维普资讯 http://www.cqvip.com

参 考 文 献

1.宋 军.林尚泽.国外医学耳鼻咽喉分册 1997;21(2):103
2.上海市第六人民医院耳鼻咽喉科.病理科.中华耳鼻喉杂志 1978;13:46
3.汪吉宝.等.中华耳鼻咽喉杂志 1987;22(4):224
4.王辉尊.等.中华耳鼻咽喉杂志 1989;24(2):94
5.周 玖.等.临床耳鼻咽喉杂志 1993;7(4):236
6.杨成章.等.临床耳鼻咽喉杂志 1995;9(1):25
7.刘 铭.等.耳鼻咽喉－头颈外科 1996;3(2):269.
8.Romett JL et al.Laryngoscope 1982;92:765
9.Stammberger H.et al.Ann Otol Rhinol Laryngol.1984;93:251

(收稿日期 1997－12－30)

The clinical feature and diagnosis of the fungal nasosinusits

Wei Lianzhi, et al
Department of Dtolaryngology, College of Clinical Medicine

Ten Patients with fungal nasosinusits verified by pathalogy were reviewed vetuospectivety.There were 5 male and 5 female patients,ranging in age from 32 to 70 years.Nasal mucus with blood was the first symptoms in all of the cases.CT scanning of the nasal sinuses showed the clouding or opacification of the sinuses.In such cases,the infection of funguses needs to be considered apart from rumours.Diagnosis is mainly made through pathological examination, and the surgical removal of the offending funguses is advissalle in the therapy of all the patients.

KEY WORDS Sinuses; Mycosis; Diagnosis

298-300 (30)

细胞周期和胞内钙离子浓度在Ro13－7410作用HL－60细胞中的变化

临床学院血液科 刘小珊* 娄陵生 曾淑蓉
检验系临床生化室 蒋纪恺 刘北忠 康格非

R733.702

提 要 本文用流式细胞术和Fura－2测定胞内钙离子方法分别观察了Ro13－7410作用人白血病HL－60细胞不同时间的细胞周期分布以及细胞内钙离子浓度的变化。结果显示Ro13－7410将多数细胞阻止在G_2/M期，同时伴随了胞内钙离子的明显上升，且与Ro13－7410对Hl－60细胞的诱导凋亡和分化作用有关。

关键词 细胞周期; 胞内钙; 白血病细胞; 维甲类化合物
中图分类号 R55

HL-60细胞

细胞周期的运行失控可导致各种疾病。细胞周期的超常快速运行，或在DNA复制不完全或有损伤时仍继续进行则可能导致癌变。各类诱导分化剂及抗癌药物均可对细胞周期产生作用从而影响细胞的增殖、分化。明确药物作用细胞后的细胞周期的分布对其作用机理的阐明有重要意义。细胞凋亡DNA的改变，一般认为是由于细胞内内源性核酸内切酶活性增加，从而使DNA链断裂所致。细胞内内源性核酸内切酶多为钙离子依赖性[1]。我们在以往的工作中发现第三代维甲类化合Ro13－7410诱导了人白血病HL－60细胞凋亡和分化的发生[2]，

* 女.1967－11出生，住院医师

维普资讯 http://www.cqvip.com

本实验进一步观察了其对细胞周期分布和胞内钙离子浓度的影响。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

人白血病HL－60细胞系引自军事医学科院附属医院药理室。用含10%小牛血清的RPMI－1640增养基在37°C，5%CO_2条件下培养。

1.2 Ro13－7410和RA处理HL－60细胞

Ro13－7140及RA(all－trans－retinoic acid)均由重庆华邦制药有限公司赠送。分别用无水乙醇配成储液，置－20°C冰箱避光保存。试验时用生理盐水稀释，乙醇终浓度小于0.1%。收集对数生长期细胞，配成浓度为1×10^5/ml的细胞悬液。药物组加入不同浓度的Ro13－7410及RA，对照组加入等体积的溶剂，于给药后不同时间收集细胞测定细胞周期和胞内钙离子浓度。

1.3 细胞周期分析

取各实验组细胞，PBS洗3次，70%乙醇固定，4°C存放待测。测定时离心去上清，RNA酶工作液作用10分钟，加入碘化丙啶，4°C染色20分钟，FACSPLUS流式细胞仪进行细胞周期分析。

1.4 胞浆内游离Ca^{2+}浓度测定[5]

取各实验组细胞分别离心，去上清，加含1%白蛋白的缓冲Hank's液2ml作负载液，重悬细胞，加入浓度为5μmol/L的Fura－2/AM20μl，避光，37°C轻震20min，离心，去上清，将负载的细胞用含0.2%白蛋白的缓冲Hank's液洗涤2次，用此液重悬细胞，25°C放置20min，保证Fura－2/AM完全去脂化，用荧光分光光度计测定荧光值(F)，加入Triton破坏细胞膜测得最大荧光值(Fmax)，再用EGTA络合钙离子得到最小荧光值(Fin)，Fura－2/AM与Ca^{2+}结合的解离常数为224，由下列分式计算出胞浆内游离Ca^{2+}浓度：

$$\text{胞浆内游离}Ca^{2+}\text{浓度}=\frac{F-Fmin}{Fmax-F}\times224(nm)$$

2 实验结果

2.1 Ro13－7410对细胞周期分布有影响

如表中所示，10^{-6}mol/L Ro13－7410作用HL－60细胞1，2，3天时G_2/M期细胞所占百分比分别为47.1，59.8，77.9。同等浓度的RA为52.0，47.6，51.3。对照为54.9，54.1，61.9

表1 Ro13－7410和RA对HL－60细胞细胞周期分布的影响

Days of treatment		%Cells in cell cycle phase		
		G_1	S	G_2/M
Control	1	26.9	18.2	54.9
	2	17.4	28.5	54.1
	3	18.4	19.7	61.9
Ro13－74	1	23.8	29.1	47.1
10	2	20.2	19.9	59.9
	3	16.2	5.9*	77.9**
	1	27.5	20.5	52.0
RA	2	15.3	37.1	47.6
	3	44.0	4.7*	51.3

x^2test ** $P<0.05$ComPared with control and RA
* $P<0.05$Compared with control

2.2 Ro13－7410对细胞内游离Ca^{2+}浓度的影响

如图1所示，10^{-6}mol/LRo13－7410作用HL－60细胞5小时可见胞内Ca^{2+}浓度明显上升，仅1小时后显著下降，后在第2－3天又呈上升趋势。

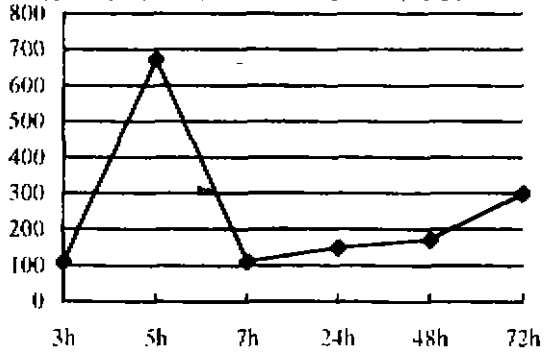


图1 Ro13－7410对HL－60细胞胞内Ca^{2+}浓度的影响

3 讨论

细胞周期与细胞癌变的关系是近年来肿瘤发生与逆转研究的热点。细胞周期的调控在肿瘤的发生和治疗中起重要作用。既往研究表明全反式维甲酸(RA)和合成的第三代维甲类化合Ro13－7410均能明显抑制白血病HL－60细胞的增殖[4]。本实验发现RA将部分细胞阻止在G_1期，而Ro13－7410使多数细胞阻止在G_2/M期。RA对HL－60细胞的诱导分化作用是明确的，我们以前在观察

维普资讯 http://www.cqvip.com

Ro13－7410诱导HL－60细胞分化时发现了细胞凋亡的同时发生。由此可见二者作用HL－60细胞后细胞周期发生的不同变化与它们对HL－60细胞不同的诱导作用有着密切联系。这同文献报道的诱导HL－60细胞凋亡发生的维甲类化合物4－HPR将细胞阻止在G_2/M期的结果一致[6]。因此Ro13－7410引起的细胞周期改变可能对HL－60细胞的凋亡和分化起重要作用。

胞内Ca^{2+}信号传递系统较早被发现与细胞凋亡的调控有密切联系。80年代初，人们发现在糖皮质激素诱导动物胸腺细胞凋亡的过程中，涉及胞内Ca^{2+}浓度的持续上升。体内和体外的一些实验表明，使双链DNA在核小体Linker部分裂解，从而形成DNA片段的核酸内切酶是钙离子、镁离子依赖性的。当胞内游离Ca^{2+}浓度上升时，此酶活性升高，而该酶抑制剂可阻断DNA片段产生和细胞凋亡[1]。另一方面，胞内Ca^{2+}的上升也可能通过其它的一些依赖Ca^{2+}离子的酶发挥作用。最近有实验证据表明，某些钙离子结合蛋白，如钙调素，Calbindin－D28K等在细胞凋亡过程中起着某种调控作用[6]。也有人认为胞内钙离子的上升，在某些细胞实验系统中，并不是启动细胞凋亡的早期事件，而是细胞凋亡过程中比较晚期的事件。维甲类化合物诱导白血病细胞凋亡伴随胞内钙离子的变化未见过报道。本文采用快速、敏捷、客观的Fura－2/AM检测胞内钙离子浓度发现胞内钙离子浓度的增高与DNA断裂有关。此结果支持Ro13－7410诱导HL－60细胞凋亡的发生。

参考文献

1.*Fesus L,et al.FEBS Lett.*1987;224:241
2.刘小珊，等.中华血液学杂志 1998;19:232
3.Grynkiewicz G,et al.J.Biol.Chem. 1985;26:3440
4.Strickland S,et al.Cancer Res. 1983;43;5268
5.Dipietrantonio A,et al.Biochem. And Biophysic.Res.Commun. 1996;224;837
6.Yui S,et al.J.Leuco.Biol 1995;58:650

(收稿日期 1997－10－30)

Alteration of cell cycle and intracellular free Ca^{2+} in the HL－60 cells induced by Ro13－7410

Liu Xiaoshan, et al
Department of Hematology, College of Clinical Medicine

Cell cycle phase and intracellular free Ca^{2+} were detected by flow cytometry and Fura－2 method respectively.The results showed that Ro13－7410 caused greatly partial cell arrest in the G_2/M phase after a 2－day treatment and the percentage of cells arrested in the G_2/M phase increased after 4 days treatment. The increase of intracellular free Ca^{2+} was also observed in Ro13－7410－treated cells.

KEY WORDS Cell cycle; Intracellular free Ca^{2+}; Leukemia cell; Retinoids