

贵州产天冬总皂苷提取物 对人早幼粒白血病细胞株 HL-60 的影响

黄懿¹, 杜浩², 王季石¹, 刘洋³, 李艳菊^{1*}

(1. 贵阳医学院附属医院血液科, 贵阳 550004; 2. 河南科技大学第一附属医院骨科, 河南 洛阳 471003;
3. 北京工业大学生命科学与生物医学工程系, 北京 100022)

[摘要] **目的:**提取贵州产天冬中总皂苷(ASP)并研究其对人早幼粒白血病细胞株 HL-60 增殖和凋亡作用。**方法:**选取贵州产天冬为研究对象,提取其总皂苷成分;以不同浓度梯度的天冬总皂苷提取物作用于人早幼粒白血病细胞株 HL-60,采用 MTT 法检测细胞增殖情况,采用流式细胞术检测细胞凋亡率;应用实时定量(Real-time) PCR 检测各组 HL-60 细胞中 B 细胞淋巴瘤/白血病 2(Bcl-2) mRNA 的表达。**结果:**随着天冬总皂苷浓度的升高,其对 HL-60 细胞增殖的抑制作用明显增强,呈现剂量依赖趋势;与对照组相比,天冬总皂苷组使 HL-60 细胞凋亡率明显增加;并且能够使 HL-60 细胞内的 Bcl-2 mRNA 表达下降。**结论:**贵州产天冬总皂苷提取物下调 Bcl-2 mRNA 的表达、诱导人早幼粒白血病细胞株 HL-60 凋亡,可能是其治疗白血病的机制之一。

[关键词] 天冬; 人早幼粒白血病细胞; 生长抑制; 凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)02-0137-03

[doi] 10.11653/syfyj2014020137

Inhibitory Effect of Total Saponins in Guizhou's Asparagi Radix on the Human Promyelocytic Leukemia HL-60 Cells

HUANG Yi¹, DU Hao², WANG Ji-shi¹, LIU Yang³, LI Yan-ju^{1*}

(1. Department of Hematology, Guiyang Medical College's Affiliated Hospital, Guiyang 550004, China;

2. Department of Orthopedics, Henan University of Science and Technology's Affiliated Hospital,

Luoyang 471003, China; 3. Department of Life Science and Biomedical Engineering,

Beijing University of Technology, Beijing 100022, China)

[Abstract] **Objective:** To extract total saponins in Guizhou's Asparagi Radix (ASP) and observe the inhibitory effect of ASP on the HL-60 cells. **Method:** Effects of ASP on the cytoactive and apoptosis rate of HL-60 cells were investigated by MTT and flow cytometry. The expression of B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2 mRNA in HL-60 cells was detected by method of Real-time PCR. **Result:** ASP could dose-dependently inhibit the cytoactive of HL-60 cells and improve significantly the apoptosis rate of HL-60 cells; The expression of Bcl-2 mRNA in HL-60 cells decreased significantly compared with blank group. **Conclusion:** ASP can decrease the expression of Bcl-2 mRNA and make HL-60 cells apoptosis, which maybe one of mechanisms of treating the human promyelocytic leukemia.

[Key words] Asparagi Radix; human promyelocytic leukemia; proliferation inhibition; apoptosis

天冬为百合科植物天门冬 *Asparagus cochinchinensis* (Lour.) Merr. 的干燥块根^[1]。天冬

块根中的主要成分为天冬总皂苷(ASP),本课题组选择贵州产天冬中药为研究对象,前期研究发现天

[收稿日期] 20130302(002)

[基金项目] 贵州省科技计划基金(黔科合 SY[2010]3075);贵州省中医药管理局项目

[第一作者] 黄懿,学士,主治医师,从事中药抗肿瘤研究,Tel:0851-6774237, E-mail:huangyild@yahoo.com

[通讯作者] *李艳菊,博士,副主任医师,从事中药抗肿瘤研究,Tel:0851-6774237, E-mail:lyj8181@163.com

冬提取物天冬总皂苷成分具有清除氧自由基和抗脂质过氧化作用^[2],故本实验将进一步对天冬总皂苷体外抗人早幼粒白血病细胞株 HL-60 活性进行实验研究,旨在为贵州产天冬总皂苷提取物进行进一步的研究和开发奠定基础。

1 材料

1.1 仪器与试剂 MTT(美国 Sigma 公司);酶标仪(美国 Bio-Tek 公司);流式细胞仪(美国 COULTER 公司);Trizol 试剂、RT-PCR 试剂盒(大连宝生物公司);引物序列由 primer 3 设计,上海英俊公司合成;倒置相差荧光显微镜(德国 Lica 公司);实时定量 PCR 仪(美国通用生物有限公司)。

1.2 试药的提取^[2] 中药天冬 Asparag Riadix 购于贵州凤岗,经本院孙绍荣教授鉴定;精密称取 0.5 g 药材粉末,置索氏提取器内,加入 100 mL 氯仿脱脂 2 h,残渣挥去溶剂后,再加甲醇 100 mL 在 80 °C 回流提取至无色,溶液回收甲醇至干,加蒸馏水 10 mL 溶解,用水饱和的正丁醇萃取 4 次(15, 10, 10, 10 mL),合并正丁醇部分,用正丁醇饱和的水洗涤,减压回收至干。

2 方法

2.1 实验设计与分组 共分 7 组:①空白对照组;②治疗组:天冬总皂苷 5 mg·L⁻¹组(ASP1)、天冬总皂苷 10 mg·L⁻¹组(ASP2)、天冬总皂苷 20 mg·L⁻¹组(ASP3)、天冬总皂苷 40 mg·L⁻¹组(ASP4)、天冬总皂苷 80 mg·L⁻¹组(ASP5);③阳性对照组:以浓度为 1 × 10⁻⁵ mol·L⁻¹ 维甲酸(ATRA)作阳性对照。

2.2 测定细胞增殖 取对数生长期的生长状态良好 HL-60 细胞(2 × 10⁵ 个/mL)接种于 96 孔平板上,孵育 24 h,于含 1% FBS 的培养基中作用 12 h 使细胞同步化,然后加入含不同浓度药物的培养基各 100 μL,每一浓度设 6 个复孔,置培养箱内培养 48 h 后,小心吸去各孔内培养液,于每孔中加入 5 g·L⁻¹ 的 MTT 溶液 100 μL,置培养箱内培养 4 h,吸去上清液,每孔加二甲基亚砷,振荡 10 min,应用酶联免疫检测仪于 490 nm 波长处检测各孔吸光度,并计算其细胞生长抑制率。

细胞生长抑制率 = (1 - A 处理组 / A 对照组) × 100%

2.3 细胞周期的检测 取生长状态良好的细胞,以 1 × 10⁶ 个细胞/瓶接种于 25 cm² 无菌的培养瓶中,置 CO₂ 恒温箱中孵育 24 h,细胞同步化后,换不同终浓度的应用液,放入 CO₂ 孵箱中孵育 49 h,将各组细胞离心后,按试剂盒说明书染色,应用流式细胞仪进行细胞周期分析。

2.4 测定 Bcl-2 mRNA 表达 各组总 RNA 采用 Trizol 法提取,采用实时定量-逆转录聚合酶链反应 Real-time PCR 进行基因片段扩增并定量。Bcl-2 及内参基因(β-actin)引物如下:Bcl-2 上游引物为 5'-CCATGACTGAGGGACCAACT-3',下游引物为 5'-CT-GCGCTGTAAGCTTCCTCT-3';B-ACTIN 上游引物为 5'-GTAGCCATCCAGGCTGTGT-3',下游引物为 5'-ACCCTCATAGATGGGCACAG-3'。反应条件:① Real-time PCR:95 °C, 5 s, 59 °C, 20 s, 72 °C, 20 s, 40 cycles。② Melt curve: 95 °C, 5 s, 65 °C, 5 s, 60 cycles。PCR 反应各管所加模板 RNA 的量约为 1 μg。最终通过 Real-time PCR 仪记录的 Ct 值而对起始模板相对定量。

2.5 统计学方法 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 13.0 软件进行组间 t 检验, P < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 测定细胞增殖 实验结果显示,在体外天冬总皂苷在 5 ~ 80 mg·L⁻¹ 均对 HL-60 细胞存活和增殖有一定的抑制作用,而且呈明显的剂量依赖关系,在药物浓度最高(80 mg·L⁻¹) 时抑制作用最强,见表 1。

表 1 不同浓度的天冬总皂苷作用 HL-60 对细胞增殖和凋亡的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$) %

组别	质量浓度 / mg·L ⁻¹	抑制率	凋亡率
空白对照	-	0.08 ± 0.04	0.78 ± 0.14
维甲酸 ³⁾	1 × 10 ⁻⁵	0.47 ± 0.07 ¹⁾	28.11 ± 1.16 ¹⁾
ASP	5	0.25 ± 0.03 ¹⁾	10.02 ± 0.37 ¹⁾
	10	0.31 ± 0.06 ¹⁾	20.35 ± 0.19 ¹⁾
	20	0.45 ± 0.09 ¹⁾	27.61 ± 1.76 ¹⁾
	40	0.52 ± 0.07 ^{1,2)}	33.15 ± 2.13 ^{1,2)}
	80	0.62 ± 0.07 ^{1,2)}	40.15 ± 1.37 ^{1,2)}

注:与空白对照组比较¹⁾ P < 0.05;与维甲酸组比较²⁾ P < 0.05;³⁾ 维甲酸的浓度单位为“mol·L⁻¹”(表 2 同)。

3.2 对 HL-60 细胞凋亡率的影响 天冬总皂苷作用 48 h 后,经 PI 染液染色,流式细胞术测定 DNA 含量并分析细胞周期,用 BD 公司 CELLQUEST 软件分析,结果表明不同浓度的天冬总皂苷作用后,细胞凋亡率明显增加,而且这种诱导作用呈剂量依赖关系,见表 1。

3.3 对 Bcl-2 mRNA 表达的影响 检测各组细胞中 Bcl-2 mRNA 表达的变化,实验发现:与对照组相比,天冬总皂苷治疗组能够下调 Bcl-2 mRNA 的表达,并呈现剂量依赖趋势见表 2。

表2 天冬总皂苷对 HL-60 细胞 Bcl-2 mRNA 相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	Bcl-2/ β -actin
空白对照	-	134.16 \pm 8.13
维甲酸 ³⁾	1×10^{-5}	76.01 \pm 6.12 ¹⁾
ASP	5	93.12 \pm 6.36 ¹⁾
	10	81.36 \pm 7.83 ¹⁾
	20	66.46 \pm 3.36 ¹⁾
	40	45.25 \pm 3.15 ^{1,2)}
	80	32.67 \pm 2.56 ^{1,2)}

4 讨论

白血病是造血系统的恶性疾病之一,是由于造血干细胞分化异常,血液或骨髓内白细胞及其幼稚细胞(即白血病细胞)不正常地过度增生造成的。目前白血病的主要治疗方法为化疗药物,但化疗药物在治疗白血病细胞同时,对正常的造血干细胞产生抑制问题有待于进一步解决,目前发现中药及天然药物不仅具有抑制白血病细胞增殖的作用,而且副作用小,能够减少对正常造血抑制的副作用^[3]。因此,从中药及天然药物中提取其有效制剂,已经成为治疗白血病的另一个重要途径。其中,急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)是急性髓细胞白血病(AML)的一种特殊类型,被FAB协作组定为急性髓细胞白血病M3型。由于该病具有高出血倾向,严重者可出现弥漫性血管内凝血(DIC),早期病死率高,故受到临床工作者的高度重视。

目前三氧化二砷对于急性髓性白血病的治疗效果已经得到确认,三氧化二砷作为临床治疗急性早幼粒白血病药物,然而三氧化二砷剂量过高时,其产生的氧自由基虽然能够诱导癌细胞凋亡,但同时具有很强的细胞毒作用,可引起癌细胞坏死、引发炎症反应,还可能对正常的造血干细胞产生细胞毒作用致细胞坏死,延长骨髓抑制期,从而限制了三氧化二砷的临床治疗。在体外实验中发现抗氧化剂能够具有促进三氧化二砷诱导血液系统恶性肿瘤细胞的凋亡作用,并且能够在诱导细胞凋亡的同时减小其细胞毒作用,从而为三氧化二砷更好的应用于临床提供一种思路。

遵义凤冈县是全国生产天门冬的主要基地。近年来研究发现天门冬具有抗辐射、抗肿瘤、抗衰老等作用^[5-8],本室近期的研究发现,贵州产天冬中天冬总皂苷提取物在体外对 O_2^- 具有清除作用($P < 0.01$),其对 O_2^- 清除率及 O_2^- 的抑制率与天冬总皂苷含量成正相关;其对 $\cdot\text{OH}$ 也有一定的清除作用,

清除率为 $(29.1 \pm 0.17)\%$ ($P < 0.05$)^[2]。

Bcl-2 家族成员是细胞凋亡过程中起重要调控作用的一类蛋白质^[8]。根据它们在细胞凋亡中的具体调节作用分为两类。一类是抗凋亡蛋白,主要包括 Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w 等,另外一类是促凋亡蛋白,包括 Bax, Bak, Bid, Bad 等。当细胞受到死亡信号刺激后,促凋亡蛋白被活化,发生构象变化,从胞液中转到细胞器的膜上,尤其是线粒体外膜上,并与膜上和膜内的抗凋亡蛋白发生相互作用,使抗凋亡蛋白丧失对细胞凋亡的抑制活性或通过和线粒体膜通透孔的组分相互作用,引起细胞器功能丧失和各种促凋亡因子的释放,最终导致细胞凋亡^[9]。

本实验以人早幼粒白血病细胞株 HL-60 为研究对象,通过 MTT 实验、细胞凋亡率及凋亡相关基因 Bcl-2 表达的检测,发现:贵州产天冬中天冬总皂苷提取物能够下调 HL-60 白血病细胞 Bcl-2 mRNA 的表达、诱导 HL-60 白血病细胞株凋亡,进而为贵州产中药治疗白血病提供一定的实验依据,为其后期的研究与开发奠定基础。

[参考文献]

- [1] 中华人民共和国国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:化学工业出版社,2005,37.
- [2] 李艳菊,丁文,李琴山,等. 贵州产天冬中总皂苷的提取及其氧自由基清除能力的研究[J]. 医药导报, 2012,31(5):91.
- [3] 李冬云,于婷婷,白桦,等. 复方浙贝颗粒减轻难治性白血病化疗后骨髓抑制的临床研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(20):3155.
- [4] 李琴山,李艳菊,刘洋. 天门冬对慢性辐射损伤大鼠肾脏保护基因表达的影响[J]. 中华预防医学杂志, 2011,45(2):184.
- [5] 李琴山,李艳菊,刘洋. 天门冬对慢性辐射损伤大鼠心脏的保护作用及其机制[J]. 中华中医药杂志, 2011,26(2):375.
- [6] 李艳菊,杜浩,李琴山,等. 贵州产天冬醇提液体外氧自由基清除作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012,18(15):182.
- [7] 李艳菊,丁文,刘洋. 天冬总皂苷对衰老大鼠心脏 P16 基因表达的影响[J]. 重庆医科大学学报,2012,37(6):511.
- [8] Eva Szegezdi, David C. MacDonald, Triona Ní Chonghaile, et al. Bcl-2 family on guard at the ER. Am J Physiol Cell Physiol, 2009,296:C941.
- [9] Adams J M, Cory S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential[J]. Curr Opin Immunol, 2007,19:488.

[责任编辑 聂淑琴]