

临床上治疗子宫内膜异位症有良好的疗效。实验结果表明,中药桂枝茯苓对免疫功能具有良好的调节作用,可以改善 EMT 免疫功能紊乱状况,使机体的免疫功能恢复动态平衡。该药对 EMT 的治疗作用可能是通过调节机体的免疫活性细胞或者免疫活性细胞分泌的免疫活性物质来影响异位内膜生长的微环境,继而干扰异位内膜的存活和生长,控制 EMT 病情发展。此药效作用在经用桂枝茯苓灌胃 4 周后的桂枝茯苓观察组大鼠异位内膜明显小于模型对照组而得到相应的证实。因此认为,中药桂枝茯苓可以调节机体的免疫功能,此机制可能为该药治疗 EMT 的作用机制之一,但其具体的调节环节还需要做更进一步的研究。

[参考文献]

[1] Femandaz S S, Hicks B R, Yudkin P L, et al. Anti-endometrial and anti-endothelial antibodies in women with endometriosis [J]. *Records*, 1993, 8(2):310-315.  
 [2] Corchado G A, Hinojosa C J. Immunological aspects of endometriosis [J]. *Ginecol Obstet Mex*, 1997, 65(3):79-81.  
 [3] 罗丽兰. 子宫内膜异位症的免疫病因学研究 [J]. *中华妇产科杂志*, 2000, 35(6):325-326.

[4] Jones R C. The effect of a luteinizing hormone releasing hormone agonist levonorgestrel, danazol and ovariectomy on experimental endometriosis in the rat [J]. *Acta Endocrinol*, 1984, 106(2):282-288.  
 [5] Weed J. Endometriosis: can it produce an anti-immune response resulting in infertility? [J]. *Clin Obstet Gynecol*, 1980, 23(3):885-889.  
 [6] Dmowski W P, Steele R W, Baker G F. Deficient cellular immunity in endometriosis [J]. *Obstet Gynecol*, 1981, 141(4):377-383.  
 [7] 李伯如, 姜道英, 陈立君, 等. 子宫内膜异位症患者外周血 T 淋巴细胞的测定 [J]. *中华妇产科杂志*, 1994, 29(2):116-117.  
 [8] 朱关玲, 张绍芬, 李大全. 子宫内膜异位症的免疫功能变化 [J]. *上海免疫学杂志*, 1996, 16(3):155-157.  
 [9] 梁雪芳, 司徒仪, 冉青珍. 子宫内膜异位症患者免疫功能的变化与分析 [J]. *广州中医药大学学报*, 1999, 16(4):283-285.  
 [10] 黄蓉, 太田博孝, 五十一岚信一. 子宫内膜异位症大鼠模型的免疫功能研究 [J]. *广东医学*, 2003, 24(11):1173-1175.

# 小檗碱诱导人急性 T 淋巴细胞白血病细胞凋亡的研究

蒋艳<sup>1</sup>, 胡群<sup>1</sup>, 刘双又<sup>1</sup>, 丁玉峰<sup>2</sup>, 刘爱国<sup>1</sup>, 张柳清<sup>1</sup>

(华中科技大学同济医学院附属同济医院 1. 儿科; 2. 药学部, 武汉 430030)

[摘要] 目的 探讨小檗碱诱导人急性 T 淋巴细胞白血病细胞(MOLT-4)凋亡的作用。方法 将处于对数生长期的 MOLT-4 细胞分为 3 组, A 组加入小檗碱(10, 100 mg · L<sup>-1</sup>), B 组加入柔红霉素 1 mg · L<sup>-1</sup>, C 组加入小檗碱 + 柔红霉素, 作用 6 和 24 h 后, 用 MTT 法检测细胞存活率; 用流式细胞术、DNA 电泳及光学显微镜观察小檗碱对 MOLT-4 细胞凋亡的影响。结果 作用 6, 24 h 后, A 组(10 mg · L<sup>-1</sup>)细胞存活率分别为 81.80%, 64.67%; B 组为 98.38%, 38.46%, C 组为 68.35%, 20.51%; C 组与 A、B 组比较, 在两个时间段差异均有显著性(P < 0.05)。小檗碱诱导 MOLT-4 细胞发生典型的细胞凋亡形态学变化, 出现 DNA 规律性断裂, 电泳呈典型的梯状条带变化。细胞周期分析提示小檗碱浓度在 10, 100 mg · L<sup>-1</sup> 时作用 24 h 细胞凋亡率分别为 5.83%, 19.93%。结论 小檗碱具有诱导白血病细胞凋亡的作用, 且小檗碱可增强柔红霉素的抗肿瘤作用, 为其临床应用提供了依据。

[关键词] 小檗碱; 白血病; 细胞凋亡

[中图分类号] R965; R286 [文献标识码] A [文章编号] 1004-0781(2005)07-0568-03

## The Study of Apoptosis of MOLT-4 Cells Induced by Berberine in Vitro

JIANG Yan<sup>1</sup>, HU Qun<sup>1</sup>, LIU Shuang-you<sup>1</sup>, DING Yu-feng<sup>2</sup>, LIU Ai-guo<sup>1</sup>, ZHANG Liu-qing<sup>1</sup> (1. Department of Pediatrics; 2. Department of Pharmacy, Tongji Hospital Affiliated with Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

**ABSTRACT Objective** To investigate the effect of berberine on inducing apoptosis of human T-lymphoblastic leukemia cell line (MOLT-4). **Methods** The exponentially growing MOLT-4 cells were divided into three groups: A, B and C. Group A were given 10 or 100 mg · L<sup>-1</sup> of berberine hydrochloride, group B were given 1 mg L<sup>-1</sup> of daunorubicin, and group C were given berberine hydrochloride plus daunorubicin. The cell survival rate were determined by MTT after 6 and 24 h incubation; the apoptosis were detected by flow cytometry, electrophoresis and microscopy. **Results** After incubation for 6 and 24 h, the cell survival rates in group A were 81.80% and 64.67%, group B were 98.38% and 38.46%, and group C were 68.35% and

20.51%。There was a significant difference in group C compared with group A and group B within either 6 or 24 h ( $P < 0.05$ )。Berberine hydrochloride could induce the typical apoptosis changes in morphology changes and DNA ladder. The flow cytometry analysis showed that the apoptosis rates were 5.83% by 10 mg · L<sup>-1</sup> berberine hydrochloride, and 19.93% by 100 mg · L<sup>-1</sup> berberine hydrochloride at 24 h. **Conclusion** Berberine hydrochloride had apoptosis-inducing-effect on leukemia cells and could enhance the antileukaemia activities of daunorubicin, which might provide a theoretical basis for its clinical application.

**KEY WORDS** Berberine; Leukemia; Cell apoptosis

小檗碱存在于小檗属植物黄柏、黄连和三颗针中,属于异喹啉衍生物类生物碱,是一种季铵化合物。小檗碱具有较强的抗菌作用,在临床上常用盐酸小檗碱治疗细菌性痢疾、胃肠炎等疾病,其不良反应小。研究证实小檗碱对实体肿瘤细胞有作用<sup>[1]</sup>,但它对淋巴细胞白血病细胞的作用研究较少。笔者对小檗碱诱导白血病细胞(MOLT-4)凋亡的作用进行研究,报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 小檗碱(盐酸黄连素,四川来福康制药有限公司,每片 100 mg,将其溶于纯化水,加热促进溶解);柔红霉素(Pharmacia&Upjohn)20 mg,用 0.9% 氯化钠注射液稀释。二者均用孔径 0.22 μm 滤膜过滤除菌,分装, -20℃ 保存。

**1.2 细胞培养** 将处于对数生长期的 MOLT-4 细胞分为 3 组, A 组加入小檗碱(0, 10, 100 mg · L<sup>-1</sup>), B 组加入柔红霉素(1 mg · L<sup>-1</sup>), C 组加入小檗碱 + 柔红霉素,培养在 37℃, 5% 二氧化碳的 RPMI1640 培养液中,作用 6 和 24 h 后,用 MTT 法检测细胞存活率;并分别进行细胞形态学、细胞周期及 DNA 电泳分析。以未加的小檗碱培养的细胞作为对照。

**1.3 MTT 法** 将对数生长期 MOLT-4 细胞( $5 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ )180 μL 接种于 96 孔板,培养 12 h 后加入小檗碱,使其终浓度为 10 mg · L<sup>-1</sup>,作用预定时间后,加 MTT 溶液 10 μL,4 h 后加 10% 十二烷基硫酸钠(SDS),37℃ 过夜后用酶联免疫检测仪于 570 nm 处测其吸光度 A 值,每组设 3 个复孔,计算细胞存活率(存活率 = 处理组 A 值/对照组 A 值 × 100%)。

**1.4 细胞形态学观察** 药物作用预定时间后,在倒置显微镜下观察细胞的形态特征。将细胞悬液离心后,用细胞沉淀涂片,瑞特染色 3 min,光镜观察细胞形态。

**1.5 流式细胞术分析** 采集细胞  $\geq 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ , 1 500 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 min 后用 80% 乙醇固定, -20℃ 过夜,再离心弃上清液, PBS 溶液洗后, 1 500 r · min<sup>-1</sup>, 10 min 离心弃上清液;将细胞重悬于 PC 缓冲液 100 μL 中,室温 15 ~ 30 min,并不停摇动,离心弃上清液;PBS

再洗 1 次,将细胞重悬于 PBS 溶液 500 μL 中,加入 10 μL 10 × PI 染液和 5 μL RNaseA(1 μg · μL<sup>-1</sup>),室温避光 30 min,上机检测。

**1.6 DNA 片断分析** 10<sup>6</sup> 个细胞用 PBS 溶液洗涤离心后,加入 20 μL 裂解缓冲液(20 mmol · L<sup>-1</sup> EDTA, 100 m · L<sup>-1</sup> Tris, pH 值 8.0, 0.8% SDS)充分混匀,加入 500 U · mL<sup>-1</sup> RNaseA 酶 10 μL, 37℃ 孵育 2 h,再用蛋白酶 K 20 mg · mL<sup>-1</sup>, 50℃ 孵育过夜,取 5 μL 电泳(35 V, 1 h)。

**1.7 统计学方法** 采用 SPSS11.5 专业数据分析统计软件处理。根据资料性质,试验数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,用  $\chi^2$  检验处理。

## 2 结果

**2.1 体外药敏试验** 柔红霉素和小檗碱单独作用均可导致 MOLT-4 细胞存活率下降,作用 24 h 时更为明显。二者合用时,在两个作用时间点(6 及 24 h),细胞存活率均较两种药物单独作用时低,差异有显著性,见表 1。

表 1 3 组细胞在不同时间的存活率 % ,  $\bar{x} \pm s$

组别	6 h	12 h
A 组	81.80 ± 0.14	64.670 ± 0.12
B 组	98.38 ± 0.29	38.460 ± 0.17
C 组	68.35 ± 0.32 <sup>*1</sup>	20.510 ± 0.20 <sup>*2</sup>

注:与 A、B 组同一时间比较, <sup>\*1</sup> $P < 0.05$

**2.2 凋亡细胞的形态学变化** MOLT-4 细胞中加入小檗碱共同培养 24 h 后,可见部分细胞变长,膜鼓起并逐渐脱离细胞形成小体。光镜下可见细胞核固缩,靠边呈新月体,细胞膜包裹裂解的细胞核及细胞核形成的凋亡小体,即为倒置显微镜下见到的小体。

**2.3 FCM 分析** 浓度为 10 和 100 mg · L<sup>-1</sup> 小檗碱作用 24 h, MOLT-4 细胞 DNA 组方图中亚 G<sub>1</sub> 期 DNA 含量(细胞凋亡率)随小檗碱剂量的加大而增高,且有 G<sub>2</sub>/M 期增加和 S 期减少。见表 2。

**2.4 凋亡细胞 DNA 电泳** MOLT-4 细胞在 100 mg · L<sup>-1</sup> 小檗碱作用 24 h 后出现典型的 DNA 梯形条带,证明小檗碱作用后细胞内源性核酸酶活性增高,将核小体之间 DNA 切割形成 180 ~ 200 bp 的多聚体。10 mg · L<sup>-1</sup> 小檗碱作用 24 h 后无明显梯形条带,可能与浓度较低有关,对照组也无梯形条带。结果与 FCM

[收稿日期] 2004-12-17 [修回日期] 2005-02-02

[作者简介] 蒋 艳(1978 -),女,山东滨州人,在读硕士,主要从事儿科血液疾病与肿瘤的研究。电话:027 - 83663279, E-mail: jiangyan859@sohu.com。

分析符合。

表 2 不同浓度小檗碱处理后细胞 FCM 检测结果 %

编号	浓度/ (mg · L <sup>-1</sup> )	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub> /M	S	凋亡率
1	0	56.69	8.62	34.69	2.05
2	10	54.65	13.85	31.50	5.83
3	100	61.33	11.03	27.64	19.93

### 3 讨论

Li 等<sup>[1]</sup>发现小檗碱以一种时间和剂量依赖的方式,潜在抑制了消化道、乳腺和克隆癌细胞。它可以抑制 cyclinB1 蛋白,导致 cdc2 激酶活性完全抑制,细胞停滞在 G<sub>2</sub>期。它对肿瘤细胞的抑制作用似乎是选择性抑制 cyclinB1,从而导致 cdc2 激酶活性的抑制。小檗碱可以直接抑制细胞周期蛋白,而后者为细胞生长周期过程的重要因素<sup>[2]</sup>。Cheng 等<sup>[3]</sup>认为小檗碱抗肿瘤的功能是通过在活化淋巴细胞中抑制 DNA 合成作用来实现的。小檗碱对人类白血病细胞 NAT 活性和 2-AF-DNA 复合物形成的影响,证实小檗碱对二者均有抑制作用,这种抑制作用大小呈浓度依赖性,剂量越大,抑制能力越强。Lin 等<sup>[4]</sup>对 K562、U937 等白血病细胞系的研究结果表明黄连的提取物和它们主要成分小檗碱和黄连碱有明显的抗白血病活性。Jantova 等<sup>[5]</sup>用 HeLa 细胞和鼠的白血病细胞 L1210 研究表明,HeLa 细胞的 IC<sub>100</sub> < 100 mg · mL<sup>-1</sup>,而 L1210 细胞 IC<sub>100</sub> 接近 10 mg · mL<sup>-1</sup>,而且有剂量依赖的细胞 S 期的减短和 G<sub>2</sub>/M 期的增长。

笔者在本研究发现,在细胞毒性实验中,小檗碱作用呈时间依赖性。柔红霉素和小檗碱合用,可以增强柔红霉素的抗淋巴细胞白血病细胞的作用。流式分析和 DNA 片断分析表明小檗碱细胞凋亡率呈剂量依赖性,且 G<sub>2</sub>/M 期增加和 S 期减少。小檗碱有较明显的诱导凋亡的作用,而且它能增强柔红霉素的抗肿瘤作用。

#### [ 参考文献 ]

[ 1 ] Li X K, Motwani M, Tong W, *et al.* Huanglian, a Chinese herbal extract inhibits cell growth by suppressing the expressing of cyclin B1 and inhibiting CDC2 kinase activity in human cancer cells[ J ]. *Mol Pharmacol*, 2000, 58( 9 ): 1287 - 1292.

[ 2 ] Margaret B, Thomas D G. Control apoptosis by Rel/MF-kB transcription factors[ J ]. *Oncogene*, 1999, 18( 23 ): 6910 - 6914.

[ 3 ] Cheng J G, Chen G W, Hung C F, *et al.* Effects of berberine on arylamine N-acetyltransferase activity and 2-aminofluorene-DNA adduct formation in human leukemia cells[ J ]. *Am J Chin Med*, 2000, 28( 2 ): 227 - 231.

[ 4 ] Lin C C, Ng L T, Hsu F F, *et al.* Cytotoxic effects of coptis chinesnsis and Epimedium sagittatum extracts and their major constituents ( berberine, coptisine and icariin ) on hepatoma and leukaemia cell growth [ J ]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2004, 31( 1-2 ): 65 - 69.

[ 5 ] Jantova S, Cipak L, Cernakova M, *et al.* Effect of berberine on proliferation, cell cycle and apoptosis in HeLa and L1210 cells[ J ]. *J Pharm Pharmacol*, 2003, 55( 8 ): 1143 - 1148.

## 灵芝菌丝体对化学性肝损伤小鼠的保护作用

杨祚荣, 卢 振, 李 秋

( 湖北省黄石市中心医院药剂科, 435000 )

[ 摘 要 ] 目的 研究发酵灵芝菌丝体对四氯化碳( CCl<sub>4</sub> )诱导的化学性肝损伤小鼠的保护作用。方法 50 只小鼠随机分为 5 组, 每组 10 只。灵芝菌丝体低、中、高 3 剂量组分别灌胃给予灵芝菌丝体混悬液 0.3, 0.6, 0.9 g · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>, 空白对照组和模型对照组则同期给予等容量 0.9% 氯化钠注射液。30 d 后, 低、中、高剂量组和模型对照组腹腔注射 CCl<sub>4</sub> 致小鼠化学性肝损伤模型, 测定小鼠血清中的丙氨酸氨基转移酶( ALT )、天冬氨酸氨基转移酶( AST )等生化指标, 同时对肝组织进行病理组织学检查。结果 灵芝菌丝体可使化学性肝损伤小鼠升高的血清 ALT、AST 和肝脏指数降低, 并使肝脏病理损伤性变化减轻。结论 灵芝菌丝体对化学性肝损伤小鼠有保护作用。

[ 关键词 ] 灵芝菌丝体; 肝损伤, 化学性; 保护作用

[ 中图分类号 ] R282.71; R965

[ 文献标识码 ] A

[ 文章编号 ] 1004-0781( 2005 )07-0570-03

### Protective Effects of Mycelia of Glossy Ganoderma on Chemical Liver Injury in Mice

YANG Zuo-rong, LU Zhen, LI Qiu ( Department of Pharmacy, Central Hospital of Huangshi City, Hubei Province, 435000, China )