参考文献:

[1] 蒋纬莹. G6PD缺乏患者红细胞膜ATP酶活性的研究[J]. 中国病理生理杂志, 1991, 7(5): 453—456.

[2] 杨义力, 陈思锋. 糖皮质激素对大鼠血清PLA_2能力的抑制[J]. 第二军医大学学报, 1989, 10(1): 29—32.

[3] Herr R D, White G L. Hypothermia: Threat to military operations [J]. Mil Med, 1991, 156(3): 140—144.

[4] 张鸿祺 主编. 灾难医学[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1993. 711—749.

[5] Hesslink R L Jr, Pepper S, Olsen R G, *et al*. Radio frequency (13.56 MHz) energy enhances recovery from mild hypothermia [J]. J Appl Physiol, 1989, 67(3): 1 208—1 212.

[6] Liu M S, Wu L L. Heart sarcolemmal Ca^{2+} transport in endotoxin shock: Ⅱ. Mechanism of impairment in ATP-dependent Ca^{2+} transport[J]. Mol Cell Biochem, 1992, 112(2): 135—142.

[7] Liu M S, Xuan Y T. Mechanism of endotoxin-induced impairment in Na-Ca exchange in canine myocardium[J]. Am J Physiol, 1986, 251(6 Pt 2): R1 078—1 085.

[8] 陆松敏, 郭素清, 刘建仓, 等. 外科理论与实践[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1996. 9—11.

[9] Kummar A, Tota W, Linda D, *et al*. Tumor necrosis factor α and interleukin 1β are responsible for *in vitro* myocardial cell depression induced by human septic shock serum[J]. J Exp Med, 1996, 183(3): 949—958.

(编辑 陈聪连)

文章编号: 1000-5404(2000)05-0451-01

经验与短篇

苦参碱对 HepG$_2$ 细胞系增殖能力的影响

Effect of Matrine on the proliferation of HepG$_2$ cell line

司维柯[1], 张广运[2], 马立强[3], 康格非[4] (第三军医大学: [1] 医学检验系临床检验学教研室, [2] 核医学教研室, [3] 医学检验系95级本科生, 重庆 400038; [4] 重庆医科大学临床生物化学教研室, 重庆 400046)

苦参是传统中药, 广泛应用于临床各科, 特别是它的抗肿瘤活性, 近年来受到极大关注, 我们曾发现苦参提取液可诱导K_{562}细胞向红系和粒系分化[1,2]。研究发现苦参纯成份——苦参碱(Matrine)是抗肿瘤的活性成份[3]。我们以人肝癌细胞株$HepG_2$作为细胞模型, 观察不同浓度苦参碱作用不同时间后, 对该细胞增殖能力的影响。

1 材料与方法

1.1 药物及主要试剂

苦参碱注射液(商品名: 斯巴德康)10 g/L, 5 ml/支, 购自广州明兴制药厂, 批号 980304。RPMI-1640 培养基和胰酶均为GIBCO产品, MTT为Serva产品。H^3-TdR购自上海原子能研究所。

1.2 细胞株及其培养

$HepG_2$细胞株, 由重庆医科大学附二院肝炎研究所提供, 并在含10%小牛血清的RPMI 1640培养中, 37℃, 5%CO_2条件下培养。

1.3 MTT试验

4.6×10^5个/ml的细胞悬液接种于96孔培养板中(100 μl/孔), 加入苦参碱注射液(10 g/L), 使终浓度为0.5、1.5、2.0 g/L, 加RPMI-1640培养液, 补足体积为200 μl。另设空白孔和对照孔, 每浓度均作3个平行孔, 混匀后放入CO_2孵箱中培养。分别于1、2、3、4 d各取出一板, 弃去上清液, 加培养液100 μl, MTT液(5 mg/ml PBS液)10 μl, 于微量振荡器上振摇2 min, 放入CO_2孵箱中培养4 h, 弃上清液, 加二甲亚砜100 μl/孔, 振摇5 min, 于酶标仪上, 人为600 nm下, 空白调零, 测得D_λ值, 计算出细胞存活率%=$D_{实验}/D_{对照}$×100%。

同上操作, 将(0.5~1)×10^5个/ml的细胞悬液接种于96孔培养板中使苦参碱终浓度为0.05~2.5 g/L, 培养3 d, 测D_λ值, 计算出细胞存活率。

1.4 ^{3}H-TdR掺入法

加样方法同上, 并使苦参碱终浓度为0.5、1.0、1.5、2.0 g/L, 培养2 d后, 加入^{3}H-TdR(1.25 μCi/孔), 振荡混匀, 继续培养24 h, 弃去上清液, 加0.25%胰酶消化, 吸去胰酶, 加培养液100 μl, 用微量吸管小心吹打并不时在倒置显微镜下检查, 至制成细胞悬液, 用多头细胞收集仪将细胞抽滤于49型纤维滤膜上, 37℃烘干, 加入固相闪烁液, 脉冲计数仪测定Bq, 计算细胞DNA合成率(%)=$Bq_{实验}/Bq_{对照}$×100%。

1.5 细胞计数

在培养瓶中加样, 加(0.2~1)×10^5个/ml细胞悬液2 ml/瓶,

(下转458页)

作者简介: 司维柯(1958—), 女, 山西省晋城市人, 博士研究生, 讲师, 主要从事肿瘤细胞的发生、发展和消亡方面的研究, 发表论文12篇。电话: (023)68752310

收稿日期: 1999-07-09; 修回日期: 2000-01-07

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

和 IL-6 在信号蛋白水平有共同作用之处; 也可能是改变了其它细胞因子的受体表达, 从而使细胞对其它细胞因子的反应性改变; 或假设 AML 细胞中 IL-6 和 G-CSF 信号传导存在着强烈的调节作用, 使一些其它的信号传导通道"关闭"[4]。

在白血病治疗过程中, 使用造血生长因子(GFs)的趋势有所增加。IL-6 可增加机体的免疫功能, 促进正常骨髓造血, 还可能有抑制白血病原始细胞生长的作用, 与其它 GFs 联合使用时, 使照射后动物外周血白细胞和血小板的恢复比使用单因子时效果好[10]。因此, 深入研究 IL-6 在白血病细胞中的调节作用对白血病的发生和防治有重要意义。

参考文献:

[1] 张纪岩, 任蕴芳, 沈倍奋. 白细胞介素 6 与急性髓系白血病[J]. 国外医学: 输血及血液学分册, 1997, 20(4): 213—215.

[2] 姜道滋, 张茂宏. 白细胞介素-6 与急性髓系白血病相互关系的研究[J]. 国外医学: 输血与血液学分册, 1996, 19(1): 11—13.

[3] 张之南. 血液病诊断及疗效标准[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 171—184.

[4] Koistinen P, Sailyet M, Poroman N, *et al*. Complex effects of interlukin 6 on clonogenic blast cell growth in acute myeloblastic leukemia[J]. Acta Haematol, 1997, 98(1): 14—21.

[5] Sladowski D, Steer S J, Clothier R H, *et al*. An improved MTT assay[J]. J Immunol Methods, 1993, 157(1—2): 203—207.

[6] 杨景山. 医学细胞化学与细胞生物技术[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1990. 26—27, 400—401.

[7] Inoue K, Sugiyama N, Ogawa H, *et al*. Expression of the interleukin-6(IL-6), IL-6 receptor, and gp-130 genes in acute leukemia[J]. Blood, 1994, 84(8): 2 672—2 680.

[8] 赖春宁, 黎 燕, 倪长源, 等. 肿瘤细胞系 IL-6R 与 IL-6R 基因表达的生物学效应[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 1997, 13(4): 17—20.

[9] Lopez M, Maroc N, Kerangueven F, *et al*. Coexpression of the genes for interleukin 6 and its receptor without apparent invovement in the proliferation of acute myeloid leukemia cells[J]. Exp Hematol, 1991, 19(8): 797—803.

[10] 邱丽玲, 孙连生. 白细胞介素 6 促血小板生成的实验及临床研究进展[J]. 实验血液学杂志, 1996, 4(3): 236—241.

(编辑 王 红)

(上接 451 页)

加苦参碱使终浓度为 0.5、0.8、1.0、1.5 g/L, 并加培养液至总体积 4.0 ml。共培养 4 d, 每天取出一瓶, 胰酶消化, 制成细胞悬液, 在改良 Neubauor 型计数板上计数细胞, 每浓度计数 3 次, 取平均结果。

2 结果

2.1 MTT 试验

2.1.1 苦参碱作用时间与肝癌细胞存活率的关系 苦参碱在 0.5、1.0、1.5、2.0 g/L 作用细胞 1~4 d 随作用时间延长, 细胞存活率降低, 到第 4 天, 除 0.5 g/L 外, 其余浓度下的细胞存活率均<50%。

2.1.2 苦参碱剂量与肝癌细胞的关系 苦参碱对肝癌细胞的抑制, 分为几个浓度段: ≤0.2 g/L 时, 存活率≥80%; 0.3~0.6 g/L, 存活率> 50%; 0.7~0.8 g/L, 存活率< 50%, > 30%; 1.0~2.5 g/L, 存活率< 30%。按抗肿瘤药物判断标准, 苦参碱>1.0 g/L, 为抗肝癌细胞敏感的药物浓度。0.7~0.8 g/L 为中度敏感, <0.6 g/L 为不敏感, <0.2 g/L 几乎无抑制作用。

2.2 苦参碱对肝癌细胞 DNA 合成的抑制

在 MTT 试验的基础上, 确定以 0.5、1.0、1.5、2.0 g/L 浓度作用细胞 3 d, 观察 DNA 合成情况。结果: 随药物浓度增加, DNA 合成降低, 大于 1.0 g/L 时, DNA 合成率小于 30%, 表明苦参碱可抑制肝癌细胞 DNA 的合成, 并有剂量依赖性。

2.3 苦参碱对肝癌细胞生长曲线的影响

苦参碱在 0.3、0.5、0.8、1.5 g/L 作用细胞 1~4 d, 细胞总数逐渐减少, 说明苦参碱可抑制肝癌细胞增殖, 并呈时间和剂量依赖性。

3 讨论

本结果表明苦参碱在一定浓度范围能有效抑制肝癌细胞的增殖, 并且抑制作用有时间、剂量依赖性。其中> 1.0 g/L 为有效抑制浓度, < 0.2 g/L 抑制作用很小。我们也研究了苦参碱作用于肝癌细胞 $HepG_2$ 后其形态和超微结构的变化(见另篇报道), 发现苦参碱浓度≥0.3 g/L 时细胞形态开始出现明显变化, 特别是细胞浆内充满圆形、透明、折光强的颗粒, 苏丹 III 染色阳性。电镜观察发现, 细胞浆内有脂肪空泡和扩张的滑面内质网。胞浆有部分溶解并出现自噬体。细胞表面微绒毛减少, 所有这些均说明苦参碱对 $HepG_2$ 细胞有细胞毒作用, 从而干扰细胞代谢, 抑制细胞增殖。

关键词: 苦参碱; 肝癌细胞; 增殖
中图法分类号: R282.07 文献标识码: B

参考文献:

[1] 司维柯, 韩 凤, 秦建平, 等. 苦参提取液诱导 K_{562} 细胞分化的细胞化学观察[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 1997, 6(2): 200—205.

[2] 秦建平, 蒋纪恺, 张 彦, 等. 苦参对 K_{562} 红白血病细胞系的诱导分化作用[J]. 重庆医科大学学报, 1994, 19(2): 151.

[3] Zhang Y, Jiang J K, Liu X S, *et al*. Differentiation and Apoptosis in K_{562} Erythroleukemia cells Induced by Matrine[J]. Natural Medicine, 1998, 52(4): 295—299.

(编辑 王 红)

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