

黄芪和何首乌抗环磷酰胺诱导胸腺细胞凋亡*

魏锡云 张锦¹ 罗映辉 陈肃标 孙劲旅

(汕头大学医学院人体解剖学和组织胚胎学教研室, 汕头 515031)

摘要 研究了黄芪和何首乌单用和联用对环磷酰胺诱导的胸腺细胞凋亡改变的影响。环磷酰胺对照组(C组)的胸腺细胞呈现明显的凋亡改变,与AM、PM和AMPM组(环磷酰胺处理的小鼠加用相应的黄芪、何首乌或黄芪加何首乌)比较,结果表明流式细胞仪检测所出现的反映凋亡细胞数量的亚G1峰-A_p峰,各组的高低不一,依次为AMPM组<AM组<PM组<C组;而正常对照组(O组)未出现A_p峰。超微结构显示的凋亡细胞密度和凋亡形态改变的程度,各组也依次为AMPM组<AM组<PM组<C组。上述结果表明,黄芪和何首乌对环磷酰胺所致的胸腺细胞凋亡改变有拮抗作用,两药联用效果更佳。

关键词 黄芪;何首乌;环磷酰胺;胸腺细胞;凋亡

近年来,黄芪和何首乌的免疫促进作用已为基础和临床研究所肯定^[1],但有关它们对免疫抑制剂拮抗作用的基础研究却报道甚少^[2]。本文通过流式细胞仪分析和超微结构观察,从分析细胞学和形态学角度来探讨黄芪和何首乌单用和联用对环磷酰胺引起胸腺细胞凋亡改变的影响,从而为这两味中药拮抗免疫抑制剂、保护免疫细胞的进一步研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 药物

黄芪注射液(*Astragalus mongholicus*,江苏省六合县制药厂),含药量1 g/ml;何首乌口服液(*Polygonum multiflorum*,中国中医研究院提供粉剂,用双蒸水配制成口服液),含药量0.5 g/ml;环磷酰胺注射液(*Cyclophosphamide*,上海第十二制药厂),含药量0.1 g/ml。

1.2 动物及分组

Km小鼠(25~30 g)30只(汕头大学医学院动物中心提供),雌雄各半,随机分成O、C、AM、PM和AMPM共5组,每组6只。

1.3 给药方法

AM组为黄芪组,用黄芪6 g/kg·d⁻¹,ig;PM组为何首乌组,用何首乌6 g/kg·d,ig;AMPM组为黄芪加何首乌组,每日同时给黄芪和何首乌各6 g/kg,ig,连续14 d。以上3组各加用环磷酰胺

8 mg/kg,ip,隔日1次,共7次。C组为环磷酰胺对照组,环磷酰胺的用量、用法同上,以生理盐水灌胃。O组为正常对照组,以生理盐水代替药物作腹腔注射和灌胃。

1.4 胸腺细胞悬液标本的制备

O、C、AM、PM和AMPM组小鼠均于末次给药24 h后,颈椎脱臼处死,分别取出胸腺,剪碎,轻轻压过100目滤网,制成各组的胸腺细胞悬液,Hanks液洗3次。离心,弃上清液,收集沉淀细胞,每组均分成2份。

1.5 流式细胞仪检测凋亡细胞

每组取沉淀细胞1份,分别4℃70%乙醇固定24 h,50 μg/ml RNA酶37℃消化1 h,碘化丙啶(PI)50 μg/ml 4℃染色1 h,应用FACS Sort流式细胞仪(美国Becton Dickinson公司产品)以每次实验至少检测10 000个细胞的数量检测单个细胞的PI荧光强度,每份标本重复测3次,共计30 000个细胞以上。激光光源用15W氙离子激光器,波长488 nm。PI染色的细胞样品经激光光源激发后产生的荧光信号由光电倍增管将光信号脉冲转换为相应的电信号脉冲,再通过模数转换器量化为数字信号,送数字计算机进行数据处理和分析显示,计算出DNA含量,得出细胞周期(G1、S、G2+M)和凋亡细胞的百分率以及DNA的组方图。细胞周期G1期为DNA合成前期,S期为DNA合成期,G2期为DNA合成后期,M期为有

丝分裂期。Ap 峰即亚 G₁ 峰, 表示低于 G₁ 期 DNA 含量的凋亡细胞。

1.6 电镜样本制备及观察

每组取沉淀细胞 1 份, 分别按常规 4% 戊二醛预固定和 1% 锇酸后固定, 乙醇逐级脱水, E-PON 618 浸透包埋, 超薄切片, 醋酸铀和枸橼酸铅染色, 日立 H 600 型透射电镜观察、照相。

2 结 果

2.1 台盼蓝排斥试验

各组细胞的阴性率均为 95%~98%。

2.2 流式细胞仪检测胸腺细胞凋亡

C、AM、PM 和 AMPM 组的细胞周期分析, 均出现明显的 Ap 峰。Ap 峰的高低依次为 AMPM 组< AM 组< PM 组< C 组, 其中 AMPM 组仅出现一个小 Ap 峰。O 组则未出现 Ap 峰(图 1)。

凋亡细胞的百分率依次为 AMPM 组 5%< AM 组 20%< PM 组 24%< C 组 43%。

2.3 超微结构观察

在 O 组中, 胸腺细胞核呈圆形或卵圆形, 异染色质多分布于核的周缘, 少量散布于核中央, 多见核仁(图 2-1), 也常见分裂相。C、AM、PM 和 AMPM 组均可见处于不同阶段的凋亡细胞(图 2-2), 凋亡细胞的分布密度依次 AMPM 组< AM 组< PM 组< C 组。AMPM 组中, 凋亡细胞核明显移位, 染色质浓缩, 多凝聚成新月形、弧形边集于核膜下(图 2-3)。AM 组和 PM 组多见凝聚成团状的核, 出现核固缩并常裂解为二, 有的有双层膜完全或不完全包裹, 有的则无膜包现象(图 2-4、5)。C 组凋亡细胞的变化多样, 并多见固缩的核碎裂成大小不一的团块, 有的小块被内质网包裹形成自噬体(图 2-6)。

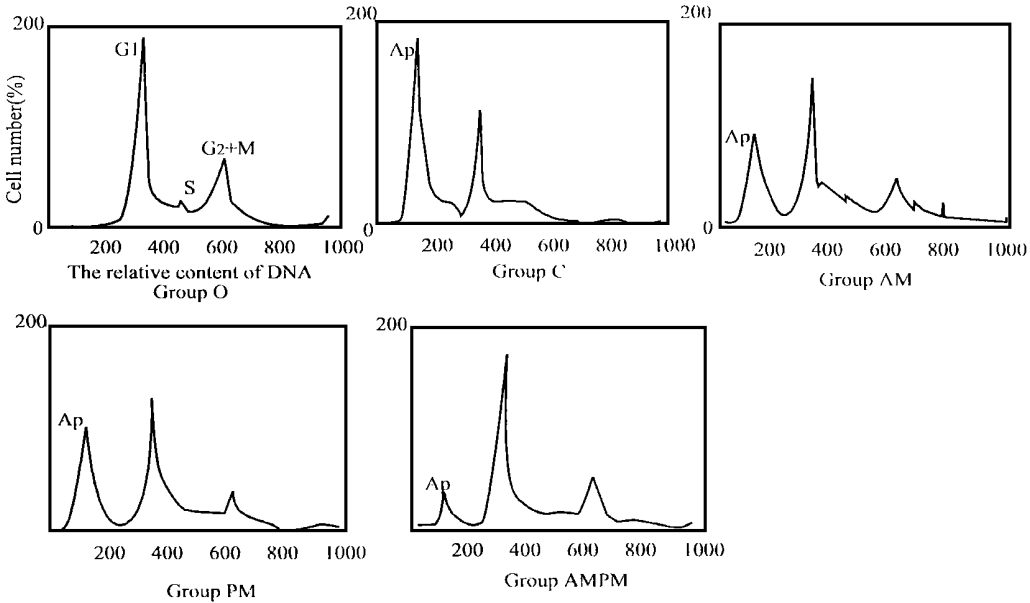


Fig 1. DNA histogram from mice thymocytes using flow cytometry. A sub-G₁ peak, labelled 'Ap' — the hallmark of the apoptotic cells were appeared, the height of Ap peaks was sequentially in group AMPM < AM < PM < C. Ap peak wasn't appeared in group O.

3 讨 论

环磷酰胺是临床常用的氮芥类免疫抑制剂, 具有明显的细胞毒性, 近年的研究发现它可以引起细胞凋亡。如通过增加胚胎发育过程中的凋亡而干扰胚胎发育的正常进行^[3], 诱发成年雄性大鼠生殖细胞凋亡^[4]、小鼠胸腺细胞和脾细胞凋亡^[5]、人淋巴细胞凋亡^[6]等; 也可诱发乳腺癌和

卵巢癌等肿瘤细胞凋亡^[7]; 还可通过破坏抑制性 T 细胞或加速破坏胰岛 β 细胞而引发糖尿病^[5,8]。本研究通过流式细胞仪和电镜观察分析, 发现 C 组小鼠胸腺细胞呈现明显凋亡改变, 也表明环磷酰胺能诱导胸腺细胞凋亡。

本实验采用流式细胞仪对经 PI 染色的细胞进行细胞周期分析的方法, 是为了直接观察细胞 DNA 的含量。由于凋亡细胞内 DNA 断裂形成了

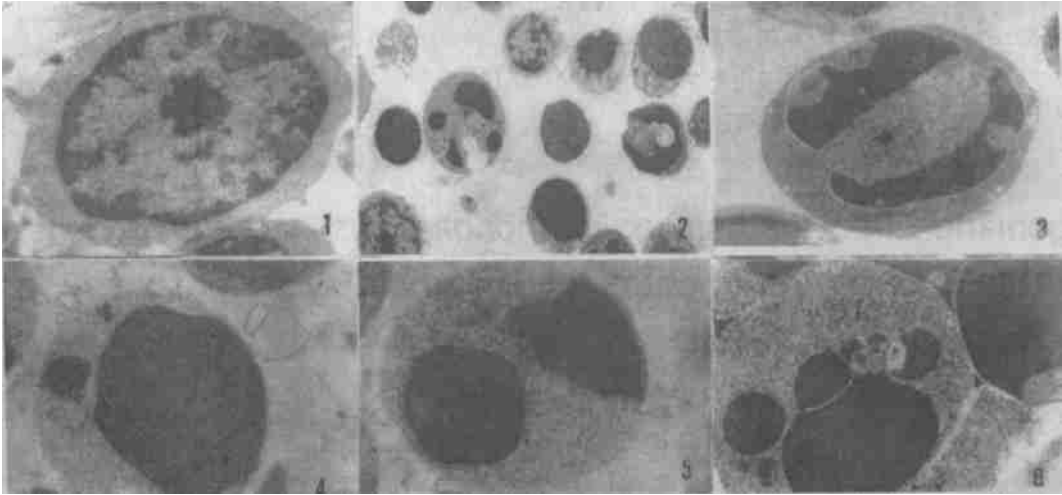


Fig 2. Ultrastructural figures (electron micrograph, original magnification, 2-1, 3, 4, 5, 6, $\times 15000$; 2-2, $\times 4000$). 2-1. A normal thymocyte showed in group O; 2-2. Apoptotic thymocytes showed differ in degree of morphologic change in group C; 2-3. Early apoptotic thymocyte showed compaction and margination of nuclear chromatin in group AMPM; 2-4, 5. The nuclei of apoptotic thymocytes divided two masses of condensed chromatin in groups AM and PM; 2-6. The nuclei of apoptotic thymocytes broke up masses of condensed chromatin, some masses were surrounded by a double-layered envelope in group C.

小片段, 小分子 DNA 可通过在染色过程中造成的细胞膜“漏洞”而漏出细胞外, 致使细胞 DNA 含量降低, 因此, 检测时在二倍体细胞 G1 峰之前出现一峰, 为亚 G1 峰-Ap 峰, 而且 Ap 峰的高低反映了发生凋亡的细胞数^[9]。又因台盼蓝排斥试验的阴性率在 95% 以上, 排除了实验前存在死细胞而在 G1 峰之前形成细胞碎片小峰的可能性; 同时正常对照组 O 组也没有出现 Ap 峰, 这就完全确定了 Ap 峰为凋亡细胞所形成, 表明 AM、PM 和 AMPM 组的凋亡细胞显著少于 C 组, 其中 AMPM 组的凋亡细胞最少。这与黄芪和何首乌均能改善胸腺微环境、促进胸腺细胞的分化成熟的作用密切相关, 也与这两味药能协同抵抗环磷酰胺的免疫抑制、保护胸腺细胞的报道相符^[2], 从而有力地说明了单用黄芪、何首乌或者黄芪与何首乌联用, 都有明显抵抗环磷酰胺诱导胸腺细胞凋亡的作用, 两药联用效果更佳。应用电镜方法, 是为了在超微结构水平上直接观察凋亡细胞的形态学改变^[10]。C 组凋亡细胞不仅在密度上大于 AM、PM 和 AMPM 组, 而且形态上处于凋亡晚期的固缩碎裂染色质小块也明显多于 AM、PM 和 AMPM 组, 并出现自噬体, 表明 C 组细胞的凋亡程度最为严重。AM、PM 和 AMPM 组三组相比, AMPM 组的凋亡细胞密度最小, 况且多处于凋亡早期改变; AM 和 PM 组均出现染色质

浓缩成团, 并出现固缩核裂解为二的现象, 提示凋亡程度较 AMPM 组为重。进一步证实了单用黄芪和何首乌有明显抵抗环磷酰胺诱导胸腺细胞凋亡的作用; 而黄芪和何首乌两药联用, 抗凋亡的作用更为明显。

参 考 文 献

- 1 魏锡云, 张锦, 李运曼等. 黄芪和何首乌对老龄小鼠胸腺影响的超微结构研究. 中国药科大学学报, 1993, 24(4): 238
- 2 魏锡云, 张锦, 陈海滨等. 扶正中药对小鼠胸腺保护作用的形态计量研究. 中国组织化学与细胞化学杂志, 1996, 5(4): 467
- 3 Moulem SA, Hales BF. Induction of apoptosis and cathepsin D in limbs exposed *in vitro* to an activated analog of cyclophosphamide. Teratology, 1995, 52(1): 3
- 4 Cai L, Hales BF, Robaire B. Induction of apoptosis in the germ cells of adult male rats after exposure to cyclophosphamide. Biol Reprod, 1997, 56(6): 1490
- 5 Casteels K, Waer M, Bouillon R, et al. 1, 25-Dihydroxyvitamin D₃ restores sensitivity to cyclophosphamide-induced apoptosis in non-obese diabetic (NOD) mice and protects against diabetes. Clin Exp Immunol, 1998, 112(2): 181
- 6 Pette M, Gold R, Pette DF, et al. Mafosfamide induces DNA fragmentation and apoptosis in human T-lymphocytes. A possible mechanism of its immunosuppressive action. Immunopharmacol, 1995, 30(1): 59
- 7 Meyn RE, Stephens LC, Hunter NR, et al. Induction of apoptosis in murine tumors by cyclophosphamide. Cancer Chemother

Pharmacol, 1994, **33**(5): 410

- 8 Augstein P, Elefanty AG, Allison J, *et al*. Apoptosis and beta-cell destruction in pancreatic islets of NOD mice with spontaneous and cyclophosphamide-accelerated diabetes. *Diabetologia*, 1998, **41**(11): 1381
- 9 Omerod MG, Sun XM, Brown D, *et al*. Quantification of apoptosis and necrosis by flow cytometry. *Acta Oncologica*, 1993, **32**(4): 417
- 10 Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, 1994, **73**(8): 2013

Antagonistic Effect of *Astragalus mongholicus* and *Polygonum multiflorum* on Thymocytes Apoptosis Induced by Cyclophosphamide

WEI Xi-Yun, ZHANG Jin-Kun, LUO Ying-Hui, CHEN Su-Biao, SUN Jin-Lu

Department of Anatomy, Histology and Embryology, Medical School of Shantou University, Shantou 515031

Abstract The effect of *Astragalus mongholicus*, *Polygonum multiflorum* and the combination of *Astragalus mongholicus* and *Polygonum multiflorum* on thymocytes apoptosis induced by cyclophosphamide (Cy) was studied. The results were as follows: in the group C (the mice were treated with Cy, Cy-mice, the control), their thymocytes revealed obvious apoptosis change, as compared with group C, in group AM, PM and AMPM (the Cy-mice were treated for 14 days with *Astragalus mongholicus*, *Polygonum multiflorum* and the combination of *Astragalus mongholicus* and *Polygonum multiflorum* respectively), using flow cytometry, the sup-G1 peaks, labelled 'Ap'—the hallmark of apoptotic cells appeared, the height of Ap peaks was sequentially in group AMPM < AM < PM < C, and Ap peak did not appear in group O. The ultrastructure showed that apoptotic thymocytes density and degree of morphologic change were sequentially in group AMPM < AM < PM < C. The results suggested that *Astragalus mongholicus* and *Polygonum multiflorum* could play an antagonistic role on thymocytes apoptosis induced by cyclophosphamide, and the combination of *Astragalus mongholicus* and *Polygonum multiflorum* could give rise to the highest effect.

Key words *Astragalus mongholicus*; *Polygonum multiflorum*; Cyclophosphamide; Thymocyte; Apoptosis