

山椒子烯酮对急性T淋巴细胞白血病的抗肿瘤 药效及安全性评价

王菲菲^{1,2}, 杨淑贤², 黄立无³, 庞敏^{2,4}, 单宇², 胡小勤¹, 李立勇², 曹丽^{2*}

(1. 广西中医药大学 药学院, 南宁 530001;

2. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193;

3. 中国人民大学医院, 北京 100872;

4. 哈尔滨商业大学 药学院(药物工程技术研究中心), 哈尔滨 150076)

[摘要] 目的:探究山椒子烯酮对急性T淋巴细胞白血病的抗肿瘤药效、机制及安全性。方法:体外培养Molt-4细胞,不同浓度山椒子烯酮(0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)给药48 h,通过细胞增殖-毒性检测法(CCK-8)检测Molt-4细胞的活性。非肥胖糖尿病/重症联合免疫缺陷(NOD/SCID)小鼠随机分为正常组,模型组,长春新碱组($1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),山椒子烯酮低、中、高剂量组(12.5, 25, 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)。除正常组外,小鼠预先照射⁶⁰Co,皮下接种Molt-4细胞建立Molt-4细胞移植瘤小鼠模型。第13天,小鼠脱臼处死并解剖。计算抑瘤率、相对肿瘤增殖率、肝指数及脾指数;苏木素-伊红(HE)染色观察肝组织、脾组织的病理变化;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肿瘤组织中磷酸化信号转导与转录激活因子-3(p-STAT3),B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2), Bcl-2相关X蛋白(Bax),半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)蛋白的表达。结果:体外实验结果表明,与空白组比较,山椒子烯酮对Molt-4细胞有明显的抑制作用,半数抑制浓度(IC₅₀)为1.49 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。体内实验结果表明,与模型组比较,山椒子烯酮中剂量组和高剂量组抑瘤效果显著,抑制率分别为50.24%和60.75%($P<0.01$)。病理结果表明,与长春新碱组比较,山椒子烯酮对肝组织、脾组织损伤较小,安全性更好。蛋白印迹结果表明,与模型组比较,山椒子烯酮中剂量组和高剂量组可以显著下调p-STAT3, Caspase-3, Bcl-2蛋白的表达($P<0.05$, $P<0.01$),上调Bax蛋白的表达($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:山椒子烯酮有明显抑制Molt-4细胞增殖,诱导Molt-4细胞凋亡的作用,其作用机制可能与下调p-STAT3, Caspase-3, Bcl-2蛋白的表达,上调Bax蛋白的表达有关。同时,山椒子烯酮对肝组织、脾组织的损伤较小,安全性更好。

[关键词] 急性T淋巴细胞白血病; 山椒子烯酮; 细胞凋亡; 抗肿瘤; Molt-4细胞

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)11-0100-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201129

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200305.1547.001.html>

[网络出版日期] 2020-3-5 17:06

Anti-tumor Efficacy and Safety of Zeylenone on Acute T Lymphoblastic Leukemia

WANG Fei-fei^{1,2}, YANG Shu-xian², HUANG Li-wu³, PANG Min^{2,4}, SHAN Yu², HU Xiao-qin¹,
LI Li-yong², CAO Li^{2*}

(1. College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China;

2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking
Union Medical College, Beijing 100193, China;

3. The Renmin University Hospital, Beijing 100872, China;

4. College of Pharmacy (Pharmaceutical Engineering Technology Research Center), Harbin
University of Commerce, Harbin 150076, China)

[收稿日期] 20191021 (013)

[基金项目] 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2016-12M-1-012)

[第一作者] 王菲菲,在读硕士,从事中药药效筛选及临床应用研究, E-mail: feifeiw1994@163.com

[通信作者] *曹丽,博士,研究员,从事天然药物抗肿瘤药理学研究, E-mail: lcao@implad.ac.cn

[Abstract] **Objective:** To investigate the anti-tumor efficacy, mechanism and safety of zeylenone on acute T lymphocytic leukemia. **Method:** *In vitro*, Molt-4 cells were treated with various concentrations of zeylenone (0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 48 h, and the cell viability was measured with cell counting kit-8 (CCK-8) assay. nonobese diabetic-severce combined immunodeficient mice (NOD/SCID) mice were randomly divided into six groups: normal group, model group, vincristine group (1 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), low-dose zeylenone group (12.5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), medium-dose zeylenone group (25 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), high-dose zeylenone group (50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). With the exception of normal group, mice were pre-irradiated with ^{60}Co and inoculated subcutaneously with Molt-4 cells to establish the Molt-4 xenograft model. Then NOD/SCID mice were sacrificed after 13 days of administration. The tumor inhibition rates, relative tumor growth rates and organ indexes were calculated. Hematoxylin and eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes of liver and spleen tissues in mice. The expressions of phosphorylation signal transducer and activator of transcription (p-STAT3), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax) and cysteine aspartate-specific protease-3 (Caspase-3) were detected in tumor tissues by Western blot. **Result:** *In vitro*, zeylenone had an obvious inhibitory effect on Molt-4 cells. IC_{50} values of zeylenone was 1.49 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. *In vivo*, compared with the model group, medium and high-dose zeylenone groups had significant tumor inhibition effects, with the inhibition rates of 50.24% and 60.75%, respectively ($P<0.01$). Additionally, liver and spleen injuries were slight in the above mentioned two groups compared with the vincristine group, indicating that zeylenone was safe. Western blot analysis showed that medium and high-dose zeylenone groups showed significant declines in proteins p-STAT3, Caspase-3 and Bcl-2, and marked increases in pro-apoptotic protein Bax compared with the model group ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** zeylenone could obviously inhibit the proliferation and induce the apoptosis of Molt-4 cells; and its mechanism may be related to the down-regulation of p-STAT3, Caspase-3, Bcl-2 and the up-regulation of Bax expressions. In addition, zeylenone had less damage to liver and spleen, and was safer than vincristine.

[Key words] acute T lymphocytic leukemia; zeylenone; cell apoptosis; anti-tumor; Molt-4 cell

根据《Global Cancer Statistics 2018》统计显示, 2018年全球新增白血病43.7万病例,死亡30.9万病例,发病率和死亡率分别为2.4%和3.2%^[1],已经严重威胁人类的生命和健康。其中,急性T淋巴细胞白血病(T-ALL)是一类发病快、危险程度较高的血液系统恶性肿瘤。目前,临床上针对急性T淋巴细胞白血病的靶向药物较少,治疗效果不理想。化疗、放疗对肿瘤的选择性较差,在杀死癌细胞的同时,也会对患者的其他器官和组织造成难以恢复的损伤^[2-3]。而临床中较热门的免疫疗法也缺乏特异治疗T-ALL的方案,如抗原受体T细胞免疫疗法(CAR-T)主要应用于复发、难治的B淋巴细胞白血病和B细胞淋巴瘤,不针对T-ALL的治疗^[4]。这导致T-ALL治疗现状颇受限制,死亡率较高。因此,如何提高T-ALL的治疗效果一直是临床的关注点和难点。

天然产物一直是抗肿瘤新药发现的重要来源。山椒子烯酮是从番荔枝科紫玉盘属山椒子 *Uvaria grandiflora* 中提取的多氧环乙烯类化合物^[5]。山椒

子味苦、性甘、微温,温中散寒、温阳去利、止痛行气,可用于治疗高血压、防治肿瘤等多种疾病。前期的研究发现,山椒子烯酮对MGC803, HeLa, HepG2, PC-3, K562等多种类型的肿瘤细胞有较强的抑制作用^[6-9],特别是对血液肿瘤较为敏感。因此,本实验通过建立Molt-4细胞移植瘤小鼠模型,探究山椒子烯酮体内抗T-ALL作用及可能作用机制并进行安全性的观察,为研究抗T-ALL药物奠定基础。

1 材料

1.1 细胞 人急性淋巴母细胞性白血病细胞Molt-4(3111C0001CCC000043)购于中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心,已传至第7代。

1.2 动物 53只SPF级雌性非肥胖糖尿病/重症联合免疫缺陷(NOD/SCID)小鼠,体质量18~20 g,购于华阜康生物技术有限公司,许可证号SYXK(京)2017-0020,饲养于SPF级动物实验室的IVC系统内隔离笼具内,温度(24±2)℃,相对湿度(55±5)%,每天明/暗各12 h。动物实验由中国医学科学院药用

植物研究所实验动物伦理委员会批准进行(批号SLXD-20181023327)。

1.3 药物与试剂 山椒子烯酮($C_{21}H_{18}O_7$, 相对分子质量 382.36, 分子结构见图1)由中国医学科学院药用植物研究所廖永红老师提供, 纯度>97.5%; 硫酸长春新碱(上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 批号 1425097); cell counting kit-8(CCK-8)[东仁化学科技(上海)有限公司, 批号 NQ646]; RPMI Medium 1640, 磷酸盐缓冲液(PBS), 100×青链霉素混合液(北京索莱宝生物科技有限公司, 批号分别为 20180808, 20180621, 20180613); 胎牛血清(加拿大维森特技术有限公司, 批号 0315528); 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH), B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2), Bcl-2相关X蛋白(Bax), 磷酸化信号转导与转录激活因子-3(p-STAT3), 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3), 羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G抗体, 马抗鼠IgG抗体(美国CST公司, 批号分别为 2118S, 3498S, 2772S, 4113S, 9662S, 7074P2, 7076P2); 苏木素-伊红染液(北京艾普希隆生物科技有限公司, 货号 G1105)。

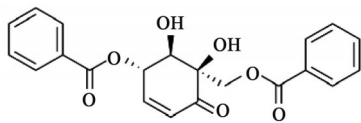


图1 山椒子烯酮的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of Zeylenone

1.4 仪器 MCO-18AC型CO₂细胞培养箱(日本Panasonic公司), DW-86L578J型-80℃冰箱(中国海尔公司), ME104T型电子分析天平(梅特勒托利多仪器有限公司), TGL-16M型离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司), FC型酶标仪(Thermo公司), EPS-300型电泳仪及转膜仪(上海天能科技有限公司), ChemiDoc XRS⁺型凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 Molt-4细胞置于RPMI Medium 1640完全培养基(含10%胎牛血清, 1%青链霉素混合液)中培养, 培养条件为37℃恒温, 5%CO₂, 相对饱和湿度。

2.2 CCK-8法检测山椒子烯酮对Molt-4细胞的生长抑制作用 取对数生长期的Molt-4细胞, 以 1.5×10^5 个/mL接种于96孔板, 每孔加入细胞悬液100 μL。培养12 h, 将细胞分为空白组, 山椒子烯酮组(0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 μmol·L⁻¹), 加入药液100 μL作用

48 h, 每组设置3个复孔, 并设置空白组排除干扰。给药48 h, 加入CCK-8 10 μL, 继续孵育2 h, 用酶标仪在450 nm波长处测吸光度A, 并计算半数抑制浓度(IC₅₀)。细胞存活率 = $(A_{\text{给药组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{正常组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$, 结果重复3次。

2.3 白血病Molt-4细胞小鼠移植瘤模型的建立 参考文献[10-12]造模。除正常组的小鼠外, 其余NOD/SCID小鼠进行全身⁶⁰Co(2 Gy/200 rad)照射。隔天收集Molt-4细胞, 用PBS配成 5×10^7 个/mL细胞悬液, 于小鼠背部皮下注射细胞悬液0.2 mL。每天观察接种部位的肿瘤增长情况, 待肿瘤体积增长到200~300 mm³即为造模成功。

2.4 动物分组及给药 将NOD/SCID小鼠随机分为5组, 分别为模型组、长春新碱组、山椒子烯酮低、中、高剂量组, 每组各9只, 取同批次小鼠8只, 设为正常组。参考文献[6], 山椒子烯酮低、中、高剂量组分别按12.5, 25, 50 mg·kg⁻¹剂量进行尾静脉注射, 每2 d给药1次; 长春新碱组按1 mg·kg⁻¹剂量进行尾静脉注射, 每周给药1次; 模型组注射0.9%氯化钠溶液, 各组尾静脉注射均为0.1 mL·(10 g)⁻¹; 正常组小鼠不做任何处理。给药12 d, 每天观察小鼠摄食、饮水和精神状态等变化。每2 d记录模型组、长春新碱组、山椒子烯酮低、中、高剂量组小鼠体质量, 并用游标卡尺测量小鼠肿瘤的短径、长径。根据 $V_{\text{肿瘤}} = 1/2 \times (a \times b^2)$ 计算肿瘤体积, 其中a, b分别表示肿瘤的长径和短径; 根据 $RTV = V_t / V_0$ 计算相对肿瘤体积, V_t为d_t测量的肿瘤体积, V₀为d₀测量的肿瘤体积; 根据 $T/C = T_{RTV} / C_{RTV} \times 100\%$ 计算相对肿瘤增殖率, T_{RTV}为实验组RTV, C_{RTV}为模型组RTV, T/C ≤ 60%, 且P < 0.05为差异有统计学意义。

2.5 计算抑瘤率及脏器指数 第13天, NOD/SCID小鼠脱臼处死, 取肿瘤、肝、脾, 用电子天平精密称重。按照肿瘤抑制率 = $(1 - \text{给药组质量} / \text{模型组质量}) \times 100\%$, 计算长春新碱组、山椒子烯酮低、中、高剂量组的肿瘤抑制率; 按照脏器指数 = 脏器质量(mg)/体质量(g) × 100%, 计算全部组别的脏器指数。

2.6 肝、脾病理学检测 除山椒子烯酮低剂量组, 取剩余5组小鼠的肝左叶、脾置于4%多聚甲醛溶液中固定, 乙醇梯度洗脱, 石蜡包埋, 切片。组织切片经水展开, 贴于载玻片上并烘干, 进行苏木素-伊红染色, 再进行乙醇梯度洗脱, 脱水后用二甲苯处理。滴加中性树脂固封, 显微镜下观察并拍照。

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测相关凋亡蛋白的表达 称取模型组、长春新碱组、山椒子烯

酮低、中、高剂量组的肿瘤组织 80 mg, 加入生理盐水 0.72 mL, 匀浆机低速匀浆, 离心机 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 弃上清, 加入裂解液裂解 2 h, 12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取上清, 整个过程于冰上操作。BCA 蛋白定量, 加入 4×loading buffer, 煮沸 5 min, -80 °C 保存。配胶上样, 电泳 2 h, 低温环境电转 1 h, 5% 脱脂牛奶室温封闭 1.5 h, 加入 Bax, Bcl-2, Caspase-3 抗体(1:1 000), p-STAT3 抗体(1:500), 于 4 °C 中过夜, TBST 洗 3 次, 每次 15 min, 加入二抗(1:2 000), 室温孵育 1.5 h, TBST 洗 3 次, 每次 15 min。利用化学发光试剂避光孵育 5 min 于凝胶成像仪中显影成像, 用 Image J 软件进行条带的灰度分析。

2.8 统计学分析 采用 SPSS 21.0 软件进行单因素方差分析, 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, LSD 法检验组间差异, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 山椒子烯酮对 Molt-4 细胞增殖的影响 山椒子烯酮能较明显抑制 Molt-4 细胞增殖, 经计算 IC₅₀ 为 1.49 μmol·L⁻¹。与空白组比较, 0.40, 0.80, 1.60, 3.20 μmol·L⁻¹ 山椒子烯酮细胞存活率均显

著降低($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 山椒子烯酮对 Molt-4 细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Effect of zeylenone on Molt-4 cells proliferation($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/μmol·L ⁻¹	细胞存活率/%
空白	-	100.00±0.53
山椒子烯酮	0.20	97.47±1.97
	0.40	85.07±2.80 ¹⁾
	0.80	68.24±1.41 ¹⁾
	1.60	31.23±1.53 ¹⁾
	3.20	25.20±3.78 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 山椒子烯酮对 Molt-4 细胞移植瘤小鼠体质量的影响 因长春新碱组小鼠体质量降低较快, 状态较差, 因此, 只给药 1 次。与模型组比较, 长春新碱组在首次给药第 4~10 天体质量显著降低($P < 0.01$), 并且伴有精神萎靡、弓背、消瘦、行动迟缓、死亡现象, 终止给药时死亡 1 只。与长春新碱组比较, 山椒子烯酮低、中、高剂量组小鼠体质量缓慢增加, 精神状态良好, 行动活跃, 无死亡现象。见表 2。

表 2 山椒子烯酮对 Molt-4 细胞移植瘤小鼠体质量的影响($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 2 Effect of zeylenone on body weight of Molt-4 xenograft mice($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	体质量/g						
		给药前	首次给药 2 d	首次给药 4 d	首次给药 6 d	首次给药 8 d	首次给药 10 d	首次给药 12 d
模型	-	19.22±0.40	20.14±0.57	20.70±0.94	21.73±0.97	21.74±0.79	22.61±0.71	22.28±0.74
长春新碱	1.00	19.51±1.01	20.27±0.96	18.62±0.93 ²⁾	17.43±1.05 ²⁾	18.41±1.14 ²⁾	20.76±1.11 ²⁾	21.27±0.96
山椒子烯酮	12.50	19.24±0.72	20.07±0.87	19.95±1.15 ³⁾	21.34±0.97 ⁴⁾	20.50±1.00 ^{1,4)}	20.95±1.29 ²⁾	20.71±1.09 ²⁾
	25.00	19.02±0.90	19.68±1.00	19.59±1.17	21.17±1.09 ⁴⁾	21.32±0.79 ⁴⁾	21.13±0.88 ¹⁾	21.68±1.06 ¹⁾
	50.00	18.94±0.75	19.24±0.83	19.51±1.09 ¹⁾	20.61±0.94 ⁴⁾	20.43±1.20 ^{1,4)}	20.34±1.10 ²⁾	20.70±1.20 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与长春新碱组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 3, 4, 6 同)。

3.3 山椒子烯酮对 Molt-4 细胞移植瘤小鼠肿瘤质量及肿瘤体积的影响 与模型组比较, 山椒子烯酮中、高剂量组的抑瘤率和 T/C 值差异有统计学意义($P < 0.01$), 抑瘤率分别为 50.24%, 60.75%, 见表 3。与模型组比较, 山椒子烯酮高剂量组和长春新碱组肿瘤的平均体积显著降低($P < 0.01$), 体积抑制率分别为(28.09±15.81)%,(83.19±3.21)%。表明山椒子烯酮可以明显抑制 Molt-4 细胞移植瘤小鼠肿瘤的增长且具有剂量依赖性。见表 4, 图 2。

3.4 山椒子烯酮对 Molt-4 细胞移植瘤小鼠肝脏指数及脾脏指数的影响 与正常组比较, 模型组和

表 3 山椒子烯酮对 Molt-4 细胞移植瘤小鼠肿瘤质量、抑瘤率、相对肿瘤增殖率的影响

Table 3 Effect of zeylenone on tumor weight, tumor inhibition rate and relative tumor growth rate of Molt-4 xenograft mice

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	肿瘤质量 ($\bar{x} \pm s, n=9$)/g	抑瘤率 /%	T/C /%
模型	-	0.75±0.21	-	100.00
长春新碱	1.00	0.15±0.08 ²⁾	79.37 ²⁾	16.58 ²⁾
山椒子烯酮	12.50	0.62±0.21 ¹⁾	25.89	69.56
	25.00	0.37±0.10 ²⁾	50.24 ²⁾	58.07 ²⁾
	50.00	0.29±0.07 ²⁾	60.75 ²⁾	52.35 ²⁾

表 4 山椒子烯酮对 Molt-4 细胞移植瘤小鼠肿瘤体积的影响($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 4 Effect of zeylenone on tumor volume of Molt-4 xenograft mice($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	肿瘤体积/mm ³			
		给药前	首次给药 4 d	首次给药 8 d	首次给药 12 d
模型	-	300.00±45.23	1 110.38±275.17	1 570.91±259.01	1 591.68±200.72
长春新碱	1.00	298.32±78.30	690.38±179.65	402.38±80.62 ²⁾	267.52±51.09 ²⁾
山椒子烯酮	12.50	320.21±45.33	792.71±157.31	1 344.30±398.64	1 459.11±413.48
	25.00	330.54±65.32	862.40±177.94	1 188.42±177.10 ¹⁾	1 388.12±229.20
	50.00	330.32±43.22	666.21±144.42	1 015.85±243.28 ²⁾	1 144.59±251.77 ²⁾



A. 模型组; B. 长春新碱组; C~E. 山椒子烯酮低、中、高剂量组(图 4 同)

图 2 山椒子烯酮对 Molt-4 移植瘤小鼠肿瘤的抑制作用

Fig. 2 Inhibitory effect of zeylenone on Molt-4 xenograft mice

长春新碱组肝脏指数显著降低($P < 0.01$),说明肝脏损伤严重存在萎缩或其他退行性改变;长春新碱组脾脏指数明显增大($P < 0.05$),脾脏出现肿大现象。与正常组比较,山椒子烯酮中、高剂量组差异无统计学意义。与长春新碱组比较,山椒子烯酮组对肝指数、脾指数损伤影响小,安全性更好。见表 5。

表 5 山椒子烯酮对 Molt-4 细胞移植瘤小鼠肝脏指数及脾脏指数的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Effect of zeylenone on liver index and spleen index of Molt-4 xenograft mice($\bar{x} \pm s$) %

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	n	肝脏指数	脾脏指数
正常	-	8	4.32±0.09	0.18±0.02
模型	-	9	3.73±0.21 ²⁾	0.20±0.02
长春新碱	1.00	9	3.85±0.27 ²⁾	0.25±0.03 ^{1,3)}
山椒子烯酮	12.50	9	3.95±0.24 ¹⁾	0.22±0.04
	25.00	9	4.31±0.22 ^{4,6)}	0.16±0.03 ⁶⁾
	50.00	9	4.47±0.16 ^{4,6)}	0.19±0.03 ⁵⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;与长春新碱组比较⁵⁾ $P < 0.05$,⁶⁾ $P < 0.01$ 。

3.5 山椒子烯酮对 Molt-4 细胞移植瘤小鼠肝组织、脾组织病理变化的影响 肝组织病理图片显示,正常组肝小叶结构清晰,肝索排列整齐,肝细胞

排列紧密,分界清晰。与正常组比较,模型组小鼠的肝组织有少量肝细胞轻度水肿,偶见多核巨细胞;长春新碱组肝组织出现较多肝细胞轻度水肿,局部可见大量多核巨细胞、中性粒细胞及少量淋巴细胞浸润等。与长春新碱组比较,山椒子烯酮中、高剂量组肝组织没有明显的炎症现象。与正常组比较,长春新碱组脾组织有少量脾小体,红髓中出现大面积瘀血,脾窦可见大面积红细胞并出现大量多核巨细胞;山椒子烯酮中、高剂量组多核巨细胞数量增加。结果表明,与长春新碱比较,山椒子烯酮对肝组织、脾组织损伤较小,安全性更高。见图 3。

3.6 山椒子烯酮对 Molt-4 细胞移植瘤小鼠肿瘤组织中 p-STAT3, Bax, Bcl-2, Caspase-3 蛋白表达的影响 与模型组比较,山椒子烯酮中、高剂量组、长春新碱组 p-STAT3, Caspase-3 表达明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),山椒子烯酮中、高剂量组 Bax 表达明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),山椒子烯酮低、中、高剂量组,长春新碱组 Bcl-2 表达明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 6,图 4。

4 讨论

急性 T 淋巴细胞白血病是一类由未成熟的 T 细胞异常的克隆性增殖并浸润其他器官和组织的血液系统恶性肿瘤,多发于儿童和青少年^[13-14]。目前,临床多使用化疗药物治疗此类疾病,但由于化疗药物的严重毒副作用及急性 T 淋巴细胞白血病易复发、预后差、耐药性的缺点导致治疗失败,从而影响患者生存质量,缩短患者的生存率^[15-16]。本课题组前期的研究发现,山椒子烯酮对肿瘤细胞具有选择特异性,并对多种肿瘤细胞具有诱导细胞凋亡的作用,但对正常细胞损伤较小^[17]。因此,山椒子烯酮可作为一种新型的抗肿瘤药物,其具有潜在的研究价值。

首先,体外实验表明山椒子烯酮可以明显抑制

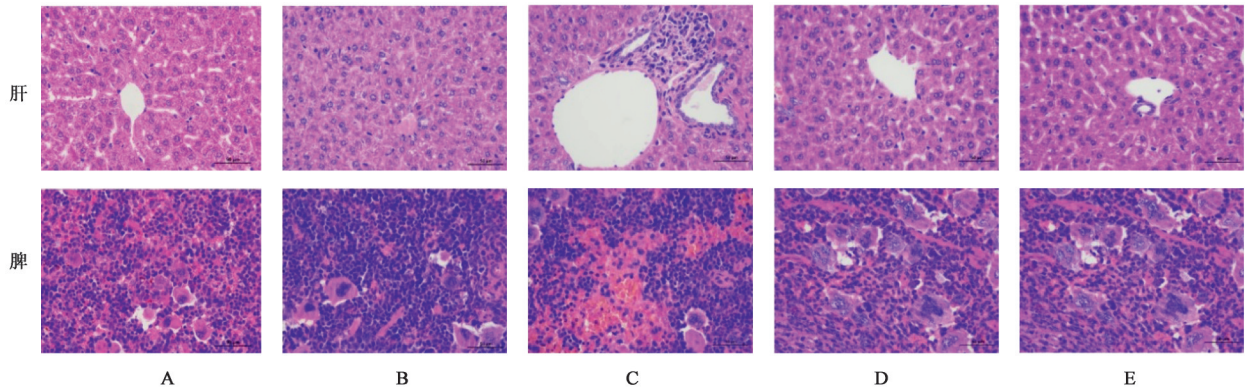


图 3 山椒子烯酮对 Molt-4 移植瘤小鼠脾脏及肝脏的影响(HE, ×400)

Fig. 3 Effect of zeylenone on spleen and liver of Molt-4 xenograft mice (HE, ×400)

表 6 山椒子烯酮对小鼠肿瘤组织中 p-STAT3, Bax, Bcl-2, Caspase-3 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Effect of zeylenone on expressions of p-STAT3, Bax, Bcl-2 and Caspase-3 in tumor tissues of mice($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	p-STAT3/GAPDH	Caspase-3/GAPDH	Bax/GAPDH	Bcl-2/GAPDH
长春新碱	1.00	0.42±0.09 ⁴⁾	0.16±0.08 ⁴⁾	1.35±0.39	0.26±0.03 ²⁾
山椒子烯酮	12.50	1.03±0.09	0.63±0.02	1.20±0.16	0.90±0.13 ¹⁾
	25.00	0.78±0.12 ¹⁾	0.44±0.07 ¹⁾	1.69±0.40 ¹⁾	0.52±0.06 ²⁾
	50.00	0.65±0.05 ²⁾	0.31±0.07 ²⁾	2.80±0.70 ²⁾	0.43±0.11 ²⁾

注: 设定模型组 p-STAT3, Bax, Bcl-2, Caspase-3 蛋白相对表达为 1。

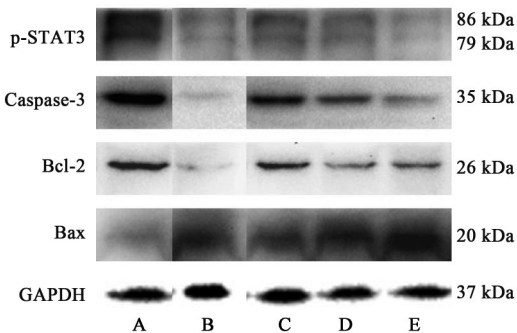


图 4 山椒子烯酮作用肿瘤组织中 p-STAT3, Bax, Bcl-2, Caspase-3 蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of zeylenone on expressions of p-STAT3, Bax, Bcl-2 and Caspase-3 in tumor tissues of mice

急性 T 淋巴细胞白血病 Molt-4 细胞的增殖, IC₅₀ 为 1.49 μmol·L⁻¹, 且具有明显的剂量依赖性, 表明山椒子烯酮可能具有潜在的抗 T-ALL 的作用。因此, 本研究进一步通过体内实验来研究山椒子烯酮是否具有抑瘤效果。建立成功的白血病小鼠模型是研究山椒子烯酮体内抑瘤效果的关键, 参考相关研究^[10-12], 本研究选用 NOD/SCID 免疫缺陷小鼠作为体内模型动物。小鼠预先经过 ⁶⁰Co 照射, 然后皮下接种 Molt-4 细胞, 成功建立白血病移植瘤小鼠模型。在临床上, 长春新碱对 T-ALL 的治疗具有较好

的疗效。因此, 本实验选择长春新碱作为阳性对照药。结果表明, 山椒子烯酮中、高剂量组对 Molt-4 细胞移植瘤小鼠抑瘤效果显著, 抑瘤率分别为 50.24%, 60.75%。长春新碱组抑瘤效果更为突出, 抑瘤率为 79.37%, 但长春新碱的毒副作用较为严重。病理结果证实, 与长春新碱组比较, 山椒子烯酮对小鼠肝组织、脾组织的损伤较小, 安全系数更高。

在多种肿瘤细胞内存在两面神激酶(JAK)/STAT 通路持续激活的现象^[18-19], 细胞因子/生长因子与受体结合使 JAK 蛋白被活化进而激活其底物 STAT 蛋白, STAT 蛋白以二聚体的方式转移至核内调控下游蛋白, 抑制肿瘤细胞凋亡, 导致肿瘤细胞的失控性增殖、转移^[20-22]。本课题组前期研究发现, 山椒子烯酮可以下调 JAK/STAT 通路中 p-JAK2, p-STAT3 的蛋白表达并激活下游线粒体凋亡通路, 从而诱导 K562 细胞凋亡^[6]。本实验应用蛋白免疫印迹法发现, 山椒子烯酮也可以显著下调 Molt-4 细胞内 p-STAT3 蛋白的表达而影响细胞活性。本课题组前期实验证实, 山椒子烯酮诱导 HeLa, PC-3 细胞凋亡的过程存在 Bcl-2/Bax 失衡的现象。Bcl-2 家族中的 Bcl-2 蛋白和 Bax 蛋白可调控线粒体膜的通透

性,当Bcl-2/Bax下降,线粒体膜通透性改变,导致大量的凋亡因子从线粒体内释放,激活Caspase-3蛋白,使其发挥凋亡执行者的作用。本研究证明了山椒子烯酮可下调Bcl-2/Bax,诱导Caspase-3前体活化,激活Caspase-3,从而促进Molt-4的细胞凋亡。

综上所述,山椒子烯酮能有效抑制Molt-4细胞的增殖并促进Molt-4细胞的凋亡,其机制可能通过抑制p-STAT3,下调Bcl-2/Bax,激活Caspase-3,诱导Molt-4的凋亡。后续的工作将继续探讨山椒子烯酮抑制Molt-4细胞增殖的分子机制。同时,本研究表明山椒子烯酮对肝组织、脾组织损伤较小,安全性较高,具有潜在治疗急性T淋巴细胞白血病的临床应用价值。

[参考文献]

[1] PHD B B M F, ME F J, PHD S M M I, et al. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.

[2] 马晶晶,陈月,于亮. 急性淋巴细胞白血病耐药机制的研究进展[J]. 中国实验血液学杂志, 2016, 24(1): 261-265.

[3] 任金海,郭晓楠. 2017年血液肿瘤研究进展[J]. 临床荟萃, 2018, 33(1): 40-45.

[4] NEELAPU S S, LOCKE F L, BARTLETT N L, et al. Axicabtagene ciloleucel CAR T-cell therapy in refractory large B-cell lymphoma[J]. N Engl J Med, 2017, 377(26): 2531-2544.

[5] 廖永红,徐丽珍,杨世林,等. 山椒子化学成分的研究[J]. 中草药, 1996, 27(9): 524-525,537.

[6] HUO X W, LIAO Y H, TIAN Y, et al. Zeylenone promotes apoptosis in chronic myelogenous leukemia-derived K562 cells by a mechanism involving Jak2 and Src kinase[J]. RSC Adv, 2016, 30(10): 1069-1070.

[7] 张蕾蕾. Zeylenone通过抑制PI3K/AKT/mTOR和ERK/MAPK信号通路诱导宫颈癌细胞凋亡的分子机制研究[D]. 北京:北京协和医学院, 2015.

[8] 张蕾蕾,李如意,张丽静,等. Zeylenone抑制人前列腺癌PC-3细胞增殖及诱导凋亡作用研究[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(6): 808-813.

[9] 曹丽,杨淑贤,李立勇. Zeylenone抑制胃癌细胞增殖、侵袭、迁移及诱导凋亡[P]. 北京: CN108379248A, 2018-08-10.

[10] 肖田田,王春燕. 人急性T淋巴细胞性白血病小鼠

模型研究[J]. 医学综述, 2012, 18(19): 3156-3159.

[11] 王骏. 白血病动物模型建立及阿可拉定对急、慢性髓性白血病的抗肿瘤作用研究[D]. 合肥:安徽医科大学, 2013.

[12] 丁江华,袁利亚,陈国安. 建立人多发性骨髓瘤NOD/SCID小鼠皮下移植瘤动物模型[J]. 解放军医药杂志, 2015, 27(3): 41-44,49.

[13] COX C V, MARTIN H M, KEARNS P R, et al. Characterization of a progenitor cell population in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia [J]. Blood, 2007, 109(2): 674-682.

[14] MOFICKE A, ZIMMERMANN M, REITER A, et al. Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000 [J]. Leukemia, 2010, 24(2): 265-284.

[15] BELVER L, FERRANDO A. The genetics and mechanisms of T cell acute lymphoblastic leukaemia [J]. Nat Rev Cancer, 2016, 16(8): 494-507.

[16] MARKS D I, ROWNTREE C. A review of the management of adults with T-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. Blood, 2017, 129(9):692608.

[17] 孙丽华,党海霞,卜兰兰,等. Zeylenone对急性淋巴细胞白血病细胞增殖及凋亡的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2012, 32(9): 15-20.

[18] LEE H J, DAVER N, KANTARJIAN H M, et al. The role of JAK pathway dysregulation in the pathogenesis and treatment of acute myeloid leukemia [J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(2): 327-335.

[19] 张青,张琳琪. JAK/STAT信号通路在细胞凋亡中的研究进展及中药干预研究[J]. 中医临床研究, 2016, 8(26): 142-145.

[20] YOU W, TANG Q, ZHANG C, et al. IL-26 promotes the proliferation and survival of human gastric cancer cells by regulating the balance of STAT1 and STAT3 activation [J]. PLoS One, 2013, 8(5): e63588.

[21] JUIN P, GENESTE O, GAUTIER F, et al. Decoding and unlocking the BCL-2 dependency of cancer cells [J]. Nat Rev Cancer, 2013, 13(7): 455-465.

[22] CRISTINA M P, ANA G C, GOLDSTEIN J C, et al. Different mitochondrial intermembrane space proteins are released during apoptosis in a manner that is coordinately initiated but can vary in duration [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(31): 11573-11578.

[责任编辑 张丰丰]