

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.02.003

维生素 C 联合硼替佐米对人 T 细胞淋巴瘤细胞株 Jurkat 细胞凋亡的应用*

邢宏运¹, 卞铁荣^{1,2}, 邓宇³

(1. 西南医科大学附属医院血液内科, 四川泸州 646000; 2. 西安理工大学材料学院, 西安 710048; 3. 重庆医科大学临床 2 系, 重庆 400016)

[摘要] **目的** 研究维生素 C 联合硼替佐米对人 T 细胞淋巴瘤细胞株 Jurkat 细胞凋亡相关蛋白 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)与 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax) 表达调节的影响。**方法** 采用 30 nmol/L 的硼替佐米组, 100 μg/mL 的维生素 C 组及联合组分别作用于 Jurkat 细胞 24、48、72 h, 设立未加药物的对照组, 应用倒置显微镜观察细胞的生长方式, 免疫组织化学检测 Bax 及 Bcl-2 的表达, CCK-8 及流式细胞技术检测 Jurkat 细胞凋亡率和细胞周期。**结果** 维生素 C 使 Jurkat 细胞的生长方式从对照组的局部聚集向近乎均匀分散变化; 维 C 组及联合组在 24 h 至 48 h 期间, Bcl-2 的表达降低较硼替佐米组快, Bax 表达升高的亦快, 且维 C 组 24~48 h 对 Bax 的表达增量远超过硼替佐米组。CCK-8 检测发现, 在 72 h 时维 C 组、联合组、硼替佐米组 Jurkat 细胞的抑制率分别为 25.72%、75.23%、56.81%; 流式检测凋亡率在 72 h 分别为 81.73%、67.06% 与 81.50%; 维生素 C 组的早期凋亡率大于晚期凋亡率, 而硼替佐米组与联合组均为早期凋亡率低, 但维生素 C 的添加, 联合用药组细胞的早期凋亡率得到了大约 15.26% 的提高。**结论** 维生素 C 抑制 T 细胞淋巴瘤细胞株 Jurkat 细胞的增殖, 尤其是促进 Jurkat 细胞早期凋亡, 且细胞凋亡调控蛋白 Bax 与 Bcl-2 参与了维生素 C 诱导 Jurkat 细胞凋亡机制。

[关键词] Jurkat 细胞; 淋巴瘤; T 细胞; 细胞凋亡; 抗坏血酸; 凋亡调控蛋白
[中图分类号] R557+.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2017)02-0152-04

Application of vitamin C combined with bortezomib in human T cell lymphoma cell line Jurkat cell apoptosis*

Xing Hongyun¹, Bian Tierong^{1,2}, Deng Yu³

(1. Department of Hematology, Affiliated Hospital, South West Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China; 2. Material College, Xi'an University of Technology, Xi'an, Shaanxi 710048, China; 3. Second Department of Clinic, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

[Abstract] **Objective** To study the influence of vitamin C combined with bortezomib on the apoptosis regulatory protein B lymphocytoma-2(Bcl-2) and Bcl-2 associated X protein (Bax) expression regulation in human T-cell lymphoma cell line Jurkat cells. **Methods** 30 nmol/L bortezomib group, 100 μg/mL vitamin C group and the combination group were adopted to act on Jurkat cells for 24, 48, 72 h respectively. There was no drug added to the control group. The inverted microscope was used to observe the cell growth way. The expression of Bax and Bcl-2 proteins was detected by immunohistochemistry. CCK-8 and flow cytometry were used to detect the cellular apoptosis and cellular cycle. **Results** Vitamin C made the Jurkat cell growth way to change from the local accumulation growth in the control group to almost evenly disperse change. The expression decrease of Bcl-2 from 24 h to 48 h in the vitamin C group and combination group were faster than that in the bortezomib group, the Bax expression increase was also faster, moreover the expression increment of Bax from 24 h to 48 h by vitamin C far surpassed that in the bortezomib group. The inhibition rates of Jurkat cell in three groups detected by CCK-8 at 72 h were 25.72%, 75.23% and 56.81% respectively. The apoptosis rates at 72 h in three groups detected by flow cytometry were 81.73%, 67.06% and 81.50% respectively. Early apoptosis rate in the vitamin C group was greater than the late apoptosis rate, but the bortezomib group and combination group all had low early apoptosis rate, but cell early apoptosis rate in the combination group was increased by about 15.26% after adding vitamin C. **Conclusion** Vitamin C inhibits T-cell lymphoma cell line Jurkat cell proliferation, especially promotes early apoptosis of Jurkat cells, moreover confirms that the apoptosis regulatory proteins Bax and Bcl-2 participate in the vitamin C-induced Jurkat cell apoptosis mechanism.

[Key words] Jurkat cells; lymphoma, T-cell; apoptosis; ascorbic acid; apoptosis regulatory proteins

近年来,人们认识到维生素 C 在心血管系统疾病及癌症预防和治疗中可能发挥重要作用^[1-8]。而硼替佐米对 T 细胞淋巴瘤细胞的凋亡、增殖等方面研究颇多^[9-11],且人 T 细胞淋巴瘤细胞株 Jurkat 细胞在国内外已经广泛地用于白血病的研究,而药物诱导细胞凋亡疗法已经成为治疗白血病的主要途径。本课题组用 Jurkat 细胞为靶细胞,观察维生素 C、硼替佐米、维生素 C 联合硼替佐米(简称联合组)分别对人 T 细胞淋巴瘤细胞株 Jurkat 细胞凋亡的差异,同时研究凋亡相关蛋白 B 淋

巴细胞瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax) 和细胞周期、细胞凋亡的变化,探讨维生素 C 能否成为治疗或预防癌症的常规辅助药物,为临床治疗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 硼替佐米(西安杨森制药有限公司),维生素 C 注射液(上海现代哈森药业有限公司),Annexin-V-异硫氰酸荧光素(FITC)/碘化丙啶(PI)试剂盒(美国 BD 公司),细胞周期试剂盒(上海凯基生物),CCK-8(日本 Dojindo 公司),Bax、Bcl-2

* 基金项目:四川省卫生厅项目(110349)。 作者简介:邢宏运,(1974—),副教授,博士,主要从事恶性血液病的发病机制方面研究。

单克隆抗体(美国 cell signaling 公司), Jurkat 细胞(中科院上海细胞库), DMEM 培养液(美国 Gibco 公司), 96 孔和 6 孔培养板(美国 Thermo Nunc 公司), 胎牛血清(新西兰 PAA 公司), 流式细胞仪(德国 Beckman Coulter Epcis-XL 公司), 全波长分光光度计(美国 Thermo 公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组及细胞生长方式观察 实验组分别为 30 nmol/L 的硼替佐米组, 100 μg/mL 的维生素 C 组(后简称维 C 组)及联合组(两种药物的浓度不变), 分别作用于 Jurkat 细胞 24、48、72 h; 对照组未加药物。观察比较各组细胞的生长方式。

1.2.2 药物对细胞的增殖抑制实验 制备 Jurkat 细胞悬液, 将细胞调整浓度为 1×10^5 /L, 接种于 96 孔培养板上, 每孔 100 μL。37 ℃ 培养箱中培养 24 h 后, 分别加入 30 nmol/L 的硼替佐米, 100 μg/mL 的维生素 C 及联合组药物, 作用 24、48、72 h。检测前加入 10 μL 的 CCK-8, 然后培养 1~4 h, 通过全波长分光光度计测定 450 nm 波长的吸光度值(A 值)。实验设置复孔, 抑制率 = $[1 - \text{实验孔 A 值} / \text{对照空 A 值}] \times 100\%$ 。

1.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡 用含 10% 胎牛血清 DMEM 培养液将细胞制成细胞悬液, 计数, 接种于 6 孔板, 每孔细胞数 1×10^5 , 加药方法同抑制试验, 37 ℃、5% CO₂ 培养 48 h, 用冷磷酸盐缓冲液(PBS)离心洗涤 2 次, 用 500 μL Binding Buffer 重悬, 转移到流式分析管中, 加入 Annexin-V-FITC 15 μL 避光反应 15 min, 再加入 PI 5 μL 避光反应 5 min, 立即

用流式细胞仪检测。

1.2.4 流式细胞术分析细胞周期 将细胞接种于 6 孔板, 每孔细胞数为 1×10^6 , 细胞培养处理方法同上, 培养 48 h, 收集细胞, 用冷 PBS 4 ℃ 离心洗涤 2 次, 加入清洗液 1 mL 混匀, 4 ℃ 离心去除, 加入固定液 1 mL 混匀, 4 ℃ 放置 16 h, 4 ℃ 离心去除, 加入缓冲液 500 μL 和 PI 20 μL 混匀, 暗室反应 45 min 后用流式细胞仪检测。

1.2.5 免疫法检测 Bax、Bcl-2 蛋白表达情况 制备 Jurkat 细胞悬液, 将细胞调整浓度为 1×10^5 /L, 接种于放置盖玻片的 6 孔培养板上, 每孔 2 mL。37 ℃ 培养箱中培养 24 h 后, 加药方法及培养时间同上述实验, 采用一步聚合物法检测, 加入 1 : 200 稀释的 Bax、Bcl-2 单抗孵育结合, 结合羊抗兔酶标二抗后应用化学染色法判定结果, 采用 Image-Pro Plus 中文版 6.0 软件分析结果。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件进行统计学分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验; 计数资料用率表示, 组间采用 χ^2 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 细胞生长方式 倒置荧光显微镜观察实验组和对照组 24、48、72 h, Jurkat 细胞生长方式显示: 对照组和硼替佐米组 Jurkat 细胞呈“堆落”生长, 而维 C 组及联合组细胞生长方式为“堆落”散开, 均匀或比较均匀地呈散细胞生长, 见图 1。

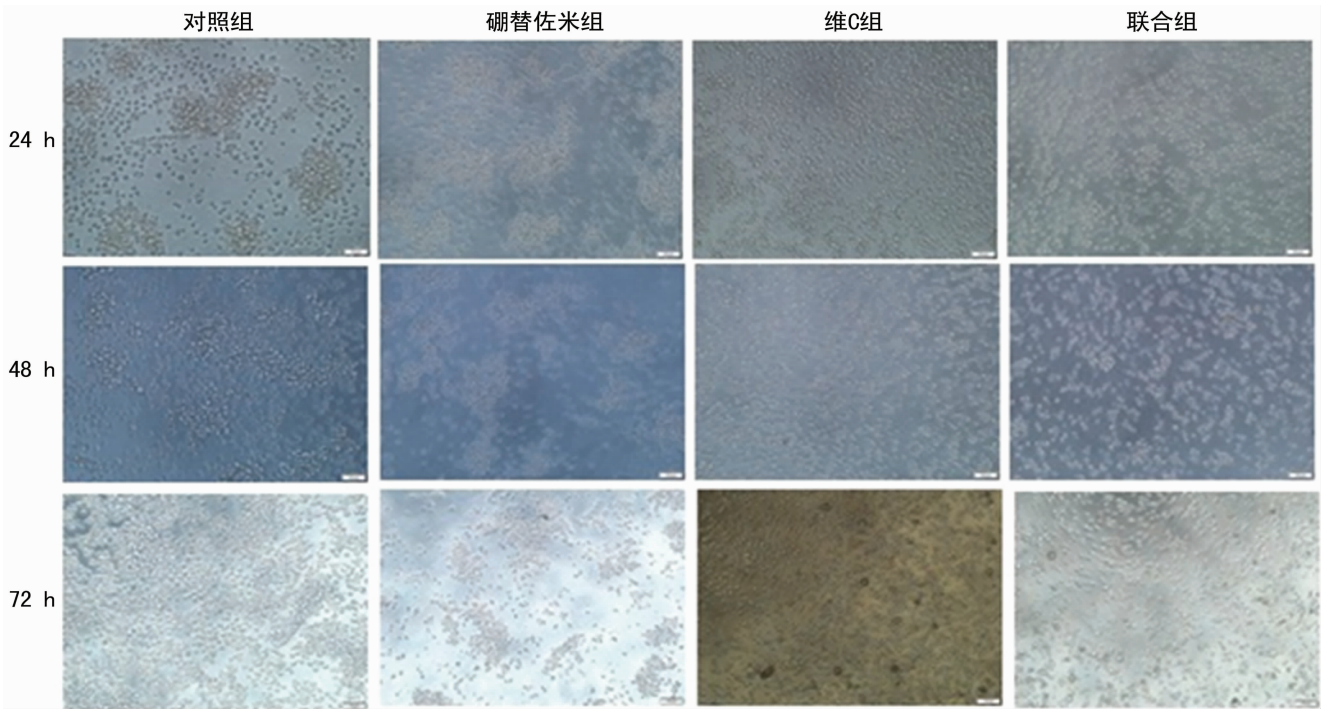
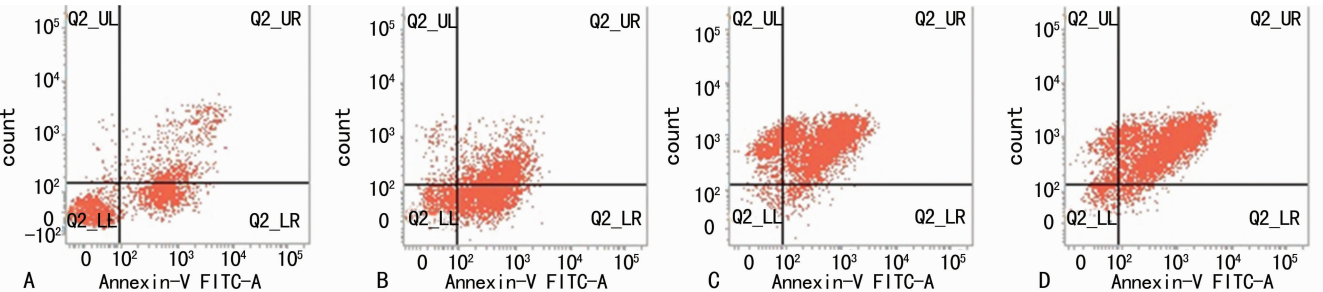
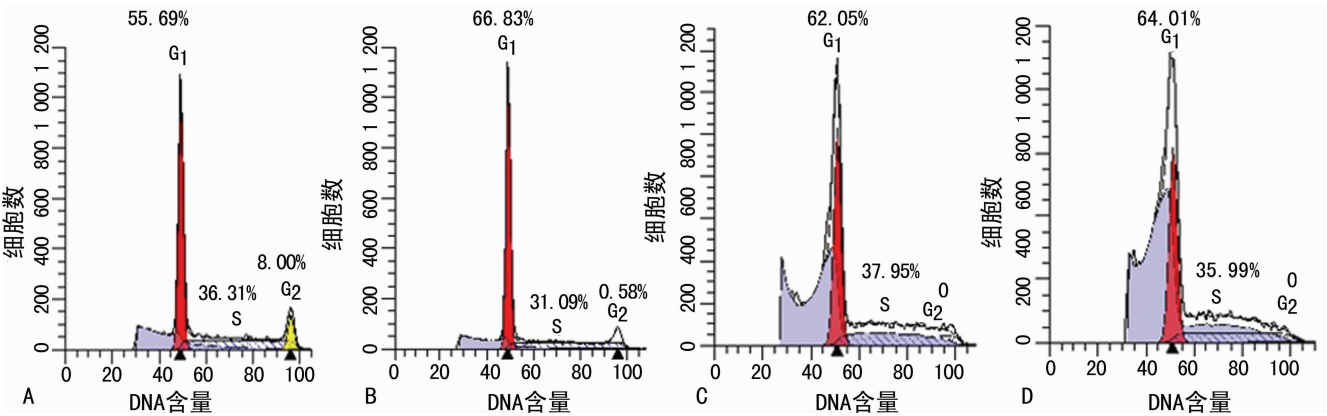


图 1 硼替佐米、维 C 及二者联合对 Jurkat 细胞生长状态的影响



A: 对照组; B: 维 C 组; C: 硼替佐米组; D: 联合组。

图 2 各组 72 h 的流式凋亡图



A: 对照组; B: 维 C 组; C: 硼替佐米组; D: 联合组。

图 3 各组 72 h 细胞周期检测结果

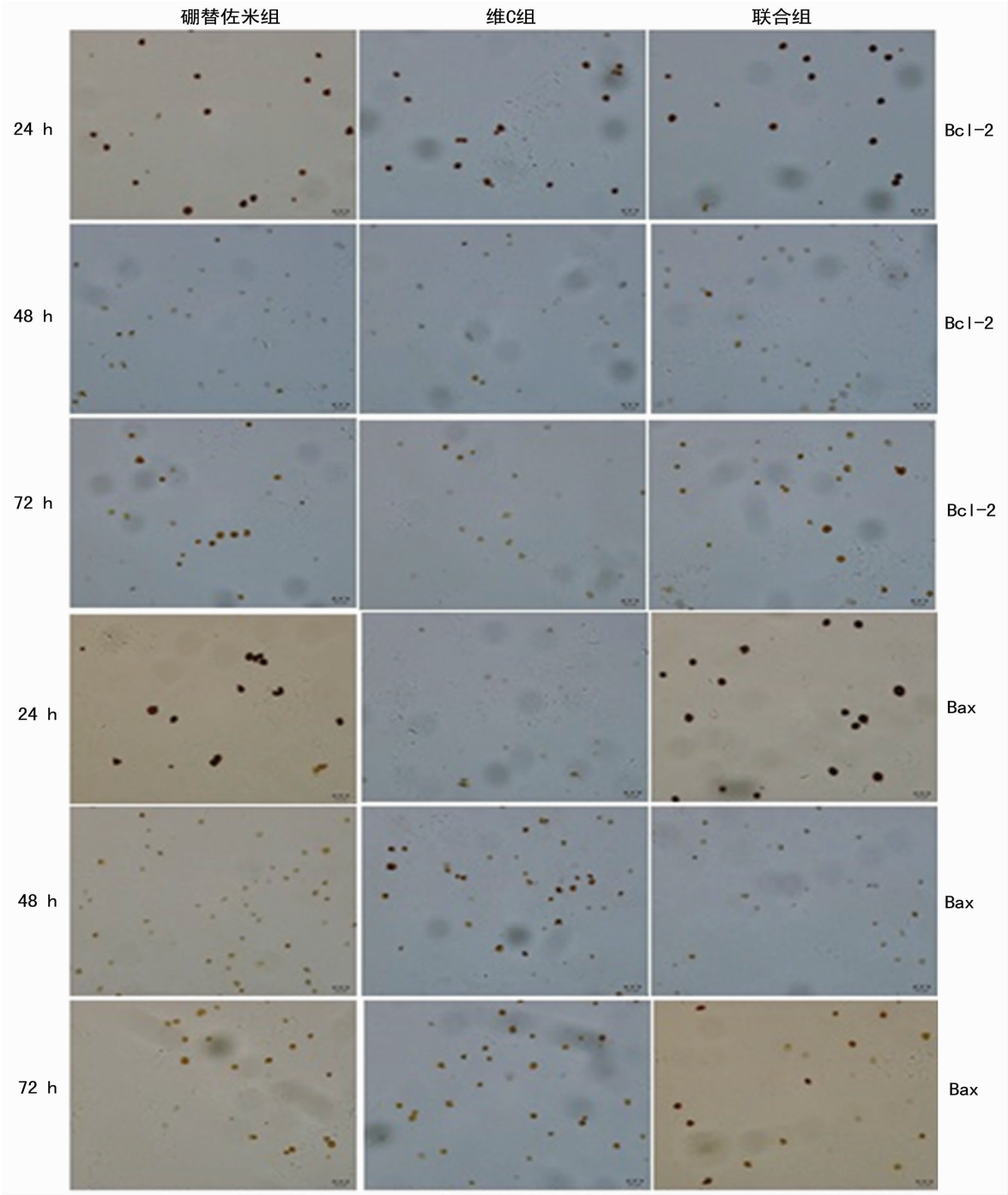


图 4 实验组 Jurkat 细胞内 Bcl-2、Bax 蛋白表达情况

表 1 各组诱导 24、48、72 h Bcl-2、Bax 蛋白染色阳性的积分光密度 (IOD) 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Bcl-2			Bax		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
硼替佐米组	211.45±0.66	12.34±0.28	95.42±3.17	91.21±1.04	96.51±2.37	127.00±4.16
维 C 组	105.19±2.35	7.06±1.87	30.44±0.73	4.78±0.69	60.53±0.62	67.94±1.65
联合组	268.85±17.23	10.64±0.81	33.76±1.78	161.81±1.51	84.49±2.28	86.85±0.28

2.2 药物对细胞的生长抑制率 联合组、硼替佐米组及维 C 组对 Jurkat 细胞的生长抑制依次降低,CCK-8 同样也验证了这一点,3 组在 72 h 的抑制率分别为 75.23%、56.81%、25.72%,差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 流式细胞术凋亡检测 实验组(维 C 组、硼体佐米组、联合组)与对照组的流式细胞术凋亡率分别为 81.73%、81.50%、67.06%与 28.51%,实验组较对照组细胞凋亡率明显增高,差异有统计学意义($P<0.05$);维 C 组较对照组早期凋亡率大于晚期凋亡率,其早期凋亡率占凋亡率的近 60.00%,而硼替佐米组与联合组比较,早期凋亡率低,但联合组的早期凋亡率较硼替佐米组约增高 15.26%,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 2。

2.4 细胞周期结果 对照组 G₁ 期 55.69%,S 期 36.31%,G₂ 期 8.00%;维 C 组 G₁ 期 66.83%,S 期 31.09%,G₂ 期 0.58%;硼替佐米组 G₁ 期 62.05%,S 期 37.95%,G₂ 期无;联合组 G₁ 期 64.01%,S 期 35.99%,G₂ 期无,与对照组相比,G₁ 期比例升高,而 S 期和和 G₂ 期细胞比例下降。各组间 G₁ 期和 S 期细胞比例差异无统计学意义($P>0.05$),G₂ 期差异有统计意义($P<0.01$),见图 3。

2.5 实验组 Bcl-2 和显微镜下对各组细胞爬片染色结果 细胞染色棕黄色即阳性表达。每组选 5 个非重复视野,通过 Image-Pro Plus 中文版 6.0 软件分析其系列图片,蛋白表达见表 1。关于 Bcl-2,24 h 组间差异有统计学意义($P<0.05$);48 h 组间差异有统计学意义($P<0.05$);72 h 硼替佐米组与其他两组差异有统计学意义($P<0.05$),而其他两组间差异无统计意义($P>0.05$)。Bax 蛋白与 Bcl-2 在 24 h 相同;48 h 维 C 组与其他两组差异有统计学意义($P<0.05$),其他两组差异无统计意义($P>0.05$);72 h 硼替佐米组与其他两组差异有统计意义($P<0.05$),见图 4。

3 讨 论

临床上硼替佐米治疗 T 细胞淋巴瘤价格高昂并对神经末梢细胞存在毒性,而维生素 C 价格低廉且是普通常见药物,且近年来维生素 C 在癌症的预防及治疗中作用日益受到人们重视^[1],加之其对正常细胞无不良反应,且能一定程度上提高机体的免疫力。这与文献[2-8]将维生素 C 应用辅助治疗卵巢癌、乳腺癌、骨转移抗放疗的患者、大剂量维生素 C 辅助治疗化疗晚期患者是一致的。而维生素 C 的作用不止表现在提高免疫力一方面,且对细胞凋亡有作用,本文对其做了研究并给出了解释。

Bcl-2 是抗凋亡蛋白,在许多白血病细胞中高表达,Bax 是促凋亡蛋白,其表达增加,可以导致细胞凋亡^[11]。Bcl-2、Bax 同为 Bcl-2 家族成员,Bcl-2 是细胞凋亡研究中最受重视的癌基因之一,Bax 为细胞凋亡调控基因。该文实验结果表明维生素 C 组及联合组在 24~48 h 时,Bcl-2 的表达降低较硼替佐米组快,Bax 表达升高的也快,表明维生素 C 在这个时间段降低了抗凋亡蛋白的表达,提高了促凋亡蛋白表达,实验结果验证了 Bax 水平增加与促进细胞凋亡相关,而 Bcl-2 蛋白水平增加与抗凋亡相关,且表明细胞凋亡可能是通过 Bax 这一途径实现的。但维 C 组及联合组 48 h 后的作用不及硼替佐米组,这为临床建议 48 h 后补充服用维生素 C 奠定基础。

在细胞增殖抑制及流式凋亡实验中维 C 组的抑制率近乎硼替佐米组的 1/3,但维生素 C 的添加使细胞的早期凋亡率得

到了大约 15.26% 的提高。细胞周期分析表明 3 组药物 G₁ 期细胞增加,联合组与硼替佐米组的 G₂ 和 S 期细胞下降,维 C 组与联合组的 G₂ 期和 S 期细胞降低,硼替佐米组 S 期细胞相对对照组没有明显变化,G₂ 期细胞亦明显减低,各组间 G₁ 期和 S 期细胞比例差异无统计学意义($P>0.05$),G₂ 期差异有统计意义($P<0.01$),但毫无疑问细胞增殖被阻滞在了 G₁ 期,使细胞无法完成 DNA 的复制,作用的效果与抗生素类化疗药相似。而维 C 组的 G₁ 期比其余两组细胞增加的高些,这是否与早期凋亡所占比例大有关,还有待于研究。总之,该研究结果表明了维生素 C 添加对 Jurkat 肿瘤细胞的早期凋亡的提高,不同于一些抑癌药物对晚期凋亡率影响大^[9-10],而早期凋亡率很小。如果维生素 C 对提高肿瘤细胞早期凋亡率具有普遍性,该研究就无疑为临床上应用维生素 C 作为肿瘤治疗的辅助药物奠定一定的基础。

参考文献

[1] 杨淑梅,杨晓梅. 维生素 C 的研究动态及新的治疗前景[J]. 中国医药导报,2008,5(28):11-13.

[2] Koushik A, Wang M, Anderson KE, et al. Intake of vitamins A, C, and E and folate and the risk of ovarian cancer in a pooled analysis of 10 cohort studies[J]. Cancer Cause Control, 2015, 26(9): 1315-1327.

[3] Günes-Bayir A, Kiziltan HS. Palliative vitamin C application in patients with radiotherapy-resistant bone metastases; a retrospective study[J]. Nutr Cancer, 2015, 67(6): 921-925.

[4] Chen N, Yin S, Song X, et al. Vitamin B sensitizes cancer cells to vitamin-C-Induced cell death via modulation of Akt and bad phosphorylation[J]. J Agric Food Chem, 2015, 63(30): 6739-6748.

[5] Campbell AW. Vitamin C; it isn't just for cancer anymore[J]. Altern Ther Health Med, 2015, 21(3): 8-10.

[6] Hoffer LJ, Robitaille L, Zakarian R, et al. High-dose intravenous vitamin C combined with cytotoxic chemotherapy in patients with advanced cancer; a phase I - II clinical trial[J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0120228.

[7] Jacobs C, Hutton B, Ng T, et al. Is there a role for oral or intravenous ascorbate (vitamin C) in treating patients with cancer; a systematic review[J]. Oncologist, 2015, 20(2): 210-223.

[8] Guerriero E, Sorice A, Capone F, et al. Vitamin C effect on mitoxantrone-induced cytotoxicity in human breast cancer cell lines[J]. PLoS One, 2014, 9(12): e115287.

[9] 陈均法,金洁. 硼替佐米联合阿霉素诱导 T 细胞淋巴瘤细胞凋亡的实验研究[J]. 中华肿瘤杂志, 2009, 31(12): 890-893.

[10] 姜立彩, 罗建民. 硼替佐米对淋巴瘤细胞增殖、凋亡及 SHP2 基因表达的影响[J]. 中国实验血液学杂志, 2015, 23(4): 1026-1029.

[11] 赵印敏, 周彩存, 杨晓君, 等. 阿奇霉素诱导淋巴瘤细胞白血病 Jurkat 细胞凋亡作用的作用[J]. 临床血液学杂志, 2009, 22(11): 600-602.