

[文章编号] 1000-4718(2012)07-1208-05

盐霉素抑制耐格列卫的人慢性粒细胞白血病细胞株 K562/Glv 增殖并诱导其凋亡^{*}

徐霜清^{1,2}, 祝爱珍³, 刘成成³, 许婷婷³, 陈小宇³, 刘革修^{3△}(¹ 中南大学湘雅医学院检验系, 湖南 长沙 410013; ² 广州金域医学检验中心, 广东 广州 510330;³ 暨南大学医学院血液病研究所, 广东 广州 510632)

[摘要] 目的: 探讨盐霉素对耐格列卫的人慢性粒细胞白血病细胞株 K562/Glv 抑制增殖和诱导凋亡的作用及其机制。方法: 采用 CCK-8 的方法检测盐霉素对 K562/Glv 细胞生长的抑制作用; 流式细胞术检测细胞凋亡、活性氧、细胞内 Ca^{2+} 浓度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 和线粒体膜电位 ($\Delta\Psi_m$); 比色法检测 caspase-3、-8 和 -9 活性; Western blotting 分析细胞色素 C、Bcl-2、Bax、 β -catenin 和磷酸化低密度脂蛋白受体相关蛋白 6 (p-LRP6) 蛋白水平。结果: 盐霉素对 K562/Glv 细胞生长具有剂量依赖性抑制作用, 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 时细胞增殖抑制率为 $(36.70 \pm 2.31)\%$, 细胞凋亡率为 $(19.66 \pm 2.43)\%$; 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 盐霉素作用于 K562/Glv 细胞, $\Delta\Psi_m$ 显著下降, 24 h 时下降至对照组的 $(19.8 \pm 2.4)\%$, 细胞内活性氧和 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 在短期显著升高。Caspase-3、-8 和 -9 活性均显著增加, 与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。Bcl-2 的表达下调, Bax 的表达明显增加, Bcl-2/Bax 比值显著降低。同时, 盐霉素也减少 K562/Glv 细胞内 β -catenin 和 p-LRP6 蛋白水平。结论: 盐霉素不仅通过 Bcl-2/Bax 途径和线粒体凋亡途径诱导耐格列卫人慢性粒细胞白血病细胞 K562/Glv 的凋亡, 而且通过抑制 Wnt 信号途径抑制 K562/Glv 细胞增殖。

[关键词] 盐霉素; 格列卫; 白血病; 细胞凋亡; 线粒体; β -catenin; 低密度脂蛋白受体相关蛋白 6

[中图分类号] R743

[文献标志码] A

doi: 10.3969/j.issn.1000-4718.2012.07.011

Salinomycin inhibits proliferation and induces apoptosis of Gleevec-resistant chronic myeloid leukemic cell line K562/Glv

XU Shuang-qing^{1,2}, ZHU Ai-zhen³, LIU Cheng-cheng³, XU Ting-ting³, CHEN Xiao-yu³, LIU Ge-xiu³(¹ Faculty of Laboratory Medicine, Xiangya Medical College of Central South University, Changsha 410013, China;² Guangzhou Kingmed Diagnostics Center, Guangzhou 510330, China; ³ Institute of Hematology, School of Medicine, Jinan University, Guangzhou 510632, China. E-mail: tliugx@jnu.edu.cn)

[ABSTRACT] **AIM:** To study the effect of salinomycin on inhibiting proliferation and inducing apoptosis of Gleevec-resistant chronic myeloid leukemia cell line K562/Glv. **METHODS:** The inhibitory effect of salinomycin on the growth of K562/Glv cells was detected by CCK-8 assay *in vitro*. Flow cytometry was used to observe apoptosis, mitochondria membrane potential ($\Delta\Psi_m$), reactive oxygen species (ROS) and the concentration of intracellular Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in K562/Glv cells. The activity of caspase-3, -8 and -9 was measured by the method of colorimetry. The levels of cytochrome C, Bcl-2, Bax, β -catenin and phosphorylated low-density lipoprotein receptor-related protein 6 (p-LRP6) were determined by Western blotting. **RESULTS:** Salinomycin inhibited the growth of K562/Glv cells in a dose-dependent manner. Salinomycin at concentration of 0.2 $\mu\text{mol/L}$ inhibited the growth of the cells with the inhibitory rate of $(36.70 \pm 2.31)\%$. The cell apoptotic rate was $(19.66 \pm 2.23)\%$. Salinomycin at concentration of 0.2 $\mu\text{mol/L}$ decreased the level of $\Delta\Psi_m$, and increased the levels of ROS, cytochrome C and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in the cells. Salinomycin also increased the activity of caspase-3, -8 and -9 in the cells, reduced the ratio of Bcl-2/Bax, and attenuated the levels of β -catenin and p-LRP6. **CONCLUSION:** Salinomycin induces the apoptosis of Gleevec-resistant myeloid leukemia cell line K562/Glv via Bcl-2/Bax and mitochondria-dependent pathways, and inhibits the cell growth through Wnt signal pathway.

[KEY WORDS] Salinomycin; Gleevec; Leukemia; Apoptosis; Mitochondria; β -catenin; Low-density lipoprotein receptor-related protein 6

[收稿日期] 2012-03-20

[修回日期] 2012-06-05

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 30670902)

△通讯作者 Tel: 020-85220262; E-mail: tliugx@jnu.edu.cn

尽管酪氨酸激酶抑制剂伊马替尼可抑制 BCR - ABL 激酶活性,对慢性期慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia,CML)治疗有效,但很难达分子学缓解。越来越多的研究表明,白血病复发和耐药的的根本原因是白血病干细胞(leukemia stem cells,LSC)的存在^[1]。因此,寻找新的、清除 LSC 的药物以减少耐药与复发十分必要。最近的研究发现一种名为盐霉素(salinomycin)的抗生素可以直接杀死肿瘤干细胞,其杀死小鼠身上乳腺癌干细胞的效力比普通抗癌药物泰克索(taxol)高 100 倍^[2-3]。本实验观察盐霉素对耐格列卫的白血病细胞株 K562/Glv 细胞增殖的影响,并对其作用机制进行了初步研究,为盐霉素应用于慢性粒细胞白血病治疗探索新的思路。

材 料 和 方 法

1 主要试剂

盐霉素、台盼蓝、Triton X-100、DMSO 和 PI 染料购自 Sigma。RPMI-1640 培养液和胎牛血清购自 Gibco。细胞内活性氧(reactive oxygen species,ROS)、caspase-3、caspase-8、caspase-9 和 JC-1 线粒体膜电位($\Delta\Psi_m$)检测试剂盒购自碧云天生物技术有限公司。细胞色素 C 凋亡检测试剂盒购自 Bio-Vision。Fluo-3AM 购自 Biotium。Epics XL 型流式细胞仪购自 Beckman Coulter。Annexin V-PI 双染测定细胞凋亡试剂盒购自 Invitrogen。

2 细胞和细胞培养

格列卫耐药慢粒细胞株 K562/Glv 由天津中国医学科学院血液病研究所惠赠。细胞用含 10% 胎牛血清、 1×10^5 U/L 青霉素及 100 mg/L 链霉素的 RPMI-1640 培养液,置于含 5% CO_2 、饱和湿度、37 °C 孵箱中培养 2~3 d 传代。

3 盐霉素对细胞生长的抑制作用

检测盐霉素对 K562/Glv 细胞的剂量-效应关系,取对数生长期细胞,调整密度为 2×10^8 cells/L,100 μL /well,盐霉素设有 0.1、0.2、0.4、0.8 和 1.6 $\mu\text{mol/L}$ 浓度梯度,设 5 个复孔,同时设 DMSO 对照孔和不加细胞的调零孔,5% CO_2 、饱和湿度、37 °C 孵育 48 h,加入 CCK-8 试剂孵育 3 h 后在全自动酶标仪上检测各孔的吸光度(A)值(测量波长 490nm)。根据实验数据计算得半数抑制浓度(half inhibitory concentration, IC_{50}) = 0.37 $\mu\text{mol/L}$ 。绘制 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 盐霉素对 K562/Glv 细胞的时间-效应曲线,孵育时间:0、24、48、72、96 h,测量方法同上。

4 Annexin V-PI 双染测定细胞凋亡

取对数生长的 K562/Glv 细胞 2×10^5 cells/well 接种至 12 孔板内,以 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 盐霉素处理,对照

组加入 1% DMSO,作用 48 h 后,消化收集细胞,PBS 洗涤,弃上清,加入 200 μL 试剂盒提供的结合缓冲液,重悬细胞后,分别加入 10 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI,轻轻混匀,4 °C 避光反应 30 min,再加入 300 μL 结合缓冲液,上机检测。

5 $\Delta\Psi_m$ 、ROS 和细胞内 Ca^{2+} 浓度($[\text{Ca}^{2+}]_i$)的检测

取对数生长期的 K562/Glv 细胞,以 2×10^5 cells/well 接种至 12 孔板,加入 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 盐霉素处理,在 6 h、12 h、24 h 时收集细胞,PBS 洗涤 2 遍。500 μL JC-1 (10 mg/L) 重悬细胞检测 $\Delta\Psi_m$,500 μL DCFH-DA (5 $\mu\text{mol/L}$) 重悬细胞检测细胞产生的 ROS,10 $\mu\text{mol/L}$ 荧光染料 Fluo-3AM 检测 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 浓度,37 °C 避光孵育 20 min,PBS 洗 3 次,即刻用流式细胞仪检测,激发波长为 488 nm,发射波长为 530 nm。

6 检测 caspase-3、caspase-8 和 caspase-9 活性

取对数生长期的 K562/Glv 细胞,以 2×10^5 cells/well 的密度接种至 12 孔板,加入盐霉素 0.2 $\mu\text{mol/L}$,分别处理 0、12、24 h,按照试剂盒说明收集细胞,预冷 PBS 洗涤后重悬于细胞裂解液中,冰上裂解 30 min,4 °C 下 $10\,000 \times g$ 离心 10 min,取上清加入显色底物(caspase-3 底物 Ac-DEVD-pNA、caspase-8 底物 Ac-IETD-pNA 和 caspase-9 底物 Ac-LEHD-pNA),终浓度 50 $\mu\text{L/L}$,均匀混合并加入到 96 孔板中,每组 5 个复孔,避光孵育 4 h,在 405 nm 处检测 A 值。

7 Western blotting 检测细胞色素 C、Bcl-2、Bax、 β -catenin 和磷酸化低密度脂蛋白受体相关蛋白 6 (phosphorylated low-density lipoprotein receptor-related protein 6 p-LRP6) 的表达

取对数生长期的 K562/Glv 细胞,分别以 0.2、0.4、0.8、1.6 $\mu\text{mol/L}$ 盐霉素处理 48 h,收集细胞,PBS 洗 2 遍,加入蛋白抽提液抽提总蛋白。取蛋白 50 μg 经 10% SDS-PAGE 电泳分离,常规转移至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉 37 °C 封闭 2 h,鼠抗人细胞色素 C、Bcl-2、Bax、 β -catenin 抗体(Santa Cruz)、p-LRP6 (Ser1490) 抗体(Cell Signaling Technology)或 β -actin 抗体(Chemicon International) 4 °C 孵育过夜,1:5 000 稀释的 HRP 标记的 II 抗室温孵育 1 h,化学发光法观察蛋白的表达。目的条带用 Image-Pro Plus 分析软件进行灰度值分析,以 β -actin 内参照校正。

8 统计学处理

数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS 15.0 统计软件处理数据,采用单因素方差分析比较各组间差异的显著性。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学

意义。

结 果

1 盐霉素对 K562/Glv 细胞增殖的抑制作用和诱导凋亡作用

结果显示 ,0.1 ~ 1.6 $\mu\text{mol/L}$ 盐霉素对 K562/Glv 细胞生长呈剂量依赖性抑制作用 ,0.1、0.2、0.4、0.8 和 1.6 $\mu\text{mol/L}$ 盐霉素细胞增殖抑制率分别为 $(89.56 \pm 2.30)\%$ 、 $(28.70 \pm 2.31)\%$ 、 $(53.77 \pm 3.02)\%$ 、 $(75.98 \pm 3.30)\%$ 和 $(89.56 \pm 3.43)\%$,与对照组比较差异显著 ($P < 0.05$) ,见图 1A。计算得 $\text{IC}_{50} = 0.37 \mu\text{mol/L}$ 。0.2 $\mu\text{mol/L}$ 盐霉素处理 K562/Glv 细胞 24 h 时即显示明显细胞增殖抑制作用 ,抑制率为 $(14.78 \pm 2.24)\%$,随着时间延长抑制作用越来越明显 ,72 h 细胞抑制率为 $(43.86 \pm 2.31)\%$,96 h 为 $(55.34 \pm 3.42)\%$,见图 1B。流式细胞术检测结果显示 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 盐霉素能够诱导 K562/Glv 细胞凋亡 ,出现明显亚 G_1 二倍体峰 ,且随着时间的增加 ,作用越明显 ,48 h 细胞凋亡率为 $(15.66 \pm 2.23)\%$,对照组及 DMSO 组凋亡率分别为 $(5.63 \pm 1.47)\%$ 和 $(5.70 \pm 1.48)\%$,见图 2。

2 盐霉素对 K562/Glv 细胞 $\Delta\Psi_m$ 、ROS 和 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响

结果显示 ,0.2 $\mu\text{mol/L}$ 盐霉素作用 K562/Glv 细胞 , $\Delta\Psi_m$ 在 6 h 时即显著下降 ,24 h 时下降至最低 ,为对照组的 $(47.5 \pm 2.3)\%$;细胞内 ROS 在 6 h 时已显著升高 ,24 h 时仍然高于对照组水平 $(144.7 \pm 4.5)\%$; $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 在 6 h 时已显著升高 ,为对照组的 $(163.6 \pm 5.6)\%$,24 h 时下降至接近对照组水平。

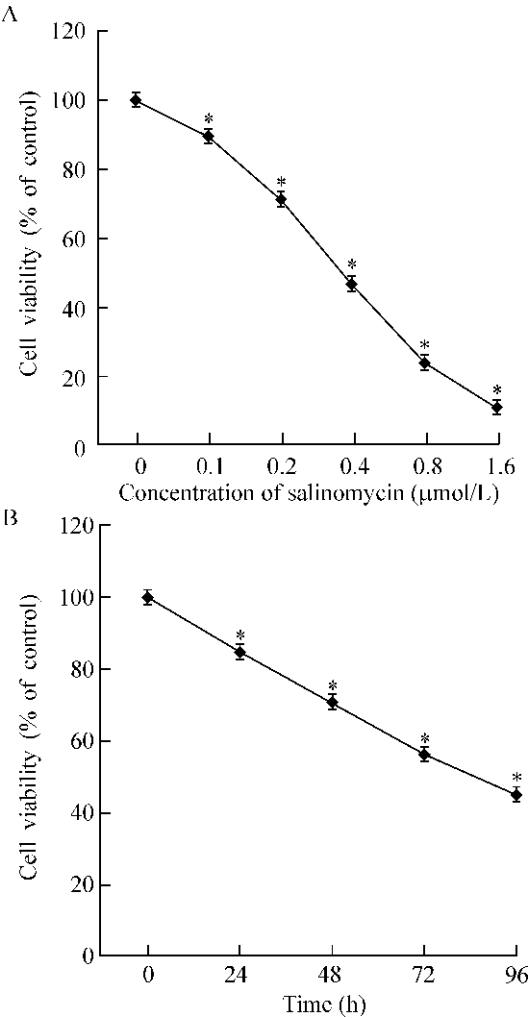


Figure 1. Inhibitory effect of salinomycin on Gleevec - resistant chronic myeloid leukemia cell line K562/Glv. A: dose - effect relationship (48 h); B: time - effect relationship (0.2 $\mu\text{mol/L}$) . $\bar{x} \pm s$. $n = 5$. * $P < 0.05$ vs control (0 $\mu\text{mol/L}$ or 0 h) .

图 1 盐霉素对 K562/Glv 细胞的生长抑制作用

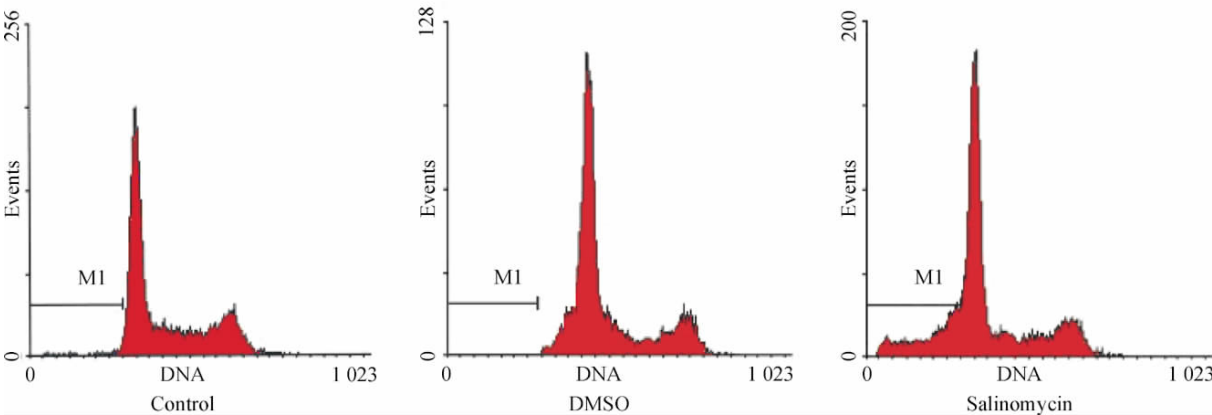


Figure 2. Salinomycin induced apoptosis of K562/Glv cells.

图 2 盐霉素诱导 K562/Glv 细胞凋亡

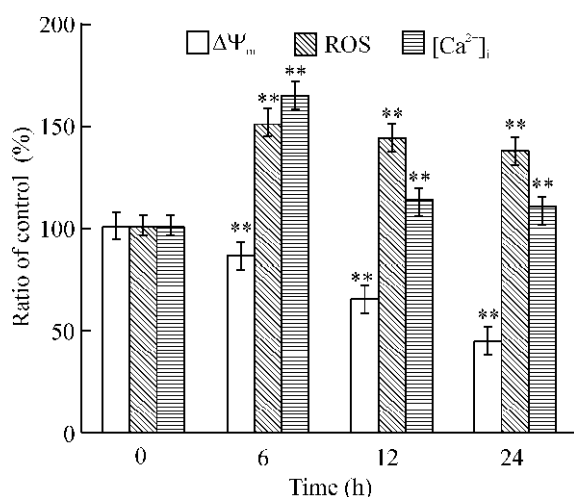


Figure 3. Effects of salinomycin on mitochondria membrane potential ($\Delta\Psi_m$), reactive oxygen species (ROS) and intracellular Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) in K562/Glv cells. $\bar{x} \pm s$, $n = 5$. ** $P < 0.01$ vs control (0 h).

图3 盐霉素对 K562/Glv 细胞线粒体膜电位、活性氧和细胞内 Ca^{2+} 的影响

3 盐霉素对 K562/Glv 细胞 caspase - 3、caspase - 8 和 caspase - 9 活性的影响

结果显示 $0.2 \mu\text{mol/L}$ 盐霉素作用 K562/Glv 细胞后, caspase - 8 和 caspase - 9 活性在 6 h 时已经达到较高水平, 而且之后仍然维持在这高水平; caspase - 3 活性则随着时间而增加, 呈时间 - 效应关系, 与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。这表明盐霉素通过先激活 caspase - 8 和 caspase - 9, 再激活 caspase - 3, 从而诱导细胞凋亡, 见图 4。

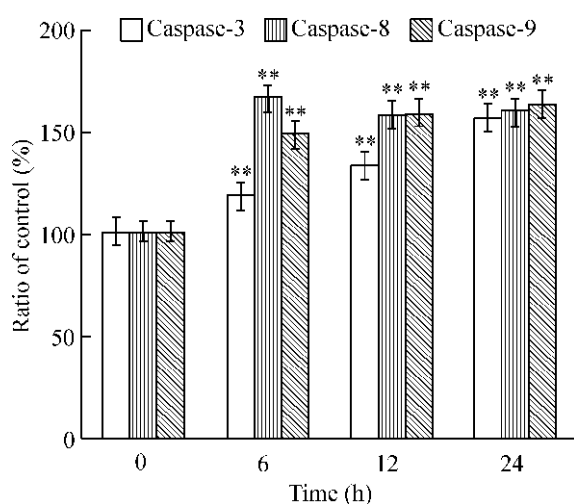


Figure 4. Effects of salinomycin on activity of caspase - 3, caspase - 8 or caspase - 9 in K562/Glv cells. $\bar{x} \pm s$, $n = 5$. ** $P < 0.01$ vs control (0 h).

图4 盐霉素对 K562/Glv 细胞 caspase - 3、caspase - 8 或 caspase - 9 活性的影响

4 盐霉素对 K562/Glv 细胞 Bcl - 2、Bax、细胞色素 C、 β - catenin 和 p - LRP6 蛋白的影响

结果显示 $0.2 \mu\text{mol/L}$ 盐霉素作用 K562/Glv 细胞 48 h, Bcl - 2 表达出现下调, Bax 表达则明显增加, Bcl - 2/Bax 比值显著降低, 同时胞浆细胞色素 C 显著增加, β - catenin 和 p - LRP6 蛋白水平也显著下降, 见图 5。结果说明盐霉素不仅通过 Bcl - 2/Bax 和细胞色素 C 途径诱导细胞凋亡, 而且通过 K562/Glv 细胞抑制细胞增殖。

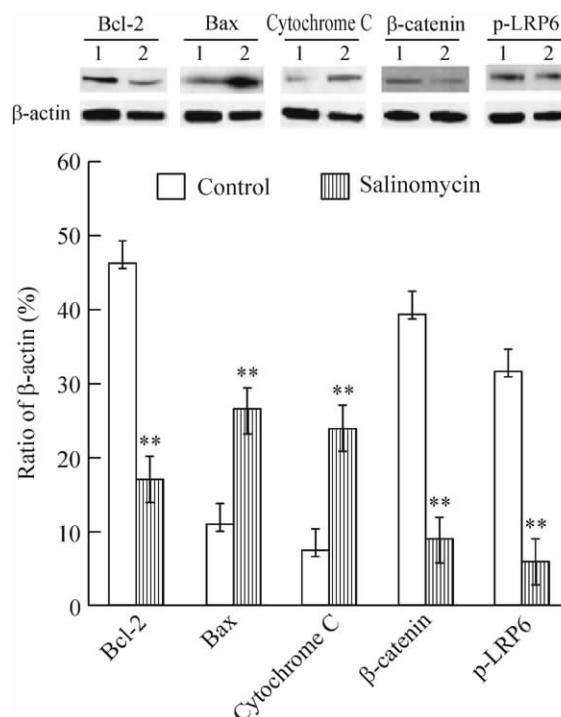


Figure 5. Effects of salinomycin on the levels of cytochrome C, Bcl - 2, Bax, β - catenin and p - LRP6 in K562/Glv cells. 1: control; 2: salinomycin. $\bar{x} \pm s$, $n = 5$. ** $P < 0.01$ vs control.

图5 盐霉素对 K562/Glv 细胞 Bcl - 2、Bax、细胞色素 C、 β - catenin 和 p - LRP6 蛋白的影响

讨 论

BCR - ABL 靶点特异药物格列卫是目前 CML 治疗的一线药物, 但是也不乏有临床格列卫耐药的现象。残留的 LSC 及原始祖细胞, 成为该疾病复发的主要因素^[14-15]。所以, 寻求新的治疗方案以清除肿瘤干细胞、减少耐药与复发仍然十分必要。

LSC 由 Lapidot 等^[6]在急性髓系白血病的研究中首先提出, 具有与正常造血干细胞相同的特征, 即自我更新、无限繁殖以及多向分化潜能。许多研究表明, Wnt/ β - catenin 信号途径在 LSCs 中具有重要作用, 解释了传统化疗不能根除白血病的原因^[17]。所以, 寻找抑制该信号途径并诱导细胞凋亡药物进

行研究具有意义。

最近研究显示,盐霉素通过 Wnt 信号途径抑制慢性淋巴细胞白血病细胞增殖并诱导其凋亡^[7]。盐霉素属于聚醚类一元羧酸,由白色链霉菌发酵产生,具有特殊的环状结构,是典型的离子载体抗生素,它对细胞中的阳离子,尤其 K^+ 、 Na^+ 、 Rb^+ 的亲合力特别强,使生物所必需的阳离子通过膜上脂质屏障的浸透性增强,妨碍细胞内外阳离子的传递,使细胞内外离子浓度发生变化,从而影响渗透压,最终使细胞崩解,起到杀菌作用。

本研究结果显示,盐霉素不仅通过降低 β -catenin 和 p-LRP6 蛋白水平抑制耐格列卫的 K562/Glv 细胞生长,而且通过使 $\Delta\Psi_m$ 下降、细胞色素 C 和 Ca^{2+} 的释放,增加细胞内 ROS,以及激活 caspase-3、-8 和 -9,降低 Bcl-2/Bax 比值,诱导细胞凋亡。我们推测其作用本质可能与 $[Ca^{2+}]_i$ 变化有关。Bcl-2 家族、线粒体细胞色素 C 及 caspase 是细胞内凋亡信号通路的基本成分,而 $[Ca^{2+}]_i$ 变化对它们的活性状态调节具有重要影响^[9]。该实验结果为改善慢性髓系白血病临床治疗方法提供新的依据。但如何应用盐霉素于该疾病的临床治疗还有待进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Chen Y, Peng C, Sullivan C, et al. Critical molecular pathways in cancer stem cells of chronic myeloid leukemia [J]. *Leukemia*, 2010, 24(9): 1545–1554.
- [2] Gupta PB, Onder TT, Jiang G, et al. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening [J]. *Cell*, 2009, 138(4): 645–659.
- [3] 曾 葭,刘成成,祝爱珍,等. 盐霉素抑制人肺腺癌耐顺铂细胞株 A549/DDP 增殖及诱导凋亡的机制 [J]. *中国病理生理杂志*, 2012, 28(5): 834–838.
- [4] White DL, Saunders VA, Dang P, et al. OCT-1-mediated influx is a key determinant of the intracellular uptake of imatinib but not nilotinib (AMN107): reduced OCT-1 activity is the cause of low *in vitro* sensitivity to imatinib [J]. *Blood*, 2006, 108(2): 697–704.
- [5] Corbin AS, Agarwal A, Loriaux M, et al. Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity [J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(1): 396–409.
- [6] Lapidot T, Sirard C, Nornm J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice [J]. *Nature*, 1994, 367(6464): 645–648.
- [7] Wang Y, Krivtsov AV, Sinha AU, et al. The Wnt/ β -catenin pathway is required for the development of leukemia stem cells in AML [J]. *Science*, 2010, 327(5973): 1650–1653.
- [8] Lu D, Choi MY, Yu J, et al. Salinomycin inhibits Wnt signaling and selectively induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(32): 13253–13257.
- [9] Lalier L, Cartron PF, Juin P, et al. Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis [J]. *Apoptosis*, 2008, 12(5): 887–896.