DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.03.036
第23卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 3
2001年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2001

文章编号:1000-5404(2001)03-0331-03

论著

昆明山海棠诱导 Jurkat 等 3 个细胞株微核形成的研究

孙华明[1],曹 佳[1],Michael Nusse[2] ([1]第三军医大学预防医学系分子毒理室,重庆 400038;[2]德国环境与健康研究中心流式细胞仪实验室,慕尼黑 85758)

提 要:目的 为研究昆明山海棠(THH)的毒理作用。方法 使用流式细胞仪检测发现 THH 均可诱导 Jurkat、CHE 和 NIH3T3 细胞株微核形成和细胞凋亡。结果 3 个细胞株表现出完全相似的变化规律,但 Jurkat 淋巴瘤细胞更为敏感,仅 25 μl/皿即在各时相点出现微核形成高峰,50 μl/皿即出现细胞凋亡高峰。结论 THH 对 Jurkat 肿瘤细胞比对 CHE 和 NIH3T3 细胞具有更大的细胞毒性。

关键词:微核形成;细胞凋亡;昆明山海棠;流式细胞仪
中图法分类号:R394;R99 文献标识码:A

Studies on micronucleus formations in 3 cell lines induced by Tripterygium hypoglaucun Hutch

SUN Hua-ming, CAO Jia, Michael Nusse (Molecular Toxicology Laboratory, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the toxicity of *Tripterygium Hypolaucun* (Level) Hutch (THH). Methods The flow cytometry technique was used to measure the micronucleus (MN) formation and cell apoptosis of Jurkat, CHE and NIH3T3 cell lines induced by THH. Results THH could induce micronucleus formation and cell apoptosis of Jurkat, CHE and NIH3T3 cell lines. Quite similar changes were observed in three cell lines, but the Jurkat cells showed more sensitive than others. It was only 25 μl/ plate THH that induced the high peak of MN formation at various time points, and only 50 μl/ plate that induced the high peak of cell apoptosis. Conclusion The result indicates that THH has stronger toxicity to Jurkat cells than to CHE and NIH3T3 cells.

Key words: micronucleus formation; apoptosis; THH; flow cytometry

昆明山海棠[Tripterygium hypoglaucun(Levl) Hutch, THH]属卫茅科雷公藤属,在祖国医学中被广泛用于治疗许多自身免疫性疾病,如类风湿关节炎、系统性红斑狼疮等[1],也有用于肿瘤治疗的零星报道[2]。近年来我室和汪旭的系列研究表明,THH 在一系列致突变试验和非整倍体检测中均表现出一定的基因毒性和较强的非整倍体毒性[3~7]。同时我室的研究还表明 THH 具有较强的诱导细胞凋亡的能力[8]。本研究进一步报道我室使用流式细胞仪研究 THH 诱导人淋巴瘤 Jurkat 细胞、小鼠成纤维细胞 NIH3T3 和中国仓鼠胚胎细胞微核形成的研究结果。

1 材料和方法

1.1 昆明山海棠水提液制备

THH 购自昆明市中药材公司。制备时称取 20 g THH 粉碎物,以 400 ml 去离子水浸泡过夜,文火煮沸 3 次,过滤去渣,浓缩至 30 ml,离心去除沉淀,上清液用孔径 0.8 μm 和 0.45 μm 滤膜分别过滤,浓缩的水提取液以 0.67 g/ml 生药计,4 ℃保存。

1.2 细胞培养

Jurkat 淋巴瘤细胞株使用 RPMI-1640 培养基,CHE 细胞使用 MEM 培养基,NIH3T3 细胞使用 DMEM 培养基。培养时均加入 10%胎牛血清,1%PS(表霉素+链霉素)。细胞初始浓度 1×10^5 cell/ml,5 ml/皿,5%CO_2 条件下 37 ℃培养 24 h,然后按每皿 25、50、100、150、200 μl 的剂量加入 THH,(CHE 细胞多设一组 400 μl),并在 12、24、30 和 48 h 各采样时相点终止培养和收集细胞。

1.3 用于流式细胞仪检测的细胞悬液制备和染色

按照 Nusse[9] 所介绍方法制备细胞核和微核悬液。方法简述如下:离心收获细胞,吸干上清液,轻轻振荡使细胞沉淀块分散,然后加入溶液Ⅰ 1 ml(584 mg/L NaCl,1 g/L 枸橼酸钠,10 mg/L RNA 酶,0.3 ml/L NP40,溴化乙啶 25 mg/L)重新悬浮细胞,室温避光保育 1 h,再加入溶液Ⅱ 1 ml(15 g/L 枸橼酸钠,0.25 mol/L 蔗糖,40 mg/L 溴化乙啶)。再次混匀细胞悬液,4 ℃保存直至流式细胞仪检测。

1.4 细胞凋亡亚 G_1 峰及微核率的流式细胞仪检测

使用 FACS$^+$ 双激光流式细胞仪,同时测定溴化乙啶(EB)荧光、前置角光散射(FSC)和小角光散射(SSC)。EB 荧光使用氩离子激光器 488 nm 光激发,所有参数使用对数方式记录。流式细胞仪检测二维点阵图如图 1 所示,以微核数目与细胞核数目之比(Mmn/Nn)作为微核率。以亚 G_1 峰细胞(S_{sub})数目与所有细胞核数目(S_{sub}+Nn)之比作为细胞凋亡率。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39400114),德国 BMBF 奖学金资助项目和第三军医大学科研基金资助项目(2000-12)
作者简介:孙华明(1972-),女,重庆市人,助理实验师,主要从事遗传和分子毒理学方面的研究,发表论文 12 篇。电话:(023)68752295
收稿日期:2000-09-07;修回日期:2001-01-15

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

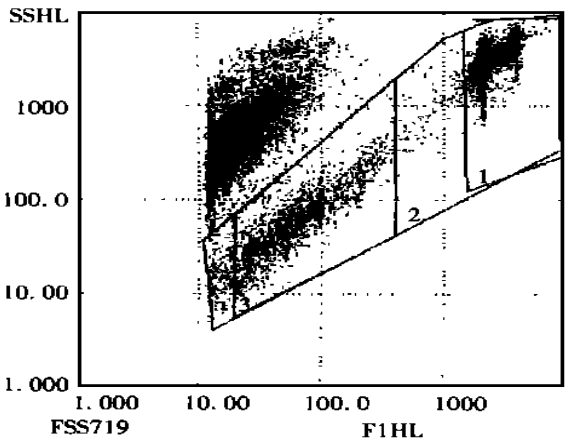


图1 细胞核和微核流式仪检测二维点阵图

Fig 1 The dot plots of cell nucleus and micronuclei measured by flow cytometry

(CHE cell; THH 50 μl/ plate, 48 h; Window 1: Cell nucleus; Window 2: Apoptosis cells; Window 3: Micronuclei)

2 结果

流式细胞仪检测的 THH 诱导 3 个细胞株的细胞微核率及细胞凋亡的量效和时效曲线见图 2(a, b, c)。从图中可以看出,在微核形成的量效反应关系中, THH 在各时相点诱导微核的最有效剂量, Jurkat 细胞是 25 μl, NIH3T3 细胞是 50 μl, CHE 细胞是 100 ~ 150 μl, 以后随着剂量增大, 细胞凋亡比例开始急剧升高,从而导致微核率进行性下降。在 3 个细胞株的最高剂量组,由于大部分细胞凋亡,其微核率已接近或低于空白对照组。在微核形成的时效反应关系中, 3 个细胞株的微核率均随着时间延长而逐渐升高。

THH 诱导的细胞凋亡均呈良好的量效和时效反应关系,但 3 个细胞株对 THH 表现出不同的敏感性, 3 个细胞株凋亡率均随 THH 剂量增大而升高,其中 Jurkat 细胞最为敏感, 16 μl/ 皿 THH 作用仅 12 h 即显著升高,在 200 μl 时到达高峰。THH 作用 24 h 和 48 h 后,仅加入 8 μl/ 皿即开始升高, 50 μl 就达到细胞凋亡高峰(此剂量作用 48 h 时可诱导 93% 细胞凋亡)。而诱导 NIH3T3 细胞和 CHE 细胞出现最高凋亡的剂量在各时相点分别是 200 μl 和 400 μl。在时效反应关系中,细胞凋亡率均是随着作用时间的延长而逐渐升高, 48 h 达到凋亡高峰。

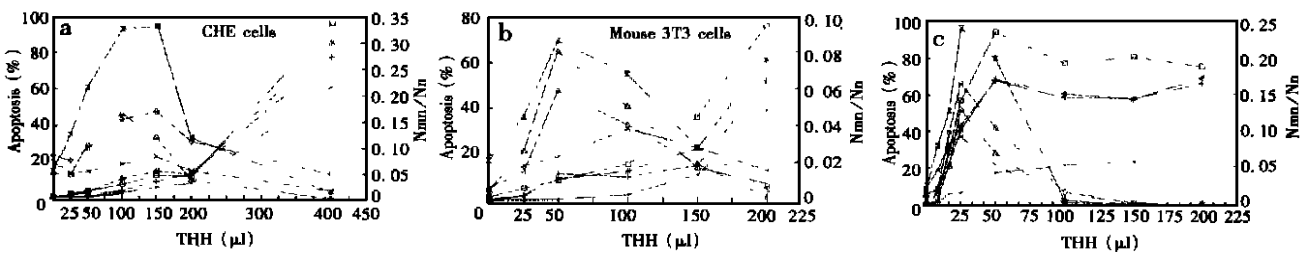


图 2 THH 诱导的 3 个细胞株凋亡和微核形成的量效和时效反应曲线

Fig 2 The dose and time-response curves of cell apoptosis and micronuclei of 3 cell lines induced by THH

Flow cytometric measurement: a) CHE cells; b) NIH3T3 cells; c) Jurkat cells

3 讨论

微核是位于细胞浆中的小核,主要由来源于染色体受损后形成的断片或丢失的整条染色体所形成。微核实验已成为目前检测遗传损伤中染色体受损的重要指标[1-10]。我室在前期人工镜检研究中[3],曾报道 THH 可诱导小鼠 NIH3T3 成纤维细胞微核率升高,并使用小鼠着丝粒 DNA 探针对其微核进行荧光原位杂交(FISH)和抗着丝粒抗体(CREST 染色)染色,证实 THH 诱导的微核约 62% ~68% 由整条染色体组成,说明 THH 具有较强的非整倍体毒性,主要是通过影响细胞有丝分裂导致染色体丢失而形成微核。这与汪旭等[6,7]报道 THH 可诱导 C-有丝分裂障碍、果蝇非整倍体形成较为一致。在本实验研究中,我们扩大了检测范围,使用流式细胞仪对 3 个细胞株大样本进行了检测,流式细胞仪具有客观、准确、自动化程度高的优点,而且可以分析细胞增殖动力学情况。结果 THH 对 3 个细胞株显示出较强的诱发微核能力。如 8 μl 剂量组即可诱导 Jurkat 细胞微核率显著升高,而 25 μl 剂量组在各时相点均达到高峰。以后随着 THH 剂量增大,细胞凋亡率开始迅速升高,有分裂增殖能力的细胞迅速减少,从而导致细胞微核率迅速下降(一般认为微核必须经细胞分裂才能形成)。因此,本研究不仅证明 THH 可以诱导体外培养细胞微核形成,而且其微核形成完全符合细胞增殖动力学规律。表明 THH 对细胞具有较强的遗传毒性,可以造成染色体的丢失和损害。

在本研究中, THH 诱导 Jurkat 肿瘤细胞凋亡比其它 2 株永生细胞株更为敏感,如在 Jurkat 细胞中(细胞初始浓度 5 ml×10^5 个细胞/ml)加入仅 50 μl THH,作用 12 h 后细胞凋亡率可达 17.6%, 24 ~30 h 后可达 68%, 48 h 时可高达 93%,也即 50 μl THH 作用 48 h 后几乎全部 Jurkat 肿瘤细胞发生了凋亡(仅 7% 细胞存活)。THH 诱导凋亡出现高峰的剂量, Jurkat 细胞(50 μl)比 NIH3T3 低 4 倍(200 μl),比 CHE 低 8 倍(400 μl),这提示 THH 对正常细胞和肿瘤细胞诱导凋亡的能力有所不同,有可能发展成为一种新的抗肿瘤药物,这为临床上将 THH 用于白血病治疗并显效提供了重要的

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

理论依据[2]。

参考文献：

[1] 舒尚义. 昆明山海棠治疗类风湿关节炎 600 例临床疗效观察[J]. 中草药通迅, 1978, 2(12): 27－29.
[2] 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(6): 43－44.
[3] 曹　佳, 胡　斌, 程天民, 等. 昆明山海棠在微核实验中非整倍体毒性的研究[J]. 遗传, 1997, 19(1): 1－3.
[4] 刘胜学, 曹　佳, 安　辉, 等. 昆明山海棠对人白血病 HPRT 位点的影响[J]. 第三军医大学学报, 1999, 2(2): 113－115.
[5] 刘胜学, 曹　佳, 安　辉, 等. 昆明山海棠诱导人白血病细胞 HPRT 基因突变的研究[J]. 遗传, 2000, 22(5): 305－308.
[6] 汪　旭, 合正基, 刘素清. 昆明山海棠诱发果蝇生殖细胞非整倍体的研究[J]. 遗传, 1995, 17(5): 34－36.
[7] 汪　旭, 合正基, 刘素清. 5-溴脱氧尿嘧啶核苷标记法检测哺乳动物体细胞染色体异常分离的研究[J]. 癌变·畸变·突变, 1994, 6(4): 1－5.
[8] 曹　佳, Nusse M. 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.
[9] Nusse M, Marx K. Flow cytometric analysis of micronuclei in cell cultures and human lymphocytes: advantages and disadvantages[J]. Mutat Res, 1997, 392(2): 109－115.
[10] 曹　佳, 林　真(日本), 余争平 编著. 微核实验－原理、方法及其在人群监测和毒性评价中的应用[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2000. 1－11.

（编辑　薛国文）

文章编号: 1000-5404(2001)03-0333-01

经验与短篇

硬膜外阻滞加静吸复合全麻在腹部大手术的应用

Application of epidural combined with intravenous-inhalation general anesthesia for major abdominal surgery

江春秀, 程　刚　　（重庆市第三人民医院麻醉科, 重庆 400000）

为了探讨更适合腹部大手术的麻醉方式, 采用硬膜外麻醉(硬外)和静吸全身麻醉的结合, 取长补短, 减少麻醉不良反应的发生。

1　资料和方法

病人选择: 择期手术 60 例, ASA Ⅰ～Ⅱ级, 随机分为全麻组Ⅰ, 硬外加静吸复合全麻组Ⅱ各 30 例。病种为膀胱全切, 胰 12 指肠切除, 广泛子宫切除加腹腔淋巴结清扫等腹部大手术。

麻醉方法: 麻醉诱导用异丙酚 1～2 mg/kg, 芬太尼 5 μg/kg, 维库溴铵 0.1 mg/kg。Ⅱ组诱导前根据手术的种类选相应的间隙施行硬外阻滞, 注入 2% 利多卡因(1∶20 万肾上腺素) 3～5 ml, 控制平面在 T_4 以下, 术中硬外间隔 30～45 min 给药。术终 PCEA 治疗。麻醉维持: 吸入 1% 异氟醚, 根据临床情况调节异丙酚滴速, 间断静脉注入芬太尼、维库溴铵。

监测指标: 连续监测 BP、HR、SPO_2、ECG, 观察记录每组患者术中肌松程度、不良反应、用药量、麻醉清醒和拔管时间。

统计学方法: 所有数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较用单因素方差分析, 组内比较用配对 t 检验。

2　结果

一般情况, 见表 1。

表 1　一般情况

组别	异丙酚 (mg)	芬太尼 (mg)	维库溴铵 (mg)	躁动	苏醒延迟	术终痛感
Ⅰ组	242±67	0.38±0.11	5.58±1.89	1/30	1/30	0/30
Ⅱ组	649±91※	0.75±0.16※	8.55±1.76※	7/30	9/30	18/30

※: $P<0.01$ 与Ⅰ组比较

循环功能: 诱导后Ⅰ、Ⅱ组 SBP、DBP、HR 均轻度降低, 插管后Ⅱ组较Ⅰ组回升幅度减少, 拔管后Ⅱ组无反跳性高血压及心动过速, 见表 2。

表 2　循环功能监测

组别		麻醉前	诱导后	插管后	拔管后
SBP(p/kPa)	Ⅰ组	17.7±1.9	15.7±2.0△	19.6±1.9	20.0±2.0
	Ⅱ组	17.4±1.5	14.6±1.6△	16.0±1.7※	16.0±2.0※
DBP(p/kPa)	Ⅰ组	11.2±1.9	9.7±1.7△	11.3±1.5	11.97±2.1
	Ⅱ组	11.0±2.3	9.3±1.6△	9.8±1.7※	10.3±1.5※
HR(次/min)	Ⅰ组	85±13.2	74±12.1△	87±12.7	94±13.5
	Ⅱ组	84.3±11.5	73.2±11.4△	75±12.6※	80±10.7※

△: $P<0.05$ 与麻醉前相比; ※: $P<0.05$ 与Ⅰ组比较

呼吸功能: RR: Ⅱ组拔管后呼吸平稳, Ⅰ组浅快。SPO_2: 拔管后Ⅱ组明显优于Ⅰ组, 见表 3。

表 3　呼吸功能监测

组别	RR(次/min)		SPO_2(%)	
	术前	拔管后	术前	拔管后
Ⅰ组	15.7±2.1	22.6±2.8△	96%±1.2%	95%±1.4%
Ⅱ组	16.2±2.5	16.8±2.7	95%±1.8%	98%±1.1%※

△: $P<0.05$ 与术前比较; ※: $P<0.05$ 与Ⅰ组比较

3　讨论

硬膜外加静吸复合全麻在腹部大手术应用结果提示: (1)因硬膜外麻醉的充分镇痛, 全麻用药量显著降低, 手术后药物残留效应降低, 病人苏醒迅速, 拔管时间提前, 利于术后呼吸管

（下转 337 页）

作者简介: 江春秀(1963－), 女, 重庆市人, 主治医师, 主要从事临床麻醉方面的研究。电话: (023)63513789
收稿日期: 2000-09-18; 修回日期: 2001-01-05

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