

- ICAM-1 表达量的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2001, 12 (2): 88-90.
- [7] 徐 术, 胡晋红, 李凤前. HPLC 测定 Beagle 犬血浆中阿魏酸钠的浓度及其药代动力学研究 [J]. 中成药, 2005, 27 (9): 1062-1065.
- [8] 裴 瑾, 杨祖貽, 刘荣敏, 等. HPLC 测定灌胃当归胡椒复方小鼠血浆中阿魏酸的含量 [J]. 中草药, 2005, 36 (4): 523-525.
- [9] 万晓霞. 冰片药理学研究进展 [J]. 广东药学院学报, 1997, 13 (2): 115-117.

白桦脂酸对人 Raji 淋巴瘤细胞增殖、凋亡及细胞周期的影响

陈 子, 吴秋玲, 陈 燕*, 何 静

(华中科技大学同济医学院附属协和医院血液病研究所, 湖北 武汉 430022)

摘 要:目的 研究 D 类细胞周期蛋白 (cyclin D3) 在 Burkitt 淋巴瘤细胞 Raji 中的表达及白桦脂酸对其的影响。方法 MTT 法检测细胞增殖活性, Annexin-V/PI 双标法检测细胞凋亡, 流式细胞仪检测细胞周期分布, RT-PCR 法分析白桦脂酸作用于 Raji 细胞后 cyclin D3 mRNA 表达的变化, Western blotting 法检测细胞内 cyclin D3 的蛋白表达。结果 白桦脂酸对 Raji 细胞有明显的增殖抑制作用, Annexin-V/PI 双标法显示, 白桦脂酸诱导细胞凋亡呈剂量依赖性。随着白桦脂酸剂量的加大, 凋亡率增高。白桦脂酸作用 Raji 细胞后主要使细胞周期阻滞于 G₀/G₁ 期, G₀/G₁ 期细胞比例随白桦脂酸剂量增大而逐渐增高, 而 S 期细胞比例随白桦脂酸剂量增大而逐渐降低, 对 G₂/M 期细胞作用不明显。RT-PCR 结果显示白桦脂酸作用于 Raji 细胞使 cyclin D3 mRNA 表达减少, 并与其剂量呈正相关。Western blotting 结果显示白桦脂酸使 cyclin D3 蛋白表达降低, 呈剂量依赖性。结论 白桦脂酸抑制 Raji 细胞增殖并诱导细胞凋亡, 可使细胞阻滞于 G₀/G₁ 期, 其可通过下调 cyclin D3 表达而发挥抗肿瘤作用。

关键词: 白桦脂酸; Raji 细胞; 细胞凋亡; cyclin D3

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)04-0556-04

Effect of betulinic acid on proliferation, apoptosis, and cell cycle of human lymphoma cell line Raji

CHEN Zi, WU Qiu-ling, CHEN Yan, HE Jing

(Institute of Hematology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

Abstract: **Objective** To investigate the anticancer effects and molecular mechanism of betulinic acid (BA) on Raji cells *in vitro*. **Methods** The effects of BA on the growth of Raji cells were studied by MTT assay. Apoptosis was assessed by Annexin-V/PI double-labeled cytometry. The influence on cell cycle was studied by flow cytometer. The cyclin D3 mRNA expression was checked by Western blotting and RT-PCR techniques. **Results** BA showed obvious inhibition on proliferation, as well as induction potency of apoptosis on Raji cells *in vitro* in a time- and dose-dependent manner by Annexin-V/PI double-labeled method. With the IC₅₀ value for 24 h being (39.44±0.65) μg/mL, Raji cells treated with BA showed accumulation in G₀/G₁ phase and reduction in the percentage of cells in S phase. The cyclin D3 mRNA expression and protein were sharply decreased in Raji cells treated with BA. **Conclusion** BA could inhibit the proliferation of Raji cells by regulating the cell cycle that arrests cells at G₀/G₁ phase and induces apoptosis of Raji cells. The antitumor effects of BA may be related to down-regulation of the expression of cyclin D3.

Key words: betulinic acid (BA); Raji cells; cell apoptosis; cyclin D3

白桦脂酸是一种从白桦树皮中提取的五环三萜类化合物。已有多项研究表明其对多种恶性疾病

有治疗作用, 以及抗炎、免疫调节和抗 HIV 病毒活性^[1~3]。Raji 细胞是人 Burkitt 淋巴瘤细胞株。已有

收稿日期: 2007-08-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30500686)

作者简介: 陈 子 (1980—), 女, 湖北人, 硕士研究生, 主要从事恶性血液病研究。E-mail: shirley0188@sina.com

* 通讯作者 陈 燕

实验证实三萜类化合物对白血病细胞系有生长抑制作用^[4]。本研究以 Raji 细胞为研究对象,采用白桦脂酸体外诱导凋亡,并检测细胞周期及其相关基因 D 类细胞周期蛋白 (cyclin D3) 在 mRNA 和蛋白表达水平的变化,以探讨白桦脂酸抗肿瘤作用的分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞:人 Burkitt 淋巴瘤细胞系 Raji 细胞株,由华中科技大学同济医学院免疫教研室提供。

1.2 药物及主要试剂:白桦脂酸 (质量分数 $\geq 98\%$),购自 Alexis 公司,溶解于二甲基亚砜 (DMSO) 中,配制成 5 mg/mL 原液分装备用,4℃保存。MTT、DMSO、碘化丙锭 (PI)、核糖核酸酶 A (RNase A) 均为 Sigma 公司产品。Annexin-V/PI 试剂盒购自深圳晶美生物制品公司。RPMI-1640 培养基购自 Invitrogen 公司;胎牛血清 (FBS) 购自杭州四季青公司。RNA 抽提试剂盒 Trizol 购自 Gibco 公司,氯仿、异戊醇、无水乙醇为国产分析纯。RT-PCR 试剂盒购自 Toyobo 公司,引物由 Invitrogen 公司合成。cyclin D3 为鼠抗人单克隆抗体,辣根过氧化物酶 (HRP) 标记羊抗小鼠二抗,均购自美国 Santa Cruz 公司。电化学发光 (ECL) 试剂盒购自美国 Piers 公司。

1.3 MTT 实验:取对数生长期的 Raji 细胞调整浓度为 1×10^5 /mL,接种于 96 孔板,每孔加细胞悬液 200 μ L,用不同质量浓度的白桦脂酸 10、15、20、30、40、60、80、100 μ g/mL 处理细胞。每种药物质量浓度设 6 个平行孔,同时设 DMSO 对照组,置 37℃、5% CO₂ 培养箱分别培养 24、48、72 h。然后每孔加入 MTT 溶液 (5 mg/mL) 20 μ L,37℃,继续孵育 4 h,终止培养,平板离心机离心 (1 000 r/min, 5 min),弃孔内上清,每孔加入 150 μ L DMSO,振荡 10 min,使结晶物充分溶解。应用 Bio-Rad M450 酶标仪 (波长 570 nm,对比波长 620 nm) 测定吸光度 (A) 值,计算细胞增殖抑制率 [细胞增殖抑制率 = (1 - 实验组 A 值 / 对照组 A 值) $\times 100\%$]。

1.4 Annexin-V/PI 双标法流式细胞术检测细胞凋亡:用不同质量浓度的白桦脂酸 (0、20、40、60 μ g/mL) 处理 Raji 细胞。置于 37℃、5% CO₂ 培养箱培养 24 h。按 Annexin-V/PI 试剂盒说明书进行操作,将细胞收获于流式管中,调整待测细胞的浓度为 1×10^6 /mL。用 4℃的 PBS 洗 1 次。弃上清,用 100 μ L 钙缓冲液重悬细胞,加 Annexin-V-FITC 10 μ L 和 PI 5 μ L,室温孵育 15 min,加钙缓冲液 300 μ L。

应用流式细胞仪 (BD 公司) 检测早期凋亡细胞 (Annexin-V-FITC 阳性而 PI 阴性) 百分率。

1.5 DNA 倍体分析检测细胞周期:用不同质量浓度的白桦脂酸 (0、20、40、60 μ g/mL) 处理 Raji 细胞。置于 37℃、5% CO₂ 培养箱培养 24 h 后收集细胞,并调整待测细胞的浓度为 1×10^6 /mL。用 PBS 洗 1 次,加入 75% 乙醇 500 μ L 4℃固定过夜。1 000 r/min 离心 5 min 去除乙醇,用 PBS 洗 1 次,加入 20 μ L RNase A (1 mg/mL) 37℃水浴 30 min。加 300 μ L PI (50 μ g/mL),4℃避光 30 min 后,用流式细胞仪检测 (BD 公司),用 Cell Modifit 软件分析细胞周期。

1.6 RT-PCR 法检测 cyclin D3 mRNA 的表达

1.6.1 引物:引物通过 Primer Premier 5.0 软件自行设计,经上海英峻公司合成。cyclin D3 引物序列为上游引物:5'-AGCGCCTTTCCCACTCTA-3',下游引物:5'-CCAGGGTTACCACCACTTGT-3',扩增产物 481 bp。 β -actin 引物序列为上游引物:5'-CTGTCCCTGTATGCCTCTG-3',下游引物:5'-ATGTCACGCACGATTTC-3',扩增产物 218 bp。

1.6.2 细胞总 RNA 提取:按 Trizol 试剂盒说明书操作步骤进行。收集 Raji 细胞 (细胞数为 2×10^6 /孔,白桦脂酸 0、20、40、60 μ g/mL 处理 24 h),1 000 r/min 离心 5 min,PBS 洗 1 次,将细胞分别转入 1.5 mL EP 管中,每管加入 1 mL Trizol,混匀,冰浴 30 min。加入 200 μ L 氯仿,剧烈震荡,冰浴 5 min。4℃、12 000 r/min 离心 20 min,取上层水相,加入与之等体积的异丙醇充分混匀,冰浴 5 min。4℃、12 000 r/min 离心 10 min,弃上清,沉淀物用 DEPC 处理的 75% 乙醇洗 1 次,空气中干燥 10 min,用 20 μ L DEPC 水溶解。将所得 RNA 用紫外分光光度仪测定纯度 ($A_{260}/A_{280} > 1.8$),计算 RNA 量。

1.6.3 逆转录反应:按照 RT 试剂盒说明书进行操作,RT 反应体系为 20.0 μ L,RT 反应液组成:DE-PC 水 5.0 μ L,5 $\times$ 缓冲液 4.0 μ L,dNTP 20 μ L,Rnase 抑制剂 1.0 μ L,oligo (dT) 1.0 μ L,RNA 6.0 μ L,Rever Tra Ace 1.0 μ L。反应条件:30℃10 min,42℃20 min,99℃5 min,4℃5 min。

1.6.4 PCR 扩增:反应体系 20 μ L。PCR 反应液组成:10 $\times$ 缓冲液 2.0 μ L, MgCl₂ 1.0 μ L, dNTP (10 mmol/L) 1.0 μ L, Taq 酶 1.0 μ L, cDNA 1.0 μ L, ddH₂O 13.0 μ L,引物 1 (10 pmol/L) 0.5 μ L,引物 2 (10 pmol/L) 0.5 μ L;混匀后,瞬时离心。进行

PCR 反应。cyclin D3 PCR 扩增条件为 94 ℃、5 min, 94 ℃ 变性 30 s, 60 ℃ 复性 1 min, 共进行 10 个循环, 94 ℃、30 s, 53 ℃ 复性 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 共进行 25 个循环, 最后 72 ℃ 延伸 10 min, 4 ℃ 保存。PCR 产物的电泳分析: 取 PCR 产物 6 μL 于 1.8% 琼脂糖凝胶电泳 (DYU—12) 仪上, 电压 100 V 电泳 20 min。置凝胶成像仪 IS1000 中成像, 用 Gelpro3 分析软件进行灰度扫描。

1.7 Western blotting 法检测 cyclin D3 蛋白的表达: 取对数生长期各质量浓度白桦脂酸 (0、20、40、60 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 作用 24 h 后的 Raji 细胞 $4 \times 10^7/\text{mL}$, 以 PBS 洗 1 次, 冰上裂解 60 min, 13 000 r/min 离心 15 min 去除沉淀, 测定上清液中的蛋白。每条泳道加蛋白 50 μg , 进行十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 并转移至硝酸纤维素膜上。用 5% 脱脂奶粉 37 ℃ 封闭 1 h, 与一抗 cyclin D3 (浓度为 1:500) 4 ℃ 孵育过夜。用 TBST 洗 3 次, 每次 15 min, 然后与 HRP 标记的兔抗鼠 IgG (1:5 000), 37 ℃ 孵育 1 h。将硝酸纤维素膜置于暗盒中, 胶片曝光, 自动洗片机冲洗胶片。采用 BioRad 系统测定各条带的 A 值。

1.8 统计学方法: 应用 SPSS 11.0 软件进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 白桦脂酸对 Raji 细胞增殖的影响: 白桦脂酸可以明显抑制 Raji 细胞增殖, 并且呈时间和剂量依赖性 (图 1), 不同质量浓度白桦脂酸作用下, 细胞增殖抑制率均明显高于 Raji 细胞对照组, 差异显著 ($P < 0.05$)。作用 24、48、72 h 时 IC_{50} 值分别为 (39.44 $\pm$ 0.65)、(26.26 $\pm$ 2.39)、(15.35 $\pm$ 1.83) $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($n=3, P < 0.05$)。

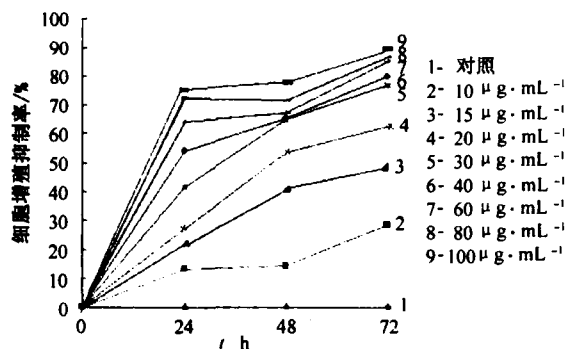


图 1 白桦脂酸对 Raji 细胞增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 1 Inhibition of BA on proliferation of Raji cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.2 白桦脂酸对 Raji 细胞凋亡的影响: 见表 1。

Annxin-V/PI 双标法流式细胞仪检测显示, 随着白桦脂酸质量浓度增加, Raji 细胞发生早期凋亡, 凋亡率也呈递增趋势。

表 1 白桦脂酸对 Raji 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Effect of BA on apoptosis of Raji cells

($\bar{x} \pm s, n=3$)

质量浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	早期凋亡率/%	晚期凋亡率/%	总凋亡率/%
0(对照)	5.08 $\pm$ 0.37	1.19 $\pm$ 0.28	6.28 $\pm$ 0.64
20	10.06 $\pm$ 1.07**	1.98 $\pm$ 0.19**	12.02 $\pm$ 1.27**
40	18.20 $\pm$ 2.35**	9.49 $\pm$ 1.62**	27.68 $\pm$ 3.96**
60	53.54 $\pm$ 1.43**	21.06 $\pm$ 2.04**	74.61 $\pm$ 3.38**

与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

2.3 白桦脂酸对 Raji 细胞周期的影响: 见表 2。不同质量浓度白桦脂酸作用 Raji 细胞 24 h 后, 细胞周期发生改变, 其主要使细胞周期阻滞在 G_0/G_1 期, G_0/G_1 期细胞比例随白桦脂酸剂量增大而逐渐增高 (其中在 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时达到峰值), 对 G_2/M 期细胞作用不明显。

表 2 白桦脂酸对 Raji 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of BA on cell cycle of Raji cells

($\bar{x} \pm s, n=3$)

质量浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	细胞周期分布/%		
	G_0/G_1	S	G_2/M
0(对照)	44.51 $\pm$ 1.12	43.33 $\pm$ 2.07	12.16 $\pm$ 1.78
20	52.94 $\pm$ 2.64**	39.85 $\pm$ 1.98**	7.21 $\pm$ 2.32**
40	58.64 $\pm$ 1.57**	28.59 $\pm$ 1.25**	12.78 $\pm$ 2.11**
60	55.71 $\pm$ 3.69**	31.71 $\pm$ 2.37**	8.58 $\pm$ 1.53**

与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

2.4 白桦脂酸对 Raji 细胞 cyclin D3 mRNA 表达的影响: 见图 2。20、40、60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 白桦脂酸处理组 cyclin D3/ β -actin 值分别为 0.681 $\pm$ 0.015、0.265 $\pm$ 0.016、0.008 $\pm$ 0.001, 显著低于空白对照组 (1.027 $\pm$ 0.020) ($n=3, P < 0.01$)。

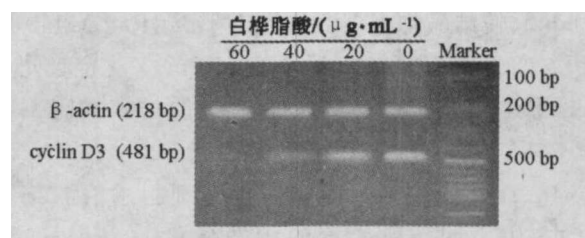


图 2 白桦脂酸对 Raji 细胞 cyclin D3 mRNA 表达的影响

Fig. 2 Effect of BA on cyclin D3 mRNA expression in Raji cells

2.5 白桦脂酸对 Raji 细胞 cyclin D3 蛋白表达的影响: 见图 3。20、40、60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 白桦脂酸作用 Raji 细胞后, 其 cyclin D3 蛋白表达均明显减弱 ($P < 0.01$)。

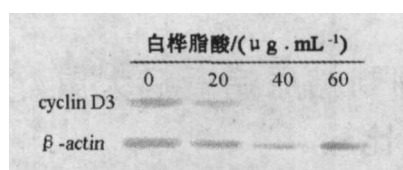


图3 白桦脂酸对 Raji 细胞 cyclin D3 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of BA on cyclin D3 protein expression in Raji cells

0.05), 且呈剂量依赖性。

3 讨论

白桦脂酸广泛存在于多种中药中。有抗炎抑菌、调血脂及抗疟疾等活性,有实验证明了白桦脂酸在恶性黑色素瘤细胞中和神经母细胞瘤中可以诱导细胞凋亡^[5],而对正常细胞无杀伤力^[6]。本实验结果表明,白桦脂酸能选择性抑制 Raji 细胞增殖,其抗细胞增殖作用有时间、剂量依赖性,并且使 cyclin D3 表达降低,呈剂量依赖性。

Annxin-V/PI 双标法检测细胞凋亡结果显示,白桦脂酸以剂量依赖方式诱导 Raji 细胞凋亡,用白桦脂酸处理 Raji 细胞 24 h,其早期凋亡率和晚期凋亡率均随剂量的加大而递增。前期研究表明白桦脂酸在恶性黑色素瘤细胞中和神经母细胞瘤中可以诱导线粒体膜电位及膜通透性的改变,从而诱导细胞凋亡^[5]。本研究白桦脂酸诱导 Raji 细胞凋亡,也可能由于其对线粒体的作用而发生,但具体机制尚待研究。

本研究结果显示,白桦脂酸主要使 Raji 细胞阻滞于 G₀/G₁期,S 期细胞比例逐渐减少。白桦脂酸作用于 Raji 细胞 24 h 后,G₀/G₁期细胞以剂量依赖的方式逐渐增加。同时,S 期细胞以剂量依赖的方式减少,表明白桦脂酸具有调节 G₁/S 检测点的作用。cyclin D 是一种重要的 G₁/S 期正性调控分子,它通过与细胞周期蛋白依赖性激酶 (CDK4 或 CDK6) 结合形成复合物,激活后者的磷酸激酶活性,磷酸化抑癌基因 pRb 并使其失活,释放出原来与非磷酸化的 pRb 相结合的 E2F 转录因子,继而启动核内靶基因的转录,促进细胞由 G₁期进入 S 期。cyclin D 包括 3 个亚型:cyclin D1、cyclin D2 与 cyclin D3,能促进细

胞增殖,加快细胞周期进程。其中 cyclin D3 是中国人非霍杰金淋巴瘤发病关系最为密切的 D 类细胞周期蛋白,并且其表达水平与 NHL 恶性程度呈明显正相关^[7]。因此 cyclin D3 的失调对于造血系统肿瘤的发生、发展有着极其重要的意义。本研究应用 RT-PCR 和 Western blotting 法检测了不同质量浓度白桦脂酸作用 Raji 细胞后,cyclin D3 在 mRNA 和蛋白水平的表达变化。白桦脂酸以剂量依赖方式使 Raji 细胞 cyclin D3 的 mRNA 和蛋白表达降低,可以推测 cyclin D3 的失调可能是导致恶性淋巴瘤发生发展的重要分子机制。

B 细胞非霍杰金氏淋巴瘤在血液系统肿瘤中占据重要地位,传统的化疗和放疗虽已取得一定效果,但仍不能让人满意。本实验以 Burkitt 淋巴瘤细胞株 Raji 细胞为研究对象,发现白桦脂酸可以通过下调 cyclin D3 的表达从而诱导肿瘤细胞发生细胞周期阻滞和凋亡。白桦脂酸来源广泛,不良反应少。随着对其作用机制的深入研究,白桦脂酸有望应用于人类癌症的治疗与预防。

参考文献:

- [1] Yu D, Morris-Natschke S L, Lee K H, *et al.* New developments in naturalproducts-based anti-AIDS research [J]. *Med Res Rev*, 2007, 1: 108-132.
- [2] Mukherjee R, Kumar V, Srivastava S K, *et al.* Betulinic acid derivatives as anticancer agents; structure activity relationship [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2006, 6: 271-279.
- [3] Hanne L Z, Henrik F. Erythrocyte membrane modifying agents and the inhibition of plasmodium falciparum growth; structure-activity relationships for betulinic acid analogues [J]. *Bioorg Med Chem*, 2004, 12: 119-127.
- [4] Hata K, Hori K, Ogasawara H, *et al.* Antileukemic activity of lup-28al-20(29)-en-3-one, a lupane triterpenoid [J]. *Toxicol Lett*, 2003, 143: 1-7.
- [5] Wing-Keung L, Joyce C K H, Florence W K C, *et al.* Apoptotic activity of betulinic acid derivatives on murine melanoma B16 cell line [J]. *Eur J Pharmacol*, 2004, 498: 71-78.
- [6] Zuco V, Supino R, Righetti S C, *et al.* Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines but not normal cells [J]. *Cancer Lett*, 2002, 175: 17-25.
- [7] 张冬梅, 陆建新, 沈爱国, 等. P27 kipi 与细胞周期素 D3 在非霍奇金淋巴瘤中的表达、定位及相互关系 [J]. *中华血液学杂志*, 2005, 26(12): 723-727.