

3 讨论

三冬茶对小鼠的小肠推进运动有促进作用,也明显加快小鼠黑便的排出,增加排便的次数、重量和含水量,其效果优于阳性对照药便秘通。同时三冬茶可以增加小鼠和大鼠肠道的含水量,特别是增加小鼠大肠的含水量,抑制大肠对水分的吸收,可起到软

化大便的作用,故临床上可望用于治疗便秘症。

参考文献

- 1 许振朝. 中草药, 1997, 29(1): 29
- 2 王静,等. 中药材, 1998, 21(7): 363
- 3 陈奇主编. 中药药理研究方法学. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 339
- 4 冯所安,等. 中草药, 1997, 28(5): 290

(1999-03-28收稿)

灵芝复方诱导 HL-60白血病细胞凋亡的研究[△]

湖南医科大学血液生理研究室(长沙 410078) 钟理* 蒋德昭 王绮如

摘要 应用体外集落与液体培养、细胞形态学观察、DNA片段凝胶电泳及DNA片段百分率测定等方法观察灵芝复方对人骨髓CFU-GM生长及HL-60细胞增殖和凋亡的作用。发现灵芝复方在一定浓度范围内对人骨髓CFU-GM生长有促进作用,而对白血病细胞系HL-60细胞集落生长则表现出剂量依赖性抑制;细胞形态学结果表明,灵芝复方对HL-60细胞凋亡具有剂量和时间依赖性诱导作用。8和16 mg/mL灵芝复方作用48 h,可使HL-60细胞DNA片段百分率明显升高;DNA片段凝胶电泳显示有明显的细胞凋亡“梯形”表现。提示灵芝复方可通过选择性诱导白血病细胞凋亡来发挥抗白血病作用。

关键词 灵芝复方 CFU-GM HL-60细胞 增殖 凋亡

The Induction of Lingzhi (*Ganoderma lucidum*) Compound on the Apoptosis of HL-60 Leukemic Cells

Research Laboratory of Blood Physiology, Hunan Medical University (Changsha 410078) Zhong Li, Jang Dezhaoh and Wang Qiru

Abstract A series of experiments including semi-solid colony culture and liquid culture *in vitro*, DNA fragments in gel electrophoresis and the percentage of DNA fragmentation test were undertaken to investigate the effects of *Ganoderma lucidum* (Leyss ex Fr) Karst Compound (GLC) on the growth of CFU-GM derived from human bone marrow and on the proliferation, apoptosis of HL-60 cells. The results indicated that different concentrations of GLC could promote human BM CFU-GM proliferation, but suppressed the growth of HL-60 cell colonies. The cell morphological observation discovered that GLC induced HL-60 cells apoptosis in a dose-dependent and time-dependent manner. Treating HL-60 cells with 8 mg/mL or 16 mg/mL GLC for 48 h increased the percentage of DNA fragmentation of these cells, and produced typical ladders of DNA fragments in gel electrophoresis. It is concluded that GLC could kill the leukemic cells by inducing them to apoptosis. GLC would be a good medicine for leukemia therapy.

Key words *Ganoderma lucidum* (Leyss ex Fr) Karst Compound (GLC) CFU-GM HL-60 cells proliferation apoptosis

细胞凋亡是一种细胞主动性死亡过程。在肿瘤发生发展过程中起着重要作用。常用的许多具有不同作用机制的抗肿瘤化疗药物都能诱导或强化肿瘤细胞凋亡^[1]。而诱导癌细胞的凋亡也成为寻找抗肿瘤药物的新途径。体外实验证明,许多抗白血病药物

能抑制白血病细胞增殖,并能诱导其凋亡。本室发现灵芝复方 [*Ganoderma lucidum* (Leyss ex Fr) Karst Compound, GLC]在一定浓度范围内能促进正常小鼠骨髓粒-单系集落形成单位(CFU-GM)增殖,并对小鼠白血病细胞系WEHI-3细胞集落生长呈剂量

* Address: Zhong Li, Department of Blood Physiology, Hunan University of Medical Sciences, Changsha

钟理男,1994年毕业于湖南医科大学,获医学学士学位。1997年毕业于湖南医科大学血液生理研究室,获医学硕士学位。研究方向:造血调控(白血病分子生物学及中西医结合治疗机制),发表科研论文4篇。1997年~1999年1月在中山医科大学生理教研室任助教,1999年2月至今在美国华盛顿大学医学院进修学习。

[△]湖南省卫生厅基金资助

依赖性抑制^[2]。为进一步了解灵芝复方的骨髓保护及抗白血病作用,为其临床应用提供依据,我们从细胞增殖和诱导凋亡方面观察了其对人正常骨髓细胞及人急性髓性白血病细胞系 HL-60细胞的影响。

1 材料

1.1 药物:灵芝复方由灵芝 *Ganoderma lucidum* (Leyss ex Fr.) Karst 黄芪 *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* (Beg.) Hsiao 党参 *Codonopsis pilosula* (Franch.) Namf. 当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Flsch. 等中草药配伍组方而成,各组药由湘雅医院中药房提供 阿糖胞苷盐酸盐 (Ara-C Hydrochloride) (美国 Sigma Co.)

1.2 骨髓标本:肋骨来自湖南医科大学附属湘雅医院、湖南医科大学附属第二医院胸外手术非血液病患者。

1.3 细胞系:HL-60细胞系由北京军事医学科学院引进。

1.4 试剂:DMEM(美国 Sigma Co.), RPMI-1640(美国 GIBCOBRL)按说明配制。新生牛血清(NBS)(杭州四季青生物工程材料研究所),马血清(HS)(北京军事医学科学院),rhGM-CSF(10 U μ L)(Genzyme Co.)二苯胺、三氯乙酸(TCA)(广州)。

2 方法

2.1 灵芝复方的制备:将复方的各组分经水泡、煮沸过滤提取、醇沉、蒸馏,用双蒸水稀释,使含生药 0.8 g/mL,过滤除菌,4 $^{\circ}$ C保存。取样作各项检测。酚类化合物、氰化物、亚硝酸盐等毒物检查符合国家 GB-7718-87标准。

2.2 人骨髓细胞 CFU-GM 体外培养:按文献方法^[3],分离人骨髓单个核细胞,以 2×10^6 /mL 的浓度加入到体外半固体琼脂培养体系中,含 28% HS 10% 人 AB 血清、50 U/mL rhGM-CSF 0.3% 琼脂,实验组加不同浓度的 GLC(4~20 mg/mL),对照组加等量 DMEM 培养液,种植 1 mL 培养体系于直径 30 mm 的培养皿中,置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度培养 14 d 后,取出置倒置显微镜下观察,以大于 40 个细胞组成的集落计数为 1 个 CFU-GM。

2.3 HL-60 细胞集落培养:取指数生长期 HL-60 细胞 $\times 10^3$ /mL 加入到含 25% NBS 0.3% 琼脂的培养体系中,实验组加不同浓度的 GLC(4~20 mg/mL),对照组加等量培养液,同 2.2 条件培养 7 d,计数集落数(大于 50 个细胞的细胞团为 1 个集落)。

2.4 HL-60 细胞液体培养及药物处理:将处于指

数生长期的 HL-60 细胞 $\times 10^5$ /mL 接种于含 10% NBS 的 RPMI-1640 培养基中,加入不同浓度的药物,置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度培养 1~5 d。

2.5 细胞形态学观察(Wright-Giemsa 染色):离心收集经药物处理,培养 1~5 d 的 HL-60 细胞, PBS 洗涤 1 次,涂片,干燥后 Wright-Giemsa 染色,油镜下观察细胞形态,计数 200 个细胞,参照文献标准^[4],计算凋亡细胞百分率并摄影。

2.6 DNA 片段凝胶电泳:离心(200 \times g, 5 min)收集经药物处理 48 h 的 HL-60 细胞, PBS 洗涤 2 次,去上清按文献法^[5]提取 DNA,取 20 μ L DNA 样品, 1.5% 琼脂糖, 0.5 \times TBE 缓冲液, 50 V 电压下电泳 4 h,溴乙锭(5 μ g/mL)染色后紫外光透射摄影。

2.7 DNA 片段百分率测定:按文献方法^[6],培养细胞离心(200 \times g, 5 min)收集后, PBS 洗涤 2 次,去上清,加细胞裂解缓冲液, 4 $^{\circ}$ C 离心(1 600 \times g, 5 min)分离出上清(片段 DNA)和沉淀(完整 DNA),分别加等体积 25% 三氯乙酸(TCA), 4 $^{\circ}$ C 沉淀过夜。 4 $^{\circ}$ C 离心(1 300 \times g, 5 min)弃上清,加入 5% TCA 溶解沉淀, 90 $^{\circ}$ C 加热 10 min,冷却 5 min,再加入新配制的 1.5% 二苯胺溶液,混匀后 30 $^{\circ}$ C 避光过夜。取反应后样品加入 96 孔板,用酶标仪测定 OD₅₇₀ 值,计算 DNA 片段百分率 [上清 OD 值 / (上清 OD 值 + 沉淀 OD 值)]。

2.8 统计学处理:实验结果以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,各组间差异采用 F 检验,若 $F > F_{0.05}$,则两两比较用 Student-Newman-Keuls q 检验; IC₅₀ 的计算用概率法。

3 结果

3.1 GLC 对人骨髓 CFU-GM 增殖的影响:如表 1 所示。与对照组比较, GLC 为 4 mg/mL 时, CFU-GM 数有非常明显增加 ($P < 0.01$), 8, 12 mg/mL 仍有明显增加 ($P < 0.05$), 各浓度间无显著性差异 ($P > 0.05$)。 GLC 达 20 mg/mL 时,对 CFU-GM 增殖出现抑制作用 ($P < 0.01$)。

3.2 GLC 对 HL-60 细胞集落产率的影响:由表 1 可见, GLC(4~20 mg/mL)对 HL-60 细胞集落生长均呈剂量依赖性抑制 ($P < 0.01$)。 IC₅₀ 为 10.8 mg/mL。

3.3 GLC 作用后 HL-60 细胞的形态学改变:对照组 HL-60 细胞以原粒及早幼粒细胞多见,经 GLC 处理的 HL-60 细胞,可见部分细胞呈现典型的凋亡细胞形态,即核固缩、胞膜突起,还可见到凋亡小体。不同浓度 GLC 处理 1~5 d 后 HL-60 细胞凋亡细胞百分率如表 2 所示, 凋亡细胞率呈明显的剂量和时

表 1 GLC对人正常骨髓 GFU-GM及 HL-60 白血病细胞集落生成的影响 (n= 6, $\bar{x} \pm s$)

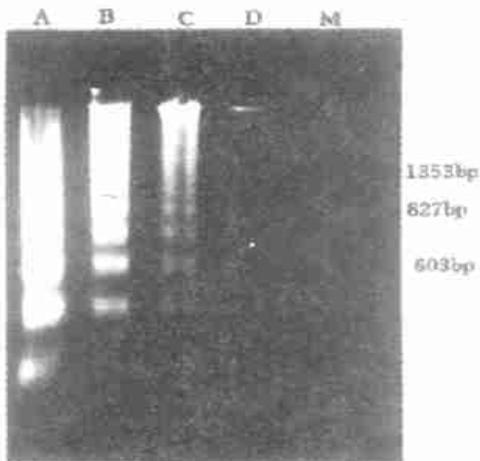
组别	剂量 (mg/mL)	集落生成数 CFU-GM	对照组集落生成数 (%) CFU-HL-60
对照	-	100.0 ± 26.1	100.0 ± 9.4
GLC	4	140.6 ± 21.8*	69.6 ± 6.5*
	8	136.4 ± 19.6	55.3 ± 8.8*
	12	135.5 ± 30.2	44.6 ± 6.0*
	16	120.5 ± 11.1	30.8 ± 3.5*
	20	44.5 ± 15.6*	18.5 ± 3.9*

与对照组比: * P < 0.05 ** P < 0.01

表 2 培养 1~5 d不同浓度 GLC对 HL-60凋亡细胞百分率的影响 (n= 3, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (mg/mL)	HL-60凋亡细胞百分率 (%)				
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
对照	-	1.2 ± 0.3	1.2 ± 0.6	2.0 ± 0.5	2.8 ± 0.6	5.7 ± 0.8
GLC	4	3.7 ± 0.8	8.3 ± 0.8*	10.2 ± 2.1*	13.3 ± 1.0	43.8 ± 1.9
	8	7.5 ± 1.0*	12.5 ± 1.0*	18.7 ± 3.0*	24.5 ± 4.0*	42.3 ± 3.8*
	16	8.5 ± 1.3*	17.8 ± 3.9*	26.7 ± 2.8*	38.0 ± 7.3*	56.0 ± 3.6*
	20	9.8 ± 1.3*	25.5 ± 3.5*	34.2 ± 2.8*	50.8 ± 2.6*	73.5 ± 4.8*

与对照组比: * P < 0.05 ** P < 0.01



A- $\times 10^{-5}$ mol/L Ara-C B-16 mg/mL GLC C-8 mg/mL GLC D对照组 M Φ X174/HadII maker

图 1 灵芝复方作用 48 h的 HL-60 细胞 DNA凝胶电泳图谱

3.5 DNA片段百分率: DNA片段百分率结果显示, 8, 16 mg/mL GLC以及 $\times 10^{-5}$ mol/L Ara-C 处理 48 h, HL-60细胞 DNA片段百分率均比对照组明显升高 (P < 0.01) (表 3)。

表 3 GLC和 Ara-C对 HL-60细胞 DNA 片段百分率的影响 (n= 3, $\bar{x} \pm s$)

组别	HL-60细胞 DNA片段百分率 (%)
对照	13. ± 0.9
8 mg/mL GLC	30.8 ± 0.8
16 mg/mL GLC	37.4 ± 1.7
$\times 10^{-5}$ mol/L Ara-C	55.3 ± 2.4

与对照组比: * P < 0.01

4 讨论

现代医学研究证明,灵芝复方中的主药灵芝具

间依赖性增加 (P < 0.05)。20 mg/mL GLC处理 5 d, 凋亡细胞百分率达 73.5% (而对照组只有 5.7%), 表明大部分细胞已发生凋亡。

3.4 DNA凝胶电泳图谱: GLC处理 HL-60细胞 48 h, 提取 DNA作凝胶电泳, 结果所示 8, 16 mg/mL GLC以及阳性对照 $\times 10^{-5}$ mol/L Ara-C均出现典型的凋亡特征性“梯形”DNA带型, 而未加药对照组为阴性 (图 1)。

有促进细胞免疫和骨髓造血的功能^[7], 同时有研究表明, 灵芝中各成分对多种肿瘤有抑制作用, 如灵芝菌丝体提取物对 S₁₈₀实体瘤有明显的抑制作用^[8]; 从赤芝中分离的三萜类成分灵芝酸对离体培养的骨肉瘤具细胞毒性。有人认为, 灵芝的抗癌活性与其高含量的碳水化合物有关^[9]。

本研究的结果显示, GLC在一定浓度范围内 (4~12 mg/mL) 能促进正常骨髓粒系造血, 而对 HL-60细胞增殖表现出明显的抑制作用, 且与作用时间和剂量有关。这说明 GLC对白血病细胞有选择性杀伤作用。随着 GLC剂量的加大和时间的延长, 具凋亡特征的 HL-60细胞比例明显提高。经 GLC处理的 HL-60细胞出现典型的“梯形”图谱, DNA片段百分率也明显升高, 表明 GLC可通过触发细胞凋亡来达到杀灭白血病细胞的作用。这与许多常用的抗白血病化疗药物作用机制是一致的。可见, GLC在体外具有选择性抑制白血病细胞增殖和诱导白血病细胞凋亡的作用, 为临床运用 GLC治疗白血病提供了一定的实验依据。

致谢: 湖南医科大学生理教研室李俊成教授及王志斌副教授提供灵芝复方液。

参考文献

- 1 Kerr JFR, et al. Cancer, 1994, 73: 2013
- 2 蒋德昭, 等. 河南医学研究, 1995, 4(增刊): 22
- 3 王承龙. 湖南医科大学学报, 1995, 20(5): 409
- 4 Wylie A H, et al. Int Rev Cyto, 1980, 68: 251
- 5 Herrman M, et al. Nucleic Acids Res, 1994, 22(24): 5506
- 6 Mangan D F, et al. J Immunol, 1991, 146
- 7 林志彬. 北京医科大学学报, 1992, (4): 271
- 8 Sone Y, et al. Agric Biol Chem, 1985, 49(9): 2841
- 9 Maruyama H, et al. J Pharmacobiodyn, 1989, 12: 118

(1999-03-29收稿)