

雷公藤醇提物对骨髓细胞增殖和凋亡的影响

高丽, 聂中标, 柴智, 郭羽, 王永辉, 闫润红, 周然*

(山西中医学院, 太原 030024)

[摘要] 目的: 观察雷公藤醇提物对大鼠骨髓细胞增殖、周期和凋亡的影响。方法: 体外培养大鼠股骨骨髓细胞, 经不同浓度的雷公藤醇提物作用后, 采用 MTT 比色法检测对骨髓细胞增殖的影响; 采用流式细胞仪 PI 单标法检测对骨髓细胞周期的影响; 采用流式细胞仪 Annexin V-FITC/PI 双标法检测对骨髓细胞凋亡的影响。结果: 雷公藤醇提物可明显抑制正常骨髓细胞增殖, 并且此抑制作用呈明显的时间和剂量依赖性。细胞周期进程的结果显示, 与正常对照组相比, 雷公藤组 G_0/G_1 期细胞比例显著增多, S 期和 G_2/M 期细胞比例显著减少, 细胞增殖指数显著降低, 早期凋亡率显著升高。结论: 雷公藤醇提物可明显抑制骨髓细胞增殖, 使骨髓细胞阻滞于 G_0/G_1 期, 并能诱导细胞凋亡。

[关键词] 雷公藤; 骨髓细胞; 凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)19-0146-04

Effects of Ethanol Extraction of *Tripterygium wilfordii* on Proliferation and Apoptosis in Bone Marrow Cells

GAO Li, NIE Zhong-biao, CHAI Zhi, GUO Yu, WANG Yong-hui, YAN Run-hong, ZHOU Ran*

(Shanxi College of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030024, China)

[Abstract] **Objective:** To study effects of ethanol extraction of *Tripterygium wilfordii* Hook. f. (TWH) on cell proliferation, cell cycle and apoptosis in bone marrow cells (BMCs) *in vitro*. **Method:** BMCs were cultured *in vitro* treated with different concentrations of ethanol extraction of TWH. MTT assay was used to evaluate the cell proliferation. The cell cycle and apoptosis rate were determined by FCM with PI and Annexin V/PI staining. **Result:** Viability of BMCs was significantly reduced by ethanol extraction of TWH in a time-and dose-dependent manner. Compared with control group, more BMCs were arrested at G_0/G_1 phase by TWH. Early Apoptosis rate was increased significantly. **Conclusion:** Ethanol extraction of TWH could notably inhibit the proliferation of BMCs, arrest BMCs at G_0/G_1 phase and induce apoptosis of BMCs.

[Key words] *Tripterygium wilfordii*; bone marrow cells; apoptosis

雷公藤 *Tripterygium wilfordii* 系卫矛科雷公藤属一年生藤本植物, 具有祛风除湿、活血化瘀、清热解毒、消肿散结、杀虫止血等功效。但雷公藤有大毒, 对消化、生殖、泌尿、心血管、骨髓及血液等系统有较

明确的损害。从 1991 年起陆续有文献报道雷公藤对骨髓血液系统的毒副作用^[1-4]。但有关雷公藤骨髓及血液系统毒性的实验研究较少, 其机制也尚未完全阐明。本实验选择体外培养的大鼠股骨骨髓细胞为研究对象, 观察雷公藤醇提物对骨髓细胞增殖和凋亡的影响, 以丰富雷公藤骨髓血液系统毒性的认识。

1 材料

1.1 试剂 雷公藤药材采自江西九江, 经山西省药品检验所高天爱研究员鉴定为卫矛科植物雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 的干燥根。取雷公藤

[收稿日期] 20110419(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30873433)

[第一作者] 高丽, 讲师, 博士, 从事方剂效用及其物质基础研究, E-mail: gaoli716@sina.com

[通讯作者] * 周然, 教授, 博士生导师, 从事方剂效用及其物质基础研究, E-mail: zhouran58@sohu.com

细粉 1 600 g,用 10 倍体积的 95% 乙醇浸泡过夜,超声处理 45 min,冷却至室温,补足质量,以 $3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,合并上清液,上清液用旋转蒸发器减压回收乙醇至无醇味,置真空干燥箱中干燥,称重,得药物粉末 150.49 g。经高效液相法测得雷公藤醇提物中雷公藤甲素的含量为 0.0548%。称取雷公藤醇提物 10 mg,以少量 DMSO 助溶后,用完全培养基定容至 10 mL,配制成终浓度为 $1\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液,0.22 μm 微孔滤器过滤除菌,分装, $-20\ ^\circ\text{C}$ 保存备用。DMSO 终浓度小于 0.1%。

IMDM 培养基(美国 Gibco),胎牛血清(杭州四季青),L-谷氨酰胺(美国 Ameresco),MTT(美国 Sigma),台盼蓝(美国 Sigma),二甲基亚砷(DMSO,美国 Ameresco),细胞周期检测试剂盒(南京凯基,批号 100602),Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(美国 BD)。

1.2 仪器 INC246 CO_2 培养箱(德国 Memmert),BBS-DSC 超净工作台(上海巴艾贝斯),3k30 台式高速冷冻离心机(德国 Sigma),SpectraMax 190 酶标仪(美国 MD),TS100 倒置显微镜(日本 Nikon),FACSCalibur 流式细胞仪(美国 BD)。

1.3 动物 SD 大鼠,体重 180 ~ 200 g,雄性,购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心,动物合格证号 SCXK(军)2007-004。

2 方法

2.1 大鼠股骨骨髓细胞的制备 SD 大鼠,颈椎脱臼法处死,置 75% 的乙醇中浸泡 3 min,超净台内,无菌取出双侧股骨,去除附着组织,移入冰浴冷却的含不完全 IMDM 培养基的培养皿中,剪去骨两端,用 5 mL 无菌注射器吸取培养液反复冲洗骨髓腔,直至股骨变成白色。冲洗出的细胞悬液经 200 目筛网过滤,移入离心管中,加红细胞裂解液,轻轻吹打 2 ~ 3 min,裂解红细胞。用不完全培养基洗细胞 2 次(第二次洗涤时加入定量的不完全培养基进行细胞计数),收集沉淀的骨髓细胞,用完全培养基(含 10% 灭活胎牛血清、 $100\ \text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素和 $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 链霉素)重悬,调骨髓细胞密度为 $1\times 10^9/\text{L}$ 。上述过程中均以台盼蓝染色检查细胞活性,活细胞大于 95% 以上方可用于实验。

2.2 骨髓细胞生长抑制率的测定 将上述骨髓细胞悬液接种于 96 孔细胞培养板中,每孔 100 μL ,置 $37\ ^\circ\text{C}$,5% CO_2 ,饱和湿度的 CO_2 培养箱中培养。

24 h 后,加入含药培养基,每孔 100 μL ,分雷公藤醇提物 10 个浓度组,分别加入不同浓度的雷公藤醇提物 100 μL ,使其终浓度分别为 1,2,4,6,8,10,12,14,16,18 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,同时设正常对照组(加 100 μL 完全培养基)和空白调零孔(只加 IMDM 培养液,酶标仪调零用),每组各设 5 个复孔。分别在培养 24,48,72 h 后,每孔加入 $5\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MTT 溶液 20 μL 。 $37\ ^\circ\text{C}$ 继续培养 4 h 后,终止培养,以 $1\ 500\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min,弃上清,每孔加入 100 μL DMSO,轻轻震荡 10 min,使结晶充分溶解。用酶标仪在 570 nm 处测吸光度(A),结果用 5 孔均值表示,按下列公式计算细胞生长抑制率,并应用 SPSS 软件计算 IC_{50} 。

$$\text{细胞生长抑制率} = \left(1 - \frac{\text{实验组 } A - \text{调零组 } A}{\text{对照组 } A - \text{调零组 } A}\right) \times 100\%$$

2.3 骨髓细胞周期的检测 将上述骨髓细胞悬液接种于 6 孔细胞培养板中,每孔 2 mL,置 $37\ ^\circ\text{C}$,5% CO_2 ,饱和湿度的 CO_2 培养箱中培养。24 h 后,小心吸弃上清 1 mL,加入含不同浓度的雷公藤醇提物 1 mL,设正常对照组(加 10% 胎牛血清的 IMDM)和雷公藤醇提物组(根据 MTT 计算出 24 h 的 IC_{50} 设 3 个浓度,分别加入不同浓度的雷公藤醇提物,使其终浓度分别为 6,8,10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$),每组各设 3 个复孔。继续培养 24 h 后,收集细胞,用预冷的 PBS 洗 2 次,弃上清,加入预冷的 70% 乙醇 $-20\ ^\circ\text{C}$ 固定过夜,离心去除乙醇固定液,用 PBS 洗 1 次,加 100 μL RNase A 酶, $37\ ^\circ\text{C}$ 反应 30 min,再加入 400 μL 碘化丙锭(PI)染液,混匀, $4\ ^\circ\text{C}$ 避光 30 min,用流式细胞仪进行细胞周期的测定。结果以细胞周期各时相细胞百分率表示,并按下列公式计算细胞增殖指数(proliferation index, PI):

$$\text{PI} = (S + G_2/M) / (G_0/G_1 + S + G_2/M) \times 100\%$$

2.4 骨髓细胞凋亡的检测 将骨髓细胞悬液接种于 6 孔细胞培养板中,每孔 2 mL,置 $37\ ^\circ\text{C}$,5% CO_2 ,饱和湿度的 CO_2 培养箱中培养。24 h 后小心吸弃上清 1 mL,加入含不同浓度的雷公藤醇提液 1 mL,使其终浓度分别为 6,8,10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,同时设含 10% 胎牛血清的 IMDM 为正常对照组,每组各设 3 个复孔。继续培养 24 h 后,收集细胞,用预冷的 PBS 洗 2 次,弃上清,用 $1\times$ Annexin-binding Buffer 重悬细胞,调细胞密度为 $5\times 10^5/\text{mL}$ 。取细胞 100 μL ,加入 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI($50\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$),混匀,避光,室温下孵育 15 min,加入 400 μL $1\times$ Annexin-binding Buffer,用流式细胞仪收集 10 000 个细胞,用

Cellquest 软件进行分析。

2.5 统计学分析 采用统计软件 SPSS 17.0 进行统计分析, 各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异的比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 对骨髓细胞增殖的影响 不同浓度的雷公藤醇提物分别处理 24, 48, 72 h 后, 骨髓细胞的生长抑制率结果见表 1。结果显示, 与正常对照组相比, 雷公藤醇提物各浓度组的抑制率均显著性升高 ($P < 0.01$)。作用相同的时间, 随着雷公藤醇提物浓度的增加, 抑制率也随之增加; 相同浓度不同作用时间时, 随着雷公藤醇提物作用时间的延长, 抑制率也随之增加。雷公藤醇提物对骨髓细胞的抑制作用具有时间和浓度依赖性。雷公藤醇提物对骨髓细胞的半数抑制浓度 IC_{50} 在 24, 48, 72 h 分别为 8.742, 5.106, 4.684 $mg \cdot L^{-1}$ 。

3.2 对骨髓细胞周期及骨髓细胞凋亡的影响 与正常对照组比较, 雷公藤醇提物 3 个剂量组 G_0/G_1

期细胞比例显著增加 ($P < 0.01$), S 期和 G_2/M 期细胞比例显著降低 ($P < 0.01$), 细胞增殖指数 (PI) 显著降低 ($P < 0.01$), 说明雷公藤醇提物作用后, 造成骨髓细胞 G_0/G_1 期阻滞; 骨髓细胞的早期凋亡率显著升高 ($P < 0.01$)。

4 讨论

骨髓是出生后的主要造血场所, 所有血细胞的发生都始于骨髓中的多能造血干细胞 (hematopoietic stem cell, HSC)。HSC 绝大部分存在于骨髓组织中, 少量存在于外周血循环中, 具有高度自我更新和分化为各种谱系造血细胞的能力。骨髓细胞的增殖是血细胞生成的基本环节。本实验采用 MTT 法检测骨髓细胞增殖情况显示, 不同浓度的雷公藤醇提物作用 24, 48, 72 h 后, 骨髓细胞的生长均受到抑制, 且雷公藤醇提物对骨髓细胞的抑制作用具有时间和浓度依赖性。

骨髓细胞周期是反映造血系统造血功能的重要指标之一, 细胞周期各个时相反映骨髓细胞增殖的

表 1 雷公藤醇提物对骨髓细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	浓度 / $mg \cdot L^{-1}$	抑制率/%		
		24 h	48 h	72 h
正常对照	-	0.00 ± 4.49	0.00 ± 5.12	0.00 ± 3.35
雷公藤醇提	1	15.50 ± 3.78 ¹⁾	20.45 ± 14.75 ¹⁾	20.98 ± 5.31 ¹⁾
	2	20.74 ± 4.73 ¹⁾	21.87 ± 7.14 ¹⁾	31.82 ± 3.75 ¹⁾
	4	33.65 ± 6.91 ¹⁾	39.61 ± 7.12 ¹⁾	33.46 ± 5.13 ¹⁾
	6	41.06 ± 3.91 ¹⁾	43.27 ± 5.15 ¹⁾	43.05 ± 4.50 ¹⁾
	8	46.29 ± 2.39 ¹⁾	57.87 ± 1.82 ¹⁾	60.89 ± 9.32 ¹⁾
	10	54.56 ± 1.69 ¹⁾	64.67 ± 1.35 ¹⁾	71.41 ± 6.73 ¹⁾
	12	58.95 ± 0.67 ¹⁾	72.90 ± 2.44 ¹⁾	74.65 ± 9.12 ¹⁾
	14	59.98 ± 1.30 ¹⁾	79.68 ± 13.88 ¹⁾	80.47 ± 3.98 ¹⁾
	16	61.81 ± 0.81 ¹⁾	81.13 ± 2.48 ¹⁾	86.11 ± 1.93 ¹⁾
	18	63.33 ± 3.12 ¹⁾	88.48 ± 5.25 ¹⁾	86.62 ± 3.14 ¹⁾

注: 与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

表 2 雷公藤醇提物对骨髓细胞周期及骨髓细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $mg \cdot L^{-1}$	细胞周期分布/%				凋亡指数 /%
		G_0/G_1	S	G_2/M	PI	
正常对照	-	69.94 ± 1.10	23.07 ± 1.78	6.98 ± 0.69	30.06 ± 1.10	10.66 ± 0.83
雷公藤醇提	6	89.63 ± 0.96 ¹⁾	8.71 ± 0.76 ¹⁾	1.66 ± 0.84 ¹⁾	10.37 ± 0.96 ¹⁾	27.24 ± 1.08 ¹⁾
	8	90.27 ± 0.95 ¹⁾	8.30 ± 0.42 ¹⁾	1.43 ± 0.65 ¹⁾	9.73 ± 0.95 ¹⁾	30.62 ± 1.95 ¹⁾
	10	93.18 ± 0.92 ¹⁾	5.43 ± 0.82 ¹⁾	1.38 ± 0.85 ¹⁾	6.82 ± 0.92 ¹⁾	36.26 ± 1.65 ¹⁾

状态。本实验用流式细胞术对骨髓细胞周期进行分析,结果显示,雷公藤醇提物作用后,骨髓细胞周期分布发生了明显改变,峰值主要出现在 G_0/G_1 期, S 和 G_2/M 期细胞比例明显减少,增殖指数显著降低。说明雷公藤醇提物作用后,造成骨髓细胞 G_0/G_1 期阻滞,提示雷公藤醇提物有可能作用于 G_1 期检测点,阻止细胞进入 S 期进行 DNA 合成,从而抑制细胞的分裂增殖。

雷公藤对体外培养的淋巴细胞^[5]、各种肿瘤细胞^[6-7]、树突状细胞^[8]、血管平滑肌细胞^[9]等多种细胞系均具有抑制增殖及杀伤能力,且这种对细胞的杀伤能力与诱导细胞凋亡相关。徐艳娟等^[10]通过实验证实,雷公藤甲素可以诱导小鼠、人脾淋巴细胞和 HeLa 细胞、CBRH-7919 细胞两种肿瘤细胞发生凋亡且呈剂量依赖性,认为雷公藤甲素很可能是通过诱导其敏感细胞凋亡而实现其免疫抑制和抗肿瘤作用的。刘养岁等^[11]等证明雷公藤甲素对肝癌细胞株 HepG₂ 有明显的诱导凋亡作用,并认为其机制可能与抑制胞核内 NF- κ B p65 蛋白表达和增加 caspase-3 活性有关。本实验分别用 6, 8, 10 $mg \cdot L^{-1}$ 雷公藤醇提物处理骨髓细胞,结果发现雷公藤醇提物可以引起骨髓细胞产生明显的凋亡,且随着药物浓度的增加,凋亡率也逐渐增加。

综上,本实验研究结果表明,雷公藤醇提物可明显抑制骨髓细胞增殖,使骨髓细胞阻滞于 G_0/G_1 期,并能诱导细胞凋亡,提示这可能与雷公藤所致骨髓血液毒性有关,其具体作用机制有待进一步研究。

[参考文献]

[1] 李保春,崔若兰,钟远,等.雷公藤致骨髓抑制和粒细

胞缺乏症三例报告[J].第二军医大学学报,1991,12(1):95.

[2] 孙鲁英,王耀献,周静威.雷公藤多甙之重度贫血1例[J].临床内科杂志,2005,22(2):84.

[3] 徐志,虞飞燕,范贤斌.雷公藤多苷致再生障碍性贫血2例报道[J].浙江中西医结合杂志,2005,15(11):704.

[4] 林为民,张颖.雷公藤多苷片致重症全血细胞减少1例[J].第四军医大学学报,2006,27(18):1707.

[5] 马海霞.雷公藤多苷、昆明山海棠、复方昆明山海棠对人T淋巴细胞系C8166增殖及凋亡的影响[D].昆明医学院,2008.

[6] 黄晓昊,孙志华,吴强.雷公藤甲素对离体子宫内膜癌细胞株增殖及凋亡信号通路PI3K/PKB的影响[J].南京医科大学学报:自然科学版,2010,30(7):910.

[7] 史继荣,赵建勋,张寰,等.雷公藤内酯醇对胆囊癌GBC-SD细胞株增殖与凋亡的影响[J].解放军医学杂志,2010,35(12):1462.

[8] 朱可建,林爱华,金纳,等.雷公藤内酯醇对人树突状细胞分化成熟的抑制[J].中华微生物学和免疫学杂志,2007,27(4):330.

[9] 罗小平,徐朝军,宋岚,等.雷公藤甲素诱导人冠状动脉平滑肌细胞凋亡的实验研究[J].实用临床医学,2007,8(8):6.

[10] 徐艳娟,黄光照.雷公藤甲素的诱导凋亡作用及其机制初步探讨[C].长沙:第四届全国中西医结合风湿类疾病学术会议论文汇编,2000:9.

[11] 刘养岁,孔连宝,蒋维维,等.雷公藤甲素对肝癌细胞株HepG₂顺铂化疗敏感性的影响[J].江苏医药,2010,36(3):249.

[责任编辑 聂淑琴]