

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.05.002

雷公藤甲素对肿瘤坏死因子- α 介导的 HCM 心肌细胞生长损伤保护作用研究*

林芸芸¹, 宋艳玲¹, 蔡海云², 顾申红^{1△}

(1. 海南医学院第一附属医院, 海南 海口 570000; 2. 海南医学院第一临床学院, 海南 海口 570000)

摘要:目的 探讨雷公藤甲素对肿瘤坏死因子- α (TNF- α)介导的 HCM 心肌细胞生长损伤的保护作用。方法 采用四唑盐(MTT)比色法检测 TNF- α 抑制 HCM 细胞生长的半数抑制浓度(IC_{50})及雷公藤甲素干预对 HCM 细胞生长抑制率的影响;采用流式细胞术检测 TNF- α 联合雷公藤甲素对 HCM 细胞凋亡率的影响;使用相应试剂盒检测细胞上清液中肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)水平。结果 TNF- α 对 HCM 细胞具有明显的生长抑制和凋亡诱导作用,且血清 CK 和 LDH 表达明显升高;低质量浓度雷公藤甲素干预后, TNF- α 对 HCM 细胞的生长抑制和诱导凋亡作用均减弱($P < 0.01$),血清 CK 和 LDH 表达呈下降趋势。结论 低质量浓度雷公藤甲素可减弱 TNF- α 对 HCM 细胞的生长抑制和凋亡诱导作用。

关键词:雷公藤甲素;肿瘤坏死因子- α ;人心肌细胞;生长损伤;细胞试验

中图分类号:R932;R285.5;R273

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2019)05-0005-04

Protective Effect of Triptolide on TNF- α -Mediated Damage in the Growth of HCM Cardiomyocytes

LIN Yunyun¹, SONG Yanling¹, CAI Haiyun², GU Shenhong¹

(1. The First Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou, Hainan, China 570000; 2. The First Clinical College, Hainan Medical College, Haikou, Hainan, China 570000)

Abstract: Objective To investigate the protective effect of triptolide on TNF- α -mediated damage in the growth of HCM cardiomyocytes.

Methods MTT assay was used to detect the IC_{50} concentration of TNF- α inhibiting the growth of HCM cells, and the effect of triptolide on inhibition rate of HCM cell growth, the flow cytometry was used to detect the effect of TNF- α combined with triptolide on the apoptotic rate of HCM cells, and the corresponding kits were used to detect the levels of creatine kinase(CK) and lactate dehydrogenase(LDH) in cell supernatants. **Results** TNF- α had significant inhibition effect on the growth of HCM cells and significant induction effect on the apoptosis of HCM cells, and the expression of serum CK and LDH was significantly increased. After intervention with low concentrations of triptolide, the effect of TNF- α on the growth inhibition and apoptosis induction of HCM cells were both weakened($P < 0.01$), the expression of serum CK and LDH showed a decreasing trend. **Conclusion** Low concentrations of triptolide can attenuate the effect of TNF- α on inhibition of growth and apoptosis induction in HCM cells.

Key words: triptolide; tumor necrosis factor- α ; human cardiomyocytes; growth injury; cell test

肿瘤坏死因子- α (TNF- α)是一种主要由巨噬细胞和单核细胞产生的促炎细胞因子,除参与正常炎症反应和免疫反应外^[1],还可作为独立因素参与心肌损伤^[2],也可作为损伤心肌细胞的诱导剂。雷公藤甲素(TW)是中药雷公藤的主要活性成分,具有抗炎、抗癌等多种药理作用^[3-4]。本研究中通过体外实验研究了 TW 干预 TNF- α 对 HCM 心肌细胞的生长抑制和凋亡诱导作用。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

细胞:人心肌细胞 HCM(美国模式培养物保藏中心,ATCC,批号为 BNCC337719)。

仪器:c150 型 CO₂ 细胞培养箱(德国 Binde 公司);

SW-CJ 型超净工作台(苏州净化设备公司);A10 型纯水仪(美国 Millipore);DMI8 型倒置显微镜(德国莱卡公司);MDF-C8V1 型-80℃超低温冰箱(日本 Sanyo 公司);FC500MCL 型流式细胞仪(美国 Beckman 公司)。

试剂:高糖 DMEM 培养基(批号为 10569010),胰蛋白酶(批号为 25200056),乙二胺四乙酸(EDTA,批号为 AM9260G),磷酸盐缓冲溶液(PBS,批号为 1001002),胎牛血清(FBS,批号为 10099141),均购于美国 Gibco 公司;二甲亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO,批号为 D2650),TW(批号为 38748-32-2, HPLC 法纯度 > 98%),均购于美国 Sigma 公司;TNF- α (北京义翘神州生物科技有限公司,批号为 10602-HNAE);MTS 细胞毒性检测试剂盒(美国 Promega 公司,批号为 G3582);Annexin V -

*基金项目:2015 年度国家自然科学基金[81560054]。

第一作者:林芸芸,女,大学本科,主治医师,研究方向为全科医学和老年病学,(电子信箱)35290637@qq.com。

△通信作者:顾申红,硕士研究生,教授,硕士研究生导师,研究方向为全科医学、心血管内科和老年科临床、科研和教学,(电子信箱)1574063710@qq.com。

FITC /PI 凋亡测定试剂盒(美国 Sigma - Aldrich 公司,批号为 APOAF - 20TST);肌酸激酶(CK)活性检测试剂盒(上海哈灵生物科技有限公司,批号为 HL70047,20T);乳酸脱氢酶(LDH)活性检测试剂盒(上海哈灵生物科技有限公司,批号为 HL20042,48T)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

人心肌细胞 HCM 为贴壁细胞,使用含有 10% FBS、100 U/mL 青霉素和 100 g/L 链霉素的高糖 DMEM 培养基培养,置 5% CO₂,37℃ 细胞培养箱中培养。待细胞生长至约 90% 时,弃去原培养基,用 PBS 轻轻吹吸 1~2 次,用 0.25% 胰蛋白酶消化,传代(平均 2 d 传代 1 次)。

1.2.2 四唑盐(MTT)比色法检测细胞生长抑制

TNF-α 或 TW:将 HCM 细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化,制成单细胞悬液,按 3 × 10⁴ 个细胞/孔的密度均匀接种于 96 孔板。第 2 天待细胞贴壁生长后弃去培养基,用 PBS 洗去未贴壁细胞,加入新鲜培养基。实验组分别加入不同质量浓度(50, 100, 150, 200, 250, 300 ng/mL)的 TNF-α 或不同质量浓度(1, 3, 10, 30, 50 ng/mL)的 TW,对照组则加等量不含药物的培养液。继续培养 24 h,弃去培养上清液,每孔加 MTT 20 μL 和不含血清培养基 100 μL,37℃ 孵育 0.5~1.0 h。最后用酶标仪在 480 nm 波长处检测各孔吸光度值,并计算细胞存活率。细胞存活率(%) = 1 - [(实验组 A₄₉₀ - 校零孔 A₄₉₀) / (对照组 A₄₉₀ - 校零孔 A₄₉₀)] × 100%。

TW 联合 TNF-α:将 HCM 细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化,制成单细胞悬液,按 3 × 10⁴ 个细胞/孔的密度均匀接种于 96 孔板。第 2 天待细胞贴壁生长后弃去培养基,用 PBS 洗去未贴壁细胞,加入新鲜培养基。处理组加入 245 ng/mL 的 TNF-α 进行处理,实验组分别加入不同质量浓度(3, 10, 30, 50 ng/mL)的 TW。继续培养 24 h,弃去培养上清液,每孔加 MTT 20 μL 和不含血清培养基 100 μL,37℃ 孵育 0.5~1.0 h。最后用酶标仪在 480 nm 波长处检测各孔吸光度值,并计算细胞存活率。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡

根据 Annexin V - FITC/PI 凋亡检测试剂盒说明书进行操作。将 HCM 细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化,制成单细胞悬液,按 2 × 10⁵ 个细胞/孔的密度均匀接种于 6 孔板。第 2 天待细胞贴壁生长后弃去培养基,用 PBS 洗去未贴壁细胞,加入新鲜培养基。处理组加入 245 ng/mL 的 TNF-α 进行处理,实验组分别加入不同质量浓度(3, 10, 30, 50 ng/mL)的 TW。继续培养 24 h,弃去培养上清液,胰酶消化、离心、收集细胞,用 250 μL 结合缓冲液重悬细胞并调整细胞浓度约为 1 × 10⁶ 个细胞/mL。向细胞悬液中依次加入 Annexin V - FITC 和 PI 溶液,

混匀后室温避光孵育 15 min,加入 400 μL PBS,混匀后上流式细胞仪检测分析。

1.2.4 试剂盒检测细胞上清液中 CK 和 LDH 水平

将 HCM 细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化,制成单细胞悬液,按 2 × 10⁵ 个细胞/孔的密度均匀接种于 6 孔板。第 2 天待细胞贴壁生长后弃去培养基,用 PBS 洗去未贴壁细胞,加入新鲜培养基。处理组加入 245 ng/mL TNF-α 进行处理,实验组则分别加入不同质量浓度(3, 10, 30, 50 ng/mL)的 TW。继续培养 24 h 后取细胞上清液,按照相关试剂盒说明书进行操作,检测细胞上清液中 CK 和 LDH 水平。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件分析。计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示,组间比较行 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TNF-α 或 TW 对细胞生长的抑制作用

MTT 试验结果显示,与对照组相比,TNF-α 可抑制 HCM 细胞的生长,并呈浓度依赖性(*P* < 0.01)。TNF-α 的半数抑制浓度(IC₅₀)经 Graphpad prism 5.0 软件计算,确定为 245 ng/mL,详见图 1 A。经 1.0~10.0 ng/mL 的 TW 作用 24 h 后,HCM 细胞生长变化无明显差异,而 > 30.0 ng/mL 质量浓度的 TW 处理可明显抑制细胞生长(*P* < 0.01),详见图 1 B。

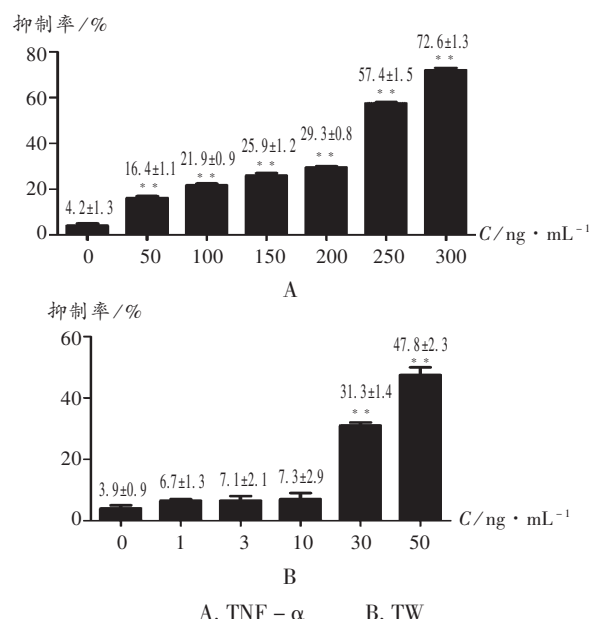


图1 TNF-α 或 TW 对 HCM 细胞生长的抑制作用(***P* < 0.01)

2.2 TW 联合 TNF-α 对细胞生长的抑制作用

用 245 ng/mL 的 TNF-α 处理 HCM 细胞的同时,加入不同质量浓度的 TW 进行干预。24 h 后 MTT 结果显示,3 ng/mL TW 和 10 ng/mL TW 实验组的 HCM 细

胞抑制率明显低于处理组 ($P < 0.01$), 而 50 ng/mL TW 实验组的 HCM 细胞抑制率反而升高 ($P < 0.01$), 详见图 2。

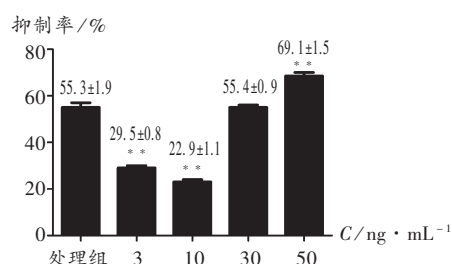


图2 TW联合TNF- α 对人心肌细胞生长的抑制作用(** $P < 0.01$)

2.3 TW对TNF- α 处理后细胞的凋亡诱导作用

用 245 ng/mL 的 TNF- α 处理 HCM 细胞的同时, 加入不同质量浓度的 TW 进行干预。24 h 后, 流式结果显示, 3 ng/mL TW 和 10 ng/mL TW 实验组对 HCM 细胞的凋亡诱导明显低于处理组 ($P < 0.01$), 而 50 ng/mL TW 实验组对 HCM 细胞的凋亡诱导反而增强 ($P < 0.01$)。详见表 1。

表1 TW对TNF- α 处理后人心肌细胞的
凋亡诱导作用($\bar{X} \pm s, \%$)

组别	Q2	Q3	Q2 + Q3	P
处理组	28.9 ± 2.5	6.4 ± 1.8	35.3 ± 2.3	
TW 3 ng/mL 组	15.8 ± 1.1 ^a	3.2 ± 0.4 ^a	19.0 ± 1.0 ^a	<0.01
TW 10 ng/mL 组	24.3 ± 3.2	3.7 ± 2.1 ^a	28.0 ± 1.5 ^a	<0.01
TW 30 ng/mL 组	26.7 ± 1.5	5.3 ± 2.1	32.0 ± 1.7	
TW 50 ng/mL 组	42.5 ± 1.5 ^a	10.3 ± 2.0 ^a	52.8 ± 4.0 ^a	<0.01

注: Q2 为晚期凋亡细胞比例, Q3 为早期凋亡细胞比例, Q2 + Q3 为总的凋亡细胞比较。与处理组比较, ^a $P < 0.01$ 。

2.4 TW联合TNF- α 对CK和LDH水平的影响

与对照组相比, 3 ng/mL TW 和 10 ng/mL TW 实验组中 CK 和 LDH 水平明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。而 30 ng/mL TW 和 50 ng/mL TW 实验组对 CK 和 LDH 的影响不明显。详见图 3。

3 讨论

TNF- α 是一种多功能细胞因子, 在感染与炎症反应、肿瘤细胞生长的抑制中发挥重要作用, 与造血、心、肝、肾、肌肉等系统功能及器官移植的排斥反应、败血症、恶病质、心力衰竭等都密切相关。有研究发现, TNF- α 对心肌细胞有诱导凋亡作用, 其激活及表达上调是导致心肌功能紊乱的重要因素。可能有以下途径: 1) TNF- α 通过与 TNF- α 受体结合, 激活 JNK 信号通路及下游转录因子, 从而诱导心肌细胞凋亡^[15-6]; 2) TNF- α 通过诱导一氧化氮的生成, 与超氧阴离子结合, 发挥毒性作用, 引起氧化还原系统失衡, 对心肌细胞发挥损伤作用^[7]; 3) TNF- α 通过诱导与细胞凋亡密切

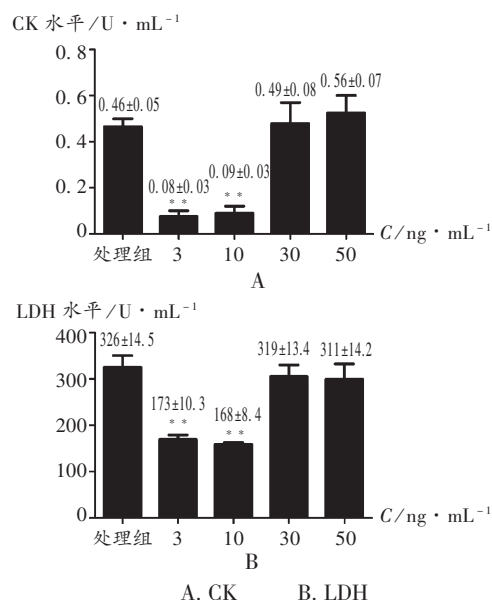


图3 TW联合TNF- α 对细胞上清液中CK和LDH水平的影响(** $P < 0.01$)

相关的 c - los, c - jun, c - Myc 等原癌基因表达, 从而诱导心肌细胞凋亡^[8]; 4) TNF- α 可通过鞘氨醇依赖机制诱导心肌细胞发生凋亡^[9]。本研究结果显示, TNF- α 处理后细胞生长受到明显抑制, 细胞凋亡率明显增加, 提示 TNF- α 有对人心肌细胞的损伤作用。

TW 又称雷公藤内酯, 是从卫矛科植物雷公藤中提取的环氧二萜内酯化合物, 具有抗炎、抗癌等多种药理活性^[10-11], 临床用于治疗炎症性疾病、自身免疫疾病和肿瘤, 高浓度 TW 可调节细胞周期, 通过线粒体凋亡途径诱导心肌细胞发生凋亡^[12-13]; 此外, 高浓度 TW 可呈剂量依赖性地抑制人类 ether - a - go - go 相关基因 (hERG) 编码的钾通道, 抑制心肌细胞复极化时钾离子外向电流, 导致动作电位时程延长, 明显抑制心肌细胞活性^[14]。本研究结果发现, 30.0 ng/mL 以上质量浓度的 TW 才会抑制心肌细胞生长和诱导其凋亡, 并对产生损伤作用; 较低质量浓度的 TW 对心肌细胞生长无明显生长抑制作用, 与 TNF- α 联用时, 可降低 TNF- α 对人心肌细胞的生长抑制作用和凋亡诱导作用, 可在一定程度上降低 TNF- α 对人心肌细胞的损伤作用。

综上所述, 安全浓度的 TW 降低 TNF- α 对人心肌细胞 HCM 细胞的生长抑制作用和凋亡诱导作用, 心肌细胞损伤标志物 CK 和 LDH 也会有所降低, 说明 TW 对 TNF- α 介导的 HCM 心肌细胞的生长损伤有保护作用, 而具体的分子机制和参与信号途径尚未阐明, 需要进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 崔志远, 曹慧, 庞晓. 慢性心力衰竭患者血清肿瘤坏死因子 α 水平变化及其与心肾功能的关系[J]. 山东医药, 2016, 56(17): 66-68.