

# Embelin 通过氧化应激途径导致DNA损伤抑制HL-60细胞增殖

杨莹 胡荣 朱珂 李迎春 李佳 苗苗 王洪涛 姚鲲 刘卓刚

**【摘要】** 目的 探讨Embelin是否通过氧化应激途径导致DNA双链损伤,从而抑制HL-60细胞增殖。方法 HL-60细胞经不同浓度(3、10、30、100及300 μg/ml)Embelin处理24 h,采用CCK-8法检测细胞增殖抑制率;采用DCFH-DA荧光探针流式细胞术测定细胞内活性氧(ROS)水平;彗星试验检测DNA双链断裂(DSB)情况。结果 与对照组相比,Embelin浓度为10、30、100及300 μg/ml时均可显著抑制HL-60细胞增殖,增殖抑制率分别为(12.74±2.27)%、(23.49±1.96)%、(30.30±1.89)%和(57.55±3.59)%( $P$ 值均 $<0.05$ );随着药物浓度的增加HL-60细胞内ROS的水平增高、DSB增加( $P$ 值均 $<0.05$ );应用ROS抑制剂N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)预先处理HL-60细胞2 h后再加入300 μg/ml的Embelin作用24 h,与单用300 μg/ml Embelin作用组比较,ROS水平下降、DSB减少,同时Embelin对HL-60细胞的抑制率由(57.55±3.59)%下降为(32.75±2.70)%( $P$ 值均 $<0.05$ )。结论 Embelin通过产生细胞内ROS发生氧化应激作用,导致DSB,最终抑制HL-60细胞的增殖。

**【关键词】** 酸藤子属; 白血病; 活性氧; 氧化性应激; DNA双链断裂

**Involvement of oxidative stress in embelin-induced cell death in leukemia HL-60 cells** Yang Ying, Hu Rong, Zhu Ke, Li Yingchun, Li Jia, Miao Miao, Wang Hongtao, Yao Kun, Liu Zhuogang. Hematological Department of Shengjing Hospital Affiliated to China Medical University, Shenyang 110023, China  
Corresponding author: Liu Zhuogang, Email: sj\_liuzg@163.com

**【Abstract】 Objective** To evaluate the effects of Embelin on HL-60 cells by the impact of oxidative stress on DNA double-strand breaks (DSBs). **Methods** HL-60 cells were treated with Embelin in different concentration (3, 10, 30, 100, and 300 μg/ml) for 24 h, and inhibitory effects was examined by CCK-8 assay. Reactive oxygen species (ROS) levels were evaluated by flow cytometry using DCFH-DA. Comet assay was used to detect the extent of DSBs. **Results** Embelin inhibited proliferation of HL-60 cells in a dose-dependent manner. At the concentration of 10, 30, 100, and 300 μg/ml, the inhibition rate was (12.74±2.27)%, (23.49±1.96)%, (30.30±1.89)%, and (57.55±3.59)% ( $P<0.05$ ). Embelin also lead to high level of intracellular ROS and deterioration of DNA damage ( $P<0.05$ ). When HL-60 cells were pretreated with ROS scavenger N-acetyl-L-cysteine (NAC) for 2 h and then treated with 300 μg/ml Embelin for 24 h, the intracellular ROS level declined and DSBs relieved ( $P<0.05$ ). Meanwhile, embelin-induced cell viability significantly declined to (32.75±2.70)% ( $P<0.05$ ). **Conclusions** Embelin induced the death of HL-60 cells by increasing the generation of intracellular oxidation and the oxidative stress, which drived the damage of DNA double-strand.

**【Key words】** Embelia; Leukemia; Reactive oxygen species; Oxidative stress; DNA double-strand breaks

虽然目前在白血病的发病机制和预后因素方面已取得巨大的进展<sup>[1-3]</sup>,但急性髓系白血病(AML)仍是一种难以治愈的疾病。常规化疗可以使大多数60岁以下患者获得完全缓解,然而其中绝大部分最终将面临疾病复发所致的死亡<sup>[4]</sup>。因此,对于

AML的治疗仍需发掘新的治疗药物。Embelin是一种具有抗炎、抗菌及抗肿瘤等多种生物学活性成分的天然植物果实<sup>[5-7]</sup>。有研究表明其可以抑制肿瘤细胞增殖并诱导其凋亡<sup>[8]</sup>。我们既往在研究中也发现Embelin可以促进白血病细胞的凋亡<sup>[9-10]</sup>。有研究表明活性氧(reactive oxygen species, ROS)介导的DNA双链断裂(DSB)途径在抑制肿瘤生长方面起重要的作用<sup>[3]</sup>。因此寻找可以诱导肿瘤细胞DSB从而达到抑制肿瘤细胞生长的药物,将为复发、难治

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.06.004

作者单位: 110005 沈阳, 中国医科大学附属盛京医院

通信作者: 刘卓刚, Email: sj\_liuzg@163.com

的白血病患者提供新的治疗办法。在本研究中我们拟探索 Embelin 是否可以通过产生细胞内 ROS 导致 DSB, 从而达到抑制白血病细胞增殖的作用。

### 材料和方法

1. 主要材料及其来源: HL-60 细胞由我院血液科实验室保存; Embelin 为美国 Sigma-Aldrich 公司产品; CCK-8 试剂盒、N-乙酰-L-半胱氨酸(N-acetyl-L-cysteine, NAC)、2',7'-二氯荧光素二乙酸酯(2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA) 均为碧云天生物技术研究产品; Gold view、Tritonx-100、二甲基亚砜(DMSO)均购自北京索莱宝科技有限公司。

2. 细胞培养: HL-60 细胞采用含有 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养基, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度环境下培养, 每 2~3 d 换液 1 次。取对数生长期的细胞进行实验。

3. 药物干预: 调整 HL-60 细胞密度为  $1 \times 10^6$ /ml 接种于 6 孔板中, 用不同浓度的 Embelin (3、10、30、100 及 300 μg/ml) 作用 24 h 后收集细胞; NAC 组提前应用 NAC (2 mmol/L) 预处理细胞 2 h, 再加入 300 μg/ml Embelin 培养 24 h。另外设立不加药物干预的对照组。

4. CCK-8 法检测细胞增殖抑制率: 将各组 HL-60 细胞以  $1 \times 10^4$ /孔接种于 96 孔板中。每孔加入 10 μl CCK-8 后继续培养 1 h。采用酶标仪检测 450 和 630 nm 波长处吸光度(A)值, 每个点设 5 个复孔。按照如下公式计算细胞增殖抑制率。

$$\text{细胞增殖抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}}{A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}}\right) \times 100\%$$

5. 细胞内 ROS 检测: 采用 DCFH-DA 荧光探针检测各组细胞内 ROS 水平。DCFH-DA 可以穿过细胞膜, 进入细胞后可以被细胞内酯酶水解为 DCFH, 而 DCFH 不能透过细胞膜。细胞内的 ROS 可以氧化无荧光的 DCFH 生成有荧光的 DCF。检测 DCF 的荧光就可以反映细胞内 ROS 的水平。取各组细胞加入 500 μl DCFH-DA (10 μmol/L), 在 37 °C 孵育箱中继续培养 30 min。收集细胞, 用 PBS 冲洗 3 次以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA, 然后上流式细胞仪检测 DCF 荧光强度。每组实验设 3 个复孔, 实验重复 3 次。

6. 彗星试验: 调整各组细胞密度为  $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ /ml, 与 1 ml 6 g/L 低熔点琼脂糖在 37 °C 下混合均

匀后滴于细胞培养皿中, 迅速铺平, 于 4 °C 冰箱使琼脂糖凝固。凝固后倒入细胞裂解液过夜。而后倒掉裂解液并用 PBS 冲洗 2 次。处理细胞培养皿使电泳缓冲液能够通过凝胶, 将培养皿底置于水平电泳槽的阳极端。倒入碱性电泳缓冲液, 碱解旋 20 min, 再以 0.7 V/cm 电压电泳 20 min。取出培养皿吸干电泳缓冲液, 加入蒸馏水中中和 2 次。最后滴加 200 μl 浓度为 25 μg/ml 的 Gold view 水溶液, 4 °C 避光染色 20 min, 于奥林巴斯 AX70 荧光显微镜下观察电泳图像。每组实验设 3 个复孔, 实验重复 3 次。

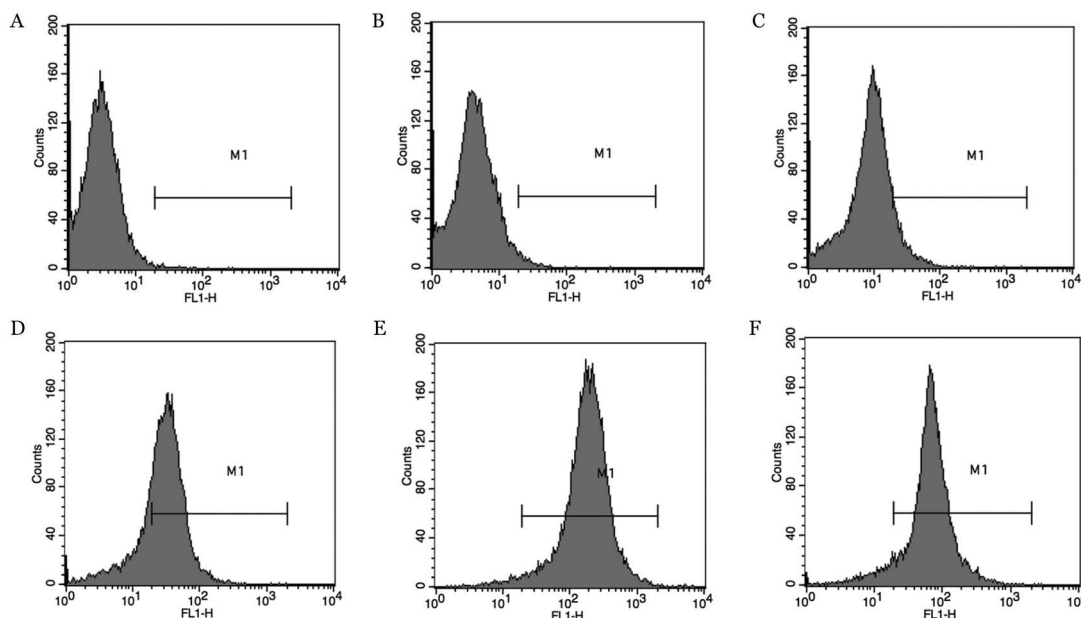
7. 统计学处理: 应用 SPSS19.0 软件进行统计学分析。实验结果用均值±标准差表示, 差异的显著性检验采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 结 果

1. Embelin 对 HL-60 细胞增殖的影响: Embelin 对 HL-60 细胞具有增殖抑制作用, 其抑制效应呈浓度依赖性。3、10、30、100、300 μg/ml Embelin 作用 HL-60 细胞 24 h 后增殖抑制率分别为 (5.09 ± 1.49)%、(12.74 ± 2.27)%、(23.49 ± 1.96)%、(30.30 ± 1.89)% 和 (57.55 ± 3.59)%。其中 10 μg/ml 及以上浓度 Embelin 的增殖抑制作用较为明显, 与对照组相比, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 3 μg/ml Embelin 对 HL-60 细胞的增殖抑制作用与对照组相比差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

2. Embelin 对 HL-60 细胞内 ROS 产生的影响: 10、30、100、300 μg/ml Embelin 作用 HL-60 细胞 24 h 后随着药物浓度增加细胞内 ROS 水平也随之增加, 分别为 (100.91 ± 0.29)%、(103.33 ± 0.57)%、(137.92 ± 1.91)%、(443.40 ± 2.62)%。将 HL-60 细胞应用抗氧化剂 NAC (2 mmol/L) 预先处理 2 h 后再加入 300 μg/ml 的 Embelin 持续作用 24 h。结果显示细胞内 ROS 水平为 (189.17 ± 2.00)%, 较单用 300 μg/ml Embelin 作用组显著下降, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (图 1)。

3. Embelin 对 DSB 的影响: 彗星实验尾长 (TL) 代表 DNA 损伤的程度。TL 值越大表示 DNA 损伤越严重。结果显示对照组尾长为 (3.68 ± 1.29) μm, 10、30、100、300 μg/ml Embelin 作用 HL-60 细胞 24 h 后 TL 值分别为 (7.47 ± 2.23)、(13.74 ± 3.19)、(24.93 ± 7.06)、(37.06 ± 9.83) μm ( $P < 0.05$ ), 随着 Embelin 药物浓度的增加, DNA 损伤强度加重 ( $P$  值均  $< 0.05$ )。加入 ROS 抑制剂 NAC 后 TL 为 (19.86 ± 8.64) μm, 较单



A: 对照组; B: 10 µg/ml Embelin 作用组; C: 30 µg/ml Embelin 作用组; D: 100 µg/ml Embelin 作用组; E: 300 µg/ml Embelin 作用组; F: N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)组(2 mmol/L NAC + 300 µg/ml Embelin)

图1 2',7'-二氯荧光素二乙酸酯荧光探针检测Embelin对HL-60细胞内活性氧水平的影响

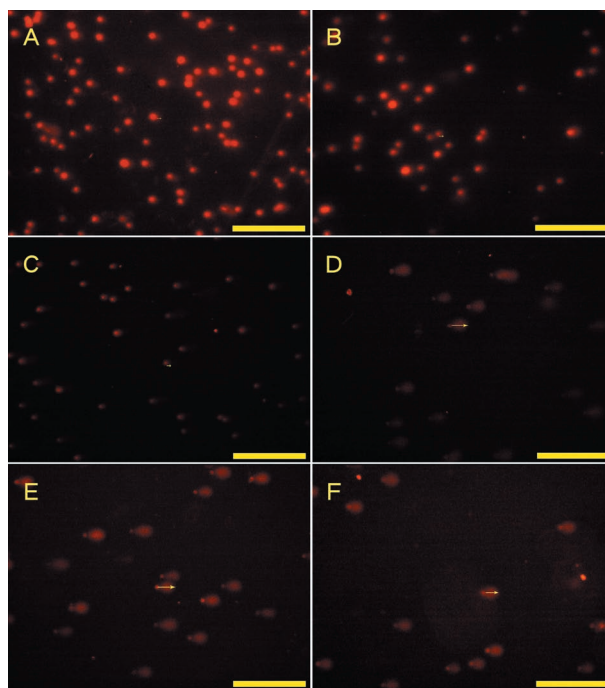
用 300 µg/ml Embelin 作用组显著缩短, 差异有统计学意义(图2)。

4. NAC 抑制 Embelin 对 HL-60 细胞增殖的影响: 为证实 Embelin 对 HL-60 细胞的增殖抑制作用是通过增加细胞内 ROS 水平, 加重 DNA 损伤所致的, 遂再次应用 CCK-8 法检测加入 ROS 抑制剂 NAC 后细胞增殖率的变化。结果显示, HL-60 细胞经 2 mmol/L NAC 预处理 2 h 后加入 300 µg/ml Embelin 作用 24 h, 增殖抑制率为 (32.75±2.70)%, 较单用 300 µg/ml 的 Embelin 作用组 [(57.55±3.59)%] 显著降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

### 讨 论

Embelin 又名酸藤子酚、恩贝酸、信筒子碱, 是一种具有抗肿瘤的生物学活性成分的天然植物果实; 作为一种 X 连锁凋亡抑制蛋白 (X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP) 小分子抑制剂而引起我们的关注。在既往的研究中, 已经证实 Embelin 可以诱导 HL-60 细胞的凋亡, 从而抑制其增殖<sup>[9]</sup>。鉴于氧化应激反应在抗肿瘤治疗中所展现的重要作用, 在本研究中我们旨在探讨 Embelin 对 HL-60 细胞增殖抑制作用是否通过产生 ROS 所发生的氧化应激作用而实现的。

目前氧化应激作为一种可以抑制肿瘤细胞增



A: 对照组; B: 10 µg/ml Embelin 作用组; C: 30 µg/ml Embelin 作用组; D: 100 µg/ml Embelin 作用组; E: 300 µg/ml Embelin 作用组; F: N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)组(2 mmol/L NAC + 300 µg/ml Embelin)

图2 彗星试验检测Embelin对HL-60细胞DNA双链断裂的影响(箭头代表彗星尾长, 标尺为200 µm)

殖的治疗策略而倍受关注<sup>[11-12]</sup>。通过氧化应激反应所产生的DNA破坏进而导致包括P53磷酸化等一

系列反应最终导致肿瘤细胞的死亡<sup>[10]</sup>。有文献报道,细胞内ROS的产生不仅具有抗肿瘤的活性还可以增加肿瘤细胞对细胞毒药物的敏感性<sup>[12-14]</sup>。肿瘤细胞对于氧化产物更加敏感,使其DNA发生破坏并且活化转录因子,这些都是导致细胞死亡的原因<sup>[15]</sup>。还有研究表明,随着氧化产物的增加将导致肿瘤细胞DNA损伤加重,同时使其阻滞于细胞周期<sup>[12,14]</sup>,达到抑制肿瘤细胞的生长作用。

本研究中我们应用不同浓度的Embelin作用于HL-60细胞24 h后,采用CCK-8法检测细胞的增殖抑制率,结果显示Embelin对HL-60细胞的增殖抑制作用呈浓度依赖性。进一步实验选用10、30、100及300 μg/ml的Embelin作用于HL-60细胞24 h,采用流式细胞术检测细胞内ROS水平。结果发现Embelin可以促进细胞内ROS的产生,并且这种促进作用呈浓度依赖性。高水平的ROS不仅可以导致细胞的死亡,并且可以引起DNA损伤和基因不稳定性。我们进一步通过彗星试验检测应用10、30、100及300 μg/ml的Embelin作用24 h后,HL-60细胞DSB情况。结果显示,加入Embelin作用后HL-60细胞存在DSB;并且随着药物浓度的增加,TL值增大,提示存在DNA损伤加重。为了证实上述作用与Embelin所致的细胞内ROS产生增多有关,我们在进一步实验中加入ROS抑制剂NAC。结果显示加入NAC后与单用同剂量Embelin作用组比较,HL-60细胞内ROS产生减少、DNA损伤减轻,同时对HL-60细胞增殖抑制作用减轻。证实Embelin通过产生细胞内ROS所致DSB,最终抑制HL-60细胞的增殖。

综上,Embelin可以诱导白血病细胞株HL-60细胞内ROS的产生并导致DNA损伤,从而达到抑制其增殖的作用,并且这些作用呈浓度依赖性。我们的研究为AML治疗提供了一个重要的思路,Embelin可能成为治疗AML的重要药物。

#### 参考文献

- [1] Ohno R, Asou N, Ohnishi K. Treatment of acute promyelocytic leukemia: strategy toward further increase of cure rate [J]. *Leukemia*, 2003, 17(8): 1454-1463.
- [2] Ravandi F, Burnett AK, Agura ED, et al. Progress in the treatment of acute myeloid leukemia [J]. *Cancer*, 2007, 110(9): 1900-1910.
- [3] Papiez MA, Bukowska-Straková K, Krzysciak W, et al. (-)-Epicatechin enhances etoposide-induced antileukaemic effect in rats with acute myeloid leukaemia [J]. *Anticancer Res*, 2012, 32(7): 2905-2913.
- [4] Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics, 2014 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2014, 64(1): 9-29.
- [5] Ahn KS, Sethi G, Aggarwal BB. Embelin, an inhibitor of X chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein, blocks nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) signaling pathway leading to suppression of NF-kappaB-regulated antiapoptotic and metastatic gene products [J]. *Mol Pharmacol*, 2007, 71(1): 209-219.
- [6] Joshi R, Kamat JP, Mukherjee T. Free radical scavenging reactions and antioxidant activity of embelin: biochemical and pulse radiolytic studies [J]. *Chem Biol Interact*, 2007, 167(2): 125-134.
- [7] Singh D, Singh R, Singh P, et al. Effects of embelin on lipid peroxidation and free radical scavenging activity against liver damage in rats [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2009, 105(4): 243-248.
- [8] Mori T, Doi R, Kida A, et al. Effect of the XIAP inhibitor Embelin on TRAIL-induced apoptosis of pancreatic cancer cells [J]. *J Surg Res*, 2007, 142(2): 281-286.
- [9] 胡荣, 吴斌, 张国君, 等. Embelin对HL-60细胞增殖、分化和凋亡的影响 [J]. *中华血液学杂志*, 2010, 31(7): 442-445.
- [10] Hu R, Zhu K, Li Y, et al. Embelin induces apoptosis through down-regulation of XIAP in human leukemia cells [J]. *Med Oncol*, 2011, 28(4): 1584-1588.
- [11] Nakazato T, Ito K, Miyakawa Y, et al. Catechin, a green tea component, rapidly induces apoptosis of myeloid leukemic cells via modulation of reactive oxygen species production in vitro and inhibits tumor growth in vivo [J]. *Haematologica*, 2005, 90(3): 317-325.
- [12] Chen HM, Chang FR, Hsieh YC, et al. A novel synthetic protoapigenone analogue, WYC02-9, induces DNA damage and apoptosis in DU145 prostate cancer cells through generation of reactive oxygen species [J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 50(9): 1151-1162.
- [13] Mi L, Sirajuddin P, Gan N, et al. A cautionary note on using N-acetylcysteine as an antagonist to assess isothiocyanate-induced reactive oxygen species-mediated apoptosis [J]. *Anal Biochem*, 2010, 405(2): 269-271.
- [14] Wang J, Yi J. Cancer cell killing via ROS: to increase or decrease, that is the question [J]. *Cancer Biol Ther*, 2008, 7(12): 1875-1884.
- [15] Schumacker PT. Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword [J]. *Cancer Cell*, 2006, 10(3): 175-176.

(收稿日期:2015-02-20)

(本文编辑:王叶青)