DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.11.009
第23卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 11
2001年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2001

文章编号:1000-5404(2001)11-1273-03

论著

昆明山海棠总生物碱诱发 HL-60 细胞凋亡的观察

敖 琳[1],曹 佳[1],徐 颖[2],杨录军[1],周紫垣[1],刘胜学[1] (第三军医大学:[1]预防医学系卫生毒理学教研室;[2]附属新桥医院药理基地;重庆 400038)

提 要:目的 观察昆明山海棠(TH)总生物碱诱导白血病细胞凋亡的发生情况。方法 应用台盼蓝染色法,荧光双重染色法,DNA 电泳结合流式细胞仪对 HL-60 细胞的凋亡进行观测。结果 HL-60 细胞在 TH 总生物碱作用下出现典型的细胞凋亡特征,包括细胞形态改变、DNA 梯状带及亚 G_1 峰,且动态变化过程较为一致。结论 TH 总生物碱具有较强的诱导白血病 HL-60 细胞凋亡的能力,总生物碱是 TH 诱导凋亡的有效成份之一。

关键词:昆明山海棠;总生物碱;细胞凋亡;HL-60 细胞
中图法分类号:R282.71;R329.28 文献标识码:A

Apoptosis of human promyelocytic leukemia HL-60 cells induced by total alkaloids of *Tripterygium hypoglaucum* (Level.) Hutch

AO Lin, CAO Jia, XU Ying, YANG Lu-jun, ZHOU Zi-yuan, LIU Sheng-xue (Laboratory of Molecular Toxicology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the apoptosis of human promyelocytic leukemia HL-60 cells induced by total alkaloids of *Tripterygium hypoglaucum* (Level.) Hutch (TH). Methods Apoptosis induced by total alkaloids of TH in HL-60 cells was determined with trypan blue test, fluorescent, PI double staining, agarose gel electrophoresis and flow cytometry analysis techniques. Results HL-60 cell treated with the total alkaloids of TH demonstrated condensation and fragmentation of chromosomes. Nuclear DNA of apoptotic cells displayed typical ladder pattern which characterized internucleosomal DNA fragmentation, and the sub-G_1 peaks appeared in flow cytometry analysis. Conclusion The total alkaloids of TH have strong effect to induce apoptosis in HL-60 cells and are effective ingredients of TH.

Key words: TH; total alkaloid; apoptosis; HL-60 cell

目前认为,肿瘤不仅是细胞增殖与分化异常的疾病,同时也是凋亡异常的疾病,能否诱导靶细胞发生凋亡已经成为鉴定抗癌药物是否有效的一个重要指标。近年来的研究表明从毒副作用相对较小的中药中寻找新的抗癌药物是一个积极的方向。中药昆明山海棠(*Tripterygium hypoglaucum* Hutch,简称 TH)属卫茅科雷公藤属植物,我们首次报道了 TH 水提取液能诱导多种细胞凋亡,尤其对 Jurkat,HL-60 白血病细胞有较强的凋亡诱导效率,提示 TH 可能成为一种新的抗肿瘤药物[1,2]。但 TH 水提取液的成份复杂,有必要进一步寻找其有效成份,为此,我们提取 TH 的主要成份之一的总生物碱,并研究其诱导 HL-60 细胞凋亡的发生情况。

1 材料与方法

1.1 实验材料

TH 购自云南省医药公司。Hoechst 33342, PI 荧光染料及 RNase A 为 Sigma 公司产品,蛋白酶 K 为华美公司产品。

HL-60 细胞由本室保存,培养于 10% 小牛血清的 RPMI 1640,传代至旺盛生长后,试验前调整细胞浓度为 $2\times10^8\cdot L^{-1}$。

1.2 实验方法

1.2.1 TH 总生物碱的提取[3] 取 TH 根块,粉碎后用 60% 乙醇浸泡 6 d,滤出药液,水浴浓缩。加入 HCl 酸化后,滤出药液,用乙醚和氯仿各萃取 2 次,保留水相。加入 Na_2CO_3 碱化,用氯仿萃取 2 次,保留有机相。水浴挥干后,得淡黄色固体,加入二甲基亚砜(DMSO)溶解,^{60}Co 照射灭菌,分装后 -20 ℃保存。TH 总生物碱溶液浓度为 14 $g\cdot L^{-1}$。

1.2.2 细胞存活率测定 细胞经药物处理后,于 0, 4, 12, 24, 48 h 采样。加入台盼蓝染液至终浓度 0.4%,染色 2~5 min 后,滴片,计算细胞存活率。

1.2.3 荧光双重染色 细胞悬液中加入荧光染液 Hoechst 33342 至终浓度 10 $\mu mol\cdot L^{-1}$, PI 至终浓度 100 $mg\cdot L^{-1}$,避光染色 15 min,荧光显微镜下观察。

1.2.4 DNA 裂解片段分析 每样品收集 1×10^6 个细胞,加入 0.5 ml 细胞裂解液(10 $mmol\cdot L^{-1}$ Tris·Cl, 10 $mmol\cdot L^{-1}$ EDTA, pH 8.0, 0.5% SDS, 0.1% RNase A)置 37 ℃保温 1 h。加入蛋白酶 K 至 100 $mg\cdot L^{-1}$, 50 ℃保温 3 h。2% 琼脂糖凝胶电泳 5 h。

1.2.5 流式细胞仪检测 细胞加入 70% 乙醇固定 24 h 以上,实验前用磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)洗去固定液,50 $mg\cdot L^{-1}$ RNase A 37 ℃消化 1 h, PI 染色 30 min 后上机检测,结果用 LysisⅡ软件分析。

1.2.6 统计学处理 数据由第三军医大学数学教研室

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30100241);第三军医大学科研基金资助项目
作者简介:敖 琳(1971—),女,重庆市人,硕士,讲师,主要从事遗传毒理和分子毒理学研究,发表论文 5 篇。电话:(023)68752295
收稿日期:2001-02-07;修回日期:2001-06-20

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

SPM R 软件包处理，采用双因素和单因素方差分析。

2 结果

2.1 不同浓度 TH 总生物碱对细胞活性的影响

TH 总生物碱能显著降低细胞存活率，并存在明显的量效和时效关系。各剂量组（35～140 mg·L^{-1}）随处理时间延长，细胞存活率逐渐降低。台盼蓝染色阳性的继发性坏死细胞出现相对缓慢，如 70 mg·L^{-1}作用 12 h 细胞坏死率仅 8.8%，24 h 升高为 18.7%，之后细胞存活率才开始大幅度降低，见图 1。

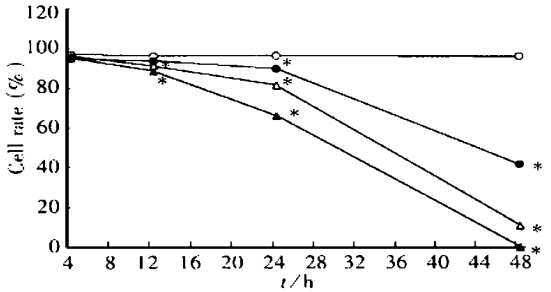


图 1 TH 总生物碱对 HL-60 细胞活性的影响

Fig 1 Effect of total alkaloids of TH on the activity of HL-60 cells （$\bar{x}\pm s$, $n=3$）

○: Control; ●: 35 mg·L^{-1}; △: 70 mg·L^{-1}; ▲: 140 mg·L^{-1}; *: $P<0.05$ *vs* control

2.2 凋亡细胞的形态学观察

利用 Hoechst 33342 及 PI 双重荧光染色发现，TH 总生物碱处理后，凋亡细胞主要表现为核固缩，染色质凝聚及边集。药物作用后期，镜下能观察到大量凋亡小体及 PI 染色阳性的继发性坏死细胞，见图 2。

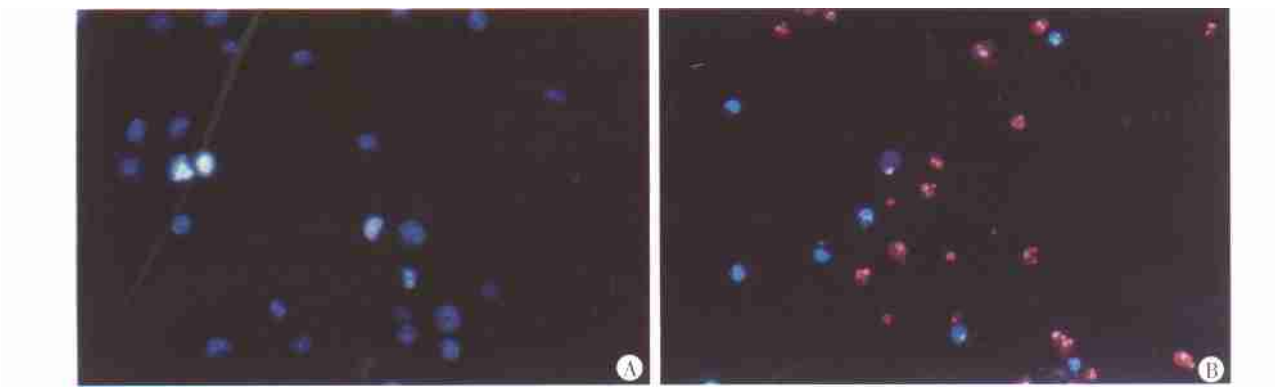


图 2 HL-60 细胞的荧光染色照片

Fig 2 Flourescence-micrographs of HL-60 cells after treated with 70 mg·L^{-1} total alkaloids of TH （Hoechst 33342 and PI staining × 200） A: 12 h; B: 24 h

2.3 凋亡细胞的 DNA 电泳结果

TH 总生物碱可诱导 HL-60 细胞出现典型的梯状带，70 mg·L^{-1}处理后，梯状带从 8 h 开始出现，一直持续到 48 h，见图 3。

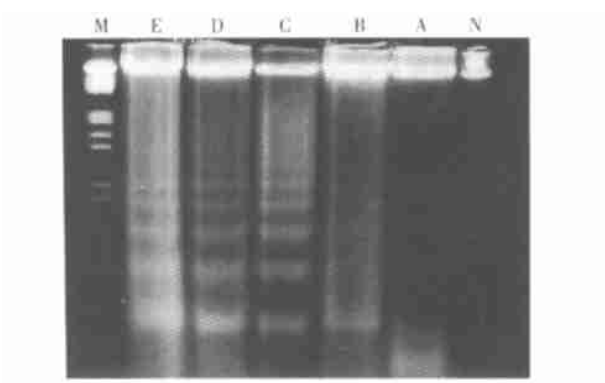


图 3 TH 总生物碱（70 mg·L^{-1}）处理 HL-60 细胞的 DNA 电泳结果

Fig 3 Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from HL-60 cells

M: λDNA/ *EcoR* Ⅰ ＋ *Hind* Ⅲ DNA marker; N: control; A, B, C, D, E: DNA samples obtained at the 4th, 8th, 12th, 24th and 48th hour after 70 mg·L^{-1} total alkaloids of TH treatment

2.4 流式细胞仪（FCM）分析结果

TH 总生物碱可诱导细胞出现典型的亚 G_1 峰。正常 HL-60 细胞的凋亡率为 1.48%，总生物碱（70 mg·L^{-1}）处理后，凋亡率显著升高，4 h 为 7.51%，12 h 为 17.66%，24 h 则达 62.83%，此后维持较长时间的高台期。同步 DNA 电泳结果与 FCM 分析显示了相同的趋势，结合细胞活性检测表明，细胞凋亡的发生明显早于继发性坏死的出现，见图 4。

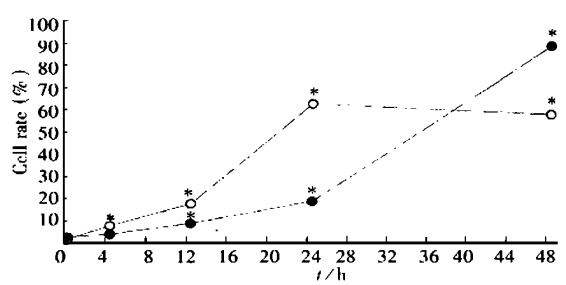


图 4 TH 总生物碱（70 mg·L^{-1}）对 HL-60 细胞凋亡的影响

Fig 4 Effect of total alkaloids of TH (70 mg·L^{-1}) on the apoptosis of HL-60 cells （$\bar{x}\pm s$, $n=3$）

○: apoptosis rate; ●: necrosis rate; *: $P<0.05$ *vs* 0 h

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

3 讨论

近年来,对天然药物,尤其是中国传统药物的抗癌作用研究日益增多,并且取得了许多有价值的研究成果[4]。昆明山海棠是云南省特产中药,卫茅科雷公藤属植物。在中医临床上,TH 广泛用于治疗类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、甲亢等自身免疫性疾病[5],同时,临床应用及实验研究均发现 TH 具有明显的抗肿瘤效应[6,7]。我们前期的研究发现 TH 水提取液能诱导包括 Jurkat, HL-60 白血病细胞, NIH3T3 细胞在内的多种细胞发生凋亡,提示 TH 可能发展成为一种新的抗癌药物[1],因此,有必要进一步分离提纯其有效成份。对 TH 主要化学成分的研究表明,生物碱尤其是精脒类生物碱有抗分裂活性,大环酯类生物碱具有多酯键,亲脂性强。因此,TH 中的生物碱成份是否具有抗肿瘤活性有待进一步研究[8,9]。此外,临床研究证明 TH 的毒性小,安全范围大,其生物碱成份在治疗自身免疫性疾病方面疗效最好且无毒副作用[4]。因此,研究 TH 的生物碱成份诱导细胞凋亡的作用及可能的作用机制,对于扩大其药用价值及开发新的抗癌药物均具有重要意义。

由于体外培养细胞体系中缺乏吞噬细胞的清除机制,因而凋亡细胞最终会出现膜破裂坏死的现象,即继发性坏死。本研究发现 TH 总生物碱处理后,台盼蓝染色阳性的坏死细胞出现相对缓慢,同步 FCM 分析则显示,细胞凋亡的出现较为迅速,TH 总生物碱(70 mg·L^{-1})处理后 4 h,细胞凋亡率即有明显升高;处理后 12 h,细胞凋亡率开始呈直线上升,至 24 h,凋亡率已达 62.83%,而此时细胞活性才开始出现大幅度降低。FCM 分析与细胞活性检测相结合,提示诱导凋亡是 TH 杀灭 HL-60 细胞的重要机制,细胞死亡是凋亡细胞发生继发性坏死的结果。TH 总生物碱处理 HL-60 细胞后有典型的亚 G_1 峰出现,自 4 h 开始,亚 G_1 期细胞逐渐增多,并维持较长时间的高台期,表明药物作用全程(0~48 h)中凋亡现象持续存在并维持较高水平。

核酸内切酶激活介导的核小体 DNA 片段一直被认为是凋亡细胞的生物化学标志,本实验发现总生物碱处理细胞后能观察到典型的梯状带。此外,采用 Hoechst 33342 与 PI 双重染色法,观察到典型的凋亡细胞核形态。

本实验综合应用多种细胞凋亡检测方法,证实 TH 总生物碱具有较强的诱导细胞发生凋亡的能力,这为进一步研究其作用机制打下了基础。

参考文献:

[1] 曹 佳, Michael Nusse. 昆明山海棠诱导 Jurkat 等 3 个细胞株发生细胞凋亡[J]. 科学通报, 1999, 44(11): 1 169—1 173.
[2] 刘胜学, 曹 佳, 安 辉, 等. 昆明山海棠对人白血病细胞 HPRT 位点的影响[J]. 第三军医大学学报, 1999, 2(2): 113—115.
[3] 中国科学院上海药物研究所. 中草药有效成分提取与分离[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1983. 263—266.
[4] Chen G Q, Zhu J, Shi G Y, *et al*. *In vitro* studies on cellular and molecular mechanism of arsenic trioxide (As_2O_3) in treatment of acute promyelocytic leukemia: AS_2O_3 induces NB_4 cell apoptosis with downregulation of Bcl-2 expression and modulation of PML-RARα/PML proteins[J]. Blood, 1996, 88(3): 1 052—1 061.
[5] 舒尚义. 昆明山海棠毒性及毒性成份的研究[J]. 云南中医杂志, 1983, 4(60): 43—44.
[6] 王士民, 王 意, 张珠涛 等. 昆明山海棠对雄性大鼠的抗生育作用及其可逆性的研究[J]. 中国药学杂志, 1989, 24(11): 652—654.
[7] 张覃沐, 陈正玉, 林 晨. 雷公藤内酯抗肿瘤作用及对小鼠免疫功能的影响[J]. 中国药理学报, 1981, 2(2): 128—131.
[8] 贾 力. 雷公藤属植物的化学, 药理和临床应用[J]. 药学通报, 1985, 20(2): 101—105.
[9] 李秀才. 雷公藤的研究与临床应用[J]. 中国中药杂志, 1997, 22(1): 53—55.

(编辑 薛国文)

消息

《中国中西医结合肾病杂志》征订启事

《中国中西医结合肾病杂志》是由中国中西医结合学会主办、中国科学技术协会主管、在国内外公开发行的全国性学术期刊。本刊执行“中西医并重、促进中西医结合”方针,旨在报道我国中西医结合在肾病临床、科研、预防等方面的经验,介绍国内外有关肾病专业的进展,为提高中西医结合水平,继承和发扬我国传统的医药学,促进我国医学科学现代化服务。

本刊辟有著名专家论疾病、名医经验荟萃、实验论著、临床论著、短篇、病例报告、讲座与综述、专病专方、体会与交流、学术动态等栏目。杂志现发行面已覆盖全国各省、市、自治区,全国各医疗卫生单位内科、肾内科、儿科、妇产科、中医科、泌尿科等的医务人员及相关的科研、教学人员均可参阅。

本刊为月刊,每期订价 8.00 元,全年 96.00 元,国际标准刊号:ISSN 1009—587X,国内统一刊号:CN 14—1277/R,邮发代号:22—26,全国各地邮局均可预订,脱订者也可直接向编辑部办理邮购。

编辑部地址:山西省太原市解放路 162 号 邮 编:030002
电 话:(0351)3181038 传 真:(0351)3188795 E-mail:yhkj@public.ty.sx.cn

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