

青蒿琥酯诱导ABC型弥漫大B细胞淋巴瘤ROS促进细胞凋亡

熊丹, 谭洁文, 吴亮, 刘香, 杨辉 (南方医科大学顺德医院, 佛山市顺德区第一人民医院, 广东佛山 528300)

摘要: 目的 探讨青蒿琥酯诱导ABC型弥漫大B细胞淋巴瘤细胞凋亡的机制。方法 人ABC型弥漫大B细胞淋巴瘤细胞株OCI-LY3加入不同浓度青蒿琥酯处理,用CCK-8法测定细胞增殖活性,荧光探针DCFH-DA染色检测ROS含量,流式细胞术检测细胞凋亡,qRT-PCR和Western blot检测Bcl-2和Caspase-3表达。结果 青蒿琥酯呈浓度依赖性抑制OCI-LY3细胞增殖($P<0.01$ 或 0.05),促进ROS产生($P<0.01$),诱导凋亡($P<0.01$),上调促凋亡基因caspase-3表达,下调抑凋亡基因Bcl-2表达($P<0.01$)。结论 青蒿琥酯可能通过促进ROS产生,上调Caspase-3和下调Bcl-2表达,从而诱导ABC型弥漫大B细胞淋巴瘤细胞凋亡。

关键词: 青蒿琥酯; ABC型弥漫大B细胞淋巴瘤; ROS; 凋亡

中图分类号: R 733.4

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610(2021)06-0667-05

Artesunate promotes apoptosis of ABC type diffuse large B-cell lymphoma by inducing ROS production

XIONG Dan, TAN Jie-wen, WU Liang, LIU Xiang, YANG Hui (Shunde Hospital, Southern Medical University, The First people's Hospital of Shunde, Foshan 528300, China)

Abstract: Objective To study the apoptosis mechanism of artesunate on ABC type diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). Methods Human ABC type DLBCL line OCI-LY3 cells were treated with different concentrations of artesunate. Cell proliferation, ROS level, apoptosis, and expression of Bcl-2 and Caspase-3 were determined by CCK-8, DCFH-DA stain, flow cytometry, qRT-PCR, and Western blot, respectively. Results Artesunate inhibited proliferation in a concentration-dependent manner ($P<0.01$ or 0.05), enhanced ROS production ($P<0.01$), induced apoptosis ($P<0.01$), and up-regulated pro-apoptotic caspase-3 and down-regulated apoptosis-inhibiting Bcl-2 expression ($P<0.01$) in OCI-LY3 cells. Conclusion Artesunate could induce apoptosis of ABC type DLBCL via up-regulating ROS and Caspase-3 and down-regulating Bcl-2 expression.

Key words: artesunate; ABC type diffuse large B-cell lymphoma; ROS; apoptosis

弥漫性大B细胞性淋巴瘤(DLBCL)是一类最常见的非霍奇金淋巴瘤(NHL)类型,具有不同生物学、临床表现和治疗反应的异质性疾病^[1],同时其高发病率和死亡率在临床上引起广泛的关注。肿瘤患者常表现为单个或多个淋巴结或结外部位快速生长的肿瘤,接受化疗可显著提高患者生存率。然而有1/5~1/4患者出现复发^[2]。基于基因表达谱(GEP)的差异,DLBCL主要分为生发中心B细胞样DLBCL(GCB-DLBCL)和活化B细胞样DLBCL(ABC-DLBCL)两种不同的亚型。尽管近年来利妥昔单抗的出现一定程度

上改善DLBCL患者的生存状况,但是ABC-DLBCL对现有经典的CHOP方案化疗效果仍然较差,且利妥昔单抗并不能克服这种不良预后,更多的患者表现为原发耐药。因此,寻找一种更有效的抗DLBCL的治疗方法或药物至关重要。

青蒿琥酯(ART)是青蒿素的半合成类似物,从甜艾草植物中提取出来治疗疟疾的一线药物,在传统中医药领域中的应用有多年的历史。现在青蒿琥酯作为抗肿瘤药物,其主要的作用是通过诱导肿瘤细胞产生活性氧(ROS)导致细胞发生死亡^[3-4]。最新的研究表明青蒿琥酯能够影响肿瘤生长、增殖,使肿瘤细胞发生凋亡和坏死影响细胞的代谢过程^[1]。本研究将结合现有的研究结果,及当前抗弥漫大B细胞淋巴瘤细胞研究的新热点,探讨青蒿琥酯是否具有诱导人ABC型弥漫大B细胞淋巴瘤细胞株OCI-LY3细胞凋

基金项目: 广东省医学科研基金面上项目(No. B2021195),佛山市科技局医学类科技攻关计划项目(No.1920001000694)

收稿日期: 2021-07-29; 修订日期: 2021-10-08

作者简介: 熊丹(1982-),男,硕士,副主任医师

亡的作用及其潜在的分子机制,为弥漫大B细胞淋巴瘤治疗提供新靶点、新思路,同时也为青蒿琥酯相关药物开发及广泛应用提供理论支撑。

1 材料和方法

1.1 实验主要材料

人ABC型弥漫大B细胞淋巴瘤细胞株(OCI-LY3)(中国科学院上海细胞库),青蒿琥酯(ART),青霉素和链霉素(sigam公司);IMDM、PBS和FBS(Gibco公司);Cell Counting Kit-8试剂盒(APEXBIO公司);Annexin V-FITC/PI双染细胞凋亡检测试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司);总RNA抽提试剂TransStart® Tip Green qPCR SuperMix试剂盒和TransScript® First-Strand cDNA Synthesis SuperMix试剂盒(北京全式金生物技术有限公司);活性氧检测试剂盒(碧云天);Bcl-2单克隆抗体、Caspase-3单克隆抗体和GAPDH单克隆抗体(CST公司)。高速冷冻离心机、全光谱分析酶标仪、细胞培养箱均购自美国公司;生物安全柜购自新加坡ESCO公司;实时荧光定量PCR仪、全自动成像仪购自美国BIO-RAD;流式细胞仪购自美国BD;倒置显微镜购自德国徕卡公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 用含10%(体积分数)胎牛血清的IMDM培养基,包含有双抗溶液(青霉素G 100 IU/mL、链霉素 100 IU/mL)于37℃、5% CO₂条件下培养至对数生长期。

1.2.2 ART对OCI-LY3细胞活力的影响 取对数生长期OCI-LY3细胞并调整细胞密度至 1×10^4 个/mL,每孔100 μL接种于96孔板,接种24 h后,设置空白对照组,分别用含1、5、10、15、20、25 μmol/L青蒿琥酯培养基替换原有培养基,每个浓度做3个复孔。在37℃、5% CO₂的培养箱中培养24 h后,每孔加入CCK-8溶液10 μL,于培养箱中反应2 h,酶标仪检测各组细胞在450 nm波长处的光密度(OD)值,并计算细胞活力。

1.2.3 倒置显微镜观察OCI-LY3细胞形态的变化 取对数生长期的OCI-LY3细胞株接种于6孔细胞培养板中,每孔细胞数调整为 5×10^5 个,每孔加入1 mL相应的含有不同浓度青蒿琥酯的培养基,使青蒿琥酯终浓度分别为10 μmol/L和20 μmol/L,并设立未加药的空白对照组,每种浓度设3个复孔。置于37℃ 5% CO₂培养箱中继续培养24 h后,倒置显微镜下观察细胞生长状态及形态学改变。

1.2.4 OCI-LY3细胞ROS含量的测定 按试剂盒说明书进行操作,取对数生长期的OCI-LY3细胞株接

种于6孔板中,培养24 h后,根据组别设置分别加入青蒿琥酯终浓度分别为10、20 μmol/L的培养基,并设立未加药的空白对照组;经过药物作用24 h后,按照1:1 000用无血清培养液稀释DCFH-DA,加入收集细胞中使终浓度为10 μmol/L,37℃细胞培养箱内孵育20 min,用流式细胞仪检测ROS表达情况,采用flowjor软件分析实验数据。

1.2.5 Annexin-V FITC/PI双染法检测OCI-LY3细胞凋亡 按试剂盒说明书进行操作,取对数生长期的OCI-LY3细胞株接种于6孔板中,培养24 h后,根据组别的设置分别加入青蒿琥酯终浓度分别为10、20 μmol/L的培养基,并设立未加药的空白对照组;药物作用24 h后,收集细胞;使用预冷的PBS洗涤细胞2次(离心300 g,5 min);加入200 μL的Binding Buffer悬浮细胞;加入5 μL Annexin V-FITC混匀后,加入5 μL PI(Propidium Iodide),混匀;室温、避光、反应15 min,用流式细胞仪检测细胞凋亡率的情况,采用flowjor软件分析实验数据。

1.2.6 Real time PCR法检测凋亡相关基因在mRNA表达水平 实验细胞及分组按照“1.2.4”中设置并处理细胞,用试剂盒提取细胞总RNA,分光光度法测定其在260~280 nm的浓度和纯度。根据TransScript® First-Strand cDNA Synthesis SuperMix试剂盒合成DNA第一链逆转录合成cDNA,cDNA第一链合成体系20 μL:取灭过菌且无核酸酶的0.2 mL PCR管,依次加入如下组份:RNA(2 μg) 2 μL、2×TS Reaction Mix 10 μL、Primer Oligo dT(18) 1 μL、无核酸酶的双蒸水至总体积20 μL;42℃保温15 min得到cDNA;往上步骤中的0.2 mL PCR管依次加入如下组分:前引物和后引物(10 μmol/L)各0.4 μL、2×TS Top/Tip Green qPCR SuperMix 10 μL无核酸酶双蒸水至总体积20 μL;轻轻混匀后,然后1 000 r/min离心20 s;行PCR扩增:反应参数:94℃ 30 s,然后94℃,5 s,65℃ 15 s,72℃ 10 s,40个循环。PCR引物序列由上海生工生物公司验证并合成,选择GAPDH为内参照,基因表达水平采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算。各基因引物序列见表1。

表1 引物序列

基因	引物序列(5'-3')	产物长度/bp
<i>bcl-2</i> 正向链	GTGAAGTGGGGGAGGATTG	197
<i>bcl-2</i> 反向链	CATGCTGGGGCCATATAGT	
<i>caspase3</i> 正向链	GGACCTGTGGACCTGAAAAA	159
<i>caspase3</i> 反向链	GCATGCCATATCATCGTCAG	
<i>gapdh</i> 正向链	GCACAGTCAAGGCCGAGAAT	151
<i>gapdh</i> 反向链	GCCTTCTCCATGGTGGTGAA	

1.2.7 Western blot法检测凋亡相关蛋白表达 实验细胞及分组按照“1.2.4”中设置并处理细胞,采用RAPI裂解液进行细胞蛋白提取,通过BCA法检测蛋白浓度,采用12%SDS-PAGE胶进行电泳、转膜,5%脱脂奶粉封闭2 h,加入稀释的一抗Bcl-2、Caspase-3和GAPDH(1:1 000)4℃孵育过夜,PBST洗膜3次,每次5 min,加入稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗(1:4 000),反应1 h,洗膜3次,每次5 min,曝光。蛋白条带采用Quantity one软件分析灰度值与GAPDH蛋白条带灰度值进行比较,分析待测蛋白表达水平。

1.3 统计学处理

采用SPSS 20.0统计软件处理数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用One-way ANOVA分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

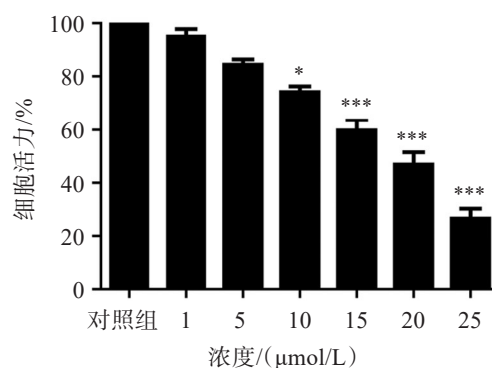
2 结果

2.1 不同浓度ART对OCI-LY3细胞活性的影响

在CCK-8实验中,为探究ART对弥漫大B细胞淋巴瘤细胞的作用,采用1、5、10、15、20、25 $\mu\text{mol/L}$ 。结果显示,与空白对照组比较,ART浓度 $\geq 10 \mu\text{mol/L}$ 时,对OCI-LY3细胞具有显著抑制作用且呈浓度依赖性($P < 0.05$ 或 0.01),见图1。故后续实验选择低浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$,高浓度为 $20 \mu\text{mol/L}$ 。

2.2 不同浓度ART对OCI-LY3细胞形态的影响

与空白对照组比较, $10 \mu\text{mol/L}$ 的ART处理能够



与对照组比较* $P < 0.05$, *** $P < 0.01$

图1 不同浓度青蒿琥酯对OCI-LY3细胞增殖活性的影响

显著抑制细胞聚集成团生长,并且 $20 \mu\text{mol/L}$ ART浓度会进一步加剧这一现象,且细胞透亮度明显降低,可见部分细胞破碎,见图2,显示ART能显著影响细胞体外生长状态,提示可抑制细胞增殖活性。

2.3 ART对OCI-LY3细胞ROS的影响

与对照组比较, $10 \mu\text{mol/L}$ 的ART处理细胞能够显著地促进细胞中ROS含量的增加(15.87 ± 2.08)($P < 0.01$),而 $20 \mu\text{mol/L}$ ART处理则进一步增加细胞ROS含量(26.61 ± 1.53)($P < 0.01$),且随着ART浓度的增加细胞内ROS也明显增加,见图3。

2.4 ART对OCI-LY3细胞凋亡的影响

通过流式细胞术双染检测,与空白对照组相比较,浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ ART导致细胞发生凋亡($P < 0.01$), $20 \mu\text{mol/L}$ 凋亡率更高($P < 0.01$),见图4。

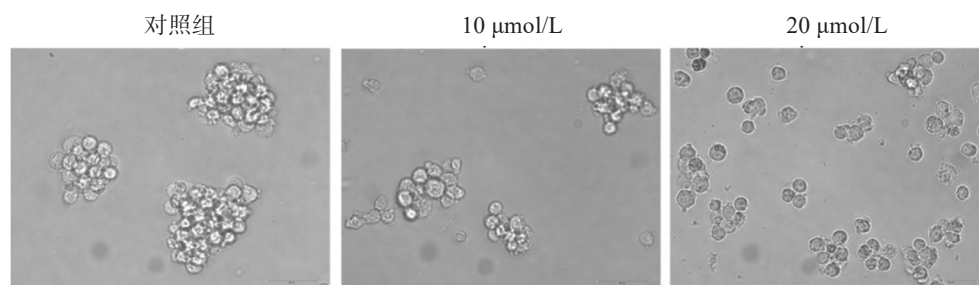
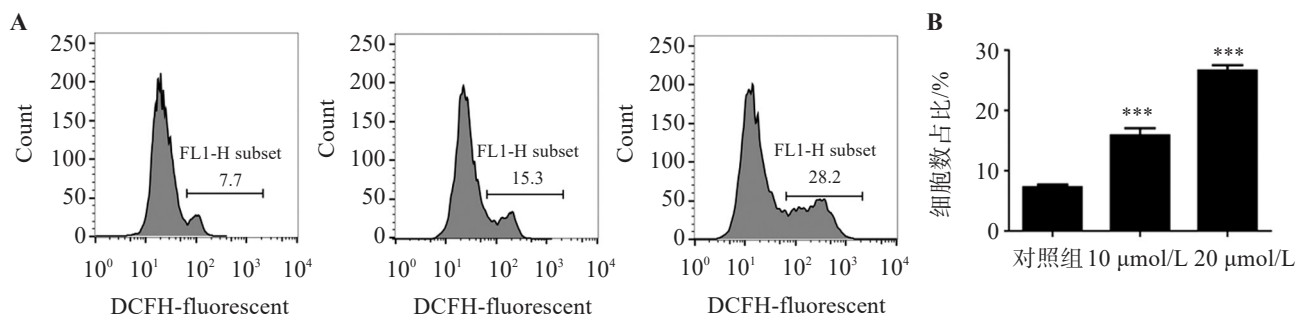


图2 青蒿琥酯对细胞形态的影响(200倍)



A. 青蒿琥酯处理后细胞中ROS含量图; B. 统计细胞ROS含量,与对照组比较:*** $P < 0.01$

图3 青蒿琥酯对OCI-LY3细胞ROS含量的影响

2.5 ART对OCI-LY3细胞凋亡相关基因转录的影响

qRT-PCR显示,与空白对照组比较,10 $\mu\text{mol/L}$ ART能够显著抑制抗凋亡基因 *bcl-2* 的表达,同时促进凋亡基因 *caspase-3* 表达($P<0.01$),在20 $\mu\text{mol/L}$ 更为显著($P<0.01$),见图5。

2.6 ART对OCI-LY3细胞凋亡相关蛋白表达的影响

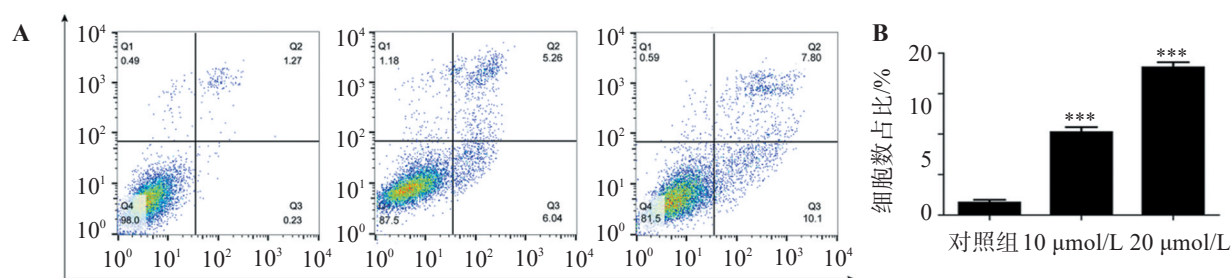
与空白对照组相比,10 $\mu\text{mol/L}$ 抗凋亡蛋白 *Bcl-2* 表达显著降低,凋亡相关蛋白 *Caspase-3* 的表达则升高($P<0.05$),以20 $\mu\text{mol/L}$ 更为显著($P<0.01$),见图6。

3 讨论

弥漫大B细胞淋巴瘤是非霍奇金淋巴瘤中最常见的一种,为一组形态学、免疫表型、遗传学和临床表

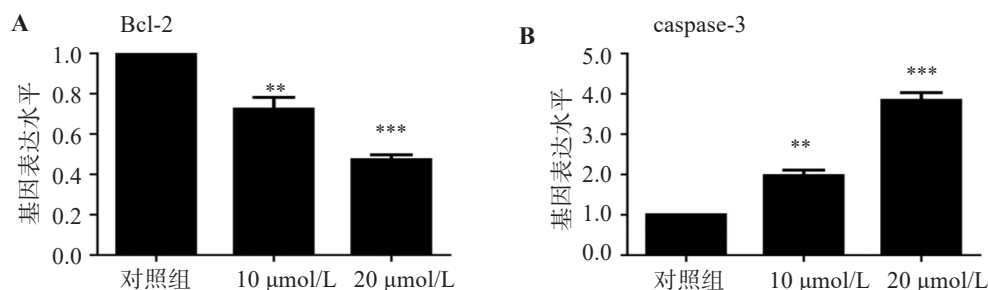
现都具有明显异质性的B细胞性淋巴瘤。国内淋巴瘤病理学统计资料显示,DLBCL在国人NHL中约占55%。近年来,CD20单克隆抗体利妥昔单抗联合CHOP方案(美罗华+环磷酰胺+阿霉素+长春新碱+强的松,R-CHOP)的广泛运用,明显改善了DLBCL总体的预后。但是R-CHOP方案主要以改善GCB-DLBCL的预后为主,使得GCB-DLBCL的5年总生存率从46%升至80%,而对ABC-DLBCL预后的改善仅从32%提高至50%。因此,如何进一步提高ABC-DLBCL的疗效是临床上亟待解决的问题。

肿瘤的发生发展与细胞增殖和凋亡密切相关,有效诱导细胞凋亡和抑制肿瘤细胞增殖已成为肿瘤治



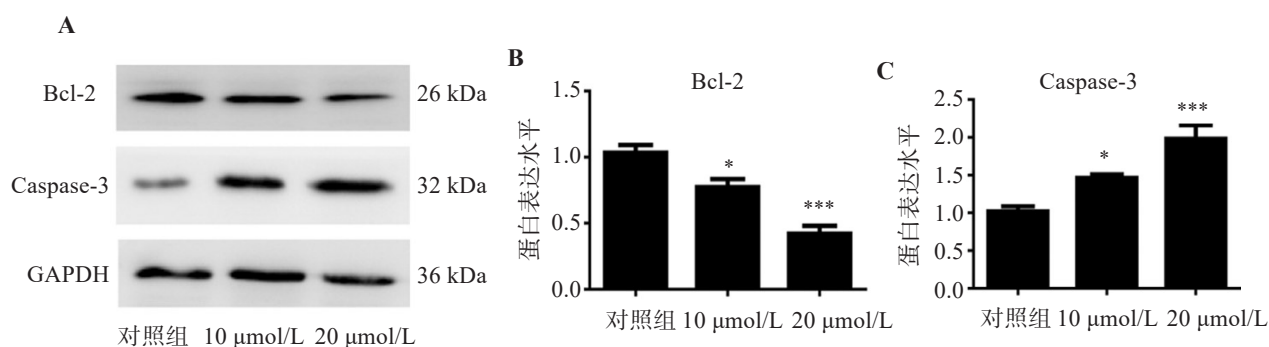
A. 青蒿琥酯处理后细胞凋亡图; B. 统计细胞凋亡率,与对照组比较:*** $P<0.001$

图4 青蒿琥酯对OCI-LY3细胞凋亡的影响



A. 青蒿琥酯处理后细胞中 *Bcl-2* 基因相对表达量; B. 青蒿琥酯处理后细胞中 *caspase-3* 基因相对表达量;与对照组比较:** $P<0.01$,*** $P<0.001$

图5 青蒿琥酯对OCI-LY3细胞 *Bcl-2* 和 *caspase-3* 基因表达的影响



A. 青蒿琥酯处理后细胞中 *Bcl-2* 和 *Caspase-3* 蛋白质电泳图; B. *BCL* 表达量;与对照组比较:* $P<0.05$,*** $P<0.001$; C. *Caspase-3* 表达量,与对照组比较:* $P<0.05$,*** $P<0.001$

图6 青蒿琥酯对OCI-LY3细胞 *Bcl-2* 和 *Caspase-3* 蛋白表达的影响

疗的新方向^[5]。细胞凋亡涉及一系列基因的激活、表达和调控。Caspase-3是肿瘤细胞凋亡的关键性分子,裂解的Caspase-3是Caspase-3的主要活性形式,在细胞中主要是促进细胞的凋亡。Bcl-2参与多种肿瘤的发生发展,并发挥着重要的生物学功能^[6]。Bcl-2是抗凋亡蛋白在细胞中发挥抑制细胞凋亡的功效,同时抑制Caspase-3的活性发挥抑制凋亡的作用^[7]。以往的研究发现,癌细胞由于代谢活跃而含有比正常细胞更高水平的ROS,这与细胞增殖、分化和细胞死亡密切相关。由于ROS水平较高,癌细胞显示出更多的氧化应激损伤,这一特性可用作癌症治疗的药物靶点。线粒体的ROS主要来源于呼吸链泄漏。细胞内升高的ROS表达可能会损伤线粒体DNA,继而导致参与呼吸链的相关线粒体RNA的转录受损,进一步增强了ROS的产生^[8]。最近的研究表明过表达ROS参与线粒体介导的凋亡并且细胞的氧化应激能够抑制抗凋亡蛋白Bcl-2的表达^[9]。本研究中青蒿琥酯的作用下能够显著的促进ABC型弥漫大B细胞淋巴瘤细胞中ROS的含量,并且细胞中抗凋亡蛋白Bcl-2在mRNA和蛋白水平上也显著的降低,细胞凋亡水平显著上升,同时也发现细胞的中凋亡蛋白Caspase-3的表达明显增强。

多项研究表明,青蒿琥酯对多种人类肿瘤细胞发挥细胞毒性作用^[10-11],并且临床研究报道其具有抗肿瘤效应。Zhang等^[12]的研究揭示青蒿琥酯能够发挥抗泌乳素瘤活性通过抑制细胞线粒体的代谢功能诱导细胞凋亡。最新的研究表明青蒿琥酯能够抑制Wnt信号通路抑制肠道肿瘤的发生发展^[13],同时也有报道其参与细胞的一种全新的死亡方式铁死亡^[14]。本研究结果表明,青蒿琥酯能够诱导ABC型弥漫大B细胞淋巴瘤细胞中ROS表达,并且抑制细胞增殖促进细胞凋亡,这与Zhou等^[15]的研究结果是相一致的。

综上所述,青蒿琥酯能够显著抑制ABC型弥漫大B细胞淋巴瘤细胞的增殖,并诱导细胞ROS的产生同时促进其凋亡,下调抗凋亡基因Bcl-2表达和上调促凋亡基因caspase-3 mRNA和蛋白水平的表达,可为青蒿琥酯应用于ABC型弥漫大B细胞淋巴瘤的临床治疗并改善ABC-DLBCL预后提供实验理论依据。

参考文献:

- [1] MARKOWITSCH S D, SCHUPP P, LAUCKNER J, et al. Artesunate inhibits growth of sunitinib-resistant renal cell carcinoma cells through cell cycle arrest and induction of ferroptosis[J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(11):3150.
- [2] YANG X, FANG D, LI M, et al. Knockdown of chitinase 3-like-1 inhibits cell proliferation, promotes apoptosis, and enhances effect of anti-programmed death ligand 1 (pd-l1) in diffuse large B cell lymphoma cells[J]. *Med Sci Monit*, 2021, 27:e929431.
- [3] VANDEWYNCKEL Y P, LAUKENS D, GEERTS A, et al. Therapeutic effects of artesunate in hepatocellular carcinoma: Repurposing an ancient antimalarial agent[J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2014, 26(8):861-870.
- [4] JEONG D E, SONG H J, LIM S, et al. Repurposing the anti-malarial drug artesunate as a novel therapeutic agent for metastatic renal cell carcinoma due to its attenuation of tumor growth, metastasis, and angiogenesis[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(32):33046-33064.
- [5] LIN P, ZHOU B, YAO H, et al. Effect of carboplatin injection on bcl-2 protein expression and apoptosis induction in raji cells[J]. *Eur J Histochem*, 2020, 4(3):3134.
- [6] QIU X G, CHEN Y D, YUAN J, et al. Functional BCL-2 rs2279115 promoter noncoding variant contributes to glioma predisposition, especially in males[J]. *DNA Cell Biol*, 2019, 38(1):85-90.
- [7] WANG W, ZHU M, XU Z, et al. Ropivacaine promotes apoptosis of hepatocellular carcinoma cells through damaging mitochondria and activating caspase-3 activity[J]. *Biol Res*, 2019, 52(1):36.
- [8] ORRENIUS S, GOGVADZE V, ZHIVOTOVSKY B. Calcium and mitochondria in the regulation of cell death[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 460(1):72-81.
- [9] REDZA-DUTORDOIR M, AVERILL-BATES D A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1863(12):2977-2992.
- [10] VÅTSVEEN T K, MYHRE M R, STEEN C B, et al. Artesunate shows potent anti-tumor activity in B-cell lymphoma[J]. *J Hematol Oncol*, 2018, 11(1):23.
- [11] ROH J L, KIM E H, JANG H, et al. Nrf2 inhibition reverses the resistance of cisplatin-resistant head and neck cancer cells to artesunate-induced ferroptosis[J]. *Redox Biol*, 2017, 11:254-262.
- [12] ZHANG W, DU Q, BIAN P, et al. Artesunate exerts anti-prolactinoma activity by inhibiting mitochondrial metabolism and inducing apoptosis[J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(14):858.
- [13] HAMOYA T, FUJII G, IIZUMI Y, et al. Artesunate inhibits intestinal tumorigenesis through inhibiting wnt signaling[J]. *Carcinogenesis*, 2021, 42(1):148-158.
- [14] KONG Z, LIU R, CHENG Y. Artesunate alleviates liver fibrosis by regulating ferroptosis signaling pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109:2043-2053.
- [15] ZHOU X, CHEN Y, WANG F, et al. Artesunate induces autophagy dependent apoptosis through upregulating ROS and activating AMPK-mTOR-ULK1 axis in human bladder cancer cells[J]. *Chem Biol Interact*, 2020, 331:109273.