

11-羧基- β -乙酰乳香酸对小鼠黑素瘤细胞 B16F10 增殖的抑制作用

王者, 王宏林

(上海交通大学医学院, 上海市免疫学研究所, 上海 200025)

摘要: 分析 11-羧基- β -乙酰乳香酸(AKBA)对小鼠黑素瘤细胞系 B16F10 增殖和凋亡的影响, 探讨其作用机制。AKBA 是从天然乳香中提取的单体。通过 CCK-8 法测定 AKBA 在不同浓度及不同时间对 B16F10 细胞增殖的影响; 以流式分析法检测 AKBA 对 B16F10 凋亡的作用; 以 Real-time PCR 法检测细胞增殖及凋亡相关基因的表达; 以 Western blot 法检测细胞增殖与凋亡相关的 NF- κ B 信号通路的变化。结果显示, AKBA 可以明显促进 B16F10 细胞的凋亡, 抑制其增殖, 并与 NF- κ B 信号转导通路的活性有关。

关键词: 11-羧基- β -乙酰乳香酸; 小鼠黑素瘤细胞; NF- κ B

中图分类号: R730.53

文献标识码: A

文章编号: 1001-2478(2012)04-0321-06

11-羧基- β -乙酰乳香酸(AKBA)是从天然乳香中提取出来的一种小分子化合物, 分子量为 512.72, 属于三环五萜类化合物, 其物理性状为白色粉末状固体。早期广泛应用于炎症性疾病的治疗, 如银屑病^[1]、结肠炎^[2]、骨关节炎^[3]等, 主要是通过抑制 NF- κ B 信号通路、5-脂氧合酶^[4]和白细胞弹性酶^[5]而发挥作用。目前, AKBA 对多种肿瘤细胞的作用已有报道^[6]; 它可以通过干扰内皮细胞生长因子受体和雷帕霉素靶蛋白信号通路, 抑制血管内皮细胞的增殖、迁移以及毛细血管管状结构形成, 从而阻断新生血管形成, 降低肿瘤的营养供应, 抑制前列腺癌的生长。AKBA 还可以通过抑制 NF- κ B 信号转导通路而抑制破骨细胞生成^[7]; 通过抑制拓扑酶 I, 促进 HL-60(急性粒细胞白血病细胞)的凋亡^[8]。

NF- κ B 是 1986 年由 Sen 和 Baltimore 首先描述^[9], 随后发现其普遍存在于哺乳动物细胞中。哺乳动物的核转录因子 NF- κ B 家族由 p50/p105(NF- κ B1)、p52/p100(NF- κ B2)、REL(cREL)、REL-A(p65)和 REL-B 组成, 这些蛋白质二聚化后形成功能性 NF- κ B。大部分的 NF- κ B 二聚体通过与细胞质中三个抑制因子(I κ B α 、I κ B β 、I κ B ϵ)中的一个结合后以抑制性的状态存在于细胞质中。在各种刺激信号的作用下(如 TNF- α 、LPS、IL-1 等), I κ B 激酶(IKK)活化并催化 I κ B 使其发生磷酸化, 并最

终通过泛素化途径降解。NF- κ B 得到活化、入核, 与其相关的 DNA 基序结合并诱导靶基因的转录^[10]。大量研究表明, NF- κ B 在肿瘤的发生发展中起重要作用, 参与调控炎症、细胞生存、细胞增殖、细胞凋亡、血管生成、细胞侵袭和转移等相关的 400 多个基因^[11]。很多肿瘤类型和肿瘤动物模型已被证明组成性表达 NF- κ B, 如肝癌、肺癌、多发性骨髓瘤、乳腺癌及黑色素瘤等^[12], 且 NF- κ B 在从炎症到肿瘤的转变过程中也起到重要作用^[11]。

AKBA 对皮肤黑素瘤细胞的作用尚未见报道。本文主要研究 AKBA 在体外对小鼠黑素瘤细胞 B16F10 增殖和凋亡的作用并对其机制进行初步探讨, 为其在临床治疗中的应用提供理论和实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 11-羧基- β -乙酰乳香酸(AKBA), 购自中国药品生物制品检定所; Trizol 及 DMSO, 购于 Sigma 公司; DMEM 高糖培养液, 购自 Thermo 公司; 胎牛血清, 购自杭州四季青生物工程材料有限公司; 青霉素-链霉素溶液, 购自碧云天生物技术研究; CCK-8 (Cell Counting Kit-8), 购自 Dojindo 公司; Annexin V/PI 凋亡试剂盒, 购自 Invitrogen 公司; Phospho-I κ B- α (Ser32) 抗体和 Phospho-NF- κ B-p65 抗体, 购自 Cell Signaling Technology; PCR 所需酶及试剂、

收稿日期: 2012-03-22; 修回日期: 2012-04-22

作者简介: 王者(1986-), 女, 硕士, 主要从事免疫学研究。

通讯作者: 王宏林(E-mail: honglin.wang@sjtu.edu.cn)

SYBR® Premix Ex Taq™, 购自 Takara 公司; CDK1、CDK2、CDK4、p27、PCNA、survivin、Bcl-xl、Bcl-2、Bid、Bim、Bad、Bax 引物, 合成于上海生工公司。

1.1.2 细胞系 小鼠黑素瘤细胞系 B16F10, 由本实验室保存。

1.1.3 仪器 超净工作台(CA-1390-1, 上海上净净化设备有限公司); 二氧化碳培养箱(Series 8000 DH, Thermo Scientific); 全自动酶标仪(Spectra Max250); 流式细胞仪(Calibur, Becton Dickinson); Real time-PCR 仪(Fast 7500, ABI); 成像仪(ChemiDoc™ XRS+, Bio-Rad)。

1.2 方法

1.2.1 11-羧基-β-乙酰乳香酸(AKBA)储存液的配制 用二甲基亚砜(DMSO)配成储存液, 浓度为 40 mmol/L, 保存于-20℃, 用时以 DMEM 培养液稀释至所需浓度。

1.2.2 细胞培养 培养液为 DMEM 高糖培养液加 10% 胎牛血清和 1% 的青霉素-链霉素溶液。

1.2.3 CCK-8 测定细胞增殖 取对数生长期的细胞常规消化、离心并计数, 用培养液稀释, 以 5 000 个细胞/100 μl/孔的比例接种到 96 孔平底培养板中, 于 5% CO₂ 饱和湿度的 37℃ 培养箱中培养, 12 h 细胞贴壁牢固后, 加入含不同终浓度 AKBA(10、30、45、60、75、90 μmol/L)的完全培养液, 及含 0.25% 的 DMSO 的完全培养液, 将完全培养液作为对照, 每组细胞的每个时间点及每个浓度均采用 3 复孔培养。于加药后 12 h、24 h 和 48 h, 分别用 CCK-8 检测细胞的增殖情况。步骤如下: 培养液与 CCK-8 按 100:1 的比例配制、混匀, 吸弃各孔细胞培养液, 按 100 μl/孔加入含 CCK-8 的培养液, 37℃ 孵育 2 h, 于 450 nm 波长检测各孔 A 值。依照 A 值计算各组细胞增殖率(增殖率=实验组/对照组×100%), 根据增殖率计算出抑制率(抑制率=1-增殖率), 使用 Graphpad Prism5 进行数据分析。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡(Annexin V/PI 双染法) 使用 50 μmol/L AKBA 处理细胞 24 h 后, 收集实验组及对照组细胞, 预冷 PBS 洗 1 次后离心, 细胞重悬于 100 μl Binding Buffer, 加入 5 μl Annexin V, 室温避光孵育 15 min, 再加入 400 μl Binding Buffer, 于上机前加入 1 μl 稀释后的碘化丙啶(propidium iodide, PI), 1 h 内上机检

测, 收集 10 000 个细胞进行分析。数据处理软件为 FlowJo7.6。

1.2.5 Real-time PCR 检测凋亡相关蛋白基因的表达 细胞经 50 μmol/L AKBA 处理 B16F10 细胞 24 h 后, 使用 500 μl Trizol 裂解, 进行 RNA 常规提取; 使用 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 进行 RNA 逆转录, 然后进行 Real-time PCR 检测。通过 Primer Express 3.0 进行引物设计, 序列如下(表 1)。

表 1 引物序列

Real-time PCR 引物序列		
CDK1	Forward	TATGATCCTGCCAAACGAATCTC
	Reverse	AATCTGATTGTCCAAGTCATCAAAGT
CDK2	Forward	GACGGAGCTTGTATCGCAAAAT
	Reverse	AGGGCTGCTTTGGCTGAA
CDK4	Forward	CTTTAACCCACATAAGCGAATCTCT
	Reverse	GCTTTCCTCCTTGTGCAGGTA
PCNA	Forward	TCGTTCTCTTAGAGTAGCTCTCATCTA
	Reverse	GGATCAGGCGTGCCTCAA
p27	Forward	AAACAAAAGGGCCAACAGAACA
	Reverse	GGGCGTCTGCTCCACAGT
survivin	Forward	GCCACGATGGTGATGAAACTAG
	Reverse	CAAACCTCTTTTGTCTGTTGTTGGT
Bcl-2	Forward	TCAGTGAAGCCGGAGTGTGA
	Reverse	TTGCAATGAATCGGGAGTTG
Bcl-xl	Forward	GGTTCCTGACGGGCATGA
	Reverse	GAGAGGTGAGTGGACGGTCAGT
Bad	Forward	CTCCGGAAGTGGCTGTTTTC
	Reverse	CCCAGACCCCAACTTAGC
Bax	Forward	GCGTGGTTGCCCTCTTCTAC
	Reverse	CTGATCAGCTCGGGCACTTTA
Bid	Forward	GAAGACGAGCTGCAGACAGATG
	Reverse	AATCTGGCTCTATTCTTCTTGGTT
Bim	Forward	TACAAAAAAGGACCAAGAGGAAAGA
	Reverse	CACTGCTGACTTGCGAGGAA

1.2.6 Western blot 检测 Phospho-IκBα-(Ser32) 和 Phospho-NF-κB-P65 50 μmol/L AKBA 处理 B16F10 细胞 48 h 后, 提取实验组与对照组细胞总蛋白, 通过 BCA 法测定蛋白浓度, 95℃ 变性 5 min, 上样 30 μg/孔。8% SDS-PAGE 胶进行电泳, 转膜(PVDF 膜)20 min, 一抗(1:1 000)4℃ 孵育过夜, 标记辣根过氧化物酶的二抗(1:2 000)室温孵育 1 h, TBST 洗 3 次, 每次 5 min, 于成像仪进行成像操作。

2 结果

2.1 AKBA 改变小鼠黑素瘤细胞系 B16F10 形态 加入含不同终浓度 AKBA 24 h 后, 显微镜下观察发现细胞形态变化(图 1)。结果显示, 经 AKBA 作用后, 随着作用浓度的增高, 细胞体积渐渐变大, 有树突样结构的细胞数逐渐增多, 当 AKBA 浓度过高时, B16F10 细胞开始萎缩, 且最后萎缩成圆形。

2.2 AKBA 抑制小鼠黑素瘤细胞系 B16F10 增殖 细胞加入不同浓度 AKBA 培养 12 h、24 h 及 48 h 后, 可以看到 AKBA 对 B16F10 增殖的抑制作用呈剂量依赖性(图 2A、B、C)和时间依赖性(图 2D, 效应时间关系曲线), 24 h 的半数抑制率 IC_{50} (细胞被抑制一半时抑制剂的浓度)为 $54.92 \mu\text{mol/L}$ (图 3)。Real-time PCR 检测凋亡相关蛋白基因

CDK1、CDK2、CDK4、PCNA、survivin、p27 的表达, 结果显示 AKBA 处理组 CDK1 呈现降低趋势, 细胞周期负性调控因子 p27 呈现升高趋势, CDK2、CDK4 和 PCNA 无明显变化(图 4)。

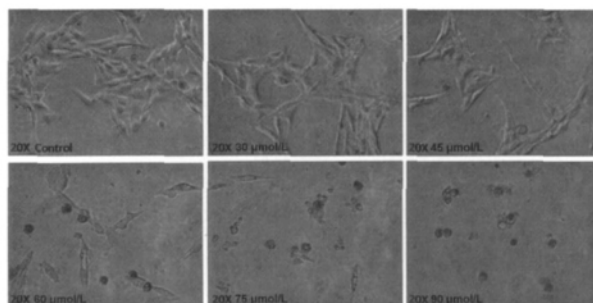


图 1 细胞形态变化

随着 AKBA 浓度的增加, 细胞体积渐渐变大, 有树突样结构的细胞数逐渐增多。当 AKBA 浓度过高时, B16F10 细胞开始萎缩, 且最后萎缩成圆形

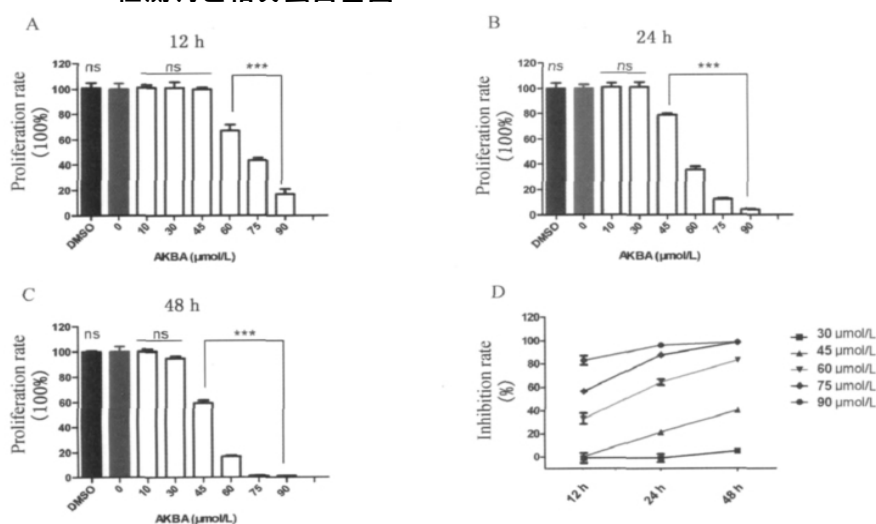


图 2 不同浓度 AKBA 在 12 h、24 h、48 h 对 B16F10 细胞系增殖的抑制呈现剂量依赖性(A、B、C, $P < 0.0001$)和时间依赖性(D)

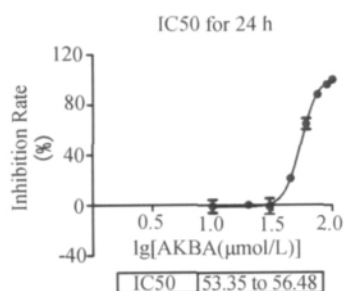


图 3 AKBA 处理 B16F10 细胞 24 h 后, 其半数抑制率为 $54.92 \mu\text{mol/L}$ ($53.35 \sim 56.48 \mu\text{mol/L}$)。Inhibition rate = $(1 - \text{proliferation rate}) \times 100\%$

2.3 AKBA 促进小鼠黑素瘤细胞系 B16F10 凋亡 $50 \mu\text{mol/L}$ AKBA 处理 B16F10 细胞系 24 h 后, 收集 AKBA 处理组和对照组细胞, 通过流式细胞仪检测细胞凋亡(图 5A)。对照组早、晚期凋亡细胞占 12.72%, 实验组早、晚期凋亡细胞占 28.57%(图 5B)。Real-time PCR 检测凋亡相关蛋白基因的表达, 结果显示 AKBA 处理后抗凋亡基因 Bcl-xl、Bcl-2 较对照组表达量下降, 促凋亡基因 Bid、Bim、Bad、Bax 较对照组表达量上升(图 5C)。由此说明, AKBA 可以通过抑制 B16 细胞系的抗凋亡基因、促进促凋亡基因的表达来促进 B16 的凋亡。

2.4 AKBA 抑制 NF- κ B 的活化 50 μ mol/L AKBA 处理 B16F10 细胞 24 h 后, 收集 AKBA 处理组和对照组细胞, 通过 Western Blot 检测 Phospho-I κ B α -(Ser32) 和 Phospho-NF- κ B-p65 的表达情况。结果表明 AKBA 处理组较对照组 I κ B α 和 P65 的磷酸化明显降低(图 6), 即 AKBA 抑制 NF- κ B 的活化。

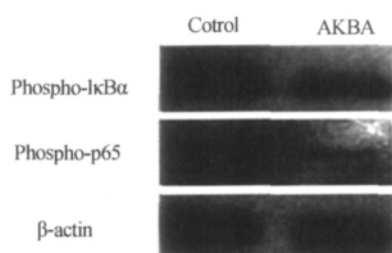


图 6 Western blot 检测对照组细胞和 AKBA 处理组细胞 Phospho-I κ B α -(Ser32) 和 Phospho-NF- κ B-p65 的表达, 结果显示 AKBA 处理后磷酸化的 p65 和磷酸化的 I κ B α 表达量明显降低

3 讨论

本研究发现, AKBA 对小鼠黑素瘤细胞 B16F10 增殖的抑制作用在不同时间段(12 h、24 h 及 48 h)均呈现剂量依赖性和时间依赖性, 增殖相关基因 CDK1 下调, p27 上调。CDK(细胞周期素依赖性激酶)是细胞周期机制的核心, CDKs 结合了细胞周期蛋白 cyclins 而被激活, 然后驱动细胞周期运行。CDK1、CDK2 是细胞周期运行并通过 G1/S 期和 G2/M 期限制点(restriction point)的关键蛋白^[13,14]。不论正常细胞还是肿瘤细胞都是通过细胞周期而增生的, 只是肿瘤细胞周期发生了改变。因此 CDK1 和 CDK2 表达均可能导致肿瘤的发生。p27 由 Polyak 等于 1994 年发现^[15], 属于 p21 家族成员, 为细胞周期负性调控因子, 主要介导增殖信号的负向传导, 其水平增高表示增殖能力减弱, 当细胞恶化时 p27 表达量降低, 无法阻断细胞分裂增殖。AKBA 可以通过上调 p27 下调 CDK1 而抑制肿瘤细胞的增殖。Bcl 家族成员的抗凋亡基因主要为 Bcl-2、Bcl-X1, 主要定位在线粒体外膜、内质网膜和核膜^[16], 发生磷酸化后或经蛋白酶水解后其活性丧失。Bcl 家族成员的促凋亡基因有 Bax、Bad、Bim、Bid, 多存在于胞浆内, 主要通过损伤线粒体介导凋亡过程。从图 5 可见, AKBA 可以降低凋亡抑制因子 Bcl-2、Bcl-X1 的表达, 促进凋亡促进因子 Bax、Bad、Bim、Bid 的表达, 从而发挥促 B16F10 细胞凋亡的作用。NF- κ B 途径

被认为是肿瘤发生发展的重要信号通路, 当 I- κ B 磷酸化后, NF- κ B 二聚体抑制得到解除, NF- κ B 发生磷酸化活化、入核, 绑定靶基因调节一系列增殖、凋亡等基因的转录。NF- κ B 一直在细胞核中存在, 就意味着 NF- κ B 的组成性表达。western blot 结果显示 AKBA 可以抑制 I- κ B 和 NF- κ B 磷酸化, 从而抑制 NF- κ B 信号通路的活化, 进一步抑制其下游基因的表达。

本实验使用从天然乳香中提取的 AKBA 单体作用于 B16F10 细胞, 结果显示 AKBA 可以抑制其增殖并呈现时间与剂量依赖性, 明显促进 B16F10 细胞的凋亡。B16F10 细胞促凋亡基因(Bad、Bid、Bim 及 Bax)表达明显上升, 抗凋亡基因(Bcl-2、Bcl-x1)表达减弱, 增殖相关基因中 CDK1 基因表达降低、p27 表达呈上升趋势, I- κ B 的磷酸化和 NF- κ B 的活化都受到明显抑制, 说明 AKBA 对于 B16F10 细胞的抑制可能主要通过抑制 NF- κ B 途径而实现。由此可见, AKBA 可以作为一个新的、有效的抗肿瘤药物, 通过抑制肿瘤组成性 NF- κ B 信号转导通路及其下游各种靶基因的表达来发挥抗肿瘤效应。

参考文献

- [1] Wang H, Syrovets T, Kess D, *et al.* Targeting NF-kappa B with a natural triterpenoid alleviates skin inflammation in a mouse model of psoriasis[J]. *J Immunol*, 2009, 183: 4755-4763.
- [2] Anthoni C, Laukoetter MG, Rijcken E, *et al.* Mechanisms underlying the anti-inflammatory actions of boswellic acid derivatives in experimental colitis[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006, 290: G1131-1137.
- [3] Sengupta K, Alluri KV, Satish AR, *et al.* A double blind, randomized, placebo controlled study of the efficacy and safety of 5-Loxin for treatment of osteoarthritis of the knee[J]. *Arthritis Res Ther*, 2008, 10: R85.
- [4] Safayhi H, Sailer ER, Ammon HP. Mechanism of 5-lipoxygenase inhibition by acetyl-11-keto-beta-boswellic acid[J]. *Mol Pharmacol*, 1995, 47: 1212-1216.
- [5] Safayhi H, Rall B, Sailer ER, *et al.* Inhibition by boswellic acids of human leukocyte elastase[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1997, 281: 460-463.
- [6] Pang X, Yi Z, Zhang X, *et al.* Acetyl-11-keto-beta-boswellic acid inhibits prostate tumor growth by suppressing vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated angiogenesis[J]. *Cancer Res*, 2009, 69: 5893-5900.
- [7] Takada Y, Ichikawa H, Badmaev V, *et al.* Acetyl-11-keto-beta-boswellic acid potentiates apoptosis, inhibits invasion,

- and abolishes osteoclastogenesis by suppressing NF- κ B and NF- κ B-regulated gene expression[J]. *J Immunol*, 2006,176:3127-3140.
- [8] Hoernlein RF, Orlikowsky T, Zehrer C, *et al*. Acetyl-11-keto-beta-boswellic acid induces apoptosis in HL-60 and CCRF-CEM cells and inhibits topoisomerase I[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999,288:613-619.
- [9] Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a posttranslational mechanism[J]. *Cell*, 1986,47:921-928.
- [10] Wang S, Liu Z, Wang L, *et al*. NF- κ B signaling pathway, inflammation and colorectal cancer[J]. *Cell Mol Immunol*, 2009,6:327-334.
- [11] Yadav VR, Prasad S, Sung B, *et al*. The role of chalcones in suppression of NF- κ B-mediated inflammation and cancer [J]. *Int Immunopharmacol*, 2011,11:295-309.
- [12] Prasad S, Ravindran J, Aggarwal BB. NF- κ B and cancer: how intimate is this relationship[J]. *Mol Cell Biochem*, 2010,336:25-37.
- [13] Nurse P. A long twentieth century of the cell cycle and beyond[J]. *Cell*, 2000,100:71-78.
- [14] Nurse P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase[J]. *Nature*, 1990,344:503-508.
- [15] Conti M, Moutereau S, Zater M, *et al*. Urinary cystatin C as a specific marker of tubular dysfunction[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2006,44:288-291.
- [16] Murphy KM, Streips UN, Lock RB. Bcl-2 inhibits a Fas-induced conformational change in the Bax N terminus and Bax mitochondrial translocation [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 17225-17228.

Inhibitory effect of acetyl-11-keto-beta-boswellic acid on B16F10 cells

WANG Zhe, WANG Hong-lin (*Shanghai Institute of Immunology, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China*)

Abstract: The aim of this study is to investigate the inhibitory effect of acetyl-11-keto-beta-boswellic (AKBA) on the proliferation and apoptosis of melanoma B16F10 cells and explore its mechanisms. AKBA is a monomer extracted from boswellin. The capacity extent of cell proliferation of B16F10 cells after being treated with different concentrations of AKBA was measured by CCK-8 assay. The apoptotic effect of AKBA was analyzed by flow cytometry. Real-time PCR was used to detect gene expression related to cell proliferation and apoptosis. Expression of NF- κ B was measured using Western blot. The results showed that AKBA significantly promoted B16F10 cell apoptosis, and restrained the proliferation of B16F10 cells, which was associated with the activity of NF- κ B pathway.

Key words: acetyl-11-keto-beta-boswellic acid; mice melanoma cells; NF- κ B