

# 三七总甙对 NB4 细胞促凝活性及诱导分化的影响

李晓红<sup>1</sup> 董作仁<sup>2</sup> 郝洪岭<sup>2</sup> 刘泽林<sup>2</sup> 罗建民<sup>2</sup> 姚丽<sup>2</sup> 杨敬慈<sup>2</sup>

**摘要** 目的:研究三七总甙对 NB4 细胞促凝活性和组织因子表达及诱导分化作用的影响。方法:用三七总甙处理 NB4 细胞,测定复钙时间观察 NB4 细胞的促凝活性(procoagulant activity, PCA),RT-PCR 检测 TF-mRNA 的表达;采用四唑蓝(MTT)法检测三七总甙对 NB4 细胞增殖抑制作用;以 NBT 还原实验、细胞形态学观察及流式细胞术分析研究三七总甙对 NB4 细胞诱导分化的影响。结果:(1)不同浓度三七总甙均可显著延长 NB4 细胞的复钙时间,降低 NB4 细胞的 PCA 水平,呈时间浓度依赖性,同时下调组织因子 TF-mRNA 的表达;(2)三七总甙可部分抑制 NB4 细胞的增殖;(3)三七总甙可提高 NB4 细胞 NBT 还原能力( $P < 0.05$ ),细胞形态方面显示单核/巨噬细胞分化趋势。结论:三七总甙可降低 NB4 细胞的促凝活性及 TF-mRNA 的表达,诱导 NB4 细胞部分分化,有望作为新的抗凝药物。

**关键词** 三七总甙 NB4 细胞 促凝活性 组织因子 细胞分化

**Effect of Panax Notoginseng Saponin on Procoagulant Activity and Differentiation Induction in NB4 Cells** LI Xiao-hong, DONG Zuo-ren, HAO Hong-ling, et al *Department of Hematology, The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang (050000)*

**Objective:** To investigate the effect of Panax notoginseng saponin (PNS) on procoagulant activity (PCA) and differentiation induction in NB4 cells. **Methods:** After NB4 cells were treated with PNS, the recalcification time, PCA and TF-mRNA expression in NB4 cells were tested by RT-PCR. The inhibitory effect of PNS on NB4 cell proliferation was analysed by MTT method, NBT assay, cell morphological observation and flow cytometry. **Results:** (1) PNS of all concentrations could significantly prolong the recalcification time and lower the PCA level in NB4 cells in time-concentration-dependent manner. Simultaneously it down-regulated the expression of TF-mRNA. (2) PNS could partially inhibit the NB4 cell proliferation. (3) PNS could raise the NBT reducing capability of NB4 cells ( $P < 0.05$ ). And morphological examination showed the differentiating tendency of monocyte and macrophage. **Conclusion:** PNS could reduce the procoagulant activity and TF-mRNA expression in NB4 cells, and partially induce the differentiation of NB4 cells, therefore, it is hopeful to be a new anti-coagulant agent.

**Key words** Panax notoginseng saponin, NB4 cell, procoagulant activity, tissue factor, cell differentiation

急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)是一种有严重出血倾向的白血病, APL 细胞表面异常表达组织因子(tissue factor, TF)是导致凝血活性增高,引起弥散性血管内凝血(DIC)的主要因素,治疗和预防 DIC 目前还没有更有效的抗凝药物,本研究以活血化瘀代表药三七提取成分三七总甙(panax notoginseng, PNS)处理 APL 细胞株 NB4 细胞,研究三七总甙的抗凝作用,并从诱导分化角度探

讨其抗凝机制,有助于寻找新的抗凝药物及治疗 DIC 的方法。

## 材料与方法

1 主要药物及试剂 三七总甙购自云南植物药业,用不含血清的 RPMI1640 培养液配成工作液浓度。四唑蓝(MTT)购自 Sigma 公司。TRIzol RNA 提取试剂盒购自 GIBCO 公司,组织因子引物由华美生物工程公司合成,随机引物及 M-MLV 逆转录酶购自 Promega 公司,TaqDNA 聚合酶购自华美生物工程公司。

2 细胞培养 NB4 细胞引自天津血研所,培养于含 10% 灭活胎牛血清(GIBCO BRL)青霉素 100U/ml 及链霉素 100mg/ml 的 RPMI1640 培养液中,于

基金项目 河北省卫生厅中医药、中西医结合科学研究计划课题

作者单位:1. 河北省中医院(石家庄 050000) 2. 河北医科大学第二医院血液科

通讯作者:李晓红,在读博士生, Tel: 0311 - 7222841, E-mail:

hblxh2002@163.com

万方数据

5%CO<sub>2</sub> 饱和湿度为 100% ,37℃ 培养箱中悬浮培养, 每 2~3 天传代 1 次,实验用对数生长期细胞,台盼蓝染色拒染率均在 95% 以上。

### 3 三七总甙对 NB4 细胞促凝活性的影响

3.1 促凝活性 (procoagulant activity, PCA) 测定  
细胞分组:用不同浓度的三七总甙处理 NB4 细胞,分为 50μg、100μg、200μg/ml 及空白对照组,于 48h、96h、144h 收集细胞,调整细胞浓度为 1 × 10<sup>7</sup>/ml,取 50μl 细胞悬液加等体积健康人混合血浆 (NHP,含凝血因子,包括 FV II) 于 37℃ 孵育 3min,再加入 0.025mol/L 氯化钙 50μl,参照文献<sup>[1]</sup>方法记录凝固时间,凝固时间越短,则 PCA 越高。独立实验重复 3 次。

3.2 组织因子 mRNA 测定 收获经 200μg/ml PNS 作用 48h、72h、96h、120h、144h 的 NB4 细胞及未经处理的对照组 NB4 细胞,TRIzol 一步法提取细胞总 RNA,电泳鉴定 RNA 质量并用紫外分光光度计 (TU-1800 北京通用) 定量。逆转录后,PCR 扩增,引物设计与扩增参照文献<sup>[2]</sup>。TF 上游引物 (575-594bp):5'-GAA GGA ACA ACA CTT TCC TA-3',下游引物 (788-765bp):5'-GG GCT GTC TGT ACT CTT CCG GTTA-3' 扩增条件为 94℃ 30s,60℃ 30s,72℃ 45s; 35 个循环,72℃ 延伸 10min,扩增片段长度 213bp。15g/L 的琼脂糖凝胶电泳 (含 EB5μg/ml),90V,40min,在紫外线灯下观察结果,读胶仪 (Alpha Image™1220 & Documentation Analysis System, Alpha Innotec Corporation, USA) 扫描定量,以 TF/GAPDH 的比值代表 TFmRNA 的表达丰度。GAPDH 为磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase)。

4 NB4 细胞增殖测定 用 MTT 法<sup>[3]</sup>检测,将对数期生长的细胞悬液接种于 96 孔培养板,每孔 200μl (细胞浓度 2 × 10<sup>5</sup> 个/ml),加入终浓度为 50、100、200μg/ml 的 PNS,每个浓度接种 3 个复孔,分别孵育 0、24、48、72、96、120h。同时设空白对照组。培养结束前 6h 加入 20μl MTT (5mg/ml),离心培养板 10min,弃上清,加入 200μl 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO),振荡溶解甲替结晶,酶标仪 (BIO-RAD) 490nm 测吸光度 A 值,绘制细胞生长曲线。独立实验重复 3 次。

### 5 三七总甙对 NB4 细胞诱导分化影响

5.1 硝基蓝四氮唑 (nitroblue tetrazolium, NBT) 还原试验 采用文献<sup>[4]</sup>方法。收集 200μg/ml PNS 处理第 4 天,第 6 天 NB4 细胞及空白对照组细胞,离心,加终浓度为 1.0mg/ml NBT 和 20ng/ml 佛波酯 (12-O-

tetradecany-phorbol-acetate, TPA),37℃ 孵育 20min,离心涂片,瑞-姬氏染色,光镜下计数 200 个细胞,细胞内有蓝黑色斑为阳性,计数 NBT 阳性细胞百分率。

5.2 细胞形态学观察 收集 200μg/ml PNS 处理第 4 天、第 6 天 NB4 细胞,瑞-姬氏染色,光镜下观察细胞形态并照相。

5.3 CD11b、CD14 测定 收集 200μg/ml 处理第 4 天、第 6 天的 NB4 细胞,冷 PBS 洗两遍,加入 CD11b、CD14 抗体,孵育 30min,流式细胞仪 (FACSCalibur) 检测。

6 统计学处理 用 SPSS 11.5 统计软件处理。采用 t 检验或单因素方差分析。

## 结 果

1 不同浓度 PNS 对 NB4 细胞 PCA 的影响 见表 1。未经处理的 NB4 细胞凝固时间最短,PCA 水平最高,不同浓度三七总甙均可延长 NB4 细胞的凝固时间,降低 NB4 细胞的 PCA,呈时间及浓度依赖性。其中 PNS 200μg/ml 组作用最强,与 PNS 50μg/ml 及 PNS 100μg/ml 组比较差异均有显著性。

表 1 不同浓度 PNS 对 NB4 细胞 PCA 的影响 (s,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	PCA			
		0h	48h	96h	144h
空白对照	3	57.4 ± 2.25	60.83 ± 4.01	60.43 ± 4.83	60.73 ± 4.45
PNS 50μg/ml	3	57.4 ± 2.25	70.33 ± 7.66	80.83 ± 1.04 *	97.67 ± 4.73 **
PNS 100μg/ml	3	57.4 ± 2.25	80.63 ± 1.65 *	85.57 ± 7.79 *	111.00 ± 11.53 *
PNS 200μg/ml	3	57.4 ± 2.25 △	86.00 ± 7.21 * △	91.50 ± 1.32 * △	154.30 ± 9.71 ** △△△

注:与空白对照组比较,\* P < 0.05,\*\* P < 0.01;与 PNS 50μg/ml 组比较,△ P < 0.05,△△ P < 0.01;与 PNS 100μg/ml 组比较,▲ P < 0.01

2 各组 TFmRNA 的表达结果比较 见图 1。PCR 产物可见 374bp (GAPDH) 213bp (TF) 条带。对照组 (未经 PNS 处理的 NB4 细胞) TFmRNA 与内参照比值为 40.8%,经 200μg/ml PNS 处理的 NB4 细胞 48h 比值降至 14.9%,144h 被完全抑制。

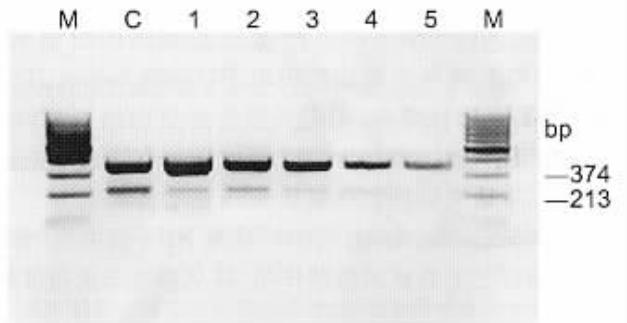


图 1 组织因子 TFmRNA 的表达

注:M 为 Marker,C 为 control,1-5 为 PNS 处理 48h、72h、96h、120h、144h

3 三七总甙对 NB4 细胞的增殖影响 见图 2。各组与对照组比较细胞增殖部分受抑。PNS100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  组及 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$  组孵育 72h 时与空白对照组比较差异有显著性 ( $P < 0.05$ )。

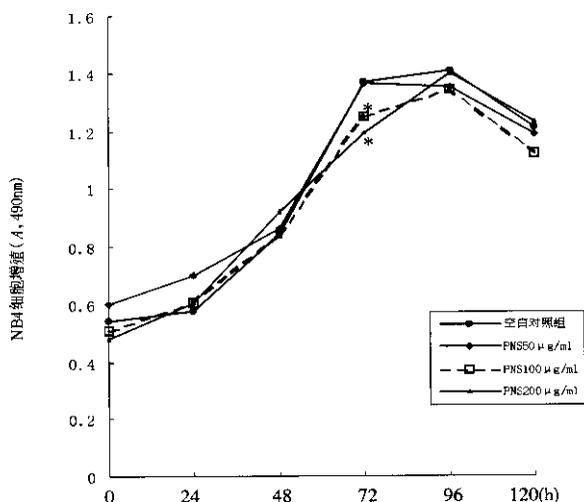


图 2 三七总甙对 NB4 细胞增殖的影响

注: PNS 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  组及 PNS 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$  组孵育 72h 与空白对照组比较, \* $P < 0.05$

4 PNS 对 NB4 细胞 NBT 阳性率及 CD11b、CD14 表达的影响 见表 2。三七总甙处理第 4 天 NB4 细胞的 NBT 阳性率升高, 第 6 天达 ( $25.33 \pm 4.04$ )%, 与对照组比较差异有显著性 ( $P < 0.05$  或

$P < 0.01$ )。CD11b、CD14 表达有一定上调, 但与对照组比较差异无显著性。

5 PNS 对 NB4 细胞形态影响 见图 3。三七总甙 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$  处理 NB4 细胞第 4 天, 可见部分细胞胞体变大, 胞浆染色变浅, 空泡增多, 浆/核比例增大, 核仁变淡或消失, 细胞核呈肾形或出现折叠。显示单核/巨噬细胞分化趋势。

### 讨 论

以往的研究证实<sup>[5,6]</sup>, NB4 细胞的促凝活性是由细胞表面组织因子决定的, 组织因子与血浆中的 FVII 结合, 共同激活 FX, 由此进入外源性凝血途径, 促进血液凝固。因此 NB4 细胞的 PCA 主要反映组织因子的功能活性。本实验结果显示: NB4 细胞具有较强的促凝活性, 在  $\text{Ca}^{2+}$  存在下, 能使健康人混合血浆 (NHP) 迅速凝固。不同浓度三七总甙均显著延长 NB4 细胞的复钙时间, 降低 NB4 细胞的 PCA 水平, 呈浓度及时间依赖性, 显示三七总甙有较强的抗凝作用。在 TFmRNA 的表达上, PNS200 $\mu\text{g}/\text{ml}$  处理 NB4 细胞 48h, TFmRNA 的表达即明显降低, 表明三七总甙抑制了 TFmRNA 的转录, 减少了组织因子的合成释放, 进而降低 NB4 细胞的促凝活性, 抑制凝血系统的激活。

为了解三七总甙的作用机制, 我们进行了诱导分化方面的相关研究, NBT 还原能力为正常中性粒细胞或分化细胞所具有, CD11b 为成熟粒细胞分化抗原标志, CD14 为成熟单核细胞分化抗原标志, 本实验结果显示经三七总甙处理第 4 天 NB4 细胞的 NBT 阳性率升高, 第 6 天达 ( $25.33 \pm 4.04$ )%, 细胞形态方面也出现单核/巨噬细胞分化趋势, CD11b 和 CD14 与对照组比较也有一定的变化, 另外, MTT 法显示三七总甙部分抑制 NB4 细胞的增殖, 在 72h 后, 各处理组与对照组比较差异有显著性, 表明三七总甙在形态及功能方

表 2 PNS 对 NB4 细胞 NTB 阳性率、CD11b、CD14 表达的影响 ( $\% \bar{x} \pm s$ )

组别		NBT 阳性率	CD11b	CD14
空白对照	第 4 天	$7.0 \pm 2.0$	$2.67 \pm 0.81$	$2.07 \pm 0.64$
	第 6 天	$9.0 \pm 1.8$	$2.67 \pm 0.81$	$2.07 \pm 0.64$
PNS200 $\mu\text{g}/\text{ml}$	第 4 天	$15.0 \pm 2.0^*$	$5.40 \pm 1.83$	$4.32 \pm 1.04$
	第 6 天	$25.3 \pm 4.0^{**}$	$4.33 \pm 1.13$	$5.47 \pm 4.21$

注: 与空白对照组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

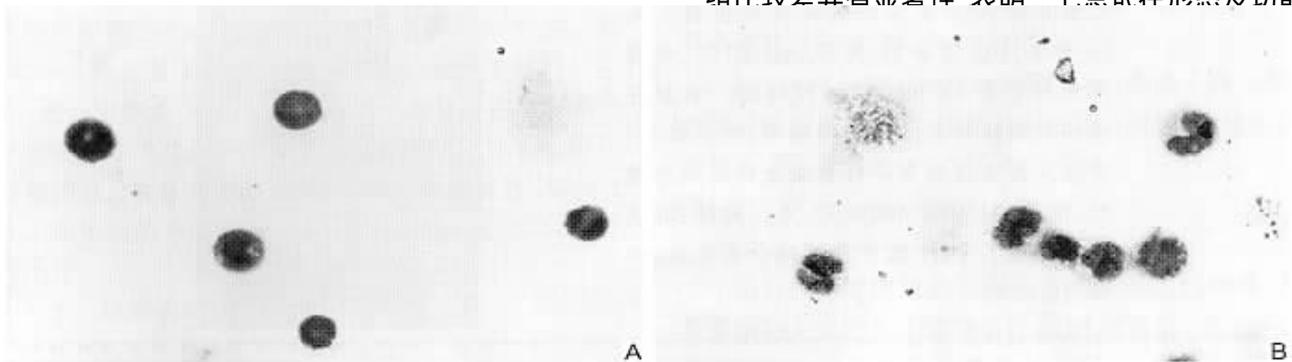


图 3 PNS 对 NB4 细胞形态的影响

注: A 为空白对照组 NB4 细胞; B 为 PNS200 $\mu\text{g}/\text{ml}$  处理第 4 天的 NB4 细胞 ( $\times 400$ )

面可诱导 NB4 细胞的部分分化,进而抑制 NB4 细胞的增殖。其诱导分化作用较弱,故 CD11b 和 CD14 表达未明显上调。

以往研究中,如维甲酸、丹参酮 II A<sup>[7,8]</sup>均显示既能降低促凝活性,又有较强的诱导分化或促凋亡作用,本研究显示三七总甙显著降低 NB4 细胞的 PCA 水平及 TFmRNA 的表达,但抑制增殖诱导分化作用相对较弱,两方面的作用不完全同步,提示三七总甙的抗凝机制部分由于其对 NB4 细胞的诱导分化作用,而更多的机制有待我们进一步探讨。

三七是活血止血的代表药,三七总甙既有较强的抗凝作用,又可诱导部分细胞分化,这一点可能更适合抗凝药物的选择及 DIC 的预防治疗。

### 参 考 文 献

- 1 Falanga R, Consonni M, Marchetti M, Locatelli G, et al. Cancer procoagulant and tissue factor differently modulated by all-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia cells. *Blood* 1998; 19(1):143—151.
- 2 Van Deursen PB, H, Gunther AW, Caroline C, et al. A novel quantitative multiplex NASBA method: application to measuring tissue factor and CD14 mRNA levels in human monocytes. *Nucleic Acids Res* 1999; 27(17):15.
- 3 刘泽林,董作仁,王福旭,等.酪氨酸磷酸酶抑制剂正矾酸钠对 Raji 淋巴瘤细胞增殖与凋亡的影响及机制探讨. *中国实验血液学杂志* 2002; 10(4):315—321.  
Liu ZL, Dong ZR, Wang FX, et al. Effect and mechanism of normal sodium vanadate, the tyrosine phosphatase inhibitor, on the cell proliferation and apoptosis of Raji lymphoma. *Chin*

- Pract Hematol J 2002; 10(4):315—321.
- 4 章静波主编.组织和细胞培养技术.北京:人民卫生出版社, 2002:228—229.  
Zhang JB, ed. *Technique of tissue and cell culture*. Beijing: People's Health Publishing House, 2002:228—229.
- 5 Kayama T, Hirotsawa S, Kawamata N, et al. All-trans retinoic acid up-regulates thrombomodulin and down-regulates tissue factor expression in acute promyelocytic leukemia cells: distinct expression of thrombomodulin and tissue factor in human leukemic cells. *Blood* 1994; 84:3001—3009.
- 6 赵维莅,王鸿利,郭为民,等.急性早幼粒细胞白血病维甲酸和砷剂治疗期间组织因子改变的研究. *中华血液学杂志* 1998; 19(9):473—476.  
Zhao WL, Wang HL, Guo WM, et al. Study on changes of tissue factor in patients with acute promyelocytic leukemia during treatment by retinoic acid and arsenic agent. *Chin J Hematol* 1998; 19(9):473—476.
- 7 程韵枫,羊裔明,邓承琪,等.丹参酮 II A 对 NB4 细胞促凝活性的影响. *华西医科大学学报* 2002; 33(4):553—555.  
Chen YF, Yang YM, Deng CQ, et al. Effect of tanshinone II A on coagulation promoting activity of NB4 cells. *J West China Med Univ* 2002; 33(4):553—555.
- 8 孟文彤,羊裔明,邓承琪,等.丹参酮 II A 诱导 NB4 细胞凋亡与线粒体跨膜电位关系的研究. *中华血液学杂志* 2002; 23(6):297—300.  
Meng WT, Yang YM, Deng CQ, et al. Study on the relationship of cell apoptosis induced by tanshinone II A and transmembrane potential of mitochondria. *Chin J Hematol* 2002; 23(6):297—300.

(收稿 2003-05-30 修回 2003-10-09)

## 《陈可冀医学选集——七十初度》一书出版

《陈可冀医学选集——七十初度》一书已由北京大学医学出版社正式出版。大 16 开本,265 万余字,定价 180.00 元,每册另加邮寄费 18.00 元,欢迎邮购。书款可由邮局或银行汇至本刊邮购部,开户银行:中国工商银行北京分行海淀支行海淀分理处,帐号 04509004609872,本刊地址:北京西苑操场 1 号,中国中西医结合杂志社,邮编:100091。