

青蒿素对脑胶质瘤 U251 细胞的辐射增敏作用

季文君¹ 陈列松² 宋云珍¹ 王逸璇¹ 赵江虎¹ 梁中琴¹

¹ (苏州大学医学部药学院药理学系 苏州 215123)

² (苏州大学附属第二医院放疗科 苏州 215004)

摘要 为探讨青蒿素 (Artemisinin) 对脑胶质瘤细胞辐射敏感性的影响及其机制, 采用甲基四唑蓝 (MTT) 法检测青蒿素对胶质瘤 U251 细胞增殖的抑制作用; Hoechst 33258 荧光染色观察凋亡小体; 单丹磺酰尸胺 (MDC) 染色和 Western blotting 检测 U251 细胞的自噬活性的改变; 用克隆形成实验测定自噬抑制剂 3-MA 对 U251 细胞的增殖抑制作用。结果显示: 青蒿素对 U251 细胞增殖有抑制作用; 青蒿素和 X 射线联合处理组细胞凋亡增加, 并出现大量自噬泡且 LC3-II 表达量值增大 ($p < 0.01$); 3-MA、青蒿素和 X 射线三联处理组细胞克隆形成率较联合处理组显著降低 ($p < 0.01$)。研究表明, 青蒿素可能主要通过诱导细胞凋亡来增强 U251 细胞对 X 射线的辐射敏感性, 同时青蒿素也能增强辐射诱导 U251 细胞的自噬活性, 但自噬机制在此过程中可能起到细胞保护作用。

关键词 青蒿素, 胶质瘤细胞, 辐射增敏, 自噬, 凋亡

中图分类号 R739.41

青蒿素, 又称黄花蒿素, 是菊科植物黄花蒿中的主要非挥发性成分, 具有抗疟疾作用, 为我国传统的抗疟中药。近年来的研究发现青蒿素及其衍生物不仅能够抑制肿瘤细胞生长并诱导肿瘤细胞凋亡, 具有显著的抗肿瘤作用^[1-5], 还具有辐射增敏作用^[6-8], 但其机制仍未阐明。本研究以脑胶质瘤 U251 为研究对象, 探讨青蒿素对 U251 细胞辐射敏感性的调节作用以及自噬在其中产生的影响。

1 实验材料与方法

1.1 材料

人类星形胶质瘤细胞系 U251 购于中国科学院上海生命科学研究院细胞库; 青蒿素 (Artemisinin)、3-甲基腺嘌呤 (3-MA) 和丹磺酰尸胺 (Monodansylcadaverine, MDC) 购于美国 Sigma 公司; D-MEM/F-12 培养基、胎牛血清购于 Gibco 公司; 甲基噻唑蓝 (MTT) 购于 Bio Basic INC; 二甲基亚砜 (DMSO) 购于 BioSharp; Hoechst 33258 染液和结晶紫染液购于碧云天生物技术公司。LC3 抗体购于 Abcam 公司; β -actin 为联科生物公司的产品; 荧光二抗购于自美国基因有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 U251 细胞接种于含 10% 胎牛血清的 D-MEM/F-12 培养基中, 在 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养。

1.2.2 辐照条件 采用 SIEMENS-Primus 直线加速器对 U251 细胞进行辐照, 辐照条件为 6 MV X 射线垂直照射, 剂量率为 2 Gy/min。

1.2.3 细胞生长抑制 采用 MTT 比色法检测青蒿素对 U251 细胞生长的抑制作用。将对数期生长的 U251 细胞以每孔 5000 个接种于 96 孔板中, 37℃, 5% CO₂ 条件下培养, 次日加入青蒿素 (25、50、100、200 和 400 $\mu\text{mol/L}$), 每组均设 6 个复孔, 分别培养 24、48 和 72 h。培养终止前 4 h 加入 MTT, 每孔 10 μL , 37℃继续培养 4 h 后每孔加入酸化的 10% SDS 100 μL 终止反应, 放置过夜, 于酶标仪检测波长为 570 nm 时的吸光度 A 值。重复 3 次。

1.2.4 Hoechst 33258 荧光染色 实验分组: 阴性对照组 (Control)、单纯辐照组 (IR)、单纯给药组 (Artemisinin) 和联合处理组 (Artemisinin + IR)。取对数生长期 U251 细胞, 调整细胞浓度后接种在酒精处理过的小圆玻片上, 置于 24 孔板内培养, 隔

国家自然科学基金 (81072656)、国家级大学生创新性实验计划 (SG315866)、江苏高校优势学科建设工程资助项目 (PAPD)、江苏省“十二五”临床药学重点学科资助

第一作者: 季文君, 女, 1987 年 5 月出生, 2010 年 7 月毕业于南京医科大学, 目前为苏州大学在读医学硕士研究生, 研究方向为肿瘤与神经药理学

通讯作者: 梁中琴, E-mail: liangzhongqin@suda.edu.cn

收稿日期: 初稿 2012-04-06, 修回 2012-06-18

天分组处理同上。X射线处理 48 h、72 h 后, 弃去培养液, 加入 0.5 mL 固定液, 固定 15 min 后, 用预冷 PBS 洗涤两次, 每次 3 min。再每孔加入 0.5 mL Hoechst 33258 染色液, 避光染色 15 min 后, 用预冷 PBS 洗涤两次, 每次 3 min, 最后用抗荧光淬灭封片液封片。用紫外激发, 于倒置荧光显微镜下观察、摄片。

1.2.5 MDC 荧光染色 取对数生长期 U251 细胞, 调整细胞浓度后接种在酒精处理过的小圆玻片上, 置于 24 孔板内培养, 隔天分组处理同上。X 射线处理 48、72 h 后, 用 MDC 染色 1 h, 封片。用紫外激发, 于倒置荧光显微镜下观察、摄片。

1.2.6 Western blotting 检测 收集细胞, 细胞裂解液裂解后, 用超声波破碎细胞, 4℃、12000 r/min 离心 10 min, 吸取蛋白上清。用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度, 在样品中加入 5×上清样缓冲液中, 煮沸 5 min 使蛋白质变性。然后采用 SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 转膜后, 5%脱脂奶粉进行非特异性封闭, 加入 LC3 抗体 4℃孵育过夜, TBST 洗 3 次, 加入荧光二抗孵育 1 h。洗膜后, 用双色红外激光成像系统检测荧光强度。

1.2.7 克隆形成实验 实验分组: 阴性对照组 (Control)、单纯辐照组 (IR)、单纯给药组 (Artemisinin)、联合处理组 (Artemisinin+IR) 和三联处理组 (3-MA+Artemisinin+IR)。将对数生长期的 U251 细胞以每孔 250 个接种于 6 孔板中, 每组均设 3 个复孔, 37℃、5% CO₂ 条件下培养, 隔天加药处理, 单纯给药组和联合处理组分别给予青蒿素 50 μmol/L, 在三联处理组中, 先给予自噬抑制剂 3-MA 10 mmol/L, 10 min 后, 再给予青蒿素 50 μmol/L, 单纯辐照组、联合处理组及三联处理组次日 X 射线辐照, 剂量 6 Gy。在 37℃、5% CO₂ 条件下静置 14 d, 弃去培养基, 用结晶紫染色后镜下计数含 50 个细胞以上的集落, 并摄影。计算克隆形成率: 克隆形成率 (%) = (处理组克隆数 / 对照组克隆数) × 100%。重复 3 次。

1.2.8 统计学分析 采用 GraphPad prism 4 软件进行作图及方差分析。p < 0.05 视为有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 法检测青蒿素对 U251 细胞增殖的抑制作用

MTT 法检测不同浓度的青蒿素对 U251 的抑制率 (见图 1)。U251 细胞分别经 0、25、50、100、200 和 400 μmol/L 的青蒿素处理 24、48 和 72 h, 结

果表明青蒿素对 U251 细胞增殖的抑制作用具有剂量依赖性和时间依赖性。随着药物浓度及作用时间的增加, 青蒿素对 U251 的抑制率逐渐增大。当青蒿素浓度为 50 μmol/L 时, 48、72 h 的细胞抑制率分别为 7.78%、11.15%。细胞存活率在 90% 左右, 对后续实验的不良影响较小, 因此本实验采用 50 μmol/L 作为药物浓度, 作用时间为 48 和 72 h。

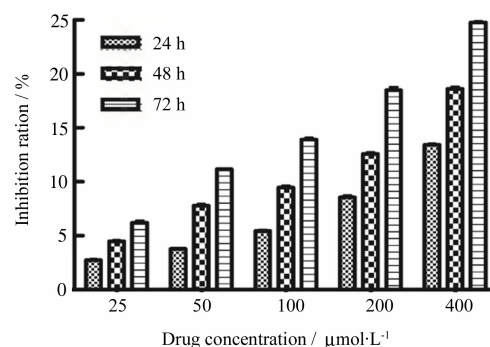


Fig.1 Effects of artemisinin on cell death of U251 cells

2.2 Hoechst 33258 荧光染色检测 U251 细胞的凋亡情况

采用 Hoechst 33258 荧光染色的方法, 在荧光显微镜下观察各组细胞核形态的变化 (见图 2)。阴性对照组和单纯给药组的细胞核大小均一, 形态完整, 较圆, 呈均匀弥散荧光。经 X 射线处理 48 h 后, 少数细胞开始凋亡, 细胞核固缩, 染色质凝集成点状结构。而联合处理组较单纯辐照组来看, 凋亡细胞数明显增多, 细胞核体积明显缩小、皱缩, 呈浓染致密的颗粒块状, 甚至细胞膜失去完整性, 并形成凋亡小体。随着处理时间的延长, 凋亡的细胞逐渐增多, 凋亡程度也逐渐加重。

2.3 MDC 荧光染色检测 U251 细胞自噬的活化

MDC 能够选择性染色于自噬特征性的自噬泡上, 是一种自噬的特异性染料。荧光显微镜下所见的细胞内点状荧光颗粒即为自噬泡。MDC 染色结果显示 (见图 3), 48 h 时, 单纯辐照组仅有少量 MDC 阳性细胞, 且细胞内点状荧光颗粒很少; 联合处理组 MDC 阳性细胞数增加, 每个细胞内点状荧光颗粒也较多, 但其变化并不显著。阴性对照组和单纯给药组无此现象。当处理时间延长至 72 h 后, 处理组细胞自噬被不同程度的活化, 其中联合处理组的细胞自噬程度较单纯处理组显著增加, 有大量明显的点状荧光颗粒出现。而阴性对照组仍无明显变化。

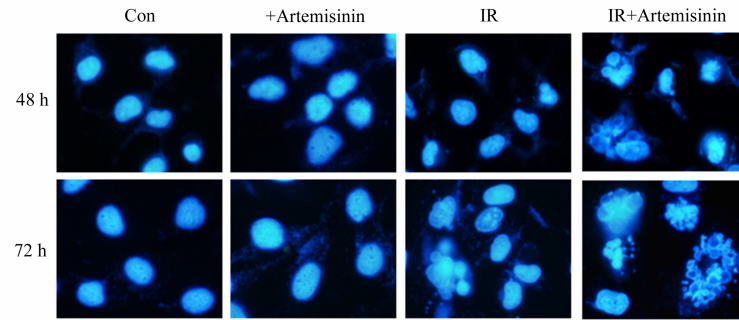


Fig.2 Effects of artemisinin and irradiation on apoptosis of U251 cells

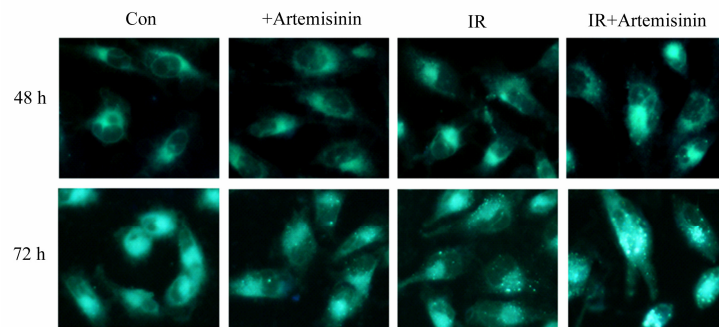


Fig.3 Effects of artemisinin and irradiation on autophagy of U251 cells

2.4 Western Blotting 检测 U251 细胞中自噬相关蛋白 LC3 表达的变化

LC3 (微管相关蛋白轻链 3, Microtubule-associated protein light chain-3) 是参与自噬泡形成的重要蛋白, 分为 I 型和 II 型。LC3-I 为胞浆可溶形式, 是未发生自噬时细胞内新合成的 LC3 加工形成的; 当细胞发生自噬时, LC3-I 经泛素化修饰, 与自噬泡膜表面的磷脂酰乙醇胺 (PE) 结合, 成为膜结合形式的 LC3-II。因此 LC3-II 被认为是自噬体的特异性标记蛋白, 其含量可表明自

噬泡的数量和自噬发生的程度^[9,10]。

Western Blot 结果表明 (见图 4), 48 h 后单纯给药组的 LC3-II 表达量与阴性对照组的相比没有统计学意义 ($p>0.05$), 单纯辐照组和联合处理组的 LC3-II 表达量增高, 与阴性对照组相比具有统计学意义 ($p<0.01$); 72 h 后各处理组的 LC3-II 表达量与阴性对照组相比都具有统计学意义 ($p<0.01$), 而联合处理组的 LC3-II 表达量与单纯辐照组相比有显著提高 ($p<0.01$)。结果提示, 联合处理组自噬相关蛋白 LC3-II 的表达显著上调, 自噬活性最高。

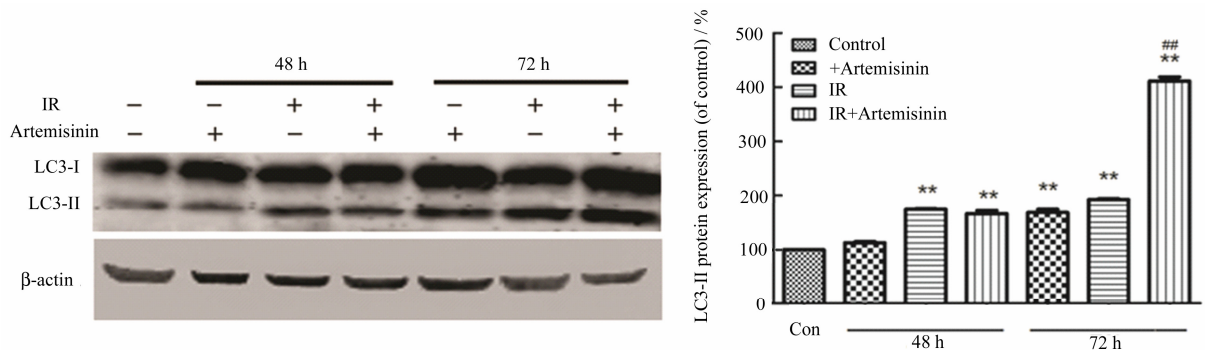


Fig.4 LC3 protein expression in U251 cells treated with artemisinin and irradiation. Data are presented as $\bar{x} \pm s$, $n=3$; **, $p<0.01$, compared with control group; ##, $p<0.01$, compared with radiation group

2.5 克隆形成实验研究自噬在青蒿素调节辐射敏感性中的作用

为了确定青蒿素对 U251 细胞辐射增敏作用的机制是通过诱导自噬还是诱导凋亡来实现,我们在青蒿素和 X 射线联合处理组中加入自噬抑制剂 3MA (三联处理组),进行克隆形成实验。实验结果显示 (见图 5),联合处理组的克隆形成能力较单

纯辐照组明显降低 ($p<0.01$); 与联合处理组相比,加入自噬抑制剂 3MA 后,细胞的克隆形成能力降低,具有显著差异 ($p<0.01$)。表明青蒿素可能主要是通过诱导凋亡来提高 U251 细胞的辐射敏感性,而青蒿素诱导的 U251 细胞自噬活性可能对细胞起保护作用。

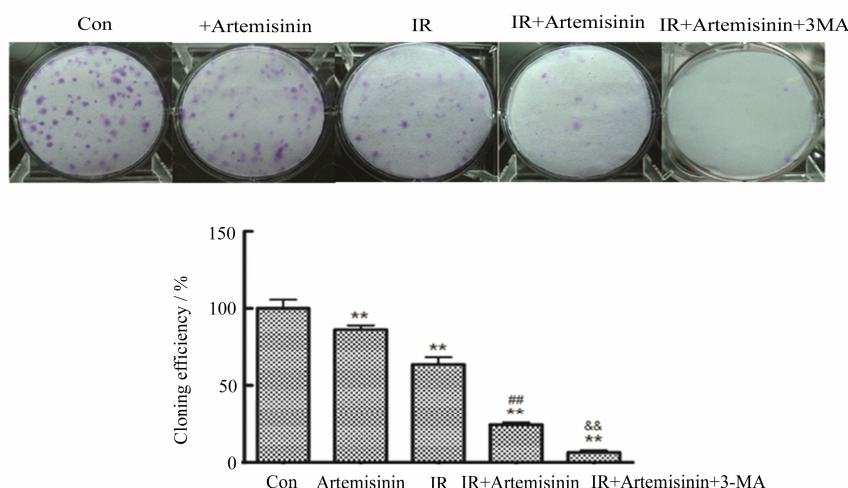


Fig.5 Effects of autophagy on cloning efficiency of U251 cells. Data are presented as $\bar{x} \pm s$, $n=3$; **, $p<0.01$, compared with control group; ##, $p<0.01$, compared with irradiation group; &&, $p<0.01$, compared with combination therapy group

3 讨论

脑胶质瘤是一种最常见的颅内肿瘤,约占所有颅内肿瘤的 45%左右。目前脑胶质瘤的治疗主要是手术为主,由于胶质瘤呈浸润性生长,手术难以完全清除,因此术后常联合化疗及放疗等综合治疗措施^[11]。但是脑胶质瘤的辐射抗性问題致使放疗疗效不佳^[12],而辐射增敏剂可以减低肿瘤对辐射的抗性,增强肿瘤的辐射敏感性。因此,寻找有效的辐射增敏剂是当今抗肿瘤研究的热点。

近年来国内外研究发现,青蒿素对包括前列腺癌、肺癌、白血病、口腔癌等多种肿瘤细胞具有一定的抑制作用^[1-5,13]。同时有研究发现青蒿素的衍生物能够增强肿瘤细胞对射线的敏感性,具有辐射增敏剂的作用^[6-8],但其增敏机制至今仍未阐明。

本研究发现青蒿素本身对脑胶质瘤 U251 细胞的增殖具有抑制作用。MTT 结果表明这种抑制作用具有剂量及时间依赖性。本实验选用对细胞增殖影响较小的 50 $\mu\text{mol/L}$ 作为实验药物浓度。通过克隆形成实验发现经青蒿素处理后再接受 X 射线照射,细胞增殖受到抑制,克隆形成能力降低。说明青蒿

素还能够增强 U251 细胞对 X 射线的辐射增敏性,具有辐射增敏作用。Hoechst 33258 染色结果显示,联合青蒿素和 X 射线处理 U251 细胞促进了细胞的凋亡,而检测各处理组细胞的自噬水平后发现,青蒿素和 X 射线联合处理组形成的自噬泡较其他各组明显增多,并且 LC3-II 的蛋白表达量也高于其他各组,表明青蒿素和 X 射线联合处理的方式能够激活 U251 细胞的自噬水平。由此可见,当联合应用青蒿素和 X 射线处理 U251 细胞时,能够同时激活细胞的凋亡与自噬。

近年来对自噬在细胞中的作用研究有着两种截然不同的观点,有研究发现激活自噬能够增加溶酶体对抗凋亡蛋白的降解从而促进细胞凋亡^[14,15]。但另有文献报道自噬诱导细胞抗凋亡能力,对细胞起到保护作用^[16]。因此,为了进一步研究自噬在青蒿素调节 U251 细胞辐射敏感性中的作用,我们在青蒿素和 X 射线联合处理前加入自噬抑制剂 3-MA 对 U251 细胞进行预处理,通过克隆形成实验发现抑制自噬后细胞克隆形成率下降,表明一定程度的自噬活性在 U251 细胞中可能起到一定的保护作用,该结果与本实验室之前的研究相符^[17]。由此推断青蒿

素可能主要是通过诱导细胞凋亡来增强 U251 细胞对 X 射线的辐射敏感性, 而其诱导的自噬活性对 U251 细胞可能是一种保护机制。但具体机制目前仍有待于进一步的研究探讨。

参考文献

- Ikukiko N, Byron G, Tomoka T N, *et al.* Transferrin receptor-dependent cytotoxicity of artemisinin-transferrin conjugates on prostate cancer cells and induction of apoptosis. *Cancer Letters*, 2009, **274**(2): 290-298
- David S, Tiphane P, Cindy L, *et al.* Transferrin overcomes drug resistance to artemisinin in human small-cell lung carcinoma cells. *Cancer Letters*, 2002, **179**(2): 151-156
- LI Ying, SHAN Feng, WU Jinming, *et al.* Novel antitumor artemisinin derivatives targeting G1 phase of the cell cycle. *Bioorg Med Chem Lett*, 2001, **11**(1): 5-8
- 谢红, 姚丽, 陈立军, 等. 青蒿素诱导人白血病细胞 K562 凋亡的线粒体机制. *现代生物医学进展*, 2009, **9**(1): 27-29
XIE Hong, YAO Li, CHEN Lijun, *et al.* Mitochondrial mechanisms of apoptosis induced by artemisinin in human leukemia K562 cells. *Progress in Modern Biomedicine*, 2009, **9**(1): 27-29
- 薄剑, 王文清, 王全顺, 等. 青蒿素对人白血病 U937 细胞凋亡及分化的影响. *第四军医大学学报*, 2008, **29**(7): 634-637
BO Jian, WANG Wenqing, WANG Quanshun, *et al.* Effects of artemisinin on apoptosis and differentiation of human leukemia U937 cells. *J Fourth Mil Med Univ*, 2008, **29**(7): 634-637
- Kim S J, Kim M S, Lee J W, *et al.* Dihydroartemisinin enhances radiosensitivity of human glioma cells in vitro. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2006, **132**(2): 129-135
- ZHAO Yanyan, JIANG Weiwei, LI Bin, *et al.* Artesunate enhances radiosensitivity of human non-small cell lung cancer A549 cells via increasing NO production to induce cell cycle arrest at G2/M phase. *Int Immunopharmacol*, 2011, **11**(12): 2039-2046
- 江庆, 曹建平, 纪蓉, 等. 二氢青蒿素对人脑胶质瘤 SHG44 细胞辐射增敏作用及其机制的研究. *辐射研究与辐射工艺学报*, 2011, **29**(3): 163-168
- JIANG Qing, CAO Jianping, JI Rong, *et al.* Investigation of radiation sensitivity and mechanism on SHG44 cells of human glioma induced by dihydrodihydroartemisinin. *J Radiat Res Radiat Process*, 2011, **29**(3): 163-168
- JIANG Houbo, CHENG Dongmei, LIU Wenhua, *et al.* Protein kinase C inhibits autophagy and phosphorylates LC3. *BBRC*, 2010, **395**(4): 471-476
- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, *et al.* LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J*, 2000, **19**(21): 5720-5728.
- 段宝奇, 高觉明, 李海林, 等. 恶性脑胶质瘤手术联合放疗和化疗的疗效分析. *中国肿瘤外科杂志*, 2009, **1**(2): 78-80
DUAN Baoqi, GAO Jueming, LI Hailin, *et al.* Combined therapy and prognosis of patients with malignant gliomas. *Chin J Surg Onco*, 2009, **1**(2): 78-80
- 张俊平. 恶性脑胶质瘤临床个体化化疗研究. 广东: 中山大学, 2006
ZHANG Junping. Individualized chemotherapy for malignant gliomas. Guangdong: Sun Yat-Sen University, 2006
- Nam W, Tak J, Ryu J K, *et al.* Effects of artemisinin and its derivatives on growth inhibition and apoptosis of oral cancer cells. *Head Neck*, 2007, **29**(4): 335-340
- LIAO Aijun, HU Rong, ZHAO Qihui, *et al.* Autophagy induced by FTY720 promotes apoptosis in U266 cells. *Eur J Pharm Sci*, 2012, **45**(5): 600-605
- WANG Qinwen, CHEN Zhengtang, DIAO Xinwei, *et al.* Induction of autophagy-dependent apoptosis by the survivin suppressant YM155 in prostate cancer cells. *Cancer Letters*, 2011, **302**(1): 29-36
- ZHANG Yahong, WU Yingliang, Tashiro S, *et al.* Involvement of PKC signal pathways in oridonin-induced autophagy in HeLa cells: A protective mechanism against apoptosis. *BBRC*, 2009, **378**(2): 273-278
- 陈列松, 李君, 龙林梅, 等. U251 细胞受 X 射线照射后的自噬现象. *辐射研究与辐射工艺学报*, 2010, **28**(4): 249-253
CHEN Liesong, LI Jun, LONG Linmei, *et al.* Study on autophagy phenomenon in U251 cells irradiated by X-rays. *J Radiat Res Radiat Process*, 2010, **28**(4): 249-253

Effects of artemisinin on the radio-sensitivity of U251 glioma cells

JI Wenjun¹ CHEN Liesong² SONG Yunzhen¹ WANG Yixuan¹ ZHAO Jianghu¹ LIANG Zhongqin¹

¹(Department of Pharmacology, Medical college of pharmacy, Soochow University, Suzhou 215123, China)

²(Department of Oncology Radiotherapy, Second Affiliated Hospital, Soochow University, Suzhou 215004, China)

ABSTRACT To investigate the radio-sensitizing effect of artemisinin on U251 glioma cells *in vitro*, MTT assay, hoechst fluorescent staining, MDC staining, Western blot assay and cloning survival assay were used. The results show that artemisinin can inhibit the proliferation of U251 cells confirmed by MTT assay. The combined treatment with artemisinin and X-rays can significantly increase the apoptosis level in U251 cells studied by hoechst fluorescent staining and induce autophagy confirmed by MDC staining and Western blot assay. Cells previously treated with autophagy inhibitors 3-MA, artemisinin and X-rays can decrease number of colonies as compared with combination therapy group (artemisinin + IR). The results suggest that artemisinin can increase the radiation sensitivity of glioma U251 cells by inducing apoptosis. Autophagy can also be induced by treatment with artemisinin and X-rays, and it may play a protective role in the regulation of radio-sensitization of U251 cells.

KEYWORDS Artemisinin, Glioma cell, Radio-sensitivity, Autophagy, Apoptosis

CLC R739.41