

# 烷化溶血磷脂对 U266 细胞作用的实验研究

黄春玲\* 陈志哲 陈君敏 王少元 刘庭波 杨 婷

(福建医科大学附属协和医院 福建省血液病研究所 福州 350001)

**摘要** 为研究烷化溶血磷脂(ET-18-OCH<sub>3</sub>)对骨髓瘤细胞系 U266 的体外杀伤作用。通过台盼蓝拒染法和克隆形成率来反映 ET-18-OCH<sub>3</sub> 对 U266 细胞的抗增殖效应;通过荧光显微镜、电镜观察细胞形态学变化,琼脂糖凝胶电泳观察 DNA 降解片段,流式细胞仪作 DNA 倍体分析来观察 ET-18-OCH<sub>3</sub> 诱导 U266 细胞凋亡的作用;通过 RT-PCR 检测 bcl-2、c-myc mRNA 水平,流式细胞仪检测 Bcl-2、C-myc 蛋白的表达来初步探讨其相关的作用机制。结果显示,U266 细胞经 ET-18-OCH<sub>3</sub> 处理后细胞生长明显受抑,呈时间和剂量依赖性;荧光显微镜,电镜下观察均可见凋亡形态学改变,7.5μg/ml ET-18-OCH<sub>3</sub> 作用 24 小时后出现典型的 DNA 降解片段。流式细胞仪检测凋亡率为 17.53%;RT-PCR 显示 bcl-2、c-myc mRNA 表达均随 ET-18-OCH<sub>3</sub> 作用时间的增加而减弱,ET-18-OCH<sub>3</sub> 作用 24 小时后,bcl-2、c-myc mRNA 分别减少了 86%、72%;流式细胞仪检测 Bcl-2 蛋白、C-myc 蛋白分别减少了原来的 17%、60%。研究结果表明,ET-18-OCH<sub>3</sub> 对 U266 细胞的生长具有明显的抑制作用,并可诱导细胞的凋亡,具有明显的抗肿瘤效应。

**关键词:** 烷化溶血磷脂 U266 细胞系 多发性骨髓瘤

烷化溶血磷脂(ET-18-OCH<sub>3</sub>, ALP)是新一类的抗肿瘤药,该类物质可选择性地杀伤肿瘤细胞。为了研究其对骨髓瘤的抗肿瘤效应,本文以 U266 细胞为研究对象,研究 ET-18-OCH<sub>3</sub> 对 U266 细胞增殖的影响,及诱导细胞凋亡的作用,并探讨其有关的作用机制。

## 材料与方 法

### 1. 研究对象

(1) 细胞系 U266 细胞系是多发性骨髓瘤细胞系,由上海长征医院侯健教授惠赠。培养体系:含 10% 灭活胎牛血清(杭州四季青)的 RPMI 1640(GIBCO)培养液,置 37℃,5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的培养箱(WJ-3D,日本)培养。实验所用细胞均处于对数生长期,台盼蓝拒染率 >95%。

(2) 烷化溶血磷脂(ET-18-OCH<sub>3</sub>) ET-18-OCH<sub>3</sub> 粉剂由德国慕尼黑大学 H. J. Kolb 教授惠赠。用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液配制成浓度为 10mg/ml,置 -20℃ 保存备用。

### 2. 台盼蓝拒染法测定细胞存活率

将浓度为  $1 \times 10^6$ /ml 的细胞分别与终浓度为 0、3.75、7.5、10、15、20μg/ml 的 ET-18-OCH<sub>3</sub> 共培养,接种于 96 孔板,每孔总体积为 200μl,每组设 3 个平行孔,于培养后 3、6、9、12、24h,用 0.4% 台盼蓝染色计数各组细胞存活率。

### 3. 集落形成率实验

将浓度为  $1 \times 10^6$ /ml 的细胞分别与终浓度为 0、3.75、7.5、及 15μg/ml 的 ET-18-OCH<sub>3</sub> 共培养,于培养后 4、8、12、24h 收集细胞,经 RPMI 1640 培养液清洗后计数活细胞数。取活细胞做集落形成实验。培养体系为:含 10% 胎牛血清;0.8% 甲基纤维素;细胞浓度为  $1 \times 10^3$ /ml;总体积为 2.0ml;种于 24 孔板,每组设 3 个平行孔,共培养 7d,计 CFU-U266 细胞数大于 20 个为一个集落。

### 4. 细胞形态学观察

(1) 显微镜 经 7.5μg/ml ET-18-OCH<sub>3</sub> 处理不同时间后的细胞悬液 100μl ( $10^7$ /ml) 和 4μl 吖啶橙(acridine orange, AO, Fluka)与溴化乙锭(ethidium bromide, EB, 华美)的混合染液混匀后,滴于洁净玻片上,立即在 490nm 激发波长的荧光显微镜下观察,计算凋亡率。

(2) 电镜 收集与终浓度为 0、7.5μg/ml ET-18-OCH<sub>3</sub> 共培养 24h 的细胞。离心、沉淀,加入含 2.5% 戊二醛和 1% 多聚甲醛混合液固定,1% 锇酸再固定,脱水,环氧树脂 618 包埋,超薄制片,用醋酸铅和枸橼酸铜染色, HU-12A 型透射电镜观察并摄影。

### 5. 片段化 DNA 的检测

收集与终浓度为 7.5 μg/ml ET-18-OCH<sub>3</sub> 共培养 0、3、6、9、12、24h 的细胞 ( $2 \times 10^6$ ),分别与 0.4ml 细胞溶解缓冲

本文 2003 年 3 月 17 日收到,7 月 14 日接受。

\* 通讯作者。现在厦门中山医院临床检验中心,361004。

E-mail: hcl-helen@sina.com

液(200mmol/L Tris-HCL pH8.0; 100mmol/L EDTA; 1% SDS; 50 μg/ml 蛋白酶K)37℃ 孵育 4h; 加入饱和酚 200μl, 氯仿/异戊醇(24:1)200μl, 室温 12 000rpm, 离心 15min, 收集水相; 加入 5mol/L NaCl 15μl, 无水乙醇 1ml 混匀, 置 -20℃ 过夜; 离心干燥后, 加入 0.4ml TNE 缓冲液(0.1mol/L NaCl; 10mmol/L Tris-HCl pH8.0; 1mmol/L EDTA pH8.0); 加入 4μl RNA 酶 A(10μg/μl)37℃ 孵育 2.5h 后, 再加入 6μl 蛋白酶 K(20μg/μl), 37℃ 孵育 5h; 再用上述方法重复抽提 1 次, 然后用 20 - 50μl TNE 缓冲液溶解, 于紫外分光光度计(DU640 型, Beckman)上定量; 制备 1.2% 琼脂糖凝胶, 取 5μg DNA 电泳(2v/cm)3 - 4h, 最后在紫外灯下观察并摄影。

6. 流式细胞仪检测细胞凋亡率

收集与终浓度为 0.7.5μg/ml ET-18-OCH<sub>3</sub> 共培养 24 小时的细胞。PBS 洗涤后, 加到 Kenesis 50 试剂盒(Bio-Rad)中, 置 18 - 25℃ 暗室孵育 30 分钟后, 于流式细胞仪(FAC-Scan, BD 公司)上进行 DNA content 分析。

7. RT-PCR 检测 bcl-2、c-myc mRNA 表达

收集与 7.5μg/ml ET-18-OCH<sub>3</sub> 共同培养 0、3、6、9、12、24h 的 U266 细胞, 用 RNA 提取液 Trizol(Life Technology)进行总 RNA 提取, 步骤详见说明书。cDNA 的合成按反转录试剂盒(Promega)说明书进行。利用两对特异性引物分别扩增 bcl-2 和 c-myc 基因, 同时以 β-actin 作为内参照, 引物序列和扩增片段长度参数见表 1。PCR 产物以 2% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶图像分析仪(Gel Doc 1000 型 Bio-Rad)分析, 计算目的基因与 β-actin 荧光强度的比值。

8. 流式细胞仪检测 Bcl-2、C-myc 蛋白的表达

收集与终浓度为 0.7.5μg/ml 的 ET-18-OCH<sub>3</sub> 共孵育 24h 的 U266 细胞, PBS 洗涤后。均分别加入抗人 Bcl-2、C-myc 单克隆抗体(Coulter), 4℃ 孵育 0.5h, 再加入等量 FITC 标记的兔抗鼠(二抗, Coulter), 继续作用 0.5h, 经流式细胞仪(FACScan, BD)检测 U266 细胞 Bcl-2、C-myc 蛋白的表达率。

9. 数据处理

利用 SPSS 10.0 软件包进行单因素方差分析, 显著性水准 α 为 0.05。

表 1 RT-PCR 扩增的引物序列

引物	PCR 扩增的引物序列	扩增片段长度 (bp)	退火温度 (℃)
β-actin	a5' GGC ATG GGT CAG AAG GAT TCC 3' b3' ATG TCA CGC ACG ATT TCC CGC 3' a5' CGA CGA CTT CTC CCG CCG CTA CCG C 3'	500	61
bcl-2	b5' CCG CAT GCT GGG GCC GTA CAG TTC C 3'	318	61
c-myc	a5' AGG TCG CTC TGC TGC TGC T 3' b5' ATG CCC CTC AAC GTT AGC T 3'	119	61

注: a、b 分别代表上、下游引物。

结 果

1. ET-18-OCH<sub>3</sub> 对 U266 细胞增殖的抑制作用

(1) ET-18-OCH<sub>3</sub> 对 U266 细胞的杀伤作用  
ET-18-OCH<sub>3</sub> 对 U266 细胞具有明显的细胞毒作用, 并呈时间和剂量的依赖性(表 2)。

表 2 ET-18-OCH<sub>3</sub> 对 U266 细胞存活率 (%) 的影响

ET-18-OCH <sub>3</sub> (μg/ml)	作用时间 (h)				
	3	6	9	12	24
0	97.5±1.2	97.4±0.7	96.4±1.0	95.9±0.4	95.6±0.4
3.75	93.6±2.2	87.9±1.7*	84.1±2.1*	78.9±2.3*	61.6±3.2*
7.5	80.9±3.0*	73.8±3.8*	67.3±2.9*	51.5±1.7*	37.7±2.9*
10	62.8±2.0*	54.3±2.2*	48.4±2.2*	35.0±4.0*	22.6±2.1*
15	53.9±2.4*	41.8±1.5*	31.4±3.4*	15.4±4.0*	4.9±2.7*
20	40.1±3.1*	29.0±4.4*	19.6±2.4*	8.8±1.3*	0±0*

注: \* 表示与对照组比较有差别(P<0.05)。

(2) ET-18-OCH<sub>3</sub> 对 U266 细胞集落形成能力的抑制作用  
ET-18-OCH<sub>3</sub> 可抑制 U266 细胞集

落的形成, 并呈时间和剂量依赖性(表 3)。

表 3 ET-18-OCH<sub>3</sub> 对 U266 细胞集落形成能力的影响

ET-18-OCH <sub>3</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )	集落/ $10^2$ cells			
	4h	8h	12h	24h
0	57.0 $\pm$ 2.6(100)	62.0 $\pm$ 5.5(100)	67.3 $\pm$ 4.2(100)	69.7 $\pm$ 3.5(100)
3.75	51.0 $\pm$ 4.6(90.7)	46.3 $\pm$ 4.0(73.8)*	35.3 $\pm$ 3.5(52.4)*	26.3 $\pm$ 2.0(37.7)*
7.5	33.7 $\pm$ 5.5(59.1)*	23.7 $\pm$ 3.0(37.8)*	9.3 $\pm$ 2.5(13.8)*	0 $\pm$ 0(0)*
15	11.0 $\pm$ 2.0(19.3)*	6.7 $\pm$ 2.5(10.7)*	0 $\pm$ 0(0)*	0 $\pm$ 0(0)*

注: \* 与对照组比较有差别( $P < 0.05$ ), 括号内数字为集落存活分数(S),  $S = \text{实验组集落形成率} / \text{对照组集落形成率} \times 100\%$ 。

## 2. ET-18-OCH<sub>3</sub> 对 U266 细胞凋亡的诱导作用

(1) 形态学观察 荧光显微镜下, 与 7.5 $\mu\text{g/ml}$  ET-18-OCH<sub>3</sub> 共同孵育 3h、6h 时仅偶见凋亡细胞( $P > 0.05$ )。当孵育 9h 时, 可见一定数量的胞核或胞浆呈致密浓染的黄绿色荧光的凋亡细胞。9h、12h、24h 凋亡率分别为 8.3 $\pm$ 3.5%、15.8 $\pm$ 4.5% 及 21.7 $\pm$ 3.2% ( $P < 0.05$ )。

电镜下, 对照组细胞显示正常的细胞结构, 核膜完整, 染色质均匀(图 1A)。而 7.5 $\mu\text{g/ml}$  ET-18-

OCH<sub>3</sub> 作用 24h 后, 部分细胞出现典型的凋亡特征: 细胞胞体变小, 染色质浓缩, 并凝聚于核膜周边, 有的细胞核裂解为多块, 个别细胞可见胞质块向表面芽生, 但未见凋亡小体(图 1B)。

(2) 片段化 DNA 的形成 电泳结果显示, 7.5 $\mu\text{g/ml}$  ET-18-OCH<sub>3</sub> 作用 24h 的 U266 细胞出现典型的“梯状”条带(DNA ladder), 而对照组和其余各时间组均未出现此降解片段(图 2)。

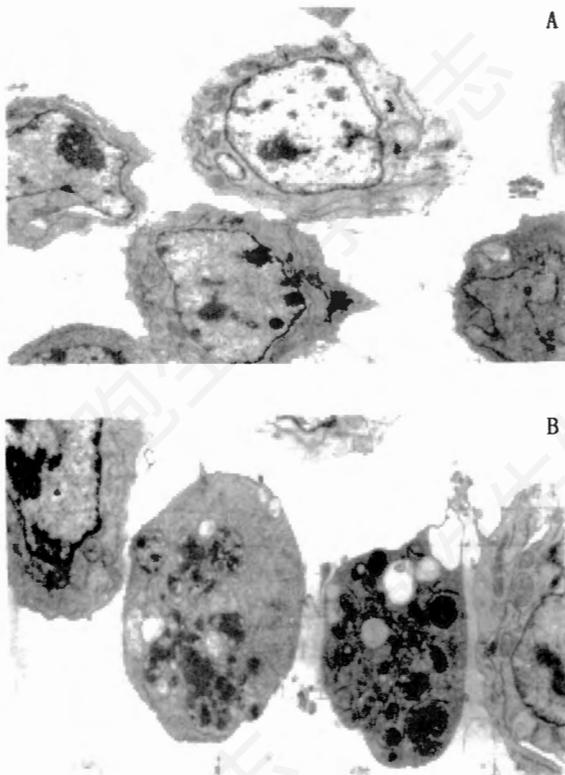


图 1 电镜下观察凋亡的 U266 细胞

A. 对照组 U266 细胞( $\times 3000$ ), B. 7.5 $\mu\text{g/ml}$  ET-18-OCH<sub>3</sub> 作用 24h 的 U266 细胞( $\times 4800$ )。

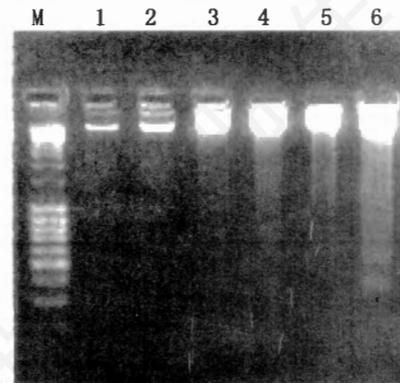


图 2 琼脂糖凝胶电泳观察 DNA 降解片段

M. PCR Marker; 1. 对照组 U266 细胞; 2、3、4、5、6. 7.5 $\mu\text{g/ml}$  ET-18-OCH<sub>3</sub> 作用 3、6、9、12、24h 的 U266 细胞。

(3) 细胞凋亡峰的检出 经流式细胞仪检测, 7.5 $\mu\text{g/ml}$  ET-18-OCH<sub>3</sub> 作用 24h 的 U266 细胞可见明显的凋亡峰(亚二倍体峰), 凋亡率为 17.53%, 而对照组细胞未见凋亡峰(图 3)。

## 3. ET-18-OCH<sub>3</sub> 对 U266 细胞 bcl-2、c-myc mRNA 及蛋白表达的下调作用

(1) RT-PCR 检测 bcl-2、c-myc mRNA 的表达

琼脂糖凝胶电泳图像显示, bcl-2、c-myc 条带亮度均随着 ET-18-OCH<sub>3</sub> 作用时间的增加而减弱。凝胶图像分析仪分析结果表明, bcl-2、c-myc 与  $\beta$ -actin

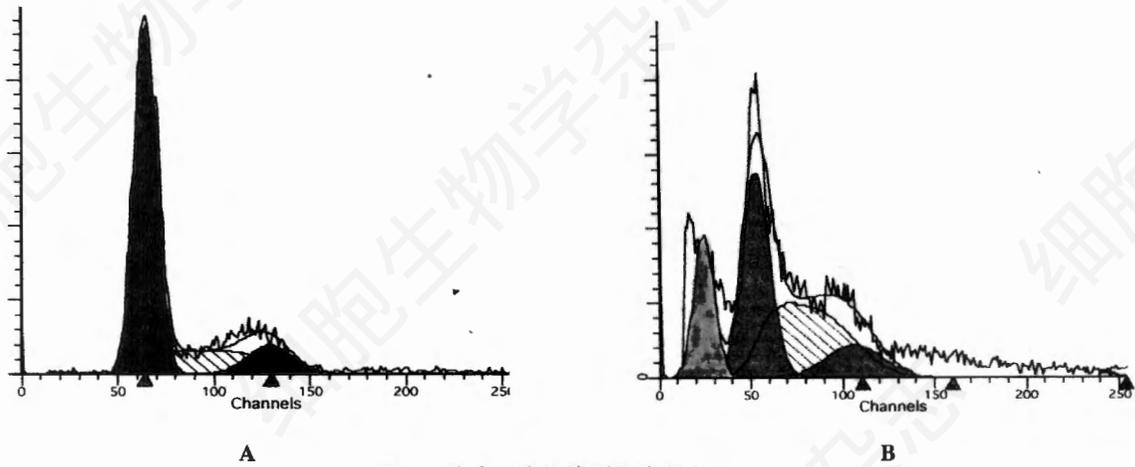


图3 流式细胞仪检测细胞凋亡

A. 对照组 U266 细胞, 凋亡率为 0.08%; B. 7.5 $\mu$ g/ml ET-18-OCH<sub>3</sub> 作用 24h 的 U266 细胞, 凋亡率为 17.53%。

荧光强度比值均有所下降(对照组比值分别为 0.790, 0.674; 作用 24h 后, 下降为 0.113, 0.189, 分别下降了原来的 86%, 72%, 图 4)。

(2) 流式细胞技术检测 Bcl-2、C-myc 蛋白的表达  
流式细胞技术检测结果表明, ET-18-OCH<sub>3</sub>

作用 24h 后, U266 细胞 Bcl-2、C-myc 蛋白的表达均有所下降, 作用 24h 后, 对照组 Bcl-2、C-myc 表达阳性率由原来的 91.26%, 41.51% 分别下降为 76.12%, 16.88%, 下降了原来的 17%, 60% (图 5, 6)。

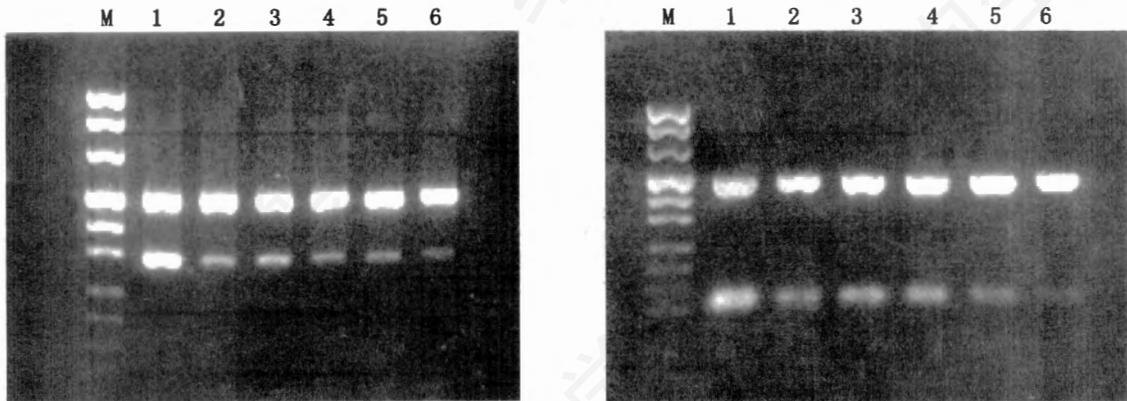


图4 ET-18-OCH<sub>3</sub> 对 U266 细胞 bcl-2(A)、c-myc(B)mRNA 表达的影响

M. PCR Marker(1116, 883, 692, 501, 489, 404, 331, 242, 190, 147, 111, 110bp); 1. 对照组 U266 细胞; 2、3、4、5、6. 7.5 $\mu$ g/ml 的 ET-18-OCH<sub>3</sub> 作用 3、6、9、12、24 小时的 U266 细胞。

### 讨 论

烷化溶血磷脂(ET-18-OCH<sub>3</sub>, ALP)是一种醚脂(ether lipid, EL),其化学结构与 2-溶血磷脂酰胆碱(lysophosphatidyl choline, LPC)相似。ALP 对肿瘤细胞具有直接杀伤作用,是新一类的抗肿瘤药物<sup>[1]</sup>。本实验观察结果表明:ET-18-OCH<sub>3</sub> 不仅对多发性骨髓瘤 U266 细胞具有明显的细胞毒作用,

还可抑制 U266 细胞集落的形成,作用呈时间和剂量依赖性。

关于 ET-18-OCH<sub>3</sub> 确切的抗肿瘤机制目前尚未完全阐明,已有研究发现,ALP 主要是通过影响细胞膜的物理特性,干扰细胞膜磷脂的生物合成与代谢<sup>[2]</sup>,使细胞的信号传递受阻,最终导致细胞增殖受抑或死亡。近年来的研究认为肿瘤的发生是细胞群体凋亡和增殖不平衡所致,因此诱导肿瘤细胞发生凋亡在肿瘤治疗中具有重要意义。有研究发现,

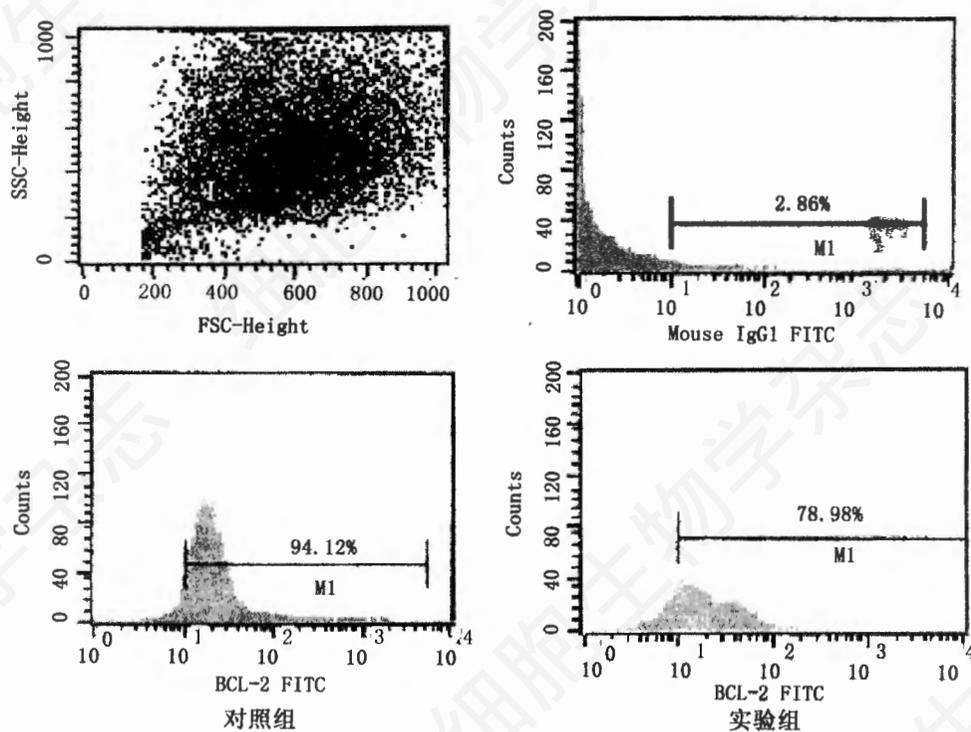


图5 ET-18-OCH<sub>3</sub>对U266细胞Bcl-2蛋白表达的影响

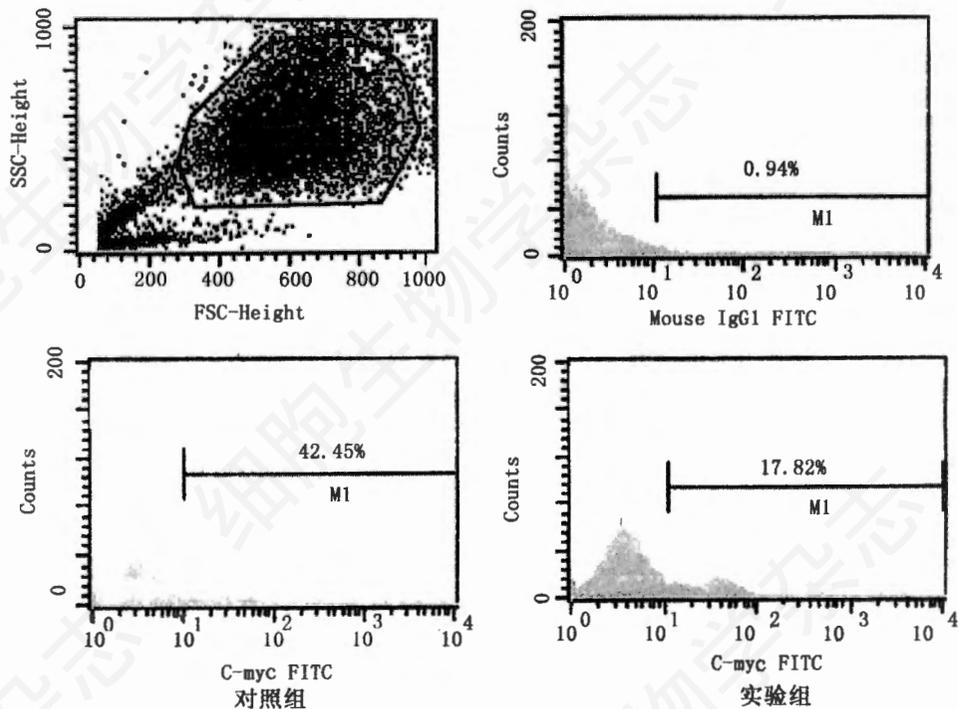


图6 ET-18-OCH<sub>3</sub>对U266细胞C-myc蛋白表达的影响

ET-18-OCH<sub>3</sub> 也可通过诱导细胞凋亡而杀死肿瘤细胞<sup>[3,4]</sup>。本实验将 7.5 μg/ml ET-18-OCH<sub>3</sub> 与 U266 细胞共同作用,结果发现无论是通过形态学观察, DNA 琼脂糖凝胶电泳还是 DNA 倍体分析等多种方法均证实,经 ET-18-OCH<sub>3</sub> 处理过的 U266 细胞具备凋亡的形态学和生化特征,且随着 ET-18-OCH<sub>3</sub> 作用时间的延长,细胞凋亡率有明显的升高,表现出时效关系。

在参与调控细胞凋亡的人体基因中, bcl-2 和 c-myc 是近年来发现的与凋亡关系密切的癌基因。它们的异常表达存在于多发性骨髓瘤等造血系统恶性肿瘤中<sup>[5]</sup>。 bcl-2 基因是细胞凋亡的抑制基因。而 c-myc 则具有双重的作用,它既可促进细胞增殖又可促进细胞的凋亡,这种相互对立的作用取决于是否存在生长因子。因此我们设想 ET-18-OCH<sub>3</sub> 可能通过影响 bcl-2 和 c-myc 的表达来诱导 U266 细胞的凋亡。我们的实验结果发现,经 ET-18-OCH<sub>3</sub> 处理过的 U266 细胞,其 bcl-2、c-myc 的 mRNA 水平及蛋白表达率均有所下降。然而 Mollinedo 等<sup>[4]</sup>以 HL-60 细胞为研究对象,结果却发现 ET-18-OCH<sub>3</sub>

并不影响 HL-60 细胞 bcl-2 mRNA 的表达,而是通过上调 c-myc mRNA 的表达来诱导 HL-60 细胞发生凋亡。对此我们认为很可能与所选择的细胞系不同有关。我们所用的细胞系为多发性骨髓瘤细胞系 U266,其可自分泌细胞因子 IL-6<sup>[6]</sup>,从而影响 bcl-2 及 c-myc 的表达。

总之,ET-18-OCH<sub>3</sub> 可有效地杀伤 U266 细胞,并可通过下调 bcl-2、c-myc mRNA 及蛋白的表达,诱导 U266 细胞发生凋亡,有显著的抗肿瘤效应及潜在的临床应用前景。

#### 参 考 文 献

- [1] Houlihan WJ, et al., 1995, *Med Res Rev.*, 15: 157 - 223.
- [2] Boggs KP, et al., 1995, *J Biol Chem.*, 270: 11612 - 11618.
- [3] Diomedea L, et al., 1994, *Int J Cancer.*, 57: 645 - 649.
- [4] Mollinedo F, et al., 1997, *Cancer Res.*, 57: 1320 - 1328.
- [5] Kastrinakis NG, et al., 2000, *Ann Oncol.*, 11: 1217 - 1228.
- [6] Schwab G, et al., 1991, *Blood.*, 77(3): 587 - 593.

## THE EFFECT OF ALKYL-LYSOPHOSPHOLIPID (ET-18-OCH<sub>3</sub>) ON U266 CELLS

HUANG Chun Ling\* CHEN Zhi Zhe CHEN Jun Min WANG Shao Yuan LIU Ting Bo YANG Ting  
(Union Hospital affiliated to Fujian Medical University, Fujian Institute of Hematology, Fuzhou 350001 China)

**ABSTRACT** To study the anti-tumor effects of alkyl-lysophospholipid ET-18-OCH<sub>3</sub> (ALP) on U266 cells. The antiproliferative activity of ET-18-OCH<sub>3</sub> was measured by the inhibitory rate and colony formation assays of U266 cells during the incubation with ET-18-OCH<sub>3</sub>. The effect of ET-18-OCH<sub>3</sub> in apoptosis induction was determined by the observation of morphology, agarose gel electrophoresis, and flow cytometry. The expression of bcl-2、c-myc mRNA and proteins were detected by RT-PCR and flow cytometry in order to understand the mechanism of apoptosis induction. Results showed that ET-18-OCH<sub>3</sub> owned significant cytotoxicity on U266 cells and inhibitory effect on colonies formation. These effects were time- and dose-dependent. ET-18-OCH<sub>3</sub> could also induce time-dependent apoptosis, which was confirmed by morphology characteristics and DNA fragments ladder on electrophoretogram. The apoptosis rate in flow cytometry was 17.53%, with no apoptotic cells found in control. RT-PCR showed bcl-2 and c-myc mRNA decreased by 86% and 72% respectively after U266 cells were incubated with ET-18-OCH<sub>3</sub> for 24h. In the mean time, the percentage of bcl-2、C-myc positive cell decreased by 17% and 60%, respectively. These results suggest that ET-18-OCH<sub>3</sub> has significant inhibitory effect on growth of U266 cells, possibly due to its apoptosis induction in U266 cells.

**Key words:** Alkyl-lysophospholipid U266 cell line Multiple myeloma

\* Corresponding author. E-mail: hcl-helen@sina.com