

紫草素对人宫颈癌HeLa细胞增殖抑制与诱导凋亡的作用研究

于明欣^{1,2*}, 宋晓坤¹, 娄建石^{2#}(1.天津医科大学附属肿瘤医院/天津市“肿瘤防治”重点实验室, 天津 300060; 2.天津医科大学药理学教研室, 天津 300070)

中图分类号 R285;R96 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)39-3679-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.39.10

摘要 目的:研究紫草素对人宫颈癌HeLa细胞增殖抑制与诱导凋亡的作用。方法:10 μg/ml紫草素作用于人宫颈癌HeLa细胞,观察细胞的形态学变化;MTT法测定细胞活性,检测紫草素对HeLa细胞的增殖抑制作用;分别测定半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(Caspase)3、8、9的活性,探究细胞凋亡的途径;流式细胞仪测定细胞凋亡率和细胞周期。结果:10 μg/ml紫草素可使HeLa细胞部分死亡;1~20 μg/ml紫草素可抑制人宫颈癌HeLa细胞的增殖($P<0.01$ 或 $P<0.05$);1、5、10、15、20 μg/ml紫草素可增强Caspase-3、8、9的活性($P<0.01$ 或 $P<0.05$);1、5、10、15、20 μg/ml紫草素在诱导人宫颈癌HeLa细胞凋亡的同时,阻断了细胞周期的进程,使S期细胞增多。结论:紫草素可抑制HeLa细胞的增殖,诱导细胞凋亡。

关键词 紫草素;人宫颈癌HeLa细胞;细胞凋亡;细胞周期;半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶

Inhibitory Effect of Shikonin on the Proliferation of Human Cervical Carcinoma HeLa Cells and Induction Effect of It on the Apoptosis of HeLa Cells

YU Ming-xin^{1,2}, SONG Xiao-kun¹, LOU Jian-shi²(1.The Affiliated Cancer Hospital of Tianjin Medical University/Tianjin Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin 300060, China; 2.Dept. of Pharmacology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To investigate the inhibitory effect of shikonin on the proliferation of human cervical carcinoma HeLa cells and induction effect of it on the apoptosis of HeLa cells. **METHODS:** After exposed to shikonin 10 μg/ml, the morphological changes of human cervical carcinoma HeLa cells were observed. The cell activity was determined by MTT, and the inhibitory effect of shikonin on HeLa cells was detected. The apoptosis pathway was studied by determining the activities of caspase-3, caspase-8, and caspase-9. Flow cytometry was used to measure cell apoptosis and cell cycle. **RESULTS:** Shikonin 10 μg/ml could made the HeLa cell death. Shikonin 1-20 μg/ml could inhibit the proliferation of HeLa cell; there was statistical significance ($P<0.01$ or $P<0.05$). Shikonin 1, 5, 10, 15, 20 μg/ml could enhance the activities of caspase-3, caspase-8 and caspase-9; there was statistical significance ($P<0.01$, $P<0.05$). Shikonin 1, 5, 10, 15, 20 μg/ml could induce the apoptosis of HeLa cells and block the process of cell cycle, especially, increasing the S phase cell. **CONCLUSIONS:** Shikonin can inhibit the proliferation of HeLa cells and induce the apoptosis of HeLa cell.

KEY WORDS Shikonin; HeLa cells; Apoptosis; Cell cycle; Caspase

紫草为紫草科植物新疆紫草 *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst.或内蒙紫草 *A. guttata* Bunge 的干燥根,始载于《神农本草经》,其味苦、性寒,具有凉血、活血、解毒、透疹、补中益气的作用^[1]。紫草的有效成分为左旋紫草素,属萘醌类物质^[2],具有多种药理作用,如抗炎、抗肿瘤、止血、促进创面愈合、抑制表皮细胞过度增生等^[3-6]。笔者前期实验表明,紫草素对正常血管平滑肌细胞的化疗损伤具有预防性保护作用和损伤后的修复作用^[7],紫草素用于预防或治疗时,实验组的细胞活性、乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase, LDH)的水平及细胞内游离Ca²⁺浓度与模型组比较有显著性差异($P<0.01$),与空白组比较无显著性差异($P>0.05$);紫草素可消除化疗药物对细胞有丝分裂的阻滞作用,使G₂期细胞比例恢复正常,单用药时可提高正常细胞S期比例。近年来研究表明,传统中药可通过抑制

肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡、诱导肿瘤细胞分化、抑制肿瘤血管生成、逆转肿瘤细胞多药耐药和增强机体免疫力等多种机制发挥抗肿瘤作用^[8]。紫草素是从紫草中提取的主要药效成分,许多研究表明,紫草素能够抑制多种肿瘤生长,如肝癌、大肠癌、结肠癌、白血病等^[9-12];但紫草素在保护机体正常细胞的同时能否杀灭肿瘤细胞尚无依据,且机制有待完善。故本研究选择人宫颈癌HeLa细胞,探讨紫草素对HeLa细胞增殖的抑制作用,并阐明其诱导凋亡的作用机制。

1 材料

1.1 仪器

RF-510型分光光度计(日本岛津公司);EP-ICS-XL型流式细胞仪(美国贝克曼-库尔特公司);CO₂培养箱(日本三洋公司);KSB- I A型超净工作台(天津尘埃净化设备厂);X51型倒置显微镜(日本Olympus公司);MK3型酶标仪(美国Thermo公司)。

1.2 试剂

紫草素(中国食品药品检定研究院,批号:0769-9903,纯

*药师。研究方向:临床药理学。电话:022-23340123-5101。E-mail: yumingxin1816@126.com

#通信作者:教授。研究方向:心血管药理学。电话:022-23542686。E-mail: jianshilou@sina.com

度: >99%); 优级胎牛血清(北京元亨金马生物技术开发有限公司, 批号: 080420); DMEM(高糖, 北京天润善达生物科技发展有限公司, 批号: 20080928); 胰蛋白酶(美国Gibco公司, 批号: 27250); MTT(美国Amresco公司, 批号: 0793); 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(Caspase)-3、8、9测试盒(南京凯基生物科技发展有限公司); 其余试剂均为分析纯, 水为纯化水。

1.3 细胞株

人宫颈癌HeLa细胞株由天津市医药科学研究所细胞室提供。

2 方法

2.1 HeLa细胞的培养

HeLa细胞接种在含10%胎牛血清、青霉素100 U/ml、链霉素100 U/ml的DMEM培养液中, 置于37℃、5%CO₂孵箱内培养, 用0.25%胰蛋白酶和0.02%乙二胺四乙酸(EDTA)混合液消化, 48~72 h传代1次, 选取对数生长期细胞进行试验。

2.2 细胞形态学观察

以每孔 $1 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ 的细胞密度接种于6孔板中, 37℃、5%CO₂孵箱内培养24 h后分别加入0、10 μg/ml的紫草素, 用倒置显微镜观察细胞形态。

2.3 MTT法测定细胞凋亡

取对数生长期的HeLa细胞接种于96孔板中, 调整细胞密度为 $1 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$, 每孔100 μl, 37℃、5%CO₂孵箱内培养24 h后给药。药物处理组每孔加入不同质量浓度的紫草素溶液100 μl, 使终质量浓度分别为1、5、10、15、20 μg/ml, 各质量浓度均设6个复孔; 空白对照组设6个复孔, 每孔加入100 μl不含药物的DMEM培养液, 继续培养12、24、48 h后, 用MTT法检测。于终止培养前4 h向每孔加入5 mg/ml的MTT 20 μl, 4 h后弃去培养液, 每孔加入DMSO 150 μl振荡5 min, 待结晶物充分溶解后, 用酶标仪测定570 nm波长处各孔的吸光度, 以反映活细胞数量。

2.4 流式细胞仪测定细胞周期

按“2.3”项下方法取对数生长期细胞给药, 紫草素的质量浓度分别为1、5、10、15、20 μg/ml。作用48 h后, 用0.25%的胰蛋白酶消化细胞, 调整细胞密度为 $1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$, 以离心半径为8 cm、1 000 r/min离心5 min, 弃上清, 加入PBS冲洗, 再以离心半径为8 cm、1 000 r/min离心5 min。重复2次, 弃上清, 重悬, 将细胞悬液逐滴加入5 ml 4℃预冷的无水乙醇中, 并不断震荡, 4℃固定过夜。将固定后的细胞悬液以离心半径为8 cm、900 r/min离心5 min, 加入50 μg/ml碘化丙啶(PI), 避光染色30 min, 上流式细胞仪检测。每份样品检测 1×10^4 个细胞, 进行细胞周期分析, 测得细胞凋亡率。

2.5 Caspase-3、8、9活力的测定

收集对数生长期细胞, 调整细胞密度为 $4 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$, 24 h贴壁后, 分别加入不同质量浓度的紫草素, 使其终质量浓度为1、5、10、15、20 μg/ml, 继续培养48 h后, 用0.25%的胰蛋白酶消化细胞, 以离心半径为8 cm、1 000 r/min离心5 min, 弃上清, 加入PBS冲洗, 再以离心半径为8 cm、1 000 r/min离心5 min, 重复2次, 按Caspase测试盒上的操作方法测定。在收集的沉淀细胞中加入50 μl冰冷裂解液(Lysis Buffer), 使用前每50 μl Lysis Buffer加入0.5 μl二巯基苏糖醇(DTT)吹打均匀, 置冰上裂解20~60 min, 其间涡旋振荡3~4次, 每次10 s, 然后在4℃下, 以离心半径为8 cm、10 000 r/min离心1 min, 小心吸取上清

(含裂解的蛋白质)转移至新的管中, 并放置冰上待用。吸取50 μl细胞裂解上清, 如体积不足50 μl用Lysis Buffer补足, 加入50 μl 2×反应缓冲液(使用前每50 μl 2×反应缓冲液加入0.5 μl DTT), 再分别加入5 μl Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9底物, 并于37℃避光孵育4 h, 用酶标仪在405 nm波长处测定吸光度。

2.6 统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用SPSS16.0统计软件对数据进行单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 紫草素对HeLa细胞形态的影响

加入紫草素后, 部分HeLa细胞胞体变圆、缩小, 培养基液面漂浮死细胞。紫草素对HeLa细胞形态的影响见图1。

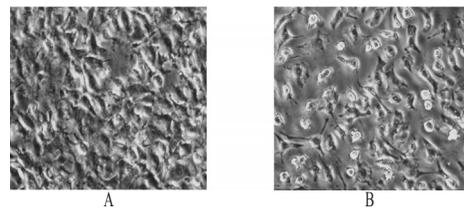


图1 紫草素对HeLa细胞形态的影响(400×)

A. HeLa细胞; B. HeLa细胞中加入10 μg/ml紫草素

Fig 1 Effect of shikonin on morphology of HeLa cell

A. HeLa cells; B. 10 μg/ml shikonin in HeLa cells

3.2 紫草素对HeLa细胞生长的抑制作用

与质量浓度为0 μg/ml时比较, 质量浓度在1~20 μg/ml范围内紫草素的吸光度值显著减小($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 且随给药质量浓度的增加及作用时间的延长, 吸光度值逐渐减小(即抑制作用增强), 表明紫草素对HeLa细胞的抑制作用呈明显的浓度和时间依赖性。紫草素对HeLa细胞生长的抑制作用见表1。

表1 紫草素对HeLa细胞生长的抑制作用($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 1 Inhibition of shikonin on HeLa cell growth ($\bar{x} \pm s, n=6$)

质量浓度, μg/ml	作用时间, h		
	12	24	48
0	0.90±0.04	0.90±0.04	0.90±0.04
1	0.72±0.06*	0.69±0.08*	0.65±0.05*
5	0.60±0.04*	0.55±0.08*	0.51±0.03*
10	0.47±0.09**	0.42±0.04**	0.39±0.06**
15	0.33±0.05**	0.30±0.08**	0.26±0.05**
20	0.23±0.06**	0.21±0.09**	0.17±0.06**

与0 μg/ml比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

vs. 0 μg/ml: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3.3 紫草素对HeLa细胞周期的影响

与质量浓度为0 μg/ml时比较, 紫草素质量浓度在1~20 μg/ml范围内, HeLa细胞G₁期显著减少, S期显著增加, 且随着给药质量浓度的增加, 处于G₁期的细胞减少, 而S期的细胞增多, 多数细胞阻滞在S期, 表明紫草素在诱导凋亡的同时, 阻断了细胞周期的进程。紫草素对HeLa细胞周期的影响见表2。

3.4 紫草素对HeLa细胞内Caspase-3、8、9活性的影响

与质量浓度为0 μg/ml时比较, 质量浓度在1~20 μg/ml范围内的紫草素对Caspase-3、8、9的活性显著增强($P < 0.01$ 或

表2 紫草素对HeLa细胞周期的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 2 Different concentrations of shikonin of HeLa cell cycle($\bar{x} \pm s, n=6$)

质量浓度, $\mu\text{g/ml}$	细胞周期		
	G ₁ , %	S, %	G ₂ , %
0	70.2±1.2	17.4±1.9	12.4±0.8
1	64.3±0.7*	23.9±2.1*	11.8±1.5
5	59.7±1.4*	29.4±1.7*	10.9±2.2
10	54.1±0.9*	37.4±2.0**	8.5±0.9
15	50.8±2.4*	42.0±1.8**	7.2±1.2
20	45.2±1.6**	49.0±2.5**	5.8±1.1

与0 $\mu\text{g/ml}$ 比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$

vs. 0 $\mu\text{g/ml}$: * $P<0.05$, ** $P<0.01$

$P<0.05$,吸光度值越大表明活性越强),且随着紫草素质量浓度的增加,吸光度值也随之增加,表明紫草素对细胞内Caspase-3、8、9的活化程度呈浓度依赖性。紫草素对HeLa细胞内Caspase-3、8、9活性的影响见表3。

表3 紫草素对HeLa细胞内Caspase-3、8、9活性的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 3 Different concentrations of shikonin on human cervical carcinoma HeLa cells within Caspase-3, 8, 9 activity in vitro($\bar{x} \pm s, n=6$)

紫草素, $\mu\text{g/ml}$	吸光度值		
	Caspase-3	Caspase-8	Caspase-9
0		0.213±0.006	
1	0.284±0.002*	0.349±0.004*	0.384±0.002*
5	0.313±0.006*	0.402±0.003*	0.472±0.007*
10	0.372±0.005*	0.495±0.006**	0.561±0.004**
15	0.416±0.007**	0.565±0.002**	0.620±0.006**
20	0.490±0.003**	0.696±0.003**	0.748±0.005**

与0 $\mu\text{g/ml}$ 比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$

vs. 0 $\mu\text{g/ml}$: * $P<0.05$, ** $P<0.01$

4 讨论

本研究分析了紫草素对宫颈癌HeLa细胞的影响。MTT比色法分析结果表明,紫草素可明显抑制宫颈癌HeLa细胞的增殖,而且这种作用具有明显的浓度依赖性和时间依赖性。流式细胞仪对不同剂量紫草素处理后的HeLa细胞进行细胞周期的检测,进一步证实了紫草素可有效抑制Hela细胞周期的正常转换,随紫草素质量浓度的增大,处于S期的细胞比例增加,而G₁期细胞减少,说明HeLa细胞脱氧核糖核酸(DNA)合成受到抑制,细胞被阻滞于S期。

细胞凋亡是中药抗癌的主要作用机制^[13]。研究发现,细胞凋亡的信号转导通路中包含着两条主要途径,即外源性通路(主要由死亡受体介导)与内源性通路(主要通过线粒体相关蛋白活化)^[14]。Caspases家族在调节细胞凋亡中发挥着重要作用,Caspase-2、8、9、10是凋亡途径上游调节因子,启动Caspase以无活性状态存在于胞浆中,通过二聚化被激活后,可引发Caspase级联反应,导致下游的Caspase-3、6、7的激活,通过直接降解胞内的结构蛋白和功能蛋白(PARP)而引起细胞凋亡,使细胞不可逆地走向凋亡途径^[15-16]。本研究对Caspase-3、8、9的活性进行检测,显示Caspase-3、8、9活性随紫草素质量浓度

的增加而增高,证实了该途径中涉及到蛋白酶的激活,可以认为紫草素可能是通过活化Caspase-3、8、9进而诱导HeLa细胞凋亡的。

综上,紫草素对细胞具有双重作用,即对正常细胞经化疗损伤后的修复作用,和对肿瘤细胞的增殖抑制及诱导凋亡作用,并初步阐明了二者的作用机制。更多的分子机制有待进一步研究加以明确。

参考文献

- [1] 葛锋,王晓东,王玉春,等.药用紫草的研究进展[J].中草药,2003,34(9):附6.
- [2] 白研,毋福海,罗碧莲,等.高效毛细管电泳法测定新疆紫草中左旋紫草素的含量[J].中国药房,2010,21(19):1790.
- [3] 赵雪梅,王桂玲,费洪荣,等.紫草有效成分的提取及其抗炎作用研究[J].中药药理与临床,2008,24(4):36.
- [4] 贺锐锐,刘永刚,魏敏吉,等.紫草组分的抗肿瘤活性及其凋亡机制研究[J].中国临床药理学杂志,2012,28(1):43.
- [5] 努尔艾买提江·阿布来提,买尔旦·马合木提,古丽仙·胡加,等.新疆紫草止血作用研究[J].时珍国医国药,2010,21(11):2889.
- [6] 王朝亮,黄素芳,李海峰,等.紫草油促进创面愈合与血管内皮生长因子表达的临床研究[J].中国全科医学,2008,11(9B):1687.
- [7] 宋晓坤,于明欣,杜春双,等.紫草素对血管平滑肌细胞化疗性损伤保护作用的机制[J].中国医院药学杂志,2011,31(8):640.
- [8] 朱梦媛,王汝冰,周文,等.紫草素及其衍生物抗肿瘤作用研究进展[J].药学学报,2012,47(5):588.
- [9] 王雪宝,王英丽,张阳.新疆紫草素抗肝癌的研究[J].中国误诊学杂志,2007,7(16):3727.
- [10] Charrier L, Jarry A, Toquet C, et al. Growth phase-dependent expression of ICAD-L/DFF45 modulates the pattern of apoptosis in human colonic cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2002,62(7):2169.
- [11] 郭云蔚,文卓夫,李永伟,等.紫草素对结肠癌SW480细胞增殖的影响[J].中国医师杂志,2009,11(10):1321.
- [12] 陈丽梅,李超民,关键虹,等.紫草素诱导人白血病细胞K562的凋亡[J].现代肿瘤医学,2009,17(2):209.
- [13] 张珂,马胜林.天然药物抗肿瘤机制的研究进展[J].中华中医药杂志,2011,26(10):2344.
- [14] Debatin KM. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2004, 53(3):153.
- [15] Oberst A, Bender C, Green DR, et al. Living with death: the evolution of the mitochondrial pathway of apoptosis in animals[J]. *Cell Death Differ*, 2008,15(7):1139.
- [16] Susan Elmore. Apoptosis: a review of programmed cell death[J]. *Toxicol Pathol*, 2007,35(4):495.

(收稿日期:2012-10-27 修回日期:2013-02-26)