

表 1 茶多酚对小鼠肝 DNA 甲基化酶活力的影响	
组别	甲基化酶比活力 (cpm/mg 蛋白)
成年对照组	2717
老年对照组	2418
老年 TP 组	3320
老年人参组	3357

注：表中数据为 3 次测定的平均值。

白蛋白作标准曲线。

1.2.5 DNA 甲基化酶的测定：在 0.1ml 反应混合液中含有 20mol/ml Tris, PH7.6; 0.1mol/ml DTT; 5mMEDTA; 9μmol/ml H-SAM(4μCi); 5μg 单链 Micrococcus Luteus DNA 及 200μg 的酶蛋白。37℃ 保温 30min 后,置冰浴中停止反应。加入 2.5μg 蛋白酶 K 和 10μl 10% SDS,并于 60℃ 水浴保温 10min,加入 1ml 碱液 (含 mol/ml NaOH; 50mol/ml EDTA; 50mol/ml Na₃PO₄; 50mol/ml 焦硫酸钠),于沸水浴中保温 10min 后加入冰浴,加入 200μg 鲑鱼精 DNA 作为载体 DNA,再用 4ml 2N 盐酸沉淀 DNA,在冰浴中保持 20min 后,以 GF/C 滤纸收集沉淀,并用 5ml 10mmol/ml 盐酸洗两次,用 95% 乙醇洗一次。在红外灯下烤干滤纸片,并用 3ml 甲苯闪烁液于 FJ-2107P 液体闪烁计数器中测定其放射性。

一个 DNA 甲基化酶活力单位被定义为：在标准检验条件下,每小时催化一个 Picomole 甲基插入到单链 Micrococcus Luteus DNA 上所需的酶量。以比活力 (cpm/mg 蛋白) 表示。

2 结果与分析

茶多酚以地小鼠肝 DNA 甲基化酶活力的影响见表 1。
从表中可见,老龄小鼠肝 DNA 甲基化酶比活力低于成年小鼠,给药组小鼠饮用本实验浓度的 TP 和 2% 人参 8 周后,肝 DNA 甲基化酶比活力均高于正常对照组。说明 TP 能明显提高小鼠肝 DNA 甲基化酶活力,其作用和传统的抗衰老中药人参相似。

DNA 甲基化作用是在 DNA 甲基化酶的作用下,从 S-腺苷酰甲硫氨酸 (S-Adenosylmethionine, 简称 SAM) 上转移甲基到 DNA 分子中胞嘧啶残基 5 位碳原子上,形成 5-甲基胞嘧啶。在生物生长、衰老过程中,DNA 不断受到外界损伤,如自发或诱导异常碱基的出现^[4],使 DNA 甲基化酶不能识别并作用于原来正常的甲基化位点;末端游离的断裂 DNA 出现导致其与 DNA 甲基化酶结合,进而影响正常甲基化部位该酶的效能。因此引起 DNA 甲基化酶活力的下降。

大量的研究表明,茶叶及其提取具有明显的抗氧化、消除自由基、抗肿瘤、抗病毒等多种生理活性,具有延缓衰老的作用。人参为我国传统的延年抗衰方剂,配伍中含人参者不胜枚举。长期的临床实践证明,人参确实有一定的延缓衰老作用。它可以调节、改善老年人内分泌、免疫和代谢功能。提高老年人智能、延缓衰老症状,同时用于治疗一些老年性疾病^[5]。

在本实验中,小鼠服用一定浓度的 TP、人参后,可能改变 DNA 甲基化酶空间构象,使它更容易向正常的甲基化位点转移甲基,从而提高了 DNA 甲基化酶的活力。

本实验的结果为进一步从分子生物的角度探讨 TP 延缓衰老的机理提供科学依据。

参考文献

1 Giulio L Canfoni, Aharon Razin. Biochemistry and Biology of DNA Methylation, Alan R. Liss Inc, New York, 1985.

2 林一萍等. 茉莉花茶的抗脂质过氧化作用及对果蝇寿命的影响[J]. 福建茶叶, 1986(4): 26~27

3 林一萍等. 人参、茶多酚等在体外抗氧自由基的分析[J]. 福建中医学院学报, 1995 5(3): 27.

4 Wilson, VL. Inhibition of DNA Methylation by Chemical Carcinogens in vitro. Cell 1983; 32: 239.

5 陈可冀. 抗衰老中药学. 中国古籍出版社出版, 1989. 198.

茶多酚诱导癌细胞凋亡结果的几种快速检测方法比较

郭 峰 张军 同济大学医学院生物教研室 上海 200331

摘 要 比较几种常规染色方法在茶多酚体外诱导 EJ 细胞的凋亡检测的效果。以同剂量茶多酚诱导膀胱癌 EJ 细胞凋亡,用琼脂糖凝胶电泳的方法确认细胞凋亡,比较苏木精、台盼兰、吉姆萨染色方法在光学显微镜下细胞凋亡形态的检测效果。结果表明,经苏木精、台盼兰、吉姆萨染色方法染色的标本均可在显微镜下找到凋亡细胞形态,而以苏木精染色方法处理的标本染色效果最好。结论是用苏木精染色方法加琼脂糖凝胶电泳是检测茶多酚诱导的膀胱癌 EJ 细胞凋亡的最佳方法。

关键词 茶多酚 苏木精染色 膀胱癌细胞 细胞凋亡

Abstract In this paper, we compared the hematoxylin-eosin staining method, typan blue staining and giemsa staininmsethods to detectin vitro the EJ cell apoptosis induced by tea polyphenols. DNA gel electrophoresis method was

used to make sure of apoptosis result induced by the same concentration of tea polyphenols. Typical cell apoptosis structure "DNA ladder" was found in the EJ cell culture apoptosis induced by the tea polyphenols ($500\mu\text{g}/\text{ml}$). Typical cell apoptosis structure was all found in the three methods apoptosis cell staining. But the hematoxylin - eosin staining of the apoptosis cell showed more clearly than the other two. The conclusion was that DNA gel electrophoresis method with hematoxylin - eosin staining to detect EJ cell apoptosis induced by tea polyphenols was the best method of the three.

Key words Polyphenols Hematoxylin - eosin staining Bladder cancer Apoptosis

目前,对细胞凋亡检测的方法主要有以下四大类方法:细胞凋亡的形态学研究方法,包括光学显微镜、电子显微镜和流式细胞仪等方法;细胞凋亡的生物化学研究方法;细胞凋亡的组织化学研究方法;细胞凋亡的分子生物化学研究方法^{[1]~[4]}。尽管检测细胞凋亡的方法日新月异,生物化学研究方法中的琼脂糖凝胶电泳法和形态学研究方法中的光学显微镜检测细胞凋亡技术仍然是目前既经济简洁、又快速准确的方法。但是,检测不同的细胞凋亡,检测方法和技术也不同。本实验的目的就是想找到一种适合于检测膀胱癌细胞凋亡的快速、准确、经济又简洁的方法。

茶多酚 (tea polyphenols) 可以诱导某些癌细胞发生凋亡^[5, 6]。本实验室也证实茶多酚能够诱导膀胱癌 EJ 细胞发生细胞凋亡。以茶多酚诱导 EJ 细胞凋亡,用琼脂糖凝胶电泳法证实细胞凋亡,再用苏木精、台盼兰、吉姆萨三种不同的染色方法对 EJ 凋亡细胞的染色,在光学显微镜下对 EJ 细胞凋亡形态的检测效果进行比较,证实用苏木精染色结合琼脂糖凝胶电泳法是检测膀胱癌细胞凋亡的最佳方法。

1 材料与方法

1.1 材料

茶多酚的制备 PBS: 参照文献^[7];茶多酚:用含量为 95% 的茶多酚 (购于浙江大学茶叶研究所) 用 PBS 配制为 10% 浓度后,用 0.22 μm 的滤菌器过滤,分装后避光 4℃ 保存备用。苏木精、台盼兰、吉姆萨染液按文献介绍的方法进行配制^[8]。

1.2 方法

1.2.1 膀胱癌 EJ 细胞株培养采用 RPMI 1640 培养液,含青霉素 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、硫酸链霉素 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、庆大霉素 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 含 10% 小牛血清,抽滤灭菌,以 1.0N HCL 或 1.0N NaOH 调节 PH 值至 7.0, 细胞接种于 50ml 培养瓶中, 37℃ 5% CO₂, 饱和湿度空气中培养。EJ 细胞株来源于北京大学泌尿外科研究所。

1.2.2 琼脂糖凝胶电泳按文献介绍的方法进行^[9]。主要步骤为:茶多酚 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 处理 24h 后作用 24h, 收集细胞 (1×10^6 个/ml), 抽提凋亡细胞的 DNA, 取制备好的 DNA 样品 20 μl 用 1% 琼脂糖电泳, UV 灯下观察、摄影。

1.2.3 染色标本的制备将膀胱癌 EJ 细胞株种入用载玻片预先铺满底部的表面皿中,待细胞长至 106 个/ml,加茶多酚 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 作用 24h, 收集长满细胞的载玻片,染色,封片,镜检,摄影。

2 结果

2.1 茶多酚对 EJ 细胞作用后核内 DNA 的影响经过茶多酚 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 处理 24h 后, EJ 细胞 DNA 呈现“梯状”(ladder) 图

谱。电泳结果见图 1。

2.2 染色结果 苏木精、台盼兰、吉姆萨染色方法在光学显微镜下均可观测到细胞凋亡的形态,吉姆萨的染色效果最差,只能隐约看到细胞凋亡的形态;台盼兰染色在低倍镜下 (10×10 倍) 可以比较清楚的看到凋亡细胞核异固缩和细胞凋亡典型的新月形核的形态,但在高倍镜 (10×100 倍) 下细胞核的边界模糊不清,因此,无法进行显微摄影;只有苏木精染色标本的检测效果最好,在高倍镜 (10×100 倍) 下细胞核的边界仍然清晰可辨,分辨率比较高,使光学显微镜下摄影记录细胞凋亡成为可能,结果见图 2。

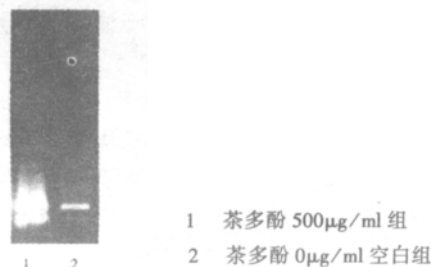


图 1 用 0 $\mu\text{g}/\text{m}$ 和 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 茶多酚处理 24h 后 EJ 细胞 DNA 电泳图

3 讨论

本实验运用目前检测细胞凋亡比较成熟的琼脂糖凝胶电泳法,在证实膀胱癌 EJ 细胞经过 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 茶多酚处理 24h EJ 细胞被诱导发生凋亡后,用三种检验细胞凋亡常规的染料方法^[9]进行染色,三种染色标本在光学显微镜下细胞内结构的清晰程度有明显的差异,苏木精染色标本效果最好、台盼兰染色标本效果仅在低倍镜下较清晰、吉姆萨染色标本观察效果最差。分析其原因可能是凋亡细胞的细胞膜对各染料的通透性不同所决定的。吉姆萨染料的颗粒相对比较粗大,因此不容易进入细胞,所以染色细胞凋亡的效果最差;台盼兰是一种染死细胞的专业染料,活细胞通常不被着色,凋亡细胞的细胞膜对台盼兰的通透性可能介于死亡细胞与活细胞之间,因此,该染料对凋亡细胞的染色效果远不如对死细胞的

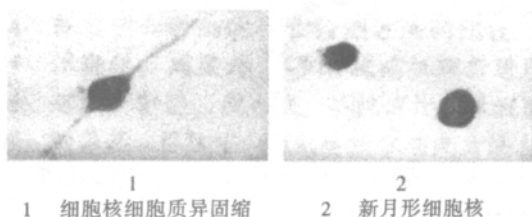


图 2 茶多酚诱导 EJ 细胞凋亡照片 (10×100 倍、H - E 染色)

染色效果好。从文献上看,虽然吉姆萨染色和苏木精染色是观察培养细胞一般形态的最常用方法,也是把细胞作为标本保存的主要方法,但是吉姆萨染液的配制技术不易准确掌握,效果往往不如苏木精染色稳定^[8]。我们的实验结果说明苏木精染色方法在研究人类膀胱癌细胞中是一种快速、有效又经济的好方法。希望我们的研究报告能为体外诱导癌细胞凋亡的观察、研究方面,提供一点参考,同时,也为茶多酚诱导膀胱癌细胞凋亡提供佐证。

参考文献

- 1 Darzynkiewicz Z, Bruno S, Bino GD, et al. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 1992, 13: 795
- 2 Micholson DW, Ali A, Thornberry NA, et al. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*, 1995, 376: 37.
- 3 Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 1995, 267: 1452.
- 4 彭黎明六种细胞凋亡检测方法的比较. *中华病理学杂志*, 1999, 28(1): 55~57.
- 5 谭晓华, 周殿元. 茶多酚抗癌机理新进展. *肿瘤*, 2000, 20(2): 138~140.
- 6 赵燕, 曹进, 祝合成. 茶抗消化道系统肿瘤的研究进展. *肿瘤*, 1998, 18(2): 121~123.
- 7 刘鼎新, 吕证宝. 细胞生物学研究方法与技术. 北京医科大学, 中国协和医科大学联合出版社 1990, 11: 9~11.
- 8 薛庆善, 肖渝平, 林娟等. 体外培养的原理与技术. 科学出版社 2001, 2: 340~345.
- 9 彭黎明, 王曾礼, 邓承祺等. 细胞凋亡的基础与临床. 人民卫生出版社 2000, 7: 153~181.

茶多酚鞣化柞蚕丝素粉的抑菌作用研究

王天元 哈尔滨学院 150080

摘 要 采用不同的方法对柞蚕丝素粉进行鞣化处理,通过抑菌实验发现,以茶多酚为鞣化剂的柞蚕丝素粉对口腔中主要致病、致龋菌有较强的抑制作用。最低抑菌浓度对微小消化链球菌 $3 \times 10^3 \text{CFU}/\text{ml}$, MIC 为 $0.075 \text{mg}/\text{ml}$, 对致龋主要菌变异链球菌 $3 \times 10^6 \text{CFU}/\text{ml}$, MIC 为 $0.15 \text{mg}/\text{ml}$, 提示该种丝素粉可用于口腔防龋。

关键词 柞蚕丝素粉 鞣化 茶多酚 抑菌

Abstract Different methods were used to tan the tussah powder by bacteriostasis experiments, It was found that using tea poly phenols as the tan additive, the tanned tussah powder showed strong inhibitory effect on the main oral pathogenic bacteria and dental caries bacteria, and $3 \times 10^3 \text{CFU}/\text{ml}$ MIC of the minimum consistency of bacteriostasis to the *P. micros* is $0.075 \text{mg}/\text{ml}$, to the main mutation of the *S. mutans*, the $3 \times 10^6 \text{CFU}/\text{ml}$, MIC is $0.15 \text{mg}/\text{ml}$. Please attend to the fact that this kind of element can be used to prevent teeth from being decayed.

Key words Extract Tan Tea tanning Inhibitor

国外有用蚕丝粉生产口香糖的报道,我们实验发现:经特殊处理的柞蚕丝素粉对多种致病菌有抑制作用。为此我们考察了鞣化柞蚕丝素粉对口腔致病菌的抑制作用,试图为柞蚕丝的利用开辟一条新途径。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 柞蚕茧壳。由黑龙江省蚕业研究所蚕场提供。

1.1.2 供试菌种

- (1) 微小消化链球菌 (*P. micros*)
- (2) 小韦荣氏球菌 (*Vitellonella parvula*)
- (3) 产黑素拟杆菌 (*B. melanilloigenicus*)
- (4) 牙龈拟杆菌 (*B. gingivalis*)
- (5) 乳酸杆菌 (*Lactobacillus*)
- (6) 变异链球菌 (*S. mutans*)

以上菌种由哈尔滨医科大学附属第一医院口腔科标本中

分离获得,经 API-20A 系统鉴定。

1.1.3 培养基:采用牛肉膏蛋白胨培养基。

1.2 实验方法

1.2.1 鞣化柞蚕丝素粉的制备

取一定量的柞蚕茧壳,清洗、去杂、加一定量的 $1\% \text{Na}_2\text{CO}_3$ 溶液,保持 80°C 15min,取出后用自来水洗至近中性,加适量浓度为 $2 \text{mol}/\text{L}$ 的 HCl 保持 80°C 30min,取出后用自来水清洗,用浓度为 $2 \text{mol}/\text{L}$ 的 NaOH 调 pH 至 5,按不同鞣化方法处理后, 80°C 烘干粉碎成 200 目细粉,制成 5% 混悬液备用。

1.2.2 将柞蚕丝素按下列方法鞣化处理

- (1) 空白对照;
- (2) 0.2% 茶多酚对照;
- (3) 橡子单宁鞣化;
- (4) 茶多酚鞣化;
- (5) 五倍子单宁鞣化;

1.2.3 菌悬液的制备

将各种供试菌种在厌氧条件下用适宜的斜面培养基活化,分别挑取适量菌苔,用无菌生理盐水制成含菌量为 $3 \times 10^3 \sim 3 \times 10^6 \text{CFU}/\text{ml}$ 的菌悬液和含菌平板。