

Rabdosin B 对急性早幼粒白血病细胞 HL-60 分化的诱导作用

魏婧昕, 丁 兰*, 刘 扬, 李佩蔚, 刘国安

西北师范大学生命科学学院, 甘肃 兰州 730070

摘要:目的 研究螺环内酯型对映-贝壳杉烷型二萜 rabdosin B(RB)诱导 HL-60 向成熟粒细胞分化的特征及机制。方法 采用台盼蓝染色、吉姆萨染色、硝基四氮唑蓝(NBT)还原力测定及流式细胞术检测 RB 对 HL-60 细胞增殖、细胞周期、NBT 还原力、细胞吞噬及细胞表面抗原 CD11b 表达的影响。结果 RB 在 1.0、3.0、5.0 $\mu\text{mol/L}$ 下抑制 HL-60 细胞增殖, 引起 HL-60 细胞 G_0/G_1 期阻滞, 增加 HL-60 细胞肾形核和分叶核细胞比率, 并伴随细胞 NBT 还原力和吞噬能力显著增强以及 CD11b 阳性细胞率明显上升。进一步检测显示, 活性氧(ROS)清除剂 *N*-乙酰-*L*-半胱氨酸(NAC, 300 $\mu\text{mol/L}$)及 NADPH 氧化酶抑制剂夹竹桃麻素(APO, 100 $\mu\text{mol/L}$)和二联苯碘锚(DPI, 0.1 $\mu\text{mol/L}$)不仅可显著抑制 RB 诱导的细胞内 ROS 升高, 并且可显著抑制 RB 诱导的 HL-60 细胞分化的各项特征指标的改变。结论 RB 可通过上调 HL-60 细胞 NADPH 氧化酶活性, 升高胞内 ROS 浓度, 诱导 HL-60 细胞向成熟粒细胞分化。

关键词: 对映-贝壳杉烷型二萜; rabdosin B; HL-60 细胞; 细胞分化; NADPH 氧化酶

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)11-2591-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.11.016

Induction effects of rabdosin B on differentiation of human promyelocytic leukemia HL-60 cells

WEI Jing-xin, DING Lan, LIU Yang, LI Pei-wei, LIU Guo-an

College of Life Sciences, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China

Abstract: **Objective** To investigate the characteristics and mechanism of spironolactone ent-kaurane diterpene type diterpene rabdosin B (RB) induced HL-60 differentiation into mature granulocytes. **Methods** The effects of RB on proliferation, cell cycle, NBT reducing power, phagocytosis, and cell surface antigen CD11b expression of HL-60 were detected by trypan blue staining, Giemsa staining, NBT reducing power assay, and flow cytometry, respectively. **Results** RB inhibited the proliferation of HL-60 cells at the concentration of 1.0, 3.0, and 5.0 $\mu\text{mol/L}$, which resulted in the arrest of G_0/G_1 phase, increased the ratio of renal nucleated and lobate nucleus, and markedly enhanced the NBT reducing power and phagocytic capacity and the significant increase of CD11b positive cell rate. Further tests showed that the active oxygen scavenger NAC (300 $\mu\text{mol/L}$), NADPH oxidase inhibitor APO (100 $\mu\text{mol/L}$), and DPI (0.1 $\mu\text{mol/L}$) not only significantly inhibited the intracellular ROS upregulation induced by RB, but also inhibited various features of RB induced HL-60 cell differentiation. **Conclusion** RB can increase the activity of NADPH oxidase in HL-60 cells, increase the intracellular ROS concentration, and induce the differentiation of HL-60 cells to mature granulocytes.

Key words: ent-kaurane diterpene; rabdosin B; HL-60 cells; differentiation; NADPH oxidase

靶向药物主导的分化治疗是癌症治疗的最佳途径已然成为共识^[1]。目前, 对于急性早幼粒细胞白血病(APL)治疗, 临床上除使用常规化疗、骨髓移植外, 还常用全反式维甲酸(ATRA)进行分化诱导治疗, 该法具有疗效高及毒副作用小的优势^[2]。ATRA 联合三氧化二砷可靶向降解融合蛋白

(PML/RAR α), 它们分别与融合蛋白的 RAR α 部分和 PML 部分结合, 降解融合蛋白, 使细胞向成熟粒细胞分化, 此方案可使 APL 的缓解率达到 90%~94%, 5 年存活率达到 90%^[3-5]。然而, APL 病人对 ATRA 的耐药症状严重影响了 ATRA 对 APL 的治疗效果^[6]。由此, 更多的研究者期待通过揭示诱导分

收稿日期: 2017-11-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31660101, 30960464)

作者简介: 魏婧昕, 女, 在读硕士, 研究方向为分子药理学。E-mail: wjx20112020130@163.com

*通信作者 丁 兰, 教授, 硕士生导师, 主要研究方向为天然产物抗癌分子药理学。E-mail: dinglan@nwnu.edu.cn

化剂对急性早幼粒细胞分化的分子靶向机制,发现新型高效低毒的分化诱导治疗药物。

随着对映-贝壳杉烷二萜冬凌草甲素(oridonin)显著的抗白血病效应的发现及其分子机制的深入研究^[7-8],尤其是其临床试验的顺利进展,该类二萜成分的分化诱导作用受到了特别关注,同时发现腺花素(adenanthin)靶向过氧化物还原蛋白(Prx) I 和 II,激活活性氧(ROS)信号通路诱导 NB4 细胞分化的作用^[9-10], wangzaozin A、epinodosin 及 leukamenin E 通过上调 NADPH 氧化酶活性,通过 ROS 通路诱导 HL-60 细胞分化的效应^[11-13]。鉴于对映-贝壳杉烷二萜分子的结构多样性^[14],研究不同分子结构类型的该类二萜化合物对白血病细胞的分化诱导活性、特征及其分子机制对于筛选并发现具有潜在价值的新型分化诱导剂有重要意义。本研究探讨另一类分子构型(螺环内酯)对映-贝壳杉烷二萜 radosin B (RB) 诱导 HL-60 细胞分化的特性及其分化机制,为其进一步的抗白血病研究提供科学依据。

1 材料

1.1 试剂与仪器

RPMI 1640 培养基购买于 Gibco 公司;特级胎牛血清购自天津森润生物公司;ATRA、硝基四氮唑蓝(NBT)、夹竹桃麻素(APO,母液浓度 10 mmol/L)、二联苯碘锚(DPI,母液浓度 10 mmol/L)、N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)、佛波酯(TPA)均为美国 Sigma 公司产品;Anti-Human CD11b FITC 购自德国 Biosciences 公司;吞噬荧光探针 P (HPMA-FMA) 本实验室合成^[15];其他化学药品均为国产分析纯。

CO₂ 培养箱(Heal Force 公司);DMI4000B 正置荧光显微镜(Leica 公司,德国);流式细胞仪(Beckman 公司,美国);m680 酶标仪(BIO-RAD 公司,美国);MM-3 型微量振荡仪(姜堰市沈高康健生化器具厂)。

1.2 药品

RB 由本课题组从甘肃产毛叶香茶菜 *Isodon japonica* Hara var. *galaucoalyx* Hara (该药材采自甘肃省西和县林场,由西北师范大学生命科学学院孙坤教授鉴定)中分离得到,通过红外、质谱等多种方法对其结构进行分析鉴定^[16]。其化学结构式见图 1。RB 晶体溶解于 DMSO 中,母液浓度为 10 mmol/L,于 4 °C 条件保存。

1.3 细胞

人早幼粒白血病细胞株 HL-60 由兰州大学生命科学学院王春明教授惠赠。

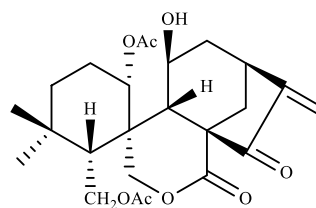


图 1 RB 的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of RB

2 方法

2.1 细胞培养

HL-60 细胞培养于含有 10% 特级胎牛血清的 RPMI 1640 培养基(含 100 U/mL 青霉素与 100 μg/mL 链霉素)中,置于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度恒温培养箱中培养,每 3 天传代 1 次,实验时所用细胞均处于对数生长期。

2.2 RB 对 HL-60 细胞增殖及细胞周期的影响

取对数生长期的 HL-60 细胞,制成浓度为 1.5×10^4 个/mL 的细胞悬液接种于 24 孔细胞培养板中,每孔 300 μL,置于恒温培养箱中培养 24 h 后,每孔分别加入 0、1.0、3.0、5.0 μmol/L RB 或 1.2 μmol/L ATRA。每隔 24 h 收集细胞,取台盼蓝与细胞悬液以 1:4 充分混匀,染色 4 min 后光镜下在计数板上记数活细胞数(未染色的细胞为活细胞,染成蓝色的细胞为死细胞)。所有实验组均设 3 组重复,取平均值计算存活率。

细胞周期检测采用 0、1.0、2.0、3.0 μmol/L RB 作用细胞 72 h 后,低速离心 5 min,弃上清并收集细胞,加 70%乙醇 4 °C 条件固定过夜。离心去除固定液,PBS 漂洗加终质量浓度为 100 μg/mL 的 RNaseA 于 37 °C 恒温孵育 30 min,加终质量浓度为 40 μg/mL PI 避光孵育 30 min,制成均一悬液后用流式细胞仪检测。

2.3 RB 对 HL-60 细胞大小、粒度及核形态的影响

细胞接种同“2.2”项,0、1.0、2.0、3.0 μmol/L RB 或 1.2 μmol/L ATRA 处理细胞 72 h,收集细胞后先用 4 °C 预冷的 70%乙醇固定,后于 -20 °C 固定 24 h,检测前离心除去固定液,并用 PBS 洗涤后加入 10 μL PI,避光孵育 30 min,制成均一悬液后用流式细胞仪检测。

细胞接种同“2.2”项,0、1.0、3.0 μmol/L RB 或 1.2 μmol/L ATRA 处理细胞 72 h,低速离心收集细胞,PBS 漂洗 2 次,用甲醇-冰乙酸(体积比 3:1)固定

20 min 后涂片,滴加吉姆萨染液避光染色 10 min,于显微镜下观察拍照,并分类统计不同核形态细胞,每组计数 300 个,计算成熟粒细胞率。分化细胞包括中幼粒细胞和晚幼粒细胞(带状核细胞和分叶状核细胞);未分化细胞包括早幼粒细胞(圆形核细胞)^[17]。

成熟粒细胞率=分化细胞/(分化细胞+未分化细胞)

按照上述相同的方法测定 3.0 $\mu\text{mol/L}$ RB 单独或联合 300 $\mu\text{mol/L}$ *N*-乙酰-*L*-半胱氨酸(NAC)、0.1 $\mu\text{mol/L}$ DPI 或 100 $\mu\text{mol/L}$ APO 培养细胞 72 h 后细胞核的变化。

2.4 细胞 NBT 还原能力测定^[18]

细胞接种同“2.2”项,0、1.0、3.0 $\mu\text{mol/L}$ RB 或 1.2 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 处理细胞 72 h,低速离心 5 min 收集细胞,PBS 漂洗 2 次后将待测细胞以 1×10^6 个/mL 密度重悬于 PBS (含终质量浓度为 2 mg/mL NBT 和 200 ng/mL TPA)中,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温孵育 30 min,离心弃上清,将待测样品分 2 份,一份涂片观察拍照,在光镜下观察胞浆内含蓝黑色颗粒的细胞(阳性细胞)。随机计数 300 个细胞,计算 NBT 阳性细胞率,按 Chen 等^[19]的方法,略有修改;另一份用酶标仪于波长 570 nm 处测定吸光度(*A*)值。

按照上述相同的方法测定 3.0 $\mu\text{mol/L}$ RB 单独或联合 300 $\mu\text{mol/L}$ NAC、0.1 $\mu\text{mol/L}$ DPI 以及 100 $\mu\text{mol/L}$ APO 培养细胞 72 h 后细胞 NBT 的还原能力。

2.5 细胞吞噬能力的测定

细胞接种同“2.2”项,0、1.0、3.0 $\mu\text{mol/L}$ RB 或 1.2 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 处理细胞 72 h,加终质量浓度为 30 $\mu\text{g/mL}$ 的荧光颗粒 P (HPMA-FMA),37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温孵育 3 h 后,离心收集细胞,加 1 mL PBS,将待测样品分 2 份,一份涂片后观察拍照;另一份用于流式细胞仪检测。

按照上述相同的方法测定 3.0 $\mu\text{mol/L}$ RB 单独或联合 300 $\mu\text{mol/L}$ NAC、0.1 $\mu\text{mol/L}$ DPI 以及 100 $\mu\text{mol/L}$ APO 培养细胞 72 h 后细胞的吞噬能力。

2.6 HL-60 细胞表面抗原 CD11b 表达的检测

细胞接种同“2.2”项,0、1.0、2.0、3.0 $\mu\text{mol/L}$ RB 或 1.2 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 处理细胞 72 h,PBS 漂洗后,调整细胞浓度为 1×10^6 个/mL,取 500 μL 细胞悬液,对照组加入 5 μL Mouse IgG1 K Isotype Control FITC,另取其他处理组的细胞悬液 500 μL 加入 5 μL anti-human CD11b FITC,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光恒温孵育 30 min,PBS 漂洗,制成均一悬液后用流式细胞仪检测。

按照上述相同的方法测定 3.0 $\mu\text{mol/L}$ RB 单独或联

合 300 $\mu\text{mol/L}$ NAC、0.1 $\mu\text{mol/L}$ DPI 以及 100 $\mu\text{mol/L}$ APO 培养细胞 72 h 后细胞 CD11b 的表达水平。

2.7 细胞 ROS 含量检测

细胞接种同“2.2”项,0、1.0、3.0 $\mu\text{mol/L}$ RB 或 1.2 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 处理细胞 3、6、9、24、48 h 后,低速离心收集细胞,PBS 漂洗,加入 1 mL DCFH-DA 荧光探针,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光恒温孵育 30 min,制成均一悬液后用流式细胞仪检测;其中 6 h 处理组的细胞悬液涂片,荧光显微镜下观察拍照。

按照上述相同的方法用流式细胞仪检测 3.0 $\mu\text{mol/L}$ RB 单独或联合 300 $\mu\text{mol/L}$ NAC 培养细胞 6 h 后细胞 ROS 含量变化。

2.8 NADPH 氧化酶活性分析

细胞接种同“2.2”项,0、1.0、2.0、3.0 $\mu\text{mol/L}$ RB 或 1.2 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 处理细胞 3、6 h 后,吸去 200 μL 培养基,每孔加入 50 μL 1 mg/mL NBT 溶液于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温孵育 1 h,离心弃上清,每孔加入 150 μL DMSO 振荡 15 min,用酶标仪于波长 570 nm 处测定 *A* 值。

按照上述相同的方法测定 0.1 $\mu\text{mol/L}$ DPI 或 100 $\mu\text{mol/L}$ APO 联合 3.0 $\mu\text{mol/L}$ RB 培养细胞 3 h 后用酶标仪测定 *A* 值。

2.9 数据统计学处理

各组数据均表示为 $\bar{x} \pm s$,数据用 SPSS 23.0 统计软件进行单因素方差分析(ANOVA),各组数据之间运用 LSR 多重比较的方法进行差异显著性检验。

3 结果

3.1 RB 阻滞 HL-60 细胞周期并抑制其增殖

以 0~5.0 $\mu\text{mol/L}$ RB 或 1.2 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 处理 HL-60 细胞 24~96 h 后,采用台盼蓝染色检测细胞活性,对活细胞计数结果显示,1.0、3.0、5.0 $\mu\text{mol/L}$ RB 作用 48~96 h 对 HL-60 细胞增殖有明显的抑制作用,并具有时间和剂量依赖性效应(图 2-A)。进一步用流式细胞仪检测发现,各处理组细胞在 72 h 分别出现了不同程度的 G_0/G_1 期阻滞(图 2-B)。RB 处理组 G_0/G_1 期细胞比率比对照组(42.3%)分别增加 1.7%、7.2%、9.3%,ATRA 组增加了 7.5%。

3.2 RB 诱导 HL-60 细胞分化的特性

3.2.1 RB 诱导 HL-60 细胞体积加大和粒度增加利用流式细胞术检测 RB 对 HL-60 细胞大小及粒度的影响。从图 3 可以看出,RB 处理 HL-60 细胞 72 h 后,细胞平均体积和粒度随处理浓度增大而增加,RB 2.0、3.0 $\mu\text{mol/L}$ 处理浓度最为明显。1.2 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 与 1.0 $\mu\text{mol/L}$ RB 的诱导效应相当。

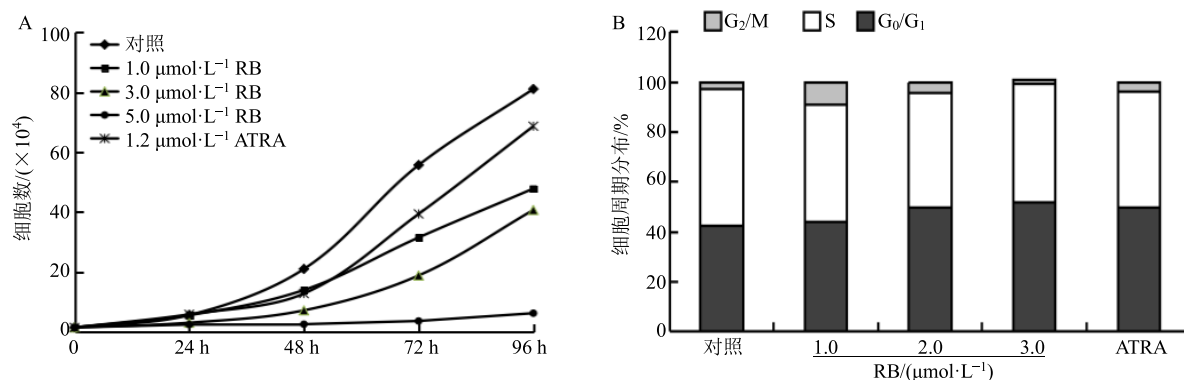
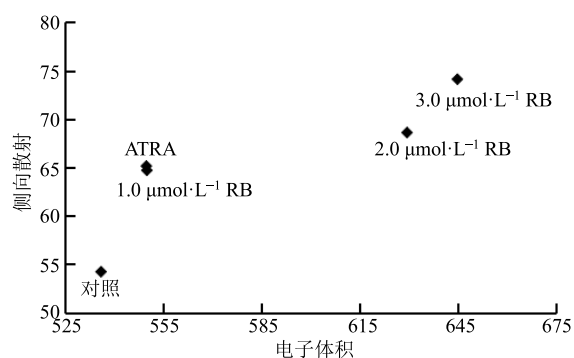
图 2 RB 对 HL-60 细胞生长 (A) 和细胞周期分布 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 2 Effects of RB on cell growth (A) and cell cycle distribution (B) of HL-60 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

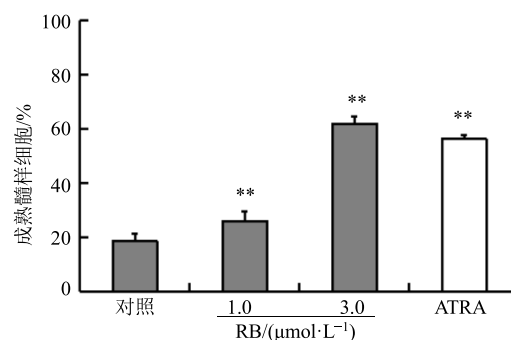
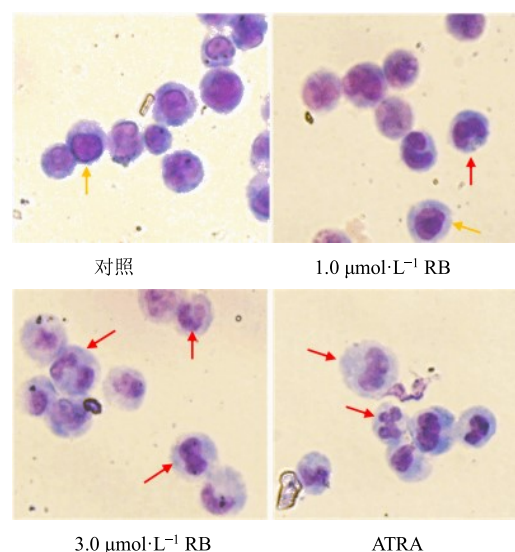
图 3 RB 引起 HL-60 细胞体积及粒度改变

Fig. 3 Volume and size changes of HL-60 cells caused by RB

3.2.2 RB 升高 HL-60 细胞肾形核和多叶核细胞比率 1.0、3.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 RB 或 1.2 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 处理 HL-60 细胞 72 h, 吉姆萨染色结果显示, 对照组细胞的核多为近圆形, 核质比较大, 而处理组细胞的核形态改变, 出现肾形核和分叶核, 同时细胞核质比减小 (图 4)。肾形核和分叶核细胞数量随着药物浓度增大而增多, 与对照组相比差异显著 ($P < 0.01$), 其中 RB 与 ATRA 处理组细胞核形的变化相似, 提示细胞向成熟粒细胞分化。

3.2.3 RB 提高 HL-60 细胞 NBT 还原能力 1.0、3.0 $\mu\text{mol/L}$ RB 处理 HL-60 细胞 72 h 后细胞的 NBT 还原力增强, 部分细胞着色明显加深 (图 5-A), NBT 阳性细胞率增加, 处理组与对照组相比差异显著 ($P < 0.01$), 并具有浓度依赖性 (图 5-B)。其中 3.0 $\mu\text{mol/L}$ RB 与 1.2 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 处理组的 NBT 还原能力接近。

3.2.4 RB 增强 HL-60 细胞的吞噬能力 流式细胞术结合荧光显微镜检测 1.0、3.0 $\mu\text{mol/L}$ RB 或 1.2 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 对细胞吞噬荧光颗粒 P(HPMA-FMA) 的影响。如图 6-A 所示, 对照组细胞荧光强度很低,

与对照组比较: ** $P < 0.01$, 图 5 和 6 同** $P < 0.01$ vs control group, same as figures 5 and 6图 4 RB 引起 HL-60 细胞核形态改变 ($\times 200, \bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 4 Changes of nucleus morphology of HL-60 cell treated with RB ($\times 200, \bar{x} \pm s, n = 3$)

难以观察到细胞内有荧光颗粒, 而处理组细胞的荧光强度增强, 高倍镜下可观察到荧光颗粒明显增多。流式细胞仪检测结果见图 6-B, 随着药物浓度增加, 处理组细胞平均荧光强度明显增加, 其数据与荧光

显微镜下观察得到结果相一致,表明药物处理后细胞对荧光颗粒 P (HPMA-FMA) 的吞噬能力增强。

3.2.5 RB 上调 HL-60 细胞表面抗原 CD11b 的表达 经不同浓度 RB 或 ATRA 作用 HL-60 细胞 72 h 后其粒细胞分化表面抗原 CD11b 的表达如图 7 所示。与对照(阳性细胞率 57.75%) 比较, 1.0、2.0、3.0 $\mu\text{mol/L}$ RB

和 1.2 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 均显著增加 HL-60 细胞表面抗原 CD11b 的表达, 其阳性细胞率分别为 73.02%、89.00%、66.40%, 并随 RB 浓度的增加而增加。

3.3 NADPH 氧化酶源 ROS 介导了 RB 对 HL-60 细胞的分化作用

3.3.1 RB 上调 HL-60 细胞的 ROS 水平 1.0、3.0

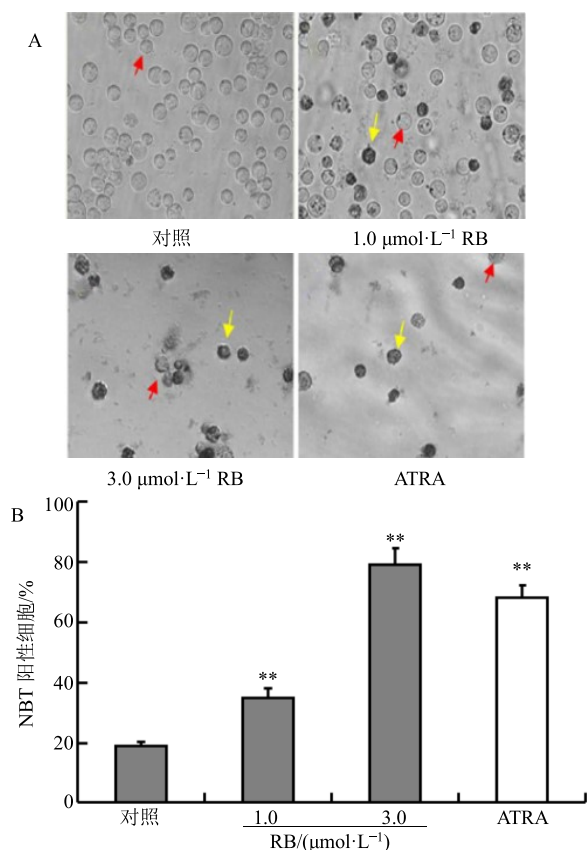


图5 RB对HL-60细胞NBT还原力的影响 ($\times 200$, $\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 5 Effect of RB on NBT-reducing ability of HL-60 cells ($\times 200$, $\bar{x} \pm s, n=3$)

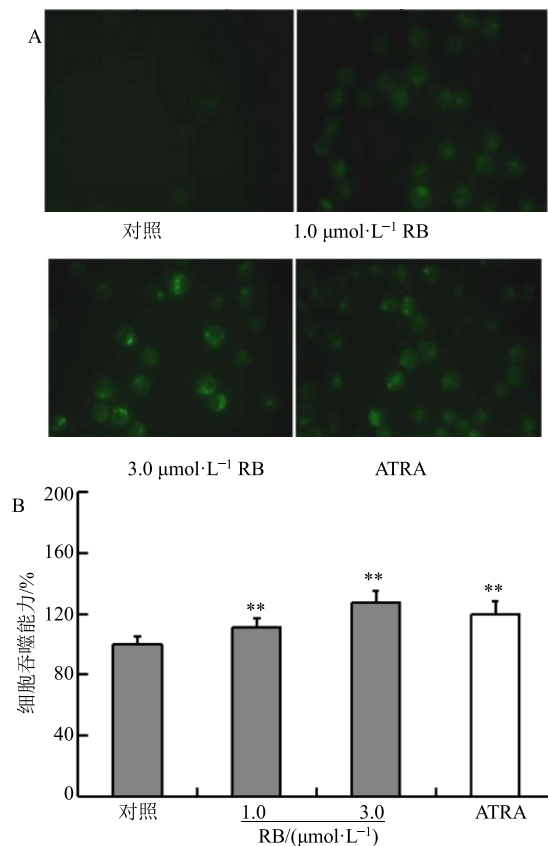


图6 RB对HL-60细胞吞噬能力的影响 ($\times 400$, $\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 6 Effects of RB on cellular phagocytic ability of HL-60 cells ($\times 400$, $\bar{x} \pm s, n=3$)

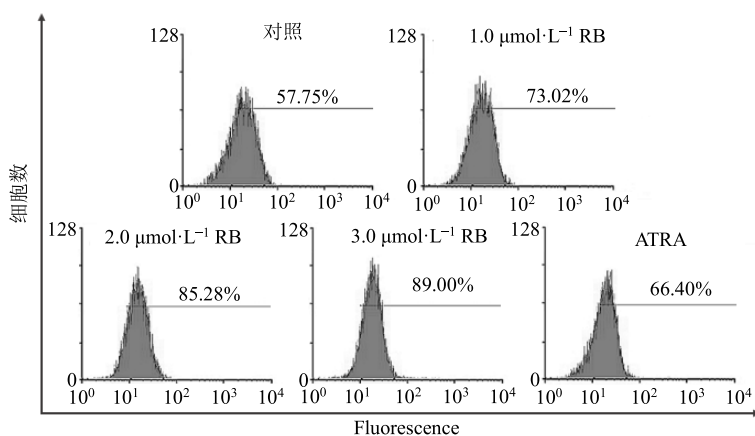


图7 RB对HL-60细胞表面抗原CD11b表达的影响
Fig. 7 Effects of RB on expression of cell surface antigen CD11b in HL-60 cells

$\mu\text{mol/L}$ RB 或 $1.2 \mu\text{mol/L}$ ATRA 作用 HL-60 细胞 3~48 h 后细胞内 ROS 水平变化如图 8-A 所示。1.0 $\mu\text{mol/L}$ RB 处理组细胞在加药 6 h 后其 ROS 水平较明显上升, 在 3、9、24 h 时 ROS 水平变化不明显, 48 h 时 ROS 水平有轻微降低。3.0 $\mu\text{mol/L}$ RB 处理组细胞内 ROS 水平各组均有升高, 尤其在 6 h 时 ROS 水平升高最为显著, 然后随时间增加, 细胞内 ROS 呈下降趋势, 同时, 用荧光显微镜表征 6 h 时处理组细胞 ROS 荧光探针图像(图 8-B), 3.0 $\mu\text{mol/L}$ RB 处理组细胞荧光强度高于对照组、1.0 $\mu\text{mol/L}$ RB 处理组和 1.2 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 处理组, 其结果与流式数据一致。

进一步以 300 $\mu\text{mol/L}$ NAC 联合 3.0 $\mu\text{mol/L}$ RB 处理 HL-60 细胞 6 h 后检测细胞 ROS 水平, 发现

NAC (自由基清除剂) 可以抑制 RB 引起的 ROS 升高(图 8-C)。

3.3.2 RB 诱导的 ROS 水平升高与 NADPH 氧化酶活性上调相关联 以 0~3.0 $\mu\text{mol/L}$ RB 分别作用 HL-60 细胞 3 h 或 6 h 后, NBT 分光光度法检测细胞氧化酶活性, 结果如图 9-A 所示。从图 9-B 可以看出, RB 可引起 NADPH 氧化酶活性显著增加 ($P < 0.01$), 并呈浓度依赖性, 而 6 h 处理组 NADPH 氧化酶在 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 和 3.0 $\mu\text{mol/L}$ 时高于 3 h 处理组。

进一步用 APO (100 $\mu\text{mol/L}$)、DPI (0.1 $\mu\text{mol/L}$) 2 种 NADPH 氧化酶抑制剂分别联合 RB 处理细胞并检测细胞内 NADPH 氧化酶活性及 ROS 浓度, 结果显示, APO、DPI 可抑制 RB 引起的 ROS 上升(图 9-C), 表明 RB 引起的 ROS 上升与 NADPH 氧化酶相关联。

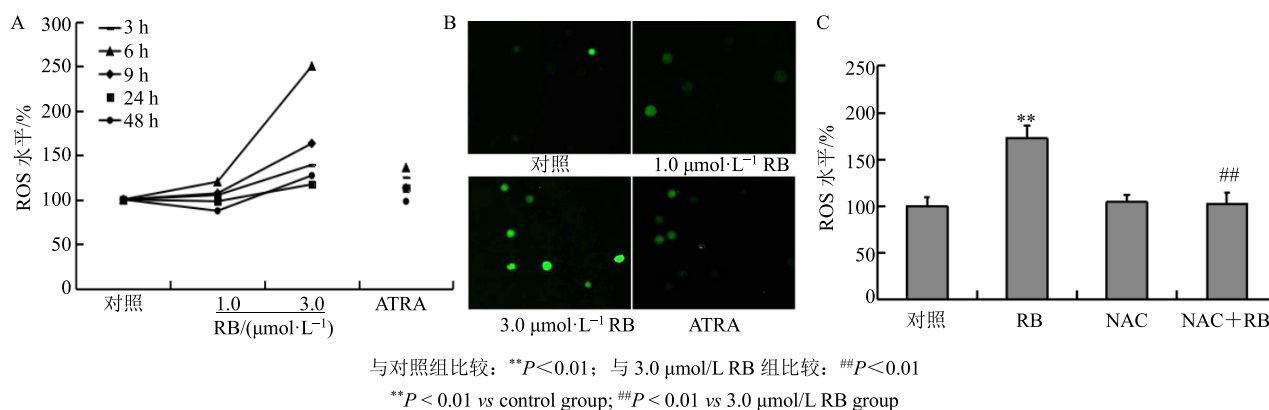


图 8 RB 对 HL-60 细胞 ROS 水平的影响 ($\times 400$, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 8 Effects of RB on ROS in HL-60 cells ($\times 400$, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

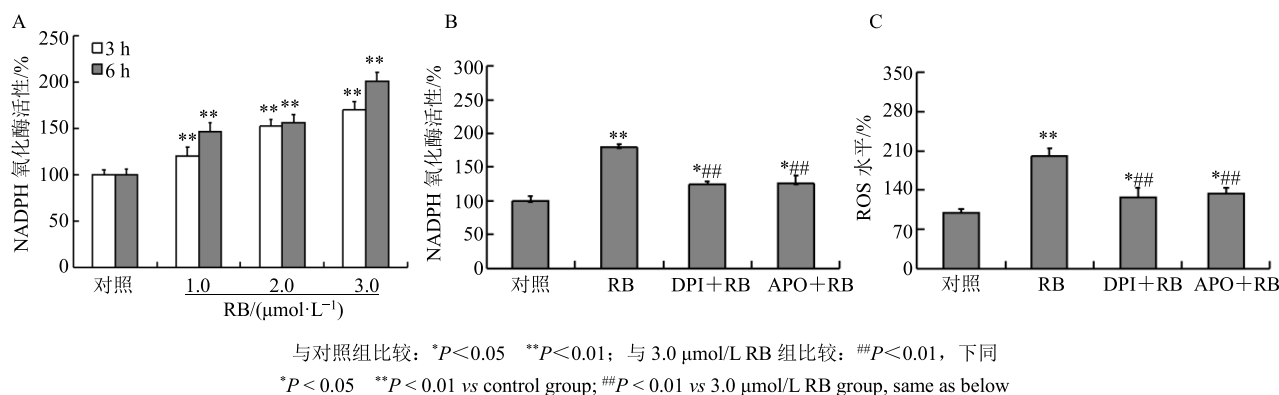


图 9 RB 单独或联合 DPI、APO 对 HL-60 细胞 NADPH 氧化酶及细胞 ROS 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 9 Effects of RB alone or in combination with APO and DPI on NADPH oxidase or activity of ROS levels in HL-60 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.4 NAC/DPI/APO 减弱 RB 对 HL-60 细胞分化的诱导作用

3.4.1 NAC/DPI/APO 减少 RB 诱导肾形核/多叶核 HL-60 细胞的比率 3.0 $\mu\text{mol/L}$ RB 联合 NAC 或

DPI 或 APO 分别作用于 HL-60 细胞 72 h 后, 吉姆萨染色观察并统计肾形核及多叶核细胞比率。从图 10 可以看出, 与 RB 单独处理组相比, 联合处理组 (RB+NAC, 或 RB+DPI 或 RB+APO) 的肾形核/

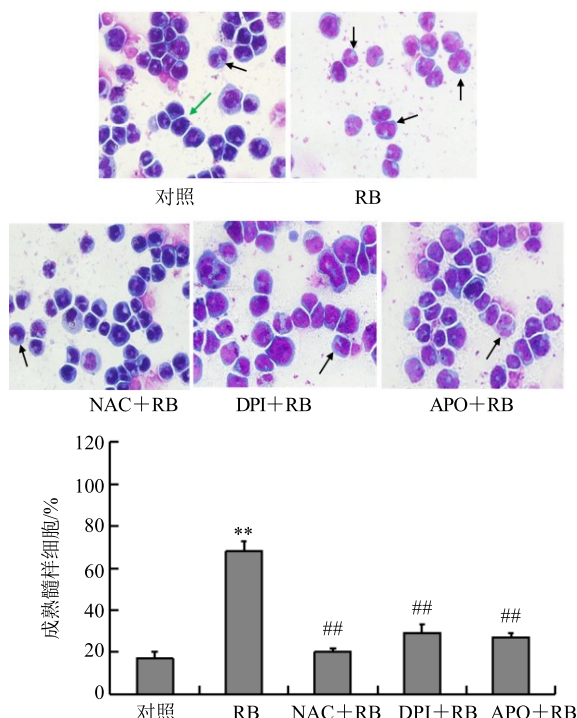


图 10 NAC 及 DPI、APO 分别联合 RB 对 HL-60 细胞核形态的影响 ($\times 200$, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 10 Changes of HL-60 cells nuclei morphology after treated with RB and in combination with NAC, DPI, and APO ($\times 200$, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

多叶核细胞比率显著降低,即活性氧抑制剂 NAC(300 $\mu\text{mol/L}$) 及 NADPH 氧化酶抑制剂 DPI (0.1 $\mu\text{mol/L}$) 和 APO (100 $\mu\text{mol/L}$) 显著降低 RB 对肾形核/多叶核 HL-60 细胞的诱导作用,表明 RB 诱导的分化作用与 NADPH 氧化酶活性及其产生的 ROS 相关联。

3.4.2 NAC/DPI/APO 降低 RB 对 HL-60 细胞 NBT 还原能力的提升作用 RB 联合 NAC 或 DPI 或 APO 分别作用于 HL-60 细胞 72 h 后,显微镜观察结合酶标仪检测各实验组细胞的 NBT 还原能力,结果见图 11。与 RB 单独处理组相比,联合处理组(RB+NAC 或 RB+DPI 或 RB+APO)细胞的 NBT 还原力明显降低,各组均差异显著 ($P<0.01$),表明 NAC (300 $\mu\text{mol/L}$)、DPI(0.1 $\mu\text{mol/L}$)及 APO(100 $\mu\text{mol/L}$) 对 RB 诱导的 HL-60 细胞 NBT 还原力升高有明显的阻滞作用,进一步显示 NADPH 氧化酶来源的 ROS 与 RB 诱导的分化作用相关。

3.4.3 NAC/DPI/APO 抑制 RB 对 HL-60 细胞吞噬能力的增强作用 RB 联合 NAC 或 DPI 或 APO 分别作用于 HL-60 细胞 72 h 后,流式细胞术结合荧光显微镜检测各实验组细胞的吞噬能力,结果见图

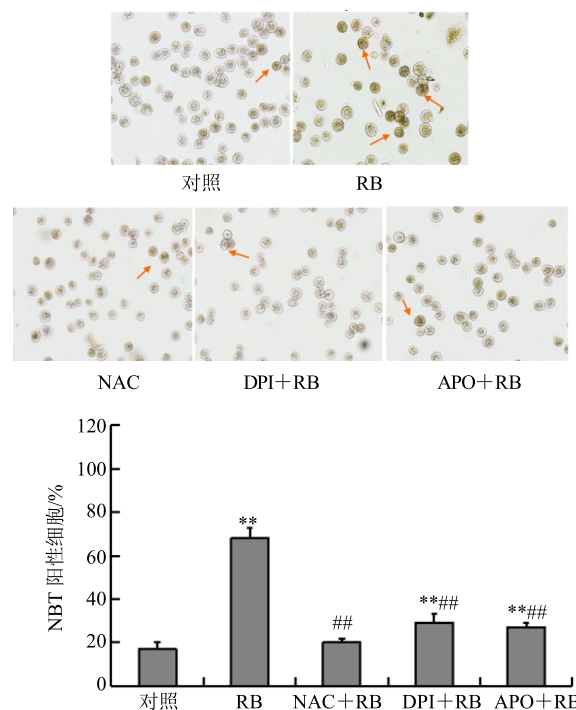


图 11 NAC 及 DPI、APO 分别联合 RB 对细胞 NBT 还原力的影响 ($\times 200$, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 11 Effects of RB in combination with NAC, DPI, and APO on NBT-reducing ability of HL-60 cells ($\times 200$, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

12,与 RB 单独处理组相比,联合处理组(RB+NAC 或 RB+DPI 或 RB+APO)细胞对荧光颗粒 P (HPMA-FMA) 的吞噬能力明显减弱:显微镜下,3 组联合处理组细胞荧光强度降低(图片未显示),表明细胞内荧光颗粒减少;进一步流式细胞术结果也显示细胞平均荧光强度降低,表明 NAC、DPI、APO 3 种抑制剂可抑制 RB 诱导的 HL-60 细胞吞噬作用增强。

3.4.4 NAC/DPI/APO 抑制 RB 引起的 CD11b 上调当 3.0 $\mu\text{mol/L}$ RB 联合 300 $\mu\text{mol/L}$ NAC 或 0.1 $\mu\text{mol/L}$ DPI 或 100 $\mu\text{mol/L}$ APO 分别作用于 HL-60 细胞 72 h 后,用流式细胞术检测细胞表面抗原 CD11b 的表达情况,结果如图 13 所示。从图 13 可以看出,与 RB 单独处理组相比,3 个联合处理组(RB+NAC、RB+DPI、RB+APO)细胞的平均荧光强度显著降低,表明自由基产生的抑制直接影响 RB 诱导 HL-60 细胞分化抗原的表达。

4 讨论

对映-贝壳杉烷二萜化合物大量存在于唇形科香茶菜属植物,它们含量丰富、结构多样,拥有多种重要生物活性^[20],尤其是抗癌活性受到广泛关

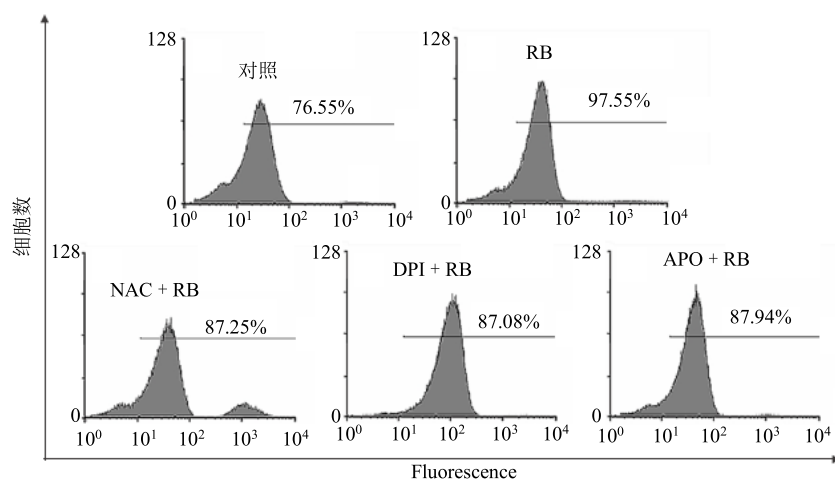


图 12 NAC、DPI、APO 联合 RB 对 HL-60 细胞吞噬能力的影响

Fig. 12 Effects of RB in combination with NAC, DPI, and APO on cellular uptake ability of HL-60 cells

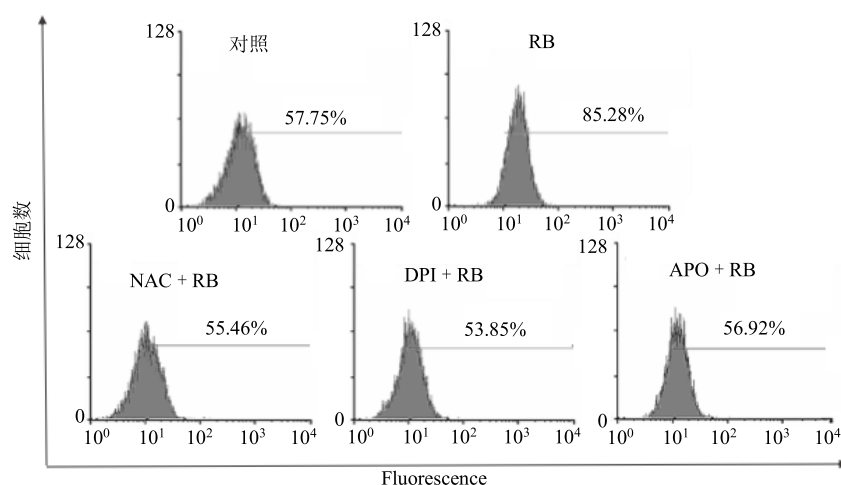


图 13 NAC、DPI、APO 联合 RB 对 HL-60 细胞 CD11b 表达的影响

Fig. 13 Effects of RB in combination with NAC, DPI, and APO on expression of CD11b in HL-60 cells

注, 相关研究报道逐年增多^[21-22], 甚至某些对映-贝壳杉烷型二萜化合物被认为有望成为新的抗癌先导化合物^[23]。例如, 对映-贝壳杉烷二萜冬凌草甲素能够诱导包括白血病细胞在内的多种肿瘤细胞的周期阻滞、凋亡^[24-25], 其机制与下调抗凋亡蛋白 Bcl-xL 与 Mcl-1 含量有关^[7,26]; 冬凌草甲素还可激活 t(8; 21) 白血病细胞凋亡途径, 通过 caspase-3 靶向切割白血病融合蛋白 AML1-ETO^[8]; 并且该化合物还具有抗核转录因子- κ B (NF- κ B) 的活性, 破坏 NF- κ B 和 DNA 间的作用^[7,27]。从香茶菜属植物细锥香茶菜中分离得到的二萜类化合物 RB 对白血病细胞的生长有明显的抑制作用, 并且随药物浓度增高, 生长抑制率增加^[28]。尤其需要关注的是, 在这类化合物抗白血病机制的研究中发现, 胞内

ROS 水平改变是周期阻滞、细胞分化以及凋亡的关键上游信号^[8,29]。本课题组连续报道了 3 种不同构型的对映-贝壳杉烷型二萜对早幼粒细胞 HL-60 诱导分化以及介导 NADPH 氧化酶活性调节, 改变胞内 ROS 水平的研究结果^[11-13]。如前所述, 对映-贝壳杉烷型二萜 wangzaozin A、epinodosin 及 leukamenin E 通过诱导白血病细胞 HL-60 向成熟粒细胞分化与胞内 ROS 水平上调相关, 通过活化 HL-60 细胞 NADPH 氧化酶活性, 升高 ROS 水平, 诱导细胞分化^[11-13]; Hou 等^[10]报道另一种对映-贝壳杉烷型二萜腺花素可诱导白血病细胞 NB4 向成熟粒细胞分化的机制是作用 NB4 细胞的过氧化氧化还原蛋白 (Prxs), 通过抑制其活性而升高 ROS 浓度, 诱导 NB4 细胞分化。这些结果显示, 对映-贝

壳杉烷型二萜的可能作用靶点均指向胞内 ROS 水平调节蛋白/酶(过氧化氧化还原蛋白或 NADPH 氧化酶), 这表明 ROS 可能是对映-贝壳杉烷型二萜类化合物抗癌机制的共同上游信号。

本研究系列实验显示, 螺环内酯型对映-贝壳杉烷型二萜 RB 诱导 HL-60 细胞向成熟粒细胞分化的特性及其可能的机制与上述对映-贝壳杉烷型二萜 wangzaozin A、epinodosin 及 leukamenin E 相一致, 尽管它们的分子结构差异较大, 分属不同分子构型类群。结果显示, RB 处理后的 HL-60 细胞粒度及细胞体积均显著增加, 说明 RB 诱导细胞内部结构改变, 复杂度增加, 骨架重组; 显微镜观察显示细胞核质比下降并且肾形核和分叶核细胞显著增加, 同以往 HL-60 细胞向粒细胞分化的核形态报道相一致^[30]。同时, RB 还引起 HL-60 细胞周期阻滞、细胞吞噬能力增加、NBT 还原能力上升以及 CD11b 表达上调, 这一系列检测项均被认为是细胞分化的标志性指标^[31-32], 并且与其他分子构型的对映-贝壳杉烷型二萜 wangzaozin A、epinodosin 及 leukamenin E 诱导 HL-60 细胞向粒细胞分化的特征高度相似^[11-13]。

进一步研究 RB 诱导上述分化过程可能的调节机制, 发现 RB 在引起 HL-60 细胞 ROS 浓度升高的同时也引起 NADPH 氧化酶活性升高, 说明 RB 诱导的分化作用可能与 NADPH 氧化酶产生的 ROS 信号通路相关联; 采用 ROS 清除剂 NAC、NADPH 氧化酶抑制剂 APO 和 DPI 联合 RB 处理细胞并检测各处理细胞的 ROS 水平、细胞形态、NBT 还原力、吞噬功能及细胞表面分化抗原的改变, 发现 ROS 清除剂以及 NADPH 氧化酶抑制剂可明显抑制 RB 诱导的各种细胞分化特征, 证实 RB 引起的分化过程与 NADPH 氧化酶以及由其产生的 ROS 相关联, 故认为 RB 诱导 HL-60 向粒细胞分化确实由 NADPH 氧化酶源性 ROS 调节。这一调控机制与所报道的另外 3 种对映-贝壳杉烷型二萜 wangzaozin A、epinodosin 及 leukamenin E 诱导 HL-60 分化机制相一致。

有报道显示, ATRA 诱导的 HL-60 细胞分化后期所产生的细胞凋亡是通过 NADPH 氧化酶介导的 ROS 升高激活 GSK-3 β 依赖的凋亡途径^[33]。本研究显示 1.2 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 诱导的分化特征指标远高于 1.0 $\mu\text{mol/L}$ RB 的分化指标, 而与 3.0 $\mu\text{mol/L}$ RB 的分化特征指标接近, 包括核分化、NBT 还原力和吞噬能力, 仅细胞分化表面抗原 CD11b 的表达量 1.0

$\mu\text{mol/L}$ RB 明显高于 1.2 $\mu\text{mol/L}$ ATRA。但 1.2 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 在 3~48 h 时诱导 ROS 水平却与 1.0 $\mu\text{mol/L}$ RB 相当, 与对照组相比 ROS 水平在 3~6 h 有升高, 但不甚明显。本研究没有进一步检测 ATRA 诱导的分化作用是否是 NADPH 氧化酶所依赖或介导。在 RB 和 ATRA 诱导 HL-60 细胞分化的实验中, 发现 2 种药物对 HL-60 细胞作用时效有明显差异, 1.2 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 可以持续作用 HL-60 细胞 5~7 d, 然后分化细胞发生凋亡; 而 RB 的持续作用在 3~4 d, 4 d 后其中的未分化细胞增殖有所增加。这说明 2 种药物可能有相似的诱导途径, 但也存在本身的差异。

NOX 家族产生的 ROS 是胞内 ROS 的重要来源。大量证据表明通过 NADPH 氧化酶能激活 MAPK 通路。ROS 引起的细胞氧化还原状态的改变可激活由 MAPK 家族不同成员参与的信号转导通路, NADPH 氧化酶抑制剂和过氧化氢酶的过表达可阻断 Ang II 参与 p38MAPK 磷酸化^[34]。RB 如何增加 NADPH 氧化酶表达的机制尚不清楚, 还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Li Y, Li G, Wang K, *et al.* Autophagy contributes to 4-amino-2-trifluoromethyl-phenyl retinate-induced differentiation in human acute promyelocytic leukemia NB4 cells [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2017, 319(2): 1-11.
- [2] Testa U, Lo-Coco F. Targeting of leukemia-initiating cells in acute promyelocytic leukemia [J]. *Stem cell Investig*, 2015, 2(17): 1-8.
- [3] Ge D, Sheng Y, Cai X. Combined staurosporine and retinoic acid induces differentiation in retinoic acid resistant acute promyelocytic leukemia cell lines [J]. *Sci Rep*, 2014, 4(4821): 1-8.
- [4] McCulloch D, Brown C, Iland H. Retinoic acid and arsenic trioxide in the treatment of acute promyelocytic leukemia: current perspectives [J]. *Onco Targets Ther*, 2017, 14(10): 1585-1601.
- [5] Brigger D, Schl fli A M, Garattini E, *et al.* Activation of RAR α induces autophagy in SKBR3 breast cancer cells and depletion of key autophagy genes enhances ATRA toxicity [J]. *Cell Death Disease*, 2015, 6(8): 1861-1870.
- [6] Ng C H, Chng W J. Recent advances in acute promyelocytic leukaemia [J]. *F1000 Res*, 2017, doi: 10.12688/f1000research.10736.1.
- [7] Zhou G B, Kang H, Wang L, *et al.* Oridonin, a

- diterpenoid extracted from medicinal herbs, targets AML1-ETO fusion protein and shows potent antitumor activity with low adverse effects on t (8; 21) leukemia *in vitro* and *in vivo* [J]. *Blood*, 2007, 109(8): 3441-3450.
- [8] Zhen T, Wu C F, Liu P, *et al.* Targeting of AML1-ETO in t(8;21) leukemia by oridonin generates a tumor suppressor-like protein [J]. *Sci Transl Med*, 2012, 4(127): 127-138.
- [9] Liu C X, Zhou H C, Yin Q Q, *et al.* Targeting peroxiredoxins against leukemia [J]. *Exper Cell Res*, 2013, 319(2): 170-176.
- [10] Hou J K, Huang Y, He W, *et al.* Adenanthin targets peroxiredoxin I/II to kill hepatocellular carcinoma cells [J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5(9): 1400-1407.
- [11] 丁 兰, 陈祎平, 刘国安, 等. Wangzaozin A 调节 NADPH 氧化酶源性活性氧诱导 HL-60 细胞分化 [J]. 华中师范大学学报: 自然科学版, 2015, 49(2): 252-260.
- [12] 丁 兰, 李佩蔚, 孔花青, 等. 对映-贝壳杉烷型二萜 Leukamenin E 对人早幼粒白血病 HL-60 细胞分化的诱导作用 [J]. 中国药房, 2016, 27(13): 1771-1774.
- [13] 丁 兰, 陈宗儒, 陈 平, 等. NADPH 氧化酶源性活性氧介导 epinodosin 诱导 HL-60 细胞分化及细胞骨架重组 [J]. 中国细胞生物学报, 2016, 38(3): 273-284.
- [14] Sun H D, Huang S X, Han Q B. Diterpenoids from *Isodon* species and their biological activities [J]. *Nat Product Rep*, 2006, 23(5): 673-698.
- [15] 吴炎鹏, 许卫兵, 孔花青, 等. P (HPMA-FMA) 荧光探针制备, 细胞毒性评估及细胞吞噬示踪检测 [J]. 功能高分子学报, 2014, 27(1): 92-98.
- [16] Ding L, Liu G A, Wang L. Cytotoxic ent-kaurane diterpenoids from *Isodon racemosa* (Hemsl) Hara [J]. *Indian J Chem B*, 2006, 45(2): 548-551.
- [17] 韩 锐. 抗癌药物研究与实验技术 [M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1997.
- [18] Kohroki J, Muto N, Tanaka T, *et al.* Induction of differentiation and apoptosis by dithizone in human myeloid leukemia cell lines [J]. *Leukemia Res*, 1998, 22(5): 405-412.
- [19] Chen H, Zhang B, Yao Y, *et al.* NADPH oxidase-derived reactive oxygen species are involved in the HL-60 cell monocytic differentiation induced by isoliquiritigenin [J]. *Molecules*, 2012, 17(11): 13424-13438.
- [20] 孙汉董, 许云龙, 姜 北. 番茶菜属植物二萜化合物 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [21] 马永成, 苏 楠, 石晓静, 等. 新型对映-贝壳杉烷二萜化合物 jaridonin 体外抗肿瘤活性及其作用机制探讨 [J]. 中国药理学杂志, 2013, 48(15): 1266-1270.
- [22] 丁 兰, 第五佳丽, 田继东, 等. 对映-贝壳杉烷型二萜化合物 Wangzaozin A 对人早幼粒白血病 HL-60 细胞生长抑制和凋亡诱导的作用 [J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(8): 727-732.
- [23] 张大永, 李子元, 施连勇, 等. ent-贝壳杉烷型二萜化合物的细胞毒活性研究进展 [J]. 有机化学, 2008, 28(11): 1911-1917.
- [24] Ikezoe T, Yang Y, Bandobashi K, *et al.* Oridonin, a diterpenoid purified from *Rabdosia rubescens*, inhibits the proliferation of cells from lymphoid malignancies in association with blockade of the NF- κ B signal pathways [J]. *Mol Cancer Therap*, 2005, 4(4): 578-586.
- [25] 季宇彬, 江 剑, 高世勇. 冬凌草甲素注射剂诱导人胃癌 SGC-7901 细胞凋亡及其机制研究 [J]. 中草药, 2011, 42(10): 2051-2055.
- [26] 魏 硕, 董诚明, 朱昀昊, 等. 产冬凌草甲素菌株筛选鉴定及其抗肿瘤活性研究 [J]. 中草药, 2017, 48(15): 3127-3130.
- [27] Leung C H, Grill S P, Lam W, *et al.* Novel mechanism of inhibition of nuclear factor- κ B DNA-binding activity by diterpenoids isolated from *Isodon rubescens* [J]. *Mol Pharmacol*, 2005, 68(2): 286-297.
- [28] 冯婷婷, 普建新, 胡 政, 等. 二萜化合物 Rabdocoetsin B 抑制蛋白酶体功能并诱导 t (8; 21) 白血病细胞凋亡 [J]. 生物工程学报, 2009, 25(8): 1218-1224.
- [29] Huang J, Wu L, Tashiro S, *et al.* Reactive oxygen species mediate oridonin-induced HepG2 apoptosis through p53, MAPK, and mitochondrial signaling pathways [J]. *J Pharmacol Sci*, 2008, 107(4): 370-379.
- [30] Guiso G, Rambaldi A, Dimitrova B, *et al.* Determination of orally administered all-trans-retinoic acid in human plasma by high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr B: Biomed Sci Appl*, 1994, 656(1): 239-244.
- [31] Li D, Wang Z, Chen H, *et al.* Isoliquiritigenin induces monocytic differentiation of HL-60 cells [J]. *Free Rad Biol Med*, 2009, 46(6): 731-736.
- [32] Chen H, Zhang B, Yuan X, *et al.* Isoliquiritigenin-induced effects on Nrf2 mediated antioxidant defence in the HL-60 cell monocytic differentiation [J]. *Cell Biol Intern*, 2013, 37(11): 1215-1224.
- [33] Wang C Y, Yang T T, Chen C L, *et al.* Reactive oxygen species-regulated glycogen synthase kinase-3 β activation contributes to all-trans retinoic acid-induced apoptosis in granulocyte-differentiated HL60 cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 88(1): 86-94.
- [34] 冷丽丽, 唐圣松. NADPH 氧化酶 NOX 家族的组织分布及生理功能 [J]. 国际病理科学与临床杂志, 2008, 28(1): 19-23.