

- Management of Lower Urinary Tract Symptoms Attributed to Benign Prostatic Hyperplasia: AUA Guideline Amendment 2019 (J). *Journal of Urology*, 2019, 202(3): 592-598.
- (3) Gratzke C, Bachmann A, Descazeaud A, et al. EAU Guidelines on the Assessment of Non-neurogenic Male Lower Urinary Tract Symptoms including Benign Prostatic Obstruction - Science Direct (J). *European Urology*, 2015, 67(6): 1099-1109.
- (4) 王贻兵, 王侠. 经尿道前列腺切除术与耻骨上前列腺切除术治疗大体积前列腺增生的效果比较 (J). *中国基层医药*, 2019, 26(20): 2467-2470.
- (5) 黄健. 中国泌尿外科和男科疾病诊断治疗指南 2019 版 (M). 北京: 科学出版社, 2020.
- (6) 李笑, 曹德宏, 任正举, 等. 前列腺增生的激光微创治疗研究进展 (J). *中华腔镜泌尿外科杂志 (电子版)*, 2020, 14(5): 83-86.
- (7) 刘宏伟, 左玲, 柳建军, 等. 经尿道等离子前列腺切除术与电切术治疗大体积前列腺增生疗效比较 (J). *中国男科学杂志*, 2015, 29(11): 45-48, 52.
- (8) 孙建明, 孙龙飞, 李勇, 等. 经尿道等离子前列腺切除术 282 例 (J). *海南医学*, 2011, 39(13): 85-87.
- (9) 何庆鑫, 李学德, 江志勇, 等. 前列腺切除术联合小切口膀胱切开术治疗大体积前列腺增生并膀胱结石的疗效观察 (J). *临床泌尿外科杂志*, 2014, 8(29): 688-690.
- (10) 韩冲芳, 吕洁萍, 闫建青, 等. 大样本老年病人麻醉的病例分析 (J). *山西医科大学学报*, 2005, 3(36): 352-354.
- (11) 冯立, 张笑萍, 于丽, 等. 提高截石位手术中体位安全管理的模式与效果评价 (J). *河北医科大学学报*, 2014, 35(9): 1106-1107.

〔文章编号〕 1007-0893(2021)05-0011-03

DOI: 10.16458/j.cnki.1007-0893.2021.05.004

广陈皮在白白血病 KG1a 细胞株凋亡中的作用机制分析

范佳鑫 吴建伟 黄建栩 李元明 郑 荣

(暨南大学附属江门中医院 江门市五邑中医院, 广东 江门 529000)

〔摘要〕 **目的:** 探究广陈皮中的主要成分川陈皮素及橙皮苷在白白血病 KG1a 细胞株凋亡中的作用机制。**方法:** CCK-8 法检测细胞抑制率; 流式细胞术检测细胞周期变化; Western blot 检测细胞 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白表达。**结果:** 川陈皮素及橙皮苷浓度不同对于 KG1a 细胞增殖抑制率影响不同, 时间增加, 增殖抑制越明显, 剂量浓度越高增值越依赖, 川陈皮素和橙皮苷对细胞阻滞周期有所不同且两者能够降低细胞的抗凋亡蛋白 Bcl-2 蛋白表达、增加 Bax 及 Caspase-3 蛋白表达。**结论:** 川陈皮素与橙皮苷可以有效抑制 KG1a 细胞增殖及诱导其凋亡。这可能与 Bcl-2 蛋白表达下调、Bax、Caspase-3 蛋白表达上调相关。

〔关键词〕 白血病; KG1a 细胞; 广陈皮

〔中图分类号〕 R 733.7; R 285 〔文献标识码〕 A

Mechanism of Pericarpium Citri Reticulatae on Apoptosis of Leukemia KG1a Cell Line

FAN Jia-xin, WU Jian-wei, HUANG Jian-xu, LI Yuan-ming, ZHENG Rong

(Jiangmen Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Jinan University, Wuyi Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Jiangmen 529000)

〔Abstract〕 **Objective** To explore the mechanism of pericarpin and hesperidin in the apoptosis of leukemia KG1a cell line. **Methods** CCK-8 method was used to detect cell inhibition rate; flow cytometry was used to detect cell cycle changes; Western blot was used to detect the protein expression of bcl-2, Bax and caspase-3. **Results** the inhibitory effects of pericarpin and hesperidin on the proliferation of KG1a cells were time and dose-dependent, and the cell cycle was obviously blocked. Both of them could decrease the expression of bcl-2 protein and increase the expression of Bax and caspase-3 protein. **Conclusion** pericarpin and hesperidin can effectively inhibit the proliferation and induce apoptosis of KG1a cells. This may be related to the down-regulation of Bcl-2 protein expression and up-regulation of Bax and caspase-3 protein expression.

〔Key Words〕 Leukemia; KG1a cells; Pericarpium Citri Reticulatae

〔收稿日期〕 2020-12-19

〔基金项目〕 广东省中医药管理局科研立项项目资助课题 (20181274)

〔作者简介〕 范佳鑫, 男, 主治医师, 主要从事血液科各疾病的诊断和治疗工作。

急性髓系白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 是一种异质性很强的恶性血液系统疾病。发病率、死亡率呈逐年递增趋势。严重的影响了患者的身体健康。化疗是控制疾病有效的办法,但同时会带来诸多并发症,比如骨髓抑制,感染,出血等^[1]。尤其老年患者,在用药治疗过程中极易出现不耐受情况,影响患者生活质量与生命安全^[2]。在这一背景下,临床医学需要不断深入研究 AML 疾病的治疗方法。为此,本研究重点以白血病 KG1a 细胞为研究对象,探讨川陈皮素、橙皮苷对 KG1a 细胞株的作用机制。

1 资料与方法

1.1 基本资料

研究设备以及研究试剂均来自正规渠道,见表 1。

表 1 研究样本及设备资料

研究内容	来源
KG1a 细胞株	南方医科大学珠江医院惠赠
川陈皮素	成都瑞芬思生物科技有限公司
橙皮苷	成都曼斯特生物科技有限公司
CCK-8 试剂盒	日本同仁株式会社
二甲亚砜	DMSO, 美国 Amresco 公司
细胞周期检测试剂盒	江苏碧云天生物技术研究所
抗 Caspase-3 抗体、Bcl-2 抗体、 β -actin 抗体、BAX 抗体以及抗兔二抗	美国 Cell signaling Technology 公司
RPMI-1640 培养基、胎牛血清	hyclone 公司

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与溶液配置 完全培养基涉及内容: 10% 胎牛血清 + RPMI-1640 基础培养基 + 1% 青霉素 + 1% 链霉素。将 KG1a 细胞株放置其中。周围温度控制在 37 °C, 注入 CO₂ 饱和浓度控制在 5% 左右, 以恒温恒湿培养。培养环节, 对细胞污染进行特殊观察。利用磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 联合川陈皮素制作母液, 浓度控制在 10 mmol · L⁻¹。而后将其置于 -20 °C 环境中。再利用 PBS 联合橙皮苷制作母液, 浓度控制在 10 mmol · L⁻¹, 而后将其置于 4 °C 环境中, 避免光照射。对药物进行稀释, 按所需浓度加入到处理组中。

1.2.2 KG1a 细胞增殖抑制 在实验过程中将实验分成三组, 实验对照组, 川陈皮素组以及橙皮苷组。而后分别将 KG1a 细胞放置到相应数量的孔板中, 孔板体积为定量体积, 容量 100 μ L。三组均设复孔 5 个。三组实验放置时间分别控制在 24 h、48 h、72 h。而后在三组实验孔板中加入 10 μ L CCK-8 液。保持温度 37 °C、5% CO₂、饱和湿度, 维持 3 h 的培养。培养完成后在酶标仪上读取 450 nm 处的吸光值, 反复重复 3 次即可。

1.2.3 细胞周期的流式细胞术检测 该阶段研究重点以药物作用和阴性作用进行分组。药物作用收集药物作用 48 h 后的溶液 178 mL, 进行离心处理, 时间为 5 min 而后收集细胞, 将收集的细胞置于 1 mL PBS, 将 0.5 mL 细胞悬液使用冰乙酸重新固定, 冰乙酸量控制在 70% 即可。将悬液置于 -20 °C 环境中, 放置 24 h 后进行 PBS 洗涤, 去除上层物质,

向其中加入 400 μ L DNA 染液, 而后进行染色, 时间控制在 0.5 h 即可, 染色后进行 PBS 洗涤, 利用细胞分析仪分析观察细胞周期。

1.2.4 Western blot 实验 将药物作用 48 h 后 KG1a 细胞进行收集, 在收集后的细胞中加入蛋白裂解液。将加入蛋白裂解液后细胞的上层物质进行收集, 对物质进行 SDS-PAGE 电泳和转膜, 完成相关操作后进行单抗处理, 时间为 2 h, 利用 PBS 洗涤处理, 次数 3 次即可。完成后进行 HRP-二抗。其目的是观察 Bcl-2, Bax, Caspase-3 表达水平, 利用相关仪器进行分析。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件进行数据处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验, 计数资料用百分比表示, 采用 χ^2 检验, *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同组间 KG1a 细胞增殖抑制情况比较

川陈皮素及橙皮苷浓度不同对于 KG1a 细胞增殖抑制率影响不同, 时间增加, 增殖抑制越明显, 剂量浓度越高增殖越依赖, 组间差异均具有统计学意义 (*P* < 0.01), 见表 2、表 3、图 1、图 2。

表 2 川陈皮素对 KG1a 细胞增殖抑制情况 (*n* = 5, $\bar{x} \pm s$)

川陈皮素浓度 / μ mol · L ⁻¹	KG1a 细胞增殖抑制率 / 时间		
	24 h	48 h	72 h
IC30	42.18 ± 1.24	26.66 ± 2.10 ^c	18.92 ± 0.30 ^{cd}
IC50	77.37 ± 3.89 ^a	50.89 ± 1.84 ^{ac}	35.51 ± 4.47 ^{acd}
IC80	208.88 ± 18.14 ^{ab}	147.01 ± 5.23 ^{abc}	86.67 ± 9.93 ^{abcd}

与 IC30 同时段比较, ^a*P* < 0.01; 与 IC50 同时段比较, ^b*P* < 0.01; 与同浓度 24 h 比较, ^c*P* < 0.05; 与同浓度 48 h 比较, ^d*P* < 0.01

表 3 橙皮苷对 KG1a 细胞增殖抑制情况 (*n* = 5, $\bar{x} \pm s$)

橙皮苷浓度 / μ mol · L ⁻¹	KG1a 细胞增殖抑制率 / 时间		
	24 h	48 h	72 h
IC30	35.13 ± 0.44	22.29 ± 1.22 ^e	16.81 ± 1.67 ^{gh}
IC50	66.10 ± 1.42 ^c	42.81 ± 1.30 ^{eg}	30.43 ± 1.59 ^{gh}
IC80	188.35 ± 8.46 ^{cf}	124.65 ± 3.86 ^{efg}	80.74 ± 3.81 ^{efgh}

与 IC30 同时段比较, ^e*P* < 0.01; 与 IC50 同时段比较, ^f*P* < 0.01; 与同浓度 24 h 比较, ^g*P* < 0.05; 与同浓度 48 h 比较, ^h*P* < 0.01

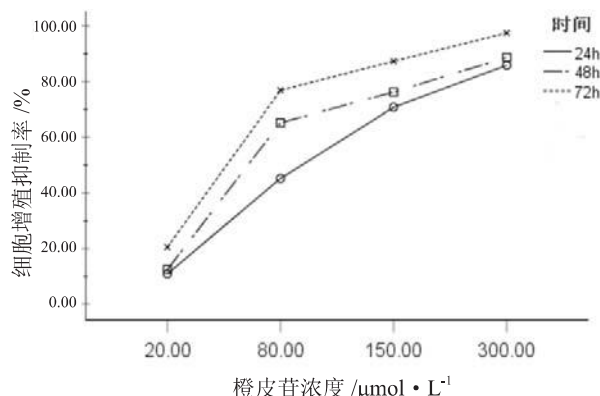


图 1 川陈皮素对 KG1a 细胞增殖抑制情况

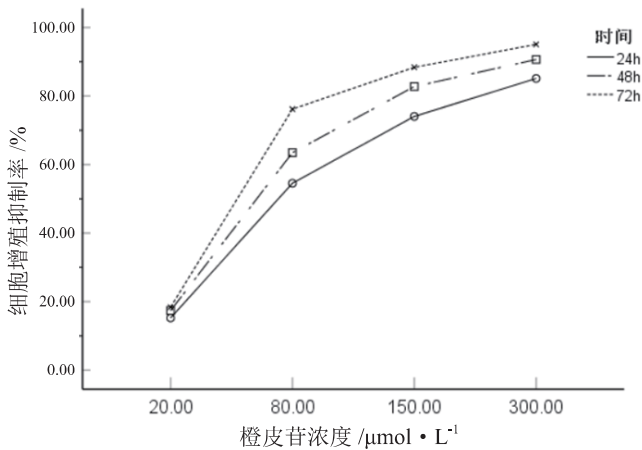


图 2 橙皮苷对 KG1a 细胞增殖抑制情况

2.2 川陈皮素和橙皮苷对 KG1a 细胞周期的影响

川陈皮素和橙皮苷单药及联合用药处理 KG1a 细胞 48 h 后, 与实验对照组相比, 川陈皮素使 KG1a 细胞阻滞在 G1 期, S 期细胞减少; 橙皮苷主要是在细胞周期的 S 期发挥抗肿瘤作用, 随着浓度的增加使大多数处于增殖的 KG1a 细胞 S 期逐渐减少, 阻滞在 G1 期, 两药联合组 KG1a 细胞的 S 期和 G2/M 期均急剧下降, 使大部分细胞无法进入正常的细胞周期中, 引起细胞凋亡, 见表 4。

表 4 川陈皮素和橙皮苷对 KG1a 细胞周期的影响 (n = 5, $\bar{x} \pm s, \%$)

组 别	G1/G0	S	G2/M
实验对照组	31.40 ± 3.18	60.51 ± 2.66	8.09 ± 3.04
川陈皮素	39.08 ± 4.24 ^f	57.23 ± 3.48 ^f	3.69 ± 2.87 ^f
橙皮苷	21.72 ± 1.13 ^f	50.29 ± 2.09 ^f	27.99 ± 3.05 ^f
两药联合	50.02 ± 2.65 ^f	34.21 ± 2.13 ^f	15.77 ± 1.13 ^f

与实验对照组比较, ^fP < 0.01

2.3 不同组间 KG1a 细胞凋亡相关蛋白的表达水平比较

Western blot 结果显示, 川陈皮素以及橙皮苷在单一用药情况下 Bcl-2 表达水平逐渐下降, 而凋亡蛋白情况相反, 逐渐增加。联合用药后, 表达情况更明显, 见图 3。

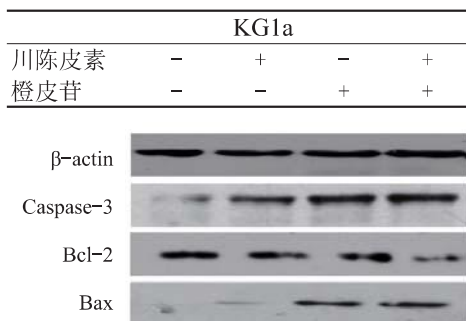


图 3 不同组间 KG1a 细胞凋亡相关蛋白的表达水平

3 讨论

陈皮是芸香科植物橘及其栽培变种的干燥成熟果皮, 药材分为“陈皮”和“广陈皮”, 后者主要主产于广东新会, 是广东十大地道药材之一, 具有理气健脾、燥湿化痰的功效。其中含有的川陈皮素以及橙皮苷具有对多种癌细胞有抑制作用, 并且可加速癌细胞凋亡速度^[3]。AML 是一种血液肿瘤, 患有疾病的患者治疗过程中需要忍受极大的痛苦进行化疗治疗, 而且疾病在治疗过程使用的药剂往往在杀死肿瘤细胞的过程中对机体产生毒副作用, 影响机体的其他组织, 在肿瘤治疗中, 传统中医药往往可以起到减毒增效的作用^[4-5]。本研究中采用不同浓度的川陈皮素及橙皮苷对白血病 KG1a 细胞进行体外杀伤作用, 采用细胞增殖抑制率、细胞凋亡率、细胞形态、凋亡蛋白测定指标情况, 结果显示川陈皮素、橙皮苷单药对 KG1a 细胞均具有增殖抑制作用, 并呈时间剂量依赖性。流式细胞检测结果显示两药联合明显将 KG1a 细胞阻滞在 G1/G0 期。在细胞凋亡蛋白表达中, 与单药处理组相比, 联合药物处理组抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平显著下调, 促凋亡蛋白 Bax、Caspase-3 的表达水平上调, 而起到加速细胞凋亡的作用。

本研究中分别证实了川陈皮素, 橙皮苷等对白血病 KG1a 细胞的凋亡抑制有很好的促进作用, 并且加快细胞凋亡, 进一步说明了广陈皮在抗白血病方面具有一定的发展前景。

[参考文献]

- (1) 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.
- (2) 刘洁, 霍本念, 张婷, 等. 胚胎干细胞对急性髓系白血病细胞 KG-1a 的影响 (J). 中国实验血液学杂志, 2018, 26(2): 389-394.
- (3) 马翠, 陈雅琳, 白天鸽, 等. 姜黄素联合阿糖胞苷对人急性髓系白血病细胞 KG1a 增殖、自噬及凋亡的影响 (J). 中国药理学通报, 2018, 34(7): 946-952.
- (4) 范佳鑫, 曾英坚, 吴建伟, 等. 三氧化二砷联合姜黄素对 KG1a 细胞的协同杀伤作用 (J). 中国实验血液学杂志, 2014, 22(5): 1267-1272.
- (5) 李莉, 王黎, 魏广民, 等. 淫羊藿素对 KG-1a 细胞增殖和凋亡的影响及其相关作用机制 (J). 中国实验血液学杂志, 2018, 26(3): 738-742.