膜结合小泡,形成凋亡小体,见图 1。



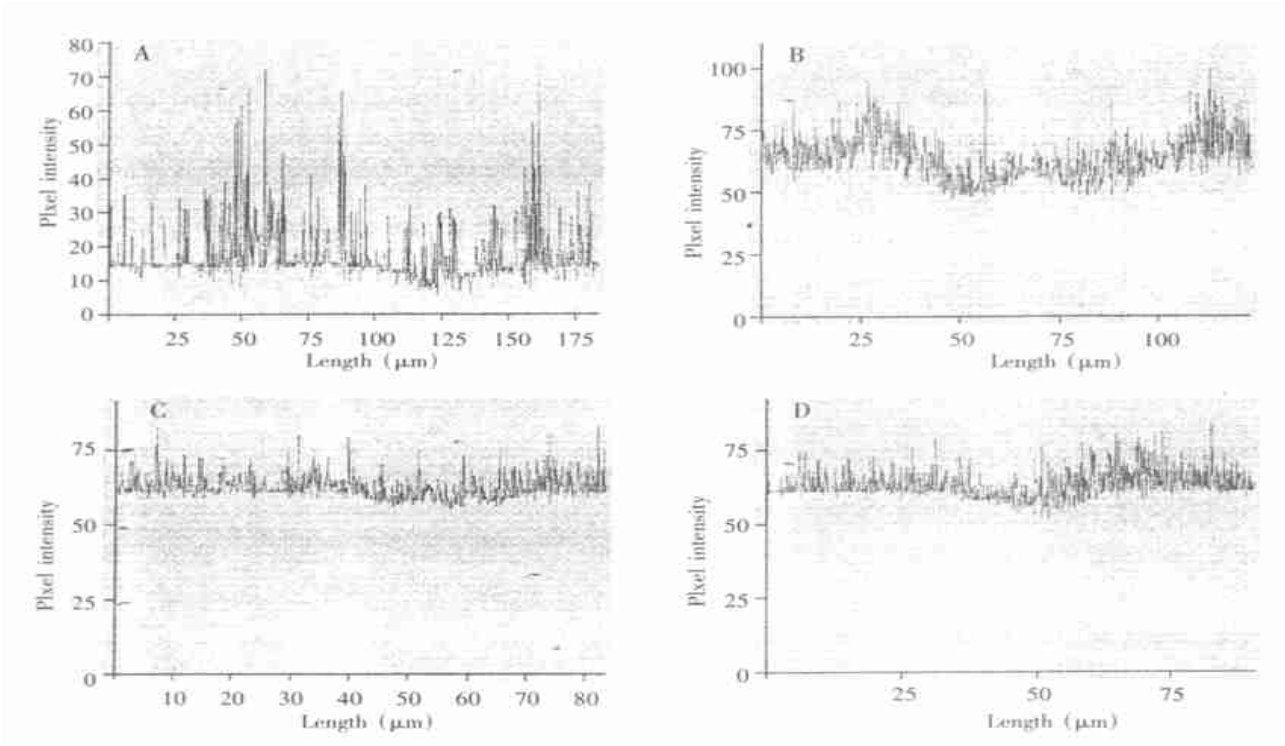
A: Control cells (10× 40× 3.46); B, C: Nuclear condensation (10×40× 3.15); D: Apoptosis body and cellular membrane blebbing (10×40×7.87)

图 1 九节龙皂甙诱导 **Hela** 细胞凋亡的形态观察

Fig 1 Morphological features of Ardipusilloside-induced apoptosis of Hela cells

Hela 细胞中的 Ca^{2+} 荧光强度,见图 2, B~D 表明 Hela 细胞内均有强荧光。A 代表未经九节龙皂甙处理的 Hela 细胞,其象素荧光强度(Pixel intensity)平均为 16.98, B~D 表示分别经九节龙皂甙处理 48, 60, 72 h 的象素荧光强度,分别为 63.40, 62.34, 62.92。

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



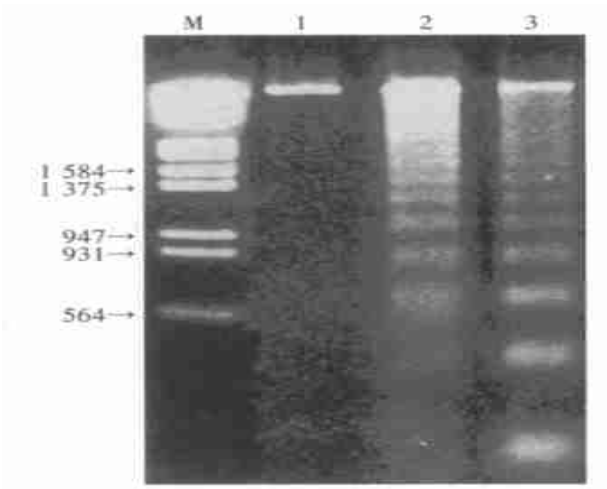
A: Control cells; B—D: Ardipusilloside—induced cells in 48, 60, and 72 h after treatment

图 2　**Hela** 细胞中 Ca^{2+} 像素强度

Fig 2　Pixel intensity of intracellular free Ca^{2+} concentration in Hela cells

2.3　琼脂糖凝胶电泳检测结果

在九节龙皂甙作用下, 经体外培养 60, 72 h 的 Hela 细胞在琼脂糖凝胶电泳上呈现明显的 DNA 梯形带, 见图 3。表明染色体 DNA 被降解成核小体的整倍数。



M: Marker; 1: Ardipusilloside treated for 48 h; 2: Ardipusilloside treated for 60 h; 3: Ardipusilloside treated for 72 h

图 3　九节龙皂甙作用下, **Hela** 细胞 **DNA** 在电泳上形成梯形带

Fig 3　Electrophoresis of Hale cells with Ardipusilloside treatment showing DNA ladder

3　讨论

Ca^{2+} 作为一种第二信使不仅在各种细胞包括高度分化的神经元中传递信息, 维持细胞内外游离钙离子浓度和变化, 而且影响着各种基本生命现象如受精卵增殖分化及死亡凋亡或坏死[5]。Jiang 等[6] 利用 Ca^{2+}-ATPase 抑制剂(Thapsigargin)研究鼠胸腺细胞凋亡表明, 在启动胸腺细胞凋亡程序前, 细胞内[Ca^{2+}]必须达到一定的阈值并且维持到触发凋亡的临界水平值, [Ca^{2+}]的瞬间增加是不能启动细胞凋亡程序的。细胞凋亡时最显著的变化是 DNA 的断裂。钙离子可直接激活核酸内切酶促进 DNA 断裂, 也可通过激活蛋白酶、磷酸酶和磷酯酶导致染色质结构完整性的丧失。研究表明, 核内钙浓度的持续升高是导致细胞凋亡的主要原因。

人乳腺癌细胞在肿瘤坏死因子的作用下产生核内钙积聚, 并激活核酸内切酶导致 DNA 断裂和细胞凋亡[7]。分离的肝细胞核在 ATP 作用下可摄取 Ca^{2+}。将肝细胞核在含钙液中孵育, 当不加 ATP 时, 由于核钙增加增加不明显, 核 DNA 断裂也没有明显的增加。当加入 ATP 后, 核在 ATP 作用下摄取钙。10 min 后 DNA 断裂明显增加。抑制肝细胞钙泵活性和钙摄入的各种药物, 都能阻断钙激活的 DNA 断裂。表明细胞核对钙的摄入可刺激核 DNA 断裂[8]。据报道, 细胞内

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

Ca^{2+}的堆积和重新分布以及细胞核内 Ca^{2+} 的增多可导致细胞凋亡[9]。

本实验通过细胞形态学的观察、细胞 DNA 的琼脂糖凝胶电泳分析、细胞内[Ca^{2+}]的测定，结果证明九节龙皂甙能诱导 Hela 细胞凋亡。我们应用 ISCM 结合 Fluo-3Am 染色技术对九节龙皂甙处理的 Hela 细胞进行了检测，6.25 mg·L^{-1}九节龙皂甙处理 Hela 细胞 48，60，72 h 的结果表明，细胞内 Ca^{2+} 像素线荧光强度由阴性对照组平均 16.98 分别增加到 63.40，62.34，62.92，细胞内 Ca^{2+} 荧光强度增加明显并且维持在较高浓度水平，同时检测到间期细胞和分裂期细胞凋亡形态特征。6.25 mg·L^{-1}九节龙皂甙作用 Hela 细胞 0～72 h，用流式细胞仪检测细胞凋亡情况，发现诱导 48 h 后出现了细胞凋亡峰[10]。提示九节龙皂甙延迟细胞凋亡可能与细胞内 Ca^{2+} 浓度的变化有关。

近年的研究表明[11]，几乎在所有真核细胞的胞浆中，都含有称为钙调蛋白（Calmodulin）的蛋白质，当 Ca^{2+} 与钙调蛋白形成复合体后，就具有了调节细胞内多种功能的能力，主要功能是激活相应的蛋白激酶和磷酸酶。细胞内 Ca^{2+} 的较高水平可能对启动凋亡程序，导致细胞凋亡起重要作用。

总之，九节龙皂甙对 Hela 细胞具有诱导凋亡的能力，Hela 细胞胞内[Ca^{2+}]i 的增加且维持在较高浓度水平，对激活 Hela 细胞凋亡程序起重要作用。其详细机制还有待进一步研究阐明。

参考文献：

[1] Kennedy M B. Regulation of neuronal function by calcium [J]. Trends Neurosci, 1989, 12(11): 417－420.

[2] Zhang Q H, Wang X J, Miao Z C, *et al*. Studies on the saponin constituents of jiu jie long [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 1993, 28(9): 673－678.

[3] Paola D A, Franco V. Spatial and temporal Ca^{2+} signaling in articular chondrocytes [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1995, 215(1): 129－135.

[4] Wang C M, Wang X F. Application of calcium fluorescent probes in medicine experiment [J]. Di-si Junyi Daxue Xuebao (J Fourth Milit Med Univ), 1997, 18(special issue): 64－66.

[5] Clapham D E. Calcium Signaling [J]. Cell, 1995, 80(): 259－268.

[6] Jiang S, Chow S C, Nicotera P, *et al*. Intracellular Ca^{2+} signals activate apoptosis in thymocytes: studies using the Ca-ATPase inhibitor thapsigargin [J]. Exp Cell Res, 1994, 212(1): 84－92.

[7] Bellomo G, Perotti M, Taddei F, *et al*. Tumor necrosis factor α induces apoptosis in mammary adenocarcinoma cells by an increase in intranuclear free Ca^{2+} concentration and DNA fragmentation [J]. Cancer Res, 1992, 52(5): 1 342－1 346.

[8] Yamaguchi M, Oishi K. Effect of nuclear Ca^{2+} uptake inhibitors on Ca^{2+}-activated DNA fragmentation in rat liver nuclei [J]. Mol Cell Biochem, 1995, 148(1): 33－37.

[9] Fang M, Zhang H, Xue S, *et al*. Intracellular calcium distribution in apoptosis of HL-60 cells induced by harringtonine: intranuclear accumulation and regionalization [J]. Cancer lett, 1998, 127(1): 113－121.

[10] Liang K M, Wang S W, Xie Y H. A flow cytometric study: apoptosis induced by ardipusilloside in a human cancer cell line Hela [J]. Di-si Junyi Daxue Xuebao (J Fourth Milit Med Univ), 2001, 22(5): 467.

[11] Zhou Y J, Zhang J R. Physiology [M]. 3rd Edition. Beijing: Renmin Weisheng Chubanshe (People's Medical Publishing House). 1994. 51－53.

（编辑 郭建秀）

（上接 724 页）

量非常重要的手段。技术阅片与诊断阅片有共同之处，但也有许多不同的地方。诊断阅片主要是围绕所观照片与疾病的关系而展开的。技术阅片不仅要考虑到诊断疾病的要求，还要从技术角度正确、全面地评定照片质量。

3.1 对技术员的要求

技术组阅片的目的在于提高技术员业务能力，照出优质片。由于诸多因素制约着影像质量，因此，作为技术员，必须全面了解影像产生的各个环节及每一环节对质量的影响。要正确把握这些环节和分析其影响因素，技术人员需要掌握和精通相关的专业理论知识。比如，对诊断知识的掌握；X 线设备，洗片机，显、定影液的工作原理、应用及注意事项；胶片、暗盒的结构、原理、感光特性及如何选择；各种部位的正确摆位；大、小焦点的正确选择；mA、KV 的合理调节，等等。

3.2 阅片的内容

影响照片质量的因素很多，技术阅片的内容概括起来可从以下几方面分析。

首先，照片是否符合诊断所需。照片的目的是为诊断疾病提供依据。只有目的明确后，才能最终为病人提供满意的服务，照出符合诊断要求的优质片。要做到这一点，技术员要具备一定的诊断基础。否则，其照出的片子再好也不能算作优质片。

其次，摆位是否符合要求，范围是否包全，左右、日期是否准确。位置摆的不标准，左右、日期有错，不仅影响诊断，甚至有可能造成严重差错、事故。

最后，技术条件是否恰当。选择曝光条件是否合适；能否正确反映影像的密度；是否可分辨各部细节的层次和有无良好的清晰度；对比度如何；影像失真度是否最小；有无伪影及划痕。这些，都应纳入阅片内容[2]。

3.3 阅片的方法

阅片通常在技术组长带领下进行，全体技术人员参加。对于照片的优劣，要全面分析，综合评定。是否达到检查目的、有无错误或者其它不足；对带有典型问题的片子更要寻找原因何在、如何解决。以便在以后的工作中注意改进；对原因不明确或尚不能找出问题的要进一步探讨。

3.4 阅片的时间

分日读制、周读制和月读制。日读制按常规每天 1 次；周读制是每 1 周确定 1～2 次进行阅片；月读制是阶段性的技术交流总结会，对一个月内典型的照片和突出的问题进行学习和讨论。

总之，我们通过应用技术组阅片制度，提高了甲片率，减少了废片率，使受检者达到了检查目的。技术组阅片制度的应用，对提高技术员素质和照片质量都有不可忽视的作用。

关键词：技术；阅片；照片质量

中图法分类号：R192 文献标识码：B

参考文献：

[1] 佟俊清. 实用 X 线检查技术解疑 [M]. 沈阳：辽宁科学技术出版社，1992. 49－50.

[2] 孟代英. X 线投照技术 [M]. 济南：山东科学技术出版社，1983. 43－46.

（编辑 郭建秀）

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