

昆明山海棠对中国仓鼠 V₇₉ 细胞二酰基甘油含量的影响*

汪旭* 和智君* 王桂兰**

(* 云南师范大学生命科学学院 昆明 650092 ** 中国科学院昆明动物研究所 昆明 650223)

昆明山海棠 *Tripterygium Hypoglaucum* (Level) Hutch (THH), 是云南传统中草药, 为卫茅科雷公藤属植物, 其主要成分为生物碱、萜类、内酯及皂甙, 已广泛应用于治疗许多自身免疫性疾病, 但用药后可导致可逆性女性闭经和男性精虫减少^[1], THH 水抽提物在哺乳动物体细胞、生殖细胞可诱发非整倍体^[2-5], 对中国仓鼠 V₇₉ 细胞细胞质正常分裂有显著的抑制作用^[6]。但是, THH 对于细胞分裂的抑制作用乃至非整倍体的诱发效应机制一直未得以验证。鉴于细胞的第二信使含量异常可导致细胞 C——有丝分裂细胞(C-M 细胞)频率升高, 而 C——有丝分裂又是一个典型的非整倍体诱发效应的筛查指标^[7], 本研究通过 THH 对 1, 2-二酰基甘油(1, 2-diacylglycerol, DAG)这一肌醇磷脂代谢途径中第二信使含量的影响这一指标, 探讨了 THH 根部水抽提物在哺乳动物细胞诱发非整倍体的可能机制。

螞蟾肽(bombesin, BOM)是一种多肽, 具有局部激素与调节细胞生长的作用, 能与中国仓鼠 V₇₉ 细胞特异性膜受体结合, 激活磷脂酰肌醇通路, 在磷脂酶 C(PLC)作用下, 使 4, 5-二磷酸磷脂酰肌醇(PIP₂)水解为 1, 4, 5-三磷酸肌醇(IP₃)和 DAG, 并使两者在细胞中积累。IP₃ 使细胞内 Ca²⁺ 浓度升高, DAG 激活蛋白激酶 C(PKC)并使细胞出现 C-M 效应。BOM 为本实验的阳性对照组。

材料和方法

1. 标准品制备

(1) DAG、BOM 均购自 Sigma 公司。用时以氯仿稀释, 分别取 DAG 0.3 μ g、0.6 μ g、0.9 μ g 标准品于 GF254TLC 硅胶板上点样以作标定。BOM 在 V₇₉ 细胞

测试中使用剂量为 0.1-0.5 μ mol/L。硅胶板购于青岛海洋化工厂。

2. 受试物制备与剂量选择

THH 根部生药购自昆明市医药公司。取根部粉碎物 100g, 以 1000ml 双蒸水浸泡 1 小时, 煮沸 3 次, 每次 30 分钟, 滤渣, 浓缩为 50ml, -20 $^{\circ}$ C 保存。抽提液浓度以 2g/ml 计, 使用前用无菌双蒸水稀释。受试剂量分别为 1mg/ml、2mg/ml。

3. 细胞培养

中国仓鼠 V₇₉ 细胞购自中科院上海细胞生物学研究所细胞库。细胞以含 20% 新生牛血清、100 μ ml 双抗、pH6.9 的 MEM 培养液 37 $^{\circ}$ C 培养。染毒前 24 小时在 100ml 培养瓶接种细胞 1×10^6 , 37 $^{\circ}$ C 进行单细胞培养。

4. 细胞染毒

染毒前将培养细胞中培养液移弃, 用 37 $^{\circ}$ C 预热的 Hank's 平衡盐溶液(pH6.9, 37 $^{\circ}$ C)荡洗细胞 2 次, 加入 8ml Hank's 平衡盐溶液, 并按 1mg/ml 和 2mg/ml 的剂量加入 THH 处理细胞 10min; 阳性对照 BOM 和相应溶剂对照, 所有操作过程及样品处理同受试组。

5. C——有丝分裂细胞制片

细胞染毒后, 弃去受试物溶液, 以 0.125% 的胰酶处理细胞。脱壁后, 800rpm 离心 3min, 弃上清液, 加入 8ml Hank's 平衡盐溶液, 混匀后取其中 4ml 细胞悬液离心, 弃上清液, 0.56% KCl 37 $^{\circ}$ C 低渗 30min, 离心, 弃上清液, 3:1 无水乙醇-冰醋酸固定细胞 15min, 离心后滴片, 室温干燥, 4% Gimsa 染色 8min。在 1000 个有丝分裂细胞中分析 C——有丝分裂细胞频率, 方法和标准同文献^[7], 通过 C——有丝分裂效应判断 THH 在 V₇₉ 细胞中的非整倍体诱发效应, 数据以 t 检验作统计学分析。

6. V₇₉ 细胞 DGA 的提取和定量测定

本文 2000 年 2 月 29 日收到, 9 月 1 日接受。

* 国家自然科学基金(39660033)、云南省科委国际合作计划(98C013)资助。

基本方法同文献[8]:取剩余4ml细胞悬液,1000rpm离心10min,弃上清液,以2ml 1:2氯仿-甲醇混合液破碎细胞,充分摇匀后静置20min;3000rpm离心10min,收集液相,在液相中依次加入0.5ml氯仿,0.5ml蒸馏水,混匀,3000rpm离心10min,收集下层氯仿相;上层液再加入0.5ml氯仿,混匀,3000rpm,离心10min,收集下层氯仿相,重复4次;收集的下层氯仿合并,氮气吹干所得抽提样品。在样品中加入100 μ l氯仿,溶解后取10 μ l于GF254硅胶板上点样,再在25甲苯:20乙醚:1无水乙醇:0.1氨水展层液中展开,经考马斯亮兰G250染色,20%甲醇脱色后用LKB2400激光光密度扫描仪测定DAG含量,其单位以积分面积计算。

结 果

1. THH对V₇₉细胞DAG含量的影响

表1和图1,ab展示了阳性对照BOM和受

试物THH分别作用V₇₉细胞10min后细胞DAG含量的变化。经BOM和THH作用后,细胞的DAG含量较对照有极显著升高($P < 0.001$),提示BOM和THH可以刺激DAG的生成。

表1 THH对V₇₉细胞DAG含量的影响

化合物	剂量	处理时间 (min)	DAG含量 (E+07积分单位)
BOM(μ mol/L)	0.1	10	25.1 \pm 5.4**
	0.5	10	21.8 \pm 0.1**
THH(mg/ml)	1.0	10	27.3 \pm 2.1**
	2.0	10	23.7 \pm 5.7**
	0	10	5.3 \pm 1.2

** $P < 0.001$ (t-检验)。

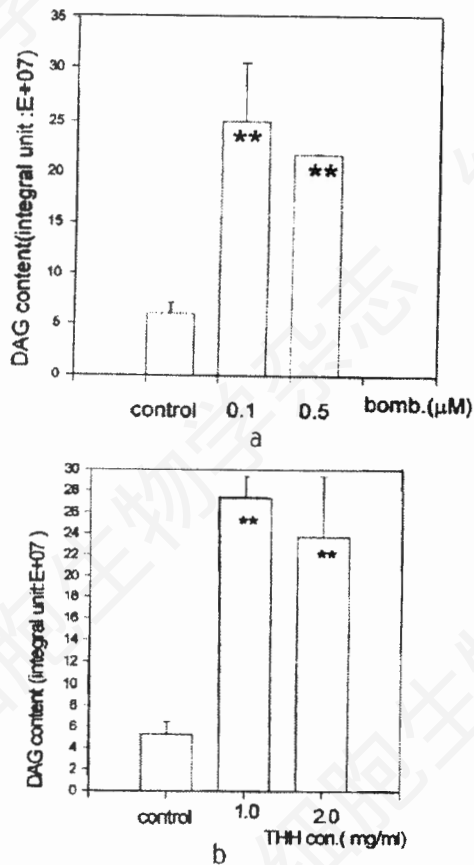


图1 a. BOM对V₇₉细胞DAG含量的影响
b. THH对V₇₉细胞DAG含量的影响

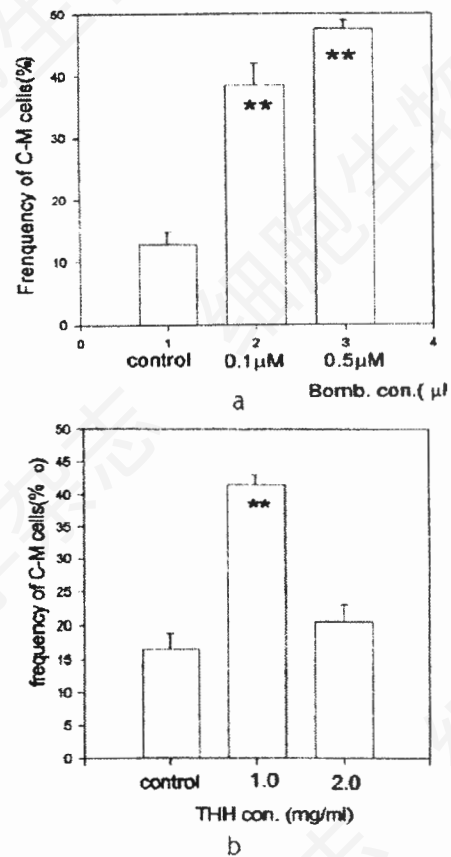


图2 a. BOM诱发V₇₉细胞C——有丝分裂
b. THH诱发V₇₉细胞C——有丝分裂

2. THH对V₇₉细胞有丝分裂的影响

表2和图2,ab为阳性对照BOM和受试物THH分别作用V₇₉细胞后所出现的C—有丝分裂细胞频率改变。BOM在2个剂量组均使V₇₉细胞C—M细胞频率显著提高(P<0.001)。在THH的高剂量组,V₇₉细胞中C—有丝分裂细胞频率较对照有显著升高(P<0.05)。这与DAG刺激蛋白酶C激活从而介导C—有丝分裂事件的发生相吻合。

表2 THH诱发V₇₉细胞C—有丝分裂

化合物	剂量	处理时间 (min)	C—M细胞 (%)
BOM ($\mu\text{mol/L}$)	0.1	10	8.5 \pm 3.5**
	0.5	10	47.5 \pm 1.5**
	溶剂对照	10	12.8 \pm 2.1
THH (mg/ml)	1.0	10	41.5 \pm 1.5*
	2.0	10	20.5 \pm 2.5
	溶剂对照	10	16.6 \pm 2.4

* P<0.05, ** P<0.001(t test)

讨 论

非整倍体是引发人类癌变、自发流产和遗传异常的重要因素之一^[9,10]。非整倍体产生是一个复杂的过程,其产生不但涉及遗传物质,还涉及到细胞器、细胞膜及膜上的某些受体以及细胞信号传递系统等^[7,11]。因而,非整倍体诱发剂这一类遗传毒性物质的检测和监控需要不同的技术系统和检测思路。

细胞的生长及有丝分裂调节与细胞的信号传导有关,在肌醇脂信号通路中,一些外界信号分子可与细胞表面受体结合,使4,5-二磷酸磷脂酰肌醇(PIP₂)水解为1,4,5-三磷酸肌醇(IP₃)和二酰基甘油(DAG)。在有丝分裂的早期,若干生长因子能使细胞中的PIP₂水解为IP₃和DAG,IP₃可使胞内Ca²⁺上升,DAG则可激活蛋白激酶C(PKC)^[12]。PKC是某些肿瘤的诱发因子,可引起细胞对外源信号的应答^[13],在肿瘤诱发剂作用下对刺激细胞有丝分

裂有重要作用^[14];PKC的升高可以介导C—有丝分裂的发生。

C—M效应特指细胞经秋水仙素(colchicine,)处理后,纺锤体受到不同程度破坏,细胞有丝分裂中期相大量积累,染色体高度浓缩及姐妹染色单体互斥角度增加等一系列细胞学特征,也泛指其它化合物引起的类似细胞学效应。具有上述染色体特征的细胞称C—M细胞,当这些细胞克服有丝分裂阻断作用而继续有丝分裂时,异常分离的染色体可随机取向、丢失或滞后,从而产生非整倍体。因此,C—M效应是产生非整倍体的前兆。C—M效应分析是筛查非整倍体诱发剂的手段之一。

THH被广泛应用于治疗许多自身免疫性疾病如类风湿和红斑狼疮,但用药后导致可逆性女性闭经和男性精虫减少^[1],本课题组在多年的研究中,发现THH为哺乳动物体细胞、生殖细胞非整倍体诱发剂^[2-5],但对其作用机制一直未得到证实。最近的研究已发现,THH能显著诱发V₇₉细胞的异常质裂,明显提高双核细胞频率,提示THH可能通过影响细胞正常质裂而导致有丝分裂异常^[6];探讨THH是否可通过细胞信号传递系统而诱发非整倍体是本研究的主要内容。

我们的实验结果显示,THH能使细胞DAG含量显著升高,同时使C—有丝分裂细胞频率显著上升。我们认为,THH可能通过细胞肌醇酯信号通路的介导,诱发哺乳动物细胞非整倍体。鉴于THH为昆明山海棠的粗抽提物,对其中主要的有效成分做进一步的遗传毒性评价是很重要的。

摘 要

本研究以昆明山海棠根部水抽提物(*Tripterygium Hypoglaucom* (Level) Hutch, THH)处理中国仓鼠V₇₉细胞,通过检测V₇₉细胞C—M细胞频率以及二酰基甘油(1,2-diacylglycerol,DAG)的含量测定,分析了THH诱发非整倍体与细胞醇磷脂信号通路的关系。结果

指出:THH能在1mg/ml、2mg/ml两个剂量上使V₇₉细胞的DAG含量显著升高(P<0.001),并明显的提高C-M细胞频率(P<0.05),提示肌醇酯信号通路是介导THH诱发非整倍体的途径之一。

关键词:昆明山海棠 V₇₉细胞 1,2-二酰基甘油
非整倍体

参 考 文 献

- [1] 舒尚义,1983,云南中医杂志,4(6):43-47.
[2] Wang Xu, et al., 1993, *Mutagenesis*, 8(5): 395-398.
[3] 汪旭等,1995,遗传 17(5):34-36.
[4] 汪旭等,1992,癌变、畸变、突变,4(6):11-14.
[5] 合正基等,1992,云南师范大学学报,12(3)89-92.
[6] 汪旭等,1998,云南师范大学学报,18(4):1-5.
[7] Önfelt. A,1992, *Mutat. Res.*, 270:97-102.
[8] 孙俊辉等,1997,生物化学与生物物理学通报 29(6):533-539.
[9] Aardema MJ, et al., 1998, *Mut. Res.* 410:3-17.
[10] Agneta Önfelt et al., 1993, *Carcinogenesis*. 14(3): 531-535.
[11] 和智君等,1999,癌变、畸变、突变,11(4):165-167.
[12] Berridge. M. J, 1987, *Annu. Rev. Biochem.*, 56: 159-193.
[13] 翟中和,1995,北京:高等教育出版社,细胞生物学,pp104-105.
[14] Clare M, et al., 1986, *The EMBO Journal*, 5(11): 2889-2898.
[15] Önfelt. A, 1987, *Muta. Res.*, 182:135-154.

THE EFFECTS OF 1,2-DIACYLGCEROL CONTENT INDUCED BY *TRIPTERYGIUM HYPOGLAUCUM*(LEVEL) *HUTCH* IN V₇₉CELLS

Wang Xu* He Zhijun* Wang Guilan**

*School of Life Sciences, Yunnan Normal University, Kunming 650092

**Kunming Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, 650223

ABSTRACT

V₇₉ Chinese hamster cells were treated *in vitro* by *Tripterygium Hypoglaucum* (Level) *Hutch* (THH). 1,2-diacylgcerol (DAG) is an important second messenger of phosphatidylinositol signal pathway in cellular signal system. The relationships between aneuploidy induction by THH and the pathway were investigated by determining the DAG content and C-mitosis cells frequency in V₇₉ cells line after treated with THH. The experiment showed that the compound increased the frequency of C-mitosis cells frequency significantly in high concentration group and the DAG content in all concentration groups. (p<0.001-0.05). The result indicated that phosphatidylinositol signal pathway might be one of the aneuploid induction mechanism for THH.

Key words: *Tripterygium Hypoglaucum*(Level) *Hutch* V₇₉ Chinese hamster cells 1,2-diacylgcerol
Aneuploidy*

名词讨论

与“implantation”相关的几个概念的讨论

范 衡 宇

(中国科学院动物研究所计划生育生殖生物学国家重点实验室 北京 100080)

“implantation”是指哺乳动物胚胎由输卵管进入子宫以后,与子宫内膜进行一系列细胞分子水平上的相互作用,进而相互识别、黏附,最后形成胎盘,使二者建

立营养联系的过程^[1]。对这一单词的译名历来很不统一,在医学资料中多译为“着床”,但由于家畜(如猪、马、牛、羊等)的滋养层细胞不像灵长类那样深度侵入