

Activin A Inhibits the Proliferation of Human Myeloma RPMI-8226 Cells

Yaxuan Gao¹ Yidi Shan¹ Zhonghui Liu² Jingyan Ge¹

1. Department of Physiology, School of Basic Medical Sciences, Jilin University, Changchun, Jilin, 130021, China

2. Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Jilin University, Changchun, Jilin, 130021, China

Abstract

Activin A is a member of the TGF- β superfamily and has the effect of inhibiting the proliferation of mouse myeloma cells and promoting apoptosis, but its effect on human myeloma cells is unclear. In this study, the human myeloma cell line RPMI-8226 was used, Cell Counting Kit-8 method was used to detect the viability of shock cells, flow cytometry was used to detect apoptosis, and PCR was used to detect mRNA expression. The experimental results found that activin A can inhibit RPMI-8226 cell viability, induce RPMI-8226 cell apoptosis, and promote the expression of ActRIIA and Smad3, suggesting that activin A inhibits RPMI-8226 cell proliferation by acting on ActRIIA-Smad3.

Keywords

Activin A; Smad signaling pathway; RPMI-8226

激活素 A 抑制人骨髓瘤 RPMI-8226 细胞增殖的机制研究

高雅萱¹ 单奕迪¹ 柳忠辉² 葛敬岩¹

1. 吉林大学基础医学院生理学系, 中国·吉林 长春 130021

2. 吉林大学基础医学院免疫学系, 中国·吉林 长春 130021

摘要

激活素 A 属于 TGF- β 超家族成员, 具有抑制小鼠骨髓瘤细胞增殖、促进凋亡的作用, 但对人骨髓瘤细胞的作用尚不清楚。本研究利用人骨髓瘤细胞系 RPMI-8226 细胞, 采用 Cell Counting Kit-8 法检测细胞活力, 流式细胞术检测凋亡以及 PCR 技术检测 mRNA 表达。实验结果发现, 激活素 A 能够抑制 RPMI-8226 细胞活力, 诱导 RPMI-8226 细胞凋亡, 并且能够促进 ActRIIA 和 Smad3 的表达, 提示激活素 A 通过作用于 ActRIIA-Smad3 抑制 RPMI-8226 细胞增殖。

关键词

激活素 A; Smad 信号通路; RPMI-8226

1 引言

激活素 A 属于 TGF- β 超家族成员, 其受体属于丝氨酸/丝氨酸激酶 (Ser/Thr) 型受体, 主要分为 I 型受体和 II 型受体, 激活素 A 先与 II 型受体结合, 再招募 I 型受体, 活化的 I 型受体可以通过经典的信号传导蛋白—Smad 途径激活靶基因^[1]。激活素是一种多功能细胞因子, 组织来源广泛, 在体内通过自分泌和旁分泌方式调节细胞生长、分化和凋亡, 在机体生理功能和病理损伤中具有重要作用^[2]。前期研究表明激活素 A 能够通过促进小鼠骨髓瘤细胞凋亡抑制其增殖^[3], 但激活素 A 对人骨髓瘤 RPMI-8226 细胞的作用尚不清楚。

2 材料与方法

2.1 主要试剂

Activin A 购自 R&D 公司、IMDM 培养基和胎牛血清购自 BI 公司、Trizol 试剂购自日本的 TaKaRa 公司、M-MLV 逆转录酶购自美国 Promega 公司、RT-PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司、CCK-8 (Cell Counting Kit-8) 购自 TaKaRa 公司、凋亡试剂盒购自天津三箭生物公司、引物由上海生物工程有限公司合成^[4]。

2.2 方法

2.2.1 细胞培养

人多发性骨髓瘤外周血 B 淋巴细胞 RPMI-8226 购自中

国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。在含有 10% 胎牛血清的 IMDM 培养基中培养，置于 5% CO₂ 浓度、37℃ 培养箱中。

2.2.2 CCK8 法检测细胞活力

WST-8[2-(2-甲氧基-4-硝苯基)-3-(4-硝苯基)-5-(2,4-二磺基苯)-2H-四唑单钠盐]是敏感的 NADH 指示剂。在一定条件下，WST-8 被还原生成高度水溶性的橙黄色的甲臞产物，利用酶标仪 450nm 波长处测定 OD 值，间接反映细胞活力。实验将 RPMI-8226 细胞 (2x10⁴ 个/孔) 接种到 96 孔板中，分别给予 0-20ng/ml 激活素 A 处理 24 h，然后加 10% 体积的 CCK-8 培养 2 h，酶标仪测定 OD 值^[5]。

2.2.3 逆转录 PCR 检测 mRNA 的表达

RPMI-8226 (3x10⁵ 个/孔) 接种到 12 孔培养板中，细胞用 0-20ng/ml 激活素 A 处理 4 h，用 Trizol 提取细胞总 RNA，cDNA 用 RT-PCR 扩增试剂盒扩增，参照厂家说明书。

2.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡

RPMI-8226 (1x10⁶ 个/孔) 接种到 12 孔培养板中，细胞用 0-20ng/ml 激活素 A 处理 12 h，收集，用 100ul 的 FACS 缓冲液重悬，再用 1 ul 的 FITC-Annexin V 和 1 ul 的 7-AAD 标记。然后通过流式细胞仪进行分析。

3 结果

3.1 激活素 A 抑制 RPMI-8226 细胞活力

激活素 A 处理 RPMI-8226 细胞 24 h 后，应用 CCK-8 试剂盒检测细胞活力，结果显示，在处理了 24 h 后，激活素 A 具有抑制 RPMI-8226 细胞活力的作用，且呈剂量相关性。

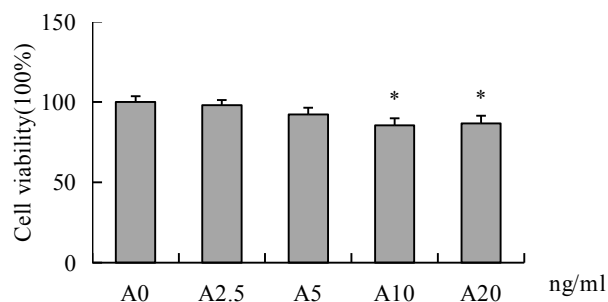


图 1 激活素 A 对 RPMI-8226 细胞活力的影响。* < 0.05，与 A0 组相比较

3.2 激活素 A 促进 RPMI-8226 细胞凋亡

在用激活素 A 处理 RPMI-8226 细胞 12 h 后，流式细

胞术检测细胞凋亡情况，发现与对照组相比较，激活素 A 10 ng/ml 和 20 ng/ml 能明显促进 RPMI-8226 细胞凋亡。

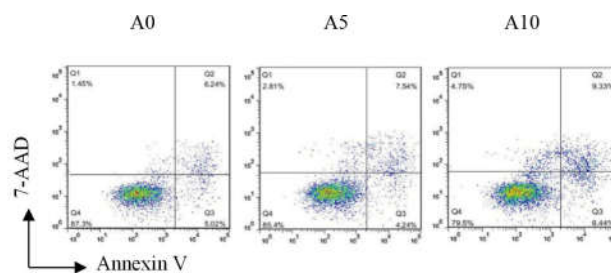


图 2 激活素 A 对 RPMI-8226 细胞凋亡的影响

3.3 激活素 A 通过经典信号通路 Smad 信号发挥作用

为确定激活素 A 是否通过 Smad 经典信号通路调控 RPMI-8226 细胞生物学功能，在用激活素 A 处理 RPMI-8226 细胞 4 小时后检测 mRNA 表达变化情况。结果显示，激活素 A 能够促进 RPMI-8226 细胞 ActR II A 和 Smad3 mRNA 表达增加。

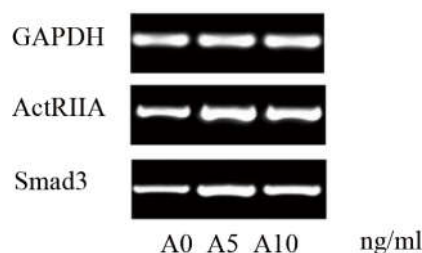


图 3 激活素 A 对 RPMI-8226 细胞 ActRIIA 和 Smad3 mRNA 表达的影响

4 讨论

激活素 A 是转化生长因子-β (TGF-β) 超家族的成员，信号传导途径包括经典的 Smads 途径和非 Smads 途径。在经典途径中，激活素 A 通过与 II 型受体结合，进而诱导 I 型受体磷酸化和活化，活化的 I 型受体可进一步使 Smad2、3 蛋白磷酸化，后者进一步与 Smad4 结合成复合物转运入细胞核内，Smad3、4 能直接与 DNA 上 Smad 结合元件结合，激活目的基因转录，进而调控基因表达水平^[6]。激活素 A 的异常表达与肿瘤的发生发展密切相关，在多种肿瘤患者循环血中激活素 A 水平升高^[7]。近年的研究发现激活素 A 在肿瘤的调节过程中发挥双重作用，既有致癌作用，也有抑制肿瘤的效应^[8]。骨髓瘤是一种血液系统恶性肿瘤，其特征为骨髓浆细胞异常增生伴有单克隆免疫球蛋白过度生成，常伴发高钙血症、多发性溶骨性损害、贫血和肾脏损害^[9]。据报道，激活素 A 能

够通过凋亡途径抑制小鼠骨髓瘤细胞活性^[10],因此本实验探究激活素A是否能够抑制人骨髓瘤细胞系RPMI-8226细胞活性^[11]。通过实验表明,激活素A能够诱导人骨髓瘤细胞系RPMI-8226的凋亡,并且促进ActRIIA受体和Smad3 mRNA的表达,提示激活素A通过作用于人骨髓瘤细胞受体抑制其增殖,其作用机制有待于进一步研究^[12]。

参考文献

- [1] Loomans HA and Andl CD: Intertwining of activin A and TGF β signaling: Dual roles in cancer progression and cancer cell invasion. *Cancers (Basel)*,2014.
- [2] Morianos I, Papadopoulou G, Semitekolou M, Xanthou G. Activin-A in the regulation of immunity in health and disease. *J Autoimmun*,2019.
- [3] Bloise E1, Ciarmela P1, Dela Cruz C1, Luisi S1, Petraglia F1, Reis FM1. Activin A in Mammalian Physiology. *Physiol Rev*,2019.
- [4] Ge J, Sun H, Li J, Shan Y, Zhao Y, Liao F, Yang Y, Cui X, Liu Z. Involvement of CHOP in activin A-induced myeloma NS-1 cell apoptosis. *Oncol Rep*,2019.
- [5] Zhang Y, Qi Y, Zhao Y, Sun H, Ge J, Liu Z. Activin A induces apoptosis of mouse myeloma cells via the mitochondrial pathway. *Oncol Lett*,2018.
- [6] Qi Y, Ge J, Ma C, Wu N, Cui X, Liu Z. Activin A regulates activation of mouse neutrophils by Smad3 signalling. *Open Biol*,2017.
- [7] Olsen OE, Wader KF, Hella H, Mylin AK, Turesson, Nesthus I, Waage A, Sundan A, Holien T. Activin A inhibits BMP-signaling by binding ACVR2A and ACVR2B. *Cell Commun Signal*,2015.
- [8] Jeruss JS, Sturgis CD, Rademaker AW and Woodruff TK: Down-regulation of activin, activin receptors, and smads in high-grade breast cancer. *Cancer Res*,2003.
- [9] Garcia-Gomez A, Sanchez-Guijo F, Del Cañizo MC, San Miguel JF and Garayoa M: Multiple myeloma mesenchymal stromal cells: Contribution to myeloma bone disease and therapeutics. *World J Stem Cells*,2014.
- [10] Wu S, Qi Y, Niu LM, Xie DX, Cui XL and Liu ZH: Activin A as a novel biomarker for colorectal adenocarcinoma in humans. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*,2015.
- [11] Zessner-Spitzenberg J, Thomas AL, Krett NL, Jung B. TGF β and activin A in the tumor microenvironment in colorectal cancer. *Gene Rep*,2019.
- [12] Gold E and Risbridger G: Activins and activin antagonists in the prostate and prostate cancer. *Mol Cell Endocrinol*,2012.