

威灵仙总皂苷对 HL60 细胞株体外作用的研究

黄莉, 黄纯兰*

(四川省泸州医学院附属医院血液内科, 四川 泸州 646000)

[摘要] 目的:提取威灵仙总皂苷(TSRC),体外作用于急性早幼粒细胞白血病 HL60 细胞,研究 TSRC 对 HL60 细胞的作用机制。方法:将 25~400 mg·L⁻¹的 TSRC 在体外与 HL60 细胞共同培养,WST-1 法检测 TSRC 对 HL60 细胞的增殖抑制作用;采用细胞形态学、透射电镜观察细胞、AnnexinV/PI 双染色研究 TSRC 诱导 HL60 细胞凋亡作用;采用 Wright's-Giemsa 染色细胞形态学观察、硝基蓝四氮唑(NBT)还原试验、细胞免疫表型 CD11b 检测等方法研究 TSRC 诱导 HL60 细胞分化作用。结果:50~400 mg·L⁻¹TSRC 在体外对 HL60 细胞增殖有明显抑制作用,呈现剂量和时间的量效关系;不同浓度 TSRC 作用 24 h 后均能显著促进 HL60 细胞凋亡;但具有统计学意义的诱导分化现象不明显。结论:TSRC 在体外可有效抑制 HL60 细胞增殖,并诱导 HL60 细胞凋亡,但对 HL60 细胞无明显的诱导分化作用。

[关键词] 威灵仙总皂苷;急性早幼粒细胞白血病;HL60 细胞;增殖;细胞分化;细胞凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)23-0311-05

Effect of Total Saponin from Radix Clematidis on Acute Promyelocytic Leukemia HL60 Cell Line *in vitro*

HUANG Li, HUANG Chun-lan*

(Department of Hematology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China)

[收稿日期] 20120617(001)

[基金项目] 四川省卫生厅基金项目(070266);泸州市科技局基金项目(2007279)

[第一作者] 黄莉,硕士,主治医师,Tel:13518389152,E-mail:yellowjasmin@126.com

[通讯作者] *黄纯兰,副教授,博士,硕士研究生导师,从事白血病的发病机制与治疗的研究,Tel:13518389152,E-mail:huangcll880@163.com

- [2] 张蕾,刘剑刚,史大卓,等. 丹参红花有效部位配伍对大鼠心肌缺血/再灌注损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2009, 15(6):37.
- [3] Walkowicz W, Gasior Z, Dabek J. The impact of prior revascularization procedures on outcome of percutaneous coronary intervention in ACS[J]. Pol Merkur Lekarski, 2011,30(175):10.
- [4] 黄斌,王辉,陈江涛. 五参顺脉胶囊对急性心肌梗死介入治疗后左室功能和 QT 间期离散度的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011, 17(1):183.
- [5] 李祖纯,夏祯芸. 丹参酮 II_A 磺酸钠注射液对急性心肌梗死再灌注治疗后左心功能的影响[J]. 中国医药导报, 2006,24(3):88.
- [6] Vassiliou V. Double-dose clopidogrel in patients undergoing PCI for ACS [J]. Lancet, 2011, 377(9762):29.
- [7] 张俊彪. 中西医结合治疗急性冠脉综合征[J]. 中国实验方剂学杂志,2012, 18(2):152.
- [8] Agewall S, Badimon L, Drouet L, et al. Oral antiplatelet agents in ACS: from pharmacology to clinical differences [J]. Fundam Clin Pharmacol, 2011, 25(5):564.
- [9] 贺运河,陈镜合. 中药抗心肌缺血再灌注损伤作用的机制研究现状[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2004,16(3):165.
- [10] 申建权,刘盛冬,雷长国. 速效救心丸治疗急性冠脉综合征疗效及安全性分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2011, 17(11):57.
- [11] 张淑娟,王振涛,韩丽华. 川芎嗪注射液对梗后大鼠缺血心肌血管新生及 VEGF-mRNA 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011, 17(7):170.
- [12] 芦殿香,吴海英,芦殿荣,等. 心肌缺血再灌注中的棘手问题及对策[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12):48.

[责任编辑 邹晓翠]

[Abstract] Objective: To study the effect of total Saponin of Radix Clematidis (TSRC) on HL60 leukemia cell *in vitro*. **Method:** *In vitro*, HL60 cells were incubated with 25-400 mg · L⁻¹ TSRC, the proliferation inhibition rate of HL60 was tested by WST-1. Cell morphology, transmission electron microscope (TEM) and Annexin-V/PI were used to investigate the apoptosis of HL60 cells. The differentiations of HL60 was analyzed by morphology of Giemsa stain, nitroblue tetrazdium (NBT) reduced method. The expressions of CD11b and CD33 induced by these drugs were measured by flow cytometry (FCM) at different time. **Result:** As compared with blank control group, Different concentrations from 50-400 mg · L⁻¹ TSRC could obviously inhibit the growth of HL60 cells with time and dose dependence; While no statistical significance in the differentiation phenomenon was observed. **Conclusion:** *In vitro*, HL60 cell' s proliferation inhibition and apoptosis could obviously induced by TSRC. But HL60 cells could not be induced differentiation by TSRC.

[Key words] total saponin of Radix Clematidis (TSRC); acute promyelocytic leukemia (APL); HL60 cell; proliferation; differentiation; apoptosis

威灵仙 *Clematis chinensis* Osbeck. 属毛茛科植物的干燥根及根茎^[1],在我国来源广泛。传统用于祛风除湿、通络止痛、骨鲠咽喉。近年来研究发现威灵仙中的有效成分三萜皂苷具有免疫抑制及抗肿瘤作用^[2-4],但目前国内外对威灵仙的抗白血病作用报道较少,研究尚处于早期阶段^[5]。本课题组成员根据文献用大孔树脂分离纯化技术从威灵仙中提取分离有效部位威灵仙总皂苷(TSRC)^[6-8]。以人早幼粒白血病细胞株 HL60 细胞为靶细胞,观察 TSRC 对 HL60 细胞的体外作用机制,以期为今后进一步研究威灵仙在血液系统恶性肿瘤临床治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料 威灵仙总皂苷(TSRC)由我院药学院参照文献提取^[6-8],系棕色粉末状结晶,储存液(16 g · L⁻¹)用无血清 RPMI 1640(Gibco 公司)溶解,应用液用含 10% 小牛血清的 RPMI 配制;WST-1 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(江苏碧云天生物技术研究);亚砷酸(黑龙江哈尔滨医药药业有限公司,规格 10 mg/支);佛波醇酯(TPA)、硝基蓝四氮唑(NBT)、全反式维甲酸(ATRA)干粉为美国 Sigma 产品;CD11b 和 CD33 购自 BD 公司。Annexin V-FITC 和碘化丙啶(PI)购自凯基生物科技发展有限公司。FASCAria 型流式细胞仪:BD 公司,酶标仪(Bio-Tek 公司,HEPA Class100 型 CO₂ 电热恒温培养箱:(Thermo Fisher 公司),H600 型透射电子显微镜:(日立公司),生物安全柜:Thermo Fisher 公司,DP70 型倒置相差荧光显微镜(Olympus 公司),UV-2100 型紫外分光光度计(北京瑞利)。

1.2 细胞培养 HL60 细胞株由四川大学华西医院干细胞生物研究室馈赠。将 HL60 细胞接种于含体积分数为 10% 小牛血清、青霉素 100 U · mL⁻¹ 及链霉

素 100 μg · L⁻¹ 的 RPMI 1640 培养液中,置于 37 °C 饱和湿度,5% CO₂ 的孵箱中悬浮培养。取对数生长期,台盼蓝染色拒染率在 95% 以上的细胞进行实验。

1.3 细胞增殖率 将细胞密度调整为 1 × 10⁴ 个/mL 的细胞悬液并接种于 96 孔板,每孔加细胞悬液 100 μL,共设 7 个实验组(每组 5 个平行孔,并重复实验 3 次),以未加药物组为空白对照组,终浓度 1.0 μmol · L⁻¹ 亚砷酸为阳性对照组,终质量浓度 25, 50, 100, 200, 400 mg · L⁻¹ TSRC 为实验组。分别培养 24, 48, 72 h。每孔加入 10 μL WST-1,继续在细胞培养箱孵育 2 h。将 96 孔板置于摇床上摇 1 min,以充分均匀待检测体系。用酶标仪在 450 nm 测定吸光度(A)并计算抑制率。

$$\text{细胞增殖抑制率} = \left(1 - \frac{A_{\text{实验组}}}{A_{\text{对照组}}}\right) \times 100\%$$

1.4 光镜及电镜形态学检测 隔日取各浓度组细胞,先用 Wright's-Giemsa 染色在光镜下进行细胞形态学观察,离心涂片瑞氏染色后油镜下观察 200 个细胞形态变化并计算细胞诱导分化率。然后收集 d4 各实验组的细胞,离心,PBS 洗涤,戊二醛固定,按常规制备超薄切片,在透射电镜下观察细胞核、染色质等的变化并照相。

$$\text{诱导分化率} = (200 - \text{早幼粒细胞}) / 200 \times 100\%$$

1.5 凋亡细胞的 Annexin V · PI 标记染色测定 取经 TSRC 作用后的细胞,离心弃上清加入 Binding Buffer 结合缓冲液重悬细胞,依次避光加入 Annexin V-FITC 4 μL, PI 染色液 5 μL 混匀,室温下避光孵育 15 min,用流式细胞仪检测。

1.6 硝基蓝四氮唑(NBT)还原实验 取各实验组细胞悬液 500 μL,与 1 g · L⁻¹ 的 NBT 溶液混合,加入 200 mg · L⁻¹ 佛波醇酯溶液(TPA) 100 μL,37 °C 孵育

30 min 后离心涂片,光镜下见胞浆内含蓝黑色颗粒的为阳性细胞。计数 200 个细胞,得出 NBT 阳性细胞的百分率。实验重复 3 次。

1.7 流式细胞仪器对细胞分化表面抗原 CD11b 和 CD33 的检测 取经 TSRC 作用后的细胞,用 CD11b 和 CD33 单抗对各组细胞进行免疫标记,用流式细胞仪检测细胞表面抗原表达(平均荧光强度)。

1.8 统计学方法 采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用应用方差分析,率的比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 威灵仙总皂苷对 HL60 细胞生长的影响 不同浓度 TSRC 对 HL60 细胞均有明显的增殖抑制作用,随着剂量增加和作用时间延长,细胞增殖抑制率增加,呈现量效关系。400 mg·L⁻¹ 组作用 72 h 后的受抑率在各组中最高,与阳性对照亚砷酸没有显著性差异。见表 1,图 1。

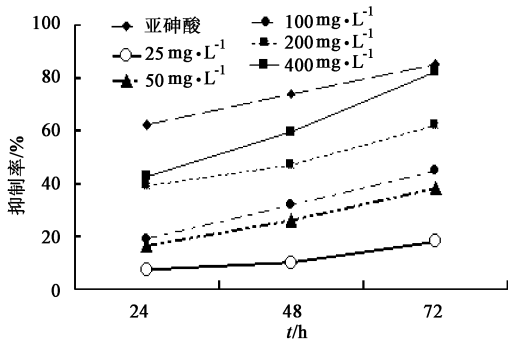


图 1 不同浓度 TSRC 及亚砷酸对 HL60 细胞生长的影响($\bar{x} \pm s$)

2.2 威灵仙总皂苷对 HL60 细胞诱导凋亡作用观察

2.2.1 细胞形态学观察 HL60 细胞经 25 ~ 400 mg·L⁻¹ TSRC 作用后,Wright's-Giemsa 染色光镜下观察,细胞散开,体积缩小,出现胞膜皱缩、胞浆呈泡沫感、

染色质凝聚并边集,核仁消失等凋亡形态。随浓度增高,时间延长,该现象越明显。见图 2。

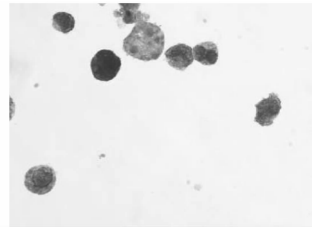


图 2 TSRC200 mg·L⁻¹ 处理 HL60 细胞 72 h 后出现的细胞核固缩、核边聚、核碎裂(Wright's-Giemsa 染色, ×1 000)

2.2.2 透射电镜 经 25 ~ 400 mg·L⁻¹ TSRC 作用后,在透射电镜下 HL60 细胞在细胞膜及核膜均完整的情况下胞浆中出现大量大小不一的圆滴状空泡,胞膜皱缩、染色质凝聚边集,核仁消失。连续培养 5 d,随药物浓度增加和培养时间的延长, > 50 mg·L⁻¹ 以上各组均可见较显著的核碎裂及凋亡小体形成。见图 3。

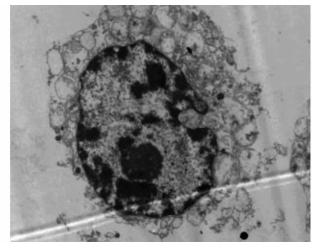


图 3 200 mg·L⁻¹ TSRC 处理 HL60 细胞 72 h 后细胞凋亡(电镜下图像 ×1 000)

2.2.3 凋亡细胞的 Annexin V/PI 双标记测定 细胞浆膜不对称性丧失导致磷脂酰丝氨酸(PS)外翻是细胞凋亡的早期过程,Annexin V 可与 PS 特异性强烈结合,被用来检测早期细胞凋亡。Annexin V/PI 检测发现,随 TSRC 浓度加大或者时间延长,凋亡细胞逐渐增加。见表 2。

表 1 不同时间不同质量浓度 TSRC 及亚砷酸作用 HL60 的抑制率($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	作用时间/h			抑制率/%		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
空白对照	-	0.41 ± 0.008	0.51 ± 0.018	0.59 ± 0.043			
亚砷酸 ³⁾	-	0.11 ± 0.004 ²⁾	0.09 ± 0.011 ²⁾	0.05 ± 0.024 ²⁾	62.3	73.9	85.1
TSRC	25	0.35 ± 0.023	0.40 ± 0.004	0.45 ± 0.029	7.6	10.3	18.2
	50	0.28 ± 0.015	0.34 ± 0.016	0.39 ± 0.027 ¹⁾	16.6	26.2	38.3
	100	0.24 ± 0.006 ¹⁾	0.28 ± 0.016 ¹⁾	0.21 ± 0.031 ¹⁾	19.3	31.9	44.9
	200	0.23 ± 0.002 ¹⁾	0.25 ± 0.004 ¹⁾	0.16 ± 0.027 ¹⁾	39.2	47.1	62.0
	400	0.21 ± 0.015 ¹⁾	0.19 ± 0.007 ¹⁾	0.07 ± 0.012 ²⁾	42.7	59.6	82.3

注:与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ 亚砷酸质量浓度为 1 μmol·L⁻¹ (表 2 同)。

表 2 TSRC 和亚砷酸对 HL60 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	凋亡率/%		
		24 h	48 h	72 h
空白对照	-	1.13 ± 0.22	2.26 ± 0.17	2.89 ± 0.42
亚砷酸 ³⁾	-	29.43 ± 4.65 ²⁾	34.85 ± 2.88 ²⁾	46.80 ± 1.21 ²⁾
TSRC	25	2.71 ± 0.75	7.99 ± 0.35 ¹⁾	11.23 ± 0.21 ¹⁾
	50	8.64 ± 1.23 ¹⁾	15.8 ± 0.93 ¹⁾	18.90 ± 1.18 ¹⁾
	100	13.10 ± 2.53 ¹⁾	14.40 ± 1.29 ¹⁾	20.80 ± 2.10 ¹⁾
	200	12.46 ± 2.11 ¹⁾	26.83 ± 2.41 ¹⁾	41.24 ± 0.74 ²⁾
	400	15.77 ± 1.98 ¹⁾	32.50 ± 4.47 ²⁾	42.00 ± 2.48 ²⁾

2.3 威灵仙总皂苷对 HL60 细胞诱导分化作用观察

2.3.1 细胞形态学观察 与空白对照组相比, TSRC 组在整个实验中细胞体积及细胞核体积无明显改变,核疏松,核浆比例无缩小,胞浆着色无变浅。

仅个别细胞核出现肾形或者杆核。而阳性对照组 1 μmol·L⁻¹ ATRA 组,细胞体积变小,胞浆增多,核缩小,核浆比例减少,细胞核由圆、椭圆转变为肾形、杆状、甚至出现分叶。

2.3.2 NBT 还原实验 TSRC 各浓度组作用于 NB4 细胞 5 d 后, NBT 还原法检测结果显示,各实验浓度组细胞内无或者仅有少量的蓝色颗粒,随浓度和时间的变化, NBT 阳性率无明显增加,与空白组无显著差异,明显低于阳性对照 ATRA 组 ($P < 0.01$)。见表 3。

2.3.3 细胞表面分化抗原 CD11b, CD33 的检测 1 μmol·L⁻¹ ATRA 作用 HL60 细胞后,可明显使 CD11b 表达 ($P < 0.01$),而 TSRC 诱导各浓度组 CD11b 表达的阳性率低,于空白对照组比较无显著差异。见表 4。

表 3 TSRC 和 ATRA 作用 96h 后对 HL60 细胞分化和形态的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

分组	质量浓度 /mg·L ⁻¹	细胞分类				诱导分化率
		早幼	中幼	晚幼	杆状及分叶	
空白对照	-	94.32 ± 2.05	3.39 ± 0.60	1.21 ± 0.78	1.06 ± 0.48	5.68 ± 2.05
ATRA ²⁾	-	44.00 ± 1.78 ¹⁾	12.33 ± 2.19 ¹⁾	20.01 ± 0.93 ¹⁾	23.65 ± 1.64 ¹⁾	56.00 ± 1.78 ¹⁾
TSRC	25	95.32 ± 2.05	1.89 ± 0.21	1.33 ± 0.80	1.46 ± 0.60	4.68 ± 2.05
	50	94.39 ± 1.31	1.04 ± 0.72	2.95 ± 0.26	1.61 ± 0.80	5.61 ± 1.31
	100	92.88 ± 3.09	2.15 ± 1.72	3.24 ± 0.25	1.73 ± 0.77	7.12 ± 3.09
	200	91.55 ± 4.50	4.82 ± 2.73	1.48 ± 0.57	2.15 ± 0.10	8.45 ± 4.50
	400	91.40 ± 5.66	4.83 ± 1.62	1.25 ± 0.61	2.51 ± 0.11	8.60 ± 5.66

注:与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ ATRA 浓度为 1 μmol·L⁻¹。

表 4 不同浓度 TSRC 作用于 HL60 细胞 72 h 后 NBT 还原率和 CD11b, CD33 表达情况 ($\bar{x} \pm s, n=3$) %

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	表达情况		
		CD11b	CD33	NBT
空白对照	-	5.2 ± 0.1	75.25 ± 1.42	6.81 ± 1.27
ATRA ²⁾	-	58.43 ± 2.83 ¹⁾	41.74 ± 1.82 ¹⁾	59.94 ± 1.99 ¹⁾
TSRC	25	5.31 ± 0.75	77.34 ± 9.79	6.88 ± 0.36
	50	8.64 ± 1.23	72.64 ± 8.28	7.13 ± 0.74
	100	7.10 ± 1.45	67.14 ± 6.23	8.34 ± 0.35
	200	8.46 ± 2.11	68.73 ± 7.93	9.57 ± 1.23
	400	9.77 ± 1.98	62.96 ± 4.02	6.61 ± 0.47

3 讨论

急性早幼粒细胞白血病 (APL) 是急性髓细胞白血病 (AML) 中的一个特殊亚型, 95% 以上的 APL 具有染色体 t(15;17) 易位, 并形成 PML-RAR α 融合基因, 并表达 PML-RAR α 融合蛋白, 此融合蛋白干扰 RAR α 信号传导, 使髓细胞分化停滞在早幼粒阶

段^[12]。目前, 国内外学者运用维甲酸和三氧化二砷治疗急性早幼粒细胞白血病虽取得了较大的进展, 但是, 维甲酸治疗综合征及耐药性, 砷剂的心脏、肝脏和肾脏等毒副作用, 以及短期内复发等现象均不容忽视。因此, 对耐药机制及逆转耐药的研究成为 APL 治疗领域的热点, 寻找对维甲酸耐药的 APL 的治疗药物仍有着重要意义。近年来, 新型的经济适用的中药诱导肿瘤细胞分化或凋亡的研究受到国内外广泛重视。研究发现中药中的有效成分皂苷可以通过诱导肿瘤细胞分化和凋亡而抑制肿瘤细胞的生长和增殖, 发挥抗肿瘤作用^[3-4, 9]。而在含有皂苷的中药中, 威灵仙在我国来源广泛, 其有效成分为三萜皂苷。目前已从威灵仙中检测到三萜皂苷类化合物已达 19 种, 统称威灵仙总皂苷 (clematoside)^[3]。文献报道, 威灵仙总皂苷对体外培养的艾氏腹水瘤 (EAC) 肉瘤腹水型 (S180A) 和肝癌腹水型 (Hep A) 细胞以及小鼠移植性肿瘤细胞等均具有明显的生长抑制作用^[10], 但威灵仙总皂苷对白血病细胞作用的

研究不多,仍处于研究的初始阶段。

本课题组从东北铁线莲中提取威灵仙总皂苷(TSRC),作用于人前髓细胞(早幼粒细胞株)HL60。笔者的研究发现,不同浓度的TSRC对HL60细胞有很好增殖抑制效力。其对HL60细胞的增殖抑制量效关系与我们课题组前期研究用TSRC干预NB4细胞的增殖抑制报道一致^[5],与文献报道亦相符合^[11]。利用瑞氏染色发现,HL60细胞与25~400 mg·L⁻¹TSRC共同培养后,细胞出现凋亡形态学改变,而在透射电镜下观察,质量浓度>50 mg·L⁻¹组更可见明显凋亡小体及凋亡细胞。虽然光镜和电镜下观察到的一系列形态变化是判断细胞凋亡直接的证据,但细胞形态改变不一定典型,单凭形态学判断不一定准确,只能作为细胞凋亡的初筛。目前最常用、最有效、最有说服力的定量检测细胞凋亡的技术是流式,常常将两者结合起来用于研究细胞凋亡。细胞凋亡时磷脂酰丝氨酸(PS)转移至细胞外表面,可与Annexin V特异性紧密结合,这一改变被认为是特异的,并且可作为凋亡细胞表面改变的标记,所以流式细胞仪可以精确的检测出凋亡细胞百分数;另外,被凋亡细胞在进入最终溶解阶段前,细胞通透性无明显改变,相对分子质量大的与DNA结合的荧光染料(如碘化丙啶,PI)不能进入细胞内,故Annexin V-FITC/PI双标检测可区别凋亡并排除细胞坏死。进一步做流式细胞术检测细胞表面Annexin V和PI标记的变化计算凋亡率后显示:与空白对照相比,TSRC 25~400 mg·L⁻¹各质量浓度组,均能诱导HL60细胞凋亡。且随着TSRC质量浓度增加、作用时间的延长,PS外翻率增加。提示TSRC能明显诱导HL60细胞凋亡。

HL60细胞可在多种分化诱导物的作用下分化为中性粒细胞或巨噬细胞,在诱导HL60细胞向正常细胞方向分化成熟过程中,糖代谢活跃,代谢产物大量释放氢,氢能将无色染料NBT还原沉淀于胞质内,呈蓝黑色颗粒,这种细胞即为NBT还原阳性细胞,是细胞分化成熟的重要标志。而随着细胞分化成熟为各期粒细胞以及成熟单核细胞,细胞表面分化抗原CD11b表达阳性率逐渐升高^[12],而早期粒细胞的标志CD33抗原会逐渐降低。但实验中TSRC各浓度组作用HL60细胞后,各浓度组细胞内无或者仅有少量的蓝色颗粒,且数量明显低于维甲酸诱导的阳性对照组,随着TSRC浓度的变化和时间的延长,细胞内蓝色颗粒数目亦没有明显增加,

各实验组诱导分化率均明显低于阳性对照组维甲酸组。提示随着TSRC作用浓度和时间的变化,NBT阳性率无明显增加。并且,瑞氏染色光镜下未见明显胞浆胞核成熟现象。流式细胞仪分析显示随浓度、时间改变,CD11b无表达增加,CD33表达无明显下降。由此提示TSRC对HL60细胞诱导分化作用不明显。

结果表明,一定浓度的威灵仙总皂苷在体外作用一定时间后能够明显抑制HL60细胞的增殖,引起增殖抑制的原因可能系促进HL60细胞发生凋亡,而非诱导HL60分化。当然,对于引起凋亡的机制还需进一步研究,以便更加深入地探讨威灵仙总皂苷对白血病的潜在治疗作用。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2000:204.
- [2] 李家实.中药鉴定学[M].上海:上海科学技术出版社,1996:73.
- [3] 赵燕强,杨立新,张宪民,等.威灵仙的成分、药理活性和临床应用的研究进展[J].中药材,2008,31(3):465.
- [4] 邱光清,张敏,杨燕军.威灵仙总皂苷的抗肿瘤作用[J].中药材,1999,22(7):351.
- [5] 周云,黄纯兰,李录克,等.威灵仙皂苷对急性早幼粒细胞白血病细胞株NB4细胞的凋亡诱导作用及其机制[J].肿瘤防治研究,2011,38(8):881.
- [6] 黄莉,黄纯兰,周云,等.威灵仙总皂苷的分离纯化[J].四川中医,2009,27(3):40.
- [7] 徐先祥,夏伦祝.大孔吸附树脂分离纯化威灵仙总皂苷的工艺研究[J].中药新药与临床药理,2006,17(1):57.
- [8] 潘激扬,倪健,尹兴斌.牛蒡子、威灵仙提取工艺优选[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(10):39.
- [9] 张昌浩,金光洙,郑艳.东北铁线莲对小鼠肿瘤的抑制作用[J].延边大学医学学报,2006,29(2):95.
- [10] 赵英,余春粉,张桂英,等.威灵仙总皂苷抗肿瘤作用及其对癌细胞增殖周期的影响[J].时珍国医国药,2010,21(8):1908.
- [11] Melnick A, Licht J. Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia [J]. Blood,1999,93:3167.
- [12] Dahl H L, Rosmarine A G, Teen D G, et al. Characterization of the Myeloid specific CD11b promoter [J]. Blood,1992,79:865.

[责任编辑 邹晓翠]