

含益髓灵氯仿提取物的兔血清/肝匀浆 诱导 HL60 细胞凋亡研究*

陈信义, 李冬云, 高志捷, 赵立业, 高利顺, 孟素萍
(北京中医药大学东直门医院, 北京 100700)

摘要: 利用体外培养的 HL60 为靶细胞, 通过含益髓灵氯仿提取物的兔血清与肝匀浆诱导 HL60 细胞凋亡研究, 分析益髓灵氯仿提取物是否在动物体内存在着诱导肿瘤细胞凋亡的生物活性。结果显示, 含益髓灵氯仿提取物的兔血清与肝匀浆均具有诱导 HL60 细胞凋亡的作用。其作用程度与用药浓度成正相关性。从而进一步证实了益髓灵复方或氯仿提取物中含有诱导肿瘤细胞凋亡的活性物质。

关键词: 益髓灵; HL60 细胞; 细胞凋亡

中图分类号: R285.5 文献标识码: D 文章编号: 1005-9903(2000)06-0040-02

在确定益髓灵水、正丁醇提取组分有促进 HL60 细胞增殖作用, 益髓灵氯仿、乙酸乙酯提取物有诱导 HL60 细胞凋亡效应基础上^[1], 本文着重进行了含益髓灵氯仿提取物的兔血清、肝匀浆诱导 HL60 细胞研究。

1 材料

1.1 试剂与动物 RPMI-1640 由华美公司提供; 15% 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), RNaseA, EDTA, Tris-CI 购于北京化学试剂商店; HL60 细胞株(急性髓性细胞白血病)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 益髓灵氯仿提取物制备 益髓灵氯仿提取物由本院制剂室制备, 按益髓灵复方(炙黄芪、党参、生熟地、菟丝子、阿胶、当归、地龙等) 临床用药剂量比例, 取生药 2.4 公斤研粉, 95% 乙醇温浸三次, 回收乙醇, 合并浸液后, 再以氯仿、乙酸乙酯、正丁醇萃提, 按极性分别得氯仿、乙酸乙酯、正丁醇与水提 4 个不

同实验用药部分。总提取率 68%, 氯仿、乙酸乙酯、正丁醇、水提组分比例分别为 3.3、3.0、24、69.7^[2]。

1.3 含药血清及肝匀浆制备 以含 1% 浓度益髓灵氯仿初提物 2ml, 腹腔注射, 每日 1 次, 连续 4 周后, 从家兔心脏取血, 离心, 制备实验用血清; 同时取出肝脏, 制备实验用肝匀浆。兔血清、肝匀浆均以 RPMI-1640 培养液作 2:1 稀释, 过滤, 灭菌后备用, 并制备不含药物的兔血清、肝匀浆作对照。

2 方法 取 HL60 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, 分组加入益髓灵氯仿提取物的血清、肝匀浆, 血清、肝匀浆浓度分别为 5%、10%、15%, 并与 5% 不含益髓灵药物的兔血清、肝匀浆对照。继续孵育培养: 分别在 6、12、24、48h 4 个时间点取培养 HL60 细胞, 经磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 2 次后, 细胞悬液经离心涂片机涂片, 瑞氏染色后光学显微镜下观察凋亡细胞, 并计算百分率, 同时进行流式细胞仪分析。

3 结果

3.1 光学显微镜观察 在 6、12、24、48h 分别用倒置显微镜观察细胞生长状态, 并涂片, 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,加入含益髓灵氯仿提取物的血清、肝匀浆体外孵育的 HL60 细胞 6h 后既有凋亡小体出现,12h 后均显示有明显的细胞凋亡现象。对照组则无明显作用。光学显微镜下凋亡的 HL60 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^[3]。

3.2 含益髓灵氯仿提取物的兔血清诱导 HL60 细胞凋亡效应 结果见表 1。从实验中发现,含益髓灵氯仿提取物的兔血清各浓度组均有诱导 HL60 细胞凋亡效应,并随浓度增加而作用增强,与对照组比较,12h 以后诱导 HL60 细胞凋亡再次明显增强,经统计学处理,差异有显著性。

表 1 兔血清诱导 HL60 细胞凋亡率比较($\bar{x} \pm s, n=4$)

浓度 (%)	6h	12h	24h	48h
0	4.60±0.14	4.30±1.86	3.60±0.95	20.00±2.47
5	4.80±0.14	10.35±0.78*	14.80±0.14**	35.60±1.13**
10	4.70±0.58	17.40±0.14**	14.90±0.07**	43.30±1.98**
15	5.50±0.54	32.40±1.63***	52.90±7.42***	72.00±1.41***

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$

3.3 含益髓灵氯仿提取物的肝匀浆诱导 HL60 细胞凋亡效应 结果见表 2。以上结果与兔血清相比,在作用时间上基本相似,但作用程度略强于兔血清,但无统计学意义。

表 2 兔肝匀浆诱导 HL60 细胞凋亡率比较($\bar{x} \pm s, n=4$)

浓度 (%)	6h	12h	24h	48h
0	4.80±0.20	7.40±2.78	20.20±5.00	29.10±4.20
2	4.90±0.08	29.70±0.49*	44.40±1.13***	49.90±0.32**
4	6.00±0.32	31.90±0.14**	48.50±1.13***	56.90±1.84***
6	6.30±0.79	54.30±1.85***	56.70±2.22***	82.50±2.11***

与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$

3.4 流式细胞仪分析 在 12、24、48h 3 个时间点取各培养组的 HL60 单细胞悬液,用 70% 乙醇固定,在 4℃ 条件下,冰箱保存 1h;染色前加 PBS 反复离心 3 次,沉淀去固定液;加入 200μl RNaseA,置 37℃ 水浴 30min;

加入 800μl PI 染液混匀,4℃ 避光放置 30min;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,G1 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^[4]。

4 讨论

本研究是在确定益髓灵初提物有促进 HI-Meg 细胞分化与凋亡以及益髓灵不同提取物有诱导 HL60/K562 细胞凋亡基础上,通过药物在动物机体内代谢后,再在体外试验中作用于靶细胞的试验方法,研究益髓灵氯仿提取物实际存在的生物活性。由此推论益髓灵治疗骨髓增生异常综合征机理可能与该药能够诱导病态细胞凋亡有一定的相关性^[5]。

以下几个问题值得进一步探讨:①氯仿提取物存在着诱导 HL60 细胞凋亡的生物活性成分。②含益髓灵氯仿提取物的兔血清、肝匀浆诱导 HL60 细胞凋亡效应也可能存在着与兔血清、肝脏中所含的某些活性物质有一定相关性。③人与动物在代谢等方面的差异。④氯仿提取物内所含的化学成分也较复杂,需要通过分析、研究与重复实验来确定其实际发挥作用的有效成分或有效部位。

参考文献:

- [1] 陈信义,邵德彬,赵立业,等. 益髓灵氯仿提取物诱导 HL-60 细胞凋亡的初步研究[J]. 中医杂志,1999,40(4):235~236.
- [2] 肖崇厚,陆蕴如. 中药化学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1987.438~439.
- [3] 张之南,潘华珍. 细胞凋亡与血液病[J]. 中华血液学杂志,1996,17(5):267.
- [4] 左连福,齐凤英,张祥宏,等. 流式细胞术与生物医学[M]. 沈阳:辽宁科学技术出版社,1996.382.
- [5] 胡凯文,陈信义,孙颖立,等. 益气养阴活血治疗骨髓增生异常综合征临床研究[J]. 北京中医药大学学报,1994,17(2):38~40.