

# $\beta$ -谷甾醇抑制骨髓增生异常综合征细胞 MUTZ-1 活性和细胞周期\*

车虹 赵冰洁 胡璇 刘松山

(成都中医药大学附属医院血液科, 四川 成都 610072)

**【摘要】** 目的 探讨  $\beta$ -谷甾醇体外抑制骨髓增生异常综合征细胞系(MUTZ-1)的效果与可能机制。方法 采用 0、10、20  $\mu\text{mol/L}$  的  $\beta$ -谷甾醇 3 个浓度分别干预 MUTZ-1 24 h 后分为 0、10、20  $\mu\text{mol/L}$  组, CCK-8 法检测细胞增殖率, 流式细胞术检测细胞凋亡率与细胞周期情况, 使用蛋白质印迹(Western blot)检测 Cyclin D1、TGF- $\beta$ 1、p-Smad2 和 p-Smad3 蛋白表达水平。结果 与 0  $\mu\text{mol/L}$  组相比, 10  $\mu\text{mol/L}$  与 20  $\mu\text{mol/L}$  的  $\beta$ -谷甾醇均能抑制细胞增殖, 促进细胞凋亡, 将细胞 G1 期延长, 阻滞细胞进入 S 期, 降低 Cyclin D1、TGF- $\beta$ 1、p-Smad2 和 p-Smad3 蛋白表达水平( $P < 0.05$ )。结论  $\beta$ -谷甾醇能抑制 MUTZ-1 细胞增殖, 促进细胞凋亡, 破坏细胞分裂周期, 其机制可能是抑制了细胞中的 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路。

**【关键词】** 骨髓增生异常综合征; 白花蛇舌草;  $\beta$ -谷甾醇; 细胞周期; TGF- $\beta$ /Smad 信号通路

**【中图分类号】** R551.3 **【文献标志码】** A **DOI:** 10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2025. 04. 008

## $\beta$ -sitosterol inhibited MUTZ-1 activity and cell cycle in myelodysplastic syndrome cells

CHE Hong, ZHAO Bingjie, HU Lian, LIU Songshan

(Department of Hematology, The Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, China)

**【Abstract】** **Objective** To investigate the inhibitory effect and mechanism of  $\beta$ -sitosterol on myelodysplastic syndrome (MUTZ-1) in vitro. **Methods** Three concentrations of  $\beta$ -sitosterol (0  $\mu\text{mol/L}$ , 10  $\mu\text{mol/L}$ , 20  $\mu\text{mol/L}$ ) were treated with mutz-1 for 24 h. Cell proliferation rate was detected by CCK-8 method, cell apoptosis rate and cell cycle were detected by flow cytometry. The protein expression levels of Cyclin D1, TGF- $\beta$ 1, p-Smad2 and p-Smad3 were detected by Western blot. **Results** Compared with 0  $\mu\text{mol/L}$  group,  $\beta$ -sitosterol of 10  $\mu\text{mol/L}$  and 20  $\mu\text{mol/L}$  could inhibit cell proliferation, promote cell apoptosis, prolong cell G1 phase, block cell entering S phase, and decrease the protein expression levels of Cyclin D1, TGF- $\beta$ 1, p-Smad2 and p-Smad3 ( $P < 0.05$ ). **Conclusion**  $\beta$ -sitosterol can inhibit the proliferation of MUTZ-1 cells, promote cell apoptosis, and disrupt the cell division cycle, which may inhibit TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway in cells.

**【Key words】** Myelodysplastic syndrome; *Hedyotis diffusa* Willd;  $\beta$ -sitosterol; Cell Cycle; TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway

骨髓增生异常综合征(Myelodysplastic syndrome, MDS)是一组起源于造血干细胞的异质性髓系克隆性疾病,以无效造血、骨髓发育不良、细胞减少、不典型增生和克隆不稳定为主要特征<sup>[1-2]</sup>。超过 10%

的 MDS 存在多种基因突变,临床上发展为急性髓系白血病的风险<sup>[3-4]</sup>。MDS 在老年人中更常见,诊断年龄中位数为 77 岁,2015 年发病率为 4.0/10 万,随着年龄的增长而增加,5 年长期总生存率为 31.3%<sup>[5]</sup>。目前 MDS 治疗手段多以免疫调节可能的同种异体骨髓移植为主<sup>[6]</sup>;造血干细胞移植是唯一具有治疗潜力的模式,但这种方法具有相对较高的死亡率,从而限制了临床使用<sup>[7]</sup>。因此,迫切需要毒副更小的药物来进行治疗。白花蛇舌草是一种传统中草药,具有增强免疫、抗化学诱变、抗肿瘤的作用<sup>[8]</sup>,有报道发现其具

基金项目:成都中医药大学附属医院科研项目(20ZL09)

通信作者:刘松山,主任医师, E-mail: Liusongshan1968@163.com

引用本文:车虹,赵冰洁,胡璇,等.  $\beta$ -谷甾醇抑制骨髓增生异常综合征细胞 MUTZ-1 活性和细胞周期[J]. 西部医学, 2025, 37(4): 518-521. DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2025. 04. 008

有治疗 MDS 的作用<sup>[9]</sup>。β-谷甾醇是白花蛇舌草的主要成分之一,同时是植物界最丰富、分布最广的植物甾醇之一<sup>[10]</sup>。除了免疫调节作用外,β-谷甾醇已被证实,具有抗癌、抗胆固醇异常、抗炎和降血糖等药理作用<sup>[11]</sup>。细胞凋亡和细胞周期阻滞是众所周知的 β-谷甾醇的抗癌作用机制,且已被证明通过抑制趋化细胞因子对肿瘤细胞有抑制作用<sup>[12]</sup>,然而具体的潜在机制还不清楚。因此,本研究旨在探究 β-谷甾醇对 MUTZ-1 细胞的作用与机制。

## 1 材料与方法

1.1 实验细胞及试剂 人骨髓增生异常综合征细胞系(MUTZ-1)购自上海富雨生物科技有限公司(FY-JY4592Z)。β-谷甾醇购自北京索莱宝科技有限公司(IS0690),纯度≥98%,CCK-8、Annexin V-FITC 试剂盒(C1062M)购自上海碧云天生物技术有限公司,Cyclin D1(ab16663)、TGF-β1(ab215715)和 β-actin(ab8226)抗体均购自艾博抗(上海)贸易有限公司,p-Smad2(18338)、p-Smad3(9520)购自 CST 公司。

1.2 仪器 SpectraMax iD3 多功能酶标仪(美谷分子仪器(上海)有限公司)、DMi1 倒置显微镜(德国徕卡)、蛋白质电泳系列(美国 Bio-Rad 公司)、Attune NxT 流式细胞仪(赛默飞世尔科技(中国)有限公司)。

1.3 细胞培养 MUTZ-1 细胞培养在 RPMI-1640 培养基(培养基包含 1%青链霉素与 10%胎牛血清),37 °C,5%CO<sub>2</sub> 的培养箱培养。待细胞生长至 80%~90%时进行消化传代备用。

1.4 细胞增殖率检测 将培养好的细胞分成 0、10、20 μmol/L 组,分别接种至 96 孔板中,每孔 100 μL,接种 24 h 后使用加入对应浓度的 β-谷甾醇继续干预 24 h,然后加入 10 μL CCK-8,室温下继续培养 4 h,使用酶标仪在 450 nm 波长下检测各孔的吸光度值,以 0 μmol/L 吸光度值作为对照孔计算细胞增殖率,细

胞增殖率=实验孔/对照孔×100%。

1.5 细胞凋亡与周期检测检测蛋白表达水平 将干预 24 h 后的细胞使用 PBS 清洗,消化后调整密度为 1×10<sup>5</sup>/mL,按 AnnexinV-FITC 试剂盒说明书操作,使用流式细胞仪上机检测各组细胞凋亡与细胞周期情况。

1.6 Western blot 检测蛋白表达情况 将干预完成后的细胞使用裂解液冰上裂解 30 min 提取总蛋白质,离心后收集上层蛋白悬液,BCA 蛋白质定量后进行蛋白质凝胶电泳,将蛋白条带转移至 PVDF 膜上,使用 5%脱脂奶粉室温封闭 2 h,4 °C 下使用稀释后的一抗孵育 12 h 以上,一抗浓度:Cyclin D1(1:1 000)、TGF-β1(1:1 000)、p-Smad2(1:1 000)、p-Smad3(1:1 000)、β-actin(1:1 000)。取出条带清洗 3 遍,使用稀释后的二抗在室温下孵育 2 h,清洗 3 遍后加入 ECL 溶液发光,在凝胶成像系统中曝光拍照并分析蛋白条带灰度值。

1.7 统计学分析 采用 SPSS 23.0 进行统计分析,计量资料均采用( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较方法为单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。以  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 β-谷甾醇对 MUTZ-1 细胞活性的影响 与 0 μmol/L 组相比,10、20 μmol/L β-谷甾醇降低 MUTZ-1 细胞增殖率,提高细胞凋亡率( $P < 0.05$ ),见表 1、图 1。

表 1 β-谷甾醇对 MUTZ-1 细胞增殖、凋亡的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Effect of β-sitosterol on proliferation and apoptosis of MUTZ-1 cells

组别	增殖率(%)	凋亡率(%)
0 μmol/L 组	100.00±2.99	3.96±0.15
10 μmol/L 组	81.31±1.99 <sup>①</sup>	13.43±0.89 <sup>①</sup>
20 μmol/L 组	73.02±2.92 <sup>①</sup>	20.99±2.23 <sup>①</sup>

注:与 0 μmol/L 组相比,① $P < 0.05$ 。

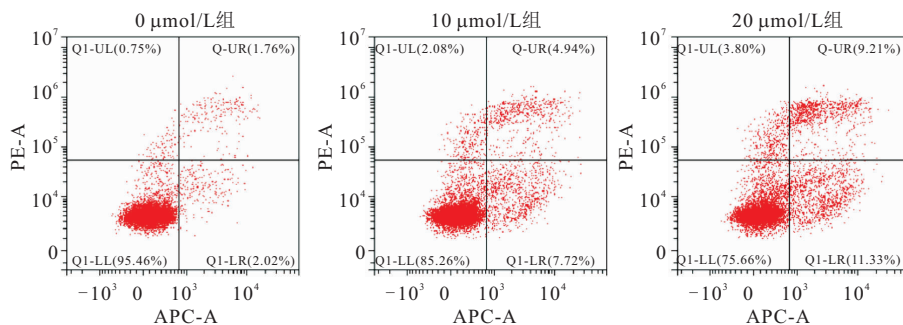


图 1 β-谷甾醇对 MUTZ-1 细胞凋亡的影响

Figure 1 Effect of β-sitosterol on apoptosis in MUTZ-1 cells

2.2 β-谷甾醇对 MUTZ-1 细胞周期的影响 与 0 μmol/L 组相比,10、20 μmol/L β-谷甾醇延长了

MUTZ-1 细胞的 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期,缩短了 S 期( $P < 0.05$ ),对 G<sub>2</sub>/M 期无影响,见图 2、表 2。

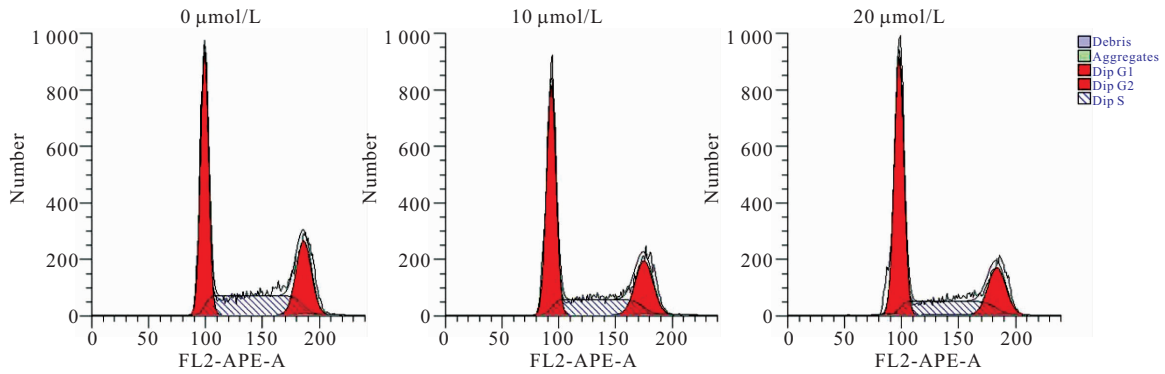


图 2 MUTZ-1 细胞周期变化情况  
Figure 2 MUTZ-1 cell cycle changes

注: Cell Number: 有效细胞数; Debris: 细胞碎片; Aggregates: 细胞聚集体。

表 2 β-谷甾醇对 MUTZ-1 细胞周期的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Effect of β-sitosterol on cell cycle of MUTZ-1 cells

组别	G0/G1 期	S 期	G2/M 期
0 μmol/L 组	44.54 ± 1.10	34.96 ± 3.03	20.50 ± 2.81
10 μmol/L 组	50.21 ± 0.63 <sup>①</sup>	26.43 ± 0.11 <sup>①</sup>	23.36 ± 0.70
20 μmol/L 组	55.09 ± 1.40 <sup>①</sup>	24.75 ± 0.75 <sup>①</sup>	20.15 ± 0.65

注: 与 0 μmol/L 组相比, ①P < 0.01。

2.3 β-谷甾醇对 MUTZ-1 细胞周期通路蛋白表达的影响 与 0 μmol/L 组相比, 10、20 μmol/L β-谷甾醇降低了 MUTZ-1 细胞中 Cyclin D1、TGF-β1、p-Smad2 和 p-Smad3 的蛋白表达水平 (P < 0.05), 见图 3、表 3。

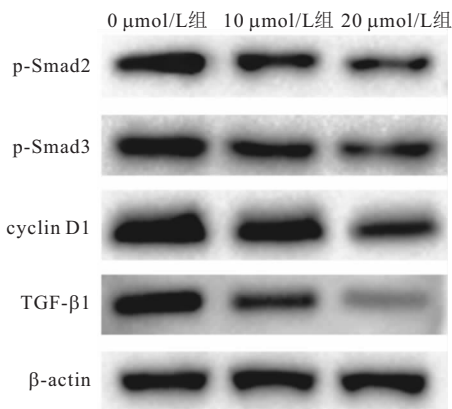


图 3 β-谷甾醇对 MUTZ-1 细胞周期通路蛋白表达的影响

Figure 3 Effect of β-sitosterol on MUTZ-1 cell cycle pathway protein expression

表 3 β-谷甾醇对 MUTZ-1 细胞周期通路蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Effect of β-sitosterol on the expression of cell cycle pathway proteins in MUTZ-1 cells

组别	Cyclin D1	TGF-β1	p-Smad2	p-Smad3
0 μmol/L 组	1.001 ± 0.044	1.001 ± 0.108	1.002 ± 0.174	1.001 ± 0.073
10 μmol/L 组	0.713 ± 0.065 <sup>①</sup>	0.540 ± 0.125 <sup>①</sup>	0.516 ± 0.048 <sup>①</sup>	0.682 ± 0.078 <sup>①</sup>
20 μmol/L 组	0.301 ± 0.070 <sup>①</sup>	0.196 ± 0.052 <sup>①</sup>	0.322 ± 0.043 <sup>①</sup>	0.386 ± 0.104 <sup>①</sup>

注: 与 0 μmol/L 组相比, ①P < 0.01。

### 3 讨论

细胞凋亡或程序性细胞死亡对多细胞生物的正

常发育、功能和内稳态至关重要<sup>[13]</sup>。凋亡可用来清除肿瘤细胞, 其水平的降低被认为是肿瘤形成的一个基本组成部分<sup>[14]</sup>。因此, 进一步开发能够诱导或增强细胞凋亡的药物可为增强抗癌药物的抗癌潜力提供一种有前景的策略。有研究表明, 哺乳动物细胞的细胞周期阻滞和凋亡与细胞增殖密切相关<sup>[14-15]</sup>。细胞周期控制是细胞生长的主要调控机制, 由细胞周期蛋白依赖激酶及其周期蛋白伴侣调控<sup>[16]</sup>。虽然 β-谷甾醇对多种人类癌细胞的抗增殖和凋亡活性的影响已被证实, 但其治疗 MDS 的疗效和潜在机制仍有待阐明。MUTZ-1 细胞是从 MDS 患者中分离建株的细胞, 能体外模拟 MDS 的发展, 姚柳等<sup>[17]</sup>也利用 MUTZ-1 细胞探讨 MDS 的相关机制, 证明了 SMO 抑制剂通过 HH 型号通路促进 MUTZ-1 细胞凋亡, 改变了细胞功能与下游蛋白表达, 说明通过研究药物干预 MUTZ-1 细胞增殖、凋亡从而探讨 MDS 的疗效这一方向是可行的。本研究发现, 10、20 μmol/L 的 β-谷甾醇能有效抑制 MUTZ-1 细胞增殖, 促进细胞凋亡, 延长细胞的 G1 期, 缩短 S 期, 说明 β-谷甾醇通过减慢细胞由 G1 期向 S 期过度, 阻止 DNA 合成, 从而抑制细胞增殖; 同时检测细胞中 Cyclin D1 蛋白表达水平, 发现该蛋白表达降低。Cyclin D1 是细胞周期由 G1 期向 S 期转换的关键蛋白<sup>[18]</sup>, 细胞周期进程激活后被降解, 但在肿瘤细胞增殖周期中 Cyclin D1 会出现过表达现象<sup>[19]</sup>。由此说明, β-谷甾醇可能通过降低 Cyclin D1 蛋白表达破坏了 MUTZ-1 的细胞增殖周期, 从而起到抑制细胞增殖, 促进细胞凋亡的效果。

TGF-β 信号通路可以调控发育或者成熟组织细胞的增殖、分化、侵袭程度, 有 3 种亚型 (TGF-β1、TGF-β2、TGF-β3) 和经典 (TGF-β/Smad) 和非经典通路 (TGF-β/PI3K/AKT、TGF-β/MAPK 等)<sup>[20]</sup>。在 MDS 中, TGF-β 信号转导的改变, 包括抑制因子的丢

失,已被证明会导致构成通路的激活和抑制造血<sup>[21]</sup>; TGF- $\beta$ 也能直接抑制红细胞和骨髓细胞的发育,抑制造血,允许克隆细胞增殖,损害内源性免疫细胞<sup>[22-23]</sup>。有研究发现,罗特西普以结合的方式阻断 TGF- $\beta$ 1 下游的 Smad2/3 蛋白,增加红细胞生成,从而治疗对促红细胞生成素无反应的低风险 MDS 患者<sup>[22]</sup>。因此,抑制 TGF- $\beta$ 1 的药物与手段在最近成为一种治疗 MDS 的新方法,突出了靶向骨髓微环境对 MDS 的治疗作用<sup>[24]</sup>。鉴于 TGF- $\beta$  信号通路在肿瘤发生发展的过程中具有两面性:早期抑制肿瘤生长,而在晚期则表现为促进肿瘤生长<sup>[25]</sup>。本实验探讨  $\beta$ -谷甾醇是否对 MUTZ-1 细胞中 TGF- $\beta$ /Smad 通路蛋白有调节作用,结果发现,使用  $\beta$ -谷甾醇后, MUTZ-1 细胞中 TGF- $\beta$ 1、p-Smad2 和 p-Smad3 的蛋白表达水平均明显降低,说明 TGF- $\beta$ /Smad 通路被抑制,流式细胞术的结果也说明了 TGF- $\beta$  含量减少后,细胞凋亡率呈现上升状态,推测与 TGF- $\beta$  介导的上皮间质转化途径被抑制有关, $\beta$ -谷甾醇在 10  $\mu$ mol/L 的浓度下对 MUTZ-1 细胞有明显的抑制作用,其机制可能是通过抑制 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路,使细胞周期停滞在 G1 期,从而抑制增殖与促进凋亡。

#### 4 结论

$\beta$ -谷甾醇能抑制 MUTZ-1 细胞增殖,促进细胞凋亡,破坏细胞分裂周期,其机制可能是抑制细胞中的 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路。

#### 【参考文献】

- ARBER D A, ORAZI A, HASSERJIAN R, *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia[J]. *Blood*, 2016, 127(20): 2391-2405.
- GILL H, LEUNG A Y H, KWONG Y L. Molecular and cellular mechanisms of myelodysplastic syndrome: implications on targeted therapy[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(4): 440.
- GARCIA-MANERO G, CHIEN K S, MONTALBAN-BRAVO G. Myelodysplastic syndromes: 2021 update on diagnosis, risk stratification and management[J]. *Am J Hematol*, 2020, 95(11): 1399-1420.
- NAZHA A, KOMROKJI R, MEGGENDORFER M, *et al.* Personalized prediction model to risk stratify patients with myelodysplastic syndromes[J]. *J Clin Oncol*, 2021, 39(33): 3737-3746.
- ZEIDAN A M, SHALLIS R M, WANG R, *et al.* Epidemiology of myelodysplastic syndromes: why characterizing the beast is a prerequisite to taming it[J]. *Blood Rev*, 2019, 34: 1-15.
- KARANTANOS T, DEZERN A E. Biology and clinical management of hypoplastic MDS: mds as a bone marrow failure syndrome [J]. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2021, 34(2): 101280.
- CHEN Y, LIU K, XU L, *et al.* HLA-mismatched hematopoietic SCT without *in vitro* T-cell depletion for myelodysplastic syndrome [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2010, 45(8): 1333-1339.
- 王增勇, 臧兰兰, 全艳春, 等. 白花蛇舌草对人胶质瘤 U251 细胞生长及细胞周期分布的影响及机制研究[J]. *南开大学学报(自然科学版)*, 2023, 56(3): 79-84.
- 杨娜, 周永明. 近 20 年中医药治疗骨髓增生异常综合征组方用药规律文献研究[J]. *内蒙古中医药*, 2021, 40(6): 152-156.
- DENG H, JIANG J, ZHANG S S, *et al.* Network pharmacology and experimental validation to identify the potential mechanism of *Hedyotis diffusa* Willd against rheumatoid arthritis[J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 1425.
- 陈元堃, 曾奥, 罗振辉, 等.  $\beta$ -谷甾醇药理作用研究进展[J]. *广东药科大学学报*, 2021, 37(1): 148-153.
- RAJAVEL T, PACKIYARAJ P, SURYANARAYANAN V, *et al.*  $\beta$ -Sitosterol targets Trx/Trx1 reductase to induce apoptosis in A549 cells *via* ROS mediated mitochondrial dysregulation and p53 activation[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 2071.
- FANG W Z, CHEN Z. Identification of anoikis related subtypes and construction of prognostic model in hepatocellular carcinoma [J]. *Cell Mol Biol*, 2023, 69(9): 219-228.
- LI F Z, PENG X F, ZHOU J L, *et al.* Aberrant MEK5 signalling promotes clear cell renal cell carcinoma development *via* mTOR activation[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2022, 148(12): 3257-3266.
- SELVARAJ C. Therapeutic targets in cancer treatment: cell cycle proteins[J]. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 2023, 135: 313-342.
- LU H X, GAO F, SHU G F, *et al.* Wogonin inhibits the proliferation of myelodysplastic syndrome cells through the induction of cell cycle arrest and apoptosis[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(5): 7285-7292.
- 姚柳, 赵芳, 秦玉婷, 等. SHH 信号通路在骨髓增生异常综合征中的表达及 SMO 抑制剂对 MUTZ-1 细胞的作用研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2022, 32(1): 32-39.
- 陶仕英, 牛建昭, 王继峰, 等.  $\beta$ -谷甾醇对 T47D 细胞增殖和细胞周期的影响及作用机制探讨[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2015, 17(2): 362-366.
- 徐正磊, 王立生, 洪英财, 等. SPON2 上调 Cyclin D1 表达对胃癌细胞影响的研究[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2022, 29(7): 481-487.
- 王乐, 丁腾, 龚伟玲, 等. 调控 TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路抗肝纤维化的中药有效成分研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(4): 666-674.
- BEWERSDORF J P, ZEIDAN A M. Transforming growth factor (TGF)- $\beta$  pathway as a therapeutic target in lower risk myelodysplastic syndromes[J]. *Leukemia*, 2019, 33(6): 1303-1312.
- YOUN M, HUANG H G, CHEN C, *et al.* MMP9 inhibition increases erythropoiesis in RPS14-deficient del(5q) MDS models through suppression of TGF- $\beta$  pathways[J]. *Blood Adv*, 2019, 3(18): 2751-2763.
- LYNCH O F, CALVI L M. Immune dysfunction, cytokine disruption, and stromal changes in myelodysplastic syndrome: a review[J]. *Cells*, 2022, 11(3): 580.
- FENAUX P, PLATZBECKER U, MUFTI G J, *et al.* Luspatercept in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(2): 140-151.
- 万正华, 蒋添翼, 杨宁. 转化生长因子  $\beta$  信号通路在肝癌中的作用及相关药物研究进展[J]. *中国临床医生杂志*, 2016, 44(5): 17-19.

(收稿日期:2023-06-18;修回日期:2024-10-31;编辑:黎仕娟)