

掌叶半夏有效提取物对 HeLa 细胞的作用及机制

李桂玲¹ 归绥琪¹ 王 莉¹ 林理根² 叶 阳²

摘要 **目的** 观察中药掌叶半夏有效提取物(Pinellia extract, PE)对 HeLa 细胞的作用,并对可能的机制进行初步研究,为其临床用于防治女性宫颈病变提供科学依据。**方法** 用倒置相差显微镜观察细胞生长并摄影,MTT 法检测细胞活性,流式细胞术检测细胞凋亡,免疫细胞化学法检测增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)蛋白表达,免疫荧光实验检测 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)蛋白表达。**结果** PE 对 HeLa 细胞的生长表现出明显的抑制作用,流式细胞术检测结果显示 PE 作用后 HeLa 细胞出现凋亡,且随着作用时间延长,凋亡细胞的比例明显增加;免疫细胞化学实验和免疫荧光实验结果表明:PE 作用 24 h 后 HeLa 细胞 PCNA 和 Bcl-2 蛋白表达均明显减少。**结论** PE 对 HeLa 细胞有明显的抑制生长和促进凋亡的作用,其促凋亡机制是通过降低 PCNA 和 Bcl-2 蛋白表达来实现的,这为进一步研究 PE 的作用机制以及抗癌新药的研制开发奠定了初步的实验基础。

关键词 掌叶半夏有效提取物;宫颈癌;HeLa 细胞株;增殖细胞核抗原;B 细胞淋巴瘤/白血病-2

Effect of Pinellia Extract on HeLa Cell Line *in vitro* and Associated Mechanism LI Gui-ling, GUI Sui-qi, Wang Li, et al *Department of Integrated Traditional and Western Medicine, Obstetrics and Gynecology Hospital of Fudan University, Shanghai (200011)*

ABSTRACT **Objective** To investigate the effect of Pinellia extract (PE) on HeLa cell line and to study its associated mechanisms, in order to provide theoretical foundations for its applying in clinical prevention and treatment of cervical disease. **Methods** HeLa cell line was incubated in media containing different concentrations of PE. Growth of cells was observed and photo-generated with inverted phase microscope; cell activity was detected by MTT assay; cell apoptosis detected by flow cytometry, protein expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) was detected by immuno-cytochemistry, and protein expression of Bcl-2 was determined by immunofluorescence. **Results** PE showed obvious inhibition on the proliferation of HeLa cells, cell apoptosis appeared after PE treatment in a time and dose dependent manner; PCNA and Bcl-2 protein expressions reduced significantly after being effected by PE for 24 h. **Conclusions** PE can obviously inhibit the growth and induce the apoptosis of HeLa cells, and its mechanism is possibly realized through down-regulating the expressions of PCNA and Bcl-2. The study set a primary experimental base for further studying the action mechanism of PE and developing new anti-tumor agents.

KEYWORDS Pinellia extract; cervical cancer; HeLa cell line; proliferating cell nuclear antigen; B cell lymphoma/leukemia-2

宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤,占女性生殖系统恶性肿瘤的半数以上,病死率居女性恶性肿瘤的首位^[1]。近年来随着人乳头状瘤病毒(HPV)感染率的上升,宫颈癌的发病率呈上升趋势,且高发年龄趋于年轻化,成为严重危害妇女健康的疾病^[2-5]。掌叶半夏为天南星科植物掌叶半夏的块茎,又名虎掌南星,有定惊祛风、化痰散结之功。1981 年上海第一医学院妇产

科医院首先报道应用掌叶半夏治疗宫颈癌疗效确切^[6]。近年来,科研人员对掌叶半夏的药理进行了深入研究,发现其抗肿瘤作用明显。本研究以掌叶半夏提取物的有效部位(Pinellia extract,以下简称 PE)作为研究对象,观察其对体外培养宫颈癌细胞株 HeLa 的作用,为寻找一种能有效防治女性宫颈病变的纯中药制剂奠定理论基础。

材料与方 法

1 药物、细胞、培养液与主要仪器 PE 由中国科学院上海药物所天然药化研究室提供,DMSO 溶解,过滤除菌,冷藏备用;RPMI1640 培养液(GIBCO 公司)、

基金项目:上海市科委科研计划项目(No.074119613)

作者单位:1. 复旦大学附属妇产科医院中西医结合科(上海 200011);2. 中国科学院上海药物研究所天然药化研究室

通讯作者:归绥琪,Tel:021-63455050, E-mail:fckzxy@126.com

胎牛血清(GIBCO 公司);二甲基噻唑二苯基四唑溴盐(MTT, Sigma 公司);Anxin-V、碘化丙啶(PI)双染试剂盒(BD 公司);人宫颈癌细胞株 HeLa 引自美国典型培养物保藏中心(简称 ATCC),经中国科学院细胞库复苏后提供;倒置相差显微镜(Nikon 公司)、CO₂ 细胞孵育箱(Heraeus 公司)、超净工作台(苏州净化设备有限公司)、连续光波酶标仪(Bio-Rad 公司)、流式细胞仪(Becton Dickinson 公司)。

2 方法

2.1 HeLa 细胞培养 细胞培养于含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液,37 ℃、5% CO₂、饱和湿度条件常规培养;细胞培养至铺满瓶底后用含 0.25% 胰蛋白酶消化液消化细胞并按 1.0×10^5 /mL 分瓶,3~5 天传代 1 次。

2.2 细胞增殖抑制实验 采用 MTT 法取对数生长期的 HeLa 细胞,胰酶消化后吹打成单细胞悬液(2×10^4 /mL)接种于 96 孔培养板,培养 24 h 细胞贴壁后加入不同浓度的 PE,使最终浓度分别为 0、0.008、0.031、0.125 及 0.500 mg/mL,同时设空白对照及溶剂对照,每一浓度设 3 复孔,分别培养 1、3、5 天,每孔加 20 μ L 5 mg/mL 的 MTT 液,37 ℃ 孵育 4 h,弃培养液,加 150 μ L DMSO,室温下振荡 10 min,使充分溶解后于 570 nm/630 nm 测定吸光值 A。本实验重复 3 次,绘制细胞生长曲线,计算 PE 作用 3 天后细胞生长抑制率,抑制率(%) = (A 对照 - A 处理) / A 对照 $\times$ 100%。

2.3 倒置相差显微镜摄影 取对数生长期的 HeLa,胰酶消化制成单细胞悬液(2×10^4 /mL),等量接种于 24 孔培养板,培养 24 h 细胞贴壁后加入 0 或 0.15 mg/mL 的 PE,分别培养 1、2、3 天,倒置相差显微镜下观察摄影。

2.4 细胞凋亡采用流式细胞检测 取对数生长期的 HeLa 细胞稀释至 1×10^5 /mL,种植于培养瓶,24 h 细胞贴壁后,加入 0.15 mg/mL 的 PE,继续培养不同的时间,0.25% 胰酶消化后 2 000 r/min 离心 5 min,弃上清,PBS 洗 2 次,加 70% 的冷乙醇固定,PBS 洗 2 次,加入 RNA 酶 0.1 mg/mL 37 ℃ 孵育 30 min,再加入 50 mg/L 的 PI 1 mL,染色 30 min,用流式细胞仪进行检测,结果用 Becton Dickinson 公司 CELLQUEST 和 Mod-FIT LT for mac v1.01 软件进行分析。主要指标为细胞凋亡。激光工作条件为氩离子激光器 Innova 90-5,激光功率为 15 mW,激光波长为 488 nm。

2.5 免疫细胞化学法检测增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)表达 将无菌的清洁盖玻片置于 24 孔板中,对数生长期细胞以 1×10^5 /mL 密度接种,24 h 细胞贴壁后,加入 0.15 mg/mL

的 PE 作用于 HeLa 细胞 24 h 后用 PBS 洗 2 次,4% 甲醛固定 10 min,PBS 洗 3 $\times$ 5 min,余下步骤按 ABC 试剂盒说明书进行,封片,显微镜下观察摄片。采用 Leica Qwin Image 定量分析仪进行分析,每个标本取 10 个视野,取积分光密度(IOD)的平均值比较。

2.6 免疫荧光法检测 Bcl-2 表达 将无菌清洁盖玻片置于 24 孔板中,对数生长期细胞以 1×10^5 /mL 密度接种,24 h 细胞贴壁后,加入 0.15 mg/mL 的 PE 作用于 HeLa 细胞 24 h 后吸出培养板中培养液,PBS 洗 5 min;4% 多聚甲醛室温固定 30 min;吸出固定液,PBS 洗 3 $\times$ 5 min;加入含 0.3% Triton X-100 和 1% BSA 的封闭液,37 ℃ 湿盒孵育 30 min;吸出封闭液,勿洗;加入 1:100 稀释的 Bcl-2 鼠抗人单克隆抗体至铺满盖玻片,4 ℃ 湿盒孵育过夜;吸出一抗工作液,PBS 洗 3 $\times$ 5 min;加入 1:100 稀释的 FITC 标记山羊抗小鼠 IgG,37 ℃ 湿盒避光孵育 60 min;吸出二抗工作液,PBS 避光洗 3 $\times$ 5 min;封片;荧光显微镜下观察摄片。采用 Leica Qwin Image 定量分析仪进行分析,每个标本取 10 个视野,取积分光密度(IOD)的平均值比较。

3 统计学方法 采用 SPSS 软件进行两样本均数比较 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组细胞增殖抑制实验结果比较 MTT 实验结果显示,低剂量 PE(0.008 mg/mL、0.031 mg/mL)及溶剂对照 HeLa 细胞生长无明显抑制作用,中等剂量 PE(0.125 mg/mL)对 HeLa 细胞生长已表现出明显的抑制作用,与空白对照组比较差异有统计学意义;当 PE 的浓度达到 0.500 mg/mL 时,细胞生长完全受到抑制(表 1、图 1)。

表 1 各组细胞增殖抑制实验结果比较 (A 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	浓度 (mg/mL)	n	HeLa 细胞		
			1	3	5(d)
空白对照	—	3	0.110 $\pm$ 0.013	0.150 $\pm$ 0.016	0.313 $\pm$ 0.034
溶剂对照	—	3	0.108 $\pm$ 0.019	0.146 $\pm$ 0.004	0.301 $\pm$ 0.035
PE	0.008	3	0.105 $\pm$ 0.021	0.142 $\pm$ 0.018	0.262 $\pm$ 0.019
	0.031	3	0.098 $\pm$ 0.017	0.133 $\pm$ 0.021	0.200 $\pm$ 0.028
	0.125	3	0.076 $\pm$ 0.004*	0.081 $\pm$ 0.029*	0.111 $\pm$ 0.031*
	0.500	3	0.014 $\pm$ 0.001**	0.008 $\pm$ 0.001**	0.007 $\pm$ 0.001**

注:与空白对照组同期比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

2 不同浓度 PE 作用 3 天后细胞生长抑制曲线(图 2) 不同浓度 PE 作用 3 天后,MTT 实验测定吸光度值,计算抑制率,绘制 HeLa 细胞生长曲线。随着 PE 浓度的增加,细胞的生长明显受到抑制;同时可看出 PE 对 HeLa 细胞生长的 50% 抑制浓度(即 IC₅₀)约为 0.15 mg/mL。此浓度被用作进一步研究的参考

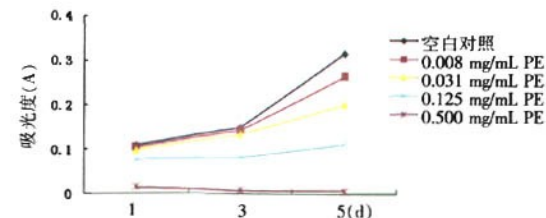


图 1 PE 作用后 HeLa 生长曲线

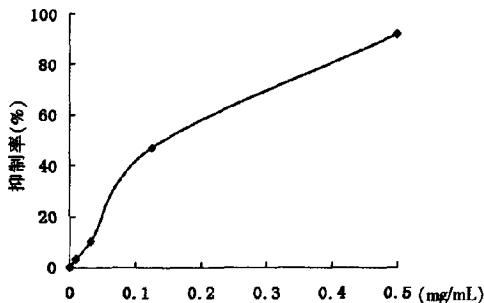


图 2 不同浓度 PE 作用 3 天对 HeLa 细胞的生长抑制曲线

浓度。

3 0.15 mg/mL PE 作用不同时间后 HeLa 细胞形态学变化(图 3) 正常生长的 HeLa 细胞胞质透亮(图 3 H1~H3)。0.15 mg/mL 的 PE 作用于细胞 1 天后,细胞胞浆即减少,形态轮廓不清晰,随着作用时间延长,2~3 天后细胞逐渐皱缩直至脱离瓶壁,而呈悬浮状态(图 3 H4~H6)。流式细胞术检测结果显示近半数悬浮细胞已凋亡。

4 PE 对 HeLa 细胞凋亡的影响(图 4) 0.15

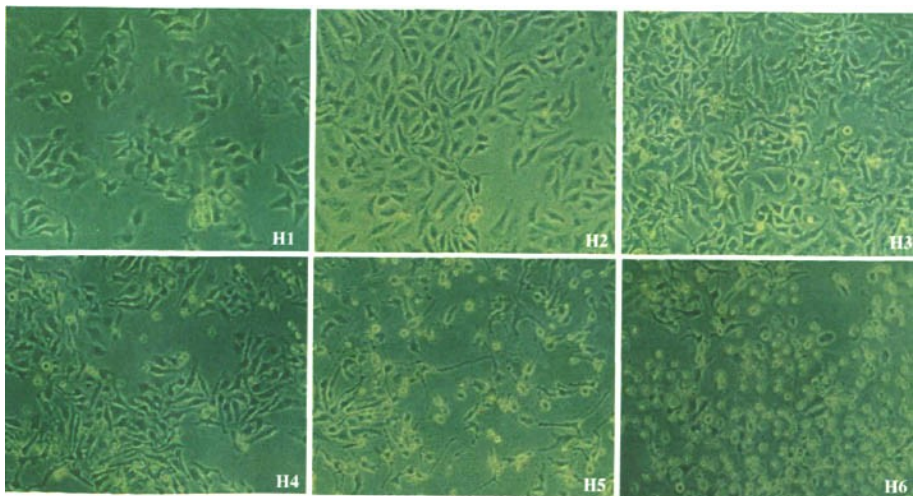
mg/mL PE 作用后 HeLa 细胞出现很大比例的凋亡,并且随着作用时间的延长,凋亡细胞比例明显增加。PE 作用 3 天后 HeLa 细胞凋亡比例为 48.76%;作用 5 天后 HeLa 细胞凋亡比例高达 83.37%,与正常对照组(6.32%、9.06%)比较差异有统计学意义。

5 PE 对 PCNA 表达的影响(图 5) HeLa 细胞存在 PCNA 的高表达;0.15 mg/mL PE 作用 HeLa 细胞 24 h 后 PCNA 的表达量明显减少,平均 IOD 值为 0.32,与正常对照组平均 IOD 值(0.41)比较差异有统计学意义($P<0.05$)。

6 PE 对 Bcl-2 蛋白表达的影响(图 6) 图中的绿色荧光为 Bcl-2 阳性表达,0.15 mg/mL PE 作用 24 h 后 HeLa 细胞 Bcl-2 的表达明显减少,平均 IOD 值为 0.54,与正常对照组平均 IOD 值(0.32)比较差异有统计学意义($P<0.05$)。

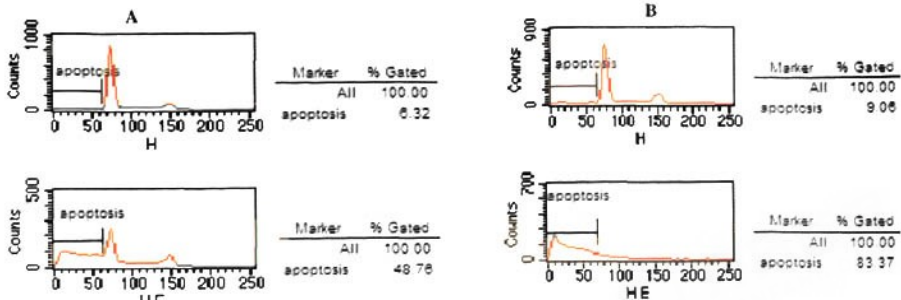
讨 论

宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤之一,在妇科肿瘤中排第 2 位,在常见的恶性肿瘤中排第 7 位。迄今为止,宫颈癌仍是引起妇女死亡的主要原因之一。世界卫生组织 20 世纪 80 年代的统计结果表明,全世界每年的新发宫颈癌病例约为 45.94 万,我国每年新发病例约为 13.15 万,占全世界宫颈癌新发病例的三分之一,每年死亡约为 5.3 万,平均病死率为 14.6/10 万,居世界第 2 位^[1]。因此,有效地预防和治疗宫颈病变已成为全球性挑战^[7]。虽然宫颈癌的治疗包括基



注:H1 为正常生长 1 天的 HeLa 细胞;H2 为正常生长 2 天的 HeLa 细胞;H3 为正常生长 3 天的 HeLa 细胞;H4 为 PE 作用 1 天的 HeLa 细胞;H5 为 PE 作用 2 天的 HeLa 细胞;H6 为 PE 作用 3 天的 HeLa 细胞

图 3 0.15 mg/mL PE 作用不同时间后 HeLa 细胞形态学变化(HE 染色, ×100)



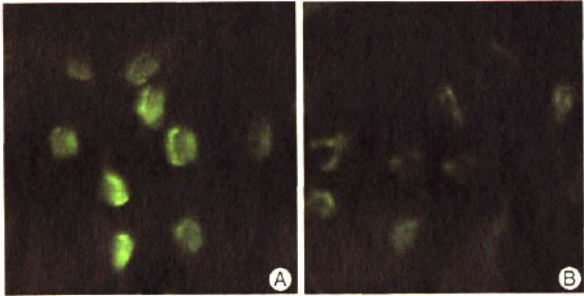
注:H 为 HeLa 细胞;HE 为 PE 作用后 HeLa 细胞;A 为 PE 作用 3 天;B 为 PE 作用 5 天

图 4 0.15 mg/mL PE 作用不同时间后 HeLa 细胞凋亡率



注:A 为阴性对照组;B 为正常对照组;C 为处理组

图 5 0.15 mg/mL PE 作用于 HeLa 细胞 24 h 后 PCNA 的表达 (ABC 染色法, $\times 100$)



注:A 为正常对照组;B 为处理组

图 6 0.15 mg/mL PE 作用于 HeLa 细胞 24 h 后 Bcl-2 蛋白表达的变化 (免疫荧光法, $\times 400$)

因治疗、免疫治疗等已取得了不少突破性进展,以及欧美等发达国家宫颈癌疫苗的上市^[7,8],确实为宫颈癌的预防和治疗带来了福音,但是在中国这样的发展中国家,疫苗普及还是很遥远的事情。因此,如何发掘中医药治疗肿瘤的潜力、开展中医药治疗肿瘤的机制研究已受到国内外的重视。

中医妇科学将宫颈癌列入“癥瘕”范畴。其中痰湿结聚为最常见病因,常与血瘀相伴,终积为“癥”,故中医辨证以痰湿癥瘕型为多见。治则为化痰软坚散结,活血祛瘀消癥。掌叶半夏 (*Pinellia pedatisecta*

Schott) 的块茎属天南星科半夏属植物类,具有化痰散结、祛风定惊之功效。20 世纪 70 年代,上海第一医学院妇产科医院用掌叶半夏治疗宫颈癌,研究分 3 个阶段:第 1 阶段用新鲜掌叶半夏煎汤代茶口服并捣烂外敷患处;第 2 阶段提取成分制成片剂口服,并制成栓剂、棒剂外用;第 3 阶段以浓醇提取物制成片剂和栓、棒剂内服外用。用此法先后治疗宫颈癌 247 例,治疗时间在 2 个月以上,Ⅰ期有效率 96.67%,Ⅱ期有效率为 74.66%,Ⅲ期有效率 74.21%^[6,9]。研究还发现,掌叶半夏浸出液对 HeLa 细胞有明显的抑制作用,表现

为细胞凝缩成团块,失去正常细胞结构,而且部分细胞脱落,但对该药的药理作用机制未进行更深入研究。孙光星等^[10]发现掌叶半夏蛋白成分对 S-180 小鼠肉瘤有明显抑制作用,朱铭伟等^[11]则观察到掌叶半夏总蛋白对多种卵巢癌细胞株有明显抑制作用。随着中药现代化的进程,中药提纯工艺的不断优化,使得对掌叶半夏有效成分的提取、纯化及鉴定成为可能。本研究采用中国科学院上海药物所天然药化研究室提供的掌叶半夏提取物的有效部位(PE)作为研究对象,观察其对体外培养的宫颈癌细胞株 HeLa 生长的作用。PE 为脂溶性半固体物质,DMSO 可以使它充分溶解后加入培养液中,制成实验所需浓度备用。

本研究结果显示:中等剂量 PE(0.125 mg/mL)对 HeLa 细胞的生长已表现出明显的抑制作用,与对照组比较差异有显著意义;当 PE 的浓度达到 0.500 mg/mL 时,细胞的生长完全受到抑制。同时由生长抑制曲线可以看出 PE 对 HeLa 细胞生长的 50% 抑制浓度(即 IC_{50})约为 0.15 mg/mL。倒置相差显微镜下观察到正常生长的 HeLa 细胞,胞质透亮,轮廓清晰;0.15 mg/mL 的 PE 作用于细胞 1 天后,细胞胞浆即减少,形态轮廓不清晰,随着作用时间延长,2~3 天后细胞逐渐皱缩直至脱离瓶壁,而呈悬浮状态。流式细胞术检测结果显示 PE 作用 3 天后近半数细胞已凋亡。免疫细胞化学实验与免疫荧光实验结果显示 PE 作用于 HeLa 细胞 24 h 后 PCNA 与 Bcl-2 蛋白的表达均明显较少,与对照组比较 IOD 值差异有统计学意义。从以上实验已初步观察到,PE 对体外培养的宫颈癌细胞株 HeLa 的生长有明显的抑制增殖及促凋亡作用,PE 对 HeLa 细胞的作用机制之一是抑制 PCNA 及 Bcl-2 蛋白的表达。这为进一步研究 PE 的抗癌作用机制以及新药的研制开发奠定了初步的实验基础。

参 考 文 献

- [1] Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000[J]. *Lancet Oncol*, 2001, 2(9):533-543.
- [2] Graaf Y, Molijn A, Doornewaad H, et al. Human papilloma virus and long-term risk of cervical neoplasia[J]. *Am J Epidemiol*, 2002, 156(2):158-164.
- [3] Munoz N. Human papilloma virus and cancer: the epidemiological evidence[J]. *J Clin Virol*, 2000, 19(1-2):1-5.
- [4] Hwang TS, Jeong JK, Park M, et al. Detection and typing of HPV genotypes in various cervical lesions by HPV oligonucleotide microarray[J]. *Gynecol Oncol*, 2003, 90(1):51-56.
- [5] Dell G, Gaston K. Human papilloma viruses and their role in cervical cancer[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2001, 58(12-13):1923-1942.
- [6] 上海第一医学院妇产科医院药剂科,基础部化学教研组. β -谷甾醇栓剂的研制[J]. *药学通报*, 1980, 15(2):23-25.
Chemistry Department of Basic Research Center. Obstetrics and Gynaecology Hospital of Shanghai 1st Medical University. Trituration of β -sitosterol suppositories[J]. *Pharmac Rep*, 1980, 15(2):23-25.
- [7] 朗景和. 迎接子宫颈癌预防的全球挑战与机遇[J]. *中华妇产科杂志*, 2002, 37(3):129-131.
Lang JH. Greeding global challenge and opportunity of cervical cancer prevention[J]. *Chin J Obstet Gynecol*, 2002, 37(3):129-131.
- [8] 张颖,郎景和. 人乳头瘤病毒疫苗在子宫颈病变预防和诊疗中的应用[J]. *中华妇产科杂志*, 2006, 41(3):214-216.
Zhang Y, Lang JH. Application of HPV vaccine in prevention and treatment for cervical lesions[J]. *Chin J Obstet Gynecol*, 2006, 41(3):214-216.
- [9] 李超荆,徐亚铭,孙月丽,等. 掌叶半夏抗子宫颈癌成分的研究: β -谷甾醇的分离、鉴定及疗效观察[J]. *上海第一医学院学报*, 1981, 8(6):421-423.
Li CJ, Xu YM, Sun YL, et al. Research on anti-cervical cancer component of *Pinellia Pedatisecta schott* [J]. *J Shanghai First Med Univ*, 1981, 8(6):421-423.
- [10] 孙光星,丁声颂,钱瑶君. 掌叶半夏总蛋白的提取,化学分析和对小鼠 S-180 瘤株的抑制作用[J]. *上海医科大学学报*, 1992, 19(1):17-20.
Sun GX, Ding SS, Qian YJ. Extraction and chemical analysis of total protein from *Pinellia Pedatisecta schott* and the inhibition effect on mice S-180 cell line[J]. *J Shanghai Med Univ*, 1992, 19(1):17-20.
- [11] 朱铭伟,周抗美,丁声颂. 掌叶半夏总蛋白对卵巢癌细胞株及人脐造血细胞的作用[J]. *上海医科大学学报*, 1999, 26(6):455-457.
Zhu MW, Zhou KM, Ding SS. Effect of total protein from *Pinellia Pedatisecta schott* on ovarian cancer cell lines and umbilical cord blood hematopoietic stem cells[J]. *J Shanghai Med Univ*, 1999, 26(6):455-457.

(收稿:2009-02-06 修回:2009-11-20)