

雷公藤甲素对 C6 胶质瘤细胞增殖凋亡作用及 对 Bcl-2, Bax 表达的影响

蔡风景*, 陈祥荣, 徐朝阳, 陈峻严

(福建医科大学附属第二医院神经外科, 福建 泉州 362000)

[摘要] **目的:**探讨雷公藤甲素对大鼠 C6 胶质瘤细胞的增殖诱导作用及其相关机制。**方法:**将大鼠 C6 胶质瘤细胞培养于含 10% (FBS), 100 mg·L⁻¹青霉素链霉素的 DMEM 培养液中, 置 37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养, 采用四甲基偶氮唑盐比色 (MTT) 法检测雷公藤甲素对大鼠 C6 胶质瘤细胞的抑制作用, 流式细胞仪 (FCM) 检测 C6 胶质瘤细胞凋亡情况, 用逆转录-聚合酶链反应 (Real Time - Polymerase Chain Reaction, RT-PCR), 免疫印迹法 (Western blotting, WB) 检测细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2), Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) mRNA 及蛋白的表达变化情况。**结果:**1.2 mg·L⁻¹浓度的雷公藤甲素溶液对 C6 胶质瘤细胞增殖有抑制作用, 且呈明显的剂量依赖性; 雷公藤甲素作用 C6 胶质瘤细胞 24 h 后, 1.2 mg·L⁻¹浓度对其凋亡诱导作用最为明显; 雷公藤甲素可明显下调细胞中 Bcl-2 mRNA 及蛋白质表达, 且该作用呈剂量-时间依赖性, 而 Bax mRNA 及蛋白质表达呈上调趋势。**结论:**雷公藤甲素对 C6 胶质瘤细胞具有较好的生长抑制和凋亡诱导作用, 而其作用机制可能与 Bcl-2, Bax mRNA 及蛋白质表达有关。

[关键词] 雷公藤甲素; C6 胶质瘤细胞; 增殖; 凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)11-0246-04

[doi] 10.11653/syfy2013110246

Triptolide Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis of C6 Glioma Cells by Regulating the Expressions of Bcl-2 and Bax

CAI Feng-jing*, CHEN Xiang-rong, XU Zhao-yang, CHEN Jun-yan

(Department of Neurosurgery, the Second Affiliated Hospital,
Medical University of Fujian, Quanzhou 362000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of triptolide (TPL) on proliferation and apoptosis of C6 cells. **Method:** C6 cells was cultured with different concentrations of TPL for different hours. MTT assay was employed to evaluate the survival of TPL-treated C6 cells. The induction of apoptosis was detected by flow cytometry analysis (FCM). The expressions of B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2) and Bcl-2 associated x protein (Bax) mRNA were detected by Real Time - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR), while the protein by Western blotting (WB) methods. **Result:** Our results showed that TPL induced apoptotic cell death in a dose- and time-dependent manner, which was accompanied by the regulation of Bcl-2 and Bax expressions. **Conclusion:** The results indicated that TPL induce the apoptosis and inhibit the proliferation of C6 glioma cells by regulating the expressions of Bcl-2 and Bax.

[Key words] triptolide; C6 glioma cells; proliferation; apoptosis

胶质瘤是最常见的颅内原发性肿瘤, 发生于神

经外皮层, 据统计其发病率占脑肿瘤总数的 50% ~ 55%, 目前多采用手术治疗、放射及化学治疗或综合治疗, 但由于胶质瘤复杂的生物学特性, 使得治疗效果差, 死亡率高。近年来, 国内外研究者不断致力于开发疗效好但副作用少的抗胶质瘤药物, 特别是对中药或中药提取活性单成分的研究逐渐增多。

[收稿日期] 20130118(001)

[通讯作者] * 蔡风景, 主治医师, 主要从事胶质瘤基础和脑外伤综合治疗, Tel: 15211372623, E-mail: caifengjing10@126.com

雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f 系卫矛科雷公藤属木质藤本植物,化学成分复杂,其中二萜内酯为主要活性成分,雷公藤甲素 (triptolide, TPL) 则为最典型的环氧二萜单体成分。现代药理研究表明, TPL 不仅有抗类风湿性关节炎^[1]作用,还有抗癌^[2-5]、治疗糖尿病肾病^[6]、治疗足细胞损伤诱导的肾病综合征^[7]、治疗肺炎^[8]、治疗脊髓损伤^[9]、治疗帕金森病^[10]、治疗溃疡性结肠炎^[11]、治疗免疫性肠病^[1]、治疗人骨髓增殖性疾病^[12]等广泛的药理作用,其中尤以抗癌活性最为突出和广泛。国内外研究人员发现其对星形胶质瘤细胞等多种肿瘤细胞具有抑制作用^[13-14]。而其抗肿瘤机制主要与抑制肿瘤细胞增殖、影响离子通道作用及多种信号通路,诱导细胞凋亡,抑制血管生成等^[15]有关。本文研究雷公藤甲素对 C6 胶质瘤细胞体外增殖抑制、诱导凋亡作用及其相关作用机制,为开发疗效确切、副作用少的抗肿瘤药物提供理论依据。

1 材料

1.1 细胞株 大鼠胶质瘤细胞系 C6, 购自中科院上海生物细胞所。

1.2 药物与试剂 雷公藤甲素(购于中科院上海药物研究所,纯度 >97%, 批号 1567-200502), 二甲亚砜(批号 1572C502), RPMI-1640(批号, 1228161), DMEM(批号 11965092), 均为 GBICO 公司产品, 胎牛血清(GBICO, 批号 1237841), Bcl-2(美国, CST, 货号 2772), Bax 单克隆抗体(美国, CST, 货号 2876)。

1.3 仪器 酶联免疫检测仪(美国, Bio-Rad, Model 680), PCR 仪(美国, Bio-Rad, Mastercycler)、蛋白电泳仪(美国, Bio-Rad, Traus-Blot RSD Cell)、凝胶成像分析系统(美国, ALPHA, Fluorchem SP), 流式细胞仪(美国, BD, FACS Calibur)。

2 方法

2.1 细胞培养 将大鼠 C6 胶质瘤细胞培养于含 10% FBS, $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 青霉素链霉素的 DMEM 培养液中, 置 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱中培养。实验前两周无药培养。取对数生长期的细胞进行试验。

2.2 细胞增殖抑制实验(MTT 法) 取对数生长期的 C6 大鼠胶质瘤细胞以 $5 \times 10^3/\text{mL}$ 密度接种于 96 孔培养板中, 培养 24 h 使细胞完全贴壁。实验孔分别加入 0.2, 0.4, 0.6, 1.2, 2.4, 4.8 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的雷公藤甲素, 每孔设 5 个复孔, 分别培养 12, 24, 48 h 后, 每孔加入 20 μL MTT 溶液(用 PBS 配成 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 继续培养 4 h 后终止培养, 弃培养上清液。每孔加入

150 μL DMSO, 振荡 10 min, 酶联免疫检测仪于 490 nm 波长处测定各孔吸光度(A)。实验重复 3 次, 根据公式: 抑制率 = (对照组 A - 实验组 A / 对照组 A - 空白组 A) $\times 100\%$, 计算出雷公藤甲素在不同时间点、不同浓度对 C6 胶质瘤细胞的生长抑制作用, 从而绘制不同浓度的雷公藤甲素作用细胞的细胞生长曲线, 观察其对细胞增殖抑制效果。其中雷公藤甲素 $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 为对照组。

2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡 取对数生长期的 C6 大鼠胶质瘤细胞以 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 密度接种, 培养 24 h 后, 分别加入 0.2, 0.4, 0.6, 1.2, 2.4, 4.8 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的雷公藤甲素共同孵育 24 h 后, 收集各组细胞, 用 PBS 洗涤细胞 2 次, 弃上清, 70% 冷乙醇充分摇匀, 固定 1 h。离心弃固定液, PBS 洗 2 次, 400 目筛网过滤, 离心弃去 PBS。加 1 mL 碘化丙啶 (PI) 染液, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光 30 min, 于流式细胞仪上进行荧光检测。

2.4 RT-PCR

2.4.1 总 RNA 抽提方法 细胞转染 48 h 后弃培养基, PBS (DEPC 水处理) 洗涤, 向培养皿中加入 1 mL Trizol, 吹打数次, 将细胞悬液转移到 1.5 mL EP 管中, 室温静置 15 min; 加入 0.2 mL 氯仿, 用力振摇 15 s, 静置 2 min, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 取上清; 加入 0.5 mL 异丙醇, 摇匀, 室温静置 10 min, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min; 弃上清, 加入 1 mL 75% 乙醇后涡旋震荡, $7\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min; 弃上清, 重复 1 次; 所得 RNA 经紫外分光光度法定量, 并于 $-70 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.4.2 半定量 RT-PCR 检测 Bcl-2 及 Bax 基因表达

首先合成 cDNA 第一链, 然后在 PCR 扩增仪上进行逆转录反应合成 cDNA, 反应条件为 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 50 min; $70 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热 15 min 终止反应。最后, 将反应后得到的 cDNA 溶液用于 PCR 扩增。PCR 反应条件为: $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 min 预变性; $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 维持 10 min. 共 40 个循环, 最后 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保温, 所用引物及其序列: Bcl-2 基因的扩增片段长度为 459 个碱基, 正向引物: 5'-GGTGC-CACCTGTGGTCCACCTG-3', 反向引物: 5'-CT-TCACTTGTGGCCAGATAGG-3'; Bax 基因的扩增片段长度为 550 个碱基, 正向引物: 5' GTTA-CAGGGTTTCATCCAGG-3', 反向引物: 5' CGTGTC-CACGTCAGCAAT-3'; β -actin 基因的扩增片段长度为 700 个碱基, 正向引物: 5'-CAACTGGGACGATAT-GGAGAAG-3'; 反向引物: 5'-TCTCCTTCTGCATC-

CTGTCAG-3'。PCR 产物半定量分析:取各组 RT-PCR 扩增产物片段上样于 1.2% 琼脂糖凝胶 (含 EB0.05%) 梳孔内,加入 0.5 × TBE 电泳缓冲液,在 5V/cm 电压条件下电泳 30 min。取出凝胶于紫外灯下拍照,经紫外荧光摄像装置成像后用 Image J 软件扫描分析电泳条带灰度值,比较各组 Bcl-2 及 Bax 基因 mRNA 的表达量。

2.5 检测 Bcl-2, Bax 蛋白表达 采用蛋白提取试剂盒提取各组细胞总蛋白,并经 BCA 法定量。SDS-PAGE 凝胶电泳步骤如下:清洗玻璃板并固定于电泳槽上;配制分离胶和浓缩胶并灌胶。上样:分装好的各组细胞总蛋白与 5 × SDS 样品缓冲液充分混匀,短暂离心,于 100 °C 水浴锅中煮沸 5 min,迅速置于冰上。微量加样器将各组样品依次加入各加样孔中。电泳:调整电压为恒压 60 V,待样品跑至分离胶和浓缩胶的分界时将电压调为 100 V,当染料溴酚蓝的前沿迁移至凝胶的 2/3 时停止电泳。采用半干法将蛋白质从凝胶上转移到 PVDF 膜,经封闭、一抗孵育、二抗孵育后洗膜显影。

2.6 统计学处理 RT-PCR 和 Western blot 电泳凝胶于紫外灯下拍照,经紫外荧光摄像装置成像后用 Image J 软件扫描分析电泳条带灰度值,比较各组 Bcl-2, Bax 基因及蛋白的相对表达量。实验数据采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用方差齐性检验及单因素方差分析各组实验数据,比较不同浓度雷公藤甲素对 C6 胶质瘤细胞的影响。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 雷公藤甲素对 C6 胶质瘤细胞的增殖抑制作用 雷公藤甲素能有效抑制 C6 胶质瘤细胞的生长,并呈浓度、时间的依赖性。不同质量浓度的雷公藤甲素(0, 0.2, 0.4, 0.6, 1.2, 2.4, 4.8 mg · L⁻¹) 分别作用于 C6 细胞 12, 24, 48 h, 采用 MTT 法测得的吸光度(A), 计算不同浓度的雷公藤甲素在不同时间点的抑制率, 所得结果如图 1, 表 1。

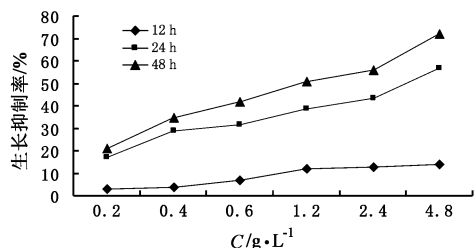


图 1 雷公藤甲素对 C6 胶质瘤细胞的生长抑制曲线

3.2 C6 细胞的凋亡情况 采用 PI 单染法, 利用流

表 1 不同浓度的雷公藤甲素对 C6 胶质瘤细胞作用 24 h 的生长抑制率和细胞凋亡率

组别	质量浓度 /mg · L ⁻¹	A	生长抑制率 /%	细胞凋亡率 /%
对照	-	1.069 ± 0.017	0	9.36 ± 0.48
TPL	0.2	0.976 ± 0.134 ¹⁾	17.1	16.32 ± 2.40 ¹⁾
	0.4	0.777 ± 0.546 ²⁾	29.1	26.27 ± 2.67 ¹⁾
	0.6	0.651 ± 0.096 ²⁾	31.9	38.52 ± 2.06 ¹⁾
	1.2	0.522 ± 0.042 ²⁾	38.8	49.03 ± 2.39 ¹⁾
	2.4	0.487 ± 0.091 ²⁾	43.7	58.43 ± 0.92 ¹⁾
	4.8	0.377 ± 0.068 ²⁾	56.8	69.51 ± 3.25 ¹⁾

注:与对照组相比¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

式细胞仪检测技术,检测对数期 C6 细胞凋亡率的变化。C6 胶质瘤细胞未经雷公藤甲素处理时细胞自然凋亡率很低,而经不同浓度的雷公藤甲素处理 24 h 后凋亡率呈上升趋势,并呈浓度依赖性,见表 1。

3.3 Bcl-2, Bax mRNA 表达 结果显示, C6 胶质瘤细胞经不同浓度雷公藤甲素处理 24 h 后, 抗凋亡基因 Bcl-2 表达呈显著下调趋势, 而促凋亡基因 Bax 表达呈明显上调, 两者均呈浓度依赖性。与对照组比较, 具有显著性差异 ($P < 0.05$)。见图 2。

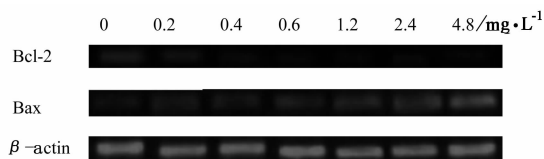


图 2 不同浓度雷公藤甲素对 C6 细胞 Bcl-2, Bax 基因表达的影响

3.4 Bcl-2, Bax 蛋白表达 结果显示, 雷公藤甲素作用 C6 胶质瘤细胞 24 h 后, Bcl-2 蛋白表达显著下调, 而 Bax 蛋白表达明显上升。与对照组比较, 具有显著性差异 ($P < 0.01$)。两者均呈浓度依赖性, 与 RT-PCR 的结果一致 (图 3)。

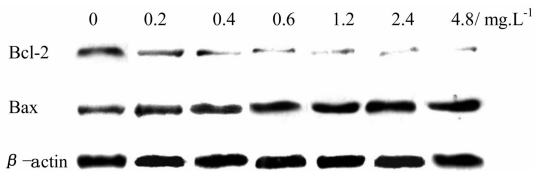


图 3 不同浓度的雷公藤甲素对 C6 细胞 Bcl-2, Bax 蛋白表达的影响

4 讨论

大量基础研究已证实雷公藤甲素对体外多种肿瘤细胞具有较强的抑制能力^[2-9], 但其抗肿瘤作用机制尚未得到充分阐明, 应用范围尚不明确。本研究以此为切入点, 在细胞水平和分子水平上阐述了雷公藤甲素抑制 C6 胶质瘤细胞增殖, 诱导其凋亡

的作用机制。

通过 MTT 法研究不同药物浓度的雷公藤甲素在不同作用时间下对 C6 胶质瘤细胞的增殖抑制作用。本实验根据一些文献报道^[16]选择了 6 个不同的药物浓度分别作用 C6 细胞 12 h, 24 h 和 48 h, 计算出抑制率, 根据抑制率绘出雷公藤甲素对 C6 细胞的生长抑制曲线, 且数据间差异显著, 具有明显的统计学意义, 充分的证明了不同浓度的雷公藤甲素作用对 C6 胶质瘤细胞生长产生明显抑制作用, 并呈浓度、时间的依赖性。FCM 还发现雷公藤甲素能够有效诱导 C6 胶质瘤细胞凋亡。

Bcl-2 基因是一种原癌基因, 它具有抑制凋亡的作用, 并用近年来的一些研究已开始揭示这一作用的机制。目前已经发现的 Bcl-2 蛋白家族按功能可分为两类, 一类是象 Bcl-2 一样具有抑制凋亡作用, 如哺乳动物的 Bcl-XL, Bcl-W, Mcl-1, A1, 线虫 Ced-9, 牛痘病毒 E1B119kD 等, 而另一类具有促进凋亡作用, 如 Bax, Bcl-Xs, Bax, Bak, Bik/Nbk, Bid 和 Harakiri。目前 Bcl-2 是凋亡分子机制研究的主要靶分子。Bcl-2 基因家族及其相关蛋白 Bcl-2 是研究最早的与凋亡有关的基因, 也是目前最受重视的调控细胞凋亡的基因家族。1997 年 Koshida 等利用免疫组织化学和临床病理学方法研究胃癌细胞的凋亡, 指出 Bcl-2 高表达, 凋亡指数低, Bcl-2 低表达或不表达, 则凋亡指数高; 而在 Bax 则情况相反, Bax 高表达时, 则凋亡指数高, Bax 低表达或不表达时凋亡指数低。

本研究采用不同浓度雷公藤甲素处理 C6 胶质瘤细胞 24 h, RT-PCR 和 Western Bolt 检测结果均显示, 雷公藤甲素在体外抗胶质瘤细胞是通过调控抗凋亡基因 Bcl-2 和促凋亡基因 Bax, 但是雷公藤甲素是如何调控这些基因及蛋白质表达还需进一步研究。

[参考文献]

[1] Wang Y, Jia L, Wu C Y. Triptolide inhibits the differentiation of Th17 cells and suppresses collagen-induced arthritis [J]. *Scand J Immunol*, 2008, 68 (4): 383.

[2] Chan E W, Cheng S C, Sin F W, et al. Triptolide induced cytotoxic effects on human promyelocytic leukemia, T cell lymphoma and human hepatocellular carcinoma cell lines [J]. *Toxicol Lett*, 2001, 122 (1): 81.

[3] Liu J, Jiang Z, Liu L, et al. Triptolide induces adverse effect on reproductive parameters of female Sprague-

Dawley rats [J]. *Drug Chem Toxicol*, 2011, 34(1): 1.

[4] Li H, Takai N, Yuge A, et al. Novel target genes responsive to the anti-growth activity of triptolide in endometrial and ovarian cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2010, 297(2): 198.

[5] Zhao F, Chen Y, Zeng L, et al. Role of triptolide in cell proliferation, cell cycle arrest, apoptosis and histone methylation in multiple myeloma U266 cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 646(1/3): 1.

[6] Gao Q, Shen W, Qin W, et al. Treatment of db/db diabetic mice with triptolide: a novel therapy for diabetic nephropathy [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2010, 25 (11): 3539.

[7] Chen Z H, Qin W S, Zeng C H, et al. Triptolide reduces proteinuria in experimental membranous nephropathy and protects against C5b-9-induced podocyte injury *in vitro* [J]. *Kidney Int*, 2010, 77 (11): 974.

[8] Hoyle G W, Hoyle C I, Chen J, et al. Identification of triptolide, a natural diterpenoid compound, as an inhibitor of lung inflammation [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2010, 298(6): L830.

[9] Su Z, Yuan Y, Cao L, et al. Triptolide promotes spinal cord repair by inhibiting astrogliosis and inflammation [J]. *Glia*, 2010, 58(8): 901.

[10] Zhou H F, Liu X Y, Niu D B, et al. Triptolide protects dopaminergic neurons from inflammation-mediated damage induced by lipopolysaccharide intranigral injection [J]. *Neurobiol Dis*, 2005, 18(3): 441.

[11] Li Y, Yu C, Zhu W M, et al. Triptolide ameliorates IL-10-deficient mice colitis by mechanisms involving suppression of IL-6/STAT3 signaling pathway and down-regulation of IL-17 [J]. *Mol Immunol*, 2010, 47 (15): 2467.

[12] Chen Q, Lu Z, Jin Y, et al. Triptolide inhibits Jak2 transcription and induces apoptosis in human myeloproliferative disorder cells bearing Jak2V617F through caspase-3-mediated cleavage of Mcl-1 [J]. *Cancer Lett*, 2010, 291(2): 246.

[13] 刘璇, 朱兴族. 雷公藤甲素对 C6 星形胶质瘤细胞中一氧化氮诱导生成的影响 [J]. *中国免疫学杂志*, 1998, 6: 416.

[14] 董志华. 雷公藤甲素的抗肿瘤活性研究 [J]. *实用临床医药杂志*, 2011(15): 36.

[15] 周幽心, 黄煜伦, 许期年, 等. 雷公藤单体体外抑制胶质瘤细胞的实验研究 [J]. *癌症*, 2002, 21 (10): 1106.

[16] 刘良, 王战勇, 黄光照, 等. 雷公藤甲素亚慢性中毒对小鼠肾脏及睾丸的影响 [J]. *同济医科大学学报*, 2001, 30(3): 214.

[责任编辑 聂淑琴]