

雷公藤甲素对肝细胞增殖和凋亡的影响

马嘉^{1*}, 吴新安¹, 李蔚¹, 陈颖¹, 都兴东²

(1. 解放军第 105 医院, 合肥 230031; 2. 解放军第 97 医院, 江苏 徐州 221004)

[摘要] 目的:研究雷公藤甲素对人源性肝细胞(L-02 细胞)增殖和凋亡的影响,为临床应用雷公藤甲素治疗肝脏疾病,防治雷公藤甲素肝毒性的不良反应提供实验依据。方法:体外培养 L-02 细胞,用 10,30,50 nmol·L⁻¹的雷公藤甲素处理细胞 48 h 后,采用台盼蓝染色后细胞计数的方法和 BrdU 掺入后流式细胞仪检测的方法检测细胞的生长和增殖能力;PI 单染后流式细胞仪检测细胞周期中细胞分布的百分率;AV/PI 双染后流式细胞仪检测细胞的凋亡率;Western blot 检测细胞中 p21 和 p53 的蛋白表达含量。结果:与对照组相比,10,30,50 nmol·L⁻¹的雷公藤甲素处理组,细胞数目从(2.72 ± 1.14) × 10⁵ 个/mL 分别减少到(1.95 ± 0.38) × 10⁵, (1.44 ± 0.44) × 10⁵, (6.97 ± 0.47) × 10⁴ 个/mL;BrdU 阳性细胞数从(7.67 ± 0.51)% 分别减少到(5.67 ± 0.29)%, (4.05 ± 0.14)%, (2.51 ± 0.15)%;阻滞在 G₁ 期的细胞百分率从 65.39% 分别上调至 68.47%, 71.19%, 83.98%;细胞凋亡率从(20.54 ± 1.44)% 分别上调至(28.02 ± 0.93)%, (36.79 ± 0.49)%, (43.35 ± 1.12)%;p21 和 p53 的蛋白表达水平上调,呈量效性关系。结论:雷公藤甲素可以通过上调 p21 的表达,将细胞阻滞在 G₁ 期,抑制 L-02 细胞的生长和增殖;同时通过上调 p53 的表达诱导 L-02 细胞的凋亡。

[关键词] 雷公藤甲素;增殖;凋亡;小鼠单克隆抗 p21 抗体;小鼠单克隆抗 p53 抗体

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)24-0283-05

Effects of Triptolide on Proliferation and Apoptosis of Human Hepatocytes

MA Jia^{1*}, WU Xin-an¹, LI Wei¹, CHEN Ying¹, DU Xing-dong²

(1. PLA Hospital No. 105, Hefei 230031, China; 2. PLA Hospital No. 97, Xuzhou 221004, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of triptolide on proliferation and apoptosis of human hepatocytes (L-02 cells), providing experimental basis for the clinical application of triptolide in treatment of liver diseases and the prevention of its liver toxicity. **Method:** Culture L-02 cells *in vitro* and treat the L-02 cells with 10, 30, 50 nmol·L⁻¹ triptolide respectively for 48 h. Detect the cellular growth and proliferation using trypan blue staining and Brdu incorporation, detect cell cycle distribution using PI staining, detect the percentage of cellular apoptosis using AV/PI double staining, detect the expression levels of p21 and p53 using western blot analysis. **Result:** Compared with the control, after treated with 10, 30, 50 nmol·L⁻¹ triptolide, the cell number was reduced from (2.72 ± 1.14) × 10⁵ cells/mL to (1.95 ± 0.38) × 10⁵, (1.44 ± 0.44) × 10⁵, (6.97 ± 0.47) × 10⁴ cells/mL respectively; the percentage of Brdu positive cells was reduced from (7.67 ± 0.51)% to (5.67 ± 0.29)%, (4.05 ± 0.14)%, (2.51 ± 0.15)% respectively; the percentage of cells arrested in G₁ stage was increased from 65.39% to 68.47%, 71.19%, 83.98% respectively; the percentage of apoptotic cells was increased from (20.54 ± 1.44)% to (28.02 ± 0.93)%, (36.79 ± 0.49)%, (43.35 ± 1.12)% respectively; the expression level of p21 and p53 protein were both up-regulated, and showed a dose-effect relationship. **Conclusion:** Triptolide could inhibit L-02 cells proliferation through up-regulation of p21 expression thus arresting cells in G₁ stage, and induce cellular apoptosis through up-regulation of p53 expression in L-02 cells.

[Key words] triptolide; proliferation; apoptosis; p21; p53

[收稿日期] 20120730(008)

[基金项目] 安徽省自然科学基金项目(10040606Q59)

[通讯作者] *马嘉,副主任药师,副教授,从事药物利用研究与新药研发研究, Tel:0551-2836351, E-mail: sygood8002@163.com

雷公藤甲素又名雷公藤内酯醇 (triptolide), 是从卫矛科植物雷公藤中分离出的主要活性物质, 是环氧化二萜内酯化合物^[1-2], 具有抗炎、抗肿瘤及免疫抑制等作用, 可用于治疗类风湿性关节炎、强直性脊髓炎、癌症和系统性红斑狼疮等疾病^[3-5]。尽管雷公藤甲素的多种制剂已在临床上使用, 且药效显著^[6], 但其毒副作用不容忽视, 主要表现为对肾脏、心脏、肝脏和生殖系统的损伤^[7-9], 其中以肝毒性最为严重, 在很大程度上限制了雷公藤甲素的临床应用^[10]。已有报道称雷公藤甲素主要通过抑制细胞生长, 诱导细胞凋亡来发挥抗肿瘤, 免疫抑制等作用^[4, 11]。此外, 杨帆等^[12]报道肾小管上皮细胞凋亡是致大鼠急性肾损伤的组织学基础。可见雷公藤甲素的治疗作用和毒性作用很大程度上类似, 且在临床应用中治疗量和中毒量很接近, 安全范围小。因此探讨和研究雷公藤甲素治疗效果和毒副反应的共同作用基础十分有意义。L-02 细胞是正常人肝细胞, 是体外研究药物对人肝细胞作用及机制的良好细胞模型, 本研究通过设置梯度浓度的雷公藤甲素, 研究其对 L-02 细胞增殖和凋亡的影响, 为临床应用雷公藤甲素治疗肝脏疾病, 防治雷公藤甲素肝毒性的不良反应提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 药品 雷公藤甲素(中国药品生物制品检定所, 批号 111567-200502), 用少量二甲基亚砷将其溶解制成 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 母液, $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 储存, 使用前用新鲜培养液稀释至所需浓度。

1.2 试剂和仪器 DMEM 培养基、胎牛血清、胰酶消化液、 $100 \times$ 青链霉素均购自英国 GIBCO 公司。台盼蓝、BrdU (5-溴脱氧尿嘧啶核苷) 均购自美国 Sigma 公司。Annexin V-FITC, PI/RNase 染色液均购自美国 BD 公司。小鼠单克隆抗 p53 抗体, 小鼠单克隆抗 p21 抗体均购自美国 Santa Cruz 公司。其余如 BCA 测定蛋白浓度试剂盒, 蛋白裂解液 RIPA, 蛋白酶抑制剂 cocktail, HRP 标记的羊抗小鼠二抗, 化学发光显影剂 ECL 均为国产试剂。

BS224S 型精密电子天平(德国 Sartorius 公司), CX31 型正置显微镜(日本 Olympus 公司), Model3550 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司), PowerPac Basic Power Supply 型蛋白电泳仪(美国 Bio-Rad 公司), Mini-PROTEAN3 型垂直电泳槽(美国 Bio-Rad 公司), Mini Trans-Blot Cell 型转移电泳槽(美国 Bio-Rad 公司), U9908-HAR0 型扫描仪(瑞典 UMAX 公司), BD FACSCalibur 型流式细胞仪(美国 BD 公

司), IGO 150 CELLLIFE™ 通用型 CO_2 培养箱(美国 Thermo 公司), D-37520 型低温离心机(德国 Thermo 公司), 其余如摇床、匀浆器、制冰机、电磁炉等均为国产仪器。

1.3 L-02 细胞培养及药物处理 L-02 细胞购自上海研域化学试剂有限公司, 以每孔 5×10^4 个细胞种植于 6 孔板内, 先将 L-02 细胞用富含 10% 血清的培养基培养 24 h 后, 无血清培养过夜使得细胞同步化, 再根据对照组和实验组的设计^[13], 加入 $10, 30, 50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 梯度浓度的雷公藤甲素处理细胞 30 min, 然后加入 10% 血清刺激细胞生长 48 h。

1.4 台盼蓝染色后计数细胞 将经梯度浓度雷公藤甲素处理 48 h 后的 L-02 细胞收获, 行台盼蓝染色, 显微镜下计数存活细胞个数, 每组实验重复 5 次。

1.5 BrdU 掺入后流式检测细胞增殖 将经梯度浓度雷公藤甲素处理 48 h 后的 L-02 细胞中加入 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BrdU, 继续培养 1 h 后收获; 75% 冰乙醇固定过夜; PBS 洗涤后加入 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl, 室温 30 min; 加入 FITC 标记的一抗 BrdU, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min; 上机检测, 每组实验重复 5 次。

1.6 PI 单染后流式检测细胞周期分布 将经梯度浓度雷公藤甲素处理 48 h 后的 L-02 细胞收获, 75% 冰乙醇固定过夜; PBS 洗涤后加入 PI 染液, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min; 上机检测, 每组实验重复 5 次。

1.7 AV/PI 双染后流式检测细胞凋亡 将经梯度浓度雷公藤甲素处理 48 h 后的 L-02 细胞收获, PBS 洗涤后加入结合缓冲液, Annexin V-FITC, PI/RNase 染色液, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min; 上机检测, 每组实验重复 5 次。

1.8 Western blot 检测 将经梯度浓度雷公藤甲素处理 48 h 后的 L-02 细胞收获; PBS 洗涤后加入 $150 \mu\text{L}$ 预冷的裂解液超声裂解; $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $13\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min, 取上清; 以 BCA 法测定提取蛋白浓度。每个样本取 $150 \mu\text{g}$ 蛋白加入等体积 $5 \times$ SDS 上样缓冲液煮沸变性; 加入预制的 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离; 0.8 A , 24 V , 半干转膜 28 min 至硝酸纤维素膜; 将转膜蛋白的膜浸入含 5% 脱脂奶粉的 PBS, 室温封闭 1 h; 加入一抗(p21, p53 和 actin $1:1\ 000$ 稀释), $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; PBS 洗涤 10 min, 3 次后, 加入 HRP 标记的山羊抗兔或山羊抗小鼠二抗 ($1:1\ 000$ 稀释), 室温孵育 1 h; PBS 洗涤 10 min, 5 次后, 用 ECL 化学发光系统检测标本膜上的信号, X 线片记录实验结果, 每组实验重复 5 次。

1.9 统计分析 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 13.0

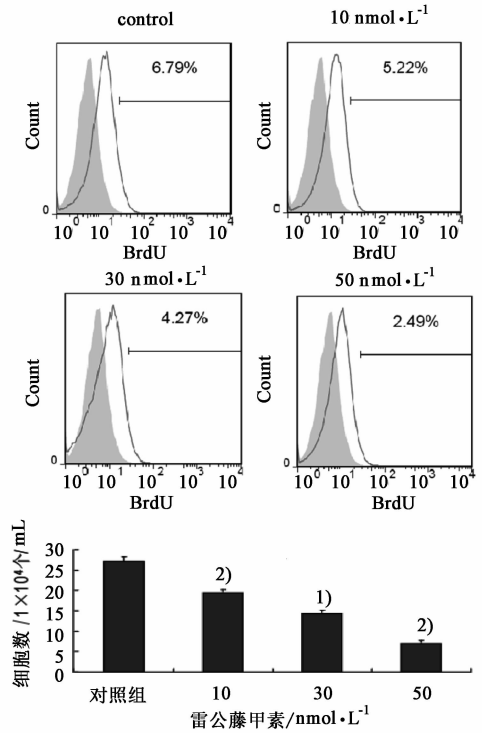
软件进行单因素方差分析和 t 检验, $P < 0.05$ 被认为有显著性差异。

2 结果

2.1 雷公藤甲素对 L-02 细胞生长的影响 将经梯度浓度处理的 L-02 细胞收获,台盼蓝染色后计数存活细胞个数,结果显示:与对照组相比,10,30,50 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的雷公藤甲素均能显著抑制 L-02 细胞的生长,且随着雷公藤甲素浓度的增加,细胞数目从 $(2.72 \pm 1.14) \times 10^5$ 个/mL 分别减少到 $(1.95 \pm 0.38) \times 10^5$, $(1.44 \pm 0.44) \times 10^5$, $(6.97 \pm 0.47) \times 10^4$ 个/mL,如图 1。

2.2 雷公藤甲素对 L-02 细胞增殖的影响 将经梯度浓度处理的 L-02 细胞收获,经 BrdU 标记后用流式细胞仪检测细胞增殖率。结果显示:与对照组相比,10,30,50 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的雷公藤甲素均能显著抑制 L-02 细胞的增殖,且随着雷公藤甲素浓度的增加, BrdU 阳性细胞百分率从 $(7.67 \pm 0.51)\%$ 分别减少到 $(5.67 \pm 0.29)\%$, $(4.05 \pm 0.14)\%$, $(2.51 \pm 0.15)\%$,如图 2。

2.3 雷公藤甲素对 L-02 细胞细胞周期分布的影响 将经梯度浓度处理的 L-02 细胞收获,经 PI 染色后用流式细胞仪检测增殖细胞的百分率。结果显示:与对照组相比,10,30,50 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的雷公藤甲素均能将 L-02 细胞阻滞在 G_1 期,且随着雷公藤甲素浓度的增加,细胞周期的阻滞作用增强,阻滞在 G_1 期的细胞率从 65.39% 分别上调至 68.47%, 71.19%, 83.98%,如图 3。



与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (图 2 ~ 3 同)

图 1 雷公藤甲素对 L-02 细胞生长的影响 ($\bar{x} \pm s$)

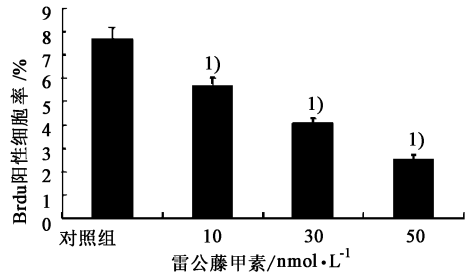


图 2 雷公藤甲素对 L-02 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

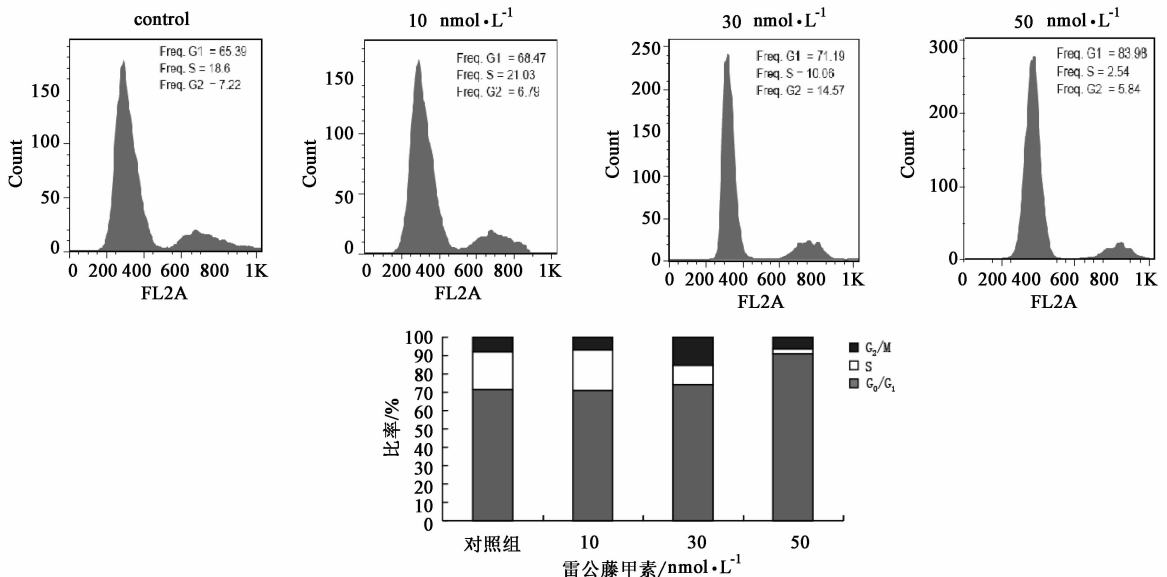


图 3 雷公藤甲素对 L-02 细胞细胞周期分布的影响

2.4 雷公藤甲素对 L-02 细胞凋亡的影响 将经梯度浓度的雷公藤甲素处理后的 L-02 细胞收获,经 AV/PI 双染后用流式细胞仪检测凋亡细胞的百分率。结果判定标准为:Annexin V-/PI-为正常细胞,Annexin V +/PI-为凋亡细胞,Annexin V +/PI+ 为坏死细胞,Annexin V-/PI+ 为细胞膜机械损伤的细胞。与对照组相比,10,30,50 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的雷公藤甲素均能诱导 L-02 细胞凋亡,且随着雷公藤甲素浓度的增加,凋亡细胞百分率增加,从 $(20.54 \pm 1.44)\%$ 分别上调至 $(28.02 \pm 0.93)\%$, $(36.79 \pm 0.49)\%$, $(43.35 \pm 1.12)\%$,如图 4。

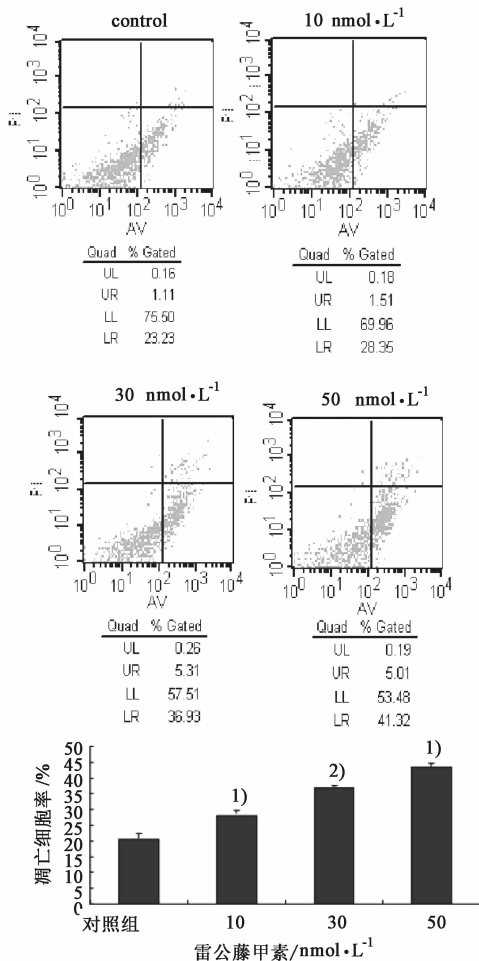


图 4 雷公藤甲素对 L-02 细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s$)

2.5 雷公藤甲素对 L-02 细胞中 p21 和 p53 蛋白表达的影响 将经梯度浓度的雷公藤甲素处理后的 L-02 细胞收获,提取蛋白后行 Western blot 检测。结果显示:与对照组相比,10,30,50 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的雷公藤甲素均能上调 p21 和 p53 蛋白的表达水平,且随着雷公藤甲素浓度的增加,p21 和 p53 蛋白表达水平的上调幅度也增加,如图 5。

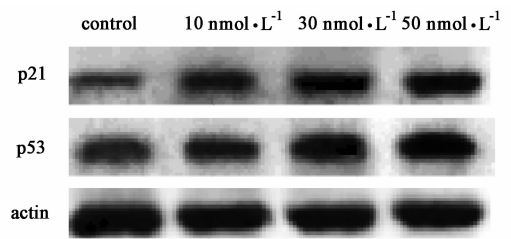


图 5 雷公藤甲素对 L-02 细胞中 p21 和 p53 蛋白表达的影响

3 讨论

在生理状态下,细胞的增殖和凋亡处于平衡状态,促进机体生长发育和代谢更新,维持机体内环境稳定,然而过度的或者受抑制的细胞增殖和凋亡都是病理性的表现。已有大量研究证实雷公藤甲素具有肝毒性,但基于人源性的正常肝细胞 L-02 细胞来研究雷公藤甲素治疗和毒性反应的共同作用基础尚未见报道。

细胞增殖和凋亡水平的改变往往与细胞周期调控的改变有关^[14]。细胞周期是细胞生命活动的基本过程,细胞在周期时相的变迁中进入增殖、分化、衰老和死亡等生理状态。正常细胞的细胞经过一定代数的倍增后将进入终末增殖状态,称为复制性衰老^[15-16]。然而在病理状态下,细胞增殖和凋亡会出现提前和推迟的现象,是诸如生长抑制,肿瘤,过度增生,成熟前衰老等疾病的发病基础。

细胞周期沿着 G_1 , S, G_2 , M 期的顺序有序地运转。 G_1 期是启动细胞周期循环的关键,参与细胞周期调控的主要分子有:细胞周期蛋白,细胞周期蛋白依赖性激酶和细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子^[17-18]。细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子,如 p15, p16, p18, p19, p21, p27, p53 等与细胞增殖和凋亡的关系一直以来是研究的热点,其中 p21 蛋白主要调控细胞从 G_1 到 S 期的进程, p53 蛋白主要与细胞的凋亡有关,发挥促进细胞凋亡的作用^[19-22]。细胞周期的运转状态是很多疾病的发病基础,也是许多药物发挥治疗作用的切入点。

雷公藤甲素在临床应用抗肿瘤、抗炎、抗生育、免疫抑制等疗效显著,同时其毒副作用也不容忽略,收益与风险并存。本研究通过用 10, 30, 50 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的雷公藤甲素处理 L-02 细胞,发现雷公藤甲素可以在纳摩尔的浓度基础上对 L-02 细胞产生显著作用,主要表现为抑制细胞生长和增殖,诱导细胞凋亡,且作用效果与雷公藤甲素的浓度呈剂量依赖性关系。流式细胞检测和 Western blot 实验的研究进一步揭示雷公藤甲素可以通过上调 p21 的表达,将 L-02 细胞阻滞在 G_1 期,抑制 L-02 细胞的增殖;同时

通过上调 p53 的表达,诱导 L-02 细胞的凋亡。雷公藤甲素对 L-02 细胞增殖和凋亡影响的研究揭示了雷公藤甲素对肝细胞的作用基础,为临床应用雷公藤甲素治疗肝脏相关疾病,防治其不良反应提供实验依据,为科学、安全、合理地使用此传统中草药中的有效成分提供了理论基础,具有指导和借鉴的意义。

[参考文献]

- [1] 张凡,李援朝. 雷公藤内酯醇的结构修饰研究进展[J]. 药学学报,2004,39(10):857.
- [2] 骆永伟,施畅,廖明阳. 雷公藤甲素抗肿瘤作用机制研究进展[J]. 中国中药杂志,2009,34(16):2024.
- [3] 陈江飞,胡毅坚,苗彩云. 雷公藤甲素药理作用的研究进展[J]. 中国医药工业杂志,2007,38(8):604.
- [4] Brinker A M, Ma J, Lipsky P, et al. Medicinal chemistry and pharmacology of genus *Tripterygium* (Celastraceae)[J]. *Phytochemistry*,2007,68(6):732.
- [5] 吴少辉,刘光明. 雷公藤内酯的提取、分析和药理作用研究进展[J]. 现代药物与临床,2011,26(1):36.
- [6] Tao X L, Cush J J, Garret M, et al. A phase I study of ethylacetate extract of the Chinese antirheumatic herb *Tripterygium wilfordii* Hook F in rheumatoid arthritis [J]. *J Rheumatol*,2001, 28(10):2160.
- [7] 刘明星,董静,杨亚江,等. 雷公藤甲素的研究进展[J]. 中国中药杂志,2005,30(3):170.
- [8] 邓文龙. 雷公藤中毒及毒副反应报告研究[J]. 中药药理与临床,2001, 17(3):42.
- [9] 朱建华,关伟,戴清保,等. 雷公藤甲素对大鼠脑皮质 Fas 蛋白表达的影响及时间节律性研究[J]. 皖南医学院学报,2009,28(3):171.
- [10] 薛璟,贾晓斌,谭晓斌,等. 雷公藤的肝毒性研究及 ADME/Tox 评价思路[J]. 中草药,2009,40(4):655.
- [11] 张纯,崔国惠,刘芳,等. 雷公藤内酯醇对人淋巴瘤细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中国临床康复,2006,47(10):107,114.
- [12] 杨帆,任亮,卓莹,等. 细胞凋亡在雷公藤甲素所致大

鼠急性肾损伤中的作用及其发生机制[J]. 中草药,2011,42(5):923.

- [13] Tao R, Lu L, Zhang R, et al. Triptolide inhibits rat vascular smooth muscle cell proliferation and cell cycle progression via attenuation of ERK1/2 and Rb phosphorylation [J]. *Exp Mol Pathol*, 2010, 90(2):137.
- [14] Pfeuty B. Strategic cell-cycle regulatory features that provide mammalian cells with tunable G₁ length and reversible G₁ arrest [J]. *PLoS One*, 2012, 7(4):e35291.
- [15] Faragher R, Kipling D. How might replicative senescence contribute to human ageing [J]. *Bioessays*, 1998, 20(12):985.
- [16] Kim W Y, Sharpless N E. The regulation of INK4/ARF in cancer and aging [J]. *Cell*,2006,127(2):265.
- [17] Marcotte R, Wang E. Replicative senescence revisited [J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2002, 57(7):B257.
- [16] Narita M, Nunez S, Heard E, et al. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence [J]. *Cell*,2003,113(6):703.
- [17] Pearson M, Carbone R, Sebastiani C, et al. Regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic ras [J]. *Nature*,2000,406(6792):207.
- [18] Alexander K, Hinds P W. Requirement for p27 (KIP1) in retinoblastoma protein-mediated senescence [J]. *Mol Cell Biol*,2001,21(11):3616.
- [19] Zheng Q H, Ma L W, Zhu W G, et al. p21Waf1/Cip1 plays a critical role in modulating senescence through changes of DNA methylation [J]. *J Cell Biochem*,2006, 98(5):1230.
- [20] Bringold F, Serrano M. Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence [J]. *Exp Gerontol*, 2000, 35(3):317.

[责任编辑 邹晓翠]