

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[△]

丁兰*, 李佩蔚, 孔花青, 陈宗儒, 刘国安(西北师范大学生命科学院, 兰州 730070)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)13-1771-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.13.12

摘要 目的:研究对映-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。方法:采用台盼蓝染色法、吉姆萨染色法、NBT 还原力测定法、荧光颗粒吞噬法及流式细胞术分别检测 0(空白对照)、0.3、0.6、0.9、1.2 $\mu\text{mol/L}$ 的 Leukamenin E 及 1.2 $\mu\text{mol/L}$ 全反式维甲酸(ATRA)作用于 HL-60 细胞 24、48、72、96 h 后对细胞数目的影响,以及作用 72 h 后细胞核形态、NBT 还原能力(以 NBT 阳性细胞率计)、细胞吞噬能力(以荧光探针 P 的荧光强度计)以及细胞表面抗原 CD11b 表达的改变情况。结果:与空白对照比较,0.3~1.2 $\mu\text{mol/L}$ 的 Leukamenin E 及 1.2 $\mu\text{mol/L}$ 的 ATRA 作用 48、72、96 h 后 HL-60 细胞数目减少,且作用 72 h 后带状核细胞和分叶状核细胞数目增加($P < 0.01$),细胞 NBT 阳性细胞率和细胞表面 CD11b 表达水平增加($P < 0.01$),P 荧光强度增强。结论:Leukamenin E 可诱导 HL-60 向成熟粒细胞分化,与白血病分化治疗剂 ATRA 具有相似的分化诱导特点。

关键词 对映-贝壳杉烷型二萜; Leukamenin E; 人早幼白血病 HL-60 细胞; 分化

Induction Effects of Ent-kaurane Diterpene Leukamenin E on the Differentiation of Human Promyelocytic Leukemia HL-60 Cells

DING Lan, LI Peiwei, KONG Huaqing, CHEN Zongru, LIU Guo'an (College of Life Science, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the induction effect of ent-kaurane diterpenoid Leukamenin E on the differentiation of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. METHODS: Trypan blue staining, Giemsa's staining, NBT reduction test, fluorescent particles phagocytosis test and flow cytometry were used to detect the number of HL-60 cells after treated with 0, 0.3, 0.6, 0.9 and 1.2 $\mu\text{mol/L}$ Leukamenin E and 1.2 $\mu\text{mol/L}$ all-trans retinoic acid (ATRA) for 24, 48, 72 and 96 h, and the cellular nucleus morphology, NBT-reducing ability (by NBT positive cell rate), phagocytic ability (by fluorescence intensity of fluorescence probe P) and the expression of antigen CD11b after treated for 72 h were observed. RESULTS: Compared with blank control, the number of HL-60 cells decreased after treated with 0.3-1.2 $\mu\text{mol/L}$ Leukamenin E and 1.2 $\mu\text{mol/L}$ ATRA for 48, 72 and 96 h; the number of band nucleus and segmented nuclei increased after treated for 72 h ($P < 0.01$); the rate of positive NBT cells and the expression of CD11b increased ($P < 0.01$); the fluorescence intensity of P strengthened. CONCLUSIONS: Leukamenin E could induce the differentiation of HL-60 cells to mature granulocyte, which is similar to the effects on HL-60 cells induced by leukemia differentiation therapeutic agent ATRA.

KEYWORDS Ent-kaurane diterpene; Leukamenin E; Human promyelocytic leukemia HL-60 cells; Differentiation

白血病的分化治疗具有靶向性高、毒副作用低及疗效好的独特优势,可避免传统放疗和化疗对患者带来的巨大伤害。目前,能应用于临床的分化治疗剂还非常有限,因此寻找新的高效低毒的分化诱导药物显得尤为重要。

全反式维甲酸(ATRA)与三氧化二砷(As_2O_3)的联合治疗可靶向降解的阻滞粒细胞成熟的 PML/RAR α 融合蛋白,诱导急性早幼粒细胞白血病(APL)的细胞分化,使 APL 的治愈率超过 80%、完全缓解率达到 100%,是目前最为成功的分化治疗方案^[1-3]。研究显示,某些极性小分子^[4]、细胞因子^[5]、1,25-二羟基维生素 D₃ 及其衍生物^[6] 等对人早幼白血病 HL-60 细胞均具有较好的分化诱导作用。但某些优良分化诱导剂[如佛波酯、二甲基亚砷(DMSO)等]因其严重的毒副作用而限制了其临床应用。近来研究发现,某些对映-贝壳杉烷型二萜化合物具有较好的抗白血病效应^[7-8],例如腺花素(Adenanthin)对白血病 NB4 细胞具有很好的分化诱导作用,而凌草甲素(Oridonin)已进入白血病治疗的临床试验。尽管已从香茶菜属(Isodon)

植物分离得到对映-贝壳杉烷型二萜约 500 余种,但有关该类化合物诱导癌细胞分化的研究报道还极少。笔者研究发现,从总序香茶菜分离得到的 2 种对映-贝壳杉烷型二萜 Wangzaozin A 和 Leukamenin E 对 HL-60 细胞均显示了凋亡诱导作用^[9-10], Wangzaozin A 还显示了良好的分化诱导效应^[11],而有关 Leukamenin E 诱导白血病细胞分化的研究较少。本文就 Leukamenin E 对 HL-60 细胞分化的诱导作用进行了研究,希望为其进一步的抗白血病研究提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

HF90 CO₂ 培养箱(香港 Heal Force 公司);超净工作台(江苏苏净集团有限公司);DMI4000B 显微镜(德国 Leica 公司);Quanta SC 流式细胞仪(美国 Beckman Coulter Cell Lab);Allegra 64R 高速低温离心机(美国 Beckman Coulter 公司)。

1.2 药品与试剂

Leukamenin E[由西北师范大学生命科学院丁兰教授从甘肃产总序香茶菜 *Isodon racemosa* (Hemsl) Hara 中分离并进行了结构确定^[12],纯度: >99.5%; Leukamenin E 用 DMSO 溶解配制];RPMI1640 培养基(美国 Gibco 公司);小牛血清(杭州四

[△] 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.30960464)

* 教授,博士。研究方向:分子药理学。E-mail: dinglan@nwnu.edu.cn

季青生物工程有限公司);DMSO(美国Merck公司);ATRA(阳性对照,批号:0072BG101,纯度:>99.5%)、台盼蓝、硝基四氮唑蓝(NBT)、十四烷酰佛波醇乙酸酯(TPA)均为美国Sigma公司产品;小鼠抗人CD11b异硫氰酸荧光素(FITC)标记抗体(德国Biosciences公司);荧光探针P(由西北师范大学生命科学院丁兰教授合成^[13]);其他化学药品为国产分析纯。

1.3 细胞

HL-60细胞株由兰州大学生命科学学院王春明教授惠赠。

2 方法

2.1 细胞培养

将HL-60细胞培养于含有10%灭活小牛血清的RPMI 1640培养基中,置于37℃、5%CO₂饱和湿度的恒温培养箱中培养。

2.2 台盼蓝染色法检测细胞存活情况

取对数生长期HL-60细胞,以 2.5×10^4 个/ml接种,预培养24h后,分别加入0(空白对照)、0.3、0.6、0.9、1.2 μmol/L的Leukamenin E和1.2 μmol/L的ATRA,继续培养24、48、72、96 h后取细胞悬液与0.4%台盼蓝染液以1:4混匀,染色5 min左右后计数活细胞数目。

2.3 吉姆萨染色法观察细胞核形态

同“2.2”项下方法接种HL-60细胞并加药培养72 h,其中以1.2 μmol/L的ATRA为阳性对照,收集细胞,磷酸盐缓冲液(PBS)洗2次,用甲醇-冰乙酸(体积比3:1)固定30 min,涂片,晾干,用吉姆萨染液染色20 min。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个细胞,计算成熟粒细胞率(%)=分化细胞/(分化细胞+未分化细胞)×100%。其中,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)。

2.4 NBT还原力测定法检测细胞NBT还原能力

同“2.2”项下方法接种HL-60细胞并加药培养72 h,收集细胞,PBS洗1次,然后将细胞悬于含有TPA(200 ng/ml)和NBT(2 mg/ml)的PBS中,37℃下孵育30 min,涂片。于光学显微镜下观察并计数200个细胞中NBT阳性细胞率。

2.5 荧光颗粒吞噬法检测细胞吞噬能力

探针P为本实验室合成的高分子荧光颗粒物,加入细胞培养液中,结合荧光显微镜观察,可监测细胞的吞噬情况^[13]。同“2.2”项下方法接种HL-60细胞,加药(除0.9 μmol/L Leukamenin E外)培养72 h后,以30 μg/ml的探针P孵育,3 h后收集细胞,PBS洗2次,重悬于PBS,涂片后荧光显微镜下观察拍照,分析P的荧光强度。

2.6 流式细胞术检测细胞表面抗原CD11b表达水平

成熟粒细胞表面抗原CD11b的表达是HL-60细胞分化的标志。同“2.2”项下方法接种HL-60细胞,加药培养72 h,收集细胞,PBS洗2次,每组样品加入小鼠抗人CD11b FITC标记抗体,充分混匀后,于4℃避光孵育30 min,260目尼龙网过滤,采用流式细胞仪检测细胞中CD11b表达,计算阳性细胞率。

2.7 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用SPSS 11.0软件进行统计分析,两两比较采用*t*检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 Leukamenin E与ATRA对HL-60细胞生长的作用

Leukamenin E和ATRA对HL-60细胞生长的抑制作用见图1。

由图1可知,与空白对照比较,不同质量浓度Leukamenin

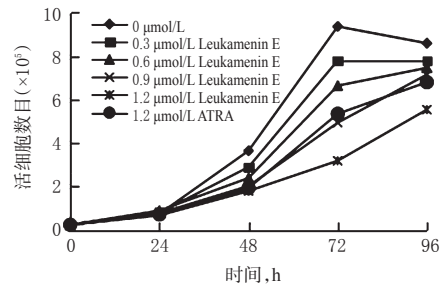


图1 Leukamenin E和ATRA对HL-60细胞生长的抑制作用
Fig 1 Inhibitory effects of Leukamenin E and ATRA on the growth of HL-60 cells

E和1.2 μmol/L的ATRA作用24 h后HL-60细胞数目无明显变化;但作用48、72、96 h后HL-60细胞数目呈不同程度减少,与Leukamenin E的质量浓度呈正相关;其中1.2 μmol/L的ATRA对HL-60细胞生长的抑制作用与0.9 μmol/L的Leukamenin E的抑制作用效果基本相当。此外,0、0.3 μmol/L的Leukamenin E作用72 h后HL-60细胞的生长进入平台期,因此,本研究在后续试验中选用72 h为HL-60细胞分化指标测试的作用时间。

3.2 Leukamenin E与ATRA对HL-60细胞核形态改变的作用

HL-60细胞的大多数为早幼粒细胞,但约有4%~15%是较早幼粒细胞更为成熟的中幼粒细胞或晚幼粒细胞^[14]。与空白对照(成熟粒细胞率5.5%)比较,0.3、0.6、0.9、1.2 μmol/L的Leukamenin E作用后HL-60细胞中带状和分叶状核粒细胞明显增多,成熟粒细胞率分别为19.9%、27.36%、44%、54.9%,均明显增加($P < 0.01$)。1.2 μmol/L ATRA与0.6 μmol/L的Leukamenin E作用后HL-60细胞中成熟粒细胞率相接近。Leukamenin E和ATRA作用后HL-60细胞核形态变化见图2,成熟粒细胞率变化见图3。

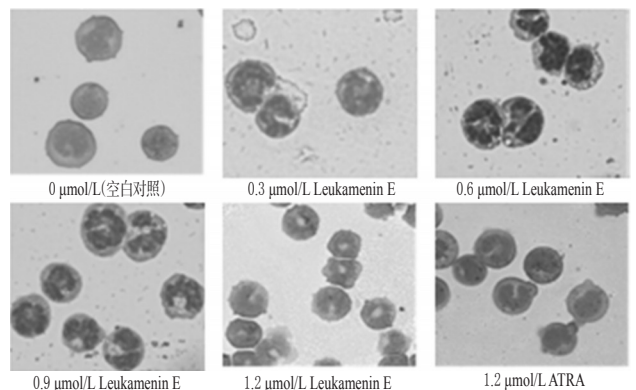


图2 Leukamenin E和ATRA作用后HL-60细胞核形态变化(×400)
Fig 2 Changes of HL-60 cells nucleolus treated with Leukamenin E and ATRA(×400)

3.3 Leukamenin E与ATRA对HL-60细胞NBT还原能力的作用

较成熟的中性粒细胞在TPA存在情况下可将NBT还原成不溶性的甲臞颗粒沉积于胞浆。与空白对照[NBT阳性细胞率为(17.2 ± 1.89)%]比较,0.3、0.6、0.9、1.2 μmol/L的Leukamenin E和1.2 μmol/L的ATRA作用后沉积有蓝黑色颗粒的HL-60细胞数目明显增加($P < 0.01$),NBT阳性细胞率分别为(21.3 ± 1.57)%、(43.3 ± 4.72)%、(63.1 ± 8.65)%、(88.8 ± 2.46)%、(37.61 ± 2.5)%,表明Leukamenin E和ATRA均能显

著提高HL-60细胞的NBT还原能力。Leukamenin E和ATRA作用后HL-60细胞着色变化见图4,NBT阳性细胞率变化见图5。

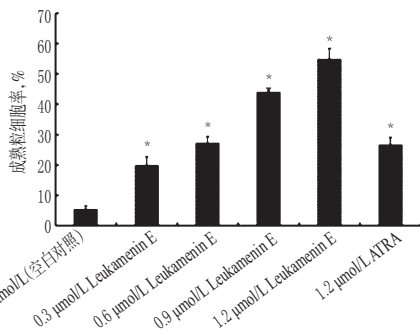


图3 Leukamenin E和ATRA作用后HL-60细胞中成熟粒细胞率变化

注:与空白对照比较,* $P < 0.01$

Fig 3 Change of mature cell rate of HL-60 cell treated with Leukamenin E and ATRA

Note: vs. blank control, * $P < 0.01$

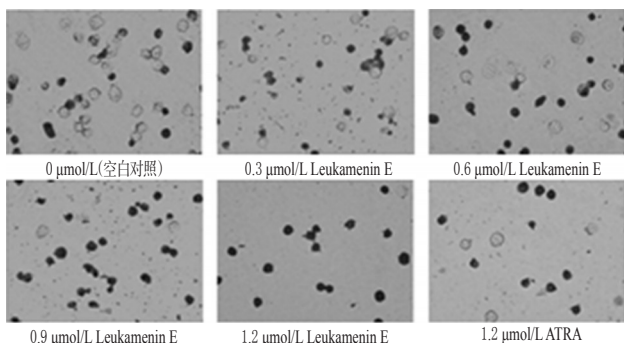


图4 Leukamenin E和ATRA作用后HL-60细胞着色变化($\times 400$)

Fig 4 The coloration change of HL-60 cells treated with Leukamenin E and ATRA($\times 400$)

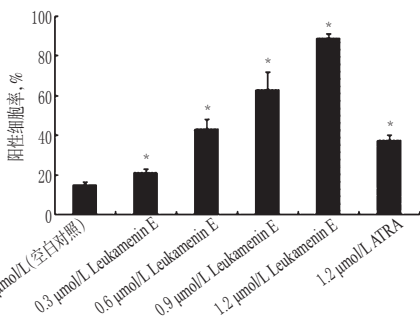


图5 Leukamenin E和ATRA作用后HL-60细胞NBT阳性细胞率变化

注:与空白对照比较,* $P < 0.01$

Fig 5 Change of NBT positive cells rate of HL-60 cells treated with Leukamenin E and ATRA

Note: vs. blank control, * $P < 0.01$

3.4 Leukamenin E与ATRA对HL-60细胞吞噬能力的作用

与空白对照比较,0.6、1.2 $\mu\text{mol/L}$ 的Leukamenin E和1.2 $\mu\text{mol/L}$ ATRA作用后HL-60细胞的HPMA-FMA荧光强度明显增强,0.3 $\mu\text{mol/L}$ 的Leukamenin E作用后HL-60细胞的HPMA-FMA荧光强度无明显变化。这表明0.6、1.2 $\mu\text{mol/L}$ 的

Leukamenin E和1.2 $\mu\text{mol/L}$ 的ATRA可使HL-60细胞吞噬能力增强,其中0.6 $\mu\text{mol/L}$ 的Leukamenin E与1.2 $\mu\text{mol/L}$ 的ATRA的吞噬诱导活性相当。Leukamenin E和ATRA作用后HL-60细胞吞噬能力的变化见图6。

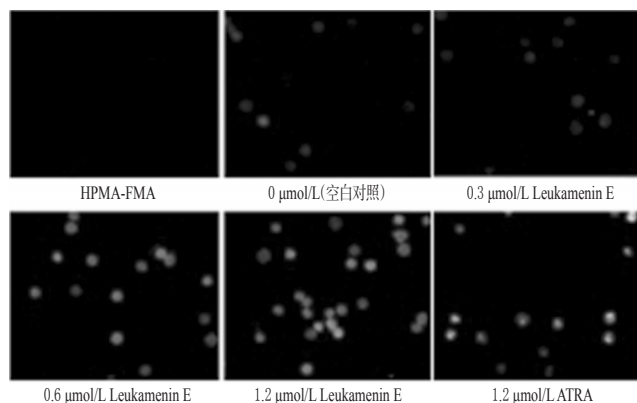


图6 Leukamenin E和ATRA作用后HL-60细胞吞噬能力的变化($\times 200$)

Fig 6 Change of phagocytic ability of HL-60 cells after treated with Leukamenin E and ATRA($\times 200$)

3.5 Leukamenin E与ATRA对HL-60细胞表面抗原CD11b表达水平的作用

成熟粒细胞表面抗原CD11b的表达是早幼粒HL-60细胞分化的标志。与空白对照(阳性细胞率为21.6%)比较,0.3、0.6、0.9、1.2 $\mu\text{mol/L}$ 的Leukamenin E和1.2 $\mu\text{mol/L}$ 的ATRA作用后HL-60细胞表面抗原CD11b表达的阳性细胞率均增加,分别为31.7%、47.0%、57.7%、72.1%、37.4%。这表明0.3~1.2 $\mu\text{mol/L}$ 的Leukamenin E和1.2 $\mu\text{mol/L}$ 的ATRA可诱导HL-60细胞向成熟粒细胞分化。Leukamenin E和ATRA作用HL-60细胞表面抗原CD11b表达水平的变化见图7。

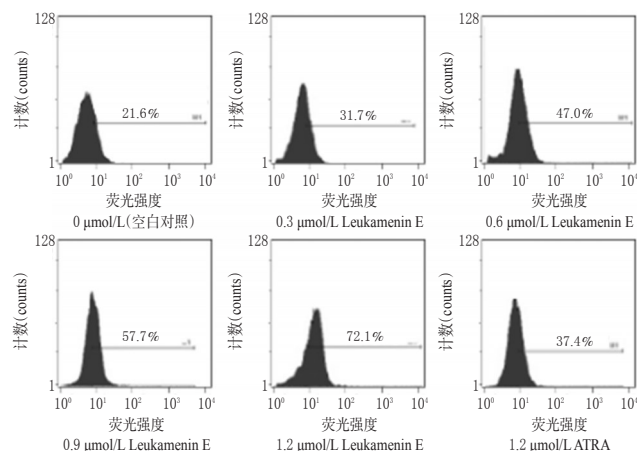


图7 Leukamenin E和ATRA作用后HL-60细胞表面抗原CD11b表达水平的变化

Fig 7 Change of the expression of antigen CD11b in HL-60 cells after treated with Leukamenin E and ATRA

4 讨论

HL-60细胞中大多数为早幼粒细胞,但约有4%~15%是较早幼粒细胞更为成熟的细胞(中幼粒细胞、晚幼粒细胞),细胞核呈带状或分叶状^[14]。HL-60细胞在不同分化诱导剂的作用下呈多向分化,ATRA诱导其向粒系细胞分化^[15];阿糖胞苷(Ara-C)诱导向单核系分化;维生素D₃和TPA诱导其向巨噬细

胞系分化^[16-17]。其中 ATRA 的分化诱导是肿瘤细胞诱导分化研究中最成熟和经典的模型,分化指标明确、结果稳定且重复性高^[18],因此本试验选择 ATRA 为阳性对照。

细胞的分化程度与细胞生长能力成负相关,即细胞分化程度越高,其生长能力越弱,因此肿瘤细胞生长能力减弱是其分化的一个重要标志。本试验中,0.3~1.2 μmol/L 的 Leukamenin E 对 HL-60 细胞显示了明显的生长抑制作用。

细胞分化的形态特征是分化最直观的实验证据。ATRA 诱导 HL-60 细胞向粒系细胞分化的形态学特征主要表现为细胞核形态的改变:带状或分叶状(2~5 叶)核细胞比率上升,细胞核质比下降^[19],其形态与人中性粒细胞核的形态接近^[19]。空白对照的 HL-60 细胞核大多数呈圆形或椭圆形,0.3~1.2 μmol/L 的 Leukamenin E 作用于 HL-60 细胞 72 h 后,带状或分叶状核细胞比率大幅提高,与 ATRA 作用后细胞核形态相类似,具有粒细胞核的典型特征。另外,成熟粒细胞的功能性标志可通过其 NBT 还原能力及吞噬功能来表征^[8,20],而 CD11b 分化抗原则是向中性粒细胞或单核细胞分化的分子标志^[21]。试验结果表明,Leukamenin E 作用于 HL-60 细胞 72 h 后细胞 NBT 还原能力及吞噬能力均显著增强,分化抗原 CD11b 表达量明显上升,这与 ATRA 作用后细胞的表现趋势一致;并且 0.6 μmol/L 的 Leukamenin E 分化诱导活性与 1.2 μmol/L ATRA 的分化诱导活性接近。

参考文献

[1] Lo-Coco F, Avvisati G, Vignetti M, *et al.* Retinoic acid and arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia[J]. *New Engl J Med*, 2013, 369(2): 111.

[2] Hugues DT, Morgane LB, Valérie LB, *et al.* Acute promyelocytic leukemia, arsenic, and PML bodies[J]. *Cell Biol*, 2012, 198(1): 11.

[3] 陈艾,刘文君.三氧化二砷治疗粒单系白血病的进展[J]. *中国药房*, 2006, 17(1): 59.

[4] Collins SJ, Ruscetti FW, Gallagher RE, *et al.* Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978, 75(5): 2 458.

[5] Chee LCY, Hendy J, Purton LE, *et al.* The granulocyte-colony stimulating factor receptor (G-CSFR) interacts with retinoic acid receptors (RARs) in the regulation of myeloid differentiation[J]. *J Leukocyte Biol*, 2013, 93(2): 235.

[6] Chen D, Eutsch X, Studzinski GP. Dual role of hematopoietic progenitor kinase 1 (HPK1) as a positive regulator of 1 α, 25-dihydroxyvitamin D-induced differentiation and cell cycle arrest of AML cells and as a mediator of vitamin D resistance[J]. *Cell Cycle*, 2012, 11(7): 1 364.

[7] Zhen T, Wu CF, 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.

[8] Liu CX, Yin QQ, Zhou HC, *et al.* Adenanthin targets peroxidoredoxin I and II to induce differentiation of leukemic

cells[J]. *Nat Chem Biol*, 2012, 8(5): 486.

[9] 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.

[10] 丁兰, 孔花青, 第五佳丽, 等. 对映-贝壳杉烷型二萜 Leukamenin E 对人早幼粒白血病细胞 HL-60 生长抑制及凋亡诱导的影响[J]. *西北师范大学学报: 自然科学版*, 2013, 49(6): 72.

[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.

[12] Ding L, Liu GA, Wang L, *et al.* Cytotoxic ent-kaurane diterpenoids from *Isodon racemosa* (Hmesl) Hara[J]. *Indian J Chem B*, 2006, 45(2): 548.

[13] 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.

[14] Newburger PE, Chovaniec ME, Greenberger JS, *et al.* Functional changes in human leukemic cell line HL-60. A model for myeloid differentiation[J]. *J Cell Biol*, 1979, 82(2): 315.

[15] Wang CY, Yang TT, Chen CL, *et al.* Reactive oxygen species-regulated glycogen synthase kinase-3β activation contributes to all-trans retinoic acid-induced apoptosis in granulocyte-differentiated HL60 cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 88(1): 86.

[16] Mangelsdorf DJ, Koeffler HP, Donaldson CA, *et al.* 1, 25-dihydroxyvitamin D3-induced differentiation in a human promyelocytic leukemia cell line (HL-60): receptor-mediated maturation to macrophage-like cells[J]. *J Cell Biol*, 1984, 98(2): 391.

[17] Katsumi K, Yoshikazu N, Tomoko K. Altered expression profiles of microRNAs during TPA-induced differentiation of HL-60 cells[J]. *Biochem Bioph Res Co*, 2004, 322(2): 403.

[18] 曾益新. 肿瘤学[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 139-142.

[19] Olins AL, Zwerger M, Herrmann H, *et al.* The human granulocyte nucleus: unusual nuclear envelope and heterochromatin composition[J]. *Eur J Cell Biol*, 2008, 87(5): 279.

[20] 田洁, 杜德林, 吴蔚. 维生素 A 酸诱导的人早幼粒白血病细胞系 HL-60 的吞噬发光测定[J]. *上海免疫学杂志*, 1988, 8(1): 42.

[21] Hannah HC, Philmo YO, Donald EI, *et al.* Multistable and multistep dynamics in neutrophil differentiation[J]. *BMC Cell Biology*, 2006, 7(35): 11.

(收稿日期: 2016-01-04 修回日期: 2016-02-29)

(编辑: 邹丽娟)