

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.02.009

· 基础研究 ·

## 雷公藤甲素对人子宫颈微血管内皮细胞活性的抑制

张雅莉<sup>1</sup>, 刁云云<sup>1</sup>, 张春泽<sup>2</sup> (1. 河北北方学院附属第二医院妇产科, 河北 宣化 075100; 2 天津市人民医院肛肠外科, 天津 300121)

**[摘要]** **目的:** 探究雷公藤甲素对人子宫颈微血管生成的抑制作用, 并探讨其作用机制。 **方法:** 选择人子宫颈微血管内皮细胞(HCerMEC)作为研究对象, 体外培养过程中分别给予0、5、10和20、40 ng/ml的雷公藤甲素处理, 采用CCK-8法测定其对细胞增殖的影响, transwell实验检测细胞的迁移能力, western blotting检测细胞血管内皮生长因子(VEGF)表达的变化。 **结果:** 雷公藤甲素抑制HCerMEC的增殖活性和细胞迁移能力, 并呈剂量依赖关系( $P < 0.05$ )。雷公藤甲素能够抑制HCerMEC细胞内VEGF的表达, 药物浓度越高抑制作用越强。 **结论:** 雷公藤甲素可以抑制HCerMEC细胞增殖和迁移活性, 该作用与其抑制VEGF表达有关。

**[关键词]** 雷公藤甲素; 新生血管; 内皮细胞; 血管内皮生长因子

**[中图分类号]** R730.5; R737 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)02-0196-004

## Triptolide inhibits activity of human cervical microvascular endothelial cells

ZHANG Yali<sup>1</sup>, DIAO Yunyun<sup>1</sup>, ZHANG Chunze<sup>2</sup> (1. Department of Obstetrics and Gynecology, the Second Affiliated Hospital of Hebei North College, Xuanhua 075100, Hebei, China; 2. Department of Anorectal Surgery, Tianjin Peoples Hospital, Tianjin 300121, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the inhibitory effect of Triptolide on vasculogenesis of human cervical microvascular endothelial cells, and to explore the mechanism. **Methods:** Human cervical microvascular endothelial cells (HCerMECs) were used as research subject, and treated with different concentrations of Triptolide (0, 5, 10, 20 and 40 ng/ml) *in vitro*. The effect of Triptolide on cell proliferation was determined by CCK-8, the cell migration ability was detected by Transwell assay while the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) was examined by western blotting. **Results:** Triptolide inhibited the proliferation and migration of HCerMECs in a dose-dependent manner ( $P < 0.05$ ). In addition, Triptolide could inhibit the expression of VEGF in HCerMECs in a concentration-dependent manner. **Conclusions:** Triptolide could inhibit the proliferation and migration activity of HCerMECs which is related with the suppression of VEGF expression.

**[Key words]** triptolide; vasculogenesis; endothelial cells; VEGF

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(2): 196-199. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.02.009]

宫颈癌在世界范围内是第二大女性常见癌症<sup>[1]</sup>。虽然包括顺铂为基础的术前化疗方案使患者的生存率有所提高<sup>[2-4]</sup>, 但是这些化疗方案的耐药性问题依然很严重。因此, 对于宫颈癌的化疗药物亟需新的突破。在肿瘤的发生发展过程中, 病理性血管生成以及新生血管机能的紊乱都起到了关键作用, 并且新生血管过程和肿瘤的转移也密切相关<sup>[5, 6]</sup>。血管内皮细胞的增殖迁移等过程主要是通过血管内皮生长因子(VEGF)及其相关通路的作用所完成的<sup>[7]</sup>。

雷公藤甲素(triptolide), 是从卫矛科雷公藤属雷公藤、昆明山海棠, 以及苍山雷公藤、东北雷公藤等植物中提纯而来的一种含有3个环氧基的二萜类内酯化合物, 是雷公藤的主要有效成分之一。雷公藤甲素生理活性强, 具有显著的抗炎、免疫调节、抗生育及抗肿瘤作用, 在临床上应用广泛<sup>[8-10]</sup>。雷公藤甲素被发现可以直接引起肿瘤细胞的凋亡<sup>[11-14]</sup>, 也可以

直接影响宫颈癌细胞的增殖过程<sup>[15]</sup>。近些年有研究表明雷公藤甲素对于全身其他部位的血管生成是有抑制作用的。本文探究雷公藤甲素对于人子宫颈微血管内皮细胞的作用, 通过细胞实验, 检测不同浓度雷公藤甲素作用下, 人子宫颈微血管内皮细胞(HCerMEC)的增殖、迁移情况, 并检测细胞内VEGF的表达变化。

### 1 材料与方法

#### 1.1 细胞系及主要试剂用品

人子宫颈微血管内皮细胞(human cervical microvascular endothelial cells, HCerMEC)及CerEpiCM

**[作者简介]** 张雅莉(1981-), 女, 医学硕士, 副主任医师, 主要从事妇科肿瘤的临床与基础研究, E-mail: 73848414@qq.com

**[通信作者]** 张春泽(ZHANG Chunze, corresponding author), 主要从事肿瘤的临床与基础研究, E-mail: 75481309@qq.com

完全培养基均购自 SclenCell 公司;雷公藤甲素购自北京华诺信得科技有限公司(纯度 $\geq 98\%$ ),使用前用二甲基亚砜(DMSO)溶解,用 CerEpiCM 培养基稀释至工作浓度;CCK-8 试剂盒购自日本同仁化学研究所,Transwell 小室购自 Corning 公司;VEGF 抗体购自 CST 公司。

### 1.2 HCrMEC 的培养

HCrMEC 细胞采用专用 CerEpiCM 完全培养基培养,每 500 ml CerEpiCM 加入 5 ml 宫颈细胞生长添加剂(CerEpiCGS, Cat. #7062)和终浓度为 100 U/ml 的青霉素形成完全培养基,37 °C,饱和湿度、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

### 1.3 CCK-8 法检测雷公藤甲素对 HCrMEC 增殖的影响

将 HCrMEC 细胞种在 96 孔板中,每孔  $1 \times 10^4$  个细胞,以每个浓度为一组,共 5 组,编号为 1~5,每组设 5 个复孔。培养 12 h 使细胞贴壁。贴壁后以换液的方式给药。用 CerEpiCM 倍比稀释雷公藤甲素 5 个不同的浓度(0、5、10、20、40 ng/ml)。在给药 24 h 后用 CCK-8 试剂检测细胞增殖情况,以换液的方式给孔板中的细胞换入含有 10% CCK-8 的 CerEpiCM 完全培养基。然后在 37 °C 温箱里孵育 60 min,检测在 450 nm 处的光密度(D)值。5 个复孔的分光度读数取平均数后和空白组进行对比。实验重复了 3 遍。

### 1.4 Transwell 法检测雷公藤甲素对 HCrMEC 迁移能力的影响

在 HCrMEC 生长至对数期时,将其质量换液为无生长因子的无血清培养基培养 24 h。然后将细胞消化下后,用含有不同浓度雷公藤甲素(0、5、10、20、40 ng/ml)的培养基混成细胞悬液,置于 transwell 上室 200  $\mu$ l ( $2 \times 10^4$  个细胞),每个浓度为一组,共 5 组,编号为 1~5。下室加入完全培养基。37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵育 12 h<sup>[4]</sup>后取出。用 4% 多聚甲醛固定 transwell 膜上的细胞,然后用 DAPI (Sigma) 对细胞进行染色。用棉签擦去上室面未迁移过去的细胞。对不同浓度实验组进行照相计数(随机 5 个视野)。实验重复了 3 遍。

### 1.5 Western blotting 测定 HCrMEC 中 VEGF 的蛋白表达

用 Western bolt 方法测定不同给药浓度情况下, HCrMEC 的血管内皮细胞生长因子(VEGF)的表达量。HCrMEC 培养至对数生长期以换液的方式给药,每个浓度为一组,共 5 组,编号为 1~5。给药 24 h 后,倒去培养基,然后用 PBS 洗 3 遍。用细胞刮将贴壁的细胞全部刮下,离心去上清后加入 RIPA 裂解液(碧云天),用振荡器混匀后,在冰上裂解 30 min,用

BCA 蛋白试剂盒测定蛋白浓度。按照每孔 35  $\mu$ g 蛋白进行 SDS-PAGE,蛋白条带转移至 PVDF 膜(Bio-Rad, America)上,用 5% 的脱脂牛奶(SIGMA, America)室温封闭 1 h。加入 Anti-VEGF 抗体和  $\beta$ -actin 的一抗(abcam),过夜后加入二抗 HRP-linked 抗体(Cell Signaling Technology),最后加入 ECL 发光液,化学发光显影。用 ImageJ 软件对于结果进行分析。实验重复了 3 遍。

### 1.6 统计学处理

所有数据结果用均数 $\pm$ 标准差表示,采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,组间差异采用配对 *t* 检验, $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 雷公藤甲素显著抑制细胞的增殖能力

随着雷公藤甲素浓度的增高,HCrMEC 细胞 *D* 值越来越低,10 ng/ml 组相对于空白对照组的生长抑制率为(6.38 $\pm$ 1.50)%,20 ng/ml 组相对于空白对照组的生长抑制率为(19.50 $\pm$ 3.01)%。可以发现随着雷公藤甲素浓度的增高,HCrMEC 细胞的增殖能力呈下降趋势(图 1)。

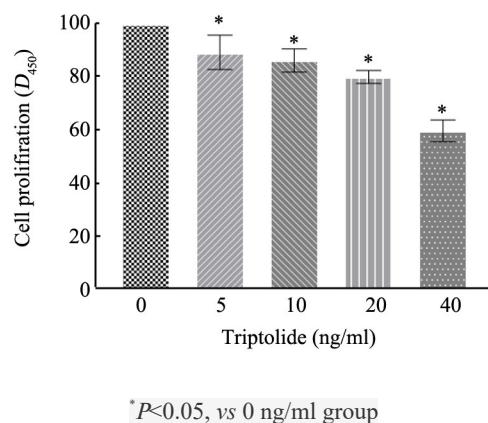


图 1 不同浓度雷公藤甲素对子宫颈微血管内皮细胞增殖的抑制

Fig.1 The inhibitory effect of different concentrations of triptolide on proliferation of HCrMECs

### 2.2 雷公藤甲素明显抑制细胞的迁移能力

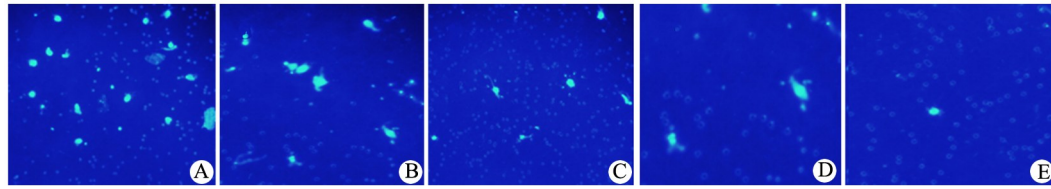
Transwell 实验可以看出,雷公藤甲素干预组与空白对照组之间对比,通过 transwell 膜的细胞数量明显减少。10、20、40 ng/ml 三个浓度组均比空白组的细胞数显著减少,而且这三组两两之间均有显著差异(图 2,图 3)。空白组每个视野下平均(19.40 $\pm$ 2.07)个细胞通过膜,10 ng/ml 组每个视野下平均(15.40 $\pm$ 1.95)个细胞,20 ng/ml 组每个视野下平均(7.2 $\pm$ 1.79)个细胞。雷公藤甲素浓度越高,细胞迁移能

力越差( $P<0.05$ )。

### 2.3 雷公藤甲素对 HCrMEC 分泌 VEGF 的影响

从 western blotting 结果可以看出,与空白对照

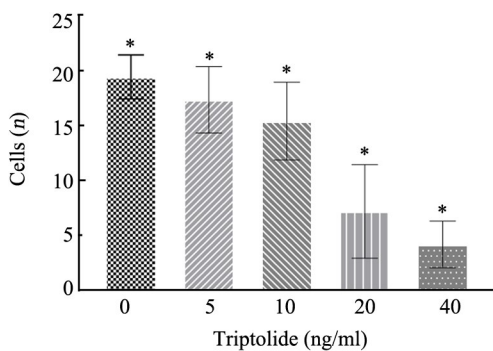
比,雷公藤甲素浓度越高,细胞的 VEGF 含量越低( $P<0.05$ )(图4)。



A: Blank control group; B: 5 ng/ml triptolide; C: 10 ng/ml triptolide; D: 20 ng/ml triptolide; E: 40 ng/ml triptolide

图2 不同浓度雷公藤甲素对子宫微血管内皮细胞迁移能力的影响

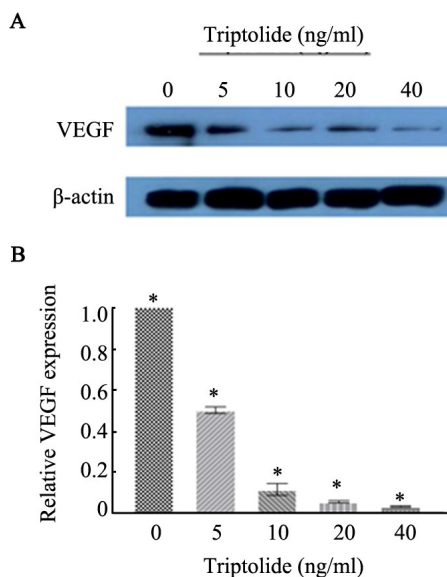
Fig.2 Effect of different concentrations of triptolide on migration capacity of HCrMECs



\* $P<0.05$ , vs 0 ng/ml group

图3 雷公藤甲素对子宫微血管内皮细胞迁移能力的抑制

Fig.3 Inhibition of triptolide on migration capacity of HCrMECs



\* $P<0.05$ , vs 0 ng/ml group

A: Western blotting analysis of VEGF expression;

B: Quantitative analysis of VEGF expression

图4 雷公藤甲素对子宫微血管内皮细胞表达血管内皮生长因子的抑制

Fig.4 The inhibitory effect of triptolide on VEGF expression in HCrMECs

### 3 讨论

在本研究中,发现雷公藤甲素具有抑制子宫微血管内皮细胞(HCrMEC)的增殖迁移的能力,并且随着雷公藤甲素浓度的提高,这种抑制效果更为明显,其浓度和抑制效果呈正相关趋势。同时在雷公藤甲素的作用下,HCrMEC细胞中的血管内皮生长因子(VEGF)的含量会降低。雷公藤甲素的给药浓度越高,HCrMEC细胞中的VEGF的含量越低,这两者呈现出负相关的趋势。

在人体的正常生理性条件下,新生血管的过程会发生在组织的创伤修复活动中,并且在女性的生殖器官组织中会表现出生理性的周期性发生新生血管过程。然而过量和失控的新生血管却和类风湿性关节炎、糖尿病肾病及多种视网膜疾病密切相关。而且不受控制的、过度的血管生成与肿瘤的发生和转移有着密不可分的关系。在肿瘤的发生发展过程中,恶性增殖的肿瘤细胞会分泌大量的VEGF,从而促进肿瘤的血管增生和增殖,进而使得肿瘤组织恶性增殖甚至会引起远端转移和扩散。在肿瘤的发生过程中,肿瘤组织的新生血管的血管内皮细胞也会分泌VEGF,这样就形成了一个恶性的不可控制的循环过程。肿瘤组织分泌的VEGF起到了一个重要的“扳机”效应,为血管生成提供了启动效果,病理性增生的血管为肿瘤组织提供了生长所必须的一部分氧和营养物质,并且为肿瘤的转移提供了途径。然而这种病理性增生的血管并未成熟,血管壁也缺乏平滑肌,这种病理性新生的血管形态不规则,缺乏正常血管的神经支配,也不具有正常血管的功能。这种新生血管往往持续性增长且处于失控状态。

所以,在整个过程中,对于VEGF的抑制和控制显得尤为重要<sup>[6]</sup>。抗VEGF可以抑制肿瘤的生长和转移,从源头上阻止肿瘤的病理性毛细血管的增殖、血管腔生成、毛细血管迁移的能力,从而对于肿瘤生长的



抑制提供了可能性。正因为这样,所以抗VEGF的治疗方法已经广泛运用在了其他癌症的治疗方面<sup>[17-19]</sup>。选择出效果好、副作用小的抗肿瘤药物显得尤为重要。很多研究致力于在中成药中找到能作用细胞增殖周期,或者是对于新生血管有抑制作用的成分,以便于确定新的化疗药物。同时也可以对一些传统的中药的药效提供证据<sup>[19]</sup>。本研究对于雷公藤甲素运用于宫颈癌的治疗有着重要的作用。

雷公藤甲素又被称为雷公藤内酯醇,是中药雷公藤中提取的二萜内酯化合物,是雷公藤的重要活性成分。雷公藤甲素有抗炎作用,对于类风湿性关节炎有很好的治疗效果。雷公藤甲素还具有抑制淋巴细胞增殖的作用,可以抑制T淋巴细胞增殖并促进其凋亡。有研究指出雷公藤甲素可以影响细胞周期活动,并直接对多种癌细胞的增殖有抑制作用<sup>[20-22]</sup>。在宫颈癌的发生发展过程中,从宫颈上皮内瘤变到浸润癌过程都有着病理性血管生成的过程。病变越严重,子宫颈的癌组织微血管密度和血管生成因子含量也就会越高。增殖实验中,给药24 h的时候,可以看出比较明显的量效关系。证明雷公藤甲素在给药24 h的时候确实可以抑制HCerMEC细胞的增殖作用。

综上所述,雷公藤甲素可以抑制HCerMEC细胞的血管形成,抑制HCerMEC细胞增殖、迁移和VEGF表达是其可能机制,为雷公藤甲素在宫颈癌治疗的临床应用提供了实验依据。

## 【参考文献】

- SERRANO B, BROTONS M, BOSCH F X, et al. Epidemiology and burden of HPV-related disease[J]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2018, 47: 14-26. DOI:10.1016/j.bpobgyn.2017.08.006.
- KATO M. Fibroblast growth factor receptors as treatment targets in clinical oncology[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018, 卷期起止页, DOI:10.1038/s41571-018-0115-y.
- TOLL G, REINERS K. Immune-mediated neuropathies[J]. *Nervenarzt*, 2016, 87(8): 887-898. DOI:10.1007/s00115-016-0164-3.
- RODEN R, STERN P L. Opportunities and challenges for human papillomavirus vaccination in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18(4):240-254. DOI:10.1038/nrc.2018.13.
- AIONE F, GIRAUDDO E. Tumor angiogenesis: methods to analyze tumor vasculature and vessel normalization in mouse models of cancer[J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1267:349-365. DOI:10.1007/978-1-4939-2297-0\_17.
- RISHNA P S, NAGARE R P, SNEHA V S, et al. Tumour angiogenesis-Origin of blood vessels[J]. *Int J Cancer*, 2016, 139(4): 729-735. DOI:10.1002/ijc.30067.
- EINOLAINEN K, KARAMAN S, D'AMICO G, et al. VEGFR3 Modulates vascular permeability by controlling VEGF / VEGFR2 signaling[J]. *Circ Res*, 2017, 120(9): 1414-1425. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.310477.
- IAEI S, HALABY R. Immunosuppressive, anti-inflammatory and anti-cancer properties of triptolide: A mini review[J]. *Avicenna J Phytomed*, 2016,6(2):149-164.
- U H, LUO L, LIU F, et al. Anti-cancer and sensibilisation effect of triptolide on human epithelial ovarian cancer[J]. *J Cancer*, 2016, 7(14):2093-2099. DOI:10.7150/jca.16178.
- MENG C, ZHU H, SONG H, et al. Targets and molecular mechanisms of triptolide in cancer therapy[J]. *Chin J Cancer Res*, 2014, 26(5): 622-626. DOI:10.3978/j.issn.1000-9604.2014.09.01.
- LI X Y, WANG S S, HAN Z, et al. Triptolide Restores Autophagy to Alleviate Diabetic Renal Fibrosis through the miR-141-3p/PTEN/Akt/mTOR Pathway[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2017, 9: 48-56. DOI:10.1016/j.omtn.2017.08.011.
- WANG G, LI N, LV X, et al. Triptolide suppresses alkali burn-induced corneal angiogenesis along with a downregulation of VEGFA and VEGFC expression[J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2017, 300(7): 1348-1355. DOI:10.1002/ar.23583.
- YANG M, GU Y, YANG D, et al. Development of triptolide-nano-emulsion gels for percutaneous administration: physicochemical, transport, pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics[J]. *J Nanobiotechnol*, 2017, 15(1): 88. DOI:10.1186/s12951-017-0323-0.
- KONG X, ZHANG Y, LIU C, et al. Anti-angiogenic effect of triptolide in rheumatoid arthritis by targeting angiogenic cascade[J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e77513. DOI:10.1371/journal.pone.0077513.
- QIN G, LI P, XUE Z. Triptolide induces protective autophagy and apoptosis in human cervical cancer cells by downregulating Akt/mTOR activation[J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(3): 3929-3934. DOI: 10.3892/ol.2018.9074.
- MINION L E, TEWARI K S. The safety and efficacy of bevacizumab in the treatment of patients with recurrent or metastatic cervical cancer[J]. *Exp Rev Anticancer Ther*, 2017, 17(3): 191-198. DOI: 10.1080/14737140.2016.1246187.
- BORCOMAN E, LE TOURNEAU C. Pembrolizumab in cervical cancer: latest evidence and clinical usefulness[J]. *Ther Adv Med Oncol*, 2017, 9(6): 431-439. DOI:10.1177/1758834017708742.
- TEWARI K S, SILL M W, LONG H R, et al. Improved survival with bevacizumab in advanced cervical cancer[J]. *N Engl J Med*, 2014, 370(8): 734-743. DOI:10.1056/NEJMoa1309748.
- SUN H, TANG F, ZHOU S, et al. Association between vascular endothelial growth factor expression and lymph node metastasis in cervical cancer: A meta-analysis[J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2016, 42(10): 1310-1316. DOI:10.1111/jog.13064.
- QIN G, LI P, XUE Z. Triptolide induces protective autophagy and apoptosis in human cervical cancer cells by downregulating Akt/mTOR activation[J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(3): 3929-3934. DOI: 10.3892/ol.2018.9074. 和15条文献重复.
- ZIAEI S, HALABY R. Immunosuppressive, anti-inflammatory and anti-cancer properties of triptolide: a mini review[J]. *Avicenna J Phytomed*, 2016, 6(2): 149-164.
- DANDAWATE P R, SUBRAMANIAM D, JENSEN R A, et al. Targeting cancer stem cells and signaling pathways by phytochemicals: Novel approach for breast cancer therapy[J]. *Semin Cancer Biol*, 2016, 卷期 40-41:192-208. DOI:10.1016/j.semcancer.2016.09.001.

[收稿日期] 2018-09-17

[修回日期] 2018-12-14

[本文编辑] 韩丹