

蓝萼甲素诱导 K562 细胞毒作用机制的初步研究

杨文华, 张健, 高立文, 王剑文*
(苏州大学药学院, 江苏 苏州 215123)

[摘要] **目的:**探讨活性氧(reactive oxygen species, ROS)在蓝萼甲素(glaucocalyxin A, GLA)诱导的人慢性粒细胞白血病 K562 细胞毒性中的作用。**方法:**GLA(0.313, 0.625, 1.250, 2.500, 5.000, 10.000 mg·L⁻¹)处理 K562 细胞 12, 24, 48 h 后, 噻唑蓝(MTT)法观察细胞毒作用;流式细胞术检测 GLA(2.5, 5.0, 10.0 mg·L⁻¹)对 K562 细胞周期的阻滞作用;流式细胞术检测 5.0 mg·L⁻¹ GLA 作用后 K562 中的 ROS 变化;利用 MTT 法检测抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)对 GLA 诱导下 K562 细胞毒作用的影响;流式细胞术检测 NAC 对 GLA 诱导下 K562 细胞周期的影响。**结果:**GLA 对 K562 细胞的生长抑制呈明显的剂量和时间依赖关系, 12, 24, 48 h 的 IC₅₀ 分别为 6.168, 2.968, 1.086 mg·L⁻¹; GLA 对 K562 细胞周期的阻滞作用主要发生在 G₀/G₁ 期; 5.0 mg·L⁻¹ GLA 作用 K562 细胞 2 h 后 ROS 较空白组上升 1.3 倍; NAC 对 GLA 细胞毒作用有明显的抑制作用, 且随 NAC 浓度上升, 抑制作用增强; NAC 能减弱 GLA 对 K562 的细胞周期阻滞作用。**结论:**GLA 对 K562 细胞具有细胞毒及细胞周期阻滞作用, 且这些作用与 ROS 有关。

[关键词] 蓝萼甲素; 活性氧; 细胞毒; 细胞周期

[中图分类号] R730.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)19-0181-04

Preliminary Investigation on Glaucocalyxin A-induced Cytotoxicity in K562 Cells

YANG Wen-hua, ZHANG Jian, GAO Li-wen, WANG Jian-wen*
(College of Pharmaceutical Sciences, Soochow University, Suzhou 215123, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the involvement of reactive oxygen species (ROS) in glaucocalyxin A (GLA)-induced cytotoxicity of human chronic myelogenous leukemia K562 cells. **Method:** After 12, 24 and 48 hours treatment by GLA, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay was performed to assess the cytotoxicity. The cell cycle was studied by flow cytometry. The ROS burst induced by GLA was also determined by flow cytometry. **Result:** Exposure of K562 cells to GLA lead to a dose-and time-dependent cytotoxicity with IC₅₀ values of 6.168, 2.968, 1.086 mg·L⁻¹ for 12, 24, 48 h, respectively. The block function of K562 cells cycle after treated GLA mainly occurred on G₀/G₁ phase. There is a generation of ROS in K562 cell after using GLA. NAC can increase the cell viability and decrease cell cycle arrest. **Conclusion:** The results suggested that ROS might be involved in the K562 cytotoxicity induced by GLA.

[Key words] glaucocalyxin A; reactive oxygen species; cytotoxicity; cell cycle

蓝萼香茶菜 *Rabdosia japonica* (Burm. f.) Hara
var. *glaucocalyx* (Maxim.) Hara 为唇形科香茶菜属民

间药用植物, 具有清热解毒、活血化瘀的作用, 用于治疗感冒、咽喉肿痛、扁桃体炎、胃炎、肝炎和癌症

[收稿日期] 20110311(005)

[基金项目] 江苏省“六大人才高峰”第五批高层次人才项目(B2008048);江苏省大学生创新实验计划

[第一作者] 杨文华, 硕士研究生, 从事药用植物成分与功能研究

[通讯作者] *王剑文, 研究员, 博士生导师, 从事生物制药研究, E-mail: jwwang@suda.edu.cn

(食道癌、贲门癌、肝癌、乳腺癌)等^[1-2]。我们从蓝萼香茶菜的地上部分中分离鉴定得到木栓酮,海棠果醛,熊果酸,蓝萼乙素,蓝萼甲素(glaucocalyxin A, GLA),蓝萼丙素等 12 种化合物^[3],其中贝壳杉烷型二萜类化合物 GLA 具有多种药理作用。张淑香等报道:GLA 通过抑制 DNA、RNA 和蛋白质合成抑制小鼠肉瘤 S180 的增殖^[4]。王瀚等发现 GLA 对人肝癌细胞 BEL-7402 和人卵巢癌细胞 HO-8910 均具有较强的细胞毒作用^[5],但 GLA 细胞毒性机制尚少见报道。本文通过研究不同浓度 GLA 处理人慢性粒细胞白血病 K562 细胞后活性氧(reactive oxygen species; ROS)水平以及自由基清除剂对 GLA 细胞毒作用的影响,旨在初步揭示 ROS 在 GLA 致 K562 细胞毒性中的作用。

1 材料

1.1 药物与试剂 GLA 由苏州大学药物化学教研室张健副教授研究组分离制备,纯度 98.36%。噻唑蓝 [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, MTT]:美国 Sigma 公司产品,新生小牛血清购自杭州四季青生物工程研究所,注射用青霉素钠购自华北制药股份有限公司,注射用硫酸链霉素购自华北制药股份有限公司,碘化丙啶(PI)购自美国 Sigma 公司,DCFH-DA 荧光探针,乙酰半胱氨酸(*N*-acetyl-L-cysteine, NAC)购自海门碧云天生物技术研究所。

1.2 细胞 K562 细胞来源于苏州大学药学院微生物与生化药学教研室。

1.3 仪器 倒置显微镜(上海精密仪器仪表有限公司),低速台式离心机(江苏金坛宏凯仪器厂),电子分析天平(德国 Sartorius 公司),酶标仪(美国 Bio-Tek 公司),洁净工作台(苏净集团安泰公司),CO₂ 培养箱(香港 Heal Force Development Ltd.),流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 K562 细胞用含 10% 小牛血清的 1640 培养基在 37 °C, 5% CO₂ 条件下常规培养。取处于指数生长期的细胞用于实验。

2.2 GLA 细胞毒性试验 细胞按常规方法进行培养,待细胞在培养瓶内长满度达到 80% 时,直接收集细胞,并调整细胞密度为 2×10^5 /mL,以每孔 90 μ L 细胞悬液接种到 96 孔板中,再加入药物或培养液 10 μ L。实验设:空白对照组、GLA 各设 6 个剂

量组(终质量浓度为 0.313, 0.625, 1.250, 2.500, 5.000, 10.000 mg·L⁻¹),每组设 6 个复孔。37 °C, 5% CO₂ 培养箱培养 8, 20, 44 h 后,每孔加入 MTT 10 μ L,继续培养 4 h。培养结束后,每孔加入 10% 酸化的 SDS 100 μ L,培养箱中放置 12 h,于酶标仪上(570 nm)测定吸光度(A)。按下列公式计算细胞存活率。实验重复 3 次。

细胞存活率 = (用药组平均 A/对照组平均 A) × 100%

抑制率 = (1 - 用药组平均 A/对照组平均 A) × 100%

2.3 GLA 对 K562 细胞周期的阻滞作用 参照 Han 等报道的方法^[6]并略作改进。细胞按 2.0×10^5 /mL 密度接种于 6 孔板上,向培养体系中分别加入 0, 2.5, 5.0, 10.0 mg·L⁻¹ GLA,作用 24 h 后,离心收集细胞,使用 PBS 洗 1 次后 70% 冰乙醇固定过夜。次日离心收集细胞, PBS 洗 1 次,用 0.5 mL PBS 重悬,加入 50 μ L PI (1 g·L⁻¹) 及 5 μ L RNase A (10 g·L⁻¹),室温避光孵育 30 min 后,流式细胞仪 FL3 通道检测。

2.4 GLA 对 K562 中 ROS 的影响 参照 Cao 等报道的方法^[7]并略作改进。收集细胞,用无菌 PBS 洗 1 次。用含有 10 mmol·L⁻¹ DCFH-DA 的不完全培养基处理 30 min (37 °C),每 5 min 振摇 1 次离心收集后,再用不完全培养基洗 3 次。接下来用完全培养基重悬细胞,每孔 4 mL,用 GLA 处理 2 h。离心收集细胞, PBS 洗 1 次。用 200 μ L PBS 重悬,上流式细胞仪进行检测。

2.5 NAC 对 GLA 诱导 K562 细胞毒作用的影响 细胞按 2.0×10^5 /mL 密度接种于 96 孔板上,分别用浓度为 1.2, 2.5, 5.0, 10.0 mmol·L⁻¹ 的 NAC 处理 1 h 后,向培养体系中分别加入不同浓度的 GLA 处理 24 h。其他操作同 2.2。

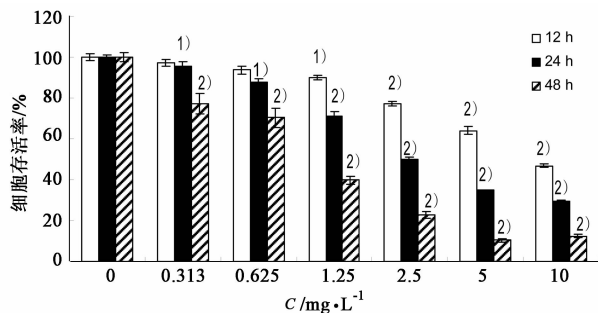
2.6 NAC 对 GLA 诱导 K562 细胞周期阻滞作用的影响 细胞按 2.0×10^5 /mL 的密度接种于 6 孔板上,用浓度为 1 mmol·L⁻¹ 的 NAC 处理 1 h 后,向培养体系中分别加入不同浓度的 GLA 处理 24 h。其他操作同 2.3。

2.7 统计学方法 实验数据用 SPSS 16.0 软件单因素方差分析软件包进行各组间数据差异显著性检验,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 MTT 法检测细胞毒性作用 由图 1 可见,随着 GLA 浓度的增加,细胞存活率逐渐下降,呈明显的量效关系;且 GLA 处理时间越长,细胞的生长抑制率

也越大,其毒性作用呈时间依赖性,12,24,48 h 时间点的半数细胞抑制剂量(IC₅₀)分别为 6.168,2.968,1.086 mg·L⁻¹,提示 GLA 对 K562 细胞具有时间和剂量依赖关系的细胞毒作用。



与同期空白对照组比¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01(图2同)

图1 不同剂量 GLA 对 K562 的细胞毒作用

3.2 GLA 对 K562 细胞周期的阻滞作用 如图2所示,随着 GLA 浓度的增加,G₀/G₁ 期细胞的数量逐渐上升,10 mg·L⁻¹ GLA 组是空白组细胞数量的 1.8 倍。初步得出 GLA 对 K562 细胞周期的阻滞作用主要集中在 G₀/G₁ 期。

对于被称为凋亡峰的 Sub-G₁ 峰,可以看出随着 GLA 浓度的上升,K562 细胞中处于 Sub-G₁ 的细胞数是呈上升趋势,表明 GLA 对 K562 的细胞毒作用具有浓度依赖性。

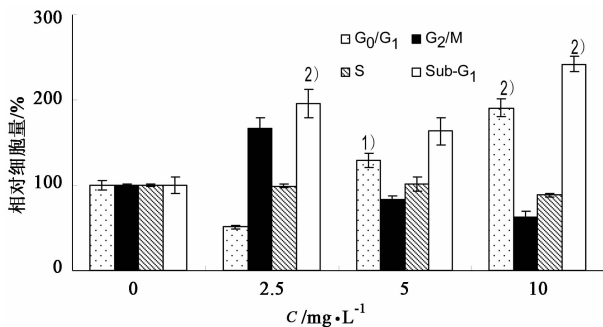


图2 GLA 对 K562 细胞周期的阻滞作用

3.3 GLA 对 K562 中 ROS 的影响 浓度为 0 和 5.0 mg·L⁻¹ 的 GLA 处理 2 h 后,K562 细胞内 ROS 水平发生改变,5.0 mg·L⁻¹ 组的 ROS 量较空白组上升了大约 1.3 倍,表明在 GLA 对 K562 的细胞毒过程中确实存在 ROS 的上升,并且 ROS 量与细胞存活率有一定的相关性。

3.4 NAC 对 GLA 诱导 K562 细胞毒作用的影响 抗氧化剂 NAC 能降低细胞中 ROS 水平。由表 1 可知,用低浓度 NAC 预处理细胞后,细胞的存活率显著上升。用高浓度的 NAC 处理细胞,因高浓度的

NAC 本身能抑制细胞生长^[8],故与对照组相比保护细胞的作用不明显。进一步证明 GLA 对 K562 的杀伤作用是通过提高细胞中的 ROS 实现的。

表1 NAC 处理对 GLA 诱导的 K562 细胞毒性的影响

NAC /mmol·L ⁻¹	GLA/mg·L ⁻¹			
	0.0	2.5	5.0	10.0
0.0	100.0 ± 0.6	59.8 ± 0.6	33.5 ± 0.3	24.8 ± 0.7
1.2	102.0 ± 1.5	69.3 ± 1.8 ²⁾	39.9 ± 1.0 ¹⁾	29.5 ± 0.9 ¹⁾
2.5	109.8 ± 0.6 ¹⁾	83.5 ± 0.7 ²⁾	46.9 ± 0.9 ²⁾	33.4 ± 0.8 ²⁾
5.0	71.4 ± 1.6 ²⁾	65.4 ± 0.6 ²⁾	40.4 ± 0.5 ¹⁾	31.0 ± 0.2 ¹⁾
10.0	56.3 ± 1.6 ²⁾	50.7 ± 1.3 ¹⁾	31.6 ± 0.4	25.5 ± 1.7

注:与同期空白对照组比¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01(表2同)。

3.5 NAC 对 GLA 诱导 K562 细胞周期阻滞的影响

由表 2 显示抗氧化剂 NAC 与对照相比对 K562 的细胞周期无显著影响,但其能减弱 GLA 对 K562 造成的 G₀/G₁ 期细胞周期阻滞作用。因此 NAC 是通过清除细胞内的 ROS 量来达到降低 GLA 的细胞周期阻滞作用的。

表2 NAC 预处理 K562 1 h 后 GLA 的

周期	细胞周期阻滞作用($\bar{x} \pm s$)			
	0	GLA	GLA + NAC	NAC
G ₀ /G ₁	100.0 ± 2.0	129.4 ± 8.3 ²⁾	88.5 ± 2.0	97.3 ± 1.2
G ₂ /M	100.0 ± 4.3	83.5 ± 2.8	112.5 ± 0.9	101.7 ± 11.5
S	100.0 ± 1.1	96.4 ± 2.0	104.6 ± 1.6	101.4 ± 4.4

注:GLA 浓度 5 mg·L⁻¹;NAC 浓度 1 mmol·L⁻¹。

4 讨论

在关于 GLA 的细胞毒实验中,GLA 对小鼠肉瘤 S180,人肝癌细胞 BEL-7402 和人卵巢癌细胞 HO-8910 的细胞毒作用均已有报道^[4-5]。前期实验中我们进行了 GLA 对不同细胞株的 IC₅₀ 的结果分别为 1.086 mg·L⁻¹ (K562),4.11 mg·L⁻¹ (SGC-7901),6.52 mg·L⁻¹ (A549),2.53 mg·L⁻¹ (U251),4.28 mg·L⁻¹ (SHG-44),6.34 mg·L⁻¹ (HepG-2),8.10 mg·L⁻¹ (BEL-7402),3.75 mg·L⁻¹ (SMMC-7721),4.62 mg·L⁻¹ (MDA-MB-231),5.41 mg·L⁻¹ (L929),4.52 mg·L⁻¹ (Hela)。其中 K562 对 GLA 最为敏感,人肝癌细胞株 BEL-7402 最为不敏感,所以后续实验中我们选择 K562 作为实验用细胞株。

在内源或外源性因素引起的细胞毒过程中,氧化应激可以造成大量的 ROS 产生^[9]。胞内 ROS 的升高,一方面可以直接导致 DNA 损伤,同时启动线

粒体相关的凋亡信号通路^[10]外,ROS 也可以通过 MAP 蛋白激酶增强非固有的凋亡途径,促进细胞凋亡的发生^[11]。上文显示,K562 经 GLA 处理后,药物对细胞的增殖抑制具有时间和浓度依赖性,并且伴随有 ROS 含量的上升,5.0 mg·L⁻¹处理组的 ROS 含量约是对照组的 1.3 倍,表明 GLA 对 K562 的细胞毒作用可能是通过提高 ROS 水平来实现的。细胞内的 ROS 是细胞凋亡中的第二信使,细胞接受促凋亡信号后引起 ROS 升高,升高的 ROS 可促进 Ca²⁺内流、上调 Bax 的表达、线粒体通透性转换孔 MPTP 的开放、Caspase 的激活,导致细胞凋亡^[12]。ROS 对 DNA 会造成损伤,而 DNA 是细胞周期中的重要物质,其损伤必然会造成其周期阻滞。我们通过 GLA 对 K562 细胞周期的阻滞作用实验,发现 GLA 对 K562 细胞主要在 G₀/G₁ 期阻滞。

我们使用抗氧化剂 NAC 预处理 K562 细胞后再施加 GLA,发现预处理组比对照组的细胞存活率有了显著的上升,且随着 NAC 浓度的上升,这种趋势更加明显。NAC 还通过抗氧化作用,降低了 GLA 对 K562 造成的细胞周期阻滞作用。综合以上结果,我们认为 ROS 的上升即细胞的氧化应激参与了 GLA 诱导的细胞毒及细胞周期阻滞作用。同时,NAC 处理后,并没有完全抑制 GLA 的细胞毒作用,表明可能存在其他的细胞毒诱导机制,有待我们进一步探讨。

[参考文献]

[1] Kim D S, Chang R G, Shen X Y, et al. Diterpenoids from *Rabdosia japonica* [J]. *Phytochemistry*, 1992, 31 (2):697.
[2] Xiang Z B, Xu Y X, Shen Y, et al. Two new

diterpenoids from *Rabdosia japonica* var. *glaucocalyx* [J]. *Chinese Chem Lett*, 2008, 19(7):852.
[3] 沈晓丹,王冰,刘春宇,等. 蓝萼香茶菜的化学成分研究(I) [J]. *中草药*, 2009, 40(12):1883.
[4] 张淑香,俞惠然,杨淑云,等. 蓝萼甲素在体外对 DNA, RNA 和蛋白质生物合成的影响 [J]. *药学情报通讯*, 1990, 8(3):62.
[5] 王瀚,丁兰,刘国安,等. 拟缺香茶菜二萜成分及细胞毒活性研究 [J]. *西北师范大学学报:自然科学版*, 2005, 41(6):54.
[6] Han Y W, Kim S Z, Kim S H, et al. The changes of intracellular H₂O₂ are an important factor maintaining mitochondria membrane potential of antimycin A-treated as juxtglomerular cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2007, 73(6):863.
[7] Cao J, Jia L, Zhou H, et al. Mitochondrial and nuclear DNA damage induced by curcumin in human G₂ cells [J]. *Toxicol Sci*, 2006, 91(2):476.
[8] Lee Y J, Lee D M, Lee C H, et al. Suppression of human prostate cancer PC-3 cell growth by *N*-acetylcysteine involves over-expression of Cyr61 [J]. *Toxicol in Vitro*, 2011, 25:199.
[9] 刘学忠,薛彬,袁燕,等. 乐果引起大鼠肝细胞凋亡的机理 [J]. *中国兽医学报*, 2010, 30(1):98.
[10] Tureens J F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species [J]. *J Physiol*, 2003, 552(2):335.
[11] Chen F, Shi X L. Intracellular signal transduction of cells in response to carcinogenic metals [J]. *Critical Rev Oncol Hemeto*, 2002, 42(1):105.
[12] Gross A, McDonnell J M, Korsmeyer S J. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis [J]. *Genes Dev*, 1999, 13(15):1899.

[责任编辑 聂淑琴]