

银杏叶多糖抑制人白血病细胞增殖的试验研究

张丽娇¹, 佟巨慧², 费瑞^{2*} (1. 长春师范学院生命科学学院, 吉林长春, 130032; 2. 吉林大学白求恩医学部, 吉林长春 130021)

摘要 [目的]明确银杏叶多糖(PGBL)对白血病的治疗价值。[方法]以干燥银杏叶为材料,提取PGBL;向100 μl对数增长期的人急性早幼粒白血病 HL-60 细胞悬液中分别加入 100 μl 含 PGBL 50、100、200 μg/ml 的 RPMI-1640 培养液,以加入 100 μl RPMI-1640 纯培养液为对照,研究不同浓度(50、100、200 μg/ml)PGBL 对 HL-60 细胞增殖的抑制率。[结果]50、100、200 μg/ml PGBL 对人急性早幼粒白血病 HL-60 细胞增殖均有不同程度的抑制作用,且随着药物浓度和作用时间的增加,抑制作用增强,即 PGBL 对 HL-60 细胞增殖的抑制作用存在剂量-时间依赖性;方差分析结果表明,PGBL 对 HL-60 细胞增殖的抑制率显著高于对照($P < 0.01$)。[结论]PGBL 对 HL-60 细胞增殖具有较好的抑制作用,且该抑制作用具有浓度-时间依赖性。

关键词 银杏叶多糖;HL-60 细胞;增殖

中图分类号 S567.1*5 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)10-04501-02

Experimental Study on Inhibition of Polysaccharides of Ginkgo Biloba Leaf on Proliferation of Human Leukemia Cell

ZHANG Li-jiao et al (College of Life Science, Changchun Teacher University, Changchun, Jilin 130032)

Abstract [Objective] The aim was to determine the therapeutic value of polysaccharides of ginkgo biloba leaf (PGBL) on leukemia. [Method] With dry ginkgo biloba leaves as the materials, the PGBL was extracted from them. 100 μl RPMI-1640 solution with 50, 100, 200 μg/ml PGBL was added into the suspension of human acute myeloid leukemia cell line HL-60 which in logarithmic growth period, with the treatment adding 100 μl RPMI-1640 pure solution as CK. The inhibition ratio of PGBL at different concn. (50, 100, 200 μg/ml) on proliferation of HL-60 cell was investigated. [Result] 50, 100, 200 μg/ml PGBL had different degree inhibition on proliferation of HL-60 and the inhibition was increased with the increase of drug concn. That was the inhibition of PGBL on proliferation of HL-60 cell had dose-time dependence. The results of variance analysis showed that the inhibition of PGBL on proliferation of HL-60 cell was significantly higher than that of CK ($P < 0.01$). [Conclusion] PGBL had a good inhibition on proliferation of HL-60 cell and the inhibition had dose-time dependence.

Key words Polysaccharides of ginkgo biloba leaf; HL-60 cell; Proliferation

近年来,白血病(leukemia)发病率呈上升趋势,但目前所用的抗白血病药物在杀伤白细胞的同时,对骨髓中正常的造血干(祖)细胞也具有杀伤作用,导致骨髓抑制与粒细胞缺乏,从而发生各种严重感染,有些药物还可使白血病细胞产生耐药性并导致化疗无效。因此,开发一种高效低毒的抗白血病药物,对该病的临床治疗具有重要意义。

银杏是世界上珍贵的药用植物,其叶、果和外种皮等皆具有药用开发价值,被称为“全身都是宝的活化石”^[1]。有研究表明,银杏外种皮多糖(polysaccharide of *Ginkgo biloba* exocarp, PGEL)具有抗肿瘤作用,可抑制人 BEL-7404 肝癌、SGC-7901 胃腺癌及 SPC-A-1 肺腺癌细胞的增殖^[2]。且 PGEL 对人急性早幼粒白血病 HL-60 细胞增殖也有抑制作用^[3]。

银杏叶多糖(polysaccharide of *Ginkgo biloba* leave, PGBL)是从银杏叶中提取出来的一种活性成分。研究表明^[4],PGBL 具有免疫调节和抗肿瘤等活性,但其对白血病细胞的作用还未见报道。笔者研究了 PGBL 对人急性早幼粒白血病 HL-60 细胞增殖的影响,以期明确 PGBL 在治疗白血病方面的潜在价值,为其临床研究及应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 白血病细胞。人急性早幼粒白血病 HL-60 细胞,吉林大学免疫教研室提供。

1.1.2 仪器。96 孔培养板, Gibico 公司; Model2450 酶标仪, 美国 Bio-Rad 公司;二氧化碳培养箱, 美国 Forma scientific In. 公司;倒置显微镜, 日本 OLYMPUS。

1.1.3 药品及试剂。RPMI-1640 培养基, 美国 Gibico 公司;胰蛋白酶, Amersco 公司;胎牛血清(FBS), 中科院生物工程研究所;四甲基偶氮唑蓝(MTT), Sigma 公司;二甲基亚砜(DMSO), 美国 Sigma 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 银杏叶多糖的提取。干燥的银杏叶经水煮, 醇沉后得银杏叶粗多糖(提取率 8.6%), 为棕褐色粉末, 易溶于水。脱蛋白和反复冻融后, 得褐白色粉末状多糖, 即银杏叶多糖(PGBL)。

1.2.2 HL-60 细胞培养。取液氮中保存的 HL-60 细胞冻存管, 迅速置于 37 °C 温水中, 摇动冻存管, 使其内容物快速融化。无菌条件下打开冻存管, 将细胞悬液转入离心管中, 加适量 1640 培养基, 1 000 r/min 离心 5 min。去上清, 加入 4.5 ml RPMI-1640 培养液和 0.5 ml 血清, 混匀后接种于培养瓶内, 置 5% CO₂ 饱和湿度培养箱内 37 °C 培养, 隔日换液。取对数生长期的细胞用于试验。

1.2.3 MTT 法测定 PGBL 对 HL-60 细胞增殖的抑制率。取对数生长期的 HL-60 细胞, 用 PBS(pH = 7.2) 洗涤 2 次, 吹散, 用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液将细胞浓度调至 1×10^6 /ml。向 96 孔培养板中分别加入上述细胞悬液 100 μl, 同时分别加入含不同浓度 PGBL(50、100、200 μg/ml) 的 RPMI-1640 培养液 100 μl。每浓度设 3 个重复孔, 对照孔加入等体积 RPMI-1640 培养液, 置 5% CO₂、37 °C 孵箱中培养 24、48、72 h。培养结束前 4 h, 分别加入 MTT 溶液 10 μl(终浓度 5 mg/ml), 4 h 后每孔加入 DMSO 150 μl/ml。用微量振荡器振荡 5 min 后, 于全自动酶标仪中 570 nm 波长下测定各组培养液的吸光度(OD 值)。计算 PGBL 对 HL-60 细胞增殖的抑制率。

抑制率(%) = (1 - 试验组培养液 OD 值/对照组培养

基金项目 吉林省科技发展计划项目(200705354)

作者简介 张丽娇(1981-), 女, 吉林长春人, 硕士, 助教, 从事细胞生物学研究。* 通讯作者。

收稿日期 2009-01-07

液 OD 值) × 100%。

1.2.4 数据统计。试验数据采用 SPSS12.0 统计软件进行处理。

2 结果与分析

由表 1 可知,不同浓度(50、100、200 μg/ml) PGBL 对 HL- 60

细胞的增殖均有不同程度的抑制作用,且随着药物浓度和作用时间的增加,其抑制作用增强,PGBL 对 HL- 60 细胞增殖的抑制作用存在一定的剂量 - 时间依赖性。方差分析结果表明,PGBL 对 HL- 60 细胞增殖的抑制作用显著高于对照(P < 0.05)。

表 1 不同浓度 PGBL 对 HL-60 细胞增殖的影响
Table 1 Effects of PGBL with different concentrations on HL-60 cell proliferation

组别 Groups	PGBL 浓度 μg/ml PGBL dose	24 h		48 h		72 h	
		OD 值	抑制率//%	OD 值	抑制率//%	OD 值	抑制率//%
		OD value	Inhibition rate	OD value	Inhibition rate	OD value	Inhibition rate
CK	0	0.785 ± 0.060	-	0.968 ± 0.034	-	1.136 ± 0.059	-
①	50	0.701 ± 0.067	10.70	0.775 ± 0.032 *	19.94	0.813 ± 0.088 *	28.44
②	100	0.605 ± 0.034 *	22.93	0.692 ± 0.073 *	28.53	0.722 ± 0.063 **	36.44
③	200	0.551 ± 0.059 *	29.81	0.606 ± 0.049 **	37.40	0.610 ± 0.076 **	46.30

注: *、** 分别表示与对照组差异显著和极显著。

Note: Comparing with CK, *, ** mean the differences are significant and extremely significant.

3 结论与讨论

多糖广泛存在于动植物和微生物中,是由醛基和酮基通过糖苷键连接的高分子聚合物,也是构成生命的 4 大基本物质之一。大量试验表明,天然多糖具有抗肿瘤活性,且无骨髓抑制等不良反应,部分多糖类化合物已应用于临床,并取得良好的治疗效果^[5]。

银杏叶多糖(PGBL)是从银杏叶中提取的一种无毒成分,可作为新一代的抗肿瘤药物^[6-7]。据报道,银杏叶多糖可抑制 S₁₈₀ 实体瘤和腹水瘤生长,延长荷瘤小鼠的存活时间,且银杏叶多糖与放疗联合使用时,可增加肿瘤细胞的放射敏感性,强化 γ-射线杀灭肿瘤细胞的效应^[7-8]。该研究通过体外培养人急性早幼粒白血病 HL-60 细胞,检测了不同浓度银杏叶多糖对 HL- 60 细胞增殖的影响。结果表明 50、100、200 μg/ml 银杏叶多糖对 HL- 60 细胞增殖均有抑制作用,且其抑制作用具有浓度 - 时间依赖性。综上所述,银杏叶多糖可抑

制 HL- 60 细胞增殖,在白血病的辅助治疗方面具有良好的应用前景,但其在临床中的应用有待于进一步研究。

参考文献

[1] 仰榴青,徐佐旗. 银杏多糖的研究进展[J]. 食品科学,2004,25(11):372-375.

[2] 许爱华,陈华圣,褚澄,等. 银杏外种皮多糖对人癌细胞株的抑制作用及与阿霉素的协同效应[J]. 中国新药杂志,2000,9(11):753-755.

[3] 许爱华,陈华圣,孙步蟾. 银杏外种皮多糖对 HL-60 细胞的体外实验研究[J]. 中药材,2004,27(5):361-363.

[4] 靳菊情,丁东宁,边晓丽,等. 银杏叶多糖的化学及清除羟自由基作用[J]. 西安医科大学学报,2000,21(5):417-419.

[5] 姜建芳,王思平,何新军. 中药多糖抗肿瘤作用研究进展[J]. 中国现代应用药学杂志,2008,25(7):616-618.

[6] 刘新,申丰,杨晓临. 银杏叶多糖对小鼠免疫细胞活性的影响[J]. 沈阳医学院学报,1999,1(3):140-142.

[7] 陈群,刘天骄. 银杏叶多糖的抗肿瘤和免疫调节作用[J]. 中药药理与临床,2003,19(5):18-19.

[8] 侯华新,黎丹戎,黄桂宽,等. 银杏叶多糖在肿瘤放射、化学治疗中的增敏作用研究[J]. 广西医科大学学报,2005,22(1):29-31.

(上接第 4492 页)

mg/ml 内,金黄色葡萄球菌、金黄色葡萄球菌(临床株)和绿脓杆菌(临床株)等供试菌对牛角七成分更敏感。由于金黄色葡萄球菌是引起细菌性食物中毒和医院院内感染的一种重要病原菌,且是最易产生耐药性的致病菌之一,牛角七活性成分对金黄色葡萄球菌较强的抑菌作用预示着开发牛角七活性成分作为植物源抗菌剂的可能性。

另外,实验结果得出,牛角七乙醇提取物及其乙酸乙酯、正丁醇部位对受试菌都具有较强的抑制活性,尤其对阳性药无作用的绿脓杆菌(临床株)具有很强的抑制活性,表明牛角七乙醇提取物及其乙酸乙酯、正丁醇部位的抗菌谱较广,并且中等极性的乙酸乙酯部位和较大极性的正丁醇部位为牛角七的抗菌活性主要部位。笔者将对牛角七乙酸乙酯和正丁醇萃取部位的活性成分作进一步的研究,再进行抗菌活性的评价,最终分离出具有抗菌活性的单体成分。同时,该

实验为抗菌药物的筛选、抗菌谱的测定、药价测定、提取过程的追踪等提供了可供参考的数据资料,为牛角七的进一步开发利用提供了一些基础资料。

参考文献

[1] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编:上册[M]. 北京:人民卫生出版社,1976.

[2] 江苏新医学院. 中药大辞典:下册[M]. 上海:上海科学技术出版社,2005.

[3] 国家医药管理局中草药情报中心. 植物药有效成分手册[M]. 北京:人民卫生出版社,1986.

[4] 《湖北恩施药用植物志》编写组. 湖北恩施药用植物志:上册[M]. 武汉:湖北科学技术出版社,2006.

[5] 胡风莲,刘宏. 中药材鬼灯檠的研究现状[J]. 陕西农业科学,2008(3):144-145.

[6] 张东佳,杨永建,史彦斌,等. 鬼灯檠的体外抑菌及急性毒性试验[J]. 中成药,2005,27(5):604-605.

[7] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,1993.

[8] 徐叔云,卞如谦,陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2002.