

• 技术与方法 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.25.034

雷公藤内酯醇的细胞内定位研究*

张颖,肖沙,徐伟,刁庆春,郝进[△]

(重庆市第一人民医院/重庆市中医院皮肤科,重庆 400011)

[摘要] **目的** 检测雷公藤内酯醇的细胞内定位,探讨其在细胞内的作用位点。**方法** 采用 4-溴甲基-7-甲氧基香豆素标记雷公藤内酯醇,与人肝癌细胞孵育;并与细胞核染料 PI 或细胞质膜染料 DiI 行双色荧光染色,用荧光显微镜观察。**结果** 与对照相比,香豆素标记在紫外激发下呈特异性的淡蓝色荧光;与 DiI 共定位显示,香豆素标记在细胞质(膜)存在;与 PI 共定位显示,香豆素标记在细胞核存在,且荧光强于细胞质(膜)。**结论** 雷公藤内酯醇在细胞内主要位于细胞核,其次是细胞质(膜),提示雷公藤内酯醇可能主要在细胞核内起作用,其次是在细胞质(膜)上起作用。

[关键词] 雷公藤;香豆素;细胞定位

[中图分类号] R93

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)25-3556-02

In-cell localization of triptolide*

Zhang Ying, Xiao Sha, Xu Wei, Diao Qingchun, Hao Jin[△]

(Department of Dermatology, Chongqing First People's Hospital/Chongqing Traditional Chinese Medicine Hospital, Chongqing 400011, China)

[Abstract] **Objective** To clarify the cellular localization of triptolide and to explore its in-cell action sites. **Methods** 4-(Bromomethyl)-7-methoxycoumarin was employed to label triptolide, then labelled triptolide was incubated with human hepatoma carcinoma cells. Subsequently, incubated cells were subjected to stain with fluorescent dye DiI or PI, which were specific to cytoplasmic membrane system and nucleus, respectively. **Results** Compared with the non-triptolide control, coumarin labelled triptolide shown a light blue fluorescence under UV excitation; Co-localization with DiI showed that triptolide exist in cytoplasm and(or) on cell membrane; Co-localization with PI showed that triptolide located in cell nucleus. Moreover, microscopic observation indicated that the fluorescence intensity in nucleus was denser than that in cytoplasm. **Conclusion** The present study demonstrate that triptolide mainly act in nucleus, followed by acting in cytoplasm and(or) on cell membrane.

[Key words] triptolide; coumarin; cellular localization

雷公藤属于卫矛科多年生藤本植物,在我国广泛分布。作为传统中药的瑰宝之一,其应用于临床已有 2000 年的历史。中国医学最早利用其根茎提取物治疗风湿性疾病,如类风湿性关节炎^[1]、系统性红斑狼疮^[2]等。从上世纪 80 年代开始,在大量临床观察的基础上,雷公藤的适应证开始不断得以拓展,目前在皮肤科、眼科、肾内科、消化科等领域均有切实的临床应用。基础研究表明,雷公藤除了抗炎作用以外^[3],近年来的研究发现其对多种血液系统肿瘤、实体性肿瘤也具有较强的抗肿瘤活性,甚至对临床一些难治性或常规化学治疗药物耐药的肿瘤亦显示出明确活性^[4]。

研究表明,雷公藤是通过几种活性单体协同而发挥其药理学活性的,其中一种二萜类化合物——雷公藤内酯醇(triptolide)为活性最强的单体^[5]。遗憾的是,作为一种具有悠久历史的、已被广泛使用的药物,绝大多数的研究主要局限在雷公藤作用后细胞的功能性改变上,即雷公藤作用结果的观察上,而由于技术手段和研究方法的局限性,对雷公藤的细胞内起作用的位点还未获得足够的认识,导致对其作用机制研究未获突破。因此,对困扰临床的适应证问题和毒副作用问题目前仍不能准确阐释,对于药物的进一步改性也无从着手。为此,本研究首先从雷公藤内酯醇在细胞中起作用位点入手,通过 4-溴甲基-7-甲氧基香豆素标记雷公藤内酯醇,于荧光显微镜下观

察雷公藤内酯醇在细胞中的定位,为下一步分析雷公藤内酯醇的作用靶蛋白奠定研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料 小鼠肝癌细胞(Hepal-6)购自中山医科大学实验动物中心;雷公藤内酯醇购自广州牌牌生物科技有限公司,纯度 99%(hplc 级);4-溴甲基-7-甲氧基香豆素购自 Sigma 公司;DMEM 培养基、胎牛血清、青链霉素混合液、胰蛋白酶、1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI)、碘化丙啶(PI)购自 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 Hepal-6 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,辅加 1% 青/链霉素混合液。细胞置于 37℃ 含有 5% CO₂ 的培养箱中培养,90% 融合时用 0.25% 胰蛋白酶传代。

1.2.2 4-溴甲基-7-甲氧基香豆素标记雷公藤内酯醇的制备 参照文献,取雷公藤内酯醇 10.00 mg,丁二酸酐 15.00 mg,4-二甲氨基吡啶 0.33 mg,溶解在 1 mL 的二氯甲烷中;用三乙胺调 pH 值至 9~10;在磁力搅拌器的搅拌下,温室反应 24 h;用大量温水洗涤反应物,将其中有机相烘干得到淡黄色晶体 triptolide14-succinate;取上述反应物 triptolide14-succinate 5.00 mg,4-溴甲基-7-甲氧基香豆素 8.80 mg,碳酸钾 50.00 mg;

* 基金项目:重庆市科委自然科学基金计划资助项目(cstc2011jjA10043,cstc2014jcyjA10130);重庆市中医院院内培育课题(2012-1-15)。

作者简介:张颖(1985-),硕士,主治医师,主要从事皮肤病学方面的研究。△ 通讯作者,E-mail:haojin_cq@163.com。

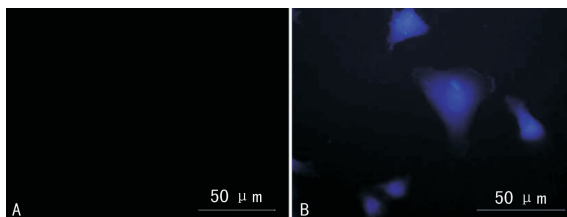
加入 1 mL 的丙酮溶剂中,在磁力搅拌器的搅拌下,37 °C,反应 1 h;用大量热水洗涤产物,取有机相,烘干即得黄色的香豆素标记的雷公藤内酯醇。

1.2.3 香豆素标记雷公藤内酯醇的细胞内定位 处于对数生长期的 Hepal-6 细胞,制备成 1×10^5 个/mL 的细胞悬液,接种于含有盖玻片的六孔板内;24 h 后加入香豆素标记雷公藤内酯醇和 DiI,使二者的终浓度分别为 4 μmol 和 5 μmol ,置于 37 °C 培养箱中孵育 30 min;或者取出香豆素标记雷公藤内酯醇孵育后的细胞,4%多聚甲醛固定 10 min,置于 4 μmol 的 PI 溶液中孵育 30 min;孵育后的细胞用 PBS 清洗 3 次,于甘油中封片,荧光显微镜(Olympus X51)下观察,Image-Pro Plus 6.0 软件(Media Cybernetics, Inc.)拍照。

2 结 果

2.1 香豆素标记雷公藤内酯醇的细胞观察 采用香豆素标记雷公藤内酯醇与细胞孵育,荧光显微镜观察显示,香豆素在紫外光激发下产生淡蓝色荧光;而只孵育香豆素的对照未见荧光,表明香豆素可以特异性标记雷公藤内酯醇;基于细胞形态的初步观察表明,雷公藤内酯醇主要累积于细胞核内,其次是累积于细胞质(膜)中,见图 1。

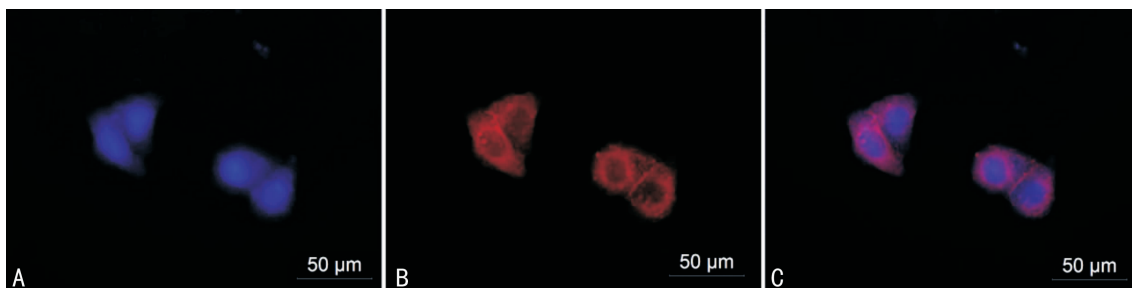
2.2 香豆素标记雷公藤内酯醇与 DiI 的共定位 为进一步明确雷公藤内酯醇的细胞分布,采用特异性染料 DiI 标记细胞质膜。与香豆素标记的共定位显示,香豆素的淡蓝色荧光与 DiI 的红色荧光在细胞质中重叠成紫色,表明雷公藤内酯醇在细胞质中的确存在,见图 2。



A: 只孵育香豆素的对照;B: 香豆素标记雷公藤内酯醇孵育后。

图 1 香豆素标记雷公藤内酯醇的细胞观察

2.3 香豆素标记雷公藤内酯醇与 PI 的共定位 进一步采用细胞核特异性染料 PI 标记细胞核,与香豆素标记的共定位显示,香豆素的淡蓝色荧光与 PI 的红色荧光在细胞核中重叠成紫色,表明雷公藤内酯醇在细胞核中的确存在(图 3)。



A: 香豆素标记;B: DiI 标记;C: A 和 B 的叠加。

图 2 香豆素标记雷公藤内酯醇与 DiI 的共定位



A: 香豆素标记;B: PI 标记;C: A 和 B 的叠加。

图 3 香豆素标记雷公藤内酯醇与 PI 的共定位

3 讨 论

雷公藤内酯醇是卫矛科植物雷公藤的主要药效成分,是一类环氧化二萜内酯化合物,具有广泛的药理作用,包括抗炎、免疫调节、抗肿瘤等,应用于各种炎症性疾病和肿瘤的治疗,提高了患者的生活质量。一种化合物具有如此广泛的药理作用,必定有其多种作用机理。近来的研究表明,雷公藤内酯醇主要通过 NF- κ B、MAPK、Akt/mTOR 等信号传导通路以及影响血管生成、细胞凋亡、肿瘤细胞增殖等生物学过程起作用^[6-7],但其在细胞中具体是通过哪些作用靶点而引起这些生物学效应的,一直没有得以充分阐明。本研究的结果提示雷公藤内酯醇的主要作用方式是在细胞核内直接调控基因转录,与其他研究者

的结果相吻合^[8-9],合理解释了为什么雷公藤内酯醇具有如此广泛而强大的药理作用。本研究结果同时还表明,雷公藤内酯醇可能通过作用于细胞质内的靶蛋白或细胞膜受体参与细胞功能的调控。

香豆素及其衍生物是一类具有荧光特性的化合物,在荧光染色和标记等领域具有重要的作用。作为一种较新的荧光标记试剂,4-溴甲基-7-甲氧基香豆素具有荧光强度高、色彩明亮等优点,已被广泛应用于样本的痕量分析^[10]。且其最大激发波长 320 nm,最大发射波长 398 nm,在紫外激发下发出明亮的淡蓝色荧光,在本研究中可以很好地与另外 2 种红色荧光染料(DiI 和 PI)实现区分和共定位。本研究的结(下转第 3561 页)

改善宫颈癌前病变及宫颈癌的预后。而对于高危型 HPV 感染的人群,是否能够更加积极的监测及治疗生殖道感染,改善宫颈及阴道微环境的状态,从而通过人体自身清除高危型 HPV 的感染,有待进一步的研究来证实。

参考文献

- [1] 曹泽毅. 中华妇产科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999: 565-577.
- [2] De Cremoux P, De La Rochefordière A, Savignoni A, et al. Different outcome of invasive cervical cancer associated with high-risk versus intermediate-risk HPV genotype [J]. *Int J Cancer*, 2009, 124(4): 778-782.
- [3] 季静, 尤志学. 高危型 HPV 负荷量与宫颈上皮内病变的关系[J]. *现代妇产科进展*, 2009, 10(10): 790-793.
- [4] Yltalo N, Sorensen P, Josefsson AM, et al. Consistent high viral load of human Papillomavirus 16 and risk of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study[J]. *Lancet*, 2000, 355(9222): 2194-2198.
- [5] 武明辉, 张淦文, 张为远. 2007~2008 年北京地区 25~54 岁已婚妇女高危型乳头状瘤病毒感染的流行病学调查[J]. *中华妇产科杂志*, 2009, 44(12): 892-897.
- [6] 杨琳, 李倪, 郭兰伟. 2010 年黑龙江省大庆市妇女乳头状瘤病毒感染状况及其危险因素调查[J]. *中华预防医学杂志*, 2013, 47(2): 118-123.
- [7] Gillet E, Meys JF, Verstraelen H, et al. Bacterial vaginosis associated with uterine cervical human papillomavirus

infection: a meta-analysis[J]. *BMC Infect Dis*, 2011, 11: 10.

- [8] King CC, Jamieson DJ, Wiener J, et al. Bacterial vaginosis and the natural history of human papillomavirus[J]. *Infect Dis Obstet Gynecol*, 2011, 2011: 319460.
- [9] 廖秦平. 女性阴道微生态及阴道微生态评价[J]. *实用妇产科杂志*, 2010, 26(2): 81-83.
- [10] 李小宁, 贺丰杰. 乳酸杆菌与宫颈癌防治的研究进展[J]. *医学研究与教育*, 2010, 27(5): 77-79.
- [11] Seow SW, Norasmara J, Rahmat B, et al. Lactobacillus species is more cytotoxic to human bladder cancer cells than Mycobacterium bovis (bacillus Calmette Guerin) [J]. *J Urol*, 2002, 168(5): 2236-2239.
- [12] Hamilton JM. The role of probiotics in the treatment and prevention of helicobacter pylori infection[J]. *Int Antimicrob Agents*, 2003, 22(4): 360-366.
- [13] 于妍妍, 金哲, 刘艳霞, 等. 宫颈高危 HPV 感染与阴道内环境相关因素分析[J]. *疑难病杂志*, 2011, 10(9): 673-675.
- [14] Liu T, Tang L, Wang LM, et al. The effect of fermented filtrate of lactobacillus on proliferation of human cervical carcinoma hela cell in vitro[J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2009, 21(9): 773-778.

(收稿日期: 2015-03-18 修回日期: 2015-05-26)

(上接第 3557 页)

果也表明, 4-溴甲基-7-甲氧基香豆素标记的淡蓝色荧光与红色荧光重叠后成紫色, 与细胞核特异性染料 PI 的共定位显示香豆素标记主要位于细胞核, 与细胞质膜系统特异性染料 DiI 的共定位显示香豆素标记在细胞质(膜)也存在, 但弱于细胞核。本实验以加入未标记雷公藤内酯醇的香豆素为阴性对照, 结果未观察到淡蓝色荧光, 说明香豆素标记为特异性标记, 结果可信。

总之, 本实验通过 4-溴甲基-7-甲氧基香豆素标记雷公藤内酯醇, 检测到雷公藤内酯醇主要位于细胞核, 其次是细胞质(膜)。提示雷公藤内酯醇的药理作用可能是主要通过直接调控基因转录, 其次是通过调控细胞质内的细胞因子或与细胞膜表面受体结合参与信号转导实现的。本研究为基于荧光标记的雷公藤内酯醇靶蛋白研究奠定了研究基础。

参考文献

- [1] Tao X, Younger J, Fan FZ, et al. Benefit of an extract of *Tripterygium Wilfordii* Hook F in patients with rheumatoid arthritis: a double-blind, placebo-controlled study [J]. *Arthritis and rheumatism*, 2002, 46(7): 1735-1743.
- [2] Li H, Zhang YY, Huang XY, et al. Beneficial effect of tripterine on systemic lupus erythematosus induced by active chromatin in BALB/c mice [J]. *Eur J pharmacol*, 2005, 512(2/3): 231-237.
- [3] Kim DH, Shin EK, Kim YH, et al. Suppression of inflammatory responses by celastrol, a quinone methide triterpenoid isolated from *Celastrus regelii* [J]. *Eur J Clin Invest*,

2009, 39(9): 819-827.

- [4] Shi X, Jin Y, Cheng C, et al. Triptolide inhibits Bcr-Abl transcription and induces apoptosis in ST1571-resistant chronic myelogenous leukemia cells harboring T315I mutation [J]. *Clin Cancer Research*, 2009, 15(5): 1686-1697.
- [5] 陈江飞, 胡毅坚, 苗彩云. 雷公藤甲素药理作用的研究进展 [J]. *中国医药工业杂志*, 2007, 8: 604-607.
- [6] Zhou YX, Huang YL. Antiangiogenic effect of celastrol on the growth of human glioma: an in vitro and in vivo study [J]. *Chin Med J*, 2009, 122(14): 1666-1673.
- [7] Jung HW, Chung YS, Kim YS, et al. Celastrol inhibits production of nitric oxide and proinflammatory cytokines through MAPK signal transduction and NF-kappaB in LPS-stimulated BV-2 microglial cells [J]. *Exp Mol Med*, 2007, 39(6): 715-721.
- [8] Wang Y, Lu JJ, He L, et al. Triptolide (TPL) inhibits global transcription by inducing proteasome-dependent degradation of RNA polymerase II (Pol II) [J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): e23993.
- [9] PAN J. RNA polymerase-an important molecular target of triptolide in cancer cells [J]. *Cancer Letters*, 2010, 292(2): 149-152.
- [10] 谢光华, 柴文刚, 王玉兰, 等. 荧光标记试剂-4-溴甲基-7-甲氧基香豆素的合成 [J]. *化学试剂*, 1980, 5: 42-44.

(收稿日期: 2015-03-08 修回日期: 2015-06-20)