

人参茎叶总皂甙对 58 例急性非淋巴细胞白血病细胞的诱导分化作用

白求恩医科大学第一临床医学院血液科(长春 130021)

易永林 李 薇 郝秀智

内容提要 本文报道人参茎叶总皂甙(GSL)对 58 例急性非淋巴细胞白血病(急非淋白血病)细胞诱导分化作用的研究结果。其中原粒细胞白血病 M_1 9 例, M_2 15 例, 早幼粒细胞白血病 M_3 12 例, 粒单细胞白血病 M_4 14 例, 单核细胞白血病 M_5 8 例。结果表明: GSL 对各类原代培养的急非淋白血病细胞均有不同程度的诱导分化作用, 对急性粒单及单核细胞白血病细胞的诱导分化作用较强。除 8 例外, 50 例诱导后的细胞均表现出程度不同的形态学、功能及细胞化学方面的改变。这一研究结果提示, GSL 可能成为治疗急性白血病的分化诱导剂。

关键词 人参茎叶总皂甙 诱导分化 原代培养 急性非淋巴细胞白血病

我们选用了吉林省抚松县园参分离制成的高纯度人参茎叶总皂甙(GSL), 内含多种人参皂甙单体如的 Rb_1 、 Rb_2 、 Re 、 Rg_1 、 Rg_2 等), 在对白血病细胞株进行诱导分化研究的同时, 观察了对 58 例急非淋白血病细胞的诱导分化效果, 并探讨了其作用机制。

资料和方法

一、细胞来源 细胞来自 58 例初治的急非淋白血病患者, 从发病到确诊平均病程为 1.5 个月, 其中原粒细胞白血病 M_1 9 例, M_2 15 例, 早幼粒细胞白血病 M_3 12 例, 粒单细胞白血病 M_4 14 例, 单核细胞白血病 M_5 8 例。男 34 例, 女 24 例, 年龄 16~72 岁, 平均 36 岁。白血病的诊断基于细胞形态、细胞化学染色, 白血病的分类根据 1986 年天津会议白血病诊断标准⁽¹⁾。

二、标本采集及单个核细胞悬液的制备 取在常规诊断时获得的肝素化骨髓 2~3 ml, 标本中白血病细胞均 >80%, 加入美国产细胞培养液(RPMI-1640), 含 15% 小牛血清, 稀释后, 加入淋巴细胞分层液中, 800 r/min 离心 40 min, 所得的单个核细胞洗两次, 重新悬浮于 RPMI-1640 培养液中, 以 2×10^5 /ml 的活细胞数接种于培养瓶内, 37℃、饱和湿

度、5%CO₂ 孵箱中培养。

三、药品与试剂 GSL 为本校基础部有机化学教研室提供, 系吉林省抚松县园参中提取的高纯度 GSL。12-0-十四烷酰-佛波醇 13-醋酸酯(TPA)为美国 Sigma 公司产品, 硝基四氮唑蓝(NBT)、 α -醋酸萘酯、AS-D 氯醋酸萘酯均为上海生化试剂厂产品。

四、实验分组 (1)诱导分化前组: 取上述调整好的细胞悬液, 于倒置显微镜下观察细胞形态, 做吞墨试验、NBT 还原试验、细胞化学及瑞氏染色。(2)人参皂甙诱导分化组: 试验前用培养液稀释 GSL 成终浓度 100 μ g/ml。(3)TPA 诱导分化组: 按文献⁽²⁾配制, 试验时终浓度为 10 ng/ml。(4)对照组: 加与 TPA 组等量的两酮。以上各组均设 3 个平行样品。

五、检测观察指标

1. 细胞生长特点及形态改变 细胞离心涂片, Wright-Giemsa 染色, 光镜下观察形态。定时观察细胞聚集、贴壁现象及贴壁后是否有细胞形态改变等。

2. NBT 还原能力测定 取 2×10^6 /ml 的细胞加等量 0.2% 的 NBT(NBT 溶解在含 200 ng/ml 新稀释的 TPA 磷酸盐缓冲液中), 37℃ 水浴 25 min, 离心涂片, Wright-

Giemsa 染色, 检查含黑色甲腊的细胞百分率。至少计数 200 个细胞。

3. 吞噬功能测定 培养 72 h 后做吞墨试验, 方法按文献⁽³⁾。

4. 细胞化学检测 α -醋酸萘酚酯酶(CE)、AS-D 氯醋酸萘酚酯酶(AE)活性测定与计数标准按常规方法。

结 果

观察不同组别各型白血病的 NBT 还原能力、吞噬功能、细胞化学、细胞生长特点及形态改变, 结果如下。

一、急性原粒白血病细胞 共观察 24 例, 其中原粒细胞白血病未分化型 M_1 9 例, 原粒细胞白血病部分分化型 M_2 15 例, GSL 组: 除 M_1 1 例、 M_2 2 例外, 其余 21 例均表现出程度不同的分化特征。21 例均出现聚集、贴壁现象, 于 72 h 时最为明显。NBT 还原能力明显增强, 吞噬功能也较对照组增强, 形态观察见中幼粒以下阶段细胞增多。TPA 诱导组: 24 h 均出现细胞聚集、贴壁现象, 贴壁细胞多呈梭形、星状, 部分细胞出现丝状突起, 该现象出现早, 多在 24 h 即已出现, NBT 还原能力、吞噬能力均增强, 形态观察见细胞多已变形, 细胞趋于成熟, 核浆比例下降, 有的胞浆中出现空泡。两组诱导后的细胞均出现向成熟分化的相应酶学改变(见附表)。

二、急性早幼粒白血病细胞 观察 12 例急性早幼粒细胞白血病 M_3 细胞, GSL 组及 TPA 组的诱导分化程度均较低。向成熟分化主要表现在 NBT 还原能力的增强上。GSL 组细胞无明显聚集、贴壁现象, 吞噬功能轻度增强, 未见杆状核、分叶核等终末分化细胞, 特异性酯酶染色阳性率降低。TPA 组全部细胞聚集、贴壁, 但细胞仍呈圆形, 并且出现时间晚, 多在 72 h 时明显, 吞噬功能有一定程度增强, 细胞化学及形态上改变不明显。

三、急性粒单及单核细胞白血病细胞 观察共 22 例, 其中急性粒单细胞白血病 M_4 14 例, 急性单核细胞白血病 M_5 8 例。GSL 组:

M_4 3 例, M_5 2 例诱导前后各指标改变不明显, 其余 17 例出现较大程度的分化。聚集、贴壁于 24 h 左右即已出现, 部分贴壁细胞伸出突起, 呈梭形、星状。NBT 还原能力及吞噬功能与对照组相比差异显著。多数病例出现非特异性酯酶活性增高。形态观察见细胞明显变形, 核呈肾形、分叶状, 核浆比例缩小, 胞浆中出现空泡, 呈现出成熟单核细胞的特征。TPA 组: 细胞明显聚集、贴壁, 贴壁细胞呈梭形、伸出丝状突起, 24 h 就已明显, 并出现较强的 NBT 还原能力及吞噬功能。与单核细胞分化相关的非特异性酯酶活性增高, 也呈现出向单核细胞分化的特征(见附表)。

讨 论

本实验结果表明, GSL 对急非淋白血病各型细胞均有不同程度的诱导分化作用, 对 M_4 、 M_5 的诱导分化作用最强, 对 M_1 、 M_2 的诱导分化作用次之, 对 M_3 的诱导分化作用最弱, 诱导后使各型白血病细胞不同程度地沿着各自系列方向终分化。本研究与 GSL 进行对比的同时, 再次证明了 TPA 的诱导分化作用。在观察的 58 例人参皂甙组急非淋白血病细胞中有 8 例未出现明显分化, 白血病细胞类型不同, 分化程度也不同, 且同一类型白血病细胞的诱导分化也存在着一定的差异。这一结果的原因是: 由于白血病细胞的异质性和易变性使得同一类型的白血病细胞对同一诱导分化剂的敏感性不同, 并说明该诱导剂对白血病细胞的诱导分化具有型别及阶段的特异性。此外, 有些出现功能上分化的细胞却未出现形态上的分化, 反之亦然。提示人参皂甙对白血病细胞促分化尚属不完全分化, 如何使白血病细胞向终末完全分化, 是值得今后不断探讨研究的问题。

关于 GSL 的诱导分化作用机制, 目前已有许多实验报道, 人参皂甙可增加细胞内 cAMP 含量, 杨贵贞等报道当给小鼠注射人参皂甙后, 小鼠脾细胞内 cAMP 水平明显提高⁽⁴⁾, 楼兰花等报道人参芦总皂甙能明显提高小

附表 GSL、TPA 诱导前后的急非淋白血病细胞功能及细胞化学变化 ($\bar{x} \pm S\bar{x}$)

白血病类型及分组		阳性细胞百分率(%)			
		NBT	吞噬	CE	AE
M ₁	诱导前	3.75 ± 3.37	3.70 ± 2.75	24.00 ± 37.00	4.10 ± 4.40
	TPA	53.12 ± 16.52* [△]	45.00 ± 17.42* [△]	4.50 ± 5.60 [△]	0.30 ± 0.80* [△]
	GSL	44.37 ± 16.50* [△]	26.00 ± 8.40* [△]	6.10 ± 4.90 [△]	0.60 ± 0.40* [△]
	对照	8.50 ± 10.00	5.75 ± 4.71	7.00 ± 12.50 [△]	3.60 ± 4.10
M ₂	诱导前	8.76 ± 6.71	10.42 ± 8.36	53.00 ± 23.00	12.20 ± 24.00
	TPA	58.76 ± 20.60* [△]	65.30 ± 18.89* [△]	49.60 ± 33.00	2.50 ± 5.30
	GSL	46.61 ± 15.53* [△]	35.92 ± 13.28* [△]	54.90 ± 30.00	6.60 ± 12.40
	对照	11.46 ± 8.13	15.84 ± 6.99	61.58 ± 26.20	7.50 ± 12.00
M ₃	诱导前	3.00 ± 3.40	6.16 ± 6.00	81.75 ± 47.63	6.50 ± 20.00
	TPA	28.58 ± 26.97* [△]	15.75 ± 12.06	38.10 ± 36.90* [△]	3.80 ± 8.40
	GSL	31.75 ± 20.20* [△]	17.25 ± 7.75	51.80 ± 9.80* [△]	3.60 ± 6.00
	对照	6.00 ± 7.20	8.58 ± 5.59	67.41 ± 28.22	1.75 ± 3.50
M ₄	诱导前	9.85 ± 10.72	16.92 ± 6.7	26.80 ± 15.9	28.70 ± 24.60
	TPA	62.07 ± 24.75* [△]	65.5 ± 12.53* [△]	20.80 ± 17.00	60.90 ± 16.79* [△]
	GSL	52.25 ± 16.63* [△]	71.50 ± 19.72* [△]	26.16 ± 17.00	59.50 ± 22.00* [△]
	对照	14.28 ± 12.31	24.61 ± 11.17	19.60 ± 12.90	31.07 ± 19.64
M ₅	诱导前	3.50 ± 3.00	17.50 ± 7.60	24.33 ± 19.26	45.00 ± 30.29
	TPA	76.50 ± 16.10* [△]	82.50 ± 15.82* [△]	21.80 ± 16.10	83.33 ± 15.81* [△]
	GSL	64.66 ± 21.77* [△]	78.66 ± 10.93* [△]	17.60 ± 15.50	78.33 ± 11.41* [△]
	对照	11.66 ± 15.24 [△]	28.00 ± 14.15	24.20 ± 17.00	57.00 ± 22.60

注: 与对照组相比, * $P < 0.05$; 与诱导前相比[△] $P < 0.05$

鼠白细胞内的 cAMP 含量⁽⁵⁾, 而有关诱导分化作用的研究证明, 能升高细胞内 cAMP 含量的药物如前列腺素 E₂、霍乱毒素、dBcamp 等均能诱导 HL-60 及 U-937 细胞分化, 并能与其它诱导分化剂起协同作用^(6, 7)。GSL 还具有诱生干扰素的作用⁽⁸⁾, 干扰素的诱导分化作用已有大量研究证实⁽⁹⁾。综合以上相关资料推论: GSL 的诱导分化作用是以上效应的综合结果, 其确切机制尚需进一步研究。

参 考 文 献

1. 白血病分类分型讨论会. 关于急性非淋巴细胞白血病分型的修改建议. 中华血液学杂志 1987; 8(3): 181.
2. Fibach E, et al. Modulation of the maturation of human leukemic promyelocytes (HL-60) to granulocytes or macrophages. Leuk Res 1982; 6: 781.
3. Takeda k, et al. Kinetics of appearance of differentiation-associated characteristics in ML-1, a line of human myeloblastic leukemia cells, after treatment with 12-0-tetradecanoylphorbol 13-acetate.

iimethyl sulfoxide, or 1-β-D-arabinofuransyl-cytosine. Cancer Res 1982; 42: 5152.

4. 杨贵贞, 等. 人参皂甙对体内外免疫调整作用的初步研究. 白求恩医科大学学报 1983; 9(3): 1.
5. 楼兰花, 等. 参芦总皂甙对小鼠免疫功能的双向调节作用. 上海免疫学杂志 1986; 6(5): 280.
6. Debra L, et al. Differentiation of U-937 histiocytic lymphoma cells towards mature neutrophilic granulocytes by dibutyryl cyclic adenosine-3', 5'-monophosphate. Cancer Res 1990; 50: 20.
7. Ingel L, et al. Priming of human myeloid leukemic cell lines HL-60 and U-937 with retionic acid for differentiation effect of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-inducing agents and T-lymphocyte-derived differentiation eactor. Cancer Res 1982; 42: 3928.
8. 于永利, 等. 吉林人参花皂甙对 NK₂IFN₂IL 调节网作用及其抑瘤效应. 中国免疫学杂志 1987; 3(1): 41.
9. Hemmi H, et. al. Combinations of recombinant human interferons and acid synergistically induce differentiation of the human nromyelocytic leukemia cell line HL-60. Blood 1987; 69: 501.

Inductive Differentiation Effect of Ginsenosides on Human Acute Non-lymphocytic Leukemic Cells in 58 Patients

Yi Rong-lin (易永林), Li Wei (李 薇), Hao Xiu-zhi (郝秀智)
*First Teaching Hospital, Norman Bathune Medical University
of Medical Sciences, Changchun (130021)*

Ginsenosides are the main active component of *Panax ginseng*. It has been shown that ginsenosides have antineoplastic, antiaging, immunologic function enhancing and other pharmacological actions. In this article, result of experimental studies showed ginsenosides extracted from stem and leaf of *Panax ginseng* (GSL) has inductive differentiation effect on all types of acute non-lymphocytic leukemia cells in primary culture. The effect on M₅, M₄ was most potent, followed by M₁, M₂ and the least, on M₃. Through analysis, it was considered that the inductive differentiation effect of ginsenosides might be due to the comprehensive effect of increasing intracellular cAMP and inducing interferon. Since GSL have some other important actions, therefore, if it could be used as a differentiation inducer in clinical practice or combined with other antineoplastic drugs, it would show co-antineoplastic actions in many aspect.

Key word ginsenosides, acute non-lymphocytic leukemia, inductive differentiation, primary culture

(Original article on page 722)

Effects of Silybin on Red Blood Cell Sorbitol and Nerve Conduction Velocity in Diabetic Patients

Zhang Jia-qing (张家庆), Mao Xiao-ming (毛晓明), Zhou Yun-ping (周云平)
Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai (200433)

The effects of silybin on red blood cell (RBC) sorbitol and nerve conduction velocity in 14 non-insulin dependent diabetic patients (female 9, male 5; average age 58.2 years) were reported. Their RBC sorbitol levels averaged 72.55 ± 21.61 nmol/g.Hb, a value almost two times of non-diabetic controls (33.31 ± 7.82 nmol/g.Hb). After 4 weeks of silybin (231mg/d) therapy, RBC sorbitol dropped to 39.53 ± 14.94 nmol/g.Hb, a highly significant reduction than that before silybin therapy. Silybin treatment had no effect on fasting blood glucose. In addition, silybin treatment slightly improved nerve conduction velocity, but statistically not significant. This report suggests that silybin may be a potent aldose reductase inhibitor, and valuable in the prophylaxis and treatment of diabetic complications.

Key word silybin, sorbitol, aldose reductase inhibitor

(Original article on page 725)

Effects of Guan-Mai-Shu (冠脉舒) on Tissue-Type Plasminogen Activator and Plasminogen Activator Inhibitor in the Plasma of Patients with Coronary Heart Disease

Xiong Xiao-zhong (熊小忠), Mo Shu-song (莫树松), et al
The Second Teaching Hospital, Hunan Medical University, Changsha (410011)