

壳聚糖纳米颗粒对 K562 细胞增殖的影响

罗慧英^{1,2}, 黄亚红¹, 杨林¹(1.甘肃中医学院, 兰州 730000; 2.甘肃省中药药理与毒理学省级重点实验室, 兰州 730000)

摘要: 目的 评价壳聚糖纳米颗粒对 K562 细胞增殖的影响, 并探讨相关机制。方法 采用 MTT 法对壳聚糖纳米颗粒的最佳作用时间和作用浓度进行筛选, 免疫荧光技术和透射电镜技术考察壳聚糖纳米颗粒对 K562 细胞形态的影响, 流式细胞仪检测壳聚糖纳米颗粒对线粒体膜电位、细胞内 ROS 含量和 Ca^{2+} 浓度的影响。结果 壳聚糖纳米颗粒($15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 可以明显诱导 K562 细胞出现凋亡改变, 表现为: 细胞核变小, 出现核聚缩等现象。同时线粒体膜电位崩解, ROS 含量增加, Ca^{2+} 浓度增加。结论 壳聚糖纳米颗粒对 K562 细胞的增殖有抑制作用, 其机制可能与诱导细胞凋亡有关。

关键词: 壳聚糖纳米颗粒; K562 细胞; 增殖; 细胞凋亡

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2014)10-1175-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.10.003

Effect of Chitosan Nanoparticles on the Proliferation of K562 Cells

LUO Huiying^{1,2}, HUANG Yahong¹, YANG Lin¹(1.Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2.Key Laboratory of Pharmacology and Toxicology for Traditional Chinese Medicine of Gansu Province, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To evaluate the effect of chitosan nanoparticles on the proliferation of K562 cells, and to explore the related mechanism. **METHODS** The best time and concentration of chitosan nanoparticles were screened by MTT method. Immunofluorescence and transmission electron microscope were used to study the effect of chitosan nanoparticles on the morphology of K562 cells. FACS was used to detect the effect of chitosan nanoparticles on MMP, intracellular ROS concentration, and Ca^{2+} concentration. **RESULTS** Chitosan nanoparticles($15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) could induce K562 cells apoptosis, such as nuclei smaller, nuclear condensation phenomena, company with the collapse of mitochondrial membrane potential, increased ROS content, and the increased of Ca^{2+} concentration. **CONCLUSION** Chitosan nanoparticles can inhibit the proliferation of K562 cells, the mechanism may be related to inducing cell apoptosis.

KEY WORDS: chitosan nanoparticles; K562 cells; proliferation; apoptosis

时至今日, 化疗依然是治疗肿瘤的常见方法, 但是化疗所引起的不良反应往往让患者难以耐受。纳米颗粒因其良好的靶向性和释放可控性逐渐引起人们的关注^[1-2]。研究表明柔红霉素纳米颗粒体内体外抗肝癌作用都明显增强^[3]。壳聚糖是由自然界广泛存在的几丁质经过脱乙酰作用得到的一种天然物质, 化学名为聚葡萄糖胺[(1-4)-2-氨基-*B-D* 葡萄糖]。自 1859 年, 法国人 Rouget 首先得到壳聚糖后, 这种天然高分子的生物官能性和相容性、血液相容性、安全性、微生物降解性等优良性能被各行各业广泛关注, 在医药、食品、化工、化妆品、水处理、金属提取及回收、生化和生物医学工程等诸多领域的应用研究取得了重大进展^[4-6]。本研究评价壳聚糖纳米颗粒对白血病 K562 细胞增殖的抑制作用, 并对相关机制进行探讨。

1 材料与方法

1.1 药品、试剂与仪器

壳聚糖纳米颗粒(分子量约为 3 000, 粒径为 40 nm 左右, 表面电荷为 50 mV)由西北民族大学化学化工学院提供, 高压灭菌后, 用双蒸水配制所需浓度(10, 15, 20, 25, 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)备用。JEM-100CX 透射电镜(JEOL 公司); 流式细胞仪(美国 Becton Dickinson)。

1.2 细胞培养

K562 细胞(中科院上海细胞库); 小牛血清和 RPMI 1640 均购自杭州四季青公司; K562 细胞正常培养在含有 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液中, 取对数生长期的细胞进行试验。

1.3 壳聚糖纳米颗粒细胞毒性测试

采用 MTT 法, 对数生长的 K562 细胞与不同浓度的壳聚糖纳米颗粒在 96 孔板中孵育不同的时

基金项目: 甘肃省青年科技基金计划(1208RJYA024)

作者简介: 罗慧英, 女, 博士, 副教授, 硕士

Tel: (0931)8765395

E-mail: louria@126.com

间(12, 24, 36, 48 h), 弃上清液加入 20 μL MTT 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 4 h, 反应产物用 DMSO 提取, 490 nm 处测定吸光度, 并按如下公式计算细胞抑制率: 细胞抑制率=(1-A_{给药组}/A_{对照组}) \times 100%, 线性回归法计算 IC₅₀。

1.4 细胞核荧光染色

采用吖啶橙-溴化乙锭(AO-EtBr)双染的方法研究壳聚糖纳米颗粒对 K562 细胞形态的影响。 10^5 个 K562 细胞与壳聚糖纳米颗粒($15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)反应 24 h 后, 收集细胞, PBS 洗涤 2 次, 加入 10 μL 的 AO-EtBr 染料, 10 min 后荧光显微镜检查并摄像。

1.5 透射电镜检查

采用透射电镜技术检测壳聚糖纳米颗粒对 K562 细胞超微结构的影响。K562 细胞与壳聚糖纳米颗粒($15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)反应 24 h 后, 离心收集细胞, PBS 洗涤 2 次, 先用 Karnovsky 液固定, 再用 1% 的 OsO₄ 固定, 脱水、干燥、包埋、切片, 电镜下观察并摄像。

1.6 线粒体膜电位测定

K562 细胞与 $15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 壳聚糖纳米颗粒反应不同时间后, 罗丹明 123($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)染色, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂ 细胞培养箱孵育 10 min, 离心后 PBS 洗涤 2 次, 重悬细胞于培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂ 培养 60 min; 流式细胞仪(激发波长 490 nm, 发射波长 530 nm)检测线粒体膜电位。

1.7 细胞内 ROS 含量测定

正常情况下, 没有荧光的 2, 7-二氯-二氢荧光素双乙酸盐(DCFH-DA)进入细胞内后会水解为 DCFH, 细胞内的活性氧物质(ROS)可以将其氧化为有荧光的 DCF, 通过流式细胞仪测定 DCF 的荧光强度可以间接反映 ROS 的含量。方法简介如下: K562 细胞经 $15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的壳聚糖纳米颗粒处理不同时间后, PBS 洗涤, 与含有 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DCFH-DA 的 1640 液共孵 60 min, 收集细胞, 流式细胞仪(激发波长 488 nm, 发射波长 525 nm)检测荧光强度。

1.8 细胞内 Ca²⁺含量测定

细胞内 Ca²⁺浓度的变化, 通过测定荧光染料 Fluo-3 的荧光强度来表示。K562 细胞经 $15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的壳聚糖纳米颗粒处理不同时间后, PBS 洗涤 2 次, 与含有 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Fluo-3 的 1640 液 37 $^{\circ}\text{C}$ 共孵 30 min, 收集细胞, 流式细胞仪(激发波长 380 nm, 发射波长 510 nm)检测荧光强度。荧光强度的计算公式为: 荧光强度(%)=(给药组荧光强度/

对照组荧光强度) \times 100%。

2 结果

2.1 壳聚糖纳米颗粒对 K562 细胞生长的抑制作用

当不同浓度的壳聚糖纳米颗粒与 K562 细胞反应不同时间后, 其生长都受到的抑制, 抑制作用呈剂量依赖性和时间依赖性。12, 24, 36, 48 h 的 IC₅₀ 分别为 37.78, 14.26, 10.93, $9.78 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 结果见图 1。在接下来的试验中, 采用 $15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的壳聚糖纳米颗粒, 反应时间为 24 h。

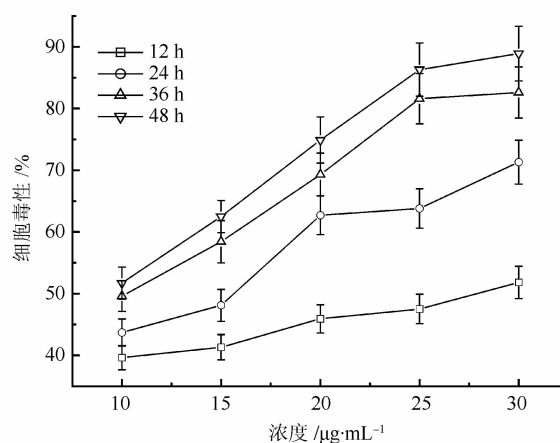


图 1 壳聚糖纳米颗粒对 K562 细胞生长的抑制作用

Fig. 1 Inhibition effects of Chitosan Nanoparticles on proliferation in K562 cells

2.2 壳聚糖纳米颗粒对 K562 细胞细胞核形态的影响

一般情况下, 溴乙锭不能进入正常细胞内, 细胞呈现的是吖啶橙的亮绿色, 只有坏死的细胞才会显现溴乙锭的褐色。正常的 K562 细胞呈现均匀的亮绿色, 而壳聚糖($15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)处理 24 h 后, 细胞核明显变小, 出现了浓缩和聚集现象, 坏死的情况也有出现。结果见图 2。

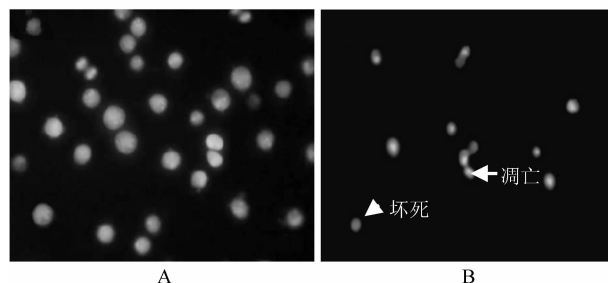


图 2 壳聚糖纳米颗粒对 K562 细胞细胞核形态的影响

A-正常细胞; B-壳聚糖处理后的细胞。

Fig. 2 Effects of chitosan nanoparticles on morphology of nuclei in K562 cells

A-normal cells; B-cells treated by chitosan nanoparticles.

2.3 壳聚糖纳米颗粒对 K562 细胞超微结构的影响

透射电镜检测结果见图 3。由图可知,正常细胞核结构松散均匀,细胞表面可见纤毛,经 $15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 壳聚糖纳米颗粒处理后,细胞核变小,出现核聚集的现象,细胞表面纤毛也消失了;同时,大量坏死的细胞也被检测到,这些细胞内部细胞结构混乱,核物质溢出。

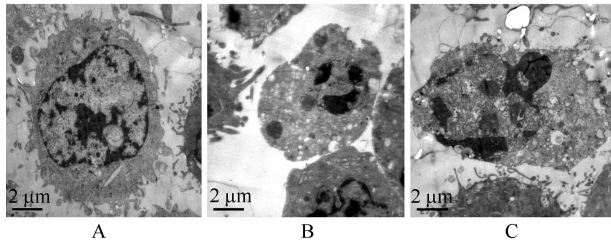


图 3 壳聚糖纳米颗粒对 K562 细胞超微结构的影响
A-正常细胞; B-壳聚糖处理后的细胞(纤毛消失); C-壳聚糖处理后的细胞(细胞坏死)。

Fig. 3 Effects of chitosan nanoparticles on ultrastructure in K562 cells

A-normal cells; B-cells treated by chitosan nanoparticles(cilia disappeared); C-cells treated by chitosan nanoparticles(necrosis).

2.4 壳聚糖纳米颗粒对 K562 细胞线粒体膜电位的影响

通过流式细胞仪检测发现,随着壳聚糖纳米颗粒处理的时间增加,线粒体膜电位(MMP)明显下降,且呈时间依赖性,处理 5 h 就达到了 3.85%,结果见图 4。提示壳聚糖纳米颗粒可以使 K562 细胞线粒体膜电位崩解。

2.5 壳聚糖纳米颗粒对 K562 细胞 ROS 含量和 Ca^{2+} 浓度的影响

随着壳聚糖纳米颗粒处理时间的延长,ROS 的含量不断增加,1 h 后 ROS 含量与对照组比较就有了明显差异。细胞内 Ca^{2+} 浓度在壳聚糖纳米颗粒处理 30 min 后就明显升高,1.5 h 后达到峰值后急剧下降,提示 Ca^{2+} 浓度升高可能是壳聚糖纳米颗粒对 K562 细胞作用的上游事件。结果见图 4。

3 讨论

近年来,壳聚糖纳米颗粒作为控释、靶向和可生物降解的药物传递系统被广泛认可^[7-8],尤其是在化疗药物的使用中,可以提高化疗药物的疗效,减少不良反应^[9-11]。笔者采用 MTT 法发现壳聚糖纳米颗粒对白血病 K562 细胞生长有抑制作用,且作用呈时间依赖性和剂量依赖性。

一般来讲,化疗药物主要通过 2 个途径杀死肿瘤细胞,一是诱导肿瘤细胞凋亡,二是诱导肿

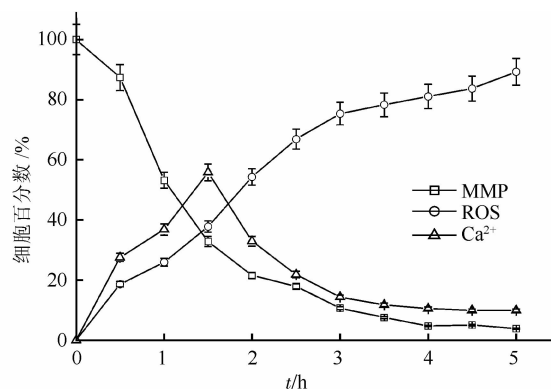


图 4 壳聚糖纳米颗粒对 K562 细胞线粒体膜电位、细胞内 ROS 含量和 Ca^{2+} 浓度的影响

Fig. 4 Effects of chitosan nanoparticles on MMP, the contents of ROS and Ca^{2+} in K562 cells

瘤细胞坏死。凋亡是细胞的一种程序性死亡,对于机体保持动态平衡非常重要,凋亡程序出现障碍有可能会诱发一系列的疾病,包括:癌症、自生免疫性疾病、病毒感染、神经退行性病变、艾滋病、心血管疾病等^[12]。作为细胞死亡的一种模式,凋亡有其特有的形态学和生化学标志。在本试验中,采用 AO-EtBr 双染和 TEM 技术的方法,不仅发现了 K562 细胞凋亡的形态学特征(核聚缩等),还发现了 K562 细胞的坏死情况。

线粒体在保持细胞内环境动态平衡中起着非常重要的作用,凋亡事件中的许多关键步骤都有线粒体的参与,例如:电子传递、MMP 崩解、半胱氨酸天冬酶的释放^[13]等,来自上游的不同信号汇集到线粒体,触发或抑制这些事件的发生,引发下游的效应。在本试验中,发现随着壳聚糖纳米颗粒处理的时间增加,线粒体 MMP 明显下降,且呈时间依赖性,提示壳聚糖纳米颗粒可以使线粒体 MMP 崩解,线粒体机能障碍,从而诱发凋亡。

ROS 在低浓度的时候是第二信使,当线粒体膜破裂后,ROS 进入细胞液中,起到传递凋亡信号的作用,同时调节细胞内 Ca^{2+} 浓度^[14]。本试验中,随着壳聚糖纳米颗粒处理时间的延长,ROS 的含量不断增加,1 h 后 ROS 含量与对照组比较就有了明显差异。细胞内 Ca^{2+} 浓度在壳聚糖纳米颗粒处理 30 min 后就明显升高,1.5 h 后达到峰值后急剧下降,提示 Ca^{2+} 浓度升高可能是壳聚糖纳米颗粒对 K562 细胞作用的上游事件。

本实验表明,壳聚糖纳米颗粒可以抑制 K562 细胞的增殖,其机制可能与诱导 K562 细胞凋亡有关。

REFERENCES

- [1] SMETS A. Programmed cell death (apoptosis) and response to anti-cancer drugs [J]. *Anticancer Drugs*, 1994, 5(2): 3-9.
- [2] LANGER R. Biomaterials in drug delivery and tissue engineering: One laboratory's experience [J]. *Accounts Chem Res*, 2000, 33(10): 94-101.
- [3] BARRAUD L, MERLE P, SOMA E, et al. Increase of doxorubicin sensitivity by doxorubicin-loading into nanoparticles for hepatocellular carcinoma cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Hepatol*, 2005, 42(4): 629-631.
- [4] SUDARSHAN N R, HOOVER D G, KNORR D. Antibacterial action of chitosan [J]. *Food Biotechnol*, 1992, 6(12): 257-272.
- [5] TSAI G J, SU W H. Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli* [J]. *J Food Prot*, 1999, 62(3): 239-243.
- [6] JANES K A, FRESNEAU M P, MARAZUELA A, et al. Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin [J]. *J Control Rel*, 2001, 73(2): 255-267.
- [7] FAN C X, CHEN Z X, GAO W H, et al. Pharmacokinetics, tissue distribution of *O*-carboxymethyl chitosans ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles in rats [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2013, 30(10): 1088-1094.
- [8] XIE L Y, HU Q, WU Y L, et al. Preparation and characterization of folic acid and PEG conjugated chitosan nanoparticles [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2013, 30(3): 284-289.
- [9] QI L, XU Z, JIANG X, et al. Cytotoxic activities of chitosan nanoparticles and copper-loaded nanoparticles [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2005, 15(11): 1397-1399.
- [10] QI L, XU Z, LI Y, et al. *In vitro* effects of chitosan nanoparticles on growth of human gastric cancer cell line MGC803 cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(10): 5136-5141.
- [11] QI L, XU Z. *In vivo* antitumor activity of chitosan nanoparticles [J]. *Bioorg Med Chem Lett* 2006, 16(9): 4243-4245.
- [12] THOMPSON C B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease [J]. *Science*, 1995, 267(7): 1456-1462.
- [13] MARCHETTI P, CASTEDO M, SUSIN S A, et al. Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis [J]. *J Exp Med*, 1996, 184(4): 1155-1160.
- [14] YANO H, MIZOGUCHI A, FUKUDA K, et al. The herbal medicine sho-saiko-to inhibits proliferation of cancer cell lines by inducing apoptosis and arrest at the G0/G1 phase [J]. *Cancer Res*, 1994, 54(12): 448-454.

收稿日期: 2013-12-29

纤体降脂 I 号不同提取物对去卵巢大鼠的影响

甘国兴¹, 吴晓芳¹, 莫新民², 李劲平³(1.清远市中医院, 广东 清远 511500; 2.湖南中医药大学, 长沙 410007; 3.中南大学药学院, 长沙 410013)

摘要: 目的 研究纤体降脂 I 号不同提取物对去卵巢大鼠的影响。方法 270 g 左右的 SD 大鼠 100 只, ♀, 按体质量随机选出正常组和假手术组各 10 只, 其余采用双侧去卵巢法, 建立去卵巢大鼠模型, 灌胃给药干预, 连续 13 周。测定大鼠食量、体质量、腹脂含量、Lee's 指数、血脂、甲状腺激素含量。结果 各提取物均能抑制模型鼠体质量增长($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 石油醚提取 A 部分能明显抑制食量增长($P < 0.01$), 降低腹脂含量和 Lee's 指数($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 显著降低血清 LDL-C、TC 水平($P < 0.01$), 有抑制子宫萎缩的趋向。结论 纤体降脂 I 号各提取物均能抑制模型鼠体质量的生长。石油醚提取 A 部分能够有效抑制模型鼠体质量和食欲的增加, 改善脂代谢紊乱, 有抑制子宫萎缩的趋向, 可能是纤体降脂 I 号的主要药效物质群。

关键词: 纤体降脂 I 号; 提取物; 去卵巢大鼠; 作用机制

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2014)10-1178-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.10.004

Effect of Different Extracts from Xianti Jiangzhi I Prescription on Ovariectomized Rats

GAN Guoxing¹, WU Xiaofang¹, MO Xinmin², LI Jingping³(1. Qingyuan Hospital of TCM, Qingyuan 511500, China; 2. Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, China; 3. College of Pharmacy, Central South University, Changsha 410013, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effect of different extracts of Xianti Jiangzhi I prescription on ovariectomized rats. **METHODS** All of 100 female SD rats, weighted about 270 g, were divided randomly into 10 groups, ten rats each group. The

基金项目: 广东省医学科研基金项目(B2013417)

作者简介: 甘国兴, 男, 硕士, 中药师 Tel: 18211320398 E-mail: guoxinggan@126.com