

4 讨论

HSV-1 的基因为双链 DNA, 易与宿主 DNA 发生整合。病毒严格寄生在细胞内, 使得药物杀伤病毒的同时对机体细胞也有损害。现有的抗疱疹病毒化学药物因为毒性太大或耐药性的产生, 其临床难以取得令人满意的效果。传统中药的多靶点作用机制、较少不良反应、无耐药性等优点表现出诱人的应用前景, 筛选高效低毒的抗病毒中药是当前抗病毒研究热点之一。对清热解暑类中药的现代研究发现其中不少中药具有抗病毒作用, 除杀灭病原微生物外, 还具有多种免疫学活性, 能非特异性增强免疫系统功能, 改善机体状况, 增强对各种感染的抵抗力。如果能够明确这类药物的抗病毒作用, 其意义是不言而喻的。

板蓝根是清热解暑类中药的典型代表, 应用于临床多年, 其传统清热解暑功效已得到认同, 尤其是对于病毒感染性疾病的治疗。国内外学者对板蓝根进行了大量的研究, 但是板蓝根中究竟何种成分起主导作用, 是作用于单一靶点还是作用于不同部位协同表现其抗病毒作用尚无定论。本实验初步研究了板蓝根的抗病毒的活性成分及作用机制, 结果显示, 板蓝根不同化学部位的抗病毒作用强度有较大

差异, 但其相关活性物质并未集于某一个单一的化学部位, 表明板蓝根是通过多种有效成分, 多环节、多途径地发挥协同作用而表现出抗病毒功效。抑制 HSV-1 的生物合成是板蓝根抗病毒的主要作用途径, 其中 II 部位尚能直接杀灭病毒。HSV-1 是有包膜的病毒, 最外层的包膜由脂质和糖蛋白组成, 其中任何一种成分改变, 即可使包膜变性, 从而灭活病毒, 故推测 II 部位中的某些化学成分能使病毒包膜变性以灭活病毒。本研究结论将指导笔者进一步提取分离板蓝根中与抗病毒功效相符的活性物质, 并为深入探讨其作用机制提供科学依据。

References:

- [1] Wang J, Li Y X, Zhang Y. Cloning, expression of HSV-IgG gene fragment and identification of the expressed protein [J]. *J Chin Biotechnol* (中国生物工程杂志), 2003, 23(6): 55-63.
- [2] Yan M, Wang Y C, Xia D Z. Effect of *Flos Lonicerae* Co solution against herpes simplex virus I *in vitro* [J]. *J Chin Pract Ophthalmol* (中国实用眼科杂志), 1998, 16(2): 82-84.
- [3] Liao Z M. Clinical approach of Banlangen Injection treating herpes simplex keratitis [J]. *J Chin Pract Ophthalmol* (中国实用眼科杂志), 2003, 21(3): 232-233.
- [4] Li D H, Tian Z G, Zhang J, et al. The use of MTT assay for the rapid testing of cytotoxicity of drugs against non-solid tumor cells [J]. *Cancer* (癌症), 1991, 10(3): 226.

蟾蜍灵对白血病 U937 细胞生长抑制和凋亡诱导作用

贾彩云¹, 呼文亮², 俞小瑞³, 于杰³, 徐瑞成²

(1. 河南大学医学院 细胞和分子免疫学研究室, 河南 开封 475001; 2. 武警医学院 生物化学教研室, 天津 300162; 3. 西安交通大学医学院 生物化学教研室, 陕西 西安 710061)

蟾蜍灵是蟾蜍毒素的主要成分之一, 蟾蜍毒素具有强心、麻醉、解毒、止痛、开窍、醒神等药理作用, 已被广泛应用于临床。近年来发现, 含有蟾蜍毒素的中药制剂在体外能抑制多种肿瘤细胞生长, 诱导白血病细胞的分化。临床观察提示, 含有蟾蜍毒素的中药制剂对肝癌、肺癌、胃癌、食管癌、白血病等具有明显的抑制作用。Numazawa^[1]研究表明, 蟾蜍毒素的各种成分以剂量依赖的方式抑制 K562 细胞生长。在所有的蟾蜍毒素中, 蟾蜍灵是诱导白血病细胞分化最有效的成分, 蟾蜍灵在较低浓度 ($1 \times 10^{-8} \sim$

1×10^{-9} mol/L) 能够在较宽的范围内(有较宽的白血病细胞谱)引起人白血病细胞分化^[2,3]。在较高的浓度 ($\geq 1 \times 10^{-7}$ mol/L) 诱导人白血病细胞凋亡^[4]。本实验以蟾蜍灵单体作用 U937 细胞株, 研究其抑制白血病细胞生长和诱导凋亡作用。

1 材料与方 法

1.1 药品、试剂和仪器: 蟾蜍灵由天津药物研究院制备, 纯度大于 99.5%, 用无水乙醇配制成母液, 用 D-Hanks 液稀释, 乙醇控制在体积分数小于 0.1% (预试验表明该体积分数的乙醇对细胞没有影响)。

收稿日期: 2004-05-18

基金项目: 天津市自然科学基金资助项目 (013804311)

作者简介: 贾彩云(1973—), 女, 河南洛阳人, 理学硕士, 讲师, 主要从事药物诱导肿瘤细胞凋亡及分子机制研究。Tel: (0378) 5654398
E-mail: jiacy602@sina.com, caiyunjia@henu.edu.cn

Hoechst 33342、碘化丙啶 (PI)、噻唑蓝 (MTT)、二甲基亚砜 (DMSO) 为 Sigma 公司产品; TUNEL 试剂盒 (In Situ Cell Detection Kit, AP) 德国 Roche 公司产品; Model550 酶标免疫测定仪, 美国 BioRAD; 尼康 E800 荧光显微镜, 日本。

1.2 细胞培养: 人髓性白血病细胞株 U937 细胞购自中国医学科学院基础医学研究所。培养基为内含 20% 灭活胎牛血清、80 U/mL 庆大霉素、0.01% L-谷氨酰胺和 0.304% NaHCO₃ 的 IMDM 培养基。于细胞处于对数生长期时加药。

1.3 倒置光学显微镜观察原位培养细胞的形态学改变: 设空白对照组和蟾蜍灵 (0.10、1.00、10.00 μmol/L) 组, 每组设 3 个复孔。培养 24 h 后加药, 48 h 后, 在倒置光学相差显微镜下观察并拍摄记录。

1.4 MTT 试验: 将 U937 细胞调整至 1×10^5 /mL, 按每孔 1×10^4 于 100 μL 接种 96 孔板, 37 °C、5% CO₂ 过夜, 加入不同浓度的蟾蜍灵, 分别以未经药物作用的 U937 细胞和单纯的培养液作为阴性对照和空白对照, 每组设 8 个复孔。继续培养 24 h。每孔加 MTT (5 g/L) 20 μL, 继续培养 4~5 h, 离心, 弃上清液, 每孔加 DMSO 200 μL, 避光震荡约 10 min。酶标仪检测 570 nm 波长处的吸光度 (A_{570}) 值。按文献方法计算平均抑制率^[5]。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{阴性对照}} - A_{\text{实验}}) / (A_{\text{阴性对照}} - A_{\text{空白对照}}) \times 100\%$$

1.5 Hoechst 33342-PI 荧光染色: 分别收集对照组和蟾蜍灵 (0.10、1.00、10.00 μmol/L) 组处理 24 h 细胞各 2×10^5 个, PBS 重悬, 加入 Hoechst 33342-PI (1:1) 染液 40 μL, 使得 Hoechst 33342 终质量浓度为 10 μg/μL, PI 终质量浓度为 50 μg/μL, 于 37 °C 孵育箱中染色 8 min, 离心, 弃上清液。加入 PBS 50 μL, 吹打, 混匀, 吸一点混和液滴于洁净玻片上, 盖片封片。于暗室中荧光显微镜下观察并记录。质量控制: 正常细胞、凋亡细胞着色 (蓝色), 死亡细胞着色 (红色)。细胞记数依据上述特点, 取连续 4 个视野, 每个视野细胞记数不少于 80 个计算细胞的凋亡率。

1.6 DNA 琼脂糖凝胶电泳: 分别收集对照组和蟾蜍灵 (0.10、1.00、10.00 μmol/L) 处理 24 h 的细胞, 用 PBS 洗 1 遍, 于 1.5 mL 离心管中, 离心沉淀至 2×10^6 个细胞, 去除上清液, 加入 50 μL 细胞裂解液 [10 mmol/L Tris, Cl (pH8.0)、10 mmol/L NaCl、10 mmol/L EDTA、100 mg/L 蛋白酶 K、1% SDS]。吹打混匀, 于 37 °C 水浴保温使混合物变得清亮, 离心, 去细胞碎片, 以等体积的苯酚-氯仿

(1:1) 抽提 2 次, 以等体积氯仿抽提 1 次, 吸上清液于另一 1.5 mL 离心管中。加入 1/10 体积的醋酸钠和 2 倍体积的冷无水乙醇, 过夜, 离心 10 min, 加入 TE (0.1 mol/L Tris Cl, pH8.0; 10.00 mmol/L EDTA) 和 RNAase (10 mg/mL) 1 μL, 37 °C 孵育 1 h, 溶解 DNA, 加上样缓冲液, 在 0.1% 琼脂糖凝胶上电泳, 室温恒流 75 mA, 3~4 h, 结果在紫外投影仪上观察。

1.7 原位缺口标记 (TUNEL) 检测方法: 分别于 6、12 和 24 h 收集 1.00 μmol/L 蟾蜍灵处理组细胞和对照组细胞各 1×10^6 个, PBS 洗 3 次, 进行细胞涂片, 用新鲜配制的多聚甲醛 (4% 于 0.10 mol/L 的 PBS 配制, pH 7.4) 于 15~25 °C 固定 1 h, PBS 洗 3 次, 置 2~8 °C 预冷穿透液 0.1% 的 TritonX-100 (0.1% TritonX-100、0.1% 枸橼酸钠) 2 min。PBS 洗 2 次, 以后操作按试剂盒说明书进行。加显色缓冲液 (100 mol/L Tris Cl pH 9.5、100 mol/L NaCl、50 mol/L MgCl₂、1% 体积的 BCIP/NBT) 50~100 μL, 于 15~25 °C 孵育 10 min, PBS 洗涤, 水封片, 镜下观察并记录。质量控制: 选取连续的 6 个视野, 每个视野细胞记数不少于 80 个, 细胞核或细胞浆 (DNA 逸出) 蓝紫色为阳性细胞, 细胞核及细胞浆不着色细胞为阴性细胞, 计算细胞的凋亡率。

1.8 统计分析: 数据输入 Excel 进行管理, 采用 SPSS10.0 软件进行统计学分析。MTT 试验各组间的差异采用方差分析 (Post-Hoc LSD 法), 组间凋亡率的差异采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 倒置光学显微镜下细胞的形态学变化: 倒置显微镜下, 对照组 U937 细胞呈悬浮性生长, 圆形, 透明, 折光性好, 大小均一, 形态一致。蟾蜍灵组 U937 细胞皱缩变小, 细胞膜完整, 出现发泡现象, 并有膜包裹的凋亡小体出现。

2.2 蟾蜍灵抑制白血病细胞的生长: 结果见表 1。蟾蜍灵可抑制白血病 U937 细胞的生长, 与对照组相比, 各浓度组均能显著抑制白血病 U937 细胞的生长 ($P < 0.01$), 蟾蜍灵对 U937 细胞的半数抑制浓度 (IC_{50}) 约为 0.025 μmol/L。并且蟾蜍灵的生长抑制作用呈时间和剂量依赖性 [除 0.050 0、0.100 0 μmol/L 组外, 其余各组间两两比较差异非常显著 ($P < 0.01$)]。本实验结果显示, 在 0.001 0~1.000 0 μmol/L 蟾蜍灵均能抑制 U937 细胞生长。

2.3 Heochst33342-PI染色结果: 对照组U937细

表 1 蟾蜍灵对 U937 细胞的生长抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Inhibition of bufalin on growth of U937 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	浓度/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	A_{570}	抑制率/%
对照	—	0.95±0.081	—
蟾蜍灵	0.001 0	0.63±0.027**	33.82
	0.012 5	0.61±0.024**	34.55
	0.025 0	0.29±0.032**	69.32
	0.050 0	0.16±0.017**	83.56
	0.100 0	0.14±0.012**	85.60
	1.000 0	0.03±0.004**	96.75

与对照组比较: ** $P<0.01$

** $P<0.01$ vs control group

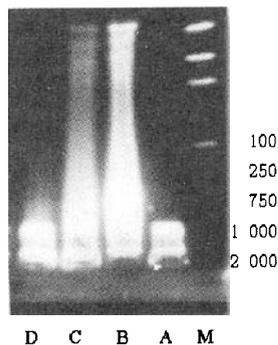
胞大小一致, 荧光均匀, 荧光相对较淡, 蟾蜍灵各处理组 U937 细胞出现典型的凋亡形态学改变, 细胞体积变小、胞浆浓缩、核固缩、核碎裂、凝集染色质荧光强度增强, 并有膜包裹的凋亡小体形成。计算各处理的凋亡率, 结果显示 0.10、1.00 和 10.00 $\mu\text{mol/L}$ 蟾蜍灵作用 U937 细胞 24 h, 细胞凋亡率分别为 18.85%、80.87% 和 92.08%, 随着浓度的升高, 凋亡率升高, 统计分析结果显示各组间差异显著 ($P<0.01$)。可见 0.10~10.00 $\mu\text{mol/L}$ 蟾蜍灵可在较短的时间内引起 U937 细胞明显凋亡。

2.4 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果: DNA 在核小体之间按 180 bp 及 180 bp 整数倍的片段断裂是细胞凋亡的早期事件, DNA 电泳时出现特征性 DNA 梯状带。0.10、1.00 和 10.00 $\mu\text{mol/L}$ 蟾蜍灵作用 U937 细胞 24 h, 电泳结果显示, 对照组没有出现梯状带, 0.10 $\mu\text{mol/L}$ 组出现较淡梯状带, 10.00 $\mu\text{mol/L}$ 组出现的梯状带带形较多, 带的亮度较强, 1.00 $\mu\text{mol/L}$ 组相对于 10.00 $\mu\text{mol/L}$ 组带形相对较少, 显示蟾蜍灵对 U937 细胞凋亡的诱导作用呈剂量依赖性。结果见图 1。

2.5 原位缺口标记 (TUNEL) 法检测结果: 1.00 $\mu\text{mol/L}$ 蟾蜍灵诱导 U937 细胞凋亡呈时间依赖性。蟾蜍灵分别作用 6、12、24 h, U937 细胞凋亡率分别为 30.52%、51.32%、65.67%。统计学分析结果显示: 与对照组相比, 随着作用时间延长, U937 细胞凋亡率呈现升高趋势 ($P<0.01$)。

3 讨论

本实验采用目前公认的药敏试验中最为推崇的 MTT 法进行药敏试验^[6], 来判定蟾蜍灵在体外对髓性白血病 U937 细胞的抗增殖作用。结果表明蟾蜍灵在 0.001 $\mu\text{mol/L}$ 即可明显地抑制髓性白血病 U937 细胞的生长 ($P<0.01$), 增加蟾蜍灵浓度抑制作用更加明显 ($P<0.01$), 由此可以得出髓性白



M-标记组 A-对照组 B~D-蟾蜍灵 10.00、1.00、0.10 $\mu\text{mol/L}$ 组

M-marker group A-control group B-D-bufalin 10.00, 1.00, 0.10 $\mu\text{mol/L}$ groups

图 1 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of DNA

血病 U937 细胞对蟾蜍灵敏感性良好。

已有研究表明蟾蜍灵能够引起 HL-60 细胞凋亡^[4]。本研究说明蟾蜍灵诱导人 U937 细胞凋亡, 并且呈时间和剂量依赖关系。用 0.10 $\mu\text{mol/L}$ 蟾蜍灵作用 U937 细胞 24 h, 在倒置光学相差显微镜下观察到细胞中出现小泡, 随后降解消失, 荧光双染显示染色质凝集、断裂, 凋亡小体形成。这些结果说明蟾蜍灵诱导 U937 细胞凋亡。原位缺口标记法显示 1.00 $\mu\text{mol/L}$ 蟾蜍灵作用 U937 细胞 6 h, 即可出现 30.52% 的阳性细胞, 并且随着时间延长及浓度的升高凋亡率明显升高 ($P<0.01$)。由蟾蜍灵处理细胞中提取的 DNA 琼脂糖凝胶电泳的结果, 出现典型的核酸断裂的梯状带, 被认为是程序性细胞死亡的早期事件, 表明蟾蜍灵能够以剂量和时间依赖的关系诱导人白血病 U937 细胞凋亡。此结论与以前的报道相一致, 即蟾蜍灵能够抑制各种肿瘤的生长而不影响正常细胞^[7]。

蟾蜍灵最可能的膜受体为 $\text{Na}^+, \text{K}^+-\text{ATPase}$, 因为在各种肿瘤细胞胞浆膜上该酶的活性可被蟾蜍灵抑制。蟾蜍灵对人肿瘤细胞的特异性作用可能归因于人细胞膜上 $\text{Na}^+, \text{K}^+-\text{ATPase}$ 特异结构^[8]。从 $\text{Na}^+, \text{K}^+-\text{ATPase}$ 到 Ras 的信号传导途径还不清楚。蟾蜍灵诱导凋亡信号传导途径及分子机制还需进一步研究。

References:

[1] Numazawa S, Shinoki M, Ito H, et al. Involvement of $\text{Na}^+, \text{K}^+-\text{ATPase}$ inhibition in K562 cell differentiation induced by bufalin [J]. *J Cell Physiol*, 1994, 160(1): 113-120.
 [2] Zhang L, Nakaya K, Yoshida T, et al. Bufalin as a potent inducer of differentiation of human myeloid leukemia cells [J]. *Biophys Res Commun*, 1991, 178: 686-693.

- [3] Zhang L, Nakaya K, Yoshida T, *et al.* Induction by bufalin of differentiation of human leukemia cell U937, and ML1 cells toward macrophage/monocyte-like cells and its potent synergistic effect on the differentiation of human leukemia cells in combination with other inducers [J]. *Cancer Res*, 1992, 52: 4634-4641.
- [4] Yutaka M, Nobuko K, Shigeo N, *et al.* Bufalin induces apoptosis and influences the expression of apoptosis-related genes in human leukemia cells [J]. *Leukemia Res*, 1995, 19 (8): 549-557.
- [5] Chen X Y, Hu W L, Xu R C, *et al.* The effect of bufalin on growth-related gene expression of human hepatocarcinoma SMMC7721 cells and its cytotoxic effect [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 2001, 15(4): 293-296.
- [6] Zhang J, Liu G X, Zhou L, *et al.* Primary culture *in vitro* and chemosensitivity test of malignant tumor cell [J]. *Bull Acad Mil Med Sci* (军事医学科学院院刊), 1997, 21(4): 280-282.
- [7] Yong K J, Hidekazo O, Nobuko K, *et al.* Selective inhibitory effect of bufalin on growth of human tumor cells *in vitro*: Association with the induction of apoptosis in leukemia HL-60 cells [J]. *Jpn J Cancer Res*, 1994, 85: 645-651.
- [8] Numazawa S, Shinoki M, Ito H, *et al.* Involvement of Na⁺, K⁺-ATPase inhibition in K562 cell differentiation induced by bufalin [J]. *J Cell Physiol*, 1994, 120: 113-120.

黑翅土白蚁不同提取物的抗炎镇痛作用

王秀丽, 王焕秀, 徐 彭, 薛德钧*

(江西中医学院, 江西 南昌 330006)

白蚁因腐蚀木材、毁坏河堤而被视为害虫, 然而近年来人们越来越重视白蚁的食用、药用及其他方面的用途。非洲、东南亚还有我国部分地区的人民喜以白蚁为食^[1]; 我国武汉将白蚁的提取物用于临床治疗癌症也取得了较好的效果^[1]。白蚁有许多品种, 笔者对品种之一的新药源黑翅土白蚁进行了化学成分及生物活性研究, 发现黑翅土白蚁机体内不仅含有丰富的蛋白质、氨基酸、多糖、微量元素、维生素等营养物质, 还含有各种烃类、甾体激素类、肝类、角鲨烯及含氮、氯、氟有机物、杂环化合物等。这些众多的化学物质应该是其诸多药理作用的物质基础。本实验对其抗炎、镇痛作用进行观察。

1 材料

1.1 样品: 黑翅土白蚁 *Odontotermes formosanus* Shiraki 鲜品产自江西鹰潭, 由鹰潭市白蚁研究所熊小生工程师鉴定。

1.2 样品的处理

1.2.1 95% 乙醇回流提取, 经化学预实验可知, 含有甾体、萜类、皂苷等成分。回收乙醇后所得浸膏(A)用蒸馏水溶解。

1.2.2 利用超临界技术萃取脂溶性成分, 所得残渣按照常规方法用醋酸乙酯回流提取, 经预实验可知, 亦含有甾体、萜类、皂苷等成分。所得浸膏(B)用蒸馏水溶解。

1.2.3 将新鲜白蚁用贝克曼高速冷冻离心机离心,

离心条件为 8 000 r/min, 共 20 min, 得上清液(C, 为深棕色)。经化学预实验可知, pH 为 5~6, 含有酚类、鞣质、多糖和苷类等成分, 茚三酮反应亦呈阳性。

1.3 实验动物: 昆明种小鼠, 雌雄兼用, 由江西医学院动物室提供, 编号为 021—9602。

1.4 主要试剂: 乙酰水杨酸, 每片 25 mg, 肠溶片, 由石家庄制药集团有限公司生产, 批号为 030102。度冷丁, 针剂, 每支 2 mL, 青海制药厂, 批号为 20000912。

2 方法与结果

2.1 对小鼠腹腔毛细血管通透性的影响^[2]: 取体重为 (20±2) g 的小鼠 80 只, 雌雄兼有, 随机分为 8 组: 空白对照组、阳性药 (乙酰水杨酸 2×10⁻⁴ g/kg) 对照组、A (6.51、3.25 g/kg) 组、B (1.2、0.6 g/kg) 组、C (60、30 g/kg) 组。分别 ig 给药, 其中空白对照组和阳性药对照组给予蒸馏水, 正常 ig 10 d。末次给药阳性药对照组 ig 乙酰水杨酸, 其余各组正常 ig 给药。各组给药 30 min 后, 尾 iv 0.5% 伊文思蓝 0.2 mL, 同时 ip 0.6% HAc 0.2 mL, 30 min 后, 小鼠脱颈椎处死。用 6 mL 生理盐水分次冲洗腹腔, 收集洗液, 加生理盐水至 10 mL。放置 20 min 后, 3 500 r/min 离心 5 min, 吸取上清液, 于 722 分光光度计 590 nm 波长处测吸光度 (A) 值, 结果见表 1。

2.2 对二甲苯所致小鼠耳廓肿胀的影响: 选用体重

收稿日期: 2004-05-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20062003)

作者简介: 王秀丽 (1978—), 女, 江西中医学院 2002 级研究生。

* 通讯作者