



隐丹参酮对宫颈癌 HeLa 细胞增殖及细胞凋亡的影响

叶因涛, 徐文清*, 仲巍

(中国医学科学院 北京协和医学院 放射医学研究所 药物室, 天津市分子核医学重点实验室, 天津 300192)

[摘要] **目的:** 研究隐丹参酮对人宫颈癌 HeLa 细胞生长的抑制作用及对细胞周期和凋亡的影响。**方法:** MTT 法检测不同浓度隐丹参酮分别在 24, 48, 72 h 对 HeLa 细胞的抑制作用; 流式细胞仪 (FCM) 检测隐丹参酮对 HeLa 细胞周期和凋亡的影响; Western blot 法检测 E6, p53, p21 蛋白的表达。**结果:** 不同质量浓度 (0.5 ~ 16 mg · L⁻¹) 隐丹参酮对 HeLa 细胞的毒性均有明显剂量和时间依赖性, 其 24, 48, 72 h 的 IC₅₀ 值分别为 17.8, 8.17, 6.55 mg · L⁻¹; 隐丹参酮可使 HeLa 细胞细胞周期的构成发生明显的变化并诱导细胞凋亡。Western blot 表明, 隐丹参酮作用 HeLa 细胞后 HPV E6 的蛋白水平表达逐渐降低, p53 和 p21 的蛋白水平表达逐渐升高。**结论:** 隐丹参酮对宫颈癌 HeLa 细胞有较强的细胞毒性, 其作用机制可能是使 HeLa 细胞生长停滞在 G₀/G₁ 期并诱导细胞凋亡, 使 S 期细胞比例降低; 抑制 HPV E6 的蛋白的表达, 使 p53 功能恢复, 启动凋亡, 从而起到杀伤肿瘤的作用。

[关键词] 宫颈癌; HeLa 细胞; 隐丹参酮; 细胞凋亡; 蛋白 p53; 蛋白 p21

丹参是临床最常用的活血化瘀中药, 现代医学认为丹参具有扩张冠状动脉、增加冠脉血流量、防止心肌缺血和心肌梗死等作用, 可治疗肝癌、胃癌、白血病、宫颈癌等疾病, 对多种肿瘤细胞具有生长抑制作用和分化诱导作用^[1-2]。丹参主要通过抑制细胞增殖、促进凋亡以及促进分化等机制发挥抗肿瘤作用^[3-4]。隐丹参酮 (cryptotanshinone) 是脂溶性的菲醌类成分之一, 体外研究表明, 丹参酮类化合物可抑制多种肿瘤细胞增殖, 影响细胞周期分布。但关于隐丹参酮抗肿瘤作用及其机制的研究较少, 特别是对于宫颈癌的研究未见文献报道。本实验主要研究隐丹参酮对宫颈癌细胞系 HeLa 的细胞毒性、细胞周期和凋亡的影响, 初步探讨其抗肿瘤作用的机制。

1 材料

1.1 试剂与药品 DMEM (dulbecco's modified eagle medium) 购自 Gibco 公司; MTT (四氮唑噻唑蓝, 四甲基偶氮唑盐) 购自上海生物工程有限公司; 牛血清购自中国协和医科大学血液学研究所; 鼠抗人 E6, p53, p21, β-actin 单抗购自美国 Santa Cruz 公

司; 隐丹参酮纯度 > 95%, 由本实验室分离提纯得到, 使其溶解于适量的二甲基亚砜 (DMSO), 终质量浓度为 0.1%, 过滤除菌, 4 °C 冰箱密封避光保存。

1.2 仪器 CO₂ 培养箱 (美国 Thermo Electron Corporation), 流式细胞仪 (美国 Beckman Altra II), 超净工作台 (苏州精华设备公司), 倒置相差显微镜 (日本 Olympus 公司), BIO-RAD MODE 1680 型酶标仪 (基因公司), AE2405 电子分析天平 (上海美特勒-托利多仪器有限公司), 细胞培养板 (日本 IWA-KI)。

2 方法

2.1 细胞株与细胞培养 人宫颈癌细胞株 HeLa 购于中国医学科学院基础医学研究所细胞中心。HeLa 细胞接种于 DMEM 培养液 (含 10% 新生牛血清及青霉素、链霉素各 100 U · mL⁻¹), 置于 37 °C, 5% CO₂ 饱和湿度的孵箱中培养, HeLa 细胞为梭形, 呈贴壁生长, 孵育 2 ~ 3 d 后用 0.25% 胰蛋白酶消化传代, 选对数生长期的细胞进行试验。

2.2 MTT 法检测隐丹参酮对 HeLa 细胞增殖的抑制作用 取对数生长期的 HeLa 细胞, 用 0.25% 胰蛋白酶消化制成单细胞悬液后细胞计数, 将细胞密度调整为 2 × 10⁴ 个/mL, 空白对照组给予等体积的 PBS; 给药组分别加入不同浓度的隐丹参酮, 其质量浓度依次为 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 mg · L⁻¹, 每个浓度设 6 个复孔。分别培养 24, 48, 72 h 后, 加入 5 g · L⁻¹ 的 MTT 液 (20 μL/孔) 4 h 后, 吸去上清加入 DMSO 150

[收稿日期] 2009-07-28

[基金项目] 中国医学科学院北京协和医学院放射医学研究所发展基金 (SF0628) 和探索基金 (ST0842)

[通信作者] * 徐文清, Tel: (022) 85683049, E-mail: xuwenqing67@yahoo.com.cn

[作者简介] 叶因涛, 研究生, 从事有关抗肿瘤天然药物的筛选等研究, Tel: (022) 85682386, E-mail: yetao6868@126.com



$\mu\text{L}/\text{孔}$,微型震荡器震荡 10 min,使完全混匀溶解结晶,在酶标仪上于 492 nm 处测其吸光度,每个剂量设平行重复 6 孔,实验重复 3 次。按以下公式计算抑制率,拟合后求 IC_{50} 值。细胞增殖抑制率 = $(1 - A_{\text{试验组}}/A_{\text{对照组}}) \times 100\%$ 。

2.3 流式细胞仪检测隐丹参酮对 HeLa 细胞周期及凋亡的影响 取对数生长的 HeLa 细胞,以 1×10^5 个/mL 的密度接种于 6 孔板,分别设有空白组、给药组(12, 24, 36, 48 h)。隐丹参酮给药质量浓度为 $8.17 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (IC_{50} 值),空白组给予等体积的 PBS。培养 24 h 后,胰酶消化,离心 ($1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 5 min),PBS 洗 2 次,用 70% 的冷乙醇使细胞悬浮固定,置 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 存 30 min, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 过夜。经 RNase 消化,PI 染色 ($4\text{ }^\circ\text{C}$ 避光染 30 min) 后流式细胞仪监测分析,每组实验重复 3 次。

2.4 Annexin V/PI 双染法检测隐丹参酮诱导 HeLa 细胞凋亡的作用 取对数生长的 HeLa 细胞,以 1×10^5 个/mL 的密度接种于 6 孔板中,分别设有空白组、给药组(12, 24, 36, 48 h)。隐丹参酮给药质量浓度为 $8.17 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (IC_{50} 值),空白组给予等体积的 PBS。培养 24 h 后,胰酶消化,离心 ($1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 5 min) 用 PBS 洗 2 次,加入 Annexin V/PI,避

光染色 15 min,上流式细胞仪检测,分析细胞凋亡比例。

2.5 蛋白免疫印迹试验 (Western blot) 给药隐丹参酮后,收集对数生长的 HeLa 细胞,加入细胞裂解液,冰上放置 15 min, $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取上清,以 Bradford 法作蛋白定量后置 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 贮存备用。灌制 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶,常规电泳,转膜,封闭。一抗 ($1:500$), $4\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜,二抗 ($1:5\ 000$), 室温孵育 2 h, ECL 显色。 β -actin 检测作为内对照,进行细胞间蛋白表达的比较。

2.6 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 One-way ANOVA 检验。

3 结果

3.1 隐丹参酮对 HeLa 细胞增殖的抑制作用 MTT 法检测,不同浓度的隐丹参酮分别给药 24, 48, 72 h 后,对 HeLa 细胞的生长呈明显抑制作用。药物作用 24, 48, 72 h 的 IC_{50} 值分别为 17.8, 8.17, 6.55 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结果表明细胞增殖的抑制率与药物浓度及作用时间密切相关,单因素方差分析结果表明不同药物浓度与空白组间细胞抑制率有显著性差异 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, 表 1)。

表 1 不同浓度的隐丹参酮对 HeLa 细胞的生长抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	A_{492}			抑制率/%		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
空白对照	0.497 \pm 0.012	0.602 \pm 0.018	0.782 \pm 0.032	0	0	0
0.5	0.452 \pm 0.015	0.534 \pm 0.026 ¹⁾	0.685 \pm 0.022 ²⁾	9.12	11.35	12.38
1	0.448 \pm 0.011	0.506 \pm 0.026 ²⁾	0.633 \pm 0.027 ²⁾	9.96	15.89	19.03
2	0.433 \pm 0.019 ¹⁾	0.456 \pm 0.009 ²⁾	0.577 \pm 0.028 ²⁾	12.87	24.25	26.21
4	0.399 \pm 0.012 ²⁾	0.406 \pm 0.017 ²⁾	0.451 \pm 0.020 ²⁾	19.71	32.61	42.32
8	0.279 \pm 0.010 ²⁾	0.272 \pm 0.013 ²⁾	0.366 \pm 0.017 ²⁾	43.78	54.79	53.26
16	0.248 \pm 0.020 ²⁾	0.259 \pm 0.013 ²⁾	0.355 \pm 0.009 ²⁾	50.22	57.06	54.65

注:与空白对照组相比¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.2 流式细胞仪检测细胞周期及早期凋亡的影响

HeLa 细胞经给药组处理,PI 染色后使用流式细胞仪进行监测分析。结果表明与空白对照组相比较,给药组效果更加显著,使 HeLa 细胞生长产生 G_0/G_1 期阻滞,S 期所占比例随给药时间的延长不断减少。 G_1 峰前出现了亚二倍体峰 (hypodiploid peak), 此为细胞发生凋亡的标志 (表 2)。

3.3 流式细胞术检测隐丹参酮诱导 HeLa 细胞凋亡的作用 HeLa 细胞经不同组别处理,PI 染色后使用

流式细胞仪进行监测分析。结果表明:给药隐丹参酮可以诱导细胞凋亡,随给药时间的增加诱导细胞凋亡的作用逐渐增强。空白组凋亡比例为 0.2%, 给药 48 h 后的细胞凋亡比例为 7.7%, 与空白组有显著性差异。细胞凋亡百分率随给药时间的延长而逐渐增大。

3.4 Western blot 法对相关蛋白的检测 宫颈癌 HeLa 细胞经隐丹参酮 $8.17 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理 12, 24, 36, 48 h 后,Western blot 法检测,随着药物作用时间的

表 2 射线照射和隐丹参酮对 HeLa 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

%

组别	给药时间/h	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	凋亡率
空白	-	55.3 ± 1.55	23.9 ± 1.48	20.8 ± 2.96	0.4 ± 0.09
给药	12	65.9 ± 2.90 ¹⁾	17.6 ± 3.98 ¹⁾	16.5 ± 0.96 ¹⁾	8.3 ± 0.11 ²⁾
	24	66.0 ± 2.06 ¹⁾	17.4 ± 1.15 ¹⁾	16.6 ± 1.70 ¹⁾	8.8 ± 0.08 ²⁾
	36	71.3 ± 1.67 ²⁾	15.5 ± 0.87 ²⁾	13.2 ± 0.90 ²⁾	10.4 ± 0.14 ²⁾
	48	73.2 ± 1.70 ²⁾	10.4 ± 2.12 ²⁾	16.4 ± 1.67 ²⁾	16.6 ± 0.17 ²⁾

延长, E6 蛋白表达逐渐降低, p53 和 p21 的表达逐渐增加(图 1)。

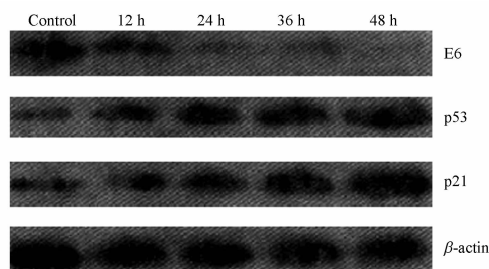


图 1 隐丹参酮诱导 HeLa 细胞凋亡过程中不同时间点蛋白水平表达的变化

4 讨论

宫颈癌患者放疗后局部控制率低和远处转移率高,严重影响其临床疗效,因而高效低毒的放射增敏药物能广泛应用于基础和临床研究^[5]。隐丹参酮是丹参的脂溶性成分之一,具有菲醌结构,其菲环可与 DNA 结合,而呋喃环和醌类结构可产生自由基,引起 DNA 损伤,从而抑制肿瘤细胞 DNA 合成^[6]。Mosaddik Ma 的研究表明,丹参酮通过抑制抗增殖细胞核抗原(PCNA)和细胞增殖相关的基因表达,影响 DNA 多聚酶的活性,抑制 DNA 合成,从而抑制肿瘤细胞的增殖,诱导细胞凋亡^[7]。

细胞凋亡与肿瘤发生、发展与消退有密切关系,某些抗肿瘤药物作用的强弱就与其诱导肿瘤细胞凋亡的活性成正比。因此,诱导肿瘤细胞凋亡成为研究抗肿瘤药物的新靶点,以及评价疗效的一项新指标^[8]。有学者认为,多种化疗药物可以引起肿瘤细胞特定靶成分的损伤或功能丧失,从而传递信号引起细胞周期阻滞及进入细胞凋亡^[9]。

细胞周期的阻滞与细胞凋亡、分化密切相关。如果 S 期占细胞周期的比例高,则提示 DNA 合成活跃。一般肿瘤细胞的 S 期比例较正常细胞要高,其增殖活性也较正常细胞高, S 期细胞明显减少,说明

其增殖活性已有所减弱^[10]。目前,随着研究越来越广泛,许多分化诱导剂能抑制肿瘤细胞生长及诱导其分化,主要是由某些癌基因及抑癌基因的表达抑制、失活和活化所致,其作用机制可能是通过抑制细胞原癌基因、诱导抑癌基因的表达,抑制细胞进入 S 期及 DNA 合成,从而诱导肿瘤细胞分化^[11]。本实验通过 MTT 法检测显示,不同浓度的隐丹参酮对 HeLa 细胞毒性有明显剂量和时间依赖性;流式细胞仪检测表明:隐丹参酮对 HeLa 细胞的细胞周期有明显的影响,在抑制 HeLa 细胞增殖的同时,可以诱导细胞周期阻滞在 G₀/G₁ 期,使 S 期细胞比例降低,使肿瘤细胞的增殖速度减慢,抑制 DNA 的合成并加速诱导细胞凋亡。

p53 是 ATM 蛋白和 DNA-PK 的重要靶作用物,在 DNA 损伤后,由于 DNA-PK 的作用,使 p53 或 Mdm-2 磷酸化,从而上调 p21 及其他 CDIs,抑制 CDKs,发生细胞周期阻滞,以便形成 DNA 修复或细胞凋亡^[12]。在正常情况下, p53 是通过泛素化途径降解的,但在感染了 HPV 宫颈癌细胞 p53 的降解是通过 E6 介导的泛素化途径来实现的,正常 p53 功能被 HPV E6 所破坏^[13]。p21 基因是 p53 的效应基因。本实验发现,隐丹参酮(8.17 mg · L⁻¹)能够随时间变化显著抑制 HPV E6 蛋白水平的表达,同时 Western blot 观察到 p53 蛋白表达增加,诱导其下游的 p21 蛋白表达增加。

综上所述,隐丹参酮能明显抑制宫颈癌 HeLa 细胞的增殖,其作用机制是通过抑制 HPV E6 的蛋白的表达,使 p53 和 p21 的蛋白水平表达逐渐升高, p53 功能恢复并启动凋亡,从而诱导 HeLa 细胞凋亡。但其确切的作用机制还需进一步的研究证实。

[参考文献]

- [1] 何金涛,周清华,袁淑兰,等. 丹参酮诱导人肺癌细胞凋亡及其分子机制[J]. 中国肺癌杂志, 2002, 5(4): 257.
- [2] 沈隽,王照艳,杜利力,等. 丹参酮 II_A 对 HeLa 宫颈癌细胞凋亡的影响[J]. 中国药房, 2007, 18(27): 2102.
- [3] 吴秀丽,杨开选,袁淑兰. 丹参酮抗肿瘤作用的体外实验研



- 究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2006, 13(2):94.
- [4] 邓惠英. 丹参及其有效成分的药理研究概况[J]. 现代医药卫生, 2007, 23(12):1812.
- [5] Serra K, Qing R, Adam P, et al. Differential radiation sensitization of human cervical cancer cell lines by the proteasome inhibitor velcade (bortezomib, PS-341) [J]. Arch Gynecol Obstet, 2008, 279(7):41.
- [6] 甄霞, 李运曼, 方伟蓉, 等. 丹参酮化合物对 K562 细胞的生长抑制及诱导凋亡作用研究[J]. 中国药理学通报, 2008, 24(7):964.
- [7] Mosaddik M A. *In vitro* cytotoxicity of tanshinones isolated from *Salvia miltiorrhiza* Bunge against P388 lymphocytic leukemia cells [J]. Phytomedicine, 2003, 10(8):682.
- [8] 胡海燕, 张洹, 邓惠, 等. 丹参酮 II_A 对 NCI-H460 肺癌细胞的增殖抑制和诱导凋亡作用[J]. 中药材, 2005, 28(4):301.
- [9] Huang X, Halicka H D, Traganos F, et al. Cytometric assessment of DNA damage in relation to cell cycle phase and apoptosis [J]. Cell Prolif, 2005, 38(4):223.
- [10] Dunne A L, Mothersill C, Robson T, et al. Radiosensitization of colon cancer cell lines by docetaxd: Mechanisms of action [J]. Oncol Res, 2004, 14(9):447.
- [11] Christa B, Josh K, Yvette D, et al. Radiosensitization of cervical cancer cells via double-strand DNA break repair inhibition [J]. Gynecol Oncol, 2008, 11(10):93.
- [12] Xue W, Zender L, Hernando E, et al. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas [J]. Nature, 2007, 445:656.
- [13] Lontas A, Yeger H. Curcumin and resveratrol induce apoptosis and nuclear translocation and activation of p53 in human neuroblastoma [J]. Anticancer Res, 2004, 24(2):987.

Effects of cryptotanshinone on proliferation and apoptosis of HeLa cell line of cervical cancer

YE Yintao, XU Wenqing*, ZHONG Wei

(Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin

Key Laboratory of Molecular Nuclear Medicine, Tianjin 300192, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the proliferation effects and apoptosis induction of cryptotanshinone on HeLa cell line of cervical cancer. **Method:** The MTT assay was used to detect the growth inhibition rates of HeLa cells at 24, 48, 72 h which cultured with cryptotanshinone in different concentrations. The cell cycle distribution and apoptosis were measured by flow cytometry. The protein expressions of E6, p53 and p21 were studied by Western blot. **Result:** The different concentrations (0.5-16 mg · L⁻¹) of cryptotanshinone had cytotoxicity on HeLa cells, which were clearly dose and time-dependent. The IC₅₀ of 24, 48, 72 h were 17.8, 8.17, 6.55 mg · L⁻¹, respectively. Cells were treated with cryptotanshinone which had significant effects on cell cycle of HeLa cell, and induced apoptosis. Western blot showed cryptotanshinone decreased expressions of HPV E6 and increased expressions of p53 and p21 proteins. **Conclusion:** Cryptotanshinone had significant cytotoxic and radiosensitization effects on cervical cancer HeLa cells. One of the mechanism may be that it might make significant G₀/G₁ phase arrest and induced apoptosis, a decrease in S phase, and restore the function of p53 to induce apoptosis in HeLa cells to kill the tumor cell.

[Key words] cervical cancer; HeLa cell; cryptotanshinone; apoptosis; protein p53; protein p21

doi: 10.4268/cjcm20100125

[责任编辑 张宁宁]