文章编号:1000-5404(2010)19-2109-03

论著

雷公藤内酯醇通过p38MAPK信号通路诱导Hut102细胞凋亡

谢会霞,郝 进 (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院皮肤科)

【摘要】 目的 探讨雷公藤内酯醇(triptolide,TP)诱导皮肤T细胞淋巴瘤蕈样肉芽肿细胞株Hut102的凋亡及其机制。方法 体外培养的Hut102细胞与12.5、25、50、100 nmol/L雷公藤内酯醇共同孵育,分别在24、48、72 h用MTT法检测Hut102细胞的增殖抑制率,Annexin V-FITC/PI双染流式细胞术分析细胞凋亡,Western blot检测Hut102细胞中磷酸化p38丝裂原活化蛋白激酶(p-p38)、caspase-3蛋白的表达水平。结果 不同浓度雷公藤内酯醇(12.5、25、50、100 nmol/L)作用Hut102细胞24 h后的增殖抑制率分别为8.67%、30.02%、52.54%、59.62%。Annexin V-FITC/PI双染流式细胞术检测经25、50、100 nmol/L雷公藤内酯醇处理24 h后Hut102细胞凋亡率分别为9.19%、21.49%、26.34%,当50 nmol/L雷公藤内酯醇组预先用p38MAPK特异性抑制剂SB203580干预后,Hut102细胞凋亡率下降为14.35%。不同浓度雷公藤内酯醇(50、100 nmol/L)处理Hut102细胞后p38、caspase-3蛋白的表达被激活,同样50 nmol/L雷公藤内酯醇组也预先用p38MAPK特异性抑制剂SB203580干预,结果p-p38的表达降低,caspase-3激活被抑制。结论 雷公藤内酯醇可以抑制Hut102细胞的增殖,其作用机制可能是通过激活p38MAPK信号通路使部分Hut102细胞产生凋亡。

【关键词】 雷公藤内酯醇;蕈样肉芽肿;Hut102;p38MAPK;细胞凋亡
【中图法分类号】 R285.5;R730.23;R733.1 【文献标志码】 A

Triptolide induces apoptosis of Hut102 cells through p38MAPK pathway

Xie Huixia, Hao Jin (Department of Dermatology, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

【Abstract】 Objective To study the effect of triptolide on apoptosis of human cutaneous T-cell lymphoma Hut102 cells and its mechanism. Methods Cutaneous T-cell lymphoma cell line Hut102 was co-cultured with triptolide solution at the terminal concentration of 12.5, 25, 50 and 100 nmol/L, respectively, in 96-well plates. At 24, 48, and 72 h after co-culture, inhibitory effect of triptolide on Hut102 cells was detected by MTT assay, apoptosis rate of Hut102 cells was assessed by Annexin V-FITC/PI, and expression of phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase (p-p38MAPK) and caspase-3 was determined by Western blot analysis. Results Triptolide inhibited the proliferation of Hut102 cells in a concentration-and time-dependent manner. Annexin V-FITC/PI showed that the apoptotic rate of Hut102 cells was 9.19%, 21.49% and 26.34%, respectively, in 24 h after they were treated with triptolide at the concentration of 25, 50 and 100 nmol/L, respectively. However, the apoptosis rate of Hut102 cells was decreased by 14.35% after they were interfered with the p38MAPK inhibitor (SB203580). The expression of p-p38MAPK and caspase-3 was activated in Hut102 cells by different concentrations of triptolide (50 and 100 nmol/L). However, the expression of phosphorylated p38MAPK was decreased and the activity of caspase-3 was inhibited by triptolide at the concentration of 50 nmol/L interfered with SB203580. Conclusion Triptolide can inhibit the proliferation of Hut102 cells by activating the p38MAPK signal pathway, thus inducing apoptosis of certain Hut102 cells.

【Key words】 triptolide; mycosis fungoides; Hut102; p38MAPK; apoptosis

Corresponding author: Hao Jin, Tel: 86-23-63693411, E-mail: haojin_cq@163.com

目前,蕈样肉芽肿(mycosis fungoides,MF)的治疗主要根据临床分期,早期阶段主要是局部外用药,进展期则采用综合的治疗及联合化疗。现有的早期阶段所采取的治疗措施疗效较差,常导致早期阶段治疗失败,疾病发生、发展到晚期,使晚期治疗变得更为棘手,因此寻找新的药物作用于蕈样肉芽肿的早期尤为重要[1]。雷公藤内酯醇(triptolide,TP)具有免疫抑制、抗移植排斥、抗炎、抗肿瘤和抗生育等多种活性,尤其抗肿瘤作用具有高效、广谱的特点,成为近年来国内外中药抗肿瘤研究的热点[2-4]。目前的研究表明雷公藤内酯醇的抗肿瘤作用主要是通过多种信号通路诱导细胞凋亡[5-8]。本实验采用蕈样肉芽肿Hut102细胞株,研

【通信作者】 郝 进,电话:(023)63693411,E-mail:haojin_cq@163.com

究雷公藤内酯醇对 MF 细胞株凋亡的诱导作用，并初步探讨其机制，为雷公藤内酯醇在 MF 早期治疗中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 Hut102 细胞株购自武汉中国典藏中心。在含10%新生牛血清的 RPMI1640 培养基、37 ℃、5% CO_2 饱和湿度条件下培养，每2～3天换液传代，实验选用处于对数生长期的细胞。

1.1.2 试剂 雷公藤内酯醇(Triptolide，中国药品生物制品检定所，批号：111567-200502)，RPMI1640 培养基(Gibco 公司)，新生小牛血清(杭州四季公司)，四甲基偶氮唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)、p38MAPK 特异性抑制剂 SB203580(Sigma 公司)，Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒(南京凯基科技生物有限公司)，p38 兔抗人多克隆抗体、p-p38 兔抗人多克隆抗体(美国 Bioworld 公司)，caspase-3 兔抗人多克隆抗体(Cell Signaling 公司)，β-actin 内参抗体(北京博奥森公司)。

1.2 方法

1.2.1 MTT 法检测细胞增殖抑制率 Hut102 细胞按 1×10^5/ml 接种于96孔板，共分6组，每个浓度设5个复孔，并设空白对照，1组只加培养基作阴性对照，1组 DMSO 作溶剂对照，DMSO 浓度为0.02‰，另4组24 h后加入不同体积的 TP 母液使 TP 的终浓度为12.5、25、50、100 nmol/L，分别于24、48、72 h后进行 MTT 试验检测。在酶标仪上测得490 nm 波长处各孔的吸光度值[D(490)值]，细胞增殖抑制率 = [1 − $D(490)_{实验组}$/$D(490)_{对照组}$] ×100%

1.2.2 细胞凋亡率检测 Hut102 细胞常规培养至对数生长期，细胞按 5×10^5/ml 接种于6孔板。培养24 h后分为7组，设只加培养基的正常细胞对照组，DMSO 溶剂对照组，25、50、100 nmol/L TP 组，20 μmol/L 的 SB203580 组，20 μmol/L 的 SB203580 + 50 nmol/L TP 组(预先用 SB203580 孵育1 h，再加入 TP 和培养基)，继续培养24 h，然后收集细胞并离心，弃上清，4 ℃预冷 PBS 洗2遍，重悬于 PBS 中，按 Annexin V-FITC/PI 试剂盒说明进行操作，采用流式细胞分析仪检测。重复3次。

1.2.3 Western blot 检测 p-p38 和 caspase-3 蛋白的表达 选用生长状态良好的 Hut102 细胞，常规培养至对数生长期，细胞按 5×10^5/ml 接种于6孔板，细胞总体积为2 ml。培养24 h后分为4组，设只加培养基的正常细胞对照组，50 nmol/L TP 组，100 nmol/L TP 组，20 μmol/L 的 SB203580 + 50 nmol/L TP 组(预先用 SB203580 孵育1 h，再加入 TP 和培养基)，继续培养24 h。参照试剂盒说明书，分组提取总蛋白，采用 BCA 法测定蛋白浓度，每个样品取45 μg 行10% SDS-PAGE，半干转移至 PVDF 膜上，5% 脱脂奶粉室温封闭2 h，分别加入 caspase -3 抗体(1∶500)、总 p38 抗体(1∶500)、p-p38 抗体(1∶500)、β-actin 抗体(1∶200)，4 ℃孵育过夜，TBST 充分洗膜后加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(1∶5 000)，室温孵育2 h，TBST 洗膜后，ECL 试剂显色，在 BIO-RAD 凝胶成像仪下曝光显影，实验重复3次。

1.3 统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SAS 8.2 统计软件行方差分析。

2 结果

2.1 雷公藤内酯醇对 Hut102 细胞的增殖抑制效应

不同浓度的雷公藤内酯醇分别作用24、48、72 h 对 Hut102 细胞增殖抑制结果表明：①随着药物浓度的增加，细胞存活率降低，有明显的剂量依赖关系($P<0.05$)，药物作用24 h后的半数抑制浓度 IC_{50} 为45 nmol/L；②同一浓度的药物有时间依赖关系，随着作用时间的延长，细胞存活率降低($P<0.01$)(表1)。

表1 雷公藤内酯醇(TP)对 Hut102 细胞增殖作用的影响($n=5$，$\bar{x}\pm s$)

组别	24 h		48 h		72 h	
	D(490)	抑制率(%)	D(490)	抑制率(%)	D(490)	抑制率(%)
空白对照组	0.65±0.01		1.10±0.1		1.35±0.06	
DMSO	0.64±0.02					
TP 12.5 nmol/L	0.59±0.02[a]	8.67±2.48	0.64±0.03[a]	41.34±2.79	0.52±0.03[a]	60.89±2.82
TP 25 nmol/L	0.45±0.03[ab]	0.02±3.07	0.53±0.02[ab]	51.81±1.95	0.45±0.02[ab]	66.20±2.44
TP 50 nmol/L	0.31±0.01[ab]	52.54±1.32	0.49±0.01[ab]	54.87±0.82	0.40±0.02[ab]	70.12±0.97
TP 100 nmol/L	0.26±0.01[ab]	59.62±1.97	0.41±0.02[ab]	62.32±2.02	0.35±0.01[ab]	73.74±0.67

a：$P<0.01$，与空白对照组比较；b：$P<0.05$，不同浓度雷公藤内酯醇组间比较

2.2 雷公藤内酯醇对细胞凋亡的影响

低浓度雷公藤内酯醇作用于 Hut102 细胞即可发生早期凋亡，且凋亡率随着药物浓度的增加而增加($P<0.01$)，加入 SB203580 后，细胞凋亡率明显降低(表2)。

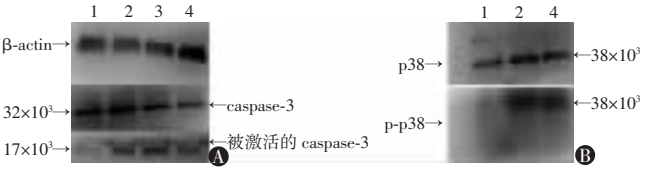
表2 雷公藤内酯醇(TP)处理 Hut102 细胞 24 h 后流式检测细胞凋亡率($n=3$，$\bar{x}\pm s$)

组别	凋亡率(%)	组别	凋亡率(%)
空白对照组	2.50±0.91	SB 20 μmol/L	3.60±0.57
DMSO	2.71±0.50	TP 50 nmol/L + SB 20 μmol/L	14.35±0.30[ab]
TP 25 nmol/L	9.19±0.37[a]	TP 100 nmol/L	26.34±0.31[a]
TP 50 nmol/L	21.49±0.11[a]		

SB：SB203580；a：$P<0.01$，与空白对照组比较；b：$P<0.01$，与50 nmol/L 雷公藤内酯醇组比较

2.3 Western blot 检测雷公藤内酯醇处理 Hut102 细胞后 caspase-3、p-p38 蛋白的表达

50、100 nmol/L 雷公藤内酯醇作用 Hut102 细胞24 h后，caspase-3 明显被激活，表现为 17×10^3 caspase-3 蛋白表达(分别为29.2%、35%)，同时50 nmol/L 雷公藤内酯醇组增强了 p-p38 的表达(20.4%)，然而此时总 p38 没有变；50 nmol/L 雷公藤内酯醇组预先用 SB203580 干预后，caspase-3 的激活被抑制(6%)，p-p38 蛋白表达水平(15.7%)减少。见图1。



1：空白对照组 2：TP 50 nmol/L 3：TP 100 nmol/L；4：TP 50 nmol/L + SB203580 20 μmol/L

图1 Western blot 检测不同浓度雷公藤内酯醇(TP)处理 Hut102 细胞后 caspase3(A)、p-p38(B)的表达

3 讨论

p38MAPK信号通路是MAPKs蛋白激酶家族的主要成员之一，抗肿瘤药物、紫外线照射、促炎细胞因子、应激刺激等因素可以引起p38MAPK激活[9,10]。活化的p38MAPK是如何调节其下游的信号分子以及具体的凋亡信号传递途径还不太清楚，但最终都将汇集到半胱氨酸蛋白酶级连放大反应这一共同通路。雷公藤内酯醇体外对乳腺癌、结肠癌、卵巢癌、肺癌等60多种肿瘤细胞都有良好的凋亡诱导作用，其机制主要从抑制细胞增殖、干预细胞周期、诱导细胞凋亡、抑制核因子NF-κB、抑制基质金属蛋白酶（MMP）的表达、影响血管形成等几个方面[11-14]。此外，Liu等[15]研究发现雷公藤内酯醇可诱导树突状细胞的凋亡来调节免疫应答，这种调节作用与p38MAPK信号通路密切相关。目前，国内外就雷公藤内酯可以诱导皮肤T细胞淋巴瘤蕈样肉芽肿细胞株的凋亡尚少见报道。

本实验通过MTT法检测了雷公藤内酯对Hut102细胞的增殖抑制作用，雷公藤内酯醇在低浓度的时候即可抑制蕈样肉芽肿细胞株Hut102增殖，并呈时间和剂量依赖方式。同时用Annexin V-FITC/PI流式细胞术检测发现雷公藤内酯醇可以诱导Hut102细胞发生凋亡，并随着雷公藤内酯醇的浓度的增加Hut102细胞发生凋亡的概率增大。进一步用Western blot检测发现，在雷公藤内酯醇干预组，caspase-3明显被激活，说明这种凋亡作用最终激活了半胱氨酸蛋白酶级连放大反应这一共同通路。除此之外，还发现在雷公藤内酯醇干预组，激活了p-p38蛋白的表达，同时在雷公藤内酯醇干预组如预先加入SB203580阻断后，细胞发生凋亡的概率降低，caspase-3的激活被抑制，p-p38蛋白的表达也降低，表明p38MAPK信号通路也参与了雷公藤内酯醇诱导的Hut102细胞凋亡。

综上所述，本研究发现雷公藤内酯醇体外可以抑制蕈样肉芽肿细胞株Hut102增殖和诱导其凋亡，其机制可能与半胱氨酸蛋白酶信号通路和p38MAPK信号通路有关，为雷公藤内酯醇在蕈样肉芽肿早期治疗阶段的应用提供了理论参考。进一步研究将阐明雷公藤内酯醇直接作用靶受体及传递致凋亡信号具体转导途径，将其不同的生物学效应与不同的靶分子和作用途径相关联，为雷公藤内酯醇的临床应用提供依据，同时也为雷公藤内酯醇的定向改造，开发特异性强、毒副作用小的小分子药物提供指导。

参考文献：

[1] Prince H M, Whittaker S, Hoppe R T. How I treat mycosis fungoides and Sezary syndrome[J]. Blood, 2009, 114(20): 4337-4353.

[2] Shamon L A, Pezzuto J M, Graves J M, *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(1): 113-117.

[3] Fidler J M, Li K, Chung C, *et al*. PG490-88, a derivative of triptolide, causes tumor regression and sensitizes tumors to chemotherapy[J]. Mol Cancer Ther, 2003, 2(9): 855-862.

[4] 程晓明，王长征，钱桂生. 雷公藤对致敏小鼠T细胞活化及其IL-5 mRNA表达的影响[J]. 第三军医大学学报，2002，24(2)：181-183.

[5] Lee K Y, 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(19): 13451-13455.

[6] Chang W T, Kang J J, Lee K Y, *et al*. Triptolide and chemotherapy cooperate in tumor cell apoptosis. A role for the p53 pathway[J]. J Biol Chem, 2001, 276(3): 2221-2227.

[7] Carter B Z, Mak D H, Schober W D, *et al*. Triptolide induces caspase-dependent cell death mediated *via* the mitochondrial pathway in leukemic cells[J]. Blood, 2006, 108(2): 630-637.

[8] Phillips P A, Dudeja V, McCarroll J A, *et al*. Triptolide induces pancreatic cancer cell death *via* inhibition of heat shock protein 70[J]. Cancer Res, 2007, 67(19): 9407-9416.

[9] Lawrence M C, Jivan A, Shao C, *et al*. The roles of MAPKs in disease[J]. Cell Res, 2008, 18(4): 436-442.

[10] 王通，曾耀英，何贤辉，等. 阻断p38途径对地塞米松诱导的胸腺细胞凋亡的影响[J]. 第三军医大学学报，2006，28(16)：1667-1670.

[11] Lee K Y, Park J S, Jee Y K, *et al*. Triptolide sensitizes lung cancer cells to TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIl)-induced apoptosis by inhibition of NF-kappaB activation[J]. Exp Mol Med, 2002, 34(6): 462-468.

[12] Yang S, Chen J, Guo Z, *et al*. Triptolide inhibits the growth and metastasis of solid tumors[J]. Mol Cancer Ther, 2003, 2(1): 65-72.

[13] Zhou G X, Ding X L, Huang J F, *et al*. Apoptosis of human pancreatic cancer cells induced by Triptolide[J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(10): 1504-1509.

[14] Pigneux A, Mahon F X, Uhalde M, *et al*. Triptolide cooperates with chemotherapy to induce apoptosis in acute myeloid leukemia cells[J]. Exp Hematol, 2008, 36(12): 1648-1659.

[15] Liu Q, Chen T, Chen H, *et al*. Triptolide (PG-490) induces apoptosis of dendritic cells through sequential p38 MAP kinase phosphorylation and caspase 3 activation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 319(3): 980-986.

（收稿 2010-07-07 修回 2010-08-21）

（编辑 王 红）