

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00856

• 论 著 •

雷公藤红素对 Raji 细胞表面超微结构与增殖活性的影响

吴 红, 胡小毛, 高杨军, 何冬梅*

暨南大学医学院血液病研究所, 广州 510632

[摘要] **目的** 研究雷公藤红素对 Burkitt 淋巴瘤细胞株 Raji 的表面超微结构及其增殖活性的影响。**方法** 选用不同浓度(0.5、1.0、1.5、2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的雷公藤红素作用于 Raji 细胞,用 CCK8 法测定细胞增殖情况,用原子力显微镜观察细胞形貌和表面超微结构变化,用 Hoechst 33258 染色及流式细胞仪检测细胞的凋亡,用流式细胞仪检测细胞周期的改变。**结果** CCK8测定表明,经不同浓度的雷公藤红素作用 24 h 后,细胞存活率从(80.67 \pm 2.08)%下降至(38.53 \pm 2.25)%,48 h 后,细胞存活率从(74.17 \pm 3.20)%下降至(33.22 \pm 1.64)%,雷公藤红素对 Raji 细胞存活率的影响呈时间和浓度依赖性。原子力显微镜扫描示:正常 Raji 细胞呈圆形,表面光滑,经浓度为 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的雷公藤红素处理 24 h 和 48 h 后,Raji 细胞开始坍塌,超微结构显示细胞膜表面粗糙、凹凸不平。Hoechst 33258 染色可见凋亡细胞;流式细胞术检测显示不同浓度的雷公藤红素作用 Raji 细胞 24 h 后,细胞凋亡率从(3.50 \pm 1.73)%增加到(38.27 \pm 6.05)%,雷公藤红素对 Raji 细胞凋亡率的影响呈浓度依赖性。流式细胞术对细胞周期的检测表明 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 雷公藤红素作用 Raji 细胞 24 h,可使 S 期细胞增加,与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 雷公藤红素可改变 Raji 细胞膜超微结构,可通过诱导 Raji 细胞凋亡而抑制其增殖。

[关键词] 雷公藤红素;伯基特淋巴瘤;超微结构;细胞凋亡;细胞周期**[中图分类号]** R 733.41**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2012)08-0856-04

Effect of tripterine on surface ultrastructure and proliferative activity of Raji cells

WU Hong, HU Xiao-mao, GAO Yang-jun, HE Dong-mei*

Institute of Hematology, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of tripterine on surface ultrastructure and proliferative activity of Burkitt lymphoma cell line Raji. **Methods** Raji cells were treated with different concentrations (0.5, 1.0, 1.5, and 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) of tripterine. Then the proliferation of Raji cells was determined by CCK8 assay, the cell membrane ultrastructure was analyzed by atomic force microscope, the apoptosis of cells was determined by Hoechst 33258 staining and flow cytometric analysis, and the cell cycle was assayed by flow cytometry. **Results** CCK8 assay showed that the survival rate of cells decreased from (80.67 \pm 2.08)% to (38.53 \pm 2.25)% 24 h after treatment with different concentrations of tripterine. The cell survival rate decreased from (74.17 \pm 3.20)% to (33.22 \pm 1.64)% 48 h after treatment. Tripterine significantly inhibited the proliferation of Raji cells and the inhibition was in a time- and concentration-dependent manner. Atomic force microscope scan showed that the untreated Raji cells were round, with relatively smooth surface. After Raji cells were treated with 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tripterine for 24 h and 48 h, the ultrastructure of the cell membrane was collapsed, and the cell surface was rough and uneven. Hoechst 33258 staining demonstrated apoptotic cells. Apoptotic rate of the Raji cells increased from (3.50 \pm 1.73)% to (38.27 \pm 6.05)% 24 h after treatment with different concentrations of tripterine. Flow cytometry analysis showed that 24 h after treatment with 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tripterine, S phase Raji cells were significantly increased compared with control group ($P<0.05$). **Conclusion** Our results demonstrate that tripterine can alter the cell membrane ultrastructure of Raji cells and can inhibit Raji cell proliferation through inducing cell apoptosis.

[Key words] tripterine; Burkitt lymphoma; ultrastructure; apoptosis; cell cycle

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(8):856-859]

雷公藤红素 (tripterine) 又名南蛇藤素, 主要存在于卫矛科雷公藤属及南蛇藤属植物中, 是治疗类

风湿病的雷公藤片、雷公藤多苷片等制剂的主要有效成分之一。文献报道雷公藤红素具有抑制免疫反

[收稿日期] 2011-11-25 **[接受日期]** 2012-06-15**[基金项目]** 国务院侨办重点学科建设基金 (51205002), 广东省科技计划重点项目 (2009B0507000029). Supported by Key Subject Construction Fund of Overseas Chinese Affairs Office of the State Council (51205002) and Key Program of Science and Technology of Guangdong Province (2009B0507000029).**[作者简介]** 吴 红, 硕士生. E-mail: 583956936@qq.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 020-85220262, E-mail: thedm@jnu.edu.cn

应和抗炎作用^[1-3]。自 2006 年中美科学家联合发现雷公藤红素通过抑制癌细胞的蛋白酶体活性进而诱发癌细胞凋亡的抗癌新机制^[4]以来,引发了对雷公藤红素抗癌活性的研究热潮。体外实验发现雷公藤红素可以抑制实体肿瘤细胞的增殖以及引起细胞凋亡^[5-6],但雷公藤红素是否可以抑制淋巴瘤细胞的增殖尚未见报道。本研究拟探讨雷公藤红素对 Burkitt 淋巴瘤 Raji 细胞增殖的抑制作用,为雷公藤红素用于抗淋巴瘤药物的开发研究提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 药品与试剂 雷公藤红素(纯度 98% 以上)购自广州齐云生物技术有限公司;RPMI 1640 培养液为 Gibco 公司产品;胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司;CCK8 试剂盒购于日本同仁化学研究所;细胞周期检测试剂盒由南京凯基生物科技发展有限公司提供;多聚甲醛购于 Sigma 公司;实验室用水为三蒸水。

1.2 细胞培养 Burkitt 淋巴瘤细胞株 Raji(暨南大学血液病研究所提供)用含 10% 胎牛血清、青霉素(100 U/ml)、链霉素(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的 RPMI 1640 培养液在 5% (体积分数) CO_2 、饱和湿度的培养箱内培养。实验所用细胞均采用对数生长期细胞。

1.3 CCK8 法检测细胞增殖情况 将细胞密度调整至 $0.7 \times 10^6/\text{ml}$,并接种于 96 孔板中,设未加药细胞组、雷公藤红素组(分为 0.5、1.0、1.5、2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 4 个浓度)和空白对照组。每组设 3 个复孔,每孔接种 70 μl 细胞,并确保每孔终体积为 100 μl 。实验设两个平行组,分别培养 24 h 和 48 h。培养液与 CCK8 试剂的体积比为 10:1(CCK8 试剂 10 μl),置于摇床上摇匀,放入培养箱孵育细胞 4 h 后在 450 nm 波长下用美国 Bio-TEK 酶标仪测定各孔的光密度(D)值,并计算细胞存活率。细胞存活率(%) = (加药组 D 值 - 空白对照组 D 值) / (未加药组 D 值 - 空白对照组 D 值) $\times 100\%$ 。

1.4 原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)观察细胞表面超微结构 用 0.025 mg/ml 的多聚赖氨酸浸泡已消毒的盖玻片 4 h,室温晾干后将其置于 6 孔板中,并接种生长状态良好的 Raji 细胞,调整细胞密度为 $0.7 \times 10^6/\text{ml}$,每孔 1.5 ml;加入雷公藤红素(终浓度为 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)培养细胞 24 h,之后吸出培养液,每孔加入 1 ml 4% 多聚甲醛溶液固定细胞 1 h,再弃多聚甲醛溶液,用超纯水洗涤盖玻片 3 次。将制备好的样品置于 AFM(美国 Thermo Microscopes 公司)的 XY 扫描台上,用监视器定位所要

扫描的样品区域,在空气中室温下利用接触模式成像。用 AFM 自带软件(IP 2.1)对图像进行平滑处理,以消除扫描方向上的低频背景噪音。

1.5 Hoechst 33258 染色观察凋亡细胞 将 Raji 细胞种于 6 孔板中,细胞密度为 0.7×10^6 个/ml,每孔 1.5 ml,分别加入终浓度为 0、0.5、1.0、1.5、2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的雷公藤红素。孵育 24 h 后,离心收集细胞,PBS 洗涤 1 次,滴加至载玻片上,固定,滴加 0.5 ml Hoechst 33258 染色液染色 5 min, PBS 洗涤 2 次。滴一滴抗荧光淬灭封片液于载玻片上,盖上一洁净盖玻片,荧光显微镜下可检测到呈蓝色的细胞核。

1.6 流式细胞术检测凋亡率和细胞周期 将 Raji 细胞种于 6 孔板中,细胞密度为 0.7×10^6 个/ml,每孔 1.5 ml,分别加入终浓度为 0、0.5、1.0、1.5、2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的雷公藤红素。孵育 24 h 后,离心收集细胞,PBS 洗涤 1 次,用 1 ml 5% 的无水乙醇 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜,再用 PBS 洗涤细胞 2 次,加 200 μl 碘化染料重悬细胞,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min 后上流式细胞仪(美国 Beckman-Coulter 公司)检测亚二倍体凋亡峰和细胞周期。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用完全随机区组设计和完全随机设计的单因素方差分析,组间的比较选用可进行多个样本均数间每两个均数比较的 q 检验。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 雷公藤红素抑制 Raji 细胞的生长 由图 1 可见,当浓度为 0.5、1、1.5、2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的雷公藤红素分别作用 Raji 细胞 24 h,细胞存活率从 $(80.67 \pm 2.08)\%$ 下降至 $(38.53 \pm 2.25)\%$,作用 48 h 时,细胞存活率从 $(74.17 \pm 3.20)\%$ 下降至 $(33.22 \pm 1.64)\%$,不同浓度间的细胞存活率相比差异有统计学意义($P < 0.05$),且雷公藤红素对 Raji 细胞的作用呈时间和浓度依赖性。

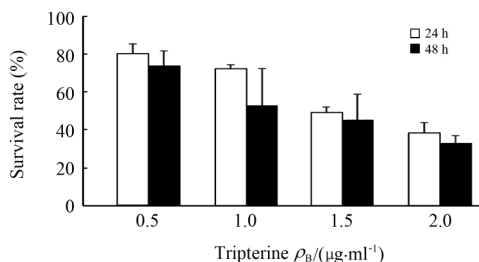


图 1 不同浓度雷公藤红素作用 Raji 细胞 24 h 和 48 h 细胞的存活率

Fig 1 Survival rate of Raji cells treated with different concentrations of tripterine for 24 h and 48 h

ANOVA, $P < 0.05$; $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

2.2 雷公藤红素改变 Raji 细胞表面超微结构 经 AFM 扫描成像,获得了对照组和雷公藤红素作用 24、48 h 的 Raji 细胞的形态结构图。选取明显诱导 Raji 细胞凋亡的 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 雷公藤红素组为例,对照组细胞表面整体较为均一平滑,细胞饱满,形态完整,细胞边缘无突起物(图 2A1-A3),从 AFM 随机附带的颗粒分布图可以看出,颗粒直径主要分布在 20~100 nm (图 2A4)。

h,膜表面变粗糙、凹凸不平,细胞开始坍塌,高度下降,可看出细胞膜表面出现了膜孔结构(图 2B1-B3),颗粒直径主要分布在 50~150 nm(图 2B4)。作用时间增加到 48 h 时,细胞坍塌比 24 h 更明显,细胞膜孔结构更加丰富(图 2C1-C3),其颗粒直径分布增加到 150~250 nm(图 2C4)。结果表明经雷公藤红素作用后细胞颗粒直径增大,说明细胞膜结构发生了明显变化,且该变化随雷公藤作用时间的延长而增大。

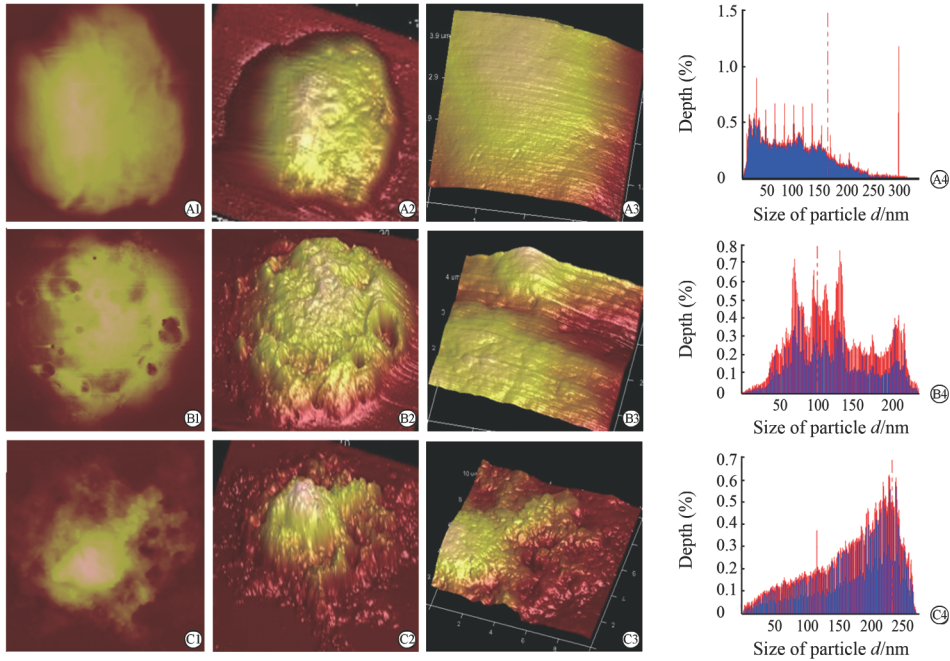


图 2 雷公藤红素(2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)作用 Raji 细胞 24 h 和 48 h 的原子力超微结构

Fig 2 Ultrastructure of Raji cells 24 h and 48 h after treatment with 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tripterine as demonstrated by atomic force microscope scan A: Control group; B: Treated with tripterine for 24 h group; C: Treated with tripterine for 48 h group. A1, B1, C1; 2D map of Raji cells; A2, B2, C2; 3D map of Raji cells; A3, B3, C3; 4 μm ultrastructure morphology map of Raji cells (500 nm \times 500 nm); A4, B4, C4: The particle distribution map of A3, B3, and C3, respectively

2.3 雷公藤红素促进 Raji 细胞凋亡 经雷公藤红素作用 Raji 细胞 48 h,通过 Hoechst 染色后均可见凋亡细胞:核膜完整,体积变小,核质固缩;而未加药细胞组未见或仅见少量凋亡细胞(图 3)。0、0.5、1.0、1.5、2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的雷公藤红素作用 Raji 细胞 24 h,流式细胞仪检测其凋亡率分别为 (3.50 \pm 1.73)%、(11.0 \pm 2.86)%、(17.10 \pm 2.08)%、(30.13 \pm 5.71)%、(38.27 \pm 6.05)%,不同浓度间的凋亡率比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$),且凋亡率呈浓度依赖性。

2.4 雷公藤红素改变 Raji 细胞周期 不同浓度雷公藤红素(0、0.5、1.0、1.5、2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)作用于 Raji 细胞 24 h 后细胞周期的改变见表 1。与对照组比较,1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 雷公藤红素组 S 期细胞明显增加,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

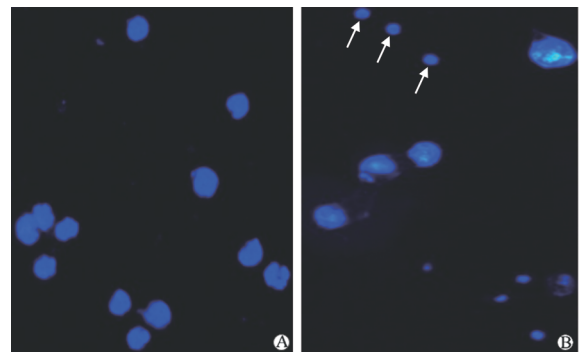


图 3 雷公藤红素作用于 Raji 细胞 48 h 的形态学改变 (Hoechst 染色)

Fig 3 Morphology of Raji cells treated with tripterine for 48 h (Hoechst staining)

Arrows indicate positive staining of the cell apoptosis. A: Control group; B: 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tripterine group. Original magnification: $\times 400$

表 1 不同浓度雷公藤红素作用 Raji 细胞
24 h 对细胞周期的影响

Tab 1 Cell cycle of Raji cells treated
with different concentrations of tripteryne for 24 h
 $n=5, \bar{x} \pm s, \%$

Group	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
Control	61.48±3.51	32.26±2.67	6.18±1.33
Tripteryne $\mu\text{g}/(\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1})$			
0.5	63.60±4.11	31.06±2.35	4.82±1.74
1.0	56.06±4.45	36.80±5.88	7.08±3.04
1.5	54.74±1.85	38.82±1.44*	5.96±2.62
2.0	55.62±7.33	33.98±3.85	10.32±4.23

* $P < 0.05$ vs control group

3 讨 论

目前, 弥漫性大 B 细胞淋巴瘤的治疗主要以化疗为主, 但其带来的不良反应也是显而易见的, 因此, 具有较低毒性甚至无毒性药物的开发显得十分重要。研究证明雷公藤红素具有广泛而显著的抗癌活性, 对多种癌细胞都有显著的杀灭作用^[7]。

本研究利用 AFM 对 Raji 细胞的形貌和细胞膜表面纳米结构进行了可视化研究, 结合 CCK8 实验和流式细胞术分析雷公藤红素对细胞凋亡和细胞周期的影响, 探讨了其对 Raji 细胞的抑制作用。AFM 是从纳米水平测量细胞机械特性的一种敏感工具, 因其超高分辨率、对样品无损伤及制样简单等优点已广泛应用于生物医学领域^[8-9]。利用 AFM 可对加药前后细胞形貌及细胞膜超微结构进行分析, 将细胞形态结构与生理功能相联系, 为研究各种生理及病理机制提供可视化依据^[10-11]。本研究发现经雷公藤红素作用的 Raji 细胞的表面超微结构相对于未处理细胞有明显的变化。未处理组细胞呈大致圆形, 细胞饱满, 细胞膜表面比较光滑平整; 雷公藤红素作用组细胞变形, 细胞出现凹陷, 细胞膜表面出现孔洞, 颗粒分布直径随着药物作用时间逐渐增大, 与文献报道^[12-16]一致。细胞增殖实验结果表明, 雷公藤红素能够明显抑制 Raji 细胞的生长, 且呈时间、浓度依赖性。细胞凋亡检测显示雷公藤红素能促进 Raji 细胞凋亡, 且凋亡率和雷公藤红素浓度增加呈依赖关系。上述结果表明雷公藤红素可抑制肿瘤细胞的增殖, 并可诱导肿瘤细胞凋亡, 与文献报道^[6, 15-17]一致。流式细胞仪检测细胞周期发现, 以 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 雷公藤红素作用 Raji 细胞 24 h, 可使 S 期细胞增加, 与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示雷公藤红素可通过诱导 Raji 细胞凋亡而抑制细胞增殖。但本实验仅在细胞增殖、凋亡和周期上做了初步分析, 有待在分子水平上对雷公藤红素抗淋巴瘤的作用机制进行深入研究。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参 考 文 献]

- [1] Kiaei M, Kipiani K, Petri S, Chen J, Calingasan N Y, Beal M F. Celestrol blocks neuronal cell death and extends life in transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Neurodegener Dis*, 2005, 2: 246-254.
- [2] Li H, Zhang Y Y, Huang X Y, Sun Y N, Jia Y F, Li D. Beneficial effect of tripteryne on systemic lupus erythematosus induced by active chromatin in BALB/c mice[J]. *Eur J Pharmacol*, 2005, 512(2-3): 231-237.
- [3] Luo D Q, Wang H, Tian X, Shao H J, Liu J K. Antifungal properties of pristimerin and celestrol isolated from *Celastrus hypoleucus*[J]. *Pest Manag Sci*, 2005, 61: 85-90.
- [4] Yang H, Chen D, Cui Q C, Yuan X, Dou Q P. Celestrol, 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: 4758-4765.
- [5] 周幽心, 黄煜伦, 许期年, 叶明, 孙成法, 周岱. 雷公藤单体体外抑制胶质瘤细胞的实验研究[J]. *癌症*, 2002, 21: 1106-1108.
- [6] 马永岚, 易虹, 杨飞兰, 张媛, 王娅, 王颖. 雷公藤红素下调 HL-60 细胞 P-Akt 与 Cyclin D1 蛋白表达及其诱导细胞凋亡的效应[J]. *中国实验血液学杂志*, 2010, 18: 898-902.
- [7] 陈铭祥, 冯玉静, 王定勇, 杨雯. 雷公藤红素的研究进展[J]. *中成药*, 2010, 32: 473-476.
- [8] Ono K, Condrón M M, Teplow D B. Structure-neurotoxicity relationships of amyloid beta-protein oligomers[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 14745-14750.
- [9] Kim H, Arakawa H, Hatae N, Sugimoto Y, Matsumoto O, Osada T, et al. Quantification of the number of EP3 receptors on a living CHO cell surface by the AFM[J]. *Ultramicroscopy*, 2006, 106(8-9): 652-662.
- [10] Wang J, Wan Z, Liu W, Li L, Ren L, Wang X, et al. Atomic force microscope study of tumor cell membranes following treatment with anti-cancer drugs[J]. *Biosens Bioelectron*, 2009, 25: 721-727.
- [11] Kaul-Ghanekar R, Singh S, Mamgan H, Jalota-Badhwar A, Panknikar K M, Chattopadhyay S. Tumor suppressor protein SMAR1 modulates the roughness of cell surface: combined AFM and SEM study[J]. *BMC Cancer*, 2009, 9: 350.
- [12] Wang D C, Chen K Y, Tsai C H, Chen G Y, Chen C H. AFM membrane roughness as a probe to identify oxidative stress-induced cellular apoptosis[J]. *J Biomech*, 2011, 44: 2790-2794.
- [13] Gopinath P, Gogoi S K, Sanpui P, Paul A, Chattopadhyay A, Ghosh S S. Signaling gene cascade in silver nanoparticle induced apoptosis[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2010, 77: 240-245.
- [14] Hu M, Wang J, Zhao H, Dong S, Cai J. Nanostructure and nanomechanics analysis of lymphocyte using AFM; from resting, activated to apoptosis[J]. *J Biomech*, 2009, 42: 1513-1519.
- [15] Mou H, Zheng Y, Zhao P, Bao H, Fang W, Xu N. Celestrol induces apoptosis in non-small-cell lung cancer A549 cells through activation of mitochondria- and Fas/FasL-mediated pathways[J]. *Toxicol In Vitro*, 2011, 25: 1027-1032.
- [16] Sung B, Park B, Yadav V R, Aggarwal B B. Celestrol, a triterpene, enhances TRAIL-induced apoptosis through the down-regulation of cell survival proteins and up-regulation of death receptors[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285: 11498-11507.
- [17] Sethi G, Ahn K S, Pandey M K, Aggarwal B B. Celestrol, 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: 2727-2735.

[本文编辑] 商素芳