

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.05.014

鸦胆子油乳对宫颈癌 SiHa 细胞的抑制

王晓娜^{1,4}, 马力², 安春丽^{1*}, 肖纯凌³, 王雪莲¹, 王冬冬²(1. 中国医科大学基础医学院病原生物学教研室, 辽宁沈阳 110001; 2. 中国医科大学附属盛京医院妇产科, 辽宁沈阳 110004; 3. 沈阳医学院病原生物学教研室, 辽宁沈阳 110034; 4. 沈阳市妇婴医院检验科, 辽宁沈阳 110014)

[摘要] 目的:探讨鸦胆子(*Brucea javanica*)油乳在体外对宫颈癌 SiHa 细胞的抑制作用及其作用机制。方法:以鸦胆子油乳(2.5、5.0、10、20、40、80 $\mu\text{g/ml}$)作用于 SiHa 细胞 24、48、72 h,以 MTT 法检测鸦胆子油乳对 SiHa 细胞增殖的抑制作用;透射电镜观察细胞的超微结构;琼脂糖凝胶电泳观察 SiHa 细胞基因组 DNA 片段化改变;流式细胞术测定 AnnexinV/PI 双染色后 SiHa 细胞凋亡率。结果:MTT 结果显示,鸦胆子油乳以剂量和时间依赖方式对 SiHa 细胞增殖有明显的抑制作用,其中 80 $\mu\text{g/ml}$ 药物作用 72 h 时的抑制率可达 92.43%;20 $\mu\text{g/ml}$ 药物作用后,透射电镜下可观察到细胞出现凋亡小体,琼脂糖凝胶电泳显示细胞凋亡特征性的 DNA 片段化“梯状”条带;流式细胞仪检测显示,10、20、40 $\mu\text{g/ml}$ 药物组作用 48 h 后凋亡率分别为(8.02 \pm 2.41)%、(51.60 \pm 7.67)%、(77.22 \pm 5.80)%。结论:鸦胆子油乳能够抑制 SiHa 细胞增殖,其作用机制可能为诱导 SiHa 细胞发生凋亡。

[关键词] 宫颈肿瘤;SiHa 细胞,鸦胆子油乳,细胞凋亡

[中图分类号] R737.33; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)05-0494-04

***Brucea javanica* oil emulsion inhibits proliferation of cervical cancer SiHa cells**

WANG Xiao-na^{1,4}, MA Li², AN Chun-li^{1*}, XIAO Chun-ling³, WANG Xue-lian¹, WANG Dong-dong²(1. Department of Pathogen Biology, Basic Medical School, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning, China; 2. Department of Gynecology and Obstetrics, Shengjing Hospital Affiliated to China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning, China; 3. Department of Pathogen Biology, Shenyang Medical College, Shenyang 110034, Liaoning, China; 4. Department of Clinical Laboratory, Shenyang Sleeper Davis Hospital, Shenyang 110014, Liaoning, China)

[Abstract] **Objective:**To investigate the inhibitory effect of *Brucea javanica* oil emulsion on cervical cancer SiHa cells *in vitro* and the related mechanisms. **Methods:** SiHa cells were treated with *Brucea javanica* oil emulsion(2.5, 5.0, 10, 20, 40, and 80 $\mu\text{g/ml}$)for 24, 48, and 72 h. The inhibitory effect of *Brucea javanica* oil emulsion on the proliferation of SiHa cells was examined by MTT; the ultrastructure of SiHa cells was observed by transmission electron microscope (TEM); the DNA fragment of SiHa cells was detected by agarose gel electrophoresis; and the apoptosis of SiHa cells was examined by flow cytometry through Annexin V and PI staining. **Results:** MTT results showed that *Brucea javanica* oil emulsion significantly inhibited the proliferation of SiHa cells in a dose- and time-dependent manner. The inhibitory rate of SiHa cells reached 92.43% after treatment with 80 $\mu\text{g/ml}$ *Brucea javanica* oil emulsion for 72 h. Apoptotic bodies and a characteristic apoptosis DNA ladder of SiHa cells were observed after treatment with 20 $\mu\text{g/ml}$ *Brucea javanica* oil emulsion. Flow cytometry results demonstrated that the apoptosis rates of SiHa cells were (8.02 \pm 2.41)%, (51.60 \pm 7.67)%, and (77.22 \pm 5.80)% 48 h after treatment with 10, 20, and 40 $\mu\text{g/ml}$ *Brucea javanica* oil emulsion for 48 h, respectively. **Conclusion:** *Brucea javanica* oil emulsion can inhibit the proliferation of SiHa cells, probably by inducing apoptosis of SiHa cells.

[Key words] cervical cancer; SiHa cells; *Brucea javanica* oil emulsion; cell apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(5): 494-497]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30670916);辽宁省科学技术计划项目(No. 2007225005-22)。Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30670916); the Science and Technology Program of Liaoning Province (No. 2007225005-22)

[作者简介] 王晓娜(1982-),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: naxiaowang@126.com

* 通信作者(Corresponding author)。E-mail: emuel@126.com

鸦胆子 (*Brucea javanica*) 为苦木科植物鸦胆子的干燥成熟果实。从鸦胆子提取制备的鸦胆子油乳剂不仅能够治疗人乳头瘤病毒 (human papilloma virus, HPV) 感染引起的扁平疣^[1]等多种皮肤疾病^[2], 也被应用于肺癌^[3]、肝癌^[4]、恶性胸腔积液^[5]等多种恶性肿瘤的辅助治疗。此外, 该药与放疗和/或化疗联合应用可以明显提高患者的生存质量。但是目前尚未见用该药治疗宫颈癌的临床报道。尹香菊等^[6]体外实验证明鸦胆子油乳具有抑制宫颈癌腺癌细胞株 (Hela 细胞, HPV18 阳性) 增殖和诱导细胞凋亡的作用。本研究观察鸦胆子油乳对宫颈癌鳞癌细胞株 (SiHa 细胞, HPV16 阳性) 的体外抑制作用及其作用机制, 期望为鸦胆子油乳的临床应用提供实验依据, 为宫颈癌的辅助治疗提供新方法。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

鸦胆子油乳剂购自沈阳药科大学制药厂。SiHa 细胞为中国医科大学附属盛京医院妇产科购于中国科学院细胞库上海生命科学院细胞资源中心。PR-MI1640 培养基、新生牛血清及胰蛋白酶均购自沈阳宝信生物公司。DNA 梯带检测试剂盒、MTT、Annexin V-EGFP 及 PI 均购自沈阳凯基生物公司。

1.2 细胞培养及同步化处理

SiHa 细胞用含 10% 小牛血清的 1640 培养基在 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养, 用不含 EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶消化传代。冷冻休克法同步化处理细胞, 细胞传代后 4 h 从温箱取出, 放入 4 °C 冰箱 8 h, 收集对数生长期细胞, 培养待用。

1.3 MTT 法检测鸦胆子油乳对细胞增殖的抑制

将鸦胆子油乳倍比稀释成 6 个质量浓度 (80、40、20、10、5.0、2.5 μg/ml), 另设正常细胞为阴性对照组。在 96 孔板每孔加入 SiHa 细胞悬液 200 μl (细胞数约 1 × 10⁴), 置 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养。将不同质量浓度药物分别加入实验孔中, 每一药物浓度设 6 个复孔。24、48、72 h 后分别取出一个培养板, 每孔加入 MTT 50 μl, 孵育 4 h, 去上清, 每孔加入 150 μl DMSO, 平板摇床振荡 15 min。常规方法用酶标仪在 550 nm 处测光密度 (D 值), 实验数据利用 origin 6.0 软件进行分析。细胞生长抑制率 (IR, %) = (1 - 实验组 D 值/阴性对照组 D 值) × 100%

1.4 电镜观察凋亡细胞形态学改变

将培养瓶中同步化处理生长良好的细胞分为正常细胞对照组和 A、B 两个实验组, 实验组中分别加入质量浓度为 10、20 μg/ml 的鸦胆子油乳, 继续培养 48 h, 收

集细胞, 常规方法制作电镜标本, 电镜观察并拍照。

1.5 凝胶电泳 DNA 梯带检测细胞基因组 DNA 片段改变

将培养瓶中同步化处理生长良好的细胞分为正常细胞对照组和 A、B 两个实验组, 实验组中分别加入为 10、20 μg/ml 的鸦胆子油乳, 继续培养 48 h, 收集细胞, 调细胞密度至 10⁵ ~ 10⁶/ml, 常规方法提取 DNA, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 5 V/cm 电泳 1 h, 紫外灯下观察并拍照。

1.6 流式细胞仪检测细胞的凋亡率

将培养瓶中同步化处理生长良好的细胞分为正常细胞对照组和 A、B、C 3 个试验组, 稀释药物浓度为 10、20、40 μg/ml 加入 3 个实验组中, 孵育 48 h。不含 EDTA 的胰酶消化细胞, 制成单细胞悬液, 调细胞密度至 5 × 10⁵/ml, 常规方法加入 Annexin V 及 PI 染色, 流式细胞术检测。资料均经 LvsisII 软件收集和分析。

1.7 统计学处理

所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *F* 检验, SPSS13.0 统计软件进行数据分析。

2 结果

2.1 鸦胆子油乳对宫颈癌 SiHa 细胞增殖的抑制

鸦胆子油乳对宫颈癌 SiHa 细胞的抑制作用结果见表 1。细胞增殖抑制率与作用时间和药物浓度依赖性, 随着作用时间的延长和药物浓度的加大, 细胞毒性作用逐渐增强; 同一浓度随作用时间延长, 抑制率逐渐增高; 同一时间点, 随浓度增高, 抑制率也逐渐增高 (均 *P* < 0.01)。

表 1 鸦胆子油乳对 SiHa 细胞增殖的抑制作用

Tab.1 Inhibitory effect of *Brucea javanica* oil emulsion on proliferation of SiHa cells

<i>Brucea javanica</i> oil emulsion ($\rho_B/\mu\text{g} \cdot \text{ml}$)	Inhibitory rate (%)		
	24 h	48 h	72 h
2.5	25.31 ± 0.84	53.49 ± 0.88	81.19 ± 1.13
5.0	27.02 ± 0.86	58.20 ± 0.97	82.90 ± 1.53
10	28.95 ± 0.76	60.10 ± 1.10	84.42 ± 0.83
20	32.89 ± 1.23	67.29 ± 1.44	87.41 ± 1.52
40	37.53 ± 0.65	69.05 ± 0.93	89.58 ± 2.13
80	41.84 ± 0.78	74.01 ± 1.16	92.43 ± 1.65
<i>F</i>	325.4	295.21	47.25
<i>P</i>	< 0.01	< 0.01	< 0.01

2.2 鸦胆子油乳作用致 SiHa 细胞超微结构的改变
透射电镜观察细胞形态发现, 对照组细胞绒毛清晰, 细胞膜、核膜均完整, 染色质均匀(图 1A)。

实验组 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 作用 48 h 后见细胞核内染色质凝聚, 边集于核膜, 呈现凋亡早期变化(图 1B); 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 药物组细胞内可见凋亡小体(图 1C)。

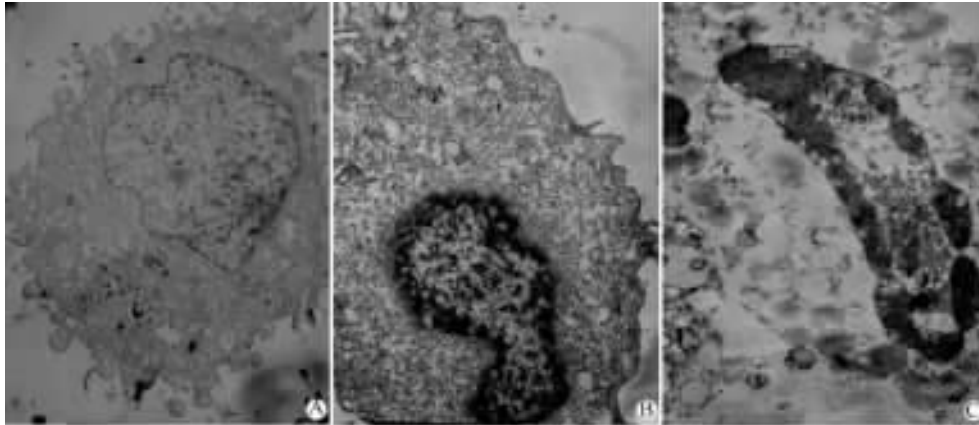


图 1 鸦胆子油乳作用后 SiHa 细胞超微结构的改变

Fig. 1 Ultrastructural changes of SiHa cells induced by *Brucea javanica* oil emulsion

A: Control ($\times 6000$); B: 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ *Brucea javanica* oil emulsion ($\times 8000$); C: 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ *Brucea javanica* oil emulsion ($\times 8000$)

2.3 鸦胆子油乳作用致 SiHa 细胞 DNA 的片段化

鸦胆子油乳诱导 SiHa 细胞 48 h 后, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 药物作用组琼脂糖凝胶电泳上 DNA 显示明显的片段化梯带, 而对照组及 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 药物作用组则没有出现片段化(图 2)。

2.4 鸦胆子油乳作用促进 SiHa 细胞的凋亡

流式细胞仪 Annexin V/PI 双染色法检测细胞凋亡, 由于晚期凋亡细胞和坏死细胞多为早期凋亡细胞继发而来, 故将两者之和计为总体凋亡率。图 3 显示, 空白对照组细胞凋亡率仅为(0.69 \pm 0.34)%, 鸦胆子油乳 10、20、40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 作用 48 h 后凋亡率分别为(8.02 \pm 2.41)%、(51.60 \pm 7.67)%、(77.22 \pm 5.80)%, 鸦胆子油乳作用组的细胞凋亡率与空白对照组比较具有显著性差异($P < 0.01$)。

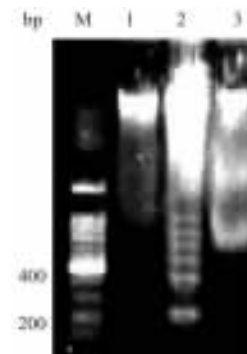


图 2 鸦胆子油乳作用致 SiHa 细胞 DNA 片段化
Fig. 2 DNA fragmentation in SiHa cells induced by *Brucea javanica* oil emulsion

M: Marker; 1: Control; 2: 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ *Brucea javanica* oil emulsion; 3: 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ *Brucea javanica* oil emulsion

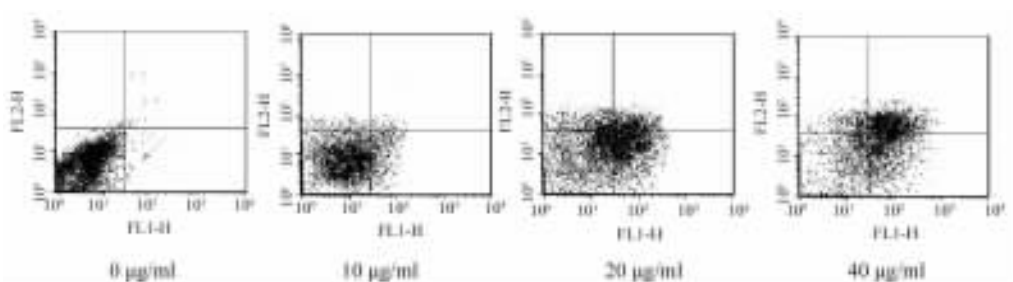


图 3 流式细胞仪检测鸦胆子油乳作用后 SiHa 细胞的凋亡率

Fig. 3 Apoptosis rate of SiHa cells after treatment with *Brucea javanica* oil emulsion as detected by FCM

3 讨论

宫颈癌是女性最常见的生殖道恶性肿瘤,严重威胁女性的健康。人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)感染是其重要致病原因之一,用 PCR 技术对宫颈癌进行分子流行病学调查发现,90% 以上的人宫颈癌标本中可检出 HPV DNA^[7],尤以 HPV16 型最突出^[8]。目前临床上治疗本病主要采用手术联合放疗及化疗等方法。因为抗癌放化疗的毒性反应较大,治疗后往往严重影响患者的生存期和生存质量。鸦胆子油乳的主要抗癌活性成分为油酸和亚油酸,在抗肿瘤的同时还具有提高机体免疫力^[9]和保护骨髓造血干细胞等作用。与常用的化疗药物相比,该药具有毒性作用小、疗效好等优势^[10]。本研究采用鸦胆子油乳体外实验研究观察该药对 SiHa 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 SiHa 细胞的增殖,并且随作用时间的延长和药物浓度的增加其抑制作用逐渐增强,具有时间和浓度的依赖性。作用 48 h 后抑制率超过 50%,作用 72 h 后抑制率超过 80%,与尹香菊^[6]等用鸦胆子油乳作用 Hela 细胞结果基本一致,表明该药对宫颈癌有治疗潜能。

细胞凋亡(apoptosis)又称程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD),与肿瘤的发生极其相关。细胞凋亡启动后,细胞将会发生一系列形态学和生物化学方面的变化,关键生化事件是细胞核的裂解:内源性核酸内切酶的激活导致染色质 DNA 在核小体连接部位断裂,继而形成单倍或多倍于 180~200 bp 的寡核苷酸片段,DNA 断裂和片段化是细胞凋亡的下游事件,DNA 断裂是不可逆的致死性损伤,之后细胞形成凋亡小体,走向生命的终点^[11]。因此,诱导肿瘤细胞凋亡被视为抗癌药物研究和开发的新靶点^[12]。吕峰^[13]、胡美薇^[14]、李英^[15]等研究表明鸦胆子油乳具有诱导膀胱癌 J82 细胞、Jurkat 细胞及 K562 细胞凋亡的作用。在本研究中,不同浓度鸦胆子油乳作用 48 h 后,电子显微镜观察到凋亡小体,并且由 DNA 梯带法检测到凋亡时 DNA 降解形成的梯带。从形态学及分子生物学角度证实了鸦胆子油乳对 SiHa 细胞有诱导凋亡的作用,说明鸦胆子油乳抑制 SiHa 细胞增殖的作用机制可能是药物诱导了细胞的凋亡程序。同时,细胞发生凋亡后,磷脂酰丝氨酸会外翻到细胞表面,通过 Annexin V/PI 双染色法测定细胞凋亡率,不同药物浓度作用 48 h 后凋亡率分别为(8.02±2.41)%、(51.60±7.67)%、(77.22±5.80)%,呈逐渐升高趋势,进一步说明鸦胆子油乳对 SiHa 细胞的抑

制作用是通过诱导其凋亡实现的。

综上所述,鸦胆子油乳能够抑制 SiHa 细胞的增殖并在适当的浓度和时间可以诱导其凋亡,为临床应用鸦胆子油乳治疗宫颈癌提供了有力的实验证据,为我国特有的鸦胆子类药物的开发应用开辟了新领域。

[参考文献]

- [1] 刘红. 鸦胆子治疗扁平疣[J]. 护理研究, 2007, 21(6): 1533.
- [2] 任海燕,王吉军. 单味鸦胆子浸泡液涂擦患部治疗疣体 76 例[J]. 中国民康医学, 2008, 20(21): 576.
- [3] 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.
- [4] 丁新梅,武长军,王鹤鹏,等. TACE 联合鸦胆子油乳注射液治疗原发性肝癌的疗效观察[J]. 中国误诊学杂志, 2008, 8(14): 3314-3315.
- [5] 赵锦艳,张雨洁,米尔班. 鸦胆子油乳剂联合白细胞介素-2 治疗恶性腹腔积液 44 例疗效观察[J]. 中国现代医生, 2009, 47(3): 23-24.
- [6] 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.
- [7] 李力. 宫颈癌与人乳头瘤病毒感染[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2006, 22(1):13-15
- [8] Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer [J]. N Eng J Med, 2003, 348(6): 518-527.
- [9] 张宏胜. 鸦胆子油乳注射液联合化疗对食管癌术后患者免疫功能的影响[J]. 海军医学杂志, 2007, 28(1): 31-33.
- [10] 林宏英,吴建梅,张文生,等. 鸦胆子油的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(4): 65-69.
- [11] 杨录军, Nuesse M, 敖琳,等. 昆明山海棠碱诱导 Jurkat 淋巴瘤细胞核 DNA 链断裂和 DNA 片段化[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(7): 1515-1517.
- [12] Nicholson DW. From bench to clinic with apoptosis based therapeutic agents [J]. Nature, 2000, 407(6805): 810-816.
- [13] 吕峰,王禾,秦卫军. 鸦胆子油乳诱导膀胱癌细胞 J82 凋亡及其机制的初步研究[J]. 中国康复理论与研究, 2007, 13(5): 432-433.
- [14] 胡美薇,张越峰,冯键. 鸦胆子油乳诱导 Jurkat 细胞凋亡及与柔红霉素的协同作用[J]. 浙江中西医结合杂志, 2007, 17(7): 400-402.
- [15] 李英,李颖,张凌岩,等. 鸦胆子油乳诱导白血病 K562 细胞凋亡及分子机制的实验研究[J]. 国际肿瘤学杂志, 2006, 33(8): 637-639.

[收稿日期] 2009-07-15

[修回日期] 2009-08-27

[本文编辑] 韩丹