维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)03-0308-04

白藜芦醇联合阿糖胞苷对人白血病 K562 细胞 Fas/FasL、survivin 表达影响

陈建斌,鲁 敏,杨泽松,黄宗干

(重庆医科大学附属第一医院血液科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨白藜芦醇及其联合阿糖胞苷对 K562 细胞凋亡的影响及相关机制。方法:采用免疫组织化学法和 RT-PCR 法分别检测白藜芦醇及其联合阿糖胞苷处理 K562 细胞 48h 后 Fas、FasL 和 Survivin 表达情况。结果:K562 细胞分别经白藜芦醇、阿糖胞苷处理 48h 后白藜芦醇组和阿糖胞苷组 Fas 表达光密度值较对照组升高($P<0.05$),FasL 表达上调较对照组有显著性变化($P<0.05$),两药联合作用 Fas 表达较单用白藜芦醇无显著性变化($P>0.05$),而 FasL 表达上调较单用白藜芦醇或阿糖胞苷有显著性变化($P<0.05$)。白藜芦醇、阿糖胞苷单独及联合作用 48h 后,K562 细胞的 Survivin mRNA 表达较细胞对照组下降($P<0.05$、$P<0.01$),两药联合作用 Survivin mRNA 表达较单用白藜芦醇无显著性变化($P>0.05$)。结论:白藜芦醇单独及联合阿糖胞苷能通过上调 Fas/FasL 的表达,激活 Fas/FasL 凋亡途径,诱导人白血病 K562 细胞凋亡,同时下调 survivin 的表达促进凋亡的发生。

【关键词】白藜芦醇;阿糖胞苷;K562;Fas/FasL;Survivin

【中国图书分类法分类号】R733.71 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-09-20

The effect of resveratrol combined with arabinosylcytosin in K562 cell Fas/FasL and survivin expression

CHEN Jian-bin, et al

(*Department of Haematology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: This study was aimed to explore the apoptotic effect the K562 cells treated by resveratrol and/or arabinosylcytosin. *Methods*: Fas/FasL expression was detected by immunohistochemical method and survivin expression was detected by RT-PCR in K562 cells, 48 hours after treatment by resveratrol and arabinosylcytosin respectively. *Results*: Fas/FasL expression in K562 cells, treated by resveratrol and arabinosylcytosin respectively, was significantly increased compared with the control group($P<0.05$). However, the effect of resveratrol combined with arabinosylcytosin in K562 cell Fas expression showed no significance changes in comparison with resveratrol or arabinosylcytosin($P>0.05$), contrary to FasL expression ($P<0.05$). Survivin mRNA expression was decreased after 48 hours in K562 cells treated by resveratrol and/or arabinosylcytosin in comparison with the control group($P<0.05$、$P<0.01$). However, the effect of resveratrol combined with arabinosylcytosin in K562 cell Survivin mRNA expression showed no significance changes in comparison with resveratrol or arabinosylcytosin($P>0.05$). *Conclusions*: In conclusion the resveratrol and/or arabinosylcytosin could upregulate Fas/FasL expression and activate the apoptosis pathway of Fas/FasL to induce the apoptosis of K562 cells. It could downregulate the expression of survivin to promote apoptosis. The two drugs had synergistic effect.

【Key words】Resveratrol; Arabinosylcytosin; K562; Fas/FasL; Survivin

Survivin 是 1997 年发现的 IAP(Inhibitor of apoptosis protein)家族的一个抗凋亡蛋白[1],其表达见于胚胎组织和多种肿瘤细胞中,不存在于正常成人组织中而能抑制多种因素诱导的细胞凋亡,因此被认为是一个肿瘤特异性凋亡抑制因子,是迄今发现最强的凋亡抑制因子。Fas/FasL 途径是体内转导凋亡信号的主要系统之一。当 Fas 与 FasL 结合或与抗 Fas 抗体交联后,诱导自身三聚体化,向细胞内传导凋亡信号,诱导细胞凋亡。因此应用适当的方法或药物,激活凋亡信号途径,抑制凋亡抑制基因产物,

作者介绍:陈建斌(1966-),男,主任医师,博士,研究方向:恶性血液病的基础与临床研究。

维普资讯 http://www.cqvip.com

在化疗药物诱导肿瘤细胞凋亡过程中起重要作用。本实验拟通过免疫组织化学法和 RT-PCR 法分别观察白藜芦醇及其联合阿糖胞苷处理 K562 细胞 48h 后 Fas、FasL 和 Survivin 表达情况，初步探讨白藜芦醇及其联合阿糖胞苷对 K562 细胞凋亡的影响及相关机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

白血病细胞株 K562 来自重庆医科大学检验系，白藜芦醇(Res，西安奥特斯生物制品有限公司)，阿糖胞苷(Ara-c，上海华联制药有限公司 批号 050105C)，RPMI1640 (北京中杉生物技术有限公司)，小牛血清(杭州四季青公司)；免疫组化试剂：鼠抗人 Fas 单克隆抗体、DAB 试剂盒及 SP-9000 免疫组化试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)，兔抗人 FasL 单克隆抗体(Santa Cruz)；RT-PCR 试剂：DEPC(北京鼎国生物公司)，TRNzol(北京天根生物制品公司)，第一链 cDNA 合成试剂盒 (上海生物工程公司)，Survivin 引物、DNA-marker(大连宝生物工程公司)。细胞培养 CO_2 孵育箱(SHEL Lab 美国)，高速低温离心机(Beckman 公司)，电泳仪及电泳槽(Bio-Rad)，PCR 仪暗箱式紫外检测仪(上海复星高科技有限公司)。引物序列：Survivin-sense：5'-CCATTAACCGCCA-GATTTGAA-3'，Survivin-antisense：5'-GATCTCCTTTCCTAA GACATTGC-3'，扩增片断 840bp；β-actin-sense：5'-CAGA GCAAGAGAGGCATCCT-3'，β-actin-antisense:5'-GGAT AGC ACAGCCTGGATAG-3'，扩增片段 250bp。阴性对照组为 β-actin。

1.2 细胞培养

取出 -80℃冻存 K562 细胞株，置 37℃水浴箱中迅速溶化，吸出细胞悬液，注入离心管并滴加 10 倍以上培养液，混匀后离心弃上清液，重复 1 次；将 K562 细胞接种于含 10%小牛血清的 RPMI1640 培养液中，置 37℃、5%CO_2 孵育箱中培养，常规换液传代，选择对数生长期细胞进行实验。

1.3 实验分组

取对数生长期细胞以 1×10^5 个 /ml 浓度接种于各培养瓶，孵育 24h 后加入处理因素。对照组不加药，Res 处理组终浓度 100μmol/L，Ara-c 处理组终浓度 422μmol/L，Res+Ara-c 处理组 Res 终浓度 100μmol/L、Ara-c 终浓度 422μmol/L。孵育 48h 后收集各组细胞离心。

1.4 免疫组化法(SP 法)检测 Fas、FasL 的表达

将细胞悬液滴至经处理后的载玻片上，风干，4%甲醛固定 20min，3%H_2O_2 去离子水孵育 10min，蒸馏水冲洗，PBS 浸泡后滴加正常山羊血清封闭，室温孵育 15min，倾去血清，滴加适当比例稀释的 Fas 和 FasL 抗体，4℃过夜。滴加生物素标记山羊抗兔、鼠 IgG，室温孵育 15min；滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液，室温孵育 15min；滴加 100μl 新鲜配制的 DAB 显色液，显微镜下控制显色 5～10min，自来水充分冲洗，苏木素复染，饱和碳酸锂显蓝，二甲苯透明，中性树胶封片，光镜下观察。

1.5 RT-PCR 检测 survivin mRNA 转录水平

1.5.1 总 RNA 的提取 用 TRNzol 试剂盒按说明书提取细胞总 RNA。

1.5.2 cDNA 的合成 提取孵育 48h K562 细胞的总 RNA，用第一链 cDNA 合成试剂盒按说明书逆转录成 cDNA 后 -20℃冻存待用。

1.5.3 RNA 鉴定 取少量提取 RNA 用紫外分光光度计分别测定其 OD 值。RNA 纯度为 $OD_{260}/OD_{280}=1.8\sim2.0$，取少量提取 RNA，进行 1%琼脂糖凝胶电泳并用溴化乙啶染色后在紫外灯观察 RNA 完整性，如果有完整的 5.8S、18S、28S 3 条电泳带，说明 RNA 完整无降解，否则，弃之重提。

1.5.4 PCR 反应 PCR 反应系统为 50μl (第 1 链 cDNA 3μl，Survivin 上游引物 2μl，Survivin 下游引物 2μl，10mmol/L dNTP2μl，25mmol/L $MgCl_2$ 2μl，10×PCR buffer 5μl，Taq 酶 0.5μl，ddH_2O 定容至 50μl)，反应条件：94℃10 min，94℃变性 30s，58℃延伸 45s，59℃退火 45s，共 35 个循环，最后 58℃延伸 1.5min。

1.5.5 PCR 产物鉴定及序列分析

取 10μl PCR 产物进行 1.5%琼脂糖凝胶电泳，电压 100V，时间 30min，嗅化乙啶染色，紫外灯下观察结果，用凝胶图像分析系统对电泳条带进行密度扫描分析，以 Survivin/β-actin 积分光密度比值半定量反映 Survivin mRNA 的表达强弱。

1.6 统计学处理

实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。应用 SPSS11.0 for Windows 统计软件分析，进行 t 检验。

2 结 果

2.1 白藜芦醇和阿糖胞苷对 K562 细胞的的 Fas/FasL 表达的影响

Fas/FasL 着色呈棕褐色，位于细胞浆或细胞膜。用北航病理图像分析系统进行结果分析，分析结果用 SPSS11.5 for Windows 统计软件行方差分析。免疫组化阳性细胞呈淡黄色、黄色、棕褐色，阴性细胞无着色(图 1)。

从表 1 可看出 K562 细胞经白藜芦醇、阿糖胞苷处理 48h 后白藜芦醇组和阿糖胞苷组 Fas 表达光密度值较对照组升高($P<0.05$)，白藜芦醇组 Fas 表达升高更明显；两药联合作用 Fas 表达较单用白藜芦醇无显著性变化($P>0.05=0.145$)。K562 细胞经白藜芦醇、阿糖胞苷处理 48h 后白藜芦醇组和阿糖

维普资讯 http://www.cqvip.com

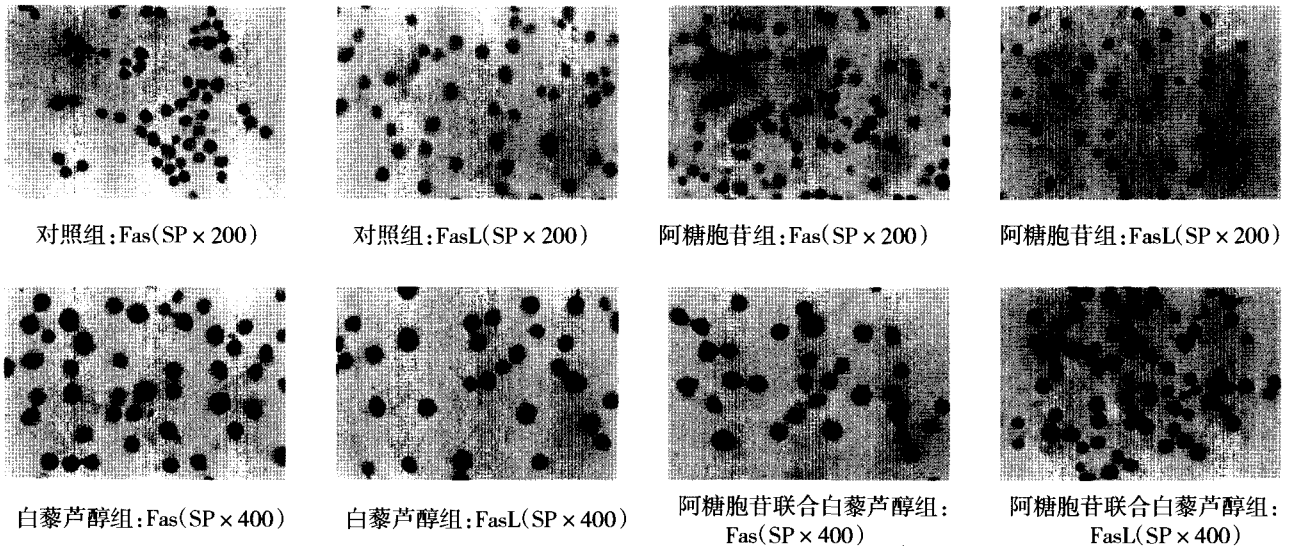
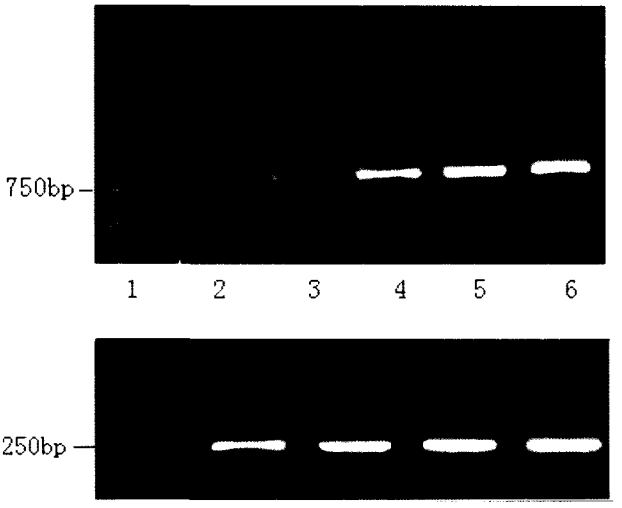


图 1 免疫组化法显示白藜芦醇、阿糖胞苷单独和联合处理 K562 细胞 48 h 后 Fas、FasL 表达

表 1 白藜芦醇、阿糖胞苷作用于 K562 细胞后 Fas、FasL 光密度值

组别	平均光密度值	
	Fas	FasL
对照组	0.150 8 ± 0.021 3	0.156 8 ± 0.022 1
白藜芦醇组	0.197 8 ± 0.022 1[a]	0.256 3 ± 0.02 6[a]
阿糖胞苷组	0.164 2 ± 0.018 6[ab]	0.198 5 ± 0.009 9[ab]
白藜芦醇联合阿糖胞苷组	0.204 5 ± 0.045 2[ab*c]	0.277 1 ± 0.019 4[abc]

注:a.与对照组比较,$P<0.05$; b.与白藜芦醇组比较,$P<0.05$; c.与阿糖胞苷组比较,$P<0.05$; b*.与白藜芦醇组比较,$P>0.05$



1.NA maker; 2.阴性对照组; 3.阿糖胞苷联合白藜芦醇组; 4.白藜芦醇组; 5.阿糖胞苷组; 6. 对照组

图 2 Survivin、β-actin RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果

胞苷组 FasL 表达较对照组有显著性变化($P<0.05$),两药联合作用 FasL 表达较单用白藜芦醇或阿糖胞苷有显著性变化($P<0.05$)。

2.2 RT-PCR 法检测 survivin mRNA 转录水平

2.2.1 RNA 样本的鉴定 提出的 RNA 样本纯度以吸光度比值 $OD_{260/280}$ 计算,结果在 1.6 以上。将提取的 RNA 样本行凝胶电泳分析可看见 28S、18S、5.8S 3 条带(部分见 28S、18S 2 条带),证明 RNA 完整无降解,可用于其后的 RT-PCR。

2.2.2 白藜芦醇、阿糖胞苷作用后 Survivin mRNA 的表达 从图 2 和表 2 可看出白藜芦醇、阿糖胞苷单独及联合作用 48h 后,K562 细胞的 Survivin mRNA 表达较细胞对照组下降($P<0.05$、$P<0.01$)。阿糖胞苷组与白藜芦醇组比较无显著性差异($P>0.05$ =0.82)。白藜芦醇联合阿糖胞苷组与阿糖胞苷组、白藜芦醇组、对照组比较有显著性差异($P<0.05$)。白藜芦醇和阿糖胞苷能下调 survivin 的表达。

3 讨 论

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 白藜芦醇、阿糖胞苷作用后 Survivin、β-actin 的 IOD 值及比值

阴性对照	白藜芦醇联合阿糖胞苷组	白藜芦醇组	阿糖胞苷组	细胞对照组
Survivin	87.397 ± 1.97	131.77 ± 5.37	139.03 ± 0.85	180.75 ± 3.58
β-actin		202.39		
Survivin/β-actin	0.4318 ± 0.01**	0.6511 ± 0.027*	0.6869 ± 0.004*	0.8931 ± 0.018

注:** 与对照比较 $P<0.01$; * 与对照组比较 $P<0.05$。

自从 1998 年 Clement 等[2]首先报道白藜芦醇能通过 CD95-CD95L 途径(即 Fas-FasL 途径)诱导 HL-60 细胞株和人乳腺癌细胞株 T47D 发生凋亡,而对正常人外周血淋巴细胞则无此作用以来,许多研究小组对其诱导肿瘤细胞凋亡进行了观察和研究,发现白藜芦醇对多种肿瘤均具有明显的诱导凋亡作用[3,4]。本实验应用免疫组织化学方法研究了白藜芦醇单独及联合阿糖胞苷处理 K562 细胞 48h 后 Fas、FasL 的表达变化:白藜芦醇处理组 Fas、FasL 蛋白表达阳性增强,与对照组相比有显著性差异($P<0.05$);阿糖胞苷处理组,Fas 表达无明显变化,FasL 表达增强。与细胞对照组,白藜芦醇与阿糖胞苷联合作用后,Fas 表达较单用白藜芦醇无明显变化($P>0.05$),FasL 表达阳性升高($P<0.05$)。这提示白藜芦醇可上调 Fas、FasL 蛋白表达水平,促使 Fas 与 FasL 的结合,激活细胞内 caspases 级联反应,诱导 K562 细胞凋亡。Fas/FasL 通路可能是白藜芦醇诱导 K562 细胞凋亡的途径之一。与阿糖胞苷联合作用后,增强 FasL 表达,促进 K562 细胞凋亡,且两者有协同作用,是否单纯与 Fas/FasL 通路有关尚需进一步研究。

Survivin 能特异地与细胞凋亡途径终末段分子 caspase 3、caspase 7 和 caspase 9 直接结合,也可通过 p21 间接抑制 caspase, 抑制细胞凋亡。其中 caspase 3 涉及线粒体和死亡受体 2 条途径,也是 Fas 介导细胞凋亡途径中关键性效应蛋白酶,因此 survivin 表达的增加会抑制 Fas 介导肿瘤细胞的凋亡[5]。Survivin 被认为是迄今发现最强的肿瘤特异性凋亡抑制因子,其抗凋亡功能较 bcl-2 家族强[6]。Survivin 基因表达在恶性增殖的白血病细胞中处于失控表达状态,其表达与白血病的发生、发展密切相关[7]。本实验用 RT-PCR 的方法研究了白藜芦醇单独及联合阿糖胞苷处理 K562 细胞 48h 后 survivin mRNA 的表达变化,发现与对照组相比白藜芦醇处理组、阿糖胞苷组,survivin mRNA 表达下降($P<0.05$、$P<0.01$)。阿糖胞苷组与白藜芦醇组比较无显著性差异($P>0.05$)。白藜芦醇联合阿糖胞苷组与阿糖胞苷组、白藜芦醇组比较有显著性差异($P<0.05$),两药有协同作用。

参 考 文 献

[1] Ambrosini G, Adida G, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed *in canaer* and lymophoma[J]. Nature Medicine, 1997; 3(8): 917-921.

[2] Clement MV, Hirpara JL, Chawdhury SH, et al. Chemo-preventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, triggers CD95 signaling-dependent apoptosis in human tumor cells[J]. Blood, 1998; 92(3): 996-1002.

[3] Wang XB, Huang J, Zou JG, et al. Effects of resveratrol on number and activity of endothelial progenitor cells from human peripheral blood[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2007; 34(11): 1109-1115.

[4] Park JW, Woo KJ, Lee JT, et al. Resveratrol induces pro-apoptotic endoplasmic reticulum stress in human colon cancer cells[J]. Oncol Rep, 2007; 18(5): 1269-1273.

[5] Hsiao HL, Wang WS, Chen PM, et al. Overexpression of thymosin beta-4 renders SW480 colon carcinoma cells more resistant to apoptosis triggered by FasL and two topoisomerase Ⅱ inhibitors via downregulating Fas and upregulating Survivin expression, respectively [J]. Carcinogenesis, 2006; 27(5): 936-944.

[6] Ling X, Cheng Q, Black JD, et al. Forced expression of survivin-2B abrogates mitotic cells and induces mitochondria-dependent apoptosis by blockade of tubulin polymerization and modulation of Bcl-2, Bax, and survivin[J]. J Biol Chem, 2007; 282(37): 27204-27214.

[7] 肖延风, 刘 雅, 田 玮, 等.Survivin 在白血病中表达及其与 Caspase、Fas 相关性研究[J]. 实用儿科临床杂志, 2005; 20(1): 13-16.

(责任编辑:关蕴良)