

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.10.016

苦参碱对多发性骨髓瘤细胞凋亡及泛素蛋白酶体通路的影响

吴迪炯¹, 徐瑾玉², 叶宝东¹, 俞庆宏¹, 高雁婷¹, 刘文宾¹, 周郁鸿^{*}

(1. 浙江中医药大学第一临床医学院, 浙江省杭州市上城区邮电路 54 号, 310006; 2. 常州市武进中医医院)

摘要 目的 观察苦参碱对多发性骨髓瘤细胞株凋亡的影响及可能作用机制。方法 以不同浓度的苦参碱 (0.25、0.5、1.0、2.0 mg/ml) 作用于人多发性骨髓瘤细胞株 RPMI 8226 和 U266, 另设蛋白酶体抑制剂 MG132 为阳性对照。采用 MTT 法测定苦参碱对两种细胞增殖的抑制率, 流式细胞仪检测两种细胞的早期凋亡水平, Western-blot 法检测两细胞株泛素 (Ub)、20S 核心颗粒 (pAb) 以及 NF- κ B 信号通路相关蛋白 (p-NF- κ B p65B、I κ B α 、p-I κ B α 、IKK α) 表达变化。结果 在同等浓度苦参碱作用下, 两细胞株细胞在 48 h 的增殖抑制率较本浓度 24 h 时明显增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。随着苦参碱浓度的递增, 各细胞株的凋亡率均逐渐增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。随着苦参碱作用浓度的递增, RPMI 8226 细胞 Ub 水平明显上调, 同时 pAb 呈进行性下降; 而 U266 细胞 Ub 表达无明显变化, 但 pAb 水平同样表达下降。苦参碱能明显抑制两细胞株核内 p-NF- κ B p65B 以及胞浆内 p-I κ B α 蛋白表达水平, 上调 RPMI 8226 胞浆内 I κ B α 表达, 且以浓度为 2.0 mg/ml 时作用最明显 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 苦参碱能促进多发性骨髓瘤细胞的凋亡, 并且有一定的浓度时间依赖性, 其中的关键因素可能是苦参碱具有抑制蛋白酶体活性的作用。

关键词 多发性骨髓瘤; 苦参碱; 细胞凋亡; 泛素; 蛋白酶体

多发性骨髓瘤是浆细胞恶性克隆性疾病, 临床可表现有骨痛、贫血、肾功能不全和感染等症状, 中位发病年龄约 61 岁^[1]。以硼替佐米为主联合化疗方案的应用, 大大改善了疾病的预后, 5 年生存率已由 1975 年的 25% 提高到了目前的 46%^[2]。然而, 应用硼替佐米所带来的经济负担以及不可逆转的外周神经毒性^[3-4], 仍是影响部分患者维持巩固治疗的重要因素。中医药及中药单体成分在抗肿瘤方面具有一定的作用^[5-6], 我们前期的研究证实了苦参碱注射液具有促进多发性骨髓瘤细胞株凋亡的作用, 可能与其上调 Caspase-3、PARP、Bim 活性, 同时下调 Bcl-2、survivin、AKT 等抗凋亡蛋白的表达有关^[7]。本研究进一步探讨苦参碱的促凋亡作用及其对泛素蛋白酶体通路的影响。

1 材料和方法

1.1 细胞系及细胞培养

人多发性骨髓瘤细胞株 RPMI 8226 和 U266,

由浙江大学血液病研究所馈赠。将 RPMI 8226、U266 细胞接种于含 10% 胎牛血清、青霉素 100 U/ml 和链霉素 100 μ g/ml 的 RPMI 1640 培养液中, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养, 每 2 ~ 3 天换液 1 次。待长满 80% ~ 90% 后, 充分吹打混匀后在倒置显微镜下进行细胞计数, 按照密度为 1×10^6 /ml 传代接种于新的培养瓶内。取对数生长期的细胞进行实验。

1.2 药物、试剂及仪器

苦参碱注射液 (泽朗医药科技有限公司, 纯度 98%, 批号: 20150355); 蛋白酶体抑制剂 MG132 (美国 Sigma 公司, 批号: M7449); AnnexinV-PI 凋亡试剂盒 (铂优生物技术有限公司, 批号: 501051); 胞核-胞浆蛋白制备试剂盒 (普利莱基因技术有限公司, 批号: P1200); 泛素 (Ub)、20S 核心颗粒 (pAb) (美国 Abcam 公司, 批号: ab134953); 核纤层蛋白 B (Lamin-B) 抗体 (美国 CST 公司, 批号: 12987-1-AP); 核因子 κ B (NF- κ B) 通路检测采样盒 (美国 CST 公司, 批号: 9936); MTT (美国 Sigma 公司, 批号: M2128); 二甲基亚砜 (美国 sigma 公司, 批号:

基金项目: 国家自然科学基金 (81503296); 浙江省自然科学基金 (LY14H290001); 浙江省中医药优秀青年人才基金计划 (2013ZQ012)

* 通讯作者: zyhblood@163.com, (0571) 86620325

RNBD6895)。倒置生物显微镜 (COIC 公司, 型号 XPS-18); 生化培养箱 (Thermo 公司, 型号 MIP-150); 流式细胞仪 (美国 BeckMan 公司, 型号 FC500MCL); 多功能全波长酶标仪系统 (Thermo 公司, 型号 MultiskanGO)。

1.3 MTT 法检测苦参碱对细胞增殖的抑制率

取对数生长期的 RPMI 8226、U266 细胞, 按 5×10^4 /ml 细胞密度接种于 96 孔板。加入不同浓度的苦参碱 (终浓度 0.25、0.5、1.0、2.0 mg/ml), 培养体系总体积为 200 μ l。对照组只加入等体积的培养基不加药物, 同时设置仅有培养基 (无细胞) 的空白组。每组设置 3 个复孔, 5% CO₂、37℃ 的恒温培养箱分别孵育 24、48 h 后, 加入 MTT (5 mg/ml) 20 μ l, 相同条件下继续孵育 4 h 后, 弃去各孔内液体, 每孔加入 150 μ l 二甲基亚砷, 置振荡器上振荡 10 min 至细胞内和周围的紫色颗粒充分溶解, 室温放置数分钟, 于自动酶标仪上测定 570 nm 处吸光度 (A) 值。重复 3 次试验, 取平均值, 计算细胞抑制率, 抑制率 (%) = $1 - (A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。同时确定各组细胞抑制率为 50% 的浓度, 即 IC₅₀ 值。

1.4 流式细胞仪检测苦参碱对细胞早期凋亡的影响

取对数生长期的细胞, 用 RPMI 1640 重悬后, 计数板计数细胞, 调整细胞数为 7.5×10^4 个/ml, 分设药物浓度为 0、0.25、0.5、1、2 mg/ml 组, 接种于 6 孔板, 每孔总体积为 2 ml。将 6 孔板置于 37℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养 24 h 后, 收集细胞。按 AnnexinV-PI 凋亡试剂盒步骤操作: 各组细胞用 PBS 洗涤 2 遍, 弃去上清, 将细胞沉淀重悬于 $1 \times$ Binding Buffer, 调整细胞至 1×10^6 个/ml, 吸取 300 μ l, 加 AnnexinV-FITC 5 μ l, PI 5 μ l, 轻轻混匀, 室温下避光孵育 15 min, 1 h 之内用流式细胞仪检测凋亡率。

1.5 Western-blot 法检测苦参碱对泛素蛋白酶体系统相关蛋白的影响

分别将 0、0.5、1.0、2.0 mg/ml 苦参碱及 5 μ mol/L MG132 作用于 RPMI 8226 细胞和 U266 细胞 24 h 后, 提取细胞总蛋白, 经 BCA 法定量蛋白, 按 200 μ g 总蛋白量上样, 经 SDS-PAGE 电泳后, 转移到硝酸纤维素膜上, 100 g/L 脱脂奶粉 4℃ 封闭过夜, 室温下与 Ub、pAb 单抗反应 2 h。辣根过氧化物酶标记的二抗反应 1 h, 充分洗膜后化学增强发光。

1.6 Western-blot 法检测苦参碱对 NF- κ B 信号通路相关蛋白的影响

分别将 0、0.5、1.0、2.0 mg/ml 苦参碱及 5 μ mol/L MG132 作用于 RPMI 8226 细胞和 U266 细胞 24 h 后, 采用胞核-胞浆蛋白制备试剂盒分别提取胞核及胞浆蛋白。其中, 核蛋白用于检测 p-NF- κ B p65B, 胞浆蛋白用于检测 I κ B α 、p-I κ B α 及 IKK α 蛋白表达水平的变化, 参考 NF- κ B 通路采样盒说明书, 蛋白灰度半定量分析采用 Image J 1.46 r 软件。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件。不同浓度间均数比较采用配对样本 *t* 检验, 对正态分布数据采用单因素方差分析; 非正态分布数据采用非参数检验, 多组间比较用 Kruskal-Wallis *H* 检验, 两两比较用 Mann-Whitney *U* 检验。

2 结果

2.1 不同浓度苦参碱对 RPMI 8226、U266 细胞增殖的抑制率比较

苦参碱对 RPMI 8226 细胞 IC₅₀ 值为 2.25 mg/ml (24 h)、1.64 mg/ml (48 h); 对 U266 细胞 IC₅₀ 值为 2.18 mg/ml (24 h)、1.58 mg/ml (48 h)。表 1 示, 在同等浓度苦参碱作用下, 两细胞株细胞在 48 h 的增殖抑制率较本浓度 24 h 时明显增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。在同浓度同一时间点比较, 0.25、0.5、2 mg/ml 苦参碱在 24 h 时对 U266 细胞增殖的抑制率高于 RPMI 8226 细胞 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 0.25 mg/ml 苦参碱在 48 h 时对 U266 细胞增殖的抑制率亦高于 RPMI 8226 细胞 ($P < 0.05$)。

表 1 不同浓度苦参碱在不同时间对 RPMI 8226、U266 细胞增殖的抑制率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

浓度 (mg/ml)	作用时间	样本数	RPMI 8226 细胞	U266 细胞
0	24 h	3	0	0
	48 h	3	0	0
0.25	24 h	3	10.5 $\pm$ 1.2	15.1 $\pm$ 1.8 ^{$\Delta\Delta$}
	48 h	3	16.7 $\pm$ 2.2 [*]	20.7 $\pm$ 2.2 ^{*Δ}
0.5	24 h	3	17.9 $\pm$ 3.4	23.0 $\pm$ 6.7 ^{Δ}
	48 h	3	23.2 $\pm$ 3.1 [*]	27.2 $\pm$ 3.4 [*]
1	24 h	3	25.6 $\pm$ 4.1	29.8 $\pm$ 1.7
	48 h	3	34.7 $\pm$ 3.8 ^{**}	35.7 $\pm$ 3.1 [*]
2	24 h	3	40.4 $\pm$ 2.5	48.1 $\pm$ 1.0 ^{$\Delta\Delta$}
	48 h	3	62.5 $\pm$ 3.5 ^{**}	63.4 $\pm$ 1.5 ^{**}

注: 与本浓度 24 h 比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 RPMI 8226 细胞同浓度同时间点比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

2.2 不同浓度苦参碱作用 24 h 时 RPMI 8226、U226 细胞早期凋亡率比较

终浓度为 0、0.25、0.5、1.0、2.0 mg/ml 的苦参碱作用于 RPMI 8226 细胞 24 h 后, 早期凋亡率分别为 (1.7 ± 0.61)%、(4.9 ± 1.03)%、(11.4 ± 0.69)%、(18.5 ± 3.61)%、(30.8 ± 2.01)%; 相应终浓度的苦参碱作用于 U226 细胞 24 h 后, 早期凋亡率分别为 (4.7 ± 2.33)%、(9.6 ± 2.65)%、(14.9 ± 0.21)%、(24.2 ± 0.77)%、(30.4 ± 0.42)%。随着苦参碱浓度的递增, 各细胞株的凋亡率均逐渐增加, 差异具有统计意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 在浓度为 0、0.25、0.5、1.0 mg/ml 的苦参碱作用下, U226 细胞凋亡率显著高于 RPMI 8226 细胞 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.3 不同浓度苦参碱作用 24 h 时 RPMI 8226、U226 细胞泛素蛋白酶体系统相关蛋白表达比较

图 1 示, 随着苦参碱作用浓度的递增, RPMI 8226 细胞 Ub 水平明显上调, 同时 pAb 呈进行性下降; 而 U226 细胞 Ub 表达无明显变化, 但 pAb 水平同样表达下降。MG132 作用后, 两细胞株均表现为 Ub 表达上调, pAb 表达下降。

2.4 不同浓度苦参碱作用 24 h 时 RPMI 8226、U226 细胞 NF-κB 信号通路相关蛋白表达比较

表 2、表 3 示, 与苦参碱组 0 mg/ml 比较, 苦参碱组在 2 mg/ml 时能下调 RPMI 8226、U226 细胞中 p-NF-κB p65B 蛋白表达, 苦参碱组在 0.5、1、2 mg/ml 时亦能下调 RPMI 8226、U226 细胞 p-IκBα 蛋白表达 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 苦参碱组在 1、2 mg/ml 时能上调 RPMI 8226、U226 细胞 Lamin-B、IκBα 蛋白表达 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); MG132 组能下调 RPMI 8226、U226 细胞 p-NF-κB p65B、p-IκBα、IKKα 蛋白表达, 上调 RPMI 8226、U226 细胞 IκBα 蛋白表达 ($P < 0.01$)。与 MG132 组比较, 苦参碱组在 0.5、1 mg/ml 时 RPMI 8226 细胞中 p-NF-κB p65B、p-IκBα、IKKα 蛋白表达明显升高, IκBα 蛋白表达明显下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 苦参碱组在 0.5、1、2 mg/ml 时 U226 细胞中 p-NF-κB p65B、IKKα 蛋白表达明显升高, IκBα 蛋白明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 苦参碱在 1 mg/ml 时 U226 细胞中 Lamin-B、p-IκBα 蛋白表达亦高于 MG132 组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

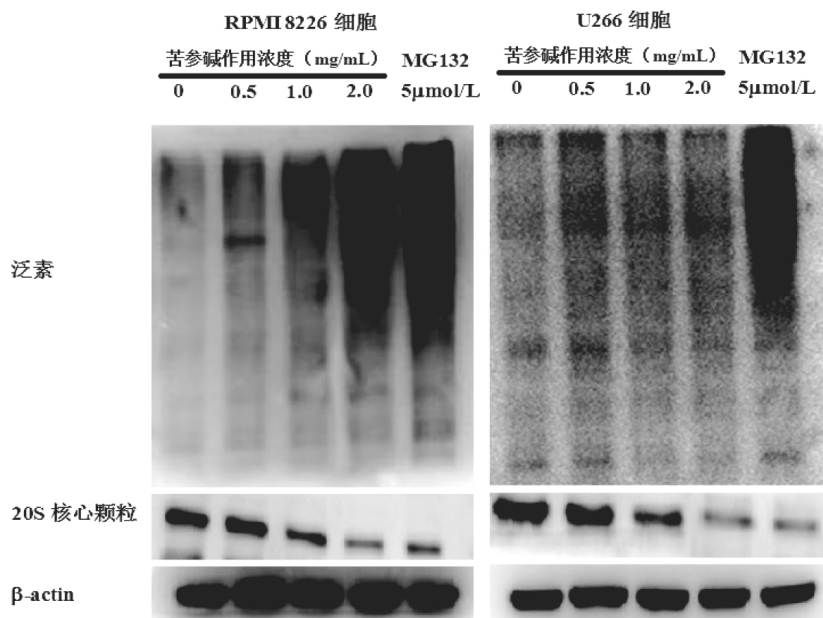


图 1 不同浓度苦参碱及 MG132 作用 24 h 后 RPMI 8226、U226 细胞中泛素、20S 核心颗粒电泳图

表 2 各组 RPMI 8226 细胞中 p-NF-κB p65B、Lamin-B、IκBα、p-IκBα 及 IKKα 蛋白表达比较 (/β-actin, $\bar{x} \pm s$)

组别	浓度	样本数	p-NF-κB p65B	Lamin-B	IκBα	p-IκBα	IKKα
苦参碱组	0 mg/ml	3	1.013 ± 0.011	0.923 ± 0.007	0.823 ± 0.013	0.796 ± 0.011	0.931 ± 0.012
	0.5 mg/ml	3	1.004 ± 0.008 ^{△△}	0.963 ± 0.012	0.941 ± 0.011 ^{**△△}	0.708 ± 0.009 ^{*△△}	0.947 ± 0.014 ^{△△}
	1 mg/ml	3	1.032 ± 0.010 ^{△△}	1.000 ± 0.018 [*]	0.960 ± 0.016 ^{**△}	0.626 ± 0.010 ^{**△△}	0.961 ± 0.018 ^{△△}
	2 mg/ml	3	0.844 ± 0.007 ^{**}	0.994 ± 0.011 [*]	1.009 ± 0.006 ^{**}	0.407 ± 0.006 ^{**}	0.937 ± 0.012 ^{△△}
MG132 组	5 mol/L	3	0.859 ± 0.012 ^{**}	0.960 ± 0.015 [*]	1.029 ± 0.012 ^{**}	0.416 ± 0.008 ^{**}	0.752 ± 0.010 ^{**}

注: 与苦参碱组 0 mg/ml 比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 MG132 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

表 3 各组 U226 细胞中 p-NF- κ B p65B、Lamin-B、I κ B α 、p-I κ B α 及 IKK α 蛋白表达比较 (/ β -actin, $\bar{x} \pm s$)

组别	浓度	样本数	p-NF- κ B p65B	Lamin-B	I κ B α	p-I κ B α	IKK α
苦参碱组	0 mg/ml	3	1.070 $\pm$ 0.012	1.042 $\pm$ 0.014	0.725 $\pm$ 0.07	1.075 $\pm$ 0.013	0.939 $\pm$ 0.020
	0.5 mg/ml	3	1.040 $\pm$ 0.017 $^{\Delta\Delta}$	1.053 $\pm$ 0.011	0.728 $\pm$ 0.010 $^{\Delta\Delta}$	1.025 $\pm$ 0.012 $^{*\Delta}$	0.909 $\pm$ 0.018 $^{\Delta\Delta}$
	1 mg/ml	3	1.020 $\pm$ 0.011 $^{*\Delta\Delta}$	1.080 $\pm$ 0.008 $^{*\Delta\Delta}$	0.827 $\pm$ 0.017 $^{**\Delta\Delta}$	1.039 $\pm$ 0.018 $^{*\Delta}$	0.921 $\pm$ 0.010 $^{\Delta\Delta}$
	2 mg/ml	3	0.944 $\pm$ 0.009 $^{**\Delta}$	1.074 $\pm$ 0.013 $^{*\Delta\Delta}$	0.824 $\pm$ 0.012 $^{**\Delta\Delta}$	0.896 $\pm$ 0.009 **	0.955 $\pm$ 0.011 $^{\Delta\Delta}$
MG132 组	5 mol/L	3	0.867 $\pm$ 0.010 **	1.021 $\pm$ 0.012	0.921 $\pm$ 0.007 **	0.803 $\pm$ 0.012 **	0.820 $\pm$ 0.013 **

注: 与苦参碱组 0 mg/ml 比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 MG132 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

3 讨论

多发性骨髓瘤细胞的克隆增殖受多种因素调控, 其中 NF- κ B 信号通路的异常起着关键性作用^[8-9]。在静息状态下, NF- κ B 与其抑制蛋白 I κ B 结合形成三聚体, 以非活性状态存在于胞浆中; 当细胞受到各种胞内外刺激后, I κ B 激酶 (IKK) 被激活, 从而导致 I κ B 蛋白磷酸化 (p-I κ B)、泛素化, 进而 I κ B 蛋白被蛋白酶体降解, NF- κ B 二聚体得到释放; 游离的 NF- κ B 二聚体通过各种翻译后的修饰作用而被进一步激活, 并转移到细胞核中, 进一步调节其下游调控基因的转录和表达^[10]。泛素蛋白酶体途径是真核细胞内蛋白质选择性降解的重要途径, 由泛素、泛素活化酶、泛素结合酶、泛素蛋白连接酶、26S 蛋白酶体和泛素解离酶组成。26S 蛋白酶体由 20S 核心蛋白酶和 19S 调节颗粒构成, 主要负责泛素化蛋白质的降解^[11]。蛋白酶体抑制剂 MG132 能与 20S 和 26S 蛋白酶体结合并使其失活, 从而阻断蛋白降解过程^[12]。硼替佐米的主要作用靶点就是 26S 蛋白酶体, 能促使 NF- κ B 停留在细胞质内, 功能受抑制, 失去抗凋亡效应和刺激细胞增生作用^[8]。

苦参, 性苦寒, 《神农本草经》谓其“主心腹结气, 癥瘕积聚, 黄疸, 溺有余沥, 逐水, 除瘤肿, 补中, 明目止泪”, 具有清热燥湿、杀虫、利尿的功效, 临床应用较为广泛。苦参碱为苦参主要有效成份之一, 现代研究显示其在治疗慢性肝病、保护心血管、抗病毒、抗肿瘤等方面具有积极的作用, 亦被用于恶性血液系统疾病的化疗辅助^[13-14]。我们的前期结果显示, 苦参碱具有抑制骨髓瘤细胞增殖, 诱导凋亡的作用^[15]。本研究结果显示, 随着苦参碱作用浓度的递增, RPMI 8226、U226 细胞增殖抑制率增加, 同时伴有早期凋亡水平的提高, 在一定程度上呈浓度和时间依赖性。苦参碱能下调两细胞株 pAb 的表达, 呈剂量依赖性, 在浓度达到 2 mg/ml 时, pAb 的抑制程度几乎与阳性对照 MG132 相当, 并能使 RPMI 8226 细胞内泛素化蛋

白明显累积。此外, 苦参碱能明显抑制两细胞株 p-NF- κ B p65B、p-I κ B α 蛋白的表达, 同时上调 I κ B α 的表达, 并且在苦参碱浓度达到 2 mg/ml 时在 RPMI 8226 细胞中与 MG132 疗效相当。此外, 苦参碱还能上调两细胞株凋亡关键蛋白 Caspase3 的作用靶点 Lamin-B, 而 MG132 则只能上调 RPMI 8226 细胞中的表达。因此, 苦参碱的抗骨髓瘤细胞作用与其促进肿瘤细胞的凋亡密切相关, 而其中的关键因素可能是苦参碱具有抑制蛋白酶体活性的作用, 而关于苦参碱是否能协同蛋白酶体抑制剂发挥作用, 是否能逆转骨髓瘤硼替佐米耐药现象是我们今后的研究方向。

参考文献

- [1] KOUROUKIS CT, BALDASSARRE FG, HAYNES AE, et al. Bortezomib in multiple myeloma: a practice guideline [J]. Clin Oncol (R Coll Radiol), 2014, 26(2): 110-119.
- [2] SAN MIGUEL JF, SCHLAG R, KHUAGEVA NK, et al. Persistent overall survival benefit and no increased risk of second malignancies with bortezomib-melphalan-prednisone versus melphalan-prednisone in patients with previously untreated multiple myeloma [J]. J Clin Oncol, 2013, 31(4): 448-455.
- [3] GAULTNEY JG, REDEKOP WK, SONNEVELD P, et al. Novel anticancer agents for multiple myeloma: a review of the evidence for their therapeutic and economic value [J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2012, 12(6): 839-854.
- [4] GILARDINI A, MARMIROLI P, CAVALETTI G. Proteasome inhibition: a promising strategy for treating cancer, but what about neurotoxicity? [J]. Curr Med Chem, 2008, 15(29): 3025-3035.
- [5] WANG H, YANG S, ZHOU H, et al. Alopentine executes antitumor effects against multiple myeloma through dual apoptotic mechanisms [J]. J Hematol Oncol, 2015, 8: 26. doi: 10.1186/s13045-015-0120-x.
- [6] MA Z, OTSUYAMA K, LIU S, et al. Baicalein, a component of Scutellaria radix from Huang-Lian-Jie-Du-Tang (HLJDT), leads to suppression of proliferation and induction of apoptosis in human myeloma cells [J]. Blood,

- 2005, 105(8): 3312-3318.
- [7] YU Q, CHEN B, ZHANG X, et al. Arsenic trioxide-enhanced, matrine-induced apoptosis in multiple myeloma cell lines [J]. *Planta Med*, 2013, 79(9): 775-781.
- [8] FUCHS O. Targeting of NF-kappaB signaling pathway, other signaling pathways and epigenetics in therapy of multiple myeloma [J]. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*, 2013, 13(1): 16-34.
- [9] LEE C, OH JI, PARK J, et al. TNF α mediated IL-6 secretion is regulated by JAK/STAT pathway but not by MEK phosphorylation and AKT phosphorylation in U266 multiple myeloma cells [J]. *Biomed Res Int*, 2013; 580135. doi: 10.1155/2013/580135.
- [10] ZHANG X, ZHU C, WU D, et al. Possible role of toll-like receptor 4 in acute pancreatitis [J]. *Pancreas*, 2010, 39(6): 819-824.
- [1] 刘婷婷, 吴迪炯, 叶宝东, 等. 泛素蛋白酶体途径在急性早幼粒细胞白血病中作用的研究进展 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2014, 22(1): 232-236.
- [2] CRAWFORD LJ, WALKER B, OVAA H, et al. Comparative selectivity and specificity of the proteasome inhibitors BzLLCOCHO, PS-341, and MG-132 [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(12): 6379-6386.
- [3] 张静涛, 王伟, 段振华. 苦参碱类生物碱的应用进展 [J]. *现代生物医学进展*, 2007, 7(3): 451-454.
- [4] 吴迪炯, 邵科钉, 孙洁, 等. 苦参碱在恶性血液系统疾病中的应用及机制研究进展 [J]. *临床血液学杂志*, 2012, 25(7): 469-471.
- [5] 罗培, 周郁鸿. 苦参碱对多发性骨髓瘤细胞的体外作用机制研究 [J]. *浙江中西医结合杂志*, 2012, 22(10): 758-761.

Impact of Matrine on Apoptosis of Multiple Myeloma and Ubiquitin-proteasome Pathway

WU Dijiong¹, XU Jinyu², YE Baodong¹, YU Qinghong¹, GAO Yanting¹, LIU Wenbin¹, ZHOU Yuhong¹

(1. First Clinical Medical College, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou, 310006; 2. Chinese Medical Hospital of Wujin, Changzhou)

ABSTRACT Objective To observe the impact of matrine on apoptosis of multiple myeloma and the possible mechanism. **Methods** Human multiple myeloma cell lines RPMI 8226 and U266 were given matrine in different concentration (0. 25, 0. 5, 1. 0, or 2. 0 mg/ml). Proteasome inhibitor MG132 was set to be positive control. The inhibition rate of matrine to multiplication of two types of cells was determined adopting methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method. Early apoptosis level of two types of cells was detected by flow cytometry. Expression changes of ubiquitin (Ub), 20S core particle (pAb) and NF- κ B signaling pathway related proteins (p-NF- κ B p65B, I κ B α , p-I κ B α , IKK α) of two cell lines were detected with Western-blot method. **Results** Under the action of matrine in the same concentration, the inhibitory rate of cell proliferation of two cell lines at the 48th hour was much higher than that at the 24th hour ($P < 0. 05$ or $P < 0. 01$). With the increasing of matrine concentration, the apoptosis rate of all cell lines increased gradually ($P < 0. 05$ or $P < 0. 01$). With the increasing of matrine effective concentration, Ub level in RPMI 8226 cells up-regulated and pAb decreased progressively. While Ub expression did not change obviously, but pAb expression decreased in U266 cells. Matrine might inhibit the expressions of p-NF- κ B p65B inside cell nucleus and p-I κ B α inside cytoplasm and up-regulate the expression of I κ B α inside RPMI 8226 cytoplasm in two cell lines, especially when the concentration was 2. 0 mg/ml ($P < 0. 5$ or $P < 0. 01$). **Conclusion** Matrine might promote apoptosis of multiple myeloma cells with some concentration-time dependence. The critical factor might be that matrine inhibits the activity of proteasome.

Keywords multiple myeloma; matrine; apoptosis; ubiquitin; proteasome

(收稿日期: 2015 - 07 - 23; 修回日期: 2015 - 11 - 23)

编辑: 邓 媛