

雷公藤内酯醇对肝癌细胞株 HepG2 的影响及作用机制

王连青, 刘 剑, 钱文斌, 刘 燕

(浙江大学医学院附属第一医院, 浙江 杭州 310000)

摘 要: [目的] 探讨雷公藤内酯醇(TPL)对肝癌细胞株 HepG2 的增殖抑制和凋亡诱导作用及作用机制。[方法] MTT 法检测 TPL 对细胞增殖的影响, Hoechst 荧光染色观察凋亡细胞形态变化, AnnexinV/PI 流式细胞仪标记法检测 TPL 对 HepG2 细胞凋亡作用的影响, Western blot 检测 caspase-3、8、9 与 PARP 的表达情况。[结果] 经 MTT 检测, 10、20、40、80nmol/L 浓度 TPL 作用 24h 后 HepG2 细胞的抑制率分别为 15.2%、22.5%、34.9% 和 40.7%; 48h 后抑制率分别为 21.5%、34.8%、44.1% 和 44.8%; 72h 后抑制率分别为 31.6%、47.2%、51.6% 和 56.0%; 抑制作用呈时间和剂量的依赖性。10、20、40、80nmol/L 浓度的 TPL 作用 24h 的 HepG2 细胞, hoechst 荧光染色显微镜下均出现明显的凋亡细胞; AnnexinV/PI 流式细胞仪检测其凋亡率分别为 8.89%、9.81%、14.69% 和 22.04%, 对照组凋亡率为 7.35%; Western blot 结果显示, 其 caspase-3、9、PARP 蛋白活化显影, 且均较对照组显影增强, 显影强度随 TPL 浓度的增加而增强, 未见 caspase-8 活化显影。[结论] TPL 通过诱导 HepG2 凋亡发挥增殖抑制作用, 其机制可能与 caspase-3、9 活化有关, 即与线粒体通路相关, 与 caspase-8 即死亡受体通路无关。

主题词: 雷公藤内酯醇(TPL); 细胞凋亡; 肝肿瘤; HepG2

中图分类号: R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2013)12-0959-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2013.12.B011

The Effect and Mechanism of Triptolide on Human Liver Cancer Cell Line HepG2

WANG Lian-qing, LIU Jian, QIAN Wen-bin, et al.

(The First Affiliated Hospital of Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310000, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the proliferation and apoptosis effect of TPL on human liver cancer cell line HepG2 and its mechanism. [Methods] TPL was added into HepG2 cells with the concentration of 10, 20, 40, 80nmol/L as the TPL treated groups, and the culture medium alone was added as the control groups. The inhibitory rates in the HepG2 cells were assessed by MTT assay. In the HepG2 cells which had cultured for 24h, the morphological characters were observed by hoechst staining, and the apoptosis was determined by AnnexinV/PI flow cytometry. The expression of activated caspase 3, 8, 9 and PARP proteins was examined by Western blot. [Results] The inhibitory rates of HepG2 cultured for 24h with 10, 20, 40, 80nmol/L concentration were 15.2%, 22.5%, 34.9% and 40.7%; for 48h, 21.5%, 34.8%, 44.1% and 44.8%; for 72h, 31.6%, 47.2%, 51.6% and 56.0% respectively, in dose and time dependent manners. When the HepG2 cells treated by TPL cultured for 24h, typical apoptotic cells were observed via hoechst staining. The apoptosis rates of the HepG2 cells treated by TPL with 10, 20, 40, 80nmol/L concentration were 8.89%, 9.81%, 14.69% and 22.04% respectively. The expression of activated caspase-3, 9 and PARP proteins in the cells treated with TPL were higher than that of the control group, and the expression increased with the concentration of TPL. [Conclusion] TPL could inhibit the proliferation and induce the apoptosis of HepG2. The apoptosis mechanism of TPL on HepG2 cells might relate to the expression of activated caspase-3, 9 and PARP proteins and the mitochondrial pathway, might not relate with caspase-8 and the death receptor pathway.

Subject words: triptolide(TPL); apoptosis; liver neoplasms; HepG2

雷公藤内酯醇(triptolide, TPL), 又称雷公藤甲素, 是从卫矛科雷公藤属雷公藤、昆明山海棠、苍山

雷公藤、东北雷公藤等植物中分离的二萜内酯化合物, 是雷公藤的主要活性成分^[1]。TPL 的分子式是: $C_{20}H_{24}O_6$, 具有细胞毒样作用, 是治疗自身免疫性疾病^[2]的主要活性成分, 同时也是引起不良反应的主要成分。除了具有抗炎、免疫抑制、抑制细胞增殖、

通讯作者: 刘 剑, 主任医师, 博士; 浙江大学附属第一医院肿瘤外科, 浙江省杭州市庆春路 79 号(310000); E-mail: liujian888889@163.com

收稿日期: 2013-11-12; **修回日期:** 2013-12-03

杀菌、止痛等活性,其在体内外均有很强的抗肿瘤作用。但 TPL 抗肿瘤机制仍未十分明确,有待进一步研究^[1,3]。肝癌是常见的恶性肿瘤之一,多数诊断时已失去根治切除机会,而肝癌对化学药物治疗疗效差,是恶性肿瘤的第二致死原因。因此,寻找有效的药物,对于提高肝癌治疗效果有重要意义。TPL 治疗肝癌的研究较少,其作用机制不明。本研究探讨 TPL 对肝癌细胞株 HepG2 的增殖抑制和诱导凋亡作用,并检测其 caspase-3、8、9 和 PARP 蛋白表达的变化,探讨 TPL 抗 HepG2 细胞的作用机制。

1 材料与方 法

1.1 材 料

HepG2 细胞株由浙江大学医学院附属第一医院外科实验室提供,细胞培养在 37℃、5%CO₂ 细胞培养箱中,取对数生长期细胞进行实验。雷公藤内酯醇注射液购自杭州吉诺生物医药公司,纯度 99%,四甲基偶氮唑蓝 MTT 由 Sigma 公司提供,培养基、小牛血清、鼠抗人 caspase-3、8、9 单克隆抗体、鼠抗人 PARP 单克隆抗体由北京中杉金桥生物技术有限公司提供。

1.2 方 法

1.2.1 MTT 法测定雷公藤内酯醇对 HepG2 细胞的增殖抑制作用

肝癌细胞株 HepG2 贴壁生长于含 10%新生小牛血清的 RPMI-1640 培养液中,置于 37℃、含 5%CO₂、饱和湿度的培养箱内,细胞生长状态良好时用于实验,实验分为 5 组,按预计量加入含有不同药物浓度的新鲜培养液,使药物终浓度分别为 10、20、40、80nmol/L,以培养液代替 TPL 为空白对照组,继续培养。

实验过程如下:取对数生长期细胞,接种于 96 孔板上,每孔 200μl,调整细胞密度为 1×10⁵/ml,共同孵育已确定的培养时间(分别是 24、48、72h),实验终止前 4h 每孔加入四甲基偶氮唑蓝 20μl,培养结束时弃去培养液,每孔加入 DMSO 150μl,轻轻吹打混匀,显色后,以酶联免疫检测仪在 570nm 波长测吸光 OD 值,按下列公式计算抑制率:

抑制率 IR (%)=(1-实验组平均 OD 值/对照组平均 OD 值)×100%

1.2.2 Hoechst 荧光染色检测凋亡细胞形态

取对数生长期 HepG2 细胞,种入六孔板内,使约为 50%~80%满,10、20、40、80nmol/L 浓度的 TPL 作用 HepG2 24h,并设立空白对照组,固定、漂洗后予 Hoechst33342 染色液染色,清洗、抗荧光淬灭封片液封片,于荧光显微镜下检测蓝色的细胞核。

1.2.3 流式细胞术结合 FITC-AnnexinV/PI 染色检测凋亡

收集 10、20、40、80nmol/L 浓度的 TPL 作用 24h 后的 HepG2 细胞,设立空白对照组,计数约 1×10⁶/ml,收集各组细胞,固定过夜,沉淀细胞用 100μl 1mg/ml RNase A 悬浮,置 37℃ 30min,加入 PI/FITC-AnnexinV 混匀,置暗处 30min,用双变量流式细胞仪检测, FITC 为绿色荧光,PI 为红色荧光。正常活细胞为 FITC⁺/PI⁻,凋亡细胞为 FITC⁺/PI⁺,坏死细胞为 FITC⁺/PI⁺。

1.2.4 Western blot 检测 caspase-3、8、9 及 PARP 表达情况

收集不同浓度 TPL 作用 24h 后的 HepG2 细胞,同时设立对照组,提取蛋白定量,制备好的蛋白-20℃保存。上样,经 SDS-PAGE 电泳后,电转膜至醋酸纤维膜,浸于 TBST 中封闭,加入一抗(一抗 caspase-3、8、9 稀释 500 倍,一抗 PARP 稀释 400 倍),4℃反应过夜,加入二抗(HRP 标记的兔抗鼠 IgG),室温反应 2h,ECLA 液 1ml 和 ECLB 液 1ml 显色,压片,拍摄照片。

1.3 统计学处理

所有实验均重复 3 次,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,实验结果以 SPSS13.0 软件进行统计分析,两组间均值比较用独立样本 *t* 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MTT 法检测 TPL 对 HepG2 细胞增殖的抑制作用

空白对照组与 10、20、40、80nmol/L 浓度的 TPL 作用 24h 后 HepG2 的抑制率 (IR) 分别为 15.2%、22.5%、34.9% 和 40.7%;48h 后抑制率分别为 21.5%、34.8%、44.1% 和 44.8%;72h 后分别为 31.6%、47.2%、51.6% 和 56.0%,呈时间和剂量依赖性(Table 1, Figure 1)。

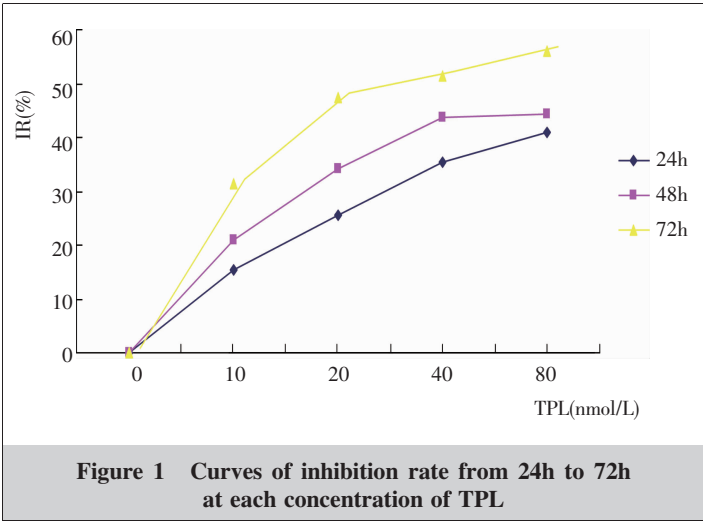
2.2 TPL 作用 HepG2 凋亡细胞形态变化

空白对照组的 HepG2 细胞表现为细胞核结构正常,着色均匀(Figure 2)。实验组(40nmol/L 浓度的

Table 1 OD value and inhibition rate of the HepG2 cells treated by different concentrations of TPL for 24,48 and 72h

Groups	24h			48h			72h		
	OD($\bar{x}\pm s$)	IR(%)	P [*]	OD($\bar{x}\pm s$)	IR(%)	P [*]	OD($\bar{x}\pm s$)	IR(%)	P [*]
Control	1.31±0.07			1.76±0.14			2.96±0.02		
TPL(10nmol/L)	1.11±0.11	15.2	0.003	1.39±0.04	21.5	0.000	2.02±0.06	31.6	0.040
TPL(20nmol/L)	1.02±0.10	22.5	0.004	1.15±0.03	34.8	0.001	1.56±0.01	47.2	0.003
TPL(40nmol/L)	0.86±0.14	34.9	0.001	0.99±0.01	44.1	0.003	1.43±0.05	51.6	0.002
TPL(80nmol/L)	0.78±0.13	40.7	0.000	0.97±0.01	44.8	0.002	1.30±0.06	56.0	0.000

*:Comparison between control group and experimental group.



TPL)作用 24h 后的 HepG2 显示,细胞核的染色质高度凝聚、边缘化,甚至细胞核裂解为碎块,产生凋亡小体(Figure 3)。

2.3 FITC-AnnexinV/PI 标记流式细胞仪测定细胞凋亡率

空白对照组和 10、20、40、80nmol/L TPL 作用 24h 后 HepG2 细胞的凋亡率分别为 7.35%±2.03%、8.89%±2.76%、9.81%±3.50%、14.69%±1.78%、22.04%±4.66%,

呈一定的上升趋势(Figure 4)。

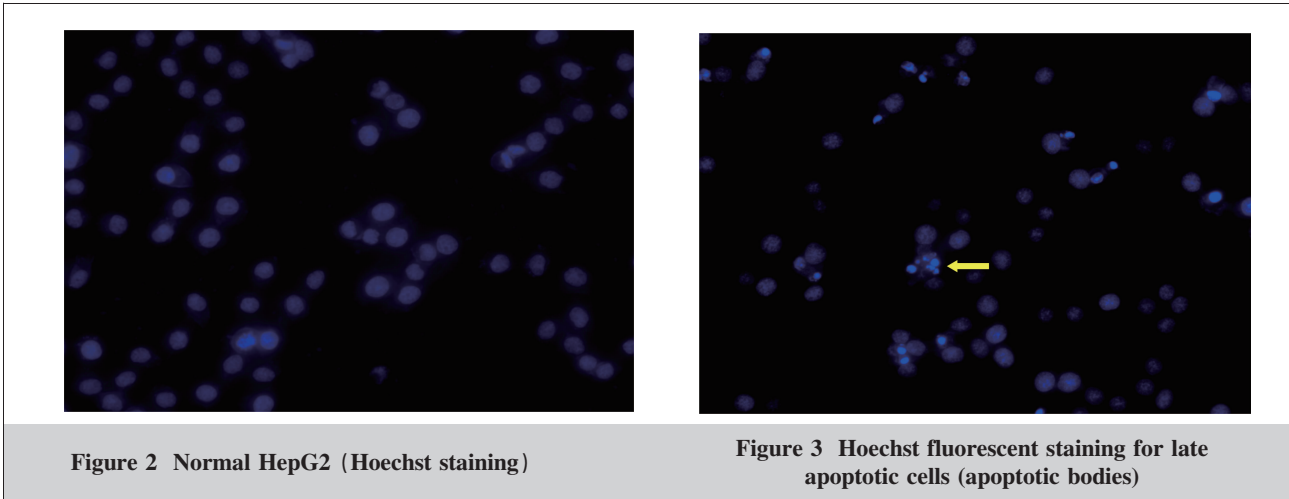
2.4 Western blot 检测 caspase-3、8、9 和 PARP 的表达

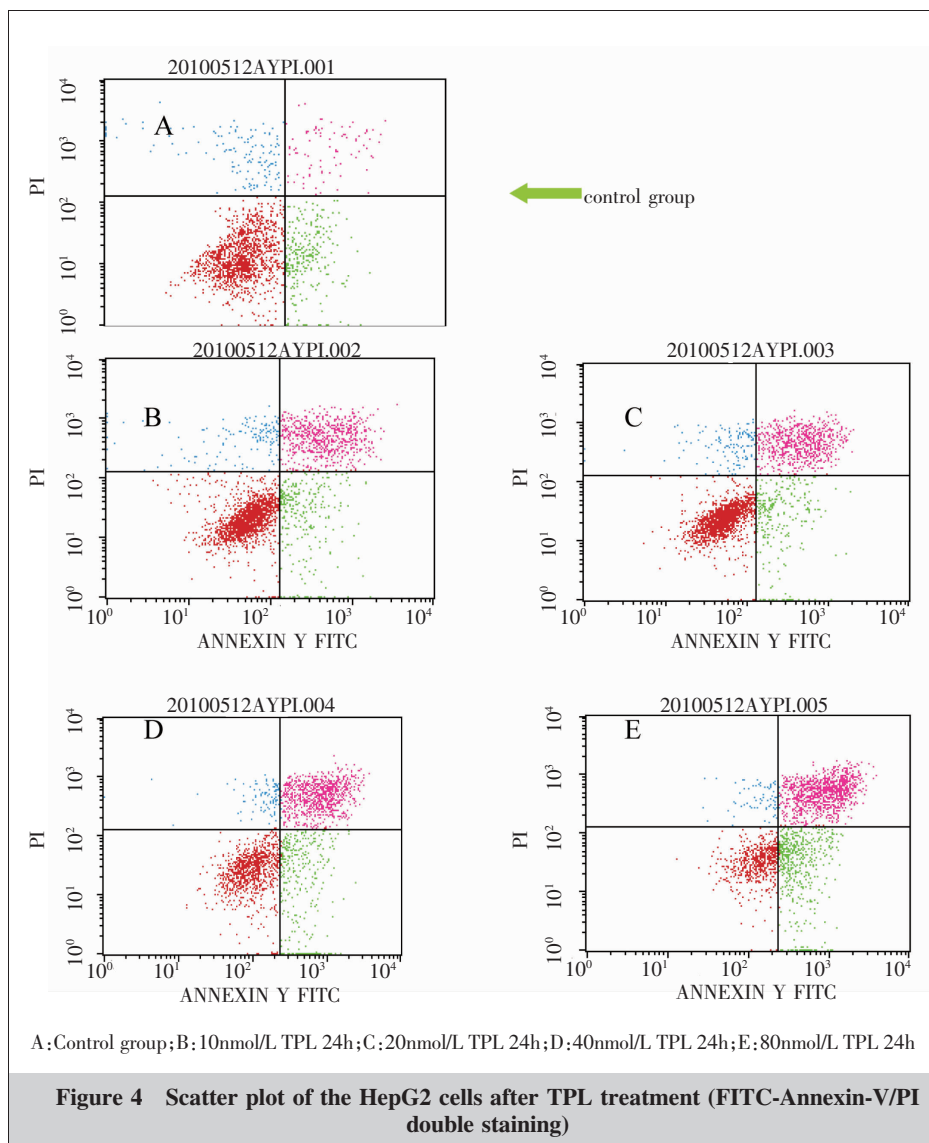
Western blot 结果显示,其 caspase-3、9、PARP 蛋白活化显影,且较空白对照组显影增强,显影强度随 TPL 浓度的增加而增强,未见 caspase-8 活化显影(Figure 5)。

3 讨论

近年来研究发现 TPL 具有广谱高效抗肿瘤作用的特点,在较低浓度即可抑制肿瘤细胞的体外增殖和集落形成,效果明显优于紫杉醇、阿霉素等,是有前途的抗肿瘤药物。崔国惠等^[4]发现雷公藤内酯醇以时间和剂量依赖方式抑制 Raji 细胞增殖,24h 半数抑制浓度为 25nmol/L,其抑制率呈现浓度依赖性。本研究结果表明 TPL 对 HepG2 的半数抑制浓度 IC₅₀ 为 38nmol/L(13.7ng/ml),说明较低浓度 TPL 就可以抑制 HepG2 细胞的增殖,其抑制作用呈浓度依赖性、时间依赖性。

TPL 可能通过多种机制发挥抗肿瘤的作用,目





前研究表明 TPL 抗肿瘤作用主要与诱导细胞凋亡有关。Ma 等^[5]观察了凋亡各期细胞的形态变化, Zhou 等^[6]发现, TPL 作用于胰腺癌细胞株, 细胞也出现凋亡形态学表现。我们采用 Hoechst 荧光染色的方法, 观察凋亡细胞形态的变化, 可以看到未经 TPL 作用的 HepG2 细胞染色均匀, 细胞核结构正常, 经 TPL 作用后, 凋亡细胞体积缩小, 早期凋亡细胞核呈波纹状或呈折缝样, 部分染色质出现浓缩状态; 晚期细胞核的染色质高度凝聚、边缘化, 甚至细胞核裂解为碎块, 产生凋亡小体, 还出现少量死亡裂解细胞。我们发现经 TPL 作用后肿瘤细胞发生了典型的凋亡变化, 提示 TPL 可以诱导 HepG2 细胞凋亡。通过 FITC-AnnexinV/PI 标记流式细胞仪检测不同浓度

TPL 作用 24h HepG2 细胞的凋亡率, 发现 TPL 作用的 HepG2 细胞发生了凋亡, 实验组与对照组相比有统计学差异 ($P < 0.05$), 凋亡率随 TPL 浓度的增加而提高。结果表明 TPL 对 HepG2 细胞的作用与诱导凋亡相关且凋亡发生呈浓度依赖性。

凋亡发生可以依赖与不依赖 caspase 系统。大多数已知的凋亡通路均需要 caspase 家族的参与。现已确定至少存在 14 种 caspase, caspase-2、8、9、10 参与细胞凋亡的起始; 参与执行细胞凋亡的则是 caspase-3、6、7。其中 caspase-3 通过降解底物 PARP、DFF-45、laminB, 导致 DNA 修复的抑制并启动 DNA 的降解。依据细胞凋亡发生过程中信号转导通路的不同, 将凋亡分为两类: 线粒体途径和死亡受体途径, 也分别被称为外在凋亡途径和内在凋亡途径。caspase-8

是死亡受体通路的关键蛋白酶, caspase-9 是线粒体通路的关键蛋白酶, 处于 caspase“瀑布式”激活的顶端, 它的活化对整个内源性凋亡通路的激活尤为重要。caspase-3 可以通过外在和内在两个信号通路激活, 通过以下途径使细胞凋亡: 它可以灭活凋亡的抑制物 (如 Bcl-2); 水解细胞的蛋白质结构, 导致细胞解体, 形成凋亡小体; 在凋亡级联反应中水解相关活性蛋白, 从而使该蛋白获得或丧失某种生物学功能。PARP (poly ADP-ribose polymerase, 聚 ADP 核糖聚合酶) 是一类存在于多数真核细胞中的蛋白质翻译后修饰酶, 具有保持染色体结构完整、参与 DNA 复制和转录的功能, 在维持基因稳定和细胞死亡过程中发挥着重要的作用。肺癌中 caspase-3、PARP 的表达情况

提示 caspase-3 的强阳性表达裂解了 PARP,从而启动了 PARP 的促凋亡作用,抑制了肺癌的恶性进展^[7]。

我们在研究中用 Western blot 检测不同浓度 TPL 作用 24h 的肝癌细胞株 HepG2 中观察到 caspase-3、9 和 PARP 被活化,蛋白表达随着浓度的增高逐渐增强,呈现浓度的依赖性,但未见 caspase-8 活化。结果表明 caspase-3、9 参与了 TPL 诱导的 HepG2 细胞凋亡,是通过线粒体通路,激活 caspase-3,裂解 PARP,引起凋亡级联反应,诱导细胞凋亡。Daniel 等^[8]研究 TPL 对胰腺癌细

胞株的作用时,认为 TPL 可以抑制细胞的生长,诱导细胞凋亡,并发现 caspase-3、9 的活化及 PARP 的裂解,其诱导凋亡的机制是通过线粒体通路实现的,而且认为线粒体通路是主要信号通路。我们实验得到的结果与 Daniel 等^[8]的报道相似,表明 TPL 诱导 HepG2 细胞凋亡的作用与 caspase-3、9 与 PARP 相关即通过线粒体通路诱导凋亡,而与 caspase-8 无关,即与死亡受体通路无关。

从我们的实验中可以看到,TPL 对肝癌细胞株 HepG2 有抑制增殖、诱导凋亡的作用,其诱导凋亡的机制与线粒体通路有关,与 caspase-8 无关即与死亡受体通路无关。

参考文献:

- [1] Zhang X,Chen YZ. The research progress of anti-tumor effect by triptolide[J]. Journal of Clinical Research,2008,6(4): 41-44.[张鑫,陈元仲.雷公藤内酯醇抗肿瘤作用研究进展[J].医学临床研究,2008,6(4):41-44.]
- [2] Han R,Yazdi R,Gerdes S,et al. Triptolide in the treatment of psoriasis and other immune-mediated inflammatory diseases[J].Br J Clin Pharmacol,2012,74(3):424-436.
- [3] Huang XW,Xu JH,Chen YZ. The tissue distribution in

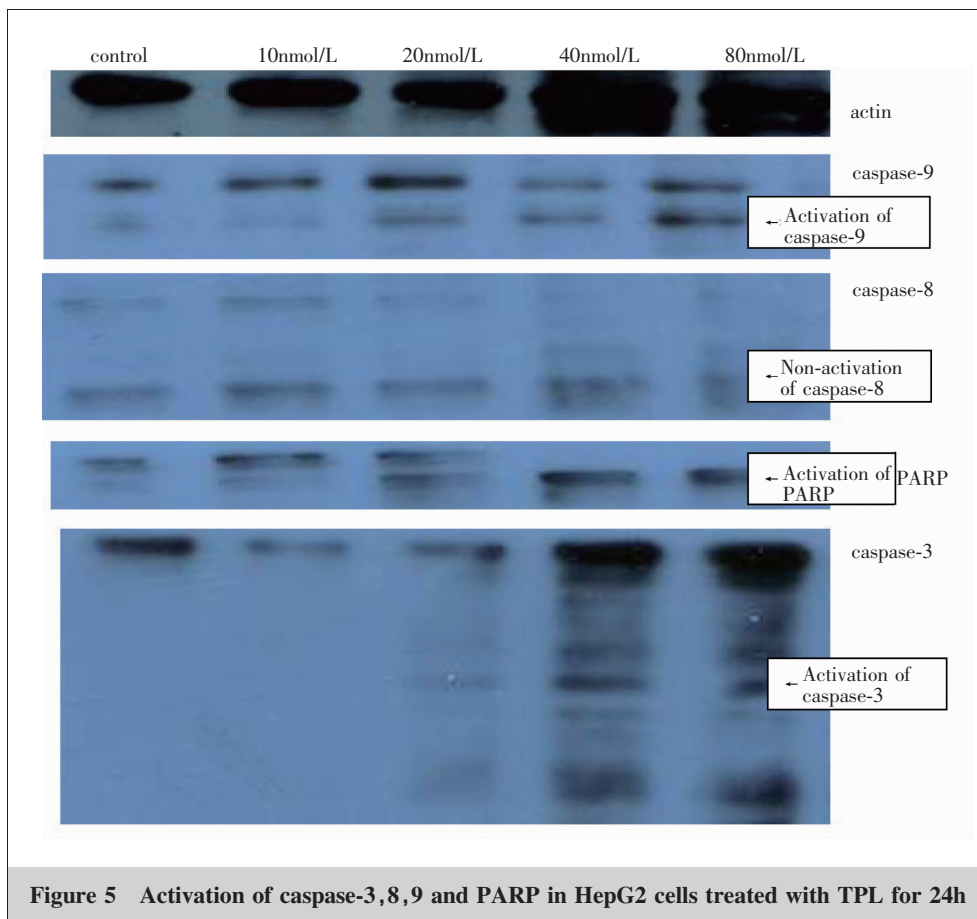


Figure 5 Activation of caspase-3,8,9 and PARP in HepG2 cells treated with TPL for 24h

rats of triptolide[J]. Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics,2008,13 (7):764-767.[黄秀旺,许建华,陈元仲.雷公藤内酯醇在大鼠体内的组织分布[J].中国临床药理学与治疗学,2008,13(7):764-767.]

- [4] Cui GH,Chen WH,Zhang C,et al. Effects of triptolide on the expression of VEGF in Raji cells and on angiogenesis in ECV304 cells[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research,2008,12(11):2039-2042. [崔国惠,陈卫华,张纯,等.淋巴瘤细胞系 Raji 细胞血管内皮细胞生长因子表达及基质胶中 ECV304 细胞血管形成与雷公藤内酯醇的干预[J].中国组织工程研究与临床康复,2008,12(11):2039-2042.]
- [5] Ma JX,Sun YL,Wang YQ,et al. Triptolide induces apoptosis and inhibits the growth and angiogenesis of human pancreatic cancer cells by downregulating COX-2 and VEGF[J].Oncol Res,2013,20(8):359-368.
- [6] Zhou GX,Ding XL,Huang JF,et al.Apoptosis of human pancreatic cancer cells induced by Triptolide[J]. World J Gastroenterol,2008,14(10): 1504-1509.
- [7] Song L,Xu ZJ,Huang CL,et al.The research of apoptosis mechanism induced by triptolide in lung cancer A549[J]. Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment,2008,15(16): 1227-1229.[宋岚,徐朝军,黄春林,等.雷公藤甲素诱导人肺腺癌 A549 细胞凋亡机制的研究[J].中华肿瘤防治杂志,2008,15(16):1227-1229.]
- [8] Daniel BC,Yumi Y,Chugh RK,et al. TRAIL and triptolide:an effective combination that induces apoptosis in pancreatic cancer cells[J]. World J Gastrointest Surg,2010,14(2):252-260.