

## 丹参酮 II<sub>A</sub> 对白血病 K562 细胞的体外诱导凋亡作用研究

刘晓丹<sup>1</sup>, 刘文达<sup>2</sup>, 刘培庆<sup>3</sup>, 王春芝<sup>1</sup>, 徐妍<sup>1</sup>, 林东军<sup>1</sup>, 黄河清<sup>3</sup>, 吴传斌<sup>3</sup>, 肖若芝<sup>1</sup>, 黄仁魏<sup>1</sup>, 刘加军<sup>1\*</sup>  
(1 中山大学附属第三医院 血液科/中山大学血液病研究所, 广东 广州 510630; 2 中山大学附属第三医院 输血科, 广东 广州 510630; 3 中山大学药学院 药理学与毒理学实验室, 广东 广州 510080)

**摘要:**目的 研究丹参酮 II<sub>A</sub> 对人急性白血病 K562 细胞的诱导凋亡作用及其作用机制。方法 以不同浓度的丹参酮 II<sub>A</sub> (10~50 μmol/L) 作用于体外培养的 K562 细胞 24、48、72 h, 应用 MTT 法检测细胞生长抑制率, 流式细胞术 (FCM) 检测细胞凋亡率, 并对 50 μmol/L 的药物作用不同时间后亚 G<sub>1</sub> 期细胞进行检测。应用免疫印迹法 (Western blotting) 检测 Caspase 3 及其裂解底物多聚 ADP-核糖聚合酶 (PARP) 的表达水平, 并对凋亡调节蛋白 Fas、Bax、Bcl-2、Bak、Bid 的表达水平进行检测。结果 20 μmol/L 以上的丹参酮 II<sub>A</sub> 可显著抑制 K562 细胞的生长、诱导细胞发生凋亡, 并呈现出明显的量效与时效关系; FCM 检测结果表明 50 μmol/L 丹参酮 II<sub>A</sub> 作用不同时间后, 亚 G<sub>1</sub> 期细胞 (凋亡细胞) 逐渐增多。20 μmol/L 以上的丹参酮 II<sub>A</sub> 作用 48 h 后 Caspase 3 逐渐被活化出现 17 000 的亚单位, Caspase 3 的作用底物 PARP 被活化裂解出现 89 000 的亚单位片段, 而且 Caspase 3 的激活以及 PARP 的裂解可被 Caspase 3 的特异性抑制剂 z-DEVD-FMK 所阻断, 促凋亡蛋白 Fas 以及 Bax 的表达水平明显升高, 而凋亡抑制蛋白 Bcl-2 及其他促凋亡蛋白 Bak 和 Bid 的表达水平则无明显变化。结论 丹参酮 II<sub>A</sub> 可以通过诱导白血病 K562 细胞凋亡而发挥体外抗白血病作用, 上调促凋亡蛋白 Fas 和 Bax 的表达水平及激活 Caspase 3 可能是丹参酮 II<sub>A</sub> 诱导白血病 K562 细胞发生凋亡的重要作用机制之一。

**关键词:** 丹参酮 II<sub>A</sub>; 白血病; K562 细胞; 细胞凋亡

中图分类号: R733.7 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)10-1663-04

### Investigation on apoptosis inducing effect of tanshinone II<sub>A</sub> on leukemia K562 cells *in vitro*

LIU Xiao-dan<sup>1</sup>, LIU Wen-da<sup>2</sup>, LIU Pei-qing<sup>3</sup>, WANG Chun-zhi<sup>1</sup>, XU Yan<sup>1</sup>, LIN Dong-jun<sup>1</sup>,  
HUANG He-qing<sup>3</sup>, WU Chuang-bin<sup>3</sup>, XIAO Ruozhi<sup>1</sup>, HUANG Ren-wei<sup>1</sup>, LIU Jia-jun<sup>1</sup>

(1 Hematological Department & Institute, Third Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510630, China;

2. Department of Transfusion, Third Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China;

3. Laboratory of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmaceutical Science of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract: Objective** To investigate the apoptosis inducing effect of tanshinone II<sub>A</sub> (Tan II<sub>A</sub>) on human acute leukemic K562 cells and its mechanisms. **Methods** K562 Cells were treated by different concentration of Tan II<sub>A</sub> (10–50 μmol/L) for 24, 48, and 72 h. The inhibitory rate of the cells was measured by MTT assay, cell apoptosis was examined by flow cytometry (FCM). Western blotting was used to detect caspase-3 and poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) expression as well as apoptotic modulators, such as Bax, Bcl-2, Bak, Bid, and Fas. **Results** Tan II<sub>A</sub> (over 20 μmol/L) could inhibit the growth and induce apoptosis in K562 cells in both time- and dose-dependent manners. FCM Analysis showed that the sub-G<sub>1</sub> cells (apoptotic cells) were gradually increased after treatment by 50 μmol/L Tan II<sub>A</sub> for different hours. Western blotting showed cleavage of the caspase-3 zymogen protein with the appearance of its 17 000 subunit, and a 89 000 subunit cleavage product of ADP-ribose PARP after Tan II<sub>A</sub> (over 20 μmol/L) treatment for 48 h. Moreover, activation of caspase-3 and PARP was dramatically inhibited by caspase-3 specific inhibitor z-DEVD-FMK. Western blotting also revealed that the expression of pro-apoptotic protein Fas and Bax was up-regulated significantly while expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 as well as other pro-apoptotic protein Bak and Bid remained unchanged. **Conclusion** Tan II<sub>A</sub> exhibits *in vitro* anti-leukemia effect by induction of apoptosis in K562 cells, and activation of caspase-3 as well as upregulation of the expression of pro-apoptotic protein Fas and Bax may be one of its significant apoptosis inducing mechanisms.

**Key words:** tanshinone II<sub>A</sub> (Tan II<sub>A</sub>); leukemia; K562 cell; apoptosis

①收稿日期: 2010-04-23

基金项目: 教育部新世纪优秀人才支持计划资助项目 (NCET-0721); 广东省科技计划资助项目 (2010B030700006)

作者简介: 刘晓丹 (1981-), 男, 山东滨州人, 硕士研究生, 主要从事细胞凋亡机制研究。

\* 通讯作者 刘加军 Tel: (020) 85252227 Fax: (020) 85253336 E-mail: jiajun.l@163.com

丹参酮 II<sub>A</sub> (tanshinone II<sub>A</sub>) 是从丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 中提取出来的一种脂溶性萘醌类衍生物。既往资料表明<sup>[1,2]</sup>, 丹参酮 II<sub>A</sub> 除了具有抗炎、抗氧化等多种传统功能外, 还可以通过调节肿瘤坏死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 以及改变血管内皮素 (ET) 的表达水平等机制保护血管内皮细胞的功能<sup>[3]</sup>。已有资料表明, 丹参酮 II<sub>A</sub> 对多种肿瘤细胞如乳腺癌<sup>[4]</sup>、肝癌细胞<sup>[5]</sup> 等具有显著的体外抗肿瘤作用; 而且丹参酮 II<sub>A</sub> 联合三氧化二砷可以诱导白血病 MR2 细胞发生凋亡, 从而降低 MR2 细胞的耐药性<sup>[6]</sup>, 丹参酮 II<sub>A</sub> 与阿霉素联用对 K562 细胞的促凋亡作用有协同效果<sup>[7]</sup>。前期体外研究资料表明<sup>[8]</sup>, 丹参酮 II<sub>A</sub> 可以降低白血病细胞的侵袭及黏附功能, 对白血病 NB4 细胞具有体外增殖抑制及诱导凋亡作用。本研究以体外培养的 K562 细胞为研究对象, 观察不同浓度的丹参酮 II<sub>A</sub> 对 K562 细胞的生长抑制及诱导凋亡作用, 并对其作用机制进行了探讨, 为其抗肿瘤临床应用与开发提供依据。

## 1 材料

RPMI 1640 培养液为美国 Gibco 公司产品; 小牛血清为杭州四季青生物制品厂产品; 抗人 Bax、Bcl-2、Bak、Bid、Fas、Caspase 3 及 PARP (Caspase 3 底物) 抗体为美国 Gibco 公司产品。丹参酮 II<sub>A</sub> 由中山大学药学院药理学与毒理学实验室提供 (质量分数 > 98%)。

超净工作台 (杭州)、CO<sub>2</sub> 细胞培养箱、普通及倒置显微镜 (Olympus 产品)、平板离心机 (国产)、96 孔培养板 (Deta, 美国)、FACSscan 型流式细胞仪 (Becton Dickinson, 美国)。

## 2 方法

2.1 细胞培养: 将 K562 细胞 (由中山大学肿瘤中心提供) 接种于含 10% 灭活小牛血清的 RPMI 1640 培养液中, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度下培养, 每 1~2 天换液 1 次, 取对数生长期的细胞进行实验, 分别用各种浓度的丹参酮 II<sub>A</sub> 处理细胞, 未加药组为对照组。

2.2 细胞生长抑制率的规定: 采用噻唑蓝 (MTT) 还原法进行检测。取对数生长期的 K562 细胞, 调整细胞浓度为  $2 \times 10^6$  / mL, 将 K562 细胞分装于数个 25 mL 的培养瓶中, 每瓶为 4 mL, 分别加入丹参酮 II<sub>A</sub> 储存液, 调整其终浓度分别为 10、20、30、40、50  $\mu$ mol / mL。取 96 孔板数个, 每孔加入上述细胞悬液 100  $\mu$ L, 每种药物浓度为 1 组, 每组设 6 个平行孔, 根据实验设计培养不同的时间。每组细胞培

养不同的时间后从培养箱中取出, 然后每孔加入 MTT (5 mg / mL) 10  $\mu$ L, 再继续培养 4~6 h 后取出, 离心后吸去上清液, 每孔加入 DMSO 100  $\mu$ L, 再将培养板震荡均匀 5 min 左右, 显微镜下观察着色颗粒消失后, 在 20 min 内以 570 nm 为测试波长, 630 nm 为参考波长, 读取吸光度 (A) 值, 计算细胞生长抑制率 [抑制率 = (对照组 A 值 - 实验组 A 值) / 对照组 A 值  $\times$  100%]。

2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡比例: 收集不同药物浓度处理不同时间后的 K562 细胞, 以 PBS 缓冲液清洗 2 次, 将细胞沉淀充分混匀, 用 70% 冷乙醇 4 °C 固定 24 h 以上。离心去除乙醇固定液, 用 PBS 清洗 1 次后, 加入 200  $\mu$ g / mL 去 DNA 酶的 RNA 酶, 流式细胞仪分析不同 DNA 量的细胞分布。应用 ModifitL TL 1.00 (MAC) 分析系统进行数据处理, 低于 G<sub>1</sub> 期的细胞为凋亡细胞, 其占细胞总数的比例为凋亡比例。

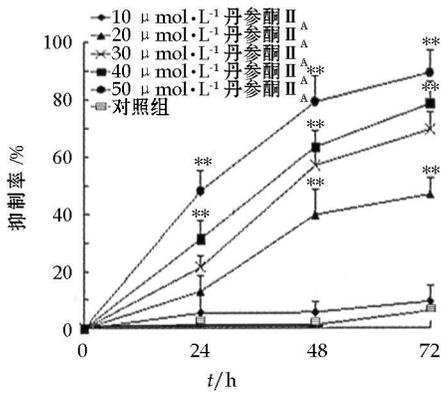
2.4 免疫印迹法 (Western blotting) 检测凋亡调节蛋白: 收集丹参酮 II<sub>A</sub> 处理 48 h 后的细胞  $1 \times 10^6$  个, 提取细胞总蛋白, 经 Bio-Rad 法定量蛋白, 取 40  $\mu$ g 总蛋白上样, 经十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SD-PAGE) 后, 转移到醋酸纤维素膜上, 5% 脱脂奶粉室温封闭 3~4 h, 4 °C 下与抗 Bax、Bcl-2、Bak、Bid、Fas 或抗 Caspase 3、PARP 抗体孵育过夜, 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗室温下孵育 2 h, 洗膜后用 DAB 显色并拍照。

2.5 统计学分析: 每组实验均重复 3 次以上, 各组实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, SPSS 13.0 软件进行统计学分析, 采用单因素方差分析。

## 3 结果

3.1 对 K562 细胞生长的抑制作用: 与对照组 (未加药物治疗组) 比较, 10  $\mu$ mol / L 丹参酮 II<sub>A</sub> 对 K562 细胞的生长无明显作用 ( $P > 0.05$ ), 20  $\mu$ mol / L 以上浓度组随着药物作用时间的延长, 细胞生长抑制率逐渐升高, 50  $\mu$ mol / L 丹参酮 II<sub>A</sub> 引起的细胞生长抑制率明显高于其他浓度的药物 ( $P < 0.01$ ), 结果见图 1。

3.2 对细胞凋亡率及亚 G<sub>1</sub> 期细胞比例的影响: 由图 2 可看出, 20  $\mu$ mol / L 以上的丹参酮 II<sub>A</sub> 对 K562 细胞具有显著的凋亡诱导作用, 并呈现出一定的时间和浓度依赖性。10  $\mu$ mol / L 丹参酮 II<sub>A</sub> 组 K562 细胞的凋亡率明显低于其他药物浓度组的凋亡率 ( $P < 0.01$ )。由图 3 可看出, 50  $\mu$ mol / L 丹参酮 II<sub>A</sub> 作用不同时间后亚 G<sub>1</sub> 期细胞峰 (凋亡细胞) 逐渐升



与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$

\*\*  $P < 0.01$  vs control group

图 1 丹参酮 II<sub>A</sub> 对 K562 细胞的生长抑制作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 1 Inhibition of tanshinone II<sub>A</sub> on growth of K562 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

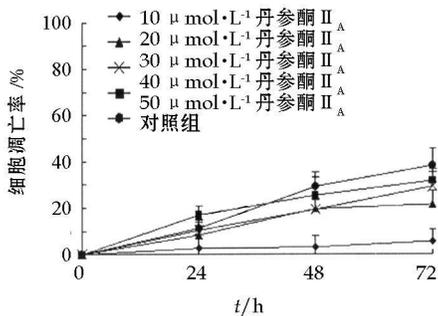


图 2 丹参酮 II<sub>A</sub> 对 K562 细胞凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 2 Effect of tanshinone II<sub>A</sub> on apoptosis of K562 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

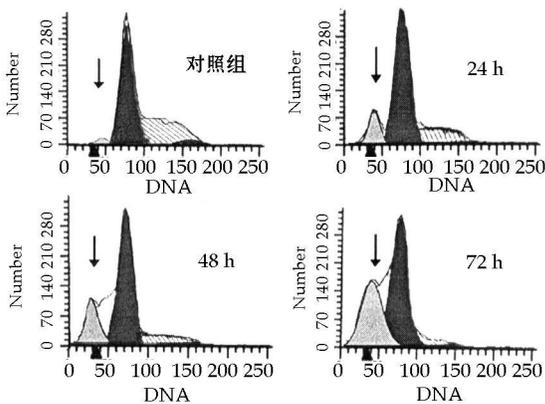
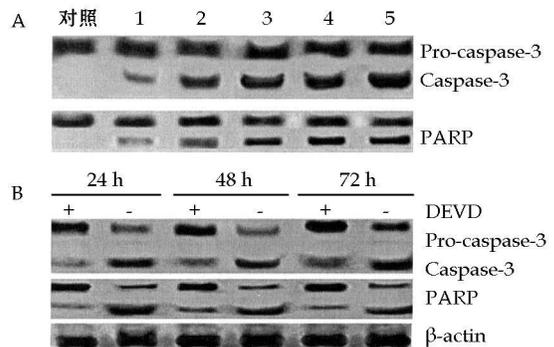


图 3 丹参酮 II<sub>A</sub> (50 μmol/L) 作用不同时间后 K562 细胞亚 G<sub>1</sub> 期细胞比例

Fig. 3 Sub G<sub>1</sub> cells ratio of K562 cells treated with 50 μmol/L tanshinone II<sub>A</sub> for different time

高 (图中箭头所指), 作用 72 h 亚 G<sub>1</sub> 期细胞比例为 41.3%, 明显高于对照组及其他时间点亚 G<sub>1</sub> 期细胞比例 ( $P < 0.05$ )。

3.3 Caspase 3 及 PRAP 表达的变化: Western blotting 检测结果显示, 20 μmol/L 以上的丹参酮 II<sub>A</sub> 作用 48 h 后, 随着药物浓度的增加, Caspase 3 逐渐被活化出现 17 000 亚单位的条带, 药物对 Caspase 3 的活化作用具有明显的浓度依赖性, 在 Caspase 3 被活化的同时, PARP 被裂解出现 89 000 的亚单位片段, Caspase 3 的活化以及 PARP 裂解片段的强度随药物浓度的增加而增强 (图 4 A)。将 K562 细胞与 Caspase-3 的特异性抑制剂 z DEVD-FMK (20 μmol/L) 共同孵育 1 h 后, 再加入 50 μmol/L 的丹参酮 II<sub>A</sub> 培养 24、48、72 h, 结果表明 Caspase 3 的激活及其底物 PARP 的裂解可特异性地被 z DEVD-FMK 所阻断 (图 4 B)。



A- Caspase 3 及其底物 PARP 可以被丹参酮 II<sub>A</sub> 裂解

B- Caspase 3 及 PARP 的裂解可以特异性地被 z DEVD-FMK 所阻断 1~5 分别为 10、20、30、40、50 μmol/L 丹参酮 II<sub>A</sub>

A- Caspase 3 and PARP were cleaved by tanshinone II<sub>A</sub> treatment B activation of Caspase 3 and PARP was inhibited by z EDVD-FMK 1—5-10, 20, 30, 40, and 50 μmol/L tanshinone II<sub>A</sub>

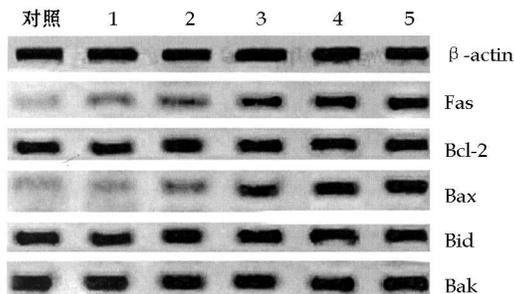
图 4 丹参酮 II<sub>A</sub> 作用后 K562 细胞 Caspase 3 及 PRAP 表达水平的变化

Fig. 4 Expression of Caspase 3 and PRAP of K562 cells after tanshinone II<sub>A</sub> treatment

3.4 丹参酮 II<sub>A</sub> 作用 48 h 后凋亡调节蛋白的变化: Western blotting 结果显示, 对照组和 10 μmol/L 的丹参酮 II<sub>A</sub> 作用 48 h 后对凋亡调节蛋白的表达无明显的影响, 而当丹参酮 II<sub>A</sub> 浓度在 20 μmol/L 以上时, 随着药物浓度的增加, 促凋亡蛋白 Fas 及 Bax 的表达水平则逐渐升高; 但是, 另外两种促凋亡蛋白 Bid 和 Bak 的表达水平则无明显变化, 同样, 凋亡拮抗蛋白 Bcl-2 的表达水平也无明显变化 (图 5)。

#### 4 讨论

Bcl-2 家族是细胞凋亡过程中重要的调节因素之一, Bcl-2 家族中的各种成分可以通过与其他凋亡相关因子的协同或拮抗作用调控凋亡的过程。



1~ 5 10、20、30、40、50 μmol/L 丹参酮 II<sub>A</sub>

1—5 10、20、30、40、and 50 μmol/L tanshinone II<sub>A</sub>

图 5 丹参酮 II<sub>A</sub> 作用 48 h 后凋亡调节蛋白表达水平的变化

Fig. 5 Protein expression of apoptotic modulatory protein after tanshinone II<sub>A</sub> treatment for 48 h

Bcl2 家族包括促进凋亡的成员如 Bax、Bak、Bid 等, 以及抑制凋亡发生的成员如 Bcl2、BclX 等。已有资料表明<sup>[9]</sup>, 凋亡拮抗蛋白特别是 Bcl2 表达水平的高低与肿瘤的发生、发展及临床疗效、预后等均密切相关, 靶向性抑制 Bcl2 家族中凋亡拮抗蛋白的表达以及诱导细胞发生凋亡已经逐渐成为白血病治疗的重要策略之一<sup>[10-11]</sup>。Fas 是另外一种重要的凋亡调节蛋白, 它主要是通过死亡因子及其受体介导的信号转导途径诱导细胞发生凋亡。近年资料表明<sup>[12]</sup>, 通过上调 Fas 的表达水平可以降低白血病 K562 细胞的生长潜力以及促进细胞发生凋亡。Caspases 是一切凋亡信号传导的共同通路, 正常情况下 Caspases 在细胞内以无活性的酶原形式存在, 当凋亡过程被启动后凋亡信号可传导至 Caspases 酶原, 使其部分肽链发生水解, 形成具有活性的 Caspases, 然后各种 Caspases 如同凝血过程一样产生“瀑布式”层层激活, 最终导致细胞发生凋亡, 目前已发现在人体内的 Caspases 共有 14 种, 其中起核心作用的是 Caspase 3。Caspase 3 被激活后可裂解产生 17 000 的活性亚单位, 后者可进一步激活 Caspases 活化的核酸内切酶 (CAD), 活化的 CAD 可切割 DNA, 导致细胞发生凋亡。在多种细胞包括白血病细胞和实体瘤细胞凋亡的过程中均有 Caspase 3 活性的变化, 多数资料显示, 无论是药物还是某些生物活性因子所诱导的肿瘤细胞凋亡, 都是通过激活 Caspases 途径开始<sup>[13]</sup>。

本研究以白血病 K562 细胞株为研究对象, 观察了丹参酮 II<sub>A</sub> 对白血病 K562 细胞的生长抑制及

诱导凋亡作用。结果表明 20 μmol/L 以上的丹参酮 II<sub>A</sub> 能抑制 K562 细胞的生长及诱导细胞发生凋亡, 而且呈现出一定的时间效应与剂量效应关系。50 μmol/L 的丹参酮 II<sub>A</sub> 作用不同时间后, 应用 FCM 检测结果显示, 随着药物浓度增加, 亚 G<sub>1</sub> 期细胞 (凋亡细胞) 比例逐渐增多; 在细胞凋亡过程中, 随着药物浓度的增加, Caspase 3 被活化, 通过其裂解底物 PARP 而诱导细胞凋亡, 在细胞凋亡的同时促凋亡蛋白 Fas 及 Bax 的表达水平逐渐升高。

综上所述, 丹参酮 II<sub>A</sub> 可以通过诱导白血病 K562 细胞凋亡而发挥体外抗白血病作用, 上调促凋亡蛋白 Fas 和 Bax 的表达水平以及激活 Caspase 3 可能是丹参酮 II<sub>A</sub> 诱导白血病 K562 细胞发生凋亡的重要作用机制之一。

参考文献:

- [1] 潘桂湘, 张伯礼, 乔延江. HPLC 法测定复方丹参中丹参的三种水溶性成分的含量 [J]. 中草药, 2002, 33(10): 901-903
- [2] 梁勇, 羊裔明. 丹参酮药理作用及临床应用研究进展 [J]. 中草药, 2000, 31(4): 304-306
- [3] 张萌, 张伯礼, 高秀梅, 等. 丹酚酸 B 和丹参酮 II<sub>A</sub> 不同配比对肿瘤坏死因子 α 损伤大鼠心脏微血管内皮细胞的影响 [J]. 中草药, 2004, 35(1): 63-65
- [4] Wang X, Wei Y, Yuan S, et al. Potential anticancer activity of tanshinone II<sub>A</sub> against human breast cancer [J]. *Int J Cancer*, 2005, 116(4): 799-807
- [5] Yuan S L, Wei Y Q, Wang X J, et al. Growth inhibition and apoptosis induction of tanshinone II<sub>A</sub> on human hepatocellular carcinoma cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(10): 2024-2028
- [6] 李力, 张智慧, 赵卫东. 丹参酮 II<sub>A</sub> 与三氧化二砷联合诱导 MR2 细胞凋亡的研究 [J]. 四川大学学报: 医学版, 2009, 40(5): 812-816
- [7] 高洁, 白茹, 李长志, 等. 丹参酮 II<sub>A</sub> 对阿霉素抑制肿瘤细胞生长作用的影响 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(2): 91-94
- [8] Liu J J, Liu P Q, Lin D J, et al. Induction of apoptosis and inhibition of cell adhesive and invasive effects by tanshinone II<sub>A</sub> in acute promyelocytic leukemia cells *in vitro* [J]. *J Biomed Sci*, 2006, 13(12): 813-823
- [9] Heiser D, Labi V, Erlacher M, et al. The Bcl2 protein family and its role in the development of neoplastic disease [J]. *Exp Gerontol*, 2004, 39(10): 1125-1135
- [10] Capitani N, Baldari C T. The Bcl2 family as a rational target for the treatment of B cell chronic lymphocytic leukaemia [J]. *Curr Med Chem*, 2010, 17(9): 801-811
- [11] 王三龙, 蔡兵, 崔承彬, 等. 吉九里香碱诱导 K562 细胞凋亡的研究 [J]. 中草药, 2007, 38(11): 1677-1681
- [12] 陈婷梅, 张健, 曹唯希, 等. 人参皂苷对人慢性粒细胞性白血病 K562 细胞 Fas, sFas 和 FasL 的影响 [J]. 中草药, 2007, 38(3): 418-420
- [13] Schimmer A D. Induction of apoptosis in lymphoid and myeloid leukemia [J]. *Curr Oncol Rep*, 2006, 8(6): 430-436