

雷公藤甲素诱导肝细胞L-02凋亡的作用机制研究^Δ

姚金成^{1*}, 刘颖¹, 胡领², 张陆勇^{3#}, 饶健¹, 曾令贵¹, 江振洲³, 何玲³(1. 湖南省药品审评认证与不良反应监测中心, 长沙 410013; 2. 中南大学湘雅二医院, 长沙 410011; 3. 中国药科大学国家新药筛选中心, 南京 210009)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)11-0964-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.11.02

摘要 目的: 研究雷公藤甲素诱导肝细胞L-02凋亡的作用机制。方法: 体外培养L-02细胞, MTT法检测雷公藤甲素对L-02细胞的毒性作用, Hoechst 33258染色观察凋亡细胞核形态的改变, 流式细胞仪检测细胞凋亡率, Western blot法检测人抗兔p53、Bcl-2、Bax与线粒体、胞浆中细胞色素C(Cyt-c)的表达。结果: 不同浓度雷公藤甲素(60、120、180 nmol/L)与同样浓度(120 nmol/L)不同作用时间(12、24、48 h)作用L-02细胞, 雷公藤甲素对细胞的抑制作用与浓度或时间呈正相关; Hoechst 33258染色可见细胞出现典型的凋亡细胞形态学改变; Western blot法显示120 nmol/L雷公藤甲素作用后, 细胞p53、Bax与胞浆中Cyt-c表达显著增强($P < 0.05$), 而Bcl-2与线粒体中Cyt-c表达显著减弱($P < 0.05$)。结论: 雷公藤甲素体外可诱导L-02细胞凋亡, 其作用机制可能与Bcl-2与线粒体中Cyt-c表达下调和p53、Bax与胞浆中Cyt-c表达上调有关。

关键词 雷公藤甲素; 人肝细胞L-02; 凋亡

Mechanism Research of Human L-02 Cells Apoptosis Induced with Triptolide

YAO Jin-cheng¹, LIU Ying¹, HU Ling², ZHANG Lu-yong³, RAO Jian¹, ZENG Ling-gui¹, JIANG Zhen-zhou³, HE Ling³(1. Hunan Center for Drug Evaluation and ADR Monitoring, Changsha 410013, China; 2. The Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, China; 3. National Center for Drug Screening, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the mechanism of triptolide-induced L-02 cells apoptosis. METHODS: L-02 cells were cultured in vitro. The inhibitory effect of triptolide on the proliferation of L-02 cells was evaluated using MTT assay. Hoechst 33258 fluorescent staining was used to observe themorphological changes of apoptotic cells. Flow cytometry was performed to determine the apoptotic rate. The protein expression of p53, Bcl-2, Bax, Cyt-c in mitochondria and cytosol were detected using Western blot analysis. RESULTS: L-02 cells are treated with different concentrations of triptolide (60, 120 and 180 nmol/L) and same concentration of triptolide for different times (12, 24 and 48 h). It showed that inhibition effect of triptolide on cell proliferation was positively correlated with the concentration of triptolide or the time. Hoechst 33258 staining revealed typical apoptotic morphological changes. Western blot analysis suggested that the contents of p53, Bax and cytosol Cyt-c enhanced significantly ($P < 0.05$), and Bcl-2 and the content of Cyt-c in mitochondria weakened significantly ($P < 0.05$) after treatment with triptolide 120 nmol/L. CONCLUSION: Triptolide probably may induce the apoptosis of L-02 cells by up-regulating proteins expression of Cyt-c in p53, Bax and cytosol and down-regulating proteins expression of Cyt-c in Bcl-2 and mitochondria.

KEY WORDS Triptolide; Human liver cell L-02; Apoptosis

研究, 2008, 19(7): 403.
[7] 汤瑞瑞, 卞鹰, 王一涛. 《中药品种保护条例》和专利对中药保护的关系探讨[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(5): 1 291.

^Δ 基金项目: 财政部行业科研专项资助课题(No.200707008); 湖南省科技厅科技计划项目(No.2009FJ3027).

* 副主任药师, 执业药师, 博士。研究方向: 分子药理、毒理及药品认证与不良反应监测。电话: 0731-88635907。E-mail: huyao68@163.com

通信作者: 研究员, 博士研究生导师。研究方向: 分子毒理学和药物筛选。电话: 025-83271500。E-mail: lyzhang@cpu.edu.cn

[8] 杨莉, 李野. 关于中药专利保护特殊规则的探讨[J]. 中国药房, 2006, 17(10): 728.

[9] 温明, 涂洪谊. 关于中药专利问题的几点思考[J]. 中国医药工业杂志, 2010, 41(7): 550.

[10] 杨显滨, 苏喆. 论中药单方专利的侵权认定[J]. 法学杂志, 2010(8): 136.

[11] 林芳花, 林励, 刘晓涵, 等. 中药专利申请的探讨[J]. 中国新药杂志, 2009, 18(10): 876.

(收稿日期: 2012-04-09 修回日期: 2012-08-16)

雷公藤是卫茅科植物,具有抗炎、抑制免疫的作用。临床上常用于治疗类风湿性关节炎、肾病综合征、支气管哮喘等,其作用机制尚不完全清楚。随着人们对其有效成分和相关药理作用的不断深入探索与临床应用的增加,它的毒副作用及其影响因素也更加受到关注。雷公藤的毒性来源于其复杂的化学成分与生理活性成分,毒性大小依次为二萜类、生物碱、三萜类与苷类^[1-2]。雷公藤甲素是雷公藤中主要的活性二萜类化合物,对心、肝、胃肠道与骨髓均有较强的损伤作用。本研究拟探讨雷公藤甲素抑制正常人肝细胞L-02增殖与诱导凋亡的作用,并通过检测细胞中人抗兔p53、B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)与线粒体、胞浆中细胞色素C(Cyt-c)含量的测定,初步探讨其诱导凋亡的作用机制。

1 材料

1.1 仪器

超净工作台(苏州艾可林净化设备有限公司);BB16型CO₂培养箱(德国Hearous公司);IX71型倒置荧光相差显微镜(日本Olympus公司);Safire2型微孔板测读仪(瑞士Tecan公司);核酸电泳仪(北京市六一仪器厂);BS210S型电子天平(德国Sartorius公司);Gel Doc 2000型凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司);BDFACS流式细胞仪(美国BD公司);Milli-Q自动纯水机(美国Millipore公司);-20℃冰箱(青岛海尔股份有限公司)。

1.2 药品与试剂

雷公藤甲素原料药购自中国医学科学院皮肤病研究所(纯度:>96%);RPMI-1640培养基、胎牛血清(美国Gibco BRL公司);MTT、二甲基亚砜(DMSO)、碘化吡啶(PI)、Hoechst 33258(美国Sigma-Aldrich公司);Western blot试剂盒、IP细胞裂解液、苯甲基磺酰氟(PMSF)、预染蛋白质分子量标准(江苏碧云天生物技术研究所);N,N,N',N'-四甲基乙二胺(TEMED)、Triton X-100、牛血清白蛋白(BSA)、多聚赖氨酸(南京生兴生物技术有限公司);p53、Bcl-2、Bax、Cyt-c、 β -actin抗体及辣根过氧化物酶标记羊抗兔Ig(美国Santa Cruz公司);硝酸纤维素膜(美国Pall公司);宽分子量预染Marker、SM1811(美国MRC公司);丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺(美国Roche公司);甘氨酸(电泳级,上海生工生物技术公司);过硫酸胺(AP,中国医药集团上海化学试剂公司);其余试剂为国产分析纯。

1.3 细胞株

正常人肝细胞L-02购自中国科学院上海细胞生物研究所,由湖南省药品审评认证与不良反应监测中心新药筛选中心实验室传代冻存。

2 方法

2.1 细胞培养

将正常人肝细胞L-02接种于含10%胎牛血清、100 U/ml青霉素、100 μ g/ml链霉素的1640培养基(pH 7.2~7.4)中,置37℃、5% CO₂培养箱中培养,每2~3天换液1次。

2.2 MTT法检测雷公藤甲素对L-02细胞的毒性作用

将雷公藤甲素溶于DMSO中,制备为0.5 mg/ml的储备液后过滤除菌,临用前用完全培养基稀释至所需质量浓度。

将处于对数生长期的L-02细胞以 5×10^4 /ml接种于96孔板,每孔180 μ l,细胞培养24 h贴壁后,分为溶剂对照与雷公藤甲素高、中、低浓度(180、120、60 nmol/L)组,置37℃、5% CO₂培养箱中培养24 h;或溶剂对照与雷公藤甲素(120 nmol/L)12、24、48 h组分别培养相应时间。将细胞置倒置显微镜下观

察细胞形态并拍照,加入5%的MTT 20 μ l,继续培养4 h,小心吸出培养液,加入200 μ l DMSO,充分振摇均匀后于510 nm波长处检测吸光度。

2.3 雷公藤甲素诱导L-02细胞凋亡时细胞核形态的改变

L-02细胞以 1×10^5 /ml接种于50 ml培养瓶中,置37℃、5% CO₂培养箱中培养24 h,换新鲜培养基,分为溶剂对照与雷公藤甲素(120 nmol/L)组。24 h孵育结束后以4%多聚甲醛溶液4℃下固定细胞10 min,离心弃固定液,用PBS溶液洗2次后再次离心,留50~100 μ l PBS溶液重悬细胞。取50~100 μ l细胞悬液涂片,自然晾干,滴加100 μ l Hoechst 33258工作液,室温染色10 min,三蒸水冲净晾干后直接在荧光显微镜下观察或封片后荧光显微镜下观察L-02细胞凋亡形态。Hoechst 33258用氩激光激发的紫外光,激发波长为352 nm,发射波长为400~500 nm,产生蓝色荧光。

2.4 PI单染测定雷公藤甲素诱导L-02细胞的凋亡

L-02细胞以 1×10^5 /ml接种于50 ml培养瓶中,置37℃、5% CO₂培养箱中培养24 h后,换新鲜培养基,细胞随机分为溶剂对照与雷公藤甲素高、中、低浓度(180、120、60 nmol/L)组,继续培养24 h;或溶剂对照与雷公藤甲素(120 nmol/L)12、24、48 h组,分别培养相应时间。各组收集L-02细胞(1×10^6 /ml),以1 ml PBS洗2次后1 000 r/min离心5 min,加入预冷的70%乙醇,4℃下固定2 h后,1 ml PI染液4℃避光染色20 min。

2.5 雷公藤甲素对L-02细胞中p53、Bcl-2、Bax与线粒体、胞浆中Cyt-c含量的影响

L-02细胞以 1×10^5 /ml接种于50 ml培养瓶中,置37℃、5% CO₂培养箱中培养24 h后,换新鲜培养基,细胞随机分为溶剂对照与雷公藤甲素(60、120、180 nmol/L)组,继续培养24 h,培养结束后收集细胞并以PBS溶液洗2次,4℃下1 000 r/min离心5 min,收集细胞。

将收集到的细胞裂解,抽提蛋白,并以Western blot法检测各组细胞p53、Bcl-2、Bax的表达量;或加入1~2.5 ml临用前添加了PMSF的线粒体分离试剂进行匀浆,4℃下600 r/min离心10 min后取上清,4℃下15 000 r/min离心30 min,分离得到细胞线粒体,将上一步骤中取得的上清继续于4℃下15 000 r/min离心10 min,所得上清即为胞浆,采用Western blot法测定细胞线粒体、胞浆中Cyt-c的含量。

3 结果

3.1 MTT法检测雷公藤甲素对L-02细胞的毒性作用

在培养时间均为24 h的情况下,与溶剂对照组比较,雷公藤甲素高、中浓度组L-02细胞活力显著减弱($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),且具有一定的浓度依赖性。在浓度均为120 nmol/L的情况下,与溶剂对照组比较,雷公藤甲素12、24、48 h组L-02细胞活力显著减弱($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),且具有一定的时间依赖性。由结果可见,120 nmol/L雷公藤甲素对L-02细胞毒性早在12 h就较明显,后续试验中选择120 nmol/L雷公藤甲素作为受试浓度开展研究。雷公藤甲素对L-02细胞活力的影响见图1。

3.2 雷公藤甲素诱导L-02细胞凋亡时细胞核形态的改变

溶剂对照组L-02细胞核内DNA分布相对均匀,核无固缩,故在视野中呈微弱蓝色;而经雷公藤甲素(120 nmol/L,24 h)培养后的部分细胞发生凋亡,凋亡细胞的细胞核呈致密浓染,或呈碎块状致密浓染。雷公藤甲素诱导L-02细胞凋亡时细胞核形态的改变见图2(Hoechst 33258染色)。

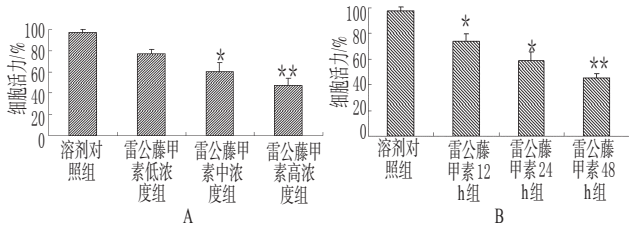


图1 雷公藤甲素对L-02细胞活力的影响

A. L-02 细胞与不同浓度雷公藤甲素(60、120、180 nmol/L)作用24 h;
B. L-02 细胞与120 nmol/L雷公藤甲素作用12、24、48 h
与溶剂对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Fig 1 Effects of triptolide on the activity of L-02 cells

A. L-02 cells treated with different concentrations of triptolide (60, 120, 180 nmol/L) for 24 h; B. L-02 cells treated with triptolide 120 nmol/L for 12, 24 and 48 h
vs. solvent control group: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

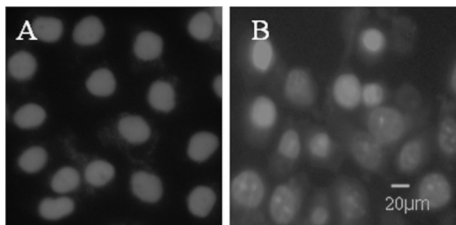


图2 雷公藤甲素诱导L-02细胞凋亡时细胞核形态的改变 (Hoechst 33258染色, 200×)

A. 溶剂对照组; B. 雷公藤甲素组

Fig 2 Morphology change of nucleus in the apoptosis of L-02 cells induced by triptolide (Hoechst 33258 staining, 200×)

A. solvent control group; B. triptolide group

3.3 PI单染测定雷公藤甲素诱导L-02细胞的凋亡

在培养时间均为24 h的情况下,与溶剂对照组比较,雷公藤甲素高、中浓度组L-02细胞凋亡率显著增加($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),且具有一定的浓度依赖性。在浓度均为120 nmol/L的情况下,与溶剂对照组比较,雷公藤甲素12、24、48 h组L-02细胞凋亡率显著增加($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),且具有一定的时间依赖性。雷公藤甲素诱导L-02细胞凋亡情况见图3。

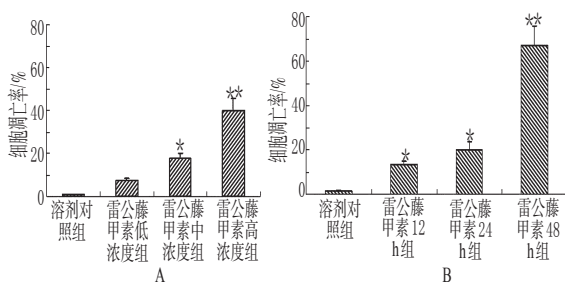


图3 雷公藤甲素诱导L-02细胞凋亡情况

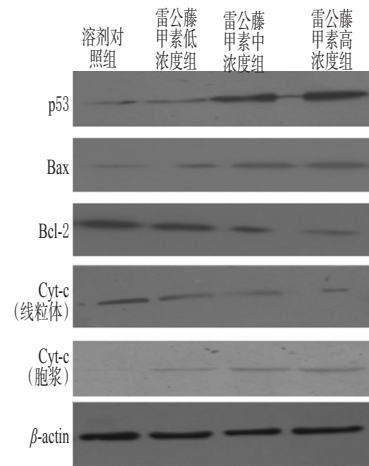
A. L-02 细胞与不同浓度雷公藤甲素(60、120、180 nmol/L)作用24 h;
B. L-02 细胞与120 nmol/L雷公藤甲素作用12、24、48 h
与溶剂对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Fig 3 Apoptosis of L-02 cells induced by triptolide

A. L-02 cells treated with different concentrations of triptolide (60, 120, 180 nmol/L) for 24 h; B. L-02 cells treated with triptolide 120 nmol/L for 12, 24 and 48 h
vs. solvent control group: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3.4 雷公藤甲素对L-02细胞中p53、Bcl-2、Bax与线粒体、胞浆中Cyt-c含量的影响

雷公藤甲素引起Cyt-c从线粒体到胞浆释放,上调p53、Bax表达,下调Bcl-2表达,且有一定的浓度依赖性,表明线粒体的相关信号通路可能参与了雷公藤甲素引起的L-02细胞毒性。L-02细胞p53、Bax、Bcl-2、Cyt-c蛋白的表达见图4。



A

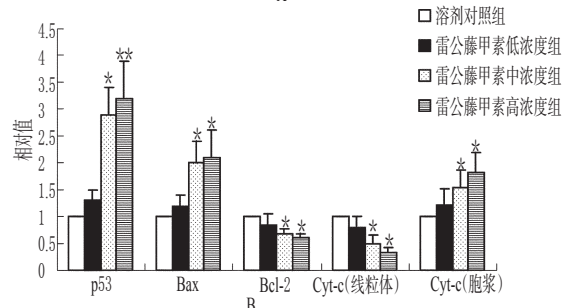


图4 L-02细胞p53、Bax、Bcl-2、Cyt-c蛋白的表达

A. 图片; B. 统计结果

与溶剂对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Fig 4 The protein expression of p53, Bax, Bcl-2 and cyt-c in L-02 cells

A. picture; B. statistical result

vs. solvent control group: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

4 讨论

雷公藤甲素具有抗类风湿、抗炎、抗肿瘤等作用,通过笔者前期系列研究发现,雷公藤甲素在肝脏部位蓄积量最大,较高剂量多次给予雷公藤甲素能导致大鼠较明显的肝毒性^[3]。

笔者以正常人肝细胞L-02为对象,研究雷公藤甲素对其的毒性作用及可能的机制。结果表明,雷公藤甲素在该试验条件下对L-02细胞有细胞毒作用,细胞出现核浓缩现象,同时流式细胞仪检测到亚二倍体细胞比例升高,且随着雷公藤甲素浓度的提高或孵育时间的延长,其细胞毒作用更为明显。

细胞中p53、Bcl-2、Bax与Cyt-c的表达变化对细胞凋亡均有着较大影响。p53在维持细胞正常生长、抑制恶性增殖过程中起着重要作用,在正常细胞里p53的表达量很低^[4-5],因此它不足以使细胞停止生长或死亡。然而,当细胞受到某种损伤如DNA损伤或缺氧后,p53的表达会急剧升高,从而使细胞停止在G1期,使受损细胞修复或发生凋亡^[6]。Bcl-2蛋白在抑制细胞凋亡中起重要作用,通过阻止凋亡而促进细胞存活, Bax能允许一些离子和小分子如Cyt-c等穿过线粒体膜,进入细胞

HPLC法测定大鼠血浆中穿心莲内酯类衍生物的含量及其药动学研究^Δ

刘蕾*,张瑜,韩光#,华素(河南大学药物研究所,河南开封 475004)

中图分类号 R285.5;R969.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)11-0967-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.11.03

摘要 目的:建立大鼠血浆中穿心莲内酯类衍生物(ADC)含量的高效液相色谱(HPLC)测定方法。方法:色谱柱为ODS C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈-水(23:77, V/V),流速为1.2 ml/min,柱温为25 ℃,检测波长为208 nm,进样量为20 μl,内标物为芦荟苷。大鼠分别经灌胃和尾静脉注射给予ADC后,测定不同时间血药浓度。采用3p87软件计算药动学参数。结果:大鼠分别经灌胃和尾静脉注射给予ADC后, $t_{1/2\alpha}$ 分别为(1.47±0.15)、(0.45±0.03)h, $t_{1/2\beta}$ 分别为(5.82±0.29)、(2.51±0.13)h,V/F分别为(1.32±0.12)、(0.38±0.04)L,AUC_{0-24h}分别为(567.51±28.55)、(243.58±12.17)μg/(ml·h),CL/F分别为(0.53±0.03)、(0.16±0.02)L/(h·kg)。灌胃ADC后, t_{max} 为2h, c_{max} 为132.33 μg/ml。结论:本方法操作简便、准确、灵敏度高、重复性好,可用于ADC血药浓度的监测及其药动学研究。

关键词 ADC;高效液相色谱法;药动学

Determination of ADC in Plasma by HPLC and Its Pharmacokinetics in Rats

LIU Lei,ZHANG Yu,HAN Guang,HUA Su(Institute of Pharmaceutics, Henan University, Henan Kaifeng 475004, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a high performance liquid chromatography (HPLC) method for the determination of ADC in rat plasma and study the pharmacokinetics of ADC in rats. METHODS: Chromatographic separation was performed on an C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) with acetonitrile-water (23:77, V/V) as mobile phase at a flow rate of 1.2 ml/min with UV detection at 208 nm, the column temperature was at 25 ℃ and aloin was used as an internal standard. ADC was intragastric administered and caudal vein injection to rats respectively. The concentrations of ADC in rat plasma were determined by HPLC and used to analyze the pharmacokinetic parameters in the compartment model by 3p87 program. RESULTS: After intragastric administration vs. caudal vein administration of ADC, pharmaceutical parameters were as follows: $t_{1/2\alpha}$ were (1.47 ± 0.15) h, (0.45 ± 0.03) h; $t_{1/2\beta}$ were (5.82 ± 0.29) h, (2.51 ± 0.13) h; V/F were (1.32 ± 0.12) L, (0.38 ± 0.04) L; AUC_{0-24h} were (567.51 ± 28.55) μg/(ml·h), (243.58 ± 12.17) μg/(ml·h); CL/F were (0.53 ± 0.03) L/(h·kg), (0.16 ± 0.02) L/(h·kg). After intragastric administration of ADC, t_{max} was 2 h c_{max} was 132.33 μg/ml. CONCLUSION: The method is simple and accurate with a high sensitivity and a good repeatability, and it can be applied to the evaluation of pharmacokinetic parameters of ADC in rats and blood concentration of ADC in clinical controlling.

KEYWORDS ADC; HPLC; Pharmacokinetics

质,从而引起细胞凋亡,在凋亡过程中主要表现为调控 Bcl-2 蛋白表达减少, Bax 蛋白表达增多, Bcl-2/Bax 比例下降, Bcl-2 与 Bax 的异源二聚体减少, Bax 同源二聚体增多^[7-8]。研究发现,经雷公藤甲素处理的 L-02 细胞中线粒体内 Cyt-c 与抗凋亡的 Bcl-2 蛋白表达减弱,并呈浓度依赖性;而同时相对应的胞浆中 Cyt-c、p53 与促进凋亡的 Bax 蛋白表达增强,从而诱导细胞凋亡。

参考文献

- [1] 王月敏,张世良,夏素霞,等.雷公藤的毒性研究及对策[J].四川生理科学杂志,2008,30(1):28.
- [2] 张蕾,宋欣伟.雷公藤生殖毒性及减毒对策的研究进展[J].浙江中西医结合杂志,2010,20(10):656.

Δ 基金项目:河南省科技创新人才项目资助(No.094100510020);河南大学校内自然科学基金资助项目(No.2009YBZR036)

* 讲师。研究方向:天然药物结构修饰及新药开发。电话:0378-3880680。E-mail:liulei@henu.edu.cn

通信作者:教授。研究方向:天然药物结构修饰及新药开发。电话:0378-3880680。E-mail:hang@henu.edu.cn

- [3] 姚金成,饶健,曾令贵,等.雷公藤甲素单次及多次给药对大鼠肝药酶活性的影响[J].中国药房,2010,21(11):961.
- [4] 李伟,张静,胡徐庞,等. PHA-767491 抑制多种肿瘤细胞生长[J].中国生物化学与分子生物学报,2010,26(5):455.
- [5] 康松涛.环氧化酶-2 和 P53 蛋白在非小细胞肺癌中的表达及意义[J].国际医药卫生导报,2009,15(16):28.
- [6] Vazquez A, Bond EE, Levine AJ. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2008, 7(12):979.
- [7] 程向东,杜义安,黄灵.苦参碱在调节 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达诱导 HepG2 细胞凋亡中的作用[J].中国肿瘤临床,2008,35(12):711.
- [8] 王彤,刘存志,刘玉珍,等. Bcl-2/Bax 基因调控机体细胞凋亡的机制研究进展[J].中国老年学杂志,2008,28(16):1658.

(收稿日期:2012-04-05 修回日期:2012-06-02)