

## 木香烃内酯对 K562/A02 细胞阿霉素耐药的逆转作用研究

辛 玥<sup>1</sup>, 丁亚辉<sup>2</sup>, 纪 庆<sup>2</sup>, 杨 铭<sup>2</sup>, 李迎辉<sup>2</sup>, 高瀛岱<sup>2\*</sup>

1 天津医科大学总医院 儿科, 天津 300052

2 中国医学科学院 北京协和医学院血液病医院 血液学研究所 实验血液学国家重点实验室, 天津 300020

**摘要:** **目的** 探索木香烃内酯对白血病耐药细胞系 K562/A02 阿霉素耐药的逆转作用。**方法** 将木香烃内酯与 K562/A02 细胞共培养 72 h 后, 采用 MTT 法检测木香烃内酯对细胞生长的抑制作用。不同浓度木香烃内酯处理 K562/A02 细胞 24 h 后, 采用 Annexin V 和 PI 双染法检测木香烃内酯对细胞的凋亡。不同浓度木香烃内酯与阿霉素共培养 72 h 后采用 MTT 法检测木香烃内酯对 K562/A02 细胞的耐药逆转情况。采用流式细胞仪检测木香烃内酯处理 24 h 之后 K562/A02 细胞阿霉素蓄积以及细胞膜表面 P-糖蛋白 (P-gp) 的表达。**结果** 木香烃内酯对 K562/A02 细胞的生长具有明显抑制作用, 呈显著的剂量相关性。与对照组比较, 2.5~50  $\mu\text{mol/L}$  木香烃内酯组 K562/A02 细胞存活率显著降低 ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ )。随着木香烃内酯浓度的增加, 凋亡细胞的比例明显增加。与对照组比较, 不同浓度木香烃内酯组细胞凋亡比例显著升高 ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ )。加入 5  $\mu\text{mol/L}$  木香烃内酯后, 使 K562/A02 细胞对阿霉素的敏感性提高 12 倍。木香烃内酯处理后 K562/A02 细胞内部阿霉素的蓄积明显增加, 呈浓度相关性。与对照组比较, 5、10  $\mu\text{mol/L}$  木香烃内酯组 K562/A02 细胞内部阿霉素的蓄积增加显著升高 ( $P < 0.05$ )。细胞表面的 P-gp 的表达并无显著影响。**结论** 木香烃内酯能够抑制 K562/A02 细胞增殖, 诱导 K562/A02 细胞凋亡, 增强阿霉素的化疗敏感性, 逆转阿霉素耐药。

**关键词:** 木香烃内酯; K562/A02 细胞; 阿霉素耐药; 细胞凋亡; P-糖蛋白

**中图分类号:** R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674 - 5515(2016)06 - 0742 - 05

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-5515.2016.06.003

## Reversal against adriamycin resistance of costunolide on K562/A02 cells

XIN Yue<sup>1</sup>, DING Ya-Hui<sup>2</sup>, JI Qing<sup>2</sup>, YANG Ming<sup>2</sup>, LI Ying-hui<sup>2</sup>, GAO Ying-dai<sup>2</sup>

1. Department of Pediatrics, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China

2. Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology and Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China

**Abstract: Objective** To investigate the reverse effect against adriamycin resistance of costunolide on leukemia drug resistant cell line K562/A02. **Methods** Costunolide and K562/A02 cells were co-cultured for 72 h, and inhibition of costunolide on K562/A02 cell were determined by MTT assay. K562/A02 cells were treated for 24 h by various concentrations of costunolide, and the apoptosis of K562/A02 cells were detected by Annexin V/PI apoptosis kit on flow cytometry. Various concentrations of costunolide and adriamycin were co-cultured with K562/A02 cells for 72 h, and the reversals were determined by MTT assay. Accumulation of adriamycin and the expression of P-glycoprotein (P-gp) were analyzed by flow cytometry after the treatment for 24 h of costunolide with various concentrations. **Results** Costunolide could significantly exhibit growth of K562/A02 cell in a dose dependent manner. Compared with the control group, survival rates of K562/A02 cell in the costunolide 2.5 — 50  $\mu\text{mol/L}$  groups were significantly decreased ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ). Apoptosis ratios of K562/A02 cells in the costunolide groups were significantly decreased with increase of concentrations of costunolide. Compared with the control group, apoptosis rates of K562/A02 cell in the costunolide groups were significantly increased ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ). Intake of adriamycin in K562/A02 cell increased to 12 times after treated by 5  $\mu\text{mol/L}$  costunolide. Accumulation of adriamycin in K562/A02 cell treated by costunolide were significantly increased in a concentration dependent manner. Compared with the control group, accumulation of adriamycin in K562/A02 cell in the 5 and 10  $\mu\text{mol/L}$  costunolide groups were significantly increased ( $P < 0.05$ ). However, there was no significant difference of expressions of

收稿日期: 2016-03-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81570100)

作者简介: 辛 玥 (1974—), 女, 天津人, 副主任医师, 硕士, 从事儿科疾病相关研究。Tel: (022)60363804 E-mail: xy\_xy0713@eyou.com

\*通信作者 高瀛岱 E-mail: ydgao@ihcams.ac.cn

P-gp between two groups. **Conclusion** Costunolide can inhibit the proliferation of K562/A02 cells, induce apoptosis in K562/A02 cells, enhance chemotherapy sensitivity of doxorubicin, and reverse adriamycin resistance.

**Key words:** costunolide; K562/A02 cell; adriamycin resistance; cell apoptosis; P-glycoprotein

白血病是一种造血系统的恶性疾病,在青少年中的发生率相对较高,因此其危害尤其突出。现行治疗白血病的方法主要是化学治疗,然而多药耐药的发生是导致化疗失败和白血病恶变、复发的根本原因<sup>[1-2]</sup>。多药耐药指肿瘤细胞在接触一种化疗药物产生耐药性后,其他不同结构和不同作用机制的多种抗肿瘤药物产生耐药性的现象。目前临床发现与多药耐药相关的蛋白主要有多药耐药基因(MDR1)、乳腺癌耐药蛋白(BCRP)、多药耐药相关蛋白(MRP)、肺耐药蛋白(LRP)等<sup>[3]</sup>。其中多药耐药基因(MDR1)即P-gp导致的多药耐药在临床上尤为常见<sup>[4-5]</sup>。因此特异性的P-gp抑制剂以及多药耐药逆转剂的开发对于临床多药耐药现象的控制具有十分重要的作用。木香烃内酯为倍半萜内酯类化合物,主要来源于木香、月桂树、荷花玉兰等植物的根部。目前的研究发现木香烃内酯具有抗炎、抗肿瘤、抗病毒、抗菌、抗氧化等作用。在抗肿瘤方面的研究发现,木香烃内酯对多种不同类型的肿瘤都有明显的杀伤作用,其抗肿瘤机制包括诱导细胞凋亡、细胞周期阻滞、抑制肿瘤细胞端粒酶的活性、抑制肿瘤侵袭迁移等<sup>[6-9]</sup>。本实验以白血病耐阿霉素细胞系K562/A02为研究对象,研究发现木香烃内酯能够抑制K562/A02细胞增殖,诱导K562/A02细胞凋亡,并且能够增强化疗药阿霉素的化疗敏感性。

## 1 材料

木香烃内酯由南开大学药学院陈悦教授实验室提供,质量分数>98%,溶于DMSO,配制成20 mmol/L储备液,-20℃保存备用。PE标记P-gp鼠抗人单克隆抗体购自美国BD公司,RPMI 1640培养基和胎牛血清购自Gibco公司,MTT和DMSO购自Sigma公司。Annexin V-FITC细胞凋亡检测盒购自BD公司,流式细胞仪为美国BD公司。阿霉素购自浙江海正药业股份有限公司。

白血病细胞K562/A02由中国医学科学院血液学研究所提供。

## 2 方法

### 2.1 木香烃内酯对K562/A02细胞生长的影响

取对数生长期的K562/A02细胞,调节细胞浓

度为 $5 \times 10^4$ /mL,按照每孔200 μL接种96孔板中。静置1 h后加入一定体积的木香烃内酯溶液,使终浓度分别为50、20、10、5、2.5、1.0、0.5、0.25 μmol/L,同时设置DMSO对照孔。作用72 h后,加入5 mg/mL MTT溶液20 μL,孵育4 h后,1 800 r/min离心15 min并弃上清,沉淀用200 μL DMSO溶解沉淀,充分溶解后测定 $A_{570 \text{ nm}}$ ,计算细胞存活率,根据GraphPad Prism5软件计算 $IC_{50}$ 值。

存活率=给药组 $A_{570 \text{ nm}}$ 值/对照组 $A_{570 \text{ nm}}$ 值

### 2.2 木香烃内酯对K562/A02细胞凋亡的影响

取对数生长期的K562/A02细胞做成细胞悬液,调节细胞浓度至 $5 \times 10^4$ /mL,按照每孔1 mL加入24孔板中,静置1 h后加入一定体积的木香烃内酯,使终浓度分别为10、5、2.5 μmol/L,同时设置DMSO对照孔。每个浓度设置3个复孔。放入37℃孵箱中24 h后,将细胞放入流式管中,1 500 r/min离心8 min后,弃上清,沉淀用100 μL结合缓冲液重悬,采用Annexin V和PI双染法在流式细胞仪上检测细胞凋亡情况。

### 2.3 木香烃内酯对K562/A02细胞的耐药逆转

取对数生长期的K562/A02细胞,调节细胞浓度为 $5 \times 10^4$ /mL,按照每孔200 μL接种于96孔板中。加入5、2.5 μmol/L木香烃内酯孵育1 h后,加入不同浓度的阿霉素,使终浓度分别为50、20、10、5、2.5、1.0、0.5、0.25 μmol/L,作用72 h后,加入5 mg/mL MTT溶液20 μL,孵育4 h后,1 800 r/min离心15 min,并弃上清,沉淀用200 μL DMSO溶解,充分溶解后测定 $A_{570 \text{ nm}}$ ,计算细胞存活率。采用GraphPad Prism5计算阿霉素的 $IC_{50}$ 值。

### 2.4 木香烃内酯对K562/A02细胞阿霉素蓄积的影响

取对数生长期的K562/A02细胞,调节细胞浓度为 $5 \times 10^4$ /mL,按照每孔1 mL加入24孔板中,加入一定体积的木香烃内酯溶液,使终浓度分别为10、5、2.5 μmol/L。每个浓度设置3个复孔。放入37℃孵箱中24 h后,将细胞吸入流式管中,1 500 r/min离心8 min后弃上清,沉淀用1 mL PBS重悬,同时加入终浓度为5 μmol/L阿霉素,37℃孵育1 h后,离心弃上清,沉淀用500 μL PBS重悬,流式细胞仪检测阿霉素的荧光强度值。

### 2.5 木香烃内酯对 K562/A02 细胞 P-gp 表达的影响

取对数生长期的 K562/A02 细胞，调节细胞浓度为  $5 \times 10^4/\text{mL}$ ，按照每孔 1 mL 加入 24 孔板中，加入一定体积的木香烃内酯溶液，使终浓度分别为 5、2.5  $\mu\text{mol/L}$ 。每个浓度设置 3 个复孔。放入 37  $^{\circ}\text{C}$  孵箱中 24 h 后，将细胞吸入流式管中，1 500 r/min 离心 8 min 后弃上清，沉淀用 100  $\mu\text{L}$  PBS 重悬，标记 5  $\mu\text{L}$  P-gp-PE，室温孵育 30 min 后，离心弃上清，用 500  $\mu\text{L}$  PBS 重悬，流式细胞仪检测 P-gp 的荧光强度值。

### 2.6 统计分析

采用 GraphPad Prism5 软件进行配对 *t* 检验，检验对照组和实验组的差异。

## 3 结果

### 3.1 木香烃内酯对 K562/A02 细胞生长的抑制作用

木香烃内酯处理 72 h 后，K562/A02 细胞的生长受到明显抑制，在低于 50  $\mu\text{mol/L}$  的浓度范围内，K562/A02 细胞生长的抑制具有显著的剂量相关性，见图 1。

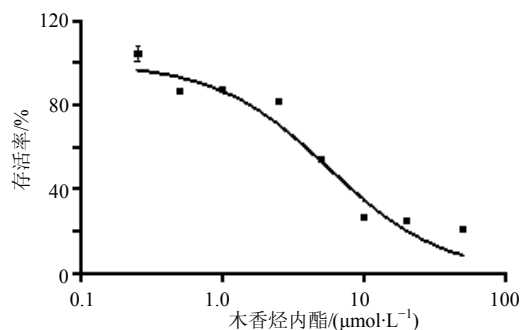


图 1 木香烃内酯对 K562/A02 细胞的抑制作用

Fig. 1 Inhibition of costunolide on K562/A02 cell

与对照组比较，2.5~50  $\mu\text{mol/L}$  木香烃内酯组 K562/A02 细胞存活率显著降低 ( $P < 0.05$ 、0.01、0.001)。木香烃内酯对 K562/A02 细胞的  $\text{IC}_{50}$  为 5.61  $\mu\text{mol/L}$ ，且在最高浓度 50  $\mu\text{mol/L}$  时，细胞的存活率最低，见表 1。

### 3.2 木香烃内酯诱导 K562/A02 细胞凋亡

不同浓度木香烃内酯处理 K562/A02 细胞 24 h 后，细胞出现明显凋亡。根据细胞凋亡的状态可以把细胞分为两类，Annexin V<sup>+</sup>为凋亡细胞，Annexin V<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>组为活细胞。根据实验结果可知，随着木香烃内酯浓度的增加，凋亡细胞的比例明显增加，见图 2。

表 1 木香烃内酯对 K562/A02 细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Table 1 Effect of costunolide on survival rates of K562/A02 cell ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

组别	浓度/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	细胞存活率/%
对照	—	99.96 $\pm$ 0.86
木香烃内酯	0.25	104.51 $\pm$ 6.67
	0.5	86.36 $\pm$ 6.29
	1.0	80.28 $\pm$ 14.22
	2.5	81.93 $\pm$ 0.64*
	5	53.86 $\pm$ 0.32**
	10	26.48 $\pm$ 1.54***
	20	24.89 $\pm$ 0.45***
50	19.89 $\pm$ 1.61***	

与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs the control group

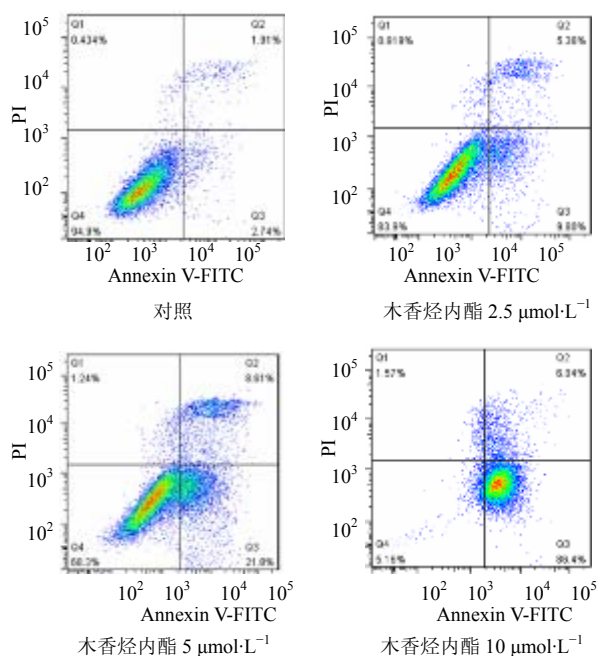
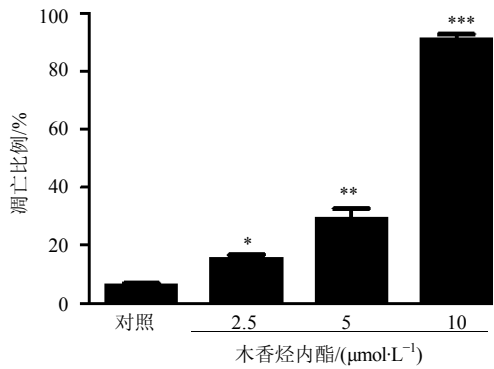


图 2 不同浓度木香烃内酯对 K562/A02 细胞凋亡的影响

Fig. 2 Effects of various concentrations of costunolide on apoptosis of K562/A02 cells

对照组细胞凋亡比例为 (6.03 $\pm$ 0.83) %，木香烃内酯浓度在 2.5、5、10  $\mu\text{mol/L}$  时细胞凋亡比例分别为 (15.10 $\pm$ 1.73) %、(29.13 $\pm$ 3.61) %、(91.07 $\pm$ 1.91) %。与对照组比较，不同浓度木香烃内酯组细胞凋亡比例显著升高 ( $P < 0.05$ 、0.01、0.001)。同时木香烃内酯处理之后活细胞的比例明显下降，见图 3。



与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$   
\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs the control group

图3 不同浓度木香桉内酯对 K562/A02 细胞凋亡比例的影响  
Fig. 3 Effects of various concentrations of costunolide on apoptosis ratios of K562/A02 cells

### 3.3 木香桉内酯对 K562/A02 细胞耐药的逆转

不同浓度木香桉内酯与阿霉素联合用药发现, 加入 2.5  $\mu\text{mol/L}$  木香桉内酯后, 阿霉素对 K562/A02 细胞的  $\text{IC}_{50}$  值由 7.60  $\mu\text{mol/L}$  降低到 3.86  $\mu\text{mol/L}$ , 化疗敏感性提高 1.97 倍。加入 5  $\mu\text{mol/L}$  木香桉内酯后, 阿霉素对 K562/A02 细胞的  $\text{IC}_{50}$  值由 7.60  $\mu\text{mol/L}$  降低到 0.62  $\mu\text{mol/L}$ , 使 K562/A02 细胞对阿霉素的敏感性提高 12 倍, 见图 4。

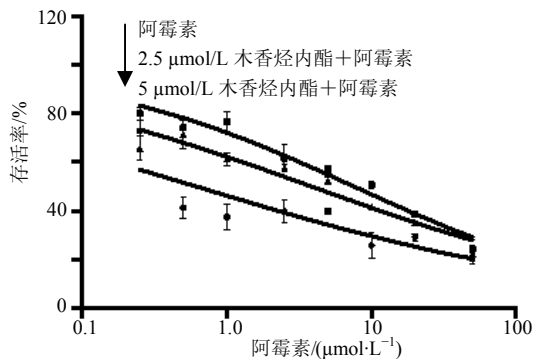


图4 不同浓度木香桉内酯与阿霉素联合用药对 K562/A02 细胞耐药的逆转

Fig. 4 Multi-drug resistance reversal on K562/A02 cells by various concentrations of costunolide combined with adriamycin

### 3.4 木香桉内酯对 K562/A02 细胞阿霉素蓄积的影响

通过研究不同浓度木香桉内酯对 K562/A02 细胞阿霉素摄取的影响发现, 木香桉内酯处理后 K562/A02 细胞内部阿霉素的蓄积明显增加, 同时阿霉素蓄积的增加呈浓度相关性。见图 5。

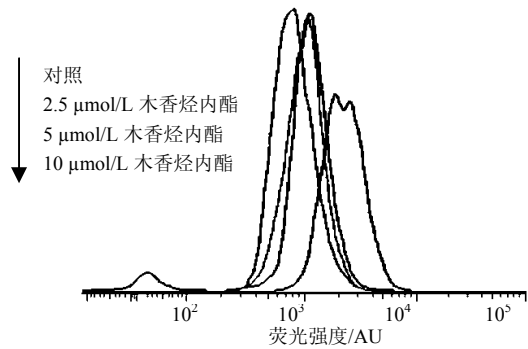


图5 木香桉内酯对 K562/A02 细胞内部阿霉素的蓄积  
Fig. 5 Effects of various concentrations of costunolide on intake of adriamycin in K562/A02 cells

当使用木香桉内酯 2.5、5、10  $\mu\text{mol/L}$  时, K562/A02 细胞内部阿霉素的蓄积分别增加 1.1、1.25、2.43 倍。与对照组比较, 5、10  $\mu\text{mol/L}$  木香桉内酯组 K562/A02 细胞内部阿霉素的蓄积显著升高 ( $P < 0.05$ ), 见图 6。

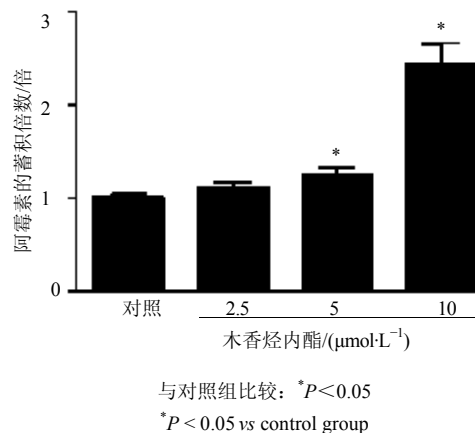


图6 木香桉内酯对 K562/A02 细胞内阿霉素蓄积的影响  
Fig. 6 Effects of costunolide on accumulation of adriamycin accumulation in K562/A02 cells

### 3.5 木香桉内酯对 K562/A02 细胞 P-gp 表达的影响

通过研究木香桉内酯对 K562/A02 细胞 P-gp 表达的影响发现, 木香桉内酯处理细胞 24 h 后, 细胞表面的 P-gp 的表达并无显著影响, 见表 2。

表2 不同浓度木香桉内酯 K562/A02 细胞 P-gp 表达的影响  
Table 2 Effects of various concentrations of costunolide on expression of P-glycoprotein in K562/A02 cells

组别	浓度/( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	P-gp 荧光强度
对照	—	1.00 ± 0.017
木香桉内酯	2.5	0.98 ± 0.007
	5	1.09 ± 0.031

#### 4 讨论

木香烃内酯有十分广泛的抗肿瘤作用,但其对正常细胞的抑制作用很弱,同时能够诱导细胞凋亡和周期阻滞,诱导细胞分化以及抑制肿瘤侵袭迁移等方面有重要的作用<sup>[10-12]</sup>。

本研究表明,木香烃内酯对 K562/A02 细胞具有明显的抑制作用。而 K562/A02 对化疗药阿霉素具有明显的耐药性,因此木香烃内酯能够克服多药耐药性。木香烃内酯在处理 24 h 后,随着木香烃内酯浓度的增加,K562/A02 凋亡细胞的比例(包括早期凋亡和晚期凋亡)明显增加,活细胞比例明显下降,因此木香烃内酯是通过细胞凋亡途径来发挥抗肿瘤作用。Dong 等<sup>[13]</sup>通过对结肠癌 SW-480 的研究表明,木香烃内酯通过抑制  $\beta$ -catenin 从而抑制 cyclin D1 和 survivin 分子,进一步发挥抗肿瘤作用,因此表明木香烃内酯是 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的抑制剂。Pitchai 等<sup>[14]</sup>则发现木香烃内酯能够抑制 NF- $\kappa$ B 的活性,从而诱发人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 的凋亡。

将 K562 诱导成的耐药细胞系 K562/A02 后,细胞表面 P-gp 表达明显增强,因此认为 P-gp 是 K562/A02 细胞耐药的主要原因。木香烃内酯作用 K562/A02 细胞后,阿霉素对 K562/A02 细胞的抑制作用明显增加,且阿霉素在细胞内的蓄积也明显增多,因此证实木香烃内酯能够一定程度的逆转 K562/A02 细胞的耐药。然而,木香烃内酯作用后 K562/A02 细胞表面 P-gp 的表达并无显著的变化,推测可能的原因为木香烃内酯对 P-gp 外排泵功能的抑制更明显,或木香烃内酯影响了其他的非 P-gp 的耐药途径。具体的作用机制有待下一步的研究。

综上所述,木香烃内酯能够抑制 K562/A02 细胞增殖,诱导 K562/A02 细胞凋亡,增强阿霉素的化疗敏感性,逆转阿霉素耐药,是具有广泛应用前景的抗白血病药物。

#### 参考文献

- [1] Chen J R, Jia X H, Wang H, *et al.* Timosaponin A-III reverses multi-drug resistance in human chronic myelogenous leukemia K562/ADM cells via down regulation of MDR1 and MRP1 expression by inhibiting PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Int J Oncol*, 2016, 48(5): 2063-2070.
- [2] Yousefi B, Samadi N, Baradaran B, *et al.* Differential effects of peroxisome proliferator-activated receptor agonists on doxorubicin-resistant human myelogenous leukemia (K562/DOX) cells [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2015, 61(8):118-122.
- [3] Baguley B C. Classical and targeted anticancer drugs: an appraisal of mechanisms of multidrug resistance [J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1395:19-37.
- [4] Ambudkar S V, Dey S, Hrycyna C A, *et al.* Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1999, 39: 361-398.
- [5] 刘海晔. 中药逆转肿瘤多药耐药性的研究进展 [J]. *中草药*, 2015, 46(7): 1096-1102.
- [6] Zheng H, Chen Y, Zhang J, *et al.* Evaluation of protective effects of costunolide and dehydrocostuslactone on ethanol-induced gastric ulcer in mice based on multi-pathway regulation [J]. *Chem Biol Interact*, 2016, 250: 68-77.
- [7] Wang Z, Zhao X, Gong X. Costunolide induces lung adenocarcinoma cell line A549 cells apoptosis through ROS (reactive oxygen species)-mediated endoplasmic reticulum stress [J]. *Cell Biol Int*, 2016, 40(3): 289-297.
- [8] Yang Z J, Ge W Z, Li Q Y, *et al.* Syntheses and biological evaluation of costunolide, parthenolide, and their fluorinated analogues [J]. *J Med Chem*, 2015, 58(17): 7007-7020.
- [9] Roy A, Manikkam R. Cytotoxic Impact of costunolide isolated from *Costus speciosus* on breast cancer via differential regulation of cell cycle-an *in-vitro* and *in-silico* approach [J]. *Phytother Res*, 2015, 29(10): 1532-1539.
- [10] Butturini E, Di Paola R, Suzuki H, *et al.* Costunolide and dehydrocostuslactone, two natural sesquiterpene lactones, ameliorate the inflammatory process associated to experimental pleurisy in mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 730: 107-115.
- [11] Whipple R A, Vitolo M I, Boggs A E, *et al.* Parthenolide and costunolide reduce microtentacles and tumor cell attachment by selectively targeting detyrosinated tubulin independent from NF- $\kappa$ B inhibition [J]. *Breast Cancer Res*, 2013, 15(5): R83.
- [12] Lohberger B, Rinner B, Stundl N, *et al.* Sesquiterpene lactones downregulate G2/M cell cycle regulator proteins and affect the invasive potential of human soft tissue sarcoma cells [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e66300.
- [13] Dong G Z, Shim A R, Hyeon J S, *et al.* Inhibition of Wnt/ $\beta$ -Catenin pathway by dehydrocostus lactone and costunolide in colon cancer cells [J]. *Phytother Res*, 2015, 29(5): 680-686.
- [14] Pitchai D, Roy A, Banu S. *In vitro* and *in silico* evaluation of NF- $\kappa$ B targeted costunolide action on estrogen receptor-negative breast cancer cells-comparison with normal breast cells [J]. *Phytother Res*, 2014, 28(10): 1499-1505.