

3 讨论

扑灭津原药 3 项致突变实验表明, 该受试物对 TA97、TA98、TA100 和 TA102 菌株无论在有无代谢活化系统存在的条件下各剂量组回变菌落数均在正常范围内。采用欧洲经合组织 (OECD) 推荐的最新实验方法<sup>[1]</sup>, 以两次给药的方式进行微核实验, 可较好地反映外来化合物可能出现的染色体损伤效应, 其结果亦为阴性。同样, 扑灭津原药也未引起小鼠睾丸初级精母细胞染色体结构畸变率和早熟分离率的增加。上述实验覆盖了体内与体外两种实验方式、微生物与哺乳动物

两种受试对象、基因与染色体两种水平、体细胞与生殖细胞两种不同的细胞, 所有结果均提示扑灭津原药无致突变作用。国外 Kligeman 曾对扑灭津等 3 种除草剂进行细胞遗传学研究, 结果也未见扑灭津有致突变作用<sup>[2]</sup>。

参考文献:

[1] 曹佳, 林真, 余争平, 等. 微核实验——原理、方法及其在人群检测和毒性评价中的应用 [M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2000: 264-272.  
[2] Kligeman A D, Doerr C L, Tennant A H, et al. Cytogenetic studies of three triazine herbicides [J]. Mutat Res. 2000, 471: 107-112.

## 雄黄对白血病 HL-60 细胞的生长抑制及其机制 Growth-inhibitory effect of arsenic sulphide on HL-60 cells and its mechanism

彭军, 郑一瑾, 吴银霞

PENG Jun, ZHENG Yi-jin, WU Yin-xia

(武汉科技大学附属医院四内科, 湖北 武汉 430064)

**摘要:** 以不同浓度 (7.5~60 mmol/L) 的雄黄 (As<sub>4</sub>S<sub>4</sub>) 作用于体外培养 HL-60 细胞 12~48 h, MTT 法检测细胞生长抑制率, 流式细胞仪法观察细胞凋亡率, 免疫组化法检测 bcl-2, 突变型 p53 蛋白表达, 应用 RT-PCR 法检测 HL-60 细胞中突变 p53 mRNA 表达。结果不同浓度的雄黄作用不同时间后, 可显著抑制 HL-60 细胞的生长, 呈时间-剂量依赖性, 并诱导细胞发生凋亡, 凋亡率为 30.18%~70.98% (P<0.01)。雄黄作用 24 h 后, 下调突变型 p53 mRNA 的表达, 且 bcl-2、突变型 p53 蛋白表达逐渐降低, 并呈浓度依赖性。这可能是其重要机制之一。

**关键词:** 雄黄 (As<sub>4</sub>S<sub>4</sub>); 白血病; HL-60 细胞; 基因; 凋亡  
**中图分类号:** O612.5; R733.7 **文献标识码:** B  
**文章编号:** 1002-221X(2007)04-0252-03

近年来国内学者发现雄黄 (As<sub>4</sub>S<sub>4</sub>) 具有抗肿瘤作用, 尤其治疗恶性血液病效果显著<sup>[1~3]</sup>, 已成为抗肿瘤研究的热点之一。研究表明, 某些砷化合物能有效地治疗急性早幼粒细胞白血病, 使肿瘤细胞株凋亡<sup>[4,5]</sup>。本研究旨在观察 As<sub>4</sub>S<sub>4</sub> 对人白血病细胞株 HL-60 细胞的增殖和凋亡及对 bcl-2、突变 p53 基因表达的影响。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 药物

高纯度雄黄 As<sub>4</sub>S<sub>4</sub> 购自 Sigma 公司, 纯度>96%, 溶解于 RPMI-1640 分装备用, 一抗 bcl-2 和 p53 购自晶美公司。

#### 1.2 细胞培养

人白血病细胞株 HL-60 细胞购自上海科学院细胞中心。在含有 10% 的胎牛血清、青霉素 100 U/ml 及链霉素 100 U/ml

的 RPMI-1640 培养基中 37℃、体积分数为 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养。每周换液传代 2 次。

#### 1.3 MTT 比色法

采用 MTT 比色法检测不同浓度 (7.5~60 mmol/L) As<sub>4</sub>S<sub>4</sub> 分别作用于 HL-60 细胞 0、12、24、36、48 h, 另设未加药组作为对照。细胞的生长抑制率 = (1 - 实验组平均 A 值 / 对照组平均 A 值) × 100%。

#### 1.4 流式细胞仪检测细胞凋亡

收集不同浓度 As<sub>4</sub>S<sub>4</sub> 处理 12~48 h 后的 HL-60 细胞, 以 PBS 缓冲液清洗后再将细胞沉淀充分混匀, 用 PBS 缓冲液重悬, 加入 200 mg/L 去 DNA 酶的 RNA 酶, 流式细胞仪分析不同 DNA 含量的细胞分布。应用 ModifiL TL1.00 (MAC) 分析系统进行数据处理, 低于 G<sub>1</sub> 期的细胞 (亚 G<sub>1</sub> 期) 为凋亡细胞, 其占细胞总数的比例为凋亡细胞比例。

#### 1.5 RT-PCR 检测突变 p53mRNA 表达

细胞总 RNA 抽提及 RT-PCR 步骤按 Trizol (GBICO 公司) 试剂盒说明书进行, 所提取的总 RNA 溶解后用紫外分光光度仪测 RNA 纯度和浓度 (A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>>1.8)。在 Genebank 检索基因 cDNA 序列, 自行设计 PCR 引物, 由上海生物工程公司合成。p53 引物序列 (上游引物: 5'-TCTGTGACTTGACCGTACTC-3', 下游引物: 5'-CACGGATCTGAAGGGTGAAA-3', 扩增产物为 349bp, β-actin 上游引物: 5'-ACCACCATGTACCCAGGCAT-3', 下游引物: 5'-CTCTCTTTGCACTCCCTGGGG-3', 扩增产物 150bp。PCR 扩增条件为 95℃、5 min, 72℃、1 min, 94℃、1 min, 5℃、1 min, 72℃、7 min by 36 循环。产物用 1% 的琼脂糖胶进行检测。用数码凝胶图像分析系统 (Kodak EDAS290) 作条带密度扫描, 结果以目的条带与对应的 β-actin 密度值表示。

#### 1.6 bcl-2、突变型 p53 蛋白水平检测

采用免疫组化法检测 bcl-2、突变型 p53 蛋白的表达, 用不同浓度的 As<sub>4</sub>S<sub>4</sub> 处理 HL-60 细胞 24 h 后丙酮固定, 正常血清

收稿日期: 2006-08-03; 修回日期: 2006-10-10  
作者简介: 彭军 (1963-), 女, 硕士, 副主任医师。

封闭后分别加入鼠抗人 (bc1-2、p53) 单克隆抗体 (均购自晶美公司), 随后加入生物素山羊抗小鼠抗体及 SABC 液, 经 DAB 显色, 以 PBS 代替一抗作为阴性对照, 结果光学显微镜下, bc1-2、突变型 p53 蛋白表达阳性细胞的胞浆和胞核内呈现特异性棕褐色。阳性表达率 = (500 个细胞内阳性细胞数 / 500) × 100%。

### 1.7 统计分析

采用方差分析和 *t* 检验, SPSS11.5 统计软件进行分析。

## 2 结果

### 2.1 细胞生长抑制率的测定

不同浓度 As<sub>4</sub>S<sub>4</sub> 作用于 12~48 h 后, 以时间剂量依赖性方式抑制 HL-60 细胞增殖, 与对照组相比细胞增殖抑制率为 36.05%~80.36%, As<sub>4</sub>S<sub>4</sub> 30~60 mmol/L 处理 48 h 后, 不同时间各浓度组之间差异有统计学意义 (*P* < 0.01), 见图 1。

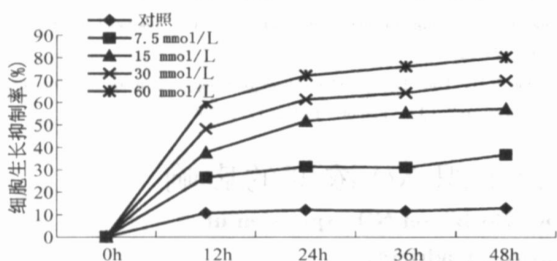


图 1 不同浓度 As<sub>4</sub>S<sub>4</sub> 对 HL-60 细胞生长抑制率的影响

### 2.2 HL-60 细胞凋亡率的变化

As<sub>4</sub>S<sub>4</sub> 30 mmol/L 时能够诱导细胞凋亡, 作用时间延长至 36~48 h, 其凋亡率超过 50% (见图 2)。

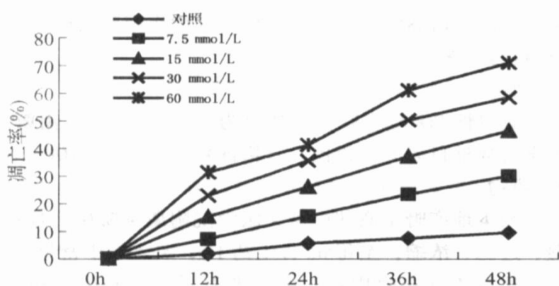


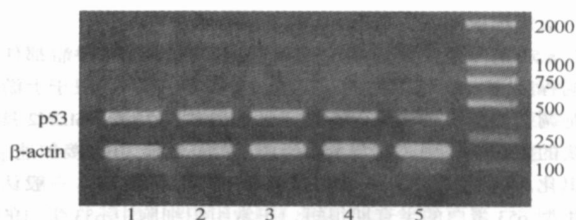
图 2 As<sub>4</sub>S<sub>4</sub> 对 HL-60 细胞凋亡率的影响

### 2.3 As<sub>4</sub>S<sub>4</sub> 对 HL-60 细胞突变 p53 mRNA 表达的影响

根据所测结果, 其 mRNA β-actin 吸光度 *A* 值与每一组 p53 的吸光度 *A* 值相比, As<sub>4</sub>S<sub>4</sub> 7.5~15 mmol/L 组与对照组之间差异无统计学意义 (*P* > 0.05), 但与 30~60 mmol/L 组相比, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05), 见图 3, 4。

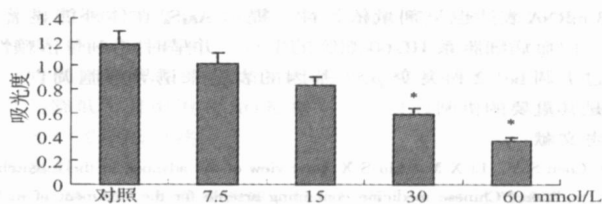
### 2.4 As<sub>4</sub>S<sub>4</sub> 对 bc1-2、突变型 p53 免疫组化蛋白表达的影响

不同浓度 As<sub>4</sub>S<sub>4</sub> 作用 24 h 后, 细胞爬片上 HL-60 细胞 bc1-2、突变 p53 蛋白表达下调, 并呈浓度依赖性, 各浓度组表达率与对照组比较差异均有统计学意义 (*P* < 0.01), 见表 1。



1—对照, 2—7.5mmol/L, 3—15mmol/L, 4—30mmol/L, 5—60mmol/L

图 3 RT-PCR 法检测 HL-60 细胞中突变 p53 mRNA 的表达



与对照比较, \**P* < 0.01

图 4 As<sub>4</sub>S<sub>4</sub> 对 HL-60 细胞 p53 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm sd$ , *n* = 3)

表 1 不同浓度 As<sub>4</sub>S<sub>4</sub> 对细胞 bc1-2、突变 p53 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	bc1-2	p53
对照组	5	145.71 ± 2.53	96.46 ± 3.58
As <sub>4</sub> S <sub>4</sub> 7.5mmol/L 组	5	124.14 ± 1.85*	79.61 ± 4.02*
As <sub>4</sub> S <sub>4</sub> 15mmol/L 组	5	98.54 ± 2.33*	64.70 ± 1.75*
As <sub>4</sub> S <sub>4</sub> 30mmol/L 组	5	71.21 ± 1.50*	51.61 ± 3.76*
As <sub>4</sub> S <sub>4</sub> 60mmol/L 组	5	45.79 ± 3.69*	35.06 ± 1.42*

与对照组比较, \**P* < 0.01

## 3 讨论

白血病细胞恶性增殖的生物学特征与白血病细胞的凋亡减少有关, 近年来随着对细胞凋亡研究的深入, 人们逐渐认识到诱导细胞凋亡是治疗肿瘤疾病的一种有效的方法和手段。含砷中药诱导急性早幼粒细胞白血病细胞凋亡的成功, 使其治疗范围逐渐从少数白血病向其他白血病及实体肿瘤扩展。目前含砷化物的雄黄也正为人们所重视, 有关雄黄诱导 APL 细胞凋亡及机制的研究已有报道<sup>[6,7]</sup>。本研究探讨了 bc1-2、突变型 p53 这两个与细胞凋亡信号传导基因有关的关键分子是否参与诱导凋亡作用。

bc1-2 基因是最早发现的细胞凋亡抑制基因, 其编码的蛋白质能抑制由多种化学及 γ-射线等引起的细胞凋亡, 延长细胞寿命, 增加细胞对多种凋亡诱导刺激因素的抗体, 但并不影响细胞的分裂与增殖。降低 bc1-2 基因表达, 可诱导细胞凋亡。已有实验证明 bc1-2 表达失调在某些白血病和淋巴瘤的发病中起重要作用<sup>[8]</sup>。本实验免疫组化结果显示, 不同浓度的 As<sub>4</sub>S<sub>4</sub> 处理 HL-60 细胞后, bc1-2 蛋白表达水平呈剂量依赖性下降, 使处理后的 HL-60 细胞呈程序性死亡<sup>[9,10]</sup>。说明 As<sub>4</sub>S<sub>4</sub> 诱

导白血病细胞的凋亡与 bcl-2 的下调有关。

p53 基因是重要的肿瘤抑制基因, 许多人类肿瘤都伴有不同程度的 p53 基因突变。突变的 p53 基因, 局限于上游的细胞凋亡调节中心, 从而有助于恶性肿瘤的发展, MDM2 具有重要的生物学作用, 它与 p53 蛋白连结, 因此可直接加速 p53 的退化。突变的 p53 基因能抑制 p53 的生化作用。一般认为野生型 p53 蛋白的半衰期很短, 正常组织细胞中 p53 蛋白的水平很低, 免疫组化技术检测不到。突变型 p53 蛋白不仅稳定性增加, 半生期延长, 并于核内积聚, 免疫组化技术可以检测到<sup>[10]</sup>。本研究结果表明, 以不同浓度的 As<sub>4</sub>S<sub>4</sub> 处理细胞后, 突变型 p53 蛋白表达水平呈剂量依赖性降低, 而且 As<sub>4</sub>S<sub>4</sub> 下调 p53 mRNA 表达也呈剂量依赖性。提示 As<sub>4</sub>S<sub>4</sub> 在体外能显著抑制人白血病细胞系 HL-60 细胞的生长, 并呈时间-剂量依赖性, 通过下调 bcl-2 和突变 p53 基因的表达来诱导细胞凋亡, 可能是其重要的机制。

参考文献:

[1] Chen S Y, Li X M, Liu S X. Over view of the advance in the research of traditional Chinese medicine containing arsenic for the treatment of malignant hematologic disease[J]. Chinese Materi a Magazine, 2000, 25(8):454.

[2] Wang Z Y. Arsenic compound as anticancer agents [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2001, 48 (Suppl1): 572-576.  
[3] Chen Z, Chen G Q, Shen Z X, et al. Treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic compounds: In vitro and in vivo studies [J]. Semin Hematol, 2001, 38 (1): 26-36.  
[4] 王振义. 开展砷剂治疗白血病的临床和机制研究 [J]. 中华血液学杂志, 1996, 17: 57.  
[5] 蔡洪培, 邓志华, 李石, 等. 三氧化二砷治疗急性早幼粒细胞白血病的机制研究 [J]. 白血病, 1996, 5 (3): 131.  
[6] 刘延方, 江滨, 陆道培. 硫化砷诱导 NB4 细胞凋亡及细胞周期阻滞的研究 [J]. 中华血液学杂志, 2000, 21 (12): 647-648.  
[7] 钟璐, 陈芳源, 韩洁英, 等. 雄黄对 NB4 和 HL-60 细胞形态、PML mRNA 及蛋白的表达影响 [J]. 中国实验血液学杂志, 2001, 9(3):223-227.  
[8] 潘炳力, 徐凌云, 杨祥良. 雄黄抗肿瘤作用研究进展 [J]. 中药材, 2004, 27 (3): 226-228.  
[9] De Maria R, Testi R. Fas2FasL interactions: a common patho-genetic mechanism in organspecific auto immunity [J]. Immunol Today, 1998, 19: 121-125.  
[10] Hau P H, Lane D P. p53 in tumor pathology. Can we trust immunohistochemistry? [J]. Pathol, 1994, 172: 1-4.

# 商陆对阿霉素所致肾损伤大鼠肾组织 NO 浓度的影响

## Effect of a Chinese herb “*Phytolacca Acinosa* Roxb” on NO expression in damaged renal tissues of rats caused by adriamycin

庞军<sup>1</sup>, 张克非<sup>2\*</sup>, 余伍中<sup>2</sup>, 王宏<sup>2</sup>, 李明<sup>2</sup>, 李辉<sup>2</sup>, 王颖<sup>2</sup>

PANG Jun<sup>1</sup>, ZHANG Ke-fei<sup>2\*</sup>, YU Wu-zhong<sup>2</sup>, WANG Hong<sup>2</sup>, LI Ning<sup>2</sup>, LI Hui<sup>2</sup>, WANG Ying<sup>2</sup>

(1. 宁波大学医学院附属阳明医院肾内科, 浙江 余姚 315400; 2. 遵义医学院附属珠海医院肾内科, 广东 珠海 519100)

**摘要:** 以商陆粗提物及强的松喂饲阿霉素所致肾损害大鼠, 观察两者对肾损伤大鼠肾组织一氧化氮(NO)与尿蛋白的影响。结果商陆粗提物可以减少阿霉素所致肾损害大鼠尿蛋白的排泄, 可能与其降低肾组织内 NO 浓度有关。

**关键词:** 商陆; 阿霉素; 肾; 一氧化氮(NO)

**中图分类号:** R692.5 **文献标识码:** B

**文章编号:** 1002-221X(2007)04-0254-02

现代药理学发现, 商陆含有商陆碱、多量硝酸钾、皂苷、商陆多糖、植物致丝裂素、脂溶性成分(棕榈酸、十四酯)等, 商陆皂苷甲具有很强的抗炎作用<sup>[1,2]</sup>。阿霉素(ADR)肾病模型以水肿、大量蛋白尿、低蛋白血症、高脂血症为特点, 其发病机理与氧自由基(OFR)产生、脂质过氧化物(LPO)形成, 对肾小球和上皮细胞产生毒性, 肾小球滤过膜电荷屏障缺损, 对分子缺乏控制, 使肾小球滤过膜通透性改变和肾小管重吸收障碍有关<sup>[3]</sup>。为了观察商陆与 NO 自由基的内在关

系, 本实验观察商陆对阿霉素肾病大鼠肾组织匀浆中 NO 浓度的影响, 以探讨商陆对肾损伤大鼠的保护作用及其机制。

### 1 材料与方法

#### 1.1 动物

健康雄性 SD 大鼠 32 只, 体重为 (300±20) g, 由第三军医大学野战外科研究所提供。合格证号: SCK 渝 200203。

#### 1.2 药物

贵州本地野生商陆由遵义医学院附属医院中药局提供。水煎、过滤、浓缩, 至每 ml 含生药 1 g, 装入瓶中密封, 冷藏保存。阿霉素(造模用药)由深圳万乐药业有限公司生产, 每支 10 mg, 批号: 0411E1。

#### 1.3 分组与动物处理

大鼠适应性饲养 1 周后, 分别置于代谢笼里取尿, 测定尿蛋白, 结果均为阴性。将 32 只大鼠随机分为 5 组, 即正常对照组(6 只)、商陆对照组(6 只, 未造模喂饲商陆)、阿霉素组(6 只)、阿霉素+商陆组(7 只)、阿霉素+激素组(7 只)。各组按照参考文献[4]方法建立模型。

#### 1.4 治疗

在第 2 次注射 ADR 后的次日, 开始灌胃给药, 商陆各组喂予商陆提取物 4 ml·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> (相当于商陆生药 4 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), 1 次灌入, 连续 2 周; 阿霉素+激素组给予强的松悬液

收稿日期: 2006-11-01; 修回日期: 2007-01-10

作者简介: 庞军(1970-), 男, 硕士, 主治医师, 主要从事肾脏病的临床及基础理论研究。

\* 通讯作者, 教授, 硕士生导师, E-mail: zkfzy@126.com