· 实验研究 ·

蓬子菜总黄酮诱导 NB4 细胞凋亡作用及机制*

朱玉良[1], 马英丽[2], 李瑞[1], 张紫阳[1], 董均明[1], 马玲[1]

摘　要: 目的　观察蓬子菜总黄酮(FGVL)诱导急性早幼粒细胞白血病细胞株(NB4)细胞凋亡作用, 并探讨其作用机制。**方法**　FGVL(50、100、200 μg/mL)作用于体外培养的 NB4 细胞, Hoechst 染色观察细胞形态学变化; 流式细胞术检测细胞周期, Annexin V-FITC/PI 双标记法检测细胞凋亡状况; RT-PCR 检测 NB4 凋亡相关基因 Mel-18、Sall4、Bmi-1 mRNA 表达。**结果**　细胞形态学观察显示, NB4 细胞经 FGVL 处理 48 h 后, 与对照组比较, FGVL 各剂量组 NB4 细胞凋亡比例均明显升高($P<0.05$), 呈现细胞核固缩、核碎裂及凋亡小体等典型的细胞凋亡特征; 与对照组(2.3%)比较, 50、100、200 μg/mL FGVL 组 NB4 细胞凋亡率(分别为 9.3%、13%、20.4%)明显升高($P<0.05$); 细胞周期检测结果显示, 与对照组比较, 50、100、200 μg/mL FGVL 组 NB4 细胞 G0/G1 期细胞比例(分别为 43.92%、37.26%、29.15%)减少, S 期细胞比例(54.16%、62.23%、70.46%)增多; 与对照组比较, 100、200 μg/mL FGVL 组 NB4 细胞 Mel-18 mRNA 表达水平升高, Sall4、Bmi-1 mRNA 表达水平明显降低。**结论**　FGVL 可阻滞 NB4 细胞于 S 期, 抑制细胞增殖, 通过调节 Mel-18、Sall4、Bmi-1 等凋亡相关基因表达诱导细胞凋亡。

关键词: 蓬子菜总黄酮(FGVL); NB4; Mel-18; Sall4; Bmi-1; 凋亡

中图分类号: R 557^{+}.3　**文献标志码**: A　**文章编号**: 1001-0580(2017)02-0211-03　DOI: 10.11847/zgggws2017-33-02-10

Pro-apoptotic effect of FGVL on NB4 cells and its mechanism

ZHU Yu-liang*, MA Ying-li, LI Rui, et al (*School of Public Health, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang Province 150081, China)

Abstract: Objective　To observe pro-apoptotic effect of flavone from *Galium verum L* (FGVL) on acute promyelocytic leukemia cells (NB4) and to explore the mechanism of the effect. **Methods**　NB4 cells in culture medium *in vitro* were treated with different concentrations of FGVL (50, 100, and 200 μg/mL). Changes in cell morphological were observed with Hoechst staining and the changes in cell cycle and apoptosis rate were analyzed with flow cytometry. The expression levels of Mel-18, Sall4, and Bmi-1mRNA were assessed with reverse transcriptase PCR (RT-PCR). **Results**　Morphological observations revealed that the percentages of apoptotic cells were significantly enhanced in NB4 cells treated with FGVL for 48 hours, with the percentages of 9.3%, 13%, and 20.4% ($P<0.05$ for all) for the dosages of 50, 100, and 200 μg/mL groups, compared with that of in the control group (2.3%); typical apoptotic morphological changes (karyopyknosis, karyorrhexis, and apoptosis bodies) were observed in the NB4 cells. Cell cycle analysis indicated that compared with the control group, the cell ratios in G0/G1 phase (43.92%, 37.26%, ans 29.15%) decreased significantly, while the ratios in S phase (54.16%, 62.23%, and 70.46%) increased obviously for the NB4 cells treated with 50, 100, and 200 μg/mL FGVL. Compared with the control group, the expression level of Mel-18 mRNA increased and Sall4 and Bmi-1mRNA decreased obviously for the NB4 cells treated with 100 and 200 μg/mL FGVL. **Conclusion**　FGVL could inhibit cell proliferation, induce cell apoptosis, and arrest cells in S phase in NB4 cells; the mechanism of the effects is probably through regulating the expressions of Mel-18, Sall4, and Bmi-1 gene.

Key words: flavone from *Galium verum L*; acute promyelocytic leukemia cell; Mel-18; Sall4; Bmi-1; apoptosis

蓬子菜(*Galium verum L.*)是茜草科(*Rubiaceae*)拉拉藤属(*Galium*), 药用植物蓬子菜为干燥全草, 其主要成分为黄酮类、蒽醌类、环烯醚萜类, 有机酸及其他成分[1]。研究表明, 黄酮类化合物具有抑制肿瘤细胞的转移、扩散、增殖并诱导其凋亡的作用[2-4]。本研究拟观察蓬子菜总黄酮(flavone from *Galium verum L*, FGVL)对人急性早幼粒细胞白血病细胞株(NB4)凋亡诱导作用, 旨在为临床寻找抗白血病的新药提供依据, 结果报告如下。

1　材料与方法

1.1　主要试剂与仪器　FGVL 纯度为 75%, 由黑龙江省中医药大学馈赠; NB4 细胞(黑龙江省血液研究所); 胎牛血清(美国 Hyclone 公司); 1640 培养基(美国 Gibco 公司); Hoechst33258、核糖核酸酶 A(江苏碧云天生物技术研究所); 碘化丙啶 PI(北京索莱宝科技有限公司); 细胞凋亡试剂盒(美国 BD 公司); 反转录及 PCR 试剂盒(日本 TakaRa 公司)。

* **基金项目**: 国家自然科学基金(81274034)
作者单位: 1. 哈尔滨医科大学公共卫生学院, 黑龙江 哈尔滨 150081; 2. 黑龙江中医药大学药学院
作者简介: 朱玉良(1990 -), 男, 黑龙江人, 硕士在读, 研究方向: 中药抗肿瘤作用机理。
通讯作者: 马玲, E-mail: malinghai@126.com
数字出版日期: 2016 - 4 - 5 10:09
数字出版网址: http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20160405.1009.026.html

CKX41 倒置显微镜、BX43 荧光显微镜(日本 Olympus 公司);PCR System 9700 仪(美国 ABI 公司);Nano Drop 2000c 微量紫外分光光度计(美国 Thermo Scientific 公司);5415R 低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司);EC3 凝胶成像系统(美国 UVP 公司);LSRFortessa 流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.2　细胞培养与分组　NB4 细胞在含有 10% 胎牛血清的 1640 培养基中,于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养,2 ~ 3 d 换液、传代,取对数生长期细胞用于实验。NB4 细胞置于 6 孔板,每孔 2×10^6 个细胞,分别加入 0(对照)、50、100、200 μg/mL FGVL,每孔 2 mL,培养 24、48 h,收集细胞用于各指标检测;每组设 3 个复孔。

1.3　指标与方法

1.3.1　细胞形态学观察　采用 Hoechst 33258 染色法,收集细胞,于离心管中静置 30 min,待细胞沉淀在离心管底部,吸取 20 μL 细胞于载玻片上,取 20 μL Hoechst 33258 染色液与细胞混匀,荧光显微镜下观察、拍照。在不同视野下计数 200 个细胞,计数凋亡细胞数。

1.3.2　细胞周期检测　采用流式细胞术,收集细胞,500 g 离心 10 min,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline,PBS)洗涤 1 次;用 300 μL PBS 重悬细胞,加 700 μL 冷无水乙醇,-20 ℃固定 24 h。收集细胞,PBS 洗涤 1 次。450 μL PBS 重悬细胞,加 50 μL核糖核酸酶 A(2.5 mg/mL),4 ℃孵育30 min。取 50 μL propidium iodide(PI)加入细胞悬液,4 ℃避光孵育 30 min,流式细胞仪检测细胞周期。

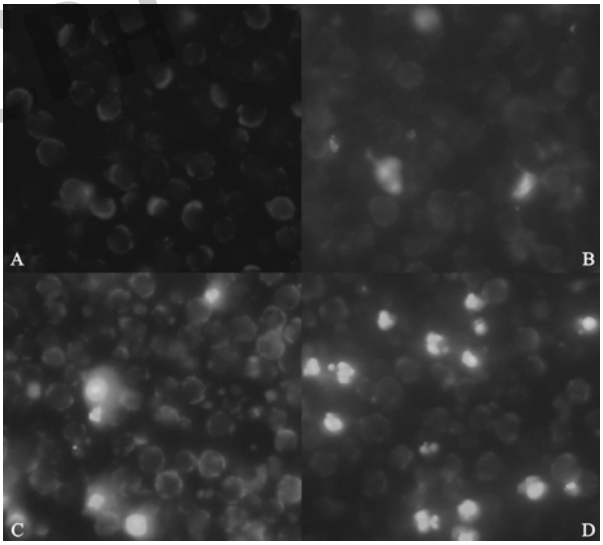
1.3.3　细胞凋亡检测　采用流式细胞术,收集细胞,500 g 离心 10 min,用冷 PBS 洗涤 2 次;用 1 × binding buffer 调整细胞密度为 1×10^6 个/mL;取 100 μL 细胞悬液置于 5 mL 离心管,分别加入 5 μL fluorescein isothiocyanate(FITC)/PI;避光置 15 min(25 ℃);加入 400 μL 1 × binding buffer,流式细胞仪计数细胞凋亡率。

1.3.4　凋亡相关基因表达检测　采用逆转录聚合酶链式反应(reverse transcriptase-PCR,RT-PCR),收集细胞,按照试剂盒提取总 RNA,逆转录合成 cDNA,进行 PCR 实验:β-actin(256 bp):上游引物:5′-CTCGCTGTCCACCTTCCA-3′,下游引物:5′-GCT-GTCACCTTCACCGTT-3′,反应条件:94 ℃预变性 2 min,94 ℃变性 45 s,55 ℃退火 1 min,72 ℃延伸 1 min,共 35 个循环,最后 72 ℃延伸 10 min;Mel-18 (281 bp):上游引物:5′-AGAAGGGGGCTCTGAGTGAT-3′,下游引物:5′-GATGTAGGCGATGTCCATGA-3′;Bmi-1 (359 bp):上游引物:5′-AATCTAAGGAGGAGGTGA-3′,下游引物:5′-CAAACAAGAAGAGGTGGA-3′;Sall4 (260 bp):上游引物:5′-ATCGAGAACACCATG-GCTCTG-3′,下游引物:5′-GACTGGGAGCCATC-CATCTTG-3′;反应条件:94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 1 min,57 ℃退火 30 s,72℃延伸30 s,共 35 个循环;最后 72 ℃延伸 10 min。1.5% 琼脂糖凝胶电泳,采用凝胶成像系统记录样品条带,以 Image J 进行产物灰度扫描,计算各基因相对表达量。

1.4　统计分析　计量数据用表示,采用 SAS 9.13 软件进行统计分析,组间比较采用方差分析,组间两两比较采用 Dunnett-*t* 检验,$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　FGVL 对 NB4 细胞形态学影响(图 1)　处理 24 h 时,对照组和 50 μg/mL FGVL 组 NB4 细胞呈均匀蓝色荧光,细胞呈圆形,大小一致,凋亡细胞少见;100、200 μg/mL FGVL 组大部分 NB4 细胞处于凋亡早、中期,细胞染色质高度凝聚,呈波纹状或折缝样,内部密度不均、细胞染色质高度凝聚、边缘化,只有少部分细胞可见细胞核裂解为碎块及凋亡小体。处理 48 h 后,各剂量 FGVL 组 NB4 细胞均出现明显凋亡现象。



注:A. 对照;B、C、D:50、100、200 μmol/L FGVL 组。

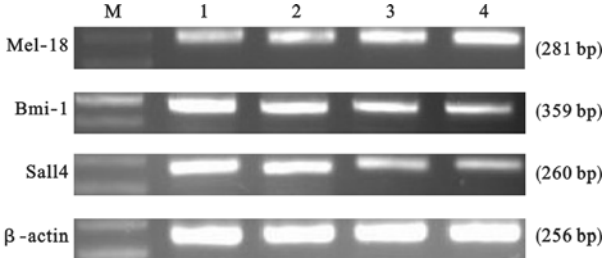
图 1　FGVL 对 NB4 细胞形态学影响(作用 48 h)

2.2　FGVL 对 NB4 细胞周期影响　对照组、50、100、200 μg/mL FGVL 组 NB4 细胞 G0/G1 期细胞比例分别为 49.97%、43.92%、37.26%、29.15%,S 期细胞比例分别为 47.07%、54.16%、62.23%、70.46%;与对照组比较,FGVL 各剂量组 NB4 细胞 G0/G1 期细胞比例减少,S 期细胞比例增多。提示 FGVL 改变了 NB4 细胞周期,使 NB4 细胞阻滞于 S 期。

2.3　FGVL 对 NB4 细胞凋亡影响　对照组、50、100、200 μg/mL FGVL 组 NB4 细胞凋亡率分别为 2.3%、9.3%、13%、20.4%;与对照组比较,FGVL 组 NB4 细胞凋亡率明显升高($P < 0.05$),呈剂量效

应关系。

2.4　FGVL 对 NB4 细胞凋亡相关基因表达影响(图 2、表 1)　与对照组比较,100、200 μg/mL FGVL 组 NB4 细胞 Mel-18 mRNA 表达明显升高($P<0.05$),各剂量 FGVL 组 NB4 细胞 Sall4、Bmi-1 mRNA 表达明显下降($P<0.05$),并呈剂量效应关系。



注:M. Marker;1:对照;2~4:50、100、200 μg/mL FGVL 组。

图 2　FGVL 对 NB4 细胞凋亡相关基因表达影响

表 1　FGVL 对 NB4 细胞凋亡相关基因表达影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别(μmol/L)	Mel-18	Bmi-1	Sall4
对照组	0.15±0.04	0.79±0.04	0.86±0.02
FGVL 50	0.27±0.06	0.64±0.11[a]	0.65±0.03[a]
100	0.50±0.04[a]	0.39±0.07[a]	0.27±0.05[a]
200	0.67±0.11[a]	0.19±0.07[a]	0.15±0.02[a]

注:与对照组比较,a $P<0.05$。

3　讨　论

细胞增殖、分化、凋亡失控是肿瘤细胞最显著的特征,诱导细胞凋亡在肿瘤治疗中具有重要作用。研究显示,黄酮类化合物能够抑制肿瘤细胞的增殖,诱导细胞凋亡,实现抗肿瘤作用[5-6]。细胞周期是指正常连续分裂的细胞从前一次有丝分裂结束到下一次有丝分裂完成所经历的连续动态过程,可分为 G0 期(静息期)、G1 期(DNA 合成前期)、S 期(DNA 合成期)、G2 期(DNA 合成后期)、M 期(有丝分裂期),存在 2 个主要限制点,即 G1/S 和 G2/M 限制点。细胞周期阻滞与细胞凋亡密切相关,许多中药或其有效成分可阻滞肿瘤细胞周期于 G1 期、S 期或 G2/M 期,抑制癌细胞增殖,并诱导凋亡,从而发挥抗肿瘤作用[7-8]。本研究结果显示,NB4 细胞经过 FGVL 处理 24 h 后,即出现凋亡现象,细胞凋亡率明显高于对照组;G0/G1 期细胞数量减少,S 期细胞数量明显增多。提示,FGVL 可阻滞 NB4 细胞于 S 期,影响 DNA 合成与复制,从而阻止细胞向 G2/M 期过渡[9]。

细胞凋亡是受多种基因控制的细胞自主性死亡方式,是一种主动、程序性的细胞固有生物学过程,涉及一系列基因的激活、表达以及调控等作用[10]。Bmi-1 是多梳基因(polycomb group genes, PcG)家族的转录抑制因子,通过多种途径参与细胞调控[11]。Bmi-1 高表达时可以减弱细胞周期素依赖性激酶(CDK4)的抑制蛋白基因 INK4a 的可变阅读框基因(P14ARF)对鼠双微粒体基因 2(mdm2)的抑制作用,从而对其介导的泛素依赖的 P53 降解增多,阻止细胞周期停滞和细胞凋亡[12]。有研究表明,Mel-18 和 Bmi-1 基因结构高度同源,在转录水平上通过抑制 c-myc 癌基因的表达下调 Bmi-1 基因,进而达到抑制肿瘤细胞增殖的目的[13];同源异型基因 Sall4 在急性白血病细胞中异常表达,发挥癌基因作用。Sall4 基因通过参与 Wnt 信号、细胞凋亡、第 10 染色体同源丢失性磷酸酶—张力蛋白基因(phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10, PTEN)、核因子-κB(nuclear factor κ, NF-κB)和 P53 等重要信号传导途径,调控细胞凋亡[14];Bmi-1 是 Sall4 的直接靶基因,Sall4 能与 Bmi-1 基因的启动子相结合,启动转录并且上调内源性 Bmi-1 基因的表达水平,阻碍细胞凋亡[15]。本研究结果显示,FGVL 可上调 Mel-18 基因表达而降低 Bmi-1 与 Sall4 表达。提示,调节凋亡相关基因 Mel-18、Bmi-1 与 Sall4 表达可能是 FGVL 诱导 NB4 细胞凋亡的重要机制之一。

参考文献

[1] 于晓敏,卢卫红,史国玉,等. 蓬子菜化学成分及其药理活性研究进展[J]. 中医药信息,2004,21(3):21-22.
[2] Yao N, Chen CY, Wu CY, et al. Novel flavonoids with antiproliferative activities against breast cancer cells[J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2011, 54(13):4339-4349.
[3] Hsieh MJ, Lin CW, Yang SF, et al. Glabridin inhibits migration and invasion by transcriptional inhibition of matrix metalloproteinase 9 through modulation of NF-κB and AP-1 activity in human liver cancer cells[J]. British Journal of Pharmacology, 2014, 171(12):3037-3050.
[4] 董晶,马英丽,李海霞,等. 蓬子菜总黄酮诱导 NB4 细胞株凋亡作用[J]. 中国公共卫生,2014,30(7):906-909.
[5] Kanadaswami C, Lee LT, Lee PPH, et al. The antitumor activities of flavonoids[J]. In Vivo, 2005, 19(5):895-909.
[6] 李海霞,马英丽,史灵恩,等. 蓬子菜黄酮类化合物对人肝癌 HepG2 细胞增殖及凋亡的机制研究[J]. 中草药,2013,44(10):1290-1294.
[7] 庞月华,张新平,冯义伯,等. 细胞周期及其调控研究进展[J]. 新疆医科大学学报,2005,28(6):596-598.
[8] 周曼,周春祥. 中药对肿瘤细胞周期影响的研究进展[J]. 环球中医药,2014,7(10):813-816.
[9] Shimada M, Nakanishi M. DNA damage checkpoints and cancer[J]. Journal of Molecular Histology, 2006, 37(5-7):253-260.
[10] 李文艺. 细胞凋亡研究进展[J]. 畜牧与饲料科学,2011,31(11):17-19.
[11] 苏进,许新华. Bmi-基因在恶性肿瘤中的研究进展[J]. 广东医学,2010,31(18):2454-2455.
[12] Spike BT, Macleod KF. The Rb tumor suppressor in stress responses and hematopoietic homeostasis[J]. Cell Cycle, 2005, 4(1):42-45.
[13] Guo WJ, Datta S, Band V, et al. Mel-18, a polycomb group protein, regulates cell proliferation and senescence via transcriptional repression of Bmi-1 and c-Myc oncoproteins[J]. Molecular Biology of the Cell, 2007, 18(2):536-546.
[14] Yang J, Chai L, Gao C, et al. SALL4 is a key regulator of survival and apoptosis in human leukemic cells[J]. Blood, 2008, 112(3):805-813.
[15] Yang J, Chai L, Liu F, et al. Bmi-1 is a target gene for SALL4 in hematopoietic and leukemic cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007, 104(25):10494-10499.

收稿日期: 2015-11-20　(解学魁编辑　刘铁校对)

中国公共卫生 CPH