

· 论 著 ·

β -榄香烯抑制人骨髓瘤细胞 RPMI-8226 增殖的实验研究*

陈浩¹, 师亮², 王素云¹, 杨敬慈¹, 潘峻^{1△}

(1. 河北医科大学附属第二医院血液科, 石家庄 050000; 2. 山西医科大学组胚教研室, 太原 030001)

摘要:目的 研究 β -榄香烯对人骨髓瘤 RPMI-8226 细胞增殖、周期和凋亡的影响。方法 用噻唑蓝(MTT)法检测 β -榄香烯对骨髓瘤 RPMI-8226 细胞增殖的影响; Annexin V/PI 双标流式术检测 β -榄香烯对骨髓瘤 RPMI-8226 细胞周期、细胞凋亡的影响; Hoechst33342/PI 双染荧光显微镜观察 β -榄香烯处理后骨髓瘤 RPMI-8226 细胞形态学变化。结果 β -榄香烯对 RPMI-8226 骨髓瘤细胞生长具有显著抑制作用, 呈浓度和时间依赖性。 β -榄香烯处理后, 与对照组相比 G0/G1 细胞比例显著升高, 而 S、G2/M 细胞比例降低。 β -榄香烯作用 48 h 可诱导骨髓瘤细胞凋亡, 凋亡率随药物浓度而递增。结论 β -榄香烯可有效抑制人骨髓瘤细胞增殖; 其抑制作用与细胞周期阻滞和细胞凋亡激活有关。

关键词: β -榄香烯; 多发性骨髓瘤; 细胞增殖; 细胞周期; 细胞凋亡

中图分类号: R733.3; R73-3

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)09-1048-03

Effect of β -elemene on proliferation of human multiple myeloma cells RPMI-8226*

CHEN Hao¹, SHI Liang², WANG Su-yun¹, et al.

(1. Department of Hematology, Second Affiliated Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050000, China;

2. Department of Histology and Embryology, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of β -elemene on proliferation, cell cycle and apoptosis of human multiple myeloma RPMI-8226 cells. **Methods** The effect of β -elemene on the growth of human multiple myeloma RPMI-8226 cells was studied through MTT assay. The effects of β -elemene on the cell cycle and apoptosis of RPMI-8226 cells was studied by combined Annexin-V protein iodide staining. The morphological changes of RPMI-8226 cells was studied by combined Hoechst33342-PI staining after treatment with β -elemene. **Results** β -elemene inhibited the proliferation of RPMI-8226 cells in a time- and dose-dependent manner. Compared with the control cells, after the treatment with β -elemene, the proportions of the RPMI-8226 cells in the G0/G1 phase increased, and the proportions of the RPMI-8226 cells in the S and G2/M phases decreased. Treatment with β -elemene for 48 h induced apoptosis of RPMI-8226 cells in a dose-dependent manner. A lot of the typical cells with apoptosis were seen by combined Hoechst33342-PI staining after treatment with β -elemene. **Conclusion** β -elemene is able to inhibit the proliferation of RPMI-8226 cells by arresting the cell cycle and inducing the cell apoptosis.

Key words: β -elemene; multiple myeloma; proliferation; cell cycle; apoptosis

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是骨髓内浆细胞异常增生的一种血液系统恶性肿瘤,目前尚缺乏有效治疗手段,故寻找新的治疗方法尤为必要^[1]。 β -榄香烯(β -elemene)是具有抗肿瘤功效的中药温莪术的有效提取物^[2]。在对实体肿瘤的研究中发现, β -榄香烯可有效诱导瘤细胞凋亡,显著抑制其增殖^[3-4]。但其对骨髓瘤影响如何,目前尚不清楚。本研究采用不同浓度 β -榄香烯处理体外培养的人骨髓瘤 RPMI-8226 细胞,观察 β -榄香烯对骨髓瘤细胞增殖、周期、凋亡等影响,为榄香烯用于对骨髓瘤的临床治疗提供理论依据。

1 材料与方

1.1 细胞培养 人骨髓瘤 RPMI-8226 细胞由河北医科大学生物科技总公司提供。在含 10% 胎牛血清、青霉素 100 u/mL、链霉素 120 μ g/mL 的 RPMI-1640 中 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱常规培养,生长曲线测试倍增时间为(24 \pm 1)h,1~2 d 传代 1 次。所有实验均在细胞处于对数生长期时进行。

1.2 药品与试剂 β -榄香烯购自大连金港制药有限公司,使

用前溶于磷酸盐缓冲液(PBS)中,配成 1 000 μ mol/L 母液,超滤除菌,-20 $^{\circ}$ C 保存。碘化丙啶(PI)、噻唑蓝(MTT)购自 Sigma 公司。Annexin V/PI 双染试剂盒购于南京凯基生物公司。Hoechst33342/PI 双染试剂盒购于河北渤海生物公司。

1.3 细胞增殖 采用 MTT 法检测。将处于对数生长期的 RPMI-8226 细胞(2×10^5 /mL)接种于 96 孔板,每孔 200 μ L。加入终浓度分别为 10、20、40、80 μ mol/L 的 β -榄香烯处理,对照组加入等体积的二甲基甲砒(DMSO),每组各设 4 个平行孔;分别于药物作用后 24、48、72 h 时,每孔加入 5 g/L MTT 20 μ L,继续孵育 4 h,离心去除上清液后各加入 DMSO 200 μ L,轻微振荡使结晶溶解后,以酶标仪 490 nm 波长处测定各孔吸光度(A)值,计算增殖抑制率。增殖抑制率=(1-实验组 A 值/对照组 A 值) \times 100%。

1.4 流式细胞仪检测细胞周期及细胞凋亡 按 Annexin V-异硫氰酸荧光素(FITC)试剂盒操作流程,不同浓度 β -榄香烯作用 48 h 后收集细胞, PBS 充分洗涤,调整细胞密度为 $1 \times$

* 基金项目:河北省科技攻关计划项目(072761130)。 Δ 通讯作者,电话:(0311) 66002841;E-mail:lingpan20002000@yahoo.com.cn。

表 1 β -榄香烯对骨髓瘤 RPMI-8226 细胞增殖的抑制作用($\bar{x} \pm s, n=4$)

β -榄香烯($\mu\text{mol/L}$)	24 h		48 h		72 h	
	吸光度	抑制率(%)	吸光度	抑制率(%)	吸光度	抑制率(%)
0	0.216 7 \pm 0.024 1	—	0.531 5 \pm 0.010 4	—	0.822 2 \pm 0.044 1	—
10	0.169 5 \pm 0.013 9	21.79	0.332 0 \pm 0.006 2	37.54	0.455 8 \pm 0.005 7	44.56
20	0.147 2 \pm 0.003 1	32.06	0.227 0 \pm 0.013 4	57.33	0.285 1 \pm 0.011 8	65.32
40	0.122 6 \pm 0.012 1	43.42	0.145 7 \pm 0.015 6	72.58	0.133 7 \pm 0.014 2	83.74
80	0.102 6 \pm 0.002 3	52.64	0.126 8 \pm 0.010 4	76.14	0.075 6 \pm 0.014 6	90.81

—:表示此项无数据。

10⁶/mL。取 400 μL 细胞悬液,加入 5 μL 的 Annexin V-FITC,混匀,室温避光孵育 10 min,离心去上清液,重悬细胞后加入 PI 使其终浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$,避光作用后上机检测细胞周期(FACScaliber,美国 BD 公司)。同法,另取细胞检测细胞凋亡。

1.5 Hoechst 33342/PI 双染荧光显微镜观察 不同浓度 β -榄香烯作用 48 h 后收集细胞,PBS 充分洗涤。1 000 r/min 离心弃上清,1 mL 培养液重悬,避光加入 10 μL Hoechst 33342,混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 8 min,PBS 冲洗 3 次去除 Hoechst 33342,再加入终浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PI 染液,避光染色 5 min,转移至载玻片,荧光显微镜下分别于 350 nm 及 488 nm 激发荧光,200 倍镜下观察。(正常细胞的细胞核为暗蓝色,早期凋亡细胞的细胞核呈亮蓝色,中、晚期凋亡细胞的细胞核呈淡红色或深红色)。

1.6 统计学方法 采用 SPSS11.0 软件包进行 *t* 检验,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结 果

2.1 β -榄香烯对骨髓瘤 RPMI-8226 细胞体外生长的影响 β -榄香烯作用 24 h 后,10 $\mu\text{mol/L}$ 组对细胞增殖已产生抑制作用,抑制率达 21.79%。随着浓度增加,细胞增殖抑制作用增强,呈浓度依赖性($P=0.002 3$);随着作用时间延长,各组增殖抑制率升高,72 h 后 80 $\mu\text{mol/L}$ 组抑制率高达 90.81%,呈时间依赖性($P=0.000 0$),见表 1。

2.2 β -榄香烯对骨髓瘤 RPMI-8226 细胞周期的影响 β -榄香烯处理 48 h 后收集各组细胞,用流式细胞仪检测各期细胞比例。数据显示:各药物处理组 G₀/G₁ 细胞比例较对照组显著增加;G₂/M、S 期细胞比例较对照组减少,见表 2。

表 2 β -榄香烯作用 48 h 后对骨髓瘤 RPMI-8226 细胞周期的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

β -榄香烯($\mu\text{mol/L}$)	各期细胞所占比例		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
0	47.87 \pm 5.67	37.72 \pm 3.81	14.41 \pm 2.26
10	54.68 \pm 4.03**	33.96 \pm 2.04*	11.36 \pm 1.79*
20	60.11 \pm 5.78**	30.15 \pm 2.42*	8.63 \pm 1.05**
40	65.26 \pm 6.36**	27.84 \pm 1.89**	4.94 \pm 1.32**
80	71.33 \pm 5.81**	25.21 \pm 2.01**	2.46 \pm 0.98**

与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较,* : $P<0.05$,** : $P<0.01$ 。

2.3 β -榄香烯对骨髓瘤 RPMI-8226 细胞凋亡的影响 AnnexinV/PI 双标流式术检测不同浓度 β -榄香烯处理 48 h 后对骨髓瘤 RPMI-8226 细胞凋亡的影响,结果发现:与对照组相比,10 $\mu\text{mol/L}$ 组的凋亡率已有明显增加,差异有统计学意义

($P<0.01$);随 β -榄香烯浓度的增加,药物组骨髓瘤细胞凋亡率递增,见表 3。

表 3 β -榄香烯作用 48 h 后对骨髓瘤 RPMI-8226 细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

β -榄香烯($\mu\text{mol/L}$)	凋亡率(%)
0	5.41 \pm 1.13
10	22.14 \pm 3.81*
20	39.53 \pm 3.12*
40	58.41 \pm 2.84*
80	65.42 \pm 2.11*

* :与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, $P<0.01$ 。

2.4 Hoechst33342/PI 双染荧光显微镜观察 对照组镜下可见大量暗蓝色正常骨髓瘤 RPMI-8226 细胞,偶见凋亡细胞,见封 3 图 1A。10、20 $\mu\text{mol/L}$ β -榄香烯处理组镜下可见典型凋亡细胞,以早期凋亡细胞为主,细胞核呈亮蓝色,染色质凝集,或核呈分叶、碎片状边集,见封 3 图 1B。40、80 $\mu\text{mol/L}$ β -榄香烯处理组镜下可见大量凋亡细胞,中、晚期凋亡细胞增多,细胞核呈淡红色或深红色,染色质片段化凝集呈多个亮点;还可见少量体积增大、核溶解、深红色或亮红色的细胞,见封 3 图 1C。

3 讨 论

多发性骨髓瘤是骨髓内浆细胞异常增生的一种恶性肿瘤,目前尚缺乏有效的治疗手段^[1]。 β -榄香烯是抗肿瘤中药温莪术的有效提取物^[2]。在对脑胶质瘤、视网膜母细胞瘤等实体肿瘤研究中发现: β -榄香烯能有效减少肿瘤细胞数量,同时对正常细胞毒副作用小^[3-4]。Yu 等^[5]用 β -榄香烯处理 HL-60、K562 等白血病细胞株,发现其可显著抑制多种白血病细胞增殖。鉴于此,本研究首先通过 MTT 实验观察 β -榄香烯对人骨髓瘤细胞 RPMI-8226 体外生长的影响,结果发现不同浓度 β -榄香烯对 RPMI-8226 细胞增殖均有抑制作用,且呈浓度和时间依赖性。提示 β -榄香烯可抑制人骨髓瘤细胞 RPMI-8226 增殖。但其具体机制、体内疗效尚有待于进一步研究。

骨髓瘤属于一种细胞周期性疾病,细胞周期调节失控是肿瘤细胞无限增殖的根本原因^[6]。本研究中,非药物处理组骨髓瘤细胞出现高比例 S 期、G₂/M 期细胞也证实这一点。经 β -榄香烯处理后,骨髓瘤 S 期、G₂/M 期细胞比例不同程度下降,而 G₀/G₁ 细胞比例显著升高,提示 β -榄香烯可能阻滞细胞生长周期于 G₀/G₁ 期。这与 Sun 等^[7]在子宫颈癌细胞的研究结果基本一致。 β -榄香烯对细胞周期的阻滞一方面减缓骨髓瘤细胞增殖的速度,另一方面增加瘤细胞发生细胞凋亡的概率^[8]。

愈来愈多的研究表明,骨髓瘤细胞无序增殖与细胞凋亡紊乱密切相关^[9]。本研究结果发现,非药物处理组骨髓瘤细胞凋亡率明显较药物处理组低,进一步说明凋亡异常是骨髓瘤发病的重要原因。本实验中经 β -榄香烯处理后骨髓瘤细胞 RPMI-8226 增殖显著受抑,为明确其原因,本研究采用流式细胞术检测 β -榄香烯对骨髓瘤细胞凋亡的影响,结果发现:10 μ mol/L 组的凋亡率已较对照组有明显增加;随着 β -榄香烯浓度增加,药物组骨髓瘤细胞凋亡率递增,提示 β -榄香烯可诱导体外培养的骨髓瘤细胞 RPMI-8226 凋亡。同时 Hoechst33342/PI 双染细胞形态学观察亦发现,不同浓度 β -榄香烯处理组镜下均出现凋亡细胞,可见典型凋亡形态学改变,进一步证实 β -榄香烯可通过诱导人骨髓瘤细胞 RPMI-8226 凋亡,抑制其增殖。其作用机制可能与下列因素有关:(1) β -榄香烯增加细胞内氧自由基(如: H_2O_2)产生,启动细胞凋亡^[5];(2) β -榄香烯影响凋亡相关基因表达,激活凋亡最终执行者——Caspase 家族^[10];(3) β -榄香烯改变线粒体膜电位和细胞内 Ca^{2+} 浓度,启动内源性细胞凋亡机制^[5]。

本研究结果表明, β -榄香烯可阻滞骨髓瘤细胞生长周期,激活细胞凋亡通路,导致体外培养的人骨髓瘤细胞 RPMI-8226 增殖抑制。尽管其具体机制及体内疗效尚有待于进一步研究说明,但结合 β -榄香烯在长期临床应用中表现出的高效、低毒、廉价等特点,提示 β -榄香烯在骨髓瘤临床治疗中有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] Dmoszynska A. Diagnosis and the current trends in multiple myeloma therapy[J]. *Pol Arch Med Wewn*, 2008, 118(10):563.
- [2] Peng X, Zhao Y, Liang X, et al. Assessing the quality of RCTs on the effect of beta-elemene, one ingredient of a Chinese herb, against malignant tumors[J]. *Contemp Clin Trials*, 2006, 27(1):70.
- [3] Yao YQ, Ding X, Jia YC, et al. Anti-tumor effect of beta-elemene in glioblastoma cells depends on p38 MAPK activation[J]. *Cancer Lett*, 2008, 264(1):127.
- [4] Zhao J, Li QQ, Zou B, et al. In vitro combination characterization of the new anticancer plant drug beta-elemene with taxanes against human lung carcinoma[J]. *Int J Oncol*, 2007, 31(2):241.
- [5] Yu Z, Wang R, Xu L, et al. N-(beta-Elemene-13-yl) tryptophan methyl ester induces apoptosis in human leukemia cells and synergizes with arsenic trioxide through a hydrogen peroxide dependent pathway [J]. *Cancer Lett*, 2008, 269(1):165.
- [6] Lima M, Teixeira Mdos A, Fonseca S, et al. Immunophenotypic aberrations, DNA content, and cell cycle analysis of plasma cells in patients with myeloma and monoclonal gammopathies[J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2000, 26(6):634.
- [7] Sun Y, Liu G, Zhang Y, et al. Synthesis and in vitro antiproliferative activity of beta-elemene monosubstituted derivatives in HeLa cells mediated through arrest of cell cycle at the G1 phase[J]. *Bioorg Med Chem*, 2009, 17(3):1118.
- [8] Alenzi FQ. Links between apoptosis, proliferation and the cell cycle[J]. *Br J Biomed Sci*, 2004, 61(2):99.
- [9] 陈幸华. 血液肿瘤治疗的现状与前景[J]. *重庆医学*, 2003, 32(10):1281.
- [10] Li QQ, Wang G, Zhang M, et al. beta-Elemene, a novel plant-derived antineoplastic agent, increases cisplatin chemosensitivity of lung tumor cells by triggering apoptosis [J]. *Oncol Rep*, 2009, 22(1):161.
- [1] (上接第 1047 页)
- [5] 杨宓, 邓锋, 李勇, 等. 转化生长因子 β_1 在下颌压缩成骨过程中的表达研究[J]. *重庆医学*, 2008, 37(11):1189.
- [6] Kaigler D, Cirelli JA, Giannobile WV. Growth factor, delivery for oral and periodontal tissue engineering[J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2006, 3(5):647.
- [7] 徐卫东, 赵建国. 骨缺损的局部基因治疗[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(10):1992.
- [8] Akin MS, Einhorn TA. Recombinant human bone morphogenetic proteins in the treatment of fractures[J]. *Foot Ankle Clin*, 2005, 12(4):639.
- [9] Nakashima M, Reddi AH. The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering[J]. *Nat Biotechnol*, 2003, 21:1025.
- [10] 邵长艳, 吴钦贞, 姜广水, 等. pIRES-BMP₂ 治疗牙髓暴露的实验研究[J]. *山东医药*, 2005, 45(1):23.
- [11] Tourriere H, Chebli K, Zekri L, et al. The Ras GAP-associated en-doribonuclease G3BP assembles stress granules [J]. *J Cell Biol*, 2003, 160(6):823.
- [12] 徐忠焯, 程远, 朱晓峰, 等. 携带 IRES 的 hBDNF 绿色荧光蛋白表达载体的构建和鉴定[J]. *重庆医学*, 2008, 37(10):1057.
- [13] 陈芳琳, 陈正堂. 绿色荧光蛋白基因标记的肺癌细胞株的建立[J]. *重庆医学*, 2007, 36(19):1938.
- [14] Kimmel E. Cavitation bioeffects [J]. *Crit Rev Biomed Eng*, 2006, 34(2):105.
- [15] Shen ZP, Brayman AA, Chen L, et al. Ultrasound with microbubbles enhances gene expression of plasmid DNA in the liver via intraportal delivery[J]. *Gene Ther*, 2008, 15(16):1147.
- [16] Porter TR. The utilization of ultrasound and microbubbles for therapy in acute coronary syndromes[J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 83(4):636.

(收稿日期:2009-08-24 修回日期:2009-10-20)

(收稿日期:2009-09-09 修回日期:2009-10-20)