

藤黄酸诱导 Burkitt 淋巴瘤细胞株凋亡及增殖抑制的分子学机制

师宪平^{1,2}, 蓝晓莹¹, 李雅楠², 温创宇^{3,4}, 黄美近⁴, 刘焕亮^{3,4*}

(1.广州医科大学免疫研究所,广东广州 510182;2.广州医科大学生化教研室,广东广州 510182;

3.中山大学 胃肠病学研究所,广东广州 510655;4.中山大学 附属第六医院,广东广州 510655)

摘要:【目的】研究藤黄酸对 Burkitt 淋巴瘤细胞株 Namalva 细胞增殖与凋亡的影响及其分子学机制,探讨藤黄酸治疗 Burkitt 淋巴瘤的潜在应用价值。【方法】用不同剂量藤黄酸处理细胞,采用 MTS 法对淋巴瘤细胞进行细胞活力及增殖抑制测定;0.25、0.5、0.75 $\mu\text{mol/L}$ 藤黄酸分别处理细胞 24 h,0.75 $\mu\text{mol/L}$ 藤黄酸分别处理细胞 6、12、24h 后收集细胞,采用 Annexin V-FTIC/PI 流式细胞术检测藤黄酸剂量依赖性细胞凋亡情况;利用 Western blot 方法检测凋亡相关蛋白和细胞增殖信号通路相关蛋白剂量与时间依赖的变化情况。【结果】藤黄酸明显抑制 Namalva 细胞的增殖,诱导 Namalva 细胞发生凋亡。随藤黄酸浓度升高与作用时间延长,细胞中 PARP、caspase 8 出现切割,Bax 表达上调,Pro-caspase 3, Pro-caspase 9, Bcl-2 表达下调。增殖通路蛋白 STAT5、p-STAT5、ERK、p-ERK 的表达受到明显抑制。【结论】藤黄酸通过影响 Burkitt 淋巴瘤细胞株 Namalva 细胞凋亡相关蛋白的表达,促进细胞凋亡;通过抑制 JAKs/STATs、MEK/ERK 信号转导通路的活化,抑制 Burkitt 淋巴瘤细胞的增殖。

关键词: Burkitt 淋巴瘤;藤黄酸;细胞增殖;细胞凋亡

中图分类号:R733.4

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2013)04-0526-05

Molecular Mechanism of Apoptosis and Proliferation Inhibition Induced by Gambogic Acid in Burkitt Lymphoma Cell Line

SHI Xian-ping^{1,2}, LAN Xiao-ying¹, LI Ya-nan², WEN Chuang-yu^{3,4}, HUANG Mei-jin⁴, LIU Huan-liang^{3,4*}

(1.Institute of Immunology, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510182, China; 2.Biochemistry Department, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510182, China; 3.Institute of Gastroenterology, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510655, China; 4.The Sixth Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510655, China)

Abstract: 【Objective】To study the influence of gambogic acid on the proliferation and cell apoptosis of Burkitt lymphoma cells Namalva, and provide basis for clinical treatment of Burkitt lymphoma. 【Methods】Burkitt lymphoma cells were treated with different doses of gambogic acid. The cell viability and proliferation were evaluated by MTS assay. Cells were treated with 0.25, 0.5, and 0.75 $\mu\text{mol/L}$ gambogic acid for 24 hours, and 0.75 $\mu\text{mol/L}$ gambogic acid for respectively 6, 12, and 24 h. The dose-dependent cell apoptosis was detected using flow cytometry with Annexin V-FTIC/PI staining. The dose- and time-dependent changes of apoptosis and proliferation-related proteins were tested by Western blotting. 【Results】The cell viability was inhibited by gambogic acid. Gambogic acid induced Namalva cell apoptosis and the cleavage of PARP and caspase 8, upregulated Bax, and decreased the expression of Pro-caspase 3, Pro-caspase 9, and Bcl-2 as well as proliferation pathway and related protein STAT5, p-STAT5, ERK, p-ERK in a dose and time dependent manner. 【Conclusion】Gambogic acid induces cell apoptosis by effecting the expression of apoptosis related proteins and inhibits cell proliferation by down-regulating the activation of JAKs/STATs, MEK/ERK signal transduction pathway in Burkitt lymphoma cells.

Key words: Burkitt lymphoma; gambogic acid; proliferation; apoptosis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2013, 34(4): 526-530]

收稿日期:2013-03-26

基金项目:国家自然科学基金(81100378);广州市科信局应用基础研究专项重点项目(2012J4100014);广东省医学科研基金(B2012159)

作者简介:师宪平,博士,讲师,研究方向:肿瘤的小分子靶向治疗,E-mail: xianping_shi@gzhmc.edu.cn; *通信作者:刘焕亮,教授,博士生导师,研究方向:分子肿瘤学,E-mail: huanliang.liu@gmail.com

Burkitt淋巴瘤(Burkitt lymphoma, BL)是一种来源于滤泡生发中心细胞的高度恶性B细胞肿瘤,该病例多见于儿童,约占儿童非霍奇金淋巴瘤(non-hodgkin's lymphoma, NHL)的40%~50%,具有高度侵蚀性,预后较差^[1]。目前临床常用的美罗华+Hyper CAVD(联合环磷酰胺、柔红霉素、长春新碱、地塞米松)在治疗低度恶性Burkitt淋巴瘤中取得了较好的效果,然而在用药过程中产生了极大的耐药复发问题及并发症,严重影响了治疗效果^[1]。因此,筛选和开发新型的能有效治疗Burkitt淋巴瘤的小分子化合物显得非常迫切和重要。中药藤黄(Gamboge),又名海藤、玉黄、腊黄,具有破血散结、解毒、止血、杀虫的作用,自古用于治疗瘰癧、疔肿、痈疽、顽癣、恶疮、跌打损伤等顽疾^[2]。藤黄酸(gambogic acid, GA)是中药藤黄的主要活性成分,因其以广泛的肿瘤细胞杀伤性被作为抗肿瘤药物在国内外进行广泛的研究^[3]。已有报道证明GA是一种多靶点抑制剂,可通过多种途径诱导包括血液系统淋巴瘤在内的多种肿瘤凋亡,逆转多药耐药性。其促凋亡途径主要体现在上调凋亡促进基因,下调凋亡抑制基因及转铁蛋白受体的表达诱导细胞发生凋亡;抑制癌细胞增殖;抗肿瘤细胞转移;抑制通道蛋白表达;逆转多药耐药性等^[4-7]。寻找新型的小分子抑制物是克服Burkitt淋巴瘤对临床常用治疗方案耐受和产生副作用的重要途径,目前为止,未发现任何关于可用于临床解决Burkitt淋巴瘤对传统化疗药耐受的报道。本课题组近年来致力于Burkitt淋巴瘤靶向化合物的筛选研究工作,利用Burkitt淋巴瘤细胞模型筛选出我国中草药藤黄的活性成份藤黄酸。本研究以Burkitt淋巴瘤Namalva细胞为研究模型,探讨藤黄酸对其诱导凋亡、抑制增殖的作用,研究藤黄酸对细胞凋亡和增殖通路的影响,进而探讨藤黄酸治疗Burkitt淋巴瘤的潜在应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料

Burkitt淋巴瘤Namalva细胞由本实验室保存。RPMI-1640高糖培养基和胎牛血清Gibco产品。藤黄酸、MTS、碘化丙啶、细胞凋亡双染检测试剂盒购自Sigma-Aldrich公司,抗Pro-caspase 8、Pro-caspase 3、Pro-caspase 9、P-Erk、Erk、Bax、Bcl-

2为Cell Signaling公司产品,抗PRAP抗体为BD公司产品,抗GAPDH、P-Stat5、Stat5抗体购自Upstate Technology公司,HRP-抗鼠/兔Ig抗体为Pierce Biotechnology公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与加药 Namalva细胞用RPMI1640(含100 mL/L胎牛血清, 1×10^5 U/L青霉素, 100 mg/L链霉素)于37℃, 50 mL/L CO₂饱和湿度条件下培养,实验所用的细胞均处于对数生长期。实验所用的藤黄酸由DMSO溶解,贮存浓度为20 mmol/L。加药时用灭菌的PBS将藤黄酸稀释至一定浓度,计算加药的体积,确保每组中DMSO的量一致(DMSO的终浓度控制在1 mL/L以下)。实验设计中所有的对照组(Control, C)均加入与加药组等比例的DMSO和PBS混合液。

1.2.2 细胞活力检测实验 用MTS法检测细胞活力抑制情况,取对数生长期的Namalva细胞接种于96孔板,每孔接种50 μL细胞悬液,共15000个细胞。对照组加入RPMI 1640培养基50 μL,实验组每孔加入含藤黄酸培养基50 μL,使藤黄酸终浓度为0、0.16、0.3125、0.625及1.25 μmol/L(在不同剂量处理细胞进行镜下观察及多次预实验的基础上确定用药浓度),每组3个重复孔。设空白对照组加入100 μL培养基用于分析数据时去除背景。不同剂量的藤黄酸作用44 h后,于各孔分别加MTS试剂20 μL,37℃继续孵育4 h,酶联免疫检测仪测定各孔的吸光度值(波长490 nm),以浓度为横坐标,细胞活力为纵坐标,绘制藤黄酸对Namalva细胞活力抑制率的柱状图,用GraphPad Prism 4.0软件计算半数抑制浓度(IC₅₀)。

1.2.3 AnnexinV/PI双标记法流式细胞术测定细胞凋亡 完全实验按照Sigma-Aldrich公司提供的试剂说明书操作。实验设有不同藤黄酸浓度处理组,24 h后收集细胞, $1 \times$ binding buffer洗涤细胞后,AnnexinV工作液100 μL室温避光孵育15 min,检测前每管加PI 1 μL上机,重复3次,对数据做统计学分析。

1.2.4 Western blot检测 不同浓度的藤黄酸处理Namalva细胞后于不同时间点收集细胞,加入蛋白裂解液充分裂解细胞提取蛋白,Bio-Rad蛋白浓度试剂盒紫外分光750 nm波长定量蛋白浓度。100-130 V恒压电泳约90 min,100 V恒压转膜约90 min,50 g/L牛奶室温封闭1 h,特异性一抗4℃

过夜,次日曝光。

1.3 统计学处理

用 GraphPad Prism 4.0 软件 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)对数据进行分析 and *t* 检验, $P < 0.05$ 判定为有统计学意义。

2 结 果

2.1 藤黄酸对 Namalva 细胞增殖及细胞学形态的影响

藤黄酸达到一定剂量时对 Namalva 细胞活力具有抑制作用,MTS 检测结果显示藤黄酸对 Namalva 细胞的活力抑制作用呈剂量依赖性 (图 1),当藤黄酸剂量达到 0.3125 $\mu\text{mol/L}$,作用 48 h,细胞的生长活力明显下降。经计算,藤黄酸对 Namalva 细胞生长的半数抑制浓度 IC₅₀ 是 0.37 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.2 藤黄酸诱导 Namalva 细胞凋亡

为了明确藤黄酸是否诱导 Namalva 细胞凋亡,采用 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞计数法进行检测。根据镜下对细胞形态学观察的结果,选择 0.25、0.5、0.75 $\mu\text{mol/L}$ 藤黄酸处理组作为实验组,经药物孵育 24 h 后进行检测。预实验过程中

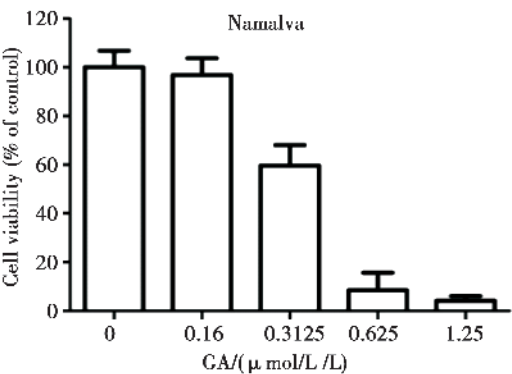


图 1 藤黄酸对 Burkitt 淋巴瘤 Namalva 细胞株增殖的影响
Fig.1 Effect of gambogic acid on the cell viability of Burkitt lymphoma cell line Namalva

我们以雷公藤内酯醇作为阳性对照检测其对 Namalva 细胞凋亡的影响,结果未显示有凋亡^[8]。图 2 结果表明,0.25、0.5、0.75 $\mu\text{mol/L}$ 藤黄酸分别处理 Namalva 细胞 24 h 后,出现了明显的细胞凋亡,凋亡率分别达到 $(34.15 \pm 1.23)\%$ 、 $(76.5 \pm 2.31)\%$ 、 $(91.95 \pm 2.22)\%$ (3 次重复实验经 *t* 检验分析,统计学分析结果见图 2($P < 0.05$),证实了藤黄酸可以诱导 Namalva 细胞发生凋亡,为探讨藤黄酸诱导 Namalva 细胞凋亡的作用机制奠定基础。

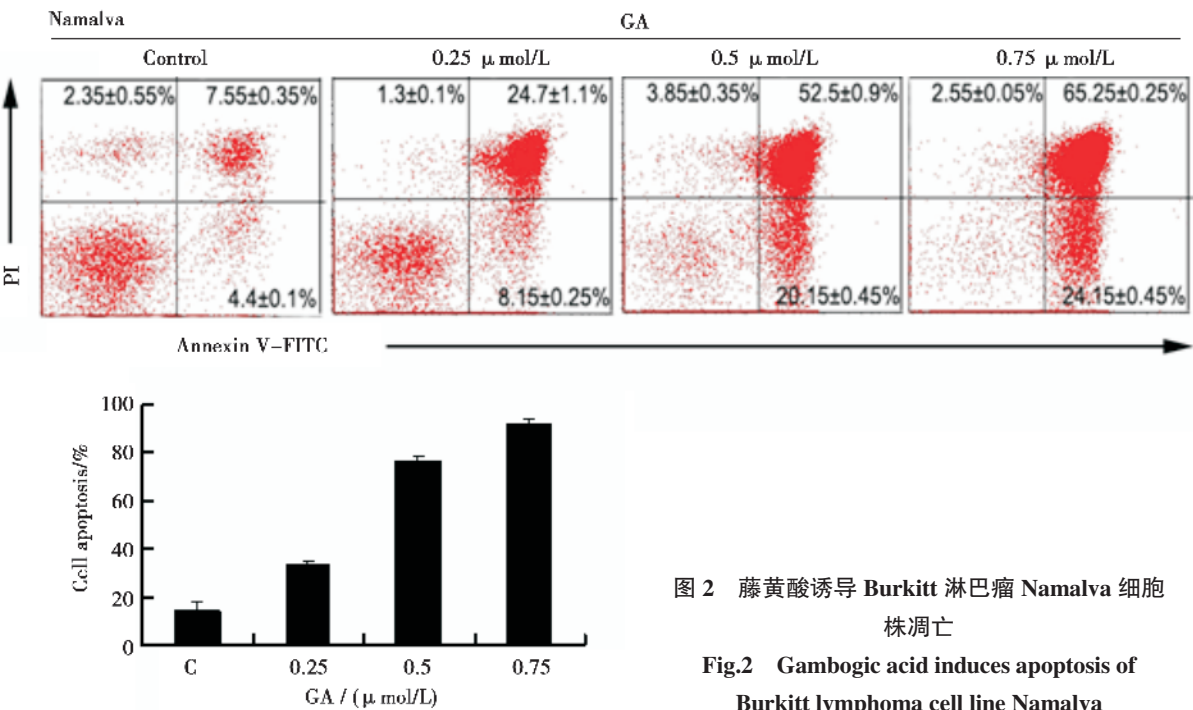


图 2 藤黄酸诱导 Burkitt 淋巴瘤 Namalva 细胞株凋亡
Fig.2 Gambogic acid induces apoptosis of Burkitt lymphoma cell line Namalva

	C	0.25	0.5	0.75
Mean	14.3	31.15	76.5	91.95
SD	3.15	1.23	2.31	2.22

2.3 藤黄酸对细胞凋亡相关蛋白表达的影响

在证实藤黄酸对 Namalva 细胞诱导凋亡的基础上,进一步检测藤黄酸对 Namalva 细胞凋亡相关蛋白的影响。0.25、0.5、0.75 $\mu\text{mol/L}$ 藤黄酸分别处理细胞 24 h,0.75 $\mu\text{mol/L}$ 藤黄酸分别处理细胞 6、12、24 h 后收集细胞,抽提全蛋白进行 Western blot 检测。结果显示,PARP 前体带呈现藤黄酸浓度和时间依赖性的减少,并出现切割带。同时引起 caspase 家族相关蛋白 caspase 3、caspase 9 及 caspase 8 前体减少,caspase 8 出现切割带。Bcl-2 家族蛋白 Bax 出现一定程度的表达上调,Bcl-2 的表达在 0.75 $\mu\text{mol/L}$ 藤黄酸处理细胞 24 h 后呈现一定的下调(图 3)。

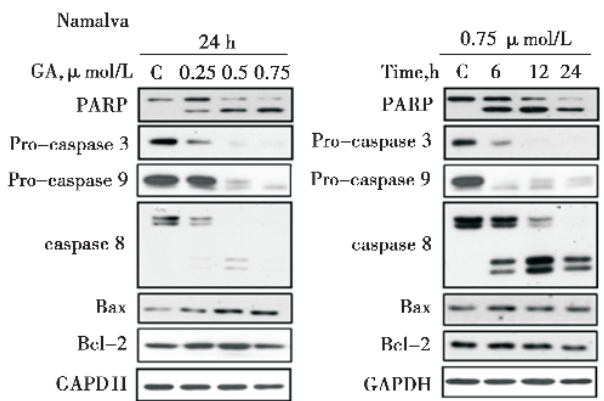


图 3 GA 对 Burkitt 淋巴瘤 Namalva 细胞株凋亡相关蛋白 PARP、Pro-caspase 3、Pro-caspase 9、caspase 8、Bax、Bcl-2 表达的影响

Fig.3 Changes of the expression of apoptosis-related proteins PARP, Pro-caspase 3, Pro-caspase 9, caspase 8, Bax, and Bcl-2 in Burkitt lymphoma cell line Namalva with gambogic acid

2.4 藤黄酸对细胞增殖信号通路的影响

在实验过程中发现,随着藤黄酸剂量的增加及作用时间的延长,细胞的增殖受到不同程度的抑制。为了进一步探讨藤黄酸对 Namalva 细胞产生增殖抑制的作用机制,采用 Western blot 方法对影响 Namalva 细胞增殖的 Ras-Raf-MEK-Erk 及 Stat3/Stat5 两条主要信号通路中的关键蛋白 Erk 和 Stat5 进行检测。0.25、0.5、0.75 $\mu\text{mol/L}$ 藤黄酸分别处理细胞 24 h,0.75 $\mu\text{mol/L}$ 藤黄酸分别处理细胞 6、12、24 h 后收集细胞,抽提全蛋白进行 Western blot 检测。图 4 结果显示,增殖相关蛋白

Erk 的磷酸化及 STAT5 蛋白的总体和磷酸化形式均呈藤黄酸浓度及时间依赖性降低,Erk 总蛋白的变化不明显。

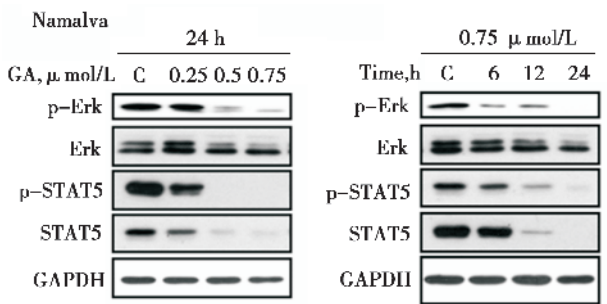


图 4 藤黄酸对 Burkitt 淋巴瘤 Namalva 细胞株增殖相关蛋白 p-Erk、Erk、p-STAT5 和 STAT5 表达的影响

Fig.4 The expression of proliferation-related proteins p-Erk, Erk, p-STAT5, and STAT5 in Burkitt lymphoma cell line Namalva with gambogic acid

3 讨论

Burkitt 淋巴瘤是儿童恶性淋巴瘤中常见的类型,在形态学和临床表现上都具有显著的异质性,且细胞多药耐药基因显著表达,传统化疗药物治疗后预后很差。因此,能有效对抗 Burkitt 淋巴瘤的新型小分子化合物的研发迫在眉睫。本文以 Burkitt 淋巴瘤细胞株 Namalva 为研究对象,探讨小分子化合物藤黄酸诱导细胞凋亡、抑制细胞增殖及其相关的分子学机制。实验结果表明,藤黄酸抑制 Namalva 细胞活力,诱导 PARP 切割,激活 caspase 3 和 caspase 8 促进 Namalva 细胞凋亡。同时,藤黄酸通过抑制 JAKs/STATs 和 MEK/ERK 信号转导通路的活化从而抑制 Namalva 细胞的增殖。

MTS 法显示,随着藤黄酸浓度增加,Namalva 细胞的生长活力明显抑制;AnnexinV/PI 双标记流式细胞术检测结果显示藤黄酸呈剂量依赖性诱导 Namalva 细胞凋亡;Western blot 检测显示 caspase 8 与 caspase 3 前体 Pro-caspase 8 与 Pro-caspase 3 的表达均随藤黄酸浓度和作用时间的增大而减少,PARP 也呈剂量与时间依赖性的切割,显示了 caspase 级联通路的活化;以上结果表明,藤黄酸诱导 Namalva 的凋亡其机制可能是藤黄酸激活了 caspase 级联反应。JAKs/STATs 和 MEK/ERK 信号转导通路与细胞的增殖、分化及凋亡关系密切,这

些通路异常活化可导致 Namalva 细胞异常增殖和恶性转化^[8-10]。实验结果提示,JAKs/STATs 和 MEK/ERK 信号转导通路中的关键分子 Stat5 总体及磷酸化形式的蛋白表达水平均下调,Erk 总蛋白表达没有明显改变的基础上磷酸化形式明显下降,说明藤黄酸能明显抑制 Namalva 细胞中两条增殖信号通路关键分子的表达与活化,从而导致细胞增殖受到抑制。而是否有其他信号通路同时参与了藤黄酸对 Namalva 细胞增殖与凋亡的调控是我们下一步研究的科学问题。该研究在细胞水平上初步证实了藤黄酸对 Burkitt 淋巴瘤的抑制作用,在接下来的工作中我们将利用荷瘤裸鼠模型进一步评价藤黄酸的动物体内抗 Burkitt 淋巴瘤作用,为探索藤黄酸治疗 Burkitt 淋巴瘤提供体内实验依据。

传统的细胞毒性药物往往会产生不良反应,特别是对造血系统和免疫系统极易造成不可逆的损伤,影响整体治疗效果。郭青龙等^[11-12]人研究证明荷瘤小鼠静脉注射不同剂量藤黄酸后,藤黄酸(8,4,2 mg/kg)对荷瘤小鼠外周血中白细胞总数无明显影响;藤黄酸(6,3,15 mg/kg)对正常大鼠外周血中白细胞总数、骨髓有核细胞数、体重、胸腺及脾脏无明显影响;藤黄酸(8,4,2 mg/kg)对小鼠的血清溶血素及巨噬细胞吞噬能力无明显影响。在接下来的动物实验中,我们将进一步验证在我们建立的动物模型中藤黄酸对动物造血和免疫系统的影响。

本文证实藤黄酸杀伤肿瘤细胞效果显著,通过对凋亡相关蛋白表达及 JAKs/STATs 和 MEK/ERK 信号转导通路的影响,明显抑制了 Burkitt 淋巴瘤 Namalva 细胞株生长,诱导其凋亡,提示了藤黄酸治疗 Burkitt 淋巴瘤具有较好的应用前景。

参考文献:

- [1] Miles RR, Arnold S, Cairo MS. Risk factors and treatment of childhood and adolescent Burkitt lymphoma/leukaemia[J]. Br J Haematol, 2012, 156(6): 730-743.
- [2] 雷秋模, 刘金妹. 藤黄抗癌作用研究的回顾与展望[J]. 肿瘤防治杂志, 2003(2): 216-219.
Lei QM, Liu JM. Retrospect and prospect of anti-cancer efficacy of Gamboge [J]. China J Cancer Prev Treat, 2003(2): 216-218.
- [3] Zhang HZ, Kasibhatla S, Wang Y, et al. Discovery, characterization and SAR of gambogic acid as a potent apoptosis inducer by a HTS assay [J]. Bioorg Med Chem, 2004, 12(2): 309-317.
- [4] Gu H, Rao S, Zhao J, et al. Gambogic acid reduced bcl-2 expression via p53 in human breast MCF-7 cancer cells[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2009, 135(12): 1777-1782.
- [5] Guo QL, You QD, Wu ZQ, et al. General gambogic acids inhibited growth of human hepatoma SMMC-7721 cells in vitro and in nude mice[J]. Acta Pharmacol Sin, 2004, 25(6): 769-774.
- [6] Anantachoke N, Tuchinda P, Kuhakarn C, et al. Prenylated caged xanthenes: chemistry and biology[J]. Pharm Biol, 2012, 50(1): 78-91.
- [7] 钱婧, 王科明. 藤黄酸抗肿瘤作用靶点的研究进展[J]. 中国肿瘤, 2011(6): 441-446.
Qian J, Wang KM. Progress in the effect of anti-tumor molecular targets of Gambogic Acid[J]. China Cancer, 2011(6): 441-446.
- [8] Shi X, Jin Y, Cheng C, et al. Triptolide inhibits Bcr-Abl transcription and induces apoptosis in STI571-resistant chronic myelogenous leukemia cells harboring T3151 mutation [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(4): 1686-1697.
- [9] Rauch J, Moran-Jones K, Albrecht V, et al. c-Myc regulates RNA splicing of the A-Raf kinase and its activation of the ERK pathway[J]. Cancer Res, 2011, 71(13): 4664-4674.
- [10] Cerliani JP, Guillardoy T, Giulianelli S, et al. Interaction between FGFR-2, STAT5, and progesterone receptors in breast cancer[J]. Cancer Res, 2011, 71(10): 3720-3731.
- [11] Radomska HS, Alberich-Jorda M, Will B, et al. Targeting CDK1 promotes FLT3-activated acute myeloid leukemia differentiation through C/EBPalpha[J]. J Clin Invest, 2012, 122(8): 2955-2966.
- [12] Yang J, Ding L, Hu L, et al. Metabolism of gambogic acid in rats: a rare intestinal metabolic pathway responsible for its final disposition [J]. Drug Metab Dispos, 2011, 39(4): 617-626.
- [13] 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[J]. 中国天然药物, 2003(4): 37-40.
Guo QL, Zhao L, Wu ZQ, et al. The effect of Garcinia acid on hematopoietic and immune function of experimental animals[J]. Chin J Nat Med, 2002(4): 37-40.

(编辑 孙慧兰)