

## 番荔枝内酯类聚醚类似物 AA005 抗白血病细胞体外增殖效应及其可能的机制

韩冰, 姚祝军<sup>1</sup>, 王立顺\*

上海交通大学医学院附属瑞金医院, 生物医学研究所, 上海 200025;

<sup>1</sup>中国科学院上海有机化学研究所, 上海 200032

**摘要** 本研究探讨番荔枝内酯类聚醚类似物 AA005 广泛的体外抗白血病细胞增殖效应及对急性早幼粒白血病细胞系 NB4 的可能作用机制。采用 CCK-8 试剂盒检测 AA005 对多种白血病细胞系增殖的影响; 台盼蓝染色法检测细胞活率的改变; 瑞氏染色后显微镜观察 NB4 细胞形态学结构的变化; 流式细胞术分析细胞死亡形式; Western Blot 检测 caspase-3 的活化情况及其底物 PARP-1 的剪切情况; 流式细胞术检测低浓度 AA005 (<200 nmol/L) 对细胞周期的影响。结果表明, 高浓度 AA005 (>200 nmol/L) 能够抑制多种白血病细胞的增殖, 呈浓度依赖性; 不同浓度的 AA005 作用于 NB4、U937、K562 白血病细胞 48 h 后, 绝大多数细胞死亡; 以 NB4 细胞为例, AA005 作用后出现类似凋亡形态特征; AA005 几乎可同时诱导细胞发生早期凋亡及晚期凋亡; AA005 诱导细胞死亡过程中仅有微弱的 caspase-3 活化及其底物 PARP-1 的剪切, caspase 广谱抑制剂 Z-VAD-fmk 不能抑制 AA005 所致的细胞死亡; 非毒性浓度的 AA005 (<200 nmol/L) 引起细胞 G<sub>2</sub>/M 期阻滞。结论: 番荔枝内酯类聚醚类似物 AA005 具有广泛的抗白血病细胞增殖效应, 其机制可能与 AA005 诱导白血病细胞死亡及引起细胞 G<sub>2</sub>/M 期阻滞有关。

**关键词** 番荔枝内酯类聚醚类似物 AA005; 急性早幼粒白血病; 细胞增殖; 细胞死亡; 细胞周期

中图分类号 R733.71; R979.1

文献标识码 A

## Effect of Annonaceous Acetogenin Mimic AA005 on Proliferative Inhibition of Leukemia Cells *in vitro* and Its Possible Mechanisms

HAN Bing, YAO Zhu-Jun<sup>1</sup>, WANG Li-Shun\*Biomedical Research Institute, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Ruijin Hospital, Shanghai 200025, China; <sup>1</sup>Shanghai Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China

\* Corresponding Author: WANG Li-Shun, Senior Scientist. Tel: (021) 63846590–776925. E-mail: Jywangls@shsmu.edu.cn

**Abstract** This study was aimed to investigate the biological behavior of annonaceous acetogenin mimic AA005 in various kinds of leukemia cells and further elaborated its possible mechanisms in acute promyelocytic leukemia (APL) cell line NB4. The proliferative inhibition of leukemia cells was measured by CCK-8 method. Cell death was determined by trypan blue. Cell morphological features of NB4 treated with AA005 were examined by microscopy after Wright's staining. The form of cell death was measured by flow cytometry. Proteins PARP-1 and caspase-3 were detected by Western blot. Flow cytometry was used to detect the cell cycle arrest induced by AA005 of low concentration. The results showed that AA005 (>200 nmol/L) significantly inhibited proliferation of all tested leukemia cell lines in a concentration-dependent manner. The vast majority of cells went to die after leukemia cell lines of NB4, U937 and K562 were treated with different concentration of AA005 for 48 h. Typical morphologic changes significantly appeared in NB4 cells after AA005 treatment. AA005 almost simultaneously induced early apoptosis and late apoptosis. The little cleavage of PARP-1 and activation of caspase-3 happened in AA005-induced cell death, and caspase-3 inhibitor Z-VAD-fmk could not block the cell death. The non-toxic concentrations of AA005 (<200 nmol/L) caused NB4 cells G<sub>2</sub>/M-phase arrest. It is concluded that annonaceous acetogenin mimic AA005 induces significant proliferative inhibition of various leukemia cell lines in a concentration-dependent manner, which may be associated with cell death and G<sub>2</sub>/M-phase arrest induced by AA005.

**Key words** annonaceous acetogenin mimic AA005; acute promyelocytic leukemia; cell proliferation; cell death; cell cycle

*J Exp Hematol* 2012; 19(3): 549–553

基金项目: 国家自然科学基金资助项目( NSFC, 81071668, 31170783 ); 上海市科委资助项目( 11QH1401700 )

\* 通讯作者: 王立顺, 研究员. 电话: (021) 63846590–776925. E-mail: Jywangls@shsmu.edu.cn

2012–04–03 收稿; 2012–04–27 接受

造血系统肿瘤白血病是指造血过程中骨髓中的造血干/祖细胞不能正常分化为外周血中成熟的血细胞,是造血系统调控发生紊乱导致造血细胞增殖失控、分化受阻和(或)凋亡障碍产生的恶性疾病<sup>[1]</sup>。急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)是髓细胞白血病的一种,由于携带特异性的 t(15; 17) 染色体易位,产生 PML-RAR $\alpha$  融合蛋白质,通过与一些转录抑制子相互作用,显性负抑制野生型的 PML 和 RAR $\alpha$  蛋白质的功能<sup>[2]</sup>,促使细胞停留在相对幼稚的早幼粒细胞阶段,不能向成熟血细胞分化,导致白血病的发生<sup>[3]</sup>。传统治疗白血病的细胞毒化疗、放疗等手段主要是通过化学或物理的方法抑制白血病细胞的增殖,诱导细胞的凋亡。20 世纪 80 年代中期我国学者首次采用全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)通过诱导白血病细胞分化有效地治疗 APL 患者<sup>[4]</sup>。然而在临床 APL 患者经 ATRA 治疗后经常由于耐药而复发。所以发现新的治疗药物或者 ATRA 的辅助药物显得尤为重要。番荔枝内酯是从番荔枝科植物中分离得到的一类具有广谱生理活性的天然化合物,具有广泛的抗肿瘤活性<sup>[5]</sup>。番荔枝内酯类聚醚类似物(annonaceous acetogenin mimic) AA005 的结构综合了天然产物(例如 bullatacin)和以前报道的多种化合物的优点,其活性比天然的番荔枝内酯类化合物分子高 5 倍以上,并且具有良好的选择性抗肿瘤活性,对正常细胞损伤小<sup>[6,7]</sup>。在此基础上,本研究探讨 AA005 对多种白血病细胞系的毒性效应,并分析其可能的作用机制,为其潜在的临床医用提供借鉴。

## 材料和方法

### 主要试剂及仪器

胎牛血清(Gibco, 美国); RPMI 1640 培养基(Sigma, 美国); NSC606985(美国国立癌症研究院抗癌药物筛选标准药剂数据库提供); 活化 caspase-3, PARP 抗体(Santa Cruz, 美国);  $\beta$ -actin 抗体(Oncogene, 美国); HRP 偶联的二抗(DAKO, 丹麦); HRP-显色试剂盒(Pierce, 美国); ApoAlert Annexin-V kit(BD Biosciences, 美国); caspase-3 特异抑制剂 Z-VAD-fmk(Sigma, 美国)。化合物 AA005 由中国科学院上海有机化学研究所姚祝军研究员课题组提供。流式细胞仪(BD FACSCalibur, 美国); CO<sub>2</sub> 培养箱(Thermo, 美国); 超净工作台(Thermo, 美国); 倒置相差显微镜(Nikon, 日

本); SDS-PAGE 凝胶电泳及转移装置均为 Bio-Rad 公司(美国)产品;

### 细胞培养

本研究采用的人的白血病细胞系包括急性早幼粒细胞白血病细胞株 NB4、急性单核性白血病细胞株 U937 和急性粒细胞白血病部分分化型细胞株 Kasumi-1、慢性髓系白血病细胞株 K562、急性粒细胞白血病细胞株 HL-60、急性 T 淋巴细胞白血病细胞株 Jurkat。这些细胞每日接种于含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素, 100  $\mu$ g/ml 链霉素和 2 mmol/L 谷氨酰胺的 RPMI 1640 或 DMEM 中, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度培养箱中培养, 每天换液, 保证一定的细胞浓度。根据实验需要加入适量的药物。

### 细胞增殖的 CCK-8 法检测

使用 CCK-8 试剂盒检测细胞增殖能力。每孔接种 5 000 - 10 000 个细胞, 按实验需要加入适量药物刺激。细胞培养一定时间后, 每孔加入 10  $\mu$ l CCK-8 试剂, 37 $^{\circ}$ C 孵育 0.5 - 4 h 后酶标仪检测 450 nm 波长处测定吸光度, 计算药物对细胞增殖的抑制率。

### 细胞死亡率的台盼蓝染色法检测

取细胞悬液与 0.4% 台盼蓝溶液以 9:1 均匀混合, 在 3 min 内用计数板分别计数活细胞和死细胞, 再根据公式计算细胞死亡率。

### 细胞凋亡的流式细胞术检测

使用 ApoAlert Annexin-V kit 检测细胞凋亡。收集 2  $\times$  10<sup>5</sup> 细胞, 用 PBS 洗 2 次, 加入 200  $\mu$ l 1  $\times$  结合缓冲液重悬细胞, 再加 2.5  $\mu$ l Annexin-V 和 5  $\mu$ l 碘化丙啶(propidium iodine, PI), 室温避光孵育 15 min, 再加 300  $\mu$ l 1  $\times$  结合缓冲液上流式细胞仪检测。

### Caspase 3 活化的 Western blot 检测

蛋白裂解液与 2  $\times$  上样缓冲液(100 mmol/L Tris, 4% SDS, 0.2% 溴酚蓝, 20% 甘油和 5%  $\beta$  巯基乙醇)等量混合, 100 $^{\circ}$ C 加热 5 min, 定量后上样于 8% - 15% SDS-PAGE 凝胶进行电泳, 常规转膜, 再用 5% 脱脂奶粉(TBS 配制)室温封闭 1 h 后, 与一抗室温孵育 2 h 或 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 经 TBS 充分洗涤后, 与相应的 HRP 标记的二抗室温孵育 1 h, 经 TBS 洗 3 遍后用 HRP-显色试剂显色并曝光于 X 光片上。

### 细胞周期分析

收集 2  $\times$  10<sup>6</sup> 细胞, 用 PBS 洗 1 遍, 离心, 细胞沉淀用 75% 乙醇于 -20 $^{\circ}$ C 固定过夜。固定后的细胞用 PBS

洗 2 遍,离心,弃去 PBS,用 100  $\mu$ l PBS 将细胞重悬,然后用 100 mg/ml RNase A (溶解于 pH 7.4 的 Tris-HCl 缓冲液) 消化 30 min。消化完成后标记 25  $\mu$ g/ml 的 PI 室温孵育 20 min,加入 400  $\mu$ l PBS 将细胞重悬后,用流式细胞仪检测细胞内 DNA 含量并将随机收集的 10 000 个细胞的数值进行统计分析。

统计学处理

相关实验数据用单因素方差和 *t*-检验进行统计学分析  $P < 0.05$  为差异具有统计学显著性。

结 果

AA005 抑制白血病细胞增殖

选用不同浓度 AA005 处理多株白血病细胞系 NB4、U937、K562、Kasumi-1、HL-60、Jurkat。CCK-8 法检测结果表明,AA005 0.2、1、5、25  $\mu$ mol/L 作用于白血病细胞 48 h 后,对白血病细胞具有广泛的增殖抑制效应,呈浓度依赖性,尤其是对急性早幼粒白血病细胞系 NB4 细胞作用最为显著(图 1)。

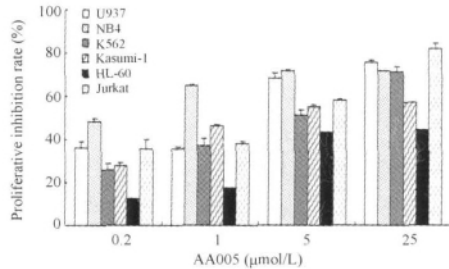


Figure 1. Inhibitory effect of AA005 (48 h) on different leukemia cell lines detected by CCK-8 method.

AA005 诱导白血病细胞死亡

为了明确 AA005 抑制白血病细胞增殖的原因,进一步采用 CCK-8 法、台盼蓝染色、形态学观察、流式细胞术等方法进行检测分析。在上述实验的基础上,选择代表性的 U937、NB4、K562 白血病细胞系,经不同浓度 AA005 处理后用 CCK-8 试剂盒检测细胞增殖抑制率,并与台盼蓝染色法检测细胞死亡率进行对比。结果表明,AA005 对白血病细胞的增殖抑制效应部分由 AA005 诱导细胞死亡所致(图 2)。

AA005 诱导 NB4 细胞死亡特征

采用急性早幼粒白血病细胞系 NB4 作为细胞模型,用 1  $\mu$ mol/L AA005, 20  $\mu$ mol/L NSC606985<sup>[8]</sup>

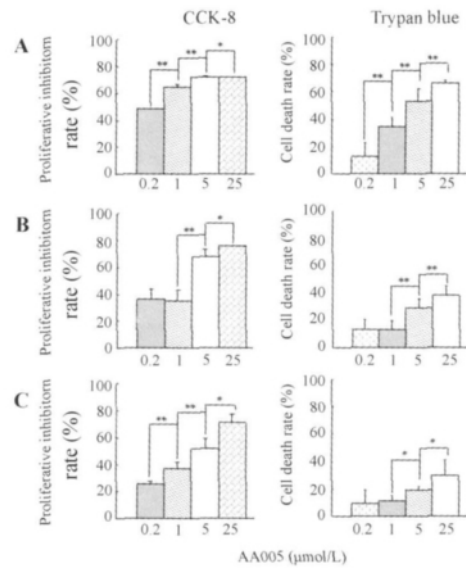


Figure 2. Death in NB4, U937, K562 leukemia cells induced by AA005 for 48 h. A: NB4 cells. B: U937 cells. C: K562 cells. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

(caspase 依赖的细胞凋亡诱导剂) 处理细胞后,瑞氏染色,显微镜观察。结果发现,AA005 诱导的细胞死亡形态类似于 NSC606985 诱导的细胞凋亡形态,如胞浆内出现小空泡,但细胞膜完整,晚期会出现凋亡小体、核碎裂等(图 3A)。用不同浓度 AA005 处理 NB4 细胞 48 h 后,Annexin-V 及 PI 染料双标细胞,流式细胞术分析细胞死亡情况。如图 3B 所示,0、0.2、1、5  $\mu$ mol/L AA005 处理细胞后早期凋亡细胞 (Annexin-V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>) 分别为 2.85%、3.83%、

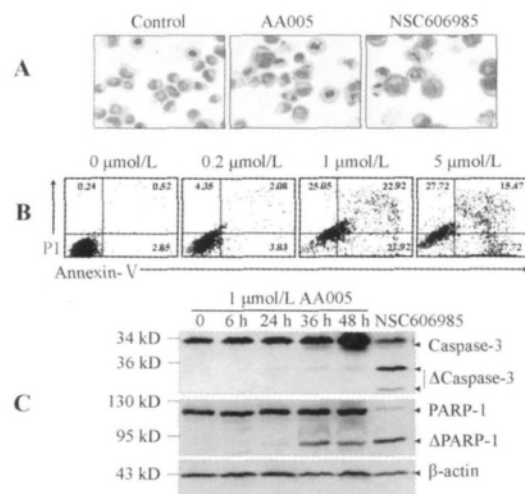


Figure 3. Death of NB4 cells induced by AA005. A: cell morphological features of NB4 examined by microscopy after Wright's staining. B: cell death measured by flow cytometry. C: proteins PARP-1 and caspase-3 detected by Western blot.

21.92% ,27.72% ,晚期凋亡细胞( Annexin-V<sup>+</sup> / PI<sup>+</sup>) 分别为 3.37% 5.91% 44.84% 和 43.19% 。

### Caspase-3 抑制剂对细胞死亡的影响

Western blot 分析 caspase-3 的活化结果显示(图 3C) ,AA005 1 μmol/L 作用于 NB4 细胞 24 h 后可以检测到 caspase-3 微弱的剪切条带 ,相应地也出现了底物 PARP-1 的剪切 ,表明 caspase-3 已开始活化。随后 ,AA005 处理 36 和 48 h 的细胞蛋白也显示了 caspase-3 活化程度随细胞死亡过程的发展而加强。但直到 AA005 作用细胞 48 h(此时细胞死亡率约 60%) ,与 NSC606985 阳性对照组(细胞死亡率约 60%) 相比 ,也只有少量 caspase-3 活化。进一步地 ,在反应体系中加入 caspase-3 的广谱抑制剂 Z-VAD-fmk 处理 NB4 细胞后 ,再分别用 AA005 和 NSC606985 诱导细胞死亡。流式细胞仪检测结果显示 Z-VAD-fmk 不能抑制 AA005 诱导的细胞死亡 ,但几乎可以完全抑制 NSC606985 诱导的细胞死亡(图 4) 。

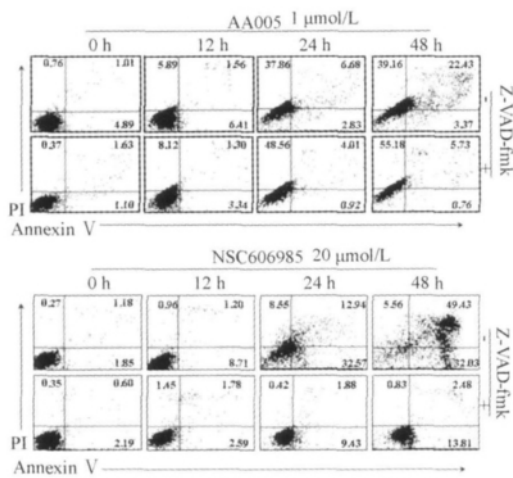


Figure 4. Cell death measured by flow cytometry after AA005 and NSC606985 treatment without or with Z-VAD-fmk.

### 非毒性浓度的 AA005 对细胞周期的作用

AA005 对白血病细胞的增殖抑制效应部分由其诱导细胞死亡而引起 ,但并不是全部。200 nmol/L AA005 处理 3 种白血病细胞系 U937、NB4、K562 ,生长抑制率分别为 39% ,61% 和 33% ,而细胞死亡率仅为 13% ,34% 和 11% 。低浓度( 12.5 ,25 ,50 ,100 ,200 nmol/L) 的 AA005 单独作用 NB4 细胞后 ,用 CCK-8 法检测细胞生长抑制率(图 5A) ,台盼蓝染色法检测细胞活率(图 5B) ,可以看到 ,AA005 处理组的细胞从第 2 天就发生了明显的增殖抑制。从

中选取具有明显增殖抑制效应的 50 和 100 nmol/L AA005 作为非毒性浓度处理 NB4 细胞 2 d ,检测细胞周期的结果表明 ,低浓度 AA005 抑制细胞增殖与细胞周期的改变密切相关 ,与对照组相比 ,AA005 处理的细胞在第 2 天 G<sub>1</sub> 期细胞明显减少 ,而 S 期、G<sub>2</sub>/M 期细胞增多(图 6) ,这说明低浓度的 AA005 诱导 NB4 细胞发生了 G<sub>2</sub>/M 期阻滞。

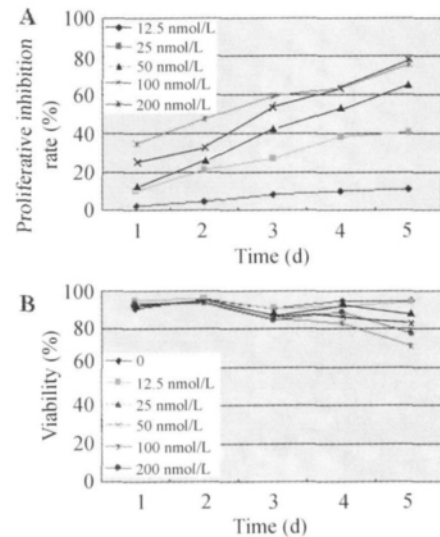


Figure 5. Proliferative inhibition and viability of NB4 cells after treatment with AA005 in low concentration. A: the proliferative inhibition of NB4 cells measured by CCK-8 assay. B: the cell viability measured by trypan blue assay.

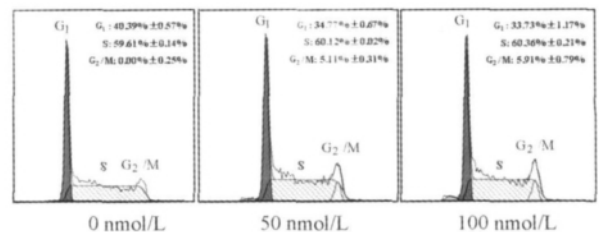


Figure 6. Changes of cell cycle in NB4 cells treated with AA005 in non-toxic concentrations.

## 讨 论

迄今为止 ,已发现番荔枝内酯类化合物 400 余种 ,它们大都具有显著的抗肿瘤活性及强细胞毒性<sup>[5]</sup> ,并且有报道称其可能是通过抑制哺乳动物线粒体中 NADH-泛醌-氧化还原酶(线粒体复合体 I) 的活性而发挥作用<sup>[9]</sup> 。中国科学院有机化学研究所姚祝军研究员课题组在过去几年里成功合成了一系列番荔枝内酯类化合物分子的类似物 ,其中 AA005 的结构综合了天然产物的优势 ,合成更简单并且抗肿瘤

活性显著优于其它类似物<sup>[7]</sup>。目前,有研究报道,AA005 能够选择性诱导胃癌细胞的死亡,但细胞死亡的机制和作用靶标尚不明确<sup>[10]</sup>。

本研究首次在体外实验中证实了 AA005 对白血病细胞具有广泛而明显地抑制增殖效应,并且该抑制效应呈浓度依赖性,其中尤其对急性早幼粒白血病细胞系 NB4 药效最为显著。以 NB4 细胞为模型,进一步探讨 AA005 抗白血病细胞增殖效应的机制,发现相对高浓度( $\geq 1 \mu\text{mol/L}$ )的 AA005 处理 48 h 后,能够显著诱导 NB4 细胞死亡(细胞死亡率约 60%)。形态学观察表明,AA005 诱导的细胞死亡形态与典型细胞凋亡诱导剂 NSC606985 处理后的死亡形态类似,如胞浆内出现小空泡,但细胞膜完整,晚期会出现凋亡小体、核碎裂等。然而 Annexin-V 及 PI 染料双标记流式细胞术检测细胞死亡情况显示,AA005 几乎可同时诱导细胞发生早期凋亡及晚期凋亡,并未出现明显的细胞由早期凋亡向晚期凋亡的转变。

Caspase 在凋亡的执行过程中起着必不可少的作用,细胞凋亡的过程实际上是 caspase 不可逆有限水解底物的级联放大反应过程<sup>[11,12]</sup>。凋亡启动阶段,caspase-8,caspase-10,caspase-9 通过 adaptor 被募集到特定的起始活化复合体,形成同源二聚体构象改变,导致同源分子之间的酶切而自身活化,即开启细胞内的死亡程序;通过异源活化方式水解下游 caspase,包括 caspase-3,caspase-6,caspase-7,将死亡信号向下传递,同时将凋亡信号放大<sup>[13]</sup>。为了进一步明确 AA005 诱导的细胞死亡方式,对细胞凋亡中关键的执行者 caspase-3 做了检测。Western blot 分析结果显示,在 AA005 诱导 NB4 细胞死亡过程中,只有少量 caspase-3 的活化,提示 AA005 诱导的细胞死亡过程中 caspase-3 并未发挥关键作用,其很可能启动了一种 caspase-3 非依赖的细胞死亡途径,caspase-3 广谱抑制剂 Z-VAD-fmk 对 AA005 的抗白血病细胞效应无影响,这为我们的观点提供了证据。进一步探讨低浓度( $< 200 \text{ nmol/L}$ ) AA005 对细胞周期的影响结果表明,低浓度的 AA005 诱导 NB4 细胞发生  $G_2/M$  期阻滞。

目前治疗白血病的方法大都缺乏特异性,对正常细胞也产生杀伤效应,导致机体出现严重的不良反应。不仅如此,最新的研究成果表明,导致白血病细胞恶性增殖的罪魁祸首可能来自于具有自我更新能力的白血病干细胞,而这些细胞具有非常强的耐

药、耐放射线等特性,导致白血病患者在化疗放疗得到完全缓解后仍复发,且复发率相当高<sup>[14,15]</sup>,所以寻找新的小分子以实现治愈白血病的目标显得极为重要。本研究发现 AA005 具有广泛而明显地抗白血病细胞增殖效应,高浓度 AA005 诱导细胞死亡,低浓度引起细胞  $G_2/M$  期阻滞,为以后研究 AA005 诱导白血病细胞死亡的具体机制及作用靶标提供了实验依据,同时也为 AA005 的潜在临床医用提供了借鉴。

## 参 考 文 献

- Xie H, Ye M, Feng R, *et al.* Stepwise reprogramming of B cells into macrophages. *Cell*, 2004; 117(5): 663-676
- Shao W, Benedetti L, Lamph WW, *et al.* A retinoid-resistant acute promyelocytic leukemia subclone expresses a dominant negative PML-RAR alpha mutation. *Blood*, 1997; 89(12): 4282-4289
- Melnick A, Licht JD. Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 1999; 93(10): 3167-3215
- Huang ME, Ye YC, Chen SR, *et al.* Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 1988; 72(2): 567-572
- Alali FQ, Liu XX, McLaughlin JL. Annonaceous acetogenins: recent progress. *J Nat Prod*, 1999; 62(3): 504-540
- Zeng BB, Wu Y, Jiang S, *et al.* Studies on mimicry of naturally occurring annonaceous acetogenins: non-THF analogues leading to remarkable selective cytotoxicity against human tumor cells. *Chemistry*, 2003; 9(1): 282-290
- Jiang S, Li Y, Chen XG, *et al.* Parallel fragment assembly strategy towards multiple-ether mimicry of anticancer annonaceous acetogenins. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2004; 43(3): 329-334
- Song MG, Gao SM, Du KM, *et al.* Nanomolar concentration of NSC606985, a camptothecin analog, induces leukemic-cell apoptosis through protein kinase Cdelta-dependent mechanisms. *Blood*, 2005; 105(9): 3714-3721
- Degli Esposti M, Ghelli A, Ratta M, *et al.* Natural substances (acetogenins) from the family Annonaceae are powerful inhibitors of mitochondrial NADH dehydrogenase (Complex I). *Biochem J*, 1994; 301(Pt 1): 161-167
- Huang GR, Jiang S, Wu YL, *et al.* Induction of cell death of gastric cancer cells by a modified compound of the annonaceous acetogenin family. *Chembiochem*, 2003; 4(11): 1216-1221
- Luthi AU, Martin SJ. The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death Differ*, 2007; 14(4): 641-650
- Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*, 2008; 27(48): 6194-6206
- Walsh JG, Cullen SP, Sheridan C, *et al.* Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008; 105(35): 12815-12819
- Gilliland DG, Jordan CT, Felix CA. The molecular basis of leukemia. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program* 2004: 80-97
- Jordan CT. The leukemic stem cell. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2007; 20(1): 13-18