

**Effect and Mechanisms of Ethanol Augments
Cucurbitacin B-induced Hepatotoxicity**

BY

Ding Qian



Institute of Chinese Medical Sciences

University of Macau

Effect and Mechanisms of Ethanol Augments Cucurbitacin B-induced
Hepatotoxicity

BY

Ding Qian

A thesis submitted in partial fulfillment of the
requirements for the degree of

Master of Science

Institute of Chinese Medical Sciences
University of Macau

2014

仁義禮知信

澳門大學

Approved by _____

Supervisor

Date _____

In presenting this thesis in partial fulfillment of the requirements for a Master's degree at the University of Macau, I agree that the Library and the Institute of Chinese Medical Sciences shall make its copies freely available for inspection. However, reproduction of this thesis for any purposes or by any means shall not be allowed without my supervisor's written permission. Authorization is sought by contacting the author at

Address: Institute of Chinese Medical Sciences, University of Macau, Av. Padre Tomas Pereira S.J., Taipa, Macau

Telephone: +853-83974873

Fax: +853-28841358

E-mail: xpchen@umac.mo



碩士學位論文

乙醇增強葫蘆素 B 肝毒性的作用与機制研究

研究生姓名: 丁 倩
導 師: 陳修平 助理教授
專 業: 中藥學
日 期: 2014 年 1 月



澳門大學中華醫藥研究

致謝

不知不覺,我在澳門大學攻讀碩士研究生生活即將結束。此刻在我心裡,只有滿滿的感恩。

首先感謝我的導師陳修平老師在我碩士期間言傳身教,以他紮實的專業知識和嚴謹的治學態度指引我完成學業。他的包容、支持以及鼓勵我將永遠銘記。

感謝澳門大學王一濤教授、李紹平教授、李銘源教授、許貝文博士、燕茹博士、鄭穎博士、張慶文博士和陸金健博士等在學業上給予我的支持和幫助。感謝實驗室技術老師Leon、Sandy、Wing、和Joanna等對我實驗的支持和幫助,感謝中華醫藥研究院所有老師!

感謝我的師姐鮑嬌琳、郭佳杰、趙文文,師兄徐增濤、吳國勝、張學農、李文學、高紅偉、張哲睿等對我課題的指導和生活上的幫助。感謝我的同學譚玉蓮、劉戈、周忠焱、楊瀟、胡楊洋等一路走來對我的鼓勵和陪伴;感謝師弟郝文慧,師妹任國文、王璐等的支持和幫助。

感謝澳門特別行政區科學技術發展基金會和澳門大學研究基金會提供研究經費。

特別感謝遵義醫學院石京山教授實驗室李文平同學協助完成部份整體動物實驗;浙江大學朱虹教授等協助完成自噬電鏡檢測;福建省人民醫院晉龍老師協助病理閱片。

最後,感謝我的家人對我默默的支持,沒有他們就沒有我的今天和明天。

摘要

乙醇增強葫蘆素 B 肝毒性的作用与機制研究

葫蘆素類是中藥瓜蒂中的主要活性成份,是一類天然的四環三萜類化合物。據報導,葫蘆素類具有一定的肝臟保護作用。最新研究顯示,葫蘆素類可同時誘導細胞自噬與凋亡。乙醇是全世界廣泛飲用的酒類主要成份,其誘導的酒精性肝損傷發生率呈明顯上升趨勢,嚴重威脅人類健康。酒精誘導的肝損傷主要通過誘導氧化應激、誘導炎癥反應、誘導細胞凋亡等。最近研究發現乙醇可有效地調節自噬。我們預實驗發現葫蘆素 B 有較強的肝細胞毒性,乙醇能明顯增強其毒性。故對乙醇增強葫蘆素 B 肝毒性作用與機制在體內外進行了研究。MTT 結果顯示葫蘆素 B 可劑量依賴降低正常肝細胞 LO2 及肝癌細胞 HepG2 的存活率,乙醇聯用可加強其毒性。但在 MCF-7 乳腺癌細胞以及 A549 肺癌細胞則無此增強作用,提示該作用可能具有肝細胞特异性。乙醇對與葫蘆素 B 結構類似葫蘆素 D 和葫蘆素 E 在 LO2 細胞上也顯示出毒性增強作用,提示化學結構也可能是重要因素。螢光探針 JC-1 和 DCFH₂-DA 研究發現,葫蘆素 B 可顯著降低 LO2 細胞線粒體膜電位,並增加細胞內活性氧(ROS)生成。乙醇可增強葫蘆素 B 導致細胞膜電位變化但不影響細胞內 ROS 生成。葫蘆素 B 誘導 LO2 細胞週期阻滯與 G2/M 期,乙醇對此無明顯影響。通過 Hoechst 33342,Annexin V 染色,以及凋亡相關 Bcl-2、Bax、Caspase 家族、PARP 蛋白的表達顯示葫蘆素 B 可誘導 LO2 細胞凋亡,這些變化可被乙醇增強。乙醇增強細胞的死亡作用可被 Caspase 抑制劑逆轉,表明增強的細胞死亡可能是通過細胞凋亡。此外,通過 MDC 染色,自噬相關蛋白表達,以及電鏡、免疫螢光等實驗證實了葫蘆素 B 可誘導 LO2 細胞自噬,乙醇可抑制葫蘆素 B 誘導的自噬。其中,AKT/mTOR 信號通路可能參與了乙醇抑制葫蘆素 B 誘導的細胞自噬。在 BALB/c 小鼠的整體動物實驗顯示,葫蘆素 B 具有較強的肝毒性,乙醇共同作用可顯著增強葫蘆素 B 引起的小鼠肝毒性,更降低了小鼠的存活率。

綜上所述,本研究顯示葫蘆素 B 具有較強的肝毒性,乙醇可通過抑制自噬增加

凋亡作用而增強其肝毒性。

關鍵詞:自噬;凋亡;葫蘆素 B;乙醇;肝毒性。



Abstract

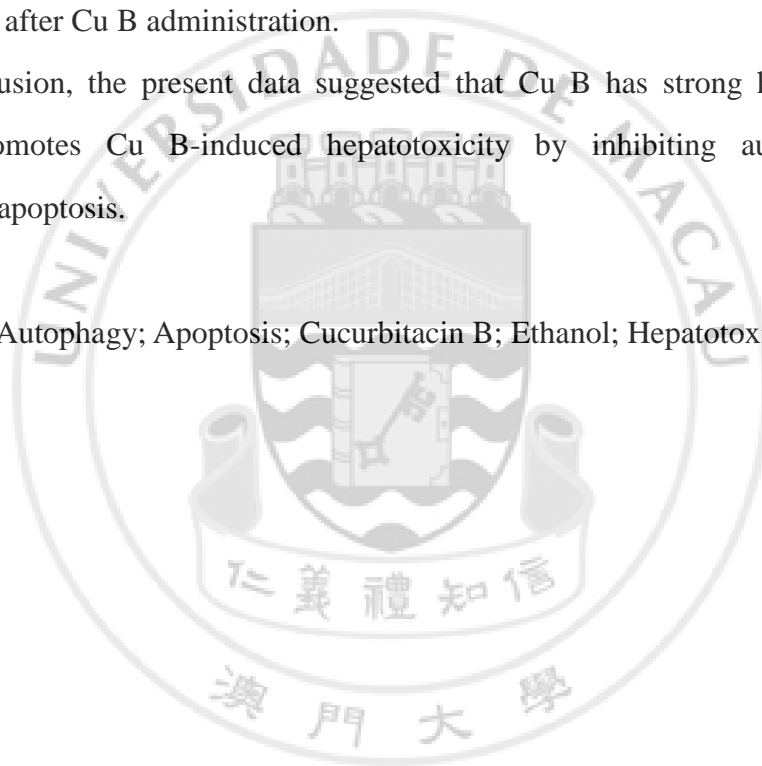
Effect and Mechanisms of Ethanol Augments Cucurbitacin B-induced Hepatotoxicity

Cucurbitacin is the main active constituent of Guadi (a traditional Chinese medicine), a natural tetracyclic triterpenoid, has reported to have hepatoprotective effects. Recent studies demonstrate Cucurbitacin has potent cytotoxic activities mediated by both apoptosis and autophagy. Ethanol, the major component of alcohol beverage, the alcoholic liver damage induced by Ethanol shows obvious rising trend, serious threat to human health. Ethanol induced liver injury is mainly induced by induced oxidative stress, inflammatory reaction, induction of apoptosis, etc. Recent report has shown Ethanol to be an effective autophagy regulator. Our Pre-Experiments found that Cu B has strong hepatocyte toxicity, which could be enhanced by Ethanol co-treatment. Here, the effect of Ethanol on Cu B induced hepatotoxicity was investigated both in vitro and in vivo. Cu B dose-dependently decreased the cell viability of LO2 (normal hepatocytes) and HepG2 (hepatocellular carcinoma cells), which could be enhanced by Ethanol co-treatment, This phenomenon was not observed in MCF-7, A549 cells suggesting it might be liver specific. Ethanol also demonstrated similar enhanced toxic effect on Cu D and Cu E in LO2 cells suggesting that chemical structures might be of importance. JC-1 and DCFH₂-DA staining found that Ethanol enhanced Cu B-induced mitochondria membrane potential ($\Delta\Psi$) depolarization without affecting intracellular reactive oxygen species (ROS) formation. Ethanol has no effects on Cu B induced cell cycle arrest. Cu B-induced apoptosis was augmented by Ethanol as determined by Hoechst 33342 staining, Annexin V staining, and apoptotic-related proteins Bcl-2, Bax, Caspase expressions.

Ethanol enhanced cell death was reversed by caspase inhibitor suggesting that the augmented cell death was apoptotic death. Furthermore, Ethanol inhibited Cu B-induced LO2 autophagy as determined by MDC staining, autophagic protein expression, transmission electron microscopy and immunofluorescence. The AKT/mTOR signaling pathway might be involved in the inhibition effect of Ethanol on Cu B induced autophagy. The animal experiment clearly demonstrated that Cu B is a potent hepatotoxic agent. Ethanol co-treatment dramatically increased Cu B-induced hepatotoxicity in BALB/c mice. In addition, Ethanol significantly decreased mice survival rate after Cu B administration.

In conclusion, the present data suggested that Cu B has strong hepatotoxicity, Ethanol promotes Cu B-induced hepatotoxicity by inhibiting autophagy and augmenting apoptosis.

Keywords: Autophagy; Apoptosis; Cucurbitacin B; Ethanol; Hepatotoxicity



目 錄

致謝	I
摘要	II
Abstract	IV
目 錄	VI
圖表目錄.....	VIII
縮寫詞表.....	IX
第一章 引言.....	1
1. 葫蘆素藥理作用.....	1
1.1 葫蘆素 B 抑制腫瘤細胞增殖.....	2
1.2 葫蘆素誘導腫瘤細胞凋亡及週期阻滯.....	2
1.3 葫蘆素對細胞骨架的影響.....	2
1.4 葫蘆素抑制血管新生.....	3
1.5 葫蘆素抑制侵襲和轉移.....	3
1.6 葫蘆素誘導細胞自噬.....	3
2 自噬.....	4
2.1 自噬概述.....	4
2.2 自噬相關信號通路.....	4
2.3 自噬的作用.....	5
2.4 自噬與凋亡.....	5
3 乙醇的肝毒性與自噬.....	6
4 研究目的.....	7
第二章 乙醇增強葫蘆素 B 肝毒性作用與機制研究.....	8
1. 實驗材料與方法.....	8
1.1. 實驗材料.....	8
1.2 細胞培養.....	8
1.3 MTT 檢測.....	9
1.4 LDH 分析.....	9
1.5 ALT 分析.....	10
1.6 Hoechst 33342 染色.....	10
1.7 JC-1 染色.....	10
1.8 ROS 檢測.....	11
1.9 Western Blot.....	12
1.10 免疫螢光.....	12
1.11 流式細胞週期分析.....	13
1.12 Annexin V/PI 檢測.....	13
1.13 MDC 染色.....	14

1.14	電鏡檢測.....	14
1.15	動物實驗.....	14
1.16	血漿 ALT, AST 和肝臟 MDA 含量檢測.....	14
1.17	H&E 染色.....	15
1.18	統計方法.....	15
2	實驗結果.....	16
2.1	Cu B、乙醇對 LO2 細胞增殖的影響.....	16
2.2	乙醇與葫蘆素共同作用對 LO2 細胞增殖的影響.....	16
2.3	乙醇與 Cu B 共同作用對腫瘤細胞增殖的影響.....	17
2.4	Cu B 和乙醇共同作用加劇 LO2 細胞損傷.....	18
2.5	乙醇加劇了 Cu B 引起的 LO2 細胞線粒體膜電位變化.....	19
2.6	乙醇加劇了 Cu B 引起的 LO2 細胞 DNA 片段化.....	20
2.7	乙醇增強了 Cu B 誘導的 LO2 細胞凋亡.....	21
2.8	乙醇對 Cu B 誘導的 LO2 細胞凋亡相關蛋白表達的影響.....	22
2.9	Caspase 抑制劑可逆轉乙醇對葫蘆素 B 細胞毒性增強作用.....	23
2.10	乙醇對 Cu B 誘導的 ROS 產生無影響.....	23
2.11	乙醇對 Cu B 誘導的 LO2 細胞 G2/M 期阻滯無影響.....	24
2.12	乙醇抑制了 Cu B 誘導的 LO2 細胞自噬泡的產生.....	25
2.13	乙醇降低了 Cu B 誘導的 LO2 細胞 LC3 蛋白聚集.....	27
2.14	乙醇、Cu B 誘導 LO2 細胞自噬相關蛋白表達.....	28
2.15	AKT 和 mTOR 信號通路參與了乙醇抑制 Cu B 誘導的細胞自噬.....	29
2.16	乙醇加劇了 Cu B 誘導的肝細胞毒性.....	29
2.17	體內實驗 WB 結果證實乙醇可以抑制 Cu B 誘導的細胞自噬同時增強 Cu B 誘導的細胞凋亡.....	31
第三章	總結與討論.....	32
	參考文獻.....	36
	Achievements.....	42

圖表目錄

圖 1 葫蘆素 B,D,E 化學結構式.....	1
圖 2 Cu B 以及乙醇對 LO2 細胞增殖抑制和細胞毒作用	16
圖 3 葫蘆素與乙醇共同作用對 LO2 細胞毒作用.....	17
圖 4 Cu B 與乙醇共同作用對三株腫瘤細胞毒作用.....	18
圖 5 Cu B 與乙醇共同作用對 LO2 細胞 LDH、ALT 釋放水平的影響.....	19
圖 6 JC-1 染色 LO2 細胞線粒體膜電位變化.....	20
圖 7 LO2 細胞 Hochest33342 染色	21
圖 8 乙醇與 Cu B 共同作用加劇了 LO2 細胞凋亡	22
圖 9 乙醇、Cu B 對 LO2 相關蛋白的表達的影響	23
圖 10 Caspase 抑製劑作用.....	23
圖 11 給藥 24h 后 LO2 細胞 ROS 水平.....	24
圖 12 給藥 24h 后 LO2 細胞週期分佈	25
圖 13 LO2 細胞自噬泡 MDC 染色	26
圖 14 電子顯微鏡檢測自噬泡.....	27
圖 15 LO2 細胞 LC3 蛋白免疫螢光	28
圖 16 LO2 細胞自噬相關蛋白表達	28
圖 17 LO2 細胞自噬相關信號通路蛋白表達.....	29
圖 18 血漿 ALT,AST 、肝臟 MDA 含量以及小鼠存活率	30
圖 19 小鼠肝臟以及肝細胞 H&E 染色	31
圖 20 小鼠肝組織凋亡、自噬相關蛋白表達.....	31
圖 21 信號通路圖.....	35

縮寫詞表

ATCC	American tissue culture collection
Bif-1	Bax-interacting factor-1
BSA	Bovine serum albumin
Cu B	Cucurbitacins B
Cu D	Cucurbitacins D
Cu E	Cucurbitacins E
DMSO	Dimethyl sulfoxide
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
EtOH	Ethanol
FBS	Fetal bovine serum
IC ₅₀	The half maximal inhibitory concentration
JAK	Janus kinase
JNK	c-Jun NH ₂ -terminal kinases
LDH	Lactate dehydrogenase
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MDC	Monodansylcadaverine
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide
PBS	Phosphate buffered saline
PCD	Programmed cell death

PFA	Paraformaldehyde
PI	Propidium iodide
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride
PS	Penicillin-streptomycin
PVDF	Polyvinylidene fluoride
ROS	Reactive oxygen species
SD	Standard deviation
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TBST	Tris-buffered saline tween
UVRAG	ultraviolet irradiation resistance-associated gene
3-MA	3-Methyladenine

