

西多福韦对 HeLa 细胞增殖抑制作用的研究

吴五洲¹, 徐祥², 欧琴², 李蓓², 丁娜娜³, 李明远³, 杨靖^{2,3}

(1. 十堰市太和医院、湖北医药学院附属太和医院骨科, 湖北 十堰 442000; 2. 湖北医药学院微生物学教研室, 湖北 十堰 442000; 3. 四川大学华西基础医学与法医学院微生物学教研室, 四川 成都 610041)

摘要:目的 研究抗病毒药西多福韦(CDV)对 HeLa 细胞的增殖抑制作用。方法 采用 MTT 法分析 CDV 和阳性对照药顺铂(DDP)对 HeLa 细胞增殖活力的影响;利用细胞集落形成实验和 Giemsa 染色技术,观察 CDV 和 DDP 导致 HeLa 细胞凋亡情况;利用流式细胞仪观察 CDV 和 DDP 对细胞凋亡及细胞周期影响。结果 MTT 法和细胞集落实验结果显示 CDV 能明显抑制 HeLa 细胞的增殖活性;流式细胞仪测定显示 CDV 和 DDP 使 HeLa 细胞阻滞于细胞周期的 S 期,并诱导 HeLa 细胞发生凋亡。结论 CDV 对 HeLa 细胞具有明显的增殖抑制作用,并能诱导细胞凋亡,CDV 有可能成为宫颈癌治疗的另一策略。

关键词:人乳头瘤病毒;HeLa 细胞;西多福韦;顺铂;细胞凋亡

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.08.038

Anti-proliferative effect of cidofovir on HeLa cells

WU Wuzhou¹, XU Xiang², OU Qin², LI Bei², DING Nana³, LI Mingyuan³, YANG Jing^{2,3}

(1. Taihe Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000, China; 2. Department of Microbiology, Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000, China; 3. Department of Microbiology, West China School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China)

Abstract: Objective To study the inhibition of cidofovir (CDV) on proliferation of HeLa cells. **Methods** MTT assay was used to analyze the influence of CDV and cisplatin (DDP) on HeLa cell proliferation. Clone formation assay and Giemsa staining were used to observe the situation of cell apoptosis caused by CDV and DDP on HeLa cells. Flow cytometry was used to detect the shape and size of apoptotic cells after PI staining. **Results** CDV could inhibit the proliferation of HeLa cells. Results of flow cytometry assay showed that CDV induced cells arrested in S-phase and cell apoptosis. **Conclusion** CDV can inhibit HeLa cells proliferation, regulate cell cycle and trigger apoptosis, which makes it become another potential treatment strategy of cervical cancer.

Key words: Human papillomavirus; HeLa cell; Cidofovir; Cisplatin; Apoptosis

人乳头瘤病毒(HPV)在宫颈癌发展进程中起关键作用,它的持续感染被认为是引发宫颈癌的最重要的原因^[1-2]。宫颈癌是中国 15~44 岁女性中的第二大高发癌症,中国每年约有 13 万新增宫颈癌病例,占世界宫颈癌新发病例总数的 28%^[3]。女性一生中 80% 可感染 HPV,通常在 24 个月内被自然清除,只有少数女性呈持续感染状态,从 HPV 最初感染到癌前病变,最终演变为宫颈浸润癌至少需要 10~15 年^[4-5]。目前,已鉴定出的 HPV 病毒亚型超过 180 种,其中 HPV16 和 HPV18 高危型 HPV 持续性感染宿主细胞是形成宫颈癌的最主要原

因^[6-7]。本研究的目的是通过初步研究药物西多福韦(CDV)对 HPV18 感染的宫颈癌阳性细胞 HeLa 的增殖抑制作用的影响,以顺铂(DDP)作为阳性对照药物来研究 CDV 对 HeLa 细胞凋亡及细胞周期的影响^[8],评价 CDV 在预防 HPV 感染和治疗宫颈癌方面的潜力和应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 宫颈癌 HeLa 细胞株为本实验室保存。

1.1.2 试剂 DMEM 细胞培养液和青链双抗购于 Hyclone,优级新生牛血清购于成都荣海生物公司,PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser 试剂盒及 SYBR® Premix Ex Taq™ II 实时荧光定量试剂盒均购于 TaKaRa。Cidofovir 和 DDP 及二甲基亚砜(DMSO)试剂购于 Sigma 公司,分别溶于细胞专用的 0.01 mol·L⁻¹ PBS 溶液中制成 50 μmol·L⁻¹ 的储存液,使用前用培养液稀释至所需浓度。

基金项目:湖北省教育厅科学研究计划项目(B2016113);十堰市科技局市级科学技术研究与开发专项基金项目(16K70);湖北医药学院研究生启动金资助计划项目(2015QDJZR08);2015 年湖北省省级大学生创新创业训练计划项目(201510929024)

通信作者:杨靖,男,副教授,硕士生导师,研究方向:肿瘤相关微生物的致病机制研究,E-mail:yangjing780228@foxmail.com

1.2 方法

1.2.1 HeLa 细胞培养 用含 10% 优级新生牛血清、1% 青链双抗的 DMEM 完全培养基作为 HeLa 细胞培养基。细胞接种后置于 5% CO₂ 培养箱中 37 ℃ 连续培养,适当更换培养液。分组设置:Control 组:未经药物处理的 HeLa 细胞;Cidofovir 药物组(CDV 组):细胞经适当浓度的 Cidofovir 处理;Cisplatin 药物组(DDP 组):细胞经适当浓度的 Cisplatin 处理。

1.2.2 MTT 法检测 HeLa 细胞活力 取对数生长长期的 HeLa 细胞用 0.25% 的胰酶消化后,制成密度为 5×10^7 cells $\cdot$ L⁻¹ 的细胞悬液,于 96 孔板中每孔加 100 μ L,待细胞贴壁后,弃旧液,配制不同浓度的 CDV(2.5、5、10、20 μ mol $\cdot$ L⁻¹) 和 DDP(2.5、5、10、20 μ mol $\cdot$ L⁻¹) DMEM 培养液,分别处理 24、48、72 h。每组设 5 复孔和对照孔。在预定的时间点每孔加入 10 μ L 浓度为 5 g $\cdot$ L⁻¹ 的 MTT 溶液后继续培养 4 h;弃旧液,每孔加入 150 μ L DMSO,置摇床上低速振荡 10~15 min;用酶标仪检测 490 nm 波长处的吸光度(OD)值,HeLa 细胞的细胞活力按公式计算:细胞活力(%) = (药物处理组值 - 调零孔值) / (Control 组孔值 - 调零孔值) $\times$ 100%。

1.2.3 HeLa 细胞集落形成 取对数生长长期的 HeLa 细胞,用 0.25% 胰蛋白酶消化,DMEM 培养液制成单细胞悬液,每孔加 1 mL 于 6 孔板,使每孔细胞数为 300 个,置于 5% CO₂ 培养箱 37 ℃ 孵育,过夜;弃旧液,每孔添加 2.5 mL 新的含不同浓度药物(操作见“1.2.2”)的 DMEM 完全培养液,每组设 5 复孔和对照孔;置于 5% CO₂ 培养箱 37 ℃ 孵育,培养 14 d 左右;当细胞板中出现肉眼可见的细胞集落时,终止培养。每孔加 2 mL 纯甲醇固定细胞固定 15 min。然后去固定液,加适量 Giemsa 染色液染 10~15 min,然后用清水缓慢洗去染色液,空气干燥;在显微镜(低倍镜)计数大于 50 个细胞的细胞集落数。本研究用存活比率表示 CDV 和 DDP 对 HeLa 细胞的增殖抑制和凋亡影响。显微镜下计数大于 50 个细胞的集落数。集落形成率 = (集落数形成数/接种细胞数) $\times$ 100%;存活比率 = (实验组集落形成率/对照组集落形成率) $\times$ 100%。

1.2.4 Giemsa 染色检测细胞凋亡 于 24 孔板中放入无菌小爬片,每孔接种 5×10^5 个细胞,5% CO₂ 培养箱 37 ℃ 孵育,过夜;弃旧培养基,每孔添加新的含适量浓度药物的完全培养基,每组设置 5 复孔,同时设置对照孔;置于 5% CO₂ 培养箱 37 ℃ 孵育,培养 48 h 左右。弃旧培养液,用 PBS 轻轻洗 2 次,每次 2 min,再加入 500 μ L 甲醇固定 3 min 之后,弃固定液,再用 PBS 洗 2 次;适量的加入 Giemsa

染色工作液,使工作液能完全覆盖爬片上的细胞,静置染色 30 min;染色后,清水洗至滴下来的水无颜色为好;用滴管在干净的载玻片滴加 1~2 滴中性树胶,用眼科镊轻轻夹住小爬片的一角,细胞面朝下盖在载玻片上,中性树胶沿着小爬片充分展开之后,用吸水纸将多余的树胶吸干,同时避免气泡产生,平放载玻片,室温下长期保存。显微镜下观察 Giemsa 染色的凋亡细胞形态并拍照记录。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞周期和细胞凋亡 6 孔细胞板中铺板,每孔细胞数为 1×10^5 个,置于 5% CO₂ 培养箱 37 ℃ 孵育过夜;15 μ mol $\cdot$ L⁻¹ (IC₅₀ 确定浓度) CDV 和 DDP 分别处理 48 h 后,0.25% 胰酶消化液(不含 EDTA)处理细胞,于 4 ℃,1 000 r $\cdot$ min⁻¹ 离心 2 min 离心收集,用冷 PBS 洗涤细胞 2 次;加入预冷的 70% 乙醇(PBS 配制)重悬细胞,置于 4 ℃ 冰箱过夜,或 -20 ℃ 长期保存;离心收集细胞,用预冷的 PBS 洗 1 次细胞,离心弃上清液,再加入预冷的 PBS 重悬细胞,调整细胞浓度为 1.0×10^6 mL⁻¹,加入终浓度为 1 mg $\cdot$ L⁻¹ 的 RNase A 酶,混匀后 37 ℃ 水浴 30 min;加入 PI 染色液(终浓度为 50 mg $\cdot$ L⁻¹),轻轻混匀,4 ℃ 避光保存后用流式细胞仪检测。

1.3 统计学方法 采用统计软件 SPSS20.0 对实验结果进行统计学处理和分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,整体分析采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间两两比较用 q 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对 HeLa 细胞活力的影响 HeLa 细胞经 CDV 处理后形态发生明显改变,细胞形状变得更不规则,细胞体积变小,细胞膜发生裂解,细胞核浓缩、颜色加深;同一时间下,CDV 和 DDP 对 HeLa 细胞的增殖抑制作用随着药物浓度的增加而增强;同一浓度下,随着时间的延长,细胞活力逐渐下降。说明 CDV 和 DDP 对 HeLa 细胞均产生明显的增殖抑制作用,且呈现一定的浓度剂量和时间的依赖性。

CDV 和 DDP 对 HeLa 细胞的增殖抑制效应,与 Control 组相比差异有统计学意义($P < 0.05$),呈现时间和浓度的依赖性(表 1,2)。把药品稀释成不同的浓度,然后计算各自的抑制率,以药品的浓度为横坐标,抑制率为纵坐标作图,通过线性回归得到纵坐标值为 50% 时对应的药品浓度,即为 IC₅₀。通过 MTT 细胞活力实验检测并结合上述数据分析,CDV 和 DDP 在 48 h 能将 HeLa 活性抑制到一半的浓度均为 15 μ mol $\cdot$ L⁻¹,故本研究选用 15 μ mol $\cdot$ L⁻¹ 的 CDV 和 DDP 作用 48 h 作为后续实验条件。

表1 CDV 和 DDP 对 HeLa 细胞 OD 值的影响/ ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	CDV			DDP		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Control 组	0.274 ± 0.035	0.534 ± 0.048	0.590 ± 0.058	0.320 ± 0.005	0.743 ± 0.038	1.218 ± 0.022
2.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.254 ± 0.032	0.320 ± 0.017 ^a	0.330 ± 0.023 ^a	0.296 ± 0.003 ^a	0.577 ± 0.025 ^a	0.799 ± 0.039 ^a
5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.224 ± 0.014 ^a	0.311 ± 0.024 ^a	0.325 ± 0.042 ^a	0.285 ± 0.017 ^a	0.541 ± 0.032 ^a	0.783 ± 0.034 ^a
10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.191 ± 0.096 ^a	0.280 ± 0.018 ^a	0.246 ± 0.018 ^a	0.284 ± 0.006 ^a	0.548 ± 0.023 ^a	0.783 ± 0.072 ^a
20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.189 ± 0.028 ^a	0.220 ± 0.026 ^a	0.127 ± 0.022 ^a	0.237 ± 0.016 ^a	0.337 ± 0.061 ^a	0.338 ± 0.033 ^a
F 值	8.109	107.529	97.988	28.701	106.537	282.079
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 Control 组比较,^a $P < 0.05$ 。表2 CDV 和 DDP 对 HeLa 细胞活力的影响/ ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	CDV			DDP		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
2.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	90.408 ± 3.009	60.392 ± 8.908	56.357 ± 6.719	92.413 ± 1.621	77.858 ± 5.537	65.557 ± 2.463
5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	82.676 ± 5.363	54.795 ± 9.619	55.246 ± 6.978	89.128 ± 6.648	73.019 ± 6.979	64.310 ± 2.425
10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	70.065 ± 5.696	52.518 ± 4.482	42.048 ± 5.515	86.303 ± 4.076	73.748 ± 2.039	64.320 ± 0.620
20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	69.036 ± 5.978	41.573 ± 7.682	21.465 ± 3.150	74.182 ± 5.147	45.465 ± 1.980	27.730 ± 2.355
F 值	13.541	10.874	67.718	19.071	50.104	761.191
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.2 HeLa 细胞集落形成 Giemsa 试剂染色 HeLa 细胞集落(图1),与 Control 组相比,CDV 和 DDP 组的集落数较少。细胞集落计数分析结果表明,CDV 组存活比率(75.35 ± 1.14)% 明显高于 DDP 组(63.71 ± 0.82)%,说明同样条件下,DDP 对 HeLa 细胞的增殖抑制作用更明显($P < 0.05$)。

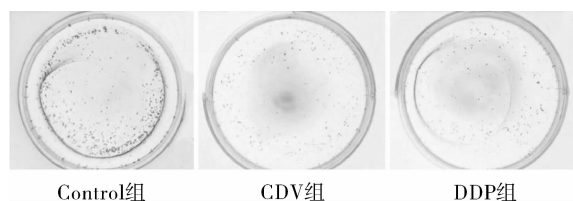
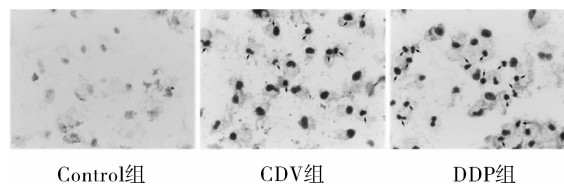


图1 HeLa 细胞集落形成

2.3 Giemsa 染色检测细胞凋亡 图2结果显示,Control 组 HeLa 细胞被 Giemsa 试剂染成浅蓝色或浅紫色,CDV 和 DDP 作用下的凋亡细胞被染成深蓝色或深紫色。Control 组细胞质为疏松淡蓝色、细胞核大、细胞核与细胞浆脱离,可见核仁、核仁数目多;CDV 组和 DDP 组 HeLa 细胞中可见细胞明显变小、有的呈长梭形、核仁裂解、细胞核染色质凝集被染成深色,可见典型的凋亡细胞。结果表明 CDV 和 DDP 能诱导 HeLa 细胞凋亡并发生形态改变。显微镜下观察,Gimesa 染色结果,箭头指示凋亡细胞核形态。

2.4 流式细胞仪检测细胞周期和细胞凋亡 细胞周期检测结果表明,CDV 和 DDP 均能对 HeLa 细胞

图2 Giemsa 染色检测 HeLa 细胞凋亡($\times 200$)

周期产生影响。与 Control 组相比,CDV 组 HeLa 细胞在 S 期比例明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),表明 CDV 使 HeLa 细胞周期阻滞于 S 期;DDP 组的 HeLa 细胞, G_0/G_1 期和 S 期细胞比例均升高不明显,提示 DDP 作用下 HeLa 细胞可能部分阻滞于 G_0/G_1 期及部分阻滞于 S 期,以上说明两种药物均能在 S 期对 HeLa 细胞产生周期阻滞。细胞凋亡检测结果表明,CDV 组和 DDP 组明显可见明显的凋亡峰(Sub G_0 峰),而 Control 组不见 Sub G_0 峰,表明 CDV 和 DDP 能诱导 HeLa 细胞产生凋亡,见表3。与 Control 组($0.837\% \pm 0.079\%$)相比,

表3 HeLa 细胞周期各期细胞比例/ ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	细胞周期		
	G_0/G_1	S	G_2/M
Control 组	57.63 ± 1.25	26.97 ± 1.70	15.36 ± 0.51
CDV 组	45.45 ± 5.59	44.55 ± 3.32 ^a	10.02 ± 2.24 ^a
DDP 组	64.63 ± 10.17	34.27 ± 10.69	10.10 ± 1.66 ^a
F 值	12.665	5.245	13.728
P 值	0.001	0.023	0.001

注:与 Control 组比较,^a $P < 0.05$ 。

CDV 组($2.593\% \pm 0.103\%$)和 DDP 组($3.573\% \pm 0.348\%$)细胞凋亡率明显较高,差异有统计学意义($F=113.985, P<0.001$)。

3 讨论

持续高危 HPV 感染是导致宫颈癌的主要原因,也使宫颈癌成为目前人类所有癌症病变中唯一病因明确的癌症。宫颈癌筛查作为一种有效预防方法使得宫颈癌的发病率及病死率明显下降^[9]。宫颈癌有年轻化趋势,且早期宫颈癌常无明显症状和体征,加上预后不良,预防显得尤为重要。宫颈癌 HPV 疫苗分为两种,即预防性疫苗和治疗性疫苗。预防性疫苗主要是抗 HPV16 和 HPV18 的二价疫苗和抗 HPV6、11、16 和 18 的四价疫苗,它为将近 70% 的病人提供保护^[10]。疫苗的预防有效性尚可,但疫苗价格昂贵,目前使用范围有限。目前手术切除治疗、放疗、化疗以及免疫治疗等仍是宫颈癌治疗的主要途径^[11]。不同 HPV 亚型与宫颈癌病理组织类型和预后存在差异,尤其是 HPV18 阳性宫颈癌,与腺癌相关,具有更强的致癌能力和复发能力^[12]。

DDP 能诱导 DNA 损伤,激活 p53 的活性,启动细胞凋亡程序,是一种广泛使用的治疗人类恶性肿瘤的抗癌药物,已经成为宫颈癌标准治疗使用的药物之一^[13-14]。CDV 最初被 FDA 批准用于治疗艾滋病病人的巨细胞病毒(CMV)引起的视网膜炎^[15]。近年来,CDV 不断拓展临床适应证,目前关于 CDV 治疗病毒的相关研究和文献报道较少,已证实 CDV 对 HPV16 阳性人宫颈癌细胞具有明显抑制作用,但机制尚未明确^[16]。CDV 对 HPV18 阳性人宫颈癌细胞 HeLa 细胞具有抑制作用的机制可能是多因素影响的结果^[17]。

本研究发现 CDV 对 HeLa 细胞产生明显的生长增殖抑制作用,并且对 HeLa 细胞的增殖抑制作用均呈现一定的浓度和时间依赖性,即抑制作用随药物浓度增加和时间延长而增强。同样实验条件下,与 CDV 相比,DDP 对 HeLa 细胞的增殖具有相对明显的增殖抑制作用。流式细胞仪检测发现 CDV 和 DDP 药物分别处理后,均对 HeLa 的细胞周期产生影响并促使细胞发生凋亡。CDV 使 HeLa 细胞周期阻滞于 S 期;DDP 使 HeLa 细胞阻滞于 S 期及部分阻滞于 G₀/G₁ 期,说明两种药物均对 HeLa 具有周期阻滞作用,并能诱导 HeLa 细胞凋亡。但目前 CDV 用于宫颈癌临床治疗的报道仍然不多,具体作用机制尚未明确,有必要进一步进行深入的基础研究。

综上所述,CDV 对宫颈癌 HeLa 细胞具有明显的增殖抑制作用,可调控细胞周期阻滞和细胞凋亡。CDV 有可能成为宫颈癌治疗的另一策略。

参考文献

- [1] GHITTONI R, ACCARDI R, CHIOCCA S, et al. Role of human papillomaviruses in carcinogenesis[J]. *Ecancer*, 2015, 9:526.
- [2] TOMMASINO M. The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis[J]. *Semin Cancer Biol*, 2014, 26:13-21.
- [3] SHI JF, CANFELL K, LEW JB, et al. The burden of cervical cancer in China: synthesis of the evidence[J]. *Int J Cancer*, 2012, 130(3):641-652.
- [4] COX JT. Epidemiology and natural history of HPV[J]. *J Fam Pract*, 2006(Suppl):3-9.
- [5] 吴泽妮, 陈汶. 人乳头瘤病毒自然史与空间分布特征对宫颈癌筛查技术的影响[J]. *中华肿瘤杂志*, 2016, 38(4):241-245.
- [6] ROSALES R, ROSALES C. Immune therapy for human papillomaviruses-related cancers[J]. *World J Clin Oncol*, 2014, 5(5):1002-1019.
- [7] 黄灵坚, 苏敏, 周小萍, 等. HPV 及亚型在不同子宫颈腺癌中的表达情况分析[J]. *安徽医药*, 2014, 18(9):1744-1745.
- [8] JING Z, HENG W, XIA L, et al. Downregulation of phosphoglycerate dehydrogenase inhibits proliferation and enhances cisplatin sensitivity in cervical adenocarcinoma cells by regulating Bcl-2 and caspase-3[J]. *Cancer Biol Ther*, 2015, 16(4):541-548.
- [9] 孙小伟, 郑凤仙, 刘金红, 等. 国产 HPV 杂交捕获技术在农村宫颈癌筛查中的应用[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2016, 23(3):137-141.
- [10] 夏和霞, 张炜. 宫颈癌防治用人乳头瘤病毒疫苗的研究进展[J]. *上海医药*, 2016, 37(11):12-16.
- [11] ROSALES R, ROSALES C. Immune therapy for human papillomaviruses-related cancers[J]. *World J Clin Oncol*, 2014, 5(5):1002-1019.
- [12] 潘在轩, 陈敏. HPV18 型与早期子宫颈腺癌患者预后的相关性[J]. *海南医学*, 2016, 27(17):2801-2803.
- [13] 付小玲. 观察宫颈癌患者调强放疗联合顺铂治疗疗效及不良反应[J]. *中国卫生标准管理*, 2015, 6(32):108-109.
- [14] 朱国方, 王若雨, 李红霞, 等. 2-脱氧-D-葡萄糖联合顺铂对宫颈癌 HeLa 细胞增殖与凋亡的影响[J]. *现代肿瘤医学*, 2016, 24(8):1187-1190.
- [15] 房舒舒, 张帅, 曹国颖. 核苷类抗病毒药物西多福韦的研究进展[J]. *中国药房*, 2016, 27(21):3022-3024.
- [16] 韩芳, 陆巧妮, 徐力昆, 等. 西多福韦对宫颈癌细胞 CaSki 内人乳头瘤病毒 16 抑制作用研究[J]. *中国医药生物技术*, 2014, 9(5):347-352.
- [17] TOPALIS D, NOGUEIRA TC, DE SCHUTTER T, et al. Resistance to the nucleotide analogue cidofovir in HPV⁺ cells: a multifactorial process involving UMP/CMP kinase 1[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(9):10386-10401.

(收稿日期:2016-10-06, 修回日期:2017-01-03)