

DOI: 10.16781/j.0258-879x.2019.09.0963

· 论 著 ·

雷公藤红素诱导未折叠蛋白反应信号通路中真核细胞翻译起始因子 2 α 活化抑制多发性骨髓瘤细胞生长

彭彬^{1,Δ}, 宋瑜婷^{1,2,Δ}, 张雪¹, 王莹¹, 曹帆帆¹, 张登海^{1*}

1. 海军军医大学(第二军医大学)附属公利医院中心实验室, 上海 200135

2. 宁夏医科大学研究生院, 银川 750000

[摘要] **目的** 研究雷公藤红素抑制多发性骨髓瘤细胞增殖与未折叠蛋白反应(UPR)的关系和分子机制, 为多发性骨髓瘤的治疗提供新的药物靶点。**方法** 4种多发性骨髓瘤细胞株 RPMI 8226、U266、SKO、KMS-11, 经不同浓度雷公藤红素(增殖实验 0.0~10.0 $\mu\text{mol/L}$ 、凋亡实验 0.0~4.0 $\mu\text{mol/L}$ 、周期阻滞实验 0.0~1.5 $\mu\text{mol/L}$)处理不同时间(增殖实验 1~3 d、凋亡实验 1 d、周期阻滞实验 1 d)后, 检测细胞增殖、凋亡、周期阻滞情况; 用蛋白质印迹法检测肌醇需求酶 1(IRE1)、蛋白激酶样内质网激酶(PERK)和活化转录因子 6(ATF6) 3条 UPR 信号通路中主要分子的表达, 包括葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)、ATF6、PERK、真核细胞翻译起始因子 2 α (eIF2 α)、磷酸化 eIF2 α (p-eIF2 α)、C/EBP 同源蛋白(CHOP)、IRE1、磷酸化 IRE1(p-IRE1)。用慢病毒包装的含短发夹 RNA(shRNA)载体对 eIF2 α 表达进行干扰, 观察雷公藤红素对干扰 eIF2 α 表达后的 RPMI 8226 细胞 UPR 信号分子表达、凋亡和细胞周期的影响。**结果** 雷公藤红素以剂量和时间依赖方式抑制 4 种多发性骨髓瘤细胞增殖、诱导凋亡、使细胞周期阻滞在 G₀/G₁ 期, 其中 RPMI 8226 细胞对雷公藤红素最敏感。在 RPMI 8226 细胞, 雷公藤红素处理浓度在 0.5~2.0 $\mu\text{mol/L}$ 作用 30 min~24 h 时均能使 UPR 的 PERK 通路中 p-eIF2 α 表达水平升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 其下游 CHOP 表达也相应增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 而对其他 2 条通路 ATF6 和 IRE1 影响不明显。用慢病毒干扰 eIF2 α 表达后, 雷公藤红素上调 CHOP 表达、诱导凋亡和周期阻滞的作用均减弱或消失。**结论** 雷公藤红素能抑制多种多发性骨髓瘤细胞增殖, 活化 UPR 的 PERK 信号通路中 eIF2 α 分子可能是其作用机制之一。

[关键词] 雷公藤红素; 多发性骨髓瘤; 未折叠蛋白反应; 真核细胞翻译起始因子 2 α

[中图分类号] R 733.3; R 285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2019)09-0963-07

Celastrol inhibits multiple myeloma cell growth by activating eukaryotic initiation factor 2 α in unfolded protein response

PENG Bin^{1,Δ}, SONG Yu-ting^{1,2,Δ}, ZHANG Xue¹, WANG Ying¹, CAO Fan-fan¹, ZHANG Deng-hai^{1*}

1. Central Laboratory, Gongli Hospital, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200135, China

2. Graduate School, Ningxia Medical University, Yinchuan 750000, Ningxia Hui Autonomous Region, China

[Abstract] **Objective** To investigate the relationship between celastrol inhibition against multiple myeloma cell growth and unfolded protein response (UPR) and the related molecular mechanism, so as to provide new drug targets for multiple myeloma treatment. **Methods** Four multiple myeloma cell lines RPMI 8226, U266, SKO and KMS-11 were treated with different concentrations (proliferation: 0.0-10.0 $\mu\text{mol/L}$; apoptosis: 0.0-4.0 $\mu\text{mol/L}$; cell cycle: 0.0-1.5 $\mu\text{mol/L}$) of celastrol for different periods (proliferation: 1-3 d; apoptosis: 1 d; cell cycle: 1 d), and cell proliferation, apoptosis and cell cycle were examined. Western blotting analysis was used to detect the main molecules in the inositol-requiring enzyme 1 (IRE1), PRKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK), and activating transcription factor 6 (ATF6) signaling pathways of UPR, which included glucose-regulated protein 78 (GRP78), ATF6, PERK, eukaryotic initiation factor 2 α (eIF2 α), phosphorylated-eIF2 α (p-eIF2 α), C/EBP homologous protein (CHOP), IRE1 and phosphorylated-IRE1 (p-IRE1). After the lentivirus vector

[收稿日期] 2019-04-17 **[接受日期]** 2019-06-26

[基金项目] 上海市浦东新区卫生和计划生育委员会学科带头人项目(PWRd2018-12), 海军军医大学(第二军医大学)附属公利医院人才培养计划(GLRb2018-01). Supported by Academic Leader Project of Shanghai Pudong New Area Health and Family Planning Commission (PWRd2018-12) and Talent Cultivation Project of Gongli Hospital of Naval Medical University (Second Military Medical University) (GLRb2018-01).

[作者简介] 彭彬, 博士, 副主任技师. E-mail: lily_1001pb@163.com; 宋瑜婷, 硕士生. E-mail: 1617210816@qq.com

^Δ共同第一作者(Co-first authors).

*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-58858730, E-mail: shanghai_zhang@hotmail.com

containing short hairpin RNA (shRNA) was used to interfere with *eIF2 α* expression in RPMI 8226 cells, the effects of celastrol were detected on signaling molecule expression, apoptosis and cell cycle. **Results** Celastrol inhibited the proliferation of 4 multiple myeloma cells, induced apoptosis, and arrested the cell cycle at G₀/G₁ phase in dose- and time-dependent manners. RPMI 8226 cells were most sensitive to celastrol. For RPMI 8226 cells, when 0.5-2.0 μ mol/L of celastrol was used for 30 min to 24 h, the p-eIF2 α levels in the PERK signaling pathway of UPR were significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the downstream CHOP expression was risen correspondingly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), but the other two pathways ATF6 and IRE1 were not affected obviously. After interference of *eIF2 α* expression with lentivirus vector containing shRNA, the effects of celastrol to increase CHOP expression, induce apoptosis and arrest cell cycle were significantly attenuated or disappeared. **Conclusion** Celastrol can inhibit the growth of a variety of multiple myeloma cells, and the activated eIF2 α molecule in the UPR PERK signaling pathway may be one of the mechanisms.

[Key words] celastrol; multiple myeloma; unfolded protein response; eukaryotic initiation factor 2 α

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2019, 40(9): 963-969]

多发性骨髓瘤 (multiple myeloma) 是一种难治性、恶性浆细胞病。骨髓瘤细胞含有丰富的内质网,能产生和分泌大量免疫球蛋白,这些免疫球蛋白在经内质网折叠时极易发生错误,从而诱发内质网应激,发生未折叠蛋白反应 (unfolded protein response, UPR)。一定程度 UPR 对维持骨髓瘤细胞内质网稳态和肿瘤细胞存活有重要作用^[1]。但过度的 UPR 将导致肿瘤细胞死亡。因此,靶向激活 UPR 的药物成为多发性骨髓瘤治疗领域的研究热点。UPR 主要通过 3 条信号通路发挥作用,分别为肌醇需求酶 1 (inositol-requiring enzyme 1, IRE1)、蛋白激酶样内质网激酶 (PKR-like endoplasmic reticulum kinase, PERK) 和活化转录因子 6 (activating transcription factor 6, ATF6) 通路。

雷公藤红素 (celastrol) 是从中药雷公藤植物中提取出的一种三萜类化合物,具有多种药理作用,包括抑制炎症^[2-3]、抗肿瘤^[4-5]、神经元保护^[6]等。本研究旨在考察雷公藤红素抑制多发性骨髓瘤细胞增殖是否与 UPR 信号通路有关,并明确相关分子机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料 多发性骨髓瘤细胞株 RPMI 8226 购自中国科学院上海细胞库,多发性骨髓瘤细胞株 U266、SKO、KMS-11 由海军军医大学 (第二军医大学) 长征医院侯健实验室馈赠。雷公藤红素购自美国 Sigma 公司 (纯度 $\geq 98\%$)。

细胞培养于含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养液中。每 2~3 d 更换 1 次新鲜培养液,取对数生长期的

细胞用于实验。细胞培养在 37 $^{\circ}$ C、含 5% CO₂ 培养箱中,并保持培养箱相对湿度维持在 95% 左右。

取一定量雷公藤红素溶于二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 中,配制成 50 mmol/L 的溶液, -20 $^{\circ}$ C 贮存。处理细胞前,用不含血清和酚红的 RPMI 1640 培养液将 50 mmol/L 雷公藤红素稀释至所需浓度。同时将等量 DMSO 用同样的培养液稀释,作为溶剂对照。

1.2 细胞增殖检测 用本实验室开发的羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酯 (5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, CFSE) 标记技术检测细胞增殖情况^[7]。简言之,先用 CFSE 标记细胞制成带荧光的细胞微球,收集药物处理后的细胞,加入 1×10^4 荧光细胞微球及碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 染料后,上流式细胞仪进行检测。

1.3 细胞凋亡检测 收集药物处理后的细胞,用预冷的磷酸盐缓冲液充分洗涤细胞 2 次,用结合缓冲液 (江苏碧云天生物技术研究所) 重悬细胞,取细胞悬液加入 Annexin V-异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 和 7-氨基放线菌素 (7-amino-actinomycin D, 7-AAD) 溶液。混匀后室温避光孵育 10 min,加入 300 μ L 结合缓冲液,上流式细胞仪进行检测。

1.4 细胞周期检测 药物处理后,收集细胞至流式管中,用 70% 乙醇固定 1 h 以上,磷酸盐缓冲液洗 3 次,加入含 RNA 酶、PI、Triton 的磷酸盐缓冲液中,37 $^{\circ}$ C 孵育 10 min 后,立刻上流式细胞仪进行检测。

1.5 蛋白质印迹法检测 收集处理后的细胞,提取总蛋白。取一定量蛋白上样至十二烷基硫酸钠-

聚丙烯酰胺凝胶进行电泳, 转膜, 膜与一抗孵育之后, 与相应的辣根过氧化物酶标记的二抗孵育, 用 ECL 进行显色, 用化学发光成像系统采集图像。

1.6 短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 载体构建 合成所需引物, sh-eIF2 α 正义引物 5'-CCG GGC ACC TTC ATT TGT TAG ATT AGG ATC CTA ATC TAA CAA ATG AAG GTG CTT TTT G-3', 反义引物 5'-AAT TCA AAA AGC ACC TTC ATT TGT TAG ATT AGG ATC CTA ATC TAA CAA ATG AAG GTG C-3'。引物溶解退火后, 将片段连入用 *EcoRI* 和 *AgeI* 双酶切过的 pHMGV2-U6-Puro 载体中, 并将连接产物转入 XL10 感受态细胞(美国 Addgene 公司)中, 提取质粒, 然后测序验证相关位点。

1.7 慢病毒包被 shRNA 载体及稳转株获得 将验证正确的载体用慢病毒包被后转染至 HEK293T 细胞(购自中国科学院上海细胞库), 经压力筛选后, 获得稳定转染 shRNA 的细胞。

1.8 统计学处理 用 SPSS 17.0 软件进行数据处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用方差分析。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 雷公藤红素抑制多发性骨髓瘤细胞增殖、诱导凋亡并导致细胞周期阻滞在 G₀/G₁ 期 用雷公藤红素分别处理人多发性骨髓瘤细胞株 RPMI 8226、U266、KMS-11、SKO 后, 发现雷公藤红素能抑制这 4 种细胞增殖, 且随药物浓度增加和处理时间延长抑制效果增强。其中 RPMI 8226 对雷公藤红素最敏感, 1、2、3 d 的半抑制浓度 (half-inhibitory concentration, IC₅₀) 值分别为 2.55、1.47、0.67 $\mu\text{mol/L}$; 对雷公藤红素最不敏感的是 SKO, 1、2、3 d 的 IC₅₀ 值分别为 4.81、3.83、2.00 $\mu\text{mol/L}$; U266 在 1、2、3 d 的 IC₅₀ 值分别为 2.61、1.98、1.21 $\mu\text{mol/L}$, KMS-11 在 1、2、3 d 的 IC₅₀ 值分别为 3.54、2.73、1.69 $\mu\text{mol/L}$ (图 1)。雷公藤红素浓度为 2.0~4.0 $\mu\text{mol/L}$ 时, 对 4 种多发性骨髓瘤细胞均能诱导发生凋亡 ($P < 0.01$); 在 1 $\mu\text{mol/L}$ 时即能诱导 RPMI 8226 细胞发生凋亡 ($P < 0.05$)。见图 2。雷公藤红素在 1.5 $\mu\text{mol/L}$ 时导致 RPMI 8226 和 U266 细胞周期阻滞在 G₀/G₁ 期, 但对 KMS-11 和 SKO 的细胞周期没有明显影响 (图 3)。

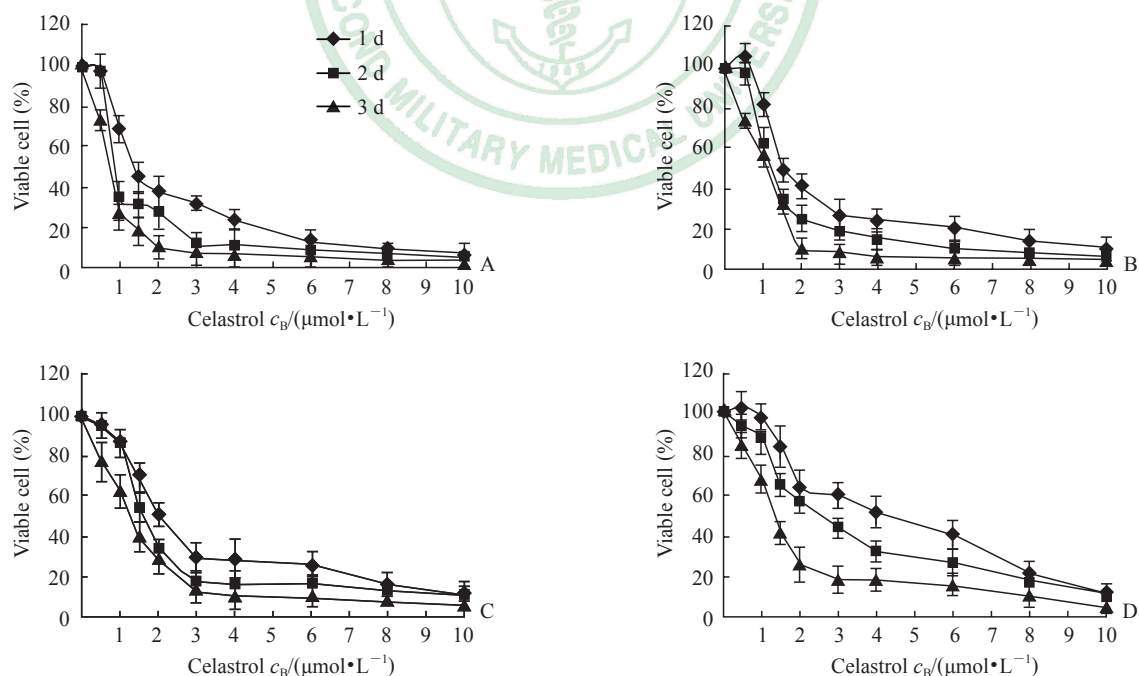


图 1 雷公藤红素以时间和剂量依赖方式抑制 4 种多发性骨髓瘤细胞株增殖

Fig 1 Celastrol inhibiting multiple myeloma cell proliferation in time- and dose-dependent ways

A: RPMI 8226; B: U266; C: KMS-11; D: SKO. $n=3, \bar{x} \pm s$

2.2 雷公藤红素对 RPMI 8226 UPR 信号通路分子表达的影响 RPMI 8226 经 0.5、1.0、

1.5、2.0 $\mu\text{mol/L}$ 雷公藤红素分别处理 10 min、30 min、1 h、6 h、24 h 后, 检测葡萄糖调节蛋

白78 (glucose-regulated protein 78, GRP78)、ATF6、PERK、真核细胞翻译起始因子 2 α (eukaryotic initiation factor 2 α , eIF2 α)、磷酸化 eIF2 α (p-eIF2 α)、C/EBP 同源蛋白 (C/EBP homologous protein, CHOP)、IRE1、磷酸化

IRE1 (p-IRE1) 的表达。结果显示,雷公藤红素主要影响 PERK 通路,并通过激活 p-eIF2 α 进一步促进下游的 CHOP 表达,而且这种作用具有剂量和时间依赖性;而对 ATF6 和 IRE1 通路没有明显影响 (图4、表1)。

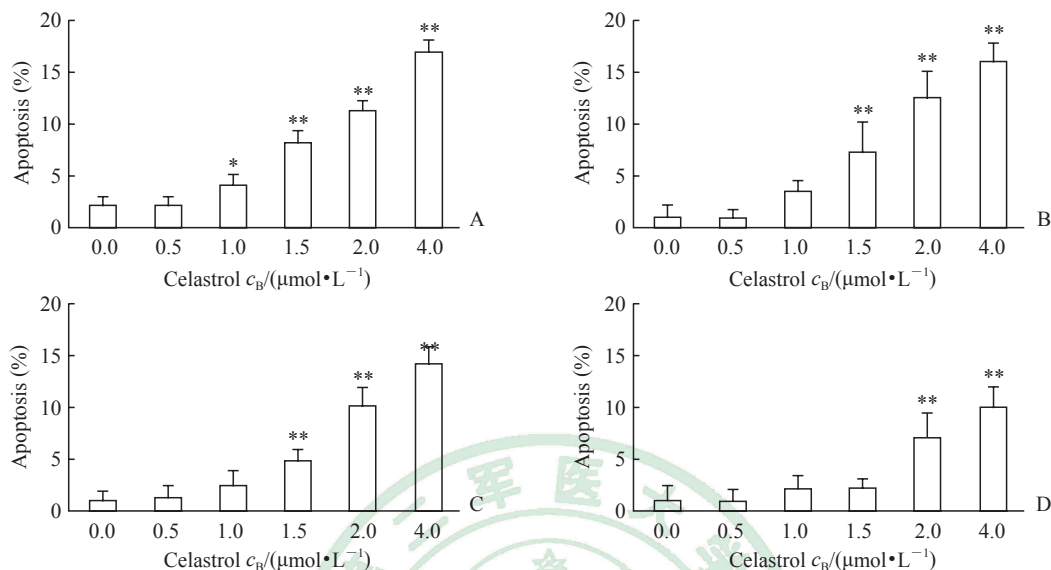


图2 雷公藤红素以剂量依赖方式诱导4种多发性骨髓瘤细胞株发生凋亡

Fig 2 Celastrol inducing multiple myeloma cell apoptosis in time- and dose-dependent ways

After 1 d treated with different concentrations of celastrol, the apoptosis levels of RPMI 8226 (A), U266 (B), KMS-11 (C) and SKO (D) cells were detected by flow cytometry. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0.0 $\mu\text{mol/L}$ celastrol group. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

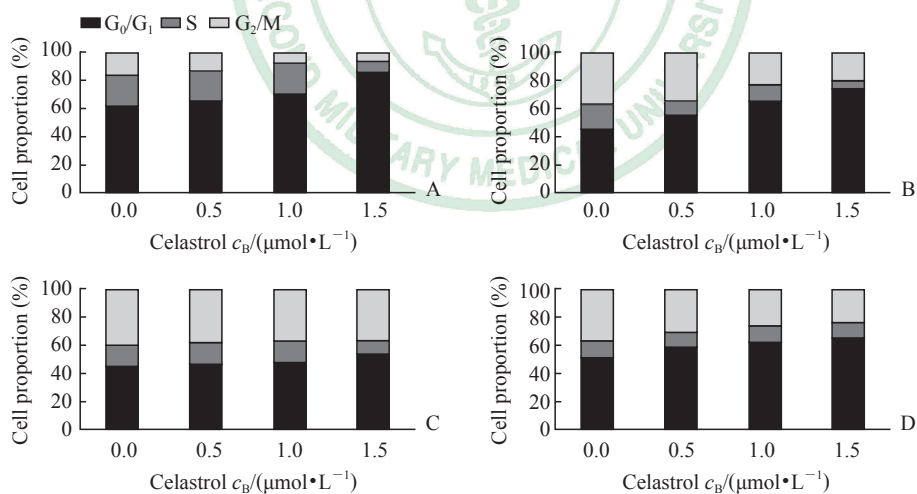


图3 雷公藤红素对4种多发性骨髓瘤细胞株细胞周期的影响

Fig 3 Effect of celastrol on cell cycle of multiple myeloma cells

After 1 d treated with different concentrations of celastrol, the cell cycle of RPMI 8226 (A), U266 (B), KMS-11 (C) and SKO (D) cells was detected by flow cytometry

2.3 雷公藤红素通过激活 eIF2 α 抑制多发性骨髓瘤细胞生长 为进一步验证 eIF2 α 活化在雷公藤红素抑制多发性骨髓瘤细胞生长中的作用,本研究通过构建针对 eIF2 α 的 shRNA 慢病毒载体,筛选出低表达 eIF2 α 的 RPMI 8226 稳转株 (图 5A)。将低表达 eIF2 α 的 RPMI 8226 细胞经 0.5、1.0、1.5、2.0 $\mu\text{mol/L}$

雷公藤红素分别处理 10 min、30 min、1 h、6 h、24 h 后检测 eIF2 α 下游 CHOP 表达,结果显示雷公藤红素上调 CHOP 表达的作用消失 (图 5B~5F)。此外, eIF2 α 低表达后,雷公藤红素诱导多发性骨髓瘤细胞发生凋亡的能力减弱 (图 6),而且不再能使多发性骨髓瘤细胞发生周期阻滞 (图 7)。

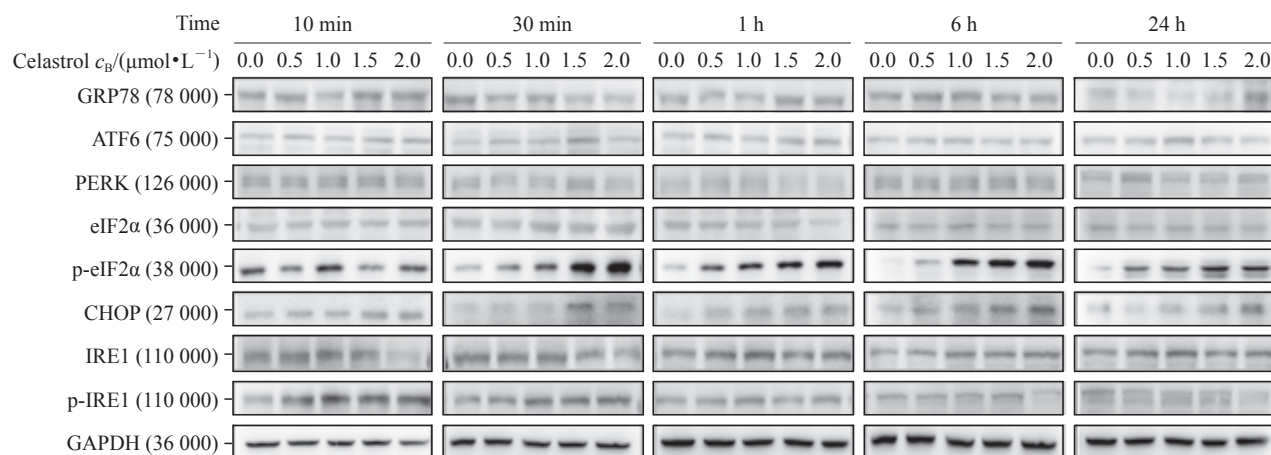


图4 雷公藤红素对多发性骨髓瘤细胞株 RPMI 8226 UPR 信号通路分子表达的影响

Fig 4 Effect of celastrol on UPR signal pathway in multiple myeloma cell RPMI 8226

UPR: Unfolded protein response; GRP78: Glucose-regulated protein 78; ATF6: Activating transcription factor 6; PERK: RKR-like endoplasmic reticulum kinase; eIF2 α : Eukaryotic initiation factor 2 α ; p-eIF2 α : Phosphorylated-eukaryotic initiation factor 2 α ; CHOP: C/EBP homologous protein; IRE1: Inositol-requiring enzyme 1; p-IRE1: Phosphorylated-inositol-requiring enzyme 1; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

表1 雷公藤红素处理后多发性骨髓瘤细胞株 RPMI 8226 UPR 信号通路分子相对表达量

Tab 1 Relative expression of UPR signal pathway molecules in multiple myeloma cell RPMI 8226 after celastrol treatment

Time	Celastrol $c_B/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	$n=3, \bar{x}\pm s$								
		GRP78	ATF6	PERK	eIF2 α	p-eIF2 α	CHOP	IRE1	p-IRE1	
10 min	0.0	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	0.5	1.15 \pm 0.22	1.17 \pm 0.35	1.12 \pm 0.31	1.11 \pm 0.26	0.98 \pm 0.26	1.19 \pm 0.11	1.16 \pm 0.60	1.27 \pm 0.56	
	1.0	0.96 \pm 0.23	1.14 \pm 0.15	1.14 \pm 0.35	1.16 \pm 0.18	1.14 \pm 0.28	1.19 \pm 0.20	1.13 \pm 0.24	1.32 \pm 0.45	
	1.5	1.29 \pm 0.17	1.18 \pm 0.28	1.12 \pm 0.25	1.13 \pm 0.28	0.92 \pm 0.11	1.16 \pm 0.33	1.04 \pm 0.67	1.16 \pm 0.48	
	2.0	1.20 \pm 0.09	1.00 \pm 0.14	1.00 \pm 0.23	1.07 \pm 0.30	0.99 \pm 0.11	1.15 \pm 0.34	0.81 \pm 0.49	1.16 \pm 0.48	
30 min	0.0	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
	0.5	0.94 \pm 0.26	1.06 \pm 0.28	0.94 \pm 0.22	0.97 \pm 0.18	1.17 \pm 0.11	1.03 \pm 0.23	0.97 \pm 0.32	1.06 \pm 0.50	
	1.0	1.05 \pm 0.14	1.04 \pm 0.12	1.03 \pm 0.23	1.14 \pm 0.17	1.44 \pm 0.15**	1.14 \pm 0.13	0.97 \pm 0.41	1.17 \pm 0.51	
	1.5	0.99 \pm 0.23	1.15 \pm 0.31	1.07 \pm 0.26	1.06 \pm 0.30	1.76 \pm 0.11**	1.38 \pm 0.28**	0.88 \pm 0.40	1.11 \pm 0.48	
	2.0	0.80 \pm 0.45	1.07 \pm 0.29	0.84 \pm 0.19	1.01 \pm 0.23	1.55 \pm 0.15**	1.31 \pm 0.25**	0.81 \pm 0.46	1.07 \pm 0.38	
1 h	0.0	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
	0.5	0.91 \pm 0.25	1.12 \pm 0.26	1.14 \pm 0.33	1.08 \pm 0.38	1.20 \pm 0.29*	1.22 \pm 0.17**	1.08 \pm 0.30	1.08 \pm 0.31	
	1.0	0.91 \pm 0.09	0.98 \pm 0.15	1.16 \pm 0.33	1.07 \pm 0.30	1.30 \pm 0.17**	1.31 \pm 0.17**	1.08 \pm 0.26	1.14 \pm 0.37	
	1.5	1.10 \pm 0.16	1.12 \pm 0.55	1.09 \pm 0.18	1.07 \pm 0.24	1.37 \pm 0.17**	1.33 \pm 0.27**	1.02 \pm 0.21	1.11 \pm 0.24	
	2.0	1.18 \pm 0.38	1.12 \pm 0.27	1.01 \pm 0.29	1.02 \pm 0.20	1.65 \pm 0.19**	1.33 \pm 0.10**	1.10 \pm 0.26	1.16 \pm 0.55	
6 h	0.0	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
	0.5	1.08 \pm 0.15	0.95 \pm 0.40	0.93 \pm 0.18	0.95 \pm 0.28	1.67 \pm 0.24**	1.06 \pm 0.14	0.99 \pm 0.39	0.93 \pm 0.39	
	1.0	1.19 \pm 0.28	1.04 \pm 0.45	1.00 \pm 0.23	1.06 \pm 0.28	2.04 \pm 0.23**	1.16 \pm 0.15**	1.09 \pm 0.23	0.99 \pm 0.48	
	1.5	0.96 \pm 0.16	0.96 \pm 0.22	0.96 \pm 0.33	0.99 \pm 0.26	2.38 \pm 0.18**	1.21 \pm 0.23**	1.04 \pm 0.13	1.06 \pm 0.14	
	2.0	0.81 \pm 0.32	0.90 \pm 0.20	0.77 \pm 0.34	0.94 \pm 0.18	2.37 \pm 0.23**	1.42 \pm 0.12**	1.07 \pm 0.36	0.80 \pm 0.35	
24 h	0.0	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
	0.5	1.02 \pm 0.32	1.05 \pm 0.38	1.14 \pm 0.11	1.00 \pm 0.13	1.66 \pm 0.30**	1.02 \pm 0.47	1.06 \pm 0.45	0.97 \pm 0.05	
	1.0	0.94 \pm 0.11	1.12 \pm 0.38	1.10 \pm 0.31	1.05 \pm 0.18	1.99 \pm 0.40**	1.23 \pm 0.11*	1.09 \pm 0.13	1.00 \pm 0.38	
	1.5	1.11 \pm 0.43	1.17 \pm 0.45	1.21 \pm 0.40	1.03 \pm 0.28	2.30 \pm 0.48**	1.80 \pm 0.22**	1.03 \pm 0.26	1.05 \pm 0.41	
	2.0	1.17 \pm 0.21	0.92 \pm 0.40	1.03 \pm 0.25	0.93 \pm 0.30	2.25 \pm 0.43**	1.89 \pm 0.16**	0.97 \pm 0.18	0.91 \pm 0.31	

UPR: Unfolded protein response; GRP78: Glucose-regulated protein 78; ATF6: Activating transcription factor 6; PERK: RKR-like endoplasmic reticulum kinase; eIF2 α : Eukaryotic initiation factor 2 α ; p-eIF2 α : Phosphorylated-eukaryotic initiation factor 2 α ; CHOP: C/EBP homologous protein; IRE1: Inositol-requiring enzyme 1; p-IRE1: Phosphorylated-inositol-requiring enzyme 1. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs 0.0 $\mu\text{mol/L}$ celastrol group

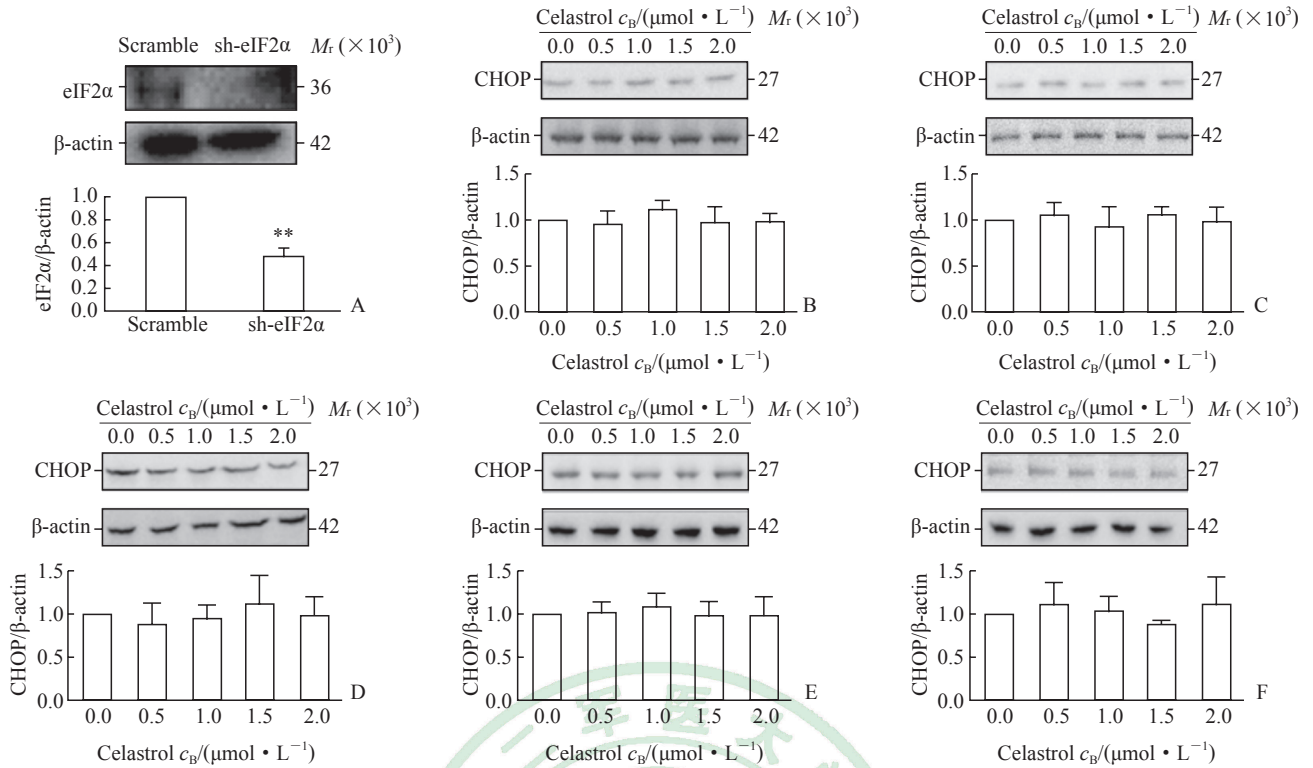


图5 干扰 *eIF2α* 后雷公藤红素对其下游 CHOP 分子表达的影响

Fig 5 Effect of celastrol on CHOP expression following interfering *eIF2α*

A: Expression of *eIF2α* protein in RPMI 8226 cells treated by short hairpin RNA; B-F: Expression of CHOP protein in RPMI 8226 cells interfered with sh-*eIF2α* and followed by celastrol treatment for 10 min (B), 30 min (C), 1 h (D), 6 h (E) and 24 h (F). *eIF2α*: Eukaryotic initiation factor 2α; CHOP: C/EBP homologous protein. ***P* < 0.01 vs scramble group. *n* = 3, $\bar{x} \pm s$

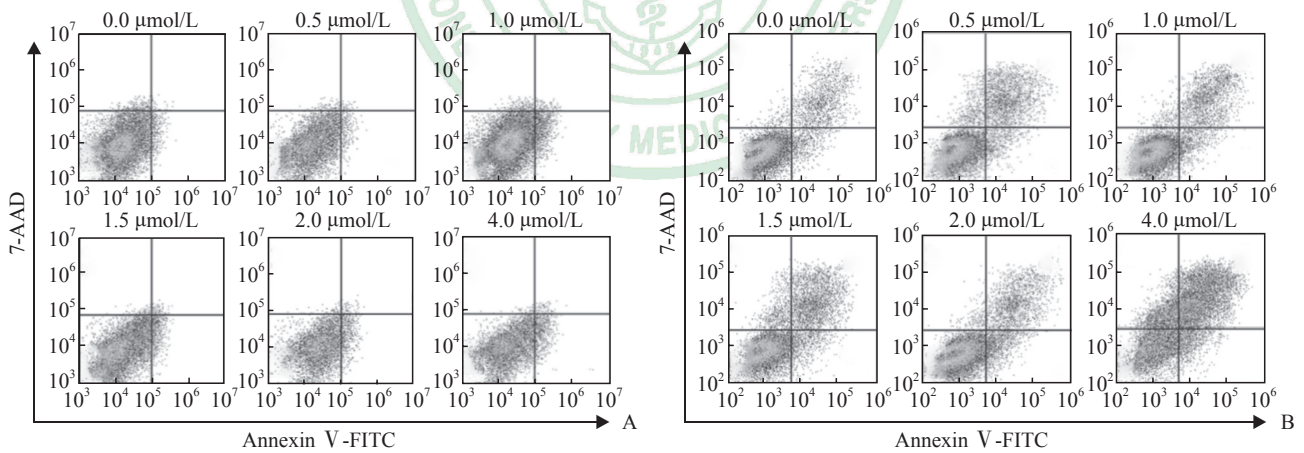


图6 干扰 *eIF2α* 后不同浓度雷公藤红素对多发性骨髓瘤细胞株 RPMI 8226 凋亡的影响

Fig 6 Effect of different concentrations of celastrol on apoptosis of multiple myeloma cell RPMI 8226 following interfering *eIF2α*

A: Scramble; B: sh-*eIF2α*. *eIF2α*: Eukaryotic initiation factor 2α; FITC: Fluorescein isothiocyanate; 7-AAD: 7-amino-actinomycin D

3 讨论

研究表明, 雷公藤红素能抑制多发性骨髓瘤细胞增殖, 诱导凋亡^[8-9]。本研究同时对多种多发性骨髓瘤细胞株进行研究, 也发现雷公藤红素能抑制多发性骨髓瘤细胞增殖, 此外还发现雷公藤红素

能使 RPMI 8226 和 U266 细胞阻滞在 G_0/G_1 期, 并与诱导 UPR 有关。

骨髓瘤细胞内单克隆免疫球蛋白或轻链 (M 蛋白) 过度生成, 为维持生存会发生内质网应激, 导致 UPR, 如果内质网应激未能得到缓解, UPR 将诱导细胞凋亡^[10]。在哺乳动物中, 内质网膜上存

在3种应激感受蛋白: IRE1、PERK、ATF6。这些跨膜蛋白位于内质网内面的结构域和内质网伴侣分子 GRP78 相互作用。其中 PERK 可通过 ATF4/ATF3 介导的 CHOP 表达增加诱导凋亡^[10-12]。研究

发现, 雷公藤红素能致头颈癌细胞死亡, 这一作用依赖于诱导 UPR, 其主要通过活化 PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP 或 IRE1/XBP1 通路激活 UPR^[13]。

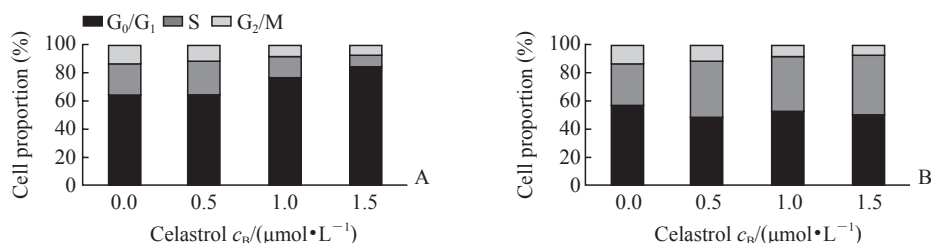


图7 干扰 eIF2 α 后雷公藤红素对多发性骨髓瘤细胞株 RPMI 8226 细胞周期的影响

Fig 7 Effect of celastrol on cell cycle of multiple myeloma cell RPMI 8226 following interfering eIF2 α

A: Scramble; B: sh-eIF2 α . eIF2 α : Eukaryotic initiation factor 2 α

本研究对 UPR 3 条信号通路中的主要分子进行检测, 发现雷公藤红素能激活 eIF2 α 并使下游的 CHOP 表达升高, 提示雷公藤红素抑制多发性骨髓瘤细胞增殖可能与该通路有关。本研究还发现通过 shRNA 干扰技术降低多发性骨髓瘤细胞 eIF2 α 表达后, 雷公藤红素上调 CHOP 表达、诱导凋亡和导致周期阻滞的作用均减弱或消失。证明雷公藤红素主要是通过激活 UPR 信号通路中 PERK 途径的 eIF2 α 发挥抗多发性骨髓瘤作用。

本研究为雷公藤红素治疗多发性骨髓瘤提供了新的基础理论依据, 提示 eIF2 α 可能是雷公藤红素发挥治疗作用的重要靶点。

参考文献

- [1] NAKAMURA M, GOTOH T, OKUNO Y, TATETSU H, SONOKI T, UNEDA S, et al. Activation of the endoplasmic reticulum stress pathway is associated with survival of myeloma cells[J]. *Leuk Lymphoma*, 2006, 47: 531-539.
- [2] YOUNG S, KWON D J, JU S M, RHIM H, BAE Y S, CHOI S Y, et al. Celastrol ameliorates HIV-1 Tat-induced inflammatory responses via NF- κ B and AP-1 inhibition and heme oxygenase-1 induction in astrocytes[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2014, 280: 42-52.
- [3] ALLEN S D, LIU Y G, KIM T, BOBBALA S, YI S, ZHANG X, et al. Celastrol-loaded PEG-*b*-PPS nanocarriers as an anti-inflammatory treatment for atherosclerosis[J]. *Biomater Sci*, 2019, 7: 657-668.
- [4] PENG B, ZHANG X, CAO F, WANG Y, XU L, CAO L, et al. Peptide deformylase inhibitor actinonin reduces celastrol's HSP70 induction while synergizing proliferation inhibition in tumor cells[J/OL]. *BMC Cancer*, 2014, 14: 146. doi: 10.1186/1471-2407-14-146.
- [5] KASHYAP D, SHARMA A, TULI H S, SAK K, MUKHERJEE T, BISHAYEE A. Molecular targets of

celastrol in cancer: recent trends and advancements[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2018, 128: 70-81.

- [6] ZHANG R, ZHU Y, DONG X, LIU B, ZHANG N, WANG X, et al. Celastrol attenuates cadmium-induced neuronal apoptosis via inhibiting Ca²⁺-CaMK II-dependent Akt/mTOR pathway[J]. *J Cell Physiol*, 2017, 232: 2145-2157.
- [7] CAO F F, XU L M, ZHANG X, WANG Y, LI M Q, UZAN G, et al. IP-FCM platform detects the existence and regulator-caused dissociation of components in naturally assembled HSP90 complex[J]. *Cytometry A*, 2014, 85: 359-367.
- [8] KANNAIYAN R, HAY H S, RAJENDRAN P, LI F, SHANMUGAM M K, VALI S, et al. Celastrol inhibits proliferation and induces chemosensitization through down-regulation of NF- κ B and STAT3 regulated gene products in multiple myeloma cells[J]. *Br J Pharmacol*, 2011, 164: 1506-1521.
- [9] TOZAWA K, SAGAWA M, KIZAKI M. Quinone methide tripterine, celastrol, induces apoptosis in human myeloma cells via NF- κ B pathway[J]. *Int J Oncol*, 2011, 39: 1117-1122.
- [10] SZEGEZDI E, LOGUE S E, GORMAN A M, SAMALI A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis[J]. *EMBO Rep*, 2006, 7: 880-885.
- [11] HARDING H P, NOVOA I, ZHANG Y, ZENG H, WEK R, SCHAPIRA M, et al. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells[J]. *Mol Cell*, 2000, 6: 1099-1108.
- [12] MCCULLOUGH K D, MARTINDALE J L, KLOTZ L O, AW T Y, HOLBROOK N J. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state[J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21: 1249-1259.
- [13] FRIBLEY A M, MILLER J R, BROWNELL A L, GARSHOTT D M, ZENG Q, REIST T E, et al. Celastrol induces unfolded protein response-dependent cell death in head and neck cancer[J]. *Exp Cell Res*, 2015, 330: 412-422.

[本文编辑] 尹茶