

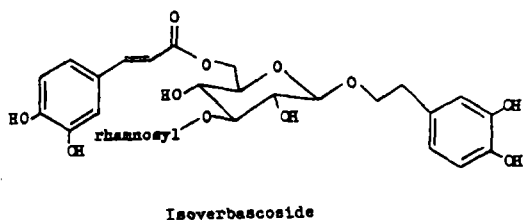
## Isoverbascoside 对 HL-60 细胞的诱导分化和细胞毒作用\*

王天叫 杨善民 黄宗平\*\* 李祺福\*\* 李庆阁\*\* 周红 郑荣梁\*\*\* 贾忠健\*\*\*

(厦门大学抗癌研究中心,\*\*厦门大学生物系, 厦门 361005)

(\*\*\*)兰州大学生物系, 兰州 730000)

目前对肿瘤的治疗基于两种基本策略:  
(1) 传统的细胞毒杀伤疗法。其缺点是选择性差, 毒副作用强。(2) 诱导分化疗法, 即诱导肿瘤细胞向正常细胞转变。后者具有选择性好, 副作用低等优点。其中最成功的例子是全反式维 A 酸用于治疗人早幼粒白血病<sup>[1]</sup>。应用纯的中药提取物筛选新的肿瘤诱导分化剂或细胞毒药物具有理论研究意义和临床应用前景。异毛蕊花苷 (isoverbascoside, Isov) 是从中草药马先蒿 (*Pedicularis striata*) 中分离提取到的天然产物, 为苯丙素甙类化合物<sup>[2]</sup>, 分子式为:



Isov 具有抗病毒、抗血小板凝集的作用<sup>[3]</sup>, 它还是一种很好的天然抗氧化剂<sup>[4,5]</sup>。Isov 对人胃腺癌 MGc80-3 细胞<sup>[6]</sup>、人早幼粒白血病 HL-60 细胞<sup>[7]</sup>的生长有抑制作用。本文以 HL-60 细胞为模型, 进一步探讨 Isov 对 HL-60 细胞的生物学效应及其可能作用机理。

## 材料与方 法

## 一、细胞培养和药物处理

HL-60 细胞培养于含 15% 灭活小牛血清的 RP-

MI-1640 培养液。药物处理在细胞接种 24 h 后进行。对照组加 D-Hanks 液。处理组 Isov 浓度范围为 10-35  $\mu\text{mol/L}$ 。Isov (由兰州大学生物系提供) 经 DMSO 预溶后用 D-Hanks 液配成 500  $\mu\text{mol/L}$  母液贮存于  $-20^\circ\text{C}$ 。

## 二、生长曲线测定

采用活细胞吸收中性红分光光度分析法<sup>[8]</sup>。简述如下: 向待测细胞中加入 40  $\mu\text{g/mL}$  中性红水溶液, 培养 3h 后, 收集细胞, 加入 1ml 裂解液 (1% 乙酸-50% 乙醇)。所得裂解液以 0.2ml/孔加于 96 孔板上, 在微孔板读数仪 (BioRad 450) 上读数。吸收波长  $\lambda=540\text{nm}$ 。根据 Isov 不同浓度处理 0-6 天各组和对照组细胞的吸收值绘制细胞生长曲线。

## 三、细胞毒作用检测

采用 0.02% 台盼蓝对各处理组和对照组细胞染色 5min, 在 200 $\times$  视野下计数 200 个细胞, 得出细胞死亡率。实验重复 3 次。于透射电镜下观察细胞死亡形态。

## 四、细胞形态结构样品的制备和观察

处理组和对照组细胞涂片后, 用 Giemsa 染色, 于光镜下观察。超微结构样品制备按常规透射电镜样品制备方法进行, 于 JEM-100cx I 型透射电镜下观察。

## 五、细胞吞噬能力的测定

采用化学发光法<sup>[9]</sup>。发光体系如下: 鲁米诺 ( $10^{-4}$  mol/L) 200  $\mu\text{l}$ , 酵母多糖 (2mg/mL) 200  $\mu\text{l}$ , PBS 500  $\mu\text{l}$ , HL-60 细胞或正常人血单个核细胞 100  $\mu\text{l}$ , 空白对照

本文 1998 年 5 月 20 日收到。1999 年 7 月 13 日接受。

\*福建省自然科学基金资助项目。

感谢汕头大学医学院中心实验室梅品超老师对细胞周期测定所给予的技术上的帮助。感谢本中心颜江华副研究员对本实验的帮助和支持。

以 200 $\mu$ l PBS 代替酵母多糖。样品于液体闪烁仪 (Model 1900TR Packard) 上测量。采用单光子计数方式, 每 6min 测 9s 的化学发光 1 次, 进行 25 个循环。实验重复 3 次。

### 六、裸小鼠异种移植成瘤试验

接种处理组 (20 $\mu$ mol/L Isov, 处理 4 天) 和对照组 HL-60 细胞各  $1 \times 10^6$  个于裸小鼠左右臀部皮下, 14 天后统计成瘤情况。共接种 5 头 4-5 周龄的 SPF 级 BALB/C 裸小鼠 (本中心医学实验动物室提供)。

### 七、细胞周期时相的测定

不同处理的细胞经碘化丙锭 (PI) 一步染色<sup>[10]</sup>后, 于 FACSsort 型流式细胞仪 (Becton Dickinson, USA) 上检测。根据所得 DNA 分布直方图, 用 Cellfit 软件进行细胞周期统计分析。

## 结 果

### 一、Isov 对 HL-60 细胞增殖的影响

细胞生长曲线 (图 1) 表明: Isov 能抑制 HL-60 细胞的增殖, 且随处理时间的延长和处理浓度的提高而增强。20-25 $\mu$ mol/L Isov 对 HL-60 细胞处理 6 天后, 细胞增殖抑制率为 59-68%, 30-35 $\mu$ mol/L Isov 能在 2-3 天内完全杀死 HL-60 细胞。台盼蓝染色显示:  $\leq 25$   $\mu$ mol/L Isov 无显著杀伤作用, 而  $\geq 30$   $\mu$ mol/L Isov 有强烈的细胞毒效应。

### 二、Isov 对 HL-60 细胞形态结构的影响

显微和超微结构观察表明: 20-25 $\mu$ mol/L Isov 诱导 HL-60 细胞向粒系方向分化, 即从早幼粒阶段向中幼粒、晚幼粒、成熟粒细胞 (杆状、分叶核细胞) 方向分化。在形态上表现为: 细胞核质比降低; 细胞核形由圆、椭圆转变为肾形、杆状、分叶; 细胞质颗粒由初级颗粒转

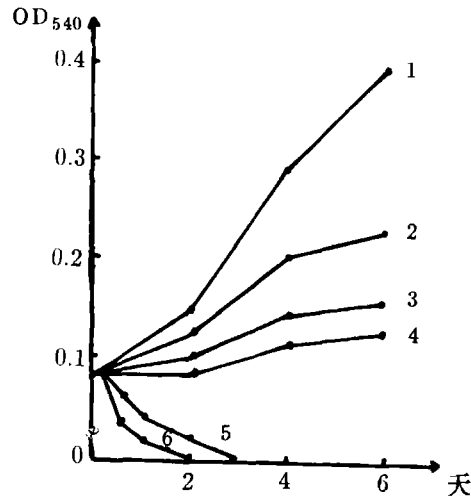


图 1 生长曲线

1. 对照组 2. 10 $\mu$ mol/L Isov 处理组 3. 20 $\mu$ mol/L Isov 处理组 4. 25 $\mu$ mol/L Isov 处理组  
5. 30 $\mu$ mol/L Isov 处理组 6. 35 $\mu$ mol/L Isov 处理组

Fig. 1 Growth curves

1. control, 2-6. HL-60 cells treated with Isov at the concentrations of 10 $\mu$ mol/L, 20 $\mu$ mol/L, 25 $\mu$ mol/L, 30 $\mu$ mol/L, 35 $\mu$ mol/L respectively.

变为特异性颗粒 (图版 I, 图 1-4)。光镜下统计 20-25 $\mu$ mol/L Isov 处理 HL-60 细胞 3 天后的各个分化阶段的细胞, 其总诱导分化率为 71%-83% (其中成熟粒细胞约占 50%) (表 1)。30-35 $\mu$ mol/L Isov 导致 HL-60 细胞死亡, 主要表现为细胞肿胀破裂或核固缩 (图版 I, 图 5)。

### 三、Isov 对 HL-60 细胞吞噬能力的影响

20-25 $\mu$ mol/L Isov 可明显提高 HL-60 细胞的吞噬能力, 且随处理时间的延长而增强。处

表 1 Isov 处理 72h 对 HL-60 细胞的诱导分化率 (%)

Table 1 The rate of differentiation of HL-60 cells induced by Isov in 72 h

组别 Groups	分化阶段 Stages of differentiation			
	早幼粒细胞 Promyelocyte	中幼粒细胞 Myelocyte	晚幼粒细胞 Metamyelocyte	成熟粒细胞 Mature granulocyte
对照组 Control	>90			
20 $\mu$ mol/L Isov	17 $\pm$ 6	15 $\pm$ 3	15 $\pm$ 1	53 $\pm$ 5
25 $\mu$ mol/L Isov	29 $\pm$ 1	10 $\pm$ 2	12 $\pm$ 3	48 $\pm$ 2

理 72h 后, HL-60 细胞的吞噬指数提高了 2.28—2.78 倍 (图 2)。

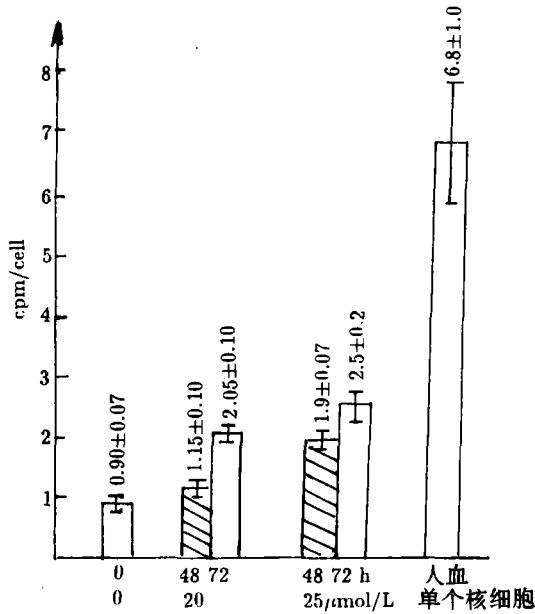


图 2 HL-60 细胞 (处理组和对照组) 吞噬指数  
Fig. 2 Indexes of phagocytosis of HL-60 cells (treatment & control)

#### 四、Isov 对 HL-60 细胞裸鼠成瘤率的影响

表 2 处理组和对照组 (20 μmol/L, 4 天) HL-60 细胞裸鼠成瘤情况

Table 2 Tumorigenesis of HL-60 cells (treatment & control) in nude mice

组别 Groups	瘤重 Xi Weight of tumor (g)					平均瘤重 $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ (g) Average weight of tumor	配对数据 t 检验 Paired-t test
	1	2	3	4	5		
对照组 Control	0.44	1.82	1.72	2.65	1.52	1.63 ± 0.32	P < 0.05
Isov 处理组 Treatment 20 μmol/L 96h	0	0.19	1.29	2.09	1.67	1.05 ± 0.37	

表 3 Isov 对 HL-60 细胞周期时相分布的影响

Table 3 The effect of Isov on the distribution of cell cycle phases of HL-60 cells

组别 Groups	各细胞周期时相百分率 (%) Cell cycle phases		
	G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
对照 Control	48.1	38.3	13.6
12h 20 μmol/L Isov	57.8**	33.3	8.8
24h 20 μmol/L Isov	48.2	34.7	17.1
72h 20 μmol/L Isov	45.6	30.8	23.7**
120h 20 μmol/L Isov	46.2	36.8	17.0

注:  $\chi^2$  检验 \*\*; P < 0.01

对照组 HL-60 细胞接种裸鼠成瘤率为 100%, 平均瘤重 1.63 ± 0.32g; 处理组 HL-60 细胞裸鼠成瘤率为 80%, 平均瘤重 1.05 ± 0.37g。处理组比对照组成瘤率降低了 20%, 平均瘤重降低了 36%。经配对数据 t 检验表明: 处理组比对照组成瘤性显著降低。(表 2)

#### 五、Isov 对 HL-60 细胞周期的影响

20 μmol/L Isov 处理 HL-60 细胞不同时间长度 (12h、24h、72h、120h)。处理组 HL-60 细胞在 12h 时间点上呈现 G<sub>1</sub> 期阻滞, 在 72h 时间点上呈现 G<sub>2</sub>/M 期阻滞, 而在 24h、120h 时间点上无明显的细胞周期时相的改变 (图 3, 表 3)。

## 讨 论

HL-60 细胞的分化诱导剂种类很多, 主要有: (1) 佛波醇及其衍生物, 诱导 HL-60 细胞向单核/巨噬方向分化。(2) 维生素类 (包括维生素 A 酸, 维生素 D<sub>3</sub> 及其衍生物), 诱导 HL-60 细胞向粒系方向分化<sup>[11]</sup>。

20—25 μmol/L Isov 可抑制 HL-60 细胞的

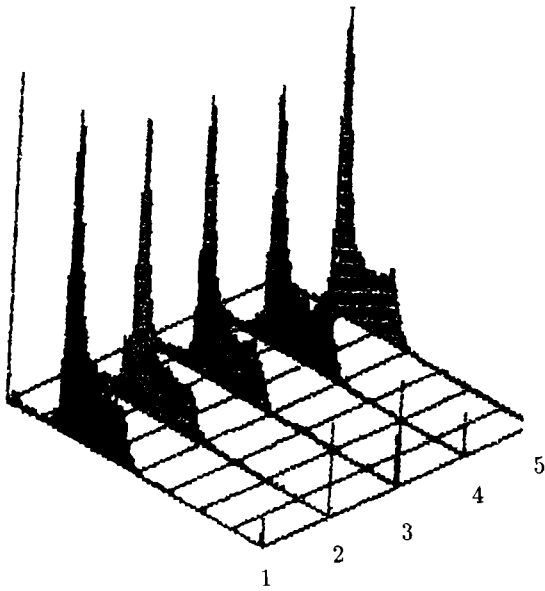


图3 对照和20 $\mu\text{mol/L}$  Isov处理组HL-60细胞的DNA分布直方图

1. 对照组, 2-5. 20 $\mu\text{mol/L}$  Isov处理组(2: 12h, 3: 24h, 4: 72h, 5: 120h)。

Fig. 3 DNA histograms of HL-60 cells

1. control, 2-5. HL-60 cells treated by 20 $\mu\text{mol/L}$  Isov respectively for 12h, 24h, 72h, 120h.

增殖, 诱导其形态上向粒系方向分化, 分化成熟的粒细胞吞噬能力增强(诱导其功能分化), 裸鼠成瘤性降低表明 Isov 诱导 HL-60 细胞恶性度降低, 提示 Isov 可作为新的肿瘤分化诱导剂; 30-35 $\mu\text{mol/L}$  Isov 有强烈杀伤 HL-60 细胞的作用, 高浓度下也是一种细胞毒药物。

HL-60 细胞被诱导分化过程中常有 c-src、c-fms 表达的增强, c-myc、c-myb 表达的降低, c-fos 表达的变化则因 HL-60 细胞的分化途径和诱导剂种类而异<sup>[11]</sup>。蛋白激酶 C (PKC) 对 HL-60 细胞的分化诱导也起着重要作用<sup>[12]</sup>。Isov 在 HL-60 细胞分化诱导过程中对基因表达变化和细胞信号传递系统影响的分子事件有待于进一步研究。

20 $\mu\text{mol/L}$  Isov 可在 12h 时间点上引起 HL-60 细胞发生 G<sub>1</sub> 期阻滞, 在 72h 时间点上引起 G<sub>2</sub>/M 期阻滞, 但 Isov 对 HL-60 细胞周

期阻滞程度并不高。Isov 对细胞周期的影响以及这种影响与 Isov 诱导 HL-60 细胞分化的关系有待于进一步研究。

中性粒细胞及单核/巨噬细胞可吞噬异物, 测定其吞噬能力可作为白血病细胞诱导分化的指标。传统方法是在显微镜下观察 HL-60 细胞在诱导分化前后对墨汁或聚苯乙烯乳胶颗粒的吞噬作用。采用化学发光法检测具有可定量、自动化等优点, 可用于实验研究和白血病分化疗法的临床监测<sup>[9]</sup>。

总之, Isov 作为一种新的肿瘤分化诱导剂和细胞毒药物, 具有理论研究意义和潜在的临床应用前景。进一步研究 Isov 对基因表达、细胞信号传递系统、细胞周期阻滞的作用以及它们之间的关系是揭示其诱导分化机理的关键。进一步研究 Isov 体内和体外的毒理作用将为其临床应用提供理论依据。

## 摘 要

不同时间、不同浓度的 isoverbacoside 体外处理 HL-60 细胞, 以形态改变(光镜和透射电镜观察)、功能分化(化学发光检测吞噬能力)、恶性度降低(裸鼠成瘤试验)等指标观察其诱导分化作用; 以台盼蓝拒染作用和电镜下形态变化确定其细胞毒作用; 用流式细胞术测定其对 HL-60 细胞周期的影响。20-25  $\mu\text{mol/L}$  Isov 1-3 天诱导 HL-60 细胞向粒系方向分化, 细胞吞噬能力提高, 裸鼠成瘤性降低。30-35 $\mu\text{mol/L}$  Isov 2-3 天对 HL-60 细胞有强烈的细胞毒作用。20 $\mu\text{mol/L}$  Isov 处理 12h 可引起 HL-60 细胞的 G<sub>1</sub> 期阻滞, 在 72h 时引起 HL-60 细胞的 G<sub>2</sub>/M 期的阻滞。

关键词: 异毛蕊花苷 (isoverbacoside) HL-60 细胞 诱导分化 细胞毒作用 细胞周期阻滞

## 参 考 文 献

[1] 王振义、孙关林、陈竺, 1994, 诱导分化疗

- 法应用现状。中华血液学杂志, 15: 105—107.
- [2] Liu, ZM, ZJ Jia, 1991, Phenylpropanoid and Iridoid glycoside from *Pedicularis striata*. *Phytochem.*, 30: 1341—1344.
- [3] Cano, E., M. Veiga, C. Jimenez, R. Riguera, 1990, Pharmacological effects of three phenylpropanoid glycosides from *Mussatia*. *Planta Medica*, 56: 24—26.
- [4] Li, Ji, RL Zheng, ZM Liu, ZJ Jia, 1992, Scavenging effects of Phenylpropanoid glycosides on superoxide and its antioxidant effect. *中国药理学报*, 13 (5): 427—430.
- [5] Li, Ji PF Wang, RL Zheng, ZM Liu, ZJ Jia, 1993, Protection of phenylpropanoid glycosides from pedicularis against oxidative hemolysis in vitro. *Planta Medica*, 59: 315—317.
- [6] 李忌、周红、郑耘、林炳珍、郑荣梁、贾忠健, 1995, 天然抗氧化剂 Isoverbascoside 对人胃腺癌细胞生长和超微结构的影响。厦门大学学报 (自然科学版), 34: 795—798.
- [7] 周红、颜青、林炳珍、王宇昉、陈瑞川、李忌、郑荣梁, 1997, Isoverbascoside 对 HL-60 细胞生长和超微结构的影响。癌症, 16: 29—31.
- [8] Borenfreund, E., N. Babich, N. Martin-Alguacil, 1990, Rapid chemosensitivity assay with human normal and tumor cells in vitro. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 26: 1030—1034.
- [9] 胡天喜、陈杞主编, 1990, 发光分析与医学 (第一版)。上海, 华东师范大学出版社, 89—99.
- [10] 左连富主编, 1991, 流式细胞术样品制备技术 (第一版)。北京, 华夏出版社, 42—53.
- [11] 张树东、胥彬, 1992, 分化诱导剂使 HL-60 细胞再分化时原癌基因的表达及其调控。实用肿瘤杂志, 7: 184—186.
- [12] Zimber, A., A. Chedeville, C. Gespach and J. P. Abita, 1994, Inhibition of proliferation and induction of monocytic differentiation in HL-60 human promyelocytic leukemia cells treated with bile acids in vitro. *Int. J. Cancer*, 59: 71—77.

## INDUCED-DIFFERENTIATION AND CYTOTOXICITY OF ISOVERBASCOSIDE ON HL-60 CELLS\*

WANG Tian Jiao YANG Shan Min HUANG Zong Ping\*\* LI Qi Fu\*\*

LI Qing Ge\*\* ZHOU Hong ZHENG Rong Liang\*\*\* JIA Zhong Jian\*\*\*

(Cancer Research Center, \*\* Department of Biology, Xiamen University, Xiamen, 361005;

\*\*\* Department of Biology, Lanzhou University, Lanzhou, 730000)

### ABSTRACT

HL-60 cells were treated by isoverbascoside with different time and different concentrations in vitro. The differentiation of HL-60 cells was evaluated by light and electron microscopy to observe morphological changes, by chemiluminescence to detect phagocytosis and by tumorigenesis in nude mice to determine malignancy. The cytotoxic effect of isoverbascoside on HL-60 cells was examined by trypan blue excluding staining and electron microscopy. The influence of isoverbascoside on cell cycle was measured by

flow cytometry. Granular differentiation of HL-60 cells was induced by isoverbascoside at 20—25 μmol/L within 1—3 days as the results of morphological changes, enhancement of phagocytosis and decreasing of tumorigenesis. Strong cytotoxicity was evidenced in HL-60 cells treated by isoverbascoside at 30—35 μmol/L. HL-60 cells treated by isoverbascoside at 20 μmol/L were delayed at G<sub>1</sub> phase at 12 hours and G<sub>2</sub>/M phase at 72 hours.

**Key Words:** Isoverbascoside. HL-60 cell. Induced-differentiation. Cytotoxicity. Cell cycle delay.

\* This work was supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province.

## 图版说明

## 图版 I

- 图 1 对照组 HL-60 细胞群体基本为早幼粒白血病细胞 (光镜  $\times 420$ )  
 图 2 20—25  $\mu\text{mol/L}$  Isov 处理组 HL-60 细胞表现出粒系分化的形态 (光镜  $\times 420$ )  
 图 3 对照组 HL-60 细胞表现为早幼粒白血病细胞的形态 (透射电镜  $\times 15,300$ )  
 图 4 20—25  $\mu\text{mol/L}$  Isov 处理组 HL-60 细胞出现终末分化 (分叶核粒细胞) (透射电镜  $\times 11,900$ )  
 图 5 30—35  $\mu\text{mol/L}$  Isov 处理组 HL-60 细胞死亡 (透射电镜  $\times 14,700$ )

a: 中幼粒细胞 b: 分叶核粒细胞 c: 杆状核粒细胞

Nu: 核仁 Mt: 线粒体 RER: 粗面内质网 Gp: 初级颗粒 Gs: 特异颗粒 Mv: 微绒毛 N: 核

## EXPLANATION OF FIGURES

## PLATE I

- Fig. 1 HL-60 cells without treatment were almost promyelocytes (by light microscopy  $\times 420$ )  
 Fig. 2 Granular differentiation of HL-60 cells was induced by Isov at 20—25  $\mu\text{mol/L}$  (by light microscopy  $\times 420$ )  
 Fig. 3 HL-60 cell without treatment showed the morphology of promyelocyte (by transmission electron microscopy  $\times 15,300$ )  
 Fig. 4 Terminal differentiation was seen in HL-60 cell treated by Isov at 20—25  $\mu\text{mol/L}$  (by transmission electron microscopy  $\times 11,900$ )  
 Fig. 5 Cell death was induced in HL-60 cell treated by Isov at 30—35  $\mu\text{mol/L}$  (by transmission electron microscopy  $\times 14,700$ )

a: myelocyte b: polymorphonuclear granulocyte c: band-formed granulocyte

Nu, nucleolus Mt: mitochondria RER: rough endoplasmic reticulum Mv: microvilli Gp: primary granule Gs: special granule N: nucleus

图 版 I

