维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2001)02-0126-03

人参多糖对人早幼粒白血病细胞株（HL-60）增殖的影响

戴 勤[1]，王亚平[2]，周开昭[1]，姜 蓉[2]，吴 宏[2]，郑 敏[2]

（1. 重庆医科大学临床学院血液内科 重庆 400016；2. 重庆医科大学基础医学院组织胚胎学教研室 重庆 400016）

【摘 要】目的：探讨人参多糖（GPS）对人粒单系造血祖细胞（CFU-GM）和人早幼粒白血病细胞株（HL-60）增殖分化的影响。方法：采用造血细胞体外培养，形态学观察，免疫细胞化学，流式细胞术等实验血液学技术。结果：GPS在体外能抑制HL-60细胞增殖，而同等剂量的GPS能明显促进正常粒单系造血祖细胞的增殖分化；在本实验条件下未见GPS对HL-60细胞有明显的诱导分化作用。结论：GPS可能通过阻止HL-60细胞从静止期（G_0期）进入增殖周期（S/G_2+M）期，抑制DNA的合成等途径进而抑制细胞的增殖；提示GPS有可能成为既能促进正常造血、又能抑制人白血病等肿瘤细胞增殖的天然诱导剂。

【关键词】人参多糖；粒单系祖细胞；HL-60；增殖；诱导分化

【中国图书分类法分类号】R733.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2000-09-01

The effect of Ginseng polysaccharide on proliferation of human promyelocytic leukemia cell line(HL-60)

DAI Qin, et al

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

【Abstract】 *Objective*: To study Ginseng polysaccharide's effect on proliferation of human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) and modulation of human granulocytopoiesis and monocytopoiesis. *Methods*: Using the techniques of cell culture ex vivo, flow-cytometry, immunocytochemistry, the effects of GPS on the proliferation of human promyelocytic leukemia cell line(HL-60) and human granulocytopoiesis and monocytopoiesis were observed. *Results*: GPS can significantly inhibit the proliferation of HL-60 ex vivo, the inhibitory effect is concerned with the concentration. The higher the concentration of GPS , the greater the proliferation inhibited; GPS may prevent HL-60 from the silent phase (G_0) entering the active proliferative phase(S/G_2+M), thus prohibit the synthesis of DNA; GPS probably can not induce HL-60 to differentiate into mature granulocytes or monocytes under our experimental conditions. *Conclusion*: GPS not only can promote the colony formation of CFU-GM but also can inhibit the proliferation of HL-60 by cytotoxic effect or by preventing HL-60 from G_0 phase entering S/G_2+M phase.

【Key words】 Ginseng polysaccharide; HL-60; Proliferation; Differentiation

多糖在分子生物学中起着决定性作用，它控制细胞分化、调节细胞生长、衰老和死亡。人参是中医临床“补气”要药，有“补气生血”之功效，人参多糖（GPS）是其主要药物成份。白血病是源自造血干细胞水平的血液系统恶性肿瘤，本文采用细胞体外培养，免疫细胞化学和流式细胞术等实验血液学技术，研究GPS对HL-60细胞和人CFU-GM增殖分化的影响。旨在为从祖国传统医学宝库中寻找既能刺激正常造血，又能抑制白血病等恶性肿瘤增殖，并能诱导其逆转、毒副反应小或无的中药诱导剂提供理论与实验依据。

作者介绍：戴 勤（1970- ），女，重庆长寿人，主治医师，硕士，主要研究方向：中药对白血病细胞增殖分化的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 HL-60细胞株 购自上海细胞生理研究所，在含10%马血清、青、链霉素（100u/ml）的RPMI-1640培养液中常规培养，每2－3天换液传代。

1.1.2 人骨髓细胞（hBMC） 取自胸外科手术切除肋骨、供髓者无放、化疗史，骨髓细胞涂片检查无造血系统异常。淋巴细胞分离液分离骨髓有核细胞（BMC），RPMI-1640培养液洗涤后制备单细胞悬液，调整细胞悬液浓度，备用。

1.1.3 人参多糖(Ginseng Polysaccharide, GPS) 四川省中药研究所刁长发教授惠赠，纯度95%以上，RPMI-1640培养液

维普资讯 http://www.cqvip.com

配制成所需浓度，过滤除菌备用。

1.1.4 主要试剂 RPMI-1640培养基，美国GIBCO公司产品；全反式维甲酸(ATRA)，Sigma公司产品；重组人粒单系集落刺激因子(rhGM-CSF)，北京北医联合生物工程公司产品；小鼠抗人CD_{14}、CD_{15}单克隆抗体，北京中山生物技术有限公司产品；琼脂(Agar)，日本进口，上海化学试剂采购供应站试剂厂分装；马血清(HS)，中国军事医学科学院提供。

1.2 方法

1.2.1 粒单系祖细胞(CFU-GM)的体外琼脂半固体培养、集落染色鉴定与计数：按本室常规方法进行[1]。

1.2.2 GPS体外作用对CFU-GM增殖分化的影响：常规对照组，常规培养(加GM-CSF)；GPS组，常规培养基础上分别加入不同浓度的GPS（终浓度为0.1～100 μg/ml）。药物对照组，常规培养体系中除去外源性GM-CSF，加入GPS，浓度同前。根据每皿种植1×10^5个BMC所生成的集落数，评价GPS体外作用对CFU-GM增殖分化的影响。

1.2.3 GPS诱导HL-60细胞分化的实验：实验分组同上，分别在培养的第2、4、6天取样进行瑞氏染色（Wright's），过氧化物酶染色（POX），糖元染色（PAS）及非特异性酯酶染色（NAE），CD_{14}、CD_{15}免疫细胞化学染色，油镜下计数阳性率及阳性强度。

1.2.4 GPS对HL-60细胞增殖影响的检测：取对数生长期的HL-60细胞，调整细胞终浓度为1×10^4/ml。对照组，常规培养；GPS组，培养体系中GPS终浓度为0.1～100 μg/ml；ATRA组，培养体系中ATRA终浓度为10^{-6}mol/L。分别在培养的第2、4、6天取样，台盼兰染色计数活细胞数，观察不同浓度GPS作用不同时间对HL-60细胞增殖的影响。

1.2.5 细胞周期测定：对照组，常规培养；GPS组，GPS终浓度为100 μg/ml；ATRA组，ATRA终浓度为10^{-6}mol/L。置37℃、含5%CO_2的孵箱中培养3天，PBS（pH7.2）洗涤细胞两次，70%冰乙醇固定。测定前去固定液，加RNA酶工作液和碘化丙啶（PI）4℃染色，经流式细胞仪检测分析得出细胞周期各时相比例。

1.2.6 统计学处理：所获实验数据均输入计算机，经SAS统计软件进行直线相关回归分析，方差分析和t检验。

2 结 果

2.1 GPS体外作用对CFU-GM集落形成的影响

通过Wright's染色，POX及PAS染色可区分粒细胞集落，单核细胞集落，粒细胞和单核细胞的混合集落。集落中单核细胞CD_{14}表达为强阳性，粒系细胞CD_{15}表达呈阳性反应。GPS体外作用能明显促进人CFU-GM的增殖分化，作用强度与药物剂量在一定范围内呈正相关（图1）。

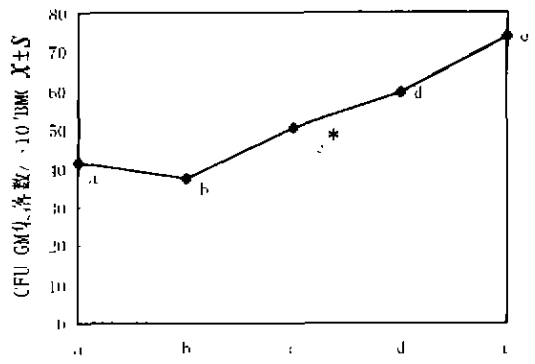


图1 GPS体外作用对CFU-GM集落形成的影响

培养体系中GPS终浓度：a:对照组；b:GPS0.1 μg/ml c:GPS1 μg/ml；d:GPS10 μg/ml；e:GPS100 μg/ml

* 与对照组比较 $P<0.01$

2.2 GPS对HL-60的增殖抑制作用

GPS在体外对HL-60细胞有明确的增殖抑制作用，抑制强度与剂量、时间有关。随加入GPS浓度的增加和时间延长，抑制作用增强。ATRA 10^{-6}mol/L作用第4天对HL-60也显示出增殖抑制作用（见表1）。

2.3 GPS对HL-60细胞增殖周期的影响

对照组的HL-60细胞大多处于增殖旺盛状态，GPS100 μg/ml作用3天后处于S/G_2+M期的HL-60细胞数明显减少，表明GPS能阻止HL-60细胞由G_0/G_1

表1 GPS对HL-60的增殖抑制作用

组别	n	作用不同时间后的HL-60活细胞数($\times10^4$/ml)		
		2d	4d	6d
对照组	8	2.14±0.57	4.84±0.86	6.89±1.0
GPS0.1 μg/ml	8	2.13±0.29	4.82±0.34	6.86±0.52
GPS1 μg/ml	8	1.82±0.30	4.63±0.57	6.43±0.48
GPS10 μg/ml	8	1.65±0.25	4.24±0.63	5.00±0.40**
GPS100 μg/ml	8	1.32±0.14**	2.84±0.38**	2.87±0.30**
ATRA 10^{-6}mol/L	6	2.03±0.69	3.70±0.64*	5.69±0.58*

* $P<0.05$与对照组比较，** $P<0.01$与对照组比较

维普资讯 http://www.cqvip.com

表2 GPS对HL-60细胞增殖周期的影响

组别	n	细胞周期分布（%）		
		G_0/G_1	S	G_2+M
对照组	4	39.77±7.84	43.84±6.56	16.39±3.06
GPS100μg/ml	4	57.15±2.83*	32.34±1.52	10.51±3.63
ATRA10^{-7}mol/L	3	49.40±4.59*	42.05±6.48	8.55±2.30

*P<0.05 与对照组相比

表3 GPS对HL-60细胞直径和核/浆比例的影响（作用第4天）

组别	细胞直径(μm)	核/浆比例
对照组	19.95±3.15	71.46±8.89
GPS100μg/ml	17.05±2.78*	65.31±8.96*
ATRA10^{-6}mol/L	14.42±3.02*	58.08±8.61*

* P<0.05与对照组比较

向S/G_2+M期移行（表2）。

2.4 GPS对HL-60细胞分化的影响

GPS100μg/ml诱导4天后的HL-60细胞胞体缩小，核直径减小，核浆比例降低，随时间延长到第6天，未见HL-60细胞向成熟粒细胞和单核细胞分化(见表3)。GPS诱导后的HL-60细胞PAS、POX、CD_{15}阳性率与对照组相比无明显差异，NAE和CD_{14}表达在实验组和对照组均为阴性。提示在本实验条件下GPS未能诱导HL-60细胞向成熟粒细胞和单核细胞分化。

3 讨 论

目前治疗白血病的主要手段仍是采用传统的大剂量联合化疗，但此疗法副作用甚大，复发率很高、尤其对机体的免疫与造血功能有极大的损害。在白血病的治疗中如何达到既抗癌又扶正固本已成为学者们迫切需解决的难题。中药以其攻补兼施，毒副作用小或无、注重整体的优越性已得到广泛认可和重视。本研究探讨人参多糖（GPS）对粒系白血病细胞增殖分化及对人粒单系造血祖细胞（CFU-GM）增殖分化的影响。旨在为寻找一种既能刺激正常造血，又能抑制白血病等恶性肿瘤增殖，毒副反应小或无的中药诱导剂提供理论与实验依据。

大量研究表明有近100余种多糖均具有抗肿瘤作用[2]。Kim KH[3]报道从人参中分离得到的酸性多糖为具有抗肿瘤活性的免疫激活剂，并证实它从NK和T细胞内源性地产生多种细胞因子产生LAK、激活杀伤细胞的能力。钱伯初等研究证明[4]，人参多糖能明显地抑制小鼠艾氏腹水癌（EAC）细胞增殖，延长S180小鼠存活时间，对荷瘤而致小鼠免疫功能低下有较好的保护作用。杨桦等[5]研究认为人参多糖可通过诱生肿瘤坏死因子而发挥抗肿瘤活性。并且又有报道[6]人参多糖能诱导T淋巴细胞和B淋巴细胞的增殖，经人参多糖诱导后的脾细胞对多种肿瘤细胞均有细胞毒作用。它还可激活巨噬细胞、增强巨噬细胞Fc受体的表达而发挥抗肿瘤作用，且人参多糖对B16黑色素瘤细胞也具有抗瘤活性。本实验结果显示GPS对HL-60细胞有明确的增殖抑制作用，其抑制强度与药物剂量和作用时间有关，随药物剂量提高、作用时间也相应缩短。而同等剂量的GPS对正常粒单系造血祖细胞却表现出促进增殖分化作用。为什么GPS对正常粒单系造血祖细胞和粒系白血病细胞的作用是表现出两种完全相反的结果，目前还不能完全解释这一现象，推测这是否与某些中药有"双向调节"作用有关。迄今人参多糖在体外对肿瘤细胞株增殖影响的实验研究报道甚少，本实验通过流式细胞术检测细胞周期显示未经处理的HL-60细胞大多数处于增殖旺盛的S/G_2+M期，经GPS诱导后的细胞被阻滞在G_0/G_1期，S/G_2+M期细胞显著减少，推测GPS对HL-60细胞的增殖抑制作用与抑制细胞DNA合成有关。此外白血病细胞自身能产生大量造血生长因子及其相应受体，这是导致细胞增殖失调的又一重要因素[8]。GPS是否通过抑制HL-60细胞自身分泌造血生长因子或抑制其受体的表达来达到抑制HL-60增殖的效应，对此，我们正在进行深入探讨。

本实验结果提示GPS100μg/ml诱导HL-60细胞第4天时可见细胞体积变小，核直径缩小，核染色质较为固缩，核浆比例减小，但仍可见一两个核仁，未见典型的杆状核和分叶核细胞。GPS诱导HL-60后POX、PAS阳性率与对照组无差异，NAE表达阴性。但用ATRA诱导后可明显观察到HL-60向成熟

（下转第131页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

成，其促进作用较CCK明显。结果提示，BBS对胰腺的促生长作用既可为间接的，也可是直接的。

VIP是胃肠道具有生理调节功能的重要的神经肽，它可能是调节胰腺分泌的主要非肾上腺素能神经递质之一。VIP可促进胰腺癌、肺癌等肿瘤细胞株的生长[9]。大鼠胰腺腺泡细胞表达VIP受体已被报道多年[4]，但尚未见对其生理功能研究的报导。我们的结果显示VIP对大鼠胰腺腺泡细胞的^{3}H-胸腺嘧啶核苷掺入无明显影响。

SST能影响细胞的增殖能力，但对胰腺腺泡细胞的营养作用尚不明。本研究未能观察到SST对大鼠胰腺腺泡细胞生长的影响。这一结果使临床应用SST治疗急性胰腺炎时，不必顾虑SST在抑制胰腺外分泌的同时是否会抑制胰腺腺泡细胞的再生，而使急性胰腺炎延迟恢复等问题。

总而言之，促进大鼠胰腺腺泡细胞生长的胃肠多肽不仅有CCK，还有BBS。SST、VIP和胃泌素则不影响胰腺腺泡细胞的生长。上述研究结果增进了胃肠多肽对胰腺部分生理功能调节的认识。用CCK或BBS促进腺泡再生，是否有益于坏死型胰腺炎、慢性胰腺炎治疗以及胰腺移植有待进一步探讨。

参 考 文 献

[1] Mutt V. Historical perspectives on cholecystokinin research[J]. Ann NY Aca Sci, 1994;713:1-10.

[2] Povoski SP, Zhou W, Longnecker DS, et al. Stimulation of in vivo pancreatic growth in the rat is mediated specifically by way of cholecystokinin-A receptors[J]. Gastroenterology, 1994: 107:1135-1146.

[3] Nylander AG, von-Friesen CP, Monstein HJ, et al. Increased expression of cholecystokinin A receptor mRNA in pancreas and cholecystokinin B receptor mRNA in oxyntic mucosa after porta-caval shunting in rats[J]. Pharmacol-Toxicol, 1997;80:147-151.

[4] Tang C, Biemond I, Appel MJ, et al. Gut peptide receptors in pancreata of azaserine-treated and normal control rats[J]. Carcinogenesis. 1995;16:2951-2956.

[5] Schultz GS, Sarras MP, Guther GR, et al. Guinea pig pancreatic acini prepared with purified collagenase[J]. Exp Cell Res. 1980;130:49-62.

[6] Githens S. Pancreatic duct cell cultures[J]. Annu.Rev. Physiol. 1994;56:419-43.

[7] Wank SA. Cholecystokinin receptors[J]. Am J Physiol. 1995: 269:G628-646.

[8] Tang C, Biemond I, and Lamers CBHW. Visualization and characterization of CCK receptor in exocrine pancreas of rat with storage phosphor autoradiography[J]. Pancreas, 1996;13:311-315.

[9] Moody TW. Peptides and growth factors in non-small cell lung cancer[J]. Peptides. 1996;17 545-555.

(上接第128页)

粒细胞方向分化。尽管本实验未观察到对HL-60的诱导分化作用，但不能排除它们有诱导HL-60分化的可能性。为进一步明确GPS对HL-60的诱导分化作用及机理，还需在诱导条件包括药物浓度、时间及其它因素进行分子生物学水平摸索并深入探讨。

综上所述，GPS体外对HL-60增殖有明显抑制作用，经GPS作用后HL-60细胞体积减小，核/浆比例减小，但未证实GPS在体外能诱导HL-60向成熟粒细胞和/或单核细胞方向分化。同等剂量的GPS能明显促进正常粒单系造血祖细胞的增殖分化。推测GPS有可能成为既能促进正常造血又能抑制白血病细胞增殖的天然诱导剂。在今后的实验中，我们将进一步探讨GPS诱导HL-60分化的作用及其机理。

参 考 文 献

[1] 王亚平，祝彼得. 当归多糖对小鼠粒单系血细胞发生的影响[J]. 中国实验血液学杂志，1993;1(1):79.

[2] 刘 锐. 多糖成分药理研究概况[J]. 甘肃中医学院学报，1991; 8(3): 42-44.

[3] Kim KH, Lee YS, Jung IS, et al. Acidic polysaccharide from Panax ginseng, ginsan, induces Th1 cell and macrophage cytolines and generates LAK cells in synergy with rIL-2[J]. Planta Med. 1998; 64(2): 110-115.

[4] 钱伯初，臧星星，许初阳，等. 人参多糖对肿瘤及荷瘤小鼠免疫功能的影响[J]. 中国药理学报，1987; 8(3): 277.

[5] 杨 桦，赫 牲，杨明久. 人参多糖抗肿瘤活性的实验研究[J]. 中国药理学通报，1992; 8(3): 218-220.

[6] Lee YS, Chung IS, Lee IR, et al. Activation of multiple effector pathways of immune system by the antineoplastic immunostimulator acidic polysaccharide ginsan isolated from Panax ginseng[J]. Anticancer Res. 1997; 17(1A): 323-331.

[7] Shin KS, Kiyohara H, Matsumoto T, et al. Rhamnogalacturonan II from the leaves of Panax ginseng C.A. Meyer as a macrophage Fc receptor expression enhancing polysaccharide[J]. Carbohydr Res, 1997; 300(3): 239-249.

[8] Young DC, Griffin JD. Autocrine secretion of GM-CSF in acute myeloblastic leukemia[J]. Blood. 1986; 68:1178.