

白花蛇舌草提取液诱导多药耐药白血病细胞 HL-60/ADR 凋亡的研究*

★ 尹小明^{1**} 赵诗云² 吴东风² 陈厚爱² 黄学明³ 孙敬¹ 王晓莉¹ 曾黎峰¹ 熊美丽¹ 指导:朱大诚⁴ (1. 江西省人民医院 南昌 330006; 2. 江西省中医药研究院 南昌 330077; 3. 南昌大学第一附属医院 南昌 330006; 4. 江西中医学院 南昌 330004)

摘要:目的:研究白花蛇舌草乙酸乙酯提取液对多药耐药白血病细胞 HL-60/ADR 的抑制作用及其机制。方法:采用 MTT 比色试验观察白花蛇舌草乙酸乙酯提取液对多药耐药细胞 HL-60/ADR 的抑制作用(HL-60/ADR 的耐药倍数为 204 倍)。采用光镜、电镜技术观察细胞形态结构的改变,利用流式细胞术(FCM)检测细胞凋亡率。结果:白花蛇舌草乙酸乙酯提取液能明显抑制 HL-60/ADR 细胞的生长,药物浓度相当于生药 41.67 mg/ml 时,即具有显著的抑制作用,抑制率呈剂量和时间依赖性,半数抑制浓度(IC₅₀)相当于生药 70.41mg/ml。流式细胞学证实白花蛇舌草乙酸乙酯提取液,能诱导多药耐药细胞 HL-60/ADR 凋亡,凋亡率也呈时间和剂量的依赖性。结论:白花蛇舌草对多药耐药细胞 HL-60/ADR 的生长具有极强的抑制作用,诱导其凋亡是其机制之一。

关键词:白花蛇舌草乙酸乙酯提取液;多药耐药;HL-60/ADR;凋亡

中图分类号:R 285.5 文献标识码:A

Study the Inhibitory Action and Inducing Apoptosis of Acetic acid ethyl ester Extracts from Hedyotis diffusa on Multidrug Resistance Leukemic cell line HL-60/ADR

YIN Xiao-ming¹, ZHAO Shi-yun², WU Dong-feng², CHEN Hou-ai², HUANG Xue-ming³, SUN Jing¹, WANG Xiao-li¹, ZENG Li-feng¹, XIONG Mei-li¹, ZHU Da-cheng⁴

1. Jiangxi Provincial People's Hospital, Nanchang 330006;

2. Jiangxi Provincial Traditional Chinese Medicine Academy, Nanchang 330077;

3. The First Affiliated Hospital of Nanchang, Nanchang 330006;

4. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004

Abstract: Objective: To study the inhibitory action and mechanism of acetic acid ethyl ester extracts from Hedyotis diffusa on multidrug resistance leukemic cell line HL-60/ADR. Methods: To observe the depressant effect of acetic acid ethyl ester extracts from Hedyotis diffusa on multidrug resistance leukemic cell line HL-60/ADR (the drug-fast multiple of HL-60/ADR is 204) by MTT. To observe the change of the cells morphology structure by light microscope and electron microscope, to detect the apoptosis rate by flow cytometry (FCM). Results: The extracts from Hedyotis diffusa could effectively inhibit the proliferation of HL-60/ADR cells. When the concentration is amount to 41.67mg/ml in pharmacognosics, it has effectively inhibitory action. The inhibition rate has dependence of dosage and time. The IC₅₀ is amount to 70.41mg/ml in pharmacognosics. Acetic acid ethyl ester extracts from Hedyotis diffusa could induce apoptosis of multidrug resistance leukemic cell line HL-60/ADR have been confirmed by flow cytometry (FCM), the apoptotic rate has dependence of dosage and time. Conclusion: Hedyotis diffusa could effectively inhibit the proliferation of multidrug resistance leukemic cell line HL-60/ADR, induce HL-60/ADR to apoptosis is one of its mechanism.

Key words: Acetic acid ethyl ester extracts from Hedyotis diffusa; Multidrug resistance; HL-60/ADR; apoptosis

* 基金项目:江西省卫生厅中医药科研基金资助项目(2006A29)

** 作者简介:尹小明(1966-),男,江西永新人,副主任技师,主要从事白血病检测、中草药抗白血病的研究工作。

多药耐药问题是白血病化疗失败和复发的根源,是临床迫切需要解决的一大难题,多药耐药是指白血病细胞一旦对某种药物产生耐药,同时对其它结构和作用机制不同的多种化疗药物也产生交叉耐药性。如何解决这一问题?中草药对多药耐药白血病细胞是否有效?曾有人报道蟾蜍治愈淋巴细胞白血病^[1~2]。白花蛇舌草也有抗肿瘤的作用,但是,其抗白血病的报道较少,而且白花蛇舌草抗粒细胞性多药耐药白血病细胞,迄今为止,国内外尚无报道。我们以白花蛇舌草乙酸乙酯提取液作用于粒细胞性多药耐药白血病细胞 HL-60/ADR,研究白花蛇舌草抑制 HL-60/ADR 细胞的机制,现报道如下:

1 材料和方法

1.1 药品 白花蛇舌草购于黄庆仁棧华氏大药房,生产许可证号:皖 Y20050033;产地:江西;批号 0611001;生产日期 2006 年 11 月 8 日,亳州市中信中药饮片厂。白花蛇舌草经江西中医药研究院中药所鉴定。

白花蛇舌草乙酸乙酯提取液的制备如下:取白花蛇舌草 100 g 加水煎煮 2 次,每次 1 h 合并煎液,浓缩,醇沉,使其含醇为 70%,静置过夜,取上清液,挥去乙醇调整为 100 ml,即含生药 1.0 g/ml。取水提液 20 ml 加 乙酸乙酯 20 ml,提取 2 次,合并乙酸乙酯液,水浴蒸干,加蒸馏水 10 ml 溶解,即得白花蛇舌草乙酸乙酯提取液。浓度以含生药计算,相当于含生药 2.0 g/ml。

阿霉素购于江西省肿瘤医院,规格:10 mg/瓶;性状:为橙红色疏松粉末;核准日期:2006 年 10 月 25 日;生产企业:深圳万乐药业有限公司。噻唑蓝(MTT),二甲亚砜(DMSO)为 Sigma 公司产品。

1.2 细胞培养 多药耐药细胞 HL-60/ADR 为阿霉素诱导的,急性早幼粒白血病细胞多药耐药株,来源于中国医学科学院、天津血液学研究所。培养基为 RPMI-1640 + 10% 胎牛血清。

RPMI-1640 为进口分装产品,血清为杭州产的四季青胎牛血清。并加入双抗(青霉素 100 μ /ml 和链霉素 100 μ g/ml),在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养。实验前做细胞生长曲线,掌握细胞生长特性,取对数生长期细胞进行实验。

1.3 MTT 比色试验 试验细胞用台盼蓝拒染法进行细胞计数,活细胞数大于 95%,调整细胞浓度,将细胞接种于 96 孔培养板。每孔加入 2×10^4 个细胞,分别进行实验。

1.3.1 HL-60/ADR 对阿霉素的耐药倍数的测定 每孔加入 2×10^4 个 HL-60 敏感细胞,5 个复孔。设

细胞空白对照和药物空白对照。实验组每孔加入阿霉素(μ g/ml) 16.667、8.333、4.166、2.083、1.041、0.521、0.260、0.130、0.0651、0.0326 共 10 个梯度,测出 HL-60 半数抑制浓度(IC₅₀) = (0.0915 $\pm$ 0.02) μ g/ml,类似方法求出 HL-60/ADR 的半数抑制浓度(IC₅₀) (18.67 $\pm$ 4.36) μ g/ml,耐药倍数(n) = $\frac{18.67}{0.0915}$ = 204(倍) > 100 倍,为高度耐药。

1.3.2 用白花蛇舌草乙酸乙酯提取液作用 HL-60/ADR 将细胞接种于 96 孔培养板每孔加入 2×10^4 个细胞,实验组分别加入 12 种不同浓度的提取液,每孔药物浓度相当于含生药(mg/ml) 333.33、166.67、83.33、41.67、20.83、10.42、5.21、2.60、1.30、0.65、0.33、0.16。对照组分为细胞对照组和药物对照,细胞对照为 180 μ l 细胞悬液加 20 μ l 生理盐水;药物对照为 180 μ l 培养基 + 20 μ l 提取液,每个梯度的药物浓度做相应浓度的药物对照。每组 5 个复孔,培养于 3 个时间段(24、48、72 h)于终止培养前 4 h 加入 MTT(5 mg/ml)20 μ l,继续培养 4 h 后,离心(1 500 r/min,10min)弃上清液,每孔加入 DMSO 150 μ l,避光振荡 10 min,立即用自动酶标仪测 492 nm 处的吸光度(A₄₉₂)值。

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

100%

1.4 形态学观察

白花蛇舌草乙酸乙酯提取液作用于 HL-60/ADR 细胞不同时间和浓度,用 MTT 比色实验测定,倒置显微镜下观察实验组和对照组 HL-60/ADR 细胞的情况。HL-60/ADR 细胞涂片,瑞氏染色,油镜下观察细胞形态;取相当于生药 83.33 mg/ml 和 41.67 mg/ml 的提取液,作用 48 h 后,饿酸固定,制成超薄切片,经重金属铀和铅染色后,在透射电子显微镜下观察细胞超微结构,形态上出现核染色质浓集、边聚、凋亡小体,核固缩或核碎裂等,典型的凋亡形态学改变。

1.5 流式细胞术分析

白花蛇舌草乙酸乙酯提取液 3 个浓度,41.67、83.33、166.67 mg/ml,作用于 HL-60/ADR 三个时间段(24、48、72 h)后,利用凯基 AnnexinV-FITC 细胞凋亡检测试剂盒,利用流式细胞仪,检测细胞凋亡率。

1.6 统计学分析

采用双侧 t 检验,求 P 值, $P < 0.05$ 差异有显著性。

2 结果

2.1 白花蛇舌草乙酸乙酯提取液对多药耐药细胞 HL-60/ADR 生长的影响

不同时间和剂量,提取液对 HL-60/ADR 细胞作用见表 1。相当于 83.33 mg/ml 生药的白花蛇舌草

表 1 白花蛇舌草乙酸乙酯提取液对多药耐药细胞 HL-60/ADR 生长的影响

组别	样本数	吸光度 (A_{492})			抑制率 (%)		
		24h	48h	72h	24h	48h	72h
细胞对照	5	0.251 ± 0.018	0.669 ± 0.026	1.080 ± 0.030			
41.67mg/ml(生药)	5	0.230 ± 0.018	0.567 ± 0.029	0.899 ± 0.035*	8.25	15.25	16.76
83.33mg/ml(生药)	5	0.202 ± 0.020	0.395 ± 0.025*	0.441 ± 0.026*	19.52	40.96	59.17
166.67mg/ml(生药)	5	0.177 ± 0.020*	0.178 ± 0.021*	0.198 ± 0.021*	29.48	73.39	81.67

注:与对照组比较,* $P < 0.01$ 。

2.2 细胞形态学变化

2.2.1 光镜 倒置显微镜下可见:对照组(图 1),细胞均一透亮、有侧凸、细胞浆无颗粒、成堆生长,给药组(图 2)细胞数量减少,细胞固缩,体积变小,且高剂量细胞数更少。涂片、瑞氏染色、油镜观察,对照组(未加药) HL-60/ADR,细胞着色深,大小基本一致,圆形、核大、核浆比失调,有些细胞之间有丝状物相联接。实验组细胞体积显著缩小,大小不等,浓染。

2.2.2 电镜 可见对照组细胞(图 3) HL-60/ADR 细胞圆形,胞浆丰富,核不规则,核模清楚,核仁粗大。给药组(图 4),形态上出现核染色质浓集,边聚、凋亡小体,核固缩或核碎裂等,典型的凋亡形态学改变。

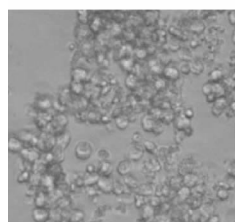


图1: 对照组HL-60/ADR 细胞形态 (200×)

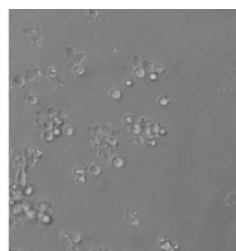


图2: 提取液83.33mg/ml生药作用 HL-60/ADR 48h后细胞形态 (200×)

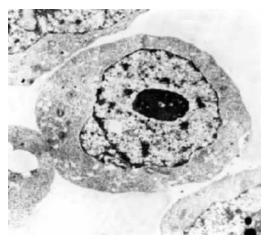


图3 对照组(未加药) (5000×)



图4 加药组(41.67mg/ml 生药, 48h) (5000×)

2.3 流式细胞仪测定 HL-60/ADR 细胞凋亡率的情况

乙酸乙酯提取液,即可显著抑制 HL-60/ADR 细胞的生长,半数抑制浓度(IC_{50})相当于 70.41 mg/ml 生药,从表 1 中可以看出,乙酸乙酯提取液对 HL-60/ADR 细胞的抑制作用具有时间和剂量依赖性。

白花蛇舌草乙酸乙酯提取液诱导细胞凋亡率存在时间和药物浓度依赖性,随药物浓度的增加和时间延长,凋亡率也增加,见表 2。

表 2 白花蛇舌草乙酸乙酯提取液诱导 HL-60/ADR 细胞凋亡率

浓度 $C/mg \cdot ml^{-1}$ (生药)	不同时间细胞凋亡率 (%)		
	24h	48h	72h
0	0.65	0.85	1.09
41.67	40.57	67.56	69.67
83.33	46.02	72.15	74.05
166.67	54.48	94.44	97.63

3 讨论

白花蛇舌草乙酸乙酯提取液,作用多药耐药细胞 HL-60/ADR 后,能显著抑制其生长,抑制率具有时间和剂量依赖性,当提取液相当于生药 166.67 mg/ml 作用 48 h,凋亡率达 94.44%,光镜显示,细胞体积缩小,核固缩。细胞数量与对照组比大为减少。电镜证实,经药物作用过的 HL-60/ADR 细胞,形态呈现典型的凋亡特征改变。总之,白花蛇舌草乙酸乙酯提取液作用 HL-60/ADR 后,经流式细胞仪、电子显微镜证实,能诱导其凋亡。这些方法是确认细胞凋亡的十分可靠的方法^[3]。

白血病是一类造血干细胞的恶性克隆性疾病,其克隆中的白血病细胞增殖失控分化障碍,凋亡受阻,而停滞在细胞发育的不同阶段。在白血病的治疗过程中,白血病细胞会产生耐药,对化疗药物产生多药耐药性是白血病化疗失败和复发的主要原因。如何诱导白血病多药耐药细胞凋亡,是临床上迫切需要解决的问题。肿瘤细胞的多药耐药指肿瘤细胞对一种抗肿瘤药物出现耐药的同时,对其它结构各异,作用机制不同的抗肿瘤药物产生交叉耐药现象^[4-5]。白血病的联合化疗,已取得长足的进展,绝大部分病人可以完全缓解,然而,几乎都以化疗失败而告终。这是因为 MDR 的发生几乎均伴随着细胞

黄竹清脑颗粒对痰热腑实证脑出血急性期大鼠血清MDA及血浆TNF- α 的影响*

★ 刘淑霞^{1**} 任惠锋² 石春明² 白雅² (1. 陕西中医学院 咸阳 712046; 2. 陕西中医学院硕士研究生 咸阳 712046)

摘要:目的:探讨黄竹清脑颗粒对脑出血急性期大鼠血清中MDA及血浆中TNF- α 的影响。方法:70只SD大鼠随机分为空白组、模型组、二陈汤组、鲜竹沥组、黄竹清脑颗粒大、中、小剂量组,造模成功后,开始灌胃给药,日1次,连续7d。然后抽取血样,测定血清中MDA及血浆中TNF- α 的含量。结果:ICH大鼠脑内血肿形成后,动物均有神经系统症状;模型组与空白组相比,血浆中TNF- α 及血清中MDA明显升高,提示造模成功;黄竹清脑颗粒大、中剂量明显优于二陈汤组和鲜竹沥组。结论:黄竹清脑颗粒具有抗氧化,抑制炎症反应,保护脑出血急性期脑神经细胞的作用,并对中风病痰热腑实证有明显改善作用。

关键词:黄竹清脑颗粒;脑出血;丙二醛;肿瘤坏死因子- α

中图分类号:R 285.5 **文献标识码:**A

凋亡抑制现象。绝大多数常规抗癌药物很难诱导MDR细胞凋亡。为解决这一问题,我们用白花蛇舌草乙酸乙酯提取液,作用于粒细胞性白血病HL-60/ADR的多药耐药细胞株,结果显示,很小的剂量就可以诱导其凋亡。

白血病细胞耐药机制很复杂,其机制有很多种,如P-糖蛋白(P-gp)的过表达,多药耐药相关蛋白(MRP)等等。HL-60/ADR的耐药机制为MRP。调控该蛋白的基因为多药耐药相关蛋白基因1(MRP1)位于16号染色体短臂1区三带一亚带(16p^{13.1}),白花蛇舌草乙酸乙酯提取液,主要含有黄酮类化合物,可上调p⁵³及下调Bcl-2和NF- κ B(P⁶⁵)蛋白的表达^[6-7],对白血病细胞敏感株(U937)细胞有抑制其增殖和诱导其凋亡作用^[8],能预防和阻止白血病细胞(K562)耐药形成,并能逆转耐药细胞的耐药性^[9]。其如何作用MDR细胞的多药耐药相关基因,还在研究当中。白花蛇舌草乙酸乙酯提取液,成份复杂,药理作用广泛,或许可以通过多部位,多靶点,作用MDR细胞,其中诱导MDR白血病细胞凋亡,是此药物发挥作用的重要机制。为临床上治疗多药耐药粒细胞性白血病提供了可靠的实验依据。

参考文献

- [1]尹小明,朱大诚.蟾蜍治疗白血病成活31年1例[J].实用中西医结合临床,2005,5(1):41.
- [2]朱大诚,尹小明.蟾酥诱导白血病细胞凋亡的研究进展[J].实用癌症杂志,2004,19(4):447.
- [3]Thompson C B. Apoptosis in the Pathogenesis and Treatment of Disease [J]. Science,1995,267:1456.
- [4]Takara K,Sakaeda T,Okumura K. An update on overcoming MDR1-mediated multidrug resistance in cancer chemotherapy [J]. Curt Pharm Des,2006,12(3):273-286.
- [5]Beck WT. The cell biology of multiple drug resistance[J]. Biochem Pharmacol,1987,36(18):2879-2887.
- [6]韦星,万福生,涂硕,等.白花蛇舌草注射液诱导人肺癌细胞株SPC-A-1凋亡及其分子机制的研究[J].中国老年学杂志,2007,27(1):110-112.
- [7]许明君,施华球,苏晓蓉,等.白花蛇舌草注射液逆转K562/ADM细胞多药耐药的作用和机制[J].中成药,2008,39(3):327-329.
- [8]林圣云,叶宝东,胡美薇,等.白花蛇舌草提取物诱导(U937)细胞凋亡的实验研究[J].中国现代应用药学杂志,2007,24(2):89-92.
- [9]陈进伟,陶师,骆蓉,等. Puerarin 逆转 K560/AO₂耐药的分子机制[J].中南大学学报(医学版),2008,33(3):216-221.

(收稿日期:2008-11-03)

* 基金项目:陕西省教育厅专项科研基金项目(07JK224)

** 作者简介:刘淑霞(1953-),女,汉族,教授,主任医师,硕士生导师,主要从事脑血管病科研与临床工作。