

doi:10.3969/j.issn.1674-4616.2024.03.008

半枝莲碱 A 对 EB 病毒阳性弥漫性大 B 细胞淋巴瘤增殖、凋亡及细胞周期的影响^{*}

刘 谦 万 勇 谢 安 程 决 刘 勇[△]

江西省人民医院,南昌医学院第一附属医院,病理科,南昌 330006

摘要 目的 探讨半枝莲碱 A 对 EB 病毒阳性弥漫性大 B 细胞淋巴瘤(EB virus-positive diffuse large B-cell lymphoma, EBV⁺DLBCL)细胞株 Farage 细胞增殖、凋亡及细胞周期的影响。**方法** 将 Farage 细胞分为对照组和不同浓度半枝莲碱 A 处理组,采用 CCK-8 法检测细胞增殖活性,流式细胞术检测细胞凋亡和细胞周期分布,RT-qPCR 法检测半枝莲碱 A 作用于 Farage 细胞后细胞周期蛋白 D3(cyclin D3)的 mRNA 表达以及 Western blot 法检测 cyclin D3 蛋白表达。**结果** CCK-8 结果显示,与对照组相比,半枝莲碱 A 能够明显抑制 Farage 细胞增殖,差异有统计学意义($P < 0.05$)。流式细胞术检测结果显示,半枝莲碱 A 诱导细胞凋亡呈剂量依赖性,且主要使细胞阻滞于 G0/G1 期。RT-qPCR 和 Western blot 结果显示,半枝莲碱 A 以剂量依赖形式使 Farage 细胞 cyclin D3 的 mRNA 和蛋白表达减少,差异具有统计学意义(P 均 < 0.05)。**结论** 半枝莲碱 A 具有抑制 Farage 细胞增殖并诱导其凋亡的作用,可使细胞阻滞于 G0/G1 期,并可能通过下调 cyclin D3 表达发挥抗肿瘤作用。

关键词 半枝莲碱 A;Farage 细胞;细胞周期;凋亡;细胞周期蛋白 D3

中图分类号 R285.5 **文献标志码** A

Effects of Scutebarbatine A on Proliferation, Apoptosis and Cell Cycle of EB Virus-positive Diffuse Large B-cell Lymphoma

LIU Qian, WAN Yong, XIE An, CHENG Yang, LIU Yong

Department of Pathology, Jiangxi Provincial People's Hospital, the First Affiliated Hospital of Nanchang Medical College, Nanchang 330006, China

Abstract Objective To investigate the effects of Scutebarbatine A on the proliferation, apoptosis and cell cycle of EB virus-positive diffuse large B-cell lymphoma(EBV⁺DLBCL)cell line Farage. **Methods** Farage cells were divided into the control group and groups treated with different concentrations of Scutebarbatine A. The cell proliferation activity was detected using CCK-8 method. Cell apoptosis and cell cycle distribution were detected by flow cytometry. The mRNA and protein expression of cyclin D3 were checked by RT-qPCR and Western blot after the action of Scutebarbatine A on Farage cells. **Results** The CCK-8 results showed that Scutebarbatine A was able to markedly inhibit the proliferation of Farage cells compared with the control group, and the difference was statistically significant($P < 0.05$). The flow cytometry results showed that Scutebarbatine A induced cell apoptosis in a dose-dependent manner and mainly blocked Farage cells in G0/G1 phase. RT-qPCR and Western blot results showed that Scutebarbatine A reduced the mRNA and protein expression of cyclin D3 in Farage cells in a dose-dependent manner, and the difference was statistically significant(all $P < 0.05$). **Conclusion** Scutebarbatine A could inhibit the proliferation of Farage cells and induce their apoptosis, which could block cells in G0/G1 phase and may exert anti-tumor effects by downregulating the expression of cyclin D3.

Key words Scutebarbatine A;Farage cells;cell cycle;apoptosis;cyclin D3

^{*} 江西省中医药管理局科技计划项目(No. 2022B020)

[△] 通信作者, Corresponding author, E-mail: kimmry@126.com

EB 病毒阳性弥漫性大 B 细胞淋巴瘤(EB virus-positive diffuse large B-cell lymphoma, EBV⁺DLBCL)是源于淋巴造血系统的恶性肿瘤,多发生于非洲、亚洲和拉丁美洲,也是我国弥漫性大 B 细胞淋巴瘤(diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL)的重要组成部分^[1]。目前对于 DLBCL 的治疗,临床上主要根据患者年龄、临床病理分期、国际预后指数评分以及耐受性等进行个性化治疗,但对于部分复发/难治患者的疗效仍不尽如人意。

半枝莲作为马唇形科黄芩属多年生草本植物,具有清热解毒、化瘀利尿等功效。文献记载,半枝莲作为抗肿瘤药物,常用于肝癌、胃癌、肺癌及宫颈癌等的治疗^[2]。在淋巴造血系统肿瘤的治疗中,也有报道将其联合常规化疗方案用于 DLBCL 的治疗^[3]。黄酮、多糖、二萜等作为半枝莲中的有效成分,具有良好的抗肿瘤活性^[4]。且最近研究发现,半枝莲中的新克罗烷型二萜具有显著的抗肿瘤活性^[5]。本研究采用 EBV⁺DLBCL 细胞株 Farage 在体外检测半枝莲二萜——半枝莲碱 A 对 Farage 增殖、凋亡及细胞周期的影响,并探讨半枝莲碱 A 对细胞周期蛋白 D3(cyclin D3)的潜在作用,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料和仪器

人 EB 病毒阳性弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 Farage 细胞株(德国微生物菌种保藏中心);半枝莲碱 A(云南西力生物,货号:BBP00853);二甲基亚砜(DMSO)(赛默飞世尔科技,批号:D12345);CCK-8 试剂盒(Sigma,批号:96992);胎牛血清(Ausbian,批号:VS500T);DMEM 细胞培养基(Corning,批号:10-013-CVR);Annexin V-APC 细胞凋亡检测试剂盒(eBioscience,批号:88-8007);杜氏磷酸缓冲盐溶液(DPBS)(武汉普诺赛,批号:PB180329);碘化丙啶(propidium iodide,PI)(Sigma,批号:P4170);核糖核酸酶 A(RNase A)(赛默飞世尔科技,批号:EN0531);曲拉通 X-100(Triton X-100)(Sigma,批号:SLBT4524);Trizol 试剂(上海普飞,批号:3101-100);RIPA 裂解液(上海鼎国生物,批号:WB-0071);BCR 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号:P0010S); β -actin(赛默飞世尔科技,批号:4333762T);cyclin D3 一抗(CST 公司,1:1000 稀释)。

引物由上海吉凯基因设计合成,cyclin D3 引物序列为上游引物:5'-ACCTGGCTGCTGTGATTGC-3',下游引物:5'-GATCATGGATGGCGGGTAC-3',扩增

产物 158 bp。 β -actin 引物序列为上游引物:5'-GCGT-GACATTAAGGAGAAGC-3',下游引物:5'-CCACGT-CACACTTCATGATGG-3',扩增产物 236 bp。

酶标仪(Tecan infinite,型号:M2009PR);流式细胞仪(BD,型号:C6 Plus);荧光显微镜(OLYMPUS,型号:IX71);qRT-PCR 仪器(Roche,型号:LightCycler 480 II);SDS-PAGE 蛋白电泳仪(上海天能,型号:VE-180);蛋白转膜仪(上海天能,型号:VE-186)。

1.2 细胞培养、药物配制及实验分组

用 10%胎牛血清 FBS,于 37℃、5%CO₂培养箱中培养 Farage 细胞。半枝莲碱 A 用 DMSO 配制成 1 mg/mL,4℃储存备用。将细胞分为对照组和半枝莲碱 A 预处理组。对照组加入 DMSO 培养液,预处理组参照下述具体实验进行不同浓度梯度处理。

1.3 CCK-8 实验

将 Farage 细胞悬液接种于 96 孔板中,待细胞沉淀后,用不同质量浓度的半枝莲碱 A(10 μ g/mL、15 μ g/mL、20 μ g/mL、30 μ g/mL、40 μ g/mL、60 μ g/mL、80 μ g/mL、100 μ g/mL)进行干预,分别于 24 h、48 h、72 h 后,每孔加入 10 μ L CCK-8,培养 2 h 后,于酶标仪 450 nm 处测定各孔吸收光度值(A),计算细胞活性(%)=(实验组 A/正常对照组 A)×100%。

1.4 流式细胞仪检测 Farage 细胞凋亡率

将 Farage 细胞悬液接种于 6 孔板中,待细胞沉淀后,用不同质量浓度的半枝莲碱 A(20 μ g/mL、40 μ g/mL、60 μ g/mL)进行干预。作用 24 h 后,收集细胞并洗涤,加入 5 μ L PI 染色,重悬细胞,再加入 10 μ L Annexin V-APC 染色,用流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况。

1.5 细胞周期检测

将 Farage 细胞悬液培养于 6 cm 培养皿中,用不同质量浓度半枝莲碱 A(20 μ g/mL、40 μ g/mL、60 μ g/mL)处理细胞,培养 24 h 后,以 1300 r/min 离心 5 min,经 4℃DPBS 洗涤,再次离心,并按 PI:RNase A:DPBS:Triton X-100=25:10:1000:40 配比进行细胞染色,用流式细胞仪检测并分析细胞周期。

1.6 RT-qPCR 法检测 cyclin D3 mRNA 的表达

用不同质量浓度半枝莲碱 A(20 μ g/mL、40 μ g/mL、60 μ g/mL)处理 Farage 细胞 24 h 后,收集细胞,以 2000 r/min 离心 5 min,去上清,细胞沉淀中加入 1 mL Trizol,充分混匀静置后,转移至新的 1.5 mL EP 管中。每管加入 200 μ L 氯仿,混匀并室温静置。于 4℃、12800 r/min 离心 15 min。吸取上层液体加入等体积预冷异丙醇,混匀后 4℃静置。再次离心弃上清。加入 1 mL、75%乙醇,洗涤沉淀。再多次离心弃上清,

室温干燥。待 RNA 沉淀透明时,加入 RNase-free 水至完全溶解,用分光光度计分析测定所抽提 RNA 的浓度及质量。按逆转录试剂盒进行操作,将得到的逆转录产物置于-20℃保存备用。根据 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒说明书加入相应试剂及样品,于 95℃ 5 s,60℃ 34 s 扩增 40 个循环并分析结果。

1.7 Western blot 法检测 cyclin D3 蛋白的表达

用不同质量浓度半枝莲碱 A (20 μg/mL、40 μg/mL、60 μg/mL)处理细胞 24 h 后,用预冷 PBS 洗涤 2 次细胞,加入 RIPA 裂解液并裂解 15 min。刮下细胞并转移至 EP 管中,超声破碎细胞(功率 40 w,共 20 次,每次 1 s,间隔 2 s)。于 4℃、离心力 12000 g,离心 15 min,取上清测定蛋白浓度。泳道中加入蛋白,进行 SDS-PAGE 电泳,并转移至 PVDF 膜上。用含 5%脱脂牛奶的 TBST 溶液室温封闭 PVDF 膜 1 h,与 cyclin D3 一抗孵育 4℃过夜,TBST 洗膜;再与二抗室温孵育 1.5 h,TBST 洗膜。最后加入 ECL 发光液曝光显影,并检测 cyclin D3 蛋白表达情况。

1.8 统计学处理方法

采用 IBM SPSS 23.0 软件进行数据分析,符合正态分布的计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 半枝莲碱 A 对 Farage 细胞增殖的影响

随着作用时间和剂量的增加,半枝莲碱 A 能够明显抑制 Farage 细胞增殖。与对照组比较,半枝莲碱 A 对 Farage 细胞的增殖抑制率明显升高(P 均 <0.05)。见图 1。

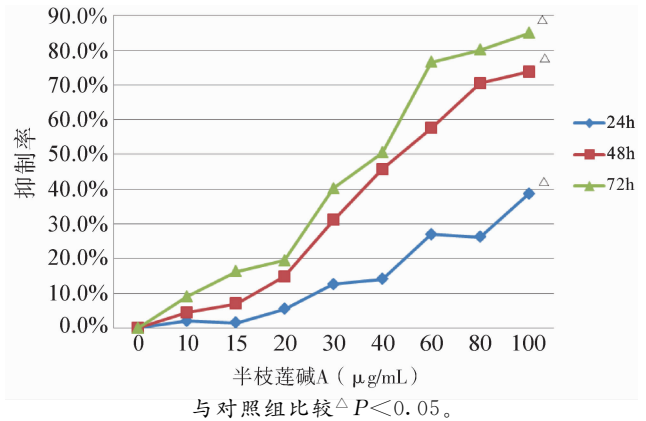


图 1 半枝莲碱 A 对细胞增殖的影响

2.2 半枝莲碱 A 对 Farage 细胞凋亡的影响

与对照组比较,20 μg/mL 半枝莲碱 A 处理组的早期凋亡率明显增高($P < 0.05$),晚期凋亡率和坏死率之间差异无统计学意义($P > 0.05$);40 μg/mL 半枝莲碱 A 处理组的早期凋亡率和坏死率明显增高(P 均 <0.05),晚期凋亡率差异无统计学意义($P > 0.05$);60 μg/mL 半枝莲碱 A 处理组的早期、晚期凋亡率和坏死率均明显增高(P 均 <0.05);各组细胞存活率随半枝莲碱 A 质量浓度的增加而逐渐降低,差异有统计学意义(P 均 <0.05)。见表 1。

2.3 半枝莲碱 A 对 Farage 细胞周期的影响

与对照组比较,20 μg/mL 半枝莲碱 A 处理组处于 G0/G1 期的细胞占比差异无统计学意义($P > 0.05$),处于 S 期的细胞占比增加($P < 0.05$)、处于 G2/M 期的细胞占比降低($P < 0.05$);40 μg/mL 和 60 μg/mL 半枝莲碱 A 处理组处于 G0/G1 期的细胞占比逐渐升高(P 均 <0.05),处于 S 期和 G2/M 期的细胞占比显著降低(P 均 <0.05)。见表 2、图 2。

表 1 半枝莲碱 A 对细胞凋亡的影响($n=3, \bar{x} \pm s$)

质量浓度(μg/mL)	早期凋亡率(%)	晚期凋亡率(%)	坏死率(%)	存活率(%)
0	3.05±0.26	0.20±0.08	0.05±0.01	96.70±0.18
20	5.36±0.13 [△]	0.20±0.01	0.11±0.05	94.33±0.18 [△]
40	5.99±0.21 [△]	0.33±0.07	0.58±0.07 [△]	93.11±0.21 [△]
60	8.96±0.23 [△]	4.68±0.08 [△]	5.56±0.39 [△]	80.80±0.57 [△]

与对照组比较[△] $P < 0.05$ 。

表 2 半枝莲碱 A 对细胞周期的影响($n=3, \bar{x} \pm s$)

质量浓度(μg/mL)	细胞周期分布(%)		
	G0/G1	S	G2/M
0	33.18±0.64	42.62±0.54	24.21±0.79
20	32.95±1.12	48.71±1.30 [△]	18.34±0.50 [△]
40	62.09±0.46 [△]	31.48±0.24 [△]	6.42±0.27 [△]
60	74.93±0.54 [△]	12.82±0.71 [△]	12.26±0.91 [△]

与对照组比较[△] $P < 0.05$ 。

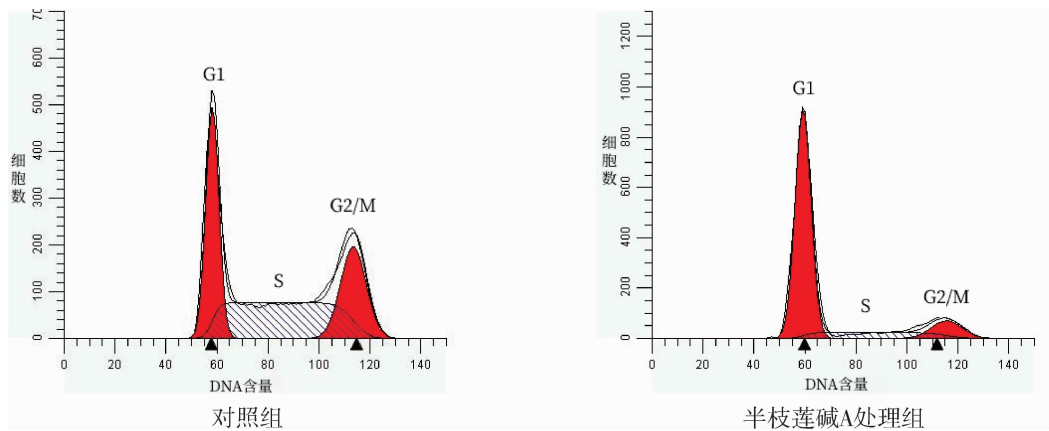


图 2 半枝莲碱 A 对细胞周期的影响

2.4 半枝莲碱 A 对 Farage 细胞 cyclin D3 mRNA 表达的影响

与对照组比较,20 $\mu\text{g/mL}$ 、40 $\mu\text{g/mL}$ 和 60 $\mu\text{g/mL}$ 半枝莲碱 A 处理组 cyclin D3 mRNA 相对表达量均降低,并呈剂量依赖性(P 均 <0.05)。见表 3。

2.5 半枝莲碱 A 对 Farage 细胞 cyclin D3 蛋白表达的影响

不同质量浓度半枝莲碱 A 处理 Farage 细胞后,均在 31 kDa 处检测到目标信号条带。与对照组比较,20 $\mu\text{g/mL}$ 半枝莲碱 A 处理组 cyclin D3 蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$);40 $\mu\text{g/mL}$ 和 60 $\mu\text{g/mL}$ 半枝莲碱 A 处理组 cyclin D3 蛋白表达降低,并呈剂量依赖性(P 均 <0.05)。见图 3、表 4。

表 3 半枝莲碱 A 对 cyclin D3 mRNA 表达的影响($n=3, \bar{x} \pm s$)

质量浓度($\mu\text{g/mL}$)	cyclin D3 mRNA 相对表达量
0	1.002 $\pm$ 0.084
20	0.673 $\pm$ 0.042 Δ
40	0.612 $\pm$ 0.036 Δ
60	0.547 $\pm$ 0.043 Δ

与对照组比较 $\Delta P<0.05$ 。

表 4 半枝莲碱 A 对 cyclin D3 蛋白表达的影响($n=3, \bar{x} \pm s$)

质量浓度($\mu\text{g/mL}$)	cyclin D3 蛋白相对表达量
0	0.893 $\pm$ 0.043
20	0.854 $\pm$ 0.025
40	0.478 $\pm$ 0.036 Δ
60	0.263 $\pm$ 0.031 Δ

与对照组比较 $\Delta P<0.05$ 。

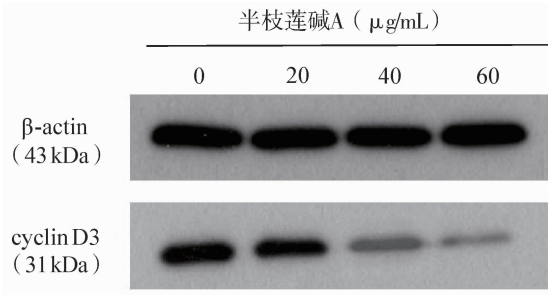


图 3 半枝莲碱 A 对 cyclin D3 蛋白表达的影响

3 讨论

EBV⁺DLBCL 作为亚洲、乃至我国 DLBCL 的重要组成部分,常规 R-CHOP 化疗方案的疗效较差,特别是当出现 EBV Ⅲ型潜伏感染以及在治疗中出现继发性噬血细胞综合征时,预后更差^[6-7]。因此,积极探寻有关 EBV⁺DLBCL 的有效治疗手段显得意义重大。

半枝莲又名韩信草,为黄芩属植物,以干燥全草入药。其性辛、且苦寒,多用于疗疮肿毒、跌扑伤痛、水肿、黄疸及蛇虫咬伤等病症的治疗^[8]。现代研究表明,半枝莲有效成分包括黄酮、二萜、三萜、生物碱、甾类、多糖等,其中黄酮、二萜、多糖等化合物具有良好的抗肿瘤活性,对肺癌、肝癌、胃癌、结直肠癌、乳腺癌和白血病等恶性肿瘤具有显著的抑制作用^[4]。那么,半枝莲碱 A 作为二萜类化合物中的重要组成部分,是否对 EBV⁺DLBCL 细胞具有体外抑制作用,成为本研究关注的重点。

从本实验结果来看,半枝莲碱 A 能够从时间和剂量上抑制 EBV⁺DLBCL 细胞株 Farage 细胞增殖、并诱导细胞凋亡,同时将细胞阻滞于 G0/G1 期,最终使细胞周期蛋白 cyclin D3 表达降低。此外,在细胞生长发育过程中,研究得最多的就是细胞周期蛋白和细胞周期依赖性蛋白激酶(cyclin-dependent kinases, CDKs)^[9]。D 型细胞周期蛋白(cyclin D)作为细胞周

期蛋白的一员,能够直接将生长因子信号与 G1 期进展联系起来。另外,部分肿瘤的形成也与 cyclin D 降解有关^[10]。研究表明,cyclin D 家族能促进细胞增殖,并加速细胞周期进程。其中,cyclin D3 是细胞周期调控机制的重要组成部分,是 G1 期 CDK4/CDK6 的调节亚基,并参与 G2/M 期的调节^[11]。在白血病的研究中,cyclin D3-CDK6 磷酸化后使糖酵解途径关键酶失活,使葡萄糖分解进入磷酸戊糖途径;使用 cyclin D3-CKD6 抑制剂后,能增加肿瘤细胞内活性氧,从而导致细胞凋亡^[12]。在我国淋巴瘤的研究中,cyclin D3 是细胞周期蛋白中与非霍奇金淋巴瘤发病关系最密切的蛋白,其表达水平与恶性程度呈明显正相关^[13]。本研究检测半枝莲碱 A 作用 Farage 细胞后 cyclin D3 的 mRNA 和蛋白表达水平后发现,其以剂量依赖方式使 Farage 细胞中 cyclin D3 mRNA 和蛋白表达降低,推测 cyclin D3 的表达下调可能与 EBV⁺DLBCL 的发生、发展有关。

本研究以 EBV⁺DLBCL 细胞株 Farage 细胞为研究对象,发现半枝莲碱 A 通过下调 cyclin D3 表达,将肿瘤细胞阻滞于 G0/G1 期并诱导凋亡。该结果不仅为半枝莲及其有效成分抗肿瘤提供实验依据,还为 EBV⁺DLBCL 的治疗带来新的可能。

参 考 文 献

[1] Nakamura S,Jaffe ES,Swerdlow SH,et al. WHO classification of tumours: WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues[M]. Revised 4th ed. Lyon,France:IARC Press,2017:304-306.

[2] 潘敏求. 中华肿瘤治疗大成[M]. 石家庄:河北科学出版社,1996.

[3] 李冰,单灵芝,刘梅,等. 沈一平治疗恶性淋巴瘤的临床经验[J]. 浙江中医杂志,2018,53(1):10-11.

[4] 吴晓龙,崔思远,王琰,等. 中药半枝莲有效成分抗肿瘤作

用机制研究进展[J]. 中华中医药杂志,2018,33(4):1459-1462.

[5] Nie XP,Qu GW,Yue XD,et al. Scutellinquinines A-C, three new cytotoxic neo-clerodane diterpenoid from *Scutellaria barbata* [J]. *Phytochem Lett*, 2010, 3 (4): 190-193.

[6] Bourbon E, Maucourt-Boulch D, Fontaine J, et al. Clinico-pathological features and survival in EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma not otherwise specified[J]. *Blood Adv*, 2021, 5(16): 3227-3239.

[7] Stuhlmann-Laeisz C, Borchert A, Quintanilla-Martinez L, et al. In Europe expression of EBNA2 is associated with poor survival in EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly [J]. *Leuk Lymphoma*, 2016; 57 (1): 39-44.

[8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典·一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010.

[9] Moiola C, De Luca P, Gardner K, et al. Cyclin T1 overexpression induces malignant transformation and tumor growth[J]. *Cell Cycle*, 2010, 9(15): 3119-3126.

[10] Qie S, Diehl JA. Cyclin D degradation by E3 ligases in cancer progression and treatment[J]. *Semin Cancer Biol*, 2020, 67(Pt 2): 159-170.

[11] Duan Y, He X, Yang H, et al. Cyclin D3/CDK11 (p58) complex involved in Schwann cells proliferation repression caused by lipopolysaccharide [J]. *Inflammation*, 2010, 33(3): 189-199.

[12] Wang H, Nicolay BN, Chick JM, et al. The metabolic function of cyclin D3-CDK6 kinase in cancer cell survival [J]. *Nature*, 2017, 546(7658): 426-430.

[13] 张冬梅,陆建新,沈爱国,等. P27kip1 与细胞周期素 D3 在非霍奇金淋巴瘤中的表达、定位及相互关系[J]. 中华血液学杂志,2005,26(12):723-727.

(收稿日期:2024-03-12)