

论著·实验研究

## 冬凌草甲素通过下调 Brg1 表达抑制 Jurkat 细胞生长

叶珍珍<sup>1</sup> 薛飞龙<sup>1</sup> 丁文评<sup>2</sup> 孔祥<sup>3</sup> 沈伊娜<sup>1</sup>

(1. 皖南医学院弋矶山医院儿科; 2. 皖南医学院弋矶山医院放疗科;  
3. 皖南医学院弋矶山医院内分泌科, 安徽 芜湖 241001)

**[摘要]** **目的** 探讨冬凌草甲素对人急性T淋巴细胞白血病 Jurkat 细胞的作用及其机制。**方法** 体外培养 Jurkat 细胞株, 用不同浓度冬凌草甲素 (0、1.25、2.5、5 和 10  $\mu\text{mol/L}$ ) 作用 Jurkat 细胞不同时间 (24、48、72 h), MTT 实验观察细胞增殖情况, 荧光显微镜观察不同浓度冬凌草甲素处理 Jurkat 细胞 12 h 后的细胞核形态变化。采用 Western blot 半定量法检测不同浓度冬凌草甲素作用 Jurkat 细胞 24 h, 以及 5  $\mu\text{mol/L}$  冬凌草甲素处理 Jurkat 细胞不同时间 (0、2、6、12 和 24 h) 后的 Brg1、P53 和 C-myc 蛋白表达。用 siRNA 沉默 Jurkat 细胞的 Brg1, 观察其对 P53、C-myc 蛋白表达以及对增殖的影响。**结果** 与无处理组相比, 冬凌草甲素对 Jurkat 细胞增殖有抑制作用 ( $P<0.05$ ), 且呈浓度和时间依赖性; 荧光显微镜下发现, 冬凌草甲素处理后的 Jurkat 细胞出现细胞核浓集、固缩等典型凋亡形态变化。与无处理组相比, 5  $\mu\text{mol/L}$  冬凌草甲素作用下, Jurkat 细胞的 Brg1 和 C-myc 表达下降, 而 P53 表达上升。siRNA 沉默 Jurkat 细胞的 Brg1 后, P53 表达升高, C-myc 蛋白表达下降, 细胞生长明显受抑 ( $P<0.05$ )。**结论** 冬凌草甲素对 Jurkat 细胞生长具有抑制作用, 其机制可能通过影响 Brg1 信号通路起作用。

[中国当代儿科杂志, 2017, 19(11): 1208-1212]

**[关键词]** 冬凌草甲素; Brg1; P53; C-myc; 急性淋巴细胞白血病; Jurkat 细胞

### Oridonin inhibits proliferation of Jurkat cells via the down-regulation of Brg1

YE Zhen-Zhen, XUE Fei-Long, DING Wen-Ping, KONG Xiang, SHEN Yi-Na. Department of Pediatrics, Yijishan Hospital, Wannan Medical College, Wuhu, Anhui 241001, China (Shen Y-N, Email: symsyn5252@sina.com)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of oridonin on the human acute lymphocytic leukemia cell line Jurkat and its mechanism. **Methods** Jurkat cells were cultured *in vitro* and treated with various concentrations (0, 1.25, 2.5, 5, and 10  $\mu\text{mol/L}$ ) of oridonin for different lengths of time (24, 48, and 72 hours). The proliferation of Jurkat cells was analyzed by MTT assay. The changes in nuclear morphology were evaluated by fluorescence microscopy at 12 hours after treatment with various concentrations of oridonin. The expression levels of Brg1, P53, and C-myc were determined by semi-quantitative Western blot in Jurkat cells treated with various concentrations of oridonin for 24 hours or 5  $\mu\text{mol/L}$  oridonin for various lengths of time (0, 2, 6, 12, and 24 hours). The expression levels of P53 and C-myc and proliferation of Jurkat cells were evaluated after Brg1 expression was knocked down by Brg1-specific siRNA. **Results** Compared with the control group, the proliferation of oridonin-treated Jurkat cells was significantly inhibited in a concentration- and time-dependent manner ( $P<0.05$ ). According to the fluorescence microscopic analysis, oridonin treatment led to nuclear pyknosis in Jurkat cells. Compared with the control group, Jurkat cells treated with 5  $\mu\text{mol/L}$  oridonin had reduced expression of Brg1 and C-myc but elevated expression of P53. Brg1 knock-down led to a significant reduction in proliferation of Jurkat cells ( $P<0.05$ ), up-regulated expression of P53, and down-regulated expression of C-myc. **Conclusions** Oridonin can inhibit the proliferation of Jurkat cells, probably via the Brg1 signaling pathway.

[Chin J Contemp Pediatr, 2017, 19(11): 1208-1212]

**Key words:** Oridonin; Brg1; P53; C-myc; Acute lymphocytic leukemia; Jurkat cell

[收稿日期] 2017-07-07; [接受日期] 2017-09-15

[基金项目] 国家自然科学基金青年项目 (81600645); 皖南医学院中青年科研基金 (WK2016F17)。

[作者简介] 叶珍珍, 女, 硕士研究生。

[通信作者] 沈伊娜, 女, 主任医师。

急性淋巴细胞白血病 (acute lymphoblastic leukemia, ALL) 是儿童常见的血液系统肿瘤, 严重威胁儿童的生命健康。目前儿童 ALL 治愈率达 80%, 但仍有 20% 左右的复发, 且化疗副反应严重, 因此探索高效低毒药物具有重要的意义<sup>[1-2]</sup>。冬凌草甲素是从唇形香茶属植物冬凌草中提取的一种四环二萜类天然有机化合物, 有抗菌、清除氧自由基、抗突变等多种生物学活性, 而且该成分具有较强的抗肿瘤活性, 对消化系统、神经系统、泌尿生殖系统和血液系统等多种肿瘤的生长具有抑制作用<sup>[3-4]</sup>。冬凌草甲素能抑制多种白血病细胞增殖及诱导白血病细胞凋亡, 与柔红霉素联合可提高对 Jurkat 细胞增殖的抑制作用<sup>[5]</sup>。另有研究提示, 冬凌草甲素联用伊马替尼对诱导 SUP-B15 细胞凋亡有协同作用, 其机制与抑制 LYN/mTOR 信号通路有关<sup>[6]</sup>。冬凌草甲素在抑制白血病中发挥重要作用, 但具体机制仍不明。既往研究提示染色质重塑因子 Brg1 (Brahma-related gene 1) 在急性白血病细胞的生长和自我更新中起重要作用<sup>[7]</sup>。因此, 本实验通过观察冬凌草甲素作用于人急性 T 淋巴细胞白血病 Jurkat 细胞后 Brg1 蛋白表达的变化, 探讨其在冬凌草甲素抑制 Jurkat 细胞生长增殖中的作用, 为 ALL 治疗提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验细胞和主要试剂

Jurkat 细胞株购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心; 冬凌草甲素购自西安旭煌生物公司, 溶于 DMSO 溶剂; RPMI 1640 培养基、胎牛血清和 DPBS 购自 Gibco 公司; 抗 Brg1 抗体、Control siRNA 和 Bgr1 siRNA 购自 Santa cruz 公司; 抗 P53 抗体、抗 C-myc 抗体购自 Cell Signaling Technology (CST) 公司; 抗 Actin 抗体购自 Proteintech 公司; Lipofectamine 2000 脂质体转染试剂和 Opti-MEM 少血清培养基购自 Thermo Fisher 科技公司; MTT 为 Sigma 公司产品, 溶于 DPBS 溶液; DAPI 染色液、HRP 标记的山羊抗兔抗体和 HRP 标记的山羊抗小鼠抗体均购自碧云天公司。

### 1.2 细胞培养

用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的饱和湿度培养箱中培养, 隔天换

液传代一次。

### 1.3 MTT 法检测细胞增殖情况

Jurkat 细胞按  $1 \times 10^5$ /mL 密度接种于 96 孔培养板, 分为空白组 (仅含培养液, 无细胞成分)、无处理组 (即药物浓度为 0  $\mu$ mol/L) 和实验组, 实验组参照文献<sup>[5]</sup>将冬凌草甲素终浓度设置为: 1.25、2.5、5 和 10  $\mu$ mol/L。每组设 3 个复孔, 分别培养 24、48 和 72 h, 加入 MTT 溶液, 4 h 后加入 10% SDS 过夜, 用酶标仪在 562 nm 波长下测定吸光度 (OD) 值, 实验重复 3 次。

细胞存活率 (%) = (实验组 OD 值 / 无处理组 OD 值)  $\times$  100%。无处理组和实验组的 OD 值均需减去空白组 OD 值。

### 1.4 DAPI 染色

Jurkat 细胞按  $1 \times 10^6$ /mL 的密度接种于 12 孔培养板, 每孔 1 mL。用终浓度 1.25、2.5、5 和 10  $\mu$ mol/L 的冬凌草甲素处理 12 h (每个浓度组设 3 个复孔), 参照说明书进行 DAPI 荧光染色, 并在 200 倍倒置荧光显微镜下观察细胞核形态。实验重复 3 次。

### 1.5 siRNA 沉默 Jurkat 细胞的 Brg1

将  $1 \times 10^5$ /mL 密度的 Jurkat 细胞接种于 12 孔培养板中, 每孔 2 mL, 培养 24 h, 用 Opti-MEM 培养基洗涤, 1000 rpm 离心后备用。A 溶液 (8  $\mu$ L siRNA+100  $\mu$ L Opti-MEM) 与 B 溶液 (8  $\mu$ L Lipofectamine 2000 脂质体 +100  $\mu$ L Opti-MEM) 混合并室温孵育 30 min, 再与 800  $\mu$ L 的 Opti-MEM 培养基混合, 加入离心后的 Jurkat 细胞中培养 6 h, 再加入含 20% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液 1 mL, 继续培养 24 h。实验重复 3 次。

### 1.6 Western blot 法检测蛋白表达

提取各组 Jurkat 细胞的蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。各取 50  $\mu$ g 蛋白样品, 加入十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 中电泳, 湿转至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉常温下封闭 2 h, 分别孵育一抗: 抗 Actin 抗体 (1:2000)、抗 Brg1 抗体 (1:1000)、抗 P53 抗体 (1:1000), 抗 C-myc 抗体 (1:1000), 4℃ 过夜, 洗膜, 加入二抗: HRP 标记的山羊抗小鼠抗体或山羊抗兔抗体, 浓度均为 1:1000, 室温下孵育 1 h, 洗膜后加显影剂显影, 用 Image Lab 2.0.1 进行条带灰度分析, 目的蛋白灰度值除以内参 Actin 蛋白校准, 再除以无处

理组灰度值作为相对表达量。实验重复3次。

### 1.7 统计学分析

采用SPSS 19.0软件进行数据处理。计量资料采用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用LSD-*t*检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 冬凌草甲素对 Jurkat 细胞增殖的影响

不同浓度 (1.25、2.5、5 和 10  $\mu\text{mol/L}$ ) 冬凌草甲素处理 24、48 或 72 h 后的细胞生存率均随浓度增大而降低; 而且 1.25  $\mu\text{mol/L}$  组细胞存活率随处理时间延长而降低 ( $P < 0.05$ ), 5  $\mu\text{mol/L}$  及 10  $\mu\text{mol/L}$  组处理 48 h、72 h 后的细胞存活率低于 24 h ( $P < 0.05$ )、但 72 h 与 48 h 之间的差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 1 和图 1。

表 1 不同浓度冬凌草甲素处理 Jurkat 细胞不同时间后细胞存活率的变化 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ )	<i>n</i>	24 h	48 h	72 h	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
0	3	100	100	100		
1.25	3	97.7 ± 4.0	75.3 ± 4.4 <sup>a,c</sup>	66.7 ± 2.8 <sup>a,c,f</sup>	52.6	<0.05
2.5	3	86.9 ± 2.3 <sup>a,b</sup>	61.8 ± 5.0 <sup>a,b,e</sup>	57.0 ± 2.4 <sup>a,b,e</sup>	64.8	<0.05
5	3	43.6 ± 0.8 <sup>a,b,c</sup>	24.9 ± 2.3 <sup>a,b,c,e</sup>	20.9 ± 2.9 <sup>a,b,c,e</sup>	92.2	<0.05
10	3	11.3 ± 1.6 <sup>a,b,c,d</sup>	1.3 ± 0.1 <sup>a,b,c,d,e</sup>	0.3 ± 0.1 <sup>a,b,c,d,e</sup>	133.7	<0.05
<i>F</i> 值		933.3	469.8	1032.5		
<i>P</i> 值		<0.05	<0.05	<0.05		

注: a 示与同时时间对照组比较,  $P < 0.05$ ; b 示与同时时间点 1.25  $\mu\text{mol/L}$  组比较,  $P < 0.05$ ; c 示与同时时间点 2.5  $\mu\text{mol/L}$  组比较,  $P < 0.05$ ; d 示与同时时间点 5  $\mu\text{mol/L}$  组比较,  $P < 0.05$ ; e 示与同浓度 24 h 组比较,  $P < 0.05$ ; f 示与同浓度 48 h 组比较,  $P < 0.05$ 。

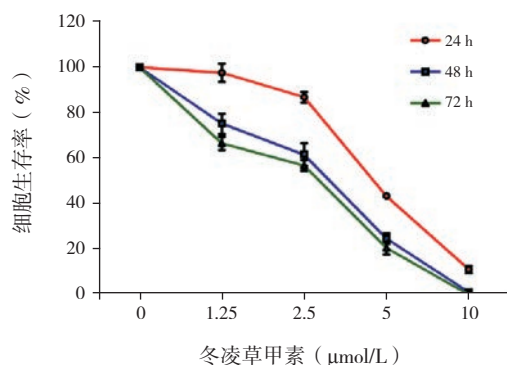


图 1 不同浓度冬凌草甲素处理不同时间对 Jurkat 细胞生长增殖的影响

### 2.2 冬凌草甲素引起 Jurkat 细胞核形态变化

不同浓度冬凌草甲素处理 Jurkat 细胞 12 h, DAPI 荧光染色后进行荧光显微镜观察: 无处理组 (图 2A) 细胞核核形完整, 呈均匀蓝色荧光, 细胞核固缩和染色质浓集少见; 随着冬凌草甲素浓度升高细胞核固缩, 提示染色质浓集的紧密蓝色荧光也增加, 见图 2B-E。

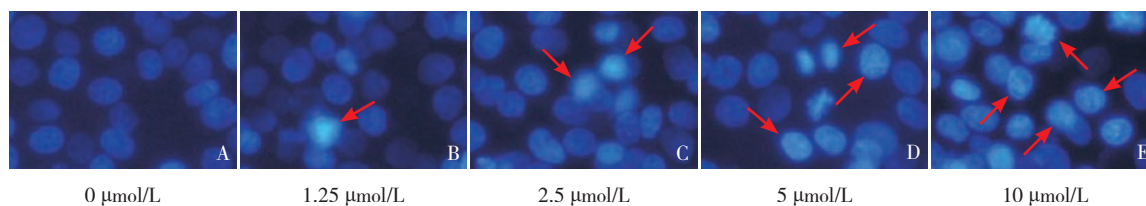
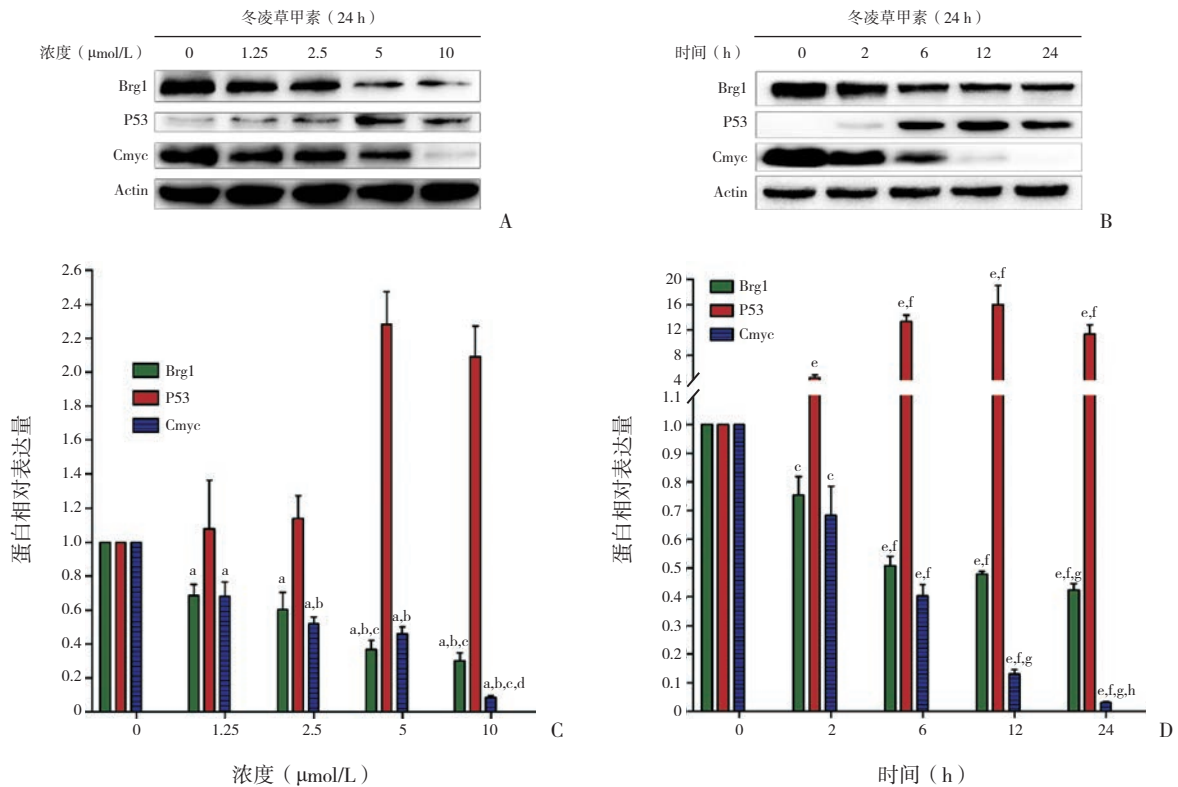


图 2 冬凌草甲素处理 12 h 后对 Jurkat 细胞核的影响 (200×) 随着药物浓度增加, 细胞核出现固缩以及染色质浓集 (如箭头所指)。

### 2.3 冬凌草甲素引起 Jurkat 细胞内 Brg1、P53 和 C-myc 蛋白的变化

不同浓度冬凌草甲素 (1.25, 2.5, 5 和 10  $\mu\text{mol/L}$ ) 作用 Jurkat 细胞 24 h 后, Brg1、C-myc 蛋白表达随着药物浓度提高呈下降趋势, P53 表达

则呈上升趋势 ( $P < 0.05$ ), 见图 3A、C。5  $\mu\text{mol/L}$  的冬凌草甲素处理 Jurkat 细胞, Brg1 和 C-myc 表达随处理时间延长而下降, P53 表达则呈上升趋势 ( $P < 0.05$ ), 见图 3B、D。

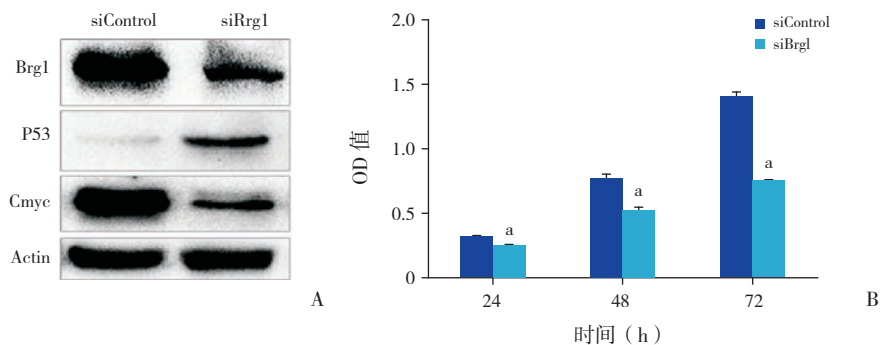


**图 3 冬凌草甲素处理后 Jurkat 细胞的 Brg1、P53、C-myc 蛋白表达** A、C ( $n=3$ ): 不同浓度冬凌草甲素作用 Jurkat 细胞 24 h 后的蛋白变化; B、D ( $n=3$ ): 5  $\mu\text{mol/L}$  冬凌草甲素作用 Jurkat 细胞不同时间后的蛋白变化。a 示与同时时间点 0 浓度组比较,  $P < 0.05$ ; b 示与同时时间点 1.25  $\mu\text{mol/L}$  组比较,  $P < 0.05$ ; c 示与同时时间点 2.5  $\mu\text{mol/L}$  组比较,  $P < 0.05$ ; d 示与同时时间点 5  $\mu\text{mol/L}$  组比较,  $P < 0.05$ ; e 示与同浓度 0 h 组比较,  $P < 0.05$ ; f 示与同浓度 2 h 组比较,  $P < 0.05$ ; g 示与同浓度 6 h 组比较,  $P < 0.05$ ; h 示与同浓度 12 h 组比较,  $P < 0.05$ 。

### 2.4 siRNA 沉默 Brg1 对 Jurkat 细胞蛋白表达和生长的影响

siRNA 沉默 Brg1 后, P53 蛋白表达较对照组

升高、C-myc 蛋白表达下降 (图 4A); 细胞生长明显受抑 ( $P < 0.05$ ) (图 4B)。



**图 4 siRNA 沉默 Brg1 对 Jurkat 细胞蛋白表达和生长的影响** a 示与 siControl 比较,  $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

随着诊疗水平提高,儿童 ALL 的 5 年生存率显著提高,但许多高危及复发病例仍缺乏有效治疗手段,且耐药问题成为治疗中的主要挑战之一,探寻新药迫在眉睫<sup>[8-9]</sup>。冬凌草甲素是冬凌草中提取的有效抗癌成分,对多种实体瘤和血液系统肿瘤均有抑制作用,机制可能与诱导细胞凋亡、细胞周期阻滞和自噬等有关<sup>[10-12]</sup>。

Brg1 是染色质重塑复合体 SWI/SNF 中三磷酸腺苷(ATP)酶催化亚单位之一,SWI/SNF 是基因表达的主要调节因子,在细胞周期调控、DNA 修复和肿瘤的发生发展中发挥重要作用<sup>[13-14]</sup>。关于 Brg1 在肿瘤中的作用还存在争议。既往有研究表明,Brg1 作为一个抑癌基因,在部分肿瘤细胞系和人类实体肿瘤存在突变或缺失现象<sup>[15-16]</sup>。然而,目前一些研究提示 Brg1 对一些肿瘤的生长必不可少,如胶质瘤、乳腺癌和血液肿瘤等<sup>[17-18]</sup>。

本研究发现,冬凌草甲素能有效抑制 Jurkat 细胞增殖,而且细胞核出现固缩、紧密等凋亡的典型形态,这提示冬凌草甲素可能通过诱导 Jurkat 细胞凋亡而抑制细胞增殖。C-myc 是一种重要的原癌基因,其过度表达与多种肿瘤发生发展有关。既往研究提示 Brg1 促进 Myc 转录而维持白血病细胞的自我更新能力<sup>[7]</sup>。P53 是抑癌基因,在调节细胞周期和细胞凋亡中发挥中作用。有学者发现,在乳腺癌和肾癌等细胞系中,Brg1 通过与组蛋白乙酰转移酶 CBP 协作抑制 P53 的活性,从而促进肿瘤细胞增殖<sup>[19]</sup>。本实验通过 siRNA 技术沉默 Jurkat 细胞 Brg1 的表达后 P53 表达上升、C-myc 表达下降, Jurkat 的细胞增殖受抑。提示冬凌草甲素对 Jurkat 细胞的抑制可能与抑制 Brg1 的表达有关。

综上所述,冬凌草甲素对 Jurkat 细胞的生长增殖起抑制作用,机制可能与其抑制 Brg1 表达相关,这为急性淋巴细胞白血病的治疗提供了新的思路和治疗靶点。

#### [参 考 文 献]

[1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017[J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(1): 7-30.  
[2] 林愈灯,宗夙. 儿童恶性血液肿瘤性疾病诊疗进展[J]. 循证医学, 2017, 17(1): 25-28.

[3] Zhao Z, Chen Y. Oridonin, a promising antitumor natural product in the chemotherapy of hematological malignancies[J]. Curr Pharm Biotechnol, 2014, 15(11): 1083-1092.  
[4] Ding Y, Ding C, Ye N, et al. Discovery and development of natural product oridonin-inspired anticancer agents[J]. Eur J Med Chem, 2016, 122: 102-117.  
[5] 张晓芬,周丽. 冬凌草甲素及联合柔红霉素对 Jurkat 细胞增殖抑制作用的观察[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2012, 19(16): 1227-1230.  
[6] Guo Y, Shan Q, Gong Y, et al. Oridonin in combination with imatinib exerts synergetic anti-leukemia effect in Ph<sup>+</sup> acute lymphoblastic leukemia cells in vitro by inhibiting activation of LYN/mTOR signaling pathway[J]. Cancer Biol Ther, 2012, 13(13): 1244-1254.  
[7] Shi J, Whyte WA, Zepeda-Mendoza CJ, et al. Role of SWI/SNF in acute leukemia maintenance and enhancer-mediated Myc regulation[J]. Genes Dev, 2013, 27(24): 2648-2662.  
[8] 王慧慧,文飞球. 儿童急性淋巴细胞白血病治疗进展[J]. 中国实用儿科杂志, 2012, 27(10): 791-794.  
[9] 马晶晶,陈月,于亮. 急性淋巴细胞白血病耐药机制的研究进展[J]. 中国实验血液学杂志, 2016, 24(1): 261-265.  
[10] Tian W, Chen SY. Recent advances in the molecular basis of anti-neoplastic mechanisms of oridonin[J]. Chin J Integr Med, 2013, 19(4): 315-320.  
[11] Yao Z, Xie F, Li M, et al. Oridonin induces autophagy via inhibition of glucose metabolism in p53-mutated colorectal cancer cells[J]. Cell Death Dis, 2017, 8(2): e2633.  
[12] Xu S, Yao H, Luo S, et al. A novel potent anticancer compound optimized from a natural oridonin scaffold induces apoptosis and cell cycle arrest through the mitochondrial pathway[J]. J Med Chem, 2017, 60(4): 1449-1468.  
[13] 张颖,郑燕芳. BRG1 在非小细胞肺癌中的作用研究进展[J]. 广东医学, 2016, 37(21): 3283-3286.  
[14] Wu Q, Lian JB, Stein JL, et al. The BRG1 ATPase of human SWI/SNF chromatin remodeling enzymes as a driver of cancer[J]. Epigenomics, 2017, 9(6): 919-931.  
[15] Weissman B, Knudsen KE. Hijacking the chromatin remodeling machinery: impact of SWI/SNF perturbations in cancer[J]. Cancer Res, 2009, 69(21): 8223-8230.  
[16] Lu P, Roberts CW. The SWI/SNF tumor suppressor complex: Regulation of promoter nucleosomes and beyond[J]. Nucleus, 2013, 4(5): 374-378.  
[17] Bai J, Mei PJ, Liu H, et al. BRG1 expression is increased in human glioma and controls glioma cell proliferation, migration and invasion in vitro[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2012, 138(6): 991-998.  
[18] Bai J, Mei P, Zhang C, et al. BRG1 is a prognostic marker and potential therapeutic target in human breast cancer[J]. PLoS One, 2013, 8(3): e59772.  
[19] Naidu SR, Love IM, Imbalzano AN, et al. The SWI/SNF chromatin remodeling subunit BRG1 is a critical regulator of p53 necessary for proliferation of malignant cells[J]. Oncogene, 2009, 28(27): 2492-2501.

(本文编辑: 俞燕)