

雷公藤红素对白血病 HL-60 和 Jurkat 细胞增殖及凋亡的影响

张晓玲¹, 李爱萍¹, 环飞², 秦珩², 段金廛^{3*}¹南京医科大学公共卫生学院, 南京 211166; ²南京医科大学江苏省医药农药兽药安全性评价与研究中心, 南京 211166;³南京中医药大学中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程研究中心, 南京 210023)

摘要 探讨雷公藤红素对人急性髓性白血病 HL-60 细胞、急性 T 淋巴细胞白血病 Jurkat 细胞增殖及凋亡的影响。采用 MTT 法、AnnexinV-FITC/PI 双染法、PI 染色法、透射电镜观察不同浓度雷公藤红素作用于两种细胞后对其生长增殖、凋亡、周期及形态等方面的影响。结果表明雷公藤红素能显著抑制 HL-60 细胞、Jurkat 细胞的增殖, 降低其存活率。给药 24 h 后, 半抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 $(0.46 \pm 1.05) \mu\text{mol/L}$ 和 $(0.88 \pm 1.13) \mu\text{mol/L}$ 。以剂量依赖方式诱导两种细胞凋亡, 细胞周期分布 G_1 期比例增加, S 期比例降低 ($P < 0.05$), 且伴有典型的细胞凋亡形态学改变。雷公藤红素能显著抑制 HL-60 细胞、Jurkat 细胞的生长增殖, 并诱导细胞凋亡。

关键词 雷公藤红素; HL-60 细胞; Jurkat 细胞; 凋亡

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2015)01-0089-05

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20150113

Effects of celastrol on the proliferation and apoptosis of human leukemia cells HL-60 and Jurkat

ZHANG Xiaoling¹, LI Aiping², HUAN Fei³, QIN Heng³, DUAN Jin'ao^{4*}

¹School of Public Health, Nanjing Medical University, Nanjing 211166; ²Safety Assessment and Research Center for Drugs, Pesticides and Veterinary Drugs of Jiangsu Province, Nanjing Medical University, Nanjing 211166; ³National and Local Collaborative Engineering Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract To determine the effects of celastrol on the proliferation and apoptosis of cell lines HL-60 and Jurkat in human leukemia. Human leukemia cell lines were treated with celastrol at different concentrations. The inhibitory rate of cell proliferation was detected by MTT assay; the apoptosis rate was detected by AnnexinV-FITC/PI double staining; cell cycle was observed by PI staining; cell morphology was observed by transmission electron microscope (TEM). Cell proliferation was inhibited by celastrol, with IC_{50} of $(0.46 \pm 1.05) \mu\text{mol/L}$ and $(0.88 \pm 1.13) \mu\text{mol/L}$ at 24 h. Celastrol induced cell apoptosis in a dose-dependent manner. The cell cycle distribution of G_1 phase rate increased, S phase rate decreased ($P < 0.05$) with typical cell apoptosis-induced morphological changes. Results showed that celastrol could significantly inhibit cell proliferation and induce apoptosis in human leukemia cell lines of HL-60 and Jurkat.

Key words celastrol; HL-60 cell; Jurkat cell; apoptosis

This study was supported by the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions

雷公藤 (*Tripterygium wilfordii* Hook. f.) 系卫矛科雷公藤属木质藤本植物, 其味苦、有大毒, 具有活血通络、祛风除湿、消肿止痛等功效, 广泛应用于系

统性红斑狼疮、肾病综合征、类风湿性关节炎、器官移植排斥反应等疾病^[1]。雷公藤红素 (celastrol, 结构式见图 1) 又名南蛇藤素, 是从雷公藤属及南蛇

藤属植物中分离出的五环三萜类物质,具有较强的抗炎、免疫抑制及抗肿瘤等药理活性^[2]。2006年,中科院武汉植物园与美国科学家联合证实了雷公藤红素的抗肿瘤机制^[3],引发了对其抗肿瘤活性的研究热潮。有文献报道,在体外较低剂量的雷公藤红素即可抑制多种肿瘤细胞的生长,包括白血病、乳腺癌、肺癌、肝癌、胃癌、结肠癌、前列腺癌等相关肿瘤细胞^[4-6]。

白血病是造血系统常见的恶性肿瘤,目前治疗白血病的方法主要是化疗,通过诱导白血病细胞凋亡,是化疗药物作用的主要机制之一。本文以人急性髓性白血病 HL-60 细胞、急性 T 淋巴细胞白血病 Jurkat 细胞为研究对象,采用 MTT 法、流式细胞术和透射电镜,探讨雷公藤红素对两种白血病细胞的增殖和凋亡效应,希望通过对雷公藤红素抗肿瘤机制的深入研究,使雷公藤红素成为新的用于白血病治疗的有效药物。

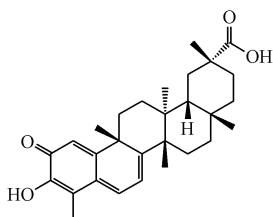


Figure 1 Chemical structure of celastrol

1 材料

1.1 药物与试剂

雷公藤红素(纯度大于99%,成都植标化纯技术有限公司),使用前用 DMSO 配成母液,临用前用细胞培养液配成所需浓度;改良型 RPMI-1640 培养基(美国 HyClone 公司);胎牛血清(浙江天杭生物科技有限公司);Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒,PI/RNase 染色液(美国 BD 公司);MTT 试剂盒(美国 Sigma 公司);柔红霉素(美国 Pharmacia & Upjohn 公司)。

1.2 仪器

Tecna Spirit 透射电镜(美国 FEI 公司);FAC-SCalibur 分析型流式细胞仪(美国 BD 公司);SpectraMax M2 酶标仪(美国 Molecular Devices 公司);Eclipse TS100 倒置荧光显微镜(日本 Nikon 公司)。

1.3 细胞系和培养条件

两种白血病细胞系(HL-60、Jurkat)均购自中

国科学院上海生物化学与细胞生物学细胞库。细胞用含 10% 灭活胎牛血清的 RPMI-1640 培养基,在 37 ℃,5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养。每 1~2 天传代 1 次,培养至对数生长期,供实验用。

2 方法

2.1 MTT 法检测对细胞的生长抑制作用

取对数生长期的 HL-60、Jurkat 两种细胞,以每毫升 2×10^5 个细胞的密度分别接种于 96 孔板,每孔加细胞悬液 100 μ L,每组设 3 复孔。实验组分别加入不同浓度的雷公藤红素(0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 μ mol/L)。对照组加入等体积 RPMI-1640 溶液,另设空白组(不加细胞)作为调零孔。药物分别作用 24, 48 h 后,加入 5 mg/mL MTT 试剂 20 μ L,37 ℃继续孵育 4 h,1 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,加入二甲基亚砜(DMSO) 150 μ L,低速振荡,使甲瓚结晶完全溶解,于酶标仪上测定 490 nm 波长处的吸收度。计算细胞的生长抑制率及 IC₅₀。以上实验重复 3 次。

2.2 Annexin V-FITC/PI 双标法检测细胞凋亡

按试剂盒说明书进行操作,设空白对照组、阳性对照组(1.89 μ mol/L 柔红霉素)和实验给药组。收集不同浓度雷公藤红素(0.25, 0.5, 1.0 μ mol/L)作用后的 HL-60、Jurkat 两种细胞及其对照组细胞,用预冷的 PBS 洗涤,将细胞混悬于 $1 \times$ 结合缓冲液 300 μ L 中,依次加入 Annexin V-FITC、PI 各 2.5 μ L,混匀,室温下避光反应 15 min,用流式细胞术检测细胞凋亡情况。

2.3 PI 染色法检测细胞周期

收集不同浓度雷公藤红素(0.25, 0.5, 1.0 μ mol/L)处理后的 HL-60、Jurkat 两种细胞及其对照组细胞,加预冷 75% 乙醇-20 ℃固定,用 PBS 洗去固定液,加入 PI/RNase 混合染料,室温避光孵育 15 min。混匀,过 300 目筛网,置流式管中检测细胞周期。

2.4 透射电镜观察

取 0.5 μ mol/L 雷公藤红素处理的 HL-60 细胞、1.0 μ mol/L 雷公藤红素处理的 Jurkat 细胞,离心弃去上清,沉淀用预冷的 PBS 洗涤 2 次,2.5% 戊二醛缓冲液 4 ℃固定过夜,常规后固定、脱水、包埋、聚合超薄切片、染色后用透射电子显微镜在观察其超微结构。

2.5 统计学分析

所得结果均表示为 $\bar{x} \pm s$, 应用 GraphPad Prism 5 统计软件进行分析, 指标比较采用 One-way ANOVA, 组间比较采用 Dunnett 检验, $P < 0.05$ 则认为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 雷公藤红素对细胞增殖的影响

由图 2 所示, 随着给药剂量和时间的增加, 雷

公藤红素对肿瘤细胞的生长抑制率显著上升, 呈一定的剂量-时间依赖关系。在给药 24 h 后, HL-60 的 IC_{50} 为 $(0.46 \pm 1.05) \mu\text{mol/L}$, Jurkat 的 IC_{50} 为 $(0.88 \pm 1.13) \mu\text{mol/L}$; 给药 48 h 后, HL-60 的 IC_{50} 为 $(0.55 \pm 1.02) \mu\text{mol/L}$, Jurkat 的 IC_{50} 为 $(0.50 \pm 1.12) \mu\text{mol/L}$ 。由图可以看出, 随着给药剂量和时间的增加, 24 h 和 48 h 对细胞的抑制率差异并不明显。因此, 后续实验均给药 24 h 处理细胞。

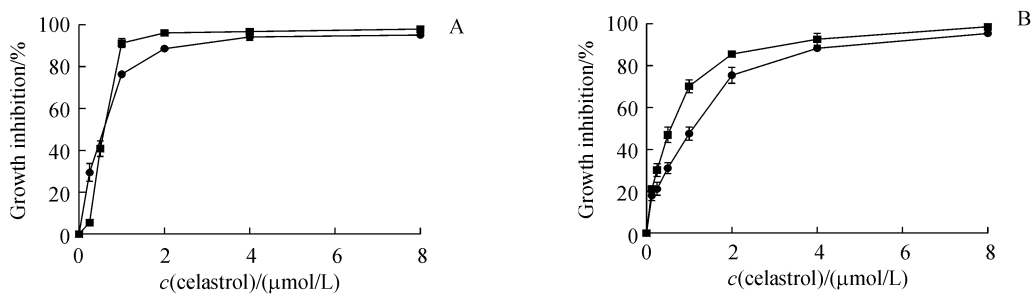


Figure 2 Inhibitory effects of various concentrations of celastrol on HL-60 cells (A) and Jurkat cells (B) ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.2 雷公藤红素对细胞凋亡的影响

用 0.25, 0.5, 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 雷公藤红素、1.89 $\mu\text{mol/L}$ 柔红霉素分别处理 HL-60 和 Jurkat 细胞 24 h 后, 收集细胞, 以 Annexin V-FITC/PI 染色, 采用流式细胞术检测细胞凋亡情况。结果如图 3 所示, 随着雷公藤红素浓度增加, 细胞凋亡率也随之增加, HL-60 细胞凋亡率 (%) 分别为 (10.20 ± 2.45) 、 (43.53 ± 1.88) 和 (98.77 ± 0.44) , 与空白对照组相比, 0.5, 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组差异均有统计学意义 ($P < 0.0001$); Jurkat 细胞凋亡率 (%) 分别为 (15.86 ± 0.88) 、 (26.26 ± 4.16) 和 (44.87 ± 4.47) , 与空白对照组相比, 0.5, 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组差异均有统计学意义 ($P < 0.01, P < 0.0001$)。

3.3 雷公藤红素对细胞周期的影响

用 0.25, 0.5, 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 雷公藤红素分别处理 HL-60 和 Jurkat 细胞 24 h 后, 收集细胞, PI/RNase 混合染料染色, 流式细胞术检测细胞周期, 结果如图 4 所示。通过与对照组比较发现, 用 0.25, 0.5, 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 雷公藤红素分别处理的 HL-60 和 Jurkat 细胞, S 期细胞比率较对照组下降, G_1 期细胞比率较对照组增加, 两组比较, 有显著性差异 ($P < 0.01$), 结果见表 1。上述数据表明雷公藤红素对 HL-60 和 Jurkat 细胞周期中的 G_1 期具有阻滞作用。

3.4 细胞形态学观察结果

正常 HL-60、Jurkat 细胞均呈较为均一的圆形或椭圆形, 细胞核、线粒体等细胞器清晰可见。用 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 雷公藤红素处理 HL-60 细胞、1.0 $\mu\text{mol/L}$ 雷公藤红素处理 Jurkat 细胞, 1.89 $\mu\text{mol/L}$ 柔红霉素处理两种细胞, 24 h 后可见细胞体积变小, 细胞质浓缩; 凋亡的细胞核内染色质高度盘绕, 出现许多称为气穴现象的空泡结构; 细胞核的染色质高度凝聚、边缘化, 形成新月形等典型的细胞凋亡形态学改变, 部分细胞核内出现凋亡小体 (图 5)。

4 讨论

细胞增殖和 (或) 凋亡异常是导致肿瘤发生的最根本原因, 现已发现许多抗肿瘤药物能通过修复或改变细胞周期的检验点达到治疗作用。

本实验以人急性髓性白血病 HL-60 细胞、急性 T 淋巴细胞白血病 Jurkat 细胞为实验材料, 研究雷公藤红素体外抗白血病的作。经初步研究发现, 雷公藤红素能显著抑制人白血病细胞的生长增殖, 促进肿瘤细胞凋亡, 并阻滞细胞周期于 G_1 期。研究结果表明, 雷公藤红素通过诱导 HL-60、Jurkat 细胞凋亡发挥对肿瘤细胞的生长抑制作用, 具有浓

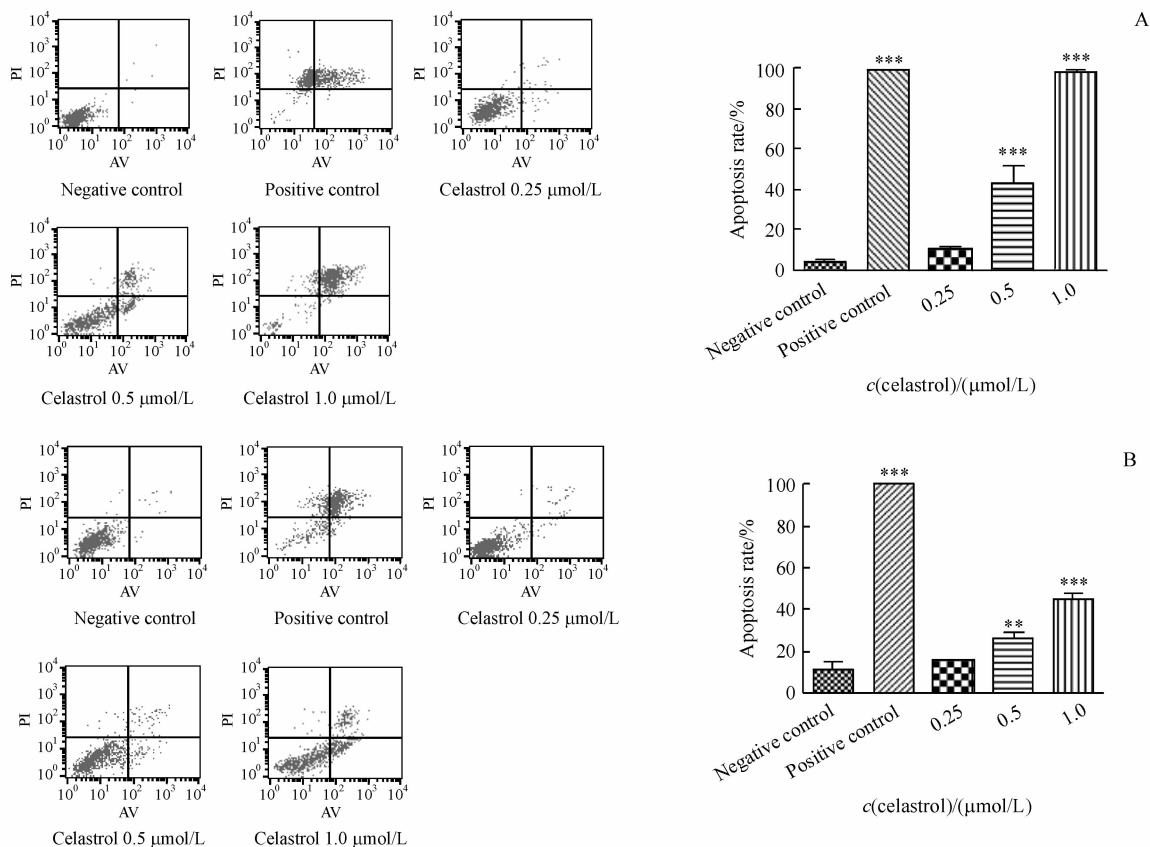


Figure 3 Annexin V/PI assay of apoptosis of HL-60 cells (A) and Jurkat cells (B) treated by celastrol taking daunorubicin (1.89 $\mu\text{mol/L}$) as positive control ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
* * $P < 0.01$, * * * $P < 0.0001$ vs negative control group

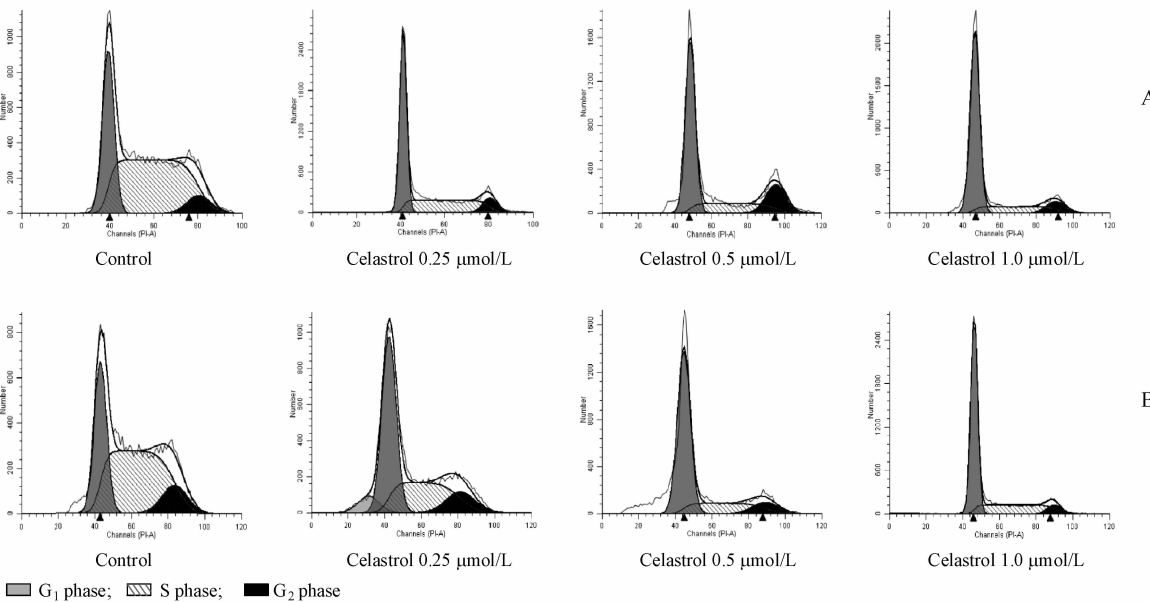


Figure 4 Effects of celastrol on cell cycle of HL-60 cells (A) and Jurkat cells (B)

Table 1 Quantification of the cells cycle with the treatment of celastrol ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| Group | Dose/($\mu\text{mol/L}$) | HL-60 cells | | Jurkat cells | |
|-----------|----------------------------|------------------------|----------------------|------------------------|----------------------|
| | | G ₁ phase/% | S phase/% | G ₁ phase/% | S phase/% |
| Control | | 28.44 \pm 2.75 | 62.71 \pm 0.27 | 30.14 \pm 3.50 | 58.87 \pm 2.87 |
| Celastrol | 0.25 | 30.24 \pm 3.23 | 45.85 \pm 4.01 | 43.24 \pm 2.05 | 48.96 \pm 3.60 |
| | 0.5 | 36.83 \pm 2.24 | 39.31 \pm 5.12 ** | 52.12 \pm 2.08 ** | 34.23 \pm 5.67 ** |
| | 1.0 | 38.74 \pm 7.22 | 32.59 \pm 6.23 *** | 55.45 \pm 3.86 ** | 27.81 \pm 3.58 *** |

** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$ vs control group

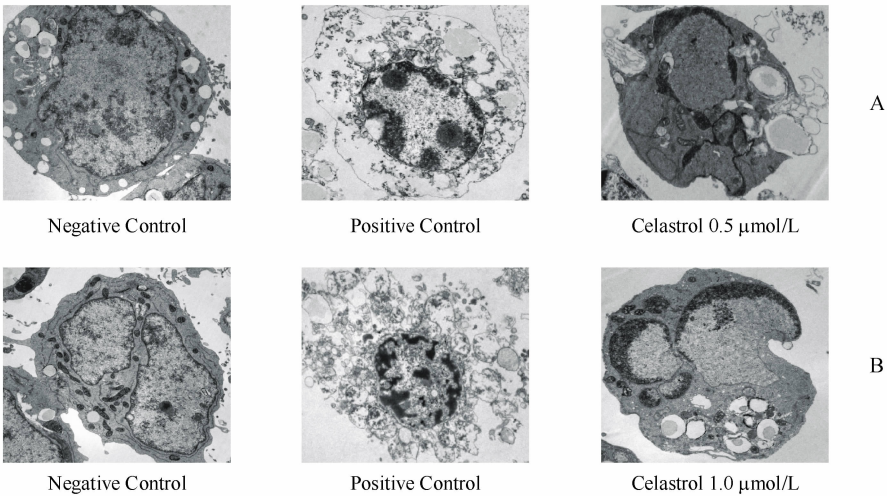


Figure 5 Morphological changes of HL-60 cells (A) and Jurkat cells (B) pre-treated and post-treated by celastrol ($\times 20\,000$)

度和时间依赖性。同时,透射电镜检测发现经雷公藤红素处理的 HL-60、Jurkat 细胞核固缩,质凝聚,边缘化,核膜裂解,出现凋亡小体。雷公藤红素抑制 HL-60、Jurkat 细胞生长、诱导其凋亡的具体机制还不十分清楚^[8-11],有待今后进一步研究。

参 考 文 献

[1] Ma J, Dey M, Yang H, *et al.* Anti-inflammatory and immunosuppressive compounds from *Tripterygium wilfordii* [J]. *Phytochemistry*, 2007, **68**(8): 1172 – 1178.

[2] Peng A, Gu Y, Lin S Y. Herbal treatment for renal diseases [J]. *Ann Acad Med Singapore*, 2005, **34**(1): 44 – 51.

[3] Kim DH, Shin EK, Kim YH, *et al.* Suppression of inflammatory responses by celastrol, a quinone methide triterpenoid isolated from *Celastrus regelii* [J]. *Eur J Clin Invest*, 2009, **39**(9): 819 – 827.

[4] Yang H, Chen D, Cui QC, *et al.* Celastrol, a triterpene extracted from the Chinese “Thunder of God Vine”, is a potent proteasome inhibitor and suppresses human prostate cancer growth in nude mice [J]. *Cancer Res*, 2006, **66**(9): 4758 – 4765.

[5] Pang X, Yi z, Zhang J, *et al.* Celastrol suppresses angiogenesis-

mediated tumor growth through inhibition of AKT/mammalian target of rapamycin pathway [J]. *Cancer Res*, 2010, **70**(5): 1951 – 1959.

[6] Ma YL, Yi H, Yang FL, *et al.* Celastrol down-regulates expression of P-Akt and Cyclin D1 in HL-60 cells and induces apoptosis [J]. *J Exp Hematol* (中国实验血液学杂志), 2010, **18**(4): 898 – 902.

[7] Salminen A, Lehtonen M, Paimela T, *et al.* Celastrol: molecular targets of Thunder God Vine [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, **394**(3): 439 – 442.

[8] Liu WP, Liu SX, Tang HZ, *et al.* Research progress on *Tripterygium wilfordii* Hook. [J]. *Chin Tradit Herbal Drugs* (中草药), 2010, **41**(7): 1215 – 1218.

[9] Ren XQ, Lu J, Meng XL, *et al.* Recent progress on pharmacological effects of celastrol [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm* (中华中医药杂志), 2013, **28**(9): 2679 – 2682.

[10] Ding HP, Li XP, Zhang W, *et al.* Research progress in pharmacologic molecular targets of celastrol [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 2012, **2**(4): 570 – 576.

[11] Liu RL, Shen XY, Li X, *et al.* Effect of tripterine on human breast cancer and its stem cells [J]. *Chin J Exp Surg* (中华实验外科杂志), 2012, **29**(12): 2455 – 2457.