

柯里拉京对宫颈癌 HeLa 细胞增殖与凋亡的影响

徐佳佳¹, 袁家会², 李小妹², 马秋娟², 李元跃¹

(1. 集美大学水产学院, 福建省海洋渔业资源与生态环境重点实验室, 福建 厦门 361021;

2. 厦门大学医学院 抗癌研究中心, 福建 厦门 361102)

摘要: 为了探讨柯里拉京对宫颈癌 HeLa 细胞增殖与凋亡的影响, 不同浓度柯里拉京作用 HeLa 细胞后, 利用 MTT 法和克隆形成实验检测柯里拉京对 HeLa 细胞的增殖抑制作用, 用倒置显微镜观察 HeLa 细胞的形态变化, 用流式细胞仪分析细胞周期与细胞死亡率, 用 Western blot 法检测细胞 PCNA、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、PARP 蛋白的表达。结果: 柯里拉京能显著抑制宫颈癌 HeLa 细胞增殖, 并呈浓度依赖效应; 流式细胞仪测定结果表明柯里拉京能使 HeLa 细胞发生 S 期周期阻滞; Western blot 结果显示加药组细胞中与增殖有关蛋白 PCNA 的表达量显著下调, 与凋亡有关蛋白 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、PARP 被剪切激活。结论: 柯里拉京对宫颈癌 HeLa 细胞有明显的抑制作用, 其抑制作用与柯里拉京诱导细胞周期阻滞及凋亡有关。

关键词: 柯里拉京; 宫颈癌; HeLa 细胞; 增殖; 凋亡

中图分类号: R29 文献标志码: A 文章编号: 1674-8646(2018)12-0001-04

Effect of corilagin on proliferation and apoptosis of human cervical cancer HeLa cells

XU Jia-jia¹, YUAN Jia-hui², LI Xiao-mei², MA Qiu-juan², LI Yuan-yue¹

(1. Key Laboratory of Marine Fisheries Resources and Environment of Fujian Province, Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Cancer Research Center, Medical College, Xiamen University, Xiamen 361102, China)

Abstract: To study the effect of corilagin on proliferation and apoptosis of human cervical cancer HeLa cells. After HeLa cells were treated with different concentration of corilagin, the inhibitory effect of corilagin on HeLa cells was detected by MTT assay and Colony formation assay. Morphological changes were observed by inverted microscope. The cell cycle and mortality were analyzed by flow cytometry. The expressions of PCNA, Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9, PARP proteins were examined by Western blot. Corilagin significantly inhibited the proliferation of cervical cancer HeLa cells in a dose-dependent manner; the result of flow cytometry indicated that corilagin could induce HeLa cells to undergo S stage cycle arrest; Western blot showed that the expression of proliferation-associated PCNA protein was remarkably down-regulated and apoptosis-associated Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9, PARP proteins were sheared and activated in HeLa cells. It shows that corilagin has a significant inhibitory effect on cervical cancer HeLa cells, and its inhibitory effect is associated with cell cycle arrest and apoptosis.

Key words: Corilagin; Cervical cancer; HeLa cells; Proliferation; Apoptosis

宫颈癌是全球女性最常见的恶性肿瘤之一。在全球妇科癌症中, 宫颈癌的发病及死亡率均位居前列。尤其是在发展中国家, 宫颈癌已成为引起妇女癌症死亡的主要原因。目前手术是治疗宫颈癌的有效手段, 但患者术后五年生存率低且易复发, 因此寻找新型抗癌药物对宫颈癌的治疗至关重要^[1]。柯里拉京(Corilagin), 又名鞣云实精, 属天然多酚单宁家族, 分子量为 634.45, 易溶于 DMSO、乙醇等有机溶剂, 微溶于水。

柯里拉京被发现存在于龙眼、榄李、海漆、叶下珠等植物中^[2]。近年来, 试验研究发现柯里拉京具有广泛的生物学活性, 如: 抗炎、抗病毒、抗氧化、保肝、抗肿瘤等^[3]。特别在抗肿瘤方面, 已有文献报道其对肝癌、胆管癌、卵巢癌细胞生长具有显著抑制作用^[4-6]。但其对宫颈癌细胞的抑制作用未见报道。本研究旨在探讨柯里拉京对宫颈癌 HeLa 细胞增殖与凋亡的影响, 为其开发治疗子宫颈癌的新型药物提供一定的理论依据。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 细胞株

人宫颈癌 HeLa 细胞由厦门大学医学院抗癌研究中心提供。

收稿日期: 2018-03-22

基金项目: 福建省高校产学研合作重大项目(2016Y4011)

作者简介: 徐佳佳(1990-), 男, 硕士研究生, e-mail: 979949223@qq.com。

通讯作者: 李元跃(1968-), 男, 博士, 硕士研究生导师, 副教授, e-mail: yuanyueli@163.com。

1.1.2 主要试剂与仪器

Corilagin(纯度 $\geq 99.36\%$)购自南京清韵生物科技有限公司,Z-VAD-FMK(泛caspase凋亡抑制剂)、MTT、DMSO、PI和 β -actin抗体购自美国Sigma公司,PCNA抗体购自英国Abcam公司,Caspase-8、Caspase-9、Cleaved caspase-3和PARP抗体购自上海碧云天公司,DMEM培养基和胎牛血清购自美国GIBCO公司,其他试剂均为分析纯。细胞恒温培养箱,倒置荧光显微镜,电泳仪,高速离心机,流式细胞仪,酶标仪、FATO超净工作台。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

Hela细胞用含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 U/mL链霉素的DMEM培养基,在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、95%湿度培养箱条件下培养。

1.2.2 MTT实验

收集对数生长期细胞以每孔 1×10^4 个接种到96孔板中,24 h后按20、40、60、80、100 μ mol/L的浓度梯度加入药物处理细胞,每个浓度设5个复孔,同时设立空白对照组;继续培养24 h后,每孔加入20 μ l MTT(5 mg/mL)放入培养箱继续培养4 h;弃培养基,每孔加入150 μ l DMSO,摇床低速摇10 min,酶标仪490 nm波长测吸光度。

1.2.3 细胞形态观察

将细胞以 1.5×10^5 个/孔接种到12孔板中,第二天分别以20、40、60、80、100 μ mol/L的浓度梯度加入药物处理24 h,然后在显微镜下观察拍照。

1.2.4 克隆增殖实验

取对数生长期细胞以每孔1 000个接种到6孔板中,次日加药处理;两周后,取出6孔板,PBS洗3次,结晶紫染色15 min,PBS洗3次;拍照并统计克隆形成数。

1.2.5 流式细胞仪检测周期

将细胞接种到12孔板中,次日分别以0、40、60、80 μ mol/L的浓度加药处理细胞,每个梯度设3个复孔;24 h后,收集细胞于EP管中,PBS洗两次,加入1 ml 70%乙醇4 $^{\circ}$ C固定过夜;次日,离心、PBS清洗去除乙醇,用含RNase A的PBS重悬细胞并于37 $^{\circ}$ C水浴中消化30 min,用PI(5 μ g/mL)避光染色10 min后上流式细胞仪分析检测周期,以不加PI染料的一管作为阴性对照。

1.2.6 PI单染法检测细胞死亡率

将对数生长期的细胞接种于12孔板中,次日先加入Z-VAD-FMK(泛caspase凋亡抑制剂)预处理

2 h,之后以60 μ mol/L的浓度加入柯里拉京处理细胞24 h,药物作用时间结束之后,用不含EDTA的胰酶消化收集细胞于EP管中,加入PI(5 μ g/mL)染料4 $^{\circ}$ C避光孵育10 min,最后用流式分析仪分析细胞死亡率,以不加PI染料的一管作为阴性对照。

1.2.7 Western blot分析

药物处理后,收集细胞于RIPA裂解液中裂解;采用BCA法测定蛋白质浓度;采用SDS-PAGE凝胶电泳法分离蛋白质并转移到PVDF膜上;将PVDF膜室温封闭在含5%脱脂奶粉的TBST中1 h;随后,加入一抗4 $^{\circ}$ C孵育过夜,TBST洗3次,接着加入二抗室温孵育1 h,TBST洗3次,最后用ECL发光检测液检测特异性蛋白条带。

1.2.8 统计学处理

以上实验均重复三次,采用GraphPad Prism 5.0软件对实验数据进行分析,所有数据以mean \pm SD表示,组间均数比较采用T检验,P值 < 0.05 被认为具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 柯里拉京对宫颈癌Hela细胞的生长抑制作用

为了研究柯里拉京对宫颈癌Hela细胞的生物学作用,采用MTT法检测不同浓度梯度柯里拉京对Hela细胞的生长影响。由图1可见,柯里拉京处理Hela细胞24 h后,Hela细胞的存活率随柯里拉京浓度增加而逐渐降低且呈剂量依赖关系,半数致死率(IC₅₀)为53.36 μ mol/L。为进一步证实柯里拉京抑制增殖作用,通过克隆形成实验检测增殖情况。如图2所示,与对照组相比柯里拉京能显著抑制克隆集落的形成,并且呈现浓度依赖性。以上结果说明柯里拉京能有效抑制宫颈癌Hela细胞增殖,并且抑制作用具有显著的浓度依赖效应。

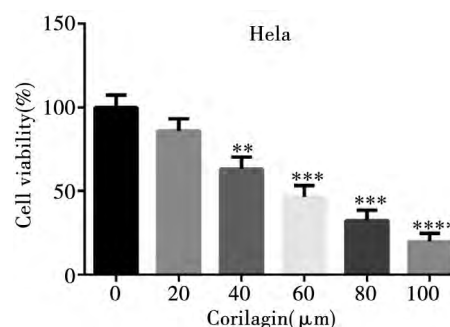


图1 MTT法检测不同浓度柯里拉京对Hela细胞存活率的影响

Fig. 1 The cell viabilities were examined by MTT assay after corilagin-treatment

注:与对照组比较,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$,**** $P < 0.0001$
Note:** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$,**** $P < 0.0001$ vs control group

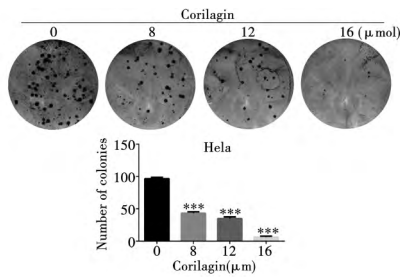


图2 柯里拉京抑制 HeLa 细胞克隆形成

Fig. 2 Corilagin inhibits the colony formation of HeLa cells

注: 与对照组比较, *** $P < 0.001$

Note: *** $P < 0.001$ vs control group

2.2 柯里拉京对 HeLa 细胞形态学的影响

用不同浓度梯度柯里拉京处理 HeLa 细胞 24 h 后, 在倒置显微镜下观察 HeLa 细胞形态变化。如图 3 所示, 对照组中细胞数量多, 细胞间紧密相接, 细胞生长状态良好, 易于观察; 经柯里拉京处理后, 随着药物浓度的升高, 细胞数目减少, 生长状况差, 体积变小, 形态变皱, 碎片状物质增多, 不易观察, 与对照组比差异明显。结果说明, 柯里拉京对 HeLa 细胞具有显著的抑制作用。

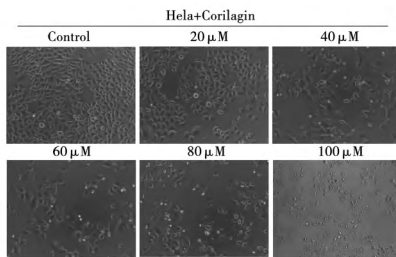


图3 显微镜观察柯里拉京诱导 HeLa 细胞形态变化

Fig. 3 The cell morphology changes were observed by microscopy after corilagin treatment

2.3 柯里拉京对 HeLa 细胞周期的影响

为了确定柯里拉京对宫颈癌 HeLa 细胞的增殖影响是否与细胞周期阻滞有关, 用柯里拉京处理宫颈癌 HeLa 细胞后, 流式细胞仪检测细胞周期变化。结果显示, 柯里拉京可诱导 HeLa 细胞发生 S 期周期阻滞, 如图 4 所示。由此表明, 柯里拉京抑制 HeLa 细胞增殖可能与细胞发生 S 期周期阻滞有关。

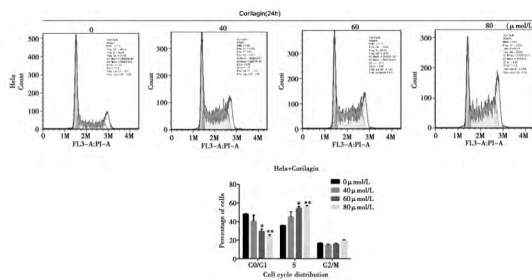


图4 柯里拉京诱导 HeLa 细胞发生 S 期阻滞

Fig. 4 Corilagin induces cell cycle arrest at S phase in HeLa cells

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

2.4 柯里拉京诱导增殖有关蛋白 PCNA 表达下调

增殖细胞核抗原 (PCNA) 为非组蛋白核蛋白, 常见于正常增殖细胞与肿瘤细胞中, 为 DNA 复制所必需, 并参与细胞周期调控^[7]。研究表明, PCNA 从细胞周期 G1 期开始在细胞核内出现, 并在 S 期表现最为明显, 是反映细胞增殖进程的重要指标^[8]。实验用柯里拉京处理 HeLa 细胞 24 h 后, PCNA 蛋白表达量随柯里拉京浓度梯度的增加而降低, 如图 5 所示。结果说明, 柯里拉京能有效抑制宫颈癌 HeLa 细胞的增殖。

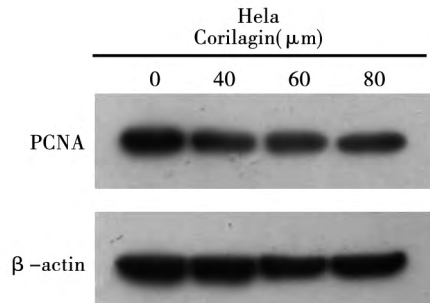


图5 不同浓度柯里拉京对 PCNA 蛋白表达的影响

Fig. 5 Effect of different corilagin concentrations on expression of PCNA protein

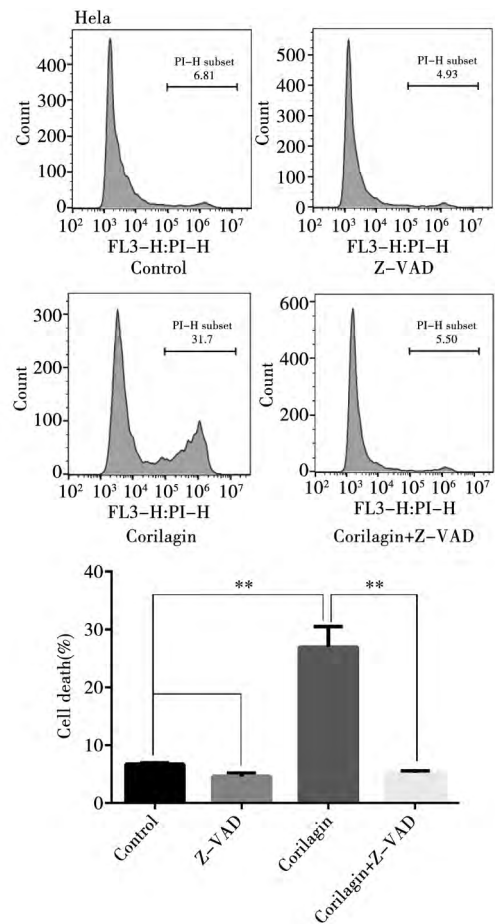


图6 流式细胞仪检测柯里拉京诱导宫颈癌细胞 HeLa 的死亡方式

Fig. 6 Corilagin-induced HeLa cell death mode was detected by Flow cytometry

注: 与对照组比较, ** $P < 0.01$

Note: ** $P < 0.01$ vs control group

2.5 柯里拉京诱导人宫颈癌 HeLa 细胞凋亡

为了检测柯里拉京是否诱导 HeLa 细胞凋亡以及是否依赖 caspase 途径。首先,采用经典的广谱性凋亡抑制剂 Z-VAD-FMK 与柯里拉京(60 $\mu\text{mol/L}$)联合处理细胞,PI 单染法检测细胞死亡率。如图 6 所示,预处理 Z-VAD-FMK 能够显著降低柯里拉京诱导的宫颈癌 HeLa 细胞的死亡($P < 0.05$)。此外,Western blot 检测凋亡有关蛋白表达水平发现,柯里拉京可明显增加 caspase-9、caspase-8、caspase-3 和 PARP 的剪切水平,如图 7 所示。以上结果说明柯里拉京诱导宫颈癌 HeLa 细胞发生 caspase 依赖的凋亡。

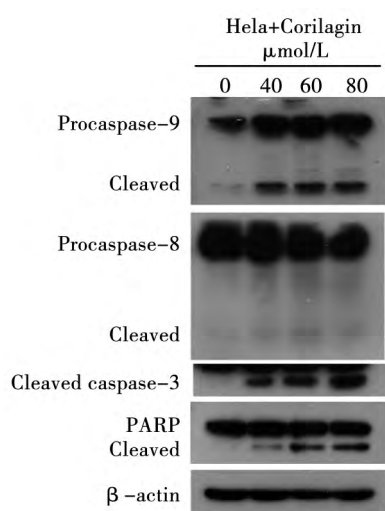


图 7 柯里拉京对凋亡相关蛋白表达的影响
Fig. 7 The effect of corilagin on the expression of apoptosis-related proteins

3 讨论

尽管柯里拉京的药理学作用已有不少报道,但在抗肿瘤方面的研究较少。有报道称,柯里拉京可通过增加 G2/M 期细胞周期阻滞、增强细胞凋亡、阻断 TGF- β 信号通路,从而显著抑制卵巢癌 SKOV3 细胞生长^[9]。但有关柯里拉京对宫颈癌 HeLa 细胞的抑制作用还未见报道。

该试验中,主要探讨了柯里拉京对宫颈癌 HeLa 细胞的增殖抑制作用和诱导凋亡作用。首先,用 MTT 法检测了柯里拉京处理后,HeLa 细胞的增殖活性。试验结果表明,随着柯里拉京浓度的增加,细胞生长受到抑制,细胞存活率也在逐渐降低。这与克隆增殖被抑制结果一致。其次,用倒置显微镜观察细胞形态变化发现,与对照组生长状态良好的细胞相比,加药处理后细胞数目减少,体积变小,碎片状物质增多。通过流式细胞仪分析细胞周期发现,柯里拉京能将 HeLa 细胞周期

阻滞在 S 期。蛋白质免疫印迹实验展示了柯里拉京作用后增殖有关蛋白 PCNA 表达量随药物浓度的增加而下降。以上实验结果表明,柯里拉京能以浓度-依赖方式显著抑制宫颈癌 HeLa 细胞的增殖。

Caspase 依赖凋亡途径作为经典凋亡途径已被广大学者所认同。其蛋白家族在凋亡过程中扮演着至关重要的作用。与凋亡有关的 Caspase 蛋白活化与否直接决定了凋亡的发生与否^[10]。本实验用流式细胞术与 Western blot 证实柯里拉京可促使凋亡有关 caspase 蛋白的剪切活化,并在加入广谱性凋亡抑制剂 Z-VAD-FMK 后,HeLa 细胞的死亡率明显下降。结果说明柯里拉京诱导 HeLa 细胞凋亡是依赖 Caspase 途径的。

综上所述,柯里拉京对宫颈癌 HeLa 细胞的增殖具有显著的抑制作用,其作用效果随着柯里拉京浓度的升高而升高,表现出明显的浓度依赖效应,并且这种抑制作用是通过阻滞细胞周期和诱导凋亡来实现的。

参考文献:

- [1] Torre L A, Bray F, Siegel R L, et al. Global cancer statistics 2012 [J]. CA Cancer J Clin 2015, 65(02): 87-108.
- [2] 林志灿, 郑溢, 李旋, 等. 不同植物中柯里拉京的含量测定及其对人胃癌细胞增殖的抑制作用 [J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2016, 55(06): 847-852.
- [3] 陈一燕, 陈崇宏. 柯里拉京药理活性研究进展 [J]. 中国现代应用药学 2010, 27(05): 390-394.
- [4] Ming Y, Zheng Z, Chen L, et al. Corilagin inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation by inducing G2/M phase arrest [J]. Cell Biol Int 2013, 37(10): 1046-1054.
- [5] Gu Y, Xiao L, Ming Y, et al. Corilagin suppresses cholangiocarcinoma progression through Notch signaling pathway in vitro and in vivo [J]. Int J Oncol 2016, 48(05): 1868-1876.
- [6] Attar R, Cincin Z B, Bireller E S, et al. Apoptotic and genomic effects of corilagin on SKOV3 ovarian cancer cell line [J]. Onco Targets Ther, 2017, 10(05): 1941-1946.
- [7] Dieckman L M, Freudenthal B D, Washington M T. PCNA structure and function: insights from structures of PCNA complexes and post-translationally modified PCNA [J]. Subcell Biochem 2012, 62(07): 281-299.
- [8] 郭玉霞, 宋建明, 王军侠. P53 和 PCNA 蛋白表达对子宫颈癌前病变恶变潜能预测的意义 [J]. 齐鲁医学杂志, 2005, 20(01): 66-67.
- [9] Jia L, Jin H, Zhou J, et al. A potential anti-tumor herbal medicine, Corilagin inhibits ovarian cancer cell growth through blocking the TGF- β signaling pathways [J]. BMC Complement Altern Med 2013, 13(27): 33.
- [10] 刘念, 江彩霞, 刘力, 等. 黄连素对人卵巢癌细胞增殖和凋亡的影响 [J]. 中国妇幼保健, 2018, 33(04): 911-914.