

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.12.009

姜黄素下调 CyclinD1 和 Bcl-2 的表达增强急性髓系 LSCs 对柔红霉素的敏感性

王全洪¹,冯永怀²,王玉和^{1△}

(遵义医学院第一附属医院:1.药剂科;2.血液内科,贵州遵义 563099)

[摘要] **目的** 探讨姜黄素(CUR)增强急性髓系白血病干细胞(LSCs)CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞对柔红霉素(DNR)敏感性的机制。**方法** 流式细胞术分析 KG1a 细胞的 CD34、CD38 表面分子的表达情况。四甲基偶氮唑蓝(MTT)法获取 CUR 作用 CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞的 IC₅₀。MTT 法、甲基纤维素克隆形成实验和流式细胞术分别检测 DNR 对两种细胞(CD34⁺CD38⁻KG1a 和 CUR/CD34⁺CD38⁻KG1a)的增殖抑制作用、克隆形成能力和凋亡影响。逆转录 PCR(RT-PCR)检测细胞 Bcl-2、Bax 和 XIAP 的 mRNA 表达。Western blot 分析细胞周期蛋白 D1(CyclinD1)、Bcl-2、Bax 和 XIAP 蛋白表达。**结果** KG1a 细胞系的 CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞比例为(98.2±3.2)%。CUR 作用 CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞 24 h 的 IC₅₀=100 μmol/L。中、高浓度(0.8、2.0 μg/mL)DNR 对 CUR/CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞的增殖抑制作用比 CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞强(P<0.05)。DNR 对 CUR/CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞克隆形成能力的抑制作用较 CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞强(P<0.05)。各 DNR 浓度组中,CUR/CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞凋亡率均比 CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞高(P<0.05)。Bcl-2 的 mRNA 及 CyclinD1 和 Bcl-2 蛋白表达下降。Bax、XIAP 的 mRNA 和蛋白表达变化不明显。**结论** CUR 能增强 CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞对 DNR 的敏感性,与 CUR 下调 CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞 CyclinD1 和 Bcl-2 的表达相关。

[关键词] 姜黄素;柔红霉素;白血病;Bcl-2;细胞周期蛋白 D1**[中图分类号]** R966**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)12-1613-04

Curcumin enhancing sensitivity of acute myeloid leukemia stem cells to daunorubicin by down-regulating expression of CyclinD1 and Bcl-2

Wang Quanhong¹,Feng Yonghuai²,Wang Yuhe^{1△}

(1. Department of Pharmacy;2. Department of Hematology, First Affiliated Hospital, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563099, China)

[Abstract] **Objective** To explore the potential mechanism of curcumin(CUR) enhancing the sensitivity of acute myeloid leukemia stem cells(LSCs) CD34⁺CD38⁻KG1a cells to daunorubicin (DNR). **Methods** The expression of surface molecules CD34, CD38 in KG1a cells was detected by the flow cytometry. The half maximal inhibitory concentration(IC₅₀) of curcumin to CD34⁺CD38⁻KG1a cells was calculated by the MTT method. MTT, methylcellulose colony formation assay and flow cytometry were applied to examine the effects of DNR on the proliferation, clone forming ability and apoptosis in the two kinds of cells(CD34⁺CD38⁻KG1a cells and CUR/CD34⁺CD38⁻KG1a cells) respectively. The mRNA-expression of Bcl-2, Bax and XIAP in the two cells were analyzed by RT-PCR. Meanwhile, the protein-expression of CyclinD1, Bcl-2, Bax and XIAP were detected by Western Blot. **Results** The percentage of CD34⁺CD38⁻KG1a in KG1a cell line was (98.2±3.2)%. The IC₅₀ of curcumin treating CD34⁺CD38⁻KG1a for 24 h was 100 μmol/L. The inhibition effect of high and middle concentrations(0.8, 2.0 μg/mL) of DNR on the proliferation of CUR/CD34⁺CD38⁻KG1a cells was stronger than that of CD34⁺CD38⁻KG1a cells (P<0.05). The inhibitory role of DNR to the colony formation on CUR/CD34⁺CD38⁻KG1a cells was more effective than that of CD34⁺CD38⁻KG1a cells(P<0.05). The apoptotic rate of CUR/CD34⁺CD38⁻KG1a cells in each concentration group of DNR was higher than that of CD34⁺CD38⁻KG1a cells(P<0.05). The mRNA-expression of Bcl-2 and the protein-expression of Bcl-2 and CyclinD1 were down-regulated. However, no significant change was observed at both mRNA-expression and protein-expression of Bax and XIAP. **Conclusion** CUR can enhance the sensitivity of CD34⁺CD38⁻KG1a cells to DNR, which might be associated with down-regulating the expression of CyclinD1 and Bcl-2.

[Key words] curcumin; daunorubicin; leukemia; Bcl-2; CyclinD1

急性白血病的化疗目前面临的主要问题是复发、耐药和药物过大的毒副作用。而复发和耐药的根源在于白血病干细胞(leukemia stem cells, LSCs)的存在, LSCs 具有高耐药性, 不能被常规化疗彻底清除^[1]。即便提高药物剂量也无法将其消除,

反而对机体产生更强的毒副作用。因此, 许多专家提出低毒高效的化疗思路, 使用化疗增敏剂就是其中一个可能有效的途径。目前姜黄素(curcumin, CUR)作为化疗增敏剂应用于实体瘤的化疗已经有一定的进展。CUR 在防癌抗癌方面有许多优

点。它可以作用于肿瘤细胞的多个靶位和通路来影响细胞的周期、凋亡、增殖、生存、侵袭、转移和血管形成等^[2]。另外, CUR 价格便宜而且容易获得。最重要的是它长期应用于食品工业中而未发现其对人体有明显的毒副作用^[3]。LSCs 具有自我更新能力, 可以重建白血病, 且多数处于静止期, 具有高度耐药性^[4]。只有建立以 LSCs 为靶点的化疗方案, 才能有效预防白血病的复发和耐药。本实验使用的 KG1a 细胞具有 LSCs 样的特征, 如对常规化疗药抵抗、能在 NOD/SCID 小鼠重建白血病、表面分子 CD34⁺CD38⁻ 等。本实验将该株 CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞作为 LSCs 模型^[5]。柔红霉素(daunorubicin, DNR) 属蒽环类抗肿瘤抗生素。它是治疗急性白血病最常用的化疗药物之一, 可以明显提高急性白血病患者无病存活率, 但是对肾脏、肝脏和心脏等全身各脏器具有毒副作用。因此, 如何实现降低 DNR 使用剂量又能有效打击白血病细胞, 尤其是 LSCs, 正是临床上面临的重大难题。本实验以 CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞株作为 LSCs 模型, 探讨 CUR 对 DNR 的化疗增敏效应和机制。以求为临床防治白血病的复发和耐药提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料 细胞: KG1a 细胞株由中国医学科学院血液学研究所惠赠。试剂: CUR、DNR、甲基纤维素及小鼠抗人 Bcl-2、细胞周期蛋白 D1(CyclinD1)、Bax、XIAP 和 GAPDH 抗体购自 sigma 公司; 四甲基偶氮唑盐(MTT)购自 MPBIO 公司; RPMI 1640 培养基购自 Hyclone 公司; 胎牛血清购自四季青公司; 瑞氏吉姆沙染液、小鼠抗人 CD34-PE、CD-38-PE 单克隆抗体购自 Biologend 公司; AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司; 细胞周期检测试剂购自江苏碧云天生物技术研究所; Reverse transcriptase first stand cDNA synthesis(Takara, Japan); Trizol 试剂、TaqDNA 聚合酶购自 Promega 公司; HRP-二抗购自武汉博士德公司。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养 KG1a 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基, 置于 37 °C、5%CO₂ 饱和湿度培养箱中培养, 每 2 天进行传代并观察是否污染, 若污染则弃用。

1.2.2 流式细胞术检测 KG1a 细胞 CD34、CD38 抗原表达 用灭菌的 1.0 mL EP 管收集约 1.0×10⁶ 个对数生长期 KG1a 细胞, 以 1 500 r/min 离心 5 min, 去上清液后用 PBS 洗涤。重复上述操作 2 次, 用 1 mL PBS 重悬细胞。向上述 EP 管中分别加入小鼠抗人单克隆抗体 CD34⁻PE、CD38⁻FITC 各 20 μL。于室温避光孵育 30 min, 然后用 PBS 洗涤 2 次。以 FITC、PE 荧光抗体为同型对照, 上流式分析仪检测。实验重复 3 次。

1.2.3 细胞分组及 CUR 作用 KG1a 细胞 24 h 的 IC₅₀ 检测与计算 于 96 孔板中接种 KG1a 细胞 5 000 个/孔, 每孔总体积为 200 μL。设空白组(只加全培)、阴性对照组(加生理盐水)和各药物组, 每组设 6 个复孔。CUR 设 10、20、40、60、80、100 μmol/L 共 6 个浓度组。于 37 °C、5%CO₂ 培养箱中孵育 24 h 后加入 20 μL MTT, 再孵育 4 h 后取出, 1 500 r/min 离心 5 min。去上清后加入 150 μL 二甲基亚砜(DMSO)溶解结晶, 震荡溶解均匀后于波长 492 nm 酶标仪测 OD 值。细胞存活率计算公式: 细胞存活率=(药物孔 OD 值-空白孔 OD 值)/(对照孔 OD 值-空白孔 OD 值)×100%。使用 Graphpad Sofeware

作出增殖抑制曲线图并计算 IC₅₀。

1.2.4 CUR/CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞的制备 于 6 孔板中加入浓度为 2×10⁵/mL 的 CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞悬液 1.8 mL, 加入 200 μL 终浓度为 IC₅₀ 的 CUR, 设 6 个复孔。充分混匀后置于 37 °C、5%CO₂ 培养箱中孵育 24 h。收集于无菌离心管中, 1 000 r/min 离心 5 min 后去上清液, 再用 PBS 洗涤 2 次, 离心速度同前, 完全培养基重悬后备用。

1.2.5 MTT 检测 DNR 对 CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞和 CUR/CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞的增殖抑制作用 设置空白对照组、阴性对照组(加生理盐水)、DNR 药物组(0.2、0.8、2.0 μg/mL), 每组设 6 个复孔。于 24 h 和 48 h 进行 MTT 实验。MTT 具体操作过程, 参考 1.2.3 步骤。使用 Graphpad Sofeware 作图。

1.2.6 甲基纤维素克隆形成实验检测 DNR 作用两种细胞 24 h 后细胞克隆形成能力 于 24 孔板接种细胞 500 个/孔。采取析因设计重复测量, 设阴性对照组、DNR 药物组(0.2、0.8、2.0 μg/mL)共 4×2=8 组, 每组设 3 个复孔。体系总体积 500 μL(50 μL 细胞悬液+150 μL 2.7%甲基纤维素+300 μL 含 20%胎牛血清 RPMI 1640 培养基)。置于 37 °C、5%CO₂ 培养箱中, 14 d 后于倒置显微镜下观察并拍照, 计算克隆集落数。统计比较各组细胞克隆形成能力。

1.2.7 流式细胞术检测 DNR 作用两种细胞 24 h 后细胞凋亡情况 采取析因设计重复测量, 设阴性对照组、DNR 药物组(0.2、0.8、2.0 μg/mL)共 4×2=8 组, 每组重复测量 3 遍。于 12 孔板中接种对数生长期的两种细胞约 1×10⁶ 个, 于各孔加入相应的盐水和药物, 体系总体积 2 mL。24 h 后分别离心收集各组细胞, 用 1 mL PBS 重悬。取 0.5 mL 细胞悬液用 PBS 洗涤 2 次后去上清液。加入 500 μL 结合缓冲液重悬细胞。分别加入 AnnexinV-FITC 和 PI 各 5 μL。室温避光孵育 15 min 后上流式细胞仪检测细胞凋亡, 实验重复 3 次。统计比较各组细胞凋亡情况。

1.2.8 流式细胞术检测 CUR/CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞周期变化 各取 0.5 mL 细胞悬液, 用 PBS 洗涤 2 次后用 70%冰乙酸重悬细胞, -20 °C 固定过夜。PBS 洗涤 1 次, 去上清加入 300 μL DNA 染液(含碘化丙啶 100 mg/L、RNA 酶 2×10⁴ U/L)37 °C 避光染色 30 min, 然后 PBS 洗涤 2 次, 上流式细胞仪检测细胞周期。统计比较两种细胞周期分布的变化。

1.2.9 逆转录 PCR(RT-PCR)检测姜黄素作用 CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞 24 h 后 Bcl-2、Bax 和 XIAP 的 mRNA 表达情况 Bcl-2 上游引物: 5'-CTG GTG GAC AAC ATC GC-3', 下游引物: 5'-GGA GAA ATC AAA CAG AGG C-3'; Bax 上游引物: 5'-TCC ACC AAG AAG CTG AGC GAG-3', 下游引物: 5'-TTC TTT GAG TTC GGT GGG GTC-3'; XIAP 上游引物: 5'-GCA GGG TTT CTT TAT ACT G-3', 下游引物: 5'-TGT CCC TTC TGT TCT AAC AG-3'; -actin 上游引物: 5'-GTG GAC ATC CGC AAA GAC-3', 下游引物: 5'-GAA AGG GTG TAA CGC AAC T-3'。使用 Reverse transcriptase first stand cDNA synthesis 试剂盒, 严格按照说明书进行实验。PCR 扩增条件如下: Bcl-2 和 Bax, 94 °C 变性 30 s, 62 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 10 s; XIAP, 94 °C 变性 60 s, 62 °C 退火 60 s, 72 °C 延伸 60 s。扩增进行 30 个循环, -actin 作为内参照。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳进行分析。

1.2.10 Western blot 检测 CUR 作用 CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞 24 h 后细胞的 CyclinD1、Bcl-2、Bax 和 XIAP 的蛋白表达情况 首先将细胞收集起来,然后加入细胞裂解液于 4℃ 溶解细胞 1 h,以 12 000 r/min,离心 5 min,吸取上清液即为总蛋白。用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度。取等量蛋白质溶液进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)电泳,电泳结束后转印到硝酸纤维素膜。封闭后加入相应单抗轻摇孵育 1 h。取出膜条用 PBS 洗涤 3 次,结合 HRP-二抗,室温轻摇 1 h 后取出用 PBS 洗涤 3 次。最后曝光、显影、定影和拍照。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计分析,graphpad 软件作图。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,均符合正态性。两组独立样本均数间比较采用 *t* 检验,随机区组设计资料采用双因素方差分析,方差分析前使用 Levene 检验方差齐性。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 KG1a 细胞株 CD34、CD38 表面分子的表达情况 KG1a 细胞中的 CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞比例为 (98.2 ± 3.2)% (图 1),可认为该株 KG1a 细胞处于白血病干祖细胞发育阶段。

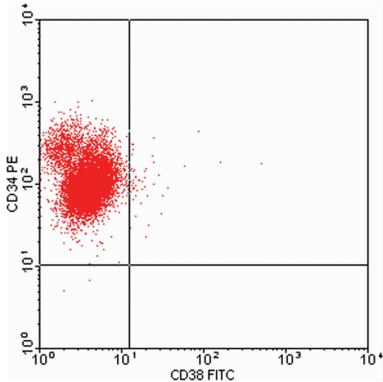


图 1 KG1a 细胞表面 CD34、CD38 表达

2.2 CUR 作用 CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞 24 h 后的 IC₅₀ CUR 作用 CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞 24 h 后的 IC₅₀ = 100 μmol/L,据此浓度配制相应的 CUR 溶液来制备 CUR/CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞,见图 2。

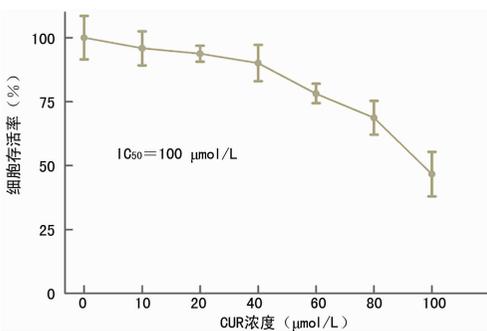
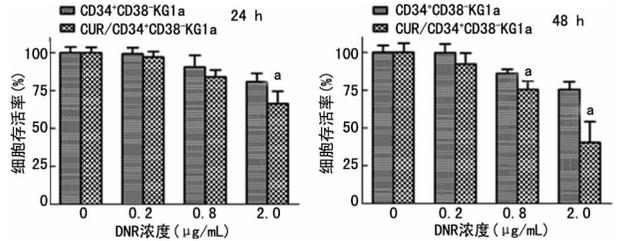


图 2 CUR 作用 CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞 24 h 的量效曲线

2.3 DNR 对 CD34⁺CD38⁻KG1a 和 CUR/CD34⁺CD38⁻KG1a 增殖抑制作用的比较 选择低、中和高浓度 DNR 作用两种细胞 24、48 h 后,两两比较它们的细胞存活率。在低浓度 (0.2 μg/mL) 组,两种细胞细胞存活率比较,差异无统计学意义 (24 h: *t* = 0.888, *P* = 0.396; 48 h: *t* = 1.944, *P* = 0.081)。而在中浓度 (0.8 μg/mL) 组,48 h 点两种细胞的细胞存活率比较,差异有统计学意义 (*t* = 4.129, *P* = 0.002),说明 DNR 对两

种细胞的增殖抑制作用不一样,对 CUR/CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞的抑制作用要强于 CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞。同样,在高浓度 (2.0 μg/mL) 组,两种细胞的存活率比较,差异有统计学意义 (24 h: *t* = 3.598, *P* = 0.005; 48 h: *t* = 3.292, *P* = 0.009)。结果显示,CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞经 CUR 干预后,DNR 对其增殖抑制作用更强,见图 3。



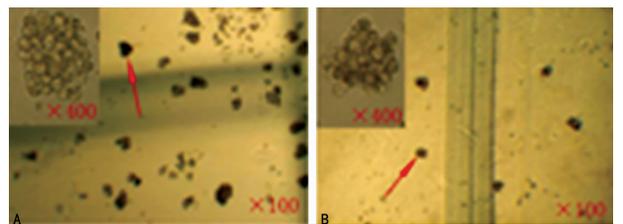
a: *P* < 0.01, 与 CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞比较。

图 3 DNR 对两种细胞的增殖抑制作用

2.4 DNR 对 CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞和 CUR/CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞克隆形成能力影响的比较 每个浓度组的两种细胞两两比较,克隆集落数均差异有统计学意义 (*P* < 0.05),见表 1。使用双因素方差分析方法,两种细胞不考虑 DNR 浓度因素的情况下进行比较,两种细胞的克隆集落数也差异有统计学意义 (*F* = 94.619, *P* = 0.000)。0.2 μg/mL DNR 作用两种细胞 24 h 后接种于甲基纤维素培养体系中,14 d 后观察克隆形成集落。集落在光学显微镜下形态,见图 4。

表 1 两组细胞 14 d 后克隆集落数比较 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

DNR	CD34 ⁺ CD38 ⁻ KG1a	CUR/CD34 ⁺ CD38 ⁻ KG1a	<i>t</i>	<i>P</i>
0 μg/mL	147.3 ± 9.7	96.7 ± 6.8	7.399	0.002
0.2 μg/mL	142.3 ± 17.0	89.7 ± 10.5	4.563	0.01
0.8 μg/mL	117.7 ± 17.8	76.3 ± 11.0	3.422	0.027
2.0 μg/mL	97.7 ± 11.0	51.3 ± 7.6	6.004	0.004



A: CD34⁺CD38⁻KG1a; B: CUR/CD34⁺CD38⁻KG1a。

图 4 克隆集落镜下形态

2.5 DNR 诱导 CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞和 CUR/CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞凋亡率比较 经 CUR 干预后,可以提高 DNR 诱导 CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞凋亡的能力。DNR 对两种细胞凋亡的影响具有一定的剂量依赖性,DNR 诱导 CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞凋亡作用并不明显,只有在最高浓度 2.0 μg/mL 时才有作用,与阴性对照组比较差异有统计学意义 (*t* = -7.971, *P* = 0.01)。与阴性对照组比较,各浓度组 DNR 均能诱导 CUR/CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞凋亡 (*P* < 0.05)。在各浓度组 DNR 中,CUR/CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞凋亡率均比 CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞高 (0.2 μg/mL 组: *t* = -7.717, *P* = 0.002; 0.8 μg/mL 组: *t* = -11.462, *P* = 0.000; 2.0 μg/mL 组: *t* = -8.362, *P* = 0.001)。

2.6 CUR 改变 CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞周期的分布 CUR 对 CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞周期影响主要是阻滞细胞周期于 G₀/G₁ 期, S 期细胞明显减少, 使得增殖旺盛的细胞减少。

2.7 CUR 作用 CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞 24 h 后 Bcl-2、Bax 和 XIAP 的 mRNA 表达的变化 用 40、80、100 μmol/L 的 CUR 处理 CD34⁺CD38⁻KG1a 24 h 后, RT-PCR 检测 Bcl-2、Bax 和 XIAP 的 mRNA 表达结果, 见图 5。与对照组比较, Bcl-2 的表达有显著下调, 尤其是 100 μmo/L 的 CUR 处理组。各 CUR 组之间也存在一定的剂量依赖性, CUR 浓度越高对 CD34⁺CD38⁻KG1a 作用越明显。但是 Bax 和 XIAP 的表达与对照比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

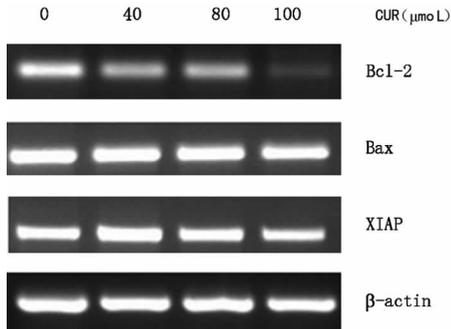


图 5 CUR 对 CD34⁺CD38⁻KG1a 的 Bcl-2、Bax 和 XIAP mRNA 表达的影响

2.8 姜黄素作用 CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞 24 h 后 CyclinD1、Bcl-2、Bax 和 XIAP 蛋白表达的变化 用 40、80、100 μmo/L 的 CUR 处理 CD34⁺CD38⁻KG1a 24 h 后。Bcl-2 和 CyclinD1 的蛋白表达显著下调, 呈一定剂量依赖。高浓度时表达下降, 与 Bcl-2 mRNA 表达情况相一致。XIAP 和 Bax 的表达无明显变化, 见图 6。

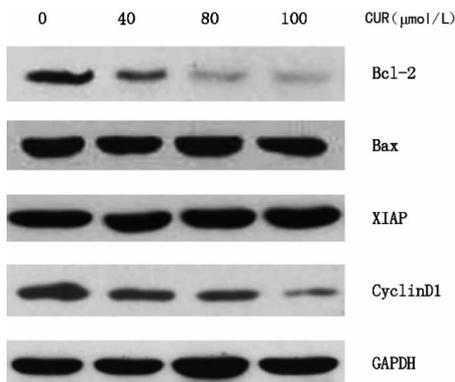


图 6 CUR 对 CD34⁺CD38⁻KG1a 的 CyclinD1、Bcl-2、Bax 和 XIAP 蛋白表达的影响

3 讨 论

随着 20 世纪 50 年代肿瘤干细胞概念的提出, 人们在这方面做了很多探索性的工作。也慢慢认识到肿瘤干细胞对化疗/放疗的抵抗是肿瘤复发的根源, 要提高肿瘤治愈率必须彻底清除肿瘤干细胞^[6]。同样的, 急性白血病患者体内存在着一群数量极少的白血病细胞能在异种移植中增殖, 它们具有广泛的自我更新和限制性地分化发展为白血病的能力, 这些细胞被称作 LSCs^[7]。本实验正是站在靶向治疗 LSCs 的层次来探讨 CUR 对 DNR 的化疗增敏效应。以求获得进一步应用到临床的相关实验依据。

增殖抑制实验证明, CUR 对 CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞有比较明显的抑制作用。本实验使用 CUR 处理后获得的 CUR/CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞被证实细胞增殖能力和克隆形成能力均比 CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞低, 可认为是 CUR 在效应上确实对 CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞产了 DNR 增敏效应。与此相似的是 Yu 等^[8]证明 CUR 单独或者联合常规化疗都能有效的治疗结肠癌并能预防化疗抵抗。为了进一步发现相关机制, 本研究进行细胞凋亡和细胞周期分布检测, 发现 CUR/CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞与 CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞的周期分布明显不同。前者更多细胞阻滞在 G₀/G₁ 期, 而相应 S 期细胞则明显减少。然而 Yogosawa 等^[9]在 HT-29 人类结肠癌细胞株中证明 CUR 阻滞细胞于 G₂/M 期。这与本实验结果虽然不同, 但反而证明了 CUR 对各种细胞的作用机制是相当复杂的, 不能一概而论。本实验还发现, DNR 诱导 CUR/CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞凋亡率比 CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞高。这可以认为是 CUR 增强 DNR 对 CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞增殖抑制作用的机制之一, 也是 CUR 产生 DNR 增敏效应的机制之一。

有研究认为, CUR 影响肝癌细胞凋亡^[10]。本研究发现与细胞凋亡相关的 Bcl-2、Bax 和 XIAP 基因的 mRNA 表达中, 只有 Bcl-2 的 mRNA 表达下调。还发现在 CyclinD1、Bcl-2、Bax 和 XIAP 基因的蛋白表达中, CyclinD1 和 Bcl-2 的蛋白表达下调。Bcl-2 和 XIAP 蛋白家族都是细胞凋亡的两个重要的途径。本实验证明, CUR 的作用凋亡途径是 Bcl-2 相关的凋亡途径, 对 XIAP 相关途径不起作用。正是 Bcl-2 表达的下调使得 CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞对 DNR 诱导的凋亡更加敏感。周期蛋白分子在急性白血病的发生和复发中有非常重要的意义。CyclinD1 蛋白是细胞 G₁ 期过渡到 S 期的调控蛋白, 其过度表达能缩短 G₁ 期, 反之表达下调很可能造成 G₀/G₁ 期阻滞。本实验中 CyclinD1 蛋白表达下调, 与周期分布检测相符合, 使得处于增殖旺盛的细胞减少。因此, CyclinD1 表达下调很可能是 CUR 增强 DNR 对 CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞增殖抑制作用的重要机制之一。Royt 等^[11]报道称 CUR 通过调节 PKC、端粒酶、NF-κB 和 HDAC 来增强乳腺癌细胞对化疗的敏感性, 有研究者发现 CUR 能够通过下调肿瘤干细胞的标志蛋白 CD133、CD44、CD166 和 ALDH 来降低化疗抵抗。

综上所述, CUR 很可能是通过下调 CyclinD1 和 Bcl-2 的表达来增加 CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞对 DNR 的敏感性, CUR 对肿瘤细胞及肿瘤干细胞的作用是多方面的。总之, 本实验通过 CUR 来致敏白血病干祖细胞 CD34⁺CD38⁻KG1a 来探讨其化疗增敏的效应和相关分子机制, 初步获得较理想的靶位分子。为接下来的更深入和更全面的化疗增敏相关信号通路的研究打下很好的基础。最终为临床更好使用 CUR 作为化疗增敏剂提供一定的实验依据。

参考文献

- [1] Misaghian N, Ligresti G, Steelman LS, et al. Targeting the leukemic stem cell: the Holy Grail of leukemia therapy [J]. *Leukemia*, 2009, 23(1): 25-42.
- [2] Anand P, Sundaram C, Jhurani S, et al. Curcumin and cancer: an "old-age" disease with an "age-old" solution [J]. *Cancer Lett*, 2008, 267(1): 133-164.
- [3] 靳胜, 陈书恩, 张曼, 等. 姜黄素逆转 HL60/(下转第 1619 页)

Caspase-3 的产生以及增加 Bcl-2 的表达,从而抑制胶质瘤细胞凋亡的发生^[15]。本研究发现,IKK 的选择性抑制剂 IKK16 可以明显抑制人胶质瘤细胞 U87 的增殖,其机制可能是通过抑制 p65 向细胞核内的转运从而抑制 NF- κ B 介导的下游因子 CyclinD1 的转录和表达相关,Caspase-3 作为凋亡下游的关键执行者,IKK16 可以明显增加 Caspase-3 促凋亡蛋白的表达,减少抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,这可能是 IKK16 促进胶质瘤细胞凋亡和抑制增殖的主要机制,此外,IKK16 在动物实验中发现可以通过口服吸收,一旦进入临床可以大大简化给药方式,为了进一步验证其临床有效性,下一步需要进行动物体内实验,从而为临床实验打下坚实的理论基础。

综上所述,IKK 的抑制剂 IKK16 可以抑制胶质瘤细胞的增殖并促进胶质瘤细胞的凋亡,IKK16 未来可能成为治疗胶质瘤的一种新型药物,具有潜在的临床应用前景。

参考文献

- [1] Solomon IH, Ramkissoon SH, Milner DA Jr, et al. Cytomegalovirus and glioblastoma: a review of evidence for their association and indications for testing and treatment [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2014, 73(11):994-998.
- [2] 李亮,边寰,张伟,等. 中枢神经系统神经上皮细胞肿瘤的流行病学研究[J]. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2013, 12(5):435-438.
- [3] 朱海波. 低级别胶质瘤的手术治疗进展[J]. *重庆医学*, 2012, 41(13):1338-1340.
- [4] 毛德强,潘玲,戴勤弼,等. 术后放疗联合替莫唑胺治疗高级别胶质瘤的近期临床疗效及安全性观察[J]. *重庆医学*, 2013, 42(1):21-23.
- [5] Olson JJ, Nayak L, Ormond DR, et al. The role of targeted therapies in the management of progressive glioblastoma: a systematic review and evidence-based clinical practice guideline[J]. *J Neurooncol*, 2014, 118(3):557-599.
- [6] Nogueira L, Ruiz-Ontanon P, Vazquez-Barquero A, et al. The NF κ B pathway: a therapeutic target in glioblastoma[J]. *Oncotarget*, 2011, 2(8):646-653.

- [7] Waelchli R, Bollbuck B, Bruns C, et al. Design and preparation of 2-benzamido-pyrimidines as inhibitors of IKK [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, 16(1):108-112.
- [8] Omuro A, DeAngelis LM. Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review[J]. *JAMA*, 2013, 310(17):1842-1850.
- [9] Munson J, Bonner M, Fried L, et al. Identifying new small molecule anti-invasive compounds for glioma treatment [J]. *Cell Cycle*, 2013, 12(14):2200-2209.
- [10] Atkinson GP, Nozell SE, Benveniste ET. NF- κ B and STAT3 signaling in glioma: targets for future therapies [J]. *Expert Rev Neurother*, 2010, 10(4):575-586.
- [11] Robe PA, Bentires-Alj M, Bonif M, et al. In vitro and in vivo activity of the nuclear factor- κ B inhibitor sul-fasalazine in human glioblastomas [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(16):5595-5603.
- [12] Kauppinen A, Suuronen T, Ojala J, et al. Antagonistic crosstalk between NF- κ B and SIRT1 in the regulation of inflammation and metabolic disorders[J]. *Cell Signal*, 2013, 25(10):1939-1948.
- [13] Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer[J]. *Mol Cancer*, 2013, 12(12):86.
- [14] Wang J, Wang Q, Cui Y, et al. Knockdown of cyclin D1 inhibits proliferation, induces apoptosis, and attenuates the invasive capacity of human glioblastoma cells[J]. *J Neurooncol*, 2012, 106(3):473-484.
- [15] Shi L, Chen J, Yang J, et al. MiR-21 protected human glioblastoma U87MG cells from chemotherapeutic drug temozolomide induced apoptosis by decreasing Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 activity[J]. *Brain Res*, 2010(1352):255-264.

(收稿日期:2014-09-28 修回日期:2015-01-26)

(上接第 1616 页)

- ADR 及 MCF-7/ADR 的多药耐药研究[J]. *重庆医学*, 2010, 39(1):21-23.
- [4] 陈好,娄世锋. 急性髓系白血病干细胞研究进展[J]. *重庆医学*, 2008, 37(4):429-432.
- [5] She M, Niu X, Chen X, et al. Resistance of leukemic stem-like cells in AML cell line KG1a to natural killer cell-mediated cytotoxicity [J]. *Cancer Lett*, 2012, 318(2):173-179.
- [6] 郭坤元,姚开泰. 以肿瘤干细胞为靶的免疫治疗[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2012, 19(4):343-347.
- [7] Horton SJ, Huntly BJ. Recent advances in acute myeloid leukemia stem cell biology [J]. *Haematologica*, 2012, 97(7):966-974.
- [8] Yu Y, Kanwar SS, Patel BB, et al. Elimination of Colon Cancer Stem-Like Cells by the Combination of Curcumin

and FOLFOX[J]. *Transl Oncol*, 2009, 2(4):321-328.

- [9] Yogosawa S, Yamada Y, Yasuda S, et al. Dehydrozingerone, a structural analogue of curcumin, induces cell-cycle arrest at the G2/M phase and accumulates intracellular ROS in HT-29 human colon cancer cells[J]. *J Nat Prod*, 2012, 75(12):2088-2093.
- [10] 宛传丹,温占朝,顾勇劲. 姜黄素单体影响肝癌 BEL-7402 细胞凋亡及其周期蛋白 D 表达的研究[J]. *重庆医学*, 2011, 40(23):2300-2302.
- [11] Royt M, Mukherjee S, Sarkar R, et al. Curcumin sensitizes chemotherapeutic drugs via modulation of PKC, telomerase, NF- κ B and HDAC in breast cancer[J]. *Ther Deliv*, 2011, 2(10):1275-1293.

(收稿日期:2014-11-10 修回日期:2015-02-18)