

地塞米松与 ATP 联用在体外诱导细粒棘球绦虫原头节细胞凋亡的研究

康金凤^{1*}, 胡汉华¹, 袁武梅¹, 武贵臻¹, 陈蓉¹, 白山别克·吴汗², 艾赛提·卡力²

【摘要】 目的 探讨地塞米松与三磷酸腺苷(ATP)联用在体外诱导细粒棘球绦虫原头节细胞凋亡的作用。方法 体外培养细粒棘球绦虫原头节, 分别设地塞米松(5 mmol/L)组、ATP(1.6 mmol/L)组、地塞米松(5 mmol/L)+ATP(1.6 mmol/L)组和空白对照组, 显微镜下观察原头节变化。药物诱导 8 h 后, 选取原头节形态改变最明显的一组 and 空白对照组, 透射电镜观察这两组原头节的超微结构, 原位末端脱氧核糖核苷酸转移酶标记技术(TUNEL 法)检测原头节中的凋亡细胞, 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (caspase-3)活性检测试剂盒检测该酶活性, 琼脂糖凝胶电泳检测两组原头节的 DNA 片段。结果 药物诱导 8 h 后观察, 与对照组相比, 地塞米松组和地塞米松+ATP 组的原头节均出现团缩、顶突内凹和体积缩小, 钙颗粒明显减少且模糊不清, 未见原头节活动, 其中地塞米松+ATP 组原头节的形态改变更明显, 故选择该组作为实验组, 与空白对照组进行后续试验。透射电镜观察见实验组原头节中实质细胞体积缩小、细胞膜皱缩、细胞基质浓缩、核异染色质凝集呈团块状或新月形边集于核膜下, 表现出凋亡细胞的特征。TUNEL 法在实验组的原头节中检测到散在的凋亡细胞, 对照组则未见凋亡细胞。实验组 caspase-3 活性约为对照组的 12 倍。电泳结果显示, 实验组 DNA 中有约 150 bp 的核小体 DNA 片段。结论 地塞米松与 ATP 联用可在体外诱导细粒棘球绦虫原头节细胞凋亡。

【关键词】 细粒棘球绦虫; 原头节; 地塞米松; 三磷酸腺苷; 细胞凋亡

中图分类号: R383.33 文献标识码: A

Apoptosis Induced *in vitro* by Dexamethasone and ATP in the Protoscolex of *Echinococcus granulosus*

KANG Jin-feng^{1*}, HU Han-hua¹, YUAN Wu-mei, WU Gui-zhen, CHEN Rong¹,
Baishanbieke WH², Aisaiti KL²

(1 *Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China*; 2 *Urumqi Animal Health Inspection Station, Urumqi 830000, China*)

【Abstract】 **Objective** To explore the apoptosis induced by dexamethasone and adenosine triphosphate (ATP) in protoscolex of *Echinococcus granulosus*. **Methods** Protoscolexes were cultured *in vitro* and used for the experiment in 4 groups: dexamethasone (5 mmol/L) group, ATP (1.6 mmol/L) group, dexamethasone (5 mmol/L)+ATP (1.6 mmol/L) group, and RPMI 1640 medium as control group. The morphology of protoscolex was observed by light microscopy. After drug treatment for 8 h, the group with significant morphological changes in protoscolex was selected to observe the ultra-structure of protoscolex by transmission electron microscopy. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling assay (TUNEL) was employed to observe the apoptosis. Caspase-3 activity was detected with a kit, and DNA fragments were separated by agarose gel electrophoresis. **Results** After induced for 8 h, the protoscolexes shrank in dexamethasone group and dexamethasone+ATP group, the rostellum was invaginated. Compared with the control, the calcareous corpuscles in the protoscolex significantly reduced and blurred in the two groups. The morphological changes in protoscolex of dexamethasone+ATP group was more obvious than that of dexamethasone group. Electron microscopy showed that dexamethasone+ATP-treated protoscolexes possessed typical morphological features of apoptosis, including the cell volume reduction with densified cytoplasm, cell membrane blebbing, and nuclear heterochromatin peripheral aggregation below the nuclear membrane. A few apoptotic cells were found in protoscolex of dexamethasone+ATP group by TUNEL, while none in the control. Caspase-3 activity significantly increased 12-fold compared to the control. About 150bp DNA fragment exhibited the typical DNA ladder formation characteristic for apoptosis in dexamethasone+ATP group. **Conclusion** Apoptosis in the

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30560141)

作者单位: 1 新疆医科大学, 乌鲁木齐 830054; 2 乌鲁木齐动物卫生监督所, 乌鲁木齐 830000

* 通讯作者, E-mail: kangjinfeng59@163.com

protoscolex of *E. granulosus* may be induced by dexamethasone and ATP *in vitro*.

【Key words】 *Echinococcus granulosus*; Protoscolex; Dexamethasone; Adenosine triphosphate; Apoptosis

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30560141)

* Corresponding author, E-mail: kangjinfeng59@163.com

地塞米松可诱导细胞凋亡。王珍等^[1]用地塞米松诱导培养的大鼠大脑皮层星形胶质细胞凋亡, 黄行许等^[2]用大剂量地塞米松快速高效诱导巨噬细胞凋亡。在寄生虫学领域, 王文实等^[3]用地塞米松成功诱导体外培养的日本血吸虫成虫混合细胞凋亡。此外, 细胞凋亡的过程需要三磷酸腺苷(ATP)^[4]。向肝细胞核内加入 1 mmol/L ATP 和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺), 可使 Ca²⁺诱导的核小体间的裂解达到半数最高水平^[5]。本文以大剂量的地塞米松和 ATP 作用于体外培养的细粒棘球绦虫原头节, 探究药物诱导细粒棘球绦虫原头节细胞凋亡的作用。

材料与方 法

1 材 料

1.1 细粒棘球绦虫原头节 有细粒棘球绦虫的绵羊肝脏和肺脏采自乌鲁木齐屠宰场, 将其表面消毒, 用无菌注射器吸出含原头节的囊液, 以无菌生理盐水洗涤原头节, 直至镜下见原头节结构清晰完整, 钙颗粒清亮明显, 且 95% 以上的原头节对伊红拒染, 确认其正常存活。

1.2 试剂 RPMI 1640 培养液购自海克隆生物化学制品(北京)有限公司, 临用前加入庆大霉素(10~20 μg/ml)。地塞米松磷酸钠注射液(批号为 20070102)购自湖北潜江制药股份有限公司。三磷酸腺苷二钠注射液(批号为 200708085)购自山西晋新双鹤药业有限责任公司。原位末端脱氧核糖核苷酸转移酶标记(TUNEL)细胞凋亡原位检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司产品。半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (caspase-3) 活性检测试剂盒和细胞凋亡-DNA 梯形带 (DNA Ladder) 抽提试剂盒为海门碧云天生物技术研究所产品。

2 方 法

2.1 细胞凋亡的诱导与实验组的筛选 将上述分离的原头节移至 RPMI 1640 培养液中, 37 °C 5% CO₂ 孵育 2 h。倒置显微镜观察原头节, 确认其存活状态良好后, 进行诱导试验。分别设地塞米松(5 mmol/L)组、ATP(1.6 mmol/L)组、地塞米松(5 mmol/L)+ATP(1.6 mmol/L)组和空白对照组, 每组 3 孔, 原头节

400~500 个/孔。37 °C 5% CO₂ 孵育 8 h 后, 倒置显微镜观察原头节变化, 选取原头节形态结构改变最明显的一组作为实验组, 和空白对照组进行透射电镜观察和其他检测。

2.2 透射电镜观察 收集实验组和空白对照组的原头节, 无菌生理盐水洗涤 1 次, 4%戊二醛前固定 24 h, 经 1%锇酸后固定、丙酮梯度脱水、Epon812 环氧树脂包埋后, 切片, 铅铀电子染色, 透射电镜(JEOL-1230, 日本电子株式会社)观察原头节的结构和细胞形态。

2.3 TUNEL 法检测 按试剂盒说明操作, 将两组原头节用 4%中性甲醛固定 24~48 h 后, 先后用琼脂糖和石蜡包埋, 切片。经二氨基联苯胺(DAB)显色和苏木素复染后, 显微镜观察。凋亡细胞的细胞核被 TUNEL 试剂染成棕黄色, 正常细胞被苏木素复染成蓝色。

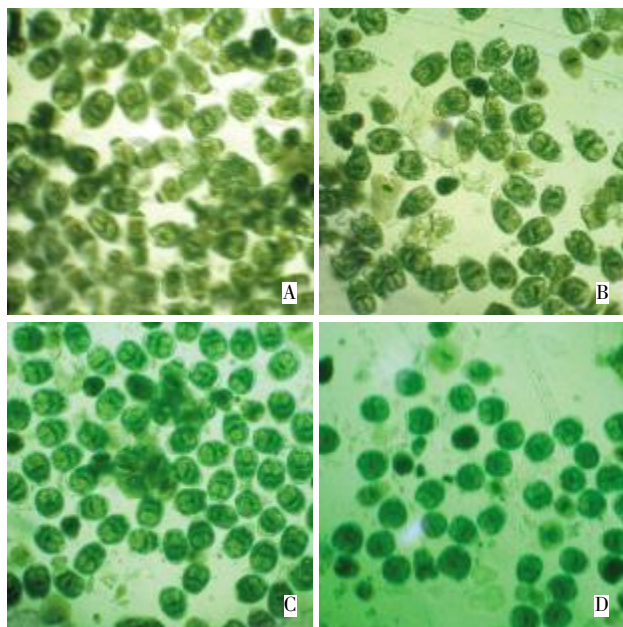
2.4 caspase-3 活性检测 caspase-3 是细胞凋亡过程中的关键酶, 在细胞凋亡中发挥核心作用。样品分 2 次检测, 每次每组测 1 孔。按试剂盒说明操作, 在冰浴中, 3 mg 样品加入 100 μl 裂解液研磨, 冰浴中放置 15~20 min, 4 °C 1 700×g 离心 15 min 后, 吸取上清液, 按说明书反应体系加入酶标板, 并设空白组, 37 °C 孵育 15 h, 用酶标仪检测吸光度(A₄₀₅值)。样品中活化的 caspase-3 催化试剂中无色的四肽化合物 Ac-DEVD-pNA 产生黄色的对硝基苯胺 pNA, 根据标准曲线和样品的 A₄₀₅ 值, 计算样品中生成的 pNA 浓度, 由此推测 caspase-3 的活性。

2.5 DNA 片段检测 按试剂盒操作说明抽提 DNA, 2%琼脂糖凝胶电泳 2 h 后观察。

结 果

1 倒置显微镜观察

药物诱导 2 h 后, 即见地塞米松组和地塞米松+ATP 组原头节顶突内凹、虫体团缩、体积缩小; 8 h 后, 原头节仍为内凹型, 体积缩小, 钙颗粒较空白对照组明显减少和模糊, 且未见原头节活动。ATP 组和空白对照组的原头节顶突出或凹入, 体积较大, 存活良好, 且可见原头节活动(图 1)。地塞米松组和地塞米松+ATP 组中, 后者的原头节改变更明显, 因此选择该组作为实验组进行后续试验。



A: 空白对照组, B: ATP 组, C: 地塞米松组, D: 地塞米松+ATP 组。
A: Control group, B: ATP group, C: Dexamethasone group, D: Dexamethasone+ATP group.

图 1 药物诱导 8 h 后原头节形态变化 (×100)

Fig.1 Morphology of protoscolexes induced by drugs for 8h (×100)

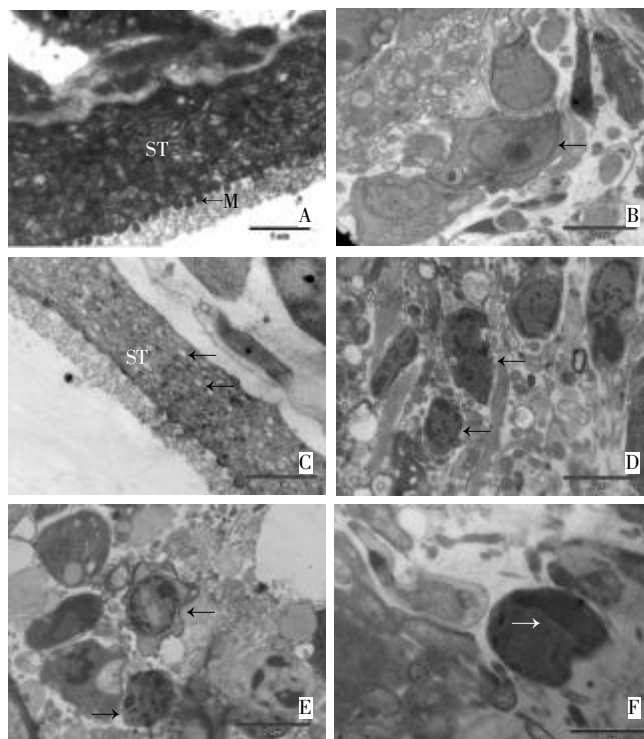
2 透射电镜观察

对照组原头节体被合胞体带结构较致密, 内有大小不等、形状不一的囊泡, 排列较规则, 散在有电子致密物, 外侧有较多排列整齐的微毛, 微毛外侧有较厚的过碘酸雪夫(PAS)染色阳性物质, 内缘有乳突状突起, 与其下的透明带或纤维带相连(图 2A); 原头节内含不同类型细胞, 实质细胞呈圆形或椭圆形, 细胞有许多突起相互交错, 细胞核大而明显, 核仁居中, 核内染色质较细腻, 异染色质较少(图 2B)。

实验组原头节体被合胞体带变薄, 结构松散, 囊泡扩张, 外侧 PAS 阳性物质减少, 微毛减少, 且排列不规则(图 2C); 实质细胞基质浓缩, 核异染色质呈粗大团块边集(图 2D); 部分实质细胞表现为细胞膜皱缩, 细胞基质变淡, 细胞器减少, 核周隙轻微增宽, 核仁消失, 部分表现为细胞缩小, 细胞表面突起减少, 细胞基质密度增高, 细胞核中央基质变淡(图 2E); 部分实质细胞细胞核异染色质呈月牙形边集于核膜下(图 2F)。实验组原头节细胞表现出细胞凋亡的特征。

3 TUNEL 检测

镜下观察, 可见实验组原头节结构尚完整, 原头节中可见被染成黄色和蓝色两种颜色的细胞核, 细胞核黄染者为凋亡细胞, 原头节中凋亡细胞呈散在分布; 而对照组原头节细胞核均呈蓝色(图 3)。



A、B: 对照组, C~F: 实验组; A: 正常原头节皮层合胞体带(×25000), B: 正常实质细胞(←)(×15000), C: 皮层合胞体带中小囊泡扩张(←), 微毛减少(×30000), D: 实质细胞基质浓缩, 核异染色质呈粗大团块状(←)(×15000), E: 部分实质细胞细胞膜皱缩, 细胞基质变淡, 核仁消失(←), 部分实质细胞细胞缩小, 细胞表面突起减少, 细胞基质密度增高, 核中央基质变淡(→)(×15000), F: 实质细胞核胞核异染色质呈月牙形边集于核膜下(→)(×30000); SL: 合胞体带, M: 合胞体带外侧的微毛。

A, B: Control group, C~F: Induced group; A: Syncytial tegument of normal protoscolex (×25000), B: Normal parenchyma cells (←) (×15000), C: Cysts expanded (←) and the number of microtriches decreased (×30000), D: Cytoplasmic matrix of parenchyma cell enriched, and heterochromatin of nucleus massed (←) (×15000), E: Cell membrane of some parenchyma cells shrank, cytoplasm became light and nucleolus disappeared (←), cell volume decreased, the process on cell member reduced and the centre of nuclear matrix became light (→) (×15000), F: A moon-shaped heterochromatin massed on the nuclear membrane of parenchyma cell (→) (×30000); ST: Syncytial tegument, M: Microtriche.

图 2 原头节的透射电镜观察

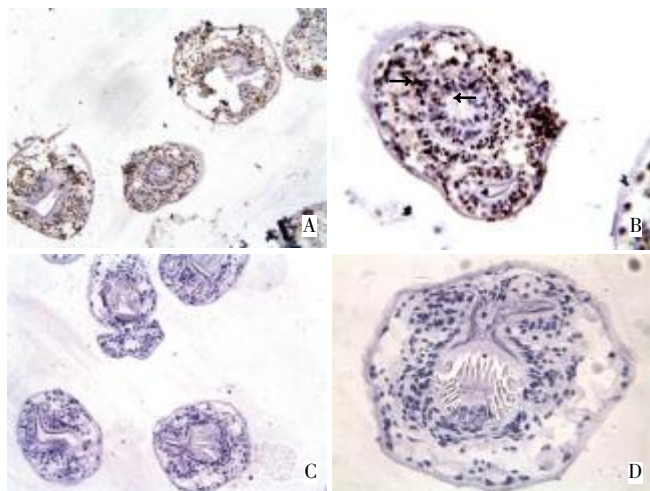
Fig.2 Observation of protoscolex by transmission electron microscopy

4 caspase-3 活性检测

结果显示, 首次实验组和对照组的 A_{405} 值分别为 0.319 和 0.103, 推算 pNA 浓度分别为 81.09 和 $6.62 \mu\text{mol/L}$; 第 2 次实验组和对照组的 A_{405} 值分别为 0.340 和 0.114, 推算 pNA 浓度分别为 109.93 和 $9.802 \mu\text{mol/L}$ 。实验组的 pNA 浓度约为对照组的 12 倍, 即实验组的 caspase-3 活性约为对照组的 12 倍。

5 DNA 凝胶电泳

实验组在 150 bp 左右区域可见明显 DNA 条带, 说明有较多的核小体 DNA 片段产生(图 4)。

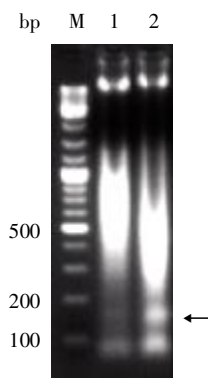


A, B: 实验组原头节中凋亡细胞呈散在分布(↑), C, D: 对照组原头节中未见凋亡细胞; A, C: ×400, B, D: ×1000。

A, B: Apoptosis cells scattered in the protoscolex of induced group (↑), C, D: No apoptosis cell in the protoscolex of control group; A, C: ×400, B, D: ×1000.

图 3 TUNEL 检测结果

Fig.3 Results of TUNEL assay



M: DNA 标志物, 1: 对照组, 2: 实验组。

M: DNA marker, 1: Control group, 2: Induced group.

图 4 原头节 DNA 片段琼脂糖凝胶电泳

Fig.4 Agarose gel electrophoresis of DNA fragments extracted from protoscolex

讨 论

据报道, 10^{-5} mol/L 和 10^{-3} mol/L 地塞米松分别能诱导体外培养的日本血吸虫成虫混合细胞和大鼠大脑皮层星形胶质细胞凋亡^[1,3]。本研究以细粒棘球绦虫原头节为实验对象, 原头节为细粒棘球绦虫生活史的幼虫阶段, 是一个完整虫体, 由多种细胞组成, 因此本研究选用了较高浓度(5×10^{-3} mol/L)的地塞米松。

细胞凋亡的典型特征之一是内源性核酸内切酶被激活, 将染色体从核小体间切成 180~200 bp 或其整数倍的 DNA 片段, 琼脂糖凝胶电泳可呈现梯形分布的 DNA 条带。180~200 bp 即一个核小体单位 DNA 的长度^[5]。在真核生物中, 不同物种、不同组织和细

胞的核小体单位长度是不同的, 约为 150~250 bp。其中直接盘绕在核小体核心颗粒上的 146 bp DNA 是保守的, 且不易被核酸酶消化, 而两个核心颗粒相连接的连接区 DNA 的长度则随物种、组织和细胞的不同而不同, 且易被核酸酶消化^[6]。核小体 DNA 被降解的程度则可随核酸酶的浓度、酶解时的温度和酶解时间的长短而变化^[6,7]。实验组在 150 bp 左右区域查见明显的 DNA 条带, 说明实验组核酸内切酶被激活, 将核小体 DNA 切割成较多核小体片段。

实验组原头节呈典型的凋亡形态, TUNEL 检测阳性, caspase-3 被大量激活, 以及核酸内切酶被激活, DNA 在核小体间发生断裂均表明细胞凋亡已发生, 证实地塞米松和 ATP 同时作用可诱导细粒棘球绦虫原头节细胞凋亡。然而, 已有文献报道仅 ATP 即可诱导某些体外培养的细胞发生凋亡^[8], 因此原头节细胞凋亡过程中地塞米松和 ATP 各自的作用有待进一步研究。

致谢 新疆医科大学临床 2007-2 班杜同心、贺晓燕和丁智慧等同学积极参加了本研究的部分工作, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Wang Z, Liu RG, Zhou JP, *et al.* Apoptosis of astrocytes induced by dexamethasone[J]. *Chin J Histochem Cytochem*, 2002, 11(3): 282-285. (in Chinese)
(王珍, 刘仁刚, 周洁萍, 等. 地塞米松诱导培养的大鼠大脑皮层星形胶质细胞凋亡[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2002, 11(3): 282-285.)
- [2] Huang XX, Chen LB, Bao YY, *et al.* Study on the apoptosis of macrophages induced by dexamethasone[J]. *Prog Biochem Biophys*, 2000, 27(5): 536-540. (in Chinese)
(黄许, 陈练波, 鲍永耀, 等. 大剂量地塞米松快速高效诱导巨噬细胞凋亡[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2000, 27(5): 536-540.)
- [3] Wang WS, Li YL. Studies on apoptosis and its induction in *Schistosoma japonicum*[J]. *Chin J Parasitol Parasit Dis*, 2000, 18(5): 269-271. (in Chinese)
(王文实, 李雍龙. 日本血吸虫细胞凋亡及其诱导的研究[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2000, 18(5): 269-271.)
- [4] Marcel L, Barbara S, Anna FC, *et al.* Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in decision between apoptosis and necrosis[J]. *J Exp Med*, 1997, 185(8): 1481-1486.
- [5] Hu Y, Ling ZQ, Shan XY. *Molecular Medical Science of Apoptosis*[M]. Beijing: Military Medical Science Press, 2002: 53-54, 476-477. (in Chinese)
(胡野, 凌志强, 单小云. *细胞凋亡的分子医学*[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2002: 53-54, 476-477.)
- [6] Bednar J, Horowitz RA, Grigoryev SA, *et al.* Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1998, 95(24): 14173-14178.
- [7] Steven MJ, Frederick JT, Heather LM, *et al.* Flexibility and constraint in the nucleosome core landscape of *Caenorhabditis elegans* chromatin[J]. *Genome Res*, 2006, 16(12): 1505-1516.
- [8] Eckhard SL, Christian H, Sylvia R, *et al.* Extracellular ATP causes apoptosis and necrosis of cultured mesangial cells via P2Z/P2X7 receptors[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 1998, 275(6): 962-971.

(收稿日期: 2009-03-02 编辑: 瞿麟平)