

贝母甲素抑制 AML-KG-1a 细胞增殖与诱导细胞凋亡研究

张 宇¹, 陈信义^{1,2}

(1.北京中医药大学东直门医院,北京 100700;

2.中医内科学教育部和北京市重点实验室,北京 100700)

摘 要: [目的] 通过体外培养和流式细胞术,检测贝母甲素对人急性髓系白血病细胞 KG-1a 增殖抑制、诱导凋亡和细胞周期分布的影响。[方法] 利用 MTT 法检测贝母甲素对 KG-1a 的增殖抑制作用,计算抑制率;以流式细胞术检测贝母甲素对细胞凋亡及周期分布的影响。[结果] ①与对照组比较,贝母甲素作用于 KG-1a 细胞 24h、48h、72h 的吸光度(OD)值均明显降低($P<0.05$),且细胞生长抑制率与药物浓度呈正相关。②与对照组比较,贝母甲素能够提高 KG-1a 细胞晚期凋亡及总凋亡率,差异均有统计学意义($P=0.003, P=0.001$)。③贝母甲素干预 KG-1a 后,细胞周期发生明显变化, G_0/G_1 期细胞比例降低、 G_2/M 期细胞比例升高、凋亡率升高($P=0.001, P=0.002, P=0.046$)。[结论] 贝母甲素具有抑制具有 LSC 特性的 KG-1a 细胞增殖、降低 G_0/G_1 期细胞比例、升高 G_2/M 期细胞比例、诱导细胞凋亡效应。

关键词: 贝母甲素; KG-1a 细胞; 凋亡; 细胞周期; 增殖抑制

中图分类号: R733.71 文献标识码: A 文章编号: 1004-0242(2015)04-0325-05

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2015.04.A015

Research of Verticine Inhibition of AML-KG-1 Cell Proliferation and Induction Cell Apoptosis

ZHANG Yu¹, CHEN Xin-yi^{1,2}

(1.Dongzhimen Hospital Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China; 2.Key Laboratory of TCM Internal Medicine of the Ministry of Education and Beijing, Beijing 100700, China)

Abstract: [Purpose] To detect the influence of Verticine on human acute myeloid leukemia cell KG-1a in inhibition proliferation, induction apoptosis and cell cycles by flow cytometry in vitro. [Methods] The effect and ratio of inhibition proliferation were conducted by MTT method. Cell apoptosis and the cell cycle distribution were detected by flow cytometry. [Results] (1) Compared with the control group, the absorbance (OD) values of KG-1a cells at 24 h, 48 h and 72 h in Verticine group decreased ($P<0.05$). The inhibition rate of cell growth was positively correlated with increased drug concentration. (2) Verticine improved the late apoptosis and apoptotic rate of KG-1a cells, which were significantly different from control group ($P=0.003, 0.007$). (3) After Verticine intervention, the cell cycle of KG-1a cells changed significantly: the value of G_0/G_1 phase declining, along with G_2/M phase and cell apoptosis rate increasing ($P=0.001, 0.002$, and 0.046). [Conclusion] Verticine can inhibit LSC KG-1a cell proliferation, enhance the G_2/M phase ratio, decrease G_0/G_1 phase ratio and induce cell apoptosis.

Key words: Verticine; KG-1a cell line; apoptosis; cell cycle; proliferation inhibition

中药浙贝母首载于《本草正》,主要功能是清热化痰,散结消痈。临床观察发现,浙贝母辅助化疗方案能够提高难治性急性白血病临床疗效^[1-3]。实验研究发现,浙贝母的主要成分贝母甲素不仅可以抑制

肿瘤细胞生长,也具有逆转肿瘤多药耐药的作用^[4-6]。

为进一步研究贝母甲素抗肿瘤耐药机制,我们选取高表达白血病干细胞(leukemia stem cell, LSC)特异性表面抗原的人急性髓系白血病细胞系 KG-1a 细胞,通过体外培养技术,以流式细胞术检测贝母甲素抑制 KG-1a 细胞增殖、诱导细胞凋亡以及对细胞周期的影响。

收稿日期: 2014-09-29; 修回日期: 2014-11-24

基金项目: 教育部高等学校博士点专项基金(20100013110008);

北京市教委共建科研基地项目(2012 北京中医药大学)

通讯作者: 陈信义, E-mail: chenxinyi0729@126.com

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 细胞系

KG-1a 细胞购于中国医学科学院血液病研究所。细胞接种于含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中,置 37℃、5%CO₂ 和全湿条件下培养,取对数生长期细胞用于实验。

1.1.2 药 物

贝母甲素购于中国食品药品检定研究院,取 20mg 贝母甲素,用无水乙醇 0.2ml 助溶,后加入 RPMI 1640 培养基 19.8ml,配制成 1mg/ml 工作液,过滤除菌分装,-20℃保存。

1.1.3 试 剂

RPMI 1640 培养基和胎牛血清,美国 Gibco 公司产品;Rnase A 酶,美国 Sigma 公司产品;荧光染料碘化丙啶(propidium iodide,PI),Annexin V-FITC 均为美国 eBioscience 公司产品。MTT 和 DMSO 为美国 Amersco 公司产品。

1.1.4 仪 器

北京昌平长城空气净化设备工程公司生产的超净台;倒置相差显微镜(日本 OLYMPUS MIT-2)、CO₂ 培养箱(日本 SANYO L-74-17)、酶标仪(Clinibio 128C)、流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.2 方 法

1.2.1 药物及试剂配制

贝母甲素工作液:取 20mg 贝母甲素,用无水乙醇 0.2ml 助溶,后加入 RPMI 1640 培养基 19.8ml,配制成 1mg/ml 工作液,过滤除菌,-20℃保存。

MTT 工作液配制:用 PBS 配制成 5mg/ml 工作液,过滤除菌,-20℃避光保存。

Rnase A 酶工作液配制:用 PBS 配制成 1mg/ml 工作液,水浴锅煮沸 10min,-20℃保存。

1.2.2 细胞培养

人急性髓细胞性白血病细胞株 KG-1a,用内含 10%灭活胎牛血清的 RPMI 1640 培养基培养,细胞接种密度为 2×10⁶ 个/ml,置于 37℃、5% CO₂ 温箱中培养,每 3d 换液一次。

1.2.3 MTT 实验

将 KG-1a 细胞(3×10⁵ 个/ml)接种于 96 孔培养板(Costar)中,每孔加细胞悬液 100μl,实验组以梯

度稀释的方法由高到低分别加入 250μg/ml、200μg/ml、150μg/ml、100μg/ml、50μg/ml 5 个浓度的贝母甲素溶液,每组设 3 个复孔,对照组加入等体积培养基。培养 24h、48h 和 72h,采用常规 MTT 法检测^[8]。每孔加 MTT(5mg/ml)20μl,孵育 4h 后,离心 96 孔板,吸出上清,每孔加 DMSO 150μl,振荡 10min,使结晶物充分溶解,用酶标仪(波长 492nm)测定各孔吸光度 OD 值,计算细胞抑制率。细胞抑制率(%)=(对照组 OD 值-实验组 OD 值)/对照组 OD 值×100%。

1.2.4 FCM 检测细胞凋亡

取对数生长期细胞,离心,计数后,将 KG-1a 细胞(3×10⁵ 个/mL)接种于 6 孔培养板(Costar)中,每孔加细胞悬液 1ml,实验组使用 MTT 法检测出的贝母甲素 IC₅₀ 药物浓度干预细胞,对照组加入等体积培养基,每孔终体积 2ml。48h 后收集细胞,PBS 洗涤 2 遍,100μl PBS 重悬细胞,制成单细胞悬液(1×10⁵ 个/ml),加入 Annexin V-FITC 5μl,冰上避光孵育 20min,PBS 洗涤 1 遍,200μl PBS 重悬细胞,加入 PI 5μl,冰上避光孵育 10min,过 200 目筛网,流式细胞仪检测。根据 FITC、PI 荧光作双参数散点图,可获得由四个象限组成的双参数图。左下象限(left lower quadrant,LLQ)为活细胞,AnnexinV-FITC(-)、PI(-);右下象限(right lower quadrant,RLQ)为早期凋亡细胞,Annexin V-FITC(+),PI(-);右上象限(right upper quadrant,RUQ)为晚期凋亡细胞,Annexin V-FITC(+),PI(+);左上象限(left upper quadrant,LUQ)为细胞收集过程中产生的损伤细胞及坏死细胞,Annexin V-FITC(-)、PI(+).每个象限的细胞数就是其在受检总细胞数中所占的比例。

1.2.5 FCM 测定细胞周期

取对数生长期细胞,离心,计数后,将 KG-1a 细胞(3×10⁵ 个/ml)接种于 6 孔培养板(Costar)中,每孔加细胞悬液 1ml,实验组使用 MTT 法检测出的贝母甲素 IC₅₀ 药物浓度干预细胞,对照组加入等体积培养基,每孔终体积 2ml。48h 后收集细胞,PBS 洗涤 2 遍,70%无水乙醇重悬,4℃固定过夜,离心,PBS 洗涤 1 遍,200μl PBS 重悬,加入 RNase A 酶 20μl,37℃孵育 40min,加入 PI 10μl,避光孵育 10min,过 200 目筛网,流式细胞仪检测,以前向角(FSC)和侧向角(SSC)设门,分析门内细胞荧光表达情况。经 Cell FIT 软件拟合分析细胞周期。实验重复 3 次。

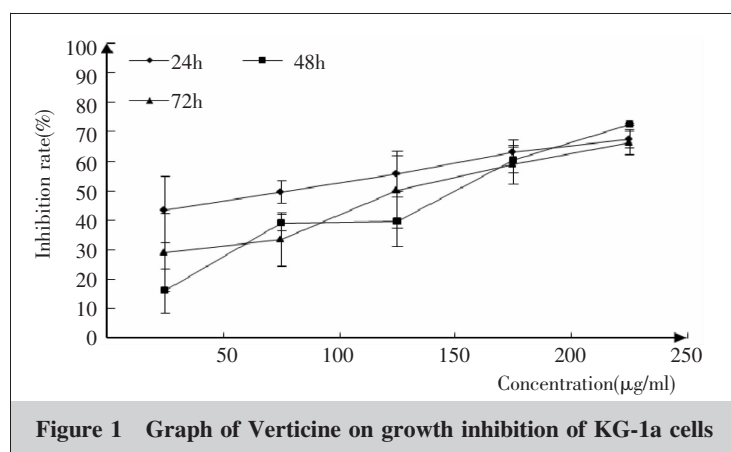
1.3 统计学处理

各组所得计量数据采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 SPSS17.0 软件处理数据,采用单因素的单向分类方差分析(one-way classification ANOVA)或者独立样本 t 检验进行比较,采用 LSD 法进行多组间两两比较。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 贝母甲素对 KG-1a 细胞增殖抑制作用

贝母甲素对 KG-1a 细胞增殖抑制作用结果详



见 Table 1, Figure 1。

从 Table 1 可以看出,与对照组比较,贝母甲素作用于 KG-1a 细胞 24h、48h、72h 的吸光度 (OD) 值均降低 ($P<0.05$),且细胞生长抑制率与药物浓度呈正相关。但从 Figure 1 结果显示,药物作用时间对细胞生长抑制率并无明显影响。表明贝母甲素对 KG-1a 细胞增殖抑制作用仅具有浓度依赖性。贝母甲素对 KG-1a 细胞作用 48h 其 IC_{50} 为 $163.55\mu g/ml$ 。

2.2 贝母甲素对 KG-1a 细胞凋亡的影响

贝母甲素诱导 KG-1a 细胞凋亡结果见 Table 2、Figure 2。

从 Table 2 可以看出,贝母甲素作用于 KG-1a 细胞 48h 后可以诱导 KG-1a 细胞发生凋亡,但对早期凋亡率无明显影响,与对照组比较无统计学意义 ($P=0.677$);但其使 KG-1a 细胞晚期凋亡 ($P=0.003$) 及总凋亡率 ($P=0.007$) 明显升高。

2.3 贝母甲素对 KG-1a 细胞周期的影响

贝母甲素对 KG-1a 细胞周期影响结果见 Table 3、Figure 3。

贝母甲素作用于 KG-1a 细胞 48h 后, G_0/G_1 期细胞比例较对照组明显降低 ($P=0.001$)、 G_2/M 期细胞比例较对照组明显升高

Table 1 Inhibition of Verticine on the proliferation of KG-1a cells ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Concentration of Verticine ($\mu g/ml$)	24h		48h		72h	
	OD	Inhibition rate (%)	OD	Inhibition rate (%)	OD	Inhibition rate (%)
Control group	1.15 ± 0.08	—	1.12 ± 0.09	—	1.22 ± 0.26	—
50	$0.81\pm 0.06^*$	29.08 ± 7.53	$0.96\pm 0.05^*$	16.12 ± 11.34	$0.67\pm 0.03^*$	43.59 ± 13.31
100	$0.76\pm 0.03^*$	33.53 ± 2.78	$0.69\pm 0.02^*$	39.19 ± 3.80	$0.60\pm 0.01^*$	49.57 ± 9.04
150	$0.57\pm 0.06^*$	50.31 ± 8.42	$0.67\pm 0.02^*$	39.55 ± 5.94	$0.52\pm 0.06^*$	55.90 ± 13.01
200	$0.47\pm 0.07^*$	58.89 ± 4.47	$0.44\pm 0.01^*$	60.51 ± 3.95	$0.44\pm 0.12^*$	63.22 ± 6.55
250	$0.38\pm 0.03^*$	66.45 ± 0.30	$0.30\pm 0.01^*$	72.45 ± 2.75	$0.39\pm 0.03^*$	67.34 ± 4.25

*: Compared with control group, $P<0.05$

Table 2 Apoptosis rate of verticine on KG-1a cells ($\bar{x}\pm s$, %)

Group	n	Early apoptotic	Late apoptotic	Apoptotic	Death
Control group	3	4.50 ± 1.90	5.53 ± 1.72	10.03 ± 1.40	4.50 ± 4.16
Verticine group	3	5.13 ± 1.53	$15.80\pm 2.27^*$	$20.83\pm 3.31^*$	4.83 ± 2.65

*: Compared with control group, $P<0.05$

Table 3 The cell cycle distribution of Verticin on KG-1a cells (%)

Group	n	G_0/G_1	G_2/M	S	Apoptosis rate
Control group	3	45.87 ± 2.05	15.06 ± 2.07	39.07 ± 4.69	6.61 ± 0.37
Verticine group	3	$32.48\pm 1.53^*$	$28.67\pm 1.60^*$	38.83 ± 0.85	$11.81\pm 3.13^*$

*: Compared with control group, $P<0.05$

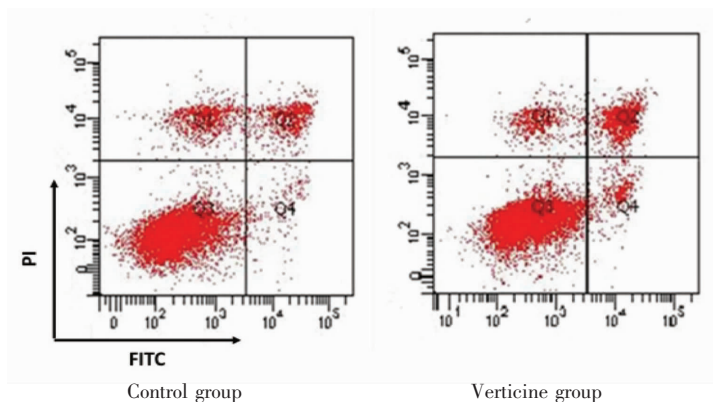


Figure 2 Apoptosis of Verticine on KG-1a cell

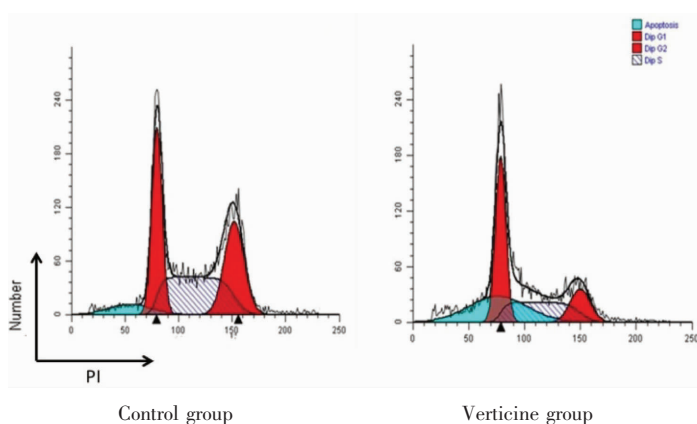


Figure 3 The cell cycle distribution of Verticin on KG-1a cell

以 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gP)、多药耐药相关蛋白 (multi-resistant related proteins, MRP)、乳腺癌耐药蛋白 (breast cancer resistance protein, BCRP)、肺耐药蛋白 (lung resistance protein, LRP) 等转运蛋白高表达相关的耐药。②以谷胱甘肽 (glutathione, GSH)、谷胱甘肽 S 转移酶 (glutathione S-transferase, GST)、拓扑异构酶 II (Topo II) 等酶学异常的耐药机制。③DNA 损伤修复异常耐药机制。以浙贝母配方的逆转耐药研究也主要集中于以上方面^[8-11]。对于白血病耐药机制及逆转耐药的探究均集中于白血病的外围研究, 研究发现 AML 患者 LSC 的数量与预后有关, 高 LSC 的 AML 患者与体内残留病灶密切相关, LSC 多数处于静止期, 且能逃避化疗药物杀伤作用^[12], 是白血病难治复发的根本。故在本项研究中, 基于前期研究结果, 我们选取具有 LSC 生物学特征的急性髓系白血病细胞 KG-1a 作为靶细胞, 试图从白血病干细胞水平探讨贝母甲素是否可影响调节和逆转肿瘤白血病多药耐药现象。

($P=0.002$), 凋亡率较对照组升高 ($P=0.046$)。

3 讨论

KG-1a 细胞系是高度表达 CD34 的人 AML 细胞株 KG-1 的变异体。有研究表明, KG-1a 细胞株中具有一群 CD34⁺CD38⁻的 LSC 样细胞, 这群细胞可以在体外培养中向 CD34⁺CD38⁺细胞分化, 并具有自我更新能力。同时, KG-1a 细胞系存在小部分具有形态原始、RNA 含量低与静止的周期的 CD34⁺CD38⁻的 LSC 样细胞外, 还存在着侧群样细胞 (side population, SP)。这两种细胞类型所代表的细胞群体不尽相同, SP 细胞可能代表了更为早期的 LSC, 各自代表了不同发育阶段的肿瘤干细胞样亚群细胞^[7]。包括白血病在内传统的肿瘤多药耐药机制主要有: ①

研究初步结果显示: ①与对照组比较, 贝母甲素作用于 KG-1a 细胞 24h、48h、72h 后的吸光度 (OD) 值均降低 ($P<0.05$), 且对细胞生长抑制率与药物浓度呈正相关, 与药物作用时间无相关性。②贝母甲素能够提高 KG-1a 细胞晚期凋亡及总凋亡率, 与对照组比较, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。③贝母甲素干预 KG-1a 后, 细胞周期发生明显变化, G₀/G₁ 期细胞比例较对照组降低, G₂/M 期细胞比例较对照组升高, 凋亡率较对照组升高, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。

基于上述研究结果, 可以初步得出如下结论: ①浙贝母具有清热化痰、开郁散结功效。临床可以用于瘰癧, 瘰癧, 疮痈肿毒, 肺癰等治疗。浙贝母有效成分贝母甲素体外能够抑制 KG-1a 白血病细胞增殖。②经贝母甲素干预后, KG-1a 白血病细胞晚期凋亡与总

凋亡率升高,认为促进具有 LSC 特征的肿瘤细胞凋亡可能是浙贝母及其活性成分抗肿瘤耐药重要机制之一,并可将浙贝母及其配方拓展用于耐药性肿瘤、复发肿瘤与难治性肿瘤的辅助治疗中。③对 KG-1a 细胞周期分布及凋亡率检测结果可以看出,贝母甲素能够使 KG-1a 细胞 G_0/G_1 期细胞比例降低、 G_2/M 期细胞比例升高,贝母甲素可以促进细胞从静止期进入有丝分裂期,从而增加化疗药物的敏感性,加强化疗药物对肿瘤细胞的杀伤作用,是浙贝母临床应用起到逆转多药耐药效应机制之一。我们将进一步对贝母甲素在白血病干细胞水平逆转多药耐药的蛋白及基因调控进行深入研究。

参考文献:

- [1] Li DY, Ye PZ, Tian SD, et al. Clinical efficacy of refractory acute leukemia Treated Fritillaria thunbergii and its compound prescription[J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2006, 24(8): 1449-1450. [李冬云, 叶需智, 田劭丹, 等. 浙贝及其配方颗粒治疗难治性急性白血病临床疗效观察[J]. 中医药学刊, 2006, 24(8): 1449-1450.]
- [2] Shi JG, Wang SH, Wang SW, et al. Er Beimu Capsule of traditional Chinese patent medicine therapy for 60 cases of advanced breast cancer [J]. Journal of the Fourth Military Medical University, 2003, 24(19): 1741. [师建国, 王三虎, 王四旺, 等. 中药二贝母胶囊治疗晚期乳腺癌 60 例[J]. 第四军医大学学报, 2003, 24(19): 1741.]
- [3] Wu HB, Li XP, Xu MY, et al. Development and therapeutic effect of Xiaoliu II capsule on the cervical lymph node metastasis [J]. China Journal of Hospital Pharmacy, 2006, 26(7): 802-804. [吴洪斌, 李小平, 徐梅英, 等. 消瘤 II 号胶囊的研制及对颈部淋巴结转移治疗的疗效[J]. 中国医院药学杂志, 2006, 26(7): 802-804.]
- [4] Chen HY, Chen XY. Effect of Peimine on inhibiting the MCF-7/TAM proliferation of human breast cancer cell and its influence on cell apoptosis [J]. Acta Chinese Medicine and Pharmacology, 2012, 40(4): 12-15. [湛海燕, 陈信义. 贝母素甲抑制人乳腺癌细胞 MCF-7/TAM 增殖及其对细胞凋亡的影响[J]. 中医药学报, 2012, 40(4): 12-15.]
- [5] Tang XY, Tang YX. Efficiency and mechanisms of peimine reversing multi-drug resistance of A549/DDP cell line [J]. Shandong Medical Journal, 2012, 52(18): 4-6. [唐晓勇, 唐迎雪. 浙贝母碱对肺癌 A549/DDP 细胞多药耐药的逆作用观察及机制探讨[J]. 山东医药, 2012, 52(18): 4-6.]
- [6] Hu KW, Chen XY, Zuo MH, et al. The effect of Bulus fritillaris thunbergii reversing multidrug resistance of leukemia (cancer) cells [J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2004, 19 (Z1): 68-70. [胡凯文, 陈信义, 左明焕, 等. 浙贝母逆转白血病(肿瘤)细胞耐药的临床与实验研究[J]. 中国医药学报, 2004, 19(Z1): 68-70.]
- [7] She M, Niu X, Chen X, et al. Resistance of leukemic stem-like cells in AML cell line KG-1a to natural killer [J]. Cancer Lett, 2012, 318(2): 173-179.
- [8] Zheng Z, Chen J, Li DY, et al. Effects of Compound Zhebei Granule plus doxorubicin on mdrl gene expression in nude mice with K562/A02 tumor xenografts [J]. Journal of Chinese Integrative Medicine, 2009, 7 (8): 758-762. [郑智, 陈菊, 李冬云, 等. 复方浙贝颗粒联合阿霉素对 K562/A02 移植瘤 MDR1 基因表达的影响 [J]. 中西医结合学报, 2009, 7(8): 758-762.]
- [9] Chen XY, Zheng Z, Chen J, et al. Effect of compound ZheBei Granule (CZBG) combined with doxorubicin on cell apoptosis and expression of related proteins in K562 / A02 multidrug resistance tumor xenografts in mice [J]. Journal of Experimental Hematology, 2009, 17 (6): 1439-1442. [陈信义, 郑智, 陈菊, 等. 复方浙贝颗粒联合阿霉素对 K562/A02 移植瘤细胞凋亡及相关蛋白表达的影响 [J]. 中国实验血液学杂志, 2009, 17(6): 1439-1442.]
- [10] Zheng Z, Hou L, Xu YM, et al. The Effect of compound Zhe Bei Granule (CZBG) combined with doxorubicin on the expression of GST and ToPo- II in K562/A02 cell line multidrug resistance tumor xenografts in mice [J]. Journal of Medical Research, 2009, 28(12): 29-31. [郑智, 侯丽, 许亚梅, 等. 复方浙贝颗粒联合阿霉素影响 K562/A02 移植瘤细胞耐药相关酶表达研究[J]. 医学研究杂志, 2009, 38(12): 29-31.]
- [11] Li DY, Zheng Z, Hou L, et al. Effects of compound ZheBei Granule (CZBG) combined with doxorubicin on expression of membrane transport proteins in K562/A02 cell xenografts [J]. Journal of Experimental Hematology, 2010, 18(1): 1-4. [李冬云, 郑智, 侯丽, 等. 复方浙贝颗粒联合阿霉素对 K562/A02 移植瘤细胞膜转运蛋白表达的影响[J]. 中国实验血液学杂志, 2010, 18(1): 1-4.]
- [12] Rhenen A, Feller N, Kelder A, et al. High stem cell frequency in acute myeloid leukemia at diagnosis predicts high minimal residual disease and poor survival [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(18): 6520-6527.