清开灵注射液及其有效成分诱导人急性早幼粒白血病细胞凋亡的研究*

陈泽涛[1]　董　倩[1]　张　玲[2]　王　芸[2]

内容提要　**目的**：研究清开灵注射液及其有效成分治疗急性白血病的作用机理。**方法**：采用体外培养技术、MTT 法、细胞形态学、DNA 凝胶电泳及流式细胞检测技术，对清开灵及其有效成分诱导的人急性早幼粒白血病(HL-60)细胞凋亡进行分析。**结果**：清开灵及其有效成分黄芩甙、猪去氧胆酸对 HL-60 细胞均有很强的细胞毒作用，牛黄胆酸的作用次之，前三者在体外作用 6h 即可诱导细胞凋亡，流式细胞仪检测出现典型凋亡峰，牛黄胆酸无诱导 HL-60 细胞凋亡作用。**结论**：清开灵注射液及其有效成分可在体外诱导白血病细胞凋亡，可能是其治疗急性白血病的作用机理之一。

关键词　清开灵注射液　黄芩甙　牛黄胆酸　猪去氧胆酸　白血病细胞　细胞凋亡

Study on Effect of Qingkailing Injection and Its Active Principle in Inducing Cell Apoptosis in Human Acute Promyelocytic Leukemia CHEN Ze-tao, DONG Qian, ZHANG Ling, et al *The Affiliated Hospital of Shandong University of TCM, Jinan (250011)*

Objective: To investigate the mechanism of Qingkailing (QKL) Injection in treating acute promyelocytic leukemia. **Methods**: Using MTT technique, cell morphologic method, DNA gel electrophoresis and flow-cytometry to study the human acute promyelocytic leukemia (HL-60) cell apoptosis induced by QKL and its active principle. **Results**: QKL and its active principle, Baicalin and hyodeoxycholic acid, showed strong cytotoxicity in inhibiting HL-60 cell, the Bezoar cholic acid showed a weaker effect. Apoptosis could be induced after being treated for 6 hrs by the former three principles, showing a typical apoptosis peak under flow-cytometry, but could not be induced by the latter one. **Conclusion**: QKL could induce leukemia cell apoptosis in vitro, which may be one of the mechanisms of QKLI in curing acute promyelocytic leukemia.

Key words　Qingkailing Injection, Baicalin, Bezoar cholic acid, hyodeoxycholic acid, leukemia cell, apoptosis

近年来，清开灵注射液广泛用于临床多种疾病的治疗[1]。已有研究表明，清开灵注射液有抗小鼠脑膜白血病的作用[2]。我们经过临床观察发现，清开灵注射液对化疗药物有增效减毒作用。为进一步探讨清开灵抗白血病的作用机理，我们又开展了清开灵注射液及其主要成分诱导白血病细胞凋亡的体外研究。

材料与方法

1　细胞　HL-60 细胞系(人急性早幼粒白血病细胞，由山东省医学科学院免疫室提供)，37℃，5% CO_2 孵育箱中，用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 (Sigma 公司产品)培养液每 2～3 天传代培养。

2　药物制备　清开灵注射液主要由牛黄、水牛角、珍珠母、黄芩、栀子、金银花、板蓝根等药物组成，其主要成分有牛黄胆酸、猪去氧胆酸、黄芩甙等，北京中医药大学实验药厂生产，2ml/支，批号：97010212。其中每 1000ml 清开灵注射液中含胆酸 7g(猪去氧胆酸 3.75g、牛黄胆酸 3.25g)，黄芩 5g。实验所用黄芩甙纯度为 95.4%，牛黄胆酸纯度为 99%，猪去氧胆酸纯度为 95%，3 种主要成分由北京中医药大学实验药厂惠赠，均以 1mmol/L NaOH 溶液助溶，以培养液调至所需浓度。

3　HL-60 细胞敏感性的检测　采用 MTT 法。取指数生长期 HL-60 细胞，用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液调至终浓度为 1×10^5/ml，按每孔 0.2ml 接种于 96 孔培养板中，设空白对照组和不同浓度药物的实验组，每组各设 3 个平行孔，置 37℃，5% CO_2 孵育箱中培养 44h，每孔加入 5mg/ml 四甲基偶氮唑蓝(MTT，Sigma 公司产品)10μl，继续孵育 4h，离心

* 国家中医药管理局科研基金资助课题(No. 95C017)

1. 山东中医药大学附属医院(济南 250011)；2. 山东省医学科学院

万方数据

去上清液，每孔加入二甲基亚砜 150μl，混匀后于自动酶标仪上测定 570nm 及 630nm 波长的吸收光度（A 值），由抑制率说明药物对 HL-60 细胞的敏感性，抑制率按下式计算：

$$\text{抑制率}(\%)=\frac{\text{对照组 A 值}-\text{实验组 A 值}}{\text{对照组 A 值}}\times 100\%$$

4 细胞形态学变化 将 HL-60 细胞及药物加入铺有玻片的 24 孔板中，每孔 2ml，细胞和药物各 1ml。细胞终浓度 1×10^5/ml，药物作用终浓度为清开灵 1/1 200 原液（以培养液稀释 1200 倍），黄芩甙终浓度 8μg/ml，猪去氧胆酸终浓度 200μg/ml，牛黄胆酸终浓度 200μg/ml，分别作用 6h、24h、48h，玻片干燥，甲醇固定后，采用 Giemsa 染色，油镜下观察细胞形态变化。

5 DNA 凝胶电泳观察 提取各药物作用 6h 后细胞的 DNA，按文献[3]略加改进进行电泳，以 PBR 322/Hinf I（华美生物工程公司产品）作为 Marker，紫外线灯下观察拍照。

6 细胞凋亡数及细胞周期变化检测 分别收集各药物作用 6h、24h 细胞 1×10^6 个，70% 乙醇固定，RNA 酶消化处理，以碘化丙锭（PI）染色，用流式细胞仪（美国 BD 公司产品）检测，每份样本测 1×10^4 个细胞，进行细胞周期分析，低于 G_1 期 DNA 含量的细胞为凋亡细胞。

7 统计学方法 采用 t 检验。

结 果

1 各药物对 HL-60 细胞敏感性的作用 当清开灵注射液被稀释 4800 倍时，HL-60 细胞抑制率为 12.91%，稀释倍数为 800 倍时抑制率为 90.67%；当稀释 200 倍时细胞全部死亡（IC_{50} 为稀释 1600 倍）。说明清开灵注射液在体外具有很强的细胞毒作用，呈剂量依赖性，随着清开灵注射液剂量的增加，对 HL-60 细胞的增殖抑制增强。在清开灵注射液的 3 种有效成分中，黄芩甙对 HL-60 细胞的抑制率最强，呈剂量依赖性，8μg/ml 的药物浓度可抑制 86.16% 的细胞增殖，25μg/ml 时抑制率为 100%（IC_{50} 为 6μg/ml）；猪去氧胆酸作用次之，抑制作用呈剂量依赖性（IC_{50} 为 100μg/ml）；牛黄胆酸在 50～100μg/ml 范围内无明显抑制作用，在 100～800μg/ml 范围内表现为呈剂量依赖性的抑制作用（IC_{50} 为 300μg/ml）。

2 药物诱导 HL-60 细胞凋亡结果

2.1 细胞的形态学变化 清开灵注射液、黄芩甙、猪去氧胆酸均可在早期（6h）即可诱导 HL-60 细胞凋亡，并出现典型的细胞凋亡特征，随着时间的延长，凋亡小体释放，坏死细胞及继发于凋亡的坏死细胞增多，胞膜不完整，出现大量细胞碎片。牛黄胆酸未见凋亡细胞出现，部分细胞体积增大、膨胀，晚期可见破裂、死亡。

2.2 DNA 凝胶电泳 清开灵注射液、黄芩甙、猪去氧胆酸作用 6h 后，HL-60 细胞 DNA 开始降解，电泳出现梯状条带，即 180bp～200bp 及其整数倍数的 DNA 片断呈梯状排列。以清开灵、黄芩甙组 DNA 片断形成的条带最清晰，猪去氧胆酸组次之。牛黄胆酸组 DNA 电泳未见梯状条带（见图 1）。

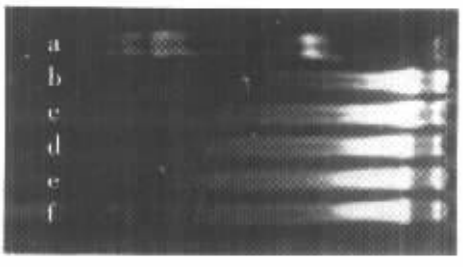

图 1 各药物作用 6h 后 DNA 凝胶电泳

注：a 为标记物 PBR 322/Hinf I；b 为细胞对照；c 为牛黄胆酸 200μg/ml；d 为猪去氧胆酸 200μg/ml；e 为黄芩甙 8μg/ml；f 为清开灵注射液（1/1200 原液浓度）

2.3 细胞凋亡检测 各药物作用 6h、24h 后，直方图中（图略）均可见 G_0/G_1 期峰前的亚二倍体峰。随时间的延长，清开灵、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，其余各组凋亡细胞比率增加。细胞周期分析显示清开灵、黄芩甙作用早期（6h）主要表现为将细胞阻滞于 S 期，减少进入 G_2/M 期细胞的比率；随时间延长，S 期细胞比率降低，细胞阻滞于 G_0/G_1（$P<0.01$）。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_0/G_1 细胞比率（$P<0.01$）。牛黄胆酸作用功能早期表现为减少 $S+G_2/M$ 期细胞比率（$P<0.01$），24h 后细胞周期分布显示与对照组比较差异无显著性（见表 1）。

表 1 各组不同时间 HL-60 细胞凋亡变化及细胞周期分布情况 （%）

组别		凋亡细胞比率	G_0/G_1	S	G_2/M
对照	6h	1.49	36.65	48.03	15.32
	24h	1.61	36.16	52.28	11.11
牛黄胆酸	6h	1.76	50.19	32.03*	17.78*
	24h	5.88*	37.15	50.06	12.79
猪去氧胆酸	6h	6.30*	45.55*	42.08	12.37
	24h	9.98*	52.35*	47.26	0.40
黄芩甙	6h	32.43*	43.77	6.23*	0
	24h	26.63*	58.81*	11.86*	29.34
清开灵	6h	18.99*	39.86	48.83	11.31
	24h	26.94*	58.67*	13.24*	28.09

注：与对照组同期比较，* $P<0.01$；每组细胞数为 1×10^4

万方数据

讨　论

清开灵注射液是‘安宫牛黄丸’的改型制剂，其主要成分有牛黄胆酸、猪去氧胆酸、黄芩甙等。本研究结果表明清开灵注射液及其 3 种有效成分均可剂量依赖性抑制 HL-60 细胞增殖，以黄芩甙、清开灵注射液作用最强，猪去氧胆酸次之，牛黄胆酸作用最弱。在诱导 HL-60 细胞凋亡的研究中发现，清开灵注射液及黄芩甙、猪去氧胆酸均有良好的诱导细胞凋亡作用，经形态学观察，DNA 凝胶电泳及流式细胞仪检测证实 3 种药物均可在作用早期（6h）诱导细胞凋亡出现，并对细胞周期分布产生影响，在早期将细胞阻滞于 S 期，随时间延长（24h）阻滞于 G_0/G_1 期细胞比率显著增高，S 期细胞比率下降。其中以黄芩甙作用最明显，推测黄芩甙是清开灵诱导细胞凋亡的主要成分。

细胞凋亡是多基因调控、多机制作用的结果。本研究观察了清开灵及其有效成分诱导细胞凋亡的现象，如能进一步研究其作用机理，证实其体内作用，从中进一步筛选有确切作用的药物（如黄芩甙、猪去氧胆酸）用于白血病的治疗研究具有重要意义。

参 考 文 献

1. 杨建华. 清开灵注射液的临床应用. 中成药 1994；16（12）：20—21.
2. 陈泽涛，顾振东，李　芮，等. 清开灵抗脑膜白血病的实验研究. 中国医药学报 1996；11（3）：51.
3. 姜　泊，张亚力，周殿元. 分子生物学常用实验方法. 北京：人民军医出版社，1996：170—172.

（收稿：2000－12－12　修回：2001－07－25）

蛋黄油外涂辅助治疗新生儿硬肿症 35 例

张淑琴　白凤玲

1999 年 2 月～2001 年 1 月，我们采用蛋黄油外涂辅助治疗新生儿硬肿症 35 例，并与用常规西医治疗的 38 例作对照，现报告如下。

临床资料　73 例为我院儿科住院患儿。诊断参照《实用儿科学》（诸福棠，吴瑞萍，胡亚美主编. 第 6 版. 北京：人民卫生出版社，1995：511）标准。按患儿入院顺序随机分为两组，治疗组 35 例，男 20 例，女 15 例；日龄 4h～14 天，平均（3±1）天；出生时体重（2720±420）g；胎龄（37±2）周；单纯新生儿硬肿症 7 例；合并新生儿肺炎 10 例，新生儿黄疸 4 例，新生儿脐炎 5 例，新生儿败血症 9 例。对照组 38 例，男 24 例，女 14 例；日龄 6h～18 天，平均（4±3）天；出生时体重（2800±380）g；胎龄（37±1）周；单纯新生儿硬肿症 10 例；合并新生儿肺炎 14 例，新生儿败血症 12 例，新生儿脐炎 1 例，新生儿黄疸 1 例。两组患儿均母乳喂养，均未放置暖箱。硬肿面积：治疗组 23%～34%，对照组 24%～34%。体温：治疗组＞35℃ 30 例，＜35℃ 5 例，对照组分别为 33 例、5 例。两组临床资料比较差异无显著性，具有可比性。

治疗方法　两组均采用常规治疗。（1）复温：采用电热毯或暖水袋缓慢复温，同时监测体温（上升速度不宜太快）。（2）营养和液体供给。（3）合并症治疗（退黄、脐部换药等）。（4）抗感染治疗。治疗组同时每天在硬肿部位涂抹蛋黄油 4～6 次，并加以局部按摩。蛋黄油制作：数个鸡蛋煮熟后去皮，除掉蛋清，将蛋黄放入勺内捣碎，文火焙，待蛋黄全部焙尽，除去杂质，将油倒入无菌干燥瓶内备用。

结　果

1　疗效判定标准　治愈：硬肿完全消失；显效：硬肿面积减少＞1/2；无效：硬肿面积减少＜1/2。

2　两组疗效　治疗组 35 例治愈 30 例，显效 4 例，无效 1 例，总有效率 97.14%；对照组 38 例，治愈 20 例，显效 10 例，无效 8 例，总有效率 78.94%。两组无效者均无死亡，两组总有效率比较差异有显著性（$\chi^2=6.49$，$P<0.05$）。两组随访 2 个月均无复发及副反应。平均治愈时间（天）：治疗组为 6±2，对照组为 11±3，两组比较差异有显著性（$t=3.3$，$P<0.05$）。

体　会　新生儿硬肿症是由寒冷损伤、感染或早产引起。中医辨证为脾肾阳虚、寒凝血瘀等。我们在西医治疗的基础上采用蛋黄油涂抹硬肿部位，对硬肿面积小于 34% 患儿取得满意效果。我们体会：蛋黄油涂抹硬肿部位使散热减少，有助于复温，并有温阳活血化瘀，促进血液循环作用。其优点为取材制作方便，价廉，疗效肯定，宜于推广，无不良反应，适合于无特殊装置（如婴儿暖箱）的基层医院及家庭应用，但对大面积硬肿疗效需进一步观察。

（收稿：2001－05－08　修回：2001－07－25）

宁夏回族自治区第二人民医院（宁夏固原　756000）

万方数据