

实验研究

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2015.10.016

大黄廑虫丸对基因转染慢性粒细胞白血病 K562 细胞趋化因子受体 4 表达的影响

滕文静¹, 周超², 曹晓靖¹, 秦宝宁¹, 杨静², 邓来军², 孙长岗^{2*}

(1. 山东中医药大学中西医结合临床学院, 山东省济南市经十路 16369 号, 250355; 2. 山东省潍坊市中医院)

摘要 目的 探讨大黄廑虫丸治疗慢性粒细胞白血病的可能作用机理。方法 将 CXCR4 基因定向克隆到含有双启动子的真核表达载体 pBudCE4.1, 经转染入 K562 细胞, 筛选获得能稳定高表达人 CXCR4 蛋白的 K562/CXCR4 细胞。16 只裸鼠随机分为空白组和大黄廑虫丸大、中、小剂量组, 每组 4 只。大黄廑虫丸大、中、小剂量组分别给予大黄廑虫丸 270、135、70 mg/ml 灌胃, 每次 3 ml, 空白组给予生理盐水 3 ml 灌胃, 均每天 1 次, 连续给药 3 天, 第 3 天每隔 2 h 给药 1 次, 连续给药 3 次, 末次给药 1 h 后, 心脏采血, 分离血清, 制备大黄廑虫丸含药血清。应用 MTT 法检测不同浓度大黄廑虫丸含药血清对 K562/CXCR4 细胞增殖的影响, TUNEL 法检测其对 K562/CXCR4 细胞凋亡的影响, Western blotting 法检测各组细胞 CXCR4 表达的变化。结果 与空白组比较, 大黄廑虫丸大、中、小剂量组细胞在 24、48、72、96 h 时吸光度 A490 均明显降低 ($P < 0.01$); 大黄廑虫丸大、中、小剂量组作用时间越长、药物浓度越高, 细胞的抑制率越高。空白组细胞凋亡率为 0.28%, 大黄廑虫丸大、中、小剂量组细胞凋亡率分别为 60.79%、28.91% 和 10.14%。大黄廑虫丸大、中、小剂量组细胞中 CXCR4 表达较空白组明显降低, 并且随剂量增大 CXCR4 表达降低。结论 大黄廑虫丸可能通过抑制 K562/CXCR4 细胞增殖, 诱导其凋亡, 并影响 CXCR4 的表达, 进而干预慢性粒细胞白血病的发生发展过程。

关键词 大黄廑虫丸; 慢性粒细胞白血病; 细胞增殖; 细胞凋亡; 趋化因子受体 4

近年来随着中医药对慢性粒细胞白血病发病机制及临床特点的研究, 发现慢性粒细胞白血病多属于中医学的“干血癆”^[1]。张仲景《金匱要略·血痹虚劳病脉证并治》中“干血癆”的代表方剂为大黄廑虫丸。既往研究表明, 大黄廑虫丸在慢性粒细胞白血病中有确切疗效^[2]。本研究拟通过观察大黄廑虫丸对人慢性粒细胞白血病系 K562 细胞趋化因子受体 4 (CXCR4) 表达的影响, 探索其治疗慢性粒细胞白血病的内在可能作用机制, 为中药治疗血液系统疾病提供理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞及药品

人慢性粒细胞白血病系 K562 细胞, 购自山东

省医学科学院基础所。大黄廑虫丸 (浓缩丸), 北京同仁堂股份有限公司同仁堂制药厂, 国药准字 Z11020002, 药物组成: 熟地黄、土鳖虫、水蛙、蛇虫、蟾蜍、干漆、桃仁、苦杏仁、黄芩、生地黄、白芍、甘草。

1.2 实验动物

SPF 级 BALB/c-nu 裸鼠 16 只, 雌雄各半, 体重 (200 ± 20) g, 购于上海斯莱克实验动物有限责任公司, 实验动物许可证号: SCXK (沪) 2003-0003。

1.3 主要试剂及仪器

四甲基偶氮唑盐 (MTT, Biolab 公司, 批号: #M03187S); 二甲基亚砜 (DMSO, 国药集团化学试剂有限公司, 批号: T20080711); 限制性内切酶 (XbaI、KpnI) 和 T4-DNA 连接酶 (Biolab 公司, 批号: #M0290S)。真核表达载体 pBudCE4.1 试剂盒 (Invitrogen 公司, 批号: Biovector008); PCR 试剂盒

基金项目: 国家自然科学基金 (81273987); 山东省自然科学基金 (ZR2013HQ005)

* 通讯作者: zhongliuyike@163.com, 13583690699

(Invitroge 公司, 批号: C81401180); Zeocin (Invitroge 公司, 批号: R250-01); 小量质粒 DNA 提取纯化试剂盒、胶回收试剂盒 (上海中科玉博生物科技有限公司, 批号: Qiagen 69104); TUNEL 试剂盒 (Promega 公司, 批号: Promega G7360); Western Blotting 试剂盒 (上海美吉生物有限公司, 批号: M20401)。RPMI-1640 培养基 (美国 Gibco 公司, 批号: G307964); Dead End Colorimetric TUNEL System (货号: Promega G7360); GelDoc100 凝胶成像仪 (美国 Bio-Rad 公司, 型号: V140130) 和 ChemiDoc XRS 化学发光成像仪 (美国 Bio-Rad 公司, 型号: 170-8070)。

1.4 CXCR4 基因重组质粒 CXCR4-pBudCE4.1 的构建

抽取正常人空腹外周血 10 ml (潍坊市中医院血液科提供), 肝素抗凝, 获取单个核细胞, 用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA。以提取的细胞 RNA 为模板进行 RT-PCR 扩增 CXCR4 基因片段, 以 GAPDH 为内参。纯化的 CXCR4 DNA 用限制性内切酶 Kpn I 和 Xho I 酶切。1% 琼脂糖凝胶电泳分离, 胶回收纯化, 经 T4-DNA 连接酶作用后转化感受态大肠杆菌细胞 TOP10, 涂布于含 Zeocin 的低盐平板 37℃ 培养过夜, 挑取阳性克隆扩增培养后备用。

1.5 K562 细胞转染

对数生长期 K562 细胞按 2×10^5 /孔的密度悬于 2 ml 完全培养液中, 接种在 6 孔板, 37℃、5% CO₂ 培养箱中过夜, 至细胞长至约 60% ~ 80% 融合。用无血清和无抗生素的培养液冲洗, 每孔加入 2.5 μg 目的基因质粒 CXCR4-pBudCE4.1 和 8 μl 脂质体, 然后置于 5% CO₂ 培养箱中 37℃ 培养 12 h。然后各孔添加含 20% 胎牛血清的培养液 500 μl, 再继续培养至 24 h。加入浓度为 200 mg/L 的选择性抗生素 Zeocin 筛选, 隔天换液, 2 周后从稳定表达的细胞克隆中挑选出多个单细胞克隆继续培养, 将 CXCR4-pBudCE4.1 转染的细胞命名为 K562/CXCR4。将细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液, 于 37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养, 细胞悬浮生长于培养基中, 取对数生长期细胞用于实验。

1.6 含药血清的配制

16 只裸鼠按照随机数表法分为空白组和大黄廬虫丸大、中、小剂量组, 每组 4 只。大黄廬虫丸大、中、小剂量组分别给予大黄廬虫丸 270、135、

70 mg/ml 灌胃, 每次 3 ml, 空白组给予生理盐水 3 ml 灌胃, 均每天 1 次, 连续 3 天, 第 3 天每隔 2 h 给药 1 次, 连续 3 次, 末次给药 1 h 后, 无菌条件下心脏采血, 分离血清, 不灭活, 在超净工作台上用 0.22 μm 微孔滤过滤器滤过除菌, -20℃ 冰箱保存备用。

1.7 MTT 法观察各组 K562/CXCR4 细胞增殖情况

取处于对数生长期 K562/CXCR4 细胞, 以 2×10^5 /ml 的细胞悬液接种于 96 孔培养板内, 100 μl/孔。空白组加入 0.2% 的 DMSO, 大黄廬虫丸大、中、小剂量组分别加入相应血清, 每孔 80 μl, 每组 6 个平行孔, 重复 3 次。全湿条件下 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24、48、72、96 h 后各孔加入 MTT 10 μl (5 g/L), 继续培养 4 h 后, 每孔加入 10% SDS 100 μl 终止培养, 37℃、5% CO₂ 培养箱中过夜, 用酶联免疫检测仪于 490 nm 处测吸光度 A 值。计算细胞增殖抑制率, 细胞抑制率 (%) = $(1 - \text{试验组 A 值} / \text{对照组 A 值}) \times 100\%$ 。

1.8 TUNEL 法检测各组 K562/CXCR4 细胞凋亡情况

收集空白组与大黄廬虫丸各剂量组作用 96 h 的 K562 细胞, 离心在 37℃ 温箱中孵育 60 min。采用 TUNEL 试剂盒, 按试剂盒说明书操作, 高倍镜下观察, DAB 显色下凋亡细胞呈棕褐色。计数 200 个细胞, 计算凋亡率, 每一个样本随机计数 5 个视野。

1.9 Western blotting 检测各组 K562/CXCR4 细胞 CXCR4 的表达

收集各剂量组大黄廬虫丸含药血清作用 96 h 的 K562/CXCR4 细胞, 提取总蛋白进行 Western Blotting 检测。SDS-PAGE 上样量为 15 μg/L。SDS 电泳: 恒流, 每块板 20 ~ 40 mA, 电泳时间约 2 h。转膜: 恒流, 每张膜 42 mA, 时间为 3.5 h。

1.10 统计学方法

采用 SPSS11.5 软件包进行统计学处理, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用方差分析; 计数资料采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 各组 K562/CXCR4 细胞不同时间细胞增殖情况比较

表 1 示, 与空白组比较, 大黄廬虫丸大、中、小剂量组细胞在 24、48、72、96 h 时吸光度 A₄₉₀ 均明显降低 ($P < 0.01$), 且大黄廬虫丸大、中、小剂量组作用时间越长、药物浓度越高, 细胞的抑制率越高。

表 1 各组 K562/CXCR4 细胞不同时间细胞抑制情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	24 h		48 h		72 h		96 h	
		A490	抑制率 (%)	A490	抑制率 (%)	A490	抑制率 (%)	A490	抑制率 (%)
空白组	4	0.38 ± 0.06	—	0.45 ± 0.06	—	0.63 ± 0.04	—	0.82 ± 0.08	—
大黄廑虫丸小剂量组	4	0.33 ± 0.04*	8.68	0.39 ± 0.04*	13.33	0.38 ± 0.03*	39.68	0.45 ± 0.03*	45.12
大黄廑虫丸中剂量组	4	0.29 ± 0.02*	23.68	0.29 ± 0.04*	35.56	0.33 ± 0.02*	47.62	0.31 ± 0.05*	62.20
大黄廑虫丸大剂量组	4	0.24 ± 0.03*	36.84	0.23 ± 0.03*	48.89	0.25 ± 0.02*	60.32	0.24 ± 0.02*	70.73

注: 与空白组比较, * $P < 0.01$

2.2 各组 K562/CXCR4 细胞凋亡情况比较

大黄廑虫丸作用细胞 96h 后, 空白组仅偶见棕褐色晚期凋亡细胞, 占 0.28%, 大黄廑虫丸大、中、小剂量组均可见数量不等的棕褐色凋亡细胞, 凋亡率分别为 60.79%、28.91% 和 10.14%。

2.3 各组 K562/CXCR4 细胞 CXCR4 表达比较

图 1 示, 大黄廑虫丸大、中、小剂量组细胞中 CXCR4 表达较空白组明显降低, 并且随剂量增大 CXCR4 表达降低。

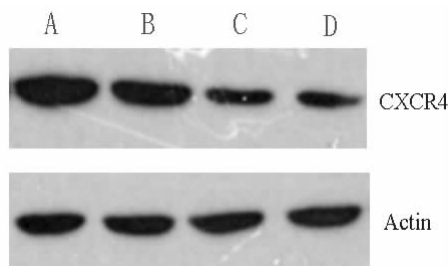


图 1 各组基因转染 K562 细胞后 CXCR4 的表达情况

注: A, 空白组; B, 大黄廑虫丸小剂量组; C, 大黄廑虫丸中剂量组; D, 大黄廑虫丸大剂量组

3 讨论

慢性粒细胞白血病是一种起源于多能造血干细胞的恶性骨髓增殖性疾病。目前中医学认为其发生过程中骨髓干细胞进行性堆积、病态造血, 似中医之所谓瘀血, 瘀血不去, 新血不生, 临床见一派气血亏虚之象, 与“干血癆”的临床表现基本符合^[1]。“干血癆”最早见于张仲景《金匱要略·血痹虚劳病脉证并治》, 谓“五劳虚极羸瘦, 腹满不能饮食, ……内有干血, 肌肤甲错, 两目黯黑, 缓中补虚, 大黄廑虫丸主之”。周霭祥^[2]认为, 慢性粒细胞白血病的发病机理为邪毒入血伤髓, 产生瘀血, 表现为胸骨压痛、骨痛、肝脾肿大、白细胞总数增高、骨髓增生极度活跃、舌质紫黯等, 由于瘀血不去, 则新血不生, 故重症或晚期患者会出现贫血的症状。

CXCR4 是一个由 352 个氨基酸构成的视紫红质样 G 蛋白偶联受体 (GPCR)。目前认为基质衍生因子 (SDF-1), 亦称 CXCL12, 是该受体的唯一

配体。近来研究发现, CXCR4 与其趋化因子 CXCL12 所构成的 CXCL12-CXCR4 生物学轴在白血病及多种肿瘤的播散和器官特异性转移中发挥着重要的作用^[3-5], CXCL12-CXCR4 生物学轴可能参与白细胞浸润、细胞迁移和器官发育等一系列重要的生理和病理过程^[6]。急性淋巴细胞白血病、急性髓性白血病等多种白血病细胞均高表达 CXCR4, 其表达与白血病细胞在骨髓的分布和扩散有关^[10-11]。研究表明, 白血病细胞的迁移能力与细胞表面 CXCR4 的表达呈正相关, 而与白血病细胞的大小、生长周期无关^[12-14]。

本实验通过体外培养 CXCR4 基因转染后的白血病 K562 细胞, 应用大黄廑虫丸含药血清进行体外干预, 发现大黄廑虫丸能有效抑制白血病细胞 K562 细胞的增殖, 促进其凋亡, 并发现大黄廑虫丸能影响基因转染后 K562 细胞 CXCR4 的表达。提示大黄廑虫丸治疗慢性粒细胞白血病的内在机制之一可能是其降低 CXCR4 的表达后, 引起 CXCL12-CXCR4 生物轴的失衡, 进而打破白血病细胞与其依赖的微环境之间的联系, 影响慢性粒细胞白血病的发生发展过程。

参考文献

- [1] 吴顺杰, 颜美心. 活血化瘀法治疗慢性粒细胞性白血病临证浅识 [J]. 中医学杂志, 2001, 19(4): 343-344.
- [2] 刘丽娟, 孙长岗. 加味大黄廑虫丸联合羟基脲治疗慢性粒细胞白血病慢性期临床观察 [J]. 山东中医药大学学报, 2012, 36(2): 113-114.
- [3] 肖诗鹰. 中医对慢性粒细胞白血病的认识及治疗概况 [J]. 江西中医药, 1996, 23(6): 55-57.
- [4] 周霭祥. 青黄散治疗慢性粒细胞性白血病 25 例近期疗效观察 [J]. 中西医结合杂志, 1981, 1(1): 16-18.
- [5] Cardones AR, Murakami T, Hwang ST. CXCR4 enhances adhesion of B16 tumor cells to endothelial cells in vitro and in vivo via beta(1) integrin [J]. Cancer Res, 2003, 63(20): 6751-6757.
- [6] Muller A, Homey B, Soto H, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis [J]. Nature, 2001, 410(6824): 50-56.

- [7] Zeelenberg IS, Ruuls-Van Stalle L, Roos E. The chemokine receptor CXCR4 is required for outgrowth of colon carcinoma micrometastases [J]. Cancer Res, 2003, 63(13): 3833-3839.
- [8] Sun YX, Schneider A, Jung Y, et al. Skeletal localization and neutralization of the SDF-1 (CXCL12)/CXCR4 axis blocks prostate cancer metastasis and growth in osseous sites in vivo [J]. J Bone Miner Res, 2005, 20(2): 318-329.
- [9] Dar A, Kollet O, Lapidot T, et al. Mutual, reciprocal SDF-1/CXCR4 interactions between hematopoietic and bone marrow stromal cells regulate human stem cell migration and development in NOD/SCID chimeric mice [J]. Exp Hematol, 2006, 34(8): 967-975.
- [10] Porecha NK, English K, Hangoc G, et al. Enhanced functional response to CXCL12/SDF-1 through retroviral over expression of CXCR4 on M07e cells: implications for

hematopoietic stem cell transplantation [J]. Stem Cells Dev, 2006, 15(3): 325-333.

- [1] 李晟, 陈子兴, 王伟, 等. CXCR4 在急性白血病细胞中的表达及其对髓外浸润的意义 [J]. 中华血液学杂志, 2004, 25(7): 405-408.
- [2] 陈日玲, 蔡康荣, 陈铭珍, 等. CXCR4 在急性白血病细胞中的表达及其意义 [J]. 实用儿科临床杂志, 2005, 20(9): 879-880.
- [3] Voermans C, van Heese WP, de Jong I, et al. Migratory behavior of leukemic cells from acute myeloid leukemia Patients [J]. Leukemia, 2002, 16(4): 650-657.
- [4] Brenner S, Whiting-Theobald N, Kawai T, et al. CXCR4-transgene expression significantly improves marrow engraftment of cultured hematopoietic stem cells [J]. Stem Cells, 2004, 22(7): 1128-1133.

Effects of *Dahuang Shuchong Wan* on the CXCR4 Chemokine Receptor 4 Expression in Chronic Myeloid Leukemia K562 Cell with Gene Transfection

TENG Wenjing¹, ZHOU Chao², CAO Xiaojing¹, QIN Baoning¹, YANG Jing², DENG Laijun², SUN Chang-gang²

(1. Chinese and Western Medicine Integrative Clinical Department, Shandong University of Chinese Medicine, Shandong Province, 250355; 2. Weifang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shandong Province)

ABSTRACT Objective To explore the underlying possible mechanism of *Dahuang Zhechong Wan* (DZW 大黄蛰虫丸 DZW) in treating chronic myeloid leukemia (CML). **Methods** The CXCR4 gene was directional cloned to eukaryotic expression vector pBudCE4.1 carrying with double promoters, and transfected into K562 cell. Screen the steady K562/CXCR4 cells with high expression of human CXCR4 protein. 16 nude mice were randomly divided to a control group and three DZW groups respectively with a large, medium and small dose, 4 mice in each group. The three DZW groups with a large, medium and small dose were respectively received DZW gavage in 270mg/ml, 135mg/ml and 70mg/ml, 3ml one time, once daily for 3 days. The control group was given normal saline gavage in 3ml, once daily for 3 days. On the third day, give gavage once every 3 hours for three times. The blood was collected from the heart one hour after the last administration, and the serum was separated for DZW serum preparation. Effects of DZW serum in different concentrations on K562/CXCR4 cells proliferation and apoptosis were respectively determined by MTT and TUNEL methods. Changes in the expression of different group CXCR4 cells were tested by Western blotting method. **Results** Compared with the control group, the A490 absorbance of three DZW group cells at large, medium and small doses were significantly lower at 24h, 48h, 72h and 96h. The longer the DZW action time with large, medium and small doses, the higher the drug concentration, and the higher was the cell inhibition rate. The cell apoptosis rate was 0.28% in the control group, and in the large, medium and small doses DZW groups were 60.79%, 28.91% and 10.14%. CXCR4 expressions significantly decreased in the large, medium and small doses DZW groups than that in the control group. The increasing the dose, the lower was the CXCR4 expression. **Conclusion** DZW could intervene in the CML developing process by restraining K562/CXCR4 cells proliferation, inducing their apoptosis and decreasing CXCR4 expression.

Keywords *Dahuang Zhechong Wan* (DZW), chronic myeloid leukemia (CML), cell proliferation, cell apoptosis, CXCR4 chemokine receptor 4 (CXCR4)

(收稿日期: 2014-07-11; 修回日期: 2014-12-08)

编辑: 邓媛