

## 论著

文章编号:1000-5404(2012)23-2384-04

# 左旋棉酚通过 ERK 通路诱导 Daudi 细胞发生自噬及意义

倪振洪,王 滨,丁 雯,程攀科,连继勤,何凤田 (400038 重庆,第三军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室)

**[摘要]** **目的** 探讨左旋棉酚诱导淋巴瘤 Daudi 细胞发生自噬可能机制及对细胞存活率的影响。**方法** 采用 CCK-8 法检测左旋棉酚在体外对 Daudi 细胞增殖抑制作用的影响;采用台盼蓝排斥实验检测不同处理对细胞存活率的影响;Western blot 检测细胞中自噬相关蛋白 LC3、ERK 和磷酸化 ERK 的表达情况;AO 染色观察经左旋棉酚处理后 Daudi 细胞酸性小体的变化情况。**结果** 左旋棉酚能剂量依赖性地抑制 Daudi 细胞的增殖和促进细胞死亡;AO 染色后经左旋棉酚处理的细胞内可观察到大量的酸性小体形成;Western blot 显示左旋棉酚能显著上调自噬相关蛋白 LC3 II 的表达及增强磷酸化 ERK 的水平,抑制 ERK 的磷酸化能下调 LC3 II 的表达;ERK 抑制剂 U0126 及自噬抑制剂 CQ 和 3-MA 均能显著增强左旋棉酚的杀细胞效力。**结论** 左旋棉酚可能通过 ERK 通路诱导 Daudi 细胞发生自噬,抑制 ERK 介导的自噬能够显著增强左旋棉酚的抗癌效应。

**[关键词]** 左旋棉酚;Burkitt 淋巴瘤;细胞增殖;自噬;ERK

**[中图分类号]** R733.4; R965; R979.19

**[文献标志码]** A

## (-)-gossypol induces autophagy in Daudi cells through ERK signal pathway

Ni Zhenhong, Wang Bin, Ding Wen, Cheng Panke, Lian Jiqin, He Fengtian (Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the mechanism of (-)-gossypol-induced autophagy and its effect on cell viability in Burkitt lymphoma Daudi cells. **Methods** CCK-8 detection was used to assess the inhibitory effects of (-)-gossypol on the proliferation in Daudi cells. Trypan blue exclusion assay was used to detect cell viability during different treatments. Western blotting was used to determine the expression of LC3 II and ERK. Acridine orange staining was used to detect the formation of acidic vesicular organelles (AVO). **Results** (-)-gossypol inhibited cell proliferation and induced cell death in a dose-dependent manner. Increased AVOs were noted after treatment of cells with (-)-gossypol. Western blot analysis revealed that (-)-gossypol treatment markedly upregulated LC3 II and induced phosphorylation of ERK. Inhibition of ERK activity blocked the upregulation of LC3 II mediated by (-)-gossypol. Inhibition of autophagy by U0126 (ERK inhibitor), CQ and 3-MA (autophagy inhibitors) enhanced cell death mediated by (-)-gossypol. **Conclusion** (-)-gossypol effectively inhibits cell proliferation and induces autophagy in Burkitt lymphoma Daudi cells via ERK pathway.

**[Key words]** (-)-gossypol; Burkitt lymphoma; cell proliferation; autophagy

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2011BB5030). Corresponding author: Lian Jiqin, E-mail: lianjiqin@sina.com; He Fengtian, E-mail: hefengtian06@yahoo.com.cn

伯基特淋巴瘤(Burkitt 淋巴瘤)是一类高度恶性的 B 细胞肿瘤,在我国多发于儿童和青年人,其发病机制可能与 myc 基因的异位、EBV 感染等因素有关<sup>[1]</sup>。目前对 Burkitt 淋巴瘤的治疗以化疗为主,疗效尚可,但仍有部分患者存在着药物抵抗和较高的复发率等问题,因此新的治疗药物还有待于进一步研发。

左旋棉酚[(-)-gossypol]是一种从棉花籽里提取的

天然化合物,具有避孕、抗病毒和抗肿瘤等特性。研究<sup>[2-4]</sup>发现左旋棉酚是一类针对抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bcl-xl 较好的抑制剂,能通过抑制抗凋亡蛋白而促进前列腺癌、肺癌、白血病、乳腺癌等肿瘤细胞的凋亡,发挥有效的抗癌效应。目前左旋棉酚作为一种抗肿瘤药物的研发工作已经进入了临床 II 期试验,但左旋棉酚对 Burkitt 淋巴瘤细胞的杀伤作用及相关机制还不清楚。

自噬是细胞内一个高度保守的代谢过程,在饥饿、缺氧和化疗等应激条件下,细胞能形成一个双层膜结构的自噬小体,包裹受损、衰老的细胞器和大分子蛋白等,然后与溶酶体融合,在溶酶体酸性水解酶的作用下

**[基金项目]** 重庆市自然科学基金(CSTC2011BB5030)

**[通信作者]** 连继勤, E-mail: lianjiqin@sina.com

何凤田, E-mail: hefengtian06@yahoo.com.cn

生成可供细胞重新利用的氨基酸、脂肪酸等小分子物质<sup>[5]</sup>。研究<sup>[6-8]</sup>表明自噬与肿瘤的发生、发展及治疗密切相关。左旋棉酚能在前列腺癌、宫颈癌等肿瘤细胞诱导自噬发生,自噬发生后可起到促进肿瘤细胞存活或促进细胞死亡的作用,但目前对左旋棉酚是否能引起淋巴瘤细胞发生自噬及自噬在其中的作用尚不清楚。

本实验旨在初步探讨左旋棉酚对 Burkitt 淋巴瘤细胞的杀伤效应、诱导自噬的可能机制及效应,以便于进一步发挥左旋棉酚对淋巴瘤的疗效。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

人 B 细胞淋巴瘤细胞系 Daudi 细胞由第三军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室保存。胎牛血清和 1640 细胞培养基购自美国 Gibco 公司;左旋棉酚、吡啶橙、U0126、3-MA 和氯喹为美国 Sigma 公司产品;CCK8 试剂盒购自日本 Dojindo Laboratories;细胞裂解液和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自江苏碧云天生物技术公司;蛋白酶抑制剂为 Roche 公司产品;LC3 抗体购自美国 Cell Signaling 公司,p-ERK 抗体和 ERK 抗体购自 Abcam 公司,GAPDH 抗体购自美国 Santa Cruz 公司。

### 1.2 方 法

1.2.1 细胞培养 Daudi 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 1640 培养基中,放置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱内培养。

1.2.2 台盼蓝排斥实验 经处理后的细胞按 9:1 的体积比加入 0.4% 的台盼蓝染色液,混匀后染色 3 min。用计数板在显微镜下计数死细胞和活细胞数量,死细胞在镜下为蓝色,活细胞由于台盼蓝不能进入而不被染色。

细胞死亡率 = 死细胞数 / (活细胞数 + 死细胞总数) × 100%

1.2.3 CCK-8 实验 以每孔 5 000 个细胞将对处于数生长期的 Daudi 细胞接种于 96 孔板,分为对照组和加药组,每组设 3 个复孔。18 h 后加入 0、2.5、5、10、20、40、80 μmol/L 的左旋棉酚。24 h 后每孔加入 10 μl 的 CCK-8 试剂,避光孵育 2 h 后使用酶标仪检测 450 nm 处的光密度值。

细胞活性 = 加药孔光密度值 / 对照孔光密度值 × 100%

1.2.4 吡啶橙染色 (acridine orange, AO) 使用 0、5、10 μmol/L 的左旋棉酚作用 Daudi 细胞 18 h 后,加入吡啶橙,使其终浓度为 50 μmol/L,充分混匀,避光孵育 15 min 后用 PBS 清洗 2 遍,荧光显微镜下观察酸性小体 (acidic vesicular organelles, AVOs) 的变化<sup>[9]</sup>,以评价细胞自噬情况<sup>[10]</sup>。

1.2.5 Western blot 检测 经 0、5、10 μmol/L 的左旋棉酚处理 18 h 后的 Daudi 细胞悬液以 800 r/min 离心 5 min,弃上清后用 PBS 洗涤 2 遍。加入含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液,充分混匀,置于冰上裂解 20 min,随后于 4 ℃ 以 12 000 r/min 离心 10 min,收集上清,并采用 BCA 法测量蛋白浓度。将定量后的蛋白以每孔 50 μg 上样,在 15% 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离,其后采用半干转的方法将蛋白转移至 PVDF 膜。将膜用含 5% 脱脂奶粉的 PBST 常温封闭 1 h,其后用 LC3 兔抗人多克隆抗体 (1:1 000 稀释) 室温孵育 2 h,孵育后用 PBST 洗 3 次,每次 10 min,随后用羊抗兔二抗 (1:10 000 稀释) 室温孵育 1 h, PBST 洗膜后用化学发光底物法于暗室显影曝光。

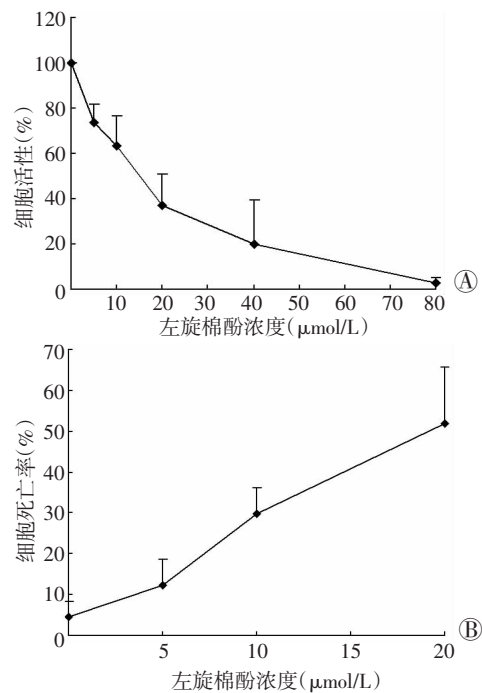
### 1.3 统计学方法

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行组间 *t* 检验。

## 2 结 果

### 2.1 不同浓度的左旋棉酚对 Daudi 细胞增殖和存活的影响

不同浓度的左旋棉酚作用 Daudi 细胞 24 h 后,采用 CCK-8 检测试剂盒及台盼蓝排斥实验检测左旋棉酚对 Daudi 细胞增殖和存活的影响。结果见图 1,左旋棉酚能剂量依赖性地抑制 Daudi 细胞的增殖并促进细胞的死亡 ( $P < 0.05$ )。

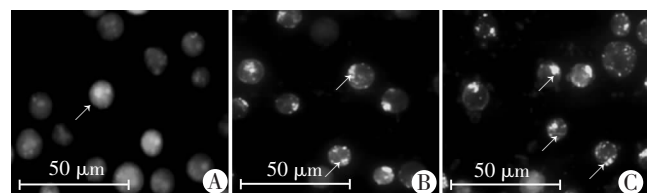


A: CCK-8 检测细胞活性; B: 台盼蓝排斥实验计数细胞死亡情况

图 1 不同浓度左旋棉酚对 Daudi 细胞增殖和存活的影响

### 2.2 吡啶橙染色分析左旋棉酚对 Daudi 细胞酸性小体数量的影响

5 μmol/L 和 10 μmol/L 的左旋棉酚处理细胞 18 h 后,荧光显微镜下可见 Daudi 细胞内酸性小体显著增多 (图 2),表明自噬增强。

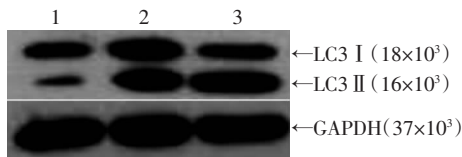


↑: 酸性小体 A: 0 μmol/L 左旋棉酚; B: 5 μmol/L 左旋棉酚; C: 10 μmol/L 左旋棉酚

图 2 不同浓度左旋棉酚对 Daudi 细胞酸性小体数量的影响

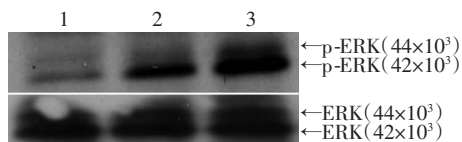
### 2.3 Western blot 检测左旋棉酚对自噬相关分子 LC3 II 的表达变化

分别用 0、5、10 μmol/L 的左旋棉酚处理 Daudi 细胞 18 h 后,自噬的标志性蛋白 LC3 II 的表达显著上调。见图 3。



1: 0 μmol/L 左旋棉酚; 2: 5 μmol/L 左旋棉酚; 3: 10 μmol/L 左旋棉酚  
图3 Western blot 检测不同浓度左旋棉酚对 Daudi 细胞 LC3 II 表达的影响

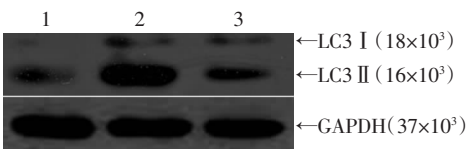
2.4 Western blot 检测左旋棉酚对 p-ERK 的表达变化  
0、5、10 μmol/L 的左旋棉酚处理 Daudi 细胞 12 h 后, ERK 的磷酸化水平显著升高(图4)。



1: 0 μmol/L 左旋棉酚; 2: 5 μmol/L 左旋棉酚; 3: 10 μmol/L 左旋棉酚  
图4 Western blot 检测不同浓度左旋棉酚对 Daudi 细胞 ERK 磷酸化的影响

2.5 Western blot 检测 ERK 抑制剂对左旋棉酚诱导的自噬的影响

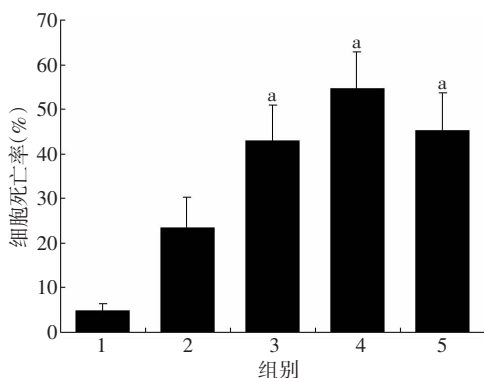
使用 20 μmol/L 的 U0126 预处理 Daudi 细胞 30 min 后, 加入 10 μmol/L 左旋棉酚处理 12 h, Western blot 检测 LC3 II 的变化, 结果显示 U0126 有效减弱了左旋棉酚引起的 LC3 II 的升高(图5), 表明 ERK 磷酸化是左旋棉酚诱导的细胞自噬的一个重要因素。



1: 正常对照组; 2: 左旋棉酚组; 3: 左旋棉酚 + U0126 组  
图5 Western blot 检测 ERK 抑制剂对各组左旋棉酚诱导的细胞自噬的影响

2.6 自噬抑制对左旋棉酚抗癌效应的影响

使用 ERK 抑制剂 U0126 及自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤(3-Methyladenine, 3-MA) 和氯喹(chloroquine, CQ) 阻断自噬后, 台盼蓝排斥实验观察左旋棉酚对细胞死亡率的影响。结果见图6, 抑制自噬能显著促进左旋棉酚的杀细胞效应, 组间比较有统计学意义( $P < 0.05$ )。



1: 正常对照组; 2: 左旋棉酚组; 3: 左旋棉酚 + U0126 组; 4: 左旋棉酚 + 3-MA 组; 5: 左旋棉酚 + CQ 组

a:  $P < 0.05$ , 与左旋棉酚组比较

图6 自噬抑制对各组左旋棉酚抗癌效应的影响

### 3 讨论

自噬是一个高度保守的代谢过程, 细胞自噬开始时, 由双层膜包裹着受损和衰老细胞器、部分大分子等待降解的物质形成自噬小泡, 随后与溶酶体融合, 形成自噬溶酶体, 在溶酶体水解酶的作用下将包裹物质降解并释放出供细胞重新合成所需的氨基酸、脂肪酸等小分子物质和能量。研究发现自噬与肿瘤密切相关, 自噬缺乏是导致肿瘤发生和发展的重要因素。在化疗和放疗过程中, 自噬扮演了双重角色, 一方面自噬可为肿瘤细胞在化放疗后提供重新合成所必需的小分子原料和能量, 促进细胞存活; 另一方面过度的细胞自噬也会导致细胞死亡<sup>[11]</sup>。深入研究自噬在肿瘤发生、发展和治疗中的作用显得十分必要。

左旋棉酚具有 BH3 样结构域, 能通过此结构域竞争促凋亡蛋白 Bax/Bak 与抗凋亡蛋白 Bcl-2/xl 的结合位点, 使促凋亡蛋白形成寡聚体, 增加细胞素 C 的释放, 从而诱导凋亡发生, 呈现出较好的抗癌效应<sup>[12]</sup>。此外, 最近研究发现左旋棉酚也能够诱导肿瘤细胞发生自噬, 在雄激素治疗抵抗的前列腺癌细胞系, 左旋棉酚能通过打断内质网 Bcl-2 和 Beclin1 之间的相互作用, 解除 Bcl-2 对 Beclin1 的抑制作用, 从而诱导自噬性细胞死亡<sup>[13]</sup>; 在乳腺癌和宫颈癌细胞系, 左旋棉酚能通过 Beclin1 依赖和非依赖的方式诱导有利于细胞存活的自噬, 增强肿瘤细胞对左旋棉酚的药物抵抗<sup>[3]</sup>。胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK) 是 MAPK 家族的一员, 参与了细胞增殖分化、稳态维持、细胞凋亡等生物学反应, 最近研究发现在不同处理因素下 ERK 磷酸化的增强是自噬发生的一个重要因素<sup>[14-15]</sup>。Sung 等<sup>[16]</sup> 研究发现左旋棉酚能上调结肠癌细胞中 ERK 的磷酸化水平, 但对于左旋棉酚能否通过 ERK 通路上调自噬水平, 目前还不清楚。

本实验发现左旋棉酚能有效地抑制 Burkitt 淋巴瘤 Daudi 细胞的增殖并促进细胞的死亡; 同时, 左旋棉酚能诱导 Daudi 细胞发生自噬, 主要表现为细胞内酸性小体的增加和自噬标志性蛋白 LC3 II 的表达上调; 此外我们发现左旋棉酚能显著增强 ERK 的磷酸化, 使用 ERK 磷酸化抑制剂 U0126 以直接可降低左旋棉酚诱导的 LC3 II 的升高。为了进一步研究左旋棉酚通过 ERK 途径诱导的自噬对细胞存活的影响, 我们使用了两种自噬抑制剂 3-MA 和 CQ 作为对照。3-MA 能通过抑制自噬起始信号通路中 Class III PI3K (Vps34) 的活性从而减弱细胞自噬的发生; CQ 能通过阻断自噬小体与溶酶体的融合从而使自噬进程发生障碍, 失去为

细胞提供原料和能量的作用<sup>[17]</sup>。实验结果显示,ERK抑制剂和自噬抑制剂均能显著促进左旋棉酚的抗癌效应,表明左旋棉酚通过 ERK 途径诱导的自噬是有利于淋巴瘤细胞存活的,可能是淋巴瘤细胞对左旋棉酚产生药物抵抗的一个重要机制。本实验初步探讨了左旋棉酚对淋巴瘤细胞的抗癌效应及相关机制,为左旋棉酚更好地研发和临床应用奠定了一定的实验基础。

#### 参考文献:

[1] Bornkamm G W. Epstein-Barr virus and the pathogenesis of Burkitt's lymphoma: more questions than answers[J]. *Int J Cancer*, 2009, 124(8): 1745-1755.

[2] Balakrishnan K, Wierda W G, Keating M J, et al. Gossypol, a BH3 mimetic, induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells[J]. *Blood*, 2008, 112(5): 1971-1980.

[3] Gao P, Bauvy C, Souquere S, et al. The Bcl-2 homology domain 3 mimetic gossypol induces both Beclin 1-dependent and Beclin 1-independent cytoprotective autophagy in cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(33): 25570-25581.

[4] Lian J, Kamak D, Xu L. The Bcl-2-Beclin 1 interaction in (-)-gossypol-induced autophagy versus apoptosis in prostate cancer cells[J]. *Autophagy*, 2010, 6(8): 1201-1203.

[5] Klionsky D J. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(11): 931-937.

[6] Kondo Y, Kondo S. Autophagy and cancer therapy[J]. *Autophagy*, 2006, 2(2): 85-90.

[7] Liu B, Cheng Y, Liu Q, et al. Autophagic pathways as new targets for cancer drug development[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2010, 31(9): 1154-1164.

[8] Roy S, Debnath J. Autophagy and tumorigenesis[J]. *Semin Immunopathol*, 2010, 32(4): 383-396.

[9] Chen Y, Azad M B, Gibson S B. Methods for detecting autophagy and determining autophagy-induced cell death[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2010, 88(3): 285-295.

[10] Li J, Liu R, Lei Y, et al. Proteomic analysis revealed association of aberrant ROS signaling with suberoylanilide hydroxamic acid-induced autophagy in Jurkat T-leukemia cells[J]. *Autophagy*, 2010, 6(6): 711-724.

[11] Morselli E, Galluzzi L, Kepp O, et al. Anti- and pro-tumor functions of autophagy[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1793(9): 1524-1532.

[12] Levine B, Sinha S, Kroemer G. Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy[J]. *Autophagy*, 2008, 4(5): 600-606.

[13] Lian J, Wu X, He F, et al. A natural BH3 mimetic induces autophagy in apoptosis-resistant prostate cancer via modulating Bcl-2-Beclin1 interaction at endoplasmic reticulum[J]. *Cell Death Differ*, 2011, 18(1): 60-71.

[14] Anand P K, Tait S W, Lamkanfi M, et al. TLR2 and RIP2 pathways mediate autophagy of *Listeria monocytogenes* via extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(50): 42981-42991.

[15] Hu P, Lai D, Lu P, et al. ERK and Akt signaling pathways are involved in advanced glycation end product-induced autophagy in rat vascular smooth muscle cells[J]. *Int J Mol Med*, 2012, 29(4): 613-618.

[16] Sung B, Ravindran J, Prasad S, et al. Gossypol induces death receptor-5 through activation of the ROS-ERK-CHOP pathway and sensitizes colon cancer cells to TRAIL[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(46): 35418-35427.

[17] Rubinsztein D C, Gestwicki J E, Murphy L O, et al. Potential therapeutic applications of autophagy[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2007, 6(4): 304-312.

(收稿:2012-06-27;修回:2012-09-12)

(编辑 汪勤俭)

## 本刊成功举办部分编委、专家组稿会

2012年11月14日,《第三军医大学学报》部分编委、专家组稿会在重庆北部新区药友集团会议室圆满召开,参加会议的有本刊编委会常务副主任委员钱桂生教授及学校3所附属医院的12位临床专家。会议由钱桂生教授主持。

学报编辑部冷怀明主任首先汇报了《第三军医大学学报》2012年的基本情况、取得的成绩、存在的问题和困难以及2013年的工作要点,并感谢各位专家、教授多年来对学报工作的支持和帮助。到会专家一致肯定了学报所取得的成绩,并积极为学报明年组稿工作献计、献策:(1)体现综合性的特点,可针对某一问题将相关基础与临床结合起来组织稿件。(2)加强主动组稿。编辑部根据自己的情况先确定组稿方向,再与相关学科专家进行沟通。(3)组稿不要局限于某一科室,充分利用组稿专家的影响力,组织国内相关领域较高水平的稿件。(4)积极与学术机构联系,扩大组稿范围。(5)编辑应了解科研动向,积极寻找组稿切入点。(6)建议设置猜想类栏目,提出一些热点问题,鼓励科研人员积极参与进来,发表自己的意见和看法。这对学报今后的发展起到积极的作用。会上专家纷纷表示愿意为学报组稿,初步形成几个组稿意向:抗菌药物的合理使用;便秘的基础与临床研究;结直肠、胆道、胰腺等疾病的临床治疗;胶囊内镜的应用;肝癌治疗的新进展等。

钱桂生教授指出:组稿专家应利用自己在各种学会中的影响,扩大组稿范围,保证组稿稿件的质量,以确保学报的学术质量。并希望编辑、编委和科研工作者共同努力,把学报越办越好。