

• 药理与临床 •

吴茱萸碱抑制 HDAC6 促进人白血病 K562 细胞周期阻滞和凋亡的机制研究

袁 龙^{1,3}, 陈 益¹, 刘泽洪¹, 王 芬¹, 李科琼⁴, 李 静^{1*}, 陈地龙^{1,2*}

1. 重庆医科大学 干细胞与组织工程研究室, 重庆 400016

2. 三峡医药高等专科学校, 重庆 402120

3. 重庆医科大学护理学院, 重庆 400016

4. 重庆医科大学公共卫生与管理学院, 重庆 400016

摘要: 目的 探讨吴茱萸碱通过抑制组蛋白去乙酰化酶 6 (HDAC6) 促进人白血病 K562 细胞周期阻滞以及凋亡的机制。方法 采用 CCK-8 法检测吴茱萸碱对 K562 细胞增殖的影响; 流式细胞术检测 K562 细胞周期和凋亡; 化学比色法检测 K562 细胞 HDAC6 活性; Western blotting 法检测 K562 细胞中 HDAC6、Cyclin D1、CDK4、Bcl-2、Bax、Cleaved Caspase-3、ERK、p-ERK、p38 和 p-p38 蛋白的表达。结果 CCK-8 法结果提示, 吴茱萸碱在一定浓度范围内 (1~16 $\mu\text{mol/L}$) 可以有效抑制 K562 细胞增殖, 并呈时间和浓度依赖性; 流式细胞术结果显示, 吴茱萸碱可将 K562 的细胞周期阻滞于 G₀/G₁ 期; 2、4、8 $\mu\text{mol/L}$ 吴茱萸碱诱导 K562 细胞 48 h 后, 其凋亡率分别为 (11.47 \pm 1.05) %、(12.77 \pm 0.79) %和 (18.58 \pm 1.37) %, 与对照组 (2.79 \pm 1.01) %相比差异显著 ($P < 0.01$); 化学比色法结果显示, 吴茱萸碱能有效抑制 HDAC6 的活性; Western blotting 结果显示, 吴茱萸碱能上调 Bax、Cleaved Caspase-3、p38 和 p-p38 蛋白的表达, 下调 CDK4、Cyclin D1、Bcl-2、HDAC6、ERK 和 p-ERK 蛋白的表达。结论 吴茱萸碱可能是通过抑制 HDAC6 的活性, 激活 MAPK 信号通路, 进而上调促凋亡蛋白的表达, 下调周期蛋白的表达, 从而抑制 K562 细胞的增殖, 诱导细胞周期阻滞和凋亡。

关键词: 吴茱萸碱; 白血病; 组蛋白去乙酰化酶 6; 细胞凋亡; 细胞周期

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253 - 2670(2016)17 - 3044 - 07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.17.014

Mechanism of evodiamine inducing cell cycle arrest and apoptosis in human erythroleukemia K562 cells through inhibiting histone deacetylase 6

YUAN Long^{1,3}, CHEN Yi¹, LIU Ze-hong¹, WANG Fen¹, LI Ke-qiong⁴, LI Jing¹, CHEN Di-long^{1,2}

1. Laboratory of Stem Cell and Tissue Engineering, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

2. Chongqing Three Gorges Medical College, Chongqing 404120, China

3. College of Nursing, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

4. School of Public Health and Management, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of evodiamine (Evo) inducing cell cycle arrest and apoptosis in K562 cells. **Methods** The effect of Evo on proliferation of K562 cells was measured by Cell Counting Kit-8 assay (CCK-8 assay), and cell cycle distribution and apoptosis were determined by flow cytometry (FCM). Chemical colorimetry assay was used to examine the activity of histone modification enzymes. The expression levels of histone deacetylase 6 (HDAC6), Cyclin D1, CDK4, Bcl-2, Bax, Cleaved Caspase-3, ERK, p-ERK, p38, and p-p38 proteins were ascertained by Western blotting. **Results** The proliferation of K562 cells was inhibited by Evo (1—16 $\mu\text{mol/L}$) in a dose- and time-dependent manner. FCM analyses revealed that Evo induced cell-cycle arrest in G₀/G₁ phase in K562 cells. The apoptosis rates of K562 cells were (11.47 \pm 1.05)%, (12.77 \pm 0.79)%, and (18.58 \pm 1.37)% respectively after induced by Evo with different concentration (2, 4, and 8 $\mu\text{mol/L}$), which showed statistically significant difference compared with the

收稿日期: 2016-01-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31271368); 重庆市渝中区科技计划项目 (20140123)

作者简介: 袁 龙 (1973—), 男, 硕士, 研究方向为中药药理学。Tel: 13638398907 E-mail: 154542801@qq.com

*通信作者 陈地龙 (1971—), 男, 博士, 研究员, 研究方向为中药药理学。Tel: 13908351026 E-mail: xinmengyuandlc@163.com

李 静 (1973—), 女, 博士, 副教授, 研究方向为中药药理学。Tel: 13370762980 E-mail: 569258455@qq.com

control group (2.79 ± 1.01)% ($P < 0.01$). The activity of HDACs was reduced after treated with Evo (2, 4, and 8 $\mu\text{mol/L}$). Western blotting assay showed that the expression of Bax, Cleaved Caspase-3, p38, and p-p38 proteins increased, while CDK4, Cyclin D1, Bcl-2, HDAC6, ERK, and p-ERK proteins down-regulation after induced by Evo. **Conclusion** Evo can induce cell cycle arrest and apoptosis in K562 cells through the inhibition of HDAC6.

Key words: evodiamine; leukemia; histone deacetylase 6; apoptosis; cell cycle

白血病是一种常见的血液系统恶性肿瘤, 据统计, 白血病已经占据我国肿瘤性疾病的第 6 位^[1]。目前, 白血病的治疗以化疗为主, 然而, 化疗是一种不可避免的损伤性治疗方法, 竭力探索损伤较小的治疗白血病的新方法, 是临床研究的热点。近年来研究表明, 中药不仅可以减轻化疗的副作用, 还可以延长甚至阻止白血病的复发; 研究还表明, 中药可以逆转包括白血病在内的多种肿瘤的多药耐药和预防相关并发症^[2-4]。

吴茱萸碱 (evodiamine, Evo) 是从吴茱萸中提取出来的活性生物碱之一, 具有降血压、降血糖、镇痛、减肥、抗肿瘤等多种生物学效应^[5]。已有文献报道^[6], 吴茱萸碱可以明显抑制人宫颈癌 HeLa, 人前列腺癌 PC-3, 人黑色素瘤 A375-S2、LNCaP, 人急性白血病 CCRF-CEM 和人胃癌 MGC803 等细胞系的增殖和诱导细胞凋亡, 但吴茱萸碱抗肿瘤的具体作用机制尚不清楚。

组蛋白乙酰化调控基因的转录和表达, 涉及细胞内多种生理病理过程。组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylases, HDACs) 是组蛋白乙酰化平衡的关键酶之一, 其催化组蛋白的去乙酰化作用, 从而抑制体内包括抑癌基因在内的多种基因的转录^[7]。大量研究表明, 抑制 HDACs 可以导致多种肿瘤细胞的增殖抑制, 也能促进细胞凋亡, HDACs 已经成为潜在肿瘤治疗的靶点^[8-9]。本研究以白血病 K562 细胞株为研究对象, 探讨吴茱萸碱对 K562 细胞 HDACs 活性的影响和诱导白血病细胞凋亡的可能机制, 为吴茱萸碱的临床应用以及白血病的治疗提供新的思路和实验依据。

1 材料

1.1 细胞株

人白血病 K562 细胞株获赠于重庆医科大学检验系, 由本实验室保存。

1.2 药品与试剂

吴茱萸碱购自南京泽朗药物科技有限公司 (质量分数 98%, 批号 ZL20131015)。细胞胞浆胞核蛋白提取试剂盒、HDAC 检测试剂盒购自美国

BioVision 公司; PVDF 膜和 ECL 发光液购自美国 Millipore 公司; RPMI 1640 培养基购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清购自以色列 Bioind 公司; 甘氨酸、Trisbase、SDS 购自美国 Genview 公司; Histone Deacetylase Antibody Sampler Kit 购自美国 Cell Signaling Technology 公司; Cleaved Caspase-3、 β -actin 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠和山羊抗兔 IgG 二抗购于碧云天生物技术研究所。

1.3 仪器

MCV-B161S (T) 超净工作台 (Sanyo); CKX41 倒置显微镜 (Olympus); BS124S 型电子天平 (Sartorius); 3K15 低温离心机 (Sigma); 1510 酶标仪 (Thermo), 043BR42402 垂直电泳仪 (Bio-RAD), ChemiDocXRS 化学发光成像系统 (Bio-RAD); 3111 二氧化碳培养箱 (Thermo)。

2 方法

2.1 细胞培养

取对数生长期 K562 细胞以 6×10^8 个/L 的细胞数接种于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度下常规培养, 每 2~3 d 换液传代。

2.2 吴茱萸碱的配制

取 DMSO 将吴茱萸碱充分溶解, 配制成 100 $\mu\text{mol/L}$ 的储备液。实验前用 RPMI 1640 完全培养液 (含 10% 胎牛血清) 稀释成所需浓度 (DMSO 终体积分数 $< 0.1\%$)。

2.3 CCK-8 法检测 K562 细胞的增殖

取对数生长期的 K562 细胞, 调整浓度为 1×10^8 个/L, 接种于 96 孔板, 每孔 200 μL 。设对照组: 加入终体积分数 0.1% 的 DMSO; 药物组: 加入终浓度为 1、2、4、8、16 $\mu\text{mol/L}$ 的吴茱萸碱; 本底对照组: 加入等量培养基; 每组分别设 5 个复孔。吴茱萸碱分别诱导 24、48、72 h 后, 每孔加入 10 μL CCK-8 工作液, 轻轻震荡使之混匀, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度下继续培养 2 h。在 450 nm 波长处检测各孔吸光度 (A) 值, 并计算细胞增殖抑制率和各时间点的半数抑制浓度 (IC_{50}), 根据 IC_{50} 确定药

物最适作用浓度和时间, 实验重复 3 次。

$$\text{增殖抑制率} = (A_{\text{对照组}} - A_{\text{药物组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{本底对照组}})$$

2.4 流式细胞仪检测 K562 细胞周期和早期凋亡

取对数生长期的 K562 细胞种植于 6 孔板, 每孔总体积为 3 mL, 细胞密度为 1×10^8 /L。实验分组: 对照组加入终体积分数为 0.1% 的 DMSO; 药物组分别加入终浓度为 2、4、8 $\mu\text{mol/L}$ 的吴茱萸碱。作用 K562 细胞 48 h 后, 收集各组细胞, 用预冷 0.01 mol/L PBS (pH 7.2) 漂洗 2 次, 75% 冷乙醇 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜。检测前去除固定液, 加入碘化丙啶 (PI) 和 Annexin V-FITC, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 染色处理 30 min, 每组样本取 3×10^4 个细胞上流式细胞仪检测。采用 Cell Quest 软件分析得出细胞周期各时相比例和细胞早期凋亡率。实验重复 3 次。

2.5 化学比色法检测 K562 细胞 HDACs 活性

细胞接种及分组方法同“2.4”项, 吴茱萸碱诱导 6 h (作用 6 h, HDACs 活性已经有明显变化。)后收集细胞。预冷 0.01 mol/L PBS (pH 7.2) 漂洗 2 次, 按照细胞胞浆核蛋白提取试剂盒说明书提取核蛋白; 按照 HDAC 检测试剂盒说明书测定 A 值。实验重复 3 次。

2.6 Western blotting 法检测 K562 细胞 HDAC6、Cyclin D1、CDK4、Bcl-2、Bax、Cleaved Caspase-3、ERK、p-ERK、p38、p-p38 蛋白表达

细胞接种及分组方法同“2.4”项, 吴茱萸碱诱导 48 h 后, 收集各组细胞, 预冷 0.01 mol/L PBS (pH 7.2) 漂洗细胞 2 次, RIPA 全细胞蛋白液提取全细胞蛋白, BCA 法检测蛋白浓度。取 50 μg 待测蛋白样品, 进行 SDS-PAGE, 电转移至 PVDF 膜, 50 g/L 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 分别加入 1:2 000 稀释的兔抗人 HDAC6 mAb 和 1:1 000 稀释的兔抗人 Cyclin D1 抗体、兔抗人 CDK4 抗体、兔抗人 ERK 抗体、兔抗人 p-p38 抗体、兔抗人 Bax 抗体、兔抗人 Bcl-2 抗体、兔抗人 Cleaved Caspase-3 抗体、小鼠抗人 p-ERK mAb、小鼠抗人 p38 mAb、小鼠抗人 β -actin mAb, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 用 TBST 漂洗后, 分别加入稀释度为 1:1 000 的辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG (H+L) 和辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG (H+L), 室温孵育 2 h, 经 TBST 漂洗, 最后用显色剂 ECL 化学发光, 图像分析软件 Quantity One 定量分析特定条带的 A 值, 并以目的条带与 β -actin 的 A 值的比值作为目的蛋白的相对表达水平。实验重复 3 次。

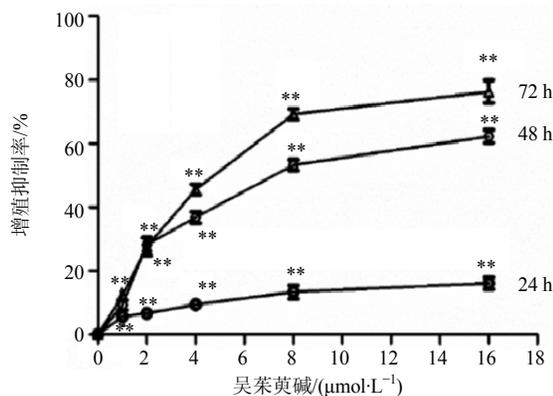
2.7 统计学处理

使用 SPSS 22.0 软件进行统计分析, 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组均数间比较用两因素和单因素方差分析。

3 结果

3.1 对 K562 细胞增殖的影响

CCK-8 法结果显示, 给予吴茱萸碱 (1~16 $\mu\text{mol/L}$) 后 K562 细胞的增殖受到抑制, 且呈剂量和时间依赖性, 与对照组比较, 差异显著 ($P < 0.01$)。结果见图 1, 吴茱萸碱作用 K562 细胞 24、48 和 72 h 的 IC_{50} 分别为 (12.03 ± 0.85)、(7.09 ± 0.11)、(6.47 ± 0.05) $\mu\text{mol/L}$ 。作用 48 h 时的 IC_{50} 为 (7.09 ± 0.11) $\mu\text{mol/L}$, 故选取与之接近的 8 $\mu\text{mol/L}$ 作为后续实验浓度的阈值。



与对照组比较: ** $P < 0.01$, 下同
** $P < 0.01$ vs control group, same as below

图 1 吴茱萸碱对 K562 细胞的增殖抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)
Fig. 1 Effect of Evo on proliferation of K562 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3.2 对 K562 细胞周期及相关蛋白表达的影响

不同浓度 (2、4、8 $\mu\text{mol/L}$) 吴茱萸碱作用 K562 细胞 48 h 后, 流式细胞仪检测结果显示, 随着吴茱萸碱浓度的增加, G_0/G_1 期细胞比例逐渐增加, 分别为 (39.37 ± 1.15)%、(54.25 ± 1.62)%、(67.77 ± 1.43)%, 与对照组 (19.80 ± 1.52)% 相比, 差异显著 ($P < 0.01$), 见图 2。Western blotting 结果显示, 随着吴茱萸碱浓度的升高, 与细胞周期相关的 CDK4 和 Cyclin D1 蛋白表达下调, 与对照组比较, 差异显著 ($P < 0.05$), 见图 3。

3.3 对 K562 细胞凋亡及凋亡相关蛋白表达的影响

不同浓度 (2、4、8 $\mu\text{mol/L}$) 吴茱萸碱作用 K562 细胞 48 h 后, 流式细胞仪检测结果显示, 随着吴茱

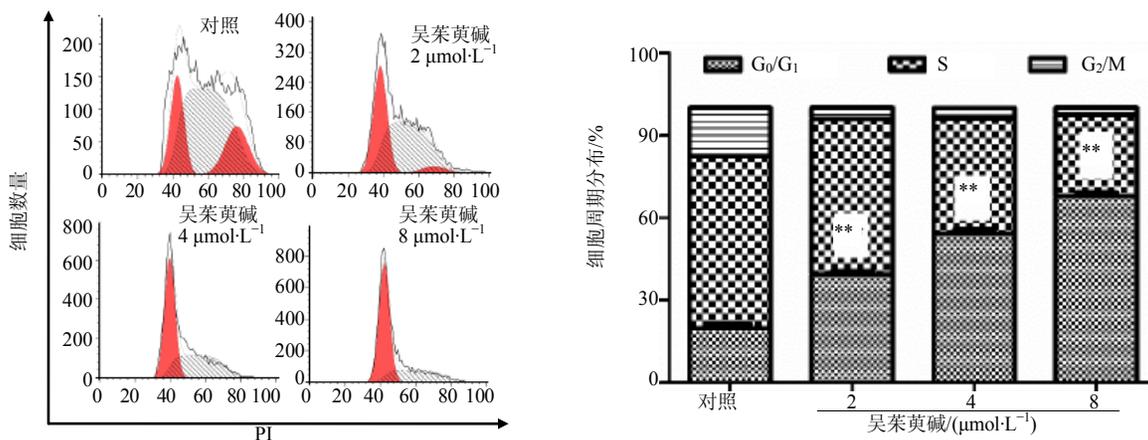
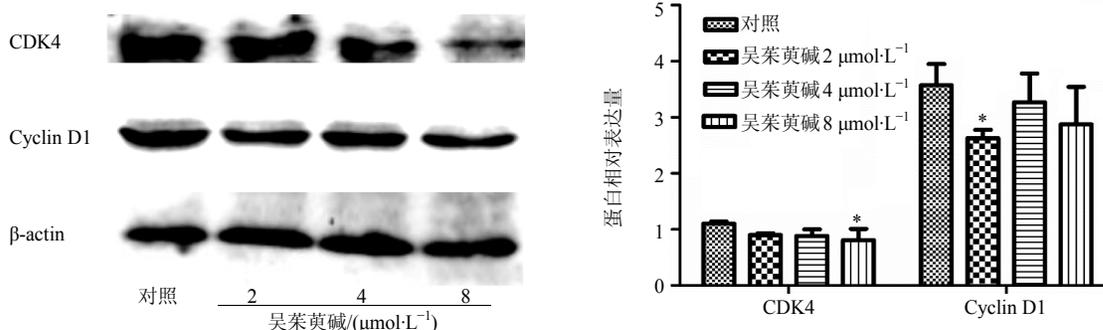


图 2 吴茱萸碱对 K562 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 2 Effect of Evo on cell cycle of K562 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



与对照组比较: * $P < 0.05$, 下同
* $P < 0.05$ vs control group, same as below
图 3 吴茱萸碱对 K562 细胞 CDK4 和 Cyclin D1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 3 Effect of Evo on CDK4 and Cyclin D1 protein expression in K562 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

碱浓度的增加, K562 细胞的早期凋亡率逐渐升高, 其凋亡率分别为 $(11.47 \pm 1.05)\%$ 、 $(12.77 \pm 0.79)\%$ 、 $(18.58 \pm 1.37)\%$, 与对照组 $(2.79 \pm 1.01)\%$ 相比, 差异显著 ($P < 0.01$), 见图 4。Western blotting 结果显示, 促凋亡蛋白 Bax 和 Cleaved Caspase-3 蛋白表

达上调; 凋亡抑制蛋白 Bcl-2 的表达下调, 与对照组相比, 差异显著 ($P < 0.01$), 见图 5。

3.4 对 K562 细胞的 HDACs 活性及 HDAC6 蛋白表达的影响

图 6 结果表明, 不同浓度 (2、4、8 μmol/L) 吴

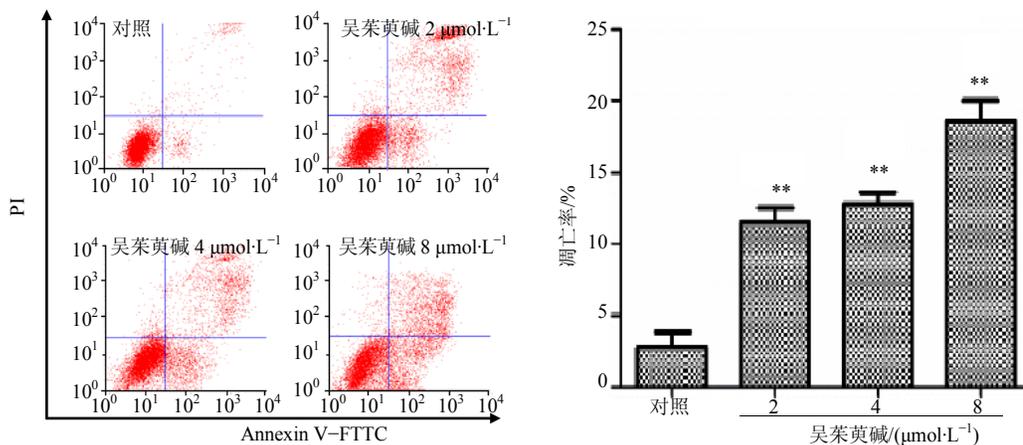


图 4 吴茱萸碱对 K562 细胞早期凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 4 Effect of Evo on early apoptosis of K562 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

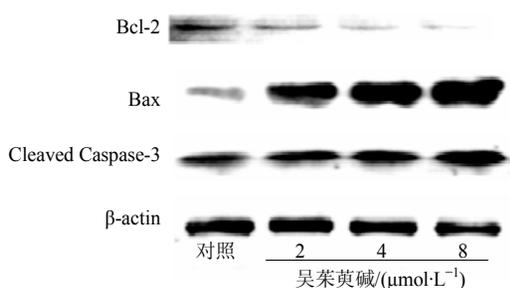


图 5 吴茱萸碱对 K562 细胞 Bcl-2、Bax 和 Cleaved Caspase-3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of Evo on expression of Bcl-2, Bax, and Cleaved Caspase-3 protein in K562 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

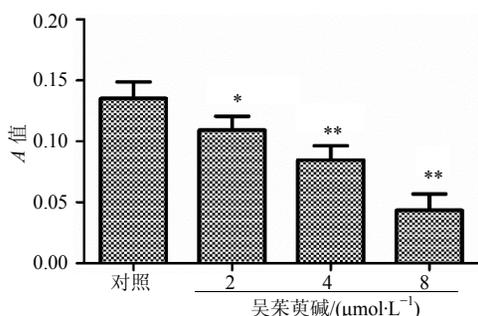
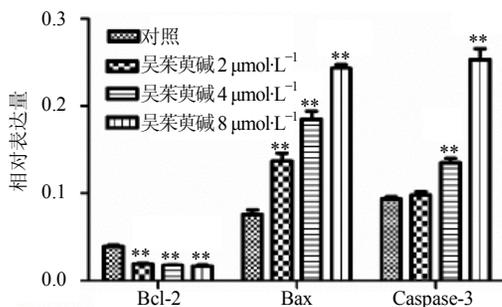


图 6 吴茱萸碱对 K562 细胞 HDACs 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of Evo on activity of HDACs in K562 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

茱萸碱作用 K562 细胞 6 h, 随着吴茱萸碱浓度的增加, HDACs 活性降低, 与对照组相比, 差异显著 ($P < 0.05, 0.01$)。Western blotting 结果显示, 随着吴茱萸碱浓度的增加, HDAC6 蛋白表达逐渐降低, 与对照组相比, 4、8 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 吴茱萸碱组差异显著 ($P < 0.01$), 2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 组没有统计学意义, 见图 7。

3.5 对 K562 细胞 ERK、p-ERK、p38、p-p38 蛋白表达的影响

不同浓度 (2、4、8 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 吴茱萸碱作用 K562

细胞 48 h, Western blotting 结果显示, 随着吴茱萸碱浓度的增加, p38 和 p-p38 表达升高, ERK 和 p-ERK 的表达下调, 与对照组相比, 差异显著 ($P < 0.05, 0.01$), 见图 8。

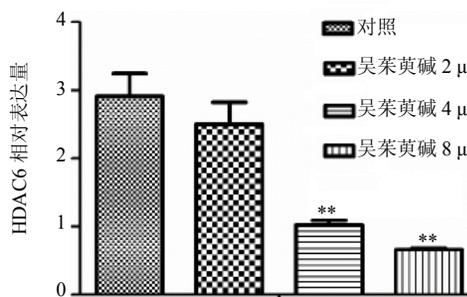
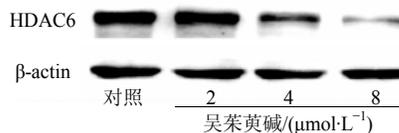


图 7 吴茱萸碱对 K562 细胞 HDAC6 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of Evo on expression of HDAC6 protein in K562 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

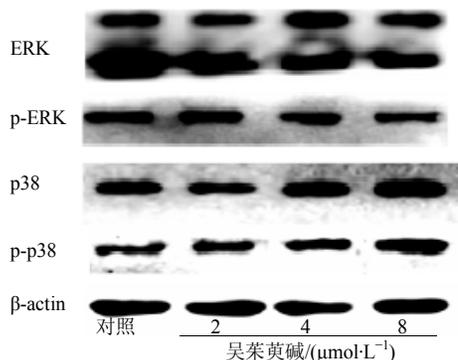
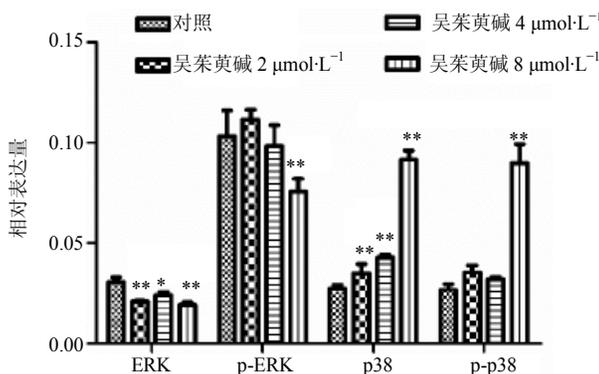


图 8 吴茱萸碱对 ERK、p-ERK、p38 和 p-p38 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Effect of Evo on expression of ERK, p-ERK, p38, and p-p38 protein in K562 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



4 讨论

吴茱萸作为一种传统中药广泛应用于中医临床,其味辛、苦,性热;具有散寒止痛、降逆止呕、助阳止泻之功。吴茱萸碱是吴茱萸的主要成分,近年来众多细胞实验和动物实验均证实其有较强的抗肿瘤活性^[10]。本研究采用 CCK-8 法检测吴茱萸碱对人白血病 K562 细胞增殖的影响,结果表明吴茱萸碱对人白血病 K562 细胞有较强的杀伤作用,能有效抑制 K562 细胞的增殖,且药物起效浓度低,呈时间和浓度依赖性。

细胞周期中有 2 个重要的调控点: G₁/S 和 G₂/M, 当 G₁ 期中的正调节因子达到一定程度时,周期才能越过 G₁/S 交界点以继续细胞周期进程,否则,细胞周期阻滞在 G₀/G₁ 期^[11]。Cyclin D1 与 CDK4 在 G₁ 期互相结合成复合物,有利于细胞周期越过 G₁/S 点,促进细胞周期进程。本研究实验结果显示,吴茱萸碱阻滞 K562 细胞周期于 G₀/G₁ 期,同时, Cyclin D1 和 CDK4 蛋白的表达均下调。细胞外信号调节激酶(ERK)是丝裂原激活蛋白激酶(MAPK)信号转导通路的关键分子之一,涉及细胞生长、发育及分化等多种生物学效应^[12]。研究报道,ERK 对细胞周期的进程具有正调节作用,用 ERK 阻滞剂抑制 ERK 的活化,可以抑制细胞周期的调控^[13-14]。本研究证明,吴茱萸碱诱导 K562 后,ERK 蛋白的表达下调,p-ERK 的表达也下调,变化有统计学意义($P < 0.05$ 、 0.01)。推测,吴茱萸碱是通过抑制 ERK 的活性阻滞 K562 细胞周期。

Bcl-2 和 Bax 分别具有抑制和促进凋亡的作用,两者在细胞内以同源二聚体存在,也可以形成异源二聚体,当 Bcl-2 不足, Bax 过量时, Bax/Bax 的同源二聚体占优势,促进细胞凋亡^[15]。Caspases 家族是哺乳动物细胞凋亡的启动者和执行者,其中 Caspase-3 是 Caspases 级联“瀑布”下游最关键的凋亡蛋白酶。Bax 蛋白作为线粒体膜上离子通道的组成成分,使细胞色素 C 得以穿过线粒体膜,激活 Caspase-9,并进一步激活 Caspase-3,导致细胞凋亡^[16]。Western blotting 结果显示,吴茱萸碱能抑制 K562 细胞 Bcl-2 蛋白的表达,上调促凋亡蛋白 Bax 的表达,同时 Caspase-3 被激活,说明吴茱萸碱能调控 K562 细胞凋亡相关蛋白,并激活 Caspases 家族,促进细胞凋亡。

p38 MAPK 信号通路是 MAPK 蛋白激酶家族的主要成员之一,定位于细胞质,当受到外界刺激激

活后,转位到细胞核。细胞外多种应激原都可引起细胞内蛋白激酶的连锁反应,从而影响细胞的基因转录、蛋白合成和促进细胞凋亡等生物效应^[17]。目前普遍认为, p38 MAPK 通过多种途径调控细胞凋亡,比如增强 c-myc 基因的转录水平、磷酸化 p53、参与 Fas/FasL 介导的凋亡、激活 c-jun 和 c-fos 以及刺激 Bax 流入线粒体而导致细胞凋亡等。本研究证实,在 K562 中,吴茱萸碱可以激活 p38,导致 p38 磷酸化,p38 的磷酸化进一步导致细胞发生凋亡。

组蛋白乙酰化修饰是由组蛋白乙酰化酶(histone acetyltransferases, HATs)和 HDACs 共同调节^[18]。HATs 调节组蛋白乙酰化,使核小体结构松弛,增强翻译活性;HDACs 调节组蛋白去乙酰化,使染色体聚集,抑制翻译^[19]。组蛋白乙酰化和去乙酰化的共同作用是基因表达调控的重要推动力^[20]。研究证实,HDACs 的过表达可以导致肿瘤的发生发展,并且在许多肿瘤中已经发现存在 HDACs 的过表达^[21-22]。因此,HDACs 是一个潜在的肿瘤治疗靶点^[2]。本研究证明,吴茱萸碱能有效抑制 HDACs 的活性,并下调 HDAC6 蛋白的表达。推测,吴茱萸碱可能是抑制白血病 K562 细胞中 HDAC6 的表达,从而发挥其抗肿瘤作用。研究发现 HDAC6 可参与肿瘤的一些信号通路的调控,比如 Ras/MAPK 信号通路,实验中发现,随着吴茱萸碱浓度的增加, p38 和 p-p38 的表达升高, ERK 和 p-ERK 的表达则下调,与对照组相比,其改变具有统计学意义。因此,吴茱萸碱诱导 K562 细胞周期阻滞和凋亡,可能通过抑制 HDAC6 的活性,激活 MAPK 信号通路,进而上调促凋亡蛋白的表达,抑制周期蛋白的表达来实现的。

综上所述,吴茱萸碱能有效抑制 K562 细胞的增殖,阻滞细胞周期,诱导细胞凋亡。其可能的机制是吴茱萸碱通过抑制 HDAC6 的表达,上调 p38,最终活化 Caspase-3,引起 K562 细胞凋亡;HDAC6 表达的抑制,还可能下调 ERK 表达,引起细胞周期的阻滞。

参考文献

- [1] 陈敏,孙雪梅. 中医药治疗白血病的研究进展 [J]. 实用中医内科杂志, 2011, 25(5): 32-35.
- [2] 张国祥,黄淑清,苏标,等. 组蛋白去乙酰化酶抑制剂抗肿瘤机制研究进展 [J]. 中国现代药物应用, 2014, 8(13): 238-240.
- [3] 李晓朋,冯子强,石雪萍,等. 吴茱萸碱逆转 K562/Adr

- 细胞多药耐药的实验研究 [J]. 中草药, 2016, 47(12): 2123-2129.
- [4] 蔡恩照, 陈玉, 李琳洁. 中医药治疗白血病研究概况 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2014, 24(12): 1132-1134.
- [5] 张志仙, 蒋美玲, 王欣慧, 等. 吴茱萸碱的药理学研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2014, 21(21): 4189-4191.
- [6] 刘利琼, 任伟, 谢丽, 等. 吴茱萸碱诱导肿瘤细胞凋亡的分子机制研究进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2015, 23(10): 1471-1474.
- [7] Florean C, Schneckenger M, Grandjennette C, *et al.* Epigenomics of leukemia: from mechanisms to therapeutic applications [J]. *Epigenomics*, 2011, 3(5): 581-609.
- [8] Carew J S, Giles F J, Nawrocki S T. Histone deacetylase inhibitors: Mechanisms of cell death and promise in combination cancer therapy [J]. *Cancer Lett*, 2008, 269(1): 7-17.
- [9] Barneda-Zahonero B, Parra M. Histone deacetylases and cancer [J]. *Mol Oncol*, 2012, 6(6): 579-589.
- [10] 张醇, 梁华平. 吴茱萸碱抗肿瘤活性研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2010, 19(17): 1558-1562.
- [11] 张丽志, 瞿全新, 温克. ERK 信号转导通路对肿瘤细胞生物学行为的调控 [J]. 医学综述, 2011, 17(6): 836-838.
- [12] McCubrey J A, Steelman L S, Chappell W H, *et al.* Mutations and deregulation of Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR cascades which alter therapy response [J]. *Oncotarget*, 2012, 3(9): 954-987.
- [13] Hoshino R, Tanimura S, Watanabe K, *et al.* Blockade of the extracellular signal-regulated kinase pathway induces marked G1 cell cycle arrest and apoptosis in tumor cells in which the pathway is constitutively activated: up-regulation of p27 (Kip1) [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(4): 2686-2692.
- [14] Kortylewski M, Heinrich P C, Kauffmann M E, *et al.* Mitogen-activated protein kinases control p27/Kip1 expression and growth of human melanoma cells [J]. *Biochem J*, 2001, 357(1): 297-303.
- [15] Cory S, Huang D C, Adams J M. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis [J]. *Oncogene*, 2003, 22(53): 8590-8607.
- [16] Schon E A, Manfredi G. Neuronal degeneration and mitochondrial dysfunction [J]. *J Clin Invest*, 2003, 111(3): 303-312.
- [17] 邱建武, 郭薇, 申丽娟. p38MAPK 在肝细胞癌中的研究进展 [J]. 世界华人消化杂志, 2008, 16(5): 503-509.
- [18] Schoofs T, Berdel W E, Müller-Tidow C. Origins of aberrant DNA methylation in acute myeloid leukemia [J]. *Leukemia*, 2014, 28(1): 1-14.
- [19] Angibaud P, van Emelen K, Decrane L, *et al.* Identification of a series of substituted 2-piperazinyl-5-pyrimidylhydroxamic acids as potent histone deacetylase inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010, 20(1): 294-298.
- [20] Minucci S, Pelicci P G. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(1): 38-51.
- [21] Sapountzi V, Côté J. MYST-family histone acetyltransferases: beyond chromatin [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68(7): 1147-1156.
- [22] Witt O, Deubzer H E, Milde T, *et al.* HDAC family: What are the cancer relevant targets? [J]. *Cancer Lett*, 2009, 277(1): 8-21.