

网络出版时间: 2023-09-19 17:16:37 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20230918.1410.004>

青藤碱通过调控 STAT3 及 NF- κ B 信号通路对多发性骨髓瘤 U266 细胞增殖、凋亡的影响

王莹莹^{1*}, 周世颖^{2*}, 陈洁², 乔璎², 赵逸², 吴佳琦², 吴英理¹, 翁巍²

摘要 目的 探讨青藤碱对骨髓瘤 U266 细胞增殖、凋亡的影响及其可能机制。方法 将培养好的 U266 细胞用不同浓度青藤碱(0、0.5、1、2 mmol/L)处理,空白对照组加入 0.5% 浓度的 DMSO。用 CCK-8 检测 U266 细胞的增殖;流式细胞术检测细胞的凋亡;Western blot 法检测各组细胞的增殖相关蛋白、凋亡相关蛋白、信号转导与转录激活因子(STAT3)及基因结合核因子(NF- κ B)信号通路相关蛋白的表达水平。结果 与空白对照组比较,青藤碱处理组 U266 细胞凋亡率增加,增殖能力降低,抗凋亡相关蛋白 Bcl-2 及 Mcl-1 表达水平下降,cleaved caspase-3、cleaved PARP 表达水平上调,STAT3、NF- κ B 信号通路活性降低,表现为 p-STAT3、p-I κ B α 的表达水平下降。结论 青藤碱通过下调 STAT3 及 NF- κ B 信号通路活性,促进骨髓瘤 U266 细胞凋亡。

关键词 青藤碱;骨髓瘤;U266 细胞;STAT3 信号通路;NF- κ B 信号通路

中图分类号 R 363.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)10-1634-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.10.004

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)作为浆细胞恶性克隆增殖性疾病,是第二常见的血液系统恶性肿瘤,以恶性浆细胞增殖并分泌单克隆免疫球蛋白及相关的组织器官损害为特点^[1]。信号转导与转录激活因子(signal transducer and activator of transcription3, STAT3)将细胞表面的细胞因子信号传递到细胞核内调节细胞增殖、存活及分化,并在许多人类肿瘤细胞如 MM、白血病和淋巴瘤中高表达^[2]。MM 内存在高度依赖白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)活化的 STAT3 信号通路,参与疾病进

展^[3]。此外,基因结合核因子(nuclear factor- κ -gene binding, NF- κ B)同样促进了 MM 细胞增殖、黏附、归巢及骨质破坏^[4]。青藤碱是从防风科植物青藤中提取出来的一种异喹啉生物碱,目前主要用于治疗风湿性疾病包括类风湿性关节炎,它也被证明具有抗炎、免疫抑制等药理活性^[5]。该研究利用青藤碱处理 MM 细胞株 U266,探讨其通过调控 STAT3 及 NF- κ B 信号通路影响 MM 细胞增殖、凋亡能力的机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 青藤碱购于上海永叶生物科技公司,以二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)配制成浓度为 5 mol/L 的储存液。凋亡试剂盒(货号: SB-Y6002)购自上海圣尔生物技术有限公司。细胞培养基 RPMI-1640、细胞培养用的胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)及消化细胞用的 0.25% 胰蛋白酶购自上海源培生物科技股份有限公司。PARP 抗体(1:1 000, 货号: 13371-1-AP)、caspase3 抗体(1:1 000, 货号: A2629)、 β -actin 抗体(1:1 000, 货号: 20536-1-AP)、Bcl-2(1:1 000, 货号: 68103-1-Ig)、Mcl-1(1:1 000, 货号: 16225-1-AP)、STAT3(1:1 000, 货号: 10253-2-AP)、I κ B α (1:1 000, 货号: 10268-1-AP)购自武汉三鹰生物技术有限公司。兔种属来源二抗(1:2 000, 货号: A25022)、p-STAT3(1:1 000, 货号: AP0070)、p-I κ B α (1:1 000, 货号: AP0123)、鼠种属来源二抗(1:2 000, 货号: A25012)购自武汉爱博泰克生物技术有限公司。微量移液器购于法国 Gilson 公司;稳压稳流电泳仪(DYY-6c 型)购于北京六一仪器厂;凝胶成像系统购于英国 Syngene 公司;Ultrospee2100 pro 紫外/可见分光光度计购于英国 Amersham Biosciences 公司;低温高速台式离心机 5417R 购于德国 EPPENDORF 有限公司;无菌洁净工作台购于苏州净化设备有限公司;倒置显微镜购于德国 Leica Microsystems 公司;超纯水仪购于美国 Millipore 公司;SHP-150 型生化培养箱购于上海精宏实验设备有限

2023-07-25 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 82170145)

作者单位: ¹ 上海交通大学医学院病理生理学系细胞分化与凋亡教育部重点实验室, 上海 200025

² 上海交通大学医学院附属同仁医院输血科, 上海 200336

作者简介: 王莹莹, 女, 博士研究生;

翁巍, 女, 主任医师, 责任作者, E-mail: ww1695@shtrhos-pital.com

* 对本文具有同等贡献

公司; Model550 酶标仪购于美国 Bio-Rad 公司。

1.2 细胞培养与药物处理 MM 细胞株 U266 由上海交通大学医学院病理与生理学教研室提供。将 U266 细胞接种于含 10% FBS、100 $\mu\text{g/ml}$ 青霉素、100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素和 2 mmol/L 谷氨酰胺的 RP-MI1640 培养液中常规培养,每天换液以保持细胞密度维持在 $2 \times 10^5 \sim 6 \times 10^5/\text{ml}$ 的最佳生长状态。将培养好的 U266 细胞用不同浓度青藤碱(0、0.5、1、2 mmol/L)处理,分别设置为 0.5 mmol/L 青藤碱组、1 mmol/L 青藤碱组、2 mmol/L 青藤碱组。同时,用 0.5% 浓度的 DMSO 处理作为空白对照组。

1.3 CCK-8 法检测细胞增殖 取对数生长期的 U266 细胞,按 $2 \times 10^5/\text{ml}$ 密度接种于 96 孔培养板,每孔 100 μl ,实验组分别加入终浓度为 0.5、1、2 mmol/L 的青藤碱,同时设溶剂对照组(加入含 0.1% DMSO 的无血清 1640 培养基)和空白对照组,每组设 3 个复孔。置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 和 95% 湿度培养箱中,培养 48 h 后每孔分别加入 10 μl CCK-8 溶液,轻微振荡 10 min 混匀,置培养箱继续培养 4 h,振荡均匀后,在酶标仪上检测 450 nm 处各孔的吸光度值。

1.4 流式细胞术检测细胞凋亡 将不同处理组细胞用 PBS 洗涤后加入 1 ml 结合缓冲液,漂洗细胞 1 次。依次加入 100 μl 结合缓冲液及 3 μl Annexin-V/FITC,重悬混匀,避光孵育 15 min,再加入 3 μl 碘化丙啶(PI),避光孵育 3 min。每管加入结合缓冲液 350 μl ,1 h 内使用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.5 Western blot 检测骨髓瘤 U266 细胞凋亡相关蛋白、NF- κB 及 JAK2/STAT3 通路相关蛋白含量

在 PBS 洗涤后的各组 U266 细胞中加入细胞裂解液提取总蛋白,取各组等量总蛋白进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳,常规转膜;室温 5% 脱脂牛奶封闭 1 h,加入相应一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;经含 0.1% Tween-20 的 PBS 充分洗涤后与相应稀释度的二抗室温反应 1 h,显影扫描保存。

1.6 统计学处理 所有试验均重复 3 次,用 SPSS 16.0 软件进行统计分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,检验方差齐性,两组间均数比较采用独立样本 t 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA,ANOVA)分析法、 F 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 青藤碱对 U266 细胞增殖、凋亡的影响 不同

浓度青藤碱处理 U266 细胞 48 h 后,CCK-8 法检测细胞的增殖能力。随着青藤碱浓度增加,U266 细胞的增殖能力明显下降,提示青藤碱可抑制 U266 细胞增殖(图 1A);与空白对照组比较,24、48 h 2 mmol/L 青藤碱组增殖率分别下降了 29%、54% (均 $P < 0.001$)。进一步,用 Annexin-V/PI 双染法检测细胞凋亡也显示:青藤碱处理后,细胞的凋亡率明显增加,并呈浓度依赖性(图 1B、C);与空白对照组比较,1、2 mmol/L 青藤碱组凋亡率分别增加了 34%、42% (均 $P < 0.001$)。

2.2 青藤碱对 cleaved caspase3、cleaved PARP 蛋白表达水平的影响 不同浓度的青藤碱处理 U266 细胞 48 h 后,Western blot 对凋亡相关蛋白的检测结果显示:随着青藤碱浓度增加,U266 细胞内 caspase-3 和 PARP 蛋白均发生明显剪切活化,提示青藤碱能诱导 MM 细胞凋亡(图 2);与空白对照组比较,2 mmol/L 青藤碱组 cleaved PARP 增加了 24%,cleaved caspase3 增加了 30% (均 $P < 0.001$)。

2.3 青藤碱对抗凋亡蛋白 Bcl-2、Mcl-1 蛋白表达的影响 用浓度梯度的青藤碱处理 U266 细胞 48 h 后,Western blot 结果显示:与空白对照组比较,随着浓度增加,抗凋亡蛋白 Mcl-1 及 Bcl-2 均明显下降(图 3);其中,与空白对照组比较,2 mmol/L 青藤碱组 Bcl-2 下降了 77%,Mcl-1 下降了 53% (均 $P < 0.001$)。

2.4 青藤碱对 U266 细胞内 STAT3 及 NF- κB 信号通路蛋白活性的影响 不同浓度青藤碱处理 U266 细胞 48 h 后,Western blot 结果显示:与空白对照组比较,高浓度青藤碱组 STAT3 及 I $\kappa\text{B}\alpha$ 的磷酸化水平明显下降(图 4A、B);其中,与空白对照组比较,2 mmol/L 青藤碱组 p-STAT3 下降了 77%,p-I $\kappa\text{B}\alpha$ 下降了 69% ($P < 0.001$)。上述结果提示,青藤碱可能通过抑制 U266 细胞内 STAT3 及 NF- κB 信号通路发挥作用。

3 讨论

青藤碱是从防风科植物青藤中提取出来的一种异喹啉生物碱,临床上用于治疗类风湿性关节炎等多种风湿性疾病,它也被证明具有多种药理活性,如抗炎、免疫抑制、抗风湿。此外,研究^[8]表明青藤碱可以下调 TNF- α 和 IL-6 在巨噬细胞中的表达从而增强巨噬细胞的吞噬功能,并且青藤碱可以维持 $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ 的平衡,调节免疫功能。目前已有关于青藤碱能够有效抑制 IL-6 和 IL-1 β 参与的炎症反应

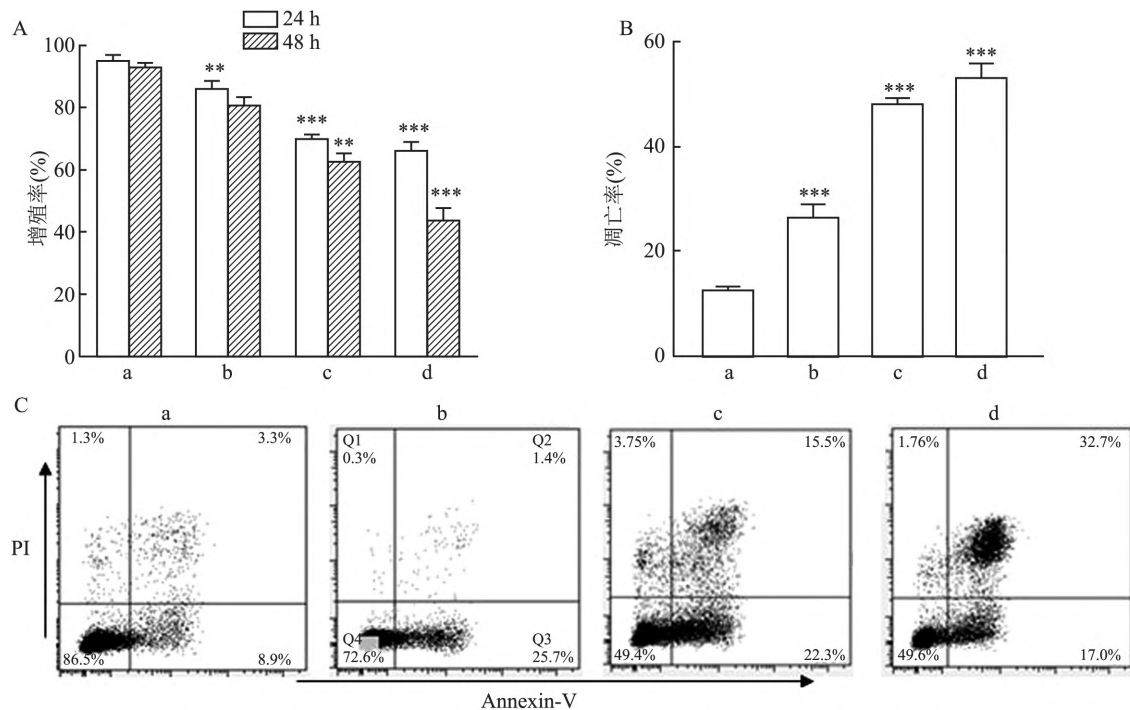


图1 青藤碱对 U266 细胞增殖和凋亡的影响

A: CCK-8 法检测细胞增殖; B、C: Annexin-V /PI 双染法检测细胞凋亡; a: 空白对照组; b: 0.5 mmol/L 青藤碱组; c: 1 mmol/L 青藤碱组; d: 2 mmol/L 青藤碱组; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

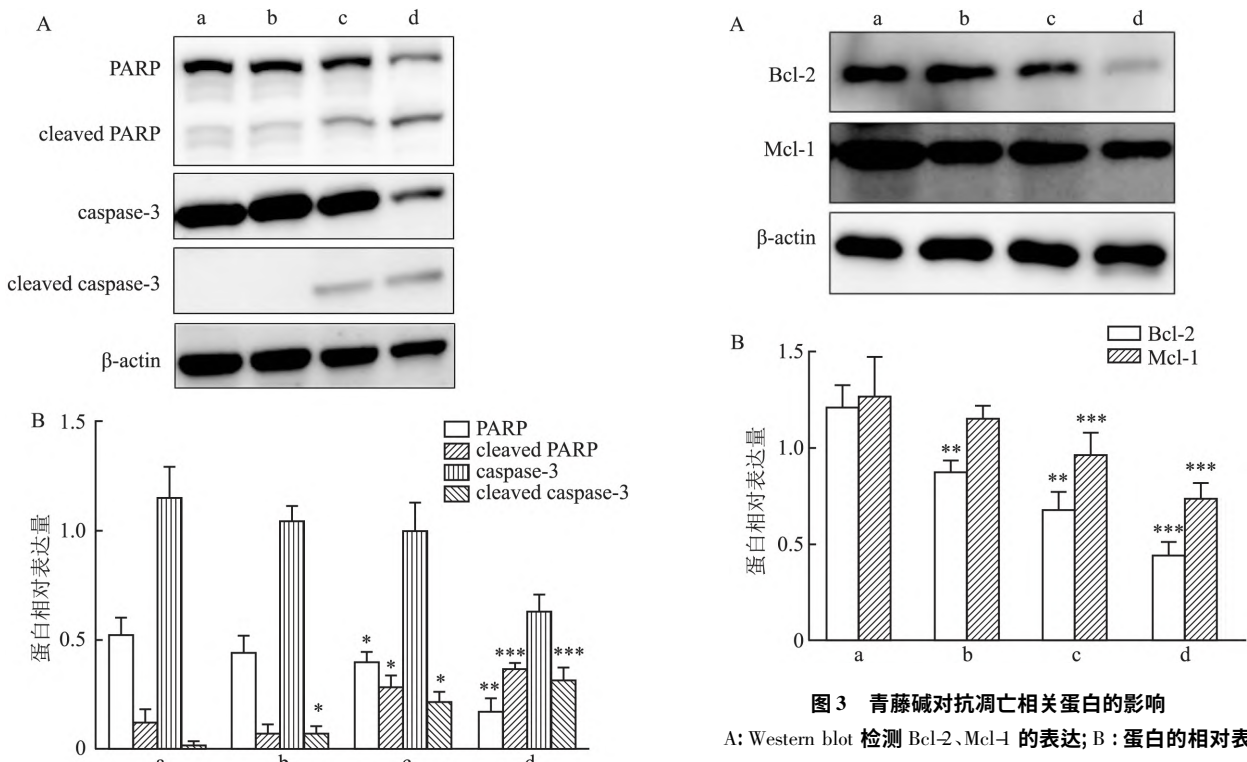


图2 青藤碱对凋亡相关蛋白的影响

A: Western blot 检测蛋白表达; B: 蛋白的相对表达量统计结果; a: 空白对照组; b: 0.5 mmol/L 青藤碱组; c: 1 mmol/L 青藤碱组; d: 2 mmol/L 青藤碱组; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

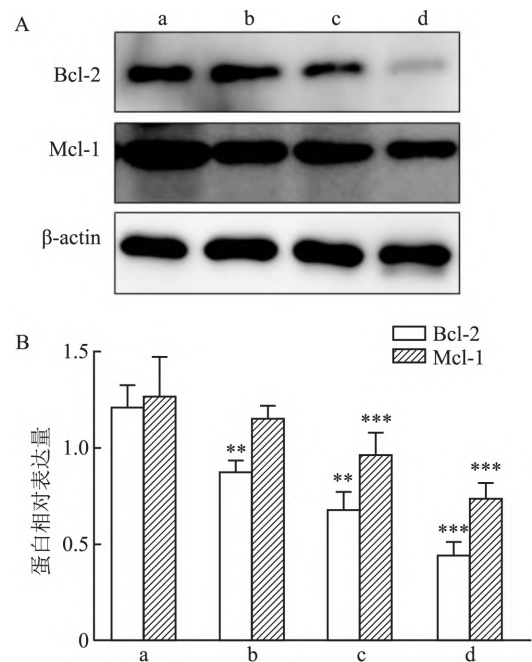


图3 青藤碱对抗凋亡相关蛋白的影响

A: Western blot 检测 Bcl-2、Mcl-1 的表达; B: 蛋白的相对表达量统计结果; a: 空白对照组; b: 0.5 mmol/L 青藤碱组; c: 1 mmol/L 青藤碱组; d: 2 mmol/L 青藤碱组; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

以及抑制 NF- κ B 信号通路的报道^[6-7],但其对 MM 的作用机制尚不清楚。

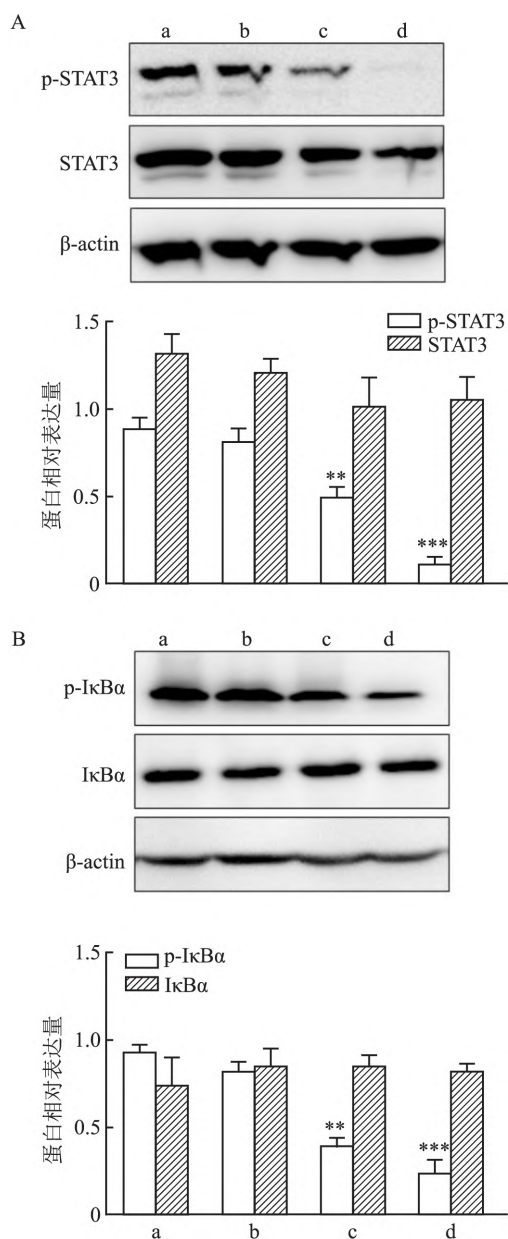


图4 青藤碱对 STAT3 及 NF- κ B 信号通路的影响

A: Western blot 检测 STAT3、p-STAT3 蛋白表达及蛋白结果量化统计; B: Western blot 检测 I κ B α 、p-I κ B α 蛋白表达及蛋白结果量化统计; a: 空白对照组; b: 0.5 mmol/L 青藤碱组; c: 1 mmol/L 青藤碱组; d: 2 mmol/L 青藤碱组; 与空白对照组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

在包括 MM 在内的多种肿瘤中均可检测到 STAT3 异常活化, STAT3 的磷酸化可促进下游多种与细胞增殖凋亡相关的靶基因转录活化, 最终影响肿瘤的发生和进展^[8-9]。

Mcl-1 作为重要的抗凋亡蛋白, 其在 MM 中的高表达能有助于 MM 细胞的增殖, 且能提高 MM 细胞的抗凋亡能力^[10]。研究^[11]发现, 使用 STAT3 或者 JAK 通路的抑制剂均可下调 Mcl-1 的表达。同

样, 本研究也显示, 青藤碱在抑制 STAT3 活化的同时也伴随着 Mcl-1 的下调。因此, 青藤碱通过抑制 STAT3 的活化进而下调 Mcl-1 的表达也是其发挥抗 MM 效应的重要机制之一。

MM 细胞增殖、生存和迁移涉及 MM 和微环境基质细胞内多条信号通路相互作用, 其中包括 PI3K/Akt/mTOR、JAK/STAT3、NF- κ B 和 RAS/RAF/MEK/ERK 等通路。针对 PI3K/Akt/mTOR 和 RAS/RAF/MEK/ERK 通路的特异性抑制剂对 MM 细胞及其微环境细胞(如骨髓基质细胞和破骨细胞等)均有生物学调节效应^[12-13], 显示出临床应用前景。研究^[14]表明, NF- κ B 通过介导细胞内 IL-6、粒细胞集落刺激生物因子、B 淋巴细胞刺激因子和巨噬细胞炎症因子等基因表达促进 MM 细胞增殖、黏附、归巢和骨质破坏。此外, NF- κ B 还能促使 MM 细胞高表达细胞周期调节因子以及调控 MM 在内一系列抗凋亡分子和端粒酶反转录酶的表达, 参与 MM 细胞增殖和存活。并且, 与 MM 黏附和转移密切相关的血管生成因子和黏附分子也均受到 NF- κ B 信号通路的调节, NF- κ B 信号通路与 MM 发病、进展以及预后有着至关重要关系^[14]。本研究表明, 青藤碱可以在体外有效抑制 MM 细胞内 NF- κ B 信号通路, 推测这是其抗 MM 的重要机制之一。

综上所述, 青藤碱在体外能有效抑制人骨髓细胞 U266 增殖及凋亡, 同时能下调细胞内抗凋亡蛋白 Mcl-1 及 Bcl-2 的表达。进一步研究提示, 青藤碱的抗 MM 效应可能与其对 STAT3 及 NF- κ B 信号通路的抑制作用密切相关。

参考文献

- Mosebach J, Thierjung H, Schlemmer H P, et al. Multiple myeloma guidelines and their recent updates: Implications for imaging [J]. Rofo, 2019, 191(11): 998 - 1009.
- Yang L, Lin S, Xu L, et al. Novel activators and small-molecule inhibitors of STAT3 in cancer [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2019, 49: 10 - 22.
- Jarnicki A, Putoczki T, Ernst M. Stat3: linking inflammation to epithelial cancer - more than a "gut" feeling? [J]. Cell Div, 2010, 5: 14.
- Markovina S, Callander N S, O'Connor S L, et al. Bone marrow stromal cells from multiple myeloma patients uniquely induce bortezomib resistant NF-kappaB activity in myeloma cells [J]. Mol Cancer, 2010, 9: 176.
- Wang A L, Li Z, Yuan M, et al. Sinomenine inhibits activation of rat retinal microglia induced by advanced glycation end products [J]. Int Immunopharmacol, 2007, 7(12): 1552 - 8.

- [6] 刘继红,李卫东,滕慧玲,等. 青藤碱治疗类风湿性关节炎免疫作用和机制 [J]. 药理学, 2005,40(2):127-31.
- [7] Zhou Y, Chen S, Dai Y, et al. Sinomenine attenuated dextran sulfate sodium-induced inflammatory responses by promoting 14-3-3 σ protein and inhibiting NF- κ B signaling [J]. J Ethnopharmacol, 2023,303:116037.
- [8] Takeda K, Kaisho T, Yoshida N, et al. Stat3 activation is responsible for IL-6-dependent T cell proliferation through preventing apoptosis: generation and characterization of T cell-specific Stat3-deficient mice [J]. J Immunol, 1998,161(9):4652-60.
- [9] Zhang Z, Mao H, Du X, et al. A novel small molecule agent displays potent anti-myeloma activity by inhibiting the JAK2-STAT3 signaling pathway [J]. Oncotarget, 2016,7(8):9296-308.
- [10] Suh D H, Kim M K, Kim H S, et al. Unfolded protein response to autophagy as a promising druggable target for anticancer therapy [J]. Ann N Y Acad Sci, 2012,1271(1):20-32.
- [11] Liu H, Ma Y, Cole S M, et al. Serine phosphorylation of STAT3 is essential for Mcl-1 expression and macrophage survival [J]. Blood, 2003,102(1):344-52.
- [12] Wang Y, Wu L, Cai H, et al. YL064 directly inhibits STAT3 activity to induce apoptosis of multiple myeloma cells [J]. Cell Death Discov, 2018,4:44.
- [13] Ramakrishnan V, D'Souza A. Signaling pathways and emerging therapies in multiple myeloma [J]. Curr Hematol Malig Rep, 2016,11(2):156-64.
- [14] Cippitelli M, Stabile H, Kosta A, et al. Role of NF- κ B signaling in the interplay between multiple myeloma and mesenchymal stromal cells [J]. Int J Mol Sci, 2023,24(3):1823.

The effect of sinomenine on proliferation and apoptosis of multiple myeloma U266 cells through regulation of STAT3 and NF- κ B signaling pathways

Wang Yingying¹, Zhou Shiyang², Chen Jie², Qiao Ying², Zhao Yi², Wu Jiayu², Wu Yingli¹, Weng Wei²

(¹Dept of Pathophysiology, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Key Laboratory of Cell Differentiation and Apoptosis, Ministry of Education, Shanghai 200025; ²Dept of Blood

Transfusion, Tongren Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200336)

Abstract Objective To investigate the effect of sinomenine on proliferation and migration of multiple myeloma (MM) cells by regulating STAT3 and NF- κ B signaling pathway. **Methods** The cultured U266 cells were treated with different concentrations of sinomenine (0, 0.5, 1, 2 mmol/L). The control group was added DMSO with 0.5% concentration. CCK-8 assay was used to detect the proliferation of U266 cells. Flow cytometry was used to detect the apoptosis of U266 cells. Western blot assay was used to detect the expression levels of apoptosis-related proteins, STAT3 and NF- κ B signaling pathway proteins in the each group. **Results** Compared with CON group, the apoptosis of U266 cells increased after Sinomenine treatment, the proliferation was inhibited; B lymphoma-2 (Bcl-2) myeloid and cell leukemia-1 (Mcl-1) expression level decreased; activated Caspase-3 (cleaved Caspase-3) and PARP (Cleaved Caspase-3) expression levels increased; the activity of STAT3 and NF- κ B signaling pathway decreased. **Conclusion** Sinomenine can down-regulate the activity of STAT3 and NF- κ B signaling pathway, promote the apoptosis of U266 cells and inhibit the proliferation of U266 cells.

Key words resveratrol; multiple myeloma; U266 cells; STAT3 signaling pathway; NF- κ B signaling pathway