

用、操作简单、费用低廉等特点。

总之,中医药治疗 AIDS 的关键是思路要符合实际,选准切入点,科学设计,联合攻关,严密实施,进行长期的、大样本的临床观察与实验研究。中医药在防治 AIDS 方面已初步显示出良好前景,相信通过中医药界同仁的共同努力,必将有所突破。

参考文献

- 1 Birmingham K. UN acknowledges HIV/AIDS as a threat to world peace. Nat Med, 2000, 6(2):117.
- 2 中华人民共和国卫生部,中国艾滋病防治联合评估报告,2003:12.
- 3 中华人民共和国卫生部,中国艾滋病防治联合评估报告,2004:4.
- 4 Young B, Kuritzkes DR. Viral kinetics: implications for treatment.

AIDS, 1999, 13(Suppl 1):11~17.

- 5 严有望. HIV 疫苗的研制及面临的科学挑战. 国外医学预防、诊断、治疗用生物制品分册, 2002, 25(6):251.
- 6 蔡卫平. AIDS 可能会不可怕. 中国处方药, 2002, 7(1):15~16.
- 7 罗士德, 来国防, 曹建新, 等. 中药治疗艾滋病的特色. 中国中西医结合杂志, 2002, 22(10):727.
- 8 蒋岩. 中医治疗艾滋病的途径——实验和临床研究结合促进中医的发展. 中国中西医结合杂志, 2002, 22(10):728.
- 9 关崇芬. 中医药治疗艾滋病的研究途径. 中国中西医结合杂志, 2002, 22(10):727.
- 10 王健, 许建阳. 中医药治疗艾滋病的现状及前景. 武警医学, 2003, 14(10):582~584.
- 11 周建伟. 针灸防治艾滋病的国内外研究进展. 中国针灸, 1996, 9:54~56.

中华眼镜蛇毒诱导人类小涎腺腺样囊性癌细胞凋亡报告

刘成军¹ 韦世秀² 李壮艳² 吴 华²

我们尝试应用近年发展起来的对恶性实体肿瘤有较高可评估率的新方法三磷酸腺苷—生物荧光肿瘤化疗药物敏感试验法(ATP-TCA法),测定眼镜蛇毒对人类小涎腺腺样囊性癌(NACC)细胞株的抑制作用,测定眼镜蛇毒与癌细胞存活的量效和时效关系,应用HE染色观察眼镜蛇毒作用NACC细胞后其细胞形态学的改变,以及流式细胞术检测眼镜蛇毒作用后的NACC细胞凋亡等方面的实验,为眼镜蛇毒的抗肿瘤临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

仪器:微孔板式自发光分析仪、水套式CO₂培养箱、流式细胞仪、倒置相差显微镜、病理图象分析仪。药品及试剂:中华眼镜蛇毒冻干粉。ATP试剂盒包括:完全分析培养基(CAM)、ATP提取液、荧光素—荧光酶、稀释缓冲液、ATP标准品、96孔检测板、针管、过滤器、过滤膜等;胎牛血清、青霉素、链霉素、RPMI1640培养基。细胞株:NACC细胞株。

1.2 方法

1.2.1 NACC细胞的培养:将NACC细胞按常规方法培养于含10%胎牛血清,青霉素100U/ml和链霉素100μg/ml的RPMI1640培养基中,于37℃、5%CO₂的培养箱中培养。取对数生长期NACC细胞用0.125%胰酶消化后收集细胞悬液,细胞计数板计算细胞数,加入完全分析培养基(CAM)制成1×10⁵/ml细胞悬液。

1.2.2 ATP-TCA法测定NACC细胞增殖的抑制率:将眼镜蛇毒冻干粉,用CAM溶解,倍比稀释成100、50、25、12.5、6.25μg/ml的不同浓度蛇毒溶液,每种蛇毒浓度各取100μl分别置96孔板中,每个蛇毒浓度组设4个复孔作为试验组,并设未加蛇毒孔作为对照组。于各孔中加入1×10⁵/ml的细胞悬液100μl,置5%CO₂、37℃、饱和湿度培养箱中分别培养24小时、

48小时、72小时、96小时,然后向各孔中加入ATP提取液50μl,多次吸取混匀,避免产生气泡,室温下孵育5分钟。从各孔中吸取50μl培养液,置96孔检测板中,在每个检测孔中加入50μl荧光素—荧光素酶测试试剂,充分混匀,在微孔板式自发光分析仪上进行ATP荧光测定。根据含药孔的荧光值与无药孔的荧光值的比较,得出该浓度药物对肿瘤细胞的抑制值,作出蛇毒剂量—抑制曲线。

2 结果

2.1 眼镜蛇毒对NACC细胞的抑制作用:不同浓度的蛇毒对体外生长的NACC细胞有明显的抑制作用,且随着蛇毒浓度升高而增强。相关资料略。

用ATP-TCA法测定不同浓度的蛇毒在不同时间内对NACC细胞影响,结果表明,作用24、48、72、96小时后,所有受试浓度的蛇毒对NACC癌细胞生长均有抑制作用,与对照组比较,均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),相关资料略。

2.2 AnnexinV,PI染色检测眼镜蛇毒诱导NACC细胞凋亡分析:流式细胞仪分析,获得由4个象限组成的细胞直方图。第1象限代表细胞收集过程中出现的机械性损伤的细胞;第2象限代表死亡细胞;第3象限代表活细胞;第4象限代表凋亡细胞。对照组的NACC细胞凋亡率5.7%,经眼镜蛇毒溶液2.0μg/ml作用48小时后的NACC细胞凋亡率52.4%。

3 讨论

细胞凋亡是一种主动的、非炎症性的、能量依赖性的细胞死亡形式,许多肿瘤药物是通过诱导细胞凋亡而发挥作用的。本实验结果表明,通过倒置相差显微镜观察,中华眼镜蛇毒作用后的NACC细胞贴壁明显减少,细胞收缩,变小、变圆,有的细胞破碎,漂浮。HE染色可见明显的细胞内空泡和核溶解、核固缩等形态学改变。经流式细胞仪检测分析,中华眼镜蛇毒作用于培养的NACC细胞48小时后,肿瘤细胞凋亡率为52.4%。眼镜蛇毒中成分复杂,其活性成分均为各种蛋白质或多肽类物质,其中有多种对机体有剧毒的毒素如神经毒素、细胞毒素等,其对NACC凋亡作用尚待深入探讨。

1 广西壮族自治区江滨医院药剂科,南宁市河堤路72号

(530021) (C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2 广西医科大学医学科学实验中心

收稿日期:2006-04-19