

# 土荆皮酸诱导宫颈癌细胞系 HeLa 凋亡的实验研究

胡云<sup>1</sup> 吴效科<sup>2</sup> 侯丽辉<sup>2</sup>

**摘要** 目的 研究土荆皮酸(PAB)对体外培养的 HeLa 细胞的生物学效应和作用机制。方法 用 MTT 法、流式细胞术、透射电镜检测体外培养的 HeLa 细胞在 PAB 作用下的增殖抑制及凋亡程度,用 RT-PCR 法检测 p53/bcl-2/bax 的表达水平。结果 (1) PAB 对 HeLa 细胞的增殖抑制作用随浓度升高而明显增强,其 IC<sub>50</sub> 约 10 μmol/L。(2) 流式细胞术证实 10 μmol/L PAB 呈时间依赖性改变细胞周期分布,一方面降低 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期的细胞比例,另一方面增高 G<sub>2</sub>/M 期细胞的比例。(3) RT-PCR 法显示 HeLa 细胞在 10 μmol/L PAB 作用 12、24、48 h 均显示 bax 上调和 bcl-2 的下调,p53 则未检测到表达。结论 在体外 PAB 能抑制 HeLa 细胞增殖,诱导其凋亡,其诱导凋亡机制可能与 bax 的上调和 bcl-2 的下调相关。

**关键词** 土荆皮酸;宫颈癌 HeLa 细胞;凋亡

## Study on the Apoptosis Inducing Effect of Pseudolaric Acid B on Cervical Carcinoma Cell Line HeLa Cells

HU Yun, WU Xiao-ke and HOU Li-hui *Department of Obstetrics and Gynecology, the 211 Hospital of PLA, Harbin (150080)*

**ABSTRACT** **Objective** To investigate the biological effect and mechanism of action of pseudolaric acid B (PAB) on the cultured human HeLa cells *in vitro*. **Methods** MTT and flow cytometric assays were used to detect the cells proliferation inhibitory rate and apoptosis of HeLa cell in exposure to PAB; the morphological changes of apoptosis were observed with electron microscope; and the expressions of p53/bcl-2/bax mRNA were detected by RT-PCR. **Results** (1) HeLa cell proliferation was inhibited by PAB in a dose-dependent manner, the IC<sub>50</sub> being about 10 μmol/L; (2) flow cytometry showed that the distribution of HeLa cell cycle was changed time-dependently by 10 μmol/L PAB-treatment, showing decrease of G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase cell percentage and increase of G<sub>2</sub>/M phase cell percentage; (3) the bax mRNA expression elevated and bcl-2 protein expression decreased markedly after being treated by 10 μmol/L PAB for 12 h, 24 h, and 48 h; while the expression of p53 mRNA could not be detected. **Conclusion** PAB can inhibit the proliferation and induce the apoptosis of HeLa cells *in vitro*, and its molecular mechanism may be associated with up-regulating bax mRNA expression and down-regulating bcl-2 mRNA expression.

**KEYWORDS** pseudolaric acid B; HeLa cervical cancer cell; apoptosis

宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤,病死率较高,其主要的死亡原因在于复发和对包括顺铂在内的化疗药耐药。因此寻找新的更有效的药物是非常必要的。土荆皮酸(pseudolaric acid B, PAB)是从荆树皮(Chinese golden larch bark)中提取的一种二萜类化合物<sup>[1]</sup>,可以诱导多种肿瘤细胞发生细胞凋亡<sup>[2]</sup>。Tan 等<sup>[3]</sup>发现 PAB 通过抑制血管新生过程来抑制肿瘤的形成及发展。但 PAB 对抗宫颈肿瘤的机制还未见相关的研究报告。为进一步研究 PAB 对宫颈癌的影响,本研究以

人宫颈癌 HeLa 细胞作为对象研究 PAB 对体外培养的宫颈癌 HeLa 细胞株的生物学效应,并探讨其可能的作用机制。

### 材料与方 法

1 主要试剂 土荆皮酸(PAB)购自哈尔滨弘博生物科技有限公司,分子量为 432.5,应用时以 RPMI-1640 培养液稀释;Trizol (RNA 提取试剂)及逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)试剂均购于 TaKaRa 公司;RPMI 1640 培养基购自 Invitrogen 公司。四唑氮蓝(MTT)购自 Sigma 公司;SuperScript First Strand Synthesis for RT-PCR 试剂盒购自 Invitrogen 公司。

### 2 方法

2.1 细胞培养 人宫颈癌细胞株 HeLa 细胞购

基金项目:黑龙江省自然科学基金项目(No:AD200647)

作者单位:1. 解放军第 211 医院妇产科(哈尔滨 150080); 2. 黑龙江中医药大学附属第一医院妇产科

通讯作者:胡云, Tel:0451-57752427, E-mail: hyun1974@sohu.com

自中国科学院上海细胞研究所细胞库。人宫颈癌 HeLa 在含有 10% 胎牛血清, 1% 青霉素、链霉素的 RPMI 1640 培养液中, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 保持饱和湿度培养。

2.2 MTT 法 取对数生长期的 HeLa 细胞接种于 24 孔培养板, 每孔细胞数 5 × 10<sup>4</sup>/mL, 待细胞贴壁, 加入不同浓度 (2.5、5、10、20 μmol/L) 的 PAB, 每组 3 个复孔。并设对照孔, 置 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱, 培养至预定时间, 加入 0.5% MTT 100 μL/孔, 继续培养 5 h, 弃上清, 加入 DMSO 1 mL。微震荡至结晶溶解, 用 Bio-TEK 公司的 ELX-800 酶标仪在 490 nm 处测定吸光度, 并计算细胞生长抑制率。细胞生长抑制率 (%) = (1 - 实验孔平均值/对照孔平均值) × 100%。本实验重复 3 次。

2.3 流式细胞术 对数生长期细胞接种于直径 6 cm 培养皿。细胞量 1 × 10<sup>6</sup>, 培养基 5 mL, 细胞贴壁后加入 10 μmol/L 的 PAB。至预定时间, 收集悬浮与贴壁细胞, PBS 清洗后, 用预冷的 70% 乙醇固定。上机前用碘化丙啶 (PI) 染色, 以流式细胞仪进行 DNA 含量及细胞周期分析。所用软件为 ModFTT, 本实验重复 3 次。

2.4 透射电镜观察 细胞培养方法同上。至预定时间后收集所有培养细胞, 密度 1 × 10<sup>6</sup>/mL, 用 2% 戊二醛 4 °C 固定, 然后用 1% 锇酸固定, 再常规乙醇脱水包埋, 超薄切片, 醋酸铅和柠檬酸铅双重染色后透射电镜观察。

2.5 RT-PCR 细胞培养方法同上, 至预定时间后收集贴壁细胞, 用 Trizol 法抽提总 RNA, 定量后按照试剂盒说明操作, 将 mRNA 逆转录成 cDNA, 在 Biometra T Gradient PCR 仪上进行 PCR: 95 °C 9 min 热启动后按下述条件扩增: 90 °C 30 s; 60 °C 30 s; 72 °C 1 min。循环次数及引物序列见表 1。PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 然后用 Bio-Rad 公司生产的 Fluoro-S 凝胶检测系统检测照相, 最后以 GAPDH 为内对照扫描分析。

表 1 引物序列表

引物名称	引物序列	循环数	产物长度
bcl-2	上游 5'-TCTGCCCTTCTTTGAGTTCG-3'	26	280 bp
	下游 5'-TCACTTGTGGCTCAGATAGG-3'		
bax	上游 5'-GCGTCCACCAAGAAGCTGAG-3'	25	311 bp
	下游 5'-ACCACCCTGGTCTTGGATCC-3'		
p53	上游 5'-TACTCCCTGCCCTTCAACAAGA-3'	25	620 bp
	下游 5'-CTTAGCACCTGAAGGTTGAAATA-3'		
GAPDH	上游 5'-GGGAGCCAAAAGGGTCATCATCTC-3'	25	353 bp
	下游 5'-CCATGCCAGTGAGCTTCCGTTTC-3'		

3 统计学方法 采用 SPSS 10.0 统计软件包做数据处理, 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用方差分析检验,

以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 结 果

1 PAB 抑制 HeLa 细胞增殖 用 MTT 法检测 PAB 对 HeLa 细胞作用 24 h 后的增殖抑制作用发现, PAB 对 HeLa 细胞的增殖抑制呈剂量依赖性关系。2.5、5、10、20 μmol/L 的 PAB 对 HeLa 细胞的抑制率分别为 13.81%、43.36%、51.05%、60.19%。IC<sub>50</sub> 为 10 μmol/L。

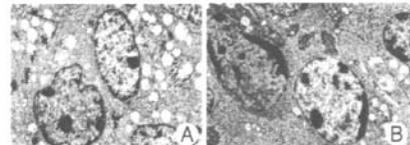
2 10 μmol/L PAB 作用不同时间后 HeLa 细胞细胞周期分布及凋亡情况 (表 2) 流式细胞仪分析结果显示, 10 μmol/L PAB 作用 HeLa 细胞 0、24、48、72 h 后, 随着作用时间的延长, 一方面降低 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期的细胞比例, 另一方面增高 G<sub>2</sub>/M 期细胞的比例。

表 2 10 μmol/L PAB 作用不同时间后 HeLa 细胞周期分布及凋亡情况 (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

作用时间 (h)	n	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> 期	S 期	G <sub>2</sub> /M 期	凋亡率 (%)
0	6	51.4 ± 2.7	34.3 ± 1.4	14.3 ± 0.8	0.21 ± 0.02
24	6	38.9 ± 1.8*	36.5 ± 1.8	24.6 ± 1.5*	4.68 ± 0.27*
48	6	34.2 ± 2.3*	37.8 ± 1.7	28.0 ± 1.6*	9.16 ± 0.68*
72	6	29.9 ± 1.7*	40.1 ± 1.8	30.4 ± 1.7*	17.3 ± 1.14*

注: 与 0h 比较, \* $P < 0.05$

3 电镜结果可以看出, PAB 作用后 HeLa 细胞胞质浓缩, 染色质浓集, 附于核膜下, 属于细胞凋亡的表现之一。



注: A 为对照组; B 为 10 μmol/L PAB 组

图 1 PAB 作用于 HeLa 细胞 24 h 后的电镜观察结果 (× 5 000)

4 10 μmol/L PAB 对 HeLa 细胞 bax 基因、bcl-2 基因 mRNA 表达的影响 (表 3) RT-PCR 结果显示, PAB 作用后, HeLa 细胞显示 bax 上调, 并以作用 48 h 最显著, 同时 bcl-2 的表达随作用时间延长而逐渐下调 (48h 内), p53 则未检测到表达。

表 3 10 μmol/L PAB 对 HeLa 细胞 bax 及 bcl-2 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

作用时间 (h)	n	bax mRNA	bcl-2 mRNA
0	6	0.61 ± 0.07	1.28 ± 0.06
12	6	0.91 ± 0.04	0.85 ± 0.06
24	6	1.17 ± 0.06*	0.67 ± 0.08*
48	6	1.54 ± 0.07**	0.45 ± 0.04**

注: 与 0 h 比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

## 讨 论

PAB 是从荆树皮中提取的一种二萜类化合物,临床广泛用于真菌感染的治疗并具有抗生育活性<sup>[1]</sup>。新近研究发现 PAB 可以抑制肿瘤血管生成<sup>[3]</sup>,并在一些肿瘤细胞系中有诱导凋亡的作用<sup>[2]</sup>,但是关于 PAB 抗人宫颈癌作用的机制尚未阐明。

PAB 对卵巢癌 HeLa 的细胞毒作用首先表现为抑制增殖。MTT 法检测显示 PAB 在适当浓度下对宫颈癌 HeLa 细胞有较强的细胞毒作用,在体外作用 24 h 的 IC<sub>50</sub> 约 10 μmol/L。而且,PAB 对 HeLa 细胞增殖的抑制作用随浓度增高而明显增强。流式细胞术结果则显示 10 μmol/L PAB 作用 0~72 h 后,呈时间依赖性改变细胞周期分布,一方面降低 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期的细胞比例,另一方面增高 G<sub>2</sub>/M 期细胞的比例,提示 PAB 通过将细胞阻滞在 G<sub>2</sub>/M 期来抑制 HeLa 细胞增殖。Meng 等<sup>[4,5]</sup>在人黑色素瘤细胞 SK-28 和人胃癌细胞 MGC803 中也发现了同样的 G<sub>2</sub>/M 期阻滞现象。Wong 等<sup>[6]</sup>报道微管是 PAB 的靶点之一。他们的研究发现 PAB 可以破坏细胞内的微管网络,抑制有丝分裂纺锤体的形成。综合上述研究结果,我们认为 PAB 对体外人宫颈癌 HeLa 细胞的生长抑制作用是通过 G<sub>2</sub>/M 期阻滞,引起有丝分裂阻断,抑制细胞分裂来完成的。

抗肿瘤药物不仅可以抑制肿瘤细胞增殖,还可以促进肿瘤细胞凋亡。本实验用电镜法对 HeLa 细胞的超微形态进行观测后发现 PAB 作用后 HeLa 细胞胞质浓缩,染色质浓集,附于核膜下,出现典型的凋亡细胞特征,表明 PAB 抑制 HeLa 细胞增殖的机制之一是通过诱导细胞凋亡而实现的。

大量研究证明:细胞凋亡是多种基因互相作用、综合调节的结果。其中 bcl-2 家族在细胞凋亡调控中有重要的作用,bcl-2 和 bax 分别是 bcl-2 家族中最主要的抑制凋亡和促进凋亡蛋白<sup>[7]</sup>。肿瘤细胞的 bcl-2/bax 表达比例与其发生和发展有着密切的关系。在多数肿瘤细胞中,bcl-2 表达水平升高,而 bax 表达下降。上调 bcl-2 或下调 bax 能抑制多种因素诱导的多种肿瘤细胞凋亡。反之,下调 bcl-2 或上调 bax 则促进多种肿瘤细胞凋亡。本研究结果显示,HeLa 细胞在 10 μmol/L PAB 作用下,同时出现 bcl-2 下调和 bax 上调,因此,PAB 很可能通过下调 bcl-2/bax 比率而促进 HeLa 细胞凋亡的。这与 Meng 等<sup>[5]</sup>在人胃癌细胞系

MGC803 中得出的结果相一致。

P53 蛋白通过调节 p21 与 bax 在细胞周期阻滞及诱导细胞凋亡中发挥重要作用。Meng 等<sup>[5]</sup>在人胃癌细胞系 MGC803 中发现 PAB 可以刺激凋亡诱导蛋白 p53 的表达。与之不同的是,本研究未检测到 PAB 对 p53 基因表达的影响,我们认为在 HeLa 细胞中 p53 不参与调控 PAB 诱导的细胞凋亡。

总之,PAB 是一种对肿瘤细胞生长及细胞凋亡影响较大的天然化合物,其在具有抑制宫颈癌 HeLa 细胞生长作用的同时,可通过下调 bcl-2/bax 比率而促进 HeLa 细胞凋亡。如果在宫颈癌的放疗期间及放疗后辅助以 PAB 的治疗,可以有助于提高肿瘤患者的治疗效果。下一步我们将使用大鼠进行体内实验研究 PAB 对于体内实体肿瘤的抑癌作用。

## 参 考 文 献

- [1] Li E, Clark AM, Hufford CD. Antifungal evaluation of pseudolaric acid B, a major constituent of pseudolaric kaempferi[J]. J Nat Prod, 1995, 58(2):57-67.
- [2] Pan DJ, Li ZL, Hu CQ, et al. The cytotoxic principles of Pseudolarix kaempferi: pseudolaric acid-A and -B and related derivatives[J]. Planta Med, 1990, 56(4):383-385.
- [3] Tan WF, Zhang XW, Li MH, et al. Pseudolaric acid B inhibits angiogenesis by antagonizing the vascular endothelial growth factor-mediated anti-apoptotic effect[J]. Eur J Pharmacol, 2004, 499(3):219-228.
- [4] Meng AG, Jiang LL. Induction of G<sub>2</sub>/M arrest by pseudolaric acid B is mediated by activation of the ATM signaling pathway[J]. Acta Pharmacol Sin, 2009, 30(4):442-450.
- [5] Meng AG, Jiang LL. Pseudolaric acid B-induced apoptosis through p53-dependent pathway in human gastric carcinoma cells[J]. J Asian Nat Prod Res, 2009, 11(2):142-152.
- [6] Wong VK, Chiu P, Chung SS, et al. Pseudolaric acid B, a novel microtubule-destabilizing agent that circumvents multidrug resistance phenotype and exhibits antitumor activity *in vivo*[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(16):6002-6011.
- [7] Yang J, Liu X, Bhalla K, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome C from mitochondria blocked[J]. Science, 1997, 275(5303):1129-1132.

(收稿:2009-09-16 修回:2010-03-29)