文章编号:1000-5404(2009)02-0105-04

论著

熊果酸诱导人急性白血病细胞凋亡及其作用机制

王晓芹,曹 波,高 宁 (第三军医大学药学院生药学教研室,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨熊果酸诱导人急性白血病细胞凋亡的作用机制。**方法** 将 0、5、10、15、20 μmol/L 的熊果酸作用于 U937 细胞 6、12 h,观察量效关系。用 20 μmol/L 熊果酸作用 U937 细胞 1、3、6、9、12、24 h,观察时效关系。采用 Annexin V/PI 染色和流式细胞仪检测细胞凋亡。用 Western blot 法检测细胞凋亡相关蛋白 PARP、Caspase-3、Caspase-9 及 Bcl-2 家族基因 Mcl-1、Bcl-2、Bcl-xL、Bax、Bad 的表达,用 β-actin 做内参照。20 μmol/L 熊果酸作用于不同类型的急性白血病细胞(U937、Jurkat、HL60)12 h,用流式细胞仪检测细胞凋亡,并用 Western blot 方法检测 Caspase-3、Caspase-9、PARP 的表达。**结果** 熊果酸作用于 U937 细胞引起细胞发生凋亡,并呈明显的量效和时效关系。Western blot 结果表明,熊果酸引起凋亡蛋白酶 Caspase-3、Caspase-9 的降解/活化增加,促进凋亡作用底物 PARP 的降解增加。熊果酸还可引起抗凋亡蛋白 Mcl-1 的表达降低,但对 Bcl-2、Bcl-xL、Bax、Bad 的表达均无明显影响。**结论** 熊果酸可诱导多种急性白血病 U937、Jurkat、HL60 细胞发生凋亡。Mcl-1 的下调可能在熊果酸诱导急性白血病细胞凋亡中起着重要的作用,其作用机制可能为熊果酸引起 Mcl-1 的下调,随后引起凋亡相关蛋白 Caspase-3、Caspase-9 的降解/活化及 PARP 的降解,最终促进细胞凋亡发生。

关键词: 熊果酸;白血病;细胞凋亡;Mcl-1
中图法分类号: R285.5;R73-36;R733.7 **文献标识码:** A

Mechanism of ursolic acid-induced apoptosis in human leukemia cells

WANG Xiao-qin, CAO Bo, GAO Ning (Department of Pharmacognosy, College of Pharmacy, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the mechanism of ursolic acid-induced apoptosis in human leukemia cells. Methods U937 cells were exposed to ursolic acid (UA) at various concentrations for 6 h and 12 h, or at 20 μmol/L for different time intervals. Cells were stained with Annexin V/PI, and their apoptosis was determined through flow cytometry. Total protein extracts were prepared and subjected to Western blot assay using antibodies against PARP, C-Caspase-3, C-Caspase-9, Mcl-1, Bcl-2, Bcl-xL, Bax, and Bad. Parallel studies were performed in human leukemia cell lines Jurkat and HL-60. Results Exposure of U937 cells to UA resulted in increase in apoptosis in dose and time-dependent manners. We found that UA-induced lethality was associated with Caspase activation and PARP cleavage, and that UA-induced apoptosis was proceeded by the downregulation of Mcl-1. Jurkat and HL-60 leukemia cells in parallel studies exhibited apoptosis after UA exposure similar to those observed in U937 cells, although HL-60 cells were less sensitive than U937 cells in UA-induced apoptosis, PARP degradation as well as Caspases activation. Conclusion UA induces apoptosis in human leukemia cells through a process that involves Mcl-1 downregulation, followed by Caspase activation and PARP degradation.

Key words: ursolic acid; leukemia; apoptosis; Mcl-1

熊果酸(ursolic acid,UA)又名乌索酸、乌苏酸,为五环三萜类化合物,广泛分布于白花蛇舌草、女贞子、乌梅、夏枯草等天然植物中。熊果酸具有广泛的生物学效应,其主要的药理功能是抗肿瘤。熊果酸的抗肿瘤作用是多方面的,主要通过诱导细胞凋亡、抑制肿瘤细胞增殖、抑制肿瘤组织血管生成、抗促癌和抗突变及抗氧化等作用来达到抗肿瘤的目的。据研究报道,熊果酸可引起多种肿瘤细胞如肺癌[1]、乳腺癌[2]、肝癌[3]、前列腺癌[4]等发生凋亡。熊果酸也可以诱导人白血病细胞发生凋亡[5],但其诱导白血病细胞凋亡的作用机制还不十分清楚。本研究对熊果酸诱导多种人急性白血病细胞(U937、Jurkat 和 HL60)凋亡进行了研究,并探索其诱导细胞凋亡的作用机制。

作者简介:王晓芹,女,山东省安丘市人,博士,讲师,主要从事抗肿瘤药物方面的研究。电话:(023) 68753736,E-mail: wxqwsh@163.com
通信作者:高 宁,电话:(023) 68753736
收稿日期:2008-10-16;修回日期:2008-11-01

1 材料与方法

1.1 主要试剂和材料

人急性髓系白血病 U937 细胞、人急性 T 淋巴细胞白血病 Jurkat 细胞、人急性早幼粒白血病 HL-60 细胞均购自美国典型培养物保存中心(American Type Culture Collection,ATCC)。熊果酸、RPMI1640、Annexin V、碘化丙啶(propidium iodide,PI)荧光染料及二甲基亚砜(DMSO)均购自美国 Sigma 公司,β-actin 抗体购于美国 Santa Cruz 公司,抗体 Cleaved-Caspase-3(C-Caspase-3)、Cleaved-Caspase-9(C-Caspase-9)、Bcl-xL 购于美国 Cell Signaling 公司,Mcl-1、Bax 抗体购自美国 PharMingen 公司,PARP 抗体购自 Biomol 公司,Bcl-2 抗体购自美国 DAKO 公司,羊抗兔 IgG 或羊抗鼠 IgG 购自北京中山公司。

1.2 主要仪器设备

ELITE-ESP 型流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司),荧光倒置光学显微镜(日本 Olympus 公司),NuPAGE Bis-Tris 电泳系统(美国 Invitrogen 公司)、半干转印仪及 Gel-Doc 2000 型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。YJ2875 型超净工作台(苏州安泰空气技术公司),TGL216G 型台式离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.3 实验分组

细胞培养方法:U937、Jurkat、HL60 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基在 37 ℃、5% CO_2 的培养箱中培养。量效关系研究实验分为对照组和不同剂量的熊果酸处理组。正常对照组不加药物,只加入 DMSO[终浓度不超过 0.1%(体积分数)]。实验组加入不同剂量的熊果酸(将熊果酸溶解于 DMSO),终浓度分别为 5、10、15、20 μmol/L,作用时间为 6 h 和 12 h,每浓度组重复 4 次实验。时效关系研究实验分为对照组和 20 μmol/L 的熊果酸处理后不同时间组。作用时间分别为 1、3、6、9、12 h 和 24 h。熊果酸诱导多种白血病细胞凋亡的研究实验分为对照组和熊果酸处理组,熊果酸的浓度为 20 μmol/L,作用时间为 12 h。

1.4 Annexin V/PI 双染色法和流式细胞仪检测细胞凋亡

人急性白血病细胞经熊果酸处理,细胞收集后经离心、PBS 缓冲液洗涤 3 次,悬浮于 100 μl 结合缓冲液(10 mmol/L HEPES,pH 7.4,140 mmol/L NaOH,2.5 mmol/L $CaCl_2$),加入 AnnexinV-FTTC 5 μl,PI 10 μl(终浓度为 5 μg/μl),振荡混匀,室温避光染色 15 min,再加入 100 μl 结合缓冲液,用 Becton Dickinson 流式细胞仪检测细胞凋亡。正常活细胞 Annexin V 及 PI 均低染(Annexin V^- PI^-),分布在流式细胞分析图的左下区(LL);早期凋亡细胞 Annexin V 高染而 PI 低染(Annexin V^+ PI^-),分布在图的右下区(RL);晚期凋亡细胞 Annexin V 及 PI 均高染(Annexin V^+ PI^+),分布在图的右上区(RU)。早期凋亡细胞百分数(RL)和晚期凋亡细胞百分数(RU)之和为细胞总凋亡率(%)。

1.5 Western blot 法检测 C-Caspase-3、C-Caspase-9、PARP、Mcl-1、Bcl-2、Bcl-xL、Bax、Bad 蛋白的表达

采用美国 Invitrogen 公司 NuPAGE Bis-Tris 电泳系统进行 Western blot 分析。细胞收集后经离心、PBS 缓冲液洗涤,用1 × NuPAGE LDS 细胞裂解液(含 50 mmol/L 二硫苏糖醇,DTT)裂解细胞后,采用考马斯亮蓝法(Coomassie Assay)测定总细胞提取液中的蛋白浓度。取 30 μg 经 SDS-PAGE 电泳分离,然后转移至醋酸纤维素膜上,5% 无脂牛奶封闭 2 h,加一抗在 4 ℃过夜孵育,TBS 缓冲液洗涤 3 次,二抗室温孵育 2 h,化学发光法检测蛋白表达。

1.6 统计学处理

细胞凋亡结果数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 12.0 统计软件行 Student's t 检验。

2 结果

2.1 熊果酸诱导人急性白血病 U937 细胞凋亡的量效和时效关系

U937 细胞经不同浓度的熊果酸作用 6 h 和 12 h,用 Annexin V/PI 染色和流式细胞仪检测熊果酸诱导的细胞凋亡。图 1 显示,熊果酸在低浓度(10 μmol/L)时可引起少量的细胞发生凋亡。随着浓度的增加,熊果酸诱导的细胞凋亡率也在不断增加,呈明显的量效关系。时效研究结果表明(图 2),20 μmol/L 的熊果酸作用 U937 细胞 3 h 后,可引起少量细胞(约 10%)发生凋亡,6 h 可诱导约 30% 的细胞发生凋亡,12 h 则诱导约 50% 的细胞发生凋亡,24 h 则达到最大作用,即诱导约 89% 的细胞发生凋亡。

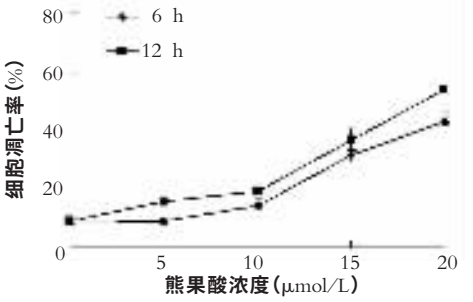


图 1 熊果酸诱导人急性白血病 U937 细胞凋亡的量效关系图

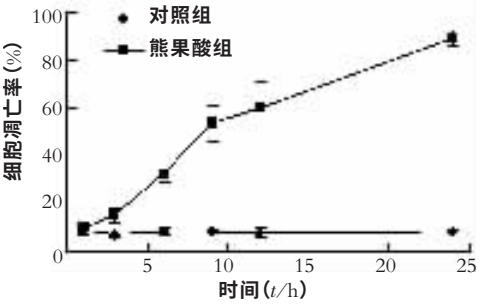
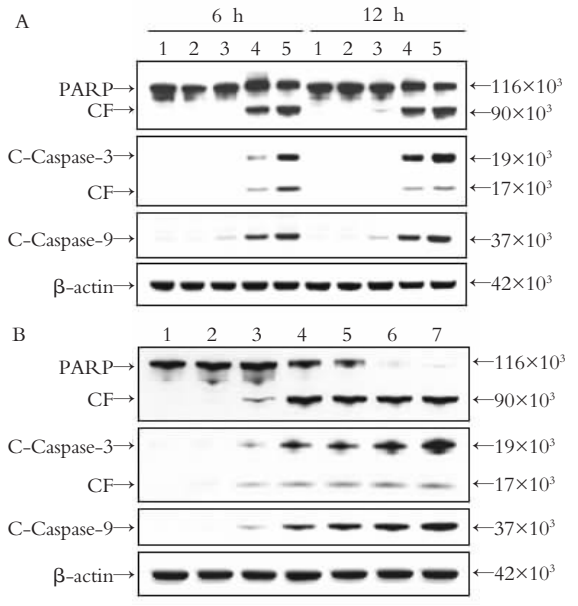


图 2 熊果酸诱导人急性白血病 U937 细胞凋亡的时效关系图

2.2 熊果酸对 U937 细胞 Caspase-3 和 Caspase-9 的降解/活化及 PARP 降解的影响

不同剂量的熊果酸(0、5、10、15、20 μmol/L)作用 6 h 和 12 h,凋亡作用底物 PARP 表达逐渐减少,裂解片段(cleaved fragment,CF)逐渐增多,C-Caspase-3 和 C-Caspase-9 的表达也逐渐增加(图 3A),提示熊果酸诱导 PARP 的降解增加,并引起

Caspase-3 和 Caspase-9 降解/活化增加,呈明显的量效关系。时效关系研究结果表明,熊果酸在浓度为 20 μmol/L 作用 U937 细胞,3 h 就开始引起 PARP 的降解,并引起 Caspase-3 和 Caspase-9 降解/活化(图 3B)。随着作用时间的增加,熊果酸引起的 PARP 降解和 Caspase-3 和 Caspase-9 降解/活化也逐渐增加,呈明显的时效关系。



A:不同浓度的熊果酸作用 U937 细胞 6、12 h　1: 0 μmol/L; 2: 5 μmol/L; 3:10 μmol/L; 4: 15 μmol/L; 5: 20 μmol/L

B: 20 μmol/L 熊果酸作用 U937 细胞不同时间　1: 0 h; 2: 1 h; 3: 3 h; 4: 6 h; 5: 9 h; 6: 12 h; 7: 24 h

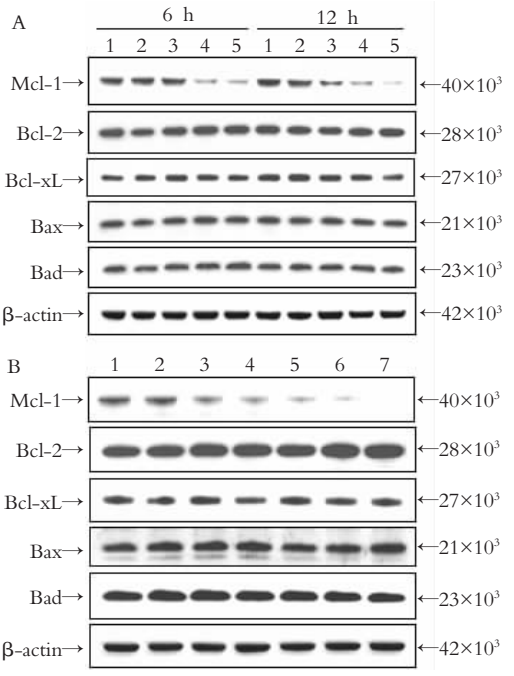
图 3　Western blot 检测熊果酸对 PARP 降解和 Caspase-3、Caspase-9 降解/活化的影响

2.3　熊果酸对 Mcl-1 表达的影响

Western blot 结果表明,熊果酸在 15、20 μmol/L 作用 U937 细胞 6 h,引起抗凋亡基因 Mcl-1 表达明显降低。而熊果酸在浓度 5 μmol/L 作用 U937 细胞 12 h,就可引起 Mcl-1 表达轻微降低。随着熊果酸浓度的增加,细胞中 Mcl-1 的表达逐渐降低,呈明显的量效关系(图 4A)。时效关系研究的结果表明,20 μmol/L 的熊果酸作用 U937 细胞 3 h 就引起 Mcl-1 的表达降低,随着作用时间的增加,细胞中 Mcl-1 的表达逐渐降低,呈明显的时效关系(图 4B)。20 μmol/L 的熊果酸作用 U937 细胞 24 h 可完全抑制 Mcl-1 的表达。但其他 Bcl-2 家族基因如 Bcl-2、Bcl-xL、Bax、Bad 等的表达均无明显变化。上述研究结果表明,Mcl-1 的下调可能在熊果酸诱导 U937 细胞凋亡中起着非常重要的作用。

2.4　熊果酸对人急性白血病 U937、Jurkat、HL60 细胞凋亡的影响

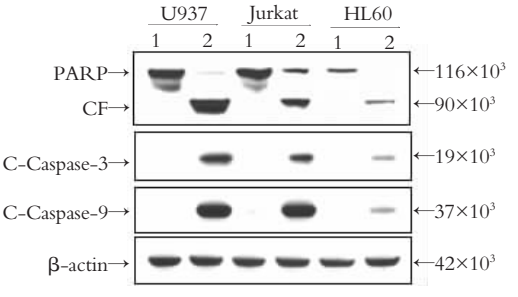
结果表明,20 μmol/L 的熊果酸作用于 U937、Jurkat、HL60 细胞 12 h,引起细胞发生不同程度的细胞凋亡[与对照组相比,U937(54.04 ± 7.31)% *vs* (7.57 ± 1.61)%, Jurkat(62.89 ± 1.71)% *vs* (8.53 ± 1.18)%, HL60(20.46 ± 3.07)% *vs* (9.72 ± 0.95)%, $P<0.01$]。说明细胞对熊果酸的敏感性依次为 Jurkat > U937 > HL60。Western blot 结果表明,熊果酸在 20 μmol/L 浓度时作用于 U937、Jurkat、HL60 细胞12 h,虽然熊果酸对不同细胞的作用程度不同,但均引起凋亡作用底物 PARP 的降解及 Caspase-3 和 Caspase-9 的降解/活化(图 5)。



A:不同浓度的熊果酸作用 U937 细胞 6 h 和 12 h　1: 0 μmol/L; 2: 5 μmol/L; 3: 10 μmol/L; 4: 15 μmol/L; 5: 20 μmol/L

B: 20 μmol/L 熊果酸作用 U937 细胞不同时间　1: 0 h; 2: 1 h; 3: 3 h; 4: 6 h; 5: 9 h; 6: 12 h; 7: 24 h

图 4　熊果酸对 Bcl-2 家族基因表达的影响



1: 对照组; 2:熊果酸组

图 5　Western blot 检测 20 μmol/L 熊果酸诱导 U937、Jurkat、HL60 细胞凋亡

3　讨论

熊果酸为五环三萜类化合物,存在于许多药用植物中。近年来,国内外陆续报道了熊果酸对肺癌、肝癌、淋巴瘤、乳腺癌、人结肠癌等多种肿瘤细胞都具有抑制作用和细胞毒作用。例如熊果酸对肺癌 A-549、乳腺癌 MCF-7、结肠癌 HT-29 等细胞均具有细胞毒作用[1,2,6],被认为是比较强的诱导肿瘤细胞凋亡的药

物。因此,熊果酸的抗肿瘤作用引起了人们的重视。有研究报道熊果酸可诱导白血病细胞发生凋亡,这些研究说明熊果酸具有一定的抗白血病作用[5],但其作用机制仍不十分清楚。

细胞凋亡是受一系列基因控制的细胞自主性死亡过程。细胞凋亡从内外多因子复杂的相互作用诱导产生凋亡信号,传递至 Caspase 并使其降解/活化开始,使凋亡作用底物如 PARP 裂解、细胞解体为结局,从而使细胞凋亡得以完成。本研究结果显示,熊果酸作用于不同类型的急性白血病细胞,引起 Caspase-3、Caspase-9 的降解/活化的增加,并引起凋亡作用底物 PARP 的降解增加,导致细胞凋亡的发生,提示熊果酸可能是通过线粒体依赖性途径而导致急性白血病细胞发生凋亡。

细胞凋亡涉及一系列基因的激活、表达以及调控等作用。Bcl-2 家族基因是一类重要的调控细胞凋亡的基因,包括抗凋亡蛋白如 Bcl-2、Bcl-xL、Mcl-1 等和促凋亡蛋白如 Bax、Bad、Bim、Bid 等。当细胞接收到凋亡刺激信号时,凋亡诱发因子与 Bcl-2、Bcl-xL、Mcl-1 等抗凋亡蛋白结合而抑制抗凋亡蛋白的表达,从而减弱其抑制凋亡作用[7];某些凋亡诱发因子与 Bax、Bad 等促凋亡蛋白结合,使原来位于细胞质或松散定位于线粒体膜上的促凋亡蛋白插入线粒体膜,诱导线粒体蛋白的释放,促进凋亡[8]。本研究结果表明,熊果酸作用于人急性白血病细胞,引起抗凋亡蛋白 Mcl-1 表达的降低并呈明显的量效和时效关系,但其他 Bcl-2 家族基因如 Bcl-2、Bcl-xL、Bax、Bad 等的表达均未受到熊果酸的作用而改变。提示熊果酸引起的 Mcl-1 表达的抑制可能在其诱导细胞凋亡中起着重要的作用。

Mcl-1 是 Bcl-2 家族基因中抗细胞凋亡成分之一。Mcl-1 是一种具有半衰期短和高度调控的蛋白,它在多种肿瘤细胞中表达,在肿瘤细胞存活过程中起着非常重要的作用[9]。多种细胞因子和生长因子均可强烈地诱导细胞中 Mcl-1 的表达,Mcl-1 的下调导致细胞发生凋亡。Mcl-1 蛋白水平通过多种不同的机制的调控,包括转录、翻译及翻译后水平的调控。有研究报道 CDK2 抑制剂 SU9516 主要是通过抑制 Mcl-1 mRNA 的转录而导致细胞发生凋亡[10]。Rahmani 等[11]在研究激酶抑制剂 BAY43-9006 诱导白血病细胞凋亡的分子机制中发现,BAY43-9006 主要是通过抑制 Mcl-1 蛋白的合成而导致细胞发生凋亡。Zhong 等[12]发现,泛激素/蛋白酶体途径可以引起 Mcl-1 泛素化及蛋白降解,从而调控细胞凋亡。由于 Mcl-1 的迅速诱导和降解,表明 Mcl-1 在调控细胞存活和细胞凋亡过程中起着非常重要的作用。但熊果酸是通过哪一种机制引起 Mcl-1 蛋白表达的下调,Mcl-1 是否在熊果酸诱导急性白血病细胞凋亡中起作用,需要通过进一步的研究加以证实。

综上所述,本研究结果表明熊果酸可诱导多种急性白血病 U937、Jurkat、HL60 细胞发生凋亡。Mcl-1 的下调可能在熊果酸诱导急性白血病细胞凋亡中起着重要的作用,其作用机制可能为熊果酸引起 Mcl-1 的下调,随后引起凋亡相关蛋白 Caspase-3、Caspase-9 的降解/活化及 PARP 的降解,最终促进细胞凋亡发生。

参考文献:

[1] Lai M Y, Leung H W, Yang W H, *et al*. Up-regulation of matrix metalloproteinase family gene involvement in ursolic acid-induced human lung non-small carcinoma cell apoptosis[J]. Anticancer Res, 2007, 27(1A): 145 - 153.

[2] 张贵平, 黎银燕, 吕嘉春, 等. 熊果酸对乳腺癌细胞 Caspase-3 和 PARP 表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(2): 141 - 144.

[3] Satomi Y, Nishino H, Shibata S. Glycyrrhetinic acid and related compounds induce G1 arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2[J]. Anticancer Res, 2005, 25(6B): 4043 - 4047.

[4] Kassi E, Papoutsi Z, Pratsinis H, *et al*. Ursolic acid, a naturally occurring triterpenoid, demonstrates anticancer activity on human prostate cancer cells[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2007, 133(7): 493 - 500.

[5] Liu X S, Jiang J. Induction of apoptosis and regulation of the MAPK pathway by ursolic acid in human leukemia K562 cells[J]. Planta Med, 2007, 73(11): 1192 - 1194.

[6] Andersson D, Liu J J, Nilsson A, *et al*. Ursolic acid inhibits proliferation and stimulates apoptosis in HT29 cells following activation of alkaline sphingomyelinase[J]. Anticancer Res, 2003, 23(4): 3317 - 3322.

[7] Youle R J, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008, 9(1): 47 - 59.

[8] Shmueli A, Oren M. Life, death, and ubiquitin: Taming the mule[J]. Cell, 2005, 121(7): 963 - 965.

[9] Craig R W. MCL1 provides a window on the role of the BCL2 family in cell proliferation, differentiation and tumorigenesis[J]. Leukemia, 2002, 16(4): 444 - 454.

[10] Gao N, Kramer L, Rahmani M, *et al*. The three-substituted indolinone cyclin-dependent kinase 2 inhibitor 3-[1-(3H-imidazol-4-yl)-meth-(Z)-ylidene]-5-methoxy-1, 3-dihydro-indol-2-one (SU9516) kills human leukemia cells *via* down-regulation of Mcl-1 through a transcriptional mechanism[J]. Mol Pharmacol, 2006, 70(2): 645 - 655.

[11] Rahmani M, Davis E M, Bauer C, *et al*. Apoptosis induced by the kinase inhibitor BAY 43-9006 in human leukemia cells involves down-regulation of Mcl-1 through inhibition of translation[J]. J Biol Chem, 2006, 280(42): 35217 - 35227.

[12] Zhong Q, Gao W, Du F, *et al*. Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis[J]. Cell, 2005, 121(7): 1085 - 1095.

(编辑 王 红)