

七叶皂苷钠抑制人白血病 Jurkat 细胞增殖的机制研究

万贵平, 张真真, 蔡雪婷, 卢悟广, 曹 鹏*

江苏省中医药研究院 细胞与分子生物学实验室, 江苏 南京 210028

摘要: 目的 研究七叶皂苷钠抑制人白血病 Jurkat 细胞增殖的作用及其机制。方法 MTT 法分析七叶皂苷钠对 Jurkat 细胞增殖的抑制作用, Hoechst 33258 染色、FITC-Annexin V/PI 双染、DNA Ladder、流式细胞术检测细胞凋亡和细胞周期, Western blotting 法分析凋亡相关蛋白变化。结果 七叶皂苷钠呈质量浓度和时间相关方式抑制 Jurkat 细胞增殖; 经七叶皂苷钠处理后的 Jurkat 细胞出现凋亡的形态学特征、DNA 条带, Annexin V⁺/PI⁺ 细胞 (早期凋亡细胞) 显著增加; 七叶皂苷钠可活化 Jurkat 细胞中 Caspase-8、Caspase-9、Caspase-3, 引起 PARP 的切割, 并减少 Bcl-2 蛋白的表达。结论 七叶皂苷钠能有效地通过诱导细胞凋亡抑制 Jurkat 细胞增殖。

关键词: 七叶皂苷钠; 白血病 Jurkat 细胞; 细胞凋亡; 细胞增殖; 抗肿瘤

中图分类号: R282.710.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)01-0106-05

Mechanism of escin sodium in inhibition of human leukemia Jurkat cells proliferation

WAN Gui-ping, ZHANG Zhen-zhen, CAI Xue-ting, LU Wu-guang, CAO Peng

Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Jiangsu Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

Abstract: Objective To investigate the effects of escin sodium on proliferation of human leukemia Jurkat cells and its possible mechanism. **Methods** The reduction of cellular viability was determined by MTT assay. Hoechst 33258 staining, DNA fragmentation assay, FITC-Annexin V-FITC/PI staining assay, and cytometric analysis were used to confirm the features of apoptosis and cell cycle. Western blotting assays were performed to explore the apoptotic pathway. **Results** Escin sodium inhibited the proliferation of Jurkat cells in both dose- and time-dependent manners. The morphological apoptosis, DNA fragmentation pattern, and the percentage of Annexin V⁺/PI⁺ (early apoptosis) cells were markedly increased in escin sodium-treated Jurkat cells. Escin sodium activated Caspase-8, Caspase-9, and Caspase-3, degraded poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), and attenuated Bcl-2 expression. **Conclusion** Escin sodium could inhibit the proliferation of Jurkat cells via the induction of apoptosis effectively.

Key words: escin sodium; leukemia Jurkat cells; apoptosis; cell proliferation; antitumor

细胞凋亡的缺失在肿瘤发生、发展过程中起重要作用, 并影响肿瘤转移及预后。肿瘤细胞逃避凋亡的能力在其对常规治疗药物产生抗药性中发挥重要作用。因此, 选择性地诱导肿瘤细胞凋亡已成为抗肿瘤药物研发的一个重要策略^[1-3]。

七叶皂苷钠是从天师栗 *Aesculus wilsonii* Rehd. 的干燥成熟果实中提取的三萜皂苷钠盐的天然混合物, 含有七叶皂苷钠 A、B、C、D 4 种成分, 在临床上作为抗水肿、抗渗出及血管保护药物。大量临床资料表明, 七叶皂苷钠药理作用可靠, 不良反应小, 治疗范围广, 在临床备受医生和患者的青睐^[4]。

但关于七叶皂苷钠抗肿瘤作用的报道较少^[5], 而抑制人急性淋巴细胞白血病 Jurkat 细胞株增殖的作用更是鲜见报道。因此, 本实验研究了七叶皂苷钠对 Jurkat 细胞增殖的抑制作用及其机制, 为将七叶皂苷钠开发成为抗肿瘤药物提供实验基础。

1 材料

1.1 药物与试剂

七叶皂苷钠 (批号: ZL-09010A, 质量分数 99.24%), 购自山东绿叶制药有限公司; 抗 Caspase-8、抗 Caspase-9、抗 Caspase-3、抗 (ADP-核糖) 聚合酶 (PARP)、抗 Bcl-2、抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶

收稿日期: 2011-06-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30873410)

作者简介: 万贵平, 主任医师, 副教授。E-mail: wanguiping@263.net

*通讯作者 曹 鹏 Tel/Fax: (025)85608666 E-mail: pcao79@yahoo.com

(GAPDH)抗体购自 Cell Signaling Technology 公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠、羊抗兔二抗购自 Santa Cruz Biotechnology 公司;MTT、RNA 酶、蛋白酶 K、碘化丙啶 (PI)、二甲基亚砜 (DMSO) 购自 Sigma 公司;Hoechst 33258 凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司;RPMI 1640 培养基购自 Invitrogen 公司。

1.2 细胞

人急性淋巴细胞白血病 Jurkat 细胞株 (clone E6-1) 购自中国科学院上海细胞研究所,接种于含 10% 小牛血清、青霉素 (100 U/mL)、链霉素 (100 μ g/mL) 的 RPMI 1640 培养基中,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度培养箱中悬浮培养。

1.3 仪器

Class II A2 型生物安全柜 (美国 Labconco 公司), Axio observer A 荧光倒置显微镜 (德国 Zeiss 公司), CKX31 倒置显微镜 (日本 Olympus 公司), HERA cell 150 CO₂ 细胞培养箱、NanoDrop—1000 微量核酸蛋白测定仪、Multiskan spectrum 全波长酶标仪 (美国 Thermo Scientific 公司)。

2 方法

2.1 MTT 法检测细胞增殖

将对数生长期 Jurkat 细胞接种于 96 孔板,37 $^{\circ}$ C 培养过夜。用不同质量浓度 (10、15、20、25、30 μ g/mL) 的七叶皂苷钠处理 Jurkat 细胞 12~48 h,每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 10 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h 后弃去培养基,每孔加入 DMSO 100 μ L,振荡 10 min,于 570、630 nm 波长处测定各孔的吸光度 (A) 值。

$$\text{细胞存活率} = (A_{570} - A_{630})_{\text{实验组}} / (A_{570} - A_{630})_{\text{对照组}}$$

2.2 FITC-Annexin V/PI 双染法和 Hoechst 33258 染色检测细胞凋亡

收集经七叶皂苷钠处理的 Jurkat 细胞,冷 PBS 洗两次,FITC-Annexin V 避光染色 10 min,离心,弃上清,加入 20 μ g/mL 的 PI 工作液 100 μ L,染色 10 min,离心,弃上清。结合缓冲液重悬细胞,流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

收集经七叶皂苷钠处理后的 Jurkat 细胞,4% 甲醛溶液 4 $^{\circ}$ C 固定 30 min。冷 PBS 洗 1 次,Hoechst 33258 工作液避光染色 10 min,离心弃固定液,加 PBS 重悬,放入 24 孔板中,荧光显微镜 ($\times 400$) 观察细胞凋亡情况。

2.3 DNA Ladder 法检测细胞凋亡

收集经七叶皂苷钠处理后的 Jurkat 细胞,加入

溶解缓冲液 20 μ L [20 mmol/L EDTA、100 mmol/L Tris, pH 8.0、0.8% 十二烷基磺酸钠 (SDS)]、RNA 酶/T1 混合液 10 μ L,37 $^{\circ}$ C 水浴 2 h。加入 20 mg/mL 的蛋白酶 K 10 μ L,50 $^{\circ}$ C 水浴过夜。2% 琼脂糖凝胶、电压 30 V 电泳 5 h。

2.4 Western blotting 检测细胞凋亡相关蛋白

收集经七叶皂苷钠处理的 Jurkat 细胞,RIPA 裂解液分离出蛋白。SDS-PAGE 分离蛋白样品,并将其转移到 PVDF 膜上,脱脂奶粉室温封闭 2 h,一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBST 洗 3 次,每次 5 min;二抗室温孵育 1 h,TBST 洗 3 次,每次 5 min。将膜置于暗室曝光,显影定影。

2.5 流式细胞仪检测细胞周期

收集经七叶皂苷钠处理的细胞,用乙醇 4 $^{\circ}$ C 固定过夜,离心去固定液,冷 PBS 洗两遍,每管细胞加入 425 μ L 冷 PBS、50 μ L RNA 酶、25 μ L PI,37 $^{\circ}$ C 避光水浴 30 min,上机检测。

2.6 数据分析

采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,单因素方差分析组间差异,两样本均数差异比较采用 t 检验。各试验重复 3 次。

3 结果

3.1 对 Jurkat 细胞增殖的影响

经七叶皂苷钠处理后,Jurkat 细胞的存活率以时间、质量浓度相关方式下降,七叶皂苷钠处理 Jurkat 细胞 24、48 h 的 IC₅₀ 值分别为 (24.5 $\pm$ 0.35)、(19.2 $\pm$ 0.78) μ g/mL。结果见表 1。

3.2 对 Jurkat 细胞凋亡的影响

Hoechst 33258 染色结果显示,对照组 Jurkat 细胞的细胞核呈圆形且染色均匀,而经 20、30 μ g/mL 七叶皂苷钠处理 24 h 的 Jurkat 细胞出现核聚缩和颗粒状的凋亡体,见图 1。

细胞凋亡的一个典型特征是染色体 DNA 在核小体之间被切断,产生的 DNA 长度约为 180~200 bp 的整数倍,电泳呈梯形条带^[6]。七叶皂苷钠处理 Jurkat 细胞 17 h 后,琼脂糖凝胶电泳结果显示,对照组细胞中为大分子的基因组 DNA,而经七叶皂苷钠 20、30 μ g/mL 处理的 Jurkat 细胞中出现明显的 DNA 梯形条带,见图 2。

在细胞凋亡过程中,细胞膜的不对称性消失,磷脂酰丝氨酸从细胞膜内侧转移到细胞膜外侧。Annexin V 是一种钙依赖的磷脂结合蛋白,与磷脂酰丝氨酸有高度的亲和力,所以标记 FITC 的 Annexin V

表 1 七叶皂苷钠对 Jurkat 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 1 Effects of escin sodium on survival rate of Jurkat cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组 别	$\rho / (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	细胞存活率 / %		
		12 h	24 h	48 h
对照	—	100.0 $\pm$ 4.6	100.0 $\pm$ 4.1	100.0 $\pm$ 2.5
七叶皂苷钠	10	102.7 $\pm$ 4.8	100.6 $\pm$ 3.3	95.9 $\pm$ 1.3
	15	98.6 $\pm$ 0.4	94.2 $\pm$ 4.5	94.0 $\pm$ 3.5
	20	99.8 $\pm$ 4.8	84.3 $\pm$ 3.6**	35.6 $\pm$ 4.5***
	25	98.5 $\pm$ 7.0	45.5 $\pm$ 3.1***	16.1 $\pm$ 4.6***
	30	76.0 $\pm$ 6.3**	22.2 $\pm$ 2.6***	6.1 $\pm$ 0.6***

与对照组比较: ** $P<0.01$ *** $P<0.001$

** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs control group

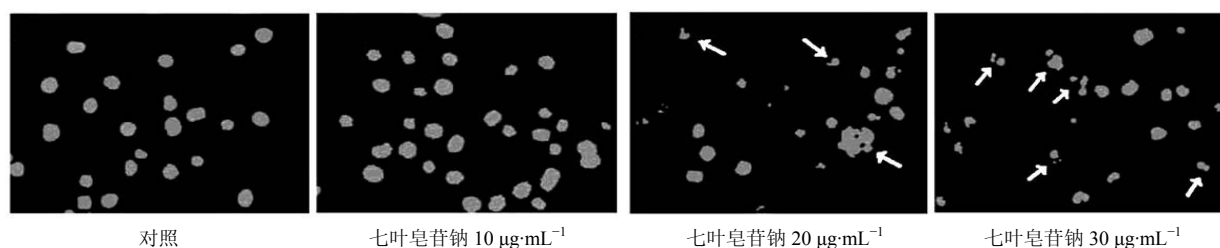


图 1 Hoechst 33258 染色法检测 Jurkat 细胞凋亡

Fig. 1 Detection of Jurkat cells apoptosis by Hoechst 33258 staining

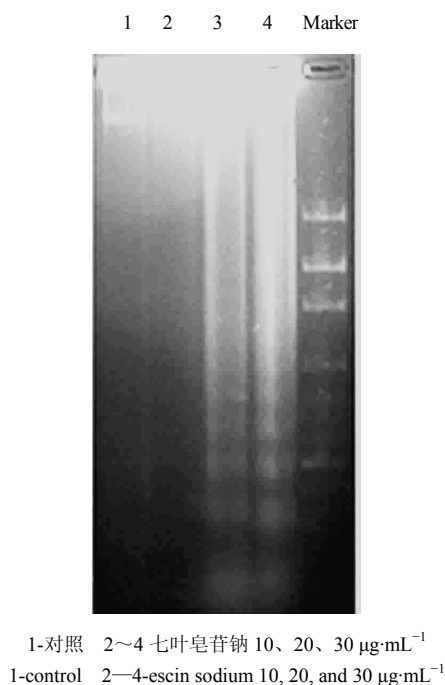


图 2 DNA Ladder 法检测 Jurkat 细胞凋亡

Fig. 2 Detection of Jurkat cells apoptosis via DNA Ladder

可作为识别外翻的磷脂酰丝氨酸的灵敏探针。FITC-Annexin V/PI 双染法可同时区分出活细胞

(A^-/PI^-)、早期凋亡细胞 (A^+/PI^-)、晚期凋亡及坏死细胞 (A^+/PI^+)^[7]。七叶皂苷钠处理 Jurkat 细胞后,早期和晚期凋亡细胞明显增加,并与其质量浓度呈相关性,而活细胞减少,见图 3。七叶皂苷钠 10、20、30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理 Jurkat 细胞 14 h 后,凋亡细胞(早期和晚期凋亡细胞)所占比例从对照组的 (4.53 ± 0.45)%, 分别增加至 (5.95 ± 1.33)%、(44.99 ± 2.06)%、(69.52 ± 1.98)%。

3.3 对 Caspase 活化的影响

Western blotting 检测结果显示,用七叶皂苷钠处理人急性淋巴细胞白血病 Jurkat 细胞 14 h 后,相对分子质量为 5.7×10^4 的 pro-Caspase-8 降解为相对分子质量为 4.1×10^4 或 4.3×10^4 活化形式的 Caspase-8。酶原形式且相对分子质量为 4.7×10^4 的 pro-Caspase-9 则被切割为相对分子质量为 3.7×10^4 的 Caspase-9,而且酶原形式的 pro-Caspase-3 的量也减少。PARP 作为活化 Caspase-3 的下游作用底物,在细胞凋亡过程中被切割^[8]。七叶皂苷钠作用 Jurkat 细胞 14 h 后,相对分子质量为 1.16×10^5 的 PARP 被切割为相对分子质量为 8.6×10^4 。这些结果均有力地证明了在七叶皂苷钠诱导 Jurkat 细胞凋亡的过程中,发生了 Caspase 级联活化。结果见图 4。

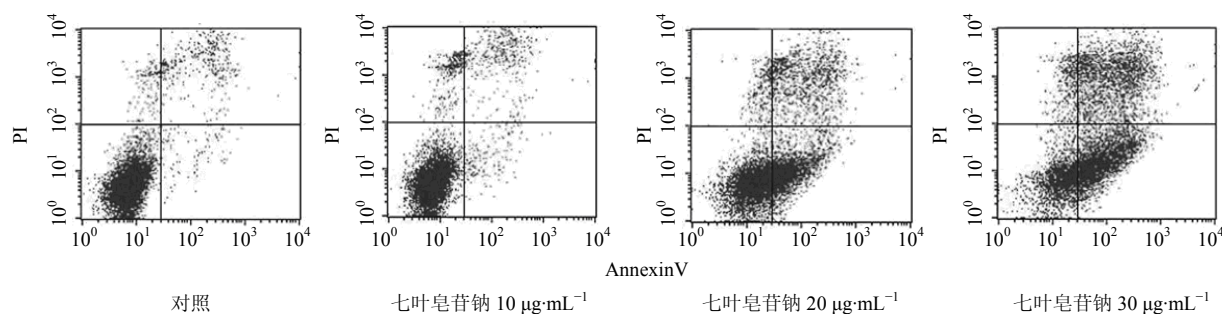


图 3 FITC-Annexin V/PI 双染法检测 Jurkat 细胞凋亡

Fig. 3 Detection of Jurkat cells apoptosis by FITC-Annexin V/PI staining

3.4 对 Bcl-2 蛋白表达的影响

Western blotting 检测结果显示, Jurkat 细胞经七叶皂苷钠处理后, Bcl-2 的表达减少并呈质量浓度相关性, 结果见图 5。

3.5 对 Jurkat 细胞周期的影响

流式细胞检测结果显示, 七叶皂苷钠对 Jurkat 细胞周期无阻滞作用, 进一步表明七叶皂苷钠抑制 Jurkat 细胞增殖是通过诱导凋亡而非阻滞细胞周期实现的。

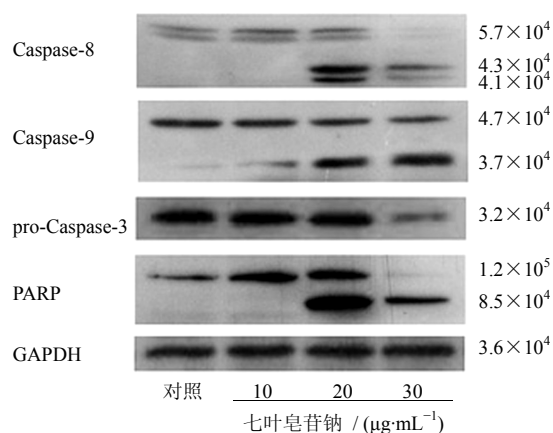


图 4 七叶皂苷钠诱导 Jurkat 细胞 Caspase 活化

Fig. 4 Caspase activation in Jurkat cells induced by escin sodium

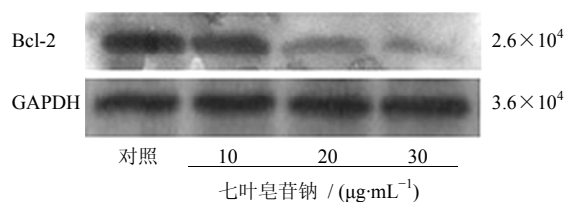


图 5 七叶皂苷钠对 Jurkat 细胞 Bcl-2 蛋白表达的影响

Fig. 5 Effects of escin sodium on protein expression of Bcl-2 in Jurkat cells

4 讨论

本实验发现七叶皂苷钠通过诱导细胞凋亡抑制人白血病 Jurkat 细胞增殖。细胞凋亡分为内源凋亡途径和外源凋亡途径两大类^[9]。在内源凋亡途径中, 线粒体通透性改变, 细胞色素 C 从线粒体释放到细胞质, 和接头分子 Apaf-1、pro-Caspase-9 一起组成凋亡小体, pro-Caspase-9 通过二聚化而活化, 活化的 Caspase-9 可以介导反馈线粒体损伤, 从而放大线粒体途径的凋亡信号^[10]。基因敲除 Caspase-9 能延缓线粒体膜电位的下降^[11]; Bcl-2 家族参与细胞凋亡过程中线粒体通透性的调节^[12]。本实验中 Caspase-9 的活化及 Bcl-2 表达的减少, 均提示在七叶皂苷钠诱导 Jurkat 细胞凋亡的过程中可能涉及内源性凋亡途径。

目前抗肿瘤药物的研发与应用已经成为生物医学科学的一个快速发展的重要领域, 从药用植物中寻找新的抗肿瘤化合物已成为抗肿瘤研发的重要方向。七叶皂苷钠作为一种植物药制剂, 符合未来用药趋势, 而且在临床上广泛应用多年, 与很多新药相比更易获得、更安全、更便宜。如果能将其开发为抗肿瘤药物, 将对临床上疗效良好、使用安全的药物拓展新的适应症提供参考和借鉴。

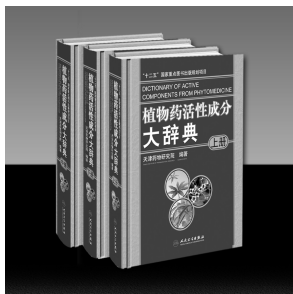
参考文献

- [1] Sun S Y, Hail N J, Lotan R. Apoptosis as a novel target for cancer chemoprevention [J]. *J Nat Cancer Inst*, 2004, 96(9): 662-672.
- [2] Kasibhatla S, Tseng B. Why target apoptosis in cancer treatment? [J]. *Mol Cancer Ther*, 2003, 2(6): 573-580.
- [3] Ferreira C G, Epping M, Krut F A, et al. Apoptosis: target of cancer therapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(7): 2024-2034.
- [4] 安丰妹, 田玉琴. β -七叶皂苷钠的临床应用范围及不良反应预防 [J]. *实用医药杂志*, 2008, 25(11): 1343-1344.

- [5] 牛泱平, 邱燕燕, 竺佳, 等. 七叶皂苷钠对小鼠急性淋巴白血细胞 L1210 细胞的体内外作用研究 [J]. 中草药, 2009, 40(11): 1770-1773.
- [6] Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis [J]. *Cardiovasc Res*, 2000, 45(3): 528-537.
- [7] van Engeland M, Nieland L J, Ramaekers F C, *et al.* Annexin V affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure [J]. *Cytometry*, 1998, 31(1): 1-9.
- [8] Nicholson D W, Ali A, Thornberry N A, *et al.* Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis [J]. *Nature*, 1995, 376(6535): 37-43.
- [9] Gupta S. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis [J]. *Int J Oncol*, 2003, 22(1): 15-20.
- [10] Chen M, Guerrero A D, Huang L, *et al.* Caspase-9-induced mitochondrial disruption through cleavage of anti-apoptotic Bcl-2 family members [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(46): 33888-33895.
- [11] Hakem R, Hakem A, Duncan G S, *et al.* Differential requirement for Caspase 9 in apoptotic pathways *in vivo* [J]. *Cell*, 1998, 94(3): 339-352.
- [12] Brunelle J K, Letai A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family [J]. *J Cell Sci*, 2009, 122(4): 437-441.

“十二五”国家重点图书出版规划项目

《植物药活性成分大辞典》(上、中、下册)



植物中的活性成分是植物药发挥疗效的物质基础, 植物活性成分研究是阐释植物药的生物活性、临床疗效和毒性的必要手段, 也是新药发现和创制的可行途径, 更是中药药效物质基础研究、质量控制以及配伍合理性及作用规律研究的前提和基础。近些年来, 随着国际上植物化学以及天然药物化学学科的迅速发展, 大量的植物活性成分被研究和报道, 形成大量、丰富的植物活性成分研究的信息源。但是, 这些资料作为原始文献散在于成千上万的中外学术期刊上, 不能满足读者对植物活性成分的系统了解、方便查阅和迅速掌握的需要。

天津药物研究院在国家科技部和原国家医药管理局新药管理办公室支持下, 在建立“植物活性成分数据库”的基础上, 组织科研人员经过几年的艰苦努力编纂了大型工具书《植物药活性成分大辞典》。本套书分上、中、下共三册, 共收载植物活性成分 8 719 个, 共约 700 万字。正文中每个活性成分包含英文正名、中文正名、异名(异名之间用分号隔开)、化学名、结构式、分子式和分子量、理化性状(晶型、熔点、溶解性、旋光、紫外、红外、质谱、氢谱和碳谱)、植物来源、生物活性等项内容。并于下册正文后附有三种索引——植物药活性成分中文名、植物药活性成分英文名和植物拉丁名索引。全书涵盖大量国内外专业期刊的翔实数据, 内容丰富、信息量大, 具有反映和体现信息趋时、简便实用的特色; 作者在注重数据科学性、系统性的同时, 着眼于全球药物研发前沿需求与我国市场实际应用的结合, 为新药研究人员选题、立项、准确评价成果提供快速、简便、有效的检索途径, 为植物药的开发生、利用提供疗效优异、结构独特的活性分子或先导化合物。

本套书的出版必将为我国“十二五”医药事业发展和天然药物产业发展提供翔实而可靠的科学数据和技术支撑, 为促进植物药资源的利用, 重大创新药物的研究以及促进特色产业的可持续发展提供趋时的数据资源和检索途径。

该书已批准列入“‘十二五’国家重点图书出版规划项目”, 已于 2011 年 11 月由人民卫生出版社出版发行, 大 16 开精装本, 每套定价 588 元。