



· 药理 ·

冬凌草乙素对白血病 K562 细胞的诱导凋亡作用及机制研究

刘晓丹¹, 刘文达², 徐妍¹, 刘培庆³, 王春芝¹, 林东军¹,
黄河清³, 吴传斌³, 肖若芝¹, 黄仁魏¹, 刘加军^{1*}

- (1. 中山大学附属第三医院血液科/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:探讨冬凌草乙素(ponicidin, PON)对白血病 K562 细胞的诱导凋亡作用及其作用机制。方法:以不同浓度的 PON ($10 \sim 50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)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, 收集药物作用 72 h 后的细胞 Annexin V 染色并通过流式细胞术(FCM)检测细胞凋亡率, 瑞氏-姬姆萨染色观察细胞凋亡时的形态学变化。应用免疫印迹法(Western blot)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 MAPKs (mitogen-activated protein kinase)信号转导通路相关蛋白(p-P38, p-ERK 和 p-JNK)以及 PI3K(磷脂酰肌醇-3-激酶)/AKT 信号通路中的 p-AKT, p-P85 蛋白的表达水平进行检测。结果: $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上的 PON 可显著抑制细胞的生长, 并呈现出明显的量-效与时效关系, FCM 检测结果表明, 不同浓度的药物作用 72 h 后, 随药物浓度的增加细胞凋亡率逐渐升高, $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PON 作用不同时间后在瑞氏-姬姆萨染色下可见典型的核浓缩及核碎裂等细胞凋亡现象。Western blot 检测结果表明, 药物作用 48 h 后 caspase-3 被活化出现 17 kD 的亚单位, 同时 PARP 被裂解出现 89 kD 的亚单位片段。Western blot 检测结果进一步显示药物作用 48 h 后 MAPKs 信号途径中 p-P38, p-ERK 和 p-JNK 蛋白的表达水平无明显变化, 而 PI3K/AKT 信号通路中的 p-AKT, p-P85 蛋白的表达水平则随着药物浓度增加而逐渐下降。结论: PON 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。PON 对 K562 细胞的诱导凋亡作用机制与 caspase-3 的活化以及降低 PI3K/AKT 信号通路中 p-AKT 及 p-P85 蛋白的表达水平有关, 而与 MAPKs 信号通路中的相关调节蛋白无关; 这些研究结果为进一步研究冬凌草素的抗白血病作用提供了有力的实验依据和技术平台。

[关键词] 冬凌草乙素; 白血病; K562 细胞; 细胞凋亡

冬凌草 *Rabdosia rubescens* 系唇形科香茶菜属植物, 冬凌草及其中提取的二萜类化合物冬凌草素已开始广泛地应用于肿瘤的治疗研究, 冬凌草中主要抗肿瘤成分为贝壳杉烷类二萜化合物^[1-2]。冬凌草乙素(ponicidin, PON)是从冬凌草中提取出来的一种重要的二萜类化合物, 新近资料表明^[3], 冬凌草乙素可通过诱导胆管癌细胞凋亡而发挥抗肿瘤作用。既往的体外研究资料表明^[4], 冬凌草乙素可通

过诱导线粒体损伤和调节某些凋亡相关基因的变化而诱导实体瘤如肺癌等肿瘤细胞发生凋亡。目前冬凌草乙素对白血病 K562 细胞的作用机制尚未见资料报道, 本研究以体外培养的 K562 细胞为研究对象, 观察了不同浓度的冬凌草乙素对 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。

1 材料

1.1 细胞系 淋巴瘤白血病 K562 细胞株由暨南大学生物化学教研室吴志慧老师馈赠。

1.2 试剂 冬凌草乙素按文献提取^[5-7]; 瑞氏-姬姆萨染液、RPMI1640 培养液(GIBCO 公司); 小牛血清(杭州四季青生物制品厂); Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基生物公司)。抗人 p-P38,

[稿件编号] 20100427008

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30772782); 教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-0721)

[通信作者] *刘加军, 副教授, 硕士生导师, 主要从事血液肿瘤分子靶向药物的开发利用及细胞凋亡机制研究, Tel: (020) 85252227, Fax: (020) 85253336, E-mail: jiajun.l@163.com



p-ERK, p-JNK, AKT, PI3K, p-AKT, p-P85, β -actin, GAPDH, caspase-3 及 PARP (caspase-3 底物) 抗体均为美国 Cayman 公司产品。

1.3 仪器及设备 超净工作台; CO₂ 细胞培养箱、普通及倒置显微镜 (美国 Olympus); 96 孔培养板 (美国 Deta); FACScan 型流式细胞仪 (美国 Becton Dickinson)。

2 方法

2.1 细胞培养 将 K562 细胞接种于含 10% 灭活小牛血清的 RPMI1640 培养液中, 在 37 °C, 5% CO₂ 饱和湿度下培养, 每 1 ~ 2 d 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 PON 处理细胞, 未加药组为对照组。

2.2 细胞生长抑制率的测定 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 2×10^6 个/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 PON 储存液, 调整其终浓度分别为 10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。取 96 孔板数个, 每孔加入上述细胞悬液 100 μL , 每种药物浓度为一组, 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 ($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 10 μL , 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 μL , 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 , 根据公式计算细胞生长抑制率。

$$\text{细胞生长抑制率} = [A_{\text{对照组}} - A_{\text{实验组}}] / A_{\text{对照组}} \times 100\%$$

2.3 Annexin V 染色后流式细胞仪 (FCM) 检测细胞凋亡 将药物处理 72 h 后的 K562 细胞收集 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 以 PBS 缓冲液清洗 2 次后再将细胞沉淀充分混匀, 用 70% 的冷乙醇 4 °C 固定 24 h 以上。然后离心去除乙醇固定液, 用 PBS 清洗 1 次后, 用 Annexin V 染色后 FCM 检测。

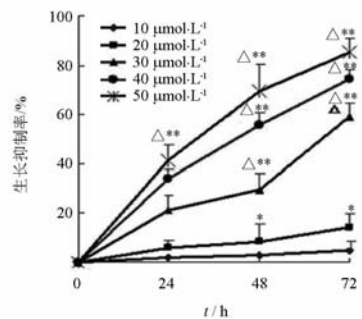
2.4 瑞氏-姬姆萨染色形态学观察细胞凋亡 收集 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PON 作用后的细胞, 离心管 $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 低速离心 3 min, 去上清, 取 0.2 mL 涂片, 冷风吹干, 加 5 滴瑞氏-姬姆萨染液, 再滴加等量缓冲液, 用吸球将其与染液吹匀, 染色 20 min, 冲洗, 晾干, 先在普通显微镜下观察, 然后在油镜下观察细胞形态学变化。

2.5 免疫印迹法 (Western blotting) 检测凋亡调节

蛋白 收集 PON 处理 48 h 后的细胞 1×10^6 个, 提取细胞总蛋白, 经 Bio-Rad 法定量蛋白。每个泳道取 40 mg 蛋白上样, 经十二烷基磺酸钠一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 p-P38, p-ERK, p-JNK, AKT, PI3K, p-AKT, p-P85, β -actin 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。

3 结果

3.1 PON 对 K562 细胞的生长抑制率 10 ~ 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PON 对 K562 细胞的生长无明显作用, 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上浓度随着药物作用时间的延长, 细胞生长抑制率逐渐升高, 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PON 引起的细胞生长抑制率明显高于其他浓度 ($P < 0.01$), 见图 1。



与 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 比较 * $P < 0.05$,

** $P < 0.01$; 与 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 比较 $\Delta P < 0.01$ 。

图 1 PON 对 K562 细胞的生长抑制作用

3.2 药物作用 72 h 后 FCM 检测细胞凋亡 FCM 检测结果表明, 10 ~ 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PON 对细胞无明显的诱导凋亡作用, 浓度在 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上时, 随药物浓度的增加, 细胞凋亡率逐渐升高。10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PON 作用 72 h 后引起的凋亡率分别为 6.5%, 11.9%, 19.6%, 39.6%, 43.4%。

3.3 瑞氏-姬姆萨染色观察细胞形态学改变 为了观察细胞形态学变化, 收集了 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PON 作用不同时间后的细胞, 进行瑞氏-姬姆萨染色。结果显示, 对照组 K562 细胞膜完整, 染色质分布均匀。药物作用 24 h 后, 可见到早期凋亡的细胞, 这类细胞体积变小, 出现许多气穴现象的空泡结构, 还

有些细胞染色质浓缩、边缘化。药物作用 48 h 后, 细胞核染色质浓缩明显, 部分细胞核浓缩呈新月状附在核膜周围, 有些细胞胞浆中可见空泡。药物作用 72 h 后, 细胞核固缩明显, 部分细胞可见核裂解, 可见细胞碎片, 见图 2。

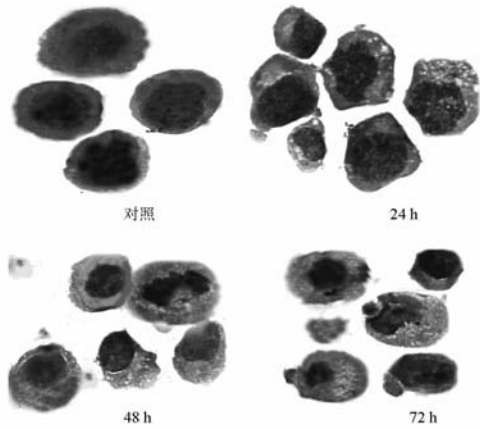
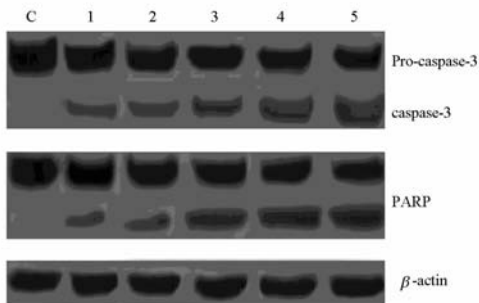


图 2 50 μmol · L⁻¹ 的 PON 作用不同时间后的细胞形态学变化(×100)

3.4 caspase-3 及 PARP 表达水平的变化 为了探讨细胞凋亡的发生机制, 对不同浓度的药物作用 48 h 后应用 Western blot 检测了 caspase-3 及 PARP 表达水平的变化。结果显示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, 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, 见图 3。



C. 对照组; 1, 2, 3, 4, 5 分别为 10, 20, 30, 40, 50 μmol · L⁻¹ PON(图 4, 5 同)。

图 3 PON 作用 48 h 后 caspase-3 及 PARP 变化

3.5 PON 作用 48 h 后 MAPKs 及 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白表达水平的变化 为了阐明不同信号通路在 PON 诱导细胞凋亡过程中的作用, 首先检测了 MAPKs 信号通路中相关蛋白 p-P38, p-ERK 和 p-JNK 水平的变化, 但在细胞发生凋亡的同时, MAPKs 信号通路中 3 种主要蛋白 p-P38, p-ERK 和 p-JNK 的表达水平没有改变, 这说明 MAPKs 信号通路没有参与 PON 对 K562 细胞的诱导凋亡作用, 见图 4。

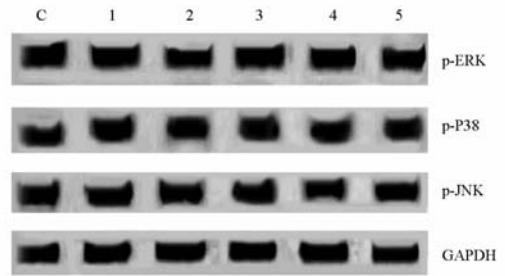


图 4 MAPKs 信号途径中调节蛋白表达水平的变化

由于 PI3K/AKT 信号通路与细胞的增殖及凋亡密切相关, 进一步检测了 PI3K/AKT 信号通路中 PI3K 及其调节亚单位磷酸化 P85 (p-P85) 的表达水平, 同时检测了 AKT 以及磷酸化 AKT (p-AKT) 表达水平的变化, 结果表明, 在 K562 细胞中存在高水平的 PI3K 及 AKT, 药物作用 48 h 后, 30 μmol · L⁻¹ 以上浓度药物随着浓度的增加 p-P85 及 p-AKT 的表达水平逐渐降低, 见图 5。

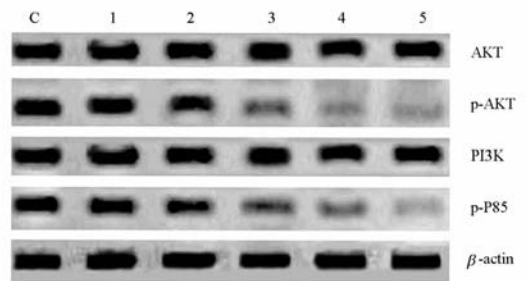


图 5 药物作用 48 h 后 PI3K/AKT 信号通路蛋白表达水平的变化

4 讨论

冬凌草在美国是前列腺癌有效治疗药物 PC-SPES 的重要成分之一^[5]。自从 DiPaola R S 等^[6]报道了关于 PC-SPES 的广泛应用前景后, 众多学者进



行了广泛的研究。到目前为止从冬凌草中已分离鉴定了20多个二萜化合物,冬凌草乙素(ponicidin, PON)是其有效抗肿瘤成分之一,其抗癌作用可能与抗突变、延缓肿瘤细胞的生长速度、逆转肿瘤细胞的耐药性及增强抗肿瘤药物的疗效等有关^[7]。

PI3K(磷脂酰肌醇-3-激酶)是一种细胞内磷脂酰肌醇激酶,具有丝氨酸/苏氨酸(Ser/Thr)激酶的活性,PI3K介导的信号转导通路可以通过不同的方式调节细胞的分裂、分化、凋亡等活动^[8]。P85是PI3K重要的调节亚基,磷酸化的P85(p-P85)表达水平增高可以促进细胞增殖,抑制细胞的凋亡过程^[8]。AKT是PI3K重要的下游调节因子,磷酸化的AKT(p-AKT)可以增加核转录因子NF- κ B的转录活性,增加肿瘤细胞的增殖,促进肿瘤细胞的侵袭和转移^[9]。PI3K/AKT信号途径的活化可以抑制促凋亡蛋白Bad的激活以及caspase激酶的活化,增加转录因子NF- κ B的活性以及上调凋亡拮抗基因Bcl-2的表达水平,同时,还可以下调Fas/Fas-L诱导的凋亡过程^[8-9]。既往资料表明^[10],在多种白血病细胞中均有PI3K/AKT信号途径的活化,而且PI3K/AKT的活性与白血病患者的化疗效果、临床预后等多种指标有关。检测结果表明,30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上的PON作用48 h后,可以显著降低p-P85和p-AKT的表达水平,从而抑制PI3K/AKT的信号途径的活化,诱导细胞发生凋亡。

caspases是一切凋亡信号传导的共同通路,目前已发现在人体内的caspases共有14种,其中起核心作用的是caspases-3。caspases-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。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caspase途径开始^[10-11]。作者的检测表明药物作用后48 h后caspase-3被活化,通过其裂解底物PARP而诱导细胞凋亡,这是PON

诱导白血病K562细胞发生凋亡的重要机制。

本研究结果表明,PON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。PON对K562细胞的诱导凋亡作用机制与caspase-3的活化以及降低PI3K/AKT信号通路中p-AKT及p-P85蛋白的表达水平有关,而与MAPKs信号通路中的相关调节蛋白无关。

[参考文献]

- [1] 韩全斌,梅双喜,姜北,等. 冬凌草中的新对映-贝壳杉烷二萜化合物[J]. 有机化学,2003,23(3):270.
- [2] 杨延武,许肖龙,何炳林. 2D NMR方法研究抗癌药物冬凌草乙素的结构与谱线归属[J]. 高等学校化学学报,1993,14(5):733.
- [3] 薛宏伟,潘祥麟. 冬凌草乙素诱导GBC-SD细胞的凋亡及对Bcl-2,p53,Fas/APO-1,C-myc表达的影响[J]. 中国药理学通报,2003,19(11):1247.
- [4] Liu J J, Huang R W, Lin D J, et al. Ponocidin, an ent-kaurane diterpenoid derived from a constituent of the herbal supplement PC-SPES, *Rabdosia rubescens*, induces apoptosis by activation of caspase-3 and mitochondrial events in lung cancer cells *in vitro* [J]. Cancer Invest,2006,24(2):136.
- [5] Marks L S, DiPaola R S, Nelson P, et al. PC-SPES; Herbal formulation for prostate cancer [J]. Urology, 2002, 60(3): 369.
- [6] DiPaola R S, Zhang H, Lambert G H, et al. Clinical and biologic activity of an estrogenic herbal combination (PC-SPES) in prostate cancer [J]. N Engl J Med, 1998,339(12): 785.
- [7] 林碧莲,杨得坡. 冬凌草素的抗癌分子病理与临床应用策略[J]. 广东药学,2000,10(4):8.
- [8] Seol D W. Up-regulation of IAPs by PI-3K: A cell survival signal-mediated anti-apoptotic mechanism [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 377(2): 508.
- [9] Mitsiades C S, Mitsiades N, Koutsilieris M. The Akt pathway: Molecular targets for anti-cancer drug development [J]. Curr Cancer Drug Targets, 2004, 4(2): 235.
- [10] Liu H, Mihara K, Song G, et al. Interferon-gamma attenuates the survival activity of G-CSF through PI3K/Akt signaling pathway in mouse multipotent progenitor cells [J]. Ann Hematol, 2007, 86(3):547.
- [11] Schimmer A D. Induction of apoptosis in lymphoid and myeloid leukemia [J]. Curr Oncol Rep, 2006, 8(6):430.



Apoptosis inducing effect of ponicedin in leukemia K562 cells and its mechanisms of action

LIU Xiaodan¹, LIU Wenda², XU Yan¹, LIU Peiqing³, WANG Chunzhi¹, LIN Dongjun¹,
HUANG Heqing³, WU Chuanbin³, XIAO Ruozhi¹, HUANG Renwei¹, LIU Jiajun^{1*}

(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. Lab of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmaceutical Science of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China)

[**Abstract**] **Objective:** To investigate the apoptosis inducing effects of ponicedin (PON) on leukemic K562 cells and its mechanisms of action. **Method:** K562 cells in culture medium *in vitro* were given different concentrations of PON ($10\text{-}50\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) for 24, 48 and 72 h. The inhibitory rate of the cells was measured by MTT assay, cell apoptotic rates were detected by flow cytometry (FCM) by using Annexin V staining after K562 cells were treated with different concentrations of PON for 72 hours, and cell morphology was observed by Wright-Giemsa staining. Western blot was used to detect caspase-3 and poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) expression, and the protein levels in mitogen-activated protein kinase signaling pathways (MAPKs, p-P38, p-ERK and p-JNK) as well as p-AKT and p-P85 in PI3K/AKT signaling pathways were also detected. **Result:** PON (over $30\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) could inhibit the growth of K562 cells in both time- and dose-dependent manner. FCM analysis revealed that apoptotic cells were gradually increased in a dose-dependent manner after treatment for 72 hours, and that marked morphological changes of cell apoptosis such as condensation of chromatin was clearly observed by Wright-Giemsa staining after treatment by $50\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PON. Western blot showed cleavage of the caspase-3 zymogen protein (32 kD), with the appearance of its 17 kD subunit, and a cleaved 89 kD fragment of 116 kD PARP was also found. Furthermore, Western blotting also showed that expression of p-AKT and p-P85 in PI3K/AKT signaling pathways was down-regulated dramatically whereas the expression of p-P38 as well as p-ERK and p-JNK remained unchanged after the cells were treated by PON for 48 h. **Conclusion:** The results demonstrate that PON exhibits *in vitro* anti-leukemia effect by induction of apoptosis in K562 cells, and that PON induced apoptosis in K562 cells mainly related to activation of caspase-3 as well as inactivation of PI3K/AKT signaling pathway via down regulation of the expression of p-AKT and p-P85 protein levels. These results provide strong laboratory evidence for further anti-leukemia trials of PON.

[**Key words**] ponicedin (PON); leukemia; K562 cells; apoptosis

doi: 10.4268/cjcm20101628

[责任编辑 张宁宁]