白桦脂酸通过阻断自噬通量介导RPMI-8226细胞凋亡的机制研究

何婷，庞牧，杨昊，林栋，雷吟泽，陈军*（深圳市中医院，广州中医药大学第四临床医学院药学部，广东 深圳 518033）

摘要：目的 明确白桦脂酸对多发性骨髓瘤RPMI-8226细胞自噬通量及凋亡的影响，并探讨其作用机制。**方法** 运用Tunel及Hoechst 33258染色法检测细胞凋亡比率及细胞形态学变化；Caspase活性检测试剂盒检测Caspase-3和Caspase-8活性；Western-blot法检测细胞各指标蛋白的表达。**结果** 白桦脂酸可诱导RPMI-8226细胞凋亡及形态变化，Z-VAD-FMK可抑制白桦脂酸的促凋亡作用，而Z-DEVD-FMK则可进一步增加白桦脂酸的促凋亡作用。另外，白桦脂酸可增加自噬相关蛋白LC3B和P62的积聚，促进Caspase-8活化及蛋白表达增加，进而增加AIF的释放；Z-VAD-FMK可拮抗白桦脂酸对LC3B、P62、Caspase-8及AIF的作用；反之，Z-DEVD-FMK可协同白桦脂酸对LC3B、P62、Caspase-8及AIF的作用。**结论** 白桦脂酸作用于RPMI-8226细胞后，除能直接激活Caspase-3之外，还可通过阻断细胞自噬通量后激活Caspase-8，增加线粒体膜通透性，使AIF释放增加，从而介导以不依赖Caspase-3活化的凋亡过程。

关键词：白桦脂酸；多发性骨髓瘤；细胞凋亡；自噬通量；Caspase-8
中图分类号：R966　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1674-229X（2026）02-0093-06
Doi：10.12048/j.issn.1674-229X.2026.02.002

Study on the Mechanism of Apoptosis in RPMI-8226 Cells Mediated by Betulinic Acid through Blocking Autophagic Flux

HE Ting, PANG Mu, YANG Hao, LIN Dong, LEI Yinze, CHEN Jun* (*Department of Pharmacy, Shenzhen Traditional Chinese Medicine Hospital, the Fourth Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Shenzhen, Guangdong* 518033, *China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To clarify the effects of betulinic acid on autophagic flux and apoptosis in RPMI-8226 multiple myeloma cells, and to explore the underlying mechanisms. **METHODS** The apoptosis rate and morphological changes were detected by TUNEL and Hoechst 33258 staining methods; the activities of Caspase-3 and Caspase-8 were measured using the Caspase activity assay kits. The expression of various indicator proteins in cells was detected by Western blotting. **RESULTS** Betulinic acid induced apoptosis and morphological changes in RPMI-8226 cells. Z-VAD-FMK inhibited the pro-apoptotic effect of betulinic acid, while Z-DEVD-FMK further enhanced the pro-apoptotic effect of betulinic acid. Additionally, betulinic acid increased the accumulation of autophagy-related proteins LC3B and P62, promote the activation and protein expression of Caspase-8, and subsequently increase the release of AIF. Z-VAD-FMK antagonized the effects of betulinic acid on LC3B, P62, Caspase-8 and AIF, whereas Z-DEVD-FMK synergized with betulinic acid to enhance its effects on LC3B, P62, Caspase-8 and AIF. **CONCLUSION** Betulinic acid can directly activate Caspase-3 in RPMI-8226 cells. After acting on RPMI-8226 cells, it can also activate Caspase-8 by blocking autophagic flux, increase mitochondrial membrane permeability, and thereby enhance the release of AIF, thereby mediating an apoptotic process independent of Caspase-3 activation.

KEYWORDS: betulinic acid; multiple myeloma; apoptosis; autophagic flux; Caspase-8

多发性骨髓瘤（multiple myeloma，MM）是一种起源于浆细胞的恶性肿瘤，常伴有多器官功能障碍，近年来以沙利度胺、硼替佐米为基础的联合化疗及异基因造血干细胞移植，使MM患者得到更好的治疗效果。然而，MM的高复发率使其仍无法治愈，已成为其进一步治疗的瓶颈[1]，因此为MM寻找新的药物及治疗靶点具有重要的临床意义。

自噬是真核细胞所具备的一种能维持自身稳

基金项目：广东省药学会科学研究基金（2024A02002）
作者简介：何婷，主管药师，研究方向：药理学　　***通信作者：**陈军，主任中药师，研究方向：临床药学、中药质量控制等，E-mail：chenj_zyy@sina.com

定的分解代谢过程，可消除细胞内受损的成分，并能为其自身提供代谢能量。相较于其他肿瘤，多发性骨髓瘤细胞具有合成大量单克隆免疫球蛋白的特性，这导致过量未折叠或异常折叠蛋白在细胞内质网表面积聚，其对骨髓瘤细胞自身具有潜在的毒性作用[2]，故多发性骨髓瘤细胞的生存可能会更加依赖自噬的调节。已有研究发现，自噬可以通过避免错误折叠蛋白的毒性堆积来维持MM细胞的持续性，自噬的水平对MM细胞的生命周期至关重要[2]，而当用特异性自噬抑制剂阻断自噬，其细胞的凋亡率明显升高[3]。以上研究提示，自噬可能成为多发性骨髓瘤的一个新的重要治疗靶点。

白桦脂酸是一种羽扇豆烷型五环三萜类化合物，在杜仲、鸡骨草、夏枯草、马甲子等多种中药中均含量较高，其被证实具有广泛的抗肿瘤活性，包括白血病、前列腺癌、卵巢癌、胃癌等[4,5]。有研究[6]发现，白桦脂酸不仅能诱导多发性骨髓瘤细胞凋亡，还能阻断其自噬通量，同时细胞Caspase-3被激活；该研究将Caspase-3特异性抑制剂与白桦脂酸联用，发现多发性骨髓瘤细胞凋亡率却反而增加。这些现象提示，白桦脂酸作用于多发性骨髓瘤细胞后，除能直接激活Caspase-3之外，还有其他途径参与了白桦脂酸诱导细胞的凋亡过程。

Lee等[7]研究发现，自噬相关蛋白LC3B及P62能增加Caspase-8的低聚反应和激活，提示自噬很有可能通过调节Caspase-8的活性从而间接影响细胞的凋亡。另有文献[8]报道，Caspase-8能通过激活Bid使线粒体膜通透性增加，而线粒体膜通透性增加更有利于AIF从线粒体释放，从而引起不依赖Caspase-3激活的凋亡过程[9,10]。白桦脂酸是否可通过阻断细胞自噬通量从而促进Caspase-8活化，尚未见有报道。

本研究拟从自噬角度来研究白桦脂酸对多发性骨髓瘤细胞凋亡的影响，并证明Caspase-8在骨髓瘤细胞自噬通量被阻断与细胞凋亡之间是否起到桥梁作用，从而为多发性骨髓瘤寻找新的治疗策略及药物。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

白桦脂酸（Betulinic acid，分子式$C_{30}H_{48}O_3$，分子量456.7，B8936-5MG，Sigma-Aldrich）；人多发性骨髓瘤RPMI-8226细胞系（STCC10906G-1，Servicebio）；Z-DEVD-FMK、Z-VAD-FMK（210344-95-9、161401-82-7，MedChemExpress）；BCA蛋白检测试剂盒、抗AIF、LC3B、P62、辣根过氧化物酶标记的IgG抗体（P0012S、AF1273、AB2023-50 μL、AF0279、A0208/ A0216，Beyotime）；无蛋白快速封闭液、RPMI 1640培养基、Caspase-3及Caspase-8活性检测试剂盒（G2052-500ML、G4532-500ML、G1921-50T、G1922-50T，Servicebio）；Hoechst 33258（94403-1ML，Sigma-Aldrich）；抗Caspase-3、Caspase-8、GAPDH抗体（ab32351、ab32397、ab8245，Abcam）；Tunel凋亡检测试剂盒（11684795910，Roche）。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及实验分组 RPMI-8226培养于RPMI1640培养基中，37 ℃、5%CO_2培养箱中常规培养，取对数生长期细胞进行后续试验。实验分组如下，Control：正常对照组；BA：白桦脂酸15 μg·mL^{-1}组；BA+Z-VAD-FMK：白桦脂酸15 μg·mL^{-1}+Z-VAD-FMK 50 μmol·L^{-1}组；BA+Z-DEVD-FMK：白桦脂酸15 μg·mL^{-1}+Z-DEVD-FMK 50 μmol·L^{-1}组。

1.2.2 Tunel染色法检测细胞凋亡 将细胞以适当密度接种到24孔板的爬片上，达到次融合状态时，不同干预组刺激细胞24 h后终止培养。4%的多聚甲醛固定60 min，然后加入0.1%Triton X-100冰浴孵育2 min；PBS洗涤后，加入Tunel检测液，避光反应90 min。PBS洗3次，防荧光淬灭封片剂封片，荧光显微镜下观察[11]。

1.2.3 Hoechst 33258染色 取对数生长期细胞，不同组干预24 h后收集细胞，4%多聚甲醛固定10 min，PBS漂洗后，加入50 μL PBS重悬细胞，吸取细胞将其涂在盖玻片上，30 min后，加入0.1% Triton X-100在4 ℃下破膜5 min，PBS漂洗后，滴加Hoechst 33258染色液于盖玻片上，避光室温孵育30 min，于荧光显微镜下检测[6]。

1.2.4 蛋白质免疫印迹实验（Western blot） 对数生长期细胞给予不同干预24 h后，提取蛋白；BCA法检测蛋白浓度；取适量蛋白质进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白并将其转至硝酸纤维素膜；无蛋白快速封闭液封闭。然后将膜依次与相应Caspase-3、Caspase-8、AIF、P62和LC3B一抗4 ℃孵育过夜，洗膜，辣根过氧化物酶标记的IgG二抗室温孵育120 min。进行化学发光反应，随后进行显影，继而对阳性条带进行灰度分析[6]。

1.2.5 Caspase-3/Caspase-8活性检测 对数生长期

细胞给予不同干预24 h后收集细胞，PBS洗涤后，加入裂解液冰浴裂解30 min，4 ℃、10 000 *g* 离心10 min，取上清加入Ac-IETD-pNA后混匀，37 ℃孵育60 min，发现颜色变化比较明显时，用酶标仪检测样本405 nm处吸光值，扣除空白对照的吸光值，即为样品中Caspase-3/Caspase-8催化产生的pNA的吸光值，通过计算OD诱导组/OD阴性对照组的倍数，确定凋亡诱导组Caspase-3/Caspase-8活化的程度[11]。

1.3 统计学处理方法

定量资料以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，每组实验独立进行，重复3次。实验数据采用Graphpad Prime 8.0软件进行统计分析，多组数据间均数比较采用One-way ANOVA分析，其中组间两两比较采用LSD-*t*检验，以$P<0.05$为差异有统计学意义，$P<0.01$表示有显著差异。

2 结果

2.1 各组RPMI-8226细胞凋亡比率的变化

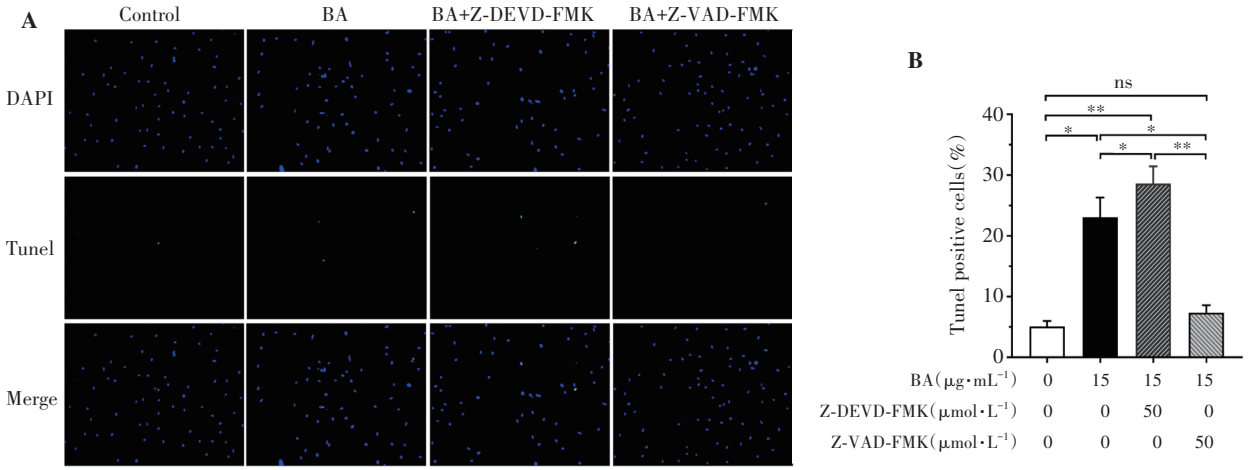
如图1所示，RPMI-8226细胞给予白桦脂酸干预后，Tunel（+）细胞比例上升至（23.06±1.63）%，其明显高于对照组的（5.09±0.45）%；白桦脂酸联合Z-VAD-FMK处理组，Tunel（+）细胞下调为（7.35±0.62）%；白桦脂酸联合Z-DEVD-FMK处理组，Tunel（+）细胞比例则显著升高至（28.60±1.42）%，相较单独白桦脂酸干预组进一步上调。

2.2 各组RPMI-8226细胞凋亡形态学的变化

在正常对照组中，Hoechst 33258染色结果显示RPMI-8226细胞核形态完整，染色质分布均匀。经白桦脂酸刺激24 h后，细胞核呈现不同程度的凋亡特征，包括胞核体积变小，染色质浓缩，产生典型凋亡小体；白桦脂酸联合Z-VAD-FMK处理组细胞形态则同正常对照组，基本未见细胞凋亡特征；然而，白桦脂酸联合Z-DEVD-FMK处理组，细胞凋亡比例更多，可见较多量细胞碎片，即白桦脂酸联合Z-DEVD-FMK作用下，坏死细胞比例也开始增加（图2）。

2.3 各组RPMI-8226细胞中Caspase-3活性及蛋白表达的变化

如图3所示，白桦脂酸可激活RPMI-8226细胞



注：A为Tunel阳性细胞代表图像，10X；B为Tunel阳性细胞数定量分析；$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{ns}P>0.05$。

图1 各组细胞凋亡比率比较

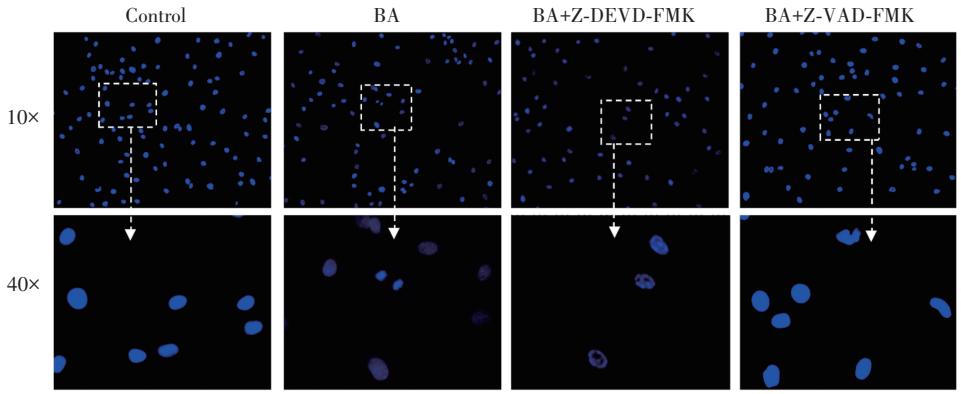


图2 各组细胞形态学比较

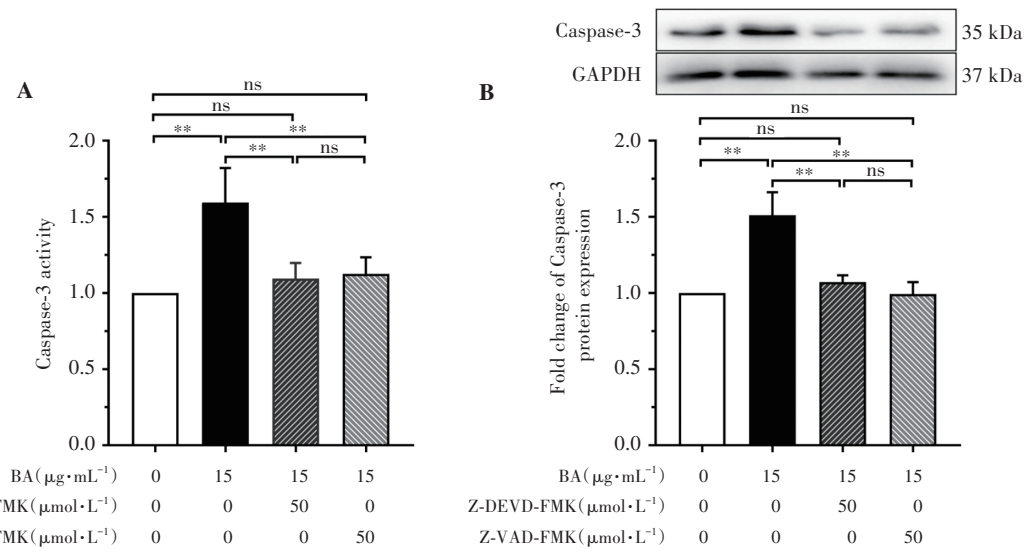
Caspase-3活性及增加其蛋白表达，Z-DEVD-FMK及Z-VAD-FMK与白桦脂酸联用均可抑制其对Caspase-3激活的作用。

2.4 各组RPMI-8226细胞中自噬相关蛋白表达的变化

Western blot检测结果显示，白桦脂酸干预后可促进RPMI-8226细胞自噬相关蛋白LC3B和P62蛋白积聚，提示白桦脂酸可能阻断细胞自噬通量；Z-DEVD-FMK与白桦脂酸联用后可进一步协同白桦脂酸对自噬通量的阻断作用；而Z-VAD-FMK则抑制白桦脂酸对自噬通量的阻断作用（图4）。

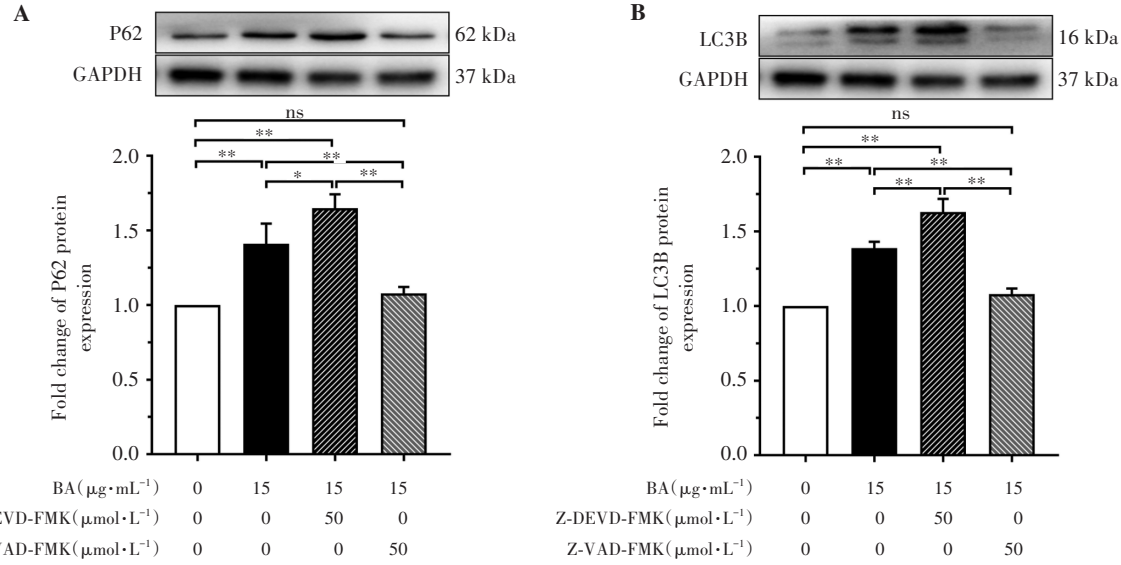
2.5 各组RPMI-8226细胞中Caspase-8活性及蛋白表达的变化

如图5所示，白桦脂酸可促进RPMI-8226细胞Caspase-8活性增强及蛋白表达增加；Z-DEVD-FMK与白桦脂酸联用可进一步使Caspase-8活性及蛋白表达增加，提示Z-DEVD-FMK或可通过进一步激活Caspase-8增加了白桦脂酸诱导细胞凋亡的敏感性。反之，Z-VAD-FMK则抑制Caspase-8的激活和蛋白表达。



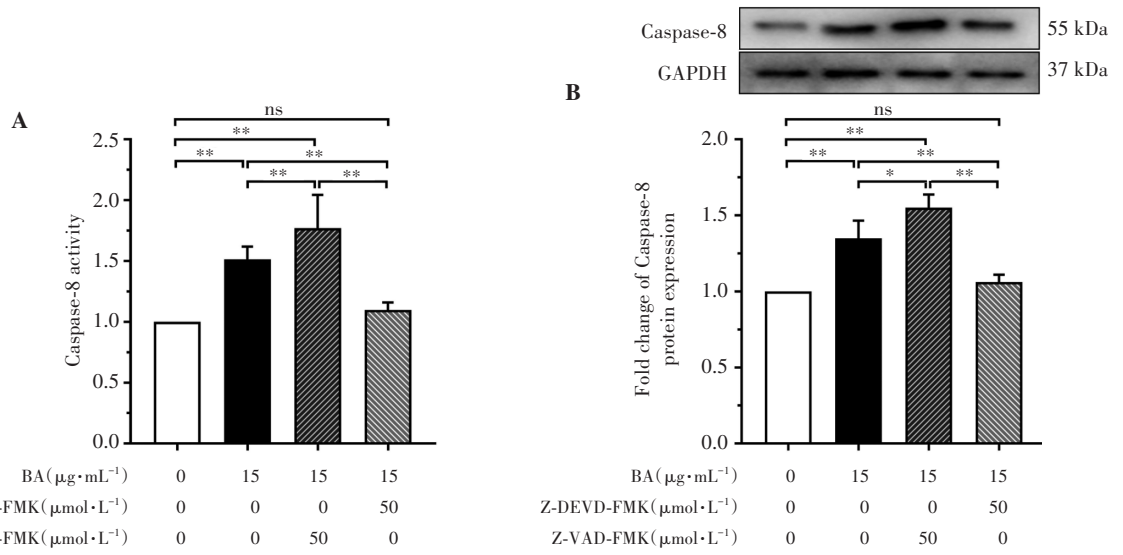
注：A为Caspase-3活性；B为Caspase-3代表性免疫印迹图像及蛋白水平的定量分析；$^{**}P<0.01$，$^{ns}P>0.05$。

图3 各组细胞Caspase-3活性及蛋白表达的比较



注：A为P62代表性免疫印迹图像及蛋白水平的定量分析；B为LC3B代表性免疫印迹图像及蛋白水平的定量分析；$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{ns}P>0.05$。

图4 各组细胞LC3B和P62蛋白表达的比较

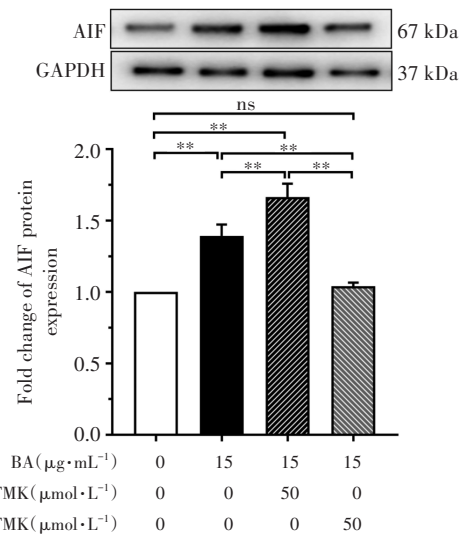


注：A为Caspase-8活性；B为Caspase-8代表性免疫印迹图像及蛋白水平的定量分析；$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{ns}P>0.05$。

图5　各组细胞Caspase-8活性及蛋白表达的比较

2.6 各组RPMI-8226细胞中AIF蛋白表达的变化

进一步结果显示白桦脂酸可显著增加AIF蛋白的表达，同时，联用Z-VAD-FMK抑制AIF的表达，而Z-DEVD-FMK则可进一步增加白桦脂酸对AIF的促进作用，提示白桦脂酸或可激活不依赖Caspase-3的其他凋亡途径（图6）。



注：AIF代表性免疫印迹图像及蛋白水平的定量分析；$^{**}P<0.01$，$^{ns}P>0.05$。

图6　各组细胞AIF蛋白表达的比较

3　讨论

白桦脂酸，又名桦木酸，是一种天然存在的五环三萜类化合物，现已在体内外实验中证明其可诱导多种组织来源的肿瘤细胞凋亡，包括多发性骨髓瘤细胞[4]。有文献报道，在白桦脂酸能明显抑制肿瘤细胞增殖的浓度范围内，未发现其对人正常细胞的增殖具有明显抑制作用[5]，以上数据为白桦脂酸成为新药可能，提供了部分理论依据。

为了进一步明确白桦脂酸诱导多发性骨髓瘤细胞凋亡的作用机制，将白桦脂酸分别与泛Caspase抑制剂和Caspase-3/7特异性抑制剂联用，再观察细胞凋亡及形态学的变化。Z-VAD-FMK为泛Caspase抑制剂，抑制多种Caspase酶，包括Caspase-1/8/9/3/7等，可影响凋亡通路的多个阶段，包括外源性和内源性途径；Z-DEVD-FMK对Caspase-3的选择性较高，对上游Caspase抑制作用较弱，适用于研究Caspase-3在细胞凋亡中的特定作用，以及与之相关的疾病机制和药物研发[12]。本研究结果显示，白桦脂酸可显著诱导RPMI-8226细胞的凋亡，Caspase-3/7特异抑制剂Z-DEVD-FMK不仅不能抑制，反而协同了白桦脂酸对RPMI-8226细胞凋亡诱导作用，较白桦脂酸单独干预组细胞凋亡特征更加明显，与前期研究报道一致[6]；而泛Caspase抑制剂Z-VAD-FMK可拮抗白桦脂酸对RPMI-8226细胞凋亡诱导作用。提示除了Caspase-3的激活，还有其他途径参与了白桦脂酸诱导RPMI-8226细胞的凋亡过程。

细胞凋亡途径主要有外源的死亡信号通路及内源的线粒体通路。在外源信号通路中，同源配体与死亡受体结合，使受体三聚体化，与衔接分子结合形成凋亡诱导复合物，随后激活Caspase-8，而活化的Caspase-8能直接剪切Caspase-7和Caspase-3，

从而促进凋亡。内源信号通路靠唯BH3域蛋白调节，其在监测到细胞DNA损伤或内质网应激时激活，通过作用于线粒体外膜的BAX/BAK蛋白从而增加线粒体膜通透性，再导致一些凋亡相关因子的释放，例如AIF。AIF除能激活Caspase蛋白外，还能转移到细胞核激活核酸内切酶，从而引起不依赖经典Caspase途径的细胞凋亡[13]。

自噬过程主要包括4个环节：自噬诱导、形成自噬小体、自噬小体与溶酶体融合形成自噬溶酶体、内源性物质的降解及再循环利用[14]。通过此过程，肿瘤细胞不仅能清除内部受损的细胞结构或不需要的生物大分子，以维持细胞代谢，还能在细胞外源能量缺乏时为自身提供重要的能量代谢。已有研究报道，自噬小体膜能作为细胞内死亡诱导信号复合物（iDISC）招募和激活Caspase-8的“平台”，从而介导细胞凋亡[15]。Lee等[7]研究发现，自噬相关蛋白LC3B及P62能增加Caspase-8的低聚反应和激活，当用基因干扰技术沉默LC3B或改变其与P62的作用结构域，都能减弱由抑制蛋白酶体降解所导致的Caspase-8激活和细胞凋亡。本研究结果显示，白桦脂酸可同时增加LC3B及P62蛋白积聚，提示其有阻断RPMI-8226细胞自噬通量的作用，同时能增加Caspase-8活性及蛋白表达。Z-DEVD-FMK仅能抑制Caspase-3的活性，与白桦脂酸联用后会导致LC3B及P62积聚进一步增加，因LC3B和P62结合后主要定位于自噬小体，其可能更有利于Caspase-8的活化，增强RPMI-8226细胞对白桦脂酸诱导凋亡的敏感性；然而Z-VAD-FMK因能同时减少LC3B及P62蛋白积聚、抑制Caspase-8、Caspase-3的活性，故能显著拮抗白桦脂酸的凋亡诱导作用。

另外，有进一步的研究报道，Caspase-8能通过激活Bid使线粒体膜通透性增加[8]，而线粒体膜通透性增加更有利于AIF的释放，从而激活内源的线粒体信号通路[9]。本研究结果显示白桦脂酸可增加AIF蛋白的表达，Z-DEVD-FMK可协同白桦脂酸进一步促进AIF的释放，而Z-VAD-FMK则可抑制AIF的释放。进一步提示白桦脂酸可能通过激活Caspase-8进而促进AIF从线粒体释放，引起不依赖Caspase-3激活的凋亡过程。

综上所述，白桦脂酸作用于RPMI-8226细胞后，除能通过直接改变线粒体膜电位来激活Caspase-3之外，还能通过阻断细胞自噬通量使LC3B和P62积聚，加剧Caspase-8活化，进一步改变线粒体膜通透性，从而使AIF释放增加，激活内源线粒体信号通路促进凋亡。

参考文献

[1] Cowan A J, Green D J, Kwok M, *et al*. Diagnosis and management of multiple myeloma: a review[J]. JAMA, 2022, 327(5): 464-477.

[2] Kozalak G, Koşar A. Autophagy-related mechanisms for treatment of multiple myeloma[J]. Cancer Drug Resist, 2023, 6: 838-857.

[3] Al-Odat O S, Guirguis D A, Schmalbach N K, *et al*. Autophagy and apoptosis: current challenges of treatment and drug resistance in multiple myeloma[J]. Int J Mol Sci, 2022, 24(1): 644.

[4] Aswathy M, Vijayan A, Daimary U D, *et al*. Betulinic acid: A natural promising anticancer drug, current situation, and future perspectives [J]. J Biochem Mol Toxicol, 2022, 36(12): e23206.

[5] Jiang W K, Li X, Dong S, *et al*. Betulinic acid in the treatment of tumour diseases: application and research progress[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 142: 111990.

[6] Yang L J, Chen Y, He J, *et al*. Betulinic acid inhibits autophagic flux and induces apoptosis in human multiple myeloma cells *in vitro*[J]. Acta Pharmacol Sin, 2012, 33(12): 1542-1548.

[7] Lee S H, Cho W J, Najy A J, *et al*. p62/SQSTM1-induced caspase-8 aggresomes are essential for ionizing radiation-mediated apoptosis[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(11): 997.

[8] Huang K, Zhang J J, O'Neill K L, *et al*. Cleavage by caspase 8 and mitochondrial membrane association activate the BH3-only protein bid during TRAIL-induced apoptosis[J]. J Biol Chem, 2016, 291(22): 11843-11851.

[9] Novo N, Ferreira P, Medina M. The apoptosis-inducing factor family: moonlighting proteins in the crosstalk between mitochondria and nuclei[J]. IUBMB Life, 2021, 73(3): 568-581.

[10] Kadam A, Mehta D, Jubin T, *et al*. Apoptosis inducing factor: cellular protective function in *Dictyostelium discoideum*[J]. Biochim Biophys Acta Bioenerg, 2020, 1861(5-6): 148158.

[11] He T, Zhang J Z, Qiao T, *et al*. Compensatory roles of Protein Related to DAN and *Cerberus* (PRDC) decrease in pulmonary arterial hypertension[J]. Int J Biol Sci, 2022, 18(6): 2372-2391.

[12] Sawai H. Differential effects of caspase inhibitors on TNF-induced necroptosis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 432(3): 451-455.

[13] Gupta R, Ambasta R K, Kumar P. Autophagy and apoptosis cascade: which is more prominent in neuronal death[J]. Cell Mol Life Sci, 2021, 78(24): 8001-8047.

[14] Xia H J, Green D R, Zou W P. Autophagy in tumour immunity and therapy[J]. Nat Rev Cancer, 2021, 21(5): 281-297.

[15] Hattori T, Fundora K A, Hamamoto K, *et al*. ER stress elicits non-canonical CASP8 (caspase 8) activation on autophagosomal membranes to induce apoptosis[J]. Autophagy, 2024, 20(2): 349-364.

（收稿日期：2025-05-06；在线出版日期：2026-01-13）