

白花蛇舌草提取物诱导 U937 细胞凋亡的实验研究

林圣云¹, 叶宝东¹, 胡美薇², 胡致平¹, 虞荣喜¹, 周郁鸿^{1*} (1. 浙江省中医院血液科, 杭州 310006; 2. 余杭第一人民医院血液科, 杭州 311100)

摘要:目的 探讨中草药白花蛇舌草 (HDW) 醇提取物在体外对人白血病细胞株的增殖抑制和凋亡作用。方法 以白血病 U937 细胞为研究对象, 以不同浓度和不同时间 HDW 醇提取物为干预因素, 用 MTT 法检测 HDW 醇提取物对 U937 细胞的抑制作用; 用细胞形态学、流式细胞术、DNA 电泳观察细胞凋亡情况。结果 U937 细胞经 HDW 醇提取物作用后, 呈时间和剂量依赖性。光镜观察可见细胞膜完整、核碎裂、凋亡小体等形态学特征, DNA 电泳呈现典型的梯形条带, 流式细胞仪分析表明

基金项目: 浙江省中医药管理局基金 (2004C036) 资助

作者简介: 林圣云 (1963 -), 女, 副主任医师, 硕士生导师。电话: 0571 - 86620325

* 通讯作者: 周郁鸿 (1951 -), 女, 教授, 主任医师, 博士生导师。电话: 13588887286

0.5, 1, 2, 4 mg/mL 的 HDW 醇提取物使 U937 细胞发生凋亡率分别为 4.18%, 56.96%, 82.43%, 56.41%。结论 HDW 醇提取物抗肿瘤效应强, 同时抑制 U937 细胞的增殖及诱导细胞凋亡。

关键词: 白花蛇舌草醇提取物; 白血病 U937 细胞; 凋亡

中图分类号: R282.710.5 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2007)02-0089-04

Laboratory Investigation of the Effect of the Extract of *Oldenlandia diffusa* on U937 Cell Apoptosis Induction

LIN Sheng-yun¹, YE Bao-dong¹, HU Mei-wei², HU Zhi-ping¹, YU Rong-xi¹, ZHOU Yu-hong¹ (1. Zhejiang Hospital of TCM, Hangzhou 310006, China; 2. The First People's Hospital of Yuhang, Hangzhou 311100, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effect of ethanol extract of *Oldenlandia diffusa* Willd on the proliferation and apoptosis of U937 cells. **METHODS** By MTT colometric assay, the inhibitory effect of ethanol extract of *Oldenlandia diffusa* on U937 cells was tested. Exposed log phase growth U937 cells to different concentrations of ethanol extract of *Oldenlandia diffusa* for different time, respectively, and then test the inhibitory effect by modified tertroalium salt (MTT) assay. The apoptosis of *Oldenlandia diffusa* induced on U937 cells was detected by optics microscope, flow cytometry and gel electrophoresis of DNA. **RESULTS** The antiproliferation effects were observed following exposure of ethanol extract of *Oldenlandia diffusa*. It showed a very substantial differences in the dose and duration dependency of the observed antiproliferative and cytotoxic effects. The U937 cells treated by ethanol extract of *Oldenlandia diffusa* are observed apoptosis characteristic morphological changes such as complete cell membrane, nuclear fragmentation apoptotic bodies and found trapezoidal belt with DNA. When ethanol extract of *Oldenlandia diffusa* treated U937 cells at the dose of 0.5, 1, 2, 4 mg/mL for 48 hours, the numbers of the apoptotic cells were respectively 4.18%, 56.96%, 82.43%, 56.41%. **CONCLUSION** Ethanol extract of *Oldenlandia diffusa* has the ability to inhibit the proliferation and induce the apoptosis of U937 cells.

KEY WORDS: ethanol extract of *Oldenlandia diffusa*; U937 cells; apoptosis

白花蛇舌草 (*Hedyotis diffusa* Willd, HDW) 是一种茜草科耳草属植物, 具有清热解毒, 活血化瘀, 利水渗湿, 消肿止痛之功效, 常用于热症, 肠胃痛, 肿瘤, 泌尿系疾病, 虫蛇咬伤等疾病^[1]。最近研究表明 HDW 提取物对多种肿瘤细胞具有明显增殖抑制作用^[2-3]。为明确 HDW 治疗白血病的作用机制, 以白血病 U937 细胞株为对象进行研究。

1 材料和方法

1.1 材料

HDW 醇提取物由浙江大学制药工程研究所提供, 其制备过程为先将 HDW 粉煎煮浓缩后, 再用乙醇提取而得, 用生理盐水调至工作母液浓度 100 mg/mL, -20℃ 保存, 临用前用 RPMI 640 调至所需浓度。U937 细胞株由浙江大学医学院肿瘤研究所提供, 培养于含 10% 小牛血清 (杭州四季青生物制品公司生产) 的 RPMI 640 培养基 (Gibco 公司产品) 中, 在 37℃, 5% 的 CO₂ 培养箱中常规培养, 每 2~4 d 传代一次, 取对数生长期细胞进行实验。

1.2 方法

1.2.1 细胞活力测定 (MTT 法) 将 U937 细胞调整浓度至 1×10^5 /mL, 接种于 96 孔板, 每孔总量 100 μ L, 以倍比稀释法分别加入 0.5~8 mg/mL HDW 醇提取物 100 μ L, 每一药物浓度设 3 个复孔。空白对照组用等体积的生理盐水替代药物, 分别培养 24, 48, 72 h。MTT 法观察白花蛇舌草提取物对 U937 细胞的抑制率, 用酶标仪 570 nm 处测吸光度 (A) 值, 计算 IC₅₀ 值。

1.2.2 光学显微镜下细胞形态学观察 各组细胞常规 Wright-Giemsa 染色, 油镜下观察细胞形态并摄片。

1.2.3 流式细胞仪 (FCM) 检测细胞 DNA 含量 各组细胞经 70% 的预冷乙醇固定, RNA 酶处理, 碘化丙啶染色后, 流式细胞仪 (Becton Dickinson 公司产品) 检测, 计数 1×10^4 个细胞, Multicycle2.5 DNA 分析软件分析数据。

1.2.4 细胞 DNA 提取及电泳 各组细胞加入 DNA 提取液 (细胞 DNA 的提取采用购自上海申博采生物科技有限公司的 Genomic DNA Miniprep Kit V.2 试剂盒提取, 酚/氯仿法抽提, 获取沉淀 DNA, 于 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳 (2 V/cm $\times$ 2 h) 成像。

1.3 统计学处理

SPSS 10.5 for Windows 统计软件分析结果, IC₅₀ 采用加权直线线性回归法求得, 两样本均数的比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 HDW 醇提取物对 U937 细胞的增殖抑制作用

MTT 法检测 HDW 醇提取物抑制 U937 细胞增殖具有时间和剂量依赖性, 浓度分别为 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 mg/mL HDW 醇提取物对 U937 细胞作用 24, 48, 72 h 后抑制率分别与空白对照组相比, 除浓度为 0.25 mg/mL 无明显差异外, 其余浓度均有显著性差异, 见图 1。

2.2 HDW 醇提取物对细胞凋亡的影响

2.2.1 凋亡细胞的形态 1 mg/mL HDW 醇提取物作用 U937 细胞 24 h 后, Wright-Giemsa 染色, 光学显微镜下可见细

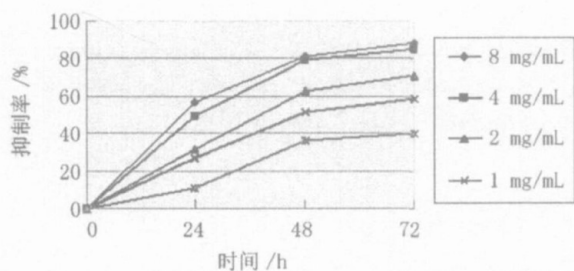


图 1 不同浓度白花蛇舌草醇提取物对 U937 细胞作用不同时间细胞抑制率

Fig 1 The inhibitory effect of different concentrations of ethanol extract of *Odenlandia diffusa* Willd on U937 cells for different time

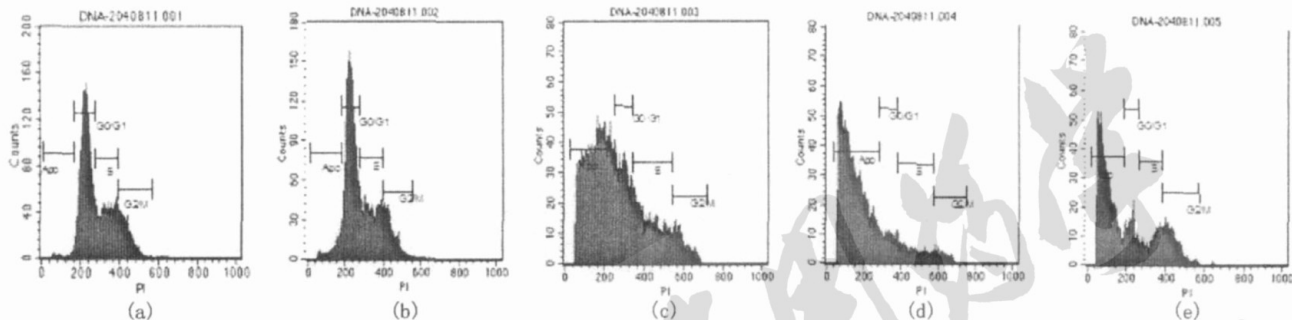


图 2 HDW 醇提取物作用 U937 细胞 48 h 后 DNA 含量变化

Fig 2 The changes of DNA content of U937 cells following exposure the ethanol extract of HDW after 48 hours

(a) 对照组, 凋亡率 0.9%; (b) 0.5 mg/mL, 凋亡率 4.18%; (c) 1 mg/mL, 凋亡率 56.96%; (d) 2 mg/mL, 凋亡率 82.43%; (e) 4 mg/mL, 凋亡率 56.41%

(a) control group, the rate of apoptotic 0.9%; (b) 0.5 mg/mL, the rate of apoptotic 4.18%; (c) 1 mg/mL, the rate of apoptotic 56.96%; (d) 2 mg/mL, the rate of apoptotic 82.43%; (e) 4 mg/mL, the rate of apoptotic 56.41%



图 3 HDW 醇提取物作用 U937 细胞 48 h 后 DNA 琼脂糖凝胶电泳

Fig 3 The gel electrophoresis of DNA of the U937 cells following exposure of the ethanol extract of HDW after 48 hours

M: Marker; 1: 8 mg/mL 组; 2: 4 mg/mL 组; 3: 2 mg/mL; 4: 1 mg/mL; 5: 0.5 mg/mL; 6: 正常对照组

M: Marker; 1: the group of 8 mg/mL; 2: the group of 4 mg/mL; 3: the group of 2 mg/mL; 4: the group of 1 mg/mL; 5: the group of 0.5 mg/mL; 6: the normal control group

3 讨论

文献报道, HDW 在体外和体内能抑制多种实体瘤的增殖。中国现代应用药理学杂志 2007 年 4 月第 24 卷第 2 期

细胞形态的变化, 染色质分布不均, 呈致密浓染的块状, 位于核周边, 核膜增厚, 核固缩, 细胞形态基本正常, 72 h 后可见大量细胞碎片散布, 细胞核高度致密化, 并出现凋亡小体。

2.2.2 细胞凋亡率 流式细胞仪分析可见在正常二倍 DNA 峰 (G1 峰) 前出现一亚二倍体凋亡峰, 即 AP 峰, 如图所示。根据 AP 峰百分率可检测凋亡细胞比率, 结果为正常 U937 细胞凋亡率为 0.9%。浓度为 0.5, 1, 2, 4 mg/mL HDW 醇提取物各组作用 48 h 时 U937 细胞的凋亡率分别为 4.18%, 56.96%, 82.43%, 56.41%, 各药物实验组与对照组相比, $P < 0.05$ 差异显著, 见图 2。

2.2.3 DNA 梯形条带 U937 细胞经 0.5~8 mg/mL HDW 醇提取物作用 48 h 可见到典型的 DNA 梯形条带, 见图 3。

殖, 对于血液系统恶性肿瘤, 《新华本草纲目》与《中药大辞典》的 HDW 项下记载, 本品煎剂 (相当于生药 6 g/mL) 在体外对急性淋巴细胞型、粒细胞型、单核细胞型及慢性粒细胞型的肿瘤细胞有较强的抑制作用^[4]。而 HDW 含有多种化学成分, 不同溶剂又可以提取不同的成分^[5], 我们用 HDW 的醇提取物 (相当于生药 18 g/每 1 g 提取物) 作用于急性单核细胞白血病 U937 细胞株, 实验证实 HDW 醇提取物有抑制白血病的作用, 同时观察到有凋亡现象出现, 流式细胞仪表明 U937 细胞凋亡率随药物浓度和时间的增加而增加。本实验提示 HDW 醇提取物抑制白血病细胞的增殖是通过凋亡途径起作用, 关于 HDW 诱导白血病细胞的凋亡机制, 将进一步深入研究。

参考文献

- [1] ZHONG LM, ZHOU H X, LIU D. Recent development of studies on clinical application and pharmacological functions of *odenlandia diffusa* Willd [J]. *Int J Tradit Clin Med* (中医药信息), 2001, 18 (14): 14-16
- [2] LIY X, FAN H, ZHANG JS *et al*. In vitro evaluation of anticancer activity of extracts from Chinese medicinal herbs [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1999, 30 (1): 37-39
- [3] YU Y C, LIW, LU Y H, *et al*. Antitumor effects of *odenlandia*

diffusa on multidrug resistance of human hepatic cancer cell Bel-7402 in vitro [J]. Journal of Beijing University: Natural Science

(北京大学学报:自然科学版), 2004, 5(3): 221-223.

[4] Jiangsu New Medical College. Herbal macro-dictionary(中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai People Publishing Company, 1997:

754.

[5] ZHAO H R, LI R, LIN Y N, *et al*. Influence of extraction process of hedyotis diffusa on anti-tumor activity [J]. J China Pharm Univ (中国药科大学学报), 2002, 33(6): 510-513.

收稿日期: 2006-01-17