

雷公藤红素对神经胶质瘤 U87 细胞增殖、凋亡和迁移的影响

龚建军¹, 胡永胜^{2*}

1. 南京军区鼓浪屿疗养院, 福建 厦门 361002

2. 解放军第118医院, 浙江 温州 325000

摘要: **目的** 研究雷公藤红素对神经胶质瘤 U87 细胞增殖、凋亡和迁移的影响及其机制。**方法** 采用 MTT 法检测雷公藤红素对 U87 细胞增殖的影响; 流式细胞术检测 U87 细胞凋亡和线粒体膜电位; Western blotting 法检测 U87 细胞中线粒体途径相关凋亡蛋白表达水平; Transwell 和划痕实验检测 U87 细胞的迁移能力。**结果** 雷公藤红素可显著抑制 U87 细胞的增殖、降低 U87 细胞线粒体膜电位并诱导 U87 细胞凋亡; 雷公藤红素显著性地调控 Bcl-2、Bax、细胞色素 C (Cyt C)、Caspase-9 和 Caspase-3 的表达水平; 同时雷公藤红素显著抑制 U87 细胞迁移能力。**结论** 雷公藤红素抑制 U87 细胞增殖、迁移和诱导其凋亡, 其中凋亡机制可能是通过调控线粒体途径相关凋亡蛋白来实现的。

关键词: 雷公藤红素; 神经胶质瘤 U87 细胞; 细胞凋亡; 线粒体途径; 细胞迁移

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)24-5194-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.24.021

Effects of celastrol on proliferation, apoptosis, and migration of glioma U87 cells

GONG Jian-jun¹, HU Yong-sheng²

1. Gulangyu Sanatorium of Nanjing Military Area Command, Xiamen 361002, China

2. Department of Pharmacy, the 118th Hospital of PLA, Wenzhou 325000, China

Abstract: Objective To study the effects of celastrol on the proliferation, apoptosis and migration of human Glioma U87 cells and investigate its preliminary action mechanism. **Methods** MTT assay were used to evaluate the effects of celastrol on U87 cells proliferation, and flow cytometry were performed to detect U87 cells apoptosis and mitochondrial membrane potential. Expression of apoptosis related proteins in mitochondria pathway were detected by western blotting. Transwell migration assay and wound healing assay were used to study the migration ability of U87 cells. **Results** After treatment with different concentrations of celastrol, the proliferation of U87 cells was significantly inhibited. The flow cytometry assay showed that celastrol decreased the mitochondrial membrane potential and induced the apoptosis of U87 cells. The mechanism of apoptosis showed that celastrol could significantly regulate the expression levels of Bcl-2, Bax, cytochrome C, caspase-9, and caspase-3 in mitochondria pathway. Additionally, celastrol significantly inhibited the migration of U87 cells. **Conclusion** Celastrol significantly inhibited the proliferation and migration, and induced apoptosis of U87 cells, which may be mediated by the regulation of mitochondrial pathway related apoptosis proteins.

Key words: celastrol; neuroglioma U87 cell; apoptosis; mitochondrial pathway; cell migration

神经胶质瘤简称胶质瘤, 是最常见的原发性中枢神经系统肿瘤, 约占所有颅内原发肿瘤的一半^[1-2]。临床上对神经胶质瘤的治疗以手术治疗为主, 但由于肿瘤浸润性生长, 与脑组织间无明显边界, 并且现有的化学药品对神经胶质瘤的临床疗效并不理想, 肿瘤的耐药已经成为化疗失败、肿瘤复发的主要原因^[3-4]。随着中药受到越来越多的关注, 从中药中寻找抗癌活性

成分是近年来研究的热点。雷公藤红素是从雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 根皮中提取出来的一种三萜类活性成分。近年来研究表明雷公藤红素具有抗肿瘤的活性, 对白血病、多发性骨髓瘤、肝癌、黑色素瘤、前列腺癌、子宫癌、乳腺癌和神经胶质瘤都具有明确的杀伤作用^[5-12]。当前研究雷公藤红素对神经胶质瘤细胞增殖、迁移及凋亡影响的报道较少。本

收稿日期: 2017-07-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81503335); 南京军区医学科技创新课题重点项目 (14ZD13)

作者简介: 龚建军 (1982—), 男, 医学硕士, 主管药师, 从事医院药学和疗养保健研究。Tel: (0592)2060181 E-mail: 123014617@qq.com

*通信作者 胡永胜, 男, 医学博士, 副主任药师, 主要从事中药药理机制研究。Tel: (0577)56989632 E-mail: yshu@outlook.com

研究以神经胶质瘤 U87 细胞为对象,考察了雷公藤红素对神经胶质瘤 U87 细胞增殖、迁移和凋亡的影响,并初步探讨其可能的作用机制,为将其开发成治疗神经胶质瘤的新药研究提供参考和依据。

1 材料

1.1 药物与试剂

雷公藤红素对照品(批号 B20707)购于上海原叶生物科技有限公司,质量分数>98%;DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)、磷酸盐缓冲液(PBS)、胰蛋白酶(Gibco,美国);双抗(上海博光生物医药技术有限公司);二甲基亚砜(DMSO)、MTT 试剂(Sigma,美国);细胞凋亡试剂盒(C1063,50次)、线粒体膜电位检测试剂盒(C2006,>100次)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(P0010S,200次)购于碧云天生物技术研究所;鼠单克隆抗体 β -actin、兔单克隆抗体细胞色素 C(Cyt C)、鼠单克隆抗体 Caspase-9、兔单克隆抗体 Caspase-3、鼠单克隆抗体 Bcl-2、兔单克隆抗体 Bax(CST,美国)、荧光二抗兔抗和鼠抗(LI-COR,美国);Transwell 小室(8 μ m,Coning 公司)、4%多聚甲醛固定液、0.1%结晶紫染液(上海博光生物医药技术有限公司)。

1.2 实验细胞

神经胶质瘤传代细胞(U87)购于中国科学院上海细胞研究所。

1.3 实验仪器

GKC 型控温水浴锅(上海苏达实验仪器有限公司);DMI3000B 型倒置相差显微镜(Leica,德国);MCO-15AC 型细胞培养箱(Sanyo,日本);SW-CJ-2D 型洁净工作台(上海苏净实业有限公司);HYQ-2121A 型涡旋震动仪(Crystal,美国);移液枪、ALLEGRA X-15R 型低温高速台式离心机(Backman,美国);BAS124S 型电子分析天平(Sartorius,德国);BD FACSCalibur 型流式细胞仪(BD,美国);153BR 型蛋白转膜仪、552BR 型蛋白电泳仪、9120 型荧光扫描仪(Bio-Rad,美国)。

2 方法

2.1 细胞培养

U87 细胞生长于含 10%胎牛血清、1%双抗的 DMEM 培养基中,于 5% CO₂、37 °C 恒温培养箱中进行培养。每隔 2 d 更换新鲜培养液,细胞密度达到 80%左右,用胰酶消化处理进行实验。

2.2 MTT 法检测细胞增殖活性

将状态良好的细胞消化下来,取 8×10^4 /mL 浓

度的 U87 细胞,接种于 96 孔板,每孔 100 μ L。12 h 后细胞完全贴壁,加入终浓度分别为 1、2、4、8、16、32 μ mol/L 的雷公藤红素,对照组加 DMSO 溶液,每组设立 5 个复孔。培养箱中继续孵育 12、24、48 h 后,采用 MTT 法检测细胞增殖情况。每孔加入 10 μ L 5 mg/mL MTT 溶液,孵育 3 h 后,小心吸弃孔内培养上清液,每孔加 150 μ L DMSO 溶液,在混匀仪上振荡 10 min,使结晶物充分溶解,用酶标仪测定 570 nm 处的各孔吸光度(A)值。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.3 流式细胞术检测细胞凋亡及线粒体膜电位

取生长状态良好的细胞,以 3×10^5 /mL 浓度接种于 6 孔板,每孔 2 mL。孵育 24 h 后完全贴壁,加入浓度为 1、3、9 μ mol/L 的雷公藤红素,对照组加入相同体积 DMSO 溶液,继续孵育 24 h 后,收集细胞并用预冷的 PBS 洗涤细胞 1 次。分别用细胞凋亡试剂盒和线粒体膜电位试剂盒参照操作说明处理待测细胞,最后采用流式细胞仪进行检测。

2.4 Western blotting 法检测相关蛋白表达量

将 3×10^5 /mL 浓度的 U87 细胞接种于 6 孔板,每孔 2 mL。孵育 24 h 后完全贴壁,分别加入终浓度为 1、3、9 μ mol/L 的雷公藤红素,对照组加入相同体积 DMSO 溶液,继续孵育 24 h 后终止培养,弃去原培养基,在 6 孔板中加入预冷的 PBS 轻轻漂洗 1 次,加入裂解液 50 μ L/孔,在冰上用细胞刮刀收集细胞,裂解 10 min,收集细胞于 12 000 r/min 离心 10 min,收取上清并用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白浓度测定。最后加入上样缓冲液,煮沸 3 min 的得到蛋白样品。上样,用 SDS-PAGE 胶进行蛋白电泳,然后电转到 PVDF 膜上,用 5%的脱脂牛奶进行封闭 30 min 后,加入一抗 β -actin、Cyt C、Caspase-9、Caspase-3、Bcl-2、Bax 在 4 °C 孵育过夜,用 TBST 溶液洗涤 3 次后,加入二抗室温孵育 1 h 后,再用 TBST 洗涤 3 次,采用 ODYSSEY 双色红外激光成像系统扫膜,记录结果。

2.5 划痕实验及 Transwell 实验检测细胞迁移能力

在孔中加入约 5×10^5 个细胞,使过夜后融合率达到 100%;第 2 天用枪头比着直尺,枪头要垂直不能倾斜地划横线;PBS 洗 2 遍细胞,把划下的细胞去除,加入无血清培养基和终浓度为 1、3、9 μ mol/L 的雷公藤红素,对照组加入相同体积 DMSO 溶液;放入 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养。24 h 后 400 倍显微镜下取样拍照,使用 Image J 软件打开图

片后, 划取同样水平线, 计算细胞迁移数目。

细胞无血清饥饿 12 h 后, 消化细胞, 终止消化后离心弃去培养液, 调整细胞密度至 $5 \times 10^5/\text{mL}$; 取细胞悬液 100 μL 加入 Transwell 小室, 同时加入终浓度为 1、3、9 $\mu\text{mol/L}$ 的雷公藤红素, 对照组加入相同体积 DMSO 溶液; 下室加入 600 μL 含 20% FBS 的培养基, 常规培养 24 h; 取出 Transwell 小室, 弃去孔中培养液, 用 PBS 洗 2 遍, 甲醇固定 30 min, 风干。0.1% 结晶紫染色 20 min, 用棉签轻轻擦掉上层未迁移细胞, 用 PBS 洗 3 遍; 400 倍显微镜下随机 5 个视野观察细胞, 计数。

2.6 统计学分析

所有数据采用 GraphPad Prism 5 统计分析软件进行分析, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 雷公藤红素对 U87 细胞增殖的影响

研究采用 MTT 法检测雷公藤红素对神经胶质瘤 U87 细胞的增殖抑制活性。结果见图 1。随着药物浓度的增加, 细胞的存活率明显降低, 并具有一定的剂量依赖性和时间依赖性。此外, 雷公藤红素作用 U87 细胞 12、24、48 h 的半数抑制浓度 (IC_{50}) 值分别为 22.65、16.83、10.56 $\mu\text{mol/L}$ 。以上结果表

明, 雷公藤红素在体外可以很好地抑制 U87 细胞的增殖活性。

3.2 雷公藤红素对 U87 细胞凋亡的影响

U87 细胞经过不同浓度 (1、3、9 $\mu\text{mol/L}$) 雷公藤红素处理 24 h 后, 用 Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡情况。流式细胞仪检测结果见图 2, 雷公藤红素可以诱导 U87 细胞出现凋亡, 对照组细胞凋亡率为 $(8.61 \pm 0.43)\%$, 而雷公藤红素 (1、3、9 $\mu\text{mol/L}$) 组的细胞凋亡率分别为 $(11.59 \pm 0.08)\%$, $(26.55 \pm 0.85)\%$ 和 $(34.57 \pm 1.21)\%$ 。

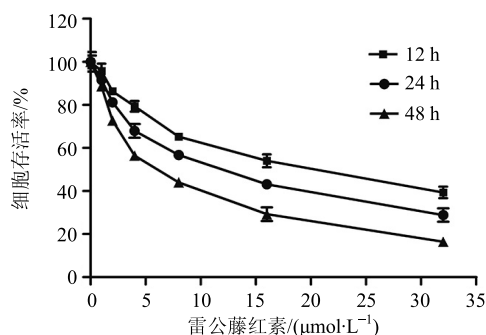


图 1 雷公藤红素对 U87 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 1 Effect of celastrol on proliferation of U87 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

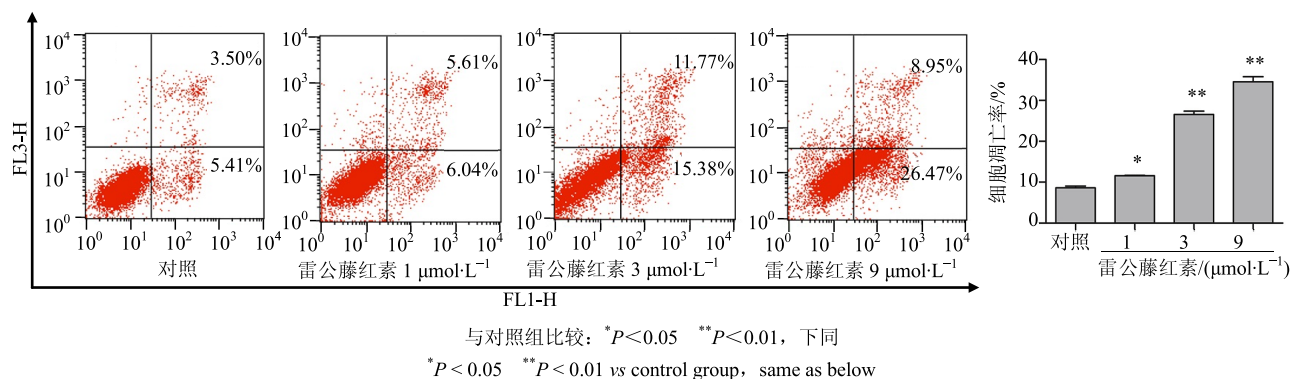


图 2 雷公藤红素对 U87 细胞凋亡影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effects of celastrol on apoptosis of U87 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3 雷公藤红素对 U87 细胞线粒体膜电位的影响

线粒体膜电位采用 JC-1 荧光探针进行检测。正常细胞的线粒体膜电位正常时, JC-1 进入线粒体内, 浓度升高而形成发射红色荧光的多聚体; 当细胞发生凋亡时, 线粒体跨膜电位去极化, JC-1 从线粒体内释放, 逆转为发射绿色荧光的单体形式, 通过流式细胞仪检测单体荧光强度来判断线粒体膜电位的变化。结果见图 3。对照组荧光强度为 $(11.20 \pm 0.42)\%$, 而

雷公藤红素 (1、3、9 $\mu\text{mol/L}$) 组荧光强度分别为 $(13.67 \pm 0.95)\%$, $(22.79 \pm 1.41)\%$, $(36.95 \pm 0.65)\%$ 。以上结果显示, 随着药物浓度的增加 U87 细胞的线粒体膜电位明显下降, 并呈剂量依赖性。

3.4 雷公藤红素对线粒体途径相关凋亡蛋白的影响

采用蛋白质印迹法检测线粒体途径相关凋亡蛋白 Bcl-2、Bax、Cyt C、Caspase-9 和 Caspase-3 的表达水平, 结果见图 4。随着雷公藤红素浓度的

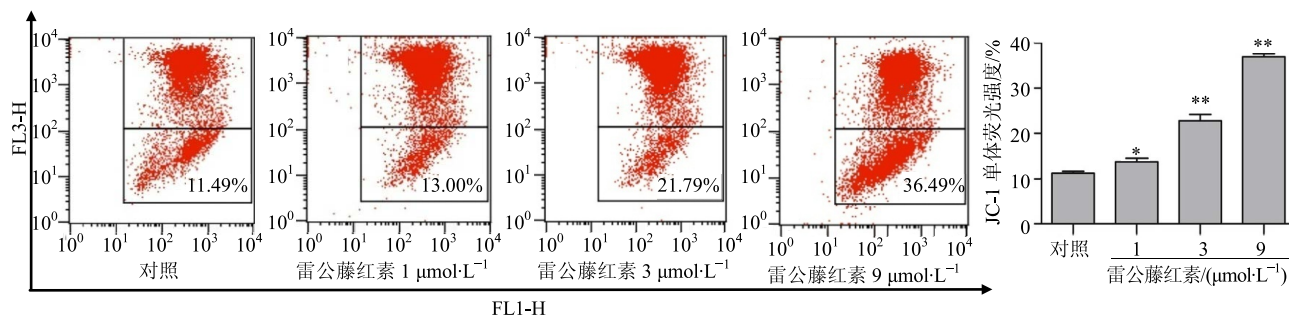


图 3 不同浓度雷公藤红素对 U87 细胞线粒体膜电位影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effects of different concentrations of celastrol on mitochondrial membrane potential of U87 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

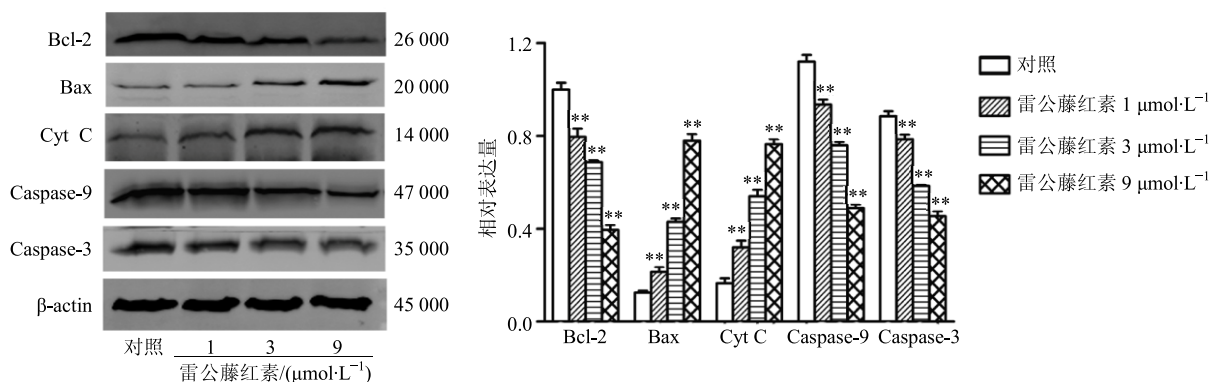


图 4 雷公藤红素对 U87 细胞 Bcl-2、Bax、Cyt C、Caspase-9 和 Caspase-3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effects of celastrol on protein expression of Bcl-2, Bax, Cyt C, Caspase-9, and Caspase-3 in U87 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

增加, Bcl-2 蛋白表达水平逐渐下降, 而 Bax 蛋白表达水平升高; Cyt C 的蛋白表达水平升高, 而 Caspase-9 和 Caspase-3 蛋白表达水平逐渐下降。以上结果显示, 雷公藤红素可以浓度依赖性地调控线粒体途径相关凋亡蛋白, 从而达到促进 U87 细胞发生凋亡的作用。

3.5 细胞划痕方法考察雷公藤红素对 U87 细胞迁移的影响

细胞划痕实验结果表明, 与对照组相比, 雷公藤红素 3、9 $\mu\text{mol/L}$ 明显抑制 U87 细胞的迁移, 并呈现出一定的浓度依赖关系, 而雷公藤红素 1 $\mu\text{mol/L}$ 未抑制 U87 细胞的迁移 (图 5)。由此表明雷公藤红素在 3 $\mu\text{mol/L}$ 以上可以抑制神经胶质瘤 U87 细胞的迁移。

3.6 Transwell 实验考察雷公藤红素对 U87 细胞迁移的影响

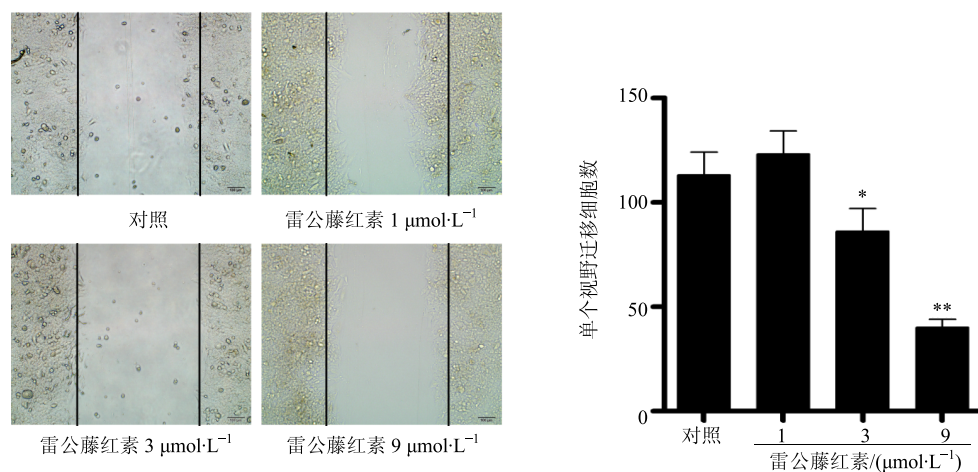
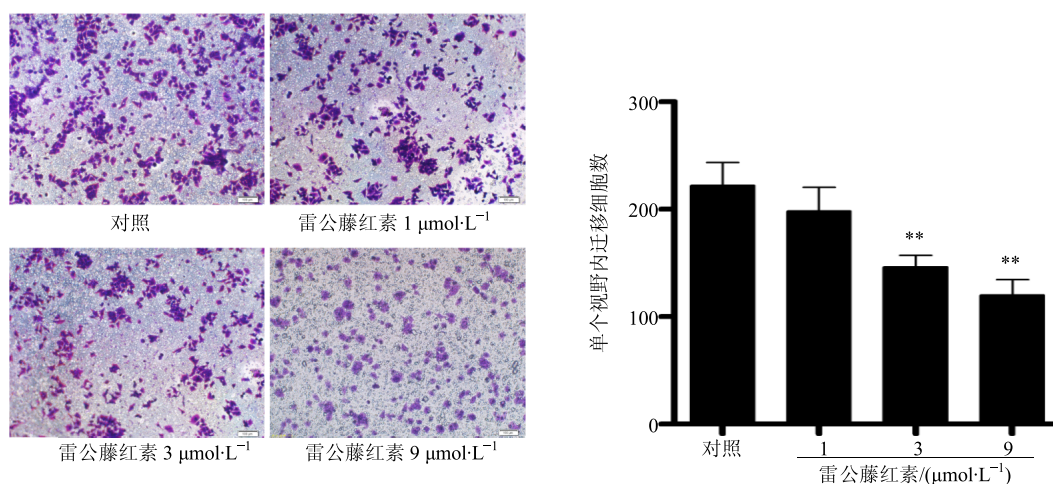
Transwell 实验结果表明, 在不同浓度雷公藤红素刺激 U87 细胞 24 h 后, U87 细胞迁移数与对照组相比明显受到抑制 (图 6)。由此提示, 雷公藤红素可抑制神经胶质瘤细胞迁移能力。

4 讨论

神经胶质瘤发病率高, 且呈侵袭性生长, 造成易复发、死亡率高的现状, 严重影响了人类的健康。雷公藤红素是雷公藤中的一种主要活性成分, 大量研究报道雷公藤红素在体外对多种肿瘤细胞增殖具有明显的抑制作用。

细胞凋亡是多细胞机体维持内环境稳定的重要自我调节机制, 诱导细胞凋亡可作为评估抗癌药物作用能力的重要指标之一^[13-14]。本研究发现雷公藤红素可以显著性地抑制神经胶质瘤 U87 细胞的增殖, 具有一定的时间和浓度依赖性, 在 12、24、48 h 的 IC_{50} 值分别为 22.65、16.83、10.56 $\mu\text{mol/L}$, 在作为治疗神经胶质瘤新药方面呈现了良好的应用前景。

细胞 Bcl-2 和 Bax 比例改变可调节细胞凋亡, 当 Bcl-2 占优势时, 细胞具有抗凋亡作用; 相反, 当 Bax 过表达时, 细胞易发生凋亡^[15]。本研究发现经过雷公藤红素处理后, U87 细胞抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达下调, 促凋亡蛋白 Bax 表达上调。线粒体膜电位下降导致线粒体膜通透性增强, 可以导致 Cyt C

图 5 雷公藤红素对 U87 细胞迁移的影响 (划痕实验, $\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 5 Effects of celastrol on migration of U87 cells (wound healing assay, $\bar{x} \pm s, n = 3$)图 6 雷公藤红素对 U87 细胞迁移的影响 (Transwell 实验, $\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 6 Effects of celastrol on migration of U87 cells (Transwell assay, $\bar{x} \pm s, n = 3$)

的释放和激活 Caspase-9、Caspase-3 系统, 继而诱导细胞发生凋亡^[16-17]。本研究采用 JC-1 荧光探针法观察到雷公藤红素可以降低 U87 细胞线粒体膜电位, 并导致 Cyt C 的释放和 Caspase-9、Caspase-3 的激活继而诱导细胞凋亡。

肿瘤细胞转移的实现是通过减少肿瘤细胞的黏附能力, 使细胞的自主运动性增加, 进而向细胞周围临近的组织浸润和转移^[18]。本研究通过划痕实验及 Transwell 实验表明雷公藤红素能够显著地抑制 U87 细胞的侵袭和迁移能力, 显示出了雷公藤红素在治疗神经胶质瘤易侵袭转移方面潜在的应用价值。前期有研究表明, U87 细胞的侵袭迁移与环氧合酶 2 (COX-2) 蛋白有关^[19], 然而雷公藤红素抑制 U87 细胞侵袭迁移能力的作用机制还有待于进一步研究阐明。

综上, 雷公藤红素可以抑制神经胶质瘤 U87 细胞的增殖、诱导其凋亡并且抑制其迁移能力, 其作用机制可能是通过线粒体途径降低线粒体膜电位, 同时调节 Bcl-2 家族的 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达水平, 促使线粒体膜的通透性增强, 导致 Cyt C 的释放和 Caspase-9、Caspase-3 的激活, 最终诱导神经胶质瘤 U87 细胞的凋亡来实现的。本研究结果初步证明了雷公藤红素多靶点作用的抗神经胶质瘤作用, 为雷公藤红素临床应用于胶质瘤治疗提供了理论参考。

参考文献

- [1] Cohen A L, Colman H. Glioma biology and molecular markers [J]. *Cancer Treat Res*, 2015, 163(1): 15-30.
- [2] Ceccarelli M, Barthel F P, Malta T M, *et al.* Molecular profiling reveals biologically discrete subsets and pathways of progression in diffuse glioma [J]. *Cell*, 2016,

- 164(3): 550-563.
- [3] Grasso C S, Tang Y J, Truffaux N, *et al.* Erratum: functionally defined therapeutic targets in diffuse intrinsic pontine glioma [J]. *Nat Med*, 2015, 21(6): 555-559.
- [4] Auffinger B, Spencer D A, Pytel P, *et al.* The role of glioma stem cells in chemotherapy resistance and glioblastoma multiforme recurrence [J]. *Expert Rev Neurother*, 2015, 15(7): 1-12.
- [5] Peng B, Xu L M, Cao F F, *et al.* HSP90 inhibitor, celastrol, arrests human monocytic leukemia cell U937 at G0/G1 in thiol-containing agents reversible way [J]. *Mol Cancer*, 2010, 9(1): 1-13.
- [6] Hu Y S, Zhou X X, Shi H, *et al.* The effect of tripterygium glucoside tablet on pharmacokinetics of losartan and its metabolite EXP3174 in rats [J]. *Biomed Chromatogr*, 2017, doi:10.1002/bmc.3973.
- [7] Sethi G, Ahn K S, Pandey M K, *et al.* Celastrol, a novel triterpene, potentiates TNF-induced apoptosis and suppresses invasion of tumor cells by inhibiting NF-kappaB-regulated gene products and TAK1-mediated NF-kappaB activation [J]. *Blood*, 2007, 109(7): 2727-2735.
- [8] Yang H, Chen D, Cui Q C, *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.
- [9] Yoon M J, Lee A R, Jeong S A, *et al.* Release of Ca²⁺ from the endoplasmic reticulum and its subsequent influx into mitochondria trigger celastrol-induced paraptosis in cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(16): 6816-6831.
- [10] Hu Y S, Qi Y P, Liu H, *et al.* Effects of celastrol on human cervical cancer cells as revealed by ion-trap gas chromatography-mass spectrometry based metabolic profiling [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1830(3): 2779-2789.
- [11] Wang W B, Feng L X, Yue Q X, *et al.* Paraptosis accompanied by autophagy and apoptosis was induced by celastrol, a natural compound with influence on proteasome, ER stress and Hsp90 [J]. *J Cell Physiol*, 2012, 227(5): 2196-2206.
- [12] 王淑静, 董立强, 刘欢, 等. 雷公藤红素对SGC-7901细胞和ECV304细胞增殖及能量代谢的影响 [J]. 中草药, 2016, 47(21): 3854-3860.
- [13] Koff J L, Ramachandiran S, Bernal-Mizrachi L. A time to kill: Targeting apoptosis in cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(2): 2942-2955.
- [14] Renault T T, Chipuk J E. Death upon a kiss: mitochondrial outer membrane composition and organelle communication govern sensitivity to BAK/BAX-dependent apoptosis [J]. *Chem Biol*, 2014, 21(1): 114-123.
- [15] Chen H C, Kanai M, Inoue-Yamauchi A, *et al.* An interconnected hierarchical model of cell death regulation by the BCL-2 family [J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(10): 1270-1281.
- [16] Vande Velde C, Cizeau J, Dubik D, *et al.* BNIP3 and genetic control of necrosis-like cell death through the mitochondrial permeability transition pore [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(15): 5454-5468.
- [17] Adrain C, Martin S J. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas [J]. *Trends Biochem Sci*, 2001, 26(6): 390-397.
- [18] 周同, 宋长玲. 细胞粘附分子、粘附蛋白与肿瘤转移 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 1995, 2(3): 232-234.
- [19] 周剑, 曹爱玲, 舒诚荣. 苦参碱对神经胶质瘤U87细胞增殖和侵袭的抑制作用研究 [J]. 现代药物与临床, 2017, 32(7): 1184-1187.