

鸦胆子油乳诱导白血病 U937 细胞凋亡的实验研究

李英 徐功立 李颖 张楠

鸦胆子油乳是临床上广泛应用的抗肿瘤中药,为探讨其在白血病中的作用,我们观察了鸦胆子油乳对人白血病 U937 细胞的生长抑制和诱导细胞凋亡作用及相关基因的改变。

材料和方法

1 试剂 鸦胆子油乳,沈阳药科大学制药厂产品,每支 10 ml,含量为 10%。

2 细胞培养 U937 细胞为人单核细胞白血病细胞株,引自中国医学科学院血液学研究所,常规传代培养。实验时均用对数生长期细胞。

3 MTT 法检测鸦胆子油乳对 U937 细胞增殖的影响 实验方法根据文献[1]略加改进,设药物处理组、细胞对照组和空白对照组。每组设 3 个复孔,在终止培养前 4 h 加入 MTT (5 mg/ml),置酶联免疫检测仪下以 570 nm 为检测波长、630 nm 为参考波长检测吸光度(A)值。

$$\text{细胞生长抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{A_{\text{实验组}}}{A_{\text{对照组}}}\right) \times 100\%$$

4 细胞形态观察

4.1 光学显微镜观察:500 $\mu\text{g/ml}$ 鸦胆子油乳作用 24, 48, 72 h, 同时设细胞对照组和空白对照组, Wright-Giemsa 染色, 光镜下观察。

4.2 透射电镜观察:收集药物作用 48 h 细胞, 3% 戊二醛固定, 用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 洗 3 次, 用 1% 锇酸固定 1 h, 梯度乙醇脱水, 丙酮浸透, 包埋, 切片, 醋酸双氧铀-柠檬酸双重染色, 1200ES 型透射电镜观察并照相。

5 DNA 凝胶电泳 取 500 $\mu\text{g/ml}$ 鸦胆子油乳作用 48, 72 h 的 U937 细胞, 设阴性对照。参照文献[2]方法提取细胞 DNA, 用 20 g/L 琼脂糖凝胶进行电泳, 紫外灯下观察并照相, 凝胶成像系统成像。

6 流式细胞术检测

6.1 细胞凋亡率和细胞周期变化: 分别收集不同浓度药物作用不同时间的各组细胞 (大于 10^6), 用 70% 乙醇固定, 离心, PBS 洗涤, 加碘化丙锭 (PI) 染色液 (10 $\mu\text{g/ml}$) 0.5 ml, 应用流式细胞仪分析不同 DNA 含量的细胞分布, 在 Macintosh650 计算机上用 ModifitLT 软件 (美国 BD 公司提供) 分析数据。

6.2 bcl-2 及 c-myc 蛋白表达变化: 收集药物作用 48 h 各组细胞 (大于 10^6), 离心, 70% 乙醇固定, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。加 PBS 调整至 100 μl , 再加相应的一抗 bcl-2, c-myc 和阴性对照鼠抗人

IgG₁ 10 μl , 室温反应 20 min 后, 加入 FITC 标记的羊抗鼠二抗 10 μl , 上流式细胞仪检测, 在 Macintosh650 计算机上用 CellQuest Plot 软件分析数据, 计算细胞阳性率。

7 RT-PCR 检测 bcl-2、c-myc mRNA 水平变化

7.1 总 RNA 提取: 取对数生长期的 U937 细胞, 以 500 $\mu\text{g/ml}$ 鸦胆子油乳处理 24, 48, 72 h, 设阴性对照。收集细胞 (大于 10^6), 按 RNA 提取试剂盒说明提取总 RNA。

7.2 总 RNA 定量: 取上述 RNA 样品各 10 μl , 用 DEPC 水稀释 300 倍, U-2000 型紫外分光光度仪测定含量。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成、纯化。扩增产物大小: β -actin 300 bp, c-myc 500 bp, bcl-2 170 bp。具体序列为:

β -actin: 正义链: 5'-ATCATGTTTGAGACCTTCAACA-3';
反义链: 5'-CATCTCTTGCTCGAAGTCC-3'。

bcl-2: 正义链: 5'-GGATCCAGGATAACGGAGGCTGG-3';
反义链: 5'-GGCATGTTGACTTCACTTG-3'。

c-myc: 正义链: 5'-CAAAGCTCGTCTCAGAGAAG-3';
反义链: 5'-AGTTGTGCTGATGTGTGGAG-3'。

7.3 逆转录反应: 取总 RNA 1 μg , M-MLV 1 μl , 逆转录反应体系 4 μl , dNTP 1 μl , DTT 2 μl , 反义链引物 1 μl , DEPC 水补至 20 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h, 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 快速离心使蒸汽沉于管底。

7.4 PCR: 在上述 20 μl 逆转录产物中继续加入 PCR 体系 18 μl , dNTP 1 μl , 正义链引物 1 μl , DEPC 水 58 μl , 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 58 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 循环 35 次, 末次延长 7 min, 结束反应。

7.5 电泳定量分析: 用凝胶成像分析系统测出阳性细胞因子和 β -actin 的表达强度, 其比值即为目的基因表达量。

8 统计学分析 卡方检验。

结 果

1 鸦胆子油乳对 U937 细胞增殖的影响 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 $\mu\text{g/ml}$ 的鸦胆子油乳与 U937 细胞作用 48 h 后, 细胞抑制率分别是 98.2%、83.4%、54.3%、23.2%、11.9%、4.7%。500 $\mu\text{g/ml}$ 鸦胆子油乳与 U937 细胞作用 24, 48, 72 h 后, 细胞抑制率分别为 56.8%、84.7%、98.5%。通过统计学处理得出鸦胆子油乳对 U937 细胞作用 48 h 的 IC_{50} 值为 214 $\mu\text{g/ml}$ 。

2 鸦胆子油乳作用后 U937 细胞的形态学变化

2.1 光学显微镜: 500 $\mu\text{g/ml}$ 的鸦胆子油乳处理 U937 细胞 48 h 后, 细胞体积变小, 染色质浓缩, 靠近核膜, 核碎片形成, 出现凋亡小体。

2.2 透射电镜:500 μg/ml 鸦胆子油乳处理 72 h 的 U937 细胞体积缩小,核染色质固缩,聚集于核膜,胞浆内空泡增多,细胞膜表面微绒毛和伪足减少,细胞器结构完整,可见凋亡小体。

3 鸦胆子油乳作用后 U937 细胞 DNA 片段化电泳 500 μg/ml 鸦胆子油乳处理 72 h 的 U937 细胞 DNA 凝胶电泳出现 DNA 梯状图谱,阴性对照及 500 μg/ml 鸦胆子油乳处理 48 h 的 U937 细胞未见明显的 DNA 梯状图谱。

4 细胞凋亡率及细胞周期变化 表 1 示不同浓度鸦胆子油乳处理不同时间后 U937 细胞的凋亡率。各处理组与对照组比较,差异均有显著性($P < 0.01$),且随着药物浓度的增高,凋亡率有增高趋势。500 μg/ml 鸦胆子油乳作用 U937 细胞后, G_0/G_1 期细胞增多, $S+G_2/M$ 期细胞减少,与对照组相比,差异有显著性($P < 0.01$)(表 2)。

表 1 不同浓度鸦胆子油乳作用不同时间后 U937 细胞的凋亡率(%)

组别	细胞凋亡率		
	24 h	48 h	72 h
对照组	1.40	0.98	1.69
药物作用组			
500 μg/ml	9.35*	10.56*	19.27*
250 μg/ml	3.97*	4.75*	7.77*
125 μg/ml	2.03*	2.39*	2.97*

注:与对照组相比,* $P < 0.01$

5 鸦胆子油乳作用后 U937 细胞 bcl-2 及 c-myc 蛋白表达水平的变化 500 μg/ml 鸦胆子油乳作用 U937 细胞 48 h 后,bcl-2 蛋白的表达由 97.65% 下调为 73.02%,c-myc 蛋白表达由 72.64% 下调为 26.90% (P 值均 < 0.01)。

6 鸦胆子油乳作用后 U937 细胞 bcl-2、c-myc mRNA 表达水平的变化 与阴性对照相比,500 μg/ml 鸦胆子油乳作用 U937 细胞 24,48,72 h 后,bcl-2、c-myc mRNA 表达量均下降。且随作用时间延长,表达量有下降趋势(表 3)。

讨 论

鸦胆子是苦木科植物 *Brucea javanica* (L) Merr 的成熟果实,鸦胆子油乳是以鸦胆子为原料,精制大豆磷脂为乳化剂制成的油水型乳剂,自从 70 年代 Kupchan 从鸦胆子中提取出 9 种具有抑癌活性的苦木内脂类单体后,引起国内外学者的重视。体内外实验研究表明,鸦胆子可抑制实体瘤和白

血病细胞的增殖^[3,4]。本实验结果显示,鸦胆子油乳对白血病 U937 细胞增殖有明显的抑制作用,并呈剂量和时间依赖性。

表 3 U937 细胞 bcl-2、c-myc mRNA 在鸦胆子油乳作用不同时间后的相对表达量的变化

基因	相对表达量			
	0 h	24 h	48 h	72 h
bcl-2	0.6995	0.6887	0.6246	0.4485
c-myc	0.9823	0.7017	0.6291	0

细胞凋亡与白血病的发生与治疗密切相关。在本实验中,鸦胆子油乳作用于 U937 细胞后,我们通过光镜、电镜均观察到典型的凋亡细胞形态改变,DNA 电泳呈现特征性“梯状 DNA”条带。125~500 μg/ml 的鸦胆子油乳均可诱导 U937 细胞凋亡,随作用时间延长及浓度加大,凋亡率增加,说明鸦胆子油乳体外能诱导 U937 细胞凋亡,其对肿瘤细胞的抑制作用可能是通过诱导细胞凋亡而发挥作用。进一步细胞周期分析显示,鸦胆子油乳作用组 G_0/G_1 期细胞增多, S 期细胞减少,提示鸦胆子油乳阻止 U937 细胞 G_0/G_1 期细胞向 S 期进展,阻断白血病细胞增殖,与国外最新研究结果^[4]相一致。

我们检测了鸦胆子油乳作用前后 U937 细胞 bcl-2、c-myc mRNA 及蛋白水平的变化,结果鸦胆子油乳作用后 bcl-2、c-myc mRNA 相对表达量降低,并随时间延长而下降;bcl-2、c-myc 阳性细胞率较对照组明显降低,提示鸦胆子油乳可能通过下调 bcl-2、c-myc 基因表达水平而发挥促凋亡作用。

参 考 文 献

- 1 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 1983, 65: 55-63.
- 2 Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z. A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. *Anal Biochem*, 1994, 218: 314-319.
- 3 Ohno N, Fukamiya N, Okano M, et al. Synthesis of cytotoxic fluorinated quassinoids. *Bioorg Med Chem*, 1997, 5: 1489-1495.
- 4 Mata-Greenwood E, Cuendet M, Sher D, et al. Brusatol-mediated induction of leukemic cell differentiation and $G(1)$ arrest is associated with down-regulation of c-myc. *Leukemia*, 2002, 16: 2275-2284.

表 2 500 μg/ml 鸦胆子油乳对 U937 细胞细胞周期的影响(%)

组别	24 h			48 h			72 h		
	G_0/G_1 期	S 期	G_2/M 期	G_0/G_1 期	S 期	G_2/M 期	G_0/G_1 期	S 期	G_2/M 期
对照组	48.20	38.70	13.10	43.85	56.15	0	43.57	45.30	11.13
药物组	63.89*	27.88	8.23	60.70*	39.30	0	56.02*	43.33	0.65

注:与对照组相比,* $P < 0.05$