文章编号:1000-5404(2012)16-1613-04

论著

左旋棉酚通过细胞自噬下调 Namalwa 细胞中 B 淋巴细胞刺激因子的表达

丁 雯[1],倪振洪[2],程攀科[2],王 滨[2],黄 刚[2],何凤田[2],连继勤[2],徐兴然[1] (400716 重庆,西南大学药学院[1];400038 重庆,第三军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室[2])

[摘要] **目的** 探讨左旋棉酚[(-)-gossypol]下调 Namalwa 细胞中 B 淋巴细胞刺激因子(B lymphocyte stimulator, BLyS)的可能机制。**方法** 采用 CCK8、台盼蓝活细胞染色检测左旋棉酚在体外对 Namalwa 细胞的生长抑制作用,吖啶橙(acridine orange, AO)染色观察经左旋棉酚处理后细胞自噬的形态特征,Western blot 检测细胞中 BLyS 和自噬蛋白微管蛋白轻链 3(LC3)的表达情况。**结果** 左旋棉酚对 Namalwa 细胞有明显的增殖抑制作用,并且具有时间和剂量依赖性;AO 染色后细胞内可观察到明显的细胞自噬小体;Western blot 结果显示,左旋棉酚可下调 Namalwa 细胞中 BLyS 的表达,并上调 LC3 Ⅱ 蛋白的表达;自噬特异性抑制剂 3-methyladenine(3-MA)可显著抑制左旋棉酚对 BLyS 的下调与 LC3 Ⅱ 的上调作用。**结论** 左旋棉酚可能通过诱导细胞自噬来下调 B 淋巴细胞中 BLyS 的表达,从而抑制细胞生长。

[关键词] B 淋巴细胞; 左旋棉酚; 自噬; B 淋巴细胞刺激因子
[中图法分类号] R392.11;R967;R979.1 [文献标志码] A

Mechanism of (-)-gossypol down-regulating B lymphocyte stimulator expression in Namalwa cells *via* autophagy

Ding Wen[1], Ni Zhenhong[2], Cheng Panke[2], Wang Bin[2], Huang Gang[2], He Fengtian[2], Lian Jiqin[2], Xu Xingran[1] ([1]School of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing, 400716; [2]Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the mechanism of (-)-gossypol down-regulating B lymphocyte stimulator (BLyS) expression in human B-cell lymphoma cell line Namalwa. **Methods** The growth inhibition of Namalwa cells by (-)-gossypol was detected by CCK8 (cell counting kit-8) kit and trypan blue staining. Cell autophagy was analyzed by observing the autophagosome formation by acridine orange (AO) staining. The expression levels of BLyS and LC3 were detected by Western blotting. **Results** The growth of Namalwa cells was significantly inhibited by (-)-gossypol in a time- and dose-dependent manner. After the (-)-gossypol treatment, the amount of autophagosomes dramatically increased. The expression level of LC3 II was up-regulated and the expression level of BLyS was down-regulated in Namalwa cells after the treatment with (-)-gossypol, and this effect could be significantly attenuated by 3-methyladenine (3-MA). **Conclusion** (-)-gossypol may inhibit the growth of B lymphocytes through autophagy-medicated BLyS down-regulation.

[**Key words**] Namalwa cells; (-)-gossypol; autophagy; B lymphocyte stimulator

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing(CSTC2011BB5030). Corresponding author: Xu Xingran, E-mail: xuxingran2002@yahoo.com.cn; Lian Jiqin, E-mail: lianjiqin@sina.com

B 淋巴细胞刺激因子(B lymphocyte stimulator, BLyS)又被称为 B 淋巴细胞活化因子(B cell activating factor of the TNF family, BAFF),属于Ⅱ型跨膜蛋白,是肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)超家族的成员之一[1]。BLyS 主要由骨髓细胞分泌[2],以膜结合型(mBAFF/BLyS)和水溶型(sBAFF/BLyS)[3]2 种形式存在。它与 B 细胞成熟抗原(BCMA)、穿膜蛋白活化物(TACI)及 BLyS 受体(BAFFR)3 种不同的受体结合后参与调节 B 淋巴细胞的存活、增殖和分泌[4],尤其是对细胞增殖和活化作用具有重要意义[5],是 B 细胞存活的关键因子[6]。研究表明,B 细胞系肿瘤细胞中 BLyS 过量表达是导致肿瘤细胞快速增殖及放化疗抵抗的重要原因[7]。因此,如何有效抑制 BLyS 的活性已经成为 B 细胞恶性肿瘤治疗中的重要策略[8]。

棉酚(gossypol)是一种多酚类化合物,有左旋棉酚[(-)-gossypol]和右旋棉酚两种异构体,主要存在于棉

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2011BB5030)
[通信作者] 徐兴然,E-mail: xuxingran2002@yahoo.com.cn
连继勤,E-mail: lianjiqin@sina.com

花的根、茎和种子内[9]。研究表明,左旋棉酚可作为抗癌药物发挥作用[10],对前列腺肿瘤[11]、多发性骨髓瘤、人慢性髓性白血病细胞系等肿瘤细胞均有杀伤作用。本课题组前期研究发现,左旋棉酚在人B细胞淋巴瘤Namalwa细胞中可下调BLyS的表达,但相关机制尚不清楚。因此,本研究以Namalwa细胞为模型,对左旋棉酚下调BLyS的可能机制进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人B细胞淋巴瘤细胞系Namalwa,由第三军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室保存并赠送。

1.1.2 试剂 胎牛血清和1640细胞培养基为美国Gibco公司产品,DMSO、吖啶橙(acridine orange, AO)、左旋棉酚和3-甲基腺嘌呤(3-Methyladenine,3-MA)为美国Sigma公司产品,CCK8试剂盒为日本Dojindo Laboraories产品,细胞裂解液和BCA蛋白浓度测定试剂盒购自江苏碧云天生物技术公司,蛋白酶抑制剂为Roche公司产品,BLyS抗体为美国Santa Cruz公司产品,微管蛋白轻链3(LC3)抗体为美国Cell Signaling公司产品,第二抗体、化学发光底物试剂盒及PVDF膜均为美国Thermo公司产品,封闭奶粉购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 Namalwa细胞培养于含10%胎牛血清的1640培养液中,于37 ℃、5% CO_2培养箱内培养,常规换液和传代后,待细胞进入对数生长期,即可进行实验。

1.2.2 CCK8法检测左旋棉酚对细胞增殖的影响 取对数生长期的Namalwa细胞接种于96孔板,每孔100 μl,分为2组:空白组和左旋棉酚药物组。加药浓度按0、2.5、5、10、20、40 μmol/L分成6组,每组设3个复孔。常规培养24 h后,将每孔离心,弃上清,各加入含10% FBS的RPMI1640和10 μl的CCK8。再于37 ℃、5% CO_2孵箱内孵育3 h。最后,在450 nm波长下测定光密度值[D(450)],计算左旋棉酚对Namalwa的生长抑制率。细胞生长抑制率 = [对照孔D(450)值 − 加药孔D(450)值]/对照孔D(450)值 × 100%

1.2.3 台盼蓝活细胞染色检测细胞存活率 在细胞培养基中加入梯度浓度的左旋棉酚(0、5、10、20 μmol/L)处理细胞24 h或用10 μmol/L左旋棉酚处理不同时间(0、6、12、18、24 h),结束后将细胞收集至EP管中。按9∶1的体积比加入0.4%的台盼蓝染色液,混匀后染色2~3 min。用计数板在镜下计数死细胞和活细胞,计算细胞活力。死细胞在镜下为深蓝色,活细胞不被染色,镜下呈无色透明状。活细胞率 = 活细胞数/(活细胞数 + 死细胞数) × 100%

1.2.4 吖啶橙(AO)染色 将对数生长期的Namalwa细胞以每孔5×10^4的密度接种到6孔板中,过夜培养后分为4组:对照组、左旋棉酚(10 μmol/L)组、3-MA(10 mmol/L)组和联合组(10 μmol/L左旋棉酚 + 10 mmol/L 3-MA联合作用),处理24 h后用100 μmol/L吖啶橙于37 ℃染色15 min,用PBS洗涤后于荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.5 细胞总蛋白的提取 收集Namalwa细胞悬液,800 r/min离心4 min,弃上清。用PBS洗涤2次后加入100 μl细胞裂解液于冰上裂解30 min。于4 ℃、12 000 r/min离心10 min,取上清并用BCA法测量蛋白浓度。

1.2.6 Western blot检测 取60 μg总蛋白,经12%聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离后,用半干转的方法将蛋白转至PVDF膜上。用5%奶粉常温封闭1 h。然后分别用1∶1 000稀释的一抗和1∶10 000稀释的二抗孵育1 h,每次孵育后用PBST洗3次,每次10 min。最后用化学发光底物法将PVDF膜用X线片曝光。

1.3 统计学分析

数据以$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件进行χ^2检验。

2 结果

2.1 左旋棉酚可显著抑制Namalwa细胞的增殖

不同浓度的左旋棉酚处理Namalwa细胞24 h后,CCK8检测其对细胞增殖的抑制率见图1,左旋棉酚对Namalwa细胞增殖具有明显的抑制作用,且随着药物浓度的增加而增强。

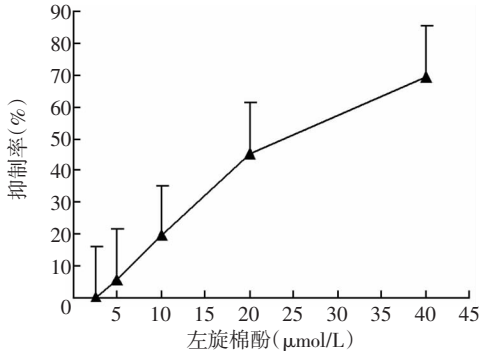


图1 不同浓度左旋棉酚对Namalwa细胞增殖抑制率的影响

2.2 左旋棉酚可显著下调Namalwa细胞的存活率

采用台盼蓝染色观察左旋棉酚不同作用浓度、不同作用时间对Namalwa细胞存活率的影响,结果见图2、3。Namalwa活细胞数量随左旋棉酚的工作浓度增加而呈量效递减关系。当左旋棉酚浓度为10 μmol/L时,Namalwa活细胞数量随其作用时间的增加而减少。

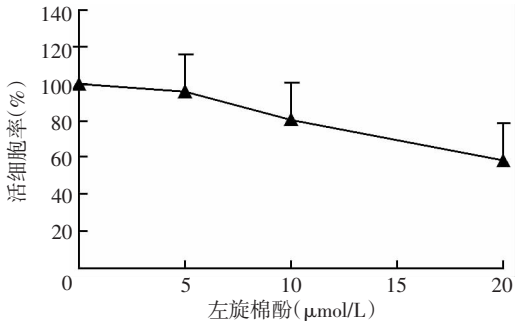


图2 不同浓度左旋棉酚作用24 h对Namalwa细胞存活率的影响

2.3 左旋棉酚下调Namalwa细胞中BLyS的表达

(-)-gossypol(10 μmol/L)作用24 h后,通过Western blot检测其对Namalwa细胞中BLyS蛋白表达的影响,见图4。在内参照蛋白GAPDH基本一致的情况下,左旋棉酚处理组的BLyS表达水平明显较对照组低,表明左旋棉酚可以下调Namalwa细

胞中 BLyS 蛋白的表达。

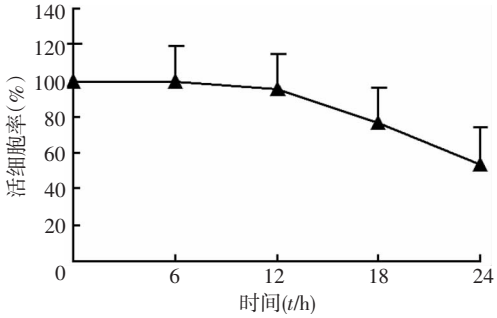
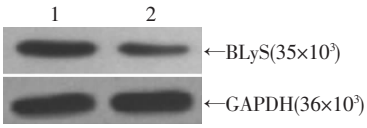


图 3 10 μmol/L 左旋棉酚作用不同时间对 Namalwa 细胞存活率的影响

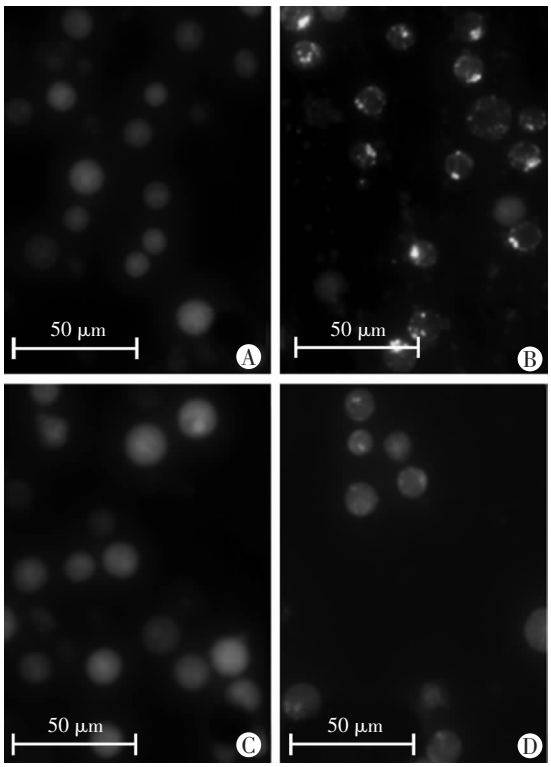


1：对照组；2：左旋棉酚(10 μmol/L)组

图 4 左旋棉酚对 Namalwa 细胞中 BLyS 表达的下调

2.4 左旋棉酚可有效诱导细胞发生自噬

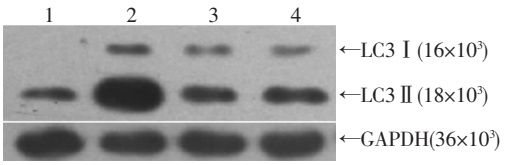
2.4.1 AO 染色 左旋棉酚(10 μmol/L)和 3-MA(10 mmol/L)单独或联合作用 24 h 后，AO 染色观察细胞的形态学变化见图 5。左旋棉酚组细胞质内橘黄色自噬小体明显多于对照组。而自噬特异性抑制剂 3-MA 单独作用或与左旋棉酚联合作用均可以明显抑制细胞中自噬小体的产生，说明左旋棉酚可以诱导 Namalwa 细胞发生自噬。



A：对照组；B：左旋棉酚(10 μmol/L)组；C：3-MA(10 μmol/L)组；D：联合组

图 5 AO 染色观察左旋棉酚对 Namalwa 细胞的自噬诱导作用

2.4.2 Western blot 检测各处理组间自噬蛋白 LC3 的表达结果见图 6。与对照组相比，左旋棉酚处理后细胞中 LC3 Ⅱ 蛋白的量显著上调，而自噬特异性抑制剂 3-MA 可以抑制这种上调作用，说明左旋棉酚可以诱导 Namalwa 细胞发生细胞自噬。

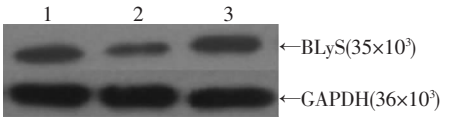


1：对照组；2：左旋棉酚(10 μmol/L)组；3：3-MA(10 mmol/L)组；4：联合组

图 6 Western blot 分析 LC3 蛋白的表达变化

2.5 抑制细胞自噬可减轻左旋棉酚对 BLyS 的下调

将细胞进行不同处理，作用 24 h 后通过 Western blot 检测细胞中的 BLyS 蛋白表达量，探讨自噬对 Namalwa 细胞中 BLyS 蛋白表达的影响。结果见图 7，使用自噬特异性抑制剂 3-MA 抑制左旋棉酚所诱导的细胞自噬后，可明显改善左旋棉酚处理组所引起的 BLyS 蛋白表达下调。



1：对照组；2：左旋棉酚(10 μmol/L)组；3：联合组

图 7 Western blot 分析自噬被抑制后 BLyS 蛋白的表达变化

3 讨论

棉酚是一种新的 Bcl-2 家族抗凋亡蛋白抑制剂，是目前主要处于Ⅱ期临床试验的唯一一个口服吸收型 Bcl-2 小分子抑制剂。它主要通过功能性地阻滞 Bcl-2 抗凋亡蛋白，随之激活 BAX 驱动的外膜蛋白诱导细胞凋亡而发挥其抗肿瘤的作用[12]。多个研究表明，左旋棉酚除了诱导肿瘤细胞发生凋亡外，还可以通过阻断 Bcl-2/xL 与 Beclin1 之间的相互作用而诱导细胞发生自噬[13]。

自噬是发生在真核细胞中由细胞初级溶酶体处理内源性底物以维持生命体蛋白代谢平衡及细胞内环境稳定的生理过程。发生自噬时，细胞内会形成明显的嗜酸性自噬小体，这种自噬小体可以被吖啶橙染为橘黄色。同时，自噬发生过程中 LC3 会由Ⅰ型转变为Ⅱ型而附着在自噬小体的双层膜上，因此，LC3 Ⅱ 表达的变化是目前检测细胞自噬中的公认标准。本研究发现，左旋棉酚处理后 Namalwa 细胞表现出明显的生长抑制和细胞自噬特征，包括自噬小体的增多与 LC3 Ⅱ 蛋白的增加。3-MA 由于可以特异性的抑制自噬信号通路中的Ⅲ类磷脂酰肌醇 3 激酶而作为常用的特异性自噬抑制剂。本实验中使用 3-MA 可以明显抑制左旋棉酚对细胞自噬的诱导作用，说明Ⅲ类磷脂酰肌醇 3 激酶的激活是左旋棉酚诱导细胞自噬所必需的。研究

还发现,左旋棉酚所诱导的细胞自噬是下调 Namalwa 细胞中 BLyS 蛋白的重要机制。由于 BLyS 是刺激 B 淋巴细胞生长的重要因素,因此推测下调 BLyS 可能是左旋棉酚抑制 B 淋巴细胞生长的重要机制。

目前,对细胞自噬活性与 BLyS 蛋白表达之间的机制研究还不够深入,体内研究更少。相信通过合理的实验设计和科学的评价体系,左旋棉酚及其他更多的 Bcl-2 家族抗蛋白凋亡抑制剂有望成为有价值的下调 BLyS、治疗 B 细胞肿瘤的药物。

参考文献:

[1] Fawzy S M, Gheita T A, El-Nabarawy E, *et al*. Serum BAFF level and its correlations with various disease parameters in patients with systemic sclerosis and systemic lupus erythematosus[J]. The Egyptian Rheumatologist, 2011, 33(1): 45 - 51.

[2] Schneider P. The role of APRIL and BAFF in lymphocyte activation [J]. Curr Opin Immunol, 2005, 17(3): 282 - 289.

[3] Gao H, Bian A, Zheng Y, *et al*. sBAFF mutants induce neutralizing antibodies against BAFF [J]. FEBS Lett, 2007, 581(4): 581 - 586.

[4] Shen Y, You F, Li C, *et al*. Molecular cloning, bioinformatics analysis and functional characterization of B-cell activating factor in goat (Capra hircus)[J]. Dev Comp Immunol, 2012, 36(1): 191 - 198.

[5] Chen C M, Ren W H, Yang G, *et al*. Molecular cloning, *in vitro* expression and bioactivity of quail BAFF[J]. Vet Immunol Immunopathol, 2009, 130(1/2): 125 - 130.

[6] 黄艳, 黄刚, 胡长江, 等. GW3965 在 Raji 细胞中对 BLyS 表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(13): 1342 - 1345.

[7] Shivakumar L, Ansell S. Targeting B-lymphocyte stimulator/B-cell activating factor and a proliferation-inducing ligand in hematologic malignancies [J]. Clin Lymphoma Myeloma, 2006, 7(2): 106 - 108.

[8] Scapini P, Bazzoni F, Cassatella M A. Regulation of B-cell-activating factor (BAFF)/B lymphocyte stimulator (BLyS) expression in human neutrophils [J]. Immunol Lett, 2008, 116(1): 1 - 6.

[9] 郭忠, 赵晋, 马建秀. 棉酚的药理作用研究[J]. 基础医学与临床, 2010, 30(1): 93 - 96.

[10] Letai A G. Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis [J]. Nat Rev Cancer, 2008, 8(2): 121 - 132.

[11] Volate S R, Kawasaki B T, Hurt E M, *et al*. Gossypol induces apoptosis by activating p53 in prostate cancer cells and prostate tumor-initiating cells [J]. Mol Cancer Ther, 2010, 9(2): 461 - 470.

[12] Etxebarria A, Landeta O, Antonsson B, *et al*. Regulation of antiapoptotic MCL-1 function by gossypol: mechanistic insights from *in vitro* reconstituted systems[J]. Biochem Pharmacol, 2008, 76(11): 1563 - 1576.

[13] He C, Levine B. The Beclin 1 interactome [J]. Curr Opin Cell Biol, 2010, 22(2): 140 - 149.

(**收稿**:2012-01-13;**修回**:2012-02-10)

(编辑 汪勤俭)

(上接 1612 页)

2 结果

231 例患者全部顺利完成手术。其中有 112 例留置胸腔闭式引流管。术中行胸膜活检时有 1 例出血,经喷射管对准活检出血部位喷射 1∶10 000 肾上腺素,出血停止。术后有 157 例出现不同程度的胸痛或伤口疼痛不适,定期更换敷料 1 ~ 2 次后自行缓解。本组 6 例患者出现发热至体温 38.0 ℃左右,经抗感染及物理降温退热治疗,2 ~ 3 d 后体温降至正常。2 例患者出现复张性肺水肿,立即予夹闭引流管、取半卧位,高流量吸氧 4 ~ 6 L/min,报告医师后予紧急药物治疗后恢复。

3 讨论

内科胸腔镜术前充分的准备,术中积极配合,术后密切观察病情和护理,是胸腔镜手术成功的重要保障。另外,术前往往需要造人工气胸,护理时需要监测生命体征,注意观察患者有无呼吸困难及严重程度,必要时查血气分析了解有无呼吸衰竭。若患者出现呼吸衰竭,立即吸氧并报告医师行胸腔穿刺抽出部分液体或气体;如果无呼吸衰竭,常规行胸片或 X 线确认人工气胸是否成功。

虽然内科胸腔镜仅需 1 个小切口,但仍需加强伤口护理,避免因为感染或疼痛造成患者痛苦和医疗费用增加。主要包括观察伤口颜色,及时更换敷料,严格无菌操作。本组患者无伤口出血及伤口感染情况。术后伤口疼痛:患者术前均予肌注米哒唑仑及盐酸哌替啶针,活检时部分患者有疼痛感,但均能耐受。

加强内科胸腔镜术后并发症的观察和处理。其并发症主要有疼痛、发热、皮下气肿、气胸、血胸、复张性肺水肿、心律失常、气体栓塞等[1,5]。发热大多是机体对手术的一种无菌性组织炎症反应,通常不需要处理,达中等度发热以上时可予药物退热,如怀疑有感染可给予经验型抗感染治疗,同时行胸腔引流液培养。部分患者人工气胸时或术后出现皮下气肿,轻者一般不需特殊处理,经休息、吸氧可自行吸收,重者需切开排气和行皮下穿刺抽气。

本组有 2 例出现复张性肺水肿均为大量胸腔积液、病程超过 2 个月的患者。当术后出现严重呼吸困难怀疑复张性肺水肿时,立即夹闭引流管、取半卧位,高流量吸氧 4 ~ 6 L/min,安慰患者消除紧张情绪,并立即静脉注射糖皮质激素、西地兰、速尿、氨茶碱等,患者症状多于 0.5 ~ 1 h 后缓解。

参考文献:

[1] 童朝辉, 王臻, 王辰. 内科胸腔镜技术及其临床应用[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2007, 30(3): 220 - 222.

[2] 潘频华, 杨红忠, 胡成平, 等. 可弯曲内科胸腔镜在不明原因胸腔积液中的应用分析[J]. 中国内镜杂志, 2007, 13(11): 1197 - 1199.

[3] 孙建华, 马俊婷, 李兰生, 等. 80 例诊断性胸腔镜并发症的观察和护理[J]. 护理研究, 2011, 25(3A): 626 - 627.

[4] 殷莉, 邱宁雷, 旷玉明. 经胸腔镜治疗胸腔积液 23 例护理配合[J]. 齐鲁护理杂志, 2010, 16(26): 63 - 64.

[5] 柯彩霞, 刘晓华, 刘琼慧. 内科胸腔镜手术并发症的观察及护理[J]. 实用医学杂志, 2008, 24(20): 3599 - 3600.

(**收稿**:2012-01-13;**修回**:2012-03-19)

(编辑 邓强庭)