维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)05-0500-03

绞股蓝皂甙与银杏内脂黄酮对 HL-60 细胞增殖的影响

王 箭[1],阳 强[1],朱 旦[1],王 虹[1],安 琳[2],翁亚光[1]

(1.重庆医科大学医学检验系,临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室,重庆市重点实验室,重庆 400016;
2.总装备部重庆军代局门诊部,重庆 400060)

【摘 要】目的:探讨并比较绞股蓝皂甙(Gypenosides,GP)与银杏内脂黄酮影响急性髓性白血病(HL-60)细胞增殖的作用。方法:分别以不同浓度绞股蓝皂甙与银杏内脂黄酮,不同作用时间处理 HL-60 细胞株,用 MTT 法观察绞股蓝皂甙与银杏内脂黄酮对(HL-60)细胞增殖的影响,流式细胞仪检测细胞增殖周期情况。结果:绞股蓝皂甙与银杏内脂黄酮在 0.025~0.8mg/ml 终浓度范围内,对 HL-60 细胞增殖的抑制作用显著,并随药物浓度及作用时间的增加而增强($P<0.05$)。两药均可显著减少 G_2/M+期细胞,增加 G_0/G_1 期细胞,并诱导凋亡细胞峰出现。结论:绞股蓝皂甙与银杏内脂黄酮均能显著的影响 HL-60 细胞增殖,两种药物抑制 HL-60 细胞增殖的机制与干扰细胞增殖、分裂,诱导凋亡有关。

【关键词】绞股蓝皂甙;银杏内脂黄酮;凋亡;细胞周期;HL-60 细胞株
【中文图书分类法分类号】R733.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-11-06

Effects of Gypenosides and Ginkgo Bilobal Flavone on proliferation of acute myeloid leukemia cells(HL-60)

WANG Jian, et al

(*Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics, Ministry of Education, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate and compare the effects of Gypenosides and Ginkgo Bilobal Flavone on acute myeloid leukemia cells (HL-60). *Methods*: MTT was used to investigate the proliferation inhibition of HL-60 with different dosages and various action periods of Gypenosides and Ginkgo Bilobal Flavone at a range of final concentrations of 0.025~0.8mg/ml($P<0.05$). Flow cytometry was applied to determine the effects on cell growth cycle. *Results*: Both of Gypenosides and Ginkgo Bilobal Flavone significantly inhibited the cell number of G_2/M+ phase, increase the cell number of G_0/G_1 phase, and induce the apoptosis of HL-60. *Conclusion*: Gypenosides and Ginkgo Bilobal Flavone both have notable inhibitory effects on growth of HL-60, and the mechanism involves the inhibition of G_2/M+ phase of HL-60 cell growth cycle and the induction of cell apoptosis.

【Key words】Gypenosides; Ginkgo Bilobal Flavone; Apoptosis; Cell cycle; HL-60 cell line

绞股蓝内含多种对人体有益的皂甙、维生素和氨基酸。研究表明,绞股蓝皂甙具有多种生理活性,能降血脂、降血糖、抗肿瘤、抗衰老、保护肝脏及增强肌体免疫功能等作用。银杏叶中含有大量的黄酮类化合物、苦内脂及人体所需的多种氨基酸和微量元素,目前已证实银杏内脂黄酮能扩张冠状血管、降低血压、抗衰老、抗肿瘤、抑制 ACE、兴奋人体免疫系统等。本实验拟用绞股蓝皂甙与银杏内脂黄酮对急性髓性白血病(HL-60)细胞增殖作用的影响进行探讨,并对该两类的抗衰老及抗肿瘤作用进行了比较。

作者介绍:王 箭(1959-),男,讲师,
主要研究方向:临床检验。

1 材料与方法

1.1 细胞株

急性髓性白血病细胞株 HL-60 细胞由本实验室提供,细胞培养在 1%小牛血清 RPMI 1640(美国 GIBCO)培养液中(内含 0.1%青霉素、链霉素),并置于 37℃、5%CO_2 培养箱内备用。

1.2 药物

绞股蓝皂甙(GP)使用时以 1640 溶剂配制最终浓度为 0.025mg/ml、0.05mg/ml、0.1mg/ml、0.2mg/ml、0.4mg/ml 五种浓度溶液;银杏内脂黄酮(GBF)配制最终浓度为 0.05mg/ml、0.1mg/ml、0.2mg/ml、0.4mg/ml、0.8mg/ml 五种浓度溶液。

1.3 MTT[1]法测定绞股蓝皂甙、银杏内脂黄酮对 HL-60 细胞

维普资讯 http://www.cqvip.com

的影响

收集对数生长期细胞，调整 HL-60 细胞浓度为 4×10^4 个 /ml，接种在 96 孔培养板中，每孔加 200μl(8×10^3 个)细胞 / 孔。实验分为试剂对照组，细胞对照组，绞股蓝皂甙、银杏内脂黄酮分别为五种终浓度的实验组，每孔加药物 20μl。每组设 8 个平行孔，重复 3 次，取平均值。分别培养 24h、48h、72h，用 MTT 法在自动酶标仪(BIO-RAD-550)测出各孔的 OD 值，计算出绞股蓝皂甙、银杏内脂黄酮五种浓度对 HL-60 细胞抑制率。

$$抑制率(\%)=1-\frac{实验平均\ OD\ 值}{细胞对照组平均\ OD\ 值}。$$

根据中效方程式[2]，计算出绞股蓝皂甙、银杏内脂黄酮对 HL-60 细胞作用的中效浓度(IC50)，中效方程式为：$fa/fu=(\frac{D}{D_m})^m$，两边取 log 得到 $\log fa/fu=m\log D-m\log D_m$，m 为 b、logD 为 x、-m logDm 为 a，则得到 y=bx+a(其中 fa 为抑制率、fu 为 1-fa、D 为药物浓度，D_m 为中效浓度，m 为斜率)，应用回归方程，以 x、y 对数为因变量，得到 a、b、γ 值，$\log D_m=-a/b$ 则可求出 D_m。

1.4 流式细胞仪检测细胞周期和调亡情况

将 HL-60 细胞 8×10^5 个 /20ml 接种于 200ml 培养瓶中，实验分为细胞对照组、绞股蓝皂甙组、银杏内脂黄酮组(培养瓶内最终浓度为 1/2 终效浓度)。培养 72h。收集细胞离心弃上清液，吸净 1mlPBS 缓冲液，转入 1.5miE-P 管中，2000r/min×2min 离心，吸尽上清夜，缓慢加入预冷 70%乙醇 1ml 固定，后用 PBS 缓冲液吸 3 次，将等体积的细胞悬液和 PI 染液混匀，4℃放置 30min，把样品放入 FCM 的样品室内，以激发波长为 488nm 测定，并用 MultiCycle 软件分析细胞周期分布及调亡情况。

1.5 数据统计学处理

用 SPSS 软件对绞股蓝皂甙、银杏内脂黄酮对 HL-60 细胞作用进行分析统计处理。实验数据结果用平均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示，SPSS10.0 统计软件进行方差分析，以 LSD 方法进行组间显著性比较，$P<0.05$ 为相差显著。

2 结 果

2.1 绞股蓝皂甙、银杏内脂黄酮对 HL-60 细胞作用的量效关系及时效关系

2.1.1 不同浓度的绞股蓝皂甙作用不同时间对 HL-60 细胞的影响 以绞股蓝皂甙的五种终浓度溶液分别处理 HL-60 细胞，并培养 24h、48h、72h，分别测定其吸光度值，计算其抑制率(表 1)($P<0.05$)；根据中效方程式算出作用 72h 时：$a=1.6400$；$b=1.6637$；$r=0.9922$；$D_m=0.1033$mg/ml。

2.1.2 不同浓度银杏内脂黄酮作用不同时间对 HL-60 细胞影响 以银杏内脂黄酮的五种终浓度溶液分别处理 HL-60 细胞，并培养 24h、48h、72h，分别测定其吸光度值，计算其抑制率(表 2)($P<0.05$)；根据中效方程式算出作用 72h 时：$a=1.6470$；$b=2.3114$；$r=0.9834$；$D_m=0.1938$mg/ml。

2.1.3 流式细胞仪检测 HL-60 细胞增殖周期分布情况 细胞对照组、绞股蓝皂甙组、银杏内脂黄酮组培养 72h 时，经流式细胞仪检测 HL-60 细胞增殖周期分布，结果如表 3。

表 1 不同浓度绞股蓝皂甙作用不同时间对 HL-60 细胞增殖的影响($\bar{x}\pm s$)

药物剂量 mg/ml	24h 抑制率	48h 抑制率	72h 抑制率
0.025	1.47±0.10	3.86±0.37	9.91±0.57
0.05	9.84±0.84	10.54±0.74	20.14±2.06
0.1	11.77±0.72	16.60±0.76	46.58±2.04
0.2	40.33±10.27	48.45±2.51	64.09±3.37
0.4	53.50±1.59	63.76±1.89	91.55±1.45

表 2 不同浓度银杏内脂黄酮作用不同时间对 HL-60 细胞增殖的影响($\bar{x}\pm s$)

药物剂量 mg/ml	24h 抑制率	48 抑制率	72h 抑制率
0.05	1.33±0.20	2.34±0.28	3.66±0.88
0.1	8.60±0.23	9.72±0.61	14.58±1.56
0.2	32.16±2.11	43.78±0.96	59.86±1.48
0.4	60.65±0.99	73.61±1.34	90.78±1.86
0.8	72.68±8.10	91.36±0.58	93.78±3.60

表 3 绞股蓝皂甙、银杏内脂黄酮对 HL-60 细胞增殖周期分布的影响($\bar{x}\pm s$)

分组	细胞周期(%)			
	G_0/G_1	S	G_2+M	sub-G_1
对照组	9.9±3.3	6.4±0.4	82.6±3.8	1.1±3.3
绞股蓝皂甙	48.6±1.8*	16.0±1.7	22.7±3.1	12.7±1.8*
银杏内酯黄酮	21.0±2.0*	28.6±1.8	44.0±2.2	6.4±2.0*

*$P<0.05$

从流式细胞仪检测 HL-60 细胞周期情况来看(表 3)，对照组细胞处于 G_2/M+S 期细胞为 89.0%，而 G_0/G_1 细胞 9.9%，说明 HL-60 细胞处于增殖旺盛状态。HL-60 细胞经绞股蓝皂甙 0.1mg/ml 作用 72h，处于增殖旺盛的 G_2/M+S 期细胞比例为 38.7%，比对照组显著降低，而 G_0/G_1 期细胞比例(48.6%)较对照细胞增多；此外处于 sub-G_1 期的凋亡细胞百分比为 12.7%。HL-60 细胞经银杏内酯黄酮 0.2mg/ml 作用 72h，S 期占 28.6%，G_2+M 期细胞为 44.0%，G_0/G_1 细胞为 21.0%，与对照细胞相比有显著性差异，处于 sub-G_1 期的凋亡细胞百分比为 6.4%，表明绞

维普资讯 http://www.cqvip.com

股蓝皂甙、银杏内酯黄酮作用 HL-60 细胞 72h 均能阻止 HL-60 细胞从 G_0/G_1 期向 G_2/M+S 期移行，并能诱导部分 HL-60 细胞呈现 sub-G_1 期的凋亡峰，从而抑制 HL-60 细胞增殖，并发生凋亡。

3 讨 论

绞股蓝皂甙广泛应用于临床，有明显的体内外抗肿瘤作用，其直接的细胞毒作用，可抑制肿瘤细胞生长增殖。竹本常松等发现 GPsX、Ⅲ以及其他在 C_{20}、C_{21} 上有游离羟基的多种皂甙，对体外培养的肝癌细胞(MHC)、肺癌细胞(3LL)、子宫颈癌细胞(Hdas3)以及黑色素肿瘤细胞(B16)有抑制作用，随浓度增高抑制作用增强，同时对正常细胞增殖无不良影响。我国学者证明，绞股蓝皂甙对培养的小鼠 S180、艾氏腹水癌(EAC)、Hela 和 HLC 细胞均有直接杀灭作用[1]。银杏叶为银杏科银杏属植物的干燥叶，用作药物在我国已有五千年的历史。银杏内脂黄酮为银杏叶提取物，有效成分主要有二类，一类为黄酮甙类，另一类为银杏苦内脂。银杏叶提取物银杏内脂黄酮具有对机体抗癌细胞毒 T 细胞的增殖和杀伤肿瘤细胞功能功效的增强等作用[2-4]。

从表 1,2 可知：绞股蓝皂甙对 HL-60 细胞增殖的抑制作用随药物浓度的增加，抑制率增强（$P<0.05$）；随用药时间的延长其抑制率增加（$P<0.05$）。银杏内脂黄酮对 HL-60 细胞增殖的抑制作用也随药物浓度的增加，抑制率增强；随用药时间的延长而增加（$P<0.05$）。结果提示：给予高剂量的绞股蓝皂甙或银杏内脂黄酮并延长用药时间其作用尤为明显。这与国内外的研究结果相一致[5,6]。根据中效方程式可知：绞股蓝皂甙 D_m=0.1033mg/ml，而银杏内脂黄酮 D_m=0.1938mg/ml，表明绞股蓝皂甙对诱导肿瘤细胞 HL-60 增殖的抑制作用优于银杏内脂黄酮。

以流式细胞技术研究绞股蓝皂甙和银杏内脂黄酮对 HL-60 细胞增殖周期的影响，表明两药均可显著减少 G_2/M+S 的增殖分裂期细胞，而使更多细胞停滞在 G_0/G_1 期，并能诱导 sub-G_1 期（凋亡细胞）显著增加。提示绞股蓝皂甙和银杏内脂黄酮对 HL-60 细胞增殖的抑制作用与干扰其增殖和分裂，并诱导凋亡有关。有关上述作用的分子机制，值得进一步探讨。

参 考 文 献

[1] 潘 峰，刘 迪，黄翠霞，等.绞股蓝皂甙的药理与临床研究[J].现代中西医结合杂志，2006；15(5)：674-676.

[2] 张胜本，张连阳.肿瘤化学治疗敏感性与抗药性[M].成都：四川科学技术出版社，1995.108-112.

[3] 辛 华，商林珊，刘金成，等.绞股蓝皂甙抗谷氨酸诱导的氧化性神经毒性[J].山东大学学报：医学版，2004；42(6)：643-647.

[4] 刘军权，陈复兴，黄 键，等.银杏叶提取物增强细胞因子诱导的杀伤细胞杀伤肿瘤细胞活性的研究[J].陕西医学杂志，2002；31：469-471.

[5] DeFeudis FV，Papadopoulos V，Drieu K.Ginkgo biloba extracts and cancer：a research area in its infancy[J].Fundam Clin Pharmacol，2003；17(4)：405-417.

[6] 姜彬慧，杨万春，赵余庆.绞股蓝抗肿瘤作用研究现状[J].中药材，2003；26(9)：683-686.

(上接第 458 页)

crobiol，2004；42(8)：3406-3414.

[9] Ishiguro N，Ebihara T，Endo R，et al.Immunofluorescence assay for detection of human metapneumovirus-specific antibody by use of baculovirus-expressed fusion protein[J].Clin Diagn Lab Immunol，2005；12(1)：202-205.

[10] Tang RS，Schickli JH，MacPhail M，et al.Effects of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus antigen insertion in two 3'proximal genome positions of bovine/human parainfluenza virus type 3 on virus replication and immunogenicity[J].J Virol，2003；27(20)：10819-10828.

[11] Schickli JH，Kaur J，Ulbrandt N，et al.An S101P substitution in the putative cleavage motif of the human metapneumovirus fusion protein is a major determinant for trypsin-independent growth in vero cells and does not alter tissue tropism in hamsters[J].J Virol，2005；79(16)：10678-10689.

[12] Leung J，Esper F，Weibel C，et al.Seroepidemiology of human metapneumovirus(hMPV)on the basis of a movel enzyme-linked immunosorbent assay utilizing hMPV fusion protein expressed in recombinant vesicular stomatitis virus[J].J Clin Microbiol，2005；43(3)：1213-1219.