

雷公藤内酯醇阳离子聚合物肝细胞毒性及其对 乳腺癌干细胞影响的研究

朱益民 孙思路 许傅英*

(丽水学院附属第一医院普外科, 丽水 323000)

摘要 该文观察了雷公藤内酯醇阳离子聚合物(TPL-PEI-CyD)对乳腺癌干细胞的影响。采用CCK-8测定TPL-PEI-CyD、雷公藤内酯醇(TPL)对HL-7702细胞的毒性,用TGF- β 1孵育培养MCF-7细胞,流式细胞仪检测其中 $CD_{44}^{+}CD_{24}^{-}$ 标志的细胞比例;免疫磁珠法分选其中 $CD_{44}^{+}CD_{24}^{-}$ 细胞群;TPL-PEI-CyD作用于MCF-7干细胞后,流式细胞术检测其中 $CD_{44}^{+}CD_{24}^{-}$ 细胞比例的变化。雷公藤内酯醇在接入聚乙烯亚胺-环糊精后,对肝细胞的毒性较雷公藤内酯醇单体显著降低($P<0.05$),用TGF- β 1培养能富集高比例的乳腺癌干细胞;免疫磁珠分选法从中分离出肿瘤干细胞;TPL-PEI-CyD较TPL更高效地抑制MCF-7干细胞后中 $CD_{44}^{+}CD_{24}^{-}$ 细胞的比例($P<0.05$)。结果说明,TPL-PEI-CyD的肝细胞毒性降低且能高效地抑制乳腺癌干细胞的性能,有望开发成为治疗乳腺癌的中药新制剂。

关键词 雷公藤属; 乳腺癌; 肿瘤干细胞

Exploration for the Toxicity of TPL-PEI-CyD to Hepatocytes and Effects on Breast Cancer Stem Cells

Zhu Yimin, Sun Silu, Xu Fuying*

(Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Lishui University, Lishui 323000, China)

Abstract The purpose of this study was to survey the effects of TPL-PEI-CyD on breast carcinoma stem cells. The cytotoxicity of TPL-PEI-CyD and TPL on HL-7702 was compared by CCK-8. After incubation and culturing by TGF- β 1, the MCF-7 cells were assessed by flow cytometry for the proportion of $CD_{44}^{+}CD_{24}^{-}$ cells; Then, sorted the $CD_{44}^{+}CD_{24}^{-}$ cells by magnetic-activated cell sorting as MCF-7 stem cells. MCF-7 stem cells were dosed by TPL-PEI-CyD and then assessed by double staining flow cytometry for the variation of $CD_{44}^{+}CD_{24}^{-}$ proportion. Compared with TPL, the toxicity of TPL-PEI-CyD on liver cells was significantly declined ($P<0.05$). Breast carcinoma stem cells could be enriched by TGF- β 1 and isolated from MCF-7 cells with immunomagnetic sorting. After dosed with TPL-PEI-CyD, the proportion of $CD_{44}^{+}CD_{24}^{-}$ in MCF-7 stem cells was significantly lower than dosed with TPL ($P<0.05$). TPL-PEI-CyD could effectively suppress the property of breast carcinoma stem cell. It showed the unique effect of traditional Chinese medicine as a efficient and low toxic drug carrier complex for breast carcinoma treatment.

Keywords triptolid; breast cancer; tumor stem cell

雷公藤内酯醇(triptolide, TPL)是一种具有抗炎、免疫抑制及多靶点抗肿瘤的中草药有效活性成分^[1-3]。

TPL作为抗肿瘤天然药物已成为研究的热点^[1,4],但由于其对心、肝、肾、骨髓的毒性,TPL的应用受到限

收稿日期: 2018-02-10 接受日期: 2018-04-08

浙江省级公益性技术应用研究计划项目(批准号: 2014C33259)和丽水学院博士科研启动金资助的课题

*通讯作者。Tel: 0578-2271072, E-mail: zym330422@163.com

Received: February 10, 2018 Accepted: April 8, 2018

This work was supported by Public Welfare Technology Application Research Program of Zhejiang Province (Grant No.2014C33259) and Research Start-up Fund for Doctors of Lishui University

*Corresponding author. Tel: +86-578-2271072, E-mail: zym330422@163.com

网络出版时间: 2018-06-01 13:52:24

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180601.1352.006.html>

制^[5]。近年来有学者研发了药物控释系统以及靶向药物载体系统,来尝试降低TPL的毒性^[6-8]。我们将TPL连接在阳离子纳米材料上,合成了雷公藤内酯醇-聚乙烯亚胺-环糊精聚合物(TPL-PEI-CyD),以求在改善其作用的同时降低其毒副作用。乳腺癌干细胞在乳腺癌的发生、转移、复发过程中起着至关重要的作用,其公认的分子表面标记物是 $CD_{44}^{+}CD_{24}^{-}$ 。本实验拟用人乳腺癌MCF-7干细胞为研究对象,观察TPL-PEI-CyD对MCF-7干细胞的影响,试图为临床治疗乳腺癌寻找突破。

1 材料与方法

1.1 材料

人乳腺癌细胞MCF-7、人肝细胞HL-7702细胞购于上海奥陆生物科技有限公司;TPL购于美国Pharm Agenesis公司;TPL-PEI-CyD由浙江大学化学生物和药物研究所合成,经核磁氢谱分析得出雷公藤内酯醇接入率为10%;RPMI1640培养液和胎牛血清购于美国Hyclone公司;CCK-8试剂盒购于同仁化学研究所;TGF- β 1购于美国Life Technologies公司;CD44-FITC、CD24-PE购于Biolegend公司;Goat anti-Mouse IgG免疫磁珠购于北京四正柏生物科技有限公司;磁分离器购于德国Miltenyi Biotech公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养基本方法 细胞培养于含10%胎牛血清的RPMI1640培养液中,置于37 °C、5% CO₂的培养箱内培养。

1.2.2 CCK-8法检测TPL-PEI-CyD的细胞毒性 将数量为 1×10^4 个细胞/孔的HL-7702细胞接种到96孔板上,培养24 h。TPL-PEI-CyD用RPMI1640配制成浓度梯度(1、2、5、10、20 μ g/mL)的溶液;鉴于雷公藤内酯醇的接入率为10%,因此作为对比的TPL单体用RPMI1640配制成浓度梯度(0.1、0.2、0.5、1、2 μ g/mL)的溶液。分别在各孔中加入含不同药物浓度的培养液,每孔0.2 mL,每组设5复孔,温育4 h后,再用细胞培养液孵育24 h后每孔加入20 μ L CCK-8,再孵育2 h。然后应用酶标仪在450 nm波长处检测各孔的吸光度(D)值,取5复孔平均值计算,细胞存活率=($D_{\text{给药组}}/D_{\text{对照组}}$) $\times 100\%$;实验重复3次。

1.2.3 富集乳腺癌干细胞 于6孔细胞培养板上每孔加入2 mL MCF-7细胞悬液(2×10^5 个细胞),培养过夜;弃上清,加入含有20 ng/mL TGF- β 1的新鲜培养

液,孵育48 h。取密度 1×10^6 /mL的细胞悬液0.1 mL,分别加入5 μ L CD44-FITC和CD24-PE;4 °C避光孵育15 min。以标准程序用流式细胞仪(flow cytometry, FCM)检测,汞激发波长488 nm,计数 2×10^4 个细胞。

1.2.4 免疫磁珠法分选 $CD_{44}^{+}CD_{24}^{-}$ 细胞 将TGF- β 1处理48 h后的MCF-7细胞消化、计数、配制成总数为 1×10^7 的细胞悬液,调整细胞液体积为100 μ L,添加10 μ L CD24抗体,充分混合均匀,孵育15 min后,添加50 μ L的IgG免疫磁珠孵育30 min,将细胞悬液静置于磁分离器中5 min,收集细胞上清液(CD24⁻)。1 000 r/min离心5 min,弃上清,将细胞重悬至100 μ L。加入10 μ L的CD44抗体,4 °C孵育30 min,加入50 μ L IgG免疫磁珠,室温孵育30 min;将细胞悬液静置于磁分离器中5 min^[8]。

1.2.5 TPL-PEI-CyD最佳浓度筛选 将MCF-7干细胞按照 1×10^5 /孔接种于24孔板中。实验分4组,各组每孔分别加入1 mL含有浓度为0 μ g/mL、2 μ g/mL、5 μ g/mL、10 μ g/mL的TPL-PEI-CyD的培养液。继续孵育48 h。取0.1 mL细胞悬液,依次加入5 μ L CD44-FITC抗体和5 μ L CD24-PE抗体,混匀,4 °C避光孵育15 min。以FCM同法检测,每组计数 1×10^4 个细胞,计算 $CD_{44}^{+}CD_{24}^{-}$ 细胞的比例。

1.2.6 TPL-PEI-CyD对乳腺癌干细胞的影响 将MCF-7干细胞按 1×10^5 /孔接种于24孔板中,孵育过夜。每孔加入1 mL含5 μ g/mL TPL-PEI-CyD的培养液,继续孵育48 h。取0.1 mL细胞悬液,依次加入5 μ L CD44-FITC抗体和5 μ L CD24-PE抗体,混匀,4 °C避光孵育15 min,加入1 mL PBS离心5 min。以FCM同法检测,计数 1×10^4 个细胞,计算 $CD_{44}^{+}CD_{24}^{-}$ 细胞的比例,实验重复3次。对照组每孔加入1 mL含有0.5 μ g/mL TPL的培养液,空白对照组则未添加药物。

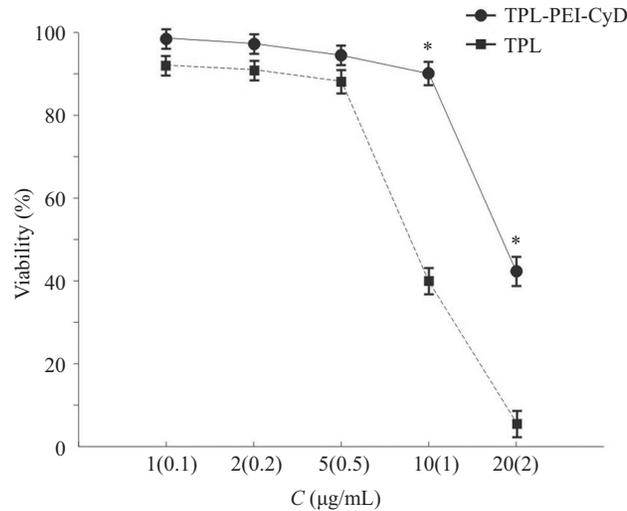
1.3 统计学方法

应用SPSS 13.0统计软件分析,结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 TPL-PEI-CyD的细胞毒性实验

用细胞计数试剂盒法测试TPL-PEI-CyD及TPL对肝细胞的毒性,实验数据绘制成曲线,如图1所示。TPL抑制细胞的增殖(即其细胞毒性),呈现明显的剂量依赖性;而雷公藤内酯醇在接入聚乙烯亚胺-环糊



CCK-8检测结果显示, TPL-PEI-CyD较TPL对HL-7702的细胞毒性降低, $*P<0.05$ 。

Comparing TPL-PEI-CyD and TPL on HL-7702 detected by CCK-8, the cytotoxicity of the former significantly reduced, $*P<0.05$.

图1 TPL-PEI-CyD与TPL对HL-7702的细胞毒性

Fig.1 Cytotoxicity of TPL-PEI-CyD and TPL on HL-7702

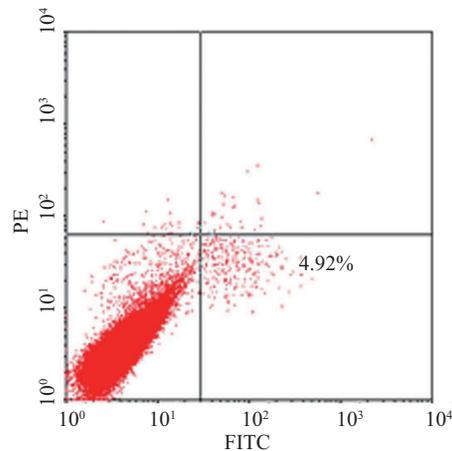


图2 MCF-7细胞以TGF-β1孵育得到CD₄₄⁺CD₂₄⁻细胞的比例

Fig.2 The proportion of CD₄₄⁺CD₂₄⁻ in MCF-7 cells after incubation by TGF-β1

精后, 对肝细胞的毒性显著降低($P<0.05$)。

以TGF-β1孵育MCF-7细胞后, FCM检测发现, CD₄₄⁺CD₂₄⁻细胞群的比例达4.92%(图2)。

2.2 磁珠分选CD₄₄⁺CD₂₄⁻细胞

将TGF-β1孵育MCF-7经CD24抗体IgG免疫磁珠及CD44抗体IgG免疫磁珠于磁分离器中分选, 所获得的细胞为CD₄₄⁺CD₂₄⁻细胞。收集的细胞可满足后续实验的需要。

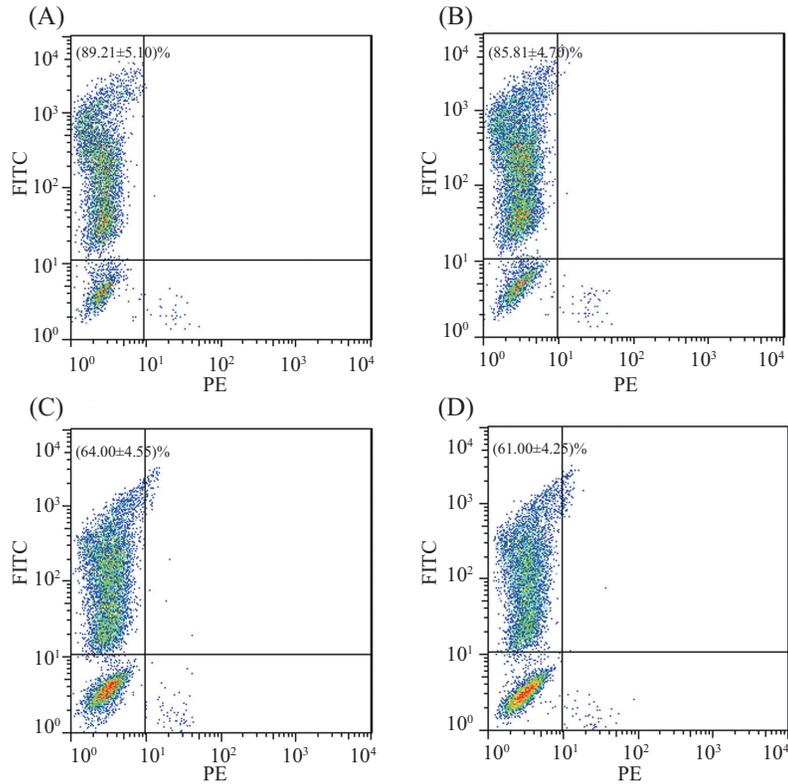
2.3 TP-PEI-CyD的最佳药物浓度筛选

观察不同浓度的TP-PEI-CyD对MCF-7干细胞中CD₄₄⁺CD₂₄⁻细胞比例的影响, 0 µg/mL、2 µg/mL、5 µg/mL和10 µg/mL浓度的TP-PEI-CyD作用MCF-7干细胞48 h后, 流式细胞仪检测各组中CD₄₄⁺CD₂₄⁻细胞比例的分别为(89.21±5.10)%、(85.81±4.70)%、

(64.00±4.55)%和(61.00±4.25%)(图3)。其中, 0 µg/mL组与2 µg/mL组的差异无显著性($P>0.05$); 5 µg/mL组、10 µg/mL组与0 µg/mL组相比较, 差异有显著性($P<0.05$); 5 µg/mL组与10 µg/mL组的差异无显著性($P>0.05$)。以上结果提示, 本实验中TP-PEI-CyD的最佳有效浓度为5 µg/mL。

2.4 TPL-PEI-CyD对乳腺癌干细胞的影响

用含5 µg/mL TPL-PEI-CyD的培养液孵育MCF-7干细胞48 h后, 用流式细胞仪检测MCF-7干细胞中CD₄₄⁺CD₂₄⁻细胞群的比例为(64.00±4.55)%; 含0.5 µg/mL TPL的培养液孵育MCF-7干细胞后, MCF-7干细胞中CD₄₄⁺CD₂₄⁻细胞群的比例为(83.11±1.70)%; 空白对照组中, CD₄₄⁺CD₂₄⁻细胞群的比例为(89.21±5.10%)(图4)。TPL-PEI-CyD组、TPL组与空白对照组相比差异

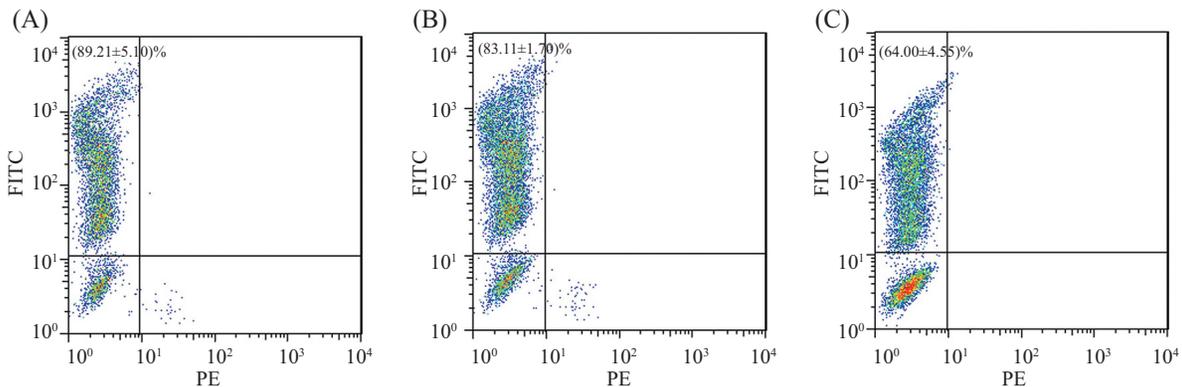


A: 0 $\mu\text{g/mL}$ 组; B: 2 $\mu\text{g/mL}$ 组; C: 5 $\mu\text{g/mL}$ 组; D: 10 $\mu\text{g/mL}$ 组。

A: 0 $\mu\text{g/mL}$ group; B: 2 $\mu\text{g/mL}$ group; C: 5 $\mu\text{g/mL}$ group; D: 10 $\mu\text{g/mL}$ group.

图3 FCM检测不同浓度的TPL-PEI-CyD对MCF-7干细胞中 $\text{CD}_{44}^{+}\text{CD}_{24}^{-}$ 细胞比例的影响

Fig.3 Different concentration of TPL-PEI-CyD affecting the proportion of $\text{CD}_{44}^{+}\text{CD}_{24}^{-}$ cell in MCF-7 stem cells assessed by FCM



A: 空白对照组; B: TPL组; C: TPL-PEI-CyD组。

A: the blank control group; B: the TPL group; C: the TPL-PEI-CyD group.

图4 FCM检测TPL-PEI-CyD对MCF-7干细胞中 $\text{CD}_{44}^{+}\text{CD}_{24}^{-}$ 细胞比例的影响

Fig.4 The effect of TPL-PEI-CyD on proportion of $\text{CD}_{44}^{+}\text{CD}_{24}^{-}$ cell in MCF-7 stem cells assessed by FCM

具有显著性($P < 0.05$), TPL-PEI-CyD组与TPL组相比差异具有显著性($P < 0.05$)。以上说明, TPL-PEI-CyD能够降低MCF-7干细胞中 $\text{CD}_{44}^{+}\text{CD}_{24}^{-}$ 细胞群的比例且效果显著优于TPL。

3 讨论

阳离子纳米载体通过提高药物溶解度, 提升其稳

定性及生物利用度, 维持持续释放而减小毒性^[6,9-11]。带正电荷的纳米微球容易黏附于带负电荷的细胞膜表面, 有利于以细胞内吞或受配体结合的方式进入细胞。在细胞内的迁移过程中, 阳离子纳米载体所具有的独特质子缓冲效应可以保护所载药物免受溶酶体的侵蚀或降解。本实验分别测试了TPL-PEI-CyD和TPL的细胞毒性。我们的体外实验证明结合

了阳离子纳米载体的TPL较TPL单体有着明显的优势,能高效进入细胞内,其细胞毒性显著降低但仍能保留其活性。

由于肿瘤组织中干细胞含量很低,难以直接分选,我们将TGF- β 1加入MCF-7的培养液中,其CD₄₄⁺CD₂₄⁻细胞亚群比例显著升高,据此可富集乳腺癌干细胞。磁性活化细胞分选系统的方法较为温和,获得细胞的活力良好。本研究通过免疫磁珠法成功分离得到CD₄₄⁺CD₂₄⁻细胞亚群,流式细胞仪检测结果证实获得的细胞纯度高、数量多、活性好。

用TPL-PEI-CyD孵育过的MCF-7干细胞,CD₄₄⁺CD₂₄⁻细胞群的比例明显下降,跟TPL原药相比,TPL-PEI-CyD更能高效地促进MCF-7干细胞分化,降低其中CD₄₄⁺CD₂₄⁻细胞的比例。由此可见,TPL-PEI-CyD在毒性降低的同时,其功效也提升了。

本研究为体外细胞实验,我们将进一步行体内试验观察TPL-PEI-CyD抑制乳腺癌干细胞的效果。如果体内试验能取得与体外实验同样的结果,那么TPL-PEI-CyD就可进入临床前期试验。鉴于TPL-PEI-CyD的低毒性和高效性,在治疗复发转移的晚期乳腺癌患者中有望发挥祖国医药独特的优势。

参考文献 (References)

- 1 刘娜,刘铭耀,李晔.雷公藤内酯醇体内外实验研究进展.海峡药学(Liu Na, Liu mingyao, Li Ye. Research progress of triptolide *in vitro* and *in vivo*. Strait Pharmaceutical Journal) 2015; 27(12): 99-101.
- 2 郭琼,南小新,张欢,罗颺,张俊,杨金瑞.雷公藤内酯醇对DU145/ADM细胞阿霉素化疗敏感性及逆转耐药的影响.中南药学(Guo Qiong, Nan Xiaoxin, Zhang Huan, Luo Yang, Zhang Jun, Yang Jinrui. Effect of triptolide on sensitivity of DU145/ADM cell
- line to adriamycin and reversal of drug resistance. Central South Pharmacy) 2013; 11(2): 81-4.
- 3 Liu RL, Shen XY, Li X, Zhang JH, Huang Y, Jiang H, *et al*. Effect of tripterine on human breast cancer and its stem cells. Chin J Exp Surg 2012; 29(24): 2455-7.
- 4 Hu TN, Wang Q, Jin X. Anticancer effect of triptolide-polyethylenimine-cyclodextrin *in vitro*. Journal of Zhejiang University (Medical Sciences) 2012; 41(6): 610-9.
- 5 Lin C, Blenda C, Kwan W, Chen HB. Pulmonary delivery of triptolideloaded liposomes decorated with anti-carbonic anhydrase IX antibody for lung cancer therapy. Sci Rep 2017; 7(1): 1097-108.
- 6 Wu B, U ST, Zhang LJ, Zhu RX. Codelivery of doxorubicin and triptolide with reduction-sensitive lipid-polymer hybridnanoparticles for *in vitro* and *in vivo* synergistic cancer treatment. Int J Nanomedicine 2017; 8(12): 1853-62.
- 7 郭小文,李德平,翟华强,曹炜,程梦琳.雷公藤的药性文献回顾及其作用机制研究进展.中国实验方剂学杂志(Guo Xiaowen, Li Deping, Zhai Huaqiang, Cao Wei, Cheng Menglin. Literature review of medicinal properties and mechanism research process analysis about tripterygium wilfordii. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae) 2012; 18(13): 299-303.
- 8 翟晓建,张浩,张旖旎. CD₄₄⁺CD₂₄⁻乳腺癌干细胞活性与多药耐药的相关性.中国组织工程研究(Zhai Xiaojian, Zhang Hao, Zhang Yini. Relationship between cell activity and multidrug resistance of CD₄₄⁺CD₂₄^{-low} breastcancer stem cells. Chinese Journal of Tissue Engineering Research) 2016; 20(32): 4758-63.
- 9 杨锐,李红波,王兵,邹声泉.雷公藤甲素及其脂质体对TFK-1细胞增殖和凋亡的影响.中华实验外科杂志(Yang Rui, Li Hongbo, Wang Bing, Zhou Shengquan. The effect of triptolide and triptolide loaded liposomes on proliferation and apoptosis to TFK-1 cells. Chin J Exp Surg) 2014; 31(11): 2378-80.
- 10 Gadde S. Multi-drug delivery nanocarriers for combination therapy. Med Chem Commun 2015; 6(11): 1916-29.
- 11 Chen JX, Qiao YT, Tang B, Chen G, Liu XF, Yang BY, *et al*. Modulation of salmonella tumor-colonization and intratumoral anti-angiogenesis by triptolide and its mechanism. Theranostics 2017; 7(8): 2250-60.