

· 药理与临床 ·

冬凌草甲素对 Raji 细胞的增殖抑制作用及其机制

刘加军^{1,3}, 潘祥林², 伍新尧¹, 王江峰¹, 陆惠玲¹, 林东军³, 黄仁魏^{3*}

(1. 中山大学中山医学院 法医物证学实验室, 广东 广州 510080; 2. 山东大学第二医院 血液肿瘤中心, 山东 济南 250033; 3. 中山大学附属第三医院 血液科, 广东 广州 510630)

摘要:目的 探讨冬凌草甲素对 B 淋巴细胞白血病细胞株 Raji 细胞的增殖抑制作用及其机制。方法 以不同浓度的冬凌草甲素作用于体外培养的 Raji 细胞, MTT 法检测细胞生长抑制率, 应用流式细胞仪、Hoechst 33258 荧光染色法观察细胞凋亡, TRAP-PCR-ELISA 法检测细胞凋亡前后的端粒酶活性。结果 冬凌草甲素可显著降低 Raji 细胞的端粒酶活性, 抑制细胞的生长, 诱导细胞发生凋亡, 并呈现出明显的剂量-效应与时间-效应关系。结论 冬凌草甲素对 B 淋巴细胞白血病具有明显的体外抗白血病作用, 降低细胞端粒酶活性, 诱导细胞发生凋亡, 可能是其重要作用机制。

关键词: 冬凌草甲素; 白血病; 端粒酶; 细胞凋亡

中图分类号: R733.7; R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)07-0774-04

Inhibitory effect and mechanism of oridonin on Raji cells proliferation

L U Jia-jun^{1,3}, PAN Xiang-lin², WU Xin-yao¹, WANG Jiang-feng¹, LU Hui-ling¹L N Dong-jun³, HUANG Ren-wei^{3*}

(1. Laboratory of Forensic and Biological Science, Medical College of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Center of Hematology and Oncology, the Second Hospital of Shandong University, Jinan 250033, China; 3. Department of Hematology, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou, 510630, China)

Abstract: **Object** To investigate the inhibitory effect of oridonin on Raji cells (B lymphocyte leukemic strain) and its mechanism. **Methods** Raji cells in culture medium *in vitro* were given different concentrations of oridonin. The inhibitory ratio of the cells was measured by MTT assay, apoptosis of cells was observed by flow cytometry (FCM) and Hoechst 33258 fluorescence staining, and the activity of telomerase was detected using TRAP-PCR-ELISA before and after apoptosis occurred. **Results** Oridonin could decrease the activity of telomerase, as well as cause apoptosis and inhibit the growth of Raji cells significantly. The suppression was both in time- and dose-dependent manner. **Conclusion** Oridonin has anti-leukemic efficacy on B lymphocyte leukemia *in vitro* very significantly, inducing apoptosis and decreasing the activity of telomerase may be most important mechanism.

Key words: oridonin; leukemia; telomerase; cell apoptosis

冬凌草甲素 (oridonin) 是从冬凌草中提取分离的一种四环二萜类化合物, 已有大量资料证明, 冬凌草甲素具有广泛的抗肿瘤作用。端粒酶是一种新型的肿瘤标志物, 端粒酶的活化是肿瘤发生发展的重要机制之一。在造血系统的恶性肿瘤中端粒酶活性均显著增高, 其中以急性白血病细胞活性最高, 端粒酶活性的变化已成为筛选抗肿瘤药物的重要标准之一。冬凌草甲素对 B 淋巴细胞白血病的作用机制尚未见资料报道, 为了探讨冬凌草甲素对其作用机

制, 本实验以体外培养的 B 淋巴细胞白血病细胞株 Raji 细胞为研究对象, 观察不同浓度冬凌草甲素对 Raji 细胞的生长抑制及诱导凋亡作用, 并检测细胞端粒酶活性的变化, 旨在探讨冬凌草甲素的体外抗白血病作用机制, 为冬凌草甲素进一步应用于临床治疗白血病提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞系: B 淋巴细胞白血病细胞株 Raji 细胞购自上海第二医科大学瑞金医院血液学研究所。

* 收稿日期: 2003-09-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30100216)

作者简介: 刘加军 (1966—), 男, 山东省日照市人, 主治医师, 讲师, 山东大学博士, 中山大学博士后, 主要从事血液肿瘤的分子生物学及细胞凋亡机制等方面研究。 Tel: (020) 87330557 E-mail: liujj@gzsums.edu.cn

* 通讯作者

1.2 药物: 冬凌草甲素(纯度>95%)由山东大学血液肿瘤中心潘祥林教授馈赠。

1.3 主要试剂: RPMI 1640 培养液: 美国 Gibco 公司产品。小牛血清: 杭州四季青生物制品厂产品。TRAP-PCR-ELISA 试剂盒: 由山东大学遗传学教研室提供。Hoechst 33258 荧光染料: Sigma 公司产品。

1.4 主要仪器: 超净工作台(杭州产)、CO₂细胞培养箱、普通及倒置显微镜(日本 Olympus 产品)、平板离心机(国产)、96孔培养板(Deta, 美国)、FACS-Scan 型流式细胞仪(Becton Dickinson, 美国)、普通及超低温水箱、电热恒温干燥箱、微量移液器等。

2 方法

2.1 细胞培养: 将 Raji 细胞接种于含 10% 灭活小牛血清的 RPMI 1640 培养液中, 在 37℃、5% CO₂ 饱和湿度下培养, 每 2~3 d 换液 1 次, 取对数生长期的细胞进行实验, 分别用各种浓度的冬凌草甲素处理细胞, 未加药物组为对照组。

2.2 细胞生长抑制率的测定: 采用噻唑蓝(MTT)还原法进行检测。取对数生长期的 Raji 细胞, 调整细胞浓度为 $2 \times 10^5/\text{mL}$, 并分装于 25 mL 培养瓶中, 每瓶 3 mL, 加入 2.5 mol/L 冬凌草甲素储存液 0、10、20、30 μL , 使冬凌草甲素的终浓度分别为 0、8、16、24 $\mu\text{mol/L}$ 。取 96 孔板数个, 每孔加入上述细胞悬液 100 μL , 每种药物浓度设 6 个平行孔, 培养不同的时间(0、12、24、36、48、60、72 h)后从培养箱中取出, 每孔加入 MTT (5 mg/mL) 10 μL , 再继续培养 4~6 h 后取出, 离心后吸去上清液, 每孔加入 DMSO 100 μL , 振荡混匀(约 5 min), 显微镜下观察着色颗粒消失后, 在 20 min 内以 570 nm 为检测波长, 630 nm 为参考波长, 测定吸光度(A)值, 计算细胞生长抑制率。

$$\text{细胞生长抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{实验}}) / A_{\text{对照}}$$

2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡比例: 收集不同药物浓度处理不同时间后的 Raji 细胞, PBS 缓冲液清洗 2 次, 将细胞沉淀充分混匀, 用 70% 冷乙醇 4℃ 固定 24 h 以上。离心去除乙醇固定液, 用 PBS 清洗 1 次后, 加入 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNA 酶, 流式细胞仪分析不同 DNA 含量的细胞分布。应用 Modifit L TL 1.00 (MAC) 分析系统进行数据处理, 低于 G₁ 期的细胞(亚 G₁ 期)为凋亡细胞, 其占细胞总数的比例为凋亡细胞比例。

2.4 细胞凋亡的形态学观察: 采用 Hoechst 33258 DNA 染色。收集不同浓度药物处理不同时间后的 Raji 细胞, 离心(3 000 r/min, 3 min)后将细胞吹

打均匀, 涂片并干燥后, 用甲醛液(40 g/L)固定 10 min, 用蒸馏水洗 2 次, 室温下晾干; 然后用 Hoechst 33258 (5 mg/L) 染色 5 min, 用蒸馏水洗 2 次, 室温下晾干, 在荧光(检测波长 360 nm, 参比波长 450 nm)显微镜下观察, 并随机拍照。

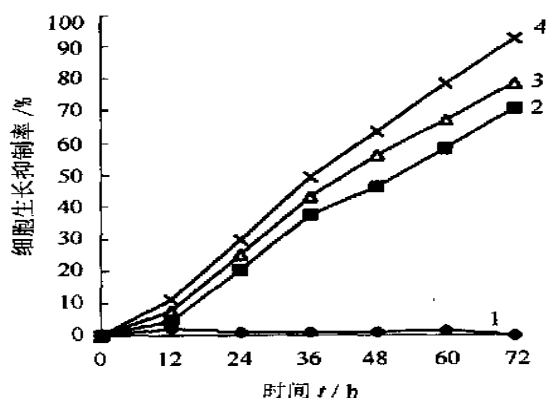
2.5 端粒酶活性的检测: 采用 TRAP-PCR-ELISA 法检测, 严格按试剂盒说明进行操作。具体步骤为:

(1) 提取端粒酶: 收集 1×10^6 个不同浓度药物处理后的细胞, 用 PBS 洗涤 2 次, $4 \times 3\,000 \times g$ 离心 10 min 后弃上清液, 加入 200 μL CHAPS 裂解液, 冰浴 30 min, $4 \times 12\,000 \times g$ 离心 20 min 后取上清液检测。(2) RT-PCR 扩增: 按试剂盒说明书进行。取上述提取物 2 μL , 反应混合液 25 μL , 加入 DEPC 处理的无菌重蒸水至总体积 50 μL , 并按以下步骤循环: 25℃、30 min 循环 1 次, 94℃、5 min 循环 1 次, 94℃、30 s, 50℃、30 s, 72℃、90 s, 循环 30 次, 再经 72℃、10 min 后置 4℃ 保存。(3) 检测扩增产物: 取扩增产物 5 μL 加入 20 μL 变性液中, 室温放置 10 min, 再加入 225 μL 杂交混合液, 充分混匀, 取 100 μL 加入亲和素包被的酶标板内, 37℃ 振荡孵育 2 h, 加入抗 DIG POD 的抗体与之作用, 最后加入 POD 的底物 TMB 显色, 加入中止液中止反应, 在自动酶标仪上测定 450 和 690 nm 波长处的 A 值。以 $A = A_{450} - A_{690}$ 表示端粒酶活性。

2.6 统计学处理: 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SAS 6.12 统计软件进行方差分析及组间比较。

3 结果

3.1 对 Raji 细胞生长抑制率的测定: 结果见图 1。随冬凌草甲素浓度的增加及作用时间的延长, 细胞生长抑制率逐渐升高, 3 种浓度的药物作用 60 h 后, 细胞生长抑制率均在 50% 以上, 与对照组(冬



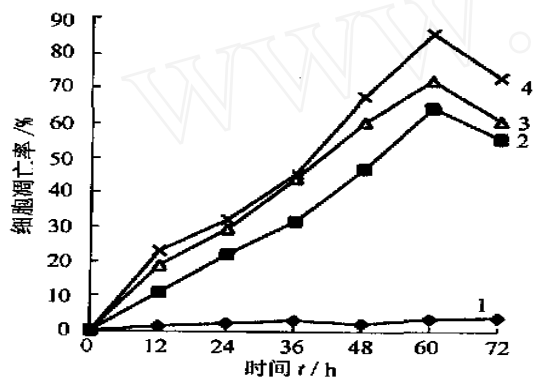
1-0 $\mu\text{mol/L}$ 2-8 $\mu\text{mol/L}$ 3-16 $\mu\text{mol/L}$ 4-24 $\mu\text{mol/L}$

图1 冬凌草甲素引起的细胞生长抑制率

Fig 1 Cell growth inhibitory rate caused by oridonin

凌草甲素为 $0 \mu\text{mol/L}$) 相比差异均有显著性 ($P < 0.01$), 8 、 $16 \mu\text{mol/L}$ 冬凌草甲素引起的生长抑制率差异无显著性 ($P > 0.05$), $24 \mu\text{mol/L}$ 冬凌草甲素作用 60 h 后引起的生长抑制率明显高于其他两种浓度的药物 ($P < 0.05$)。

3.2 细胞凋亡率检测: 结果见图 2。细胞凋亡率随作用时间的延长而逐渐增加。3 种浓度的药物与对照组比较均能明显诱导细胞凋亡 ($P < 0.01$), 16 、 $24 \mu\text{mol/L}$ 冬凌草甲素引起的凋亡率之间差异无显著性 ($P > 0.05$), 但均高于 $8 \mu\text{mol/L}$ 冬凌草甲素引起的细胞凋亡率 ($P < 0.05$)。药物作用 $48 \sim 60 \text{ h}$ 后凋亡细胞数量达高峰, 但随之细胞凋亡率下降, 这可能是细胞大部分死亡所致。



1-0 $\mu\text{mol/L}$ 2-8 $\mu\text{mol/L}$ 3-16 $\mu\text{mol/L}$ 4-24 $\mu\text{mol/L}$

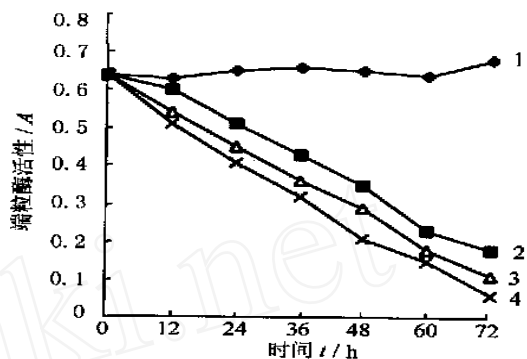
图 2 冬凌草甲素引起的细胞凋亡率

Fig 2 Cell apoptotic rate caused by oridonin

3.3 细胞形态学的变化: 3 种浓度冬凌草甲素处理 Raji 细胞后, 随药物作用时间的延长, 细胞的生长逐渐受到抑制, 48 h 后生长抑制明显。在倒置显微镜下可见, 部分细胞核内染色质浓缩成块状, 有些染色质块聚集在核膜边缘或近贴核膜, 染色质逐渐发生断裂, 部分核膜逐渐崩解, 染色质呈分叶状或形成粗细不均匀的碎块并相互分离, 呈现出细胞凋亡的典型变化。 $24 \mu\text{mol/L}$ 冬凌草甲素处理 Raji 细胞 60 h 后, 细胞凋亡最为明显, 在 Hoechst 染色图片上可见 $70\% \sim 80\%$ 的细胞发生凋亡的特征性改变。但随后这种特征性变化又逐渐减少, 60 h 后在 Hoechst 染色下, 可见细胞核的荧光强度逐渐减弱。各浓度药物作用于 Raji 细胞后均未见细胞的分化现象。

3.4 对 Raji 细胞端粒酶活性的影响: 结果见图 3。Raji 细胞的端粒酶活性较高, 3 种浓度药物作用 12 h 后, 细胞端粒酶活性均显著低于对照组 ($P < 0.01$)。随药物浓度的增加和作用时间的延长, 端粒酶活性逐渐下降, 并呈现出剂量-效应与时间-效应

关系, 在药物作用 72 h 后, 细胞的端粒酶活性几近为零, 其中 $24 \mu\text{mol/L}$ 冬凌草甲素对端粒酶活性的影响最为显著, 与其他两种浓度药物比较差异有显著性 ($P < 0.05, 0.01$)。



1-0 $\mu\text{mol/L}$ 2-8 $\mu\text{mol/L}$ 3-16 $\mu\text{mol/L}$ 4-24 $\mu\text{mol/L}$

图 3 冬凌草甲素对细胞端粒酶活性的影响

Fig 3 Effect of oridonin on cell telomerase activity

4 讨论

冬凌草甲素对 EAC、HAC、S₁₈₀、P₃₈₈ 及 L₁₂₁₀ 等多种移植性肿瘤均具有明显的抑制作用, 其对实体瘤的治疗目前已广泛应用于临床, 常用于食道癌、胃癌等多种实体瘤的治疗, 并且均取得了明显的临床疗效。研究表明冬凌草甲素的抗癌作用可能与降低肿瘤细胞的钠泵转运活性、抗突变作用及增强其他抗肿瘤药物的疗效有关^[1-3]。

最近的研究表明冬凌草甲素对某些血液系统的肿瘤细胞具有明显的生长抑制作用, 并能诱导细胞发生凋亡^[4,5], 但冬凌草甲素对 Raji 细胞的作用机制尚未见报道。本实验结果表明, 冬凌草甲素能明显抑制 Raji 细胞的生长, 诱导其发生凋亡, 与文献报道一致^[6,7]。为了探讨冬凌草甲素对白血病细胞的生长抑制及诱导凋亡机制, 本实验检测了细胞生长抑制及发生凋亡过程中细胞端粒酶活性的变化。结果表明, 该药能显著降低细胞端粒酶的活性, 且呈现出一定的时间-效应与剂量-效应关系。

端粒酶 (telomerase) 是一种特殊的核糖核蛋白多聚酶, 由 RNA 和蛋白质构成, 其中 RNA 成分是端粒合成的模板, 其蛋白质成分是一种逆转录酶, 因此, 端粒酶的活化可以弥补复制造成的端粒缩短。端粒-端粒酶学说认为大多数的肿瘤细胞均有端粒酶活性的显著升高, 肿瘤细胞在其复制过程中, 尽管其端粒不断缩短, 甚至比相应的正常组织更短, 但由于细胞在恶变过程中发生了端粒酶的再激活, 因此仍表达端粒酶活性。由于持续存在高水平的端粒酶活性, 细胞的端粒长度随着细胞的不断分裂仍保持

相对的稳定,使得细胞成为一种“永生”状态,因此,端粒酶活性的增加与肿瘤的发生、发展密切相关;临床资料表明造血系统的恶性肿瘤普遍表现出端粒酶活性增强^[8],其中以急性白血病端粒酶活性最强,在白血病的不同阶段其端粒酶水平也不完全一样,端粒酶活性的高低与白血病的进展程度相一致,复发及难治性急性白血病的端粒酶水平明显高于缓解及恶性程度较低的急性白血病,端粒酶活性越高的白血病患者其化疗效果及预后越差,存活率也越低。因此,端粒酶活性的高低对于判断白血病的疗效、恶性程度、预后及复发等均具有重要的临床意义。

端粒酶活性的变化与细胞凋亡的关系目前尚未完全阐明。近期研究资料显示,在细胞凋亡过程中,端粒酶可能起重要的调节机制^[9,10],端粒酶活性下降可以促进细胞的程序性死亡过程,端粒酶活性抑制剂可以增加急性白血病细胞的凋亡率,而且可以增加其他化疗药物的临床疗效,“抗端粒酶疗法”有可能成为一种广泛的白血病治疗方法,而且也是筛选新型抗肿瘤药物的重要指标之一。本实验结果显示,冬凌草甲素可显著降低 Raji 细胞的端粒酶活性,抑制细胞的生长,诱导细胞发生凋亡,这可能是

冬凌草甲素体外抗白血病作用的重要机制之一。

References

- [1] Wu KM. Effect of oridonin on the activity of tumor cell sodium pump [J]. *Cancer Res Prev Treat* (肿瘤防治研究), 1994, 21(4): 208-209.
- [2] Yang SL, Han SY, Zhang Q, et al. Study on the antitumor activity of oridonin [J]. *Carcinog Teratog Mutag* (癌变·畸变·突变), 2001, 13(1): 8-10.
- [3] Yang SL, Zhang Q, Song AY, et al. The effect of oridonin on UDS in the primary cells of the lung and liver in rat [J]. *Henan Med Univ* (河南医科大学学报), 2001, 36(4): 415-418.
- [4] Wang J, Liu QY, Hu HY, et al. Oridonin induces apoptosis in human leukemia HL-60 cells [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2001, 17(4): 402-404.
- [5] Liu JJ, Wu XY, Pan XL, et al. Mechanism of oridonin induced apoptosis on NB4 cells [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2003, 25(11): 900-902.
- [6] Ikezoe T, Chen SS, Tong XJ, et al. Oridonin induces growth inhibition and apoptosis of a variety of human cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2003, 23(4): 1187-1193.
- [7] Han QB, Li ML, Li SH, et al. Ent-kaurane diterpenoids from *Isodon rubescens* var. *lushanensis* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2003, 51(7): 790-793.
- [8] Ohgashiki H, Sashida G, Tauchi T. Telomeres and telomerase in hematologic neoplasia [J]. *Oncogene*, 2002, 21(4): 680-687.
- [9] Saretzki G. Telomerase inhibition as cancer therapy [J]. *Cancer Lett*, 2003, 194(2): 209-219.
- [10] Nakajima A, Tauchi T, Sashida G. Telomerase inhibition enhances apoptosis in human acute leukemia cells: possibility of antitelomerase therapy [J]. *Leukemia*, 2003, 17(3): 560-567.

Effects of crocetin on experimental atherosclerosis in rats

DENG Yuan-xiong, QIAN Zhi-yu*, TANG Fu-tian

(Department of Pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: **Object** To study the effect of crocetin (CCT) on experimental atherosclerotic formation in rats. **Methods** Atherosclerotic rat models were replicated by administration of excessive vitamin D₂ (VD₂) followed by feeding a high-cholesterol diet. The blood samples were assayed for the content of TC, TG, LDL-C, HDL-C, MDA level, and the activity of SOD in serum. The sections of aorta and liver were examined. **Results** High- and low-dosages of CCT were found significantly to reduce serum TC, LDL-C, and MDA level; and elevate serum HDL-C level, SOD activity, and antiatherosclerotic index (AAI) in atherosclerotic rats. The histopathological observation of aortic arch showed the alleviation of atherosclerotic damage by CCT. **Conclusion** CCT has obvious antiatherosclerotic effect in rats.

Key words: crocetin; antiatherosclerosis; blood lipid; vitamin D₂ (VD₂)

西红花酸对大鼠实验性动脉粥样硬化的影响

邓远雄, 钱之玉*, 唐富天

(中国药科大学 药理教研室, 江苏 南京 210009)

摘要: **目的** 研究西红花酸对大鼠实验性动脉粥样硬化的影响。 **方法** 采用给予大剂量维生素D₂(VD₂)后饲喂

* 收稿日期: 2003-10-10

作者简介: 邓远雄(1968—),男,湖南桂东人,主管药师,硕士研究生,主要从事生化药理研究。 E-mail: dengyx1968@tom.com

* 通讯作者 Tel: (025) 83271322