

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01415

## 补骨脂素加长波紫外线对 NB<sub>4</sub> 细胞线粒体膜电位的影响

Joint effect of psoralen plus ultraviolet A on mitochondrial membrane potential of NB<sub>4</sub> cells

向阳, 陈楠楠, 李海霞, 黄世林

解放军第210医院中医血液科, 大连 116021

[关键词] 补骨脂素; 长波紫外线; NB<sub>4</sub> 细胞株; 细胞凋亡; 线粒体膜电位

[中图分类号] R 733.7 [文献标志码] B [文章编号] 0258-879X(2008)11-1415-02

补骨脂素(psoralen, PSO)是中药补骨脂中的主要成分。研究表明自中药补骨脂中提取的 PSO 加长波紫外线(UVA), 即 PUVA 对人白血病细胞 NB<sub>4</sub>、K<sub>562</sub>、HL-60 的生长均有抑制作用<sup>[1-2]</sup>, 并可诱导白血病细胞凋亡。本研究应用析因设计观察 PUVA 对 NB<sub>4</sub> 细胞线粒体膜电位( $\Delta\Psi_m$ )的影响, 以探讨 PUVA 诱导其凋亡的作用机制。

### 1 材料和方法

1.1 细胞株 NB<sub>4</sub> 细胞株由大连医科大学惠赠。

1.2 药品及主要试剂 PSO 为大连理工大学及本院共同由纯中药补骨脂中提取和制备, 纯度 98.5%。二甲基亚砜(DMSO)购自北京化工厂。RPMI 1640 培养基和胎牛血清为 Gibco 产品。JC-1 为 Molecular Probe 公司产品。

1.3 仪器和设备 流式细胞仪购自美国贝克曼库尔特公司, GLY-10 型光量子血液平衡治疗仪由徐州华卫医疗设备公司研制。

1.4 细胞培养 NB<sub>4</sub> 细胞常规培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基(含硫酸庆大霉素 0.025 U/ml)中, 于 37℃、体积分数为 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中进行连续培养。

1.5 流式细胞术早期凋亡试剂盒测定 PUVA 24 h 后 NB<sub>4</sub> 细胞的凋亡情况 取浓度为  $4.0 \times 10^5$ /ml、处于对数生长期的 NB<sub>4</sub> 细胞株 5 ml, 分别加入补骨脂素 0、5、10、20、40  $\mu$ l, 使反应体系中的 PSO 终浓度分别为 0、10、20、40、80  $\mu$ g/ml, 放入石英比色皿中, 在 GLY-10 型光量子血液平衡治疗仪( $\lambda = 360$  nm)上以  $1 \text{ J/m}^2$  辐射量边照射边震荡, 照射时间分别为 0、5 min。处理后各实验组细胞继续培养 24 h 后, 取 1 ml 样品以  $300 \times g$  的转速离心 3 min, 弃去上清液, 用 PBS 洗 2 次, 加 100  $\mu$ l 含钙 PBS 静置 10 min, 加 5  $\mu$ l Annexin V, 10  $\mu$ l PI, 避光 15 min, 上机待测, 以未经处理的 NB<sub>4</sub> 细胞为阴性对照, 于流式细胞仪(FCM)上进行荧光检测, 并给出相应阳性表达

率。

1.6 透射电镜下观察细胞超微结构特点 收集浓度为  $5.0 \times 10^5$ /ml, 经 PUVA(PSO 80  $\mu$ g/ml + UVA 5 min)处理的 NB<sub>4</sub> 细胞 10 ml, 用 PBS 清洗 2 次, 转入 2.0 ml 离心管, 离心( $2\,000 \times g$ ) 3 min, 弃上清, 缓缓加入 2.5% 戊二醛 2 ml, 4℃ 冰箱静置 2 h 以上。磷酸缓冲液冲洗, 饿酸固定, 水洗、脱水, 浸透、包埋, 制定超薄切片, 透射电镜下观察。

1.7 流式细胞术测定 PUVA 24 h 后 NB<sub>4</sub> 细胞  $\Delta\Psi_m$  的变化情况 试验分组及处理方法同前。收集  $1 \times 10^6$  个细胞, 重悬于 1 ml PBS 中, 加入 200  $\mu$ mol/L JC-1 10  $\mu$ l, 37℃、体积分数为 5% CO<sub>2</sub> 孵育 15~30 min, 2 ml PBS 洗 1 次, 室温下离心( $500 \times g$ ) 3 min, 弃上清, 加 500  $\mu$ l PBS, 轻摇试管使细胞重悬, 上机检测, 用 50 mmol/L CCCP 1  $\mu$ l, 37℃ 孵育 5 min, 进行荧光标准补偿, 并记录荧光强度。

1.8 统计学处理 所有实验结果均来自至少 3 组平行或 3 次重复实验。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用  $2 \times 5$  析因设计的方差分析; 所有统计采用 SPSS 11.5 统计软件完成。

### 2 结果

2.1 细胞凋亡 AnnexinV-PI 双染早期凋亡试剂盒检测 PUVA 后 24 h, NB<sub>4</sub> 细胞的凋亡率见表 1。析因设计的方差分析结果显示, PUVA 可上调 NB<sub>4</sub> 细胞的凋亡率, 两因素不同水平间的差异有统计学意义( $P < 0.01$ ), 各因素之间有交互作用( $P < 0.01$ )。

2.2 细胞  $\Delta\Psi_m$  的变化 应用流式细胞仪检测 PUVA 后 24 h NB<sub>4</sub> 细胞  $\Delta\Psi_m$  的相对荧光强度的变化, 见表 2。PUVA 可下调 NB<sub>4</sub> 细胞  $\Delta\Psi_m$  水平, 两因素不同水平间的差异有统计学意义( $P < 0.01$ ), 各因素之间有交互作用( $P < 0.01$ )。

2.3 超微结构的改变 透射电镜下观察 PUVA 后 NB<sub>4</sub> 细胞出现胞体缩小, 胞质浓缩, 胞核体积减小, 裂解成一个或数个致密体, 可见核小体碎裂, 核染色质聚集或边集, 部分染色

[收稿日期] 2008-01-08

[接受日期] 2008-09-17

[基金项目] 国家自然科学基金(30472257)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30472257)。

[作者简介] 向阳, 硕士, 主任医师, 硕士生导师。E-mail: tcm210dl@yahoo.com.cn

质致密成斑块状或沿核膜收缩成新月体状,整个细胞可裂解 成大小不一凋亡小体。见图1。

表1 PUVA后24h NB<sub>1</sub>细胞凋亡率

(n=3,  $\bar{x} \pm s$ , %)

辐照时间 t/min	PSO $\rho_B / (\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1})$				
	0	10	20	40	80
0	7.88 ± 0.64	9.37 ± 0.66	9.56 ± 0.48	11.01 ± 2.03	22.97 ± 1.59
5	12.03 ± 1.26	15.44 ± 1.01	30.74 ± 1.55	38.16 ± 1.25	42.10 ± 1.54

表2 PUVA后24h NB<sub>1</sub>细胞株相对荧光强度的变化

(n=3,  $\bar{x} \pm s$ )

辐照时间 t/min	PSO $\rho_B / (\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1})$				
	0	10	20	40	80
0	583.33 ± 2.15	436.90 ± 3.18	376.80 ± 5.91	333.40 ± 7.01	323.53 ± 6.98
5	237.10 ± 8.51	210.43 ± 6.40	206.83 ± 5.39	200.73 ± 8.78	182.27 ± 8.59

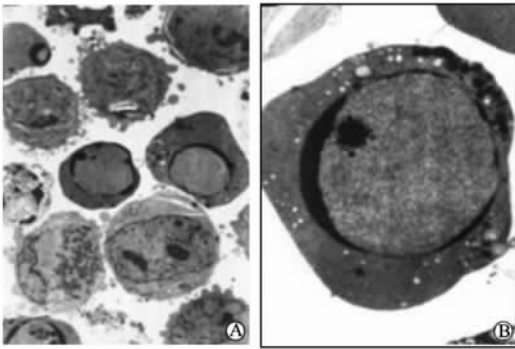


图1 NB<sub>1</sub>细胞PUVA后超微结构的改变

Original magnification: ×2 500(A); ×6 000(B)

### 3 讨论

研究表明在波长范围为320~360 nm之间的紫外光照射下,可激发PSO的动力效应,增强其抗肿瘤及抗白血病的作[1-6]。本实验在360 nm UVA照射条件下,流式细胞术检测结果显示NB<sub>1</sub>细胞的凋亡率随着PSO浓度的增加、UVA照射时间的延长而增加,呈现剂量-时间依赖性;不同浓度的PSO、不同照射时间的UVA对NB<sub>1</sub>细胞的凋亡率有显著性差异(P<0.01),且PSO浓度与UVA照射时间呈现交互作用(P<0.01)。透射电镜下观察到PUVA后NB<sub>1</sub>细胞的超微结构呈现出凋亡的形态学改变。研究结果表明PSO可诱导NB细胞的凋亡,加用UVA照射可明显增强PSO诱导细胞凋亡的作用。当PSO浓度为80 μg/L、UVA照射时间为5 min时,NB<sub>1</sub>细胞的凋亡率达最高值为(34.9 ± 0.30)%。

研究已表明线粒体在细胞凋亡的过程中起枢纽作用,而ΔΨ<sub>m</sub>降低被认为是细胞凋亡级联反应过程中最早发生的事件,出现在细胞核变化(染色质浓缩、DNA断裂)之前[7-8],一旦ΔΨ<sub>m</sub>剧变,则细胞凋亡将不可逆转。本实验采用流式细胞术检测观察到NB<sub>1</sub>细胞的ΔΨ<sub>m</sub>的水平随着PSO浓度的增加、UVA照射时间的延长而下降,呈现剂量-时间依赖性;不同浓度的PSO、不同照射时间的UVA对NB<sub>1</sub>细胞的ΔΨ<sub>m</sub>

影响有显著性差异(P<0.01),且PSO浓度与UVA照射时间呈现交互作用(P<0.01),表明PSO可降低ΔΨ<sub>m</sub>,且与UVA有协作用,加用UVA照射可明显增强PSO的作用强度。当PSO浓度为80 μg/L、UVA时间为5 min时,NB<sub>1</sub>白血病细胞株ΔΨ<sub>m</sub>达最低值为(182.27 ± 8.59)。

由此可见,PUVA降低NB<sub>1</sub>细胞的ΔΨ<sub>m</sub>是诱导NB<sub>1</sub>细胞凋亡的作用机制之一。

### [参考文献]

- [1] 向阳,葛永亮,张德杰,陈楠楠,黄世林. 补骨脂素加长波紫外线对NB<sub>1</sub>、K562白血病细胞株的作用[J]. 第四军医大学学报, 2006,27:609-611.
- [2] 陈楠楠,黄世林,张德杰,向阳,郭爱霞,张励. 补骨脂素加长波紫外线对人白血病细胞株NB<sub>1</sub>、NB<sub>1</sub>、K562作用的研究[J]. 中国中医急症,2007,16:444-446.
- [3] 吴少华,张仲海,赵建斌. 补骨脂素体内外抗癌活性的实验研究[J]. 中国中药杂志,1998,23:303-305.
- [4] Garneiro L V, Ferreira S R, Chen C L, Andreu G L. Psoralen derivatives and longwave ultraviolet irradiation are active in vitro against human melanoma cell line[J]. J Photochem Photobiol B,2004,76(1-3):49-53.
- [5] Plumas J, Drillat P, Jacob M C, Richard M J, Favrot M C. Extracorporeal photochemotherapy for treatment of clonal T cell proliferations[J]. Bull Cancer,2003,90(8-9):63-70.
- [6] Effect T, Fabry U, Osieka R. Induction of apoptosis, depletion of glutathione, and DNA damage by extracorporeal photochemotherapy and psoralen with exposure to UV light in vitro[J]. Anticancer Res,2001,21(4A):2777-2783.
- [7] Buss J L, Neuzil J, Gellert N, Webert C, Ponka P. Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone analogs induce apoptosis in hematopoietic cells due to their iron-chelating properties[J]. Biochem pharmacol,2003,65:161-172.
- [8] Cain K, Bratton S B, Cohen G M. The Apaf-1apoptosome: a large caspase-activating complex[J]. Biochemie,2002,84(2-3):203-214.

[本文编辑] 孙岩