

雷公藤甲素诱导 HeLa 细胞 p53 依赖的自噬和凋亡 *

张 斌^{1)**} 王蕴非^{1)**} 赵 飞¹⁾ 雷 鸣^{1,2)***} 黄伟伟^{1)***}

(¹⁾ 西北农林科技大学生命科学院, 杨凌 712100; (²⁾ 中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 自噬与凋亡被认为是细胞程序性死亡的两种重要途径, 二者的交互联系对阐明药物的抗肿瘤机理有重要价值. 众多的研究表明, 雷公藤甲素对多种肿瘤细胞都具有显著的抑制作用. 细胞凋亡与自噬可被相同的因素所诱导, p53 蛋白可以同时二者起调控作用, 在自噬与凋亡的交互作用(crosstalk)中扮演着重要角色. 本文以 HeLa 细胞为模型, 研究雷公藤甲素诱导 HeLa 细胞发生自噬和凋亡的机制, 并通过抑制 p53 依赖的转录, 研究雷公藤甲素诱导 HeLa 细胞 p53 依赖的自噬和凋亡交互联系.

关键词 雷公藤甲素, p53, 自噬, 凋亡

学科分类号 Q255

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0060

凋亡与自噬被认为是细胞程序性死亡的两种重要方式^[1-2], 二者可以通过相似的因素被诱导^[3], 在保守精确的调控下发生, 决定着受调控细胞的命运. 同时, 自噬作为真核生物中重要的细胞内物质降解途径, 可以将蛋白质和细胞器等包裹进自噬小体, 与溶酶体相融合后使其降解^[4], 对生命过程中正常的物质代谢及周转不可或缺, 并广泛参与到诸如衰老、神经退行性疾病、病毒感染、免疫、肿瘤等各种生理及病理的生命活动中^[5]. 因此, 理解凋亡与自噬的交互联系对于阐明药物作用机理起着关键的作用.

p53 基因可以同时细胞凋亡与自噬起调控作用. p53 基因在凋亡途径中的作用已经被广泛的研究所阐明, 在遇到诸如 DNA 损伤、低氧胁迫、原癌基因异常表达等条件下, 细胞中 p53 基因被激活, 通过上调 BAX、PUMA 等一系列促凋亡基因的表达, 促进细胞凋亡的发生^[6]. 然而 p53 基因对自噬的调控作用存在两方面, 细胞核定位的 p53 蛋白可以通过调控溶酶体蛋白 (damage-regulated autophagy modulator, DRAM) 表达而促进细胞自噬的发生^[7], 与之相反, 细胞质定位的 p53 蛋白可以抑制 AMP 激活的蛋白激酶 (AMP-activated protein

kinase, Ampk) 的活性, 而 Ampk 进一步抑制哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTor) 的作用, mTor 激活可以通过对 Ulk1-ATG13-FIP200 复合物的调控抑制自噬发生, 所以细胞质定位的 p53 对自噬的发生起抑制作用^[8-9]. 基于 p53 基因在肿瘤发生发展中的重要作用, 通过 p53 基因的细胞凋亡与自噬调控对于抗肿瘤研究有着重要的意义.

雷公藤甲素 (triptolide) 几乎对所有组织来源的肿瘤细胞都具有显著抑制作用, 如胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、肾癌、胶质细胞癌等^[10-14]. 雷公藤甲素的作用机理研究证实其可以通过与转录因子 TF II H 的 XPB 亚基共价结合, 抑制 RNA 聚合酶 II 参与的转录^[15], 另外的研究还发现雷公藤甲素能

* 国家重大科学仪器开发专项 (2012YQ030261) 及国家自然科学基金资助项目 (31540002, 31571194).

** 共同第一作者.

*** 通讯联系人. Tel: 029-87080160

雷 鸣. E-mail: leiming70@hotmail.com

黄伟伟. E-mail: whuang0210@163.com

收稿日期: 2016-02-25, 接受日期: 2016-04-21

促进 RNA 聚合酶 II 大亚基 Rpb1 的降解, 从而抑制 RNA 的转录^[16]. 研究表明, 雷公藤甲素可以诱导肿瘤细胞凋亡与自噬的发生, 而 p53 蛋白对自噬与凋亡起双重调控作用, 是一个很好的研究自噬与凋亡交互联系的靶标分子^[17]. 因此, 本研究选择 HeLa 细胞(p53 野生型)为对象, 研究雷公藤甲素通过 p53 蛋白对肿瘤细胞自噬及凋亡过程的影响.

1 材料与方法

1.1 实验材料

HeLa 细胞购自北京协和医科大学基础医学细胞中心. 雷公藤甲素购自深圳牌牌科技有限公司. Bafilomycin A1 (B1793)、Rapamycin (R8781)、Chloroquine(C6628)、LC3B 抗体(L7543)购自 Sigma Aldrich. 3-Methyladenine(NSC 66389)购自上海前尘生物科技有限公司. PARP 抗体(sc8007)、p62 抗体(sc-28359)、p53 抗体(sc-126)、DRAM 抗体(sc-98654)购自 Santa Cruz 公司. Caspase-3 抗体(9665)、mTor 抗体(2983)、Phospho-mTor (Ser2448) 抗体(5536)购自 Cell Signaling 公司. β -Actin 抗体(CW0096)、山羊抗兔二抗(CW0103)、山羊抗鼠二抗(CW0102)及 BCA 定量试剂盒购自北京康为世纪公司. Tubulin 抗体(AT819)、Pifithrin- α (S1816)、抗兔免疫荧光染色试剂盒 Alexa Fluor 488(P0176)、细胞裂解液 RIPA(P0013B)、细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒(P0027)及细胞增殖检测试剂盒 CCK8(C0037)购自碧云天生物技术公司.

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

HeLa 细胞用含 10% FBS 及青霉素 - 链霉素的 DMEM (Gibco)细胞培养液, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养.

1.2.2 细胞增殖检测

HeLa 细胞消化后铺至 96 孔板中(5000 个细胞 / 孔), 培养至贴壁后加入不同浓度雷公藤甲素溶液或相应药物溶液, DMSO 为对照, 培养 24 h/48 h 后, 每孔加入 10 μ l CCK8 溶液, 37℃孵育 2 h 后, 用酶标仪检测 450 nm 光吸收(A_{450}), 空白培养基加入 CCK8 为对照, 细胞相对活性=($A_{\text{测定组均值}} - A_{\text{空白培养基均值}} / (A_{\text{对照组均值}} - A_{\text{空白培养基均值}})$).

1.2.3 细胞克隆形成实验

HeLa 细胞消化后铺至 12 孔板中, 培养至贴壁后, 处理组培养基中加入 5 nmol/L 雷公藤甲素,

对照组加 DMSO, 每个处理设 3 个重复, 培养约 2 周左右, 多聚甲醛固定后结晶紫染色照相观察.

1.2.4 LC3 免疫荧光染色

HeLa 细胞消化后铺至 6 孔板中制作细胞爬片, 50 nmol/L 雷公藤甲素处理细胞, 对照组细胞中加入 DMSO, 24 h 后多聚甲醛固定细胞, 进行 LC3B 抗体及荧光二抗孵育, 荧光显微观察分析 LC3 蛋白的分布情况.

1.2.5 Western blot

胰酶消化收集细胞样品, 加入细胞裂解液 RIPA 裂解细胞, 4℃高速离心后取上清. 将上清蛋白液用 BCA 定量试剂盒对总蛋白质浓度定量. 电泳后转 NC 膜, 孵育一抗及二抗, 加入 ECL 发光液后用 ChemiDoc XRS+ Imaging System(Bio-Rad) 成像观察.

1.2.6 统计学分析

试验数据结果均以平均值 $\pm$ 标准方差(SD)表示. 使用 t 检验检测处理组和对照组之间的差异. 以 $P < 0.05$ 设为显著性差异.

2 实验结果

2.1 雷公藤甲素抑制 HeLa 细胞增殖并诱导 HeLa 细胞凋亡

为了确定雷公藤甲素对 HeLa 细胞的作用, 用不同浓度雷公藤甲素分别处理 HeLa 细胞 24 h 和 48 h 后, 细胞相对活力检测表明, 50 nmol/L 及 100 nmol/L 雷公藤甲素处理 24 h、48 h 后细胞相对活性明显下降(图 1a). 雷公藤甲素处理后细胞克隆形成实验结果也表明, 5 nmol/L 雷公藤甲素明显抑制 HeLa 细胞克隆形成能力(图 1b). 说明雷公藤甲素对 HeLa 细胞有显著的增殖抑制作用.

显微观察发现 25 nmol/L 以上浓度雷公藤甲素处理 HeLa 细胞 24 h 后, 细胞出现大量死亡, 形态明显改变. 因此, 进而对细胞凋亡途径进行检测. 在凋亡过程中, 胱天蛋白酶 Caspase3 被剪切后成为激活型 Caspase3, 并裂解其底物聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(nuclear poly(ADP-ribose) polymerase, PARP)产生剪切条带, 如上三者可以作为凋亡检测的标志物. 如图 1c 所示, 50 nmol/L、100 nmol/L 雷公藤甲素处理细胞 24 h 后, Caspase3 条带变弱, 而激活型 Caspase3、PARP 剪切条带变强, 这说明凋亡激活过程与雷公藤甲素浓度呈依赖关系. 同时, 50 nmol/L 雷公藤甲素处理细胞不同时间后,

24 h 处理出现明显的激活型 Caspase3 和 PARP 剪切条带, 细胞凋亡检测表现出对药物处理时间的依

赖性(图 1d). 说明雷公藤甲素诱导 HeLa 细胞凋亡呈浓度和时间依赖性.

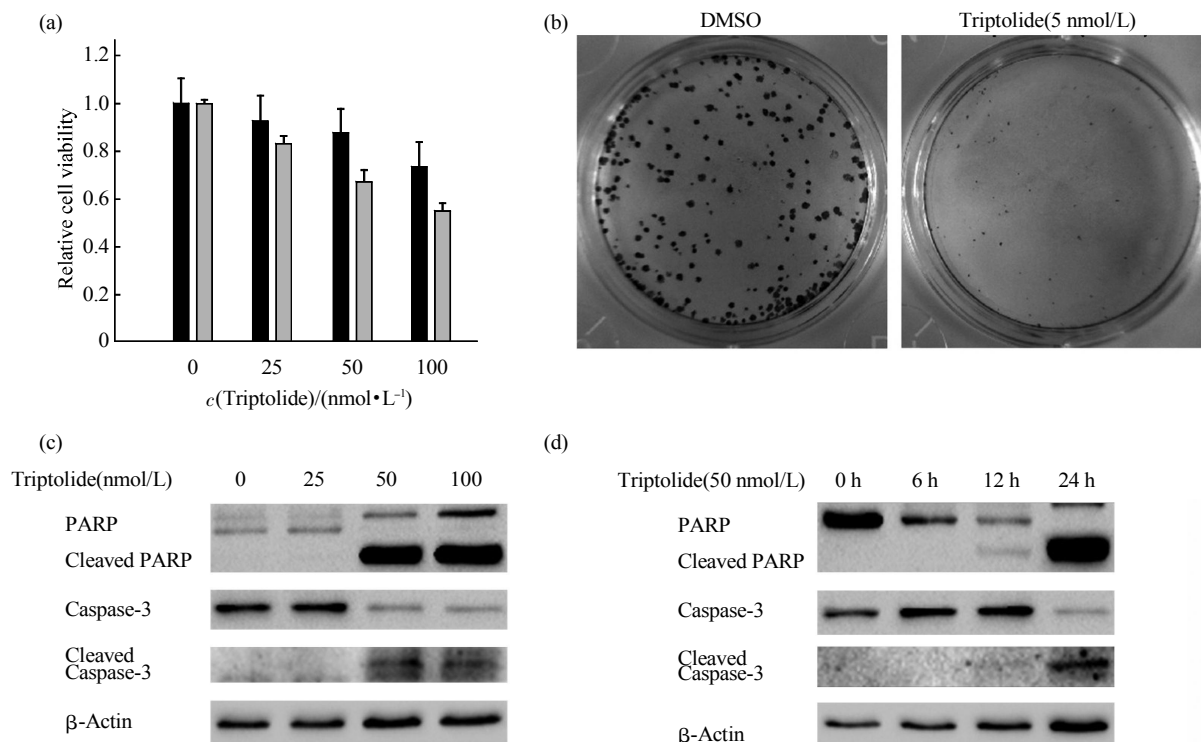


Fig. 1 Triptolide inhibits proliferation and induces apoptosis in HeLa cells

(a) HeLa cells were treated with different doses of Triptolide for 24 h and 48 h, and then cell relative viability assays were analyzed with cck8. ■: 24 h; □: 48 h. (b) The clonogenic assay was conducted after treated HeLa cells with 5 nmol/L Triptolide about 2 weeks. (c) Different doses of Triptolide treated HeLa cells for 24 h, and then the apoptosis markers were analyzed. β -actin as control. (d) 50 nmol/L Triptolide treated HeLa cells for different time, and then the apoptosis markers were analyzed. β -actin as control.

2.2 雷公藤甲素诱导 HeLa 细胞发生自噬

自噬与凋亡通常可以被相同的因素所诱导, 所以进一步检测雷公藤甲素是否诱导 HeLa 细胞发生自噬. 自噬过程被激活后, 微管相关蛋白 LC3- I 被剪切加工并脂质化成为 LC3- II, 进入自噬小体膜中, 最终当自噬小体与溶酶体融合后被降解^[5]. 另外, p62(SQSTM1)蛋白在自噬过程中可与 LC3 蛋白相结合并最终被降解^[18]. 因此, 二者常被选作自噬检测的标志分子.

50 nmol/L 雷公藤甲素处理 HeLa 细胞 24 h (DMSO 为对照)后, LC3 免疫荧光染色显示(图 2a), DMSO 处理的细胞中, 细胞质中没有出现较明显的 LC3 绿色荧光斑点聚集, 而雷公藤甲素处理后, 细胞质中出现明显的 LC3 绿色荧光斑点, 细胞质中 LC3 斑点的出现是自噬激活的标志. 进一步验证 LC3 免疫荧光染色的结果, 将 HeLa 细胞用不同

浓度雷公藤甲素进行处理, 如图 2b 所示, LC3- II 条带增强与雷公藤甲素呈现出浓度依赖性; 相反, p62 蛋白条带变弱也与雷公藤甲素呈现出浓度依赖性. 同时, 50 nmol/L 雷公藤甲素处理 HeLa 细胞不同时间后, LC3- II /p62 条带变化与药物处理呈时间依赖性(图 2c).

当自噬性降解被抑制后也可以导致 LC3- II 条带的累积而变强. 为了明确雷公藤甲素对 LC3- II 的影响是因促进自噬而非抑制自噬降解所致, 因此, 将雷公藤甲素与自噬激活剂雷帕霉素(rapamycin)、抑制剂巴佛洛霉素 A1(bafilomycin A1)分别单独和协同处理细胞后, 分析 LC3- II 条带的变化. 比较细胞分别被 DMSO (泳道 1)、triptolide (泳道 2)、bafilomycin A1 (泳道 4)、bafilomycin A1 +triptolide (泳道 6)处理后发现, bafilomycin A1 因抑制自噬性降解而导致 LC3- II 条

带的累积, 而 bafilomycin A1+triptolide 处理组对比 bafilomycin A1 处理组会有更多 LC3- II 条带累积, 这说明雷公藤甲素可以诱导更多 LC3- II 蛋白的产生, 当自噬在溶酶体降解后期被 bafilomycin A1 抑制后, LC3- II 蛋白便形成累积(图 2d). Rapamycin 通过抑制 mTor 激活而促进自噬的发生, 最终导致 LC3 的自噬性降解, 将 rapamycin 与 triptolide 协同

处理后(泳道 5), 两个激活剂的联用更加促进了 LC3- II 条带减弱, 这可以解释为自噬途径被激活后的降解所致(图 2d).

综合以上的结果分析, 雷公藤甲素促进 HeLa 细胞自噬的发生, 并且与药物处理呈现浓度和时间的依赖性关系.

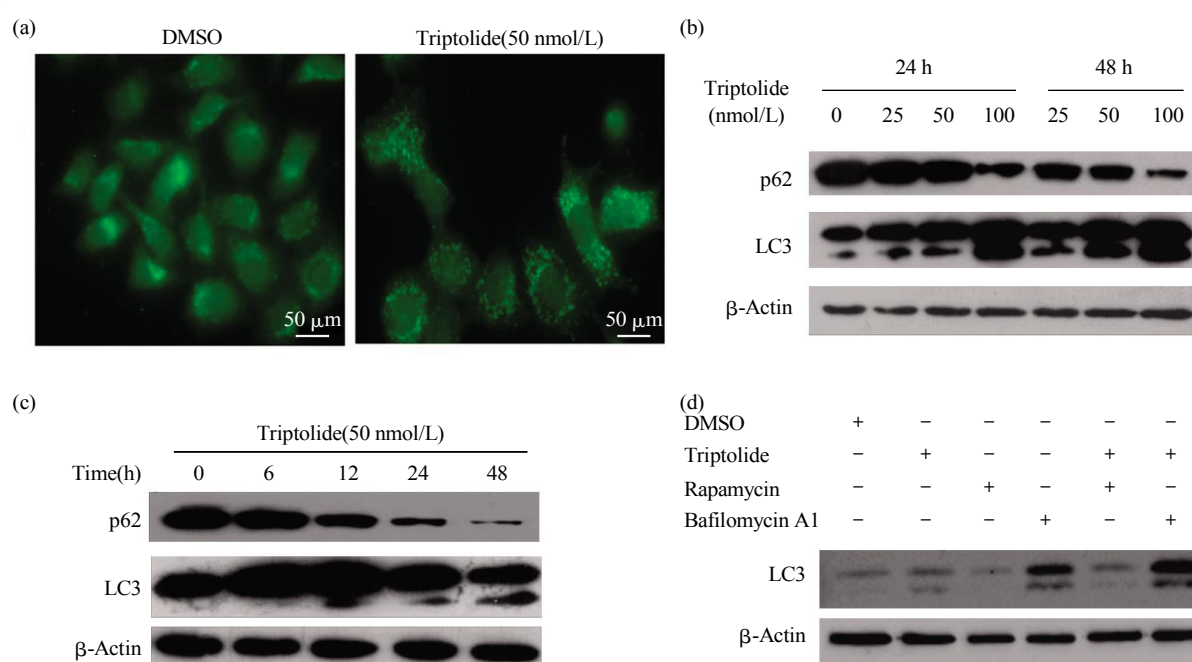


Fig. 2 Triptolide induces autophagy in HeLa cells

(a) The HeLa cells were treated with 50 nmol/L Triptolide for 24 h, and then Immuno-fluorescence of LC3 was observed by microscopy. (b) The HeLa cells were treated with different doses of Triptolide for 24 and 48 h, p62 and LC3 bands were analyzed. β-actin as control. (c) The HeLa cells were treated with 50 nmol/L Triptolide for different time, p62 and LC3 bands were analyzed. β-actin as control. (d) The HeLa cells were treated with 50 nmol/L Triptolide, 400 nmol/L Rapamycin, 100 nmol/L Bafilomycin A1 respectively or in combination for 24 h, LC3 bands were analyzed. β-Actin as control.

2.3 雷公藤甲素通过 p53 诱导 HeLa 细胞发生自噬

p53 蛋白与肿瘤发生有密切关系, 在 DNA 修复、细胞周期、细胞凋亡等过程中起关键作用, 在自噬与凋亡的交互作用(crosstalk)扮演重要角色. 实验中发现, 50 nmol/L 雷公藤甲素处理 HeLa 细胞 12 h 以上后, p53 蛋白条带随处理时间延长而明显增强(图 3a), 进一步通过细胞核及细胞质蛋白的分离后发现, 雷公藤甲素处理后细胞核与细胞质中的 p53 蛋白水平均明显升高(图 3b).

p53 通过转录激活作用促进凋亡蛋白的表达已经被研究者充分地证实, 而 p53 在自噬调控中则存在激活与抑制两个方面. 对 p53 蛋白调控的自噬相

关蛋白 DRAM 的分析发现, 50 nmol/L 雷公藤甲素处理 HeLa 细胞后, DRAM 蛋白条带随处理时间的延长表现出上升的趋势(图 3a), 这与雷公藤甲素诱导的 p53 变化基本一致. 这说明雷公藤甲素处理细胞后, 通过促进 p53 的转录激活继而上调 DRAM 促进自噬的发生.

然而, 细胞质定位的 p53 蛋白被认为对自噬起到负调控作用, 细胞质中的 p53 可以间接激活 mTor 的作用而抑制自噬发生^[8-9]. 为了进一步解释细胞质中 p53 蛋白水平升高与雷公藤甲素诱导的自噬激活的矛盾, 对雷公藤甲素处理细胞不同时间后的 mTor、mTor-p 的变化水平进行检测, 发现

50 nmol/L 雷公藤甲素处理 HeLa 细胞 12 h、24 h 后, 细胞中的 mTor、mTor-p 均明显下降, 与雷公藤甲素诱导的 p53 上调呈反相关, mTor 蛋白水平下降从而抑制自噬作用削弱, 这就解释了细胞质中高水平的 p53 并没有产生抑制自噬的结果。

以上结果说明, 雷公藤甲素能同时增加细胞核与细胞质中的 p53 蛋白水平, 可以通过上调 p53 依赖的转录而对自噬进行激活, 雷公藤甲素同时降低自噬抑制关键蛋白 mTor 的水平, 从而降低细胞质中 p53 蛋白对自噬的抑制作用, 最终导致自噬的激活。

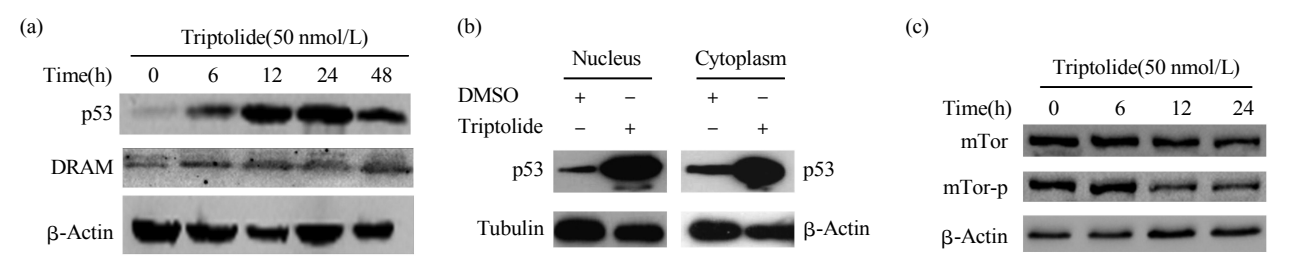


Fig. 3 Triptolide induces p53-dependent autophagy in HeLa cells
(a) The HeLa cells were treated with 50 nmol/L triptolide for different time, p53 and DRAM were analyzed, β -actin as control. (b) The HeLa cells were treated with 50 nmol/L triptolide for 24 h, nuclear and cytoplasmic p53 level were analyzed. Tubulin and β -actin were used as control respectively. (c) The HeLa cells were treated with 50 nmol/L triptolide for different time, mTor and mTor-p(ser2448) were analyzed. β -actin as control.

2.4 p53 依赖的转录抑制对雷公藤甲素诱导的自噬与凋亡的调控

雷公藤甲素诱导 HeLa 细胞产生的自噬及凋亡与 p53 转录活性密切相关, 因此, 通过 p53 依赖的转录抑制剂 Pifithrin- α ^[19]与雷公藤甲素协同作用, 探讨对自噬与凋亡的影响。如图 4a 所示, 与雷公藤甲素单独处理(泳道 2)比较, 雷公藤甲素与 Pifithrin- α 协同处理细胞后(泳道 4), 自噬标志分子 p62 有明显的累积, LC3- II 条带变弱, 而雷公藤甲素诱导的 p53 蛋白水平变化并未受到 Pifithrin- α 的影响, 说明当 p53 转录活性被抑制后, 雷公藤甲素

诱导的自噬过程也随之受到抑制。图 4b 凋亡检测表明, 相比于雷公藤甲素单独处理(泳道 2), 雷公藤甲素与 Pifithrin- α 协同处理细胞后(泳道 4), PARP 剪切条带和激活型 Caspase3 条带均变弱, Caspase3 条带增强, 这说明 p53 转录抑制剂 Pifithrin- α 能够削弱雷公藤甲素诱导的凋亡过程。

综合以上结果表明, 雷公藤甲素诱导的自噬与凋亡作用可以被 Pifithrin- α 部分抑制, 调控 p53 依赖的基因转录有助于理解雷公藤甲素诱导的自噬和凋亡的交互联系过程。

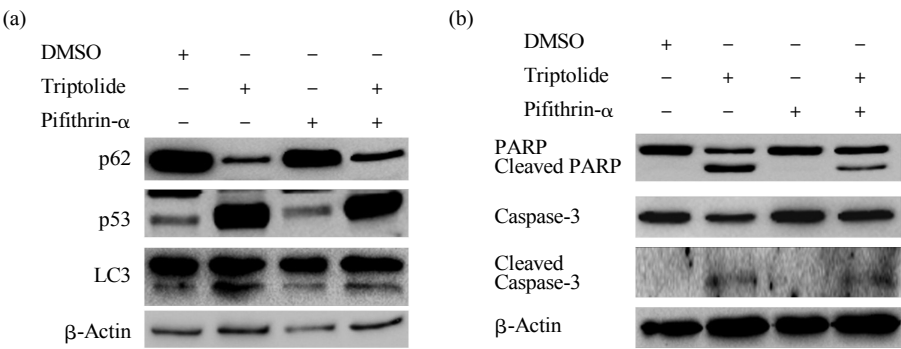


Fig. 4 Pifithrin- α (p53-dependent transcription inhibitor) inhibits Triptolide induced apoptosis and autophagy
(a) HeLa cells were treated with 50 nmol/L triptolide and 20 μ mol/L Pifithrin- α separately or in combination for 24 h, p62, LC3- II and p53 were analyzed. β -actin as control. (b) HeLa cells were treated with 50 nmol/L triptolide and 20 μ mol/L Pifithrin- α separately or in combination for 24 h, apoptosis markers were analyzed, β -actin as control.

2.5 雷公藤甲素与自噬抑制剂协同作用对 HeLa 细胞凋亡和增殖的影响

自噬对于肿瘤细胞的生长有双重的作用, 为了进一步理解雷公藤甲素所诱导的自噬与凋亡的相互联系, 将自噬抑制剂 3-Methyladenine (3-MA)、Chloroquine (CQ)、NH₄Cl 处理 HeLa 细胞, 检测其对凋亡的影响. 如图 5a 所示, 3-MA 处理细胞后出现较强的激活型 Caspase3 条带, 而 Chloroquine (CQ)、NH₄Cl 检测到较弱的激活型 Caspase3 条带, 三者处理后 p53 条带均有一定程度的增强, 这说明单独的自噬抑制剂处理细胞后可通过 p53 蛋白的累积对凋亡起促进作用. 当雷公藤甲素与自噬抑制剂协同处理后, 与雷公藤甲素单独处理相比较, 凋亡

有所增强, 尤其是 NH₄Cl 与雷公藤甲素的协同处理, 出现较强的激活型 Caspase3 条带(图 5a), 说明雷公藤甲素诱导的 p53 上调与自噬抑制剂导致的 p53 累积共同促进了凋亡活性的增加.

自噬抑制剂与雷公藤甲素协同作用对 HeLa 细胞增殖影响实验(图 5b)表明, 雷公藤甲素与自噬抑制剂分别和协同处理细胞 24 h 后, 三种自噬抑制剂中只有 3-MA 表现出明显的增殖抑制活性, 与雷公藤甲素单独处理比较, 当自噬抑制剂与雷公藤甲素协同作用后, 雷公藤甲素的抑制增殖活性显著地增强. 这与图 5a 中的凋亡检测结果相一致. 说明当自噬被抑制后, 雷公藤甲素的药物杀伤活性得到了极大的加强.

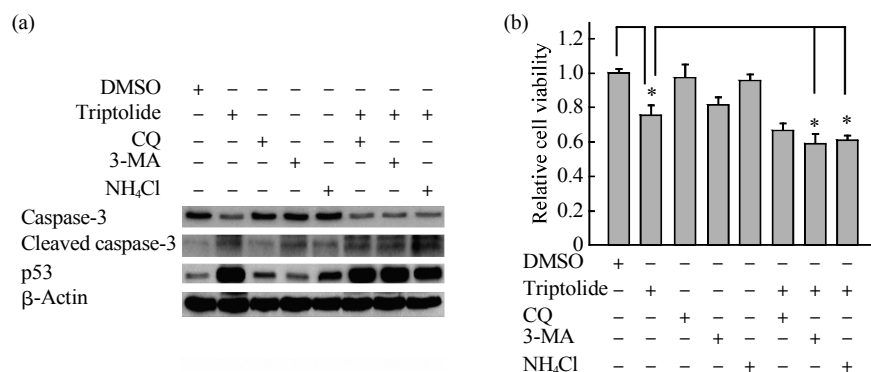


Fig. 5 Autophagy inhibitors and Triptolide treatment affect HeLa cells apoptosis and proliferation

(a) HeLa cells were treated with 50 nmol/L triptolide, 10 mmol/L 3-MA, 3 μ mol/L Chloroquine (CQ), 20 mmol/L NH₄Cl separately or in combination for 24 h, the apoptosis markers and p53 were analyzed. β -actin as control. (b) HeLa cells were treated with 50 nmol/L triptolide, 10 mmol/L 3-MA, 3 μ mol/L Chloroquine (CQ), 20 mmol/L NH₄Cl separately or in combination for 24 h, the cell relative viability was analyzed.

3 讨 论

传统中药成分中活性物质的研究越来越得到研究者的关注. 雷公藤甲素的转录抑制活性及促凋亡活性已经得到了明确的解释, 但雷公藤甲素调控肿瘤细胞自噬的报道目前还比较少. 本研究关注雷公藤甲素的抗肿瘤细胞增殖活性, 发现其通过 p53 调控通路促进 HeLa 凋亡与自噬的发生, 通过抑制 p53 依赖的转录, 可以一定程度抑制雷公藤甲素诱导的凋亡与自噬过程. 实验中发现, 雷公藤甲素可以同时提高细胞核与细胞质中的 p53 水平, 细胞核中 p53 水平的升高而导致的转录激活能够通过影响

DRAM 促进自噬的发生. 然而, 细胞质定位的 p53 蛋白被认为起到自噬抑制的作用, 这与雷公藤甲素诱导自噬的过程相互矛盾. 实验发现雷公藤甲素在上调 p53 高水平表达的同时, 能够显著抑制细胞中 mTor 的水平, 而 mTor 激活对自噬起抑制作用, 因此细胞质中定位的 p53 不能通过对 mTor 的激活而抑制自噬, 这就解释了雷公藤甲素对自噬的激活作用. 同时, p53 促进大量下游凋亡调控通路中蛋白质的表达, 导致了 Caspase3 蛋白前体被剪切加工为激活型 Caspase3, 对其底物 PARP 进行剪切, 最终导致了凋亡的发生. 图 6 总结了雷公藤甲素通过上调 p53 对 HeLa 细胞凋亡和自噬激活的调控途径.

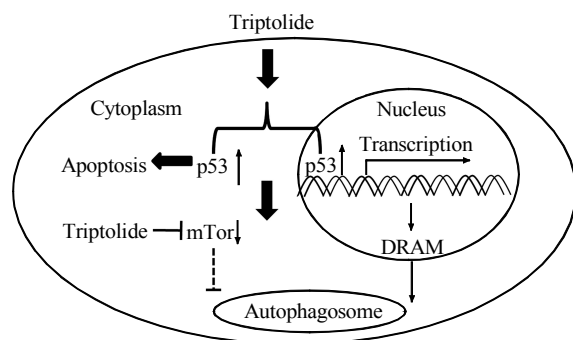


Fig. 6 Schematic diagram of the regulation of Triptolide induced p53-dependent autophagy and apoptosis crosstalk

Triptolide induces p53 accumulation in nucleus and cytoplasm, which activates apoptosis in HeLa cell. The nucleus located p53 induces autophagy through enhancing DRAM expression. On the contrary, the cytoplasm located p53 inhibits autophagy through indirect regulation of mTOR. Simultaneously, mTOR is also inhibited by triptolide and ultimately results in autophagy activation. Thus, triptolide induced autophagy and apoptosis crosstalk is in a p53-dependent manner.

p53 依赖的转录抑制剂 Pifithrin- α 可以部分抑制雷公藤甲素诱导的自噬和凋亡过程, 说明 p53 的转录活性对于雷公藤甲素促进自噬和凋亡的发生发挥重要作用。同时, 实验中还发现当 HeLa 细胞自噬通路被抑制之后, p53 蛋白的累积与自噬抑制剂的促凋亡活性相关, 说明自噬抑制剂可能通过上调 p53 蛋白而发挥促凋亡活性, 自噬抑制剂与雷公藤甲素协同作用导致凋亡和细胞增殖抑制增强。综上所述, 雷公藤甲素可以通过 p53 通路促进细胞凋亡和自噬的发生, 当自噬被抑制后, p53 一定程度累积, 雷公藤甲素的促凋亡活性显著增强。这暗示自噬阻断在发挥抗肿瘤药物杀伤作用中可能发挥重要作用。

参 考 文 献

- [1] Maiuri M C, Zalckvar E, Kimchi A, *et al.* Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007, **8**(9):741-752
- [2] Shen H M, Codogno P. Autophagic cell death: Loch Ness monster or endangered species?. *Autophagy*, 2011, **7**(5): 457-465
- [3] Liang J, Shao S H, Xu Z X, *et al.* The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27 (kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nature Cell Biology*, 2007, **9**(2): 218-224
- [4] Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2011, **27**: 107-132
- [5] Mariño G, López-Otín C. Autophagy: molecular mechanisms, physiological functions and relevance in human pathology. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2004, **61**(12): 1439-1454
- [6] Fridman J S, Lowe S W. Control of apoptosis by p53. *Oncogene*, 2003, **22**(56): 9030-9040
- [7] Crighton D, Wilkinson S, O'Prey J, *et al.* DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell*, 2006, **126**(1): 121-134
- [8] Feng Z. p53 regulation of the IGF-1/AKT/mTOR pathways and the endosomal compartment. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2010, **2**(2): a001057
- [9] Tasdemir E, Maiuri M C, Galluzzi L, *et al.* Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nature Cell Biology*, 2008, **10**(6): 676-687
- [10] Zhou G X, Ding X L, Huang J F, *et al.* Suppression of 5-lipoxygenase gene is involved in triptolide-induced apoptosis in pancreatic tumor cell lines. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, **1770**(7): 1021-1027
- [11] Yang S, Chen J, Guo Z, *et al.* Triptolide inhibits the growth and metastasis of solid tumors. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2003, **2**(1): 65-72
- [12] Westfall S D, Nilsson E E, Skinner M K. Role of triptolide as an adjunct chemotherapy for ovarian cancer. *Chemotherapy*, 2008, **54**(1): 67-76
- [13] Li J, Zhu W, Leng T, *et al.* Triptolide-induced cell cycle arrest and apoptosis in human renal cell carcinoma cells. *Oncology Reports*, 2011, **25**(4): 979-987
- [14] Lin J, Chen L Y, Lin Z X, *et al.* The effect of triptolide on apoptosis of glioblastoma multiforme (GBM) cells. *Journal of International Medical Research*, 2007, **35**(5): 637-643
- [15] Titov D V, Gilman B, He Q L, *et al.* XPB, a subunit of TFIIH, is a target of the natural product triptolide. *Nature Chemical Biology*, 2011, **7**(3): 182-188
- [16] Manzo S G, Zhou Z L, Wang Y Q, *et al.* Natural product triptolide mediates cancer cell death by triggering CDK7-dependent degradation of RNA polymerase II. *Cancer Research*, 2012, **72**(20): 5363-5373
- [17] Lorin S, Pierron G, Ryan K M, *et al.* Evidence for the interplay between JNK and p53-DRAM signaling pathways in the regulation of autophagy. *Autophagy*, 2010, **6**(1): 153-154
- [18] Pankiv S, Clausen T H, Lamark T, *et al.* p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, **282**(33): 24131-24145
- [19] Mendjargal A, Odkhuu E, Koide N, *et al.* Pifithrin- α , a pharmacological inhibitor of p53, downregulates lipopolysaccharide-induced nitric oxide production *via* impairment of the MyD88-independent pathway. *International Immunopharmacology*, 2013, **15**(4): 671-678

Triptolide Induces p53-Dependent Autophagy and Apoptosis in HeLa Cells*

ZHANG Bin^{1)**}, WANG Yun-Fei^{1)**}, ZHAO Fei¹⁾, LEI Ming^{1,2)***}, HUANG Wei-Wei^{1)***}

¹⁾ Department of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling 712100, China;

²⁾ Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract Autophagy and apoptosis are considered as two main kinds of programmed cell death. The crosstalk between autophagy and apoptosis is crucial for illustration of anti-tumor drug's effects. Triptolide, a diterpene compound extracted from *Tripterygium wilfordii* Hook F, attracts increasing attention from researchers worldwide for its broad anti-tumor spectrum. Triptolide could bind to XPB (a subunit of the transcription factor TF II H) and leads to RNA polymerase II-mediated transcription inhibition. Also, triptolide induces autophagy and apoptosis processes in cancer cells. Through regulating different kinds of related proteins, tumor repressor p53, plays key roles in the crosstalk between autophagy and apoptosis. Thus, in this study, the authors focused on triptolide induced p53-dependent autophagy and apoptosis processes in HeLa cells, and to demonstrate the regulation of crosstalk through p53-dependent transcription inhibitor and autophagy inhibitors treatment. Using CCK-8 assay and clonogenic assay, triptolide shows significant inhibition effect on HeLa cells. The apoptosis analysis by Western blot has shown that triptolide induces the cleavage of caspase3 and nuclear poly (ADP-ribose) polymerase (PARP). Immuno-fluorescence and Western blot assay have shown that triptolide also leads to LC3-II accumulation and p62 degradations. Collectively, triptolide induces autophagy and apoptosis in a time- and dose-dependent manner. Meanwhile, p53 is significantly up-regulated and the mammalian target of rapamycin (mTOR) is down-regulated with triptolide treatment, and ultimately results in activation of autophagy and apoptosis. Western blot assay have shown that triptolide-induced autophagy and apoptosis are partly inhibited by utilizing p53-dependent transcription inhibitor (Pifithrin- α). Furthermore, the combination treatment of autophagy inhibitors with triptolide enhances triptolide induced apoptosis, and significantly improves inhibition effect of triptolide in HeLa cells. Triptolide induces p53-dependent autophagy and apoptosis in HeLa cells. p53 functions as a key regulator in the triptolide induced autophagy and apoptosis crosstalk.

Key words triptolide, p53, autophagy, apoptosis

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0060

*This work was supported by grants from National Instrumentation Program(2012YQ030261) and The National Natural Science Foundation of China (31540002, 31571194).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author. Tel: 86-29-87080160

LEI Ming. E-mail: leiming70@hotmail.com

HUANG Wei-Wei. E-mail: whuang0210@163.com

Received: February 25, 2016 Accepted: April 21, 2016