

小白菊内酯抑制紫杉醇诱导的肿瘤细胞凋亡

方 勇^{1*}, 吴金民¹, 卢 瑜², Jennifer M. DZIADYK³, 潘宏铭¹, 范伟民³

(1. 浙江大学医学院附属邵逸夫医院肿瘤中心, 浙江 杭州 310016; 2. 南京军区杭州疗养院, 浙江 杭州 310007; 3. Department of Pathology and Laboratory Medicine, Medical University of South Carolina, 171 Ashley Avenue, Charleston, SC 29425, USA)

摘要: 目的 探讨 NF- κ B 在紫杉醇诱导肿瘤细胞凋亡中的作用及小白菊内酯对紫杉醇诱导凋亡的影响。方法 以人乳癌 BCap37 细胞和人表皮 KB 细胞为研究对象, 用 5, 10 和 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 小白菊内酯预处理细胞, 以 DNA 凋亡梯状条带、DNA 含量、MTT、细胞甩片及电泳迁移率变动分析(EMSA)法检测它对紫杉醇诱导细胞凋亡的影响并探索其作用靶点。结果 通过检测 DNA 凋亡梯状条带、DNA 含量和细胞生存率, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 小白菊内酯能显著抑制紫杉醇所诱导的 BCap37 和 KB 细胞凋亡, 但不影响紫杉醇诱导肿瘤细胞 G_2/M 期阻滞。EMSA 实验表明小白菊内酯能抑制紫杉醇诱导激活 NF- κ B。结论 小白菊内酯通过抑制 NF- κ B 的激活来抑制紫杉醇所诱导的肿瘤细胞凋亡, 而紫杉醇诱导肿瘤细胞凋亡的过程可能与 G_2/M 期阻滞无关。

关键词: 凋亡; 小白菊内酯; 紫杉醇; 核因子- κ B

中图分类号: R979.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2004)01-0042-05

紫杉醇(paclitaxel)是来源于紫杉树皮中的一种新型抗微管化疗药物, 目前广泛用于治疗晚期卵巢癌、乳癌及其他多种实体肿瘤^[1]。紫杉醇可使微管二聚体与微管间的平衡转向聚合方向, 稳定微管防止其解聚, 诱导有丝分裂长期阻滞于 G_2/M 期, 并可诱导细胞凋亡^[2], 激活或调节多种凋亡相关基

因或蛋白^[3,4], 而核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)起着非常重要的作用。NF- κ B 与 NF- κ B 抑制基因 I κ B- α 共同参与调节炎症、免疫应答、细胞增生及细胞凋亡^[5]。已经报道 NF- κ B 与 150 种靶基因的转录有关。Huang 等^[6,7] 证明紫杉醇可通过激活 NF- κ B 而诱导细胞凋亡, 并通过对紫杉醇耐药的 MCF-7 乳腺癌细胞株、大鼠前列腺癌 R3227 细胞研究, 表明 NF- κ B/I κ B- α 信号转导途径决定着肿瘤细胞对紫杉醇的敏感性^[5]。

从艾菊内酯化出一种萜半萜烯内酯化合物小白菊内酯(parthenolide, $C_{15}H_{20}O_3$, M_r :248.3)。实验证实小白菊内酯有抗炎作用^[8], 并可抑制 NF- κ B 的激活^[9]。为进一步研究紫杉醇诱导肿瘤细胞凋亡机制及小白菊内酯对它诱导肿瘤细胞凋亡的影响, 本研究特选用对紫杉醇敏感的人乳癌 BCap37 细胞和人表皮 KB 细胞了解它的临床重要性和作用机制, 以及 NF- κ B 途径在紫杉醇诱导肿瘤细胞凋亡中的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞培养和药物

紫杉醇和小白菊内酯购自 Sigma 公司, 分别溶解在氯仿和 100% 二甲亚砜中, 分别配成 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 20 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 贮存液, 以 RPMI 1640 培养液稀释至所用浓度。在含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液中常规培养人乳癌 BCap37 细胞和人表皮癌 KB 细胞(分别购自上海中国科学院细胞库和美国 ATCC 公司)。将细胞分为单用紫杉醇组 and 小白菊内酯 + 紫杉醇组(5, 10 和 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 小白菊内酯预处理细胞 3 h 后, 再加入 20, 50 和 100 nmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 紫杉醇作用 24 或 48 h)。

1.2 DNA 降解分析

收集细胞, 用磷酸缓冲盐溶液(PBS)洗 2 次后, 加入低渗细胞裂解液(5 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-Cl pH 8.0, 20

收稿日期: 2003-02-09 接受日期: 2003-04-01

基金项目: 美国国立卫生研究院资助项目(CA92880); 美国国立卫生研究院资助项目(CA82440)

作者简介: 方 勇(1973-), 男, 江西省景德镇人, 医学博士, 主要从事肿瘤药理及凋亡信号传导途径研究。

* 联系作者 E-mail: fyzju@sina.com Tel: (0571) 87978388, 13588491264 Fax: (0571) 86044817

mmol·L⁻¹ EDTA 和 0.5% (V/V) Triton X-100], 冰浴 20 min, 10 000 × *g* 离心 20 min, 等体积的苯酚/氯仿/异丙醇(25:24:1)抽提 1 次。用 7.5 mol·L⁻¹ 醋酸钠和乙醇沉淀 DNA, 溶解在 TE 缓冲液中(含 RNase)。1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 室温、恒流 70 V 电泳 2 h, 紫外灯下观察结果并摄影。

1.3 碘化丙啶染色法和流式细胞仪检测

参照 Huang 等^[6]的方法碘化丙啶染色, 检测 DNA 含量。胰酶消化收集按上述 1.1 分组处理的细胞, 70% 乙醇固定, 4℃ 保存。600 × *g* 离心 5 min, 并用冲洗液 (PBS 中含有 0.5% 牛血清白蛋白和 0.1% Triton X-100) 洗 2 次。

1.4 细胞甩片及光镜检查

按照 Johnson 等^[10]的方法制作细胞甩片。胰酶消化收集 BCap37 细胞, PBS 洗 2 次, 取 (5 ~ 10) × 10⁴ 细胞用于细胞甩片。光镜下观察计数, 只有细胞核染色体呈浓缩状才被认为是丝分裂阻滞。共计数 300 个细胞, 计算 G₂/M 期细胞百分率。

1.5 MTT 实验

胰酶消化 BCap37 细胞后, 将细胞稀释成 2 × 10⁸ L⁻¹ 的密度, 按每孔 100 μL 加入 96 孔培养板 (Falcon, Oxford, CA)。细胞贴壁后, 与相应浓度的药物作用 48 h。参照 Huang 等^[6]的方法进行 MTT 实验。

1.6 核蛋白提取及电泳迁移率变动分析 (electrophoretic mobility shift assay, EMSA)

参照 Huang 等^[7]的方法进行 EMSA 实验。胰酶消化收集 BCap37 细胞, 提取核蛋白。用 Dc 蛋白定量试剂盒 (Bio-Rad) 检测核蛋白含量。用 T4 多核苷酸激酶 (Promega, Madison, WI) 和 [γ-³²P] ATP 标记特异性的双链寡核苷酸序列 G-25 离心柱 (Amersham Biosciences) 纯化探针。

1.7 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 *t* 检验进行统计学分析。

2 结果

2.1 小白菊内酯对细胞增殖及紫杉醇诱导凋亡的影响

以不同浓度的小白菊内酯预处理 BCap37 细胞和 KB 细胞 48 h, 加入 MTT 4 h 后测定 *A*_{560 nm}。结果表明小白菊内酯 5 ~ 20 μmol·L⁻¹ 不影响肿瘤细胞增殖 (*P* > 0.05, 表 1)。图 1 可见, 20 nmol·L⁻¹ 或更高浓度的紫杉醇可诱导 BCap37 和 KB 细胞出现典型的 DNA 凋亡条带。但用 20 μmol·L⁻¹ 小白菊内酯预处理后, 能显著抑制紫杉醇所诱导的 DNA 凋亡条带。以流式细胞仪测定 DNA 含量进一步确认了该现象 (图 2)。

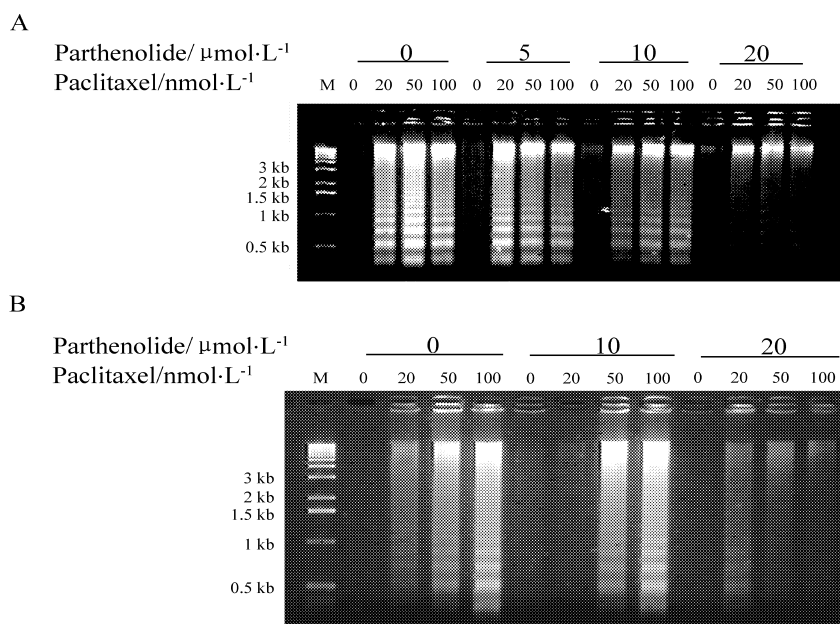


Fig 1. Effect of parthenolide on paclitaxel-induced apoptosis determined by internucleosomal DNA cleavage. BCap37 cells(A) and KB cells(B) were treated with different concentrations of paclitaxel for 48 h with or without pretreatment of parthenolide for 3 h. For the control group, the same volume of chloroform and DMSO were added.

Tab 1. Effect of parthenolide on cell proliferation

Parthenolide/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Cell proliferation($A_{560\text{ nm}}$)	
	BCap37	KB
0	1.56 ± 0.13	1.80 ± 0.14
5	1.51 ± 0.09	1.77 ± 0.17
10	1.48 ± 0.07	1.75 ± 0.13
20	1.45 ± 0.10	1.73 ± 0.11

Cells were incubated with parthenolide for 48 h, then MTT was added, 4 h later, the data were measured.

对 BCap37 细胞进行细胞周期研究, 结果表明小白菊内酯虽然能抑制紫杉醇诱导的肿瘤细胞凋亡, 但不影响紫杉醇所诱导的细胞周期阻滞(图 3)。

2.2 小白菊内酯抑制紫杉醇诱导的 NF- κ B 激活

以不同浓度小白菊内酯(5, 10 和 $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)预处理 BCap37 细胞 3 h 后, 加入不同浓度的紫杉醇(20, 50 和 $100\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)作用 24 h。提取细胞核蛋白。EMSA 实验结果表明, 紫杉醇能诱导 NF- κ B 激

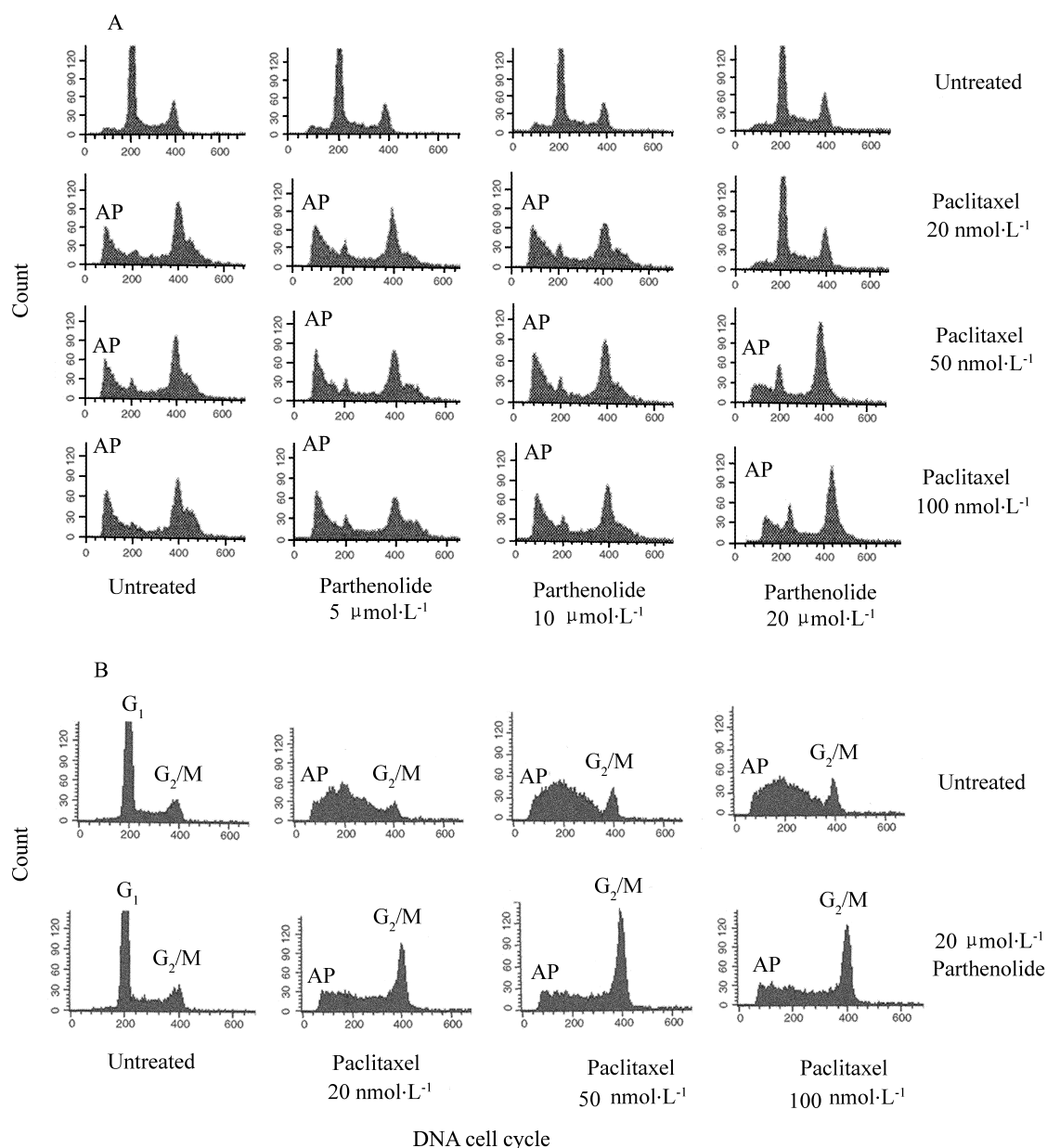


Fig 2. Effect of parthenolide on the paclitaxel-induced apoptosis determined by flow cytometry. BCap37 cells (A) and KB cells (B) were exposed to 20, 50 and $100\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ paclitaxel for 48 h with or without pretreatment of different concentrations of parthenolide for 3 h. For the untreated group, the same volume of chloroform (A) and DMSO (B) were added. The peak labelled apoptotic peak (AP) represents apoptotic cells.

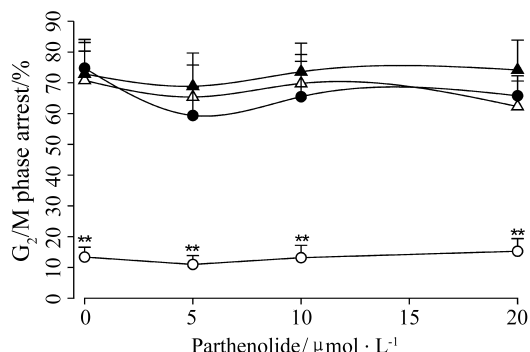


Fig 3. Effect of parthenolide on the G₂/M phase induced by paclitaxel determined by cytospin slides.

Bcap37 cells were pretreated with different concentrations of parthenolide for 3 h then exposed to 0 (○) 20 (●), 50 (△) and 100 (▲) nmol·L⁻¹ paclitaxel for 48 h. The percentage of G₂/M phase was counted in 300 cells from each slide. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$ (slides). ** $P < 0.01$, compared with other three corresponding groups. There is no difference among the 20, 50, 100 nmol·L⁻¹ paclitaxel groups, and between with or without parthenolide.

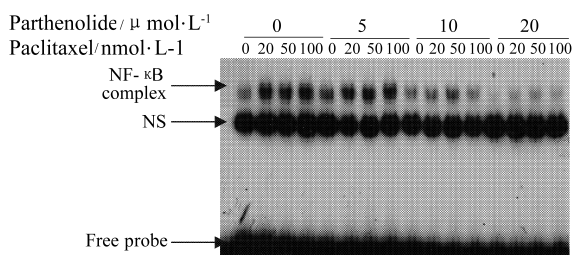


Fig 4. Effect of parthenolide on paclitaxel-induced nuclear factor-kappaB (NF-κB)/DNA binding activity by electrophoretic mobility shift assay (EMSA).

NS: non-specific binding. Equal amounts of nuclear extracts, which were prepared from Bcap37 cells treated with indicated concentration of paclitaxel for 24 h either in the absence or presence of parthenolide (5, 10 and 20 μmol·L⁻¹), were examined for NF-κB/DNA binding activity in the EMSA.

活,但 20 μmol·L⁻¹小白菊内酯可显著抑制紫杉醇所诱导的 NF-κB 激活(图 4)。

3 讨论

本研究中,紫杉醇能诱导 BCap37 细胞和 KB 细胞出现典型的 DNA 凋亡梯状条带和亚二倍体峰,而 20 μmol·L⁻¹小白菊内酯可显著抑制紫杉醇诱导的凋亡,却不影响有丝分裂 G₂/M 期阻滞。EMSA 实验结果证明小白菊内酯能抑制紫杉醇所诱导的 NF-κB

激活。

本实验中用小白菊内酯可阻断紫杉醇所诱导 NF-κB 的激活,抑制紫杉醇诱导的肿瘤细胞凋亡。这与 Patel 等^[11]的结果不一致,他们的实验显示小白菊内酯可抑制 MDA-MB-231 乳腺癌细胞 NF-κB 激活,提高对紫杉醇的敏感性。Johnson 等^[10]和 Huang 等^[6,7]则以不同的细胞株进行研究,表明根据细胞类型及刺激因素的不同, NF-κB 激活与细胞凋亡存在双向调节关系,可诱导或阻滞凋亡的发生。所以还需要进一步研究小白菊内酯的药理作用及 NF-κB 激活在诱导细胞凋亡中的作用机制。

总之, NF-κB 激活在紫杉醇诱导肿瘤细胞凋亡中具有重要的作用,小白菊内酯可抑制紫杉醇所诱导 NF-κB 激活,进而抑制肿瘤细胞凋亡,但并不影响紫杉醇诱导的有丝分裂 G₂/M 期阻滞,提示紫杉醇诱导细胞凋亡的过程可能与 G₂/M 期阻滞无关,并有待于进一步的深入研究。

4 参考文献:

- [1] Rowinsky EK. The development and clinical utility of the taxane class of antimicrotubule chemotherapy agents [J]. *Annu Rev Med*, 1997, **48**:353 - 374.
- [2] Jordan MA, Wilson L. Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1998, **10**(1):123 - 130.
- [3] Moos PJ, Fitzpatrick FA. Taxanes propagate apoptosis via two cell populations with distinctive cytological and molecular traits [J]. *Cell Growth Differ*, 1998, **9**(8):687 - 697.
- [4] Fan W. Possible mechanism of paclitaxel-induced apoptosis [J]. *Biochem Pharmacol*, 1999, **57**(11):1215 - 1221.
- [5] Huang Y, Fang Y, Dziadyk JM, Norris JS, Fan W. The possible correlation between activation of NF-κB/IκB pathway and the susceptibility of tumor cells to paclitaxel-induced apoptosis [J]. *Oncol Res*, 2002, **13**(2):113 - 122.
- [6] Huang Y, Johnson KR, Norris JS, Fan W. Nuclear factor-kappaB/IkappaB signaling pathway may contribute to the mediation of paclitaxel-induced apoptosis in solid tumor cells [J]. *Cancer Res*, 2000, **60**(16):4426 - 4432.
- [7] Huang Y, Fan W. IκappaB kinase activation is involved in regulation of paclitaxel-induced apoptosis in human tumor cell lines [J]. *Mol Pharmacol*, 2002, **61**(1):105 - 113.
- [8] Bork PM, Schmitz ML, Kuhnt M, Escher C, Heinrich M. Sesquiterpene lactone containing Mexican Indian medicinal plants and pure sesquiterpene lactones as potent inhibitors of transcription factor NF-κB [J]. *FEBS Lett*, 1997, **402**(1):

- 85 – 90.
- [9] Hehner SP, Heinrich M, Bork PM, Vogt M, Ratter F, Lehmann V, *et al.* Sesquiterpene lactones specifically inhibit activation of NF-kappaB by preventing the degradation of IkappaB-alpha and IkappaB-beta [J]. *J Biol Chem*, 1998, **273**(3):1288 – 1297.
- [10] Johnson KR, Wang L, Miller MC 3rd, Willingham MC, Fan W. 5-Fluorouracil interferes with paclitaxel cytotoxicity against human solid tumor cells [J]. *Clin Cancer Res*, 1997, **3**(10):1739 – 1745.
- [11] Patel NM, Nozaki S, Shortle NH, Bhat-Nakshatri P, Newton TR, Rice S, *et al.* Paclitaxel sensitivity of breast cancer cells with constitutively active NF-kappaB is enhanced by IkBa super-repressor and parthenolide [J]. *Oncogene*, 2000, **19**(36):4159 – 4169.

Parthenolide attenuated the apoptosis induced by paclitaxel

FANG Yong^{1*}, WU Jin-Min¹, LU Yu², Jennifer M. DZIADYK³, PAN Hong-Min¹, FAN Wei-Min³

(1. Department of Oncology, Sir Run Run Shaw Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310016, China; 2. Hangzhou Sanatorium, Nanjin Military Command, Hangzhou 310007, China; 3. Department of Pathology and Laboratory Medicine, Medical University of South Carolina, 171 Ashley Avenue, Charleston, SC 29425, USA)

Abstract: **AIM** To detect the signal pathway of apoptosis induced by paclitaxel and the biological effect of parthenolide on the paclitaxel-induced apoptosis. **METHODS** In this study, pretreatment with 5, 10 and 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ parthenolide, DNA cleavage, DNA content, MTT assay, cytospin slides and electrophoretic mobility shift assay (EMSA) were used to determine the actual effects and its mechanism of parthenolide on the paclitaxel-induced apoptosis in human breast cancer BCap37 cells and human epidermoid tumor KB cells. **RESULTS** Through the results from DNA cleavage, PI staining for the DNA content and percentage of cell viability, 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ parthenolide could selectively inhibit paclitaxel-induced apoptotic cell death in BCap37 and KB

cells but did not affect paclitaxel's ability on the cell cycle arrest at G₂/M phase. Subsequent observations using EMSA assay indicated that parthenolide interfered with NF- κ B activation and its DNA binding activity. **CONCLUSION** These findings indicate that parthenolide suppresses paclitaxel-induced apoptosis *via* inhibition of NF- κ B activation and the paclitaxel-induced apoptosis may not correlate to G₂/M phase arrest. **Key words:** apoptosis; parthenolide; paclitaxel; nuclear factor-kappaB

Foundation item: The project supported by NIH of USA (CA92880); and by NIH of USA (CA82440)

* Corresponding author.

(本文编辑 乔虹)