

雷公藤内酯醇衍生物对肝癌细胞增殖、凋亡的作用研究

王意¹, 韩丽乔¹, 杨祎琦¹, 王凯¹, 张露¹, 王晓婉¹, 刘博^{1,2,3}, 黄宪章¹(1. 广州中医药大学第二附属医院, 广东 广州 510120; 2. 广州市中药活性成分手性研究重点实验室, 广东 广州 510006; 3. 粤港澳中医药与免疫疾病研究联合实验室, 广东 广州 510006)

摘要: **目的** 研究新型雷公藤内酯醇(Triptolide, TPL)衍生物对正常肝细胞的毒性以及对肝癌细胞的增殖、凋亡作用。**方法** 通过对 TPL 进行化学修饰, 获得 2 种新型衍生物: 雷公藤内酯三醇(TP-3-OH)和丙烯酸雷公藤甲素酯(TPO)。通过体外培养人胚胎肝细胞 LO2 和肝癌细胞 HepG2、Hep3B、SMMC-7721, 分为 DMSO 对照组, TPL/TP-3-OH/TPO 低、中、高浓度组(25、50、100 nmol·L⁻¹)。通过检测培养上清中乳酸脱氢酶(LDH)的活性来评价 TP-3-OH、TPO 对肝细胞的毒性; 采用 MTT 实验检测细胞增殖情况; 采用流式细胞术及 Western Blot 法检测细胞凋亡及凋亡通路相关蛋白表达情况; 采用划痕实验检测细胞迁移能力。**结果** 与 TPL 组比较, 50、100 nmol·L⁻¹ 浓度条件下 TP-3-OH、TPO 组的 LO2 细胞培养上清中的 LDH 活性明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 DMSO 对照组比较, TPO 中、高浓度(50、100 nmol·L⁻¹)组的 LO2 细胞增殖抑制率明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$), TPO 低、中、高浓度(25、50、100 nmol·L⁻¹)组的 HepG2、Hep3B、SMMC-7721 肝癌细胞增殖抑制率均明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$); TPO 高浓度(100 nmol·L⁻¹)组的 LO2、HepG2 和 SMMC-7721 细胞的早期、晚期细胞凋亡率均明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$); TPO 中、高浓度(50、100 nmol·L⁻¹)组 SMMC-7721、HepG2 细胞的 cleaved-Caspase-3、cleaved-PARP 蛋白表达显著上调($P < 0.01$); TPO 中浓度(50 nmol·L⁻¹)组 SMMC-7721 细胞的 24 h 迁移率明显降低($P < 0.05$)。**结论** 经化学修饰获得的 2 种新型 TPL 衍生物对肝细胞的毒性降低, 其中 TPO 具有抑制肝癌细胞增殖、促进肝癌细胞凋亡的作用。

关键词: 雷公藤内酯醇衍生物; 雷公藤内酯三醇; 丙烯酸雷公藤甲素酯; 肝癌; 凋亡; 迁移

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2022)01-0014-06

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2022.01.003

Effects of Triptolide Derivatives on Hepatocellular Carcinoma Proliferation and Apoptosis

WANG Yi¹, HAN Liqiao¹, YANG Weiqi¹, WANG Kai¹, ZHANG Lu¹, WANG Xiaowan¹, LIU Bo^{1,2,3}, HUANG Xianzhang¹(1. The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China; 2. Guangzhou Key Laboratory of Chirality Research on Active Components of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China; 3. Guangdong-Hong Kong-Macau Joint Lab on Chinese Medicine and Immune Disease Research, Guangzhou 510006 Guangdong, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of two triptolide derivatives on the cytotoxicity of normal hepatic cells and the proliferation and apoptosis of hepatocellular carcinoma cells. **Methods** Triptolide was modified by chemical method and transferred to two new monomers with similar structures, TP-3-OH and TPO. *In vitro* cultured normal hepatic cell (LO2), and three carcinoma cells (HepG2, Hep3B, and SMMC-7721) were treated with DMSO or different concentrations of TPL, TP-3-OH or TPO (25, 50, 100 nmol·L⁻¹). Detection of LDH activity in the cell

收稿日期: 2021-04-14

作者简介: 王意, 男, 硕士, 主管技师, 研究方向: 肿瘤的化学药物治疗。Email: wangyi2719@126.com。通信作者: 黄宪章, 男, 博士, 教授, 研究方向: 临床检验检测标准化。Email: huangxz020@163.com。刘博, 男, 博士, 教授, 研究方向: 中药活性物质化学研究与结构优化。Email: doctliu@gzucm.edu.cn。

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFC1707900); 广州市重点实验室建设专项(202002010004); 广州中医药大学一流学科重点项目(XK2018019); 广东省中医院院内专项(YN2016QJ06, YN2018ML04); 中国博士后科学基金项目(2016M602452); 广东省中医药管理局项目(20201161)。

cultural supernatant was used to assess the cytotoxicity of these drugs to LO2 cells. MTT assay, flow cytometry and Western Blot were used to assess the effects of these drugs on proliferation and apoptosis of LO2 cells and carcinoma cells. Wound-healing assay was used to assess cell migration. **Results** Compared with TPL group, the LDH activities of LO2 cells cultural supernatant in TP-3-OH and TPO 50 and 100 nmol·L⁻¹ groups were significantly reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with DMSO group, the proliferation inhibition rates of LO2 cells in TPO 50 and 100 nmol·L⁻¹ groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the proliferation inhibition rates of carcinoma cells (HepG2, Hep3B and SMMC-7721) in TPO 25, 50 and 100 nmol·L⁻¹ groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the early and later apoptotic rates of carcinoma cells (LO2, HepG2, and SMMC-7721) in TPO 100 nmol·L⁻¹ groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the protein levels of cleaved-Caspase-3 and cleaved-PARP in TPO 50 and 100 nmol·L⁻¹ groups ($P < 0.01$), were significantly increased. The 24-hour migration rates of SMMC-7721 cells in TPO 50 nmol·L⁻¹ group were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** We obtained two triptolide derivatives with attenuated hepatic cells toxicity, and TPO, one of them, inhibits proliferation and promotes apoptosis of hepatocellular carcinoma cells.

Keywords: Triptolide derivatives; TP-3-OH; TPO; hepatocellular carcinoma; apoptosis; migration

肝癌是世界第五大恶性肿瘤，每年新增确诊病例超过 50 万人，死亡人数高达 25 万，我国是原发性肝癌发病率最高的国家之一^[1-2]。肝实质细胞癌 (Hepatocellular carcinoma, HCC) 为原发性肝癌中最常见的类型，约占肝脏肿瘤的 75%^[1]。原发性肝细胞癌的常用化疗药物包括索非拉尼 (Sorafenib)、顺铂 (Cisplatin)、氟尿嘧啶 (5-FU) 等，但上述药物均有不同程度的副作用和耐药性，临床亟需更加安全有效的药物^[3]。

近年来研究^[4]发现，中药提取物在多种恶性肿瘤的治疗中具有潜在应用价值。雷公藤 (*Tripterygium wilfordii* Hook. f.) 是卫矛科雷公藤属木质藤本植物，常用于自身免疫系统性疾病的治疗。雷公藤内酯醇 (Triptolide, TPL) 又名雷公藤甲素，具有抗炎、免疫抑制、抗肿瘤等药理作用，既是雷公藤的主要生物活性成分，同时也是主要毒性成分。其治疗浓度与中毒浓度相近，以肝、肾毒性最大，严重者可致患者死亡，极大限制了其临床应用^[5]。因此，本研究团队采用结构修饰的方法将 TPL 转化为雷公藤内酯三醇 (TP-3-OH) 和丙烯酸雷公藤甲素酯 (TPO，结构式见图 1)，拟探讨这 2 种新型 TPL 衍生物对正常肝细胞的毒性以及对肝癌细胞的增殖、凋亡作用。

1 材料与方法

1.1 细胞及培养 LO2、HepG2、Hep3B、SMMC-7721 细胞系，均购自于美国 ATCC 细胞库。细胞使用含 10% 胎牛血清、 1×10^5 U·L⁻¹ 青霉素和 100 mg·L⁻¹ 链霉素的 DMEM 完全培养基，于 5% CO₂、37℃ 及

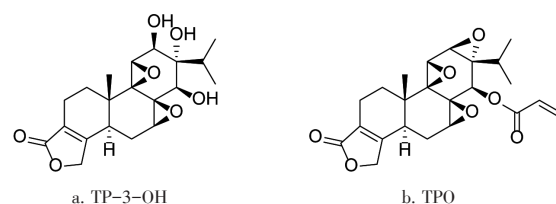


图 1 雷公藤内酯三醇 (TP-3-OH) 与丙烯酸雷公藤甲素酯 (TPO) 的结构式

Figure 1 Structural formula of TP-3-OH and TPO

饱和湿度条件下培养。

1.2 药物及试剂 TPL，成都健腾生物技术公司，批号：38748-32-2；TPO、TP-3-OH，均由广东省中医院制备合成。胎牛血清 (批号：2243863)、DMEM 培养基 (批号：8120403)、青霉素/链霉素 (批号：15140122)，均购自美国 Gibco 公司；Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒，江苏凯基生物有限公司，批号：20190902；MTT 试剂盒，上海碧云天生物科技发展有限公司，批号：ST316；β-actin (批号：4970)、Caspase-3 (批号：14220)、cleaved-Caspase-3 (批号：9664)、PARP (批号：9542)、cleaved-PARP (批号：5625) 抗体以及抗兔二抗 (批号：7074)、抗鼠二抗 (批号：7076)，均购自美国 CST 公司；乳酸脱氢酶 (LDH) 检测试剂盒，瑞士罗氏公司，批号：529538。

1.3 主要仪器 Roche 生化分析仪，瑞士罗氏公司；MF52-LED 型倒置显微镜，德国 Leica 公司；FACSCantoII 流式细胞仪，美国 BD 公司；Bio-rad 蛋白电泳系统，美国伯乐公司；Epoch 酶标仪，美国 BioTek 公司。

1.4 TPL 衍生物制备

1.4.1 TP-3-OH 的制备 室温下将 TPL (100 mg, 0.27 mmol) 溶解于 20 mL 磷酸缓冲溶液 (pH=4.0) 中, 加热回流 48 h 后, 冷却至室温; 二氯甲烷萃取, 用饱和氯化钠溶液、水洗涤, 无水硫酸钠干燥; 浓缩后经制备色谱纯化得白色固体 (TP-3-OH) 24 mg, 收率约为 25.0%。TP-3-OH 分子式为 $C_{20}H_{26}O_7$, ESI-MS m/z : 377.159 8 [M-H]⁻ (理论值 377.160 0)。¹H-NMR (400 MHz, *d*-DMSO) δ 4.84 (m, 2H), 4.54 (br s, 1H), 4.29 (br, 2H), 3.83 (br, 1H), 3.69 (d, *J*=5.4 Hz, 1H), 3.32 (d, *J*=6.1 Hz, 1H), 2.94 (br, 1H), 2.68 (m, 1H), 2.27 (q, *J*=6.9 Hz, 1H), 2.17 (m, 1H), 2.14 (br d, *J*=5.8 Hz, 1H), 1.97 (m, 1H), 1.84 (t, *J*=14.0 Hz, 1H), 1.39 (dd, *J*=12.4, 4.9 Hz, 1H), 1.26 (td, *J*=12.4, 5.8 Hz, 1H), 0.95 (s, 3H), 0.88 (d, *J*=6.9 Hz, 3H), 0.77 (d, *J*=6.9 Hz, 3H)。¹³C-NMR (100 MHz, *d*-DMSO) δ 173.7, 163.0, 123.7, 76.3, 74.8, 70.8 (CH₂), 68.3, 65.8, 61.6, 61.1, 58.5, 39.8, 35.3, 30.2 (CH₂), 27.7, 22.9 (CH₂), 17.2 (CH₂), 16.1, 16.0, 14.4。

1.4.2 TPO 的制备 取 103.4 mg (0.287 mmol) TPL 与 1.75 mg (0.014 35 mmol) 4-二甲基氨基吡啶, 溶于 5 mL 无水二氯甲烷中; 加入 319.5 mg (3.157 mmol) 三乙胺, 冰浴至约 0 °C; 逐滴加入 259.7 mg (2.87 mmol) 丙烯酰氯, 滴毕逐渐恢复至室温, 搅拌反应 2 h, 用饱和碳酸氢钠水溶液淬灭反应; 二氯甲烷萃取, 水层用二氯甲烷再萃取 2 次, 合并二氯甲烷萃取液; 用饱和氯化钠水溶液洗去二氯甲烷萃取液中的大部分水, 再用无水硫酸钠干燥, 减压蒸干; 经制备薄层硅胶板分离, 用石油醚-乙酸乙酯 (2:1~1:1) 作为展开剂, 得到无色透明油状物 (TPO) 32.1 mg, 收率约为 27.0%。TPO 分子式为 $C_{23}H_{26}O_7$, ESI-MS m/z : 415.175 7 [M+H]⁺ (理论值 415.175 6)。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 6.54 (d, *J*=16.1 Hz, 1H), 6.23 (dd, *J*=17.3, 10.4 Hz, 1H), 5.94 (d, *J*=10.4 Hz, 1H), 5.15 (s, 1H), 4.77~4.61 (m, 2H), 3.84 (d, *J*=3.2 Hz, 1H), 3.52 (dd, *J*=30.8, 4.2 Hz, 2H), 2.70 (d, *J*=13.3 Hz, 1H), 2.32 (d, *J*=18.3 Hz, 1H), 2.18 (d, *J*=26.5 Hz, 2H), 1.90 (d, *J*=39.2 Hz, 2H), 1.59 (dd, *J*=4.8, 16.0 Hz, 1H), 1.24 (m, 1H), 1.06 (s, 3H), 0.97 (d, *J*=7.0 Hz, 3H), 0.85 (d, *J*=6.9 Hz, 3H)。¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 173.24, 165.52, 159.98, 132.46 (CH₂), 127.78, 125.63,

71.13, 69.98 (CH₂), 63.64, 63.40, 61.11, 59.78, 55.36, 55.09, 40.40, 35.71, 29.86 (CH₂), 28.33, 23.47 (CH₂), 17.58, 17.08 (CH₂), 16.76, 13.74。

1.5 细胞毒性实验 取对数生长期的 LO2 细胞, 以每孔 1×10^4 个接种于 96 孔板。分别使用终浓度为 10、50、100 nmol·L⁻¹ 的 TPL、TPO、TP-3-OH 处理细胞, 24 h 后收集培养上清, 采用 Roche 生化分析仪检测培养上清中的 LDH 活性。

1.6 MTT 法检测细胞增殖 待 LO2、HepG2、Hep3B、SMMC-7721 细胞生长至对数期, 将单细胞悬液以每孔 1×10^4 个接种于 96 孔板。空白组为含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 对照组为加入溶剂对照 (DMSO) 的细胞组, 实验组为以低、中、高浓度 (25、50、100 nmol·L⁻¹) TPO、TP-3-OH 处理的细胞组。干预 24 h 后, 小心吸弃培养基上清, 每孔加入用培养基稀释的终浓度为 0.5 mg·L⁻¹ 的 MTT 溶液 100 μ L; 培养细胞 4 h 后, 弃去培养基, 每孔加入 150 μ L DMSO 溶液, 避光置摇床上低速摇 10 min; 待结晶物充分溶解后, 采用酶标仪在 490 nm 处检测各孔的吸光度 (A) 值。计算: 细胞增殖抑制率 (%) = [(对照组 A₄₅₀ - 空白组 A₄₅₀) - (实验组 A₄₅₀ - 空白组 A₄₅₀)] / (对照组 A₄₅₀ - 空白组 A₄₅₀) $\times$ 100%。

1.7 流式细胞术检测细胞凋亡 取对数生长期的 LO2、HepG2、SMMC-7721 细胞, 以每孔 5×10^5 个接种于 12 孔板。使用终浓度为 50、100 nmol·L⁻¹ 的 TPO 处理细胞 24 h 后, 采用 0.25% 的无 EDTA 胰酶消化收集细胞; 用预冷的 PBS 洗涤 2 次, 并用 300 μ L 1 $\times$ Binding Buffer 重悬细胞; 每管细胞悬液加入 5 μ L FITC Annexin V 和 5 μ L PI, 室温避光孵育 5 min, 1 h 内使用流式细胞仪检测。

1.8 Western Blot 法检测凋亡通路相关蛋白的表达 取对数生长期的 HepG2、SMMC-7721 细胞, 以每孔 5×10^5 个接种于 12 孔板。使用终浓度为 25、50、100 nmol·L⁻¹ 的 TPO 处理细胞 24 h; 收集细胞后加入裂解液, 冰上充分裂解后提取总蛋白。采用 BCA 法测定蛋白浓度后, 加入 Loading buffer 并于 100 °C 煮沸 10 min 使蛋白充分变性。变性后的样品经过 SDS-PAGE 凝胶电泳, 并电转移至 PVDF 膜; 使用 TBST 配制的 5% BSA 溶液于室温下封闭 1 h, 再经过相应的一抗 4 °C 下孵育过夜, TBST 洗涤; 加入二抗室温下孵育 2 h, TBST 再次洗涤; 最后, 加入 ECL 化学发光液使膜条发光, 并使用感光胶片压片、显影、定影得到电泳结果, 观察不同处理组之

间凋亡相关蛋白的变化趋势。使用 Adobe Photoshop CS2 软件计算蛋白条带灰度值,以 β -actin 为内参进行半定量分析。

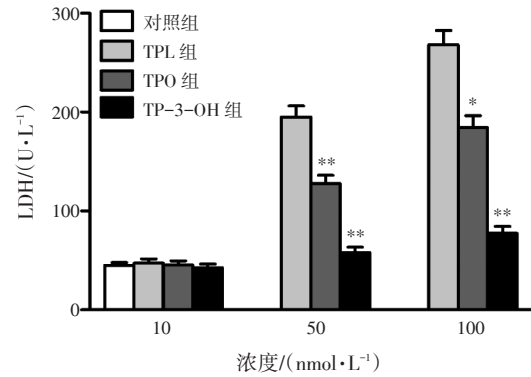
1.9 细胞划痕实验 取对数生长期的 SMMC-7721 细胞,以每孔 5×10^5 个接种于 24 孔板。待细胞长满后,用无菌枪头进行划痕;用 PBS 洗涤细胞 3 次,去除划下的细胞;加入含 $50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ TPO 的含 1% 血清的培养基继续培养 24 h 后,进行拍照。使用 ImageJ 软件对划痕照片进行分析,测量划痕距离,计算: $24 \text{ h 细胞迁移率}(\%) = [(0 \text{ h 划痕距离} - 24 \text{ h 划痕距离}) / 0 \text{ h 划痕距离}] \times 100\%$ 。

1.10 统计学处理方法 采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据分析;计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示;数据先进行正态性检验和方差齐性检验;多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA),两两比较采用 t 检验;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TPL、TP-3-OH、TPO 对正常肝细胞的毒性作用 结果见图 2。与 TPL 组比较,50、100 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度条件下 TP-3-OH、TPO 组的 LO2 细胞培养上清中的 LDH 活性明显降低,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结果表明,2 种新型衍生物对肝细胞的毒性明显低于 TPL。

2.2 TP-3-OH、TPO 对 LO2 细胞及肝癌细胞增殖的影响 结果见表 1。与对照组比较,TPO 中、高浓度 (50、100 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组的 LO2 细胞增殖抑制率明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),TPO 低、中、高浓度 (25、50、100 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组的 HepG2、Hep3B、SMMC-7721 肝癌细胞增殖抑制率均明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),且呈现药物剂量依赖趋势;TP-3-OH 中、高



注:与 TPL 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 2 雷公藤内酯醇(TPL)、雷公藤内酯三醇(TP-3-OH)及丙烯酸雷公藤甲素酯(TPO)对 LO2 细胞的毒性作用 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 2 Cytotoxicity of TPL, TP-3-OH and TPO to LO2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

浓度组的 Hep3B、SMMC-7721 肝癌细胞增殖抑制率有一定升高 ($P < 0.05$)。结果表明,TPO 对 HepG2、Hep3B、SMMC-7721 肝癌细胞具有明显增殖抑制作用,而 TP-3-OH 的抑制作用不明显。

2.3 TPO 对 LO2 细胞及肝癌细胞凋亡的影响 结果见图 3、表 2。与对照组相比,TPO 高浓度 (100 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组的 LO2、HepG2 和 SMMC-7721 细胞的早期、晚期细胞凋亡率明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$);TPO 中浓度 (50 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组的 LO2、HepG2 和 SMMC-7721 细胞的早期细胞凋亡率明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结果表明,TPO 可诱导 HepG2、SMMC-7721 肝癌细胞的凋亡。

2.4 TPO 对肝癌细胞凋亡通路相关蛋白表达的影响 结果见图 4。与对照组相比,TPO 中、高浓度 (50、100 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组 SMMC-7721、HepG2 细胞的 cleaved-Caspase-3、cleaved-PARP 蛋白表达显著上调 ($P <$

表 1 丙烯酸雷公藤甲素酯(TPO)、雷公藤内酯三醇(TP-3-OH)对 LO2 细胞及肝癌细胞增殖抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Table 1 Effect of TPO and TP-3-OH on LO2 and HCC cells proliferation ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

组别	浓度 / ($\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	细胞增殖抑制率 / %			
		LO2	HepG2	Hep3B	SMMC-7721
对照组	-	3.0 $\pm$ 2.8	1.0 $\pm$ 1.0	1.0 $\pm$ 1.0	2.0 $\pm$ 1.0
TPO 低浓度组	25	12.0 $\pm$ 4.6	28.6 $\pm$ 3.5*	18.7 $\pm$ 3.2*	19.3 $\pm$ 3.5*
TPO 中浓度组	50	26.0 $\pm$ 12.4*	52.0 $\pm$ 9.5**	38.3 $\pm$ 7.0**	35.3 $\pm$ 2.5**
TPO 高浓度组	100	48.0 $\pm$ 9.5**	77.0 $\pm$ 12.8**	65.7 $\pm$ 8.1**	69.0 $\pm$ 6.6**
TP-3-OH 低浓度组	25	3.0 $\pm$ 2.5	2.7 $\pm$ 2.1	5.7 $\pm$ 2.5	3.0 $\pm$ 1.0
TP-3-OH 中浓度组	50	10.0 $\pm$ 1.1	4.3 $\pm$ 3.5	9.0 $\pm$ 3.6*	8.3 $\pm$ 1.5*
TP-3-OH 高浓度组	100	7.0 $\pm$ 2.8	11.7 $\pm$ 7.6	15.7 $\pm$ 5.9*	12.7 $\pm$ 2.5*

注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

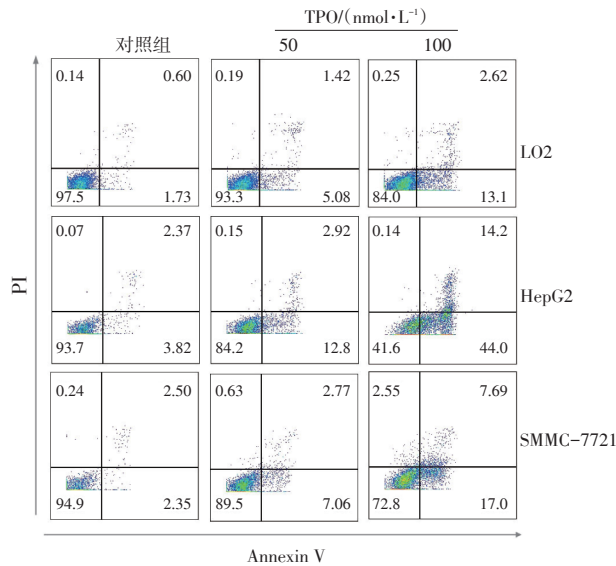


图3 丙烯酸雷公藤甲素酯(TPO)对 LO2 及 HepG2、SMMC-7721 细胞凋亡的诱导作用

Figure 3 Effect of TPO on apoptosis of LO2, HepG2 and SMMC-7721 cells

0.01)。结果表明, TPO 可诱导 SMMC-7721、HepG2 肝癌细胞凋亡通路的活化。

2.5 TPO 对 SMMC-7721 肝癌细胞迁移能力的影响
结果见图 5。与对照组比较, TPO 中浓度(50 nmol·L⁻¹)组 SMMC-7721 细胞的 24 h 迁移率明显降低, 差异

有统计学意义($P < 0.05$)。结果表明, TPO 能够抑制 SMMC-7721 肝癌细胞的迁移。

3 讨论

近年来的研究^[6-8]发现, 雷公藤甲素(TPL)具有广泛且高效的抗肿瘤作用, 其对乳腺癌、白血病、肝癌、胃癌、肺癌、结肠癌等 60 多种肿瘤细胞均有抗肿瘤作用, 甚至强于现有一线抗肿瘤药物。Li 等^[9]研究表明, TPL 在体外可抑制 HepG2、Hep3B、SMMC-7721 等肝癌细胞增殖, 促进其凋亡; 在小鼠体内, TPL 具有抑制异种移植肝癌组织生长的作用, 且作用强于顺铂。TPL 还可增强体内外肝癌细胞对化疗药物如顺铂、5-氟尿嘧啶、索拉菲尼的敏感性。Alsaied 等^[10]研究表明, 使用 TPL 与索拉菲尼联合给药, 体外可促进肝癌细胞凋亡, 体内可缩小小鼠肿瘤体积, 抑制肿瘤进展, 且作用强于 TPL 或索拉菲尼单独给药。说明 TPL 不但具有直接抗肿瘤作用, 还对其他化疗药物具有增效作用。

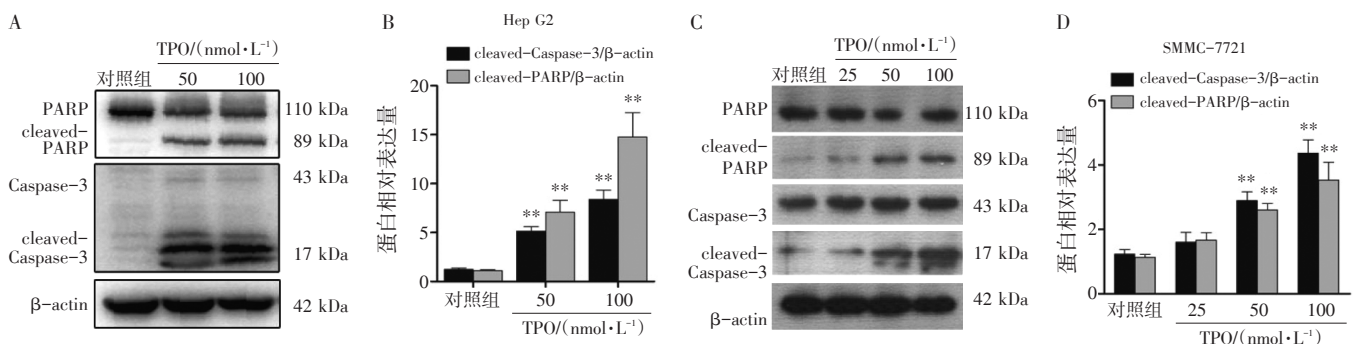
虽然 TPL 具有很好的抗肝癌功效, 但其较强的肝、肾等毒性极大地限制了其临床使用^[9]。降低雷公藤提取物毒性的方法有联合用药、靶向输送以及结构改造等^[11-13]。因此, 获得高效低毒的 TPL 衍生物成为了近期的研究热点, 国内外许多学者做了大量研

表2 丙烯酸雷公藤甲素酯(TPO)对 LO2 及 HepG2、SMMC-7721 细胞凋亡的诱导作用($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2 Effect of TPO on apoptosis of LO2, HepG2 and SMMC-7721 cells($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	浓度/ (nmol·L ⁻¹)	LO2		HepG2		SMMC-7721	
		早期细胞凋亡率/%	晚期细胞凋亡率/%	早期细胞凋亡率/%	晚期细胞凋亡率/%	早期细胞凋亡率/%	晚期细胞凋亡率/%
对照组	-	1.93 ± 0.49	0.83 ± 0.40	3.63 ± 1.06	2.20 ± 0.36	2.31 ± 0.85	2.60 ± 1.05
TPO 中浓度组	50	5.93 ± 1.40*	1.80 ± 0.61	16.63 ± 3.67**	3.30 ± 1.06	6.66 ± 1.53*	4.93 ± 2.63
TPO 高浓度组	100	14.16 ± 4.59*	3.47 ± 0.80*	35.56 ± 9.30**	12.13 ± 2.21**	18.73 ± 4.55**	8.80 ± 3.58*

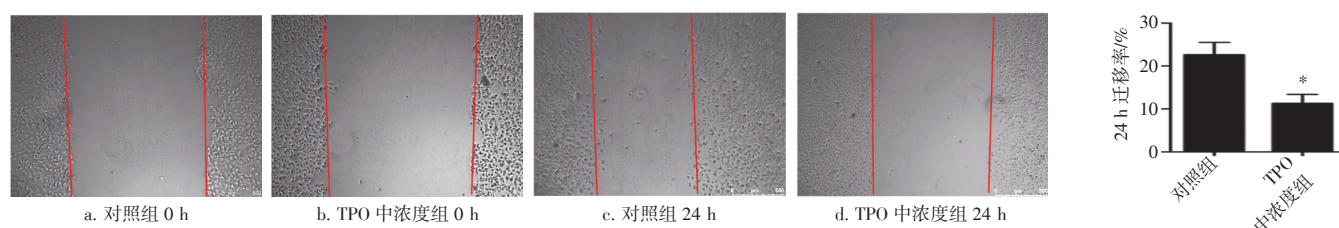
注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$



注: A. HepG2 蛋白电泳图; B. HepG2 凋亡通路相关蛋白分析; C. SMMC-7721 蛋白电泳图; D. SMMC-7721 凋亡通路相关蛋白分析。与对照组比较, ** $P < 0.01$

图4 丙烯酸雷公藤甲素酯(TPO)对 HepG2、SMMC-7721 细胞凋亡通路相关蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 4 Effect of TPO on apoptosis signal pathway of HepG2 and SMMC-7721 cells($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



注：与对照组比较，* $P < 0.05$

图 5 丙烯酸雷公藤甲素酯(TPO)对 SMMC-7721 细胞迁移能力的影响($\times 50$; $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 5 Effect of TPO on SMMC-7721 cells migration($\times 50$; $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

究^[14]，针对其化学结构的不同部位进行修饰。本研究通过结构修饰的方法将 TPL 转化为 2 种新型衍生物 TPO、TP-3-OH。通过细胞毒性实验发现 TPO、TP-3-OH 处理的 LO2 肝细胞释放 LDH 的水平明显低于 TPL 处理组，说明这 2 种新型单体对肝细胞的毒性明显低于 TPL。通过 MTT 实验检测 TPO、TP-3-OH 对肝癌细胞增殖的影响，结果发现 TPO 对 HepG2、Hep3B、SMMC-7721 肝癌细胞具有明显增殖抑制作用，而 TP-3-OH 的抑制作用不明显。进一步通过流式细胞术和 Western Blot 实验探讨 TPO 对肝癌细胞凋亡的诱导作用，发现 TPO 可诱导 HepG2、SMMC-7721 肝癌细胞的凋亡，并促进 Caspase-3 和 PARP 剪切。通过划痕实验还发现 TPO 能够抑制 SMMC-7721 肝癌细胞的迁移。上述结果表明 TPO 不仅毒性降低，且在体外实验中依然保持较好的抗肝癌作用，可抑制肝癌细胞增殖和迁移，并促进其凋亡。此外，本研究还发现 TPO 对 LO2 细胞的抑制作用弱于对肿瘤细胞的抑制作用，提示 TPO 可能具有一定的肿瘤细胞选择性抑制作用，但这还需要进一步的研究证明。

综上所述，本研究通过化学修饰方法获得了 2 种新型 TPL 衍生物，并通过体外实验发现其中一种单体 TPO 具有抑制肝癌细胞增殖，促进凋亡的抗肿瘤作用。TPO 是否可替代 TPL 用于肿瘤及类风湿性关节炎等自身免疫性疾病的治疗，值得进一步深入探索。

参考文献：

- [1] LLOVET J M, ZUCMAN-ROSSI J, PIKARSKY E, et al. Hepatocellular carcinoma [J]. Nature Reviews Disease Primers, 2016, 2: e16018.
- [2] 陈建国. 中国肝癌发病趋势和一级预防[J]. 临床肝胆病杂志, 2012, 28(4): 256-260.
- [3] IKEDA M, MORIZANE C, UENO M, et al. Chemotherapy for hepatocellular carcinoma: current status and future perspectives[J].

- Japanese Journal of Clinical Oncology, 2018, 48(2): 103-114.
- [4] HU B, AN H M, WANG S S, et al. Preventive and therapeutic effects of chinese herbal compounds against hepatocellular carcinoma [J]. Molecules, 2016, 21(2): 142-168.
- [5] 薛璟, 贾晓斌, 谭晓斌, 等. 雷公藤化学成分及其毒性研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(5): 726-733.
- [6] LIU L, SALNIKOV A V, BAUER N, et al. Triptolide reverses hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition and stem-like features in pancreatic cancer by nf-kappab downregulation [J]. International Journal of Cancer, 2014, 134(10): 2489-2503.
- [7] HUANG M, ZHANG H, LIU T, et al. Triptolide inhibits mdm2 and induces apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells through a p53-independent pathway [J]. Molecular Cancer Therapeutics, 2013, 12(2): 184-194.
- [8] ZHAO L, JIANG B O, WANG D, et al. Triptolide reduces the viability of osteosarcoma cells by reducing mmp-1 and hsp70 expression [J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2016, 11(5): 2005-2010.
- [9] LI S G, SHI Q W, YUAN L Y, et al. C-myc-dependent repression of two oncogenic mirna clusters contributes to triptolide-induced cell death in hepatocellular carcinoma cells[J]. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2018, 37(1): 51-64.
- [10] ALSAIED O A, SANGWAN V, BANERJEE S, et al. Sorafenib and triptolide as combination therapy for hepatocellular carcinoma [J]. Surgery, 2014, 156(2): 270-279.
- [11] WANG P Y, ZENG W J, LIU J, et al. Trc4, an improved triptolide derivative, specifically targets to truncated form of retinoid X receptor- α in cancer cells[J]. Biochemical Pharmacology, 2017, 124: 19-28.
- [12] JIANG Q W, CHENG K J, MEI X L, et al. Synergistic anticancer effects of triptolide and celastrol, two main compounds from thunder god vine [J]. Oncotarget, 2015, 6(32): 32790-32804.
- [13] LING D, XIA H, PARK W, et al. Ph-sensitive nanoformulated triptolide as a targeted therapeutic strategy for hepatocellular carcinoma[J]. ACS Nano, 2014, 8(8): 8027-8039.
- [14] 李唯, 陈阿虹, 阙慧卿, 等. 雷公藤内酯醇结构修饰和构效关系研究进展[J]. 药物评价研究, 2019, 42(8): 1651-1662.

(编辑：邹元平)