维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)07-0796-03

青蒿琥酯诱导人白血病细胞 K562 胀亡和凋亡作用的研究

田雪莲,王莎莉

(重庆医科大学基础医学院生理学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨青蒿琥酯(Artesunate,ART)对人慢性粒细胞性白血病细胞株 K562 增殖抑制的影响。方法:采用 MTT 比色法检测青蒿琥酯对体外培养的 K562 细胞的生长抑制作用,光、电镜下观察青蒿琥酯作用后的 K562 细胞形态学变化特征,流式细胞仪检测在不同浓度、不同时间作用下青蒿琥酯诱导 K562 细胞的细胞胀亡率和凋亡率。结果:青蒿琥酯对 K562 细胞有明显的增殖抑制作用,24h、48h、72h 的半数抑瘤浓度 IC_{50}(μg/ml)分别为 65.17、31.63、10.51。青蒿琥酯主要引起 K562 细胞的胀亡和凋亡变化,但胀亡率与凋亡率无明显差别。结论:青蒿琥酯主要通过胀亡和凋亡 2 种方式抑制 K562 细胞增殖,并呈明显量效时效关系。

【关键词】青蒿琥酯;K562;胀亡;凋亡

【中国图书分类法分类号】R285.5 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-10-31

The oncosis and apoptosis-inducing effect of artesunate on the K562 human leukemia cell line

TIAN Xue-lian, et al

(*Department of Physiology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of artesunate(ART) on human leukemia cell line K562. *Methods*: Inhibition of proliferation was measured by a colorimetric MTT assay. The morphological changes of K562 were observed under a light microscope and an electron microscope. Flow cytometry assay detected the ratio of apoptosis and oncosis of K562 cell lines which were induced at three different times by three different concentrations of ART. *Results*: ART extract clearly inhibited the proliferation of K562. The 50% effective dose evaluated on 24h, 48h, and 72h of ordinal exposure to the extract, were 65.17 μg/ml, 31.63 μg/ml, and 10.51 μg/ml, respectively, ART extract-treated cells exhibited morphological changes typical of oncosis and apoptosis. Futheremore, the ratio of apoptosis was not different from to that of oncosis. *Conclusion*: Artesunate can control proliferation of the K562 human leukemia cell line in two forms: oncosis and apoptosis. The ratio of oncosis and apoptosis present typical dose-dependence and time-dependence.

【Key words】Artesunate; K562; Oncosis; Apoptosis

青蒿琥酯是青蒿素衍生物,具有过氧化桥的倍半萜类化合物,有水溶性好,抗疟活性高等[1~3]特点。近年来的研究报道青蒿素及其衍生物具有抗多种肿瘤细胞的作用,并且还具有毒性低,不存在交叉耐药,可以逆转肿瘤细胞的多药耐药[4]等优势,故对青蒿素衍生物的研究也是当今生物学领域的热门课题之一。本实验观察了青蒿琥酯对体外培养的人慢性粒细胞白血病细胞株 K562 的增殖抑制作用,为青蒿素类药物进一步的临床治疗作用提供新的理论与实验依据。

作者介绍:田雪莲(1978-),女,硕士,研究方向:中药药理及新药研究开发。

通讯作者:王莎莉,女,教授,E-mail:YPWang@public.cta.cq.cn。

基金项目:重庆市科委攻关项目[30472253]。

1 材料与方法

1.1 试剂

RPMI1640 培养基(美国 GIBCO 公司),四甲基唑氮盐(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)购自美国 Sigma 公司,小牛血清(中国杭州四季清公司)。

1.2 青蒿琥酯的配制

注射用青蒿琥酯(纯度 99.99%,广西南药股份有限公司,国药准字号 H10930195,批号 050401),5%碳酸氢钠 1ml 溶解,以 RPMI1640 培养液配制成1mg/ml,4℃保存。

1.3 细胞株及细胞培养

维普资讯 http://www.cqvip.com

K562 细胞株(人慢性粒细胞白血病细胞株)在含有 10%小牛血清、青霉素(100U/ml)、链霉素(100U/ml)的 RPMI1640 培养基中悬浮培养,在 37℃、5%CO_2 饱和湿度条件下培养,2~3d 传代 1 次。

1.4 实验方法

1.4.1 MTT(四甲基偶氮唑盐比色法)检测青蒿琥酯对白血病细胞株 K562 增殖的影响 取对数生长期 K562 细胞,台盼蓝拒染法检测细胞活力达 95%以上,接种于 96 孔培养板中,调整青蒿琥酯作用终浓度(μg/ml)为:3.125、6.25、12.5、25、50、100、150,并设置对照组,每组样本 6 个复孔,37℃、5%CO_2 饱和湿度条件下分别培养 24h、48h、72h。终止培养时每孔加入 MTT20μl,孵育 4h 后,加 DMSO(二甲基亚砜)150μl/孔,置酶联免疫检测仪下测吸光度(OD)值,570nm 为检测波长。采用直线回归法计算药物的半数抑制浓度(IC_{50})。

细胞生长抑制率(%)=(1-加药组 OD 值/对照组 OD 值)×100%

1.4.2 青蒿琥酯 25μg/ml 作用于 K562 48h 后在电镜下观察 K562 细胞的超微结构变化。

1.4.3 流式细胞术检测细胞胀亡率和凋亡率 采用 FITC AnnexinV-PI 双染法。按照说明书操作,设置青蒿琥酯浓度 12.5μg/ml、25μg/ml、50μg/ml,分别作用于 K562 细胞 12h、24h、36h,并分别设置对照。离心收集各组细胞约 10^6,PBS 洗 2 次,用 1×Binding Buffer 缓冲液 400μl 重悬细胞,然后加入 FITC(异硫氰酸荧光素)标记的 Annexin V(FITC-Annexin V)和 PI 各 5μl,25℃避光孵育 15~30min,然后上流式细胞仪检测。用流式细胞仪 Cell Quest 软件分析参数 FLI-1,FLI-2。观察 Annexin-V(+)/PI(-),Annexin-V(++)/PI(+),Annexin-V(-)/PI(-),检测细胞凋亡率和胀亡率。

1.4.5 统计学方法 所有实验数据均应用 SAS 统计软件分析。

2 结 果

2.1 青蒿琥酯对 K562 细胞增殖的影响

MTT 结果显示青蒿琥酯对 K562 细胞增殖有明显的抑制作用,并呈明显时效($P<0.001$)、量效($P<0.001$)依赖关系(表 1)。24h、48h、72h 的 IC_{50} 值分别为 65.17μg/ml、31.63μg/ml、10.51μg/ml。

2.2 青蒿琥酯对 K562 细胞的超微结构变化

青蒿琥酯 25μg/ml 作用 K562 细胞 48h 后主要表现为 2 种方式改变,(1)细胞胀亡:细胞膜破坏,胞膜起泡,膜泡中充满细胞质,线粒体肿胀,细胞周围可见胞内容物的外溢。(2)细胞凋亡:细胞体

表 1 青蒿琥酯对人白血病细胞 K562 体外增殖的影响($\bar{x}\pm s$, n=6)

ART(μg/ml)	细胞抑制率(%)		
	24h	48h	72h
对照组	0±0	0±0	0±0
3.125	6.68±2.94*	27.40±4.46**	32.14±4.98**
6.25	18.49±6.03*	29.16±3.43**	38.25±3.88**
12.5	24.93±6.66**	37.85±8.44**	49.16±8.08**
25	35.74±8.44**	43.53±4.29**	63.38±7.71**
50	48.42±7.78**	57.45±9.60**	79.40±6.54**
100	50.74±4.72**	65.08±5.39**	85.10±7.39**
150	50.32±1.35**	62.12±4.76**	78.34±5.42**

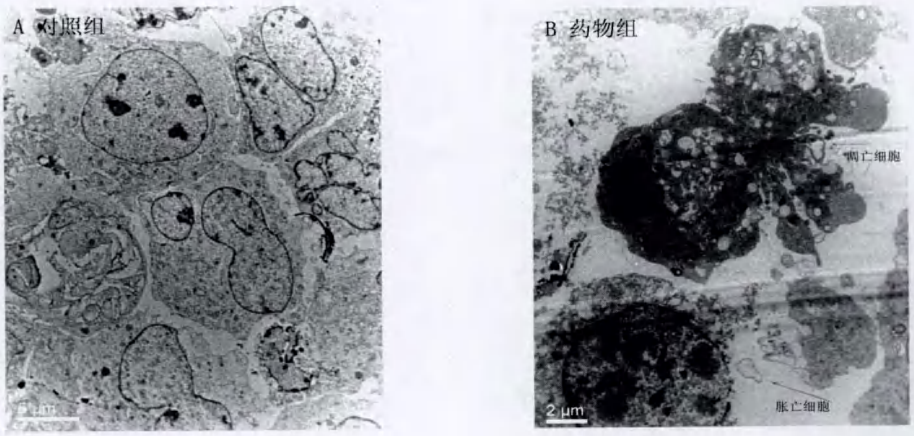
注:与对照组比较:*$P<0.05$,**$P<0.01$。

表 2 青蒿琥酯作用于 K562 细胞后的细胞凋亡率和胀亡率值($\bar{x}\pm s$, n=3)

ART(μg/ml)	12h		24h		48h	
	凋亡率(%)	胀亡率(%)	凋亡率(%)	胀亡率(%)	凋亡率(%)	胀亡率(%)
对照组	3.28±0.88	2.63±0.39	2.87±0.65	2.37±0.22	2.54±0.19	2.52±0.10
12.5	4.24±0.06*	4.13±0.62*	7.41±0.51*	7.31±0.86*	11.07±0.18**	10.18±0.34**
25	4.24±0.06*	5.24±0.58*	12.32±5.51**	11.06±0.19**	21.50±0.56**	23.51±0.63**
50	5.18±0.20*	6.70±0.45*	18.76±0.68**	21.62±1.08**	34.68±1.57**	37.30±0.74**

注:与对照组比较:*$P<0.05$,**$P<0.01$。

维普资讯 http://www.cqvip.com



A. 对照组(×3 000) K562 细胞　　B. 药物组(×5 000)K562 细胞

图 1　K562 细胞(透射电镜)

积缩小,细胞质浓缩,核染色质凝聚,胞质内大小不等的空泡形成,细胞膜完整,胞膜表面微绒毛和伪足减少,可见膜包裹内有较完整的细胞器和细胞核碎片的凋亡小体(图 1)。

2.3　青蒿琥酯诱导 K562 细胞凋亡、胀亡

流式细胞仪法检测当青蒿琥酯浓度为 12.5 μg/ml、25 μg/ml、50 μg/ml 时作用于 K562 细胞 12h、24h、36h 后,可同时诱导 K562 细胞胀亡和凋亡,且均与对照组有显著性差异($P<0.01$)。但每相同浓度和相同时间组的胀亡率和凋亡率比较无统计学意义($P>0.05$,表 2)。

3　讨　论

造血细胞增殖失调是白血病的重要生物学特征,治疗白血病的有效方法是尽可能的杀死肿瘤细胞并抑制其生长。本实验用 MTT 法检测了青蒿琥酯对 K562 细胞的增殖抑制作用。结果显示:青蒿琥酯对 K562 细胞增殖有明显的抑制作用,并呈明显时效($P<0.001$)、量效($P<0.001$)依赖关系。青蒿琥酯作用于 K562 细胞 24h、48h、72h 的半数抑制浓度 IC_{50}(μg/ml)分别为 65.17、31.63、10.51(表 1)。

近年来李颖,刘新等[5-8]学者认为青蒿琥酯对 K562 细胞的增殖抑制作用主要是诱导了细胞的凋亡,但我们实验首次发现:青蒿琥酯可同时诱导 K562 细胞的胀亡和凋亡。在电镜下可观察到(图 1):一种表现为细胞体积增大,胞膜不完整,胞浆溢出,核肿胀等胀亡改变;另一种表现为细胞体积缩小,胞膜完整,胞核固缩,有凋亡小体等。为了进一步研究胀亡和凋亡这两种形式变化,我们对此进行了鉴别检测。实验采用荧光标记 Annexin-V 与 PI 双染法[9,10],通过反映细胞膜的完整性来区别细胞的凋亡和胀亡:胀亡细胞膜完整性破坏,绿色及红色荧光 Annexin-V(++),PI(+);凋亡细胞膜完整,绿色荧光 Annexin-V(+),PI(-);活细胞 Annexin-V(-),PI(-)。统计结果显示每相同作用条件下的细胞胀亡率和凋亡率变化均无明显差别,可见青蒿琥酯诱导 K562 细胞胀亡和凋亡 2 种变化的作用强度是基本持平的(表 2)。

对于这种同等作用条件下表现出的两种形态学变化,我们认为青蒿琥酯对 K562 细胞具有双重作用,即它通过诱导 K562 细胞的胀亡和凋亡来杀死肿瘤细胞,并抑制其生长。细胞胀亡是一种 ATP 耗尽,被动的细胞死亡;而细胞凋亡是一种主动耗能过程,其程序的完成需要 ATP[11]。ATP 是否缺乏可能是青蒿琥酯作用于细胞后形态学差异的决定性因素。只有在缺氧[12]、底物缺乏、ATP 进行性减少等情况下,造成各种细胞膜性结构的破坏,膜通透性严重缺陷及膜上离子泵功能衰竭等细胞损伤,从而引起细胞内的水、钠、钙离子大量内流入细胞、线粒体肿胀等"伴有肿胀的细胞死亡"- 胀亡[13,14]。显然青蒿琥酯诱导 K562 胀亡的产生也可能与细胞的 ATP 耗尽有关,从而导致细胞膜的破坏,钙、钠等离子通道功能以及线粒体功能损害,这可能也是青蒿琥酯抑制白血病细胞的作用机制之一。

参　考　文　献

(下转第 846 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

子存在相关性,直接损伤血管内膜,造成内皮损伤,加速动脉粥样硬化进程。③男性 UA＞390~420 μmol/L(6.5~7mg/dl)、女性＞360 μmol/L(6mg/dl)时,UA 的抗氧化作用则转化为强氧化剂,氧化应急反应增强,UA 水平升高可能是促发动脉粥样硬化性血管病变的重要因素之一。高尿酸血症时,氧自由基生成增加,损害线立体、溶解酶功能,从而促进粒细胞在血管内皮的聚集。④参与炎症和血栓形成。高尿酸血症还可以促进脂质过氧化,氧化后的低密度脂蛋白胆固醇对内皮细胞有毒性作用,促进血管平滑肌细胞的凋亡,进一步造成血管局部炎症反应,增加斑块的不稳定性。⑤高尿酸血症的患者常合并高血压、高血糖症、血脂异常等,UA 可通过这些因素的综合作用加重血管内皮损伤,促进冠状动脉狭窄病变发生[5]。

参 考 文 献

[1] 谭庆华.高尿酸血症患者血脂紊乱的初步观察[J]. 华夏医学,2005;6(18):906-907.

[2] 叶任高,陆再英.内科学[M]. 第 6 版.全国高等学校教材.人民卫生出版社,2004.862-868.

[3] 徐成斌.对《中国成人血脂异常防治指南》的浅释[J]. 中华老年医学杂志,2006;12(25):935-936.

[4] 中国肥胖问题工作组数据汇总分析协作组. 我国成人体重指数和腰围对相关疾病危险因素异常的预测价值适宜体重指数和腰围切点的研究[J]. 中华流行病学杂志,2002;23(1):5-10.

[5] 黄 燕,饶邦复.痛风综合征[J]. 世界今日医学杂志,2006;7(5):225-226.

[6] 王永红. 重庆市 9 529 例体检人群糖代谢特点及代谢异常的临床研究,2007;32(5):524-527.

(责任编辑:关蕴良)

(上接第 798 页)

[1] Mercer AE,Maggs JL,Sun XM,et al. Evidence for the involvement of carbon-centered radicals in the induction of apoptotic cell death by artemisinin compounds[J]. J Biol Chem,2007;282(13):9372-9382.

[2] Posner GH,Paik IH,Sur S,et al. Orally active, antimalarial, anticancer,artemisinin-derived trioxane dimers with high stability and efficacy[J]. J Med Chem,2003;46(6):1060-1065.

[3] Dong Y,Chollet J,Matile H,et al. Spiro and dispiro-1,2,4-trioxolanes as antimalarial peroxides:charting a workable structure-activity relationship using simple prototypes[J]. J Med Chem,2005;48(15):4953-4961.

[4] Efferth T,Giaisi M,Merling A,et al. Artesunate induces ROS-mediated apoptosis in doxorubicin-resistant T leukemia cells[J]. Public Library of Science,2007;2(1):693.

[5] 李 颖,张凌岩,周 慧,等.青蒿琥酯对 K562 细胞凋亡诱导作用及其与亚砷酸的协同作用[J].肿瘤防治杂志,2005;12(15):1143-1145.

[6] 刘 新,李 颖,徐功立,等.青蒿琥酯对人慢性粒细胞白血病 K562 细胞凋亡及 Fas/FasL 蛋白表达的影响[J].上海中医药杂志,2006;40(10):63-65.

[7] 叶宝东,朱宁希,虞荣喜,等.青蒿琥酯诱导人白血病细胞 K562 凋亡的实验研究[J]. 浙江医学,2005;27(12):899-901.

[8] 赵新汉,王志宇,李 晶,等. Bcl-2 反义核酸增强青蒿琥酯诱导 K562 细胞凋亡[J]. 第四军医大学学报,2006;27(14):1282-1285.

[9] Brush MD. Recourse to death. A bevy of new products harnesses the power of flow cytometry for detecting apoptosis[J]. The Scientist,2000;14(16):25-29.

[10] Rabkin SW,Kong JY. Lovastatin-induced cardiac toxicity involves both oncotic and apoptotic cell death with the apoptotic component blunted by both caspase-2 and caspase-3 inhibitors[J]. Toxicol Appl Pharmacol,2003;193(3):346-355.

[11] 陈 义,黄秀榕,祁明信.细胞胀亡的分子机制研究[J]. 中国病理生理杂志,2004;20(11):2143-2146.

[12] Franek WR,Morrow DM,Zhu H,et al. NF-kappaB protects lung epithelium against hyperoxia-induced nonapoptotic cell death-oncosis[J]. Free Radic Biol Med,2004;37(10):1670-1679.

[13] Yasuhara S,Asai A,Sahani ND,et al. Mitochondria, endoplasmic reticulum,and alternative pathways of cell death in critical illness[J]. Crit Care Med,2007;35(9):S488-495.

[14] Jugdutt BI,Idikio HA. Apoptosis and oncosis in acute coronary syndromes:assessment and implications[J]. Mol Cell Biochem,2005;270(1-2):177-200.

(责任编辑:冉明会)