

Desmosdumotin-C A 环衍生物 TEP 诱导 HL-60 细胞凋亡作用机制研究

郭宏举¹, 向卓², 常李荣¹, 史宁¹, 梁海¹, 郑凯音¹, 吴久鸿^{1*}

¹解放军第306医院药学部,北京100101;²解放军第401医院药剂科,青岛266071

摘要:本研究主要探讨毛叶假鹰爪素 C(Desmosdumotin C) A 环衍生物 TEP 诱导人急性白血病 HL-60 细胞凋亡作用及机制。流式细胞技术检测 TEP 诱导细胞凋亡及其对凋亡细胞中 Fas、FasL、Bax、Bcl-2 表达率的影响,透射电镜观察凋亡细胞形态学改变。结果显示 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TEP 作用细胞 24 h 后,细胞可呈现典型的凋亡形态学变化;40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TEP 可明显提高凋亡细胞中 Fas、FasL、Bax 的表达($P < 0.05$),并可明显降低抗凋亡细胞 Bcl-2 的表达($P < 0.05$)。以上实验结果表明毛叶假鹰爪素 C(Desmosdumotin C, Des C) A 环衍生物 TEP 可有效地诱导 HL-60 细胞凋亡,其作用机制可能与上调 Fas、FasL、Bax 表达以及下调 Bcl-2 表达有关。

关键词:毛叶假鹰爪素 C;衍生物;HL-60;凋亡;作用机制

中图分类号:R966

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.9.005

The Effects and Mechanisms of an A ring Derivative of Desmosdumotin-C (TEP) induced Apoptosis in HL-60 Cells

GUO Hong-ju¹, XIANG Zhuo², CHANG Li-rong¹, SHI Ning¹, LIANG Hai¹, ZHENG Kai-yin¹, WU Jiu-hong^{1*}

¹Department of Pharmacy, The 306th Hospital of P. L. A, Beijing 100101, China;

²Department of Pharmacy, The 401th Hospital of P. L. A, Qingdao 266071, China

Abstract: This study focused on the effects of TEP, an A ring derivative of desmosdumotin-C, on the human acute leukemia HL-60 cell apoptosis, and the underlying mechanisms. TEP-induced apoptosis and its effect on Fas, FasL, Bax, Bcl-2 expression were measured by flow cytometry, and the morphological changes of the apoptosis cells were further observed by transmission electron microscope. The results showed that 24 h after 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TEP treatment, the typical apoptotic morphological changes were induced in HL-60 cell. Meantime, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TEP significantly increased Fas, FasL, and Bax expression ($P < 0.05$), and decreased Bcl-2 expression ($P < 0.05$). All the results suggested that TEP effectively induced apoptosis in HL-60 cells, and the mechanism may be involved in upregulating Fas, FasL, Bax expression, and reducing Bcl-2 expression.

Key words: desmosdumotin C; derivative; HL-60 cell; apoptosis; mechanism

毛叶假鹰爪素 C(Desmosdumotin-C)是从番荔枝科假鹰爪属 *Desmos* (*Annonaceae*) 植物毛叶甲鹰爪根中分离得到的一种活性天然产物,为具有新颖化学骨架的黄酮结构类似物^[1],其衍生物具有抗肿瘤^[2]、抗氧化^[3]、神经元保护^[4]等多种生物活性。其中 A 环 4,6,6 三乙基,5 位丙氧基取代,B 环间位硝基取代衍生物 TEP 前期体外活性研究发现具有良好抑制 HL-60 细胞增殖的活性^[5],其作用机制尚未明确,更未见其相关文献报道。因此本实验首次

采用透射电镜观察、流式细胞仪凋亡检测等方法,对 Desmosdumotin-C A 环衍生物 TEP 诱导人急性白血病 HL-60 细胞凋亡作用及其机制进行初步研究。

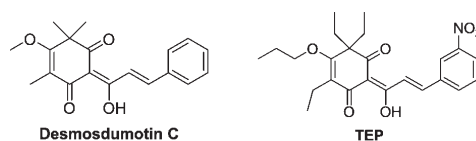


图1 Desmosdumotin-C 和 TEP 的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of desmosdumotin-C and TEP

1 材料与仪器

1.1 试剂与药物

Desmosdumotin-C A 环衍生物 TEP (由解放军

收稿日期:2016-07-01 接受日期:2016-07-27

基金项目:国家自然科学基金(81072546;81470156)

* 通讯作者 Tel:86-10-64879825; E-mail:jiuhongwu2015@163.com

306 医院药学部实验中心合成并提供)。HL-60 为美国 ATCC 公司产品, Anti-Fas antibody [DX2] (批号: ab25633)、Anti-Fas Ligand antibody [B-R17] (批号: ab47175), Mouse IgG2b, 均为 Abcam 公司产品; anti-human Bax PE 抗体(批号: sc-7480 PE)、anti-human Bcl-2 PE(批号: sc-509 PE) 均为 Santa Cruz Biotech 公司产品; APC Annexin V、7-AAD、10 × Binding Buffer 为美国 BD 公司产品; 5% 血清为美国 Hyclone 公司产品; PBS 缓冲液、胰酶均为北京百奥森泰生物技术有限公司产品。青霉素(山东鲁抗集团, 160wu, 批号: 150705); 硫酸链霉素(深圳华南制药有限公司, 1 g, 批号: 141103)。

1.2 主要仪器

十万分之一电子天平: 德国 Sartorius 科学仪器公司; MULISKAN ASCENT MK3 酶标仪: 美国 Thermo 公司; CO₂ 培养箱: 美国 Thermo 公司; 倒置相差显微镜(OLYMPUS CKX41); 移液器: 芬兰 Finnpi-pette 公司; 离心机: 上海安亭科学仪器厂; 流式细胞仪: BDFACSCalibur, 美国 BD 公司。透射电子显微镜(Jeol JEM-1230 型)。

2 实验方法

2.1 细胞培养

HL-60 为悬浮生长细胞, 培养于含 10% 小牛血清、1 × 10⁵ U/L 青霉素、100 g/L 链霉素的 RPMI-1640 培养液中, 于 37 °C 恒温, 5% CO₂ 及饱和湿度的培养箱中培养, 细胞每 3 d 传代 1 次。待细胞数量符合实验要求时, 备用。

2.2 细胞凋亡检测

将不同浓度的 TEP 与 HL-60 细胞作用 24 h, 不含 EDTA 胰酶消化收集细胞, PBS 轻轻洗涤细胞, 1000 rpm 条件下离心 5 min, 重复两次, 收集约 5 × 10⁵ 个细胞, 加入 500 μL 的 Binding Buffer 悬浮细胞。加入 5 μL Annexin V-PE 和 5 μL 7-AAD 染液混匀, 即刻加入 100 μL Buffer 工作液混匀, 4 °C 冰浴放置 30 min 后加 400 μL Buffer 工作液。立即使用流式细胞仪 BDFACSCalibur 检测, 激发波长 488 nm, 发射波长 578 nm, Annexin V-PE 橙红色荧光使用 FL4 通道检测; 激发波长 546 nm, 发射波长 647 nm, 7-AAD 红色荧光使用 FL3 通道检测。

2.3 透射电镜观察

取 40 μg/mL 的 TEP 处理 0、16、24 h 的细胞离心后弃上清, 沉淀用冰预冷的 pH 7.4 PBS 离心洗涤

细胞 2 次, 2.5% 戊二醛磷酸缓冲液 4 °C 固定细胞 4 h, 实验室常规方法固定后、超薄切片, 用透射电子显微镜(Philip) 观察凋亡后细胞形态变化。

2.4 Fas 和 FasL 检测

取 40 μg/mL TEP 作用于 HL-60 细胞 24 h, 加入稀释的 Mouse anti-human Fas 抗体, 以 Mouse IgG1 κ 为同型对照抗体, 在 4 °C 暗处孵育 30 min 后, 用流式细胞仪检测 TEP 作用前后 HL-60 中细胞 Fas 的表达, 定量分析 Fas 阳性细胞百分率; 采用相同的方法, 以 Mouse IgG2b κ 为同型对照抗体, 检测 TEP 作用前后 HL-60 细胞 FasL 的表达, 定量分析 FasL 阳性细胞的百分率。

2.5 Bax 和 Bcl-2 检测

取 40 μg/mL TEP 作用于 HL-60 细胞 24 h, 分别加入 Mouse anti-human Bax PE 抗体、Mouse anti-human Bcl-2 PE 抗体, 以 Rabbit anti-mouse IgG1-PE 为阴性对照, 在 4 °C 暗处孵育 30 min 后, 用流式细胞仪检测 TEP 作用前后 HL-60 细胞 Bax、Bcl-2 的表达, 然后定量分析 Bax、Bcl-2 阳性细胞的百分率。

2.6 统计学处理

所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS13.0 软件进行统计学处理分析, 对所测定结果进行方差齐性检验, 各组间比较使用单因素方差分析检验, 以 $P < 0.05$ 为有统计学意义, $P < 0.01$ 时为极显著性差异。

3 实验结果

3.1 TEP 作用 HL-60 细胞 24 h 后凋亡情况

流式细胞术检测结果表明, 不同浓度的 TEP 作用 24 h 后, HL-60 细胞出现了凋亡现象(结果如图 2), 细胞凋亡率明显高于不加药物的对照组细胞。

3.2 细胞形态学观察

正常条件下生长的 HL-60 细胞为圆形或椭圆形, 长势均一。当 40 μg/mL TEP 作用 16、24 h 后, 可见细胞出现圆缩现象, 胞浆内产生空泡, 并同时出现细胞核形成新月体, 形染色体边缘聚集等典型的细胞凋亡的形态学改变, 部分细胞细胞核内出现凋亡小体, 随着 TEP 作用时间延长上述病变得更为明显(结果如图 3)。

3.3 Fas、FasL 阳性细胞百分率检测

40 μg/mL TEP 作用 HL-60 细胞 24 h 后 Fas、FasL 表达率显著上升, Fas、FasL 阳性细胞的百分率(29.23 ± 1.64、9.49 ± 0.89) 明显高于对照组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$), 结果表明 TEP 上调了

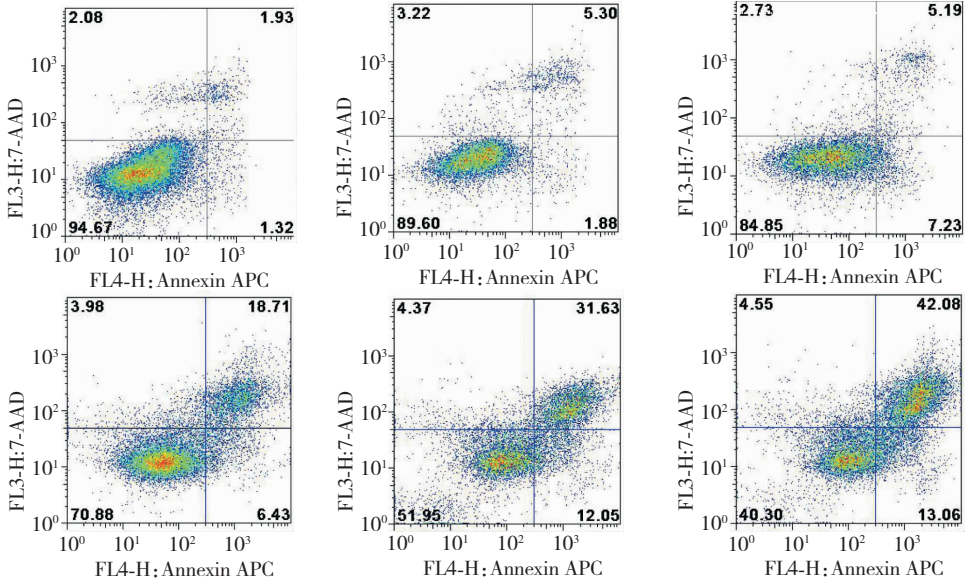


图2 TEP作用24 h的HL-60细胞凋亡情况

Fig. 2 HL-60 cell apoptosis 24 h after TEP treatment

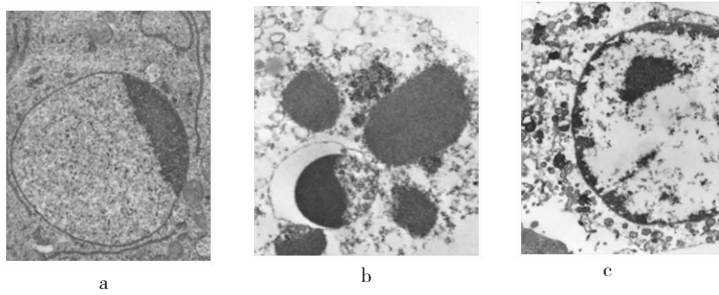


图3 40 μg/mL TEP作用0(a)、16 h(b)、24 h(c)后HL-60细胞形态变化(×10000)

Fig. 3 The morphological changes of HL-60 cells after 40 μg/mL TEP treatment for 0 (a), 16 h (b) and 24 h (c)

靶细胞 Fas、FasL 的表达,从而启动胞内相关凋亡性信号转导通路,是 TEP 诱导肿瘤细胞凋亡的可能作用机制之一。结果如图 4 所示。

3.4 Bax、Bcl-2 阳性细胞百分率检测

40 μg/mL TEP 作用 HL-60 细胞 24 h 后。Bax 表达率明显上升(73.46 ± 4.31), Bcl-2 的表达率则

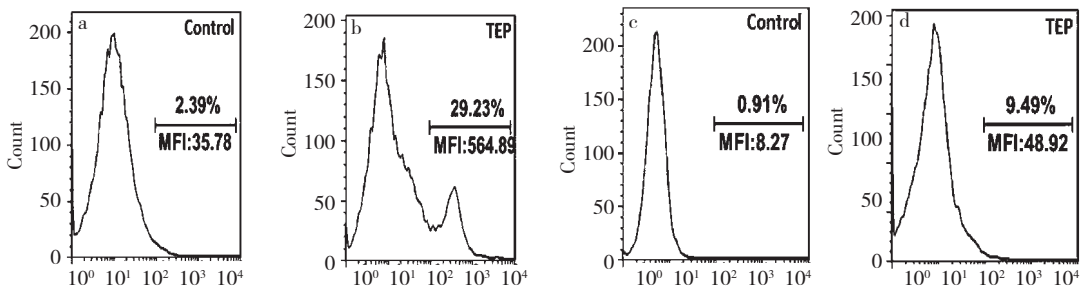


图4 40 μg/mL TEP 作用 HL-60 细胞 24 h 对 Fas、FasL 表达水平的影响

Fig. 4 Fas and FasL expression in HL-60 cells treated with 40 μg/mL for 24 h

注:a:对照 Fas 的表达;b:TEP 作用 24 h Fas 的表达;c:对照 FasL 的表达;TEP 作用 24 h FasL 的表达

a: Fas expression in the control cells;b: Fas expression in the cells treated with 40 μg/ml TEP for 24 hours;c: FasL expression in the control cells;d: FasL expression in the cells treated with 40 μg/ml TEP for 24 hours.

明显下降(3.52 ± 0.21), 差异具有统计学意义($P < 0.05$), 结果表明 TEP 上调了靶细胞 Bax 的表达, 下调抗凋亡基因 Bcl-2 的表达, 使 Bcl-2/Bax 的比值

下降, 是 TEP 诱导肿瘤细胞凋亡的另一条可能作用机制。结果见图 5。

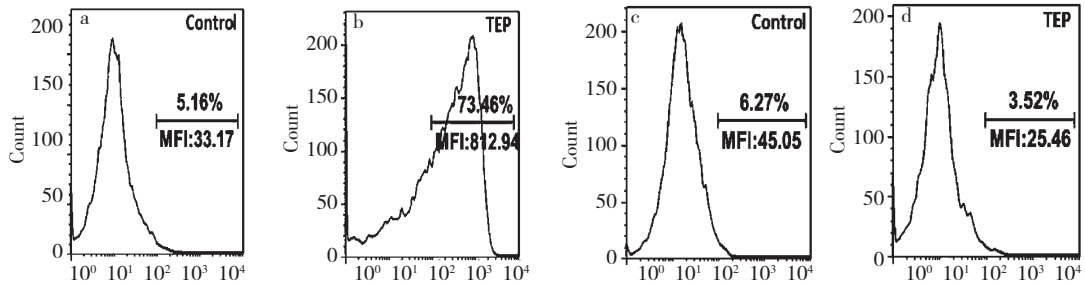


图 5 40 $\mu\text{g}/\text{Ll}$ TEP 作用 HL-60 细胞 24 h 对 Bax、Bcl-2 表达水平的影响

Fig. 5 Bax and Bcl-2 expression in HL-60 cells treated with 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 24 h

注: a: 对照 Bax 的表达; b: TEP 作用 24 h Bax 的表达; c: 对照 Bcl-2 的表达; d: TEP 作用 24 h Bcl-2 的表达

Note: a: Bax expression in the control cells; b: Bax expression in the cells treated with 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TEP for 24 h; c: Bcl-2 expression in the control cells; d: Bcl-2 expression in the cells treated with 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TEP for 24 h

4 讨论与结论

毛叶假鹰爪素 (Desmosdumotin-C) 体外对多种肿瘤细胞株均有显著抑制作用^[6]。Des-C 活性衍生物对 TNF α 诱导的 NF- κ B 信号通路有抑制效果^[7]。能选择性作用于细胞 G2/M 期^[8], 具有调节纺锤体和染色体分离的作用。

抗肿瘤化合物除直接作用相应靶点外, 还可以通过激活凋亡基因而诱导肿瘤细胞凋亡。化合物作为外部因素是否能诱导细胞凋亡, 很大程度上取决于细胞凋亡信号传递系统。虽然不同凋亡诱导物及不同细胞的凋亡机制有差异, 但凋亡途径主要有以下几条: (1) 线粒体途径, (2) FasL/Fas 途径, (3) 神经酰胺途径, (4) P53 途径^[9]。而多基因调控也正是参与这些凋亡途径的主要因素, 这些基因主要有: (1) Bcl-2 基因家族, (2) 原癌基因 (oncogen), (3) 野生型 P53 基因 (wtP53), (4) Fas 和 FasL。Fas/FasL 属于肿瘤坏死因子 (TFN) 家族, 两者作用后可诱导 HL-60 细胞凋亡^[10]。本研究结果显示, 未经过 TEP 作用的 HL-60 细胞 Fas 及 FasL 表达率较低。当 HL-60 细胞经过 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TEP 作用 24 h 后, 其 Fas 和 FasL 阳性细胞表达率明显升高, 百分率为 ($29.23 \pm 1.64, 9.49 \pm 0.89$)%, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。提示 TEP 上调了 HL-60 细胞中 Fas 及 FasL 表达, 继而启动相关胞内死亡信号转导通路, 这可能是 TEP 诱导凋亡作用的机制之一。Bax 和 Bcl-2 基因是研究最早的与凋亡有关的基因, Bax 是促凋亡

因子, Bcl-2 是凋亡抑制因子, 两者互为一对同源蛋白, Bax 既可以单独形成同聚体, 也可以与 Bcl-2 形成异二聚体, 如 (Bcl-2/Bcl-2、Bcl-2/Bax、Bax/Bax), 二者之间不同的聚合比例影响着细胞不同的存亡走向^[11]。本研究结果显示, 经 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TEP 作用 24 h 后, HL-60 细胞中 Bax 表达率明显上升 (73.46 ± 4.31)%, Bcl-2 的表达率则明显下降 (3.52 ± 0.21)%, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。Bcl-2/Bax 的比例显著下调, 诱导了 HL-60 细胞的凋亡。表明了 TEP 下调 Bcl-2/Bax 比例可能是诱导 HL-60 肿瘤细胞凋亡的另一条作用机制。

透射电镜观察结果也证明了以上结果, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TEP 作用 HL-60 细胞 16 h 后, HL-60 细胞出现了圆缩现象, 同时胞浆内产生大量空泡。开始出现染色体边缘聚集现象。24 h 后 HL-60 细胞核形成新月体, 部分细胞细胞核内出现凋亡小体形等典型的细胞凋亡形态。

上述实验结果表明, TEP 诱导凋亡是其抑制 HL-60 增殖的主要机制。其作用的分子机制可能是通过影响 Fas、FasL、Bax、Bcl-2 的表达而影响信号传导通路, 进而诱导细胞凋亡发挥抗肿瘤作用。

参考文献

- 1 Wu JH, Mcphailb AT, Bastowc KF, et al. Desmosdumotin C, a novel cytotoxic principle from *Desmos dumosus*. *Tetrahedr Lett*, 2002, 43: 1391-1393.
- 2 Shu YS (舒彦松), Zhang XH (张学辉), Xiang Z (向卓), et al. Synthesis and antitumor activity evaluation of desmosdumo-

- tin C derivatives. *Pharm J Chin People's Liberation Army* (解放军药学报), 2013, 29:403-406.
- 3 Liang H (梁海), Xiang Z(向卓), Ma TX(马天翔), *et al.* Synthesis and antioxidant activities of novel chalcone FMC and its analogues. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2014, 49:1939-1944.
 - 4 Guo HJ (郭宏举), Liang H (梁海), Xiang Z(向卓), *et al.* Protective effects of a chalcone derivative G01 on H₂O₂-induced oxidative damage in cortical neurons of mice. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2015, 28:2138-2141.
 - 5 Xiang Z (向卓). Design, synthesis and mechanism of *in vitro* anti-tumor, anti-oxidation action study of novel chalcones Des-C, FMC analogous. China: The Fourth Military Medical University (第四军医大学), MSc. 2014.
 - 6 Li EZ (厉恩振), Song MY(宋明玉), Xiang Z(向卓), *et al.* Synthesis and antitumor evaluation of desmosdumotin C derivatives on B-ring. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2013, 48:924-929.
 - 7 Hu CM (胡春梅). Studies on designation and synthesis of the leading compound desmosdumotin C derivatives. China: Academy of Military Medical Sciences (中国人民解放军军事医学科学院), MSc. 2007.
 - 8 Nakagaw GK, Wu PC, Bastowc KF, *et al.* Antitumor agents 283. Further elaboration of desmosdumotin C analogs as potent antitumor agents; activation of spindle assembly checkpoint as possible mode of action. *Bioorg Med Chem*, 2011, 19:1816-1822.
 - 9 Roberta VT, Vincenzo C, Barbara T, *et al.* Activation of p53-dependent responses in tumor cells treated with a PARC-interacting peptide. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 368:350-356.
 - 10 Drikes W, Schone S, Uphoff C, *et al.* Expression and function of CD95 (Fas/ Apo-1) in leuke mialymphoma tumor lines. *Br J Haematol*, 1997, 96:584-593.
 - 11 Weaver CV, Liu SP. Differentially expressed pro-and anti-apoptogenic genes in response to benzene exposure; Immunohistochemical localization of p53, Bag, Bad, Bax, Bcl-2, and Bcl-w in lung epithelia. *Exp Toxicol Pathol*, 2008, 59:265-272.
-
- (上接第 1401 页)
- 6 Long HY (龙海燕), Liu YM(刘雁鸣), Huang XY(黄晓燕), *et al.* Determination of flavonoids content in Dengzhan Xixin Jiaonang by UV spectrophotometry. *Central South Pharm* (中南药学), 2011, 9:766-769.
 - 7 Cai LZ(蔡丽珠), Feng C(冯春), Luo SS(罗珊珊), *et al.* Determination of scutellarin in Dengzhanxixin mixture (sugar-free) by HPLC. *J Yunnan Univ Tradit Chin Med* (云南中医学院学报), 2014, 37(6):5-8.
 - 8 Sun J(孙佳), Zheng L(郑林), Wang AM(王爱民), *et al.* Determination of six components in *Erigeron breviscapus* of Guizhou by UPLC. *Chin J Pharm* (中国医药工业杂志), 2013, 44:673-676.
 - 9 Hou JY(侯靖宇), Lu Y(陆苑), Pan J(潘洁), *et al.* Simultaneous determination of six components in *Inula cappa* by UPLC-MS. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2015, 27:1917-1921.
 - 10 Hu J(胡杰), Li YT(李月婷), Hou JY(侯靖宇), *et al.* Simultaneous determination of five main index compounds in Radix Paeoniae Rubra by UPLC-MS. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2015, 27:282-285.
 - 11 Liu P(刘鹏), Zhou J(周军), Qin XY(秦向阳), *et al.* Determination of scutellarin in *Erigeron breviscapus* from different places by HPLC. *J Fourth Mil Med Univ* (第四军医大学学报), 2006, 27:781-783.
 - 12 Zheng L(郑林), Mu JL(牟景丽), Huang Y(黄勇), *et al.* Simultaneous determination of seven ingredients in Xinshao Freeze-dried Powder Injection by UPLC-MS/MS. *Chin J New Drugs* (中国新药杂志), 2014, 23:106-109.