

• 药理与临床 •

水仙提取物对人类多发性骨髓瘤细胞系 ARH-77 增殖和凋亡的作用

刘 静¹, 胡维新^{1*}, 何莉芳²

(1. 中南大学湘雅医学院 分子生物学研究中心, 湖南 长沙 410078;

2. 中南大学湘雅医学院 生物学教研室, 湖南 长沙 410078)

摘要:目的 研究水仙提取物对人类多发性骨髓瘤细胞系 ARH-77 的增殖及凋亡的影响。方法 采用 MTT 法检测水仙提取物 (1.25、2.5、5、10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 作用 ARH-77 细胞 3 d 后细胞存活率的变化; 采用荧光染色法观察水仙提取物 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 作用 3 d 对 ARH-77 细胞凋亡的影响; 流式细胞仪分析细胞周期时相变化和检测细胞凋亡率; 核仁组织区 (NOR) 相关嗜银蛋白 (AgNOR) 染色法检测细胞 NOR 的改变; 透射电镜观察细胞亚微结构变化。结果 水仙提取物能明显抑制 ARH-77 细胞增殖, 降低细胞存活率 ($P < 0.01$), 其 IC_{50} 为 4.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 促进肿瘤细胞凋亡 ($P < 0.05$), 阻滞细胞周期于 G_2/M 期 ($P < 0.01$); 降低 AgNOR 的数目 ($P < 0.001$) 和促进 AgNOR 的融合 ($P < 0.01$); 引起细胞亚微结构改变。结论 水仙提取物能抑制 ARH-77 细胞增殖, 诱导 ARH-77 细胞凋亡。

关键词: 水仙提取物; 人类多发性骨髓瘤; 细胞增殖; 细胞凋亡

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)12-1824-04

Effects of extract from *Narcissus tazetta* var. *chinensis* on proliferation and apoptosis of human multiple myeloma cell line ARH-77

LIU Jing¹, HU Wei-xin¹, HE Li-fang²

(1. Research Center of Molecular Biology, Xiangya School of Medicine, Center South University, Changsha 410078, China;

2. Department of Biology, Xiangya School of Medicine, Center South University, Changsha 410078, China)

Abstract: Objective To study the effects of extract from *Narcissus tazetta* var. *chinensis* on proliferation and apoptosis of human multiple myeloma cell line ARH-77. **Methods** The survival rate of cells were tested by MTT assay when cells were affected by 1.25, 2.5, 5, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of the extract for 3 d. After being induced by 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of the extract for 3 d, apoptotic cells were observed with fluorescence stain; changes of the cell cycle were analyzed by Flow Cytometry; the number and shape of nucleolar organizer region (NOR) were tested by AgNOR assay and submicroscopic structure were observed by transmission electron microscope. **Results** The extract from *N. tazetta* var. *chinensis* could significantly inhibit the proliferation and reduce the survival rate of ARH-77 cells ($P < 0.01$), the IC_{50} was 4.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Typical apoptosis morphologic cells were seen, the rate of apoptosis cells were increased ($P < 0.05$), and the cell cycle was arrested at G_2/M phase ($P < 0.01$) in the experimental group; then the extract from *N. tazetta* var. *chinensis* could make the number of AgNOR ($P < 0.001$) decrease, the cell fusion in AgNOR ($P < 0.01$) accelerate, and the submicroscopic structures of cell change. **Conclusion** The extract from *N. tazetta* var. *chinensis* could obviously inhibit the proliferation and induce the apoptosis of ARH-77 cells.

Key words: the extract from *Narcissus tazetta* var. *chinensis* Roem.; human multiple myeloma; cell proliferation; cell apoptosis

水仙 *Narcissus tazetta* L. var. *chinensis* Roem. 属石蒜科植物, 而石蒜科是 20 种富含生物碱的植物之一。到目前为止, 已在石蒜科中发现了约 500 种结构各异、生物学功能不同的生物碱, 其中有

的已经运用到临床治疗^[1]。从水仙中提取的活性化合物单体包括伪石蒜碱 (pseudolycorine)、石蒜碱 (lycorine)、多花水仙碱 (tazettine)、漳州水仙碱等多种生物碱。研究报道, 石蒜碱具有选择性抗白血病

收稿日期: 2005-02-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39880021; 30500269)

作者简介: 刘 静 (1971—), 女, 湖南永州人, 副教授, 博士, 主要从事多发性骨髓瘤及白血病治疗的细胞及分子机制研究。

Tel: (0731) 4805449 E-mail: liujing@xysm.net

* 通讯作者 胡维新

活性^[2];从石蒜科中提取的一种富含谷氨酸盐的抗真菌肽具有免疫调节和增殖抑制作用^[3]。

多发性骨髓瘤是一种严重危害中老年人身体健康的恶性血液肿瘤,目前,化学药物治疗仍是治疗多发性骨髓瘤的主要手段。而现存的化疗药物多具有不良反应的缺陷。因此,发现新的抗肿瘤药物是肿瘤治疗和新药设计的重要目标,而中草药由于富含多种天然活性化合物,资源丰富,取材简单,几千年来一直广为民用,是新药的主要来源之一。本研究以人类多发性骨髓瘤细胞系 ARH-77 细胞为实验材料,对经水仙提取物作用后的 ARH-77 细胞进行了细胞增殖、细胞凋亡、细胞超微结构等方面的实验,旨在探讨水仙提取物的抗肿瘤作用及其机制。

1 材料

1.1 药品:水仙购自花卉市场,经鉴定为正品。水仙茎、叶提取物由中南大学湘雅医学院分子生物学研究中心制备。即取处于开花期的新鲜水仙茎、叶洗净,榨汁,离心取上清液。溶液分别经醋酸和氢氧化铵处理后,再经氯仿、乙醚等有机溶剂抽提并干燥后,溶解于二甲基亚砷(DMSO)中。制得的生物总碱混合物质量占茎、叶鲜质量的0.2%。经高效液相色谱分析,提取物中主要含石蒜碱、多花水仙碱等生物碱^[4]。临用前用无血清的RPMI-1640培养基稀释,培养基中DMSO终体积分数 $\leq 0.2\%$ 。

1.2 细胞系:人类多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)细胞系 ARH-77(ATCC),由美国阿肯色大学医学院田尔明博士赠送。

1.3 主要试剂:RPMI-1640培养基购自Gibco公司,小牛血清购自华美生物工程公司,吖啶橙(AO)、溴化乙锭(EB)、噻唑蓝(MTT)、DMSO、碘化丙啶(PI)购自Sigma公司,RNase A为生命技术公司产品,硝酸银(AgNO₃)、白明胶及其他试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 MTT实验:为观察不同质量浓度水仙提取物对ARH-77细胞的生长抑制作用,将对数生长期的ARH-77细胞以 1×10^5 /mL接种于96孔培养板中,每孔200 μ L,每组重复4孔。实验组分别加入不同质量浓度(1.25、2.5、5、10、20 μ g/mL)水仙提取物,对照组加入等体积的RPMI-1640溶液,另设空白组(不加细胞)作为调零孔,水仙提取物作用细胞3 d后,按文献方法进行MTT实验^[5]。实验独立重复3次。根据下列公式计算ARH-77细胞的存活率,并计算IC₅₀值。

$$\text{存活率} = \frac{\text{实验组 } A_{570} \text{ 值}}{\text{对照组 } A_{570} \text{ 值}} \times 100\%$$

2.2 荧光染色观察细胞凋亡:对数生长期的ARH-77细胞以 1×10^5 /mL接种,实验组细胞经10.0 μ g/mL(预试验表明此为最佳作用质量浓度)水仙提取物作用3 d,分别取对照组和实验组ARH-77细胞悬液5 μ L于载玻片上,加5 μ L荧光染色液(AO/EB,0.1 mg/mL)染色1 min,盖上盖玻片。在荧光显微镜下观察,根据细胞的显色及其核结构辨认凋亡细胞。每张玻片任选10个视野计数固缩核和细胞核总数来计算细胞凋亡率。

$$\text{细胞凋亡率} = \frac{\text{固缩核数}}{\text{细胞核总数}} \times 100\%$$

2.3 流式细胞仪分析细胞周期变化:对数生长期的ARH-77细胞以 1×10^5 /mL接种,然后分别收集对照组和经10.0 μ g/mL水仙提取物处理3 d的实验组ARH-77细胞各 1×10^6 个,PBS洗涤后用4 $^{\circ}$ C预冷的70%乙醇固定,20 μ g/mL RNase A消化后经50 μ g/mL PI染色,流式细胞仪检测,Cell Quest软件分析细胞周期时相分布。

2.4 核仁组织区(nucleolar organizer region, NOR)相关嗜银蛋白(AgNOR)染色,分别收集对照组和经10.0 μ g/mL水仙提取物处理3 d的实验组ARH-77细胞,PBS洗涤后,制备成细胞悬液进行滴片;固定液甲醇-冰醋酸(3:1)固定5 min;70 $^{\circ}$ C恒温避光潮湿环境下滴上AgNOR工作液(2%甲酸明胶液与50%硝酸银按1:2体积比混合)染色3 min,双蒸水反复冲洗;95%~100%系列乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。每张滴片观察100个以上细胞的核内AgNOR颗粒数,按照《关于AgNOR研究工作的标准化方案》(全国核仁组织区学术研讨会制订的上海方案)观察其形态并计数^[6]。

2.5 透射电子显微镜观察细胞超微结构:分别收集对照组和经10.0 μ g/mL水仙提取物处理3 d的实验组ARH-77细胞,经固定、漂洗、脱水、包埋、修块、切片、染色、电镜观察。

2.6 统计学分析:实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析和 t 检测判定显著性差异。

3 结果

3.1 水仙提取物使ARH-77细胞的存活率下降:经不同质量浓度的水仙提取物处理后ARH-77细胞存活率显著下降,与对照组相比,差异显著($P < 0.01, 0.001$),见表1,其IC₅₀值为4.8 μ g/mL。细胞存活率与水仙提取物的质量浓度呈负相关。

3.2 水仙提取物能诱导ARH-77细胞凋亡,阻滞细胞周期于G₂/M期:荧光显微镜下,对照组细胞

表 1 水仙提取物对 ARH-77 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 1 Effect of extract from *N. tazetta* var. *chinensis* on viability of ARH-77 cells ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	$\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	A_{570}	存活率/%
对照	—	0.37±0.03	100.00
实验	1.25	0.31±0.06	84.25±6.25
	2.50	0.28±0.04**	75.29±4.18
	5.00	0.17±0.03**	46.10±3.24
	10.00	0.13±0.01***	35.91±1.19
	20.00	0.08±0.01***	20.37±1.42

与对照组比较: ** $P<0.01$ *** $P<0.001$

** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs control group

的细胞核结构正常,染色均匀,95%以上呈绿色,为活细胞;实验组中大量细胞体积缩小,核浓缩;核呈浓集的绿色或桔黄色荧光,为早期凋亡细胞;小部分细胞具有核碎裂及凋亡小体等现象,为晚期凋亡细胞。经流式细胞仪检测,实验组凋亡率较对照组明显增加 ($P<0.05$),实验组 G_2/M 期细胞所占比例明显上调 ($P<0.01$),见表 2。

表 2 水仙提取物对 ARH-77 细胞凋亡及细胞周期分布的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of extract from *N. tazetta* var. *chinensis* on apoptosis and cell cycles of ARH-77 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	凋亡率/%	细胞周期分布/%		
		G_0/G_1	S	G_2
对照	5.50±0.50	68.75±3.10	27.00±0.80	4.26±2.30
实验	19.33±4.93*	47.19±1.70	25.25±3.86	27.55±5.56**

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

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

3.3 水仙提取物使 ARH-77 细胞的核仁类型改变、数目减少:实验组细胞的 AgNOR 类型从弥散型向聚集型转变 ($P<0.01$),见表 3;实验组细胞的 AgNOR 颗粒均数明显减少 ($P<0.001$),见表 4。

表 3 ARH-77 细胞核中 AgNOR 形态分布

Table 3 Forms of AgNOR in nucleus of ARH-77 cells

组别	细胞总数	AgNOR 形态分布/个(%)			
		单一型	弥散型	聚集型	核仁内型
对照	403	130 (32.26)	205 (50.87)	18 (4.46)	50 (12.41)
实验	530	202 (38.11)	107 (20.19)	205 (38.68)	16 (3.02)

3.4 水仙提取物使细胞超微结构改变:对照组细胞亚微结构完好。而实验组大部分细胞胞体缩小,细胞表面的微绒毛减少或消失;胞质中滑面内质网和粗面内质网均出现增生和扩张,甚至肿胀和空泡化改变;线粒体数目增加、嵴增多;大部分细胞内细胞核移位、边集;染色质凝聚浓缩成团块状、新月形、弧形边集于核膜下。少数细胞内可见形态大小不一的凋

表 4 ARH-77 细胞核中各型 AgNOR 颗粒数比较 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 4 Number and shapes of different AgNOR in nucleus of ARH-77 cells ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	AgNOR 颗粒数				AgNOR ($\bar{x} \pm s$)
	单一型	弥散型	聚集型	核仁内型	
对照	7.18±0.50	9.53±0.26	7.56±0.86	9.14±0.49	8.60±0.20
实验	2.02±0.12**	3.93±0.17**	2.88±0.15**	3.06±0.53**	2.84±0.11**

与对照组比较: ** $P<0.01$ *** $P<0.001$

** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs control group

亡小体。

5 讨论

肿瘤及许多人类疾病都是细胞周期性疾病^[7]。细胞周期事件的调和主要发生在 G_1/S 和 G_2/M 的转换期,其通过一系列的检测点而执行^[8]。已经证明,肿瘤的发生是由于这些检测点的许多调节因子丢失或功能停滞^[9],而一些抗肿瘤药物能够修复已改变的检测点。植物类抗肿瘤药物的筛选和有效成分的分离是当前新药研发的重要策略之一。实践证明多种植物生物碱具有良好的抗肿瘤作用。临床使用的主要有:长春新碱、长春碱、喜树碱及其衍生物,三尖杉酯碱、高三尖杉酯碱,苦参碱、氧化苦参碱等。石蒜治疗肿瘤的报道最早在公元前 4 世纪,石蒜碱具有抗白血病活性^[2],氧化石蒜碱对艾氏腹水瘤和肝癌腹水型小鼠的寿命延长率为 121%~192%^[10,11]。伪石蒜碱能延长 Rauscher 白血病脾肿大小鼠的寿命^[12]。而石蒜科植物水仙中同样富含多种具有抗肿瘤作用的生物碱,本实验结果显示水仙提取物能显著抑制肿瘤细胞增殖,降低肿瘤细胞的存活率,阻滞细胞周期于 G_2/M 期;细胞形态学观察表明水仙提取物能诱导肿瘤细胞凋亡的发生。这预示着水仙提取物参与了细胞内凋亡、周期相关的信号传导通路的调控。核仁组织区相关嗜银蛋白(AgNOR)是一组与核糖体 RNA (rRNA) 转录有关的酸性蛋白,可能是 RNA 聚合酶 I 的亚单位或 rDNA 转录的调节蛋白,也可能是一种酸性的磷酸化蛋白 C₂₃(核仁素)和 B₂₃蛋白。只有当 rRNA 基因转录活性达到一定阈值,NOR 才能被银染色,否则不能被银染色^[13]。实验发现经水仙提取物作用后 AgNOR 颗粒均数明显减少,类型从弥散型向聚集型转变,这说明水仙提取物作用后,有效地抑制了细胞内 rRNA 基因转录活性,从而影响细胞的增殖能力。

水仙提取物能显著抑制肿瘤细胞增殖,诱导肿瘤细胞凋亡。本研究将为深入揭示水仙提取物抗肿瘤机

制提供理论和实验基础;为进一步开展方剂研究提供策略;为临床治疗多发性骨髓瘤及其他恶性肿瘤开辟新的道路,具有重要的理论意义和应用前景。

References:

[1] Jin Z. Amaryllidaceae and *Scelletium* alkaloids [J]. *Nat Prod Rep*, 2005, 22(1): 111-126.
 [2] Liu J, Hu W X, He L F, et al. Effects of lycorine on HL-60 cells via arresting cell cycle and inducing apoptosis [J]. *FEBS Lett*, 2004, 578(3): 245-250.
 [3] Chu K T, Ng T B. First report of a glutamine-rich antifungal peptide with immunomodulatory and antiproliferative activities from family Amaryllidaceae [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 325(1): 167-173.
 [4] Then M, Szentmihalyi K, Sarkozi A, et al. Effect of sample handling on alkaloid and mineral content of aqueous extracts of greater celandine (*Chelidonium majus* L.) [J]. *J Chromatogr A*, 2000, 889(1-2): 69-74.
 [5] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. *J Immunol Methods*, 1983, 65(1-2): 55-63.
 [6] Xu L Z. The standardization precept of research about

AgNOR [J]. *Chin J Clin Oncol* (中国肿瘤临床), 1996, 23(5): 377.
 [7] Webster K R. Therapeutic potential of targeting the cell cycle [J]. *Chem Res Toxicol*, 2000, 13(10): 940-943.
 [8] Paulovich A G, Toczyski D P, Hartwell L H. When checkpoints fail [J]. *Cell*, 1997, 88(3): 315-321.
 [9] Agami R, Bernards R. Distinct initiation and maintenance mechanisms cooperate to induce G₁ cell cycle arrest in response to DNA damage [J]. *Cell*, 2000, 102(1): 55-66.
 [10] Lee S Y. Effect of *N*-phthalyl-L-glutamyl-sarcosine and lycorine on the respiration and glycolysis of the Ehrlich ascites tumour cells of mouse [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1965, 12(8): 542-545.
 [11] Hohmann J, Forgo P, Molnar J, et al. Antiproliferative Amaryllidaceae alkaloids isolated from the bulbs of *Sprekelia formosissima* and *Hymenocallis x festalis* [J]. *Planta Med*, 2002, 68(5): 454-457.
 [12] Song L R, Hong X, Ding X L, et al. *Dictionary of Modern Chinese Traditional Medicine* (现代中药学大辞典) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2001.
 [13] Crocker J. Nucleolar organiser regions [J]. *Curr Top Pathol*, 1990, 82: 91-149.

泽泻有效部位对肾草酸钙结石模型大鼠肾组织骨桥蛋白表达的影响

米其武¹, 曹正国², 刘继红¹, 吴继洲³, 尹春萍³, 周四维¹, 叶章群¹

(1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院 泌尿外科, 湖北 武汉 430030; 2. 安徽省立医院 泌尿外科, 安徽 合肥 230001; 3. 华中科技大学同济医学院 药学院, 湖北 武汉 430030)

摘要:目的 研究泽泻有效部位对大鼠肾草酸钙结石形成和肾组织骨桥蛋白(OPN)表达的影响,探讨泽泻抑制尿结石形成的机制。方法 采用现代植化和生物活性导向分离的方法分离、提取泽泻的有效部位。将30只大鼠随机分成3组:对照组、模型组、泽泻组。以乙二醇和1 α -羟基维生素D₃ ig 制备大鼠肾草酸钙结石模型。检测各组大鼠血及尿生化、肾Ca²⁺水平、24 h尿草酸分泌量和肾组织病理学改变,并采用免疫印迹(Western blotting)和半定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)分别观察各组大鼠肾组织OPN蛋白及其mRNA的表达水平。结果 ig 泽泻有效部位(主要以四环三萜类化合物为主)大鼠的血清肌酐(SCr)、尿素氮(BUN)、肾Ca²⁺水平、24 h尿Ca²⁺分泌量、肾组织草酸钙晶体的分布、OPN蛋白及其mRNA的表达水平均显著低于模型组(P<0.01)。结论 泽泻有效部位能抑制大鼠肾组织OPN的表达,减少肾组织草酸钙结晶的沉积,从而能有效抑制大鼠肾草酸钙结石的形成。
关键词:泽泻; 尿石; 骨桥蛋白; 草酸钙

中图分类号:R285.5 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2005)12-1827-05

Effects of active fraction of *Alisma orientale* on osteopontin expression in renal tissue of urolithiasis model rat with calcium oxalate stone

MI Qi-wu¹, CAO Zheng-guo², LIU Ji-hong¹, WU Ji-zhou³, YIN Chun-ping³,
 ZHOU Si-wei¹, YE Zhang-qun¹

(1. Department of Urology, Affiliated Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; 2. Department of Urology, Anhui Provincial Hospital, Hefei 230001, China; 3. School of Pharmacy, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

收稿日期:2005-04-02

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970891)

作者简介:米其武(1963—),男,辽宁朝阳人,副主任医师,在读博士研究生,主要从事泌尿外科尿石症和膀胱肿瘤的研究。

Tel: (0769) 2223412-3701 E-mail: mqw175@163.com