

藏红花素对耐伊马替尼慢性白血病粒细胞的促凋亡作用

张 洋*, 郑卫东, 邸玉玮, 方 伟, 廖玉琴

(广东省医学科学院//广东省人民医院检验科, 广东 广州 510080)

摘 要:【目的】分析探讨藏红花素对耐伊马替尼白血病细胞株 K562/Ima 的增殖抑制和促凋亡的机制。【方法】耐伊马替尼的白血病细胞株 K562/Ima 接种于 96 孔板中,经不同浓度的藏红花素分别处理 48h 采用 CCK8 法检测细胞增殖抑制情况, Hoechst 染色藏红花素处理的细胞, 荧光显微镜观察及采用 Annexin V/PI 双染分析藏红花素对 K562/Ima 细胞的促凋亡作用。K562/Ima 细胞经藏红花素处理, 及采用 Caspase 蛋白抑制剂处理, 检测 Caspase-3 激活情况。【结果】细胞增殖抑制实验显示藏红花素能够显著抑制耐药 K562/Ima 细胞的增殖, 呈一定的浓度依赖关系, $P < 0.05$ 。随着藏红花素浓度的提高, K562/Ima 细胞凋亡率逐渐上升, 表现为细胞皱缩, 细胞核固缩, 染色增强, 出现核小体。荧光活性检测实验显示经藏红花素处理后, Caspase-3 活性明显增强。采用 Caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK 作用后, Caspase-3 活性被部分抑制, K562/Ima 细胞凋亡率降低。【结论】藏红花素能够抑制 K562/Ima 细胞的增殖, 诱导其凋亡, Caspase 信号通路可能参与其中。

关键词:藏红花素;伊马替尼;慢性粒细胞性白血病;细胞凋亡

中图分类号:R73-36

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2013)04-0537-05

Apoptotic Induction Effect and Mechanism of Crocin on Imatinib Resistant K562/Ima Cells

ZHANG Yang*, ZHENG Wei-dong, DI Yu-wei, FANG Wei, LIAO Yu-qin

(Department of Laboratory Medicine, Guangdong General Hospital, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the proliferative inhibition and apoptotic induction effect of crocin on imatinib-resistant K562/Ima cells. 【Methods】 K562/Ima cells were seeded in the 96-well plant and treated with different concentrations of crocin for 48 h. Then CCK8 method was applied to explore the inhibition rate of crocin. The apoptosis rate of crocin on K562/Ima cells was detected by Hoechst 33258 dying and Annexin V/PI method. Caspase activity was detected after crocin treatment. 【Results】 Crocin could effectively inhibit K562/Ima cells growth, with a concentration dependent pattern. The apoptotic rate of K562/Ima cells was increased as the concentration of crocin was raised. Caspase-3 was activated after crocin treatment in K562/Ima cells. Caspase inhibitor Z-VAD-FMK could effectively revise this effect. 【Conclusion】 Crocin can significantly inhibit growth and induce apoptosis of K562/Ima cells probably via Caspase pathway.

Key words: crocin; imatinib; chronic myeloid leukemia; apoptosis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2013, 34(4):537-541]

慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia, CML),是一种起源于造血干细胞的恶性增殖性疾病^[1-2],病程通常分为慢性期、加速期和急变期^[3]。慢性期患者对于羟基脲、干扰素、温和化疗以及酪氨酸激酶抑制剂 Imatinib (Gleevec)等相关治疗反应较好,部分患者缓解后可以接受异基因造血干细胞移植。急变期患者骨髓和外周血中的不成熟细胞大量积聚,类似于急性白血病的表现^[4]。慢性白血病粒细胞中 9 号染色体和 22 号染色体相互

易位,形成 BCR-ABL 融合基因,表达的融合蛋白具有酪氨酸激酶活性^[5]。融合蛋白可通过激活多条信号通路,使造血干细胞转化并具有生长增殖优势。临床治疗慢粒非常有效的药物为 Imatinib,通过靶向抑制 BCR-ABL 酪氨酸激酶活性,能够使大部分的慢粒患者症状缓解,但由于肿瘤细胞不能完全清除,慢粒仍能复发,并产生耐药。因此,积极寻找有效的药物治疗耐药性白血病是非常迫切的。近年来研究发现,藏红花素(crocin)对多种肿瘤

收稿日期:2013-03-08

基金项目:广东省自然科学基金博士启动项目(2008)(8451008004001345)

作者简介:张洋,博士,技师,研究方向:肿瘤诊断与生物治疗, E-mail: zhangyang5229@yahoo.com.cn, 020-83827812 转 62451

均具有抑制作用。但对耐 Imatinib 白血病是否具有抑制作用,未见报道。本研究观察藏红花素对白血病细胞的增殖影响并探讨其可能的作用机制,为临床应用藏红花素治疗耐药性白血病提供一定的依据。

1 材料与方法

1.1 材料、仪器与试剂

藏红花素 crocin, Hoechst 33258 购自 Sigma 公司, Annexin V-PI 细胞凋亡检测试剂盒购自凯基生物, 人髓原白血病耐药株 K562/Ima 为中山大学黄文林实验室惠赠。Imatinib 为瑞士诺华公司生产。RPMI 1640 培养液及胎牛血清购自 Gibco 公司。Caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK 购自碧云天生物, 采用 DMSO 配制成 20 mmol/L 的母液, 使用时按 1:1 000 浓度加入到培养液中。Hoechst 33258 用 PBS 溶成 1 mg/mL 母液, 使用时按 1:1 000 稀释。细胞增殖检测试剂盒 Cell Counting Kit-8 为日本 dojindo 试剂公司生产, Caspase-3 活性检测试剂盒采用美国 Promega 公司试剂 Caspase-Glo3/7 kit, 产品编号: G8090 (Promega, Madison, WI, USA)。

1.2 藏红花素的配制

将 200 mg 藏红花素溶于 4 mL 含有 12.5 mg EDTA 的 PBS 中, 配成浓度为 50 mmol/L 的保存液, 储存于 4 ℃。取 Imatinib 100 mg 溶于 1.7 mL DMSO 中, 配成 100 mmol/L 保存液。

1.3 白血病耐药株培养

K562/Ima 细胞用含体积分数 10% 的 FBS 的 R1640 培养液于含体积分数 5% 的 CO₂ 37 ℃ 培养箱中培养, 培养液中含有终浓度为 1 nmol/L 的 Imatinib 维持细胞耐药性。3~5 d 传代一次, 将细胞轻轻吸出离心去上清, 加入新鲜培养液继续培养。

1.4 CCK8 法检测藏红花素对 K562/Ima 细胞的增殖抑制

取对数生长期的 K562/Ima 细胞, 用培养液调整细胞浓度为 5 000 mL⁻¹, 每孔加入 200 μL 细胞悬液, 并加入 Imatinib 使其终浓度为 1 nmol/L, 置于培养箱中约 6 h 后, 每孔加入藏红花素母液致其终浓度为 0、0.625、1.25、2.5、5、10 mmol/L。每个浓度做 4 个复孔。将 96 孔板置于培养箱中孵育 48 h。每孔加入 20 μL CCK8 溶液后在培养箱温育 1.5 h。取培养板, 采用分光光度计在 450 nm 处检测吸光度 A。细胞增殖抑制率 = $(1 - A_{\text{实验组}} / A_{\text{对照组}}) \times 100\%$ 。

1.5 流式细胞仪检测 K562/Ima 凋亡率

取对数生长期的 K562/Ima 调整细胞浓度后接种于 6 孔板中继续培养, 待细胞密度达 60%~70% 时, 加入含 Imatinib 及不同浓度藏红花素的细胞培养液继续培养 48 h。阴性对照组为等量不含藏红花素的培养液。阳性对照为秋水仙素 (10 μg/L) 处理组。处理完毕后离心分离细胞, PBS 洗涤后制成细胞悬液, 进行 Annexin V-PI 染色, 流式细胞仪检测。

1.6 Hoechst 染色分析 K562/Ima 凋亡情况

K562/Ima 细胞经藏红花素处理, 方法同流式分析。待 48 h 后, 培养液中加入 Hoechst 33258 染液至终浓度为 1 μg/mL 作用 10 min, 于荧光显微镜下观察。

1.7 Caspase-3 活性检测

Caspase-3 活性检测采用 Promega 公司试剂盒。该试剂盒原理为在凋亡早期活化的 Caspase-3 能够特异地剪切 D1E2V3D4-X 底物, 水解 D4-X 肽键, 释放出发光基团 AMC。根据释放的 AMC 荧光强度的大小, 可以测定 Caspase-3 的活性, 从而反映 Caspase-3 被活化的程度^[6-7]。本实验中, 将 K562/Ima 细胞接种于 96 孔板中, 每孔细胞 5000 个, 分别经藏红花素或(和)Caspase 抑制剂作用 24 h。取出 96 孔板, 按照 Caspase 活性检测试剂盒要求操作。设置空白反应孔, 即不含细胞而含有培养液、处理药物及反应底物。阴性对照组即为无药物处理的细胞组, 用于分析细胞培养体系的 Caspase 基本表达情况。孵育完毕, 采用荧光分光光度计检测每孔荧光强度。

1.8 统计学方法

统计分析采用 SPSS 16.0 统计软件。细胞增殖抑制实验、流式检测结果采用方差分析, 两两比较计算 P 值。检验水准: $\alpha = 0.05$

2 结果

2.1 藏红花素可抑制 K562/Ima 细胞的增殖

增殖抑制实验结果显示藏红花素能够抑制 K562/Ima 细胞的生长, 随着浓度的提高, 藏红花素对 K562/Ima 的增殖抑制效果逐渐增强 (图 1)。各组 K562/Ima 细胞生存率差异存在统计学意义, $P < 0.05$ 。

2.2 藏红花素可诱导 K562/Ima 细胞凋亡

K562/Ima 细胞经藏红花素处理后,细胞体积变小皱缩,折光性增强,细胞内出现空泡,Hoechst 染色,荧光显微镜下观察细胞核固缩及核裂解现象(图 3)。流式细胞仪分析显示,秋水仙素阳性对照组凋亡率为 45.01%,藏红花组凋亡率为 27.84%。采用 Caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK 预处理 K562/Ima 细胞 12 h 后,加入藏红花素作用。与藏红花素处理组相比,经抑制剂处理组细胞凋亡率降低,具有统计学意义(图 2)。结果表明藏红花素能够诱导耐 Imatinib K562/Ima 细胞凋亡。

2.3 藏红花素处理后 K562/Ima 细胞中 Caspase-3 被激活

经藏红花素处理 K562/Ima 细胞 24 h,采用 Caspase 活性检测试剂盒分析显示藏红花素能够明显激活 K562/Ima 细胞中 Caspase-3 的活性。经 Caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK 预处理后,Caspase-3 活性被部分抑制(图 4,表 1)。

3 讨 论

藏红花是鸢尾科番红花属球类草本植物,自

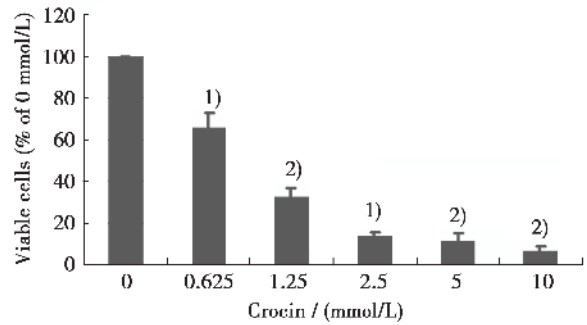


图 1 藏红花素浓度依赖性地抑制 K562/Ima 细胞增殖
Fig.1 Crocin could effectively inhibit the proliferation of Imatinib-resistant K562/Ima cells in different concentrations

K562/Ima cells were treated with different concentrations of crocin and cell proliferation was detected by CCK8 method ($n = 5$). 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$.

古以来,我国就有使用藏红花医治跌打损伤、活血化瘀等疾病。近年研究发现,藏红花提取物在神经保护、抗肿瘤和抗心血管疾病等方面具有良好的效果。研究发现藏红花提取物藏红花酸能够

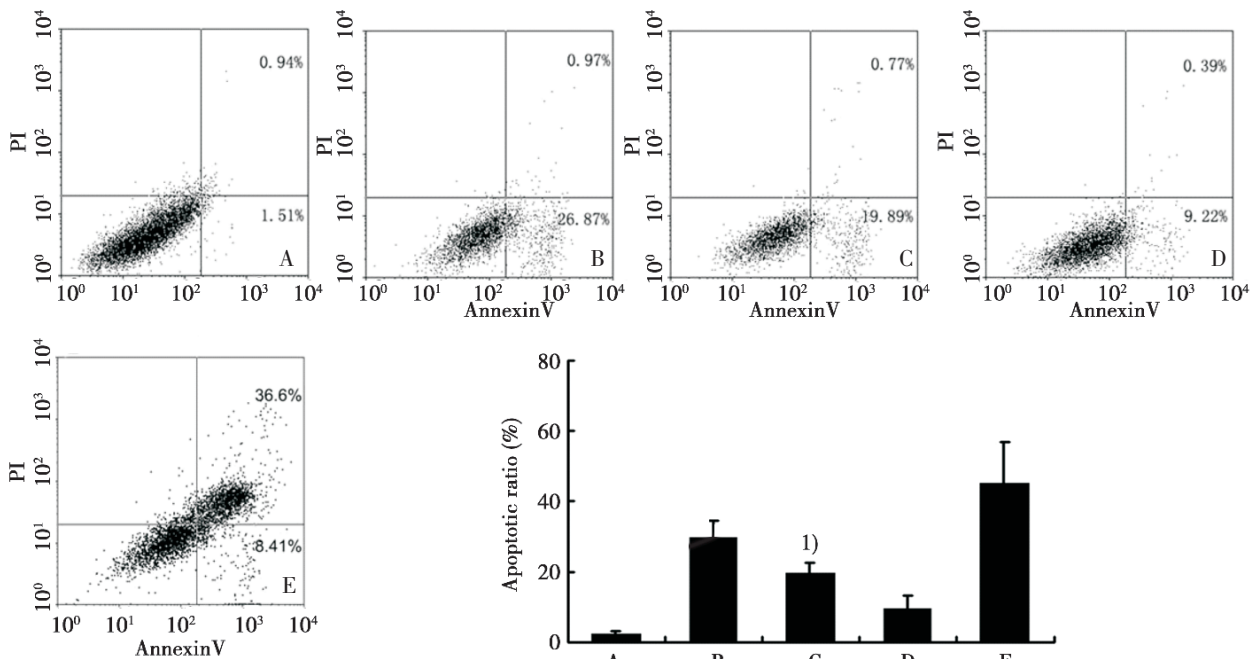


图 2 Caspase 抑制剂能够部分抑制藏红花素诱导的 K562/Ima 细胞凋亡

Fig.2 Caspase inhibitor Z-VAD-FMK could partially suppress apoptosis of K562/Ima induced by crocin

K562/Ima cells were treated with crocin or/and Caspase inhibitor Z-VAD-FMK for 24 h, then cell apoptosis was analyzed by Annexin V/PI staining ($n = 3$). A: K562/Ima cells with no crocin; B: 2.5 mmol/L crocin; C: 2.5 mmol/L crocin + Z-VAD-FMK; D: Z-VAD-FMK; E: colchicine as positive control. (1) $P < 0.05$ compared with B group).

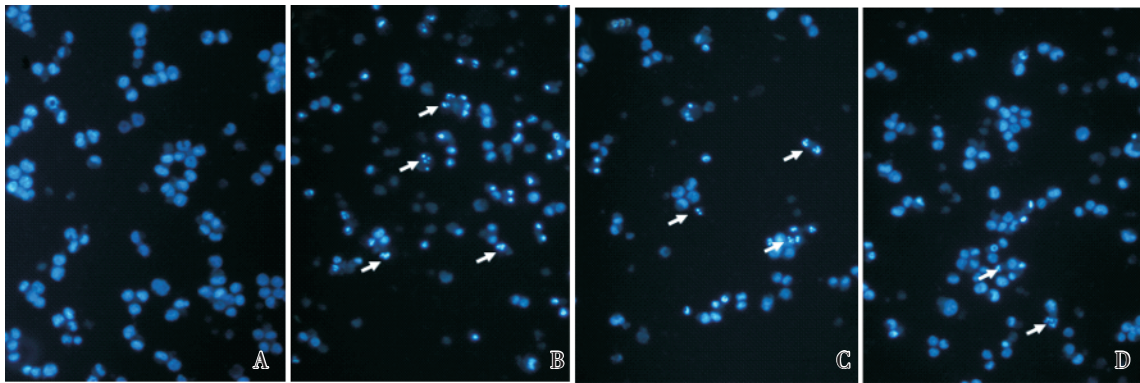


图 3 Hoechst 染色显示藏红花素诱导 K562/Ima 细胞凋亡的形态学改变.

Fig.3 Hoechst 33258 staining assay of apoptotic K562/Ima cells induced by crocin

K562/Ima cells were treated with crocin or/and Caspase inhibitor Z-VAD-FMK for 24 h, nucleosome was stained by Hoechst 33258 ($n = 3$). A: K562/Ima cells with no crocin. B: 2.5 mmol/L crocin. C: 2.5 mmol/L crocin + Z-VAD-FMK. D: Z-VAD-FMK. ($\times 200$)

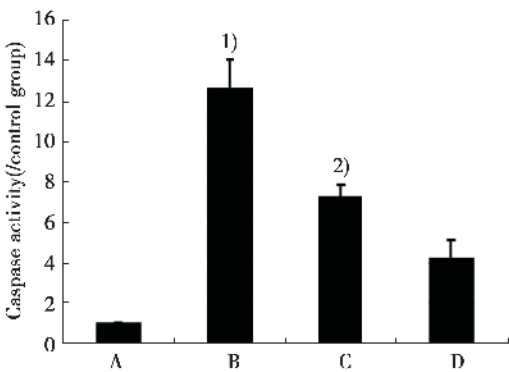


图 4 经藏红花素处理的 K562/Ima 细胞中 Caspase-3 活性被激活

Fig.4 Caspase-3 was activated by crocin in K562/Ima cells

K562/Ima cells were treated with crocin or/and Caspase inhibitor Z-VAD-FMK for 24 h, then Caspase-3 activity was explored ($n = 3$). A: K562/Ima cells with no crocin. B: 2.5 mmol/L crocin. C: 2.5 mmol/L crocin + Z-VAD-FMK. D: Z-VAD-FMK. 1) compared with A group, 2) compared with B group, $P < 0.05$.

抑制横纹肌肉瘤细胞生长,但对正常猴肾细胞无细胞毒作用,显示藏红花素能够选择性地抑制肿瘤细胞生长^[5]。Garcia-Olmo 等^[8]研究发现长期使用藏红花素能够抑制雌性小鼠结肠癌移植瘤的生长,小鼠存活期延长。血清分析表明该药对小鼠只有轻微的肾毒性。研究提示使用藏红花素对结肠癌进行长期治疗可明显提高小鼠存活率而无明显的毒副作用。Escribano 等^[9]研究显示采用藏红花素处理后,宫颈癌 Hela 细胞溶胀、细胞膜破裂,并具有一定的浓度依赖性,而对正常细胞无损伤作用。体内实验发现采用藏红花萃取物处理小鼠,可

表 1 各处理组三次实验荧光强度检测

Table 1 The fluorescence intensities of each group in triple detections

Group	First detection	Second detection	Third detection
A	908 016	1 004 090	973 160
B	12 409 510	11 691 813	12 062 625
C	6 968 683	6 820 444	6 894 820
D	4 392 993	3 612 870	4 020 508

Cells were planted and cultured with Imatinib and different concentrations of crocin in a 96-well plate with a density of 5000 cells per well for 48 h. Then 100 μ L Caspase-Glo reagent was added to each well and cells were cultured for another 3 h in room temperature and the luminescence of each sample was measured in a plate-reading luminometer as directed by the luminometer manufactory.

抑制 20-甲基胆蒽(MCA)诱发的软组织肉瘤^[10]。

目前的研究显示,藏红花素抗肿瘤的机制主要通过死亡受体(Fas/FasL)通路介导其细胞毒作用。吴强等^[11]发现采用藏红花浸出液可明显抑制人神经母细胞瘤生长,S 期细胞明显减少,FasL 表达上调,使下游 Caspase-8 酶原活化,从而激活下游的级联反应。在本研究中,我们初步探讨了藏红花素对耐 Imatinib 慢性粒细胞白血病的作用机制。在肝癌细胞 HepG2 中,藏红花素可能通过下调端粒酶的活性抑制了肿瘤的增殖^[12]。在舌癌中,藏红花素通过抑制 DNA 和 RNA 的合成从而抑制肿瘤细胞的扩增^[13]。

本实验采用耐 Imatinib 的白血病细胞株 K562/Ima 为模型,分析了藏红花素对耐药白血病的抗肿瘤效果。增殖抑制结果显示藏红花素能够

有效抑制 K562/Ima 细胞的增殖, 流式及 Hoechst 染色分析表明藏红花素诱导了 K562/Ima 细胞的凋亡, 在 2.5 mmol/L 浓度组可达 27.84%。与对照组相比, 藏红花素处理组 Caspase-3 活性增强, 而应用 Caspase 通路抑制后藏红花素处理组凋亡及 Caspase-3 活性均被抑制, 结果提示 Caspase 凋亡通路参与了藏红花素促 K562/Ima 细胞凋亡机制。研究显示白血病患者细胞可通过增加 BCR-ABL 基因的拷贝数对 Imatinib 产生耐药性^[14-15], 而藏红花素具有抑制细胞 DNA 合成的作用^[13], 提示藏红花素可能通过抑制 BCR-ABL 基因合成提高了 K562/Ima 细胞对 Imatinib 的敏感性, 从而抑制 K562/Ima 细胞的增殖。藏红花素能够通过 Fas-FasL 通路诱导白血病患者细胞凋亡^[11], 而 K562/Ima 细胞存在较多量的 Fas 及 FasL 表达^[16], 提示藏红花素也可能通过 Fas-FasL 通路诱导 K562/Ima 细胞凋亡。

综上所述, 藏红花素可通过 Caspase-3 途径诱导耐 Imatinib 慢性粒细胞白血病患者细胞 K562/Ima 凋亡, 具体机制如死亡受体通路是否被激活或基因合成是否被抑制有待进一步探讨。

参考文献:

- [1] Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, et al. Chronic myelogenous leukemia: biology and therapy [J]. Ann Intern Med, 1999, 131(3): 207-219.
- [2] Kantarjian HM, Talpaz M, Giles F, et al. New insights into the pathophysiology of chronic myeloid leukemia and imatinib resistance[J]. Ann Intern Med, 2006, 145(12): 913-923.
- [3] Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, et al. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia[J]. N Engl J Med, 2002, 346(9): 645-652.
- [4] Chen Y, Peng C, Li D, et al. Molecular and cellular bases of chronic myeloid leukemia [J]. Protein Cell, 2010, 1(2): 124-132.
- [5] Jagadeeswaran R, Thirunavukkarasu C, Gunasekaran P, et al. In vitro studies on the Selective Cytotoxic Effect of Crocetin and Quercetin [J]. Fitoterapia, 2000, 71(4): 395-399.
- [6] Le, DA, Le DA, Wu Y, Huang Z, et al. Caspase activation and neuroprotection in caspase -3 -deficient mice after in vivo cerebral ischemia and in vitro oxygen glucose deprivation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(23): 15188-15193.
- [7] Bayascas JR, Yuste VJ, Benito E, et al. Isolation of AmphiCASP-3/7, an ancestral caspase from amphioxus (*Branchiostoma floridae*). Evolutionary considerations for vertebrate caspases [J]. Cell Death Differ, 2002, 9(10): 1078-1089.
- [8] García-Olmo DC, Riese HH, Escribano J, et al. Effects of long term treatment of colon adenocarcinoma with crocin, a carotenoid from saffron (*Crocus sativus* L.): an experimental study in the rat [J]. Nutr Cancer, 1999, 35(2): 120-126.
- [9] García-Olmo DC, Riese HH, Escribano J, et al. In vitro activation of macrophages by a novel proteoglycan isolated from corms of *Crocus sativus* L [J]. Cancer Lett, 1999, 144(1): 107-114.
- [10] Salomi MJ, Nair SC, Panikkar KR. Inhibitory effects of *Nigella sativa* and saffron (*Crocus sativus*) on chemical carcinogenesis in mice [J]. Nutr Cancer, 1991, 16(1): 67-72.
- [11] Wu Qiang, Shi Cheng-ren, Shen Min, et al. Apoptosis in neuroblastoma cell cultures induced by saffron extracts through CD95/CD95-L pathway [J]. Chin J Pediatr Surg, 2003, 24(4): 2353-2356.
- [12] Nouredini SK, Wink M. Antiproliferative effects of crocin in HepG2 cells by telomerase inhibition and hTERT down-regulation [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 13(5): 2305-2309.
- [13] Sun J, Xu XM, Ni CZ, et al. Crocin inhibits proliferation and nucleic acid synthesis and induces apoptosis in the human tongue squamous cell carcinoma cell line Tca8113 [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2011, 12(10): 2679-2683.
- [14] Morinaga K, Yamauchi T, Kimura S, et al. Overcoming imatinib resistance using Src inhibitor CGP76030, Abl inhibitor nilotinib and Abl/Lyn inhibitor INNO-406 in newly established K562 variants with BCR-ABL gene amplification [J]. Int J Cancer, 2008, 122(11): 2621-2627.
- [15] Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification [J]. Science, 2001, 293(5531): 876-880.
- [16] Chen KC, Liu WH, Chang LS. Taiwan cobra phospholipase A2-elicited JNK activation is responsible for autocrine fas-mediated cell death and modulating Bel-2 and Bax protein expression in human leukemia K562 cells [J]. J Cell Biochem, 2010, 109(1): 245-254.