

DOI:10.7499/j.issn.1008-8830.2013.12.023

论著·实验研究

黄芪注射液对 U937 细胞增殖与凋亡的影响及相关机制的探讨

贾秀红 尹宝慧 李建厂

(滨州医学院附属医院儿科, 山东 滨州 256603)

【摘要】 目的 研究不同浓度黄芪注射液对白血病细胞株 U937 增殖、凋亡的影响, 并初步探讨其相关分子机制。方法 白血病细胞株 U937 随机分为实验组(分别采用不同浓度黄芪注射液 62.5、125、250、500、1000 $\mu\text{g/mL}$ 处理 U937 细胞)和对照组(不加黄芪注射液)。四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测各组细胞增殖能力, FITC-PI 双染法流式细胞术检测各组细胞的凋亡, Hoechst33258 染色后荧光显微镜下观察各组细胞形态学变化; U937 细胞加入 1000 $\mu\text{g/mL}$ 黄芪注射液后 0 h、12 h、24 h、48 h, 采用 RT-PCR 法检测 c-myc、p27 mRNA 的表达。结果 与对照组相比, 不同浓度黄芪注射液均能抑制 U937 细胞增殖, 差异均具有统计学意义($P<0.05$); 不同浓度黄芪注射液均能诱导 U937 细胞凋亡, 较对照组显著增多($P<0.05$), 黄芪注射液浓度为 1000 $\mu\text{g/mL}$ 时凋亡率可达 $(63 \pm 4)\%$; 黄芪注射液作用于 U937 细胞, 随时间延长, c-myc mRNA 表达逐渐下降, p27 mRNA 表达逐渐增强, 差异均具有统计学意义($P<0.01$)。结论 黄芪注射液体外可有效抑制白血病细胞株 U937 增殖, 并诱导其凋亡, 其相关分子机制可能与下调 c-myc 基因和上调 p27 基因表达有关。

[中国当代儿科杂志, 2013, 15(12): 1128-1133]

【关键词】 黄芪注射液; 白血病; 细胞增殖; 细胞凋亡; 白血病细胞株

Effect of astragalus injection on U937 leukemia cells proliferation and apoptosis and relevant molecular mechanisms

JIA Xiu-Hong, YIN Bao-Hui, LI Jian-Chang. Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, Binzhou, Shandong 256603, China (Email: jiaxiuhong001@163.com)

Abstract: Objective To study the effect of astragalus injection on U937 leukemia cells proliferation and apoptosis and relevant molecular mechanisms. **Methods** Leukemia cell line U937 cells were treated with different concentrations of astragalus (62.5, 125, 250, 500, 1000 $\mu\text{g/mL}$). The U937 cells without astragalus treatment were used as the control group. The ability of cell proliferation was measured by MTT method. Flow cytometry was used to explore cell apoptosis. The cell morphology changes were observed under a fluorescent microscope by dyeing Hoechst33258. mRNA expression of c-myc and p27 in U937 cells which was exposed in 1000 $\mu\text{g/mL}$ astragalus after 0, 12, 24 and 48 hours was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Various concentrations of astragalus injection inhibited U937 cell proliferation effectively compared with the control group ($P<0.05$). They also induced U937 cells apoptosis and the apoptosis rate reached to $(63 \pm 4)\%$ in the 1000 $\mu\text{g/mL}$ astragalus treatment group. mRNA expression level of c-myc was gradually declined and p27 mRNA expression was gradually increased with astragalus treatment time ($P<0.01$). **Conclusions** Astragalus injection may inhibit proliferation and induce apoptosis of leukemia cell line U937 *in vitro*. This contributes to down-regulation of c-myc expression and up-regulation of p27 expression.

[Chin J Contemp Pediatr, 2013, 15(12): 1128-1133]

Key words: Astragalus injection; Leukemia; Cell proliferation; Cell apoptosis; Leukemia cell line

白血病是一类严重危害人类健康的恶性克隆性疾病, 其发病率在儿童恶性肿瘤中占首位。目

前白血病的治疗主要以化疗为主, 由于化疗药物多为非选择性细胞杀伤剂, 副作用大, 易出现多

[收稿日期] 2013-04-10; [修回日期] 2013-05-10

[基金项目] 山东省科学技术发展计划(基金编号 2010GSF10264)。

[作者简介] 贾秀红, 女, 硕士, 教授, 主任医师。

药耐药导致化疗失败,而中药治疗白血病由于其低毒性、预后好等优点,近年来逐渐成为研究的热点^[1]。中药黄芪在白血病临床治疗中的研究主要集中在调节患者免疫功能方面,董静等^[2]研究发现大剂量黄芪能提高白血病患者体内DC细胞数量并增强其抗原提呈能力。此外,有研究表明,黄芪成分黄芪总苷能诱导NB4细胞凋亡^[3],黄芪总黄酮能抑制K562细胞增殖^[4],提示黄芪具有潜在的抗白血病作用。本实验旨在体外观察黄芪注射液对白血病细胞株U937增殖与凋亡的影响,并在分子水平探讨其作用机制,为进一步阐明黄芪抗白血病作用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

人白血病U937细胞株(滨州医学院肿瘤分子生物学重点实验室提供);RPMI1640培养基、胎牛血清(美国Hyclone公司);RNAiso Plus总RNA提取试剂、PCR反应试剂盒(日本TAKARA公司);逆转录试剂盒(Fermentas公司);MTT细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司);二甲基亚砜(DMSO,美国Sigma公司);细胞凋亡检测试剂盒(凯基生物公司);Hoechst33258荧光染料(碧云天生物技术有限公司);黄芪注射液(神威药业有限公司);PCR引物(上海赛百盛生物技术有限公司),其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人白血病细胞株U937采用10%胎牛血清和青霉素(浓度为100 U/mL)、链霉素(浓度为0.1 mg/mL)双抗的RPMI1640培养基中,置于37℃、5% CO₂培养箱中培养,根据细胞生长状况,2~3 d传代一次,取对数生长期细胞进行后续实验。

1.2.2 MTT法检测细胞增殖能力 取对数生长期U937细胞,调整细胞密度为 2×10^4 个/mL,按100 μL细胞悬液/孔接种于96孔板上,实验组分别加入62.5、125、250、500、1000 μg/mL RPMI1640培养基稀释的不同浓度的黄芪注射液100 μL,对照组仅加入100 μL RPMI1640培养基,每组均设5个复孔,置于37℃、5% CO₂培养箱中培养,分别于24 h、48 h、72 h后每孔加入MTT 20 μL (5 mg/mL),培养箱中继续培养4 h,离心后弃培养基,加入DMSO 150 μL溶解结晶,酶标仪检测各孔在560 nm处的吸光度值(A560),

各组中5个平行孔取平均值计算细胞增殖抑制率(inhibitory rate, IR)。IR = (1 - 实验组 A560 / 对照组 A560) × 100%。

1.2.3 FITC-PI双染流式细胞术法检测细胞的凋亡 取对数生长期U937细胞接种于6孔板上(4×10^5 个细胞/孔),实验组分别加入62.5、125、250、500、1000 μg/mL的黄芪注射液,培养基终体积为2 mL,对照组加入RPMI1640完全培养基至2 mL,37℃、5% CO₂培养箱中培养,48 h后离心收集细胞(2000 rpm离心5 min),PBS洗涤细胞2次(2000 rpm离心5 min),加入500 μL Binding Buffer 悬浮细胞,加入5 μL Annexin V - FITC混匀后,加入5 μL Propidium Iodide (PI),室温避光反应15 min后流式细胞仪检测各组细胞的凋亡情况,实验独立重复3次。

1.2.4 Hoechst33258染色法进行细胞形态学观察

取对数生长期U937细胞,以 1×10^5 个细胞/孔接种于24孔板上,分别用终浓度为62.5、125、250、500和1000 μg/mL黄芪注射液处理细胞,对照组仅加RPMI1640完全培养基,置于37℃、5% CO₂培养箱中培养,48 h后离心收集细胞(2000 rpm离心2 min),用PBS洗涤细胞2次(2000 rpm离心2 min),加入500 μL固定液(4%多聚甲醛)混匀,室温固定细胞15 min,离心去除固定液,PBS洗涤细胞2次(2000 rpm离心2 min),加入150 μL终浓度为10 μg/mL的Hoechst33258染色液,充分混匀后加入24孔板,振荡器上室温避光染色15 min,荧光显微镜下在激发波长346 nm,发射波长460 nm处进行细胞形态观察、照相。

1.2.5 RT-PCR法检测c-myc和p27 mRNA的表达

取对数生长期U937细胞接种于6孔板上(4×10^5 个细胞/孔),加入黄芪注射液,终浓度为1000 μg/mL。分别于加药后0 h、12 h、24 h、48 h后收集细胞,并提取细胞总RNA,测定RNA纯度,吸光度A260/A280在1.8~2.0之间,测定RNA浓度,RT-PCR两步法检测c-myc和p27 mRNA的表达情况,β-actin为内参,引物序列为:c-myc正义链5'-GATTCTCTGCTCTCCTCGAC-3',反义链5'-TCCAGACTCTGACCTTTTGC-3',扩增长度为180 bp; p27正义链5'-ATGTCACGTGCGAGTGTG-3',反义链5'-TCTGTAGTAGAACTCGGGCAA-3',扩增长度为270 bp。β-actin正义链5'-TCATGTTTGAGACCTTCAA-3',反义链5'-GTCTTTGCGGATGTCCACG-3',扩增长度为513 bp。按下列条件进行RT-PCR反应:95℃预变性5 min;95℃变性30 s,55℃退火45 s,72℃延伸30 s,共进行35

个循环；最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1 % 琼脂糖凝胶电泳鉴定，Tanon-2500 凝胶成像系统拍照，并采用 Tanon Gel 凝胶图像分析软件检测目的基因与 β -actin 的灰度值，二者比值为目的基因的相对表达量，实验独立重复 3 次。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析，计量资料用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 SNK- q 检验， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 黄芪注射液对 U937 细胞增殖能力的影响

MTT 法检测细胞的增殖能力，结果显示，实验组 5 种不同浓度黄芪注射液在 24 h、48 h、72 h 均能有效抑制 U937 细胞增殖，与相应时间点对照组 IR 相比，差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。黄芪注射液对 U937 细胞增殖的抑制作用随浓度增加，抑制作用越明显 ($P < 0.05$)；黄芪注射液浓度相同时，不同时间点组间比较，差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (表 1、图 1)。

表 1 不同浓度黄芪注射液作用不同时间对 U937 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	24 h		48 h		72 h	
	A ₅₆₀	IR(%)	A ₅₆₀	IR(%)	A ₅₆₀	IR(%)
对照组	1.09 $\pm$ 0.15	0	1.22 $\pm$ 0.18	0	1.97 $\pm$ 0.09	0
62.5 μ g/mL	0.96 $\pm$ 0.13	11.9 $\pm$ 3.6 ^a	1.00 $\pm$ 0.14	17.7 $\pm$ 4.4 ^a	1.55 $\pm$ 0.18	21.6 $\pm$ 8.9 ^a
125 μ g/mL	0.86 $\pm$ 0.27	22.3 $\pm$ 13.8 ^{a,b}	0.88 $\pm$ 0.11	27.0 $\pm$ 8.5 ^{a,b}	1.32 $\pm$ 0.19	32.9 $\pm$ 11.4 ^{a,b}
250 μ g/mL	0.67 $\pm$ 0.11	39.1 $\pm$ 2.4 ^{a,b,c}	0.65 $\pm$ 0.08	46.3 $\pm$ 2.1 ^{a,b,c}	0.89 $\pm$ 0.04	54.6 $\pm$ 3.3 ^{a,b,c}
500 μ g/mL	0.51 $\pm$ 0.07	53.2 $\pm$ 5.4 ^{a,b,c,d}	0.52 $\pm$ 0.10	57.1 $\pm$ 3.9 ^{a,b,c,d}	0.77 $\pm$ 0.05	61.2 $\pm$ 0.8 ^{a,b,c,d}
1 000 μ g/mL	0.39 $\pm$ 0.05	64.3 $\pm$ 2.5 ^{a,b,c,d,e}	0.40 $\pm$ 0.05	67.5 $\pm$ 1.7 ^{a,b,c,d,e}	0.48 $\pm$ 0.05	75.9 $\pm$ 2.0 ^{a,b,c,d,e}
F 值		59.790		137.596		83.897
P 值		<0.05		<0.05		<0.05

a: 与同时时间点对照组比较, $P < 0.05$; b: 与同时时间点 62.5 μ g/mL 组比较, $P < 0.05$; c: 与同时时间点 125 μ g/mL 组比较, $P < 0.05$; d: 与同时时间点 250 μ g/mL 组比较, $P < 0.05$; e: 与同时时间点 500 μ g/mL 组比较, $P < 0.05$ 。

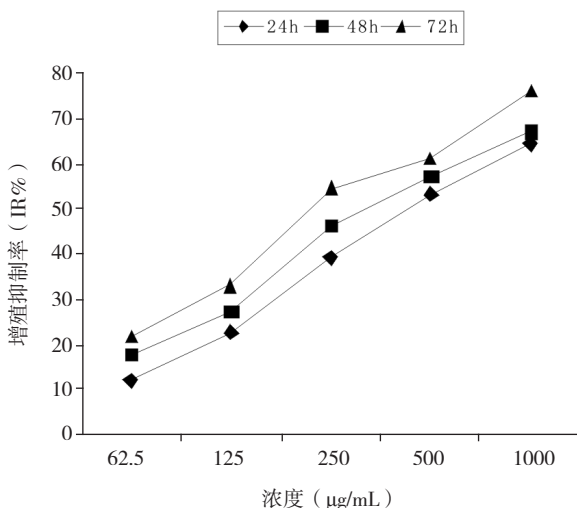


图 1 黄芪注射液作用于 U937 细胞的浓度 - 抑制率曲线

2.2 黄芪注射液对 U937 细胞凋亡的影响

FITC-PI 双染流式细胞术检测各组细胞的凋亡情况，结果显示，实验组不同浓度黄芪注射液 (62.5、125、250、500、1000 μ g/mL) 作用于 U937 细胞，48 h 细胞凋亡率分别为 (10.4 $\pm$ 3.2) %、(19.1 $\pm$ 1.3) %、(35.2 $\pm$ 3.2) %、(43.6 $\pm$ 5.2) %、

(62.7 $\pm$ 4.4) %，与对照组凋亡率 (5.24 $\pm$ 1.55) % 相比，差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)；实验组不同浓度间进行组间比较，差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 2)。

2.3 黄芪注射液对 U937 细胞形态学的影响

Hoechst33258 染色后，通过荧光显微镜观察，结果显示，细胞染色质与 Hoechst33258 结合后，荧光显微镜下细胞核呈蓝色，对照组细胞核形态规则，染色质分布均匀，实验组各组 U937 细胞加黄芪注射液后，细胞核染色质密集、深染，有的碎裂，形成凋亡小体，可见较多碎裂状致密染色质和凋亡小体，其中 500、1000 μ g/mL 黄芪注射液组较为明显 (图 3)。

2.4 黄芪注射液对 U937 细胞中 c-myc 和 p27 表达的影响

U937 细胞经终浓度为 1000 μ g/mL 的黄芪注射液处理后，RT-PCR 结果显示，0 h、12 h、24 h、48 h c-myc 的相对表达量分别是 (186 $\pm$ 10) %、(143 $\pm$ 10) %、(85 $\pm$ 8) %、(32 $\pm$ 8) %，p27 的相对表达量分别是 (39 $\pm$ 8) %、(65 $\pm$ 3) %、(77 $\pm$ 10) %、(175 $\pm$ 12) %，随时间延长，

c-myc 表达量依次降低, p27 表达量依次升高, 差异均有统计学意义 (分别 $F=15917.204$, $P<0.01$; $F=11381.519$, $P<0.01$) (图 4)。

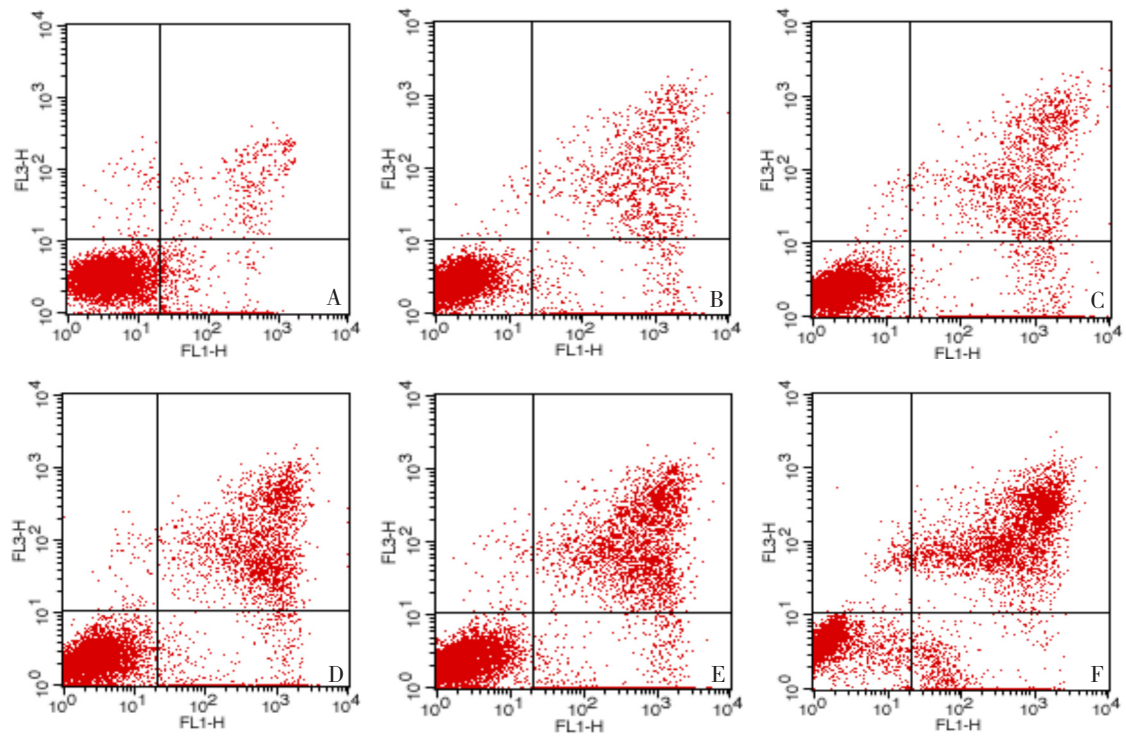


图 2 不同浓度黄芪注射液对 U937 细胞凋亡的影响 A 为对照组; B~F 分别是浓度为 62.5、125、250、500、1000 $\mu\text{g/mL}$ 黄芪注射液处理组。随着黄芪注射液浓度的增加, U937 细胞凋亡率增加。

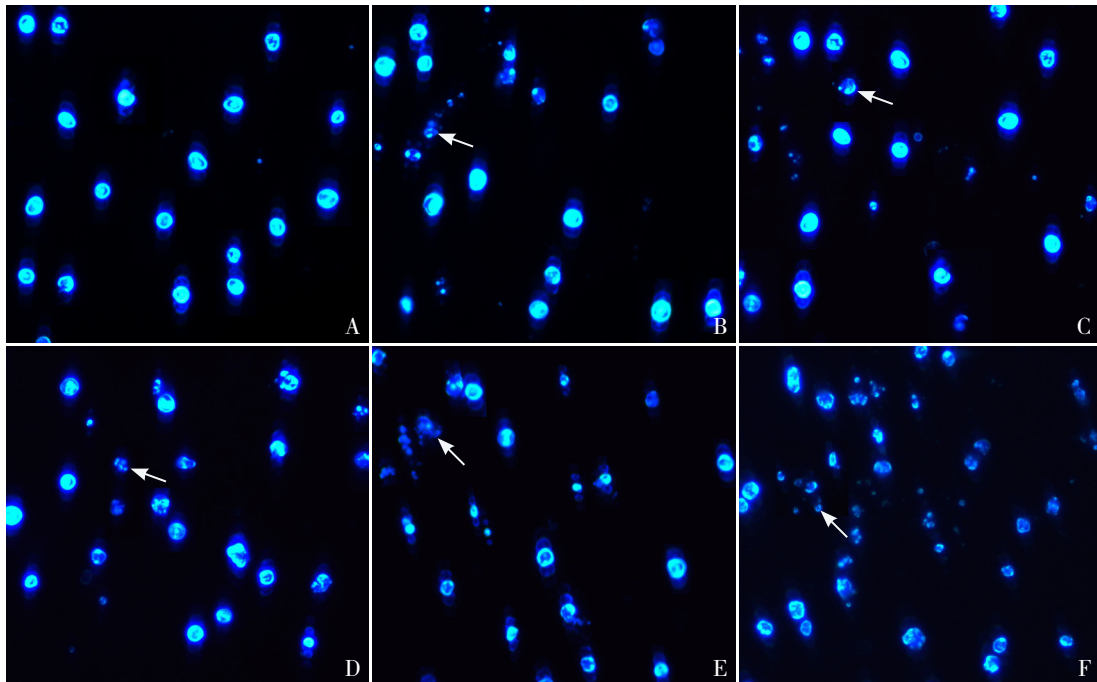


图 3 不同浓度黄芪注射液作用下 U937 细胞凋亡形态学变化 (Hoschst33258 染色, $\times 200$) A 为对照组, 细胞核形态规则, 染色质分布均匀; B~F 分别是浓度为 62.5、125、250、500、1000 $\mu\text{g/mL}$ 黄芪注射液处理组, 可见较多碎裂状致密染色质和凋亡小体。箭头指示凋亡小体。

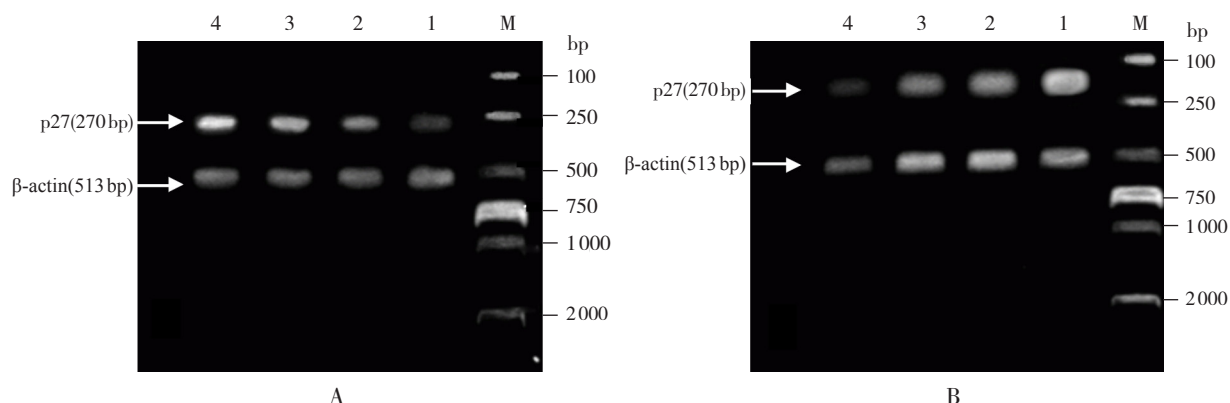


图4 RT-PCR检测c-myc和p27 mRNA表达情况 A: p27 mRNA的RT-PCR结果; B: c-myc mRNA的RT-PCR结果, 1~4分别为黄芪注射液处理U937细胞后0h、12h、24h、48h; M: DNA marker。随时间延长, c-myc相对表达量依次降低, p27相对表达量依次升高。

3 讨论

黄芪作为传统的扶正中药,在临床肿瘤治疗中得到广泛应用。黄芪注射液中主要含有黄芪多糖类、黄芪皂苷类、黄酮类、多种氨基酸及多种微量元素等多种有效成分,其主要作用为增强患者免疫力与减轻放、化疗副作用,但近年来多项研究发现黄芪注射液对结肠癌细胞株SW480、难治型basal-like乳腺癌细胞MDA-MB-468、鼻咽癌CNE-2细胞株有明显的增殖抑制作用和促凋亡作用^[5-7],表明黄芪具有潜在抗肿瘤的作用。此外,黄芪在抗白血病研究中也取得一定进展,黄芪有效成分黄芪总苷、黄芪总黄酮能通过抑制NB4细胞、K562细胞增殖发挥其抗白血病作用^[3-4],Yan等^[8]从蒙古黄芪干燥根中分离纯化出的黄芪凝集素能有效抑制K562细胞增殖,促进其凋亡。故本实验以白血病U937细胞株为研究对象,初步探讨黄芪注射液对其增殖、凋亡的影响及相关分子机制。

白血病细胞U937是人单核细胞白血病细胞株,MTT法分别检测不同浓度黄芪注射液作用于U937细胞24h、48h、72h后细胞的增殖情况,结果显示,黄芪注射液能有效抑制U937细胞增殖,且这种抑制作用呈剂量依赖性。同时,本研究采用流式细胞术检测了黄芪注射液对U937细胞凋亡的影响,药物作用48h后,不同浓度黄芪注射液不同程度地促进U937细胞凋亡,随药物剂量增加,凋亡率也明显增加,Hoechst33258染色后荧光显微镜下观察,凋亡细胞的细胞核出现密集、深染,有的细胞核碎裂,形成凋亡小体,随药物剂量增加,碎裂状致密染色质和凋亡小体增多,这与流式细

胞术检测凋亡率的结论一致。

本研究表明,黄芪注射液能通过抑制U937细胞增殖和诱导U937细胞凋亡发挥抗白血病作用,但分子水平的具体作用机制国内外研究较少,Huang等^[9]研究表明黄芪凝集素能通过caspase相关途径诱导K562细胞凋亡,胡雪莹等^[3]证明黄芪总苷通过不依赖Akt的NF-κB信号通路诱导NB4细胞凋亡,Cheng等^[10]证明黄芪通过上调Apaf-1、caspase-3、AChE促进HEL细胞凋亡。白血病以细胞无限增殖和凋亡受阻为特征,细胞增殖与细胞周期密切相关,p27是细胞周期重要的负性调控因子,它通过阻碍细胞增殖周期,减少DNA合成和有丝分裂,抑制细胞增殖。研究表明p27是多种抗肿瘤药物作用的靶点,它们通过诱导p27表达,特异性阻滞细胞周期,从而达到抗肿瘤的作用^[11]。原癌基因c-myc不仅参与细胞增殖的调节,还与细胞凋亡密切相关,有研究表明^[12],中药大黄素通过下调c-myc表达从而促进HL60细胞凋亡。下调c-myc的表达能促进肿瘤细胞凋亡的机制可能是c-myc能抑制肿瘤细胞对损伤DNA的识别作用,当其表达受到抑制之后,细胞恢复其对损伤DNA的识别功能,使含有畸变染色体的肿瘤细胞凋亡^[13]。本研究采用RT-PCR检测经1000 μg/mL黄芪注射液处理后的U937细胞中p27和c-myc表达情况,结果显示,随药物作用时间延长,p27 mRNA表达水平逐渐升高,而c-myc表达水平逐渐下降,提示黄芪注射液可能通过促进p27表达,抑制c-myc表达,进而抑制U937细胞增殖,并促进其凋亡,发挥抗白血病作用的。

总之,本研究显示,黄芪注射液作用于U937白血病细胞株后,能有效抑制U937细胞增殖,并

促进其凋亡, 相关分子机制可能与上调 p27 表达和下调 c-myc 表达有关, 在体外实验初步证实了黄芪的抗白血病作用, 为黄芪应用于白血病治疗提供了理论基础。

[参 考 文 献]

- [1] 刘笑梦, 曹娇玲, 臧玉柱. 人参皂苷对人白血病 -60 细胞凋亡的影响 [J]. 中国当代儿科杂志, 2012, 14(10): 792-795.
- [2] 董静, 顾华丽, 马承泰, 张芙蓉, 陈志红, 张源潮. 大剂量黄芪对急性白血病患者外周血树突状细胞的诱导和抗原呈递功能的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 25(10): 872-875.
- [3] 胡雪莹, 夏瑞祥, 程昌斌, 杨明珍, 曾庆曙, 夏海龙, 等. 黄芪总苷诱导人白血病 NB4 细胞凋亡的机制 [J]. 中华肿瘤杂志, 2011, 33(5): 345-348.
- [4] 张冬青, 汪德清, 于勇. 黄芪总黄酮和毛蕊异黄酮对 K562 细胞的抑制作用及其机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(24): 3502-3505.
- [5] 樊占兵, 李明, 魏双江, 秦彩娟, 肖庆旺. 黄芪注射液对结肠癌 SW480 细胞的生长抑制作用 [J]. 中国医药导报, 2011, 8(18): 33-34.
- [6] 叶媚娜, 陈红凤. 黄芪注射液对 basal-like 型乳腺癌细胞 MDA-MB-468 增殖的影响 [J]. 中西医结合学报, 2008, 6(4): 399-404.
- [7] 刘成军, 韦世秀, 李杜艳, 李佳荃. 黄芪注射液对人鼻咽癌 CNE-2 细胞株的抑制作用研究 [J]. 中国药房, 2005, 16(18): 1376-1378.
- [8] Yan Q, Li Y, Jiang Z, Sun Y, Zhu L, Ding Z, et al. Antiproliferation and apoptosis of human tumor cell lines by a lectin (AMML) of *Astragalus mongholicus* [J]. *Phytomedicine*, 2009, 16(6-7): 586-593.
- [9] Huang LH, Yan QJ, Kopparapu NK, Jiang ZQ, Sun Y. *Astragalus membranaceus* lectin (AML) induces caspase-dependent apoptosis in human leukemia cells [J]. *Cell Prolif*, 2012, 45(1): 15-21.
- [10] Cheng XD, Hou CH, Zhang XJ, Xie HY, Zhou WY, Yang L, et al. Effects of Huangqi (Hex) on inducing cell differentiation and cell death in K562 and HEL cells [J]. *Acta Biochimica Biophysica Sinica*, 2004, 36(3): 211-217.
- [11] 赵玥铭, 王熹嫔, 陆牡丹, 沈爱国, 张冬梅, 陆建新, 等. 全反式维甲酸对人白血病细胞系 U937 细胞生长的影响及其机制分析 [J]. 中华实验血液学杂志, 2008, 29(7): 464-467.
- [12] 黄绿叶, 胡建达, 陈鑫基, 祝亮方, 胡辉亮. c-myc 在大黄素抑制 HL-60 细胞增殖及诱导凋亡中的作用 [J]. 中华血液学杂志, 2005, 26(6): 348-351.
- [13] Cheng J, Luo J, Zhang X, Hu J, Hui H, Wang C, et al. Inhibition of cell proliferation in HCC-9204 hepatoma cells by a c-myc specific ribozyme [J]. *Cancer Gene Ther*, 2000, 7(3): 407-412.

(本文编辑: 王晓莉)