维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2002)04-0386-02

苦参碱对K562细胞骨架的作用观察

张 彦，刘小珊，许相儒，刘北忠，何於娟，马凌娣，蒋纪恺
（重庆医科大学检验系临床生化教研室，重庆 400016）

【摘 要】目的：从细胞骨架方面进一步探索苦参碱对人白血病K562细胞株的作用机制。方法：采用微管吮吸技术和基因芯片技术分析苦参碱处理前后K562细胞粘弹系数和细胞骨架蛋白基因表达的改变。结果：0.1mg/ml苦参碱作用K562细胞24h后粘弹系数下降，细胞骨架类基因prefoldin 与ezrin 的mRNA表达增强。结论：苦参碱能够导致K562细胞的细胞骨架发生变化。

【关键词】苦参碱；基因芯片；细胞骨架；K562细胞
【中国图书分类法分类号】R917.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2002-01-24

Investigations on cytoskeleton of K562 cells induced by matrine

ZHANG Yan, et al
(Department of Clinical Biochemistry, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To study the effect of matrine on cytoskeleton of K562 cells. *Methods*: Micropipette aspiration technique was adopted to investigate the viscoelasticity of K562 cells, while the different expression of cytoskeletal protein gene was analyzed by DNA microarray. *Results*: In matrine-treated K562 cells, the viscoelastic properties K1, K2 and μ were decreased significantly, and the gene expression of prefoldin and ezrin was much stronger than that of control cells. *Conclusion*: The cytoskeleton changed in matrine-treated K562 cells.

【Key words】 Matrine; DNA microarray ; Cytoskeleton ; K562 cells

K562细胞是一株分化极差、恶性程度较高的人白血病细胞。多年研究表明，在一些分化诱导剂的作用下，K562细胞可以向红细胞系、粒细胞系和巨核细胞系方向分化成熟，并表现出相应血细胞类型的成熟标志[1]。苦参是传统的中草药，具有抗肿瘤、抗炎等作用，苦参碱是其中主要的生物碱。本课题组以前的研究结果证实[2]，一定浓度的苦参碱能够诱导K562细胞向正常细胞分化，但分化的机制不甚明了。有研究认为，恶性肿瘤细胞的骨架结构混乱，细胞刚性异常[3]。实验拟从细胞流变学角度探索苦参碱对K562细胞的作用机理。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

K562细胞培养于含10%小牛血清的PRMI-1640 (GIBCO, USA)培养基中。取对数生长期细胞，调节细胞数为1×10^5个/ml，加入苦参碱使其终浓度为0.1 mg/ml，37℃，5% CO_2培养24h。对照组除不加苦参碱外其余相同。

1.2 细胞变形性测定

采用微管吮吸技术测量单个K562细胞的变形性。实验系统由倒置显微镜、显微操作器、压力控制和记录系统、图象分析处理仪等部分组成。在倒置显微镜下，显微操作器引导与之相连的微管使其尖端靠近细胞表面，压力控制系统产生一阶跃负压吸吮细胞，使其一小部分进入微管。实验结果由系数K1、K2、μ表示，其中K1与K2是两个平行的弹性系数，反映了细胞的初始变形程度，细胞初始变形程度正比于[(1/K1)+(1/K2)]，最大变形程度正比于1/K1，二者与时间无关；μ是粘性系数，反映了随着K1和K2的变化细胞变形与时间的关系。

1.3 基因芯片杂交

提取苦参碱处理前后K562细胞的mRNA，在逆转录制作探针的过程中分别用荧光素cy3标记对照组，cy5标记处理组。芯片HGEC－80s（上海博星基因芯片有限责任公司）42℃预杂交5h、加入探针后42℃杂交15－20h，洗涤、干燥、扫描等操作均按照说明书进行。

1.4 基因芯片结果的筛选

采用GenePix 4000B扫描仪扫描得到两种细胞中的基因表达谱图片，经Genepix Pro 3.0图象处理软件分析得到实验组/对照组荧光比值。差异表达基因筛选方法：先将所有数据的前景值与背景值相减，得出cy3、cy5标记的强度值；再根

作者介绍：张 彦（1968- ），女，讲师，博士，
主要研究方向：肿瘤分化与逆转。
基金项目：国家自然科学基金（No.30171150）。

维普资讯 http://www.cqvip.com

据总数为n的有效基因的cy5/cy3的自然对数值InRi=In cy5/cy3，以Ri值在0.1～10之间的有效基因作为均一化依据，算出这些基因cy5/cy3自然对数平均值In(R')，即均一化系数，将所有数据项的cy3标记强度乘上均一化系数，得出调整后的cy3*。最后算出所有基因调整后的Ratio值（cy5/cy3*），筛选出Ratio大于2或小于0.5的数据，这些数据所代表的基因在与两种探针杂交时表现出较大的差异。

2 结 果

2.1 细胞变形性

0.1mg/ml苦参碱作用24h后的K562细胞，其粘弹性发生了明显改变。

弹性系数K1由对照组725.73 ± 215.06下降至用药组432.50 ± 67.20。

弹性系数K2由对照组433.13 ± 119.28下降至用药组242.50 ± 31.20。

粘性系数μ由对照组71.53 ± 38.04下降至用药组49.46 ± 15.30。

2.2 基因芯片结果分析

基因芯片一共检测了152个与细胞骨架蛋白有关的基因，其中绝大部分基因cy5/cy3*比值介于0.5～2.0之间，包括各种肌动蛋白（actin）和微管蛋白（tubulin）以及它们的相关蛋白质，提示它们在对照组与实验组细胞中的表达没有差异；在差异表达的基因中，有3个基因的比值小于0.5，包括了参与细胞骨架重排的SNX2蛋白等，提示它们在苦参碱作用的K562细胞中表达减少；另有prefoldin和ezrin基因的比值分别为2.838和2.014，提示它们在苦参碱作用后表达明显增强。

3 讨 论

细胞变形性是指细胞在流动过程中的变形能力，其大小取决于细胞的几何形状、细胞膜的粘弹性及内粘度等几个因素。有学者认为白血病时肿瘤细胞较正常细胞“硬”，动物实验也发现，小鼠接种白血病细胞后，白细胞变形能力下降[4]，因此白血病细胞变形性低于正常血液细胞，刚性却大于正常细胞。

苦参碱是中药苦参的一个重要组成成分，我们以前的工作中已发现0.1mg/ml的苦参碱能够诱导K562细胞形态上向正常细胞分化，并有血红蛋白含量增加，乳酸脱氢酶活力增大，同时又显著影响了K562细胞的细胞周期、端粒酶活性以及c-myc和N-ras等癌基因的表达[5]。本实验采用微管吮吸技术研究苦参碱处理前后K562细胞变形性的改变，拟从细胞流变学角度探讨苦参碱诱导K562细胞分化的机理。

微管吮吸技术是评价单个细胞或细胞对之间变形或粘附特性的重要研究手段，它是测量一定管径下细胞的吸入长度与负压之间的关系。细胞变形能力愈差，所需负压愈高，粘弹系数愈大。本实验利用此技术测定了苦参碱作用K562细胞前后粘弹性的改变，发现三个粘弹系数K1、K2和μ在苦参碱作用后均明显低于对照K562细胞，其中K1、K2反映了细胞的初始变形程度，μ反映了细胞变形对时间的依赖性。此三个系数的降低提示，苦参碱作用后K562细胞流变性增大，刚性减弱。与文献[2]报道苦参碱能诱导K562细胞向成熟方向分化的结果相一致。

由于肿瘤细胞的粘弹性与细胞骨架的结构状态以及胞外基质的改变紧密相关，骨架蛋白的组成和结构决定了细胞的粘弹性。为了进一步了解苦参碱诱导K562细胞粘弹性发生改变的机制，以及细胞骨架蛋白基因表达的改变情况，我们利用基因芯片技术对苦参碱作用前后K562细胞的基因表达谱进行了分析，结果显示检测的152个骨架蛋白相关基因中有5个基因发生了改变。特别是prefoldin与ezrin两个蛋白质的基因在苦参碱诱导后表达明显增强。prefoldin与ezrin都是与细胞骨架相关的蛋白质：prefoldin是一个分子伴侣，参与新生肌动蛋白（actin）和微管蛋白（tubulin）的折叠，使他们具有天然的空间构象并/或参与它们的聚合[6]。ezrin是ERM（ezrin-radixin-moesin）家族中的主要组成部分，ERM作为联系膜蛋白与细胞骨架之间的桥梁，不仅参与了细胞骨架的构成、细胞骨架稳定性的维持，还与细胞内信号与物质的传输有关[7,8]。本实验中prefoldin与ezrin的mRNA表达增加，提示苦参碱作用后，细胞骨架蛋白的结构与功能可能趋向正常，从而使K562细胞的粘弹系数减少，细胞流变性明显增强。这一结果从一个侧面证实了苦参碱可诱导K562细胞向成熟方向分化，也从细胞骨架这一角度解释了苦参碱诱导分化作用的机制，但具体的变化过程以及与其它细胞骨架类基因表达的关系仍需进一步的研究。

（下转第390页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

肠并较移植前基准增高，表明该组肠粘膜细胞的合成速度较快。细胞增生的数量大，则相应的凋亡的细胞数量也增加从而维持动态平衡，而该组凋亡细胞的数量却增加不明显，凋亡程度较移植前基准无明显加重，表明HGF不仅促进肠粘膜细胞增殖，对粘膜细胞的凋亡也有较强的抑制作用，使移植肠粘膜细胞的数量维持在较高的水平。

HGF对肝细胞的增殖和凋亡的作用较为明确。基因工程技术使小鼠基因突变肝细胞表达大量HGF，肝部分切除后，突变小鼠的肝脏增生加快[8]。HGF还可引起Bcl-xL的强烈表达从而阻断Fas及其配体的激活后的信号转导，减轻肝细胞凋亡及肝功能损害[9]。

HGF可通过其受体c-Met与上皮或内皮细胞结合，导致细胞分裂或分化增加，或细胞分离，运动能力增加。在包括小肠在内的许多器官均发现有HGF的存在，其受体c-Met也在小肠有较强的表达[10]。HGF可能通过外分泌、内分泌及旁分泌多种途径作用于其位于肠上皮细胞膜上的受体，但对受体磷酸化后细胞内复杂的信号转导过程目前尚缺乏了解。

本研究结果表明肝细胞生长因子(HGF)能明显促进移植肠上皮细胞增殖并抑制其凋亡。

参 考 文 献

[1] Kato Y, Yu D, Lukish JR,et al.Influence of luminal hepatocyte growth factor on small intestine mucosa mass in vivo [J].J Surg Res,1997;71:49-53.

[2] Soin AS, Friend PJ, Richard JK, et al. A modification to improve technical success rate of small bowel transplantation in rats[J]. Transplantation Proc, 1996;28(5):2722.

[3] Schroeder P, Scheizer E, Blomer A, et al. Glutamine prevents mucosal injury after small bowel transplantation[J]. Transplantation, 1992;24:1104-1107.

[4] Abu Eliragd, Tzakis A, Todo S, et al. Monitoring and treatment of intestinal allograft rejection in human[J].Transplant Proc,1993;25(12):1202-1203.

[5] Dignass AU, Lynch-Devaney K, Podolsky DK, et al. Hepatoocyte growth factor/scatter factor stimulates intestinal epithelial cell proliferation and migration[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1994;202:701-709.

[6] Kato Y, Yu D, Lukish JR, et al. Hepatocyte growth factor enhances intestinal mucosal cell function and mass in vivo[J]. J Pediatr Surg, 1997;32:991-994.

[7] Kato Y, Yu YD, Schwartz MZ, et al. Hepatocyte growth factor up-regulates SGLT1 and SGLT5 gene expression after massive small bowel resection[J]. J Pediatr Surg, 1998;33:13-15.

[8] Shiota G, Wang TC, Nakamura T, et al. Hepatocyte growth factor in transgenic mice:effects on hepatocyte growth ,liver regeneration and gene expression[J].Hepatology, 1994;19:962-964.

[9] Kosai K, Matsumoto K, Nagata S, et al. Abrogation of Fas-induced fulminant hepatic failure in mice by hepatocyte growth factor[J]. Biochem Biophys Res Commun,1998;244(3):683-690.

[10] Di-Renzo MF, Narsimhan RP, Olivero M, et al. Expression of the Met/HGF receptor in normal and neoplastic human tissues [J]. Oncogen, 1991;6:1997-2003.

（上接第387页）

参 考 文 献

[1] Tabilio A, Pelicci PG, Vinci G, et al. Myeloid and megakaryocytic properties of K562 cell lines[J]. Cancer Research, 1983; 43:4569-4574.

[2] Zhang Y, Jiang JK, Liu XS, et al. Differentiation and Apoptosis in K562 Erythroleukemia Cell Induced by Matrine [J]. Natural Medicine, 1998;52(4):295-299.

[3] 汪 宁. 细胞骨架刚性的调控与癌症的抑制[M]. 肿瘤分子生物学研究进展，第1版. 北京：军事医学科学出版社，1996;53-56.

[4] 胡金麟. 细胞流变学[M]. 第1版，北京：科学出版社，2000;40-69.

[5] 张丽萍，蒋纪恺，谭荣安，等. 苦参碱对K562细胞株端粒酶活性和细胞周期的影响[J]. 中华肿瘤杂志，1998;20(5):328-329.

[6] Rommelarer H, Deve MD, Neirynck K, et al. Prefoldin Recognition Motifs in the Nonhomologous Proteins of the Actin and Tubulin Families[J].J Bio Chem, 2001; 276(44):41023-41028.

[7] Hovens CM, Kaye AH. The tumour suppressor protein NF2/merlin: the puzzle continues [J]. J Clin Neurosci, 2001; 8(1):4-7.

[8] Louvet-Valles S. ERM proteins: from cellular architecture to cell signaling [J]. Bio Cell, 2000;95(5):305-316.