基础研究 文章编号:0253-3626(2010)07-1010-04

雷公藤内酯醇协同地塞米松诱导蕈样肉芽肿 hut-102 细胞凋亡及其机制

张 波,郝 进
(重庆医科大学附属第二医院皮肤科,重庆 400010)

【摘 要】目的:探讨雷公藤内酯醇(Triptolide,TP)与地塞米松联合对蕈样肉芽肿(Mycosis fungoides,MF)hut-102 细胞体外增殖、凋亡是否具有协同作用及其机制。方法:MTT 法检测细胞存活率;流式细胞术检测细胞凋亡率;蛋白印迹法检测糖皮质激素受体(Glucocorticoid receptor,GR)和凋亡相关蛋白 Caspase-3 表达。结果:①不同浓度 TP(6.25、12.5、25 nmol/L)和地塞米松(10^{-7}、10^{-6}、10^{-5} mol/L)对 hut-102 细胞均有增殖抑制作用,与时间、浓度相关;12.5 nmol/L TP 与不同浓度地塞米松联合,细胞抑制率随地塞米松浓度升高呈现协同作用。②TP 和地塞米松均能诱导 hut-102 细胞凋亡,联合用药凋亡率明显高于单药,具有交互效应。③$10^{-5}$ mol/L 地塞米松作用 hut-102 细胞后,GR 表达降低($P<0.05$),联合用药(12.5 nmol/L TP+10^{-5} mol/L 地塞米松)GR 表达上调、Caspase-3 激活增强($P<0.05$)。结论:TP 联合地塞米松可明显抑制 hut-102 细胞增殖,增强诱导凋亡,具有协同效应,其作用机制可能与 GR 表达上调、Caspase-3 激活增强有关。

【关键词】蕈样肉芽肿 hut-102;雷公藤内酯醇;地塞米松;糖皮质激素受体;Caspase-3;凋亡
【中国图书分类法分类号】R739.5 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-12-07

Apoptosis of mycosis fungoides hut-102 cells induced by triptolide in combination with dexamethasone and its mechanism

ZHANG Bo, et al
(*Department of Dermatology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of triptolide combined with dexamethasone on proliferation and apoptosis of the mycosis fungoides hut-102 cells and the possible mechanisms. *Methods*: The viability of hut-102 cells was measured by MTT assay; the apoptotic rate of hut-102 cells was detected by flow cytometry. The expression levels of Glucocorticoid receptor (GR) and apoptosis-related protein Caspase-3 were determined by Western blot analysis. *Results*: ①MTT assays showed that different concentrations of triptolide or dexamethasone can effectively inhibit the proliferation of hut-102 cells in a dose and time-dependent manner. When triptolide (12.5 nmol/L) was co-administered with dexamethasone, the inhibition rate increased along with the concentration of dexamethasone. And we observed positive cooperative inhibitory effects of triptolide and dexamethasone on the proliferation of hut-102 cells. ②Both triptolide and dexamethasone can independently promote apoptosis of the hut-102 cell. And the apoptotic rate in the combination group was higher than single group ($P<0.01$). ③Compared with the significantly decreased expression of Glucocorticoid receptor (GR) in hut-102 cells in dexamethasone group, the expression of GR and activated caspase-3 increased in the combination group ($P<0.05$). *Conclusion*: The apoptosis of hut-102 cells induced by dexamethasone was enhanced by triptolide, which maybe connected with the increased expression of GR and activated Caspase-3 in hut-102 cells.

【Key words】Hut-102; Triptolide; Dexamethasone; Glucocorticoid receptor(GR); Caspase-3; Apoptosis

蕈样肉芽肿(Mycosis fungoides,MF)是最常见的原发皮肤 T 细胞淋巴瘤,病程进展缓慢,但晚期侵袭强、预后差。早期干预以延缓或阻止其病情进展对改善患者预后非常重要。皮损局部外用糖皮质激素(Glucocorticoid,GC)诱导肿瘤细胞凋亡是目前 MF 常规治疗手段之一,疗效确切,副作用小,但长期应用存在疗效降低或耐药现象。

雷公藤内酯醇(Triptolide,TP),亦称雷公藤甲素,是从卫矛科植物雷公藤中分离出的一种环氧二萜内酯化合物,具有多种生物学活性。在国内大量的系统性红斑狼疮、大疱性疾病、湿疹类等炎症性疾病临床治疗中,发现雷公藤具有增强 GC 的抗炎活性、降低 GC 用量的作用,但其机制尚不明了,

作者介绍:张 波(1981-),男,硕士,
研究方向:皮肤淋巴瘤。
通讯作者:郝 进,男,副教授,E-mail: haojin_cq@163.com。

缺乏相应的理论支持。

本研究以 MF hut-102 细胞株为研究对象，观察 TP 对地塞米松诱导 hut-102 细胞凋亡是否具有协同及逆转耐药作用，并对其可能机制进行了初步探讨，期望为 MF 的临床治疗提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 hut-102 细胞株（中国典藏中心，ATCC）。

1.1.2 试剂 TP（Triptolide）和地塞米松（Dexamethasone）（中国药品生物制品检定所），RPMI1640 培养基（美国 Gibco 公司），新生小牛血清（杭州四季），四甲基偶氮唑蓝（MTT），二甲基亚砜（DMSO），Annexin v-FITC/PI 凋亡试剂盒（南京凯基科技生物有限公司），糖皮质激素受体（Glucocorticoid receptor，GR）抗体、Caspase-3 抗体（Cell Signaling 公司），β-actin 内参抗体（北京博奥森）。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 hut-102 细胞株接种在 50 ml 和 100 ml 培养瓶中，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 d 换液传代，实验选处于对数生长期的细胞。

1.2.2 MTT 法检测 TP 和地塞米松对淋巴瘤 hut-102 细胞的增殖抑制作用 用含 10%小牛血清的 RPMI1640 培养液将 hut-102 细胞调成 1×10^5 个/ml 的细胞悬液，加入 96 孔培养板内，每孔 180 μl。实验设空白组对照组（无细胞和药物）、阴性对照组（有细胞但未加药物）、各 3 个不同浓度的 TP 组和地塞米松组，共 4 组，共 3 板。每孔加药 20 μl，使 TP 组的终浓度分别为 6.25、12.5、25 nmol/L，地塞米松组终浓度为 10^{-7}、10^{-6}、10^{-5} mol/L，各组均设 5 个复孔，在 37℃5%CO_2 箱内分别培养 24、48、72 h 后，加入 MTT（5 mg/ml），每孔加 20 μl，培养 4 h，弃上清，每孔加 DMSO200 μl，自动酶标仪机测 490 nm 下的每孔吸光度值（A），细胞生长抑制率 $=1-A_{实验组}/A_{对照组}\times100\%$。将 12.5 nmol/L TP 与不同浓度地塞米松联合作用 hut-102 细胞，检测 24 h 后细胞增殖情况，实验设空白组、阴性对照组、TP 组、地塞米松组和联合组，方法同前。

1.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡率 试验分 4 组，正常细胞对照组、TP 组、地塞米松组和联合药物组。细胞以 2×10^5 个/ml 接种，培养方式同前。12.5 nmol/L TP 分别与 10^{-5}、10^{-6} mol/L 地塞米松联合用药。培养 24 h 后，1 000 r/min 离心 10 min，弃上清，4℃ PBS 洗 2 次，将细胞重悬于 100 μl Annexin V-FITC 和 5 μl PI 轻轻混匀后室温避光反应 15 min，加入 400 μl 结合缓冲液，流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.2.4 Western-blot 检测 GR 和凋亡蛋白 Caspase-3 表达 试验设正常组和实验组，实验组分 10^{-5} mol/L 地塞米松组、12.5 nmol/L TP 和 10^{-5} mol/L 地塞米松联合组，细胞接种和培养方法同上。24 h 后终止培养，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 50 μg 行 10% SDS-PAGE，湿转移至 PVDF 膜上，5%脱脂奶粉室温封闭 2 h，分别加入兔抗人 GR 多克隆抗体（1:500）和兔抗人 Caspase-3 单克隆抗体（1:500），4℃孵育过夜，TBST 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，ECL 试剂显色，凝胶成像仪下曝光显影，用 Quantity one 凝胶图像分析软件检测各组目的蛋白及其内参蛋白的吸光度值，分析计算结果。

1.2.5 统计学处理 所有数据均采用均数加减标准差（$\bar{x}\pm s$），多组均数比较用单因素方差分析，两组间均数比较采用独立样本 t 检验，交互效应用多因素方差分析，应用统计软件 SPSS 17.0 进行统计学分析。

2 结 果

2.1 TP、地塞米松及两者联合对 hut-102 细胞的抑制效应

不同浓度的 TP 组、地塞米松组及两者联合作用对 hut-102 细胞生长抑制结果表明：①同一时间随 TP、地塞米松浓度的增加，抑制率增高（$P<0.05$）；同一浓度的药物有时间依赖关系，随着作用时间的延长，抑制率明显升高（$P<0.01$），见图 1、2；②12.5 nmol/L TP 联合不同浓度地塞米松后，抑制率明显高于单药组且随地塞米松浓度升高呈协同作用（协同指数 CI<1）。见图 3。

2.2 TP、地塞米松对细胞凋亡的影响

Annexin-V FITC/PI 双标法结果显示：12.5 nmol/L TP 分别于 10^{-6}、10^{-5} mol/L 地塞米松联合后，细胞凋亡率明显高于单药组，多因素方差分析，交互效应呈协同（$P<0.01$）将 12.5 nmol/L TP+10^{-5} mol/L 地塞米松组作为研究对象，联合前后，细胞凋亡情况见图 4，交互效应轮廓图见图 5。

2.3 Western 印迹法检测 GR、Caspase-3 的表达

检测各组目的蛋白及其内参蛋白的吸光度值，计算两者

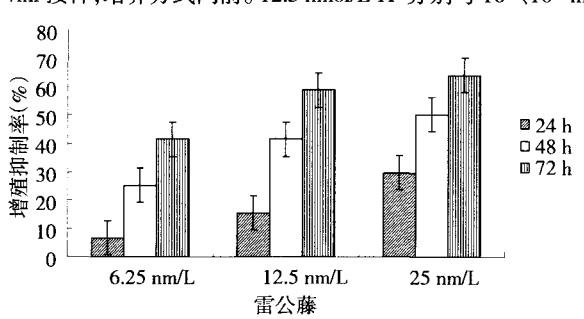
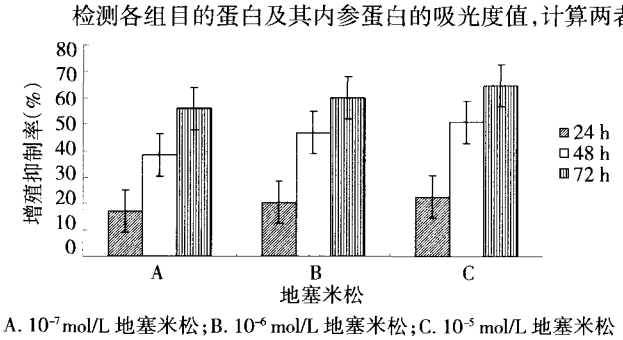
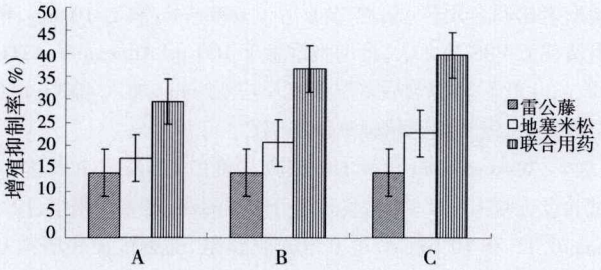


图 1 不同浓度 TP 对 hut-102 细胞增殖作用的影响



A. 10^{-7} mol/L 地塞米松；B. 10^{-6} mol/L 地塞米松；C. 10^{-5} mol/L 地塞米松

图 2 不同浓度地塞米松对 hut-102 细胞增殖作用的影响



A. 12.5 nmol/L TP、10^{-7} mol/L 地塞米松及其联合；B. 12.5 nmol/L TP、10^{-6} mol/L 地塞米松及其联合；C. 12.5 nmol/L TP、10^{-5} mol/L 地塞米松及其联合

注：联合组与单药组比较，$P<0.01$

图 3　TP 与不同浓度地塞米松联合作用 24 h 对 hut-102 细胞增殖作用的影响

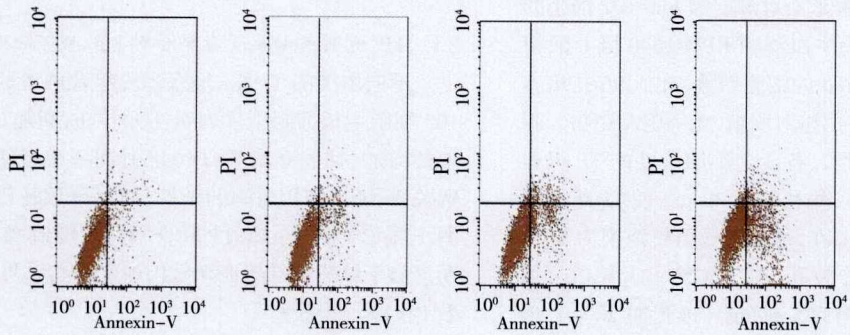
比值，以此作为蛋白的相对表达量。药物处理 hut-102 细胞 24 h 后，地塞米松组灰度比值（GR/β-actin）为（0.684 ± 0.011），药物联合组为（0.735 ± 0.01），正常细胞组为（0.766 ± 0.015）。与正常对照组相比，地塞米松使 GR 表达下调（$P<0.05$）；联合组与地塞米松组相比，GR 表达增强（$P<0.05$）。地塞米松组灰度比值（Caspase-3/β-actin）为（0.226 ± 0.017），药物联合组为（0.354 ± 0.013），联合组 Caspase-3 激活表达高于地塞米松组（$P<0.05$）。蛋白表达见图 6。

3　讨　论

MF 是低度恶性淋巴瘤，易复发，初期侵及皮肤，后期侵

表 1　TP、地塞米松处理 Hut-102 细胞 24 h 后流式细胞术检测细胞凋亡率的改变

组别	凋亡率(%)
正常细胞对照组	5.02 ± 0.64
12.5 nmol/L TP 浓度组	10.29 ± 0.55
10^{-6} mol/L 地塞米松浓度组	13.39 ± 1.20
10^{-5} mol/L 地塞米松浓度组	17.2 ± 0.83
12.5 nmol/L TP+10^{-6} mol/L 地塞米松浓度组	21.48 ± 0.68
12.5 nmol/L TP+10^{-5} mol/L 地塞米松浓度组	26.44 ± 0.45



A. 正常细胞对照组；B. 12.5 nmol/L TP 组；C. 10^{-5} mol/L 地塞米松组；D. 12.5 nmol/LTP+10^{-5} mol/L 地塞米松组

图 4　TP、地塞米松处理 hut-102 细胞 24 h 后流式细胞术检测细胞凋亡率

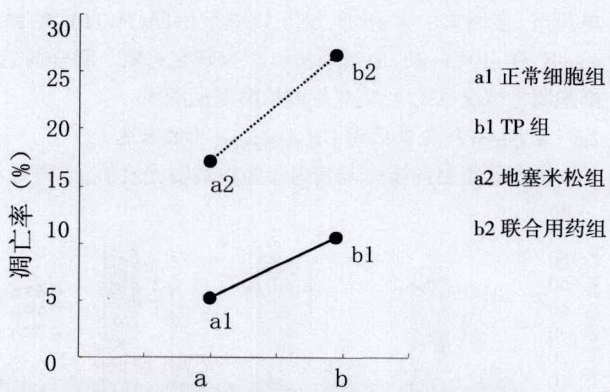
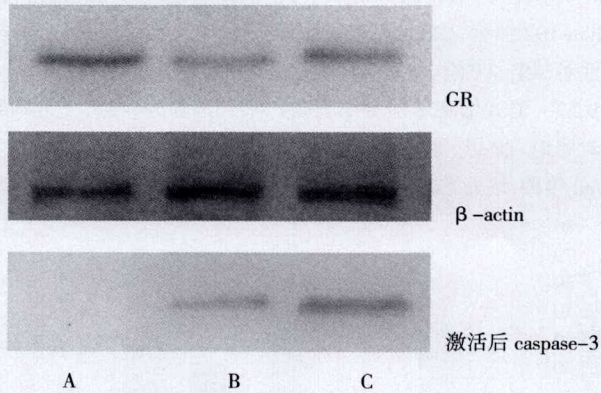


图 5　TP、地塞米松诱导 hut-102 细胞凋亡交互效应轮廓图



A .正常对照组；B. 10^{-5} mol/L 地塞米松组；C. 12.5 nmol/L TP+10^{-5} mol/L 地塞米松组

图 6　GR、Caspase-3 蛋白水平表达情况

及系统、内脏。临床治疗分早期和晚期，早期治疗以 GC 外用常见，疗效明显，晚期联合化疗。然而由于疾病具有顽固性、易复发性，再次治疗缓解率降低，常规药物疗效下降，且易出现激素耐受，影响疾病预后转归。如何拮抗激素耐受，维持或增强 GC 临床疗效，已成为研究热点。

TP 有较强的抗炎、抗肿瘤及免疫抑制活性，有报道显示[1]，雷公藤作用后，重症急性胰腺炎大鼠胰腺组织中 GR 表达上调。周太光等[2]研究结果表明，口服雷公藤制剂后，肾病型紫癜性肾炎患儿外周血淋巴细胞中 GR 的表达上调。但 TP 与地塞米松联合作用皮肤淋巴瘤细胞，是否能上调细胞内 GR 的表达，增强地塞米松诱导的凋亡，未见报道。本实验以蕈样肉芽肿 hut-102 细胞为研究对象，探讨 TP 联合地塞米松，在抑制增殖和诱导凋亡上是否具有协同作用及其机制。

在本实验中，TP 和地塞米松对 hut-102 细胞均有增殖抑制和诱导凋亡作用，随时间浓度增强。药物处理该细胞 24 h 后显示，联合组(一定浓度 TP 联合不同浓度地塞米松)细胞抑制率明显较单药组高，且随药物浓度升高，差异愈加显著($P<0.01$)，高浓度地塞米松联合组明显呈现协同(协同指数<1)，同时，联合组细胞凋亡率明显高于单药组，且具有交互效应。由此认为，TP 可增强地塞米松体外诱导 hut-102 细胞的凋亡，两者联合有协同性，即 TP 与地塞米松联合有更好的抗 hut-102 细胞作用。

本实验进而通过对 GR 和 Caspase-3 两种蛋白表达的研究阐述了 TP 增强地塞米松诱导 hut-102 细胞凋亡的可能机制。GR 是一种配体依赖性的转录调节因子，与配体结合后，最终通过调节靶基因的表达发挥生理及药理作用。GC 具有广泛的生物学效应，且主要是由 GR 介导而发挥[3,4]。研究显示[5,7]，GR 的数量是 GC 疗效的决定因素之一。笔者参阅中外文献，发现在多种肿瘤细胞中，随 GC 作用，GR 表达减少[8,12]。结合本实验结果，高浓度地塞米松作用 hut- 102 细胞后，GR 表达较正常细胞减少($P<0.05$)，这表明皮肤淋巴瘤 hut-102 细胞同样存在激素耐受现象，大剂量使用激素后，其受体表达下调从而降低激素药物活性。当小剂量 TP 与地塞米松联合作用后，GR 表达上调，说明 TP 逆转了地塞米松作用下GR 表达下降的趋向，从而能促进 GR 与其配体的结合，使得地塞米松发挥更好的药物效果。Caspase 在细胞凋亡过程中具有不可忽视的意义，其中 Caspase-3 更是处于关键位置，大多数触发细胞凋亡的因素均需通 Caspase-3 介导的信号传导途径[13,14]，本实验中，联合用药组较地塞米松组 Caspase-3 激活增强，说明 TP 同样可通过 Caspase 途径增强诱导 hut-102 细胞凋亡。

根据实验结果得出，TP 联合地塞米松可明显抑制 hut-102 细胞增殖，并增强诱导凋亡，药物间具有协同作用，其生物效应与 TP 上调 GR、增强 Caspase-3 激活有关，由此可以解释两者具有协同作用的部分机制。当然，是否还有其他机制有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] 冯文明，鲍 鹰，朱 鸣，等.雷公藤多甙对重症急性胰腺炎大鼠糖皮质激素受体的上调影响[J].中国中西医结合外科杂志，2008，14(2)：135-137.

[2] 周太光，邓正华，黄善文.雷公藤总苷对肾病型紫癜性肾炎患儿糖皮质激素受体的影响及其临床意义[J].实用儿科临床杂志，2007，22(17)：1315-1316.

[3] Ito K，Chung K F，Adcock I M.Update on glucocorticoid action and resistance[J].J Allergy Clin Immunol，2006，117(3)：522-543.

[4] Revollo J R，Cidlowski J A.Mechanisms generating diversity in glucocorticoid receptor signaling[J].Ann N Y Acad Sci，2009，117(9)：167-178.

[5] Kofler R，Schmidt S，Kofler A，et al.Rssistance to glucocoticoid-induced apop-tosis in lymphoblastic leukemia[J].J Endocrinol，2003，178(1)：19-27.

[6] Cho Y J，Lee K E.Dscreased glucocoticoid binding affinity to glucocorticoid receptor is important in the poor response to steroid therapy of older-aged patients with severe bronchial asthma[J]. Allergy Asthma Proc，2003，24(5)：353-358.

[7] Spahn J D，Leung D Y，Chan M T，et al.Mechanisms of glucocorticoid reduction in asthmatic subjects treated with intravenous immunogiobulin [J]. J Allergy Clin Immunol，1999，103(3 Pt 1)：421-426.

[8] Xu M，Song L，Wang Z.Efects of Dexamethasone on glucocorticold receptor exp- ression in a human ovarian carcinoma cell line 3AO[J].Chin Med J (Engl)，2003，116(3)：392-395.

[9] 李 波，白祥军，王海平.地塞米松对人单核细胞糖皮质激素受体蛋白表达的影响[J].中华急诊医学杂志，2006，15(6)：525-528.

[10] Albrecht M，Janssen M，Konrad L，et al.Effects of dexamethasone on proliferation of and fibronectin synthesis by human primary prostatic stromal cells in vitro [J].Andrologia,2002，34(1)：11-21.

[11] Orbak Z.Glucocorticoid resistance[J].Biochemistry (Mosc)，2006，71(10)：1073- 1081.

[12] Chebotaev D，Yemelyanov A，Budunova I.The mechanisms of tumor suppressor effect of glucocorticoid receptor in skin[J].Mol Carcinog，2007，46(8)：732-740.

[13] Depraetere V，Golstein P.Dismantling in cell death：molecular mechanisms and relationship to caspase activation[J].Scand J Immunol，1998，47(6)：523-531.

[14] Lu G，Kang Y J，Han J，et al.TAB-1 modulates intracellular localization of p38 MAP kinase and downstream sign aling[J].J Biol Chem，2006，281(9)：6087-6095.

(责任编辑：关蕴良)