

从自噬角度研究雷公藤甲素引起 HepG2 细胞肝毒性的机制

刘春晖, 周玲玲, 马可迅, 王婧, 冯哲, 周学平*
(南京中医药大学, 南京 210023)

[摘要] **目的:**探讨雷公藤甲素(TP)对 HepG2 细胞的过氧化损伤及对自噬的调控作用。**方法:**将质量浓度为 0.003 2, 0.016, 0.08, 0.4, 2 g·L⁻¹的 TP 作用于体外培养的 HepG2 细胞 48 h,另设空白组做对比,采用噻唑蓝(MTT)法检测细胞生长活性,采用酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测超氧化物歧化酶(SOD),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性,采用蛋白质免疫印迹(Western blot)法检测自噬相关蛋白微管相关蛋白轻链3(LC3 II)与 Beclin1 蛋白的表达情况,用免疫荧光法检测自噬相关蛋白 LC3 的表达情况。**结果:**与空白组比较,随着 TP 质量浓度的增加,HepG2 活性下降($P < 0.05, P < 0.01$);检测细胞上清中 SOD, GSH-Px 的活性,均较空白组降低($P < 0.05, P < 0.01$);Western blot 表明 TP 可上调 LC3 II 与 Beclin1 蛋白水平的表达($P < 0.05, P < 0.01$),免疫荧光法同样表明 TP 能够引起自噬相关蛋白 LC3 表达的增多($P < 0.05, P < 0.01$),均具有一定的浓度依赖性。**结论:**一定质量浓度的 TP 可造成肝细胞损伤,其损伤机制可能与过氧化损伤以及过氧化损伤导致的自噬过度激活有关。

[关键词] 雷公藤甲素; HepG2 细胞; 自噬; 肝毒性; 过氧化损伤

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)10-0099-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017100099

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170308.0942.024.html>

[网络出版时间] 2017-03-08 9:42

Triptolide-induced HepG2 Cells Hepatotoxicity Through Autophagy

LIU Chun-hui, ZHOU Ling-ling, MA Ke-xun, WANG Jing, FENG Zhe, ZHOU Xue-ping*
(Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the toxicity of triptolide on HepG2 cells and its modulating effects on autophagy. **Method:** HepG2 cells were cultured *in vitro*, and triptolide with the concentrations of 0.003 2, 0.016, 0.08, 0.4, 2 g·L⁻¹ were added into the cells for 48 h. Compared with the control group, the cells viability was detected by MTT assay, ELISA methods was used to determine superoxide dismutase (SOD), glutathion peroxidase (GSH-Px) activity, the expressions of the autophagy-related protein LC3 II and Beclin1 were detected by Western blot, and the expression of the autophagy-related protein LC3 was detected by immunofluorescence. **Result:** Compared with the control group, with the increase in the dose of triptolide, the HepG2 activity was decreased ($P < 0.05, P < 0.01$); the levels of SOD and GSH-Px expressions were lower than the control group ($P < 0.05, P < 0.01$); the expressions of autophagy-related protein LC3 II and Beclin1 were detected by Western blot ($P < 0.05, P < 0.01$), and the expression of autophagy-related protein LC3 was also detected by immunofluorescence in a dose-dependent manner ($P < 0.05, P < 0.01$). **Conclusion:** Certain concentrations of triptolide could cause hepatotoxicity, which was related to peroxidation and overactivating autophagy caused peroxidation.

[Key words] triptolide; HepG2 cells; autophagy; hepatotoxicity; peroxidative damage

[收稿日期] 20161230(014)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81573869,81673937)

[第一作者] 刘春晖,在读硕士,从事中医内科学风湿病方向研究,Tel:15195751836,E-mail:liuhuanguangdao@126.com

[通讯作者] *周学平,博士,教授,博士生导师,从事中医内科学风湿病方向研究,Tel:13901592816,E-mail:zxp@njutcm.edu.cn

雷公藤是临床常用的一味中药,具有祛风除湿、活血通络、消肿止痛等功效,用于治疗类风湿关节炎、系统性红斑狼疮等自身免疫系统疾病,效果显著。随着雷公藤广泛应用于临床,其毒副作用也日益受到关注。雷公藤的毒副作用主要体现在对胃肠道、肝脏、生殖系统、肾脏等系统的损害^[1],使其临床应用受限。雷公藤是具有确定肝脏毒性的药物,而雷公藤甲素(triptolide, TP)是雷公藤的主要有效成分,近年来有研究表明一定量的 TP 可造成肝细胞损伤,并可诱导细胞凋亡^[2],因此明确其肝毒性的机制对雷公藤的安全合理应用有重要的指导意义。前期研究发现,雷公藤所致肝毒性与过氧化损伤关系密切^[3],但其氧化损伤的机制尚不明确。自噬是真核细胞维持机体内环境稳定的一种保护机制,广泛地参与了机体的各种生理病理过程,其可被诸如氧化应激^[4]、营养缺乏^[5]、缺氧^[6]等诸多因素激活,自噬发生通常对细胞具有一定的保护作用,但自噬的大量激活也可加重细胞的凋亡,造成细胞损伤^[7]。因此本实验拟从自噬的角度,通过观察 TP 引起肝细胞氧化应激及对自噬的影响,探讨其肝毒性的机制。

1 材料

1.1 细胞株 人肝癌 HepG2 细胞由南京中医药大学药学院提供。

1.2 药物及试剂 TP(纯度 $\geq 98\%$)(成都普菲德生物技术有限公司,批号 150602),使用二甲基亚砜(DMSO)溶解配置成质量浓度为 $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的母液,储存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用,根据需要用 DMEM 稀释。磷酸盐缓冲液(PBS,武汉博士德生物工程有限公司,批号 10D16B30);四甲基偶氮唑盐(MTT)(美国 Sigma 公司,批号 M2128);DMSO 和 4% 多聚甲醛溶液(Biosharp 公司,批号分别为 B0015K030100 和 154803BL539A);高糖 DMEM 培养液(上海源培生物科技股份有限公司,批号 F40408);胎牛血清(FBS)及胰蛋白酶(美国 Gibco 公司,批号 161979, 1804456);超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒,谷胱甘肽过氧化酶(GSH-Px)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20141113, 20150321);LC3A/B 抗体(美国 CST 公司,批号 #12741); β -action Body, Beclin1 Polyclonal Antibody 和 Peroxidase-conjugated Affinipure Goat Anti-Rabbit IgG (H + L)(美国 Proteintech 公司,批号分别为 20536-I-AP, 11306-1-AP, SA00001-2)。

1.3 仪器 Tecan infinite 200 型全自动酶标仪(美

国 Tecan 公司),Mini-protean 型小型垂直电泳槽(美国 Bio-Rad 公司),5200 型化学发光凝胶成像系统(上海天能公司),DFM-60D 型倒置荧光显微镜(上海蔡康光学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 HepG2 细胞以含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养,2~3 d 换液 1 次,当细胞的汇合度达到 70%~80% 时用胰蛋白酶消化传代或用于实验。

2.2 MTT 法检测细胞活性 取对数生长期的 HepG2 细胞(7×10^3 个/mL),接种到 96 孔板,每孔 180 μL 。将细胞分为空白组和不同质量浓度的 TP 组(质量浓度分别为 0.003 2, 0.016, 0.08, 0.4, $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$),待细胞贴壁后 TP 各质量浓度组分别加入相应浓度的含药培养液 20 μL ,空白组加入单纯培养液,放置细胞培养箱 48 h 后,每孔加入 20 μL 质量浓度为 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 MTT 试剂,置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱孵育 4 h,弃上清加入 DMSO 150 μL ,室温摇床 10 min,酶标仪 490 nm 处测吸光度 A,计算细胞生长活性(细胞生长活性 = $A_{\text{TP组}}/A_{\text{空白组}}\times 100\%$)。

2.3 过氧化指标 SOD, GSH-Px 检测 细胞培养和加药方法同 2.2 项,待药物作用结束以后,收集细胞上清培养液,检测不同质量浓度 TP 对 SOD, GSH-Px 的影响,具体检测方法参照试剂盒说明书。

2.4 蛋白质免疫印迹(Western blot)法检测自噬相关蛋白 取对数生长期 HepG2 细胞(7×10^3 个/mL),接种到 6 孔板,每孔 1.8 mL,分组同 2.2 项,待细胞贴壁后加入相应浓度的含药培养液 200 μL ,空白组加入单纯培养液,给药 48 h 后去除培养液,加 PBS 清洗 2 次,吸尽 PBS,加裂解液后收集细胞, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $12\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min,吸取上清,一部分用 BCA 法测上样量,其余的上清液以 5:1 的比例加入 6 \times 的 Loading buffer, $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 沸水加热 5 min,冷却, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。配分离胶,灌胶待分离胶凝固后,加浓缩胶,待浓缩胶凝固,根据 BCA 检测的加样量加样,加电泳液以 40 mA 电泳 80 min,200 mA 转膜 90 min,敷封闭液 2 h, TBST 清洗 3 次每次 5 min,加一抗 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜, TBST 清洗 3 次每次 5 min,加二抗 2 h, TBST 清洗 3 次每次 5 min,加显影液曝光,检测相关蛋白的表达量。

2.5 免疫荧光法检测自噬标志蛋白 处理后的细胞 4% 多聚甲醛固定 10 min, Tritonx-100 通透液室温静置 10 min, 1% BSA 封闭液封闭 60 min, 孵育一抗, 静置 60 min, 孵育二抗, 静置 60 min, DAPI 孵育

5 min, 每一步完成均采用 PBS 清洗 3 次, 每次 10 min, 封片, 荧光显微镜观察拍照, 统计荧光强度。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 10.0 统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 不同浓度的 TP 对 HepG2 细胞生长活性的影响 把不同浓度的 TP 作用于 HepG2 细胞 48 h, 与空白组比较, MTT 法检测到 HepG2 细胞的生长活性随着 TP 浓度的升高而逐渐下降 ($P < 0.05, P < 0.01$), 表明一定浓度的 TP 可造成 HepG2 细胞的损伤, 且损伤程度与 TP 的浓度相关。见表 1。

表 1 不同浓度的雷公藤甲素对 HepG2 细胞生长活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 1 Effect of different concentrations of TP on viability of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	质量浓度/ $g \cdot L^{-1}$	生长活性/%
空白	-	99.82 ± 7.52
TP	0.003 2	83.25 ± 3.64 ¹⁾
	0.016	76.35 ± 3.04 ¹⁾
	0.08	60.25 ± 4.25 ²⁾
	0.4	51.25 ± 3.82 ²⁾
	2	29.48 ± 5.62 ²⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

3.2 不同浓度的 TP 对 HepG2 细胞上清中过氧化指标的影响 与空白组比较, 0.016 ~ 2 $g \cdot L^{-1}$ 的 TP 可降低细胞中 SOD 的活力, 0.08 ~ 2 $g \cdot L^{-1}$ 的 TP 可降低细胞中 GSH-Px 的活力, 与空白组比较差异显著 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 2。

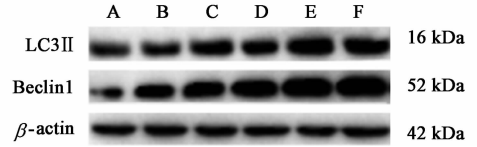
表 2 不同浓度的 TP 对 HepG2 细胞过氧化指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 2 Effect of different concentrations of TP on peroxide index of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	质量浓度/ $g \cdot L^{-1}$	SOD/ $U \cdot mL^{-1}$	GSH-Px/ $\mu mol \cdot L^{-1}$
空白	-	35.42 ± 3.31	58.22 ± 4.13
TP	0.003 2	31.33 ± 3.48	47.75 ± 4.62
	0.016	26.31 ± 3.26 ¹⁾	45.27 ± 3.81
	0.08	18.93 ± 4.15 ²⁾	39.21 ± 2.29 ¹⁾
	0.4	14.65 ± 3.18 ²⁾	29.56 ± 2.16 ²⁾
	2	9.29 ± 2.74 ²⁾	24.41 ± 2.73 ²⁾

3.3 不同浓度的 TP 对 HepG2 细胞自噬蛋白表达的影响 Western blot 法检测自噬的相关蛋白 LC3 II 与 Beclin1 的表达情况, 结果显示, 随着 TP 浓度

的升高, 与空白组比较, LC3 II 与 Beclin1 蛋白的表达明显增强 ($P < 0.05, P < 0.01$), 提示 TP 在肝毒性浓度可以激活自噬, 且激活程度与浓度呈正相关。见图 1, 表 3。



A. 空白组; B. TP 0.003 2 $g \cdot L^{-1}$ 组; C. TP 0.016 $g \cdot L^{-1}$ 组; D. TP 0.08 $g \cdot L^{-1}$ 组; E. TP 0.4 $g \cdot L^{-1}$ 组; F. TP 2 $g \cdot L^{-1}$ 组

图 1 不同浓度的 TP 对 HepG2 细胞自噬相关蛋白表达的影响

Fig. 1 Effect of different concentrations of TP on autophagy protein of HepG2 cells

表 3 不同浓度的 TP 对 HepG2 细胞自噬相关蛋白灰度值表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 3 Effect of different concentrations of TP on gray scale of autophagy protein of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	质量浓度/ $g \cdot L^{-1}$	LC3 II/ β -actin	Beclin1/ β -actin
空白	-	1.06 ± 0.11	1.12 ± 0.13
TP	0.003 2	1.41 ± 0.13 ¹⁾	1.91 ± 0.24 ¹⁾
	0.016	4.04 ± 0.21 ²⁾	4.73 ± 0.15 ¹⁾
	0.08	5.15 ± 0.32 ¹⁾	5.34 ± 0.32 ¹⁾
	0.4	7.31 ± 0.15 ²⁾	6.98 ± 0.22 ¹⁾
	2	8.72 ± 0.24 ²⁾	8.95 ± 0.28 ¹⁾

3.4 不同浓度的 TP 对 HepG2 细胞自噬蛋白 LC3 荧光强度的影响 为了进一步明确 TP 对细胞自噬的影响, 进一步采用免疫荧光法观察自噬蛋白 LC3 的影响, 绿色为目的蛋白 LC3 的表达, 蓝色为细胞核, 结果显示, 与空白组比较, 随着 TP 浓度的升高, 表示 LC3 的绿色荧光强度逐渐增强, 含有 LC3 阳性反应的细胞增多 ($P < 0.05, P < 0.01$), 进一步证实了 TP 在肝毒性浓度对自噬的激活作用与浓度呈正相关。见表 4, 图 2。

表 4 不同浓度的 TP 对 HepG2 细胞 LC3 蛋白荧光强度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 4 Effect of different concentrations of TP on LC3 protein fluorescence intensities of HepG2 cells were affected on different concentrations of TP ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	质量浓度/ $g \cdot L^{-1}$	相对吸光度/%
空白	-	98.63 ± 7.31
TP	0.003 2	120.21 ± 18.24
	0.016	340.29 ± 9.93 ¹⁾
	0.08	401.52 ± 31.02 ²⁾
	0.4	614.53 ± 22.84 ²⁾
	2	749.74 ± 32.15 ²⁾

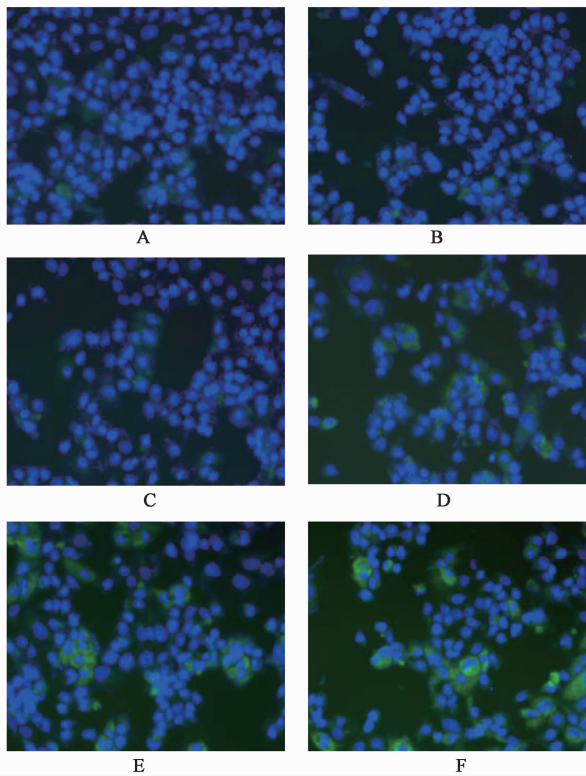


图 2 不同浓度的 TP 对 HepG2 细胞 LC3 蛋白荧光强度的影响(免疫荧光, $\times 200$)

Fig. 2 Effect of different concentrations of TP on LC3 protein fluorescence intensities of HepG2 cells were affected on different concentrations of TP (immunofluorescence, $\times 200$)

4 讨论

自噬是机体维持内环境稳定的一种机制,近几年自噬的生物学作用越来越得到人们的广泛认识。自噬在生理状态下能够维持细胞内环境的稳定,在氧化应激、缺血缺氧再灌注损伤等应激条件下,自噬作为机体的一种适应性反应出现。目前已有研究报道,自噬在药物性肝损伤中同样也发挥着重要的作用。师婷等^[8]发现在 LPS/GaIN 诱导的小鼠肝损伤过程当中,肝损伤早期自噬能起到一定的保护作用;NI 等^[9]发现扑热息痛会对小鼠及体外培养的原代肝细胞造成肝损伤,自噬可以降低肝损伤程度。这些研究表明在生理病理情况下机体内发生的自噬可起到一定保护性的作用,但是自噬的过度发生将导致自噬体的形成数量超过溶酶体的降解能力,在一些调节因子的作用下自噬会诱导细胞发生凋亡^[10],这可能是引起细胞损伤的重要原因。刘泽洲等^[11]发现 TP 诱导的急性小鼠肝损伤中,肝细胞损伤严重,自噬体明显增多;WANG 等^[12]发现在小鼠肝脏缺血再灌注损伤模型中,用活性氧簇清除剂 *N*-acetylcysteine 后可以明显降低小鼠肝脏缺血再灌注

损伤的程度,降低自噬和凋亡的水平,说明自噬也是引起细胞损伤的一个因素。

雷公藤的主要有效成分,也是其主要毒性成分,姚金成等^[13]发现 TP 可以诱导 LO2 细胞凋亡,与 TP 诱导产生活性氧有关。本文采用 HepG2 细胞系筛选了 TP 肝毒性的剂量范围,结果显示 $0.0032 \sim 2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 TP 可以造成细胞不同程度的损伤,且具有明显的浓度依赖性,同时研究结果还显示 $0.016 \sim 2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 TP 可明显降低细胞上清中 SOD, GSH-Px 酶的活力,提示 TP 在肝毒性的剂量下可以引起过氧化损伤,可见氧化应激造成的损伤是 TP 肝毒性的重要机制之一,前期的实验结果也证实了雷公藤肝毒性过程中氧化损伤的存在,并可通过诱导肝细胞的过度凋亡造成损伤。WANG 等^[12]发现在小鼠肝脏缺血再灌注损伤模型中,用活性氧簇清除剂 *N*-acetylcysteine 后可以明显降低小鼠肝脏缺血再灌注损伤的程度,降低自噬和凋亡的水平,说明氧化应激与自噬的密切关系。氧化应激反应产生的诸多因子,常常可作为上游信号因子通过多种途径激活自噬,而自噬过度激活常能够与凋亡一起造成细胞损伤^[12,14],因此本文进一步采用了 Western blot 和免疫荧光 2 种不同方法观察了 TP 在肝毒性剂量下对自噬的影响情况,结果表明,TP 在肝毒性剂量下可引起自噬相关蛋白表达的增高,且与浓度呈正相关,提示 TP 可浓度依赖性地激活自噬。因此推测,在 TP 肝毒性剂量下,其可造成氧化应激,氧化应激的产物可通过多种途径激活自噬,这可能是机体的一种保护性反应,以对抗细胞的过氧化损伤,但随着 TP 浓度增加,持续的药物刺激可能诱发了过度的自噬,过度的自噬与氧化应激反应等一起造成肝细胞损伤。

综上所述,一定浓度的 TP 可造成肝细胞损伤,其损伤机制可能与过氧化损伤以及过氧化损伤导致的自噬过度激活有关。进一步研究其对自噬的调控机制可能发现减毒的作用靶点,并对雷公藤的临床合理用药提供指导。

[参考文献]

- [1] 李原丽,覃筱芸. 雷公藤 294 例不良反应的文献调查与分析[J]. 山西医药杂志, 2011, 40(1): 88-90.
- [2] 尹亮,王亮,蒋维维,等. 雷公藤甲素对人肝癌细胞株 HepG2 体内外作用的研究[J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 2011, 31(2): 170-174.
- [3] 柳璋璞,周玲玲,冯哲,等. 基于肝细胞立体培养体系的雷公藤内酯醇肝毒性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(13): 248-251.

- [4] Kiffin R, Christian C, Knecht E, et al. Activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress [J]. *Mol Biol Cell*, 2004, 15(11):4829-4840.
- [5] XUE L L, Mark P, Ben A, et al. Beclin 1 is required for starvation-enhanced, but not rapamycin-enhanced, LC3-associated phagocytosis of *Burkholderia pseudomallei* in RAW264.7 cells [J]. *Infect Immun*, 2013, 81(1):271-277.
- [6] 杜海磊, 佟辉, 陈聆, 等. 急性缺血缺氧诱导肝癌细胞自噬及其相关机制 [J]. *外科理论与实践*, 2012, 17(6):649-653.
- [7] MIAO Q, BI L L, LI X, et al. Anticancer effects of bufalin on human hepatocellular carcinoma HepG2 cells: roles of apoptosis and autophagy [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(1):1370-1382.
- [8] 师婷, 许瑞龄. Beclin-1 在 LPS/GalN 诱导的肝损伤中的表达及意义 [J]. *临床医药实践*, 2013, 22(7):521-524.
- [9] NI H M, Jaeschke H, DING W X. Targeting autophagy for drug-induced hepatotoxicity [J]. *Autophagy*, 2012, 8(4):709-710.
- [10] CHANG Y, YANG J M. Autophagy and apoptosis: rivals or mates? [J]. *Chin J Cancer*, 2013, 32(3):103-105.
- [11] 刘泽洲, 许可嘉, 张天娇, 等. 雷公藤甲素诱导小鼠急性肝损伤的形态学研究 [J]. *现代生物医学进展*, 2015, 15(17):3207-3211.
- [12] WANG C, CHEN K, XIA Y, et al. *N*-acetylcysteine attenuates ischemia-reperfusion-induced apoptosis and autophagy in mouse liver via regulation of the ROS/JNK/Bcl-2 pathway [J]. *PLoS One*, 2014, 9(9):e108855.
- [13] 姚金成, 刘颖, 胡领, 等. 雷公藤甲素诱导肝细胞 L-02 凋亡的机制 [J]. *中国新药杂志*, 2013, 22(6):698-703.
- [14] 于洋, 徐冶, 刘师兵, 等. 过氧化氢通过内质网应激信号通路对 Hela 细胞自噬和凋亡的诱导作用 [J]. *吉林大学学报:医学版*, 2015, 41(3):437-441.

[责任编辑 周冰冰]