青蒿琥酯对人白血病 K562 细胞凋亡抑制蛋白表达的影响

王玮琴^①, 王永钢^②, 金晓红^②

① 浙江省中医院药剂科, 杭州 310006;

② 绍兴市中医院药剂科, 绍兴 312000

E-mail: zjhzwwq@163.com

2011-01-14 收稿, 2011-02-23 接受

摘要 用 Western blot 法检测青蒿琥酯对白血病 K562 细胞的 X 染色体连锁凋亡抑制因子(X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP)、存活素(Survivin)、细胞凋亡抑制蛋白 1 (cellular IAP1, cIAP-1)和细胞凋亡抑制蛋白 2 (cellular IAP2, cIAP-2)表达的影响, 以及对 K562 细胞半胱氨酸天冬氨酸酶 3 (caspase-3)和多聚 ADP-核糖聚合酶裂解片段(poly ADP-ribose polymerase cleavage, PARP cleavage)的作用. 青蒿琥酯能够下调 XIAP, Survivin 和 cIAP-2 的表达, 上调 caspase-3 活化亚基(17 kD)和 PARP cleavage (85 kD)的表达. 青蒿琥酯通过下调 XIAP, Survivin 和 cIAP-2 的表达来诱导白血病细胞凋亡, caspase-3 也与诱导白血病细胞凋亡有关.

关键词

青蒿琥酯
IAP 家族
凋亡
caspase-3
PARP cleavage

青蒿琥酯(Artesunate, Art)是我国科学家从菊科植物黄花蒿(*Artemisia annua* L.)中提取的具有过氧桥结构的倍半内酯类抗疟药^[1], 在临床上对抢救和治疗脑型疟和恶性疟等疗效显著. 鉴于青蒿琥酯的化学结构中含有过氧桥, 近年来有不少关于它诱导肿瘤细胞凋亡的报道^[2,3], 认为该药在组织有可能释放氧, 但对于青蒿琥酯抗肿瘤细胞凋亡的分子机制尚未明了.

凋亡是多细胞生物细胞死亡的一种形式, 细胞凋亡调控异常可协助肿瘤细胞逃避免疫监视并抵抗化疗药物的杀伤作用, 是肿瘤细胞发生发展和抵抗化疗的原因之一. 凋亡抑制蛋白(IAPs)是重要的抗凋亡因子, 目前已发现 8 种: XIAP, cIAP-1, cIAP-2, 睾丸特异性凋亡抑制蛋白(testis specific IAP), Survivin, 神经元性凋亡抑制蛋白(neuronalapoptotic inhibitor protein, NAIP)、含泛素连接酶的杆状病毒 IAP 重复序列^[4] (baculoviral IAP repeat containing ubiquitin conjugating enzyme, BRUCE)和黑色素瘤凋亡抑制蛋

白(melanoma-IAP). 为进一步明确青蒿琥酯抗肿瘤凋亡作用的分子机制, 我们观察了 Art 对急性白血病 K562 细胞凋亡抑制蛋白的作用, 为分析该药抗肿瘤作用的位点和机制提供实验依据.

1 材料与仪器

注射用青蒿琥酯由桂林第二制药厂生产; 人白血病 K562 细胞由中科院上海细胞所提供; 兔抗人 XIAP, Survivin, cIAP-1, cIAP-2, caspase-3 和 PARP cleavage 由美国 Santa Cruz 公司提供.

2 实验方法

(i) 细胞培养. 人白血病 K562 细胞为悬浮生长的细胞, 用含 10%小牛血清的 RPMI 1640 培养液, 在 37℃, 5%CO₂, 饱和湿度条件下常规培养, 2~3 d 传代 1 次, 取对数生长期的细胞进行实验.

(ii) MTT 法测定 IC₅₀ 值. 制备 K562 单细胞悬液, 经台盼蓝检测活性细胞 ≥ 95%, 调整细胞数为

英文引用格式: Wang W Q, Wang Y G, Jin X H. Effects of Artesunate on the expression of inhibitor of apoptosis proteins in human erythroleukemia K562 cells (in Chinese). Chinese Sci Bull (Chinese Ver), 2011, 56: 828-831, doi: 10.1360/972010-2003

$1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$, 接种于 96 孔板. 用不同浓度的青蒿琥酯作用 48 h 后, 采用 MTT 法, 用酶标仪(Multiskan MK3, 美国 Thermo 公司)在 570 nm 测定吸收度 A_{570} 值. 以二甲亚砜(DMSO)作为溶剂对照组, 计算细胞增殖率. 采用 IC₅₀ 计算软件(中国科学院上海药物研究所), 计算青蒿琥酯对 K562 细胞的 IC₅₀ 值以及 95% 的置信区间.

(iii) Western blot 分析. 将 $15 \mu\text{mol/L}$ 青蒿琥酯作用 K562 细胞 12 h, 然后分别收集对照组和试验组细胞, 用冰预冷磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞 3 次, 加入细胞裂解液(50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 0.1%十二烷基硫酸钠(SDS), 1%乙基苯基聚乙二醇(NP40), 0.5%去氧胆酸钠, 1 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA), 1 $\mu\text{g/mL}$ 抑肽酶(aprotinin), 100 $\mu\text{g/mL}$ 苯甲基磺酰氟(PMSF), pH 8.0), 使细胞浓度为 $1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$, 涡旋混匀后冰浴 30 min, 于 4℃离心(12000 r/min) 10 min, 收集上清液, 用考马斯亮兰 CBBG₂₅₀ 蛋白测定试剂盒测定蛋白质浓度. 样品与 2 倍体积的上样缓冲液混匀, 煮沸 5 min, 用 7.5%或 12.5% SDS-聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳分离. 分离的蛋白质电转移至硝酸纤维素膜, 5%脱脂奶粉封闭 1 h 后, 与第一抗体孵育 1 h, 然后加入辣根过氧化物酶标记的抗兔 IgG 第二抗体共同孵育 1 h, 鲁米诺化学发光显色底物(LumiGLO)显色发光, 于暗室 X-ray 胶片曝光, 胶片用 JS-300 凝胶图像分析仪(Sx Image 软件分析系统)进行扫描分析处理.

3 结果

3.1 青蒿琥酯对细胞增殖的影响

青蒿琥酯对 K562 细胞增殖有明显抑制作用. 将 60, 30, 15 和 $7.5 \mu\text{mol/L}$ 青蒿琥酯与 K562 细胞作用 48 h 后, 抑制率依次为 70.3%, 65.12%, 52.61%和 37.62%, 呈剂量依赖关系, 统计学处理得到 IC₅₀ 值为 $15 \mu\text{mol/L}$.

3.2 K562 细胞 IAPs 经青蒿琥酯处理后在不同时段的表达

经 $15 \mu\text{mol/L}$ 青蒿琥酯作用 12 h 后, XIAP, Survivin, cIAP-1 和 cIAP-2 在不同时段的表达由 Western blot 检测(图 1). XIAP, Survivin, cIAP-1 和 cIAP-2 的表达随时间增加而降低, 其中 XIAP 和 IAP-2 表达

图 1 Western blot 法检测 K562 细胞 IAPs 经 $15 \mu\text{mol/L}$ 青蒿琥酯作用 12 h 后在不同时段的表达

受到的影响较明显.

3.3 K562 细胞 PARP 和 caspase-3 经青蒿琥酯处理后在不同时段的表达

由 $15 \mu\text{mol/L}$ 青蒿琥酯作用 12 h 后, PARP (116 kD)及其片段(85 kD)、caspase 前体 caspase-3 原酶(32 kD)及其活化亚基(17 kD)在不同时间段的表达由 Western blot 检测. 如图 2 所示, 随时间增加, caspase-3 原酶(32 kD)、PARP (116 kD)的表达逐渐降低; caspase-3 活化亚基(17 kD)、PARP 裂解片段(85 kD)的表达逐渐增加.

4 讨论

IAPs 是一类重要的抗细胞凋亡因子, 它独立于重组人 B 细胞淋巴瘤因子 2 (Bcl-2)家族, 能抑制细胞表面死亡受体配体、细胞色素 C 以及化疗药物引起的细胞凋亡. 所有 IAPs 成员都含有 1~3 个冠状病毒 IAP 重复序列(baculovovirus IAP repeat, BIR)结构, 该结构是抑制细胞凋亡的关键功能域, IAPs 通过该结构与活化 caspase 的 N 端 IAP 结合基序(IAP binding

图 2 Western blot 法检测 K562 细胞 PARP 和 caspase-3 经 $15 \mu\text{mol/L}$ 青蒿琥酯作用 12 h 后在不同时段的表达

motif, IBM)结合. 细胞凋亡受抑制是白血病发生、发展及化疗耐药、治疗失败的主要原因之一.

为探讨青蒿琥酯抗白血病细胞凋亡的分子机制, 我们将青蒿琥酯作用于 IAPs 家族的重要蛋白 XIAP, Survivin, cIAP-1 和 cIAP-2. 实验中, 白血病 K562 细胞经 15 $\mu\text{mol/L}$ 青蒿琥酯作用 12 h 后, 利用 Western blot 法检测, 发现 XIAP, Survivin, cIAP-1 和 cIAP-2 的表达随时间增加而降低, 其中 XIAP 和 cIAP-2 的表达受影响最明显. Lima 和 Carter 等人^[5,6]报道, 可通过负性调控因子的作用, 下调 XIAP 在恶性血液病和(或)恶性血液细胞系的表达以诱导 caspase 依赖性细胞凋亡, 从而增加肿瘤细胞对化疗和药物的敏感性, 减少其耐药. 本实验证实, 青蒿琥酯抗急性白血病细胞凋亡与下调 XIAP 有关. cIAP-2 定位于 11q22-23, 其表达率和表达水平与急性白血病的发展和转归密切相关, 但并不直接抑制 caspase^[7-9]. Karasawa 等人^[10]用基因芯片分析, 发现耐药细胞中 cIAP-2 高表达. 实验中我们发现, 青蒿琥酯可明显下调 cIAP-2 的表达, 青蒿琥酯是否可用于治疗耐药白血病仍需进一步证明.

在正常活细胞中, caspase 以前体 pro-caspase-3 (32 kD)酶原形式存在于胞质中; 在细胞凋亡早期阶

段, pro-caspase-3 被快速活化为 caspase-3(由 2 个 17 kD 的大亚基和 2 个 12 kD 的小亚基组成), 裂解相应的胞质胞核底物, 最终导致细胞凋亡^[11,12]. Eckelman 等人^[13]发现, XIAP 具有强稳定性和高效性, 是最有效力的 caspase 抑制剂, 其主要通过 BIR2 和 BIR3 结构直接与活化的 caspase-3, -7 和-9 结合, 从而封闭 caspase 与底物的结合, 抑制 caspase 酶催化活性. 为了进一步确定青蒿琥酯的作用机制, 将 caspase-3 最主要底物 PARP (116 kD)及其片段(85 kD), caspase 前体 caspase-3 原酶(32 kD)及其活化亚基(17 kD)由 15 $\mu\text{mol/L}$ 青蒿琥酯作用 12 h, 然后用 Western blot 法检测它们在不同时间段的表达. 结果显示, 随时间增加, caspase 前体 caspase-3 原酶(32 kD)的表达逐渐降低, 而其裂解片段(17 kD)的表达逐渐增加. 本实验发现, 青蒿琥酯作用 2 h 后, PARP 裂解片段的表达逐渐增加. 在细胞凋亡时, PARP (116 kD)在 Asp²¹⁶-Gly²¹⁷ 处被 caspase-3 剪切成 2 个片段(85 和 31 kD), 使 PARP 与 DNA 结合的 2 个锌指结构和羧基端的催化区域分离, 导致核小体间的 DNA 裂解^[14].

通过实验, 我们推断青蒿琥酯通过下调 XIAP, Survivin 和 cIAP-2 的表达而诱导白血病细胞凋亡, 同时 caspase-3 也可能与诱导白血病细胞凋亡有关.

参考文献

- 1 Dhingra V, Vishweshwar Rao K, Lakshmi Narasu M. Current status of artemisinin and its derivatives as antimalarial drugs. *Life Sci*, 2000, 66: 279-300
- 2 Wu G D, Zhou H J, Wu X H. Apoptosis of human umbilical vein endothelial cells induced by artesunate. *Vasc Pharmacol*, 2005, 41: 205-212
- 3 Liu X, Li Y, Xu G L, et al. Effects of Artesunate on K562 cell apoptosis and Fas/FasL expression of chronic granulocytic leukemia. *Shanghai J Tradit Chin Med*, 2006, 10: 63-65
- 4 Lacasse E C, Mahoney D J, Cheung H H, et al. IAP-targeted therapies for cancer. *Oncogene*, 2008, 27: 6252-6275
- 5 Lima R T, Martins L M, Guimarães J E, et al. Chemosensitization effects of XIAP downregulation in K562 leukemia cells. *J Chemother*, 2006, 18: 98-102
- 6 Carter B Z, Mak D H, Schober W D, et al. Triptolide induces caspase-dependent cell death mediated via the mitochondrial pathway in leukemic cells. *Blood*, 2006, 108: 630-637
- 7 Vassina E M, Yousefi S, Simon D, et al. cIAP-2 and survivin contribute to cytokine-mediated delayed eosinophil apoptosis. *Eur J Immunol*, 2006, 36: 1975-1984
- 8 Bertrand M J, Milutinovic S, Dickson K M, et al. cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination. *Mol Cell*, 2008, 30: 689-700
- 9 Eckelman B P, Salvesen G S. The human anti-apoptotic proteins cIAP1 and cIAP2 bind but do not inhibit caspases. *J Biol Chem*, 2006, 281: 3254-3260
- 10 Karasawa H, Miura K, Fujibuchi W, et al. Down-regulation of cIAP2 enhances 5-FU sensitivity through the apoptotic pathway in human colon cancer cells. *Cancer Sci*, 2009, 100: 903-913
- 11 Mouratidis P X, Colston K W, Dalglish A G. Doxycycline induces caspase-dependent apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Int J Cancer*, 2007, 120: 743-752

- 12 Debatin K M. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother*, 2004, 53: 153–159
- 13 Eckelman B P, Salvesen G S, Scott F L. Human inhibitor of apoptosis proteins: Why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Rep*, 2006, 7: 988–994
- 14 Lazebnik Y A, Kaufmann S H, Desnoyers S, et al. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature*, 1994, 371: 346–347

Effects of Artesunate on the expression of inhibitor of apoptosis proteins in human erythroleukemia K562 cells

WANG WeiQin¹, WANG YongGang² & JIN XiaoHong²

¹*Department of Pharmacy, Zhejiang Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310006, China;*

²*Department of Pharmacy, Traditional Chinese Medicine Hospital of Shaoxing City, Shaoxing 312000, China*

Western blot was performed to detect the influence of Artesunate on the expression of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP), survivin, cellular IAP1 (cIAP-1), and cellular IAP2 (cIAP-2), and to investigate the effect of Artesunate on caspase-3 and poly ADP-ribose polymerase (PARP) cleavage in human erythroleukemia K562 cells. Artesunate downregulated the expression of XIAP, survivin, and cIAP-2, and upregulated the expression of a 17-kD caspase-3 cleavage fragment and an 85-kD PARP cleavage fragment. By down-regulating XIAP, survivin, and cIAP-2, Artesunate induced apoptosis in K562 cells. The mechanism of this apoptosis may involve caspase 3.

Artesunate, IAPs, apoptosis, caspase 3, PARP cleavage

doi: 10.1360/972010-2003