

苦参碱对NK/T细胞淋巴瘤细胞的增殖抑制作用

顾建友^{1,2} 张宇¹ 王潇^{1,2} 项静静¹ 邓姝¹ 吴迪炯¹ 陈均法¹ 俞立虹¹ 周妍¹
王尧坤³ 沈建平¹

¹浙江中医药大学附属第一医院,杭州 310006;²浙江省中西医结合循环系疾病诊治重点实验室,杭州 310006;³绍兴第二医院,绍兴 312000

通信作者:沈建平,Email:sjping88@163.com

基金项目:浙江省自然科学基金(LY15H290004、LY16H290002);国家中医临床研究基地科研专项(JDZX2015116);浙江省医药卫生平台重点资助计划(2015ZDA021)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2020.04.014

Proliferation inhibition effects of matrine on natural killer/T-cell lymphoma cells mediated by c-Myc signaling pathway

Gu Jianyou^{1,2}, Zhang Yu¹, Wang Xiao^{1,2}, Xiang Jingjing¹, Deng Shu¹, Wu Dijiong¹, Chen Junfa¹, Yu Lihong¹, Zhou Yan¹, Wang Yaokun³, Shen Jianping¹

¹The First Affiliated Hospital, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, China;² Key Laboratory of Integrative Chinese and Western Medicine for the Diagnosis and Treatment of Circulatory Diseases of Zhejiang Province, Hangzhou 310006, China;³Shaoxing Second Hospital, Shaoxing 312000, China
Corresponding author: Shen Jianping, Email: sjping88@163.com

NK/T细胞淋巴瘤(NKTCL)是一类侵袭性强的非霍奇金淋巴瘤,在我国淋巴瘤患者中约占11%^[1],晚期或复发难治患者的5年总体生存(OS)率不足52%^[2]。NKTCL的病因常与EB病毒(EBV)感染相关,也与c-Myc的过表达密切相关^[3]。中药的有效成分苦参碱具有广泛的抗肿瘤活性,在白血病、多发性骨髓瘤、胃癌等疾病的治疗中具有良好的疗效^[4]。然而,苦参碱抗淋巴瘤的确切分子机制目前仍不明确,在本研究中我们探讨苦参碱对NKTCL细胞株NK92细胞的增殖抑制作用及其分子机制。

材料与方法

1. 细胞来源及主要试剂:人NK92细胞购自德国微生物菌种保藏中心,以含12.5%胎牛血清、12.5%马血清和10 μg/L IL-2的α-MEM培养基在37℃、5%CO₂条件下培养。苦参碱购自南京泽朗医药科技有限公司,高效液相色谱法鉴定纯度为98%,以α-MEM培养基配成储存液备用。MTT购自美国Amresco公司,亚胺环己酮和MG132购自美国Cayman Chemical公司,TRIzol购自美国Invitrogen公司,逆转录试剂盒HiScript II Q RT reagent kit和定量PCR试剂盒ChamQ™ SYBR qPCR Master Mix kit购自南京诺唯赞公司。c-Myc抗体和LMP1抗体购自美国Abcam公司,磷酸化c-Myc(Ser62)抗体购自美国CST公司,钙/钙调素依赖激酶II γ亚基(CaMK II γ)抗体购自苏州Abgent公司,β-actin抗体购自杭州Dawen公司。

2. MTT法检测细胞增殖抑制率:收集对数生长期的

NK92细胞,调整细胞密度为4×10⁵/ml,接种到96孔板中。加入不同终浓度的苦参碱(0.125、0.250、0.500、1.000、2.000、4.000 mmol/L),对照组加入等体积的培养基,同时设置仅有培养基而无细胞的空白对照组。每组设置6个复孔,放入培养箱中分别孵育24、48、72 h,随后加入MTT溶液继续孵育4 h,然后以1 000×g离心10 min,弃掉各孔内的液体,每孔加入150 μl DMSO,振荡10 min后于酶标仪上测定490 nm处的吸光度(A)值,根据以下公式计算细胞增殖抑制率:细胞增殖抑制率(%)=(A_{对照组}-A_{实验组})/(A_{对照组}-A_{空白组})×100%。药物的半数抑制浓度(IC₅₀)值通过GraphPad Prism软件计算。

3. Western blot法分析第62位丝氨酸磷酸化c-Myc [p-c-Myc(Ser62)]、CaMK II γ和EBV LMP1的表达:NK92细胞以2.5×10⁵/ml的密度接种于6孔板中,处理组加入1.96 mmol/L的苦参碱,对照组只加入等体积的培养基,两组细胞在细胞培养箱中孵育48 h。收集细胞,用RIPA细胞裂解液提取细胞总蛋白,BCA法测定蛋白样品的浓度。采用SDS-PAGE行蛋白质电泳,电转法将蛋白从胶转移到PVDF膜上,用50 g/L脱脂奶粉溶液室温封闭PVDF膜1 h, TBST缓冲液洗膜3次。加入对应的一抗溶液,4℃孵育PVDF膜过夜, TBST缓冲液洗膜3次,与辣根过氧化物标记的二抗在室温下孵育1 h。TBST缓冲液洗膜4次,加入ECL工作液,利用化学发光成像(Odyssey Fc)系统拍照并自动分析蛋白条带的灰度值。

4. 亚胺环己酮追逐法分析c-Myc蛋白半衰期变化: NK92细胞以7.5×10⁵/孔接种到6孔板中,处理组加入

1.96 mmol/L 苦参碱, 对照组加入等体积的培养基。两组细胞在细胞培养箱中孵育 12 h, 加入 100 mg/L 亚胺环己酮(蛋白质合成抑制剂), 在不同时间点(0、25、50、75、100 min)收取细胞样品。Western blot 法分析 c-Myc 和 β -actin 的蛋白表达情况。利用 Odyssey Fc 系统对蛋白条带拍照并自动分析蛋白条带的灰度值, c-Myc 蛋白的相对表达量以 c-Myc 灰度值与内参 β -actin 灰度值的比值表示。以加入亚胺环己酮前(0 min)的 c-Myc 蛋白含量作为 100%, 其他时间点 c-Myc 蛋白含量与 0 min 时 c-Myc 蛋白含量的比值作为剩余 c-Myc 百分含量。以亚胺环己酮处理时间为 X 轴, 剩余 c-Myc 百分比为 Y 轴, 应用 GraphPad Prism 软件作出指数衰减曲线并自动计算出 c-Myc 蛋白的半衰期。

5. MG132 阻断法分析 c-Myc 蛋白降解的蛋白酶体依赖性: NK92 细胞以 5×10^5 /孔接种到 6 孔板中, 然后将细胞分成 4 组: 苦参碱组(1.96 mmol/L)、MG132 组(10 μ mol/L)、联合组(1.96 mmol/L 苦参碱+10 μ mol/L MG132)和对照组, 加入对应终浓度的药物或不含药物的等体积培养液。各组细胞在细胞培养箱中孵育 6 h, 收集细胞样品, Western blot 法分析 c-Myc 和 β -actin 的蛋白表达情况。

6. 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 分析 c-Myc、Max、Miz-1、Mad 和 LMP1 基因的转录表达: NK92 细胞以 7.5×10^5 /孔接种到 6 孔板中, 将细胞分为 4 组: 1.2、2.4、3.6 mmol/L 苦参碱组和对照组, 苦参碱组加入对应浓度苦参碱, 对照组加入不含药物的等体积培养基。4 组细胞在细胞培养箱中孵育 24 h 后收集细胞, 按 TRIzol 试剂说明步骤抽提各组细胞总 RNA, 逆转录生成 cDNA, 两步法行定量 PCR。各基因的表达水平采用相对定量法($2^{-\Delta\Delta Ct}$)计算, 以 β -actin 作为内参。

7. 统计学处理: 采用 GraphPad Prism 软件进行统计学分析。近似服从正态分布的定量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 苦参碱对 NK92 细胞的增殖抑制作用: 随着苦参碱作用浓度递增或作用时间延长, 其对 NK92 细胞的增殖抑制率逐渐增加(表 1)。苦参碱作用 24 h、48 h 和 72 h 的 IC_{50} 值分别为(6.32 \pm 0.02)、(1.96 \pm 0.03)、(1.71 \pm 0.05) mmol/L。

2. 苦参碱对 NK92 细胞 c-Myc、p-c-Myc(Ser62)、CaMK II γ 和 LMP1 蛋白表达的影响: Western blot 检测结果显示, 苦参碱作用于 NK92 细胞 48 h 后, LMP1、CaMK II γ 、p-c-Myc(Ser62)、c-Myc、p-c-Myc(Ser62)/c-Myc 较对照组的相对表达量(实验重复 3 次)分别为 0.481 \pm 0.025、0.691 \pm 0.095、0.634 \pm 0.042、0.702 \pm 0.030、0.884 \pm 0.038, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)(图 1)。

3. 苦参碱对 NK92 细胞 c-Myc 蛋白半衰期的影响: 亚胺环己酮追逐法结果显示, 对照组 NK92 细胞中 c-Myc 蛋白的半衰期为 80.7 min, 苦参碱组 NK92 细胞中 c-Myc 蛋白的半衰期为 33.4 min, 两者的差异有统计学意义(图 2)。

4. 苦参碱对 NK92 细胞 c-Myc 蛋白降解的蛋白酶体依赖性影响: 蛋白酶体抑制剂 MG132 阻断法的结果显示, MG132 单独处理 NK92 细胞后, c-Myc 蛋白相对表达量约为对照组的 0.533 \pm 0.052; 苦参碱单独处理后, c-Myc 蛋白相对表达量约为对照组的 0.387 \pm 0.038; 苦参碱联合 MG132 处理后, c-Myc 蛋白相对表达量则恢复到对照组的 0.544 \pm 0.059, 与单独 MG132 处理组的差异无统计学意义(图 3)。

5. 苦参碱对 NK92 细胞 c-Myc、Max、Miz-1、Mad、LMP1

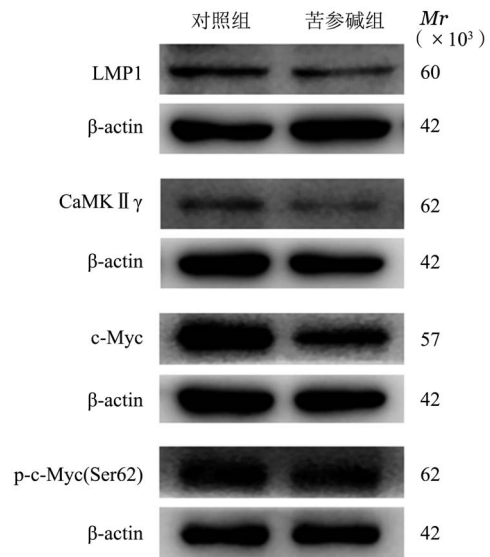
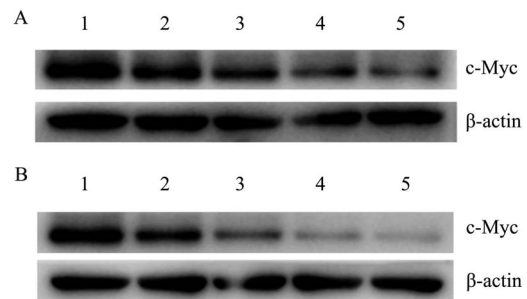


图 1 Western blot 法分析苦参碱对 NK92 细胞 c-Myc、p-c-Myc(Ser62)、CaMK II γ 和 LMP1 蛋白表达量的影响



1: 0 min; 2: 25 min; 3: 50 min; 4: 75 min; 5: 100 min; A: 对照组; B: 苦参碱组

图 2 Western blot 法分析苦参碱对 NK92 细胞 c-Myc 蛋白半衰期的影响

表 1 不同浓度苦参碱对 NK92 细胞的增殖抑制率(% , $\bar{x} \pm s$) (样本量 = 6)

作用时间	0.125 mmol/L	0.250 mmol/L	0.500 mmol/L	1.000 mmol/L	2.000 mmol/L	4.000 mmol/L
24 h	0.714 \pm 0.440	1.512 \pm 0.788	3.002 \pm 1.045	5.464 \pm 0.992	15.422 \pm 1.546	33.756 \pm 1.527
48 h	2.134 \pm 0.876	4.140 \pm 0.967	7.988 \pm 1.445	13.770 \pm 1.788	49.532 \pm 2.492	90.104 \pm 1.110
72 h	4.294 \pm 0.800	7.084 \pm 0.993	11.180 \pm 1.203	19.212 \pm 1.357	57.272 \pm 1.359	94.272 \pm 2.265

基因转录的影响:RT-qPCR分析结果显示,苦参碱作用于NK92细胞24 h后,c-Myc基因的转录被抑制,其抑制程度随着苦参碱作用浓度的提高而增强。Max、Miz-1、Mad基因转录上调,其上调的程度与苦参碱的作用浓度成正比;EBV LMP1基因的转录未被苦参碱抑制,转录显著上调(图4)。

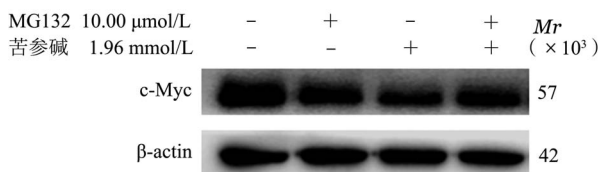
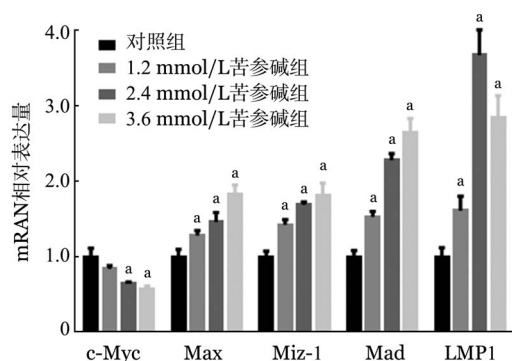


图3 Western blot法分析MG132和苦参碱对NK92细胞c-Myc蛋白表达量的影响



注:^a与对照组相比, $P < 0.05$

图4 实时荧光定量PCR法检测苦参碱对NK92细胞c-Myc、Max、Miz-1、Mad、LMP1基因mRNA相对表达量的影响

讨 论

我们前期研究发现苦参碱能抑制急性早幼粒细胞白血病细胞的增殖,并能诱导其凋亡^[5]。本研究中,我们发现苦参碱抑制NKTCL细胞NK92的增殖,且具有明显的剂量和时间依赖性。

约45.4% NKTCL患者存在c-Myc转录因子过表达,c-Myc活化是NKTCL的重要发病机制之一^[6]。本研究显示,苦参碱显著抑制了NK92细胞c-Myc基因的转录和翻译,表明c-Myc基因受抑可能是苦参碱抑制NK92细胞增殖的主要分子机制。苦参碱作用下,c-Myc蛋白的半衰期缩短,表明c-Myc蛋白结构的稳定性下降。c-Myc蛋白结构的稳定性是由第62位丝氨酸磷酸化(维持稳定)和第58位苏氨酸磷酸化(破坏稳定,促进降解)共同决定的^[7]。苦参碱作用于NK92细胞后,p-c-Myc(Ser62)蛋白水平及在总c-Myc蛋白中所占比例均显著下调,表明苦参碱通过抑制p-c-Myc(Ser62)降低c-Myc蛋白结构的稳定性,从而加速其蛋白酶体依赖性蛋白降解。

CaMK II γ 是p-c-Myc(Ser62)的蛋白激酶,在T细胞淋巴瘤患者中,CaMK II γ 与c-Myc蛋白表达呈正相关^[8]。本研究显示,苦参碱抑制了NK92细胞CaMK II γ 蛋白的表达,抑制程度与磷酸化c-Myc的下调程度同步,提示苦参碱通过抑制CaMK II γ 表达下调c-Myc磷酸化,进而破坏c-Myc蛋白的稳

定性,加速其降解。

c-Myc与Max蛋白结合后才能发挥增强转录作用,而Mad和Miz-1均能抑制c-Myc的活性^[9]。本研究发现,苦参碱处理NK92细胞后,c-Myc基因的转录被抑制,同时Mad和Miz-1基因的转录被增强,提示c-Myc的功能受到进一步抑制。

c-Myc是EBV LMP1的靶基因^[10],苦参碱处理NK92细胞后,LMP1蛋白表达显著下调,但其基因的转录水平却显著上调,提示苦参碱通过调控特定微小RNAs阻遏LMP1基因的翻译,导致LMP1蛋白水平下降,进而导致其下游靶基因c-Myc的转录和表达受抑。

综上,苦参碱通过抑制LMP1的表达抑制c-Myc的转录,通过抑制CaMK II γ 的表达破坏c-Myc蛋白的结构稳定性,通过增强Mad和Miz-1的表达抑制c-Myc功能活化。苦参碱有望成为治疗NKTCL的有效补充方案。

参 考 文 献

- [1] Sun J, Yang Q, Lu Z, et al. Distribution of lymphoid neoplasms in China: analysis of 4,638 cases according to the World Health Organization classification[J]. Am J Clin Pathol, 2012, 138(3): 429-434. DOI: 10.1309/AJCP7YLTQPUSDQ5C.
- [2] Kwong YL, Kim WS, Lim ST, et al. SMILE for natural killer/T-cell lymphoma: analysis of safety and efficacy from the Asia Lymphoma Study Group[J]. Blood, 2012, 120(15):2973-2980. DOI: 10.1182/blood-2012-05-431460.
- [3] Ng SB, Selvarajan V, Huang G, et al. Activated oncogenic pathways and therapeutic targets in extranodal nasal-type NK/T cell lymphoma revealed by gene expression profiling[J]. J Pathol, 2011, 223(4):496-510. DOI: 10.1002/path.2823.
- [4] 马玲娣,朱志超,孙晓,等. IL-6/JAK/STAT3介导苦参碱对K562细胞的增殖抑制作用[J].中华血液学杂志, 2015, 36(5): 422-426. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.05.015.
- [5] 吴迪炯,周郁鸿,朱俊,等. 苦参碱对急性早幼粒细胞白血病细胞维甲酸耐药的逆转作用研究[J].中华血液学杂志, 2011, 32(5):313-316. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2011.05.006.
- [6] Ng SB, Selvarajan V, Huang G, et al. Activated oncogenic pathways and therapeutic targets in extranodal nasal-type NK/T cell lymphoma revealed by gene expression profiling[J]. J Pathol, 2011, 223(4):496-510. DOI: 10.1002/path.2823.
- [7] Sears R, Nuckolls F, Haura E, et al. Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability[J]. Genes Dev, 2000, 14(19):2501-2514. DOI: 10.1101/gad.836800.
- [8] Gu Y, Zhang J, Ma X, et al. Stabilization of the c-Myc Protein by CAMK II γ Promotes T Cell Lymphoma[J]. Cancer Cell, 2017, 32(1):115-128.e7. DOI: 10.1016/j.ccell.2017.06.001.
- [9] Bédard M, Maltais L, Montagne M, et al. Miz-1 and Max compete to engage c-Myc: implication for the mechanism of inhibition of c-Myc transcriptional activity by Miz-1[J]. Proteins, 2017, 85(2):199-206. DOI: 10.1002/prot.25214.
- [10] Dirmeier U, Hoffmann R, Kilger E, et al. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus coordinately regulates proliferation with control of apoptosis[J]. Oncogene, 2005, 24(10):1711-1717. DOI: 10.1038/sj.onc.1208367.

(收稿日期:2019-10-08)

(本文编辑:律琦)