论著

文章编号:1000-5404(2012)18-1844-05

南赤爮提取物诱导宫颈癌 HeLa 细胞凋亡及作用机制研究

石孟琼[1],刘 雄[2],周继刚[2],杨文雁[1],罗 涛[2],熊兴军[3] (443002 湖北 宜昌,三峡大学医学院:基础医学实验中心[1],中医临床医学院内科住院部[2];443500 湖北 长阳,长阳县中医院药剂科[3])

[摘要] **目的** 观察南赤爮提取物对宫颈癌 HeLa 细胞凋亡的诱导作用,并探讨其可能的作用机制。**方法** 用不同浓度的南赤爮提取物(0.10、0.25、0.50、1.00、2.00 mg/ml)于不同作用时间(24、48、72 h)处理宫颈癌 HeLa 细胞后,采用 MTT 法检测不同浓度的南赤爮提取物在不同作用时间下对 HeLa 细胞增殖率的影响;用 0.50 和 1.00 mg/ml 的南赤爮提取物处理宫颈癌 HeLa 细胞 48 h 后 Hoechst33258 染色观察细胞形态变化,Annexin V-FITC/PI 染色测定细胞凋亡率,JC-1 染色法测定细胞线粒体跨膜电位水平,Caspase 试剂盒检测 HeLa 细胞中 Caspase-9 和 Caspase-3 的活性,荧光定量 PCR 测定 Bcl-2 和 Bax mRNA 表达,并计算 Bcl-2 与 Bax 的比值。**结果** 南赤爮提取物对 HeLa 细胞的生长抑制作用呈明显的时间-剂量依赖性;南赤爮提取物(0.50 和 1.00 mg/ml)处理能显著降低 HeLa 细胞线粒体膜电位,促进 HeLa 细胞凋亡($P<0.05$,$P<0.01$);上调 Bax mRNA 表达,下调 Bcl-2 mRNA 表达和 Bcl-2 与 Bax 的比值以及增强 Caspase-9 和 Caspase-3 的活性($P<0.05$,$P<0.01$)。**结论** 南赤爮提取物可诱导 HeLa 细胞凋亡,其作用机制与降低 HeLa 细胞线粒体膜电位及调节凋亡相关基因 Bcl-2、Bax 和 Caspase-9、Caspase-3 的表达有关。

[关键词] 南赤爮;宫颈癌;HeLa 细胞;凋亡

[中图法分类号] R282.71;R285.5;R737.33 [文献标志码] A

Apoptosis of cervix cancer HeLa cells induced by *Thldiantha nudiflora Hemsl* extract

Shi Mengqiong[1], Liu Xiong[2], Zhou Jigang[2], Yang Wenyan[1], Luo Tao[2], Xiong Xingjun[3] ([1]Experimental Center of Basic Medicine, [2]Department of Internal Medicine, Hospital of Traditional Chinese Medicine, Medical College of Three Gorges University, Yichang, Hubei Province, 443002; [3]Department of Pharmacy, Changyang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Changyang, Hubei Province, 443500, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of *Thldiantha nudiflora Hemsl* extract on the apoptosis in human cervix cancer HeLa cells. **Methods** HeLa cells were treated with *Thldiantha nudiflora Hemsl* extract at different concentrations of 0.10, 0.25, 0.50, 1.00, and 2.00 mg/ml for different times (24, 48, and 72 h). Cell viability was determined by MTT assay. After HeLa cells were treated with *Thldiantha nudiflora Hemsl* extract (0.5 and 1.0 mg/ml), cell morphology was examined by hoechst33258 through fluorescence microscopy. Annexin V/PI double-staining was performed to detect apoptosis of HeLa cells by flow cytometry. The mitochondrial membrane potential of HeLa cells was measured by JC-1 staining. The activities of Caspase-9 and Caspase-3 were measured by Caspase assay kit. The expression of Bcl-2 and Bax at mRNA level was detected by real-time PCR, and Bcl-2/Bax ratio was analyzed. **Results** The inhibitory effect of *Thldiantha nudiflora Hemsl* extract on HeLa cells showed a significant time-dose response. *Thldiantha nudiflora Hemsl* extract (0.50 and 1.00 mg/ml) significantly decreased the mitochondrial membrane potential of HeLa cells, promoteed apoptosis($P<0.05$, $P<0.01$, respectively), up-regulated the mRNA expression of Bax, down-regulated the expression of Bcl-2 and Bcl-2/Bax ratio, and increased the activities of Caspase-9 and Caspase-3, when compared with the negative control group($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** *Thldiantha nudiflora Hemsl* extract effectively induces the apoptosis in HeLa cells. The mechanism may be related to decreasing the mitochondrial membrane potential of HeLa cells, and regulating the expression of apoptosis-related genes Bcl-2, Bax, Caspase-9, and Caspase-3.

[**Key words**] *Thldiantha nudiflora Hemsl*; cervix cancer; HeLa cells; apoptosis

[基金项目] 湖北省卫生厅中医药中西医结合科研项目(2010Z-Y09)

[通信作者] 刘 雄,电话:(0717)6912330, E-mail: 13997652561@163.com

Supported by the Project of Traditional Chinese Medicine and Integration With Western Medicine From Department of Public Health of Hubei Province (2010ZY09). Corresponding author: Liu Xiong, Tel: 86-717-6912330, E-mail: 13997652561@163.com

宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤,恶性程度高,易复发,死亡率高,目前已成为全球性的公共卫生问题[1]。据WHO统计数据显示,全球每年新发宫颈癌病例约有55.51万,其中我国新发病例占28.8%,达到13.15万;全世界每年约有30.98万死于宫颈癌,我国约有2~3万[2-3]。值得关注的是,我国当前宫颈癌的发病率不仅有上升趋势,而且是发病年龄有明显的年轻化倾向,因而宫颈癌的防治任务仍十分艰巨[3]。近年来天然药物以毒性低、安全范围广、药源丰富越来越受到人们的关注,已成为肿瘤治疗领域的一大特色。寻找高效低毒中药来改变肿瘤的生物学行为已成为肿瘤治疗的重要策略。南赤飑为葫芦科植物 *Thldiantha nudiflora Hemsl* 的根。民间习称野南瓜、毛土瓜、球子莲,苗名称四棍汝,具有清热解毒,理气活血,泻热祛淤,消肿散结,止痢通乳之功效[4],主要用于治疗痈肿、肠炎、痢疾、毒蛇咬伤及乳汁不通等症,鄂西、湘西土家民间有将它用于治疗宫颈癌的传统,但在治疗宫颈癌的基础研究方面鲜有报道。本实验初步观察南赤飑提取物对人宫颈癌HeLa细胞株体外生长的影响,并探讨其作用机制,以期为其临床应用及研究开发提供理论基础和实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验药物

南赤飑购自宜昌市中医院,并经三峡大学植物与天然产物湖北省重点实验室汪鋆植教授鉴定为葫芦科南赤飑植物南赤飑,该药材标本保存于三峡大学国家中医药管理局中药药理科研三级实验室。南赤飑提取物制备:取南赤飑药材500 g,粉碎成粗粉,加10倍量蒸馏水浸泡2 h后,加热回流提取3次,每次3 h,合并滤液,3 500 r/min,离心20 min,得提取液,旋转蒸发器干燥得南赤飑浸膏,二甲基亚砜(DMSO)溶解浸膏样品配制成浓度为10 mg/ml提取物药液,再以细胞培养液稀释成所需浓度,经过0.22 μm孔径滤膜过滤除菌后供实验用。

1.2 细胞

宫颈癌HeLa细胞株由中科院上海细胞生物研究所细胞库提供。

1.3 主要试剂与仪器

RPMI1640细胞培养基、小牛血清、胰酶、DMSO(Gibco公司);碘化丙啶(PI)、四甲基偶氮唑盐(MTT)、线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)(Sigma公司);Hoechst33258(凯基生物公司);Annexin V/FITC(晶美生物工程有限公司);Caspase-9和Caspase-3活性检测试剂盒(碧云天);Bcl-2、Bax和GAPDH(上海生工合成,具体引物序列见表1);Trizol和DEPC(上海生工);Prime Script™ RT reagent Kit、*Taq* DNA聚合酶(大连宝生物工程有限公司);其他试剂均为市售分析纯。GENios酶标仪(瑞士Tecan公司),EPICS XL-4流式细胞仪、荧光检测仪(美国Backman Coulter公司);CKX41倒置显微镜(日本,奥林巴斯);NU-4750E型CO_2培养箱(Nu Aire公司);SW-4T-2F洁净工作台(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);LS-B50L立式压力蒸汽灭菌器(上海华线医用核子仪器有限公司);CDF-3220多元定量PCR仪(美国MJ Research公司);Gene Genius凝胶分析系统(英国SYNGNE公司)。

表1 荧光定量PCR引物序列

基因名称	上游	下游	片段长度(bp)
Bcl-2	5′-TGTGGCCTTCTTTGAGTTCG-3′	5′-TCACTTGTGGCTCAGATAGG-3′	280
Bax	5′-GCGTCCACCAAGAAGCTGAG-3′	5′-ACCACCCTGGTCTTGGATCC-3′	311
GAPDH	5′-GGGAGCCAAAAGGGTCATCTC-3′	5′-CCATGCCAGTGAGCTTCCGTTC-3′	353

1.4 方法

1.4.1 HeLa细胞培养 用含10%小牛血清的RPMI1640培养基,置37 ℃、CO_2体积分数为5%的饱和湿度条件下培养。HeLa细胞贴壁生长,取对数生长期细胞用于实验。

1.4.2 南赤飑提取物对HeLa细胞的生长抑制检测 取对数期生长的HeLa细胞配制成细胞密度为1×10^5/ml的细胞悬浮液,接种于96孔板中,每孔100 μl,5% CO_2、37 ℃孵育,待细胞贴壁后,更换培养液,分别设阴性对照孔(不加南赤飑提取物而加等量的培养液)、空白对照孔(不加细胞,其他条件与前相同)和南赤飑提取物实验组,实验组加入不同质量浓度的南赤飑提取物100μl,根据预实验的实验结果,使其终质量浓度分别为0.10、0.25、0.50、1.00、2.00 mg/ml,每组设4个复孔。将培养板移入CO_2孵箱中继续培养,分别于24、48和72 h后取出培养板,每次加入新配制的5 mg/ml MTT液20 μl,37 ℃避光孵育4 h,终止培养。吸去上清液,每孔加入DMSO 150 μl,置摇床上低速振荡10 min后,用酶标仪于490 nm处测量各孔的光密度值D(490),根据公式计算:细胞抑制率=[1-实验组D(490)/对照组D(490)]×100%。

1.4.3 南赤飑提取物对HeLa细胞形态学变化观察 取对数生长期的HeLa细胞,接种于6孔板中,每个孔中分别接种1×10^5/ml细胞。培养24 h待细胞完全贴壁展开,更换培养液,实验分别设阴性对照孔和0.50和1.00 mg/ml的南赤飑提取物培养孔,各3个复孔,继续培养48 h后,终止培养。弃去培养基,用4 ℃预冷的PBS缓冲液洗涤3次,4%多聚甲醛4 ℃固定30 min,弃固定液,PBS冲洗3次,加入适量1 μg/ml的荧光染液Hochest 33258,避光染色15 min,弃掉,用PBS洗涤,自然晾干,在荧光显微镜下观察凋亡细胞形态学变化。

1.4.4 南赤飑提取物对HeLa细胞凋亡分析 阴性对照组和南赤飑提取物组(0.50和1.00 mg/ml)HeLa细胞分别用相应浓度的药物处理,于培养箱内继续培养48 h后,收集细胞,2 000 r/min,离心5 min,用PBS以洗涤2次,然后加入Annexin V-FITC试剂盒中500 μl的Binding Buffer悬浮细胞,调节细胞浓度为1×10^6/ml,取100 μl上述细胞,分别按试剂盒说明加入

PI和Annexin Ⅴ-FITC,混匀后室温避光15 min后,用流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.4.5 南赤飑提取物对HeLa细胞线粒体的跨膜电位分析 阴性对照组和南赤飑提取物组(0.50和1.00 mg/ml)HeLa细胞分别用相应浓度的药物处理,于培养箱内继续培养48 h后,收集细胞,2 000 r/min,离心5 min,用PBS以洗涤2次,调节细胞浓度为1×10^6/ml,取100 μl上述细胞,加入JC-1(1 mg/L)10 μl,37 ℃避光孵育10 min,上机检测。

1.4.6 南赤飑提取物对HeLa细胞DNA ladder分析 阴性对照组和南赤飑提取物组(0.50和1.00 mg/ml)HeLa细胞分别用相应浓度的药物处理,于培养箱内继续培养48 h后,收集细胞,按如下步骤操作:用PBS洗2遍加入50 μl细胞裂解液,混匀,37 ℃水浴保温至混合物变得清亮,然后13 000 r/min,离心5 min,收集上清液于另一微量离心管中;依次用等体积酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)和氯仿抽提1次;然后收集上清液加入1/10体积3 mol/L醋酸钠和2倍体积冷乙醇,于-20 ℃沉淀过夜;次日于4 ℃,12 000 r/min,离心10 min,弃上清液室温晾干,加入20 μl TE缓冲液,1 μl RNA酶,37 ℃保温1 h;然后加入4 μl样品缓冲液,混匀,于2.0%琼脂糖凝胶上电泳,100 V电压下电泳1.0 h,凝胶成像系统观察结果。

1.4.7 南赤飑提取物对HeLa细胞Caspase活性检测 阴性对照组和南赤飑提取物组(0.50和1.00 mg/ml)HeLa细胞分别用相应浓度的药物处理,于培养箱内继续培养48 h后,收集细胞,用PBS以洗涤2次,离心(2 000×g, 5 min),收集沉淀细胞加入50 μl冰冷的裂解缓冲液,反复吹打,于冰浴中裂解60 min,离心(4 ℃, 10 000×g, 5 min),吸取上清液至EP管中,进行Caspase活性检测,具体方法按照试剂盒说明书进行。

1.4.8 荧光定量PCR测定Bcl-2、Bax mRNA表达 阴性对照组和南赤飑提取物组(0.50和1.00 mg/ml)HeLa细胞分别用相应浓度的药物处理,于培养箱内继续培养48 h后,收集细胞,用PBS以洗涤2次,离心,收集沉淀细胞。用Trizol试剂提取心肌细胞总RNA,按说明书操作。总RNA经紫外分光光度计测定260 nm与280 nm处光密度比值[D(260)/D(280)]为1.8~2.0。将提取的RNA反转录为cDNA(按照反转录试剂盒严格操作);在RNase Free处理过的反应管中加入SYBR® Premix Ex *Taq*™ Ⅱ (2×) 12.5 μl, PCR Forward Primer (10 μmol/L)1 μl, PCR Reverse Primer(10 μmol/L)1 μl, DNA模板2 μl, dH_2O(灭菌蒸馏水)8.5 μl,最终反应体系为25 μl。将样品放入实时定量PCR扩增仪中按95 ℃预变性30 s、95 ℃变性5 s、退火30 s、72 ℃延伸20 s条件扩增30次。利用PCR仪汇出扩增曲线,进行结果分析。

1.5 统计学分析

每项实验至少重复3次,所有实验数据以$\bar{x}\pm s$表示,在SPSS 13.0统计软件上进行单因素方差分析及LSD-t检验。

2 结果

2.1 南赤飑提取物对HeLa细胞的生长抑制作用

由表2可知:南赤飑提取物实验组在不同作用时间(24、48、72 h)点和不同浓度(0.10~2.00 mg/ml)时对HeLa细胞生长均有抑制作用,与阴性对照组比较,差异具有显著性($P<0.01$);而且同一浓度的南赤飑提取物对HeLa细胞的生长抑制率随作用时间的延长而提高,与作用24 h时间比较,差异具有显著性($P<0.05$, $P<0.01$)。实验结果显示,南赤飑提取物对HeLa细胞的生长抑制作用呈明显的时间-剂量依赖性。

表2 南赤飑提取物对宫颈癌HeLa细胞生长抑制率的影响

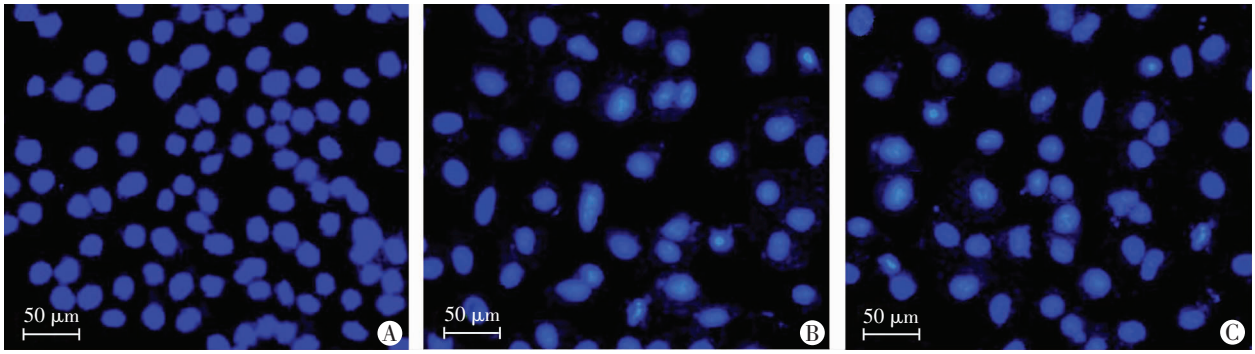
(%, $n=4$, $\bar{x}\pm s$)

作用时间(h)	浓度(mg/ml)		
	24	48	72
0(阴性对照组)	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
0.10	17.90±2.46 [a]	20.23±3.75 [a]	25.33±4.48 [ab]
0.25	26.43±4.31 [a]	33.10±4.98 [a]	35.35±5.61 [ab]
0.50	36.55±2.75 [a]	44.23±3.03 [ac]	50.25±3.93 [ac]
1.00	54.13±4.04 [a]	63.28±2.70 [ac]	65.78±3.90 [ac]
2.00	63.98±2.98 [a]	68.83±2.10 [ab]	72.95±3.27 [ac]

a:$P<0.01$,与阴性对照组比较;b:$P<0.05$,c:$P<0.01$,与同一浓度南赤飑提取物作用24h比较

2.2 南赤飑提取物对HeLa细胞形态学变化的影响

经Hoechst33258荧光染色后,荧光显微镜下可见阴性对照组细胞膜完整、胞核圆形或椭圆形,核形态饱满,核质着色深,密度均匀一致(图1A);用南赤飑提取物(0.50和1.00 mg/ml)处理48 h后,可见部分细胞膜皱缩,表面粗糙,核变小,染色质浓集,荧光增强,并产生形似块状的细胞碎片,出现凋亡小体,呈现典型的凋亡形态特征,以1.0 mg/ml南赤飑提取物处理组更为明显(图1B、C)。



A:阴性对照组;B:0.50 mg/ml南赤飑提取物组;C:1.00 mg/ml南赤飑提取物组

图1 各组南赤飑提取物对HeLa细胞形态学变化的影响

2.3 南赤飑提取物对 HeLa 细胞凋亡的影响

HeLa 细胞经南赤飑提取物(0.50、1.00 mg/ml)处理 48 h 后出现了明显的凋亡,而且随着南赤飑提取物浓度增加凋亡率提高,与阴性对照组比较,具有显著性差异($P<0.01$),见表 3。实验表明南赤飑提取物能诱导宫颈癌 HeLa 细胞发生凋亡。

表 3 各组南赤飑提取物对 HeLa 细胞凋亡率、线粒体膜电位的影响($n=5$, $\bar{x}\pm s$)

组别	剂量(mg/ml)	凋亡率(%)	膜电位(mV)
阴性对照组	–	2.54 ±0.80	154.90 ±21.17
南赤飑提取物组	0.50	22.31 ±2.49 [b]	124.81 ±18.72[a]
南赤飑提取物组	1.00	30.88 ±3.43 [b]	117.75 ±19.37 [b]

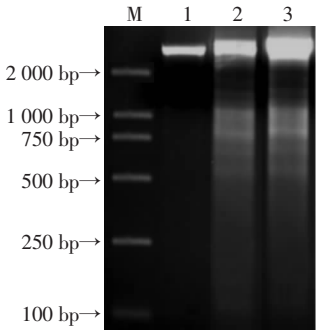
a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与阴性对照组比较

2.4 南赤飑提取物对 HeLa 细胞线粒体膜电位的影响

如表 3 所示,南赤飑提取物可使 HeLa 细胞线粒体膜电位快速下降,与阴性对照组比较,具有显著性差异($P<0.01$),且随着南赤飑提取物给药浓度的升高而增强。实验结果表明南赤飑提取物对 HeLa 细胞线粒体具有毒性作用。

2.5 南赤飑提取物对 HeLa 细胞 DNA ladder 的影响

细胞凋亡时主要的生化特征是染色质 DNA 在核小体单位之间的连接处断裂,形成 50 ~ 300 kb 的 DNA 大片段,或 180 ~ 200 bp 整数倍的寡核苷酸片段,在凝胶电泳上表现为梯形电泳图谱。脂糖凝胶电泳结果显示,南赤飑提取物处理组出现典型的凋亡细胞 DNA 梯级格局,并且随着用药浓度的增加,DNA ladder 的数目增加(图 2)。



M:标准;1:阴性对照组;2:0.50 mg/ml 南赤飑提取物组;3:1.00 mg/ml 南赤飑提取物组

图 2 各组南赤飑提取物对 HeLa 细胞 DNA ladder 的影响

2.6 南赤飑提取物对 HeLa 细胞 Caspase-9、Caspase-3 活性的影响

由表 4 可知,HeLa 细胞用南赤飑提取物(0.5 和 1.0 mg/ml)处理后可使细胞中 Caspase-9、Caspase-3 活性分别提高 56.2%、74.7% 和 49.8%、85.0%,与阴性对照组比较具有显著性差异($P<0.01$),且随着南赤飑提取物给药浓度的升高而增强。

表 4 各组南赤飑提取物对 HeLa 细胞 Caspase-9、Caspase-3 活性的影响($n=5$,$\bar{x}\pm s$)

组别	剂量(mg/ml)	Caspase-3(U/ml)	Caspase-9(U/ml)
阴性对照组	–	61.46 ±9.80	69.37 ±8.61
南赤飑提取物组	0.50	92.06 ±10.77 [a]	108.38 ±10.27 [a]
南赤飑提取物组	1.00	113.68 ±14.67 [a]	121.18 ±9.28[a]

a:$P<0.01$,与阴性对照组比较

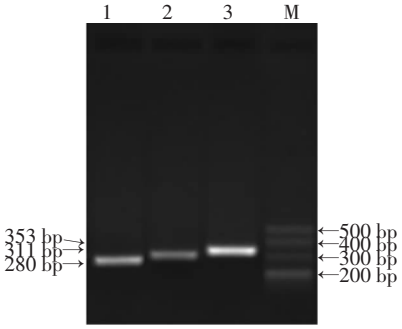
2.7 南赤飑提取物对 HeLa 细胞 Bcl-2、Bax mRNA 表达的影响

如表 5 和图 3、4 所示,用南赤飑提取物(0.5 和 1.0 mg/ml)处理后可使 HeLa 细胞中 Bcl-2 mRNA 表达量降低,Bax mRNA 表达量升高,Bcl-2/Bax 的比值降低,与阴性对照组比较具有显著性差异($P<0.05$,$P<0.01$),且随着南赤飑提取物给药浓度的升高而增强。

表 5 各组南赤飑提取物对 HeLa 细胞 Bcl-2、Bax mRNA 表达的影响($\bar{x}\pm s$,$n=3$)

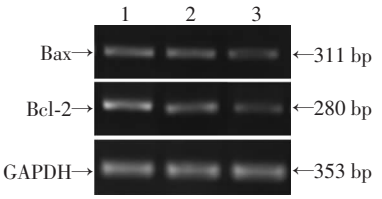
组别	剂量(mg/ml)	Bcl-2/GAPDH	Bax/GAPDH	Bcl-2/Bax
阴性对照组	–	0.643 ±0.031	0.442 ±0.033	1.460 ±0.081
南赤飑提取物组	0.5	0.537 ±0.040[a]	0.512 ±0.023[a]	1.048 ±0.033[b]
南赤飑提取物组	1.0	0.387 ±0.021[b]	0.611 ±0.039[b]	0.636 ±0.070[b]

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与阴性对照组比较



1:Bcl-2;2:Bax;3:GAPDH;M:标准

图 3 Bcl-2、Bax 和 GAPDH mRNA 电泳结果



1:阴性对照组;2:0.50 mg/ml 南赤飑提取物组;3:1.00 mg/ml 南赤飑提取物组

图 4 各组南赤飑提取物对 HeLa 细胞 Bcl-2、Bax mRNA 表达的影响

3 讨论

近年来从天然药物中寻找疗效确切且副作用小的抗肿瘤药已成为国内外重要的课题,围绕天然药物抗肿瘤的机制研究方兴未艾,先后研究开发了鬼臼毒素、长春新碱、紫杉醇、三尖杉酯碱等系列天然抗肿瘤药物及制剂,广泛应用于临床各种类型肿瘤疾病的防治,取得了较好的疗效。南赤飑为我国土家族民间习用的传统药物,具有清热解毒,理气活血,泻热祛淤,消肿散结,止痢通乳之功效[4],主要用于治疗痈肿、肠炎、痢疾、毒蛇咬伤及乳汁不通等症,并有将它用于宫颈癌防治的传统,然而有关其抗肿瘤的分子机制方面研究未见报道。本实验将在其临床疗效得以充分肯定的基础

上,从细胞水平进一步证实其对诱导宫颈癌 HeLa 细胞凋亡及作用机制,为此我们进行了本实验。实验结果表明,南赤飑提取物在不同作用时间(24、48、72 h)点和不同浓度(0.10~2.00 mg/ml)时对 HeLa 细胞生长均有抑制作用,随着南赤飑提取物浓度的增加和作用时间的延长,其抑制作用更加明显,表明南赤飑提取物对 HeLa 细胞生长的抑制作用与药物浓度和作用时间有密切关系。

肿瘤的发生、发展是由于细胞增殖和凋亡失调而导致细胞无限增殖所致,因此抑制肿瘤细胞增殖及促进其凋亡成为评估抗癌药物作用能力的重要指标[5]。本实验用 Hoechst33258 染色和细胞 DNA 片段化及流式细胞术分析后发现 HeLa 细胞经南赤飑提取物处理后细胞膜皱缩,染色质浓集,荧光增强,出现凋亡小体和 DNA 片断化等典型的细胞凋亡特征及凋亡率提高,表明南赤飑提取物抑制 HeLa 细胞增殖的机制之一是通过诱导细胞凋亡而实现的。

目前认为细胞凋亡的触发是一个有多种基因参与的级联式表达的结果,药物诱导肿瘤细胞凋亡受一个或多个基因的调控[6]。在细胞凋亡调的诸多控因素中,Bcl-2 家族基因备受瞩目,Bcl-2 与 Bax 基因均属于 Bcl-2 家族。Bcl-2 基因与 Bax 基因结合形成异二聚体,当 Bax 表达增强时,Bax 同源二聚体形成增多,细胞凋亡加速;当 Bcl-2 表达增多时,Bax 同源二聚体解离,形成 Bcl-2/Bax 异源二聚体,抑制 Bax/Bax 二聚体诱导的细胞凋亡作用,因此 Bcl-2/Bax 的比例是细胞凋亡发生与否的关键因素。本研究中,我们用荧光定量 PCR 检测了 HeLa 细胞在南赤飑提取物处理后 Bcl-2、Bax mRNA 表达,结果发现用南赤飑提取物处理后 Bax mRNA 表达水平明显增加,Bcl-2 mRNA 表达和 Bcl-2 与 Bax 的比值显著降低。实验提示南赤飑提取物对 HeLa 细胞凋亡促进作用可能与其调节 Bcl-2 和 Bax 表达有关。

在细胞凋亡信号传导通路中最重要的酶是 Caspases,在许多凋亡过程中,Caspases 是凋亡信号转导网络的核心[7]。现已公认,只要细胞的死亡是依赖 Caspase 的激活,那么这种细胞死亡就一定是凋亡[8]。Bcl-2 家族在细胞凋亡的线粒体信号通路上游过程发挥作用,而 Caspase 蛋白激酶家族则在下游发挥作用,在这一过程中有多种促凋亡和抗凋亡的蛋白相互作用,两者失调导致细胞凋亡;同时 Bcl-2 基因亦可直接或间接抑制线粒体膜渗透性转移孔道复合物的开放,其表达降低可使线粒体膜电位下降,进而导致膜质子转运异常,通透性增加,引起细胞色素 C 从线粒体中释放到胞浆中,与凋亡蛋白酶活化因子-1、Caspase-9 前体形成凋亡小体,激活 Caspase-9;Caspase-9 再酶解 Caspase-3 前体,释放出 C 末端小肽片段,从而活化 Caspase-3,活化的 Caspase-3 再瀑布式激活 Caspase-2,6,8,10 等。这些激活的 Caspases 最终激活脱氧核糖核酸酶,水解核酸和细胞骨架蛋白,导致细胞凋亡[9~10]。因此激活 Caspase-9 及 Caspase-3 是细胞凋亡的必经之路。本研究中,我们发现南赤飑提取物可显著降低 HeLa 细胞线粒体膜电位,并且随着剂量的增加而增强;在 Caspase 活性分析中,南赤飑提取物可使 HeLa 细胞中 Caspase-9 和 Caspase-3 的活性显著升高。实验结果提示南赤飑提取物对 HeLa 细胞凋亡的促进作用不但与其调节 Bcl-2 家族的 Bcl-2 和 Bax 表达水平有关,而且与其激活下游的 Caspase 蛋白激酶家族的 Caspase-9 及 Caspase-3 表达有关。

综上所述,本研究证实南赤飑提取物有显著的诱导 HeLa 细胞凋亡作用,其机制可能是通过降低 HeLa 细胞线粒体膜电位,上调 Bax mRNA 表达,下调 Bcl-2 mRNA 表达和 Bcl-2 与 Bax 的比值以及增强 Caspase-9 和 Caspase-3 的活性,从而抑制 HeLa 细胞生长、诱导肿瘤细胞凋亡。

参考文献:

[1] Barbera L, Thomas G. Management of early and locally advanced cervical cancer [J]. Semin Oncol, 2009, 36 (2): 155-169.

[2] 刘继红, 李玉洁. 我国宫颈癌预防面临的机遇和挑战[J]. 中国肿瘤, 2010, 19(7): 424-426.

[3] 王临虹, 邱琇, 郑睿敏, 等. 我国宫颈癌流行病学状况及防治策略的回顾与展望[J]. 中国妇幼卫生杂志, 2010, 1 (3): 146-149.

[4] 徐玉辉. 南赤飑的生药鉴别[J]. 基层中药杂志, 1999, 13(1): 31.

[5] Scatena R. Mitochondria and cancer: a growing role in apoptosis, cancer cell metabolism and dedifferentiation [J]. Adv Exp Med Biol, 2012, 942: 287-308.

[6] Mao H, Lebrun D G, Yang J, *et al*. Deregulated signaling pathways in glioblastoma multiforme: molecular mechanisms and therapeutic targets [J]. Cancer Invest, 2012, 30 (1): 48-56.

[7] Leist M, Jaattela M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001, 2(8): 589-598.

[8] Estaquier J, Vallette F, Vayssiere J L, *et al*. The mitochondrial pathways of apoptosis [J]. Adv Exp Med Biol, 2012, 942: 157-183.

[9] Martinou J C, Desagher S, Antonsson B. Cytochrome c release from mitochondria: all or nothing [J]. Nature Cell Biol, 2000, 2(3): E41-E43.

[10] Dasmahapatra G, Almenara J A, Grant S. Flavopiridol and histone deacetylase inhibitors promote mitochondrial injury and cell death in human leukemia cells that overexpress Bcl-2 [J]. Mol Pharmacol, 2006, 69(1): 288-298.

(**收稿**:2012-03-17;**修回**:2012-04-16)

(编辑 张 维)