

[文章编号] 1007-385X(2004)01-0036-03

雷公藤内酯醇对人宫颈癌细胞的凋亡诱导效应

刘秋燕¹, 吕占军¹, 何小波², 陈涛涌³, 李楠³, 于益芝³, 马鹏程⁴(1. 河北医科大学实验动物学部免疫学研究室, 石家庄 050017; 2. 浙江大学医学院免疫学研究所, 杭州 310031; 3. 第二军医大学免疫学研究所, 上海 200433; 4. 中国医学科学院皮肤病研究所, 南京 210042)

[摘要] 目的: 观察雷公藤内酯醇是否能抑制肿瘤细胞增殖, 并探讨其是否通过诱导肿瘤细胞凋亡发挥抗肿瘤作用。方法: 选择人宫颈癌细胞株 HeLa 为研究对象, 以 MTT 实验检测肿瘤细胞的增殖, 以 AnnexinV/PI 染色检测细胞的凋亡, R123 染色检测线粒体膜电势的变化。Hoechst 33258 荧光染色法观察细胞形态学改变, 琼脂糖凝胶电泳检测染色体 DNA 断裂。结果: 雷公藤内酯醇能明显抑制 HeLa 细胞的增殖; AnnexinV/PI 染色结果证明雷公藤内酯醇能诱导 HeLa 细胞凋亡, R123 染色结果说明雷公藤内酯醇诱导的细胞凋亡与线粒体膜电势的变化有关。雷公藤内酯醇处理的 HeLa 细胞可见凋亡特有的形态学及生物化学改变, DNA 电泳呈梯状条带。结论: 雷公藤内酯醇可以通过诱导肿瘤细胞凋亡而发挥抗肿瘤作用。

[关键词] 雷公藤内酯醇; 肿瘤细胞; 增殖; 凋亡

[中图分类号] R373.33 **[文献标识码]** A

Induction of Human Cervix Cancer Cell Apoptosis by Triptolide

LIU Qiu-yan¹, LI Zhan-jun¹, HE Xiao-bo², CHEN Tong-yong³, YU Yi-zhi³, LI Nan³, MA Peng-cheng⁴(1. Institute of Immunology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; 2. Institute of Immunology, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China; 3. Institute of Immunology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 4. The Institute of Dermatology, Chinese Academy of Medical Sciences, Nanjing 210042, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the proliferation inhibitory effect and the apoptosis-inducing activity of triptolide on HeLa cells. **Methods:** The effects of triptolide on cell proliferation were observed *in vitro* by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method. The morphological alterations were confirmed by Hoechst 33258 staining. The apoptosis was evaluated by flow cytometry analysis and agarose gel electrophoresis. **Results:** Triptolide exhibited a marked antiproliferative effect on HeLa cells. Triptolide induced apoptosis of the cultured cells in a time- and dose-dependent manner, as evidenced by an increased percentage of annexin V/PI positive cells. Correspondingly, we observed a decrease of R123 uptake in Triptolide-treated cells, indicative of a reduction in mitochondrial membrane potential. The morphological changes of apoptotic cells and ladder pattern of DNA were observed in triptolide-treated cells. **Conclusion:** Triptolide can inhibit the proliferation of HeLa cells by induction of cells apoptosis.

[Key words] triptolide; HeLa cells; proliferation; apoptosis

* 雷公藤内酯醇是从雷公藤(*Tripterygium wilfordii hook. f.*, TWHF)中提取出来的一种活性成分,已有多篇文献报道了其抗炎作用及免疫抑制的机制^[1-2]。近年来,有文献报道其具有抗肿瘤作用^[3-4]。宫颈癌是导致女性死亡的重要因素,雷公藤内酯醇是否抑制宫颈癌细胞的增殖,至今尚未见报道。本研究选择人宫颈癌细胞株 HeLa 为研究对象,观察雷公藤内酯醇是否能抑制 HeLa 细胞增殖,并探讨其作用是否与凋亡相关。

雷公藤内酯醇纯品由中国医学科学院皮肤病研究所(南京)提供。样品经高效液相层析分析,归一化法计算,其纯度大于 99%^[5]。雷公藤内酯醇粉剂用 DMSO 配制为 1 mg/ml 储备液,微孔滤膜(0.22 μm),-20℃保存,临用前用 RPMI-1640 稀释为 10 ng/ml 使用浓度,DMSO 的含量最大不超过 0.002%。RPMI-1640(GIBCO),新生牛血清(四季青生物工程材料有限公司,杭州),MTT(Sigma),Vybrant Apoptosis Assay Kit

1 材料与方 法

1.1 药品和试剂

[基金项目] 国家自然科学基金(30121002)

[作者简介] 刘秋燕(1969-),女,河北雄县人,博士研究生,主要从事细胞免疫和肿瘤免疫方面的研究

和 R123 购自 Molecular Probes(Eugene, Oregon, USA)。

1.3 细胞株

人宫颈癌细胞株 HeLa 购于中国科学院上海细胞所。于含 10% 小牛血清和双抗的 RPMI-1640 培养液中, 37℃, 5% CO₂ 常规培养。

1.4 MTT 试验

细胞用胰酶消化, 调整细胞数为 5×10^4 /ml, 接种 96 孔细胞培养板, 每孔 100 μ l, 重复 3 孔, 培养 24 h 后, 加入雷公藤内酯醇 0, 5, 10, 20 ng/ml, 继续培养 1, 3, 5 d, 每孔加入 5 mg/ml MTT 20 μ l, 继续培养 4 h 后, 吸去培养液, 每加入 DMSO 200 μ l, 在酶标仪上测定 570 nm 处的吸光度(A)值。

$$\text{抑制率(\%)} = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{处理}}}{A_{\text{对照}}} \times 100\%$$

1.5 DNA 凝胶电泳

细胞经 PBS 洗涤 2 次, 加入等体积的裂解缓冲液(0.32 mol/l 蔗糖, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.6, 5 mmol/L MgCl₂, 1% Triton X-100)充分混匀, 4℃ 离心, 沉淀用 3 ml 裂解缓冲液溶解。白色沉淀加 300 μ l 的 TES 悬浮, 加入 80 μ l 的 5 mmol/L NaClO₄ 和 10% SDS 100 μ l, 混匀, 37℃ 10 min 和 65℃ 15 min 处理后, 加入等体积的 PCI(酚: 氯仿: 异戊醇 = 25: 24: 1), 4℃ 离心, 取上层液, 加入 2 倍体积的无水乙醇过夜, 70% 乙醇洗涤 2 次, 吸干, 加适量 TE 溶解, 2% 凝胶电泳。

1.6 流式细胞仪检测

雷公藤内酯醇处理 HeLa 细胞 24 h, 胰酶消化细胞, 调整细胞为 1×10^5 /ml, 离心弃上清, 加入 AnnexinV/PI loading buffer 100 μ l, AnnexinV 5 μ l, PI (5 mg/ml) 1 μ l, 室温孵育 15 min, 流式细胞仪检测平均荧光强度。同样上述处理的细胞, 加入 R123, 37℃, 20 min, 流式细胞仪检测低标记峰。

1.7 Hoechst 33258 荧光染色

雷公藤内酯醇 10 ng/ml 处理 HeLa 细胞 72 h, 取细胞悬液 1 ml, 加入 10% Hoechst 33258 染液 10 μ l, 37℃ 避光 15 min, 制成细胞涂片, 荧光显微镜观察。

1.8 统计学分析

所有数据用 SPSS8.0 软件进行组间 *t* 检验。

2 结果

2.1 雷公藤内酯醇对 HeLa 细胞生长增殖的影响

不同浓度的雷公藤内酯醇处理 HeLa 细胞, 用 MTT 实验检测细胞的增殖情况(图 1)。实验表明雷公藤内酯醇能明显抑制 HeLa 细胞的增殖, 且有时间和剂量依赖性。

2.2 雷公藤内酯醇对 HeLa 细胞 DNA 的影响

雷公藤内酯醇 20 ng/ml 作用 48 h 后, HeLa 细胞 DNA 电泳出现凋亡条带(图 2)。

图 1 雷公藤内酯醇对 HeLa 细胞生长抑制的影响

Fig. 1 Inhibition of triptolide on the growth of HeLa cells

图 2 雷公藤内酯醇处理的 HeLa 细胞基因组 DNA 电泳图谱

Fig. 2 Gel electrophoresis of DNA from HeLa cell

2.3 雷公藤内酯醇对 HeLa 细胞形态学的影响

雷公藤内酯醇处理的 HeLa 细胞, 大部分出现核固缩、DNA 浓缩并向核膜靠拢, 核浆比例减小以及胞膜皱缩等早期凋亡形态学变化, 部分细胞因 DNA 断裂, 细胞核表现为块状或点状, 出现凋亡小体(图 3)。

2.4 雷公藤内酯醇对 HeLa 细胞凋亡及线粒体膜电势的影响

不同浓度的雷公藤内酯醇处理 HeLa 细胞 24 h, AnnexinV/PI 染色, 流式细胞仪分析细胞早期(AnnexinV)凋亡和晚期(PI)凋亡情况(图 4), 对照组 HeLa 细

胞的凋亡率为 4.0%,不同浓度的雷公藤内酯醇(1, 5, 10, 20 ng/ml)处理的 HeLa 细胞的凋亡率分别为 11.1%, 18.3%, 29.5%, 55.9%,呈剂量依赖性。

图 3 雷公藤内酯醇诱导 HeLa 细胞
凋亡的荧光显微图(×200)

Fig. 3 Fluorescence micrograph of triptolide-induced
apoptosis of HeLa cells

A: HeLa cells untreated with triptolide;
B: HeLa cells treated with triptolide

图 4 不同浓度的雷公藤内酯醇处理 HeLa 细胞
AnnexinV/PI 和 R123 染色结果

Fig. 4 Effect of different concentration of
trptolide on HeLa cell apoptosis

3 讨论

中药雷公藤的提取物,在中国用于抗炎及免疫抑制已有 2000 多年的历史,雷公藤内酯醇,是从雷公藤中提取出来的一种活性成分,主要用于类风湿性关节

炎、系统性红斑狼疮、抗移植排斥等疾病的治疗。近年来,有文献报道,雷公藤内酯醇(triptolide)能抑制 MCF-7, PC-3, B16F10 等细胞的增殖并诱导其凋亡。宫颈癌是导致女性死亡的重要因素,雷公藤内酯醇是否抑制宫颈癌细胞的增殖并诱导其凋亡,至今尚未见报道。本研究选择人宫颈癌细胞株 HeLa 为研究对象,观察到雷公藤内酯醇能显著抑制 HeLa 细胞增殖,并从形态学观察、流式细胞分析和 DNA 生化改变等不同角度均证实雷公藤内酯醇抑制宫颈癌细胞增殖作用中有诱导凋亡机制参与。

结果表明,雷公藤内酯醇在较低的作用浓度(5 ng/ml)就可以抑制宫颈癌细胞的增殖,对宫颈癌细胞的增殖作用呈剂量依赖性,随着药物浓度的增加,其抑制作用明显增强。在同一作用浓度下有具有时间依赖性,随着作用时间的延长,抑制作用亦明显增强。有文献报道^[6],雷公藤内酯醇能够诱导 T 淋巴细胞细胞凋亡,提示其临床应用应该尽可能的降低药物浓度增加用药时间。

p53 基因是迄今发现的与人类肿瘤相关性最密切的基因,它在调节基因的转录,诱导细胞凋亡,控制 DNA 的复制与修复以及维持基因组的稳定性等方面具有关键性的作用。有文献报道^[3,4],雷公藤内酯醇能够增加 p53 在细胞核内的累积,降低细胞周期抑制分子 p21, p27 和抗凋亡基因 bcl-2 的表达,激活 caspase 家族蛋白,从而诱导肿瘤细胞凋亡。雷公藤内酯醇通过何种机制诱导 HeLa 细胞凋亡,我们将作进一步的研究报道。

【参考文献】

- [1] Chan MA, Kohlmeier E, Branden M, *et al.* Triptolide is more effective in preventing T cell proliferation and interferon-gamma production than is FK506 [J]. *Phytother Res*, 1999, 13: 464-467.
- [2] Wang J, Xu R, Jin R, *et al.* Immunosuppressive activity of the Chinese medicinal plant *Tripterygium wilfordii*. I. Prolongation of rat cardiac and renal allograft survival by the PG27 extract and immunosuppressive synergy in combination therapy with cyclosporine [J]. *Transplantation*, 2000, 70: 447-455.
- [3] Shamon LA, Pezzuto JM, Graves JM, *et al.* Evaluation of the mutagenic, cytotoxic, and antitumor potential of triptolide, a highly oxygenated diterpene isolated from *Tripterygium wilfordii* [J]. *Cancer Lett*, 1997, 112: 113-117.
- [4] Lee KY, Chang W, Qiu D, *et al.* PG490 (triptolide) cooperates with tumor necrosis factor-alpha to induce apoptosis in tumor cells [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274: 13451-13455.
- [5] Mao YP, Cai JJ, Tao XL, *et al.* High-performance liquid chromatographic and determination of triptonide, triptolide and triptophenolide in ethyl acetate extract of *Tripterygium wilfordii* Hook f [J]. *J Liq Chromatogr Rel Technol*, 1998, 21: 2699-2714.
- [6] Yang Y, Liu Z, Tolosa E, Yang J, *et al.* Triptolide induces apoptotic death of T lymphocyte [J]. *Immunopharmacology*, 1998, 40: 139-149.