

〔文章编号〕 1007-0893(2021)06-0024-03

DOI: 10.16458/j.cnki.1007-0893.2021.06.008

# 和厚朴酚联合三氧化二砷诱导骨髓瘤细胞凋亡的作用机制

范佳鑫 吴建伟 何亚利 李元明 郑 荣

(暨南大学附属江门中医院 江门市五邑中医院, 广东 江门 529000)

〔摘要〕 目的: 探究和厚朴酚(HNK)联合三氧化二砷( $As_2O_3$ )诱导人多发性骨髓瘤RBM18226细胞株的凋亡作用机制。方法: 不同浓度的HNK、 $As_2O_3$ 单药作用于细胞24 h、48 h、72 h后, 采用CCK-8法检测细胞增殖抑制率; 应用Annexin V-FITC/PI双染及PI单染法流式细胞术检测各处理组细胞凋亡和周期分布情况; 采用Western blot法检测细胞中Bcl-2、Bax、Caspase-3蛋白表达水平。结果: HNK与 $As_2O_3$ 单药对RBM18226细胞增殖具有抑制作用, 呈时间和剂量依赖性; HNK与 $As_2O_3$ 单药能有效诱导细胞凋亡, 两药联合后对细胞的诱导凋亡作用较单药显著, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ); HNK和 $As_2O_3$ 单药可使骨髓瘤细胞阻滞在S期, 两药联合可增强诱导细胞分化作用, 使细胞由G1、G2期进入S期, 差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。联合用药时能够降低细胞的Bcl-2水平、增加Caspase-3以及BAX水平表达。结论: HNK及 $As_2O_3$ 联合对人多发性骨髓瘤RBM18226细胞株具有协同杀伤作用, 该作用可能通过激活凋亡相关信号通路来诱导凋亡。

〔关键词〕 多发性骨髓瘤; RBM18226细胞株; 和厚朴酚; 三氧化二砷

〔中图分类号〕 R 738.1 〔文献标识码〕 A

## The Effect of Proliferation Inhibition on RBM18226 Cells by Combining Honokiol with Arsenic Trioxide

FAN Jia-xin, WU Jian-wei, HE ya-li, LI Yuan-ming, ZHENG Rong

(Jiangmen Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Jinan University, Wuyi Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Jiangmen 529000)

〔Abstract〕 Objective To explore the potential mechanism of honokiol combined with arsenic trioxide on proliferation to Multiple myeloma RBM18226 cells. Methods After different concentrations of HNK and  $As_2O_3$  acted on the cells for 24 h, 48 h, 72 h, the cell proliferation inhibition rate was detected by the CCK-8 method; the AnnexinV-FITC/PI double staining and PI single staining method were used for flow cytometry detection of apoptosis and cycle distribution for each group; Western blot was used to detect the expression levels of Bcl-2, Bax, and Caspase-3 proteins in the cells. Results The inhibitory effects of honokiol and arsenic trioxide on the proliferation of RBM18226 cells were time and dose-dependent, and the cell cycle was obviously blocked. Both of them could decrease the expression of bcl-2 protein and increase the expression of Bax and caspase-3 protein, Compared with single drug-treatment group, the cell survival rate and the apoptosis rate is higher in combined drug-treatment group. Conclusion Honokiol combined with Arsenic trioxide could effectively inhibit the proliferation of RBM18226 cells, Which may be associated with the downregulation of Bcl-2 and the upregulation of Bax and caspase-3 protein expression.

〔Key Words〕 Primary myeloma; RBM18226 cells; Honokiol; Arsenic trioxide

多发性骨髓瘤是一种单克隆浆细胞恶性增殖并分泌大量单克隆免疫球蛋白, 造成正常多克隆免疫球蛋白分泌被抑制。随着新药出现, 该病的缓解率及生存率有所提高, 但仍存在部分耐药患者, 可以尝试在传统中医药中寻找增效减毒方案。和厚朴酚(honokiol, HNK)是一种源于木兰科植物厚朴根茎和皮的生物活性成分, 它具有多种生物效应<sup>[1]</sup>, 对人β细胞慢性淋巴细胞性白血病, 多发性骨髓瘤具有诱导细胞凋亡和生长抑制的作用<sup>[2-3]</sup>。而三氧化二砷(arsenic trioxide,  $As_2O_3$ ) (砒霜)作为中医药的抗肿瘤药物, 在骨髓瘤治疗中也有一定疗效。本研究重点以人多发性骨髓瘤RBM18226细胞株为研究对象, 进行下述报道。

### 1 资料与方法

#### 1.1 基本资料

人RBM18226细胞株由南方医科大学珠江医院郭坤元教授所馈赠, 由南方医科大学基础生命科学实验室传代冻存。HNK( $10\text{ mg} \cdot \text{瓶}^{-1}$ , 纯度 $\geq 98\%$ , CAS号: 35354-74-6, 产品编号H4914, 美国Sigma公司); 注射用三氧化二砷( $As_2O_3$ ,  $10\text{ mg}$ )为北京双鹭药业有限公司产品; CCK-8试剂盒为日本同仁株式会社产品; 产自美国Amresco公司的二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO); 产自南京凯基生物科技发展有限公司的AnnexinV-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒; 产自江苏碧云天生物技术研究所的细胞周期检测试剂

〔收稿日期〕 2021-01-04

〔作者简介〕 范佳鑫, 男, 主治医师, 主要从事血液科各疾病的诊断和治疗工作。

盒；抗 Caspase-3 抗体、BCL-2 抗体、β-actin 抗体以及抗兔二抗；RPMI-1640 培养基及胎牛血清（hyclone 公司）。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 在含有浓度为 10 % 的胎牛血清的 RPMI1640 培养液中培养人 RBMI8226 细胞株，需要注意的是在使用前应当将培养液放置于 56 °C 环境中 30 min，以达到灭活补体的效果，随后将培养液放置于湿度饱和，温度控制在 37 °C，5 % CO<sub>2</sub> 的培养箱内，结合细胞的实际生长情况传代换液，并选取相应数量生长期的细胞开展实验。

1.2.2 细胞增殖抑制率检测 通过 CCK-8 检测 HNK 及 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 单药及联合用药对细胞的增殖抑制，实验步骤按照说明书进行操作：在 96 孔板中接种密度为 1 × 10<sup>4</sup> · mL<sup>-1</sup> 的细胞，每孔全培的总体积为 100 μL，在本实验中，将所有细胞设无药物处理对照组（con）以及不同浓度的 HNK 单药组、As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 单药组。As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>（终浓度）分别为 1、3、5、10、20、30、40、60 μmol · mL<sup>-1</sup> 共 8 个浓度梯度；HNK（终浓度）分别为 5、8、15、20、30、40、50、60 μmol · mL<sup>-1</sup> 共 8 个浓度梯度，每组设 5 个复孔，置于 37 °C，CO<sub>2</sub> 为 5 %、饱和湿度的培养箱中分别培养 24 h、48 h、72 h，然后每孔加入 CCK-8 工作液 10 μL，继续培养 4 h，用酶标仪测定 450 nm 波长处的吸光值 A（OD）值，实验重复 3 次。按下列公式计算细胞增殖抑制率。细胞增殖抑制率（%）=（1 -（实验组 - 空白组） /（对照组 - 空白组）） × 100 %。

1.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡率及细胞周期百分率 依据上述实验结果细胞分组分为对照组、HNK 组（浓度为 15 μmol · L<sup>-1</sup>）、As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 组（浓度为 6 μmol · L<sup>-1</sup>）、以及 HNK + As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 组（HNK 浓度为 15 μmol · L<sup>-1</sup>，As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 浓度为 6 μmol · L<sup>-1</sup>），当药物作用 24 h 之后按照 1500 r · min<sup>-1</sup> 的速度进行 5 min 离心处理，收集各组细胞，并将其重悬于 1 mL 磷酸缓冲盐溶液（phosphate buffered saline, PBS），其中 0.5 mL 细胞悬液，用 PBS 洗涤 1 次，随后利用 70 % 的乙酸再次重悬，将其放置于 -20 °C 的环境下过夜之后，以 PBS 重新洗涤 1 次，弃上清，并在其中加入 400 μL DNA 染液，随后放置室温条件下，避光染色 30 min，PBS 洗涤 2 次后上流式细胞分析仪对细胞周期进行检测。剩余的 0.5 mL 细胞则加入 500 μL 结合缓冲液，进行细胞重悬，然后分别加入 AnnexinV-FITC 和 PI 各 5 L。放置于室温条件下，避光孵育 15 min，随后上机对细胞凋亡率进行检测。上述实验反复操作 3 次。

1.2.4 Western blot 法检测细胞中 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白表达水平 细胞分组同上，作用 RBMI8226 细胞 24 h 后收集细胞，加入适量的细胞裂解液进行冰浴裂解收集上清液。据目的蛋白的分子量选择分离胶的浓度，采用 Bradford 法测总蛋白浓度。配制备用的 5 % 浓缩胶和 10 % 分离胶。去等量上清液与缓冲液混合后煮沸 5 min。冷却后再上样 50 g。接着进行 SDD-PAGE 电泳和转膜。牛奶封闭后加入

相应的单抗摇晃孵育 2 h。PBS 洗涤孵育单抗的膜条 3 遍，然后结合 HRP- 二抗。用于检测各组蛋白表达。最后化学发光显影、扫描分析。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件分析数据，计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示，采用 t 检验，计数资料用百分比表示，采用  $\chi^2$  检验，P < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HNK 对 RBMI8226 细胞增殖抑制作用

选择不同浓度 HNK 作用 RBMI8226 细胞 24 h、48 h、72h 后检测并计算细胞增殖抑制率。结果显示，HNK 对 RBMI8226 细胞的增殖抑制作用具有时间 - 剂量依赖性，差异具有统计学意义（P < 0.05），见图 1。HNK = 15 μmol · L<sup>-1</sup> 时，24 h 增殖抑制率为（27.14 ± 0.26）%。选取该浓度作为研究浓度与 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 联合用药。

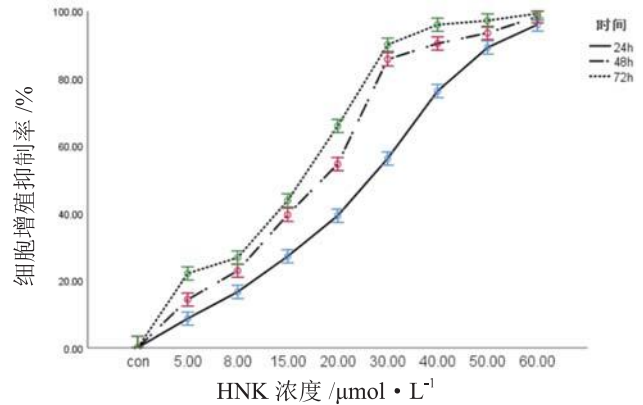


图 1 HNK 作用 RBMI8226 细胞的量效曲线

2.2 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 对 RBMI8226 细胞增殖抑制作用

选择不同浓度 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 作用 RBMI8226 细胞 24 h、48 h、72 h 后检测并计算细胞增殖抑制率。结果显示，As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 对 RBMI8226 细胞的增殖抑制作用具有时间 - 剂量依赖性，差异具有统计学意义（P < 0.05），见图 2。As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> = 6 μmol · L<sup>-1</sup> 时，24 h 增殖抑制率为（31.32 ± 1.15）%。选取该浓度作为研究浓度与 HNK 联合用药。

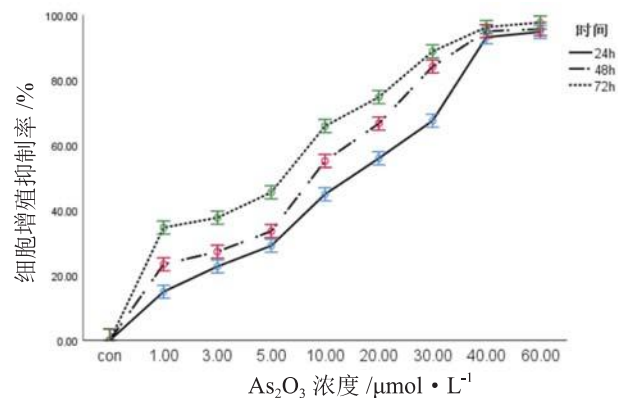
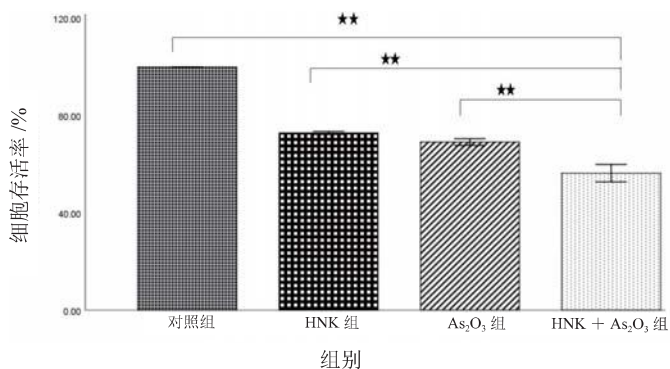


图 2 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 作用 RBMI8226 细胞的量效曲线

2.3 HNK、As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 单药及联合用药对 RBMI8226 细胞存活率的影响。

作用 24 h 后, HNK 组、As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 组及 HNK + As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 组均能抑制 RBMI8226 细胞增殖, 且 HNK + As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 组优于 HNK 组、As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 组, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 3。



不同组别比较 ( $n = 3, \bar{x} \pm s$ ), \*\* $P < 0.01$  (HNK 15  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 6  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )

图 3 各组 RBMI8226 细胞的存活率

2.4 HNK、As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 单药及联合用药对 RBMI8226 细胞凋亡和细胞周期百分率的影响

与对照组比较, HNK 组、As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 组及 HNK + As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 组凋亡率均高于对照组, 且 HNK + As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 组凋亡率高于 HNK 组、As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 组, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 4。

与对照组比较, As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 组、HNK 组均能明显阻滞细胞于 S 期, 相应的 G1 期、G2 期减少, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 联合用药后, HNK + As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 组细胞明显阻滞于 S 期, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 见表 3、封三图 5。

表 3 各组 RBMI8226 细胞不同细胞周期百分率比较 ( $n = 3, \%$ )

组 别	G1	S	G2
对照组	39.75 ± 2.13	38.38 ± 2.09	21.87 ± 2.87
As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 组	40.52 ± 4.24 <sup>a</sup>	57.23 ± 3.48 <sup>a</sup>	2.25 ± 3.04 <sup>a</sup>
HNK 组	40.67 ± 3.18 <sup>a</sup>	55.06 ± 3.48 <sup>a</sup>	4.27 ± 0.35 <sup>a</sup>
HNK+As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 组	33.02 ± 2.65 <sup>a</sup>	61.21 ± 4.13 <sup>a</sup>	5.77 ± 1.13 <sup>a</sup>

与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$

注: As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> — 三氧化二砷; HNK — 和厚朴酚

2.5 各组 RBMI8226 细胞中 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白表达水平

作用 24 h 后, HNK + As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 组 Bax、Caspase-3 的蛋白表达水平高于 HNK 组、As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 组及对照组; 而 bcl-2 蛋白表达水平低于 HNK 组、As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 组, 见图 6。

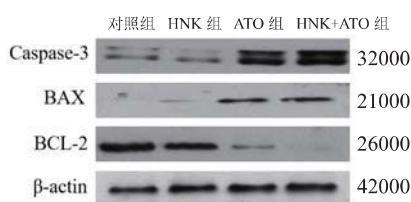


图 6 各组细胞 RBMI8226 中 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白表达电泳图

3 讨论

多发性骨髓瘤近年来发病率逐渐上升, 目前的标准治疗是以蛋白酶体抑制剂、免疫调节剂为主的方案, 但部分患者耐药, 借助中医药来达到减毒增效作用是一治疗途径。HNK 是中药厚朴的提取成分, 具备抗炎抗氧化的独特功效, 相关文献已证实 HNK 可通过多种途径发挥抗肿瘤作用, 如诱导肿瘤细胞凋亡, 阻止肿瘤细胞转移及诱导其分化等 [4-5]。As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 是传统中药砒霜的主要成分, 抗肿瘤效果显著 [6], 在血液系统恶性肿瘤治疗中, As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 的应用价值十分显著。本研究以人多发性骨髓瘤 RBMI8226 细胞株为研究对象, 探讨两药联合对 RBMI8226 细胞株的杀伤机制。

本研究结果显示, HNK 对 RBMI8226 细胞具有增殖抑制作用, 细胞抑制率呈现出随着时间和浓度的增加而上升。联合低浓度的 HNK 与 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 能有效抑制细胞增殖, 并有效地诱导 RBMI8226 细胞凋亡, 且效果优于单药组。两药单药均能够将 RBMI8226 细胞阻滞与 S 期, 两药联合可增强诱导细胞分化作用, 使细胞由 G1、G2 期进入 S 期。在凋亡蛋白表达方面, 联合药物作用后 RBMI8226 细胞后凋亡抑制蛋白 BCL-2 表达水平下调, 而促凋亡蛋白 Caspase-3、BAX 上调, 表明 HNK 联合 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 对人多发性骨髓瘤细胞株 RBMI8226 具有协同细胞毒作用是通过促凋亡信号蛋白的激活同时抑制抑凋亡蛋白的活化实现的。

综上所述, HNK、As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 单药对人骨髓瘤细胞株 RBMI8226 细胞有抑制作用, 但所需浓度较高, 两药低浓度联合用药即能够达到增强协同作用。而两者协同作用可能与细胞周期阻滞于 S 期相关, 还可能与 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白表达变化相关。

[参考文献]

- (1) 陈淑珍. 和厚朴酚的抗肿瘤实验治疗及其分子作用靶点的研究进展 (J). 药学学报, 2016, 51(2): 202-207.
- (2) 范佳鑫, 曾英坚, 翁光祥, 等. 和厚朴酚对 HL-60 细胞增殖抑制作用及其相关机制研究 (J). 中国实验血液学杂志, 2014, 22(6): 1577-1583.
- (3) Arora S, Singh S, Piazza GA, et al. Honokiol: a novel natural agent for cancer prevention and therapy. Curr Mol Med, 2012, 12(10): 1244-1252.
- (4) 周晋, 孟然, 李丽敏, 等. 和厚朴酚对人白血病细胞株和原代细胞的影响. 中华内科杂志, 2003, 42(10): 713-715.
- (5) 陈伟, 林冠文, 张青. 和厚朴酚诱导人非霍奇金淋巴瘤 Raji 细胞凋亡及其可能机制 (J). 南方医科大学学报, 2011, 31(11): 1918-1921.
- (6) Yang MH, Zang YS, Huang H, et al. Arsenic trioxide exerts anti-lung cancer activity by inhibiting angiogenesis. Curr Cancer Drug Targets, 2014, 14(6): 557-566.