

清毒片对 HL-60 细胞尿激酶型 纤溶酶原激活剂活性的体外影响

王文花^{1*}, 杨洪涌², 刘安平², 陈鹏², 赵珍品²

(1. 温州医学院附属第二医院中医教研室, 浙江温州 325003;

2. 广州中医药大学附属第一医院血液科, 广东广州 510405)

[摘要] 目的: 观察中药清毒片对 HL-60 细胞尿激酶型纤溶酶原活化剂(α -PA)活性的影响。方法: 取离心灭菌后的清毒片药物水煎浓缩剂 2 mL, 以含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液逐步稀释为从 1:10 至 1:1 600 的 12 个稀释倍数, 分别培养等量细胞, 同时以阿糖胞苷作为实验的阳性对照, 以培养液作为阴性对照。用 MTT 法分别测定各浓度药液的细胞增殖抑制率, 取上清进行 α -PA 活性的 ELISA 检测。结果: 清毒片水煎浓缩剂对 HL-60 细胞有较好的抑制作用, 随着药物浓度加大, 抑制作用增强, 同时细胞上清中的 α -PA 活性下降。结论: 清毒片对急性早幼粒细胞性白血病的治疗作用与其降低白血病细胞 α -PA 活性水平的作用有关。

[关键词] 清毒片; HL-60 细胞; 尿激酶型纤溶酶原激活剂

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)04-0060-04

The Influence of Qingdupian on the Expression of α -PA in HL-60 Cells

WANG Wen-hua^{1*}, YANG Hong-yong², LIU An-ping², CHEN Peng², ZHAO Zhen-pin²

(1. The Staffroom of Traditional Chinese Medicine, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325003, China;

2. Department of Hematology, The First Affiliated Hospital of Guangzhou TCM University, Guangzhou 510405, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of Qingdupian on the α -PA expression in HL-60 cells. **Methods:** 2 mL of Qingdupian was diluted with RPMI-1640 culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum to 12 diluted liquids from 1:10 to 1:1 600 concentrations. Ara-c was used as the positive control, and the culture medium as the negative control. MTT assay was performed. The supernatant was collected for ELISA essay to determine the activity of α -PA. **Results:** The results research showed that Qingdupian fluid has inhibiting effects on HL-60 cells. And the α -PA activity in the supernatant fluid dropped with the raise of medicine concentration. **Conclusions:** It suggests that the curative effect of Qingdupian is related to its effect of declining α -PA activity on leukemia cells.

[Key words] Qingdupian; HL-60 cells; α -PA

尿激酶型的纤溶酶原活化剂(α -PA)是一种与多种恶性肿瘤性疾病相关的细胞因子, 主要参与纤溶系统的活化和肿瘤细胞的转移。近年国内外多项实

验研究发现其对于急性白血病(AL)的诊断和治疗均具有重要的参考价值。本研究通过观察中药清毒片药物水煎剂对白血病细胞 HL-60 上清液中 α -PA 活性的影响, 探讨中药对白血病疾病状况的影响机理。

1 材料

1.1 细胞 人早幼粒白血病细胞株 HL-60(购自中山医科大学实验动物中心)。

[收稿日期] 2007-09-06

[通讯作者] * 王文花, Tel: (0577) 88833645; E-mail: annie.wwh@sohu.com

1.2 主要试剂 特级无支原体胎牛血清购自杭州四季青公司, (批号: 020725)。RPMI-1640 干粉为 GIBCO 公司产品, (批号: P1502)。噻唑蓝 (MTT) 为 MDBio 公司产品, (批号: 228029)。二甲基亚砷为广州新成精细化工厂产品, (批号: 020706)。 α -PA 检测 ELISA 试剂盒为 Chemicon International 公司产品, (产品号: ECM600)。

1.3 主要仪器设备 倒置显微镜 (Olympus 产品), 细胞培养箱 (NAPCO Series 5400 CO₂ Incubator), -20℃冰箱 (HUALING BCD-268WA), 离心机 (上海产 TDL-5 型), 电热恒温水温箱 (上海跃进医疗器械厂), 全自动酶标仪 (BIO-RAD Model 3550) 等。

2 方法

2.1 制备清毒片药物口服液 清毒片方剂由七叶一枝花、白花蛇舌草、大青叶、胡黄连、山慈姑、法半夏、竹茹、莪术、大黄、生地黄、仙鹤草、三七末组成, 生药饮片由广州中医药大学附属第一医院门诊部提供, 水煎过滤两次, 滤液经高压灭菌后浓缩至药物终浓度为 2 g·mL⁻¹, -4℃保存备用。

2.2 对 HL-60 细胞生长的影响 将清毒片药液进行高速离心 (8 000 r·min⁻¹ 5 min), 取离心后的无菌清毒片药物水煎浓缩剂上清液 2 mL, 以 RPMI-1640 培养液稀释为 20 mL, 再将其按 1, 2, 4, 8, 10, 16, 20, 32, 40, 80, 100, 160, 320 倍的浓度继续稀释, 分别培养等量细胞, 同时以 25 μ g·mL⁻¹, 50 μ g·mL⁻¹, 100 μ g·mL⁻¹, 200 μ g·mL⁻¹, 400 μ g·mL⁻¹ 的阿糖胞苷作为实验的阳性对照, 以未加药物的 RPMI-1640 培养液作为阴性对照, 计算各浓度药液的细胞生长抑制率。

方法参照有关文献^[1-4]。步骤如下:

取指数生长期生长旺盛的 HL-60 细胞, 用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液调至终浓度为 1 $\times 10^5$ ·mL⁻¹ 按每孔 100 μ L 接种于 96 孔板。按各药物组浓度顺序, 每个样本设 2 个平行孔, 分别加入 100 μ L 各浓度清毒片、阿糖胞苷样本, 置 37℃, 5% CO₂ 培养箱培养 44 h。每孔加入 5 mg·mL⁻¹ 的 MTT 10 μ L, 继续孵育 4 h。离心去上清液, 每孔加入二甲基亚砷 (DMSO) 100 μ L, 混匀后于全自动酶标仪测定 570 nm 处的吸光度 A 值, 根据测定的各样本 A 值计算抑制率。细胞抑制率 = (1 - 各浓度药物的平均吸光度值 / 对照孔的吸光度值) $\times 100\%$ 。并算出药物的半数抑制剂量 (ID₅₀)。

2.3 细胞 α -PA 活性的 ELISA 测定 参照文献方法

对细胞进行处理。^[4]

人早幼粒白血病细胞株 HL-60, 用完全 RPMI-1640 培养液加 10% 胎牛血清培养, 置 37℃, 5% CO₂ 培养箱, 3~5 d 换液 1 次, 倒置显微镜观察, 待细胞生长旺盛 (达指数生长期) 后用于实验。

取培养良好的 HL-60 细胞, 离心后弃上清, 用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液稀释混匀, 计数板计数后按每孔 200 μ L, 密度 5 000/孔 (细胞浓度为 2.5 $\times 10^4$ ·L⁻¹) 铺板, 同步培养 24 h, 加入含各药液的 RPMI-1640 培养液 200 μ L, 使药液为选定的浓度, 刺激 48 h 后分别沉淀各组细胞, 取上清液进行 α -PA 活性的 ELISA 检测, 观察各浓度药物对 HL-60 细胞 α -PA 活性的影响程度。

2.4 统计学分析 向 96 孔板的每一孔中加入 40 μ L 包含 α -PA 的各浓度清毒片药液, 阿糖胞苷药液处理的细胞上清液、空白对照上清液或 α -PA 阳性对照。添加足够的去离子水使总体积为 160 μ L。再向每一孔中加入 20 μ L 分析缓冲液及 20 μ L 发色底物, 37℃孵育 24 h, 在全自动酶标仪上于 405 nm 处读取吸光度值。运用 Excel 统计软件, 采用计量资料的 *t* 检验对各药物处理细胞上清中的 α -PA 活性进行比较。

3 结果

3.1 对 HL-60 细胞增殖的影响 结果见表 1, 随着药物浓度的逐渐增加, A₄₉₀ 值逐渐下降。清毒片和阿糖胞苷对 HL-60 细胞均具有良好的抑制效果, 抑制率随着药物浓度的增大而增强。清毒片的 IC₅₀ 为 50.55 mg·mL⁻¹。

3.2 对 HL-60 细胞上清 α -PA 活性的影响 根据试剂盒所提供的 α -PA 阳性标准品浓度与其在酶标仪上所反映出的 OD₄₀₅ 值绘制标准曲线, 随着标准品浓度加大, 其所对应的 OD₄₀₅ 值逐渐增大, 标准曲线呈逐渐上升的趋势。

与空白组相比较, 各清毒片水煎浓缩液处理组细胞培养上清液中所测得的 OD₄₀₅ 值均显著低于空白组 OD₄₀₅ 值。且随着药物浓度的降低, OD 值呈逐步增大的趋势, 提示药物浓度和 α -PA 活性之间具有较好的量效关系。对照药阿糖胞苷也显示了良好的降低 HL-60 细胞上清液中 α -PA 活性的作用。结果见表 2。

4 讨论

有关 α -PA 和 AL 关系的研究发现, 培养的白血病细胞中有纤溶活化剂 (PAs) 的高表达。用 HL-60

表 1 清毒片对 HL-60 细胞增殖的直接抑制作用

组别	药物浓度(mg·mL ⁻¹ , 阿糖胞苷为 μg·mL ⁻¹)	各浓度药物的细胞 增殖抑制率(%)
清毒片组	101.5	73.81
	50.75	50.51
	25.38	42.91
	12.69	40.69
	10.15	40.41
	6.34	40.28
	5.08	32.80
	3.17	32.73
	2.53	30.46
	1.27	25.78
	0.63	16.19
阿糖胞苷组	400	56.01
	200	44.17
	100	31.01
	50	12.39
	25	9.63
空白组	-	-

表 2 清毒片对 HL-60 细胞 u-PA 活性的直接影响($\bar{x} \pm s$)

组别	药物浓度(mg·mL ⁻¹ , 阿糖 胞苷为 μg·mL ⁻¹)	OD ₄₀₅ 平均值
清毒片组	25.38	0.120 ± 0.026 ²⁾
	6.34	0.215 ± 0.004 ²⁾
	1.27	0.216 ± 0.006 ²⁾
	0.63	0.316 ± 0.003 ²⁾
	0.32	0.481 ± 0.032 ¹⁾
阿糖胞苷组	400	0.120 ± 0.009 ²⁾
	200	0.210 ± 0.01 ²⁾
	100	0.211 ± 0.012 ²⁾
	50	0.211 ± 0.012 ²⁾
	25	0.413 ± 0.013 ²⁾
空白对照	-	0.507 ± 0.026

注: 与空白对照相比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.001$

细胞作为 AL 细胞的模型研究细胞周围基质降解, 证实 HL-60 细胞通过纤溶系统活化 MMP-9, 而 MMP-9 的活化促进了基质降解, 增强了白血病细胞的侵犯能力^[5]。白血病细胞激活 u-PA 前体的能力增强, 而且主要是 u-PA 的活性形式释放到了培养介质中^[6]。

国内也有研究表明, AML 患者骨髓和血浆中 u-PA 的浓度均高于正常人, 并且发现白血病细胞主要表达 u-PA, 而不产生 t-PA^[7]。而 AML 患者治疗后未缓解患者 u-PA、u-PAR 持续增高, 出血严重者 u-PA 显著升高, 得出结论 u-PA、u-PAR 可作为部分 AML 预后判断的指标^[8]。说明白血病细胞的确存在过度表达 u-PA 的情况, 且提示白血病早期浸润与 u-PA 的表达有关。

清毒片是在由若干清热解毒类中药组成的白血病治疗方剂上发展而制成的一种口服片剂。在临床上, 对于缓解患者病情和改善患者生存质量起到了良好的作用。本实验研究参照中药复方研究的有关文献^[9], 以人急性早幼粒白血病细胞系 HL-60 作为 AL 细胞模型, 探讨了清毒片在体外对白血病细胞生长状态及细胞周围 u-PA 活性的影响, 以便与临床研究结合起来, 更深入地探讨这种中药治疗 AL 的临床作用机理, 同时更进一步了解 AL 病理变化状态下病变细胞周围 u-PA 活性的变化特征及中药对其产生的影响。

在药物对白血病细胞抑制作用的 MTT 检查方面, 清毒片和阿糖胞苷均表现出随着剂量浓度的加大, 对 HL-60 细胞表现出逐渐增强的抑制作用。证实了虽然有效浓度显著大于阿糖胞苷, 但清毒片方剂的水煎浓缩液的确具有抑制 HL-60 白血病细胞生长的作用, 且抑制率随着药物浓度的加大而增强。同时通过 u-PA 活性测定的 ELISA 实验, 发现清毒片方剂的水煎浓缩液具有降低 HL-60 细胞培养上清中 u-PA 活性的作用, 且随着药物浓度的加大, u-PA 活性单位 OD 值显著下降。说明清毒片在对 HL-60 细胞生长抑制的同时具有降低其 u-PA 活性物质产生的作用, 提示这种药物的药效与其改变白血病细胞 u-PA 活性的作用有关。而降低白血病细胞的 u-PA 活性就意味着改变了细胞周围环境, 降低了白血病细胞的转移活性, 为该药的作用机理提供了实验证明。同时也为作为纤溶活化剂之一的 u-PA 与 AL 之间, 尤其是 AML 之间的关系, 及 AL 中医治疗方剂方面的研究提供了参考。

[参考文献]

- [1] 章静波. 组织细胞培养技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002. 109-1127.
- [2] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海: 上海科技出版社, 1991. 159-250.

- [3] 唐加明, 陈安薇. 全反式维甲酸对阿糖胞苷诱导 HL-60 细胞凋亡的影响[J]. 白血病, 2000, 9(5): 287-289.
- [4] 连粤湘, 谭俊, 邓子德, 等. 复方双草退黄冲剂的体外抗乙型肝炎病毒作用[J]. 中国中西医结合肝病杂志, 2000, 10(2): 20-21.
- [5] Devy L, Noel A, Baramova E, *et al.* Production and activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) by HL-60 promyelocytic leukemia cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 238(3): 842-846.
- [6] Mustjoki S, Alitalo R, Stephens RW, *et al.* Plasminogen activation in human leukemia and in normal hematopoietic cells[J]. *APMIS*, 1999, 107(1): 144-149.
- [7] 陈怡, 俞康, 江松福. 纤溶酶相关蛋白在急性髓性白血病血浆和骨髓中的表达[J]. 临床血液学杂志, 2000, 13(1): 26-28.
- [8] 吴方, 王学锋, 璩斌, 等. 止、凝血分子标志物检测在急性白血病诊治中的意义[J]. 中华血液学杂志, 2001, 22(3): 141-144.
- [9] 黄海茵, 郭映华, 于尔辛. 体外细胞培养应用于中药复方研究的进展[J]. 中国中西医结合杂志, 2000, 20(5): 394-396.