肿瘤相关研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001097

# 青蒿琥酯对白血病 K562 细胞自噬的影响及其相关机制的研究

张　萍，杨桂存，陈红霞，王小静，梁绍燕，徐酉华
（重庆医科大学附属儿童医院血液科、儿童发育疾病研究教育部重点实验室、儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地、儿科学重庆市重点实验室，重庆　400014）

【摘　要】**目的**：研究青蒿琥酯（artesunate，ART）对白血病 K562 细胞自噬的影响，并初步探讨其作用机制。**方法**：不同浓度（0、6.25、12.5、25、50、100 mg/L）ART 刺激 K562 细胞，用 CCK-8 法分别检测 24、48、72 h 后 K562 细胞和健康人外周血有核细胞的增殖抑制情况，并计算 48 h 半数抑制浓度（inhibitory concentration，$IC_{50}$）；$IC_{50}$ 浓度下，采用 CCK-8 法、Annexin V-FITC/PI 双染法联合流式细胞仪分别检测空白对照组（未加药物）、10 μmol/L 自噬抑制剂二磷酸氯喹（chloroquine diphosphate，CQ）组、30 mg/L ART+10 μmol/L CQ 组及 30 mg/L ART 组 K562 细胞的增殖抑制率、凋亡率；Western blot 检测不同浓度 ART 作用 K562 细胞 48 h，及 IC50 浓度下 ART 作用 K562 细胞 12、24、48、72 h 后，LC3、p62、HMGB1、Beclin1 的蛋白表达情况。**结果**：ART 抑制 K562 细胞增殖，以时间剂量依赖性方式影响，且作用 48 h $IC_{50}$ 为 30 mg/L；30 mg/L ART+10 μmol/L CQ 组（70.85 ± 5.57）%的增殖抑制率较 30 mg/L ART 组（34.07 ± 7.32）%、空白对照组（0.00 ± 2.15）%明显增高；Annexin V-FITC/PI 双染法联合流式细胞仪结果显示 ART+CQ 组（16.67 ± 1.34）%的凋亡率较 ART（9.48 ± 1.00）%空白对照组（1.92 ± 0.09）%明显增加；Western blot 结果显示，与对照组比较，自噬相关分子 LC3、p62 的蛋白表达水平在所设定的各浓度及不同干预时间时均上调明显。Beclin1 的蛋白表达水平在 ART 高浓度（25、50、100 mg/L）及干预时间（24、48、72 h）较长时下调明显。HMGB1 的蛋白表达水平在 ART 高浓度（50、100 mg/L）及不同干预时间（12、24、48、72 h）时下调明显。**结论**：ART 以时间剂量依赖性方式抑制 K562 细胞自噬，可能机制是通过抑制自噬体的融合降解、下调自噬形成相关分子 HMGB1、Beclin1 的表达而减弱肿瘤细胞对恶劣肿瘤微环境的应激反应、扩大肿瘤细胞的损伤，最终促进 K562 细胞的死亡。

【关键词】青蒿琥酯；白血病；K562；自噬
【中图分类号】R733.72　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2016-03-24

# Effect of artesunate on autophagy of leukemic K562 cells and its mechanism

*Zhang Ping, Yang Guicun, Chen Hongxia, Wang Xiaojing, Liang Shaoyan, Xu Youhua*
*(Department of Hematology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University; Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders; China International Science and Technology Cooperation Base of Child Development and Critical Disorders; Chongqing Key Laboratory of Pediatrics)*

【Abstract】***Objective***: To study the autophagy of artesunate (ART) on leukemic K562 cells and its possible mechanism. ***Methods***: The inhibitory effect of ART on the proliferation of K562 cells was detected by CCK-8. The cell apoptosis was examined by the flow cytometry. Western blot was carried out to detect the expressions of LC3, p62, HMGB1 and Beclin1. ***Results***: ART inhibited the proliferation of K562 cells in a dose-and-time dependent manner, with $IC_{50}$ value of 30 mg/L at 48 h. In addition, ART could induce the apoptosis of K562 cells and the apoptosis could incease when combined with CQ. According to the results Western blot, ART could up-regulate the expressions of autophagy-related molecule LC3, p62 and down-regulate the expressions of HMGB1, Beclin1. ***Conclusion***: ART shows the effects in inhibiting the autophagy of leukemic K562 cells. Its mechanism may be related to the down-regulation the expression of HMGB1, Beclin1, and the inhibition of autophagic degradation, and that ART-induced inhibition of autophagy may eventually results in the death in K562 cells.

【Key words】artesunate; leukemia; K562; autophagy

**作者介绍**：张　萍，Email：273035985@qq.com，研究方向：血液肿瘤。
**通信作者**：徐酉华，Email：xuyouhua0504@sina.com。
**基金项目**：重庆医科大学附属儿童医院转化医学资助项目（编号：7000003）。
**优先出版**：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20161215.1201.060.html（2016-12-15）

自噬是真核细胞中溶酶体介导的一种自降解过程。有研究报道自噬与肿瘤的发生密切相关，对肿瘤发挥双刃剑作用。某些情况下，诱导自噬可以抑制肿瘤生长，并导致自噬相关性细胞死亡；但大多数情况下，肿瘤细胞可利用自噬应对缺氧、营养匮乏及清除氧自由基等，从而发挥保护肿瘤细胞的作用。目前，自噬在血液肿瘤中的作用逐渐受到关注。研究[1]表明自噬与慢性髓细胞白血病（chronic myeloid leukemia，CML）的发生、治疗、耐药、复发等方面密切相关。青蒿琥酯（artesunate，ART）是从黄花蒿茎叶中提取的有效成分，其特殊的过氧桥结构产生的强氧化作用已广泛应用于临床。ART 对包括白血病在内的多种肿瘤细胞均有显著抑制增殖、诱导凋亡的作用[2-5]，但 ART 对白血病自噬影响的研究少见报道。本研究拟将 ART 作用于 K562 细胞，观察 ART 对 K562 细胞自噬的影响，初步探讨可能的相关机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 K562 细胞株 由重庆医科大学儿科研究所传代保存。

1.1.2 实验试剂 注射用青蒿琥酯（桂林南药股份有限公司，国药准字 H10930195）；二磷酸氯喹（美国 Sigma-Aldrich 公司）；RPMI1640 培养基（美国 Gibco 公司）；胎牛血清（美国 Hyclone 公司）；Trizol 试剂（美国 Ambiong 公司）；CCK-8 试剂（日本 DOJINDO 公司）；Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒、全蛋白提取试剂盒（凯基生物技术有限公司）；LC3、p62 抗体（美国 CST 公司），β-Actin、HMGB1、Beclin1（Abcam 公司）；辣根过氧化物标记的羊抗兔二抗（中杉金桥）；SDS-PAGE 凝胶试剂盒（碧云天公司）。

### 1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 K562 细胞悬浮生长于含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基中，置于 37 ℃、5%$CO_2$ 饱和湿度的培养箱中培养，取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 CCK-8 法检测细胞增殖 取对数生长期细胞，调整细胞密度为 $6\times10^4$ 个/mL，按每孔 5 000 个接种于 96 孔板，对照组加入等量的细胞及 RPMI1640 完全培养基，分组 1：实验组分别加入 RPMI1640 完全培养基稀释的青蒿琥酯，使其终浓度分别为 6.25、12.5、25、50、100 mg/L 梯度，使 96 孔板内每孔终体积为 100 μL，每组设 4 个复孔。置于 37 ℃、5%$CO_2$ 的孵箱中培养，分别培养 24、48、72 h 后每孔分别加入 CCK-8 10 μL，继续培养 4 h 后，取 450 nm 波长，用酶标仪测吸光度（absorbance，A）值；分组 2：取 1 例健康成人外周血有核细胞，分为健康加药组及健康未加药组，将 K562 细胞分为 K562 加药组及 K562 未加药组，在加药组中加入 ART，使得终浓度为 48 h $IC_{50}$（该例健康成人血常规、尿常规、大便常规、肝功能、肾功能皆正常）。分组 3：对照组同分组 1，实验组中分别加入 ART、CQ、ART+CQ，使其终浓度分别为：$IC_{50}$ ART、10 μmol/L CQ、$IC_{50}$ ART+10 μmol/L CQ，加入 RPMI1640 使每孔体积为 100 μL，培养 48 h 后加入 CCK-8，酶标仪测 A 值。K562 细胞生长抑制率（%）=[1-($A_{实验孔}$-$A_{空白孔}$)]/($A_{对照孔}$-$A_{空白孔}$)×100%。实验孔：含有细胞的培养基、CCK-8 和药物；空白孔：不含细胞和药物的培养基、CCK-8；对照孔：含有细胞的培养基、CCK-8、不含药物。

1.2.3 Annex in V-FITC/PI 双染法联合流式细胞学检测细胞凋亡 取对数生长期细胞，调整细胞浓度，按 $1\times10^5$ 个/mL 接种于 6 孔板，实验组分别加入 ART（48 h $IC_{50}$）、CQ（10 μmol/L）、ART+CQ，对照组加入等量的细胞及 RPMI1640 完全培养基。收集各实验组及对照组作用 48 h 的 K562 细胞，按照凯基 Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒说明，收集约 $1\times10^6$ 个细胞重悬于 500 μL 1×Binding Buffer，依次加入 Annexin V-FITC5 μL、PI 5 μL，室温避光孵育 15 min，流式细胞仪检测凋亡率。

1.2.4 Western blot 收集各处理组的细胞（约 $6\times10^7$ 个），按照凯基全蛋白提取试剂盒说明提取细胞总蛋白并测定蛋白浓度。取 100 μg 蛋白在 15%的分离胶及 5%浓缩胶的 SDS-PAGE 上电泳，160 mA 转膜 110 min，室温下 5%的脱脂牛奶封闭 2 h，按 1∶1 000 加入一抗，4 ℃孵育过夜。洗膜后按 1∶2 000 加二抗，室温孵育 2 h 后 ECL 显影，凝胶成像系统分析条带灰度值，以目的条带与 β-actin 的灰度值之比作为目的蛋白的相对表达水平。

### 1.3 统计方法

采用 SPSS 20.0 软件统计分析，每组实验均独立重复 3 次，结果以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，表 1、表 2 使用重复测量方差分析，表 3、表 4、表 5 使用单因素方差分析检验，检验水准 $\alpha=0.05$。

## 2 结 果

### 2.1 CCK8 检测结果

2.1.1 不同浓度 ART 对 K562 细胞增殖的影响 K562 细胞在不同浓度 ART（0、6.25、12.5、25、50、100 mg/L）分别作用 24、48、72 h 后，ART 对 K562 细胞增殖抑制作用明显增加，呈时间、剂量依赖性。处理时间相同时，重复测量方差分析各浓度 ART 相对于空白对照组对 K562 的增殖抑制率有统计学意义（$F$=2 133.590，$P$=0.000）；处理浓度相同时，重复测量方差分析处理不同时间后 K562 的增殖抑制率有统计学意义（$F$=489.220，$P$=0.000）；方差分析结果还显示作用时间会随着 ART 浓度的不同而不同（$F$=22.200，$P$=0.000）（表 1）。其 48 h $IC_{50}$ 为 30 mg/L，采用此浓度进行后续实验。

2.1.2 ART 对健康成年人外周血有核细胞以及 K562 细胞增殖影响的比较 30 mg/L ART 对健康成年人外周血有核细胞及 K562 细胞进行干预，分别作用 24、48、72 h，健康加药组及 K562 加药组的细胞生长均受到明显抑制（$F$=498.440，$P$=0.000）；作用时间与作用浓度一致时，健康加药组与 K562 加药组之间存在统计学差异（$F$=332.660，$P$=0.000），ART 对健康人外周血单核细胞的生长抑制明显低于 K562（表 2）。

表 1 ART 对 K562 细胞的生长抑制作用（$\bar{x}\pm s$，$n$=3）

Tab.1 ART inhibits the grouth of K562 cells in a dose-and time-dependent manner（$\bar{x}\pm s$，$n$=3）

| ART | 生长抑制率（%） | | |
|---|---|---|---|
| | 24 h | 48 h | 72 h |
| 对照组 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 6.25 mg/L 组 | $15.51\pm4.02^{ab}$ | $30.51\pm0.66^{cd}$ | $47.43\pm2.27^{ef}$ |
| 12.5 mg/L 组 | $27.78\pm4.21^{ab}$ | $41.52\pm1.86^{cd}$ | $58.52\pm1.62^{ef}$ |
| 25.00 mg/L 组 | $30.90\pm2.57^{ab}$ | $51.20\pm1.46^{cd}$ | $67.10\pm1.05^{ef}$ |
| 50.00 mg/L 组 | $49.53\pm3.90^{ab}$ | $75.33\pm1.69^{cd}$ | $88.56\pm0.68^{ef}$ |
| 100.00 mg/L 组 | $59.70\pm0.99^{ab}$ | $84.20\pm1.15^{cd}$ | $93.91\pm0.12^{ef}$ |
| $F$ 值（分组） | 2 133.590 | $P$ 值（分组） | 0.000 |
| $F$ 值（时间） | 489.220 | $P$ 值（时间） | 0.000 |
| $F$ 值（时间×分组） | 22.200 | $P$ 值（时间×分组） | 0.000 |

注：a，与 24 h 对照组比较，差异有统计学意义，$P$<0.05；b：与 48 h 及 72 h 比较，差异有统计学意义，$P$<0.05；c：与 48 h 对照组比较，差异有统计学意义，$P$<0.05；d：与 24 h 及 72 h 比较，差异有统计学意义，$P$<0.05；e：与 72 h 对照组比较，差异有统计学意义，$P$<0.05；f：与 24 h 及 48 h 比较，差异有统计学意义，$P$<0.05

表 2 ART 对健康人外周血有核细胞及 K562 细胞生长抑制的影响（$\bar{x}\pm s$，$n$=3）

Tab.2 Cell growth inhibition of ART on healthy adult peripheral blood nucleated cells and K562（$\bar{x}\pm s$，$n$=3）

| 分组 | 生长抑制率（%） | | |
|---|---|---|---|
| | 24 h | 48 h | 72 h |
| 健康加药组 | $18.40\pm1.46$ | $27.16\pm2.01$ | $35.05\pm1.31$ |
| K562 加药组 | $40.34\pm2.16^{a}$ | $49.02\pm1.42^{b}$ | $60.47\pm1.99^{c}$ |
| $F$ 值（分组） | 2133.590 | $P$ 值（分组） | 0.00 |
| $F$ 值（时间） | 489.220 | $P$ 值（时间） | 0.00 |
| $F$ 值（时间×分组） | 6.090 | $P$ 值（时间×分组） | 0.25 |

注：a，24 h K562 加药组与健康加药组之间存在统计学差异，$P$<0.05；b：48 h K562 加药组与健康加药组之间存在统计学差异，$P$<0.05；c：72 h K562 加药组与健康加药组之间存在统计学差异，$P$<0.05

2.1.3 ART 单独或联合自噬抑制剂 CQ 后对 K562 细胞增殖的影响 以空白组为对照（即 0.00%），30 mg/L ART 组、10 μmol/L CQ 组及 ART 联合 CQ 组处理 K562 细胞 48 h 后，各组增殖抑制率分别为：(47.57 ± 2.08)%、(7.15 ± 2.13)%、(70.85 ± 5.57)%（表 3）。方差分析 4 组细胞增殖抑制率有统计学差异（$F$=982.480，$P$=0.00）。两两比较结果显示：30 mg/L ART 组、10 μmol/L CQ 组及 ART 联合 CQ 组相对于空白组增殖抑制率明显增加（$P$=0.000），且 10 μmol/L CQ 组 K562 的增殖抑制作用明显低于 ART 组；ART 联合 CQ 组相对于 30 mg/L ART 组及 10 μmol/L CQ 组增殖抑制率明显增加（$P$=0.000）。

2.2 Annexin V-FITC/PI 荧光标记法检测 ART 对 K562 细胞凋亡的影响

以空白组为对照，30 mg/L ART 组、10 μmol/L CQ 组及 ART 联合 CQ 组处理 K562 细胞 48 h 后，各组凋亡率分别为：(9.48 ± 1.00)%、(8.28 ± 0.97)%、(16.67 ± 1.34)%（表 3）。方差分析 4 组细胞凋亡率有统计学差异（$F$=115.45，$P$=0.000）。两两比较结果显示：30 mg/L ART 组、10 μmol/L CQ 组及 ART 联合 CQ 组相对于空白组凋亡率明显增加（$P$=0.000）；ART 联合 CQ 组相对于 30 mg/L ART 组及 10 μmol/L CQ 组增殖抑制率明显增加（$P$=0.000）；10 μmol/L CQ 组与 ART 组凋亡率无明显差异（$P$=0.170）（图 1，表 3）。

表 3 ART、CQ 对各组细胞的凋亡率及增殖抑制率的影响（$\bar{x}\pm s$，$n$=3）

Tab.3 Cell growth inhibition and apoptosis of 30 mg/L ART and 10 μmol/L CQ（$\bar{x}\pm s$，$n$=3）

| 分组 | 凋亡率（%） | 增殖抑制率（%） |
|---|---|---|
| 对照组 | $1.96\pm0.09$ | 0.00 |
| ART组 | $9.48\pm1.00^{a}$ | $47.57\pm2.08^{c}$ |
| CQ组 | $8.28\pm0.97^{a}$ | $7.15\pm2.13^{c}$ |
| ART+CQ组 | $16.67\pm1.34^{ab}$ | $70.85\pm5.57^{cd}$ |
| $F$ 值 | 115.450 | 982.480 |
| $P$ 值 | 0.000 | 0.000 |

注：a，与对照组比较，差异有统计学意义，$P$<0.05；b：ART+CQ 组与 ART组相比，差异具有统计学意义，$P$<0.05；c：与对照组比较，差异有统计学意义，$P$<0.05；d：ART+CQ 组与 ART 组相比，差异具有统计学意义，$P$<0.05

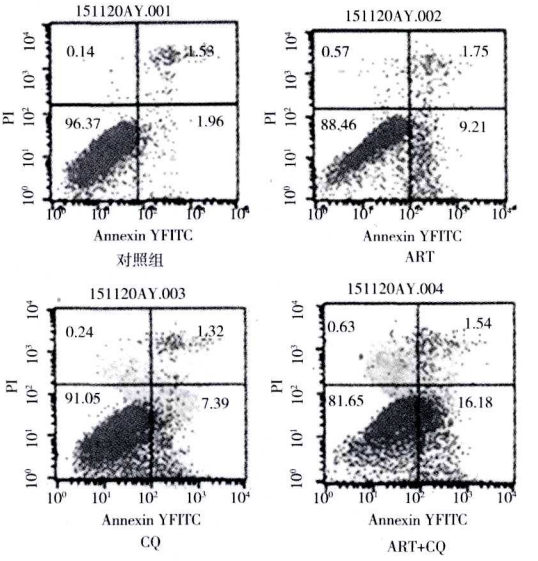


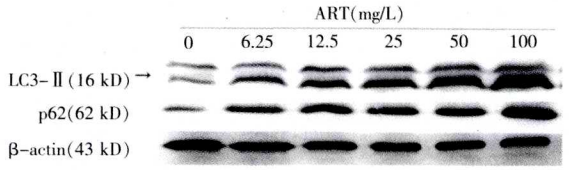

图 1 ART 单独及联合 CQ 作用于 K562 细胞 48 h 以后 Annexin V-FITC/PI 双染流式图（$\bar{x}\pm s$，$n$=3）

Fig.1 Apoptosis effect of 30 mg/L ART with or without 10 μmol/L CQ（$\bar{x}\pm s$，$n$=3）

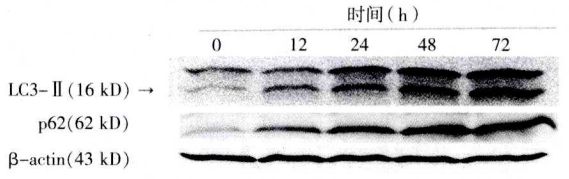
2.3 Western blot 检测 ART 对 K562 细胞自噬相关蛋白 LC3、p62、HMGB1、Beclin1 表达的影响

以空白组为对照，各实验组 LC3-Ⅱ、p62 的表达水平随药物浓度的增加而上调，相对于对照组明显升高，方差分析各组 LC3-Ⅱ、p62 蛋白的表达水平有统计学差异（$F_{LC3-Ⅱ}$=1 906.820，$P_{LC3-Ⅱ}$=0.000；$F_{p62}$=331.550，$P_{p62}$=0.040）；随着 ART 浓度的增加，Beclin1 蛋白的表达逐渐下降，与对照组相比，方差分析显示 ART 在较高浓度（25、50、100 mg/L）时 Beclin1 蛋白的表达有统计学差异（$F$=58.460，$P$=0.000），在低浓度（6.25、12.5 mg/L）差异无统计学意义（$P$>0.05）；HMGB1 蛋白随着 ART 浓度的增加表达下调，与对照组相比，ART 在较高浓度（50、100 mg/L）时 HMGB1 蛋白的表达有统计学差异（$F$=90.350，$P$=0.000），在低浓度（6.25、12.5、25 mg/L）差异无统计学意义（$P$>0.05）（图 2A、C，表 4）。

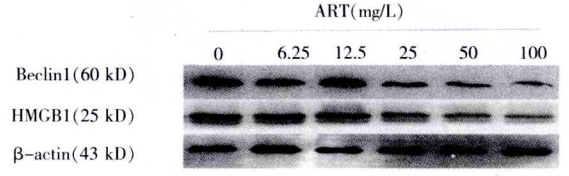
30 mg/L ART 分别处理 K562 细胞 12、24、48、72 h 后，LC3-Ⅱ、p62 的表达随时间延长而上调，相对于对照组明显增高，方差分析各组 LC3-Ⅱ、p62 蛋白的表达水平有统计学差异（$F$=165.290，$P$=0.000）；与对照组相比，方差分析各组HMGB1、Beclin1 蛋白的表达水平，除了 12 h Beclin1 蛋白的表达无统计学差异（$P$>0.05），其余时间点 HMGB1、Beclin1 蛋白的表达水平皆有统计学差异（$F$=148.990，$P$=0.000）（图 2B、D，表 5）。



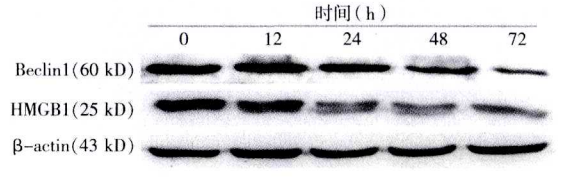

A. 不同浓度 ART 处理 K562 细胞 48 h 后 LC3、p62 的蛋白表达水平




B. 30 mg/L ART 作用不同时间后 LC3、p62 的蛋白表达水平




C. 不同浓度 ART 处理 K562 细胞 48 h 后 Beclin1、HMGB1 的蛋白表达水平




D. 30 mg/L ART 作用不同时间后 Beclin1、HMGB1 的蛋白表达水平

**图 2 Western blot 检测自噬相关蛋白的表达**

Fig.2 Expressions of autophagy-related protein detected by Western blot

**表 4 Western blot 检测各组细胞随 ART 浓度变化时 LC3、p62 和 Beclin1、HMGB1 的蛋白相对表达量（$\bar{x}\pm s$，$n$=3）**

Tab.4 Protein expressions of Beclin1, HMGB1, LC3 and p62 under different concentrations of ART detected by Western blot ($\bar{x}\pm s$, $n$=3)

| ART(mg/L) | LC3 | p62 | Beclin1 | HMGB1 |
|---|---|---|---|---|
| 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 |
| 6.25 | 1.72 ± 0.49[a] | 2.01 ± 0.08[a] | 0.88 ± 0.04 | 0.93 ± .01 |
| 12.5 | 2.10 ± 0.48[a] | 2.14 ± 0.02[a] | 0.87 ± 0.09 | 0.85 ± 0.02 |
| 25.00 | 2.60 ± 0.42[a] | 2.43 ± 0.13[a] | 0.78 ± 0.01[a] | 0.51 ± 0.12 |
| 50.00 | 3.14 ± 0.08[a] | 2.54 ± 0.88[a] | 0.62 ± 0.01[a] | 0.33 ± 0.05[a] |
| 100 | 4.90 ± 0.07[a] | 3.82 ± 0.11[a] | 0.52 ± 0.01[a] | 0.26 ± 0.06[a] |
| $F$ 值 | 1 906.820 | 331.550 | 58.460 | 90.350 |
| $P$ 值 | 0.000 | 0.040 | 0.000 | 0.010 |

注：a，与对照组比较，差异有统计学意义，$P$<0.05

**表 5 Western blot 检测各组细胞在 30 mg/LART 分别作用 0、12、24、48、72 h 时 LC3、p62 和 Beclin1、HMGB1 的蛋白相对表达量（$\bar{x}\pm s$，$n$=3）**

Tab.5 Protein expressions of Beclin1, HMGB1, LC3 and p62 under different time points of ART detected by Western blot ($\bar{x}\pm s$, $n$=3)

| 时间（h） | LC3 | p62 | Beclin1 | HMGB1 |
|---|---|---|---|---|
| 0 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 |
| 12 | 3.35 ± 0.44[a] | 2.68 ± 0.91[a] | 0.95 ± 0.04 | 0.75 ± 0.04[a] |
| 24 | 4.74 ± 0.59[a] | 3.66 ± 0.74[a] | 0.93 ± 0.03[a] | 0.50 ± 0.03[a] |
| 48 | 9.59 ± 0.39[a] | 5.33 ± 0.41[a] | 0.41 ± 0.04[a] | 0.43 ± 0.06[a] |
| 72 | 9.99 ± 0.84[a] | 6.75 ± 1.11[a] | 0.21 ± 0.04[a] | 0.35 ± 0.04[a] |
| $F$ 值 | 165.290 | 27.120 | 385.910 | 148.990 |
| $P$ 值 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

注：a，与对照组比较，差异有统计学意义，$P$<0.05

## 3 讨 论

ART 分子式为 $C_{19}O_8H_{28}$，主要作为一种高效低毒的传统中药治疗疟疾。ART 具有抗肿瘤细胞增殖、诱导凋亡的作用[4-6]，使 ART 成为一种抗肿瘤候选药，其作用机制及途径已成为研究热点。本研究表明，ART 对 K562 细胞增殖有明显抑制作用，而对健康成人外周血有核细胞的抑制较弱，表现出对肿瘤细胞的选择性毒性，且其 48 h $IC_{50}$ 为 30 mg/L，本实验所选取的实验浓度在 ART 的安全范围（0~150 mg/L），与以往报道一致[3,7]。

近年来大量研究发现，肿瘤细胞可利用自噬以应对缺氧、营养匮乏及清除氧自由基、损伤的线粒体等，从而促使肿瘤细胞抵抗化疗、放疗及免疫治疗[8-9]。在肿瘤中，自噬可以通过限制 DNA 损伤介导的凋亡，激活 HMGB1，清除受损的细胞器及氧化聚合的蛋白，受损大分子、破损细胞器降解后营养循环再利用而保护肿瘤细胞[10-12]。因此，目前自噬在肿瘤中被认为是发挥保护肿瘤细胞的作用。根据自噬的形成过程，自噬的抑制分为不同阶段，包括：对溶酶体降解的抑制；对自噬体与溶酶体融合的抑制；对自噬体形成的抑制。CQ 作为经典的自噬抑制剂，在自噬的终末阶段通过改变溶酶体 PH，抑制水解酶的活性，进而阻碍溶酶体降解[13]。为明确自噬在慢性髓系白血病 K562 细胞中的作用，本研究使用 CQ单独或联合 ART 共处理细胞，通过 CCK-8、流式细胞学检测细胞存活率和凋亡率，结果显示，CQ 在K562 细胞中能通过抑制自噬诱导细胞死亡，但效果温和，而 ART 联合 CQ 共处理 K562 细胞可导致显著的细胞死亡。因此，本研究证明自噬在 K562 细胞中发挥促肿瘤细胞存活作用，与文献[14]报道一致。

自噬作为一种选择性的非 caspase 依赖的程序性细胞死亡，在肿瘤发生、发展中有重要意义。细胞自

噬是多基因共同参与的过程，如 LC3、p62、Beclin1、HMGB1 等[15-17]。其中，LC3 有Ⅰ型和Ⅱ型之分。未发生自噬时，细胞内合成的 LC3 经过加工，成为可溶性的 LC3-Ⅰ。当自噬激活时，LC3-Ⅰ经泛素样加工修饰，与磷脂酰乙醇胺(PE)结合形成 LC3-Ⅱ。LC3-Ⅱ是自噬标志性蛋白，与自噬体的数目呈正相关。p62 作为一种多功能的折叠蛋白，通过其表面的 LC3 结构域与自噬体表面的 LC3 结合，进而在自噬溶酶体中被降解，引起 p62 下调。Beclin1 是自噬体形成过程中的一个必需分子，介导其他自噬蛋白定位于吞噬泡，调控自噬体的形成与成熟。而 HMGBl 除了作为染色质绑定的核蛋白外，HMGBl 可与 Beclinl 直接作用最终诱导自噬的发生。本研究中，LC3-Ⅱ蛋白的表达与 ART 作用于 K562 细胞的作用时间和剂量呈依赖性显著上调，提示自噬体的数目增多。自噬体的增多有 2 种可能：一是自噬体的形成增多，二是自噬体成熟受抑即自噬体不能和溶酶体结合或融合后内容物发生无效降解而导致自噬体在细胞内的累积[16]。为明确本研究中自噬体数目增多的原因，用 Western blot 检测了 p62 蛋白的表达情况，结果显示 p62 呈时间剂量依赖性方式显著上调。以上研究中 LC3、p62 的显著上调说明了自噬体的的数目增多与自噬溶酶体的融合、降解减少有关，表明 ART 有可能通过阻滞自噬体与溶酶体融合或降解，进而导致自噬体的累积，最终抑制 K562 细胞自噬，以时间剂量依赖性方式。同时，结合抑制自噬后 CCK8、流式细胞学明显细胞死亡明显增多的实验结果，本研究说明：ART 所诱导的 K562 细胞死亡可能与 ART 介导的自噬抑制有关，抑制自噬，肿瘤细胞对缺血、缺氧、营养物质缺乏等恶劣肿瘤微环境的应激适应能力减弱，从而扩大肿瘤细胞的损伤，导致 K562 细胞死亡增加，与 Button 的研究中 ART 通过抑制神经鞘瘤细胞株 RT4 自噬促进肿瘤细胞死亡的研究结果一致[18]。

自噬过程分为 3 个阶段：启动阶段、延长阶段、成熟阶段。因此，可以从 3 个层面调控自噬：调控自噬的上游信号，干预自噬体的形成过程，影响自噬体与溶酶体的成熟融合过程[19]。本研究结果显示，ART 可引起与自噬体形成有关的 Beclin1、HMGB1 在基因、蛋白水平表达下调，提示 ART 不仅能通过抑制自噬体的融合降解抑制自噬，还可通过阻滞自噬体的形成抑制自噬，且其阻滞自噬体降解的作用显著强于对自噬体形成的抑制作用，最终通过抑制 K562 自噬促进细胞凋亡。

综上所述，本研究表明 ART 在 K562 细胞中可通过抑制自噬促进 K562 细胞凋亡。因此将 ART 与其他通过诱导凋亡治疗白血病的一线化疗药物联用可能会有增强化疗药治疗效果的作用。本研究对青蒿琥酯在白血病治疗方面的开发及应用提供了依据。

## 参 考 文 献


[1] 李梦琪，刘卓刚. 自噬对慢性髓系白血病的双重作用[J]. 中国实验血液学杂志，2015，23(2)：583-586.

[2] Efferth T，Giaisi M，Merling A，et al. Artesunate induces ROS-mediated apoptosis in doxorubicin-resistant T leukemia cells[J]. PLoS One，2007，2(8)：e693.

[3] 田雪莲，王莎莉. 青蒿琥酯诱导人白血病细胞 K562 胀亡和凋亡作用的研究[J]. 重庆医科大学学报，2008，33(7)：796-798，846.

[4] Singh NP，Lai H. Selective toxicity of dihydroartemisinin and holotransferrin toward human breast cancer cells[J]. Life Sci，2001，70(1)：49-56.

[5] Efferth T，Volm M. Glutathione-related enzymes contribute to resistance of tumor cells and low toxicity in normal organs to artesunate [J]. In Vivo，2005，19(1)：225-232.

[6] Lai H，Singh NP. Selective cancer cell cytotoxicity from exposure to dihydroartemisinin and holotransferrin[J]. Cancer letters，1995，91(1)：41-46.

[7] 郭兴伯，符林春，简华香，等. 健康人静脉注射青蒿琥酯的耐受性和毒副反应研究——Ⅰ期临床试验[J]. 中药新药与临床药理，1991，2(2)：29-31.

[8] Sehgal AR，Konig H，Johnson DE，et al. You eat what you are：autophagy inhibition as a therapeutic strategy in leukemia[J]. Leukemia，2015，29(3)：517-525.

[9] Degenhardt K，Mathew R，Beaudoin B，et al. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis，inflammation，and tumorigenesis[J]. Cancer Cell，2006，10(1)：51-64.

[10] Green DR，Levine B. To be or not to be?How selective autophagy and cell death govern cell fate[J]. Cell，2014，157(1)：65-75.

[11] Morselli E，Shen S，Ruckenstuhl C，et al. p53 inhibits autophagy by interacting with the human ortholog of yeast Atg17，RB1CC1/FIP200 [J]. Cell Cycle，2011，10(16)：2763-2769.

[12] Livesey KM，Kang R，Vernon P，et al. p53/HMGB1 complexes regulate autophagy and apoptosis[J]. Cancer Res，2012，72(8)：1996-2005.

[13] 喻琴琴，杨 俊，李馨欣. 自噬及其抑制剂的研究进展[J].实用医学杂志，2013，29(17)：2908-2910.

[14] Altman BJ，Jacobs SR，Mason EF，et al. Autophagy is essential to suppress cell stress and to allow BCR-Abl-mediated leukemogenesis [J]. Oncogene，2011，30(16)：1855-1867.

[15] Meijer AJ，Codogno P. Signalling and autophagy regulation in health，aging and disease[J]. Mol Aspects Med，2006，27(5-6)：411-425.

[16] Klionsky DJ，Abdelmohsen K，Abe A，et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy[J]. Autophagy，2016，12(1)：1-222.

[17] Yang L，Yu Y，Kang R，et al. Up-regulated autophagy by endogenous high mobility group box-1 promotes chemoresistance in leukemia cells[J]. Leuk Lymphoma，2012，53(2)：315-322.

[18] Button RW，Lin F，Ercolano E，et al. Artesunate induces necrotic cell death in schwannoma cells[J]. Cell Death Dis，2014，5：e1466.


（责任编辑：冉明会）