

秦巴硒菇提取物(FA-2-b-β)对慢性髓系白血病原代细胞凋亡的影响

程明霞^{1,2}, 黄秀娟¹, 刘世栋³, 张文辉¹, 韩彩娟¹, 金大成^{1,2}, 王东萍^{1*}, 孙延庆^{1,2*} (1.甘肃省人民医院血液内科, 兰州 730000; 2.甘肃中医药大学, 兰州 730000; 3.兰州大学第一附属医院心外科, 兰州 730000)

摘要: 目的 探讨中药秦巴硒菇提取物(酸性 RNA 蛋白复合物 FA-2-b-β)对人慢性髓系白血病(chronic myeloid leukemia, CML)原代细胞系凋亡的影响。方法 采用 CCK8 法检测不同时间段(24, 48, 72 h)FA-2-b-β 作用于 CML 原代细胞的增殖抑制率; 流式细胞术检测细胞凋亡率和周期; 蛋白印迹法测定相关凋亡蛋白 Bcl-2、Bax、MET、CD44 和 β-catenin 的表达。结果 FA-2-b-β 抑制 CML 原代细胞增殖, 并呈时间、浓度依赖性。FA-2-b-β 处理后, CML 原代细胞凋亡率明显升高, 促凋亡蛋白 Bax 表达升高, 抗凋亡蛋白 Bcl-2、MET、CD44 和 β-catenin 表达降低。结论 秦巴硒菇提取物通过下调凋亡相关蛋白抑制 CML 原代细胞增殖并诱导细胞凋亡, 表现出较强的体外抗白血病作用。

关键词: 秦巴硒菇; 慢性髓系白血病; 原代白血病细胞; 细胞凋亡; 细胞周期

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2020)20-2433-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.20.001

引用本文: 程明霞, 黄秀娟, 刘世栋, 等. 秦巴硒菇提取物(FA-2-b-β)对慢性髓系白血病原代细胞凋亡的影响[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(20): 2433-2437.

Study of Qinba Mushroom Extract (FA-2-b-β) on Apoptosis of Chronic Myeloid Leukemia Primary Bone Marrow Cell

CHENG Mingxia^{1,2}, HUANG Xiujuan¹, LIU Shidong³, ZHANG Wenhui¹, HAN Caijuan¹, JIN Dacheng^{1,2}, WANG Dongping^{1*}, SUN Yanqing^{1,2*} (1.Department of Hematology, Gansu Provincial People's Hospital, Lanzhou 730000, China; 2.Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 3.Department of Interventional Radiology, The First Hospital of Lanzhou University; Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effect of acidic RNA protein complex (FA-2-b-β) extracted from Qinba mushroom on apoptosis of primary human chronic myeloid leukemia(CML) bone marrow cell line. **METHODS** The cell proliferation rate was measured by CCK8 method at different time(24, 48, 72 h) points. Flow cytometry was used to detect cell apoptotic rate and cell cycle. Western blotting was used to detect the expression of Bcl-2, Bax, MET, CD44 and β-catenin protein. **RESULTS** FA-2-b-β inhibited the proliferation of primary CML bone marrow cell line effectively in a dose and time dependent manner. After treated with Qinba mushroom, the apoptosis rates of primary CML bone marrow cell line increased, the expression of Bax increased, and the expression of Bcl-2, MET, CD44, β-catenin decreased. **CONCLUSION** Qinba mushroom extract inhibits proliferation, induces apoptosis of primary CML bone marrow cell line by regulating the related apoptotic protein. Qinba mushroom has strong anti-leukemia effect *in vitro*.

KEYWORDS: Qinba mushroom; chronic myeloid leukemia; primary CML bone marrow cell; cell apoptosis; cell cycle

慢性髓系白血病(chronic myeloid leukemia, CML)是一种起源于骨髓多能造血干细胞, 由双向多能造血干细胞衍生而来的骨髓恶性克隆增殖性肿瘤^[1]。其特征为费城染色体(Ph)(9: 22)(q34: q11)相互移位形成 BCR-ABL 致癌基因, 并通过下游效应分子磷酸化驱动 CML 的发生。CML 的治疗药物主要是 BCR-ABL 酪氨酸激酶抑制剂伊马替尼,

其临床治疗疗效好, 能明显改善 CML 患者的预后, 延长生存期。然而, 随着治疗时间的延长, 部分患者出现耐药, 复发, 甚至导致心、肝、脾、肺、肾、内分泌等代谢系统不良反应, 因此 CML 新的调控及干预机制有待更深入的探究。研究发现近几十年的抗肿瘤新药约 50%是自然界中传统药物提取而来^[2]。人们试图从传统药物中寻找价格低

基金项目: 国家自然科学基金项目(81560670); 甘肃省自然科学基金项目(1606RJZA089); 甘肃省中医药科学技术研究课题(GZK-2011-71); 甘肃省中医药管理局科研课题(GZK-2013-8)

作者简介: 程明霞, 女, 硕士, 住院医师 Tel: (0931)8281575 E-mail: CMX17393194699@126.com **共同第一作者:** 黄秀娟, 女, 硕士, 住院医师 Tel: (0931)8281575 E-mail: 1019721701@qq.com ***通信作者:** 孙延庆, 男, 博士, 主任医师, 教授 Tel: (0931)8281575 E-mail: 18394496255@163.com 王东萍, 女, 硕士, 主治医师 Tel: (0931)8281575 E-mail: wangdongping1016@126.com

廉、多靶点、不良反应小的药物为 CML 治疗提供新的方案。补充和替代医学(complementary and alternative medicine, CAM)已被用于治疗各种疾病,包括肿瘤^[3]。

秦巴硒菇又名姬松茸、梁金菇,属于担子菌纲,在我国福建、湖北、陕西、云南等多地种植,营养和药用价值丰富,是一种药食兼用的珍稀菌类。研究发现秦巴硒菇提取物作为一种极具潜力的新型抗肿瘤 CAM^[4],能抑制肿瘤细胞增殖,且未见明显的生物学毒性^[5]。秦巴硒菇提取物之一蛋白葡聚糖,具有诱导肿瘤细胞凋亡,调节自然杀伤细胞活性和抑制巨噬细胞激活的作用^[6],能够有效抑制多种肿瘤细胞的生长,提高实验动物生存率。课题组前期研究发现秦巴硒菇提取物酸性 RNA 蛋白复合物 FA-2-b- β 通过 caspase 信号通路诱导 CML 细胞 HL60 发生凋亡,并协同叠氮氨基酸(3'-azido-3'-deoxythymidine, AZT)促进胃癌细胞株 MKN45 凋亡、对 AZT 抗肿瘤效应具有增敏作用^[7]。本研究选取 CML 原代细胞,通过体外实验探讨秦巴硒菇提取物 FA-2-b- β 对 CML 原代细胞凋亡的影响及机制。

1 材料和方法

1.1 细胞

原代细胞株分离自甘肃省人民医院初诊 CML 患者骨髓,并在 RPMI 1640(美国 Gibco 公司,批号: E210702)中培养,辅以 10%热灭活血清(美国 Gibco 公司,批号: 11E034)。

1.2 试剂

CCK8 试剂盒(贝博公司,批号:LF676);CD44、MET、Bcl-2 和 β -catenin 抗体均购自美国 Cell Signaling Technology 公司,批号: 3570;蛋白酶检测试剂盒(索莱宝公司,批号: 20190307);细胞凋亡检测试剂盒(索莱宝公司,批号: HC0318)。

1.3 药品

秦巴硒菇由陕西紫阳公司提供,其提取物酸性 RNA 蛋白复合物(FA-2-b- β)由中国兰州大学化学与工程学院天然产物研究室分离,按文献^[8]方法提取,500 g 国产秦巴硒菇水溶多糖经分离纯化后可得到 4.86 g FA-2-b- β 。PBS 配成所需浓度,灭菌,4 °C 冰箱保存,备用。

1.4 方法

1.4.1 CCK8 法检测细胞凋亡率 将密度为 1×10^4 个细胞接种于 96 孔板,37 °C,5%的 CO₂ 饱和湿度培养箱,0,1.2,1.5,1.8,2.1,2.4 mg·mL⁻¹ 的 FA-2-b- β

作用于生长对数期原代细胞、每孔 100 μ L,每组 5 个复孔,分别培养 24,48,72 h,培养终止前加 10 μ L CCK8 试剂;4 h 后 96 孔板置于振荡器上震荡 5 min,酶标仪测 450 nm 处吸光度值。

1.4.2 流式细胞术检测细胞凋亡 取对数生长期细胞,将 10×10^5 个细胞接种到 6 孔板中,加入不同浓度梯度的 FA-2-b- β (0,1.2,1.5,1.8,2.1,2.4 mg·mL⁻¹),培育 48 h 后,各组细胞离心后收集,用 PBS 洗涤细胞 2~3 次,加入 100 μ L loading Buffer,制成单细胞悬液,然后依次加入 Annexin V-FITC 和 PI 各 5 μ L,混匀室温避光 30 min,流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.4.3 流式细胞术检测细胞周期 取对数生长期细胞,将 10×10^5 个细胞接种到 6 孔板中,加入不同浓度的 FA-2-b- β (0,1.2,1.5,1.8,2.1,2.4 mg·mL⁻¹),处理 48 h 后收集细胞,预冷 PBS 洗 2~3 次,将细胞悬于预冷 75%的乙醇中,-20 °C 固定过夜,次日加 RNase A 400 μ L,37 °C 水浴 30 min,再加入 50 μ L PI 染液,缓慢并充分重悬细胞,流式细胞术检测细胞周期。

1.4.4 蛋白印迹法 蛋白印迹法检测 Bcl-2, Bax, β -catenin, CD44 及 MET 表达水平,Actin 为内参蛋白;不同药物浓度 FA-2-b- β (0,1.2,1.8,2.4 mg·mL⁻¹)作用于原代细胞 48 h 后,收集细胞并用预冷 PBS 洗涤 2~3 次。加入含有 1 mmol·L⁻¹ PMSF 的 RIPA 缓冲液裂解。4 °C 离心 15 min,BCA 蛋白质测定试剂盒进行总蛋白定量,取等量蛋白样品,SDS-PAGE 后将分离蛋白质转移至 PVDF 膜上,将膜用 PBS-Tween 20 中的 5%脱脂奶粉封闭 2 h,加入按相应比例稀释的一抗 4 °C 孵育过夜。然后加入二抗孵育 2 h, TBST 洗涤 2~3 次,然后进行曝光显影。

1.4.5 统计学分析 以上实验数据进行 3 次相似独立重复实验,统计软件使用 SPSS 21.0 进行数据分析,结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组数据间用独立样本 *t* 检验进行分析,2 组或者多组数据间则用单向方差分析。所有实验结果的分析都采用双尾 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FA-2-b- β 对原代细胞系增殖抑制率

不同时间段 FA-2-b- β 对原代细胞生长具有增殖抑制作用,且呈浓度时间依赖性,结果见图 1[存活率=(实验组 OD-空白对照 OD)/(对照组 OD-空

白对照 OD)]。

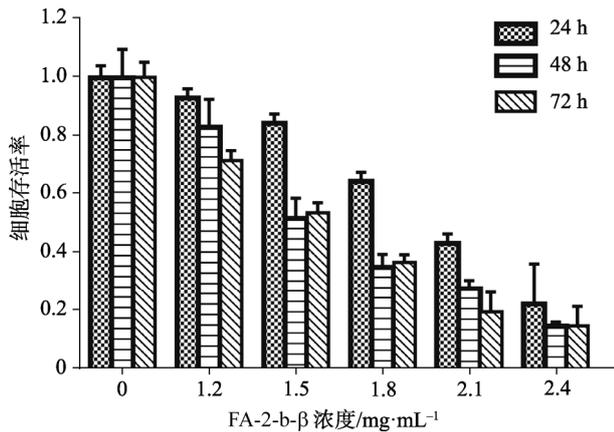


图 1 FA-2-b-β 对 CML 原代细胞的增殖抑制作用
Fig. 1 FA-2-b-β inhibited the growth capacity of primary CML bone marrow cell cells

2.2 FA-2-b-β 诱导原代细胞凋亡

FA-2-b-β 诱导肿瘤细胞凋亡, 总细胞凋亡率包括明显的早期凋亡率(右下象限)和晚期凋亡(右

上象限)率, 结果见图 2。结果表明, 不同浓度(0, 1.2, 1.5, 1.8, 2.1, 2.4 mg·mL⁻¹)的 FA-2-b-β 处理细胞 48 h 后, 细胞凋亡率依次为 0.43%, 3.47%, 33.18%, 71.83%, 78.98%, 93.45%, 随着浓度的增加, 细胞凋亡率显著上升。

2.3 FA-2-b-β 对原代细胞周期的实验分析

将原代细胞与不同浓度(0, 1.2, 1.5, 1.8, 2.1, 2.4 mg·mL⁻¹)的 FA-2-b-β 置于适当培养基培育 48 h, 与对照组相比, G1 百分比增加, 依次为 33%, 37%, 43%, 54%, 63%, 89%, 结果见图 3。

2.4 蛋白印迹法

通过蛋白免疫印迹法测定 β-catenin 相关凋亡蛋白表达, 结果见图 4。不同浓度的 FA-2-b-β 处理原代细胞 48 h 后, 与对照组相比, Wnt 信号下游的靶标及相关抗凋亡蛋白 Bcl-2、MET、CD44 和 β-catenin 以浓度依赖性方式降低, 促凋亡蛋白 Bax 以浓度依赖性方式增加。

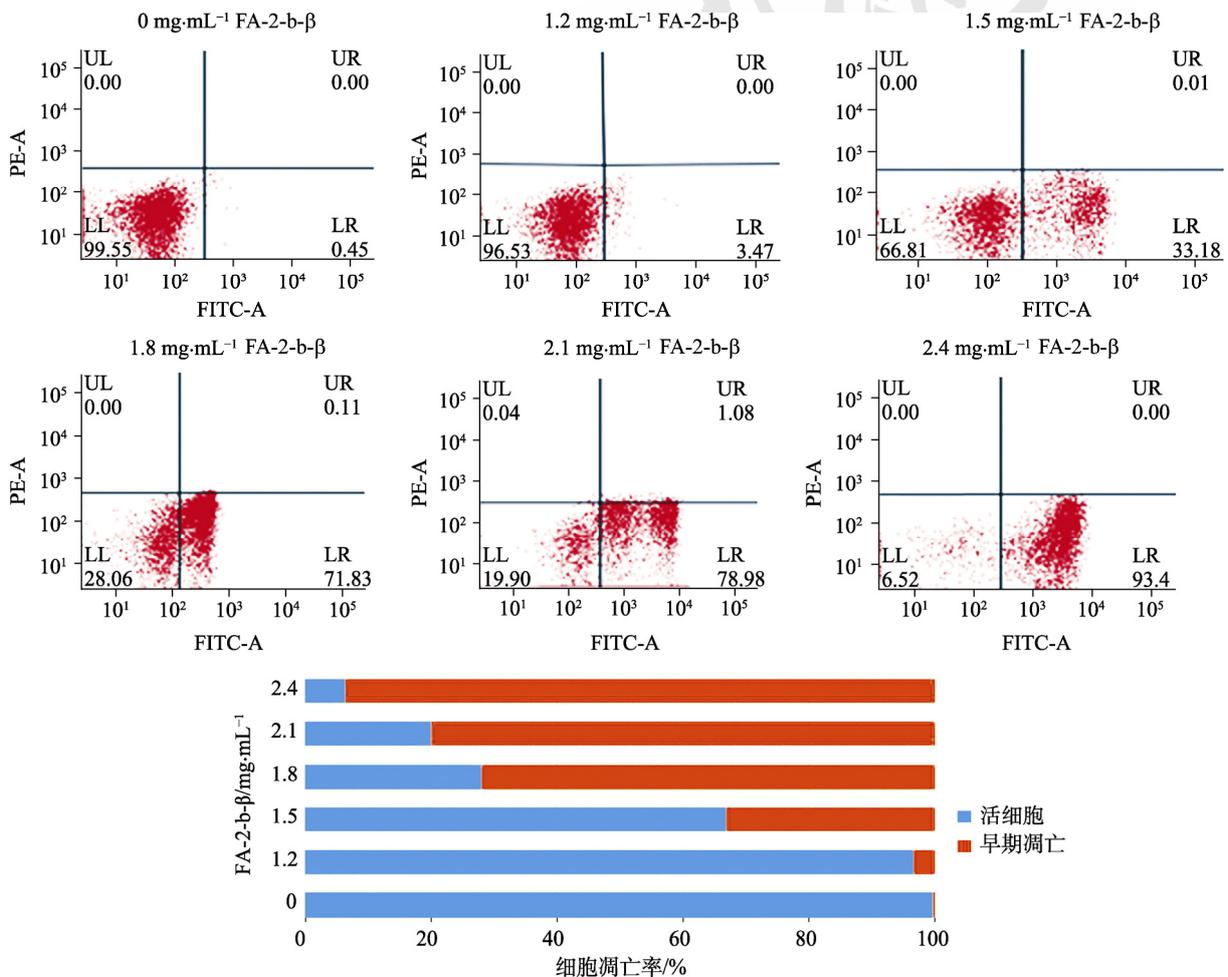


图 2 FA-2-b-β 对 CML 原代细胞凋亡的影响
Fig. 2 Effects of FA-2-b-β on primary CML bone marrow cell apoptosis

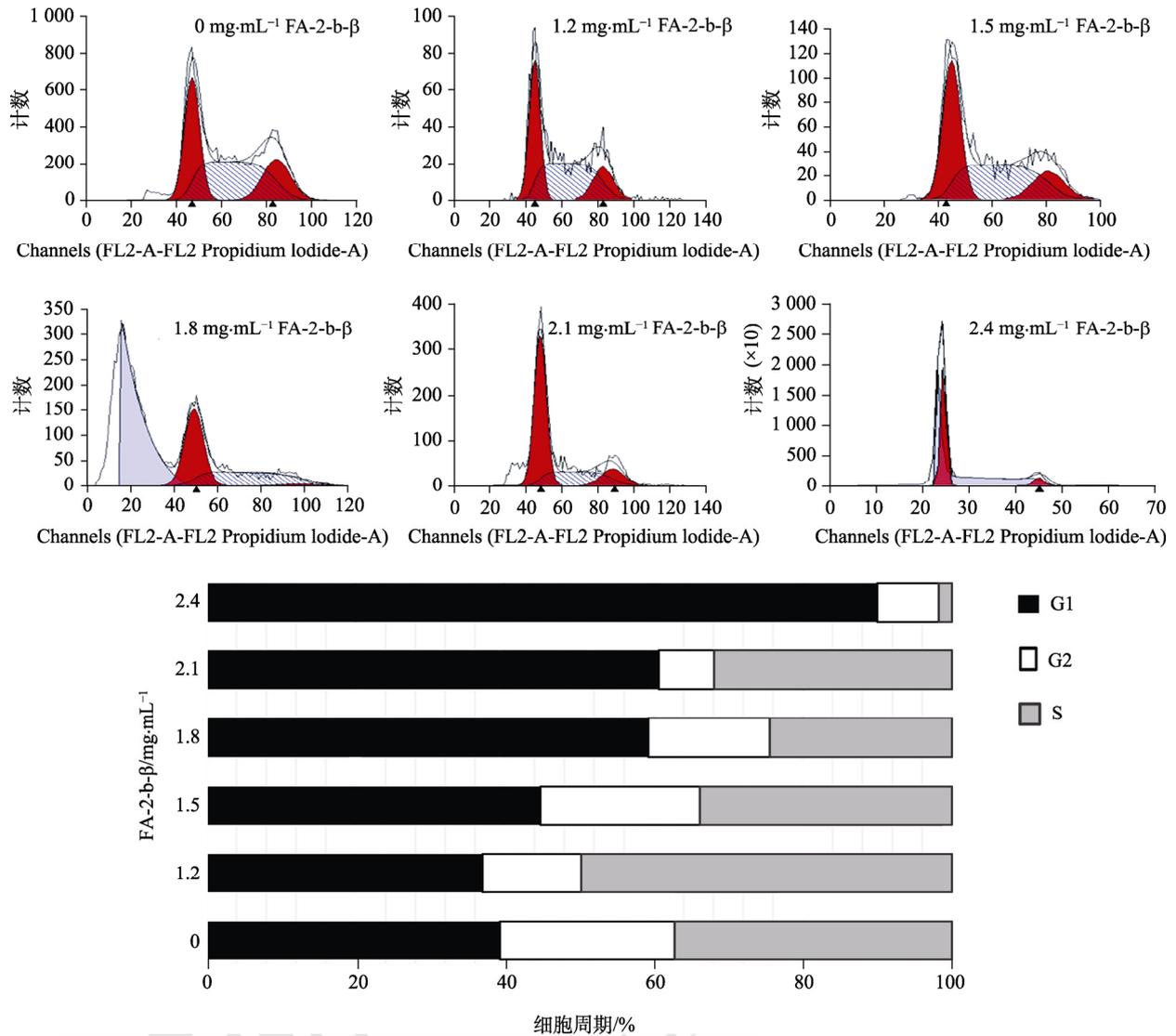


图3 FA-2-b-β对CML原代细胞周期的影响
Fig. 3 Effects of FA-2-b-β on primary CML bone marrow cell cycle

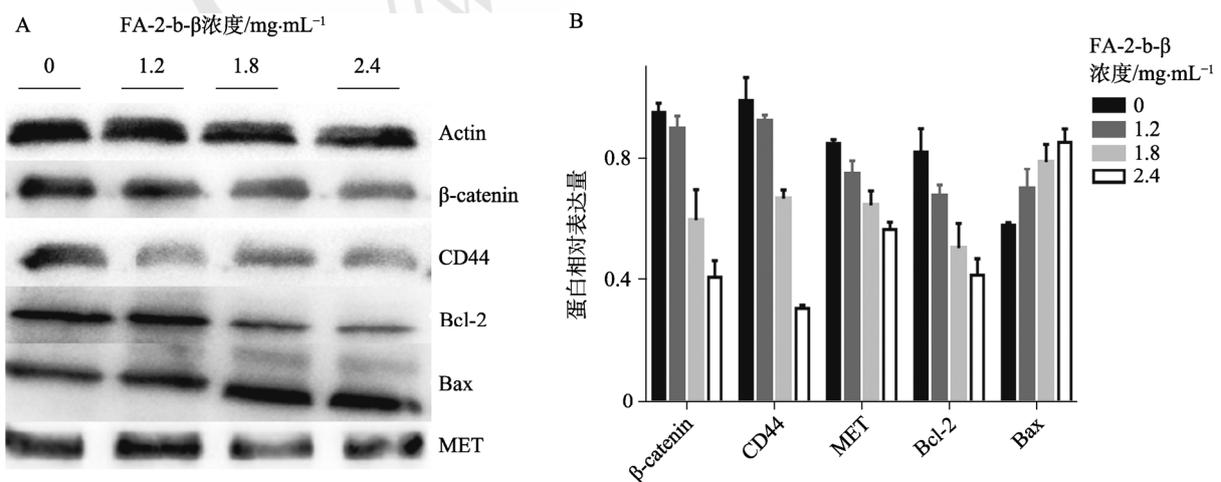


图4 Western blotting检测FA-2-b-β对Bcl-2、MET、CD44、β-catenin及Bax的影响
Fig. 4 Effect of FA-2-b-β on Bcl-2, MET, CD44, β-catenin and Bax determined by Western blotting

3 讨论

秦巴硒菇具有抗肿瘤、降血脂、抗凝血、安神和提高免疫力等功效。秦巴硒菇提取物 FA-2-b-β 调节凋亡蛋白的表达使肿瘤细胞发生凋亡^[9]。本研究通过流式细胞术观察到不同浓度的 FA-2-b-β 作用于原代细胞后,细胞凋亡率上升,细胞周期阻滞在 G1 期。有研究指出 β-catenin 与 CML 有显著关联,CD44 作为黏附分子,对于 CML 干细胞非常重要^[10-11]。虽然 β-catenin 和 CD44 是 2 种不同的黏附分子,前者在细胞核里促进多种基因转录,后者则在细胞表面作为受体介导黏附。但两者之间有许多共同之处,均通过信号分子以细胞骨架关联,影响细胞黏附,促进细胞生存^[12]。β-catenin 和 CD44 任一信号途径激活,都会促进另一信号途径的作用^[13-14],在 CML 加速和急变过程起关键性作用。为此本课题组通过蛋白印迹法检测发现 CML 原代细胞中,β-catenin 和 CD44 高表达,当不同浓度的 FA-2-b-β 作用于生长状态良好的原代细胞后,导致胞质中的 β-catenin 大量积累并转位入核,与转录因子 LEF/TCF 结合,抑制 β-catenin 和 LEF/TCF 的核定位,破坏 β-catenin 和 LEF/TCF 复合物,使 Wnt/β-catenin 下游中抑制凋亡蛋白 Bcl-2, MET 表达降低,促凋亡蛋白 Bax 表达上调,进而导致原代细胞发生凋亡并且使细胞周期停滞在 G1 期,抑制 DNA 的合成,从而抑制 CML 原代细胞的生长,引起 CML 原代细胞发生凋亡。这揭示了 Wnt/β-catenin 表达变化影响了下游相关凋亡蛋白表达水平,进而影响肿瘤细胞的生长,与先前学者研究一致^[15-16]。该研究结果揭示 FA-2-b-β 促进 CML 原代细胞凋亡是通过 Wnt/β-catenin 和 CD44 信号通路介导的。

综上所述,秦巴硒菇提取物 FA-2-b-β 通过调控凋亡蛋白 β-catenin、CD44、Bcl-2, MET 和 Bax 抑制 CML 原代细胞增殖并诱导其凋亡,将细胞周期阻滞在 G1 期,在体外具有较强的抗白血病效应。秦巴硒菇抑制 CML 细胞增殖并诱导其凋亡的其他通路和更深入的分子生物学机制,有待体内外实验进一步验证。

REFERENCES

- [1] HUGHES T P, MAURO M J, CORTES J E, et al. Asciminib in chronic myeloid leukemia after ABL kinase inhibitor failure [J]. *N Engl J Med*, 2019, 381(24): 2315-2326.
- [2] MATSUSHITA Y, FURUTANI Y, MATSUOKA R, et al. Hot water extract of *Agaricus blazei* Murrill specifically inhibits growth and induces apoptosis in human pancreatic cancer cells[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2018, 18(1): 319.
- [3] CEVIK A B, AKINCI A C, BAGLAMA S S. The use of complementary and alternative medicine among lymphoma and cancer patients with a solid tumor: Oncology clinics at Northern and Southern Turkey [J]. *Complement Ther Med*, 2019(47): 102173.
- [4] 王东萍, 石玮, 葛万文, 等. 秦巴硒菇提取物 FA-2-b-β 诱导 CD34⁺CD38⁻KG1a 白血病干细胞凋亡及其相关机制[J]. *中国实验血液学杂志*, 2019, 27(6): 1761-1766.
- [5] WANG H T, YANG L C, YU H C, et al. Characteristics of fucose-containing polysaccharides from submerged fermentation of *Agaricus blazei* Murrill [J]. *J Food Drug Anal*, 2018, 26(2): 678-687.
- [6] WU S, LI F, JIA S, et al. Drying effects on the antioxidant properties of polysaccharides obtained from *Agaricus blazei* Murrill [J]. *Carbohydr Polym*, 2014(103): 414-417.
- [7] SUN Y Q, GUO T K, XI Y M, et al. Effects of AZT and RNA-protein complex (FA-2-b-beta) extracted from *Liang Jin* mushroom on apoptosis of gastric cancer cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(31): 4185-4191.
- [8] AKIYAMA H, ENDO M, MATSUI T, et al. Agaritine from *Agaricus blazei* Murrill induces apoptosis in the leukemic cell line U937 [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1810(5): 519-525.
- [9] HAMAD A, SAHLI Z, EL SABBAN M, et al. Emerging therapeutic strategies for targeting chronic myeloid leukemia stem cells [J]. *Stem Cells Int*, 2013(2013): 724360.
- [10] LI W, JI M, LU F, et al. Novel AF1q/MLLT11 favorably affects imatinib resistance and cell survival in chronic myeloid leukemia [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(9): 855.
- [11] CHOKCHAITAWESUK C, KOBAYASHI T, IZUMIKAWA T, et al. Enhanced hexosamine metabolism drives metabolic and signaling networks involving hyaluronan production and O-GlcNAcylation to exacerbate breast cancer [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(11): 803.
- [12] LIN L, WEI H, YI J, et al. Chronic CagA-positive *Helicobacter pylori* infection with MNNG stimulation synergistically induces mesenchymal and cancer stem cell-like properties in gastric mucosal epithelial cells [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(10): 17635-17649.
- [13] ZHOU Y, LI H, GUO Q L. Advances in the Treatment of targeting specific gene subtypes of acute myeloid leukemia [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2019, 36(10): 1297-1303.
- [14] BURSLEM G M, SCHULTZ A R, BONDESON D P, et al. Targeting BCR-ABL1 in chronic myeloid leukemia by PROTAC-mediated targeted protein degradation [J]. *Cancer Res*, 2019, 79(18): 4744-4753.
- [15] XU J J, GE M H, ZHENG G W, et al. Apoptosis induced by the C21 Sterols in *Marsdenia Tenacissima* Caulis and its molecule mechanism of action in SACC-83 and SACC-LM Cells [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2019, 36(10): 1205-1211.
- [16] JIANG W G, SANDERS A J, KATOH M et al. Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives [J]. *Semin Cancer Biol*, 2015, 35(Suppl): S244-S275.

收稿日期: 2019-12-19
(本文责编: 曹粤锋)