

苦参碱联合高三尖杉酯碱对 HL-60 细胞凋亡的影响及其机制研究

韩乔燕 傅奕 陶岚 叶金松 吴玲玉 陈浩月 陈璐 姜鑫 孙森

Study on the effect and mechanism of HL-60 cell apoptosis induced by matrine combined with homoharringtonine

Han Qiaoyan, Fu Yi, Tao Lan, Ye Jinsong, Wu Lingyu, Chen Haoyue, Chen Lu, Jiang Xin, Sun Miao

Corresponding author: Sun Miao, Department of Hematology, Jingjiang People's Hospital, Jingjiang 214500, China. Email: sunmiao@medmail.com.cn

近年来中药成分分子靶向治疗白血病成为国内外研究的热点^[1], 中药有效成分高三尖杉酯碱(HHT)、苦参碱(MAT)等经多种途径与化疗药物协同作用于白血病细胞已受到越来越广泛的重视^[1-2], 但 MAT 联合 HHT 治疗急性髓系白血病(AML)的报道极少。诱导细胞凋亡亦是中药抑制肿瘤细胞增殖的一条重要途径, 我们通过探讨 MAT 联合 HHT 对人 AML 细胞系 HL-60 细胞凋亡的影响及机制, 为中药联合应用抗 AML 提供理论依据。

材料和方法

1. 主要材料及来源: HL-60 细胞购自美国 ATCC 公司, RPMI 1640 培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司, DMSO 购自美国 Sigma 公司, Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒购自美国 Becton Dickinson 公司, Bcl-2、Bax 兔单克隆抗体(单抗)购自美国 Cell Signaling Technology (CST) 公司, 牛血清白蛋白(BSA)购自北京索莱宝科技有限公司, CCK-8 试剂盒、Western 及 IP 细胞裂解液、PMSF、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(6×)、彩色预染蛋白质分子量标准、考马斯亮蓝染色试剂盒均购自碧云天生物技术研究所, 增强型 HRP-DAB 底物显色试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司, PVDF 膜购自美国 Bio-Rad 公司, HHT 购自杭州民生药业有限公司, MAT 购自扬子江药业集团有限公司。

2. 细胞培养: HL-60 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液, 置 37 °C、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养, 每 2~3 d 换液 1 次并传代, 实验前无药培养 2 周。

3. CCK-8 法检测药物对细胞的增殖抑制率: 取对数生长

期的 HL-60 细胞, 调整细胞密度为 2×10^5 /ml, 接种于 96 孔板, 每孔 100 μ l, 在 37 °C、5% CO₂、饱和湿度培养箱中预培养 2 h 后分别加入不同浓度 HHT、MAT, 使 HHT 终浓度分别为 0.0025、0.005、0.01、0.02、0.04、0.08、0.16 μ g/ml, MAT 终浓度分别为 25、50、100、200、400、800、1 600、3 200 μ g/ml。按浓度由低到高依次加入 96 孔板混匀培养, 每个浓度设 4 个复孔, 以不含药正常培养的 HL-60 细胞孔为对照组, 另设含有培养基而没有细胞孔为调零空白对照孔, 混匀后置 37 °C、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养 24 h 后, 每孔加入 10 ml CCK-8 溶液, 将培养板在同样条件下孵育 4 h, 用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度(A)值, 分别计算细胞增殖抑制率。实验重复 3 次, 取平均值作为结果。

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

4. Annexin V/PI 标记流式细胞术检测各组细胞凋亡率: 取对数生长期的 HL-60 细胞, 调整细胞密度为 1×10^6 /ml, 接种于 24 孔板, 实验分为空白对照组(细胞悬液)、MAT 单药组、HHT 单药组、MAT+HHT 组。加入相应浓度药物工作液混匀后置 37 °C、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养 24 h 后, 收集细胞, 4 °C PBS 洗 2 次, 再加入 1×结合缓冲液重新悬浮细胞, 调整其密度为 1×10^6 /ml, 取 100 μ l 上述细胞悬液(1×10^5 细胞)至流式管中, 加入 Annexin V-FITC、碘化丙锭(PI)各 5 μ l, 轻轻涡旋后于室温(25 °C)避光孵育 15 min, 在每个反应管中加入 400 μ l 1×结合缓冲液, 立即上流式细胞仪检测。

5. Western blot 法检测各组 Bcl-2、Bax 蛋白表达水平: 取对数生长期的 HL-60 细胞, 调整细胞密度为 1×10^6 /ml, 接种于 6 孔板, 实验分组同上。加入相应浓度药物工作液, 混匀后置 37 °C、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养 24 h 后收集细胞, Western 及 IP 细胞裂解液裂解细胞提取总蛋白, 用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度, 进行 SDS-PAGE, 蛋白从凝胶电转移至 PVDF 膜上, 3% BSA 室温封闭 2 h, 加一抗 4 °C 过夜。次日加二抗室温孵育 1 h, 增强型 HRP-DAB 底物显色试剂显色。

6. 统计学处理: PVDF 膜经扫描成像后用 Quantity One 凝胶图像处理软件进行半定量分析, 条带强度分析所得的蛋白相对值(%)采用方差分析进行统计学处理。采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 数据以均数±标准差表示, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. HHT 对 HL-60 细胞 IC₅₀、MAT 对 HL-60 细胞 IC₁₀ 筛

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.05.018

基金项目: 江苏省中医药局科技项目(LZ13207)

作者单位: 214500 江苏靖江, 靖江市人民医院血液科(韩乔燕、陶岚、叶金松、吴玲玉、陈浩月、陈璐、姜鑫、孙森); 扬州大学医学院(傅奕)

通信作者: 孙森, Email: sunmiao@medmail.com.cn

选: HHT、MAT 单药对 HL-60 细胞的增殖抑制率随着药物浓度增加而升高,呈剂量依赖关系(图 1、2)。HHT 单药对 HL-60 细胞 IC₅₀ 为 0.042 μg/ml, MAT 单药对 HL-60 细胞 IC₁₀ 为 32 μg/ml。筛选出 HHT 0.04 μg/ml、MAT 25 μg/ml 联合用药作用于 HL-60 细胞,避免大剂量诱导剂对细胞的杀伤作用。

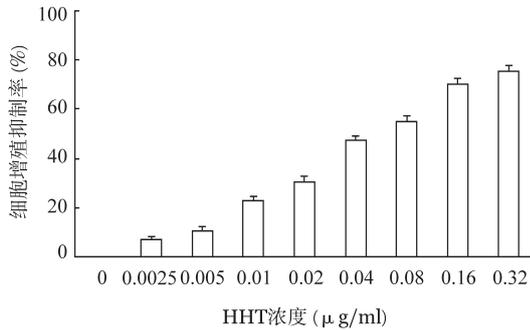


图1 不同浓度高三尖杉酯碱(HHT)对 HL-60 细胞增殖的抑制作用(实验重复3次)

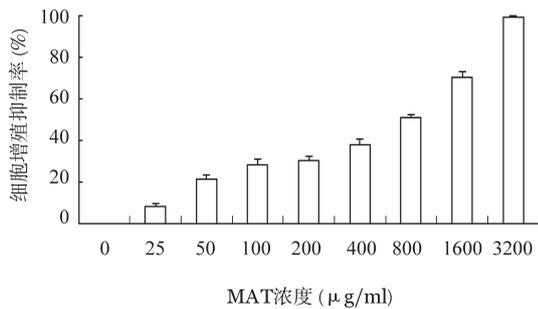
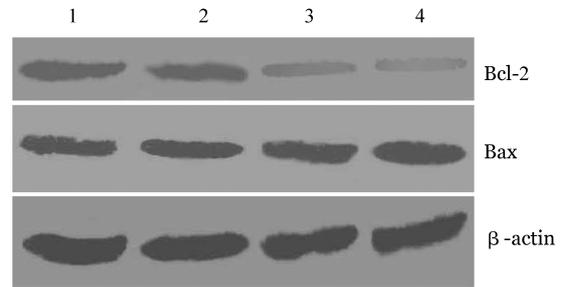


图2 不同浓度苦参碱(MAT)对 HL-60 细胞增殖的抑制作用(实验重复3次)

2. Annexin V/PI 标记流式细胞术检测各组 HL-60 细胞凋亡情况:空白对照组、MAT(25 μg/ml)单药组、HHT(0.04 μg/ml)单药组、MAT(25 μg/ml)+HHT(0.04 μg/ml)组 HL-60 细胞凋亡率分别为(0.96±0.04)%、(1.29±0.06)%、(8.36±0.13)%和(12.8±1.75)%。其中 HHT 单药组、MAT+HHT 组凋亡率显著高于空白对照组、MAT 单药组(P 值均 <0.01),且 MAT+HHT 组凋亡率显著高于 HHT 单药组($P<0.01$);MAT 单药组较空白对照组稍增高,差异无统计学意义($P>0.05$)。

3. 各组 Bcl-2、Bax 蛋白表达水平:Western blot 检测结果显示,空白对照组、MAT(25 μg/ml)单药组、HHT(0.04 μg/ml)单药组、MAT(25 μg/ml)+HHT(0.04 μg/ml)组 Bcl-2 相对表达水平(灰度值)分别为 85.43±7.54、83.86±8.07、40.58±5.29、20.99±3.25, Bax 相对表达水平(灰度值)分别为 42.71±0.72、43.42±1.03、57.19±5.05、65.33±6.07, Bcl-2/Bax 比值分别为 2.00±0.21、1.93±0.14、0.71±0.03、0.32±0.02。其中 HHT 单药组、MAT+HHT 组 Bcl-2/Bax 比值显著低于空白对照组、MAT 单药组(P 值均 <0.01),且 MAT+HHT 组也显著低于 HHT 单药组($P<0.01$);MAT 单药组较空白对照组 Bcl-2/Bax

比值稍减低,但差异无统计学意义($P>0.05$)(图 3)。



1:空白对照组;2:MAT(25 μg/ml)单药组;3:HHT(0.04 μg/ml)单药组;4:MAT(25 μg/ml)+HHT(0.04 μg/ml)组

图3 Western blot 法检测苦参碱(MAT)联合高三尖杉酯碱(HHT)对 HL-60 细胞 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响

讨 论

诱导白血病细胞凋亡是目前治疗白血病药物重要的作用机制之一^[3]。多种凋亡相关基因参与了诱导肿瘤细胞凋亡的过程,如 p53、Bcl 家族、Caspase 家族和 Survivin 等^[4]。Bcl-2 家族蛋白在细胞凋亡调控中起重要作用,Bcl-2 与 Bax 分别是抑制凋亡和促进凋亡的基因^[5]。Bcl-2 表达升高使细胞数目增加,未成熟和衰老细胞亦增多,受到致癌因素攻击后细胞变性的概率明显增加,易于发生肿瘤^[6],而肿瘤细胞高表达 Bcl-2 基因可促进肿瘤生长^[7]。Bax 具有拮抗 Bcl-2 促进细胞凋亡的作用。当 Bax 形成同源二聚体时可以诱导细胞凋亡,而当 Bax 与 Bcl-2 形成异源二聚体时则抑制细胞凋亡^[6]。细胞内 Bcl-2/Bax 表达水平的比值是决定细胞凋亡及其凋亡严重程度的关键^[8-9]。

HHT 是从我国三尖杉属植物中分离出的一种有抗癌作用的天然生物碱,我国首先将其用于白血病的治疗,并取得显著的临床疗效^[10-12]。HHT 具有抑制蛋白质合成作用,能诱导多种白血病细胞凋亡^[13-14]。此外,HHT 与组蛋白去乙酰化酶抑制剂辛二酰苯胺异羟肟酸(suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA)联合应用能通过上调 TNF 相关凋亡诱导配体和死亡受体增强 AML 细胞的凋亡^[1]。

MAT 是传统中药苦参的主要有效成分,以 MAT 为主要活性成分的苦参碱注射液目前在临床应用广泛,有治疗或辅助治疗实体肿瘤和血液肿瘤的作用^[15]。临床研究表明,苦参碱注射液不仅能增强化疗药物的作用,还能减轻多发性骨髓瘤(MM)、急性白血病、非霍奇金淋巴瘤化疗过程中的不良反应,如恶心、呕吐、黏膜炎、心脏毒性、肝脏毒性、骨髓抑制、多汗等^[16]。MAT 主要通过抑制肿瘤增殖、诱导肿瘤分化和凋亡、抗肿瘤浸润和远处转移等发挥抗肿瘤作用^[17-18]。研究发现 MAT 通过将细胞阻滞于 G₁ 期,改变 caspase-3、Cyclin E、Bcl-2、Bax 蛋白表达诱导细胞凋亡而抑制胆囊癌细胞增殖^[19]。MAT 还通过上调 Bax、Fas/FasL 和下调 Bcl-2 诱导人骨肉瘤细胞 caspase 依赖的凋亡^[20]。MAT 能通过诱导凋亡发挥抗骨髓瘤细胞效应,三氧化二砷与 MAT 协同作用能增强

MAT 诱导凋亡的作用^[16]。MAT 还可通过线粒体通路及 Akt 失活诱导人 AML 细胞凋亡^[2]。

我们选取 HHT 对 HL-60 细胞 IC₅₀ 前的浓度 0.04 μg/ml, 与非细胞毒剂量的 MAT (25 μg/ml) 联合作用于 HL-60 细胞, 避免大剂量诱导剂对细胞株的杀伤作用, 结果显示 MAT+HHT 组凋亡率明显高于空白对照组、MAT 单药组及 HHT 单药组 ($P < 0.01$)。提示 MAT 与 HHT 联合用药有增强 HHT 诱导 HL-60 细胞凋亡的作用。MAT 单药组、HHT 单药组、MAT+HHT 组 Bcl-2 表达水平依次下降, Bax 表达水平则依次升高, Bcl-2/Bax 比值也依次降低, 且 MAT+HHT 组 Bcl-2/Bax 比值也显著低于 HHT 单药组, 提示 MAT 与 HHT 联合用药可增强 HHT 上调促凋亡蛋白 Bax、下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 诱导 HL-60 细胞凋亡, 为临床联合用药提供了理论参考。

参考文献

- [1] Cao H, Cheng Y, You L, et al. Homoharringtonine and SAHA synergistically enhance apoptosis in human acute myeloid leukemia cells through upregulation of TRAIL and death receptors[J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7(6): 1838-1844.
- [2] Zhang S, Zhang Y, Zhuang Y, et al. Matrine induces apoptosis in human acute myeloid leukemia cells via the mitochondrial pathway and Akt inactivation[J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e46853.
- [3] Cotter TG. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(7): 501-507.
- [4] Shtilbans V, Wu M, Burstein DE. Evaluation of apoptosis in cytologic specimens [J]. *Diagn Cytopathol*, 2010, 38(9): 685-697.
- [5] Guo B, Zhai D, Cabezas E, et al. Humanin peptide suppresses apoptosis by interfering with Bax activation [J]. *Nature*, 2003, 423(6938): 456-461.
- [6] Lalier L, Cartron PF, Juin P, et al. Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis [J]. *Apoptosis*, 2007, 12(5): 887-896.
- [7] Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis [J]. *Oncogene*, 2003, 22(53): 8590-8607.
- [8] Huang S, Okumura K, Sinicrope FA. BH3 mimetic obatoclax enhances TRAIL-mediated apoptosis in human pancreatic cancer cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(1): 150-159.
- [9] Ristorcelli E, Beraud E, Verrando P, et al. Human tumor nanoparticles induce apoptosis of pancreatic cancer cells [J]. *FASEB J*, 2008, 22(9): 3358-3369.
- [10] Jin J, Wang JX, Chen FF, et al. Homoharringtonine-based induction regimens for patients with de-novo acute myeloid leukemia: a multicentre, open-label, randomised, controlled phase 3 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2013, 14(7): 599-608.
- [11] Yu W, Mao L, Qian J, et al. Homoharringtonine in combination with cytarabine and aclarubicin in the treatment of refractory/relapsed acute myeloid leukemia: a single-center experience [J]. *Ann Hematol*, 2013, 92(8): 1091-1100.
- [12] Huang BT, Zeng QC, Yu J, et al. High-dose homoharringtonine versus standard-dose daunorubicin is effective and safe as induction and post-induction chemotherapy for elderly patients with acute myeloid leukemia: a multicenter experience from China [J]. *Med Oncol*, 2012, 29(1): 251-259.
- [13] Chen R, Guo L, Chen Y, et al. Homoharringtonine reduced Mcl-1 expression and induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemia [J]. *Blood*, 2011, 117(1): 156-164.
- [14] Lou YJ, Qian WB, Jin J. Homoharringtonine induces apoptosis and growth arrest in human myeloma cells [J]. *Leuk Lymphoma*, 2007, 48(7): 1400-1406.
- [15] Sun M, Cao H, Sun L, et al. Antitumor activities of kushen: literature review [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 2012: 373219.
- [16] Yu Q, Chen B, Zhang X, et al. Arsenic trioxide-enhanced, matrine-induced apoptosis in multiple myeloma cell lines [J]. *Planta Med*, 2013, 79(9): 775-781.
- [17] Yan F, Liu Y, Wang W. Matrine inhibited the growth of rat osteosarcoma UMR-108 cells by inducing apoptosis in a mitochondrial-caspase-dependent pathway [J]. *Tumour Biol*, 2013, 34(4): 2135-2140.
- [18] Zhang P, Wang Z, Chong T, et al. Matrine inhibits proliferation and induces apoptosis of the androgen-independent prostate cancer cell line PC-3 [J]. *Mol Med Rep*, 2012, 5(3): 783-787.
- [19] Zhang Z, Wang X, Wu W, et al. Effects of matrine on proliferation and apoptosis in gallbladder carcinoma cells (GBC-SD) [J]. *Phytother Res*, 2012, 26(6): 932-937.
- [20] Liang CZ, Zhang JK, Shi Z, et al. Matrine induces caspase-dependent apoptosis in human osteosarcoma cells in vitro and in vivo through the upregulation of Bax and Fas/FasL and downregulation of Bcl-2 [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2012, 69(2): 317-331.

(收稿日期: 2014-10-23)

(本文编辑: 王叶青)