

Cathepsin D 及 Fas ligand 在苦参碱诱导 急性 T 淋巴母细胞白血病 JM 细胞株 凋亡中的表达研究*

冯骥良 黄高昇** 郭英 梁蓉 王哲 王娟红 张晓晖 杨国荣 闫庆国
(第四军医大学病理学教研室 西安 710032)

摘要 为了检测苦参碱诱导 JM 细胞发生凋亡过程中 Cathepsin D、Fas-L 的表达情况,应用光镜及电镜观察加药及未加药组细胞形态学变化。免疫细胞化学染色观察 Cathepsin D 在细胞内的表达及定位。半定量 PCR 检测 Cathepsin D mRNA 在转录水平的变化并用 Western Blot 检测 Cathepsin D、Fas-L 蛋白表达。结果显示 0.6mg/ml 加药组细胞培养 72h, 出现凋亡形态学改变。免疫细胞化学染色 Cathepsin D 阳性信号主要位于呈凋亡形态学改变的胞浆和胞核内。其阳性细胞率在处理组明显高于对照组, 处理组 Cathepsin D 的 mRNA 转录上调。处理组前体 Cathepsin D (52kD) 的条带亮度较对照组强, 而切割后产物(32kD)亮度较对照组弱; Fas-L 在处理组表达上调。提示: 苦参碱诱导 JM 细胞的凋亡伴随 Cathepsin D 及 Fas-L 的表达改变。

关键词: 苦参碱 Cathepsin D JM 细胞 Fas-L 程序性细胞死亡

白血病是严重危害人类健康与生命的疾病, 发病率在我国为 3-4/10 万人口^[1]。其中, T 淋巴母细胞白血病发病急, 恶性程度高, 严重危害青少年的生命^[2]。诱导白血病细胞凋亡是治疗白血病的策略之一^[3]。苦参碱是一种从中药苦参中提取的生物碱^[4]。以往的研究发现苦参碱可以诱导肝癌细胞凋亡^[5], 也可以诱导髓系 K562 细胞分化和凋亡^[6,7]。JM 为急性 T 淋巴母细胞白血病细胞株^[8]。我们以往的研究发现苦参碱可以抑制 JM 细胞的增殖并且可以诱导其发生凋亡。从加药后 24 小时起, 光镜、透射电镜下观察发现 JM 细胞浆有大量空泡。Cathepsin D 是一种组织蛋白酶, 在细胞内主要分布于溶酶体和内体(endosome)。本研究旨在探讨在苦参碱作用 JM 发生 PCD 的过程中, 是否有 Cathepsin D、Fas-L 的表达改变。

材料及方法

1. 药物

苦参碱购自西安天其植物化学有限责任公司, 分子量: 248.37, 纯度大于 98%。加药前用 RPMI1640 培养基溶解, 过滤。

2. 细胞系及其培养

人 T 细胞白血病细胞株 JM 由本室保存。RPMI1640

培养基(含 10% 小牛血清), 于 37℃、5% CO₂ 条件下培养。细胞生长至对数生长期分组并加药, 每瓶中细胞初始浓度 2×10^5 /ml, 隔天传代, 并补充药物至相应浓度。分组细胞各设 3 个复组, 实验结果取平均值。

3. 细胞形态学观察

加药后每 8h 倒置显微镜下观察细胞形态, 取样甩片行 Wright-Giemsa 染色^[9]; 收集细胞 2×10^6 个, 离心, 戊二醛固定, 透射电镜(JEM-2000EX, 日本)观察细胞超微结构变化。

4. 流式细胞仪检测

取对数生长期细胞, 分为 0.1mg/ml、0.2mg/ml、0.4mg/ml、0.6mg/ml、0.8 mg/ml 及不加苦参碱的对照组, 培养 96h 后收集细胞, PBS 洗涤 2 次, 弃上清, 各加 1ml PBS, 再加 2ml 无水乙醇, 震荡混匀, 固定 3h 送检; 另选 0.8 mg/ml 组, 分别在 24h、48h、72h、96h 收集细胞, 同上述方法处理、固定送检。(Coulter Epics ELITE ESP 型流式细胞仪, 美国)

5. 半定量 PCR

提取对照组及苦参碱(0.6mg/ml)处理 72h、96h JM 细胞总 RNA(TRIzol, GIBCO)并定量。分别取等量 RNA 反转录(200U, Superscript II reverse transcriptase, GIBCO)。然后以反转录产物为模板, PCR 扩增(1.5U Taq DNA polymerase, Takara; 引物: 上游 5' ATC CAC CAC AAG TAC

本文 2002 年 12 月 27 日收到, 2003 年 5 月 5 日接受。

* 本研究为由国家自然科学基金项目(30171186)。

** 通讯作者。E-mail: jiliangfeng@hotmail.com

AAC AGC G3';下游 5' GTC CAC AAT GGC CTC ACA GC3')。PCR 反应条件:94℃,5min;94℃,30sec,56.5℃,30sec,72℃,30sec。30 循环;72℃,7min。同时,扩增 β -actin (上游 5' CAA GAA AGG GTG TAA CGC AAC TA3';下游 5' TCC TGT GGC ATC CAC GAA ACT A3')作为内参照。PCR 产物在 1.0% 琼脂糖凝胶分离。

6. 免疫组化染色

细胞甩片用冷丙酮固定,含 3% H_2O_2 的甲醇室温孵育 30min 灭活内源性过氧化物酶。2% Triton X-100 孵育 10min,以增加膜通透性。5% 山羊血清室温封闭 30min。一抗 1:100 稀释,4℃ 反应过夜。小鼠抗人 Cathepsin D 单克隆抗体购自 ZYMED 公司。二抗及显色反应采用 DAKO 公司的 Universal LSAB 试剂盒。用目镜中放置方格测微器观察,在对照组及处理组细胞甩片上分别取 10 个高倍镜视野,计数每个视野中 Cathepsin D 阳性细胞数。统计学处理:用统计软件 SPSS10.0 进行方差分析比较,以 $P < 0.01$ 为有显著性差异。

7. Western Blot

分别提取实验组和对照组细胞总蛋白,经紫外分光光度仪定量(UV-265W, Beckman),各组取等量总蛋白进行 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。转膜,1% 牛血清白蛋白封闭非特异性抗原,与一抗溶液杂交过夜(山羊抗人 Cathepsin D 多克隆抗体 1:1000 稀释,兔抗人 Fas-L 多克隆抗体 1:500 稀释),TBST(2.42g Tris, 80g NaCl, pH7.6。0.1% Tween-20)洗膜,然后与辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗杂交,DAB 显色。山羊抗人 Cathepsin D 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司。兔抗山羊 IgG-HRP 购自博士德公司。Fas ligand(Fas-L)兔抗人多克隆抗体,羊抗兔 IgG-HRP 购自博士德公司。

结 果

1. 形态学观察

从 24h 开始,0.6mg/ml 苦参碱处理组在倒置显微镜下可见大部分细胞体积增大,Wright-Giemsa 染色见胞浆内大量空泡。一些细胞体积缩小细胞呈出芽状改变,培养液内见零星细胞碎片。随时间延长一直到 96h,一些细胞聚集成团,细胞体积缩小,核浓缩,但细胞形态完整。培养液内细胞碎片数量明显增多。Wright-Giemsa 染色(见图版图 1A、B)、透射电镜(见图版图 2A、B)下见典型凋亡细胞形态学改变。

2. 免疫组化染色

0.6mg/ml 苦参碱处理组细胞在 120h 免疫细胞化学染色可见大量 Cathepsin D 阳性细胞,体积小,核浓缩,呈凋亡形态学改变。阳性颗粒不仅表达在这些细胞的胞浆,而且在胞核内也呈阳性;对照组 Cathepsin D 阳性细胞数量少,阳性信号也定位于呈

凋亡形态学改变的细胞内(见图版图 3A、B)。分别计数对照组和处理组各 10 个高倍镜视野,每个视野中 Cathepsin D 阳性细胞数,两者相比有显著差异($P < 0.001$,表 1)。

表 1 Cathepsin D 在处理组和对照组 JM 细胞中的表达分析比较

组 别	视野数	Cathepsin D 阳性细胞数
处理组	10	25.8 ± 4.0497
对照组	10	3.6 ± 2.319

处理组与对照组差异显著($P < 0.001$,个/视野, mean ± SD)

3. 流式细胞仪分析

加药后 96h,随给药量增加,0.1 mg/ml - 0.8 mg/ml 各加药组可见亚二倍体峰,凋亡细胞比例逐渐增加,对照组为 1.4%;各组 S 期细胞比例递减,对照组为 31.8%;G1 期细胞比例递增,对照组为 60.2% (图 1);0.8 mg/ml 组从加药后 24h - 96h,凋亡细胞比例逐渐增加;S 期细胞比例递减;G1 期细胞比例递增(图 2)。

4. 半定量 PCR

对照组及苦参碱处理 72h、96h 组于 400bp 均见 Cathepsin D 扩增条带,但亮度依次增强。对照组及处理组 β -actin 扩增条带亮度一致(图 3)。

5. Western Blot

0.6mg/ml 苦参碱 96h 处理组及对照组均可以检测到 Cathepsin D 的前体(52kD)及切割后产物(32kD)。处理组 52kD 条带亮度较对照组强,而 32kDa 条带亮度较对照组弱(图 4);Fas-L(38kD)在 0.6mg/ml 苦参碱 96h 处理组条带亮度较对照组强(图 5)。

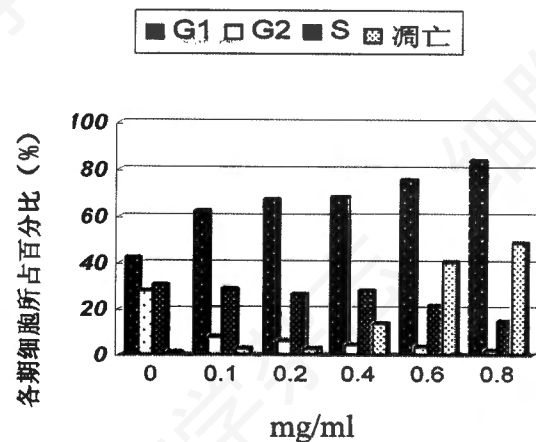


图 1 流式细胞仪检测对照组(0mg/ml)及不同剂量加药组 JM 细胞 96h 细胞周期变化

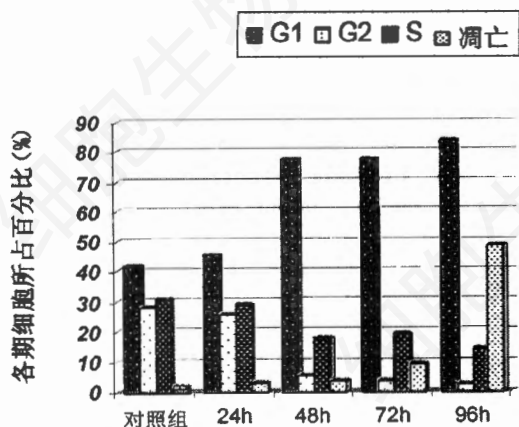


图2 流式细胞仪检测 JM 细胞对照组及 0.8mg/ml 加药组 24h、48h、72h、96h 细胞周期变化

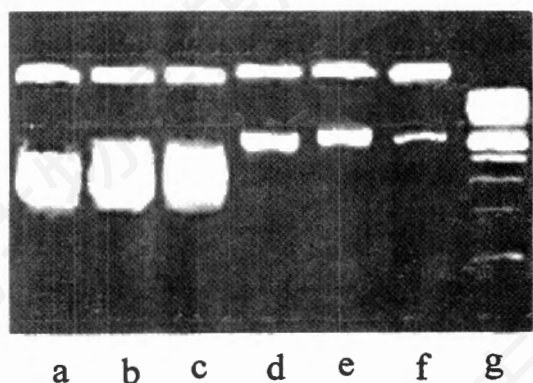


图3 RT-PCR 检测 Cathepsin D 在加药 72h、96h 的 mRNA 表达水平

(a、b 分别为药物处理后 96h、72h β -actin, c 为对照组 β -actin; d、e 为药物处理后 96h、72h Cathepsin D, f 为对照组 Cathepsin D; g 为 marker)

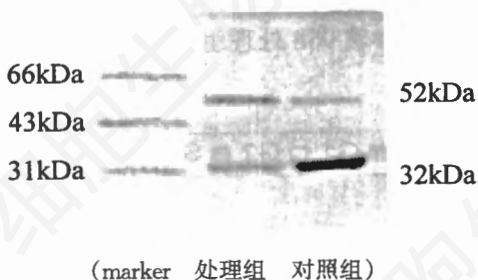


图4 Western Blot 检测处理组及对照组 Cathepsin D 的表达

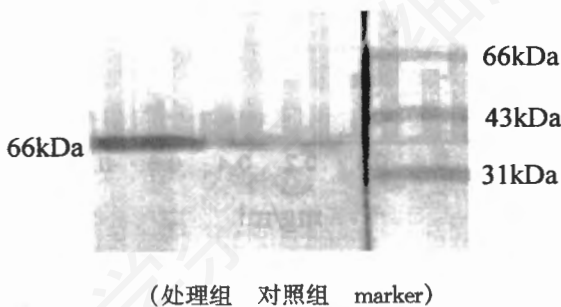


图5 Western Blot 检测处理组及对照组 Fas-L 的表达

讨论

中药苦参碱对 T 细胞白血病细胞株 JM 的抑制增殖和诱导凋亡的作用,使其可望成为一种治疗急性 T 淋巴细胞白血病的有效药物,所以明确该药物作用细胞的分子机理显得尤为重要。鉴于在此凋亡模型中特异性空泡样改变及越来越多的组织蛋白酶直接参与凋亡发生的证据^[10],我们试图探讨 Cathepsin D 的表达在 JM 细胞凋亡中的作用。

近来越来越多的实验证实,组织蛋白酶参与了不同的化学药物以及细胞处于缺氧,撤除血清等应激情况下所导致的凋亡过程。Stoka^[11]、Guicciardi^[12]、Berchem^[13]等在不同的凋亡模型中报道了组织蛋白酶 Cathepsin B、D 的参与。虽然在不同的凋亡模型中,不是同一种组织蛋白酶介导了凋亡的发生,但至少这些证据表明组织蛋白酶在上述模型的凋亡发生信号传导过程中是必不可少的。

Cathepsin D 在苦参碱处理 JM 细胞前后的分布差异对了解其参与凋亡过程的分子机理很有意义。我们的免疫组化染色证实,在处理组的凋亡细胞和未处理组的自发凋亡细胞核和胞浆中,均可以检测到 Cathepsin D 的强阳性信号。这种 Cathepsin D 在凋亡细胞中的高表达现象提示我们:JM 细胞发生凋亡,不仅与 Cathepsin D 相关,而且可能与 Cathepsin D 在核内的分布有关。这对于我们进一步的分子机理研究是一个重要提示。

Cathepsin D 普遍存在于多种组织的溶酶体及内体(endosome)中^[14,15],以 52kD 的前体蛋白分泌,然后要被切割成 42kD 的中间体,最后再被进一步剪切成为 32kD 的终产物^[16]。当培养液中加入苦参碱 72h、96h, RT-PCR 检测到处理组 Cathepsin D 转录水平较对照组升高。Western Blot 检测对照组 Cathepsin D 前体蛋白较处理组水平低,而 Cathepsin D 切割后的 32kD 产物却比处理组的水平高。说明苦参碱作用 JM 细胞后,Cathepsin D 在转录和表达水平都是上调的。只是在苦参碱处理后,前体 Cathepsin D 在切割成 32kD 分子过程受到了抑制,而导致了 52kD 前体形式的蓄积。Cathepsin D 通常情况下贮存在溶酶体、内体等酸性细胞器。而细胞内引发凋亡的许多因子是在胞浆内作用的,所以许多学者进而研究了 Cathepsin D 从溶酶体外泄(leakage)到胞浆与凋亡触发的关系^[17,18],发现在该蛋白酶参与的细胞凋亡中的确伴有溶酶体膜的不稳定性

以及组织蛋白酶的胞浆泄漏。但究竟外泄到胞浆中参与细胞凋亡过程的 Cathepsin D 是其前体,还是切割后的产物均没有确切报道。

一些文献报道,在 Fas/FasL 介导的凋亡模型中, Cathepsin D 作为信号分子传递死亡信息的作用是不可缺的^[18,19]。所以,我们也检测了在这一模型中 Fas-L 的表达。苦参碱处理 JM 细胞 72h、96h, Western Blot 结果显示 Fas-L 在处理组表达明显高于对照组。提示在苦参碱诱导 JM 细胞发生的 PCD,可能启动了 Fas/Fas-L 这一死亡途径。

参 考 文 献

- [1] 沈志祥、欧阳仁荣,1999, 血液肿瘤学, 人民卫生出版社, 274.
- [2] James H. J., 1996, *Blood: Textbook of Hematology (3rd)*. 838. Little, Brown and Company, Boston.
- [3] Hideshima T. et al., 2001, *Semin Oncol*, **28**(6): 607 - 612.
- [4] Zhang L. et al., 1997, *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **22**(12): 740 - 742.
- [5] 司维柯、肖桃元、康格非, 2000, 第三军医大学学报, **22**(6): 553 - 555.
- [6] Zhang LP. et al., 2001, *Leuk Res*, **25**(9): 793 - 794.
- [7] 李旭芬、张苏展、郑树, 2000, 实用癌症杂志, **15**(6): 566 - 568.
- [8] Cohen J. D., et al., 1991, *Radiat Res*, **126**(3): 372 - 378.
- [9] Barr R. D. et al., 1976, *Br J Haematol*, **32**: 565 - 572.
- [10] Isahara K. et al., 1999, *Neuroscience*, **91**(1): 233 - 249.
- [11] Stoka V. et al., 2001, *J Biol Chem* **276**(5): 3149 - 3157.
- [12] Guicciardi M. E. et al., 2000, *J Clin Invest*, **106**(9): 1127 - 1137.
- [13] Berchem G. et al., 2002, *Oncogene* **21**(38): 5951 - 5955.
- [14] Reid W. A. et al., 1986, *J Clin Pathol*, **39**(12): 1323 - 1330.
- [15] Stinchcombe J. C. et al., 2000, *Traffic*, **1**(5): 435 - 444.
- [16] Fujita H. et al., 1991, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179**(1): 190 - 196.
- [17] Roberg K. et al., 2002, *Am J Pathol*, **161**(1): 89 - 96.
- [18] Brunk U. T. et al., 1999, *Redox Rep*, **4**(1): 3 - 11.
- [19] Levy-Strumpf N. et al., 1998, *Oncogene*, **17**(25): 3331 - 3340.

THE EXPRESSION OF CATHEPSIN D AND FAS LIGAND ON PCD OF JM CELLS INDUCED BY MATRINE*

FENG Ji Liang HUANG Gao Sheng** GUO Ying et al
(Molecular Oncology Laboratory, Department of Pathology,
Fourth Military Medical University, Xi'an 710032 China)

ABSTRACT To study the expression of cathepsin D and Fas-L on PCD of JM cells induced by matrine, morphologic changes were observed under light microscope with Wright-Giemsa staining and electron microscope. Immunohistochemical staining was used to observe the expression and location of cathepsin D within the JM cells. RT-PCR and Western Blot were conducted to investigate the expression of cathepsin D and Fas-L in transcriptional and translational level of JM cells respectively with and without treatment by matrine. At the 72h after the treatment of matrine(0.6mg/ml), typical apoptosis features of cells were observed under light microscope and electron microscope, and those features are more prominent with the time prolonging. Immunohistochemical staining found that cathepsin D positive signal intensively located in cytoplasm and nucleolus of those cells with apoptotic characteristics in both treatment and control group. While the rate of positive cells to 1000 positive and negative cells in treatment group was significantly higher than that in control. RT-PCR indicated the transcription of cathepsin D mRNA was up-regulated gradually at the 96h and 120h comparing to control group. Western Blot showed that 52kD procathepsin D was stronger in treatment group than that in control, while the pattern of 32kD processed form was just the opposite. The expression of Fas-L in JM cells was up-regulated after matrine treatment. The above data suggest that matrine can up-regulate the expression of cathepsin D in both transcriptional and translational level. While at the same time, this alkaloid can interfere the process of procathepsin D(52kD) to its 32kD mature form, and result in the arrest of 52kD form. PCD induced by matrine executes through Fas/Fas-L pathway, and 52kD cathepsin D maybe play important role in this process. Out of regard for the independence of RNA and protein synthesization in the Fas/Fas-L pathway, we suppose that up-regulation of cathepsin D precedes the activation of the Fas receptor.

Key words: Matrine Cathepsin D JM cell Fas-L Programmed cell death

* Project was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30171186).

** Corresponding author. E-mail: jiliangfeng@hotmail.com