

· 实验研究 ·

槐耳浸膏对骨髓瘤细胞株 PRM I₄₂₂₆ 细胞的影响

钱红兰 汤丽苑 孙 岚 陈 怡 梁 彬 叶海格

温州医学院附属第一医院血液科 温州 325000

摘 要 目的:探讨槐耳浸膏(金克)对骨髓瘤细胞细胞株 PRM I₄₂₂₆细胞增殖和凋亡的影响。方法:体外培养 PRM I₄₂₂₆细胞与 1.5、3、5mg/ml 的不同浓度槐耳浸膏共孵育,分别在 24、36和 72小时时,用 CCK-8法检测细胞增殖抑制率,流式细胞术(FCM)检测早期细胞凋亡情况。结果:槐耳浸膏可抑制 PRM I₄₂₂₆细胞增殖,不同浓度的槐耳浸膏对多发性骨髓瘤细胞增殖的抑制效果不同,以 5mg/ml 时抑制增殖效果最好。且浓度为 5.0mg/ml 的槐耳浸膏诱导多发性骨髓瘤细胞 48小时抑制率达到高峰 84%。FCM 检测表明,槐耳浸膏可诱导 PRM I₄₂₂₆细胞早期凋亡,浓度为 5.0mg/ml 槐耳浸膏对 PRM I₄₂₂₆细胞处理 48小时引起 25.9%的凋亡率。这两种作用均随槐耳浸膏浓度和作用时间的延长而增强。结论:槐耳浸膏可在体外抑制 PRM I₄₂₂₆细胞增殖,并促进其凋亡。

关键词 多发性骨髓瘤 槐耳浸膏 细胞增殖 细胞凋亡

多发性骨髓瘤是影响人类健康的恶性肿瘤之一。由于对化疗药物易产生耐药性,故疗效并不理想。槐耳浸膏(金克)作为一种传统的抗癌中药,目前已有其成品(金克 R—槐耳颗粒,国家一类新药)运用于临床,对肝癌、肺癌、食管癌、胃癌、淋巴瘤等均有独特疗效。为进一步探讨其抗癌机制,本实验以多发性骨髓瘤细胞株 PRM I₄₂₂₆细胞为研究对象,观察槐耳浸膏对 PRM I₄₂₂₆细胞增殖及凋亡的影响,为临床应用槐耳治疗多发性骨髓瘤细胞提供理论依据。

1 实验材料

药物与试剂:槐耳浸膏(由江苏盖天力药业有限公司提供);CellCountingKit-8试剂(日本同仁化学研究所);FITC-Annexin-V 试剂(Bender Medsystems公司);PRM I1640培养基(美国 GBCO公司);胎牛血清(天津市正江高科技有限公司)。细胞:多发性骨髓瘤细胞株 PRM I₄₂₂₆(由浙医大惠赠)。
仪器和器材:FACSC caliber流式细胞仪(美国 B. D 公司);台式高速离心机,恒温水浴箱,低温冰箱,高压灭菌锅,磁力震荡器,微量加样器,恒温 CO₂ 培养箱,超滤除菌器(Millipore);超净工作台,高温烤箱,超低温冰箱,移液器,96孔、24孔培养板若干,酶标仪(Bio-tek Instruments ELX800)。

2 实验方法

2.1 药品制备 精确称取槐耳浸膏 1000mg,将其溶解于 100ml PRM I1640培养基,以 0.22um 超滤除菌器过滤除菌,制备成 10mg/ml 的 PRM I1640 浓缩含药培养液,实验时稀释成不同浓度备用。

2.2 细胞培养 多发性骨髓瘤细胞株 PRM I₄₂₂₆细胞用常规方法培养。培养条件:加 1%青霉素、1%链霉素、10%小牛血清的 PRM I-1640 培养液,相对湿度 94%,5% CO₂,37℃。细胞每隔 48~72小时换液 1次,细胞浓度 2×10⁵/ml 时常规传代培养。

2.3 CCK-8法检测细胞增殖活性 实验按 CCK-8 试剂盒说明书操作。主要包括:取对数生长期细胞,将每孔 6×10³个 PRM I₄₂₂₆细胞接种于 96孔培养板中,24小时后于 96孔培养板分别加入 0、1.5、3、5mg/ml 的槐耳浸膏,每组 6复孔,继续培养 24小时、36小时、48小时后,每孔加入 CCK-8 溶液 10μl,微振荡后 37℃ 继续孵育 1~2小时,酶标仪测 OD450nm 值。生长抑制率计算公式:生长抑制率(%)=(1-实验组平均吸光度/细胞对照组平均吸光度)×100%。

2.4 流式细胞术检测 AnnexinV(细胞凋亡) AnnexinV/PI 方法检测细胞凋亡,检测方法参照试剂盒说明书进行。设立 1个对照组和 3个药物浓度组,每组浓度分别为 0、1.5、3、5mg/mL。不同浓度药液与 PRM I₄₂₂₆细胞共同培养 48小时,每组收集 1×10⁶个细胞;将细胞悬于 binding buffer 液中,其中 binding buffer 是以 1:4 稀释(50mL buffer + 150mL 蒸馏水),在稀释的 buffer 重悬细胞,并调整细胞流式细胞仪 Annexin V/PI 法检测细胞感染浓度 2×10⁵/mL,取 195μL 细胞悬液加入 5μL BV-Hc3 上机检测在 24小时、36小时、48小时的凋亡百分率。

2.5 统计学方法 采用 SPSS 11.0 软件。所有数据

以 ($\bar{x} \pm s$)表示。组内比较采用单因素方差分析和 *t* 检验。组间比较采用双因素可重复数据方差分析。

3 结果

3.1 PRM I₆₂₂₆细胞增殖抑制情况 槐耳浸膏对 PRM I₆₂₂₆细胞的增殖具有明显的抑制作用。5.0、3.0、1.5mg/ml槐耳浸膏对 PRM I₆₂₂₆细胞作用 48小时时生长的抑制率分别为 84.3%、67.9%、25.8%。体外细胞毒实验显示槐耳浸膏高浓度组(5.0mg/ml)对 PRM I₆₂₂₆细胞生长的抑制率达 84%以上。随着槐耳浸膏浓度的增加和作用时间的延长,其对 PRM I₆₂₂₆细胞的增殖抑制率逐渐增高,且呈时间剂量效应,见表 1。

表 1 槐耳浸膏对 PRM I₆₂₂₆细胞的增殖抑制作用 ($\bar{x} \pm s$) %

槐耳浸膏浓度 / (mg/ml)	24小时	36小时	48小时
1.5	-18.6 ± 2.54	27.2 ± 0.71	25.8 ± 0.62
3.0	-20.1 ± 2.22	49.0 ± 0.64**	67.9 ± 0.58**
5.0	-28.8 ± 2.46	59.4 ± 0.46**	84.3 ± 0.35**

与 36小时同一浓度比较, *P* < 0.01; 与 1.5mg/ml浓度比较, ** *P* < 0.01

3.2 PRM I₆₂₂₆细胞凋亡情况 AnnexinV-FITC / PI双染色后经流式细胞仪行细胞凋亡计数。PRM I₆₂₂₆细胞经 1.5~5.0mg/ml槐耳浸膏作用 24~48小时。细胞凋亡结果显示,1.5~5.0mg/ml槐耳浸膏在一定时间范围内,诱导 PRM I₆₂₂₆细胞的作用随药物浓度及作用时间的增加而增强,呈明显的时间浓度依赖性。除 24小时外,同一浓度不同作用时间比较及同一时间不同浓度比较,差异均有显著性意义,见表 2。

表 2 槐耳浸膏对 PRM I₆₂₂₆细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$) %

槐耳浸膏浓度 / (mg/ml)	24小时	36小时	48小时
1.5	1.03 ± 0.01	0.72 ± 0.10	2.67 ± 1.21
3.0	1.43 ± 0.11	4.28 ± 0.64	10.13 ± 2.61
5.0	1.51 ± 0.41	14.47 ± 0.46	22.59 ± 2.69

与 36小时不同浓度比较, *P* < 0.01

(上接第 397页)积极控制血压、调理血脂等,运用中西医疗法积极全面控制危险因子,预防心血管并发症的发生和发展,以提高生活质量,降低死亡率,这是我们临床工作者要考虑的首要问题。

参 考 文 献

1 姚 军,高 妍.餐后高血糖及其评价.中国实用内科杂

4 讨 论

槐耳是一种药用真菌,槐耳浸膏由槐耳菌质经热水提取所得,含有多种有机成分和 10余种矿物质元素,其主要抗癌活性成分为蛋白多糖(PS-T)。研究表明,它不仅能抑制肿瘤细胞生长,诱导肿瘤细胞凋亡,还能增强机体免疫力,是一种较理想的免疫增强剂。它对巨噬细胞有非常显著的促进作用,还能增强溶酶体活性,提高体液免疫及细胞免疫。并能内源性诱导产生干扰素,能刺激产生 L-2(白介素)等淋巴因子,具备干扰素和 L-2的抗肿瘤特性^[1,2]。同时,对血管的内皮细胞体外构建新生血管具有抑制作用,从而抑制肿瘤血管的生成^[1,2]。

本实验结果提示,槐耳浸膏对骨髓瘤细胞 PRM I₆₂₂₆的抑制作用存在明显的时间剂量依赖关系。

细胞凋亡早期出现磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)外翻,利用 AnnexinV / PI双染,能将早期凋亡及晚期凋亡死亡区分开,现已将 AnnexinV / PI染色流式细胞检测作为一种早期凋亡标志^[3,4]。实验结果显示,在高浓度组早期凋亡明显,说明高浓度药物杀伤肿瘤细胞主要通过诱导凋亡。

参 考 文 献

- 1 张芷旋,范羽,周清华,等.槐耳浸膏对人高转移大细胞肺癌细胞 L9981血管生成相关基因表达的影响.中国肺癌杂志,2006,9(2):139
- 2 许戈良,英卫东,马金良,等.槐耳浸膏体外抑制血管生成的实验研究.中国药理学通报,2003,19(12):1410
- 3 李莉,孔宪涛.细胞凋亡检测方法评价.上海医学检验杂志,2000,15:57-59
- 4 黄涛,孔庆志,卢宏达,等.槐耳浸膏诱导人肺腺癌细胞 A549凋亡的实验研究.中华结核和呼吸杂志,2001,24(8):503

收稿日期:2007-01-25

志,2004,24(7):396

2 徐成斌.防治糖尿病动脉粥样硬化性心血管病的新观点.国外医学.内分泌学分册,2003,23(3):174

收稿日期:2006-12-04