维普资讯 http://www.cqvip.com



参 考 文 献

1.陈婷梅,等.中国中西结合杂志 1993,15(5):317
2.王亚平,等.解剖学报 1997;28(3):304
3.王瑞雪,等.重庆医科大学学报 1991;16(4):330

(收稿日期 1998－07－02)

# Experimental study on the effect of proliferation and differentiation of $K_{562}$ cell treated with TSPG

*Chen Tingmei*, et al

Department of microbiology, faculty of medical laboratory sciences

By using cell culture ex.vivo, flow cytometry (FCM), morphological observation, cytochemistry and immunocytochemistry, the effects of Total Saponins of Panax Ginseng (TSPG) on proliferation and differentiation of $K_{562}$ cells were studied. The results indicated that TSPG could markedly inhibit the proliferation of $K_{562}$ cells, block $K_{562}$ cells entering the active proliferative phase ($G_2/M+S$), and promote $K_{562}$ cells to differentiate toward the mature blood cell. Our experiment also showed that after induced by TSPG, the ratio of positive $K_{562}$ cells of expressing $HIR_2$ $CD_{w41}$, glycogen, benzidine stain is obviously higher than that of control. Combining with our previous ressearch works, we infer that TSPG may be one of the natural inducers which can not only enhance normal hematopoiesis, but also inhibit proliferation of such cancer cells as leukemia cells, and induce differentiation of these cells. The mechanism should be continually studied.

**KEY WORDS** TSPG; $K_{562}$ cells; Proliferation; Differentiation

119-123 (3)

# 苦参提取液诱导$K_{562}$细胞分化的研究

成都军区总医院放射介入病房 秦建平* 顾 明 赵 碧
检验系 蒋纪恺 张 彦 王霞文

R733.705

**提 要** 利用体外培养技术，以$K_{562}$细胞为实验模型，通过$K_{562}$细胞的生长曲线，细胞形态，乳酸脱氢酶活性，血红蛋白测定等，观察了苦参提取液对$K_{562}$细胞的诱导分化作用。以MTT法结合细胞形态探讨苦参提取液作用$K_{562}$细胞的有效分化浓度及有效作用时间。研究结果表明:12mg/ml浓度的苦参提取液作用$K_{562}$细胞二天，从形态到代谢都发生了变化。LDH活性明显降低;血红蛋白生成;细胞增殖明显受到抑制。电镜形态提示，细胞向似红细胞系、粒细胞系及单核细胞系分化。

**关键词** 苦参; $K_{562}$细胞株; 诱导分化 白血病 苦参提取液.
**中图分类号** R285.5

白血病是血液系统早期细胞分化受阻、反分化导致不能形成有正常功能细胞而引起的疾病，其治疗主要有化疗、骨髓移植等。但疗效尚不能令人满意。因此探讨新的治疗途径显得十分必要而迫切。1978年Leo Sachs报告恶性肿瘤细胞可以分化为较成熟或较良性的细胞以来，有关诱导分化剂的研究及应用已有不少文献报道[1]。目前已知一些化

*男，1965－11出生，主治医师

维普资讯 http://www.cqvip.com



学或生物活性物质能诱导白血病细胞向具有正常表型和功能的终末细胞分化。全反式维甲酸诱导早幼粒白血病细胞分化的治疗方法在我国临床的成功应用，开辟了一条非杀伤性治疗肿瘤的新途径。但此方法尚存在治疗病种单一，复发率高等缺点。近年来，从中药和天然药物中提取和寻找诱导剂已成为治疗白血病等肿瘤的希望及重要途径。

## 1 材料与方法

**1.1 苦参液的制备** 参见文献[2]方法提取，高压灭菌后，4℃保存备用。

**1.2 细胞培养** $K_{562}$细胞在含15%小牛血清的RPMI-1640培养液中培养，收集对数生长期细胞，调整细胞浓度为$1\times10^4-10^5$个/ml，实验组加入苦参液，其终浓度为4mg/ml、8mg/ml、12mg/ml、16mg/ml及20mg/ml，对照组加等量1640培养液，补足体积，同等条件下培养，以加药后开始计算培养时间，另培养第二天追加苦参液，以分析不同效果。

**1.3 光镜观察** 收集细胞，离心涂片，Wright.Giemsa染色，油镜下观察细胞的形态变化。

**1.4 电镜观察** 收集细胞，离心，用3%戊二醛和四氧化锇固定细胞，环氧树脂包埋，超薄切片，电子染色，透射电镜观察摄片。

**1.5 细胞生长曲线测定** 用0.4%台盼兰拒染法，每天计数细胞一次，连续计数5天，观察不同浓度苦参液作用不同时间对$K_{562}$细胞生长的影响。

**1.6 MTT法**[3] 调整细胞悬液浓度为$10^4$个/ml，加入24孔塑料培养板中。空白对照组加培养液用于仪器调零，阴性对照组加细胞悬液，实验组加苦参提取液（终浓度为4-20mg/ml）、每孔体积均为200μl，每组重复三孔，置37℃，5%$CO_2$培养箱中培养，每天进行测定，共5天。计算出肿瘤细胞的存活率。

$$\text{肿瘤细胞存活率}=\frac{\text{实验组A值}}{\text{阴性组A值}}\times100\%$$

按肿瘤药物判断标准[4]：肿瘤细胞存活率<30%敏感；30%-50%中度敏感；≥50%不敏感。

**1.7 乳酸脱氢酶(LDH)活性测定** 取$10^4-10^5$个/ml细胞悬液，加苦参液终浓度分别为8mg/ml和12mg/ml培养5天。每天取0.5ml细胞悬液，先用生理盐水洗涤3次，再超声破碎细胞，用全自动生化分析仪速率法测定其活性，计算10^8个细胞的LDH活性单位。

**1.8 血红蛋白(Hb)含量测定** 对照组与苦参提取液组（终浓度4-16mg/ml）的$K_{562}$细胞分别培养2天，细胞悬液及标本处理同LDH的测定。用ELISA双抗体夹心法测定细胞Hb的含量。通过包被抗体、封闭，加不同浓度Hb液体做标准曲线、HRP-Hb-Ab、新鲜配制的底物溶液，硫酸终止反应，最后用酶标仪(492nm)测吸光度值(A值)。通过标准曲线查出Hb浓度，再换算出每$10^8$个细胞所含Hb的微克量(μg)。

## 2 结果

### 2.1 苦参液对$K_{562}$细胞增殖的影响

对照组及苦参液4mg/ml浓度组的细胞增殖数在前4天内逐日上升，第5天开始下降。8mg/ml浓度以上的苦参液作用细胞第1天，表现细胞增殖

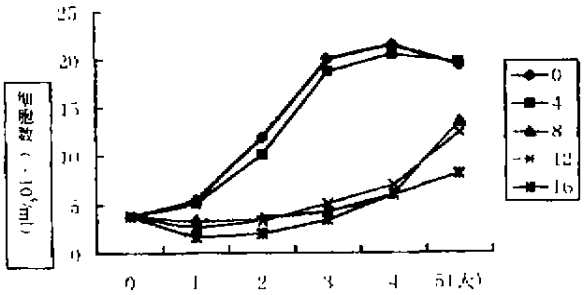



图1 不同浓度苦参液对$K_{562}$细胞增殖的影响

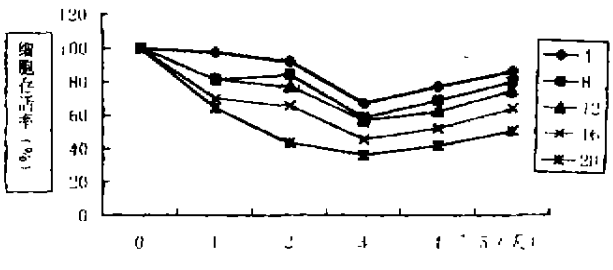



图2 不同浓度的苦参液对$K_{562}$细胞存活率的影响

维普资讯 http://www.cqvip.com



抑制，并随苦参液浓度加大而抑制效应增加，但至第3天细胞又开始增殖，第5天细胞数明显增多(图1)。

### 2.2 苦参液对$K_{562}$细胞存活率的影响

#### 2.2.1 $K_{562}$细胞存活率

不同浓度的苦参液持续作用$K_{562}$细胞1～5天，用MTT法每天测定，算出细胞的存活率。作用第1天，细胞存活率开始下降，第3天下降较明显，第4天则开始回升。随浓度加大，其存活率下降越明显，而回升亦越慢(图2)。

#### 2.2.2 第二天追加苦参液后细胞存活率

苦参液8～16mg/ml浓度作用$K_{562}$细胞后，于第2天追加等浓度的苦参液。结果显示，第1～2天，细胞存活率有所下降，第3天其存活率明显下降，第4天有所回升，随加入苦参液浓度增高，其存活率逐渐下降(表1)。

表1 追加苦参液对$K_{562}$细胞存活的影响

| 苦参液 | 细胞存活率(%) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| (mg/ml) | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5(d) |
| 8 | 100 | 83.5 | 80.4 | 40.8 | 44.8 | 57.6 |
| 12 | 100 | 81 5 | 76.8 | 30.4 | 37.3 | 40.0 |
| 16 | 100 | 72.4 | 63.6 | 20.3 | 26.4 | 25.6 |

### 2.3 苦参液对$K_{562}$细胞形态的影响

2.3.1 光镜 苦参液12mg/ml作用2天，$K_{562}$细胞的形态大小、胞浆、染色质、核仁等(图5)较未加药细胞(图4)发生了变化。提示苦参液促使$K_{562}$细胞形态明显分化成熟。

2.3.2 电镜 $K_{562}$细胞核大，核明显畸形，细胞器少，分化极差(图6)。苦参液12mg/ml作用细胞2天，细胞呈椭圆形，核异染色质含量增多，胞浆见少量含铁血红素，似中幼红细胞(图7左)；细胞核明显缩小，见大量含铁血红素，似晚幼红细胞(图7右)，分叶核，胞浆丰富，似粒细胞(图8)，核呈肾形，有核仁，胞浆丰富似幼稚单核细胞(图9)。提示苦参液能诱导$K_{562}$细胞向多种血细胞方向分化。

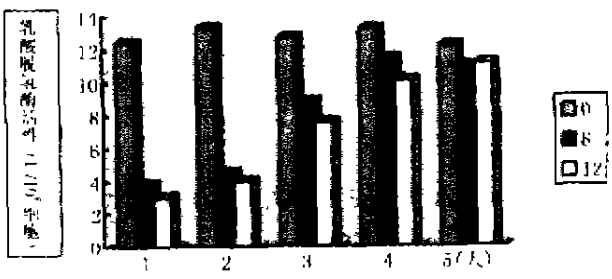



图3 不同浓度苦参液对$K_{562}$细胞乳酸脱氢酶的影响

### 2.4 苦参液对$K_{562}$细胞内的乳酸脱氢酶(LDH)活性的影响

$K_{562}$细胞内的LDH活性1～5天基本保持不变。苦参液8mg/ml和12mg/ml作用细胞1～2天，细胞内的LDH活性较0mg/ml组降低，第3天酶活性开始回升(图3)。

### 2.5 苦参液对K562细胞生成血红蛋(Hb)的影响

不同浓度的苦参液作用$K_{562}$细胞2天，除苦参液0mg/ml组未测得Hb外，苦参液4.16mg/ml组皆测得有Hb。提示苦参液能诱导细胞生成Hb(表2)。

表2 不同浓度苦参液作用$K_{562}$细胞二天Hb变化

| | 苦参液(mg/ml) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 4 | 8 | 12 | 16 |
| Hb含量 | | | | | |
| ($\mu g/10^6$细胞) | 0 | 215.6 | 604.2 | 643.2 | 480.6 |

## 3 讨论

本文把MTT法结合形态的观察用于诱导分化剂有效浓度及有效作用时间的选择，根据Salmon SE的药敏标准及本研究目的，应在使细胞存活率≥50%范围内的苦参液浓度里选择实验的有效浓度，由表2可知该有效浓度应在12mg/ml范围内。连续观察各浓度作用下的细胞形态变化。确定了本实验的有效浓度为8～12mg/ml，有效作用时间为2天。

我们用苦参液12mg/ml作用$K_{562}$细胞2天，光镜下观察到细胞形态发生了变化明显趋于成熟(图5)。电镜进一步提示：细胞向似红系、粒系、单核系方向分化。与Lozzio等[5]报道$K_{562}$细胞可向早期红系、粒系及单核系方向自发分化结果相似。另Green等[6]报道六亚甲基双乙酰胺(HMBA)可诱

维普资讯 http://www.cqvip.com







注:图4 胞体大，胞浆多少不等，核大、不规则，染色浅，核质呈细网状，核仁大而明显(×1650倍)。
图5 胞体变小，胞浆增多，核缩小，染色变深，核仁消失(×1650倍)。

注:图6 核大、明显畸形，细胞器少(×10000倍)。
图7左 细胞呈椭圆形，核异染色质增多，胞浆较多，见少量含铁血红素;
图7右 核明显缩小，见大量含铁血红素，未见到细胞器(×10000倍)。
图8 分叶核，见线粒体及粗面内网(×8000倍)
图9 核呈肾形，见核仁，常染色质丰富，含较多线粒体及少量粗面内质网(×8000倍)。

导K562细胞向粒系、单核系分化成熟。说明$K_{562}$细胞是分化程度极低的造血祖细胞，具有多向分化潜能性。苦参系豆科属植物，成份复杂，其中可分离出苦参碱等十七种生物碱[7]。其中的有效作用成份及诱导分化调控的机制有待进一步研究。

在本研究的有效浓度及时间条件下，观察到细胞的代谢亦发生了变化。测得用药组细胞内Hb含量平均为623.7μg/108细胞，而0mg/ml组为0μg/108细胞(表5)进一步证实苦参液可诱导细胞沿红系分化。测得胞内LDH活性第1,2天降低，平均为5U/108细胞、而0mg/ml组LDH活性平均为13U/108细胞。表明细胞分化时其胞内LDH活性降低。用药组第3天LDH回升可能因药物逐渐代谢而未分化细胞增殖所致(表4)。有文献报道[8,9]，白血病患者血清LDH活性明显高于正常，其升高主要来源于白血病细胞，酶活性变化与疗效明显相关。结合本文结果，可望把LDH作为临床白血病患者诱导分化治疗时病情变化及疗效判断的辅助指标。

有作者认为[10]：细胞的分化受增殖能力的影响，即分化程度低的细胞其增殖旺盛，反之分化程度高时增殖能力低。由表1可知，对照及4mg/ml浓度组细胞增殖旺盛、而8~12mg/ml组作用细胞第1～2天细胞增殖受抑制，此时镜检，细胞发生了分化、随着苦参液在胞内的代谢，细胞的增殖又回升。这与姜绪荣等[11]报道人参皂甙作用$K_{562}$细胞，细胞分化时、其增殖受抑制的结果一致。实验进一步表明(表3)，第2天追加药后、细胞存活率明显降低，此时镜检发现大量细胞碎片。说明大浓度苦参液时

维普资讯 http://www.cqvip.com



$K_{562}$细胞有杀伤作用。

目前我们正进行苦参液有效作用成份的提取、纯化及诱导分化调控机制的研究苦参液的有效成份可望用于临床白血病的诱导分化治疗。

## 参 考 文 献

1.王振义，等.中华血液学杂志 1994;15:105
2.徐建国，等.中国中药杂志 1990;15(10):49
3.汤为学，等.重庆医科大学学报 1992;17(2):103
4.Sydney E.Salmen. Cancer Treat Rep 1984;68(1):117
5.B.B.Lozzio, et al. Proceedings of The Society For Experimental Biology And Medicine 1981;166:546
6.A.R.Green, et al. Exp Hema 1993:21:525
7.张守芳.苦参研究概况(续)，中草药通讯 1997;2:30
8.柴忆欢，等.苏州医学院学报 1992;(92):74
9.刘云鹏，等.中国医科大学学报 1989;(814):300
10.穗积本男.国外医学肿瘤分册 1992;19(1):37
11.姜绪荣，等.大连医学院学报 1991;13(4):151

(收稿日期 1998－09－21)

# The effect of sophoa extract on induced differentiation of $K_{562}$ cell strain

*Qing Jianping*, et al
Radiologic interventional group of radiology, chengdu army general hospital

Using culture assay in Vitro, $K_{562}$ cell strain as anexperimental model, We observed the effect of sophoa extract on induced differentiation of $K_{562}$ cell strain by cell growth curve, cell morphology, Latic dehydrogenase activity assay and hemoglobin determination. The effective concentration and time by MTT assay combined with cell morphology was studied. Results showed that $K_{562}$ cell had been acted on by sophoa extract 12mg/ml for two days. Its morphology and metabolism were changed. Their LDH activity lowered obviously; the Hb was produced by these cells; the proliferation of the cell was suppressed. Electron microscopy showed: the cells differentiate toward the primitive cell with erythrocyte, granulocyte and monocyte lineages

**KEY WORDS** Sophoa flavescans Ait; $K_{562}$ cell strain; Induction of differentiation

123-126

# 苦参碱的氚标记、鉴定

R273.37
R286.97
R286.0

临床生化教研室 许相儒* * 蒋纪恺 张 彦 刘北忠 张莉萍 刘小珊

**提 要** 苦参碱(matrine)是提纯于中药苦参、山豆根等豆科槐属植物的一种生物碱活性成分，经现代研究证实其有多种药理作用，尤以其诱导人类白血病细胞分化引人关注。为探明其作用机制，根据其结构特点、理化性质，并结合研究需要，我们尝试用同位素催化置换法对苦参碱进行氚($^3H$)标记，标记结果：放射性总活度(RTA)>1.85×10⁹Bq;放射性比活度(S)=10.06×10¹Bq/μg;放射性化学纯度(RCP)=95.2%，并对标记产物的理化性能及生物学效应作以鉴定，证明用氚标记苦参碱的方法是成功的，能满足进一步研究的要求。

**关键词** 苦参碱; 氚标记 白血病 中药
**中图分类号** R286.02

* 本课题为国家自然科学基金资助项目，编号:39670881
* * 男，1970－03出生，研究生