

· 基础研究 ·

葡萄柚黄酮抑制白血病细胞株增殖的体外实验研究

王 博¹ 沈英英¹ 张 蕴¹ 林圣云¹ 蒋剑平² 肖韵悦²
 杨新新² 钱文斌³ 周郁鸿¹ 武利强¹

摘要 目的 研究葡萄柚黄酮组分 (PTFC) 对 Kasumi-1、K562 细胞株的生长抑制作用及诱导凋亡情况, 从而为白血病的临床治疗提供实验基础。**方法** 不同浓度的 PTFC (0、0.125、0.25、0.5、1、2 mg/mL) 作用于 Kasumi-1、K562 细胞株, 采用 MTT 法检测 PTFC 对 Kasumi-1、K562 细胞株的生长抑制作用; Annexin V/PI 流式细胞术检测 PTFC 诱导 Kasumi-1、K562 细胞株的凋亡情况; Hoechst 33258 染色法观察 PTFC 诱导白血病细胞凋亡的形态学改变; Western Blot 法检测 PTFC 作用后 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、PARP 蛋白表达变化。**结果** 0.125 ~ 2 mg/mL PTFC 可明显抑制 Kasumi-1、K562 细胞株增殖, 与空白对照组 (PTFC 0 mg/mL) 比较, 细胞存活率明显降低 ($P < 0.05$), 对 Kasumi-1 的 IC_{50} (24、48 h) 分别为 1.99、0.89 mg/mL, 对 K562 的 IC_{50} (24、48 h) 分别为 1.23、1.03 mg/mL; 通过 Annexin V/PI 流式细胞术检测, 0.125 ~ 2 mg/mL PTFC 作用 24 h 可诱导 Kasumi-1、K562 细胞凋亡, 诱导 Kasumi-1 凋亡率分别为 2.98%、3.2%、3.66%、8.6%、19.8%, K562 的凋亡率分别为 3.19%、3.19%、3.49%、7.25%、16.87%; Hoechst 33258 染色法检测发现 PTFC 作用后 Kasumi-1、K562 细胞中出现明显凋亡小体; 与空白对照组比较, Caspase-3、Caspase-9、PARP 被激活 ($P < 0.05$)。**结论** PTFC 可抑制 Kasumi-1、K562 细胞增殖并诱导其凋亡, 其凋亡相关机制与 PARP、Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达变化相关。

关键词 白血病; 葡萄柚黄酮组分; 细胞凋亡; 半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶

The Mechanism of Pure Total Flavonoids from *Citrus Paradisi* Macfad for Inhibiting *in vitro* Proliferation of Leukemia Cell Strain WANG Bo¹, SHEN Ying-ying¹, ZHANG Yun¹, LIN Sheng-yun¹, JIANG Jian-ping², XIAO Yun-yue², YANG Xin-xin², QIAN Wen-bin³, ZHOU Yu-hong¹, and WU Li-qiang¹ 1 Department of Hematology, First Affiliated Hospital, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou (310006); 2 The First School of Clinical Medicine, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou (310053); 3 Department of Hematology, First Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou (310003)

ABSTRACT Objective To observe the inhibition of pure total flavonoids from *Citrus paradisi* macfad (PTFC) on Kasumi-1 and K562 cell strains, and induction on their apoptosis, thus providing experimental evidence for clinical therapy of leukemia. **Methods** Leukemia Kasumi-1 cell strain and K562 cell strain were treated by PTFC (0, 0.125, 0.250, 0.500, 1.000, 2.000 mg/mL, respectively). MTT colorimetric assay was used to detect the growth inhibition of PTFC on leukemia Kasumi-1 and K562 cell strains. Their apoptosis rates were analyzed by Annexin V /PI flow cytometry. The morphological changes of apoptotic cells were observed using Hoechst 33258 staining. The expressions of Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9, and PARP were detected by Western Blot. **Results** PTFC in certain concentration range (0.125 - 2.000 mg/mL) markedly inhibited the proliferation of Kasumi-1 and K562 cell strains. Compared with the blank control group (PTFC 0 mg/mL), the cell survival rate was significantly reduced ($P < 0.05$)

基金项目: 浙江省医药卫生科技计划项目 (No. 2017RC022); 浙江省中医药优秀青年人才基金项目 (No. 2017ZQ012)

作者单位: 1. 浙江中医药大学附属第一医院血液科 (杭州 310006); 2. 浙江中医药大学第一临床医学院 (杭州 310053); 3. 浙江大学医学院附属第一医院血液科 (杭州 310003)

通讯作者: 武利强, Tel: 0571-86008701, E-mail: wuliqiang_2003@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20190327.108

in a dose-and time-dependent manner. The IC_{50} (24 h and 48 h) for Kasumi-1 was 1.99 mg/mL and 0.89 mg/mL respectively, and the IC_{50} for K562 (24 h and 48 h) was 1.23 mg/mL and 1.03 mg/mL respectively. Through Annexin V/PI flow cytometry detection, 0.125–2.000 mg/mL PTFC induced apoptosis of Kasumi-1 and K562 cells at 24 h. The induced apoptosis rate of Kasumi-1 cell was 2.98%, 3.20%, 3.66%, 8.60%, 19.80%, respectively. The induced apoptosis rate of K562 cells was 3.19%, 3.19%, 3.49%, 7.25%, and 16.87%, respectively. Hoechst 33258 staining showed typical apoptotic body occurred after treated by PTFC. Caspase-3, Caspase-9, and PARP were activated in Kasumi-1 and K562 cell strains, as compared with the blank control group ($P < 0.05$). Conclusions PTFC significantly inhibited the proliferation of Kasumi-1 and K562 cell strains and induced their apoptosis. Its mechanism might be related to the activation of Caspase-3, Caspase-9, and PARP proteins.

KEYWORDS leukemia; pure total flavonoids from *Citrus paradisi* macfad; cell apoptosis; cysteine aspartic acid specific protease

白血病是一类起源于造血前体细胞的血液系统恶性肿瘤,骨髓中异常的原始细胞及幼稚细胞大量增殖并抑制正常造血,并在肝、脾、淋巴结等全身各脏器中浸润,导致贫血、出血、感染、肝脾淋巴结肿大及骨骼疼痛等浸润症状^[1]。目前针对白血病的治疗,联合化疗是最常用手段,但其既作用于白血病细胞,又作用于正常细胞,毒副作用明显;造血干细胞移植,存在移植供者配型难,费用大,复发治疗较困难等问题^[2]。因此,如何处理化疗相关细胞毒性、化疗后复发耐药性以及进一步开展异基因造血干细胞移植仍然是临床工作者所面临的重大难题。

黄酮类化合物直接来源于天然植物,不良反应小,其抗癌抗肿瘤作用备受关注,研究发现其抗癌抗肿瘤作用与诱导细胞凋亡、阻碍细胞周期、干预细胞信号转导、促进抑癌基因表达和抑制癌基因表达相关^[3-5]。本实验是在提取和纯化葡萄柚后获得黄酮组分(pure total flavonoids from *Citrus Paradisi* macfad, PTFC),经成分分析主要包含 3 个活性单体(质量配比为:柚皮苷 31.77%,新橙皮苷 42.27%,柚皮芸香苷 11.12%),并将在不同浓度、不同作用时间等条件下,观察 PTFC 对白血病细胞株 Kasumi-1、K562 的增殖抑制作用、诱导细胞凋亡、凋亡形态以及细胞凋亡率等,以探讨 PTFC 抗白血病细胞的可能分子机制,为临床上寻找低毒高效的抗白血病药物提供实验依据。

材料与方 法

1 材料

1.1 细胞株 人髓系白血病 Kasumi-1、K562 细胞株由浙江大学医学院附属第一医院血液病研究所惠赠(购自美国标准生物制品收藏中心,货号: CRL-2724)。

1.2 药物 PTFC 由浙江中医药大学中药制剂室从葡萄柚皮中制备和提取(购自联华集团,批号: 130501),取新鲜葡萄柚皮用自来水洗净,切丝,自然晒干,粉碎,过 20 目筛,获得葡萄柚皮粉,取葡萄柚皮粉 50 g,加入 pH 为 4.6~6.0 的缓冲液,并加入纤维素酶,搅拌状态下于 30~50℃ 水浴 1~2 h,然后在 200~300 W 条件下超声处理 20~30 min,获得混合料液;在混合料液中加入无水乙醇,在 150~250 W 频率下超声处理 30~40 min,过滤,获得滤液和滤饼;将滤液浓缩、干燥,再用水溶解后加入乙酸乙酯萃取,取上层萃取液真空干燥,获得所述葡萄柚皮黄酮类提取物^[6](该提取方法已获得国家发明型专利,专利号: ZL201210118093.9)。

1.3 试剂及仪器 二甲基亚砜购自杭州化学试剂有限公司;四甲基偶氮唑蓝及碘化丙啶(PI)试剂盒购自美国 Sigma-Aldrich 公司;Western Blot Luminol(ECL)试剂盒购自以色列 Biological Industries 公司;Caspase-3、8、9、PARP、 β -actin 抗体购自美国 Cell-Signaling 公司;流式凋亡检测试剂盒购自美国 Biouniquer 公司;PVDF 膜购自美国 Millipore 公司;细胞培养箱购自美国 Forma Scientific 公司,型号 3110;荧光倒置显微镜购自德国 Leica 公司,型号 DM ILLED;垂直电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司,型号 12-0625;转膜装置购自美国 Thermo 公司,型号 TS-100;脱色摇床购自海门市麒麟医用仪器厂,型号 TS-8;超声波细胞粉碎机购自宁波新芝生物科技股份有限公司,型号 UP-250。

2 方法

2.1 细胞培养 采用常规培养。Kasumi-1、K562 细胞在体积分数 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中,于 37℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养,1~2

天换液传代 1 次^[7,8]。取对数生长期细胞为实验对象。

2.2 细胞增殖 采用 MTT 比色法检测。分别取对数生长期 Kasumi-1、K562 细胞,以 1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,分别重悬于无血清的 RPMI1640 培养液中,调整 Kasumi-1、K562 细胞终浓度为 1×10^5 进行实验,将细胞悬液分别接种于 96 孔培养板,使每孔终体积为 200 μ L,分别加入 5 种不同浓度的 PTFC,使终浓度分别达到 0.125、0.25、0.5、1、2 mg/mL,并设空白对照组(PTFC 0 mg/mL);置于培养箱中孵育 24、48 h 后,每孔加 MTT 工作液 20 μ L,再置培养箱中孵育 4 h,3 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 DMSO 200 μ L/孔,震荡,使底部蓝紫色结晶物充分溶解后,在酶标仪 570 nm 波长处读取吸光度值(OD 值),实验重复 3 次,设复孔 4 个,取平均值为最终结果。采用 Graphpad 软件计算 IC_{50} 结果;细胞存活率(%) = 处理组/对照组 $\times 100\%$ 。

2.3 细胞早期凋亡 采用 Annexin V/PI 双染色流式细胞仪检测。取对数生长期的 Kasumi-1、K562 细胞以 1×10^5 /mL 接种于 6 孔培养板,分别加入实验浓度 PTFC(0.125、0.25、0.5、1、2 mg/mL),同时设空白对照组(PTFC 0 mg/mL),24 h 后收获细胞,冷 PBS 洗涤 2 次,4 $^{\circ}$ C,1 000 r/min 离心,5 min,弃上清。将细胞重悬于 500 μ L Annexin V Binding buffer,转移至流式细胞仪专用试管中,加 5 μ L Annexin V-FITC 混匀后,加入 5 μ L Propidium iodide,轻轻混匀,室温避光反应 10 min,立刻用流式细胞仪检测,Cellquest 1.2 分析软件分析结果。

2.4 细胞凋亡 采用 Hoechst 荧光染色检测。取对数生长期 Kasumi-1、K562 细胞,分别悬浮于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液中,调整细胞终浓度为 1×10^5 个/mL 进行实验,将两种细胞悬液分别接种于 6 孔板,使每孔终体积为 5 mL,分别加入 PTFC,使终浓度达到 2 mg/mL,设空白对照组(PTFC 0 mg/mL),作用于 Kasumi-1、K562 细胞 24 h 后,收集空白对照组及药物处理组细胞,离心,PBS 洗涤 2 次,弃上清,各加入 4% 甲醛 200 μ L 分别移至 EP 管,放入培养箱中 30 min。离心弃甲醛,用移液器在干净玻璃片上涂单层细胞,待涂层干燥后,PBS 摇床洗 3 次,每次 10 min,用含 0.5% Triton 的 PBS 在摇床上透化 30 min,再用 PBS 摇床洗 3 次,每次 10 min,每张玻片用 1 μ g/mL Hoechst 33258 染液均匀滴涂于细胞涂层,避光反应 20 min。弃 Hoechst 33258 染液,PBS 摇床洗 3 次,每次 10 min。分别用低倍(10 \times)、高倍(40 \times)、油镜(100 \times)观察,用油镜(100 \times)拍照。

2.5 蛋白表达 采用 Western Blot 检测。取对数生长期的 Kasumi-1、K562 细胞以每瓶 1.0×10^5 个接种于培养瓶中,使终体积为每瓶 10 mL,加入 PTFC,使终浓度为 0、0.5、1、2 mg/mL,作用 24 h。24 h 后收集细胞,离心,弃上清,用预冷 PBS 洗涤 2 次,加细胞裂解液 50 ~ 100 μ L,反复吹打,置冰上,用超声波细胞粉碎机处理(160 W,持续 3 s,间隔 5 s,共 3 次),剪切 DNA,至溶液不再黏稠,4 $^{\circ}$ C 12 000 \times g 离心 5 min,取上清液,计量,Braford 法测蛋白质浓度后 -70 $^{\circ}$ C 冻存备用或直接使用。将蛋白样品用 BCA 蛋白定量试剂盒定量后,每孔加入 50 μ g 总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,电泳结束后按半干法将电泳产物转印到 NC 膜上,5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h,加 Caspase-3、8、9,PARP、 β -actin 一抗(1:1 000 稀释)4 $^{\circ}$ C 过夜,TBST 洗膜 10 min \times 3 次后,加荧光二抗(1:5 000 稀释),室温孵育 2 h,TBST 洗膜 10 min,共 3 次后,使用 ECL 试剂盒进行显影。显影扫描后用 Image J 软件进行图像采集和定量分析,并计算各检测指标相对于内参蛋白的相对表达水平,使用归一化处理,比较各实验组相对于对照组蛋白的表达水平。

2.6 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。单变量两组资料比较采取 t 检验,多组资料比较采用单因素方差分析,其中两两比较采用 SNK- q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 不同浓度 PTFC 对 Kasumi-1、K562 细胞生长抑制作用比较(表 1) PTFC 作用于 Kasumi-1、K562 细胞 24 h IC_{50} 分别为 1.99、1.23 mg/mL;48 h IC_{50} 分别为 0.89、1.03 mg/mL;各组细胞存活率随着药物浓度增大而降低。与空白对照组比较,0.25 ~ 2 mg/mL 的 PTFC 作用 Kasumi-1 细胞 24、48 h;1、2 mg/mL 的 PTFC 作用 K562 细胞 24 h 及 0.5 ~ 2 mg/mL 的 PTFC 作用 K562 细胞 48 h,细胞存活率差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

2 不同浓度 PTFC 作用于 Kasumi-1、K562 细胞凋亡情况比较(图 1,表 2) 用 0.125 ~ 2 mg/mL 的 PTFC 作用于 Kasumi-1、K562 细胞 24 h 后进行流式细胞术检测 Kasumi-1 细胞凋亡率分别为 2.98%、3.2%、3.66%、8.6%、19.8%,K562 细胞的凋亡率分别为 3.19%、3.19%、3.49%、7.25%、16.87%。可以诱导 Kasumi-1、K562 细胞凋亡。与空白对照组比较,PTFC 浓度为 1、2 mg/mL 时,Kasumi-1、K562 细胞凋亡率均上升($P < 0.05$)。

表 1 不同浓度 PTFC 对 Kasumi-1、K562 细胞存活率影响比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

PTFC 浓度 (mg/mL)	n	Kasumi-1 细胞存活率		K562 细胞存活率	
		24 h	48 h	24 h	48 h
空白对照	3	101.35 ± 7.50	96.24 ± 5.70	100.02 ± 4.74	98.68 ± 13.73
0.125	3	95.63 ± 3.85	81.98 ± 10.84	99.39 ± 1.43	94.63 ± 4.91
0.25	3	84.29 ± 5.93*	76.16 ± 10.58*	99.24 ± 2.27	93.42 ± 3.13
0.5	3	77.66 ± 12.08*	64.93 ± 12.95*	92.41 ± 6.83	73.71 ± 5.02*
1	3	65.66 ± 11.10*	45.39 ± 8.03*	52.72 ± 2.11*	50.75 ± 2.59*
2	3	50.27 ± 4.43*	31.34 ± 4.51*	34.33 ± 2.45*	21.30 ± 1.13*

注:与空白对照组比较,*P < 0.05

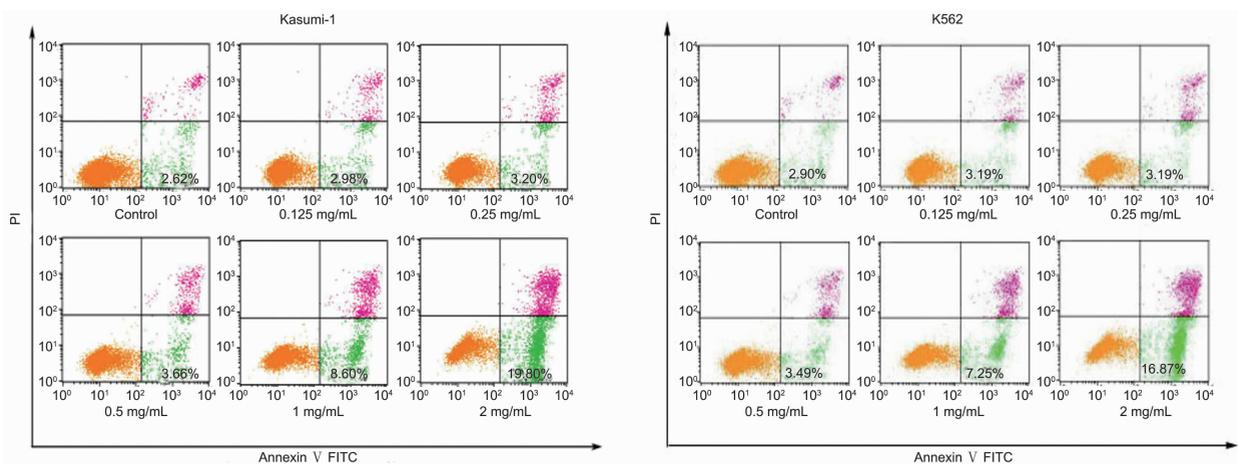


图 1 不同浓度 PTFC 作用于 Kasumi-1、K562 细胞凋亡流式检测图

表 2 不同浓度 PTFC 对 Kasumi-1、K562 细胞凋亡率影响比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

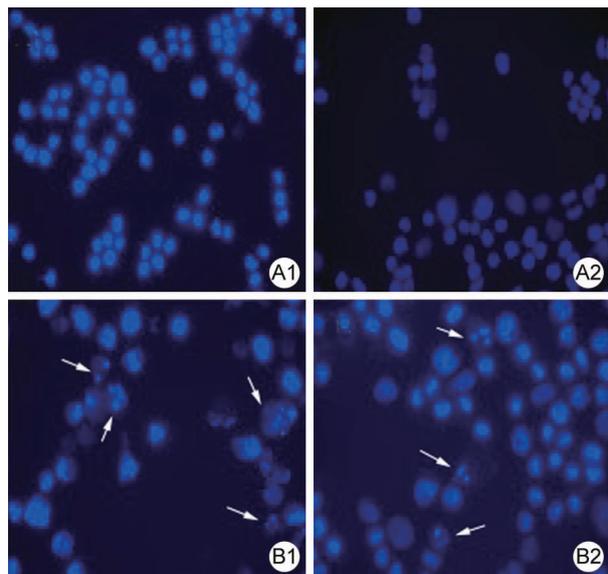
PTFC 浓度 (mg/mL)	n	凋亡率	
		Kasumi-1 细胞	K562 细胞
空白对照	3	2.62 ± 0.63	2.90 ± 0.71
0.125	3	2.98 ± 0.29	3.19 ± 0.18
0.25	3	3.20 ± 1.65	3.19 ± 0.87
0.5	3	3.66 ± 1.71	3.49 ± 0.46
1	3	8.60 ± 3.24*	7.25 ± 0.88*
2	3	19.80 ± 5.93*	16.87 ± 0.79*

注:与空白对照组比较,*P < 0.05

3 2 mg/mL 的 PTFC 作用 Kasumi-1、K562 细胞株凋亡形态(图 2) 2 mg/mL 的 PTFC 作用 Kasumi-1、K562 细胞 24 h 后,荧光倒置显微镜观察发现,与图中 A1、A2 比较,B1、B2 细胞核内可见明显凋亡小体。

4 不同浓度 PTFC 对 Kasumi-1、K562 细胞 PARP、Caspase-3、9、8 蛋白表达的影响比较(图 3,表 3) PTFC 作用 Kasumi-1 细胞 24 h 后(β -actin 为内参),在 0.5、1、2 mg/mL 的 PTFC 作用下,PARP、Caspase-9 蛋白明显激活上调(P < 0.05); 2 mg/mL 的 PTFC 作用下,Kasumi-1 细胞 Caspase-3 蛋白激活亦有统计学意义(P < 0.05)。而 Kasumi-1

细胞 Caspase-8 蛋白条带,激活不明显(P > 0.05)。PTFC 作用 K562 细胞 24 h 后,1、2 mg/mL 的 PTFC 作用下,PARP、Caspase-3、8、9 蛋白明显激活上调



注:A 为空白对照组,A1 为 Kasumi-1,A2 为 K562;B 为 2 mg/mL PTFC 组,B1 为 Kasumi-1,B2 为 K562;箭头所示为凋亡细胞凋亡小体

图 2 2 mg/mL 的 PTFC 作用 Kasumi-1、K562 细胞株凋亡形态荧光染色图 (Hoechst 33258 荧光染色, × 100)

表 3 不同浓度 PTFC 对 Kasumi-1、K562 细胞 PARP、Caspase-3、9、8 蛋白表达的影响比较 ($\bar{x} \pm s$)

PTFC 浓度 (mg/mL)	n	Kasumi-1 细胞				K562 细胞			
		PARP	Caspase-3	Caspase-9	Caspase-8	PARP	Caspase-3	Caspase-9	Caspase-8
空白对照	3	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
0.5	3	0.88 ± 0.08*	1.00 ± 0.02	1.24 ± 0.28*	1.16 ± 0.18	1.19 ± 0.02*	0.96 ± 0.07	1.06 ± 0.06	1.01 ± 0.00*
1	3	1.42 ± 0.10*	0.98 ± 0.02	1.43 ± 0.17*	1.17 ± 0.18	1.30 ± 0.03*	1.50 ± 0.04*	1.39 ± 0.15*	1.06 ± 0.02*
2	3	1.76 ± 0.11*	1.25 ± 0.09*	1.42 ± 0.06*	1.15 ± 0.15	1.34 ± 0.05*	2.58 ± 0.11*	2.18 ± 0.45*	1.08 ± 0.02*

注:与空白对照组比较,*P < 0.05

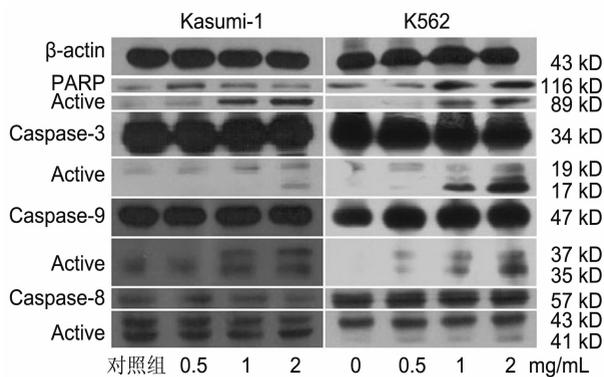


图 3 不同浓度组 PTFC 作用于 Kasumi-1、K562 蛋白表达条带图

($P < 0.05$); 0.5 mg/mL 的 PTFC 作用下, PARP、Caspase-8 蛋白激活上调差异亦有统计学意义($P < 0.05$)。

讨 论

白血病是源于造血干细胞且发病率较高的恶性肿瘤之一,占癌症总发病率的 5%,我国白血病发病率约 2.76/10 万,病死率高^[9]。迄今化疗和造血干细胞移植仍是白血病最重要和最基本的治疗手段并且是其他治疗的基础。研究表明,癌症的发生与细胞凋亡或程序化死亡的失控有关^[3]。细胞凋亡信号的感受、整合和执行的相关分子的突变和表达异常都可能导致细胞凋亡的异常和癌症的发生^[10]。因此,本研究团队认为通过某种方法途径抑制白血病细胞的凋亡,恢复增殖和凋亡之间的动态平衡,诱导白血病细胞凋亡是治疗白血病的又一思路方法。故选取白血病 Kasumi-1 和 K562 细胞株做研究,Kasumi-1 细胞株来源于人急性髓系白血病细胞,K562 细胞株来源于人慢性髓系白血病细胞,采用不同浓度 PTFC 作用于白血病 Kasumi-1、K562 细胞株发现,随着 PTFC 浓度的增加、作用时间的延长细胞存活率降低,抑制率升高,表明 PTFC 对白血病 K562 细胞株有增殖抑制作用。

为了进一步了解 PTFC 对白血病细胞株增殖抑制作用的机制,实验中采用流式细胞分析法和 Hoechst

染色法检测 PTFC 作用后的白血病 Kasumi-1、K562 细胞株,发现不同浓度及不同作用时间的 PTFC 对 Kasumi-1、K562 细胞株的凋亡率有明显差异,细胞的凋亡率随着 PTFC 浓度的增加、作用时间的延长而升高。细胞形态学呈现典型的凋亡特征性改变,核染色质凝集成团块状或凋亡小体。同时通过流式细胞术检测出细胞的早期凋亡率随着药物浓度的增加而增加。推测 PTFC 抑制 Kasumi-1、K562 细胞的增殖可能是通过诱导细胞凋亡。

在凋亡信号转导过程中,内源性细胞凋亡途径(线粒体凋亡途径)通过线粒体释放细胞色素 C 和 SmaC 蛋白参与 Caspases 的级联反应,细胞色素 C 与细胞凋亡蛋白酶活化因子-1 结合,在 ATP/dATP 存在条件下形成寡聚体,使 Caspase-9 自身剪切活化,活化的 Caspase-9 再作用于 Caspase-3 前体,水解其 C 末端的部分片段,被活化的 Caspase-3 作用于底物蛋白 Lamin(核层蛋白)、DNA 破碎因子、多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(poly ADP-ribose polymerase, PARP)、甾体激素反应元件结合蛋白 1 和 2 等,并使这些蛋白水解,最终导致了细胞凋亡发生^[11-13]。Westren Blot 实验的结果显示,经 PTFC 处理后,Kasumi-1、K562 细胞株的 PARP、Caspase-3、Caspase-9 明显激活,即随着 PTFC 作用浓度的升高,cleaved PARP、Caspase-3、Caspase-9 的量增加,Kasumi-1 细胞 Caspase-8 激活不明显,该结果说明,PTFC 引起 Kasumi-1、K562 细胞凋亡是 Caspase 依赖性的,可能是通过内源性细胞凋亡途径(线粒体凋亡)途径导致白血病细胞凋亡。本研究检测了 PTFC 引起 Kasumi-1、K562 细胞凋亡过程中凋亡信号转导的终末途径,但对在细胞凋亡过程发挥重要作用的应激活化的 MAP 激酶(stress-activated MAP kinase, SAPK)和 p38 丝裂原活化蛋白激酶是否参与 PTFC 引起白血病 Kasumi-1、K562 细胞凋亡,以及 PTFC 引起 Kasumi-1、K562 细胞凋亡过程中,凋亡信号转导的上游途径以及确切的药靶并不明了,有待进一步的研究。

综上所述,PTFC 是从葡萄柚中提取获得的黄酮

组分,它来源于天然植物,具有低毒副作用、高效和取材广泛等优点,本实验结果证实了葡萄柚黄酮组分 PFC 能够抑制白血病 Kasumi-1、K562 细胞增殖,并且可以通过内源性途径诱导白血病 Kasumi-1、K562 细胞凋亡,为临床上寻找低毒高效的白血病治疗药物提供了实验基础,但其诱导白血病细胞凋亡的具体分子生物学机制还有待进一步研究。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] 任兴华,周翠玲,卢莹,等. 5 例急性白血病患者化疗后并发完全性肠梗阻的临床分析[J]. 滨州医学院学报, 2013, 36(4): 290-291.
- [2] Qin T, Castoro R, El Ahdab S, et al. Mechanisms of resistance to decitabine in the myelodysplastic syndrome[J]. PLoS One, 2011, 6(8): e23372.
- [3] Salucci M, Stivala LA, Maiani G, et al. Flavonoids uptake and their effect on cell cycle of human colon adenocarcinoma cell (CaCo₂)[J]. Br J Cancer, 2002, 86(10): 1645.
- [4] Lee LT, Huang YT, Hwang JJ, et al. Blockade of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase activity by quercetin and luteolin leads to growth inhibition and apoptosis of pancreatic tumor cells[J]. Anticancer Res, 2002, 22(3): 16151.
- [5] Ranelletti FO, Maqqiano N, Serra FG, et al. Quercetin inhibits p21-RAS expression in human colon cancer cell lines and in primary colorectal tumors [J]. Int J Cancer, 2000, 85(3): 438-445.
- [6] Jiang JP, Wang B, Li J, et al. Total coumarins of *Hedyotis diffusa* induces apoptosis of myelodysplastic syndrome SKM-1 cells by activation of caspases and inhibition of PI3K/Akt pathway proteins [J]. J Ethnopharmacol, 2017, 196(1): 253-260.
- [7] Lin JF, Zeng H, Zhao JQ. MiR-212-5p regulates the proliferation and apoptosis of AML cells through targeting FZD5[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(23): 8415-8422.
- [8] Benites BD, da Silva Santos Duarte A, Longhini ALF, et al. Exosomes in the serum of acute myeloid leukemia patients induce dendritic cell tolerance: Implications for immunotherapy [J]. Vaccine, 2019, 37(11): 1377-1383.
- [9] Krause DS, Crispino JD. Molecular pathways: induction of polyploidy as a novel differentiation therapy for leukemia[J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(22): 6084-6088.
- [10] Erba E, Bassano L, Di Liberti G, et al. Cell cycle phase perturbations and apoptosis in tumor cells induced by apilidine [J]. Br J Cancer, 2002, 86(9): 1510-1517.
- [11] Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway[J]. Science, 2002, 296(5573): 1655-1657.
- [12] Nikrad M, Johnson T, Puthalalath H, et al. The proteasome inhibitor Bortezomib sensitizes cells to killing by death receptor ligand TRAIL via BH3-only proteins Bik and Bim [J]. Mol Cancer Ther, 2005, 4(3): 443-449.
- [13] Sikdar S, Mukherjee A, Ghosh S, et al. Condu-rango glycoside-rich components stimulate DNA damage-induced cell cycle arrest and ROS-mediated caspase-3 dependent apoptosis through inhibition of cell proliferation in lung cancer, *in vitro* and *in vivo* [J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2014, 37(1): 300-314.

(收稿: 2019-01-02 在线: 2019-04-22)

责任编辑: 段碧芳

英文责编: 张晶晶