维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2006)02-0159-04

青蒿酸对人红白血病 K562 细胞增殖抑制的体外研究

周生伟[1]，王莎莉[2]，王亚平[1]

（1.重庆市生物化学与分子药理重点实验室，重庆 400016；2.重庆医科大学基础医学院生理教研室，重庆 400016）

【摘 要】目的：探讨青蒿酸体外作用对 K562 细胞增殖的影响及其机制。方法：采用 MTT 法检测青蒿酸对 K562 细胞增殖的影响，流式细胞术分析细胞周期分布情况，透射电子显微镜进行形态学观察。结果：青蒿酸作用 K562 细胞 24h、48h，能显著抑制细胞增殖，随药物浓度增加，对细胞增殖的抑制强度也显著增高。经青蒿酸作用 48h，处于 G_0/G_1 期 K562 细胞增加，且能诱导 K562 细胞发生凋亡。电镜可观察到细胞凋亡的形态学改变。结论：青蒿酸能抑制 K562 细胞增殖，这种抗肿瘤作用可能与抑制 K562 细胞进入细胞增殖周期和诱导细胞凋亡有关。

【关键词】K562 细胞；青蒿酸；增殖抑制；凋亡

【中国图书分类法分类号】R329.2+8 【文献标识码】A 【收稿日期】2005-12-10

Inhibitory effects of artemisinic acid on proliferation of K562 cells in vitro

ZHOU Shengwei, et al

(*Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology of Chongqing, Chongqing Medical University*)

【Abstract】Objective: To investigate the effects of artemisinic acid on proliferation of K562 cells and its mechanism in vitro. Methods: MTT assay was used to detect the effects of artemisinic acid on proliferation of K562 cells. The flow cytometry was used to analyze the distribution of cell cycle. Morphological changes of cells were observed by electron microscopy. Results: The proliferation of K562 cells was inhibited by intervention of artemisinic acid significantly after 24 hours and 48 hours, and the effects were in concentration-dependent manner. The cell number in G_0/G_1 increased and apoptosis was induced after the treatment with artemisinic acid for 48 hours, the morphological characteristic of apoptosis was observed by electron microscopy. Conclusion: Artemisinic acid can inhibit the proliferation of K562 cells, which may be -due to induction of apoptosis and prohibit on of tumor cells from entering cell cycle.

【Key words】K562 cells; Artemisinic acid; Inhibitory proliferation; Apoptosis

中药青蒿为菊科植物黄花蒿（Artemisia annua L.），青蒿酸是从青蒿叶中分离的抗疟疾有效成分。近年来，文献报道青蒿酸及衍生物具有体外抗肿瘤作用[1]，但其作用机制不清楚。本文观察了青蒿酸对人红白血病细胞株 K562 细胞增殖体外抑制作用，旨在为其治疗肿瘤提供理论基础与实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株

K562 细胞：由重庆医科大学组胚教研室提供。在含 10% 新生牛血清（杭州四季青生物工程材料有限公司）的 RPM1640（美国 GIBCO）培养液（内含 100U/L 青霉素、100μg/ml 链霉素），37℃、5% CO_2、饱和湿度的条件下进行细胞悬浮培养，并常规传代。

人胚胎肺成纤维细胞：由本实验室刘永刚博士分离、纯化、鉴定。在含 10%胎牛血清（杭州四季清生物工程材料有限公司）的 DMEM（美国 GIBCO）培养液，37℃、5% CO_2、饱和湿度的条件下进行细胞贴壁培养，并常规传代。

1.2 主要药物与试剂

青蒿酸由重庆医科大学生理教研室王莎莉教授分离、纯化及鉴定。用 1640 培养液配成 50mg/L 溶液（储备液），4℃保存。

柔红霉素购于意大利法玛西亚普强公司（产品批号 4F1093）。

1.3 方法

1.3.1 MTT 法检测青蒿酸对 K562 细胞的增殖抑制率[2] 取对数生长期的 K562 细胞及人胚胎肺成纤维细胞分别调整细胞浓度为 1×10^5 个/ml，以 100μl/孔接种于 96 孔板。实验分

作者介绍：周生伟（1979- ），男，硕士，主要研究方向：血细胞发生及调控。

基金项目：重庆市科委基金资助（渝科发计字[2005]50 号文件）。

维普资讯 http://www.cqvip.com

组:K562 细胞青蒿酸组，在培养体系中加入终浓度 1.562～25mg/L 的青蒿酸;K562 细胞柔红霉素组,在培养体系中加入终浓度 0.075～0.3mg/L 的柔红霉素;K562 细胞对照组加入等量培养液。人胚胎肺成纤维细胞青蒿酸组和人胚胎肺成纤维细胞柔红霉素组药物浓度同上,药物组及对照组均设 6 个平行空。分别在 CO_2 孵箱中培养 24h、48h，每孔加入 0.5% MTT 20μl 继续培养 4h,弃上清,加入 200μl DMSO,微量振荡至 MTT 完全溶解,于自动酶标读数仪(550 型 BIORAD 公司美国)450nm 处测定各孔 OD 值。重复实验 3 次，求平均值。并用下面公式计算药物对细胞抑制率。

细胞抑制率 = 1- 实验组平均 OD 值 / 对照组平均 OD 值

1.3.2 细胞周期和凋亡率的测定 以 5×10^5 个 /ml K562 细胞接种于培养瓶中,同步化处理后换培养液。青蒿酸组加入终浓度为 12.5、9.5、6.5mg/L 的青蒿酸，柔红霉素组加入终浓度为 0.3、0.15、0.075mg/L 柔红霉素,对照组加入等量培养液。培养 48h 离心(1000r/min, ×10min),弃上清,PBS 洗涤 2 次(1000r/min, ×5min)以去除细胞碎片。预冷,70%乙醇固定,碘化丙啶染色后置流式细胞仪(FACS Calibar Becton Dickinson,USA)分析。并用 MotiFit 软件分析细胞周期及凋亡情况。

1.3.3 透射电镜观察 收集 12.5mg/L 青蒿酸作用 48h 的 K562 细胞和对照组的 K562 细胞，离心弃上清,PBS 洗涤 2 次,3%戊二醛前固定,1%四氧化锇后固定，乙醇梯度脱水,环氧树脂 618 包埋,聚合,超薄切片,醋酸双氧铀和枸橼酸铅染色,透射电镜(H-600 型)观察摄片。

1.3.4 统计学处理 应用 SPSS 统计软件进行实验数据统计学处理。数据以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 青蒿酸对 K562 细胞的增殖抑制影响

青蒿酸和柔红霉素分别处理 K562 细胞 24h、48h,均有不同程度的增殖抑制效应,且呈剂量依赖性(表 1)。

2.2 青蒿酸对人胚胎肺成纤维细胞生长的作用

6.25mg/L 以下青蒿酸作用人胚胎肺成纤维细胞 24h、48h 与对照组相比,无统计学意义。12.5mg/L 以上青蒿酸作用人胚胎肺成纤维细胞 24h、48h 与对照组相比,OD 值有不同程度降低,并且均有统计学意义。柔红霉素各组作用人胚胎成纤维细胞 24h、48h与对照组相比,均有统计学意义(表 2)。

2.3 青蒿酸对 K562 细胞周期分布及凋亡的影响

从表 3 可知,9.5mg/L 以上青蒿酸作用 48h,处于 G_0/G_1 期 K562 细胞较对照组有所增加,S 期则与

表 1 青蒿酸和柔红霉素体外作用 24h 和 48h 对 K562 细胞的增值的影响(n=6)

青蒿酸浓度 (mg/L)	24h		48h		柔红霉素浓度 (mg/L)	24h		48h	
	OD值 ($\bar{x}\pm s$)	抑制率 (%)	OD值 ($\bar{x}\pm s$)	抑制率 (%)		OD值 ($\bar{x}\pm s$)	抑制率 (%)	OD值 ($\bar{x}\pm s$)	抑制率 (%)
对照组	0.564 ± 0.015	0	0.987 ± 0.026	0	对照组	2.163 ± 0.033	0	2.597 ± 0.026	0
1.562	0.531 ± 0.011	5.85	0.912 ± 0.021	7.60	0.075	1.514 ± 0.023	30.00	1.745 ± 0.030	32.80
3.125	0.520 ± 0.014	7.80	0.855 ± 0.022	13.37	0.150	1.238 ± 0.037	42.76	1.342 ± 0.030	48.32
6.250	0.402 ± 0.010	28.72	0.627 ± 0.019	36.47	0.225	1.055 ± 0.041	51.23	1.127 ± 0.038	56.60
12.500	0.156 ± 0.012	72.34	0.091 ± 0.011	90.78	0.300	0.992 ± 0.020	54.14	0.887 ± 0.029	65.85
25.000	0.090 ± 0.011	84.04	0.045 ± 0.020	95.44					

注:青蒿酸组与对照组比较,$P<0.05$;组内两两比较,$P<0.05$;柔红霉素组与对照组比较,$P<0.05$;组内两两比较,$P<0.05$

表 2 青蒿酸和柔红霉素体外作用 24h 和 48h 对人胚胎肺成纤维细胞的增值的影响(n=6)

青蒿酸浓度 (mg/L)	24h		48h		柔红霉素浓度 (mg/L)	24h		48h	
	OD值 ($\bar{x}\pm s$)	抑制率 (%)	OD值 ($\bar{x}\pm s$)	抑制率 (%)		OD值 ($\bar{x}\pm s$)	抑制率 (%)	OD值 ($\bar{x}\pm s$)	抑制率 (%)
对照组	0.168 ± 0.012	0	0.202 ± 0.016		对照组	0.580 ± 0.031	0	0.625 ± 0.022	0
1.562	0.164 ± 0.018	2.38	0.188 ± 0.012	6.93	0.075	0.464 ± 0.024	20.00	0.491 ± 0.020	21.44
3.125	0.160 ± 0.015	4.76	0.187 ± 0.018	7.43	0.150	0.451 ± 0.023	22.24	0.469 ± 0.016	24.96
6.250	0.154 ± 0.010	8.33	0.18 ± 0.009*	8.91	0.225	0.406 ± 0.021	30.34	0.399 ± 0.027	36.16
12.500	0.15 ± 0.014*	10.71	0.17 ± 0.015*	11.88	0.300	0.390 ± 0.013	32.76	0.359 ± 0.017	42.56
25.000	0.14 ± 0.012*	12.50	0.17 ± 0.013*	15.35					

注:青蒿酸组与对照组比较,* $P<0.05$,柔红霉素组与对照组比较,$P<0.05$

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 3 不同浓度青蒿酸和柔红霉素的细胞周期分布和细胞凋亡率

青蒿酸	细胞周期分布(%)			凋亡率	柔红霉素	细胞周期分布(%)			凋亡率
(mg/L)	G_0/G_1	S	G_2/M	(%)	(mg/L)	G_0/G_1	S	G_2/M	(%)
0	41.03	45.59	13.38	2.20	0	41.03	45.59	13.38	2.20
6.5	36.96	45.78	17.26	3.02	0.075	14.19	19.08	66.73	1.70
9.5	59.89	25.12	14.99	10.49	0.150	11.16	24.92	63.93	1.79
12.5	54.20	33.88	7.92	20.68	0.300	11.90	16.75	71.35	2.07

对照组相比有明显的下降。柔红霉素各组作用 48h，处于 G_0/G_1 期、S 期 K562 细胞较对照组明显下降，G_2/M 期与对照组相比有明显的增加。此外 9.5mg/L 以上青蒿酸组有凋亡峰的出现，而柔红霉素组未见凋亡峰出现。

2.3 青蒿酸作用对 K562 细胞其超微结构的影响

对照组 K562 细胞体积较大，核幼稚，核浆比例大，胞膜完整(图 1)。青蒿酸作用 K562 细胞 48h 可见较多凋亡细胞，表现为细胞体积变小，胞膜皱缩，胞浆电子密度加深，染色质致密固缩聚集于核膜呈境界分明的块状或新月形小体，核裂解，常有凋亡小体，核胞质内有大小不等空泡形成(图 2)。

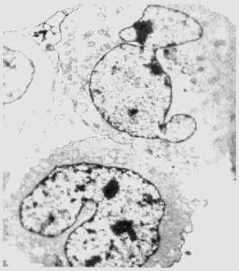


图 1 对照组的 K562 细胞 ×5000

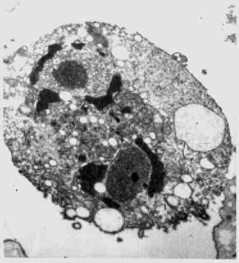


图 2 青蒿酸作用 48h 的 K562 细胞 ×6000

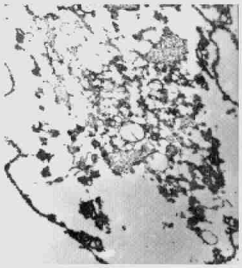


图 3 青蒿酸作用 48h 的 K562 细胞 ×5000

另外见大量严重肿胀溶解的细胞，胞内核及其他细胞器结构不清，表面细胞膜多处不连续(图 3)。

3 讨 论

中药青蒿为菊科植物黄花蒿 (Artemisia annua L.)。青蒿酸是从青蒿叶中分离的抗疟疾有效成分。经过结构修饰可形成青蒿素类衍生物：双氢青蒿素、蒿甲醚、蒿乙醚及青蒿琥脂等。青蒿素类药物抗疟疾活性高，毒性小。近年来发现青蒿素类类药物具有明显的抗肿瘤活性。1992 年孙玮辰等[1]发现青蒿酸及青蒿 A 等对人肝癌细胞 SMMC-7721 具有明显杀伤作用，而对人胚肺细胞无效。提示青蒿酸及青蒿酸衍生物有选择性杀伤癌细胞作用。本研究结果表明不同浓度青蒿酸作用 K562 细胞 24h 及 48h，均有不同程度的增值抑制效应，且呈剂量依赖性(组间比较 $P<0.05$)。而对人胚肺成纤维细胞作用很轻微。提示青蒿酸对 K562 细胞有较强的靶向性。

细胞周期是指细胞从上次分裂结束到下次分裂终末的过程。它由 G_1 期、S 期、G_2 期和 M 期组成。细胞周期在不同时相的多个检查点受到调控，其中以 G_1/S 期和 G_2/M 期检查点最为重要，周期素依赖性激酶(Cyclin-dependent kinases, CDKs)、周期素

维普资讯 http://www.cqvip.com

(Cyclins) 和周期素依赖性激酶抑制因子(Cyclin-dependent kinases inhibitors, CKIs)三类因子参与该调控过程。而在正常细胞的 G_2/M 期,CyclinB1 和 $P34^{cdc2}$ 起着重要作用。$P34^{cdc2}$ 只有和 CyclinB1 结合才有活性,是启动有丝分裂的"引擎",调控细胞的分裂和增殖[3]。本实验研究结果显示,青蒿酸作用 48h,K562 细胞被大量阻滞在 G_0+G_1 期,而 S 期细胞明显减少。提示青蒿酸阻止 K562 细胞进入细胞增殖周期,抑制其大量增殖。林芳等研究的双氢青蒿素将 MCF 细胞阻滞在 G_0+G_1 期[4]。本实验同时显示青蒿酸的抗肿瘤机制可能有凋亡和胀亡两种,其中以胀亡为主。电镜可见大量严重肿胀溶解的细胞。胞内核及其他细胞器结构不清,表面细胞膜多处不连续,此类细胞占大多数。电镜同时观察到较多凋亡细胞,表现为细胞体积变小,胞膜皱缩,胞浆电子密度加深,染色质致密固缩聚集于核膜呈境界分明的块状或新月形小体,核裂解,常有凋亡小体,核胞质内有大小不等空泡形成。细胞凋亡率同时随药物浓度增高而增加,凋亡的细胞占少数。提示青蒿酸对 K562 细胞的杀伤作用主要是破坏细胞膜, 导致胞内细胞器大量外流,引起细胞的死亡;同时具有部分促进细胞凋亡作用。周晋等研究青蒿素对人白血病细胞株 NB4、K562 和原代 APL 细胞的影响及可能机制,亦提示其抗肿瘤机制有凋亡和胀亡两种[4]。作者认为白血病细胞膜是青蒿类药物作用的靶点之一,其可使白血病细胞内钙离子升高,导致白血病细胞凋亡。并且同时通过开某些细胞膜上的离子通道,使细胞内钙浓度增加, 激活 caspase 非依赖性细胞死亡形式,在没有三磷酸腺苷(ATP)缺乏时发生胀亡[4]。董海鹰等研究青蒿素体外培养的白血病 K562 细胞的凋亡诱导作用及机制,认为青蒿素对 K562 细胞明显的促凋亡机制可能与抑制内向整流钾电流有关[5]。王勤等研究青蒿琥脂对肝癌细胞的诱导凋亡机制认为其凋亡分子机制是 P53 非依赖性的[6]。杨小平等的研究也证实上述结论,认为与凋亡调节基因 bcl-2 下调有关[7]。美国华盛顿大学 Lai 等认为其抗肿瘤作用可能与抗疟疾机制相似[8]。他们认为青蒿素具有选择性烷化蛋白质的作用,这可能与青蒿素结合了癌细胞内特殊的靶蛋白受体,从而导致肿瘤死亡有关[9]。因此青蒿类的药物之间具体作用机制可能有所不同,其抗肿瘤的机制尚不十分清楚。青蒿酸的抗肿瘤的具体机制还须进一步实验证实。

综上所述:青蒿酸在体外能抑制 K562 细胞增殖,其机制可能是 K562 细胞被阻滞在 G_0+G_1 期,大量细胞膜破裂,导致胞内细胞器大量外流,细胞死亡;同时具有部分促进 K562 细胞凋亡的作用。

参 考 文 献

[1] 孙玮辰,韩家娴. 四种青蒿酸及青蒿 B 衍生物的体外抗癌作用[J]. 中国药理学报,1992;13(6):541-543.

[2] 汤为学,骆云鹏,王瑞雪. 人实体瘤抗癌药物敏感实验 MTT 法的建立[J].重庆医科大学学报,1992;17(2):103-108.

[3] Lohka MJ, Hayes MK, Mailer. Purification of maturation promoting factor, an intracellular of early mitotic events [J]. Proc Natl Acad Sic USA, 1988;85(9):3009-3013.

[4] 周 晋,孟 然,李丽敏,等.青蒿素对人白血病细胞株和原代细胞的影响[J].中华内科杂志,2003;42(10):713.

[5] 董海鹰,王知非,宋维华,等.青蒿素诱导 K562 细胞凋亡研究[J]. 中国肿瘤,2003;12(18):473.

[6] 王 勤,顺理茂,赵 一,等.青蒿琥脂抗肿瘤作用的机制研究[J].药学学报,2002;37(6):477.

[7] 杨小平,张 星. 青蒿琥脂诱导人肿瘤凋亡及分子机制的探讨[J]. 中草药, 2002;33(9):819.

[8] Singh N P, Lai H. Selective toxicity of dihydroartenmisinin and holotransferrin toward human breast cancer cells [J]. Life Science, 2001;70:49-56.

[9] Lee CH, Hong h, Shin J, et al. NMR studies on novel antitumor drug candidate deoxoartemisinin and carboxypropyl deoxoartemisinin [J]. Biochem Biophys Res common, 2000;274(2):359.