

· 实验研究 ·

柴胡皂甙 d 上调人急性早幼粒白血细胞糖皮质激素受体 mRNA 对细胞生长的影响*

步世忠¹ 许金廉¹ 孙继虎¹ 陈宜张¹ 商 权²

内容提要 目的:观察柴胡皂甙 d(SSd)对人急性早幼粒白血细胞(HL60)糖皮质激素受体(GR)mRNA 表达的调节作用及对细胞生长的影响。方法:用从柴胡中提取的单体成分 SSd,以³H-胸腺嘧啶(³H-TdR)掺入法和流式细胞仪观察细胞生长,用 Northern blot 分析 SSd 对 GR mRNA 的改变。结果:经 SSd 作用后,HL60 细胞³H-TdR 掺入率明显降低,呈时间和剂量依赖关系,SSd 10 μ g/ml 处理 48h 作用最明显;流式细胞仪分析细胞呈现 G₀/G₁ 期阻滞现象,GR mRNA 表达增加。结论:SSd 可上调 HL60 细胞 GR mRNA 表达并抑制细胞生长。

关键词 柴胡皂甙 d 糖皮质激素受体 信使核糖核酸 人急性早幼粒白血细胞 细胞生长

Effect of Saikosaponin-d on Up-regulating GR mRNA Expression and Inhibiting Cell Growth in Human Leukemia Cells Bu Shizhong, XU Jinlian, SUN Jihu, et al *Physiology Department, The Second Military Medical University, Shanghai (200433)*

Objective: To study the effect of Saikosaponin-d (SSd) on the expression of glucocorticoid receptor (GR) mRNA and cell growth in HL60 cells. **Methods:** Antiproliferation effects of SSd on HL60 cells were determined by ³H-thymidine incorporation. Cell cycle analysis was also performed by flow cytometry. GRmRNA was analyzed by northern blot analysis. **Results:** After 48 hours treatment with 10 μ g/ml SSd, ³H-thymidine incorporation decreased in HL60 cells and the effect was time and dose dependent. The flow cytometry analysis showed HL60 cells were arrested at G₀/G₁ phase. The expression of GR mRNA increased. **Conclusion:** SSd exhibits the inhibition effects on cell growth in HL60 cells and could up-regulate the expression of GR mRNA in HL60 cells.

Key words Saikosaponin-d, glucocorticoid receptor, mRNA, cell growth, human leukemia cells

柴胡为中药常用药,其有效成分柴胡皂甙有抗炎、调节内分泌和免疫系统的功能^[1],柴胡皂甙可分为 a、b、c、d、e、f、g、h、i 9 种,其中具有抗炎和内分泌及免疫调节功能的是柴胡皂甙 d(SSd)^[2],SSd 有糖皮质激素(GC)样甾环结构,因此对 SSd 的研究已引起国内外学者的广泛重视。在生物体的生长和发育过程中 GC 起着极其重要的作用,而这些作用都是通过糖皮质激素受体(GR)介导的。本研究将以人急性早幼粒白血细胞(HL60)为研究对象,观察 SSd 对 HL60 细胞 GRmRNA 表达和细胞生长的影响。

材料与方法

1 柴胡皂甙 d 日本 Wako Junyaku 公司产品。

2 细胞株 HL60 细胞为人急性早幼粒白血细胞株,引自中国科学院上海细胞研究所细胞库;HL60 细胞浓度为 1 $\times$ 10⁶/ml,在 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 培养箱中培养。

3 ³H-胸腺嘧啶(³H-TdR)掺入 按文献^[3]方法,将 HL60 细胞置于 96 孔培养板,每孔加 100 μ l 细胞悬液,再加³H-TdR 2 μ Ci(³H-TdR 特异活性为 22Ci/mmol;中国科学院上海原子核研究所提供)做 SSd 对³H-TdR 掺入影响的剂量依赖性和时间依赖性分析。

4 凋亡细胞和细胞周期测定 按文献^[4]方法,取经 SSd 处理及对照组细胞各 1 $\times$ 10⁶/ml, PBS 洗涤,以 70% 冷乙醇 4 $^{\circ}$ C 固定 4h,离心(500r/min, 5min)去除乙醇,加入磷酸-枸橼酸缓冲液 40 μ l 悬浮细胞,室温置 30min,离心(500r/min, 5min),PBS 100 μ l 悬浮沉淀细胞,加入 Rnase A 溶液 1 μ l, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min,加入碘化丙啶溶液 50 μ l(1mg/ml)混合,置暗室 30min 染色。用流式细胞仪测定凋亡细胞数和细胞周期。

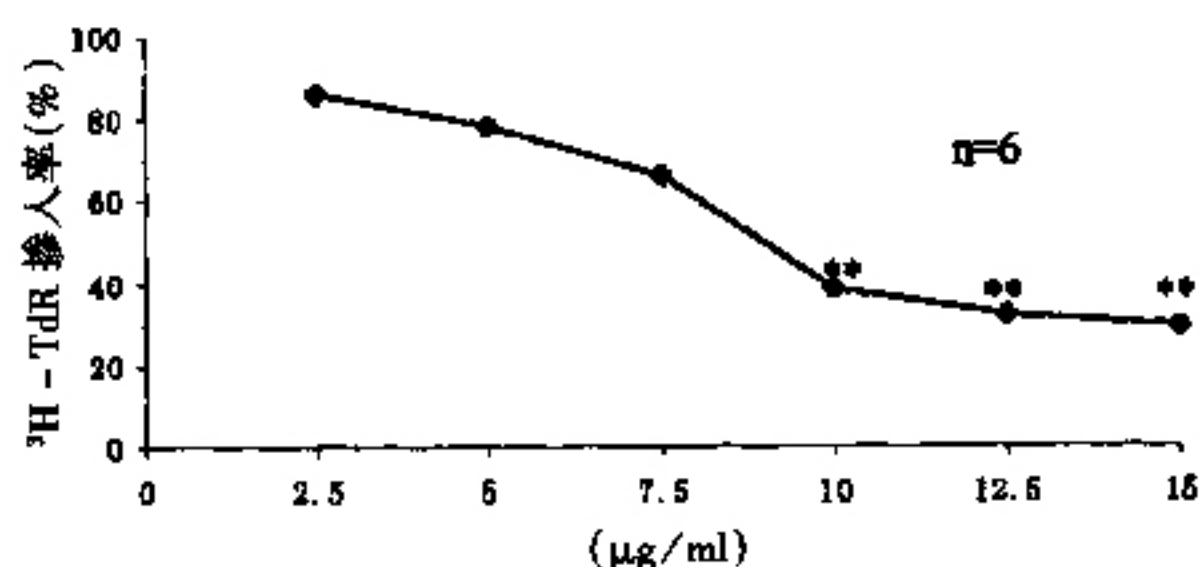
* 国家中医药管理局基金资助(No. 96F016)

1. 第二军医大学生理教研室(上海 200433);2. 中国科学院上海生化研究所分子生物学国家重点实验室

5 总 RNA 抽提和 Northern 印迹法测定 GRmRNA 细胞总 RNA 抽提按照 Chomczynski⁽⁵⁾ 硫氰酸胍-苯酚-氯仿一步法加以改进⁽⁶⁾, 经 DABA 法⁽⁷⁾ 测知其中 DNA 含量小于 1%, 经紫外分光光度计 ($OD_{260}/OD_{280} > 1.8$) 后, 通过电泳转移交联于尼龙膜上, 与 α -³²PdATP 标记的人 GRmRNA (编码 DNA 结合区) 或 β 肌动蛋白 (β -Actin) cDNA (比活为 5×10^8 cpm/ μ g) 于 65℃ 杂交过夜, 杂交信号于 -70℃ 放射自显影。湿润的尼龙膜用 10mmol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸 (Tris-HCl, pH8.0), 1mmol/L 乙二胺四乙酸 (EDTA), 0.1% (w/v) 十二烷基硫酸钠 (SDS) 于 95℃ 洗 20min, 可除去杂交信号, 用于下一次杂交。

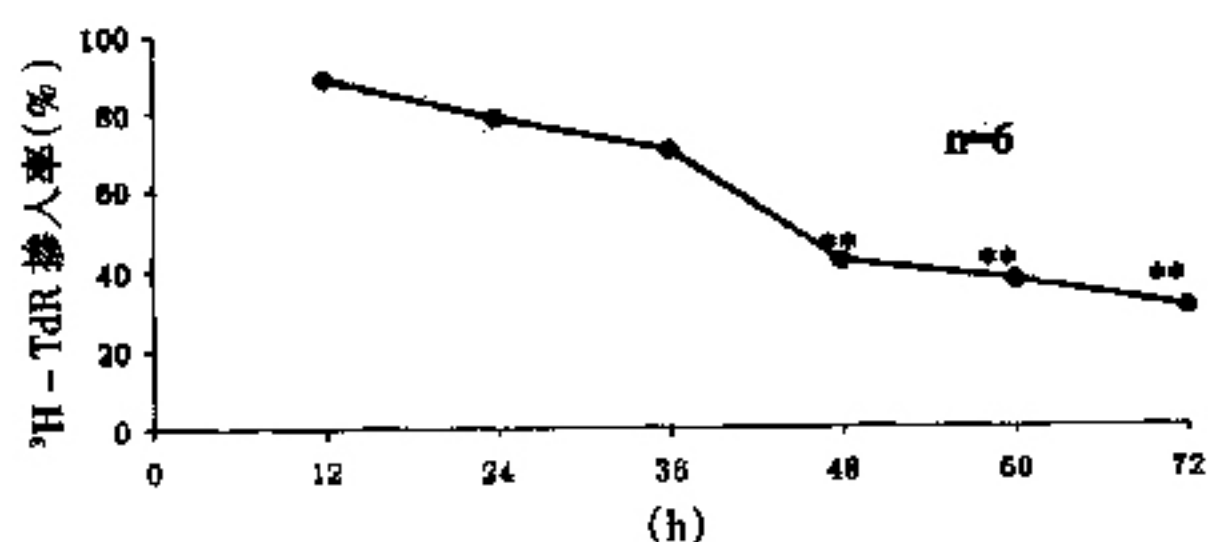
结 果

1 SSd 对 HL60 细胞³H-TdR 掺入率的影响 见图 1、2。经 SSd 处理后的 HL60 细胞³H-TdR 掺入率明显下降, 并呈剂量和时间依赖, 10 μ g/ml 剂量时³H-TdR 掺入率下降最明显, 达 40% ($P < 0.01$); 48h 时对³H-TdR 掺入率下降到 38% ($P < 0.01$)。



与 7.5 μ g/ml 比较, ** $P < 0.01$

图 1 SSd 对 HL60 细胞³H-TdR 掺入率的剂量依赖性曲线



与 36h 比较, ** $P < 0.01$

图 2 SSd 对 HL60 细胞³H-TdR 掺入率的时间依赖性曲线

2 HL60 细胞的流式细胞仪分析 见图 3。HL60 细胞经 SSd 10 μ g/ml 处理 48h 后, 细胞被阻滞在 G_0/G_1 期。

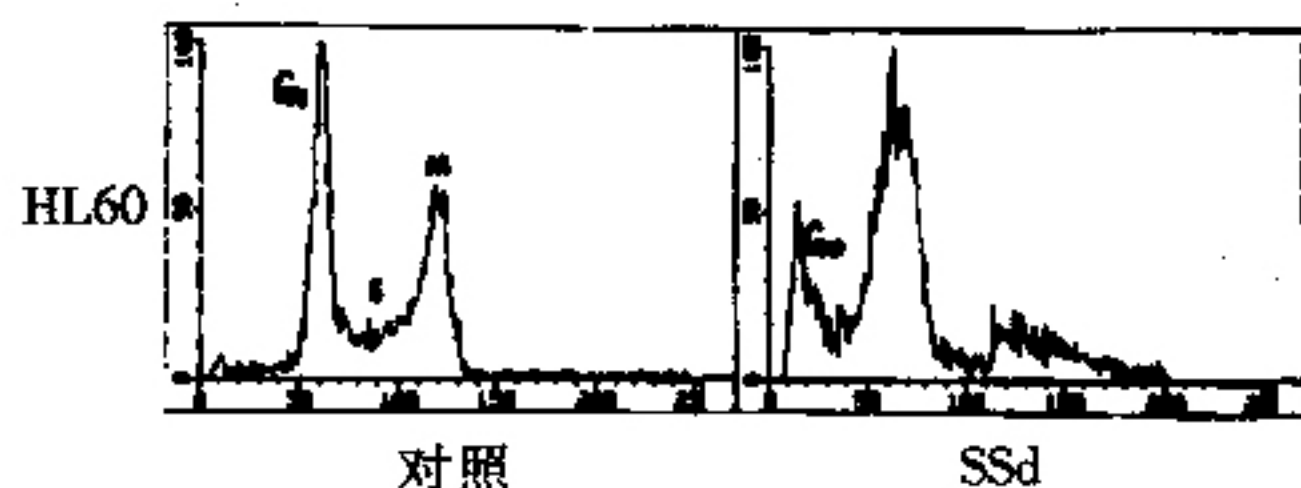


图 3 HL60 细胞的流式细胞仪分析

3 SSd 对 HL60 细胞 GRmRNA 表达的影响 见图 4。Northern blot 分析发现 SSd 处理 48h 后 GRmRNA 明显增加。

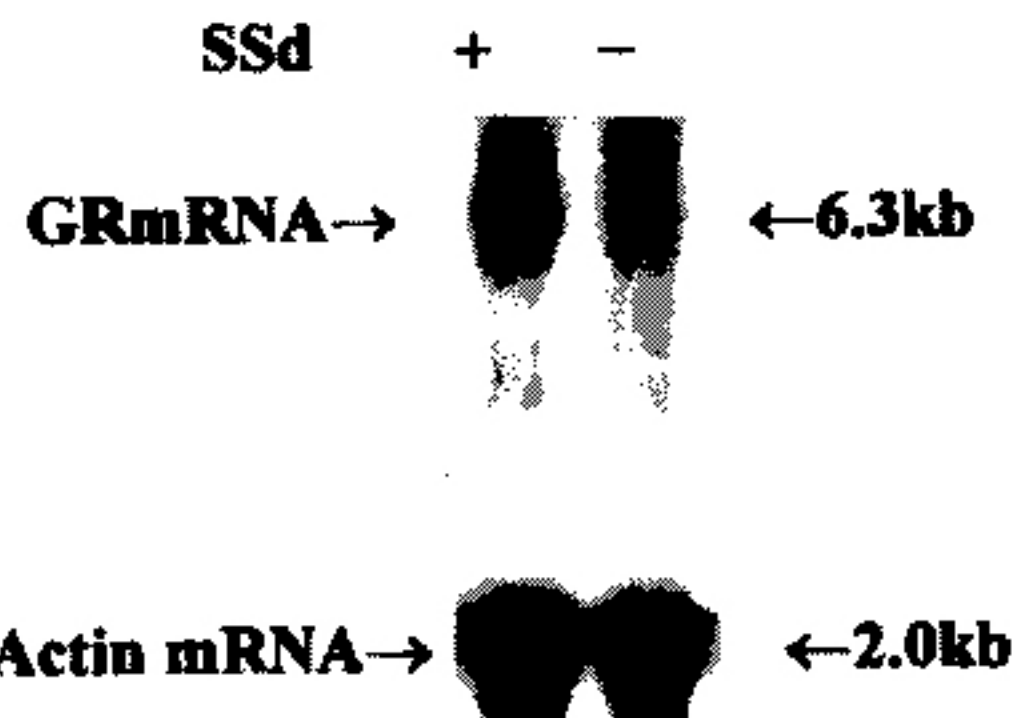


图 4 SSd 对 HL60 细胞 GRmRNA 表达

讨 论

SSd 具有 GC 样的甾环结构, 近期有报道 SSd 可刺激下丘脑促肾上腺皮质激素释放因子, 垂体促肾上腺皮质激素的分泌, 也可刺激垂体前叶促肾上腺皮质激素前体物质前阿黑皮原的基因表达⁽⁸⁾; SSd 有明显的增加巨噬细胞微丝和微管的功能, 增强该细胞的吞噬活性; SSd 能增加 T 淋巴细胞的活性, 对白细胞介素 2 及其受体的表达有诱导作用。SSd 的这些作用可能与其具有 GC 相似的甾环结构有关。GC 具有抗炎、调节免疫功能, 同时对细胞的生长和凋亡有重要的调节作用, GC 的这些作用都是由 GR 介导的, 而作为蛋白质的 GR 则是通过细胞内的基因组机制由 GRmRNA 翻译而来。本研究表明 SSd 可有效地降低 HL60 细胞³H-TdR 掺入率, 胸腺嘧啶是细胞增殖中胞核合成所必须的成分, 因此, 胸腺嘧啶掺入率的降低表明细胞增殖受抑制, 所以 SSd 可明显抑制 HL60 细胞增殖, 阻止肿瘤细胞的生长, 其效应呈剂量依赖和时间依赖关系, 当 SSd 处理 48h 后, 以及剂量大于 10 μ g/ml 时, 胸腺嘧啶掺入率明显降低。流式细胞仪分析也支持这一结果, 经 SSd 处理的 HL60 细胞 G_0/G_1 期增加, S 期细胞减少, 呈现明显的 G_0/G_1 阻滞现象。表明 SSd 可明显抑制 HL60 细胞 S 期 DNA 合成, 干扰了蛋白质代谢, 从而抑制细胞的分裂增殖。Northern blot 分析

GRmRNA 表达的结果表明,SSd 抑制 HL60 细胞增殖时,GRmRNA 表达明显增加。GC 的生物学活性都是通过细胞的基因组调节机制,由 GR 介导的,GC 的作用决定于 GC 和 GR 两方面因素,GC 对 GR 及 GRmRNA 的表达有负向调节(Downregulation)作用,因此增加 GC 的浓度,虽然 GC 的生物学效应是增强了,但 GRmRNA 的表达则大大降低。在 GC 含量不变的情况下,增加 GRmRNA 的表达,可提高 GC 的生物学功能而又可避免增加 GC 剂量所引起的一系列副作用。本研究中,在其他培养条件不变的情况下,HL60 细胞经 SSd 处理后,GRmRNA 表达增加,同时,SSd 对细胞的生长有明显的抑制作用,这可能是因为 SSd 有 GC 样甾环结构有关,有部分与 GC 相同的作用,不同的是 GC 下调 GRmRNA 表达,而 SSd 使 GRmRNA 表达增加。SSd 可增加 HL60 细胞 GRmRNA 表达,同时抑制细胞生长,表现为时间和剂量依赖。

参 考 文 献

1. 贾琦,张如意. 柴胡属植物中皂甙化学研究进展. 药学学报 1989;24:961—971.
2. Kato M, Pu MY, Nagase N, et al. Characterization of the im-

- munoregulatory action of saikosaponin-d. Cellular Immunol 1994;159:15—25.
3. Shi YF, Frankel A, Radvanyi LG, et al. Rapamycin enhances apoptosis and increases sensitivity to cisplatin in vitro. Cancer Res 1995;55:1982—1991.
4. Traganos F, Ardelt B, Halko N, et al. Effects of genistein on the growth and cell cycle progression of normal human lymphocytes and human leukemic MOLT-4 and HL60 cells. Cancer Res 1992;52:6200—6208.
5. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analytical Biochemist 1987;162:156—159.
6. Bu SZ, Yin DL, Ren XH, et al. Progesterone induces apoptosis and up-regulation of P53 expression in human ovarian carcinoma cell lines. Cancer 1997;79:1944—1950.
7. Thomas PS, Leranch C, Wirkin JW, et al. Specific measurement of DNA in nuclei and acids using diaminobenzoic acid. Anal Biol 1978;89:35—39.
8. Dobashi I, Tozawa F, Horiba N, et al. Central administration of saikosaponin d increases corticotropin-releasing factor mRNA levels in the rat hypothalamus. Neurosci Lett 1995;197:235—242.

(收稿:1999-06-12 第2次修回:2000-01-10)

中药熏洗液治疗肛门疾病 170 例

赵国华 胡志维 金刚石

1996 年 6 月~1999 年 3 月,我们用中药熏洗液治疗肛门疾病 170 例,并与高锰酸钾液坐浴 80 例作对照,现报告如下。

临床资料 250 例患者按 2:1 随机分为两组。治疗组 170 例,男 102 例,女 58 例;年龄 10~65 岁,平均 32 岁;病程 1~25 天,平均 12 天;内痔 25 例,炎性外痔 17 例,混合痔 29 例,肛裂 15 例,肛窦炎 4 例,肛门周围急性感染(毛囊炎及肛周皮下脓肿早期)10 例,各种肛门病手术 70 例。对照组 80 例,男 48 例,女 32 例;年龄 10~65 岁,平均 32 岁;病程 1~22 天,平均 11 天;内痔 6 例,炎性外痔 12 例,混合痔 9 例,肛裂 8 例,肛窦炎 4 例,肛门周围急性感染 8 例,各种肛门病手术 33 例。排除对象:年龄 <10 岁或 >65 岁,孕妇,肛门直肠肿瘤,深部脓肿或皮下脓肿中、晚期,未按规定用药者。

治疗方法 治疗组用中药熏洗液(由两面针 24g 黄连 15g 毛冬青 144g 五倍子 72g 芒硝 72g 冰片 3g 薄荷 1g,组成;制法:以前 5 味中药水煎 2 次,第 1 次煎 45min,第 2 次煎 30min,合并 2 次煎液过滤,并浓缩至 1200ml,待药液稍冷加入冰片及薄荷脑,拌匀,装瓶备用,每瓶 250ml)125ml 加温开水 2500ml 熏洗。对照组用 1:5000 高锰酸钾(PP 粉,即取 PP 粉 0.5g,加温开水 2500ml)熏洗,两组患者均先熏洗后坐浴,每

次 20min,每天 2 次,3 天为 1 个疗程,连用 2 个疗程评定疗效。

结 果 (1)疗效标准:1 个疗程后肛门水肿消退,疼痛消失,出血停止,脱出肛管回缩,感染消退为显效;2 个疗程后上述症状、体征有不同程度减轻或消失为有效;2 个疗程后上述症状、体征无改善为无效。(2)两组综合疗效:治疗组显效 40 例(23.5%),有效 114 例(67.1%),无效 16 例(9.4%),总有效率为 90.6%。对照组显效 10 例(12.5%),有效 40 例(50.0%),无效 30 例(37.5%),总有效率为 62.5%。两组比较,治疗组疗效优于对照组($\chi^2 = 28.67, P < 0.05$)。(3)两组症状疗效:肿胀、疼痛、出血、脱出的肛管总有效率,治疗组分别为 97%、100%、75%、50%;对照组分别为 83%、60%、55%、50%。

体 会 中医学认为肛门疾病的发生是由于风热燥湿,四气相合乘虚而入,致肛门部经络阻塞,血脉不行,气滞血瘀,热毒蕴结。因此,治疗中注意行气活血、清热解毒、祛风止痛。本方中药以两面针为主药,其性味辛苦麻微温,具有行气活血、祛风活络、散瘀消肿止痛的作用;黄连、毛冬青等性味苦涩,活血通脉,清热解毒,以加强其行气活血作用;芒硝能清火解毒,消肿止痛;五倍子涩肠止血,收敛固脱;冰片具有清热止痛作用;薄荷有疏风清热,消肿止痛之功。尤其对减少术后水肿、疼痛及各种原因引起的肛门局部肿痛效果较好,值得推广应用。

(收稿:1999-06-01 修回:1999-09-30)