

雷公藤红素抑制 C2C12 细胞增殖及诱导其凋亡

许艳华, 刘 津, 陈华群

(南京师范大学生命科学学院, 江苏省分子医学生物技术重点实验室, 江苏 南京 210023)

[摘要] 雷公藤红素(*Celastrol*)是传统草药雷公藤根部有效的提取成分,被广泛用于炎症性疾病如类风湿性关节炎、肾炎等治疗.近年来发现,其能抑制肿瘤细胞增殖,具有诱人的肿瘤治疗应用前景.本研究观察到雷公藤红素会抑制 C2C12 小鼠骨骼肌母细胞的增殖,并可能通过诱导 Caspase-3 的降解致使 C2C12 凋亡,提示雷公藤红素临床应用的安全性值得关注.

[关键词] 雷公藤红素, C2C12 成肌细胞, 细胞增殖, 细胞凋亡

[中图分类号] Q28 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2013)03-0093-04

Inhibition Effects of the Proliferation and Induction of the Apoptosis Of *Celastrol* In C2C12 Cells

Xu Yanhua, Liu Jin, Chen Huaqun

(Jiangsu Key Laboratory for Molecular and Medical Biotechnology, School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

Abstract: *Celastrol* is an effective content extracted from god vine, a traditional herb. It has been widely used in the treatment of arthritics and nephritis. Recently, it has further been found to suppress the proliferation of tumor cells, and as a potential candidate to treat tumor. We report in this study that in vitro, *Celastrol* inhibits the proliferation of mouse myoblast, C2C12 cells, as well as induces apoptosis through activation of Caspase-3. Our datas suggest that the safety of *Celastrol* is needed to be further investigated.

Key words: *Celastrol*, C2C12 myoblast, cell proliferation, cell apoptosis

雷公藤红素(*Celastrol*)又名南蛇藤素,是一种从传统中药雷公藤的根皮部提取出的中药有效成分,是临床上用于治疗关节炎、风湿病、肾炎等疾病的药物雷公藤片、雷公藤多苷片等的主要成分^[1,2].雷公藤红素具有多种生物活性和显著药理活性,如抗炎、免疫抑制等^[3,4].雷公藤红素有广泛的药理作用,特别是随着其抗肿瘤效应的发现而备受关注^[5].然而,雷公藤红素对正常细胞的作用则缺乏报道.本研究发现,雷公藤红素体外可抑制培养的 C2C12 小鼠成肌细胞的增殖并诱导其凋亡.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂

雷公藤红素(纯度 $\geq 98\%$)购自 Sigma-aldrich,以 DMSO 溶解,0.2 μm 滤膜过滤,制备浓度为 5 mg/mL 的储存液;高糖 DMEM 培养基购自 Thermo 生物公司;胎牛血清购自 Gibico 公司;GAPDH 抗体购自上海康成生物工程有限公司;兔抗被切割的 Caspase-3 抗体购自 Cell signaling technology 公司;磷脂酰丝氨酸 V 凋亡试剂盒购自南京凯基.

1.1.2 细胞

小鼠成肌细胞系 C2C12 细胞购自 ATCC.在 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 细胞培养箱中培养,培养基为含有 10% 胎

收稿日期:2013-03-13.
基金项目:江苏省优势学科资助项目(PAPD).
通讯联系人:陈华群,博士,教授,研究方向:骨骼肌和内皮细胞生物学. E-mail:Chenhuaqun@njnu.edu.cn

牛血清、10 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素和 10 U/mL 青霉素的高糖 DMEM.

1.2 方法

1.2.1 MTT 检测细胞的活性

96 孔培养板中的细胞加入 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide, 噻唑蓝], 30 $\mu\text{L/孔}$ (5 mg/mL), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h. 吸去上清, 每孔加入 150 μL DMSO, 室温低速震荡 10 min 至紫色结晶完全溶解, 酶标仪测定 570 nm OD 值. 以对照组 OD 值为 100%, 计算实验组细胞活力.

1.2.2 凋亡细胞的测定

凋亡细胞以 FITC 标记的磷脂酰丝氨酸 V 凋亡试剂盒测定, 方法按照试剂盒说明书进行. 简述如下: 收集细胞, 重悬于 500 μL Binding buffer, 浓度约为 2×10^5 个细胞/mL, 每管内分别加入 5 μL Annexin-V-FITC 和 5 μL PI 染液, 室温避光孵育 15 min, 流式细胞仪测定 (Guava Technologies, Hayward, CA, USA), 结果以 Guava TUNEL 软件进行分析, 早期和晚期的凋亡细胞均记为凋亡细胞.

1.2.3 Western blot 分析

收集细胞, 以预冷的 PBS 洗 2 次, 加入细胞裂解缓冲液[20 mmol/L Tris (pH 7.5), 135 mmol/L NaCl, 2 mmol/L EDTA, 2 mmol/L DTT, 25 mmol/L $\beta 2$ glycerophosphate, 0.1% glycerol, 0.1% Triton X-100, 1 mmol/L Na_3VO_4 , 10 ng/mL aprotinin, 10 ng/mL leupeptin 和 1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)], 置于冰上震荡裂解 30 min, 12 000 rpm/min 离心 15 min, 取上清加入 SDS 样品缓冲液, 95 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min, 10% SDS PAGE 电泳, 转移蛋白至 PVDF 膜上, 以 5% 脱脂牛奶的 TBST 封闭 1 h, 分别加入相应抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 洗 3 次, 每次 10 min, 加入辣根过氧化物酶标记羊抗兔 (Casepase-3)、羊抗鼠 (GAPDH), 室温孵育 1 h, TBST 洗 3 次, 每次 10 min. 以 ECL western blotting 检测试剂盒 (Syngene, Britain) 进行显色.

1.2.4 所有实验均重复 3 次以上, 结果以 t -检验进行分析, 以平均值 \pm 标准差表示, $P<0.05$ 表示有显著性差异.

2 结果

2.1 雷公藤红素抑制 C2C12 的增殖、诱导细胞的死亡

雷公藤红素处理 C2C12 细胞 24 h, 低浓度组细胞形态无明显变化, 但细胞的密度较对照组低; 高浓度时, 细胞发生明显的形态改变, 体积变小, 部分细胞变圆, 显示死亡形态 (图 1A). MTT 分析发现, 雷公藤红素明显抑制细胞活力, 并具有浓度依赖性 (图 1B). 以对照组细胞活力为 100%, 在 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞活力为 $(97.11\pm 2.92)\%$, 显示细胞没有受到明显影响; 随着浓度升高 (0.5 $\mu\text{mol/L}$), 细胞活力显著降低, 为 $(91.70\pm 4.21)\%$; 到 1.5 $\mu\text{mol/L}$ 时, 实验组与对照组产生非常明显的差异 ($P<0.001$), 其 IC_{50} 值约为

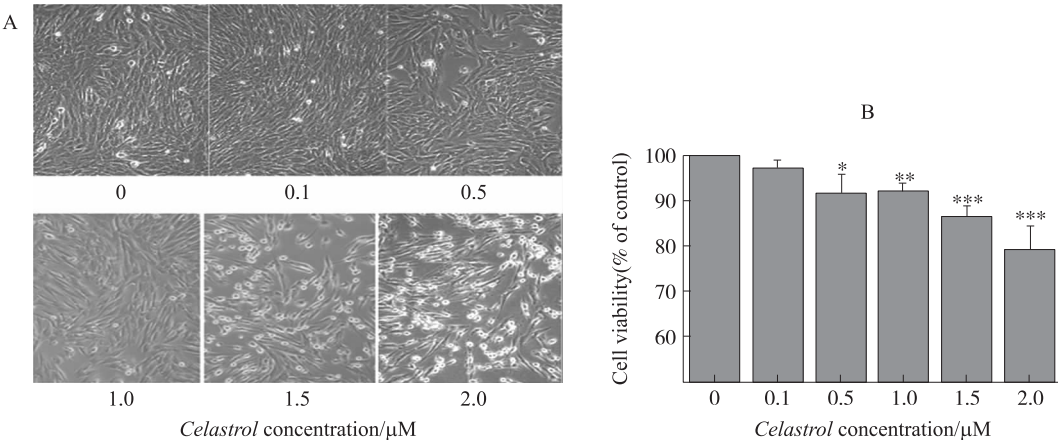


图 1 雷公藤红素诱导 C2C12 细胞死亡
A: 光镜下形态学变化(10 \times); B: MTT 分析
Fig. 1 Celastrol induced C2C12 cell death
A: morphological change(10 \times); B: MTT analysis

1. 21 $\mu\text{mol/L}$. 后续实验我们选择以 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 、1.0 $\mu\text{mol/L}$ 和 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 3 种浓度处理细胞.

2.2 雷公藤红素诱导 C2C12 细胞凋亡

已有的研究发现,雷公藤红素诱导细胞死亡的方式主要是细胞凋亡^[6,7]. 在早期凋亡细胞,细胞膜脂质侧的磷脂酰丝氨酸发生外翻. Annexin V 是一种磷脂结合蛋白,与磷脂酰丝氨酸有高度亲和力,通过细胞外侧暴露的磷脂酰丝氨酸与凋亡早期细胞的胞膜结合,显示早期细胞的凋亡^[9]. 碘化丙啶 (Propidium iodide, PI) 是一种荧光染料,可与 DNA 结合并对其染色. 在活细胞和早期凋亡细胞,其质膜完整,PI 不能进入细胞. 在晚期凋亡细胞,质膜的完整性被破坏,PI 进入细胞结合 DNA,细胞显示 Annexin V 和 PI 染色呈双阳性. 雷公藤红素处理 6 h, Annexin V 阳性的早期凋亡细胞和 Annexin V/PI 双染色的晚期凋亡细胞均处于较高水平且显著高于对照组,并具有浓度依赖性 (Fig. 2A). 随着雷公藤红素浓度的升高,早期和晚期凋亡细胞总数显著增加 (Fig. 2B).

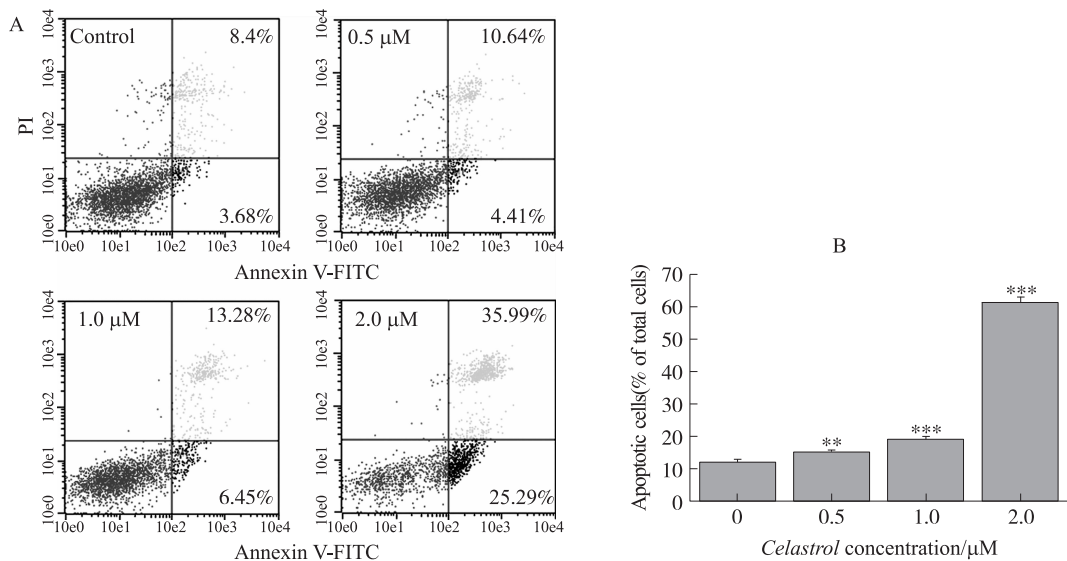


图2 雷公藤红素诱导 C2C12 细胞凋亡

A: Annexin V 和 PI 染色-流式细胞技术测定早期凋亡细胞和晚期凋亡细胞;

B: A 图的早期和晚期凋亡细胞的总合并进行统计学分析结果

Fig. 2 Celastrol induces apoptosis of C2C12 cells.

A. the percentage of early and late stages of apoptotic cells were detected by flow cytometry using annexin V/PI staining;

B. total apoptotic cells were showed by bar chart

2.3 雷公藤红素诱导 Caspase-3 的降解

细胞发生凋亡时,胞质内无活性的 Procaspace-3 被切割成为 Cleaved caspase-3 (切割 Caspase-3) 的活性形式,进入细胞核内,激活内源性核酸酶, DNA 发生降解,形成凋亡小体^[10]. 对照组 C2C12 细胞中 Caspase-3 仅有小部分被切割成 17 kD 产物. 以不同浓度雷公藤红素处理 12 h 后明显促进了活性 Caspase-3 的产生,且具有剂量依赖性 (Fig. 3).

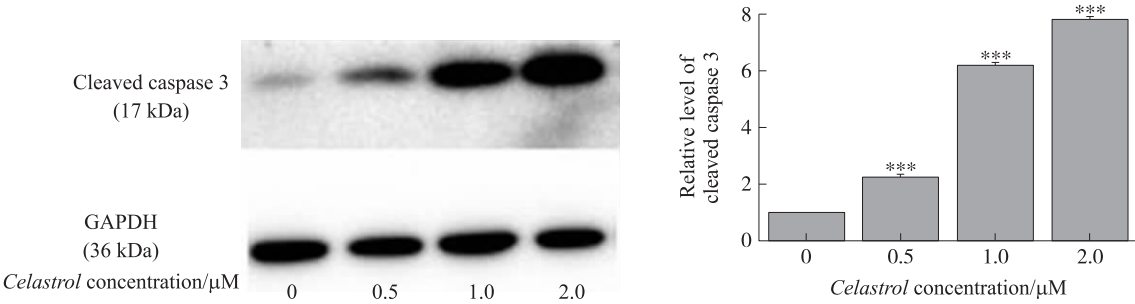


图3 雷公藤红素诱导 caspase-3 的激活, Western Blotting 分析细胞中被切割的 caspase-3, 实验重复 3 次

Fig. 3 Effects of Celastrol on the expression level of cleaved casepase-3. Representative data of Western blot analysis.

The experiments were repeated for three times

3 讨论

雷公藤红素具有显著的抗肿瘤活性. 对于非小细胞肺癌、急性髓系白血病 HL-60、结肠癌、乳腺癌等均具有强烈的抑制增殖或促进凋亡的作用^[11-14]. 本研究发现,雷公藤红素同样可抑制 C2C12 细胞的增殖,促进细胞凋亡,表明其对骨骼肌可能存在毒性作用. 药物的毒副作用往往与其对药物的耐受程度相关. 本研究发现,C2C12 对于雷公藤红素的 IC₅₀ 较低,为 1.21 μmol/L. 而目前其他报道中,肿瘤细胞对于雷公藤红素的耐受普遍不低于或远高于 C2C12^[11-13]. 在结肠癌细胞株 HT29 中,其 IC₅₀ 高达 56 μmol/L^[11],仅骨髓瘤中 IC₅₀ 低于 C2C12 细胞^[14].

虽然雷公藤红素的广谱抗肿瘤效应让人们对其应用前景寄予厚望,但毒副作用将是其临床应用的一大障碍. 因此,如何降低毒性作用是雷公藤红素研究的一个热点问题. 既可通过化学结构改造来降低其毒性作用,也可通过联合用药降低其使用剂量来降低其毒性作用. 有研究发现,低浓度(0.099 μmol/L)雷公藤红素就可显著增强 5 氟尿嘧啶的杀瘤活性^[15].

总之,本研究结果表明雷公藤红素对于体外培养的 C2C12 细胞具有毒性作用,其体内作用机制仍需进一步研究.

[参考文献]

- [1] Li H,Zhang Y Y,Tan H W,et al. Therapeutic effect of tripterine on adjuvant arthritis in rats[J]. J Ethnopharmacol,2008,118(3):479-484.
- [2] 陈铭祥,冯玉静,王定勇,等. 雷公藤红素的研究进展[J]. 中成药,2010,32(3):473-476.
- [3] 雷万军,王建军. 雷公藤免疫抑制作用研究概况[J]. 洛阳医学专报,1996,15(2):129-133.
- [4] Yu X,Tao W,Jiang F,et al. Celastrol attenuates hypertension-induced inflammation and oxidative stress in vascular smooth muscle cells via induction of heme oxygenase-1[J]. Am J Hypertens,2010,23(8):895-903.
- [5] Yang H,Chen D,Cui Q C,et al. Celastrol, 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(9):4 758-4 765.
- [6] 鲍一笑,张登海,张玲珍,等. 雷公藤红素诱导 CEM-6T 细胞凋亡的机制研究[J]. 上海免疫学杂志,2003,23(3):187-189.
- [7] Mou H,Zheng Y,Zhao P,et al. Celastrol 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(5):1 027-1 032.
- [8] Vermes I,Haanen C,Steffens-Nakken H,et al. A novel assay for apoptosis:Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V[J]. J Immunol Methods,1995,184(1):39-51.
- [9] David Y,Ora S. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle[J]. Nature,1977,270(5639):725-727.
- [10] Philippe G,Wei H Y,Raymond A S. Ischemic preconditioning by caspase cleavage of poly(ADP-Ribose)polymerase-1[J]. The Journal of Neuroscience,2003,23(22):7 967-7 973.
- [11] 徐银海,严杰. 雷公藤红素诱导人急性髓系白血病 HL-60 细胞凋亡及其机制的研究[J]. 浙江大学学报:理学版,2008,35(3):311-314.
- [12] Lu W,Jia G,Meng X,et al. Beta-catenin mediates the apoptosis induction effect of celastrol in HT29 cells[J]. Life Sci,2012,91(7/8):279-283.
- [13] Zhou L L,Lin Z X,Fung K P,et al. Celastrol-induced apoptosis in human HaCaT keratinocytes involves the inhibition of NF-κB activity[J]. Eur J Pharmacol,2011,670(2/3):399-408.
- [14] Kannaiyan R,Manu K A,Chen L,et al. Celastrol inhibits tumor cell proliferation and promotes apoptosis through the activation of c-Jun N-terminal kinase and suppression of PI3 K/Akt signaling pathways[J]. Apoptosis,2011,16(10):1 028-1 041.
- [15] 罗伟,陈卫昌. 雷公藤红素联合 5-氟尿嘧啶在人结肠癌细胞中的相互作用[J]. 中国现代医药杂志,2008,10(12):4-7.

[责任编辑:黄 敏]