肿瘤分子学相关研究 文章编号:0253-3626(2009)07-0822-04

大黄素诱导白血病 K562 细胞凋亡的实验研究

金丹婷,刘北忠,刘 畅,王春光,王 翀,王东生,郝 坡,钟 梁
(重庆医科大学临床检验诊断学教育部重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨大黄素对人白血病 K562 细胞的增殖抑制与诱导凋亡作用。方法:采用 MTT 法检测大黄素对 K562 细胞的增殖抑制作用;通过 Wight-Giemsa 染色(W-G 染色),在普通光镜下观察细胞的形态学变化;运用 Annexin V/PI 双标记法检测大黄素对 K562 细胞的凋亡效应;采用流式细胞技术检测细胞周期变化与凋亡情况;通过比色法检测 Caspase-3、8、9 的相对活性,分析大黄素诱导 K562 细胞凋亡的信号途径。结果:大黄素能显著抑制 K562 细胞的增殖,作用 24、48、72 h 后的半数抑制率浓度分别为 80、50、40 μmol/L;处理组细胞在普通光镜下可见典型的凋亡形态学改变;Annexin V/PI 双标记法检测到 K562 细胞在大黄素的诱导下出现早期凋亡并呈剂量依赖性($P<0.01$);流式细胞仪结果分析发现,处理组的 K562 细胞被阻滞于 G_0/G_1 期,与对照组相比,凋亡率明显升高并呈现剂量依赖性($P<0.01$);大黄素可触发 Caspase-3、8、9 的活性增高($P<0.01$)。结论:大黄素能有效地抑制 K562 细胞的增殖并诱导其凋亡,其机制和 Caspase 信号途径的活化有关。

【关键词】大黄素;K562 细胞;细胞凋亡;半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶
【中国图书分类法分类号】R285.5;R329.28;R733.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-10-15

Experimental study of K562 leukemia cells apoptosis induced by emodin

JIN Dan-ting, et al
(*Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics, Ministry of Education, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the mechanism of K562 leukemia cells proliferation and apoptosis induced by emodin. *Methods*: Inhibitory effect of emodin on proliferation of K562 leukemia cells was assayed by MTT method. The morphologic changes of K562 cells were observed under microscop after Wight-Giemsa staining. Apoptosis was checked by Annexin V/PI. The changes of cell cycle and apoptosis were detected by flow cytometry. The activities of Caspase-3,8,9 were checked by chromatometry to analyze the apoptosis of K562 cells. *Results*: The proliferation of K562 leukemia cells was significantly inhibited by emodin. The IC50 of K562 cells inhibited with emodin for 24 h, 48 h and 72 h were 80, 50 and 40 μmol/L respectively. Typical morphological changes of K562 cells were observed by microscopy. The proliferation of K562 cells was obviously inhibited in dose-dependent manner. In Annexin V/PI, emodin induced K562 cells toward apoptosis in dose-dependent manner ($P<0.01$). The result of flow cytometry indicated that the cell cycle was blocked in G_0/G_1 phase ($P<0.01$). After treated with emodin, the activities of Caspase-3,8,9 were significantly higher than those in the normal control ($P<0.01$). *Conclusion*: Emodin inhibits proliferation and induces apoptosis of K562 leukemia cells, and up-regulating the experession of Caspase may be one of its mechanisms.

【Key words】Emodin; K562 cell; Cell apoptosis; Caspase

大黄素是从大黄及其它中药中提取出来的蒽醌类化合物,具有多种生物学活性,如抗肿瘤、抗菌、增强免疫力及促进胃肠平滑肌运动等[1-4]。近年来的研究表明大黄素能够抑制肝癌[5],肺癌细胞[6],急性早幼粒 HL-60 细胞[7],淋巴瘤 U937 细胞[8]的增殖并诱导其凋亡;但是对人红白血病 K562 细胞株的作用尚无报道。本实验通过 MTT、流式细胞术、Caspase 检测等方法观察大黄素对 K562 细胞的增殖抑制和诱导凋亡作用,并探讨其作用机制。

作者介绍:金丹婷(1984-)女,硕士,
研究方向:中药抗肿瘤分子机制研究。
通讯作者:刘北忠,男,教授,E-mail:liubeizhong@yahoo.com.cn。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(30300449);国家中医药管理局资助项目(02-03ZP52);重庆医科大学校级课题资助项目(XBYB200710,XBYB2007108)。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

K562 细胞株为本实验室保存;大黄素(纯度>98%)购自陕西森弗;四甲基偶氮唑盐(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)购

自美国 Sigma 公司，MTT 以 PBS 配成 5 mg/ml 的工作液，4℃保存；RPMI1640 购自 GIBCO 公司，胎牛血清购自杭州四季青公司；K562 细胞培养于 RPMI1640 培养基中（含 10%胎牛血清，青、链霉素 100 U/ml），置 37℃，饱和湿度，5%CO_2 培养箱中培养。

1.2 方法

1.2.1 MTT 观察细胞的增殖抑制 取对数生长期的细胞，将细胞数调整到 1×10^5个 /ml，接种于 96 孔板，每孔细胞液量为 100 μl，加入大黄素使其终浓度分别为 20、40、50、60、80 μmol/L。同时设立 DMSO，阴性和溶剂对照。每个浓度做 5 个平行孔。37℃、5%CO_2 条件下培养 24、48、72 、96 h。实验结束前 4 h 加入 MTT（5 mg/ml）10 μl，继续培养 4 h，离心，弃上清，加入 100 μl 的 DMSO 终止反应。摇匀后在 492 nm 的波长下测吸光度值（A_{492}），计算不同浓度下大黄素作用 K562 细胞不同时间的抑制率（%）。细胞生长抑制率 =（1−$A_{试验组}$）/$A_{对照组}\times100\%$。

1.2.2 光学显微镜观察细胞形态学变化 取 K562 细胞悬液 1.0×10^5 个 /ml 5 ml 接种于培养瓶中，加入大黄素使其终浓度为 40 μmol/L 培养 48 h 后，瑞氏染色后，光学显微镜下观察。

1.2.3 Annexin V/PI 双标记法 离心收集药物处理 12 h 后 K562 细胞数为 1.0×10^6 个 /ml，PBS 洗 2 次，用 1:4 的 binding buffer 缓冲液 190 μl 重悬细胞，加入异硫氰酸荧光素（FITC）标记的 AnnexinV-FITC 5 μl 和 20 μg/ml PI 10 μl，置冰上作用 10 min，流式细胞仪检测。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞周期的变化 收集对数生长期细胞，计数调整细胞数为 1.0×10^5 个 /ml，实验组加入大黄素，终浓度分别为 20、30、40 μmol/L，同时设立阴性对照，相同的条件下培养 48 h，收集细胞，1 000 r/min 离心 5 min，PBS 洗 2 次，75%的乙醇固定，流式细胞仪检测。

1.2.5 比色法测定 Caspase-3、8、9 活性 收集对数生长期细胞，将细胞数调整到 1×10^5 个 /ml，实验组加入大黄素并将浓度调整到 40 μmol/L，重复 3 次，同时设立阴性对照。相同条件下培养 72 h 收集细胞，PBS 洗 2 遍，加入 50 μl 的 Lysis buffer 和 0.5 μl 的 DTT，置冰上作用 40 min，离心收集上清液，加入 50 μl 的 2×Reaction Buffer 和 0.5 μl 的 DTT，再加 5 μl Caspase-3 Substrate、Caspase-8 Substrate、caspase-9 Substrate，37℃避光孵育 4 h。酶标仪检测 405 nm 处的吸光度值（A_{405}）。

1.3 统计学分析

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 13.0 统计软件，进行两因素重复测量设计的方差分析。

2 结 果

2.1 大黄素对 K562 细胞增殖抑制作用

MTT 法结果显示，同一浓度的大黄素对 K562 细胞的增殖抑制率随着时间的延长而增高，具有时间依赖性。处理组 K562 细胞的增殖抑制率随大黄素浓度增大而增高，具有剂量依赖性（见表 1）。

2.2 大黄素诱导 K562 细胞凋亡的形态学改变

对照组为典型的白血病细胞形态，细胞完整，圆形，细胞核大，核仁明显，染色质分布均匀，细胞质少，蓝色，细胞质内无明显的颗粒。40 μmol/L 的大黄素作用于 K562 细胞 48 h 后凋亡明显增加。Wight-Giemsa 染色（W-G 染色），光镜下可看到细胞体积缩小，皱缩，胞核固缩，核碎裂，核仁消失并有典型的凋亡小体（Apoptosis body）形成（见图 1）。

2.3 Annexin V/PI 双标记法检测细胞凋亡

Annexin V/PI 双参数法是敏感的凋亡检测方法，早期凋亡细胞以 Annexin V-FITC 染色为主，结果显示实验组 K562 经 40、60 μmol/L 大黄素处理 12 h 后均可出现早期凋亡，并呈现浓度梯度，凋亡率分别为 8.89%、26.06%，对照组为 2.09%（见表 2，图 2），与对照组相比有统计学意义（$P<0.01$）。

2.4 流式细胞仪分析 K562 细胞周期的变化与凋亡

大黄素作用 K562 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。表明大黄素能够诱导 K562 细胞的凋亡，并有剂量依赖性（$P<0.01$）（见图 3）。

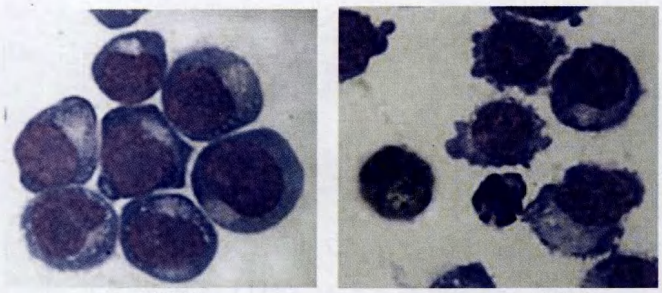
2.5 大黄素对 K562 细胞 Caspase-3、8、9 活性的影响

大黄素作用 K562 细胞 72 h 后，A（405）值明显升高（$P<0.01$），表明大黄素作用 K562 细胞后，处理组 Caspase-3、8、9 的相对活性明显升高（见表 3）。

表 1 大黄素对 K562 细胞的增殖抑制率（$\bar{x}\pm s$，%，$n=5$）

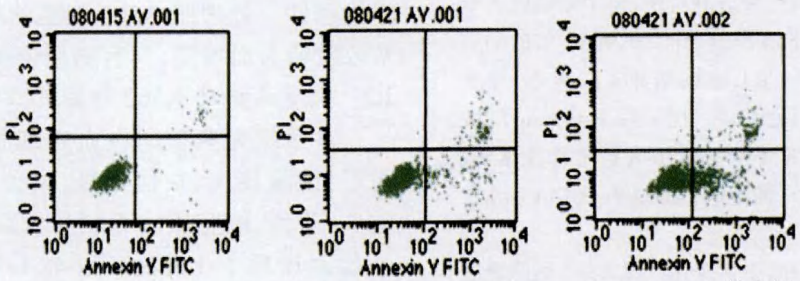
组别	24 h	48 h	72 h
对照组	1.02 ± 0.20	2.34 ± 0.31	4.07 ± 0.13
20 μmol/L	−6.00 ± 0.40	8.00 ± 0.36*	18.5 ± 0.14*
40 μmol/L	3.60 ± 0.21*	25.5 ± 0.25*	42.7 ± 0.18*
50 μmol/L	12.3 ± 0.33*	47.6 ± 0.43*	65.7 ± 0.25*
60 μmol/L	23.9 ± 0.15*	63.8 ± 0.12*	91.4 ± 0.34*
80 μmol/L	50.5 ± 0.45*	76.8 ± 0.35*	97.3 ± 0.21*

* 与对照组比较 $P<0.01$



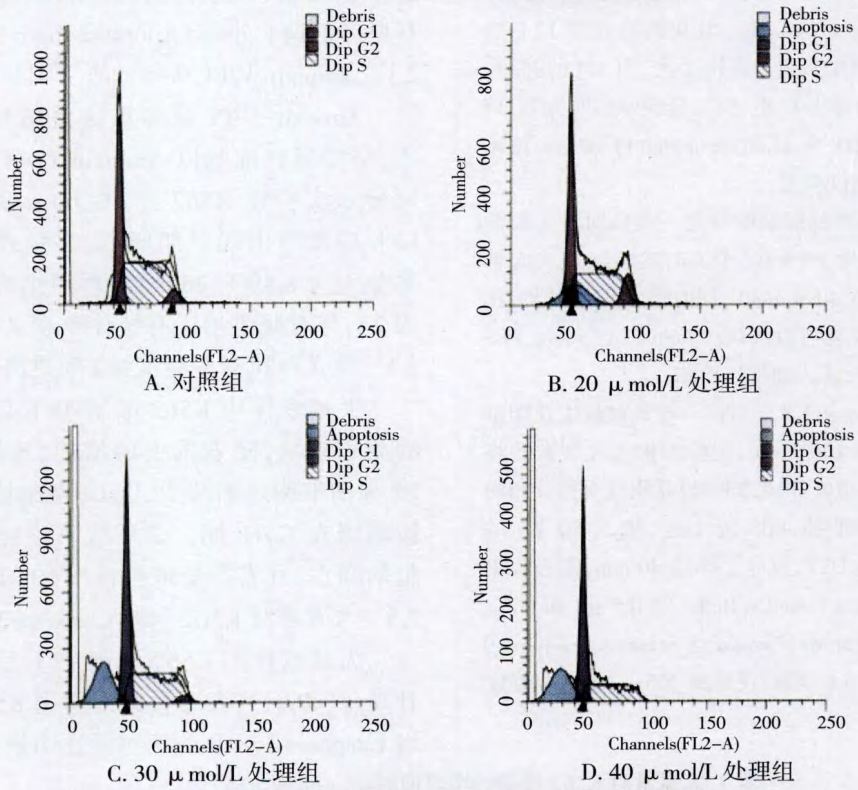
A. 对照组　　B. 处理组

图 1　Wight-Giemsa 染色的 K562 细胞形态(×100)



A. 对照组　　B. 40 μmol/L 处理组　　C. 60 μmol/L 处理组

图 2　Annexin V/PI 双标记法检测细胞凋亡



A. 对照组　　B. 20 μmol/L 处理组

C. 30 μmol/L 处理组　　D. 40 μmol/L 处理组

图 3　流式细胞仪分析作用 48 h K562 细胞周期变化与凋亡

表 2　Annexin V/PI 双标记法检测细胞凋亡的结果(%)

组别	正常细胞	凋亡细胞
对照组	95.24	2.09
40 μmol/L	84.81	8.89*
60 μmol/L	67.14	26.06*

* 与对照组比较 $P<0.01$

表 3　大黄素处理 K562 细胞 72 h Caspase-3、8、9 活性测定结果(A_{405}, n=3)

检测指标	对照组	处理组
Caspase-3	0.133 ± 0. 050	0.395 ± 0.054*
Caspase-8	0.087 ± 0. 080	0.296 ± 0.023*
Caspase-9	0.122 ± 0. 040	0.425 ± 0.011*

* 与对照组比较 $P<0.01$

3 讨 论

Kawai 等[9]首先发现了大黄素能够抑制鼠白血病 L1210 细胞的生长。目前有研究报道了大黄素能够抑制多种肿瘤细胞的生长,并通过 Bax 途径,Caspase 途径[10],FAS 途径,P53 途径等[5]诱导多种肿瘤细胞株的凋亡。

本实验以 K562 细胞为研究对象,通过 MTT 法证实了大黄素能够有效抑制 K562 细胞的增殖。终浓度在 40~80 μmol/L 的大黄素作用 K562 细胞 24 h 均出现抑制现象。48 h 后处理组的抑制效果与对照组相比明显增强,72 h 后,各处理组细胞抑制率都超过半数,与对照组相比差异有统计学意义。另外在 MTT 试验过程中还发现低浓度的大黄素能够促进 K562 细胞的增殖。具体机制尚不清楚。本实验结果表明,大黄素对 K562 细胞抑制作用具有一定的时间与剂量依赖性。通过 Wight-Giemsa 染色(W-G 染色)可以看到典型的细胞凋亡形态学变化。Annexin V/PI 结果显示大黄素能够早期诱导细胞的凋亡并有剂量依赖性。同时,流式细胞周期分析结果显示大黄素能够显著诱导 K562 细胞的凋亡,并有剂量依赖性。另外随着药物浓度的增加 S 期细胞逐渐减少,G_0/G_1 期细胞逐渐增多,大部分细胞被阻滞在 G_0/G_1 期。

细胞凋亡是一个由多因素,多分子参与的复杂过程。在细胞凋亡的机制研究中,明确提出了 3 条途径,线粒体途径,死亡受体途径和内质网途径,其中线粒体途径是主要的。Caspase-9 是该途径的关键蛋白酶,处于 Caspase 瀑布式激活的起始部位。在细胞色素 C 及凋亡蛋白酶活化因子-1(Apaf-1)等协助下活化 Caspase-3。而 Caspase-8 的活化依赖于死亡受体途径,被激活的 Caspase-8 又可激活下游的 Caspase-3。Caspase-3 是细胞凋亡蛋白级联反应的关键激酶,也是细胞凋亡的主要效应分子。Caspase-3 活化是染色质聚集,DNA 片段化等凋亡形态形成所必须的。因此 Caspase-8 和 Caspase-9 分别代表了死亡受体和线粒体两条凋亡途径。本实验通过酶标法检测到大黄素作用后 K562 细胞的 Caspase-3、8、9 活性明显增高,推测大黄素诱导 K562 细胞凋亡可能与线粒体和死亡受体途径有关。连晓岚等[8]在研究大黄素诱导 U937 细胞凋亡中也发现了大黄素能够活化 Caspase-3,从而诱导细胞的凋亡。

细胞凋亡在肿瘤的形成过程中扮演着重要的角色,肿瘤的发生是细胞的增殖和凋亡失去平衡所致,通过诱导肿瘤细胞的凋亡,以达到治疗肿瘤的目的。本实验研究发现,大黄素能显著抑制人红白血病 K562 细胞的增殖并诱导其凋亡,并对其作用机制进行初步探讨,从而为大黄素的进一步开发应用奠定实验基础。

参 考 文 献

[1] Kuo Y C, Meng H C, Tsai W J. Regulation of cell proliferation, inflammatory cytokine production and calcium mobilization in primary human T lymphocytes by emodin from Polygonum hypoleucum Ohwi[J]. Inflamm Res, 2001, 50(2): 73-82.

[2] Srinivas G, Anto R J, Srinivas P, et al. Emodin induces apoptosis of human cervical cancer cells through poly(ADP-ribose) polymerase cleavage and activation of caspase-9[J]. Eur J Pharmacol, 2003, 473(2-3): 117-125.

[3] Su Y T, Chang H L, Shyue S K, et al. Emodin induces apoptosis in human lung adenocarcinoma cells through a reactive oxygen species-dependent mitochondrial signaling pathway[J]. Biochem Pharmacol, 2005, 70(2): 229-241.

[4] 罗 聪,安 洪,刘传康,等. 复方烫疡油对兔耳瘢痕形成的影响[J]. 重庆医科大学学报, 2006, 31(3): 380-383, 458.

[5] Shieh D E, Chen Y Y, Yen M H, et al. Emodin-induced apoptosis through p53-dependent pathway in human hepatoma cells[J]. Life Sciences, 2004, 74(18): 2279-2290.

[6] Lee H Z. Effects and mechanisms of emodin on cell death in human lung squamous cell carcinoma[J]. Br J Pharmacol, 2001, 134(1): 11-20.

[7] 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.

[8] 连晓岚,胡建达,郑志宏,等. 大黄素诱导白血病 U937 细胞凋亡及机制初探[J]. 中国药理学通报, 2007, 23(10): 1312-1316.

[9] Kawai K, Kato T, Mori H, et al. A comparative study on cytotoxicities and biochemical properties of anthraquinone mycotoxins emodin and skyrin from penicillium islandicum sopp[J]. Toxicol Lett, 1984, 20(2): 155-160.

[10] Wang C, Wu X, Chen M, et al. Emodin induces apoptosis through caspase 3-dependent pathway in HK-2 cells[J]. Toxicology, 2007, 231(2-3): 120-128.

(责任编辑:冉明会)