

[文章编号] 1000-4718(2009)10-2017-05

## 南蛇藤素和扁蒴藤素显著下调 HLA-B\*2705 启动子的活性\*

赵丽珂<sup>1,2</sup>, 古洁若<sup>1△</sup>, 余得恩<sup>1,3</sup>

(1 中山大学附属第三医院风湿科, 广东 广州 510630; 2 卫生部北京医院风湿免疫科, 北京 100730;

3 加州大学洛杉矶分校风湿免疫科, CA 90024, USA)

**[摘要]** 目的: 利用高通量药物筛选方式, 为寻找潜在的脊柱关节炎 (SpA) 新的治疗药物提供理论依据。方法: 选取 12 264 小分子化合物分别使用 293T-HLA-B27 和 HeLa-HLA-B27 稳定细胞株, 观察对 HLA-B\*2705 启动子有调节作用的化合物, 筛选能够下调 HLA-B\*2705 启动子活性的阳性化合物: 启动子活性 >150% 为激动剂, 启动子活性 <60% 为抑制剂。并且对进一步筛选出的抑制剂进行细胞毒性试验及半数抑制浓度/半数效应浓度 (IC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>) 检测, 筛选出具有较好剂量-效应的阳性化合物。结果: (1) 使用 293T-HLA-B27 细胞第 1 次筛选出 624 种阳性化合物, 阳性率为 5.1%; (2) 使用 HeLa-HLA-B27 细胞株对上述 624 种化合物进行再次筛选, 有 70 种化合物再次显示出对 B\*2705 启动子活性的增强或者抑制作用; (3) 进行 EC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub> 检测的 40 种化合物中, 6 种化合物为抑制剂, 表现出较好的剂量-效应曲线, 其中南蛇藤素和扁蒴藤素均为雷公藤类衍生物。结论: 南蛇藤素和扁蒴藤素可下调 HLA-B27 表达, 提示在今后针对 HLA-B\*2705 相关的 SpA 患者治疗中, 它们可能是值得研究的潜在有效化合物。

[关键词] HLA-B\*2705 启动子; 雷公藤属; 脊柱关节炎

[中图分类号] R593.23

[文献标识码] A

## Celastrin and pristimerin derived from Leigongteng inhibit promoter activity of HLA-B\*2705 gene

ZHAO Li-ke<sup>1,2</sup>, GU Jie-ruo<sup>1</sup>, YU David<sup>1,3</sup>

(1 Department of Rheumatology, The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China;

2 Department of Rheumatology Beijing Hospital, Beijing 100730, China; 3 Department of Rheumatology, University of California at Los Angeles, CA 90024, USA. E-mail: gujieruo@163.com)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To screen the effective chemicals, which can suppress the promoter activity of the HLA-B\*2705 gene as potential therapeutic agents. **METHODS:** The HeLa-HLA-B27, 293T-HLA-B27 stable transfectants were used to monitor the effect of 12 264 chemicals through high throughput screening (HTS). Chemicals which regulates HLA-B\*2705 promoter activity more than 150% or less than 60% were picked out for the further IC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub> and cell viability detection. **RESULTS:** (1) The primary screening used by 293T-HLA-B27 stable transfectant yielded about 5.1% hits which either suppressed (556 chemicals) or enhanced (68 chemicals) the HLA-B\*2705 promoter activity. (2) A reconfirmation screening was carried out with these 624 of the candidates using transfected HeLa-HLA-B27 cells. Seventy hits were confirmed. (3) Based on the bioinformatics of those positive hits, 40 chemicals were selected for in-depth analysis by dose-response experiment and IC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub> detection. Six suppressors showed potential pharmacological activities. Interestingly, two suppressors (celastrin and pristimerin) are derived from Leigongteng, a herbal medicine already used for several decades for treatment of immune regulatory and inflammatory diseases. Four active chemicals were computer designed with no relevance to the above structures. **CONCLUSION:** Chinese traditional herb Nansheteng and Leigongteng might be the potential drugs for HLA-B27 positive patients. These results provide new direction for research in both the therapeutics and the pathogenesis of spondyloarthritis.

[KEY WORDS] HLA-B\*2705 promoter; *Tripterygium*; Spondyloarthritis

[收稿日期] 2008-11-14

[修回日期] 2009-03-16

\* [基金项目] 国家自然科学基金面上资助项目 (No. 30571735); 国家自然科学基金国家杰出青年科学基金资助项目 (No. 30325019); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金资助项目 (No. 20060558046); 广东省科技项目资助 (No. 2005A30801005)

△通讯作者 E-mail: gujieruo@163.com

临床研究发现脊椎关节炎 (spondyloarthritis, SpA) 患者 HLA - B27 阳性率明显增高, 其中, 约 90% - 95% 以上的强直性脊柱炎 (ankylosing spondylitis, AS) 患者 HLA - B27 阳性, 60% - 80% 的反应性关节炎 (reactive arthritis, ReA) 和 50% 伴脊柱关节受累的银屑病或肠病相关的关节炎患者为 HLA - B27 阳性<sup>[1]</sup>。虽然目前对 HLA - B27 在 SpA 发病机制中作用尚不清楚, 但大量的遗传学连锁关连研究表明 HLA - B27 可能为其中一个主要的致病易感基因。多个地区和国家的许多有关 B27 亚型与 SpA 相关性的研究<sup>[3,4]</sup> 提示, HLA - B\*2705 的高表达水平与 SpA 有密切相关。本研究以 HLA - B\*2705 为靶点, 运用国际先进的高通量药物筛选技术和先进的筛选设备, 以稳定转染 HLA - B\*2705 启动子荧光素酶载体的 HeLa 细胞株和 293T 细胞株为基础, 筛查小分子化合物对 HLA - B27 表达的影响, 目的是发现能够下调 HLA - B27 基因表达的新的的小分子化合物, 从而为 SpA 的治疗提供新的靶药物研究方向。

## 材 料 和 方 法

### 1 细胞株培养

表达 HLA - B\*2705 启动子的稳定转染细胞系 HeLa - HLA - B27 细胞、293T - HLA - B27 细胞均来自本实验室<sup>[4]</sup>。细胞株培养于含 10% 胎牛血清、200 mg/L 潮霉素的 EMEM 培养基。EMEM 培养基和胎牛血清均购自 Invitrogen。潮霉素购自 Sigma。所有细胞在 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、95% 湿度的培养箱中培养。

### 2 HTS 药物筛选模型稳定性考察

本研究中建立的细胞筛选模型适用于高通量筛选, 其稳定性由 Z' 因子考察。把阳性克隆细胞接种于 384 孔板 (4 000 cells/well, 50 μL 培养液/孔) 过夜, 将 TNF - α (20 μg/L) 加入到设置的 48 个阳性样品孔中, 阴性对照孔设置 48 个细胞对照孔。诱导 24 h 后, 裂解细胞使用微孔板荧光发光计检测 Luc 荧光值。TNF - α 购自 eBioscience。

$Z'$  因子 =  $1 - [3 \times \text{阳性样品孔 Luc 值的标准差 (s)} + 3 \times \text{对照孔 Luc 值的标准差 (s)}] / (\text{阳性样品孔 Luc 平均值} - \text{对照孔 Luc 平均值})$ 。

信号本底比 (S/B) = 阳性样品孔 Luc 平均值 / 对照孔 Luc 平均值。

信噪比 (S/N) = (阳性样品孔 Luc 平均值 - 对照孔 Luc 平均值) / 对照孔 Luc 值的标准 (s)。

### 3 使用 293T - HLA - B27 稳定细胞株对化合物库第 1 次筛选

应用基于 Luc 报告基因细胞系统模型对 UCLA

MSSR 实验室样品库中的 12 264 种小分子化合物库进行筛选, 化合物包括: 204 种生物活性的脂质, 72 种离子通道, 84 种酶抑制剂, 84 种磷酸酶抑制剂和激酶抑制剂, 1 120 种 FDA 批准的药物, 2 000 种其它的具有生物活性的药物和 8 000 种未知功能的化合物。将稳定转染细胞株 293T - HLA - B27 细胞接种于 384 孔板中 (4 000 cells/well, 50 μL 培养液/孔), 待贴壁良好后用机械手加入待筛化合物 0.5 μL (终浓度 10 μmol/L), 每板均加入 DMSO (R&D) 作为阴性对照、TNF - α 作为阳性对照 (根据第 2 部分的结果选取)。加入化合物 24 h 后, 使用 Britelite Reporter Gene Assay system (Perkin Elmer) 分析。将化合物上调/下调 HLA - B\*2705 基因启动子转录的荧光酶相对活性定义为:  $(1 - \text{荧光值样品} / \text{荧光值 DMSO}) \times 100\%$ 。样品的荧光酶相对活性大于 150% 为激动剂, 荧光酶相对活性 < 60% 为抑制剂。

### 4 使用 HeLa - HLA - B27 稳定细胞株对化合物库第 2 次筛选

将第 1 次筛选出的阳性化合物 (相对于对照组 Luc 值 > 150%, 或者 Luc 值 < 60%), 使用 HeLa - HLA - B27 稳定细胞株对这些化合物进行第 2 次筛选以排除假阳性。将 HeLa - HLA - B27 细胞接种于 384 孔板中 (4 000 cells/well, 50 μL 培养液/孔), 待贴壁良好后加入阳性化合物 (10 μmol/L)、TNF - α (20 μg/L) / IFN - β (1 × 10<sup>6</sup> U/L), 每板均加入 DMSO 作为阴性对照、TNF - α 作为阳性对照。加入化合物 24 h 后, 使用 Britelite Reporter Gene Assay system 分析。TNF - α 购自 eBioscience, IFN - β 均购自 Cell Science。并使用 ATPlite Assay (Perkin Elmer) 检测阳性化合物对细胞增殖功能的影响。

### 5 半数效应浓度/半数抑制浓度 (EC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>) 检测

将用 HeLa - HLA - B27 细胞第 2 次筛选出的阳性化合物成倍稀释 12 次, 在 384 孔反应板中每孔中加入 DMSO 10 μL。第 1 孔加储存浓度的化合物 10 μL, 混匀后吸出 10 μL 加入第 2 孔。如此反复倍比稀释至第 10 孔, 从第 10 孔吸出 10 μL 弃掉。第 11 孔为空白对照。阳性化合物浓度梯度 0.1 μmol/L - 50 μmol/L。将 HeLa - HLA - B27 细胞接种于 384 孔板中 (4 000 cells/well, 50 μL 培养液/孔), 待贴壁良好后加入上述稀释后的阳性化合物, 每板均加入 DMSO 作为阴性对照、TNF - α 作为阳性对照。加入化合物 24 h 后, 使用 Britelite Reporter Gene Assay system 试剂检测发光值。

### 6 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件。选择 Student *t* 检验

进行样品或阳性药组与对照组之间差异显著性即各组间算术均数的差异性检验。使用 GraphPad Prism 5.0 计算  $IC_{50}/EC_{50}$  和 95% 置信区间。

## 结 果

### 1 模型稳定性考察

根据筛选出的阳性克隆细胞进行的 24 次试验的结果计算的信噪比(S/N)、信号本底比(S/B)及 Z' 因子值分别为 659.4、5.5、0.88, 说明此模型具有很好的稳定性。

### 2 使用 293T-HLA-B27 稳定细胞株对化合物库第 1 次筛选结果

使用 293T-HLA-B27 稳定细胞株对 12 264 种化合物进行第 1 次筛选, 结果显示 624 种化合物能够增强或者抑制 HLA-B\*2705 启动子活性(相对于对照组 Luc 值 > 150%, 或者 Luc 值 < 60%), 其中抑制剂 556 种(4.5%)。第 1 次化合物筛选的阳性率为 5.1%, 见表 1。

### 3 使用 HeLa-HLA-B27 稳定细胞株对初筛化合物第 2 次筛选

使用 HeLa-HLA-B27 稳定细胞株对上述 624 种化合物进行再次筛选, 结果显示: 在单纯 HeLa-

B27 组, 70 种化合物再次显示出对 HLA-B\*2705 启动子活性的显著调节作用(相对于对照组 Luc 值 > 150%, 或者 Luc 值 < 60%), 其中抑制剂 34 种; 在使用 TNF- $\alpha$ /IFN- $\beta$  刺激的 HeLa-B27 组, 778 种化合物(激动剂 20 种, 抑制剂 58 种)可以上调或者下调 HLA-B\*2705 启动子的活性, 见表 2。共计 130 种化合物对 HLA-B\*2705 启动子具有调节作用, 其中 32 种化合物可以同时增强或者抑制 2 组 HLA-B\*2705 启动子的活性。我们选取了 40 种感兴趣的化合物进行  $EC_{50}/IC_{50}$  检测。

表 1 化合物用 293T-HLA-B27 稳定细胞株调节 HLA-B\*2705 启动子活性结果

Tab 1 Results of first chemical screening by using 293T-HLA-B27 stable cells

Chemical library	No. chemicals	Hits (%)	Suppressors (%)
Biomol libraries	504	24	23
Microcourse spectrum collection	2 000	103	93
FDA approved drug library	1 120	159	122
Druggable compound set	8 640	338	318
Total	12 264	624(5.1%)	556(4.5%)

表 2 使用 HeLa-HLA-B27 稳定转染细胞株对化合物库第 2 次筛选结果

Tab 2 Results of secondary chemical screening by using HeLa-HLA-B27 stable cells

Chemical library	No. chemicals	HLA-B27		HLA-B27/TNF $\alpha$ + IFN $\beta$	
		Hits (%)	Suppressors	Hits (%)	Suppressors
Biomol libraries	24	3(0.5%)	3	8(1.3%)	7
Microcourse spectrum collection	103	36(5.8%)	23	35(5.6%)	28
FDA approved drug library	159	10(1.6%)	5	22(3.5%)	19
Druggable compound set	338	21(3.4%)	3	13(2.1%)	4
Total	624	70(11.2%)	34	78(12.5%)	58

### 4 阳性化合物的 $EC_{50}/IC_{50}$

在进行  $EC_{50}/IC_{50}$  试验的 40 种化合物中, 6 种抑制剂化合物有较好的剂量-反应效应曲线, 同时细

胞增殖功能试验显示细胞活性在 85% - 100%。其中有 3 种化合物具有已知的生物学活性, 见表 3, 另外 3 种为电脑设计的未知功能的化合物。

表 3 6 种具有较好的剂量-反应效应曲线的抑制剂列表

Tab 3 List of six suppressors with good dose-response curves

Suppressors	$IC_{50}$ ( $\mu$ mol/L)	95% CI	R <sup>2</sup>	Max inhibition (%)
Celastrol	2.49	0.7781 to 4.198	0.94	94
Pristimerin	3.25	2.958 to 3.547	1.00	93
Cantharidic acid	3.73	2.597 to 4.858	0.98	70
Unknown(TAR-16117)	4.03	3.391 to 4.673	1.00	82
Unknown(TAR-15J19)	0.88	0.6808 to 1.084	0.99	95
Unknown(TAR-19F12)	5.94	4.707 to 7.178	1.00	84

### 5 3种已知的生物学活性化合物化学结构(图1)

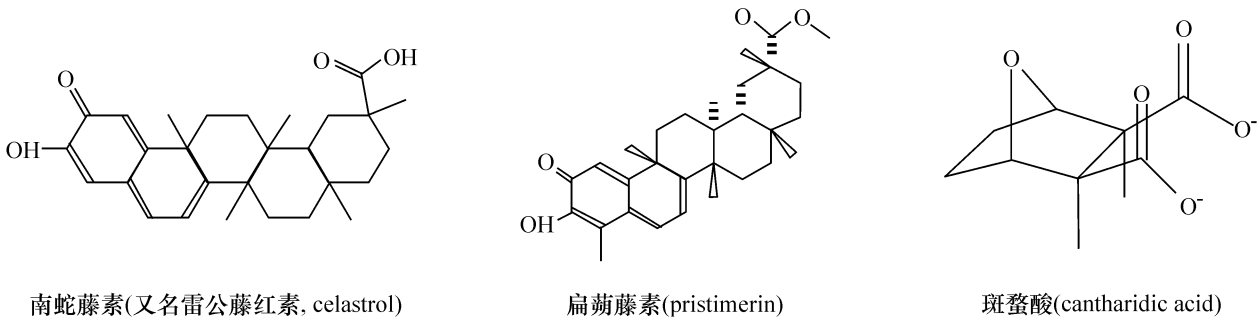


Fig 1 Chemical structures of three suppressors.

图1 3种抑制剂的化学结构

### 6 6种抑制剂的剂量-反应效应曲线(图2)

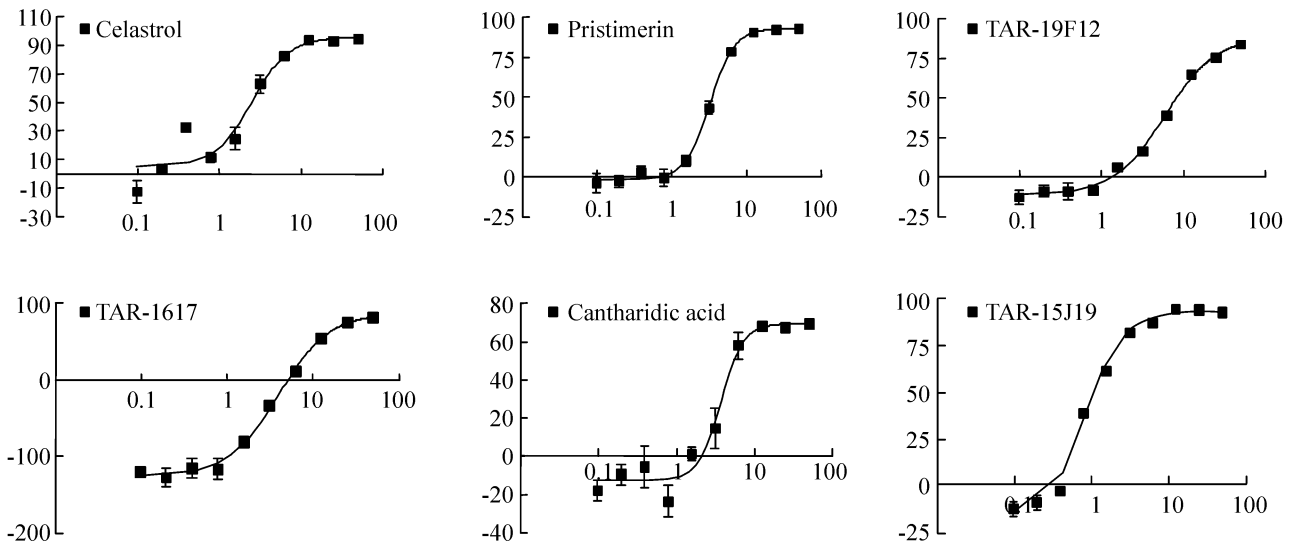


Fig 2 Dose - response curves of six suppressors [ Y axis: relative activity (%). X axis: log (concentration) ].

图2 6种抑制剂的剂量-反应效应曲线

## 讨 论

HTS技术与传统的药物筛选方法相比有以下几个优点:反应体积小、自动化、灵敏快速检测、高度特异性。随着对HTS研究的不断深入,随着对筛选模型的评价标准、新的药物作用靶点的发现以及筛选模型的新颖性和实用性的统一,HTS技术将在未来的药物研究中发挥越来越重要的作用。

我们利用该系统筛选了12 264种小分子化合物,得到的14种能上调/下调HLA - B\* 2705基因启动子活性的化合物,其中抑制剂有6种,已知功能的有3种,它们是分别是南蛇藤素(又名雷公藤红素, celastrol)、扁蒴藤素( pristimerin)、斑蝥酸( cantharidic acid)。另外3种为电脑设计的未知功能的化合物。出乎意料的是抑制剂中雷公藤红素和扁蒴

藤素均是雷公藤类衍生物,可从南蛇藤中共分离到,它们具有抗炎镇痛、抗肿瘤、抗菌、抗病毒、抗生育等广泛的药理活性<sup>[5]</sup>。体外实验中发现扁蒴藤素抑制鼠巨噬细胞表达<sup>[6]</sup>,其结构类似物南蛇藤素在体外有抗脂质过氧化作用<sup>[7]</sup>。此外,Chang等<sup>[8]</sup>通过筛选发现南蛇藤素和扁蒴藤素作用于人类的非小细胞肺癌(A549)、乳腺癌(MCF - 7)、结肠癌(HCT - 8)、鼻咽癌及其耐药株(KB、KB - VIN)、神经胶质瘤(U - 87 - MG)、前列腺癌(PC - 3)、卵巢癌(1A9、PTX10)等细胞株时,具有显著的细胞毒活性(ED<sub>50</sub>为0.076 - 0.340 mg/L)。Ngassapa等<sup>[9]</sup>也发现南蛇藤素对上述以及鼠白血病P388细胞株有显著的细胞毒作用。Dirsch等<sup>[6]</sup>研究发现扁蒴藤素可影响NO生成的各个环节,如剂量依赖性减少亚硝酸盐的蓄积,降低诱导型NOS mRNA水平等,并证实NF - κB的活

性下降,IL-1 $\beta$ 为炎症过程中的重要因子。

南蛇藤素为红色立方体结晶,熔点 199-201  $^{\circ}\text{C}$ ,也是雷公藤的主要活性成分之一,具有较显著的免疫抑制和抗炎作用。以往的研究证实其有抗炎和抑制多种细胞因子(IL-1 $\alpha$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8、PGE<sub>2</sub>)释放的作用<sup>[10,11]</sup>,对肥大细胞型白血病细胞株有致凋亡的作用<sup>[12]</sup>。周幽心等<sup>[13]</sup>的体外实验证明:南蛇藤素对血管内皮细胞的体外血管生成和内皮细胞的体外增殖有明显抑制作用。研究表明雷公藤红素可显著减少狼疮小鼠的 24 h 尿蛋白量、抑制血清抗 dsDNA 抗体的产生。可能是由于雷公藤红素直接抑制 B 细胞产生包括抗 dsDNA 抗体在内的多种自身抗体所致,从而使免疫复合物在肾小球的沉积减少,并减轻肾小球滤过膜通透性损伤,使蛋白尿减少<sup>[14]</sup>。根据我们的试验结果推测南蛇藤、雷公藤可能通过下调 HLA-B27 表达而起到治疗 SpA 的作用。

本实验的研究结果表明,雷公藤类衍生化合物(南蛇藤素和扁蒴藤素)可下调 HLA-B27 表达,提示在今后针对 HLA-B\*2705 相关的 SpA 患者治疗中,它们可能是值得研究的潜在有效化合物。

#### [参 考 文 献]

- [1] Khan MA, van der Linden SM. A wider spectrum of spondyloarthropathies[J]. *Semin Arthritis Rheum*, 1990, 20(2):107-113.
- [2] Taurog JD, Maika SD, Simmons WA, et al. Susceptibility to inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rat lines correlated with the level of B27 expression[J]. *J Immunol*, 1993, 150(9):4168-4178.
- [3] Cauli A, Dessole G, Fiorillo MT, et al. Increased level of HLA-B27 expression in ankylosing spondylitis patients compared with healthy HLA-B27-positive subjects: a possible further susceptibility factor for the development of disease[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2002, 41(12):1375-1379.
- [4] 赵丽珂, 古洁若, 余得恩. HLA-B27 启动子荧光素酶报告基因载体的构建及其在 HeLa 细胞的转录调控研究[J]. *中华风湿病学杂志*, 2007, 8(11):449-452.
- [5] 张 舰. 南蛇藤的研究进展[J]. *国外医学:中医中药分册*, 2004, 26(6):335-339.
- [6] Dirsh VM, Kiemer AK, Wagner H, et al. The triterpenoid quinonemethide pristimerin inhibits inducible nitric oxide synthase in murine macrophages[J]. *Eur J Pharmacol*, 1997, 336(2-3):211-217.
- [7] Sassa H, Kogure K, Takaishi Y, et al. Structural basis of potent antiperoxidation activity of the triterpene celastrol in mitochondria: Effect of negative membrane surface charge on lipid peroxidation[J]. *Free Radical Biol Med*, 1994, 17(3):201-207.
- [8] Chang FR, Hayashi K, Chen IH, et al. Antitumor agents. 228. five new agarofurans, reissantins A-E, and cytotoxic principles from reissantia buchananii[J]. *J Nat Prod*, 2003, 66(11):1416-1420.
- [9] Ngassapa O, Soejarto DD, Pezzuto JM, et al. Quinone-methide triterpenes and salaspemic acid from kokoon ochracea[J]. *J Nat Prod*, 1994, 57(1):1-8.
- [10] He W, Huang FC, Gavai A, et al. Novel cytokine release inhibitors. Part III: truncated analogs of tripterine[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 1998, 8(24):3659-3664.
- [11] Huang FC, Chan WK, Moriarty KJ, et al. Novel cytokine release inhibitors: Part I. triterpenes[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 1998, 8(14):1883-1886.
- [12] 鲍一笑, 余润泉, 张登海, 等. 雷公藤红素对人肥大细胞白血病细胞系 HMC-A 作用的实验研究[J]. *中华血液学杂志*, 1999, 20(3):146-148.
- [13] 周幽心, 孙成法, 许期年, 等. 雷公藤红素抑制血管内皮细胞株增殖的体外研究[J]. *实用癌症杂志*, 2004, 19(6):564-567.
- [14] 许 晨, 吴兆龙. 雷公藤红素对狼疮模型鼠的肾小球硬化的防治作用[J]. *中华内科杂志*, 2002, 41(5):317-321.