

蛇床子素对宫颈癌 HeLa 细胞凋亡的作用研究*

于有江,彭建明[#],叶记林,苏兰娣,罗雪

(扬州职业大学医学院,江苏扬州 225009)

[摘要] **目的** 探讨蛇床子素对宫颈癌 HeLa 细胞增殖、凋亡的作用及可能的机制。**方法** 经不同浓度蛇床子素处理体外培养的宫颈癌 HeLa 细胞,采用四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测细胞增殖活性,流式细胞仪检测细胞凋亡率和细胞内活性氧(ROS)水平,半定量 RT-PCR 法检测 Bcl-2 和 Bax mRNA 的表达。**结果** 与对照组比较,不同浓度的蛇床子素均可明显抑制人宫颈癌 HeLa 细胞增殖、诱导细胞凋亡,增高细胞内 ROS 水平,降低 Bcl-2/Bax 的表达比例,且具有一定的剂量依赖性。**结论** 蛇床子素抑制人宫颈癌 HeLa 细胞增殖并促进细胞凋亡,与升高细胞 ROS 水平、促进激活促凋亡因子 Bax 的表达和抑制抗凋亡因子 Bcl-2 的表达有关。

[关键词] 宫颈肿瘤;蛇床子素;细胞凋亡

[中图分类号] R34

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)07-0883-03

Effect of osthole on apoptosis of human cervical carcinoma HeLa cells*

Yu Youjiang, Peng Jianming[#], Ye Jilin, Su Landi, Luo Xue

(Medical College of Yangzhou Polytechnic College, Yangzhou, Jiangsu 225009, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect and the possible mechanism of osthole on proliferation and apoptosis of human cervical carcinoma HeLa cells and its possible mechanism. **Methods** After cervical carcinoma HeLa cells were incubated with different concentrations osthole, the cell proliferation activity was examined by MTT assay. The apoptosis rate and cellular ROS level were measured by flow cytometry. The Bcl-2 and Bax mRNA expression was determined by semi-quantitative RT-PCR. **Results** In comparison with the control group, osthole with different concentrations could obviously inhibit the HeLa cells proliferation and accelerated the cellular apoptosis, lowered the expression rate of Bcl-2/Bax, raise the cellular ROS level in a osthole dose-dependent manner. **Conclusion** Osthole may inhibit HeLa cell proliferation and accelerates the cells apoptosis, which might be associated with the increasing the cellular ROS level, promoting Bax expression and inhibiting Bcl-2 expression.

[Key words] uterine cervical neoplasms; osthole; apoptosis

蛇床子素(Osthole)是从中药蛇床子中提取的一种香豆素,其化学名称为 7-甲氧基-8-异戊烯基香豆素,具有多种药理学和生物化学活性^[1-2]。现代研究表明,蛇床子素具有多种药理学功能,不仅能保护肝脏、保护神经、抗骨质疏松、抗炎等,还有较强的抗癌活性^[2-4]。目前为止关于蛇床子素在宫颈癌中的研究较少,本研究以人宫颈癌细胞 HeLa 为模型,观察蛇床子素抗宫颈癌的作用,并探讨其可能的作用机制。

1 材料与方

1.1 材料 人宫颈癌 HeLa 细胞购自中国科学院上海细胞生物学研究所细胞库。蛇床子素购自上海诗丹德生物公司(纯度 98%),用二甲基亚砜(DMSO)配成 200 mmol/L 的贮存液;RPMI-1640 培养基和胎牛血清购自美国 Gibco 公司;四甲基偶氮唑盐(MTT)为 AMRESO 产品;Annexin V-PI 细胞凋亡和细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒购于上海碧云天生物技术公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 细胞接种于 RPMI-1640 培养液(含 10% 胎牛血清),置于 37 ℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养。取对数生长期细胞用于以下各实验。

1.2.2 MTT 法测定细胞增殖 取对数生长期细胞,调整细胞浓度为 5×10⁴ 个/mL,接种于 96 孔板中,每孔 100 μL。24 h 后按分组要求加入不同剂量的蛇床子素(20、40、80、120、160、200 μmol/L),溶剂对照组加等体积的 0.1% DMSO,同时设不加细胞只加培养液的孔为空白对照(对照组)。终止培养前 4 h 每孔加入 10 μL MTT。培养 4 h 后,吸弃上清液,每孔加入 100 μL DMSO 溶解反应产物,在酶标仪上检测 492 nm 的吸光度值(OD)。抑制率计算如下:

$$\text{抑制率} = (1 - OD_{\text{药物组}} / OD_{\text{对照组}}) \times 100\%$$

1.2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡 将各处理组(蛇床子素 100、150、200 μmol/L)细胞用胰酶消化,离心收集细胞,PBS 洗涤 2 次后用 500 μL Binding buffer 重悬细胞,并加入 Annexin V 和碘化丙啶(PD)轻轻混匀,室温避光孵育 15 min 后,利用流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.2.4 DCFH-DA 法观察细胞 ROS 水平 采用荧光探针 DCFH-DA 进行 ROS 检测。取经蛇床子素处理 48 h 后的 HeLa 细胞,胰酶消化后,用无血清培养基重悬,加入 DCFH-DA 溶液,37 ℃孵育 30 min 后利用流式细胞仪检测细胞的 ROS 水平。

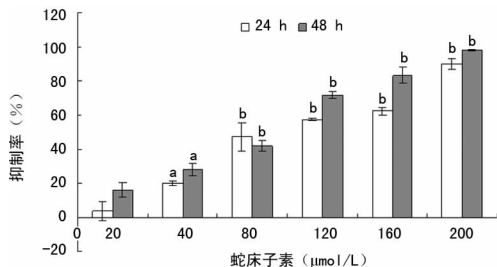
This is trial version

1.2.5 RT-PCR 法检测 Bcl-2 和 Bax mRNA 的表达 取经蛇床子素处理 48 h 后的 Hela 细胞,用 TRIzol 抽提细胞总 RNA,逆转录为互补 DNA(cDNA),取适量 cDNA 为模板,PCR 法检测 Bcl-2 和 Bax mRNA 的表达。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参,进行组间差异比较。引物如下:Bcl-2 上游引物为 5'-GGT CGC CAG GAC CTC GCC GC-3',下游引物为 5'-AGT CGT CGC CGG CCT GGC G-3';Bax 上游引物为 5'-GAG CTG CAG AGG ATG ATT GC-3',下游引物为 5'-AGC CCA ACA GCC GCT CCC GG-3';GAPDH 上游引物为 5'-GAG TCA ACG GAT TTG GTC GT-3',下游引物为 5'-GAC AAG CTT CCC GTT CTC AG-3'。

1.3 统计学处理 采用 SPSS12.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 One-way ANOVA 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

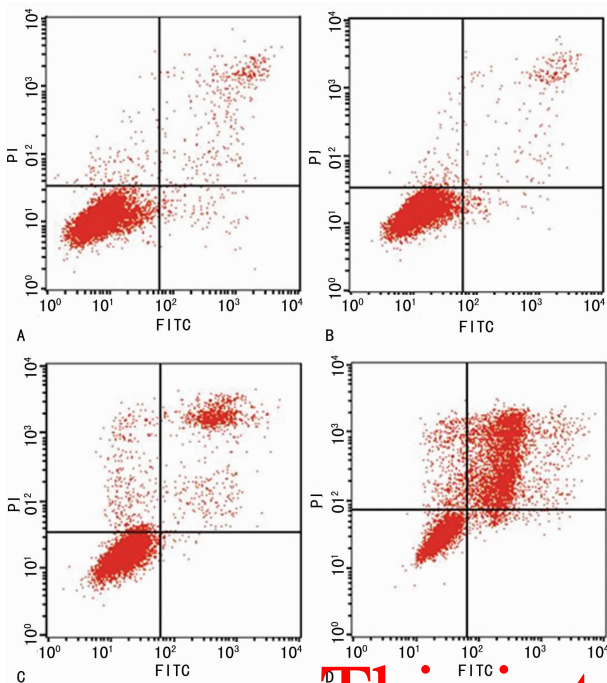
2 结果

2.1 各组肿瘤细胞增殖率比较 通过 MTT 法观察不同浓度蛇床子素对宫颈癌 Hela 细胞增殖的影响,结果显示,蛇床子素对宫颈癌 Hela 细胞的增殖具有明显的抑制作用,蛇床子素各剂量组与对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),而且随药物浓度的增加,其抑制作用逐渐增强,见图 1。



a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与对照组比较。

图 1 蛇床子素处理后对 Hela 细胞增殖的作用

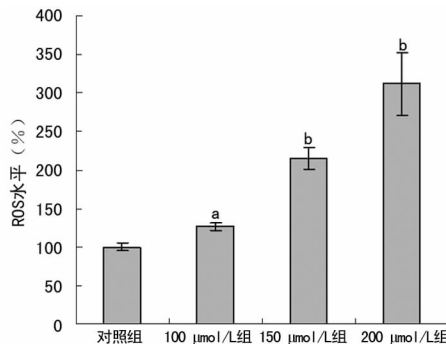


A: 对照组; B: 100 μmol/L 组; C: 150 μmol/L 组; D: 200 μmol/L 组。

图 2 各处理组细胞的流式细胞仪检测结果

2.2 各组宫颈癌 Hela 细胞凋亡率比较 Annexin V 和 PI 双染各处理组细胞,流式细胞仪检测细胞凋亡。结果显示,100 μmol/L 蛇床子素处理宫颈癌 Hela 细胞 48 h 后其凋亡率为 $(4.42 \pm 1.94)\%$,与对照组 $(4.34 \pm 0.26)\%$ 比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);150 μmol/L 和 200 μmol/L 蛇床子素处理宫颈癌 Hela 细胞 48 h 后其凋亡率分别为 $(9.66 \pm 0.12)\%$ 和 $(41.51 \pm 0.30)\%$,与对照组 $(4.34 \pm 0.26)\%$ 比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 2。

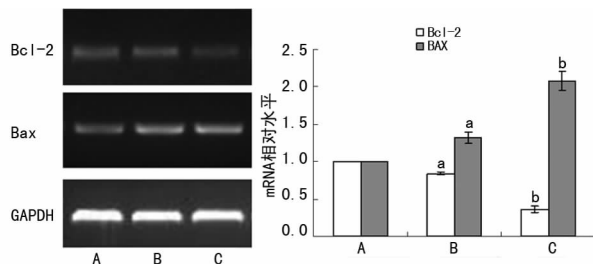
2.3 各组 Hela 细胞 ROS 水平比较 利用 DCFH-DA 法观察细胞 ROS 水平,结果显示,100、150、200 μmol/L 蛇床子素处理组细胞内 ROS 为 $(1.26 \pm 0.04)\%$ 、 $(2.15 \pm 0.14)\%$ 和 $(3.12 \pm 0.42)\%$,与对照组 $(1.00 \pm 0.05)\%$ 比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 3。



a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与对照组比较。

图 3 各组 Hela 细胞 ROS 水平比较

2.4 蛇床子素对宫颈癌 Hela 细胞 Bcl-2 和 Bax mRNA 表达的影响 蛇床子素处理 48 h 后,RT-PCR 检测 Bcl-2 和 Bax mRNA 的表达,与对照组比较,各蛇床子素药物处理组 Bcl-2 mRNA 表达量下降,而 Bax mRNA 表达量明显升高,Bcl-2/Bax 比值显著下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 4。



A: 对照组; B: 150 μmol/L 组; C: 200 μmol/L 组; a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与对照组比较。

图 4 RT-PCR 测定各组 Hela 细胞 Bcl-2 和 Bax 的表达

3 讨论

蛇床子素具有比较广谱的抗癌作用,对包括胃癌、乳腺癌、黑色素瘤、肝癌、白血病、前列腺癌、肺癌等都具有较好的抗癌活性^[4-9]。但对于蛇床子素在宫颈癌中的抗癌作用研究较少。本研究对蛇床子素抗人宫颈癌 Hela 细胞的作用进行了研究,结果显示蛇床子素能有效地抑制人宫颈癌 Hela 细胞增殖和诱导肿瘤细胞凋亡。

ROS 是一类具有比分子氧更活泼的化学反应性的含氧物,主要包括离子状态的超氧阴离子、羟根离子和非离子状态的过氧化氢等。正常生理条件下生物体内存在着一套完善的

氧化/抗氧化体系,可将 ROS 维持在一个稳定的范围内。当 ROS 过度产生,超过了机体抗氧化防御的能力,就会促使细胞发生转化、导致恶性肿瘤的发生^[10-12]。近年来的研究发现,多种临床应用的抗癌药物如三氧化二砷、烷化剂、多柔比星、紫杉醇和喜树碱等,能通过诱导 ROS 的大量增加来诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤细胞增殖,从而达到抗癌的目的^[10,13-14]。Groninger 等^[15]用长春新碱(vincristine, VCR)作用于初发急性淋巴细胞性白血病(ALL)患儿的骨髓白血病细胞和 ALL 细胞株 Jurkat 细胞。在 VCR 作用的早期即可在 Jurkat 细胞检测到 ROS 的存在,应用 ROS 清除剂作用后,ROS 的产生被抑制,并且 Caspase 酶系活性降低,进而抑制 Jurkat 细胞凋亡。但是,蛇床子素能够通过诱导 ROS 的增加来诱导宫颈癌细胞凋亡,目前尚无研究报道。本研究结果显示,蛇床子素诱导宫颈癌 Hela 细胞凋亡与其诱导氧化应激、升高 ROS 水平有关。

越来越多的研究显示,Bcl-2 蛋白家族成员在细胞凋亡的线粒体途径中起重要调控作用。Bcl-2 家族包括两类功能相反的蛋白质:抑制凋亡的蛋白(Bcl-2、bcl-xL)和诱导凋亡的蛋白(Bax、Bak、Bid 和 Bim)^[11]。Bcl-2 和 Bax 分别是 Bcl-2 家族中最有代表性的抗凋亡蛋白和促凋亡蛋白。在凋亡发生过程中,Bax 在某些凋亡相关因素的激活下,可从胞浆迁移至线粒体膜上,Bax 形成线粒体膜通道,导致线粒体膜电位无法维系,膜的完整性遭到破坏,从而导致细胞色素 C 释放,经过 Caspase 活化级联反应,最终导致凋亡发生。本研究发现,当蛇床子素作用于宫颈癌 Hela 细胞后,Bax mRNA 的表达显著升高,而 Bcl-2 mRNA 的表达明显降低,提示蛇床子素通过诱导 Bcl-2/Bax 失衡,进而促发凋亡。

综上所述,蛇床子素通过影响宫颈癌细胞 ROS 水平,打破氧化还原平衡,从而改变线粒体膜通透性,促进激活促凋亡因子 Bax,抑制抗凋亡因子 Bcl-2,经过级联反应,诱导细胞凋亡。

参考文献

- [1] 董晓华,孟宪勇,张力,等.蛇床子素对 AD 大鼠神经元凋亡及细胞周期的影响[J].神经药理学报,2012,2(3):7-14.
- [2] 徐燕,廖建华,吴龙火.蛇床子素的生物学活性与作用机制研究进展[J].湖北农业科学,2013,52(18):4313-4318.
- [3] 李慧.蛇床子素及其衍生物抗肿瘤作用机制研究进展[J].中药药理与临床,2015,31(3):208-214.
- [4] 徐小嫚,张毅,曲丹,等.蛇床子素对人肺鳞癌 NCI-H520 细胞系增殖、凋亡的影响[J].中国医刊,2013,48(3):35-37.
- [5] 苏立平,薛明明,陈立,等.蛇床子素对大鼠肝癌动物模型肝细胞生物行为学特性及血管特征的影响[J].中国生化药物杂志,2014,34(6):35-37.
- [6] 杨大朋,王海啸,彭延延,等.蛇床子素对人乳腺癌细胞增殖、细胞周期及凋亡的影响[J].南京师大学报(自然科学版),2010,33(2):76-80.
- [7] 张毅,佟笑竹,徐小嫚,等.蛇床子素体外对人前列腺癌 DU145 细胞增殖的抑制作用及机制[J].实用药物与临床,2013,16(2):96-98.
- [8] 吕金敏.蛇床子素诱导人肺腺癌细胞进入 G₂/M 阻滞并引起凋亡性死亡研究[J].浙江中西医结合杂志,2015,25(2):115-117.
- [9] Jarzab A, Grabarska A, Kielbus M, et al. Osthole induces apoptosis, suppresses cell-cycle progression and proliferation of cancer cells[J]. Anticancer Res, 2014, 34(11):6473-6480.
- [10] Shen K, Xie J, Wang H, et al. Cambogin induces Caspase-Independent apoptosis through the ROS/JNK pathway and epigenetic regulation in breast cancer cells[J]. Mol Cancer Ther, 2015, 14(7):1738-1749.
- [11] Bonora M, Pinton P. The mitochondrial permeability transition pore and cancer: molecular mechanisms involved in cell death[J]. Front Oncol, 2014(4):302.
- [12] Kello M, Drutovic D, Chripkova M, et al. ROS-dependent antiproliferative effect of brassinin derivative homobrassinin in human colorectal cancer CaCO₂ cells[J]. Molecules, 2014, 19(8):10877-10897.
- [13] Wang Y, Xu K, Zhang H, et al. Retinal ganglion cell death is triggered by paraptosis via reactive Oxygen species production: a brief literature review presenting a novel hypothesis in glaucoma pathology[J]. Mol Med Rep, 2014, 10(3):1179-1183.
- [14] Palit S, Kar S, Sharma G, et al. Hesperetin induces apoptosis in breast carcinoma by triggering accumulation of ROS and activation of ASK1/JNK pathway[J]. J Cell Physiol, 2014, 230(8):1729-1739.
- [15] Groninger E, Meeuwssen-De Boer T, Koopmans P, et al. Vincristine pharmacokinetics and response to vincristine monotherapy in an up-front window study of the Dutch Childhood Leukaemia Study Group (DCLSG)[J]. Eur J Cancer, 2005, 41(1):98-103.

(收稿日期:2016-08-16 修回日期:2016-11-30)

《重庆医学》对临床研究论文医学伦理学要求

凡投本刊的涉及人的生物医学研究论文,作者应说明所在用的试验程序是否经过伦理审查委员会(单位性的、地区性的或国家性的)评估,注明批准号。涉及患者(受试者)的应签订知情同意书。

《重庆医学》编辑部

This is trial version
www.adultpdf.com