

人参炔醇对 HL-60 细胞体外诱导分化作用的研究

王泽剑¹, 吴英理², 林琦¹, 陈红专¹, 陆阳^{1*}

(1. 上海第二医科大学药物研究所, 上海 200025; 2. 上海第二医科大学附属瑞金医院血液病研究所, 上海 200025)

摘要: 目的 通过细胞形态学和增殖动力学研究人参炔醇对 HL-60 细胞诱导分化作用。方法 采用台盼蓝染色及细胞计数器测定细胞存活量, 流式细胞仪检测人参炔醇对细胞周期和分子标志表达的影响, 观察信号通路阻断剂对人参炔醇诱导细胞分化的影响。结果 人参炔醇使 HL-60 细胞倍增时间延长, 诱导 HL-60 向单核细胞分化, 细胞集中于 G₁ 期, 显著上调细胞表面 CD14 分子表达, 并中度上调 CD11b 分子表达, RpcAMPS 及 H7 均可使人参炔醇诱导的 HL-60 细胞 NBT 阳性率降低。结论 人参炔醇诱导 HL-60 向单核细胞分化, 与细胞内腺苷酸环化酶 (cAMP), 蛋白激酶 C (PKC) 信号通路活化有关。

关键词: 三七; 人参炔醇; HL-60; 细胞分化

中图分类号: R 286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2003)08-0736-03

Effect of panaxynol on differentiation of HL-60 cells line *in vitro* induced

WANG Ze-jian¹, WU Ying-li², LIN Qi¹, CHEN Hong-zhuan¹, LU Yang¹

(1. Institute of Materia Medica; 2. Institute of Hematology of Ruijin Hospital,

Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China)

Key words: *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen; panaxynol; HL-60; cell differentiation

三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 在中国民间具有悠久的药用历史, 具有止血活血、消肿止痛的功效, 常用于治疗多种外伤性疾病。现代临床实践证明三七在中枢神经系统、心血管系统、内分泌系统和免疫系统具有广泛的药理活性; 基础研究表明三七及其活性成分具有抗肿瘤、抗应激、抗氧化的作用。以往对三七化学成分和活性研究多集中在三七正丁醇部位 (皂苷成分), 曾报道从三七醇提物的石油醚部位分离出人参炔醇 (panaxynol) 和人参环炔醇 (panaxydol)^[1]。人参炔醇对多种肿瘤细胞具有十分明显的增殖抑制作用^[2]。为进一步阐明其在防治肿瘤过程中的作用及机制, 本实验以维甲酸为阳性对照, 研究了人参炔醇对体外培养 HL-60 细胞的影响。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂: HL-60 细胞系由中国科学院上海细胞所提供。人参炔醇按报道方法制备^[1], 波谱及色谱分析均显示为单体化合物, 纯度 ≥ 98%。将其溶于无水乙醇, 终浓度为 0.1%, 储备在 4℃ 冰箱中备用。台盼蓝、溴化乙锭、NBT 购自上海生工试剂公司。维甲酸由上海第二医科大学附属瑞金医院血液病研究所提供。FITC 标记的 CD11b, FITC 标记的

CD13, PE 标记的 CD14 鼠抗人单克隆抗体为 DaKo 公司产品。TPA, RpcAMPS, H7 均为 Sigma 公司产品。RPMI1640、胎牛血清为 Gibco 公司产品。

1.2 仪器: FACS-420 型流式细胞仪为 Coulter 公司产品; 颗粒计数形态分析仪 (Particle Count and Size Analyzer) 为 Beckman 公司产品; 细胞电片机 (Cytopro) 为 Viescor 公司产品; CM120 型电镜为荷兰飞利浦公司产品。

1.3 方法: 将 HL-60 细胞培养于含 10% 灭活胎牛血清及青霉素 100 U/mL、链霉素 100 μg/mL 的 RPMI1640 培养液中, 置 CO₂ 孵箱中悬浮培养。实验分 3 组: 正常对照组、人参炔醇组、维甲酸组。根据细胞毒性试验选用人参炔醇组浓度分别为 4, 8, 16 μmol/L, 维甲酸 (0.1 μmol/L) 为阳性对照。每组设 3 个平行。

1.3.1 细胞生长测定: 加药后连续 3 d, 逐日取各组细胞, 台盼蓝染色观察, 细胞计数器计数。

细胞倍增时间 $TD = t \log 2 / (\log N_t - \log N_0)$ ^[3]

式中 t 为培养时间, N_0 , N_t 分别代表接种后及培养 t h 后的细胞数。

1.3.2 电镜观察: 加药 72 h 后分别取处理组和对

* 收稿日期: 2002-08-13

基金项目: 上海市教委学科建设项目 (S970204)

作者简介: 王泽剑 (1972—), 男, 河南郑州人, 上海第二医科大学在读博士, 主要研究方向: 治疗防尔茨海默病的新药开发。

Tel: (021) 63846590-776464 E-mail: wangzejian0@Yahoo.com.cn

照组细胞悬液离心,弃上清,沉淀细胞用 2.5% 的戊二醛磷酸缓冲液固定,48 h 后琼脂糖凝胶包埋,钨酸染色,制片后电镜下观察细胞形态。

1.3.3 NBT 实验:加药 72 h 后取处理组和对照组细胞悬液离心,弃上清,沉淀重悬于无血清培养基中,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清。每管加入 1 mL 含 0.1% NBT 和 100 ng/mL TPA 的无血清培养基,37℃ 放置 25 min,吸少量细胞悬液,电片,干燥,常规瑞氏-姬姆萨染色,在油镜下计数 200 个细胞,含蓝紫色斑为阳性细胞,计算阳性率^[4];阻断剂组在人参炔醇 16 μmol/L 组加药孵育的同时加 Rp-cAMPS 或 H7,其终浓度分别为 100 μmol/L 和 50 μmol/L,72 h 后观察阻断剂对人参炔醇诱导细胞 NBT 反应的影响。

1.3.4 流式细胞仪检测:加药 72 h 后收集细胞并计数,PBS 洗涤,取部分细胞用 70% 乙醇固定,用于 DNA 含量测定,另一部分细胞分别与不同的 CD 单抗孵育 30 min 之后固定,上样前离心去除固定液,调细胞浓度为 10⁶/mL,流式细胞仪检测,Bios Consort30 软件系统处理数据。

2 结果

2.1 对细胞生长的影响:见表 1。人参炔醇和维甲酸均可使 HL-60 细胞增殖数量下降,倍增时间延长,对细胞生长有明显抑制作用。经台盼蓝染色,各组细胞均未发现坏死细胞。

表 1 人参炔醇对 HL-60 细胞倍增时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of panaxynol on double time of HL-60 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)				
组 别	剂 量 /(μmol · L ⁻¹)	细胞倍增时间/h		
		24 h	48 h	72 h
对照	-	23.6 ± 4.41	23.1 ± 2.35	25.4 ± 4.27
维甲酸	0.1	33.4 ± 4.37*	39.0 ± 2.47**	54.8 ± 8.54**
人参炔醇	4	30.8 ± 4.54	37.2 ± 4.42*	39.8 ± 2.23*
	8	38.3 ± 6.47*	54.4 ± 4.54**	64.2 ± 6.27**
	16	40.4 ± 2.27**	54.0 ± 6.28**	68.7 ± 10.47**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

2.2 电镜观察结果:对照组 HL-60 细胞呈圆形或不规则椭圆形,胞质内核糖体丰富,可见粗面内质网及线粒体,胞核大而胞浆极少,常见 1~2 个大核仁,核内常染色质明显;人参炔醇处理 72 h 后,HL-60 细胞胞体稍有增大,核浆比下降,核形状不规则,呈肾形,核内异染色质数量明显增加,胞质中除一般细胞器外,还可见发育良好的高尔基体和微丝结构。

2.3 对 HL-60 细胞分化的影响:见表 2。人参炔醇和维甲酸均对 HL-60 细胞具有诱导分化作用。人

参炔醇对 HL-60 具有剂量、时间依赖的诱导分化作用,16 μmol/L 的人参炔醇作用 72 h 可诱导 58% 的 HL-60 细胞分化。预先给予 cAMP 依赖蛋白激酶的特异性阻断剂 Rp-cAMPS 后可显著的抑制 NBT 反应阳性率,NBT 阳性细胞为 12.7%,与人参炔醇 16 μmol/L 组相比差异有显著统计学 ($P < 0.01$);预先给予 PKC 阻断剂 H7 后,NBT 阳性细胞为 42.7%,与人参炔醇组相比有显著性差异 ($P < 0.05$),提示 Rp-cAMPS 和 H7 均可抑制人参炔醇对 HL-60 细胞诱导分化作用,以 Rp-cAMPS 作用较为显著。

表 2 人参炔醇对 HL-60 细胞 NBT 反应阳性率的作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of panaxynol on NBT positive reduction of HL-60 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)				
组 别	剂 量 /(μmol · L ⁻¹)	反应阳性率/%		
		24 h	48 h	72 h
对照	-	2.4 ± 1.41	4.2 ± 2.47	2.5 ± 1.07
维甲酸	0.1	12.2 ± 3.43*	31.7 ± 4.75**	55.2 ± 8.47**
人参炔醇	4	12.5 ± 4.07*	16.7 ± 5.84**	30.4 ± 8.79**
	8	12.7 ± 4.85*	23.5 ± 5.46**	47.4 ± 4.58**
	16	14.8 ± 4.25**	38.4 ± 9.28**	58.3 ± 6.35**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

2.4 流式细胞仪检测结果:见表 3 和 4。人参炔醇可剂量依赖性增加 G₀/G₁期细胞数,S 期细胞数相应减少,G₂/M 期细胞数增加,细胞被阻滞于 G₀/G₁ 期和 G₂/M 期,提示细胞增殖受抑制。维甲酸组诱导 HL-60 细胞凋亡,凋亡率 16.7%,而人参炔醇各剂量组均未发现对 HL-60 细胞有诱导凋亡作用。人参炔醇中度增加 HL-60 细胞表面 CD11b 分子表达,并剂量依赖性促进 CD14 分子表达,降低 CD13 的表达,维甲酸可明显促进 CD11b 分子表达,下调 CD13 分子表达,对 CD14 分子表达无影响。

表 3 人参炔醇对 HL-60 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of panaxynol on cycle of HL-60 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)				
组 别	剂 量 /(μmol · L ⁻¹)	细胞周期分布/%		
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
对照	-	29.2 ± 4.4	64.1 ± 2.4	1.5 ± 4.3
维甲酸	0.1	43.7 ± 4.7*	54.8 ± 8.4**	1.7 ± 2.4
人参炔醇	4	30.8 ± 4.5	41.2 ± 4.5**	27.8 ± 2.2**
	8	45.3 ± 6.7*	37.2 ± 4.4**	17.4 ± 6.7**
	16	65.3 ± 2.2**	18.4 ± 6.2**	15.1 ± 4.4**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

3 讨论

HL-60 是人早幼粒白血病细胞系,易于观察形

表 4 人参炆醇对 HL-60 细胞 CD 分子表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 4 Effect of panaxynol on expression of CD of HL-60 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	剂 量 $I(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	细胞表面分子 / % CD11b	CD13	CD14
对照	-	6.2 $\pm$ 2.1	84.8 $\pm$ 9.3	12.4 $\pm$ 1.8
维甲酸	0.1	60.2 $\pm$ 6.5* *	51.5 $\pm$ 7.7* *	17.1 $\pm$ 3.5
人 参 炆 醇	4	15.8 $\pm$ 4.5*	58.5 $\pm$ 6.5* *	35.5 $\pm$ 3.4* *
	8	21.3 $\pm$ 3.7* *	29.7 $\pm$ 4.8* *	64.4 $\pm$ 4.5* *
	16	25.4 $\pm$ 8.2* *	16.5 $\pm$ 2.4* *	78.2 $\pm$ 4.2* *

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$
* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group

态,因此常作为诱导分化研究的模型之一,不同的分化诱导剂可分别诱导 HL-60 细胞向粒细胞或单核巨噬细胞分化^[5]。台盼蓝染色显示人参炆醇各组均无坏死细胞,流式细胞仪结果显示人参炆醇在诱导分化过程中,对 HL-60 细胞增殖及 DNA 合成具有明显的抑制作用,未见凋亡峰,进一步说明该剂量、时间范围内人参炆醇可直接抑制 HL-60 细胞增殖,但并不杀伤细胞。

形态分化客观地反映分化诱导剂对细胞的分化作用;细胞功能分化可反映药物诱导分化的可能机制。由于分化 HL-60 细胞中过氧化物酶的作用,NBT 接受来自 NADPH 的氢,变成蓝紫色的甲瓚,并沉积于有过氧化物酶的部位,因此,通常以 NBT 还原能力判断 HL-60 细胞是否分化成熟^[6]。有效的诱导剂 NBT 反应阳性率应大于 50%,因此,人参炆醇可作为诱导分化剂。

人参炆醇对 HL-60 细胞的 DNA 合成具有明显的抑制作用,G 期细胞数显著增加,S 期细胞相应减少。CD11b 是细胞表面 β 整合素的 α 亚基,在未分化的髓系细胞仅微量表达,是 HL-60 细胞分化早期的分子标志,为粒细胞和单核细胞所共有^[5,7];CD13 是细胞表面的氨肽酶 N,为细胞髓系标志,与急性髓系白血病的肿瘤浸润及肿瘤细胞对凋亡诱导剂的耐受有关,目前发现 CD13 的高表达涉及部分病人化疗后的维甲酸综合征及白细胞增多,CD13 表达的下降可提高肿瘤细胞对凋亡诱导剂的敏感性^[8,9];CD14 为镶嵌在细胞膜蛋白上的磷脂成分,其功能可能是髓系特异的生长因子受体,在粒系仅微量表达,随单核细胞逐渐成熟 CD14 表达相应增加,被认为是单核/巨噬细胞的标志^[9],实验结果提示经人参炆醇处理的 HL-60 细胞其恶性程度降低,

并向单核/巨噬细胞方向分化,该时间范围内未见细胞凋亡,可能与孵育时间较短有关。

以往研究表明 HL-60 细胞向单核/巨噬细胞方向分化通常与细胞内腺苷酸环化酶、蛋白激酶 C 通路的活化有关^[9,10]。本实验结果提示:人参炆醇对 HL-60 细胞的诱导分化作用与细胞内 cAMP, PKC 通路的活化有关,以 cAMP 依赖的蛋白激酶系统活化为为主。人参炆醇对细胞内信号通路的影响是直接作用还是间接作用仍须进一步研究。

致谢:上海第二医科大学附属瑞金医院血研所王振义教授对本实验设计的指导,上海第二军医大学细胞生物学教研室易静教授对本研究的电镜技术支持。

References:

[1] Lin Q, Zhao X, Liu P, *et al.* Studies on the lipophilic constitution of *Panax notoginseng* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(6): 490-492.

[2] Fujioka T, Furumi K, Fuji H, *et al.* Antiproliferative constituents from Umbelliferae plants. V. A new furanocoumarin and falcariindiol furanocoumarin ethers from the root of *Angelica japonica* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1999, 47(1): 96-100.

[3] Yang R J, Zhang M H, Yan F, *et al.* Studies on the differentiation of human promyelocytic leukemia cell line HL-60 *in vitro* [J]. *Acad J Second Mil Med Univ* (第二军医大学学报), 1994, 15(2): 124-129.

[4] Li C, Wang Y, Gao L, *et al.* Expression of toll-like receptors 2 and 4 and CD14 during differentiation of HL-60 cells induced by phorbol 12-myristate 13-acetate and 1 α , 25-dihydroxy-vitamin D (3) [J]. *Cell Growth Differ*, 2002, 13(1): 27-38.

[5] Drayson M T, Michell R H, Durham J, *et al.* Cell proliferation and CD11b expression are controlled independently during HL-60 cell differentiation initiated by 1, 25 α -dihydroxyvitamin D (3) or all-trans-retinoic acid [J]. *Exp Cell Res*, 2001, 266(1): 126-134.

[6] Schultz H, Engel K, Gaestel M, *et al.* PMA-induced activation of the p42/44 ERK-and p38RK-MAP kinase cascades in HL-60 cells is PKC dependent but not essential for differentiation to the macrophage-like phenotype [J]. *J Cell Physiol*, 1997, 173(3): 310-318.

[7] Pu Q, Yang M R. *The Colour Atlas of Histological Pathology of Bone Marrow in Hematological Disorders* (血液病骨髓诊断病理学彩色图谱) [M]. Beijing: Science Press, 2002.

[8] Yang M, Yang M M, Yang T, *et al.* Leukemic cell-surface CD13/aminopeptidase N and resistance to apoptosis mediated by endothelial cells [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2002, 94(13): 1020-1028.

[9] Vahdat L, Maslak P, Miller W H, *et al.* Early mortality and the retinoic acid syndrome in acute promyelocytic leukemia: impact of leukocytosis, low-dose chemotherapy, PMN/RAR- α isoform, and CD13 expression in patients treated with all-trans retinoic acid [J]. *Blood*, 1994, 84(11): 3843-3849.

[10] Lopez L G, Buron M I, Alcain F J, *et al.* Redox regulation of cAMP levels by ascorbate in 1, 25-dihydroxy-vitamin D3-induced differentiation of HL-60 cells [J]. *Biochem J*, 1998, 331(Pt 1): 21-27.