

双去甲氧基姜黄素通过降低线粒体膜电位诱导人白血病 K562 细胞凋亡

苗久旺^{1,2}, 张钦德², 王洪波³, 傅风华^{1,3*}

(1. 山东中医药大学药学院, 济南 250355;

2. 山东中医药高等专科学校, 山东烟台 264199;

3. 烟台大学药学院, 山东烟台 264003)

[摘要] 目的:探讨双去甲氧基姜黄素对 K562 细胞增殖的影响及其机制。方法:以 1, 10, 30, 50, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的双去甲氧基姜黄素对 K562 细胞作用 48 h 或 72 h 后 MTT 法检测细胞增殖;以 10, 30, 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的双去甲氧基姜黄素对 K562 细胞作用 24 h 或 48 h 实验,另设空白组, AO/EB 双染法倒置荧光显微镜观察凋亡形态, Rh123 染色流式细胞仪检测线粒体膜电位, Annexin V/PI 染色流式细胞仪检测凋亡率, Western blot 方法检测 Bcl-2, Bax 的表达活性。结果:与空白组比较,双去甲氧基姜黄素可剂量依赖性抑制 K562 细胞的增殖,在 30, 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下,双去甲氧基姜黄素可诱导细胞凋亡,下调 Bcl-2/Bax, 并可降低线粒体的膜电位 ($P < 0.01$)。结论:双去甲氧基姜黄素可抑制 K562 细胞的增殖,作用机制可能与改变线粒体膜电位诱导的细胞凋亡有关。

[关键词] 双去甲氧基姜黄素; 抗肿瘤; 凋亡; 线粒体膜电位

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)24-0109-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015240109

Bisdemethoxycurcumin Induced Human Leukemia K562 Cells Apoptosis Through Down-regulation of Mitochondrial Membrane Potential MIAO Jiu-wang^{1,2}, ZHANG Qin-de², WANG Hong-bo³, FU Feng-hua^{1,3*}
(1. College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Jinan 250355, China; 2. Shandong College of TCM, Yantai 264199, China; 3. School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264003, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the antitumor effects and mechanisms of bisdemethoxycurcumin (BDMC) on K562 cells. **Method:** K562 cells were treated with 1, 10, 30, 50, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of BDMC for 48 h or 72 h, then the anti-proliferative effect was assessed by MTT assay. K562 cells were treated with 10, 30, 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of BDMC for 24 h or 48 h, and another blank group was also established. The apoptosis morphology was observed by AO/EB staining using fluorescence microscope, mitochondrial membrane potential (MMP) was detected by Rhodamine 123 staining using flow cytometry instrument and apoptosis rate was detected by Annexin V/PI staining using flow cytometry instrument. The expression of Bcl-2, Bax was evaluated by Western blot method. **Result:** BDMC could inhibit the proliferation of K562 cells in a dose dependent manner when compared with the blank group. BDMC at the dose of 30, 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ could induce cell apoptosis, decrease the ratio of Bcl-2/Bax and reduce mitochondrial membrane potential. **Conclusion:** BDMC could inhibit proliferation of K562 cells, and its mechanism may be related with the induction of cell apoptosis via mitochondria pathway.

[Key words] bisdemethoxycurcumin; antitumor; apoptosis; mitochondrial membrane potential

姜黄素类化合物包括姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素,为中药姜黄根茎中所含 3 种主

[收稿日期] 20150414(004)

[基金项目] 山东省中医药科技发展计划项目(2011-151)

[第一作者] 苗久旺,在读博士,讲师,从事中药抗肿瘤药物药理研究, Tel:0535-5136913, E-mail:miao02@sina.com

[通讯作者] *傅风华,博士生导师,教授,从事中药药理研究, Tel:0535-6706060, E-mail:fenghua@sohu.com

要成分,具有广泛的药理活性,如抗炎、抗氧化、抗肿瘤等^[1-2]。近年来对姜黄素的抗肿瘤作用报道较多,而对另外 2 种姜黄素报道较少。姜黄素可通过多途径、多靶点杀死肿瘤细胞,且对正常细胞毒性小^[3],美国国立癌症研究所将其列为第三代癌化学预防药,然而物理稳定性差、体内易被代谢、口服生物利用度低等缺点限制了其在临床上的应用^[4-5]。双去甲氧基姜黄素在结构上比姜黄素少 2 个甲氧基,在物理稳定性方面更趋于稳定;体内研究表明,同种剂型的双去甲氧基姜黄素的口服生物利用度比姜黄素及去甲氧基姜黄素高^[6],对某些肿瘤细胞具有更好的抑制活性^[7],提示双去甲氧基姜黄素在抗肿瘤方面具有研究开发的潜能。已有研究表明,姜黄素可通过诱导凋亡及自噬机制抑制人白血病 K562 细胞增殖^[8]。本研究主要探讨了双去甲氧基姜黄素对 K562 细胞的抑制作用及可能机制,为传统中药辅助治疗慢性髓细胞白血病的天然药物开发提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞株 人白血病 K562 细胞购自中国科学院上海细胞库。

1.2 药物及试剂 改良 MTT 试剂盒(批号 20121017),AO/EB 活细胞/凋亡细胞/坏死细胞鉴别试剂盒(批号 20121011),罗丹明 123 (Rh123) 染色试剂盒(批号 20120925),Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(批号 20121102)均购自南京凯基生物公司;RIPA 裂解液(批号 P0013B),蛋白酶抑制剂 PMSF(批号 ST506),BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号 P0012-1, P0012-2),ECL 增强型化学发光液(批号 P0018-1, P0018-2), β -actin 一抗(批号 AA128-1),HRP 二抗(兔抗,批号 A0208;鼠抗,批号 A0216)均购自上海碧云天生物技术有限公司;Bcl-2(批号 15071S),Bax(批号 2772S)一抗均购自 Cell Signaling Technology 公司;双去甲氧基姜黄素(贵州迪大科翔生物有限公司,批号 GZDD-0218-200909,实验时先用少量 DMSO 溶解,再用培养基配制成不同浓度药液,使 DMSO < 0.1%)。

1.3 仪器 Multiscan MK 3 型酶标仪(美国 Thermo 公司),IX51 型倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司),Coulter Epics XL 型流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司),ImageQuant LAS 4000 型凝胶成像系统(美国 GE 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 人白血病 K562 细胞用含 10% 胎

牛血清的 RPMI 1640 培养液于 37 °C,5% CO₂ 恒温培养箱内培养,取对数生长期的细胞用于各实验。

2.2 MTT 法检测细胞增殖 取对数生长期细胞以每孔 90 μ L 4 000 个接种于 96 孔板,加入 10 μ L 药物,使药物的终浓度为 1, 10, 30, 50, 100 μ mol·L⁻¹,空白组加入 10 μ L 不含药物的培养基。参考改良 MTT 试剂盒说明书,48 h 或 72 h 后每孔加入 5 \times MTT 溶液 10 μ L,继续培养 4 h 后每孔加入 SDS 三联液(10% SDS,5% 异丁醇,0.012 mol·L⁻¹ HCl) 100 μ L,37 °C 孵育过夜,酶标仪检测 570 nm 波长处吸光度 A,按公式计算细胞抑制率^[9-10]。

$$\text{细胞抑制率} = (1 - \text{药物组平均 } A / \text{空白组平均 } A) \times 100\%$$

2.3 AO/EB 双染法观察细胞形态 收集经不同浓度药物作用 48 h 后的细胞,PBS 洗细胞 2 次,加入 100 μ L PBS 制成细胞悬液,将 AO/EB 试剂盒中 Dye Reagent 1 和 Dye Reagent 2 等体积混合后加入 10 μ L,继续 37 °C 孵育 10 min,PBS 洗细胞 2 次,置于 96 孔板中在倒置荧光显微镜下观察细胞形态并拍照。

2.4 Annexin V-FITC/PI 双染检测凋亡率 收集经不同浓度药物作用 48 h 后的细胞,PBS 洗涤细胞 2 次,加入 500 μ L Binding Buffer 悬浮细胞,加入 5 μ L Annexin V-FITC 混匀,再加入 5 μ L PI 混匀,室温孵育 15 min,流式细胞仪检测凋亡率。

2.5 Rh123 染色检测线粒体膜电位 收集经不同浓度药物作用 48 h 后的细胞,并重悬于无血清培养基中,加入 Rh123 染液 3 mg·L⁻¹,37 °C 孵育 10 min,以无血清培养基洗涤细胞 2 次,流式细胞仪检测线粒体膜电位。

2.6 Western blot 检测凋亡相关蛋白表达 收集经不同浓度药物作用 24 h 的细胞,PBS 洗涤细胞 2 次,加入 RIPA 裂解液(含 1 mmol·L⁻¹的 PMSF)冰上裂解细胞 10 min。13 000 r·min⁻¹离心 10 min,将上清转移至预冷离心管中,BCA 法蛋白定量后,各取 30 μ g 蛋白,加入上样缓冲液,95 °C 变性 5 min。12% 聚丙烯酰胺-SDS 凝胶电泳后,转至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭 1 h,加入一抗后放置 4 °C 过夜,TBST 洗涤 3 次,每次 15 min,加入二抗室温孵育 50 min,TBTS 洗涤 3 次,每次 15 min,加入 ECL 增强型化学发光剂,ImageQuant LAS 4000 凝胶成像系统成像并分析^[11]。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因

素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 K562 细胞增殖的抑制作用 K562 细胞经不同浓度双去甲氧基姜黄素作用 48 h 或 72 h 后,呈明显的时间、剂量依赖性抑制细胞增殖作用,其 48 h 的 IC_{50} 为 $(26.78 \pm 1.12) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。见图 1。

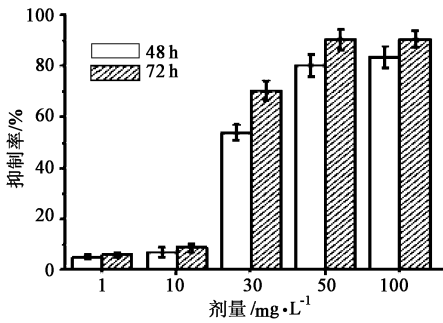
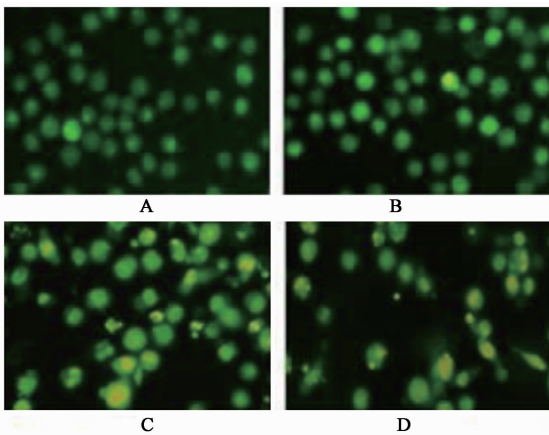


图 1 双去甲氧基姜黄素对 K562 细胞的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 1 Anti-proliferation effects of bisdemethoxycurcumin on K562 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2 双去甲氧基姜黄素诱导 K562 细胞凋亡的形态学观察 不同浓度药物作用于 K562 细胞 48 h 后,空白组及 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组细胞形态较为完整,细胞核呈均匀黄绿色荧光,无明显凋亡特征,30, 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 实验组橙红色荧光细胞核数目逐渐增多,并出现核浓缩、碎裂、凋亡小体等,提示早期凋亡或晚期凋亡细胞数增多。见图 2。



A. 空白组; B. 加 BDMC $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; C. 加 BDMC $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组;
D. 加 BDMC $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组 (图 3 ~ 5 同)

图 2 双去甲氧基姜黄素对 K562 细胞形态学影响 (免疫荧光, $\times 200$)
Fig. 2 Morphological effects of bisdemethoxycurcumin on K562 cells (IF, $\times 200$)

3.3 对 K562 细胞线粒体膜电位的影响 荧光染料罗丹明 123 可穿过细胞膜并在活细胞的线粒体内聚集,通过检测其荧光强度可反应线粒体功能。不同浓度双去甲氧基姜黄素作用于 K562 细胞 48 h

后,30, 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的双去甲氧基姜黄素作用时,罗丹明 123 荧光强度减弱,说明在高于 $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度时双去甲氧基姜黄素可使线粒体膜电位下降。见图 3。

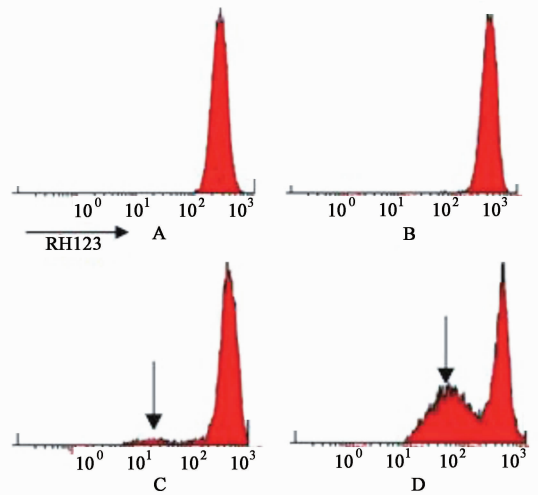


图 3 双去甲氧基姜黄素对 K562 细胞线粒体膜电位的影响
Fig. 3 Mitochondrial membrane potential effects of bisdemethoxycurcumin on K562 cells

3.4 对 K562 细胞凋亡率的影响 Annexin V-FITC 可标记早期及晚期凋亡细胞,PI 可标记晚期凋亡及死亡细胞。U4 区 ($\text{Annexin V}^+/\text{PI}^-$) 表示早期凋亡细胞比率,U2 区 ($\text{Annexin V}^+/\text{PI}^+$) 表示晚期凋亡细胞比率,细胞总凋亡比率为 U2 和 U4 之和,结果表明,随药物浓度增加,细胞凋亡率逐渐增加,呈剂量依赖性。见图 4。

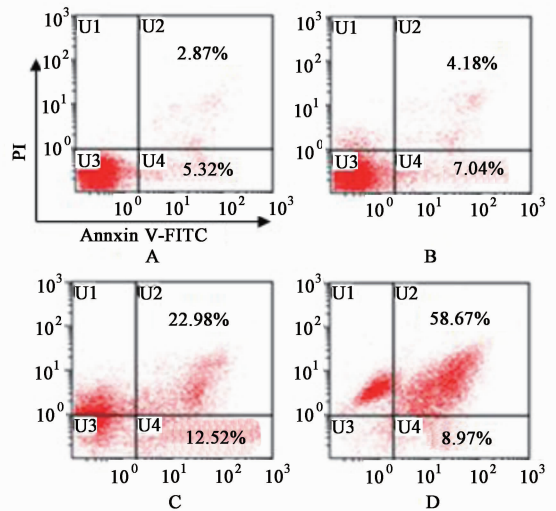
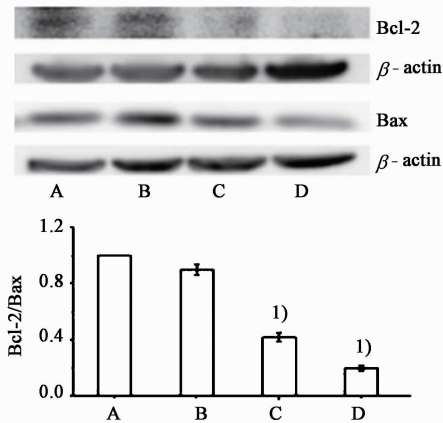


图 4 双去甲氧基姜黄素对 K562 细胞凋亡率的变化
Fig. 4 Apoptotic rate changes of K562 cells by bisdemethoxycurcumin

3.5 对 K562 细胞 Bcl-2, Bax 的影响 双去甲氧基

姜黄素作用于 K562 细胞 24 h 后,与空白组相比,10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时对 Bcl-2 影响不大,30, 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时 Bcl-2 表达明显减少,Bax 则在 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时略微增加,随药物剂量增加 Bcl-2/Bax 呈明显下降趋势($P < 0.01$)。见图 5。



与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$

图 5 双去甲氧基姜黄素对 K562 细胞 Bcl-2, Bax 的影响及对 Bcl-2/Bax 的改变($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Bcl-2, Bax and rate Bcl-2/Bax changes of K562 cells by bisdemethoxycurcumin($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

慢性髓细胞白血病为多能造血干细胞的恶性克隆性疾病,其特征性遗传学标志为费城染色体阳性和表达 Bcr-Abl 融合基因,增殖与凋亡失控是其发生的机制之一。传统的白血病的治疗药如羟基脲、马利兰、干扰素等及目前推荐使用的一线药酪氨酸激酶抑制剂伊马替尼往往因耐药、毒副作用大等因素使得治疗陷入困境^[12],因此寻找新的辅助治疗药物是目前白血病治疗需亟待解决的问题。姜黄素因抗肿瘤活性高、多靶点、毒性低等优点而备受关注,已成白血病化疗药增效、减毒、逆转耐药的重点研究方向。但除水溶性差外,稳定性差及口服生物利用度低成为姜黄素使用过程中的“瓶颈”,因此本课题组选用比姜黄素在溶解性、稳定性、口服生物利用度等方面具有优势的双去甲氧基姜黄素进行实验研究。

慢性髓细胞白血病表达如 Bcr-Abl, Bcl-2 等基因可促进细胞增殖并抑制凋亡,因此选用药物诱导细胞凋亡并抑制增殖是抗白血病的重要策略。已有研究表明,双去甲氧基姜黄素可通过诱导凋亡抑制非小细胞肺癌^[13]、胃癌^[14]等细胞生长。本研究结果表明,双去甲氧基姜黄素对 K562 细胞的增殖具有抑制作用,可诱导细胞凋亡,30, 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的

双去甲氧基姜黄素作用 48 h 后, K562 细胞出现了明显的凋亡特征, Annexin V/PI 双染法结果显示细胞凋亡率呈剂量依赖性增加,这与文献报道姜黄素对 K562 细胞抑制作用及凋亡率结果相似^[15]。

线粒体途径是细胞凋亡的主要途径之一,线粒体膜的功能对细胞是增殖还是凋亡具有重要影响^[9]。细胞受应激或凋亡诱导剂作用,会导致线粒体破坏,线粒体膜内膜外之间的通透性转运孔开放,引起膜电位下降,促使细胞色素 C, 凋亡诱导因子等释放到胞质中,激活 Caspase-3 引起凋亡。Bcl-2 家族中的抗凋亡分子和促凋亡分子之间的平衡在维持细胞线粒体膜电位稳定性方面具有重要意义,尤其是 Bcl-2/Bax 对凋亡发生起重要的“分子开关”作用^[16]。Bax 位于胞质中,由胞质移位至线粒体膜后,可开放分子通道使促凋亡因子释放增加。Bcl-2 位于线粒体外膜上,可稳定线粒体膜抑制促凋亡因子释放,并可与 Bax 结合成二聚体,降低线粒体膜的渗透性,起抗凋亡作用。研究表明,双去甲氧基姜黄素可降低线粒体膜电位调控人乳腺癌 MCF-7 细胞衰老^[11]。本实验中 K562 细胞经双去甲氧基姜黄素作用 48 h 后,线粒体膜电位下降,以 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作用最为明显,药物作用 24 h 后,30, 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时 Bcl-2 表达及 Bcl-2/Bax 趋势明显下降;10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时膜电位及 Bcl-2 表达与空白组相比变化不大,而 Bcl-2/Bax 略微下降,这与形态学实验及凋亡率检测结果相一致。

综上所述,双去甲氧基姜黄素可通过诱导细胞凋亡抑制 K562 细胞增殖,降低 Bcl-2/Bax 引起线粒体膜电位破坏可能是其作用机制之一。

[参考文献]

- [1] Peschel D, Koerting R, Nass N. Curcumin induces changes in expression of genes involved in cholesterol homeostasis [J]. J Nutr Biochem, 2007, 18 (2): 113-119.
- [2] Lukita-Atmadja W, Ito Y, Baker G L, et al. Effect of curcuminoids as anti-inflammatory agents on the hepatic microvascular response to endotoxin [J]. Shock, 2002, 17(5):399-403.
- [3] Ravindran J, Prasad S, Aggarwal B B. Curcumin and cancer cells; how many ways can curry kill tumor cells selectively [J]. AAPS J, 2009, 11(3):495-510.
- [4] Basile V, Ferrari E, Lazzari S, et al. Curcumin derivatives; molecular basis of their anti-cancer activity [J]. Bio Chem Pharmacol, 2009, 78(10):1305-1315.

- [5] Chuah A M, Jacob B, Jie Z, et al. Enhanced bioavailability and bioefficacy of an amorphous solid dispersion of curcumin [J]. Food Chem, 2014, 156: 227-233.
- [6] Li R, Qiao X, Li Q, et al. Metabolic and pharmacokinetic studies of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin in mice tumor after intragastric administration of nanoparticle formulations by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2011, 879(26):2751-2758.
- [7] 黄燕芬,洪行球. 二脱甲氧基姜黄素抗肿瘤作用研究 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(15):1909-1911.
- [8] Jia Y L, Li J, Qin Z H, et al. Autophagic and apoptotic mechanisms of curcumin-induced death in K562 cells [J]. J Asian Nat Prod Res, 2009, 11(11):918-928.
- [9] 苗久旺,张忠泉,谢松强. N-4-(二氯乙基)丁胺-1,8-萘酰亚胺对人肝癌 HepG2 细胞的抑制作用及其机制研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2015, 31(20): 2031-2033.
- [10] 周建军,乐秀芳,韩家娴,等. 评价抗癌物质活性的改良 MTT 方法 [J]. 中国医药工业杂志, 1993, 24(10):455-457.
- [11] Li Y B, Gao J L, Zhong Z F, et al. Bisdemethoxycurcumin suppresses MCF-7 cells proliferation by inducing ROS accumulation and modulating senescence-related pathways [J]. Pharmacol Rep, 2013, 65(3):700-709.
- [12] 袁霞. 新型 Bcr-Abl/Src 激酶抑制剂 FB2 抗伊马替尼耐药慢性髓系白血病作用及机制研究 [D]. 北京:北京协和医学院, 2010.
- [13] Xu J H, Yang H P, Zhou X D, et al. Autophagy accompanied with bisdemethoxycurcumin-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cells [J]. Biomed Environ Sci, 2015, 28(2):105-115.
- [14] Luo C, DU Z, Wei X, et al. Bisdemethoxycurcumin attenuates gastric adenocarcinoma growth by inducing mitochondrial dysfunction [J]. Oncol Lett, 2015, 9(1): 270-274.
- [15] 王西阁,胡姬婷,栾斌,等. 姜黄素抑制 k562 细胞生长并诱导凋亡机制的研究 [J]. 山东医药, 2009, 49(49):73-75.
- [16] 王卫东,陈正堂. Bcl-2/Bax 比率与细胞“命运” [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2007, 14(4):393-396.

[责任编辑 周冰冰]

本刊向屠呦呦老师致贺

屠老师多年艰苦奋斗、执著地进行科学研究,获此殊荣,是全国科技工作者、科学家群体的榜样!在此,我刊向我所屠呦呦老师获得诺贝尔生理学或医学奖表示祝贺!

Congratulation to Youyou Tu

Youyou Tu wins the honor for years of hard work and persistent scientific research, and is a perfect example for nationwide scientific workers and scientists. We hereby give Ms. Tu our congratulation on her receiving the 2015 Nobel Prize in Physiology or Medicine!