

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2014.05.009

• 基础研究 •

马齿苋脑苷A对人宫颈癌HeLa细胞凋亡和侵袭转移的影响

郑国银^{1,2}, 曲丽萍^{1,2}, 张 宏^{3,4}, 辛海量^{1,2}

Effects of Portulacerebroside A on Apoptosis, Migration and Invasion of Human Cervical Cancer HeLa Cells

ZHENG Guoyin^{1,2}, QU Liping^{1,2}, ZHANG Hong^{3,4}, XIN Hailiang^{1,2}

1. Department of Traditional Chinese Medicine, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Chinese Materia Medica and Science of Prescriptions, Faculty of Traditional Chinese Medicine, Second Military Medical University,

3. Department of Pharmaceutical Botany, School of Pharmacy; 4. Department of Central Laboratory, Shanghai Seventh People's Hospital

Corresponding Author: XIN Hailiang, E-mail: hailiangxin@163.com; ZHANG Hong, E-mail: zhanghong@smmu.edu.cn



Abstract: Objective To examine whether portulacerebroside A (PCA), a novel cerebroside compound isolated from Portulaca oleracea L., influences the apoptosis, migration and invasion of human cervical cancer HeLa cells. **Methods** HeLa cells were treated with various concentrations of PCA. Cell viability was examined by MTT assay and the apoptosis induced by PCA was determined by flow cytometry. The scratch test, matrigel assay and Transwell test were performed respectively to estimate the capabilities of migration, adhesion and invasion of HeLa cells. **Results** PCA treatment significantly inhibited cell viability, increased apoptosis rate, decreased migration percentages and HeLa cells adhesion, and reduced invasion cells number. **Conclusion** PCA markedly induces the apoptosis and suppresses the migration and invasion of HeLa cells, suggesting its potential therapeutic effects on cervical cancer.

Key words: Herbal drug; Portulacerebroside A; Tumor; Apoptosis; Migration; Invasion

摘要: 目的 观察马齿苋脑苷脂类新化合物马齿苋脑苷A (portulacerebroside A, PCA) 对人宫颈癌HeLa细胞凋亡和侵袭转移的影响。方法 不同浓度PCA作用HeLa细胞不同时间后, 采用MTT法观察药物对细胞活力的影响, 流式细胞仪检测凋亡率, 划痕试验观察细胞迁移百分率, 基质胶法测定细胞黏附百分率, Transwell试验检测侵袭细胞数。结果 PCA显著抑制HeLa细胞活力, 增加细胞凋亡率, 降低细胞迁移百分率和黏附百分率, 减少侵袭细胞数。结论 PCA显著诱导人宫颈癌HeLa细胞凋亡和抑制其侵袭转移, 提示其潜在抗宫颈癌作用。

关键词: 中药; 马齿苋脑苷A; 肿瘤; 细胞凋亡; 转移; 侵袭

中图分类号: R737.33 **文献标识码:** A

0 引言

马齿苋科植物马齿苋 (Portulaca oleracea L.) , 广泛分布全球温带和热带地区, 为药食两用植物, 其地上部分为中药马齿苋来源, 具有清热解

毒、凉血消肿之功效, 临床可用于防治大肠癌、腹泻、痢疾、尿路感染等多种疾病。马齿苋所含化学成分包括黄酮类、萜类、香豆素类、生物碱类、挥发油类和多糖等, 其粗提物或有效部位具有抗肿瘤、保肝、抗菌、抗缺氧、抗氧化、抗病毒、心律失常、调血脂、降血糖等多种药理作用^[1]。李玉萍等^[2]通过体外筛选发现, 马齿苋总生物碱明显抑制HeLa细胞增殖, 体内试验则显著抑制荷瘤 (S180) 小鼠瘤体重量。然而, 到目前为止并没有任何关于马齿苋单体化合物抗宫颈癌的体内外研究报道, 这对进一步深入阐明马齿苋确切的抗癌作用机制和新药研发具有重要意义。我们先

收稿日期: 2013-03-05; **修回日期:** 2013-07-04

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目(81102774)

作者单位: 1.200433 上海, 中国人民解放军第二军医大学长海医院中医科; 2.中国人民解放军第二军医大学中医系中药方剂学教研室, 3.药学院药用植物学教研室; 4.上海市第七人民医院中心实验室

通信作者: 辛海量, E-mail: hailiangxin@163.com; 张宏, E-mail: zhanghong@smmu.edu.cn

作者简介: 郑国银 (1982-), 女, 博士, 主治医师, 主要从事肿瘤基础和临床研究

前对马齿苋药材的质量等进行了研究^[3]，并从中分离得到一个新的脑苷脂类化合物马齿苋脑苷A (portulacerebroside A, PCA)。本研究旨在探讨PCA对宫颈癌HeLa细胞是否具有诱导凋亡和抑制其侵袭转移的作用，以初步评价其临床应用价值。

1 材料与方法

1.1 实验材料

HeLa细胞(南京凯基生物科技发展有限公司)，磷酸缓冲液 (PBS, Hyclone, 美国)，胎牛血清 (FBS, Hyclone, 美国)，DMEM细胞培养液、二甲基亚砜 (DMSO)、四甲基噻唑盐 (MTT) 和 0.25% 胰酶 (Trypsin) (Sigma, 美国)，链霉素、青霉素双抗液 (碧云天生物研究所, 中国)。

1.2 马齿苋脑苷A的制备

马齿苋脑苷A参照文献方法制备^[3]，纯度 98.1%。实验前用DMSO溶解 (终浓度<0.5%)，再用培养液稀释至所需浓度。

1.3 细胞培养

HeLa细胞在含体积分数10%胎牛血清，1%链霉素、青霉素双抗液的DMEM细胞培养液中37℃、5%的CO₂和饱和湿度条件下传代培养，每2天换培养液1次，细胞生长成片，相互融合铺满瓶底约80%时进行传代。

1.4 细胞活力

取对数生长期HeLa细胞，0.25%不含EDTA胰酶消化，加入新鲜培养液吹打，调整细胞浓度2×10⁴/ml, 100 μl/孔接种于96孔板中，在5%CO₂、37℃的细胞培养箱内培养12 h，至细胞铺满板底80%时弃去培养液，加入含不同浓度PCA的培养液，每个浓度做6个复孔，分别于12 h和24 h两个不同时间点进行MTT活性检测。每个时间点检测前再加入0.5%的MTT液20 μl/孔，继续培养4 h后弃上清液，加入150 μl的DMSO，振荡10 min。在570 nm检测波长下，自动酶联免疫分析仪测定吸光度值 (OD)。

1.5 凋亡率检测

将HeLa细胞以1×10⁶个/ml的浓度分别接种于6孔板中，每孔2 ml。DMEM培养液培养12 h后，加入不同浓度的PCA继续培养12 h。0.25%胰酶消化，吸弃胰酶，加入培养液终止，用1 ml枪头轻轻吹打，至细胞成悬浮状。将细胞悬浮液转移至离心管中，以2 000 r/min离心5 min，弃培养液。PBS缓冲液洗涤1~2次，2 000 r/min收集细胞，500 μl Binding Buffer 悬浮细胞，加入5 μl Annexin V-FITC

混匀，再加入5 μl Propidium Iodide混匀，室温避光反应10 min。使用流式细胞仪(FACSCalibur, Becton Dickinson, 美国)检测细胞凋亡率。

1.6 细胞迁移实验

采用划痕试验法观察PCA对细胞迁移能力的影响。将HeLa细胞以1×10⁶个/ml接种于6孔板，每孔2 ml。待细胞覆盖率达到95%时，用10 μl无菌枪头在孔中央划十字交叉线，PBS洗3次。改用含不同浓度的PCA培养液 (含0.5%胎牛血清) 培养12 h。弃去培养液，PBS清洗，4%多聚甲醛固定15 min，倒置显微镜 (CKX41, Olympus, 日本) 下观察十字交叉中心附近，随机选5个视野记录细胞数，以空白组为对照，计算迁移百分比。

1.7 细胞黏附实验

将基质胶(Sigma, 美国)30 μl加入96孔培养板中，干燥1 h后，37℃的PBS液小心冲洗2次，每孔加入含1%胎牛血清的PBS 100 μl，培养箱中孵育1 h，再以PBS液200 μl冲洗两次。将经不同浓度PCA预处理12 h的HeLa细胞用无血清DMEM培养液制成5×10⁵个/ml细胞悬液，加入96孔培养板中，每孔100 μl，培养箱中孵育0.5、1、1.5 h。培养结束后，缓慢吸出培养液，PBS小心冲洗未黏附的细胞2次，加入含2%胎牛血清的DMEM培养液200 μl，MTT法测定OD值。试验同时设含10%胎牛血清培养的空白对照，以各无血清组OD值/含血清空白组OD值计算黏附百分率。

1.8 细胞侵袭试验

细胞体外侵袭试验采用Transwell小室进行。将HeLa细胞用不同浓度PCA预处理12 h，胰酶消化后配制成5×10⁵个/ml的单细胞悬液，加入侵袭小室上层，每孔100 μl，下方小室放置500 μl含20%FBS的DMEM培养液，37℃下孵育8 h后，取出小室，用湿润棉签擦去底部的基质胶和细胞，甲醛固定10 min，常规HE染色后于200倍光学显微镜下计数膜背面侵袭的细胞数，计数中间和四周5个视野，计算平均数。

1.9 统计学方法

采用SPSS15.0统计学软件进行数据分析，数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。多组间比较采用方差分析和两组之间t检验。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对细胞活力的影响

本实验考察了7个不同给药浓度 (1.5、3、6、9、12、15和18 μg/ml) 和2个不同时间点 (12 h和

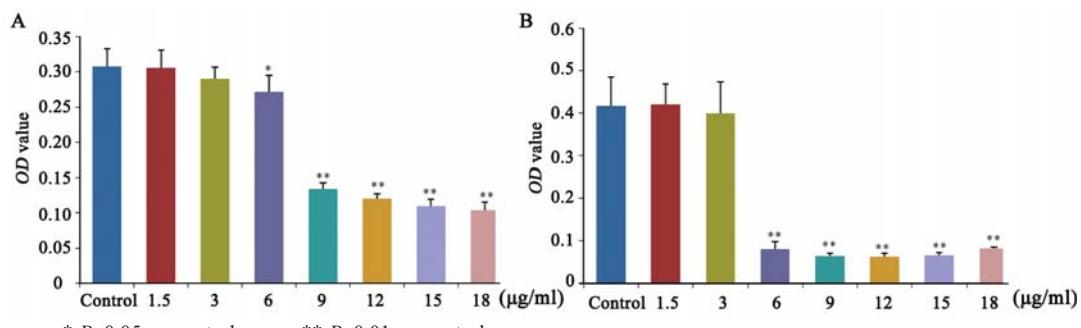


图1 马齿苋脑苷A作用12 h(A)和24 h(B)后对HeLa细胞活力的影响

Figure1 Effects of PCA on viability of HeLa cells after treatment for 12 h(A) and 24 h(B)

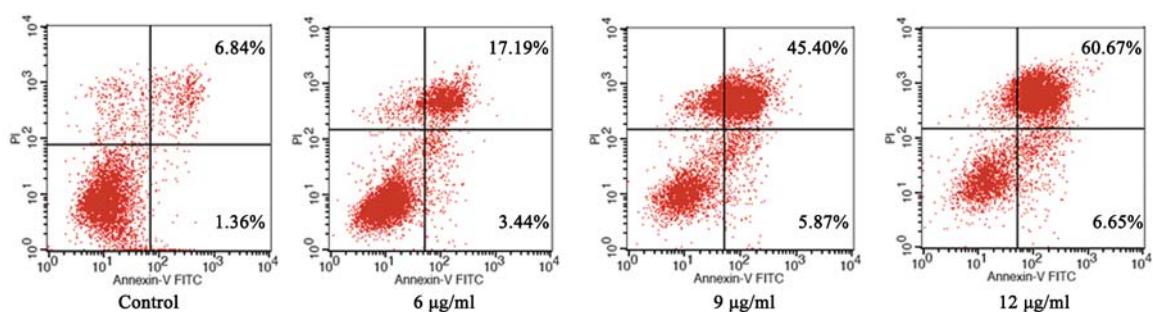
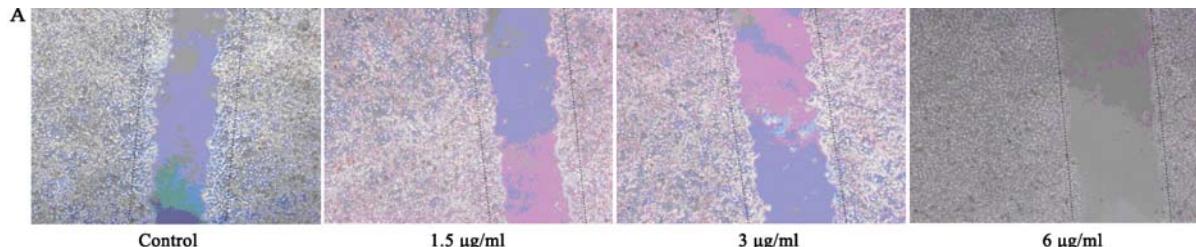


图2 马齿苋脑苷A作用12 h后对HeLa细胞凋亡率的影响

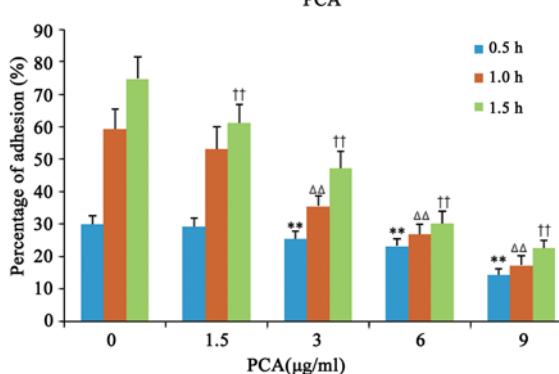
Figure2 Effects of PCA on apoptosis of HeLa cells after treatment for 12 h



**: P<0.01 vs. control group

图3 马齿苋脑苷A作用12 h后对HeLa细胞迁移的影响

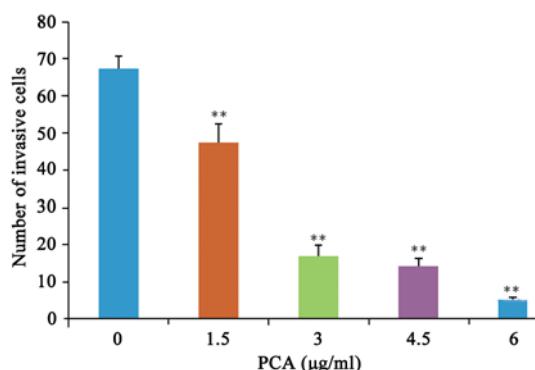
Figure3 Effects of PCA on migration of HeLa cells after treatment for 12 h



**, ΔΔ, ††: P<0.01 vs. corresponding control groups

图4 马齿苋脑苷A作用不同时间后对HeLa细胞黏附百分率的影响

Figure4 Effects of PCA on adhesion rate of HeLa cells after treatment for different time



**: P<0.01 vs. control group

图5 马齿苋脑苷A作用12 h后对HeLa细胞穿膜细胞数的影响

Figure5 Effects of PCA on invasion number of HeLa cells after treatment for 12 h

24 h) PCA对HeLa细胞活力的影响。给药浓度等于或高于6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,细胞活力被显著抑制,且随给药时间的延长抑制作用愈加明显,与空白组比较差异有统计学意义($P<0.05$ 或 0.01),见图1。

2.2 对细胞凋亡率的影响

流式细胞仪凋亡检测结果显示,正常空白组凋亡率为仅8.2% (右上限+右下限)。但给予PCA (6、9、12 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 处理12 h后,HeLa细胞凋亡率显著升高,3个浓度组分别为20.63%、51.27%和67.32%,且呈剂量依赖关系,见图2。

2.3 对细胞迁移能力的影响

划痕实验结果显示,经PCA处理12 h后HeLa细胞迁移能力显著降低,与空白组比较,细胞迁移数量显著减少,迁移百分率显著降低,差异有统计学意义(P 均 <0.01),且呈剂量依赖性,见图3。

2.4 对细胞黏附能力的影响

实验考察了PCA4个剂量作用12 h后在0.5、1、1.5 h对HeLa细胞黏附率的影响,见图4。结果发现,除1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 剂量0.5 h和1 h外,其余各组在3个时间点均显著降低细胞黏附百分率(与空白组比较, P 均 <0.01),提示其明显的抑制细胞黏附能力。

2.5 对细胞侵袭能力的影响

细胞在一定时间内穿过基质胶的数量可反映其侵袭能力。本实验结果显示不同浓度PCA预处理12 h后,HeLa细胞穿过基质胶的数目显著降低,与空白组比较差异有统计学意义(P 均 <0.01),见图5。

3 讨论

癌症引起人体死亡不仅涉及肿瘤细胞恶性增殖,更与其侵袭转移密切相关,理想的治疗药物应既能抑制肿瘤细胞增殖,又能阻止其侵袭和转移。已有一些中药单体成分被报道同时具有这两方面的作用,如50~600 μM 浓度的白藜芦醇可抑制宫颈癌细胞(SiHa、HeLa和C33A)增殖和诱导凋亡^[4],250~1 000 μM 浓度则减少Transwell侵袭试验中HeLa细胞小室底膜穿过数^[5]。10、20、40 μM 浓度的三氧化二砷(As_2O_3)可通过增加活性氧和降低线粒体膜电位诱导宫颈癌细胞(HeLa)凋亡^[6],5 μM 浓度抑制宫颈癌细胞(HeLa, SiHa, Caski)的黏附、侵袭和迁移^[7]。然而,同时具有这两方面作用的中药单体化合物并不多,而且这些化合物不是

使用剂量较大就是对人体具有剧烈的毒性,难以进一步在临床推广应用。

马齿苋苷A为我们首次从中药马齿苋中分离得到脑苷脂类的新化合物,经采用经典的体外实验方法,包括MTT法、流式细胞凋亡检测、划痕试验、Transwell法和黏附试验等实验证实,PCA较低剂量即能显著诱导HeLa细胞凋亡,明显抑制其侵袭和转移,提示其良好的抗宫颈癌作用。然而,PCA诱导宫颈癌HeLa细胞凋亡和抑制其侵袭转移的分子作用机制尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] Xie SY, Pang MF, Sun Y, et al. Recent progress on chemical constituents of Portulaca oleracea L. and their pharmacological effects [J]. Xian Dai Yao Wu Yu Lin Chuang, 2011, 26(3): 212-5. [解思友, 逢美芳, 孙艳, 等. 马齿苋的化学成分与药理作用最新研究进展[J]. 现代药物与临床, 2011, 26(3): 212-5.]
- [2] Li YP, Zeng XW, Ye J, et al. Screening antitumor effect of active constituents from portulaca oleracea L. in vitro and in vivo [J]. Shizhen Guo Yi Guo Yao, 2009, 20(11): 2726-7. [李玉萍, 曾宪伟, 叶军, 等. 马齿苋活性成分体内外抗癌作用的初步筛选[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(11): 2726-7.]
- [3] Xin HL, Hou YH, Li M, et al. α -Linolenic acid and linoleic acid in extract of portulaca oleracea L. determined by high-performance liquid chromatography [J]. Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao, 2008, 6(11): 1174-7. [辛海量, 侯银环, 李敏, 等. 高效液相色谱法测定马齿苋提取物中 α -亚麻酸和亚油酸的含量[J]. 中西医结合学报, 2008, 6(11): 1174-7.]
- [4] Shen X, Lv SL, Zhang J, et al. Effects of Res on proliferation and apoptosis of human cervical carcinoma cell lines C33A, SiHa and HeLa [J]. J Med Coll PLA, 2009, 24(3): 148-54.
- [5] Dong DG, Guo EM, Zhang Y, et al. Effects of resveratrol on the expressions of matrix metalloproteinase and tissue inhibitors of metalloproteinase in cervical cancer HeLa cells [J]. Zhonghua Zhong Liu Fang Zhi Za Zhi, 2007, 14(7): 489-93. [董德刚, 郭恩绵, 张璠, 等. 白藜芦醇对宫颈癌HeLa细胞基质金属蛋白酶及其组织抑制剂的影响[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2007, 14(7): 489-93.]
- [6] Woo SH, Park IC, Park MJ, et al. Arsenic trioxide induces apoptosis through a reactive oxygen species-dependent pathway and loss of mitochondrial membrane potential in HeLa cells [J]. Int J Oncol, 2002, 21(1): 57-63.
- [7] Yu J, Qian H, Li Y, et al. Arsenic trioxide (As_2O_3) reduces the invasive and metastatic properties of cervical cancer cells in vitro and in vivo [J]. Gynecol Oncol, 2007, 106(2): 400-6.

[编辑: 黄园玲; 校对: 邱颖慧]