

• 基础研究 •

Kayadiol 对子宫内膜癌细胞株 HEC-1 的影响

李学慧¹, 代丽丽¹, 董 玫², 张 霞¹, 谢 磊¹, 张红真^{1△}

(河北医科大学: 1. 第一医院妇产科; 2. 基础医学院, 河北石家庄 050011)

摘要:目的 探讨二萜类化合物 kayadiol 抑制子宫内膜癌细胞 HEC-1 增殖作用的机制。方法 采用四甲基偶氮唑盐 (MTT) 法检测 kayadiol 对子宫内膜癌 HEC-1 细胞增殖的抑制作用; 采用 DNA 断裂原位末端标记 (TUNEL) 法和 Western blot 法检测 kayadiol 诱导子宫内膜癌 HEC-1 细胞凋亡。结果 kayadiol 对 HEC-1 细胞增殖显示较强的抑制活性, 呈量效关系; 其中以 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 kayadiol 处理 HEC-1 细胞后, 发现凋亡率变化与时间呈依赖关系, HEC-1 细胞内的 Bax 和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3) 蛋白表达显著上调。结论 Kayadiol 可通过诱导细胞凋亡抑制 HEC-1 细胞增殖。

关键词: 二萜类; kayadiol; 子宫内膜肿瘤; 细胞凋亡

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.15.018

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)15-1731-03

Effects of Kayadiol on human endometrial carcinoma cell line-1

Li Xuehui¹, Dai Lili¹, Dong Mei², Zhang Xia¹, Xie Lei¹, Zhang Hongzhen^{1△}

(Hebei Medical University: 1. Department of Gynecology and Obstetrics, First Hospital; 2. Basic Medical College, Shijiazhuang, Hebei 050011, China)

Abstract: Objective To study the mechanism of kayadiol as one of diterpenoid compounds for inhibiting the proliferation of human endometrial carcinoma cell line-1 (HEC-1). **Methods** The MTT assay was adopted to detect the Kayadiol's inhibition to cell line HEC-1 proliferation. The apoptosis rate of HEC-1 induced by Kayadiol was measured by Western blot and TUNEL method. **Results** Kayadiol could strongly inhibit the proliferation of HEC-1 cells with dose-dependent relationship. 10 $\mu\text{mol/L}$ Kayadiol could induce apoptosis of HEC-1 cells with time-dependent relationship. Expression of Bax and caspase-3 proteins was significantly upregulated in HEC-1 cells treated by Kayadiol. **Conclusion** Kayadiol could inhibit proliferation of HEC-1 cells via inducing apoptosis of HEC-1 cells.

Key words: diterpenes; Kayadiol; endometrial neoplasms; apoptosis

目前化疗已成为治疗中、晚期恶性肿瘤的重要方法,但是现有的绝大多数化疗药物细胞毒作用大、组织特异性差,易产生耐药性等问题一直困扰着临床医生。因此,寻找毒副作用低,抗耐药性强,组织特异性强的化疗药物已成为国内、外研究的热点之一。自天然产物紫杉醇作为抗癌药物应用到临床以来,与其结构相似药物的开发已愈来愈受到重视。有研究报道,日本粗榧果实中分离出的二萜类化合物 kayadiol 对人白血病细胞 K562 细胞增殖有抑制作用^[1-2]。目前对二萜类化合物的抑瘤活性的研究比较少见,关于 kayadiol 抑制细胞增殖作用机制的研究更少见报道。本研究将二萜类化合物 kayadiol 作用于人子宫内膜癌 HEC-1 细胞株,观测其对子宫内膜癌细胞的生物学影响,并探讨其内在机制。

1 材料与方法

1.1 材料 人子宫内膜癌细胞株 HEC-1 由日本千叶大学医学部第二生物化学教室提供。实验用化合物 kayadiol 由河北医科大学药学院天然药物化学教研室提供。四甲基偶氮唑盐 (MTT) 和顺铂 (cisplatin) 购自美国 Sigma 公司; 胎牛血清、RP-MI1640、胰蛋白酶购自 GIBCO 公司; TUNEL 细胞凋亡原位检测试剂盒 (11684795910) 购自德国 Roche 公司; 十二烷基硫酸钠 (SDS) 购自美国 Biotec 公司; 鼠抗人半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3) 多克隆抗体、鼠抗人 Bax 多克隆抗体 (sc-7480)、羊抗鼠 IgG 红外荧光二抗及 β -actin 购自美国 Santa

Cruz 公司; 溴化乙锭购自美国 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 体外抑瘤实验 取对数生长期 HEC-1 细胞, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$, 接种于 96 孔板, 每孔 100 μL , 培养箱中培养 24 h 后, 吸出各孔内培养基, 加入含有不同浓度 kayadiol (1、10、100 $\mu\text{mol/L}$) 的培养基, 并设二甲亚砜 (DMSO) 溶剂对照组 (1、10、100 $\mu\text{mol/L}$ 的 DMSO)、顺铂对照组 (分别为 1、10、100 $\mu\text{mol/L}$ 的顺铂), 每孔 100 μL , 每组设 3 个复孔, 继续在培养箱中培养 44 h 后, 向各培养孔中加入 10 mL MTT (5 mg/mL), 继续培养 4 h, 弃上清液, 每孔加入 DMSO 150 μL , 震荡 10 min, 充分溶解蓝紫色结晶。采用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 于 492 nm 波长下测定各孔 OD 值, 计算药物对细胞的抑制率。生存率 (%) = (实验组 OD 值/对照组 OD 值) \times 100%。

1.2.2 凋亡细胞原位标记与半定量分析 取对数生长期的 HEC-1 细胞, 接种于 8 孔培养板, 每孔 100 μL (含 1×10^4 个细胞), 分别加入终浓度 0.1% DMSO 和终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 kayadiol 100 μL , 于培养箱中分别培养 12、24 h; 弃培养液, 加入 4% 多聚甲醛, 每孔 100 μL , 于室温培养 1 h; 弃液体, 加入通透液每孔 100 μL , 冰浴 2 min; 弃液体, 溶剂对照组与 kayadiol 组加入 TUNEL 溶液, 每孔 80 μL 。溶剂对照组, 加入荧光标记的三磷酸脱氧尿苷 (dUTP) 液, 每孔 80 μL , 加盖玻片在暗湿

盒中反应 1 h。弃液体,荧光显微镜下观察,可以使用的激发波长范围为 450~500 nm,发射波长范围为 515~565 nm (绿色荧光)。结果根据凋亡阳性细胞分布情况。每张切片拍摄 5 个阳性视野,每视野计数正常细胞数和带荧光的凋亡细胞数,以阳性细胞所占正常细胞的百分比作为细胞凋亡率(AR)。

1.2.3 Western blot 法检测 收集溶剂对照组、顺铂对照组(终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的顺铂作用 48 h)和 kayadiol 组(终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ kayadiol 作用 48 h)HEC-1 细胞,按蛋白提取操作步骤提取细胞总蛋白,BCA 法蛋白定量,12%SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)2 h,然后将蛋白转移至聚偏氟乙烯膜,用含脱脂奶粉的无蛋白(TBS)封闭缓冲液封闭 1 h 后,分别加入一抗 Bax 抗体(1 : 500)和 Caspase-3 抗体(1 : 700),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,加入二抗(1 : 5 000),室温孵育 1 h,双色红外激光成像系统扫描显像,设 $\beta\text{-Actin}$ 为内参。

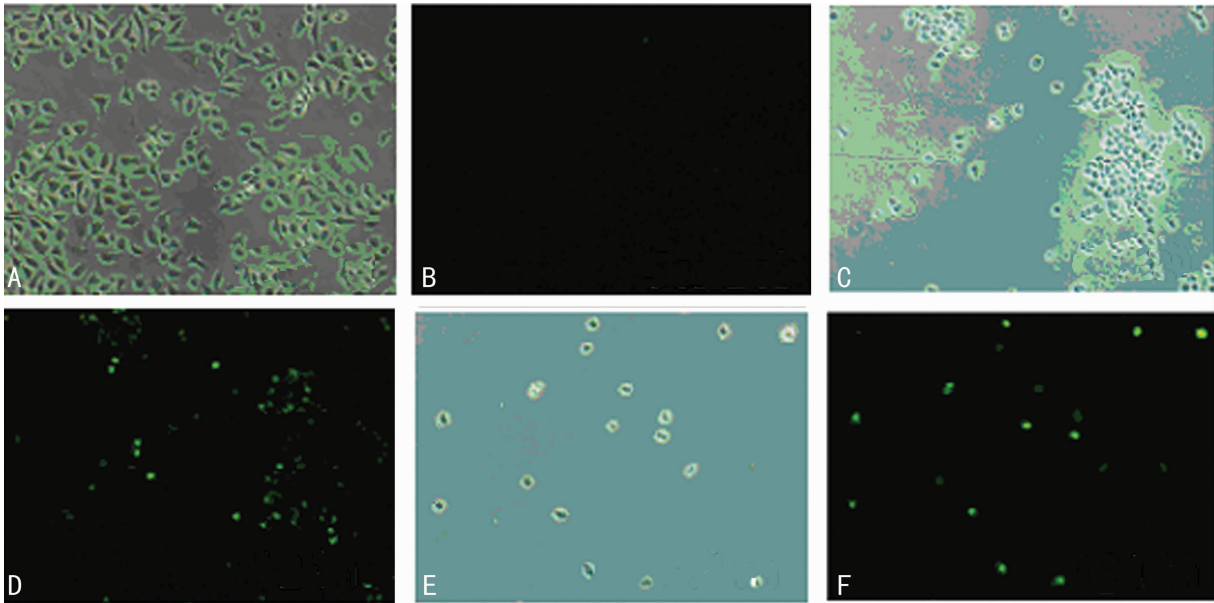
1.3 统计学处理 应用 SPSS13.0 统计软件分析。实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两个独立样本组间均数比较用 t 检验。多组间比较用方差分析,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Kayadiol、顺铂对 HEC-1 细胞增殖的影响 Kayadiol 和顺铂对 HEC-1 细胞的增殖显示强的抑制活性。1、10、100 $\mu\text{mol/L}$ 的顺铂处理 HEC-1 细胞后,其生存率分别为 86.04%、66.33%、37.04%,并呈现较好的剂量依赖关系,与溶剂对照组比较均差异有统计学意义($P<0.05$); kayadiol 组 1、10、100 $\mu\text{mol/L}$ kayadiol 处理 HEC-1 细胞后,其生存率分别为 69.87%、39.31%、2.76%,并呈现较好的剂量依赖关系,与溶剂对照组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。顺铂和 kayadiol 作用后 HEC-1 细胞生存率比较,见表 1。

表 1 顺铂和 kayadiol 作用后 HEC-1 细胞生存率比较 (%)			
组别	1 $\mu\text{mol/L}$	10 $\mu\text{mol/L}$	100 $\mu\text{mol/L}$
Kayadiol 组	69.87**	39.31**	2.76**
顺铂对照组	86.04*	66.33*	37.04*
溶剂对照组	90.03	88.54	89.36

* : $P<0.05$, ** : $P<0.01$,与溶剂对照组比较。



A、B:溶剂对照组(光镜、荧光显微镜);C、D:Kayadiol 组 12 h 后(光镜、荧光显微镜);E、F:Kayadiol 组 24 h 后(光镜、荧光显微镜)。

图 1 各组 HEC-1 细胞凋亡情况

2.2 Kayadiol 对 HEC-1 细胞凋亡的影响 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 kayadiol 处理 HEC-1 细胞 24 h 后,TUNEL 法检测结果显示,Kayadiol 可明显诱导 HEC-1 细胞的凋亡,具有时间依赖关系,溶剂对照组和 Kayadiol 组 12、24 h 的 HEC-1 细胞凋亡率比较,差异有统计学意义($P<0.01$),见表 2。荧光显微镜下观察各组 HEC-1 细胞凋亡情况,见图 1。

表 2 溶剂对照组和 Kayadiol 组 12、24 h 的 HEC-1 细胞凋亡率比较 ($\bar{x}\pm s$)		
组别	12 h	24 h
溶剂对照组	2.40 \pm 1.20	3.06 \pm 0.27
Kayadiol 组	40.16 \pm 6.84*	86.88 \pm 6.00**

* : $P<0.05$, ** : $P<0.01$,与溶剂对照组比较。

2.3 Kayadiol 对 HEC-1 细胞中 Bax 和 Caspase-3 蛋白表达的影响 Western blot 结果提示,经 kayadiol 处理 48 h 后的 HEC-1 细胞内的 Bax、caspase-3 蛋白表达水平显著上调,与顺铂对照组接近,见图 2。

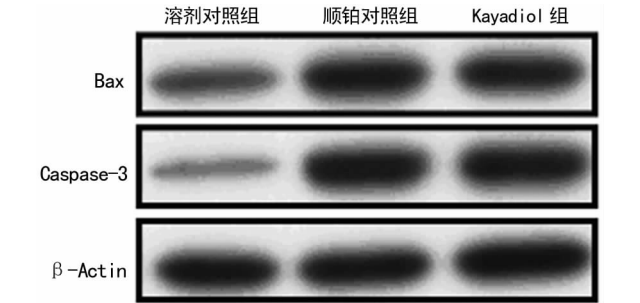


图 2 各组 HEC-1 细胞 48 h 后 Bax、Caspase-3 蛋白表达

3 讨 论

子宫内膜癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,占女性生殖道恶性肿瘤的 20%~30%。子宫内膜癌的治疗以手术为主,放疗为辅,化疗主要用于特殊病理类型、细胞分化差或晚期的和复发的子宫内膜癌,旨在降低内膜癌的复发风险^[3-4],提高总体生存率。近年来,具有高危因素的子宫内膜癌术后同步放、化疗也开始应用^[5-7],同时,国外开展了多项针对早期高危子宫内膜癌术后辅助化疗预防复发的随机对照研究,使早期子宫内膜癌化疗成为目前研究的热点之一。

二萜类化合物中紫杉醇、雷公藤内酯醇等多种肿瘤细胞的增殖都有抑制作用^[8-11]。kayadiol 是从日本榧树中分离出的二萜类化合物,潘永梅等^[1]报道 kayadiol 对人白血病细胞 K562 细胞增殖也有抑制活性。顺铂是广谱抗癌药,为铂的金属络合物,作用似烷化剂,主要作用靶点为 DNA,是被证明在铂类药物中最有效的药物。本实验以 kayadiol 为研究对象,以顺铂为阳性对照,用 MTT 比色法检测其对子宫内 膜癌 HEC-1 细胞株体外生长的抑制作用,结果显示经 1、10、100 $\mu\text{mol/L}$ 3 种不同浓度的 kayadiol 作用 HEC-1 细胞后,HEC-1 细胞株生存率与溶剂对照组比较均差异有统计学意义,且呈现剂量依赖关系,以浓度 100 $\mu\text{mol/L}$ 显著($P<0.01$),强于顺铂抑瘤效果。

细胞增殖与凋亡平衡的失调和多种癌症的发生、发展有着密切联系^[12-14]。凋亡抑制基因过表达、促凋亡基因突变或缺失,都可使肿瘤发生率增加^[15]。本实验用 TUNEL 法检测了 kayadiol 处理 12、24 h 后 HEC-1 细胞的细胞凋亡率,结果显示差异有统计学意义,且具有时间依赖关系,提示 kayadiol 具有明显诱导 HEC-1 细胞发生凋亡的活性。Bax 蛋白是 Bcl-2 家族的一种前凋亡蛋白,主要定位于细胞质,一旦受到凋亡因子的诱导,可以向线粒体转位,通过寡聚化在线粒体外膜形成跨膜通道,或者开启线粒体的通透性转换孔,导致线粒体中的凋亡因子释放,从而激活 Caspase 蛋白导致细胞凋亡。Caspase 家族属于半胱氨酸蛋白酶,是细胞凋亡中的关键蛋白酶^[16],其中 Caspase-3 可直接降解胞内的结构蛋白和功能蛋白而引起细胞凋亡。本实验用 Western blot 法检测 kayadiol 处理 48 h 后的 HEC-1 细胞中的 Caspase-3 和 Bax 蛋白水平,结果显示:经 kayadiol 处理后,HEC-1 细胞内的 Caspase-3 和 Bax 蛋白表达明显上调,提示 kayadiol 对人子宫内膜癌细胞增殖的抑制作用有可能是通过诱导肿瘤细胞凋亡来实现的。

综上所述,本实验证实 kayadiol 对 HEC-1 细胞的增殖具有强的抑制作用,呈时效和量效关系,其抑制 HEC-1 细胞增殖是通过上调 Bax 蛋白的表达和激活 Caspase-3 而引起肿瘤细胞凋亡而实现的。诱导细胞凋亡是一个由多信号诱导、多基因调控和多因子参与的过程,本实验验证的仅仅是诱导凋亡的通路之一,kayadiol 是否还通过其他途径诱导凋亡需要进一步

研究。

参考文献:

- [1] 潘永梅,王建华,曹聪梅,等.日本粗榧果肉中三种二萜类化合物体外抗癌活性研究[J].中药药理与临床,2009,25(2):70-73.
- [2] 曹聪梅,董玫,张喜萍,等.日本榧树果实的化学成分研究[J].天然产物研究与开发,2009,21(5):737-739.
- [3] Obel JC, Fleming GF. Chemotherapy in endometrial cancer[J]. Chin Adv Hematol Oncol, 2006, 4(4): 459-468.
- [4] 李静,孔为民.子宫内膜癌化疗进展[J].中华妇产科杂志,2010,45(8):632-636.
- [5] 孔为民,李静,李丽英,等.顺铂同步放化疗对子宫内膜癌 HEC-1A 细胞的抑制作用及其机制的初步研究[J].中华妇产科杂志,2010,45(11):874-877.
- [6] 李静,孔为民,李丽英,等.紫杉醇同步放化疗对子宫内膜癌 HEC-1A 细胞系的抑制作用及其机理的初步研究[J].实用癌症杂志,2010,25(2):114-119.
- [7] 于海林,鹿欣.铂类抗癌药物在妇科肿瘤治疗中的应用[J].世界临床药物,2008,29(7):399-405.
- [8] 李长华,彭星.紫杉醇与顺铂联合化疗对宫颈鳞癌细胞株 HCE1 作用的实验研究[J].中华临床医师杂志:电子版,2012,6(8):2037-2042.
- [9] 曹飞麟,郑瑞,周申康,等.低浓度紫杉醇对 NK-92MI 细胞增殖及细胞毒效应的影响[J].浙江医学,2012,34(6):431-437.
- [10] 吴妙芳,李晶,谢玲玲,等.紫杉醇在常见妇科恶性肿瘤中的应用[J].临床药物治疗杂志,2012,10(3):27-31.
- [11] 李鹏,孔北华,刘秋燕,等.雷公藤内酯醇诱导上皮性卵巢癌 Caov-3 凋亡的实验研究[J].实用妇产科杂志,2005,21(1):24-27.
- [12] 杨全会,许荣焜.细胞凋亡与肿瘤[J].生理科学进展,2006,37(4):373-378.
- [13] 欧阳高亮,李祺福.细胞凋亡与肿瘤的发生发展和治疗[J].国外医学:肿瘤学分册,2000,27(5):266-269.
- [14] 周彩虹,黄启福.凋亡与肿瘤及其治疗进展[J].中国病理生理杂志,2004,20(11):2124-2133.
- [15] Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide [J]. Science, 1995, 267(5203): 1445-1449.
- [16] 刘丽君,赵思顺,代秀云,等. Caspase-3 在妇科恶性肿瘤中的研究进展[J].中国现代药物应用,2011,5(3):227-228.

(收稿日期:2012-11-08 修回日期:2013-03-22)

启事:本刊对院士及 863、973 项目文章开通绿色通道,欢迎投稿。