

- [9] ZHANG Z, LIAO W, BERNHARDT B, et al. Brain iron redistribution in mesial temporal lobe epilepsy: a susceptibility-weighted magnetic resonance imaging study[J]. BMC Neurosci, 2014, 15: 117.
- [10] 李欣, 罗海龙, 陈雪寒, 等. 海人酸癫痫大鼠海马区能量代谢异常和线粒体功能障碍的变化[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(11): 2595-2596.
- [11] JO A, HEO C, SCHWARTZ TH, et al. Nanoscale intracortical iron injection induces chronic epilepsy in rodent[J]. J Neurosci Res, 2014, 92(3): 389-397.
- [12] DAS J, SINGH R, SHARMA D. Antiepileptic effect of fisetin in iron-induced experimental model of traumatic epilepsy in rats in the light of electrophysiological, biochemical, and behavioral observations[J]. Nutr Neurosci, 2017, 20(4): 255-264.
- [13] 罗赞飞, 吴迪炯, 温晓文, 等. 姜黄素在铁过载疾病治疗中的研究进展[J]. 浙江临床医学, 2014, 16(5): 822-823.
- [14] JYOTI A, SETHI P, SHARMA D. Curcumin protects against electrobehavioral progression of seizures in the iron-induced experimental model of epileptogenesis[J]. Epilepsy Behav, 2009, 14(2): 300-308.
- [15] 徐其岭, 闫莉, 谭毅. 外伤性癫痫发病机制的研究进展[J]. 中国临床新医学, 2013, 6(9): 913-916.
- [16] FRIEDMAN A, KAUFER D, HEINEMANN U. Blood-brain barrier breakdown-inducing astrocytic transformation: Novel targets for the prevention of epilepsy[J]. Epilepsy Research, 2009, 85(2): 142-149.
- [17] MICHALAK Z, SANO T, ENGEL T, et al. Spatio-temporally restricted blood-brain barrier disruption after intra-amygdala kainic acid-induced status epilepticus in mice[J]. Epilepsy Res, 2013, 103(2/3): 167-179.

(收稿日期: 2017-01-03, 修回日期: 2017-01-21)

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2019.02.007

◇ 药学研究 ◇

白藜芦醇联合 SB203580 对宫颈癌细胞凋亡迁移的影响及机制

李雪玲¹, 张凯敏¹, 李变英¹, 李明君²作者单位:¹ 漯河市第三人民医院妇产科, 河南 漯河 462000; ² 郑州大学第一附属医院肿瘤科, 河南 郑州 450052

基金项目: 河南省医学科技攻关计划项目(122300410036)

摘要: **目的** 探讨白藜芦醇联合 SB203580 对宫颈癌细胞凋亡迁移的影响及机制。 **方法** 培养人宫颈癌 HeLa 细胞, CCK8 实验检测不同浓度白藜芦醇作用于细胞 48 h 后对细胞增殖影响, 挑选最佳作用浓度。将细胞分为四组, 即对照组(A 组): 不做处理; SB203580 组(B 组), 加 10 $\mu\text{mol/L}$ SB203580; 白藜芦醇组(C 组), 加 60 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇; 白藜芦醇组 + SB203580 组(D 组), 加 60 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇和 10 $\mu\text{mol/L}$ SB203580。流式细胞仪、Transwell 小室检测四组细胞的凋亡率和迁移数, Western blot 检测 p38、p-p38、活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3 (Cleaved-caspase3)、B 型白蛋白/2 型淋巴细胞样蛋白 (Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 蛋白表达。 **结果** 白藜芦醇能显著抑制人宫颈癌 HeLa 细胞增殖, 60 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇抑制了一半的细胞增殖 ($P < 0.001$); B 组 (14.83 $\pm$ 1.23) % 细胞凋亡率显著低于 A 组 (3.42 $\pm$ 0.78) %, 细胞迁移数 (189.20 $\pm$ 7.93) 显著高于 A 组 (135.40 $\pm$ 7.23); C 组 (35.57 $\pm$ 1.86) % 和 D 组 (23.45 $\pm$ 1.45) % 细胞凋亡率显著高于 A 组, C 组 (51.30 $\pm$ 5.49) 和 D 组 (97.60 $\pm$ 6.88) 细胞迁移数显著低于 A 组; D 组细胞凋亡率显著高于 B 组, 低于 C 组, 细胞迁移数显著低于 B 组, 高于 C 组 ($P < 0.001$); B 组 p-p38 [(0.087 $\pm$ 0.011 比 0.152 $\pm$ 0.014)]、Cleaved-caspase3 [(0.162 $\pm$ 0.011 比 0.093 $\pm$ 0.009)]、Bax 蛋白表达 [(0.191 $\pm$ 0.013) 比 (0.154 $\pm$ 0.012)] 显著低于 A 组, Bcl-2 蛋白表达 [(0.208 $\pm$ 0.014) 比 (0.347 $\pm$ 0.015)] 显著高于 A 组; C 组和 D 组 p-p38 [(0.282 $\pm$ 0.016) 、(0.201 $\pm$ 0.015)]、Cleaved-caspase3 [(0.315 $\pm$ 0.013) 、(0.223 $\pm$ 0.012)]、Bax 蛋白表达 [(0.441 $\pm$ 0.015) 、(0.294 $\pm$ 0.014)] 显著高于 A 组, C 组和 D 组 Bcl-2 蛋白表达 [(0.071 $\pm$ 0.010) 、(0.156 $\pm$ 0.012)] 显著低于 A 组; D 组 p-p38、Cleaved-caspase3、Bax 蛋白表达显著高于 B 组, 低于 C 组, Bcl-2 蛋白表达显著低于 B 组, 高于 C 组 ($P < 0.001$)。p38 蛋白表达在各组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。 **结论** 白藜芦醇通过调控 p38MAPK 信号通路抑制人宫颈癌 HeLa 细胞增殖和迁移, 并通过调节 Cleaved-caspase3、Bax、Bcl-2 促进细胞凋亡。

关键词: 白藜芦醇; p38; SB203580; 宫颈癌; 凋亡; 迁移

Effect and mechanism of resveratrol combined with SB203580 on the apoptosis and migration of cervical cancer cells

LI Xueling¹, ZHANG Kaimin¹, LI Luanying¹, LI Mingjun²

Author Affiliations: ¹ Department of Obstetrics and Gynecology, Luohe Third People's Hospital, Luohe, Henan 462000, China; ² Department of Oncology, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450052, China

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of resveratrol combined with SB203580 on the apoptosis and migration of cervical cancer cells. **Methods** Human cervical carcinoma HeLa cells were cultured, and the effect of different concentrations of resveratrol on cell proliferation was detected by CCK8 assay, and optimal concentration was selected. The cells were assigned into four groups: control group (group A), no treatment; SB203580 group (group B), with 10 $\mu\text{mol/L}$ SB203580; resveratrol group (group C), with 60 $\mu\text{mol/L}$ resveratrol; resveratrol and SB203580 group (group D), with 60 $\mu\text{mol/L}$ resveratrol and 10 $\mu\text{mol/L}$ SB203580. Cell apoptosis and migration number were detected in four groups by flow cytometry and Transwell assay separately; expressions of p38, p-p38, Cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase 3 (Cleaved-caspase 3), B-cell leukemia/lymphoma 2-like proteins (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax) was detected by Western blot. **Results** Resveratrol could significantly inhibit the proliferation of human cervical carcinoma HeLa cells, 60 $\mu\text{mol/L}$ resveratrol inhibited half cell proliferation ($P < 0.001$). Apoptosis rate ($14.83 \pm 1.23\%$) in group B was significantly lower than ($3.42 \pm 0.78\%$) of group A, the number of cell migration (189.20 ± 7.93) was significantly higher than (135.40 ± 7.23) of group A. Apoptosis rates in group C ($35.57 \pm 1.86\%$) and group D ($23.45 \pm 1.45\%$) were significantly higher than group A. Cell migration numbers in group C (51.30 ± 5.49) and group D (97.60 ± 6.88) were significantly lower than group A. The apoptosis rate in group D was significantly higher than group B, and lower than group C, and its number of cell migration was significantly lower than group B, and higher than group C ($P < 0.001$). The expressions of Cleaved-Caspase 3, Bax protein and p-p38 in group B were significantly lower than group A [(0.162 ± 0.011) vs. (0.093 ± 0.009) , (0.191 ± 0.013) vs. (0.154 ± 0.012) , (0.087 ± 0.011) vs. (0.152 ± 0.014) , respectively], and the expression of Bcl-2 protein was significantly higher than group A [(0.208 ± 0.014) vs. (0.347 ± 0.015)]. The expressions of p-p38, Cleaved-caspase 3, Bax protein in group C [(0.282 ± 0.016) , (0.315 ± 0.013) and (0.441 ± 0.015) , respectively] and group D [(0.201 ± 0.015) , (0.223 ± 0.012) and (0.294 ± 0.014) , respectively] were significantly higher than group A, and the expressions of Bcl-2 protein in group C (0.071 ± 0.010) and group D (0.156 ± 0.012) were significantly lower than group A. The expressions of p-p38, Cleaved-caspase 3, Bax protein in group D were significantly higher than group B, but lower than group C. The expression of Bcl-2 protein in group D was significantly lower than group B, but higher than group C ($P < 0.001$). There was no significant difference in p38 protein expression among the groups ($P > 0.05$). **Conclusions** Resveratrol can inhibit the proliferation and migration of human cervical cancer HeLa cells through regulating the p38MAPK signaling pathway, and promote cell apoptosis through regulation of Cleaved-caspase 3, Bax and Bcl-2. **Key words:** Resveratrol; p38; SB203580; Cervical cancer; Apoptosis; Migration

宫颈癌是常见的妇科恶性肿瘤,其发病率仅次于乳腺癌,位居妇科恶性肿瘤第二位,而病死率位居首位。据统计,我国每年宫颈癌新增病例约30万,死于宫颈癌的约5万,而且宫颈癌的发病率逐年上升并有年轻化的趋势^[1-2]。宫颈癌的治疗主要采用手术和放疗,但针对早期病人有很好的效果,对于晚期病人,只能采取放疗,而放疗药物有毒性作用,对病人身体会造成严重危害^[3]。因此,寻找低毒高效的抗宫颈癌药物受到广大研究者的关注。中药因作用广谱,且能有效抑制肿瘤增殖,诱导细胞凋亡等作用成为研究热点^[4]。白藜芦醇属于非黄酮类多酚化合物,存在于葡萄、藜芦等植物中^[5]。研究显示,白藜芦醇对肿瘤的起始、促进、进展三个过程均有明显的抑制作用,并通过多种途径对乳腺癌、肝癌等肿瘤有抑制效应^[6-8]。p38丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPKs)在多种肿瘤的生长和增殖中处于活性状态,其特异性抑制剂SB203580对子宫内膜癌、食管癌等肿瘤有促凋亡和杀伤特性^[9-10]。因此,本研究于2015年3月—2016年3月对白藜芦醇联合SB203580对宫颈癌细胞凋亡迁移的影响及机制进行探索,以期后续更多研究治疗宫颈癌的方

法提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人宫颈癌HeLa细胞购自中国科学院细胞库。

1.1.2 试剂 胎牛血清(FBS)(批号:1618862)、RPMI1640培养基(批号:20131112)均购自美国Gibco公司;细胞凋亡试剂盒购自美国BD公司(批号:B148216);二喹啉甲酸(BCA)(批号:P0010S-1)、细胞计数试剂盒(CCK8)(批号:1213BS159)均购自碧云天生物技术有限公司;活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶3(Cleaved-caspase3)单克隆抗体购自美国Promega(批号:101024);B型白细胞/2型淋巴细胞样蛋白(Bcl-2,批号:2772S)、Bcl-2相关X蛋白(Bax,批号:2762S)、单克隆抗体均购自美国CST公司;p38(批号:37619)、p-p38(批号:21771)抗体均购自Abcam公司;HRP标记的羊抗兔IgG(批号:109525)购自北京中杉金桥公司。

1.1.3 仪器 CO₂细胞培养箱HERAcell型购自美国Thermo公司;倒置荧光显微镜CK2-TRC-3型购自日本Olympus公司;流式细胞仪LSR II购自美国

BD 公司;垂直电泳槽 DY CZ-24EN 购自北京六一仪器;128C 型酶标仪购自奥地利 CliniBio 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 从液氮罐中取出装有人宫颈癌 HeLa 细胞的冻存管,37 ℃ 水浴解冻。向冻存管中加入含有 10% FBS、100 μg/mL 链霉素和 100 U/mL 青霉素的 RPMI1640 培养基,1 000 r/min 离心 5 min,倒除上清,加入细胞培养液悬浮细胞,接种到细胞培养板中,37 ℃,5% CO₂ 培养箱中培养。观察到细胞融合度达到 85% 以上时,0.25% 的胰酶消化细胞,显微镜下观察细胞收缩趋于变圆时停止消化,1 000 r/min 离心 5 min,磷酸盐缓冲液(PBS)重悬细胞,离心,倒掉培养基,加入完全培养基培养,传代。

1.2.2 CCK8 检测细胞增殖 取对数生长期的人宫颈癌 HeLa 细胞,胰酶消化细胞,调整细胞浓度为 4×10^3 /mL,将 100 μL 细胞悬液接种于 96 孔细胞培养板中,置于 37 ℃,5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。加入 40、60、80、100 μmol/L 的白藜芦醇作用 48 h,对照组不加白藜芦醇。每孔加入含 10% CCK8 溶剂的培养液 100 μL,培养箱中孵育 4 h,酶标仪在波长为 490 nm 处测定并记录各组的吸光度 OD,计算细胞增殖抑制率。细胞增殖抑制率 = (1 - 实验组 OD 值/对照组 OD 值) × 100%。

1.2.3 白藜芦醇与 SB203580 对宫颈癌细胞凋亡的影响 将细胞分为四组,即对照组(A组):不做处理;SB203580 组(B组),加 10 μmol/L SB203580;白藜芦醇组(C组),加 60 μmol/L 白藜芦醇;白藜芦醇组 + SB203580 组(D组),加 60 μmol/L 白藜芦醇和 10 μmol/L SB203580。将生长至对数期的人宫颈癌 HeLa 细胞以每毫升 5×10^5 个细胞接种于 96 孔细胞培养板中,37 ℃,5% CO₂ 培养箱中培养 24 h,观察到细胞融合度达到 70%~80% 时,加入分组的四组细胞,37 ℃,5% CO₂ 培养箱中培养 48 h,收集悬浮及贴壁细胞,1 000 r/min 离心 5 min,膜联蛋白 V-FITC (AnnexinV-FITC)结合液重新悬浮细胞,避光室温孵育 10 min,离心,弃上清,碘化丙啶(PI)冰盒中避光孵育 10 min。加 400 μL 缓冲液。流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.2.4 白藜芦醇与 SB203580 对宫颈癌细胞迁移的影响 取对数生长期的人宫颈癌 HeLa 细胞,调整细胞浓度为每毫升 10^5 个,Transwell 小室上层加入 100 μL 细胞悬液,下层加入 500 μL 含 10% FBS 的 RPMI1640 培养基,培养 24 h 后,弃去上下室的培养基,上层分别加入四组细胞,下层加入含 10% FBS 的培养基,每个浓度设置 3 个重复孔,37 ℃,5% CO₂

浓度培养箱中培养 24 h 后,将培养基弃去,用棉签轻轻拭掉膜上的细胞,HE 染色后随机选择 5 个视野,显微镜下拍照计数。每组重复 3 次。

1.2.5 蛋白质印迹法(Western blot)检测 p38、p-p38、Cleaved-caspase3、Bcl-2、Bax 蛋白表达 四组细胞作用于人宫颈癌 HeLa 细胞 48 h 后,PBS 洗涤细胞,适量的裂解液冰上裂解 30 min,收集细胞,4 ℃ 14 000 r/min 离心 15 min,收集上清。BCA 试剂盒测定蛋白浓度,将蛋白样品与上样缓冲液充分混合,SDS-PAGE 电泳分离,4 ℃ 转膜过夜。取出 PVDF 膜用 5% 脱脂奶粉封闭后,分别以 p38、Cleaved-caspase3、Bcl-2、Bax 作为一抗(1:1 000),4 ℃ 孵育过夜,TBST 清洗后加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:2 000),37 ℃ 孵育 1 h,洗膜,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参用自动凝胶成像系统采集图像并计算蛋白表达率。

1.3 统计学方法 所有实验数据采用 SPSS 20.0 软件进行分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组比较采用两独立样本的 *t* 检验,多组数据比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用 SNK-*q* 检验或 Dunnett 法,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 白藜芦醇对细胞增殖的影响 为了确定白藜芦醇作用于人宫颈癌 HeLa 细胞合适的浓度,选择 40、60、80、100 μmol/L 的白藜芦醇作用于细胞 48 h,CCK8 检测细胞增殖活性。结果显示,40、60、80、100 μmol/L 白藜芦醇的细胞抑制率分别为(24.1 ± 2.3)%、(52.2 ± 3.4)%、(73.1 ± 3.1)%、(91.4 ± 2.7)%,均显著高于对照组(2.2 ± 1.5)%,差异有统计学意义(*P* < 0.05),且表现出浓度依赖性。60 μmol/L 的白藜芦醇抑制了一半的细胞增殖,后续选择 60 μmol/L 的白藜芦醇作为研究对象。具体数据见表 1。

表 1 各组的 *q'*(Dunnett 法) 双侧检验结果

组别	次数	细胞抑制率/ (%, $\bar{x} \pm s$)	与对照组比较		
			<i>q</i>	<i>q</i> 界值表	
				0.05	0.01
对照组	6	2.2 ± 1.5	—	—	—
40 μmol/L 白藜芦醇	6	24.1 ± 2.3 ^a	14.13	2.06	2.80
60 μmol/L 白藜芦醇	6	52.2 ± 3.4 ^a	32.28	2.35	3.07
80 μmol/L 白藜芦醇	6	73.1 ± 3.1 ^a	45.77	2.51	3.22
100 μmol/L 白藜芦醇	6	91.4 ± 2.7 ^a	57.59	2.61	3.32
<i>F</i> 值, <i>P</i> 值		541.757,0.000			

注:与对照组相比,^a*P* < 0.05

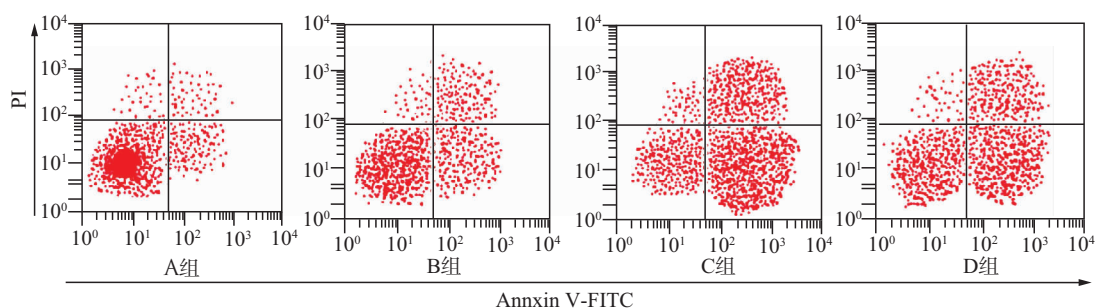


图1 白藜芦醇联合 SB203580 对宫颈癌细胞凋亡的影响

2.2 白藜芦醇联合 SB203580 对宫颈癌细胞凋亡的影响 四组细胞作用于人宫颈癌 HeLa 细胞 48 h 后, B 组细胞凋亡率显著低于 A 组, 差异有统计学意义 ($t = 10.083, P = 0.000$), C 组和 D 组的凋亡率显著高于 A 组, 差异有统计学意义 ($t_1 = 28.411, P_1 = 0.000; t_2 = 17.700, P_2 = 0.000$), D 组显著高于 B 组, 差异有统计学意义 ($t = 7.617, P = 0.000$), 且低于 C 组, 差异有统计学意义 ($t = 10.710, P = 0.000$), 如图 1 和表 2。

表2 白藜芦醇联合 SB203580 对宫颈癌细胞凋亡的影响

组别	次数	凋亡率/(%, $\bar{x} \pm s$)
A 组	6	3.42 ± 0.78
B 组	6	14.83 ± 1.23^{ab}
C 组	6	35.57 ± 1.86^{ab}
D 组	6	23.45 ± 1.45^a
F 值		288.461
P 值		0.000

注: 与 A 组相比, ^a $P < 0.05$; 与 D 组相比, ^b $P < 0.05$

2.3 白藜芦醇联合 SB203580 对凋亡相关蛋白表达的影响 四组细胞作用于人宫颈癌 HeLa 细胞 48h 后, Western blot 检测 Cleaved-caspase3、Bax、Bcl-2 蛋白表达, 结果显示, B 组 Cleaved-caspase3、Bax 蛋白表达显著低于 A 组, 差异有统计学意义 ($t_{\text{Cleaved-caspase3}} = 13.276, P_{\text{Cleaved-caspase3}} = 0.000; t_{\text{Bax}} = 3.345, P_{\text{Bax}} = 0.010$), Bcl-2 蛋白表达显著高于 A 组, 差异有统计学意义 ($t_{\text{Bcl-2}} = 13.203, P_{\text{Bcl-2}} = 0.000$); C 组 Cleaved-caspase3、Bax 蛋白表达显著高于 A 组, 差异有统计学意义 ($t_{\text{Cleaved-caspase3}} = 29.791, P_{\text{Cleaved-caspase3}} = 0.000; t_{\text{Bax}} = 25.948, P_{\text{Bax}} = 0.000$), Bcl-2 蛋白表达显著低于 A 组, 差异有统计学意义 ($t_{\text{Bcl-2}} = 26.217, P_{\text{Bcl-2}} = 0.000$); D 组细胞 Cleaved-caspase3、Bax 蛋白表达显著高于 A 组, 差异有统计

学意义 ($t_{\text{Cleaved-caspase3}} = 19.861, P_{\text{Cleaved-caspase3}} = 0.000; t_{\text{Bax}} = 12.658, P_{\text{Bax}} = 0.000$), Bcl-2 蛋白表达显著低于 A 组 ($t_{\text{Bcl-2}} = 18.143, P_{\text{Bcl-2}} = 0.000$), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); D 组 Cleaved-caspase3、Bax 蛋白表达显著高于 B 组, 差异有统计学意义 ($t_{\text{Cleaved-caspase3}} = 16.514, P_{\text{Cleaved-caspase3}} = 0.000; t_{\text{Bax}} = 22.603, P_{\text{Bax}} = 0.000$), 低于 C 组 $t_{\text{Cleaved-caspase3}} = 9.930, P_{\text{Cleaved-caspase3}} = 0.000; t_{\text{Bax}} = 13.291, P_{\text{Bax}} = 0.000$, Bcl-2 蛋白表达显著低于 B 组, 差异有统计学意义 ($t_{\text{Bcl-2}} = 13.013, P_{\text{Bcl-2}} = 0.000$), 高于 C 组, 差异有统计学意义 ($t_{\text{Bcl-2}} = 8.074, P_{\text{Bcl-2}} = 0.000$), 如图 2 和表 3。

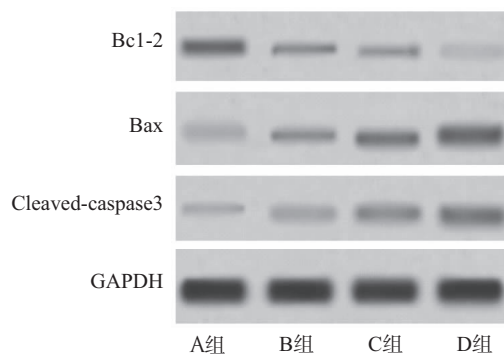


图2 白藜芦醇联合 SB203580 对宫颈癌细胞凋亡相关蛋白表达的影响

表3 白藜芦醇联合 SB203580 对凋亡相关蛋白表达的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	Cleaved-caspase3	Bax	Bcl-2
A 组	0.093 ± 0.009	0.154 ± 0.012	0.347 ± 0.015
B 组	0.162 ± 0.011^{ab}	0.191 ± 0.013^{ab}	0.208 ± 0.014^{ab}
C 组	0.315 ± 0.013^{ab}	0.441 ± 0.015^{ab}	0.071 ± 0.010^{ab}
D 组	0.223 ± 0.012^a	0.294 ± 0.014^a	0.156 ± 0.012^a
F 值	206.872	269.831	241.618
P 值	0.000	0.000	0.000

注: 与 A 组相比, ^a $P < 0.05$; 与 D 组相比, ^b $P < 0.05$

2.4 白藜芦醇与 SB203580 对宫颈癌细胞迁移的影响 四组细胞作用于人宫颈癌 HeLa 细胞 48 h

后,B组细胞迁移数显著高于A组,差异有统计学意义($t=9.495, P=0.000$),C组和D组细胞迁移数显著低于A组,差异有统计学意义($t_1=24.338, P_1=0.000; t_2=16.166, P_2=0.000$),D组细胞迁移数显著低于B组,差异有统计学意义($t=14.843, P=0.000$),高于C组,差异有统计学意义($t=8.171, P=0.000$),见表4。

表4 白藜芦醇与SB203580对宫颈癌细胞迁移的影响

组别	次数	细胞迁移数/(个, $\bar{x} \pm s$)
A组	6	189.2 $\pm$ 7.93
B组	6	135.4 $\pm$ 7.23 ^{ab}
C组	6	51.3 $\pm$ 5.49 ^{ab}
D组	6	97.6 $\pm$ 6.88 ^a
F值		212.564
P值		0.000

注:与A组相比,^a $P<0.05$;与D组相比,^b $P<0.05$

2.5 白藜芦醇与SB203580对p38和p-p38蛋白表达的影响 四组细胞作用于人宫颈癌HeLa细胞48h后,Western blot检测p38和p-p38蛋白表达,结果显示,B组p-p38蛋白表达显著低于A组,差异有统计学意义($t=5.636, P=0.001$),C组和D组细胞p-p38蛋白表达显著高于A组,差异有统计学意义($t_1=11.272, P_1=0.000; t_2=4.249, P_2=0.003$),D组p-p38蛋白表达显著高于B组,差异有统计学意义($t=16.909, P=0.000$),低于C组,差异有统计学意义($t=7.024, P=0.000$),p38在四组的蛋白表达比较差异无统计学意义($P>0.05$),见图3和表5。

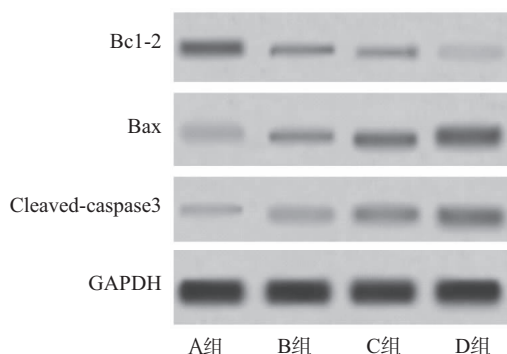


图3 白藜芦醇与SB203580对宫颈癌HeLa细胞p38和p-p38蛋白表达的影响

3 讨论

研究显示,白藜芦醇能抑制肿瘤细胞生长并通

表5 白藜芦醇与SB203580对p38和p-p38蛋白表达的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	次数	p38	p-p38
A组	6	0.438 $\pm$ 0.014	0.152 $\pm$ 0.014
B组	6	0.432 $\pm$ 0.013	0.087 $\pm$ 0.011 ^{ab}
C组	6	0.453 $\pm$ 0.013	0.282 $\pm$ 0.016 ^{ab}
D组	6	0.441 $\pm$ 0.014	0.201 $\pm$ 0.015 ^a
F值		1.282	101.639
P值		0.345	0.000

注:与A组相比,^a $P<0.05$;与D组相比,^b $P<0.05$

过杀伤肿瘤细胞达到抗肿瘤的目的,因此被认为是有效的潜在抗肿瘤药物。一些体外实验显示白藜芦醇能通过影响细胞生长和炎症、促进细胞凋亡、抗血管转移等途径抑癌和抗癌^[11-12]。MAPKs信号通路对细胞增殖、凋亡、肿瘤转移、蛋白合成等途径有调控作用,p38是MAPK信号通路中重要的一员,p38MAPK信号通路能通过调节细胞增殖、凋亡、分化等维持机体各个组织的相对稳定。当p38MAPK信号通路受到抑制时,能引起细胞增殖^[13-14]。本研究中用不同浓度的白藜芦醇作用于人宫颈癌HeLa细胞,细胞增殖受到明显的抑制,且随着白藜芦醇浓度增加细胞抑制率增加。60 $\mu\text{mol/L}$ 的白藜芦醇抑制了一半的细胞增殖,被选择作为后续研究对象。p38MAPK抑制剂SB203580与白藜芦醇联合处理细胞时,B组细胞凋亡率显著低于A组,C组和D组细胞凋亡率显著高于A组,D组细胞凋亡率显著高于B组,低于C组。这说明白藜芦醇通过p38MAPK抑制细胞增殖,促进细胞凋亡。

凋亡有内源性和外源性两种途径,虽然两种途径的机制不一样,但都需要激活凋亡相关蛋白Cleaved-caspase3,从而启动细胞的程序性死亡^[15]。Bcl-2和Bax是Bcl-2家族的抑凋亡蛋白和促凋亡蛋白,在细胞凋亡过程中,Bax移位到线粒体膜上,导致膜电位发生变化,Bax空间构象变大从而发生活化。Bax发生活化后可诱导线粒体释放细胞色素C,从而诱导细胞的凋亡。Bcl-2和Bax可结合形成二聚体,抑制或促进细胞的凋亡^[16-18]。研究显示,Bcl-2表达抑制和Bax表达升高,能使线粒体膜发生渗透性转化,释放细胞色素C,激活Cleaved-caspase3从而诱导细胞凋亡。本研究结果显示,B组Cleaved-caspase3、Bax蛋白表达显著低于A组,Bcl-2

蛋白表达显著高于 A 组;C 组和 D 组细胞 Cleaved-caspase3、Bax 蛋白表达显著高于 A 组,Bcl-2 蛋白表达显著低于 A 组;D 组 Cleaved-caspase3、Bax 蛋白表达显著高于 B 组,低于 C 组,Bcl-2 蛋白表达显著低于 B 组,高于 C 组。

转移是恶性肿瘤的基本特征之一,是对恶性肿瘤不断增殖,并沿着趋化剂浓度梯度向远处转移的过程。其异常生长除了肿瘤本身的生长外,还能向肿瘤临近组织侵袭并转移到其他部位,这往往是肿瘤引起死亡的原因^[19-20]。研究显示,白藜芦醇能通过多种机制抑制肿瘤细胞的迁移^[21]。本研究结果显示,白藜芦醇能抑制宫颈癌细胞的迁移,p38MAPK 抑制剂能减弱白藜芦醇对细胞迁移的影响。这说明白藜芦醇通过调控 p38MAPK 信号通路抑制宫颈癌细胞迁移。

综上所述,白藜芦醇可通过调控 p38MAPK 信号通路抑制人宫颈癌 HeLa 细胞增殖和迁移,并通过调节 caspase3、Bax、Bcl-2 促进细胞凋亡。

参考文献

- [1] KIM HS,KIM TH,SUH DH,et al. Success factors of laparoscopic nerve-sparing radical hysterectomy for preserving bladder function in patients with cervical cancer;a protocol-based prospective cohort study[J]. Ann Surg Oncol,2015,22(6):1987-1995.
- [2] FU ZZ,PENG Y,CAO LY,et al. Value of apparent diffusion coefficient (ADC) in assessing radiotherapy and chemotherapy success in cervical cancer [J]. Magn Reson Imaging, 2015, 33 (5): 516-524.
- [3] DENG T,FENG Y,ZHENG J,et al. Low initial human papillomavirus viral load may indicate worse prognosis in patients with cervical carcinoma treated with surgery[J]. Journal of Gynecologic Oncology,2015,26(2):111.
- [4] 刘丽,沈洪,姜鹏君,等. 异甘草素诱导 NCI-H157 细胞凋亡及对 ERS 相关基因表达的影响[J]. 南京中医药大学学报,2016,32(3):264-268.
- [5] 兰艳丽,刘韵. 光动力学处理对宫颈癌细胞的 miRNA 的影响[J]. 安徽医药,2015,19(12):2321-2325.
- [6] OLIVER P,PARDO T,VASILSKIS E,et al. Resveratrol as molecular competitor of PIB on the binding sites of the amyloid plaque [J]. Journal of Nuclear Medicine,2015,56(supplement 3):1556.
- [7] 孙大鹏,李莹,韩冠英. 白藜芦醇通过 c-FLIP 蛋白影响乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的生长和侵袭[J]. 中国老年学杂志,2015,35(24):40-42.
- [8] ZULUETA A,CARETTI A,SIGNORELLI P,et al. Resveratrol: a potential challenger against gastric cancer[J]. World J Gastroenterol,2015,21(37):10636-10643.
- [9] SATSUKA A,MEHTA K,LAIMINS L. p38MAPK and MK2 pathways are important for the differentiation-dependent human papillomavirus life cycle[J]. J Virol,2015,89(3):1919-1924.
- [10] XUE CJ,ZHAO YN,LI JM,et al. Impacts of SB203580 on the spatial memory and the expression of phosphorylated p38 MAPK and Homer1a in the hippocampus in rats with diffuse brain injury[J]. Int J Clin Exp Pathol,2016,9(3):3781-3786.
- [11] 郭勇,田晓丽,范琼瑛,等. 白藜芦醇诱导前列腺癌细胞系 PC3 凋亡的实验研究[J]. 河北医科大学学报,2016,37(7):838-841.
- [12] 张怀念,张咏莉. 宫颈癌分子遗传机制及其相关基因功能研究[J]. 安徽医药,2015,19(2):219-221.
- [13] 商阳阳,郑璐,尤楠,等. COMMD7 基因通过细胞外调节蛋白激酶/丝裂原活化蛋白激酶信号通路促进肝癌细胞 HepG2 增殖的研究[J]. 中华消化外科杂志,2015,14(4):316-320.
- [14] JIANG X,LI T,LIU RH. 2 α -Hydroxyursolic acid inhibited cell proliferation and induced apoptosis in MDA-MB-231 human breast cancer cells through the p38/MAPK signal transduction pathway [J]. J Agric Food Chem,2016,64(8):1806-1816.
- [15] DICK SA,CHANG NC,DUMONT NA,et al. Caspase 3 cleavage of Pax7 inhibits self-renewal of satellite cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112 (38): E5246-E5252. DOI: 10. 1073/pnas. 1512869112.
- [16] 周海燕. 黄芪多糖对 2 型糖尿病大鼠胰岛内质网应激及 Bcl-2 和 Bax 表达影响的研究[D]. 合肥:安徽中医药大学,2015.
- [17] HAO C,GAO L,ZHANG Y,et al. Acetylated chitosan oligosaccharides act as antagonists against glutamate-induced PC12 cell death via Bcl-2/Bax signal pathway [J]. Mar Drugs, 2015, 13 (3): 1267-1289.
- [18] TIAN X,ZENG G,LI X,et al. Cantharidin inhibits cell proliferation and promotes apoptosis in tongue squamous cell carcinoma through suppression of miR-214 and regulation of p53 and Bcl-2/Bax[J]. Oncol Rep,2015,33(6):3061-3068.
- [19] SHARMA S,WANG J,HUANG M,et al. Interleukin-7 gene transfer in non-small-cell lung cancer decreases tumor proliferation, modifies cell surface molecule expression, and enhances antitumor reactivity. [J]. Cancer Gene Ther,2016,3(5):302-313.
- [20] AIKAWA V,PORTER D,LUSKIN MR,et al. Transmission of an expanding donor-derived del(20q) clone through allogeneic hematopoietic stem cell transplantation without the development of a hematologic neoplasm[J]. Cancer Genetics,2015,208(12):625-629.
- [21] 华丛书,陈海,张朝东,等. 白藜芦醇诱导人肺腺癌 A549 细胞凋亡及其与 p38 MAPK 信号途径的联系[J]. 安徽医科大学学报,2015,50(10):1447-1450.

(收稿日期:2016-10-17,修回日期:2017-11-18)