

锯叶棕提取物通过阻断 STAT3 通路抑制 U266 细胞增殖及促凋亡

● 车玉琴* 张立德[▲]

摘要 目的:探讨锯叶棕提取物对 U266 细胞增殖的影响以及锯叶棕提取物对 IL-6 介导的 STAT3 磷酸化效应。方法:①体外培养的 U266 细胞加入到不同浓度的锯叶棕提取物(0.5 或 1.0 μ l/ml)培养 24 小时,利用流式细胞仪测定位于前 G1 时期的细胞百分比以检测细胞凋亡;②体外培养的 U266 细胞加入到锯叶棕提取物(1.0 μ l/ml)培养 24 小时,应用 Western Blot 检测 STAT3 与 P-STAT3 表达;③血清饥饿培养 24h 的 U266 细胞暴露于 IL-6(20ng/mL,30min),另一组用锯叶棕提取物 1.0 μ l/mL 预处理 3 小时的这些细胞,同时应用 Western Blot 检测 STAT3 与 P-STAT3 表达。结果:①锯叶棕提取物诱导 U266 细胞凋亡具有剂量依赖性($P < 0.05$);②应用锯叶棕提取物预处理的 U266 细胞,STAT3 磷酸化水平较未经处理的 STAT3 磷酸化水平下降 80.0%;③血清饥饿培养 24h 的 U266 细胞暴露于 IL-6(20ng/mL,30min),STAT3 磷酸化水平增加 20 倍;用锯叶棕提取物 1.0 μ l/mL 预处理 3 小时的这些细胞,可阻断 STAT3 磷酸化水平 85.0%。结论:锯叶棕提取物可能通过下调 IL-6 介导的 STAT3 磷酸化水平,抑制 U266 细胞增殖并促凋亡。

关键词 U266 细胞 锯叶棕提取物 细胞增殖 细胞凋亡 STAT3

信号转导与转录激活物(Signal Transducers and Activation of Transcriptions, STATs)是存在于细胞质内的蛋白质,具有信号转导和转录因子的作用,它参与了正常细胞对细胞因子和生长因子的反应^[1]。STATs 活化是靠酪氨酸和丝氨酸残基磷酸化的上游激酶^[2],这种信号转导已经被证明在肿瘤形成中发挥重要作用,尤其 STAT3 的紊乱与包括多发性骨髓瘤(Multiple myeloma, MM)在内的许多恶性肿瘤有密切关系,如头与颈的肿瘤及乳腺癌等^[3]。目前针对 MM 的治疗主要采用化学药物与造血干细胞移植等综合治疗,虽然取得了一定的效果,但微小残留病灶的存在使 MM 易复发,患者生存期缩短,因此迫切需要新的治疗方法。锯叶棕是棕榈科植物(锯叶棕榈成熟的干燥果实),生长在南北美洲,它的提取物作为植物药

目前被广泛应用。本实验以 MM 细胞株 U266 为研究对象,探讨锯叶棕提取物对 U266 细胞增殖及凋亡的影响,为临床治疗 MM 开辟新的途径。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药物与试剂 锯叶棕提取物(美国 Calbiochem 公司);IL-6(Sigma 公司);碘化丙啶(Sigma);RNase(Promega, Madison, WI);PBS、70%乙醇、HCl、NaCl、EDTA、NaF、无水乙醇、甲醇等(北京化工厂);NP-40 细胞裂解液(Sigma 公司),SDS(Sigma 公司);Tris(美国 DOW-ANGUS 公司);EDTA(美国 AMRES-CO 公司);发光液(普利莱公司);抗-STAT3(Santa Cruz Biotechnology);抗-p-STAT3(Cell Signaling, Beverly, MA);二抗:HRP 标记的羊抗鼠抗体(上海中杉公司);PRMI-1640 培养基(美国 GIBCO 公司),胎牛血清(美国 GIBCO 公司)。

1.1.2 细胞 多发性骨髓瘤细胞株 U266(美国 ATCC)。

* 作者简介 车玉琴,女,主任医师,医学博士,硕士研究生导师。研究方向:中西医结合治疗肿瘤的机理。

[▲]通讯作者 张立德,博士研究生导师,E-mail:ZHLDTCM@163.COM

• 作者单位 辽宁中医药大学(110032)

1.1.3 仪器和器材 台式高速离心机,恒温水浴箱,低温冰箱,高压灭菌锅,磁力震荡器,微量加样器,恒温 CO₂ 培养箱,超滤除菌器(Millipore);超净工作台,高温烤箱,超低温冰箱,移液器,6孔培养板(Flow Laboratories, Irvine, CA),100mm 的培养皿(Flow Laboratories, Irvine, CA),流式细胞仪(美国 Becton Dickson 公司);垂直板电泳转移装置、恒温水浴摇床、多用脱色摇床;聚偏二氟乙烯纤维素膜(Amersham Corp., Arlington Heights, IL);加样器,离心管,冻存管,酸缸,烧杯,注射器,酒精灯、计数板、各种规格的吸头、加样器;各种规格的烧杯、量筒;硝酸纤维素膜,乳胶手套,保鲜膜,搪瓷盘(>20×20cm),X-光片夹,X-光片,玻棒长短各一根,计时器,吸水纸;胶片(Kodak X-Omat BT);医用 X 射线胶片 12.7×17.8cm(购于伊士曼柯达公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 药品制备 锯叶棕提取物是从锯叶棕干燥果实中萃取,一个胶囊含有效成分 400 毫克,锯叶棕提取物溶解于 70% 乙醇配制备用(一个胶囊/1 毫升 70% 乙醇);IL-6 用 PRMI-1640 培养液稀释至工作浓度。

1.2.2 细胞培养 多发性骨髓瘤细胞株 U266 细胞用常规方法培养。培养条件:加 1% 青霉素、1% 链霉素、10% 小牛血清的 PRMI-1640 培养液,相对湿度 94%,5% CO₂,37℃,每隔 48~72 小时换液 1 次。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡 将对数生长期的 U266 细胞(调整细胞悬液浓度为 5×10⁵/ml)2ml 加入含不同浓度锯叶棕提取物(0.5 或 1.0μl/ml)的 6 孔培养板内;每组平行设两个复孔,做三次独立实验,并设空白对照;培养 24 小时后用冷 PBS 洗涤细胞一次,然后用 70% 的乙醇固定并于 -20℃ 过夜;碘化丙啶 1ml 加入到含有核糖核酸酶的液体中染色细胞,置 37℃,10 分;将细胞通过流式细胞仪进行扫描,应用 CellQuest 细胞周期分析软件进行储存及分析。

1.2.4 Western blot 检测 STAT3 与 P-STAT3 表达

①取对数生长期 U266 细胞悬液 2ml(细胞浓度为 6×10⁶/ml),接种于 100mm 培养皿中,加入锯叶棕提取物(1μl/ml)培养 24 小时,离心收集 2×10⁷ 个细胞;②血清饥饿培养 24h 的 U266 细胞暴露于 IL-6 (20ng/mL, 30 min),另一组用锯叶棕提取物 1.0μl/mL 预处理 3 小时的这些细胞,离心收集 2×10⁷ 个细胞;将细胞裂解后用考马斯亮蓝法测定样品中蛋白浓度。取 50μg 蛋白质于 SDS-聚丙烯凝胶电泳,然后

将蛋白质转印至硝酸纤维素膜上,5% 脱脂奶粉封闭 1 小时,分别加入抗 STAT3 与抗 P-STAT3 抗体(稀释浓度依照说明书)过夜;加入碱性磷酸酶标记的二抗作用 2 小时(稀释浓度为 1:1000),显色后用荧光扫描仪扫描,蛋白质条带与标准化的 STAT3 蛋白强度比较。

1.2.5 统计学分析 应用 SPSS12.0 统计软件,进行单因素方差分析(ANOVA)比较两组间差异。

2 结果

2.1 锯叶棕提取物对 U266 细胞凋亡的影响 不同浓度的锯叶棕提取物(0.5 或 1.0μl/ml)诱导 U266 细胞凋亡较对照组有显著差异 *P<0.05,而且显示出具有剂量依赖性(图 A)。

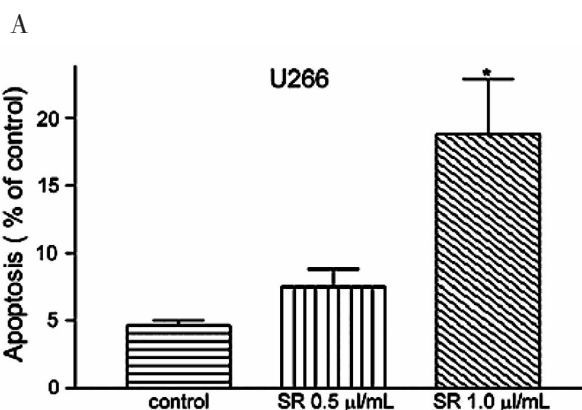


图 A 锯叶棕提取物诱导 U266 细胞凋亡结果

2.2 锯叶棕提取物锯阻断 STAT3 磷酸化水平 应用锯叶棕提取物处理的 U266 细胞,STAT3 磷酸化水平较未经处理的 STAT3 磷酸化水平下降 80.0% (图 B)。

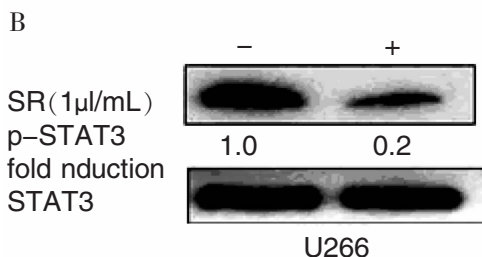


图 B 锯叶棕提取物对 U266 细胞 STAT3 与 P-STAT3 表达结果

2.3 锯叶棕提取物锯抑制 IL-6 介导的 STAT3 磷酸化水平 血清饥饿培养 24h 的 U266 细胞暴露于 IL-6 (20ng/mL, 30min),STAT3 磷酸化水平增加 20 倍,用锯叶棕提取物 1.0μl/mL 预处理 3 小时的这些细胞,可阻断 STAT3 磷酸化水平 85.0% (图 C)。

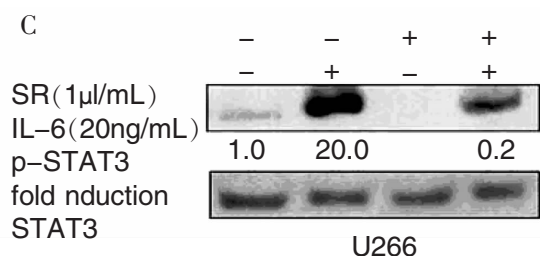


图 C 锯叶棕提取物对 IL-6 介导的 U266 细胞 STAT3 与 P-STAT3 表达结果

3 讨论

植物药(包括草药)用来治疗癌症已有几个世纪,例如中草药复合物 PC-SPEs 抑制不同种类癌细胞的生长,如非小细胞肺癌细胞和前列腺癌细胞^[4]。最近有报道指出,另一种叫冬凌草甲素的香茶菜属草木植物能够诱导肺癌细胞的凋亡或抑制乳腺癌细胞生长^[5]。冬凌草甲素萃取物来自香茶菜属的冬凌草素,它也是基于诱导多种人类癌细胞的生长停滞和凋亡^[6]。黄芩苷是 PC-SPEs 的一种主要成分,它抑制人类癌细胞的增殖,如前列腺癌细胞株、乳腺癌细胞株、成髓细胞的白血病细胞株、前髓细胞性白血病细胞株^[7]。

锯叶棕是棕榈科植物(锯叶棕榈成熟的干燥果实),生长在南北美洲,目前它的提取物作为植物治疗药物被广泛应用。锯叶棕提取物主要用于良性前列腺增生症的治疗。最近的资料表明锯叶棕提取物能够诱导依赖雄激素的前列腺癌细胞 LNCaP 的生长抑制和凋亡^[8]。并且抑制乳腺癌细胞增殖作用具有剂量依赖性^[9]。在这项研究中,我们发现锯叶棕提取物诱导 U266 细胞凋亡具有剂量依赖性(图 A)。

以往的研究表明,STAT3 信号转导在肿瘤生成中起关键性作用,并且这种信号转导能够被 IL-6 所激活^[10]。IL-6 是一种多效的细胞因子,它以自分泌或旁分泌形式来刺激 MM 细胞的增殖,并且在这些细胞扮演着一种抗凋亡的角色^[11]。MM 细胞通常能够促进 IL-6 的表达,从而导致了 JAK/STAT 与 Ras/ERK 信号转导途径的激活^[12]。在本研究中,我们首次发现锯叶棕提取物下调了 U266 细胞 STAT3 磷酸化水平(图 B);锯叶棕提取物预处理的 U266 细胞,下调 IL-6 介导的 STAT3 磷酸化水平(图 C)。

总之,锯叶棕提取物是一种重要的植物药,可以通过阻断 STAT3 信号转导通路来抑制 U266 细胞的生长。锯叶棕提取物有可能应用到影响 STAT3 信号转导通路作用的肿瘤包括 MM 的治疗。

参考文献

- [1] Darnell JE Jr, Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins [J]. *Science*, 1994, 264(5164): 1415-1421.
- [2] Ihle JN. STATs and MAPKs; obligate or opportunistic partners in signaling [J]. *Bioessays*, 1996, 18(2): 95-98.
- [3] Epling-Burnette PK, Liu JH, Catlett-Falcone R, et al. Turkson J, Oshiro M, Kothapalli R, Li Y, Wang JM, Yang-Yen HF, Karras J, Jove R and Loughran TP; Inhibition of STAT3 signaling leads to apoptosis of leukemic large granular lymphocytes and decreased Mcl-1 expression [J]. *J Clin Invest*, 2001, 107(3): 351-362.
- [4] Ikezoe T, Chen SS, Yang Y, et al. PC-SPEs: Molecular mechanism to induce apoptosis and downregulate expression of PSA in LNCaP human prostate cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2003, 23(5): 1461-1470.
- [5] Liu JJ, Huang RW, Lin DJ, et al. Ponicidin, an ent-kaurane diterpenoid derived from a constituent of the herbal supplement PC-SPEs, *Rabdosia rubescens*, induces apoptosis by activation of caspase-3 and mitochondrial events in lung cancer cells in vitro [J]. *Cancer Invest*, 2006, 24(2): 136-148.
- [6] Ikezoe T, Chen SS, Tong XJ, et al. Oridonin induces growth inhibition and apoptosis of a variety of human cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2003, 23(4): 1187-1193.
- [7] Ikezoe T, Chen SS, Heber D, et al. Baicalin is a major component of PC-SPEs which inhibits the proliferation of human cancer cells via apoptosis and cell cycle arrest [J]. *Prostate*, 2003, 49(4): 285-292.
- [8] Yang Y, Ikezoe T, Zheng Z, et al. Saw Palmetto induces growth arrest and apoptosis of androgen-dependent prostate cancer LNCaP cells via inactivation of STAT3 and androgen receptor signaling [J]. *Int J Oncol*, 2007, 31(3): 593-600.
- [9] Hostanska K, Suter A, Melzer J et al. Evaluation of cell death caused by an ethanolic extract of *Serenoa repens* fructus (Prostasan) on human carcinoma cell lines [J]. *Anticancer Res*, 2007, 27(2): 873-881.
- [10] Bromberg J, Darnell JE. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function [J]. *Oncogene*, 2000, 19(21): 2468-2473.
- [11] Kawano M, Hirano T, Matsuda T, et al. Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas [J]. *Nature*, 1988, 332(6159): 83-85.
- [12] Frassanito MA, Cusmai A, Piccoli C et al. Manumycin inhibits farnesyltransferase and induces apoptosis of drug-resistant interleukin 6-producing myeloma cells [J]. *Br J Haematol*, 2002, 118(1): 157-165, 2002.