

生长密集状态,这可能得助于婴幼儿角膜内皮细胞具有较高的生长分裂潜力,因此成年人角膜内皮细胞用此方法培养难以成功,细胞不能达到密集状态。我们曾将培养的人角膜内皮细胞种植于除去内皮细胞的兔角膜植片上,再将此植片移植到兔眼中,获得成功<sup>[4,5]</sup>,移植的角膜内皮细胞具有正常的形态特征和生理功能,能维持角膜的正常厚度及透明度。

### 摘 要

本文报告了用带塑料环的明胶培养膜培养角膜内皮细胞和角膜上皮细胞的结果。两种细胞在达到生长密集状态后,均具有正常眼角膜内皮和角膜上皮细胞的形态特征。此方法可用于各种培养细胞的研究,特别是需分隔细胞层顶面和底面培养环境的实验及药物毒性等研究,使实验条件更接近于正常眼内的环境条件。

### 参 考 文 献

[1] Stocker FW, et al., *Am J Ophthalmol*

1958, 20:294.

[2] Perlman M, Baum JL. *Arch Ophthalmol* 1974, 92:235.

[3] Mannagh J, Ray Irving A. *Arch Ophthalmol* 1965; 74:847.

[4] Lin N, et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (abstract) 1987; 28(suppl): 171.

[5] McCulley, JP, et al., *Cornea* (abstract) 1987; 6:67.

[6] McCarey BE, Kaufman HE. *Invest Ophthalmol* 1974; 13:165.

[7] Kaufman HE, et al., *Am J Ophthalmol* 1984; 98:112.

[8] Jumblatt MM, et al., *Transplantation* 1980; 29:498.

[9] Jumblatt MM, et al., *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1978; 17:1135.

[10] Jumblatt MM, et al., *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986; 27:8.

[11] 林宁等, 中山医科大学学报, 1989, 10:17.

[12] Nayak SK, Binder PS. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984; 25:1213.

[13] Inslar MS, Lopez JG. *Curr Eye Res* 1986; 5:967.

## 茯苓素对人白血病细胞系 HL-60 的诱导分化作用

范 勇 杜德林 李秀森·唐佩弦  
(军事医学科学院基础医学研究所)

茯苓素是从茯苓多糖的粗提物中得到的一组小分子化合物。它的抗肿瘤活性已被吕丁等和我们以前的工作所证实<sup>[1]</sup>。在体外,茯苓素可以明显地抑制小鼠 L<sub>1210</sub> 和人白血病细胞系 HL-60 的增殖。在本文中,我们以 HL-60 细胞为模型,对茯苓素的诱导分化活性进行了研究。结果发现,在培养体系中加入 12.5—100  $\mu\text{g/ml}$  的茯苓素,HL-60 细胞分化为单核—巨噬细胞。硝基蓝四唑(NBT)阳性率明显高于对照组,细胞形态、细胞化学染色及吞噬功能均发生显著变化。

### 材 料 与 方 法

#### 1. 细胞

由中国医学科学院药物研究所韩锐教授提供 HL-60 细胞系。RPMI 1640 培养液加 20% 经 56 $^{\circ}\text{C}$  30 分钟灭活的小牛血清,再加入青霉素、链霉素、卡那霉素各 100 U/ml,在 5%  $\text{CO}_2$ 、37 $^{\circ}\text{C}$  饱和湿度条件下培养。每 3—4 天传代 1 次。实验时取对数生长期的细胞,离心 1500 rpm, 7 分钟,弃上清,细胞再悬于新鲜培养液内,加入 12.5—100  $\mu\text{g/ml}$  茯苓素进行培养。

#### 2. 药物与试剂

茯苓素由中国医学科学院医药生物技术研究所生

化室许津教授提供。配成水溶液和乙醇溶液。小牛血清(本院放射医学研究所), RPMI 1640培养基(Gibco), NBT(瑞士Fluka), 氯乙酸AS-D萘酚(北京化工), 乳胶颗粒(上海化学试剂厂), 4-甲基糠形酮-磷酸, 4-甲基糠形酮-葡萄糖醛酸(Sigma)。

### 3. 观察指标

(1) 用离心涂片法制成细胞涂片, Wright-Giemsa染色, 作细胞形态学观察。

(2) NBT还原试验 收获 $1 \times 10^6$ 细胞, 1500 rpm离心7分钟, 弃上清, 加入新鲜含20%小牛血清的1640培养液0.5 ml, 1.1 mg/ml NBT溶液0.5 ml,  $3.24 \mu\text{M}$ 的TPA(佛波醇双酯)0.05 ml,  $37^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$ 培养箱孵育25分钟, 冰浴终止反应, 离心涂片, 作Wright-Giemsa染色, 油镜下计数阳性细胞, 计数200个细胞, 得阳性率。

(3) 非特异性酯酶( $\alpha$ -NAE)、酸性磷酸酶(ACP)、萘酚AS-D氯醋酸酯酶(CE)染色采用本实验室常规方法<sup>[2]</sup>。

(4) 溶酶体酶测定: 用荧光比色法测酸性磷酸酶(ACP)和 $\beta$ -葡萄糖醛酸酶( $\beta$ -Gluc)含量。用0.05 mol/L pH 4.0的醋酸缓冲液配制4-甲基糠形酮-磷酸和4-甲基糠形酮-葡萄糖醛酸作为底物, 用0.1%的Triton-100 $\times$ 将培养一定时间的细胞制成裂解液, 与底物作用15分钟后, 用0.1 mol/L pH 10.6的甘氨酸缓冲液终止反应。用荧光分光光度计(岛津RF-540型)测定生成的荧光产物, 该产物反映着酶的含量。

(5) 吞噬功能测定: 将2  $\mu\text{l}$ 的乳胶颗粒(浓度 $5 \times 10^8/\text{ml}$ , 平均直径1—1.2  $\mu$ ), 加至1.0 ml无血清培养液中, 收获细胞 $1 \times 10^6$ , 与上述乳胶颗粒悬液共同孵育,  $37^\circ\text{C}$  1小时, 用PBS洗3次, 去除细胞表面粘附的乳胶颗粒, 离心涂片, Wright-Giemsa染色, 显微镜下计数阳性细胞, 每个细胞以吞噬5个颗粒以上者为阳性。每个样品计数300个细胞, 得阳性率。

## 结 果

### 1. 形态学变化

茯苓素处理3天后, 倒置显微镜下可见部分细胞贴壁, 呈梭形, 高浓度组尤著。但细胞贴壁不牢, 用滴管吹打便可使其脱落。到第4—6天, 细胞形态发生明显变化。主要表现为胞体增大, 胞质丰富, 染色变浅(由深蓝变浅灰蓝)。胞核质比值缩小。核由圆形变为椭圆、肾形、马蹄铁形等多种形状, 个别细胞核呈分叶状。核染色质浓集, 呈条网状, 核仁仍可见, 但远不及对照组清晰。从形态学看, 茯苓素作用后的细胞类似单核巨噬细胞(图版图1、2)

### 2. NBT反应

HL-60细胞与12.5—100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 茯苓素一起培养4天, 50—80%以上的细胞获得还原NBT染料的能力。阳性细胞质中出现蓝黑色甲臆颗粒(图版图3、4)。到第6天时, 阳性率增至70—90%以上(见图)。用50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 茯苓素处理细胞, 分别于第1、2、3、4、6天做NBT还原测定, 观察细胞出现还原NBT能力的动态。结果于加药的第2天出现阳性细胞, 约15%, 第3天增至50%。第6天达90%。而对照组未发现阳性细胞, 第3天仅2%, 第6天4.5%。

### 3. 酶组织化学反应

分别于加药的第4、6天观察了 $\alpha$ NAE、ACP、CE反应的变化, 结果见表1。

### 4. 溶酶体酶测定

用荧光比色法测定了茯苓素处理前后两种

表1 HL-60细胞经茯苓素处理后几种酶组织化学反应

茯苓素浓度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	$\alpha$ -NAE 阳性率(%)		ACP 强度		CE 强度	
	4天	6天	4天	6天	4天	6天
100	84.6 $\pm$ 10.5	89.6 $\pm$ 16.8	+++	+++	-	-
75	81.8 $\pm$ 6.1	82.4 $\pm$ 12.5	+++	+++	±	-
50	67.6 $\pm$ 5.6	80.0 $\pm$ 4.4	+++	+++	±	±
25	28.8 $\pm$ 12.2	61.8 $\pm$ 12.3	+++	+++	±	±
12.5	23.5 $\pm$ 11.3	58.5 $\pm$ 11.4	++	+++	+	+
0	2.0 $\pm$ 0.4	5.4 $\pm$ 3.7	+	+	+++	+++

表2 HL-60细胞与不同浓度茯苓素孵育后4及6天酸性磷酸酶(ACP)与 $\beta$ -葡萄糖醛酸酶( $\beta$ -Gluc)活性变化

茯苓素浓度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	ACP( $\text{ng产物}/\text{min}/10^5\text{细胞}$ )		$\beta$ -Gluc( $\text{ng产物}/\text{min}/10^5\text{细胞}$ )	
	4天	6天	4天	6天
100	32.0 $\pm$ 8.5**	31.0 $\pm$ 8.8**	1.16 $\pm$ 0.58*	0.88 $\pm$ 0.24
75	35.6 $\pm$ 8.8**	36.2 $\pm$ 19.1*	0.85 $\pm$ 0.55**	1.39 $\pm$ 0.98
50	41.7 $\pm$ 7.6**	39.4 $\pm$ 14.7**	1.16 $\pm$ 0.52**	1.81 $\pm$ 1.35*
25	35.2 $\pm$ 12.4**	41.8 $\pm$ 18.7**	1.06 $\pm$ 0.46**	1.74 $\pm$ 1.02*
12.5	26.8 $\pm$ 11.7*	39.0 $\pm$ 19.2*	0.96 $\pm$ 0.57*	1.35 $\pm$ 1.11
0	13.4 $\pm$ 3.9	19.6 $\pm$ 4.2	0.31 $\pm$ 1.80	0.57 $\pm$ 0.32

与对照相比: \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$   
 $\bar{x} \pm \text{SD}$

反映单核-巨噬细胞特征的溶酶体酶 ACP 和  $\beta$ -Gluc 含量的变化。加药第 4、6 天两种酶活性明显高于对照组( $p < 0.05$  或  $0.01$ )，当茯苓素浓度递增到 75、100  $\mu\text{g/ml}$  时即失去剂量-效应的相关性(表 2)。

### 5. 吞噬功能测定

茯苓素处理 3 到 4 天后，HL-60 获得吞噬乳胶颗粒功能的细胞分别为 31.4% 及 73.6%。与平行组 NBT 阳性率接近，后者为 47.5% 和 80.0%。而对照组吞噬细胞及 NBT 阳性率均不超过 3.0%(表 3，图版图 5、6)。

### 6. 茯苓素诱导分化的时间及可逆性试验

用 50  $\mu\text{g/ml}$  茯苓素与 HL-60 细胞共同孵

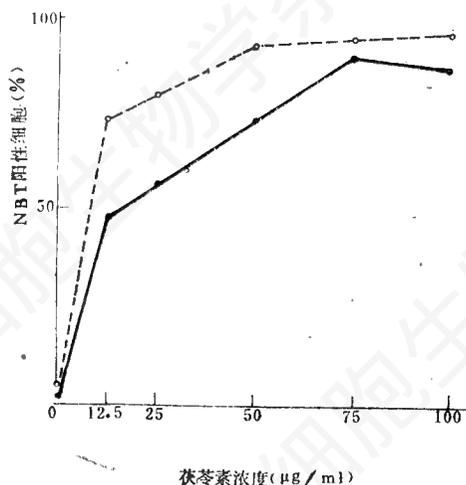


图 HL-60 细胞与茯苓素孵育 4、6 天时 NBT 阳性细胞的百分率

●—● 4天 ○—○ 6天

表3 HL-60 细胞经茯苓素处理后吞噬功能的获得及与 NBT 阳性率的比较

组别	茯苓素(50 $\mu\text{g/ml}$ )		对 照	
	3天	4天	3天	4天
NBT阳性细胞(%)	47.5	80.0	0	2.0
吞噬功能细胞(%)	31.4	73.6	0	1.6

育，于加药后 3、6、12、24、48、72 小时洗去药物，细胞再悬于不含茯苓素的新鲜培养液内，于 96 小时做 NBT 还原试验。结果表明，在 24 小时前洗去药物，细胞 NBT 阳性率无变化。48 小时后洗去药物，NBT 阳性率明显升高，达 70-90% 以上，而对照组及 24 小时前洗去药物的各组阳性率均在 5% 以下。

### 讨 论

上述实验结果表明，茯苓素可诱导 HL-60 分化成熟为单核巨噬样细胞。目前发现的诱导 HL-60 细胞分化的诱导剂已有百余种，有抗代谢药，如阿糖胞苷(Ara-C)，蒽环类抗菌素，如柔佛霉素；肿瘤促发剂，如佛波醇双酯(TPA)；极性化合物，如二甲基亚砷；还有一些具有生理活性的物质，如维生素 A 酸(RA)，1,25(OH) $_2$ D $_3$  和生物因子，如干扰素(IFN)，肿瘤坏死因子(TNF)，白细胞介素(IL-3)等。茯苓素作用后的 HL-60 细胞 NBT 阳性率远高于 TPA，与  $10^{-6}\text{mol/L}$  的 RA 接近。但从形态变化来看，茯苓素的诱导作用不如 RA、TPA 等诱导

剂完全<sup>[2]</sup>。表现为细胞核仁还隐约可见。茯苓素诱导 HL-60 细胞分化至少需持续作用 48 小时以上, 而 TPA 只需 3—6 小时<sup>[3]</sup>, RA 12—24 小时<sup>[4]</sup>, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 4 小时便可诱导 HL-60 细胞分化<sup>[5]</sup>。茯苓素与 RA 等诱导剂一样, 一经诱导分化, 细胞便不依赖于药物的存在而继续分化成熟, 其诱导分化作用为不可逆性。

白血病的发生, 首先是造血细胞分化障碍, 具有分裂增殖能力的白血病细胞在组织内蓄积和浸润等, 从而出现一系列临床症状。用诱导分化的方法治疗白血病是近年来一种新的尝试。诱导分化的研究, 为研究细胞分化的调控, 白血病的发病机理也提供了有益的实验模型。目前, 虽然越来越多的分化诱导剂相继问世, 但中药的诱导分化作用却报道甚少。茯苓素诱导细胞分化活性的发现, 为诱导剂的来源开辟了一条新的探索途径。此外, 茯苓素尚有抑制肿瘤细胞增殖, 增强机体免疫的作用<sup>[1,6]</sup>, 如果同样可以诱导原代培养的白血病细胞分化, 经临床前药理实验后, 有可能用于髓系白血病人的辅助治疗手段。

## 摘 要

本文报道了茯苓素对人急性早幼粒白血病细胞系 HL-60 的诱导分化作用。用 12.5—100 μg/ml 茯苓素处理 4 天, 50—80% 以上的 HL-60 细胞获得还原 NBT 染料的能力。细胞形态及细胞化学反应发生显著变化。溶酶体酶含量显著增加, 并获得吞噬乳胶颗粒的能力, 分化为单核巨噬样细胞。茯苓素诱导 HL-60 细胞分化需持续作用 48 小时以上, 诱导分化作用为不可逆性。

## 参 考 文 献

- [1] 许津等, 1988, 中国医学科学院学报, 10 (1), 45-49.
- [2] 杜德林, 李秀森, 1987, 军事医学科学院院刊, 11(1): 14-23.
- [3] Fantana JA. et al., 1981, *Peoc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (6): 3863-3866.
- [4] Breitman, TK., 1982, Expression of differentiated functions in cancer cells. Edited by RF. Revoltalla et al: pp 257-275 Raven Press, New York.
- [5] Murao, SI. et al., 1983, *Cancer Research*, 43 (10): 4989-4996.
- [6] 吕丁等, 1987, 中国医学科学院学报, 9 (6): 433-438.

## 钙离子与激素对小麦黄化幼苗离体核转录活性的影响

黄凤英 邱泽生 赵微平  
(北京师范大学生物系)

近年来, 随着研究手段的进步, 对转录这一基因表达过程的重要环节有了进一步的了解。但对植物细胞内的这一过程以及各种因素对转录的调控关系还了解得不够。目前, 人们普遍承认, 植物激素对转录有调控作用。曾发现洋葱根尖细胞核经激动素处理 30 分钟后, 即可看到 RNA 量增加<sup>[1]</sup>; 浮萍、豌豆根组织以及椰子、豌豆芽的离体细胞核等都能在 KT\* 刺

激下加速 RNA 的合成<sup>[2-5]</sup>。但也有报道证明 KT 并无促进 RNA 合成的作用<sup>[6]</sup>。

Ca<sup>2+</sup> 在植物体中有不同于其他二价离子的特殊作用以及钙调蛋白(CaM)的发现, 使人们对 Ca<sup>2+</sup> 颇感兴趣。目前趋向一致的看法是:

KT: 激动素; IAA: 吲哚-3-乙酸; EGTA: 乙二醇双乙胺醚-N, N'-四乙酸。