维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2003)03－0328－03

昆布多糖硫酸酯对急性髓性白血病 HL－60 细胞的调控

肖 青[1], 唐宗山[1], 黄宗干[1], 董浦江[2]

(1.重庆医科大学临床学院血液内科;2.重庆医科大学临床学院器官移植研究室,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究昆布多糖硫酸酯(LAMS)对急性髓性白血病 HL－60 细胞株的调控作用。方法:用 MTT 法测定不同浓度 LAMS 对 HL－60 细胞株的增殖抑制作用;流式细胞仪分析不同浓度作用下细胞凋亡率;免疫组化法测定 LAMS 对 HL－60 细胞株 NF－κB 家族 P65 亚单位的作用。结果:HL－60 细胞增殖抑制程度与昆布多糖硫酸酯的浓度呈正相关;HL－60 细胞凋亡率随药物浓度的增加而升高;在 LAMS 浓度为 0.75μg/ml 作用下,P65 在 12h 表达呈强阳性,24h 几乎不表达,而 IKbα 在 6h 表达呈强阳性。结论:LAMS 可以诱导体外 HL－60 细胞凋亡,其中对凋亡的调控作用可能为负调控;LAMS 能够调控 NF－κB 的表达,其表达有时间差异性。说明 LAMS 已作用于分子水平。

【关键词】昆布多糖硫酸酯;HL－60 细胞株;调控

【中国图书分类法分类号】R557 【文献标识码】A 【收稿日期】2002－10－15

The study of modulated effects of LAMS on HL－60

XIAO Qing, et al

(*Department of Hematology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the effects of LAMS on modulation of HL－60 cell strain. *Methods*: MTT was used to determine the inhibiting action in the different concentration of LAMS on HL－60 cell strain. The attitude of Sub－G1 peak in DNA histogram was examined by FCM. NF－κB expression affected by LAMS was determined by using immunohistochemical stainings. *Results*: With the increase of LAMS concentration, the inhibiting effects on multiplication of HL－60 cells were decreased. After treatment of HL－60 cells with 0.75μg/ml LAMS for 6h、12h、24h, the expression of P65 was the most significant at 12h, while the expression of IKbα was the most significant at 6h. The exptession of NF－κB reduced in LAMS group without time－dependent pattern. *Conclusion*: LAMS can induce HL－60 cells apoptosis. LAMS can modulate the expression of NF－κB. It also suggested that LAMS had an influence at molecular level.

【Key words】LAMS; HL－60 cell strain; Modulation

化疗是目前治疗急性白血病最基本与重要的手段。但化疗药物毒副作用大,目前人们正在积极寻找高效低毒的抗癌新药。昆布多糖硫酸酯(laminarin sulphate, LAMS)是一种具有多种生物功能的多糖酯,其从海带中制取昆布多糖,在人工条件下硫酸化为昆布多糖硫酸酯。在体内、外实验证实 LAMS 具有抗肿瘤作用[1]。本文采用现代生物学技术探讨 LAMS 对白血病细胞的调控作用。

1 材料与方法

1.1 实验细胞

人急性粒系白血病细胞株(HL－60 细胞):购自第三军医大学营养学教研室。常规传代培养。

1.2 药品和试剂

LAMS 由重庆医科大学临床学院器官移植室自制、提供,制取方法按文献[2]制备,多糖含量 30%,使用前用 1640 培养液配制成 50μg/ml, 0.22μm 滤膜过滤。阿糖胞苷(Ara－c)为比利时法玛西亚普强药厂产品,IKbα、P65 抗人抗鼠多抗,IKbα、P65 免疫组化 SP 试剂盒,为北京中山生物技术有限公司产品。

1.3 噻唑蓝还原法(MTT 法)检测细胞生长抑制率

采用常规 MTT 法。取对数生长期,设 PBS 对照组和不同浓度实验组,每孔细胞总数 2×10^4 个,重复三孔。实验分三组(1)HL－60 细胞 + LAMS,分别加浓度为 1.25 μg/ml、1.875 μg/ml、2.5 μg/ml、3.125 μg/ml 的 LAMS;(2)HL－60 细胞 + Ara－c;(3)HL－60 细胞 + Ara－c + LAMS,置 37℃、

作者介绍:肖 青(1964－),女,主治医师,主要研究方向:血液系统疾病。

维普资讯 http://www.cqvip.com

5% CO_2 培养箱中培养 24h。在酶标仪(560nm 波长)上测量各孔吸光度值(OD 值),按以下公式计算细胞生长抑制率。

抑制率(%)=(1-实验组平均 OD 值/对照组平均 OD 值)×100%

1.4 光镜观察

分别收集对照组(常规培养)和加入 LAMS 浓度为 3μg/ml 孵育 24h 实验组细胞,离心后弃上清液,取沉淀涂片,瑞氏染色,显微镜下观察细胞形态,见图 1、2。



图 1 瑞氏染色×400 HL-60 细胞株在 LAMS 作用 24h (浓度 3μg/ml)

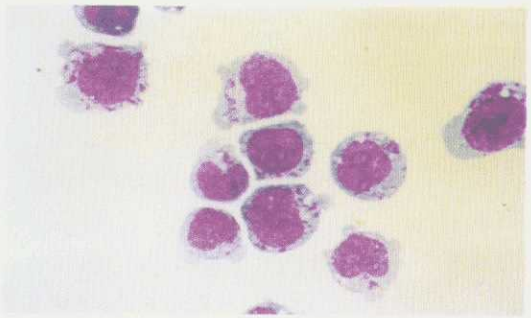


图 2 瑞氏染色×1000 HL-60 细胞株对照组

1.5 流式细胞仪分析

对照组(常规培养)和不同终浓度(分别加入 LAMS 浓度为 0.75μg/ml、1.5μg/ml、3μg/ml)的 LAMS 与 HL-60 细胞共孵育 24h 后,PBS 洗涤两次,用 70% 乙醇-20℃ 固定过夜,洗涤后加 RnaseA 酶消化,PI 4℃ 避光染色 30min,FCM 上检测,出现亚 G1 峰细胞为凋亡细胞,得出凋亡率。

1.6 NF-κB 的检测

分别收获与 0.75μg/ml LAMS 共同孵育了 6h、12h、24h 和对照组的 HL-60 细胞,1000r/min 离心 5min,弃上清液(培养液),PBS 洗涤 2 次,离心后取沉淀涂片。取不同时间的细胞涂片,用常规 SP 染色检测 IκBα、P65 的表达。中性树脂封片后,油镜下取染片上、中、下、左、右五个视野,连续记数 100 个细胞中,计数细胞质或细胞核呈棕黄色者为阳性细胞的比例,计算均数。(IκBα 多抗抗体稀释倍数为 100,P65 抗体稀释倍数为 50)。

2 结 果

2.1 LAMS 对 HL-60 细胞的生长抑制率

随 LAMS 浓度增加,实验孔的光密度(OD)降低。说明 LAMS 对 HL-60 细胞增殖的抑制程度与其浓度成正比。与对照组比较,有非常显著性差异,$0.002 < P < 0.005$。并且,71 μg/L Ara-C 与 1.25 μg/ml LAMS 有协同作用。

2.2 LAMS 诱导 HL-60 细胞凋亡的形态

对照组细胞生长良好,结构完整,核边缘清晰,染色质精细。加入不同浓度 LAMS 的细胞中,加入 3μg/ml、培养 24h,可见部分细胞出现凋亡的典型形态学变化,即核浓缩深染,核染色质边缘呈环状或月芽状,或核碎裂成串珠状,有的细胞部分脱范形成凋亡小体。

2.3 流式细胞仪鉴定凋亡细胞

LAMS 作用 24h 后,FCM 显示有凋亡亚 G1 峰出现,并且随 LAMS 浓度增加,HL-60 细胞凋亡率增加。其凋亡率分别为 7.53%、17.35%、35.8%。

2.4 IκBα、P65 的定位和表达水平

免疫组化染色结果,IκBα 在加药组和对照组在胞浆和胞核均有表达。在 LAMS 0.75μg/ml 浓度作用下,在 6h 表达最强,24h 表达降低,6h 与 24h 比差异显著($P < 0.005$);P65 在加药组和对照组胞核均有表达,同一浓度下,12h 表达最强,24h 后 P65 近乎不表达,12h 与 24h 比差异显著($P < 0.001$),提示 NF-κB 的表达有时间差异性。

表 1 不同浓度 LAMS 对 HL-60 细胞增殖抑制

LAMS	浓度	OD 值($\bar{x} \pm s$)	抑制率(%)
	0μg/ml	103.33±4.51	0
	1.25μg/ml	80.00±2.00	22.58
	1.875μg/ml	59.67±7.91	42.25
	2.5μg/ml	45.00±5.00	56.45
	3.125μg/ml	38.67±3.21	62.58
Ara-C	71μg/L	51.67±4.16	50.00
LAMS+Ara-c	1.25μg/ml 71μg/L	15.33±5.51	85.16

*各项均为 3 次试验结果的平均值±标准差

表 2 LAMS 对 HL-60 细胞 IκBα、P65 蛋白表达的影响(阳性细胞率%)

LAMS(0.75μg/ml) 作用时间	IκBα(%)	P65(%)
6h	94.00±2.000	17.67±2.055
12h	65.67±6.028	96.67±1.581
24h	41.00±4.58	5.33±1.528
对照组	72.67±2.646	21.00±3.000

维普资讯 http://www.cqvip.com

3 讨 论

白血病化疗药物既有抗肿瘤作用,同时对正常细胞的损伤又有较强的副作用。天然植物抗癌物质的开发和利用正是目前研究的课题。昆布多糖硫酸酯是碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)附着和bFGF依赖性细胞增殖的抑制剂。文献报道[3-5],LAMS单独给药,能够使肿瘤生长延迟,并可以加强一些细胞毒物质的抗肿瘤活性,亦无明显毒副作用。此外,LAMS还是一种免疫激活剂,能够对抗化疗药物环磷酰胺引起的白细胞减少,具有升高白细胞作用。那么,LAMS是否具有"双向调节"作用,既能促进正常造血,又能抑制白血病等恶性肿瘤增殖,有待我们进一步探讨。有实验表明[6],LAMS可使肝癌细胞凋亡,增殖受抑制程度加大,且变化程度随LAMS剂量增加而加大。我们的实验显示,LAMS对HL-60细胞亦有增殖抑制作用和促进凋亡作用,其程度与浓度成正比,且与阿糖胞苷合用有协同作用。推测LAMS是否影响了凋亡基因的蛋白表达。

NF-κB是一种具有多向性调节的蛋白质分子,它是一类参与炎症、免疫、细胞生长、细胞凋亡及癌症发生等诸多生物学过程中基因调节的重要转录因子。通常情况下,NF-κB以NF-κB/IκBs复合物的形式、非活性状态存在于细胞质中,只有在受到各种活化因素的作用,使NF-κB从NF-κB/IκBs复合物中解离出并转位于细胞核,与相应的靶基因结合。故P65检测阳性常常是NF-κB活化的标志。我们的研究表明,昆布多糖硫酸酯作用于急性髓性白血病HL-60细胞,可以调控IκBα与P65的表达,在LAMS浓度为0.75μg/ml时,IκBα在6h表达最强,而P65在12h表达最强,P65在12h后表达减弱,24h几乎不表达。那么NF-κB在细胞周期的表达有一定的时限性。这与范芸[7]报道的As_2O_3可诱导早幼粒细胞程序性死亡,在这一过程中,NF-κB可能起负调控作用相一致。

参 考 文 献

[1] Hoffman R, Paper D H, Donaldson J, et al. Inhibition of angiogenesis and murine tumour growth by laminarin sulphate [J]. BJ Cancer, 1996; 73(10): 1183-1186.

[2] 范曼芳,陈琼华. 褐藻淀粉和褐藻淀粉酯的制取、分析及生物活性比较[J]. 中国药科大学学报,1988;19(1):30-34.

[3] Folkman J, Langer R, Linhardt RJ et al. Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or a heparin fragment in the presence of cortisone[J]. Science. 1983; 221(4612): 719-725.

[4] Tanaka NG, Sakamoto N, Inoue K, et al. Antitumor effects of an antiangiogenic polysaccharide from an Arthrobacter species with or without a steroid[J]. Cancer Res. 1989; 49(23): 6727-6730.

[5] Teicher BA, Sotomayor EA, Huang ZD. Antiangiogenic agents potentiate cytotoxic cancer therapies against primary and metastatic disease[J]. Cancer Res. 1992; 52(23): 6702-6704.

[6] 董浦江,姚榛祥,涂 刚. LAMS对肝癌细胞株Bcl-2、BaX基因蛋白的影响[J]. 重庆医科大学学报,2002;27(1):26-31.

[7] 范 芸,顾惜春,刘俊达,等. 转录因子NF-κB对急性早幼粒白血病细胞程序性死亡的调节[J]. 医学研究生学报,2002;13(2):118-124.