DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.22.028
第25卷第22期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 22
2032 2003年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)22-2032-02

苦参碱对白血病细胞分泌 IL-6 和 TNF-α 的影响

戴碧涛[1],蒋纪恺[2],刘 瑜[1],王莉佳[1],王世一[1] (重庆医科大学:[1]儿科学院血液科,重庆 400014;[2]临床检验学院,重庆 400046)

提 要:目的 探讨苦参碱诱导分化对白血病细胞分泌白细胞介素-6(IL-6),肿瘤坏死因子(TNF-α)的影响。方法 采集19例儿童白血病和9例对照骨髓单个核细胞(MMNC),对每例标本分别加苦参碱或不加苦参碱进行体外培养。培养72 h收集上清液,用双抗夹心法ELISA检测IL-6和TNF-α。结果 病人及正常MMNC均有自分泌IL-6、TNF-α的能力。但对照组自分泌IL-6、TNF-α的作用明显比病人组强($P<0.05$)。加入与不加入苦参碱对比,两组MMNC分泌IL-6、TNF-α均无明显差异($P>0.05$)。结论 两组MMNC均有自分泌IL-6、TNF-α的能力。苦参碱对白血病以及对照骨髓单个核细胞分泌IL-6,TNF-α无干扰作用。

关键词:苦参碱;细胞培养;白血病;IL-6;TNF-α
中图法分类号:R282.71;R390.1;R733.7 文献标识码:A

Effects of matrine on secretion of IL-6 and TNF-α in leukemia cells

DAI Bi-tao, JIANG Ji-kai, LIU Yu, WANG Li-jia, WANG Shi-yi (Department of Hematology, College of Pediatrics, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To study the effects of matrine on the secretion of interleukin 6 (IL-6) and tumor necrosis factorα (TNF-α) in leukemia cells. Methods The samples of marrow mononuclear cells (MMNCs) were collected from 19 children with acute leukemia and 9 normal controls. Each sample was divided into two portions. In one portion, matrine was added but another not. The supernatant was collected after culture for 72 h. The levels of IL-6 and TNF-α in the supernatant were detected by ELISA method. Results MMNCs could secrete IL-6 and TNF-α in the patient group and the control group. The ability to secrete IL-6 and TNF-α in the control group was stronger than that in patient group ($P<0.05$). Matrine had no effect on the autocrine of IL-6 and TNF-α in MMNCs ($P>0.05$). Conclusion MMNCs are endowed with the ability to secrete IL-6 and TNF-α. Matrine has no interfering effect on the secretion levels of IL-6 and TNF-α in MMNCs.

Key words: matrine; cell culture; leukemia; IL-6; TNF-α

苦参作为中成药对肿瘤的抑制作用有较多报道[1,2],苦参的提纯物苦参碱在适当浓度时对K562细胞有诱导分化作用已得到证实[2],其机制在进一步探讨中。文献报道,白血病能通过自分泌或刺激基质细胞以旁分泌形式在肿瘤微环境中大量表达各类生物因子。一些研究表明,以细胞因子为中心的细胞增殖调节机制和细胞应答出现异常很可能是其增殖的重要原因。白细胞介素-6(IL-6)与肿瘤坏死因子(TNF-α)等参与正常及恶性造血调控,IL-6的异常表达在白血病的发生和发展中起重要作用,TNF-α对肿瘤的毒性作用和抗增殖作用已被肯定。为了解苦参碱在对白血病细胞诱导剂量作用下对白血病细胞分泌IL-6及TNF-α有何影响,我们进行了以下实验。

1 资料和方法

1.1 研究对象

实验组骨髓标本均来自我院确诊为急性白血病的患儿,共19例。年龄4个月至11岁9个月,男12例,女7例。其中急性髓细胞白血病(Acute lymphocytic leukemia, ALL)11例,急性淋巴细胞白血病(Acute myelocytic leukemia, AML)8例。对照组骨髓9例取自骨髓检查为正常的非感染及非恶性病者,年龄6个月至10岁。

1.2 主要试剂

植物血球凝集素(PHA)购自广州市医药工业研究所。苦

基金项目:四川省卫生厅科研基金资助项目(960086)
Supported by the Sci &Tech Research Project Foundation of Public Health Department of Sichuan Province(960086)
作者简介:戴碧涛(1956—),女,四川省犍为县人,副主任医师,主要从事血液肿瘤方面的研究,发表论文8篇。电话:(023)63862453
收稿日期:2002-11-08;修回日期:2003-01-12

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

参碱由重庆医科大学检验系临床生化教研室惠赠。IL-6、TNF-α 试剂盒购自(北京)晶美生物制品公司。

1.3　实验分组

抽取骨髓标本 1~2 ml 于灭菌肝素抗凝瓶中, 将自然沉淀的骨髓细胞成分移入梯度液(Ficoll)中, 2 000 r/min 离心沉淀, 吸取单个核细胞部分并分散在含 20% 小牛血清的 RPMI1640 培养液中。调节单个核细胞(MNNC)悬液使其细胞数为 1×10^6/ml。加入 PHA 后将标本分成两组, 加苦参碱组为Ⅰ组, 不加苦参碱为Ⅱ组。两组均于 37 ℃, 5%CO_2 孵箱中孵育 72 h, 收取上清液—30 ℃冷冻保存待测。骨髓对照标本以同样方式处理并分组。

1.4　IL-6、TNF-α 含量检测

IL-6、TNF-α 的检测均采用双抗夹心 ELISA 法, 操作按试剂盒说明书进行。

1.5　统计学分析

实验数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 均数之间比较用方差齐性检验, t 检验和 t' 检验。

2　结果

从表 1 中可以看到, MMNC 有自分泌 IL-6 能力。对照组自分泌 IL-6 能力比病人组强。病人 MMNC 加苦参碱与不加苦参碱培养, 其上清液 IL-6 含量无差异。在加药与不加药两组中, 均可以看到, 白血病的分型不同其 IL-6 的含量有差异。AML 分泌 IL-6 较 ALL 高, 差别显著。对照加药与未加药组比较, 上清液 IL-6 含量无差异。这与病人组对苦参碱的反应是一致的。

从表 1 可以看出, MMNC 有自分泌 TNF-α 的能力。对照组分泌 TNF-α 的能力较病人组强。病人 MMNC 加苦参碱培养与不加苦参碱培养, 其上清液 TNF-α 含量无差异。对照组也同。在加药与不加药两组中, 均可以看到, 白血病的分型不同其 TNF-α 的含量无差异。病人未加药组与对照未加药组比较, 后者的 TNF-α 含量明显高于前者。

表 1　苦参碱对孵育 72 h MMNC 自分泌 IL-6、TNF-α 的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Effects of matrine on the autocrine of IL-6 and TNF-α in MMNCs after culture for 72 h($\bar{x}\pm s$)

Group	n	IL-6(pg/ml)	TNF-α(pg/ml)
Leukemia+matrine	19	49.715±39.375	88.468±80.836
ALL+matrine	8	24.695±21.787△	57.258±46.954
AML+matrine	11	64.310±40.588	98.340±95.385
Leukemia	19	53.218±52.428☆	70.999±71.515☆
ALL	8	23.408±16.939#	54.028±43.820
AML	11	70.608±50.463	80.899±71.458
Control+matrine	9	105.790±28.702*	931.443±816.428*
Control	9	113.216±21.608☆☆	807.100±761.915☆

*: $P<0.05$ *vs* leukemia+matrine; △: $P<0.05$ *vs* AML+matrine; ☆: $P<0.05$ *vs* control group; #: $P<0.05$ *vs* AML group

3　讨论

祖国医学在治疗肿瘤、白血病方面积累了丰富的经验。随着中医理论的发展, 中西医诊疗的结合, 对单味中药抗肿瘤有效成分的分析和机制研究成为新的研究方向。中药苦豆子提取物苦参碱具有抗肿瘤作用, 在一定剂量下对白血病细胞有诱导分化和抑制增殖作用已从实验中得到证实[3], 但作用机制尚不完全清楚。文献[3, 4]报道可能是抑制端粒酶活性, 也有研究表明苦参碱影响细胞周期调控蛋白[5], 从而诱导分化白血病细胞。IL-6 能够促进某些白血病细胞的成熟和分化, TNF-α 对白血病细胞有抑制增殖作用。苦参碱对细胞因子水平有何影响, 是否通过细胞因子的作用来诱导分化白血病细胞未见报道。本实验通过病人和对照骨髓单个核细胞体外加入诱导分化剂量的苦参碱共同培养, 结果没有提示对 IL-6 和 TNF-α 分泌有影响。提示苦参碱对白血病细胞的作用可能不是通过影响细胞因子 IL-6 和 TNF-α 来实现的。

本研究结果显示未加苦参碱组对照 MMNC 比病人 MMNC 自分泌 L-6 和 TNF-α 量明显高, 与相关报道相似。而加入苦参碱后, 这一现象并未改变, 提示苦参碱对非白血病细胞自分泌 L-6 和 TNF-α 也无影响。

本研究还显示, 在不同类型的白血病细胞, 自分泌 IL-6、TNF-α 的差异并未因加入苦参碱和未加入苦参碱而有改变, 说明苦参碱不影响 MMNC 分泌 IL-6、TNF-α 这一现象与白血病类型无关。

文献[1]报道槐果碱(苦参碱的异构体)对荷瘤小鼠的免疫功能无明显影响。本实验结果显示对免疫因子 IL-6 和 TNF-α 自分泌无影响, 是否提示苦参碱对白血病免疫功能也无影响, 这待进一步研究。苦参碱在不同浓度对白血病细胞具有诱导分化、凋亡、杀伤作用, 不同浓度的苦参碱对 IL-6、TNF-α 影响是否不同也值得进一步探讨。

参考文献:

[1] 司维柯, 陈　安, 李　鹏, 等. 苦参碱诱导人肝癌细胞系 $HepG_2$ 凋亡的研究[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(7): 816—820.

[2] 何於娟, 蒋纪恺, 张　彦, 等. 苦参碱对 K562 细胞增殖抑制与诱导分化的实验研究[J]. 浙江中西医结合杂志, 2001, 11(4): 219—221.

[3] 张莉萍, 蒋纪恺, 张　彦, 等. 苦参碱对 K562 细胞增殖与分化作用的机制研究[J]. 中华血液学杂志, 1999, 20(6): 315—316.

[4] 李旭芬, 张苏展, 郑　树, 等. 苦参碱对 K562 细胞端粒酶 hTERT—mRNA 表达及其酶活性影响作用的研究[J]. 癌症, 2001, 20(4): 391—393.

[5] 张莉萍, 蒋纪恺, Joe Tam. 细胞周期调控蛋白在 K562 细胞的表达及意义[J]. 中国现代医学杂志, 2001, 11(10): 4—8.

(编辑　陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net