

鸦胆子油乳对 HPV16 亚型感染细胞的作用及机制研究

胡 燕¹ 万小洁¹ 潘榴榴¹ 章圣辉² 郑飞云¹

摘要 **目的** 研究鸦胆子油乳(*brucea javanica* oil emulsion, BJOE)在体外对人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)16 亚型感染细胞的抑制作用及其可能作用机制。**方法** 选择人宫颈鳞状上皮永生化细胞系(Ect1/E6E7)与人宫颈癌 CaSki 细胞系作为 HPV16 亚型感染的宫颈癌前病变与宫颈癌体外实验模型。采用 MTT 法检测 5、10、20 及 40 $\mu\text{g/mL}$ BJOE 体外分别作用 24、48 及 72 h 对 HPV16 感染细胞增殖活性的影响;Hoechst 33258 细胞核染色荧光显微镜下观察细胞凋亡形态学变化;Annexin V-FITC/PI 双染色法检测细胞凋亡率;半定量 RT-PCR 法检测 HPV16 E6、E7 基因 mRNA 的表达;免疫细胞化学染色(Elivison 二步法)检测 HPV16 E6、E7、p53 及 Rb 基因蛋白的表达。**结果** (1)5、10、20 及 40 $\mu\text{g/mL}$ BJOE 体外分别作用 24、48 及 72 h 对 HPV16 感染细胞的增殖具有明显抑制作用,且表现为浓度与时间的依赖性($P < 0.05$)。(2)HPV16 阳性细胞在 BJOE 作用后发生了细胞凋亡形态学变化,5、10 及 20 $\mu\text{g/mL}$ BJOE 体外作用 48 h 后细胞凋亡率逐渐升高($P < 0.05$)。(3)5、10 及 20 $\mu\text{g/mL}$ BJOE 体外作用 HPV16 阳性细胞 48 h 后 E6 与 E7 基因 mRNA 的相对表达量逐渐降低($P < 0.05$)。(4)5、10 及 20 $\mu\text{g/mL}$ BJOE 作用后,HPV16 E6、E7 及突变型 P53 蛋白的表达逐渐减弱($P < 0.05$),而 Rb 蛋白的表达逐渐增强($P < 0.05$)。**结论** BJOE 在体外对 HPV16 亚型感染细胞具有明显的抑制作用,其作用机制可能与药物下调病毒癌基因 E6、E7 表达相关。

关键词 鸦胆子油乳;宫颈;人乳头状瘤病毒;凋亡

Effects of *Brucea Javanica* Oil Emulsion on Human Papilloma Virus Type 16 Infected Cells and Mechanisms Research HU Yan¹, WAN Xiao-jie¹, PAN Liu-liu¹, ZHANG Sheng-hui², and ZHENG Fei-yun¹ 1 Department of Gynecology, First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang (325000), China; 2 Institute of Medical Sciences, First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang (325000), China

ABSTRACT **Objective** To explore the *in vitro* inhibitive effect and underlying mechanisms of *Brucea Javanica* oil emulsion (BJOE) on human papilloma virus (HPV) type 16 infected cells. **Methods** The HPV16 E6/E7 immortalized human ectocervical Ect1/E6E7 cell line and the CaSki cell line were selected as the *in vitro* models of premalignant cervical lesion and cervical cancer respectively. After treated with BJOE at different concentrations (5, 10, 20, and 40 $\mu\text{g/mL}$) at the operation time points (24, 48, and 72 h), the effects of BJOE on proliferative activities were measured by MTT assay. The morphologic changes of cell apoptosis stained with Hoechst 33258 were observed by fluorescence microscope. The effect on the cell apoptosis rate was analyzed by Annexin V-FITC/PI double-labeled flow cytometry. The mRNA expressions of HPV16 E6 and E7 were determined by semi-quantitative RT-PCR. The protein expressions of HPV16 E6, E7 oncogene, and specifically interacted p53, Rb antioncogene were stained by immunocytochemical staining (Elivison two-step procedure). **Results** (1) The proliferative activities of the Ect1/E6E7 cell and the CaSki cell treated with BJOE at different concentrations (5, 10, 20, and 40 $\mu\text{g/mL}$) at the operation time points (24, 48, and 72 h) were obviously inhibited, showing dose- and time-dependent manners ($P < 0.05$). (2) Typical changes of apoptosis were observed in both HPV 16 positive cell lines after treated with BJOE. The cell apoptosis rates increased markedly after being cultured with BJOE at different concentrations (5, 10,

基金项目:温州市科技计划资助项目(No.Y20090261)

作者单位:1.温州医科大学附属第一医院妇科(浙江温州 325000);2.温州医科大学附属第一医院医学科学研究所(浙江温州 325000)

通讯作者:胡 燕, Tel: 13806696807, E-mail: 627830566@qq.com

DOI: 10.7661/CJIM.2013.11.1545

and 20 $\mu\text{g/mL}$) for 48 h ($P < 0.05$). (3) After treated with BJOE at different concentrations (5, 10, and 20 $\mu\text{g/mL}$) for 48 h, the HPV16 E6 and E7 mRNA relative expressions in both HPV 16 positive cell lines decreased significantly ($P < 0.05$). (4) After treated with BJOE at different concentrations (5, 10, and 20 $\mu\text{g/mL}$), the expressions of HPV16 E6, E7, and mutant p53 protein decreased gradually ($P < 0.05$), while the Rb protein expression increased gradually ($P < 0.05$). Conclusions BJOE showed obvious *in vitro* inhibitory effects on HPV type 16 infected cells. Its underlying mechanisms might be possibly associated with down-regulating expressions of HPV16 E6 and E7 oncogenes.

KEYWORDS Brucea Javanica Oil Emulsion; cervix; human papilloma virus; apoptosis

生殖道高危型人乳头瘤病毒(human papilloma-virus, HPV)的感染是导致宫颈癌及癌前病变发生的必要生物学因素^[1]。临床上感染率最高的是 HPV16 亚型,也是宫颈病变中最常见的高危亚型^[2,3],研究抗病毒药物对其的抑制作用及机制对于筛选有效防治宫颈癌及癌前病变的药物具有非常重要的代表意义。

鸦胆子油乳(bucea javanica oil emulsion, BJOE)是一种目前已应用于临床治疗某些晚期恶性肿瘤的纯中药制剂,对正常细胞无损害^[4,5]。近来有研究报道鸦胆子油可能具有抗乳头状瘤病毒的作用^[6,7],提示其在抗高危 HPV 病毒及相关宫颈疾病防治方面可能具有较大的潜在应用价值。但国内外尚未见有关 BJOE 对 HPV 高危亚型的作用及相关机制的研究报道。本研究选择已转染 HPV16 E6、E7 基因的人宫颈鳞状上皮永生化细胞系(Ect1/E6E7)与人宫颈癌 CaSki 细胞系(含完整 HPV16 基因组)分别作为 HPV16 亚型感染的宫颈癌前病变与宫颈癌的体外实验模型,研究 BJOE 在体外对 HPV16 亚型感染细胞的抑制作用及可能机制。

材料与方法

1 细胞株及培养 人宫颈癌 Caski 细胞株(美国标准生物制品收藏中心:CRL-1550)购买自中国科学院细胞库。人宫颈鳞状上皮永生化细胞系(Ect1/E6E7,美国标准生物制品收藏中心:CRL-2614)购自上海拜力生物科技有限公司。用含 10% 胎牛血清、青霉素 100 U/mL、链霉素 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 RPMI-1640 培养基,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 及饱和湿度的恒温培养箱中培养,每 2~3 天传代 1 次,取对数生长期的细胞进行实验。

2 药物及试剂 鸦胆子油乳注射液(沈阳药科大学制药厂产品,生产批号:Z21020639,10 mL/支,含量为 10%),3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)(美国 Sigma 公司),磷脂结合蛋白 V/碘化丙啶(Annexin V-FITC/PI)凋亡试剂盒(美国 Invitrogen 公司),Envision 免疫组化检测试剂

盒(丹麦 Dako 公司),细胞凋亡-Hoechst 33258 染色试剂盒(苏州碧云天生物技术研究),鼠抗人 HPV16 E6、E7、Rb、p53(突变型)单克隆抗体(美国 Abcam 公司)。RNA PCR Kit(AMV)Ver. 3.0 试剂盒(日本 TAKARA 公司),逆转录试剂盒(美国 Fermentas 公司)。

3 观察指标及方法

3.1 MTT 法检测 HPV16 感染细胞体外增殖活性 将 CaSki 与 Ect1/E6E7 细胞分别接种于 96 孔细胞培养板。分别将终浓度为 5、10、20 及 40 $\mu\text{g/mL}$ 的 BJOE 加入相应培养孔作为实验组,以仅加入细胞培养液(不含胎牛血清)的细胞为对照组,并以不含细胞单加培养液的为空白组。每组设 6 个复孔,实验重复 3 次。于药物作用 24、48 及 72 h 后取出培养板,每孔加入 5 mg/mL MTT 液 20 μL 孵育 4 h。去上清液,每孔加入 150 μL 二甲基亚砷,置摇床上低速振荡 10 min。置酶标仪 490 nm 测定光密度值(OD 值),计算细胞生长抑制率(cell growth inhibition rate, CGIR) = $[1 - (\text{实验组 OD 值} - \text{空白组 OD 值}) / (\text{对照组 OD 值} - \text{空白组 OD 值})] \times 100\%$ 。

3.2 Hoechst 33258 染色法观察细胞凋亡形态学变化 将洁净盖玻片置于 6 孔板内,分别接种 CaSki 与 Ect1/E6E7 细胞于 6 孔培养板,将含 20 $\mu\text{g/mL}$ 的 BJOE 加入培养孔作为实验组,以仅加入培养液(不含胎牛血清)的细胞为对照组。常规培养 48 h 后取出,按 Hoechst 33258 试剂盒操作程序常规染色,置荧光显微镜下观察染色呈蓝色的细胞核,最大激发波长为 350 nm,最大发射波长为 460 nm。

3.3 Annexin V-FITC/PI 双染色法检测细胞凋亡率 将 CaSki 与 Ect1/E6E7 细胞接种于 6 孔培养板,分别将终浓度为 5、10 及 20 $\mu\text{g/mL}$ 的 BJOE 加入相应培养孔作为实验组,以仅加入培养液(不含胎牛血清)的细胞为对照组,并以不含细胞单加培养基的为空白组。常规培养 48 h 后取出培养板,收集细胞,按试剂盒操作程序常规染色。1 h 内置于流式细

胞仪中检测,实验重复 3 次。

3.4 半定量 RT-PCR 法检测 HPV16 E6、E7 基因 mRNA 表达 分别收集经 5、10 及 20 $\mu\text{g/mL}$ 的 BJOE 作用 48 h 的 CaSki、Ect1/E6E7 细胞与对照组细胞,采用 RNAiso Reagent 试剂盒提取细胞总 RNA。取 1 μg 总 RNA,利用禽类成髓细胞瘤病毒 (AMV) 逆转录酶逆转录为 cDNA。PCR 反应在 TP600PCR 仪(日本 Takara 公司)上进行,以 β 肌动蛋白(β -actin)为内参照(产物长度 434 bp)。引物序列分别为: HPV16 E6 基因: 上游: 5'-GAACAG-CAATACAACAAACCG- 3'; 下游: 5'-TCTGCAA-CAAGACATACATCG- 3', 产物长度 159 bp。HPV16 E7 基因: 上游: 5'-ATGGAGATACACCTA-CATTGC- 3'; 下游: 5'-TAACAGGTCTTCCAAAGTACG-3',产物长度 245 bp。循环参数:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s;58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,40 个循环。PCR 反应产物以 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离,溴化乙锭染色,置凝胶电泳处理系统成像,采用图像分析软件 Gel-Pro 4.0 分别测量 HPV16 E6、HPV16 E7 和 β -actin 的平均积分吸光度,用 HPV16 E6、E7 与 β -actin 的比值分别表示其 mRNA 相对表达量。

3.5 免疫细胞化学染色(Elivison 二步法)检测 HPV16 E6、E7、p53 (突变型)、Rb 基因蛋白的表达 将无菌盖玻片置 6 孔培养板,分别接种 CaSki 与 Ect1/E6E7 细胞,将终浓度为 5、10 及 20 $\mu\text{g/mL}$ 的 BJOE 加入相应培养孔作为实验组,以仅加入培养液(不含胎牛血清)的细胞为对照组。培养 48 h 后取出细胞爬片,固定、中性树脂封片。按 Envision 免疫组化检测试剂(即用型)试剂盒操作程序常规操作。实验重复 3 次。一抗稀释倍数分别为 E6 (1: 100)、E7

(1: 200)、p53 (1: 250)、Rb (1: 200)。采用 MIQAS 医学图像定量分析系统、医学图像定量分析软件(上海求为生物科技有限公司)进行图像分析。图像统一放大 200 倍。选择测量区域(总面积约 0.15 mm^2),测量免疫组化图像中阳性区域面积比以及光密度值(OD 值)。每张切片分析 3 个视野,计算免疫组化阳性指数,阳性指数 = 阳性面积比 $\times$ OD 值。

4 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组数据比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 q 检验。采用 Probit (概率单位法)计算半数抑制浓度 (IC_{50})。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

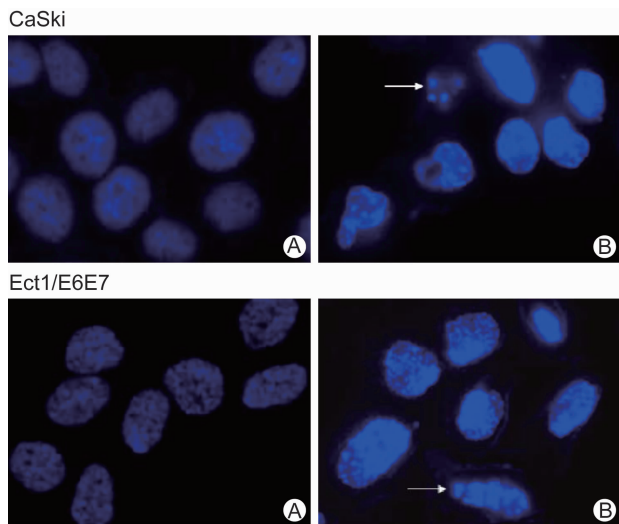
1 BJOE 对 HPV16 感染细胞体外增殖活性的影响(表 1) MTT 结果显示,对照组细胞生长活跃, BJOE 对 Ect1/E6E7 细胞及 CaSki 细胞的体外增殖均具有明显抑制作用,且表现为浓度与时间的依赖性,同一浓度随作用时间的延长,同一时间点随药物浓度的增加,对细胞的体外生长抑制作用呈现逐渐增强的趋势,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。仅在 Ect1/E6E7 细胞中,当药物浓度高达 40 $\mu\text{g/mL}$ 时,作用 72 h OD 值与 48 h 比较虽略有下降,但差异无统计学意义($P > 0.05$),可能与药物浓度高导致细胞在 48 h 已基本受抑制有关。Ect1/E6E7 细胞与 CaSki 细胞比较,各相同浓度的 BJOE 体外作用 Ect1/E6E7 细胞 24 h 的 CGIR 均低于 CaSki 细胞($P < 0.05$),而该作用在 48 h 后明显增强。经 Probit 法计算 BJOE 体外作用 Ect1/E6E7 细胞 24、48 及 72 h 的 IC_{50} 分别为: 97.081、34.458 及 11.620 $\mu\text{g/mL}$,而 CaSki 细胞分别为:27.331、6.972 及 2.154 $\mu\text{g/mL}$ 。

表 1 BJOE 对 HPV16 感染细胞体外增殖活性的影响 (%, $\bar{x} \pm s$)

BJOE ($\mu\text{g/mL}$)	24 h		48 h		72 h	
	OD	CGIR	OD	CGIR	OD	CGIR
CaSki						
0	0.205 $\pm$ 0.005	0.000	0.464 $\pm$ 0.010	0.000	0.641 $\pm$ 0.011	0.000
5	0.167 $\pm$ 0.007 *	18.689	0.295 $\pm$ 0.014 * $\blacktriangle$	36.419	0.247 $\pm$ 0.007 * $\blacktriangle$ $\circ$	61.455
10	0.134 $\pm$ 0.005 * $\triangle$	34.632	0.175 $\pm$ 0.006 * $\triangle\blacktriangle$	62.175	0.160 $\pm$ 0.000 * $\triangle\blacktriangle$ $\circ$	75.044
20	0.103 $\pm$ 0.005 * $\triangle$	49.663	0.123 $\pm$ 0.006 * $\triangle\blacktriangle$	73.427	0.108 $\pm$ 0.000 * $\triangle\blacktriangle$ $\circ$	83.189
40	0.081 $\pm$ 0.005 * $\triangle$	60.486	0.091 $\pm$ 0.004 * $\triangle\blacktriangle$	80.346	0.086 $\pm$ 0.000 * $\triangle\blacktriangle$ $\circ$	86.557
Ect1/E6E7						
0	0.184 $\pm$ 0.006	0.000	0.352 $\pm$ 0.005	0.000	0.472 $\pm$ 0.005	0.000
5	0.175 $\pm$ 0.006 *	4.797 $\bullet$	0.281 $\pm$ 0.005 * $\blacktriangle$	20.104	0.363 $\pm$ 0.005 * $\blacktriangle$ $\circ$	23.151
10	0.167 $\pm$ 0.005 * $\triangle$	9.175 $\bullet$	0.193 $\pm$ 0.003 * $\triangle\blacktriangle$	45.310	0.254 $\pm$ 0.000 * $\triangle\blacktriangle$ $\circ$	46.226
20	0.146 $\pm$ 0.007 * $\triangle$	20.823 $\bullet$	0.115 $\pm$ 0.004 * $\triangle\blacktriangle$	67.411	0.110 $\pm$ 0.000 * $\triangle\blacktriangle$ $\circ$	76.671
40	0.127 $\pm$ 0.005 * $\triangle$	31.123 $\bullet$	0.103 $\pm$ 0.005 * $\triangle\blacktriangle$	70.708	0.101 $\pm$ 0.007 * $\triangle\blacktriangle$	78.542

注:与同一时间点对照组比较,* $P < 0.05$;与同一时间点前一浓度比较, $\triangle P < 0.05$;与同一浓度作用 24 h 比较, $\blacktriangle P < 0.05$;与同一浓度作用 48 h 比较, $\circ P < 0.05$;与同一浓度作用于 CaSki 细胞 24 h 比较, $\bullet P < 0.05$

2 BJOE 作用后 HPV16 感染细胞凋亡的形态学改变(图 1) Hoechst 33258 染色后荧光显微镜下观察发现,对照组细胞核呈圆形或椭圆形,荧光微弱、呈弥散性。而 20 $\mu\text{g/mL}$ BJOE 作用 Ect1/E6E7 与 CaSki 细胞 48 h 后,均可见到细胞核染色质固缩,核内有浓染、致密、呈颗粒块状的蓝色荧光,提示有细胞凋亡发生,并可见部分核发生碎裂,形成大小不一的典型凋亡小体。可见,BJOE 体外作用 Ect1/E6E7 与 CaSki 细胞可诱导细胞凋亡。

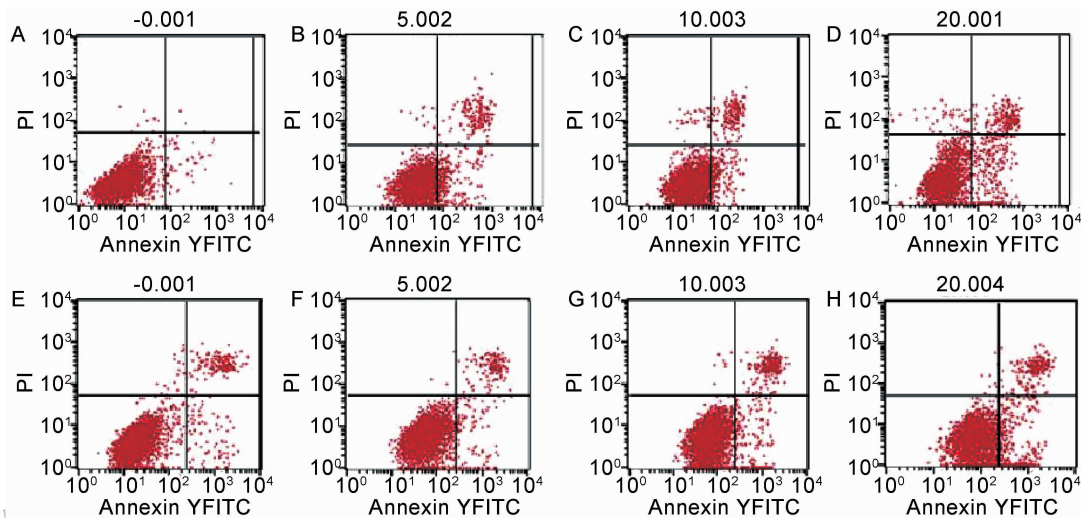


注:A 为对照组;B 为实验组;箭头所示为 20 $\mu\text{g/mL}$ BJOE 作用 48 h 后出现的凋亡细胞和凋亡小体

图 1 荧光显微镜观察 BJOE 作用 48 h 后 Ect1/E6E7 与 CaSki 细胞凋亡的形态学变化 (Hoechst 33258 染色, $\times 1000$)

3 BJOE 体外作用对 HPV16 感染细胞凋亡率的影响(图 2) Annexin V-FITC/PI 双染色法检测细胞凋亡,因晚期凋亡细胞和坏死细胞(右上象限)多为早期凋亡细胞(右下象限)继发而来,故将二者之和记为总体凋亡率。CaSki 细胞对照组、5、10 及 20 $\mu\text{g/mL}$ BJOE 实验组凋亡率分别为 $(4.16 \pm 0.39)\%$ 、 $(10.56 \pm 0.76)\%$ 、 $(12.64 \pm 1.39)\%$ 、 $(27.91 \pm 1.41)\%$ 。各组间均数比较差异具有统计学意义($F = 259.864, P < 0.05$)。两两比较结果发现,除 5 $\mu\text{g/mL}$ 组与 10 $\mu\text{g/mL}$ 组间细胞凋亡率差异无统计学意义($P > 0.05$)外,其他各组间比较差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。Ect1/E6E7 细胞对照组、5、10 及 20 $\mu\text{g/mL}$ BJOE 实验组凋亡率分别为 $(2.18 \pm 0.61)\%$ 、 $(7.47 \pm 0.69)\%$ 、 $(10.93 \pm 1.15)\%$ 、 $(17.39 \pm 1.05)\%$ 。各组间均数比较差异具有统计学意义($F = 98.886, P < 0.05$)。两两比较结果发现各组间差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。

4 BJOE 体外作用对 HPV16 感染细胞 HPV16 E6、E7 基因的 mRNA 表达影响(表 2) 半定量 RT-PCR 法结果显示,HPV16 E6、E7 和内参 β -actin mRNA 扩增产物大小与预期一致。经 5、10 及 20 $\mu\text{g/mL}$ BJOE 体外作用 48 h 后,Ect1/E6E7 细胞中 HPV16 E6、E7 mRNA 表达水平随药物浓度增加而下降,各药物组与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。同样,CaSki 细胞中 HPV16 E6、E7 mRNA 表达水平也随药物浓度增加而下降,各药物组与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。



注:A-D 分别为 CaSki 细胞对照组、5、10、20 $\mu\text{g/mL}$ BJOE 实验组;E-H 分别为 Ect1/E6E7 细胞对照组、5、10、20 $\mu\text{g/mL}$ BJOE 实验组

图 2 Annexin V-FITC/PI 双染色法检测 BJOE 体外作用对 Ect1/E6E7 与 CaSki 细胞凋亡率的影响

表 2 BJOE 体外作用对 HPV16 感染细胞 HPV16 E6、E7 基因的 mRNA 表达影响 ($\bar{x} \pm s$)

BJOE 浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	Ect1/E6E7		CaSki	
	E6 mRNA	E7 mRNA	E6 mRNA	E7 mRNA
0	0.279 $\pm$ 0.005	0.342 $\pm$ 0.019	0.292 $\pm$ 0.008	0.590 $\pm$ 0.004
5	0.240 $\pm$ 0.008 *	0.277 $\pm$ 0.012 *	0.159 $\pm$ 0.008 *	0.433 $\pm$ 0.005 *
10	0.237 $\pm$ 0.006 *	0.199 $\pm$ 0.004 *	0.111 $\pm$ 0.003 *	0.361 $\pm$ 0.006 *
20	0.186 $\pm$ 0.018 *	0.187 $\pm$ 0.024 *	0.085 $\pm$ 0.003 *	0.220 $\pm$ 0.016 *

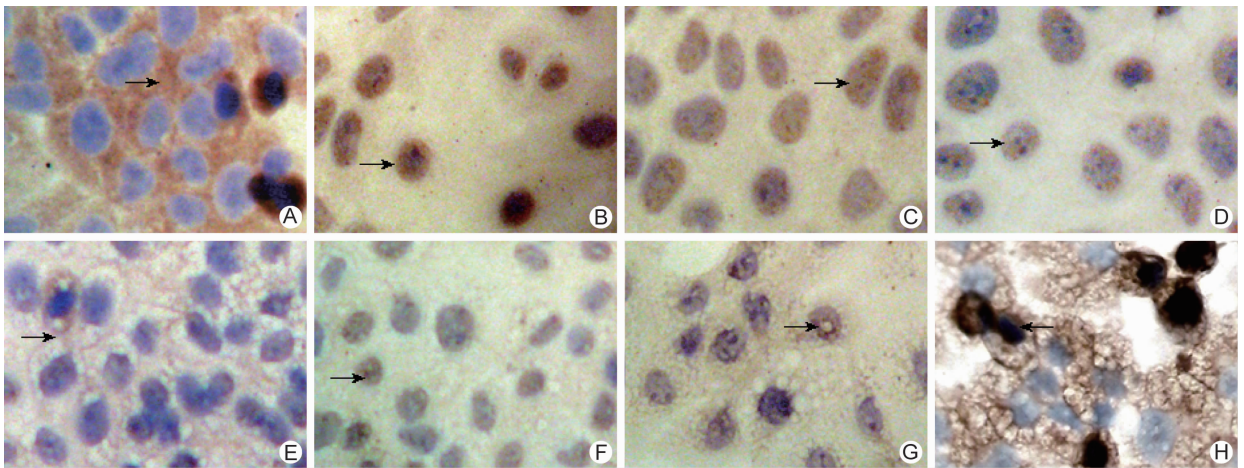
注:与对照组比较, * $P < 0.05$

5 BJOE 体外作用对 HPV16 感染细胞 HPV16 E6、E7、Rb 及 p53 基因蛋白表达的影响 (图 3、4, 表 3) 免疫细胞化学染色 (Elivison 二步法) 结果显示, HPV16 E6 蛋白阳性主要为细胞浆着色, HPV16 E7、Rb 蛋白及 P53 蛋白 (突变型) 阳性主要为细胞核着色。在 Ect1/E6E7 与 CaSki 细胞的对照组中可见 HPV16 E6、E7 及 P53 蛋白 (突变型) 均呈阳性表达,

而 Rb 蛋白表达微弱。经不同浓度 BJOE 体外作用 48 h 后, HPV16 E6、E7 及 P53 蛋白 (突变型) 的表达逐渐减弱, 而 Rb 蛋白表达渐增强 (图 3、4)。经免疫组化阳性指数比较 (表 3), 各药物作用组与对照组差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

讨 论

积极防治生殖道高危 HPV 感染对于阻断宫颈癌前病变及宫颈癌的发生有着极为重要的临床意义。但至今尚无针对宫颈高危型 HPV 感染确实、有效的治疗药物或手段。目前已应用于临床的预防性疫苗对已发生的感染并没有治疗作用, 不能阻断病毒感染细胞的复制及增殖, 数百万已感染高危 HPV 的妇女仍处于可能进展为宫颈癌的危险之中。鸦胆子油是苦木科植物鸦胆子的干燥成熟果实经提取得到的脂肪油, 有研究发现^[6,7] 其对某些 HPV 感染相关疾病具有一定的治疗



注: A-D 为对照组; E-H 为实验组; A、E 为 HPV16 E6 蛋白表达, 箭头所示为细胞浆表达; B、F 为 P53 (突变型) 蛋白表达, 箭头所示为细胞核表达; C、G 为 HPV16 E7 蛋白表达, 箭头所示为细胞核表达; D、H 为 Rb 蛋白表达, 箭头所示为细胞核表达 (下图同)

图 3 BJOE 体外作用对 CaSki 细胞 HPV16 E6、E7、Rb 及 p53 基因蛋白表达的影响 (Elivison 二步法, $\times 200$)

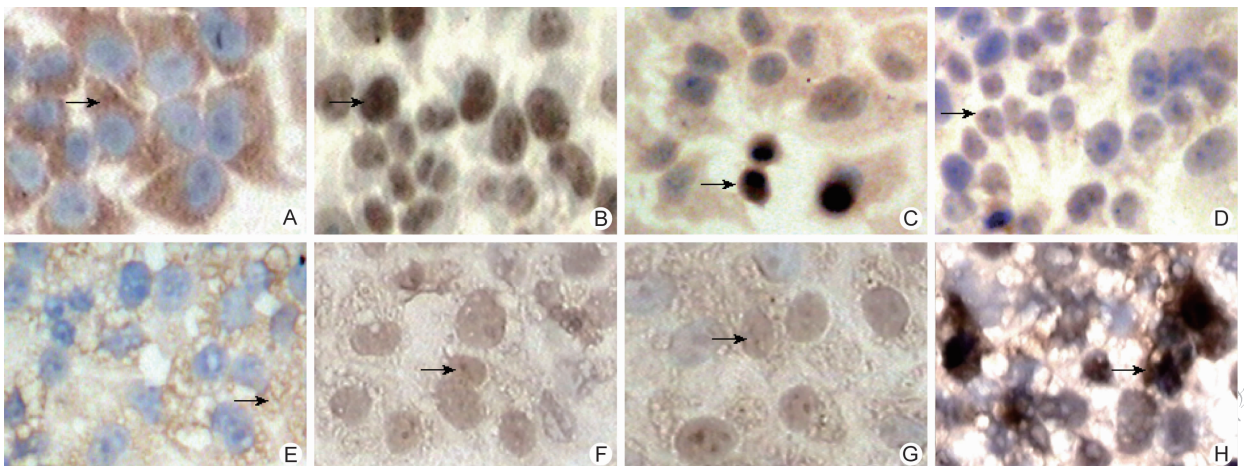


图 4 BJOE 体外作用对 Ect1/E6E7 细胞 HPV16 E6、E7、Rb 及 p53 基因蛋白表达的影响 (Elivison 二步法, $\times 200$)

表 3 不同浓度 BJOE 体外作用后 HPV16 E6、E7、Rb 及 P53(突变型)蛋白的表达 (免疫组化阳性指数, $\bar{x} \pm s$)

BJOE 浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	HPV16 E6 蛋白	HPV16 E7 蛋白	P53(突变型) 蛋白	Rb 蛋白
Ect1/E6E7				
0	179.07 $\pm$ 13.74	250.26 $\pm$ 11.35	171.51 $\pm$ 8.91	44.75 $\pm$ 8.65
5	139.48 $\pm$ 12.76 *	200.90 $\pm$ 9.89 *	101.96 $\pm$ 7.33 *	84.11 $\pm$ 8.74 *
10	112.54 $\pm$ 10.52 *	145.22 $\pm$ 9.27 *	56.04 $\pm$ 7.07 *	152.21 $\pm$ 9.43 *
20	72.51 $\pm$ 7.21 *	126.26 $\pm$ 9.96 *	40.86 $\pm$ 4.71 *	201.85 $\pm$ 7.00 *
CaSki				
0	189.02 $\pm$ 21.12	118.00 $\pm$ 13.59	49.57 $\pm$ 13.08	45.38 $\pm$ 8.92
5	118.72 $\pm$ 10.01 *	62.93 $\pm$ 10.93 *	24.43 $\pm$ 5.47 *	75.52 $\pm$ 11.10 *
10	65.28 $\pm$ 9.35 *	54.58 $\pm$ 9.42 *	18.89 $\pm$ 7.33 *	130.34 $\pm$ 16.26 *
20	31.01 $\pm$ 6.87 *	45.59 $\pm$ 11.20 *	14.75 $\pm$ 4.83 *	154.67 $\pm$ 14.31 *

注:与对照组比较, * $P < 0.05$

作用,提示其在抗生殖道高危 HPV 感染及防治相关宫颈疾病中可能具有较大的潜在应用价值。本实验初步研究了 BJOE 在体外对 HPV16 亚型感染细胞的作用及相关机制,以期为早日筛选出能有效清除高危型 HPV 病毒感染细胞的药物,并为进一步防治高危 HPV 感染相关的宫颈病变提供实验基础与理论依据。

本实验采用的细胞系 Ect1/E6E7 源于正常宫颈阴道部细胞,经转染 HPV 病毒癌基因 E6、E7,在体外具有永生化能力可无限传代^[8]。研究证明^[9],细胞的永生化状态是一种不完全转化,其形态学和生物遗传学特征为癌前状态,可被认为临床的“癌前”阶段。而人宫颈癌 CaSki 细胞系因含有完整 HPV16 基因组,因此选择作为 HPV16 亚型感染的宫颈癌体外实验模型。

MTT 法检测结果显示,BJOE 不仅对 HPV16 亚型阳性的宫颈癌 CaSki 细胞具有抑制作用,同时对因转染 HPV16 E6、E7 基因而具有永生化能力的宫颈癌前病变 Ect1/E6E7 细胞的体外生长和永生化状态也具有一定的抑制作用,并且表现为浓度与时间的依赖性。可见,BJOE 对这两种 HPV16 亚型阳性细胞的体外增殖均具有显著的抑制作用,提示其对高危 HPV 感染细胞的复制与增殖具有明显的抑制作用。

研究发现,BJOE 在体外对某些宫颈癌细胞具有抑制作用,其机制可能为药物诱导了细胞的凋亡程序^[10,11]。而本实验中,具有永生化能力的 Ect1/E6E7 细胞在 BJOE 的体外作用下出现了与宫颈癌 CaSki 细胞相似的生长抑制现象,提示其因转染 HPV16 E6、E7 基因所具有的细胞永生化能力受到了明显抑制,其机制可能也与细胞凋亡程序的诱导相关。

本研究通过 Hoechst 33258 染色法发现,这两种 HPV16 阳性细胞在 BJOE 作用下均发生了细胞凋亡

形态学变化,并有凋亡小体的出现。而 Annexin V-FITC/PI 双染色法也显示,经不同浓度 BJOE 体外作用后细胞凋亡率出现了逐渐升高的趋势。可见,BJOE 体外作用可诱导和促进 HPV16 阳性细胞的凋亡,从而抑制了其体外增殖。

为进一步探讨 BJOE 对 HPV16 亚型感染细胞的体外增殖抑制与促进细胞凋亡作用是否与 HPV16 主要病毒癌基因 E6、E7 介导的细胞永生生化机制被阻断相关,本研究首先通过 RT-PCR 法检测发现,各不同浓度 BJOE 体外作用 Ect1/E6E7 与 CaSki 细胞后 HPV16 E6 与 E7 基因 mRNA 的相对表达量逐渐降低。可见,BJOE 体外作用具有下调 HPV 病毒癌基因 E6、E7 mRNA 表达水平的作用,该作用极有可能是其发挥抑制高危型病毒阳性细胞增殖和促进细胞凋亡作用的关键机制。而进一步的免疫细胞化学染色检测结果显示,经不同浓度 BJOE 作用后,HPV16 E6 和 E7 蛋白的表达显示出逐渐减弱的趋势。由以上结果可知,BJOE 体外作用于这两种 HPV16 阳性细胞不仅对 HPVE6、E7 mRNA 的表达水平具有一定的抑制作用,其蛋白水平的表达也受到了抑制。在高危型 HPV 致病的关键步骤中,病毒癌基因 E6、E7 的蛋白表达水平下降预示着其与抑癌基因的相互作用将被削弱,其结果可能导致了病毒感染细胞永生化能力的丧失及细胞发生凋亡,失去其致病性。

高危 HPV 病毒癌基因 E6、E7 与抑癌基因 p53、Rb 的关系一直被认为是高危 HPV 病毒致病机制中的关键,也是导致病毒感染细胞无限制生长的根本原因^[12]。因野生型 p53 基因所编码的蛋白半衰期短、含量低,免疫组化方法不易检测到,故免疫组化法检测到 P53 蛋白的表达即提示其发生了突变,突变后的 p53 基因蛋白具有抑制癌细胞凋亡、促进其增殖的功能。本实验免疫细胞化学染色法检测结果发现,在未经 BJOE 作用的细胞中,均观察到突变型 P53 蛋白的阳性表达,可见这两种细胞均在 E6 的持续表达下出现了 p53 基因的突变,而 Rb 基因蛋白表达微弱。经不同浓度 BJOE 体外作用后,两种 HPV16 阳性细胞中突变型 P53 蛋白的表达逐渐减弱,而 Rb 蛋白的表达逐渐增强。结合 HPV16 E6、突变型 P53 蛋白的免疫细胞化学染色结果,二者表达在 BJOE 体外作用后出现一致的逐渐减弱趋势,提示 BJOE 具有下调 HPV16 阳性细胞中 E6 蛋白的表达,致 E6 蛋白对 P53 蛋白的降解或诱导作用明显减弱,失活的突变型 P53 蛋白表达因而明显下降,抑癌基因 p53 得以重新发挥其“基因卫士”的作用,从而诱导和促进病毒感染

细胞的凋亡。而 HPV16 E7 和 Rb 蛋白的表达在 BJOE 体外作用后出现相反的变化趋势,提示 BJOE 可通过下调 E7 蛋白的表达,减少 Rb 蛋白降解,使得该基因通路重新激活,从而促进病毒感染细胞的凋亡。

综上所述,BJOE 体外作用 HPV16 阳性细胞可分别通过下调其病毒癌基因 E6、E7 的表达而抑制对细胞周期调控基因 p53 及 Rb 蛋白的降解或诱导作用,从而诱导和促进 HPV16 亚型阳性细胞的凋亡,抑制病毒感染细胞的持续增殖而达到治疗作用。研究结果可为进一步将其应用于临床治疗高危 HPV 感染及相关宫颈病变的研究提供一定的实验基础和理论依据。BJOE 作为一种中药制剂,在抗高危 HPV 感染及治疗与高危 HPV 感染密切相关的宫颈病变方面具有一定的价值和临床应用前景。

参 考 文 献

- [1] Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, et al. The causal relation between human papilloma virus and cervical cancer[J]. J Clin Pathol, 2002, 55(4): 244 - 265.
- [2] Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer[J]. N Eng J Med, 2003, 348(6): 518 - 527.
- [3] Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, et al. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia [J]. Vaccine, 2008, 26 (Suppl 10): K1-K16.
- [4] 孙忠慧. 鸦胆子油静脉乳剂对卵巢癌细胞株 CAOV3 作用的实验研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2009, 18 (14): 1591 - 1592.
- [5] 马力, 张月宁. 鸦胆子油乳诱导肝癌细胞凋亡及对相关基因表达的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2004, 12 (3): 559 - 562.
- [6] 曾旭东, 何源萍, 严福波, 等. 微波配合鸦胆子油治疗成人喉乳头状瘤临床观察[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2008, 22(12): 566 - 567.
- [7] 陈碧荣, 冯邓陈. 鸦胆子抗人乳头瘤病毒的作用研究[J]. 中成药, 2006, 28(12): 1819 - 1820.
- [8] Fichorova RN, Rheinwald JG, Anderson DJ. Generation of papillomavirus-immortalized cell lines from normal human ectocervical, endocervical, and vaginal epithelium that maintain expression of tissue-specific differentiation proteins [J]. Biol Reproduction, 1997, 57(4): 847 - 855.
- [9] Stampfer MR, Yaswen P. Human epithelial cell immortalization as a step in carcinogenesis [J]. Cancer Lett, 2003, 194(2): 199 - 208.
- [10] 王晓娜, 马力, 安春丽, 等. 鸦胆子油乳对宫颈癌 SiHa 细胞的抑制[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2009, 16 (5): 494 - 497.
- [11] 尹香菊, 栾和芝, 安春丽, 等. 鸦胆子油乳对宫颈癌 Hela 细胞的抑制作用及其作用机制[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2008, 15(4): 393 - 395.
- [12] Munger K, Baldwin A, Edwards KM, et al. Mechanisms of human papilloma virus-induced oncogenesis[J]. J Virol, 2004, 78(21): 11451 - 11460.

(收稿:2012-06-13 修回:2012-12-29)

欢 迎 投 稿 欢 迎 订 阅