

牛蒡多糖对 K562 细胞增殖的抑制及其机制的探讨^①

孟宇, 吕俊, 齐世美

(皖南医学院生物化学教研室, 安徽 芜湖 241001 E-mail: mengyu60@163.com)

摘要: **目的** 研究牛蒡多糖对 K562 细胞增殖的抑制作用并初步探索其机制。**方法** MTT 法检测牛蒡多糖对 K562 细胞增殖的抑制作用, RT-PCR 检测 BCL-2 mRNA、Bax mRNA 的表达。**结果** 牛蒡多糖能明显抑制 K562 细胞的增殖; BCL-2 基因表达下调, Bax 的基因表达增多。**结论** 牛蒡多糖对 K562 细胞增殖有抑制作用, 其机制可能与 BCL-2 基因表达下调, Bax 的表达上调有关。

关键词: 牛蒡多糖; K562 细胞; BCL-2 mRNA; Bax mRNA

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2014)01-0010-02

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2014.01.004

Inhibition of K562 cell proliferation by burdock polysaccharide and the related mechanism

Meng Yu, Lü Jun, Qi Shimei

(Department of Biochemistry, Wannan Medical College, Wuhu 241001, Anhui, China
E-mail: mengyu60@163.com)

Abstract: **Objective** To study the inhibitory effect of burdock polysaccharide on K562 cell proliferation and to study its mechanism. **Methods** An MTT method was used to detect the inhibition of K562 cell proliferation by burdock polysaccharide, and an RT-PCR method was used to detect the expression of BCL-2 mRNA and Bax mRNA. **Results** Burdock polysaccharide could significantly inhibit the proliferation of K562 cells; the expression of BCL-2 decreased, and the expression of Bax gene increased. **Conclusion** Burdock polysaccharide can inhibit the proliferation of K562 cells, and its mechanism may be related to down-regulating the expression of BCL-2 gene and up-regulating the expression of Bax.

Key words: Burdock polysaccharide; K562 cells; BCL-2 mRNA; Bax mRNA

多糖作为一种具有特殊生物学活性功能的物质, 日益受到重视, 其在抗肿瘤、抗病毒、增加免疫等方面具有一定的功能。前期实验已经证实牛蒡多糖对正常小鼠、环磷酰胺致免疫低下小鼠和 S180 肉瘤小鼠的免疫系统均有增强作用, 不同剂量组的抑瘤率均明显提高, 同时能提高荷瘤小鼠巨噬细胞产生 NO 及吞噬活性^[1], 但是牛蒡多糖对 K562 细胞的抑制作用及机制未见报道。本课题旨在前期实验研究的基础上, 应用 MTT、RT-PCR 法检测相关指标, 初步探索牛蒡多糖是否对 K562 癌细胞体外增殖具有抑制作用, 是否影响凋亡相关基因 BCL-2、Bax mRNA 的表达, 从而探讨牛蒡多糖对 K562 细胞抑制作用的可能机制, 寻找一种新的能够诱导 K562 癌细胞凋亡的多糖, 作为治疗白血病的天然无毒副作用的药物, 为白血病治疗药物的研发提供必要依据。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器 RPMI-1640 培养基(南京凯基生物); 胰蛋白酶(合肥志宏); MTT(合肥志宏生物); K562 细胞株(引自皖

南医学院中心实验室); RNA 提取试剂盒(合肥志宏); 逆转录一聚合酶联反应(RT-PCR)试剂盒(合肥志宏)。CO₂ 培养箱(Excella Eco-170); 酶标仪(EPOCH); 倒置显微镜(OLYMPUS)。

1.2 方法

1.2.1 MTT 法检测细胞抑制率 取对数生长期的 K562 细胞, 置于 24 孔板, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 每孔加入 100 μl 相应的含药培养基, 设置阴性组, 在 CO₂ 培养箱中培养 24 h、48 h 后。每孔加入 20 μl MTT(5 mg/ml), 培养箱继续培养 4 h, 弃去培养基, 每孔加入 100 μl DMSO 溶解, 摇床 10 min 轻轻混匀; λ=490 nm, 测出 OD 值, 计算抑制率: 抑制率=(1-试验组 A₄₉₀ 均值/空白对照组 A₄₉₀ 均值)×100%。

1.2.2 RT-PCR 测定 BCL-2、Bax mRNA 的表达 取对数生长期的细胞以 2×10⁵/ml 均匀接种细胞于 6 孔板, 每孔 2 ml。分为阴性对照组和给药组, 给药组分别加入牛蒡多糖 5 μg/ml、10 μg/ml、20 μg/ml, 作用 30 min 后, 所有组均培养 48

① 基金项目: 皖南医学院中青年基金项目(编号: WK201215)

h 后,用 Trizol 一步提取法提取细胞总 RNA,紫外分光光度计测定其浓度和纯度;样品总 RNA 浓度根据核酸稀释倍数计算;所用 RNA 纯度;其 OD260/OD280 均在 1.8~2.1 之间。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。以 β -actin 作为内参照物。经过模板 DNA 的变性,模板 DNA 与引物的退火,引物的延伸反应后,取反应液 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳。

1.3 统计学处理 实验结果采用 SPSS 9.0 软件进行方差分析。

2 结果

2.1 牛蒡多糖对 K562 细胞增殖的抑制作用 牛蒡多糖作用于白血病 K562 细胞 24 h 后,与对照组相比,牛蒡多糖 5 μ g/ml 组和 10 μ g/ml 对细胞的抑制率高于阴性对照组,具有统计学意义 ($P < 0.05$),而 20 μ g/ml 组明显抑制细胞增殖。牛蒡多糖作用于白血病 K562 细胞 48 h 后,与对照组相比,牛蒡多糖 5 μ g/ml 组对细胞的抑制率高于阴性对照组,具有统计学意义 ($P < 0.05$),而 10 μ g/ml 和 20 μ g/ml 组均显著抑制 K562 细胞的增殖,如表 1 所示。

表 1 牛蒡多糖处理 24 h、48 h 后对 K562 细胞增殖的抑制率 ($\bar{x} \pm s$)

组别	浓度 (μ g/ml)	作用 24 h		作用 48 h	
		OD	抑制率 (%)	OD	抑制率 (%)
阴性对照组	—	0.843 \pm 0.045	—	0.882 \pm 0.009	—
牛蒡多糖组	5	0.650 \pm 0.067 ^a	15.16	0.704 \pm 0.048 ^a	24.16
牛蒡多糖组	10	0.562 \pm 0.102 ^a	20.62	0.583 \pm 0.087 ^b	32.38
牛蒡多糖组	20	0.403 \pm 0.173 ^b	36.25	0.329 \pm 0.120 ^b	54.45

注:牛蒡多糖组与阴性组比较,a: $P < 0.05$,b: $P < 0.01$

2.2 牛蒡多糖对 BCL-2 和 Bax 基因表达的影响 与对照组相比,牛蒡多糖 5 μ g/ml 组对 BCL-2 基因的表达下调,Bax 的表达影响不大;与对照组相比,牛蒡多糖 10 μ g/ml 组对 BCL-2 基因表达明显下调,Bax 的表达上调;牛蒡多糖 20 μ g/ml 组对 BCL-2 基因表达明显下调,对 Bax 的基因表达具有明显的上调作用,见图 1。

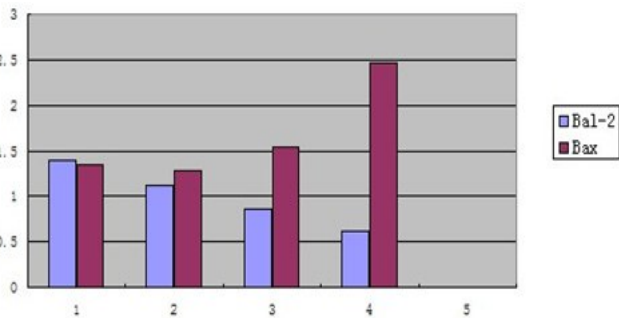


图 1 不同浓度牛蒡多糖对 BCL-2 和 Bax 基因表达的影响

注:图中横坐标下,1 为对照组;2 为 5 μ g/ml 组;3 为 10 μ g/ml 组;4 为 20 μ g/ml 组

3 讨论

目前,环境污染越来越严重,白血病的发病率也逐年上升,尤其是慢性粒细胞白血病(CML),是一种严重危害生命的造血系统的恶性肿瘤,目前其主要的治疗是传统的姑息治疗和化

疗,化疗药物主要有干扰素和阿糖胞苷^[2],但治疗效果随着时间增加而不佳,且存在严重的副作用,同时给病人带来很大的痛苦。目前对牛蒡根的药理活性研究较多,现代研究表明,牛蒡根具有抗菌^[3]、抗突变、抗癌^[4]、抗衰老^[5]等作用。本课题组从牛蒡根中提取牛蒡多糖,并对其从提取工艺到药理学功能等方面进行了研究,发现牛蒡多糖一定剂量灌胃处理能提高小鼠的脾淋巴细胞增殖及 IL-2、IFN- γ 的分泌^[6],本实验室研究也显示牛蒡多糖对正常小鼠、环磷酰胺致免疫低下小鼠 S180 肉瘤小鼠的免疫系统均有增强作用,但牛蒡多糖对白血病的治疗及抑制肿瘤生长的作用机制并未见报道,是否对癌细胞具有凋亡诱导作用不得而知。牛蒡多糖作为一种天然药物,在治疗肿瘤方面有着巨大的研发价值,本课题通过实验确定牛蒡多糖对 K562 细胞增殖的抑制作用,并初步探讨其机制,Bcl-2 家族蛋白成员 Bax 和 Bcl-2 在线粒体介导的内源性凋亡通路中起着重要的作用,抗凋亡蛋白 Bcl-2 可以通过阻止促凋亡蛋白 Bax 在线粒体膜上的作用而抑制细胞凋亡^[7-8],且 Bcl-2/Bax 比例大小与细胞是否会发生凋亡有密切关系^[9-11]。本实验运用 RT-PCR 方法检测 Bax 和 Bcl-2 的基因表达,结果显示 BCL-2 基因表达下调,Bax 的基因表达增多,说明牛蒡多糖对 K562 细胞增殖的抑制作用机制可能与 BCL-2 基因表达下调,Bax 的表达上调,并且调控 Bcl-2/Bax 比例有关,其进一步机制有待继续进行研究。

参考文献:

[1] 刘少芳,陈靠山.牛蒡低聚果糖对小鼠的免疫调控及抗肿瘤作用的研究[D].济南:山东大学,2007:29-48.
 [2] 朱磊,郭静明.慢性粒细胞白血病的治疗进展[J].航空航天医药,2010,21(8):1378-1379.
 [3] 林学政,刘春燕,陈靠山,等.不同地域牛蒡叶绿原酸的含量及其抑菌试验[J].天然产物研究与开发,2004,16(4):328-330.
 [4] 牛玲,唐莉莉.牛蒡抗突变作用的研究[J].南京医科大学学报:中文版,1997,17(4):343-344.
 [5] 李玉洁,刘树明,李淑莲,等.牛蒡根抗衰老作用的实验研究[J].时珍国医国药,2004,15(9):545-546.
 [6] 盛荣华,陈靠山,孟宇.牛蒡低聚果糖对小鼠淋巴细胞增殖和 IL-2、IFN- γ 产生的影响[J].专家论坛,2011,18(4):5-6.
 [7] Borner C. The bcl-2 protein family: Sensors and checkpoints for life-or-death decisions [J]. Mol Immunol, 2003,39(11):615-647.
 [8] Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis [J]. Genes Dev, 1999,13(15):1899-1911.
 [9] Kuang YF, Chen YH. Induction of apoptosis in a non-small cell human lung cancer cell line by isothiocyanates is associated with p53 and p21 [J]. Food Chem Toxicol, 2004,42(10):1711-1718.
 [10] Allsopp TE, Wyatt S, Paterson HF, et al. The proto-oncogene bcl-2 can selectively rescue neurotrophic factor-dependent neurons from apoptosis [J]. Cell, 1993,73(2):295-307.
 [11] Shen Y, White E. P53-dependent apoptosis pathways [J]. Adv Cancer Res, 2001,82:55-84.

收稿日期:2013-11-18;修回日期:2013-12-20