

度药物抑制下代谢过程的热谱图其形状基本相同,但随着加入药物浓度的增加,其生长代谢过程的停滞期延长,生长代谢峰向后移,且指数生长期的斜率不同

3.2 从表 1 中的  $k$  值可以说明随着中药药液浓度的增加,细菌生长受抑制的作用越大,从而可以定性地刻划药液抗菌作用的程度;从图 3, 4 可以得出参叶的最小抑菌浓度为 0.114 g/mL,参花为 0.500 g/mL,从而可以定量地刻划中药抑菌作用的大小;从表 1 中  $I$  值以及图 5 可以得出参叶的半抑制率为 0.046 g/mL,参花为 0.275 g/mL,半抑制率的大小反映了中药抑菌作用的差别。参叶和参花的  $k$  值,  $I\%$ ,  $IC_{50}$  的综合分析说明人参的不同药用部位参叶和参花,其药效存在着差异,参叶在浓度很低时就表现出很强的抑菌作用,而参花的抑菌作用相对较弱,药效的强弱从一个侧面反映了药性的差异。

3.3 从图 1, 2 中可见,在不同的药液浓度下,细菌代谢过程的热功率-时间曲线与基线构成的面积发生了变化,这种变化呈现出一定的规律性。在图 1 中,随着参叶浓度的增大,其热功率-时间曲线下的面积 ( $\Delta H$ ) 呈逐渐减小的趋势;在图 2 中,随着参花浓度的增大,其热功率-时间曲线下的面积 ( $\Delta H$ ) 呈逐渐增大的趋势(表 1)。也就是说:参叶能降低细菌生长代谢的产热量,参花能增加细菌生长代谢的产

热量,  $\Delta H$  的大小体现了参叶和参花的药性差异,与传统文献中所记载的“……参叶大苦大寒,损气败血,……”,“补中带表,大能生胃津,去暑气,将虚火……”的提法基本相符<sup>[8]</sup>,可见细菌生长代谢的产热量 ( $\Delta H$ ) 可作为中药四性研究的一个重要指标。

3.4 中药四性的微量热法研究是我们在中医药传统理论的指导下,结合生物热力学的先进技术所做的有益的尝试,研究证明:该方法科学可行,突破了传统四性研究中思想和方法的局限性,是定性定量刻划中药四性的有效手段,还可作为中草药活性筛选的新工具

参考文献:

- [1] 肖培根,肖小河. 21世纪与中药现代化 [J]. 中国中药杂志, 2000, 25(2): 67-70.
- [2] Tan A M, Xu B, Hang S Q, et al. Thermochemical study on the growth metabolism of human promyelocytic leukemia HL-60 cells inhibited by water-soluble metalloporphyrins [J]. *Thermochimica Acta*, 1999, 333 99-102.
- [3] Wadso L. Microcalorimetric technique for characterization of living cellular systems. Will there be any important practical application? [J]. *Thermochimica Acta*, 1995, 269-270 337-350.
- [4] 高晓山. 中药药性论 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1992
- [5] Xie C L, Tang H, Song Z, et al. Microcalorimetric study of bacterial growth [J]. *Thermochimica Acta*, 1988, 123 33-36.
- [6] 冯英,刘义,屈松生,等. D-氨基葡萄糖 Schiff碱及金属配合物的抗菌活性 [J]. 物理化学学报, 1996, 12(8): 756-759.
- [7] 陈藏器. 本草纲目拾遗. 卷三. 参叶 [M]. 唐开元二十七年.

## 昆明山海棠诱导 HL-60 细胞凋亡的初步研究

敖琳,曹佳,孙华明,杨录军,刘胜学,周紫垣

(第三军医大学 分子毒理实验室,重庆 400038)

**摘要:**目的 探讨中药昆明山海棠 (THH) 诱导急性白血病细胞凋亡的规律及发生机制。方法 应用染料排除法、活细胞荧光染色、DNA 电泳、流式细胞仪、斑点杂交、原位杂交和荧光  $Ca^{2+}$  指示剂进行检测和观察。结果 HL-60 细胞在 THH 作用下出现典型的细胞凋亡特征,包括细胞形态改变、DNA 梯状带以及亚  $G_0$  峰,并且存在明显的量效和时效关系。进一步研究表明, Bcl-2 基因在凋亡过程中的表达持续下调,细胞内游离  $Ca^{2+}$  浓度未发生明显变化。结论 THH 有较强的诱导白血病 HL-60 细胞凋亡的能力,其作用机制与下调 Bcl-2 基因表达有关。

**关键词:** 昆明山海棠;细胞凋亡; HL-60 细胞

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2001)10-0913-04

### Preliminary studies on apoptosis of HL-60 cells induced by *Tripterygium hypoglaucum*

AO Lin, CAO Jia, SUN Hua-ming, YANG Lu-jun, LIU Sheng-xue, ZHO U Zi-huan

(Laboratory of Molecular Toxicology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Key words** *Tripterygium hypoglaucum* (Évl.) Évl. ex Hutch.; apoptosis; HL-60 cells

收稿日期: 2000-12-26

基金项目: 第三军医大学科研基金

作者简介: 敖琳 (1971-),女,重庆市人,讲师,硕士,主要从事分子毒理与遗传毒理研究

昆明山海棠 *Tripterygium hypoglaucum* (Évl.) Évl. ex Hutch (简称 THH) 是云南省特产中药, 中医临床上广泛用于治疗各种自身免疫性疾病, 同时, 临床治疗及实验研究均表明 THH 具有明显的抗肿瘤效应<sup>[1,2]</sup>。由于缺乏对其作用机制的认识, 因而限制了 THH 在临床的进一步应用。对细胞凋亡及凋亡相关疾病的研究使人们认识到, 由于细胞增殖与死亡平衡的失调而造成的细胞凋亡不足可诱发肿瘤、自身免疫性疾病等细胞增生性疾病。由此, 我们提出, THH 的作用机制可能与诱导细胞凋亡有关, 并且首次报道了 THH 水提取液对 Jurkat CHE NIH3T3 细胞均有较强的凋亡诱导作用, 且 Jurkat 白血病细胞更为敏感<sup>[3]</sup>。因此, 诱导细胞凋亡可能是 THH 治疗自身免疫性疾病的机制, 并提示 THH 有可能发展成为一种新的抗癌药物。目前尚缺乏对其他肿瘤细胞以及对 THH 诱导细胞凋亡分子机制的研究。为此, 本研究以人早幼粒白血病 HL-60 细胞为材料, 研究 THH 水提取液诱导 HL-60 细胞凋亡的发生情况, 并初步探讨其分子机制。

## 1 材料

1.1 药物: THH 购自云南省医药公司, 按本室常规方法制备水提取液。取 THH 根块 100 g, 粉碎后加入 500 mL 双蒸水浸泡 24 h, 煮沸 3 次, 药液浓缩成 150 mL, 滤膜过滤除菌, 分装后 -20℃ 保存备用。THH 水提取液每毫升含生药 0.667 g, 使用剂量分别为每毫升培养基 5, 10, 20, 40 μL 药液。

1.2 细胞培养: HL-60 细胞由本室保存, 培养于 10% FCS RPMI 1640, 传代至旺盛生长后, 试验前调整细胞浓度为  $2 \times 10^5$  /mL, 台盼蓝鉴定细胞活性在 98% 以上。

1.3 主要试剂: 地高辛随机引物标记及检测试剂盒, Tripure Isolation Regent 以及 Fura-2/AM 为 Boehringer 公司产品。

## 2 方法

2.1 细胞存活率测定: 细胞经药物处理后, 于规定时间采样, 加入台盼蓝染液至终浓度为 0.4%, 染色 2~5 min 后, 滴片, 计算细胞存活率。

2.2 活细胞悬液荧光染色: 细胞悬液中加入荧光染料 Hoechst 33342 至终浓度 10 μmol/L, PI 至终浓度 100 mg/L, 避光染色 15 min, 荧光显微镜下观察。

2.3 DNA 电泳分析: 每样品收集  $1 \times 10^6$  个细胞, 加入 0.5 mL 细胞裂解液 (10 mmol/L Tris, Cl, 10 mmol/L EDTA, pH 8.0, 0.5% SDS, 0.1%

RNase A) 置 37℃ 保温 1 h, 加入蛋白酶 K 至 100 mg/L, 50℃ 保温 3 h, 2% 琼脂糖凝胶电泳 5 h。

2.4 流式细胞仪检测: 细胞加入 70% 乙醇固定 24 h 以上, 实验前用 PBS 洗去固定液, 50 mg/L RNase A 37℃ 消化 1 h, PI 染色 30 min 后上机检测, 结果用 Lysis II 软件分析。

2.5 Bcl-2 基因表达分析: 利用斑点杂交和原位杂交方法检测细胞内 Bcl-2 mRNA 的表达。Bcl-2 探针用地高辛随机引物法进行标记。按 Tripure Isolation reagent 说明书提取细胞总 RNA 后, 点样于硝酸纤维素膜上进行斑点杂交, 利用薄层扫描仪检测各阳性反应斑点的灰度值。细胞涂片经多聚甲醛固定, 蛋白酶 K 消化, 醋酸酐封闭后, 与 1:100 Bcl-2 探针 42℃ 杂交 16 h, Anti-Dig-Ap 37℃ 温育 1 h, 最后底物显色 30 min。镜检计算阳性细胞比率。

2.6 细胞内游离  $Ca^{2+}$  浓度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) 的测定: 参照文献进行<sup>[4]</sup>。细胞悬液加入 Fura-2/AM 至终浓度 5 μmol/L, 37℃ 温育 45 min, HBSS 缓冲液洗 3 次。采用日立 F3010 型荧光分光光度计测定荧光强度。激发光波长 350 nm, 发射光波长 510 nm, 狭缝 10 nm, 检测静息荧光强度  $F_0$ ; 然后加入 Triton X-100 至终浓度 0.1%, 检测最大荧光强度  $F_{max}$ ; 最后加入 EGTA 至终浓度 10 nm, 检测最小荧光强度  $F_{min}$ , 按以下公式计算细胞内游离  $Ca^{2+}$  浓度:

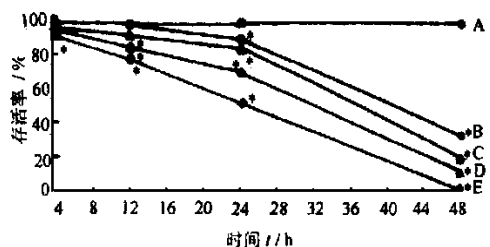
$$[Ca^{2+}]_i = Kd(F_0 - F_{min}) / (F_{max} - F_0)$$

$$Kd = 224 \text{ nmol/L}$$

2.7 数据处理: 数据由第三军医大学数学教研室 SPM R 软件包处理, 主要采用单因素方差分析。

## 3 结果

3.1 细胞活性检测结果: THH 能显著降低细胞存活率, 存在明显的量效和时效关系, 各剂量组 (5~40 μL/mL) 随处理时间延长, 细胞存活率逐渐降低, 且剂量越大, 存活率下降的速度相应加快 (图 1)。



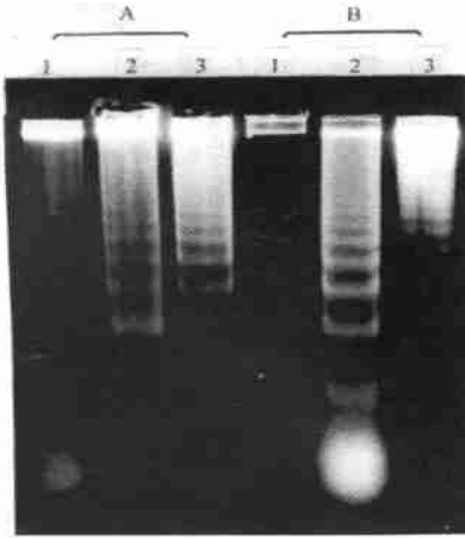
与对照组相比: \*  $P < 0.05$

图 1 THH 水提取液对 HL-60 细胞存活率的影响

3.2 细胞形态观察: THH 可诱导细胞出现典型的

凋亡细胞形态,包括核固缩,染色质边集,核碎裂及凋亡小体

3.3 DNA电泳结果: THH各剂量组均有典型的梯状带出现,并且随剂量加大,梯状带出现的时间前移。5, 10及 20 $\mu$  L/mL组在 12h 开始出现梯状带,而高剂量组 40 $\mu$  L/mL在实验全程均可观察到典型的梯状带(图 2)。



A-40 $\mu$  L/mL B-20 $\mu$  L/mL  
1-3依次为 4, 12, 24 h 处理组

图 2 THH水提取液处理 HL-60细胞的 DNA电泳结果

3.4 凋亡细胞亚 G<sub>1</sub>峰检测结果: THH处理后,凋亡率显著升高,随时间推移,低剂量组(5 $\mu$  L/mL)凋亡率呈持续性增强趋势,其余各剂量组升高后则维持较长时间的凋亡率高台期。此外,随 THH剂量增加,凋亡率上升的速度也随之加快(图 3)。因此,药物诱导的凋亡发生率存在明显的量效和时效关系。图 4示 THH 10 $\mu$  L/mL处理后的亚 G<sub>1</sub>峰。

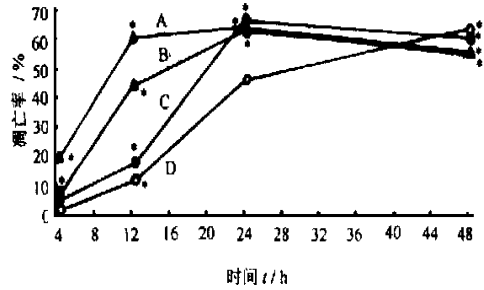
3.5 斑点杂交及原位杂交结果: HL-60细胞经 THH(10 $\mu$  L/mL)处理后,胞浆内 Bcl-2 mRNA的含量显著低于正常细胞,从处理后 4~ 24 h 均呈持续性降低趋势(表 1)。

3.6 [Ca<sup>2+</sup>]检测结果: HL-60细胞经 THH(10

表 1 THH水提取液(10 $\mu$  L/mL)对 HL-60细胞 Bcl-2 基因表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	斑点杂交灰度值	原位杂交阳性细胞率(%)
对照组	2 155 295 $\pm$ 362 611	48.13 $\pm$ 5.15
4 h 组	697 450 $\pm$ 77 173 <sup>a</sup>	28.25 $\pm$ 6.08
12 h 组	506 185 $\pm$ 101 816 <sup>a</sup>	13.38 $\pm$ 6.42 <sup>a</sup>
24 h 组	389 390 $\pm$ 183 706	10.25 $\pm$ 4.25

与对照组相比: \* P < 0.05



与对照组相比: \* P < 0.05

图 3 THH水提取液对 HL-60细胞凋亡率的影响  
 $\mu$  L/mL)处理后,其 [Ca<sup>2+</sup>]与正常对照组相比未发生显著改变(P> 0.05),处理前后 [Ca<sup>2+</sup>]维持在 170~ 190 nmol/L范围内,无显著性差异

#### 4 讨论

近年来,从毒副作用相对较小的中药中寻找新的抗癌药物是一个积极的方向。THH是卫茅科雷公藤属植物,其毒性远远小于同属的雷公藤。本研究发现,THH能诱导细胞出现典型的凋亡细胞形态,包括核固缩、染色质边集、核碎裂及凋亡小体形成等。DNA有规律地在核小体之间的降解从而形成的梯状带,是凋亡细胞的重要生化标志。琼脂糖凝胶电泳显示,THH能诱导细胞出现典型的 DNA梯状带,并且随剂量增加,梯状带的出现时间前移,表现出良好的剂量和时间依赖关系。流式仪检测表明 THH可诱导细胞出现典型的亚二倍体峰(凋亡峰),并且存在明显的量效和时效关系。在 DNA直方图中,从 4h 开始,亚 G<sub>1</sub>期细胞逐渐增多,凋亡率升高并维持较长时间的高台期或呈持续升高趋势,表明药物作用全程(0~ 48 h)凋亡现象均持续存在。

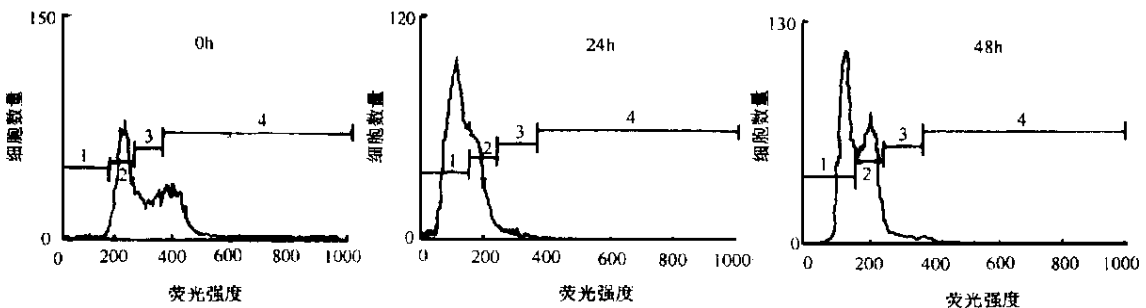


图 4 THH水提取液(10 $\mu$  L/mL)诱导的 HL-60细胞凋亡峰流式细胞仪分析图

并维持在较高水平。本研究应用染料排除法、活细胞悬液荧光染色结合 DNA 电泳及 FCM 分析,均观察到 THH 诱导细胞凋亡的典型表现,并且检测结果较一致地反映了 THH 诱导细胞凋亡的动态变化规律,证实 THH 具有较强的诱导白血病 HL-60 细胞凋亡的能力。

Bcl-2 基因在细胞凋亡中起负性调节因子作用,其过度表达可保护肿瘤细胞,使许多瘤细胞对阿糖胞苷、长春新碱、顺铂等化疗药物产生抗性,这可能是形成多药耐药性的原因之一<sup>[5]</sup>; Bcl-2 表达增强是许多肿瘤的共性,能使肿瘤细胞维持明显的生长优势。HL-60 细胞作为 Bcl-2 基因高表达细胞株,实验观察到,THH 水提取液 (10<sup>μ</sup> L/mL) 处理后 4 h, Bcl-2 基因表达即出现显著降低,直到处理后 24 h 均保持持续降低趋势。同步 FCM 分析则显示凋亡的高峰发生在 24 h 左右,说明 Bcl-2 表达下调是一个早期事件,提示 Bcl-2 基因有可能是 THH 诱导 HL-60 细胞凋亡的启动基因。由于 80% 以上的肿瘤其 p53 基因为突变型,使这些肿瘤对传统化疗药物并不敏感<sup>[6]</sup>。在 p53 基因突变的 HL-60 细胞中,THH 能通过下调 Bcl-2 基因诱导凋亡发生,提示 THH 可能发展成为一种广谱抗肿瘤药物。

大量研究表明,在 HL-60 细胞凋亡过程中至少存在两种不同的信号途径:一种以 Ca<sup>2+</sup> 为第二信使,通过参与凋亡过程中一些关键点的调节,包括激

活 Ca<sup>2+</sup> 依赖性核酸内切酶,而启动细胞自主死亡程序;另一种可能依靠其他信号通路诱导细胞凋亡。目前认为凋亡时细胞内信号还涉及 cAMP、蛋白激酶系统、氧化应激等。本研究采用目前应用较广的 Ca<sup>2+</sup> 荧光指示剂 Fura-2/AM 检测 HL-60 细胞内游离 Ca<sup>2+</sup> 浓度,结果提示 THH 在启动细胞凋亡过程中未引起细胞内 Ca<sup>2+</sup> 稳态的改变。结果提示 THH 可能有通过 Ca<sup>2+</sup> 以外的其他信号通路启动 HL-60 细胞凋亡。此外,HL-60 细胞为 Bcl-2 高表达细胞株,研究表明,过表达的 Bcl-2 蛋白能抑制胞内 Ca<sup>2+</sup> 库的动员,阻止 [Ca<sup>2+</sup>] 升高及核钙的积累<sup>[7]</sup>,这可能是 THH 诱导 HL-60 细胞凋亡早期 [Ca<sup>2+</sup>] 未发生变化的一个重要原因。

参考文献:

- [1] 舒尚义. 昆明山海棠毒性及毒性成份的研究 [J]. 云南中医杂志, 1983, 4(6): 43-44.
- [2] 王士民,王 慧,张珠涛,等. 昆明山海棠对雄性大鼠的抗生育作用及其可逆性的研究 [J]. 中国药理学杂志, 1989, 24(11): 652-654.
- [3] 曹 佳, Michael Nusse. 昆明山海棠诱导 Jurkat 等 3 个细胞株发生细胞凋亡 [J]. 科学通报, 1999, 44(11): 1169-1173.
- [4] 张钧田. 用 Fura-2/AM 测定细胞内游离钙浓度的方法 [J]. 中国药理学杂志, 1991, 26(11): 655-658.
- [5] 曾庆平,郭 勇. 细胞凋亡异常及其药物治疗法 [J]. 中国药理学杂志, 1997, 32(12): 733-736.
- [6] Hartwell L H, Kerr F R, Arends M J, *et al.* Cell cycle control and cancer [J]. Science, 1994, 266: 1821-1825.
- [7] Zamzani N, Tutaka M F, Kane B J, *et al.* Subcellular and Mitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins [J]. Oncogene, 1998, 16(17): 2265-2282.

## 桂枝对致痫大鼠海马 CA1 区诱发场电位的影响

徐淑梅,何津岩,林来祥,郑开俊,仇晓菁

(天津医科大学 生理教研室,天津 300070)

**摘要:**目的 探讨桂枝对癫痫模型海马脑片诱发场电位的影响。方法 以毛果芸香碱致痫大鼠为实验对象,用细胞外玻璃微电极记录方法,观察桂枝对癫痫模型离体海马脑片 CA1 区锥体细胞诱发群峰电位 (population spike, PS) 的影响。结果 桂枝提取液使致痫大鼠海马脑片 PS 幅度平均降低 28.73%,平均 16.8 min 恢复。结论 桂枝能降低致痫大鼠海马脑片 CA1 区顺向诱发 PS 幅度,提示桂枝对中枢神经系统的突触传递过程有明显的抑制效应。

**关键词:**桂枝;癫痫;海马脑片;群峰电位

中图分类号: R286.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2001)10-0916-03

### Effect of cassia twig on evoked field potential of CA1 of hippocampal slice in epileptogenic rat

收稿日期: 2001-04-27

基金项目:天津市 21 世纪—青年科学基金资助项目 (No. 963708411)

作者简介:徐淑梅 (1960-),女,河北省人,副教授,学士学位。1983 年毕业于天津医学院医疗系,主要从事神经电生理研究。