

藤黄酸诱导骨髓瘤 U266 细胞凋亡及机制研究

杨永公 张启国 欧阳建 李翠萍 陈军浩

【摘要】 目的 探讨藤黄酸对人多发性骨髓瘤 U266 细胞凋亡的影响及机制。方法 不同浓度藤黄酸处理 U266 细胞, 四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测对细胞增殖的影响, Annexin V/PI 双染法检测细胞的凋亡, JC-1 染色法检测线粒体跨膜电位水平, 流式细胞仪检测荧光素激活的 Caspase 3、Caspase 8、Caspase 9 阳性细胞水平。结果 藤黄酸呈浓度依赖性抑制 U266 细胞的生长, 藤黄酸 >0.5 μg/ml 才出现较明显的诱导凋亡的能力, 藤黄酸降低 U266 细胞线粒体跨膜电位水平。藤黄酸作用 U266 细胞 24 h 和 48 h 时激活的 Caspase 3、Caspase 8、Caspase 9 阳性细胞比例分别上升 24.9%、31.7%、32.4% 和 57.0%、64.5%、63.5%。结论 藤黄酸可抑制 U266 细胞的生长, 机制与诱导 U266 细胞凋亡有关, 线粒体跨膜电位途径和胞浆激活途径参与了凋亡的发生。

【关键词】 多发性骨髓瘤; 藤黄; 细胞凋亡; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶; U266 细胞

Effect of gambogic acid on the apoptosis of multiple myeloma U266 cell line and its mechanism YANG Yong-gong, ZHANG Qi-guo, OUYANG Jian, LI Cui-ping, CHEN Jun-hao. Department of Hematology and Jiangsu Key Laboratory of Molecular Medicine, Nanjing Drum Tower Hospital, Medical School of Nanjing University, Nanjing 210008, China
Corresponding author: ZHANG Qi-guo, Email: qgzhang8@sina.com

【Abstract】 Objective This study was aimed to investigate the effect of gambogic acid (GA) on the apoptosis of multiple myeloma U266 cell line and its mechanism. **Methods** The U266 cells were treated with GA at different concentration, the inhibition rates were detected by MTT assay. Apoptosis induced by GA was observed by Annexin V/PI doubling staining assay. Mitochondrial membrane potential was measured by JC assay. Activated Caspase 3, Caspase 8 and Caspase 9 in living U266 cells were measured by caspGLOW™ fluorescein staining kit. **Results** U266 cell growth was inhibited in a concentration-dependent manner. GA decreased the mitochondrial membrane potential of U266 cell. GA induced apoptosis of U266 cells and increased activated Caspase 3, Caspase 8, Caspase 9 positive cell number for 24.9%, 31.7%, 32.4% in 24 h and 57.0%, 64.5%, 63.5% in 48 h. **Conclusions** GA inhibits the growth of U266 cell by the effect of apoptosis, GA triggers U266 cell apoptosis through both intrinsic and extrinsic pathways.

【Key words】 Multiple myeloma; GARCINIA MORELLA; Apoptosis; Caspases; U266 cell

藤黄为藤黄科植物藤黄树(*Garcinia hanbaryi* Hook. f.)的树干被割伤后流出的胶状树脂, 藤黄酸是藤黄的主要活性成分。古代医书记载具有攻毒、消肿、祛腐敛疮、止血、杀虫等功效^[1]。研究发现藤黄酸对多种人恶性血液病细胞株如淋巴瘤(Raji、Jurkit)、白血病(K562、U937、HL60)、骨髓增生异常综合征(MDS)(MUTZ-1)等肿瘤细胞具有抗增殖和诱导凋亡的作用^[2-7], 对多发性骨髓瘤 U266 细胞凋亡及 Caspase 信号通路的作用鲜见报道, 我们作了检测如下。

材料与方 法

一、材料

藤黄酸购自美国 Biomol 公司, 纯度 98%; U266 细胞株由中科院上海生命科学院惠赠; 10% 胎牛血清、RPMI 1640 培养液、青霉素、链霉素、谷氨酰胺购自 Gibco 公司; 四甲基偶氮唑盐(MTT)检测细胞增殖及细胞毒性试剂盒、JC-1 细胞凋亡试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司; Annexin V/PI 细胞凋亡试剂盒购自 BD pharmgem 公司; 荧光素激活的 Caspase 3、Caspase 8、Caspase 9 检测试剂盒购自 BioVision 公司。FACS-Canto 流式细胞仪购自美国 BD 公司。

二、方法

1. 细胞培养:将人 U266 细胞调整至 $1.5 \times 10^6/\text{ml}$,接种于 24 孔培养板中,在含 10% 胎牛血清,100 U/ml 青霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素及谷氨酰胺的 RPMI1640 培养液中,取对数生长期细胞进行实验。根据实验分组加入不同浓度的藤黄酸(4.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.0625 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0 $\mu\text{g}/\text{ml}$),37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度培养。实验重复 3 次,每次设 3 个复孔。分别于培养 1 d、2 d、3 d 时取细胞进行检测。

2. MTT 检测细胞生长:将待检细胞悬液 100 μl 加入 96 孔培养板中,加入 5 mg/ml MTT 溶液 50 μl 继续孵育 4 h。离心去上清,加入二甲亚砜 150 μl ,振荡溶解 10 min。每组各作 3 个重复孔。用酶联免疫检测仪测定 490 nm 波长下的吸光度(A),计算细胞生长抑制率。生长抑制率 = $(1 - A_{\text{试验}}/A_{\text{对照}})$ 。

3. Annexin V/PI 双染检测细胞凋亡:分别收集 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 未处理和经藤黄酸处理的细胞 100 μl ,细胞悬液加入 Annexin V/FITC 5 μl 和 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 PI 溶液 10 μl ,混匀后室温避光孵育 15 min,加入磷酸盐缓冲液(PBS)400 μl ,采用流式细胞仪进行荧光强度分析与早期凋亡细胞检测,用 BD 公司 FACSDiva software 软件分析结果。

4. JC-1 染色检测线粒体的功能:收集 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 细胞,用 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养液 1 ml 重悬,加入 1 mg/ml JC-1 5 μl 充分混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中避光孵育 20 min,离心去除上清并用 PBS 洗涤 2 次,流式细胞仪检测,激发波长为 488 nm,检测波长为 575 nm,用荧光强度值表示线粒体跨膜电位。

5. 流式细胞仪检测荧光素激活的 Caspase 3、Caspase 8、Caspase 9 表达:收集 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 藤黄酸处理后的 U266 细胞($1 \times 10^6/\text{ml}$) 1 ml,PBS 漂洗 2 次,同时设立不加药物的对照组。把藤黄酸药物作用组和对照组分入 300 μl 的 Eppendorf 管中,加 1 μl FITC-DEVD-FMK 于各管中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中孵育 1 h,离心机半径 16 cm,3000 r/min 离心 5 min 后移去上清,把细胞悬浮于漂洗液中再次离心去上清。悬浮细胞于 300 μl 漂洗液放置于冰上,使用流式细胞仪 FL-1 通道检测。

三、统计学分析

采用 SPSS 11.5 软件进行数据处理,实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析(ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 藤黄酸抑制骨髓瘤 U266 细胞的生长:以 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.0625 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、4.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度的藤黄酸分别处理 U266 细胞 24 h,MTT 法检测细胞增殖情况。统计学处理表明 U266 细胞第 1 天增殖抑制率在低浓度各组(0.0625 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$)与 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),较高浓度组(0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、4.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)与 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),藤黄酸呈浓度依赖性抑制 U266 细胞增殖,见图 1。

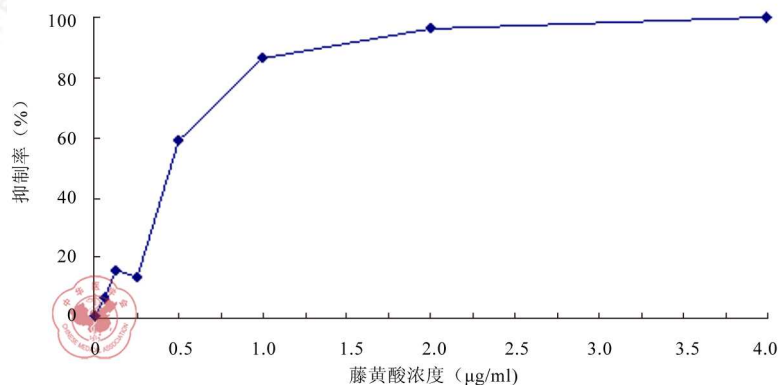


图1 不同浓度藤黄酸作用24 h对U266细胞增殖的抑制作用

2. 藤黄酸诱导骨髓瘤 U266 细胞的凋亡; Annexin V-FITC/PI 双标法检测藤黄酸对 U266 细胞凋亡的影响,其中早期凋亡细胞指 Annexin V-FITC 标记阳性,而 PI 标记阴性的细胞群;晚期凋亡细胞指的是 Annexin V-FITC 与 PI 均标记阳性的细胞群;总凋亡率为早期凋亡率与晚期凋亡率的总和。藤黄酸作用 24 h 的 U266 细胞凋亡情况, >0.5 $\mu\text{g/ml}$ 才显示明显的诱导凋亡的能力,见图 2,3。

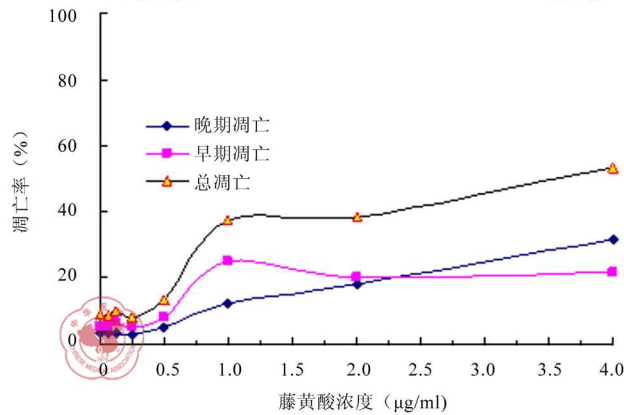


图2 不同浓度藤黄酸作用24 h对U266细胞凋亡的影响

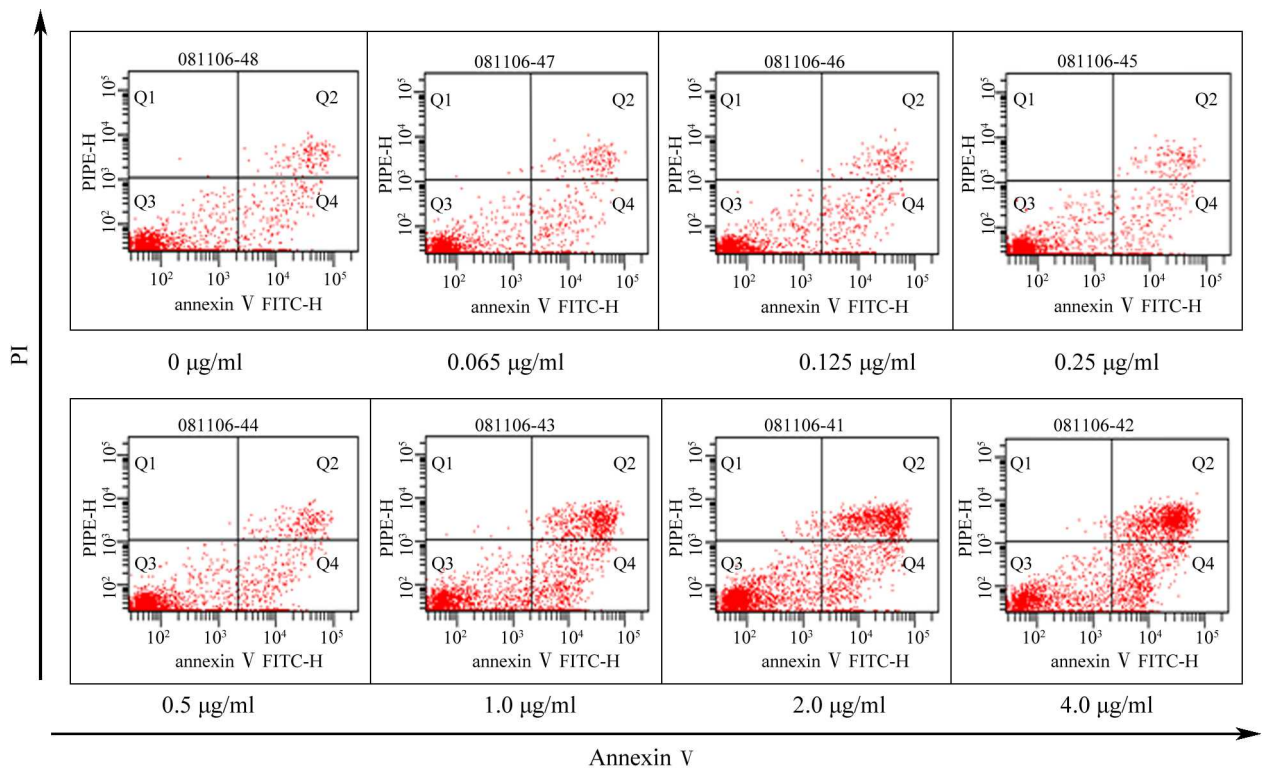


图3 不同浓度藤黄酸对U266细胞作用24 h的凋亡水平

3. 藤黄酸导致伴受损线粒体跨膜电位的 U266 细胞比例增加:以 0 $\mu\text{g/ml}$ 、0.0625 $\mu\text{g/ml}$ 、0.125 $\mu\text{g/ml}$ 、0.25 $\mu\text{g/ml}$ 、0.5 $\mu\text{g/ml}$ 、1.0 $\mu\text{g/ml}$ 、2.0 $\mu\text{g/ml}$ 、4.0 $\mu\text{g/ml}$ 浓度的藤黄酸分别处理 U266 细胞 24 h,检测藤黄酸作用后的 U266 细胞线粒体跨膜电位水平,随着藤黄酸浓度的增加,伴有受损线粒体跨膜电位的 U266 细胞的百分比进行性增加,见图 4,5。

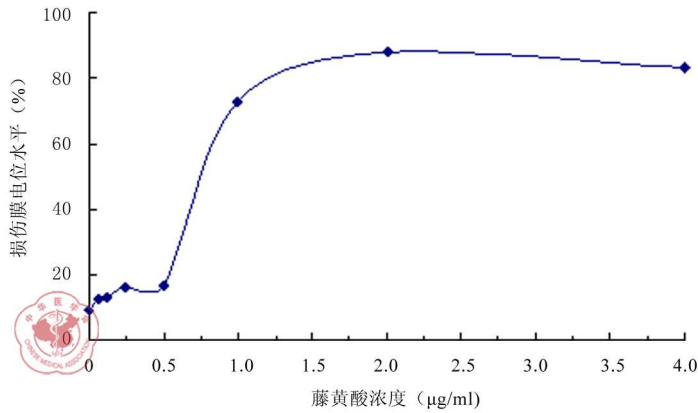


图4 不同浓度藤黄酸作用24 h对U266细胞线粒体跨膜电位的影响

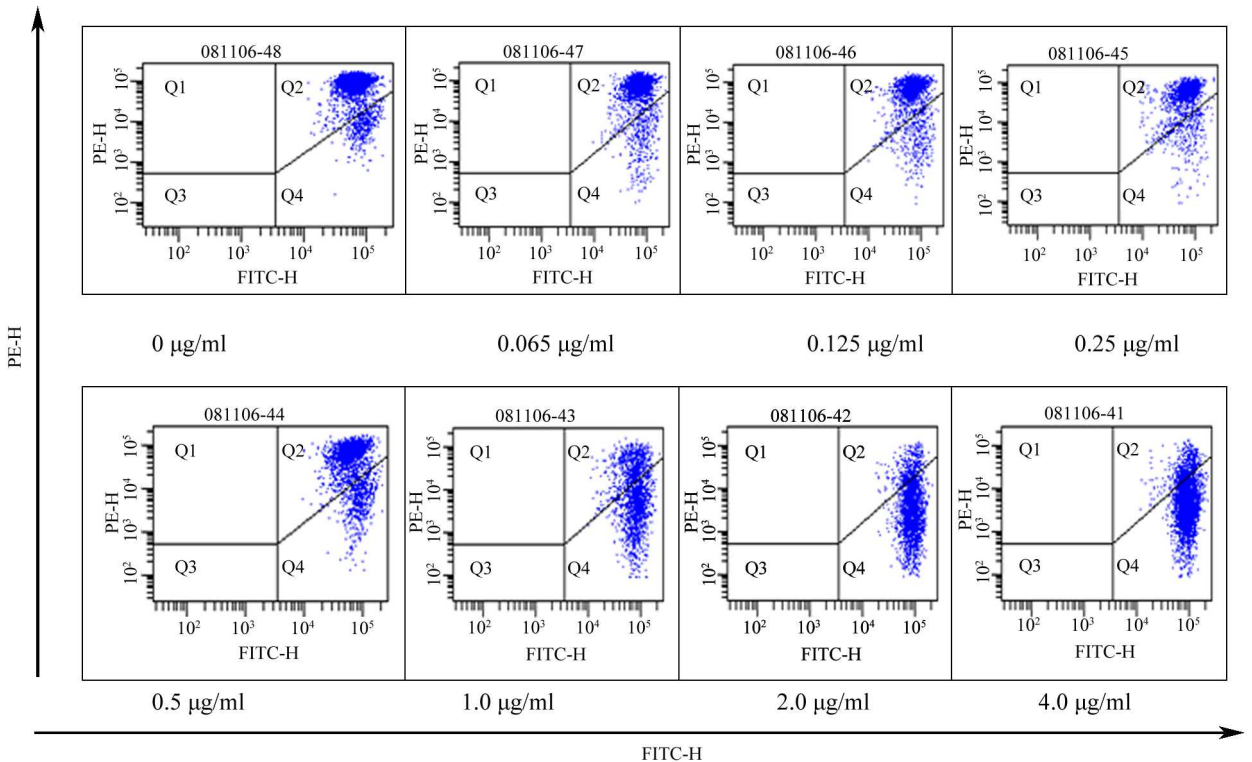


图5 不同浓度藤黄酸对U266细胞作用24 h的线粒体跨膜电位水平(Q4)

4. 藤黄酸对 U266 细胞活化的 Caspase 3、Caspase 8、Caspase 9 表达水平的影响:藤黄酸 2 μg/ml 作用 U266 细胞 24 h、48 h 时, U266 细胞活化的 Caspase 水平以荧光素激活阳性的 Caspase 细胞百分比来表示。结果发现藤黄酸作用 U266 细胞 24 h 用药标本较对照标本的 Caspase 3、Caspase 8、Caspase 9 阳性细胞比例分别上升 24.9%、31.7%、32.4%; 作用 48 h Caspase 3、Caspase 8、Caspase 9 阳性细胞比例分别比对照组上升 57.0%、64.5%、63.5%,见图 6,7。

讨 论

多发性骨髓瘤是浆细胞恶性肿瘤,在血液系统肿瘤发病率居第二位,临床治疗不易缓解,缓解后短期内复发率高,常规化疗中位生存时间 30 个月左右,目前即使采用大剂量化疗和造血干细胞移植仍不能完全治愈本病,不断寻找和发现新型治疗药物以克服骨髓瘤细胞药物抵抗和改善患者预后是我们目前面临的课题^[8]。

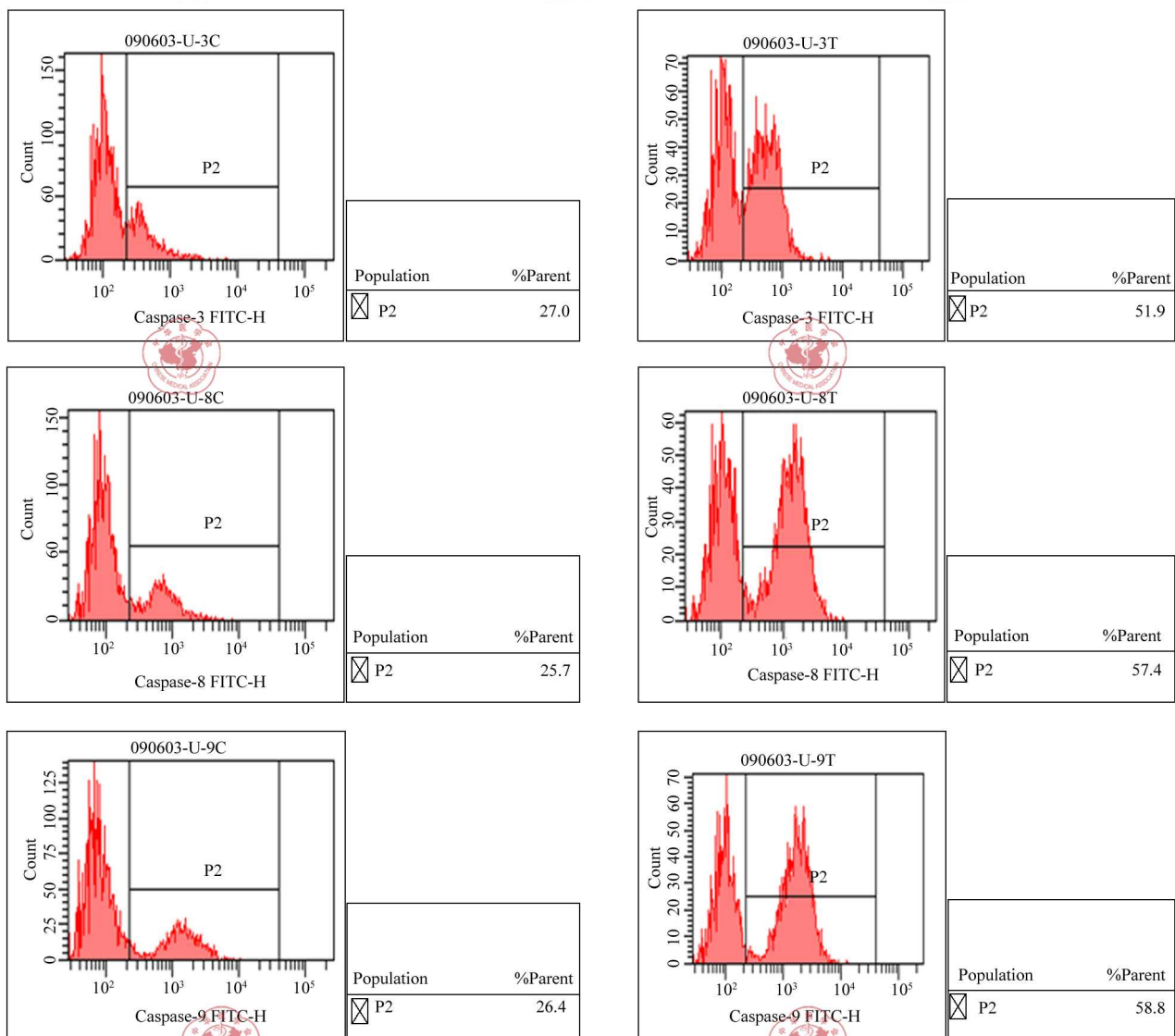


图6 藤黄酸对U266细胞作用24 h时Caspase 3、Caspase 8、Caspase 9的水平(左图藤黄酸0 μg/ml, 右图2 μg/ml)

近 20 多年来,国内外特别是我国学者对藤黄及其活性成分藤黄酸等做了大量的研究工作,发现藤黄酸不仅对实体肿瘤有体内外抗瘤活性,而且对白血病、淋巴瘤、MDS 等多种血液系统恶性肿瘤也有抗癌作用^[6-10]。藤黄酸抗癌机制多样如诱导肿瘤细胞凋亡,使细胞周期停滞,诱导肿瘤细胞分化,抑制肿瘤端粒末端转移酶活性,抗血管新生等^[10]。我们检测了藤黄酸对 U266 细胞生长的影响,发现藤黄酸呈浓度依赖性抑制 U266 细胞的生长,藤黄酸 >0.5 μg/ml 显示出诱导凋亡的能力。藤黄酸具有杀死骨髓瘤 U266 细胞的作用,考虑与诱导凋亡有关。

目前认为细胞凋亡的途径主要有死亡受体途径和线粒体途径。死亡受体途径是指细胞膜上的死亡受体 Fas、TNFR 和 TRAILR 等,与相应的配体 FasL、TNFα 和 TRAIL 等结合后,通过接头蛋白招募并激活 Caspase 8,并依次激活其他的 Caspase,最终使细胞凋亡;线粒体途径则是指细胞在诸如 DNA 损伤、缺氧或细胞毒性药物等凋亡刺激信号作用下,线粒体释放细胞色素 C 到细胞质中,并激活 Caspase 9 来引起细胞凋亡^[11]。研究发现许多肿瘤细胞虽含有 Caspases,但激活 Caspase 瀑布的分子机制存在部分缺陷,导致肿瘤细胞失去凋亡的能力^[12]。内源性途径中的线粒体跨膜电位降低被认为是细胞凋亡级联反应过程中最早发生的事件,它发生在细胞核凋亡特征(染色质浓缩、DNA 断裂)出现之前,一旦线粒体跨膜电位崩溃,细胞凋亡就不可逆转。线粒体早期的变化当属线粒体通透性转换孔的开启和由此引起线粒体跨膜电位的降低^[13-14]。我们检测了藤黄酸对 U266 细胞线粒体跨膜电位的影响,发现藤黄酸能显著减低 U266 细胞线粒体的跨膜电

位水平且激活 Caspase 9 水平增加,表明存在线粒体通路的激活。外源性途径凋亡通路的活化涉及死亡受体信号和 Caspase 8 的激活,Kasibhatla 等^[15]发现转铁蛋白受体(TfR)亦为藤黄酸的一个分子靶点,藤黄酸与转铁蛋白受体呈可逆结合,通过 Caspase 8 途径快速激活凋亡级联反应,并且 Caspase 8 的激活为凋亡的诱导所必需。藤黄酸处理 U266 细胞 24 h 时 Caspase 8 阳性细胞比例明显升高,48 h 时 Caspase 8 升高幅度进一步扩大,提示外源性途径随时间推移不断激活。本结果显示伴随 Caspase 8、Caspase 9 作为外、内源性途径的激活,共同通路中 Caspase 3 也同步活化,最终导致 U266 细胞凋亡事件的完成。

本研究证实藤黄酸对多发性骨髓瘤细胞株 U266 有抑制生长的作用,机制与诱导 U266 细胞凋亡有关。Caspase 8 激活的胞浆途径和 Caspase 9 激活的线粒体跨膜电位途径参与了藤黄酸诱导 U266 细胞凋亡的发生。藤黄酸作为一种凋亡诱导剂,在杀灭肿瘤细胞的同时对机体造血细胞和免疫相关细胞的功能无显著影响^[16],有望成为一种有前途的抗骨髓瘤药物。

参 考 文 献

- [1] 孔令东,叶定江,吴皓. 藤黄的炮制及其现代研究概况. 中国中药杂志,1995,20(2):89-91.
- [2] Aggarwal BB, Kunnumakkara AB, Harikumar KB, et al. Potential of spice-derived phytochemicals for cancer prevention. *Planta Med*, 2008, 74(13):1560-1569.
- [3] 王勇,陈燕,陈子,等. 藤黄酸诱导 Raji 细胞凋亡的机理研究. 中国实验血液学杂志,2009,17(1):88-91.
- [4] Wang Y, Chen Y, Chen Z, et al. Gambogic acid induces death inducer-obliterator 1-mediated apoptosis in Jurkat T cells. *Acta Pharmacol Sin*, 2008, 29(3):349-354.
- [5] Tao Z, Zhou Y, Lu J, et al. Caspase-8 preferentially senses the apoptosis-inducing action of NG-18, a Gambogic acid derivative, in human leukemia HL-60 cells. *Cancer Biol Ther*, 2007, 6(5):691-696.
- [6] 洪铁艳,陈宝安,高冲,等. 藤黄酸对 MUTZ-1 细胞生长抑制作用及其机理研究. 中国实验血液学杂志,2009,17(2):373-376.
- [7] 陆跃鸣,叶定江. 不同温度、时间的藤黄蒸制品对 K562 肿瘤细胞生长抑制作用. 南京中医药大学学报,1996,12(3):26-27.
- [8] Balsas P, López-Royuela N, Galán-Malo P, et al. Cooperation between Apo2L/TRAIL and bortezomib in multiple myeloma apoptosis. *Biochem Pharmacol*, 2009, 77(5):804-812.
- [9] Piazza FA, Gurrieri C, Trentin L, et al. Towards a new age in the treatment of multiple myeloma. *Ann Hematol*, 2007, 86(3):159-172.
- [10] 王勇,陈燕. 藤黄酸的抗肿瘤作用及机制. 临床血液学杂志,2008,21(4):395-398.
- [11] Gogvadze V, Orrenius S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Chem Biol Interact*, 2006, 163(1/2):4-14.
- [12] Reed JC, Pellecchia M. Apoptosis-based therapies for hematologic malignancies. *Blood*, 2005, 106(2):408-418.
- [13] 张启国,李翠萍,陈军浩,等. 藤黄酸对 K562 细胞的凋亡诱导及其作用机制研究. 中国实验血液学杂志,2009,17(6):1443-1447.
- [14] 陈昊,张春芳,张昶,等. 细胞色素 C、caspase-8 及 caspase-9 在肝癌中的表达及意义[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版,2010,4(10):2019-2023.
- [15] Kasibhatla S, Jessen KA, Maliartchouk S, et al. A role for transferrin receptor in triggering apoptosis when targeted with gambogic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(34):12095-12100.
- [16] 郭青龙,赵丽,吴照球,等. 藤黄酸对实验性动物造血功能及免疫功能的影响. 中国天然药物,2003,1(4):229-232.

(收稿日期:2010-11-17)

(本文编辑:巨娟梅)