

特别是血清脂蛋白成分直接相关^[4]。因此,研究海嘧啶对红细胞膜流动性的影响可以从细胞水平和分子水平探讨其作用机制。众所周知,细胞恶性增殖的分子基础之一即跨膜信号传递链索的异常,肿瘤细胞的恶性转化与再分化可能分别与跨膜信号传递链索的损伤和修复有关,改变或扩增其中的某些分子,就可能引起信号传递链索的失常和分子程序的紊乱,造成细胞的转化和生长失控,引起恶性肿瘤。修复和改变其中的某些分子就可能使损伤了的跨膜信号传递链索得到修复,使恶性肿瘤细胞再分化而促使癌细胞逆转,以上程序涉及到多种蛋白质,特别是膜蛋白和膜脂类。细胞癌变与癌变逆转都与膜流动有关^[7]。本研究证明海嘧啶能降低荷瘤小鼠红细胞膜的微粘度,使膜流动性升高,有助于集体红细胞免疫功能的调整,有助于使损伤的跨膜信号传递链索恢复正常,提高对肿瘤细胞的杀伤能力。

DNA分子位于细胞中的染色体、线粒体中,是一种由简单重复单位构成的线形序列所决定的高分子聚合物,几乎存在于所有细胞遗传,信息储存在DNA分子中,然后以DNA为模板合成RNA,继而以RNA为模板完成蛋白质多肽链的合成。在细胞增殖过程中可将其周期划分为G₁、S、G₂和M期,肿瘤细胞周期与正常细胞周期的速率和时间都是相似的,即周期的长短主要由G₁期的长短来决定。因此,理想的药物应该是杀死癌细胞而正常细胞免受其

害。如绝大多数抗肿瘤药物可以通过直接损伤DNA抑制DNA聚合酶、抑制有丝分裂器,抑制拓扑酶等方式作用于肿瘤细胞^[8]。本研究结果表明:海嘧啶降低肿瘤细胞内DNA含量从而发挥其抗肿瘤作用。随着给药时间的变化,海嘧啶以高、中剂量作用24、36h效果较好。随着给药时间的延长,其作用并不显著,由此可以说明,海嘧啶对肿瘤细胞的影响与其生长周期有关,而肿瘤细胞的周期动力学特点是细胞群主体分布于DNA合成活跃的S期,我们的研究结果又发现肿瘤细胞内DNA含量明显降低,因此,可以推测海嘧啶为一周期特异性药,其主要特点是通过影响肿瘤细胞内DNA的合成而发挥作用,但是海嘧啶是通过何种途径影响到DNA的生物合成还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 张翥林. 抗肿瘤药物的药理与临床应用[M]. 郑州: 河南医科大学出版社, 1999.
- [2] 季宇彬, 高世勇, 孔琪, 等. 海嘧啶抗肿瘤作用的实验研究[J]. 中草药, 2001, 32(6): 524-527.
- [3] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993.
- [4] 聂松青, 薄惠卿, 林克椿. 蜂花精对大鼠红细胞膜脂流动性的影响[J]. 生物物理学报, 1997, 13(4): 584.
- [5] 唐孝礼, 许实波, 周永红, 等. 鱼精巢DNA对细胞膜和细胞体的保护作用[J]. 中国药理学报, 2000, 16(6): 657-660.
- [6] 司徒镇强. 细胞培养[M]. 北京: 世界图书出版公司, 1996.
- [7] 徐立生, 曲长芝. 抗癌药物巴豆碱、顺铂对红细胞膜的作用[J]. 中华肿瘤杂志, 1995, 17(2): 115.
- [8] 欧阳高亮, 李祺福. 细胞凋亡与肿瘤的发生发展和治疗[J]. 国外医学-肿瘤学分册, 2000, 27(5): 266-268.

1-甲基-4-苯基吡啶离子诱发大鼠小脑颗粒细胞凋亡

蒲小平, 李晓蓉, 李慧农, 李长龄

(北京医科大学药学院 药理室, 北京 100083)

摘要: 目的 建立 1-甲基-4-苯基吡啶离子(1-methyl-4-phenyl pyridinium ion, MPP⁺)诱导的大鼠小脑颗粒细胞凋亡模型。方法 MPP⁺处理大鼠小脑颗粒细胞, 分别用甲基绿-派诺宁染色, DNA凝胶电泳, 流式细胞术进行检测。结果 浓度为 50 μmol/L MPP⁺使小脑颗粒细胞发生凋亡。结论 以 MPP⁺为诱导剂建立的大鼠小脑颗粒细胞凋亡模型, 可用于研究和帕金森病(PD)有关的细胞凋亡的调控机制和筛选抗PD药物。

关键词: 1-甲基-4-苯基吡啶离子(MPP⁺); 小脑颗粒细胞; 凋亡

中图分类号: R285.51 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2001)08-0715-04

Induction of rat cerebellar granular neuron apoptosis by 1-methyl-4-phenyl pyridinium cation

PU Xiao-ping, LI Xiao-rong, LI Hui-nong, LI Chang-ling

收稿日期: 2000-02-12

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目课题, No. G1998051124

作者简介: 蒲小平(1956-), 女, 甘肃人, 副研究员, 博士, 1995年获日本北海道大学药理学博士学位, 现在北京大学药学院分子与细胞药理学系工作。研究方向: 神经细胞凋亡蛋白酶 Caspase-3为靶的药物研究。

(Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Beijing University of Medical Sciences, Beijing 100083, China)

Abstract Object To establish a rat cerebellar granular neuron (CGN) apoptosis model by 1-methyl-4-phenyl pyridinium cation (MPP⁺). **Methods** Rat CGN were treated with MPP⁺ and the resulting cell morphology examined by methyl green-pyronine staining, agarose gel electrophoresis of DNA and flow cytometry. **Results** MPP⁺ at the concentration of 50 μ mol/L can induce CGNs apoptosis of the established model. **Conclusion** The CGNs apoptosis model induced by MPP⁺ can be used for the study on regulatory mechanism of cell apoptosis and the screening of antiparkinsonian drugs.

Key words 1-methyl-4-phenyl-pyridinium cation (MPP⁺); cerebellar granular neuron (CGN); apoptosis

帕金森病 (Parkinson's Disease PD) 是一种老年人常见的中脑黑质纹状体系统多巴胺能神经元变性丢失为主要特征的神经退行性疾病。随着我国人口老龄化进程的加快, PD 的患病率明显增高。神经毒素 1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶离子 (1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridinium ion, MPTP) 能诱发啮齿类动物产生持续的 PD 样症状, 可选择性地引起动物中脑黑质多巴胺神经元变性。用 MPTP 制作的 PD 样动物模型, 常用于抗 PD 药物的研究和开发^[1]。MPTP 在脑中经单胺氧化酶氧化成活性代谢衍生物 1-甲基-4-苯基吡啶离子 (1-methyl-4-phenylpyridinium ion, MPP⁺), 可以导致多巴胺能神经细胞损伤。近年来的研究表明, 在 PD 的病理过程中, 存在细胞凋亡机制^[2]。为了建立与 PD 有关的神经细胞凋亡模型, 本研究以 MPP⁺ 为凋亡诱导剂, 应用甲基绿-派诺宁染色, DNA 凝胶电泳、流式细胞术对 MPP⁺ 诱发的大鼠小脑颗粒细胞进行检测。MPP⁺ 浓度为 50 μ mol/L 时可观察到典型的细胞凋亡的特征。这为研究和 PD 有关的细胞凋亡的调控机制和筛选抗 PD 药物提供良好的细胞模型。

1 材料

1.1 动物: 7~8 d Wistar 大鼠, 北京医科大学动物部提供。

1.2 试剂: MEM 培养基 (Gibco), 牛胰蛋白酶 (Dfco), 牛胰蛋白酶抑制剂 (中科院上海生化所东风生物公司), 蛋白酶 K (Merck), RNA 酶 (中科院上海生化所东风生物公司), 多聚赖氨酸 (Mr > 30 000, Sigma), MPP⁺ (Sigma), 其余试剂为国产分析纯。

1.3 仪器: CO₂ 培养箱 (美国 Precision Scientific), JTT-900 型超净工作台 (北京半导体设备一厂), 倒置显微镜 (重庆光学仪器厂), 高速低温离心机 (美国 Sorvall), 紫外荧光观察照相机、DNA 电泳仪 (北京六一仪器厂)。

2 方法

2.1 小脑颗粒细胞的分离与培养^[3,4]: 7~8 d Wistar 大鼠, 常规消毒后, 无菌分离小脑, 剔除软脑膜, 切成 1 mm³ 的小块, 加入含 0.1% Trypsin 的 KRB 缓冲液, 37℃ 消化约 10 min, 其间振荡数次, 再加入含 83 mg/L 胰蛋白酶抑制剂的 KRB 缓冲液 (消化终止液), 终止消化, 经 200 目不锈钢网过滤, 离心 (500×g, 10 min) 后将细胞再次悬浮于上述消化终止液中。用吸管轻轻吹打, 沉降 5 min 后吸取上清液, 沉淀中再加入相同溶液, 重复上述操作合并上清, 1 000×g 离心 5 min, 沉淀悬浮于含 10% 小牛血清 MEM 培养液中, 细胞计数后, 2×10^5 cfu/L 接种于预先经 5 mg/L 多聚赖氨酸铺板的 35 mm 培养皿, 置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养, 24 h 后更换含 10 μ mol/L 阿糖胞苷的培养液, 以抑制非神经细胞的增殖。

2.2 MPP⁺ 诱导凋亡的检测

2.2.1 凋亡细胞的形态学观察: 将细胞培养在盖玻片上, 培养第 4 天, 加 50 μ mol/L MPP⁺ 溶液, 于 24, 48, 72, 96 h 后用 PBS 洗涤 2 次, 细胞置于 Carnoy 液 (无水乙醇-氯仿-冰醋酸 = 6: 3: 1) 固定 3 min, 用甲基绿-派诺宁染色液染色 3~5 min^[5,6], 丙酮脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 光镜下做凋亡细胞的形态学观察。

2.2.2 凋亡细胞 DNA 电泳^[7,8]: 小脑颗粒细胞培养方法同上。在加 50 μ mol/L MPP⁺ 溶液后, 分别于 24, 48, 72, 96 h 收集实验组和对照组细胞 3×10^5 cfu/L, 预冷 PBS 洗 2 次, 用适量细胞裂解液 (10 mmol/L Tris⁺ HCl pH 8.0, 1 mmol/L EDTA, 10 mmol/L NaCl, 1% SDS) 悬浮细胞, 加蛋白酶 K 使其终浓度为 200 mg/L, 37℃ 水浴过夜, 加入等体积饱和酚溶液, 抽提 2 次, 加入 2 倍体积无水乙醇混匀, 再加入 1/10 体积 3 mol/L 醋酸钠溶液混合, -20℃ 放置 2 h, 10⁵×g 离心 10 min 沉淀 DNA, 弃无水乙醇后用 70% 乙醇漂洗两次, 沉淀溶于适量 TE 缓冲液 (10 mmol/L Tris⁺ HCl, pH 8.0, 1

mmol/L EDTA) 中,再加入 $25 \mu\text{L}$ RNA 酶 (10 g/L) 放置 37°C , 30 min , 加热 68°C , 10 min , 以除去 RNA 置 4°C 冰箱保存备用, 提取产物进行 DNA 琼脂糖凝胶电泳, 以检测 MPP 诱导细胞凋亡中所产生的 DNA 梯状裂解。

2.2.3 流式细胞仪分析: 用流式细胞仪定量检测细胞凋亡的百分率^[9]。收集对照组, $50 \mu\text{mol/L}$ MPP 作用不同时间的细胞 $\times 10^5 \text{ cfu/L}$, 用 PBS 离心 ($500 \times \text{g}$, 5 min) 洗涤 2 次, 弃上清, 加入 70% 乙醇 1.0 mL $500 \times \text{g}$ 离心 5 min 洗涤制成单细胞悬液, 每毫升细胞悬液加 PI (1 g/L) $100 \mu\text{L}$ 染色, 暗室放置 30 min 后用流式细胞仪检测细胞凋亡发生情况。

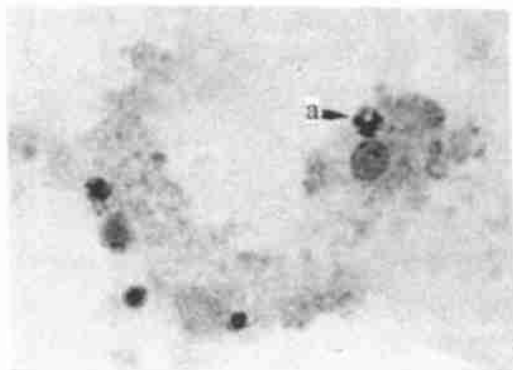
3 结果

3.1 诱发细胞凋亡的形态学观察: 甲基绿-派诺宁染色, 在显微镜下可见 MPP 诱发的凋亡细胞较正常细胞明显缩小, 约为正常细胞的 $1/3$ 左右, 胞膜皱缩不规则, 染色体凝聚成颗粒状或团块状, 形成凋亡小体 (图 1), 该形态学改变为凋亡细胞所特有。

3.2 诱发细胞凋亡的电泳观察: 细胞凋亡的生化标志是 DNA 被有规律切割, 在凝胶电泳上形成相隔约 200 bp 阶梯状条带 (DNA ladder), 观察 $50 \mu\text{mol/L}$ MPP 作用 $24, 48, 72 \text{ h}$ 的电泳结果, 均看到 DNA 梯带, 24 h 出现 DNA 梯状条带, 而 48 h 梯状条带最明显, 结果见图 2。

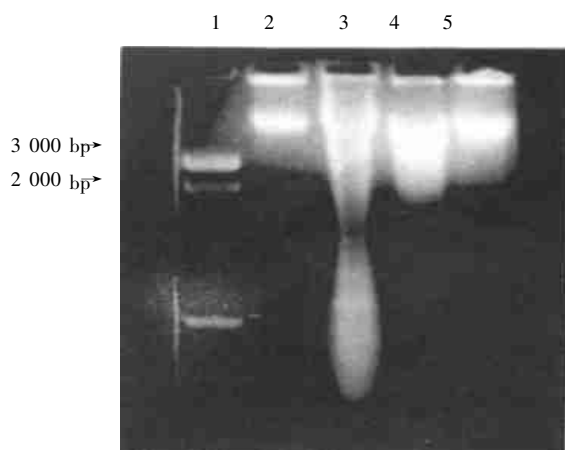
3.3 诱发细胞凋亡程度的观察: $50 \mu\text{mol/L}$ MPP 作用 12 h 就有明显的诱发凋亡的作用, 此时在 G_1 期前就出现低于二倍体的凋亡峰, 根据峰值的高低定量细胞凋亡的百分率, 加入 $50 \mu\text{mol/L}$ MPP $12 \sim 48 \text{ h}$ 凋亡细胞数从 31.9% 上升至 67.9% , 呈增强趋势。流式细胞仪测定结果显示, 48 h 细胞凋亡

率最大 (图 3), 这与 DNA 凝胶电泳的结果一致。在 DNA 凝胶电泳中观察到特征性的梯状条带。



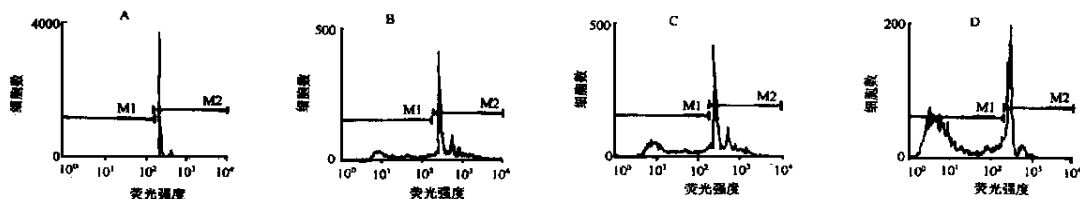
a 所示甲基绿深染细胞核中的凋亡小体, 而派诺宁染色细胞浆 ($\times 200$)

图 1 $50 \mu\text{mol/L}$ MPP 诱发的凋亡细胞的甲基绿-派诺宁染色



1-Mr 标准 2-对照组 3-MPP 处理 24 h
4-MPP 处理 48 h 5-MPP 处理 72 h

图 2 $50 \mu\text{mol/L}$ MPP 诱发的凋亡细胞的 DNA 凝胶电泳图谱



A-对照 B-MPP 处理 12 h C-MPP 处理 24 h D-MPP 处理 48 h

图 3 流式细胞仪检测 $50 \mu\text{mol/L}$ MPP 诱发的细胞凋亡率

4 讨论

细胞死亡有两种方式: 坏死和凋亡。一般认为细胞凋亡是一种主动过程, 常需合成一些新的蛋白并在核酸内切酶存在的条件下使染色体 DNA 发生降解^[7]。细胞发生凋亡时, 出现明显的核固缩、凝聚, 形成凋亡小体, 细胞 DNA 电泳时出现明显的“梯状”,

在流式细胞仪 DNA 定量分析图谱上出现显著的凋亡峰, 通过这些凋亡特征的检测, 可以定性定量分析细胞凋亡的情况。本研究采用原代培养的大鼠小脑颗粒神经元, 以 MPP 诱导神经元凋亡, 通过多细胞核形态观察、DNA 裂解的凝胶电泳分析及流式细胞仪凋亡峰的定量分析等方面均证明 MPP 诱导的小

脑颗粒神经元死亡是典型的细胞凋亡。而且该模型具有以下特点及优点: (1)小脑颗粒细胞是哺乳动物脑中数量最丰富的细胞之一。(2)小脑颗粒细胞培养方法成熟,易于获得,易于培养。细胞纯度可达 95%左右。虽然小脑不是 MPTP毒性的最初靶标,但 MPTP也作用于小脑^[10]。由于 MPTP需从国外购买,价格昂贵,而且用 MPTP所制作的动物模型用药量大,成功率仅达 30%左右,这对于开展抗 PD的药物研究带来困难。细胞凋亡是 PD发病机制中必不可少的环节,就有可能通过阻止细胞凋亡,以达到延缓 PD的发病进程和改善病情之目的。我们建立的该细胞模型具有简单可靠的特点,为从中草药及合成化合物中筛选抗 PD剂提供了新方法、新途径。

参考文献:

- [1] Kopin I J, Markey S P. MPTP toxicity implications for research in Parkinson's Disease[J]. *Ann Rev Neurosci*, 1988, 11: 81-96.
- [2] Stern G. Parkinson's Disease: The apoptosis hypothesis[J].

- Adv Neurol*, 1996, 69: 101-107.
- [3] Levi G, Aloisi F, Ciotti M T, *et al.* Autoradiographic localization and depolarization induced release of acidic amino acids in differentiation cerebellar granule cell cultures[J]. *Brain Res*, 1984, 290: 77-86.
- [4] 鄂征. 组织培养和分子细胞学技术[M]. 第二版. 北京: 北京出版社, 1997.
- [5] 杜卓民. 实用组织学技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982.
- [6] Moffitt P. Amethyl green-pironin technique for demonstrating cell death in the murine tumour S₁₈₀[J]. *Cell Biol*, 1994, 18: 677-681.
- [7] Santosh R, D Mello, Gall C, *et al.* Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: Inhibition of death by insulin-like growth factor I and cAMP[J]. *Proc Natl Acad USA*, 1993, 90: 10989-10993.
- [8] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1993.
- [9] Nicoletti L, Migliorati G, Pagliacci M C, *et al.* A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry[J]. *J Immunol Methods*, 1991, 139: 271-279.
- [10] Marini A M, Schwartz J P, Kopin I J. The neurotoxicity of 1-methyl-4-phenylpyridinium in-cultured cerebellar granule cells[J]. *J Neurosci*, 1989, 9: 3665-3671.

大黄素对大鼠腹腔巨噬细胞产生的 TNF- α 、IL-1、IL-6及细胞 [Ca²⁺]_i的影响

张 骏,翁福海,李会强,姚 智

(天津医科大学药学院,天津 300203)

摘要:目的 研究中药大黄有效成分大黄素对不同状态下的巨噬细胞分泌 TNF- α 、IL-1、IL-6和 [Ca²⁺]_i的影响。方法 利用脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)刺激的大鼠腹腔巨噬细胞作为过度炎症反应的体外模型,用生物学方法和荧光分光光度法测定巨噬细胞合成分泌的 TNF- α 、IL-1、IL-6和 [Ca²⁺]_i。结果 大黄素对 TNF- α 的分泌和 [Ca²⁺]_i有双向调节作用。结论 大黄素可能具有免疫双向调节功能。

关键词: TNF- α ; IL-1; IL-6; [Ca²⁺]_i; 大黄素

中图分类号: R286.95 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2001)08-0718-04

Effect of emodin on secretion of TNF- α , IL-1, IL-6, and level of intracellular Ca²⁺ by rat peritoneal macrophage

ZHANG Jun, WENG Fu-hai, LI Hui-qiang, YAO Zhi

(College of Pharmacy, Tianjin University of Medical Sciences, Tianjin 300203, China)

Abstract Object To study the effect of emodin, the active principle in rhubarb on the secretion of TNF- α , IL-1, IL-6, and [Ca²⁺]_i by rat peritoneal macrophage under different conditions. **Methods** Hypernomic inflammation models of isolated rat peritoneal macrophage were prepared by lipopolysaccharide excitation and the levels of [Ca²⁺]_i and the proinflammatory cytokines TNF- α , IL-1 and IL-6 secreted determined by fluorescence spectrophotometry and bioassay. **Results** Emodin showed a dual regulatory effect on the secretion of proinflammatory cytokines and [Ca²⁺]_i. **Conclusion** It seemed that emodin has a biphasic immuno-regulatory effect.

收稿日期: 2001-12-11

作者简介: 张 骏 (1966-), 男, 浙江人, 讲师。1988年毕业于天津第二医学院获理学学士学位, 2000年毕业于天津医科大学获医学硕士学位。现在天津医科大学药学院工作, 主要从事药理学及药物分析工作。Tel (022) 23328724