

·论著·

苦参碱对急性淋巴细胞性白血病细胞 Bcl22 表达的影响

覃遵科¹,殷小成²

(11 张家界市人民医院,湖南 张家界 427000; 21 南华大学附一医院,湖南 衡阳 421001)

[摘要] 目的 苦参碱是苦参的主要成分,具有抗 K562 细胞、HL260 细胞增殖的作用。本文主要探讨苦参碱抗儿童急性淋巴细胞白血病(ALL)细胞增殖作用及可能机制。方法 MTT 法检测苦参碱对 ALL 细胞的生长抑制作用,流式细胞仪(FCM)检测苦参碱对 ALL 细胞 Bcl22 表达的影响。结果 0.1 mg/ml ~ 1.0 mg/ml 浓度的苦参碱对 ALL 细胞的增殖有抑制作用。培养 48 h 后,与未处理组相比,其 OD 值(MTT 法)由 0.84 ± 0.27 分别降低为 0.1 mg/ml 时的 0.73 ± 0.16 , 0.2 mg/ml 时的 0.58 ± 0.15 , 0.5 mg/ml 时的 0.32 ± 0.16 , 1.0 mg/ml 时的 0.24 ± 0.14 , 差异有显著性。苦参碱可下调 ALL 细胞 Bcl22 的表达,培养 48 h 后, Bcl22 阳性率由 $(25.0 \pm 5.8) \%$ 降低至 0.1 mg/ml 时的 $(21.3 \pm 6.1) \%$, 0.2 mg/ml 时的 $(18.2 \pm 3.7) \%$, 0.5 mg/ml 时的 $(14.5 \pm 4.0) \%$, 1.0 mg/ml 时的 $(10.0 \pm 3.2) \%$ 。与对照组相比差异有显著性。结论 苦参碱具有抗 ALL 细胞的增殖作用,其可能机制可能与其下调 ALL 细胞 Bcl22 的表达有关。
[中国当代儿科杂志, 2004, 6(6): 497 - 499]

[关键词] 苦参碱;急性淋巴细胞白血病;Bcl22;儿童

[中图分类号] R725.5;R733.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008 - 8830(2004)06 - 0497 - 03

The effect of matrine on Bcl22 expression in acute lymphoblastic leukemia cells

Zun2Ke QIN, Xiao2Cheng YIN. The People's Hospital of Zhangjiajie, Zhangjiajie, Hunan 427000, China (Email: qinzunke@126.com)

Abstract : Objective Matrine, a main ingredient of sophora, can inhibit the proliferation of many tumor cells such as K562 and HL260. This study was designed to investigate the effect of matrine on acute lymphoblastic leukemia (ALL) cells and its possible mechanisms. **Methods** The samples were obtained from 24 children with initial ALL. The ALL cells were cocultured with matrine. The inhibition effect of the proliferation of ALL cells was detected by the MTT assay. A flow cytometer (FCM) was used to detect the expression of Bcl22 in ALL cells. **Results** Compared with the controls without matrine treatment (0.84 ± 0.27), the OD values (reflecting the survival cell amount) were reduced significantly after 48 hrs of different concentrations of matrine incubation (0.73 ± 0.16 at 0.1 mg/ml, 0.58 ± 0.15 at 0.2 mg/ml, 0.32 ± 0.16 at 0.5 mg/ml, and 0.24 ± 0.14 at 1.0 mg/ml). The positive rate of Bcl22 protein was downregulated significantly from $(25.0 \pm 5.8) \%$ in the untreated controls to $(21.3 \pm 6.1) \%$ in the cells treated with 0.1 mg/ml matrine, and $(18.2 \pm 3.7) \%$ for 0.2 mg/ml, $(14.5 \pm 4.0) \%$ for 0.5 mg/ml and $(10.0 \pm 3.2) \%$ for 1.0 mg/ml at 48 hrs of incubation. **Conclusions** Matrine can inhibit the proliferation of ALL cells, and the possible mechanism may be associated with the downregulated Bcl22 expression in ALL cells.

[Chin J Contemp Pediatr, 2004, 6(6): 497 - 499]

Key words: Matrine; Acute lymphoblastic leukemia; Bcl22; Child

苦参是我国传统的常用中成药,其主要生物碱之一苦参碱,具有抑制肿瘤细胞生长、抗风湿、抗感

染、升高白细胞数等功能。国内研究发现苦参煎液对人早幼粒白血病细胞有诱导分化作用^[1];近几年

[收稿日期] 2004 - 02 - 17; [修回日期] 2004 - 08 - 17
[基金项目] 湖南省卫生厅项目基金课题(编号 2001 - Y - 90)。
[作者简介] 覃遵科(1958 -),男,大学,副主任医师,副院长。主攻方向:小儿血液病。
[通讯作者] 覃遵科,张家界市人民医院,邮编:410005。

来,有人研究了苦参碱对 K562 细胞诱导分化作用、苦参抗人急性髓系白血病 HL260 细胞作用^[2~4]。本研究观察了苦参碱对急性淋巴细胞性白血病细胞的生长抑制作用及其对淋巴细胞性白血病细胞 Bcl2 表达的影响,旨在探讨其抗急性淋巴细胞性白血病作用及可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

苦参碱购自中国药品生物制品检定所(纯度 > 99 %);RPMI- 1640 培养液购自 Gibco BRL 公司;鼠抗人 Bcl22 单克隆抗体,羊抗鼠 IgG(第二抗体)购自北京中山生物技术公司。

1.2 病例选择

选取 2002 年 5 月~2003 年 10 月在中南大学湘雅医院和南华大学附一医院儿科门诊或住院的初治 ALL 患儿 24 例。男 14 例,女 10 例;年龄 3 个月至 14 岁,中位年龄为 6 岁 6 个月。根据 FAB 标准,24 例患儿中 L₁ 8 例,L₂ 14 例,L₃ 2 例。化疗前抽取肝素抗凝的骨髓液 2~3 ml。

1.3 方法

1.3.1 白血病患者骨髓单个核细胞悬液制备及培养 肝素抗凝的骨髓液 2~3 ml,用淋巴细胞分离液常规分离单个核细胞,用含 20 %胎牛血清的 RPMI21640 培养液调整单个核细胞数为 2 × 10⁶ ml⁻¹,加入苦参碱使其终浓度为 0.1、0.2、0.5 mg/ml、1.0 mg/ml,对照组加入等量 RPMI21640 培养液,在 37 ℃,5 % CO₂ 共同孵育。

1.3.2 苦参碱对 ALL 细胞作用的形态学方法检测 体外培养的白血病细胞经姬姆萨染色和苏木精染色后油镜下观察。

1.3.3 MTT 法检测苦参碱对 ALL 细胞的生长抑制作用 取上述培养体系分别孵育 24 h、48 h、72 h 的细胞悬液,每孔加 MTT(1 μg/ml),继续培养 4 h,平板离心机离心,弃上清液,可见 MTT formazan 蓝色结晶,二甲亚砜中止反应,ELISA 比色仪测定 570 nm 处吸光度(OD 值),以 OD 值间接反应存活细胞数量。

1.3.4 流式细胞仪(FCM)检测苦参碱对 ALL 细胞 Bcl22 表达的影响 选择不同浓度下苦参碱作用 ALL 细胞 48 h 后 ALL 细胞 Bcl22 基因表达蛋白阳性率。苦参碱作用后的 ALL 细胞悬液离心、PBS 液洗、70 %乙醇固定后,分别加第一抗体和加第二抗体,进行细胞免疫荧光染色后,进行流式细胞仪检测,计算阳性细胞百分率及荧光指数(fluorescence index, FI),软件分析结果。

1.4 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 和 *F* 检验,以 *P* < 0.05 示有显著性差异,统计分析采用 SPSS 10.0 软件。

2 结果

2.1 形态学表现

光镜下细胞凋亡的形态学改变主要是染色质凝固、核固缩断裂、细胞浆浓缩,但细胞膜保持完整。多数白血病细胞可见细胞凋亡的形态学改变,以苦参碱 0.5 mg/ml 浓度下作用 ALL 细胞明显,但苦参碱 1.0 mg/ml 浓度下作用 48 h 后可见以细胞坏死为主的表现。

2.2 MTT 增殖检测结果

各浓度组苦参碱对 ALL 细胞的增殖有较强的抑制作用,与未处理组相比有显著性差异(*P* < 0.05),且呈现一定的浓度和时间依赖性。见表 1。

表 1 苦参碱对 ALL 细胞增殖的影响
Table 1 Effects of matrine on ALL cells proliferation (n = 24)

	24 h	48 h	72 h
未处理组	0.55 ± 0.24	0.84 ± 0.27 ^a	1.21 ± 0.16 ^b
0.1 mg/ml	0.45 ± 0.21 ^c	0.73 ± 0.16 ^{a,c}	1.01 ± 0.09 ^{b,c}
0.2 mg/ml	0.34 ± 0.14 ^c	0.58 ± 0.15 ^{a,c}	0.82 ± 0.12 ^{b,c}
0.5 mg/ml	0.21 ± 0.13 ^d	0.32 ± 0.16 ^{a,d}	0.584 ± 0.12 ^{b,d}
1.0 mg/ml	0.16 ± 0.13 ^d	0.24 ± 0.14 ^{a,d}	0.16 ± 0.06 ^{b,d}
<i>F</i>	5.73	26.12	12.76
<i>P</i>	< 0.01	< 0.01	< 0.01

注:与同组别 24 h 比较,a *P* < 0.05,b *P* < 0.01;与同时点未处理组比较,c *P* < 0.05,d *P* < 0.01

2.3 流式细胞仪 (FCM) 检测苦参碱对 ALL 细胞 Bcl22 表达的结果

不同浓度苦参碱处理 ALL 细胞 2 d 后 ,Bcl22 蛋白阳性率呈明显的下降趋势 ,由未处理组的 25.0 %

± 5.8 % 下调至 1.0 mg/ml 组的 10 % ± 3.2 % , 0.1 mg/ml ~ 1.0 mg/ml 浓度下 ,各组 Bcl22 阳性率与未处理组 Bcl22 阳性率比较差别有显著性。见表 2。

表 2 苦参碱对 Bcl22 蛋白表达阳性率的影响

Table 2 Effects of matrine on the positive rate of Bcl22 expression in ALL cells (n = 16)					
苦参碱浓度 (mg/ml)	0 (未处理组)	0.1	0.2	0.5	1.0
Bcl22 阳性率 (%)	25.0 ± 5.8	21.3 ± 6.1 ^a	18.2 ± 3.7 ^a	14.5 ± 4.0 ^a	10.0 ± 3.2 ^b

注 : a 表示与未处理组相比 P < 0.05 ; b 表示与未处理组相比 P < 0.01

3 讨论

苦参是我国传统的常用中医药 ,苦参碱是其主要的生物碱之一 ,已能提取和纯化 ,具有抑制肿瘤生长、抗感染等多种功能。白血病是一种常见的肿瘤性疾病 ,ALL 是白血病中常见一种类型 ,在小儿尤其多见。目前主要采用化疗和骨髓移植 ,费用昂贵 ,且化疗副作用大 ,开发中药治疗是治疗白血病的一个方向。

本结果发现苦参碱对 ALL 细胞的增殖有抑制作用 ,苦参碱在相对低浓度下 (0.1 ~ 0.5 mg/ml) 对 ALL 细胞有诱导凋亡作用 ,但相对高浓度时的 (1 mg/ml) 可见以细胞坏死为主的表现。现已证明 ,细胞凋亡调控蛋白与白血病发生、发展有密切关系。近年研究表明 Bcl22 参与了细胞诱导、分化、凋亡的调控 ,它与淋巴细胞的发育密切相关 ,在对淋巴细胞白血病的研究中发现 Bcl22 在急性淋巴细胞性白血病中表达明显高于正常人^[5]。Bcl22 过度表达则使淋巴细胞寿命延长 ,淋巴细胞凋亡减少 ,数量增多 ,且提供产生继发性基因改变的机会 ,使淋巴细胞恶变。在苦参碱胃腺癌细胞 SGC27901 Bcl22 表达的影响研究中 ,发现苦参碱对胃腺癌细胞 SGC27901 有凋亡诱导作用 ,且与降低 SGC27901 细胞 Bcl22 表

达有关^[6]。本研究发现一定浓度苦参碱作用 ALL 细胞可引起生长抑制 ,具有一定的凋亡诱导作用。流式细胞仪检测发现苦参碱作用后的 ALL 细胞 Bcl22 阳性率呈明显的下降趋势 ,苦参碱可下调 ALL 细胞 Bcl22 表达 ,推测苦参碱对 ALL 细胞生长抑制作用可能与其下调 ALL 细胞 Bcl22 基因表达有关 ,进一步研究其机制 ,开发并把苦参碱应用于临床将具有重要意义。

[参 考 文 献]

[1] 徐建国,马俊荣,杨贵生,任连生,郭亚东,张鸿翔 1 苦参煎液对人早幼粒白血病细胞的诱导分化研究 [J] 1 中国中药杂志, 1990, 15(10): 49 - 50.

[2] 张彦,蒋纪恺,刘小珊,刘百忠,许湘儒,何渝军,等 1 苦参碱诱导 K562 白血病细胞分化和凋亡的实验研究 [J] 1 癌症,2000, 19(8): 756 - 758.

[3] 张莉萍,蒋纪恺,谭荣安,刘小珊,张彦,许湘儒,等 1 苦参碱对 K562 细胞株端粒酶活性和细胞周期的影响 [J] 1 中华肿瘤杂志,1998, 20(5): 328 - 329.

[4] 谭孟群,罗志勇,王绮如,蒋德昭 1 苦参抗白血病作用及其机制 [J] 1 湖南医科大学学报,2000, 25(5): 443 - 445.

[5] Schattner EJ. Apoptosis in lymphocytic leukemia and lymphomas [J]. Cancer Invest, 2002, 25(5): 737 - 748.

[6] 张百江,岳红方,李新民 1 苦参碱对胃腺癌细胞 SGC27901 Bcl22 表达的影响 [J] 1 中国肿瘤临床与康复,2000, 7(3): 34 - 35.

(本文编辑:钟乐)