

的作用机制主要涉及两个方面^[6],一是促进胰岛素的分泌和释放或是抑制胰高血糖素的分泌;二是影响胰岛素受体后代谢的某些环节,主要是抑制肝脏的糖异生作用,其目的均是降低并控制血糖。本研究从胰岛素水平、C肽、胰岛素受体后效应探讨了百草降糖片降低血糖的作用机制。

四氧嘧啶是一种特异性的 β 细胞毒剂,能选择性地破坏胰岛 β 细胞,引起实验性糖尿病^[7]。结果显示百草降糖片对四氧嘧啶所致的血糖升高有明显的抑制作用,这表明百草降糖片可减弱四氧嘧啶对胰岛 β 细胞的损伤或改善受损伤的 β 细胞的功能。

胰高血糖素能促进糖异生作用而使肝糖原输出增多,百草降糖片能对抗这种作用。百草降糖片能增加肝糖原、肌糖原的含量,另外降糖的同时,也能促进正常小鼠和糖尿病大鼠胰岛素的分泌和增加C肽的含量。由此可说明百草降糖片降血糖作用机制可能是一方面通过防止葡萄糖在肠道吸收,另一方面通过改善胰岛功能,促进胰岛素分泌来降低血糖的。

糖尿病对机体氧化应急增加,自由基及其产物的产生和清除障碍与糖尿病,尤其是大血管、微血管、神经并发症的发病有关,受自由基的作用,体内生物膜中的多价不饱和脂肪酸发生过氧化反应,生成LPO,糖尿病患者中LPO明显增高,测定LPO含量可反映机体脂质过氧化的速率和强度^[8]。SOD是机体清除氧自由基的一种重要酶,其活力的高低

与衰老、肿瘤及血液、心血管、内分泌系统等疾病有着十分密切的关系,也可反映机体清除自由基能力的高低。已有较多资料表明,糖尿病模型及临床I型、II型糖尿病,均存在着氧自由基代谢紊乱,SOD活性降低,LPO增高^[9]。本实验结果表明,百草降糖片能显著升高SOD水平,降低LPO含量,从而说明百草降糖片具有明显的抗氧化作用和清除氧自由基的能力,故百草降糖片对糖尿病并发症的发生也可起到一定的预防和治疗作用。

参考文献:

- [1] 茅彩萍,徐乃玉,顾振纶.百草降糖片降血糖作用的实验研究[J].中草药,2001,32(12):1111-1113.
- [2] 周序开.葡萄糖氧化酶法测定血糖含量[J].中华医学检验杂志,1982,5:56.
- [3] 尹义存,邹大进,鲁瑾.水飞蓟宾对高脂饮食大鼠胰岛素敏感性的影响[J].第二军医大学学报,1999,20(4):231-233.
- [4] 袁勤生,陈浩,周刚宏,等.超氧化物歧化酶测定方法的比较[J].中国药理学杂志,1994,29(1):679-681.
- [5] 向荣,王鼎年.过氧化脂质硫代巴比妥酸分光光度法的改进[J].生物化学与生物物理进展,1990,17(3):241-242.
- [6] Groop L, Groop P H, Stenman S, et al. Comparison of pharmacokinetics, metabolic effects and mechanisms of action glyburide and glipizide during Long-term treatment[J]. Diabetes Care, 1987, 10: 671-678.
- [7] 徐叔云.药理实验方法学[M].第二版.北京:人民卫生出版社,1991.
- [8] 金晖,唐尧.糖尿病中的氧化与抗氧化损伤[J].医学综述,1996,2(2):49-51.
- [9] 田浩明,梁荃忠,张翔迅.糖尿病病人红细胞超氧化物歧化酶和血浆过氧化脂质的变化[J].中华内分泌代谢杂志,1990,6:146-147.

蟾蜍灵诱导白血病 HL-60细胞分化及相关基因表达

徐瑞成¹,陈小义¹,陈莉¹,呼文亮¹,钱进²

(1. 武警医学院,天津 300162; 2. 天津药物研究院,天津 300193)

摘要:目的 研究中药蟾酥中蟾毒成分蟾蜍灵(bufoalin)的抗癌机制。方法 以早幼粒白血病 HL-60细胞为靶细胞,应用电泳技术观察 bufoalin诱导的细胞分化,免疫组化方法检测增殖细胞核抗原(PCNA)和细胞周期素依赖性蛋白激酶抑制因子 p21^{WAF1}的表达。结果 0.001 μmol/L bufoalin作用 HL-60细胞,细胞向粒细胞方向分化, p21^{WAF1}表达显著升高,而 PCNA表达显著下降,二者呈显著负相关($P < 0.01$)。结论 bufoalin诱导 HL-60细胞分化,与其上调 p21^{WAF1}的表达、下调 PCNA表达有关。

关键词: 蟾蜍灵; HL-60细胞; 细胞分化; p21^{WAF1}; 增殖细胞核抗原; 基因表达

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2002)02-0151-03

收稿日期: 2001-08-18

基金项目: 天津市自然科学基金重点项目资助 项目号: 013804311

作者简介: 徐瑞成, 32岁, 副教授, 硕士。主要从事细胞周期和细胞凋亡的研究, 发表论文 10余篇。

HL-60 cell differentiation induced by bufalin and its relative gene expression

XU Rui-cheng¹, CHEN Xiao-yi¹, CHEN Li¹, HU Wen-liang¹, QIAN Jin²

(1. Medical College of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China;

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China)

Key words bufalin; HL-60 cell line; cell differentiation; p21^{WAF1}; proliferating cell nuclear antigen; gene expression

我们既往的研究表明,蟾蜍灵(bufalin)能有效抑制早幼粒白血病细胞和胃癌细胞的生长,高浓度 bufalin (0.01 $\mu\text{mol/L}$ 及以上浓度)具有极强的诱导凋亡作用^[1,2],国外学者研究证实, bufalin 具有诱导分化作用^[3,4],这种双重作用机制可能与药物浓度有关,本研究观察了低浓度 bufalin (0.001 $\mu\text{mol/L}$) 诱导 HL-60 细胞分化,以及对细胞周期素依赖性蛋白激酶(CDK)抑制因子 p21^{WAF1} 和增殖细胞核抗原(PCNA)基因表达的调控作用。

1 材料

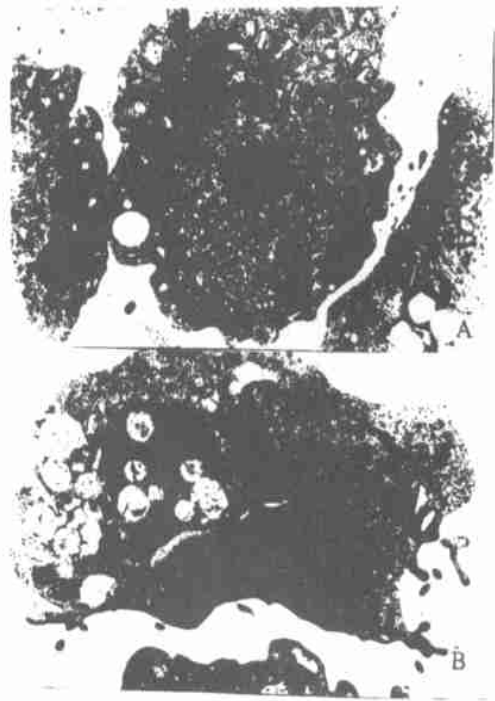
1.1 药品试剂: bufalin 的制备按我们以前报道的方法进行^[2]。RPMI 1640 培养基为美国 Gibco 公司产品, p21^{WAF1} 和 PCNA 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司,二抗及检测试剂盒由武汉博士德公司提供,胎牛血清由中国医学科学院血液学研究所生产,其他试剂为国产分析纯。

1.2 细胞株: HL-60 细胞由中国医学科学院血液学研究所吴克复教授惠赠,用 RPMI 1640 培养,补充 10% 胎牛血清、100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素和 100 U/mL 青霉素,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 体积 CO_2 孵育箱(美国 Napco)中培养。每 2~4 天传代 1 次,在接种细胞处于对数生长期时进行药物处理。

2 方法和结果

2.1 bufalin 诱导 HL-60 细胞分化: 分别收集对照组和 0.001 $\mu\text{mol/L}$ bufalin 处理 24 h 的细胞,离心,弃上清,加入 2% 戊二醛固定液,用吸管轻吹,使细胞团块浮起,固定 30 min,用 1% 钼酸后固定 2 h; 酒精逐级脱水、渗透,环氧树脂包埋,超薄切片,铀铅染色,在透射电镜下观察细胞形态学变化。HL-60 细胞恢复了终末分化: 对照组 HL-60 细胞呈类圆形,胞核位于中央,胞浆有多数突起,乳头状或波浪状,有极丰富的多聚及游离的核糖体,线粒体发育不成熟,胞核染色质极丰富,常染色质高度不规则分散,有大的核仁(图 1-A); 而药物处理组细胞呈分化后的粒细胞样结构特征,出现分叶状核,核质比变小,具备了吞噬能力,将凋亡小体吞噬(图 1-B)。

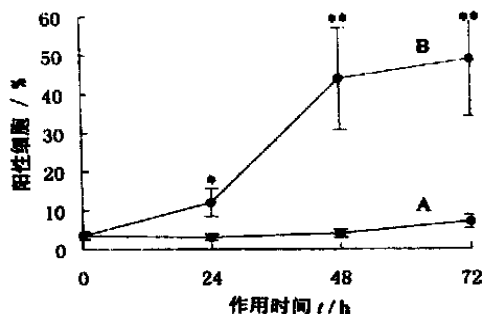
2.2 Bufalin 对 HL-60 细胞 PCNA 及 p21^{WAF1} 表达



A-对照组; B-药物处理组

图 1 bufalin 诱导 HL-60 细胞分化的形态学变化(透射电镜 $\times 7500$)

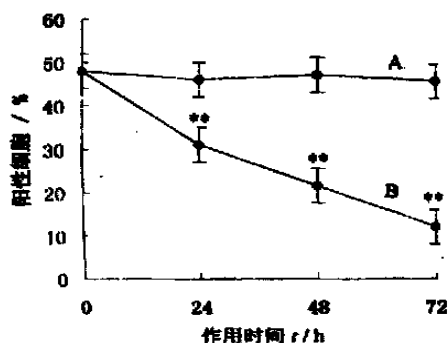
的影响: 将 0.001 $\mu\text{mol/L}$ bufalin 处理不同时相点的细胞以 $\times 10^6$ cell/mL 的浓度制备细胞悬液,均匀涂于防脱片剂处理的玻片,形成直径为 0.5 cm 细胞印迹,丙酮室温固定 30 min, 0.01 mol/L TBS 洗涤 2 min 3 次,滴加正常血清封闭液,室温 20 min 甩干;加鼠抗人 PCNA 或 p21^{WAF1} 单克隆抗体,室温下作用 1 h, TBS 洗涤;加生物素标记的羊抗鼠单抗,室温下作用 30 min, TBS 洗涤;加链酶亲和素-碱性磷酸酶溶液(SABC-AP),室温下 20 min, TBS 洗涤,水洗 1 次;用 BCIP/NBT 显色 10~30 min,水洗,干燥后水溶性封片剂封片;阴性对照以磷酸缓冲液代替一抗,其余步骤相同。显微镜(日本 Nikon)下照相并计数(选择 5 个视野,计数显紫蓝色的阳性细胞占总细胞的百分比,样本均值的比较采用 *t* 检验)。由图 2、3 可见,经 bufalin 处理后, p21^{WAF1} 表达增强,而 PCNA 表达降低,二者呈显著负相关 ($P < 0.01$)。



与对照组比较 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

A 对照组 B 药物处理组

图 2 bufalin 对 HL-60 细胞 p21^{WAF1} 表达的影响



与对照组比较 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

A 对照组 B 药物处理组

图 3 bufalin 对 HL-60 细胞 PCNA 表达的影响

3 讨论

实验结果显示, bufalin 处理 HL-60 细胞以后, 电镜下可见诱导分化的细胞将凋亡小体作为异己分子吞噬。实际上, 在组织中是具有吞噬功能的细胞对凋亡小体进行吞噬^[5], 在本实验体系中, HL-60 细胞被诱导分化成粒细胞样细胞, 也具备了吞噬能力。从而在形态学方面证明 bufalin 的诱导分化作用。

bufalin 诱导肿瘤细胞分化的机制还不是很清楚。Numazawa 等应用 bufalin 诱导人单核细胞白血病 THP-1 细胞分化时, 下调 c-myc 和 c-fos 的表达, 诱导 c-fos 和 egr-1 的转录^[3]。c-myc 和 c-fos 是细胞周期早期基因, 与细胞周期调控密切相关。bufalin 与分化诱导剂维甲酸 (RA) 联用, 诱导原代培养的急性早幼粒白血病 (APL) 细胞分化, 表现极

强的协同作用, 在有些病例中, bufalin 恢复了 RA

耐受的 APL 细胞对 RA 的敏感性, 但机制不明^[4]。

p21^{WAF1} 是细胞周期素依赖性激酶 (CDK) 的抑制因子, 已知 p21^{WAF1} 的表达调控与抑癌基因 p53 密切相关。p53 蛋白的积聚, 可使细胞停滞于 G1 晚期, 目前认为 p53 蛋白的这种作用是通过调节 p21^{WAF1} 的基因表达来实现的, p53 通过与 p21^{WAF1} 编码区上游的 p53 结合点的结合, 以促进 p21^{WAF1} 的表达^[6]。p21^{WAF1} 可抑制 CDK 和 PCNA, 阻断细胞周期进程, 在某些肿瘤细胞, p53 基因突变, p21^{WAF1} 表达水平极低, 导致细胞增殖失控^[7]。我们用 bufalin 处理 HL-60 细胞, p21^{WAF1} 基因表达较对照组显著升高, 而且抑制了 PCNA 的表达, 此结果提示 bufalin 可通过促进抑癌基因 p21^{WAF1} 的表达, 从而抑制细胞增殖, 促进细胞分化。

最近, Kawazoe 等^[8]克隆了一个受 bufalin 调节的细胞分化和凋亡的相关基因 Tiam1, 在其正义链转染细胞中, p21 激活蛋白激酶 (p21 activation kinase, PAK) 的活性显著升高, 可见 bufalin 诱导癌细胞分化和凋亡与 CDK 抑制因子的表达密切相关, 它们相互作用的机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 徐瑞成, 陈小义, 陈莉, 等. 蟾蜍灵诱导白血病 HL60 细胞凋亡的初步研究 [J]. 中国中药杂志, 2001, 26: 59-61.
- [2] 陈小义, 徐瑞成, 陈莉, 等. 蟾蜍灵对人胃癌细胞系 MGC-803 的细胞毒作用 [J]. 中草药, 2000, 31: 920-922.
- [3] Numazawa S, Inoue N, Nukura H, *et al.* A cardiotonic steroid bufalin-induced differentiation of THP-1 cells [J]. Biochem Pharmacol, 1996, 52: 321-329.
- [4] Yamada K, Hno K, Tomoyasu S, *et al.* Enhancement by bufalin of retinoic acid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cells in primary culture [J]. Leuk Res, 1998, 22: 589-595.
- [5] Savill J. Apoptosis: Phagocytic docking without shocking [J]. Nature, 1998, 392: 505-509.
- [6] Choisy R C, Reisdorf P, Yonish R E, *et al.* Mechanism of p53-induced apoptosis: in search of gene which are regulated during p53-mediated cell death [J]. Toxicol, 1998, 102: 491-496.
- [7] Michieli P, Chedid M, Lin D, *et al.* Induction of waf1/cip1 by a p53-independent pathway [J]. Cancer Res, 1994, 54: 3391-3395.
- [8] Kawazoe N, Watabe M, Masuda Y, *et al.* Tiam1 is involved in the regulation of bufalin-induced apoptosis in human leukemia cells [J]. Oncogene, 1999, 18: 2413-2421.

欢 迎 投 稿

欢 迎 订 阅