文章编号:1000-5404(2013)12-1179-04

论著

双氢青蒿素促进胶质瘤GL261细胞的凋亡

尹 怡,曹 鎏,李 飞,陈图南,葛红飞,傅楚华,李 钊,兰 川,冯 华 (400038 重庆,第三军医大学西南医院神经外科,全军神经外科研究所,全军神经创伤防治重点实验室)

[摘要] **目的** 研究双氢青蒿素对胶质瘤GL261细胞凋亡的影响与作用机制。**方法** 0、30、60、90 μmol/L双氢青蒿素处理GL261细胞,倒置显微镜下观察细胞形态改变,CCK-8法检测处理后GL261细胞活力的改变,Annexin V PI法检测双氢青蒿素对GL261细胞凋亡的影响,免疫荧光显微镜观察双氢青蒿素处理后激活型Caspase-3的表达改变与亚细胞定位,Western blot检测激活型Caspase-3与抗凋亡蛋白Bcl-xL的表达变化。**结果** 双氢青蒿素能有效诱导胶质瘤GL261细胞凋亡,抑制细胞活性,具有浓度依赖性($P<0.05$);30 μmol/L双氢青蒿素作用12 h即可诱导Caspase-3激活并与细胞核共定位;双氢青蒿素能够下调Bcl-xL、上调激活型Caspase-3的表达水平,且具有浓度依赖性($P<0.05$)。**结论** 双氢青蒿素通过抑制抗凋亡蛋白Bcl-xL、诱导Caspase-3激活途径介导胶质瘤GL261细胞凋亡。

[关键词] 双氢青蒿素;胶质瘤;GL261;凋亡
[中图法分类号] R284.1;R285.5;R730.264 [文献标志码] A

Dihydroartemisinin induces apoptosis in GL261 glioma cells

Yin Yi, Cao Liu, Li Fei, Chen Tunan, Ge Hongfei, Fu Chuhua, Li Zhao, Lan Chuan, Feng Hua (Department of Neurosurgery, Institute of Neurosurgery, Key Laboratory of Neurotrauma Prevention and Treatment, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the role and mechanism of dihydroartemisinin in inducing apoptosis in glioma GL261 cells. **Methods** GL261 cells were treated with different concentrations of dihydroartemisinin (0, 30, 60 and 90 μmol/L). The morphological changes of GL261 were observed by an inverted microscope, and the viability of GL261 cells was measured by CCK-8 assay. Annexin V PI assay was used to study the percentage of apoptotic GL261 cells. Laser scanning confocal microscopy was applied to examine the expression and subcellular localization of activated caspase-3 in the GL261 cells, and Western blotting was carried out to detect the expression of activated caspase-3 and Bcl-xL. **Results** Dihydroartemisinin reduced the viability and induced apoptosis of GL261 cells in a dose-dependent manner ($P<0.05$). Treatment with 30 μmol/L dihydroartemisinin for 12 h could induce the activation of caspase-3 and co-localization with the nucleus in GL261 cells. Dihydroartemisinin could up-regulate the level of activated caspase-3 and down-regulate the level of Bcl-xL in GL261 cells in a dose-dependent manner ($P<0.05$). **Conclusion** Dihydroartemisinin induces apoptosis in GL261 cells. Anti-apoptotic protein Bcl-xL and the executor caspase-3 are involved in this process.

[**Key words**] dihydroartemisinin; glioma; GL261; apoptosis

Supported by the National Basic Research Program (973 Program, 2010CB529400). Corresponding author: Feng Hua, E-mail: fenghua8888@yahoo.com.cn

脑胶质瘤是最常见的中枢神经系统原发性恶性肿瘤,占颅内肿瘤的40%~60%,具有低治愈率、高复发率和高死亡率的特点,其中恶性胶质母细胞瘤即使经过"手术切除+放、化疗"等综合治疗后患者的中位生存期仍小于15个月[1]。青蒿素(artemisinin)是从中药黄花蒿中提取的有过氧基团的倍半萜内酯药物,在临床上作为抗疟药物使用[2]。双氢青蒿素(dihydroartemisinin,DHA)为青蒿素在体内的主要活性代谢产物,具有高效、低毒、代谢迅速等特点。除已知的抗疟作用外,现有研究提示双氢青蒿素可能具有肿瘤抑制

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划,2010CB529400)
[通信作者] 冯 华, E-mail:fenghua8888@yahoo.com.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130410.1542.010.html(2013-04-10)

作用,表现为促进肿瘤细胞凋亡、抑制血管生成及免疫调节等[3-4]。本研究以胶质瘤细胞系GL261为主要研究对象,观察DHA对胶质瘤细胞的杀伤作用,旨在为探寻新型抗胶质瘤化疗药物提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

GL261细胞株由第三军医大学西南医院病理学研究所惠赠,双氢青蒿素购自重庆西阳华立武陵山制药有限公司,储存时溶解于DMSO(200 μmol/L),使用时溶解于DMEM/F12(HyClone)+10% FBS(HyClone)中。0.25% EDTA胰酶(HyClone)、Cell Counting Kit-8、Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒(碧云天)、兔抗小鼠Caspase-3单抗、兔抗小鼠Bcl-xL单抗(Cell Signaling Technology)、小鼠抗小鼠GAPDH单抗、HRP标记山羊抗兔IgG二抗、HRP标记山羊抗小鼠IgG二抗(北京中杉金桥)、Alexa Fluor 488标记山羊抗兔二抗、Hoechst 33258(碧云天)、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒(碧云天)、BCA蛋白浓度测定试剂盒(碧云天)、彩色预染蛋白分子量标准品(Thermo PageRuler 10×10^3 ~ 170×10^3)、PVDF膜(Roche)、超敏ECL显色液(Thermo SuperSignal West Pico)、二氧化碳培养箱(Heal Force HF160W)、凝胶成像仪(Bio-Rad)、流式细胞仪(BD FACSCalibur)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 小鼠GL261细胞培养于37 ℃含5% CO_2饱和湿度恒温培养箱内,使用含10% FBS的DMEM/F12培养基,细胞单层贴壁生长,待培养液颜色转黄时换液,至70% ~ 80%融合时使用含0.25% EDTA的胰酶消化传代。

1.2.2 倒置显微镜下观察不同DHA浓度对GL261细胞形态的影响 选取对数生长期的GL261细胞2.0×10^5分别接种于6孔板内培养12 h,加入0(DMSO对照组)、30、60、90 μmol/L的DMEM/F12完全培养基,18 h后倒置显微镜下观察细胞形态(×200)。

1.2.3 细胞生长抑制测定 GL261细胞生长抑制测定采用CCK-8试剂盒,选取对数生长期的GL261细胞5.0×10^3分别接种于96孔板内培养16 h,加入DHA终浓度分别为0、10、20、40、60、80、100、120 μmol/L的DMEM/F12完全培养基,12 h后每孔中加入100 μL CCK-8试剂,孵育2.5 h后,用酶标仪检测波长450 nm处光密度值[$D(450)$]。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡 采用Annexin V-FITC检测不同DHA浓度下GL261细胞凋亡情况。选取对数生长期的GL261细胞2.0×10^5分别接种于6孔板内培养12 h。加入DHA终浓度分别为30、60、90 μmol/L的DMEM/F12完全培养基对照组采用DMSO处理,24 h后消化并按每孔1.0×10^5收集细胞。PBS缓冲液清洗、离心后,加入2.5 μL Annexin V-FITC与10 μL PI染液,室温避光孵育5 min后立即进行流式检测。

1.2.5 免疫荧光检测DHA对GL261细胞激活型Caspase-3的表达影响 选取对数生长期的GL261细胞1.0×10^4分别接种于激光共聚焦培养皿内培养12 h。加入DHA终浓度为30 μmol/L的DMEM/F12完全培养基,对照组采用DMSO处理18 h后PBS缓冲液漂洗后,加入4 ℃ 4%多聚甲醛固定10 min,PBS漂洗,0.1% Triton X-100 4 ℃作用30 min,PBS漂洗,封闭血清室温1 h,PBS漂洗,滴加激活型Caspase-3一抗工作液(1∶200),4 ℃过夜,PBS漂洗,滴加Alexa Fluor 488二抗工作液(1∶500),37 ℃ 1 h,避光,PBS漂洗,滴加Hoechst33258 3 min后漂洗,封片后用激光共聚焦显微镜观察。

1.2.6 Western blot检测DHA对GL261细胞Bcl-xL和激活型Caspase-3的表达影响 选取对数生长期的GL261细胞5.0×10^5分别接种于培养瓶内培养。待50%的细胞出现融合时,加入DHA终浓度分别为30、60、90 μmol/L的DMEM/F12完全培养基对照组采用DMSO处理,18 h后消化细胞。裂解细胞并收集蛋白样品,BCA法测定蛋白浓度,按40 μg每泳道上样。遵试剂盒说明书进行电泳、转膜操作。Caspase-3(1∶2 000)、Bcl-xL(1∶2 000)、GAPDH(1∶5 000)4 ℃孵育过夜,HRP标记山羊抗兔或小鼠二抗(1∶5 000)37 ℃孵育1 h后ECL显色检测蛋白条带。

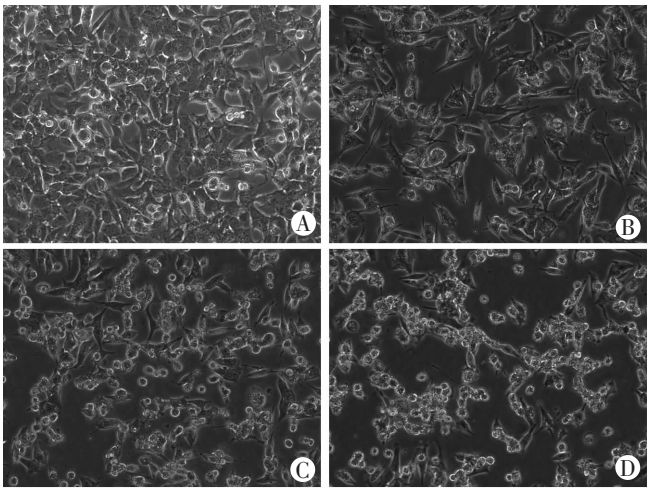
1.3 统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 20.0统计软件,两组间比较行独立样本t检验,两组以上比较行单因素方差分析。

2 结果

2.1 DHA对GL261细胞形态及数量的影响

镜下观察结果提示,DHA可显著改变GL261的生长形态。与DMSO对照组相比,典型的梭状细胞数明显减少($n=4$, $P<0.05$),而圆形细胞明显增多($n=4$, $P<0.05$)。另外,镜下观察可看到DHA作用后,细胞间出现明显间隙。见图1。



A:DMSO对照组(0 μmol/L);B~D:30、60、90 μmol/L DHA组

图1 不同浓度DHA对GL261细胞形态学的影响(倒置显微镜 ×200)

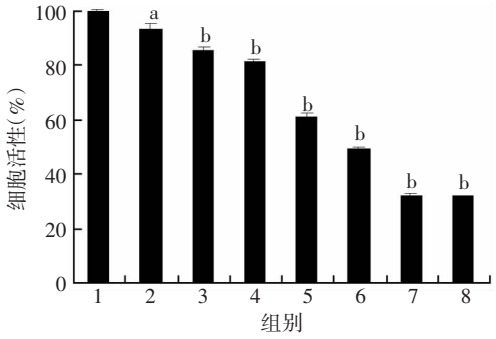
2.2 DHA对GL261细胞活性的影响

CCK-8结果提示,与DMSO对照组相比,不同浓度梯度的DHA可明显抑制GL261细胞存活($P<0.05$,$P<0.01$)。见图2。

2.3 DHA对GL261细胞激活型Caspase-3表达的影响

免疫荧光组织化学染色可见,DMSO对照组GL261细胞几乎无激活型Caspase-3表达,而30 μmol/L DHA作用后可见

Caspase-3 表达明显升高,且与细胞核共定位。见图 3。



1:DMSO 对照组;2 ~ 8:分别为 10、20、40、60、80、100、120 μmol/L DHA 组 a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与对照组比较

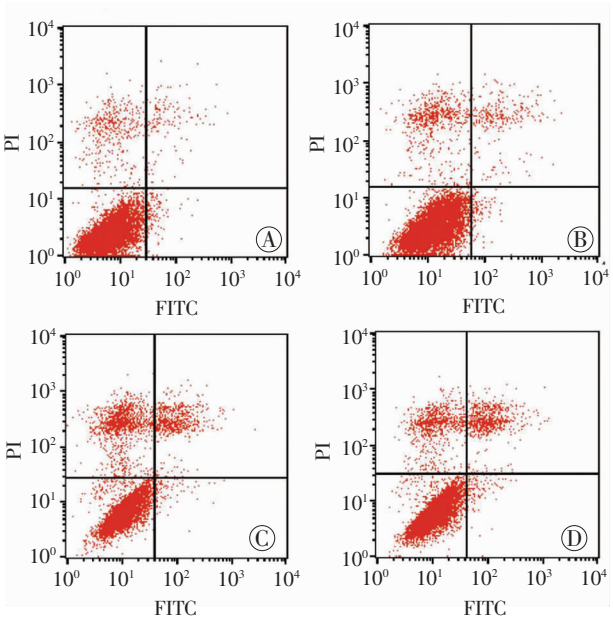
图 2 不同浓度 DHA 对 GL261 细胞活性的影响 ($n=4, \bar{x} \pm s$)

2.4 DHA 导致 GL261 细胞凋亡

不同浓度 DHA(30、60、90 μmol/L)作用 GL261 细胞 24 h 后,坏死和晚期凋亡的细胞数比例分别为(3.33 ± 0.22)%、(7.16 ± 0.33)% 和(7.74 ± 0.28)%,均较 DMSO 对照组(1.95 ± 0.45)% 显著增加($n=4$, $P<0.05$),具有浓度依赖性($P<0.05$)。见图 4。

2.5 DHA 导致 GL261 细胞 Bcl-xL 和激活型 Caspase-3 蛋白表达水平下降

不同浓度 DHA(30、60、90 μmol/L)作用 GL261 细胞 24 h 后,Bcl-xL 蛋白表达量较 DMSO 对照组明显降低($n=4$, $P<0.05$);激活型 Caspase-3 的表达水平明显升高($n=4$, $P<0.05$)。DHA 可影响 GL261 细胞内 Bcl-xL 和激活型 Caspase-3 蛋白的表达,呈现一定的浓度依赖性,提示 DHA 通过抑制抗凋亡蛋白 Bcl-xL 的表达,增加 Caspase-3 的激活水平促进 GL261 细胞凋亡。见图 5。



A:DMSO 对照组;B ~ D:30、60、90 μmol/L DHAD 组

图 4 不同浓度 DHA 对 GL261 细胞凋亡的影响

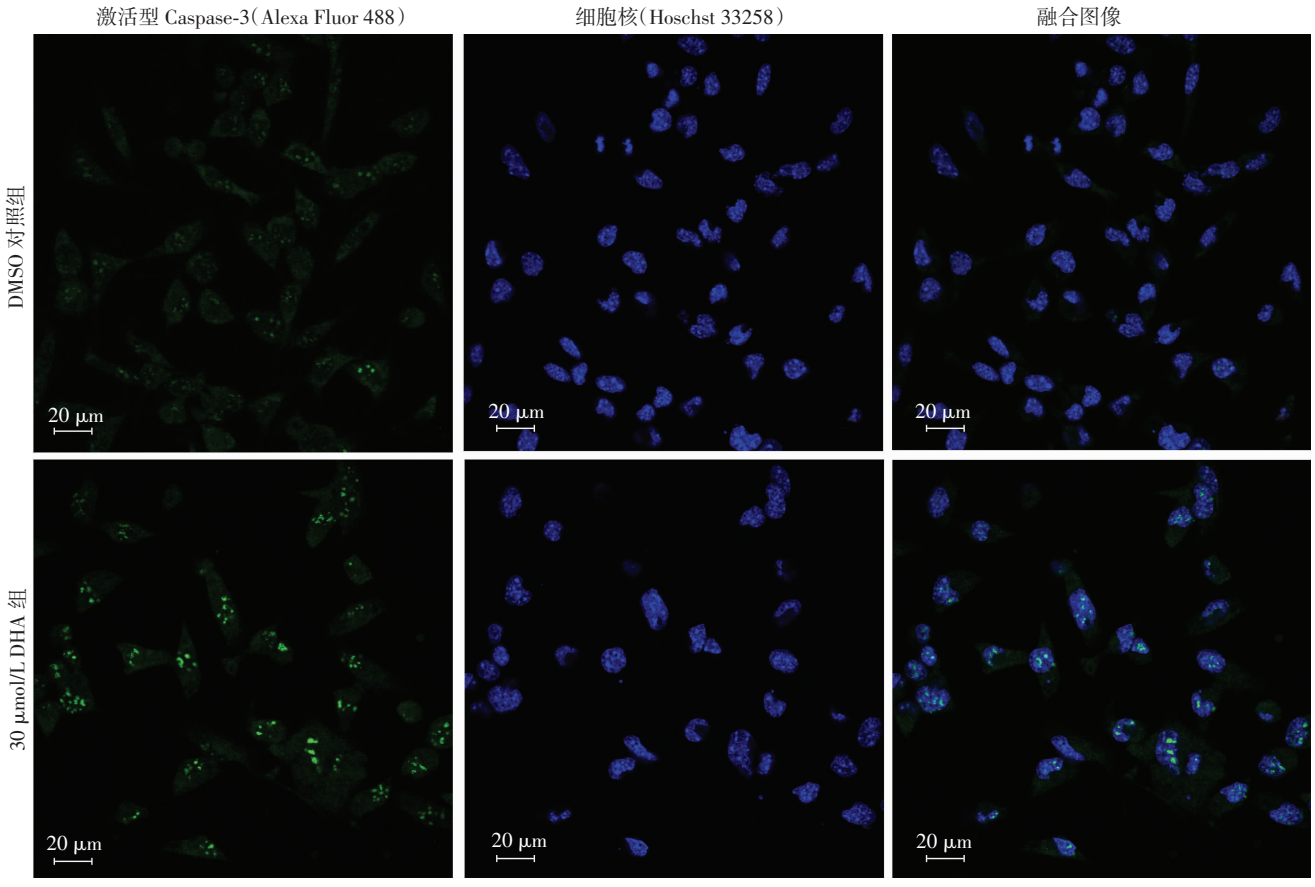
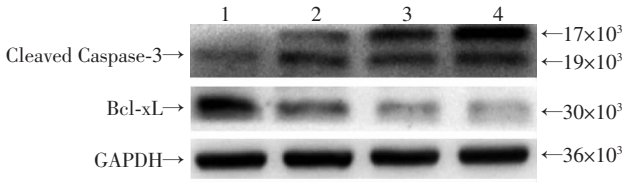


图 3 免疫荧光染色观察 DHA 对 GL261 细胞激活型 Caspase-3 亚细胞定位的影响



1:DMSO 对照组;2~4:分别为 30、60、90 μmol/L DHA 组

图5 不同浓度 DHA 组 GL261 细胞 Bcl-xL 和激活型 Caspase-3 蛋白的表达

3 讨论

胶质瘤的推荐治疗方式为"手术切除+同步放化疗",具有侵袭性生长的特性[5],即便患者接受标准流程的治疗措施其预后仍然不良[1]。寻找新的治疗靶点是目前胶质瘤领域的研究热点。青蒿素及其衍生物如双氢青蒿素、青蒿琥酯、青蒿甲醚等成分是目前普遍应用的抗疟药物,且毒副作用较其他抗疟药物轻[2]。双氢青蒿素是体内青蒿素主要活性代谢产物,分子结构上含有3个内过氧化物桥,与游离铁作用后产生大量氧自由基,导致细胞的结构分子如蛋白质、核酸及脂质损伤,最终致使细胞死亡[6]。肿瘤细胞生长旺盛,需要将大量铁转运至胞内,因而 DHA 可通过产生过量氧自由基诱导肿瘤细胞凋亡,成为一种新的潜在化疗方式。目前,已有研究报道 DHA 对乳腺癌、肺癌和血液系统等肿瘤细胞具有明显的杀伤作用[6-8]。本研究通过凋亡检测等手段证实 DHA 可诱导胶质瘤细胞凋亡,且具有剂量依赖性。

细胞受到过量应激(如氧自由基)刺激后可激活线粒体凋亡途径,释放细胞色素 c 等促凋亡信号分子,诱导凋亡小体形成,激活 Caspase-3 执行最终的细胞凋亡过程[9]。凋亡小体的形成需要 Apaf-1 结合细胞色素 c 并发生齐聚反应,而细胞内多种信号分子如 Bcl-2、Bcl-xL 等 Bcl 蛋白家族成员对该过程具有负向调控作用[10]。生理浓度的氧自由基细胞可耐受,通过上调 Bcl 等蛋白,抑制细胞凋亡,起到细胞自我保护作用[9-11]。

我们通过免疫荧光染色与蛋白免疫印迹等手段发现,DHA 可导致 GL261 细胞 Caspase-3 活化,且活化水平与 DHA 剂量成正相关。进一步研究发现,DHA 降低 GL261 内 Bcl-xL 蛋白表达量,也与剂量相关。结合前述文献复习所得结论,我们推测 DHA 可通过胶质瘤细胞内蓄积的铁,产生过量氧自由基,抑制 Bcl-xL 表达,活化 Caspase-3 启动细胞凋亡途径从而杀伤胶质瘤细胞。

双氢青蒿素在抗疟治疗中已被证实具有低毒、高效等特性,利于向肿瘤治疗领域的转化。已有报道证实,双氢青蒿素可透过血脑屏障,可在脑内达到有效的药物浓度,因此具备了应用于中枢神经系统肿瘤化疗的必需条件[12]。放疗、化疗是胶质瘤的主要非手术治疗方式,双氢青蒿素是否具有放、化疗增敏作用仍需要对其作用机制进一步探讨。另外,胶质瘤干细胞是导致胶质瘤侵袭的重要细胞基础,由于其对现有放疗、化疗措施具有明显的抗性,且外科手术无法对其彻底清除[13],双氢青蒿素对这一特殊群体是否具有选择杀伤性仍待探索。

参考文献:

[1] Wen P Y, Kesari S. Malignant gliomas in adults[J]. N Engl J Med, 2008, 359(5): 492-507.

[2] O'Neill P M, Posner G H. A medicinal chemistry perspective on artemisinin and related endoperoxides[J]. J Med Chem, 2004, 47(12): 2945-2964.

[3] Jansen F H, Soomro S A. Chemical instability determines the biological action of the artemisinins[J]. Curr Med Chem, 2007, 14(30): 3243-3259.

[4] 曹红卫, 郭毅斌, 魏利召, 等. 青蒿素对脓毒症大鼠肺损伤的保护作用[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(10): 951-954.

[5] 王晖, 冯华, 陈图南, 等. 细胞外 ATP 对 U87 胶质瘤细胞生长和侵袭的作用[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(7): 589-592.

[6] Zhou H J, Wang Z, Li A. Dihydroartemisinin induces apoptosis in human leukemia cells HL60 *via* downregulation of transferrin receptor expression[J]. Anticancer Drugs, 2008, 19(3): 247-255.

[7] Mao H, Gu H, Qu X, *et al*. Involvement of the mitochondrial pathway and Bim/Bcl-2 balance in dihydroartemisinin-induced apoptosis in human breast cancer *in vitro*[J]. Int J Mol Med, 2013, 31(1): 213-218.

[8] Zhang J L, Wang Z, Hu W, *et al*. DHA regulates angiogenesis and improves the efficiency of CDDP for the treatment of lung carcinoma[J]. Microvasc Res, 2013, 87: 14-24.

[9] Riedl S J, Salvesen G S. The apoptosome: signalling platform of cell death[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007, 8(5): 405-413.

[10] Hyman B T, Yuan J. Apoptotic and non-apoptotic roles of caspases in neuronal physiology and pathophysiology[J]. Nat Rev Neurosci, 2012, 13(6): 395-406.

[11] Allen C L, Bayraktutan U. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke[J]. Int J Stroke, 2009, 4(6): 461-470.

[12] Davis T M, Binh T Q, Ilett K F, *et al*. Penetration of dihydroartemisinin into cerebrospinal fluid after administration of intravenous artesunate in severe falciparum malaria[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(1): 368-370.

[13] Chen J, McKay R M, Parada L F. Malignant glioma: lessons from genomics, mouse models, and stem cells[J]. Cell, 2012, 149(1): 36-47.

(**收稿**:2013-03-11;**修回**:2013-03-26)

(编辑 王小宴)