文章编号:1000-5404(2012)13-1297-03

论著

大黄素诱导白血病KG-1a细胞凋亡及对Bcl-2/Bax mRNA表达的影响

晁 荣[1],靳蕊蕊[1],陈 彻[2],席亚明[1],楚惠媛[2],李 明[1],张 豪[1] (730000 兰州,兰州大学第一医院血液科,血液学研究所[1];730000 兰州,甘肃中医学院医学基础实验教学中心[2])

[摘要] **目的** 本研究观察大黄素(emodin)对人急性髓系白血病KG-1a细胞的增殖及凋亡影响,探讨Bcl-2/Bax基因在其中的作用。**方法** 采用四唑蓝比色试验(MTT)检测大黄素对KG-1a细胞增殖的影响;流式细胞术(FCM)测定细胞周期变化与凋亡情况;RT-PCR法检测大黄素作用后细胞Bcl-2/Bax mRNA表达的变化。**结果** 大黄素能抑制KG-1a细胞的增殖,作用48 h的半数抑制浓度(IC_{50})约为171.8 μmol/L流式细胞仪分析出现典型的亚二倍体峰(凋亡峰),将细胞阻滞于G_0/G_1期,大黄素作用后KG-1a细胞Bcl-2基因表达下调,而Bax基因表达上调,并呈量效关系。**结论** 大黄素可诱导KG-1a细胞凋亡,其机制可能与下调Bcl-2,上调Bax基因表达水平有关。

[关键词] 大黄素;KG-1a细胞;Bcl-2;Bax;细胞凋亡;干细胞
[中图法分类号] R285.5; R73-361; R733.7 [文献标志码] A

Emodin induces apoptosis and down-regulates Bcl-2/Bax in leukemia KG-1a cells

Chao Rong[1], Jin Ruirui[1], Chen Che[2], Xi Yaming[1], Chu Huiyuan[2], Li Ming[1], Zhang Hao[1] ([1] Institute of Hematology, Department of Hematology, First Hospital, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu Province, 730000; [2] Teaching Center of Medical Basic Experiment, Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou, Gansu Province, 730000, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of emodin on the proliferation and apoptosis in human acute myeloid leukemia cell line KG-1a, and to investigate the role of Bcl-2/Bax in the process. **Methods** KG-1a cells were exposed to emodin at the doses of 25, 50, 100 and 200 mol/L. Cell viability was measured with MTT assay. The change of cell cycle and apoptosis were detected by flow cytometry (FCM). The expression of Bcl-2/Bax mRNA was assessed by RT-PCR. **Results** Emodin significantly inhibited the proliferation in KG-1a cells, with IC_{50} value of 171.8 μmol/L after treatment for 48 h. Emodin blocked cell cycle at G_0/G_1 phase, and a remarkable sub-G1 apoptotic peak was observed according to the detection of flow cytometry. The expression of Bcl-2 was down-regulated, while that of Bax was obviously up-regulated in a dose-dependent manner. **Conclusion** Emodin can significantly induce apoptosis of KG-1a cells, which might be related to the down-regulation of Bcl-2 and up-regulation of Bax.

[**Key words**] emodin; KG-1a cells; Bcl-2; Bax; cell apoptosis; stem cells

Supported by the Special Funds of Basic Scientific Research from Gansu Finance Department (GZC2010176), and the Project of Scientific Research for Ordinary Traditional Chinese Medicine of Gansu (GZK-2011-69). Corresponding author: Chen Che, Tel: 86-931-8765412, E-mail: Chen72123@163.com, Xi Yaming, Tel: 86-931-8625200, E-mail: xiyaming02@163.com

大黄素是从大黄及其他中药中提取出来的蒽醌类衍生物,具有抗菌消炎、免疫抑制、抗肿瘤等生物学活性,尤其是其抗肿瘤作用已成为近年的研究热点[1],并且由于其毒性低活性高而受到研究者的广泛关注。KG-1a细胞是来源于急性髓系白血病微分化的M0亚型白血病细胞系,有研究表明处于G_0/G_1期的细胞比例约为15.5%[2]。CD34主要在干/祖细胞上表达,其带有更为原始的细胞特性,而KG-1a细胞中含有的$CD34^+$细胞约占96.3%,明显比其他人白血病细胞系多(K562仅占0.17%)[2]。Bonnet等[3]证实$CD34^+CD38^-$白血病细胞是导致AML的Lsc,而KG-1a细胞中含有的$CD34^+CD38^-$亚群细胞约占7.02%[2]。故本研究选用人急性髓细胞性白血病细胞系KG-1a细胞作为研究对象,探讨大黄素对其增殖、凋亡的影响及作用机制,为大黄素的临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 药品、试剂和细胞培养

大黄素(纯度大于98%)为甘肃鹏程生物科技发展有限公司产品,用二甲基亚砜(DMSO,Sigma公司产品)溶解,-20 ℃避光保存备用。人急性髓细胞性白血病细胞株KG-1a购自上

[基金项目] 甘肃省财政厅基本科研业务费专项资金[甘政财[2010]176号];2011年甘肃省普通中医药科研立项资助课题(GZK-2011-69)
[通信作者] 陈 彻,电话:(0931)8765412,E-mail:Chen72123@163.com
席亚明,电话:(0931)8625200,E-mail:xiyaming02@163.com

海丽臣生物科技有限公司,用含10%胎牛血清(杭州四季青公司产品)的RPMI1640培养基,于37 ℃、5% CO_2,饱和湿度的培养箱中培养,2~3 d换液传代1次。

1.2 细胞增殖试验

采用MTT法。取对数生长期的KG-1a细胞,将细胞调整为1×10^5/ml接种于96孔板,每孔100 μl,加入不同浓度大黄素(终浓度依次为25、50、100、200 μmol/L),各组溶液中DMSO体积分数不超过0.1%,置于37 ℃、5% CO_2培养箱中分别培养24、48和72 h后在各孔加入MTT(Sigma公司产品)(5 g/L)10 μl,继续培养4 h后,轻轻吸掉上清,然后加入DMSO 100 μl终止培养,于摇床上轻摇10 min,用酶标仪在492 nm波长下测各孔的吸光度[D(492)]。计算细胞增殖抑制率。

细胞抑制率=[1 − D(实验组)/D(对照组)]×100%

1.3 细胞凋亡和细胞周期检测

取对数生长期的KG-1a细胞,调整密度为1×10^5/ml的细胞悬液5 ml接种于6孔板,分别加不同浓度大黄素(终浓度依次为25、50、100、200 μmol/L),培养48 h后离心收集细胞,用PBS洗涤,重悬细胞于70%乙醇,4℃固定24 h,经PBS洗涤,加入含RNA酶的碘化丙锭(PI)避光染色30 min,用流式细胞仪分析。

1.4 RT-PCR法检测Bcl-2/Bax mRNA的表达

取对数生长期的KG-1a细胞,调整密度为1×10^7/ml的细胞悬液5 ml接种于6孔板,分别加不同浓度大黄素(终浓度依次为25、50、100、200 μmol/L),培养48 h后离心收集细胞,用总RNA提取试剂盒(天根生化科技有限公司产品)抽提细胞总RNA,使用分光光度仪检测RNA的浓度与质量。要求D(260)/D(280)在1.8~2.0左右,进行纯化和鉴定。用cDNA第1链合成试剂盒(天根生化科技有限公司产品)合成第1链cDNA,以第1链反应液为模板,加入相应引物50 μl反应体系进行PCR扩增(94 ℃,45 s;55 ℃,45 s;72 ℃,45 s;35个循环),72 ℃延伸5 min反应产物经1%的琼脂糖凝胶电泳,溴化乙啶(EB)显色,在凝胶成像仪上成像,分析条带的亮度(表1)。

表1 Bcl-2、Bax引物序列

基因	序列(5′-3′)
Bcl-2	上游:CGACTTCGCCGAGATGTCCAGCCAG
	下游:ACTTGTGGCTCAGATAGGCACCCAG
Bax	上游:GTTTCATCCAGGATCGAGC
	下游:GGAAGTCCAATGTCCAGC
β-actin	上游:CCACGGCTGCTTCCAGCTCC
	下游:GGACTCCATGCCCAGGAAGGAA

1.5 统计学分析

结果以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 13.0软件分析,用单因素方差分析进行统计学处理。

2 结果

2.1 倒置显微镜下观察大黄素作用于KG-1a细胞的形态变化

KG-1a细胞经不同浓度大黄素处理培养48 h后细胞形态不规则,均匀性降低,细胞间隙增大,数量明显减少,细胞有较明显的固缩现象,碎片增多。随着药物浓度的增加,细胞数量逐渐减少(图1)。

2.2 大黄素对KG-1a细胞的增殖抑制作用

MTT法检测结果显示,大黄素作用于KG-1a细胞后,随大黄素浓度的增加,细胞增殖抑制越明显,呈剂量依赖性;随时间的延长,大黄素对KG-1a细胞的增殖抑制亦升高,呈时间依赖性(表2)。大黄素对KG-1a细胞的48 h半数抑制浓度(IC_{50})约为171.8 μmol/L,实验组与对照组比较差异显著($P<0.05$)。

表2 大黄素对KG-1a细胞的增殖抑制率[$n=3$, $(\bar{x}\pm s)$%]

组别	24 h	48 h	72 h
对照组	1.04±0.01	2.24±0.01	4.01±0.01
大黄素25 μmol/L	17.91±1.68[a]	21.91±1.55[a]	26.23±1.07[a]
大黄素50 μmol/L	34.72±1.50[a]	36.20±1.05[a]	38.21±2.04[a]
大黄素100 μmol/L	46.56±1.35[a]	50.81±2.04[a]	65.14±1.11[a]
大黄素200 μmol/L	55.92±1.94[a]	66.50±1.32[a]	80.40±1.91[a]

a:$P<0.05$,与对照组比较

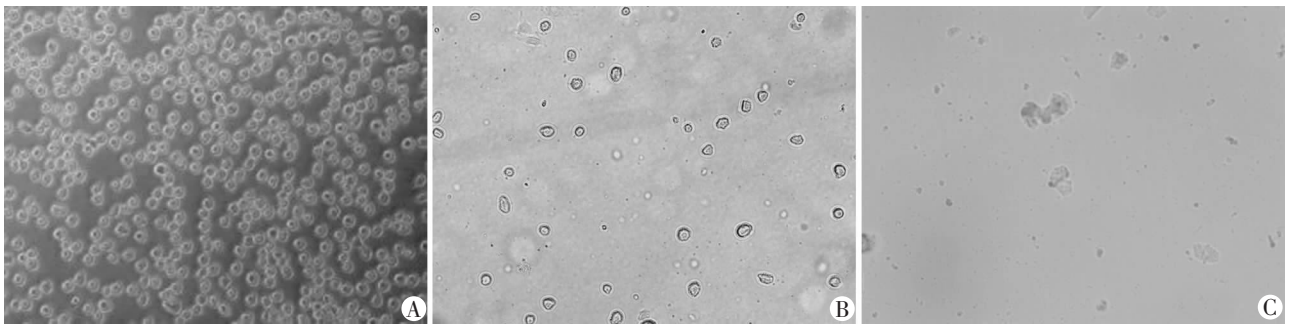
2.3 大黄素对KG-1a细胞周期和凋亡的影响

大黄素作用KG-1a细胞48 h后,细胞出现明显的凋亡现象,随着浓度的增加,细胞凋亡的比例增加,S期细胞逐渐减少,G_0/G_1期细胞逐渐增多,细胞被阻滞在G_0/G_1期。流式细胞仪分析出现典型的亚二倍体峰(凋亡峰),表明大黄素能够诱导KG-1a细胞凋亡,与对照组比较差异显著($P<0.05$)(表3)。

表3 大黄素对KG-1a细胞周期的影响[$n=3$, $(\bar{x}\pm s)$%]

组别	G_0/G_1	S	G_2/M
对照组	45.31±0.98	48.80±1.02	6.85±1.35
大黄素25 μmol/L	48.71±1.23	44.51±1.24[a]	3.17±0.86
大黄素50 μmol/L	63.72±0.99[b]	37.14±0.86[b]	0.26±0.02
大黄素100 μmol/L	66.20±1.02[b]	33.8±1.32[b]	0.17±0.06
大黄素200 μmol/L	66.91±1.26[b]	33.20±0.98[b]	0.14±0.04

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较

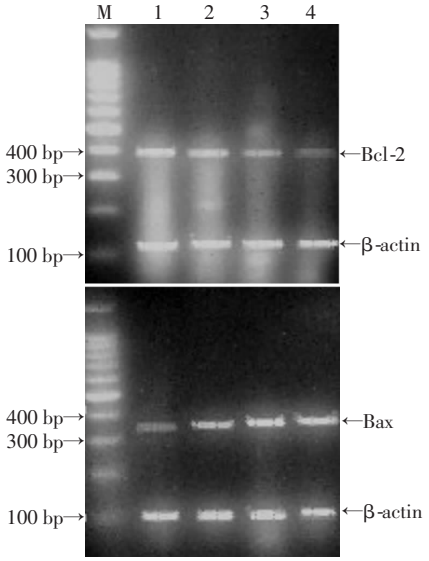


A:对照组;B:100 μmol/L大黄素;C:200 μmol/L大黄素

图1 大黄素作用于KG-1a细胞48 h的形态变化 (倒置显微镜×100)

2.4 大黄素对 KG-1a 细胞 Bcl-2/Bax mRNA 的影响

凝胶成像仪上成像,分析条带的亮度。不同浓度大黄素作用于 KG-1a 细胞 48h 后,随药物浓度的增加 Bcl-2 mRNA 的表达逐渐减少,条带逐渐变暗;Bax mRNA 的表达逐渐增加,条带逐渐变亮(图 2)。



M: DNA 标准; 1: 对照组; 2: 50 μmol/L 大黄素; 3: 100 μmol/L 大黄素; 4: 200 μmol/L 大黄素

图 2 大黄素作用于 KG-1a 细胞 48 h 后 Bcl-2/Bax mRNA 的表达

3 讨论

诱导肿瘤细胞凋亡是目前最为热点的中药抗肿瘤机制,利用凋亡机制清除白血病细胞引发出白血病治疗的新观念、新手段。大黄素在化学结构上和阿霉素、柔红霉素等抗癌药物一样同属于蒽醌类化合物,其药理作用广泛,具有抗菌消炎、免疫抑制、抗肿瘤等方面的作用。早在 1966 年,我国学者已发现大黄素对治疗动物移植瘤有效,已发现大黄素可明显抑制多种肿瘤细胞的增殖并诱导其凋亡[4-6],但对凋亡的机制有多种不同的解释。本研究采用不同浓度的大黄素处理来源于人急性髓系白血病未分化的 M0 亚型白血病细胞系 KG-1a 后, 探讨细胞增殖、凋亡和凋亡相关基因 bcl-2 和 bax 表达的关系。

本研究结果显示,大黄素能够明显抑制 KG-1a 细胞的增殖,这种抑制作用呈时间和剂量依赖的关系,其 48 h 的半数抑制率(IC_{50})约为 171.8 μmol/L。通过流式细胞仪检测发现大黄素作用于 KG-1a 细胞 48 h 后,可出现典型的亚二倍体峰(凋亡峰),将细胞阻滞于 G_0/G_1 期,并且存在明显的量效关系。由此可见,大黄素主要是通过诱导凋亡而抑制肿瘤细胞的增殖。

细胞凋亡是一种由基因调控的主动而有序的细胞自主性死亡过程,Bcl-2 基因家族发挥着重要作用,尤其是抑凋亡基因 Bcl-2 和促凋亡基因 Bax[7]。Bcl-2 是抑凋亡基因,可控制线粒体中致凋亡因子释放, 增加细胞对多种凋亡刺激因素的抗性;而 Bax 是与 Bcl-2 功能密切相关的促凋亡基因,它不但可以拮抗 Bcl-2 的凋亡抑制作用, 而且还可直接促进细胞的凋亡。Bax 大量表达时自身形成的同源二聚体(Bax/Bax)可促进细胞凋亡,而 Bcl-2 过度表达时与 Bax 形成异源二聚体(Bcl-2/Bax)可抑制细胞凋亡[8]。因此人们认为在凋亡刺激物作用后,抗凋亡基因 Bcl-2 与促凋亡基因 Bax 之间的失衡是肿瘤发生的机制之一,已有研究证实其与多种肿瘤的发生、发展有关[9-10]。大黄素诱导白血病细胞凋亡的研究显示,大黄素可下调 Bcl-2 并刺激 Bax 蛋白表达来诱导细胞凋亡。本研究结果显示,经大黄素作用于 KG-1a 细胞后,Bcl-2 mRNA 的表达水平下降,而 Bax mRNA 的表达水平明显增高。这说明了 Bcl-2/Bax mRNA 参与了大黄素诱导 KG-1a 细胞凋亡的调控,并且通过下调 Bcl-2 上调 Bax 的表达而诱导其凋亡。

综上所述,大黄素可显著抑制具有干细胞性的 KG-1a 细胞的增殖并诱导其凋亡,同时 Bcl-2/Bax 基因也参与了该过程的调控,但是对于诱导凋亡的信号通路还有待进一步研究。

参考文献:

[1] 郭立杰, 蔡骏. 大黄素抗肿瘤作用的研究进展[J]. 肿瘤防治研究, 2008, 35(8): 605-608.
[2] 杨松, 钟晓明, 张伶, 等. 人白血病细胞系 KG-1a 中肿瘤干细胞样亚群细胞的初步研究[J]. 细胞生物学杂志, 2008, 30(4): 527-531.
[3] Bonnet D, Dick J E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell[J]. Nat Med, 1997, 3(7): 730-737.
[4] 夏珊, 李世荣, 刘剑毅, 等. 大黄素对人增生性瘢痕成纤维细胞的增殖抑制及细胞内游离 Ca^{2+} 的作用[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(20): 1982-1984.
[5] 陈英玉, 郑合勇, 胡建达, 等. 大黄素抑制 HL-60/ADR 耐药细胞增殖和诱导凋亡的作用[J]. 中国实验血液学杂志, 2007, 15(5): 955-960.
[6] 张旭霞, 孙延庆, 魏小芳, 等. 大黄素对人慢性髓细胞性白血病 K562 细胞增殖与凋亡及 c-myc 基因表达的影响[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2009, 16(20): 1541-1545.
[6] 魏天南, 胡建达, 陈英玉, 等. 大黄素对 Jurkat 细胞凋亡的诱导作用及其机制的初步研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2009, 17(5): 1203-1206.
[7] Adams J M, Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family[J]. Trends Biochem Sci, 2001, 26(1): 61-66.
[8] Wang S J, Guo X, Zuo H, *et al*. Chondrocyte apoptosis and expression of Bcl-2, Bax, Fas, and iNOS in articular cartilage in patients with Kashin-Beck disease[J]. J Rheumatol, 2006, 33(3): 615-619.
[9] 石全红, 廖正步, 支兴刚, 等. 凋亡抑制基因 survivin 在脑膜瘤的表达及其与 bcl-2、bax 的相关性[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(3): 253-255.
[10] 王佳, 唐良莅, 姚珍薇. Survivin 在子宫内膜异位症的表达及其与 bcl-2、bax 相关性的研究[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(21): 2186-2188.

(**收稿**:2011-10-29;**修回**:2011-12-19)
(编辑 王 红)