

## · 基础研究 ·

## 斑蝥提取物诱导宫颈癌细胞凋亡机制的实验研究

次旦旺久<sup>1,2</sup> 赵相轩<sup>1</sup> 王晓明<sup>1</sup> 卢再鸣<sup>1</sup> 林坤<sup>1</sup> 张强<sup>1</sup>

**摘要** **目的** 研究斑蝥提取物(cantharis extract, CTE)诱导人宫颈癌 Hela 细胞凋亡作用及其分子机制。**方法** 体外培养人宫颈癌细胞系 Hela,利用 CCK-8 法检测 CTE 对 Hela 细胞增殖抑制作用;光学显微镜及荧光显微镜下观察不同浓度 CTE 诱导细胞凋亡的形态学改变;Annexin V/PI 双染流式细胞仪检测细胞凋亡率;Western blot 法检测细胞增殖和凋亡相关蛋白表达变化。**结果** CTE 显著抑制 Hela 细胞增殖,呈浓度及时间依赖型,处理 48 h 的 IC<sub>50</sub> 为 3.94 μg/mL。经光学显微镜下观察可见随着药物浓度增加细胞出现明显离巢凋亡。Hoechst 33258 染色后发现,随着药物浓度的增加,核固缩、核碎裂等典型凋亡改变的细胞数目逐渐增多,呈浓度依赖型。Annexin V/PI 双染流式凋亡检测示,随着药物浓度的增加凋亡细胞数量逐渐增加,药物处理组(1.25、2.5、5.0 μg/mL)的凋亡率分别为 14.73%、29.75%、53.33%;与对照组比较,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。Western blot 检测显示,与对照组比较,药物处理组细胞增殖相关蛋白 PCNA 蛋白表达降低( $P < 0.05$ );促凋亡蛋白 Bax、Bak、Bid 表达增加,2.5、5.0 μg/mL 组 Bax 表达及 1.25、2.5、5.0 μg/mL 组 Bid 表达有效期异有统计学意义( $P < 0.05$ )。而抗凋亡蛋白 Bcl-2、Mcl-1、Survivin 表达降低( $P < 0.05$ ),Bcl-XL 表达无显著改变;凋亡蛋白激酶 Caspase-3 蛋白表达下降( $P < 0.05$ ),而 Caspase-3 底物凋亡相关蛋白 PARP 出现明显切割带,Cleaved-PARP 蛋白表达增加( $P < 0.05$ )。**结论** CTE 显著抑制 Hela 细胞增殖,诱导 Hela 细胞凋亡,其可能机制与下调抗凋亡蛋白、上调促凋亡相关蛋白表达相关。

**关键词** 细胞凋亡;细胞增殖;宫颈癌;斑蝥;信号通路

Mechanism Study for Cantharis Extract Inducing Apoptosis of Cervical Cancer Cells CIDAN Wang-jiu<sup>1,2</sup>, ZHAO Xiang-xuan<sup>1</sup>, WANG Xiao-ming<sup>1</sup>, LU Zai-ming<sup>1</sup>, LIN Kun<sup>1</sup>, and ZHANG Qiang<sup>1</sup>  
1 Department of Radiology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang (110004); 2 Department of Radiology, People's Hospital of Tibet Autonomous Region, Lasa (856000)

**ABSTRACT** **Objective** To study antitumor effects of Cantharis extract (CTE) on the proliferation and apoptosis of human cervical cancer Hela cell line, and the underlying mechanisms. **Methods** Human cervical cancer Hela cell line was cultured *in vitro*. CCK-8 assay was used to detect the inhibitory effect of CTE on Hela cell proliferation. The morphology changes of cell apoptosis induced by different concentrations of CTE were observed under optical microscope and fluorescence microscope. Flow cytometry based on Annexin V/PI double staining was performed to evaluate the ratio of apoptosis. Western blot assay was used to detect cell proliferation and changes of apoptosis related protein expressions. **Results** CTE significantly inhibited the proliferation of Hela cells in a dose and time dependent manner. IC<sub>50</sub> of CTE after 48 h treatment was 3.94 μg/mL. Apparent anoikis occurred under optical microscope along with increased CTE concentrations. After Hoechst33258 staining, the number of cells with typical apoptosis changes, such as pyknosis and karyorrhexis gradually increased in a concentration dependent manner. Annexin V/PI double staining also showed the number of apoptotic cells increased along with increased CTE concentrations. The apoptosis ratios of different concentration groups (1.25, 2.5,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.31371425);盛京自由研究者基金资助项目(No.200802)

作者单位:1.中国医科大学附属盛京医院放射科(沈阳 110004);2.西藏自治区人民医院放射科(拉萨 856000)

通讯作者:赵相轩,Tel:024-96615-73614,E-mail:xiangxuanzhao@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20180205.108

5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) were 14.73%, 29.75%, 53.33%, respectively, statistically different from those of the control group ( $P < 0.05$ ). Western blot showed that, as compared with the control group, the expression of proliferation related protein PCNA decreased ( $P < 0.05$ ), expressions of pro-apoptotic proteins Bax, Bak and Bid increased. There was no statistical difference in Bax expression between 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CTE group and 5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CTE group ( $P < 0.05$ ). There was no statistical difference in Bid expression among 1.25, 2.5, 5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CTE groups ( $P < 0.5$ ). Expressions of anti-apoptotic proteins Bcl-2, Mcl-1, and Survivin decreased, no change of Bcl-XL protein expression in the CTE treated groups. The expression of apoptotic protein kinase Caspase-3 decreased, Caspase-3 substrate apoptosis related protein PARP obviously occurred in the zona cutting, and the protein expression of Cleaved-PARP increased ( $P < 0.5$ ). Conclusion CTE significantly inhibited cell proliferation of Hela cells and induced apoptosis possibly related to down-regulating expressions of anti-apoptotic proteins and up-regulating expression of pro-apoptotic proteins.

**KEYWORDS** apoptosis; cell proliferation; cervical cancer; Cantharis; signal pathway

宫颈癌(cervical cancer, CC)是女性常见的恶性肿瘤之一,全球每年约有 53 万名女性被诊断为 CC,其中每年病死人数高达 27 万<sup>[1]</sup>,严重影响了女性健康。在我国 CC 发病居高不下,其病死率占女性恶性肿瘤中的第 3 位<sup>[1]</sup>。近年发病率逐年上升,发病年龄更是趋于年轻化<sup>[2]</sup>。除了早期手术切除,对于晚期、复发和顽固性 CC 仍无有效的治疗手段。中药及中成药能改善中、晚期恶性肿瘤患者生存率,减少放疗化疗引起的不良反应,同时改善患者生活质量<sup>[3]</sup>。笔者选用人宫颈癌 Hela 细胞为研究对象,探讨斑蝥提取物(cantharis extract, CTE)对 Hela 细胞增殖和凋亡的影响及其潜在机制。现报告如下。

## 材料与方法

1 细胞株 人宫颈癌细胞株 Hela,购自南京凯基生物科技发展有限公司。

2 药物及提取物制备 斑蝥购自沈阳恒秋药材有限公司,经过鉴定为斑蝥成虫;称取干燥斑蝥 200 g 高速粉碎机粉碎后加入 2 000 mL 的 75%乙醇,室温浸泡 24 h,用滤纸过滤,得出浸出液,并弃渣;浸出液用旋转蒸发仪低温( $< 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ )减压蒸馏后获得浓缩液体 50 mL,过滤除去析出物,最后滤液使用真空冷冻干燥机对其进行冷冻干燥,得粉末共计 5 g,为斑蝥粗提取物,置入干燥器备用。精密天平准确称量 10 mg 干燥粉末用 1 mL DMSO 溶解,0.22  $\mu\text{m}$  一次性过滤器过滤除去不溶解杂质,得实验用的 CTE,放入 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。使用前用 DMEM 培养基稀释斑蝥提取物到所需浓度。

3 试剂及仪器 DMEM 高糖培养基,胎牛血清,0.25%胰蛋白酶均购自 Thermo Scientific HyClone

公司。Survivin、Bax、Bcl-2、Bid、Mcl-1、PARP 兔抗人单克隆抗体购自 Cell Signal Biotechnology 公司; $\beta$ -actin 兔抗人单克隆抗体购自 Affinity Biosciences;Caspase-3 兔抗人多克隆抗体购自 Immunoway 公司;羊抗兔 IgG 购自 Origene 公司。细胞增殖试剂盒 CCK8 购自北京索莱宝公司;Annexin V/PI 流式检测试剂盒购自北京四正柏生物科技有限公司;Hoechst 33258 染色液购自 Sigma 公司。流式细胞仪(型号 FACSCalibur,美国 BD 公司),酶标仪(型号 Filter MAX F5, Mocular Device),倒置荧光显微镜(型号 TS100,日本尼康公司)。

## 4 方法

4.1 细胞培养及实验分组 Hela 宫颈癌细胞培养使用培养基为 10%胎牛血清的高糖 DMEM 培养基,含 5%二氧化碳,饱和湿度的细胞培养箱中培养。根据 CTE 浓度的不同,实验分为 4 组,分别为对照组、1.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组、2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组、5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组。

4.2 细胞形态学观察及 Hoechst 33258 染色 对数生长期 Hela 细胞,用 0.25%胰酶消化,吹打至单个细胞,用血球计数板计数细胞,调整细胞浓度至  $5 \times 10^4/\text{mL}$ ,取 2 mL 细胞悬液接种于 6 孔板,过夜贴壁后根据细胞分组进行处理 48 h。然后在倒置显微镜下观察细胞失巢凋亡,并进行拍照。Hoechst 33258 (1 mg/mL) 37  $^{\circ}\text{C}$  避光染色 15 min,在倒置荧光显微镜下观察染色质凝聚和断裂,拍照。

5 CCK-8 法检测细胞增殖 对数生长期 Hela 细胞,调整细胞浓度至  $5 \times 10^4/\text{mL}$ ,取 100  $\mu\text{L}$  细胞悬液接种于 96 孔板,过夜贴壁后根据实验分组进行药物处理 48 h。每孔加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 溶液,置于 37  $^{\circ}\text{C}$  细胞培养箱内培养 1~2 h,酶标仪测定波长为 450 nm 处

的吸光度值(A)。实验独立重复 3 次。并计算各组细胞增殖率,并用 SPSS-Probit 检测 IC<sub>50</sub>值。

**6 Annexin V/PI 检测 Hela 细胞凋亡** 对数生长期 Hela 细胞,调整细胞浓度至  $5 \times 10^5$ /mL,取 2 mL 细胞悬液接种于 6 孔板,过夜贴壁后根据分组不同浓度药物处理 48 h。胰酶消化收集细胞,然后根据试剂盒说明进行操作,所有操作均在冰上完成。凋亡百分率为(早期凋亡率 + 晚期凋亡率)。

**7 Western blot 检测细胞凋亡相关蛋白表达** Hela 细胞不同浓度药物处理 48 h,样本冰上裂解 30 min,离心后收集裂解液,配平蛋白浓度,加入煮样缓冲液,100 °C 煮样 10 min。12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳。然后湿转法将蛋白转到 PVDF 膜上。一抗室温摇床孵育 4 h 或 4 °C 过夜孵育,二抗常温孵育 2 h。PVDF 膜用 ECL 发光液处理后,进行暗室下胶片曝光。胶片用扫描仪扫描。实验独立重复 3 次。用 Image J 软件对条带进行半定量分析,目标蛋白质相对含量分别用其与  $\beta$ -actin 特异性条带的积分光密度之比值表示。

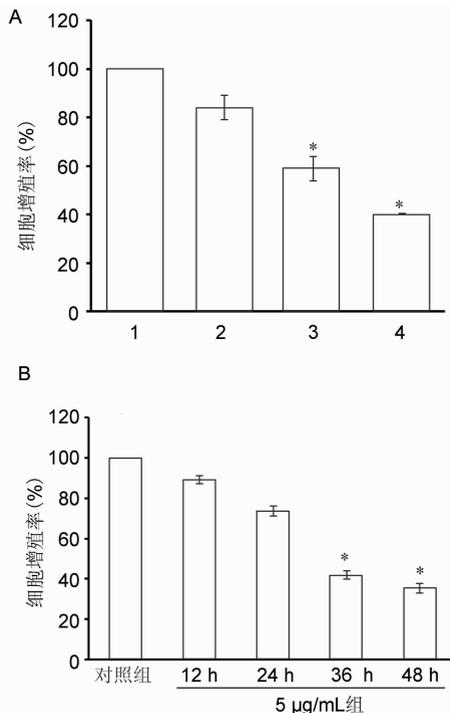
**8 统计学方法** 采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

**1 不同浓度 CTE 作用 Hela 细胞 48 h 后细胞形态学观察 (图 1)** 光学显微镜下,不同浓度 CTE 处理 Hela 细胞 48 h 后随着 CTE 浓度增加细胞出现失

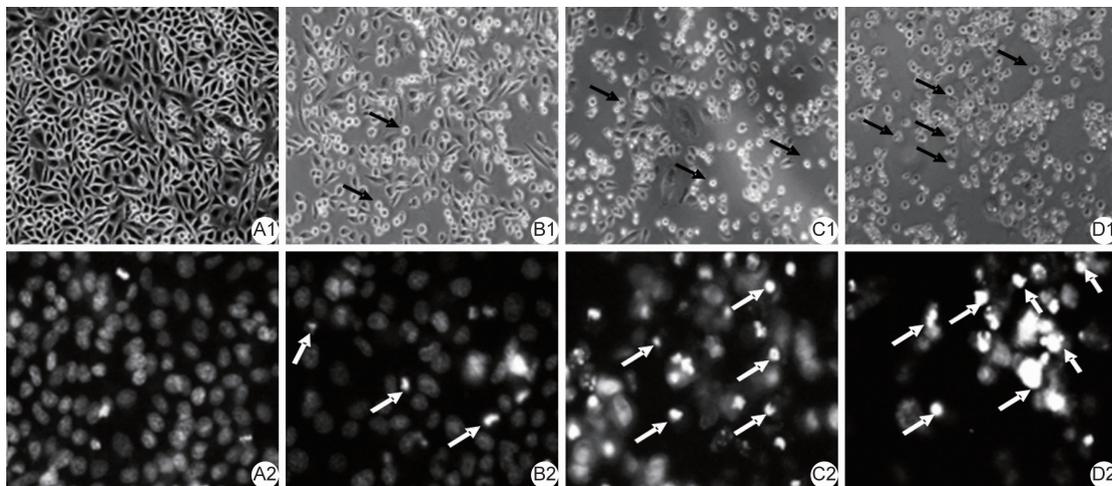
巢凋亡,球形死亡细胞数量逐渐增多。经 Hoechst 33258 染色后各不同 CTE 浓度组组内见核固缩、边集、碎裂等典型凋亡细胞明显增多。

**2 各组细胞增殖情况比较 (图 2)** 经 0、1.25、2.5、5  $\mu$ g/mL CTE 处理 Hela 细胞后,细胞增殖率分



注:图 A 为不同浓度 CTE 作用于 Hela 细胞 48 h 各组细胞增殖率;1、2、3、4 分别为对照组、1.25、2.5、5.0  $\mu$ g/mL 组;图 B 为浓度为 5  $\mu$ g/mL CTE 作用于 Hela 细胞不同时间点的细胞增殖率;与对照组比较,\* $P < 0.05$

图 2 各组细胞增殖情况比较



注:A1、A2 为对照组;B1、B2 为 1.25  $\mu$ g/mL 组;C1、C2 为 2.5  $\mu$ g/mL 组;D1、D2 为 5.0  $\mu$ g/mL 组;A1、B1、C1、D1 为光镜下观察图像( $\times 100$ );A2、B2、C2、D2 为 Hoechst33258 染色图( $\times 100$ );黑色箭头表示球形死亡的细胞;白色箭头表示核固缩、碎裂细胞

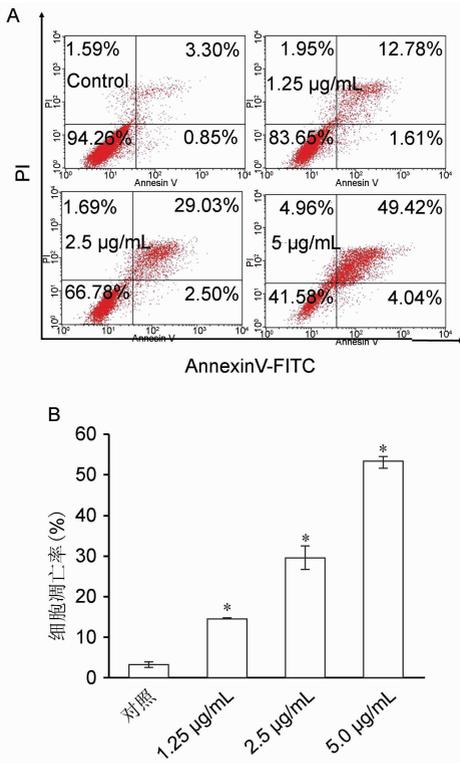
图 1 不同浓度 CTE 作用 Hela 细胞 48 h 后的细胞形态学观察

别为 100%、(83.95 ± 5.10)%、(58.99 ± 5.29)% 和(40.16 ± 0.10)%，随着 CTE 浓度增加细胞增殖率逐渐受抑制。与对照组比较，2.5、5.0 μg/mL 组增殖率差异有统计学意义(P < 0.05)。CTE 处理 Hela 细胞的 IC<sub>50</sub> 为 3.94 μg/mL。选择 5 μg/mL CTE 分别用不同时间(12、24、36、48 h)作用于 Hela 细胞，各时间段 Hela 细胞的增殖率(%) 分别为 89.02 ± 1.76、73.50 ± 2.42、41.68 ± 1.90、35.11 ± 2.24，与对照组比较，36、48 h 时段增殖率差异有统计学意义(P < 0.05)。

3 各组细胞凋亡率比较(图 3) 不同浓度的 CTE 作用于 Hela 细胞后，细胞凋亡数量随药物浓度的增加而增加，1.25、2.5、5 μg/mL 组的细胞凋亡率分别为(14.73 ± 0.32)%、(29.75 ± 2.58)%、

(53.33 ± 1.29)%，与对照组(3.47 ± 0.34)% 比较，差异有统计学意义(P < 0.05)。

4 不同浓度 CTE 作用 48 h 后各组蛋白表达水平比较(图 4，表 1) 与对照组比较，1.25、2.5、5.0 μg/mL 组细胞增殖相关的 PCNA 蛋白表达明显下降(P < 0.05)。Bcl-2 家族蛋白 Bax、Bak、Bid 表达增加，而 2.5、5.0 μg/mL 组 Bax 表达及 1.25、2.5、5.0 μg/mL 组 Bid 表达差异有统计学意义(P < 0.05)。Bcl-2、Mcl-1 表达下降(P < 0.05)，Bcl-XL 表达无显著改变(P > 0.05)；2.5、5.0 μg/mL 组抑制凋亡家族蛋白 Survivin 表达下降(P < 0.05)。各药物处理组 Caspase-3 蛋白表达下降；Caspase-3 底物 PARP 被切割，Cleaved-PARP 蛋白与对照组比较，差异均有统计学意义(P < 0.05)。



注:图 A 不同浓度 CTE 作用 Hela 细胞 48 h 后的流式结果;图 B 不同浓度 CTE 作用于 Hela 细胞 48 h 细胞凋亡数量的柱状图;与对照组比较，\*P < 0.05

图 3 各组细胞凋亡率比较

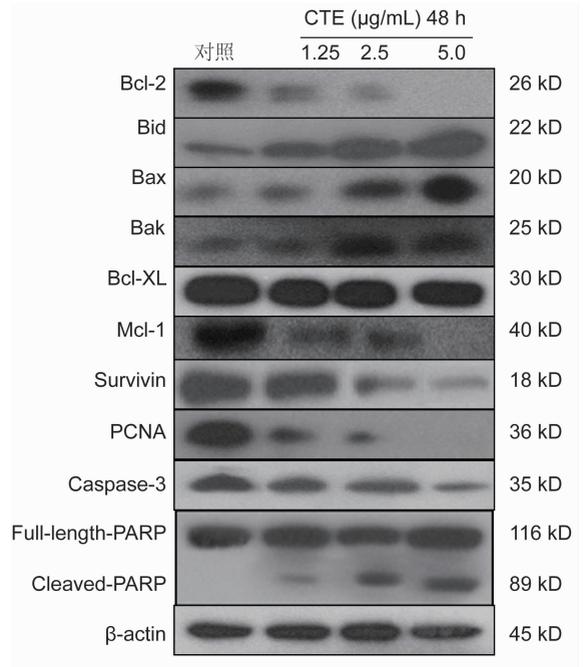


图 4 不同浓度 CTE 处理 Hela 细胞 Western blot 图

### 讨 论

斑蝥(Cantharis)是一种传统的中药。斑蝥素(Cantharidin)是斑蝥的主要成分<sup>[4]</sup>，化学结构为 1,2-顺-二甲基-3,6-氧桥六氢化邻苯二甲酸酐，

表 1 不同浓度 CTE 处理 Hela 细胞 48 h 后各组蛋白表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	Bax	Bak	Bid	Bcl-2	Mcl-1	Bcl-XL	PCNA	Survivin	Cleaved-PARP	Caspase-3
对照	3	0.33 ± 0.01	0.29 ± 0.03	0.37 ± 0.02	0.82 ± 0.02	0.84 ± 0.01	1.76 ± 0.07	0.75 ± 0.01	1.08 ± 0.05	0.02 ± 0.01	0.81 ± 0.02
1.25 μg/mL	3	0.37 ± 0.01	0.29 ± 0.02	0.46 ± 0.03*	0.45 ± 0.02*	0.50 ± 0.00*	1.63 ± 0.06	0.38 ± 0.01*	1.09 ± 0.05	0.14 ± 0.02*	0.74 ± 0.02*
2.5 μg/mL	3	0.62 ± 0.04*	0.39 ± 0.04	0.51 ± 0.04*	0.32 ± 0.04*	0.42 ± 0.33*	1.75 ± 0.13	0.26 ± 0.02*	0.62 ± 0.04*	0.26 ± 0.02*	0.71 ± 0.05*
5.0 μg/mL	3	0.67 ± 0.01*	0.38 ± 0.02	0.58 ± 0.01*	0.11 ± 0.02*	0.21 ± 0.01*	1.81 ± 0.01	0.10 ± 0.01*	0.34 ± 0.02*	0.26 ± 0.02*	0.35 ± 0.01*

注:与对照组比较，\*P < 0.05

化学式( $C_{10}H_{12}O_4$ )分子量为 196.2。斑蝥早在中国汉朝时代就用于腹部肿瘤的治疗,是古老的抗肿瘤药物<sup>[4]</sup>。近几年来临床研究发现,斑蝥在治疗消化系统恶性肿瘤如胃癌,结直肠癌等方面显示出其独特的疗效,尤其在晚期恶性肿瘤具有一定的疗效。斑蝥素在肿瘤细胞中破坏其 DNA 链,诱导细胞凋亡<sup>[5,6]</sup>;同时抑制肿瘤细胞的化疗抵抗<sup>[7]</sup>。有关斑蝥在治疗 CC 方面的研究国内外尚处于空白。

本实验通过 CTE 作用于 Hela 宫颈癌细胞,发现 CTE 显著抑制 Hela 细胞增殖。细胞的增殖是一种非常复杂的生物学行为,受细胞内复杂的机制调控,细胞增殖的任何关键步骤失调可能会导致细胞的过度的增殖而癌变。PCNA 是 DNA 聚合酶  $\delta$  的辅助蛋白,在真核生物 DNA 复制和修复中必须的组成成分,在细胞周期进程中发挥重要作用,是细胞周期的标记蛋白<sup>[8]</sup>。PCNA 在肿瘤细胞中的表达与肿瘤细胞的增殖存在明显相关性<sup>[9]</sup>,本研究与 Xie X<sup>[10]</sup> 等报道的黄水茄中药提取物能够通过下调 PCNA 一致。因此,CTE 能够通过降低 PCNA 表达抑制宫颈癌细胞生长。

细胞凋亡过程是细胞的主动程序性死亡过程。目前临床所使用的大部分化疗药物都是通过促进凋亡来起到抗肿瘤的目的<sup>[11]</sup>。本实验笔者通过 Hoechst33258 染色法检测发现,Hela 细胞经不同浓度 CTE 处理后可见核固缩、核碎裂等典型的凋亡细胞,通过 Annexin V/PI 染色检测凋亡发现,随着药物的浓度增加,凋亡的细胞数量明显增加。多种蛋白和酶参与肿瘤细胞凋亡过程,主要包括 Bcl-2 家族、抑制凋亡蛋白家族(inhibitor of apoptosis protein, IAP)及半胱天冬酶家族(Caspase)参与细胞凋亡过程。Bcl-2 蛋白家族能抑制或激活凋亡膜结合蛋白<sup>[12]</sup>。本研究中发现,经 CTE 处理 Hela 细胞后发现促凋亡蛋白 Bax、Bak 表达明显增加,而抑制凋亡蛋白 Bcl-2、Bid、Mcl-1 表达明显下降,但是 Bcl-XL 蛋白表达无显著改变,这说明,Bcl-2 家族蛋白 Bax、Bak、Bcl-2、Bid、Mcl-1 蛋白在 CTE 诱导 Hela 细胞起到重要的作用,上述 Bcl-2 家族蛋白的表达改变与 Ling Q<sup>[12]</sup> 等和 Zhao L<sup>[13]</sup> 等中药苦参提取物和连翘提取物影响 Bcl-2 蛋白家族表达相一致。Survivin 是 IAP 家族成员,Survivin 蛋白促进细胞增殖、抑制凋亡、诱导肿瘤基质血管形成、减少对放疗的敏感性<sup>[14,15]</sup>,有研究表明,多种抗肿瘤药物促进肿瘤细胞凋亡与 Survivin 蛋白抑制相关<sup>[14]</sup>。另外 Survivin 通过 Caspase-3、Caspase-7 及 Caspase-9 等抑制细胞凋亡<sup>[16,17]</sup>。本研究中,我们发现 CTE 明显抑制 Survivin 蛋白表达,以往中药苦参提取物处理胰

腺癌细胞中下调 Survivin 蛋白相一致<sup>[12]</sup>,因此,说明 Survivin 蛋白表达抑制与 CTE 抑制 Hela 细胞增殖相关。Caspase-3 是细胞凋亡的关键酶,激活核酸内切酶而使 DNA 降解,导致细胞凋亡<sup>[18]</sup>。本研究中 CTE 能显著降低 Caspase-3,而且 Caspase-3 的底物 PARP 蛋白被剪切,最终诱导肿瘤细胞凋亡,Lange I<sup>[19]</sup> 等报道中药玄参提取物抑制神经母细胞瘤中玄参提取物能抑制 Caspase-3 表达且 PARP 蛋白被剪切,提示 CTE 在 Hela 细胞中可能使通过激活 Caspase-3,进步切割 DNA,最终诱导 Hela 细胞的凋亡。

总之,CTE 能够有效诱导宫颈癌细胞凋亡和增殖抑制。这种抗肿瘤效应可能通过调节细胞凋亡相关蛋白的表达实现。今后如果能够继续进行小鼠移植瘤实验检测 CTE 体内对宫颈癌细胞的杀伤作用,将会进一步推动此中药在抗 CC 方面的应用。

利益冲突:无。

#### 参 考 文 献

- [1] Bhat S, Kabekkodu SP, Noronha A, et al. Biological implications and therapeutic significance of DNA methylation regulated genes in cervical cancer[J]. Biochimie, 2016, 121(2): 298-311.
- [2] Du PL, Wu KS, Fang JY, et al. Cervical cancer mortality trends in China, 1991-2013, and predictions for the future[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015, 16(15): 6391-6396.
- [3] Chung VC, Wu X, Hui EP, et al. Effectiveness of Chinese herbal medicine for cancer palliative care: overview of systematic reviews with meta-analyses[J]. Sci Rep, 2015, 5(16): 1811-1826.
- [4] Wang GS. Medical uses of mylabris in ancient China and recent studies[J]. J Ethnopharmacol, 1989, 26(2): 147-162.
- [5] Efferth T, Rauh R, Kahl S, et al. Molecular modes of action of cantharidin in tumor cells[J]. Biochem Pharmacol, 2005, 69(5): 811-818.
- [6] Sagawa M, Nakazato T, Uchida H, et al. Cantharidin induces apoptosis of human multiple myeloma cells via inhibition of the JAK/STAT pathway[J]. Cancer Sci, 2008, 99(9): 1820-1826.
- [7] Zheng LH, Bao YL, Wu Y, et al. Cantharidin reverses multidrug resistance of human hepatoma HepG2/ADM cells via down-regulation of P-glycoprotein expression[J]. Cancer Lett, 2008, 272(1): 102-109.