

本文引用:赵小强,吴雅莉,仝佳音,等. 鱼藤素对急性髓系白血病 KG-1a 细胞增殖和凋亡的影响及机制[J]. 新乡医学院学报,2021,38(12):1121-1127. DOI:10.7683/xyxyxb.2021.12.003.

【基础研究】

鱼藤素对急性髓系白血病 KG-1a 细胞增殖和凋亡的影响及机制

赵小强, 吴雅莉, 仝佳音, 席晓平, 程英英, 杨海平

(河南科技大学第一附属医院/河南科技大学临床医学院血液内科,河南 洛阳 471000)

摘要: **目的** 探讨鱼藤素对急性髓系白血病(AML) KG-1a 细胞增殖、凋亡的影响及机制。**方法** 将对数生长期 KG-1a 细胞随机分为 0.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组、10.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组、20.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组、40.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组、80.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组,分别用含有 0.00、10.00、20.00、40.00、80.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素的培养基培养。鱼藤素干预 48 h 后,采用倒置显微镜观察 5 组细胞的形态学变化。采用二甲基噻唑(MTT)实验检测 5 组细胞增殖能力。另取对数生长期 KG-1a 细胞随机分为空白组、鱼藤素组、氯化锂(LiCl)组、鱼藤素 + LiCl 组,空白组细胞用正常培养基培养,鱼藤素组细胞用含 80.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素的培养基干预 72 h, LiCl 组细胞用含 30 mmol · L⁻¹ LiCl 的培养基干预 72 h,鱼藤素 + LiCl 组细胞用含 80.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素和 30 mmol · L⁻¹ LiCl 的培养基干预 72 h。采用流式细胞术检测 4 组细胞凋亡情况及细胞周期分布。采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)法检测 4 组细胞 S 期激酶相关蛋白 2(SKP2)、β-链接素(β-catenin)、聚腺苷酸二磷酸核糖转移酶(PARP) mRNA 相对表达量。采用 Western blot 法检测 4 组细胞中 SKP2、β-catenin、PARP 蛋白相对表达量。**结果** 鱼藤素干预 48 h 时,与 0.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组比较,10.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组、20.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组、40.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组、80.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组细胞间隙增大,细胞数量显著减少,形态不规则,细胞核固缩、碎片增加,且随着鱼藤素药物干预浓度的增加,细胞数量逐渐减少,形态变化逐渐明显。鱼藤素干预 24、48、72 h 时,10.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组、20.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组、40.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组、80.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组细胞增殖能力显著低于 0.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组($P < 0.05$),20.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组、40.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组、80.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组细胞增殖能力显著低于 10.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组($P < 0.05$),40.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组、80.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组细胞增殖能力显著低于 20.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组($P < 0.05$),80.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组细胞增殖能力显著低于 40.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组($P < 0.05$);鱼藤素干预 24、48、72 h 时,5 组细胞的增殖能力均随培养时间延长显著降低,组内各时间点之间两两比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。空白组、鱼藤素组、LiCl 组、鱼藤素 + LiCl 组细胞凋亡率分别为(5.37 ± 0.61)%、(34.89 ± 4.57)%、(2.54 ± 0.36)%、(21.10 ± 4.69)%;空白组、LiCl 组、鱼藤素 + LiCl 组细胞凋亡率显著低于鱼藤素组($P < 0.05$);空白组、LiCl 组细胞凋亡率均显著低于鱼藤素 + LiCl 组;LiCl 组细胞凋亡率均显著低于空白组($P < 0.05$)。空白组、鱼藤素 + LiCl 组、鱼藤素组的 G₀/G₁ 细胞占比显著低于 LiCl 组,G₂/M 细胞占比显著高于 LiCl 组($P < 0.05$);鱼藤素 + LiCl 组、鱼藤素组的 G₀/G₁ 细胞占比显著低于空白组,G₂/M 细胞占比显著高于空白组($P < 0.05$);鱼藤素组的 G₀/G₁ 细胞占比显著低于鱼藤素 + LiCl 组,G₂/M 细胞占比显著高于鱼藤素 + LiCl 组($P < 0.05$);4 组 S 期细胞百分比比较差异无统计学意义($F = 0.696, P > 0.05$)。空白组、鱼藤素 + LiCl 组、鱼藤素组细胞 SKP2、β-catenin、PARP mRNA 及蛋白相对表达量显著低于 LiCl 组($P < 0.05$),鱼藤素 + LiCl 组、鱼藤素组细胞 SKP2、β-catenin、PARP mRNA 及蛋白相对表达量显著低于空白组($P < 0.05$),鱼藤素组细胞 SKP2、β-catenin、PARP mRNA 及蛋白相对表达量显著低于鱼藤素 + LiCl 组($P < 0.05$)。**结论** 鱼藤素对 AML KG-1a 细胞具有增殖抑制、细胞周期阻滞及凋亡促进作用,其作用机制可能与抑制 SKP2、β-catenin、PARP 表达有关。

关键词: 急性髓系白血病;鱼藤素;增殖;凋亡

中图分类号: R733.7 文献标志码: A 文章编号: 1004-7239(2021)12-1121-07

Effect of deguelin on the proliferation and apoptosis of acute myeloid leukemia KG-1a cells and its mechanism

ZHAO Xiaoqiang, WU Yali, TONG Jiayin, XI Xiaoping, CHENG Yingying, YANG Haiping

(Department of Hematology, the First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology/Clinical School of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471000, Henan Province, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect and mechanism of deguelin on the proliferation and apoptosis of acute myeloid leukemia (AML) KG-1a cells. **Methods** The logarithmic growth phase KG-1a cells were randomly divided into

DOI:10.7683/xxvxyxb.2021.12.003

收稿日期:2020-12-06

基金项目:河南省卫生健康委员会及河南科技大学第一附属医院资助项目(编号:LHGJ20190546)。

作者简介:赵小强(1980-),男,河南伊川人,博士,副主任医师,研究方向:白血病的基础与临床研究。

0.00 nmol · L⁻¹ deguelin group, 10.00 nmol · L⁻¹ deguelin group, 20.00 nmol · L⁻¹ deguelin group, 40.00 nmol · L⁻¹ deguelin group and 80.00 nmol · L⁻¹ deguelin group, and they were cultured with 0.00, 10.00, 20.00, 40.00 and 80.00 nmol · L⁻¹ deguelin respectively. After intervention with deguelin for 48 h, the morphological changes of cells in the five groups were observed with the inverted microscope. The proliferation ability of cells in the five groups were detected by the dimethylthiazole (MTT) experiment. In addition, KG-1a cells in the logarithmic growth phase were randomly divided into blank group, deguelin group, lithium chloride (LiCl) group, deguelin + LiCl group, the cells in the blank group were cultured in normal medium, the cells in the deguelin group were intervened with medium containing 80.00 nmol · L⁻¹ deguelin for 72 h, the cells in the LiCl group were intervened with medium containing 30 mmol · L⁻¹ LiCl for 72 h, the cells in the deguelin + LiCl group were intervened with medium containing 80.00 nmol · L⁻¹ deguelin and 30 mmol · L⁻¹ LiCl for 72 h. The apoptosis and cell cycle distribution of cells in the four groups were detected by flow cytometry. The relative expression levels of S-phase kinase-related protein 2 (SKP2), β -catenin and polyadenylic acid diphosphate ribose transferase (PARP) mRNA of cells in the four groups were detected by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) method. The relative expression levels of SKP2, β -catenin and PARP protein of cells in the four groups were detected by Western blot. **Results** After deguelin intervened for 48 h, compared with the 0.00 nmol · L⁻¹ deguelin group, the cells in the 10.00 nmol · L⁻¹ deguelin group, 20.00 nmol · L⁻¹ deguelin group, 40.00 nmol · L⁻¹ deguelin group and 80.00 nmol · L⁻¹ deguelin group had larger intercellular spaces, significantly reduced number, irregular morphology, pyknosis of the nucleus and increased fragments. With the increase in the concentration of deguelin intervention, the number of cells gradually decreased, the morphological change was gradually obvious. After deguelin intervened for 24 h, 48 h and 72 h, the cell proliferation capacity of cells in the 10.00 nmol · L⁻¹ deguelin group, 20.00 nmol · L⁻¹ deguelin group, 40.00 nmol · L⁻¹ deguelin group and 80.00 nmol · L⁻¹ deguelin group was significantly lower than that in the 0.00 nmol · L⁻¹ deguelin group ($P < 0.05$); the cell proliferation capacity of cells in the 20.00 nmol · L⁻¹ deguelin group, 40.00 nmol · L⁻¹ deguelin group and 80.00 nmol · L⁻¹ deguelin group was significantly lower than that in the 10.00 nmol · L⁻¹ deguelin group ($P < 0.05$); the cell proliferation capacity of cells in the 40.00 nmol · L⁻¹ deguelin group and 80.00 nmol · L⁻¹ deguelin group was significantly lower than that in the 20.00 nmol · L⁻¹ deguelin group ($P < 0.05$); the cell proliferation capacity of cells in the 80.00 nmol · L⁻¹ deguelin group was significantly lower than that in the 40.00 nmol · L⁻¹ deguelin group ($P < 0.05$). After deguelin intervened for 24 h, 48 h and 72 h, the proliferation ability of the cells in the five groups decreased with time, and the difference between each time point in the five groups was statistically significant ($P < 0.05$). The apoptotic rate of cells in the blank group, deguelin group, LiCl group and deguelin + LiCl group was $(5.37 \pm 0.61)\%$, $(34.89 \pm 4.57)\%$, $(2.54 \pm 0.36)\%$, $(21.10 \pm 4.69)\%$, respectively; the apoptotic rate of cells in the blank group, LiCl group and deguelin + LiCl group was significantly lower than that in the deguelin group ($P < 0.05$); the apoptotic rate of cells in the blank group and LiCl group was significantly lower than that in the deguelin + LiCl group ($P < 0.05$); the apoptotic rate of cells in the LiCl group was significantly lower than that in the blank group ($P < 0.05$). The proportion of cells in G₀/G₁ in the blank group, the deguelin + LiCl group and the deguelin group were significantly lower than that in the LiCl group, and the proportion of cells in G₂/M was significantly higher than that in the LiCl group ($P < 0.05$); the proportion of cells in G₀/G₁ in the deguelin + LiCl group and the deguelin group was significantly lower than that in the blank group, and proportion of cells in G₂/M was significantly higher than that in the blank group ($P < 0.05$); the proportion of cells in G₀/G₁ in the deguelin group was significantly lower than that in the deguelin + LiCl group, and proportion of cells in G₂/M was significantly higher than that in the deguelin + LiCl group ($P < 0.05$); there was no significant difference in the percentage of S-phase cells among the four groups ($F = 0.696, P > 0.05$). The relative expression levels of SKP2, β -catenin, PARP mRNA and protein in the blank group, deguelin + LiCl group and deguelin group were significantly lower than those in the LiCl group ($P < 0.05$); the relative expression levels of SKP2, β -catenin, PARP mRNA and protein in the deguelin + LiCl group and deguelin group were significantly lower than those in the blank group ($P < 0.05$); the relative expression levels of SKP2, β -catenin, PARP mRNA and protein in the deguelin group were significantly lower than those in the deguelin + LiCl group ($P < 0.05$). **Conclusion** Deguelin has proliferation inhibition, cell cycle arrest and apoptosis promotion effects on AML KG-1a cells, and its mechanism of action may be related to the inhibition of SKP2, β -catenin and PARP expression.

Key words: acute myeloid leukemia; deguelin; proliferation; apoptosis

急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)是造血干细胞发生异常增殖的一种恶性疾病,病死率较高^[1]。随着多药联合化学治疗、免疫治疗、造血干细胞移植等的应用,AML的预后得以改善,但化学治疗毒副作用大、完全缓解率低、易复发且易发展为难治性白血病;免疫治疗通过人为增强或抑制

机体的免疫功能以达到治疗疾病目的,容易影响自身免疫系统;造血干细胞移植可根治该病,但来源不足^[2-3]。鱼藤素是从一种自豆科植物绢毛扁豆中分离的拟鱼藤酮类化合物,具有抗病毒、抗肿瘤等药理作用,已被证实对肝癌、乳腺癌细胞有增殖抑制及凋亡诱导作用,且可增强肿瘤细胞对放射治疗和化学

治疗的敏感性^[4-5]。但目前关于鱼藤素对 AML 治疗作用及相关机制的研究尚少^[6-7]。因此,本研究旨在探讨鱼藤素对 AML KG-1a 细胞增殖、凋亡的影响及机制,以期为 AML 的临床治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 细胞、试剂与仪器 AML KG-1a 细胞购自上海名劭生物科技有限公司;RPMI 1640 培养基购自北京诺为生物技术有限公司,胰蛋白酶购自深圳乐芙生物科技有限公司,鱼藤素购自湖州展舒生物科技有限公司,氯化锂(lithium chloride, LiCl)购自江西赣锋锂业股份有限公司,二甲基噻唑(dimethylthiazole, MTT)溶液、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)溶液购自上海士锋生物科技有限公司,Annexin V binding buffer 标记液、Annexin V-异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)、碘化丙啶(propidium iodide, PI)购自北京中杉金桥生物技术有限公司,TRIzol 试剂盒、反转录试剂盒均购自美国 Invitrogen 公司,实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)试剂盒、SYBR Green Mix、二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白定量试剂盒购自美国 Sigma 公司,放射免疫沉淀(radio-immunoprecipitation, RIPA)裂解液购自西安赫特生物科技有限公司,兔抗人 S 期激酶相关蛋白 2(S-phase kinase-associated protein 2, SKP2)一抗、 β -链接素(β -catenin)一抗、聚腺苷酸二磷酸核糖转移酶[poly (ADP-ribose) polymerase, PARP]一抗、山羊抗兔 IgG 二抗购自美国 Sigma 公司,电化学发光(electrochemiluminescence, ECL)显色液购自上海西唐生物科技有限公司;倒置显微镜购自日本奥林巴斯株式会社, Tecan-5082 Sunrise 型全自动酶标仪购自奥地利 TECAN 公司, Amnis ImageStream X MK II 型流式细胞仪购自德国 Luminex 公司;引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2 研究方法

1.2.1 细胞培养及分组 将 KG-1a 细胞接种于含体积分数 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,置于 37 ℃、含体积分数 5% CO₂、饱和湿度细胞培养箱中培养。待细胞生长至密度 75% 时,用胰蛋白酶消化并传代,2~3 d 传代 1 次。取对数生长期 KG-1a 细胞,胰蛋白酶消化后以每孔 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 个细胞接种于 6 孔板,随机分为 0.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组、10.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组、20.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组、40.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组、80.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组,分别用含有 0.00、10.00、20.00、40.00、

80.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素的培养基培养,每组设 5 个复孔。

另取对数生长期 KG-1a 细胞,胰蛋白酶消化后以每孔 2×10^5 个细胞接种于 6 孔板,随机分为空白组、鱼藤素组、LiCl 组、鱼藤素 + LiCl 组。空白组细胞用正常培养基培养,鱼藤素组细胞用含 80.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素的培养基培养 72 h, LiCl 组细胞用含 30 mmol · L⁻¹ LiCl 的培养基培养 72 h, 鱼藤素 + LiCl 组细胞用含 80.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素和 30 mmol · L⁻¹ LiCl 的培养基培养 72 h, 每组设 5 个复孔。

1.2.2 细胞形态学观察 倒置显微镜下观察 0.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组、10.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组、20.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组、40.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组、80.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组细胞干预 48 h 的生长状态。

1.2.3 MTT 实验检测细胞增殖能力 0.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组、10.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组、20.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组、40.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组、80.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组细胞干预 24、48、72 h 后,每孔加入 20 μL 新鲜制备的 MTT 溶液($5.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 4 h 后离心弃上清,每孔加入 150 μL DMSO 溶液,振荡 10 min,观察到甲瓚颗粒完全溶解后,应用酶标仪测定波长 570 nm 处吸光度值,吸光度值越大表示细胞增殖能力越强。实验重复 3 次,取均值。

1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡情况 取空白组、鱼藤素组、LiCl 组、鱼藤素 + LiCl 组细胞,用胰蛋白酶消化并收集细胞至离心管中,磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤, Annexin V binding buffer 标记液冲洗后离心,弃上清, 200 μL Annexin V binding buffer 标记液重悬,加入 5 μL Annexin V-FITC 混合均匀, 4 ℃ 避光孵育 15 min,加入 5 μL PI 染液混合均匀,避光反应 30 min,应用流式细胞仪上样并检测各组细胞凋亡率。实验重复 3 次,取均值。

1.2.5 流式细胞术检测细胞周期分布 取空白组、鱼藤素组、LiCl 组、鱼藤素 + LiCl 组细胞,用胰蛋白酶消化并收集细胞至离心管中, 4 ℃、1 800 r · min⁻¹ 离心 10 min(离心半径 12 cm),使用预冷 PBS 冲洗细胞后 4 ℃、1 800 r · min⁻¹ 离心 10 min,预冷 PBS 重悬细胞,加入预冷体积分数 70% 乙醇混匀, 4 ℃ 固定 12 h, 4 ℃、1 800 r · min⁻¹ 离心 10 min,预冷 PBS 冲洗细胞,加入 RNA 酶 A(RNaseA)使其终质量浓度为 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 37 ℃ 水浴 30 min,加入 PI 染液使其终质量浓度为

50 mg · L⁻¹, 4 ℃ 避光染色 30 min, 使用 300 目尼龙网过滤。使用流式细胞仪上样并检测细胞周期。实验重复 3 次, 取均值。

1.2.6 qRT-PCR 法检测细胞中 SKP2、β-catenin、PARP mRNA 表达 取空白组、鱼藤素组、LiCl 组、鱼藤素 + LiCl 组细胞, 用胰蛋白酶消化并收集细胞至离心管中, 采用 TRIzol 试剂盒提取总 RNA, 按反转录试剂盒说明书反转录为 cDNA, 采用 qRT-PCR 法检测 SKP2、β-catenin、PARP mRNA 表达。SKP2 上游引物序列为 5'-GTCTGCACCATGCGCAATGCGTCA-3', 下游引物序列为 5'-CTACGCGTGCA-CACGCTGCACCGC-3'; β-catenin 上游引物序列为 5'-ACGTGCACGCGTGCAAGGGCCTGC-3', 下游引物序列为 5'-CATGTGTACGTCCACGGTTGCGTA-3'; PARP 上游引物序列为 5'-TGGCACGTGCAGCTAGT-CACGTGC-3', 下游引物序列为 5'-GTGCGCTCTGT-GTCGTGTCACGTG-3'; 内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 上游引物序列为 5'-CTTTGCACCGCACGTGCGCATT-AG-3', 下游引物序列为 5'-GTGCACGCTG-CACGCTGTCAATGC-3'。反应体系为 SYBR Green Mix 11 μL, cDNA 模板 1.5 μL, 上、下游引物各 1.0 μL, 加入双蒸水至总反应体系为 20.0 μL。反应条件为 95 ℃ 变性 35 s, 60 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 40 个循环, 72 ℃ 延伸 5 min。采用 2^{-ΔΔCt} 法计算 SKP2、β-catenin、PARP mRNA 相对表达量。实验重复 3 次, 取均值。

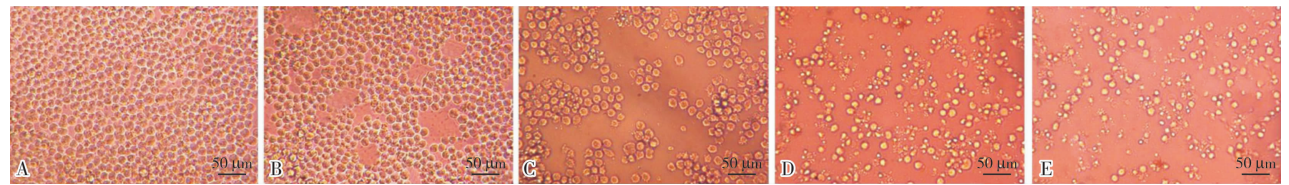
1.2.7 Western blot 法检测细胞中 SKP2、β-catenin、PARP 蛋白表达 取空白组、鱼藤素组、LiCl 组、鱼藤素 + LiCl 组细胞, 用胰蛋白酶消化并收

集细胞至离心管中, 预冷 PBS 洗涤, 加入 100 μL 预冷 RIPA 裂解液裂解, 使用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。取 40 μg 蛋白样本, 沸水煮 10 min 使其变性, 使用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白, 将蛋白恒压转至聚偏氟乙烯膜上, 脱脂奶粉室温摇床封闭 2 h, Tris 缓冲生理盐水洗涤; 加入兔抗人 SKP2、β-catenin、PARP 一抗 (稀释度均为 1 : 1 000), 4 ℃ 孵育过夜, 加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (稀释度均为 1 : 2 000), 常温孵育 2 h, Tris 缓冲生理盐水洗涤; 滴加 ECL 显色剂, 暗室中曝光、显影, 应用凝胶成像系统扫描、分析各条带灰度值, 以 GAPDH 为内参, 以 SKP2、β-catenin、PARP 蛋白条带灰度值与 GAPDH 灰度值比值表示蛋白相对表达量。实验重复 3 次, 取均值。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 19.0 软件进行数据统计与分析。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析; 如 Levene 检验方差齐, 采用单因素方差分析行总均值比较, 应用最小显著性差异法-*t* 检验行两两比较; 如 Levene 检验方差不齐, 采用 Welch 检验行总体均值比较, 应用 Dunnett T3 检验行两两比较; *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 5 组细胞形态学变化 结果见图 1。鱼藤素干预 48 h 时, 与 0.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组比较, 10.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组、20.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组、40.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组、80.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组细胞间隙增大, 细胞数量显著减少, 形态不规则, 细胞核固缩、碎片增加, 且随着鱼藤素药物干预浓度的增加, 细胞数量逐渐减少, 形态变化逐渐明显。



A: 0.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组; B: 10.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组; C: 20.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组; D: 40.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组; E: 80.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组。

图 1 5 组细胞形态学变化 (×100)

Fig.1 Cell morphology changes in the five groups (×100)

2.2 5 组细胞增殖能力比较 结果见表 1。鱼藤素干预 24、48、72 h 时, 10.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组、20.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组、40.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组、80.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组细胞增殖能力显著低于 0.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组, 20.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组、40.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组、80.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组细胞增殖能力显著低于 10.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组,

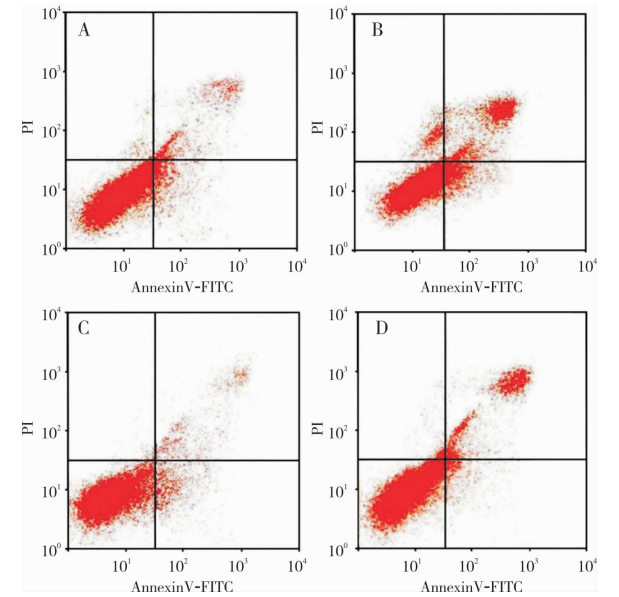
40.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组、80.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组细胞增殖能力显著低于 20.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组, 80.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组细胞增殖能力显著低于 40.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。鱼藤素干预 24、48、72 h 时, 5 组细胞的增殖能力随培养时间延长而降低, 组内各时间点之间两两比较差异均有统计学意义 (*P* < 0.05)。

表 1 5 组细胞增殖能力比较

Tab.1 Comparison of cell proliferation ability in the five groups		(x̄ ± s)		
组别	n	细胞增殖能力(吸光度值)		
		24 h	48 h	72 h
0.00 nmol · L ⁻¹ 鱼藤素组	3	0.89 ± 0.09	0.77 ± 0.09 ^e	0.68 ± 0.09 ^{ef}
10.00 nmol · L ⁻¹ 鱼藤素组	3	0.75 ± 0.08 ^a	0.61 ± 0.07 ^{ae}	0.45 ± 0.05 ^{aef}
20.00 nmol · L ⁻¹ 鱼藤素组	3	0.62 ± 0.07 ^{ab}	0.44 ± 0.05 ^{abe}	0.37 ± 0.04 ^{abef}
40.00 nmol · L ⁻¹ 鱼藤素组	3	0.48 ± 0.05 ^{abc}	0.32 ± 0.05 ^{abce}	0.29 ± 0.03 ^{abcef}
80.00 nmol · L ⁻¹ 鱼藤素组	3	0.36 ± 0.05 ^{abcd}	0.25 ± 0.04 ^{abcde}	0.11 ± 0.02 ^{abcdef}
F		45.338	57.742	81.481
P		<0.05	<0.05	<0.05

注:与 0.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组比较^a*P* < 0.05;与 10.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组比较^b*P* < 0.05;与 20.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组比较^c*P* < 0.05;与 40.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组比较^d*P* < 0.05;与同组 24 h 比较^e*P* < 0.05;与同组 48 h 比较^f*P* < 0.05。

2.3 4 组细胞凋亡率比较 结果见图 2。空白组、鱼藤素组、LiCl 组、鱼藤素 + LiCl 组细胞凋亡率分别为 (5.37 ± 0.61)%、(34.89 ± 4.57)%、(2.54 ± 0.36)%、(21.10 ± 4.69)%。空白组、鱼藤素组、LiCl 组、鱼藤素 + LiCl 组细胞凋亡率比较差异有统计学意义 (*F* = 104.037, *P* < 0.05)。空白组、LiCl 组、鱼藤素 + LiCl 组细胞凋亡率均显著低于鱼藤素组,差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。空白组、LiCl 组细胞凋亡率均显著低于鱼藤素 + LiCl 组,差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。LiCl 组细胞凋亡率显著低于空白组,差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。



A:空白组;B:鱼藤素组;C:LiCl 组;D:鱼藤素 + LiCl 组。

图 2 4 组细胞凋亡率

Fig.2 Apoptosis rate of cells in the four groups

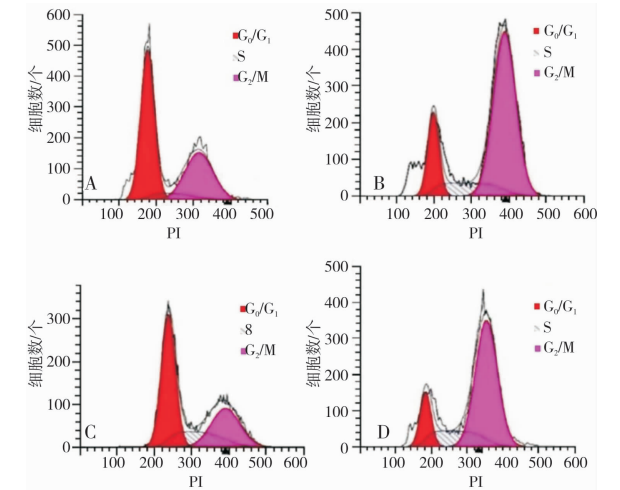
2.4 4 组细胞周期分布比较 结果见表 2 和图 3。空白组、鱼藤素组、LiCl 组、鱼藤素 + LiCl 组 G₀/G₁、G₂/M 细胞占比比较差异有统计学意义 (*F* = 19.150, *P* < 0.05)。空白组、鱼藤素 + LiCl 组、鱼藤素组的 G₀/G₁ 细胞占比显著低于 LiCl 组, G₂/M 细胞占比显著

高于 LiCl 组,差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。鱼藤素 + LiCl 组、鱼藤素组的 G₀/G₁ 细胞占比显著低于空白组, G₂/M 细胞占比显著高于空白组,差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。鱼藤素组的 G₀/G₁ 细胞占比显著低于鱼藤素 + LiCl 组, G₂/M 细胞占比显著高于鱼藤素 + LiCl 组,差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。4 组 S 期细胞占比比较差异无统计学意义 (*F* = 0.696, *P* > 0.05)。

表 2 4 组细胞周期分布比较

Tab.2 Comparison of cell cycle distribution among the four groups					(x̄ ± s)	
组别	n	G ₀ /G ₁	S 期/%	G ₂ /M		
空白组	3	51.42 ± 7.51	28.14 ± 3.54	20.30 ± 2.85		
鱼藤素组	3	35.57 ± 3.97 ^a	28.72 ± 2.87	35.60 ± 4.14 ^a		
LiCl 组	3	61.85 ± 6.43 ^{ab}	26.01 ± 3.02	12.56 ± 2.14 ^{ab}		
鱼藤素 + LiCl 组	3	42.08 ± 4.82 ^{abc}	28.40 ± 3.67	29.52 ± 3.06 ^{abc}		
F		19.150	0.696	19.916		
P		<0.05	>0.05	<0.05		

注:与空白组比较^a*P* < 0.05;与鱼藤素组比较^b*P* < 0.05;与 LiCl 组比较^c*P* < 0.05。



A:空白组;B:鱼藤素组;C:LiCl 组;D:鱼藤素 + LiCl 组。

图 3 4 组细胞周期分布

Fig.3 Cell cycle distribution in the four groups

2.5 4 组细胞中 SKP2、β-catenin、PARP mRNA 相对表达量比较 结果见表 3。空白组、鱼藤素组、LiCl 组、鱼藤素 + LiCl 组细胞中 SKP2、β-catenin、PARP mRNA 相对表达量比较差异有统计学意义($F = 77.343, 77.343, 44.555, P < 0.05$)。空白组、鱼藤素 + LiCl 组、鱼藤素组细胞中 SKP2、β-catenin、PARP mRNA 相对表达量显著低于 LiCl 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。鱼藤素 + LiCl 组、鱼藤素组细胞中 SKP2、β-catenin、PARP mRNA 相对表达量显著低于空白组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。鱼藤素组细胞中 SKP2、β-catenin、PARP mRNA 相对表达量显著低于鱼藤素 + LiCl 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 3 4 组细胞中 SKP2、β-catenin、PARP mRNA 相对表达量比较

Tab. 3 Comparison of the relative expression levels of SKP2, β-catenin and PARP mRNA in cells among the four groups				
(x̄ ± s)				
组别	n	SKP2 mRNA	β-catenin mRNA	PARP mRNA
空白组	3	0.65 ± 0.07	0.72 ± 0.08	0.71 ± 0.08
鱼藤素组	3	0.22 ± 0.03 ^a	0.30 ± 0.04 ^a	0.36 ± 0.05 ^a
LiCl 组	3	1.32 ± 0.22 ^{ab}	1.42 ± 0.25 ^{ab}	1.19 ± 0.21 ^{ab}
鱼藤素 + LiCl 组	3	0.49 ± 0.05 ^{abc}	0.53 ± 0.06 ^{abc}	0.55 ± 0.06 ^{abc}
F		77.343	77.343	44.555
P		<0.05	<0.05	<0.05

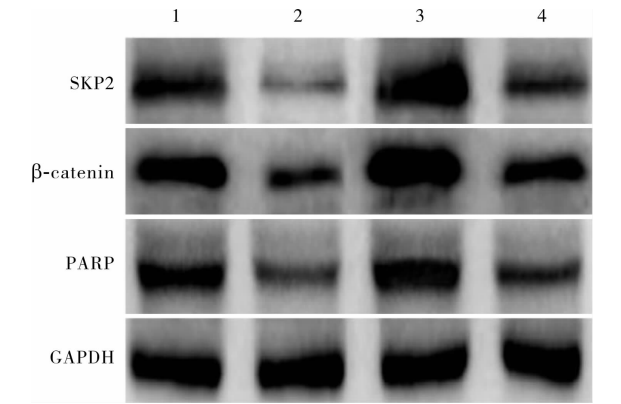
注:与空白组比较^a $P < 0.05$;与鱼藤素组比较^b $P < 0.05$;与 LiCl 组比较^c $P < 0.05$ 。

2.6 4 组细胞中 SKP2、β-catenin、PARP 蛋白相对表达量比较 结果见表 4 和图 4。空白组、鱼藤素组、LiCl 组、鱼藤素 + LiCl 组细胞中 SKP2、β-catenin、PARP 蛋白相对表达量比较差异有统计学意义($F = 98.313, 102.853, 114.515, P < 0.05$)。空白组、鱼藤素 + LiCl 组、鱼藤素组细胞中 SKP2、β-catenin、PARP 蛋白相对表达量显著低于 LiCl 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。鱼藤素 + LiCl 组、鱼藤素组细胞中 SKP2、β-catenin、PARP 蛋白相对表达量显著低于空白组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。鱼藤素组细胞中 SKP2、β-catenin、PARP 蛋白相对表达量显著低于鱼藤素 + LiCl 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 4 4 组细胞中 SKP2、β-catenin、PARP 蛋白相对表达量比较

Tab. 4 Comparison of the relative expression levels of SKP2, β-catenin and PARP protein in cells among the four groups				
(x̄ ± s)				
组别	n	SKP2 蛋白	β-catenin 蛋白	PARP 蛋白
空白组	3	0.57 ± 0.06	0.61 ± 0.07	0.63 ± 0.07
鱼藤素组	3	0.11 ± 0.02 ^a	0.24 ± 0.03 ^a	0.20 ± 0.02 ^a
LiCl 组	3	1.24 ± 0.21 ^{ab}	1.33 ± 0.19 ^{ab}	1.01 ± 0.12 ^{ab}
鱼藤素 + LiCl 组	3	0.32 ± 0.03 ^{abc}	0.42 ± 0.05 ^{abc}	0.39 ± 0.04 ^{abc}
F		98.313	102.853	114.515
P		<0.05	<0.05	<0.05

注:与空白组比较^a $P < 0.05$;与鱼藤素组比较^b $P < 0.05$;与 LiCl 组比较^c $P < 0.05$ 。



1:空白组;2:鱼藤素组;3:LiCl 组;4:鱼藤素 + LiCl 组。
图 4 4 组细胞中 SKP2、β-catenin、PARP 蛋白表达
Fig. 4 Expression of SKP2, β-catenin and PARP protein of cells in the four groups

3 讨论

AML 属于恶性克隆性疾病,源自淋巴源性多潜能祖细胞或髓系祖细胞,细胞克隆中的白血病干细胞发生失控性增生、分化障碍,大量累积在外周血、骨髓及其他造血组织中,并对其他器官与组织造成浸润,抑制正常造血系统,导致器官浸润、感染、贫血、出血等症状^[8-9]。尽管白血病干细胞与正常干细胞均具有自我更新及分化潜能,但白血病干细胞自我调控能力丧失,并抵抗常规放射治疗和化学治疗,是 AML 复发及转移的种子细胞^[10]。因此,探寻白血病干细胞靶向治疗方式,抑制其不可控性增殖,同时诱导其凋亡,为治愈 AML 提供了新的希望。

有研究显示,AML 实质上是一类细胞周期性疾病,其发生、发展与细胞周期关系密切,临床上常用的 AML 化学治疗药物基本上是通过影响 DNA 的合成进而阻滞细胞周期来达到抑制白血病干细胞生长的目的^[11]。鱼藤素是一种异黄酮类化合物,近年来有研究表明,鱼藤素对细胞增殖、生长、细胞周期分布、凋亡等具有调节作用,可抑制血管新生,以癌变细胞及癌变前细胞为攻击目标,通过介导相关特定分子代谢途径阻断其生长,从而发挥强大的抗癌活性^[12-13]。此外,鱼藤素作为天然植物提取物在起到抗肿瘤作用的同时对病灶周边组织的正常细胞影响较小,安全性高,具有广阔的应用前景。ZHANG 等^[14]研究表明,无论是体内实验还是体外实验,鱼藤素均表现出诱导 AML 细胞分化的效果,认为鱼藤素具有 AML 治疗作用。本研究结果显示,鱼藤素干预 24、48、72 h 后,10.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组、20.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组、40.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组、80.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组细胞增殖能力显著低于 0.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组,20.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组、40.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组、80.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素

组细胞增殖能力显著低于 10.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组, 40.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组、80.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组细胞增殖能力显著低于 20.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组, 80.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组细胞增殖能力显著低于 40.00 nmol · L⁻¹ 鱼藤素组; 且鱼藤素组凋亡率、G₂/M 细胞占比显著高于空白组, 提示鱼藤素对 AML 细胞具有增殖抑制、促进凋亡及细胞周期阻滞作用, 且表现为剂量依赖性。

Wnt 信号通路是重要的细胞增殖、分化调控途径, 参与细胞极化、黏附、迁移等行为, 且与其他信号通路具有交叉、协同作用, 调控祖细胞及干细胞增殖、分化。β-catenin 是 Wnt 信号通路的重要因子, 且是将 AML 细胞生物信号自细胞膜转运到细胞质的信使。Wnt 信号通路被激活后, β-catenin 可在细胞内大量累积, 并参与细胞连接位置黏合带的形成。此外, 游离性 β-catenin 可进入细胞核参与 SKP2、PARP 等下游基因表达的调控。KANG 等^[15] 研究显示, Wnt 信号通路的失控将触发骨髓造血干细胞髓样再生, 并损害下游多能祖细胞的产生及血液输出, 从而参与 AML 发生及发展。YUAN 等^[16] 研究发现, 激活 Wnt/β-catenin 信号通路将进一步增强 AML 细胞恶性程度, 提示该通路在 AML 发病机制中发挥作用。本研究结果发现, 空白组、LiCl 组、鱼藤素 + LiCl 组细胞凋亡率均显著低于鱼藤素组, 空白组、LiCl 组细胞凋亡率均显著低于鱼藤素 + LiCl 组, LiCl 组细胞凋亡率均显著低于空白组; 空白组、鱼藤素 + LiCl 组、鱼藤素组 G₀/G₁ 细胞占比显著低于 LiCl 组, G₂/M 细胞占比显著高于 LiCl 组; 鱼藤素 + LiCl 组、鱼藤素组 G₀/G₁ 细胞占比显著低于空白组, G₂/M 细胞占比显著高于空白组; 鱼藤素组 G₀/G₁ 细胞占比显著低于鱼藤素 + LiCl 组, G₂/M 细胞占比显著高于鱼藤素 + LiCl 组; 提示 Wnt/β-catenin 信号通路激活剂 LiCl 干预 KG-1a 细胞后, 鱼藤素凋亡抑制及细胞阻滞作用被削弱, 说明鱼藤素通过抑制激活 Wnt/β-catenin 信号通路发挥对 AML 细胞的凋亡抑制及细胞阻滞作用。本研究结果发现, 空白组、鱼藤素 + LiCl 组、鱼藤素组细胞中 SKP2、β-catenin、PARP mRNA 及蛋白相对表达量显著低于 LiCl 组, 鱼藤素 + LiCl 组、鱼藤素组细胞中 SKP2、β-catenin、PARP mRNA 及蛋白相对表达量显著低于空白组, 鱼藤素组细胞中 SKP2、β-catenin、PARP mRNA 及蛋白相对表达量显著低于鱼藤素 + LiCl 组, 提示鱼藤素可能通过调控 Wnt/β-catenin 信号通路相关下游基因 SKP2、β-catenin、PARP 影响 AML 细胞的增殖及凋亡。

综上所述, 鱼藤素对 AML KG-1a 细胞具有增殖

抑制、细胞周期阻滞及促进凋亡作用, 其机制可能与抑制 SKP2、β-catenin、PARP 表达有关。

参考文献:

[1] 王德征, 江国虹, 张爽, 等. 1999—2015 年天津市白血病死亡率变化趋势分析[J]. 中华预防医学杂志, 2019, 53(3): 319-322.

[2] BLACKBURN L M, BENDER S, BROWN S. Acute leukemia: diagnosis and treatment[J]. *Semin Oncol Nurs*, 2019, 35(6): 150950.

[3] MUKHERJEE S, SEKERES M A. Novel therapies in acute myeloid leukemia[J]. *Semin Oncol Nurs*, 2019, 35(6): 150955.

[4] LIAO W, LIU X, YANG Q, et al. Deguelin inhibits HCV replication through suppressing cellular autophagy via down regulation of Beclin1 expression in human hepatoma cells[J]. *Antiviral Res*, 2020, 174: 104704.

[5] NGUYEN C T, ANN J, SAHU R, et al. Discovery of novel anti-breast cancer agents derived from deguelin as inhibitors of heat shock protein 90 (HSP90) [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2020, 30(17): 127374.

[6] GAO F, YU X, LI M, et al. Deguelin suppresses non-small cell lung cancer by inhibiting EGFR signaling and promoting GSK3β/FBW7-mediated Mcl-1 destabilization[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(2): 143.

[7] 赵明明, 黄艳群, 李莲, 等. Wnt/β-catenin 信号通路激活剂对过氧化氢诱导的星形胶质细胞凋亡的影响[J]. 临床和实验医学杂志, 2018, 17(9): 25-29.

[8] CHOPRA M, BOHLANDER S K. The cell of origin and the leukemia stem cell in acute myeloid leukemia[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2019, 58(12): 850-858.

[9] VOSBERG S, GREIF P A. Clonal evolution of acute myeloid leukemia from diagnosis to relapse [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2019, 58(12): 839-849.

[10] NARAYANAN D, WEINBERG O K. How I investigate acute myeloid leukemia[J]. *Int J Lab Hematol*, 2020, 42(1): 3-15.

[11] LI H, TIAN X, WANG P, et al. MicroRNA-582-3p negatively regulates cell proliferation and cell cycle progression in acute myeloid leukemia by targeting cyclin B2 [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2019, 4: 24: 66.

[12] CHEN L, JIANG K, CHEN H, et al. Deguelin induces apoptosis in colorectal cancer cells by activating the p38 MAPK pathway[J]. *Cancer Manag Res*, 2018, 11: 95-105.

[13] LI W, YU X, MA X, et al. Deguelin attenuates non-small cell lung cancer cell metastasis through inhibiting the CtsZ/FAK signaling pathway[J]. *Cell Signal*, 2018, 50: 131-141.

[14] ZHANG X, ZHAO Z, YI S, et al. Deguelin induced differentiation of mutated NPM1 acute myeloid leukemia *in vivo* and *in vitro* [J]. *Anticancer Drugs*, 2017, 28(7): 723-738.

[15] KANG Y A, PIETRAS E M, PASSEGUÉ E. Dereglated Notch and Wnt signaling activates early-stage myeloid regeneration pathways in leukemia[J]. *J Exp Med*, 2020, 217(3): jem. 20190787.

[16] YUAN Y, WANG Q, MA S L, et al. lncRNA PCAT-1 interacting with FZD6 contributes to the malignancy of acute myeloid leukemia cells through activating Wnt/β-catenin signaling pathway [J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(11): 7104-7114.

(本文编辑: 郭 潇)