

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00794

· 短篇论著 ·

## 青蒿琥酯引起骨髓瘤细胞 RPMI8226 G<sub>2</sub>/M 期阻滞

王素云<sup>1\*</sup>, 刘志妙<sup>2</sup>, 郝洪岭<sup>1</sup>, 成志勇<sup>3</sup>, 杨晓阳<sup>1</sup>, 李杰<sup>1</sup>, 王瑞仓<sup>1</sup>, 李燕<sup>1</sup>, 杨洁<sup>1</sup>, 袁军<sup>1</sup>, 王超<sup>1</sup>

1. 河北省人民医院血液内科, 石家庄 050001

2. 石家庄丰益肛泰医院外科, 石家庄 050000

3. 保定市第一医院血液内科, 石家庄 071000

**[摘要]** **目的** 研究青蒿琥酯对人多发性骨髓瘤细胞系 RPMI8226 细胞周期的影响及可能机制。**方法** 分别以浓度为 0、25、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的青蒿琥酯作用于 RPMI8226 细胞, 用透射电镜观察细胞变化, 流式细胞术检测细胞周期分布, 蛋白质印迹法检测细胞周期相关蛋白 cyclin B1 和 p34<sup>cdc2</sup> 的变化。**结果** 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  青蒿琥酯处理 48 h 后, 多数细胞显示出凋亡细胞的特征性形态。随着青蒿琥酯浓度增加, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞的比例逐渐下降 ( $P < 0.05$ ), G<sub>2</sub>/M 期细胞的比例逐渐上升 ( $P < 0.05$ ), 细胞明显阻滞于 G<sub>2</sub>/M 期。细胞周期蛋白 cyclin B1 表达水平随青蒿琥酯浓度的增加而增加, p34<sup>cdc2</sup> 表达水平随青蒿琥酯浓度的增加而降低。**结论** 青蒿琥酯能将 RPMI8226 细胞阻滞于 G<sub>2</sub>/M 期, 其机制可能与 cyclin B1 的升高及 p34<sup>cdc2</sup> 的降低有关。

**[关键词]** 青蒿琥酯; 多发性骨髓瘤; 细胞周期; 细胞周期蛋白 B1; CDC2 蛋白激酶**[中图分类号]** R 286.91; R 733.3**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2013)07-0794-03

### Artesunate induced G<sub>2</sub>/M phase cell cycle arrest in multiple myeloma RPMI8226 cells

WANG Su-yun<sup>1\*</sup>, LIU Zhi-miao<sup>2</sup>, HAO Hong-ling<sup>1</sup>, CHENG Zhi-yong<sup>3</sup>, YANG Xiao-yang<sup>1</sup>, LI Jie<sup>1</sup>, WANG Rui-cang<sup>1</sup>, LI Yan<sup>1</sup>, YANG Jie<sup>1</sup>, YUAN Jun<sup>1</sup>, WANG Chao<sup>1</sup>

1. Department of Hematology, Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050051, Hebei, China

2. Department of Surgery, Fengyigangtai Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050000, Hebei, China

3. Department of Hematology, the First Hospital of Baoding, Baoding 071000, Hebei, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of artesunate on the cell cycle of human multiple myeloma RPMI8226 cells and explore the related molecular mechanisms. **Methods** RPMI8226 cells were treated with 0, 25, and 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  artesunate. The morphology change of cells was observed under transmission electron microscope, the cell cycle distribution was detected by flow cytometry, and the expression of cyclin B1 and p34<sup>cdc2</sup> protein was examined by Western blotting analysis. **Results** After treated with 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  artesunate for 48 h, most RPMI8226 cells showed characteristic morphology of apoptosis. With the increase of artesunate concentration, the proportion of RPMI8226 cells in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase was significantly decreased ( $P < 0.05$ ) and that of cells in G<sub>2</sub>/M phase was significantly increased ( $P < 0.05$ ), suggesting that artesunate induced noticeable G<sub>2</sub>/M arrest. Cyclin B1 level was increased and the p34<sup>cdc2</sup> level was decreased with the increase of artesunate concentration. **Conclusion**

Artesunate can induce G<sub>2</sub>/M arrests in RPMI8226 cells, which may be related to the increased cyclin B1 expression and decreased p34<sup>cdc2</sup> expression.

**[Key words]** artesunate; multiple myeloma; cell cycle; cyclin B1; CDC2 protein kinase

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(7):794-796]

青蒿琥酯 (artesunate) 是青蒿素的衍生物, 是一个包含过氧化物基团 (-C-O-O-C-) 的倍半萜框架复合物。本课题组在前期研究中发现, 青蒿琥酯对小鼠骨髓瘤细胞株有抑制增殖、促进凋亡作用<sup>[1-2]</sup>, 并

可引起 SP2/0 细胞周期阻滞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期<sup>[1]</sup>。本实验旨在进一步验证青蒿琥酯对人多发性骨髓瘤细胞株 RPMI8226 细胞周期分布的影响, 并初步探讨其影响细胞周期分布的机制。

**[收稿日期]** 2013-01-09 **[接受日期]** 2013-04-07**[基金项目]** 河北省科技厅科技支撑计划项目 (12276104D-1). Supported by Science and Technology Supporting Program of Hebei Province (12276104D-1).**[作者简介]** 王素云, 博士, 副主任医师。

\* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 0311-85988214, E-mail: suyunwen@163.com

## 1 材料和方法

1.1 材料 人多发性骨髓瘤细胞株 RPMI8226 为河北省人民医院血液内科实验室保存,用含 10% 胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司)的 RPMI1640 培养液在 37℃、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度环境下孵育。青蒿琥酯购自上海复星医药有限公司(规格为 60 mg/支,批号: H10930195)。Cyclin B1、p34<sup>cdc2</sup> 鼠抗人单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司;HRP 标记的山羊抗鼠二抗购自北京鼎国生物技术有限责任公司。

1.2 透射电镜下观察细胞形态学变化 因 50 μg/mL 青蒿琥酯诱导 RPMI8226 细胞凋亡的作用最明显<sup>[2]</sup>,本研究主要观察了 50 μg/mL 青蒿琥酯作用 48 h 后 RPMI8226 细胞的凋亡形态。取细胞洗涤后离心,用 4% 戊二醛固定后,脱水、浸蜡、包埋、切片,用透射电镜观察细胞形态学变化。

1.3 流式细胞术检测细胞周期 因青蒿琥酯的半数有效抑制浓度(IC<sub>50</sub>)为 36.47 μg/mL<sup>[2]</sup>,本实验取对数生长期 RPMI8226 细胞,以终浓度为 0、25、50 μg/mL 的青蒿琥酯进行作用。分别于作用 48 h 后收集细胞,PBS 清洗后用 70% 乙醇 4℃ 固定,再次 PBS 清洗后,加入 RNA 酶,10 min 后用终浓度为 50 μg/mL 的 PI 染色 30 min。上流式细胞仪测定细胞周期分布。

1.4 蛋白质印迹检测细胞周期相关蛋白表达 收集经不同浓度青蒿琥酯作用 48 h 后的 RPMI8226 细胞,离心弃上清,预冷的 1×PBS 洗 2 次,用 200 μL 预冷的蛋白裂解液于 4℃ 裂解 1 h,冰浴下超声裂解 15 min。4℃、16 000×g 离心 10 min,取上清液。用 BCA 蛋白浓度检测试剂盒测定蛋白浓度,取 80 μg 样品蛋白加入等体积上样缓冲液,经 SDS-PAGE

后,用水浴式电转仪转至硝酸纤维素膜上。用 5% 胎牛血清白蛋白 37℃ 封闭 1 h,分别加入以 5% 脱脂奶粉 1:500 稀释的鼠抗人 cyclin B1 抗体、p34<sup>cdc2</sup> 抗体、β-actin 单克隆抗体,4℃ 孵育过夜。TBS 洗膜 3 次,加入 HRP 标记山羊抗小鼠二抗,37℃ 培养 1 h,TBS 洗膜 3 次。化学发光法检测后分析结果。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 11.5 统计学软件对数据进行分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用方差分析。检验水平( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 青蒿琥酯对 RPMI8226 细胞形态学的影响 透射电镜观察显示 50 μg/mL 青蒿琥酯处理 48 h 后,多数细胞显示出凋亡细胞的特征性形态:部分细胞核出现核染色质边移、染色质固缩,有的碎裂成数个团块;胞质有大空泡形成,胞体减小(图 1)。

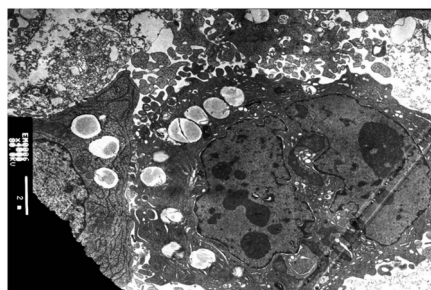


图 1 青蒿琥酯(50 μg/mL)作用 48 h 后凋亡细胞的电镜下形态

Original magnification: ×4 000

2.2 青蒿琥酯对 RPMI8226 细胞周期的影响 由图 2 可见,不同浓度的青蒿琥酯作用于 RPMI8226 细胞 48 h 后,G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞的比例随着青蒿琥酯浓度的升高而下降,G<sub>2</sub>/M 期细胞的比例随着青蒿琥酯浓度的升高而上升( $P < 0.05$ )。

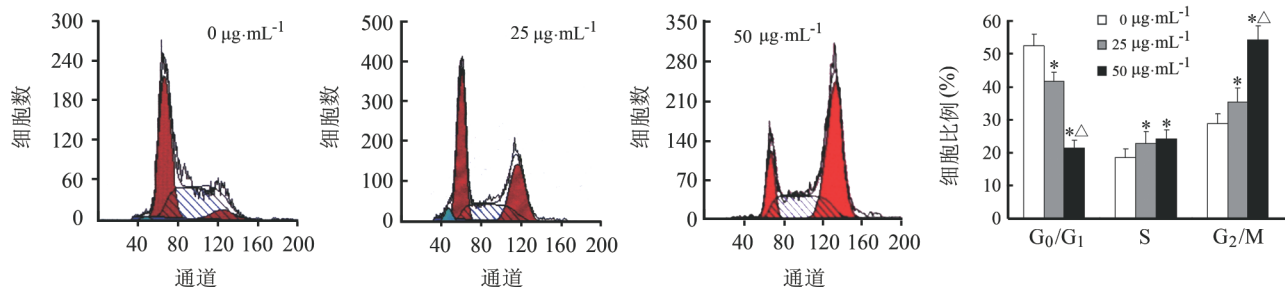


图 2 不同浓度青蒿琥酯作用 48 h 后 RPMI8226 细胞周期变化

\*  $P < 0.05$  与 0 μg/mL 组比较; △  $P < 0.05$  与 25 μg/mL 组比较.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$

2.3 青蒿琥酯对 cyclin B1 和 p34<sup>cdc2</sup> 蛋白表达的影响 当 RPMI8226 细胞经不同浓度青蒿琥酯作用 48 h 后, cyclin B1 蛋白表达量随着青蒿琥酯浓度的增加而增加, 而 p34<sup>cdc2</sup> 蛋白表达量随着青蒿琥酯浓度的增加而逐渐减少, 呈现出浓度依赖关系(图 3)。

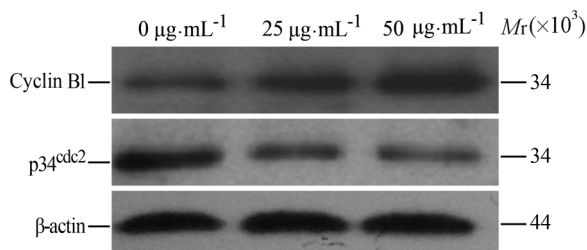


图 3 不同浓度青蒿琥酯作用 48 h 后 RPMI8226 细胞 cyclin B1 和 p34<sup>cdc2</sup> 蛋白的表达

### 3 讨论

肿瘤细胞的增殖、凋亡、分化、衰老均为细胞周期依赖性。细胞周期中有 2 个基本调控点, 能够监视细胞周期调控的运作, 是确保基因准确遗传的关键所在。一个调控点位于 G<sub>1</sub> 期和 S 期的过渡时期, 另一个位于 G<sub>2</sub> 与 M 期之间。Finaurini 等<sup>[3]</sup>发现双氢青蒿素能够通过影响细胞周期从而抑制人类红细胞的分化。本研究观察到 0、25、50 μg/mL 的青蒿琥酯作用于 RPMI8226 细胞 48 h 后, 随着青蒿琥酯浓度增加, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞的比例逐渐减少, G<sub>2</sub>/M 期细胞的比例逐渐增加, 细胞周期被明显阻滞于 G<sub>2</sub>/M 期。既往研究发现, 青蒿琥酯可以将人表皮样癌 A431 细胞和人子宫内膜癌 HEC-1B 细胞阻滞在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期<sup>[4-5]</sup>, 本课题组前期的研究表明青蒿琥酯可使 SP2/0 细胞周期阻滞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期<sup>[1]</sup>, 但周晋等<sup>[6]</sup>发现在人白血病细胞株 NB4、K562 和原代 APL 细胞中, 细胞周期阻滞于 G<sub>2</sub>/M 期, 可见青蒿琥酯对于不同肿瘤细胞周期的影响不同。

细胞周期调控系统的基础是 2 个蛋白家族: 一是周期素依赖的蛋白激酶(CDKs), 另一个是周期素(cyclin)。CDK4、CDK6、cyclin D 主要调控 G<sub>1</sub> 期, CDK1、cyclin A、cyclin B1 主要调控 G<sub>2</sub> 期。Cyclin B1 是 G<sub>2</sub>/M 调控点的正性调控因子, cyclin B 与 CDK1 形成有丝分裂促进因子(mitosis promoting factor, MPF), 直接参与细胞成熟和有丝分裂<sup>[7]</sup>。细胞周期由 G<sub>2</sub> 期到有丝分裂期的过渡是由蛋白激酶

p34<sup>cdc2</sup> 来调控。Cyclin B1 是 p34<sup>cdc2</sup> 最重要的调控因子, p34<sup>cdc2</sup> 只有在与 cyclin B1 结合之后才能发挥其磷酸化底物的作用, 使细胞从 G<sub>1</sub>/S 期进入到 G<sub>2</sub>/M 期。本研究发现随着青蒿琥酯浓度的增加, RPMI8226 细胞 cyclin B1 蛋白的表达水平逐渐增加, p34<sup>cdc2</sup> 蛋白的表达水平逐渐降低, 呈浓度依赖关系。说明青蒿琥酯将 RPMI8226 细胞阻滞于 G<sub>2</sub>/M 期的机制可能与 cyclin B1 升高及 p34<sup>cdc2</sup> 的降低有关。深入研究青蒿琥酯对多发性骨髓瘤细胞周期分布的影响及其机制, 将为多发性骨髓瘤的治疗提供新的依据。

### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

### [参考文献]

- [1] 李世辉, 潘 峻, 薛 芳. 青蒿琥酯对骨髓瘤细胞 SP2/0 的作用观察及其机制的初步探讨[J]. 中华肿瘤杂志, 2008, 30: 16-20.
- [2] 王素云, 杨晓阳, 邓 凯, 成志勇, 陈 浩, 杨静慈, 等. 青蒿琥酯对骨髓瘤 RPMI8226 细胞增殖、凋亡及对 Survivin、Caspase-3、Caspase-7 的影响[J]. 中草药, 2010, 41: 39-43.
- [3] Finaurini S, Basilico N, Corbett Y, D'Alessandro S, Parapini S, Oliario P, et al. Dihydroartemisinin inhibits the human erythroid cell differentiation by altering the cell cycle[J]. Toxicology, 2012, 300: 57-66.
- [4] Jiang Z, Chai J, Chuang H H, Li S, Wang T, Cheng Y, et al. Artesunate induces G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> cell cycle arrest and iron-mediated mitochondrial apoptosis in A431 human epidermoid carcinoma cells[J]. Anticancer Drugs, 2012, 23: 606-613.
- [5] 王利娟, 杨玉琮, 苟文丽. 青蒿琥酯抑制人子宫内膜癌 HEC-1B 细胞增殖及诱导其凋亡的机制[J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2013, 34: 93-97.
- [6] 周 晋, 孟 然, 李丽敏, 刘 影, 李宝馨, 杨宝峰. 青蒿素对人白血病细胞株和原代细胞的影响[J]. 中华内科杂志, 2003, 42: 713-715.
- [7] Han S J, Conti M. New pathways from PKA to the Cdc2/cyclin B complex in oocytes: Wee1B as a potential PKA substrate [J]. Cell Cycle, 2006, 5: 227-231.

[本文编辑] 魏学丽, 孙 岩