苦参碱作用 K562细胞表面分化抗原表型的改变

何於娟,蒋纪恺,张彦,刘小珊,刘北忠,许相儒,涂植光*

(重庆医科大学 临床生化教研室,重庆 400016)

中图分类号: R285.5; R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2001)08-0730-02

近年来,肿瘤诱导分化剂的研究日渐增多,从中药和天然药物中寻找和提取诱导分化剂是一种新途径。苦参碱是传统中药苦参的有效成分,文献报道具有抗癌活性^[1],对白血病细胞有抑制生长和诱导分化作用^[2]。本课题组在前期研究的基础上^[3,4]通过流式细胞仪检测进一步表明:一定浓度的苦参碱可诱导 K562细胞向成熟方向分化,并具有多向诱导分化作用。

1 材料与方法

1.1 苦参碱:纯度 99%,由实验室自备。

1.2 细胞培养:K562细胞在含 10% 新生小牛血清的 RPMI-1640培养液中传代培养。

1.3 苦参碱对 K562细胞的作用:收集对数生长期细胞,调整细胞浓度为 1×10^5 /mL,用苦参碱的终浓度为 0.2 mg/mL,作用 9 d,每 3天换液补药 1次,于第 3,6,9天收集细胞,同时设立对照组。分别收集细胞,离心涂片做瑞氏染色,光镜观察细胞形成变化结果。

1.4 细胞表面分化抗原(SmCD)检测:苦参碱作用方法同前,取对照组和经作用 6 d的 K562细胞用 PBA(0.01 PBS+ 0.2% 牛血清白蛋白+ 0.1% 叠氮钠)洗涤 2次,分别加入鼠抗人 McAb(CD34 CD33 CD14 CD15 CD26 CD27 CD41 HIR2) 4℃ 孵育 3 min,用 PBA洗涤去除未结合的 McAb,再加入 FITC 标记的二抗,4℃ 孵育 60 min, PBS洗涤 2次,将细胞悬浮于 PBS中,FCM(美国 Becton-Dickinson 公司

产品,型号 FACS C)检测 10 000个细胞/例,数据经计算机处理,计算出阳性细胞百分率。

2 结果

2.1 苦参碱对 K562细胞作用的形态学变化:对照组 K562细胞体积较大,多呈圆形、椭圆形或卵圆形,染色质疏松,核仁清楚,数目不等,核浆比例大,细浆多见瘤状突起,胞浆内未见颗粒,偶见空泡;经 0.2 mg/mL 苦参碱诱导 3 d后, K562细胞核浆比明显缩小,6 d后体积减小,形态更规则,核仁开始消失,9 d后核浆比更小,核仁完全消失,胞浆内有空泡出现;经 0.3 mg/mL 苦参碱诱导 3 d后的 K562细胞形态变规则,核浆比缩小,核仁仍可见,6 d后细胞体积明显减小,核染色质变致密,核仁消失,部分细胞浆内有大量空泡出现,并伴随凋亡发生,9 d后细胞凋亡及空泡更为明显。结果表明苦参碱对 K562细胞有诱导分化作用且与浓度及作用时间有关。0.2 mg/mL 苦参碱作用 6 d后细胞向成熟方向分化,0.3 mg/mL 苦参碱作用 6 d后就其细胞形态观察提示可能有凋亡发生。

2.2 苦参碱对 K562细胞作用 6 d后 SmCD的变化:经苦参碱作用 6 d后, K562细胞表面 CD33、CD14、CD15、HIR₂、CD27表达均增高,其增加强度依次为: CD33 > HIR₂ > CD15 > CD27 > CD14,提示 K562细胞在苦参碱的作用下可以向髓系、红系、粒系等分化,见表 1。

3 讨论

表 1 苦参碱对 K562细胞作用 6 d后细胞表面分化抗原表达结果

(%)

组别	干粗细胞		髓系				T淋巴系		B淋巴系
	CD ₃₄	CD ₃₃	CD ₁₄	CD ₁₅	CD ₄₁	HIR ₂	CD ₂₇	CD ₂₀	
对照	1.35	15.65	6.01	1.95	0.40	38.69	3.03	0.13	
加药	5.71	57.15	13.87	13.63	0.52	51.32	13.73	0.12	

人类白血病是源自多能造血干细胞水平的血液系统肿瘤,白血病细胞仍有一定的自我更新能力和

分化潜能,但丧失了终末分化的能力,即受阻于原始或幼稚细胞阶段。文献报道^[5], K562细胞为分化受

* 收稿日期: 2000-10-26

基金项目: 国家自然科学基金资助 编号: 39670881

作者简介: 何於娟(1972-),女,四川省南充市人,重庆医科大学临床生化教研室讲师,在读博士研究生。研究方向: 苦参碱诱导 K562细胞

分化的分子机制研究 Tel (023) 68894666

E-mail heyujuan2001@yahoo.com

阻滞的异常造血祖细胞,具有向红系、粒系、巨核系等多向分化的潜能。

我们采用 0.2 mg/mL 苦参碱作用 K562 细胞 3~9 d 后,从细胞形态学观察到细胞体积、核形、核浆比、核仁数量等随作用时间延长均有明显改变。所有细胞都源自共同获得一些新抗原的同时也丢失了某些原有的抗原,因此处于不同分化阶段的造血细胞,其抗原表型是不同的,不同的细胞系列也具有不同系列相关性抗原、CD₃₃表达于所有细胞系列的祖细胞或干细胞,为细胞系列非特异性标志。在干细胞初期分化产生最早期祖细胞出现了 CD₃₃之后,祖细胞定向分化时出现一系列特异性抗原,如粒系分化细胞伴有 CD₁₅表达阳性细胞增加,CD₁₄为单核细胞特异性 SmCD, HIR₆仅存在于幼红细胞和成

熟红细胞表面,CD₄₁存在于巨核细胞和血小板表面,CD₂₇存在于 T 淋巴细胞,CD₂₀存在于 B 淋巴细胞。从 SmCD 测定结果提示,0.2 mg/mL 的苦参碱可诱导 K562 细胞向红系、粒系等系分化。以上结果表明 K562 细胞具有多向分化潜能,苦参碱具有诱导其分化的作用。

参考文献:

- [1] 张守芳. 苦参研究概况 [J]. 中草药, 1997, 28(2): 30-32.
- [2] 徐建国, 马俊英, 杨贵生, 等. 苦参煎液对人早幼粒白血病细胞的诱导分化研究 [J]. 中国中药杂志, 1990, 15(10): 49-50.
- [3] 秦建平, 蒋纪恺, 张彦, 等. 苦参对 K562 红白血病细胞诱导分化作用 [J]. 重庆医科大学学报, 1994, 19(2): 150-151.
- [4] 张莉萍, 蒋纪恺, 张彦, 等. 苦参碱对 K562 细胞增殖与分化作用的机制研究 [J]. 中华血液学杂志, 1999, 20(6): 315-316.
- [5] Tabilio A, PeIcci P G, Vinci G, et al. Myeloid and megakaryocytic properties of K562 cell lines [J]. Cancer Res, 1983, 43: 4569-4572.

中药抗病毒鼻咽雾化吸入剂体外抗 CVB₃、CVB₅ 作用研究

胡晓蕙, 汪涛, 高岚, 蒋连泓*

(天津中医学院, 天津 300193)

中图分类号: R288.5; R286.87

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2001)08-0731-03

柯萨奇 B 组病毒 (CVB) 是引起普通感冒、疱疹性咽炎、无菌性脑膜炎、心肌炎、心包炎等多种疾病的病原。这组病毒经呼吸道、消化道感染。病毒经口入侵人体,常在咽、扁桃体等处增殖,感染数天在咽部、鼻咽分泌物中检出病毒^[1]。这组病毒引起多种疾病的早期症状常表现为咽部红肿、疼痛、鼻咽部卡他性炎症等症状^[2],对人群潜在危险很大。目前预防和治疗这组病毒引起疾病的有效方法还很少。中药抗病毒鼻咽雾化吸入剂经临床观察能迅速改善患者咽部红肿、疼痛等症状,控制炎症发展。为寻找、治疗 CVB 感染的有效方法,进行了中药抗病毒鼻咽雾化剂体外抗 CVB₃、CVB₅ 的实验研究

1 材料

1.1 中药抗病毒鼻咽雾化吸入剂由课题组提供处方,天津医药科学研究所制剂。是主要由金银花、厚朴、牛蒡子、辛夷等制成的水提剂。

1.2 CVB₃、CVB₅ 病毒株:由天津医科大学微生物教研室提供

1.3 HeLa 细胞株:由天津医科大学微生物学教研室提供

2 实验方法

2.1 中药抗病毒鼻咽雾化吸入剂无毒剂量测定:将鼻咽雾化剂由原液到 1:2, 1:4, 1:8 稀释成 4 个稀释度,每个稀释度各接种两支 HeLa 细胞培养管,每支管 0.1 mL,加细胞维持液 0.9 mL,5% CO₂ 37℃ 培养,逐日观察细胞病变效应 (CPE)。

2.2 CVB₃、CVB₅ 病毒毒力测定——TCID₅₀ 测定:将上述病毒原液分别稀释成 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹, 分别加入相同细胞管中,5% CO₂ 37℃ 培养 40~48 h,逐日观察 CPE。TCID₅₀ 按 Reed-Muench 方法计算^[3]。

2.3 中药抗病毒鼻咽雾化吸入剂对病毒预先感染细胞的作用:将 CVB₃、CVB₅ 分别稀释为 10⁻⁸ 后,每型病毒接种 4 只细胞管,37℃ 作用 1 h 后,加入等量鼻咽雾化剂,再加入等量细胞维持液,5% CO₂ 37℃ 培养,逐日观察 CPE。

* 收稿日期: 2000-11-09

基金项目:天津市教委科研课题,成果登记号 95233