◆实验研究◆

雷公藤红素对人多发性骨髓瘤H929细胞凋亡的诱导作用及分子机制研究

何晓其[1,2]

1. 浙江中医药大学，浙江 杭州 310053；2. 杭州市第九人民医院，浙江 杭州 311225

［摘要］**目的：**观察雷公藤红素诱导人多发性骨髓瘤H929细胞凋亡的效果，并分析诱导凋亡的分子机制。**方法：**取培养48 h后处于平台期的H929细胞，按照1.0×10^9/L细胞密度接种于6孔细胞培养板中，分为对照组、雷公藤红素组（0.5 mg/L、1.0 mg/L和5.0 mg/L），各浓度雷公藤红素组分别加入对应浓度的雷公藤红素，对照组加入等体积二甲亚砜（DMSO）溶液。比较不同浓度雷公藤红素组H929细胞活力抑制率，比较各组H929细胞凋亡率及H929细胞培养物中P53、剪切型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3（cleaved caspase-3）、剪切型聚腺苷二磷酸核糖聚合酶-1（cleaved PARP-1）、bax、bcl-2表达水平。**结果：**H929细胞活力抑制率随着雷公藤红素处理浓度升高而升高，不同浓度雷公藤红素组H929细胞活力抑制率两两比较，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。与对照组比较，不同浓度雷公藤红素组H929细胞凋亡率均较高（$P<0.05$）。H929细胞凋亡率随着雷公藤红素处理浓度增加而增加，不同浓度雷公藤红素组H929细胞凋亡率两两比较，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。与对照组比较，不同浓度雷公藤红素组H929细胞培养物中P53、cleaved caspase-3、cleaved PARP-1、bax表达水平均较高（$P<0.05$），bcl-2表达水平均较低（$P<0.05$）。H929细胞培养物中P53、cleaved caspase-3、cleaved PARP-1、bax表达水平随着雷公藤红素处理浓度升高而升高，bcl-2表达水平随着雷公藤红素处理浓度升高而降低，不同浓度雷公藤红素组H929细胞培养物中P53、cleaved caspase-3、cleaved PARP-1、bax、bcl-2表达水平两两比较，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。**结论：**雷公藤红素对人多发性骨髓瘤H929细胞具有活力抑制和凋亡诱导作用，且有一定的剂量效应，这一作用可能与线粒体凋亡途径有关。

［关键词］人多发性骨髓瘤；H929细胞；雷公藤红素；细胞凋亡；分子机制
［中图分类号］R285.5 ［文献标志码］A ［文章编号］0256-7415（2023）20-0001-05
DOI：10.13457/j.cnki.jncm.2023.20.001

Study on Induction of Tripterine on Apoptosis of H929 Human Myeloma Cells and Its Molecular Mechanism

HE Xiaoqi[1,2]

1. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou Zhejiang 310053, China; 2. Hangzhou Ninth People's Hospital, Hangzhou Zhejiang 311225, China

Abstract: Objective: To observe the effect of tripterine inducing apoptosis of H929 human myeloma cells, and analyze the molecular mechanism of inducing apoptosis. **Methods:** H929 cells that are in the plateau stage after 48 hours of cultivation were taken, and were inoculated into 6-well cell culture plates with 1.0 × 10^9/L cell density, which were divided into the control group, the tripterine group (0.5 mg/L,

［收稿日期］2022-03-31
［修回日期］2023-07-14
［作者简介］何晓其（1989-），女，主管药师，E-mail：hexiaoqi202012@126.com。

1.0 mg/L, and 5.0 mg/L). Each concentration of the tripterine group was added with corresponding concentration of tripterine, and the control group was added with equal volume of dimethyl sulfoxide (DMSO) solution. The inhibition rates of H929 cell viability at different concentrations of tripterine groups were compared, and the apoptosis rates of H929 cells in each group and the expression levels of P53, cleaved cysteine aspartic protease-3 (cleaved caspase-3), cleaved poly ADP-ribose polymerase-1 (cleaved PARP-1), bax, and bcl-2 in H929 cell culture were compared among the groups. **Results:** The inhibition rates of H929 cell viability were increased with the increase of tripterine treatment concentration, and there were significant differences being found in the comparison of the inhibition rates of H929 cell viability in different concentrations of tripterine groups ($P<0.05$). The apoptosis rates of H929 cells in different concentrations of tripterine treatment group were higher when compared with that in the control group ($P<0.05$). The apoptosis rates of H929 cells were increased with the increase of tripterine treatment concentration, and there were significant differences being found in the comparison of the apoptosis rates of H929 cells in different concentrations of tripterine groups ($P<0.05$). The expression levels of P53, cleaved caspase-3, cleaved PARP-1 and bax in H929 cell cultures treated with different concentrations of tripterine were relatively high when compared with those in the control group ($P<0.05$), and the expression levels of bcl-2 were relatively low ($P<0.05$). The expression levels of P53, cleaved caspase-3, cleaved PARP-1, and bax in H929 cell cultures were increased with the increase of tripterine treatment concentrations, and the expression levels of bcl-2 were decreased with the increase of tripterine treatment concentrations. There were significant differences being found in the comparison of expression levels of P53, cleaved caspase-3, cleaved PARP-1, bax, and bcl-2 in H929 cell cultures in different concentrations of tripterine groups ($P<0.05$). **Conclusion:** Tripterine can inhibit the viability and induce apoptosis of H929 human myeloma cells, and has a certain dose effect, which may be related to the mitochondrial apoptosis pathway.

Keywords: Human multiple myeloma; H929 cells; Tripterine; Apoptosis; Molecular mechanism

多发性骨髓瘤可造成骨髓造血衰竭、骨破坏、器官组织损伤等[1]，目前临床对多发性骨髓瘤尚无有效治疗方案。雷公藤红素是卫矛科植物雷公藤和南蛇藤的主要活性成分，具有较强的免疫调节、抗炎、抗病原微生物、抗肿瘤等药理学活性[2]。有研究显示，雷公藤红素对肝癌、乳腺癌、前列腺癌、胶质瘤等具有广谱的药理学活性，其作用机制在于上调人骨肉瘤 U-2OS 细胞中促凋亡蛋白 Bcl-2 关联 X 蛋白和细胞色素 C 的表达，诱导细胞凋亡[3]。H929 细胞系由骨髓瘤患者的恶性积液建立，主要用于人骨髓瘤疾病研究。本研究观察雷公藤红素诱导人多发性骨髓瘤 H929 细胞凋亡的效果，并参考饶俊珍等[4]研究结果确定雷公藤红素浓度，分析其分子作用机制，报道如下。

1 研究材料

人多发性骨髓瘤 H929 细胞株购自中国质粒载体菌株细胞株基因保藏中心；雷公藤红素购于南京泽朗医药科技有限公司，纯度为 99.2%；DMEM 培养基、胎牛血清等均购于美国 Gibco 公司；青链霉素双抗购自武汉尚恩生物技术有限公司；二甲亚砜(DMSO)溶液购自北京索莱宝科技有限公司；CCK-8 试剂盒购于和元生物技术(上海)股份有限公司；Annexin V-PE/7-AAD 细胞凋亡检测试剂盒及流式细胞仪购自美国 BD 公司；兔抗人 P53 蛋白、剪切型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(cleaved caspase-3)抗体、剪切型聚腺苷二磷酸核糖聚合酶-1(cleaved PARP-1)抗体和羊抗兔热根辣氧化物酶标记的二抗购于美国 Abcam 公司；RIPA 缓冲液购

于翌圣生物科技(上海)股份有限公司；SDS-聚丙烯酰氨凝胶电泳购于常州伯仪生物科技有限公司；硝酸纤维素购于上海闪晶分子生物科技有限公司。

2 研究方法

2.1 细胞培养 H929细胞采用DMEM培养基进行传代培养，其中含10%胎牛血清，使用浓度为100 U/mL的青链霉素双抗，细胞在37 ℃、5%二氧化碳(CO_2)培养箱中培养。待细胞生长至对数期，去除旧的培养液，使用磷酸盐缓冲液冲洗，加入1 mL胰蛋白酶消化，至细胞间隙增大、形态变圆时，马上脱离M底分装，再在细胞培养箱中培养。

2.2 细胞活力抑制情况检测 培养48 h后细胞长满瓶壁，此时细胞虽有活力但不再分裂，判定为细胞处于平台期。取培养48 h后的H929细胞，用10%胎牛血清RPMI-1640培养液悬浮，细胞计数后调整细胞密度至1.0×10^9/L，接种于6孔细胞培养板中，分为对照组、雷公藤红素组(0.5 mg/L、1.0 mg/L和5.0 mg/L)。各浓度雷公藤红素组分别加入对应浓度的雷公藤红素，对照组加入等体积DMSO溶液。加入CCK-8后在37 ℃、5% CO_2培养箱中继续培养2 h，测定A450。细胞活力抑制率=(1-雷公藤红素组A450/对照组A450)×100%。

2.3 细胞凋亡检测 取上述培养48 h后的H929细胞，保持每孔细胞密度>1.0×10^9/L，使用胰酶消化后离心，丢弃上清液，将H929细胞密度调整为1.0×10^9/L。吸取200 μL细胞悬液，加入5 μL的Annexin V-PE和10 μL的7-ADD，于室温下避光孵育15 min，再加入300 μL预冷Binding buffer混匀。用流式细胞仪检测，每种处理重复6次，取平均值。

2.4 Western Blotting 取上述培养48 h后的H929细胞，离心机恒温4 ℃处理10 min，用含蛋白酶抑制剂的RIPA缓冲液悬浮沉淀细胞，用BCA试剂盒测定悬液中蛋白质含量。以SDS-聚丙烯酰氨凝胶电泳分离蛋白，将分离的蛋白转移至硝酸纤维素膜上。以凝胶成像仪分析蛋白条带灰度，以GAPDH蛋白灰度值作为参照，观察各组P53、cleaved caspase-3、cleaved PARP-1、bax、bcl-2表达情况。

2.5 统计学方法 采用SPSS25.0统计学软件进行数据分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，多组间对比采用F检验，两两比较采用LSD-t检验。$P<0.05$表示差异有统计学意义。

3 研究结果

3.1 不同浓度雷公藤红素组H929细胞活力抑制率比较 见表1。H929细胞活力抑制率随着雷公藤红素处理浓度升高而升高，不同浓度雷公藤红素组H929细胞活力抑制率两两比较，差异均有统计学意义($P<0.05$)。

表1 不同浓度雷公藤红素组H929细胞活力抑制率比较($\bar{x}\pm s$) %

组 别	n	细胞活力抑制率
0.5 mg/L雷公藤红素组	6	35.27±3.65
1.0 mg/L雷公藤红素组	6	44.83±3.87
5.0 mg/L雷公藤红素组	6	78.29±2.01
F值		37.934
P		<0.001

3.2 各组H929细胞凋亡率比较 见表2及图1。与对照组比较，不同浓度雷公藤红素组H929细胞凋亡率均较高，差异均有统计学意义($P<0.05$)。H929细胞凋亡率随着雷公藤红素处理浓度增加而增加，不同浓度雷公藤红素组H929细胞凋亡率两两比较，差异均有统计学意义($P<0.05$)。

3.3 各组H929细胞培养物中凋亡相关蛋白表达水平比较 见表3及图2。与对照组比较，不同浓度雷公藤红素组H929细胞培养物中P53、cleaved caspase-3、cleaved PARP-1、bax表达水平均较高，bcl-2表达水平均较低，差异均有统计学意义($P<0.05$)。H929细胞培养物中P53、cleaved caspase-3、cleaved PARP-1、bax表达水平随着雷公藤红素处理浓度升高而升高，bcl-2表达水平随着雷公藤红素处理浓度升高而降低，不同浓度雷公藤红素组H929细胞培养物中P53、cleaved caspase-3、cleaved PARP-1、bax、bcl-2表达水平两两比较，差异均有统计学意义($P<0.05$)。

表2 各组H929细胞凋亡率比较($\bar{x}\pm s$) %

组 别	n	细胞凋亡率
对照组	6	37.54±1.42
0.5 mg/L雷公藤红素组	6	55.39±4.83
1.0 mg/L雷公藤红素组	6	68.29±3.04
5.0 mg/L雷公藤红素组	6	84.39±2.65
F值		57.256
P		<0.001

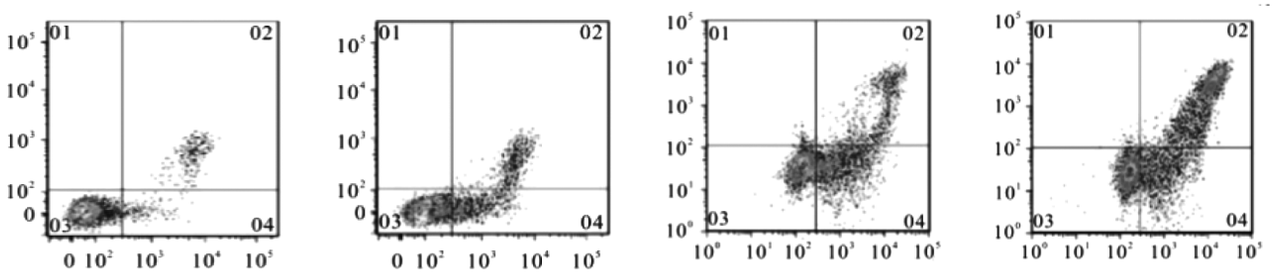


图 1　各组 H929 细胞凋亡率

表 3　各组 H929 细胞培养物中凋亡相关蛋白表达水平比较（$\bar{x}\pm s$）

组　别	n	P53	cleaved caspase-3	cleaved PARP-1	bax	bcl-2
对照组	6	0.94±0.06	1.02±0.02	0.86±0.01	1.10±0.04	1.16±0.10
0.5 mg/L 雷公藤红素组	6	1.34±0.21	1.59±0.23	1.43±0.34	1.22±0.14	0.86±0.05
1.0 mg/L 雷公藤红素组	6	1.57±0.32	1.71±0.29	1.61±0.28	1.46±0.25	0.68±0.07
5.0 mg/L 雷公藤红素组	6	1.81±0.24	1.93±0.26	1.78±0.32	1.66±0.33	0.42±0.09
F 值		8.614	8.548	7.039	4.127	13.473
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	0.002	<0.001

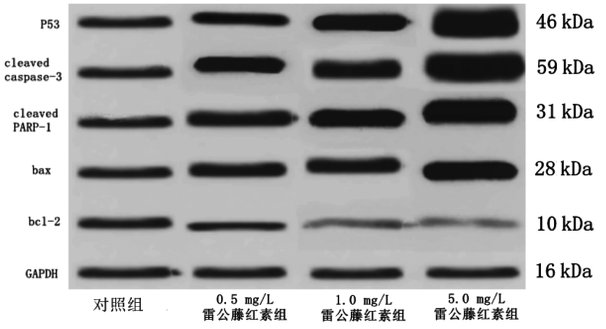


图 2　各组 H929 细胞培养物中凋亡相关蛋白表达 WB 图

4　讨论

有研究表明，肿瘤细胞过度增殖、凋亡抑制、骨髓微环境改变在多发性骨髓瘤发生、进展中具有重要作用[5-6]。目前临床治疗多发性骨髓瘤以细胞移植、免疫调节剂、蛋白酶体抑制剂为主，但由于患者通常年龄偏大，且多合并肾功能损害、免疫功能低下、感染、骨质破坏等，耐受度均不高，疗效受限。细胞凋亡的过程非常复杂，P53、caspase-3、PARP-1、bcl-2、bax 均在细胞凋亡过程中发挥一定作用。本研究应用 CCK-8 法和细胞凋亡实验分析雷公藤红素对 H929 细胞是否具有生长抑制及诱导凋亡的作用，并检测各组 H929 细胞培养物中 P53、cleaved caspase-3、cleaved PARP-1、bcl-2、bax 表达水平，目的在于探究雷公藤红素对 H929 细胞凋亡的分子机制，以及该机制是否与 P53、caspase-3、PARP-1、bcl-2、bax 之间存在联系。

细胞凋亡是常见的细胞生物学特征，又被称为Ⅰ型程序性细胞死亡。有研究显示，雷公藤红素能够通过蛋白酶体途径诱导肿瘤细胞凋亡[7]。本研究结果显示，随着雷公藤红素处理浓度增加，多发性骨髓瘤 H929 细胞活力抑制率明显降低，细胞凋亡率明显增加。顾恪波等[8]研究发现，雷公藤红素能够抑制 MCL1 mRNA 转录，并通过泛素-蛋白酶体途径快速降解 MCL1 蛋白，进而激活线粒体凋亡途径，引起细胞生长抑制和凋亡。结合本研究结果表明，雷公藤红素对多发性骨髓瘤 H929 细胞具有生长抑制和凋亡诱导作用。

PARP-1 能够通过调节能量代谢影响细胞生存，并和肿瘤细胞获得性耐药的发生有密切关系。李金霞等[9]研究认为，PARP-1 参与乳腺癌细胞耐药形成，沉默 PARP-1 能够提高乳腺癌细胞化疗敏感性，关闭肿瘤细胞线粒体凋亡信号通路。caspase-3 是细胞胞外凋亡途径中的关键环节，被认为是细胞凋亡的执行蛋白，而 PARP-1 是 caspase-3 的切割底物，在细胞凋亡中发挥重要作用[10]。本研究结果显示，不同浓度雷公藤红素组 H929 细胞培养物中 P53、cleaved caspase-3、cleaved PARP-1、bax 表达水平均高于对照组，bcl-2 表达水平均低于对照组（$P<0.05$）。随着雷公藤红素处理水平增加，

P53、cleaved caspase-3、cleaved PARP-1、bax 表达水平均上升，bcl-2 表达水平均下降。提示 P53、cleaved caspase-3、cleaved PARP-1、bax、bcl-2 与细胞凋亡之间存在一定联系。当细胞受到凋亡刺激后，bax/bak 形成低聚物复合体，插入到线粒体外膜孔隙，导致线粒体渗透压改变，跨膜电位丢失，促使凋亡复合体形成，活化 caspase-9 前体，进而激活 caspase-3 和 caspase-7，引发 caspase 级联反应，从而诱发细胞凋亡。诱导凋亡蛋白的大量表达，也可引起 bcl-2 表达下降，导致 bax 从细胞质转运至线粒体，启动线粒体凋亡通路。可见，雷公藤红素促进 H929 细胞凋亡的作用机制可能与诱导线粒体凋亡途径有关。

综上，雷公藤红素对人多发性骨髓瘤 H929 细胞具有活力抑制和凋亡诱导作用，且有一定剂量效应，为多发性骨髓瘤的临床治疗提供了理论基础。

[参考文献]

[1] 范枝俏，樊文静，陈佳文，等. 泊马度胺治疗复发难治性多发性骨髓瘤的研究进展[J]. 重庆医学，2019，48(17)：3001-3005，3009.

[2] 高琦，郭艳，魏小娟. 雷公藤红素对人胰腺癌细胞 PANC-1 增殖、侵袭和迁移的抑制作用[J]. 中国癌症杂志，2019，29(1)：26-31.

[3] 董立强，王斌，苏适，等. 雷公藤红素抗肿瘤作用及机制研究进展[J]. 生物技术进展，2023，13(1)：77-82.

[4] 饶俊珍，汪娟. 雷公藤红素对人恶性黑色素瘤细胞凋亡的影响[J]. 中国医药，2022，17(8)：1242-1246.

[5] RICHARDSON P G，HOFMEISTER C C，ROSENBAUM C A，et al. Twice-weekly ixazomib in combination with lenalidomide-dexamethasone in patients with newly diagnosed multiple myeloma[J]. Br J Haematol，2018，182(2)：231-244.

[6] 赵叶梅，李莉娟，张文娟，等. 多发性骨髓瘤药物治疗进展[J]. 医学综述，2019，25(8)：1524-1529.

[7] 彭彬，宋瑜婷，张雪，等. 雷公藤红素诱导未折叠蛋白反应信号通路中真核细胞翻译起始因子 2α 活化抑制多发性骨髓瘤细胞生长[J]. 第二军医大学学报，2019，40(9)：963-969.

[8] 顾恪波，何立丽，张丽娜，等. 雷公藤抗多发性骨髓瘤研究进展[J]. 河北中医，2019，41(5)：788-792.

[9] 李金霞，马力. 沉默 PARP-1 对乳腺癌细胞 MCF-7 顺铂耐药的影响[J]. 中国病理生理杂志，2018，34(2)：218-224.

[10] 钟月玲. 雷公藤红素基于蛋白酶体抑制活性诱导多发性骨髓瘤凋亡研究[D]. 成都：成都医学院，2019.

（责任编辑：刘迪成）