

千层纸素诱导人慢性粒细胞白血病 K562 的凋亡作用

王 玉^{1,2}, 赵 丽^{1,2}, 缪瀚驰^{1,2}, 李志裕³, 郭青龙^{1,2*}(¹江苏省肿瘤发生与干预重点实验室; ²天然药物活性组分与药效国家重点实验室;³中国药科大学药物化学教研室, 南京 210009)

摘 要 探讨千层纸素对人慢性粒细胞白血病细胞 K562 的凋亡诱导作用及其可能机制。采用 MTT 法检测细胞存活率; 电镜下观察细胞超微结构的改变; DAPI 染色观察细胞凋亡; 流式细胞仪检测细胞凋亡率; Western blot 法分析凋亡相关蛋白 caspase 9、survivin 及 ERK1/2 的表达变化情况。结果表明千层纸素呈浓度依赖地抑制 K562 细胞的增殖作用, 诱导 K562 细胞发生凋亡, 上调 K562 细胞中 cleaved-caspase 9 蛋白, 下调 survivin、pro-caspase 9 及 p-ERK1/2 蛋白的表达水平。千层纸素可诱导 K562 凋亡, 这可能与下调 survivin 蛋白表达, 激活 caspase 9 蛋白, 抑制 ERK 信号通路有关。

关键词 千层纸素; 人慢性粒细胞白血病; 凋亡; 抗肿瘤活性

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2014)02-0232-05

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20140218

Apoptosis induction of oroxylin A in human chronic myelogenous leukemia cell line K562

WANG Yu^{1,2}, ZHAO Li^{1,2}, MIAO Hanchi^{1,2}, LI Zhiyu³, GUO Qinglong^{1,2*}

¹Jiangsu Key Laboratory of Carcinogenesis and Intervention; ²State Key Laboratory of Natural Medicines; ³Department of Medicinal Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract To investigate the apoptotic effect of oroxylin A on human chronic myelogenous leukemia cell line K562 and its potential mechanism. K562 cells were treated with oroxylin A. MTT assay was performed to assess growth inhibition effect of oroxylin A on K562 cells. The morphological change of cells were observed under electronic microscope. DAPI staining and flow cytometry were employed to observe the apoptosis rate of K562 cells. Changes in the expression of caspase 9, survivin and ERK1/2 were analyzed by Western blotting. Results showed that oroxylin A inhibited the growth of K562 in a time and dose-dependent manner. Oroxylin A induced cell apoptosis was characterized by appearance of numerous engorged vacuoles, reduction of microvilli on cell surface, condensation of chromatin and emergence of apoptotic body. Besides, oroxylin A dose-dependently induced K562 cell apoptosis, up-regulated the expression of cleaved-caspase 9 and down-regulated expression of survivin, pro-caspase 9 and p-ERK1/2 proteins. In conclusion, all these results showed that oroxylin A can induce apoptosis of K562 cells, which might be related to the down-regulation of survivin expression, activation of caspase 9 and inhibition of ERK signaling pathway.

Key words oroxylin A; chronic myelogenous leukemia; apoptosis; antitumor activity

This study was supported by China National Key High-Tech Innovation Project for the R&D of Novel Drugs (No. 2012ZX09103101-050) and the National Natural Science Foundation of China (No. 81373448, No. 81173086)

慢性粒细胞白血病(chronic myelogenous leukemia, CML)是一种发生在造血干细胞的恶性骨髓

增殖性疾病^[1], CML 严重威胁人类健康, 该亚型约占各类白血病 20%, 在慢性白血病中占 95%, 病程

* 收稿日期 2013-12-12 * 通信作者 Tel: 025-83271055 E-mail: anticancer_drug@163.com

基金项目 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目(No. 2012ZX09103101-050); 国家自然科学基金资助项目(No. 81373448, No. 81173086)

发展较缓慢。CML 细胞遗传学标志是在骨髓中可以发现 Ph 染色体[t(9;22)(q34;q11)]或 BCR/ABL 融合基因^[2]。目前临床上一线治疗药物是针对 BCR/ABL 融合基因的络氨酸酶抑制剂,如伊马替尼进行靶向治疗,但是 CML 对伊马替尼却极易产生耐受性^[3]。

千层纸素(oroxylin A,结构式见图1),属于黄酮类化合物,也是中药黄芩的有效成分之一^[4],千层纸素具有很强的抗肿瘤生物活性,其作用机制可能是通过诱导肿瘤细胞凋亡^[5],逆转肿瘤细胞耐药性^[6-7],抑制肿瘤细胞侵袭和转移^[8],诱导肿瘤细胞周期阻滞^[9],抑制肿瘤血管生成^[4]等发挥其抗肿瘤作用。千层纸素对 CML 细胞是否具有诱导凋亡作用未见报道,本文以人慢性粒细胞白血病细胞 K562 为对象,研究千层纸素对 CML 细胞的生长抑制及其诱导细胞凋亡的作用及可能机制。

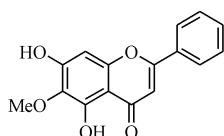


Figure 1 Chemical structure of oroxylin A

1 材 料

1.1 试 剂

千层纸素(oroxylin A,橙黄色晶体,纯度99%),由中国药科大学江苏省肿瘤发生与干预重点实验室提供,使用前用 DMSO 配成母液,临用前用细胞培养液配成所需浓度。RPMI 1640 培养基以及胎牛血清(FBS)均购自于美国 Gibco 公司;MTT 购自美国 Fluka 公司;DMSO 为上海化工有限公司的产品。Anti-caspase-9, survivin, ERK1/2, p-ERK1/2, actin 购自于美国 Santa Cruz 公司,临用前用 PBST 按 1:500 稀释成工作液使用。HRP 标记的抗兔及抗鼠二抗购自美国 Rockland Inc 公司。

1.2 细胞株

K562 与 K562/ADM 细胞株购自中国科学院上海生物化学与细胞生物学细胞库。细胞半贴壁生长,采用 100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素和 10% 胎牛血清(FBS)的 RPMI 1640 培养基、5% CO₂、37 ℃、饱和湿度下培养。

2 方 法

2.1 体外细胞培养

将 K562 细胞以适宜浓度接种于培养瓶,置于恒温 37 ℃、5% CO₂ 及饱和湿度的培养箱(以下同)中培养,细胞呈半贴壁生长状态。每 2~3 天离心传代 1 次,加入新鲜培养液吹打均匀,按所需细胞量移入新培养瓶中,添加完全培养液至适量。

2.2 透射电镜下观察千层纸素对 K562 细胞凋亡的作用

以每孔 1×10^6 个 K562 的细胞量点于 6 孔板中培养 24 h。单独给药千层纸素 60, 90, 120 $\mu\text{mol/L}$,继续培养 48 h。置于电镜下观察 K562 细胞凋亡情况并拍照。实验重复 3 次。

2.3 四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测千层纸素对 K562 的细胞生长抑制作用

取对数生长期的 K562 细胞,以每孔 100 μL 接种于 96 孔细胞培养板中,培养 24 h,除对照组外各自加入含不同浓度千层纸素的培养基 100 μL ,每组设 5 个复孔,培养 48 h 后每孔加入 MTT 20 μL ,37 ℃ 孵 4 h,4 000 r/min 离心 15 min,弃上清液,加入 DMSO 100 μL ,振荡混匀使 MTT 还原产物充分溶解后,于酶标仪检测 570 nm 波长处吸光度(A)。计算细胞的生长抑制率(inhibition ratio, IR)和 IC₅₀。以上实验重复 3 次。

2.4 双染法流式术检测细胞凋亡

以每孔 1×10^6 个 K562 的细胞量点于 6 孔板中,培养 24 h。单独给药千层纸素 60, 90, 120 $\mu\text{mol/L}$,继续培养 48 h。收集细胞,PBS 洗 3 遍,将细胞混悬于结合缓冲液 500 μL 中,依次加入 Annexin V-FITC、PI 各 5 μL ,混匀,利用流式细胞术检测细胞凋亡情况,激发波长及发射波长分别为 488 和 530 nm。

2.5 DAPI 染色法检测细胞凋亡

以每孔 1×10^6 个 K562 的细胞量点板于 6 孔板中培养 24 h。单独给药千层纸素 60, 90, 120 $\mu\text{mol/L}$,继续培养 48 h。收集细胞,均匀涂片于盖玻片上,室温下用 4% 多聚甲醛(PBS 配制,pH 7.4)固定 30 min。用 PBS 洗玻片 3 次,然后放入 0.2% TritonX-100(PBS 配制)溶液中,室温下放置 5 min,用 PBS 洗 3 次。用 DAPI(5.0 mg/mL)染色 10 min,用 PBS 洗 3 次,荧光显微镜观察,拍照。

2.6 免疫印迹

给予千层纸素的剂量为 60、90 和 120 $\mu\text{mol/L}$ 处理 48 h, 收集并裂解细胞, 提取细胞总蛋白, 用 BCA 法对蛋白进行定量, 取等量蛋白样品用 10% SDS-PAGE 进行电泳, 恒压将蛋白转至醋酸纤维素膜, 室温下将膜在含 1% BSA 的 PBS 中封闭 1 h, 按照一定的稀释度加入各种一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, HRP 标记的二抗 (1:2 000) 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 近红外荧光扫描仪扫描。

2.7 统计学处理

采用 SPSS16.0 统计软件, 计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 千层纸素对 K562 细胞增殖的影响

根据图 2 显示, 随着给药时间和剂量的增加, 千层纸素对肿瘤细胞的生长抑制率越来越高, 呈一定的时间-剂量依赖关系, 在给药 24 h 后, K562 对千层纸素的 IC_{50} 为 $(225.2 \pm 10.25) \mu\text{mol/L}$, 在给药 48 h 后, IC_{50} 为 $(119.3 \pm 8.12) \mu\text{mol/L}$ 。

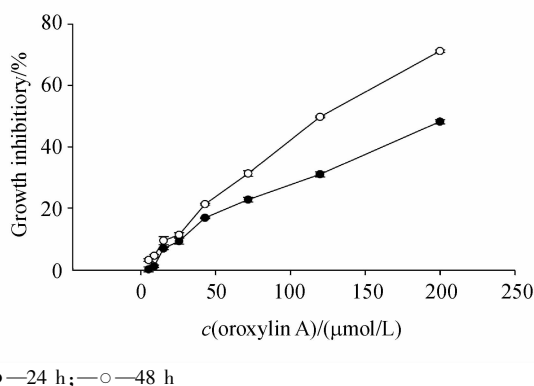


Figure 2 Inhibitory effect of oroxylin A on K562 cells was detected by MTT assay. After treatment with various concentrations of oroxylin A for 48 h, growth inhibition was assessed ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2 千层纸素对细胞超微结构的影响

电镜下观察, 对照组细胞形态清晰, K562 细胞呈圆形, 结构完整饱满, 细胞核较大, 核仁明显。用 60、90 和 120 $\mu\text{mol/L}$ 千层纸素处理 48 h 后, 细胞发生了不同程度的凋亡, 表现为胞质内出现大量空泡, 细胞核发生破碎, 核仁变小, 见图 3。

3.3 双染法流式术检测细胞凋亡

用 60、90 和 120 $\mu\text{mol/L}$ 千层纸素处理 K562 细

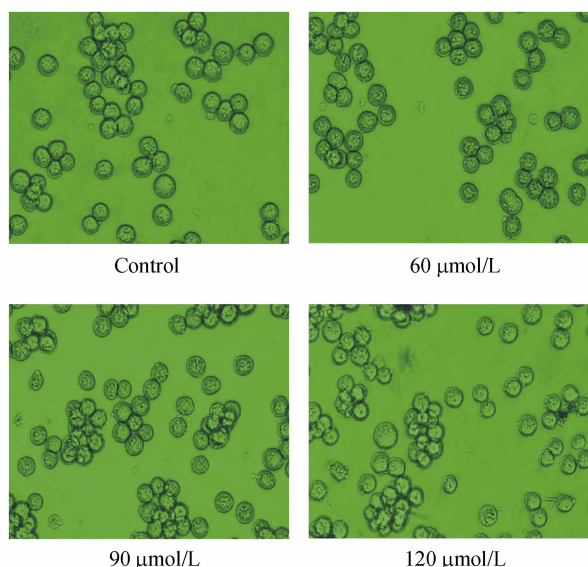


Figure 3 Morphological change of cells caused by oroxylin A treatment by transmission electron microscope

胞 48 h 后, 收集细胞, Annexin V-FITC/PI 双染, 流式细胞术检测细胞凋亡情况, 如图 4(A) 中显示, 随着千层纸素浓度的增加, 细胞凋亡率也随之增加, 120 $\mu\text{mol/L}$ 的千层纸素可以引起高达 40.6% 的细胞凋亡。与对照组相比, 60、90 和 120 $\mu\text{mol/L}$ 的千层纸素处理引起的早期凋亡以及 120 $\mu\text{mol/L}$ 的千层纸素引起的晚期凋亡有显著性差异, 结果具有统计学意义 ($P < 0.05, P < 0.01$), 实验重复 3 次, 见图 4(B) 所示。

3.4 DAPI 染色检测细胞凋亡情况

采用 DAPI 染色实验来检测千层纸素的诱导细胞凋亡作用。如图 5 所示, DAPI 荧光染色后观察, K562 细胞千层纸素给药组细胞核出现明显的凋亡现象: 首先是细胞核内的染色质出现不规则凝集, 进而凝集加剧, 染色质固缩为团块状, 且染色质固缩程度呈剂量依赖性, 并出现凋亡小体, 而加药前细胞核呈现均匀明亮的荧光。

3.5 Western blot 法检测千层纸素凋亡相关蛋白及 ERK 蛋白表达情况

经过 48 h 不同浓度的千层纸素处理后, 免疫印迹实验表明千层纸素可以下调凋亡相关蛋白 caspase 9 的原型形式, 上调其剪切活性形式, 与细胞存活相关的 survivin 蛋白在千层纸素作用下, 有明显的下调 (图 6), 而千层纸素对 ERK 蛋白没有明显影响, 而其活性形式 p-ERK1/2 明显下调, 见图 7(A)。结果显示千层纸素引起的

K562 凋亡作用可能与 ERK 信号通路有关,图 7 下调p-ERK1/2($P<0.05$, $P<0.01$)。(B)显示 90 和 120 $\mu\text{mol/L}$ 的千层纸素可以显著

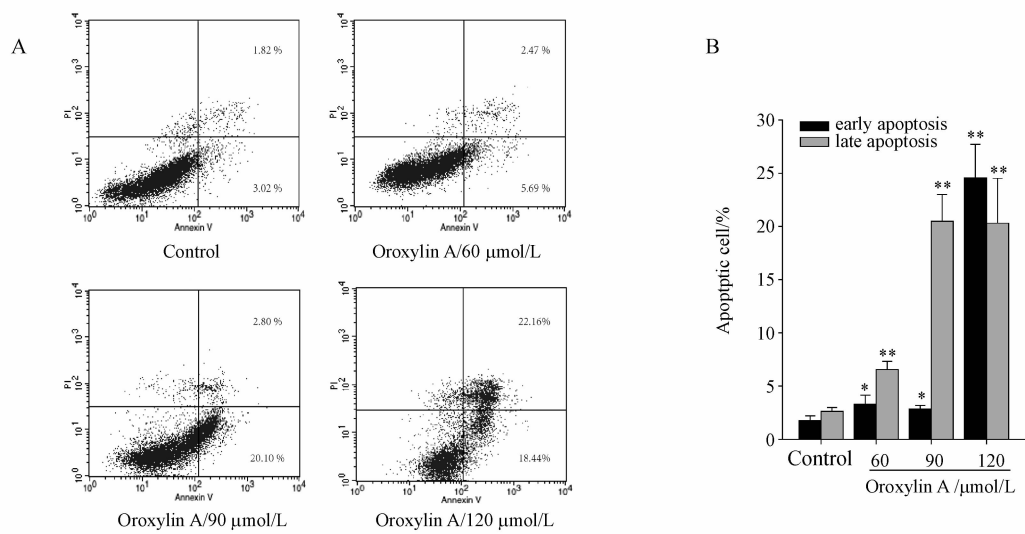


Figure 4 (A) After treatment with 60,90,and 120 $\mu\text{mol/L}$ oroxylin A,Annexin V-PI assay was performed to detect apoptosis cells. (B) Quantification of the apoptotic cells with the treatment of oroxylin A ($\bar{x} \pm s, n = 3$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

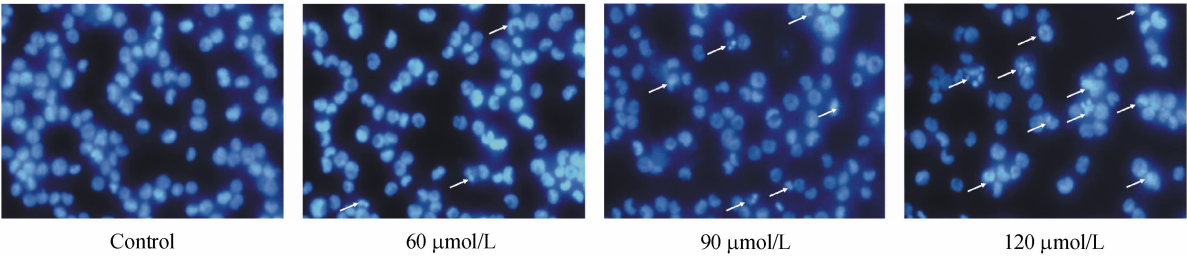


Figure 5 Nuclear condensation induced by oroxylin A by DAPI staining

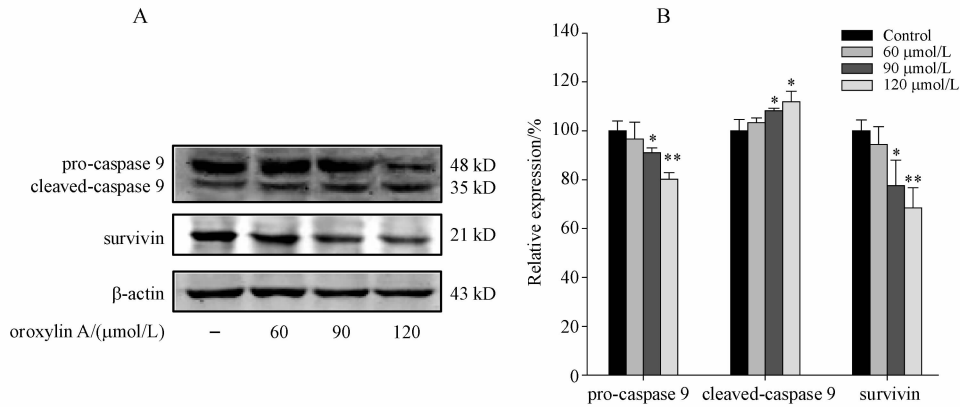


Figure 6 (A) Effect of oroxylin A on caspase 9 and survivin expression in K562 cells. (B) The densitometric analysis of pro-caspase 9/ β -actin and survivin/ β -actin ratios ($\bar{x} \pm s, n = 3$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

4 讨 论

传统中药因其毒性低,不良反应少,在肿瘤治疗中已显露出了良好的潜能,根据国内外文献报

道,黄酮类化合物具有良好的抗感染、抗病毒、抗感染、抗肿瘤的作用,从中药黄芩中提取的千层纸素在肝癌、肺癌、乳腺癌等方面都有一定的抑制作用^[10]。但对慢性粒细胞白血病的研究尚未报道,

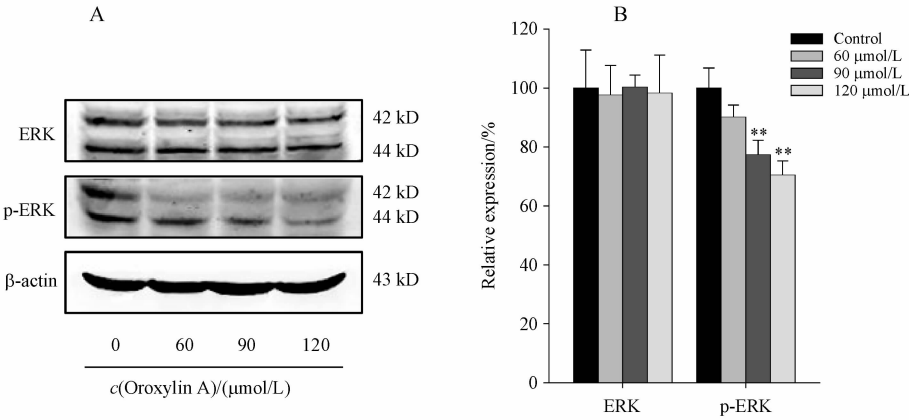


Figure 7 Effect of oroxylin A on p-ERK1/2 expression in K562 cells (A) and densitometric analysis of ERK1/2/ β -actin and p-ERK1/2/ β -actin ratios (B). $\bar{x} \pm s, n = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

本研究结果表明,千层纸素能明显抑制人慢性粒细胞白血病 K562 的体外增殖,且具有明显的时间-剂量依赖性。

Caspase 9 作为半胱氨酸蛋白酶家族的一员,参与凋亡的级联反应,当 caspase 9 在被药物剪切激活时,细胞则发生凋亡^[11],survivin 是凋亡蛋白抑制剂家族的一员,在各型肿瘤中都证实其过度表达,survivin 的表达能促进肿瘤的增殖和发展^[12],经本实验证实千层纸素能显著激活 K562 中 cleaved-caspase 9,降低 caspase 9 的原型及 survivin 的表达。进一步的研究发现千层纸素能显著下调 p-ERK1/2 的水平,ERK1/2 作为一类丝/苏氨酸蛋白激酶,是传递丝裂原信号的信号转导蛋白,在许多人类的肿瘤中都可发现其过度激活,它正常定位于胞浆,一方面接受大量来自生长因子、丝裂原、环境刺激等的信号,另一方面通过 ERK 信号级联反应作用于核转录因子如 AP-1、NF- κ B 等,当磷酸化激活后转位至胞核,调节转录因子活性,产生细胞效应,调节着细胞的增殖、分化和存活^[13],初步研究发现千层纸素对 p-ERK1/2 蛋白有影响,但具体的作用机制亟需深入研究。

参考文献

[1] Wong RS, Cheong SK. Leukaemic stem cells; drug resistance, metastasis and therapeutic implications[J]. *Malaysian J Pathol*, 2012, **34**(2):77-88.

[2] Junia V. Melo, Timothy P. Hughes, et al. Chronic myeloid leukemia[J]. *Hematology*, 2003.

[3] Kusio-Kobialka M, Podsiwylow-Bartnicka P, Peidis P, et al. The PERK-eIF2 α phosphorylation arm is a pro-survival pathway of BCR-ABL signaling and confers resistance to imatinib treatment in chronic myeloid leukemia cells[J]. *Cell Cycle*, 2012, **11**(21):

4 069-4 078.

[4] Gao Y, Lu N, Ling Y, et al. Oroxylin A inhibits angiogenesis through blocking vascular endothelial growth factor-induced KDR/Flk-1 phosphorylation[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2009, **136**(5):667-675.

[5] Li HN, Nie FF, Liu W, et al. Apoptosis induction of oroxylin A in human cervical cancer HeLa cell line in vitro and in vivo[J]. *Toxicology*, 2009, **257**(1/2):80-85.

[6] Zhu B, Zhao L, Zhu L, et al. Oroxylin A reverses CAM-DR of HepG2 cells by suppressing Integrin β 1 and its related pathway[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012, **259**(3):387-394.

[7] Yang HY, Zhao L, Yang Z, et al. Oroxylin a reverses multi-drug resistance of human hepatoma BEL7402/5-FU cells via downregulation of P-glycoprotein expression by inhibiting NF- κ B signaling pathway[J]. *Molecular Carcinogenesis*, 2012, **51**(2):185-195.

[8] Sun Y, Lu N, Ling Y, et al. Oroxylin A suppresses invasion through down-regulating the expression of matrix metalloproteinase-2/9 in MDA-MB-435 human breast cancer cells[J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, **603**(1/2/3):22-28.

[9] Zhu L, Zhao L, Wang H, et al. Oroxylin A reverses P-glycoprotein-mediated multidrug resistance of MCF7/ADR cells by G2/M arrest[J]. *Toxicol Lett*, 2013, **219**(2):107-115.

[10] Yao J, Hu R, Sun J, et al. Oroxylin A prevents inflammation-related tumor through down-regulation of inflammatory gene expression by inhibiting NF- κ B signaling[J]. *Mol Carcinog*, 2014, **53**(2):145-58. doi:10.1002/mc.21958.

[11] Farias-de-Oliveira DA, Villa-Verde DM, Nunes Panzenhagen PH, et al. Caspase-8 and caspase-9 mediate thymocyte apoptosis in trypanosoma cruzi acutely infected mice[J]. *J Leukoc Biol*, 2013, **93**(2):227-234.

[12] Cheung CH, Huang CC, Tsai FY, et al. Survivin-biology and potential as a therapeutic target in oncology[J]. *Onco Targets Ther*, 2013, **6**:1 453-1 462.

[13] Gough DJ, Koetz L, Levy DE. The MEK-ERK pathway is necessary for serine phosphorylation of mitochondrial STAT3 and Ras-mediated transformation[J]. *PLoS ONE*, 2013, **8**(11):e83395.