

# 流式细胞仪检测清开灵注射液及其有效成分诱导 HL-60 细胞凋亡及其机理研究\*

陈泽涛,董倩,张勇,吴凯

(山东中医药大学附属医院,济南 250014)

**摘要:** 我们通过流式细胞仪检测证明:清开灵注射液及其有效成分黄芩甙、猪去氧胆酸体外作用以诱导 HL-60 细胞凋亡为主,体外作用 6h 可诱导产生凋亡早期蛋白 AnnexinV,并同时增加 Fas 蛋白表达,降低 bcl-2 蛋白表达( $P < 0.01$ )。牛黄胆酸可同时上调 Fas 和 bcl-2 表达,无明显诱导细胞凋亡作用。

**关键词:** 流式细胞仪;凋亡蛋白;清开灵注射液

**中图分类号:** R285.5    **文献标识码:** B    **文章编号:** 1005-9903(2000)06-0037-03

我们已通过临床观察发现清开灵注射液对急性白血病的治疗有良好作用,已进行的实验证明,清开灵注射液及其有效成分黄芩甙、猪去氧胆酸、牛黄胆酸在体外对 HL-60 细胞均有不同程度的细胞毒作用,经细胞形态学、DNA 凝胶电泳证实,清开灵、黄芩甙和猪去氧胆酸可诱导细胞凋亡,为进一步研究其作用机理,我们应用流式细胞仪对细胞凋亡进行了分析并检测了凋亡蛋白的表达变化,从细胞凋亡的角度解释了清开灵的作用机理,并发现其有效成分黄芩甙发挥了重要作用。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞** HL-60 细胞系(人急性早幼粒白血病细胞,山东省医学科学院免疫室提供),37℃,50% CO<sub>2</sub> 温箱中,用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640(Sigma,美国)培养液每 2~3 天传代培养。

**1.2 药物制备** 清开灵注射液,北京中医药大学实验药厂生产,规格 2ml/支,批号:97010212。黄芩甙,纯度 95.4%,牛黄胆酸,纯度 99%,猪去氧胆酸,纯度 95%,由北京中医药大学实验药厂惠赠,1N NaOH 溶液助

溶,以培养液调至所需实验浓度。

**1.3 流式细胞仪检测凋亡细胞数及细胞周期变化** 分别收集各药物作用 6h、24h 细胞  $1 \times 10^6$  个,70% 乙醇固定,RNA 酶消化处理,以碘化丙锭(PI)染色,作流式细胞仪检测,每份样本测 10000 个以上细胞<sup>[1]</sup>。

**1.4 流式细胞仪检测凋亡细胞及坏死细胞的比例** 采用 PI/AnnexinV 双染法。收集各药物处理 6h 后细胞  $1 \times 10^6$  个,以 PI/AnnexinV 标记后,上机检测 10000 个以上细胞。

**1.5 流式细胞仪检测 Fas 蛋白表达的变化<sup>[2]</sup>** 收集各药物处理 6h 后细胞  $1 \times 10^6$  个,1% 多聚甲醛固定,以 Fas/FITC 抗体标记后上机检测。

**1.6 流式细胞仪检测 bcl-2 蛋白表达的变化<sup>[2]</sup>** 收集各药物处理 6h 后细胞  $1 \times 10^6$  个,45℃ 水浴 5min,75% 乙醇固定 30min,山羊血清封闭过夜,以 bcl-2/FITC 抗体标记,上机检测。

## 2 结果

**2.1 流式细胞仪检测细胞凋亡** 各药物作用 6h、24h 后,直方图中均可见 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期峰前的亚二倍体峰,即凋亡峰(见图 1)。随时间的延长,清开灵注射液、黄芩甙组出现较多的细胞碎片,黄芩甙组凋亡细胞比率下降,其余

收稿日期:2000-02-02

\* 国家中医药管理局科学基金资助,NO95C017

各组凋亡细胞比率增加(见表 1)。细胞周期分析(见表 2)显示清开灵组、黄芩甙组在作用早期(6h)主要表现为将细胞阻滞于 S 期,减少进入 G<sub>2</sub>/M 期的细胞比率,随时间延长,作用 24h 后主要表现为减少 S 期细胞比率,将细胞阻滞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期( $P < 0.01$ );猪去氧

胆酸作用主要表现为将细胞阻滞于 S 期,同时增加 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 细胞比率( $P < 0.01$ );牛黄胆酸作用早期表现为减少 S+G<sub>2</sub>/M 期细胞比率( $P < 0.01$ ),24h 后细胞周期分布显示与对照组无明显差异。

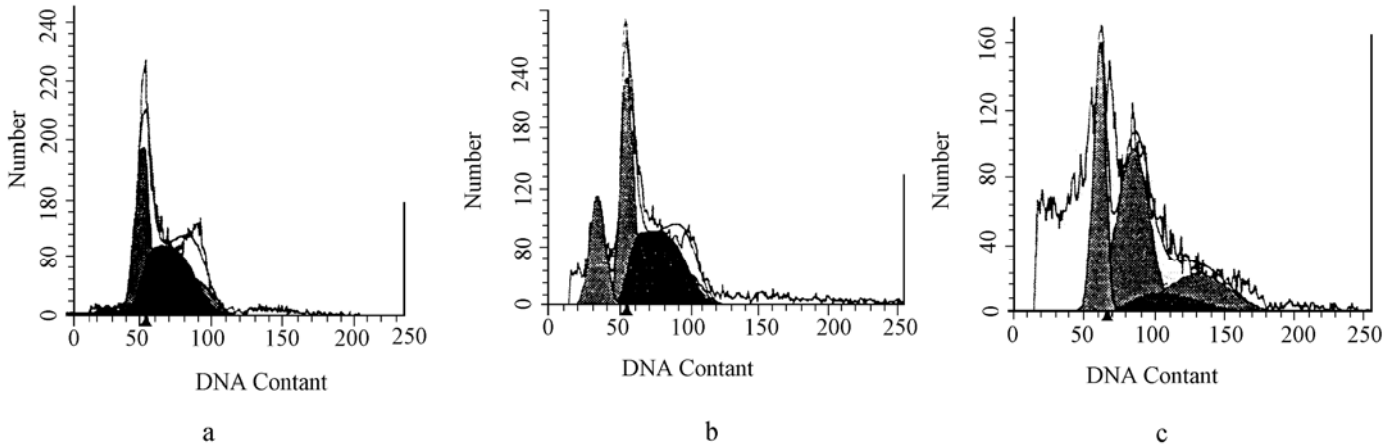


图 1 流式细胞仪检测 HL-60 细胞凋亡直方图

a. 细胞对照 b. 清开灵 6h c. 清开灵 24h

表 1 各药物作用 6h、24h 后 HL-60 细胞凋亡变化(%)

treatment	6h	24h
	凋亡细胞比率	凋亡细胞比率
control	1.49	1.61
牛黄胆酸(200μg/ml)	1.76	5.88*
猪去氧胆酸(200μg/ml)	6.30*	9.98*
黄芩甙(8μg/ml)	32.43*	26.63*
清开灵(1/1200 原液)	18.99*	26.94*

注:与对照组比较: \*  $P < 0.01$

2.2 PI/AnnexinV 双染法检测细胞凋亡与坏死比率 AnnexinV 表达于早期凋亡细胞的胞膜上,AnnexinV 阳性细胞代表凋亡细胞群体,在散点图中位于右下象限;坏死细胞由于胞膜不完整,PI 染液可进入细胞内部而使其着色,故 PI 阳性细胞代表坏死细胞群体,在散点图中位于右上象限,活细胞位于左下象限。本方法可明确地将 3 个细胞群体分开。见表 3。

表 2 各药物作用 6h、24h 后细胞周期分布(%)

treatment	6h			24h		
	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
control	36.65	48.03	15.32	36.16	52.28	11.11
牛黄胆酸(200μg/ml)	50.19	32.03	17.78	37.15	50.06	12.79
猪去氧胆酸(200μg/ml)	45.55	42.08	12.37	52.35	47.26	0.40
黄芩甙(8μg/ml)	43.77	56.23	0.00	58.81	11.86	29.34
清开灵注射液(1/1200 原液)	39.86	48.83	11.31	58.67	13.24	28.09

上述结果显示,牛黄胆酸、猪去氧胆酸诱导 HL-60 细胞 6h 后,胞膜上 AnnexinV 表达不明显;黄芩甙与清开灵在诱导细胞凋亡的同时也能引起细胞坏死,但在作用细胞 6h

后其作用以诱导细胞凋亡为主。

2.3 各药物作用 6h 后 Fas、bcl-2 蛋白表达水平的变化(见表 4)

Fas 是细胞促凋亡基因,Fas 蛋白表达增

高则促进细胞凋亡发生。与对照组比较,各药物作用 HL-60 细胞 6h 后, Fas 蛋白表达水平均有不同程度的上调,以黄芩甙作用明显。 bcl-2 是凋亡抑制基因, bcl-2 蛋白表达高,则抑制细胞凋亡。本结果显示 HL-60 细胞为 bcl-2 高表达细胞,各药物作用 6h 后,猪去氧胆酸组、黄芩甙组、清开灵组均可不同程度地降低 bcl-2 蛋白表达,以后二者作用最明显。牛黄胆酸可同时上调 Fas、bcl-2 表达。

表 3 PI/AnnexinV 双染法检测结果(%)

treatment	活细胞	PI(+)	AnnexinV(+)
control	98.72	0.65	0.55
牛黄胆酸(200 $\mu$ g/ml)	97.83	1.09	0.98
猪去氧胆酸(200 $\mu$ g/ml)	98.63	0.60	0.74
黄芩甙(8 $\mu$ g/ml)	90.23	2.74	6.93*
清开灵注射液(1/1200 原液)	87.61	4.00	8.29*

注:统计学处理为同组 PI(+), AnnexinV(+ ) 之间作比较: \*  $P < 0.01$

表 4 Fas、bcl-2 蛋白表达率(%)

treatment	Fas 蛋白	bcl-2 蛋白
control	0.74	90.56
牛黄胆酸(200 $\mu$ g/ml)	2.46**	94.32*
猪去氧胆酸(200 $\mu$ g/ml)	1.28**	85.69**
黄芩甙(8 $\mu$ g/ml)	2.50**	77.46**
清开灵注射液(1/1200 原液)	1.16**	78.66**

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

### 3 讨论

实验证实在药物作用 6h 后,细胞以明显凋亡为主,其凋亡抑制基因 bcl-2 表达下调及促凋亡基因 Fas 表达增加,是药物诱导细胞凋亡的机理之一。此外,通过细胞周期分析显示,清开灵及黄芩甙在作用 6h 后主要表现为抑制细胞分裂,作用 24h 后主要表现为降低细胞 DNA 合成,猪去氧胆酸主要表现为抑制细胞分裂。分析认为清开灵及黄芩甙、猪去氧胆酸不但能诱导细胞凋亡,还可抑制细胞的增殖分裂,但诱导凋亡与抑制增殖分裂

之间的关系还需进一步研究分析。通过 PI/AnnexinV 双染法检测细胞凋亡可有效地区分凋亡及坏死细胞群,是目前国际上公认的检测方法,经本方法检测发现清开灵、黄芩甙在体外作用 6h 后诱导细胞产生早期凋亡蛋白 AnnexinV,死亡细胞以凋亡群体为主。猪去氧胆酸诱导细胞凋亡随时间延长,凋亡率增加,6h 凋亡率为 6.3%,24h 凋亡率为 9.98%,但采用双染法检测显示,6h 后 AnnexinV 蛋白表达率仅为 0.74,分析认为猪去氧胆酸诱导细胞凋亡可能存在 AnnexinV 蛋白表达以外的机制。牛黄胆酸诱导细胞凋亡的作用很弱,作用 6h 后无明显凋亡出现,24h 后凋亡率为 5.88%,双染法显示牛黄胆酸引起细胞坏死大于凋亡,它还同时上调 Fas、bcl-2 表达。结合我们已完成的形态学和 DNA 凝胶电泳观察认为,牛黄胆酸无明显诱导细胞凋亡作用,可能主要与 bcl-2 表达增高有关。在本实验中虽然没有设阳性药物对照,但与已发表的文献报道<sup>[3-5]</sup>对比,认为清开灵、黄芩甙在低剂量、短时间诱导细胞凋亡的作用与 Vp16、阿糖胞苷相似,优于榄香烯乳,这一推论仍需通过进一步的实验证实。

### 参考文献:

- [1] 赵卫红,寿好长,闫福岭.细胞凋亡[M].河南:河南医科大学出版社,1997.196~197.
- [2] 左连富.流式细胞术样品制备技术[M].北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社.1991.89~88.
- [3] 吴学宾,高雪芝,金宝安,等.鬼臼乙叉甙诱导 HL-60 细胞凋亡作用的实验研究[J].中华血液学杂志,1996,17(12):651.
- [4] 仇志根,马伴吟,杨毅,等.阿糖胞甙诱导 HL-60 细胞凋亡中 bcl-2、c-myc 基因表达水平的变化[J].中华血液学杂志,1997,18(7):372~373.
- [5] 周锡建,干祥生,王立群,等.榄香烯乳对 HI meg 细胞系增殖抑制和诱导凋亡作用[J].中华血液学杂志,1997,18(5):263~264.