

· 药物研究 ·

抗心律失常药 E-4031 对人胃癌细胞系 SGC-7901 的肿瘤生物学行为的调节作用*

吕清¹, 卢晓明¹, 舒晓刚¹, 孙仁虎¹, 崔静², 王国斌¹

(华中科技大学同济医学院附属协和医院 1. 胃肠外科; 2. 胰腺外科, 武汉 430022)

[摘要] 目的 研究Ⅲ类抗心律失常药 E-4031, 即钾离子通道蛋白 (HERG K⁺) 特异性阻断药对胃癌细胞 SGC-7901 肿瘤生物学行为的调节作用, 探讨其是否具有阻止胃癌发生、发展的功能。方法 应用逆反应-聚合酶链反应 (RT-PCR) 及 Western-blot 方法检测胃癌细胞系 SGC-7901 中 *herg1* 基因的表达情况, 并应用特异性钾离子通道蛋白阻断药Ⅲ类抗心律失常药 E-4031 阻断胃癌细胞 HERG K⁺ 通道, 研究 E-4031 对胃癌细胞生长、增殖、凋亡及侵袭能力等肿瘤生物学行为的调节作用。结果 *herg1* 基因在胃癌细胞系 SGC-7901 中呈现过度表达, 当其表达 HERG K⁺ 通道蛋白被Ⅲ类抗心律失常药 E-4031 阻断后, 胃癌细胞增殖降低, G₀/G₁ 细胞增多, 凋亡增加 ($P < 0.01$), 并且其侵袭转移能力降低。结论 HERG K⁺ 通道蛋白在胃癌中表达过度, 而其特异性阻断药 E-4031 具有调节胃癌细胞肿瘤生物学行为和抑制肿瘤细胞生长增殖的功能。

[关键词] E-4031; 抗心律失常药; HERG K⁺ 通道蛋白; 胃癌; 增殖; 凋亡; 侵袭

[中图分类号] R972.2; R735.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1004-0781(2010)01-0005-05

Regulation Effects of Antiarrhythmic Drug E-4031 on Tumor Biologic Behavior of Gastric Cancer Cell Line SGC-7901

LV Qing¹, LU Xiao-ming¹, SHU Xiao-gang¹, SUN Ren-hu¹, CUI Jing², WANG Guo-bin¹ (1. Department of Gastrointestinal Surgery; 2. Department of Pancreatic Surgery, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

ABSTRACT Objective To investigate the regulation effects of the class III antiarrhythmic drug E-4031, HERG K⁺ channels specific blocker on *herg1* gene expressed in gastric carcinoma cell line SGC-7901, and explore whether it could prevent tumorigenesis of gastric carcinoma. **Methods** Reverse Transcription PCR assay and western-blot analysis were used to detect the expression of *herg1* gene on cell line SGC-7901. By blocking the channels with the class III antiarrhythmic drug E-4031, the tumor cell invasion, proliferation and apoptosis were analyzed. **Results** The *herg1* gene was over expressed in the gastric cancer cells. While, the cell population at G₀/G₁ phase and apoptotic number of tumor cells were increased ($P < 0.01$), and less tumor cell proliferated was found when HERG K⁺ channel was blocked by E-4031 ($P < 0.05$). Moreover, the drug inhibited cell migration ($P < 0.05$). **Conclusion** HERG K⁺ channels were probably overexpressed in the gastric cancer cell line SGC-7901 and the class III antiarrhythmic drug E-4031 could make a important role in regulating the biological behavior of tumor cells and suppressing the growth of tumor.

KEY WORDS E-4031; Antiarrhythmic drug; HERG K⁺ channel; Gastric carcinoma; Proliferation; Apoptosis; Invasion

临床统计, 约 > 80% 肿瘤患者死于肿瘤细胞的侵袭与转移。肿瘤侵袭转移的过程虽然很复杂, 但其基本步骤, 包括压力的作用、癌组织的黏附性降低、癌细

胞的迁移、细胞黏附分子的作用和细胞外基质的降解^[1]。肿瘤的进展过程与其侵袭转移密切相关, 这也是导致对其治疗效果不佳的原因^[2,3]。细胞膜表面的钾离子通道在不同的细胞中呈现出异质性, 并且在调节神经和肌肉的兴奋性的功能基础上, 还具有调节细胞与基底膜黏附的作用, 可促进肿瘤细胞的分裂增殖与移动^[4~7]。*herg1* 基因及其表达的 HERG1 蛋白所构成的细胞钾离子通道能够改变细胞与基底膜的连接能力, 从而可能调节肿瘤细胞侵袭和转移, 在肿瘤向周围组织浸润并侵入血管、淋巴管远隔转移中发挥重要作用^[8]。笔者未见胃癌组织中 *herg1* 基因及其蛋白表达

[收稿日期] 2009-03-03

[基金项目] * 国家自然科学基金资助项目 (基金编号: 30772128)

[作者简介] 吕清 (1981 -), 男, 湖北武汉人, 博士, 专业研究方向: 外科学。电话: (0) 13006378863, E-mail: lvq11111@yahoo.com.cn。

[通讯作者] 王国斌 (1954 -), 男, 湖北京山人, 教授, 博士生导师, 专业研究方向: 外科学。电话: 027 - 85726139, E-mail: wanggb11111@yahoo.com.cn。

的研究报道,而且直接证明 HERG1 蛋白可调节肿瘤细胞侵袭的研究也很罕见,所以到底其与胃癌细胞转移之间是否存在某种联系值得研究。同时在生理情况下,发挥特异性阻断作用并在临床上作为Ⅲ类抗心律失常药使用的 E-4031 是否因此而具有抑制胃癌细胞生长和侵袭的调节作用,同样也值得研究。

1 材料与方法

1.1 细胞 人类胃癌细胞系 SGC-7901 为贴壁细胞,由华中科技大学同济医学院附属协和医院实验室提供。

1.2 试剂 人工基底膜基质凝胶 Matrigel 购自美国 BD 公司;牛血清白蛋白(BSA)、Ⅲ类抗心律失常药 E-4031 为美国 Sigma 公司产品;胎牛血清(FBS)为 Hyclone 公司产品;RT-PCR 试剂盒购自大连宝生物工程公司;一抗[兔抗人 HERG1 蛋白、 β 肌动蛋白(β -actin)]、二抗(辣根酶标记羊抗兔 IgG)购自北京中山生物技术有限公司;蛋白裂解液、化学发光底物系统为美国 Pierce 公司产品;Boyden 侵袭小室为美国 Corning Costar 公司产品;PCR 引物由上海 Invitrogen 公司合成;Annexin V 凋亡检测试剂盒为 Biovision 公司产品。

1.3 细胞培养 SGC-7901 细胞为人胃癌细胞,属贴壁细胞。采用培养基为含有 10% FBS 的 RPMI-1640,细胞培养于 37 °C,5% 二氧化碳(CO₂)饱和湿度的孵育箱中,2~3 d 后通过离心传代。

1.4 RT-PCR 技术检测 herg1 gene mRNA 的表达 收集 SGC-7901 细胞,用 TRIzol 试剂一步法提取总 RNA,逆转录合成 cDNA,以 cDNA 为模板,在同一管中扩增 herg1 和 β -actin。herg1 上游引物:5'-TCCAGCGGCTGTACTCGGGC-3',下游引物:5'-TGGACCAGAAGTGTCGGAGAATC-3'; β -actin 上游引物:5'-AACTCCATCATGAAGTGTGA-3',下游引物:5'-ACTCCTGCTTGCTGATCCAC-3'。PCR 条件:94 °C 预变性 10 min;94 °C 60 s,65 °C 60 s,72 °C 45 s,30 个周期;72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖电泳,herg1 和 β -actin 的扩增产物分别位于 575bp 及 247bp 的位置。用凝胶成像分析系统分析,以 herg1 与 β -actin 条带灰度值的比值作为 herg1 mRNA 的相对表达水平。实验重复 3 次,结果取平均值。

1.5 蛋白印迹法检测肿瘤细胞中 HERG1 蛋白的表达 收集 SGC-7901 细胞,蛋白裂解液裂解细胞,提取总蛋白并行蛋白定量,经聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜、封闭,依次与 HERG1 及 β -actin 抗体(稀释度 1:1 000)和碱性磷酸酶标记的二抗(稀释度 1:500)

反应,加入化学发光底物,曝光。HERG1 和 β -actin 蛋白的相对分子质量分别为 145 000 和 42 000,用成像分析系统分析,以 HERG1 与 β -actin 灰度值的比值作为 HERG1 蛋白的相对表达水平。实验重复 3 次,结果取平均值。

1.6 细胞增殖情况的检测 将 SGC-7901 细胞消化重悬于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中,调整细胞浓度至 1×10^6 个 \cdot mL⁻¹。将细胞悬液分为 6 组加入 96 孔板中,并每组设两复孔以作重复对照。分别加入不同浓度 HERG K⁺ 通道特异性阻滞剂 E-4031 到各组细胞中(1,5,10,20,40 μ mol \cdot L⁻¹),余下一组作空白对照。将培养板置于 37 °C,5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中孵育 48 h。加入 5 g \cdot L⁻¹ MTT 100 μ L,并继续孵育 4 h,去除上清液,每孔加入 DMSO 100 μ L,振荡 15 min。在波长 490 nm 酶标仪下进行检测。实验重复 3 次,结果取平均值。

1.7 细胞生长周期变化情况的检测 将 SGC-7901 细胞消化重悬于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中,调整细胞浓度至 1×10^6 个 \cdot mL⁻¹。将细胞悬液分为两组加入 6 孔板中,并每组设两复孔以作为重复对照。其中一组加入终浓度为 40 μ mol \cdot L⁻¹ E-4031,余下一组作空白对照。将培养板置于 37 °C,5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中孵育 48 h。消化细胞,并用含 70% 乙醇的磷酸盐缓冲液 PBS 漂洗干净,加入 20 μ g \cdot mL⁻¹ 溴化乙啶染色 1 h,并作流式细胞仪检测。实验重复 3 次,结果取平均值。

1.8 细胞凋亡情况的检测 将 SGC-7901 细胞消化重悬于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中,调整细胞浓度至 1×10^5 个 \cdot mL⁻¹。将细胞悬液分为两组加入 6 孔板中,并每组设两复孔以作重复对照。其中一组加入终浓度为 40 μ mol \cdot L⁻¹ E-4031,余下一组作空白对照。将培养板置于 37 °C,5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中孵育 48 h。消化细胞,并用 PBS 漂洗干净,用 Annexin V 凋亡检测试剂盒进行检测,并作流式细胞仪检测。实验重复 3 次,结果取平均值。

1.9 统计学方法 采用 SPSS 10.0 软件进行统计学处理,计量资料的结果以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,并采用方差分析和 *t* 检验进行比较。

2 结果

2.1 胃癌细胞 SGC-7901 中 herg1 mRNA 和 HERG1 蛋白的表达 RT-PCR 及蛋白印迹法结果显示,SGC-7901 细胞中 herg1 mRNA 和 HERG1 蛋白均明显表达,并且 herg1 mRNA 和蛋白的表达水平较正常对照组胃黏膜及阳性细胞株 LOVO 有明显增多($P < 0.05$),而

对照组几乎未见任何表达,见图 1。

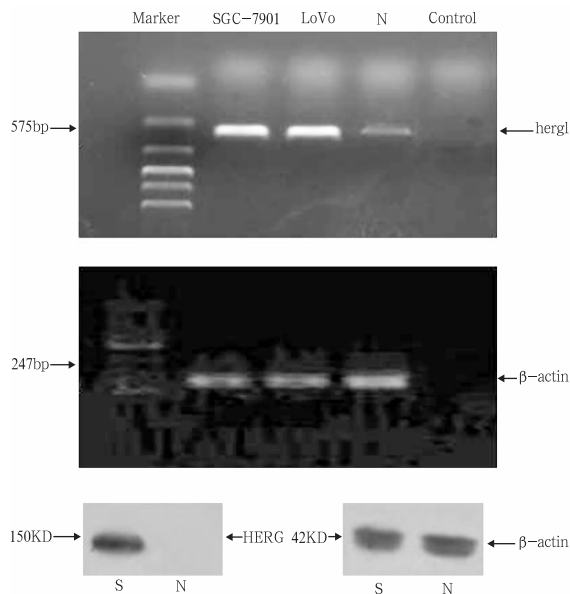


图 1 胃癌细胞 SGC-7901 中 hERG1 基因 mRNA 和 HERG1 蛋白的表达情况

LOVO 细胞系为阳性对照, N 为正常胃黏膜, Control 为阴性对照, S 为胃癌细胞 SGC-7901

Fig. 1 The expression of hERG1 gene mRNA and HERG1 protein in gastric carcinoma cell line SGC-7901

The cell line LOVO is the positive control group; N is normal gastric mucosa group; Control is the negative control group; S is SGC-7901 cell line group.

2.2 E-4031 对 SGC-7901 细胞作用后细胞增殖情况的变化 SGC-7901 细胞增殖情况通过 MTT 方法检测结果显示, 在使用不同浓度阻滞剂 E-4031 阻滞 HERG K⁺ 通道后, 与对照组细胞比较, SGC-7901 细胞的增殖明显被抑制, 此种抑制是剂量依赖性的, 其最大有效作用浓度为 40 μmol · L⁻¹。且较正常对照组而言, 增殖抑制率升高, 差异有极显著性 ($F = 8.96, P < 0.01$)。

2.3 E-4031 对 SGC-7901 细胞作用后细胞生长周期的变化 流式细胞仪检测结果显示, 在使用 E-4031 阻滞 HERG K⁺ 通道后, 与对照组细胞比较, SGC-7901 细胞的生长周期明显改变。处于细胞周期 S 期的细胞数量减少, 而 G1 期的细胞数量则明显增多。G1/G0 的比值从 35.29% 增加到 55.03%, 差异有极显著性 ($t = 31.732, P = 5.837 \times 10^{-7} < 0.01$); 而 G2/M 比值变化不大, 差异无显著性 ($t = 1.203, P = 0.283 > 0.05$)。

2.4 E-4031 对 SGC-7901 细胞作用后细胞凋亡状态的变化 流式细胞仪检测结果显示, 在使用 E-4031 阻滞 HERG K⁺ 蛋白通道后, 与对照组细胞比较, SGC-7901 细胞的凋亡数明显增多, 所占细胞比例从 2.91% 增加至 5.28% ($t = 7.750, P = 5.720 \times 10^{-4} < 0.01$)。

而死亡细胞比例也同样增多, 从 3.74% 增加至 4.56%, 差异均有极显著性 ($t = 7.806, P = 5.530 \times 10^{-4} < 0.01$)。

2.5 E-4031 对 SGC-7901 作用后细胞侵袭能力的变化 细胞体外侵袭能力的检测结果显示, 在使用 E-4031 阻滞 HERG K⁺ 蛋白通道后, 与对照组细胞比较, SGC-7901 细胞侵袭入 Boyden 小室的数目明显降低, 侵袭抑制率升高, 差异有极显著性 ($t = 7.019, P = 1.110 \times 10^{-4} < 0.01$)。

3 讨论

胃癌是我国常见的恶性肿瘤, 发病率超过 25/100 000, 肿瘤细胞通过侵袭转移扩散到远隔部位是胃癌患者致死的主要原因, 因此研究胃癌转移的机制, 针对其中的某些环节施加影响可能成为胃癌治疗的新策略。hERG1 基因表达的 HERG1 蛋白属于较保守的调节神经细胞和肌细胞兴奋性的细胞膜表面 K⁺ 通道蛋白家族 (HERG K⁺) 的成员。以往的研究表明这种基因不仅在正常心肌细胞和神经细胞中表达, 在肿瘤细胞中也有不同程度的表达, 并发挥特殊的病理生理作用, 这可能为肿瘤生长发展提供有利的相对选择性的条件^[9-13]。在本研究中, hERG1 基因及其表达的 HERG1 蛋白在胃癌细胞系 SGC-7901 中出现高度表达, 而在正常对照胃黏膜组织中几乎未见表达, 这些数据表明该蛋白与肿瘤发生有一定的相关性, 同时有研究报道该蛋白对肿瘤细胞的增殖和生长具有促进作用, 基于上述理论和实验基础, 我们在研究中使用 III 类抗心律失常药 E-4031 对肿瘤细胞进行干预处理, 因为该药为 HERG1 蛋白所构成的钾离子通道特异性阻断剂, 其通常是作为抗心律失常药物在临床发挥作用, 而肿瘤细胞同样特异性的表达 HERG K⁺ 蛋白通道, 通过应用该药阻断此蛋白通道观察其是否对肿瘤细胞产生生物学作用。实验表明在加入该通道蛋白的特异性抑制剂 III 类抗心律失常药 E-4031 后, 胃癌细胞系 SGC-7901 发生明显的生物学行为改变, 增殖能力低下, 大部分细胞处于生长周期静止期, 并且凋亡和死亡细胞数量明显增多, 具有抑制肿瘤细胞生长, 促进其凋亡, 对其具有明显的生物学调节作用。当然该药物对肿瘤细胞作用后出现的肿瘤生物学行为的改变也反过来证明 HERG K⁺ 蛋白通道对于肿瘤细胞生理功能的重要调节作用, 提示该通道在肿瘤发生发展过程中发挥重大作用, 具有促经细胞增殖, 抑制肿瘤细胞凋亡, 保护肿瘤细胞生长的功能。

细胞外基质的降解是肿瘤侵袭转移的重要环节, 细胞膜表面的钾离子通道具有调节细胞与基底膜黏附

的作用,使细胞间黏附性减弱,其可促进肿瘤细胞的分裂增殖与移动并刺激癌细胞迁移和侵袭^[14],在本实验中通过使用Ⅲ类抗心律失常药 E-4031 阻断在肿瘤细胞特异性表达并增多的 HERG K⁺ 蛋白通道,发现胃癌细胞体外侵袭能力有明显的改变,侵袭力减弱,侵袭抑制率增高,初步说明该药物具有抑制胃癌细胞侵袭转移的生物学作用,同时也说明其作用的靶点分子 hege1 基因表达蛋白 HERG1 则在胃癌细胞的侵袭转移的过程中具有重要的调节能力,并可能决定胃癌细胞侵袭转移的方式。但此种作用是 E-4031 直接作用于 HERG K⁺ 蛋白通道发挥抑制功能,还是通过间接途径或别的方式发挥作用尚不能说明和解释,且 hege1 基因在胃癌细胞转移侵袭中具体的分子调节信号途径也尚不清楚,这些都有待进一步研究来证实。本研究表明Ⅲ类抗心律失常药 E-4031 对胃癌细胞的增殖、凋亡、侵袭转移等特定肿瘤生物学行为均有不同程度的调节作用,这与其作用位点 hege1 基因编码的 HERG K⁺ 蛋白通道在胃癌中的过度表达可能是细胞恶变后获得的一种有助于肿瘤细胞生长发展和促进胃癌向远处转移的能力密切相关,笔者在本实验中应用 E-4031 特异性的阻断胃癌细胞系 SGC-7901 过度表达的该通道蛋白后出现明显的抗肿瘤作用。Ⅲ类抗心律失常药 E-4031 在体外对胃癌细胞系 SGC-7901 的抑制作用提示该药物在胃癌的临床治疗中将可能发挥重大作用,虽然其能否作为抗肿瘤药物应用于临床治疗还有很多方面的问题要进行考虑和研究,其体内治疗的有效性、安全性和实用性也尚需进一步的实验证明,但却为肿瘤治疗的理论和实践研究方案提供新的思路。另外,在本实验的过程中,Ⅲ类抗心律失常药 E-4031 作用的分子靶点通道蛋白 HERG K⁺ 只表达在胃癌细胞株及阳性对照组肠癌细胞株 LOVO 中,而在正常胃黏膜组织中几乎不表达,提示该通道蛋白与胃癌有明显的相关性。

靶向治疗是当前癌症治疗的前沿革命性方法,笔者认为Ⅲ类抗心律失常药 E-4031 和其阻滞受体 HERG K⁺ 通道由于和胃癌组织的相关性和对其作用的特定性,在肿瘤的侵袭转移机制中可能发挥了重要的调节作用,而细胞侵袭转移是胃癌治疗效果难以控制的主要原因,故可为胃癌诊断和治疗过程中提供了较为明确的分子靶向研究目标;另一方面,对于癌症研究的日益加深对于使得临床治疗方法有新的突破,herg1 基因编码的 HERG1 蛋白通道作为自身免疫性疾病的治疗靶点已经研究^[15]。因此,应重视以该通道为靶点的阻滞剂在癌症治疗未来临床应用中的价值,

对如何加强其药物作用和特异性加以进一步研究。

[DOI] 10.3870/yydb.2010.01.002

[参考文献]

- [1] 高峰,周文学,佟柏峰,等. C2Met、MMP29、TIMP21 在胃癌中的表达及与胃癌侵袭转移的关系[J]. 哈尔滨医科大学学报,2004,38(4):259-262.
- [2] HANAHAN D, WEINBERG R A. The hallmarks of cancer [J]. *Cell*, 2000, 100: 57-70.
- [3] ROY J, VANTOL B, COWLEY E A, et al. Pharmacological separation of hEAG and hERG K⁺ channel function in the human mammary carcinoma cell line MCF-7 [J]. *Oncol Rep*, 2008, 19(6): 1511-1516.
- [4] WONDERLIN W F, STROBL J S. Potassium channels, proliferation and G1 progression [J]. *J Membr Biol*, 1996, 154: 91-107.
- [5] BINGGELI R, WEINSTEIN R C. Membrane potentials and sodium channels: hypotheses for growth regulation and cancer formation based on changes in sodium channels and gap junctions [J]. *J Theor Biol*, 1986, 123: 377-401.
- [6] ARCANGELI A, BIANCHI L, BECCHETTI A, et al. A novel inward-rectifying K⁺ current with a cell cycle dependence governs the resting potentials of mammalian neuroblastoma cells [J]. *J Physiol*, 1995, 489: 455-471.
- [7] WEBB C P, TAYLOR G A, JEFFERS M, et al. Evidence for a role of Met HSF/SF during Ras-mediated tumorigenesis/metastasis [J]. *Oncogene*, 1998, 17(16): 2019-2025.
- [8] BIANCHI L, WIBLE B, ARCANGELI A, et al. HERG encodes a K⁺ current highly conserved in tumors of different histogenesis—a selective advantage for cancer cells? [J]. *Cancer Res*, 1998, 58: 815-822.
- [9] MASI A, BECCHETTI A, RESTANO-CASSULINI R, et al. HERG1 channels are overexpressed in glioblastoma multiforme and modulate VEGF secretion in glioblastoma cell lines [J]. *Br J Cancer*, 2005, 93: 781-792.
- [10] CHERUBINI A, TADDEI G L, CROCIANI O, et al. HERG potassium channels are more frequently expressed in human endometrial cancer as compared to non-cancerous endometrium [J]. *Br J Cancer*, 2000, 83: 1722-1729.
- [11] LASTRAIOLI E, GUASTI L, CROCIANI O, et al. Herg1 gene and HERG1 protein are overexpressed in colorectal cancers and regulate cell invasion of tumor cells [J]. *Cancer Res*, 2004, 64: 606-611.
- [12] SMITH G A M, TSUI H W, NEWELL E W, et al. Functional up regulation of HERG K⁺ channels in neoplastic hematopoietic cells [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 18528-18534.
- [13] CROCIANI O, GUASTI L, BALZI M, et al. Cell cycle-

dependent expression of HERG1 and HERG1 B isoforms in tumor cells[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 2947-2955.

- [14] HOFMANN G, BERNABEI P A, CROCIANI O, *et al.* HERG K⁺ channels activation during 1 integrin mediated adhesion to fibronectin induces an up regulation of vb3 integrin in the preosteoclastic cell line FLG 29. 1 [J]. *J*

Biol Chem, 2001, 276: 4923-4931.

- [15] BEETON C, PENNINGTON M W, WULFF H, *et al.* Targeting effector memory T cells with a selective peptide inhibitor of Kv1. 3 channels for therapy of autoimmune diseases[J]. *Mol Pharmacol*, 2005, 67: 1369-1381.

雷公藤内酯醇对内毒素激活

小鼠腹腔巨噬细胞分泌促炎递质 NO 和 IL-6 的影响*

杨帆¹, 白祥军¹, 刘开俊¹, 杨业金², 曾叶²

(华中科技大学同济医学院 1. 附属同济医院创伤外科; 2. 生化与分子生物学系, 武汉 430030)

[摘要] 目的 观察雷公藤内酯醇(TP)对内毒素(LPS)激活小鼠腹腔巨噬细胞(MΦ)分泌促炎递质一氧化氮(NO)和白细胞介素-6(IL-6)的影响。方法 分离纯化 MΦ, 用 LPS 激活, 与不同浓度 TP 进行培养, 以 Griess 试剂检测培养上清液中的 NO 含量; 以 ELISA 法检测培养上清液中的 IL-6 的浓度。结果 TP 在浓度 0.01 ~ 10.00 μg · mL⁻¹ 范围内, 时间 4 ~ 24 h 范围内, 对 MΦ 产生 NO 具有显著抑制作用 ($P < 0.01$), 且呈剂量和时间依赖关系; TP 在浓度 0.001 ~ 10.000 μg · mL⁻¹ 范围内, 时间 12 h, 对 MΦ 产生 IL-6 具有显著抑制作用 ($P < 0.01$), 呈剂量依赖关系。结论 TP 可以抑制被 LPS 激活的 MΦ 活性, 具有高效低毒的抗炎作用。

[关键词] 雷公藤内酯醇; 内毒素; 巨噬细胞; 一氧化氮; 白细胞介素-6

[中图分类号] R286; R392.114

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-0781(2010)01-0009-04

Effect of Triptolide on Secretion of Inflammatory Cellular Factor NO and IL-6 in Mice Peritoneal Macrophage Activated by Lipopolysaccharide

YANG Fan¹, BAI Xiang-jun¹, LIU Kai-jun¹, YANG Ye-jin², ZENG Ye² (1. Department of Traumatic Surgery Affiliated with Tongji Hospital, 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

ABSTRACT Objective To study the effect of triptolide(TP) on NO and IL-6 of peritoneal elicited macrophage(MΦ) activated by lipopolysaccharide(LPS) in mice. **Methods** The peritoneal elicited macrophage were separated, purified and activated by LPS in mice, then cultured in vitro with a series concentration of TP. The activity of NO and level of IL-6 in cellular supernatants were determined by Griess reagent and ELISA, respectively. **Results** The activity of NO in MΦ was significantly inhibited ($P < 0.01$) by TP(0.01 - 10.00 μg · mL⁻¹) during 4 - 24 h in a time and dosage dependent manner; The level of IL-6 was obviously decreased ($P < 0.01$) by TP(0.001 - 10.000 μg · mL⁻¹) in 12 h in a dose-dependent way. **Conclusion** TP could inhibit the NO activity and IL-6 level in macrophage activated by LPS, and it has strong anti-inflammatory effects with low toxicity.

KEY WORDS Triptolide; Lipopolysaccharide; Macrophage; Nitrogen monoxidum; Interleukin-6

雷公藤作为中药在治疗自身免疫性疾病、肾病综合征、癌症等方面疗效显著^[1], 但同时亦有大量研究表明其有效剂量和中毒剂量相接近, 且毒性作用较大^[2], 所以雷公藤的广泛应用一直受到限制。雷公藤由生物碱、二萜类和三萜类等多种化学成分组成, 研究表明各种成分均具有不同程度的抗炎、抗肿瘤和免疫抑制等活性。因此, 如何在不影响雷公藤疗效的基础上, 寻找毒性作用最小的有效成分, 成为近年来的研究热点。而雷公藤内酯醇(triptolide, TP)是从雷公藤中

新近分离出的一种二萜内酯类单体化合物, 笔者在本实验中以体外培养的小鼠腹腔巨噬细胞(MΦ)为细胞模型, 观察 TP 对 MΦ 分泌一氧化氮(NO)和白细胞介素-6(IL-6)的量效和时效影响, 以及不同浓度 TP 的毒性作用, 为证明 TP 具有较强抗炎作用, 同时毒性作用较小以及今后进一步纯化雷公藤有效成分提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 试剂 PRMI-1640 培养基(Gibco 公司), 小牛血