文章编号:1000-5404(2010)06-0593-04

论著

二氟甲基鸟氨酸对T淋巴瘤Jurkat细胞生长的影响

任玉珊,韩 钰,曹春雨,王艳林 (443002 湖北 宜昌,三峡大学医学院分子生物学研究所)

[摘要] **目的** 研究二氟甲基鸟氨酸(difluromethylornithine,DFMO)对人T淋巴瘤Jurkat细胞的影响及其作用机制,为探讨DFMO能否用于治疗人白血病提供实验依据。**方法** DFMO(0~10 mmol/L)处理人T淋巴瘤Jurkat细胞24~72 h后,MTS法检测细胞的存活率,化学分析法检测精胺氧化酶(spermine oxidase, SMO)和乙酰多胺氧化酶(acetylpolyamine oxidase, APAO)活性,DNA片段化分析检测细胞凋亡,荧光染料法检测细胞线粒体膜电位变化,Western blot法检测细胞内Bax含量,分光光度法检测caspase-3酶活性。**结果** DFMO处理细胞能显著抑制Jurkat细胞的生长($P<0.01$),抑制率随药物浓度的增加和作用时间的延长而加大, DFMO浓度为10 mmol/L时,24 h抑制率为33%,48 h抑制率为38%,72 h抑制率为49%。DFMO处理可导致Jurkat细胞DNA片段化,促进Bax由细胞质向线粒体转移,细胞内caspase-3活性增加(增加46%, $P<0.05$),并伴有线粒体膜电位的显著降低,DFMO浓液为2和5 mmol/L时,分别降低29%和53%($P<0.01$)。DFMO还能诱导细胞内SMO活性(增加1.1倍,$P<0.05$)但对APAO的活性无诱导性影响。**结论** DFMO对人T淋巴瘤Jurkat细胞具有生长抑制和诱导凋亡的作用。

[关键词] 二氟甲基鸟氨酸;T淋巴细胞;Jurkat细胞;细胞凋亡;生长抑制物
[中图法分类号] R730.23;R733;R977.4 **[文献标志码]** A

Difluoromethylornithine suppresses growth and improves apoptosis of human leukemia Jurkat cells

Ren Yushan, Han Yu, Cao Chunyu, Wang Yanlin (Institute of Molecular Biology, Medical College of Three Gorges University, Yichang, Hubei Province, 443002, China)

[Abstract] **Objective** To investigate whether difluromethylornithine (DFMO) can be used in the treatment of human leukemia. **Methods** The cell proliferation was detected by MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)] assay after treatment of human lymphocyte Jurkat cells by DFMO (0 to 10 mmol/L) for 24 to 72 h. Enzyme activity of spermine oxidase (SMO) and acetylpolyamine oxidase (PAO) was determined by chemiluminesence assay. DNA fragmentation assay was used to evaluate cell apoptosis. Fluorescent dye assay was performed to determine the changes in mitochondrial membrane potential. Western blotting was used to determine Bax content. Casepase-3 enzyme activity was measured by spectrophotometric method. **Results** DFMO treatment inhibited the proliferation of Jurkat cells significantly in a dosage- and time-dependent manner ($P<0.01$). When DFMO concentration was 10 mmol/L, the inhibitory rate for cell growth was 33% in 24 h, 38% in 48 h and 49% in 72 h respectively. DFMO treatment resulted in DNA fragmentation, promoted translocation of Bax from the cytoplasma to the mitochondria and increased caspase-3 activity by 46% ($P<0.05$) accompanied by a significant reduction in the mitochondrial membrane potential in Jurkat cells, reducing 29% at 2 mmol/L DFMO and 53% at 5 mmol/L DFMO ($P<0.01$). DFMO promoted the activity of SMO by 1.1-fold ($P<0.05$) but no inducible effect on PAO activity in Jurkat cells. **Conclusion** DFMO can inhibit cell growth and induce apoptosis in human leukemia Jurkat cells.

[Key words] difluromethylornithine; T-Lymphocytes; Jurkat cells; apoptosis; growth inhibitors

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30772590) and the Key Project of Science Foundation of Department of Education of Hubei Province (D200713003). Corresponding author: Wang Yanlin, Tel: 86-717-6397398, E-mail: fzswangyl@ctgu.edu.cn

[通信作者] 王艳林,电话:(0717)6397398,E-mail:fzswangyl@ctgu.edu.cn

研究发现,多胺(腐胺,精脒,精胺)代谢失调与多种疾病的发生、发展密切相关,特别是发现高多胺含量为肿瘤细胞快速生长所必需后,多胺代谢途径逐渐成为人们关注的肿瘤治疗的潜在靶点[1-4]。鸟氨酸脱羧酶(ornithine decarboxylase,ODC)是多胺生物合成途径中的限速酶,有效抑制ODC活性有可能通过降低细胞内多胺含量而抑制肿瘤生长[5,6]。二氟甲基鸟氨酸(difluromethylornithine,DFMO)是ODC特异性外源抑制剂,为鸟氨酸的化学结构类似物。临床研究发现,DFMO有治疗胃癌、前列腺癌、神经胶质瘤、黑素瘤、乳腺癌和宫颈癌的潜在应用价值[4,7],但目前尚不清楚DFMO能否用于人白血病治疗。本实验通过细胞增殖分析和细胞凋亡分析等方法,研究了DFMO对人T淋巴瘤Jurkat细胞的影响及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株与试剂

溴化噻唑蓝四氮唑[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-^{2}H-tetrazolium, MTS]细胞增殖分析试剂购于Promega公司,Caspase-3凋亡检测试剂盒为美国Biological公司产品,荧光染料碘化3,3′二己氧基羰花青(3,3′-dihexyloxa-carbocyanine iodide, Dioc6)为Sigma产品,Bax特异性抗体为Santa Cruz Biotech公司产品,RPMI1640为美国Sigma公司产品,小牛血清为Invitrogen公司产品,ECL化学发光检测试剂为GE Healthcare公司产品,T淋巴瘤Jurkat细胞由本实验室保存,DFMO由美国Johns Hopkins大学医学院Robert A. Casero教授惠赠,其他试剂为Sigma公司产品。全波长酶标仪为Thermo公司产品,Sirius荧光仪为德国Berthold公司产品,Gel Logic-200凝胶图像分析仪为日本Kodak公司产品,Infinite F200荧光酶标仪为瑞士TECAN公司产品。

1.2 方法

1.2.1 MTS法检测细胞增殖 将对数生长期的Jurkat细胞以2×10^7/L密度接种于96孔板中,每孔100 μl。37 ℃培养48 h后,向孔内加入含不同浓度(0~10 mmol/L)DFMO的RPMI1640培养基100 μl,对照细胞孔内加不含药物的培养基。培养24~72 h后每孔加MTS 15 μl,37 ℃继续培养4 h,在全波长酶标仪上读取波长为490 nm的吸光度值$D(490)$。细胞存活率=$D(490)_{药物处理细胞}/D(490)_{对照细胞}\times100\%$,细胞抑制率=100%-细胞存活率。

1.2.2 DNA片段化分析检测细胞凋亡 用不同浓度(1~5 mmol/L)DFMO处理Jurkat细胞48 h后,60×*g*离心5 min收集细胞,加细胞裂解液(Tris-HCl 50 mmol/L,pH=8.0, EDTA 20 mmol/L, Triton X-100 0.5%)在4 ℃条件下裂解细胞20 min。10 000×*g*离心10 min去除细胞核后,将上清转到新的离心管中,经等体积酚/氯仿抽提,将上清转移到新的离心管中,无水乙醇沉淀核酸。将DNA沉淀溶于0.1×柠檬酸缓冲液(NaCl 15 mmol/L, sodium citrate 1.5 mmol/L, pH=7.0)后,加入DNase-free RNase,37 ℃消化30 min,加NaCl至终浓度为1 mol/L,等体积酚/氯仿再次抽提,乙醇沉淀。将DNA沉淀溶解于双蒸水中,1.5%琼脂糖凝胶电泳分离,EB染色。

1.2.3 荧光染料法测定线粒体膜电位 Jurkat细胞计数后,按照20 000/孔的密度接种到24孔培养板中,培养24 h后,分别用0、0.5、1、2、5 mmol/L的DFMO处理细胞8 h,每个DFMO浓度设3个复孔。然后在每孔加入20 μl的Dioc6(3.1 μmol/L),置37 ℃培养箱中培养30 min后,60×*g*离心10 min收集细胞,PBS洗涤1次后,再用100 μl PBS重悬细胞并转入到96孔板中,用荧光酶标仪在激发波长为485 nm,发射波长为535 nm条件下检测荧光值,并以此荧光值代表线粒体膜电位的大小。

1.2.4 分光光度法检测caspase-3活性 对数生长期的Jurkat细胞经5 mmol/L DFMO处理24 h,收集细胞并用PBS洗涤2次后,加入冰冷的细胞裂解液并置冰上保温10 min,10 000×*g*离心5 min收集上清,然后按照caspase-3凋亡检测试剂盒说明书进行酶活性测定。以每毫克细胞蛋白产生的吸光度值$D(400)$表示酶活性。

1.2.5 Western blot法检测Bax表达 DFMO 5 mmol/L处理Jurkat细胞24 h,离心收集细胞,加入细胞裂解液(HEPES 10 mmol/L pH=7.2, D-甘露醇210 mmol/L,蔗糖70 mmol/L,琥珀酸钠5 mmol/L, EGTA 0.2 mmol/L,洋地黄皂苷100 mg/L,复合蛋白酶抑制剂1%),室温裂解5 min后,750×*g*离心10 min去除细胞核,将上清转移到新的EP管中,再13 000×*g*离心10 min,收集上清(细胞质),并用细胞裂解液重悬沉淀(线粒体)。以细胞质蛋白每孔15 μg,线粒体蛋白每孔3 μg的上样量加样,经SDS-PAGE凝胶电泳后,电转至PVDF膜。膜用5%脱脂牛奶室温封闭2 h后,先后用鼠抗人Bax单克隆抗体(1∶600)和HRP标记的二抗(1∶3 000)室温孵育,ECL显色,X光片曝光记录结果。以Bax与内参照蛋白βactin积分吸光度的比值作为Bax的表达水平。

1.2.6 化学分析法检测精胺氧化酶(spermine oxidase,SMO)和乙酰多胺氧化酶(acetylpolyamine oxidase,APAO)活性 在12孔培养板中培养的Jurkat细胞经DFMO处理24 h,PBS缓冲液洗涤后,用甘氨酸缓冲液83 mmol/L(pH=8.0)重悬细胞,每孔300 μl,置-80 ℃低温冰箱冷冻48 h后,收集细胞裂解液用于SMO和APAO活性测定。酶活性采用化学发光法分析,以每微克细胞蛋白、每分钟产生的光强度表示酶活性单位,即相对光强度单位(relative light unit, RLU)。

1.3 统计学处理

数据用$\bar{x}\pm s$表示,组间均数比较采用小样本双侧t检验(GraphPad Instat分析软件)。

2 结果

2.1 DFMO抑制Jurkat细胞增殖

MTS分析实验显示,DFMO对Jurkat细胞的生长呈明显抑制作用,抑制率随药物浓度增加和作用时间的延长而加大(表1)。DFMO浓度为10 mmol/L时,24 h抑制率为33%,48 h抑

制率为38%,72 h抑制率为49%。

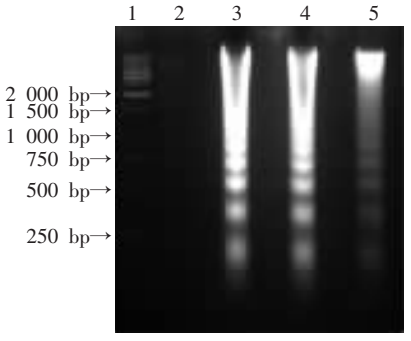
2.2 DFMO诱导Jurkat细胞凋亡

2.2.1 DNA片段化分析 从DFMO处理48 h的细胞和0 mmol/L DFMO处理的细胞中分离DNA片段,经琼脂糖凝胶电泳分析发现,DFMO处理可诱导出凋亡细胞典型的梯度排列的DNA电泳带(图1)。

表1 DFMO对Jurkat细胞存活率的影响 [$n=3$, ($\bar{x}\pm s$)%]

DFMO浓度(mmol/L)	24 h	48 h	72 h
0	100.0±1.2	100.0±1.2	100.0±0.3
0.1	91.9±2.1[a]	89.6±3.8[b]	88.8±4.0[b]
0.5	88.8±3.5[b]	82.4±1.0[b]	78.4±2.2[b]
1.0	84.6±1.6[b]	78.4±1.0[b]	75.4±0.7[b]
2.0	83.8±1.0[b]	76.1±2.2[b]	70.9±2.4[b]
5.0	82.6±2.1[b]	69.7±1.8[b]	65.0±0.2[b]
10.0	66.8±4.4[b]	61.7±1.2[b]	51.9±1.0[b]

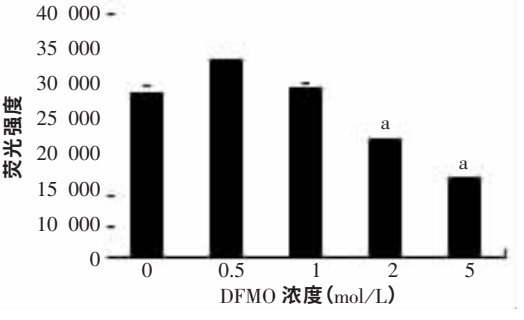
a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, 与0 mmol/L DFMO组比较



1: DNA标准;2: 0 mmol/L DFMO组; 3: 1 mmol/L DFMO组; 4: 2.5 mmol/L DFMO组; 5: 5 mmol/L DFMO组

图1 DFMO处理48 h导致Jurkat细胞DNA片段化

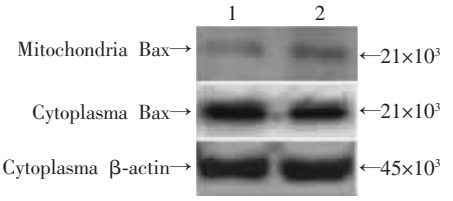
2.2.2 DFMO对Jurkat细胞的线粒体膜电位的影响 图2结果显示,与0 mmol/L DFMO组比较,低浓度DFMO(0.5~1 mmol/L)处理8 h对Jurkat细胞线粒体膜电位无明显影响,但高浓度二氟甲基鸟氨酸(2~5 mmol/L)处理明显降低线粒体膜电位。



a: $P<0.01$, 与0 mmol/L DFMO组比较

图2 DFMO处理8 h对Jurkat细胞线粒体膜电位的影响

2.2.3 DFMO对Caspase-3及Bax蛋白的影响 与0 mmol/L DFMO组细胞caspae-3活性[(3.64±0.18)/mg细胞蛋白]相比,5 mmol/L DFMO处理24 h后,Jurkat细胞内caspae-3活性[(5.32±0.35)/mg细胞蛋白]明显增加($P<0.05$)。与此同时细胞质中Bax含量下降52%,但线粒体内Bax含量增加67%,提示DFMO可促使Bax由细胞质向线粒体转移(图3)。



1: 对照细胞; 2: 5 mmol/L DFMO处理24 h的细胞.

图3 DFMO对Jurkat细胞细胞质和线粒体中Bax表达的影响

2.3 DFMO对SMO和PAO活性的影响

表2结果显示,1 mmol/L DFMO处理Jurkat细胞48 h,即可使SMO的活性显著性增加约1.1倍($P<0.05$),再增加DFMO浓度,酶活性没有进一步增加。与之相反,DFMO对Jurkat细胞内的APAO活性无诱导性影响,在高浓度(5 mmol/L)下,DFMO对APAO活性还有明显的抑制作用($P<0.05$)。

表2 DFMO处理48 h对Jurkat细胞内SMO和APAO活性的影响 ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

DFMO(mmol/L)	SMO活性(RLU/μg·min)	APAO活性(RLU/μg·min)
0	1 010±144	708±104
1	2 119±202[a]	535±55
2.5	2 189±161[a]	676±122
5	1 943±70[a]	411±113[a]

a: $P<0.05$, 与0 mmol/L DFMO组比较

3 讨论

作为细胞内多胺合成途径限速酶ODC的抑制剂,DFMO已被证实能抑制多种肿瘤的细胞的生长,其作用机制尚未完全阐明,可能与耗竭肿瘤细胞快速生长必须的多胺成分、抑制细胞周期和诱导细胞凋亡密切相关。前期临床研究亦发现,DFMO单独使用或和其他药物联合应用对多种肿瘤具有治疗作用[4-7]。

本研究进一步探讨了DFMO对人T淋巴瘤Jurkat细胞的影响,结果显示,DFMO处理可有效抑制Jurkat细胞的增殖,抑制率随药物剂量和作用时间的增加而加大。为进一步分析DFMO抑制Jurkat细胞增殖的分子机制,本研究从DNA片段化,线粒体膜电位的改变和凋亡相关因子的改变等角度,分析了DFMO对Jurkat细胞凋亡的影响。结果显示,DFMO可在Jurkat细胞中诱导出凋亡细胞特征性的DNA片段化现象,同时DFMO还能促进凋亡相关蛋白Bax从细胞质向线粒体

转移,并降低线粒体的膜电位,上述两种改变将引起线粒体内细胞色素C的释放,并由此活化凋亡途径下游的caspase-3等蛋白酶类,最终引起细胞凋亡[8]。我们推测,DFMO诱导Jurkat细胞发生凋亡的能力,可能是其抑制Jurkat生长的基础之一。作为多胺合成途径的抑制剂,DFMO是否对多胺降解代谢有直接或间接的影响,目前研究较少。SMO和APAO是多胺降解代谢必需的酶,它们在氧化底物多胺的过程中,产生的H_2O_2是活性氧的成分之一[9-11],而活性氧本身具有激发细胞凋亡的功能。本研究发现,DFMO在抑制ODC的同时,对SMO活性具有明显上调作用,其机制有待进一步研究。SMO活性的增加在协同消耗肿瘤细胞快速生长需要的多胺的同时,产生的局部高H_2O_2含量亦有助于激发细胞凋亡。上述研究结果提示,ODC抑制剂DFMO对人T淋巴瘤Jurkat细胞具有生长抑制和诱导凋亡的作用,对治疗人白血病具有潜在的应用价值。

参考文献:

[1] Babbar N, Murray-Stewart T, Casero R A Jr. Inflammation and polyamine catabolism: the good, the bad and the ugly[J]. Biochem Soc Trans, 2007, 35(Pt 2): 300-304.

[2] Moinard C, Cynober L, de-Bandt J P. Polyamines: metabolism and implications in human diseases[J]. Clin Nutr, 2005, 24(2): 184-197.

[3] Wang Y, Casero R A Jr. Mammalian polyamine catabolism: a therapeutic target, a pathological problem, or both? [J]. J Biochem (Tokyo), 2006, 139(1): 17-25.

[4] Casero R A Jr, Marton L J. Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases[J]. Nat Rev Drug Discov, 2007, 6(5): 373-390.

[5] Shantz L M, Levin V A. Regulation of ornithine decarboxylase during oncogenic transformation: mechanisms and therapeutic potential[J]. Amino Acids, 2007, 33(2): 213-223.

[6] Wallace H M, Fraser A V, Hughes A. A perspective of polyamine metabolism[J]. Biochem J, 2003, 376(Pt 1): 1-14.

[7] Simoneau A R, Gerner E W, Nagle R, *et al*. The effect of difluoromethylornithine on decreasing prostate size and polyamines in men: results of a year-long phase IIb randomized placebo-controlled chemoprevention trial[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2008, 17(2): 292-299.

[8] Jiang X, Wang X. Cytochrome C-mediated apoptosis[J]. Annu Rev Biochem, 2004, 73: 87-106.

[9] Wang Y, Hacker A, Murray-Stewart T, *et al*. Induction of human spermine oxidase SMO(PAOh1) is regulated at the levels of new mRNA synthesis, mRNA stabilization and newly synthesized protein [J]. Biochem J, 2005, 386(Pt 3): 543-547.

[10] Wang Y, Hacker A, Murray-Stewart T, *et al*. Properties of recombinant human N1-acetylpolyamine oxidase (hPAO): potential role in determining drug sensitivity[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2005, 56(1): 83-90.

[11] Casero R A, Pegg A E. Polyamine catabolism and disease[J]. Biochem J, 2009, 421(3): 323-338.

(**收稿**:2009-08-17;**修回**:2009-10-14)

(编辑 吴培红)

(上接592页)

腹腔引流200 ml液体,术后2 h拔除气管导管,随访1周,生命体征平稳,左手末梢循环好,术后12 d安全出院。

2 讨论

动脉重度痉挛是桡动脉穿刺测压的严重并发症,如发现不及时或处理不正确均会导致肢体远端缺血坏死、截肢(趾)等不良后果。一般情况下,由于尺动脉与桡动脉在手掌所形成掌深弓和掌浅弓存在,即使桡动脉重度痉挛也不会导致肢体远端的缺血坏死[2]。但存在一定诱因时,如栓子的脱落、炎性因子等刺激均会导致整个外周血管痉挛与收缩,如果不及时处理则有可能导致肢体坏死。

桡动脉痉挛呈过程性发展,首先自指端开始,而后向指根部及以上部位发展,但没有超过手腕部。皮肤苍白先从拇指开始,再逐渐累及其他手指及掌侧和掌背侧皮肤。我们认为:①动脉痉挛的原因除机械刺激外与全身感染导致的末梢循环差、组织缺血、缺氧,因循环不稳定而使用一些血管活性药物均是发生小动脉广泛痉挛的重要因素。因此保持手术间适宜的温度,保证微循环有效灌注,及时纠正酸碱平衡和电解质紊乱对预防因动脉穿刺所致的小动脉痉挛尤显重要。②利多卡因能阻滞交感神经的兴奋性,直接降低血管平滑肌的收缩作用,达到改善微循环的目的。一旦发现动脉痉挛,可经动脉测压管内推注少量利多卡因,必要时可重复进行。③罂粟碱或酚妥拉明可作为辅助用药,但应注意其使用剂量及浓度[3]。

参考文献:

[1] 庄心良, 曾因明, 陈伯銮. 现代麻醉学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2003: 1919.

[2] Archbold R A, Robinson N M, Schilling R J. Radial artery access for coronary angiography and percutaneous coronary intervention [J]. BMJ, 2004, 329(7463): 443-446.

[3] Ruiz-Salmeron R J, Mora R, Masotti M, *et al*. Assessment of the efficacy of phentolamine to prevent radial artery spasm during cardiac catheterization procedures: a randomized study comparing phentolamine vs. verapamil [J]. Catheter Cardiovasc Interv, 2005, 66(2): 192-198.

(**收稿**:2009-12-16;**修回**:2009-12-29)

(编辑 张 维)