

蓬子菜总黄酮诱导急性早幼粒细胞白血病 NB4 细胞株凋亡的研究

董晶¹, 石晶², 郭毓鹏¹, 关红军¹, 李晓霞¹, 马英丽³, 马玲^{4*}

- (1. 牡丹江医学院 公共卫生学院, 黑龙江 牡丹江 157011;
2. 哈尔滨市儿童医院, 哈尔滨 150010; 3. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040;
4. 哈尔滨医科大学 公共卫生学院, 哈尔滨 150081)

[摘要] 目的:探讨蓬子菜总黄酮(FGVL)抗急性早幼粒细胞白血病 NB4 细胞株的作用,为以后临床治疗早幼粒细胞白血病提供一个新的依据。方法:以急性早幼粒细胞白血病细胞株 NB4 为研究对象,实验分为 3 个实验组(FGVL 质量浓度依次为 50,100,200 mg·L⁻¹)和空白组(相同体积的培养液),通过台盼蓝染色观察 FGVL 对 NB4 细胞生长的影响;噻唑蓝法(MTT)检测 FGVL 对细胞增殖的抑制作用;吖啶橙/溴乙锭(AO/EB)荧光染色观察 NB4 细胞凋亡的形态学变化;DNA 琼脂糖凝胶电泳检测细胞凋亡;逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)检测凋亡相关基因 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2),Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)mRNA 的表达。结果:与空白组比较,FGVL(50,100,200 mg·L⁻¹)能抑制 NB4 细胞的增殖($P < 0.01$);24 h 细胞形态学可见明显的细胞凋亡特征以及 DNA 琼脂糖凝胶电泳显示典型的 DNA“梯形”凋亡条带;RT-PCR 实验表明,与空白组比较,FGVL 下调了抑制细胞凋亡基因 Bcl-2 mRNA 的表达,并上调促凋亡基因 Bax mRNA 的表达($P < 0.01$),其作用与剂量呈正相关。结论:FGVL 抗急性早幼粒细胞白血病 NB4 细胞的增殖并诱导细胞凋亡,其作用机制与调节 Bcl-2/Bax 表达有关,可为急性早幼粒细胞白血病临床化疗用药提供一个新的可能。

[关键词] 蓬子菜总黄酮; NB4 细胞; 凋亡; B 细胞淋巴瘤/白血病-2; Bcl-2 相关 X 蛋白; 急性早幼粒细胞白血病

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)11-0117-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2016110117

Flavone from Galii Veri Herba et Radix-induced Apoptosis of Acute Promyelocytic Leukemia Cells (NB4)

DONG Jing¹, SHI Jing², GUO Yu-peng¹, GUAN Hong-jun¹, LI Xiao-xia¹, MA Ying-li³, MA Ling^{4*}

- (1. College of Public Health, Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157011, China;
2. Harbin Children's Hospital, Harbin 150010, China;
3. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China;
4. College of Public Health, Harbin Medical University, Harbin 150081, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of flavone from Galii Veri Herba et Radix (FGVL) against acute promyelocytic leukemia cell line NB4, in order to provide a new evidence for future clinical treatment for acute promyelocytic leukemia. **Method:** In this study, the growth of acute promyelocytic leukemia cell line NB4 at different dosages of FGVL was observed with trypan blue staining. Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay was used to detect the proliferation inhibition of NB4 cells. Acridine orange ethidium bromide (AO/EB) staining was used to detect morphological changes in NB4 apoptosis. DNA agarose electrophoresis was adopted to test apoptosis. The expression of pro-and anti-apoptotic genes Bax and Bcl-2 were examined by reverse transcription-polymerase

[收稿日期] 20150602(010)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81274034)

[第一作者] 董晶, 硕士, 助教, 从事肿瘤方面的研究, Tel:13603636137, E-mail:hellodongjing@126.com

[通讯作者] * 马玲, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药抗肿瘤作用机制研究, Tel:13654657092, E-mail:malingshai@126.com

chain reaction (RT-PCR). **Result:** Compared with the blank group, FGVL (50, 100, 200 mg·L⁻¹) could inhibit the proliferation of NB4 cells ($P < 0.01$); morphology analysis presented the characteristics of apoptosis, and DNA agarose electrophoresis showed the typical DNA ladder in 24 h. According to RT-PCR experiments, compared with the blank group, FGVL could down-regulate the mRNA expression of Bcl-2 and up-regulate the mRNA expression of Bax in NB4 cells ($P < 0.01$), with the positive correlation with the dosage. **Conclusion:** FGVL can resist acute promyelocytic leukemia NB4 cell proliferation and induce apoptosis, and its mechanism is related to the expression of Bcl-2/Bax. It provides a new possible clinical chemotherapy for acute promyelocytic leukemia.

[**Key words**] flavone from Galii Veri Herba et Radix; NB4 cells; apoptosis; Bcl-2; Bax; acute promyelocytic leukemia

白血病是造血系统的恶性疾病,我国白血病的发病近年来呈上升的趋势^[1]。急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)是急性髓细胞白血病的一个特殊的亚型,以往的化疗药物全反式维甲酸或三氧化二砷出现耐药性^[2-3],加之化疗对人体有诸多的毒性作用,因此需要寻求一种高效低毒的新药来代替以往化疗药物。蓬子菜是一种天然野生植物,主要活性成分为黄酮类化合物。近几年,国内外文献曾报道,黄酮类化合物能够抑制恶性肿瘤的增殖并诱导其凋亡^[4-6]。本研究探讨从中国东北野生的蓬子菜中提取的总黄酮,对急性早幼粒细胞白血病 NB4 细胞株的作用和凋亡机制的研究,以及进一步探讨了使用药物的最佳剂量和最佳时间,为临床治疗急性早幼粒细胞白血病提供一个新药以及为探索用药剂量和时间提供依据。

1 材料

1.1 细胞 急性早幼粒细胞白血病细胞株 NB4 由黑龙江省血液研究所馈赠。

1.2 药物及试剂 蓬子菜总黄酮(FGVL),由黑龙江省中医药大学赠送。噻唑蓝(MTT)试剂和 Trizol 细胞裂解液(美国 Sigma 公司,批号分别为 JM21449E, 14105),反转录及 PCR 试剂盒(日本 TakaRa 公司,批号 RR014A),引物由上海生工公司合成,DNA ladder 试剂盒(江苏碧云天生物技术研究,批号 C0007)。

1.3 仪器 HF90 型 CO₂ 恒温培养箱(力康生物医疗科技控股有限公司),IX73 型倒置显微镜和 IX53 型荧光显微镜(日本 Olympus 公司),Synergy 2 型多功能酶标仪(美国 Bio-Tek 公司),9700 型 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 将 10% 的新生牛血清的 1640 培养基加入 NB4 细胞,并放置在 37 °C 5% CO₂ 培养箱

中培养。当细胞密度达到 80% ~ 90% 时,将细胞瓶内的细胞转移到离心管中,离心收集的细胞,弃掉上层溶液,向离心管中加入新的培养液,充分混匀细胞沉淀,将其细胞溶液分装到新的培养瓶中,继续培养。

2.2 台盼蓝染色 实验分为实验组和空白组,取对数生长期的 NB4 细胞,接种于 96 孔板,每孔接种 3×10^4 个/100 μ L,放置培养箱中培养 4 h 后,分别加入不同质量浓度的 FGVL 100 μ L(质量浓度依次为 50, 100, 200 mg·L⁻¹),空白组加入相同体积的培养液,每组设置 3 个平行复孔。培养 24, 48, 72 h 后,收集细胞,用 0.4% 台盼蓝染液进行染色,在倒置显微镜下观察计数(死细胞被染成蓝色,活细胞呈无色透明),绘制生长曲线。

2.3 MTT 法 取对数生长期的 NB4 细胞,接种于 96 孔板,每孔接种 3×10^4 个细胞,放置培养箱中培养 4 h 后,分别加入不同质量浓度的 FGVL(50, 100, 200 mg·L⁻¹),每孔 100 μ L,空白组加入相同体积的培养液,每组设置 3 个平行复孔。放置在 37 °C 5% CO₂ 的培养箱中培养 24, 48, 72 h 后,每孔加入的 MTT(5 g·L⁻¹)20 μ L,37 °C 孵育 4 h,用 96 孔板离心机收集细胞,弃上清,每孔加入 DMSO 200 μ L,37 °C 摇床震荡 10 min,使用全自动酶标仪于 490 nm 处测定其吸光度 A,按下式计算细胞增殖抑制率。

$$\text{细胞增殖抑制率} = (1 - \text{实验组 } A / \text{空白组 } A) \times 100\%$$

2.4 吖啶橙/溴乙锭(AO/EB)荧光染色 AO/EB 染色在荧光显微镜下观察,正常细胞呈绿色,荧光亢进,形状呈圆形;早期凋亡细胞呈绿色,核周染色质固缩;晚期凋亡细胞呈红色或橘红色,核染色质固缩状或碎裂,可见凋亡小体;坏死细胞呈红色或橘红色,胞膜崩解,体积变大。取对数生长期的 NB4 细胞,接种于 96 孔板,每孔接种 3×10^4 个/100 μ L,放置培养箱中培养 4 h 后,分别加入不同质量浓度的 FGVL

100 μL (质量浓度依次为 50, 100, 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 空白组加入相同体积的培养液, 每组设置 6 个平行复孔。放置在 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 的培养箱中培养 24 h 后, 收集细胞, 每一组的每 2 个孔内的细胞收集到一个离心管中, 将收集好的细胞放置 15 min, 待细胞自然的沉淀到离心管底部, 取细胞悬液 20 μL , 与事先滴在载玻片上的 AO/EB 4 μL (250 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ AO, 250 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ EB) 染液混匀, 荧光显微镜下观察拍照。

2.5 DNA 的提取和电泳分析 不同质量浓度的 FGVL (0, 50, 100, 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 药物作用 NB4 细胞 12, 24 h 后, 每个剂量组收集 1×10^6 个细胞, 按照碧云天 DNA ladder 试剂盒的说明书操作。

2.6 逆转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR)

2.6.1 总 RNA 提取 将收集的 2×10^6 个细胞中加入 1 mL TRIzol 上下颠倒混匀充分裂解细胞, 室温放置 5 min; 然后加入 0.2 mL 三氯甲烷, 剧烈震荡 10 s, 室温放置 5 min, 12 000 $\times g$ 低温离心 15 min; 取上层水相于另一新离心管中, 加入等体积异丙醇, 上下颠倒混匀, 室温放置 10 min 后, 12 000 $\times g$ 低温离心 10 min; 弃上清, 加入 1 mL 75% 乙醇上下颠倒洗涤 RNA 沉淀; 7 500 $\times g$ 低温离心 5 min, 弃上清, 自然晾干 RNA 沉淀; 将干燥后的 RNA 沉淀中加入适量的 DEPC 处理水溶解。

2.6.2 cDNA 合成 按照 TaKaRa 公司的逆转录试剂盒的操作说明进行逆转录, 反应体系为 10 μL , RNA 质量浓度为 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 反应条件为 42 $^{\circ}\text{C}$ 30 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 5 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 获得 cDNA。

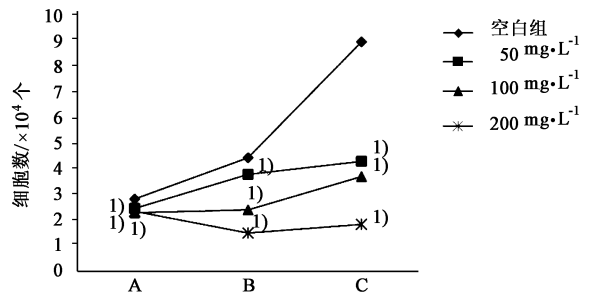
2.6.3 PCR 检测 按照 TaKaRa 公司的试剂盒进行操作, β -肌动蛋白 (β -actin) 上游引物 5'-CTCGCTGTCCACCTTCCA-3', 下游引物 5'-GCTGTACCTTACCGTT-3', 片段长度 256 bp。反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 2 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 55 $^{\circ}\text{C}$, 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 共 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min; Bcl-2 引物上游引物 5'-TTCCCATCGCTGT CCTTCG-3', 下游引物 5'-CGCTTAGATACAAATG TCCGTGTC-3', 片段长度 340 bp, 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$, 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 59 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 共 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。Bax 引物上游引物 5'-GGATGCGTCCACCAAGAA-3', 下游引物 3'-AAACA CCGCCCTCAG-5', 片段长度 386 bp, PCR 的反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 63 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 共 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。PCR 产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分析。

2.7 统计学分析 采用 SAS 9.13 和 SPSS 19.0 统

计软件处理数据, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用方差分析和卡方检验, 两两比较采用卡方分割和 Dunnett t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对细胞生长的影响 在一定剂量范围内 (0, 50, 100, 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 细胞的数量与药物浓度及作用时间呈负相关, 随着药物浓度的增加和时间的延长, 细胞的生长明显受到抑制。在 24, 48, 72 h 3 个时间点, 各个剂量组 (50, 100, 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 与空白组比较均有统计学意义 ($P < 0.01$)。见图 1。



与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$; A. 24 h; B. 48 h; C. 72 h (图 2 同)。

图 1 FGVL 对 NB4 细胞生长的影响 ($n = 6$)

Fig. 1 Effects of FGVL on growth of NB4 cells ($n = 6$)

3.2 对细胞增殖的影响 随着 FGVL 剂量的增加, 细胞增殖抑制率逐渐增大; 与空白组比较, 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 剂量组无明显差别, 而 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 剂量组均有统计学意义 ($P < 0.01$)。经过 24, 48, 72 h 后, 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 剂量组的抑制率减小, 而 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 剂量组的细胞增殖抑制率增加 ($P < 0.01$)。见图 2。

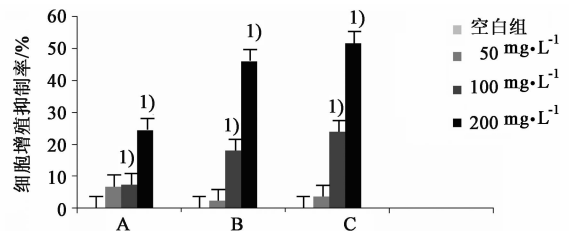
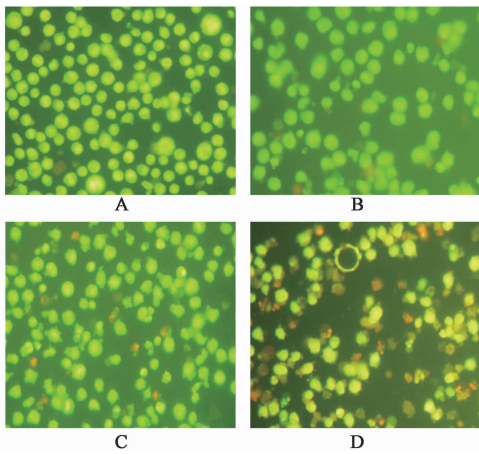


图 2 FGVL 对 NB4 细胞的增殖抑制的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Effects of FGVL on inhibition of NB4 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.3 对 NB4 细胞凋亡形态学的影响 FGVL 作用于 NB4 细胞 24 h 后, 正常 NB4 细胞核染色质着绿色大小均匀, 呈圆形, 早期凋亡细胞, 细胞体积缩小, 核呈绿色, 固缩状, 显微镜下可见圆形小体; 晚期凋亡细胞细胞膜通透性改变, EB 进入细胞内, 核染色质着橘红色呈固缩状或破碎状, 细胞收缩变小, 胞核模糊, 结构不完整。见图 3。

3.4 FGVL 诱导细胞凋亡的 DNA 片段 FGVL 作



A. 空白组; B. FGVL 50 mg·L⁻¹组; C. FGVL 100 mg·L⁻¹组; D. FGVL 200 mg·L⁻¹组 (图 4 同)

图 3 FGVL 诱导 NB4 细胞凋亡的细胞形态学改变 (AO/EB, × 200)

Fig. 3 Morphology changes of NB4 cells after treating them by different concentration of FGVL (AO/EB, × 200)

用于 NB4 细胞 12 h, 各剂量组与空白组比较无明显变化。当 FGVL 作用于 NB4 细胞 24 h 后, 与空白组比较, 50 mg·L⁻¹无明显变化, 而 100, 200 mg·L⁻¹组 NB4 细胞内可见细胞凋亡的 DNA 梯形条带 (即 DNA 碎片)。见图 4。

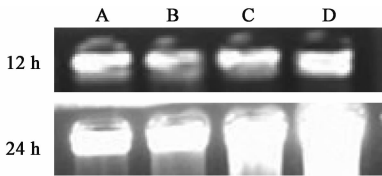
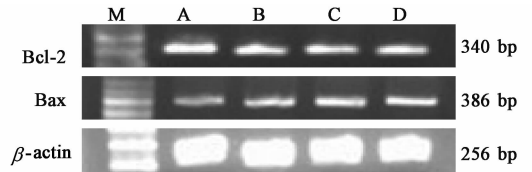


图 4 FGVL 诱导 NB4 细胞凋亡的 DNA 片段
Fig. 4 DNA fragmentation of NB4 cells after 24 hours and 48 hours treatment by different concentration of FGVL

3.5 对 Bcl-2/Bax mRNA 表达的影响 NB4 细胞经 FGVL 处理 24 h 后, 随着剂量增加, Bcl-2 mRNA 表达逐渐减少, 而 Bax mRNA 表达增加。与空白组比较, FGVL 50, 100, 200 mg·L⁻¹ 剂量组的 Bcl-2 mRNA 表达均减少, 而促凋亡基因 Bax mRNA 表达逐渐增强 ($P < 0.05$)。见图 5, 表 1。

4 讨论

蓬子菜是一种广泛分布于我国东北、华北、西北以及长江流域的天然野生植物, 其活性成分为黄酮类化合物。有文献报道, 从天然植物中提取的黄酮类化合物还具有低毒、多靶点的抗白血病治疗的优越性^[7]。本研究从天然野生植物蓬子菜中提取到有效活性成分总黄酮 (FGVL), 开展对 NB4 细胞的体外实验研究。经实验后发现, FGVL 具有抑制



M. Marker; A. 空白组; B. FGVL 50 mg·L⁻¹组; C. FGVL 100 mg·L⁻¹组; D. FGVL 200 mg·L⁻¹组

图 5 FGVL 对 NB4 细胞 Bcl-2, Bax mRNA 表达的影响

Fig. 5 Effects of FGVL on Bcl-2, Bax mRNA expression in NB4 cells

表 1 FGVL 对 NB4 细胞作用 24 h Bcl-2 和 Bax mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effects of FGVL on gene expression level of Bcl-2 and Bax mRNA in NB4 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	Bcl-2 mRNA	Bax mRNA	Bax/Bcl-2
空白	-	0.715 ± 0.068	0.643 ± 0.049	0.902 ± 0.043
FGVL	50	0.683 ± 0.074	0.695 ± 0.055	1.022 ± 0.065 ¹⁾
	100	0.657 ± 0.072	0.744 ± 0.064 ¹⁾	1.135 ± 0.058 ¹⁾
	200	0.651 ± 0.078	0.759 ± 0.065 ¹⁾	1.171 ± 0.080 ¹⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

NB4 细胞增殖的作用, 并且在 24, 48, 72 h 3 个时间点, 100, 200 mg·L⁻¹ 剂量组的增殖抑制率与空白组比较有统计学意义。通过 AO/EB 染色实验的形态学观察, 在 24 h, 各剂量组的 FGVL 使 NB4 细胞的形态发生明显改变。由于分子水平的改变要早于形态学改变, 本研究做了 12, 24 h 的两个时间点的凋亡片段的检测, 以进一步在分子水平探讨 NB4 细胞的改变。经实验发现 12 h 各剂量组的 DNA 链是完整的, 没有出现断裂。当 FGVL 作用 NB4 细胞 24 h, 100, 200 mg·L⁻¹ 剂量组可见 DNA 凋亡条带 (“梯形”条带), 与空白组比较差异明显。在此基础上可认为 100 mg·L⁻¹ FGVL 作用于 NB4 细胞 24 h, 可抑制细胞增殖并诱导 NB4 细胞凋亡。

细胞凋亡是一种由基因调控的细胞的自主有序的死亡过程, 其中抑凋亡基因 Bcl-2 和促凋亡基因 Bax 发挥着相当重要的作用^[8]。Bax 大量表达时自身形成的同源二聚体 (Bax/Bax) 可促进细胞的凋亡, 而 Bcl-2 过度表达时与 Bax 形成异源二聚体 (Bcl-2/Bax) 可抑制细胞的凋亡^[9]。本研究表明在 24 h 时, FGVL 可使抑凋亡基因 Bcl-2 mRNA 表达下调, 并使促凋亡基因 Bax mRNA 表达上调, 且 100, 200 mg·L⁻¹ 剂量组的 Bax mRNA 表达水平与空白组有统计学差异, 当大量表达的 Bax mRNA 形成同源

二聚体,促进了 NB4 细胞的凋亡。

综上所述,本研究的实验结果表明,蓬子菜总黄酮具有诱导急性早幼粒细胞白血病 NB4 细胞株凋亡的作用,其凋亡机制与 Bcl-2 和 Bax 的表达水平有关,且 FGVL 诱导 NB4 细胞凋亡的最佳剂量和时间 为 50 ~ 100 mg · L⁻¹ 和 12 ~ 24 h。具体的最佳剂量和时间,需日后进一步深入探讨研究,很可能为临床治疗急性早幼粒细胞白血病提供一个新药以及为探索用药剂量和时间提供依据。

[参考文献]

[1] 姚红玉,陈建国,张永辉,等. 启东 1972 年 ~ 2000 年白血病发病率分析[J]. 中国肿瘤,2002,11(6):339-341.
[2] 黄梓伦. 急性早幼粒细胞白血病治疗现状[J]. 广东医学,2004,25(8):869-871.
[3] 徐双年,陈洁平,刘建平,等. 三氧化二砷治疗急性早幼粒细胞白血病疗效的系统综述和 meta 分析[J]. 中西医结合学报,2009,7(9):801-808.
[4] Suh Y, Afaq F, Johnson J J, et al. A plant flavonoid

fisetin induces apoptosis in colon cells by inhibition of COX₂ and Wnt/EGFR/NF-κB-signaling pathways [J]. Carcinogenesis,2009,30(2):300-307.

[5] 肖义军,陈元仲,陈炳华,等. 不同寄主红花桑寄生总黄酮提取物抗白血病细胞株 HL-60 的研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(4):427-431.
[6] 张冬青,汪德清,李卉,等. 黄芪总黄酮对 K562 细胞凋亡及细胞周期的影响[J]. 中国药理学通报,2010,26(1):136-137.
[7] 唐宇宏,朱红请,季建敏,等. 葛根总黄酮诱导 NB4 细胞凋亡的机制探讨[J]. 江西医药,2010,36(7):802-804.
[8] Adams J M, Cory S. Life-or-death decisions by the bcl-2 protein family [J]. Trends Biochem Sci,2001,26(1):61-66.
[9] Wang S J, Guo X, Zuo H, et al. Chondrocyte apoptosis and expression of Bcl-2, Bax, Fas, and iNOS in articular cartilage in patients with Kashin-Beck disease [J]. J Rheumatol,2006,33(3):615-619.

[责任编辑 周冰冰]