

方药研究

益髓灵氯仿提取物诱导 HL-60 细胞
凋亡的初步研究陈信义¹ 邵德彬² 赵立业¹ 胡凯文¹ 庞大本² 池旭生² 李玉梅²

摘要 本项研究重点进行了益髓灵氯仿提取物、含氯仿提取物的兔血清、含氯仿提取物的兔肝匀浆、足叶乙甙、正常兔血清五组诱导 HL-60 细胞凋亡效应的实验研究。结果显示,短期液体培养后,取培养的 HL-60 细胞,经光学显微镜观察与流式细胞仪分析,前四组均见明显的 HL-60 细胞凋亡现象。其中,含益髓灵氯仿提取物的兔肝匀浆作用最强,与阳性对照药足叶乙甙相似,兔血清作用次之,益髓灵氯仿提取物作用较弱,正常兔血清无明显的诱导 HL-60 细胞凋亡作用。对于其诱导凋亡机理尚正在研究之中。

主题词 脱噬作用/药物作用 巨核细胞/药物作用
② 益髓灵氯仿提取物

益髓灵具有益气养阴、活血解毒功能,临床用于治疗骨髓增生异常综合征及配合化疗治疗白血病等,已取得较好的临床疗效^[1,2]。我们在临床研究的同时,先后对其进行了部分治疗机理研究^[3~5]。在研究益髓灵对白血病巨核细胞(HI-Meg)影响过程中发现,益髓灵初提物有诱导 HI-Meg 细胞凋亡作用^[6~8]。为了拓宽研究内容,我们按照有关文献,采用不同溶剂对益髓灵进行了提取,并进行了初步的实验研究。在基本确定益髓灵水、正丁醇提取物有促进 HL-60 细胞增殖作用,益髓灵氯仿、乙酸乙酯提取物有诱导 HL-60 细胞凋亡效应基础上,重点进行了益髓灵氯仿提取物以及含该提取物的兔血清、肝匀浆诱导 HL-60 细胞研究。

1 材料与方法

1.1 材料:RPMI-1640 由华美公司提供,小牛血清由中国医学科学院天津血液病研究所提供,碘化丙啶(PI)、RNAase、EDTA、Tris-Cl 购于北京化学试剂商店,HL-60 细胞株由军事医学科学院生命医学研究中心提供,实验用家兔(雄性,体重 2kg)由北京海淀

温泉动物实验厂提供,美国 Becton-Dickinson 公司产荧光激活分选仪(FACS)420 型由中国中医研究院基础理论研究所提供。

1.2 方法:按益髓灵(本院制剂)临床用药剂量,取益髓灵生药研粉,在我院制剂室用乙醇提取后,再分别用氯仿、乙酸乙酯、正丁醇提取,其余部分为水溶部分^[9]。以含 1% 浓度益髓灵氯仿初提物 2ml,给家兔腹腔注射,每日 1 次,连续 4 周后心脏取血,离心,制备兔血清,同时取出兔肝脏,制备肝匀浆。兔血清、肝匀浆均以 RPMI-1640 培养液 2:1 稀释,过滤,灭菌后备用。并制备正常兔血清。取 HL-60 细胞株,调细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$,以 RPMI-1640 培养液加 15% 小牛血清,在 5%CO₂, 37℃ 条件下,孵育传代培养,在指数增殖后,分组加入 10% 益髓灵氯仿初提物以及含该提取物的兔血清、肝匀浆。并设足叶乙甙阳性对照与正常兔血清阴性对照,继续孵育培养 6~12 小时,分别在 6 小时、12 小时两个时间点取培养的 HL-60 细胞行光学显微镜观察与流式细胞仪分析。

2 结果

2.1 光学显微镜观察:在 6 小时、12 小时两个时间点分别用倒置显微镜观察细胞生长状态,再以细胞涂片机涂片,瑞氏染色,用低倍镜观察后,放大 100 倍油镜下观察凋亡小体。结果显示,加入益髓灵氯仿提取物以及含该提取物的兔血清、肝匀浆体外孵育的 HL-60 细胞 6 小时后已有凋亡小体出现,12 小时后均显示有明显的 HL-60 细胞凋亡现象。其中,含益髓灵氯仿提取物的兔肝匀浆作用最强,与阳性对照药足叶乙甙相似;兔血清作用次之;益髓灵氯仿提取物作用较弱,正常兔血清无明显的诱导 HL-60 细胞凋亡作用。光学显微镜下凋亡的 HL-60 细胞,其细胞核呈暗红色,细胞浆呈蓝黑色,核染色质出现密集、浓缩,核碎裂等细胞凋亡特征性改变(图片资料略)。

2.2 流式细胞仪分析:在 12 小时时间点取各培养组的 HL-60 单细胞悬液,用 70% 乙醇固定,在 4℃ 条件下,冰箱保存 1 小时;染色前加 PBS 反复离心 3 次,沉

1 北京中医药大学东直门医院,北京东城区海运仓 (100700)

2 中国中医研究院

收稿日期:1998-01-04;修回日期:1998-12-24

淀去固定液;加入 200 μ l RNAase,置 37℃水浴 30 分钟;加入 800 μ l PI 染液混匀,4℃避光放置 30 分钟;流式细胞术分析,记录激发波长 488nm,PI 荧光通过 585nm 阻断滤片,由光电倍增管测试,多道脉冲分析器分析,显示凋亡细胞散点图。细胞凋亡时,GI 峰左侧出现近二倍体细胞群峰。其散点图显示结果与光学显微镜下观察相一致(散点图资料略)。

3 讨论

英国生物学家 Keer 等在 1972 年首先提出细胞凋亡概念^[10],近些年来,随着科学技术不断发展和研究手段的更新,对细胞凋亡发生机理与基因调控进行了部分揭示,人们日益重视细胞凋亡与各种疾病之间的相关联系,特别是白血病等与细胞凋亡关系极为密切。有学者研究证明,白血病等的发生是由于细胞增殖与凋亡之间平衡失调所致。正常细胞在转化为癌细胞时,其本身具有异常高速度增殖率,在伴随有细胞形态学、细胞代谢与功能异常的同时,癌细胞也不同程度发生凋亡。增殖与凋亡之间存在着一定平衡关系,这种平衡关系决定着癌细胞生长速度。因此,在癌细胞生长过程中,过多的癌细胞凋亡无疑是有益的。故而研究细胞凋亡与癌症发生、发展的相关性是癌症治疗的重要手段,也将是今后本领域研究的热点课题。

国外多采用化学药物来诱导癌细胞凋亡。但是,由于化学药物本身具有一定毒性,它除能够诱导癌细胞凋亡外,对机体正常细胞和组织也能带来严重损害。因而,尚未在临床广泛应用。国外也有用蟾毒灵诱导 HL-60 细胞凋亡的研究报告。但我们认为,蟾蜍毒素对人体可能带来严重的不良反应,因而缺乏临床推广运用的可行性。国内有以丹参酮体外诱导 HL-60 细胞凋亡的研究文献,但尚未推广应用于临床。中医药用于治疗白血病已有上千年历史,临床实践证明,中药能够增加化学药物杀伤癌细胞的敏感性,也能够减低化学药物的毒副作用。除此以外,近些年临床与实验研究还表明,单味中药或中药复方还有抗癌细胞多药耐药与诱导癌细胞凋亡作用。基于上述,中医药治疗白血病/肿瘤的临床与实验研究已经受到了国内外学者的高度重视。开展单味中药或中药复方诱导癌细胞凋亡研究将会成为临床最有广泛前景的应用基础性研究课题。

益髓灵用于治疗骨髓增生异常综合征等恶性血液病已经获得了较好临床疗效,其初提物有诱导 HI-Meg 细胞分化与凋亡的生物活性。为了进一步拓宽研究内容,观察益髓灵能否有诱导癌细胞凋亡效应,1996 年初至 1997 年底,我们开展了益髓灵氯仿提取物以及

含该提取物的兔血清、肝匀浆体外诱导 HL-60 细胞凋亡研究。初步的研究结果表明,HL-60 细胞在体外孵育过程中,能够被益髓灵氯仿提取物以及含该提取物的兔血清、肝匀浆诱导凋亡。其中,含氯仿提取物的兔肝匀浆诱导 HL-60 细胞凋亡效应与阳性对照药足叶乙甙类似。初步研究结果为深入开展益髓灵诱导癌细胞凋亡研究奠定了良好基础,也为该药配合化学药物治疗癌症提供了实验研究依据。根据以上初步预实验研究基础,目前正在或即将进行的研究工作有:(1)益髓灵氯仿提取物以及含该提取物的兔血清、肝匀浆诱导 HL-60 细胞凋亡量效、时效关系;(2)采用 DNA 电泳、激光共聚焦扫描显微镜、分子生物学等技术与方法研究益髓灵氯仿提取物以及含该提取物的兔血清、肝匀浆诱导 HL-60 细胞凋亡机理;(3)益髓灵不同溶剂提取物与含有不同溶剂提取物的兔血清、脏器匀浆诱导患者白血病细胞凋亡效应及其机理研究。

4 参考文献

- 1 陈信义,孙颖立,乐兆升,等.益气养阴活血法治疗骨髓增生异常综合征.中医杂志,1991,(32)4:28.
- 2 胡凯文,陈信义,孙颖立,等.益气养阴活血法治疗骨髓增生异常综合征临床研究.北京中医药大学学报,1994,(17)2:38.
- 3 胡凯文,陈信义,孙颖立,等.YSL 对 AMMS/5 小鼠粒系造血影响的实验研究.中药药理与临床,1993,特刊,66.
- 4 陈信义,苏伟,孙颖立,等.益髓灵对 MDS 患者血淋巴细胞周期影响的初步研究.中国中医基础理论杂志,1995,创刊(1):47.
- 5 陈信义,苏伟,孙颖立,等.流式细胞仪分析益髓灵对 MDS 患者 T 细胞亚群的影响.中国中医基础理论杂志,1995,1(3):32.
- 6 陈信义,张洪钧.益髓灵及其拆方对巨核系病态造血细胞影响的研究.北京中医药大学学报,1995,(18)5:34.
- 7 张洪钧,陈信义,宋玉华,等.益髓灵对人类白血病巨核细胞基因表达影响的研究.中国中医基础理论杂志,1996,(1)1:43.
- 8 张洪钧,宋玉华,孙颖立,等.益髓灵对白血病巨核细胞系 HI-Meg 增殖与分化影响的研究.中国组织化学与细胞化学杂志,1996,(5)4:483.
- 9 肖崇厚,陆蕴如.中药化学.上海:上海科技出版社,1987:438.
- 10 Keer JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. Br J Cancer, 1972,26:239.

注:本文系国家自然科学基金课题部分内容(批准号:3947863)

ABSTRACTS FROM ORIGINAL ARTICLES

One—hundred and Thirteen Cases of Unstable Angina Pectoris (Blood Stasis Syndrome) Treated with Shen—yuan—dan Decoction

Liu Hongxu, Jin Mei, Wang Zhenyu, et al.

This therapy, with a total effective rate of 90%, was satisfactory for all syndromes and various kinds of UA. Those cases with plasmal NO and t—PA lower than normal recovered to certain extent after the treatment. But there was no effect on plasmal ET after treatment, indicating that the mechanism of Shen—yuan—dan may be partially due to the repair of vessel endothelium, lowering of vessel tension, decrease of unstable thrombus through the regulation of plasma NO, t—PA level, hence, the improvement of coronary blood supply.

Authors' address: Beijing Hospital of TCM, Beijing 100010

Key words: Angina pectoris, unstable/TCM therapy
(Original article on page 219)

Long—term Observation on the Delay of Exacerbation of Chronic Renal Failure by Fuzhengjiangzhuo Decoction

Wang Jinxue, Li Xinyong, Wu Dahong

Long—term observation for 3—57 months revealed that Fuzhengjiangzhuo Decoction can effectively delay the developmental process of CRF, with a significant difference of 1/Scr and therapeutic process (month) linear regression oblique rate *b* before and after the treatment. It decreased 46.15% of the rate of threatening of terminal renal failure within 3 years, and markedly improved the nutritional condition at the same time, marked increase of albumin, proper A/G ratio, decrease of triglyceride, marked increase of high density lipoprotein and marked decrease of blood phosphorus, indicating that the important approach of the decoction may lie on its useful regulation on the metabolism of protein, lipids and calcium—phosphorus.

Authors' address: Badachu Hospital, Beijing Labour Union, Beijing 100041

Key words: Renal failure, chronic/TCM therapy @ Fuzhengjiangzhuo Decoction
(Original article on page 222)

Hypertensive Cor Pulmonale Treated with Lipidium Co. Injection

Jing Hua, Xiong Xudong

In 54 cases of pulmonary hypertension, the PaCO₂ was markedly lowered, PaO₂ and SaO₂ elevated, HR, CO and mPAP, PVR all lowered in the treatment group ($P < 0.05$). When compared with the group treated by western drugs, there was no difference in mPAP, PVR ($P > 0.05$), but SBP was significantly different ($P < 0.05$). Clinically, the Lipidium Co. Injection yielded the actions of lowering mPAP, improving arterial gas analysis, with no effect on general circulation. Patients' signs, symptoms, were all improved after 1 month treatment, with an effective rate of 89.29% for the TCM group.

Authors' address: No. 455 Hospital, PLA, Shanghai 200052

Key words: Cor pulmonale/TCM therapy
(Original article on page 225)

Preliminary Study on HL—60 Cellular Wither Induced by Chloroform Extract of Yisuiling

Chen Xinyi, Shao Debin, Zhao Liye, et al.

The experiment was conducted on the actions of 5 kinds of reagents on HL—60 cellular wither, viz. Yisuiling chloroform extract, rabbit serum chloroform extract, rabbit liver paste chloroform extract, Etoposide, and normal rabbit serum. Results revealed that after fluid incubation for a short period, the HL—60 cultured cells showed no wither in the former 4 groups under microscope and flowing cytometer. Among them, action was strongest in rabbit liver paste of Yisuiling extract group, similar to the positive control of Etoposide. Followed by rabbit serum, and the action was weak in Yisuiling chloroform extract. There was no obvious action of induced wither by normal rabbit serum. The mechanism of induced wither is still under investigation.

Authors' address: Dongzhimen Hospital, Beijing University of TCM, Beijing 100700

Key words: Yisuiling cell culture cell wither dephagocytosis/drug action magakaryocyte/drug action @ Yisuiling chloroform extract
(Original article on page 235)