

实验研究

大蒜素诱导人 T 淋巴细胞白血病
细胞株凋亡的实验研究俞超芹¹ 凌昌全¹ 潘瑞萍¹ 黄雪强¹ 张登海²

摘要 应用 DNA 断裂点标记法(TUNEL)、DNA 凝胶电泳以及光镜等技术探讨大蒜素诱导人急性白血病 T 淋巴细胞株(6T-CEM 细胞)凋亡的规律。结果:大蒜素在 0.1 μ g/ml 剂量时即明显诱导 6T-CEM 细胞凋亡,50 μ g/ml 达到高峰,凋亡率为 36.4%。15 μ g/ml 大蒜素作用 6T-CEM 细胞 2 小时,出现明显凋亡,24 小时达到高峰,凋亡率为 56.9%。结论:大蒜素可诱导 6T-CEM 细胞凋亡,且有明显的时间和剂量效应。

主题词 白血病, T 细胞/中医药疗法 大蒜辣素/药理学 脱噬作用/药物作用

大蒜是我们的日常食品,它的药用价值愈来愈受到人们的重视。大蒜素(Allicin)是从大蒜中提取的单体,它最早用于治疗真菌感染,近年来的研究表明,大蒜素对心血管疾病、糖尿病均有治疗作用,尤其是大蒜素可以预防和治疗肿瘤,如大蒜素可显著抑制 K562 和 HR-8348 细胞株的增殖,阻留 S 期的细胞于 G₂/M 期,并对抗癌药有增敏作用。本文利用 DNA 断裂点标记法和 DNA 凝胶电泳研究大蒜素诱导 6T-CEM 细胞(人急性白血病 T 淋巴细胞株)凋亡,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料:人急性白血病 T 淋巴细胞株(6T-CEM)由中科院上海分院细胞所提供。用含 10% 的小牛血清的 RPMI-1640 (GBICO) 安全培养液培养。大蒜素(INJECTIO ALLITRIDI, 烯丙基硫代磺酸酯 30mg/ml)由上海禾丰制药有限公司提供。TUNEL 标记液、Streptavidin-AP、碱性磷酸酶底物(NBT/BCIP)由德国宝灵曼公司提供。

1.2 大蒜素对 6T-CEM 细胞毒性及诱导凋亡(DNA 断端点标记)剂量效应实验:6T-CEM 细胞处于对数增殖期时,调整细胞浓度为 1 $\times 10^6$ /ml,细胞悬液接种

在 24 孔板中。加不同浓度的大蒜素,设空白对照。37 $^{\circ}$ C 二氧化碳孵箱内继续培养 2 小时,取 40 μ l 细胞悬液,0.4% 台盼蓝染色,计数阳性率。收集其余细胞悬液,离心,去上清,加入 40% 甲醛,固定 15 分钟,离心, PBS 洗涤。加穿透液(含 0.1% Triton X-100, 0.1% NaAc), PBS 洗涤。在显微镜下点片,晾干。TUNEL 标记液 37 $^{\circ}$ C 水浴作用 60 分钟。PBS 洗涤, TUNEL Buffer 1 洗涤背景。加 Streptavidin-AP 置 37 $^{\circ}$ C 水浴 30 分钟。碱性磷酸酶底物(NBT/BCIP)显微镜下显色。核固红复染,自然干燥后中性树胶封片,显微镜下计数阳性细胞。细胞核染成蓝色为阳性细胞。

1.3 大蒜素对 6T-CEM 细胞毒性、细胞凋亡时间效应实验:6T-CEM 细胞处于对数增殖期时,调整细胞浓度为 1 $\times 10^6$ /ml,细胞悬液接种在 24 孔板中。加终浓度为 15 μ g/ml 剂量大蒜素,在不同时间分别以台盼蓝染色, TUNEL 标记,计数台盼蓝阳性率及细胞凋亡率。

1.4 核酸电泳:第 1、2 步骤同上述剂量、毒性实验。然后加药 18 小时收集细胞悬液,离心,去上清, PBS 洗涤。加 DNA 抽提液(含 TBE、Rnase、NP-40 等)20 μ l,置 50 $^{\circ}$ C 水浴 60 分钟。加蛋白酶 K 3 μ l(10mg/ml),置 50 $^{\circ}$ C 水浴 2 小时。用 1.8% 琼脂糖凝胶电泳, 50V 2 小时,做 EB 染色,紫外灯下观察 DNA 电泳结果,设标准 DNA 分子量(EcoRI/Hind III)。

2 结果

2.1 大蒜素对 6T-CEM 细胞毒性及诱导凋亡剂量效应实验:台盼蓝染色结果显示,0.01~50 μ g/ml 剂量的大蒜素作用 6T-CEM 细胞 2 小时,台盼蓝染色阳性率(即坏死细胞)在 12% 以下;100 μ g/ml 剂量时,台盼蓝染色阳性率为 21.5%,空白对照为 8.1%。TUNEL 标记结果:0.1 μ g/ml 剂量的大蒜素作用 6T-CEM 细胞 2 小时,细胞出现明显凋亡(25.8%),此后凋亡率有所下降,50 μ g/ml 时细胞凋亡再次达到高峰。TUNEL 标记显微镜下所见,细胞收缩变小,染成蓝色的为凋亡细胞。

1 中国人民解放军第二军医大学长海医院,上海市长海路(200433)

2 中国人民解放军第二军医大学长征医院

收稿日期:1998-06-18

2.2 大蒜素对 6T-CEM 细胞毒性、细胞凋亡时间效应实验:15 μ g/ml 剂量大蒜素、0.2 μ g/ml 羟基喜树碱作用 6T-CEM 细胞不足 24 小时,台盼蓝染色阳性率分别在 16.7%、15.8%以下,作用 24 小时台盼蓝染色阳性率分别达 37.6%和 55.9%。空白对照组不同时间坏死细胞均在 17.7%以下。大蒜素作用 4 小时,6T-CEM 细胞出现明显凋亡,24 小时达到高峰。羟基喜树碱作用 2 小时,6T-CEM 细胞即出现明显凋亡,24 小时达到高峰。空白对照不同时间细胞凋亡率均在 17.6%以下。

2.3 核酸凝胶电泳:0.1~100 μ g/ml 剂量的大蒜素作用 6T-CEM 细胞 2 小时,可见明显的 DNA“梯子”(ladder),其第一条带约为 180bp,说明在核小体连接处的 DNA 被随机切断产生寡聚核小体,而对照细胞不显示“梯子”状 DNA 条带。

3 讨论

细胞凋亡(Apoptosis)又称细胞程序性死亡,是一种细胞生理性死亡。细胞增生和细胞凋亡之间的平衡是多细胞生物体维持自身稳定的重要因素,如细胞凋亡受阻或细胞增殖失控都可导致肿瘤形成。肿瘤的发生、发展与细胞增殖和凋亡的不平衡有关,大蒜素既对肿瘤细胞增殖有抑制作用,也可能诱导肿瘤细胞凋亡。

细胞凋亡是 Kerr 最早提出的。凋亡的典型特征是:DNA 降解为特征性的 80~200bp 片段,表现“梯子”状 DNA 条纹;染色质早期边缘化,后期片断化,这主要是由于凋亡过程中核酸内切酶活化的结果。凋亡的另一显著特征是细胞膜保持完整性,在体内这种膜的完整性直至凋亡小体(Apo body)被吞噬细胞吞噬。我们的 TUNEL 标记、DNA 电泳结果表明,0.1~100 μ g/ml 剂量的大蒜素作用 6T-CEM 细胞 2 小时,即出现典型的细胞凋亡特征。

TUNEL 法--DNA 断裂点标记法可早期检测及原位检测细胞凋亡,这种方法较 DNA 电泳法与 DNA 含量测定法有明显优点。根据 TUNEL 法结果,大蒜素在 0.1 μ g/ml 剂量时即明显诱导 6T-CEM 细胞凋亡,50 μ g/ml 达到高峰。15 μ g/ml 大蒜素作用 6T-CEM 细胞 2 小时,出现明显凋亡,24 小时达到高峰,此后凋亡率下降,36 小时为 7.2%。在 0.1~50 μ g/ml 范围剂量的大蒜素 2 小时对 6T-CEM 细胞的直接杀伤作用(即细胞坏死)较低(在 12.0%以下),50 μ g/ml 增大至 21.5%。15 μ g/ml 大蒜素对 6T-CEM 细胞的直接杀伤作用随时间的增加而加强,12 小时在 16.7%以下,24 小时在 37.6%以上。以上结果表明,大蒜素诱导 6T-CEM 细胞凋亡有明显的剂量和时间效应。

西安中医消化病研究医疗科研培训中心 消化病专科培训班招生

为了发展与提高消化病中医、中西医结合治疗技术和治疗水平,应全国各地医院联办消化病专科的需求,为了满足消化病专科医生知识更新的需要,本中心常年举办消化病专科培训班。

1. 学习内容:消化系统各病的新发展、消化系统各病治疗的新进展、消化病科研药品研究的新技术、探讨技术合作、联合办院。

2. 招收对象:县级各级医院、乡镇医院、卫生所医生,各医疗单位需要消化病专科进修提高的医生。

3. 开学时间:1999 年 3 月至 11 月,每月 1 期,4、5 日报到,6 日上课。培训费每人 490 元。食宿统一安排,费用自理。

4. 报名方式:欲参加者请来信来电报名,并请先寄报名费 50 元,索取正式通知。

联系地址:陕西省西安市健康西路 23 号,西安中医消化病研究院,联系人:田养年,电话:(029)5259454,邮政编码:710061。(广告编号:9905-15)

中国中医研究院培训中心 1999 年招生通知

中国中医研究院是中国中医药研究和医疗教学的重要基地,我中心依托中国中医研究院科研医疗教育的优势,集国内中医药界中医专家教授师资力量和他们丰富的理论知识临床技能办学经验,为国内外广大医务工作者提供一个学习交流的机会,现将 1999 年上半年招生计划安排如下。

1. 任志远中国传统针灸刀(即小刀)疗法、薛立功古代圆针疗法的现代临床应用专题研修班,时间:1999 年 9 月 2 日~9 月 7 日、1999 年 11 月 10 日~11 月 16 日;2. 全国高级中医进修班,时间:1999 年 8 月 20 日~8 月 31 日;3. 全国高级中医急诊临床应用进修班,时间:1999 年 8 月 10 日~8 月 19 日;4. 全国高级针灸临床应用研修班,时间:1999 年 9 月 9 日~9 月 20 日;5. 全国高级推拿按摩研修班,时间:1999 年 10 月 4 日~10 月 15 日;6. 全国高级中西医结合治疗骨折与肢体畸形矫正经验研修班,时间:1999 年 10 月 18 日~10 月 27 日;7. 全国高级中医肛肠病研修班,时间:1999 年 5 月 21 日~5 月 30 日、1999 年 10 月 29 日~11 月 8 日。

以上各班于开班前一日报名,学费 680 元,报名费 5 元,学习结束颁发中英文对照、钢印结业证书,食宿统一安排,费用自理,学员请备 2 寸免冠照片两张,广告刊出,按时开课。地址:北京东直门内北新仓 18 号中国中医研究院培训中心,邮政编码:100700,联系人:沙力、狄福金,电话:(010)64062096、64075193。(广告编号:9905-16)