

苦参碱类生物碱抗人红白血病 K562 细胞药理作用的研究进展

张明发, 沈雅琴

上海美优制药有限公司, 上海 201204

摘要: 苦参碱类生物碱(苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱、槐定碱)能抑制人红白血病 K562 细胞增殖并诱导分化和凋亡, 其诱导分化和凋亡及抑制增殖的机制可能是多方面的, 与下调原癌基因 c-myc、c-jun, 肝细胞核转录因子-1 α (HNF-1 α), 生存素, 人端粒酶逆转录酶 (hTERT) 表达和抑制端粒酶活性; 与上调 H-ras、N-ras、p21、p53、LIGHT, 细胞周期蛋白 D1, 细胞周期蛋白依赖性激酶-5 (Cdk5), 细胞骨架相关蛋白 prefoldin、ezrin 表达有关。苦参碱类生物碱还可能通过下调 P-糖蛋白、环氧化酶-2 和 Bcl-2 表达, 上调 p27 表达, 解除 K562 细胞的多药耐药性, 提高 K562 细胞对化疗药的敏感性, 因此苦参碱类生物碱与化疗药联用治疗耐药 K562 白血病, 可产生增效减毒效果。

关键词: 苦参碱类生物碱; 苦参碱; 氧化苦参碱; 槐果碱; 槐定碱; K562 细胞; 白血病

中图分类号: R973 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2019) 01-0226-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.01.036

Research advances of effects of matrine-type alkaloids against erythroleukemia K562 cells

ZHANG Mingfa, SHEN Yaqin

Shanghai Meiyou Pharmaceutical Co. Ltd., Shanghai 201204, China

Abstract: Matrine-type alkaloids (matrine, oxymatrine, sophocarpine, and sophoridine) inhibit proliferation, and induce differentiation and apoptosis in erythroleukemia K562 cells. The effective mechanism of matrine-type alkaloids are related to down-regulation of the expressions of proto-oncogenes, c-myc and c-jun, HNF-1 α , survivin, human telomerase reverse transcriptase (hTERT), and inhibition of telomerase activity, and up-regulation of the expressions of H-ras, N-ras, p21, p53, LIGHT, cyclin D1, cyclin dependent kinase 5 (Cdk5), and cytoskeleton-associated proteins, prefoldin and ezrin. Matrine-type alkaloids elevate susceptibility of K562 cells to chemotherapeutic by down-regulating the expressions of P-glycoprotein, cyclooxygenase-2 and Bcl-2, and up-regulating the expression of p27 to relieve multi-drug resistance of K562 cells. Thus matrine-type alkaloids in combination with chemotherapeutic to treat K562 leukemia, can induce the effects of increasing efficacy and attenuating toxicity.

Key words: matrine-type alkaloids; matrine; oxymatrine; sophocarpine; sophoridine; K562 cells; leukemia

在植物界中, 苦参碱类生物碱(matrine-type alkaloids)主要存在于豆科的槐属、野决明属、山豆根属以及小檗科的牡丹草属植物之中。其中研究比较多的植物是槐属中的苦参 *Sophor flavescens*、越南槐 *S. tonkinensis* (山豆根常为其地方名)、苦豆子 *S. alopecuroides* 和白刺花 *S. viciifolia*。从植物中提取得到的苦参碱类生物碱至少超过 30 种。其中生物活性研究比较多的有苦参碱(matrine)、氧化苦参碱(oxymatrine)、槐果碱(sophocarpine)、氧化槐果碱(oxysophocarpine)、槐定碱(sophoridine)、氧化槐

定碱(oxysophoridine)和槐胺碱(sophoramine)。它们的生物活性广泛, 如抗菌、抗病毒、抗炎、免疫调节、抗肿瘤、保护心、肝、肺、肾、脑、血管作用, 对心脏有正性肌力、负性频率、抗心律失常作用, 还有升高白细胞、平喘、抗溃疡、抗肝纤维化以及镇静、催眠、镇痛等中枢神经药理作用^[1-11]。苦参碱类生物碱在中毒剂量时常常伤害肝、肾、肺和脑, 其中神经毒作用尤为突出, 可使动物表现出不安、躁动、痉挛性抽搐等兴奋症状, 最后因呼吸困难而死。在苦参碱类生物碱中槐定碱是目前已知的中枢神经毒性最

收稿日期: 2018-09-29

第一作者: 张明发(1946—), 研究员, 研究方向为中药药理。Tel: 13816371915 E-mail: 13816371915@139.com

强者^[12]。

人红白血病 K562 细胞属髓性粒细胞性白血病细胞,是分化程度极低且分化受阻的造血细胞,但还有多向分化潜能,是一种常见的白血病细胞。本文综述苦参碱类生物碱抑制 K562 细胞增殖,促进凋亡和分化以及逆转耐药性作用及其机制,为临床研究和开发苦参碱类生物碱的新适应症提供参考。

1 抑制人红白血病 K562 细胞增殖并诱导凋亡

1.1 苦参碱

孙莉等^[13]报道苦参碱对人红白血病 K562 细胞增殖的半数抑制浓度(IC_{50})为 1.35 mmol/L,对阿霉素耐药的 K562(K562/ADM)细胞增殖的 IC_{50} 为 6.3 mmol/L。林泽^[14]报道苦参碱对 K562 细胞 48 h 增殖的 IC_{50} 为 2.13 mmol/L,并使 K562 细胞发生自噬。路莎莎^[15]报道苦参碱对 K562 细胞 24 h 增殖的 IC_{50} 为 1.37 mmol/L,并浓度相关地抑制 K562 细胞的集落形成能力和诱导凋亡。张虹丽^[16]报道苦参碱对 K562 细胞、K562/ADM 细胞 48 h 增殖的 IC_{50} 分别为 0.8 g/L 和 1.2 g/L。李旭芬等^[17]报道苦参碱对 K562、K562/ADM、长春新碱耐药的 K562(K562/VIN) 细胞 72 h 增殖的 IC_{50} 分别为 0.838、1.135、1.137 g/L。在 0.25、0.5、1 g/L 浓度时苦参碱浓度和时间相关地提高这 3 种 K562 细胞的凋亡率,镜下可见部分细胞出现胞质空泡化、核固缩并边缘化;部分细胞体积缩小、胞质固缩伴固缩深染,并有核碎裂等凋亡细胞;DNA 琼脂糖凝胶电泳可见 DNA 阶梯状条带,细胞周期滞留在 S 期, G_2/M 期细胞减少。

王秀坤等^[18]报道苦参碱在 0.1 g/L 浓度时能抑制 K562 细胞生长。张永清等^[19]报道苦参碱 0.05~0.5 g/L 浓度相关地抑制 K562 细胞增殖,电镜下可见细胞染色质浓集靠边,呈月牙状,有些细胞核染色质和胞膜向细胞外突起,部分脱落形成凋亡小体,并诱导 K562 细胞凋亡相关基因 bcl-6 表达上调,增殖细胞核抗体表达下调。蔺晓康等^[20]报道苦参碱 0.05~0.6 g/L 浓度和时间相关地抑制 K562 细胞生长,并可见细胞凋亡的形态学变化,电泳可见梯状 DNA。吕晓霞等^[21]报道苦参碱浓度在 0.2、0.5、1 g/L 时对 K562 细胞增殖的抑制率分别为 25.88%、46.90%、63.03%,使细胞增殖滞留在 S 期,阻滞细胞的有丝分裂,浓度在 0.05、0.1、0.2 g/L 时诱导 K562 细胞的早期凋亡率分别为 11.6%、69.81%、44.12%,而对照组细胞的自发凋亡率为 1.49%。杨春秀等^[22]报道苦参碱 0.5、0.75、1.0、1.25、1.5 g/L 浓度和时间相关地抑制 K562 细胞增殖,使细胞周期滞留在 G_1

期,S 期细胞减少。王中林等^[23]报道苦参碱在 0.1、0.5、1 g/L 时浓度和时间相关地抑制 K562 细胞增殖,并下调 K562 细胞的生存素基因表达。重庆医科大学的蒋纪恺研究团队^[24-28]报道苦参碱 0.1~1 g/L 浓度和时间相关地抑制 K562 细胞增殖和细胞内的乳酸脱氢酶活性。0.1 g/L 浓度的苦参碱在与 K562 细胞一起培养时,于第 4 天起抑制 K562 细胞增殖,当质量浓度为 0.2 g/L 或以上时可引起 K562 细胞凋亡。

戴碧涛等^[29]报道苦参碱在 0.16~0.4 g/L 时浓度相关地抑制 K562 细胞增殖,0.08 g/L 苦参碱与长春新碱、阿糖胞苷或三尖杉酯碱联用可增强他们的抑制 K562 细胞增殖的作用,但不能增强阿霉素或柔红霉素对 K562 细胞增殖的抑制作用。

林淑仪^[30]报道苦参碱在 0.15、0.2、0.25 g/L 能浓度相关地抑制 K562 细胞在缺氧时的侵袭转移能力。即显著降低 K562 细胞黏附率、迁移率、侵袭率,其中可使侵袭率甚至降至常氧时以下,如以常氧时 K562 细胞侵袭率为 100%,缺氧时侵袭率则为 139.61%,而苦参碱 3 个浓度组使 K562 细胞在缺氧时的侵袭率分别降至 121.11%、83.54%、63.63%,并能浓度相关地对抗 K562 细胞过度表达缺氧诱导因子-1 α 和血管内皮生长因子的基因。

1.2 氧化苦参碱

李春炎等^[31]报道氧化苦参碱抑制 K562 细胞增殖的 IC_{50} 为 0.33 g/L,电镜下可见氧化苦参碱诱导 K562 细胞凋亡,出现核固缩、核碎裂、凋亡小体等典型的凋亡形态。黄素培^[32]报道氧化苦参碱抑制 K562 细胞 72 h 增殖的 IC_{50} 为 0.719 g/L。郭宏伟等^[33]报道氧化苦参碱对 K562 细胞增殖的 IC_{50} 为 2.33 g/L,在二倍体前可检测到凋亡峰,镜下可见凋亡形态改变,也可见到细胞凋亡的特征性 DNA 梯形带。路莎莎^[15]报道氧化苦参碱对 K562 细胞 24 h 增殖的 IC_{50} 为 3.65 mmol/L。郝彩芹等^[34]报道氧化苦参碱 82.5、165、330、660 mg/L 对 K562 细胞增殖呈浓度和时间相关的抑制作用,并促进 K562 细胞凋亡,降低细胞集落形成率。王秀坤等^[18]报道氧化苦参碱在 1~100 mg/L 均可抑制 K562 细胞增殖,但增殖抑制率均在 40% 以下。

1.3 槐果碱等其他苦参碱类生物碱

槐果碱和氧化槐果碱在 1~100 mg/L 时都不抑制 K562 细胞增殖,但槐定碱和槐胺碱浓度在 100 mg/L 时能抑制 K562 细胞增殖,抑制率均在 40% 以下^[18]。曹东旭等^[35]报道槐果碱 0.1~1 g/L 浓度和时

间相关地抑制 K562 细胞增殖,高浓度槐果碱可使 K562 细胞呈现典型的细胞凋亡形态变化,并出现 DNA 梯形条带,使 K562 细胞周期滞留在 G_0/G_1 期,1 g/L 槐果碱作用 72 h 后, G_0/G_1 细胞比例由 38.0% 上升到 56.2%。林泽^[14]报道槐果碱和槐定碱对 K562 细胞 48 h 增殖的 IC_{50} 分别为 2.79、4.95 mmol/L。路莎莎^[15]报道槐果碱和槐定碱对 K562 细胞 24 h 增殖的 IC_{50} 均大于 3.2 mmol/L。孙莉^[13]采用短刺小克银汉霉菌微生物对苦参碱进行生物转化,获得 13-羟基苦参碱、13,14-二羟基苦参碱、12-羟基苦参碱、13-羰基苦参碱、12-羰基苦参碱,这 5 种苦参碱类化合物对 K562 细胞增殖的 IC_{50} 分别为 6.2、10.3、8.1、15.8、6.4 mmol/L;对 K562/ADM 的 IC_{50} 分别为 11.4、16.1、9.9、25.4、8.5 mmol/L。

2 诱导 K562 细胞分化

蒋纪恺团队^[24-28]报道苦参碱 0.001、0.01、0.1、1 g/L 都能诱导 K562 细胞分化,在培养 5 d 时诱导分化率达到最高(以联苯胺染色为指标,即 K562 细胞中出现血红蛋白)分别为 3%、7%、29%、15%,也就是说苦参碱在 0.001~0.1 g/L 的低浓度时浓度相关地促进 K562 细胞分化,且 0.1 g/L 时达到最高,以后随着浓度升高,诱导分化的作用逐渐减弱,而诱导凋亡的作用逐渐增强。苦参碱诱导的 K562 细胞形态特征:0.1 g/L 诱导 5 d 后,细胞体积减小、核浆比例降低、染色质聚集、核仁消失,类似于多色性幼红细胞和正色性幼红细胞,糖原染色呈强阳性,呈现出红系分化;0.2 g/L 苦参碱诱导 3 d 后,K562 细胞核浆比例明显缩小,6 d 后细胞体积减小,形态更规则、核仁开始消失,9 d 后核浆比例更小、核仁完全消失、胞浆内空泡出现;0.3 g/L 苦参碱诱导 3 d 后的 K562 细胞形态规则、核浆比例缩小、核仁仍可见,6 d 后细胞体积明显缩小、核染色质变致密、核仁消失、部分细胞浆内有大量空泡出现并伴随凋亡发生,9 d 后细胞凋亡及空泡更为明显,表明苦参碱诱导 K562 细胞分化与浓度及作用时间有关,0.2 g/L 苦参碱作用 6 d 后细胞向成熟方向分化,0.3 g/L 作用 6 d 后细胞有凋亡发生。

吕晓霞等^[21]和张翠梅等^[36]报道苦参碱在 0.05、0.1、0.2 g/L 浓度时诱导 K562 细胞向红系分化和凋亡,并认为与上调 K562 细胞内细胞周期调控蛋白 p27kip1 蛋白表达有关。何於娟等^[37]用 0.2 g/L 苦参碱作用于髓系 K562 细胞 6 d,发现能上调 K562 细胞表面分化抗原 CD33、CD15、CD27、CD14 表达,不影响 CD20 表达,由于 CD14 表达于红系细胞表面、

CD15 表达于粒系细胞表面、CD27 表达于 T 淋巴细胞表面、CD20 表达于 B 淋巴细胞表面,因此苦参碱能诱导骨髓造血细胞向髓系、红系、粒系及 T 淋巴系方向分化,其中诱导 CD15、CD27 的表达强度大于 CD14,希望今后加强苦参碱对粒系、T 淋巴系分化的研究。

郝彩芹等^[34]给正常小鼠连续 3 d 皮下注射氧化苦参碱 82.5、165、247.5、330、495、660 mg/kg,发现剂量在 82.5~247.5 mg/kg 时呈剂量相关性促进小鼠骨髓粒单祖细胞增殖,剂量大于 495 mg/kg 时剂量相关地抑制骨髓粒单祖细胞增殖。

3 抑制增殖、诱导分化和凋亡的作用机制

蒋纪恺团队对苦参碱抑制 K562 细胞增殖、诱导分化和凋亡的作用机制做了进一步研究。他们利用 mRNA 差异显示技术对 K562 细胞在苦参碱诱导前后的基因表达进行比较和分析,发现经 0.2 g/L 苦参碱作用后,从 K562 细胞中找到 17 条差异显示条带,对其中被苦参碱表达下调的 4 个条带进行序列分析和同源性比较,3 个条带克隆与已知蛋白质或蛋白酶的碱基序列高度同源,另一条带为未知的基因。前 3 个条带分别克隆与 NADH-泛醌还原酶 100% 同源,与单链 DNA 结合蛋白(SSBP)100% 同源,与人类核糖体蛋白 S11(RPS11)100% 同源,推测苦参碱可能通过下调细胞氧化呼吸链中的 NADH-泛醌还原酶表达,抑制细胞增殖;也可通过下调 SSBP 表达,阻滞 DNA 复制,抑制细胞增殖;也可通过下调 RPS11 表达,抑制某些蛋白质翻译过程,诱导 K562 细胞分化^[38-39]。该团队的张彦等^[40]采用基因芯片技术,发现 0.1 g/L 苦参碱作用 K562 细胞 3 h 后,出现 30 个差异表达基因,其中表达上调的基因有 21 个,主要涉及代谢相关蛋白基因、细胞受体等;表达下调有 18 个,包括抑癌基因、原癌基因、DNA 结合与转录因子、代谢相关蛋白基因、细胞信号转导基因等,并推测苦参碱可能是通过下调白介素-6、信号转导子和转录因子-3 激活剂(STAT3)的基因表达,抑制 K562 细胞增殖;通过抑制信号转导途径中的恶性增殖相关受体如 SORT1 基因表达,抑制肿瘤细胞生长;通过下调 DNA 结合、转录相关因子如 RNA 聚合酶-1 亚单位(ROA40)基因、转录起始因子-1A 蛋白(TIF-1A)基因、CLN3 基因表达,抑制 DNA 复制和转录,阻滞 K562 细胞增殖;通过下调细胞凋亡重要的诱发基因 bcl-2 拮抗蛋白-1(BAK1)基因表达,抑制 K562 细胞凋亡。

蒋纪恺团队^[26-27,41]发现苦参碱处理 K562 细胞均

能随着细胞分化的启动,使原癌基因 *c-myc*、*c-jun*、肝细胞核转录因子-1 α (*HNF-1\alpha*)表达明显下调,使 *H-ras*、*N-ras*、*p21*(系细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂)、*p53*的 mRNA 表达明显上调,同时也使细胞周期蛋白 D1、细胞周期蛋白依赖性激酶-5(*Cdk5*)表达明显上调。路莎莎^[15]也报道苦参碱下调 K562 细胞表达 *c-myc*、 β -链蛋白(β -*catenin*),伴随半胱天冬酶-9、半胱天冬酶-3 不同程度的激活,从而诱导细胞分化和抑制细胞增殖。黄凤霞等^[42]报道苦参碱浓度在 0.05、0.1、0.5、1 g/L 呈浓度和时间相关地下调 K562 细胞中的 *Cgi-100* 的基因表达,使 K562 细胞增殖受到抑制、细胞幼稚程度减少,即能诱导细胞分化。刘小珊等^[43]报道 0.4 g/L 苦参碱作用 K562 细胞 48 h 可上调 *LIGHT* 基因(即肿瘤坏死因子 SF14)表达。刘小珊等^[44]还报道苦参碱可降低伊马替尼单独作用 K562 细胞的联苯胺染色阳性细胞数以及转录因子 *GFi-1B* 的表达,显示出抑制伊马替尼作用 K562 细胞后的红系分化。张彦等^[45]报道 0.1 g/L 苦参碱显著降低 K562 细胞的弹性系数 *K1*、弹性系数 *K2* 和黏性系数 μ ,从而使 K562 细胞流变性增大,刚性减弱,从一个侧面证实苦参碱可诱导 K562 细胞向成熟方向分化。基因芯片技术发现苦参碱能上调与细胞骨架相关蛋白前折叠素类蛋白 *prefoldin* 和细胞骨架与细胞膜之间的连接蛋白 *ezrin* 的基因表达,并认为苦参碱可能提高促进 *prefoldin* 和 *ezrin* 表达,降低 K562 细胞的黏弹性系数而增大 K562 细胞流动性。

肿瘤细胞分化成熟的同时可伴有端粒酶活性下降。张莉萍等^[26,46]报道 0.1 g/L 苦参碱作用 K562 细胞 2 d 后出现端粒酶活性下降,5 d 后端粒酶活性明显降低,但苦参碱对端粒酶活性无直接抑制作用。李旭芬等^[47]报道苦参碱浓度(0.1、0.5、1、2 g/L)相关地抑制 K562 细胞人端粒酶逆转录酶(*hTERT*)基因表达和端粒酶活性(抑制率分别为 0.3%、13.0%、91.7%、98.6%),说明苦参碱即能诱导 K562 细胞分化也能促进细胞凋亡。李红波等^[48-49]报道受¹⁹²铀照射人员静滴 80 mg/d 苦参碱或受直线加速器照射的小鼠灌胃 8 mg/(kg·d)都可抑制因射线照射引起的骨髓细胞端粒酶活性升高,并促进细胞凋亡。

刘北忠等^[50]采用不同浓度的苦参碱作用 K562 细胞 5 min 后,测定总蛋白酪氨酸激酶活性,发现苦参碱浓度小于 0.1 g/L 时浓度相关地抑制酶活性,浓度大于 0.1 g/L(如 0.1~1 g/L)时酶活性抑制无明显

差异,即不再增强。0.1 g/L 时活性抑制率最大,为 26.8%,由于抑制膜相蛋白酪氨酸激酶活性先于胞浆内的蛋白酪氨酸激酶,提示有一个信号的跨膜转运过程,同时伴有蛋白酪氨酸磷酸酶活性的相应变化,提示细胞内的蛋白酪氨酸残基磷酸化与去磷酸化的即时调节机制。苦参碱类生物碱均有抑制前列腺素合成作用^[8-11],其中苦参碱已被证实是通过抑制磷脂酶 *A₂* 和环氧化酶,阻滞前列腺素合成^[8]。可是刘北忠等^[51]报道 0.1 g/L 苦参碱作用 K562 细胞,短时间内不影响前列腺素合成,但至第 2 天时升高前列腺素 *E₂* 浓度,以后又逐渐恢复正常,且苦参碱浓度(0.1~0.6 g/L)相关地触发 K562 细胞外前列腺素 *E₂* 浓度升高,并认为苦参碱是通过激活磷脂酶 *A₂* 活性,引起前列腺素 *E₂* 浓度升高,从而影响 K562 细胞增殖。由于成熟红细胞并无合成前列腺素 *E₂* 的酶系,推测苦参碱诱导 K562 细胞向红系的分化并不彻底,且可能有多向分化的存在。

4 逆转 K562 细胞的耐药性

在前文中已经提到苦参碱类生物碱对耐阿霉素的 K562 细胞增殖也有抑制作用,但与对敏感的 K562 细胞比较,IC₅₀ 均有一定的增大^[13,16-17],对耐长春新碱的 K562 细胞的 IC₅₀ 也增大^[17],也就是说耐药 K562 细胞对苦参碱类生物碱也可产生一定程度的耐药,但苦参碱和氧化苦参碱能逆转耐药 K562 细胞的耐药性,提高对化疗药的敏感性。

陈超等^[52]报道单用阿霉素对敏感 K562 细胞和 K562/ADM 细胞的 IC₅₀ 分别为 6.6、489.2 μ g/L,如将 30 mg/L 苦参碱与阿霉素联用,阿霉素的 IC₅₀ 分别降为 5.3 μ g/L 和 63.3 μ g/L,苦参碱增强阿霉素对 K562/ADM 细胞的抑制作用远强于对敏感 K562 细胞,逆转耐药倍数达到 7.73 倍。阿霉素对敏感 K562 细胞表达 *p27*(细胞周期蛋白依赖性激酶-2 抑制剂)和 P-糖蛋白(*P170*)的表达率分别为 83.1% 和 0.61%;对 K562/ADM 细胞表达 *p27* 的表达率降为 33.1%,对 *P170* 蛋白的表达率上调至 6.51%;苦参碱不明显影响阿霉素对敏感 K562 细胞表达 *p27* 和 *P170*,但能显著上调阿霉素对 K562/ADM 细胞表达 *p27*(62.1%),下调 *P170* 蛋白表达(5.13%);苦参碱也能使阿霉素在 K562/ADM 细胞中的积累比率由 5.1% 升高到 11.6%,因此苦参碱可通过下调 P-糖蛋白的表达,阻滞 K562/ADM 细胞内的阿霉素外排至细胞外,提高细胞内的化疗药浓度,逆转耐药;还可通过上调 *p27* 表达,增强阿霉素抑制 K562/ADM 细胞增殖作用。张虹丽^[16]报道苦参碱还可通过提高 K562 和 K562/

ADM细胞表面MICA(系一种自然杀伤细胞活化受体的配体)表达率(分别提高1.52倍和2.69倍),增强自然杀伤细胞对K562和K562/ADM细胞的杀伤活性,即提高K562和K562/ADM细胞对自然杀伤细胞的杀伤敏感性。马玲娣等^[53]报道苦参碱还能上调K562细胞表面自然杀伤细胞活化受体的另外2种配体(ULBP2和ULBP3)表达,但不能上调耐药K562/AO2细胞表面表达自然杀伤细胞活化受体的配体。

王双等^[54]报道苦参碱0.5、0.75、1 g/L浓度相关地抑制多药耐药K562/AO2细胞增殖,提高细胞凋亡率和下调Bcl-2表达,也能浓度相关地增强阿霉素对K562/AO2细胞的抑制作用、促进细胞凋亡和明显降低Bcl-2表达。王双等^[55]还报道非细胞毒浓度的甲孕酮(10 mg/L)和苦参碱(50 mg/L)分别于阿霉素联用,可使单用阿霉素的K562/AO2细胞凋亡率由0.15%分别提高至8.8%和9.8%,3药联用凋亡率进一步提高至18.8%;使K562/AO2细胞中的P-糖蛋白由单用阿霉素时的89.0%分别降至85.0%(下降4.5%)和76.6%(下降20.5%),3药联用进一步降至68.9%(下降36.6%);甲孕酮、苦参碱均能提高K562/AO2细胞内阿霉素浓度,2药联用进一步提高阿霉素进入K562/AO2细胞的浓度。因此苦参碱可通过抑制K562/AO2细胞过度表达P-糖蛋白,阻滞K562/AO2细胞外排化疗药,从而增强化疗药的抗癌作用。桂琳等^[56]报道阿霉素对K562和K562/AO2细胞的 IC_{50} 分别为0.398 mg/L和33.31 mg/L,说明K562/AO2细胞对阿霉素耐药。如联用200 mg/L苦参碱可使 IC_{50} 值降至9.44 mg/L,凋亡率明显提高,使P-糖蛋白和环氧化酶的基因和蛋白表达明显下调,而环氧化酶-2抑制剂塞来昔布能进一步加强苦参碱的上述作用,提示苦参碱可通过下调环氧化酶-2和P-糖蛋白,逆转K562/AO2细胞的多药耐药,提高化疗药的抗癌作用。

氧化苦参碱在50 mg/L的非细胞毒浓度可显著降低阿霉素对K562/AO2细胞的 IC_{50} ,使 IC_{50} 由原来的34.9 mg/L降至13.3 mg/L,逆转耐药倍数达到2.62倍,使P-糖蛋白的表达从90.2%下调至44.2%,并能抑制K562/AO2细胞将柔红霉素泵出细胞外,与苦参碱一样通过抑制P-糖蛋白的表达,提高化疗药在白血病细胞中的浓度,逆转K562/AO2细胞的多药耐药,增强化疗药的抗癌作用^[57]。

路莎莎^[15]报道苦参碱浓度相关地抑制耐伊马替尼的K562/G细胞增殖并诱导凋亡。 IC_{50} 为1.48

mmol/L,与其对敏感K562细胞的 IC_{50} (1.37 mmol/L)接近。杨春秀等^[22]报道苦参碱0.75 mg/L能增强3 μ mol/L三氧化二砷抑制K562细胞增殖的作用;能增强三氧化二砷将K562细胞周期滞留在 G_2 期,减少S期细胞数,进一步上调p21(系细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂)蛋白表达,下调细胞周期蛋白D1、细胞周期蛋白依赖性激酶-4的蛋白表达,而苦参碱自己使K562细胞周期滞留在 G_1 期的作用被三氧化二砷对抗。

胡美薇等^[58]最近报道苦参碱抑制K562细胞和耐伊马替尼的K562/IM细胞增殖的 IC_{50} 分别为0.54 g/L和1.57 g/L,均能上调这2种癌细胞的自噬标志物Beclin-1和LC3-II/I表达,下调p62蛋白表达。0.4 g/L苦参碱与自噬抑制剂3-甲基腺嘌呤联用可使单用苦参碱对K562/IM细胞的增殖抑制率由13.50%升高至65.25%,凋亡率由13.12%升高至21.70%,并使Beclin-1及LC3-II/I蛋白表达下降,p62和半胱天冬酶-3表达增强,提示苦参碱在抑制K562细胞和K562/IM细胞增殖的同时,可诱导自噬,自噬抑制剂可增强K562细胞对苦参碱的敏感性,提高苦参碱的抗肿瘤作用。

5 结语

苦参碱类生物碱能抑制人红白血病K562细胞增殖并诱导分化和凋亡,可是相关研究都是在体外进行,且诱导分化的作用仅见于苦参碱一种,因此今后抗K562细胞研究不仅应该扩大到其他苦参碱类化合物,还应该进行体内的抗K562作用,以便可能找到优于苦参碱的药物。其诱导分化和凋亡及抑制增殖的机制可能是多方面的,可能与下调原癌基因c-myc、c-jun,肝细胞核转录因子-1 α (HNF-1 α),生存素,人端粒酶逆转录酶(hTERT)表达和抑制端粒酶活性;上调H-ras、N-ras、p21、p53、LIGHT,细胞周期蛋白D1,细胞周期蛋白依赖性激酶-5(Cdk5),细胞骨架相关蛋白prefoldin、ezrin表达有关。苦参碱类生物碱还可能通过下调P-糖蛋白、环氧化酶-2和Bcl-2表达,上调p27表达,解除K562细胞的多药耐药性,提高K562细胞对化疗药的敏感性,因此苦参碱类生物碱与化疗药联用治疗耐药K562白血病,可产生增效减毒效果。

参考文献

- [1] 张明发,沈雅琴. 苦参碱类生物碱抗乙型肝炎病毒的临床药理作用的研究进展[J]. 抗感染药学, 2018, 15(1): 1-6.
- [2] 张明发,沈雅琴. 苦参碱类生物碱抗病毒的临床药理作

- 用研究进展 [J]. 抗感染药理学, 2018, 15(2): 185-191.
- [3] 张明发, 沈雅琴. 苦参碱类生物碱抗菌药理作用研究进展 [J]. 抗感染药理学, 2018, 15(3): 369-374.
- [4] 张明发, 沈雅琴. 苦参碱类生物碱抗真菌和抗寄生虫药理作用研究进展 [J]. 抗感染药理学, 2018, 15(4): 553-556.
- [5] 张明发, 沈雅琴. 苦参碱类生物碱的镇痛作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(5): 904-911.
- [6] 张明发, 沈雅琴. 还原型苦参碱类生物碱的中枢抑制和神经保护作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(8): 1541-1547.
- [7] 张明发, 沈雅琴. 氧化苦参碱的中枢抑制和神经保护作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(10): 1916-1923.
- [8] 张明发, 沈雅琴. 苦参碱抗炎和免疫抑制药理作用的研究进展 [J]. 抗感染药理学, 2018, 15(5): 737-742.
- [9] 张明发, 沈雅琴. 苦参碱类生物碱抗肉瘤药理作用的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(11): 2117-2122.
- [10] 张明发, 沈雅琴. 槐定碱、氧化槐定碱、13 α -羟基苦参碱抗炎和免疫抑制作用的研究进展 [J]. 抗感染药理学, 2018, 15(6): 921-925.
- [11] 张明发, 沈雅琴. 槐果碱类生物碱及槐胺碱的抗炎和免疫抑制作用的研究进展 [J]. 抗感染药理学, 2018, 15(7): 1111-1115.
- [12] 张明发, 沈雅琴. 苦参碱类生物碱的毒性研究进展 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(4): 682-691.
- [13] 孙 莉, 钱生勇, 冒小平, 等. 苦参碱衍生物的生物转化制备及其抗肿瘤活性研究 [J]. 药学与临床研究, 2017, 25(1): 24-26.
- [14] 林 泽. 槐属植物中药生物碱抗肿瘤作用机制研究 [D]. 汕头: 汕头大学, 2011.
- [15] 路莎莎. 苦参碱抗慢性粒细胞白血病作用及其分子机制研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2014.
- [16] 张虹丽. 苦参碱对K562及K562/ADM细胞MICA表达及NK细胞杀伤敏感性的影响 [D]. 兰州: 兰州大学, 2012.
- [17] 李旭芬, 张苏展, 郑 树, 等. 苦参碱对K562及其多药耐药细胞K562/vin、K562/dox的诱导凋亡作用 [J]. 实用癌症杂志, 2000, 15(6): 566-568, 609.
- [18] 王秀坤, 李家实, 魏璐雪, 等. 白刺花生物碱的体外抑瘤作用 [J]. 北京中医药大学学报, 1996, 19(2): 59-60.
- [19] 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.
- [20] 蔺晓康, 姜西玲, 张晓晖. 苦参碱对白血病细胞K562和JM诱导凋亡作用的研究 [J]. 西北药学杂志, 2003, 18(5): 211-213.
- [21] 吕晓霞, 蒋丽佳, 范 静, 等. 苦参碱抑制慢性粒细胞白血病K562细胞生长和诱导凋亡作用研究 [J]. 现代中西医结合杂志, 2010, 19(2): 147-150.
- [22] 杨春秀, 田祖国, 石耿辉, 等. 三氧化二砷联合苦参碱抑制K562细胞增殖及机制研究 [J]. 医学研究杂志, 2018, 47(1): 138-142.
- [23] 王林中, 邹典定, 赵东赤. 苦参碱诱导K562细胞凋亡与survivin基因表达的相关性研究 [J]. 实用中医内科杂志, 2005, 19(2): 108-109.
- [24] 何於娟, 蒋纪恺, 张 彦, 等. 苦参碱对K562细胞增殖抑制与诱导分化的实验研究 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2000, 11(4): 219-221.
- [25] 张莉萍, 蒋纪恺, 张彦, 等. 苦参碱对K562细胞增殖与分化作用的机制研究 [J]. 中华血液学杂志, 1999, 20(6): 315-316.
- [26] Zhang L P, Jiang J K, Tam J W O, et al. Effects of matrine on proliferation and differentiation in K562 cells [J]. Leuk Res, 2001, 25(9): 793-800.
- [27] 张莉萍, 蒋纪恺, Tam J. 苦参碱对白血病细胞癌基因和细胞周期调控蛋白表达的影响 [J]. 中国肿瘤临床, 2001, 28(5): 347-350, 360.
- [28] 张 彦, 蒋纪恺, 刘小珊, 等. 苦参碱诱导K562白血病细胞分化和凋亡的实验研究 [J]. 癌症, 2000, 19(8): 756-758.
- [29] 戴碧涛, 蒋纪恺, 王付丽, 等. 苦参碱联合抗肿瘤药抑制K562细胞增殖的研究 [J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(5): 392-394.
- [30] 林淑仪. 苦参碱、川芎嗪抑制低氧培养后白血病细胞侵袭转移作用的实验研究 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2011.
- [31] 李春炎, 杨 兵, 曲洪浩, 等. 氧化苦参碱对K562肿瘤细胞增殖的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2009, 9(4): 645-647.
- [32] 黄素培. 康艾注射液和苦参碱注射液对不同肿瘤细胞增殖的抑制作用 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2012, 12(8): 712-715.
- [33] 郭宏伟, 王 芳, 牛志英, 等. 氧化苦参碱对人红白血病K562细胞株凋亡作用的研究 [J]. 宁夏医科大学学报, 2011, 33(10): 924-927.
- [34] 郝彩芹, 李 静, 李兴玉, 等. 氧化苦参碱对骨髓来源细胞生长的双向调节作用 [J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(21): 4016-4022.
- [35] 曹东旭, 元英进. 槐果碱对人红白血病K562细胞的增殖抑制和诱导凋亡作用 [J]. 天津科技大学学报, 2006, 21(4): 33-36.
- [36] 张翠梅, 高建慧, 李德乐, 等. 苦参碱诱导K562细胞向红系分化伴随凋亡 [J]. 南方医科大学学报, 2008, 28(3): 478-480.
- [37] 何於娟, 蒋纪恺, 张 彦, 等. 苦参碱作用K562细胞表面分化抗原表型的改变 [J]. 中草药, 2001, 32(8): 730-731.
- [38] 刘北忠, 蒋纪恺, 何於娟, 等. 改良DDRT-PCR研究苦参碱诱导K562细胞分化相关的差异表达基因 [J]. 中国生

- 物化学与分子生物学报, 2003, 19(3): 338-390.
- [39] 何於娟, 蒋纪恺, 张彦, 等. 苦参碱诱导K562细胞分化的差异表达基因的研究 [J]. 中草药, 2005, 36(2): 224-2268.
- [40] 张彦, 马凌娣, 蒋纪恺, 等. 苦参碱诱导K562细胞分化早期的基因表达分析 [J]. 中华血液学杂志, 2004, 25(6): 342-345.
- [41] 何於娟, 蒋纪恺, 刘小珊, 等. 苦参碱对K562细胞早期原癌基因表达的影响 [J]. 癌症, 2002, 21(4): 369-372.
- [42] 黄凤霞, 张彦, 王伟佳. 苦参碱对K562细胞Cgi-100基因表达和细胞增殖的影响 [J]. 中国实验血液学杂志, 2008, 16(3): 525-530.
- [43] 刘小珊, 蒋纪恺. 苦参碱对K562细胞LIGHT基因表达的影响 [J]. 中国肿瘤, 2008, 17(2): 116-118.
- [44] 刘小珊, 蒋纪恺. 苦参碱联合伊马替尼对K562细胞红系分化的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2008, 17(1): 1-2.
- [45] 张彦, 刘小珊, 蒋纪恺, 等. 苦参碱对K562细胞骨架的作用观察 [J]. 重庆医科大学学报, 2002, 27(4): 386-387, 390.
- [46] 张莉萍, 蒋纪恺, 刘小珊, 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.
- [47] 李旭芬, 张苏展, 郑树, 等. 苦参碱对K562细胞端粒酶hTERT-mRNA表达及其酶活性影响作用的研究 [J]. 癌症, 2001, 20(4): 391-393.
- [48] 李红波, 肖扬, 蒋祖军, 等. 苦参碱对受¹⁹²钷照射人员骨髓细胞端粒酶活性及细胞凋亡的影响 [J]. 实用医学杂志, 2011, 27(24): 4373-4375.
- [49] 李红波, 肖扬, 李力, 等. 苦参碱对低剂量照射小鼠骨髓细胞端粒酶活性及细胞凋亡的影响 [J]. 华南国防医学杂志, 2011, 25(4): 284-288.
- [50] 刘北忠, 蒋纪恺, 何於娟, 等. 苦参碱诱导K562细胞酪氨酸激酶与磷酸酶的活性改变 [J]. 中草药, 2003, 34(1): 48-51.
- [51] 刘北忠, 蒋纪恺, 何於娟, 等. 苦参碱对K562细胞培养液中PGE2含量的影响 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2002, 12(11): 669-670.
- [52] 陈超, 蔡天革, 张荣华, 等. 6种中药活性成分对K562/ADM耐药性逆转及p27和P170蛋白表达影响 [J]. 中成药, 2014, 36(1): 1-4.
- [53] 马玲娣, 卢绪章, 朱志超, 等. 苦参碱对白血病细胞NKG2D配体表达的作用研究 [J]. 中国实验血液学杂志, 2013, 21(6): 1429-1434.
- [54] 王双, 陈祥明. 苦参碱联合阿霉素对耐药白血病K562/AO2细胞株凋亡及Bcl-2表达的影响 [J]. 社区医学杂志, 2014, 12(6): 30-32.
- [55] 王双, 梁军. 甲孕酮联合苦参碱对耐药细胞株K562/AO2多药耐药逆转作用的研究 [J]. 泰山医学院学报, 2008, 29(3): 201-204.
- [56] 桂琳, 李静, 陈宝安, 等. 环氧化酶-2抑制剂联合苦参碱逆转K562/AO2细胞多药耐药的研究 [J]. 东南大学学报: 医学版, 2012, 31(2): 174-178.
- [57] 彭向前, 张文会, 李军. 氧化苦参碱逆转多药耐药细胞系K562/AO2耐药性的研究 [J]. 中国肿瘤临床, 2008, 35(19): 1127-1130.
- [58] 胡美微, 傅丽娟, 范翠, 等. 苦参碱诱导人白血病耐药细胞K562/IM自噬和凋亡的研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2018, 38(2): 213-218.