

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.23.004

雷公藤甲素对 U251 细胞自噬活性的影响及机制研究*

惠 双¹,郭宏强²,王 博¹,王 媛¹,张成辉¹

(1. 河南省南阳市中心医院肿瘤内科 473000;2. 郑州大学附属肿瘤医院肿瘤内科,郑州 450000)

[摘要] **目的** 探讨雷公藤甲素对 U251 细胞自噬活性的影响及机制。**方法** 采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测雷公藤甲素对 U251 细胞的增殖抑制率、半数抑制浓度(IC_{50});免疫荧光化学法测定细胞中 LC3-Ⅱ表达,Western blot 法测定 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ、Beclin-1、磷酸化 P70、磷酸化 Erk、磷酸化 AKT 蛋白的表达。**结果** 雷公藤甲素作用于 U251 细胞后,细胞增殖受抑制,24 h 的 IC_{50} 为 0.73 $\mu\text{mol/L}$,48 h 的 IC_{50} 为 0.27 $\mu\text{mol/L}$ 。免疫荧光法测定 6、12、24 h 后 LC3-Ⅱ水平增高;Western blot 法测定,LC3-Ⅱ水平、LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ比值随时间增高;Beclin-1 水平增高,磷酸化 P70、磷酸化 Erk 表达降低、磷酸化 AKT 无明显变化。**结论** 雷公藤甲素可抑制 U251 细胞增殖并促进自噬,并可通过上调 Beclin-1 表达和抑制 mTOR 的活性来促进自噬。

[关键词] 雷公藤内酯;自噬;胶质母细胞瘤;U251 细胞

[中图分类号] R733.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2016)23-3179-03

The influence and mechanism of Triptolide on autophagy in human glioma cell line U251*

Hui Shuang¹,Guo Hongqiang²,Wang Bo¹,Wang Yuan¹,Zhang Chenghui¹

(1. Department of Oncology, Central Hospital of Nanyang City, Nanyang, Henan 473000, China;

2. Department of Oncology, Affiliated Tumor Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the variation of autophagic activity in U251 cells after treatment with Triptolide and its mechanisms. **Methods** We measured the proliferation inhibition rate, half inhibitory concentration (IC_{50}) by MTT assay; LC3-Ⅱ protein expression were tested by immunofluorescence assay; protein expression of LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ, Beclin-1, Phospho-P70, Phospho-Erk and Phospho-AKT were measures by Western blot. **Results** After treatment with Triptolide, the proliferation of U251 cells was inhibited, with the IC_{50} of 0.73 $\mu\text{mol/L}$ at 24 h and the IC_{50} of 0.27 $\mu\text{mol/L}$ at 48 h; the expression of LC3-Ⅱ were increased at 6, 12, 24 h; the expression of LC3-Ⅱ, LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ and Beclin-1 increased, the expression of Phospho-P70 and Phospho-Erk decreased and the expression of Phospho-AKT had no obvious change. **Conclusion** Triptolide could inhibit the proliferation of U251 cells and induce cell autophagy; Triptolide could increase the autophagy by upregulating Beclin-1 expression and inhibiting the activity of mTOR.

[Key words] Triptolide; autophagy; glioblastoma; U251 cells

胶质瘤是源于神经外胚层间质细胞的颅内恶性肿瘤,约占颅脑肿瘤的 50%。其中多形胶质母细胞瘤是较常见的一种病理类型,标准治疗为手术和术后放射治疗。其恶性程度高,治疗效果差,接受标准治疗患者的中位生存期仅为 9 个月^[1]。近年来,对该病治疗进展主要在替莫唑胺同步放化疗并联合化疗或靶向治疗,但仍未能明显提高其疗效^[2]。因此,寻求有效的治疗药物对于多形胶质母细胞瘤的治疗有着重要意义。雷公藤甲素是中药材雷公藤的一种提取成分,具有抗炎、免疫抑制、抗肿瘤、抗生育等多种作用^[3-6]。有文献表明雷公藤甲素可影响胶质瘤细胞周期调控和促进凋亡^[7-8]。雷公藤甲素作用于多形胶质母细胞瘤细胞系 U251 细胞,发现其能促进细胞自噬和抑制细胞增殖,本研究初步研究其发生机制,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 U251 细胞系由郑州大学附属肿瘤医院中心实验室提供;雷公藤甲素标准品由福建汉堂生物制药公司提供;四甲基偶氮唑蓝(MTT)、免疫荧光试剂盒、细胞总蛋白提取试剂盒为上海生物工程有限公司产品;鼠抗人单克隆抗体、兔抗鼠酶标二抗为上海碧云天生物公司产品;PE 标记单抗、流式细胞仪(FACSCanto II 型)为美国 BD 公司产品;酶联免疫吸附实验

(ELISA) 比色仪: Metertech. Σ 960 型,蛋白电泳仪: A13 1154 型。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 实验选用含有 10% 灭活小牛血清,青霉素和链霉素各 100 KU/L 的 RPMI-1640 培养液,将 U251 细胞加入该培养液置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱内悬浮培养。

1.2.2 细胞增殖抑制的检测 将处于对数生长期 U251 细胞以 $3 \times 10^5/\text{L}$ 浓度接种于 96 孔培养板,加入终浓度为 0、0.01、0.10、0.30、0.50 $\mu\text{mol/L}$ 的雷公藤甲素,对照组加入等量的 RPMI-1640 培养液,各孵育 60 h。每 12 h 收集各组 U251 细胞,使用 MTT 法在 ELISA 比色仪 570 nm 处记录吸光度(A)值,并计算出不同浓度组雷公藤甲素在各时间点对 U251 细胞的增殖抑制率及半数抑制浓度(IC_{50})。每浓度组设 5 个平行副孔测均值。增殖抑制率=(对照孔 A 值-各浓度孔 A 值)/对照孔 A 值 $\times 100\%$, IC_{50} 由线性回归方程求得。

1.2.3 免疫荧光法测定 U251 细胞 LC3-Ⅱ蛋白的表达 将加入 0.20 $\mu\text{mol/L}$ 雷公藤甲素培养的 U251 细胞组设为实验组,加入等量生理盐水的 U251 细胞设为对照组。培养 6、12、24 h 后收集各组细胞,上离心机以 3 000 r/min 分离细胞,用磷酸盐

* 基金项目:国家自然科学基金青年基金(81101797)。 作者简介:惠双(1976—),副主任医师,硕士,主要从事肿瘤的内科治疗及肿瘤的分子病理学方面研究。

缓冲液(PBS)洗涤后于多聚赖氨酸玻片上进行细胞涂片;使用 4%多聚甲醛固定 30 min 后,用 PBS 洗涤 3 次后晾干。置于 37 ℃用山羊血清封闭 20 min,加入鼠抗人 LC3-II 一抗置 4 ℃冰箱过夜。再次用 PBS 洗涤 3 次后,加入荧光素标记兔抗鼠二抗,置于 37 ℃孵育 15 min 后,封片剂封片。荧光显微镜下观察并摄像。

1.2.4 Western blot 法测细胞自噬相关蛋白的表达 分组及培养方法同免疫荧光法。各组收集细胞 2×10^7 ,用细胞总蛋白提取试剂盒,裂解细胞,4 ℃离心机以 12 000 g 分离蛋白。加入 PBS 液煮沸 5 min 后上样,12%聚丙烯酰胺凝胶进行电泳。电转法转膜后,用 2%牛血清蛋白-磷酸盐缓冲液(BSA-PBS)封闭过夜,次日加鼠抗人单抗于 37 ℃孵育 4 h,PBS 依次冲洗 3 次,加辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗置 37 ℃孵育 1 h,PBS 再次冲洗 3 次,加电化学发光(ECL)发光液显色,置暗室曝光显影,用图像分析软件记录图片数据带灰度分析,用该法测定实验组和对照组 LC3- I、LC3- II、Beclin-1、磷酸化 P70、磷酸化 Erk、磷酸化 AKT 蛋白的表达。

1.3 统计学方法 采用 SPSS17.0 软件数据分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验;计数资料用率表示,组间采用 χ^2 检验,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学

意义。

2 结 果

2.1 雷公藤甲素对 U251 细胞的增殖抑制 不同浓度雷公藤甲素对 U251 细胞均存在增殖抑制作用,见表 1、图 1。24、48 h 的雷公藤甲素对 U251 细胞的 IC_{50} 为 0.73 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.27 $\mu\text{mol/L}$ 。

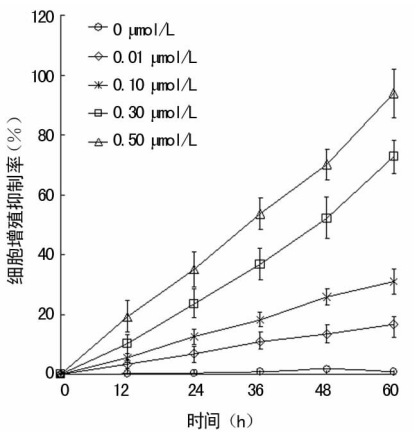


图 1 不同浓度雷公藤甲素对 U251 细胞增殖抑制率曲线

表 1 不同浓度雷公藤甲素对 U251 细胞的增殖抑制作用($\bar{x}\pm s$)

组别	A ₅₆₀ 值(nm)		抑制率(%)	
	24 h	48 h	24 h	48 h
0.50 $\mu\text{mol/L}$ 雷公藤甲素组	0.569 $\pm$ 0.063	0.183 $\pm$ 0.068	34.9 $\pm$ 5.8	70.2 $\pm$ 5.1
0.30 $\mu\text{mol/L}$ 雷公藤甲素组	0.667 $\pm$ 0.064	0.287 $\pm$ 0.067	23.6 $\pm$ 4.6	52.3 $\pm$ 6.9
0.10 $\mu\text{mol/L}$ 雷公藤甲素组	0.763 $\pm$ 0.085	0.423 $\pm$ 0.070	12.5 $\pm$ 2.7	25.8 $\pm$ 2.7
0.01 $\mu\text{mol/L}$ 雷公藤甲素组	0.813 $\pm$ 0.085	0.513 $\pm$ 0.070	6.8 $\pm$ 2.7	13.4 $\pm$ 3.1
0 $\mu\text{mol/L}$ 雷公藤甲素组	0.869 $\pm$ 0.067	0.581 $\pm$ 0.072	0.4 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.5
对照组	0.872 $\pm$ 0.067	0.591 $\pm$ 0.072	0	0

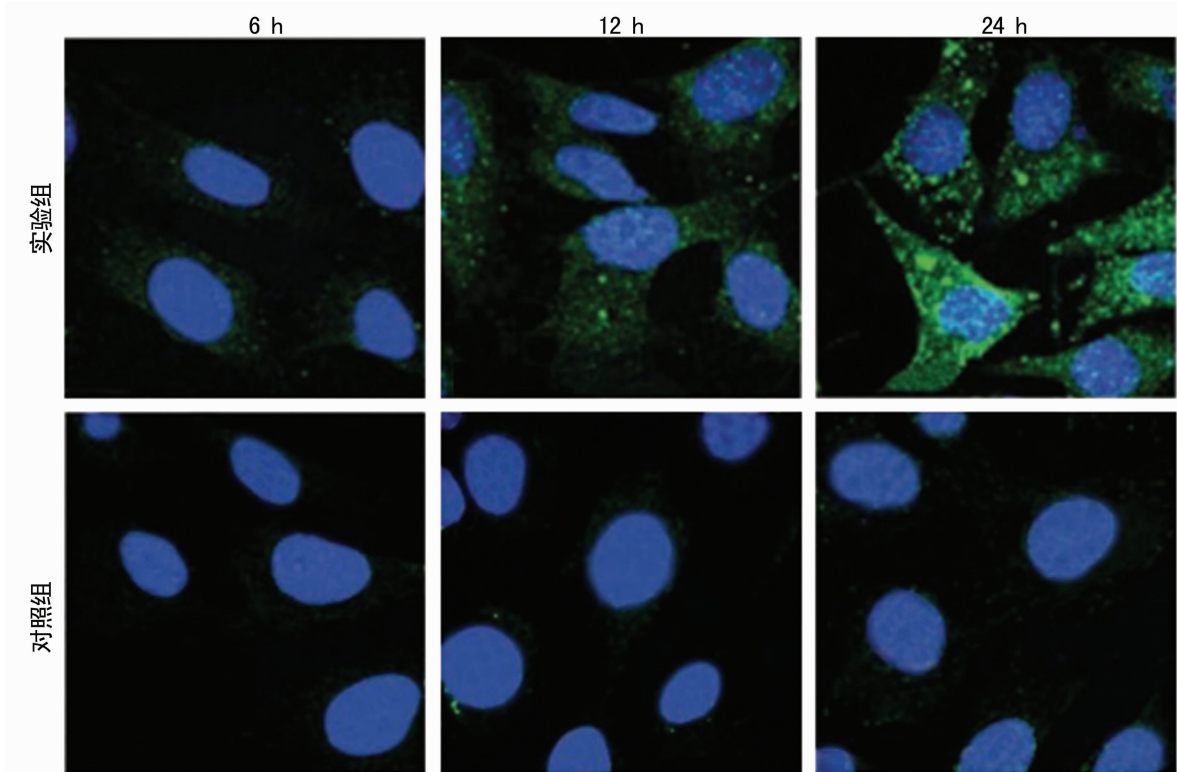


图 2 免疫荧光法测定 U251 细胞中 LC3- II 蛋白的表达

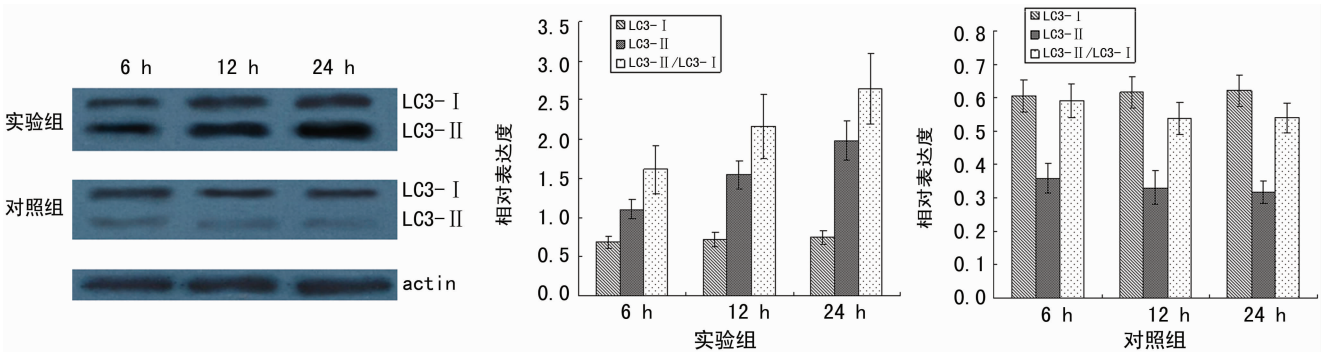


图 3 Western blot 法测定 LC3- I 和 LC3- II 蛋白的表达

2.2 免疫荧光显微镜下观察细胞 将实验组和对照组细胞置于荧光显微镜下发现,对照组细胞质中 LC3- II 荧光信号极低且随时间无明显变化,实验组细胞质 LC3- II 荧光信号随时间而明显增强,见图 2。

2.3 Western blot 法测定 LC3- I 和 LC3- II 蛋白的表达 随时间延长,实验组 LC3- II 蛋白表达明显增加,LC3- II /LC3- I 比值也逐渐增高。对照组 LC3- II 表达较低,随时间无明显变化,见图 3。实验组与对照组相比,在 6、12、24 h 后,LC3- I 相对表达度、LC3- II 相对表达度、LC3- II /LC3- I 比值差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.4 Western blot 法测定 Beclin-1、磷酸化 P70、磷酸化 Erk、磷酸化 AKT 蛋白的表达 用 Western blot 法测定第 24 h 的实验及对照组各蛋白表达差异,发现实验组 Beclin-1 组较对照组明显增高,而实验组磷酸化 P70、磷酸化 Erk 较对照组明显降低,磷酸化 AKT 两组无明显差异,见图 4。实验组与对照组相比,Beclin-1、磷酸化 P70、磷酸化 Erk 蛋白相对表达度差异有统计学意义($P<0.05$),磷酸化-AKT 蛋白相对表达度差异无统计学意义($P>0.05$)。

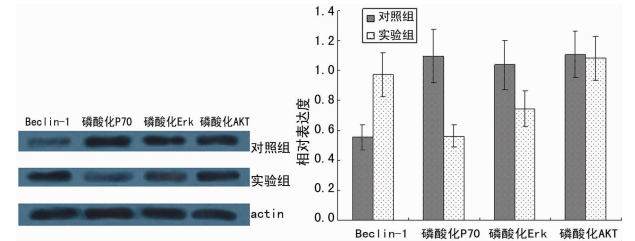


图 4 Western blot 法测定 Beclin-1、磷酸化-P70、磷酸化-Erk、磷酸化-AKT 蛋白的表达

3 讨 论

细胞自噬是真核生物细胞内溶酶体依赖性的蛋白质或细胞器降解过程,是细胞应激的一种表现。自噬与肿瘤的增殖调控,能量代谢,凋亡调控,免疫逃逸,转移浸润,微环境改变等诸多生物学行为密切相关^[9-13],研究肿瘤细胞的自噬属性对于肿瘤的防治有着重要的意义。

微管相关轻链蛋白 3 (LC3)在自噬体的输送和与溶酶体的融合过程起重要作用,其活性体 LC3- II 定位于自噬体外膜,LC3- II /LC3- I 比值是反映自噬强度的一个重要指标^[13-14]。Beclin-1 在自噬体隔膜隔离和囊泡封闭过程中起重要作用,其可与 P53 蛋白、B 细胞淋巴瘤 2(Bcl-2)蛋白家族等多种蛋白相互作用而影响自噬^[15]。雷帕霉素靶蛋白(mTOR)是自噬信号转导通路的一个枢纽,活化型 mTOR 复合体通过抑制 ULK1-FIP200-Atg13 复合体激活从而抑制自噬,P70 是 mTOR 一个重要底物,实验常以 P70 数量反映 mTOR 活性^[9,16],Ras/

MAPK/Erk/mTOR 通路和 PI3KI/AKT/mTOR 通路是 mTOR 上游 2 个重要通路,由多种生长因子信号介导,通过激活 mTOR 实现对自噬的抑制^[16-17]。本实验发现雷公藤甲素可诱导 U251 细胞自噬而抑制其生长,并明确了此作用的部分机制:(1)增强 Beclin-1 表达;(2)下调 Erk 表达,从 Ras/MAPK/Erk/mTOR 通路抑制 mTOR 活性。

本研究为临床应用雷公藤甲素治疗胶质母细胞瘤提供了理论依据和实验室数据。雷公藤甲素诱导 U251 细胞自噬的其他机制,本课题组正在研究中并将陆续发表研究成果。

参考文献

[1] Stewart LA. Chemotherapy in adult high-grade glioma;a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials [J]. Lancet, 2002, 359 (9311):1011-1018.

[2] Stupp R, Hegi ME, Mason WP, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial[J]. Lancet Oncol, 2009, 10(5): 459-466.

[3] 居星耀. 雷公藤甲素诱导 H22 细胞凋亡作用研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2007, 16(5): 586-587, 597.

[4] 于艳秋, 张义侠, 金玉楠, 等. 雷公藤多甙对急性移植植物抗宿主病小鼠的作用[J]. 中国实验血液学杂志, 2006, 14 (5): 928-933.

[5] Phillips PA, Dudeja V, Mccarroll JA, et al. Triptolide induces pancreatic cancer cell death via inhibition of heat shock protein 70 [J]. Cancer Res, 2007, 67 (19): 9407-9416.

[6] Antonoff MB, Chugh R, Borja-Cacho D, et al. Triptolide therapy for neuroblastoma decreases cell viability in vitro and inhibits tumor growth in vivo[J]. Surgery, 2009, 146 (2): 282-290.

[7] Zhang HP, Zhu WB, Su XW, et al. Triptolide inhibits proliferation and invasion of malignant glioma cells [J]. J Neurooncol, 2012, 109(1): 53-62.

[8] Lin J, Chen L, Lin Z, et al. Inhibitory effect of triptolide on glioblastoma multiforme in vitro[J]. J Int Med Res, 2007, 35(4): 490-496.

[9] Rabinowitz JD, White E. Autophagy and metabolism[J]. Science, 2010, 330(6009): 1344-1348.

[10] Sui X, Chen R, Wang Z, et al. Autophagy (下转第 3184 页)

一定的交互关系。本研究单独 MDP、ATP 刺激单核细胞后, IL-1 β 、IL-18 的水平比较微弱表达,但与空白对照组相比较差异有统计学意义。MDP 预处理后的单核细胞中加入 ATP, ELISA 测试后发现 IL-1 β 、IL-18 的水平显著高于空白对照组,较二者单独刺激后有明显差异。但 IL-1 β 差异较显著,这可能与它自身特性有关,胞外的 IL-1 β 与胞内的核因子 κ B(NF- κ B)、胞内的 NF- κ B 与细胞质内的 NOD2 构成两对正反馈环路,从而放大最初的炎症信号,导致机体损伤及微循环障碍加重^[10]。

由 Real-time PCR 结果猜想可能与以下因素有关:(1)采纳的 MDP 预处理时间与 NF- κ B 达到峰值的时间相符;(2)MDP 所致 NF- κ B 信号通路的活化,为大量炎症前体基因的转录提供了前提条件。Caspase-1 的活化不仅是 ATP 激活 NLRP3 的结果,而且是 MDP 激活 NLRP1 的结果,Caspase-1 是二者联合刺激后产生效应的关键点^[11];(3)MDP 的预刺激既提供了大量无活性的 NLRP3 蛋白寡聚体又加强了 NLRP3 对 ATP 的敏感性,从而导致更多 Caspase-1 的自身激活^[12];(4)MDP 激活 NOD2 后促使正反馈环路形成,大量的 NOD2 凭借 NLRP1 这条途径切割 Pro-Caspase-1,诱发大量 IL-1 β 、IL-18 分泌到细胞外,而细胞外 IL-1 β 的增多又促进了其上游因子间正反馈环路的构成。

综上,MDP、ATP 单独刺激单核细胞后 NLRP3 及下游炎症因子的表达很微弱,MDP 联合 ATP 刺激细胞后可促进 NLRP3 及下游炎症因子的表达显著增加,二者之间存在促进及协同作用,但产生协同效应的具体机制及信号途径的具体位点尚不清楚,有待于进一步研究去证实。NLRP3 及炎症因子参与了动脉粥样硬化的形成与发展,干预其下游因子及调控其信号通路将为治疗动脉粥样硬化的形成提供新的方向。

参考文献

- [1] Fukata M, Vamadevan AS, Abreu MT. Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders[J]. *Semin Immunol*, 2009, 21(4): 242-253.
- [2] Duewell P, Kono H, Rayner KJ, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals[J]. *Nature*, 2010, 464(7293): 1357-1361.
- [3] Wang L, Qu P, Zhao J, et al. NLRP3 and downstream cytokine expression elevated in the monocytes of patients with coronary artery disease[J]. *Arch Med Sci*, 2014, 10(4): 791-800.
- [4] Mayor A, Martinon F, De Smedt T, et al. A crucial function of SGT1 and HSP90 in inflammasome activity links mammalian and plant innate immune responses[J]. *Nat Immunol*, 2007, 8(5): 497-503.
- [5] Wang L, Qu P, Zhao J, et al. NLRP3 and down-stream cytokine expression elevated in the monocytes of patients with coronary artery disease[J]. *Arch Med Sci*, 2014(10): 791-800.
- [6] Hoegen T, Tremel N, Klein M, et al. The NLRP3 inflammasome contributes to brain injury in pneumococcal meningitis and is activated through ATP-dependent lysosomal cathepsin B release[J]. *J Immunol*, 2011, 187(10): 5440-5451.
- [7] Park JH, Kim YG, McDonald C, et al. RICK/RIP2 mediates innate immune responses induced through Nod1 and Nod2 but not TLRs[J]. *J Immunol*, 2007, 178(4): 2380-2386.
- [8] Strober W, Murray PJ, Kitani A, et al. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2[J]. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6(1): 9-20.
- [9] Franchi L, Eigenbrod T, Núñez G. Cutting edge: TNF- α mediates sensitization to ATP and silica via the NLRP3 inflammasome in the absence of microbial stimulation[J]. *J Immunol*, 2009, 183(2): 792-796.
- [10] Dinarello CA. A clinical perspective of IL-1 β as the gatekeeper of inflammation[J]. *Eur J Immunol*, 2011, 41(5): 1203-1217.
- [11] Hsu LC, Ali SR, McGillivray S, et al. A NOD2-NALP1 complex mediates caspase-1-dependent IL-1 β secretion in response to *Bacillus anthracis* infection and muramyl dipeptide[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(22): 7803-7808.
- [12] Jarry A, Vallette G, Cassagnau E, et al. Interleukin 1 and interleukin 1 β converting enzyme (caspase 1) expression in the human colonic epithelial barrier. Caspase 1 downregulation in colon cancer[J]. *Gut*, 1999, 45(2): 246-251.

(收稿日期:2016-04-01 修回日期:2016-06-23)

(上接第 3181 页)

- and chemotherapy resistance; a promising therapeutic target for cancer treatment[J]. *Cell Death Dis*, 2013(4): e838.
- [11] White E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(6): 401-410.
 - [12] Mathew R, White E. Autophagy in tumorigenesis and energy metabolism: friend by day, foe by night[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2011, 21(1): 113-119.
 - [13] Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 and Autophagy[J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 445(1): 77-88.
 - [14] Kuma A, Matsui M, Mizushima N. Aggregates independ-

ent of autophagy: caution in the interpretation of LC3 localization[J]. *Autophagy*, 2007, 3(4): 323-328.

- [15] Blander JM. A long-awaited merger of the pathways mediating host defence and programmed cell death[J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(9): 601-618.
- [16] Yang ZF, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2010, 22(2): 124-131.
- [17] Baehrecke EH. Autophagy: dual roles in life and death? [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6(6): 505-510.

(收稿日期:2016-04-16 修回日期:2016-06-21)