

中药对淋巴细胞型白血病小鼠 细胞膜流动性的影响

山东中医学院附属医院(济南 250011) 陈泽涛 顾振东

内容提要 本实验通过应用荧光偏振技术观察了中药益气养阴方和补气养血方治疗前后, 淋巴细胞型白血病小鼠(L_{7212})红细胞及淋巴细胞膜流动性的变化, 结果表明两方药可以通过降低淋巴细胞膜的流动性, 改善膜的结构和功能发挥抗白血病的作用。淋巴细胞膜流动性的异常可能对白血病的早期诊断有意义。

关键词 白血病 细胞膜流动性 益气养阴方 补气养血方

细胞膜脂质流动是细胞膜的主要动力学特性。细胞膜的一切正常功能都有赖于膜结构的完整性和膜脂的恒定流动。在细胞周期的不同时期、代谢过程之中、疾病条件下以及药物作用后都会有流动性的变化。近年来, 国内外陆续报道, 采用荧光偏振技术测定一些患者及动物的细胞膜流动性, 从分子生物学的角度研究一些病变的发病原理, 为临床诊断和治疗寻找新的依据^[1~7]。本研究通过使用能标记在膜脂区的荧光探针 1,6-二苯基, 1,3,5-己三烯(1,6-diphenyl, 1,3,5-hexatriene, 缩写 DPH), 采用荧光偏振技术测定应用中药益气养阴方和补气养血方治疗前后, 淋巴白血病小鼠(L_{7212})红细胞及淋巴细胞膜脂区流动性的变化, 并对其作用机理进行了探讨。

材料与方法

一、材料

1. 动物模型: 健康 615 小鼠, 近交系, 雄性, 体重 $20 \pm 2g$ 。细胞株为可移植性淋巴细胞型白血病小鼠 L_{7212} 。以上动物均由中国医学科学院血液病研究所提供。按常规方法将制备好的 L_{7212} 瘤种小鼠脾细胞悬液于右腋皮下接种给小鼠(每只 $0.1ml$, 含细胞 2×10^5 个), 制成淋巴细胞型白血病小鼠模型。将接种好的小鼠随机分为益气养阴方、补气养血方、对照三组, 每组各 6 只。

2. 药物: 益气养阴方: 黄芪、太子参、蒲公英、白花蛇舌草、半枝莲、小蓟各 $30g$, 黄芩、女贞子、生地各 $24g$, 旱莲草 $18g$, 天冬、麦冬各 $15g$, 白术、云苓各 $12g$ 。补气养血方: 黄芪、党参、白花蛇舌草、小蓟各 $30g$, 当归、补骨脂、首乌各 $24g$, 枸杞 $18g$, 云苓、白术、阿胶(烔化)各 $12g$, 甘草 $6g$ 。将上述药物按常规方法水煎, 最后浓缩为 $200g$ 生药/ $100ml$ 药液备用。以上

药物均为我院中药房提供。

3. 试剂: DPH, 美国 sigma 公司产品, 母液浓度为 $2 \times 10^{-3}M$, 以四氢呋喃为溶剂, 于棕色瓶中低温保存, 一般可使用 1 个月。工作液为母液加 PBS 液稀释, 浓度为 $2 \times 10^{-6}M$, 用时配制。

二、方法

1. 给药方式: 于接种当天开始灌胃给药, 每天 $0.6ml/只$, 分两次灌服, 共 6 天。用药组分别灌服相应的药液, 对照组灌服生理盐水。除对照组于接种后第 3 天处理一批外, 余皆于接种后第 6 天处理, 取血、脾脏分离细胞。另外设一组健康 615 小鼠作为对照。

2. 细胞的分离: (1) 红细胞: 在小鼠处死前, 于后眼眶静脉丛取血约 $0.2ml$, 肝素抗凝, 加 PBS 液 $2ml$, 离心 ($2000rpm$) $10min$, 再用 PBS 液洗两次, 计数红细胞, 然后用 PBS 液调整至细胞浓度为 $1 \times 10^7/ml$ 。(2) 淋巴细胞: 将小鼠称重后, 颈椎脱臼处死, 无菌操作取脾, 称重。将脾研磨, 分出细胞, 用 Geys 液悬浮, 经 200 目尼龙网双层过滤, 将滤液离心 ($2000rpm$) $10min$ 。低渗法去除红细胞。用台盼蓝试验检查细胞活性, 要求活细胞大于 95%。用 PBS 液配成浓度为 $1 \times 10^7/ml$ 的细胞悬液。

3. 测定方法: 将制备好的细胞悬液 $2ml$ 加入 $2ml$ $2 \times 10^{-6}M$ 的 DPH 工作液, 混匀。红细胞混悬液在 $25^\circ C$, 脾淋巴细胞混悬液在 $30^\circ C$, 分别温育 $30min$ 。然后用 PBS 液洗两次, 再用 PBS 液 $4ml$ 将其悬起, 进行荧光测定。未标记的细胞悬液作为空白对照。使用岛津 RF-540 荧光分光光度计测定荧光偏振度(P)。红细胞测定时激发光波长为 $364nm$, 发射光波长为 $453nm$; 淋巴细胞测定时激发光波长为 $361nm$, 发射光波长为 $430nm$ 。出入狭缝两者皆为 $10nm$ 。细胞膜的流动度(LFU)根据 Einstein 硬粒子溶液粘度公式计算: $LFU = (P_{max}/$

Pr-1)/Pr。

结 果

一、各组红细胞膜偏振度(P)的比较:见表1。

表1 各组红细胞膜P的比较 ($\bar{x} \pm S$)

组 别	鼠数	红细胞膜 P
健康对照	6	0.2925 $\pm$ 0.0517
模型对照	6	0.2906 $\pm$ 0.0104
益气养阴	6	0.2965 $\pm$ 0.0192
补气养血	6	0.2733 $\pm$ 0.0487

健康 615 小鼠与淋巴细胞白血病 L₇₂₁₂ 小鼠红细胞膜的荧光偏振度 (P) 无明显差异; 两个中药组与对照组的比较, 其荧光偏振度的改变亦不显著。

2. 健康对照: 不同时间 L₇₂₁₂ 接种小鼠及用药两组淋巴细胞膜 P 及流动度 (LFU) 的比较: 见表 2。在白血病发病初期 (L₇₂₁₂ 接种后第 3 天) 及晚期 (L₇₂₁₂ 接

表2 各组淋巴细胞膜P及LFU值的比较 ($\bar{x} \pm S$)

组 别	鼠数	P	LFU
健康对照	12	0.2015 $\pm$ 0.0306	7.9191 $\pm$ 2.4984
L ₇₂₁₂ 接种第3天	5	0.1409 $\pm$ 0.0095**	18.3430 $\pm$ 3.0603**
L ₇₂₁₂ 接种第6天	10	0.1686 $\pm$ 0.0285*	13.1226 $\pm$ 6.3397*
益气养阴	6	0.2087 $\pm$ 0.0232 Δ	7.0031 $\pm$ 2.1024 Δ
补气养血		0.2101 $\pm$ 0.0229 $\Delta\Delta$	6.8877 Δ $\pm$ 2.1956 Δ

注: 与健康对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$; 与 L₇₂₁₂ 接种第 6 天比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

种后第 6 天), 恶性变的淋巴细胞其膜 P 及 LFU 均较健康者显著增大 ($P < 0.001$ 或 $P < 0.05$); 且在初期即有极显著增大 ($P < 0.001$)。初期与晚期比, 膜 P 及 LFU 亦有一定的差异, 但无统计学意义, 可能是前者样本小 ($n = 5$) 的缘故。提示淋巴细胞膜流动性的异常可用于白血病发病初期的诊断。从表 2 还可看出, 经中药益气养阴方和补气养血方治疗后的 L₇₂₁₂ 小鼠, 其膜流动性明显低于未治疗组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而与健康 615 小鼠无显著差异。提示这两个中药方可

通过降低白血病患者淋巴细胞的流动性, 改善膜结构及功能。

讨 论

随着对生物膜结构与功能认识的日益深入, 膜与疾病的研究也日趋广泛。发现许多疾病除实质性器官的细胞膜病变外, 常伴有红细胞膜的异常。另外有人观察到再生障碍性贫血患者红细胞膜的流动性降低, 膜蛋白电泳出现异常谱带^[8,9]。研究表明, 正常 615 小鼠与淋巴细胞白血病 L₇₂₁₂ 小鼠红细胞膜的荧光偏振度无明显改变, 提示在白血病患者及动物中红细胞膜所受的影响可能较小。国外于 1974 年开始陆续有人报道淋巴细胞性白血病患者淋巴细胞膜脂区流动性增大, 且随着病程发展而变化, 用于诊断和预告白血病的复发具有较高的灵敏度和精确性^[8,9]。国内于 1980 年开始有这方面的报道, 不但证实了国外的发现, 同时发现新生的非癌变的淋巴细胞膜脂区也具有较大的流动性。研究表明, 在白血病发病初期及晚期恶性变的淋巴细胞膜流动性均较正常者显著增大, 且在初期这种变化就极显著, 提示淋巴细胞膜流动性的异常可用于白血病发病初期的诊断。中药益气养阴方和补气养血方可以通过降低白血病淋巴细胞膜的流动性, 改善膜结构及功能, 发挥治疗白血病的作用。

参 考 文 献

1. 崔伟. 红细胞膜与疾病研究进展. 生理科学 1988; 8 (5): 285.
2. 聂松青, 等. 蜂王精对大鼠红细胞膜流动性的影响. 北京医学院学报 1983; 15(14): 249.
3. Inbar M, et al. Microviscosity in the surface membrane lipid layer of intact normal lymphocytes and leukemic cells. FEBS Lett 1974; 38: 268.
4. Inbar M, et al. A method for the quantitative prognosis of human acute lymphatic Eur J Cancer 1977; 13: 1231.
5. 蒋桂森, 等. 白血病淋巴细胞膜脂区流动性的变化. 生物化学与生物物理学报 1984; 16(6): 521.
6. 刘树森, 等. 正常和淋巴白血病淋巴细胞膜的 DPH 荧光偏振度和对 PHA 及 CaBP 刺激的反应. 生物化学与生物物理进展 1983; (2): 36.
7. 李柏龄, 等. 白血病患者外周血单个核细胞及白血病细胞的荧光偏振度测定. 中华血液学杂志 1986; 7(4): 236.

Studies on the Hidropoiesis of the Decoction of Gui Zhi Tang(桂枝汤) in Mice and Rats

Fu Hang-yu(富杭育), He Yu-zhuo(贺玉琢), et al

Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of TCM, Beijing (100700)

Effects of the Decoction of Gui Zhi Tang (DGZT) on the hidropoiesis of animal paw in different pathophysiological conditions were studied with the examination of sweat stains. The diaphoresis was found in normal rats when 2.5~10.0 g crude drugs/kg p. o. of the DGZT was administrated. The diaphoretic function was also promoted by DGZT in mice infected with influenza virus which the function was gradually suppressed. The decoction had the action of bidirectional regulation and normalization in polyhidrosis induced by aminopyrines or in hypohidrosis induced by atropine on rats.

Key Words Decoction of Gui Zhi Tang, hidropoiesis, bidirectional regulation

(Original article on page 34)

Experimental Study on the Immunosuppressive Effects of Qinghaosu(青蒿素) and Its Derivative

Sun Xiu-zhen(孙秀珍), et al

Dept. of Immunology, Beijing Medical University, Beijing (100083)

In this report the researchers studied the immunosuppressive effects of Qinghaosu (QHS) and its derivative (DQHS). The results indicated that after 7-day successive administration i. p of QHS and DQHS at the dosage of 25~100 mg/kg, the amounts of anti-SRBC IgM PFC and IgG PFC in the murine spleen were decreased significantly ($P < 0.01$). At the dosage of 100 mg/kg the QHS and DQHS were able to inhibit the DTH induced with BSA and the proliferative responses of murine spleen cells to Con A and LPS. These results suggested the suppressive effects of QHS and DQHS on both humoral and cellular immunities of mice. Interleukin-2 (IL-2) is an important mediate in the immune response and plays a critical role in the activation and differentiation of T and B lymphocytes. The results in this report showed a significant suppression of IL-2 production of murine spleen cells after 7-day administration i. p of QHS and DQHS, which suggested that the inhibition of IL-2 production could be the important one of the mechanisms of the immunosuppressive effects of QHS and DQHS.

Key Words Qinghaosu, immunosuppression, interleukin-2

(Original article on page 37)

The Effect of Herbal Tonic on the Membrane Fluidity of the Mice Suffered from Lymphatic Leukemia

Chen Ze-tao(陈泽涛), Gu Zhen-dong(顾振东)

Affiliated Hospital of Shandong College of TCM, Jinan (250011)

By using fluorescence polarization technology, the authors have studied variations in the membrane fluidity of red blood cell and spleen lymphocytes of the mice with lymphatic leukemia (L7212) untreated or treated by the compound tonic of traditional Chinese medicine decoction of reinforcing Qi(气) and nourishing Yin(阴) and decoction of reinforcing Qi and nourishing blood. It was not only confirmed that the membrane fluidity of malignant lymphocytes increased more greatly, but also discovered that the variations could appear in early period of leukemia. The membrane fluidity of lymphocytes of the mice with leukemia treated by the herbal tonic could drop to normal level. But the membrane fluidity of the red blood cell between the normal mice(615) and the leukemia mice (L7212), untreated or treated by the herbal tonic, had no significant difference. Result: the above mentioned suggests the herbal tonic could resist leukemia by reducing the membrane fluidity of the lymphocytes and improving structure and function of the membrane.

Key Words leukemia, membrane fluidity, herbal tonic, decoction of reinforcing Qi and nourishing Yin, decoction of reinforcing Qi and nourishing blood

(Original article on page 39).