miR-20a 通过 ATG16L1 影响细胞自噬并参与调节雷公藤甲素肝毒性

张彩霞，王伟艳，李会芳，杜晨晖，刘　珊，魏砚明*

山西中医药大学中药与食品工程学院，山西 晋中　030619

摘　要：目的　观察雷公藤甲素对 miR-20a 及自噬相关 16 样蛋白 L1（autophagy related 16 like protein1，ATG16L1）表达的影响，探讨 miR-20a 对雷公藤甲素所致肝细胞毒性的调控作用。**方法**　利用雷公藤甲素处理人正常肝细胞株 HL7702 和 C57BL/6J 小鼠，通过 qRT-PCR 和 Western blotting 检测 *miR-20a*、ATG16L1 及自噬标记物微管相关蛋白 1 轻链 3II（microtubule-associated protein 1 light 3II，LC3II）的表达。利用雷公藤甲素和 miR-20a 模拟物或抑制物共同处理 HL7702 细胞，通过 qRT-PCR 和 Western blotting 检测 ATG16L1 及 LC3II 的表达；CCK-8 法检测细胞存活率；试剂盒检测乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase，LDH）释放量；ELISA 检测半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3（cystein-asparate protease-3，Caspase-3）和 Caspase-9 的活性。**结果**　雷公藤甲素显著下调人正常肝细胞或小鼠肝组织中 *miR-20a* 表达（$P<0.05$），上调 ATG16L1 和 LC3II 的表达（$P<0.05$）。miR-20a 模拟物可抑制雷公藤甲素引起的 ATG16L1、LC3II 表达升高（$P<0.05$），进一步降低细胞存活率（$P<0.05$），提高 LDH 释放量（$P<0.05$），上调 Caspase-3 和 Caspase-9 活性（$P<0.05$），而 miR-20a 抑制物具有相反作用。**结论**　miR-20a 通过 ATG16L1 影响自噬过程，参与调节雷公藤甲素肝细胞毒性。

关键词：雷公藤甲素；肝细胞毒性；细胞自噬；miR-20a；ATG16L1；细胞凋亡

中图分类号：R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2023)13 - 4214 - 10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.13.014

miR-20a regulates autophagy by targeting ATG16L1 and involved in triptolide-induced hepatotoxicity

ZHANG Cai-xia, WANG Wei-yan, LI Hui-fang, DU Chen-hui, LIU Shan, WEI Yan-ming

College of Chinese Medicine and Food Engineering, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China

Abstract: Objective　To validate the effect of triptolide on miR-20a and autophagy related 16 like protein1 (ATG16L1) expressions and evaluate the regulatory role of miR-20a in triptolide-induced hepatotoxicity. **Methods**　HL7702 cells and C57BL/6J mice were treated with triptolide, and then *miR-20a* and ATG16L1 levels were detected by qRT-PCR and Western blotting. After HL7702 cells exposure to triptolide and simultaneous transfection with miR-20a mimics or inhibitor, ATG16L1 and microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3II) expressions were detected by qRT-PCR and Western blotting; Cell survival rate was detected by CCK-8 method; The release of lactate dehydrogenase (LDH) was detected by kit; The activities of cystein-asparate protease-3 (Caspase-3) and Caspase-9 were detected by ELISA. **Results**　Triptolide significantly down-regulated *miR-20a* expression in normal liver cells or mouse liver tissues ($P < 0.05$), as well as upregulated ATG16L1 and LC3II expressions ($P < 0.05$). miR-20a mimics significantly reversed the elevated ATG16L1 and LC3II expressions induced by triptolide ($P < 0.05$), further exacerbated triptolide-elicited decrease in cell viability ($P < 0.05$), increase in lactate dehydrogenase leakage and activation of apoptosis proteases Caspase-3 and Caspase-9 ($P < 0.05$), whereas miR-20a inhibitor exhibited opposite effects. **Conclusion**　miR-20a plays a regulatory role on triptolide-mediated hepatotoxicity by targeting ATG16L1 to affect autophagy.

Key words: triptolide; hepatotoxicity; autophagy; miR-20a; ATG16L1; apoptosis

中药引起的肝损伤是临床上药物肝损伤的重要病因之一。雷公藤甲素既是传统中药雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f.的主要活性成分，具有免疫调节、神经保护、抗血管生成、抑制细胞增殖

收稿日期：2023-02-09

基金项目：山西省科技厅基础研究课题资助项目（202103021224295）；山西中医药大学毒效关系研究创新团队（2022TD1016）；山西中医药大学科技创新能力培养计划“基础研究专项”课题资助项目（2020PY-JC-17）

作者简介：张彩霞，硕士研究生，研究方向为中药新产品开发与应用。E-mail: 2303537480@qq.com

***通信作者：**魏砚明，副教授，硕士生导师，从事中药药理与毒理研究。Tel: (0351)3179717　E-mail: weiyanming2005@aliyun.com

及促细胞凋亡等药理活性，也是引起肝脏毒性不良反应的主要物质基础[1-2]。研究表明有多种机制参与雷公藤甲素所致肝毒性，如药物代谢与转运紊乱、氧化应激、细胞凋亡、免疫损伤、肠道菌群失调等[3]。此外，细胞自噬也被认为是雷公藤甲素引起肝毒性的关键机制[4]。细胞自噬是一种进化高度保守并受严格调控的将底物运送至溶酶体中降解的过程。雷公藤甲素可剂量相关性激活肝癌细胞自噬活性，促进肝癌细胞死亡[5-6]。在正常肝细胞系中，雷公藤甲素通过促进自噬关键蛋白 Beclin1 的表达上调细胞自噬活性[7]。另外，雷公藤甲素处理可导致斑马鱼肝组织中自噬相关基因 *Beclin1* 和自噬相关基因 5（autophagy-related gene 5，*Atg5*）表达明显升高[8]，引起小鼠肝组织中自噬标记物微管相关蛋白 1 轻链 3（microtubule-associated protein 1 light 3，LC3）堆积[9]。因此，调节细胞自噬水平可能为抑制或减轻其肝毒性的潜在途径。然而，目前对于雷公藤甲素调节肝细胞自噬的作用途径及细胞自噬在雷公藤甲素肝毒性中的功能仍有待阐明。

小 RNAs（miRNAs/miRs）是一类由内源基因编码的长度约为 22 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子。通过与特定 mRNA 的 3’-UTR 结合，引起 mRNA 降解或抑制蛋白质翻译。miRNAs 参与调控细胞分化、器官发育、细胞代谢、细胞凋亡等多种生理过程，其表达异常与多种疾病的发生密切相关，是潜在的疾病诊断生物标志物和药物的治疗靶点[10]。雷公藤甲素可以上调或下调多种 miRNAs 的表达，影响多条信号通路，实现其抗肿瘤、抗炎、免疫调节及抗血管生成等多种药理活性[11]。另外，miRNAs 通过调控细胞自噬相关基因或调节因子的表达，在细胞自噬过程中发挥关键作用[12]。

本课题组利用转录组测序观察到雷公藤甲素能明显下调正常肝细胞中 miR-20a 表达，并且 Targetscan（http://www.targetscan.org/vert.72/）、miRDB（http://mirdb.org）网站预测 ATG16L1 为其下游靶点。由于 ATG16L1 是自噬小体形成所必需的关键蛋白质[13]，推测 miR-20a 可能作为雷公藤甲素的作用靶点，参与调控细胞自噬，并在雷公藤甲素肝毒性中发挥作用。本实验拟观察雷公藤甲素对正常肝细胞中 miR-20a 及其下游潜在靶点 ATG16L1 表达的影响，探讨 miR-20a 对雷公藤甲素所致肝细胞毒性的调控作用，旨在为增进对雷公藤甲素肝毒性作用机制的了解，寻找雷公藤甲素肝毒性的生物标志物提供线索。

1 材料

1.1 细胞及动物

人正常肝细胞株 HL-7702 购自北纳创联生物技术有限公司。

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠，体质量 16～18 g，6 周龄，购自斯贝福（北京）生物技术有限公司，动物许可证号 SCXK（京）2019-0010。动物实验经山西中医药大学动物伦理委员会批准（伦理批准号 2021DW207）。

1.2 药品与试剂

雷公藤甲素（质量分数＞98%，批号 210607）购自上海融禾医药科技发展有限公司；氯喹（批号 C6628）购自美国 Sigma 公司；Lipofectamine 2000 转染试剂（批号 2307486）购自美国 Thermo 公司；BCA 蛋白浓度试剂盒（批号 20211101）购自北京索莱宝科技有限公司；蛋白酶抑制剂（P1006）、RIPA 蛋白裂解液（批号 011921210824）、β-肌动蛋白（β-actin）抗体（批号 AA128）购自上海碧云天生物技术有限公司；RPMI 1640 完全培养基、Opti-MEM 培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司；超敏 ECL 化学发光试剂盒（批号 MA0186-1-Nov-16G）购自大连美伦生物技术有限公司；CCK-8 试剂盒（批号 JH620）购自日本同仁化学科技（上海）有限公司；乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase，LDH）试剂盒（批号 20220319）、谷草转氨酶（glutamic-oxaloacetic transaminase，GOT）试剂盒（批号 C010-2-1），谷丙转氨酶（glutamic-pyruvic transaminase，GPT）试剂盒（批号 C009-2-1）购自南京建成生物工程研究所；半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3（cystein-asparate protease-3，Caspase-3）、Caspase-9 试剂盒（批号 20211215）购自上海瓦兰生物科技有限公司；ATG16L1 3’-UTR 野生型（Wt）和突变型（Mut）荧光质粒，由分别向 pmirGLO 荧光素酶载体 XhoI/XbaI 位点插入含有 miR-20a 预测靶序列（GCACTTT）及突变靶序列（TTGACCC）3’-UTR 片段得到，由上海吉玛基因有限公司提供；pCMV-FLAG-ATG16L1 质粒，向 pCMV-Flag 载体 EcoRI/XhoI 位点插入 ATG16L1 cDNA 序列得到，由 PPL 生物有限公司提供；pEGFP-N1-LC3 质粒受赠于山西中医药大学任晋宏博士；LC3II 抗体（批号 GR3338049-2）购自英国 Abcam 公司；ATG16L1 抗体（批号 H226AA0020）、Trizol 试剂（批号

G921KA7073）、双荧光素酶报告基因检测试剂盒、miRNA 第一链 cDNA 合成试剂盒（批号 HCT4KA2901）、miRNA 荧光定量 PCR 试剂盒（批号 H712KA0769）、MightyScript 第一链 cDNA 合成 Master Mix（批号 H525KA0190）、SGExcel FastSYBR qPCR 预混液（批号 I112KA3257）、miR-20a 模拟物（mimics）、miR-20 模拟物阴性对照（mimics NC）、miR-20a 抑制物（inhibitor）、miR-20 抑制物阴性对照（inhibitor NC）均由上海生工生物工程有限公司提供；实验中所用引物均由上海生工生物工程有限公司合成，序列见表 1。

表 1　引物序列

Table 1　Primer sequences

引物	序列（5’-3’）
miR-20a	F: UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG
	R: CUACCUGCACUAUAAGCACUUUA
U6	F: CTCGCTTCGGCAGCACA
	R: AACGCTTCACGAATTTGCGT
ATG16L1	F: CAAGCCGAATCTGGACTGTGGATG
	R: CGGTCGTAGCTTCCTGAGACAAT
GAPDH	F: GACATGCCGCCTGGAGAAAC
	R: AGCCCAGGATGCCCTTTAGT

1.3　仪器

Galaxy 170s CO_2 培养箱（德国 Eppendorf 公司）；Allegra X-30R 型台式冷冻离心机（美国 Beckman Coulter 公司）；EasyWeLL 系列 JY98-IIIN 型细胞破碎仪（宁波新芝生物科技股份有限公司）；倒置激光共聚焦显微镜（日本 Olympus 公司）；微量紫外分光光度计（美国 Thermo 公司）；Power Wave 全波长酶标仪（美国 Bio-Tek 公司）；Powercycler 普通 PCR 仪（英国 Analylik Jena 公司）；FQD-96A 型多功能实时荧光定量 PCR 扩增仪（杭州博日公司）；ImageQuant LAS 500 化学发光成像系统（美国 GE 公司）。

2　方法

2.1　细胞培养

HL7702 细胞用含 10%胎牛血清、100 μg/mL 链霉素和 100 U/mL 青霉素的 RPMI 1640 完全培养基中，置于 5% CO_2、95%空气的 37 ℃恒温培养箱中培养。

2.2　细胞及动物分组和给药

取对数生长期的 HL7702 细胞，加入 25、50、100 nmol/L 雷公藤甲素处理 24 h 或用 50 nmol/L 雷公藤甲素处理 12、24、48 h 后，检测细胞存活率，并检测 *miR-20a* 和 ATG16L1 表达；根据 Lipofectamine 2000 转染试剂说明，将 HL7702 细胞转染 pEGFP-N1-LC3 质粒 24 h 后，加入 25、50、100 nmol/L 雷公藤甲素处理 24 h，检测 LC3 点状物的形成；设置对照组（仅加入培养基）、miR-20a mimics 组、miR-20a mimics NC 组，转染 24 h 后，检测 miR-20a 和 ATG16L1 表达；将 miR-20a mimics、miR-20a mimics NC 与 ATG16L1 3’-UTR Wt、ATG16L1 3’-UTR Mut 荧光质粒分别共转染到 HL7702 细胞内，检测荧光强度；设置对照组（仅加入培养基）、雷公藤甲素组、雷公藤甲素＋miR-20a mimics 组、雷公藤甲素＋miR-20a mimics NC 组、雷公藤甲素＋miR-20a inhibitor 组、雷公藤甲素＋miR-20a inhibitor NC 组、雷公藤甲素＋miR-20a mimics＋ATG16L1 组、雷公藤甲素＋氯喹（20 μmol/L）组，转染 miR-20a mimics、miR-20a inhibitor 和 50 nmol/L 雷公藤甲素共同处理 48 h，或转染 miR-20a mimics 和 50 nmol/L 雷公藤甲素共同处理 24 h 后，转染 pCMV-FLAG-ATG16L1，继续培养 24 h 后，检测细胞存活率、LDH 释放量，并检测 Caspase-3、Caspase-9 活性和 ATG16L1、LC3II 蛋白表达。

将 C57BL/6J 小鼠随机分为对照组、雷公藤甲素组，每组 6 只，对照组 ip 0.9%生理盐水，雷公藤甲素 ip 0.8 mg/kg 雷公藤甲素，每 2 天注射 1 次，注射 3 次，末次给药 24 h 后，分离血清，取肝组织，备用。

2.3　CCK-8 法检测细胞存活率

将 HL7702 细胞接种到 96 孔板中，经不同处理后，按照 CCK8 试剂盒说明书测得各孔吸光度（*A*）值并计算细胞存活率。

2.4　RNA 提取及 qRT-PCR 检测

按照 Trizol 试剂说明书提取不同处理细胞和小鼠肝组织中的总 RNA，分别使用 miRNA 第一链 cDNA 试剂盒和 MightyScript 第一链 cDNA 合成 Master Mix 进行反转录，随后以反转录产物为模板，*miR-20a* 以 *U6* 为内参，*ATG16L1* 以 *GAPDH* 为内参，通过 miRNA 荧光定量 PCR 试剂盒和 SGExcel FastSYBR qPCR 预混液分别对 *miR-20a* 和 *ATG16L1* 进行定量分析。

2.5　蛋白提取及 Western blotting 检测

细胞经 PBS 漂洗后，加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液，冰上裂解 15 min 后，23 号针头反复吹打破碎细胞，或取适量小鼠肝组织，加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液，组织匀浆仪破碎后，4 ℃、

3500 r/min 离心 10 min，取上清液，BCA 法测定蛋白浓度。将上清液与 5×SDS 上样缓冲液混匀，95 ℃加热 5 min 使蛋白变性。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，加入含 5%脱脂奶粉的 TBST，室温封闭 1 h，加入 ATG16L1、LC3II 一抗（1∶1000），4 ℃孵育过夜后，加入二抗（1∶5000），室温孵育 1 h。采用 ECL 化学发光试剂盒在化学发光成像系统下进行曝光，Image J 软件定量目的条带。

2.6 激光共聚焦显微镜观察 LC3 点状物

将转染 pEGFP-N1-LC3 质粒的 HL7702 细胞经 4%多聚甲醛固定后，DAPI 溶液染细胞核，封片，激光共聚焦显微镜下观察 LC3 点状物的形成。随机选取 5 个视野不少于 150 个细胞，对其中含有≥5 个 LC3 点状物的细胞进行计数。

2.7 双荧光素酶报告基因实验

将 miR-20a mimics、miR-20a mimics NC 分别和 ATG16L1 3’-UTR Wt 和 Mut 荧光质粒共转染至 HL7702 细胞 48 h 后，按照双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书测定荧光强度。

2.8 LDH 释放量检测

HL7702 细胞经不同处理后，收集细胞培养液，2500 r/min 离心 10 min，取上清液，根据 LDH 检测试剂盒说明书测定 LDH 释放量。

2.9 Caspase-3 和 Caspase-9 活性检测

细胞经胰酶消化后，2500 r/min 离心 5 min，收集细胞，加入预冷 PBS，利用细胞破碎仪进行破碎，4 ℃、3000 r/min 离心 5 min，按照 ELISA 试剂盒说明书测定 Caspase-3 和 Caspase-9 活性。

2.10 GOT 和 GPT 活性检测

按照 GOT 和 GPT 试剂盒说明书检测小鼠血清中 GOT 和 GPT 活性。

2.11 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，通过 SPSS 软件进行方差齐性检验，采用 GraphPad prism8 软件进行统计分析和作图，多组间进行单因素方差分析，两组间比较用 *t* 检验。

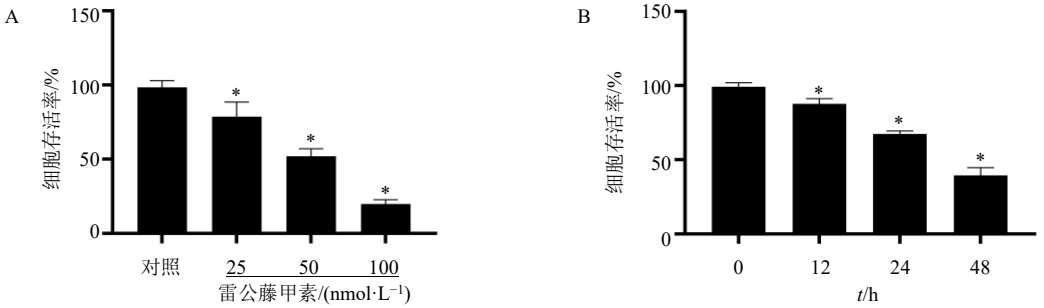
3 结果

3.1 雷公藤甲素降低 HL7702 细胞存活率

HL7702 细胞经不同浓度的雷公藤甲素处理 24 h 后，CCK-8 法检测细胞存活率，结果显示雷公藤甲素可以显著抑制细胞活力（$P<0.05$），且呈剂量相关性（图 1-A）。为了比较雷公藤甲素不同处理时间对细胞存活率的影响，HL7702 细胞经 50 nmol/L 雷公藤甲素处理 12、24、48 h 后，检测 HL7702 细胞存活率，结果显示随着处理时间延长，细胞存活率逐渐降低（$P<0.05$，图 1-B）。

3.2 雷公藤甲素对 HL7702 细胞 *miR-20a* 和 ATG16L1 表达的影响

HL7702 细胞经不同浓度的雷公藤甲素处理 24 h 后，利用 qRT-PCR 和 Western blotting 检测 *miR-20a* 和 ATG16L1 的表达，结果显示 25 nmol/L 雷公藤甲素处理的 HL7702 细胞中未观察到 *miR-20a* 和 ATG16L1 的表达有明显变化（图 2-A），但随着雷公藤甲素浓度的提高，*miR-20a* 的表达显著降低（$P<0.05$），ATG16L1 的表达显著提高（$P<0.05$）。为了比较雷公藤甲素不同处理时间对 *miR-20a* 和 ATG16L1 的表达，将 HL7702 细胞经 50 nmol/L 雷公藤甲素处理 12、24、48 h 后，检测 *miR-20a* 和 ATG16L1 的表达，结果显示不同处理时间均引起 *miR-20a* 表达显著降低（$P<0.05$，图 2-B）；而在经雷公藤甲素处理 12 h 的 HL7702 细胞中未观察到



与对照组或 0 h 比较：*$P<0.05$，图 2、4、5 同

*$P < 0.05$ *vs* control group or 0 h, same as below figs. 2, 4, 5

图 1 不同浓度 (A) 或处理时间 (B) 的雷公藤甲素对 HL7702 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 1 Effect of triptolide with different concentrations (A) or incubation times (B) on viability of HL7702 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

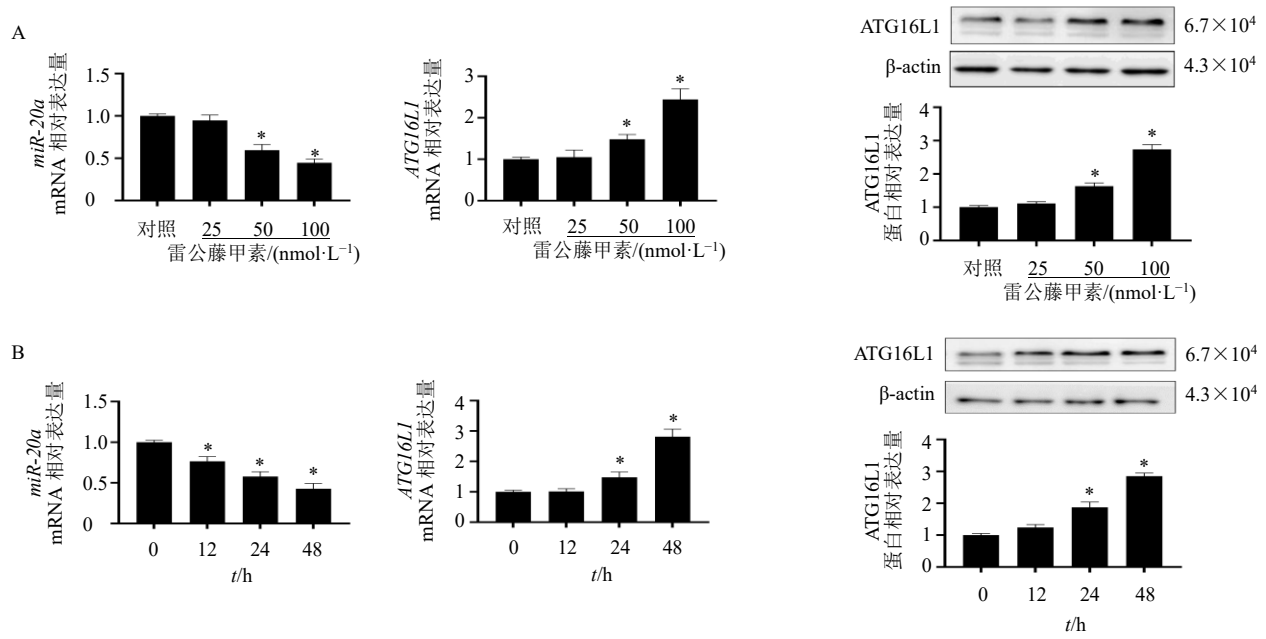


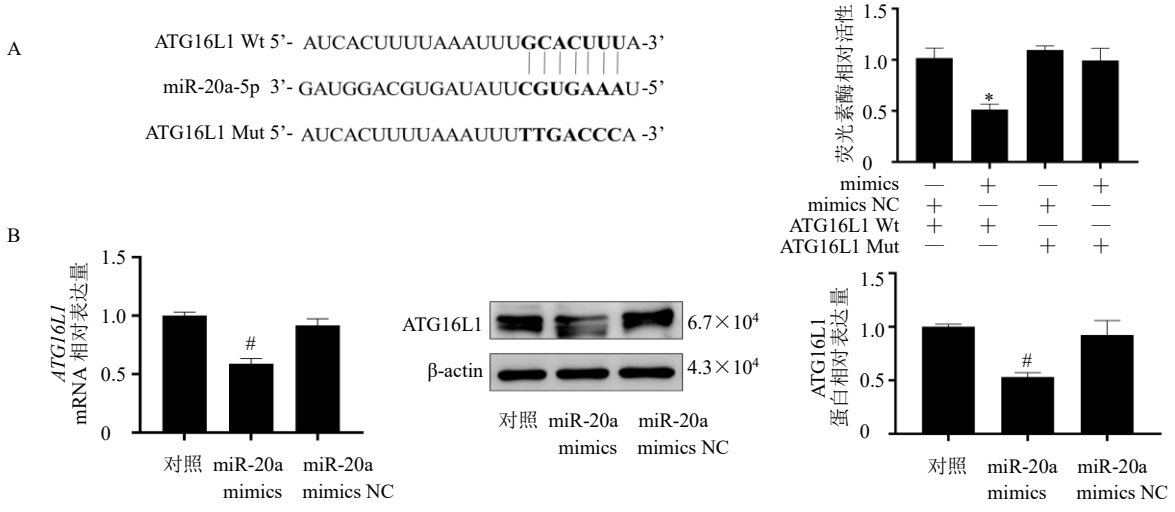
图 2　不同浓度 (A) 或处理时间 (B) 的雷公藤甲素对 HL7702 细胞 *miR-20a* 和 ATG16L1 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 2　Effect of triptolide with different concentrations (A) or incubation times (B) on *miR-20a* and ATG16L1 expressions in HL7702 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

ATG16L1 mRNA 和蛋白的表达有明显变化，但雷公藤甲素处理 24、48 h 显著提高 *ATG16L1* mRNA 和蛋白的表达（$P<0.05$）。

3.3　miR-20a 靶向调节 ATG16L1 的表达

双荧光素酶报告基因检测（图 3-A）结果显示，ATG16L1 3’-UTR Wt 荧光质粒与 miR-20a mimics 共转染组相对荧光强度显著低于 miR-20a mimics NC（$P<0.05$），而 Mut 荧光质粒共转染组无明显变化。HL7702 细胞转染 miR-20a mimics 后，ATG16L1 的 mRNA 和蛋白表达均显著降低（$P<0.05$），而 miR-20a mimics NC 对 ATG16L1 表达量则无明显影响（图 3-B）。以上结果说明，miR-20a 能够靶向结合于 ATG16L1 的 3’-UTR，进而抑制 *ATG16L1* mRNA 转录后水平。



与 ATG16L1 Wt＋mimics NC 组比较：$^{*}P<0.05$；与对照组比较：$^{\#}P<0.05$

$^{*}P < 0.05$ *vs* ATG16L1 Wt + mimics NC group; $^{\#}P < 0.05$ *vs* control group

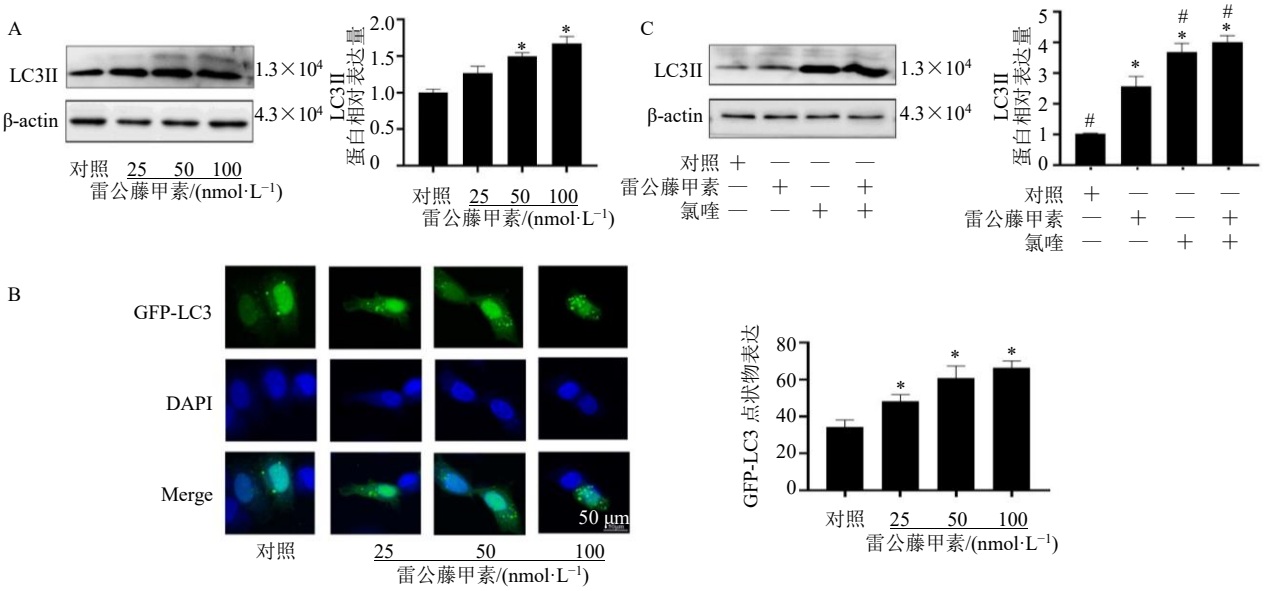
图 3　miR-20a 与 ATG16L1 的靶向关系 (A) 及对 ATG16L1 表达 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 3　Targeting relationship between miR-20a and ATG16L1 (A) and its effect on ATG16L1 expression (B) ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.4 雷公藤甲素对 HL7702 细胞自噬的影响

LC3II 作为细胞自噬的底物，特异定位于自噬小体膜上，其表达量与自噬小体数量正相关。因此，LC3II 常作为检测自噬水平的标志物[14-15]。HL7702 细胞经不同浓度的雷公藤甲素处理 24 h 后，Western blotting 检测 LC3II 的表达，结果显示 50、100 nmol/L 的雷公藤甲素显著提高 LC3II 表达（$P<0.05$，图 4-A）。利用不同浓度的雷公藤甲素处理转染 pEGFP-N1-LC3 质粒的 HL7702 细胞 24 h，观察到雷公藤甲素可剂量相关性增加自噬小体点状物的形成（$P<0.05$，图 4-B）。

自噬流是由吞噬泡组装位点的形成、自噬小体的形成、自噬小体与溶酶体的融合及底物的降解等多个连续步骤组成的动态过程。自噬流活化引起的自噬小体形成增多或受阻引起的自噬小体降解抑制均能导致 LC3II 表达升高[16]。当使用自噬抑制剂氯喹阻断自噬小体与溶酶体的融合时，如果雷公藤甲素能够激活细胞自噬流，氯喹处理则进一步增加 LC3II 表达，反之，氯喹处理对 LC3II 表达无明显影响[17]。为了观察雷公藤甲素对肝细胞中自噬流的影响，HL7702 细胞经 50 nmol/L 雷公藤甲素单独处理或和 20 μmol/L 氯喹共同处理 24 h 后，Western blotting 检测 LC3II 的表达，结果显示，雷公藤甲素与氯喹共处理较雷公藤甲素单独处理 LC3II 表达进一步提高（$P<0.05$，图 4-C），表明雷公藤甲素可促进细胞自噬流。



与雷公藤甲素组比较：#$P<0.05$

#$P < 0.05$ *vs* triptolide group

图 4 雷公藤甲素对 HL7702 细胞 LC3II蛋白表达 (A)、自噬点状物 (B) 和自噬流 (C) 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 4 Effect of triptolide on LC3II protein expression (A), autophagic puncta (B) and autophagic flux (C) in HL7702 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.5 雷公藤甲素对小鼠血清中 GOT、GPT 活性及肝组织中 *miR-20a*、ATG16L1 与 LC3II 表达的影响

利用试剂盒检测小鼠血清中 GOT 和 GPT 的活性，结果显示与对照组比较，雷公藤甲素组小鼠血清中 GOT 和 GPT 活性显著升高（$P<0.05$，图 5-A），表明肝毒性模型构建成功。通过 qRT-PCR 和 Western blotting 检测小鼠肝组织中 *miR-20a*、ATG16L1 和 LC3II 的表达水平，结果显示雷公藤甲素组 *miR-20a* 显著下调，*ATG16L1* mRNA 和蛋白表达显著上调（$P<0.05$），LC3II 蛋白表达升高（$P<0.05$，图 5-B、C）。

3.6 miR-20a 对雷公藤甲素引起 HL7702 细胞自噬活化的影响

HL7702 细胞经 50 nmol/L 雷公藤甲素单独处理或转染 miR-20a mimics、miR-20a inhibitor 共同处理 24 h 后，qRT-PCR 和 Western blotting 检测 *ATG16L1* mRNA 和 LC3II 的表达，结果显示，miR-20a mimics 显著抑制雷公藤甲素引起的 *ATG16L1* mRNA 和 LC3II 表达升高（$P<0.05$），miR-20a inhibitor 可进一步促进 *ATG16L1* mRNA 和 LC3II 表达上调（$P<0.05$），而 miR-20a mimics NC 或 inhibitor NC 则无明显影响（图 6）。

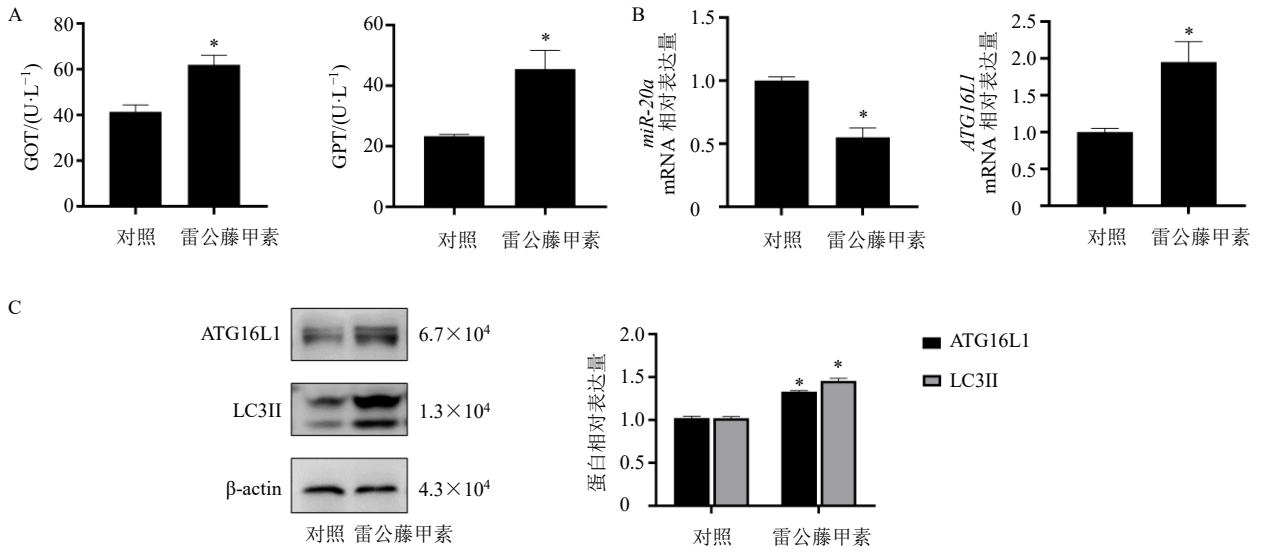
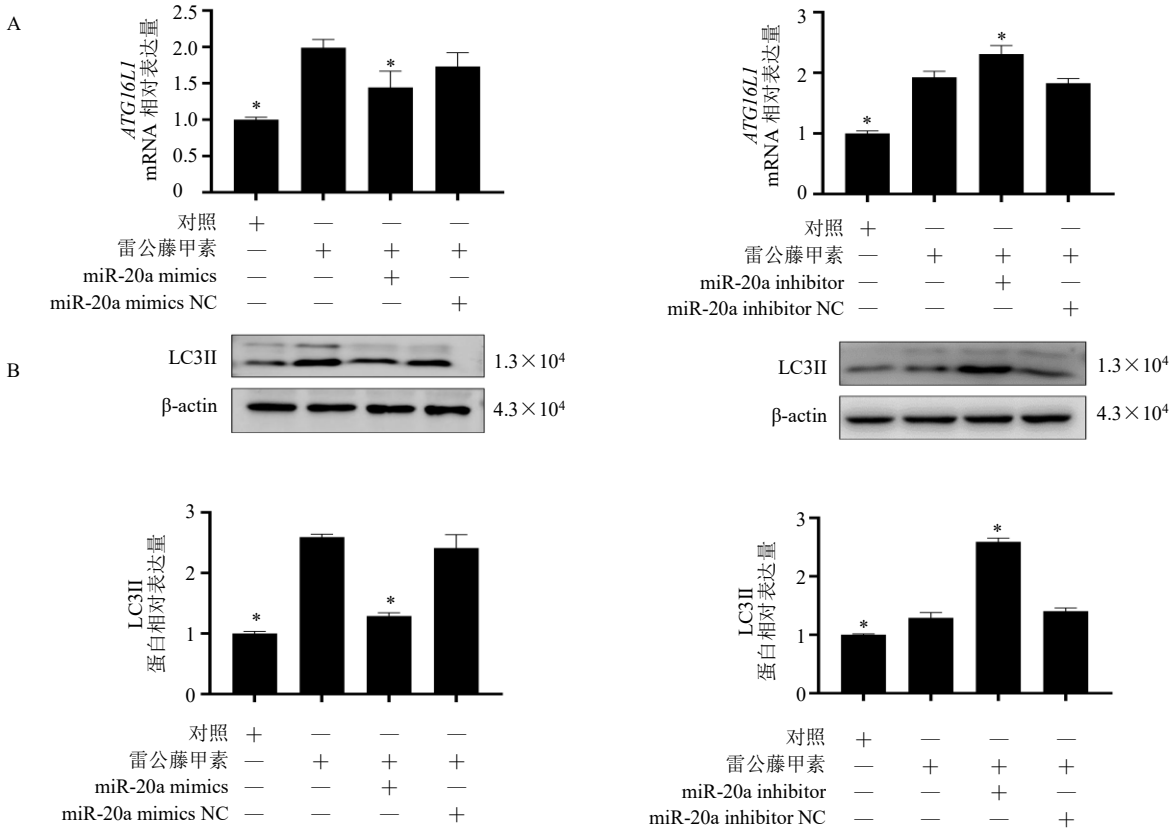


图 5　雷公藤甲素对 C57BL/6J 小鼠肝功能指标 (A)、肝组织 *miR-20a* 及 *ATG16L1* mRNA 表达 (B) 和 ATG16L1 及 LC3II 蛋白表达 (C) 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 5　Effect of triptolide on liver function indexes (A), *miR-20a* and *ATG16L1* mRNA expressions (B) and ATG16L1 and LC3II protein expressions (C) in C57BL/6J mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



与雷公藤甲素组比较：$^{*}P<0.05$

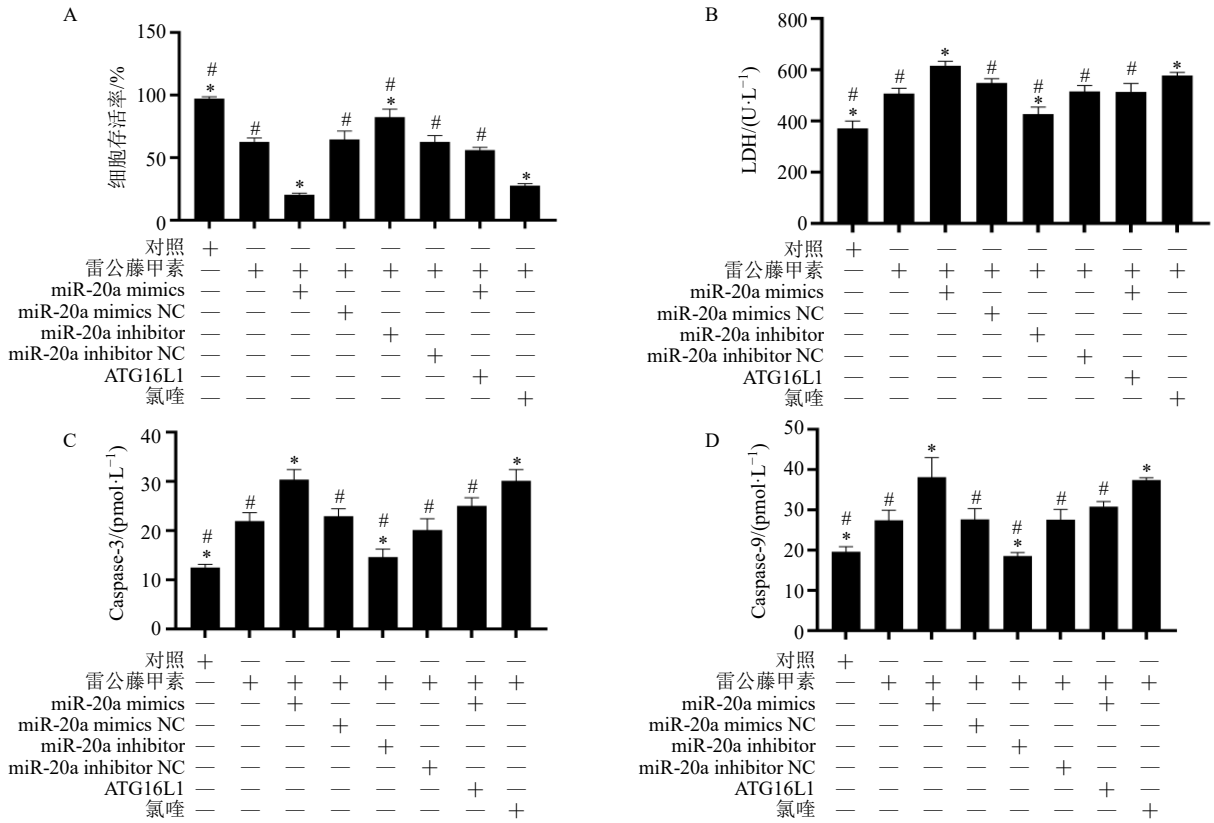
$^{*}P < 0.05$ *vs* triptolide group

图 6　miR-20a 对雷公藤甲素处理 HL7702 细胞后 *ATG16L1* mRNA (A) 和 LC3II蛋白 (B) 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 6　Effect of miR-20a on *ATG16L1* mRNA (A) and LC3II protein (B) expressions in HL7702 cells after triptolide treatment ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.7 miR-20a 对雷公藤甲素引起 HL7702 细胞毒性的影响

LDH 是细胞内糖酵解途径中的氧化还原酶，其释放量反映细胞膜的完整性，是细胞毒性的重要指标[18]；细胞凋亡是雷公藤甲素引起肝毒性的重要机制，其中 Caspase-3 和 Caspase-9 级联活化反应是凋亡过程中的关键信号通路[8]。HL7702 细胞经 50 nmol/L 雷公藤甲素单独处理或与转染 miR-20a mimics、miR-20a inhibitor、FLAG-ATG16L1 及 20 μmol/L 氯喹共同处理后，检测细胞存活率、LDH 释放量、Caspase-3 和 Caspase-9 活性。如图 7 所示，与对照组比较，雷公藤甲素显著降低细胞存活率（$P<0.05$），提高 LDH 释放量（$P<0.05$），上调 Caspase-3 和 Caspase-9 活性（$P<0.05$）。转染 miR-20a mimics 和雷公藤甲素共处理较雷公藤甲素单独处理细胞存活率进一步下降（$P<0.05$），LDH 释放量进一步增多（$P<0.05$），Caspase-3 和 Caspase-9 活性显著提高（$P<0.05$），阴性对照 miR-20a mimics NC 则无明显影响；与转染 miR-20a mimics 比较，转染 miR-20a inhibitor 对细胞存活率、LDH 释放量、Caspase-3 和 Caspase-9 活性具有相反效应（$P<0.05$）。利用氯喹抑制自噬小体和溶酶体的融合[19]，干预细胞自噬过程可进一步加剧雷公藤甲素肝细胞毒性（$P<0.05$）。而共转染 FLAG-ATG16L1 则逆转 miR-20a mimics 对雷公藤甲素对 HL7702 细胞存活率、LDH 释放量、以及 Caspase-3 和 Caspase-9 活性的影响（$P<0.05$）。



与雷公藤甲素组比较：*$P<0.05$；与雷公藤甲素＋miR-20a mimics 组比较：#$P<0.05$

*$P < 0.05$ *vs* triptolide group; #$P < 0.05$ *vs* triptolide + miR-20a mimics group

图 7 miR-20a 对雷公藤甲素处理后 HL7702 细胞活力 (A)、LDH 释放 (B)、Caspase-3 (C) 和 Caspase-9 (D) 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 7 Effect of miR-20a on cell viability (A), LDH release (B), Caspase 3 (C) and Caspase 9 (D) activities in HL7702 cells after triptolide treatment ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

4 讨论

多种 miRNAs 在雷公藤甲素的药理作用中发挥关键作用[11]。雷公藤甲素通过下调 miR-155 表达，引起 SHIP1 表达升高，从而抑制 α-突触核蛋白引起的炎症因子释放和小胶质细胞活化[20]。雷公藤甲素可抑制高糖诱导的人肾小管上皮细胞中 miR-188 表达上调，阻断 PTEN 信号通路，逆转糖尿病肾病上皮间质细胞转化[21]。另外，miRNAs 与细胞自噬的

起始、延伸及成熟等多个阶段密切相关[22]。miR-376b 可下调自噬关键基因 *Beclin1* 和 *ATG4* 的表达，抑制自噬起始[23]。miR-181a 和 miR-630 分别调节 *ATG5*、*ATG12* 表达，影响细胞自噬囊泡伸展阶段[24]。miR-130 则可通过靶向自噬小体-溶酶体融合关键基因人溶酶体关联膜蛋白 1（lysosomal associated membrane protein 1，*LAMP1*），参与调节融合过程[25]。作为 miR-17-92 簇的一员，miR-20a 通过阻断自噬相关基因 *ATG5* 和 *FIP2000* 的表达，抑制缺氧引起的结肠癌细胞自噬活化[26]。miR-20a 也可负调控 ATG7 表达，阻断细胞自噬，从而抑制神经母细胞瘤细胞增殖[27]。另外，*ATG16L1* mRNA 也被证明为 miR-20a 的下游靶点。ATG16L1 能够与自噬起始过程中泛素样结合系统中的 ATG12-ATG5 复合体非共价结合，在隔离膜的延伸及自噬小体双层膜的形成过程中发挥关键作用[28]。miR-20a 通过下调 ATG16L1 的表达抑制细胞自噬，从而促进巨噬细胞中分枝杆菌的存活[29]。缺氧引起的 miR-20a 表达抑制能够上调 ATG16L1 表达并诱导自噬活化，引起破骨细胞分化[30]。本研究中，雷公藤甲素在引起肝细胞毒性、诱导肝细胞自噬活化的同时，能够明显降低正常肝细胞和肝组织中 miR-20a 的表达，上调 ATG16L1 的表达。双荧光素酶报告实验证实 miR-20a 结合于 ATG16L1 的 3’-UTR，并且 miR-20a mimics 或 inhibitor 能够阻断或进一步促进雷公藤甲素引起的肝细胞中 ATG16L1 及自噬标记物 LC3II 表达升高。因此，雷公藤甲素通过靶向调节 miR-20a 的表达，上调 ATG16L1，从而引起细胞自噬活化。此外，Targetscan、miRDB 网站预测自噬相关基因 *ATG2B*、UNC-51 样激酶 1（UNC-51 like kinase 1，*ULK1*）、*ATG14*、*ATG7* 等均为 miR-20a 下游潜在靶点，然而 qRT-PCR 和 Western blotting 检测结果显示雷公藤甲素对肝细胞中这些潜在靶点的表达无明显影响，提示上述自噬相关基因可能在雷公藤甲素引起的肝细胞自噬活化过程中未发挥关键作用。研究表明，多种机制参与雷公藤甲素调节 miRNA 表达。雷公藤甲素通过干预转录因子 Smad2/3 的磷酸化，阻断其于 Smad4 的结合及入核运输，从而抑制转化生长因子-β（transforming growth factor-β，TGF-β）引起的 miR-30 表达下调[31]。雷公藤甲素还能够抑制 c-myc 转录活性，阻断 miR-7-92 和 miR-106b-25 的转录[32]。今后的工作将探讨雷公藤甲素调节 miR-20a 表达的分子机制或信号通路。

细胞自噬对于细胞生存具有两面性。正常条件下，细胞自噬活性维持在较低水平。外界刺激可以增强细胞自噬活性，发挥降解蛋白质或细胞器、维持代谢平衡和促细胞生存的功能。另一方面，过度活化的细胞自噬则导致细胞功能受损，引起自噬性死亡[33]。本实验在体外条件下证明了利用 miR-20a mimics 或自噬抑制剂氯喹处理较雷公藤甲素单独处理可进一步降低正常肝细胞的存活率，促进 LDH 释放及细胞凋亡，加剧雷公藤甲素引起的肝细胞毒性，而 miR-20a inhibitor 则具有缓解雷公藤甲素肝毒性的效应，说明细胞自噬是肝细胞受到雷公藤甲素处理时激发的一种保护性机制，而阻断细胞自噬途径则可能影响体内活性氧或受损伤的细胞器清除能力，拮抗其对雷公藤甲素引起肝细胞凋亡的缓解作用，从而进一步加剧肝细胞毒性[34]。今后将尝试在体内条件下验证 miR-20a 是否通过自噬途径对雷公藤甲素肝毒性发挥调控效应。过表达 ATG16L1 能够部分逆转过表达 miR-20a mimics 对雷公藤甲素肝毒性的影响，一方面验证了 ATG16L1 在 miR-20a 调节雷公藤甲素肝毒性中发挥重要作用，另一方面说明 miR-20a 的其他潜在靶点可能参与了其对雷公藤甲素肝毒性的调节作用[26-27]。未来有必要探讨 miR-20a 的其他下游靶基因是否在雷公藤甲素肝毒性中发挥作用。

综上，本研究观察了雷公藤甲素对正常肝细胞及小鼠肝组织中 miR-20a 及其下游靶基因 *ATG16L1* 表达的影响，结果验证了在体外条件下 miR-20a 通过 ATG16L1 影响自噬过程，并参与调节雷公藤甲素肝细胞毒性，为阐明雷公藤甲素肝毒性的作用机制及 miR-20a 作为雷公藤甲素肝毒性的新型生物标记物提供了参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Xi C, Peng S J, Wu Z P, *et al*. Toxicity of triptolide and the molecular mechanisms involved [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 90: 531-541.

[2] Li Y J, Lia S, Xuea X Y, *et al*. Integrating systematic pharmacology-based strategy and experimental validation to explore mechanism of *Tripterygium* glycoside on cholangiocyte-related liver injury [J]. *Chin Herb Med*, 2022, 14(4): 563-575.

[3] Hu Y Q, Wu Q G, Wang Y L, *et al*. The molecular pathogenesis of triptolide-induced hepatotoxicity [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 979307.

[4] Wei Y M, Wang Y H, Xue H Q, *et al*. Triptolide, A potential

autophagy modulator [J]. *Chin J Integr Med*, 2019, 25(3): 233-240.

[5] 李彦, 付滨, 梁丙楠. 雷公藤肝毒性作用机制研究进展 [J]. 天津中医药, 2017, 34(5): 358-360.

[6] Zhang L L, Li C Q, Fu L, *et al*. Protection of catalpol against triptolide-induced hepatotoxicity by inhibiting excessive autophagy via the PERK-ATF4-CHOP pathway [J]. *PeerJ*, 2022, 10: e12759.

[7] Wei Y M, Luan Z H, Liu B W, *et al*. Autophagy in triptolide-mediated cytotoxicity in hepatic cells [J]. *Int J Toxicol*, 2019, 38(5): 436-444.

[8] Huo J T, Yu Q W, Zhang Y, *et al*. Triptolide-induced hepatotoxicity via apoptosis and autophagy in zebrafish [J]. *J Appl Toxicol*, 2019, 39(11): 1532-1540.

[9] 许可嘉, 张天娇, 韩森, 等. 细胞自噬参与雷公藤甲素诱导的肝细胞损伤 [J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(26): 5012-5014.

[10] Menon A, Abd-Aziz N, Khalid K, *et al*. miRNA: A promising therapeutic target in cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(19): 11502.

[11] Zhou K, Chang Y X, Han B, *et al*. MicroRNAs as crucial mediators in the pharmacological activities of triptolide (Review) [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 21(5): 499.

[12] 曾征鹏, 蔡金文, 廖毓梅, 等. MicroRNA-21 通过自噬影响疾病的研究进展 [J]. 中南大学学报: 医学版, 2022, 47(7): 936-941.

[13] Li Y, Zhou D M, Ren Y H, *et al*. Mir223 restrains autophagy and promotes CNS inflammation by targeting ATG16L1 [J]. *Autophagy*, 2019, 15(3): 478-492.

[14] 魏砚明, 任晋宏, 栾智华, 等. 多种细胞自噬调节剂对自噬标记物 LC3II 及 p62 表达的影响 [J]. 中国药科大学学报, 2018, 49(3): 341-347.

[15] Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting [J]. *Autophagy*, 2007, 3(6): 542-545.

[16] 吕晓希, 胡卓伟. 自噬流的检测方法 [J]. 药学学报, 2016, 51(1): 45-51.

[17] Wang Z, Wu Q, Li C Y, *et al*. Quantitative determination of autophagy flux by probes [J]. *Methods Cell Biol*, 2021, 164: 157-165.

[18] 吴若霞, 李正阳, 任婷, 等. 加味丹参饮结合微小核糖核酸 21 对大鼠心肌细胞的保护机制 [J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(1): 61-64.

[19] Kimura T, Takabatake Y, Takahashi A, *et al*. Chloroquine in cancer therapy: A double-edged sword of autophagy [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(1): 3-7.

[20] Feng Y, Zheng C Y, Zhang Y J, *et al*. Triptolide inhibits preformed fibril-induced microglial activation by targeting the microRNA155-5p/SHIP$_1$ pathway [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 6527638.

[21] Xue M, Cheng Y, Han F, *et al*. Triptolide attenuates renal tubular epithelial-mesenchymal transition via the miR-188-5p-mediated PI3K/AKT pathway in diabetic kidney disease [J]. *Int J Biol Sci*, 2018, 14(11): 1545-1557.

[22] Zhang H, Liang J L, Chen N. The potential role of miRNA-regulated autophagy in Alzheimer's disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(14): 7789.

[23] Korkmaz G, le Sage C, Tekirdag K A, *et al*. MiR-376b controls starvation and mTOR inhibition-related autophagy by targeting ATG4C and BECN1 [J]. *Autophagy*, 2012, 8(2): 165-176.

[24] Zhang J, Wang P Y, Wan L, *et al*. The emergence of noncoding RNAs as Heracles in autophagy [J]. *Autophagy*, 2017, 13(6): 1004-1024.

[25] D'Adamo S, Cetrullo S, Minguzzi M, *et al*. MicroRNAs and autophagy: Fine players in the control of chondrocyte homeostatic activities in osteoarthritis [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 3720128.

[26] Che J, Wang W S, Huang Y, *et al*. MiR-20a inhibits hypoxia-induced autophagy by targeting ATG5/FIP200 in colorectal cancer [J]. *Mol Carcinog*, 2019, 58(7): 1234-1247.

[27] Yu Y B, Zhang J, Jin Y Q, *et al*. MiR-20a-5p suppresses tumor proliferation by targeting autophagy-related gene 7 in neuroblastoma [J]. *Cancer Cell Int*, 2018, 18: 5.

[28] Hamaoui D, Subtil A. ATG16L1 functions in cell homeostasis beyond autophagy [J]. *FEBS J*, 2022, 289(7): 1779-1800.

[29] Guo L, Zhao J, Qu Y L, *et al*. MicroRNA-20a inhibits autophagic process by targeting ATG7 and ATG16L1 and favors mycobacterial survival in macrophage cells [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2016, 6: 134.

[30] Sun K T, Chen M Y, Tu M G, *et al*. MicroRNA-20a regulates autophagy related protein-ATG16L1 in hypoxia-induced osteoclast differentiation [J]. *Bone*, 2015, 73: 145-153.

[31] Yang Q Q, Sun M J, Chen Y, *et al*. Triptolide protects podocytes from TGF-β-induced injury by preventing miR-30 downregulation [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(11): 5150-5159.

[32] 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]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 51.

[33] Napoletano F, Baron O, Vandenabeele P, *et al*. Intersections between regulated cell death and autophagy [J]. *Trends Cell Biol*, 2019, 29(4): 323-338.

[34] Gao Q. Oxidative stress and autophagy [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 12(6): 179-198.

[责任编辑 李亚楠]