

补骨脂素加长波紫外线光化学疗法诱导人白血病细胞凋亡时对线粒体膜电位的影响

陈楠楠, 张 晨, 向 阳, 黄世林, 张德杰^{*}
(解放军第 210 医院 中医血液科, 辽宁 大连 116021)

摘 要:目的 研究补骨脂素 (PSO) 加长波紫外线 (UVA) 光化学疗法 (PUVA) 诱导人白血病细胞 K562、NB4 凋亡时对线粒体膜电位的影响。方法 细胞与不同质量浓度 PSO, 接受或不接受 UVA 照射后共同培养, 电镜下观察细胞超微结构改变, 流式细胞仪检测细胞凋亡率和线粒体膜电位变化, 采用多因素方差分析法进行统计学处理。结果 PUVA 处理后的 K562、NB4 细胞超微结构出现明显的凋亡形态学改变; PSO、UVA 照射及 PUVA 均可使细胞凋亡率增加, 线粒体膜电位下降, PUVA 的作用显著强于前两者 ($P < 0.01$)。结论 PUVA 可诱导人白血病细胞发生凋亡, 诱导凋亡的途径之一为下调线粒体膜电位水平。

关键词: PUVA; 白血病; K562 细胞; NB4 细胞; 凋亡; 线粒体膜电位

中图分类号: R286.91 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2009)02-0252-03

Effect of PUVA on mitochondrial membrane potential in apoptosis of K562 and NB4 leukemia cells

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

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

Abstract: **Objective** To study the effects of psoralen (PSO) and long wave ultraviolet A (UVA) [PSO + UVA (PUVA)] on mitochondrial membrane potential in apoptosis of K562 and NB4 leukemia cells. **Methods** Cells were incubated with PSO in different concentration irradiated with or without UVA. The changes of ultrastructure of the cells were observed under the electron microscope. The apoptosis rates and the changes of mitochondrial membrane potential were detected through the flow cytometry. The factorial design and analysis of variance were used to analyze the interaction among the factors. **Results** There were obvious ultrastructure changes in apoptosis of K562 and NB4 leukemia cells after treated with PUVA. PSO, UVA, and PUVA all increased the apoptosis rates and decreased the mitochondrial membrane potential, and the effects of PUVA were stronger than that of the other two ($P < 0.01$). **Conclusion** PUVA could induce the apoptosis of K562 and NB4 leukemia cells and one of the pathway to induce apoptosis is to downregulate the mitochondrial membrane potential.

Key words: PUVA; leukemia; K562 cells; NB4 cells; apoptosis; mitochondrial membrane potential

补骨脂 *Fructus Psoraleae* 属于补肾助阳类中药, 现代药理研究表明, 补骨脂素 (psoralen, PSO) 是其种子中的主要成分, 是一类杂环化合物, 又称呋喃香豆素, 具有光敏性质与抗肿瘤活性。PSO 本身具有一定的抗肿瘤活性^[1], 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。研究表明补骨脂素加长波紫外线光化学疗法 (PUVA) 对人白血病细胞 HL-60、K562、NB4 均有一定的杀伤作用^[3], 且 PUVA 诱导 HL-60、K562 细胞发生凋亡与调控 Fas 及 FasL 基因表达有关^[4], 但其确切作用机制尚不清楚, 本实验进一步探讨 PUVA 法对人白血病细胞 K562、NB4 细胞凋亡的作用及部分作用机制, 为 PUVA 的临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株: 人红白血病细胞 K562 由大连医科大学惠赠; 人急性髓细胞白血病 (FAB-M3) NB4 细胞

^{*} 收稿日期: 2008-06-17

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, 主治医师, 医学博士。Tel: 13387856109 E-mail: chnngax@163.com

由上海血液学研究所陈竺院士惠赠。

1.2 药品及主要试剂: PSO (质量分数 98.5%, 质量浓度为 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、胎牛血清为 Gibco 产品。小牛血清系杭州四季青生物材料工程公司产品。JC-1 为 Molecular Probe 公司产品。

1.3 仪器和设备: 流式细胞仪购自美国贝克曼库尔特公司, GL Y—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。

1.4 细胞培养: K562、NB4 细胞分别常规培养于含 10% 小牛血清及 10% 胎牛血清的 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 透射电镜下观察细胞超微结构特点^[4]: 收集浓度为 5.0×10^5 /mL 细胞, 经 PUVA (PSO 80 μg/mL, UVA 5 min) 处理 24 h 的 K562、NB4 细胞 10 mL, 用 PBS 清洗两次, 转入 2.0 mL 离心管, 离心 (2 000 r/min) 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, 透射电镜下观察。

1.6 流式细胞术测定 PUVA 作用 24 h 后细胞的凋亡情况: 取浓度为 4.0×10^5 /mL, 处于对数生长期的 K562、NB4 细胞 5 mL, 分别加入 PSO 0、5、10、20、40 μL, 使其在反应体系中的终质量浓度分别为 0、10、20、40、80 μg/mL, 放入石英比色皿中, 在

GL Y—10 型光量子血液平衡治疗仪 ($\lambda = 360$ nm) 上以 1 J/m^2 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 μL 碘化丙啶 (PI) 染液, 避光反应 30 min, 加入 PBS 400 μL, 上机检测, 并用 Multicycle 软件分析得出相应的细胞凋亡百分率。

1.7 流式细胞术测定 PUVA 作用 24 h 后细胞线粒体膜电位的变化: 分组及处理方法同 1.6 项。收集 1×10^6 个细胞, 重悬于 1 mL PBS 中, 加入 200 μmol/L JC-1 10 μL, 37℃、5% CO₂ 孵育 15~30 min, 2 mL PBS 洗 1 次, 室温下离心 (1 000 r/min) 3 min, 弃上清, 加 500 μL PBS, 轻摇试管使细胞重悬, 上机检测, 用 50 mmol/L CCCP 1 μL, 37℃ 孵育 5 min, 进行荧光标准补偿。

1.8 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; 统计计算均用 SPSS 11.5 统计软件进行。

2 结果

2.1 透射电镜下观察 PUVA 后细胞超微结构改变: PUVA 作用 24 h 后 K562、NB4 细胞均出现体积缩小, 胞浆浓缩, 胞核体积减小, 裂解成一个或数个致密体, 可见核小体破裂, 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的凋亡小体, 见图 1。

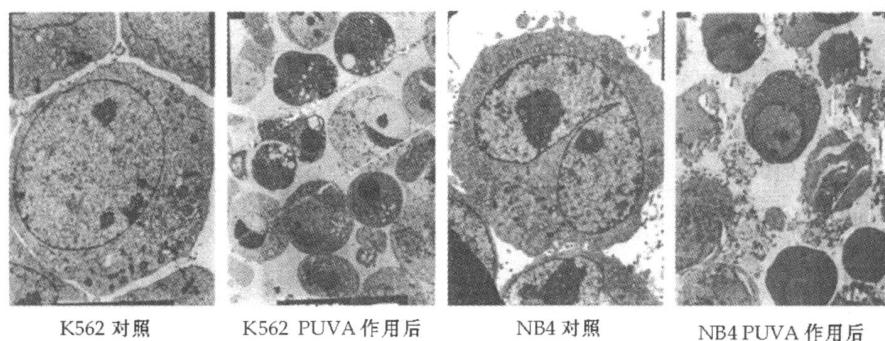


图1 PUVA 作用后 K562 和 NB4 细胞超微结构的改变

Fig.1 Ultrastructure change of K562 and NB4 leukemia cells after treated with PUVA

2.2 PUVA 诱导细胞凋亡的作用: 应用流式细胞仪检测 PUVA 作用 24 h 后 K562、NB4 细胞凋亡率, 见表 1。PSO 各剂量照射 0 min 即可引起 NB4 细胞凋亡, 照射 5 min, 细胞凋亡率明显增加; PUVA 作用 24 h 对 K562 细胞亦有诱导凋亡作用。

2.3 PUVA 对 K562、NB4 细胞线粒体膜电位的影

响: 应用流式细胞仪检测 PUVA 作用 24 h 细胞线粒体膜电位相对荧光强度的变化, 见表 2。结果表明 PUVA 作用 24 h 后 K562 及 NB4 细胞线粒体膜电位明显下降。

3 讨论

PSO 具有抗肿瘤、抗白血病的作用, 同时又具

表 1 PUVA 作用 24 h 后 K562、NB4 细胞的凋亡率
($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 1 Apoptosis rates of K562 and NB4 leukemia cells after treated with PUVA for 24 h
($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

PSO 终质量浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	K562 细胞凋亡率/ %		NB4 细胞凋亡率/ %	
	0 min	5 min	0 min	5 min
0	1.18 $\pm$ 0.24	6.51 $\pm$ 0.20 **	4.97 $\pm$ 0.61	25.43 $\pm$ 0.90 **
10	1.41 $\pm$ 0.11 **	7.99 $\pm$ 0.34 **	6.63 $\pm$ 0.31 **	26.57 $\pm$ 0.42 **
20	1.47 $\pm$ 0.05 **	9.23 $\pm$ 0.39 **	10.87 $\pm$ 0.80 **	30.67 $\pm$ 0.11 **
40	1.52 $\pm$ 0.12 **	11.94 $\pm$ 0.50 **	11.83 $\pm$ 0.51 **	34.90 $\pm$ 0.30 **
80	2.73 $\pm$ 0.04 **	17.84 $\pm$ 0.57 **	15.13 $\pm$ 0.32 **	24.63 $\pm$ 0.38 **

与其相应的对照组 (0 min, 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$);

$P < 0.01$ vs corresponding 0 min group, following tables are same

表 2 PUVA 作用 24 h 后 K562、NB4 细胞线粒体膜电位的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 2 Changes of mitochondrial membrane potential of K562 and leukemia NB4 cells after treated with PUVA for 24 h ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

PSO 终质量浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	K562 细胞线粒体膜电位		NB4 细胞线粒体膜电位	
	0 min	5 min	0 min	5 min
0	377.93 $\pm$ 5.46	262.00 $\pm$ 5.51 **	583.33 $\pm$ 2.15	237.10 $\pm$ 8.51 **
10	310.90 $\pm$ 5.73 **	232.37 $\pm$ 2.73 **	436.90 $\pm$ 3.18 **	210.43 $\pm$ 6.40 **
20	193.43 $\pm$ 9.81 **	132.83 $\pm$ 1.34 **	376.80 $\pm$ 5.91 **	206.83 $\pm$ 5.39 **
40	144.00 $\pm$ 3.70 **	119.83 $\pm$ 2.56 **	333.40 $\pm$ 7.01 **	200.73 $\pm$ 8.78 **
80	122.23 $\pm$ 8.94 **	117.50 $\pm$ 0.98 **	323.53 $\pm$ 6.98 **	182.27 $\pm$ 8.59 **

有光敏活性^[5-7],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。电镜和流式细胞仪检测结果显示,PUVA 可诱导 K562、NB4 白血病细胞发生凋亡。与对照组 (0 min 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 相比,单纯 PSO 和 UVA,以及 PUVA 均可增加细胞凋亡率,但多因素方差分析结果显示 PUVA 的作用要显著强于前两者,也再次证明了 PSO 的光敏效应。

线粒体是细胞内 ATP 的主要生产中心,线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential,

$\Delta\Psi_m$) 是由于线粒体内膜两侧质子及其他离子不平衡而形成的,是保持线粒体功能所必需的。在线粒体内、外膜交界处存在一种蛋白性孔道,即膜渗透性转换通道 (permeability transition pore, PTP),多种刺激如氧化应激、超负荷、再灌注损伤等均可造成 PTP 开放^[8],引起线粒体膜电位的下降,呼吸链断裂,诱导细胞凋亡和死亡。本实验结果显示,经 PSO、UVA 和 PUVA 处理的 K562、NB4 细胞线粒体膜电位均有下降,且统计分析结果显示 PUVA 对细胞线粒体膜电位的影响最强,提示 PUVA 在诱导 K562、NB4 细胞凋亡的过程中可能影响了 PTP 的开放,下调了细胞线粒体膜电位水平。

参考文献:

- [1] 崔小庆. 补骨脂素加长波紫外线抗肿瘤的实验研究和应用 [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 photo-reaction 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人白血病细胞株 NB4、HL-60、K562 细胞作用的研究 [J]. 中国中医急症, 2007, 16(4): 444-446.
- [4] 陈楠楠, 向阳, 张 励, 等. 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 [J]. 中草药, 2008, 39(10): 1521-1524.
- [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 photo-chemotherapy 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] Halestrap A P, Kerr P M, Javadov S, et al. Elucidating the mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1366(1-2): 79-94.

《中草药》杂志售过刊信息

《中草药》杂志编辑部尚存部分过刊合订本,包括:1974-1975 年、1976 年、1979 年、1988 - 1993 年 (80 元/年),1996、1997 年 (110 元/年)、1998 年 (120 元/年)、1999 年 (135 元/年)、2000 年 (180 元/年)、2001 - 2003 年 (200 元/年)、2004 年 (220 元/年)、2005 年 (260 元/年)、2006 年 (280 元/年)、2007 年 (280 元/年)、2008 年 (280 元/年)。1996 年增刊 (50 元)、1997 年增刊 (45 元)、1998 年增刊 (55 元)、1999 年增刊 (70 元)、2000 年增刊 (70 元)、2001 年增刊 (70 元)、2002 年增刊 (65 元)、2003 年增刊 (65 元)、2004 年增刊 (65 元)、2005 年增刊 (65 元)、2006 年增刊 (65 元)、2007 年增刊 (65 元)、2008 年增刊 (55 元)。欢迎订购。订购者请直接与《中草药》杂志编辑部联系。

电话: (022) 27474913 23006821

传真: (022) 23006821

E-mail: zcyzjbj@sina.com