

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X·2008·04·020

· 短篇论著 ·

鸦胆子油乳对宫颈癌 HeLa 细胞的抑制作用及其作用机制

Inhibitory effect of Brucea javanica oil emulsion against cervical cancer cell line HeLa and its mechanism

尹香菊^{1,2}, 栾和芝¹, 安春丽^{1*}, 王雪莲¹, 酆玉艳³, 王晓娜¹ (1. 中国医科大学基础医学院病原生物学教研室, 沈阳 110001, 2. 沈阳医学院何氏视觉科学学院生物综合教研室, 沈阳 110001, 3. 承德医学院寄生虫教研室, 河北承德 067000)

[摘要] 目的: 探讨鸦胆子油乳对宫颈癌 HeLa 细胞的抑制作用及其可能的机制。方法: 采用倒置显微镜及巴氏染色法, 观察药物质量浓度分别为 5、10 $\mu\text{g/ml}$ 作用下细胞形态的变化; 用 MTT 法检测 5 个不同药物质量浓度(40、20、10、5、2.5 $\mu\text{g/ml}$) 作用下药物对细胞的抑制率; 用流式细胞仪检测药物质量浓度分别为 10、20 $\mu\text{g/ml}$ 的实验组细胞周期的变化。结果: 鸦胆子油乳作用后, 颈癌 HeLa 细胞形态上都发生了改变, 凋亡小体出现; 鸦胆子油乳显著抑制了宫颈癌 HeLa 细胞的增殖, 作用 48 h 后各组中抑制率都已超过 60%, 72 h 后抑制率都超过 80%; 鸦胆子油乳阻滞 S 期细胞进入 $G_2 \sim M$ 期, 并且有凋亡峰, 10、20 $\mu\text{g/ml}$ 药物作用后细胞凋亡率分别为 59.9%、69.8%。结论: 鸦胆子油乳可有效抑制宫颈癌 HeLa 细胞的增殖且呈时间依赖性, 其机制可能与诱导细胞凋亡和阻滞细胞于 S 期有关。

[关键词] 鸦胆子油乳; 宫颈癌细胞; 增殖; 细胞周期; 凋亡

[中图分类号] R737.33; R730.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2008)04-0393-03

宫颈癌是女性最常见的生殖道恶性肿瘤, 其发病呈年轻化趋势, 病死率居女性癌症病死率的第二位。目前临床主要采用手术联合放疗及化疗等治疗方法, 但是大多数放疗及化疗药物毒性作用大, 对人体伤害重, 严重影响患者的生活质量。因此, 寻求一种不良反应小的辅助放、化疗药物成为迫切需求。

鸦胆子油乳(*brucea javanica* oil emulsion) 是苦木科植物鸦胆子成熟果实的提取物, 其主要成分为油酸和亚油酸。鸦胆子油乳能明显抑制肿瘤细胞生长, 配合肿瘤的化疗及放疗有增效减毒作用。实验发现鸦胆子油乳对人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)有抑制作用, 可用于治疗 HPV 引起的扁平疣^[1]、寻常疣^[2]、尖锐湿疣^[3]及喉乳头状瘤^[4]等, 但其对与 HPV 感染密切相关的宫颈癌细胞有无作用尚未见报道。本实验通过观察鸦胆子油乳作用后宫颈癌 HeLa 细胞形态、增殖及生长周期等的变化, 研究该制剂对 HeLa 细胞的抑制效果及其作用机制, 为鸦胆子油乳用于宫颈癌的临床辅助治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

鸦胆子油乳由沈阳药科大学制药厂生产, 宫颈癌 HeLa 细胞株由本实验室保存, RPMI 1640 培养液、新生牛血清及胰蛋白酶均购自沈阳宝信生物公司, 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑(MTT)、

二甲基亚砷(DMSO)及碘化丙啶(PI)等均购自美国 Sigma 公司。

1.2 HeLa 细胞的培养

常规方法复苏冻存的 HeLa 细胞, 置于含有 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养, 用含 0.02% 乙二胺四乙酸(EDTA)的 0.25% 胰酶消化传代。

1.3 鸦胆子油乳作用后 HeLa 细胞形态的观察

将培养瓶中传代 24 h 生长良好的细胞分为正常细胞对照组、实验 A 组和 B 组, 实验 A、B 组中分别加入鸦胆子油乳 5、10 $\mu\text{g/ml}$, 对照组不加鸦胆子油乳。继续培养细胞, 随时用倒置显微镜观察细胞生长情况。作用 48 h 后分别收集各组细胞, 加入甲醛固定, 用 Harris 苏木精-橙黄-G6、EA36 染液及不同浓度酒精进行巴氏染色, 观察细胞形态改变。

1.4 MTT 法检测鸦胆子油乳对 HeLa 细胞抑制作用

设计 5 个不同终质量浓度(40、20、10、5、2.5 $\mu\text{g/ml}$) 的实验组和一个不加药物的阴性对照组, 采用 MTT 法检测细胞增殖抑制率。将培养瓶中对数

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30670916); 沈阳市科技发展计划项目(No. 1063315-1-00)。Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 30670916); Development Program of Science and Technology of Shenyang (No. 1063315-1-00)

[作者简介] 尹香菊(1979-), 女, 辽宁省沈阳市人, 硕士, 主要从事肿瘤生物治疗方面的研究, E-mail: yinxiangju123@163.com

* Corresponding author. E-mail: cmuel@126.com

生长期的Hela细胞转移到96孔细胞培养板中,每孔细胞液200 μl,细胞数约1 × 10⁴,37 °C、5% CO₂条件下继续培养24 h。然后将药物分别加入实验孔中,设6个复孔,另设不加药的正常细胞做阴性对照组。继续培养24、48和72 h,每孔加入MTT 20 μl,孵育4 h,去上清,再加入150 μl DMSO振荡10 min,按常规方法用酶标仪在490 nm处测光密度(D)。细胞生长抑制率(%)=(1 - 实验组D/阴性对照组D) × 100%。

1.5 流式细胞术检测鸦胆子油乳对Hela细胞周期的影响

将培养瓶中传代24 h生长良好的细胞分为正常细胞对照和两个实验组a、b。实验组a、b中分别加入质量浓度为10、20 μg/ml的鸦胆子油乳,对照组不加鸦胆子油乳。继续孵育48 h,按时收集不同药物浓度处理的Hela细胞,制成单细胞悬液,计数细胞数 > 1 × 10⁶/ml, PBS洗涤后离心,加入-20 °C预冷的无水乙醇固定30 min。离心除去乙醇, PBS洗涤,再加入碘化丙啶溶液400 μl,4 °C作用20 min后进行流式细胞仪检测。

1.6 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS11.0软件进行处理,各浓度及各时间点间比较应用F检验,剂量效应和时间剂量关系的检验应用直线相关回归分析。

2 结果

2.1 鸦胆子油乳作用后Hela细胞形态学的变化

倒置显微镜观察发现:随药物浓度的增加,细胞生长密度逐渐下降,正常的多边形细胞中异形细胞逐渐增多。加药12 h后细胞生长密度下降,细胞生长受抑,细胞体积缩小,皱缩的圆形细胞(即凋亡细胞)增多,此现象10 μg/ml组比5 μg/ml组更明显。随着药物作用时间的延长,可见大量膨大、不规则形细胞即死细胞从瓶壁上脱落形成细胞碎片。

巴氏法染色观察发现:正常对照组的细胞显示轮廓清楚、胞膜完整清晰,细胞间结构紧密。5 μg/ml的实验A组可见细胞出现皱缩,体积缩小,细胞间连接减少,核内染色质向核膜聚集并呈凝块状,核处于溶解状态,并可见到发泡的凋亡小体。10 μg/ml的实验B组也可见到染色质浓缩和边缘化,并且能清楚地看到染色质固缩于核膜周边呈半月形的典型形态和发泡的凋亡小体(图1)。

2.2 鸦胆子油乳对Hela细胞增殖的抑制作用

MTT检测结果(表1)显示,同一质量浓度的鸦胆子油乳对Hela细胞作用24、48、72 h后,抑制率有

显著差异(P < 0.01),显示药物作用时间和细胞抑制率间有一定相关性。同一时间点,不同质量浓度间抑制率稍有增高,但无统计意义。由此表明,鸦胆子油乳对Hela细胞的细胞毒作用随着作用时间延长毒性作用逐渐增强,当作用48 h时实验组中抑制率都已超过60%,72 h后抑制率都超过80%。

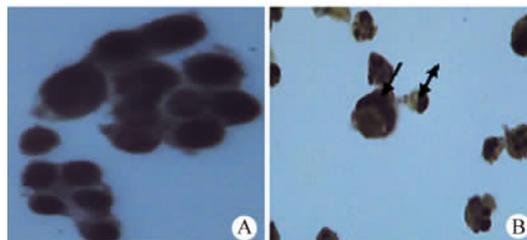


图1 鸦胆子油乳作用后Hela细胞形态学的变化
A: 对照组(×600); B: 鸦胆子油乳(10 μg/ml)作用(单箭头表示半月形固缩,双箭头表示凋亡小体,×400)

表1 不同浓度鸦胆子油乳作用不同时间对Hela细胞增殖的抑制(n=6, $\bar{x} \pm s$, %)

鸦胆子油乳 ($\rho_B/\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	24 h	48 h	72 h
2.5	26.08 ± 2.21	63.3 ± 1.94	80.47 ± 1.23
5.0	28.02 ± 0.39	65.44 ± 4.29	81.20 ± 1.16
10	30.43 ± 1.74	67.15 ± 2.19	81.81 ± 3.24
20	31.71 ± 2.84	67.68 ± 1.59	82.95 ± 0.98
40	37.82 ± 6.86	72.90 ± 2.01	83.34 ± 1.30
F	9.51	61.30	54.16
P	<0.01	<0.01	<0.01

2.3 鸦胆子油乳对Hela细胞周期的影响

在不同浓度鸦胆子油乳作用48 h后,流式细胞仪检测细胞周期变化(表2),可以看出随着药物浓度增加,G₀~G₁期细胞比率下降,S期细胞比率显著增加,G₂~M期细胞也增多。两实验组经鸦胆子油乳作用48 h后细胞的凋亡率分别是59.9%和69.8%。

3 讨论

宫颈癌是严重威胁妇女健康的常见恶性肿瘤之一,目前宫颈癌的全球发病率和病死率有增长趋势^[5]。尤其生育年龄患者的比例持续升高,大约10%~15%的宫颈癌发生在育龄阶段。在西方国家许多妇女在生育前就被诊断为宫颈癌,而一些手术方法不保留生育功能。

表 2 鸦胆子油乳作用对 HeLa 细胞周期的影响

鸦胆子油乳 ($\rho_B/\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	凋亡率 (%)	细胞周期(%)		
		$G_0 \sim G_1$	S	$G_2 \sim M$
0	0	76.6	17.5	5.9
10	59.9	53.7*	34.5*	11.8*
20	69.8	41.0*	45.2*	13.8*

* $P < 0.05$ vs 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$

鸦胆子油乳的主要成分为油酸和亚油酸,具有抗肿瘤和提高机体免疫功能的作用。鸦胆子油乳用于肿瘤的联合化、放疗已广泛应用于肺癌^[6-7]、转移性脑瘤^[8]、肝癌^[9]、食管癌^[10]、胰腺癌^[11]等多种恶性肿瘤;同时还可以用于治疗 HPV 引起的扁平疣、寻常疣、尖锐湿疣及喉乳头状瘤^[14]等,但是目前尚未见用该药治疗宫颈癌的报道。本实验首次观察鸦胆子油乳对宫颈癌 HeLa 细胞的抑制作用,结果表明鸦胆子油乳在体外能够明显抑制宫颈癌 HeLa 细胞的增殖,而且随作用时间的延长其抑制效果显著增强,当作用 48 h 后,抑制率已超过 60%,72 h 后抑制率几乎超过 80%。

细胞的凋亡异常与肿瘤的发生及发展有关,诱导肿瘤细胞凋亡是很多化疗药物的作用机制之一,王芳等^[12]研究表明鸦胆子油乳具有诱导 HL-60 肿瘤细胞凋亡的作用。本研究发现经鸦胆子油乳作用后,HeLa 细胞的核固缩,染色质高度浓缩聚集,呈半月形聚集于核膜下,并形成凋亡小体。另外,流式细胞仪检测结果也显示,10、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 药物作用在 HeLa 细胞均有明显的凋亡峰出现。以上这些均说明鸦胆子油乳抑制 HeLa 细胞的作用机制可能是药物诱导了细胞的凋亡程序。

细胞周期有若干个关卡即调定点,其中以 $G_1 \sim S$ 期转换和 $G_2 \sim M$ 期转换最为重要。由于基因组的不稳定,肿瘤细胞能顺利地通过这两个关卡,因此肿瘤细胞的特点是细胞周期运行失控造成无限增殖和分化受阻。而 $G_2 \sim M$ 调定点被认为是肿瘤治疗敏感性的主要决定因素^[13]。本实验使用药物鸦胆子油乳引起 HeLa 细胞周期分布的改变,随着药物浓度增加,S 和 $G_2 \sim M$ 期细胞数量明显增加, $G_0 \sim G_1$ 期细胞数量显著减少,提示鸦胆子油乳阻滞 S 期细胞进入 $G_2 \sim M$ 期,降低肿瘤细胞分裂能力,抑制其增殖。刘悦等^[14]通过观察鸦胆子油乳对体外培养的人膀胱癌细胞系 BIU-87 细胞的作用,主要是阻止 BIU-87 细胞由 $G_0 \sim G_1$ 期向 S 期进展,实验结果的差异可能

是由于肿瘤细胞类型的不同。

综上所述,鸦胆子油乳对宫颈癌 HeLa 细胞可以抑制增殖、诱导凋亡并阻滞其周期,鸦胆子油乳除用于治疗 HPV 引起的扁平疣、寻常疣、尖锐湿疣及喉乳头状瘤外,对于防治 HPV 相关的宫颈癌也有一定的应用前景。

[参考文献]

- [1] 刘红. 鸦胆子治疗扁平疣[J]. 护理研究, 2007, 21(6): 1533-1533.
- [2] 刘玉泽,王苏洪. 手术切除加外用鸦胆子仁根治寻常疣 15 例[J]. 临床军医杂志, 2002, 30(4): 33-33.
- [3] 林添文,曾凡钦,陈明锋. 鸦胆子液治疗尖锐湿疣[J]. 中国乡村医药杂志, 2001, 8(12): 30-30.
- [4] 曾旭东,何源萍. 微波配合鸦胆子油治疗成人喉乳头状瘤的临床体会[J]. 中国耳鼻咽喉喉底外科杂志, 2005, 11(5): 362-363.
- [5] Anttila A, Pukkila E, Söderman B, et al. Effect of organised screening on cervical cancer incidence and mortality in Finland, 1963-1995: recent increase in cervical cancer incidence[J]. Int J Cancer, 1999, 83(1): 59-65.
- [6] Tibaldi C, Ricci S, Russo F, et al. Increased dose-intensity of gemcitabine in advanced non small cell lung cancer (NSCLC): a multicenter phase II study in elderly patients from the "palmone toscano group"(POLTO)[J]. Lung Cancer, 2005, 48(1): 121-127.
- [7] Quoix E, Breton JL, Ducolone A, et al. First line chemotherapy with gemcitabine in advanced non-small cell lung cancer elderly patients: a randomized phase II study of 3-week versus 4-week schedule[J]. Lung Cancer, 2005, 47(3): 405-412.
- [8] 龙新兵,韩富,谢才军,等. 鸦胆子油乳针辅助治疗脑转移瘤 32 例[J]. 广东医学, 2007, 28(7): 1175-1176.
- [9] 刘学章,胡刚,李华,等. 肝动脉灌注鸦胆子油联合化疗栓塞治疗原发性肝癌的临床应用[J]. 实用放射学杂志, 2006, 22(5): 634-635.
- [10] 阿依贤古. 通幽汤联合鸦胆子乳剂治疗中晚期食管癌的疗效观察[J]. 河北中医, 2007, 29(6): 511-513.
- [11] 徐红,高远,王庆才,等. 应用 HIFU 联合中药鸦胆子乳剂扶正抗癌治疗晚期胰腺癌[J]. 苏州大学学报:医学版, 2006, 6(6): 1027-1029.
- [12] 王芳,曹玉,刘红岩,等. 鸦胆子油乳诱导 HL-60 细胞凋亡的研究[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(4): 760-762.
- [13] Russell KJ, Wiens LW, Demers GW, et al. Abrogation of the G2 checkpoint results in differential radiosensitization of G1 checkpoint-deficient and G1 checkpoint-competent cells[J]. Cancer Res, 1995, 55(8): 1639-1642.
- [14] 刘悦,王禾,符庆吉,等. 鸦胆子油乳对膀胱癌影响的实验研究[J]. 中华泌尿外科杂志, 2001, 22(6): 336-338.

[收稿日期] 2008-05-26

[修回日期] 2008-07-01

[本文编辑] 王莹