

和厚朴酚对人白血病细胞系 U937 细胞增殖和凋亡的影响

薛芳¹, 成志勇², 杨琳¹, 李世辉³, 张敬宇¹, 姚丽¹, 潘陵^{1*}

(1. 河北医科大学第二医院血液内科, 河北省血液病重点实验室 河北 石家庄 050000;

2. 保定市第一医院血液科, 河北 保定 071000; 3. 北京航空工业中心医院肿瘤科, 北京 100012)

摘要:【目的】探讨和厚朴酚(HNK)对白血病细胞系 U937 细胞增殖和凋亡的影响。【方法】将 U937 细胞和正常外周血单核细胞分别与 HNK 共培养, Hoechst33342 荧光染色检测细胞凋亡形态, 用噻唑蓝比色法(MTT)检测 HNK 对细胞增殖的抑制作用; 流式细胞仪检测凋亡; 罗丹明 123 检测线粒体膜电位; Caspase3/7 活性检测试剂盒检测 Caspase3/7 活性; 荧光定量 PCR(FQ-PCR)检测 Caspase-3、Caspase-7 mRNA 水平变化。【结果】HNK 对 U937 的体外增殖有显著抑制作用, 48 h 半数抑制浓度(IC₅₀)为 11.8 μg/mL, 而对正常外周血单核细胞的 IC₅₀ 为 40.3 μg/mL, Annexin V/PI 双标染色显示, 细胞凋亡与和厚朴酚呈浓度和时间依赖相关。HNK 明显降低 U937 细胞线粒体膜电位, 增加 Caspase3/7 活性及 mRNA 表达水平, 但对正常外周血单核细胞的增殖抑制和凋亡作用不明显。【结论】HNK 可能通过激活 caspase-3/7 抑制 U937 细胞增殖、诱导 U937 细胞凋亡。

关键词: 和厚朴酚; U937 细胞系; 膜电位; 线粒体; Caspase3/7

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-3554(2009)04-0408-05

Effects of Honokiol on Proliferation and Apoptosis on U937 Cells

XUE Fang¹, CHENG Zhi-yong², YANG Lin¹, LI Shi-hui³, ZHANG Jing-yu¹, YAO Li¹, PAN Ling^{1*}

(1. Department of Hematology, The Second Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China;

2. Department of Hematology, The First Hospital of Baoding, Baoding 071000, China;

3. Department of Oncology, The Center Hospital of Aviation Industry of Beijing, Beijing 100012, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the anti-proliferative and apoptosis effect induced by Honokiol (HNK) on human myeloid leukemia cell line U937 cells in vitro. 【Methods】After treated with different concentration of HNK, Hoechst33342 fluorescent staining was used to detect cell apoptosis; the growth inhibition ration of U937 cells and PBMCs were analyzed by MTT assay; the apoptosis ration was detected by flow cytometry; mitochondrial membrane potential was explored by rhodamine 123 stain; Caspase3/7 protein activity kit was used to test the Caspase3/7 activity; the Caspase-3 and Caspase-7 mRNA levels were detected by real-time fluorescent relative-quantification reverse transcriptional PCR (FQ-PCR). 【Results】Honokiol could significantly inhibit the proliferation of U937 cells in terms of the indexes of IC₅₀/U937 11.8 μg/mL and IC₅₀/PBMCs 40.3 μg/mL, and the anti-proliferative effect was in a time and concentration dependent manner; Flow cytometry analysis manifested that Honokiol could induce U937 cells apoptosis by Annexin V/PI double Annexin V/PI fluorescein stain; Honokiol significantly inhibited the mitochondrial membrane potential of U937 cells and enhanced the ability of Caspase3/7 and the mRNA expression levels, but not the PBMCs. 【Conclusion】HNK can inhibit U937 cells proliferation and induce cells apoptosis via activating Caspase 3/7.

Key words: Honokiol; U937 cell line; membrane potential, mitochondrial; Caspase3/7

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(4):408-412]

收稿日期: 2009-03-25

基金项目: 河北省科技攻关计划项目(072761130)

作者简介: 薛芳, 主治医师, 医学博士, 从事中西医结合治疗白血病研究; * 通讯作者: 潘陵, 主任医师, 博士研究生导师, E-mail:

lingpan20002000@yahoo.com.cn

厚朴的根茎皮主要用于治疗焦虑、咳嗽和胃肠功能紊乱的传统中药,和厚朴酚(honokiol, HNK)是由其中提取出的羟基多酚化合物,具有抗血栓、抗感染、抗焦虑和抗氧化等功效^[1-2]。近年来国外相继报导了其抗肿瘤作用^[3-6],其能够诱导多种肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤血管生成及与传统化疗药物协同抗肿瘤活性。但在造血系统肿瘤中的作用及其机制尚不明确,本研究通过检测 HNK 对人髓系白血病细胞系 U937 细胞和正常的外周血单个核细胞的体外增殖抑制和细胞毒性作用,探讨 HNK 诱导造血系统肿瘤凋亡的效应及其对凋亡分子的作用机制。

1 材料与方法

1.1 药物

和厚朴酚(HNK)由广州市三先生物制品公司提供并鉴定,经临界萃取技术得到厚朴提取物,纯度大于 95%。用二甲基亚砜(DMSO)将和厚朴酚配置成浓度为 20 mg/mL 储存液,-20 °C 保存。

1.2 试剂

噻唑蓝(MTT)、碘化丙啶(PI)及 RNA 酶(北京鼎国生物技术有限公司);AnnexinV/PI 双染试剂盒(北京宝赛生物技术有限公司);SYBR Green Real Master Mix(北京天根);Caspase-Glo 3/7 Assay 试剂盒(Promeg USA)。

1.3 细胞

人类急性单核细胞白血病细胞系 U937 购于协和医科大学血液病研究所,外周血单个核细胞(PBMCs)提取于健康志愿者。

1.4 方法

1.4.1 细胞培养 U937 及 PBMCs 在含 100 mL/L 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 RPMI 1640 培养液中,37 °C,体积分数 5% CO₂,饱和湿度条件下培养。选取对数生长期细胞进行实验。

1.4.2 Hoechst33342 检测细胞凋亡 收集终浓度为 0、10 μg/mL 的 HNK 的 RPMI1640 培养液中培养 48 h 的 U937 细胞,1 × PBS 洗涤 2 次,加入荧光染料 Hoechst33342 至终浓度 10 μg/mL。常温避光染色 15 min,取 40 μL 细胞悬液,在激发波长为 350 nm 荧光显微镜下观察结果并计数 500 个细胞,计算凋亡细胞所占比例。

1.4.3 体外细胞增殖抑制实验 分别取对数生长期 U937 细胞和正常外周血单核细胞约 1 × 10⁴/mL,加于 96 孔板中。设立 10 个药物浓度组,每组 HNK 的终浓度为 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50 μg/mL,对照组加入同样浓度的 DMSO,分别培养 24 h 和 48 h,并计算不同时间的 IC50。

1.4.4 AnnexinV/PI 双标法检测 U937 细胞的凋亡率变化 不同终浓度的 HNK 与 U937 细胞和 PBMCs 分别共同培养 24 和 48 h。收集不同干预组细胞,1 × PBS 洗涤 2 次后加入 500 μL 的 Binding Buffer 悬浮细胞,加入 10 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI,室温下避光、反应 15 min,流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.4.5 罗丹明 123 检测细胞线粒体膜电位变化 分别收集不同处理组细胞,每组细胞为 1 × 10⁶ 个。1 × PBS 洗涤 2 次后重悬于 5 μg/mL 的罗丹明 123(由线粒体摄取的阳离子亲脂染料,细胞内罗丹明 123 的摄取量与线粒体跨膜电位 ΔΨ_m 成正相关) 在 37 °C、体积分数 5%CO₂ 条件下孵育 30 min,用 1 × PBS 洗涤 2 次,流式细胞仪检测细胞内的荧光强度。

1.4.6 实时荧光定量 PCR ①收集不同处理组细胞,TRIzol 提取总 RNA,电泳鉴定 RNA 并定量,逆转录合成 cDNA。②实时荧光定量 PCR 反应:SYBR 反应体系共 25 μL。反应条件为 94 °C 5min,94 °C 45 s,60 °C 1 min,30 个循环,设空白对照。PCR 反应前 3 ~ 15 个循环的荧光信号作为荧光本底信号,调节基线至适宜处,各荧光曲线与基线交叉点的循环数即为 Ct 值。根据 ΔCt = Ct(目的基因) - Ct(β-actin),ΔΔCt = 2^{-ΔCt} 计算检测基因 mRNA 相对表达量,每组重复 3 次取平均值。PCR 引物序列如下:①Caspase-3 上游 5'-TTC AGA GGG GAT CGT TGT AGA AGT C-3',下游 5'-CAA GCT TGT CGG CAT ACT GTT TCA G-3'(产物 264 bp);②Caspase-7 上游 5'-TGA CCT ATC CTC CCC TCA-3',下游 5'-TCT CCT GCC TCA CTG TCC-3'(产物 107 bp);③β-MG 上游 5'-ACC CCC ACT GAA AAA GAT GA-3',下游 5'-ATC TTC AAA CCT CCA TGA TG-3'(产物 115 bp)。

1.4.7 Caspase3/7 活性检测 分别取对数生长期 U937 细胞和正常外周血单核细胞分别 5 000 个 100 μL,加于 96 孔板中,每组 3 个复孔,加入终浓度为 10 μg/mL 的 HNK 分别培养 12、24 h,将

Caspase-Glo 3/7 底物和缓冲液混合,取 100 μL 加入上述标本中,混合孵育 1 h 后酶标仪测波长 405 nm 处的吸光值,空白孔作参照,计算处理组吸光度与对照组吸光度的比值,确定活化程度。

1.4.8 统计学方法 两样本均数比较采用 t 检验,率的比较采用 χ^2 检验或确切概率法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Hoechst33342 荧光染色检测细胞凋亡

Hoechst33342 检测凋亡,正常细胞核的 Hoechst 着色的形态呈圆形,淡蓝色;而凋亡细胞的核由于浓集而呈亮蓝色或核呈分叶,碎片状,边集(图 1)。结果显示 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 HNK 作用 48 h 后,凋亡细胞比例明显高于对照组 ($38.6\% \pm 4.8\%$ vs $3.5\% \pm 1.2\%$; $t = 9.71$, $P < 0.01$)。

2.2 体外抑制细胞增殖实验结果

HNK 高浓度组 (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 作用 48 h 后对 U937 细胞生长的抑制率达 90% 以上,且抑制率随 HNK 浓度的加大和作用时间的延长而增强(各浓度组与对照组相比差异有统计学意义, $P < 0.05$),显出浓度和时间效应关系。计算 HNK 对 U937 细胞 48 h 的 IC_{50} 为 $11.8 \pm 1.37 \mu\text{g}/\text{mL}$,

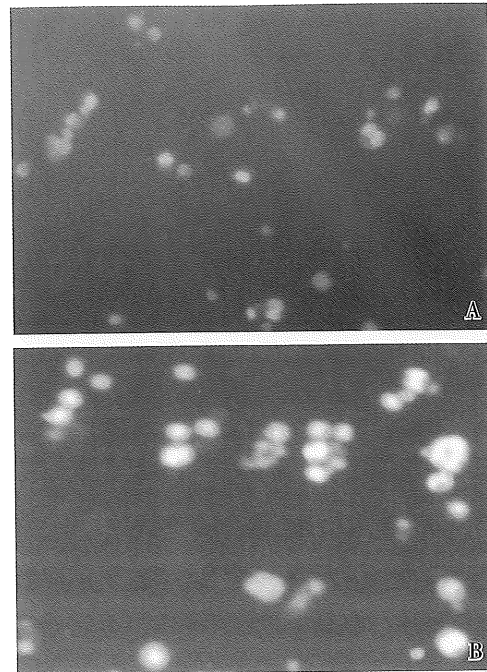


图 1 Hoechst33342 荧光染色检测 HNK 处理后 U937 细胞凋亡

Fig.1 Detecting apoptosis after treated with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HNK 48 h later with Hoechst 33342 fluorescent staining

A: control, B: HNK treatment $\times 40$

而对 PBMCs 的 IC_{50} 为 $40.3 \pm 7.18 \mu\text{g}/\text{mL}$,两者相比有统计学意义 ($t = 7.78$, $P < 0.01$, 图 2)。

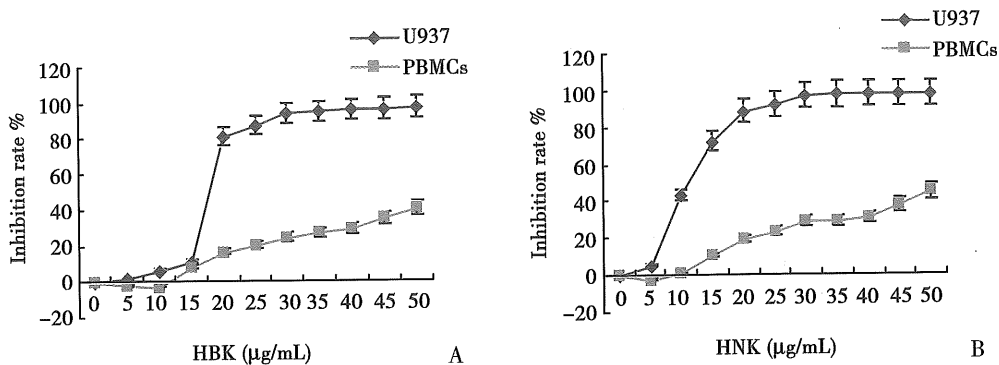


图 2 不同浓度 HNK 作用 24 h(A) 和 48 h(B) 培养后 HNK 对 U937 和 PBMCs 的生长抑制率

Fig.2 The growth inhibition ratio of U937 and PBMCs cells after treated with different concentration of HNK in 24(A) and 48(B) hours

2.3 AnnexinV/PI 双标检测细胞凋亡结果

HNK 作用于 U937 细胞后,凋亡细胞所占比例随着药物浓度和作用时间的增加而增加,呈现对 HNK 的时间-浓度依赖,凋亡率明显高于 PBMCs(表 1)。

2.4 不同浓度 HNK 对 U937 细胞线粒体膜电位的影响

不同浓度 HNK 处理 U937 细胞 12 和 24 h 后,空白对照组 U937 细胞内罗丹明 123 荧光强度最强,随着 HNK 浓度的增加及时间的延长,细胞

内罗丹明 123 荧光强度逐渐减弱, 呈现时间依赖性和浓度依赖性减低(表 2)。

2.5 Caspase-3、Caspase-7 mRNA 及蛋白活性及检测

以 0.5、10、15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HNK 作用 U937 细胞 12 及 24 h 后 Caspase-3、Caspase-7 mRNA 与 $\beta\text{-GM}$ 相比, 表达水平呈浓度依赖性上升($P < 0.01$, 图 3), 其蛋白活性同样呈现浓度依赖性升高($P < 0.01$, 表 3)。

表 1 不同浓度 HNK 及作用不同时间后对 U937 和 PBMCs 凋亡率的影响

Table 1 The apoptosis ration of U937 and PBMCs cells after treated with different concentration of HNK and time points ($\bar{x} \pm s, \%$)

	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$		15 $\mu\text{g}/\text{mL}$		20 $\mu\text{g}/\text{mL}$	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
U937	12.5 \pm 1.9	31.2 \pm 4.8 ¹⁾	15.4 \pm 2.3 ¹⁾	47.9 \pm 7.2 ¹⁾	30.2 \pm 3.9 ¹⁾	83.0 \pm 6.4 ¹⁾
PBMCs	10.4 \pm 1.2	19.8 \pm 1.6	11.2 \pm 1.7	21.8 \pm 3.4	13.7 \pm 2.2	29.6 \pm 4.1

1) Compared with PBMCs group $P < 0.01$

表 2 不同浓度 HNK 处理 12 和 24 h 后 U937 细胞线粒体膜电位的变化

Table 2 The change of mitochondrial membrane potential after treated with different concentration of HNK in 12 or 24 hours ($\bar{x} \pm s$)

Groups	0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	15 $\mu\text{g}/\text{mL}$
12 h	354 \pm 51	271 \pm 43 ¹⁾	225 \pm 37 ¹⁾	171 \pm 31 ¹⁾
24 h	373 \pm 58	238 \pm 40 ¹⁾	188 \pm 31 ¹⁾	148 \pm 27 ¹⁾

1) Compared with untreated group $P < 0.01$

表 3 不同浓度 HNK 作用 U937 细胞 12 和 24 h 后 Caspase-3、Caspase-7 蛋白活性变化

Table 3 The Caspase-3 and Caspase-7 protein activity change after treated with different concentration of HNK after 12 or 24 hours ($\bar{x} \pm s$)

Groups	0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	15 $\mu\text{g}/\text{mL}$
12 h	0.121 \pm 0.011	0.152 \pm 0.014 ¹⁾	0.214 \pm 0.019 ¹⁾	0.341 \pm 0.028 ¹⁾
24 h	0.123 \pm 0.013	0.191 \pm 0.018 ¹⁾²⁾	0.251 \pm 0.022 ¹⁾²⁾	0.401 \pm 0.041 ¹⁾²⁾

1) Compared with untreated group, $P < 0.01$; 2) Compared with 12 h group, $P < 0.01$

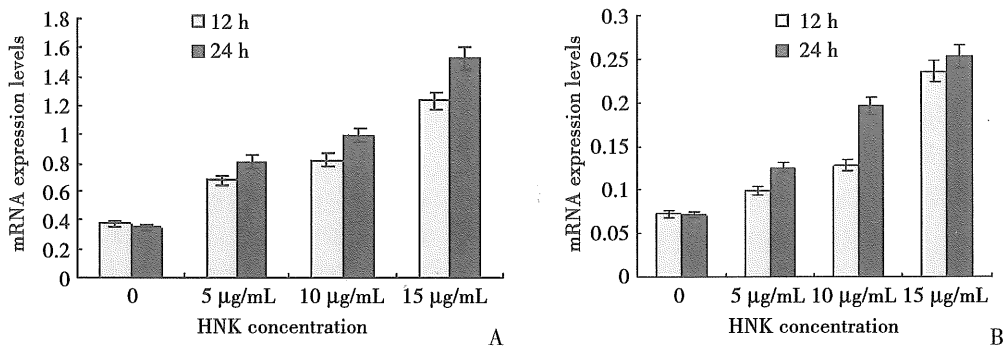


图 3 不同浓度 HNK 作用 U937 细胞 12 和 24 h 后 Caspase-3、Caspase-7 mRNA 变化

Fig.3 The Caspase-3 and Caspase-7 mRNA change after treated with different concentration of HNK after 12 or 24 hours

A: Caspase-3 mRNA; B: Caspase-7 mRNA

3 讨论

厚朴属木兰科植物, 主要用于治疗焦虑、咳嗽和胃肠功能紊乱的传统中药, 从其干燥皮中可提取药用成分是厚朴酚及和厚朴酚, 近年来发现和厚朴酚具有明显的抗肿瘤活性。有研究发现^[3-5]和

厚朴酚可明显抑制卵巢癌、乳腺癌等多种实体肿瘤生长作用, 同时在造血系统肿瘤, 如人白血病细胞系 HL-60 细胞中亦有抑制其体外增殖和促分化作用, 是具有靶向作用的抗肿瘤药物。

我们的研究结果显示, HNK 对白血病细胞系 U937 细胞的增殖有明显的抑制作用。10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 HNK 处理 24 h 后, 其抑制率分别

为6.8%和11.3%,48 h后分别为60.8%和74.7%,表明其作用随时间延长和浓度提高而增强,Hoechst33342荧光染色显示HNK处理组细胞凋亡率明显高于对照组。

AnnexinV/PI双标凋亡检测显示HNK作用于U937细胞后,凋亡细胞所占比例随着药物浓度和作用时间的增加而增加,呈现对HNK的时间-浓度依赖,而对PBMCs凋亡作用不明显,提示HNK对肿瘤细胞的作用明显强于非肿瘤细胞。

线粒体膜电位是由线粒体内膜两侧质子及其他离子不平衡而形成的,是保持线粒体功能所必需的。在线粒体内、外膜交界处存在一种蛋白性孔道,即膜渗透性转换通道(PTP),其受到损伤刺激后开放,引起线粒体膜电位的下降,释放细胞色素C等,最终激活Caspase-3,诱导细胞凋亡^[7]。而细胞色素C的释放过程受Bcl-2家族的调控。Bcl-2家族蛋白位于线粒体的上游,对线粒体诱导的细胞凋亡具有重要的调节作用^[8]。本研究结果显示,经不同浓度的HNK处理12和24 h后,U937细胞线粒体膜电位水平明显降低,呈现时间浓度依赖性相关。

我们的前期试验表明HNK呈浓度依赖性的抑制Bcl-2 mRNA及蛋白表达,并提高Bcl-2/Bax比值^[9]。而Bcl-2被抑制后,细胞凋亡信号传导中caspase家族起着核心作用^[8,10]。其中caspase-8/9为凋亡的效应分子,而caspase-3/7为凋亡执行分子,激活后表明细胞进入凋亡的最后阶段。Caspase-3以酶原的形式存在于胞浆中,在凋亡的早期阶段被激活,活化的Caspase-3由两个大亚基和两个小亚基组成,裂解相应的胞浆胞核底物,最终导致细胞凋亡^[8,11-13]。我们研究结果显示HNK抑制U937细胞后,细胞启动凋亡程序,Caspase-3/7 mRNA及蛋白活性在24 h内明显增加,并呈现时间浓度依赖性相关。

众所周知,应用疗效好而且毒副作用低的化疗药物对白血病的治疗是至关重要的,所以利用相对廉价的中药、天然药物及从中提取的有效成份制剂抗击白血病,配合其他化疗药物和骨髓移植治疗,已日益受到广泛重视。本研究还观察到HNK对外周血单个核细胞的增殖和凋亡影响不大,对肿瘤细胞的作用靶向性很强,未来有望成为一类新型的无毒无副作用的抗癌药物。

参考文献:

- [1] 王立青,江荣高,陈蕙芳.厚朴酚与和厚朴酚药理作用的研究进展[J].中草药,2005,36(10):1591-1594.
- [2] Kuribara H, Stavinoha WB, Maruyama Y. Behavioral pharmacological characteristics of honokiol, an anxiolytic agent present in extracts of Magnolia bark, evaluated by an elevated plus-maze test in mice [J]. J Pharm Pharmacol, 1998,50(8):819-826.
- [3] Li Z, Liu Y, Zhao X. Honokiol, a natural therapeutic candidate, induces apoptosis and inhibits angiogenesis of ovarian tumor cells [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2008,140(1):95-102.
- [4] Liu H, Zang C, Emde A, et al. Anti-tumor effect of honokiol alone and in combination with other anti-cancer agents in breast cancer [J]. Eur J Pharmacol, 2008,591(1-3):43-51.
- [5] Fong WF, Tse AK, Poon KH, et al. Magnolol and honokiol enhance HL-60 human leukemia cell differentiation induced by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2005,37(2):427-441.
- [6] Luo Y, Xu Y, Chen L, et al. Preparative purification of anti-tumor derivatives of honokiol by high-speed counter-current chromatography [J]. J Chromatogr A, 2008,1178(1-2):160-165.
- [7] Kenji I, Teru H, Makoto H, et al. Honokiol overcomes conventional drug resistance in human multiple myeloma by induction of caspase-dependent and -independent apoptosis [J]. Blood, 2005,106(8):1794-1800.
- [8] 易铁男,周云峰,伍刚. Caspase家族与细胞凋亡的研究进展[J]. 国外医学肿瘤学分册,2001,28(1):39-42.
- [9] 薛芳,李世辉,潘峻.和厚朴酚对U937细胞的体外作用[J]. 中成药,2007,29(11):1582-1585.
- [10] 薛红漫,罗招凡,孟哲,等. HA14-1诱导不同Bcl-2表达水平的白血病细胞凋亡[J]. 中山大学学报:医学科学版,2005,25(2):172-175.
- [11] Leung AW, Halestrap AP. Recent progress in elucidating the molecular mechanism of the mitochondrial permeability transition pore [J]. Biochim Biophys Acta, 2008,1777(7-8):946-952.
- [12] Weber IT, Fang B, Agniswamy J. Caspases: structure-guided design of drugs to control cell death [J]. Mini Rev Med Chem, 2008,8(11):1154-1162.
- [13] Fan TJ, Han LH, Cong RS, et al. Caspase family proteases and apoptosis [J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2005,37(11):719-727.

(编辑 孙慧兰)