

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2015.05.017

大黄廑虫丸对慢性粒细胞白血病 K562 细胞增殖和凋亡的影响

秦宝宁¹, 滕文静¹, 周超², 曹晓静¹, 刘泽旺¹, 汪丛丛³, 吕庆亮³, 孙长岗^{2*}

(1. 山东中医药大学基础医学院, 山东省济南市经十路 16369 号, 250355; 2. 山东省潍坊市中医院; 3. 潍坊医学院)

摘要 目的 从细胞增殖和凋亡角度探讨大黄廑虫丸治疗慢性粒细胞白血病的可能机理。方法 16 只裸鼠随机分为空白组和中药高、中、低剂量组, 每组 4 只。中药高、中、低剂量组分别给予浓度为 1.97、0.9、0.45 g/ml 的大黄廑虫丸溶液灌胃, 每组 0.2 ml/(10 g·d), 每日 1 次, 连续 7 天, 空白组给予等量生理盐水。停药次日, 分离血清制备大黄廑虫丸含药血清。应用 MTT 法检测大黄廑虫丸含药血清对慢性粒细胞白血病系 K562 细胞增殖的影响, 细胞克隆形成实验检测对细胞克隆形成的影响, 用 Annexin V FITC/PI 法检测对细胞凋亡和细胞周期的影响。结果 中药高剂量组在 72 h 时生长抑制率明显高于中药中、低剂量组 ($P < 0.01$)。中药各剂量组克隆形成率较空白组明显下降 ($P < 0.01$), 中药中、高剂量组克隆形成率明显低于中药低剂量组 ($P < 0.01$)。中药高剂量组细胞早期凋亡率、晚期凋亡率及合计凋亡率均较中药低、中剂量组升高明显 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。中药低、中、高剂量组 G_0/G_1 期细胞显著高于空白组, G_2/M 期细胞下降 ($P < 0.01$), 并且以中药高剂量组明显。结论 大黄廑虫丸能抑制 K562 细胞增殖和诱导其凋亡, 将其阻滞于 G_0/G_1 期, 并且高剂量的大黄廑虫丸效果最好。

关键词 大黄廑虫丸; 慢性粒细胞白血病; K562 细胞; 细胞增殖; 细胞凋亡

慢性粒细胞白血病 (chronic myelocytic leukemia, CML) 属于恶性骨髓增殖性疾病, 临床上以乏力、消瘦、发热、肝、脾、淋巴结肿大和骨痛为主要症状^[1]。这与张仲景《金匱要略》大黄廑虫丸主证所描述“干血癆”的“羸瘦、腹满、不能饮食、肌肤甲错、双目暗黑”的临床表现相符。中医学认为, CML 的主要病机为瘀毒内结, 郁久化热, 入髓伤血, 耗伤气血, 血行迟滞而为瘀。祛除瘀血、郁热等病理因素则脏腑功能调和、气血运行顺畅、新血渐生。因此本实验初步探讨大黄廑虫丸对 CML K562 细胞增殖和凋亡的影响, 为临床应用大黄廑虫丸治疗 CML 提供依据。

1 材料

1.1 实验动物

16 只 SPF 级 BALB/c-nu 裸鼠, 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。

1.2 细胞与药物

人慢性粒细胞白血病细胞系 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)。

1.3 试剂与仪器

RPMI1640 培养基 (美国 Gibco 公司, 批号: 307964); 小牛血清 (杭州四季青公司, 批号: 090512); 四甲基偶氮唑盐 (MTT)、二甲基亚砷 (DMSO) 均购自国药集团化学试剂有限公司 (批号: T20080711); Annexin V-FITC/PI 双染法细胞凋亡检测试剂盒 (欣博盛生物科技有限公司, 批号: NB47572k); 碘化丙啶 (PI, 上海七海复泰生物科技有限公司)。FACS420 流式细胞仪 (美国 Becton-Dickinson 公司); 二氧化碳培养箱 (美国 Thermo Scientific 公司, 3110 型); 全自动酶标仪 (Bio-Rad 公司, 680 型); 96 孔细胞培养板 (上海玉博生物科技有限公司)。

基金项目: 国家自然科学基金 (81273987); 山东省自然科学基金 (ZR2011HQ050)

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

2 方法

2.1 含药血清的配制

16 只裸鼠按照随机数表法分为空白组和中药高、中、低剂量组，每组 4 只。将大黄廑虫丸研磨成粉，用生理盐水配成相应的浓度，中药高、中、低剂量组浓度分别为 1.97 g/ml、0.9 g/ml、0.45 g/ml，每组各灌胃 0.2 ml/ (10 g · d)，每日 1 次，连续 7 天，空白组给予等量生理盐水。停药次日无菌条件下心脏采血，离心机离心后分离血清，不灭活，在超净工作台上用 0.22 μm 微孔过滤器滤过除菌，-20℃ 冰箱保存备用。

2.2 细胞培养

将 K562 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 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。

2.3 MTT 法观察大黄廑虫丸含药血清对 K562 细胞增殖的影响

取对数生长期 K562 细胞 1.0×10^5 /ml 的单细胞悬液以每孔 80 μl 体积接种于 96 孔板，设 6 个复孔，中药高、中、低剂量组加入相应药物 80 μl，各组药物含药血清占培养体系 25%，以未加药组作为空白组；在 37℃ 和 5% CO₂ 及 95% 饱和湿度下，培养 24、48 和 72 h；每孔加入 5 mg/ml 的 MTT 溶液 10 μl/孔，相同条件下继续培养 4 h；1000 r/min 离心 15 min，然后弃去孔内培养液，每孔加入 20% 的 SDS 和 DMF 混合液 80 μl，振荡 10 min，使结晶充分溶解后，在酶联免疫检测仪上 490nm 波长测定各孔吸光度 (OD₄₉₀ 值)，分别检测用药后 24、48、72 h 的 OD₄₉₀ 值。每批共做 3 板，先后在不同时期进行两次实验，最后统计采用平均值。各组药物对 K562 细胞的生长抑制率 (%) = (1 - 实验组 OD₄₉₀ 平均值 / 空白组 OD₄₉₀ 平均值) × 100%。

2.4 细胞克隆形成实验观察大黄廑虫丸含药血清对 K562 细胞克隆形成的影响

收集细胞接种于 24 孔培养板中，设空白组及中药高、中、低剂量组，每组设 3 个复孔，每孔含细胞数 200 个，中药高、中、低剂量组加入相应药物 80 μl。分别加入含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基 500 μl，甲基纤维素终浓度为 0.8%，培养至第 7~10 天时计算细胞克隆数，以大于或等于 50 个细胞者为 1 个克隆。克隆形成率 (%) = (克

隆数/200) × 100%，实验重复 3 次。

2.5 Annexin V-FITC/PI 检测大黄廑虫丸含药血清对 K562 细胞凋亡、细胞周期的影响

调整细胞浓度为 3×10^5 /ml，设空白组及中药高、中、低剂量组，每组设 3 个复孔，中药高、中、低剂量组加入相应药物 80 μl，经不同浓度药物作用 48 h 后，收集细胞按照 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒说明书操作。用 1 × Binding Buffer 调整细胞浓度为 1.0×10^6 /ml，吸取 100 μl 移至另一 EP 管，加入 5 μl FITC 和 5 μl PI 试剂，轻轻混匀，室温暗处放置 15 min，再加入 400 μl 1 × Binding Buffer，在 1 h 内进行流式细胞仪分析。细胞凋亡结果以 Annexin V-FITC 阳性/PI 阴性为早期凋亡，Annexin V-FITC 阳性/PI 阳性为晚期凋亡，利用 Mod Fit 2.0 软件 (美国 Verity Software House 公司) 分析细胞周期，结果以细胞周期各时相 (G₀/G₁、S 和 G₂/M) 百分比表示。

2.6 统计学方法

采用 SPSS 11.5 软件包进行统计学处理，结果以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，用单因素方差分析。

3 结果

3.1 大黄廑虫丸含药血清对 K562 细胞增殖活性的影响

表 1 示，不同浓度大黄廑虫丸含药血清作用 K562 细胞 24、48 和 72 h 后，均可抑制细胞的生长，与空白组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。中药中、高剂量组在 48 h 和 72 h 生长抑制率明显高于中药低剂量组 ($P < 0.01$)，中药高剂量组在 72 h 时生长抑制率明显高于中药中剂量组 ($P < 0.01$)，说明其抑制效应呈现为时间、剂量依赖性。

表 1 各组细胞不同时间生长抑制率比较 (%， $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	24 h	48 h	72 h
空白组	36	0	0	0
中药低剂量组	36	12.15 ± 1.42*	18.23 ± 1.02*	24.71 ± 1.14*
中药中剂量组	36	17.55 ± 0.95*	28.12 ± 1.16* [△]	35.26 ± 1.67* [△]
中药高剂量组	36	11.62 ± 1.32*	36.53 ± 1.41* [△]	46.71 ± 2.18* ^{△△}

注：与空白组同时时间比较，* $P < 0.01$ ；与中药低剂量组同时时间比较， $\Delta P < 0.01$ ；与中药中剂量组同时时间比较， $\Delta\Delta P < 0.01$

3.2 大黄廑虫丸含药血清对 K562 细胞克隆的影响

不同浓度大黄廑虫丸含药血清可以抑制 K562 细胞集落的形成，空白组克隆数为 92.44/200 个细

胞集落, 中药低剂量组克隆数为 62.84/200 个细胞集落, 中药中剂量组克隆数为 9.34/200 个细胞集落, 中药高剂量组克隆数为 2.34/200 个细胞集落。表 2 示, 中药各剂量组克隆形成率较空白组明显下降 ($P < 0.01$), 中药中、高剂量组克隆形成率明显低于中药低剂量组 ($P < 0.01$), 而中药中、高剂量组组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 各组细胞克隆形成率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	克隆形成率 (%)
空白组	9	46.22 $\pm$ 2.12
中药低剂量组	9	31.42 $\pm$ 2.81*
中药中剂量组	9	9.67 $\pm$ 0.61* Δ
中药高剂量组	9	1.17 $\pm$ 0.61* Δ

注: 与空白组比较, * $P < 0.01$; 与中药低剂量组比较, $\Delta P < 0.01$

3.3 大黄廑虫丸含药血清对 K562 细胞凋亡的影响

表 3 示, 中药低、中、高剂量组处理细胞 48 h 后, K562 细胞早期凋亡率、晚期凋亡率及合计凋亡率均较空白组明显升高 ($P < 0.01$)。并且中药高剂量组细胞早期凋亡率、晚期凋亡率及合计凋亡率均较中药低、中剂量组升高明显 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各组均主要以早期凋亡为主。

3.4 大黄廑虫丸含药血清对 K562 细胞周期的影响

表 4 示, 中药低、中、高剂量组 G_0/G_1 期细胞显著高于空白组, G_2/M 期细胞下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 并且中药高剂量组 G_0/G_1 期细胞显著高于中药低剂量组, G_2/M 期细胞低于中药低剂量组 ($P < 0.01$)。说明大黄廑虫丸能够使 K562 细胞

发生 G_0/G_1 期阻滞, 抑制其增殖, 以中药高剂量效果最好。

4 讨论

CML 是一种源于多能造血干细胞的恶性血液病, 因具备细胞生物学的鲜明特点——造血干细胞的异常克隆和分子遗传学的典型特征——费城染色体 (ph 染色体或 Bcr-Abl 融合基因) 而成为血液肿瘤研究领域中最活跃的热点^[2]。我们认为, 《金匱要略》“干血癆”所述症状高度符合血液系统骨髓增殖性疾病的临床特征, 谓“五劳虚极羸瘦, 腹满不能饮食, ……内有干血, 肌肤甲错, 两目暗黑, 缓中补虚, 大黄廑虫丸主之”。唐荣川在《血证论》提出并系统阐释了“瘀血致癆”的重要性和特殊性, 指出“瘀血不去, 新血不生”“久则耗气伤精而成癆”。大量实验研究已证明, 大黄素具有抗肿瘤、诱导癌细胞凋亡等作用^[3-4], 而大黄素是大黄廑虫丸的重要有效成分之一。有研究已证实, 使用大黄廑虫丸为基本方加减治疗慢性粒细胞白血病等骨髓增殖性疾病确有疗效^[5]。

本研究结果显示, 大黄廑虫丸能有效抑制白血病细胞 K562 细胞的增殖, 且抑制效应呈浓度、时间依赖性; 能抑制 K562 细胞克隆的形成, 说明大黄廑虫丸在干细胞阶段即对白血病细胞产生抑制作用。流式细胞仪检测结果显示, 大黄廑虫丸能影响 K562 细胞周期而抑制细胞增殖, 将其阻滞于 G_0/G_1 期, 并且高剂量的大黄廑虫丸效果最好。但大黄廑虫丸抑制 K562 细胞增殖和诱导细胞凋亡的分子机制及具体的信号通路需要进一步深入研究探讨。

表 3 各组细胞不同时期凋亡率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	早期凋亡率	晚期凋亡率	合计
空白组	3	2.02 $\pm$ 0.75	1.41 $\pm$ 0.13	3.43 $\pm$ 0.88
中药低剂量组	3	11.12 $\pm$ 2.14*	10.13 $\pm$ 2.45*	21.25 $\pm$ 4.59*
中药中剂量组	3	23.12 $\pm$ 0.19* Δ	10.11 $\pm$ 3.27*	33.23 $\pm$ 3.46* Δ
中药高剂量组	3	49.78 $\pm$ 2.91* Δ $\blacktriangle$	20.15 $\pm$ 2.75* Δ $\blacktriangle$	69.93 $\pm$ 5.66* Δ $\blacktriangle$

注: 与空白组比较, * $P < 0.01$; 与中药低剂量组比较, $\Delta P < 0.05$; 与中药中剂量组比较, $\blacktriangle P < 0.01$

表 4 各组细胞周期分布比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	G_0/G_1 期	S 期	G_2/M 期
空白组	3	47.65 $\pm$ 0.72	12.75 $\pm$ 0.41	40.20 $\pm$ 0.41
中药低剂量组	3	65.21 $\pm$ 4.23**	6.46 $\pm$ 2.39*	28.33 $\pm$ 6.42**
中药中剂量组	3	71.35 $\pm$ 2.71**	7.91 $\pm$ 2.74	20.74 $\pm$ 0.35**
中药高剂量组	3	75.83 $\pm$ 9.24** Δ	6.35 $\pm$ 0.27**	17.82 $\pm$ 5.67** Δ

注: 与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与中药低剂量组比较, $\Delta P < 0.01$

参考文献

- [1] 魏惠. 慢性粒细胞白血病的诊断与治疗进展 [J]. 长江大学学报, 2011, 8(8): 225-227.
- [2] Gunz FW. The epidemiology and genetics of the chronic leukaemia [J]. Clin Haematol, 1977, 6(1): 3-20.
- [3] Srinivas G, Anto RJ, srinivas P, et al. Emodin induces apoptosis of human cervical cancer cells through poly (ADP-ribose) polymerase cleavage and activation of caspase-9 [J]. Eur J Pharmacol, 2003, 473(223): 117-125.
- [4] Su YT, Chang HL, Shyue SK, et al. Emodin induces apoptosis in human lung adenocarcinoma cells through a reactive oxygen species-dependent mitochondrial signaling pathway [J]. Biochem Pharmacol, 2005, 70(2): 229-241.
- [5] 和付林, 王力, 张晓坤, 等. 大黄素诱导癌细胞凋亡和抑制视黄醇 X 受体的转录激活功能 [J]. 药理学报, 2008, 43(4): 350-355.
- [6] 张旭霞, 孙延庆, 魏小芳, 等. 大黄素对人慢性髓细胞性白血病 K562 细胞增殖与凋亡及 c-myc 基因表达的影响 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2009, 16(20): 1541-1545.
- [7] 刘丽娟. 加味大黄廬虫丸治疗慢性粒细胞白血病慢性期的临床与实验研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2012.

Effect of *Dahuang Zhechong Wan* on Chronic Myeloeytic Leukemia K562 Cell Proliferation and Apoptosis

QIN Baoning¹, TENG Wenjing¹, ZHOU Chao², CAO Xiaojing¹, LIU Zewang¹, WANG Congcong³, LÜ Qingliang³, SUN Changgang²

(1. School of Basic Medical Sciences, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, 250355; 2. Weifang Traditional Chinese Medicine Hospital; 3. Weifang Medical College)

ABSTRACT Objective To study the possible mechanism of *Dahuang Zhechong Wan* (DHZCW) in treating chronic myeloeytic leukemia (CML) from the angle of cell proliferation and apoptosis. **Methods** Sixteen nude mice were randomly divided into blank control group and high, medium and low dose traditional Chinese medicine (TCM) groups, with four in each. The high, medium and low dose TCM groups were given DHZCW solution with the concentration of 1.97, 0.9, 0.45 g/ml by gavage, 0.2 ml/ (10 g · d), once daily for 7 days, while the blank control group received the same volume of normal saline. The medicated serum containing DHZCW was prepared on the next day of withdrawal. The MTT assay, colony formation assay and Annexin V FITC/PI method were applied to detect the impact on the proliferation of CML cell line K562, the formation of colonies and the apoptosis and cell cycle respectively by the medicated serum. **Results** The growth inhibition rate of the high dose TCM group on 72 h was significantly higher than that of the medium and low dose TCM group ($P < 0.01$). The colony forming rate of all TCM groups was significantly lower than the control group ($P < 0.01$) and that of the high and medium dose TCM group was lower than the low dose TCM group ($P < 0.01$). The apoptosis rate in early and late phase, as well as the total apoptosis rate of high dose TCM group were significantly higher than the low dose TCM group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Cells in G_0/G_1 phase in low, medium and high dose TCM groups were significantly more than that in the blank control group, with less cells in G_2/M phase ($P < 0.01$), which was most significantly shown in the high dose TCM group. **Conclusion** DHZCW could inhibit the proliferation of K562 cells and induce the apoptosis by arresting cells in G_0/G_1 phase. Also, best effects achieved with high dose of DHZCW.

Keywords *Dahuang Zhechong Wan*; chronic myeloeytic leukemia; K562 cell; cell proliferation; cell apoptosis

(收稿日期: 2014-05-15; 修回日期: 2014-10-07)

编辑: 邓 媛