

喜树碱诱导的草地贪夜蛾 Sf9 细胞凋亡

王文祥¹, 钟国华², 胡美英^{2,*}, 黄劲飞², 葛萃萃¹

(1. 广州出入境检验检疫局, 广州 510623; 2. 华南农业大学资源环境学院, 广州 510642)

摘要: 传统植物源杀虫剂喜树碱具有优异的抑制昆虫生长发育活性, 其诱导昆虫细胞凋亡的作用方式和机制尚不明确, 极大地限制了喜树碱在植物保护领域的应用开发。本研究以 1 $\mu\text{mol/L}$ 喜树碱诱导草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* Sf9 细胞呈现细胞皱缩、微绒毛消失和染色质边集等典型细胞凋亡早期超微结构形态特征, 中期凋亡小体逐渐出现并急剧增多, DNA 电泳分析可见清晰 DNA 片段化凋亡特征。流式细胞术分析表明 1 $\mu\text{mol/L}$ 喜树碱诱导 Sf9 细胞 12 h 凋亡率达到最大值 39.67%, 是对照的 13.13 倍, 随后减小。喜树碱诱导 Sf9 细胞凋亡在 12 h 和 24 h 时 Sf caspase-1 分别出现两个活性高峰, 表明其作为效应因子在细胞凋亡级联反应过程中具有影响作用。喜树碱显著抑制 Sf9 细胞拓扑异构酶 I 活性, 阻断解旋负超螺旋 pBR322 DNA, 导致 DNA 损伤进而启动细胞凋亡级联反应使 Sf caspase-1 活性增加, 提示其信号转导过程是细胞凋亡诱导机制之一。本研究通过分析喜树碱的诱导昆虫 Sf9 细胞凋亡, 对揭示喜树碱诱导昆虫细胞凋亡的作用机制具有重要启示和帮助。

关键词: 草地贪夜蛾; 喜树碱; Sf9 细胞; 细胞凋亡; 级联反应; 流式细胞术

中图分类号: Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2011)08-0894-08

Induced apoptosis of camptothecin in *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells

WANG Wen-Xiang¹, ZHONG Guo-Hua², HU Mei-Ying^{2,*}, HUANG Jin-Fei², GE Cui-Cui¹ (1. Guangzhou Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou 510623, China; 2. College of Natural Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Camptothecin possesses excellent inhibitive effects on insect growth and development. The apoptotic induction mode and mechanism of camptothecin are ambiguous, which restricts the application of camptothecin in plant protection. In order to investigate its inhibitive effect at the cellular level, the apoptotic induction effect of camptothecin on *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells was studied. Induced with 1 $\mu\text{mol/L}$ camptothecin, Sf9 cells showed typical morphological changes such as cell shrinkage, loss of microvilli and chromatin condensation under the transmission electron microscope. DNA Ladder assay indicated that camptothecin induced apoptosis in Sf9 cells. Apoptotic rate of Sf9 cells treated with 1 $\mu\text{mol/L}$ camptothecin increased within 12 h, and reached the maximum of 39.67% at 12 h, which was 13.13 times as high as that of the control. In addition, the activity of Sf caspase-1, the homolog of mammalian effector caspase, increased after apoptosis induction in Sf9 cells, which reached the maximum at 12 h and 24 h, respectively. Furthermore, camptothecin inhibited Topo I of Sf9 cells to unwind supercoiled pBR322 DNA, which caused DNA damage to activate caspase. This suggests that the signal transduction pathway of caspase cascade is one of mechanisms of apoptosis induction. This study provides important clues to understanding the mechanisms of apoptosis induction.

Key words: *Spodoptera frugiperda*; camptothecin; Sf9 cells; apoptosis; cascade; flow cytometry

喜树碱是从我国特有植物物种珙桐科 (Nyssaceae) 喜树 *Camptotheca acuminata* Decaisne 的嫩叶、果实、树皮和根中提取得到的 (林隆泽等, 1977)。它作为传统植物源杀虫剂在害虫防治上得到了广泛应用, 经喜树碱处理的马尾松毛虫

Dendrolimus punctatus 畸形蛹占死蛹总数的 7.14% ~ 28.5%, 羽化率显著降低 (湖南省林业科学研究所, 1978)。Rhee 等 (2002) 指出 1 $\mu\text{mol/L}$ 喜树碱诱导昆虫 Sf9 细胞 18 h 凋亡率为 33.4%, 贾建文等 (2009) 也指出 0.35 ~ 3.5 $\mu\text{mol/L}$ 处理后 36 h 均可

基金项目: 教育部博士学科点专项科研基金 (20094404110019)

作者简介: 王文祥, 男, 1977 年生, 山东成武人, 博士, 研究方向为天然源农药、植物检疫处理, E-mail: wawexi@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: humy@scau.edu.cn

收稿日期 Received: 2011-03-09; 接受日期 Accepted: 2011-05-19

诱导 Sf9 细胞凋亡。0.5 $\mu\text{mol/L}$ 喜树碱还可诱导斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* SL-1 细胞凋亡,并具有一定的浓度依赖性和时序性(钟国华等,2008;黄劲飞等,2010)。喜树碱作为我国特有的典型植物源杀虫剂可诱导离体昆虫细胞凋亡,但其作用方式和诱导凋亡机制尚不明确,极大地限制了喜树碱在植物保护领域的应用开发。为破解这一难题,探讨和研究喜树碱在细胞和分子水平上诱导昆虫细胞凋亡势在必行,也为研究喜树碱抑制农林害虫生长发育的作用机制提供启发和帮助。

在医学领域上对喜树碱诱导恶性肿瘤细胞凋亡机制的研究较为深入,临床应用证明喜树碱通过诱导胃肠道腺癌、绒毛膜上皮癌、圆柱形腺癌、急性粒细胞白血病和膀胱癌等肿瘤细胞凋亡而具有较好疗效(Slichemyer and Hoff, 1990)。喜树碱诱导肿瘤细胞凋亡主要是通过抑制 Topo I 活性来实现的,其具体作用机制是喜树碱与 Topo I-DNA 复合物结合形成三元复合物阻断单链 DNA 在切口部位重新结合,使瞬时 DNA 单链断裂连接成为永久断裂,并不能被修复(Hsiang *et al.*, 1985)。不可修复切口形成后,既影响了复制叉前进,又干扰了 DNA 复制及转录过程,产生不可修复的 DNA 损伤,启动细胞凋亡进程。本文探讨了喜树碱诱导的昆虫 Sf9 细胞凋亡,确证喜树碱抑制 Sf9 细胞 Topo I 启动级联反应并通过 Sf caspase-1 表达。同时,证明了喜树碱诱导肿瘤和昆虫细胞具有相同作用靶标 Topo I 和不同的 caspase 效应器表达,喜树碱诱导细胞凋亡的作用机制可能没有种间差异,为植物源杀虫剂诱导昆虫细胞凋亡信号转导的进一步研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* Sf9 细胞系(中山大学生命科学院生物防治重点实验室惠赠), Grace's 培养液(Gibco 公司)加入 10% FBS(Gibco 公司)作为完全培养液每隔 2 d 换液培养。

1.2 试剂和仪器

喜树碱(99.64%)购于四川德全天然产物有限公司;DNA 提取试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司;溴化乙锭(EB)和 DMSO 购自美国 Sigma 公司;乙二胺四乙酸(EDTA)购自美国 Amersco 公司;琼脂糖购自西班牙 Biowest 公司;三羟甲基氨

基甲烷(Tris)购自瑞士 Roche 公司,聚偏二氟乙烯(PVDF)杂交膜购自美国 Millipore 公司,其他未特别注明的为常规生化试剂。透射电子显微镜(TEM)购自荷兰 FEI 公司;流式细胞仪购自美国 BD 公司;电泳与凝胶成像系统和荧光分光光度计均购自美国 BIO-RAD 公司;细胞转基因仪购自美国 BTX 公司。

1.3 细胞超微形态 TEM 观察

取 1 $\mu\text{mol/L}$ 喜树碱诱导细胞凋亡的 Sf9 细胞 1×10^6 个,5 000 r/min 离心 5 min,上清培养液弃去后将沉淀用 2% 琼脂糖预包埋,冷却凝固后切为 8 mm^3 样品块于 4% 戊二醛固定过夜。然后使用 0.2 mol/L 磷酸缓冲液以 20 min/次漂洗 6 次,1% 锇酸固定 3 h 后再次以 0.2 mol/L 磷酸缓冲液 10 min/次漂洗 6 次,依次使用 50%, 70%, 80%, 90% 和 100% 乙醇脱水,每次 10 min。环氧丙烷脱水过渡 2 次,每次 10 min。以环氧丙烷和 Epon812 环氧树脂比例分别为 3:1, 1:1 和 1:3 混合物依次进行渗透,每次 30 min。纯 Epon812 环氧树脂包埋,室温过夜,置 70°C 烘箱中聚合 8 h 后进行常规修块、定位与切片,醋酸铀-柠檬酸铅双重染色,TEM 观察细胞内部形态。

1.4 DNA 电泳

将正常生长的 Sf9 细胞 1×10^6 个吹打均匀后加入适量新鲜培养液计数并平均分瓶培养,待细胞生长至 70%~80% 汇合时加入终浓度 1 $\mu\text{mol/L}$ 喜树碱,采用纯化试剂盒分别提取不同处理时间的细胞基因组 DNA,1.5% 琼脂糖凝胶电泳(0.5 $\mu\text{g/mL}$ EB)观察细胞 DNA 电泳结果。

1.5 细胞凋亡率测定

参照 Lery 等(1999)方法,终浓度 1 $\mu\text{mol/L}$ 喜树碱不同时间诱导 Sf9 细胞 2×10^6 个,5 000 r/min 离心 5 min 后弃上清,用含 10% FBS 预冷至 4°C 的 PBS 悬浮细胞,振荡同时加入预冷至 -20°C 乙醇固定。过夜后离心弃上清,PBS 洗两次后加入 PI 染液(50 $\mu\text{g/mL}$ PI, 0.1% Triton X-100, 0.1 mmol/L EDTA, 50 $\mu\text{g/mL}$ RNase A)常温避光孵育 30 min,流式细胞仪 FL2 通道检测凋亡率。

1.6 Sf caspase-1 表达及活性测定

取 1 $\mu\text{mol/L}$ 喜树碱分别诱导不同时间细胞凋亡的 Sf9 细胞 1×10^7 个,PBS 洗两次后加入预冷至 4°C 蛋白裂解液[1% Triton X-100, 0.32 mmol/L 蔗糖, 5 mmol/L EDTA, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 2 mmol/L 二硫苏糖醇, 1 mmol/L 苯甲基磺

酰氟, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抑肽酶, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 亮抑酶肽]充分悬浮, 4 $^{\circ}\text{C}$ 裂解 15 min 后 2 000 r/min 15 min 离心收集上清, BCA 方法重复 3 次测定蛋白质含量并分装保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 。配制 15% 蛋白质分离胶在 Tricine 缓冲液系统中进行 SDS-PAGE, 电泳结束后将分离胶蛋白恒压转移至 PVDF 膜上, 将 PVDF 膜置于 5% 脱脂奶粉溶液中封闭 60 min, 取出后 TBS 清洗 3 次, 每次 5 min。加入兔抗 active-caspase-3 多克隆抗体孵育 2 h 后 TBS 清洗 3 次, 每次 10 min。加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG 孵育 1 h 后 TBS 清洗 3 次, 每次 10 min。DAB 显色系统显色 5 ~ 10 min, 加水终止反应并将 PVDF 膜烘干保存 (Sahdev *et al.*, 2003)。

将所得不同处理时间 Sf9 细胞总蛋白各 50 μg 加入含 100 mmol/L Ac-DEVD-AMC 荧光底物的 50 μL 反应体系 (100 mmol/L Hepes, 10% 蔗糖, 0.1 Chaps, 2 mmol/L 二硫苏糖醇, 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抑肽酶, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 亮抑酶肽) 30 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 荧光分光光度计 380 nm 激发测定 430 ~ 460 nm 吸收值 (Rhee *et al.*, 2002)。

1.7 拓扑异构酶 I (Topo I) 活性测定

将 1×10^7 个/mL Sf9 细胞吹打下来后 5 000 r/min 离心 5 min 收集, PBS 洗涤一次后将沉淀悬浮于 1 mL nuclear buffer 中 (100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L KH_2PO_4 , 5 mmol/L MgCl_2 , 1 mmol/L EGTA, 10 mmol/L 巯基乙醇, 10% 甘油, 0.5 mmol/L PMSF, 0.25 mol/L 蔗糖, pH 6.4), 然后加入 9 mL 含 0.35% Triton X-100 的 nuclear buffer, 冰浴 30 min, 5 000 r/min 离心 5 min 后收集, nuclear buffer 洗涤一次并悬浮于 1 mL lysis buffer 中 (100 mmol/L NaCl, 5 mmol/L KH_2PO_4 , 0.5 mmol/L EGTA, 1 mmol/L EDTA, 10 mmol/L 巯基乙醇, 0.5 mmol/L PMSF), 缓慢加入 5 mol/L NaCl, 使其终浓度为 0.35 mol/L。冰浴 1 h 并不时轻轻摇晃, 15 000 r/min 离心 15 min 后取上清加入等体积甘油作为酶粗提液, 核酸蛋白分析仪测定蛋白质含量后分装保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ (De Isabella *et al.*, 1990)。将 pBR322 通过细胞转基因仪转化到大肠杆菌 *Escherichia coli*, 于 LB 培养基中 190 r/min 摇床培养 16 ~ 18 h 后取出, 按质粒提取试剂盒说明书提取质粒 DNA, 核酸蛋白分析仪测定核酸含量后分装保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 。3.5 μL 解旋缓冲液 [200 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 340 mmol/L KCl, 40 mmol/L MgCl_2 , 20 mol/L DTT, 120 mg/mL BSA, 5 mmol/L

EDTA], 含至少 0.1 μg pBR322 的 DNA 7 μL , 含 1 U Topo I 酶活力 (1 U 定义为在标准反应条件下使 0.1 μg 负超螺旋 pBR322 完全解旋的酶量) 的酶粗提液 5 μL 及不同浓度喜树碱待测样品 1 μL , 三蒸水补足至 16.5 μL 。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min 后加入 1 μL 反应终止液 (100 mmol/L EDTA, 5% SDS, 50% 甘油, 0.5% 溴酚蓝), 1% 琼脂糖凝胶电泳 (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EB) 记录结果 (Marx *et al.*, 1997)。

1.8 数据统计与分析

对喜树碱诱导 Sf9 细胞的凋亡率、Sf caspase-1 和 Topo I 活性结果数据均采用 SAS 8.1 软件进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 凋亡细胞超微形态变化

利用 TEM 进行观察, 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 喜树碱诱导 Sf9 细胞凋亡的超微结构形态特征变化见图 1。正常细胞染色质均匀分布, 可见个别吞噬泡, 核膜双层膜界限清晰 (图 1: A, B), Sf9 细胞处理 6 h 可见细胞皱缩、微绒毛消失、染色质边集、吞噬泡数量增加、线粒体数量减少和核膜皱缩且界限模糊 (图 1: C, D)。15 h 吞噬泡数量明显增加、线粒体数量明显减少、大量包含染色质的凋亡小体和核膜成段断裂 (图 1: E, F)。喜树碱诱导 Sf9 细胞凋亡的超微结构形态特征结果表明细胞凋亡早和中期凋亡特征逐渐凸显, 细胞凋亡早期细胞外部轮廓、微绒毛、核膜和染色质变化最突出, 随后吞噬泡和线粒体数量明显变化, 中期凋亡小体逐渐出现并急剧增多。

2.2 凋亡细胞 DNA 降解情况

1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 喜树碱诱导 Sf9 细胞凋亡 DNA 电泳结果见图 2, 除 0 h 和 3 h 外均可见与细胞凋亡模型一致的 DNA 片段化。0 ~ 9 h 被诱导 Sf9 细胞 DNA 片段化条带深浅程度由无到有并不断增大, 9, 12, 15 和 18 h 条带清晰, 且四者无明显差异, 21 h 和 24 h 处理条带变浅, 并介于 6 h 和 9 h 之间。喜树碱处理后 6 h 即超微结构形态特征呈现明显变化时, DNA 已经被部分降解为小片段, 并随着形态特征变化而降解程度不断增大, 其 DNA 片段数量也随之增加, 9, 12, 15 和 18 h DNA 降解程度达到最大。

2.3 不同诱导时间的凋亡率变化

1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 喜树碱不同时间诱导 Sf9 细胞凋亡率结果见图 3, 喜树碱诱导后 Sf9 细胞凋亡率迅速增

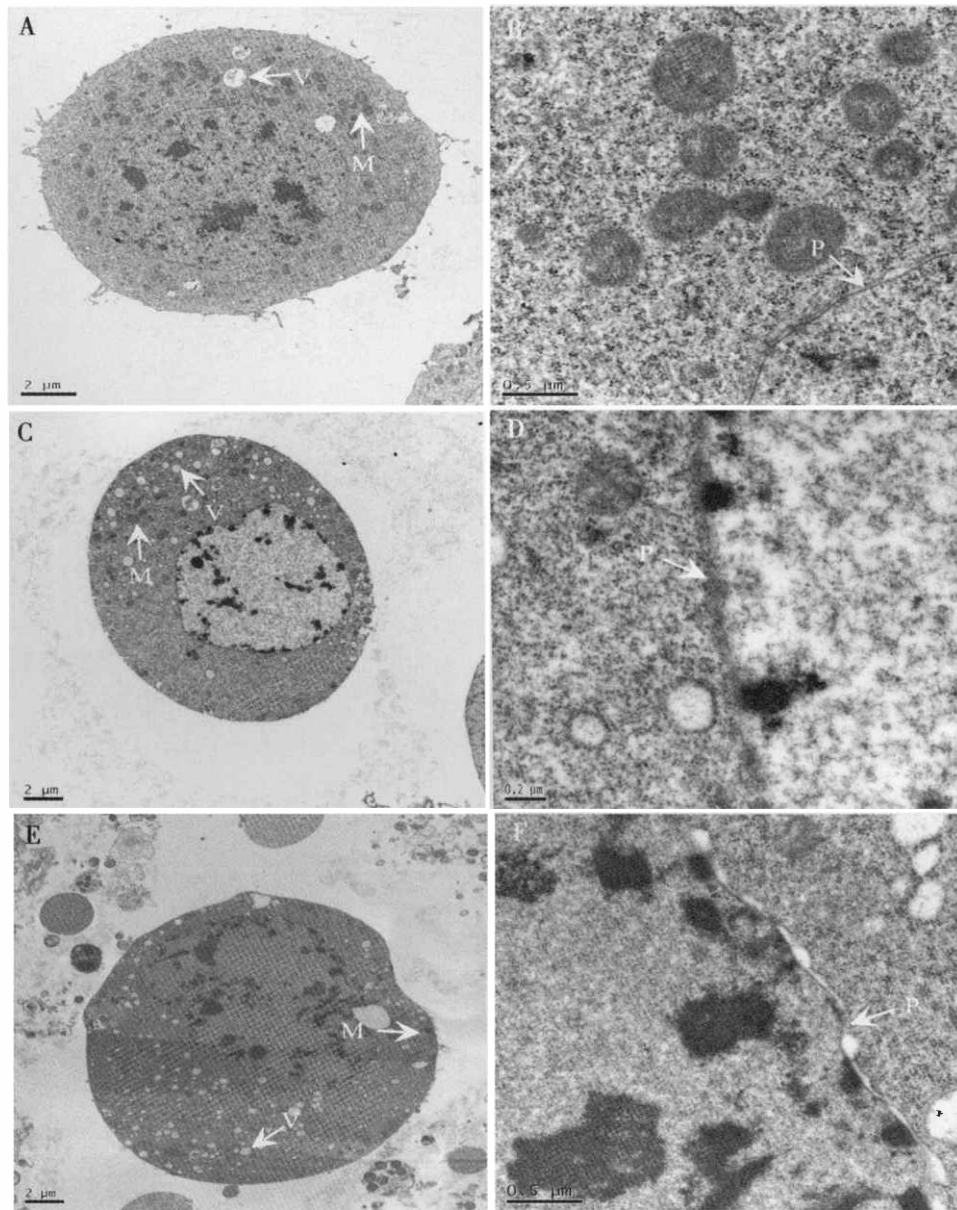


图1 1 $\mu\text{mol/L}$ 喜树碱诱导 Sf9 细胞凋亡不同时间的超微结构形态特征变化 TEM 观察

Fig. 1 TEM micrographs of Sf9 cells induced with 1 $\mu\text{mol/L}$ camptothecin at different time

A, B: 诱导后 0 h (0 h after induction); C, D: 诱导后 6 h (6 h after induction); E, F: 诱导后 15 h (15 h after induction). A, C 和 E 中 V 为吞噬泡, M 为线粒体; B, D 和 F 中 P 为细胞膜。V shows vacuoles, and M shows mitochondrions in A, C and E. P shows plasma membrane in B, D and F.

大, 3 h 凋亡率是对照的 9.51 倍。3 - 12 h 凋亡率逐渐增大, 且各处理间差异均显著。12 h 凋亡率达最大值 39.67%, 是对照的 13.13 倍, 随后逐渐减小, 15, 18 和 6 h 结果差异均不显著。

2.4 不同诱导时间 Sf caspase-1 的表达及活性变化

1 $\mu\text{mol/L}$ 喜树碱诱导 Sf9 细胞凋亡不同时间 Sf caspase-1 的 Western blot 分析结果见图 4, 表明 0, 9, 12, 18, 24 和 30 h 均有不同程度 Sf caspase-1 表

达, 明确 Sf caspase-1 在 Sf9 细胞中存在, 并在喜树碱诱导细胞凋亡后其活性发生规律性变化。1 $\mu\text{mol/L}$ 喜树碱诱导 Sf9 细胞凋亡不同时间的 Sf caspase-1 活性分析见图 5。Sf9 细胞 Sf caspase-1 活性在喜树碱诱导后平缓增大, 9 - 12 h 迅速增大并在 12 h 达到较高数值 5.02, 是 0 h 结果的 6.03 倍; 12 - 15 h 呈减小趋势并在 15 - 18 h 没有明显变化, 而 18 - 24 h 迅速增大并在 24 h 达到最大值 6.4, 是 0 h 结果的 7.68 倍; 24 - 30 h 活性再次减小。

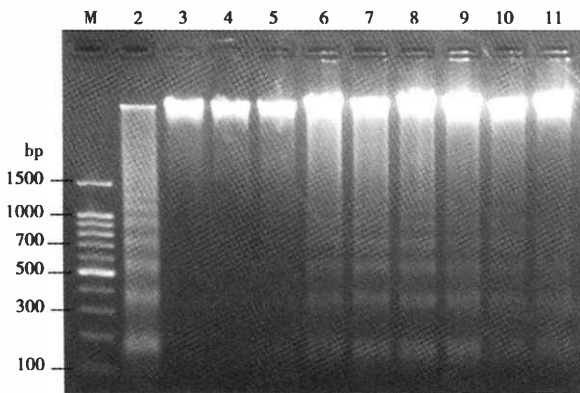


图2 1 μmol/L 喜树碱诱导 Sf9 细胞 DNA 电泳结果

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis analysis of genomic DNA fragmentation of Sf9 cells induced by 1 μmol/L camptothecin M: DNA 分子量标准物 100 bp ladder (DNA molecular weight marker 100 bp ladder); 2: DEX 诱导小鼠前胸腺原代细胞 4 h 细胞凋亡模型 (Apoptotic mouse thymocytes at 4 h after induction by DEX); 3-11: 1 μmol/L 喜树碱诱导 Sf9 细胞凋亡的 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 和 24 h (At 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 and 24 h after treatment with 1 μmol/L camptothecin, respectively).

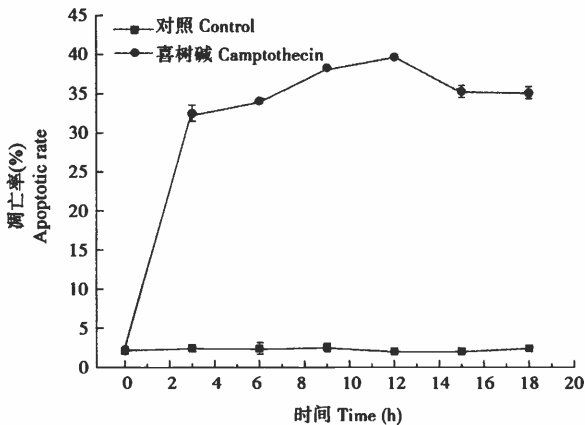


图3 喜树碱诱导 Sf9 细胞凋亡的凋亡率变化结果

Fig. 3 Changes of apoptotic rate in camptothecin-induced Sf9 cells

图中每一处理重复 3 次, 图中数据为平均值 ± 标准差。Each treatment was repeated three times. The data are denoted as mean ± SD.

图5 同 The same for Fig. 5.

图4 1 μmol/L 喜树碱诱导 Sf9 细胞凋亡不同时间的 Sf caspase-1 定性分析

Fig. 4 Qualitative analysis of Sf caspase-1 in camptothecin-induced Sf9 cells

anti-caspase3 抗体进行免疫印迹检测 18 kDa 片段作为活性 Sf caspase-1 存在标志。Western blot showing the expression of 18 kDa fragment of Sf caspase-1 with active anti-caspase3 antibody.

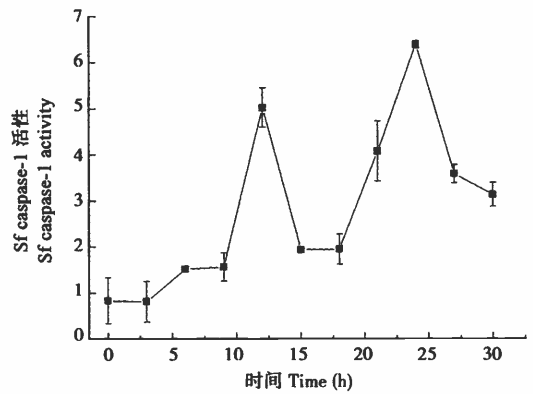


图5 1 μmol/L 喜树碱诱导 Sf9 细胞凋亡不同时间的 Sf caspase-1 活性

Fig. 5 Sf caspase-1 activity in 1 μmol/L camptothecin-induced Sf9 cells

2.5 喜树碱对 Topo I 的抑制活性

喜树碱抑制 Sf9 细胞 Topo I 活性分析见图 6。第 2 泳道 pBR322 DNA 是正常负超螺旋, 3 泳道是 Sf9 细胞中的 Topo I 使 pBR322 DNA 完全解旋。第 4~7 泳道处理的 pBR322 DNA 被 Sf9 细胞中 Topo I 不同程度催化解旋, 其中第 4 泳道处理大部分 pBR322 DNA 被 Sf9 细胞 Topo I 解旋, 说明 0.1 μmol/L 喜树碱没有完全抑制 Topo I 活性, 而第 5, 6 和 7 泳道 pBR322 DNA 基本没有被解旋, 说明 1 μmol/L, 10 μmol/L 和 60 μmol/L 喜树碱均可以显著抑制 Topo I 活性。

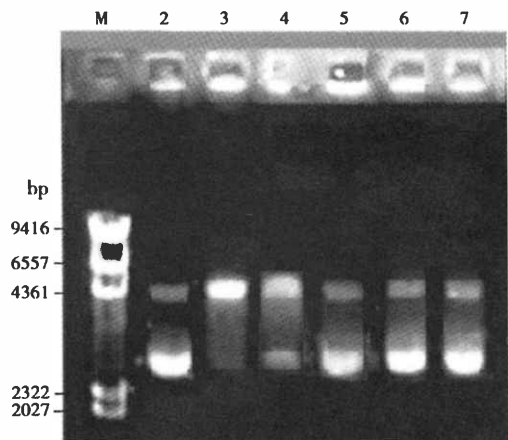


图6 喜树碱抑制 Sf9 细胞 Topo I 活性分析

Fig. 6 Inhibition of Topo I in camptothecin-induced Sf9 cells M: 分子量标准物 λ/Hind III digest marker (λ/Hind III digest marker); 2: 7 μL pBR322 DNA; 3-7: 7 μL pBR322 DNA 和 5 μL Topo I 分别与 1 μL 对照, 0.1 μmol/L, 1 μmol/L, 10 μmol/L 和 60 μmol/L camptothecin(终浓度)在 16.5 μL 缓冲液中的反应产物 (Reaction products of 7 μL DNA of pBR322 and 5 μL Topo I react to 1 μL control, 0.1 μmol/L, 1 μmol/L, 10 μmol/L and 60 μmol/L camptothecin (final concentration) in a final volume of 16.5 μL buffer, respectively).

3 讨论

3.1 昆虫 Sf9 凋亡细胞的超微结构变化

形态特征变化是最为典型和通用的细胞凋亡检测方法,喜树碱诱导 Sf9 细胞的超微结构变化直接证明了细胞凋亡、凋亡早期和中期的形态特征区别。喜树碱诱导 Sf9 细胞呈现典型细胞凋亡超微结构形态特征与 Jacobson 等(1997)结果相似,其原因可能是昆虫细胞与最普遍的哺乳动物细胞以线粒体为核心的线粒体通路相类似,即线粒体作为调控细胞凋亡的关键因子决定着细胞凋亡进程(Ravagna *et al.*, 2002; Parone *et al.*, 2002)。喜树碱诱导 Sf9 细胞后线粒体和吞噬泡等细胞器形态结构和数量发生明显变化,不同于其他哺乳动物细胞凋亡模型,表明具体信号转导执行过程可能又有区别。

3.2 DNA-Ladder 的形成过程

喜树碱诱导昆虫 Sf9 细胞在 6 h 凋亡率达最大值时,凋亡细胞超微结构形态特征和 DNA-Ladder 说明核酸被切割后主要形成规则小片段,大片段存在时间极短。细胞凋亡发生后 Endo G 表达被激活,这种 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 依赖性核酸内切酶活性可被 Zn^{2+} 阻断,被切割的 20 ~ 580 kb 核酸大片段作为标签暗示将继续切割并形成规则寡核苷酸片段(Weaver *et al.*, 1993; Bicknell *et al.*, 1994; Kataoka *et al.*, 1997)。Endo G 继续在核小体连接部位单链切割,如果 DNA 双链上两个单链切口相距小于或等于 14 bp 则使双链发生解离而形成约 185 bp 或多聚体组成的寡核苷酸片段,提取细胞总 DNA 或选择性提取小分子 DNA 后经琼脂糖凝胶电泳可以观察到独特的呈规则间隔 180 ~ 200 bp (核小体单位)的特征性 DNA-Ladder。然而,根据本文 DNA 片段化电泳结果,并没有观察到被切割的 20 ~ 580 kb 核酸大片段,而是直接观察到 DNA-Ladder 电泳结果。同时,根据喜树碱不同诱导时间的凋亡率变化结果表明 3 h 凋亡率迅速增大,没有观察到典型形态学变化和 DNA 片段化,在处理 6 h 才观察到凋亡率继续增大和典型的凋亡超微结构形态以及 DNA-Ladder。由此说明,喜树碱诱导 0 ~ 3 h 大部分 Sf9 细胞 DNA 被切割为大片段,随后 3 ~ 6 h 大片段被 Endo G 再次切割为小片段。在 0 ~ 12 h 喜树碱处理过程中 DNA 被 Endo G 不断切割,亚二倍体 DNA 碎片逐渐积累导致凋亡率不断增大,处理

12 h DNA 被完全切割后不再形成亚二倍体碎片即达到凋亡率最大值。

3.3 Sf caspase-1 级联反应进程

诱导因子喜树碱将信号传递给 Sf caspase-1 执行细胞凋亡, Sf caspase-1 作为凋亡效应器在细胞凋亡过程中影响凋亡早、中和晚期的细胞生物学特征变化。Sf9 细胞中 35 kDa 的 Sf caspase-1,是目前已知唯一的 Sf9 细胞凋亡效应器,它由 299 个氨基酸组成,在 Asp-28, Asp-24 和 Asp-195 切割形成 p19/18 大亚基和 p12 小亚基,具有 QACQG 保守五肽结构域,可被 p35 抑制,与 Caspase3 具有 38% 同源性(Alnemri *et al.*, 1994; Ahmad *et al.*, 1997)。喜树碱诱导 Sf9 细胞使 Sf caspase-1 高水平表达明确两者与 H_2O_2 、UV-B 等诱导因子具有相同细胞凋亡效应器(Sahdev *et al.*, 2003)。Manji 和 Friesen (2001)证明 Sf caspase-1 同 caspase3 活化过程相似,也具有细胞凋亡级联反应,在 Sf21 细胞中存在抗 p35 的 caspase 介导 pro-Sf caspase-1 切割活化过程。p35 通过抑制活性 Sf caspase-1 和 pro-Sf caspase-1 活化来阻断 35 缺陷型 AcMNPV 诱导的细胞凋亡(Seshagiri and Miller, 1997)。OpIAP 和 CpIAP 不能抑制活性 Sf caspase-1,而是通过抑制 pro-Sf caspase-1 活化来阻断放线菌素 D 诱导的 Sf21 细胞凋亡(Crook *et al.*, 1993; Birnbaum *et al.*, 1994; Clem and Miller, 1994)。同时, p35 和 OpIAP 抑制 pro-Sf caspase-1 活化的方式也不同, OpIAP 抑制活化起始阶段大小亚基之间 TETD ↓ G 过程,但 p35 不能抑制此过程,而是阻断大亚基 DXXD ↓ (G/A) 活化过程,结合果蝇 drICE 和 DCP-1 也存在 TETD ↓ G 活化过程,再次明确在昆虫中存在以抗 p35 的 caspase 为起点进行 TETD ↓ G,以 Sf caspase-1 为终点的蛋白级联反应(LaCount *et al.*, 2000)。因此,在昆虫中存在与哺乳动物相似但又有区别的细胞凋亡级联反应,其中 p35 位于上游 caspase 和 pro-Sf caspase-1 之间,而 IAPs 位于信号转导上游。本文结果表明喜树碱诱导 Sf9 细胞的凋亡中期凋亡率与 Sf caspase-1 活性最大值出现时间相一致,间接证明了典型的凋亡超微结构形态以及 Endo G 切割核酸后形成的 DNA-Ladder 是诱导凋亡的早期和中期结果,凋亡信号传递到下游后激活 Sf caspase-1,通过其活性规律性变化来完成晚期细胞凋亡的全部过程。

3.4 喜树碱抑制 Topo I 诱导 Sf9 细胞凋亡

喜树碱对肿瘤细胞与昆虫 Sf9 细胞具有相同的

凋亡诱导机制, Sf9 细胞中同样存在与哺乳动物解旋负超螺旋 DNA 功能相似的 Topo I, 1 $\mu\text{mol/L}$ 喜树碱即可抑制 Sf9 细胞中 Topo I 活性, 使 pBR322 DNA 不能解旋。DNA 新生链的合成通过 DNA 聚合酶 III 催化, 在这一过程中 DNA 必须由螺旋酶在复制叉处边移动边解开双链。DNA Topo I 打开一条链使正超螺旋状态转变成松弛状态, DNA Topo II 在 DNA 解链前方不停地继续将负超螺旋引入双链 DNA。这两种酶保证了环状或开环 DNA 复制过程中的顺利解链, 再由 DNA 聚合酶 III 合成新的 DNA 链(Wang, 2002)。以喜树碱为代表的拓扑异构酶抑制剂通过形成 DNA 与 Topo I 的稳定复合物发挥其细胞毒性作用, 干扰复制叉的移动和切口连接, 使得瞬时的单链成为永久断裂, 永久断裂的单链随后成为基因重组和修复的靶点, 引起大片段基因的插入与缺失, 染色质变型和移位(Froelich-Ammon and Osheroff, 1995)。这种情况导致 Topo I 断裂复合物的不断积累, 抑制 DNA 的正常复制和转录, 造成不可修复的 DNA 损伤, 从而激活 DNA 损伤检验点执行细胞凋亡(马云彤, 2010)。喜树碱通过抑制 Topo I 活性阻断 DNA 复制而启动细胞凋亡信号转导过程, 是诱导多种离体或活体细胞凋亡的重要机制(Hsiang *et al.*, 1985; Pommier *et al.*, 1998)。本文结果表明喜树碱对肿瘤细胞与昆虫 Sf9 细胞具有相同的凋亡诱导机制, 喜树碱显著抑制 Sf9 细胞拓扑异构酶 I 活性, 阻断解旋负超螺旋 pBR322 DNA, 导致 DNA 损伤进而启动细胞凋亡级联反应使 Sf caspase-1 活性增加, 其信号转导过程是细胞凋亡诱导机制之一。

细胞是昆虫形态结构和生命活动的基本单位, 是研究昆虫各器官及其生理功能变化规律的起点。在昆虫的生活史中, 认识昆虫在生长、发育、变态和繁殖过程中各器官的细胞和亚细胞的结构改变对于揭示蛋白质功能、信号分子转导和物质的代谢与转化等相关生物化学规律具有突出的实际意义。此外, 21 世纪新农药研究的特点是建立在基因和分子水平基础之上的, 进一步认识杀虫剂与害虫生命活动本质对于杀虫剂开发和害虫防治也具有积极意义。

参 考 文 献 (References)

- Ahmad M, Srinivasula SM, Wang L, Litwack G, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES, 1997. *Spodoptera frugiperda* caspase-1, a novel insect death protease that cleaves the nuclear immunophilin FKBP46, is the target of the baculovirus antiapoptotic protein p35. *J. Biol. Chem.*, 272(3): 1421 - 1424.
- Alnemri ES, Fernandes-Alnemri T, Pomeranke K, Robertson NM, Dudley K, DuBois GC, Litwack G, 1994. FKBP46, a novel Sf9 insect cell nuclear immunophilin that forms a protein-kinase complex. *J. Biol. Chem.*, 269(49): 30828 - 30834.
- Bicknell GR, Snowden RT, Cohen GM, 1994. Formation of high molecular mass DNA fragments is a marker of apoptosis in the human leukaemic cell line, U937. *J. Cell Sci.*, 107: 2483 - 2489
- Birnbaum MJ, Clem RJ, Miller LK, 1994. An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with cys/his sequence motifs. *Journal of Virology*, 68(4): 2521 - 2528.
- Clem RJ, Miller LK, 1994. Control of programmed cell death by the baculovirus genes *p35* and *iap*. *Mol. Cell. Biol.*, 14(8): 5212 - 5222.
- Crook NE, Clem RJ, Miller LK, 1993. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *Journal of Virology*, 67(4): 2168 - 2174.
- De Isabella P, Capranico G, Binaschi M, Tinelli S, Zunino F, 1990. Evidence of DNA topoisomerase II-dependent mechanisms of multidrug resistance in P388 leukemia cells. *Mol. Pharmacol.*, 37: 11 - 16.
- Froelich-Ammon SJ, Osheroff N, 1995. Topoisomerase poisons: Harnessing the dark side of enzyme mechanism. *J. Biol. Chem.*, 270(37): 21429 - 21432.
- Hsiang YH, Hertzberg R, Hecht S, Liu LF, 1985. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J. Biol. Chem.*, 260: 14873 - 14878.
- Huang JF, Jia JW, Luo JJ, Weng QF, Zhong GH, 2010. Modes of action of six different botanical alkaloids against *Spodoptera litura* cultured cell line SL-1. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 29(1): 37 - 42. [黄劲飞, 贾建文, 罗建军, 翁群芳, 钟国华, 2010. 6 种生物碱对斜纹夜蛾离体培养细胞的作用方式. 华中农业大学学报, 29(1): 37 - 42]
- Institute of Forestry Sciences in Hunan Province, 1978. Research in the bioactivity of botanical alkaloids against *Dendrolimus punctatus*. *Acta Entomologica Sinica*, 21(1): 108 - 112. [湖南省林业科学研究所, 1978. 应用植物碱防治马尾松毛虫的初步探讨. 昆虫学报, 21(1): 108 - 112]
- Jacobson MD, Weil M, Raff MC, 1997. Programmed cell death in animal development. *Cell*, 88: 347 - 354.
- Jia JW, Huang JF, Wang WX, Hu MY, Zhong GH, 2009. Effects of different insecticidal components on induction of apoptosis in *Spodoptera frugiperda* cultured cell line Sf9. *Journal of South China Agricultural University*, 30(4): 35 - 41. [贾建文, 黄劲飞, 王文祥, 胡美英, 钟国华, 2009. 不同杀虫成分对 Sf9 细胞凋亡的影响. 华南农业大学学报, 30(4): 35 - 41]
- Kataoka A, Kubota M, Usami L, Okuda A, Lin YW, Koishi S, Sawada M, Akiyama Y, Furusho K, 1997. Constitutive endonuclease to induce high molecular weight or internucleosomal DNA fragmentation in freshly isolated leukemia cells. *Cancer Letters*, 117: 29 - 34.
- LaCount DJ, Hanson SF, Schneider CL, Friesen PD, 2000. Caspase

- inhibitor p35 and inhibitor of apoptosis op-IAP block *in vivo* proteolytic activation of an effector caspase at different steps. *J. Biol. Chem.*, 275(21): 15657 - 15664.
- Léry X, Charpentier G, Belloncik S, 1999. DNA content analysis of insect cell lines by flow cytometry. *Cytotechnology*, 29: 103 - 113.
- Lin LZ, Zhao ZY, Xu RS, 1977. Research on chemical composition of *Camptotheca acuminata* I. Chemical composition of *Camptotheca acuminata* root. *Acta Chimica Sinica*, 35(3,4): 227 - 230. [林隆泽, 赵志远, 徐任生, 1977. 抗癌植物喜树化学成分研究 I. 喜树根的化学成分. 化学学报, 35(3,4): 227 - 230]
- Ma YT, 2010. DNA damage, repair and checkpoint response mediated by topoisomerase I inhibitor. *Journal of Xi'an University of Arts and Science (Natural Science Edition)*, 13(1): 50 - 53. [马云彤, 2010. 拓扑异构酶 I 抑制剂介导的 DNA 损伤、修复和检验点应答. 西安文理学院学报(自然科学版), 13(1): 50 - 53]
- Manji GA, Friesen PD, 2001. Apoptosis in motion. an apical, p35-insensitive caspase mediates programmed cell death in insect cells. *J. Biol. Chem.*, 276(20): 16704 - 16710.
- Marx G, Zhou H, Graves DE, Osheroff N, 1997. Covalent attachment of ethidium to DNA results in enhanced topoisomerase II-mediated DNA cleavage. *Biochemistry*, 36: 15884 - 15891.
- Parone PA, James D, Martinou JC, 2002. Mitochondria: regulating the inevitable. *Biochimie*, 84: 105 - 111.
- Pommier Y, Pourquier P, Fan Yi, Strumberg D, 1998. Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1400(1(3): 83 - 105.
- Ravagna L, Roumier T, Kroemer G, 2002. Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J. Cell. Physiol.*, 192(2): 131 - 137.
- Rhee WJ, Kim EJ, Park TH, 2002. Silkworm hemolymph as a potent inhibitor of apoptosis in Sf9 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 295(4): 779 - 783.
- Sahdev S, Taneja TK, Mohan M, Sah NK, Khar AK, Hasnain SE, Athar M, 2003. Baculoviral p35 inhibits oxidant-induced activation of mitochondrial apoptotic pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 307: 483 - 490.
- Seshagiri S, Miller LK, 1997. Baculovirus inhibitors of apoptosis (IAPs) block activation of Sf-caspase-1. *Cell Biology*, 94: 13606 - 13611.
- Slicemyer WJ, Hoff DD, 1990. New natural products in cancer chemotherapy. *J. Clin. Pharmacol.*, 30: 770 - 788.
- Wang JC, 2002. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nature*, 3: 430 - 440.
- Weaver VM, Lach B, Walker PR, Sikorska M, 1993. Role of proteolysis in apoptosis: involvement of serine proteases in internucleosomal DNA fragmentation in immature thymocytes. *Biochemical Cell Biology*, 71(9 - 10): 488 - 500.
- Zhong CH, Shui KJ, Huang JF, Jia JW, Hu MY, 2008. Induction of apoptosis by botanical components in *Spodoptera litura* cultured cell line. *Acta Entomologica Sinica*, 51(4): 449 - 453. [钟国华, 水克娟, 黄劲飞, 贾建文, 胡美英, 2008. 植物源物质诱导的斜纹夜蛾细胞凋亡. 昆虫学报, 51(4): 449 - 453]

(责任编辑: 赵利辉)