

蛇床子素通过抑制 PI3K/AKT 信号通路 诱导 K562 细胞凋亡和增殖抑制*

潘莉萍¹ 郭静明¹ 袁伟¹

[摘要] 目的:研究蛇床子素对人慢性髓系白血病细胞 K562 增殖和凋亡的影响,并探讨其相关作用机制。方法:培养髓系白血病细胞 K562,分别用不同浓度的蛇床子素处理(0、5、10、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)。细胞培养 48 h 后,利用 MTT 法检测 K562 细胞增殖;流式检测 K562 细胞凋亡;Western blot 法检测 PI3K、p-AKT、AKT、Bax、Bcl-2 和 Cleavage-Caspase3 表达。结果:蛇床子素可以呈浓度依赖性的诱导 K562 细胞增殖抑制和凋亡,上调 Bax 和 Cleavage-Caspase3 表达,下调 PI3K、p-AKT 和 Bcl-2,对 AKT 表达无明显影响。结论:蛇床子素可通过抑制 PI3K/AKT 信号通路而诱导 K562 细胞增殖抑制和凋亡。

[关键词] 蛇床子素;K562 细胞;增殖;凋亡;PI3K/AKT

doi:10.13201/j.issn.1004-2806.2016.03.017

[中图分类号] R331.1 [文献标志码] A

Osthole induced proliferation inhibition and apoptosis of K562 cells by suppressing PI3K/AKT signal pathway

PAN Liping GUO Jingming YUAN Wei

(Department of Hematology, Yichang Central Hospital, Yichang, 443000, China)

Corresponding author: YUAN Wei, E-mail: 1042157787@qq.com

Abstract Objective: To study the influence and potential mechanism of osthole in the proliferation and apoptosis of human leukemia K562 cells. **Method:** The K562 cell was cultured in the DMEM. MTT method was used to evaluate the proliferation effect of K562 and the apoptosis of K562 cells were evaluated by flow cytometric analysis. The expression of PI3K, p-AKT, AKT, Bax, Bcl-2 and Cleavage-Caspase3 were detected by Western blot. **Result:** The osthole treatment can significantly attenuate the proliferation rate of K562 cell, the expression of PI3K, p-AKT and Bcl-2 and increase the apoptosis rate of K562 cell, the expression of Bax and Cleavage-Caspase3. Wherefore, it had no influence on the expression of AKT. **Conclusion:** Osthole can induce the apoptosis and inhibit the proliferation of human leukemia K562 cells through suppressing PI3K/AKT signaling pathway.

Key words osthole; K562 cell; proliferation; apoptosis; PI3K/AKT

慢性髓细胞白血病(chronic myelocytic leukemia, CML)是白血病中较为棘手的一种,此病一旦进展无法控制,患者一般仅能存活 4 年,目前治疗效果欠佳,死亡率极高^[1]。因此,寻找治疗 CML 的方案成为一个紧迫而现实的问题。蛇床子素是一种从伞形植物蛇床提取的化合物,最近研究发现其具有促进凋亡和抑制增殖的活性^[2],而增殖过度 and 凋亡受阻是 CML 的重要发病机制^[1]。本实验利用人 CML 细胞 K562 为靶细胞,研究蛇床子素对 K562 细胞的作用,并探讨其可能的作用机制。

1 材料与方

1.1 药品与试剂

K562(购自武汉病毒研究所),蛇床子素(纯度 98%,西安易乐),以 DMSO 溶解、-20℃ 保存备用,使用前稀释至指定浓度。DMSO(美国, Sigma);RPMI 1640 培养液(美国, Gibco);小牛血清

(杭州,四季青);96 孔培养板(美国, Falcon); β -actin(中国, Abmart);p-AKT, AKT, PI3K, Cleavage-Caspase3, Bax 及 BCL-2 均为美国, CST。Trizol reagent(美国, Invitrogen);逆转录试剂盒(美国, GeneCopoeia);SYBRgreen(日本, Takara)。RT-PCR 仪(BIO-RAD),蛋白裂解液 RIPA(碧云天),蛋白酶抑制剂 cocktail 及 Western blot 凝胶制备试剂盒(武汉谷歌生物公司),BCA 蛋白定量试剂盒(碧云天)。RT-PCR 引物(擎科生物技术有限公司),酶标仪(Thermo Fisher)。

1.2 细胞培养

K562 细胞置于含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中,加入链霉素(100 U/ml)和青霉素(100 U/ml),在 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养。

1.3 仪器

CO₂ 细胞培养箱(Forma scientific, 美国);倒置显微镜、激光共聚焦显微镜(Olympus, 日本);酶标仪(Thermo Fisher, 美国)。PVDF 膜(Roche, 美

* 基金项目:2010 年宜昌市科研项目(No: A11301-38)

¹ 三峡大学第一临床医学院宜昌市中心人民医院血液科(湖北宜昌, 443000)

通信作者:袁伟, E-mail: 1042157787@qq.com

国),ECL 试剂盒(Bi-panch,美国),胶片及化学发光仪(Kodak,美国),RT-PCR 仪(BIO-RAD,美国)。

1.4 MTT 法检测 K562 细胞增殖

将对数生长期的 K562 细胞以 1×10^5 /ml 接种于 96 孔板内,加入蛇床子素(0、5、10、20) $\mu\text{g/ml}$,每组设 3 个复孔,同时以不加入蛇床子素组为空白对照组。96 孔板置于 37°C 、5% CO_2 培养箱培养 48 h 后,加入 5 mg/ml 的 MTT 溶液 20 μl /孔,用酶标仪于波长 570 nm 处读取吸收度(A)值,按照下列公式计算增殖率。增殖抑制率 = $(1 - \text{实验组 A 值} / \text{空白组 A 值}) \times 100\%$ 。

1.5 Annexin-V 双染法检测 K562 细胞凋亡

取对数生长期的 K562 细胞,以 1×10^5 /ml 接种于 96 孔板内。细胞培养 48 h 后,加入蛇床子素(0、5、10、20) $\mu\text{g/ml}$,其中加入蛇床子素剂量为 0 的组加入等体积的 DMSO,取 1 ml 细胞悬液,1000 r/min 离心 5 min,去培养液,加 RNA 酶, 37°C 水浴 1 h,放入冰浴加入 0.5 mg/L 碘化丙啶(PI)及 Annexin-V,流式细胞仪检测。采用 CELIQUEST 软件分析细胞凋亡率。

1.6 Western blot 检测 K562 细胞 PI3K、p-AKT、AKT、Bax、Bcl-2 和 Cleavage-Caspase3 表达

将各组收集的细胞按照蛋白裂解液 RIPA 操作说明提取蛋白。取各组细胞总蛋白样品 100 μg ,以样品中的 β -actin 为内参,经 SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜,然后用含 5% 脱脂奶粉的 PBS 封闭 2 h,分别加入适量含 2% 脱脂奶粉的 PBS 稀释 PI3K 抗体(1 : 1000),p-AKT2(1 : 500),AKT(1 : 1000),Cleavage-Caspase3(1 : 500),Bax(1 : 500),Bcl-2(1 : 1000), β -actin(1 : 3000)抗体, 4°C 孵育过夜。PBS 洗膜 3 次,10 min/次,根据一抗的来源,再分别加入适量含 2% 脱脂奶粉的 PBS 稀释的 HRP 标记羊抗兔 IgG(1 : 500)、HRP 标记羊抗鼠 IgG(1 : 5000),室温下作用 2 h,PBS 洗膜 3 次,10 min/次,ECL 化学发光显色、压片、显影、定影、胶片扫描保存。用 GelPro Analyzer (Ver. 3.0) 软件测定上述

条带灰度值与 β -actin 内参条带灰度值的比值,分别将上述蛋白表达量化。

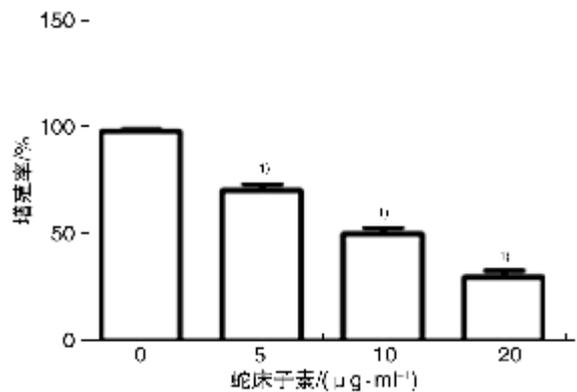
1.7 统计学处理

采用 SPSS12.0 软件进行数据分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析(ANOVA),多个样本间的两两比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 蛇床子素对体外髓系白血病细胞 K562 增殖的影响

实验结果显示,蛇床子素呈浓度依赖性抑制 K562 细胞增殖($P < 0.05$) (图 1)。



与 0 $\mu\text{g/ml}$ 组比较,¹⁾ $P < 0.05$ 。

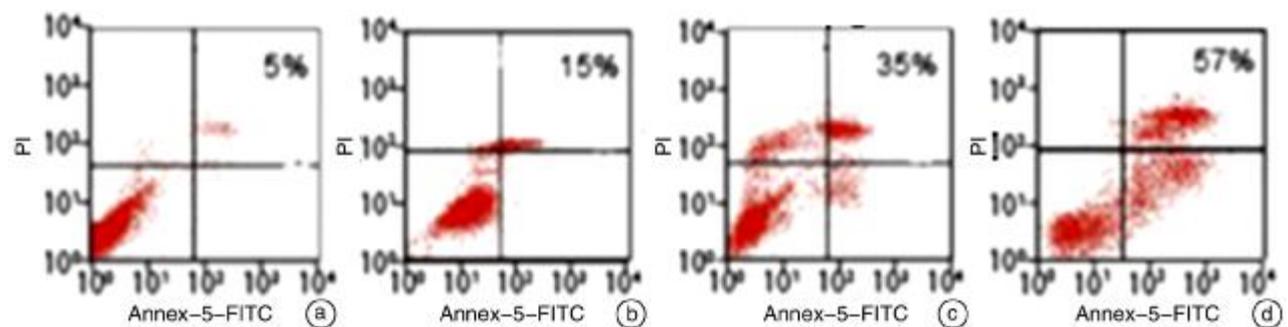
图 1 MTT 法检测蛇床子素对 K562 细胞增殖的影响

2.2 蛇床子素对体外髓系白血病细胞 K562 细胞凋亡的影响

实验结果显示,蛇床子素呈浓度依赖性诱导 K562 细胞凋亡($P < 0.05$) (图 2)。

2.3 蛇床子素对 K562 细胞 PI3K、AKT 蛋白表达的影响

实验结果显示,蛇床子素作用 K562 细胞 48 h 后,AKT 蛋白无明显变化($P > 0.05$),但 PI3K、p-AKT 表达明显降低($P < 0.05$) (图 3)。



a: 0 $\mu\text{g/ml}$ 组; b: 5 $\mu\text{g/ml}$ 组; c: 10 $\mu\text{g/ml}$ 组; d: 20 $\mu\text{g/ml}$ 组。

图 2 流式检测蛇床子素对 K562 细胞凋亡的影响

2.4 蛇床子素对 K562 细胞 Bax、Bcl-2 和 Cleavage-Caspase3 蛋白表达的影响

实验结果显示,蛇床子素作用 K562 细胞 48 h 后,Bax 和 Cleavage-Caspase3 蛋白表达明显增加,而 Bcl-2 表达明显降低($P < 0.05$)(图 4)。

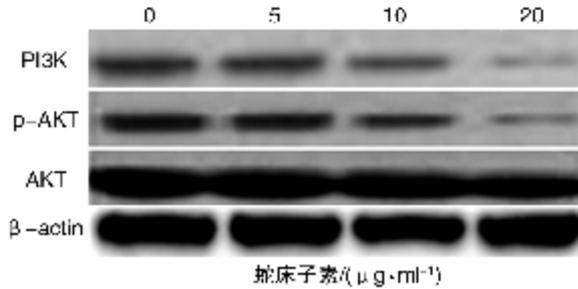


图 3 Western blot 检测蛇床子素对 K562 细胞 PI3K、AKT 蛋白表达的影响

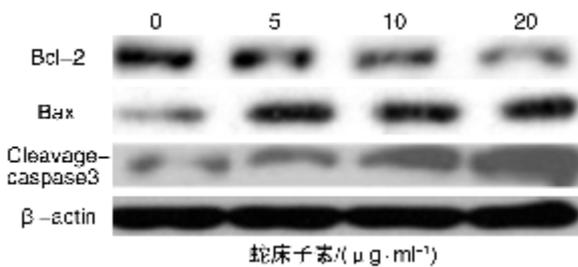


图 4 Western blot 检测蛇床子素对 K562 细胞 Bcl-2、Bax 和 Cleavage-Caspase3 蛋白表达的影响

3 讨论

CML 是一种起源于多能干细胞的髓系增殖性肿瘤,其恶性程度高,愈后差^[1]。目前治疗方法包括化疗、干细胞移植和放疗等,化疗药物以 α -干扰素、阿糖胞苷、甲磺酸伊马替尼、高三尖杉酯碱注射液、达沙替尼和尼洛替尼为主,化疗药物毒副作用大,价格昂贵;干细胞移植要求高,兼容性差,排斥反应大;而放疗容易导致相邻组织器官损伤。因此,寻找高效、低毒、可行性高的药物成为一个紧迫而现实的问题。

蛇床子素又名喔斯脑,由于具有补肾益气的功效而被广泛应用于临床。其化学结构为 7-甲氧基-8-异戊烯基香豆素,为伞形科一年生草本植物蛇床

的果实。最新研究发现,蛇床子素具有广泛的生理活性,如抗炎、抗凋亡及抗肿瘤的功效^[2]。然而,其对 CML 的效果目前尚不清楚。

本实验中 MTT 结果显示,蛇床子素可以呈浓度依赖性抑制 CML 细胞 K562 增殖;利用流式检测 Annex5 标记显示,蛇床子素可以呈浓度依赖性诱导 K562 细胞凋亡;Western blot 检测显示,蛇床子素可以呈浓度依赖性促进凋亡蛋白 Bax 和 Cleavage-Caspase3 表达明显增加,而抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达明显减少。提示蛇床子素可以诱导 K562 细胞增殖抑制和凋亡,故具有抗肿瘤的活性,但具体机制不明。

研究发现 PI3K/AKT 信号通路在 K562 细胞增殖和凋亡中发挥重要作用,其活化具有促进 K562 增殖和抑制 K562 凋亡的作用^[3]。本实验结果显示,蛇床子素可以呈浓度依赖性抑制 PI3K、p-AKT 活化,而对 AKT 表达无明显影响。因此,我们推测蛇床子素可以通过抑制 PI3K/AKT 信号通路活化而诱导 CML K562 细胞增殖抑制和凋亡,而具有抗白血病肿瘤的活性。

综上所述,蛇床子素可通过抑制 PI3K/AKT 信号通路活化而抑制 K562 细胞增殖和促进其凋亡。然而,是否还有其他信号通路参与蛇床子素诱导 K562 细胞增殖抑制和凋亡,尚需进行更深入的研究。

参考文献

- [1] Zuckerman T, Rowe JM. Pathogenesis and prognostication in acute lymphoblastic leukemia [J]. F1000Prime Rep, 2014, 6: 59.
- [2] Xu XM, Zhang Y, Qu D, et al. Osthole suppresses migration and invasion of A549 human lung cancer cells through inhibition of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in vitro [J]. Mol Med Rep, 2012, 6: 1018-1022.
- [3] Kang Q, Yan S. Piperlongumine reverses doxorubicin resistance through the PI3K/Akt signaling pathway in K562/A02 human leukemia cells [J]. Exp Ther Med, 2015, 9: 1345-1350.

(收稿日期:2015-03-29)