

• 博士之窗 •

515 抗瘤方剂诱导白血病 HL-60 细胞凋亡的研究

谢新生^{*} 高 聆 宋玉琴 王春霞 赵家军 徐功立

内容提要 **目的**:观察中药 515 抗瘤方剂对白血病 HL-60 细胞的影响。**方法**:采用光镜、透射电镜观察形态及结构,流式细胞术测量凋亡率,原位末端标记检测 DNA 断裂。**结果**:细胞与药物共同孵育一定时间后出现核固缩、核碎裂等典型的凋亡形态学变化,药物浓度在 0.013 ~ 0.04g/ml 之间,药物组与对照组凋亡率有显著性差异($P < 0.01$)。**结论**:515 抗瘤方剂能诱导 HL-60 细胞发生凋亡,细胞凋亡率随时间延长增加,且呈现剂量依赖性。

关键词 中药 细胞凋亡 HL-60 细胞

Study on 515 Anti-Tumor Recipe in Inducing Leukemic HL-60 Cells Apoptosis XIE Xinsheng, GAO Ling, SONG Yuqin, et al *Shandong Provincial Hospital, Jinan (250021)*

Objective: To observe the efficacy of 515 anti-tumor recipe on inducing human myeloid leukemic HL-60 cells apoptosis. **Methods**: The morphological change of apoptotic cells was observed by light microscopy and transmission electromicroscopy (TEM), and flow cytometry and TUNEL reaction to further confirm the apoptosis of HL-60 cells. **Results**: Typical apoptosis appeared such as marginal nuclei, chromatin condensation and nuclear fragmentation could be seen by light microscopy and TEM. The drug concentration was between 0.013 ~ 0.04g/ml. The apoptosis rate is 30 % in 0.04g/ml group at the 72nd hour, but it was only 0.8 % in the control group at the same time ($P < 0.01$). **Conclusions**: The 515 anti-tumor recipe can induce apoptosis in HL-60 cells. The apoptosis rate increased as the time extended. There was an enhanced efficiency of apoptosis in a dose-dependent manner.

Key words Chinese herbal medicine, apoptosis, HL-60 cells

为寻找新的抗癌药,通过筛选制备了由三棱、女贞子、黄药子、黄芪等多味中药组成的 515 抗瘤方剂,并观察了 515 抗瘤方剂对白血病 HL-60 细胞的影响。

材料和方法

1 515 抗瘤方剂 由本院药理研究室提供。原药包括黄芪 30g 炮山甲 30g 三棱 5g 女贞子 20g 黄药子 5g 莪术 15g 薏苡仁 30g 白花蛇舌草 20g,水煎后取上清,经浓缩、冷冻干燥后制成粉剂备用。用前以生理盐水配制成 0.04g/ml 的浓度,以直径为 0.22 μ m 的微孔滤膜过滤除菌,于 4℃ 冰箱保存。实验时用 RPMI 1640(美国 GIBCO BRL 公司生产,批号:1000606)稀释,组成药物浓度分别为 0.04g/ml,0.02g/ml,0.013g/ml,0.008g/ml 及对照(非加药)5 个实验组。

2 细胞株 HL-60 细胞由本院中心实验室细胞室传代培养。

3 细胞培养 HL-60 细胞接种于含 10 % 小牛血清(购自山东省医学科学院)的培养液 RPMI 1640 中,置 37℃,5 % CO₂ 浓度及饱和湿度的恒温培养箱中悬浮培养,传代至对数生长,实验前 24h 半量换液。96 孔培养板每孔以每毫升 2×10^5 个细胞的浓度接种,每组 12 个孔。

4 形态学观察 培养细胞经上述不同浓度的药物作用 12、24、48、72h 后,每个组别分别取 3 个孔的细胞,离心后 PBS 洗两次,做细胞滴片,自然风干,4 % 福尔马林固定 25 min 后做 HE 染色,光镜下观察,另取上述不同浓度药物作用不同时间的细胞 $10^6 \sim 10^7$ 个,4 % 戊二醛固定,包埋,切片进行透射电镜(JEOL-1200EX 日本产)观测。凋亡率的计算:高倍视野下计数 200 个细胞,凋亡率 = 凋亡细胞数/200 个细胞 $\times 100\%$

5 流式细胞仪(FACScan,美国 BECTON DICKINSON 公司)检测:对照组及 0.04g/ml 药物浓度分别与细胞共同孵育 72h 后取 1×10^6 个细胞,PBS 洗 2 次,70 % 冷乙醇 4℃ 固定 12h,PBS 清洗细胞,与含 1 %

RNA 酶的 TrisHCl 缓冲液(pH7.4) 孵育 30 min,PI 染色,检测凋亡细胞。

6 原位末端脱氧核苷酸转移酶标记反应(Tunel,试剂盒由德国宝灵曼公司生产):滴片自然干燥后,4%多聚甲醛常温固定 30 min,PBS 轻洗玻片,0.1% Tritonx-100 冰浴下孵育 2 min 透膜,20%乙酸阻断内源性酶 15s,PBS 洗片 2 次后,使标本周围干燥,加 50 μ l Tunel 反应混和液于标本上,37 $^{\circ}$ C 湿盒孵育 30 min,TBS 清洗,加 50 μ l Tunel Ap 于标本上,37 $^{\circ}$ C 湿盒孵育 30 min,TBS 清洗后加反应底物,室温孵育 10 min,核固红衬染,封片,光镜下观察,阳性(凋亡)细胞呈蓝色,阴性细胞呈红色,计算阳性标记率。

结 果

1 形态学变化 药物作用 24h 后即出现具有凋亡特征的细胞,光镜可见凋亡细胞核染色质高度浓缩,核碎裂(见图 1A)。透射电镜可见核固缩,核染色质浓缩至核膜下(见图 1B)。

2 药物诱导 HL-60 细胞凋亡的动态变化 同一药物浓度在不同的作用时间,HL-60 细胞凋亡率随时间而增加。0.04g/ml 浓度组在 24、72h 诱导的凋亡率分别为 9.7%、30.0%,而对照组凋亡率分别为 0.3%、0.8%,药物浓度于 0.013~0.04g/ml 间各组分别与对照组比较,凋亡率有显著性差异($P < 0.05$)。见图 2。

3 药物剂量与细胞凋亡诱导的关系 0.008g/ml

浓度组作用不明显,但随药物浓度增大,细胞凋亡率增高,在 0.013~0.04g/ml 浓度范围内有明显的剂量依赖性,即药物浓度与凋亡率成正相关。见图 2。

4 流式细胞仪检测 0.04g/ml 的浓度作用 72h 后,可见明显的亚 G_1 峰(即凋亡峰),凋亡率达 27.57%,对照组凋亡率仅为 2.37%,见图 3。

5 TUNEL 反应 0.04g/ml 药物浓度与细胞共同孵育 48h 后,细胞阳性标记率为 26.0%,而对照组仅 0.5%($P < 0.01$)。

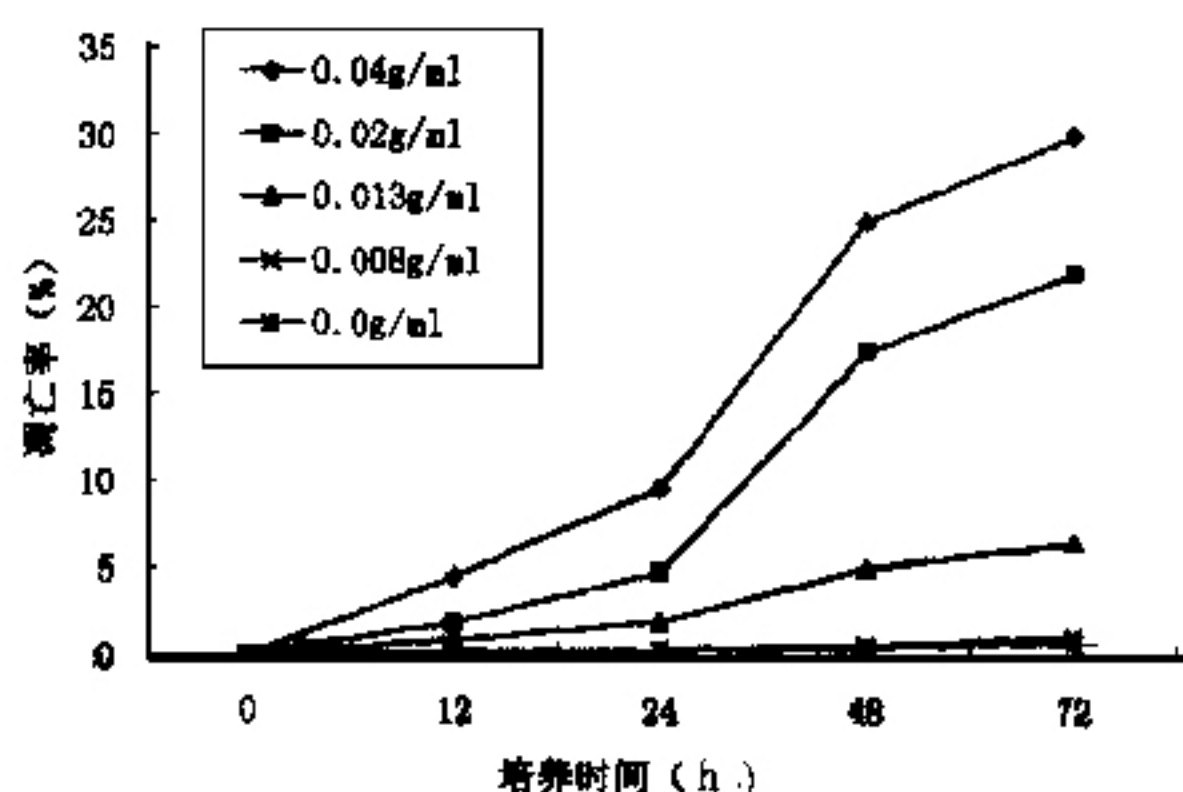
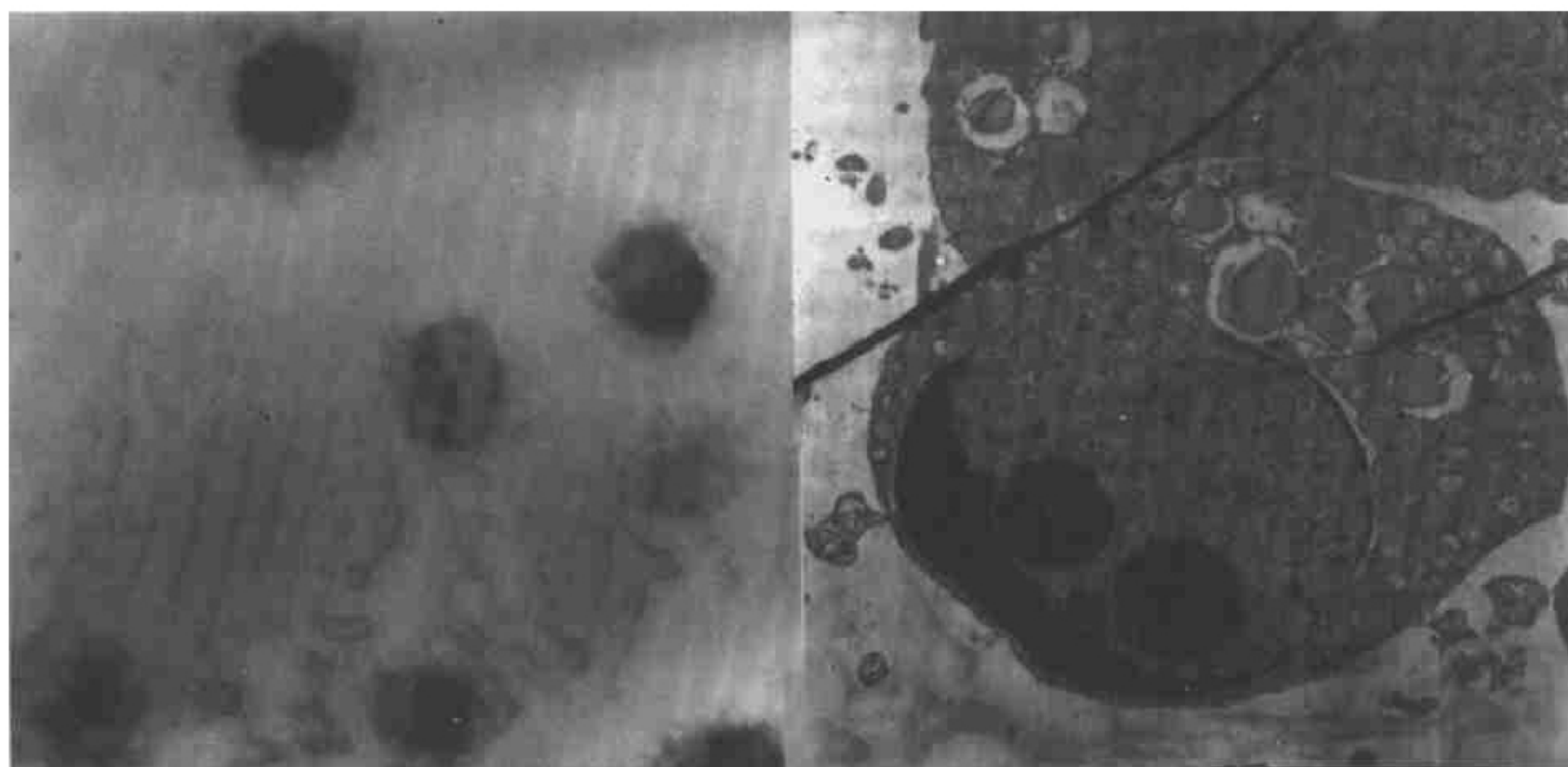


图 2 各浓度组在作用不同时间后 HL-60 细胞凋亡率的变化



A:HE 染色 $\times 100$

B:透射电镜 $\times 4000$

图 1 0.04g/ml 的药物浓度作用 48h 后细胞形态学变化

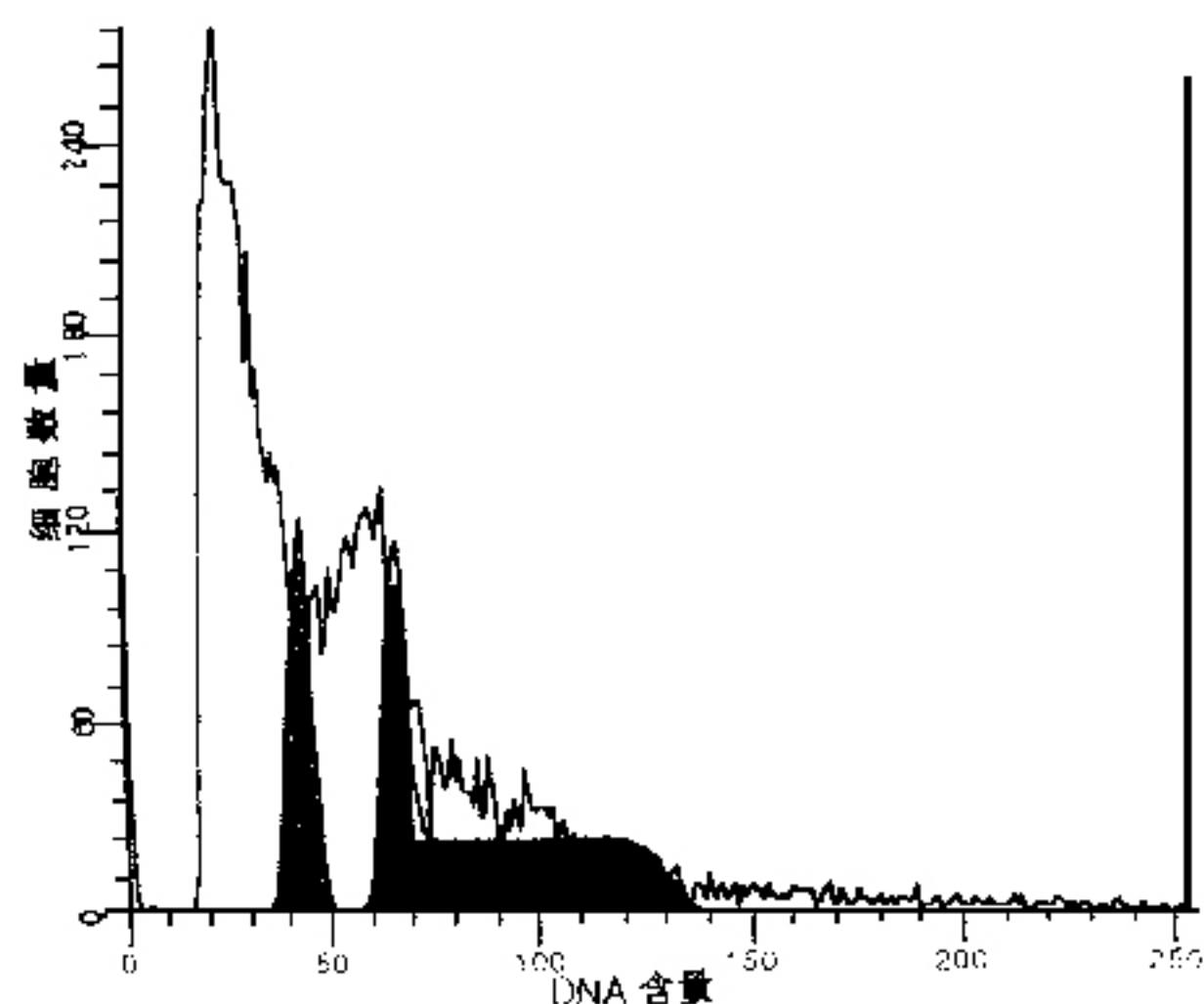
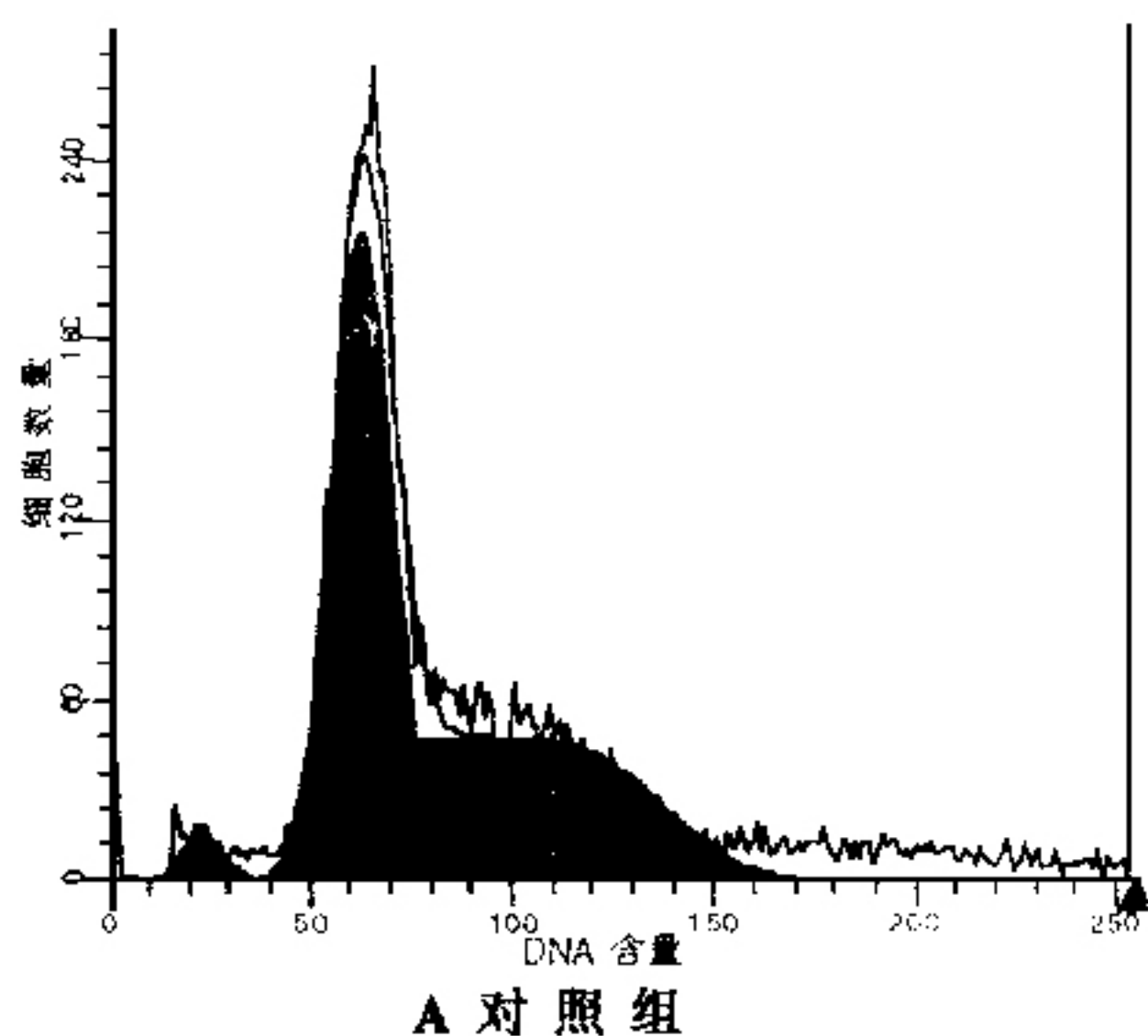


图 3 药物作用 72h 后流式细胞仪检测结果

讨 论

细胞凋亡是细胞在接受外界一些致凋亡因素作用后发生的一种主动自杀过程,触发白血病细胞发生凋亡是目前白血病治疗上主要目标之一,研究凋亡的方法很多,形态学观察是判断细胞凋亡的基本方法,核碎裂、核小体出现为主要指标⁽¹⁾,流式细胞仪定量的方式确定细胞内总 DNA 量变化也是目前被广泛采用的方法,本实验显示 515 抗肿瘤方剂在与细胞作用 24h 即可诱导典型的凋亡细胞出现,作用 72h 后凋亡率达 30% 左右,且在 0.013 ~ 0.04g/ml 浓度范围内凋亡率与药物浓度有良好的线性关系,即随药物浓度增大,凋亡率逐渐升高;药物作用后出现较高的亚 G₁ 峰,进一步证实了 515 抗肿瘤方剂具有诱导 HL-60 细胞凋亡的作用,但上述两种方法对凋亡细胞内部发生的本质变化却不能反映。细胞凋亡时,DNA 被内源性核酸酶,从核小体间断裂成 180 ~ 200bp 的核苷酸链,断裂产生一粘性末端,本实验选用具有特异性且敏感度高的末端标记方法,避免了坏死细胞及 X 线损伤细胞 DNA 随机断端被 DNA 多聚酶标记造成的假阳性⁽²⁾,实验中在低倍镜下即可见药物组有大量的阳性细胞,说明在药物作用的早期就已诱导细胞凋亡,中药与传统化疗药物比较,有副作用小,毒性低,骨髓抑制轻等优点,本研究为传统中药治疗白血病的开发利用提供了一定的理论依据,但本药通过何种途径诱导白血病细胞发生凋亡尚需进一步探讨。

参 考 文 献

1. 周剑峰,陈 燕,李崇渔,等.阿糖胞苷诱导 HL-60 细胞凋亡的研究.中华肿瘤杂志 1997;19(2):107—110.
2. 韩 锐主编.抗癌药物研究与试验技术.北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1997:403.

(收稿:1999-08-09 修回:1999-10-25)