

雷公藤甲素通过依赖于 caspase 的线粒体途径促进子宫内膜癌细胞凋亡

王晓菲, 吴 强*, 孙志华*, 李海金

(南京医科大学附属江苏省肿瘤医院妇瘤科, 江苏 南京 210009)

[摘要] **目的:**研究雷公藤甲素对子宫内膜癌 HEC-1B 细胞生长和凋亡的调节作用,探讨其促进子宫内膜癌细胞凋亡的作用途径。**方法:**①细胞增殖/毒性检测试剂(CCK-8)测定雷公藤甲素对 HEC-1B 细胞的生长抑制作用及加入 caspase 抑制剂(z-VAD-fmk)后对其作用的影响;②Western blot 法检测用药后 caspase-3、9 和 bcl-2 蛋白表达情况及 z-VAD-fmk 对 caspase-3、9 蛋白表达的影响。**结果:**CCK-8 比色法显示雷公藤甲素对子宫内膜癌 HEC-1B 细胞的生长有明显的抑制作用,且存在时间和浓度依赖性($P < 0.01$),在 48、72 h 作用效果明显。加入 z-VAD-fmk 后,雷公藤甲素对 HEC-1B 细胞生长抑制作用显著下降但仍高于对照组($P < 0.01$)。Western blot 结果同样证明加入 z-VAD-fmk 后,caspase-3、9 蛋白的表达有一定的减弱但仍高于对照组($P < 0.05$);同时随着药物浓度的增加,caspase-3、9 蛋白表达逐渐升高,bcl-2 蛋白表达逐渐降低($P < 0.05$)。**结论:**雷公藤甲素对子宫内膜癌 HEC-1B 细胞的生长有明显的抑制作用,通过依赖于 caspase 的线粒体凋亡途径促进子宫内膜癌 HEC-1B 细胞凋亡。

[关键词] 雷公藤甲素;子宫内膜癌;线粒体;caspase,bcl-2

[中图分类号] Q255

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)02-168-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20130205

Triptolide induces caspase-dependent apoptosis in endometrial cancer via the mitochondrial pathway

Wang Xiaofei, Wu qiang*, Sun Zhihua*, Li Haijin

(Department of Gynecological Oncology, Jiangsu Cancer Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210009, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the pro-apoptosis effects of triptolide in human with endometrial cancer cell line (HEC-1B) on proliferation and apoptosis and its underlying mechanisms. **Methods:** ①The Cell Counting Kit-8(CCK-8) was performed to measure the inhibitive effect of triptolide on the apoptosis on cell proliferation. ②The apoptosis and the change of caspase-3/9 in HEC-1B by pretreatment with the z-VAD-fmk (pan-caspase inhibitor) were detected by CCK-8 and Western blot. Western blot was used to examine the expression of caspase-3/9, bcl-2. **Results:** The proliferation of HEC-1B was significantly decreased by triptolide in a dose- and time-dependent manner ($P < 0.01$), and the effect in 48 h/72 h was obvious. The pan-caspase inhibitor z-VAD-fmk pretreatment reduced triptolide-induced apoptosis in HEC-1B, but the result was still higher than the control group ($P < 0.01$). Triptolide increased the levels of caspase-3/9 expression while reduced bcl-2 expression in the dose-dependent manner ($P < 0.05$). **Conclusion:** Triptolide functions as an effective apoptotic inducer in a caspase-dependent apoptosis via mitochondrial mechanism in human endometrial cancer (HEC-1B).

[Key words] triptolide; endometrial cancer; mitochondrial; caspase; bcl-2

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(2): 168-171]

子宫内膜癌是最常见的女性生殖道恶性侵袭性肿瘤之一,2011 年美国大约有 46 470 例新发子宫

内膜癌患者,死亡病例约为 8 120 例^[1]。在我国虽然没有详细的统计数据,但子宫内膜癌的发病率有逐年上升的趋势。雷公藤甲素(triptolide, TP)是从植物雷公藤中提取到的环氧化二萜内酯化合物,是可以应用于临床治疗的主要活性成分。国内外已有多篇文献报道了 TP 的抗肿瘤作用,但对于其作用于子宫内膜癌的研究报道较少。本课题组既往研究证明

[基金项目] 江苏省中医药局科技基金资助(HZ07029);江苏省肿瘤医院重点专科建设项目(ZS201202)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: qiangw88@126.com; szhnj@163.com

TP可以促进子宫内膜癌细胞凋亡^[2]。本次研究的目的在于对其抗肿瘤的机制进行进一步的研究,以了解TP治疗子宫内膜癌的作用机制,寻求治疗子宫内膜癌的一种新的辅助化疗药物。

1 材料与方法

1.1 材料

人子宫内膜癌细胞株 HEC-1B 购自中科院上海细胞库。TP 购自中国食品药品检定研究院,纯度 $\geq 98\%$; 细胞培养基 DMEM 购自美国 Gibco 公司;二甲基亚砜(DMSO)购自美国 Sigma 公司;细胞增殖/毒性检测试剂(CCK-8)购自日本同仁化学研究所;z-VAD-fmk(caspase 抑制剂)购自上海碧云天公司;兔抗人 caspase-3、9 和 bcl-2 单克隆抗体为美国 Cell Signaling Technology 公司产品;兔抗人 β -actin 单克隆抗体为美国 Bioworld 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

HEC-1B 细胞培养于含有 10%胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的 DMEM 培养液中,于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中培养,每 48 h 换液 1 次,0.25%胰蛋白酶消化传代,3~4 d 传代 1 次。细胞呈单层贴壁生长,选用对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 CCK-8 比色法测定各组 HEC-1B 细胞生长抑制率

取对数生长期的 HEC-1B 细胞胰蛋白酶消化后以 4×10^3 个/孔接种于 96 孔板,待细胞贴壁过夜培养后分别加入 TP(终浓度:10、20、40、80、160 nmol/L)培养 24、48、72 h,同时设不加药的对照组和只加培养液的阴性对照组,每个浓度设 5 个复孔。培养结束后,按照 CCK-8:DMEM=1:10 的比例,每孔加入 110 μ l,培养箱孵育 90 min 后酶标仪测 450 nm 处的吸光度值 $D(450 \text{ nm})$,细胞存活率(%)=[实验组 $D(450 \text{ nm})$ -空白对照组 $D(450 \text{ nm})$]/[阴性对照组 $D(450 \text{ nm})$ -空白对照组 $D(450 \text{ nm})$] $\times 100\%$ 。

1.2.3 CCK-8 法测定加入 caspase 抑制剂 z-VAD-fmk 后 TP 对 HEC-1B 细胞生长的影响

取对数生长期的 HEC-1B 细胞,胰蛋白酶消化后以 4×10^3 个/孔接种于 96 孔板,待细胞贴壁过夜后,分为 4 组:T+Z-:TP(+) z-VAD-fmk(-);T+Z+:TP(+) z-VAD-fmk(+);T-Z+:TP(-) z-VAD-fmk(+);T-Z-:TP(-) z-VAD-fmk(-)。TP 浓度为 40 nmol/L, z-VAD-fmk 浓度为 20 μ mol/L,培养箱内培养 48 h 后用 CCK-8 比色法测定细胞存活率,方法同 1.2.2 节。

1.2.4 Western blot 测定蛋白表达

取对数生长期的 HEC-1B 细胞胰酶消化后,接种于 6 孔板内,待细胞贴壁过夜培养后分别加入 TP(终浓度:20、40、80 nmol/L)培养,同时设不加药的对照组,加药后培养 48 h 提取细胞总蛋白。取等量蛋白样品行 SDS-PAGE 电泳,后转到硝酸纤维膜上,用冰 PBS 漂洗后置于含 5%脱脂奶粉的 TBST 溶液中封闭 2 h,加入 1:1 000 的 caspase-3、9 和 bcl-2 兔抗人单克隆抗体,1:4 000 的 β -actin 兔抗人单克隆抗体,4 $^{\circ}$ C 过夜,PBST 溶液洗涤 3 次。辣根过氧化物酶标记的二抗(稀释比例 1:1 000),室温孵育 90 min 后,用 PBST 溶液洗涤 4 次,ECL 显影。胶片经 Quantity One 成像分析系统扫描分析。

1.3 统计学方法

以上实验均重复 3 次。应用 SPSS17.0 统计软件进行分析,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间均数的两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P \leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TP 对子宫内膜癌 HEC-1B 细胞生长具有明显的抑制作用

随着时间和药物浓度的增加,TP 对 HEC-1B 细胞生长的抑制作用逐渐增加,表现为时间和浓度依赖性,随着药物作用时间的延长和浓度的增加,细胞存活率逐渐降低。TP 作用 48、72 h 时对 HEC-1B 细胞生长抑制作用明显($P \leq 0.01$,图 1)。

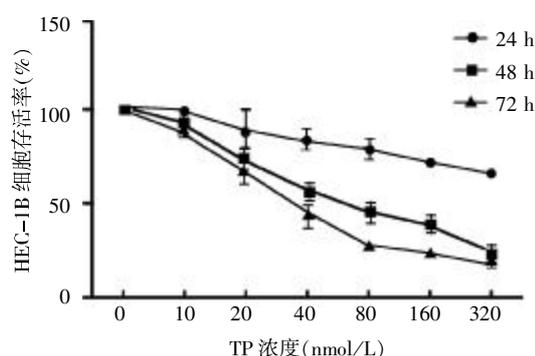


图 1 TP 对 HEC-1B 细胞存活率的影响

Figure 1 The effects of TP on proliferation of HEC-1B cells

2.2 加入 caspase 抑制剂 z-VAD-fmk 后 TP 对子宫内膜癌 HEC-1B 细胞生长的抑制作用

CCK-8 比色法显示,只加入 TP 组(T+Z-)细胞存活率为(54.10 \pm 3.66)%,先加入 z-VAD-fmk 孵育 1 h 后再加 TP 处理组(T+Z+)细胞存活率上升为(73.42 \pm 3.22)%,说明加入 z-VAD-fmk 后 TP 促进凋

亡能力明显减低($P < 0.01$, 图 2)。只加入 z-VAD-fmk 组(T-Z+)细胞存活率为(98.99 ± 0.90)%, 与对照组(T-Z-)相比 $P > 0.05$, 说明仅加入 z-VAD-fmk 对细胞生长没有抑制作用。

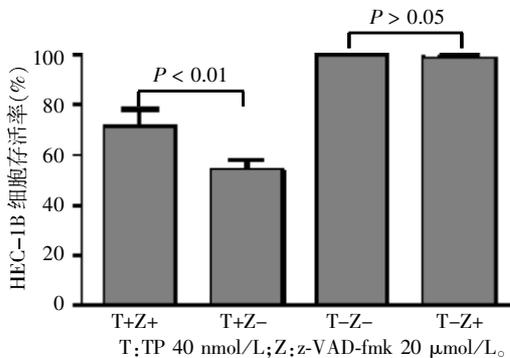


图 2 加入 caspase 抑制剂 z-VAD-fmk 后 TP 对 HEC-1B 生长的影响

Figure 2 The effects of TP on proliferation of HEC-1B cells with caspase inhibitor

2.3 TP 对 HEC-1B 细胞内 caspase-3、9 和 bcl-2 蛋白表达影响

按照相应的药物浓度加入各组细胞处理 48 h, 与对照组相比, 随着药物剂量的改变, caspase-3、9 和 bcl-2 的表达呈浓度依赖关系, caspase-3、9 的表达增加, bcl-2 的表达下降, 各浓度组与对照组相比差异均有统计学意义($P < 0.05$, 图 3)。

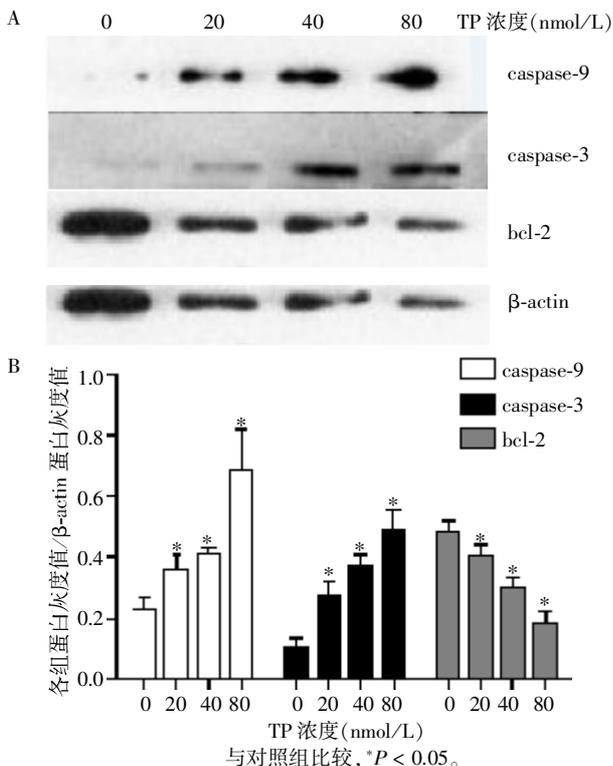


图 3 加入不同浓度 TP 后各蛋白的变化情况

Figure 3 The protein expressions tested with the different concentration TP

2.4 加入 caspase 抑制剂 z-VAD-fmk 后, 再加入 TP 对 caspase-3、9 蛋白表达的影响

同时加入 z-VAD-fmk 与 TP 组 (T+Z+) 的 caspase-3、9 蛋白表达与只加入 TP 组(T+Z-)相比明显下降($P < 0.05$, 图 4), 但仍高于对照组(T-Z-)及只加入 z-VAD-fmk 组(T-Z+), 与 CCK-8 检测结果相符。

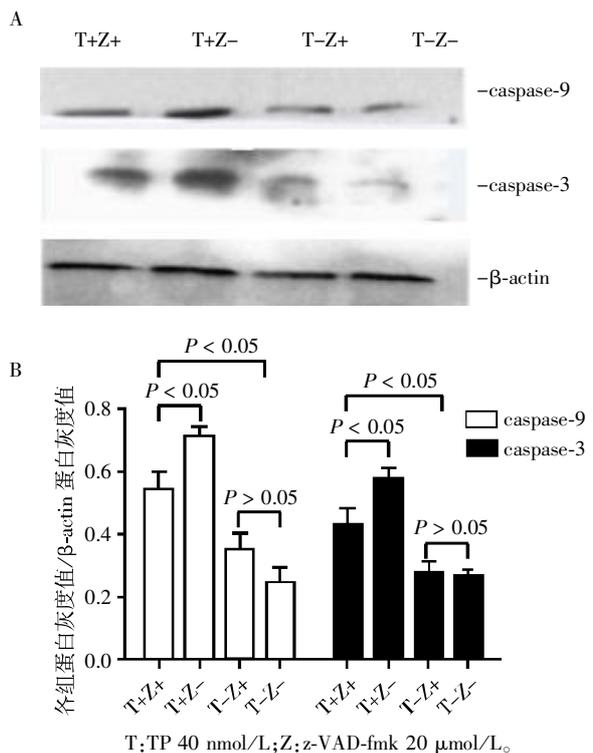


图 4 加入 caspase 抑制剂后对 caspase-3、9 蛋白表达的影响

Figure 4 The expressions of protein level of caspase-3/9 with caspase inhibitor

3 讨论

大部分早期子宫内膜癌患者, 手术能达到有效的治疗目的, 而晚期的患者则以手术、化疗、放疗等两种或者两种以上联合治疗方可控制病情的发展^[3]。放疗能够降低子宫内膜癌患者的局部复发率, 但不能提高其远期生存率, 晚期或复发而不能手术切除的患者, 化疗将成为其关键的治疗手段^[4]。研究证明 TP 具有广泛抗肿瘤作用, 对 60 余种肿瘤包括乳腺癌^[5]、直肠癌^[6]、前列腺癌^[7]、口腔癌^[8]等具有抑制作用。体内外研究证实 TP 与传统的抗肿瘤药物如紫杉醇、多柔比星、丝裂霉素 C、顺铂等相比具有更有效的抗肿瘤活性^[9]。

线粒体凋亡途径由 bcl-2 家族调控, 可分为促进凋亡蛋白和抑制凋亡蛋白, 这两种蛋白的相互作用决定了细胞是否凋亡^[10]。其中 bcl-2 是一类定位于染色体 18q21 的重要致癌基因, 是第一个被发现能够调节

凋亡的基因。它能以不依赖于细胞分裂的方式阻止细胞程序性凋亡^[11]。在传统的肿瘤治疗中 bcl-2 蛋白的表达与多种肿瘤的发生及耐药性的产生有密切联系^[12],在肿瘤细胞中即使存在完整的 p53,过度表达的 bcl-2 也可导致肿瘤细胞耐药性的产生^[13]。本实验证实不同浓度的 TP 能够显著抑制 HEC-1B 细胞的生长,具有时间和浓度依赖性($P < 0.05$),同时 Western blot 的结果显示随着药物剂量的增加,bcl-2 蛋白的表达水平与对照组相比明显降低($P < 0.05$),与近年来关于 TP 促进肿瘤细胞凋亡及对凋亡蛋白调控的研究结果相符^[14]。对传统抗肿瘤药物耐药的子宫内膜癌患者,TP 也许可以改善其预后,有助于指导临床治疗。

降低 bcl-2 蛋白的表达可以促进细胞色素 C 的释放从而激活依赖于 caspase 通路的细胞凋亡^[14]。在细胞凋亡信号的刺激下,细胞色素 C 从线粒体释放到胞浆中,是线粒体凋亡途径关键的一步,其与细胞凋亡蛋白酶激活因子 AP1 相结合,募集并激活 caspase-9,后激活下游的 caspase-3,启动 caspase 的级联反应^[15]。caspase-3 是在所有细胞中都表达的作为凋亡途径的中枢连接部位的不活跃前体酶,作为凋亡的执行者可以被其他的 caspase 激活,例如活化的 caspase-9^[16]。本研究结果显示随着 TP 药物浓度的增加,caspase-3、9 蛋白的表达逐渐增高 ($P < 0.05$);同时加入 z-VAD-fmk 和 TP 对 HEC-1B 细胞生长的抑制作用明显低于只加入 TP 组($P < 0.05$),与对照组相比仍有一定的生长抑制作用($P < 0.05$),与 Western blot 结果相符,说明 TP 通过依赖 caspase 的线粒体凋亡途径促进子宫内膜癌 HEC-1B 细胞凋亡,但是 z-VAD-fmk 并不能完全阻断 TP 对 HEC-1B 的促凋亡作用,说明 TP 促进 HEC-1B 细胞凋亡的机制中还存在其他途径。

综上所述,TP 可以明显抑制子宫内膜癌 HEC-1B 细胞的生长并促进其凋亡,并能促进 caspase-3、9 的表达,说明 TP 将是一个治疗子宫内膜癌的有效化疗药物。我们未来需要更多的药物和动物实验证明 TP 促进子宫内膜癌细胞凋亡的其他途径,以便将其更好地应用于临床。

[参考文献]

[1] D'Andrilli G, Bovicelli A, Paggi MG, et al. New insights in endometrial carcinogenesis [J]. J Cell Physiol, 2012, 227 (7): 2842-2846
[2] 黄晓昊,孙志华,吴强,等.雷公藤甲素对离体子宫内膜癌细胞增殖及凋亡信号通路 PI3K/P-KB 的影响 [J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 2010, 30(7): 910-913

[3] Tong JS, Zhang QH, Huang X, et al. Icaritin causes sustained ERK1/2 activation and induces apoptosis in human endometrial cancer cells [J]. PLoS One, 2011, 6(3): 16781
[4] Hogberg T, Signorelli M, de Oliveira CF, et al. Sequential adjuvant chemotherapy and radiotherapy in endometrial cancer-Results from two randomised studies [J]. Eur J Cancer, 2010, 46(13): 2422-2431
[5] Liang M, Fu J. Triptolide inhibits interferon- γ -induced programmed death-1-ligand 1 surface expression in breast cancer cells [J]. Cancer Lett, 2008, 270(2): 337-341
[6] Johnson SM, Wang X, Evers BM. Triptolide inhibits proliferation and migration of colon cancer cells by inhibition of cell cycle regulators and cytokine receptors [J]. J Surg Res, 2011, 168(2): 197-205
[7] Li W, Liu Y, Li XX, et al. MAPKs are not involved in triptolide-induced cell growth inhibition and apoptosis in prostate cancer cell lines with different p53 status [J]. Planta Med, 2010, 77(1): 27-31
[8] Chen YW, Lin GJ, Chia WT, et al. Triptolide exerts anti-tumor effect on oral cancer and KB cells *in vitro* and *in vivo* [J]. Oral Oncol, 2009, 45(7): 562-568
[9] 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
[10] Antonsson B. Bax and other pro-apoptotic bcl-2 family "killer-proteins" and their victim the mitochondrion [J]. Cell Tissue Res, 2001, 306(3): 347-361
[11] Sasi N, Hwang M, Jaboin J, et al. Regulated cell death pathways; new twists in modulation of bcl2 family function [J]. Mol Cancer Ther, 2009, 8(6): 1421-1429
[12] Cotter TG. Apoptosis and cancer; the genesis of a research field [J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(7): 501-507
[13] Wan CK, Wang C, Cheung HY, et al. Triptolide induces Bcl-2 cleavage and mitochondria dependent apoptosis in p53-deficient HL-60 cells [J]. Cancer Lett, 2006, 241 (1): 31-41
[14] Kim MJ, Lee TH, Kim SH, et al. Triptolide inactivates Akt and induces caspase-dependent death in cervical cancer cells via the mitochondrial pathway [J]. Int J Oncol, 2010, 37(5): 1177-1185
[15] Yao J, Jiang Z, Duan W, et al. Involvement of mitochondrial pathway in triptolide-induced cytotoxicity in human normal habitant L-02 cells [J]. Biol Pharm Bul, 2008, 31 (4): 592-597
[16] Shu B, Duan W, Yao J, et al. Caspase 3 is involved in the apoptosis induced by triptolide in HK-2 cells [J]. Toxicol in Vitro, 2009, 23(4): 598-602