

牡荆素诱导人宫颈癌 HeLa 细胞凋亡和细胞周期阻滞的作用

王娜, 张霞, 王玉净, 张华林, 孟亚丽*
(河北医科大学第一医院, 河北 石家庄 050000)

摘要:目的 研究牡荆素诱导人宫颈癌 HeLa 细胞凋亡和细胞周期阻滞的作用。方法 HeLa 细胞培养至对数生长期, 分为对照组和牡荆素低、中、高剂量组; 通过 MTT 法检测细胞增殖能力, 流式细胞术检测细胞凋亡率及细胞周期, Western blot 检测 Bcl-2、Bax、caspase-3、p-P53、cyclin B1、cyclin E 蛋白表达。结果 与对照组比较, 牡荆素各剂量组在 24、48、72 h 内细胞存活率下降 ($P<0.05$, $P<0.01$), 细胞凋亡率增加 ($P<0.01$), Bcl-2 表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), Bax、caspase-3 表达增加 ($P<0.01$), S 期细胞数、cyclin B1、cyclin E 蛋白表达减少 ($P<0.05$, $P<0.01$), G₁ 期细胞数、p-P53 表达增加 ($P<0.05$, $P<0.01$)。结论 牡荆素具有抑制 HeLa 细胞增殖的作用, 该作用与诱导细胞凋亡和细胞周期阻滞有关。

关键词: 牡荆素; 宫颈癌; 凋亡; 细胞周期

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)03-0961-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.03.051

宫颈癌为威胁妇女生命健康的重大疾病, 全球每年约有 50 万新发病例, 且其致死率高居女性恶性肿瘤第四位^[1]。近年来, 随着宫颈癌筛查手段及水平的提高, 宫颈癌发病率明显下降, 但仍然有一大部分患者确诊时即为晚期而失去了手术的最佳阶段^[2]。目前, 化疗仍然是复发和晚期宫颈癌患者最主要的治疗手段^[3]。中药治疗宫颈癌具有低毒副作用、疗效显著、价格低廉等优点, 引起了广大研究者的关注^[4]。

牡荆素是来源于牡荆子和牡荆叶中的天然黄酮类化合物, 具有预防心肌缺血再灌注损伤、降血糖、神经保护、止痛、抗氧化、抗炎等生物活性^[5]。研究发现, 牡荆素能呈时间-剂量依赖性的抑制人肝癌细胞 SMMC-7721 的增殖, 并诱导凋亡^[6]。姜玲等^[7]证实体外牡荆素能抑制卵巢癌 SKOV3 细胞系干细胞样细胞球的形成, 但牡荆素抑制肿瘤细胞增殖的机制并未阐明, 且其对宫颈癌的抑制作用相关报道较少。因此, 本研究以人宫颈癌 HeLa 细胞为研究对象, 在证实牡荆素具有抑制其增殖作用的基础上, 进一步探讨与凋亡及细胞周期的关系, 初步阐明其作用机制, 以期后续临床应用奠定基础。

1 材料

1.1 试剂与药物 牡荆素 (纯度>96%, 南京道斯夫生物科技有限公司); 胎牛血清、DMEM 培养基 (美国 Gibco 公司); MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司); Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒 (大连美仑生物技术有限公司); 细胞周期检测试剂盒 (杭州联科生物技术股份有限公司); Bcl-2、Bax、

caspase-3、p-P53、cyclin B1、cyclin E、GAPDH 多克隆抗体 (美国 CST 公司)。

1.2 仪器 YSK-239 型高速离心机 (美国 Sigma 公司); IX7 型倒置荧光显微镜 (日本 Olympus 公司); Multiscan-GO 酶标仪 (美国 Thermo 公司); FACSCalibur 流式细胞仪 (美国 BD 公司); Mini-Protein 小垂直板电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 细胞株 人宫颈癌 HeLa 细胞购于中国科学院上海细胞库。

2 方法

2.1 HeLa 细胞增殖 HeLa 细胞培养至对数生长期, 离心收集细胞并用完全培养液重悬, 调整细胞密度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 。取 100 μL 细胞悬液于 96 孔细胞培养板中, 培养 24 h 后, 弃去培养液, 分为对照组, 牡荆素低、中、高剂量组, 分别加入含终浓度为 0、2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 牡荆素完全培养液, 继续培养 24、48、72 h。采用 MTT 法, 于 450 nm 波长处测光密度 (OD) 值。

2.2 细胞凋亡率检测 HeLa 细胞培养于 6 孔培养板中, 按“2.1”项下方法分组处理, 培养 48 h 后, 离心并收集细胞于上样管中。依次加入 Annexin V-FITC 结合液 150 μL 、Annexin V-FITC 3 μL 、PI 2 μL 重悬细胞, 在室温条件下于暗室内孵育 15 min。加入磷酸盐缓冲液使终体积为 500 μL , 经 300 目筛子滤过后, 上机检测, 并通过 Cell Quest 软件分析。

2.3 细胞周期检测 HeLa 细胞培养于 6 孔培养板中, 按“2.1”项下方法分组处理, 培养 48 h 后, 离心并收集细胞

收稿日期: 2020-04-16

基金项目: 河北省卫生厅基金项目 (20160709)

作者简介: 王娜 (1983—), 女, 硕士, 主治医师, 从事妇科肿瘤治疗研究。Tel: (0311) 87155172, E-mail: wangna5421@126.com

*通信作者: 孟亚丽 (1963—), 女, 主任医师, 从事妇科肿瘤治疗研究。Tel: (0311) 87155172, E-mail: 736275769@qq.com

于上样管中。在4℃条件下用预冷至0℃75%乙醇固定HeLa细胞0.5 h,加少量磷酸盐缓冲液重悬细胞,再加入适量PI使其终浓度为50 mg/L。在室温条件下于暗室内孵育30 min,加入磷酸盐缓冲液使终体积为500 μL,经300目筛子滤过后,上机检测。

2.4 Western blot 法检测 Bcl-2、Bax、caspase-3、p-P53、cyclin B1、cyclin E 蛋白表达 HeLa 细胞培养于6孔培养板中,按“2.1”项下方法分组处理,培养48 h后,离心并收集细胞于1.5 mL离心管中。在冰水浴下加入细胞裂解液裂解0.5 h,离心取上清,采用考马斯亮蓝法测总蛋白浓度。经12% SDS-PAGE凝胶电泳分离目的蛋白,并通过湿转法将目的蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜上。用封闭液在4℃条件下封闭2 h,再用稀释后(1:2 000)一抗(Bcl-2、Bax、caspase-3、p-P53、cyclin B1、cyclin E)孵育过

夜,二抗(1:5 000)孵育2 h。采用ECL法显色,以GAPDH为内参蛋白,Image J软件对目的蛋白条件进行分析与半定量。

2.5 统计学分析 通过SPSS 18.0软件进行处理,数据以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方法分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 牡荆素对 HeLa 细胞增殖的影响 与对照组比较,牡荆素各剂量组在24、48、72 h内HeLa细胞存活率均下降($P < 0.05$, $P < 0.01$),且随着药物浓度及作用时间的延长,细胞存活率越低,具有明显的剂量依赖关系及时间依赖关系,结果见表1。由此可知,牡荆素具有抑制HeLa细胞增殖的作用。

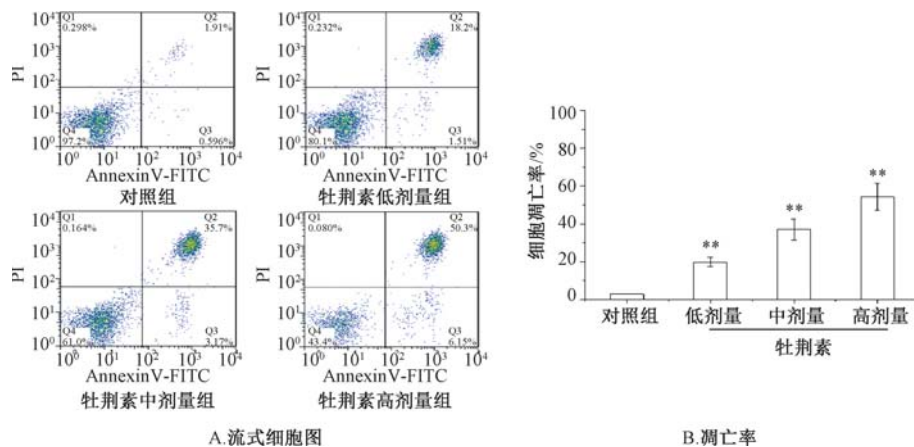
表1 牡荆素对 HeLa 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	剂量/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	细胞存活率/%		
		24 h	48 h	72 h
对照组	0	100.00±0	100.00±0	100.00±0
牡荆素低剂量组	2.5	89.55±10.05 *	81.56±9.24 **	75.06±7.85 **
牡荆素中剂量组	5	73.90±8.36 **	64.63±7.52 **	52.14±5.97 **
牡荆素高剂量组	10	63.58±8.81 **	49.41±5.44 **	40.27±6.13 **

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

3.2 牡荆素对 HeLa 细胞凋亡率的影响 与对照组比较,牡荆素各剂量组HeLa细胞48 h后的细胞凋亡率均增加($P < 0.01$),结果见图1。由此可知,牡荆素对HeLa细胞

凋亡率的诱导作用,随着作用剂量的增加而增强,表现出明显的剂量依赖关系。

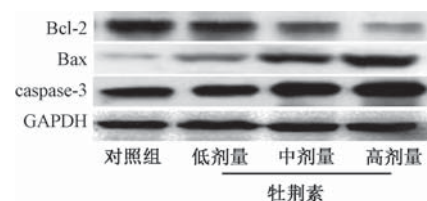


注:与对照组比较,** $P < 0.01$ 。

图1 牡荆素对 HeLa 细胞凋亡率的影响 ($n=5$)

3.3 牡荆素对 HeLa 细胞凋亡相关蛋白表达的影响 与对照组比较,牡荆素各剂量组HeLa细胞Bcl-2表达降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),Bax表达升高($P < 0.01$),牡荆素中、高剂量组HeLa细胞caspase-3表达升高($P < 0.01$),牡荆素低剂量组caspase-3表达升高,但差异无统计学意义($P > 0.05$),结果见图2、表2。由此可知,牡荆素具有HeLa细胞凋亡作用。

3.4 牡荆素对 HeLa 细胞周期分布的影响 与对照组比较,牡荆素各剂量组HeLa细胞S期细胞数减少($P < 0.05$, $P <$



0.01),而G₁细胞数增加($P < 0.05$, $P < 0.01$),结果见图3。由此可知,牡荆素对HeLa细胞周期G₁/S进程具有阻滞作用。

表 2 牡荆素对 HeLa 细胞凋亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	剂量/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	Bcl-2	Bax	caspase-3
对照组	0	1.41 $\pm$ 0.16	0.23 $\pm$ 0.03	1.10 $\pm$ 0.13
牡荆素低剂量组	2.5	1.23 $\pm$ 0.14 *	0.62 $\pm$ 0.08 **	1.22 $\pm$ 0.14
牡荆素中剂量组	5	0.85 $\pm$ 0.09 **	1.06 $\pm$ 0.12 **	1.57 $\pm$ 0.16 **
牡荆素高剂量组	10	0.47 $\pm$ 0.05 **	1.38 $\pm$ 0.15 **	1.84 $\pm$ 0.21 **

注:与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

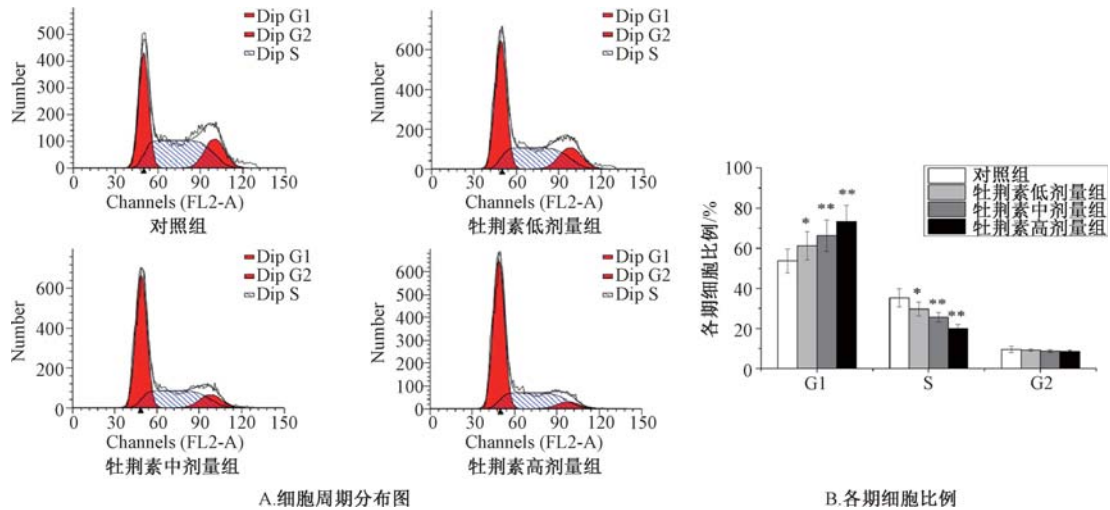


图 3 牡荆素对人宫颈癌 HeLa 细胞周期分布的影响 ($n=5$)

3.5 牡荆素对 HeLa 细胞 p-P53、cyclin B1、cyclin E 蛋白表达的影响 与对照组比较, 牡荆素组各剂量组 HeLa 细胞 p-P53 表达增加 ($P<0.01$), cyclin B1、cyclin E 蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), 结果见图 4、表 3。由此可知, 牡荆素具有细胞周期阻滞作用。

4 讨论

细胞凋亡与肿瘤的发生发展关系密切, 凋亡进程由多种基因严密调控, 是一种为适应外部环境而进行的主动性

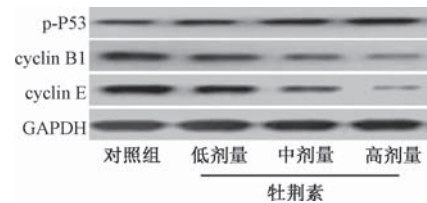


图 4 牡荆素对人宫颈癌 HeLa 细胞 p-P53、cyclin B1、cyclin E 蛋白表达的影响

表 3 牡荆素对人宫颈癌 HeLa 细胞 p-P53、cyclin B1、cyclin E 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	剂量/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	p-P53	cyclin B1	cyclin E
对照组	0	0.21 $\pm$ 0.03	0.63 $\pm$ 0.08	0.86 $\pm$ 0.10
牡荆素低剂量组	2.5	0.36 $\pm$ 0.05 **	0.48 $\pm$ 0.06 **	0.67 $\pm$ 0.08 *
牡荆素中剂量组	5	0.53 $\pm$ 0.07 **	0.24 $\pm$ 0.04 **	0.32 $\pm$ 0.03 **
牡荆素高剂量组	10	0.74 $\pm$ 0.06 **	0.18 $\pm$ 0.02 **	0.11 $\pm$ 0.02 **

注:与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

程序死亡过程^[8]。在众多的凋亡调控基因中, B 淋巴细胞瘤-2 基因 (*Bcl-2*) 和 *Bcl-2* 相关 X 蛋白 (*Bax*) 在宫颈癌等多种肿瘤中表达异常, 为细胞凋亡过程中的关键调控因子, 已成为多种抗癌药物研发的热门靶点^[9]。*Bcl-2* 基因可阻断细胞凋亡进程, 而作为 *Bcl-2* 同源基因的 *Bax* 则具有促进细胞凋亡作用^[10]。细胞凋亡最主要的途径为线粒体凋亡途径, 凋亡信号首先促使线粒体的通透性转换孔开放, 随后使线粒体跨膜电位下降, 进而导致线粒体膜功能障碍, 引起半胱氨酸蛋白酶-3 (caspase-3) 的激活及表达增加, 诱发 caspase 家族级联反应, 最终使细胞发生凋亡^[11]。本研究首先采用 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞法在细胞水平上, 发现牡荆素具有诱导 HeLa 细胞凋亡的作用; 进而采

用 Western blot 法在分子水平上, 证实牡荆素可以降低 HeLa 细胞 *Bcl-2* 表达、增加 *Bax*、caspase-3 表达, 进一步提示牡荆素抑制 HeLa 细胞增殖作用与诱导凋亡有关。

近年来, 细胞癌变与细胞周期的关系已成为广大研究者关注的焦点, 通过靶向细胞信号传导途径中的相关蛋白, 调节细胞周期进程^[12]。除 G_0 期、 G_1 期、S 期、 G_2 期及 M 期外, G_1 /S 期是最为重要的检查点, 其可监测 DNA 合成的保真度和细胞组分的完整性^[13]。本研究采用流式细胞术检测发现, 人宫颈癌 HeLa 细胞经不同浓度的牡荆素处理 48 h 后, S 期细胞数减少, 而 G_1 细胞数增加, 提示牡荆素对 HeLa 细胞周期 G_1 /S 进程具有阻滞作用。p53 蛋白是基因组的监护者, 致癌信号、DNA 损伤等细胞应激均会激活

p53 信号通路, 进而活化多个下游途径, 使细胞周期检查点 G₁/S 期暂时停顿, 诱导细胞凋亡及衰老^[14]。细胞周期蛋白及细胞周期蛋白依赖性激酶共同调控细胞周期的进程, 其中细胞周期蛋白 cyclin B1 和 cyclin E 是促进 G₁ 期向 S 期转换的主要调节蛋白, 若表达降低, 则会导致 G₁/S 进程受阻^[15-16]。本研究发现人宫颈癌 HeLa 细胞经不同浓度的牡荆素处理 48 h 后, p-P53 表达增加, 而 cyclin B1、cyclin E 蛋白表达降低, 进一步提示牡荆素具有阻滞细胞周期 G₁/S 进程的作用。

综上所述, 牡荆素可能通过诱导人宫颈癌 HeLa 细胞凋亡和细胞周期阻滞, 发挥抑制 HeLa 细胞增殖作用, 为牡荆素治疗宫颈癌提供重要的实验基础, 也可作为牡荆素抗肿瘤作用机制的研究提供新的思路。

参考文献:

- [1] Murfin J, Irvine F, Meehan-Rogers R, *et al.* Education, income and occupation and their influence on the uptake of cervical cancer prevention strategies: a systematic review[J]. *J Clin Nurs*, 2020, 29(3-4): 393-415.
- [2] Bedell S L, Goldstein L S, Goldstein A R, *et al.* Cervical cancer screening: past, present, and future[J]. *Sex Med Rev*, 2020, 8(1): 28-37.
- [3] Cibula D, Planchamp F, Fischerova D, *et al.* European society of gynaecological oncology quality indicators for surgical treatment of cervical cancer[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2020, 30(1): 3-14.
- [4] Yang J P, Li J Y, Sun M M, *et al.* Studies of traditional Chinese medicine monomer on HeLa cell of cervical cancer[J]. *Pak J Pharm Sci*, 2014, 27(4 Suppl): 1063-1068.
- [5] 白 军, 谢宛玉, 曹建国. 紫花牡荆素药理作用的研究进展[J]. *中国新药杂志*, 2010, 19(21): 1954-1957.
- [6] 石元英, 邓立东, 饶伟文, 等. 牡荆素对人肝细胞癌 SMMC-7721 细胞的增殖抑制作用及其机制的影响[J]. *中国医院药学杂志*, 2016, 36(5): 366-371.
- [7] 姜 玲, 曹晓正, 李 程, 等. 紫花牡荆素对 SKOV3 卵巢癌细胞样细胞 FoxO3a 磷酸化的影响[J]. *中国癌症杂志*, 2015, 25(5): 360-364.
- [8] Ihraiz W G, Ahram M, Bardaweel S K. Proton pump inhibitors enhance chemosensitivity, promote apoptosis, and suppress migration of breast cancer cells[J]. *Acta Pharm*, 2020, 70(2): 179-190.
- [9] 周瑶瑶, 陈风云, 屠文骆. 棕榈酸在体外通过促进凋亡作用抑制宫颈癌 Hela 细胞增殖的研究[J]. *实用肿瘤学杂志*, 2019, 33(5): 402-406.
- [10] 陈彦洁, 柳传毅, 吕满霞, 等. 鱼藤素诱导肺癌细胞凋亡和细胞周期阻滞的分子机制[J]. *中国药理学通报*, 2019, 35(8): 1109-1114.
- [11] Bhagya K P, Aswathy R J, Radhakrishnan K, *et al.* Autoimmune regulator enhanced the expression of caspase-3 and did not induce massive germ cell apoptosis in GC1-Spg cells[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2020, 54(1): 40-52.
- [12] 缪 慧, 朱伯金, 邵伯云. 灯盏花素对肺癌 A549 细胞增殖、凋亡及细胞周期的影响[J]. *临床和实验医学杂志*, 2019, 18(22): 2405-2409.
- [13] 武 红, 杨丽萍, 冯海芹, 等. 沙利度胺对人宫颈癌 Hela 细胞周期的影响及其作用机制[J]. *现代肿瘤医学*, 2019, 27(19): 3378-3381.
- [14] Zhu R X, Cheng A S L, Chan H L Y, *et al.* Growth arrest-specific gene 2 suppresses hepatocarcinogenesis by intervention of cell cycle and p53-dependent apoptosis [J]. *World J Gastroenterol*, 2019, 25(32): 4715-4726.
- [15] Farshadi E, Yan J, Leclerc P, *et al.* The positive circadian regulators CLOCK and BMAL1 control G2/M cell cycle transition through cyclin B1[J]. *Cell Cycle*, 2019, 18(1): 16-33.
- [16] Dong L, Yu L, Bai C R, *et al.* USP27-mediated cyclin E stabilization drives cell cycle progression and hepatocellular tumorigenesis[J]. *Oncogene*, 2018, 37(20): 2702-2713.