

白鲜碱对小鼠脾淋巴细胞活力的体外抑制作用及机制研究^Δ

丛欢*, 杨莹, 包亚男, 洪博, 郭丽娜(齐齐哈尔医学院药学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

中图分类号 R285;R992 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)21-2963-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.21.17

摘要 目的:研究白鲜碱对小鼠脾淋巴细胞活力的体外抑制作用并探讨其可能的作用机制。方法:分离并培养小鼠原代脾淋巴细胞,以0(空白对照)、50、100、150 μmol/L白鲜碱作用细胞24 h后,采用MTT法检测细胞活力,乳酸脱氢酶(LDH)法检测细胞LDH释放率,流式细胞术检测细胞早期凋亡率,Hoechst 33342和碘化丙啶(PI)双染法检测细胞坏死率,Western blot法检测细胞中胱天蛋白酶3(Caspase 3)、剪切体Caspase 3(Cleaved-Caspase 3)蛋白表达水平以及彗星试验法检测细胞DNA损伤(以DNA拖尾区域比例反映)。结果:与空白对照比较,100、150 μmol/L白鲜碱可显著抑制细胞活力($P<0.01$);150 μmol/L白鲜碱可显著增加细胞LDH的释放($P<0.05$),释放率达到79.37%;50、100、150 μmol/L白鲜碱均可提高细胞的早期凋亡率,但差异均无统计学意义($P>0.05$);150 μmol/L白鲜碱可显著增加细胞坏死率($P<0.05$),坏死率达到78.64%;50、100、150 μmol/L白鲜碱均可升高Caspase 3蛋白表达水平,但差异均无统计学意义($P>0.05$),然而50、100 μmol/L白鲜碱可显著提高Cleaved-Caspase 3蛋白表达水平($P<0.05$);白鲜碱可呈剂量依赖性地引起DNA损伤,其中100、150 μmol/L白鲜碱可显著增加DNA拖尾区域比例($P<0.01$)。结论:白鲜碱可以抑制脾淋巴细胞活力,其作用机制可能与诱导脾淋巴细胞坏死和造成DNA损伤有关。

关键词 白鲜碱;脾淋巴细胞;凋亡;坏死;DNA损伤;体外试验

Study on the Viability Inhibitory Effects and Mechanism of Dictamnine on Mice Spleen Lymphocyte *in vitro*

CONG Huan, YANG Ying, BAO Yanan, HONG Bo, GUO Lina (College of Pharmacy, Qiqihar Medical University, Heilongjiang Qiqihar 161006, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the inhibitory effect of dictamnine on the viability of mice spleen lymphocyte *in vitro* and explore its potential mechanism. METHODS: The primary spleen lymphocytes of mice were isolated and cultured. The cells were treated with 0 (blank control), 50, 100, 150 μmol/L dictamnine for 24 h. MTT assay was used to determine the cell viability; Lactic dehydrogenase (LDH) assay was used to determine release rate of LDH. Early apoptosis rate was detected by flow cytometry. Necrosis rate was detected by Hoechst 33342 and PI double staining; Western blot assay was used to detect the protein expressions of Caspase 3 and Cleaved-Caspase 3 in cells. Comet assay was used to detect DNA damage in cells (reflected in the proportion of DNA tail area). RESULTS: Compared with blank control, 100, 150 μmol/L dictamnine could significantly inhibit the viability of lymphocytes ($P<0.01$). 150 μmol/L dictamnine could significantly increase the release of LDH ($P<0.05$), and release rate reached 79.37%. 50, 100, 150 μmol/L dictamnine could improve the early apoptotic rate of lymphocyte, but there was no statistical significance ($P>0.05$). 150 μmol/L dictamnine could significantly increase the necrosis rate ($P<0.05$), and necrosis rate reached 78.64%. 50, 100, 150 μmol/L dictamnine could increase the protein expression of Caspase 3, but there was no statistical significance ($P>0.05$), while 50, 100 μmol/L dictamnine could improve the protein expression of Cleaved-Caspase 3 significantly ($P<0.05$). DNA damage was induced in a dose-dependent manner by dictamnine, in which 100 and 150 μmol/L dictamnine could significantly increase DNA tail area ($P<0.01$). CONCLUSIONS: Dictamnine can inhibit spleen lymphocyte viability, and the mechanism may be related to inducing spleen lymphocyte necrosis and DNA damage.

KEYWORDS Dictamnine; Spleen lymphocytes; Apoptosis; Necrosis; DNA damage; *In vitro* test

在湿疹、过敏特应性皮炎等病理条件下的免疫反应迁延难愈,严重危害着人类的健康。白鲜皮为多年生草本植物白鲜和狭叶白鲜的根皮,有清热燥湿、祛风解毒的功效,是治疗各种皮肤病的常见药物^[1-3],具有抗炎^[4]、抗过敏^[5]、抗辐射^[6]等诸多药理作用,在临床上得到了广泛的应用。但白鲜皮的毒性作用也不能忽视,白鲜皮入

肝经,表现出肝毒性^[7]。白鲜碱作为白鲜皮的主要活性成分,也具有一定的肝毒性,如郭晓培等^[8]报道了白鲜碱可以呈剂量依赖性地增加HepG2细胞上清液中丙氨酸转氨酶(AST)和天冬氨酸转氨酶(ALT)活性,使线粒体膜电位下降,造成细胞损伤;再如Li ZQ等^[9]报道了白鲜碱可以通过升高细胞色素P₄₅₀3A4酶(CYP3A4)活性引起亚慢性肝损伤。白鲜皮虽善于治疗免疫系统疾病,可白鲜皮是否对免疫系统有损伤作用却未见报道。故本研究选用白鲜皮的有效成分白鲜碱作用于体外脾淋巴细胞,考察其对脾淋巴细胞的活力的影响及机制,为白

^Δ 基金项目:黑龙江省教育厅基本科研业务费项目(No.2016-KYYWF-0862)

* 讲师,博士。研究方向:中药药理与毒理。E-mail:congshuancl@163.com

鲜皮对免疫系统可能存在的损伤作用作出初步探索。

1 材料

1.1 仪器

3001 型酶标仪、3111 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司);DXFLEX 型流式细胞仪(美国 Beckman 公司);C300 型凝胶成像仪(美国 Azure Biosystems 公司);H-2050R 型离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);DYY-6D 型电泳仪(北京六一生物科技有限公司);TH4-200 型荧光倒置显微镜(日本奥林巴斯株式会社)。

1.2 药品与试剂

白鲜碱标准品(北京坛墨质检科技有限公司,批号:484-29-7,纯度:≥98%);小鼠淋巴细胞提取液(深圳达科为生物技术有限公司,批号:33R021607);RPMI-1640 培养基(美国 Hyclone 公司);胎牛血清(杭州四季青生物有限公司);Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒、细胞凋亡与坏死检测试剂盒、乳酸脱氢酶(LDH)细胞毒性检测试剂盒(上海碧云天生物科技有限公司,批号:C1062M、C1056、C0016);CD3-FITC 鼠单克隆荧光抗体、CD19-PE 鼠单克隆荧光抗体(美国 Biolegend 公司,批号:100204、115508);低熔点琼脂糖凝胶、MTT 试剂(北京索莱宝科技有限公司);高熔点琼脂糖凝胶(法国 Biowest 公司);胱天蛋白酶 3(Caspase 3)兔多克隆抗体、β-肌动蛋白(β-actin)兔多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔免疫球蛋白 G(IgG)二抗(美国 Proteintech 公司,批号:19677-1-AP、20536-1-AP、SA00001-2);ECL 发光试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司,批号:CW0049M)。

1.3 动物

健康 SPF 级 ICR 小鼠,6~8 周龄,体质量(18~20)g,购自辽宁省长生生物有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(辽)2015-0001。动物实验部分符合齐齐哈尔医学院实验动物伦理要求。

2 方法

2.1 小鼠原代脾淋巴细胞的分离及鉴定

断颈处死小鼠,医用酒精浸泡 5 min,无菌分离小鼠脾组织,置于 200 目尼龙网上,加入 5 mL 小鼠淋巴细胞提取液,缓慢研磨,将细胞悬液置于 15 mL 离心管中,加入 1 mL 的 RPMI-1640 培养基,在室温下以 800×g 离心 30 min,取中间淋巴细胞层,置于 15 mL 离心管中,加入 10 mL 的 RPMI-1640 培养基,颠倒洗涤,在室温下再以 250×g 离心 10 min,倾倒上清液,磷酸盐缓冲液(PBS)重悬细胞,此时台盼蓝拒染率≥90%,即活细胞比例≥90%。调整脾淋巴细胞密度为每 1 mL 1×10⁶ 个,取 200 μL 细胞悬液,按 CD3-FITC 荧光抗体、CD19-PE 荧光抗体说明书加入抗体,4 ℃避光静置 30 min 后,加入 600 μL 的 PBS(含 1% 胎牛血清),吹匀,室温下以 250×g 离心 10 min,弃上清,加入 500 μL 的 PBS,吹匀,进行流式细胞术检测,试验重复 3 次。发现 B 淋巴细胞比率为(75.50±1.05)%、T 淋巴细胞比率为(14.53±0.65)% (CD3-FITC 标记的为 T 淋巴细胞,CD19-PE 标记的为 B

淋巴细胞),总淋巴细胞纯度≥90%。脾淋巴细胞鉴定的流式细胞图见图 1。

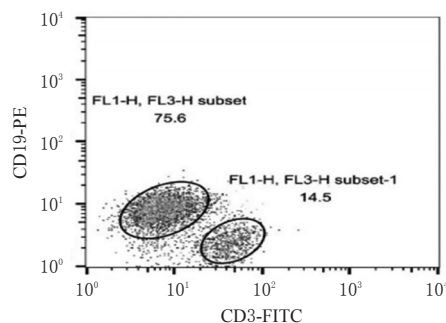


图 1 脾淋巴细胞鉴定的流式细胞图

Fig 1 Flow cytogram for identification of spleen lymphocyte

2.2 小鼠原代脾淋巴细胞的分组及给药

调整脾淋巴细胞密度为每 1 mL 2×10⁶ 个,铺于 96 孔板中,每孔 100 μL,设置 4 个试验组:其中,空白对照组加入 RPMI-1640 培养基 100 μL(终体积为 200 μL,细胞终密度为每 1 mL 1×10⁶ 个);3 个白鲜碱组均加入含药 RPMI-1640 培养基 100 μL(终体积为 200 μL,细胞终密度为每 1 mL 1×10⁶ 个,DMSO 终浓度为 0.05%,白鲜碱终浓度分别为 50、100、150 μmol/L)。每组设 6 个复孔,振荡混匀。

2.3 MTT 法测定细胞活力抑制率

将“2.2”项下各组细胞置于 37 ℃、含 5% CO₂ 的培养箱中,培养 20 h 后每孔加入 MTT 溶液 20 μL,继续培养 4 h,DMSO 溶解,然后于 570 nm 波长下用酶标仪测定各孔吸光度(A)值,计算细胞活力抑制率[细胞活力抑制率(%)=(A_{空白对照组}-A_{给药组})/A_{空白对照组}×100%]。试验重复 6 次。

2.4 LDH 法检测脾淋巴细胞 LDH 释放率

将“2.2”项下各组细胞置于 37 ℃、含 5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h 后,在室温下以 100×g 离心 5 min,取上清液,按 LDH 细胞毒性检测试剂盒说明操作并计算细胞 LDH 释放率,试验重复 6 次。

2.5 流式细胞术检测细胞早期凋亡

将“2.2”项下各组细胞置于 37 ℃、含 5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h 后,将细胞置于 1.5 mL 离心管中,在室温下以 100×g 离心 5 min,弃上清,加入 1 mL PBS 重悬,再在室温下以 100×g 离心 5 min,PBS 反复洗涤 3 次,按细胞凋亡检测试剂盒说明书操作,经流式细胞仪检测,设定(Annexin V-FITC)⁺/PI⁻象限为早期凋亡区,计算各组细胞早期凋亡细胞的比例,记为早期凋亡率。试验重复 3 次。

2.6 Hoechst 33342 和 PI 双染法检测细胞坏死

将“2.2”项下各组细胞置于 37 ℃、含 5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h 后,将细胞置于 1.5 mL 离心管中,在室温下以 100×g 离心 5 min,弃上清,加入 800 μL 细胞染色缓冲液,按照细胞凋亡与坏死检测试剂盒说明书操作,经荧光显微镜观察,设定弱蓝色荧光细胞为正常细胞,强

红色荧光细胞为坏死细胞,计算各组细胞坏死率。试验重复3次。

2.7 Western blot 法检测细胞中 Caspase 3、Cleaved-Caspase 3 蛋白表达

将细胞置于 37 ℃、含 5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h 后,用 PBS 冲洗细胞 2~3 次,转移至 1.5 mL 离心管中,加入适当体积 RIPA(含蛋白酶抑制剂、磷酸化抑制剂),冰上孵育 30 min,移液器反复吹打,确保细胞完全裂解,然后以 12 000 ×g 离心 5 min,收集上清,即为总蛋白溶液。二喹啉甲酸(BCA)法进行蛋白定量后,经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)电泳分离,转入醋酸纤维素印迹膜上,5%脱脂奶粉封闭 2.5 h,Caspase 3、β-actin 一抗(1:500)孵育过夜,TBST 洗膜 3 次,辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 二抗(1:3 000)孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次,置于凝胶成像仪中,ECL 发光,观察反应条带,Image J 软件分析条带灰度值,以目的蛋白条带与内参(β-actin)条带灰度值的比值表示目的蛋白的相对表达量。试验重复 3 次。

2.8 彗星试验检测细胞 DNA 损伤

将细胞置于 37 ℃、含 5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h 后,各组取 200 μL 细胞悬液,置于 1.5 mL 离心管中,与低熔点琼脂糖凝胶以体积比为 1:1 的比例混匀,铺于用高熔点琼脂糖凝胶制备后的载玻片上,4 ℃ 固化 18 min,随后将载玻片置于新鲜配制的 4 ℃ 预冷的细胞裂解液当中 1.5 h,蒸馏水漂洗,置于电泳槽中,18 V、300 mA 下电泳 30 min,随后蒸馏水漂洗,用 0.4 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液中和 3 次,每次 5 min,加入无水乙醇固定 1 h,室温下过夜。阅片时,在载玻片表面滴加 2 mL 溴化乙锭,荧光显微镜观察,CASP-1.2.3 软件进行结果分析,测定 DNA 拖尾区域比例[拖尾面积/(拖尾面积+头部面积)],比例越大代表 DNA 损伤越严重。每组选 30 个细胞进行测定,试验重复 3 次。

2.9 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件对结果进行统计分析。数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,方差齐时两组间比较采用 LSD-*t* 检验,方差不齐则采用 Kruskal-Wallis 检验。*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 白鲜碱对脾淋巴细胞活力的影响

在细胞孵育 24 h 后,与空白对照组比较,白鲜碱 100、150 μmol/L 组脾淋巴细胞活力显著受到抑制(*P* < 0.01),并在设定浓度范围内呈现浓度依赖性趋势,其中 150 μmol/L 白鲜碱组脾淋巴细胞的活力抑制率达到 40% 以上,结果详见表 1。

3.2 白鲜碱对脾淋巴细胞 LDH 释放率的影响

在细胞孵育 24 h 后,与空白对照组比较,白鲜碱 50、100、150 μmol/L 组脾淋巴细胞中 LDH 的释放量均不同程度增加,且呈现浓度依赖性趋势。其中,白鲜碱 150

μmol/L 组差异有统计学意义(*P* < 0.05),其 LDH 的释放率接近 80%,结果见表 2。

表 1 各组细胞活力抑制率结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 1 Viability inhibition rate of cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	浓度, μmol/L	A	活力抑制率, %
空白对照组		0.42 ± 0.01	
白鲜碱组	50	0.41 ± 0.02	3.28
	100	0.31 ± 0.01**	26.84
	150	0.24 ± 0.01**	43.46

注:与空白对照组比较,***P* < 0.01

Note: vs. blank control group, ***P* < 0.01

表 2 各组细胞 LDH 释放率测定结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 2 Results of LDH release rate of cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	浓度, μmol/L	吸光度	LDH 释放率, %
空白对照组		0.09 ± 0.03	
白鲜碱组	50	0.18 ± 0.11	14.83
	100	0.37 ± 0.16	43.05
	150	0.60 ± 0.14*	79.37

注:与空白对照组比较,**P* < 0.05

Note: vs. blank control group, **P* < 0.05

3.3 白鲜碱对脾淋巴细胞早期凋亡的影响

在细胞孵育 24 h 后,与空白对照组比较,白鲜碱 50、100、150 μmol/L 组脾淋巴细胞的早期凋亡比例虽有升高,但差异均无统计学意义(*P* > 0.05),结果见图 2、表 3。

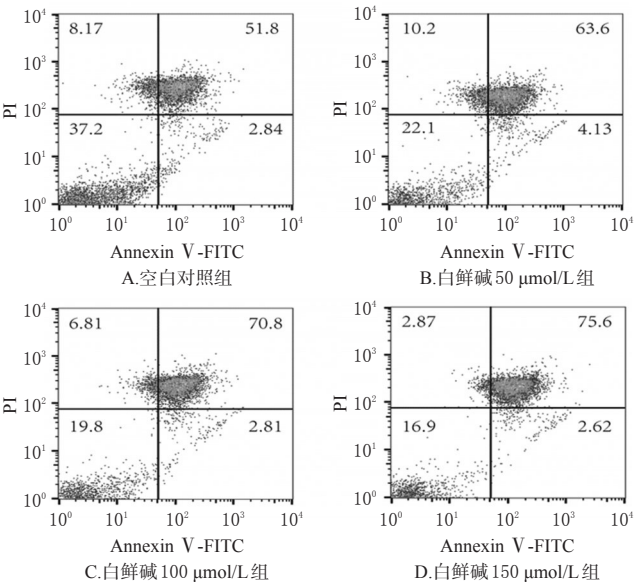


图 2 各组细胞凋亡测定的流式细胞图

Fig 2 Flow cytograms for apoptosis of cells in each group

3.4 白鲜碱对脾淋巴细胞坏死的影响

在细胞孵育 24 h 后,与空白对照组比较,白鲜碱 50、100、150 μmol/L 组脾淋巴细胞坏死率均不同程度升高,并呈剂量依赖性趋势;其中,白鲜碱 150 μmol/L 组差异有统计学意义(*P* < 0.05),结果见图 3、表 4。

表3 各组细胞早期凋亡率测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)
Tab 3 Results of early apoptosis rate of cells in each group($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度, $\mu\text{mol/L}$	细胞早期凋亡率, %
空白对照组		2.63 ± 0.46
白鲜碱组	50	3.44 ± 0.75
	100	2.61 ± 0.20
	150	2.53 ± 0.11

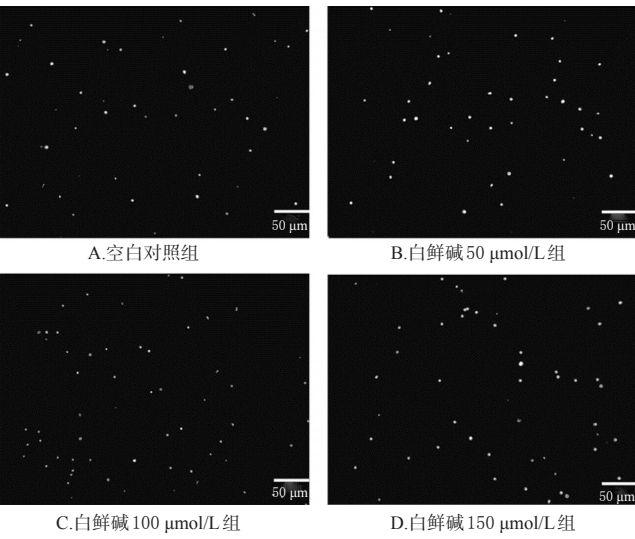


图3 各组细胞坏死检测的Hoechst 33342和PI双染图
Fig 3 Hoechst 33342 and PI double staining pictures for cell necrosis detection in each group

表4 各组细胞坏死率测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)
Tab 4 Results of necrosis rate of cells in each group($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度, $\mu\text{mol/L}$	细胞坏死率, %
空白对照组		42.47 ± 10.55
白鲜碱组	50	66.12 ± 6.38
	100	75.14 ± 3.59
	150	$78.64 \pm 7.23^*$

注:与空白对照组比较, $*P<0.05$
Note: vs. blank control group, $*P<0.05$

3.5 白鲜碱对脾淋巴细胞Caspase 3、Cleaved-Caspase 3蛋白表达的影响

在细胞孵育24 h后,与空白对照组比较,白鲜碱50、100、150 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞中Caspase 3蛋白表达水平差异均无统计学意义($P>0.05$);但白鲜碱50、100 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞中Cleaved-Caspase 3蛋白表达水平显著升高($P<0.05$),结果见图4、表5。

3.6 白鲜碱对脾淋巴细胞DNA损伤影响

在细胞孵育24 h后,与空白对照组比较,白鲜碱50、100、150 $\mu\text{mol/L}$ 组脾淋巴细胞DNA拖尾区域比例均不同程度升高,呈剂量依赖性趋势;其中,白鲜碱100、150 $\mu\text{mol/L}$ 组差异有统计学意义($P<0.01$),结果见图5、表6。

4 讨论

本研究采用50、100、150 $\mu\text{mol/L}$ 3个浓度的白鲜碱

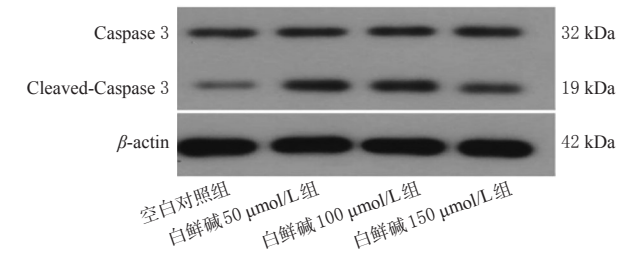


图4 各组细胞中Caspase 3、Cleaved-Caspase 3蛋白表达的电泳图

Fig 4 Electrophoregrams of protein expressions of Caspase 3 and Cleaved-Caspase 3 of cells in each group

表5 各组细胞中Caspase 3、Cleaved-Caspase 3蛋白表达测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 5 Results of protein expressions of Caspase 3 and Cleaved-Caspase 3 of cells in each group($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度, $\mu\text{mol/L}$	蛋白表达相对量	
		Caspase 3/ β -actin	Cleaved-Caspase 3/ β -actin
空白对照组		0.66 ± 0.02	0.56 ± 0.04
白鲜碱组	50	0.67 ± 0.01	$0.75 \pm 0.05^*$
	100	0.70 ± 0.03	$0.77 \pm 0.06^*$
	150	0.72 ± 0.01	0.66 ± 0.01

注:与空白对照组比较, $*P<0.05$,
Note: vs. blank control group, $*P<0.05$

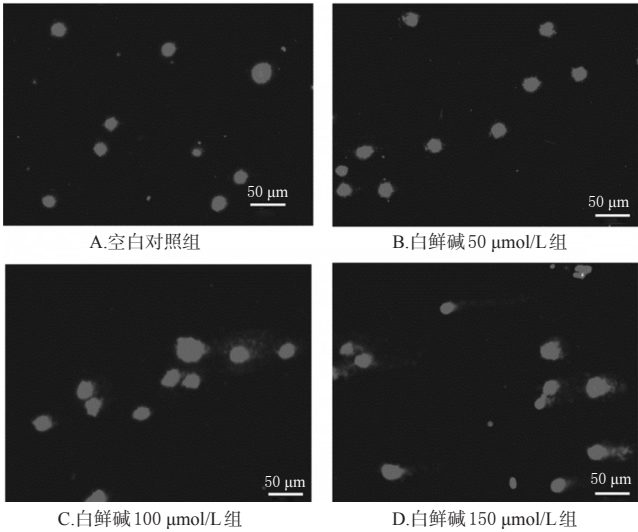


图5 各组细胞DNA损伤检测的荧光图
Fig 5 Fluorescence charts of DNA damage detection of cells in different group

作用于体外培养的原代小鼠脾淋巴细胞,以筛选出对原代小鼠脾淋巴细胞具有损伤作用的药物浓度,并初步阐述损伤机制,此浓度梯度亦在白鲜碱产生肝细胞损伤的浓度范围内^[8]。本研究发现,150 $\mu\text{mol/L}$ 白鲜碱可以显著抑制细胞活力、增加细胞LDH释放率,这提示白鲜碱对脾淋巴细胞确有一定的损伤。细胞凋亡可以导致细胞活力下降,脾淋巴细胞自身在体外存在着自发性凋

表6 各组细胞DNA拖尾区域比例测定结果($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab 6 Results of DNA tail area ratio of cell in each group($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	浓度, $\mu\text{mol/L}$	DNA拖尾区域比例, %
空白对照组		0.40 ± 0.05
白鲜碱组	50	0.83 ± 0.15
	100	$2.94 \pm 0.35^{**}$
	150	$7.23 \pm 0.63^{**}$

注:与空白对照组比较, $^{**}P<0.01$
Note: vs. blank control group, $^{**}P<0.01$

亡^[10]。流式细胞术检测中发现,不同浓度白鲜碱组中代表早期凋亡-象限[(Annexin V-FITC)/PI⁻]中细胞比例较空白对照组并无显著性差别,而(Annexin V-FITC)/PI⁺象限中细胞比例较空白对照组呈显著的剂量依赖性增加(数据未列出,代表晚期凋亡和/或坏死的丧失细胞膜完整性的细胞),与细胞活性检测结果相一致。细胞凋亡途径包括线粒体依赖性途径和非线粒体依赖性途径, Caspase 3 为此两类凋亡途径的关键蛋白^[11-12]。Cleaved-Caspase 3 为 Caspase 3 活化过程中经剪切产生的活性片段,实行凋亡“执行者”功能,该剪贴体蛋白表达的变化反映着凋亡水平的变化。本研究显示,低浓度(50、100 $\mu\text{mol/L}$)白鲜碱可以显著增加细胞中 Cleaved-Caspase 3 蛋白的表达,说明凋亡参与了此进程;但随着白鲜碱浓度的增加, Cleaved-Caspase 3 蛋白的表达量逐渐减少,凋亡也减少,但细胞活力却依然下降,这提示坏死机制可能参与到此过程中。经 Hoechst 33342 和 PI 双染法检验,随着白鲜碱浓度的增加,坏死的细胞比例逐渐增多,说明在设定浓度范围内,凋亡并未参与到细胞活力下降的整个过程中,而坏死是此进程的主要诱因。

某些细胞中, Caspase 依赖性的细胞凋亡可以转换为非 Caspase 依赖性的细胞死亡。比如,糖皮质激素作用的胸腺细胞,会产生 Caspase 依赖性凋亡,在使用 Caspase 广谱抑制剂之后,细胞仍会以一种类似于凋亡动力学的方式死亡^[13-14]。胸腺细胞主要由 T 淋巴细胞组成,同时, T 淋巴细胞也是脾淋巴细胞的重要组成部分。在本研究中,低浓度(50、100 $\mu\text{mol/L}$)的白鲜碱可促进脾淋巴细胞 Cleaved-Caspase 3 蛋白表达,高浓度(150 $\mu\text{mol/L}$)的白鲜碱可抑制 Cleaved-Caspase 3 蛋白表达,然而凋亡减少的同时坏死却在增加,表现为细胞活力的持续下降,这提示高浓度白鲜碱可能作用于脾淋巴细胞中的 T 淋巴细胞,并将细胞凋亡转换为坏死进程。DNA 的完整性调控着细胞的各种蛋白表达,维持着细胞稳定, DNA 损伤会改变遗传物质的结构,阻止细胞复制机制的正常运作^[15]。本研究发现,白鲜碱可以引起脾淋巴细胞的凋亡和坏死。而细胞凋亡与坏死均可引起 DNA 规则和不规则地断裂,当损伤超过 DNA 自身修复功能时,则会引起细胞活力下降。所以,100、150 $\mu\text{mol/L}$ 白鲜碱作用后细胞 DNA 拖尾区域比例显著升高。

综上所述,白鲜碱在体外可以抑制脾淋巴细胞活力,其机制可能与白鲜碱诱导细胞坏死、造成细胞 DNA 损伤有关,但其更多的作用机制和影响有待进一步研究证实。

参考文献

[1] 张凯,张宇,王丽红,等.白鲜皮多糖硫酸酯化修饰及抗银屑病作用研究[J].中国药房,2019,30(8):1049-1056.

[2] 殷小倩,于俊生.中医药对慢性肾衰竭皮肤瘙痒症的认识[J].中国中西医结合肾病杂志,2018,19(4):360-362.

[3] 王莎莎,宋业强.复方白鲜皮汤治疗玫瑰糠疹45例临床观察[J].湖南中医杂志,2017,33(12):59-60,64.

[4] 周晓鹰,陈洁,金柳,等.白鲜皮的药理作用及抗炎活性成分研究进展[J].常州大学学报:自然科学版,2018,30(1):82-86.

[5] 赵夏,马晓晨.白鲜皮提取物抗过敏反应研究[J].中医学报,2019,34(3):568-571.

[6] 兰玉艳,李岩.白鲜皮提取物对辐射损伤小鼠造血功能的保护作用[J].北华大学学报:自然科学版,2018,19(2):201-204.

[7] 葛斐林,牛明,韩紫欣,等.白鲜皮制剂相关肝损伤的药物流行病学特征分析[J].中国中药杂志,2019,44(5):1048-1052.

[8] 郭晓培,李艾芳,张宝旭,等.白鲜碱对 HepG2 细胞的毒性作用及其机制[J].中国药理学与毒理学杂志,2013,27(1):95-100.

[9] LI ZQ, JIANG LL, ZHAO DS. The modulatory role of CYP3A4 in dictamnine-induced hepatotoxicity[J]. *Front-Pharmacol*, 2018, 9(3):1033-1042.

[10] MCKALLIP RJ, LOMBARD C, MARTIN BR et al. Delta 9-tetrahydrocannabinol-induced apoptosis in the thymus and spleen as a mechanism of immunosuppression in vitro and in vivo[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002, 302(2):51-65.

[11] 陈婕,李杨蕾,鲍依琪,等.蛇床子素对 L02 细胞的毒性作用及其机制研究[J].中国现代应用药学,2018,35(6):859-863.

[12] 姜丹,宫丽鸿.稳斑汤对 ApoE 基因敲除小鼠动脉粥样硬化不稳定斑块凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 表达的影响[J].中华中医药学刊,2019,37(5):1215-1218,1311.

[13] PENNIGER JM, KROEMER G. Molecular and mechanisms of T lymphocyte apoptosis[J]. *Adv Immunol*, 1998, 68(7):51-144.

[14] HILDEMAN DA, MITCHELL T, TEAGUE TK, et al. Reactive oxygen species regulate activation-induced T cell apoptosis[J]. *Immunity*, 1999, 10(11):735-744.

[15] LI Z, PEARLMAN AH, HSIEH P. DNA mismatch repair and the DNA damage response[J]. *DNA Repair: Amst*, 2016, 38(7):94-101.

(收稿日期:2019-05-29 修回日期:2019-09-01)
(编辑:林 静)