

靛玉红-3'-单肟对猕猴成纤维细胞增殖和凋亡及周期同步化的影响

杨纪峰¹, 采克俊², 金立方³, 高基民¹

(1 温州医学院 生命科学学院, 浙江 温州 325035; 2 湖州师范学院 生命科学学院, 浙江 湖州 313000;

3 绍兴文理学院 生命科学学院, 浙江 绍兴 312000)

【摘要】 【目的】研究靛玉红-3'-单肟(indirubin-3'-monoxime)对猕猴成纤维细胞增殖、凋亡和周期同步化的影响。【方法】用 PI 和 FITC 同时对细胞进行染色, 用流式细胞仪检测荧光强度, 对细胞内 DNA 和蛋白质的含量作相对定量, 分析细胞在 G₀, G₀+G₁, S, G₂+M 期的分布比例; 用 BrdU 标记法检测靛玉红-3'-单肟处理对细胞增殖的影响, 用原位末端标记法(TUNEL)检测细胞凋亡的发生情况。【结果】(1)与处于对数增殖期(对照)的细胞相比, 10 μ mol/L 靛玉红-3'-单肟处理 30 h 后, G₀ 与 G₀+G₁ 期细胞比例分别由 7.27% 和 84.26% 增加为 14.21% 和 94.22%, 差异达显著水平。(2)与对数增殖期细胞(BrdU 阳性率为 80%)相比, 靛玉红-3'-单肟处理 30 h 可显著地抑制细胞的增殖, 在后续标记培养 24 h 期间只有 8.15% 的细胞呈 BrdU 阳性, 如果是在去除药物的正常条件下标记培养 24 h, 大多数细胞(58.28%)又可进入增殖状态。(3)与正常培养对照组细胞凋亡率(1.12%)相比, 靛玉红-3'-单肟处理组凋亡发生率为 1.82%, 虽有所增加但差异不显著。【结论】靛玉红-3'-单肟是一种可逆的细胞周期抑制剂, 对猕猴成纤维细胞增殖的抑制作用是可逆的, 对细胞凋亡发生率没有显著影响。

【关键词】 靛玉红-3'-单肟; 猕猴成纤维细胞; 细胞增殖; 细胞凋亡; 周期同步化

【中图分类号】 Q813.1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2011)05-0008-07

Effects of indirubin-3'-monoxime on cell proliferation, apoptosis and cycle synchronization in rhesus monkey fibroblasts

YANG Ji-feng¹, CAI Ke-jun², JIN Li-fang³, GAO Ji-min¹

(1 School of Life Sciences, Wenzhou Medical College, Wenzhou, Zhejiang 325035, China;

2 School of Life Sciences, Huzhou Normal College, Huzhou, Zhejiang 313000, China;

3 School of Life Sciences, Shaoxing University, Shaoxing, Zhejiang 312000, China)

Abstract: 【Objective】 This study was to investigate the effects of indirubin-3'-monoxime on proliferation, apoptosis and cycle synchronization of rhesus monkey fibroblasts. 【Method】 Cells were stained with PI and FITC, then were analyzed with flow cytometry to detect the distribution of cells in G₀, G₀+G₁, S, and G₂+M stages. Cell proliferation was analyzed with BrdU incorporation into new synthesized DNA synthesis. Apoptosis was detected with *in situ* TUNEL analysis. 【Result】 (1) Compared with cycling cells, proportions of G₀ and G₀+G₁ cells significantly increased from 7.27% and 84.26% to 14.21% and 94.22% in cultures treated with 10 μ mol/L indirubin-3'-monoxime. (2) During 24 h BrdU labeling culture, cell proliferation was significantly inhibited and only 8.15% of indirubin-3'-monoxime treated cells were BrdU-positive in contrast to 80% of cycling control cultures. However, after removal of indirubin-3'-monoxime, 58.28% cells reentered proliferation during 24 h labeling. (3) Apoptosis occurrence increased, but

* [收稿日期] 2011-01-11

[基金项目] 浙江省自然科学基金项目(Y2080996); 温州医学院科研启动基金项目(QTJ07018)

[作者简介] 杨纪峰(1977—), 男, 山东莒南人, 讲师, 博士, 主要从事核移植和胚胎发育研究。E-mail: yangjif12@hotmail.com

[通信作者] 高基民(1964—), 男, 江西新建人, 教授, 博士, 主要从事细胞与分子医学研究。E-mail: jimingao64@163.com

not significantly, in cultures treated with indirubin-3'-monoxime (1.82%) compared with normal control cultures (1.12%). **【Conclusion】** Indirubin-3'-monoxime is a kind of reversible cycle inhibitor for rhesus monkey fibroblasts, which can inhibit cell proliferation in a reversible way and does not induce apoptosis.

Key words: indirubin-3'-monoxime; rhesus monkey fibroblast; proliferation; apoptosis; cycle synchronization

20 世纪 60 年代,中国医学科学院的研究人员对治疗慢性粒细胞白血病比较有效的当归龙荟丸中的 11 种草药成分进行研究,发现其中的青黛是起主要作用的活性成分。青黛是一种深蓝色的颗粒状药材,是用爵床科植物马蓝、十字花科植物菘蓝或蓼科植物蓼蓝的叶或茎加工而成。青黛中靛蓝(Indigo)和靛玉红(Indirubin)含量相对较高,其中靛玉红被证实具有抗肿瘤活性^[1-4]。早期常将青黛及相关药材用于慢性粒细胞白血病的治疗,其具有疗效好、副作用小的特点。后来研究表明,青黛提取物靛玉红可以抑制多种肿瘤细胞的增殖,并可诱导细胞的凋亡^[5-6]。动物试验表明,靛玉红毒副作用小,长期处理对骨髓和造血干细胞没有影响,但是其水溶性和脂溶性均比较差,所以研究人员设计开发了很多靛玉红的衍生物。

靛玉红-3'-单肟(Indirubin-3'-monoxime)是靛玉红的衍生物之一,其属于吲哚类细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂,可以抑制 Cdk1、Cdk2 和 Cdk5,能竞争性地结合 ATP 位点,从而将细胞周期阻断在 G1/S、G2/M 期^[7]。另外,其还能抑制糖原合成酶激酶-3 β (GSK3 β),GSK3 β 是一种多功能的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶^[8],它也是芳香烃受体(AhR)的抑制剂^[9]。靛玉红-3'-单肟分子质量小、活性更高、毒副作用小,作为多种激酶的抑制剂,很有潜力被开发成治疗多种疾病的药物。最近,在阿尔茨海默病小鼠动物模型上的研究表明,靛玉红-3'-单肟处理可显著改善空间记忆缺陷,减少 β 淀粉样蛋白沉积和微管结合蛋白 Tau 过磷酸化^[10]。靛玉红-3'-单肟可以通过抑制 GSK3,维持线粒体功能和肝细胞能量平衡,防止肝脏缺血再灌注引起的损伤(Hepatic ischemia reperfusion injury, HIRI)^[11]。靛玉红-3'-单肟还可以抑制由血小板源生长因子(PDGF)和凝血酶引起的血管内皮细胞的增殖,以及体内新生内膜的形成,使其有潜力进一步被开发成新型的抗血管生成的药物^[12]。

猕猴作为灵长类试验动物,与其他常用的试验动物相比,其在生理、生化、遗传、发育和进化等方面更接近于人类,是适合人类疾病研究的理想动物模型。体细胞克隆猕猴技术如果能取得成功,可以为

医药研究提供良好的动物模型,为人类治疗性克隆的研究提供理论和技术支持。目前,虽有关于体细胞克隆猕猴胚胎发育的研究^[13],但到目前为止,还没有成功通过体细胞核移植技术获得克隆猕猴个体的报道。在核移植技术中,优化对体细胞的同步化处理可以获得更高比例、性质更均一的体细胞,以提高核移植成功率,阐明影响克隆胚成功发育的因素。在以往的动物核移植研究中,常用血清饥饿法和接触抑制法对体细胞进行 G0 或 G1 期同步化处理,但是这种强制性的作用并不能真正达到同步化细胞的效果^[14]。后来,有报道使用特异、可逆性的周期阻断药物来同步化核移植所需的体细胞,例如 butyrolactone I、roscovitine、olomucine 和 mimosine 等,其对细胞周期的同步化作用更为有效、准确,因为它们可以将细胞阻断在一个时间范围小而特定的周期阶段^[15-17]。

以往有关靛玉红对细胞生命活动影响的研究更多集中在肿瘤细胞上,为了更全面地了解这种具有抗癌疗效的化合物对正常体细胞的影响及其作用机制,寻求一种更有效、安全的体细胞周期同步化处理方法,本研究以猕猴成纤维细胞为材料,探讨了靛玉红-3'-单肟对细胞增殖和凋亡的影响及其同步化细胞周期的效果,以期获得可用于核移植研究的性质更均一的猕猴成纤维细胞提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验动物与试剂

本试验所用的猕猴来自中国科学院昆明动物所灵长类研究中心,动物饲养繁殖及试验操作处理符合国际试验动物评估和认证委员会(AAALAC)及昆明动物所动物伦理委员会的标准和规定。试验所用的化学试剂除特别标明外,均购自 Sigma 公司(St Louis, Mo)。细胞凋亡检测试剂盒(Cat. No. 1684817)和 5-溴脱氧尿嘧啶(BrdU)标记检测试剂盒(Cat. No. 1299964),购自罗氏公司(Roche)。

1.2 猕猴成纤维细胞系的建立与培养

对新生猕猴耳朵部位的皮肤用体积分数 75% 乙醇消毒,然后用无菌手术器械剪取长 6~8 mm,

宽 1~2 mm, 厚约 1 mm 的皮肤组织, 放在含有 DMEM 培养液的离心管里。在超净工作台上将取来的材料放到适量的无钙镁 PBS 溶液(添加 100 IU/mL 青霉素、链霉素)中洗 5 次, 再用适量的含体积分数 10% 胎牛血清(FCS, 购自 Invitrogen)和 100 IU/mL 青霉素、链霉素的 DMEM(Gibco 23700-024)培养液洗 1 次, 然后移到培养皿中, 用锋利的剪刀反复剪切成很小的碎块, 将组织碎块转移到含有少量培养基的培养瓶中均匀分散贴壁, 将培养瓶放入 37℃、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养, 待组织块牢固地贴附在瓶壁上以后, 再缓慢加入 5 mL 含体积分数 10% FCS 的 DMEM 培养基进行培养, 以后每隔 2 d 检查 1 次, 观察是否需要更换培养基, 等到组织块上迁出的细胞增殖铺满瓶壁时进行传代培养。传代培养 2 次后即可冻存, 冻存液为含体积分数 10% DMSO 的小牛血清, 细胞密度为 2×10^6 mL⁻¹, 将冻存管放入冻存盒, 于冰箱中降温到 -70℃ 后, 再转移到液氮罐中保存。

1.3 靛玉红-3'-单肼对细胞周期分布的影响

将猕猴成纤维细胞解冻后培养, 待其长满瓶壁后进行传代培养。当传代的细胞在瓶壁上的融合度达到 70%~80%(细胞正处于旺盛增殖状态)时, 将培养瓶分 3 组进行后续试验。第 1 组细胞直接进行固定、染色, 作为对数增殖期细胞对照组; 第 2 组细胞继续在正常培养基中培养 2 d, 最后细胞大多因接触抑制而停止增殖, 消化后进行固定和染色, 作为接触抑制对照组; 第 3 组细胞分别用不同浓度(5, 10, 15, 20 μmol/L)的靛玉红-3'-单肼处理 30 h, 再进行固定、染色。

按照 Crissman 等^[18]的方法, 用乙醇固定细胞, 用 PI 和 FITC 双染色法对细胞的 DNA 和蛋白质含量进行检测分析。先用胰酶将猕猴成纤维细胞消化, 悬在含有体积分数 10% FCS 的 DMEM 溶液中, 分装到 15 mL 的离心管中, 每管含有 5.00×10^5 个细胞, 在 1 000 r/min 下离心 10 min, 重悬在 1 mL 冷“saline GM”(6.1 mmol/L 葡萄糖, 137 mmol/L NaCl, 5.4 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L Na₂HPO₄ · 7H₂O, 0.9 mmol/L KH₂PO₄, 0.5 mmol/L EDTA)中, 边摇动边加入 3 mL 的 4℃ 无水乙醇。在 4℃ 下固定 12 h 后, 于 -20℃ 保存待用, 也可接着进行染色处理。染色步骤如下: 在 1 000 r/min 下离心 8 min 使细胞成团, 倒掉上清液, 加入 3 mL 含有 5 mmol/L EDTA 的无钙镁 PBS 洗 1 次; 1 000 r/min 离心 8 min 后弃掉上清液, 加入 1 mL 含有 0.03

mg/mL PI, 0.3 mg/mL RNase A 和 0.005 μg/mL FITC 的无钙镁 PBS, 在室温下染色 1 h, 之后用孔径 30 μm 尼龙滤膜过滤到 5 mL 的离心管中, 用细胞流式仪(Vantage SE, BD)进行检测。每个样品采集 10 000 个细胞的荧光数据, 用 Cell Quest 软件(BD San Jose, CA)进行分析, 在绿色荧光值(蛋白质含量)和红色荧光值(DNA 含量)的二维分布点图上, 对分别代表 G₀, G₀+G₁, S 和 G₂+M 期细胞区域内的点数进行统计, 计算各时期细胞百分比。

1.4 BrdU 标记法检测靛玉红-3'-单肼处理对猕猴成纤维细胞增殖的影响

为了验证靛玉红-3'-单肼对细胞周期的同步化效果, 进一步用 BrdU 掺入标记法检测其对猕猴成纤维细胞增殖的影响。将解冻复苏的猕猴成纤维细胞在直径 2.5 cm 的培养皿(用于免疫组化染色)和 25 cm² 的培养瓶(用于细胞计数)中进行培养, 当细胞单层融合度达到 70%~80% 时, 将细胞分成 3 组。第 1 组直接在培养液中添加 10 μmol/L BrdU 标记培养 24 h, 或者培养 24 h 后再添加 BrdU 标记培养 24 h, 作为正常培养的对数期旺盛增殖细胞对照组。第 2 组细胞加入 15 μmol/L 靛玉红-3'-单肼处理 30 h, 再添加 10 μmol/L BrdU 标记培养 24 h, 然后固定染色。第 3 组细胞用靛玉红-3'-单肼处理 30 h 后, 将培养液换成只含 BrdU 不含靛玉红-3'-单肼的正常培养液继续培养 24 h, 用于判断靛玉红-3'-单肼处理对细胞增殖的抑制作用是否可逆。

细胞染色根据 Kues 等^[17]的方法进行, 并略加改变。用预冷的 -20℃ 含 150 mmol/L 甘氨酸(pH 2.0)的体积分数 70% 乙醇溶液固定细胞样品。固定结束后, 在单层细胞上滴加 BrdU 抗体工作液, 以石蜡膜覆盖后放到湿盒中, 在 37℃ 培养箱里孵育 30 min。孵育后用洗液洗 3 遍, 再滴加结合有碱性磷酸酶的二抗, 在 37℃ 培养箱里孵育 30 min。用洗液洗涤后, 添加含有碱性磷酸酶底物 NBT/X-Phosphate 的溶液(pH 9.5)进行显色反应, DNA 上掺入了 BrdU 的细胞核在普通光镜下呈现褐色或暗褐色。将没有结合 BrdU 的细胞(核)经 Hoechst 33342 (1 μg/mL)染色后, 在 Zeiss Axiovert 200 倒置显微镜下用荧光拍照进行细胞总数计数。以不添加 BrdU、一抗或者二抗的样品作为对照, 每个样品至少计数 500 个细胞, 每个处理重复 3 次。

1.5 原位末端标记法(TUNEL)检测猕猴成纤维细胞的凋亡情况

在细胞培养皿中, 待第 5 代细胞生长至 70%~

80%融合时,加入 15 $\mu\text{mol/L}$ 靛玉红-3'-单肟处理 30 h。处理结束后,对贴壁的细胞单层中的 DNA 片段化情况进行检测。检测步骤如下:首先用新鲜配制的 40 g/L 多聚甲醛溶液在室温下固定细胞样品 1 h,然后使用含有体积分数 3% H_2O_2 的甲醇溶液处理 10 min,以封闭内源的过氧化物酶活性。再用含有体积分数 1% Triton X-100 的 1 g/L 柠檬酸钠溶液在冰浴条件下处理 2 min,进行膜通透处理。PBS 洗涤 3 次后,在细胞样品上滴加 50 μL TUNEL 反应混合液,覆盖适当大小的石蜡膜,然后放在避光的湿盒中,在 37 $^\circ\text{C}$ 的培养箱中温育 1 h。温育结束,用 PBS 洗涤后,再滴加 50 μL Converter-POD(结合辣根过氧化物酶的荧光素抗体),在 37 $^\circ\text{C}$ 培养箱中避光温育 30 min。最后加入 DAB 底物溶液(Sigma D3939)在室温下处理 10 min,进行显色反应,用 Hoechst 33342 染液进行反染。在 Zeiss Axiovert 200 倒置显微镜下进行拍照、计数分析。试验以不

表 1 靛玉红-3'-单肟处理 30 h 后猕猴成纤维细胞在细胞周期各个阶段的分布情况
Table 1 Cell cycle satges distribution of rhesus monkey fibroblast after indirubin treatment %

处理 Treatment	细胞周期 Cell cycle stage			
	G0	G0+G1	S	G2+M
对数增殖期(对照) Cycling cells	7.27 $\pm$ 2.13 a	84.26 $\pm$ 2.23 a	8.50 $\pm$ 1.00 a	7.24 $\pm$ 1.78 ac
接触抑制(对照) Contact inhibition	18.10 $\pm$ 1.24 b	91.85 $\pm$ 1.61 b	5.48 $\pm$ 1.02 b	2.67 $\pm$ 1.24 bd
5 $\mu\text{mol/L}$ 靛玉红-3'-单肟 5 $\mu\text{mol/L}$ indirubin	19.26 $\pm$ 1.36 b	92.80 $\pm$ 1.92 bc	3.14 $\pm$ 0.50 c	4.07 $\pm$ 1.50 bc
10 $\mu\text{mol/L}$ 靛玉红-3'-单肟 10 $\mu\text{mol/L}$ indirubin	14.21 $\pm$ 1.87 c	94.22 $\pm$ 2.05 bc	3.63 $\pm$ 0.87 c	2.14 $\pm$ 1.28 bd
15 $\mu\text{mol/L}$ 靛玉红-3'-单肟 15 $\mu\text{mol/L}$ indirubin	13.73 $\pm$ 1.91 c	94.50 $\pm$ 0.82 bc	3.12 $\pm$ 0.74 c	2.38 $\pm$ 0.69 bd
20 $\mu\text{mol/L}$ 靛玉红-3'-单肟 20 $\mu\text{mol/L}$ indirubin	14.45 $\pm$ 1.96 c	95.06 $\pm$ 2.60 c	3.20 $\pm$ 1.51 c	1.74 $\pm$ 1.13 d

注:同列数据后标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。
Note:Data in the same row with different letters have significant difference($P<0.05$).

从表 1 可以看出,不同浓度的靛玉红-3'-单肟处理均可显著降低猕猴成纤维细胞在 S 期的比例,同步化作用主要是将细胞阻断在 G0 和 G1 期。与对数增殖期对照组细胞相比,5 $\mu\text{mol/L}$ 靛玉红-3'-单肟处理的同步化效果最为明显,G0 和 G0+G1 期的细胞比例均显著上升;但与接触抑制对照组细胞相比,二者之间没有显著差异。在靛玉红-3'-单肟处理浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 时,G0+G1 期细胞的同步化效果基本达到了最佳,S 和 G2+M 期细胞均减少并接近最低的细胞比例。而更高浓度的靛玉红-3'-单肟(15,20 $\mu\text{mol/L}$)处理并不能进一步增强同步化效果,这说明猕猴成纤维细胞对靛玉红-3'-单肟处理的反应很明显,在低浓度的情况下就能达到理想的同步化效果。

2.2 靛玉红-3'-单肟对猕猴成纤维细胞增殖的影响

由图 1A 可见,正常培养对照组中,当细胞处于旺盛增殖期(70%~80%融合度)时,用 BrdU 标记培养 24 h 后进行检测发现,有 80%的细胞呈阳性,

添加末端脱氧核苷转移酶的染色细胞为阴性对照,以预先经 DNase I 处理的细胞样品作为凋亡阳性对照。

1.6 数据分析

每个处理浓度、每个检测均重复至少 3 次,所有百分比形式的数据经反正弦(arc sin)转换后,再用 SPSS 软件进行单因素方差分析(ANOVA),显著性差异以 $P<0.05$ 为标准。

2 结果与分析

2.1 靛玉红-3'-单肟对猕猴成纤维细胞周期分布的影响

用流式细胞仪对单个细胞的 DNA 和蛋白质含量同时进行测定,以此分析细胞在细胞周期各阶段(G0,G0+G1,S,G2+M)的分布情况,检测不同浓度的靛玉红-3'-单肟对猕猴成纤维细胞的同步化效果,确定最适处理浓度,结果见表 1。

显示大多数细胞处于增殖周期中,在 25 cm^2 培养瓶中培养的细胞总数由标记前的每瓶 5.30×10^5 增加到了 9.51×10^5 ;如果是在之后的第 2 个 24 h 内进行标记,仍有 39.39%的细胞呈 BrdU 阳性,其他细胞可能由于接触抑制或密度抑制而停止增殖。由图 1B 可知,用 15 $\mu\text{mol/L}$ 靛玉红-3'-单肟处理 30 h 后的贴壁细胞,如果继续在新添加了 BrdU 且含靛玉红-3'-单肟的培养液里标记培养 24 h,只有很少一部分(8.15%)细胞呈现 BrdU 阳性,每瓶的细胞总数平均为 6.42×10^5 ;而如果换成以只含有 BrdU 的正常培养液继续标记培养 24 h,有大部分的细胞(58.28%)重新进入增殖状态,呈现 BrdU 阳性(图 1C),每瓶的细胞总数增加到 9.35×10^5 。这说明与旺盛增殖的对照组细胞相比,细胞周期抑制剂靛玉红-3'-单肟处理可明显抑制细胞的增殖,而且这种抑制作用是可逆的。

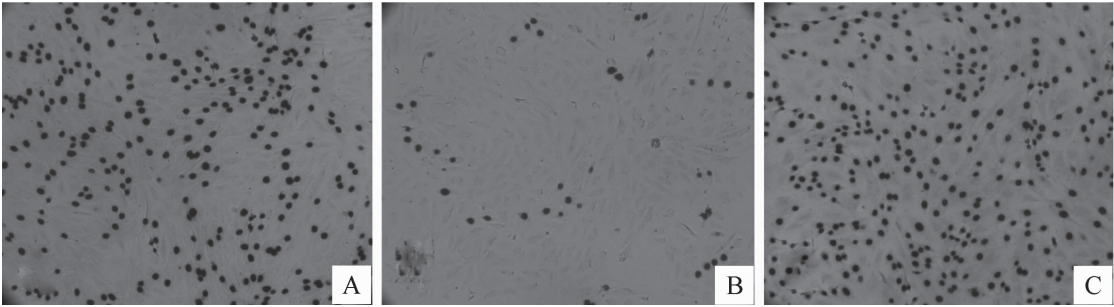


图 1 用 BrdU 标记法(标记 24 h)检测对数增殖期细胞在不同条件下的增殖情况(100×)
A. 在正常培养液中培养 24 h; B. 用靛玉红-3'-单肟处理 30 h 后加入 BrdU 继续培养 24 h;
C. 经靛玉红-3'-单肟处理 30 h 后换到正常培养液中标记培养 24 h

Fig. 1 Proliferation of rhesus fibroblasts during 24 h BrdU labeling(100×)

A. Normal cycling culture as control group; B. Samples labeled in medium containing BrdU and indirubin after treatment with indirubin for 30 h; C. Samples labeled in culture medium just containing BrdU after treatment with indirubin for 30 h

2. 3 靛玉红-3'-单肟对猕猴成纤维细胞生长形态和细胞凋亡的影响

靛玉红-3'-单肟处理对猕猴成纤维细胞生长形

态和细胞凋亡的影响结果见图 2 和图 3, 其中细胞凋亡情况用原位末端标记法(TUNEL)检测。

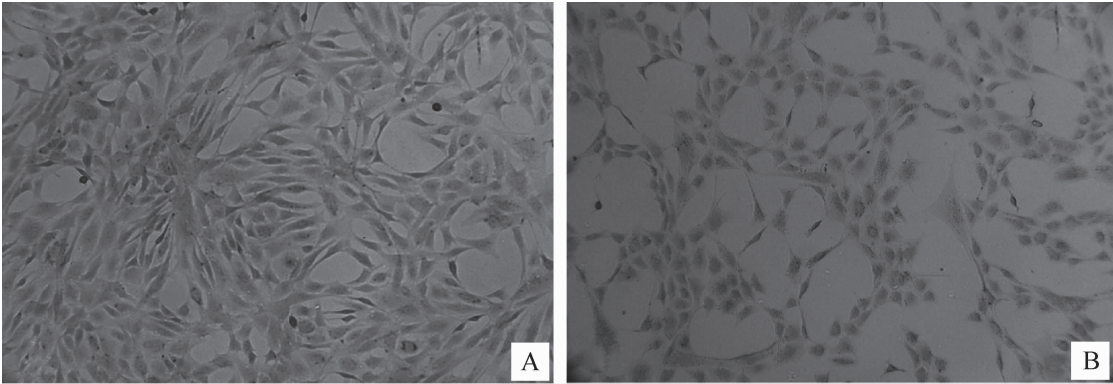


图 2 猕猴成纤维细胞贴壁培养的形态观察(100×)
A. 正常培养组; B. 靛玉红-3'-单肟处理组

Fig. 2 Morphology of rhesus fibroblasts cultures(100×)

A. Control samples in normal culture medium; B. Samples treated with indirubin

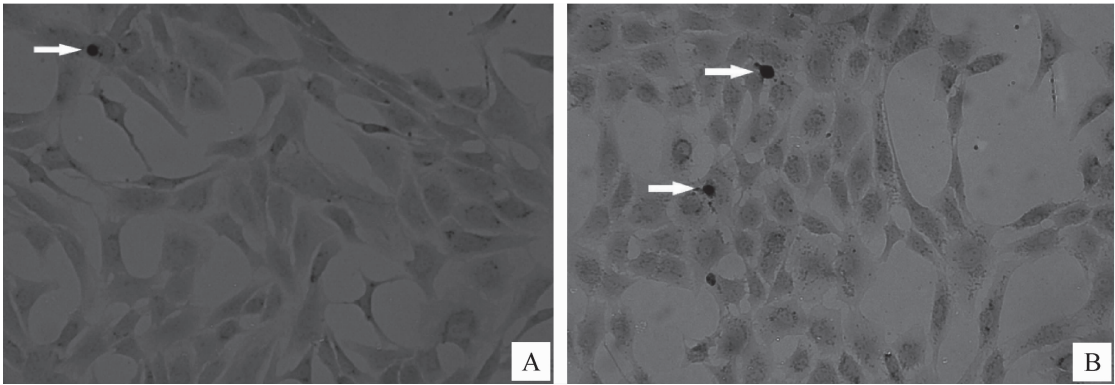


图 3 猕猴成纤维细胞凋亡情况的原位末端标记法(TUNEL)检测(200×)
A. 正常培养组; B. 靛玉红-3'-单肟处理组; 箭头所指为阳性染色

Fig. 3 Apoptosis detection with *in situ* TUNEL analysis in rhesus fibroblasts cultures(200×)
A. Normal culture as control; B. Samples treated with indirubin; The arrow indicates apoptotic cell

由图2可见,在正常培养条件下,对数增殖期的猕猴成纤维细胞呈明显的梭形,胞质伸出2~3个突起(图2A),用靛玉红-3'-单肼处理后贴壁细胞的形态稍微有些变化,胞质伸出的突起变短(图2B),但很少有细胞从瓶壁脱落悬浮在培养液表面,这与正常培养的对照组细胞情况一样,说明很少有细胞因死亡悬浮起来。用TUNEL法检测贴壁的细胞,发现正常培养对照组的细胞发生凋亡的比例很低(图3A),只有1.12%的细胞呈现阳性染色,表明其细胞核内发生了DNA片断化;靛玉红-3'-单肼处理组凋亡发生的百分比有所增加,达1.82%(图3B),但与对照组相比并无显著差异。

3 结论与讨论

靛玉红是一种常用于治疗慢性粒细胞白血病的中药配方的活性成分之一,也是第一种被用于人类癌症治疗的细胞周期蛋白依赖性激酶(CDKs)抑制剂。靛玉红及其衍生物通过与ATP竞争性地结合催化亚基的位点,有选择性地抑制周期蛋白依赖激酶^[7]。靛玉红-3'-单肼可以以浓度依赖的方式抑制多种血细胞和非血细胞的增殖,将它们阻断在G2+M期或G1期,其中对T-淋巴母细胞性白血病Jurkat细胞系最敏感,G1期阻滞伴随着Rb蛋白磷酸化水平下降^[7,19]。本试验结果表明,靛玉红-3'-单肼也可以有效地将猕猴成纤维细胞阻断在G0+G1期,而对其他时期没有阻断效果,在很低的浓度下,5~10 $\mu\text{mol/L}$ 的靛玉红-3'-单肼处理就可以将G0+G1期细胞的比例提高到90%以上,说明猕猴成纤维细胞对靛玉红-3'-单肼处理很敏感。为了进一步证实靛玉红-3'-单肼对猕猴成纤维细胞周期在G0+G1期的阻滞作用,本研究用BrdU标记法检测了靛玉红-3'-单肼处理对细胞增殖的影响,在培养液中添加胸腺嘧啶核苷酸的类似物BrdU,其可以在增殖细胞中替代胸腺嘧啶核苷酸掺入到S期新合成的DNA分子中,此方法是分析细胞增殖(DNA合成)的经典方法。通过BrdU标记法分析细胞增殖的情况,靛玉红-3'-单肼对猕猴成纤维细胞的周期阻断和抑制增殖作用得到了证实,并且证明了这种抑制阻断作用是可逆的,在撤除药物处理后,24 h内有接近60%的细胞重新进入了DNA合成细胞增殖的周期运转中。

靛玉红-3'-单肼可以诱导多种肿瘤细胞发生凋亡^[19-21]。研究表明,靛玉红衍生物E804能够抑制Src-Stat3信号通路,从而诱导乳腺癌和前列腺癌细

胞发生凋亡^[22]。在人宫颈癌Hela细胞上的研究表明,靛玉红-3'-单肼可以诱导细胞凋亡,其主要是通过外部路径(Extrinsic pathway)引起由凋亡前体Bcl-2家族成员Bid和Bax介导的二型反应(Type II response)^[21]。细胞凋亡时,内源的核酸内切酶激活,将染色质DNA切割成许多双链DNA片段或者产生很多单链断裂点(缺口),暴露出大量的3'-OH末端,所以用TUNEL法可以原位特异地显示出凋亡细胞。尽管有很多研究表明,靛玉红及其各种衍生物具有诱导肿瘤细胞凋亡的作用^[19-22]。但本研究用TUNEL法分析靛玉红-3'-单肼对细胞凋亡的影响,发现靛玉红对猕猴成纤维细胞未表现出明显的诱导凋亡作用,这种差异的具体原因还有待进一步研究,比如检测正常体细胞中细胞凋亡相关基因的表达和蛋白活性,如果能够进一步证实,这种诱导肿瘤细胞凋亡的作用在正常体细胞中普遍没有发生,那么靛玉红衍生物就很有潜力成为治疗多种疾病的药物。靛玉红不能诱导猕猴成纤维细胞凋亡的特性,也使其能够成为体细胞克隆猕猴研究中体细胞周期同步化处理的一种安全方法。另外,有研究表明,靛玉红-3'-单肼不影响细胞周期的主要调控因子的表达,即使浓度达30 $\mu\text{mol/L}$ 时,其对体外条件下微管蛋白的聚合和解聚也没有明显的影响^[7,23]。

Campbell等^[24]研究表明,供体细胞核和受体胞质的周期协调对核移植重构胚的发育有十分重要的影响。在核移植试验中,常用MII期卵母细胞作为受体,为了得到核型正常的重构克隆胚胎,必须使用处于G0或G1期的核供体细胞^[24]。本试验结果表明,对于用作核移植的体细胞而言,靛玉红-3'-单肼处理可能是一种安全而有效的细胞周期同步化方法。另外,关于靛玉红引起肿瘤细胞凋亡的分子机制及其对正常细胞影响的差异还需要进行进一步的研究。

【参考文献】

- [1] 吴莲明,杨尧平,朱传先. 青黛治疗慢性粒细胞白血病有效成分的研究[J]. 中草药通讯,1979(9):6-8.
Wu L M, Yang Y P, Zhu Z X. Studies on the active principles of indigofera tinctoria in the treatment of CML [J]. Comm Chinese Herb Med, 1979(9):6-8. (in Chinese)
- [2] 曾庆田,杜德极,杨士兰. 靛玉红的药理研究. I:抗肿瘤作用[J]. 中草药通讯,1979(11):35-39.
Zeng Q T, Du D J, Yang S L. Pharmacological studies of indirubin. I: Antitumor effect [J]. Comm Chinese Herb Med, 1979(11):35-39. (in Chinese)
- [3] 张时行. 靛青根化学成分的研究[J]. 中草药,1983,14(6):247-

- 248.
- Zhang S X. Studies on the chemical constituents of isatis indigotica root [J]. Chinese Trad Herb Drugs, 1983, 14(6): 247-248. (in Chinese)
- [4] 陈迪华, 谢晶曦. 中药青黛的化学成分 [J]. 中草药, 1984, 15(12): 534-536.
- Chen D H, Xie J X. Chemical constituents of traditional Chinese medicine Qingdai [J]. Chinese Trad Herb Drugs, 1984, 15(12): 534-536. (in Chinese)
- [5] Kim S H, Choi S J, Kim Y C, et al. Anti-tumor activity of noble indirubin derivatives in human solid tumor models *in vitro* [J]. Arch Pharm Res, 2009, 32(6): 915-922.
- [6] 吴琦玮, 葛忠良, 高月, 等. 靛玉红对肿瘤细胞抑制作用的研究及相关机制探讨 [J]. 天津中医药, 2008, 25(1): 55-58.
- Wu Q W, Ge Z L, Gao Y, et al. Inhibitory effect of indirubin on growth of some cancer cells and its mechanism [J]. Tianjin Journal of Trad Chinese Med, 2008, 25(1): 55-58. (in Chinese)
- [7] Hoessel R, Leclerc S, Endicott J A, et al. Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases [J]. Nat Cell Biol, 1999, 1(1): 60-67.
- [8] Leclerc S, Garnier M, Hoessel R, et al. Indirubins inhibit glycogen synthase kinase-3 beta and CDK5/p25, two protein kinases involved in abnormal tau phosphorylation in Alzheimer's disease; A property common to most cyclin-dependent kinase inhibitors [J]. J Biol Chem, 2001, 276(1): 251-260.
- [9] Peter Guengerich F, Martin M V, McCormick W A, et al. Aryl hydrocarbon receptor response to indigoids *in vitro* and *in vivo* [J]. Arch Biochem Biophys, 2004, 423(2): 309-316.
- [10] Ding Y, Qiao A, Fan G H. Indirubin-3'-monoxime rescues spatial memory deficits and attenuates beta-amyloid-associated neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. Neurobiol Dis, 2010, 39(2): 156-168.
- [11] Varela A T, Simões A M, Teodoro J S, et al. Indirubin-3'-oxime prevents hepatic I/R damage by inhibiting GSK-3beta and mitochondrial permeability transition [J]. Mitochondrion, 2010, 10(5): 456-463.
- [12] Zahler S, Liebl J, Fürst R, et al. Anti-angiogenic potential of small molecular inhibitors of cyclin dependent kinases *in vitro* [J]. Angiogenesis, 2010, 13(3): 239-249.
- [13] Zhou Q, Yang S H, Ding C H, et al. A comparative approach to somatic cell nuclear transfer in the rhesus monkey [J]. Hum Reprod, 2006, 21(10): 2564-2571.
- [14] Cooper S. Mammalian cells are not synchronized in G1-phase by starvation or inhibition; Considerations of the fundamental concept of G1-phase synchronization [J]. Cell Prolif, 1998, 31(1): 9-16.
- [15] Gibbons J, Arat S, Rzuicidlo J, et al. Enhanced survivability of cloned calves derived from roscovitine-treated adult somatic cells [J]. Biol Reprod, 2002, 66(4): 895-900.
- [16] Yu Y S, Sun X S, Jiang H N, et al. Studies of the cell cycle of *in vitro* cultured skin fibroblasts in goats; Work in progress [J]. Theriogenology, 2003, 59(5/6): 1277-1289.
- [17] Kues W A, Anger M, Carnwath J W, et al. Cell cycle synchronization of porcine fetal fibroblasts; Effects of serum deprivation and reversible cell cycle inhibitors [J]. Biol Reprod, 2000, 62(2): 412-419.
- [18] Crissman H A, Steinkamp J A. Rapid, one step staining procedures for analysis of cellular DNA and protein by single and dual laser flow cytometry [J]. Cytometry, 1982, 3(2): 84-90.
- [19] Marko D, Schätzle S, Friedel A, et al. Inhibition of cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) by indirubin derivatives in human tumour cells [J]. Br J Cancer, 2001, 84(2): 283-289.
- [20] Xiao Z, Hao Y, Liu B, et al. Indirubin and meisoindigo in the treatment of chronic myelogenous leukemia in China [J]. Leuk Lymphoma, 2002, 43: 1763-1768.
- [21] Shi J, Shen H M. Critical role of Bid and Bax in indirubin-3'-monoxime-induced apoptosis in human cancer cells [J]. Biochem Pharmacol, 2008, 75(9): 1729-1742.
- [22] Nam S, Buettner R, Turkson J, et al. Indirubin derivatives inhibit Stat3 signaling and induce apoptosis in human cancer cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(17): 5998-6003.
- [23] Damiens E, Baratte B, Marie D, et al. Anti-mitotic properties of indirubin-3'-monoxime, a CDK/GSK-3 inhibitor; Induction of endoreplication following prophase arrest [J]. Oncogene, 2001, 20(29): 3786-3797.
- [24] Campbell K H, Loi P, Otaegui P J, et al. Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer [J]. Rev Reprod, 1996, 1(1): 40-46.