

# 雄黄对 T 淋巴细胞白血病细胞系 CEM 的促凋亡作用

张 晨,黄世林,向 阳,郭爱霞

(解放军中医血液病研究所,辽宁 大连 116021)

[摘要] 目的 观察雄黄对人类 T 淋巴细胞白血病细胞凋亡的影响。方法 人类 T 淋巴细胞白血病细胞系 CEM 体外培养,采用 MTT 法测定对细胞生长的抑制率,流式细胞仪分析细胞周期,并检测凋亡相关蛋白 Apo2.7 和 Fas 的表达。结果 雄黄体外对 CEM 细胞的生长有抑制作用,流式细胞仪检测可见亚二倍体的凋亡细胞和凋亡相关蛋白 Apo2.7 表达的升高,对细胞周期的影响表现为 G<sub>2</sub>/M 期的阻滞,而对 Fas 蛋白的表达没有影响。结论 雄黄有诱导 CEM 细胞凋亡的作用。

[关键词] 雄黄;白血病;凋亡

[中图分类号] R733.7 [文献标识码] A [文章编号] 1672-1977(2003)01-0042-02

## Study on Realgar inducing apoptosis in T lymphocytic cell line CEM

ZHANG Chen, HUANG Shi-Lin, XIANG Yang, GUO Ai-Xia

(TCM Hematology Institute of People's Liberation Army, Dalian, Liaoning Province 116021, China)

[ABSTRACT] **Objective** To study the Realgar induced T lymphocytic leukemia cell line CEM apoptosis in vitro. **Methods** CEM cells were incubated with Realgar. Cell proliferation inhibition was determined by MTT. Cell cycle, apoptosis, Apo2.7 and Fas were measured by cytometer. **Results** Realgar inhibited the proliferation of CEM cell line. The cells treated with Realgar showed a Sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> apoptotic peak in DNA distribution histogram, increment of Apo2.7 protein expression, and arrested cells in G<sub>2</sub>/M phase, but ineffectiveness on Fas expression. **Conclusion** The Realgar can induce CEM cell apoptosis in vitro.

[KEY WORDS] Realgar; leukemia; apoptosis

[J Chin Integr Med 2003, 1(1):42-43]

中药砷剂治疗急性早幼粒细胞白血病 (APL) 取得了令人瞩目的成就,尤其是三氧化二砷 (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) 诱导 APL 细胞凋亡分子机制的研究,用现代分子生物学技术阐释古老中医治疗白血病的物质基础,使之为人所接受,由此推动了对中药砷剂研究的扩展。雄黄是目前中药砷剂研究的另一热点。雄黄辛温有毒,入肝、胃经,具有解毒杀虫,燥湿祛风,化痰消积之功效,主治寒热、鼠疫恶疮、疥癣、瘰疬、牙疳及蛇咬伤等。以雄黄为君药的复方黄黛片(由雄黄、青黛、丹参和太子参等组成)具有清热解毒、益气生血的作用,临床治疗 APL 完全缓解率达 90% 以上,其疗效高于化疗、全反式维甲酸和 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>[1]</sup>。在此基础上,我们采用人 T 淋巴细胞白血病细胞系 CEM,体外观察雄黄抗淋巴细胞白血病的作用,为部分地阐明雄黄治疗 APL 的作用机制提供更多的实验依据。

### 1 材料与方

1.1 药物 1% 雄黄溶液按文献配制<sup>[2]</sup>,使用时用 RPMI 1640 稀释。

1.2 细胞培养 人类 T 淋巴细胞白血病细胞系 CEM,由美国 Roswell Park 实验室引进,大连医科大学提供,常规接种于含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基中,置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,取指数生长期的细胞进行实验。

1.3 细胞增殖抑制率 96 孔板接种 1 × 10<sup>4</sup> 细胞,每组设 6 个复孔,实验组加入终浓度为 15、30、60 g/L 的雄黄培养 24 h,采用 MTT 法于酶联仪上测定波长为 490 nm 的光密度值,按下列公式计算细胞增殖抑制率。

细胞增殖抑制率 = (1 - 实验组光密度值/对照组光密度值) × 100%

1.4 细胞周期测定 细胞经雄黄处理后,取 1 × 10<sup>6</sup> 细胞,70% 冷乙醇固定过夜,PBS 洗两遍,加 PI 50 mg/L,0.1% Triton X-100, RNase 50 mg/L,避光染色 30 min, Coulter XL 型流式细胞仪检测,用 Multicycle 软件分析细胞周期,低于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞

[作者简介] 张 晨(1963-),男,主治医师,在读博士研究生。E-mail: zcshsmmu@sina.com

为亚二倍体细胞凋亡峰(Sub-G<sub>0</sub>/ G<sub>1</sub>)。

1.5 Apo2.7 和 Fas 的测定 Fas-FITC (美国 Pharmingen 公司)及 Apo2.7-PE(法国 Immunotech 公司)单克隆抗体直接免疫标记法,另设鼠 IgG 作同型对照,流式细胞仪检测。

1.6 统计学分析 采用 F 检验。

## 2 结果

2.1 雄黄对 CEM 细胞增殖的影响 细胞经雄黄 15、30、60 mg/L 处理 24 h 后,细胞增殖抑制率分别为 19.1%、27.8% 和 35.1%。

2.2 雄黄对细胞周期的影响 CEM 细胞经雄黄处理 24 h 后可见 Sub-G<sub>0</sub>/ G<sub>1</sub> 细胞凋亡峰,而对细胞周期的影响表现为 G<sub>2</sub>/ M 期阻滞的特点,见表 1。

表 1 雄黄对 CEM 细胞周期和凋亡的影响 (%)

药物浓度(mg/L)	G <sub>0</sub> / G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> / M	凋亡率
对照组	62.2	27.6	10.2	3.6
15	58.1	23.3	18.6	9.1
30	59.2	20.7	20.1	12.6
60	53.5	21.1	25.3	21.5

2.3 Apo2.7 和 Fas 的表达 细胞经雄黄处理 24 h 后 Apo2.7 和 Fas 的表达情况见表 2。

表 2 雄黄对 Apo2.7 和 Fas 表达的影响 (n=3,  $\bar{x} \pm s$ , %)

药物浓度(mg/L)	Apo2.7	Fas
对照组	2.83 ± 2.03	15.10 ± 2.49
15	11.07 ± 1.89*	13.10 ± 5.31
30	18.72 ± 8.54*	12.50 ± 1.85
60	30.70 ± 9.43*	15.70 ± 3.45

注:与对照组比较 \* P < 0.05

## 3 讨论

目前体外对 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 抗肿瘤谱及作用机制的研究较为广泛和深入,而以二硫化二砷(As<sub>2</sub>S<sub>2</sub>)为主要成分的雄黄研究报道较少。近年来复方黄黛片在

临床治疗 APL 取得高缓解率,并且未见明显毒副作用,因而对雄黄的研究逐渐受到重视,有关雄黄诱导 APL 细胞凋亡及作用机制的研究可见报告<sup>[3,4]</sup>。我们对雄黄作用机制也进行了初步探索,体外研究显示其对 NB4、HL-60 和 K562 细胞均有促凋亡作用<sup>[2,5]</sup>。本文利用人类 T 淋巴细胞白血病细胞系 CEM,了解雄黄是否具有促 CEM 细胞凋亡的作用,结果显示:(1)雄黄可明显抑制 CEM 细胞的生长;(2)对细胞周期的影响表现为 G<sub>2</sub>/ M 期的阻滞;(3)可对 CEM 细胞产生促凋亡作用。上述结论与二硫化二砷诱导 NB4、HL-60 和 K562 细胞凋亡相符合。另外,本实验显示在 24 h 内雄黄对 Fas 表达没有影响,提示在此浓度和时间范围内雄黄诱导细胞凋亡可能不是通过 Fas/ FasL 途径。

As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 和 As<sub>2</sub>S<sub>2</sub> 在体外对多种白血病细胞系以及实体肿瘤细胞系均有良好的抗肿瘤效应,但在临床上除对 APL、慢性粒细胞白血病和骨髓增生异常综合征等少数疾病有较好的疗效外<sup>[6]</sup>,对其他肿瘤性疾病治疗效果不佳。这种体外抗肿瘤谱与临床实际治疗间的差异,除体内外不同因素的影响外,采用何种方式和方法来克服体内外这种促凋亡的差异尚需深入探索和研究。

### [参考文献]

- 1 黄世林,郭爱霞,向阳,等.复方青黛片为主治疗急性早幼粒细胞白血病的临床研究[J].中华血液学杂志,1995,19(9):26-28.
- 2 白月辉,黄世林.雄黄对 NB4 及 HL-60 细胞的促凋亡作用[J].中华血液学杂志,1998,2(6):477-480.
- 3 陈思宇,刘陕西,张梅,等.雄黄对急性早幼粒细胞白血病细胞 NB4 细胞基因表达谱的影响[J].第四军医大学学报,2002,23(6):封 2.
- 4 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.
- 5 张晨,黄世林.雄黄诱导 K562 细胞凋亡的研究[J].中国中医基础医学杂志,1999,5(3):30-31.
- 6 朱华淳,沈云峰,周新,等.复方青黛片(白血康)治疗恶性血液病 31 例[J].中华临床医药,2002,3(13):62-63.

[收稿日期] 2003-03-04 [本文编辑] 周庆辉

## 《中西医结合学报》征集读者和作者来信的启事

本刊拟设“读者·作者·编者”栏目。欢迎广大读者、作者来信,畅谈阅读本刊后的感想,为继续办好本刊献计献策;也欢迎对本刊登载的论文所提出的观点发表不同的意见,开展讨论。来信可通过邮局寄送,亦可使用本刊电子信箱。

《中西医结合学报》杂志社