

青蒿琥酯对人胚肺成纤维细胞 Caspase-3 表达的影响

王昌明, 黎洪秀, 张孝飞(桂林医学院附属医院, 广西 桂林 541001)

摘要: 目的 研究青蒿琥酯对人胚肺成纤维细胞(human embryonic lung fibroblast, HELF)系 HFL-I 细胞体外生长的影响, 为青蒿琥酯抗纤维化提供实验依据。方法 采用 CCK-8 法检测青蒿琥酯对体外培养的 HFL-I 细胞生长的影响, 用流式细胞术测定细胞凋亡率; RT-PCR 法测定凋亡相关蛋白 Caspase-3 的 mRNA 表达水平, Western blot 法分析 Caspase-3 蛋白的表达情况。结果 青蒿琥酯呈浓度依赖性抑制 HFL-I 细胞增殖, HFL-I 细胞经青蒿琥酯作用后细胞主要停滞于 G1 期, 凋亡率明显增加($P<0.01$), Caspase-3 mRNA 的表达显著高于对照组, Caspase-3 蛋白的表达亦显著高于对照组。结论 青蒿琥酯很可能通过上调 Caspase-3 mRNA 及蛋白的表达水平, 进而抑制 HFL-I 细胞的增殖, 并促进 HFL-I 细胞的凋亡, 从而发挥抗肺纤维化作用。

关键词: 青蒿琥酯; 人胚肺成纤维细胞; 凋亡; Caspase-3

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2011)01-0011-04

Effect of Artesunate on the Expression of Caspase-3 in Human Embryonic Lung Fibroblasts

WANG Changming, LI Hongxiu, ZHANG Xiaofei(The Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effect of artesunate on the growth of human embryonic lung fibroblast HFL-I cells *in vitro* and provide experimental data for anti-fibrosis activity of artesunate. **METHODS** CCK-8 assay was used to determine the effect of artesunate on the growth of HFL-I cells *in vitro*. Apoptosis ratio was examined by flow cytometry (FCM). The mRNA level of Caspase-3, one of apoptosis related proteins, were assessed by RT-PCR. The expression of Caspase-3 protein was detected by Western blot. **RESULTS** Artesunate has a significantly inhibitory effect on the proliferation of HFL-I cells in a dose-dependent manner *in vitro*. Flow cytometry assay demonstrated a higher distribution in G1 phase of HFL-I cells with artesunate. And apoptosis rate of HFL-I cells was significantly increased in artesunate-treated group compared with control group ($P<0.01$). RT-PCR analysis showed the levels of Caspase-3 mRNA were significantly increased in artesunate-treated group, compared with control group. Western blotting also showed a significant enhancement of Caspase-3 protein levels in artesunate-treated group, when compared to control group. **CONCLUSION** Artesunate may exert marked anti-pulmonary fibrosis effect by up-regulating the mRNA and protein level of Caspase-3, which could induce the growth inhibition and apoptosis in HFL-I cells.

KEY WORDS: artesunate; human embryonic lung fibroblasts; apoptosis; Caspase-3

肺纤维化(pulmonary fibrosis)是由多种原因引起的慢性弥漫性肺部炎性疾病, 是呼吸系统最严重疾病之一, 患者确诊后平均生存期仅3~5年。糖皮质激素仍为肺纤维化治疗的主导药物, 但它仅对20%患者有效, 且常常为一过性反应, 因此, 抗纤维化治疗可能为肺纤维化的治疗开辟新的前景。近年研究发现, 青蒿素类药物除抗疟疾外, 还具有抗纤维化等作用^[1]。因此, 青蒿素类药物用于治疗肺纤维化在理论上成为可能, 但目前尚未见到关于该类药物治疗肺纤维化的报道。本研究观察了青蒿素衍生物青蒿琥酯对人胚肺成纤维细胞(human embryonic lung fibroblast, HELF)系

HFL-I细胞增殖、凋亡的影响, 并探讨了其可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

HFL-I 细胞株(购于中科院细胞库); 青蒿琥酯(广西桂林南药公司, 纯度>99%, 批号: ZA080203); CCK-8 试剂(Sigma 公司); 二甲基亚砜(DMSO, 北京索莱宝科技有限公司); 碘化丙啶(PI, 上海浩然生物技术有限公司); D-MEM/F-12 培养基(Gibco 公司); FBS, 胰酶, RNA 提取试剂 Trizol, 反转录试剂盒 PrimeScript™ RT reagent Kit, PCR 试剂盒 Premix PrimeSTAR HS(Sigma 公司); 引物由上

基金项目: 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科攻 10124008-4)

作者简介: 王昌明, 男, 博士, 教授 Tel: 13607731185 E-mail: wcm@glmc.edu.cn

海生物工程有限公司合成。

1.2 HFL-I 细胞培养

HFL-I 细胞用含 10% FBS、 $1 \times 10^5 \text{ u} \cdot \text{L}^{-1}$ 青霉素及 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素的 D-MEM/F-12 培养液培养, 37°C 、5% CO_2 培养箱培养, 3 d 换液 1 次、5~6 d 传代 1 次。取 4 代以上细胞用于下列实验。

1.3 细胞增殖测定(CCK-8 法)

取对数生长期 HFL-I 细胞接种于 96 孔培养板中, 每孔含细胞 5×10^3 个, 培养 24 h 后加入适当浓度青蒿琥酯, 浓度分别为 3.75, 7.5, 15, $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 每组样本设 3 个复孔, 对照组只加入等体积的培养液, 37°C 、5% CO_2 饱和湿度下培养, 继续培养 1~7 d, 规定的时间内吸去培养液, 磷酸盐缓冲液(PBS)洗一次, 每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 含 10% CCK-8 溶液的无血清培养基, 继续培养 2 h 后, 取 $80 \mu\text{L}$ 用酶标仪于 450 nm 处测定吸光度(A), 并计算各组细胞的增殖抑制率[增殖抑制率(%)=(1-实验组 A 值/对照组 A 值) $\times 100\%$]。

1.4 流式细胞术检测细胞周期及凋亡率

取对数生长期 HFL-I 细胞, 用含 10% FBS 的 D-MEM/F-12 培养液调整细胞密度为 $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$, 接种于 25 cm^2 的培养瓶中, 5% CO_2 、 37°C 培养箱中培养 12 h 至贴壁, 用含 0.5% FBS 的 D-MEM/F-12 培养液培养 24 h, 使细胞周期同步化。用浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的青蒿琥酯处理 HFL-I 细胞 0, 12, 24, 48 h, 收集细胞, 制成单细胞悬液, 70%乙醇固定, 4°C 保存过夜, -20°C 保存(有效期为 1 周)。检测前用 PBS 洗去固定液, 加入 $20 \mu\text{L}$ RnaseA, 37°C 孵育 30 min, 暗处加 PI 染液, 冰浴 30 min, 染色后以 300 目筛网过滤。调整细胞浓度为 $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 后采用流式细胞仪, 在波长 488 nm 下用 Multicycle DNA 分析软件行细胞周期及凋亡率测定, 实验重复 3 次。

1.5 RT-PCR 检测 Caspase-3 基因的表达

HFL-I 细胞种于 6 孔板, 细胞贴壁并长至 80%汇合度, 更换为含 2%血清的 DMEM 培养基培养 12 h, 用浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的青蒿琥酯处理 HFL-I 细胞 0, 12, 24, 48 h, 收集细胞, 用 Trizol 试剂提取高质量的 mRNA(提取的是 RNA, 不是 mRNA) (RNA 在 260 nm 和 280 nm 的吸光度比值为 1.8~2.0 之间)。按照反转录试剂盒说明合成 cDNA。PCR 引物序列如下: 人内参 β -actin 上游引物为 $5' \text{-AGTGTGACGTGGACATCCGCA-3'}$, 下游引物为 $5' \text{-ATCCACATCTGCTGGAA}$

GGTGGAC-3' , 扩增产物 243 bp, Caspase-3 mRNA 上游引物为 $5' \text{-TGACCGAGGCTACATTTCAGATGACACC-3'}$, 下游引物为 $5' \text{-CAAGAGAG TTGGGCTGACCAGAAACAC-3'}$, 扩增产物 365 bp。PCR 反应条件: 预变性 94°C 3 min, 变性 94°C 30 s, 退火 $56\sim 62^\circ\text{C}$ 30 s, 延伸 72°C 45 s, 循环扩增 30 个循环, 保存 4°C , 实验重复 3 次。

1.6 Western blot 法分析凋亡相关蛋白 Caspase-3 的表达

HFL-I 细胞予以 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的青蒿琥酯作用 0, 12, 24, 48 h 后, 离心收集, 参考文献[1]的方法裂解细胞提取蛋白, Bradford 法测定蛋白浓度, 在 12% SDS-PAGE 上进行电泳, 每个泳道蛋白上样量为 $50 \mu\text{g}$ 。电泳后蛋白条带转移至硝酸纤维素膜上, 膜用含 5%脱脂奶粉的 TPBS 室温封闭 1 h, 兔抗人 Caspase-3 单克隆抗体(1:500 稀释) 4°C 放置过夜, 经 TPBS 洗膜, 辣根过氧化物酶标记的二抗室温作用 1 h(1:5000 稀释)。经 TPBS 洗膜, 采用 ECL 法对目标条带进行检测。采用同一张膜通过抗体的洗脱, 重新对 $\beta 2$ 肌动蛋白条带进行检测, 作为内参照。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 10.0 统计软件进行统计学处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$, 采用方差分析及 t 检验, 率的比较行 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 青蒿琥酯对 HFL-I 细胞株增殖的抑制作用

HFL-I 细胞在给予 $2.5\sim 160 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的青蒿琥酯 48 h 后, 生长受到显著抑制, 并呈剂量依赖性, 结果见图 1。测定青蒿琥酯对 HFL-I 细胞的 IC_{50} 为 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

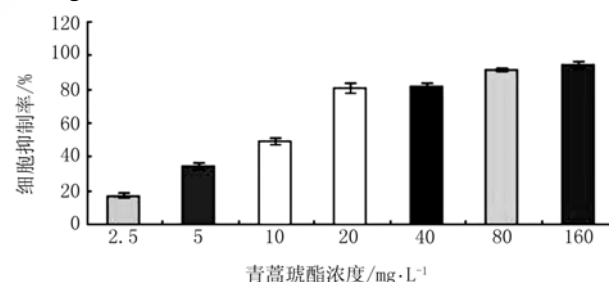


图 1 不同浓度青蒿琥酯对 HFL-I 细胞 48 h 增殖的影响

Fig 1 Effect of artesunate on proliferation of HFL-I on 48 hours

2.2 青蒿琥酯对 HFL-I 细胞周期及凋亡率的影响

$10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 青蒿琥酯处理 HFL-I 细胞 24, 48 h

的细胞凋亡率与 0 h 比较差异有统计学意义, 结果见表 1。

表 1 不同浓度青蒿琥酯对体外培养的 HFL-I 细胞周期的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Effect of artesunate on the cell cycle distribution of HFL-I($\bar{x} \pm s$)

作用时间/h	G0+G1/%	S/%	G2+M/%	凋亡率/%
0	58.8±0.8	26.3±0.3	14.9±0.2	2.0±0.1
12	59.8±0.5	25.4±0.1	14.8±0.5	2.2±0.2
24	66.1±0.3 ¹⁾	23.2±0.5	10.7±0.2	25.3±0.4 ²⁾
48	73.8±0.2 ²⁾	17.1±0.4	9.1±0.3	31.5±0.7 ²⁾

注: 与 0 h 比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

Note: Compared with 0 h, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

2.3 青蒿琥酯对 Caspase-3 mRNA 表达水平的影响
与对照组比较青蒿琥酯处理组随着作用时间的延长, Caspase-3 mRNA 的表达呈逐渐增强趋势, 结果见图 2。

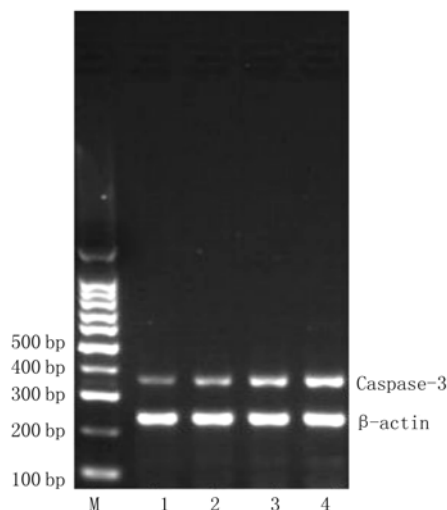


图 2 青蒿琥酯对 HFL-I 细胞 Caspase-3 mRNA 的影响
M-标记; 1-对照组; 2-青蒿琥酯作用 12 h; 3-青蒿琥酯作用 24 h; 4-青蒿琥酯作用 48 h

Fig 2 Effect of artesunate on the Caspase-3 mRNA of HFL-I

M-marker; 1-control group; 2-artesunate effect 12 h; 3-artesunate effect 24 h; 4-artesunate effect 48 h

2.4 青蒿琥酯对 HFL-I 细胞凋亡相关蛋白 Caspase-3 表达的影响

HFL-I 细胞经 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 青蒿琥酯作用 12, 24, 48 h 后, 用 Western blot 法检测细胞内 Caspase-3 的表达。结果显示 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 青蒿琥酯处理 24, 48 h 后, Caspase-3 蛋白表达明显增高, 结果见图 3。

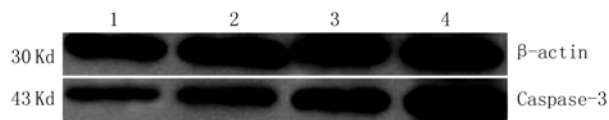


图 3 青蒿琥酯对 HFL-I 细胞 Caspase-3 蛋白表达的影响
1-对照组; 2-青蒿琥酯作用 12 h; 3-青蒿琥酯作用 24 h; 4-青蒿琥酯作用 48 h

Fig 3 Effect of artesunate on the protein expression of Caspase-3 of HFL-I

1-control group; 2-artesunate effect 12 h; 3-artesunate effect 24 h; 4-artesunate effect 48 h

3 讨论

肺纤维化是肺组织损伤和修复共同作用的结果, 越来越多的研究表明成纤维细胞的活化与肺纤维化的发生和发展密切相关。正常情况下的肺成纤维细胞处于静息状态, 而在肺纤维化患者肺标本中成纤维细胞大量增殖并活化, 活化的成纤维细胞转化为肌成纤维细胞, 最终导致肺纤维化^[2]。Moodiey 等^[3]研究发现, 肺成纤维细胞抗凋亡能力明显强于普通的成纤维细胞。近年有研究表明诱导成纤维细胞凋亡是抗肺纤维化的重要治疗方法之一^[4]。因此, 对抑制肺成纤维细胞增殖, 促进肺成纤维细胞凋亡药物的研究成为肺纤维化治疗的研究热点。

青蒿素是我国科研人员于 1972 年首次从菊科植物黄花蒿中分离得到, 其衍生物包括青蒿琥酯、二氢青蒿素、蒿甲醚和蒿乙醚。除青蒿琥酯在碱性条件下可溶外, 其他青蒿素衍生物均难溶于水^[5]。近年研究^[6]表明青蒿素类药物除抗疟疾外, 还具有抗纤维化等作用。

细胞凋亡的信号转导途径如下, 即死亡受体通路途径(Fas/FasL)、线粒体通路途径(Bid)、内质网通路途径(Bad)、生存因子抗凋亡途径(Survivin)^[7]。Caspase-3 是细胞凋亡下游的关键执行者, 参与多条途径的细胞凋亡, 被认为是介导细胞凋亡的核心酶^[8-9]。本研究即通过对 Caspase-3 表达产物的检测, 研究青蒿琥酯对 HFL-I 细胞促凋亡的作用。研究结果显示 HFL-I 细胞经 $2.5 \sim 160 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的青蒿琥酯 48 h 后, 生长受到显著抑制, 并呈剂量依赖性。 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 青蒿琥酯作用 48 h 后, 用 RT-PCR 法检测到 Caspase-3 mRNA 的表达随时间延长而增强; 并用 Western blotting 法检测到 pro-Caspase-3 降解产物 Caspase-3 蛋白表达亦随时间延长而增强。

前期研究^[10]显示：青蒿琥酯能抑制Survivin mRNA在HFL-I细胞中的表达，且呈剂量依赖性。结合本研究结果，共同提示青蒿琥酯促人胚肺成纤维细胞凋亡的可能机制为：通过上调Caspase-3 mRNA及Caspase-3蛋白的表达，下调Survivin mRNA的表达，达到抑制HFL-I细胞增殖、促进HFL-I细胞凋亡的作用。本研究结果为将来青蒿琥酯应用于肺纤维化的治疗提供实验依据，但青蒿琥酯的抗肺纤维化作用还可能还存在其他机制，有待进一步研究。

REFERENCES

- [1] XU H S, LIU P, YE Y J, et al. Antimalarial agent artesunate inhibits production of tn α - and il-1 β via inhibition of nf-kappab path-way in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes [J]. *Ann Rheum Dis*, 2007, 66(2): 452-457.
- [2] WANG Z, ZHAO L D, ZHANG X, et al. Thalidomide inhibits TGF- β 1-induced transdifferentiation of human fetal lung fibroblast cell line to myofibroblast [J]. *Basic Clin Med*, 2009, 29(1): 59-63.
- [3] MOODLEY Y P, CATERINA P, SEAFFIDI A K, et al. Comparison of the morphological and biochemical changes in normal human lung fibroblasts and fibroblasts derived from lungs of patients with idiopathic Pulmonary fibrosis during FasL-induced apoptosis [J]. *Pathol*, 2004, 202 (4): 486-495.
- [4] SELMAN M, THANNIEKAL V J, PARDO A, et al. Idiopathic Pulmonary fibrosis: pathogenesis and therapeutic approaches [J]. *Drugs*, 2004, 64(4): 405-430.
- [5] LI Y, WU Y L. An over four millennium story behind Qinghaosu(artemisinin)-a fantastic antimalarial drug from a traditional Chinese herb [J]. *Curr Med Chem*, 2003, 10(21): 2197-2223.
- [6] XU G L, CHEN P, LIANG J S, et al. Research on artesunate's therapeutic action and mechanism to pulmonary fibrosis in rats [J]. *Clin Med Eng*, 2009, 16(9): 6-7.
- [7] LIU S H, TAO C L, LUO Z H, et al. Dynamics simulation on the signal transduction pathways of apoptosis [J]. *Chin J Pathophysiol*(中国病理生理杂志), 2009, 25(6): 1244-1248.
- [8] JIANG Y Q, XIONG X Y, YU L H. Oridonin induced MDA-MB-231 cell apoptosis through the action of Caspase Pathway [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2009, 20(6): 1493-1495.
- [9] LI J Y. Study the relationship of Caspase-3 and tumour [J]. *Med Recapit*(医学综述), 2005, 11 (5): 430-432.
- [10] WANG C M, ZHANG X F, TAN N, et al. Effects and mechanism of artesunate on the cell proliferation and apoptosis in human embryonic lung fibroblast cell line HFL-I [J]. *Shandong Med J*(山东医药), 2010, 50(3): 33-35.