

补骨脂素加长波紫外线光化学疗法诱导 HL-60、K562 细胞凋亡及对 Fas、FasL 表达的影响

陈楠楠, 向阳, 张 励, 张德杰, 黄世林

(中国人民解放军第210医院 中医血液科, 辽宁 大连 116021)

摘要:目的 探讨补骨脂素(PSO)加长波紫外线(PUVA)光化学疗法(UVA)诱导人白血病细胞 HL-60、K562 凋亡及对 Fas、FasL 表达的影响。方法 以 HL-60、K562 细胞为研究对象,以细胞凋亡率、电镜下细胞超微结构改变以及细胞 Fas、FasL 在基因、蛋白水平的表达为检测指标,观察 PSO 加波长为 360 nm 的 UVA 对人白血病细胞诱导凋亡的作用以及部分作用途径,并采用多因素方差分析法进行统计学处理。结果 PSO、UVA 照射及 PUVA 均可诱导 HL-60、K562 细胞发生凋亡,PUVA 的作用显著强于前两者。电镜下观察经 PUVA 处理后的 HL-60、K562 细胞超微结构,可见明显的凋亡形态学改变。PSO、UVA 照射及 PUVA 均可上调 HL-60、K562 细胞 Fas 在基因、蛋白水平的表达,下调 FasL 在基因、蛋白水平的表达,PUVA 的作用显著强于前两者。结论 PUVA 可诱导白血病细胞 HL-60、K562 发生凋亡,作用强于 PSO 及 UVA 照射,PUVA 诱导 HL-60、K562 细胞凋亡的途径之一为上调细胞 Fas 基因表达水平,下调 FasL 基因表达水平。

关键词:补骨脂素;长波紫外线;HL-60 细胞;K562 细胞;凋亡;Fas;FasL

中图分类号:R286.91

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)10-1521-04

Effects of PUVA on apoptosis and expression of Fas and FasL in HL-60 and K562 cells

CHEN Nan-nan, XIANG Yang, ZHANG Li, ZHANG De-jie, HUANG Shi-lin

(Department of Traditional Chinese Medicine and Hematology, 210th Hospital of PLA, Dalian 116021, China)

Abstract: **Objective** To explore the effects of psoralen (PSO) and long wave ultraviolet A (UVA) [PSO+UVA (PUVA)] on apoptosis and expression of Fas and FasL in HL-60 and K562 leukemia cells.

Methods The HL-60 and K562 cells were taken as the study objects and their apoptosis ratios, ultrastructure changes, and the expression of Fas and FasL were detected in order to observe the effects of PSO extracted from Chinese medicine and UVA of wave length 360 nm on human leukemia cells. The factorial design and analysis of variance were used to analyze the interaction among the factors. **Results** PSO, UVA, and PUVA all induced the apoptosis and the effects of PUVA were stronger than those by the other two. After HL-60 and K562 cells had been treated with PUVA, they all showed obvious ultrastructure change about apoptosis observed under the electron microscope. PSO, UVA, and PUVA all increased the expression of Fas gene and protein and decreased the expression of FasL gene and protein, the effects of PUVA were stronger than those by the other two. **Conclusion** PUVA could induce the apoptosis of HL-60 and K562 cells and the effects are the strongest. One of the pathway of PUVA to induce apoptosis is to upregulate the expression of Fas gene and downregulate that of FasL gene.

Key words: psoralen (PSO); long wave ultraviolet A; HL-60 cells; K562 cells; apoptosis; Fas; FasL

补骨脂素(psoralen, PSO)是补益类中药补骨脂 *Psoralea corylifolia* L. 种子中的主要成分之一,属呋喃香豆素类物质。PSO 本身具有一定的抗肿瘤活性^[1],且 PSO 具有光敏性,经长波紫外线(ultraviolet A, UVA)照射后,在化学及生物过程中发生光致敏性,使原来与 DNA 间微弱的结合转变成与 DNA 双螺旋的链间共价键交联,阻碍 DNA

聚合酶沿 DNA 链的连续性移动,使 DNA 聚合酶模板活性丧失,从而抑制了 DNA 的合成^[2]。此外,PSO 可对 RNA 的合成、细胞酶的活性以及糖、脂肪代谢产物产生影响。本实验由补骨脂中提取出 PSO 以不同质量浓度 PSO 加波长为 360 nm,不同照射时间的 UVA 光照作用于 HL-60、K562 细胞,通过流式细胞仪检测 HL-60、K562 细胞在补骨脂素加

收稿日期:2008-01-18

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30472257)

作者简介:陈楠楠(1976-),女,吉林省长春市人,主治医师,医学博士,研究方向为中西医结合血液病临床与基础研究。

Tel: 13387856109 E-mail: chnngax@163.com

长波紫外线光化学疗法(PUVA)后的凋亡情况;电镜下观察细胞超微结构改变;荧光定量PCR及流式细胞技术检测Fas、FasL在基因、蛋白水平的表达情况,以探讨PUVA法对HL-60、K562细胞诱导凋亡作用及部分作用途径。

1 材料与方法

1.1 细胞株:人急性非淋巴细胞白血病-M2型HL-60细胞、人红白血病K562细胞由大连医科大学惠赠。

1.2 药品及主要试剂:PSO(质量分数98.5%,质量浓度10 mg/2 mL)由大连理工大学及本院共同由补骨脂中提取和制备。RPMI-1640培养液为Gibco产品。小牛血清系杭州四季青生物材料公司产品。Trizol为美国Gibco BRL公司产品。Fas、FasL基因表达试剂盒购自中山大学达安基因股份有限公司。鼠抗人Fas(CD95)、FasL(CD95L)单克隆抗体为美国CALTAG实验室产品。

1.3 仪器和设备:流式细胞仪购自美国贝克曼库尔特公司,GLY-10型光量子血液平衡治疗仪由徐州华卫医疗设备公司研制,DA7600型荧光定量PCR仪购自中山大学达安基因股份有限公司。

1.4 细胞培养:HL-60、K562细胞常规培养于含10%小牛血清的RPMI-1640培养基(含硫酸庆大霉素0.025 U/mL)中,于37℃、5%CO₂饱和湿度培养箱中进行连续培养。

1.5 流式细胞术测定PUVA 24 h后HL-60、K562细胞的凋亡情况:取浓度为 4.0×10^5 /mL,处于对数生长期的HL-60、K562细胞5 mL,分别加入PSO 0.5、10、20、40 μ L,使其在反应体系中的终质量浓度分别为0、10、20、40、80 μ g/mL,放入石英比色皿中,在GLY-10型光量子血液平衡治疗仪($\lambda=360$ nm)上以1 J/m²辐射量边照射边震荡,照射时间分别为0.5 min。处理后各实验组细胞继续培养24 h后,收集 5.0×10^5 细胞,用PBS洗两次,弃上清,加入100 μ L碘化丙啶(PI)染液,避光反应30 min,加入PBS 400 μ L,上机检测,并用Multicycle软件分析得出相应的细胞凋亡百分率。

1.6 透射电镜观察细胞超微结构:收集浓度为 5.0×10^5 /mL,经PUVA(PSO 80 μ g/mL, UVA 5 min)处理24 h的HL-60、K562细胞10 mL,用PBS清洗两次,转入2.0 mL离心管,2 000 r/min离心3 min,弃上清,缓缓加入2.5%戊二醛2 mL,4℃冰箱静置2 h以上。磷酸缓冲液冲洗,锇酸固定,水洗、脱水,浸透、包埋,制定超薄切片,透射电镜观察。

1.7 荧光定量PCR技术检测PUVA 4 h后HL-60、K562细胞Fas、FasL基因表达情况:(1)总RNA提取,采用Trizol一步法提取mRNA,按照试剂盒说明书操作。(2)cDNA合成,反应体系包括:5 $\times$ 逆转录buffer 4 μ L(含Mg²⁺ 4 mmol/L),逆转录酶(200 U/ μ L) 1 μ L, dNTPs(10 mmol/L) 0.5 μ L,上游引物0.4 μ L,下游引物0.4 μ L, DEPC水9.7 μ L, RNA模板4 μ L,总体积20 μ L;反应条件:37℃、1 h, 95℃、3 min。(3)将cDNA进行PCR扩增,反应体系包括:5 $\times$ 定量PCR buffer 10 μ L(含Mg²⁺ 2 mmol/L), Taq酶(3 U/ μ L) 1 μ L, Fas或FasL上游引物1.0 μ L,下游引物1.0 μ L,各自的荧光探针1.0 μ L(注:上、下游引物,探针的终浓度均为10 pmol/L), dNTP 1 μ L, ddH₂O 30 μ L, cDNA模板5 μ L,总体积50 μ L;同时将制备的定量模板按照 2×10^8 、 2×10^7 、 2×10^6 、 2×10^5 、 2×10^4 梯度稀释,加入不同反应管中,在DA7600型荧光PCR仪进行扩增;反应条件:93℃、2 min, 93℃、1 min, 55℃、1 min,共40个循环。(4)反应结束后由计算机自动计算定量结果,再通过换算得出每微克总RNA中Fas、FasL的mRNA拷贝数。上、下游引物及探针序列如下, H-FAS, 上游引物:5'-GGG-CATCTGGACCCTCCTA-3';下游引物:5'-GGC-ATTAACACTTTTGGACGATAA-3';探针:5'-FAM-CTCTGGTTCTTACGTCGTTTGCTAGT-AMRA-3'。H-FASL, 上游引物:5'-CAGTCCA-CCCCCTGAAAAA-3';下游引物:5'-CTTGA-GTTGGACTTGCCTGTAA-3';探针:5'-FAM-AGGAGCTGAGGAAAGTGGCCCATAMRA-3'。

1.8 流式细胞术测定PUVA 24 h后HL-60、K562细胞Fas、FasL蛋白表达情况:收集HL-60、K562细胞 1×10^6 个, PBS洗涤1次后弃上清液,加入FITC-Fas抗体10 μ L,避光孵育20 min,加500 μ L PBS上机检测Fas蛋白表达,以FITC-IgG1做对照;收集细胞加入Intraprep Reagent 1 100 μ L,轻轻混匀后室温(18~25℃)孵育15 min,加入4 mL PBS, 300 $\times g$ 室温下离心5 min,加入100 μ L Intraprep Reagent 2 100 μ L,轻轻混匀后室温孵育5 min,加入PE标记的Fas-L,避光孵育15 min,加入4 mL PBS, 300 $\times g$ 室温下离心5 min,弃上清液,重悬细胞于500 μ L PBS中,上机检测FasL蛋白表达,以PE-IgG1R做对照。

1.9 统计学处理:所有实验结果均来自至少3组平行或3次重复实验。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用多

因素方差分析,均用 SPSS 11.5 统计软件进行。

2 结果

2.1 PUVA 诱导 HL-60、K562 细胞凋亡的作用:应用流式细胞仪检测 PUVA 24 h 后 HL-60、K562 细胞的凋亡率,结果显示,PSO、UVA 照射及 PUVA 均可使白血病细胞凋亡率升高,与对照组(0 min, 0 μg/mL)相比,有统计学意义(P<0.01);且 PUVA 的作用要显著强于 PSO 及 UVA(P<0.01),结果见表 1。

2.2 透射电镜下观察 PUVA 后细胞超微结构的改变:透射电镜下 HL-60、K562 细胞出现细胞体积缩小,胞浆浓缩,胞核体积减小,可裂解成一个或数个致密体,可见核小体碎裂,核染色质聚集或边集,部分染色质致密成斑块状或沿核膜收缩成新月体状,整个细胞可裂解成大小不一凋亡小体,见图 1 (HL-60、K562 对照细胞为×4 000 结果,PUVA 处理细胞为×1 500~2 500 结果)。

2.3 荧光定量 PCR 技术检测 PUVA 4 h 后 HL-60、K562 细胞 Fas、FasL 基因表达情况:结果见表 2 和 3。PSO、UVA、PUVA 均可上调 Fas 基因的表达,下调 FasL 基因表达,且 PUVA 作用更显著。

表 1 PUVA 作用 24 h 后 HL-60、K562 细胞的凋亡率 ($\bar{x}\pm s$, n=3)

Table 1 Apoptosis rate of HL-60 and K562 cells treated with PUVA for 24 h ($\bar{x}\pm s$, n=3)

p/(μg·mL ⁻¹)	HL-60 细胞凋亡率/%		K562 细胞凋亡率/%	
	0 min	5 min	0 min	5 min
0	10.60±0.31	28.53±0.05**△△	1.18±0.24	6.51±0.20**△△
10	18.90±0.06**	29.17±0.38**△△	1.41±0.11**	7.99±0.34**△△
20	25.64±0.23**	32.56±0.04**△△	1.47±0.05**	9.23±0.39**△△
40	26.19±1.21**	33.39±0.11**△△	1.52±0.12**	11.94±0.50**△△
80	26.94±0.26**	37.72±0.09**△△	2.73±0.04**	17.84±0.57**△△

与相应的对照组(0 min, 0 μg/mL)比较:**P<0.01
与相应的 0 min 组比较:△△P<0.01 (下表同)
**P<0.01 vs corresponding control group (0 min, 0 μg/mL);
△△P<0.01 vs corresponding omin group, following tables are same

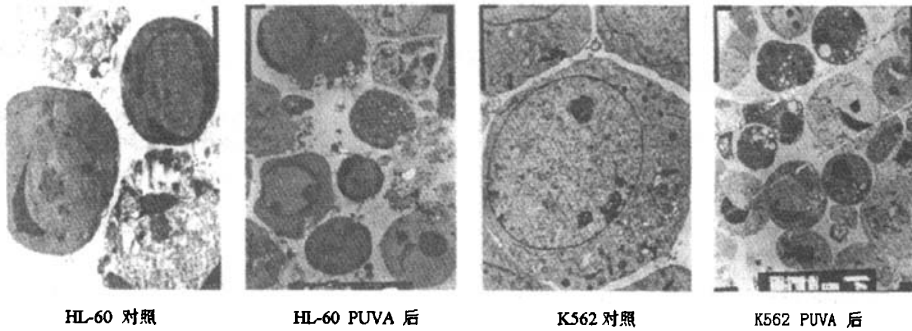


图 1 PUVA 后 HL-60 和 K562 细胞超微结构的改变

Fig. 1 Ultrastructure change of HL-60 and K562 after treated with PUVA

表 2 PUVA 作用 4 h 后 HL-60、K562 细胞 Fas mRNA 的表达 ($\bar{x}\pm s$, n=3)

Table 2 Expression of Fas mRNA in HL-60 and K562 cells treated with PUVA for 4 h ($\bar{x}\pm s$, n=3)

PSO p/(μg·mL ⁻¹)	HL-60 细胞/(拷贝数:μg ⁻¹)		K562 细胞/(拷贝数:μg ⁻¹)	
	0 min	5 min	0 min	5 min
0	(8.40±0.59)×10 ³	(1.50±0.26)×10 ^{5**△△}	(2.97±0.42)×10 ⁴	(9.03±0.47)×10 ^{5**△△}
10	(1.90±0.61)×10 ^{4**}	(1.15±0.13)×10 ^{6**△△}	(2.27±0.33)×10 ^{5**}	(6.83±0.40)×10 ^{6**△△}
20	(2.37±0.47)×10 ^{4**}	(1.69±0.32)×10 ^{6**△△}	(4.89±0.48)×10 ^{5**}	(1.37±0.29)×10 ^{7**△△}
40	(5.87±0.39)×10 ^{4**}	(5.15±0.15)×10 ^{6**△△}	(8.14±0.59)×10 ^{6**}	(1.54±0.10)×10 ^{7**△△}
80	(1.62±0.36)×10 ^{5**}	(7.88±0.38)×10 ^{6**△△}	(2.97±0.14)×10 ^{7**}	(5.98±0.43)×10 ^{7**△△}

表 3 PUVA 作用 4 h 后 HL-60、K562 细胞 FasL mRNA 的表达 ($\bar{x}\pm s$, n=3)

Table 3 Expression of FasL mRNA in HL-60 and K562 cells treated with PUVA for 4 h ($\bar{x}\pm s$, n=3)

PSO p/(μg·mL ⁻¹)	HL-60 细胞/(拷贝数:μg ⁻¹)		K562 细胞/(拷贝数:μg ⁻¹)	
	0 min	5 min	0 min	5 min
0	(8.69±0.44)×10 ⁷	(2.64±0.31)×10 ^{7**△△}	(2.21±0.31)×10 ⁶	(7.82±0.21)×10 ^{5**△△}
10	(7.03±0.47)×10 ^{7**}	(1.58±0.38)×10 ^{7**△△}	(1.54±0.09)×10 ^{6**}	(4.31±0.43)×10 ^{5**△△}
20	(5.68±0.47)×10 ^{7**}	(8.20±1.45)×10 ^{6**△△}	(7.14±0.49)×10 ^{5**}	(1.55±0.36)×10 ^{5**△△}
40	(5.17±0.38)×10 ^{7**}	(1.64±0.40)×10 ^{6**△△}	(5.79±0.16)×10 ^{5**}	(3.46±0.44)×10 ^{4**△△}
80	(2.71±0.29)×10 ^{7**}	(2.61±0.33)×10 ^{5**△△}	(5.38±0.23)×10 ^{5**}	(9.15±0.49)×10 ^{3**△△}

2.4 流式细胞术测定 PUVA 24 h 后 HL-60、K562 细胞 Fas、FasL 蛋白表达情况:PSO、UVA、PUVA 均可上调 Fas 蛋白的表达,下调 FasL 蛋白表达,且 PUVA 作用更显著。结果见表 4 和 5。

表 4 PUVA 作用 24 h 后 HL-60、K562 细胞 Fas 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 4 Expression of Fas protein in HL-60 and K562 cells treated with PUVA for 24 h ($\bar{x} \pm s, n=3$)

PSO $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	HL-60 细胞/%		K562 细胞/%	
	0 min	5 min	0 min	5 min
0	3.29±0.39	18.17±1.07*** $\Delta\Delta$	14.67±2.02	28.33±1.55*** $\Delta\Delta$
10	9.70±0.71**	23.90±1.21*** $\Delta\Delta$	29.00±1.64**	29.03±1.69*** $\Delta\Delta$
20	10.83±1.01**	25.83±1.06*** $\Delta\Delta$	33.10±0.95**	47.63±0.70*** $\Delta\Delta$
40	12.10±0.85**	29.50±1.15*** $\Delta\Delta$	40.77±1.88**	69.67±2.39*** $\Delta\Delta$
80	18.73±1.22**	47.03±1.36*** $\Delta\Delta$	44.17±1.47**	79.63±1.52*** $\Delta\Delta$

表 5 PUVA 作用 24 h 后 HL-60、K562 细胞 FasL 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 5 Expression of FasL protein in HL-60 and K562 cells treated with PUVA for 24 h ($\bar{x} \pm s, n=3$)

PSO $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	HL-60 细胞/%		K562 细胞/%	
	0 min	5 min	0 min	5 min
0	58.67±1.75	33.90±1.90*** $\Delta\Delta$	88.17±1.72	56.90±1.44*** $\Delta\Delta$
10	58.40±1.87**	19.13±1.31*** $\Delta\Delta$	76.83±0.31**	56.77±1.60*** $\Delta\Delta$
20	57.57±1.48**	18.50±1.51*** $\Delta\Delta$	75.00±2.52**	56.60±2.04*** $\Delta\Delta$
40	54.33±1.69**	17.53±1.74*** $\Delta\Delta$	55.27±3.17**	44.73±3.27*** $\Delta\Delta$
80	37.40±1.73**	15.60±1.42*** $\Delta\Delta$	38.13±0.93**	25.27±0.67*** $\Delta\Delta$

3 讨论

PSO 具有抗肿瘤、抗白血病的作用,同时又具有光敏活性^[3~7],波长范围在 320~360 nm 的紫外光照射,可激发 PSO 的动力效应,从而增强其抗肿瘤及抗白血病的作用。本实验采用紫外波长为 360 nm 的 GLY-10 型光量子血液平衡治疗仪和/或 PSO 对实验组进行处理,对细胞凋亡率、电镜下超微结构改变进行检测、分析,证实 PUVA 法对人急性非淋巴细胞白血病-M2 型 HL-60 细胞、人红白血病 K562 细胞有明显的诱导凋亡作用,可以说明诱导白血病细胞凋亡是 PUVA 法杀伤人类白血病细胞的途径之一。多因素方差分析结果显示,PUVA 可诱导 HL-60、K562 白血病细胞发生凋亡,与对照组 (0 min, 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 相比,不同质量浓度的 PSO 与不同照射的 UVA 对 HL-60、K562 白血病细胞株的凋亡率有明显差异,细胞的凋亡率随着 PSO 质量浓度的增加,UVA 照射时间的延长而增加。

Fas/FasL 系统在传统细胞凋亡信号中起着重要作用^[8]。HL-60、K562 细胞 Fas 的表达下降,而 FasL 的表达增强,当 Fas 水平下调至低于 Fas/FasL 途径诱导凋亡的阈值时,凋亡受到抑制,而细胞表面 FasL 表达使 Fas 高表达激活 T 淋巴细胞发生凋亡,从而导致肿瘤细胞逃避机体免疫系统监视,在体内无限增殖。荧光定量 PCR 技术检测结果显示,PSO、UVA、PUVA 均可上调 Fas 基因的表达,下调 FasL 基因表达,且 PUVA 的作用要显著强于前两者,经 PUVA 作用后,HL-60 细胞 Fas 基因表达拷贝数的数量级由对照组的 10^3 上升至 10^6 , K562 细胞 Fas 基因表达拷贝数量级由对照组的 10^4 上升至 10^7 ,HL-60 细胞 FasL 基因表达拷贝数量级由对照组的 10^7 下调至 10^5 ,K562 细胞 FasL 基因表达拷贝数量级由对照组的 10^6 下调至 10^3 。流式细胞仪检测结果在蛋白质水平上进一步证实上述结果。PUVA 诱导 HL-60、K562 细胞发生凋亡的作用途径之一可能是对 Fas/FasL 系统的调控,通过上调 Fas 基因,下调 FasL 基因而诱导细胞凋亡。

参考文献:

[1] 崔小庆. 补骨脂素加长波紫外线抗肿瘤的试验研究和应用 [J]. 国外医学:肿瘤学分册, 1991, 18(3): 157-160.
[2] Musajo L, Rodighiero G, Dallacqua F. Evidences of a photoreaction of the photosensitizing furocoumarins with DNA and with pyrimidine nucleosides and nucleotides [J]. *Experientia*, 1965, 21(1): 24-26.
[3] 陈楠楠, 黄世林, 张德杰, 等. 补骨脂素加长波紫外线对红白血病细胞株 NB4、HL-60、K562 细胞作用的研究 [J]. 中国中医急症, 2007, 16(4): 444-446.
[4] 吴少华, 张仲海, 赵建斌. 补骨脂素体外抗瘤活性的实验研究 [J]. 中国中药杂志, 1998, 23(5): 303-305.
[5] Garneiro L V, Ferreira S R, Chen C L, *et al.* Psoralen derivatives and longwave ultraviolet irradiation are active in vitro against human melanoma cell line [J]. *J Photochem Photobiol B*, 2004, 76(1-3): 49-53.
[6] Plumas J, Drillat P, Jacob M C, *et al.* Extracorporeal photochemotherapy for treatment of clonal T cell proliferations [J]. *Bull Cancer*, 2003, 90(8-9): 63-70.
[7] Efferth T, Fabry U, Osieka R, *et al.* Induction of apoptosis, depletion of glutathione, and DNA damage by extracorporeal photochemotherapy and psoralen with exposure to UV light in vitro [J]. *Anticancer Res*, 2001, 21(4A): 2777-2783.
[8] Nagata S, Golstein P. The Fas death factor [J]. *Science*, 1995, 267(5203): 1449-1456.