

Research on the Anti-Leukemia Mechanism of the Petroleum Ether Parts and Polysaccharides of Sago Cycas

Ben Chen¹ Lu Li^{1,2*}

1. Guangxi Experimental Center of Traditional Chinese Medicine, Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning, Guangxi, 530200, China

2. Guangxi Key Laboratory of Basic Research of Traditional Chinese Medicine, Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning, Guangxi, 530200, China

Abstract

Objective: To investigate the effect of extractive from sago cycas on proliferation and apoptosis inhibition of K562 leukemia cells line and discuss its action mechanism. **Methods:** K562 leukemia cells line was treated with the extractive from sago cycas (1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625mg/L) and another blank group was set up. Cell viability was estimated by using CCK-8 assay; The apoptosis morphology changes were observed by Hoechst 33258 staining; Flow cytometry was used on Annexin V-FITC /propidium iodide staining to detect the rate of apoptosis; Western blot was used to detect Caspase-3 and Cytochrome C protein expression. **Results:** The extractive from sago cycas various nuclear changes such as nuclear shrinkage, chromatin condensation and obvious apoptotic bodies were observed after K562 cell line was treated with extractive from sago cycas for 24 h. 125, 62.5, 31.25, 15.625mg/L extractive from sago cycas induced apoptosis of K562 (P<0.05). extractive from sago cycas promoted Caspase-3 and Cytochrome C protein degradation (P<0.05, P<0.01). **Conclusion:** The extractive from sago cycas can inhibit the proliferation of K562 cells in vitro, and the mechanism may be correlated with inducing cell apoptosis by promoting Caspase-3 and Cytochrome C activity.

Keywords

sago cycas; apoptosis; human chronic myeloid leukemia K562 cells

苏铁提取物石油醚部位及多糖成分抗白血病作用机制研究

陈奔¹ 李璐^{1,2*}

1. 广西中医药大学广西中医药科学实验中心, 中国·广西南宁 530200

2. 广西中医药大学广西中医基础研究重点实验室, 中国·广西南宁 530200

摘要

目的: 以人慢性髓系白血病 K562 细胞为研究对象, 探讨苏铁提取物对 K562 细胞增殖与凋亡抑制作用及其作用机制。**方法:** 以质量浓度分别为 1000、500、250、125、62.5、31.25、15.625mg/L 的苏铁提取物作用于人慢性髓系白血病 K562 细胞, 另设空白组, 采用 CCK8 法检测苏铁提取物对其增殖抑制作用, Hoechst 33258 染色法观察细胞凋亡的形态学变化, Annexin V-FITC, PI 双染法应用流式细胞术检测细胞凋亡, 蛋白质免疫印迹 (Western blot) 检测半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (Caspase-3) 凋亡蛋白及细胞色素 C (Cytochrome C) 的表达。**结果:** 苏铁提取物作用于 K562 细胞 24h 后可使细胞核皱缩, 染色质凝集, 形成明显的凋亡小体; 与空白组比较, 125、62.5、31.25、15.625mg/L 苏铁提取物能诱导 K562 细胞凋亡 (P<0.05); 与空白对照组比较, 苏铁提取物作用组促进 Caspase-3 蛋白及细胞色素 C 的表达 (P<0.05, P<0.01)。**结论:** 苏铁提取物能够抑制人慢性髓系白血病 K562 细胞的增殖, 其作用机制可能与促进 Caspase-3 蛋白及细胞色素 C 活性进而诱导细胞凋亡效应有关。

关键词

苏铁提取物; 凋亡; 人慢性髓系白血病 K562 细胞

【基金项目】 广西高校中青年骨干教师基础能力提升项目——《苏铁提取物抗人白血病有效部位筛选及作用机制研究》(项目编号: 2017KY0322); 广西中医基础研究重点实验室——五脏温阳化痰汤对动脉粥样硬化型大鼠脂质代谢的影响及机制研究(项目编号: K201255803)。

【作者简介】 陈奔(1990-), 男, 中国广西人, 研究生学历, 助理研究员, 从事中药药理研究。

1 引言

慢性粒细胞白血病是一种影响血液及骨髓的恶性肿瘤, 其特点是产生大量不成熟的白血病细胞。但在中国古代医学中并没有白血病这一疾病名称, 根据此病的主要临床特点如发热、贫血、出血、肝脾及淋巴结肿大等, 可在历代文献中查到相关的证候, 故该病可归属于“虚劳”“急劳”“热劳”“百

日劳”“血证”等病证范畴^[1]。天然药用植物是新药研发的重要来源,一些具有良好抗肿瘤活性且毒副作用低的化合物直接或间接来源于天然植物,因此,从天然药物中寻找安全、有效的抗白血病药物具有重要意义。

苏铁属苏铁科苏铁属植物,苏铁又名铁树、凤尾蕉,裸子植物,属苏铁科、铁树属常绿乔木。据《本草纲目拾遗》记载,叶有解热毒,凉血散瘀止血等功效;将其茎干去皮入药,有清热解毒、止血散瘀、抗菌治烫的作用。为常绿灌木,全年可采集^[2],所以对于这种有药用价值的资源进行研究,发现其新用途,对于中药资源保护和开发具有重要意义。

本研究以造血系统恶性肿瘤白血病细胞为研究对象,采用 CCK-8 法、Hoechst 33258 染色、Annexin V -FITC/PI 双标记法、Caspase-3 活性检测、细胞色素 C 活性检测、Western blot 等技术与方法,初步研究苏铁提取物对人白血病 K562 细胞的增殖抑制作用及抗肿瘤分子作用机制,期待为苏铁提取物作为抗白血病等多种肿瘤药物的开发提供实验依据。

2 材料

2.1 细胞株

人白血病 K562 细胞,购于南京凯基生物科技发展有限公司。K562 细胞悬浮接种在含 10% 胎牛血清 1640 培养液中,于 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养。

2.2 药物及试剂

苏铁多糖部位及石油醚部位(课题组提取);胎牛血清和 RPMI-1640 培养基(美国 Gibco 公司);细胞荧光凋亡 Hoechst 33258 检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司);Caspase-3 antibody 和细胞色素 C(美国 Cell signaling 公司);Annexin V-FITC Apoptosis Detection kit(美国 BD 公司);CCK-8(日本同仁公司);BCA 试剂盒(碧云天生物技术);格列宁(北京伊诺凯科技有限公司);其他试剂均为分析纯。

2.3 仪器

FACS Calibur 流式细胞仪(美国 BD);DMI3000B 型倒置荧光显微镜(德国 Leica 公司),酶标仪(美国 thermo 公司);CO₂ 培养箱(美国 thermo 公司);高速冷冻离心机(美国 thermo 公司);Jess 多功能全自动蛋白免疫印迹定量分析系统(美国 ProteinSimple 公司)

3 方法

3.1 苏铁有效部位的提取分离

苏铁提取物为本课题组从苏铁中提取分离得到,经前期试验研究证明苏铁多糖部位和石油醚提取部位的抗肿瘤效果最优,因此本研究选用这两种苏铁提取物作为研究对象。

制备方法:取新鲜苏铁叶 10g,洗净,加入双蒸水 30ml,煮沸后文火煎煮,保持微沸状态 30min,冷却后过滤,收集滤液,药渣再加水 20ml 煎煮 30min,收集滤液。两次滤液混匀浓缩得到苏铁粗提取液 10ml。

多糖部位提取:取粗提液,3500 r/min 离心 15 min,将上清液减压浓缩至原体积的 1/5,加入溶液 5 倍体积的无水乙醇,在 4℃ 条件下醇化 24h,醇化液在 3500r/min 条件下离心 15min,弃去上清液,将沉淀溶于适量蒸馏水后,除去蛋白质,蒸馏水透析,减压浓缩,最后冷冻干燥得到苏铁多糖部位冻干粉。

石油醚部位提取:按粗提液/95%乙醇=1/3 比例加入溶剂,用 95%乙醇加热回流提取 3 次,用石油醚萃取 3 次,合并萃取液并减压回收溶剂得到苏铁石油醚部位。

以下文中提到苏铁多糖部位和石油醚部位的提取物,无特别说明情况下,两者统称为“苏铁提取物”

3.2 细胞培养

于 37℃、5%CO₂ 下,用 RPMI-1640 培养液(含 10% 胎牛血清)传代培养人白血病 K562 细胞,实验用细胞均处于对数生长期。

3.3 CCK-8 法检测苏铁提取物对 K562 细胞增殖的影响

取对数生长期的 K562 细胞,以 1×10^5 / 孔接种至 96 孔板培养 24h 后,设立阴性对照组、阳性对照组及给药组,阴性对照组加入等体积培养液,阳性药为格列宁,终浓度为 0.1mg/L,药物组加入含不同浓度苏铁提取物(1000、500、250、125、62.5、31.25、15.625mg/L)培养液 200μL,置培养箱中培养,分别在细胞培养 12、24、48h 后于每孔加入 CCK-8(5g/L)溶液 20μL,振荡混匀后,置于培养箱内继续孵育 4h,加入 150μL DMSO 溶液终止反应,振荡至蓝色晶体完全溶解,于酶标仪 490nm 处测定光密度值 OD,计算药物对细胞的增殖抑制率。

$$\text{细胞增殖抑制率} = \frac{(1 - \text{加药组 OD 值})}{\text{对照组 OD 值}} \times 100\%$$

3.4 苏铁提取物诱导 K562 细胞凋亡的形态观察

取 K562 细胞以 1×10^5 /孔接种至 6 孔培养板, 培养 24h 后, 药物组加入含不同浓度苏铁提取物 (125、62.5、31.25、15.625mg/L) 培养液 2mL, 对照组孔加入等体积的培养液, 置培养箱培养 24h 后, 置倒置显微镜下观察细胞凋亡形态。

3.5 流式细胞仪检测细胞凋亡率

取 K562 细胞接种于 6 孔板中, 培养 24h 后加入药物, 作用 24h 后收集细胞, 用预冷 PBS 洗涤, 重悬于 binding buffer 溶液并使细胞浓度为 1×10^6 /mL。于 100 μ L 细胞悬液中分别加入 Annexin V -FITC 及 50 μ g/mL PI 染色液各 5 μ L, 置室温避光孵育 15 min 后加入 binding buffer 200 μ L, 混匀, 1h 内于流式细胞仪进行检测并计算细胞凋亡率, 凋亡细胞为 AnnexinV 阳性细胞。

3.6 蛋白质免疫印迹 (Western blot) 分析蛋白表达

取对数生长期 K562 细胞, 细胞数 1×10^6 个 /皿置于培养皿中, 分别加入不同质量浓度的苏铁提取物多糖物质和石油醚部位使其终质量浓度分别为 62.5、15.625 mg/L, 125、31.25mg/L, 并设置空白组, 作用 24h。收集细胞, 用细胞裂解液 200 μ L 裂解 1h, 冰冻破碎后, 15000 \times g 离心 15min, 收集上清。用 BCA 试剂盒蛋白定量后, 上 Jess 多功能全自动蛋白免疫印迹定量分析系统。

3.7 统计学处理

实验数据采用 SPSS 17.0 软件进行统计, 计数资料以率表示, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。计量资料组间比较采用方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

4 结果

4.1 苏铁提取物对 K562 细胞的增殖抑制作用

结果如图 1、图 2 所示, 不同浓度苏铁提取物作用于 K562 细胞 24h 后对 K562 细胞的增殖抑制作用呈浓度依赖性。

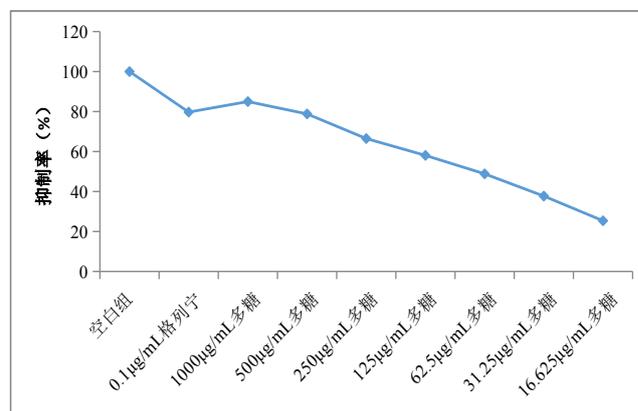
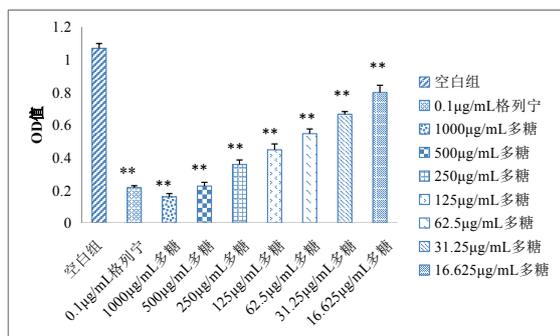


图 1 苏铁多糖成分对 K562 细胞增殖抑制作用

注: ** 表示 $P < 0.01$

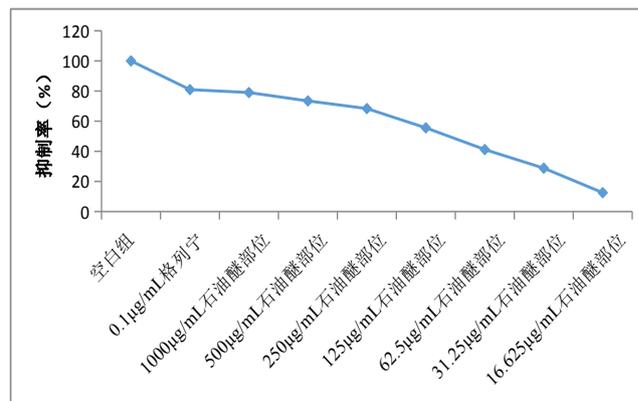
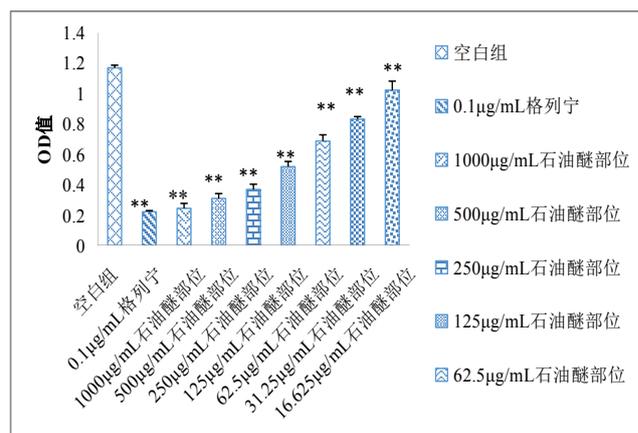
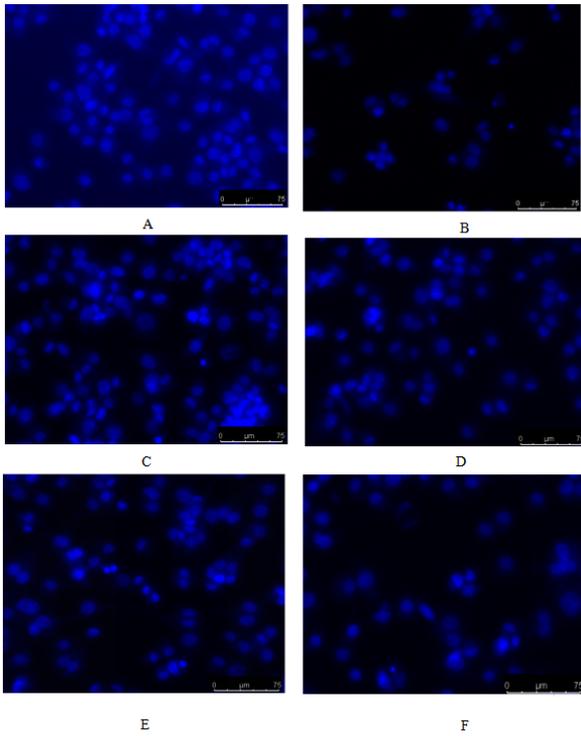


图 2 苏铁石油醚部位对 K562 细胞增殖抑制作用

注: * 表示 $P < 0.01$

4.2 苏铁提取物诱导 K562 细胞凋亡的形态学观察

结果如图 3 所示, 经 Hoechst33258 荧光染色显示, 未经药物处理的细胞, 其细胞核染色均匀, 体积较大, 细胞质舒展, 数量较多, 而经药物作用 24h 后, 细胞生长疏散, 细胞核皱缩, 且细胞核染色密集, 核内有多个颗粒, 即染色发生断裂, 形成凋亡小体。



A. 阴性对照组; B. 阳性药物对照组; C. 62.5ug/ml 苏铁多糖部位提取物; D. 15.625ug/ml 苏铁多糖部位提取物; E. 125ug/ml 苏铁石油醚部位提取物; F. 31.25ug/ml 苏铁石油醚部位提取物

图3 K562 细胞凋亡形态变化的荧光显微镜观察 (x20)

4.3 苏铁提取物对 K562 细胞凋亡的影响

Annexin V-FITC 及 PI 双标记法流式细胞仪检测结果显示, 不同浓度苏铁提取物作用后能明显诱导 K562 细胞发生凋亡。其中空白组, 0.1μg/mL 格列宁组, 62.5μg/mL 多糖组, 15.625μg/mL 多糖组, 125μg/mL 石油醚部位组, 31.25μg/mL 石油醚部位组作用于 K562 细胞 24h 后, 细胞早期凋亡率分别为 1.1%, 6.3%, 23.6%, 6.6%, 35.3%, 8.6%, 晚期凋亡率分别为 5.2%, 19.2%, 10.4%, 14.4%, 11%, 11.4% 由此可见, 苏铁提取物多糖物质和石油醚部位对 K562 细胞的凋亡作用剂量依赖关系主要体现在早期凋亡, 对晚期凋亡的作用基本一致。空白组与药物组比较具有统计学差异 ($P < 0.05$), 如图 4 所示。

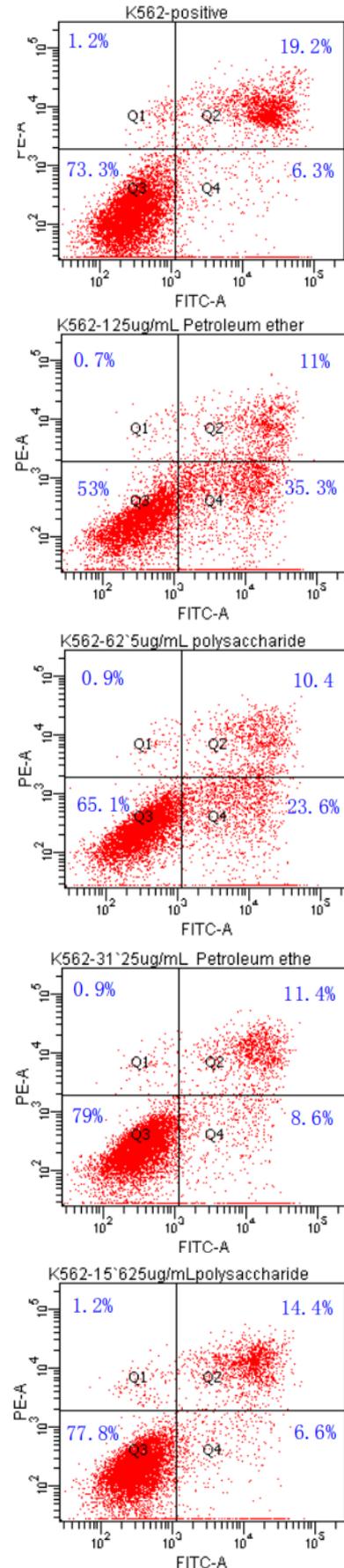


图4 各组细胞凋亡不同程度的比较

4.4 苏铁提取物对 Caspase-3 蛋白和细胞色素 C 表达的影响

K562 细胞给予不同质量浓度苏铁提取物作用 24h 后, 与空白组比较, 给药组总 Caspase-3 蛋白 (35kD) 的表达显著升高。石油醚部位和多糖的激活 Caspase-3 (17kD) 也都不同程度升高, 62.5ug/mL 石油醚部位较显著。给药组细胞色素 C 表达有不同程度的升高, 但不显著, 如图 5 所示。

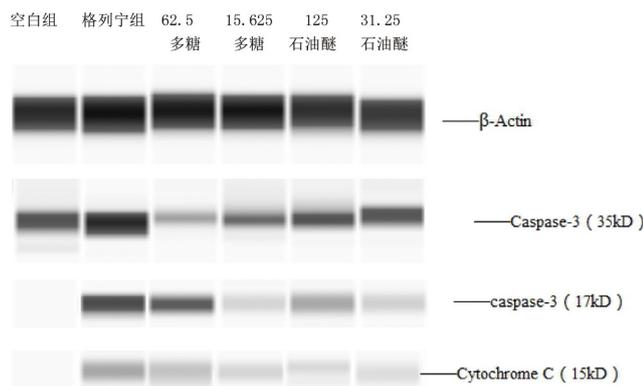


图 5 不同组间 Caspase-3、Cytochrome C 蛋白表达对比

5 结论

前期孙玲玲^[3]等已经研究报道铁树叶提取液对白血病细胞株 K562 的增殖有明显抑制作用, 苏铁中含有苏铁苷, 新苏铁苷 A 及 B、黄酮等成分, 具有抗肿瘤, 但并未阐明抗肿瘤机制。本实验首次探讨了苏铁有效提取部位对 K562 细胞的抑制作用及其机制, 实验采用 CCK-8 法检测到苏铁多糖部位和石油醚部位提取物对人白血病 K562 细胞有良好的抑制作用。细胞凋亡是致病因子或异常信号诱导发生的“生理性”细胞死亡^[4], 在细胞的精细调控和病损细胞的清除等方面发挥着重要作用, 细胞凋亡过程伴随着细胞内一系列化学分子信号的传导, 影响细胞凋亡的因子包括蛋白质因子、离子 (如 Ca^{2+})、线粒体膜电位等, 凋亡细胞通过对凋亡信号的感知和一系列的变化及调控从而释放一些蛋白, 如凋亡介导因子、Caspase 家族和核酸内切酶、细胞色素 C 等^[5-6]。凋亡是药物抗肿瘤的主要途径之一, 细胞凋亡具有典型的特征性形态学改变, 通过 Hoechst 33258 凋亡染色发现经苏铁提取物处理后 K562 细胞有明显的形态学变化, 染色质浓缩沿核膜排列, 碎裂呈块状结构, 有凋亡小体出现, 呈亮蓝色荧光, 呈现出典型的细胞凋亡形态, 表明苏铁提取物具有促进 K562 细胞凋亡的作用。应用流式细胞术 Annexin V-FITC/PI 双标记法定量

实验可见随着苏铁提取物浓度的升高, 细胞凋亡率增加, 细胞凋亡率与苏铁提取物的浓度呈正相关, 与空白组比较, 结果具有统计学差异, 进一步表明苏铁提取物能促进 K562 细胞凋亡。在 Western blot 实验中显示, 苏铁提取物在诱导 K562 细胞发生凋亡的过程中伴有 Caspase-3 和细胞色素 C 两种蛋白表达的改变, 提示苏铁提取物诱导肿瘤细胞凋亡的作用与这两种蛋白表达调控有关。近年来对细胞色素 C 的认识已经从其对能量代谢的控制而进展为对其参与凋亡过程的研究。在脑缺血再灌注损伤过程中, 起作用的不只是线粒体呼吸活性的丧失, 更重要的是细胞色素 C 自线粒体的释放。正常情况下, 细胞色素 C 是一个定位于线粒体膜间隙的相对分子量为 1.45×10^4 的水溶性蛋白质, 电稳定性地结合于线粒体内膜, 不能通过外膜。神经元凋亡过程中, 细胞色素 c 通过线粒体外膜释放, 在 ATP/dATP 的参与下, 在胞质中与 Apaf-1 结合形成寡聚体, Apaf-1 通过其氨基端和 Caspase-9 前体的功能前区相互作用, 导致 Caspase-3 激活, 并进一步激活下游的 Caspases^[7-8]。本实验证明苏铁石油醚部位和多糖成分能够诱导 K562 细胞凋亡, 为今后的中药抗白血病研究提供基础。

参考文献

- [1] 郝晶, 崔永春, 王伟涛, 等, 中医药治疗白血病的研究进展 [J]. 天津中医药, 2003, 20(2): 84-86.
- [2] 江苏新医学. 中药大词典 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1996.
- [3] 孙玲玲, 毕富勇, 凌烈峰, 等, 铁树叶提取液对白血病细胞株 K562、HL-60 增殖抑制作用的实验研究 [J]. 九江学院学报 (自然科学版), 2001, 16(4): 192-193.
- [4] 彭黎明, 王曾礼. 细胞凋亡的基础与临床 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000.
- [5] 苏苗, 俞腾飞, 郭敏, 等. 肝细胞凋亡机制的研究进展 [J]. 中国临床药理学杂志, 2015, 31(16): 1684-1686.
- [6] Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium -apoptosis link [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2003, 4(07): 552-565.
- [7] Szabo S J, Kim S T, Costa G L, et al. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment [J]. Cell, 2000, 100(6): 655-669.
- [8] Wurster A L, Tanaka T, Gmsby M J. The biology of Stat4 and Stat6 [J]. Oncogene, 2000, 19(21): 2577-2584.