

藤黄酸调控白血病 K562 细胞 GFI-1 表达 及对细胞增殖和凋亡的影响*

武汉科技大学医学院 刘晓倩 李依 郭佳丽 吴涛¹ 张素洁¹ 许超平² 吴芷静 常伟^{2*}, 武汉 430065

摘要 目的: 探讨藤黄酸对白血病 K562 细胞增殖和凋亡的影响及可能的机制。方法: 体外培养 K562 细胞, 采用 CCK-8 法检测不同浓度藤黄酸(0、0.2、0.4、0.8、1.2、2.0 μmol/L) 处理 24、48、72 h 后 K562 细胞增殖率; 用流式细胞术检测 K562 细胞的凋亡和周期; 采用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR) 和 Western blot 法检测独立生长因子 1(GFI-1) 的 mRNA 及蛋白表达水平。结果: 藤黄酸可以抑制 K562 细胞的增殖, 并呈剂量、时间依赖性; 0.4 μmol/L 藤黄酸处理 24 h 后的 K562 细胞凋亡率增加; 藤黄酸对 GFI-1 的 mRNA 表达无显著影响, 藤黄酸可以下调 GFI-1 蛋白的表达; 藤黄酸及蛋白酶体抑制剂(MG132) 共处理后的 K562 细胞 GFI-1 蛋白水平较藤黄酸组升高; 藤黄酸及氯喹(CQ) 共处理后的 K562 细胞 GFI-1 蛋白水平与藤黄酸组无统计学差异($P > 0.05$)。结论: 藤黄酸可以有效抑制 K562 细胞的增殖并诱导细胞凋亡; 藤黄酸可以诱导 K562 细胞 G0/G1 期及 S 期阻滞; 藤黄酸通过蛋白酶体途径促进 GFI-1 蛋白降解。

关键词 藤黄酸; K562 细胞; 细胞增殖; 细胞凋亡; 蛋白酶体通道; 独立生长因子

中图分类号 R733.7 **文献标识码** A **DOI** 10.11768/nkjwzzzz20210115

Gambogic acid regulates GFI-1 expression in K562 cells and its effects on cell proliferation and apoptosis LIU Xiao-qian, LI Yi, GUO Jia-li, WU Tao¹, ZHANG Su-jie¹, XU Chao-ping², WU Zhi-jing, CHANG Wei^{2*}. School of Medicine, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430065, China

Abstract Objective: To investigate the effect of gambogic acid on proliferation and apoptosis of leukemic K562 cells and its possible mechanism. Methods: K562 cells were cultured *in vitro*, and the proliferation rate of K562 cells after treatment with different concentrations of gambogic acid (0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 2.0 μmol/L) for 24, 48, and 72 h was determined by CCK-8 method. Flow cytometry was used to detect the apoptosis and cycle death of K562 cells. K562 cells were treated by different methods, and mRNA and protein expression levels of independent growth factor 1 (GFI-1) were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and Western blotting respectively. Results The proliferation of K562 cells was inhibited by gambogic acid in a dose-dependent and time-dependent manner. After treatment with 0.4 μmol/L gambogic acid for 24 h, the apoptosis rate of K562 cells increased. The GFI-1 mRNA expression was not significantly affected by gambogic acid, but the GFI-1 protein expression was down-regulated by gambogic acid. GFI-1 protein level in K562 cells treated with gambogic acid + proteasome inhibitor was increased as compared with that in the gambogic acid group, and GFI-1 protein level in K562 cells treated with gambogic acid + chloroquine showed no significantly different from that in the gambogic acid group. Conclusion: Gambogic acid can effectively inhibit the proliferation of K562 cells and induce cell apoptosis; Gambogic acid can induce arrest of K562 cells at G0/G1 phase and S phase; Gambogic acid promotes the degradation of GFI-1 protein by the proteasome pathway.

Keywords Gambogic acid; K562 cells; Cell proliferation; Cell apoptosis; Proteasome pathway; GFI-1

慢性髓系白血病(chronic myelogenous leukemia, CML)是一种起源于多能造血干细胞的恶性克隆增殖性疾病。CML 目前的治疗方案主要是酪氨酸酶抑制剂(TKI)、干扰素等药物治疗,以及同种异基因骨髓或外周造血干细胞移植(allogeneic-hematopoietic stem cell transplantation, allo-HSCT)^[1~3],然

而药物的毒副作用、耐药问题以及进行 allo-HSCT 后的排斥反应严重影响患者生活质量^[4]。藤黄是藤黄科植物分泌的一种树脂,从藤黄中可提取出一种名为藤黄酸的化合物。研究表明,藤黄酸有抑制酶活性、逆转肿瘤多耐药以及抑制肿瘤侵袭等作用^[5]。本实验将观察藤黄酸对 CML K562 细胞增值的作用。

材料与方法

实验细胞和试剂 K562 细胞购自中国典型培养物保藏中心(China Center for Type Culture Collection, CCTCC)。藤黄酸购于北京索莱宝科技有限公司;RPMI

★基金项目:武汉市卫生计生委医学科科研项目(No:WX18C32);

湖北省卫生健康委联合基金项目(No:WJ2018H0113)

¹ 武汉科技大学附属华润武钢总医院

² 武汉科技大学附属普仁医院

* 通信作者:常伟, E-mail: cwei200408@163.com

1640、磷酸盐缓冲液(PBS)、胎牛血清购于 Gibco;CCK-8 试剂盒、独立生长因子1(growth factor independence 1, GFI-1)测试试剂盒购于翌圣生物科技(上海)有限公司;细胞凋亡、细胞周期检测试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司;RT-qPCR 试剂购于 Toyobo(货号:QPK-201);MG-132 购于上海皓元生物医药科技有限公司;Penicillin-Streptomycin-Glutamine (100X) 购于 Gibco。

细胞培养 将复苏后的 K562 细胞接种于培养皿中,加入 RPMI 1640(含有 10% 胎牛血清,1% 双抗)培养基,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱内进行传代培养,取生长状态良好的细胞用于实验。

CCK-8 细胞增殖检测 取对数生长期的 K562 细胞,离心重悬后加入完全培养基,将细胞密度调整为 1 × 10⁶/mL,接种于 96 孔板中,加入不同浓度(0、0.2、0.4、0.8、1.2、2.0 μmol/L)的藤黄酸,以加入藤黄酸浓度 0 μmol/L 组为对照组加入等量完全培养基,培养 24、48、72 h,每孔加入 10 μL 的 CCK8 试剂,37℃ 孵育 60 min,然后检测各组 450 nm 处吸光度值(OD 值),计算各组细胞抑制率(%) = [(1 - 试验组 OD 值/对照组 OD 值) × 100%]。

流式细胞仪检测细胞凋亡 取对数生长期的 K562 细胞,离心重悬后加入完全培养基,将细胞密度调整为 1 × 10⁶/mL,接种于六孔板中,加入不同浓度(0、0.4 μmol/L)的藤黄酸,以加入藤黄酸浓度 0 μmol/L 组为对照组,加入等量完全培养基,孵育 24 h 后收集细胞,800 μL 预冷的磷酸缓冲液(PBS)洗涤细胞,1 000 转/min,离心 10 min,去上清,使用结合缓冲液重悬细胞,加 Annexin V-FITC、PI 混匀避光 10 min,1 h 内上流式细胞仪检测。

流式细胞仪检测细胞周期 取对数生长期的 K562 细胞,离心重悬后加入完全培养基,将细胞密度调整为 1 × 10⁶/mL,接种于六孔板中,加入不同浓度(0、0.4 μmol/L)的藤黄酸,以加入藤黄酸浓度 0 μmol/L 组为对照组,加入等量完全培养基,培养 24 h 后 PBS 洗涤、重悬,300 μL 的预冷乙醇 4℃ 固定 24 h,上机前 PBS 洗涤 2 次,去除固定液,加入 10 μL 核糖核酸酶 A,碘化丙啶(PI)染色,避光孵育

30 min,于流式细胞仪检测 FL2 通道。

实时定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测 GFI-1 mRNA 表达 使用 TRIzol 法提取细胞 RNA,琼脂糖电泳检测 RNA 条带完整性,使用试剂盒将其反转录为 cDNA 备用。反应程序采用两步法,为 98℃ 5 min;98℃ 30 s,63℃ 30 s,40 个循环。反应体系选择 10 μL,为 Taq SYBR 混合液 5 μL,上下游引物各 0.2 μL,模板 0.5 ng,ddH₂O 补足 10 μL。本研究所用引物 GFI1-qpcr-F:CGGCTCCTA CAAGTGCATCA, GFI1-qpcr-R: AGTCAAAGC TCCGTTCTCCTGC 每组实验设置 3 个重复,以 actin 为内参,2^{-ΔΔCt} 法计算各个基因相对表达水平。

Western blot 法检测 GFI-1 蛋白 取对数生长期的 K562 细胞,离心重悬后加入完全培养基,将细胞密度调整为 2.5 × 10⁵/mL 的细胞悬液,分别加入不同药物,藤黄酸浓度 0 μmol/L 组为对照组加入等量完全培养基;藤黄酸浓度 0.4 μmol/L 组为藤黄酸组;藤黄酸浓度 0.4 μmol/L 并予以 MG132(50 μmol/L)的处理组为藤黄酸 MG132 组;藤黄酸浓度为 0.4 μmol/L 加氯喹(CQ)50 μmol/L 为藤黄酸 CQ 组。处理 24 h 后,收集、裂解细胞,提取蛋白并测量蛋白浓度。用质量分数为 8% 的 SDS-PAGE 电泳分离后转膜,以 5% 脱脂奶粉室温封闭 1.5 h,加入 GFI-1(ZEN-BIO-SCIENCE)一抗 4℃ 孵育过夜,TBST 缓冲液充分洗膜,加入二抗,室温孵育 2 h,洗膜 4 次。应用 ECL 法依次行压片、显影、定影检测。

统计学处理 采用 SPSS 25.0 统计学软件。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,使用单因素方差分析进行多组间的比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

藤黄酸可以抑制白血病 K562 细胞增殖 与对照组比较,藤黄酸浓度为 0.2 μmol/L 作用于 K562 细胞 48、72 h 抑制率差异有统计学意义(均 $P < 0.05$),且随着藤黄酸浓度的增加,抑制作用越强。表明藤黄酸可抑制 K562 细胞的增殖,其抑制作用呈剂量依赖性及时间依赖性,见表 1、图 1。

表 1 藤黄酸对 K562 细胞增殖的影响(%, $\bar{x} \pm s$)

时间	藤黄酸(μmol/L)					
	对照组	0.2	0.4	0.8	1.2	2
24 h	0.00 ± 0.00	5.59 ± 2.98	74.22 ± 1.03 **	87.05 ± 0.08 **	91.93 ± 0.35 **	93.64 ± 0.33 **
48 h	0.00 ± 0.00	13.30 ± 1.41 *	72.70 ± 0.79 **	81.29 ± 1.06 **	89.67 ± 0.36 **	94.39 ± 0.79 **
72 h	0.00 ± 0.00	75.18 ± 0.70 **	85.64 ± 0.14 **	91.96 ± 0.24 **	94.98 ± 0.19 **	95.14 ± 0.34 **

注:与对照组同时间段比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

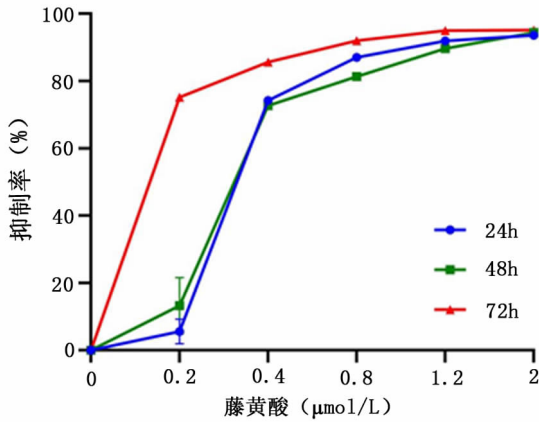


图1 藤黄酸对 K562 细胞增殖的影响

藤黄酸促进 K562 细胞凋亡 与对照组比较,用 0.4 μmol/L 藤黄酸处理 K562 细胞 24h 后 K562 细胞凋亡率明显增加,表明 0.4 μmol/L 藤黄酸可以促进 K562 细胞凋亡,见表 2、图 2。

表 2 藤黄酸对 K562 细胞凋亡率的影响(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	藤黄酸(μmol/L)	
	对照组	0.4
早期凋亡组	1.87 ± 0.10	18.88 ± 1.51 **
晚期凋亡组	0.90 ± 0.19	57.51 ± 0.86 **

注:与对照组比较, ** $P < 0.01$

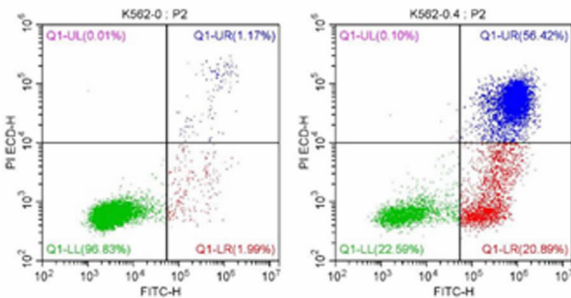


图2 藤黄酸对细胞凋亡的影响

藤黄酸对 K562 细胞周期分布的影响 使用 0.4 μmol/L 藤黄酸处理 K562 细胞 24 h 后,流式细胞仪检测结果提示,K562 细胞的周期分布发生了明显变化,表现为 G0/G1 期细胞比例增多 ($P < 0.01$),S 期细胞比例增多 ($P < 0.01$),G2/M 期细胞比例减少 ($P < 0.01$),表明该实验浓度藤黄酸诱导 K562 细胞发生 G0/G1 期及 S 期阻滞,见表 3、图 3。

表 3 藤黄酸对 K562 细胞周期的影响(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	G0/G1	S	G2/M
对照组	45.04 ± 0.77	19.96 ± 0.75	32.06 ± 0.31
藤黄酸组	54.13 ± 1.44 **	34.87 ± 2.45 **	9.34 ± 0.89 **

注:与对照组比较, ** $P < 0.01$

藤黄酸可以通过蛋白酶体途径抑制 GFI-1 蛋白

的表达 藤黄酸处理组与对照组 mRNA 水平无明显区别,表明藤黄酸对 GFI-1 mRNA 水平无明显影响,见图 4。藤黄酸组 GFI-1 蛋白表达水平较空白对照组明显减低,藤黄酸 MG132 组的 GFI-1 蛋白表达水平较藤黄酸组有所增高,藤黄酸 CQ 组的 GFI-1 蛋白表达水平较藤黄酸组无增高。表明藤黄酸可以抑制 GFI-1 蛋白的表达,藤黄酸是通过蛋白酶体途径抑制 GFI-1 蛋白的表达,见图 5。

讨论

有研究表明藤黄酸可以抑制肿瘤细胞增殖、侵袭及转移^[6,7],如恶性黑色素瘤、胃癌、肾癌、乳腺癌、肺癌^[8~12]等。早期有临床试验研究了藤黄酸的最大耐受剂量以及剂量限制性毒性,显示藤黄酸有良好的疗效与安全性^[13]。Chi 等^[14]应用藤黄酸治疗晚期或转移性肺癌,证实其具有抗肿瘤的作用,且不良反应较轻,进一步证实了藤黄酸的安全性与有效性。

本研究提示,藤黄酸可以抑制 K562 细胞增殖,其有效药物浓度为 0.4、0.8、1.2、2 μmol/L,且 4 组浓度对 K562 细胞增殖抑制作用无显著差异;藤黄酸浓度为 0.2 μmol/L 作用 48、72 h 时,对 K562 细胞增殖具有抑制作用。有效药物浓度的藤黄酸可以诱导 K562 细胞凋亡,可以影响 K562 细胞的周期,使 K562 细胞发生 G0/G1 期及 S 期阻滞。以上结果证明了藤黄酸抑制白血病 K562 细胞增殖的有效性。

GFI-1 为一种原癌基因,定位于染色体 1p22^[15]。GFI-1 编码一种转录阻遏蛋白,在造血细胞中高度表达,是维持造血干细胞、祖细胞以及多种造血谱系发展所必需的^[16,17]。GFI-1 是转录网络的一部分,可调节造血干细胞和祖细胞的发育,而转录因子功能的失调与造血系统恶性肿瘤的发生和发展有关^[18]。在淋巴瘤^[19]、胃癌^[20]等恶性肿瘤中存在该基因的异常,GFI-1 参与细胞的生长增殖、周期调节以及信号传导通路的调控,其表达与疾病的预后呈负相关。本试验中,加入有效浓度藤黄酸的白血病 K562 细胞 GFI-1 蛋白表达水平下降,提示 GFI-1 为藤黄酸抗肿瘤的作用靶点之一。

泛素-蛋白酶体途径是机体中降解蛋白质的重要途径之一,具有高选择性与特异性,该途径与细胞的增殖、凋亡以及细胞周期的调控等密切相关,与肿瘤的发病机制有关^[21,22]。MG 132 是一种常用的蛋白酶体抑制剂^[23,24]。本试验中,单用藤黄酸组细胞的 GFI-1 蛋白水平明显下降,而加用蛋白酶体抑制

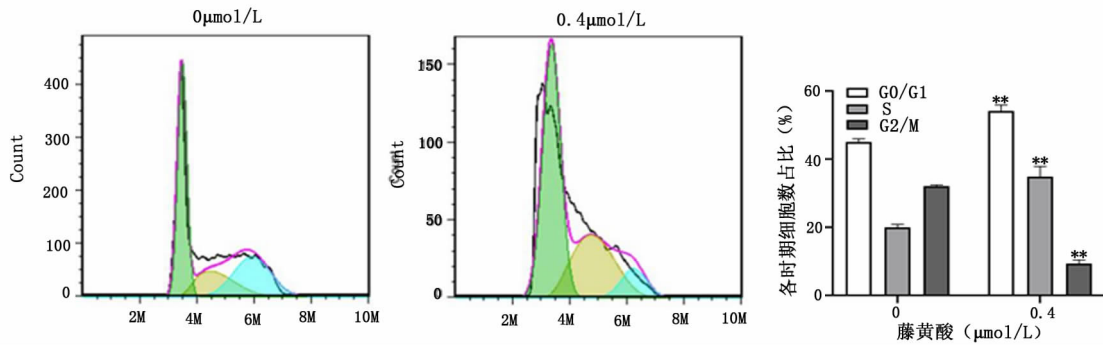


图3 藤黄酸对细胞周期的影响

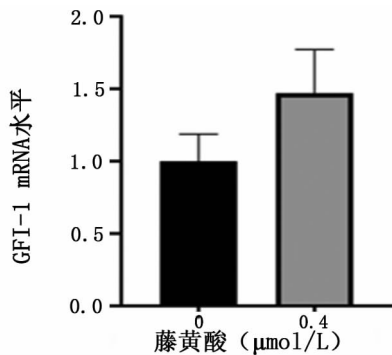


图4 藤黄酸对GFI-1mRNA表达的影响

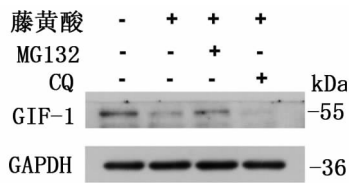


图5 藤黄酸、MG132、CQ对GFI-1蛋白表达的影响

剂MG132后GFI-1蛋白水平较藤黄酸组升高,提示藤黄酸下调GFI-1的作用可以被MG132拮抗,表明藤黄酸是通过蛋白酶体途径抑制GFI-1蛋白的表达。

参考文献

- Latagliata R, Romano A, Mancini M, et al. Discontinuation of alpha-interferon treatment in patients with chronic myeloid leukemia in long-lasting complete molecular response [J]. *Leuk Lymphoma*, 2016, 57(1):99-102.
- Smith G, Apperley J, Milojkovic D, et al. A british society for haematology guideline on the diagnosis and management of chronic myeloid leukaemia [J]. *Br J Haematol*, 2020, 191(2):171-193.
- Takahashi N. Chronic myeloid leukemia; state-of-the-art management [J]. *Rinsho Ketsueki*, 2018, 59(6):747-754.
- Le Coutre PD, Giles FJ, Hochhaus A, et al. Nilotinib in patients with Ph+ chronic myeloid leukemia in accelerated phase following imatinib resistance or intolerance: 24-month follow-up results [J]. *Leukemia*, 2012, 26(6):1189-1194.
- Liu Y, Chen Y, Lin L, et al. Gambogic acid as a candidate for cancer therapy: a review [J]. *Int J Nanomedicine*. 2020, 22(15):10385-10399.
- Wang X, Chen W. Gambogic acid is a novel anti-cancer agent that inhibits cell proliferation, angiogenesis and metastasis [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2012, 12(8):994-1000.
- Yu J, Wang W, Yao W, et al. Gambogic acid affects ESCC progression through regulation of PI3K/AKT/mTOR signal pathway [J]. *J Canc-*

- er, 2020, 11(19):5568-5577.
- Liang L, Zhang Z. Gambogic acid inhibits malignant melanoma cell proliferation through mitochondrial p66shc/ROS-p53/Bax-mediated apoptosis [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 38(4):1618-1630.
- Lin D, Lin X, He T, et al. Gambogic acid inhibits the progression of gastric cancer via circRNA_ASAP2/miR-33a-5p/CDK7 axis [J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12(5):9221-9233.
- Jang JH, Kim JY, Sung EG, et al. Gambogic acid induces apoptosis and sensitizes TRAIL-mediated apoptosis through downregulation of cFLIPL in renal carcinoma Caki cells [J]. *Int J Oncol*, 2016, 48(1):376-384.
- Wang S, Xu Y, Li C, et al. Gambogic acid sensitizes breast cancer cells to TRAIL-induced apoptosis by promoting the crosstalk of extrinsic and intrinsic apoptotic signalings [J]. *Food Chem Toxicol*, 2018, 119(11):334-341.
- Ye L, Zhou J, Zhao W, et al. Gambogic acid-induced autophagy in nonsmall cell lung cancer NCI-H441 cells through a reactive oxygen species pathway [J]. *J Cancer Res Ther*, 2018, 14(Supplement):S942-S947.
- Zhou ZT, Wang JW. Phase I human tolerability trail of Gambogic acid [J]. *Chin New drugs (Chin)*, 2007, 16(9):435-437.
- Chi Y, Zhan XK, Yu H, et al. An open-labeled, randomized, multicenter phase IIa study of gambogic acid injection for advanced malignant tumors [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2013, 126(9):1642-1646.
- Yang X, Liu H, Lin Z H, et al. Inhibitory effect of RNA interference targeting GFI-1 on the proliferation of atypical chronic myelogenous leukemia NT1 cells [J]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 2016, 38(8):572-577.
- van der Meer LT, Jansen JH, van der Reijden BA. Gfi1 and Gfi1b: key regulators of hematopoiesis [J]. *Leukemia*, 2010, 24(11):1834-1843.
- Phelan JD, Shroyer NF, Cook T, et al. Gfi1-cells and circuits; unravelling transcriptional networks of development and disease [J]. *Curr Opin Hematol*, 2010, 17(4):300-307.
- Kim W, Klarmann KD, Keller JR. Gfi-1 regulates the erythroid transcription factor network through Id2 repression in murine hematopoietic progenitor cells [J]. *Blood*, 2014, 124(10):1586-1596.
- Grimes HL, Chan TO, Zweidler-McKay PA, et al. The Gfi-1 proto-oncoprotein contains a novel transcriptional repressor domain SNAG and inhibits G1 arrest induced by interleukin-2 withdrawal [J]. *Mol Cell Biol*, 1996, 16(11):6263-6272.
- 蒯小玲, 张健峰, 易楠, 等. Gfi-1在胃癌中的表达及其临床意义 [J]. *交通医学*, 2016, 30(6):553-555, 560.
- 董慧琳, 聂红明, 梅昭荷, 等. 泛素蛋白酶体途径的应用研究进展 [J]. *中国医药导报*, 2019, 16(29):25-30.
- 何波, 王文瑞, 李健, 等. 蛋白酶体抑制剂MG132对膀胱癌细胞增殖及凋亡的影响 [J]. *中国医科大学学报*, 2019, 48(4):349-353.
- Qiang W, Sul F, MA J, et al. Pmteasome inhibitor MG132 induces thymid cancer cen apoptosis by modulating the activity of transcription factor FOX03a [J]. *Endocrine*, 2017, 56(1):98-108.
- SUN F, ZHANG Y, XU L, et al. Proteasome inhibitor MG132 enhances cisplatin-induced apoptosis in osteosarcoma cells and inhibits tumor growth [J]. *Oncol Res*, 2017, 26(4):655-664.

(2020-12-08 收稿 2021-01-11 修回)