论著

文章编号:1000-5404(2008)18-1730-03

青蒿琥酯对人子宫颈癌细胞株 HeLa 凋亡与增殖的影响

王明华[1],郑军生[2],骆云鹏[3],米 粲[1] (重庆医科大学基础医学院:[1]病理学教研室,[3]病理生理学教研室,重庆 400016;[2]中山大学附属第三医院妇产科,广州 510630)

摘 要:目的 研究青蒿琥酯(artesunate,ART)对人子宫颈癌细胞 HeLa 凋亡与增殖的影响。**方法** 通过 MTT 法观察 ART 对 HeLa 细胞的生长抑制作用;荧光染色观察 ART 作用前后细胞形态的改变;免疫组化检测 HeLa 细胞 caspase-3 表达;流式细胞术观察 ART 对细胞周期的影响,并检测细胞线粒体膜电位 $\Delta\Psi_m$ 和细胞内活性氧(reactive oxygen species,ROS)的改变。**结果** ART 对 HeLa 细胞的生长抑制作用呈时间、剂量依赖关系;荧光染色观察见凋亡小体形成;透射电镜见细胞染色质凝聚,边集呈新月形;免疫组化检测细胞质 caspase-3 呈阳性表达;流式细胞术检测 ART 可引起 HeLa 细胞周期 S 期阻滞;细胞内 ROS 明显升高($P<0.01$),$\Delta\Psi_m$ 显著降低($P<0.05$)。**结论** ART 作用于人子宫颈癌 HeLa 细胞,可能通过线粒体途径诱导细胞凋亡,抑制细胞增殖。

关键词: 青蒿琥酯;HeLa 细胞;氧自由基;线粒体膜电位;细胞凋亡
中图法分类号: R73-36;R737.33;R978.61 **文献标识码:** A

Growth inhibition effects of artesunate on human cervical cancer cell line HeLa

WANG Ming-hua[1], ZHENG Jun-sheng[2], LUO Yun-peng[3], MI Can[1] ([1]Department of Pathology, [3]Department of Pathophysiology, Faculty of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing 400016; [2]Department of Gynaecology and Obstetrics, The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of artesunate on human cervical cancer cell line HeLa. Methods The inhibitory effect on cell proliferation was assessed by MTT assay. Transmission electron microscopy and fluorescent staining were applied to demonstrate the presence of apoptosis. Cell cycle, reactive oxygen species (ROS) levels and mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) were examined by flow cytometry, respectively. Expression of caspase-3 was detected by immunohistochemical methods. Results Growth inhibition of ART on HeLa cells was time- and dose-dependent. Apoptotic feature was observed by transmission electron microscopy and fluorescent staining. The blocking of the cell cycle was in S-phase. The expression of caspase-3 in cytoplasm was positive. The generation of ROS increased obviously ($P<0.01$) after ART treated the cells for 72 h, while the levels of $\Delta\Psi_m$ were decreased ($P<0.05$). Conclusion Artesunate inhibits the proliferation of HeLa cells, which action may be related to increasing of the cellular ROS level and decreasing of mitochondrial member potential, resulting in cell apoptosis.

Key words: artesunate; HeLa cell line; reactive oxygen species; mitochondrial member potential; apoptosis

青蒿琥酯(artesunate, ART)是我国科学家在20世纪70年代首次从菊科植物黄花蒿(*aremisia annua Linn*)中分离提取的新型结构的过氧化物倍半萜内酯青蒿素(*artemisinin*)的琥珀酸酯,对疟原虫红细胞内型裂殖体具有高度杀灭作用,其抗疟作用与自由基的调节有关[1]。

子宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤之一,其发病率在女性恶性肿瘤中仅次于乳腺癌,而在发展中国家则居首位。手术和放疗是子宫颈癌常用的治疗手段,疗效肯定,但中晚期患者5年生存率仅50%左右,其原因主要为局部肿瘤未控制或复发,其次为淋巴结转移或远处转移。随着宫颈癌发病的年轻化,腺癌比例的增高以及患者对治疗后生活质量要求的提高,化疗已由晚期姑息治疗的行列进入有效的综合治疗行列。ART 在临床主要用于抗疟治疗,具有高效、低毒、耐受性好等优点。研究表明 ART 对多种肿瘤具有抑制作用[2]。青蒿素类药物的抗肿瘤作用具有靶向性,且不易产生耐药性[3,4],若能将其应用于临床肿瘤治疗,则具有广泛的应用前景。本实验主要研究 ART 对人子宫癌细胞株 HeLa 凋亡与增殖的影响,并探讨其作用机制,为 ART 的临床应用提供实验依据。

作者简介:王明华,女,四川省德昌县人,博士研究生,主要从事肿瘤病理方面的研究。E-mail: minghua_wangcq@yahoo.com.cn
通信作者:米 粲,电话:(023)68485789
收稿日期:2007-10-22;**修回日期:**2008-01-25

1　材料与方法

1.1　材料和仪器

人子宫颈鳞癌细胞株 HeLa 由本校病理生理学教研室提供,ART(纯度为 99.9%)为重庆通和制药有限责任公司惠赠,免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司,DCFH-DA、罗丹明 123、吖啶橙、溴化乙啶均购自美国 Sigma 公司;Hitachi-600 型透射电子显微镜(日本)。

1.2　方法

1.2.1　ART 的配制　　ART 由 5% $NaHCO_3$ 溶解配成60 mg/ml 母液(实验前配制),用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液稀释至所需浓度。

1.2.2　MTT 法检测 ART 对 HeLa 的生长抑制作用　　取对数生长期 HeLa 细胞计数后以细胞数 5×10^4 ml^{-1}、100 μl/孔接种于 96 孔板,24 h 后每孔加入含不同浓度 ART 的 RPMI1640 完全培养基 100 μl,使 ART 的终浓度分别为 12.5、25、50、100、200、400 μg/ml,同时设细胞对照组,每组浓度设 3 个复孔。分别于培养 24、48、72 h 后加入 5 mg/ml MTT (20 μl/孔),继续培养 4 h,弃上清,加入 DMSO 150 μl/孔,微量振荡器摇振 10 min,待甲臜结晶完全溶解后酶标仪测定 570 nm 处波长的吸光度值[$D(570)$]。实验重复 3 次。

$$细胞增殖抑制率(\%)=\frac{1-药物处理组的平均[D(570)]}{细胞对照组的平均[D(570)]}\times100\%$$

1.2.3　透射电镜观察 ART 作用后 HeLa 细胞形态变化　　取对数生长期 HeLa 细胞接种于 75 ml 培养瓶,处理组加入终浓度为 15.63 μg/ml 的 ART,利用回归方程求出 ART 作用 HeLa 细胞 72 h 的中效浓度(IC_{50})为 31.26 μg/ml。根据 MTT 实验结果,以下处理组 ART 浓度均取 1/2[IC_{50}],作用 72 h 后收集细胞,2 000 r/min,离心 15 min,弃上清,2.5% 戊二醛固定,1% 四氧化锇再固定,环氧树脂包埋,作超薄切片,电子染色,透射电镜观察。

1.2.4　荧光染色观察 ART 作用后 HeLa 细胞形态变化　　取对数生长期 HeLa 细胞接种于 24 孔板。处理组加入 ART,培养 72 h 后弃上清,PBS 洗 2 次,吖啶橙及溴化乙啶(浓度均为 100 μg/ml)等物质的量混合避光染色 15 min,落射式荧光显微镜下观察细胞形态改变。

1.2.5　流式细胞仪检测 HeLa 细胞周期　　取对数生长期 HeLa 细胞接种于 75 ml 培养瓶。处理组加入 ART,培养 72 h 后收集细胞到 1.5 ml 的 EP 管内,PBS 洗 2 次,4 ℃ 预冷的 70% 乙醇 1 ml 固定,PI 染色后流式细胞仪检测细胞周期改变。

1.2.6　免疫组化检测 HeLa 细胞 caspase-3 表达　　HeLa 细胞接种于预先放置小玻片(玻片经泡酸、清洗、高温灭菌处理)的 24 孔板内。处理组加入 ART,培养 72 h 后弃上清,PBS 洗 2 次,95% 乙醇固定 40 min,4 ℃ 保存,按免疫组化试剂盒说明书检测 caspase-3 的表达。

1.2.7　HeLa 细胞内活性氧(ROS)的测定　　HeLa 细胞接种于 75 ml 的培养瓶内。处理组加入 ART,培养 72 h 后收集细胞到 1.5 ml 的 EP 管内,DCFH-DA(无水乙醇稀释,终浓度 10 μmol/L)避光染色 30 min, DCFH-DA 的激发波长 488 nm,发射波长 525 nm,流式细胞仪检测细胞平均荧光强度(MFI),MFI 值可反映 ROS 含量。

1.2.8　细胞线粒体膜电位 $\Delta\Psi_m$ 测定　　标本制备同方法 1.2.7。72 h 后收集细胞到 1.5 ml EP 管内,罗丹明 123(蒸馏水配制,4 ℃ 保存,终浓度 10 μg/ml)37 ℃ 避光染色 30 min, 流式细胞仪检测 $\Delta\Psi_m$,MFI 值可反映 $\Delta\Psi_m$ 的改变。

1.3　统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,应用 SPSS 11.5 统计软件,多组样本间均值比较采用单因素方差分析,两组样本间均值比较采用独立样本 t 检验。

2　结果

2.1　ART 对 HeLa 细胞增殖的作用

2.1.1　MTT 法检测不同浓度 ART 对 HeLa 细胞的作用　　ART 对 HeLa 细胞的生长抑制作用呈时间、剂量依赖性增强($P<0.01$,表 1)。

表 1　MTT 法检测不同浓度 ART 对 HeLa 细胞的抑制作用($\%$, $\bar{x}\pm s$)

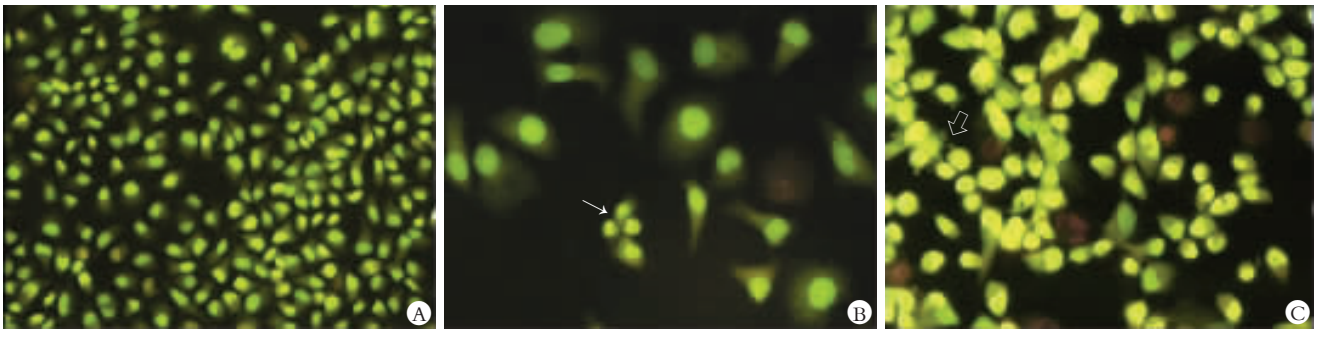
ART 浓度	24 h	48 h	72 h
12.5 μg/ml	0.073 ± 0.003	0.171 ± 0.004^{b}	0.261 ± 0.016^{b}
25 μg/ml	0.108 ± 0.123^{a}	0.169 ± 0.012^{ab}	0.310 ± 0.013^{ab}
50 μg/ml	0.289 ± 0.015^{a}	0.391 ± 0.013^{ab}	0.662 ± 0.017^{ab}
100 μg/ml	0.381 ± 0.012^{a}	0.584 ± 0.011^{a}	0.853 ± 0.009^{ab}
200 μg/ml	0.471 ± 0.013^{a}	0.707 ± 0.013^{ab}	0.911 ± 0.019^{ab}
400 μg/ml	0.534 ± 0.010^{a}	0.782 ± 0.017^{ab}	0.943 ± 0.018^{ab}

a: $P<0.01$,与 12.5 μg/ml ART 比较;b: $P<0.01$,与 24 h 比较

2.1.2　ART 对 HeLa 细胞周期的影响　　ART 作用 72 h,HeLa 细胞 G_0/G_1 期细胞比例显著下降($P<0.05$),S 期细胞比例显著上升($P<0.01$),提示细胞周期阻滞发生在 S 期。

2.2　ART 对 HeLa 细胞形态的影响

2.2.1　荧光染色结果　　对照组 HeLa 细胞呈巢状排列,细胞大小不一,可见核分裂相;ART 作用 72 h 后 HeLa 细胞荧光染色显示:细胞排列紊乱,可见凋亡小体及细胞质出泡现象(图 1)。



A:对照组(×100);B、C:ART 处理组(×200)　　↑凋亡小体;⇧:细胞质出泡

图 1　荧光显微镜观察 ART 作用 72 h HeLa 细胞形态改变

2.2.2 透射电镜结果 电镜下可见对照组 HeLa 细胞核形态不规则,核内染色质丰富,核仁明显;ART 作用 72 h 后,见部分细胞呈早期凋亡图像,核染色质呈新月形凝聚、边集。

2.3 ART 对 HeLa 细胞 caspase-3 表达的影响

Caspase-3 阳性染色主要定位于细胞质,呈棕黄色。ART 作用 HeLa 细胞 72 h,细胞质呈阳性表达(图 2)。

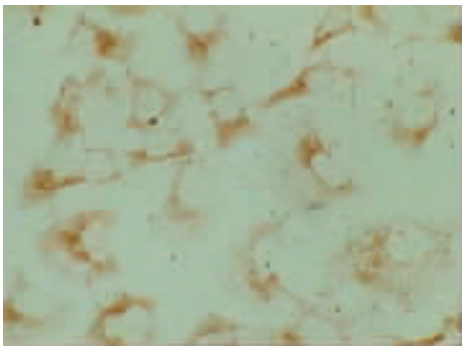


图 2 ART 作用 72 h 后 caspase-3 表达 (S-P×400)

2.4 细胞内 ROS 测定

ART 作用 HeLa 细胞 72 h,对照组 MFI 为(5.78 ± 0.37),处理组 MFI 为(6.99 ± 0.13),ROS 明显增加($P<0.01$)。

2.5 细胞线粒体 $\Delta\Psi_m$ 测定

ART 作用 HeLa 细胞 72 h,对照组 MFI 为(327.87 ± 12.29),处理组 MFI 为(295.04 ± 10.65),$\Delta\Psi_m$ 明显降低($P<0.05$)。

3 讨论

ART 是青蒿素重要的衍生物之一,除具有抗疟、抗血吸虫及其他寄生虫、影响免疫功能等作用外,还具有显著的抗肿瘤作用。体内外实验表明,ART 对多种肿瘤如小鼠 HepS 肝癌、子宫颈癌、胃癌、肺腺癌等均具有增殖抑制和促进凋亡的作用[5-8]。本实验通过 MTT 法亦证实 ART 对 HeLa 细胞有生长抑制作用,并呈时间、剂量依赖性增强。从细胞周期的变化来看,ART 作用 HeLa 细胞 72 h 可引起细胞周期阻滞于 S 期。而透射电镜及荧光染色结果则提示 ART 可诱导 HeLa 细胞凋亡,表现为细胞核染色质呈新月型凝聚、边集,并可见胞质出泡及凋亡小体等改变。

研究表明,青蒿素及其衍生物的抗肿瘤作用与其抗疟机制一致。在 2 价铁离子介导下,青蒿素及其衍生物分子内过氧桥裂解产生自由基[9]。自由基作为强烷化剂,易攻击生物大分子,能直接作用于细胞膜系统、蛋白质和 DNA,导致细胞损伤[10]。自由基还能通过不同的氧化应激信号转导途径作用于细胞,诱导细胞凋亡。

细胞内活性氧(ROS)增加可直接或间接损伤线粒体膜,引起 ROS 下降[11]。ROS 下降导致线粒体通透性转变孔(mitochondrial permeability transition pore, MPTP)开放,并释放凋亡诱导因子(apoptosis inducing factor, AIF)、细胞色素 C(Cyt C)和凋亡蛋白酶激活因子 1 等,激活 caspases 蛋白酶级联反应,最终引起细胞凋亡。Caspases 蛋白酶的级联激活是细胞凋亡过程的主要执行环节,caspase-3 是细胞凋亡过程中的主要效应因子[12,13]。多数触发细胞凋亡的因素,最终均需要通过 caspase-3 介导的信号转导途径导致细胞凋亡。

本实验中,流式细胞仪及免疫组化检测结果提示 ART 作用 HeLa 细胞 72 h 后细胞内 ROS 增高,$\Delta\Psi_m$ 下降,同时细胞 caspase-3 表达阳性,即 ART 通过线粒体途径诱导 HeLa 细胞凋亡。亦有研究表明,ART 的抗肿瘤作用还与下调 CDC25A,抑制 survivin 表达,下调细胞间黏附分子-1 等有关[7,8,14],说明 ART 的抗肿瘤作用是多方面的,除了可通过氧化应激直接导致细胞损伤外,还可通过多条途径诱导细胞凋亡。

参考文献:

[1] 尤启冬. 药物化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 402 - 403.

[2] Efferth T. Molecular pharmacology and pharmacogenomics of artemisinin and its derivatives in cancer cells[J]. Curr Drug Targets, 2006, 7(4): 407 - 421.

[3] Efferth T, Benakis A, Romero M R, *et al*. Enhancement of cytotoxicity of artemisinins toward cancer cells by ferrous iron[J]. Free Radic Biol Med, 2004, 37(7): 998 - 1009.

[4] Sadava D, Phillips T, Lin C, *et al*. Transferrin overcomes drug resistance to artemisinin in human small-cell lung carcinoma cells[J]. Cancer Lett, 2002, 179(2): 151 - 156.

[5] 陈绍芳, 徐亦益, 刘祥麟, 等. 青蒿琥酯对小鼠 Heps 肝癌的抑瘤作用[J]. 中国肿瘤, 2004, 13(6): 375 - 377.

[6] 王 静, 刘 亮, 李金梅, 等. 青蒿琥酯抗人食管癌作用与调控 CDC25A 表达的关系[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(5): 428 - 431.

[7] 赵君宁, 何一然, 张振玉, 等. 青蒿琥酯对人胃癌细胞增殖及凋亡的影响[J]. 中国癌症杂志, 2005, 15(4): 347 - 350.

[8] 王燕燕, 祝开荣, 崔向军, 等. 青蒿琥酯诱导人肺腺癌 A549 细胞凋亡的研究[J]. 中华实验外科杂志, 2007, 24(1): 121 - 122.

[9] Efferth T, Giaisi M, Merling A, *et al*. Artesunate induces ROS-mediated apoptosis in doxorubicin-resistant T leukemia cells[J]. PLoS ONE, 2007, 2(1): e693.

[10] Klaunig J E, Kamendulis L M. The role of oxidative stress in carcinogenesis[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2004, 44: 239 - 267.

[11] Yao K, Ye P, Zhang L, *et al*. Epigallocatechin gallate protects against oxidative stress-induced mitochondria-dependent apoptosis in human lens epithelial cells[J]. Mol Vis, 2008, 14: 217 - 223.

[12] 袁长青, 丁振华. Caspase 的活化及其在细胞凋亡中的作用[J]. 生理科学进展, 2002, 33(3): 220 - 224.

[13] Yao H, Tang X, Shao X, *et al*. Parthenolide protects human lens epithelial cells from oxidative stress-induced apoptosis *via* inhibition of activation of caspase-3 and caspase-9[J]. Cell Res, 2007, 17(6): 565 - 571.

[14] 张宇川, 陈世耀, 张尤历. 青蒿琥酯对结肠癌 HCT116 细胞间黏附分子蛋白表达的影响[J]. 中国临床医学, 2006, 13(15): 775 - 776.

(编辑 张 维)