

17-羟-岩大戟内酯 B 对 U251 细胞增殖及凋亡作用的影响

王晓丽<sup>1</sup>, 岳丽玲<sup>2</sup>, 周丽<sup>2</sup>, 刘吉成<sup>1\*</sup>

(1. 齐齐哈尔医学院医药科学研究所, 黑龙江 齐齐哈尔 161006;  
2. 齐齐哈尔医学院中心实验室, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

[摘要] 目的:探讨 17-羟-岩大戟内酯 B(HJB)对人脑胶质瘤细胞 U251 增殖及凋亡的影响。方法:将 U251 细胞分为空白对照组,5-氟尿嘧啶组(80  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),HJB 组(6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 800  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。用不同浓度的药物作用 24 h 及药物半数抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ )浓度作用不同时间(12, 24, 48, 72 h),四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测细胞活性,流式细胞仪 Annexin V-FITC/PI 检测细胞凋亡率,分光光度法检测半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)和半胱氨酸蛋白酶-9(Caspase-9)的相对活性。结果:与空白对照组相比,HJB 对 U251 细胞的增殖有显著抑制作用,并呈浓度依赖及时间依赖性( $P<0.05$ ),作用 24 h 后  $\text{IC}_{50}$  为 62.236 11  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。HJB 可诱导 U251 细胞凋亡,浓度 30, 60, 120  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  分别处理细胞 24 h 后,早期凋亡率明显升高( $P<0.05$ ),且呈浓度依赖关系;Caspase-3 及 Caspase-9 的相对活性均升高( $P<0.05$ ),并呈浓度依赖关系。结论:HJB 明显抑制体外 U251 细胞生长并诱导其凋亡,线粒体途径可能是诱导其凋亡的机制之一。

[关键词] 17-羟-岩大戟内酯 B; U251; 细胞凋亡; Caspase-3; Caspase-9

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)18-0254-04

Effect of 17-hydroxy-jolkinolide B on Proliferation and Apoptosis of U251 Cells

WANG Xiao-li<sup>1</sup>, YUE Li-ling<sup>2</sup>, ZHOU Li<sup>2</sup>, LIU Ji-cheng<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Medicine, Qiqihar Medical College, Qiqihar 161006, China;

[收稿日期] 20120329(001)  
[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30973902)  
[第一作者] 王晓丽,硕士,实习研究员,从事肿瘤药理学研究,Tel:15204523306,E-mail:wangxiaoli.01@163.com  
[通讯作者] \*刘吉成,博士,教授,主任药师,从事肿瘤药理学研究,Tel:0452-2663103,E-mail:qyybliu@126.com

外周血象、骨髓有核细胞数量、骨髓中 DNA 含量以及骨髓细胞各个细胞周期时相的影响,结果提示地榆升白片对骨髓抑制小鼠骨髓造血系统具有较显著的恢复作用,其分子机制有待进一步的研究。

[参考文献]

[1] 邓震亭. 环磷酰胺药理与毒理研究现状[J]. 天津药学,2009,21(4):42.  
[2] 金美花. 地榆药理作用与临床应用[J]. 现代医药卫生,2009,25(16):2479.  
[3] 苏燎原. 淋巴细胞及其辐射效应[M]. 北京:原子能出版社,2000:222.  
[4] 任非非,刘敬霞,俞维,等. 枸杞不同制剂对环磷酰胺致血虚大鼠全血细胞及骨髓造血功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(3):188.  
[5] 古丽努尔·买买提,彭安,郑艳波. 环磷酰胺化疗所致骨髓抑制的中药(寿胎丸)干预研究[J]. 北京师范大学

学报,2010,46(4):480.  
[6] 申文江,夏廷毅,李宝生. 地榆升白片在肿瘤放化疗中的临床应用[J]. 中国实用内科杂志,2009,29(6):1.  
[7] 刘志辉,孟庆勇. 海藻多糖对小鼠骨髓放射性急性损伤的保护作用[J]. 广东医学院学报,2002,20(6):420.  
[8] 刘新春,程玉峰,李德爱. 实用抗肿瘤药物治疗学[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:1078.  
[9] 赵菊花,祝彼得,黄茜,等. 圣愈汤对骨髓抑制小鼠骨髓细胞周期和凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,16(8):202.  
[10] Israels E D, Israels L G. The cell cycle. Stem cell [J]. 2001, 19(1):88.  
[11] 詹启敏. 分子肿瘤学[M]. 北京:人民卫生出版社,2005:322.

[责任编辑 何伟]

## 2. The Hub Laboratory, Qiqihar Medical College, Qiqihar 161006, China)

**[Abstract] Objective:** To study the effects of 17-hydroxy-jolkinolide B (HJB) on proliferation and apoptosis of U251 cells. **Method:** After the cells were treated with HJB at various concentrations (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 800  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) for 24 h, or at half maximal inhibitory concentration of a substance ( $\text{IC}_{50}$ ) for various durations (12, 24, 48, 72 h), cell viability was measured by 3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). Annexin V-FITC by cytometry was used to test the apoptosis rate. Absorption spectrometry was adopt to measure the relative activity of Caspase-3 and Caspase-9. **Result:** The HJB evidently inhibited the growth of U251 cells in a time and dose-dependent manner ( $P < 0.05$ ), with  $\text{IC}_{50}$  value for 24 h being 62.236 11  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , and it could induce apoptosis of U251 cells. After HJB treatment at 30, 60 and 120  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  for 24 h, the apoptosis rate of U251 cells was 3.10%, 3.51% and 5.98%, respectively ( $P < 0.05$ ), and the relative activity of Caspase-3 or Caspase-9 was advanced with dose-dependent manner. **Conclusion:** The HJB evidently inhibits the growth of U251 and induces the apoptosis of U251. The mechanism may be mediated by mitochondrion pathways.

**[Key words]** 17-hydroxy-jolkinolide B; U251; cell apoptosis; caspase-3; caspase-9

狼毒大戟属大戟科植物,含有多种化学成分,主要为二萜和三萜类化合物,还有鞣质,甾体,蒽醌,黄酮等,其中有多种成分发现具有抗肿瘤功能<sup>[1]</sup>。狼毒大戟在体外可明显抑制人白血病 K562 细胞,肝癌 HepG2 细胞,人前列腺癌 LNCap 细胞系的生长<sup>[2]</sup>,但对其作用机制缺乏深入了解。17-羟-岩大戟内酯 B(HJB)是二萜类化合物的一种,研究发现 HJB 可直接作用于致癌基因 JAK 家族激酶,从而使肿瘤细胞凋亡发挥其抗肿瘤作用<sup>[3]</sup>。HJB 在细胞凋亡的研究或临床上的应用鲜见报道。本文探讨 HJB 对 U251 细胞生长的抑制作用及诱导凋亡的作用,从而为该药临床应用提供实验依据。

## 1 材料

**1.1 细胞株** 人脑胶质瘤 U251 细胞株,中国科学院细胞库,批号 TcHu58。

**1.2 药物** HJB 粉末,齐齐哈尔大学化工学院张树军教授赠,纯度 > 99%;用二甲基亚砜(DMSO, Sigma 公司,批号 20100103665)助溶,配制成摩尔浓度为 10  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,过滤除菌,置 -20  $^{\circ}\text{C}$  冻存备用,临用前依次对半稀释成系列浓度梯度<sup>[4]</sup>。

**1.3 试剂** DMEM 高糖培养基, GIBCO 公司,批号 991030;胰蛋白酶(0.25% EDTA), Solarbio 公司,批号 20120222;胎牛血清, Hyclone 公司,批号 NWK0489;MTT, Sigma 公司,批号 M2128;Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒,南京凯基生物科技发展有限公司,批号 20111226;Caspase-3 分光光度法检测试剂盒,南京凯基生物科技发展有限公司,批号 20120419;Caspase-9 分光光度法检测试剂盒,南京

凯基生物科技发展有限公司,批号 20120405;BCA 蛋白定量试剂盒,北京康为试剂生物有限公司,批号 01052011。

**1.4 仪器** FACSCalibur-流式细胞仪(BD 公司), 5417R-离心机(Eppendorf 公司), SAFIRE II-BASIC-酶标仪(TECAN 公司), 3111-CO<sub>2</sub> 培养箱(Thermo 公司)。

## 2 方法

**2.1 细胞培养** 胶质瘤 U251 细胞培养于 DMEM 培养液(含 10% 的胎牛血清, 100  $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$  青霉素, 100  $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$  链霉素, 3.7  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{NaHCO}_3$ )中,在 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中常规培养,隔天传代,试验时取对数生长期细胞。

**2.2 MTT法检测细胞活性** 取对数生长期 U251 细胞接种于 96 孔培养板(细胞数为  $1 \times 10^4$  个/mL, 100  $\mu\text{L}$ /孔), 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h 待细胞贴壁后:试验分为空白对照组(不加药),阳性对照组(5-氟尿嘧啶摩尔浓度为 80  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),加药组(HJB 浓度分别为 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 800  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),培养 24 h;以  $\text{IC}_{50}$  药物浓度培养 12, 24, 48, 72 h。试验每个浓度设 4 个复孔,并以空白孔调零。药物作用后加入 MTT 溶液(5  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 20  $\mu\text{L}$  继续培养 4 h,去孔内培养基,每孔加 DMSO 150  $\mu\text{L}$ ,摇床低速振荡 10 min 使其充分溶解,在酶标仪  $A_{490\text{nm}}$  处检测吸光度(A)值。计算抑制率及  $\text{IC}_{50}$ 。

抑制率 = (1 - 加药组 A 值/对照组 A 值)  $\times 100\%$

**2.3 细胞凋亡率检测** 取对数生长期 U251 细胞,接种于 12 孔板( $2 \times 10^5$  个/mL, 500  $\mu\text{L}$ /孔), 37  $^{\circ}\text{C}$ ,

5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h 待细胞贴壁后, 试验分为空白对照组, 加药组 (HJB 浓度为 30, 60, 120 μmol·L<sup>-1</sup>), 培养 24 h。细胞用不含 EDTA 的胰酶消化收集, PBS 洗涤二次 (2 000 r·min<sup>-1</sup>, 5 min), 收集 1 × 10<sup>5</sup> 细胞, 加入 500 μL 的 Binding Buffer 悬浮细胞, 加入 5 μL Annexin V-FITC, 5 μL Propidium Iodide, 混匀。室温, 避光反应 10 min。流式细胞仪进行检测, 分析药物作用后细胞凋亡率。

**2.4 分光光度法检测 Caspase-3 及 Caspase-9 活性**  
取对数生长期 U251 细胞, 接种于 35 mm 培养皿 (5 × 10<sup>6</sup> 个/mL, 1 mL/培养皿), 37 ℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h 待细胞贴壁后, 试验分为: 空白对照组, 阳性对照组 (5-氟尿嘧啶浓度为 80 μmol·L<sup>-1</sup>), 加药组 (HJB 浓度为 30, 60, 120 μmol·L<sup>-1</sup>), 培养 24 h。离心 (2 000 r·min<sup>-1</sup>, 5 min), 收集 4 × 10<sup>6</sup> 个细胞。操作按试剂盒说明书进行, 在酶标仪 A<sub>405 nm</sub> 处检测吸收度 A。通过计算 A<sub>诱导剂</sub>/A<sub>阴性对照</sub> 的倍数来确定凋亡诱导剂组 Caspase-3 及 Caspase-9 的活化程度。

**2.5 统计学处理** 采用 SPSS 13.0 统计软件, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用 SNK 检验, P < 0.05 为有统计意义。

3 结果

**3.1 MTT 细胞活性检测结果** HJB 不同浓度作用 24 h 后, 与空白对照组相比, 对 U251 细胞的增殖有显著性抑制作用, 并呈浓度依赖关系 (P < 0.05) (表 1), IC<sub>50</sub> 为 62.236 11 μmol·L<sup>-1</sup>; 以 IC<sub>50</sub> 药物浓度作用不同时间点, 与空白对照组相比, 有显著性差异, 且细胞活力呈时间依赖性下降, 但 48 h 没有进一步下降 (表 2)。因此选用浓度 60 μmol·L<sup>-1</sup>, 作用时间 24 h 进行后续实验。

表 1 不同浓度 HJB 对 U251 细胞活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 组别     | 浓度<br>/μmol·L <sup>-1</sup> | 细胞活性<br>/%                |
|--------|-----------------------------|---------------------------|
| 空白对照   | 0                           | 100                       |
| HJB    | 6.25                        | 83.7 ± 12.3 <sup>1)</sup> |
|        | 12.5                        | 72.4 ± 3.7 <sup>1)</sup>  |
|        | 25                          | 50.7 ± 4.4 <sup>1)</sup>  |
|        | 50                          | 42.9 ± 2.6 <sup>1)</sup>  |
|        | 100                         | 36.4 ± 4.2 <sup>1)</sup>  |
|        | 200                         | 35.9 ± 5.2 <sup>1)</sup>  |
|        | 400                         | 32.9 ± 3.1 <sup>1)</sup>  |
|        | 800                         | 26.9 ± 2.2 <sup>1)</sup>  |
| 5-氟尿嘧啶 | 80                          | 47.2 ± 7.7 <sup>1)</sup>  |

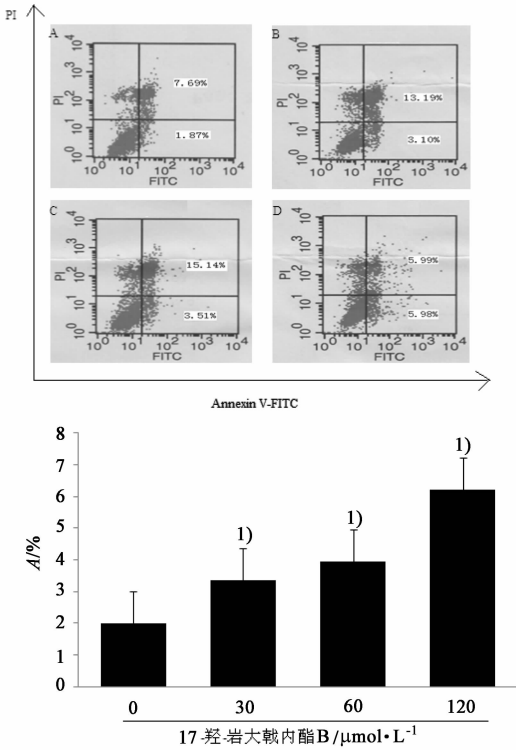
注: 与空白对照组比较<sup>1)</sup> P < 0.05 (表 2 ~ 4 同)。

**3.2 细胞凋亡检测结果** HJB 可诱导 U251 细胞凋亡, 药物浓度 30, 60, 120 μmol·L<sup>-1</sup> 分别处理细

表 2 HJB 作用不同时间点对 U251 细胞活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

| 组别   | 浓度<br>/μmol·L <sup>-1</sup> | 作用时间<br>/h | 细胞活性<br>/%               |
|------|-----------------------------|------------|--------------------------|
| 空白对照 |                             | 0          | 100                      |
| HJB  | 12                          |            | 84.6 ± 2.3 <sup>1)</sup> |
|      |                             | 24         | 50.3 ± 3.0 <sup>1)</sup> |
|      |                             | 48         | 45.1 ± 2.4 <sup>1)</sup> |
|      |                             | 72         | 40.9 ± 5.0 <sup>1)</sup> |

胞 24 h 后, 早期凋亡率较空白对照组明显升高 (P < 0.05), 并呈浓度依赖关系 (图 1)。



A. 空白对照组; B. HJB 30 μmol·L<sup>-1</sup>; C. HJB 60 μmol·L<sup>-1</sup>; D. HJB 120 μmol·L<sup>-1</sup>  
HJB 处理 U251 细胞 24 h, 用流式细胞仪 Annexin V-FITC/PI 检测细胞凋亡率, 数字代表每组细胞凋亡百分率,

图 1 HJB 对 U251 细胞凋亡的影响

**3.3 Caspase-3 及 Caspase-9 活性检测结果** HJB 作用 24 h 后, Caspase-3 及 Caspase-9 的相对活性均较空白对照组升高 (P < 0.05), 并呈浓度依赖关系。Caspase-3 及 Caspase-9 活化程度随着药物浓度 (30, 60, 120 μmol·L<sup>-1</sup>) 的增加而增大, 与空白对照组相比, 分别为 1.5, 2.0, 2.5 倍 (表 3) 和 1.5, 2.1, 2.7 倍 (表 4)。

4 讨论

胶质瘤是最常见的颅内原发性肿瘤, 约占颅内肿瘤的 46%, 占成年人全身肿瘤的 2%, 恶性胶质瘤发病率为 (5 ~ 8)/100 万, 病死率高<sup>[5]</sup>。胶质瘤具有

表 3 HJB 对 U251 细胞 Caspase-3 活性的影响( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

| 组别     | 浓度<br>/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ | Caspase-3 活性<br>/%             |
|--------|---------------------------------------------|--------------------------------|
| 空白对照   | 0                                           | 100                            |
| HJB    | 30                                          | 151.7 $\pm$ 4.2 <sup>1)</sup>  |
|        | 60                                          | 201.7 $\pm$ 4.4 <sup>1)</sup>  |
|        | 120                                         | 249.5 $\pm$ 8.1 <sup>1)</sup>  |
| 5-氟尿嘧啶 | 80                                          | 220.0 $\pm$ 10.0 <sup>1)</sup> |

表 4 HJB 对 U251 细胞 Caspase-9 活性的影响( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

| 组别   | 给药剂量<br>/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ | Caspase-9 活性<br>/%             |
|------|-----------------------------------------------|--------------------------------|
| 空白对照 | 0                                             | 100                            |
| HJB  | 30                                            | 152.2 $\pm$ 7.7 <sup>1)</sup>  |
|      | 60                                            | 211.6 $\pm$ 9.1 <sup>1)</sup>  |
|      | 120                                           | 270.3 $\pm$ 10.3 <sup>1)</sup> |
|      | 80                                            | 221.6 $\pm$ 14.1 <sup>1)</sup> |

多质性和浸润性的特点,手术难以完全切除,放射治疗不太敏感<sup>[6]</sup>,因此对于胶质瘤的化疗研究是目前的一个热点。近年来研究人员已逐渐认识到一些药物的抗癌机制与其诱导细胞凋亡密不可分,能否诱导肿瘤细胞凋亡已成为抗肿瘤药物的一个标准<sup>[7]</sup>。本实验结果显示,HJB 对人胶质瘤 U251 细胞有明显的抑制作用,且这种抑制作用是通过诱导凋亡实现的,并呈浓度和时间依赖关系。由此可见,狼毒的有效成分 HJB 可能对胶质瘤的发生和发展有延缓作用。

Caspase-3 是 Caspase 家族的重要成员,是细胞凋亡信号通路下游最主要的执行分子,在脑肿瘤细胞凋亡过程也扮演重要角色,被称为终结者<sup>[8-9]</sup>。通常情况下,Caspase-3 以无活性的酶原形式存在,只有在凋亡因素刺激下被上游蛋白酶切割才能活化,裂解相应的胞浆胞核底物,最终导致细胞凋亡<sup>[10]</sup>。本实验测定了 Caspase-3 的活化程度,结果发现 HJB 对人胶质瘤 U251 细胞具有很强的诱导凋亡作用,并存在剂量依赖关系。

经典的 Caspase 依赖的凋亡途径可分为死亡受体途径和线粒体途径,死亡受体途径通过 Caspase-8 的激活启动凋亡,Caspase-9 的激活启动线粒体途径<sup>[11]</sup>。本实验结果显示,Caspase-9 活化程度随着药物浓度的增加而增大,提示 HJB 诱导 U251 细胞凋亡启动了线粒体途径。线粒体受到破坏释放出细胞色素 C,procaspase-9 会通过 CARD 结构之间的相互作用聚集而自我激活,启动下游信号级联,诱发凋亡<sup>[12]</sup>。至于 HJB 诱导 U251 细胞凋亡的信号转导通路的具体机制尚需进一步探讨。

[参考文献]

[ 1 ] 浮光苗,余伯阳,李星,等. 狼毒大戟化学成分与药理作用[J]. 国外医药:植物药分册,2003,18(3):101.

[ 2 ] Wang Li-ping, Duan Hui-ying, Wang Yi-shan, et al. Inhibitory effects of Lang-du extract on the in vitro and in vivo growth of melanoma cells and its molecular mechanisms of action [J]. Cytotechnology, 2010, 62(4):357.

[ 3 ] Wang Ying, Ma Xiu-quan, Yan Shou-sheng, et al. 17-hydroxy-jolkinolide B inhibits signal transducers and activators of transcription 3 signaling by covalently cross-linking janus kinases and induces apoptosis of human cancer cells [J]. Cancer Res, 2009, 69(18):7302.

[ 4 ] 谢江宁,宋素芬,李香,等. 桑黄总三萜的提取及其体外抗脑胶质瘤 U251 活性[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(5):24.

[ 5 ] Mischel P S, Cloughesy T F. Targeted molecular therapy of GBM [J]. Brain Pathol, 2003, 13(1):52.

[ 6 ] 刘圆圆,黄新,甄汉深,等. 广西虎纹捕鸟蛛毒诱导 U251 胶质瘤细胞凋亡及 Caspase-3 的激活[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(6):184.

[ 7 ] Tang Hong-yun, Qin Yong, Li Jian-yong, et al. The scavenging of superoxide radicals promotes apoptosis induced by a novel cell-permeable fusion protein, sTRAIL: FeSOD, in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-resistant leukemia cells [J]. BMC Biol, 2011, 9(1):18.

[ 8 ] 唐丹,李剑萍,郑锡凤,等. 熊果酸通过 STAT3 通路调控胃癌细胞增殖和凋亡[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(2):179.

[ 9 ] J David Beckham, Kathryn D Tuttle, Kenneth L Tyler. Caspase-3 activation is required for reovirus-induced encephalitis in vivo [J]. J Neurovirol, 2010, 16(4):306.

[ 10 ] Li Zheng, Jo Jihoon, Jia Jie-Min, et al. Caspase-3 activation via mitochondria is required for long-term depression and AMPA receptor internalization [J]. Cell, 2010, 141(5):859.

[ 11 ] Sarice R Boston, Rahul Deshmukh, Scott Strome, et al. Characterization of ERK docking domain inhibitors that induce apoptosis by targeting rsk-1 and caspase-9[J]. BMC Cancer, 2011, 11(1):7.

[ 12 ] 石俊梅,张冬梅,姚楠,等. 三萜皂苷 Saxifragifolin D 抑制人肝癌耐药细胞 HepG2/ADM 生长并诱导细胞凋亡作用研究[J]. 中国药理学通报,2012, 28(1):34.

[责任编辑 何伟]