DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.14.019

论著

文章编号:1000-5404(2003)14-1266-03

基因芯片方法研究苦参碱抗白血病细胞增殖机制

张永清[1],黄高升[2],王 哲[2],冯骥良[2],郭 英[2] (第四军医大学:[1]西京医院血液内科,[2]基础医学部病理学教研室,西安 710032)

提 要:目的 探索苦参碱抗白血病细胞增殖的机制。方法 提取苦参碱诱导前后白血病细胞株K562总RNA,经逆转录合成cDNA探针后与人的细胞周期相关基因芯片杂交,用ESTblot软件分析杂交结果。结果 经苦参碱诱导后K562细胞111个周期相关基因中,有CCNB1,cyclin D1,PCNA,TFDP1等15个基因表达显著下调,CDKN2D,E2F5等5个基因表达上调,Western blotting方法证实了PCNA基因表达改变。结论 苦参碱的抗白血病细胞增殖作用与PCNA,P19-INK4D等多个细胞周期相关基因表达变化有关。

关键词:白血病;苦参碱;细胞增殖;基因芯片
中图法分类号:R285.5;R312;R733.7 文献标识码:A

Study of the mechanism of anti-leukemia proliferation of matrine with cDNA array

ZHANG Yong-qing, HUANG Gao-shen, WANG Zhe, FENG Ji-liang, GUO Ying (Department of Hematology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract: Objective To study the mechanism of anti-leukemia proliferation of matrine. Methods Total RNA from leukemia cell strain K562 was isolated before and after matrine induction. CDNA probe was labeled with α-32P-dATP by RT-PCR, and then used as probe to hybridize with cell cycle related cDNA expression array. Autoradiogram images were analyzed with ESTblot software. Results After matrine induction, expressions of 15 out of 111 cell cycle related genes including CCNB1, cyclin D1, PCNA, TFDP1 were down-regulated notably. Meanwhile, expressions of 5 out of 111 genes including CDKN2D, E2F5 were up-regulated markedly. Changes of gene expression of PCNA were confirmed by Western blot analysis. Conclusion The mechanism of anti-leukemia proliferation of matrine is related to the expression changes of cell cycle related genes such as PCNA, P19-INK4D and *etc*.

Key words: leukemia; matrine; cell proliferation; gene chip

抑制白血病细胞增殖是治疗白血病的主要手段之一。化疗药物因其显而易见的毒副作用,患者难以长期坚持。苦参碱是苦参型生物碱的一种,因为其低毒,且有较强的抗炎症、抗肿瘤的药效作用而成为目前研究的热点[1]。研究显示,小剂量苦参碱具有显著的抗白血病细胞增殖作用[2,3],显示了苦参碱抗白血病的药学价值,但其抗白血病作用的机制仍不清楚。我们用基因芯片技术研究了苦参碱诱导前后白血病细胞周期相关基因的变化,以揭示苦参碱抗白血病的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

K562细胞购自本校免疫学教研室;Atlas Human Cell Cycle Array (clontech #:7748-1)由美国加州希望城国家医学中心放射生物学实验室主任Dr. Li JJ惠赠;Atlas Pure Total RNA Labeling System (K1038-1), ExpressHyb Hybridization Solution (#:8015-1)及NucleoSpin Nucleic Acid Purification Kits均购自Clontech公司;α-^{32}PdATP(放射比活性3.7×10^{11} Bq/L)购自北京亚辉公司;苦参碱(Matrine $C_{15}H_{24}ON_2$ 纯度>99%)购自西安天奇植物化学有限公司;Western bloting试剂盒购自德国Boehringer Mannheim公司。

1.2 方法

1.2.1 苦参碱诱导K562细胞 K562细胞培养于含10%胎牛血清(FCS)的RPMI1640培养基中,置于37 ℃、饱和湿度、5% CO_2孵箱内培养,将生长状态良好细胞经计数后分为实验组及对照组(起始细胞数为1×10^5个/瓶),实验组用0.2 g/L苦参碱溶液处理,对照组细胞不做任何处理。

1.2.2 真核细胞总RNA提取及*DNase*Ⅰ消化 分别收集经苦参碱作用7 d的实验组细胞及未做任何处理的对照组细胞(各1×10^7个),参照Atlas Pure Total RNA Labeling System说明书(User Manual PT3231-1)提取K562细胞总RNA。用无*RNase*的*DNase*Ⅰ消化总RNA中的基因组DNA(37 ℃,30 min),纯化后的总RNA经紫外分光光度仪定量后冻存于-80 ℃备用。

1.2.3 RNA的甲醛变性凝胶电泳 灌制1 g/L甲醛变性凝

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30171186);第四军医大学创新工程资助项目(CX01A004)
作者简介:张永清(1965-),男,湖北省洪湖市人,博士,讲师,主要从事淋巴造血组织肿瘤方面的研究。电话:(029)3375203
收稿日期:2002-12-09;修回日期:2003-04-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

胶, 分别取实验组及对照组总 RNA 样品 2 μg, 经甲醛变性处理后加入凝胶上样孔, 5 V/cm 电泳, 至溴酚蓝迁移接近凝胶底部后, 取出凝胶, 用溴化乙锭染色至条带清晰, 观察 RNA 完整性。

1.2.4　PCR 法检测 RNA 样品纯度　　分别取实验组及对照组样品各 3 μg 为模板, 以 0.3 ng K562 细胞基因组 DNA 样品为阳性对照。以K562 细胞基因组 5′ 调控区 intron 1 的一对引物(上游引物: 5′-ggctccaagttttctatgtg-3′; 下游引物: 5′-cgaaggcagggagtctaaaagac-3′)进行 PCR。按以下程序扩增: 94 ℃变性 5 min, 单循环 94 ℃变性 30 s, 55 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 40 s 循环 30 次, 最后 72 ℃延伸 7 min。

1.2.5　PolyA RNA 富集、cDNA 探针合成、标记及纯化　　按 Atlas Pure Total RNA Labeling System 说明书分别富集两组各45 μg 总RNA 中的 Poly A RNA, 以 PolyA RNA 为模板, 以 CDS Primer Mix 为引物, dNTP Mix (for dATP label)为原料, 用 α-^{32}PdATP 参入标记逆转录合成 cDNA 探针。用 NucleoSpin Nucleic Acid Purification Kits 按说明纯化 α-^{32}P 标记的 cDNA 探针(以去除未标记的 α-^{32}P 和标记的小分子核苷酸)。

1.2.6　空白尼龙膜杂交法检测 cDNA 探针的纯度　　取实验组、对照组已标记 cDNA 探针样品(各自总量的 1/5)分别与空白尼龙膜杂交(方法见以下 cDNA 探针与 cDNA 表达点阵杂交), 以进一步检测 cDNA 探针中杂质污染情况。

1.2.7　实验组及对照组 cDNA 探针分别与两张细胞周期 cDNA 表达点阵尼龙膜杂交　　将预热至 68 ℃的快速杂交液(ExpressHyb Hybridization Solution)5 ml 加入装有 cDNA 表达点阵尼龙膜(以下简称膜)的杂交筒内, 将杂交筒固定于杂交炉内, 68 ℃, 转速为 5 r/min, 预杂交 30 min。两组 cDNA 探针分别加入 5 μl Cot-1 DNA (1 g/L), 置电炉上煮沸变性 2 min 后, 快速放置冰水上。弃预杂交液, 各杂交筒内加入 5 ml 预热至 68 ℃的快速杂交液, 将变性后探针加入杂交筒内, 快速与杂交液混匀, 同预杂交条件杂交 6 h。分别用溶液Ⅰ(2× SSC, 1% SDS), 溶液Ⅱ(0.1× SSC, 0.5% SDS), 溶液Ⅲ(2× SSC, 0.1% SDS)洗膜 3 次。用无齿平镊将膜挟起, 待膜上多余液体滴净后, 包入保鲜膜, 固定于暗盒内, 于 -70 ℃放射性自显影。

1.2.8　细胞周期 cDNA 表达点阵杂交结果分析　　用扫描仪将 X 线片经放射自显影记录结果输入计算机, 用 Estblot cDNA 表达点阵专用分析软件分析两张膜 111 个细胞周期基因相应点曝光恢度值。分别以与实验组和对照组 cDNA 探针杂交的两张膜上相对应的管家基因(House keeping gene)的恢度值为内对照, 两组经校正后恢度值的比值大于 2 者为表达上调, 小于 0.6 者为表达下调。

1.2.9　Western blotting 验证 PCNA 表达变化结果　　诱导细胞第 7 日, 实验组与对照组各取细胞 10^7 个, 分别提取每组细胞总蛋白, 各取样品 10 μg, 采用 Western blotting 试剂盒检测苦参碱诱导前后 PCNA 表达情况。

2　结果

2.1　总 RNA 的纯度

实验组及对照组总 RNA 经紫外分光光度仪测得 A_{260} 与 A_{280} 比值分别为 1.92, 1.96, 说明总 RNA 纯度已达到实验要求标准。

2.2　RNA 的甲醛变性凝胶电泳

样品经甲醛凝胶电泳分离, 溴化乙锭染色后, 28S, 18S RNA 带于紫外光下清晰可见, 且前者亮度为后者亮度的 2 倍, 证明所提 RNA 保存完整。

2.3　PCR 法检测样品纯度

分别取实验组和对照组总 RNA 3 μg 为膜板进行 PCR 未能扩增出基因组 DNA 特异条带, 而 0.3 ng 基因组 DNA 扩增出特异条带, 进一步提示所提总 RNA 中基因组 DNA 污染量很少(少于 0.01%)。

2.4　探针与空白尼龙膜杂交结果

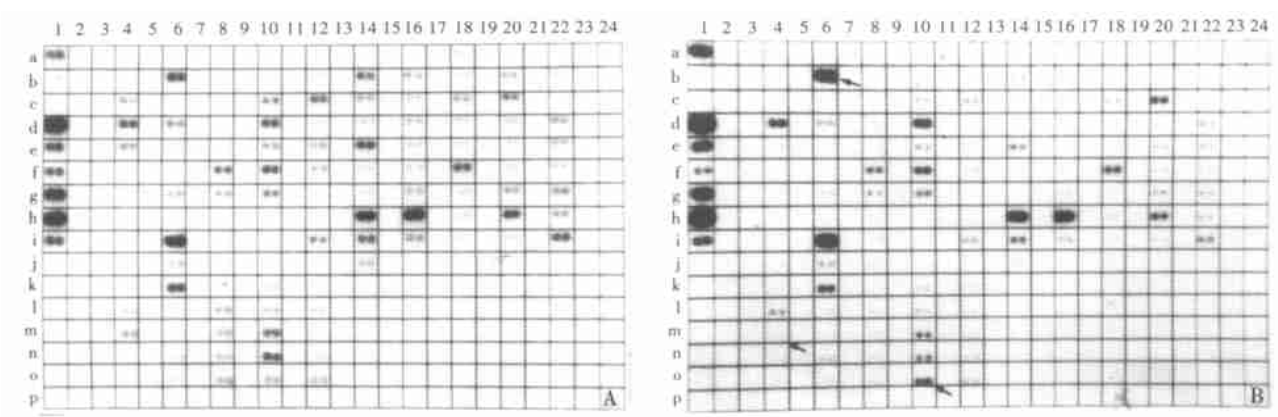
两组 cDNA 探针与空白尼龙膜杂交均未见明显非特异性背景出现, 说明合成的 cDNA 探针中所含杂质极少。

2.5　实验组及对照组细胞周期相关基因表达差异

苦参碱作用 K562 细胞 7 d 后, 111 个细胞周期相关基因中, 共有 PCNA, CCNB1, cyclin D1, TFDP1, TFDP2 等 15 个基因表达明显下调, CDKN2D(Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor 2D), CDC42, E2F5 等 5 个基因表达显著上调, 其中 CDKN2D 基因表达上调幅度达 30 余倍之多, 见图 1。

2.6　Western blotting 验证苦参碱诱导前后 PCNA 表达变化结果

Western blotting 检测显示, 对照组 PCNA 呈阳性; 0.2 g/L 浓度苦参碱诱导K562 细胞 7 d 后, PCNA 检测结果阴性。



←: Changed expression

图 1　苦参碱诱导前(A)后(B)K562 细胞周期相关基因表达点阵杂交结果

Fig 1　Hybridization result of cell cycle related gene expression array of K562 cells before(A) and after(B) matrine induction

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

3 讨论

20世纪80年代即发现传统中药苦参碱对大小鼠肿瘤细胞生长具有明显抑制作用[4]。最近，几家实验室均报道苦参碱能抑制人白血病细胞K562的增殖，同时可诱导其分化，促进其凋亡[2,3]。目前，关于中药抑制肿瘤细胞增殖、影响肿瘤细胞周期进展机制的研究很少，作者曾用细胞凋亡基因芯片方法研究苦参碱诱导前后的K562细胞，发现BCL-2、Caspas10等多个促凋亡基因表达上调[5]，而用细胞周期cDNA点阵来研究苦参碱的抗癌机制，国内外尚属首次。

本研究结果显示，苦参碱可以下调促进细胞增殖、阻碍细胞分化及凋亡的相关基因表达，如CCNB1、cyclin D1、TFDP1、PCNA等。CCNB1及cyclin D1均属于细胞周期素(Cyclins)家簇，这些分子可通过与特定的细胞周期素依赖性蛋白激酶(Cyclin-dependent kinases，CDKs)分子结合形成复合物来调控细胞周期[6]。PCNA则可分别与CDK4/cyclin D1复合物及CDK2/cyclin E复合物结合，通过磷酸化调节细胞周期的一套底物，如pRb，P_{107}，P_{130}等，促进细胞增殖。PCNA同时还是DNA聚合酶的附属蛋白，其表达与细胞增殖密切相关，其表达上调是细胞进入S期的主要标志[7]；一个细胞增殖周期能否顺利进行，主要取决于该细胞能否顺利通过若干个关卡(Check-Points)，其中最重要的关卡有两个，即G_1/S转换和G_2/M转换，前者称启动点(Start point)，后者称限制点(Restriction point)。CCNB1是调节细胞顺利通过G_2/M关卡的特异分子[6]，若CCNB1表达下调有可能使K562细胞周期受阻于G_2/M期。PCNA是DNA聚合酶辅因子，其表达与细胞增殖密切相关，是细胞进入S期标志之一。基因芯片检测发现苦参碱可诱导K562细胞PCNA表达显著下调，这一结果用Western blotting方法在蛋白质水平得到了进一步证实，在苦参碱诱导的肝癌细胞系中也得到了同样的结果[8]。提示，苦参碱抑制不同种类细胞增殖可能与诱导PCNA表达下调这一共有途径有关，这一机制在苦参碱抑制K562细胞增殖过程中发挥了较为重要的作用。B细胞淋巴瘤-6(BCL-6)高特异地表达于大B细胞淋巴瘤及滤泡性淋巴瘤的肿瘤细胞中[9,10]，苦参碱可诱导原本不表达BCL-6的K562细胞高表达具有转录抑制活性的BCL-6表达，此时PCNA表达下调[3]，说明PCNA可能是BCL-6的下游分子。CDKN2D属细胞周期素依赖性蛋白激酶抑制剂(Cyclins dependent kinases inhibitors，CKIs)家族分子，主要功能是抑制CDKs分子活性，促使细胞退出增殖周期。肿瘤细胞从增殖周期中退出后主要走向以下两条途径：一条是向下分化，另一条是凋亡[9]，所以苦参碱的抗白血病作用的主要机制可能与干预白血病细胞周期的cyclins-CDKs-CKIs网络调控系统基因表达有关。

参考文献：

[1] Ku Y R, Chang L Y, Lin J H, *et al*. Determination of matrine and oxymatrine in Sophora subprostata by CE[J]. J Pharm Biomed Anal, 2002, 28(5): 1005-1010.

[2] Zhang L P, Jiang J K, Tam J W. Effects of Matrine on proliferation and differentiation in K-562 cells[J]. Leuk Res, 2001, 25(9): 793-800.

[3] 张永清，黄高升，郭 英，等. 苦参碱诱导K562细胞凋亡相关基因bcl-6表达上调[J]. 第四军医大学学报，2001，22(3)：封2.

[4] Tao S C, Wang J Z. Pharmacological function of matrine[J]. ACTA Pharmacological Sinica, 1992, 27(3): 201-204.

[5] 张永清，黄高升，冯骥良，等. cDNA表达点阵研究苦参碱诱导K562细胞凋亡基因表达改变[J]. 第四军医大学学报，2002，23(9)：封2.

[6] 张晓辉，黄高升，王文亮. 细胞周期网络调节系统Cyclins-CDKs-CKIs与肿瘤发生的关系[J]. 国外医学肿瘤学分册，1997，24(2)：77-80.

[7] Pich A, Ponti R, Valente G. MIB-1, Ki67, and PCNA scores and DNA flow cytometry in intermediate grade malignant lymphomas[J]. J Clin Pathol, 1994, 47(1): 18-22.

[8] 司维柯，张广运，马立强. 苦参碱对HepG2细胞系增殖力的影响[J]. 第三军医大学学报，2000，22(5)：451-458.

[9] 张永清，黄高升，王 哲，等. BCL-6在反应增生淋巴组织及不同类型淋巴瘤中表达[J]. 第四军医大学学报，2002，23(8)：685-688.

[10] Pileri S A, Gaidano G, Zinzani P L, *et al*. Primary mediastinal B-Cell lymphoma: high frequency of BCL-6 mutations and consistent expression of the transcription factors OCT-2, BOB.1, and PU.1 in the absence of immunoglobulins[J]. Am J Pathol, 2003, 162(1): 243-253.

(编辑 张大春)

(上接1265页)

位有关。大脑的PNETs大多在幕上中线部位，大脑半球深部；小脑的PNETs多见于儿童，青年人也可见，老年人罕见。本病病理上见密集小细胞，胞质少，胞核深染，核分裂像多，可有或无菊形团结构[2]。徐庆中[2]认为，中枢神经系统神经上皮性胚胎性肿瘤中一组肿瘤是原始神经外胚叶肿瘤，其中发生于儿童小脑半球的髓母细胞瘤，其实质上是一种发生于小脑的原始神经外胚叶肿瘤。PNETs临床上呈高度恶性，平均存活期1.5年[3]。本例原始神经外胚瘤发生于70岁老年病人，幕上幕下多发病灶，影像学提示生长在大脑和小脑半球表浅部位，经手术及病理证实，文献检索未见报道。

关键词：神经外胚瘤；手术治疗
中图法分类号：R730.264 文献标识码：B

参考文献：

[1] Kleihues P, Burger P C, Scheithauer B W. Histological typing of tumors of the central nervous system[M]. 2nd ed. Berlin: Springer Verlag, 1993. 27-30.

[2] 徐庆中. 原始神经外胚叶肿瘤[J]. 中华病理学杂志，1999. 28(3). 227-228.

[3] 史玉泉，陈意生. 现代外科病理学[M]. 北京：人民军医出版社，1998. 838.

(编辑 张 宁)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net