

· 论 著 ·

## 异常黑胆质成熟剂总酚与顺铂、多西他赛联合对人宫颈癌 SiHa 细胞的影响\*

王国宁<sup>1</sup>, 米开热木·麦麦提<sup>2</sup>, 古扎丽努尔·阿不力孜<sup>1△</sup>

(1. 新疆医科大学附属肿瘤医院妇外五科, 新疆乌鲁木齐 830011; 2. 喀什地区第一人民医院病理科, 新疆喀什 844000)

**摘要:**目的 研究异常黑胆质成熟剂水提取物总酚与顺铂、多西他赛联合对体外培养的人宫颈癌 SiHa 细胞增殖的影响, 并探讨其作用机制。方法 总酚分别与顺铂、多西他赛联合作用于 SiHa 细胞, 采用 MTT 法检测细胞增殖抑制情况, 倒置相差显微镜观察细胞形态, 流式细胞术检测 SiHa 细胞 Bcl-2、端粒酶表达水平。结果 总酚-顺铂组、总酚-多西他赛组的细胞增殖抑制率分别明显高于顺铂组、多西他赛组( $P < 0.05$ ), 且细胞体积变小、变圆, 可见较多脱落圆形死亡细胞, 细胞 Bcl-2、端粒酶表达水平显著降低( $P < 0.05$ )。结论 异常黑胆质成熟剂总酚与顺铂、多西他赛联合可能通过降低 Bcl-2 和端粒酶表达水平而抑制 SiHa 细胞的增殖。

**关键词:** 基因, Bcl-2; 端粒, 末端转移酶; 细胞增殖; 细胞凋亡; 异常黑胆质成熟剂

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.18.001

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)18-1769-03

### The effect of combination of total phenolics from abnormal Savda Munziq with cisplatin or docetaxel on human cervical cancer SiHa cells\*

Wang Guoning<sup>1</sup>, Mikaram·mamat<sup>2</sup>, Guzalnur·Abliz<sup>1△</sup>

(1. Fifth Department of Gynecology, Affiliated Tumor Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830011, China; 2. Department of Pathology, First Regional People's Hospital of Kashgar, Kashgar, Xinjiang 844000, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effects of combination of total phenolics from abnormal Savda Munziq water extracts with cisplatin or docetaxel on human cervical cancer SiHa cells *in vitro*, and to explore the mechanism. **Methods** SiHa cells were treated with total phenolics combined with cisplatin or docetaxel. Inhibition of cellular proliferation was detected by MTT assay, cellular morphology was observed by inverted phase microscope, and levels of Bcl-2 and telomerase expression in SiHa cells were detected by flow cytometry. **Results** The inhibitory rates of cellular proliferation of total phenolics-cisplatin group and phenolics-docetaxel group were significantly higher than those in cisplatin group and docetaxel group ( $P < 0.05$ ), respectively. Cells became small and round, and a lot of detached, round and dead cell could be seen. Levels of cellular Bcl-2, and telomerase expression were markedly decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Total phenolics from abnormal Savda Munziq combined with cisplatin or docetaxel can inhibit proliferation of SiHa cells via inhibiting cellular Bcl-2 and telomerase expression levels.

**Key words:** genes, Bcl-2; telomerase; cell proliferation; apoptosis; abnormal Savda Munziq

自 2004 年 WHO 公布宫颈癌是惟一可望消灭的肿瘤以来, 国内外对宫颈癌的研究日益增多。维药异常黑胆质成熟剂是维吾尔医治疗和预防各种肿瘤的有效处方, 在临床实践中广泛使用, 其疗效显著。本实验采用维药异常黑胆质成熟剂水提取物总酚, 以人子宫颈鳞癌 SiHa 细胞为研究对象, 将其分别与顺铂、多西他赛联合作用进行比较, 探讨异常黑胆质成熟剂总酚与顺铂及多西他赛有无协同作用及其作用机制, 以寻找新的抗肿瘤药物。

#### 1 材料与与方法

**1.1 细胞株** SiHa 细胞购于中国医学科学院上海细胞生物研究所。

**1.2 主要试剂与仪器** 总酚由新疆医科大学哈木拉提·吾甫尔教授惠赠。实验用药及试剂包括: 顺铂(澳大利亚 Hospira Australia Pty Ltd.)、多西他赛(江苏恒瑞医药)、高糖 Dulbecco's 改良培养基(Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM)、胎牛血清(美国 GIBCO 公司)、四甲基偶氮唑蓝[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide,

MTT]、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、胰蛋白酶(AMRESCO 公司)、破膜剂(BECKMAN COULTER)、鼠抗人 Bcl-2 抗体(INVITROGEN)、兔抗人端粒酶抗体(北京博奥森)等。实验用仪器主要有 CO<sub>2</sub> 培养箱(Thermo Scientific)、倒置相差显微镜(OLYMPUS)、全自动酶标仪(BIO-RAD)及流式细胞仪(BECKMAN COULTER)等。

**1.3 细胞培养** SiHa 细胞用含 5% 胎牛血清、100 U/mL 青、链霉素的高糖 DMEM 培养基, 在 37 °C、饱和湿度、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。3 d 换液 1 次, 5~6 d 传代 1 次, 取对数生长期细胞进行实验。

**1.4 MTT 法检测** 取对数生长期 SiHa 细胞, 调整细胞密度为  $5 \times 10^4$  个/mL, 将其接种于 96 孔板, 每孔接种 100  $\mu$ L, 继续培养 48 h, 将细胞分为: (1) 对照组(只加培养基); (2) 实验组(包括单药组: 总酚组、顺铂组、多西他赛组; 联合组: 总酚-顺铂组、总酚-多西他赛组); (3) 空白组(包括空白对照组、空白实验组)。根据前期实验及预实验结果, 单独用药浓度分别为: 总酚 0、50、75、100  $\mu$ g/mL, 顺铂 0、1、5  $\mu$ g/mL, 多西他赛 0、5、10  $\mu$ g/mL;

表 1 总酚与顺铂联合对 SiHa 细胞增殖抑制率的影响( $\bar{x} \pm s, \%$ )

总酚浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	顺铂 0 $\mu\text{g/mL}$			顺铂 1 $\mu\text{g/mL}$			顺铂 5 $\mu\text{g/mL}$		
	作用 24 h	作用 48 h	作用 72 h	作用 24 h	作用 48 h	作用 72 h	作用 24 h	作用 48 h	作用 72 h
0	0	0	0	10.41 $\pm$ 2.16	17.60 $\pm$ 3.50	21.52 $\pm$ 2.77	21.46 $\pm$ 1.58	37.82 $\pm$ 2.86	62.45 $\pm$ 2.40
50	0	0	0	16.12 $\pm$ 2.40 $\Delta$	28.37 $\pm$ 2.07 $\Delta\star$	36.22 $\pm$ 3.18 $\Delta\star$	27.66 $\pm$ 1.31 $\Delta$	45.61 $\pm$ 4.34 $\Delta\star$	64.16 $\pm$ 2.90 $\star$
75	7.90 $\pm$ 2.96	11.97 $\pm$ 2.24	20.85 $\pm$ 2.91	24.56 $\pm$ 3.52 $\Delta$	41.73 $\pm$ 1.91 $\Delta\star$	63.85 $\pm$ 2.10 $\Delta\star$	38.64 $\pm$ 1.96 $\Delta$	58.61 $\pm$ 0.57 $\Delta\star$	73.06 $\pm$ 1.60 $\Delta\star$
100	28.20 $\pm$ 3.15	33.40 $\pm$ 1.83	40.01 $\pm$ 2.38	40.44 $\pm$ 1.03 $\Delta$	53.57 $\pm$ 3.10 $\Delta\star$	73.39 $\pm$ 1.25 $\Delta\star$	49.83 $\pm$ 3.59 $\Delta$	71.41 $\pm$ 2.11 $\Delta\star$	83.81 $\pm$ 3.02 $\Delta\star$

$\Delta$ :  $P < 0.05$ , 与相同浓度的单药组比较;  $\star$ :  $P < 0.05$ , 与相同浓度其他作用时间组比较。

表 2 总酚与多西他赛联合对 SiHa 细胞增殖的影响( $\bar{x} \pm s, \%$ )

总酚浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	多西他赛 0 $\mu\text{g/mL}$			多西他赛 5 $\mu\text{g/mL}$			多西他赛 10 $\mu\text{g/mL}$		
	作用 24 h	作用 48 h	作用 72 h	作用 24 h	作用 48 h	作用 72 h	作用 24 h	作用 48 h	作用 72 h
0	0	0	0	23.65 $\pm$ 0.70	21.74 $\pm$ 2.25	39.92 $\pm$ 2.07	34.22 $\pm$ 1.67	48.03 $\pm$ 1.91	54.20 $\pm$ 3.23
50	0	0	0	33.66 $\pm$ 2.62 $\Delta$	49.59 $\pm$ 2.43 $\Delta\star$	61.08 $\pm$ 2.35 $\Delta\star$	49.80 $\pm$ 2.31 $\Delta$	61.12 $\pm$ 0.54 $\Delta\star$	70.66 $\pm$ 1.11 $\Delta\star$
75	7.90 $\pm$ 2.96	11.97 $\pm$ 2.24	20.85 $\pm$ 2.91	42.21 $\pm$ 2.17 $\Delta$	63.33 $\pm$ 1.64 $\Delta\star$	72.20 $\pm$ 2.75 $\Delta\star$	55.50 $\pm$ 0.48 $\Delta$	74.38 $\pm$ 3.30 $\Delta\star$	82.06 $\pm$ 1.26 $\Delta\star$
100	28.20 $\pm$ 3.15	33.40 $\pm$ 1.83	40.01 $\pm$ 2.38	50.25 $\pm$ 1.88 $\Delta$	71.54 $\pm$ 1.11 $\Delta\star$	80.72 $\pm$ 1.38 $\Delta\star$	64.57 $\pm$ 2.04 $\Delta$	80.85 $\pm$ 0.72 $\Delta\star$	90.32 $\pm$ 1.81 $\Delta\star$

$\Delta$ :  $P < 0.05$ , 与相同浓度的单药组比较;  $\star$ :  $P < 0.05$ , 与相同浓度其他作用时间组比较。

联合用药采用各浓度总酚分别与上述各浓度顺铂、多西他赛联合。按分组加药处理, 分别培养 24、48、72 h 后每孔加 20  $\mu\text{L}$  MTT, 继续培养 4 h 终止实验, 加入 DMSO 150  $\mu\text{L}$ , 用全自动酶标仪震荡 10 min 检测各组在 490 nm 处的吸光度值(optical density, OD<sub>490</sub>)。按公式计算细胞增殖抑制率。细胞增殖抑制率 =  $[1 - (\text{实验组平均 OD}_{490} \text{值} - \text{空白实验组平均 OD}_{490} \text{值}) / \text{对照组平均 OD}_{490} \text{值} - \text{空白对照组平均 OD}_{490} \text{值}] \times 100\%$ 。实验重复 5 次, 每浓度组均设 4 复孔。

**1.5 倒置相差显微镜观察** 药物处理 48 h 后分别采用倒置相差显微镜观察对照组、总酚-顺铂组及总酚-多西他赛组 SiHa 细胞的形态变化。

**1.6 流式细胞术检测** 取对数生长期 SiHa 细胞接种于培养瓶, 接种  $5 \times 10^5$  个细胞/瓶, 48 h 贴壁后将细胞分为对照组(细胞未用药物处理)、顺铂组(顺铂 5  $\mu\text{g/mL}$ )、多西他赛组(多西他赛 20  $\mu\text{g/mL}$ )、总酚组(总酚 75  $\mu\text{g/mL}$ )、总酚-顺铂组(总酚 75  $\mu\text{g/mL}$ 、顺铂 5  $\mu\text{g/mL}$ )、总酚-多西他赛组(总酚 75  $\mu\text{g/mL}$ 、多西他赛 20  $\mu\text{g/mL}$ ), 继续培养 48 h, 胰酶消化成单细胞悬液, 磷酸缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)洗 2 次, 破膜剂破膜后, 加 5  $\mu\text{L}$  鼠抗人 Bcl-2 抗体、2  $\mu\text{L}$  兔抗人端粒酶抗体, 15 min 后加 4 mL PBS 洗涤离心, 去上清液, 加入 1 mL 鞘液行流式细胞仪检测。

**1.7 统计学处理** 应用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析, 计量数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 方差分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 总酚与顺铂联合对 SiHa 细胞增殖抑制率的影响** 总酚-顺铂组的细胞增殖抑制率比顺铂组明显增加( $P < 0.05$ ), 顺铂浓度不变时, 随总酚浓度增大, 细胞增殖抑制率增加; 并且相同药物浓度处理组的细胞增殖抑制率随时间增加而增大( $P < 0.05$ )。而低浓度总酚(50  $\mu\text{g/mL}$ )对细胞无杀伤作用, 却能显著提高顺铂对细胞增殖的抑制( $P < 0.05$ )。总酚与顺铂的交互作用为协同, 见表 1。

**2.2 总酚与多西他赛联合对 SiHa 细胞增殖抑制情况** 总酚-多西他赛组比多西他赛组细胞增殖抑制率明显增加( $P < 0.05$ ), 多西他赛浓度不变时, 随总酚浓度增大, 二者联合作用的细胞增殖抑制率增加( $P < 0.05$ ), 相同药物浓度处理组细胞

增殖抑制率随时间增加而增大( $P < 0.05$ )。低浓度总酚(50  $\mu\text{g/mL}$ )也显著提高多西他赛对细胞增殖的抑制( $P < 0.05$ )。总酚与多西他赛亦具有协同作用, 见表 2。

### 2.3 总酚分别与顺铂、多西他赛联合对 SiHa 细胞形态的影响

倒置相差显微镜观察, 对照组 SiHa 细胞贴壁良好, 几乎无脱落细胞, 形态正常, 大多呈梭形, 生长舒展, 细胞质透亮; 总酚-顺铂组与总酚-多西他赛组细胞体积变小、变圆, 细胞核固缩, 核质比减小, 细胞质浑浊, 可见空泡状细胞, 部分细胞核核膜消失, 可见较多脱落圆形死亡细胞, 见封 3 图 1。

**2.4 总酚分别与顺铂、多西他赛联合对 SiHa 细胞 Bcl-2、端粒酶的表达** 由表 3、封 3 图 2 可见, 总酚组、顺铂组、多西他赛组、总酚-顺铂组及总酚-多西他赛组细胞 Bcl-2 和端粒酶表达水平均低于对照组( $P < 0.05$ ), 总酚-顺铂组及总酚-多西他赛组细胞 Bcl-2 和端粒酶表达水平均低于单药组、总酚组( $P < 0.05$ )。

表 3 总酚、顺铂及多西他赛对 SiHa 细胞 Bcl-2、端粒酶表达水平的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	Bcl-2	端粒酶
对照组	73.67 $\pm$ 4.44	62.27 $\pm$ 4.49
单药组		
总酚组	60.87 $\pm$ 2.71 $\Delta$	50.77 $\pm$ 3.44 $\Delta$
顺铂组	33.50 $\pm$ 4.44 $\Delta$	33.37 $\pm$ 4.57 $\Delta$
多西他赛组	26.10 $\pm$ 4.81 $\Delta$	43.97 $\pm$ 4.19 $\Delta$
联合组		
总酚-顺铂组	11.73 $\pm$ 3.17 $\Delta\star$	18.87 $\pm$ 1.25 $\Delta\star$
总酚-多西他赛组	9.77 $\pm$ 3.56 $\Delta\star$	27.73 $\pm$ 5.39 $\Delta\star$

$\Delta$ :  $P < 0.05$ , 与对照组比较;  $\star$ :  $P < 0.05$ , 与单药组比较。

## 3 讨 论

以顺铂为基础的同步放、化疗可提高宫颈癌患者的生存率, 使宫颈癌患者的死亡危险下降 28%~50%<sup>[1]</sup>, 现已用于宫颈癌等多种恶性肿瘤的治疗<sup>[2]</sup>。多西他赛即多西紫杉醇, 是新近研制应用的一种紫杉醇类抗肿瘤药物, 体内外实验研究表明, 多西他赛对多种人类肿瘤, 如结肠癌、卵巢癌、肺癌和乳腺

癌等都有细胞毒性,并能诱导肿瘤细胞凋亡<sup>[3-4]</sup>,对晚期宫颈癌也有一定的疗效<sup>[5]</sup>。

本研究 MTT 结果表明顺铂和多西他赛单独作用,可显著抑制 SiHa 细胞生长,这与以往研究相似<sup>[6-7]</sup>,总酚分别与二者联合能显著提高肿瘤细胞的增殖抑制率( $P < 0.05$ ),具协同作用。顺铂浓度一定时,随总酚浓度增大,细胞增殖抑制率增加;相同药物浓度处理 SiHa 细胞,随作用时间增加,细胞增殖抑制率也明显增加( $P < 0.05$ )。总酚与多西他赛联合作用亦得到类似结果。倒置相差显微镜观察实验组细胞发生形态学改变,这表明总酚分别与顺铂、多西他赛联合可抑制 SiHa 细胞的增殖。

现代研究已证实异常黑胆质成熟剂可清除自由基、提高患者机体抗氧化功能、防止羟自由基引发的 DNA 氧化损伤和线粒体氧化损伤等,总酚是异常黑胆质成熟剂的水提物,有报道在异常黑胆质成熟剂的水提物中总酚含量最高,为 38.28 mg/g,明显高于含量位居第 2 的总黄酮 16.21 mg/g<sup>[8]</sup>。国内玛依努尔和哈木拉提<sup>[9]</sup>曾报道维吾尔异常黑胆质成熟剂诱导宫颈癌 HeLa 细胞野生型 p53 基因的表达及下调 Bcl-2 基因表达,这可能是其增强机体抗病力的分子机制之一。

Bcl-2 蛋白主要表达于线粒体外膜、细胞核膜和内质网。Bcl-2 蛋白的生理功能主要是抑制细胞凋亡,延长细胞寿命,而不影响细胞增殖和分化<sup>[10]</sup>。有研究表明,Bcl-2 蛋白的过度表达与宫颈癌的发生有一定的关系,并且与宫颈癌的临床进程相关<sup>[11]</sup>。总酚联合顺铂、多西他赛作用 SiHa 细胞 48 h,细胞 Bcl-2 表达水平明显低于对照组、顺铂组、多西他赛组及总酚组( $P < 0.05$ ),这提示其作用机制可能与调节 Bcl-2 的表达相关,即降低 Bcl-2 表达可降低 DNA 损伤因子的抵抗性,有可能解除 Bcl-2 对肿瘤细胞凋亡的抑制作用,阻止凋亡机制的信号分子作用其靶分子,从而促进肿瘤细胞的凋亡或增强药物对肿瘤细胞的杀伤作用,而其具体作用机制还有待于进一步研究。

本研究结果显示总酚联合顺铂、多西他赛作用 SiHa 细胞 48 h 后,细胞端粒酶表达水平明显低于对照组、顺铂组、多西他赛组及总酚组( $P < 0.05$ )。端粒酶能合成端粒,其活性是大多数细胞恶化的共同通路,也是目前已具有特异性的恶性肿瘤标志物,端粒酶高表达可维持端粒长度,使肿瘤细胞能逃避细胞凋亡而不断增殖,从而导致肿瘤发生<sup>[12]</sup>。染色体的扩增已作为宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia,CIN) II/III 进展为宫颈癌的相关事件,端粒酶参与了宫颈癌的发生、发展过程<sup>[13]</sup>,国外研究证实,人端粒酶逆转录酶 mRNA 和端粒酶活性表达水平与宫颈癌的发生和进展相关<sup>[14]</sup>。有报道用 TRAP(telomeric repeat amplification protocol)法对端粒酶活性进行研究,结果宫颈癌、宫颈内皮瘤形成和正常组织端粒酶活性表达分别为 78.9%、25.0%和 0.0%,宫颈癌端粒酶的表达及其活性高于 CIN 和正常对照<sup>[15]</sup>。这提示总酚与顺铂、多西他赛联合作用机制可能与降低端粒酶的活性有关。

本研究还表明低浓度总酚(50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )对 SiHa 细胞无抑制作用,但可增加化疗药物顺铂、多西他赛对 SiHa 细胞的增殖抑制( $P < 0.05$ ),这为晚期和复发宫颈癌患者的治疗提供了新的思路。

总之,本研究表明总酚分别与顺铂、多西他赛联合能抑制宫颈癌 SiHa 细胞的增殖,当顺铂、多西他赛浓度不变时,总酚对 SiHa 细胞增殖抑制率呈明显的浓度及时间依赖性;其联合作用机制可能与降低 Bcl-2 表达和降低端粒酶活性有关,然

而,总酚通过何种途径来调节 Bcl-2 表达和端粒酶活性,还有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Eifel PJ. Concurrent chemotherapy and radiation therapy as the standard of care for cervical cancer[J]. *Nat Clin Pract Oncol*,2006,3(5):248-255.
- [2] Darzynkiewicz Z, Halicka DH, Tanaka T. Cytometric assessment of DNA damage induced by DNA topoisomerase inhibitors[J]. *Methods Mol Biol*,2009(582):145-153
- [3] 丁勇,范清宇,张殿忠,等.紫杉醇诱导成骨肉瘤细胞凋亡[J]. *中国现代医学杂志*,2002,12(13):1-3.
- [4] 彭磊,王臻,王庆良,等.多西紫杉醇体外诱导骨肉瘤细胞系 pl-1 的凋亡[J]. *中国临床药理学和治疗学*,2002,7(1):1-4.
- [5] Bergqvist M, Brattström D, Gullbo J, et al. p53 status and its in vitro relationship to radiosensitivity and chemosensitivity in lung cancer[J]. *Anticancer Res*,2003,23(2B):1207-1212.
- [6] 郑小冬,朱雪琼,吕杰强,等.顺铂对子宫颈癌 SiHa 和 HeLa 细胞化疗作用的对照研究[J]. *实用肿瘤杂志*,2008,23(3):233-235.
- [7] 朱丽红,魏丽惠,李小平,等.紫杉醇脂质体对宫颈癌 SiHa 细胞体外杀伤作用的研究[J]. *中国肿瘤*,2008,17(8):704-707.
- [8] 木拉提·克扎衣别克,阿不都热依木·玉苏甫,哈木拉提·吾甫尔.异常黑胆质成熟剂总黄酮和总酚的含量测定[J]. *时珍国医国药*,2009,20(3):519-522.
- [9] 玛依努尔·艾力,哈木拉提·吾甫尔.维吾尔药异常黑胆质成熟剂总黄酮逆转肝癌细胞耐药性的作用[J]. *中国中医药信息杂志*,2007,14(9):31-33.
- [10] 姜育红,韩萌,何国斌,等.人口腔上皮鳞状细胞癌发生发展过程中 Bcl-2 蛋白表达的研究[J]. *实用口腔医学杂志*,2000,16(4):279-281.
- [11] 王晓丽,屈春萍. bcl-2 蛋白在宫颈癌中的表达[J]. *陕西肿瘤医学*,1999,7(1):25-27.
- [12] Royle NJ, Méndez-Bermúdez A, Gravani A, et al. The role of recombination in telomere length maintenance[J]. *Biochem Soc Trans*,2009,37(Pt 3):589-595.
- [13] Hopman AH, Theelen W, Hommelberg PP, et al. Genomic integration of oncogenic HPV and gain of the human telomerase gene TERC at 3q26 are strongly associated events in the progression of uterine cervical dysplasia to invasive cancer[J]. *J Pathol*,2006,210(4):412-419.
- [14] Wisman GB, Knol AJ, Helder MN, et al. Telomerase in relation to clinicopathologic prognostic factors and survival in cervical cancer[J]. *Int J Cancer*,2001,91(5):658-664.
- [15] 奚玲,朱涛,吴鹏,等.人端粒酶逆转录酶在子宫颈癌组织中的表达变化及其意义[J]. *中华妇产科杂志*,2005,40(6):407-410.