

芸香苷诱导 K562 细胞凋亡机制

陈立军, 靳秋月, 王瑞珉, 王 玮, 呼文亮, 陈 虹

(中国人民武装警察部队医学院 生化教研室, 天津 300162)

摘 要:目的 研究芸香苷诱导白血病 K562 细胞凋亡过程中 caspase-3 基因及细胞色素 C 的表达。方法 体外培养白血病 K562 细胞, MTT 法观察细胞毒作用, 测定 IC_{50} , Hoechst 33342/PI 双荧光染色后, 荧光显微镜下观察细胞核形态, 流式细胞仪检测细胞周期, TRIZOL 试剂提取 K562 细胞 RNA, 核酸定量仪检测纯度, RT-PCR 扩增, 紫外透射检测扩增产物, 扩增产物测序, 观察 caspase-3 的表达, 4×10^{-5} mol/L 药物处理细胞后, 分离细胞线粒体和胞浆, 经 SDS-PAGE 电泳分离蛋白, Western blotting 检测线粒体、细胞浆细胞色素 C 表达。结果 芸香苷浓度为 2×10^{-5} 、 4×10^{-5} 、 8×10^{-5} mol/L 时, 细胞生长受到显著抑制, 并呈剂量依赖性; 不同浓度芸香苷处理 K562 细胞 44 h 后, 应用 MTT 比色法计算 IC_{50} 为 4×10^{-5} mol/L; 4×10^{-5} mol/L 芸香苷处理细胞 24 h 后, Hoechst 33342/PI 双荧光染色可观察到明显核固缩、凝集等细胞凋亡表现; 流式细胞仪检测芸香苷处理后 G_2 期细胞显著增多 (64.7%), DNA 合成受抑, 凋亡率增加; PCR 产物经过琼脂糖凝胶电泳, 紫外透射仪下明显观察到 500 bp 条带, 产物经过序列测定证实芸香苷处理细胞诱导 caspase-3 基因的表达; Western Blotting 检测线粒体细胞色素 C 表达水平下调, 细胞浆出现明显细胞色素 C 蛋白条带。结论 芸香苷诱导 K562 细胞 caspase-3 基因表达, 细胞色素 C 通过线粒体膜进入胞浆, 导致细胞线粒体功能异常, 细胞发生凋亡, 线粒体途径诱导白血病细胞凋亡是其作用机制之一。

关键词: 芸香苷; caspase-3; 细胞凋亡; 细胞色素 C

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)05-0738-04

Mechanism of rutoside inducing apoptosis in K562 cells

CHEN Li-jun, JIN Qiu-yue, WANG Rui-min, WANG Wei, HU Wen-liang, CHEN Hong

(Department of Biochemistry, Medical College of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China)

Key words: rutoside; caspase-3; apoptosis; cytochrome C

芸香苷是食物中常见的类黄酮物质, 属黄酮醇类, 研究发现, 黄酮类化合物具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、抗病毒、抗心血管疾病、免疫调节等作用。黄酮类化合物结构中每个苯环可连接羟基、糖基或多糖等取代基, 由于糖的种类及连接位置不同, 可以形成各种黄酮苷。本课题组组合成了具有较强阻滞癌细胞增殖作用且水溶性良好的芸香糖苷 (芸香苷), 并探讨其诱导肿瘤细胞凋亡过程中细胞色素 C 及 caspase-3 基因的表达。

1 材料与方法

1.1 药品及仪器: 芸香苷 (自制, 质量分数 $\geq 99\%$, 用时现配, 以不含胎牛血清的 RPMI-1640 培养基溶解稀释至所需浓度), Hoechst 33342 (美国 Sigma 产品), PI (美国 Sigma 产品); 荧光显微镜 (Nikon), 核酸定量仪 (英国, Biochro), 流式细胞仪 (标本固定后送外检), 全自动酶标仪 (美国, 伯乐), 恒温 CO_2 培养箱 (美国, FORMA)。

1.2 细胞形态学观察

1.2.1 细胞及细胞培养: 人红白血病细胞 (K562), 培养于含 10% 小牛血清、100 U/L 青霉素、80 U/L 链霉素的 RPMI-1640 (pH 7.2) 培养基中, $37^\circ C$ 、5% CO_2 恒温培养箱中孵育生长。

1.2.2 生长曲线的制备: 取对数生长期的 K562 细胞制成细胞悬液, 调整细胞数为 5×10^4 /mL, 接种于 25 mL 培养瓶中, 每组设平行瓶, 于接种同时给药, 药物浓度分别为 2×10^{-5} 、 4×10^{-5} 、 8×10^{-5} mol/L, 对照组加等体积不含胎牛血清的 RPMI-1640 培养基, 于 $37^\circ C$ 、5% CO_2 孵育箱中培养, 每天随机抽取实验组及对照组各 3 瓶细胞, 按台盼蓝拒染法染色, 光镜下计数活细胞, 取均值, 以时间为横坐标, 每 mL 活细胞数为纵坐标作图得生长曲线。

1.2.3 MTT 法观察细胞毒作用: 调整 K562 细胞浓度为 5×10^4 /mL, 于对数生长期接种于 96 孔板, 每孔加 200 μ L 细胞悬液, 培养 24 h 后, 实验组分别

收稿日期: 2005-09-15

作者简介: 陈立军 (1967—), 女, 天津市人, 武警医学院生化教研室副教授, 主要从事肿瘤分子生物学研究。

Tel: (022) 60578076 E-mail: chenlijun67@eyou.com

加入 2×10^{-5} 、 4×10^{-5} 、 8×10^{-5} mol/L 的芸香苷,另设对照组(加入 200 μ L 细胞悬液,不加药)和空白组(只加 200 μ L 培养基),每组设 4 个复孔,培养 44 h,加 MTT 20 μ L (5 mg/mL),4 h 后离心,弃上清,加入 DMSO 200 μ L,充分振荡 10 min,用全自动酶标仪(波长 570 nm)测定各孔吸光度(A)值,计算细胞生长抑制率。

细胞生长抑制率 = $(A_{\text{对照}} - A_{\text{实验}}) / A_{\text{对照}} \times 100\%$

1.2.4 Hoechst 33342/PI 双荧光染色观察细胞形态:称取 Hoechst 33342、PI 各 1 mg,分别溶于 10 mL DMSO 和 pH 7.2 PBS 中,配成 100 μ g/mL 的储备液,用前等量混合。细胞经药物(4×10^{-5} mol/L)处理 24 h,分别收集细胞,每个标本取 200 μ L 移入 Eppendroff 管中,加入荧光染料 Hoechst 33342 至终浓度 10 μ g/mL,PI 50 μ g/mL,37 $^{\circ}$ C 下染色 15 min,取 40 μ L 细胞悬液迅速滴在载玻片上加盖玻片,在荧光显微镜下观察结果。

1.2.5 流式细胞仪(FCM)测定:K562 细胞在 80% 乙醇中固定,于 -20 $^{\circ}$ C 过夜,经磷酸钠-柠檬酸缓冲液(pH 7.8)低渗处理,Rnase A 消化,PI 染色,FCM 检测。

1.3 细胞凋亡机制探讨

1.3.1 总 RNA 的提取:用 2×10^{-5} 、 4×10^{-5} mol/L 的芸香苷分别处理细胞,另设对照组,每组细胞设平行瓶,分别培养 16、20、24 h 后,离心收集细胞。用 TRIZOL 试剂提取细胞总 RNA,操作中尽可能避免 RNA 酶的污染,在低温环境下快速完成。取部分样品稀释,核酸定量仪测定 A_{260}/A_{230} 与 A_{260}/A_{280} 的值,鉴定总 RNA 的纯度。

1.3.2 RT-PCR:根据 Gene Bank 提供的 caspase-3 (序号:U26943)与 β -actin (序号:X63432)的核酸序列,利用计算机软件辅助设计两对引物,上海生工合成。Caspase-3 引物:上游 5'-GTGGAATTGATGCGTGATG3',下游 5'-GGAATCTGTTTCTTTGCATG3',扩增产物 500 bp; β -actin 引物:上游 5'-GCACCACACCTTCTACAATG3',下游 5'-GTGGTGAAGCTGTAGC3',扩增产物 350 bp。取总 RNA 各 2 μ g,按试剂说明书组成 20 μ L 逆转录反应体系,合成 cDNA 第 1 链。PCR 50 μ L 反应体系:cDNA 4 μ L,10 $\times$ PCR 缓冲液(含 $MgCl_2$)5 μ L,10 mmol/L dNTP 1 μ L,caspase-3 与 β -actin 上下游引物各 50 pmol,2 U/ μ L Taq 酶 1 μ L,加 ddH₂O 至 50 μ L。反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,再 30 个循环(94 $^{\circ}$ C、45 s,56 $^{\circ}$ C、45 s,72 $^{\circ}$ C、45 s),

72 $^{\circ}$ C 充分延伸 5 min。扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳后,紫外透射仪下观察结果。

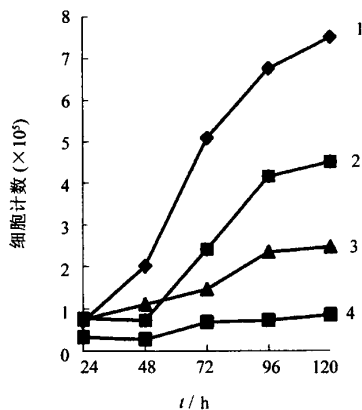
1.3.3 分离纯化线粒体:取 1×10^9 个以 4×10^{-5} mmol/L 芸香苷处理过的 K562 细胞,PBS 洗涤后,用 11 mL 预冷的 RSB 溶液[10 mmol/L NaCl,2.5 mmol/L $MgCl_2$,10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)]悬浮细胞,转移到 15 mL 的匀浆器中,作用 10 min,研磨数次,使细胞膨胀破碎。加 8 mL 2.5 $\times$ MS 缓冲液[525 mmol/L 甘露醇,175 mmol/L 蔗糖,12.5 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5),2.5 mmol/L EDTA (pH 7.5)]混匀。将匀浆转至离心管中,加 1 $\times$ MS 缓冲液[210 mmol/L 甘露醇,70 mmol/L 蔗糖,5.0 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5),1.0 mmol/L EDTA (pH 7.5)]至 30 mL。1 300 $\times g$ 离心 5 min,取上清于另一离心管,17 000 $\times g$ 离心 15 min,上清为胞浆成分留用,沉淀以 1 $\times$ MS 悬浮,17 000 $\times g$ 离心 15 min,上清与前步合并备用,线粒体沉淀加在事先准备好密度梯度的蔗糖溶液(1.5 mol/L 和 1.0 mol/L)的表面上,60 000 $\times g$ 离心 20 min,取两浓度蔗糖之间的线粒体薄层,用 0.25 mol/L 蔗糖溶液悬浮线粒体,17 000 $\times g$ 离心 15 min,线粒体沉淀以 1 $\times$ MS 缓冲液悬浮备用。

1.3.4 SDS-PAGE 电泳:把 15 mL 15% 的分离胶注入事先准备好的玻璃板间隙,留出浓缩胶的空间,上面覆一层去离子水。聚合完成后,倒出水,加入 4 mL 配制好的浓缩胶,插好梳子。浓缩胶聚合好后,拔去梳子,用去离子水洗梳孔,按次序加入处理过的样品(样品与加样缓冲液混匀,100 $^{\circ}$ C,3 min)10 μ L,加入蛋白质分子量标准。电泳开始时,电压为 100 V,染料进入分离胶后,电压为 180 V。染料抵达分离胶底部时,停止电泳,取下凝胶备用。

1.3.5 Western Blotting:剪 6 张与电泳凝胶大小一致的 3 mm 滤纸和一张硝酸纤维素膜(NC 膜),滤纸和 NC 膜用转移缓冲液(39 mmol/L 甘氨酸,48 mmol/L Tris-HCl,0.037% SDS)浸泡 5 min,把滤纸、凝胶、膜依次放在半干电转移仪内,转膜电流为 0.2 A。转好的 NC 膜室温干燥 50 min,将 NC 膜放在封闭液中室温振荡 1 h。把 NC 膜放在塑料袋中,并加入稀释好的一抗(0.1 mL/cm²膜)4 $^{\circ}$ C,轻轻振荡 2 h。将膜取出用 PBS 漂洗 3 次,每次各 10 min;加入稀释好的二抗(0.1 mL/cm²膜)室温轻轻振荡 1 h。取出 NC 膜,漂洗液(150 mmol/L NaCl,50 mmol/L Tris-HCl)洗 3 次,每次 10 min,加入配制好的 DAB 显色液,观察条带,照像。

2 结果

2.1 不同浓度芸香苷对 K562 细胞生长的影响:与对照组相比,芸香苷浓度为 2×10^{-5} 、 4×10^{-5} 、 8×10^{-5} mol/L 时,细胞生长受到抑制,并呈剂量依赖性(图 1)。



1-对照组 2~4-芸香苷 2×10^{-5} 、 4×10^{-5} 、 8×10^{-5} mol/L

1-control 2-4-rutoside 2×10^{-5} , 4×10^{-5} , and 8×10^{-5} mol/L

图 1 不同浓度芸香苷作用于 K562 细胞的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of K562 cells treated with rutoside in various concentrations

2.2 芸香苷对 K562 细胞的细胞毒作用:芸香苷处理 K562 细胞 44 h 后,细胞生长受到抑制,该药物对 K562 细胞的 IC_{50} 值为 4×10^{-5} mol/L。 2×10^{-5} 、 4×10^{-5} 、 8×10^{-5} mol/L 组抑制率分别为 20.3%、53.2%、92.6%,与对照组比较差异有显著性 ($P < 0.01$)。

2.3 Hoechst 33342/PI 双荧光染色观察细胞形态:芸香苷处理细胞 24 h 后,Hoechst 33342/PI 双荧光染色,荧光显微镜下观察到 4 种形态细胞:核结构正常的活细胞染成蓝色;部分死亡细胞染成红色,核呈正常结构;部分细胞染成蓝色,核呈固缩块或圆珠状;部分细胞也被染成红色,但可见明显的染色质凝集;后两种细胞出现明显的细胞凋亡表现,镜下计数细胞比例占约 60%。

2.4 流式细胞仪 (FCM) 测定:对照组出现典型肿瘤细胞系特征,处于 S 期的细胞占 60.2%, G_2 期细胞 6.8%,芸香苷加药组 S 期细胞减少仅占 20.6%, G_2 期细胞大量增加为 64.7%,表明芸香苷可显著抑制肿瘤细胞增殖。

2.5 总 RNA 的提取结果:核酸定量检测,所提取的总 RNA 的 A_{260}/A_{230} 为 1.7, A_{260}/A_{280} 为 1.9,无异硫氰酸盐类与蛋白质的污染,其质量浓度约为 $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

2.6 RT-PCR 结果: 4×10^{-5} mol/L 的芸香苷处理 K562 细胞 24 h 后,经逆转录后 PCR 扩增检测到 caspase-3 基因的表达(图 2)。

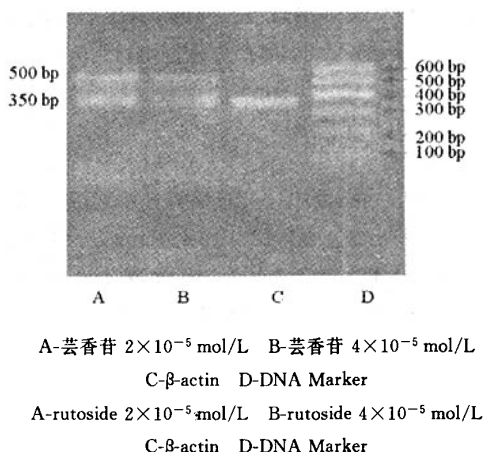


图 2 RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 2 Agrose gel electrophoresis of RT-PCR product

2.7 Western Blotting 检测结果:SDS-PAGE 电泳结果经转膜后,DAB 显色,硝酸纤维素膜上在细胞色素 C 的相应位置上出现单一的棕褐色条带,对应加样泳道可知,经芸香苷处理细胞后胞浆中有细胞色素 C 的表达,线粒体中细胞色素 C 的表达下调(图 3)。

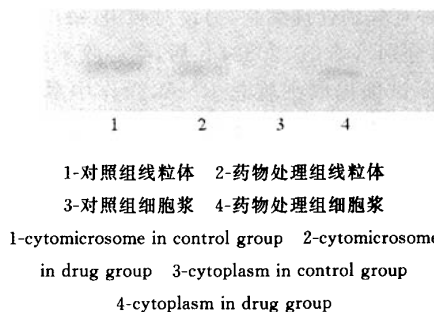


图 3 K562 细胞细胞色素 C 表达 Western blotting 结果

Fig. 3 Expression of cytochrome C in K562 cell assayed by Western blotting

3 讨论

细胞凋亡是一个基因调节的主动过程,是调节体内细胞数量的生理机制。肿瘤的发生、发展与细胞凋亡有关。随着对白血病细胞凋亡基因调控的研究,已经证明多种化疗药物是通过诱导白血病细胞凋亡而起作用的。很多研究表明黄酮类诱导肿瘤细胞凋亡的机制可能是:①与诱发抗凋亡基因 Bcl-2 的蛋白发生降解有关^[1];②抑制酪氨酸蛋白激酶 (PTP)、蛋白激酶 (PKC) 和 RNA 聚合酶,阻断细胞的 G_1 晚期或使细胞聚集于 G_2 -M 期,从而抑制肿

瘤细胞生长^[2];③促进线粒体细胞色素 C 释放入胞质,激活相关 caspase 激酶和引起 PARP 蛋白降解,促进细胞凋亡的级联反应过程^[3];④通过抑制 PKC 上调 iNOS 的表达,iNOS 的过量表达引发 caspase-3 表达^[4]。芸香苷具有广泛的生物学活性,既可抑制脂质过氧化、抑制血小板聚集、抑制环氧化酶、对实验性急性胰腺炎具有一定的保护作用,又能够抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡。本实验通过 RT-PCR 法证实芸香苷在诱导 K562 细胞凋亡过程中激活了效应蛋白酶 caspase-3 的表达,Western-blotting 检测到胞浆中细胞色素 C 的表达,表明细胞色素 C 促进线粒体细胞色素 C 释放入胞质,激活相关 caspase 激酶,促进细胞凋亡的级联反应过程,诱导肿瘤细胞凋亡。芸香苷诱导实体瘤和白血病细胞凋亡的其他

详细机制还有待于进一步研究探讨。

References:

- [1] Li Y S, Kang T B, Liang N C. Effect of quercetin on the expressions of p53 and Bcl-2 gene proteins in intact HL-60 cells [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 1999, 15(3): 255-257.
- [2] Rong Y, Yang E B, Zhang K, et al. Quercetin apoptosis in the monoblastoid cell line U937 *in vitro* and the regulation of heat shock proteins expression [J]. *Anticancer Res*, 2000, 20 (6B): 4339.
- [3] Wang I K, Lin-shiau S Y, Lin J K. Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrom C release and activation of Caspase-9 and Caspase-3 in leukemia HL-60 cells [J]. *Cancer*, 1999, 35(10): 1517-1520.
- [4] Ren W H, Gong C C, Wu J L, et al. Expression of iNOS gene and Caspase-3 in Eca-109 cell apoptosis induced by 8-Br-cAMP and quercetin [J]. *J Zhengzhou Univ: Med Sci* (郑州大学学报:医学版), 2003, 38(5): 684-686.

三七总皂苷改善兔动脉粥样硬化斑块稳定性的机制探讨

袁志兵,李晓辉*,李淑惠,张海港,刘 雅

(第三军医大学 基础部,重庆 400038)

动脉粥样硬化 (AS) 不稳定斑块破裂是导致心脑血管事件发生的重要原因,大量研究表明:60%~75% 的急性冠脉综合征 (acute coronary syndrome, ACS) 是由于斑块破裂继发血栓引起的。不稳定斑块虽然不易导致严重的管腔狭窄,却容易发生破裂、糜烂、钙化等情况而易于继发血栓而引起 ACS^[1]。因此,采取有效措施增强斑块稳定性将对 ACS 的防治有重要意义。但是,迄今尚缺乏稳定 AS 斑块的有效措施,因此寻找其有效救治药物十分必要。前期研究发现三七总皂苷 (*Panax notoginseng* total saponin, PNS) 通过抗炎和免疫调节途径对兔 AS 的形成有抑制作用^[2];PNS 还能增加兔 AS 斑块内胶原水平,增厚斑块纤维帽,减少基质金属蛋白酶-2 (MMP-2) 和血管内皮生长因子 (VEGF) 表达,有改善兔 AS 斑块稳定性的作用。本实验进一步对 PNS 改善 AS 斑块稳定性的机制进行探讨。

1 材料

1.1 动物:日本大耳兔,一级,雄性,体重 2.0~2.5 kg,第三军医大学实验动物所提供。

1.2 仪器:BX 51/61 显微镜为 Olympus 公司产品;隔水式电热恒温培养箱为上海跃进医疗器械厂产品;DGF25012C 电热鼓风干燥箱购自重庆华茂仪器有限公司;Image Pro Plus 4.5 图像分析软件由 Media Cybernetics 公司提供,550 型酶标仪为 BIO-RAD 公司产品。

1.3 药物与试剂:PNS (质量分数>99%) 由中国科学院云南植物研究所提供 (用时以双蒸水配成 3、9、24 mg/mL)^[3];胆固醇为成都科龙化工试剂厂产品。兔抗兔肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6) 一抗为武汉博士德公司产品,小鼠抗兔二抗、DAB 试剂盒为中山生物试剂公司产品。TNF- α 、IL-6 ELISA 试剂盒购自第四军医大学。

2 方法

2.1 实验分组及造模:日本大耳兔 46 只,给予高胆固醇饲料 [基础饲料+0.5% 胆固醇+10% 鸡蛋 (去蛋清)+5% 猪油] 60 g/(kg·d) 喂养,第 12 周末随机选取 6 只解剖观察模型建立情况。其余动物随机分 4 组:模型组 [生理盐水 5 mL/(kg·d)];

收稿日期:2005-08-12

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (30470465; 30371768)

作者简介:袁志兵 (1979—),男,湖南省新化县人,硕士,助教,主要从事动脉粥样硬化斑块稳定性的药物干预研究。

Tel: (023) 68753397-83 E-mail: zhibinyuan@sina.com

* 通讯作者 李晓辉 Tel: (023) 68753397-81 Fax: (023) 68753397-82 E-mail: xhl@mail.tmmu.com.cn