

• 药理与临床 •

雷公藤红素对巨噬细胞焦亡的影响

辛文好^{1*}, 韦珍妮¹, 张颖¹, 孙宇¹, 张丹²

1. 滨州医学院药学院, 山东 烟台 264003

2. 中日友好医院 药学部, 北京 100029

摘要: 目的 探讨雷公藤红素对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 焦亡的影响及相关机制。方法 采用 MTT 法测定细胞增殖; 吖啶橙 (AO)/溴化乙啶 (EB)、Hoechst/PI 荧光染色观察细胞焦亡形态变化; ELISA 法检测细胞上清液中白细胞介素-1 β (IL-1 β) 分泌量; Western blotting 法检测 Caspase-1 蛋白表达水平; Caspase-1 活性检测试剂盒检测细胞内 Caspase-1 酶活性。结果 经 MTT 法检测发现, 雷公藤红素在 50 nmol/L 以下对巨噬细胞 RAW264.7 增殖活性无显著影响; AO/EB、Hoechst/PI 染色显示雷公藤红素能够改善脂多糖 (LPS) 与三磷酸腺苷 (ATP) 诱导的细胞焦亡; ELISA 结果显示, 雷公藤红素能够抑制 IL-1 β 的分泌 ($P < 0.05$), 且具有一定的浓度依赖性; Western blotting 检测发现 cleaved-Caspase-1 蛋白表达量降低, 同时雷公藤红素能抑制 Caspase-1 的酶活性。结论 雷公藤红素抑制 LPS 与 ATP 诱导的细胞焦亡, 可能与抑制 IL-1 β 的分泌, 抑制 Caspase-1 的活化有密切关系。

关键词: 雷公藤红素; 细胞焦亡; 炎症; Caspase-1; 白细胞介素 1 β ; 巨噬细胞

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)05-1087-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.05.015

Effect of celastrol on pyroptosis of macrophages RAW264.7

XIN Wen-Yu¹, WEI Zhen-Ni¹, ZHANG Ying¹, SUN Yu¹, Zhang DAN²

1. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Binzhou Medical University, Yantai 264003, China

2. Department of Pharmacy, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China

Abstract: Objective To investigate the effects and underlying mechanism of celastrol on pyroptosis in macrophage RAW264.7.

Methods Cell viability was determined by using MTT assay. Effects of celastrol on pyroptosis of macrophages were observed through AO/EB and Hoechst/PI fluorescence staining. The secretions of IL-1 β in the culture supernatant were analyzed by ELISA. The protein levels of Caspase-1 was assayed by Western blotting. And Caspase-1 activity was detected with Caspase-1 activity detection kit. **Results** Based on the MTT assay, the concentrations under 50 nmol/L of celastrol used were not toxic to the macrophages. PI or EB uptake induced by lipopolysaccharide (LPS) and ATP were significantly reduced by celastrol. Pretreatment with celastrol greatly reduced the secretion of IL-1 β in a dose-dependent manner, and inhibited the up-regulation of cleaved-Caspase-1. Additionally, celastrol could inhibit the activation of Caspase-1 in macrophages. **Conclusion** Celastrol significantly reduced pyroptosis induced by LPS and ATP through inhibition of IL-1 β secretion and Caspase-1 activation.

Key words: celastrol; pyroptosis; inflammation; Caspase-1; IL-1 β ; macrophage

雷公藤药材来源于卫矛科雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 根的木质部, 其主要活性成分有雷公藤甲素、雷公藤乙素、雷公藤红素等, 雷公藤红素属于三萜类化合物^[1], 其分子式为 C₂₉H₃₈O₄, 形状为红色针状结晶^[2-3]。雷公藤红素具有抗炎、抗肿瘤等药理作用^[4], 可通过抑制核转录因子- κ B (NF- κ B)

信号通路, 从而达到抑制细胞增殖并诱导凋亡的作用^[5]。细胞焦亡 (pyroptosis) 是一种特殊的新发现的程序性细胞死亡方式, 是细胞内炎症小体活化的结果, 细胞焦亡的发生依赖于 Caspase-1 的激活^[6], 并与多种疾病密切相关^[7]。雷公藤红素对细胞焦亡是否有影响, 未见文献报道。

收稿日期: 2017-09-27

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81503339); 山东省博士基金资助项目 (BS2014YY049); 烟台市科技计划资助项目 (2014ZH092); 科研启动基金资助项目 (BY2013KYQD09)

*通信作者 辛文好, 女, 博士, 研究方向为抗炎免疫药理学。Tel: (0535)6913216 E-mail: xinwenyu1391139@163.com

研究发现 Nod 样受体蛋白 (NOD-like receptor pyrin domain containing 3, NLRP3) 炎症小体是一种存在于细胞质中的蛋白复合物, 通过 Caspase-1 的分子平台促进白细胞介素-1 β (IL-1 β) 和 IL-18 的成熟和释放, 进而引起细胞焦亡与炎症反应。各种内源的或外源的刺激可通过不同的信号通路激活 NLRP3 炎症小体来活化 Caspase-1^[8]。最近的一项研究表明, 雷公藤红素可抑制结肠中 IL-18、IL-1 β 和干扰素 (IFN- γ) 的生成, 推测其机制与抑制 NLRP3 炎症小体的活化有密切关系^[9]。本研究探讨雷公藤红素对脂多糖 (LPS) 与三磷酸腺苷 (ATP) 诱导巨噬细胞焦亡的影响及相关作用机制, 为炎症的治疗提供新的思路。

1 材料

1.1 药品与试剂

雷公藤红素 (批号 2070203, 质量分数 99.4%), 购于科曼思特医药科技发展有限公司; LPS (批号 025M4040V)、ATP (批号 SLBM7646V) 均购于美国 Simga 公司; 测定 IL-1 β 的 ELISA 试剂盒 (批号 142548016) 购于美国 Ebioscience 公司; Hoechst/PI 双染试剂盒 (批号 C1056)、BCA 蛋白浓度检测试剂盒 (批号 P0012)、Caspase-1 活性检测试剂盒 (批号 025M4040V) 均购于碧云天生物技术有限公司; Caspase-1 抗体 (批号 C1101) 购于 Abcam 公司; GAPDH 抗体 (批号 #2118) 购于 Cell Signaling Technology。

1.2 仪器

Spectra Max M5 酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司); GS-15R 离心机 (美国 Beckman 公司); SDS-PAGE 电泳装置 (BioRad 公司产品); MCO-15AC 二氧化碳细胞培养箱 (日本 SANYO 公司)。

1.3 细胞

小鼠巨噬细胞 RAW264.7 由本实验室前期冻存, 取 6~10 代细胞用于实验。

2 方法

2.1 MTT 法检测细胞增殖

小鼠巨噬细胞 RAW264.7 在 37 °C、5% CO₂、饱和湿度条件下用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液传代培养。RAW264.7 细胞接种于 96 孔板 (1×10^5 /mL), 培养 24 h 后, 加入 12.5、25、50、100 nmol/L 的雷公藤红素, 另设正常对照组 (加入同等体积的含 0.1% DMSO 的培养液), 每组设 3 个复孔。24 h

后 96 孔板吸去培养基, 加 10 μ L MTT (5 mg/mL), 培养 4 h 后于避光环境中吸取 MTT 溶液, 加入 DMSO, 置摇床上低速振荡 10 min, 使结晶物充分溶解, 570 nm 处测定吸光度 (A) 值。

2.2 ELISA 法检测 IL-1 β 水平

RAW264.7 细胞接种于 96 孔板 (1×10^5 /mL), 培养 24 h 后, 加入 12.5、25、50 nmol/L 的雷公藤红素, 另设正常对照组 (加入同等体积的溶剂), 每组设 3 个复孔。2 h 后模型组、给药组加入 LPS (终质量浓度为 0.1 μ g/mL), 正常对照组加入同等体积的溶剂, 置于 37 °C 5% CO₂ 的培养箱中孵育。12 h 后加入 ATP (终浓度为 5 mmol/L), 30 min 后收集上清液, 按试剂盒方法检测 IL-1 β 水平。

2.3 AO/EB、Hoechst/PI 染色法检测细胞膜通透性

细胞分组及药物处理同“2.2”项, 按照参考文献方法^[10], ATP 刺激 30 min 后弃去培养液, PBS 清洗 2 次, 加入 AO/EB 或 Hoechst/PI 染色液, 避光 37 °C 孵育 2~5 min, 于荧光显微镜下观察焦亡细胞并拍照。

2.4 Western blotting 检测 Caspase-1 的表达

RAW264.7 细胞接种于培养皿 (1×10^5 /mL), 培养 24 h 后, 加入不同浓度雷公藤红素 (12.5、25、50 nmol/L), 2 h 后模型组、给药组加入 LPS (终质量浓度为 0.1 μ g/mL), 置于 37 °C 5% CO₂ 的培养箱中孵育。12 h 后加入 ATP (终浓度为 5 mmol/L), 培养箱中继续孵育 30 min。弃去上清液, 加入冰的生理盐水洗涤 2 遍收集细胞。冰上用 500 μ L 裂解液裂解 30 min, 12 000 r/min 离心, 收集上清液, 加入上样缓冲液, 煮沸 5 min。Western blotting 检测蛋白表达, 经 12% SDS-PAGE 分离后, 转移至 PVDF 膜上, 室温下 5% BSA 封闭 1 h, 加入 1:1 000 稀释的一抗, 4 °C 下孵育过夜, TBST 洗涤 3 次后加入 1:1 000 稀释的二抗, 孵育 2 h, 同法洗涤 3 次, 按试剂盒说明书加入 ECL 发光化学显色底物液, 曝光显色, 观察结果并分析处理显影蛋白条带。

2.5 Caspase-1 活性检测试剂盒检测 Caspase-1 活性

细胞分组及药物处理同“2.2”项, ATP 刺激 30 min 后弃去培养液, PBS 清洗 2 次, 加入裂解液冰上裂解细胞, 取裂解液离心 10 min 后收集上清液, 用 Bradford 测定蛋白浓度。将等量样品置于 96 孔板于 37 °C 和 20 ng 的 Ac-DEVD-pNA 作用后孵育过夜进行酶标仪检测, 测 405 nm 下的 A 值, 根

据所生成的游离硝基苯胺 (pNA) 的量, 计算 Caspase-1 的酶活力。

2.6 统计学分析

所有数据采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 ANOVA 进行统计学检验。

3 结果

3.1 对细胞增殖的影响

由图 1 可知, 与对照组相比, 12.5、25、50 nmol/L 雷公藤红素对细胞的增殖无明显影响, 当浓度为 100 nmol/L 时明显抑制细胞的增殖 ($P < 0.05$)。因此选 50 nmol/L 以下浓度进行后续实验。

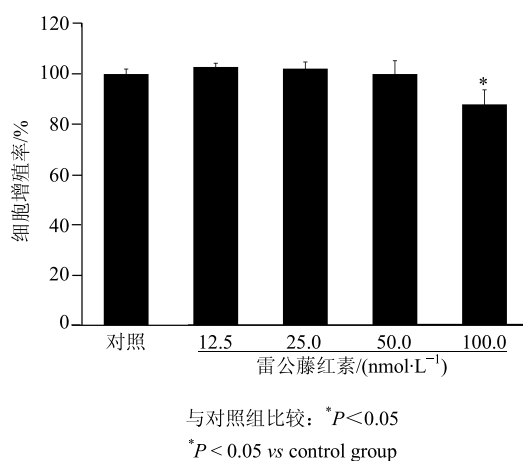


图 1 雷公藤红素对 RAW264.7 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 1 Effects of celastrol on proliferation of RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2 对细胞焦亡的影响

3.2.1 AO/EB 染色法 AO 染色液能透过胞膜完整的细胞, 嵌入细胞核 DNA, 与双链 DNA 结合后发出绿色荧光, 而 EB 染色液仅能透过胞膜受损的细胞, 嵌入核 DNA, 发橘红色荧光。焦亡细胞的细胞膜通透性升高, EB 染料容易进入细胞, 与 DNA 结合。由图 2 可知, 对照组中, EB 透过量较少, 红色荧光不明显; 模型组中, EB 透过多, 显红色荧光, 经 Merge 后显示橘黄色。而给药组随雷公藤红素浓度的增加, 红色荧光逐渐减少, 说明雷公藤红素能够改善细胞膜的通透性, 焦亡细胞减少。

3.2.2 Hoechst/PI 染色法 Hoechst 是一种可以穿透细胞膜的蓝色荧光染料, 对细胞的毒性较低, 能够通过完整的细胞膜而显蓝光; PI 是一种可以嵌合到双链 DNA 和 RNA 的碱基对中并为之结合的荧光染料, 无碱基特异性, 仅能通过受损的细胞膜显示

红光。由图 3 可见, 对照组中荧光呈蓝色, 模型组中荧光颜色呈高红色。与模型组比较, 随着雷公藤红素浓度的增加, 红色荧光逐渐减少, 表明雷公藤红素能够改善细胞膜的通透性, 抑制细胞焦亡。

3.3 对细胞 IL-1 β 分泌的影响

如图 4 所示, 对照组中 IL-1 β 的分泌量几乎为零, 模型组中 IL-1 β 的分泌量最高, 与模型组相比, 给药组中 IL-1 β 的分泌量随药物浓度的增加逐渐减少。其中, 雷公藤红素中、高剂量组与模型组相比差异显著 ($P < 0.05, 0.01$)。

3.4 对 Caspase-1 蛋白表达的影响

由图 5 可见, Western blotting 结果显示 pro-Caspase-1 在各组中表达量无明显差异, 而剪切后活化的 Caspase-1 在模型组中表达增强, 且不同浓度的雷公藤红素能够不同程度地抑制 Caspase-1 的剪切与活化。

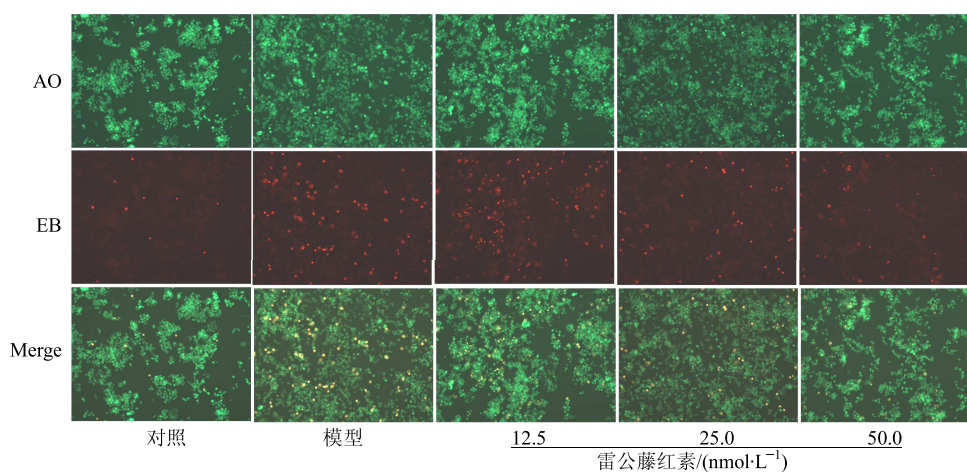
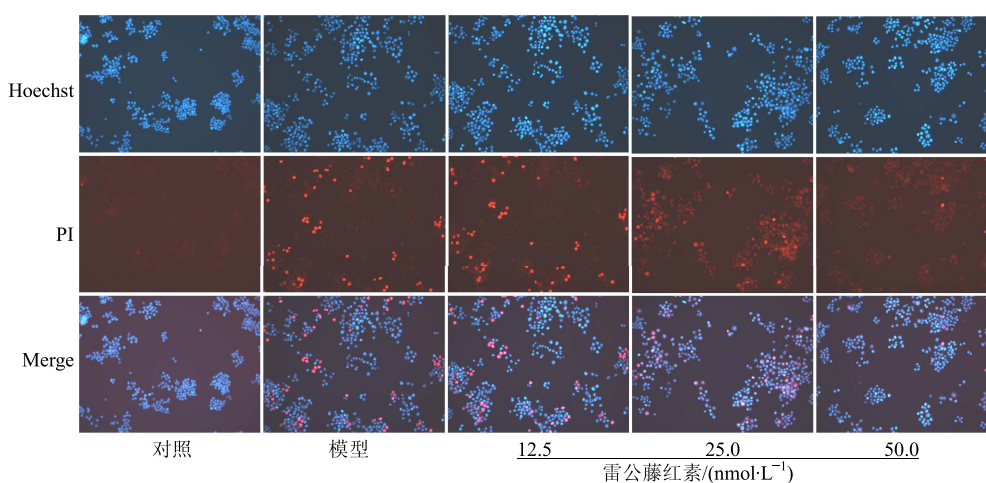
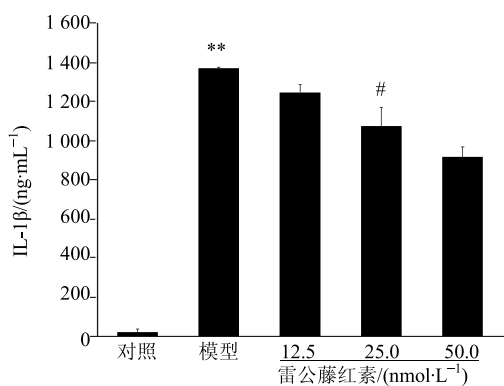
3.5 对 Caspase-1 酶活性的影响

由图 6 可知, 与对照组比较, 模型组中 Caspase-1 的酶活性最高, 给药组中 Caspase-1 活性随着雷公藤红素浓度的增加而降低, 具有一定的浓度依赖性, 说明雷公藤红素能够抑制 Caspase-1 的酶活性。

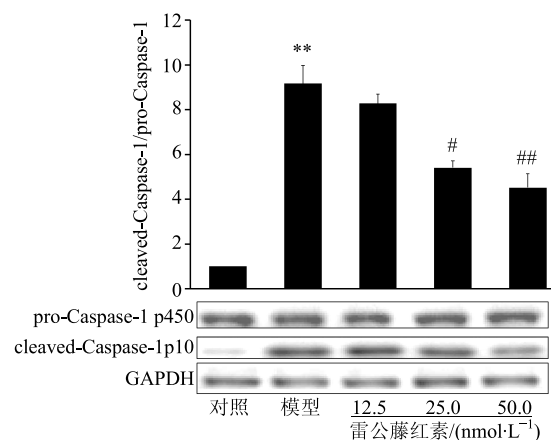
4 讨论

研究发现, 雷公藤红素具有抗炎、抗肿瘤作用, 及治疗关节炎等药理作用^[11-13]。雷公藤红素亦具有较强的免疫调节活性, 可通过抑制免疫细胞产生, 调节细胞因子释放等多条通路发挥抗炎的作用^[14]。本研究就雷公藤红素对 LPS 诱导巨噬细胞焦亡的影响及机制研究进行了探讨。结果显示, 雷公藤红素能够抑制 LPS 与 ATP 诱导的巨噬细胞焦亡, 抑制 LPS 与 ATP 诱导的 IL-1 β 分泌与 cleaved-Caspase-1 的表达, 以及 Caspase-1 的酶活性。

细胞焦亡是一种特殊的新发现的程序性细胞死亡方式, 最显著的特征是质膜完整性丧失和胞质物质释放到细胞外环境, 细胞焦亡时, 质膜破裂形成小孔, 细胞渗透性肿胀, 胞内物质流出, 有利于能够穿透细胞膜的细胞染料穿过焦亡细胞, 嵌入细胞核 DNA, 使其染色阳性^[15], 多种体内外刺激信号通过不同途径激活 Caspase-1, 使细胞发生焦亡, 炎症体的激活活化是细胞焦亡过程的关键。通过 AO/EB、Hoechst/PI 染色实验观察焦亡细胞形态学变化, 发现雷公藤红素能够改善细胞膜的通透性, 减少细胞焦亡。

图 2 雷公藤红素对 RAW264.7 细胞焦亡的影响 (AO/EB 染色法, $\times 200$)Fig. 2 Effects of celastrol on pyroptosis of macrophages RAW264.7 cells (AO/EB staining, $\times 200$)图 3 雷公藤红素对细胞焦亡的影响 (Hoechst/PI 染色法, $\times 200$)Fig. 3 Effects of celastrol on pyroptosis of macrophages RAW264.7 cells (Hoechst/PI staining, $\times 200$)

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$, 下同
 ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group, same as below

图 4 雷公藤红素对 RAW264.7 细胞 IL-1 β 分泌的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 4 Effects of celastrol on secretion of IL-1 β by RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)图 5 雷公藤红素对 RAW264.7 细胞 Caspase-1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 5 Effects of celastrol on protein expression of Caspase-1 in RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

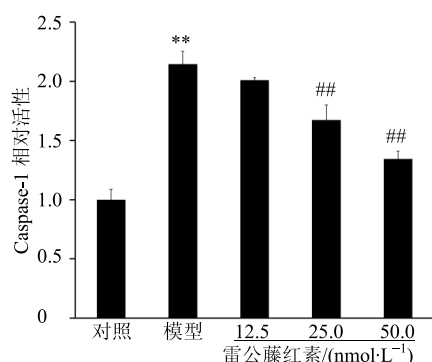


图 6 雷公藤红素对 RAW264.7 细胞 Caspase-1 酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effects of celastrol on activity of Caspase-1 in RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

IL-1 β 是一种具有多种免疫调节功能的活性分子,属于 IL-1 家族,是细胞内重要的促炎症因子。IL-1 β 主要是由单核细胞、巨噬细胞产生,且与 NLRP3 信号通路密切相关^[16]。能通过与其受体结合而激活下游的 NF- κ B 信号通路,从而促进一些炎症因子的释放。实验结果显示雷公藤红素能明显抑制 LPS 与 ATP 诱导 IL-1 β 的分泌,且具有一定的浓度依赖性。但雷公藤红素是否通过调控 NLRP3 信号通路进而影响 IL-1 β 分泌还需要进一步探讨。

Caspase-1 是 Caspase 家族中的一种特异性蛋白水解酶,Caspase-1 又称 IL-1 β 转化酶,是炎症 Caspase 中的重要一员,主要参与激活调控过程。当细胞受到各种胞外病原体或胞内危险信号刺激时,细胞内会装配形成炎症体,并招募 pro-Caspase-1,从而导致 pro-Caspase-1 自我的剪切与活化,形成有活性的 Caspase-1。Caspase-1 通过促进炎症因子的加工和释放而调控细胞的炎症反应,经炎症体活化的 Caspase-1 能够切割 pro-IL-1 β ,使其形成成熟型的 IL-1 β 。实验结果显示雷公藤红素能够降低 cleaved-Caspase-1 的表达量,该结果与文献报道类似^[17]。此外,雷公藤红素能够抑制 Caspase-1 的酶活性,且具有一定的浓度依赖性,说明雷公藤红素抑制 Caspase-1 的剪切与活化进而抑制 IL-1 β 的分泌。

综上所述,雷公藤红素能够抑制 LPS 与 ATP 诱导的细胞焦亡,其作用机制可能与抑制 IL-1 β 的分泌,抑制 Caspase-1 的活化密切相关。雷公藤红素作为一种蛋白酶体抑制剂,通过影响肿瘤细胞内多种信号通路,如抑制蛋白酶体、IKK α / β 激酶、HSP90 等,并能激活 Caspase-3/7 等途径诱导细胞凋亡,雷公藤红素通过何种途径调控细胞焦亡与凋亡

还需要更多的研究去揭示^[2]。深入研究细胞焦亡有助于认识其在相关疾病发生、发展和转归中的作用,可能为后续的研究提供重要的靶向。

参考文献

- [1] 韩菁婕,柳芳,张相林,等.雷公藤主要活性成分的结构修饰及药理活性研究进展[J].中国药房,2016,27(4):560-561.
- [2] 宋书中,伍春莲.雷公藤红素诱导肿瘤细胞凋亡机制的研究进展[J].中成药,2015,37(7):1548-1552.
- [3] 吴丹,寇芳,吕春明,等.雷公藤红素抗癌作用的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2016,19(11):356-360.
- [4] Lin L J, Sun Y, Wang D X, et al. Celastrol ameliorates ulcerative colitis-related colorectal cancer in mice via suppressing inflammatory responses and epithelial-mesenchymal transition [J]. *Front Pharmacol*, 2016, 11(3389): 1-14.
- [5] 张乙川,刘峰,王俊,等.雷公藤红素诱导人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡研究[J].中国普外基础与临床杂志,2016,123(1):40-51.
- [6] 胡厚祥,陈海燕.细胞焦亡在心衰衰竭进程中的研究进展[J].西部医学,2016,28(3):304-305.
- [7] 祁会丽,姚丽芬.细胞焦亡激活机制及相关疾病研究进展[J].中华实用诊断与治疗杂志,2016,530(5):418-419.
- [8] 李翔,刘红梅,林文源.NLRP3 炎症小体在炎症疾病中的研究进展[J].医学综述,2015,24(12):4451-4452.
- [9] Shaker M E, Ashamallah S A, Houssen M E. Celastrol ameliorates murine colitis via modulating oxidative stress, inflammatory cytokines and intestinal homeostasis [J]. *Chemico-Biol Inter*, 2014, 210(5): 32-33.
- [10] Chang Y P, Ka S M, Hsu W H, et al. Resveratrol inhibits NLRP3 inflammasome activation by preserving mitochondrial integrity and augmenting autophagy [J]. *J Cell Physiol*, 2015, 230(7): 1567-1579.
- [11] 袁菱,童德银.雷公藤红素及其制剂的抗肿瘤研究进展[J].中国医院药学杂志,2016,736(14):1225-1228.
- [12] 王淑静,董立强,刘欢,等.雷公藤红素对 SGC-7901 细胞和 ECV304 细胞增殖及能量代谢的影响[J].中草药,2016,47(21):3854-3860.
- [13] 侯晓丽,孙铭学,高焕焕,等.抗炎天然产物活性成分研究进展[J].药学实践杂志,2015,33(1):20-27.
- [14] 赵莹莲.雷公藤红素作用机制的研究进展[J].临床合理用药,2015,8(9):170-171.
- [15] 邱珍,夏中原,周斌.细胞焦亡的研究进展[J].医学综述,2016,22(15):2936-2937.
- [16] 王娇娇,王丽娜,叶丹丹,等.NLRP3/Caspase-1 炎症体通路在大鼠根尖周炎中表达的研究[J].基础研究论著,2016,32(6):552-553.
- [17] Bauernfeind F E, Bartok A, Rieger L, et al. Cutting edge: reactive oxygen species inhibitors block priming, but not activation, of the NLRP3 inflammasome [J]. *J Immunol*, 2011, 187(2): 613-617.