

雷公藤甲素对白血病 HL-60 和 Jurkat 细胞增殖及凋亡的影响

环 飞¹, 胡艳辉¹, 秦 珩¹, 张晓玲^{2*}

(¹南京医科大学公共卫生学院, 江苏省医药农药兽药安全性评价与研究中心, ²卫生检验学系, 江苏 南京 211166)

[摘要] **目的:**探讨雷公藤甲素对人急性髓系白血病 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。**方法:**采用 MTT 法、Annexin V-FITC/PI 双染法、PI 染色法、透射电镜观察不同浓度雷公藤甲素作用于两种细胞, 对其生长增殖、凋亡、细胞周期及形态等方面的影响。**结果:**雷公藤甲素能显著抑制 HL-60、Jurkat 细胞的增殖, 降低其存活率。给药 24 h 后, 半数细胞抑制剂量(IC₅₀)分别为(42.50 ± 9.38)nmol/L 和(60.91 ± 9.77)nmol/L。能以剂量依赖方式诱导两种细胞凋亡, 细胞周期分布 G1 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。**结论:**雷公藤甲素能显著抑制 HL-60、Jurkat 细胞的生长增殖, 并诱导细胞凋亡。

[关键词] 雷公藤甲素; HL-60 细胞; Jurkat 细胞; 细胞凋亡

[中图分类号] R733.7

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)01-036-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20150108

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

Huan Fei¹, Hu Yanhui¹, Qin Heng¹, Zhang Xiaoling^{2*}

(¹Safety Assessment and Research Center for Drug, Pesticide and Veterinary Drug of Jiangsu Province, ²Department of Hygienic Analysis and Detection, of School of Public Health, NJMU, Nanjing 211166, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the effect of triptolide on the proliferation and apoptosis of HL-60 cells in acute myeloid leukemia and Jurkat cells in T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Methods:** Human leukemia cell lines were treated with triptolide at different concentrations. The inhibitory rate of cells proliferation was detected by MTT assay, apoptosis rate was detected by AnnexinV-FITC/PI double staining, cell cycle was observed by PI staining, and cell morphology was observed by transmission electron microscope (TEM). **Results:** Cell proliferation of HL-60 and Jurkat cells was significantly inhibited and their survival rates were reduced by triptolide in a dose-dependent manner, with the IC₅₀ value for 24 h of (42.50 ± 9.38) nmol/L and (60.91 ± 9.77) nmol/L, respectively. Triptolide induced cells apoptosis in a dose-dependent manner, apparent cell cycle and typical apoptotic morphological changes. **Conclusion:** Triptolide could significantly inhibit cell proliferation and induce apoptosis in human leukemia cell lines of HL-60 and Jurkat.

[Key words] triptolide; HL-60 cell; Jurkat cell; apoptosis

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(01):036-039, 050]

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]。雷公藤甲素(triptolide, TPL)是

从雷公藤植物中分离提取的一种环氧二萜内酯类化合物, 具有抗炎、抗生育、免疫调节等多种作用^[2]。近年来研究发现, 雷公藤甲素还具有广谱的抗肿瘤作用, 在体外可以抑制肿瘤细胞增殖和诱导细胞凋亡, 在体内可以抑制肿瘤生长和转移^[3-6]。雷公藤甲素对血液肿瘤具有抑制作用, 包括人急性髓系白血病 HL-60 细胞、急性 T 淋巴细胞白血病 Jurkat 细胞、U937、OCI-AML3、K562 细胞等^[7-9]。雷公藤甲素

[基金项目] 江苏高校优势学科建设工程项目

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: zhangxl3@aliyun.com

是雷公藤提取物中最具有潜力的抗肿瘤活性成分之一^[10]。本文以 HL-60、Jurkat 细胞为研究对象,采用 MTT 法、流式细胞术和透射电镜,探讨雷公藤甲素对两种白血病细胞的增殖和凋亡效应。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 药 物 与 试 剂

雷公藤甲素,纯度 > 99%(成都植标化纯技术有限公司);改良型 RPMI-1640 培养基(HyClone 公司,美国);胎牛血清(浙江天杭生物科技有限公司);Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒(BD 公司,美国);PI/RNase 染色液(BD 公司,美国);MTT 试剂盒(Sigma 公司,美国)。

1.1.2 仪 器

透射电镜 Tecnai Spirit(FEI 公司,美国);分析型流式细胞仪 FACSCalibur(BD 公司,美国);酶标仪 SpectraMax M2(Molecular Devices 公司,美国),倒置荧光显微镜 Eclipse TS100(Nikon 公司,日本),CO₂ 培养箱(Thermo 公司,美国)。

1.1.3 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 d 传代 1 次,培养至对数生长期,供实验用。

1.2 方 法

1.2.1 MTT 法检测雷公藤甲素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 2×10⁵ 个/ml 分别接种于 96 孔板,每孔加细胞悬液 100 μl,每组设 3 复孔。实验组分别加入不同浓度的雷公藤甲素(3.125、6.250、12.005、25.000、50.000、100.000、200.000 nmol/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 g/L MTT 试剂 20 μl,37℃继续孵育 4 h,1 000 r/min 离心 10 min,弃上清,加入二甲基亚砷(DMSO)150 μl,低速震荡,使甲瓞结晶完全溶解,于酶标仪上测定 490 nm 波长处的吸光度值。计算细胞的生长抑制率和半数细胞抑制剂量(IC₅₀)。以上实验重复 3 次。

1.2.2 Annexin V-FITC/PI 双标法检测细胞凋亡

按试剂盒说明书进行操作,设对照组和实验组。收集不同浓度雷公藤甲素(25、50、100 nmol/L)

作用后的 HL-60、Jurkat 细胞及其对照组细胞,用 4℃ 预冷 PBS 洗涤 2 次,以 1×10⁶ 个/ml 的细胞密度重悬于 1×结合缓冲液 300 μl 中,依次加入 Annexin V-FITC、PI 各 2.5 μl,混匀,避光,室温反应 15 min,用流式细胞术检测细胞凋亡情况。

1.2.3 PI 染色法检测细胞周期

收集不同浓度雷公藤甲素(25、50、100 nmol/L)处理后的 HL-60、Jurkat 细胞及其对照组细胞,加预冷 75%乙醇-20℃固定,用 1×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。

1.2.4 透射电镜观察

取 50 nmol/L 雷公藤甲素处理 HL-60 细胞、100 nmol/L 雷公藤甲素处理 Jurkat 细胞,离心后弃上清,沉淀用冰预冷的 pH7.4 PBS 离心洗涤 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亚细胞水平观察其超微结构。

1.3 统 计 学 分 析

所得结果均表示为均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$),应用 GraphPad Prism5 统计软件进行分析,指标比较采用 One-way ANOVA,组间比较采用 Dunnett *t* 检验, $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 雷公藤甲素对细胞增殖的影响

随着给药剂量和时间的增加,雷公藤甲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(图 1)。在给药 24 h 后,HL-60 的 IC₅₀ 为 (42.50 ± 9.38)nmol/L, Jurkat 的 IC₅₀ 为 (60.91 ± 9.77)nmol/L;给药 48 h 后,HL-60 的 IC₅₀ 为 (22.47 ± 3.79)nmol/L, Jurkat 的 IC₅₀ 为 (38.64 ± 6.00)nmol/L。由图可以看出,随着剂量的增加,给药 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。

2.2 雷公藤甲素对细胞凋亡的影响

用 25、50 和 100 nmol/L 雷公藤甲素分别处理 HL-60 和 Jurkat 细胞 24 h 后,收集细胞,Annexin V-FITC/PI 双染,流式细胞术检测细胞凋亡情况(图 2A~B),随着雷公藤甲素浓度的增加,细胞凋亡率也随之增加。HL-60 分别为 (7.73 ± 3.34)%、(56.25 ± 3.05)%、(77.43 ± 3.43)%,与对照组 (4.01 ± 1.83)% 比较,50 和 100 nmol/L 剂量组差异均有统计学意义($P < 0.001$);Jurkat 细胞分别为 (16.35 ±

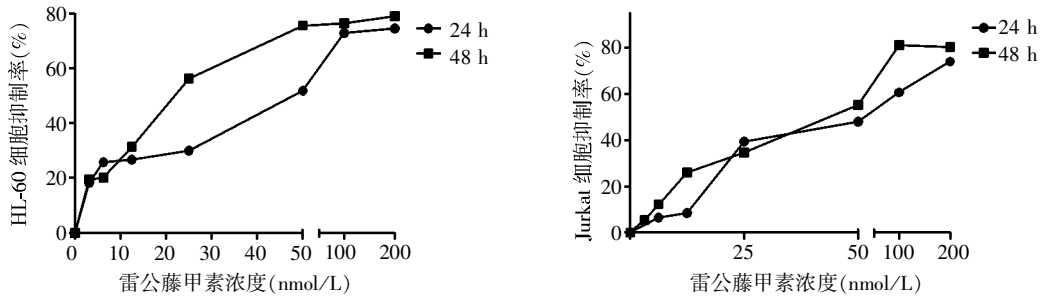


图 1 雷公藤甲素对细胞增殖抑制的影响

Figure 1 Inhibitory effects of triptiride on cell proliferation

5.65%)、(38.45 ± 3.86)%、(64.74 ± 1.86)%，与对照组 (11.22 ± 5.73)%比较,50 和 100 nmol/L 剂量组差异均有统计学意义($P < 0.001$),结果如图 2C 所示。

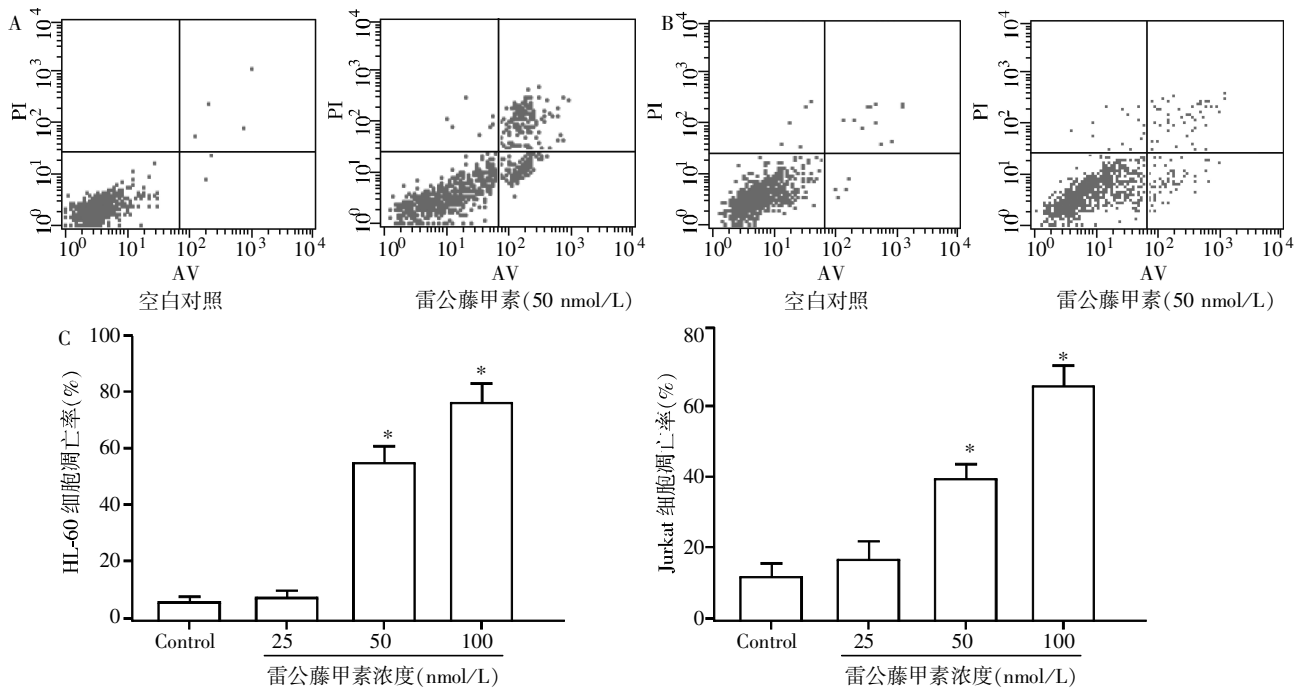
2.3 雷公藤甲素对细胞周期的影响

用 25,50 和 100 nmol/L 雷公藤甲素分别处理 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(图 3)。通过与对照组比较发现,用 25、50 和 100 nmol/L 雷公藤甲素处理的 HL-60 和 Jurkat 细胞,S 期细胞比率较对照组下降,G1 期细胞比率较对照组增加,两组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$,表 1)。上述数据表明雷公藤甲素对 HL-60 和 Jurkat 细胞周期中的 G1 期具有阻滞作用。

2.4 细胞形态学观察结果

因两种细胞对雷公藤甲素的耐受程度不同,从流式细胞术的结果来看,相同的给药剂量下,HL-60 细胞的凋亡率高于 Jurkat 细胞。在前期实验的基础上,选择用 50 nmol/L 雷公藤甲素处理 HL-60 细胞、100 nmol/L 雷公藤甲素处理 Jurkat 细胞。

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。给药 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,形成新月体形等典型的细胞凋亡形态学变化,部分细胞细胞核内出现凋亡小体(图 4)。



A:HL-60 细胞;B:Jurkat 细胞;C:定量分析结果(与对照组相比,* $P < 0.001$, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)。

图 2 雷公藤甲素对 HL-60、Jurkat 细胞凋亡的影响

Figure 2 Effects of triptiride on apoptosis of HL-60 and Jurkat cells

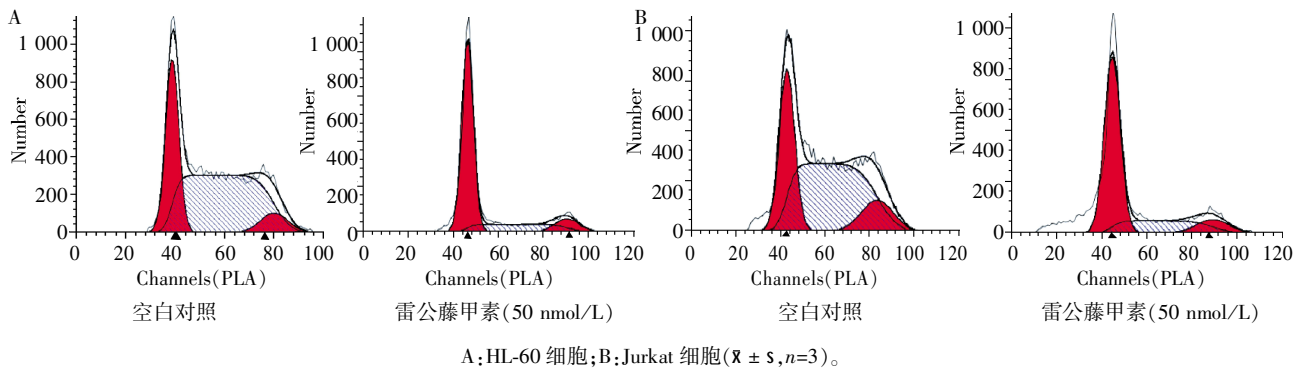


图 3 雷公藤甲素对 HL-60、Jurkat 细胞周期分布的影响

Figure 3 Effects of triptolide on cell cycle of HL-60 and Jurkat cells

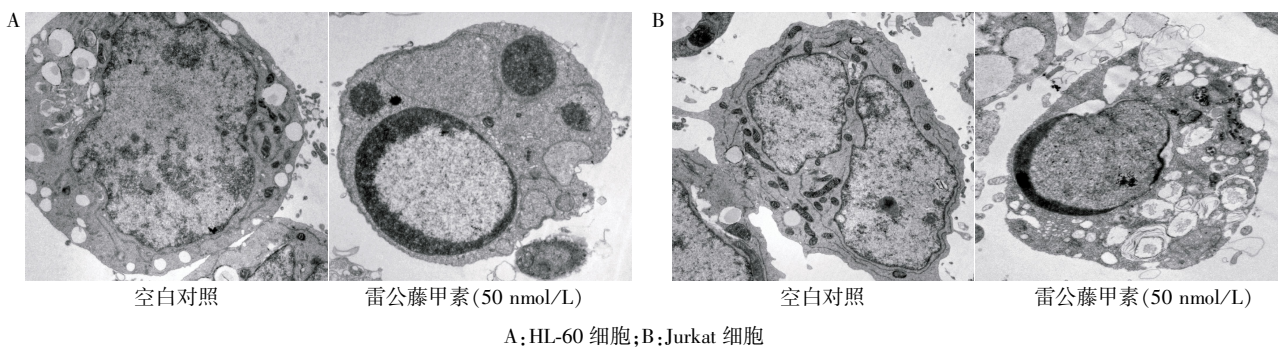


图 4 雷公藤甲素作用前后细胞形态学改变的电镜观察结果($\times 20\ 000$)

Figure 4 Morphological changes of cells pre-treated and post-treated by triptolide($\times 20\ 000$)

表 1 雷公藤甲素对 HL-60、Jurkat 细胞周期分布的影响

Table 1 Effects of triptolide on cell cycle of HL-60 and Jurkat cells (%)

组别	HL-60		Jurkat	
	G1 期	S 期	G1 期	S 期
对照组	28.44 \pm 2.75	62.71 \pm 0.27	30.14 \pm 3.50	58.87 \pm 2.87
实验组	36.66 \pm 2.99	25.34 \pm 2.10*	65.89 \pm 1.98*	27.56 \pm 1.87*

与对照组比较, * $P < 0.01$ 。

3 讨论

细胞凋亡涉及一系列基因的激活、表达及调控,是细胞为更好地适应生存环境而采取的主动死亡过程,在心血管病变、神经性病变、肿瘤的发生等疾病中发挥重要的作用^[11]。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测点达到治疗作用。

白血病是造血系统的一种恶性肿瘤,又称血癌。按照细胞类型进行分类,大致可分为骨髓性白血病和淋巴细胞性白血病。本实验同时考察了这两种类型,以人急性髓系白血病 HL-60 细胞、急性 T 淋巴细胞白血病 Jurkat 细胞为实验材料,研究雷公藤甲素体外抗白血病的作用。经初步研究发现,雷公藤甲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 G1 期。研究结果表明,雷公藤甲素通过诱导 HL-60、Jurkat 细胞凋亡发挥对肿瘤细胞的生长抑制作用,具有浓度和时间依赖性。同时,透射电镜检测发现经雷公藤甲素处理的 HL-60、Jurkat 细胞,核固缩、质凝聚、边缘化、核膜裂解、出现凋亡小体。从量化结果分析来看,随着雷公藤甲素作用浓度的增加,发生凋亡的细胞比例逐渐增加,呈明显的剂量依赖性。

影响细胞凋亡的因素很多,机制也是复杂多样,迄今尚未明了。而雷公藤甲素抑制 HL-60、Jurkat 细胞生长,诱导其凋亡的具体机制还不十分清楚^[12-14],有待于进一步的深入研究。相信不久的将来,随着对雷公藤甲素抗肿瘤机制研究的不断深入,雷公藤甲素有望作为新的有效药物用于白血病的治疗,拓宽白血病的用药范围。

[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 SY. Herbal treatment for renal diseases [J]. *Ann Acad Med Singapore*, 2005, 34(1): 44-51

(下转第 50 页)