

· 论 著 ·

## 槐耳清膏对 K562细胞体外作用研究

王运玉 吴柱国

**【摘要】目的** 通过用不同浓度的槐耳清膏作用于体外培养的 K562细胞,探讨槐耳清膏对 K562细胞的增殖抑制及凋亡诱导作用。**方法** 应用 MTT法、细胞形态学观察以及流式细胞术观察槐耳清膏对体外培养的 K562细胞的增殖抑制及凋亡诱导作用。**结果** MTT法结果显示:在终浓度分别为 0.5、1、2、4和 8 mg/ml的槐耳清膏作用于体外培养的 K562细胞 12、24、36、48、72 h后,槐耳清膏抑制细胞增殖作用随着浓度增加及培养时间延长而逐渐增强,与对照组相比差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。流式细胞技术显示:不同浓度的槐耳清膏作用于 K562细胞 48 h后,随着浓度的增加,凋亡细胞百分比逐渐增加,与对照组相比差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。**结论** 槐耳清膏在体外对 K562细胞有抑制增殖和诱导凋亡的作用。

**【关键词】** 槐耳清膏; 凋亡; K562细胞; 白血病

**Effects of extractum trametes robiniphila murr on K562 cells in vitro** Wu Yunyu, Wu Zhuguo  
Hui Zhou Municipal Central Hospital, Zhanjiang Guangdong 516001, China  
Corresponding author: Wu Zhuguo Email: Wugdmc@126.com

**【Abstract】Objective** To investigate the effects of extractum trametes robiniphila murr on the proliferation and apoptosis of K562 cells, cells were treated with different concentrations of extractum trametes robiniphila murr. **Methods** K562 cells were cultured *in vitro*, and logarithmic phase cells were used for study. MTT-inhibitory test and cell morphological analysis were used to examine the effects of extractum trametes robiniphila murr on the proliferation of K562 cells. The effects of extractum trametes robiniphila murr on apoptosis of K562 cells were examined by flow cytometry. **Results** MTT results showed that the inhibition ratio of K562 cells proliferation increased and had a dose-and time-dependent manner after cells were treated with 0.5, 1, 2, 4 and 8 mg/ml concentration of extractum trametes robiniphila murr for 12, 24, 36, 48 and 72 h. Compared with the control group, the difference had statistical significance ( $P < 0.01$ ).  $IC_{50}$  of this polysaccharide in 12, 24, 36, 48 and 72 h was separately 7.86, 4.64, 3.06, 1.92 and 1.84 mg/ml. Flow cytometry method results indicated that the apoptosis ratio of K562 cells for 48 h increased with the increasing of concentration of extractum trametes robiniphila murr, and the difference had statistical significance ( $P < 0.01$ ) compared with the control group. Extractum trametes robiniphila murr could induce cell apoptosis in a dose-dependent manner. **Conclusion** Extractum trametes robiniphila murr could inhibit proliferation and induce apoptosis of K562 cells *in vitro*.

**【Key words】** Atractum trametes robiniphila murr; Apoptosis; K562 cell; Leukemia

白血病的治疗仍为当今一大难题,化疗是目前

治疗白血病最常用的手段,但常规化疗药物不仅毒副作用大,而且耐药现象也逐渐显现,因此寻找高效、低毒的新型抗肿瘤药物成为白血病治疗的重要课题之一。槐耳是一种入药 1500 余年但已湮没

作者单位: 516001 惠州市中心人民医院儿科,广东惠州  
(王运玉);广东医学院科技处(吴柱国)

通讯作者: 吴柱国 Email: wugdmc@126.com

300余年的重要药用真菌,槐耳清膏是药用真菌槐耳菌质发酵后的热水提取物,含有多有机成分、10余种矿物质元素,其主要活性成分是多糖蛋白,由6种单糖组成的杂多糖结合18种氨基酸构成<sup>[1]</sup>。目前已有成品槐耳颗粒(商品名:金克)应用于肝癌、胃癌、食管癌、肺癌、乳腺癌、白血病、恶性淋巴瘤等多种肿瘤的临床治疗,取得一定的疗效。然而,槐耳清膏的抗癌作用机理,特别是与细胞增殖、凋亡有关的研究较少,其对白血病K562细胞增殖、凋亡的影响尚未见报道,本实验通过观察槐耳清膏对K562细胞增殖、凋亡的影响,为槐耳清膏在白血病治疗中的应用提供实验依据。

### 材料和方法

1 材料 K562细胞购自中国科学院上海细胞库,培养液为含10%新生牛血清(购于杭州四季青生物公司)终浓度为100 U/ml的青霉素和链霉素的RPMI 1640(购于Gibco, USA公司)液体培养体系,置37℃、5% CO<sub>2</sub>恒温培养箱中培养,每两天换液一次,实验选用对数生长期细胞。槐耳清膏由江苏启东盖天力药业有限公司提供。MTT、PI、RNaseA均为Sigma USA公司产品。丹尼酶标仪(MK-3)购自丹麦,EPICSXL流式细胞仪购自COWTER COU. USA。

2 药品配置 精确称取槐耳清膏10.0 g,溶于100 ml单RPMI 1640培养液,以0.22 μm超滤除菌器过滤除菌,制成100 mg/ml的槐耳清膏浓缩含药培养液。临用前用培养液分别稀释成0.5~8 mg/ml的工作液。

### 3 检测指标及方法

3.1 体外药物MTT实验及细胞形态学观察 计算抑制率采用MTT法,取对数生长期、生长良好的K562细胞,0.4%台盼蓝染色计数活细胞(活细胞5%)用于实验,调整各组细胞浓度为 $2 \times 10^5$  /ml,每组设6个复孔。阴性对照组加入含细胞的RPMI 1640培养液,各实验组分别加入槐耳清膏终浓度为0.5、1、2、4和8 mg/ml的含细胞的培养液,每组均设空白对照孔(为无细胞的相应浓度的含药培养液,为消除药物自身颜色对吸光度的影响)。接种完毕后在37℃、5% CO<sub>2</sub>条件下孵育培养12、24、36、48、72 h后,每孔加入MTT溶液(5 mg/ml)10 μl混匀后37℃、5% CO<sub>2</sub>条件下孵育4 h,离心去除上清,加入DMSO 100 μl摇床振荡充分溶解30 min后,用丹尼酶标仪检测各组细胞的吸光度,测定波长为

570 nm,校正波长为630 nm。计算:肿瘤抑制率 = 1 - (实验组光密度 - 空白对照组光密度) / (阴性对照组光密度 - 空白对照组光密度) × 100%。

按改良Karber公式计算半数抑制率( $IC_{50}$ ):

$$\lg IC_{50} = X_m - 1(P - (3 - P_m - P_n) / 4)$$

X<sub>m</sub>: lg最大剂量 I lg(最大剂量 相临剂量) P:阳性反应率之和 P<sub>m</sub>:最大阳性反应率

形态学观察实验分组同MTT法检测细胞增殖抑制部分,分别作用48 h后,于倒置显微镜下观察细胞形态变化,并拍照。

3.2 流式细胞术检测细胞凋亡 分别收集终浓度为0.5、1、2、4、0.8 mg/ml的槐耳清膏作用48 h后的K562细胞,加入冷PBS洗涤离心2次,用70%冰乙醇固定12~24 h(4℃),调整细胞数为 $1 \times 10^6$  /ml,冷PBS洗涤2次,除去乙醇。加入PI染液4 避光染色30 min后,用300目(孔径40~50 μm)尼龙网过滤后上机检测。采用488 nm激发波长检测细胞核中PI荧光强度,打印DNA含量分布图。

4 统计学方法 本实验计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用SPSS 13.0统计软件进行统计描述,多个样本均数的比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),多个样本均数间每两个均数的比较根据方差齐性检验(Homogeneity-of-Variance),当总体方差齐同时选择LSD法;当方差不齐时,选择Tamhane's T2法,  $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

### 结 果

1 槐耳清膏对K562细胞的增殖抑制作用 以不同终浓度(0、0.5、1、2、4和8 mg/ml)的槐耳清膏作用于K562细胞12、24、36、48和72 h后,用MTT法,槐耳清膏对细胞增殖的抑制作用,随着药物浓度的增加、作用时间的延长,细胞抑制率明显增加(见表1,图1)。在8 mg/ml作用72 h后,细胞抑制率最高,达到(81.39 ± 2.70)%。其中12、24、36、48和72 h的半数抑制率( $IC_{50}$ )分别为7.86、4.64、3.06、1.92和1.84 mg/ml。各实验组与对照组比较,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。细胞形态学观察如图2~7所示,槐耳清膏以不同浓度(0、0.5、1、2、4和8 mg/ml)作用于K562细胞48 h, K562细胞的活细胞数随着槐耳清膏浓度的增加胞体逐渐变小,其细胞数亦减少。相差显微镜下可见部分较小细胞先是核膜边缘出现多个突起后,细胞逐渐缩小、碎裂、分散、死亡,浓度越高,细胞死亡越多。当槐耳清膏终浓度

为 8 mg/m 培养 48 h,几乎没有活细胞存在。

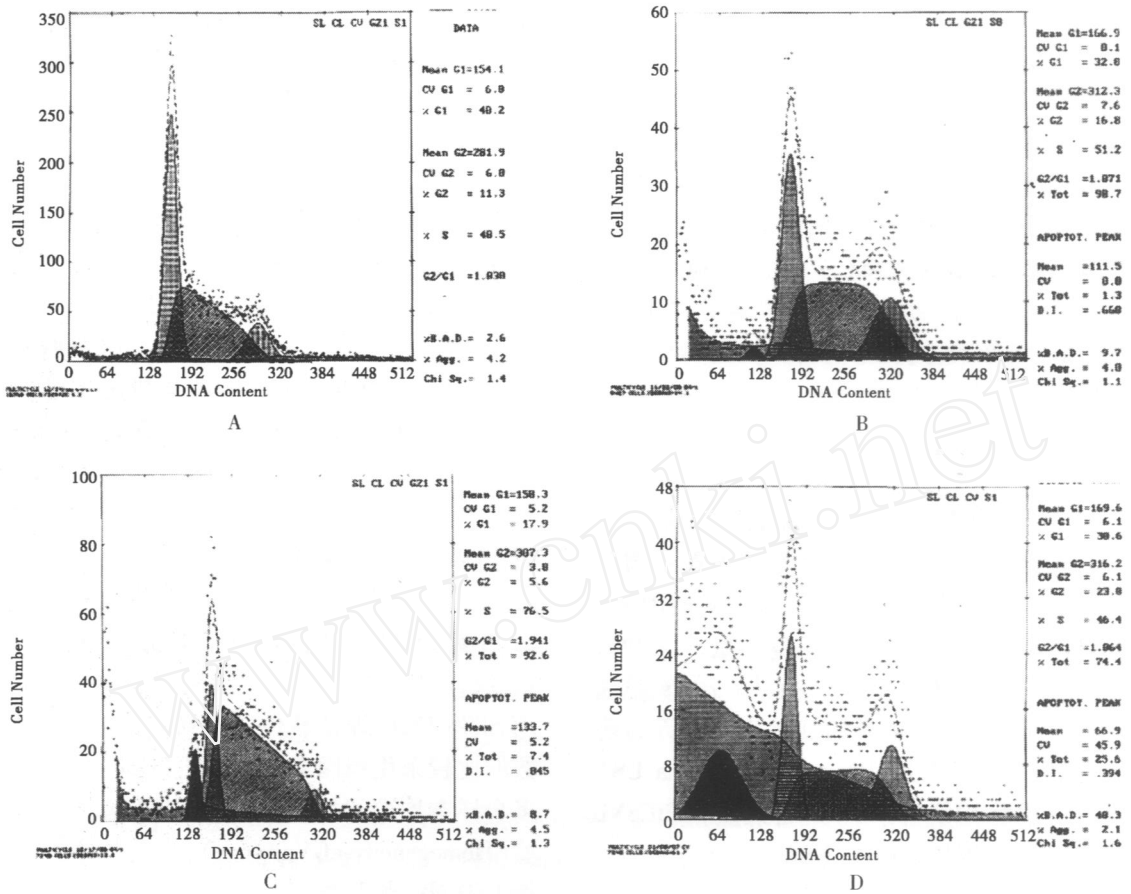


图 2 流式细胞术分析不同浓度的槐耳清膏对 K562细胞凋亡率的影响

A contr(0 mg/ml) B 0.5 mg/ml C 2 mg/ml D 8 mg/ml

2 槐耳清膏对 K562细胞的诱导凋亡作用 流式细胞仪检测结果(表 2)显示,分别用终浓度为 0 μg/ml、0.5、1、2、4和 8 mg/ml的处理 K562细胞 48 h后)结

果,随着槐耳清膏浓度增加,亚二倍峰(凋亡峰)所占比例逐渐增大,与对照组比较差异具有统计学意义(P < 0.05)。

表 1 槐耳清膏对 K562细胞的增殖抑制率 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

浓度 (mg/ml)	作用不同时间的抑制率 (%)				
	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h
0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.5	5.54 ± 0.51**	10.14 ± 1.07**	15.09 ± 1.58**	21.45 ± 1.72**	28.22 ± 1.16**
1	13.31 ± 1.89**	20.07 ± 1.26**	28.82 ± 2.77**	34.64 ± 1.61**	38.49 ± 2.67**
2	32.56 ± 2.37**	39.95 ± 2.27**	46.07 ± 2.37**	52.12 ± 1.81**	58.20 ± 2.34**
4	39.69 ± 4.28**	48.59 ± 1.58**	55.20 ± 3.58**	60.84 ± 2.42**	68.99 ± 1.82**
8	52.31 ± 1.99**	60.88 ± 2.48**	67.08 ± 2.01**	74.26 ± 2.3**	82.39 ± 2.70**

One-Way ANOVA, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, compaled with control group; P < 0.05, compaled with foretime; P < 0.05, compaled with foredose

表 2 流式细胞术分析不同浓度的槐耳清膏刺激 K562细胞时对细胞凋亡率的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

浓度 (mg/ml)	<i>n</i>	凋亡率 (%)
0.0		0.21 ± 0.13
0.5		1.18 ± 0.19*
1.0		3.40 ± 0.22**
2.0		7.38 ± 0.21**
4.0		13.37 ± 0.31**
8.0		25.30 ± 0.31**

One-Way ANOVA, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , compared with control group

## 讨 论

槐耳是一种药用真菌。其主要抗癌活性成分为蛋白多糖 (PS-T)。本实验应用槐耳清膏作用于体外培养的 K562细胞,通过 MTT抑制实验和细胞形态学观察 K562细胞增殖抑制情况,检测槐耳清膏对 K562细胞增殖的影响<sup>[2]</sup>。结果表明槐耳清膏对体外培养的 K562细胞的生长具有明显的抑制作用,其抑制强度随槐耳清膏浓度的增加和作用时间的延长而增强。槐耳清膏对 K562细胞增殖抑制的机理尚未完全明确。本组实验证实槐耳清膏诱导 K562细胞凋亡是其抑制增殖的重要机理之一。

自细胞凋亡 (apoptosis)的概念建立以来,其与人类疾病特别是与肿瘤的关系一直是医学界研究的热点。人们认识到肿瘤的发生不仅和细胞过度增殖有关,也与细胞凋亡的减少有关,因此,诱导肿瘤细胞凋亡给恶性肿瘤的防治提供了一条新的思路。近年来,细胞凋亡已作为评估抗肿瘤药物疗效的一个重要指标。很多多糖类中药可以通过诱导肿瘤细胞的凋亡而抑制肿瘤细胞增殖<sup>[3,4]</sup>,近几年,已有报道槐耳清膏可以通过诱导肺癌、直肠癌等肿瘤细胞的凋亡而抑制肿瘤的生长<sup>[5,6]</sup>。槐耳清膏是否可以诱导 K562细胞凋亡未见报道,我们通过流式细胞技术显示在不同浓度的槐耳清膏作用于 K562细胞

48 h后,于  $G_0/G_1$  期前可见亚二倍体峰 (AP峰)即凋亡峰,随着药物浓度的增加,亚二倍体峰的峰值越高且细胞亚二倍体峰所占比例逐渐增大,呈剂量依赖性,与对照组相比差异有显著性。我们研究证明槐耳清膏可以诱导 K562细胞凋亡,这说明诱导细胞凋亡可能是槐耳清膏抗肿瘤作用的一个重要机理之一。目前槐耳清膏诱导肿瘤细胞凋亡的机制还不清楚,以往有研究表明槐耳清膏诱导人直肠癌 HR8348细胞凋亡可能与 bak/bcl-2、bak/bcl-x1比值的升高及上调基因 p53表达有关<sup>[7]</sup>。槐耳清膏与人胰腺癌细胞 Panc-1 共同培养时可通过上调凋亡基因 Caspase-3的表达而促进凋亡发生<sup>[8]</sup>。调控相关基因的表达也可能是槐耳清膏诱导 K562细胞凋亡的重要机理之一,关于槐耳清膏诱导 K562细胞凋亡的作用机制及基因学证据有待进一步研究。

## 参 考 文 献

1. 陆鹏,陈莉,陆正鑫. 实验性肝癌中比较槐耳与 L-2对 PTEN和 L-2R阳性细胞的影响. 现代中西医结合杂志, 2004, 13: 1982-1985.
2. 刘卓位,王崇刚,高斌,等. 人癌细胞抗肿瘤药物筛选实验的临床研究. 山西医科大学学报, 1998, 29: 130-131.
3. 庄毅. 抗癌新药槐耳冲剂的研究. 中国药学杂志, 1998, 33: 273-275.
4. 季宇彬,高世勇,张秀娟. 羊栖菜多糖诱导肿瘤细胞凋亡的研究. 中国中药杂志, 2004, 29: 245-247.
5. Hattori T S, Komatsu N, Shichijo S, et al. Protein-bound Polysaccharide K Induced Apoptosis of the Human Burkitt Lymphoma Cell Line. Biomed Pharmacother, 2004, 58: 226-230.
6. 黄涛,孔庆志,卢宏达,等. 槐耳清膏诱导人肺癌细胞 A549凋亡的实验研究. 中华结核和呼吸杂志, 2001, 24: 503-503, 1006.
7. 程若川,汤礼贵,兰丽琴. 槐耳清膏诱导人直肠癌 HR8348细胞凋亡的实验研究. 中国肿瘤, 2003, 12 (2): 122-124.
8. 周进,李德春,匡玉庭. 金克 (槐耳清膏)抑制胰腺癌细胞 Panc-1生长转移的实验研究. 苏州大学学报 (医学版), 2005, 25 (2): 226-228.

(本文图 2~7见封 3中图 2:A-F)

(收稿日期: 2008-01-29;修回日期: 2008-03-27)

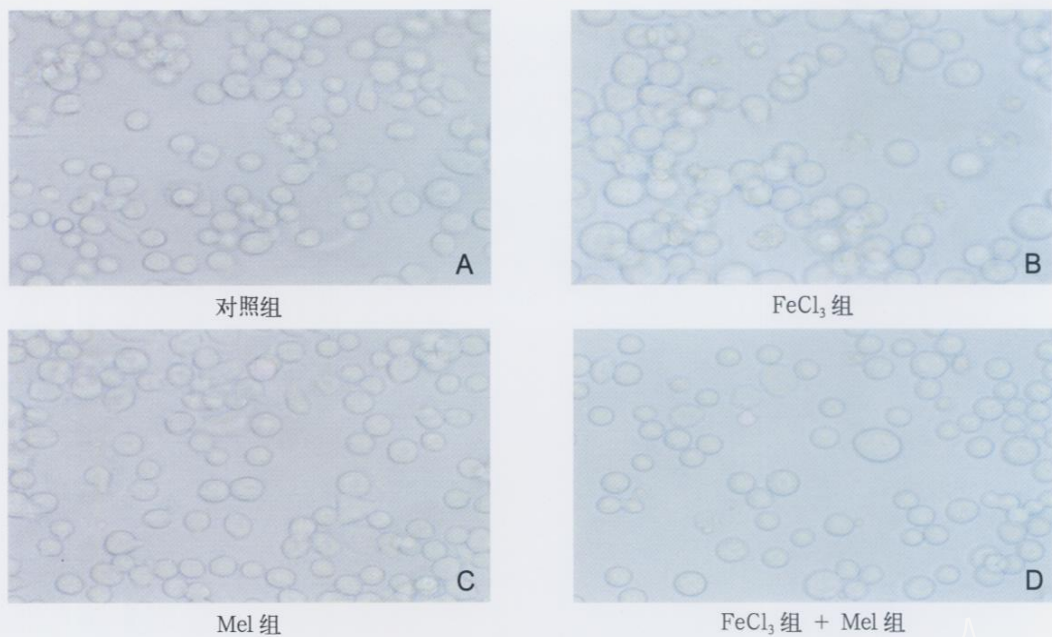


图 1A 各实验组细胞在显微镜下的形态变化 ( $\times 200$ ) (见正文 97 页)

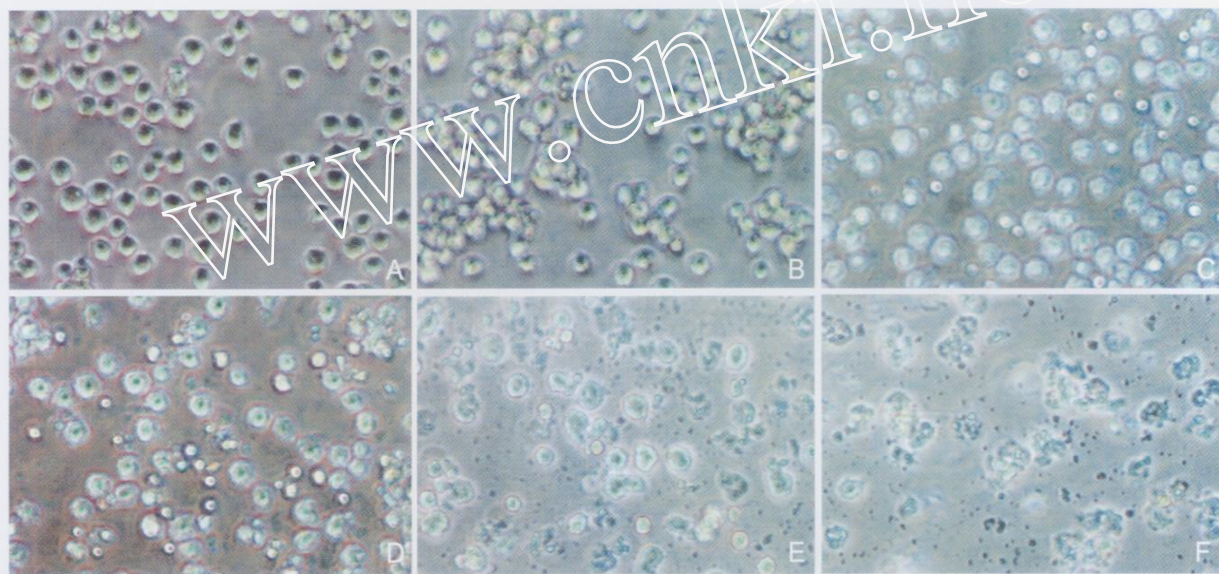


图 2 相差显微镜下不同剂量槐耳清膏作用于 48h 后 k562 细胞形态 ( $\times 400$ )

A 正常细胞 B 0.5mg/ml C 1mg/ml D 2mg/ml E 4mg/ml F 8mg/ml (见正文 104 页)

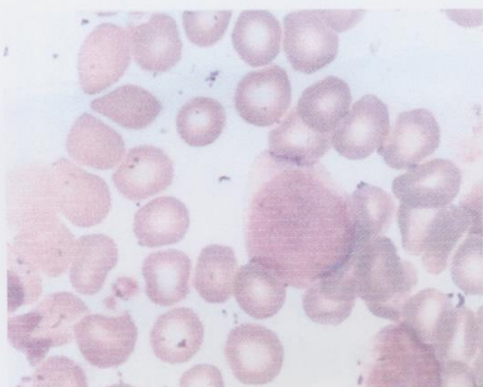


图 1 低倍镜下幼稚巨核细胞 ( $10\times$ )

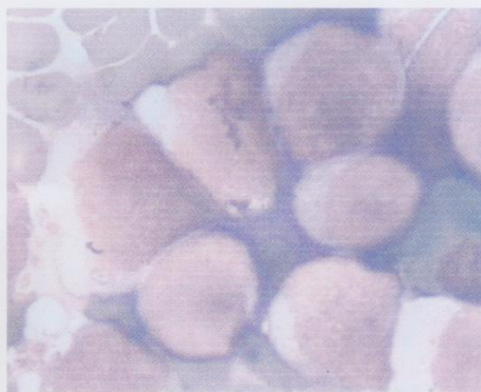


图 2 油镜下幼稚巨核细胞 ( $100\times$ ) (见正文 121 页)