

白藜芦醇在体外通过自噬作用抑制宫颈癌细胞增殖的研究

孙传名^{1,2}, 方文秀², 周荣生², 汪陶荣³, 赵卫东¹, 陈晓宇³

摘要 目的 探讨体外白藜芦醇(Res)对人宫颈癌 HeLa 细胞的抑制增殖和诱导自噬作用及其部分机制。方法 体外培养的宫颈癌 HeLa 细胞分为对照组(仅加培养基 RPMI-1640)、白藜芦醇组(加入 Res 5、10、20、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 处理), MTT 法检测各组 HeLa 细胞增殖抑制情况, Hoechst 33258 观察不同浓度 Res 处理 HeLa 后细胞凋亡情况, 免疫荧光法检测不同浓度 Res 处理 HeLa 细胞后 LC3A/B 的表达, Western blot 法检测 p62 及 Beclin-1 自噬相关蛋白的表达。结果 与对照组比较, Res(5、10、20、50、100 $\mu\text{mol/L}$) 处理 HeLa 细胞增殖抑制率逐渐增高($P < 0.01$); 细胞凋亡显著增加; 荧光显微镜下可见, Res(30、100 $\mu\text{mol/L}$) 处理后, 可见 HeLa 细胞质中分布较多的 LC3A/B 绿色荧光; Res 处理 HeLa 细胞 48 h 后, 随着 Res 浓度增高, p62 表达逐渐降低, 而 Beclin-1 表达逐渐增强。结论 Res 体外可抑制 HeLa 细胞增殖, 诱导其凋亡, 其机制可能与诱导 HeLa 细胞自噬增强有关。

关键词 宫颈癌; 白藜芦醇; 细胞增殖; 凋亡; 自噬

中图分类号 R 737.7

文献标志码 A **文章编号** 1000 - 1492(2018)05 - 0664 - 05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2018.05.002

宫颈癌是女性生殖系统最为常见的恶性肿瘤之一, 近年来其发病率呈逐年升高趋势^[1]。植物抗毒素白藜芦醇(resveratrol, Res)是从花生、虎杖、葡萄等植物中提取的多元酚类, 生物学和药理学活性广泛, 研究^[2-3]显示其具有抗炎、抗氧化、预防肿瘤和抗老化等特性。真核生物体内细胞内衰老、变性、受损的细胞器需依赖细胞内自噬-溶酶体途径降解, 从而调节细胞器质量, 稳定细胞内环境, 防止致突变物质聚集于细胞或发生基因突变^[4]。Res 抗宫颈癌 HeLa 细胞作用已有文献^[5]报道, 但关于自噬在 Res 对宫颈癌 HeLa 细胞的增殖抑制中的作用研究报道较少。该研究在体外采用不同浓度 Res 处理人宫颈癌 HeLa 细胞, 检测 Res 对 HeLa 细胞的增殖抑制和促进凋亡作用, 同时, 检测 Res 诱导 HeLa 细胞自噬情况, 探讨 Res 对宫颈癌 HeLa 细胞部分作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验试剂和主要仪器 白藜芦醇(纯度 $\geq 99\%$, 美国 Aladdin Sigma 公司, 用时稀释于培养液); 四甲基偶氮唑蓝(MTT)(美国 Genview 公司); 培养基 RPMI-1640、胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶(美国 Gibco 公司); 二甲亚砜(DMSO)、Hoechst 33258 染液、青霉素和链霉素溶液、蛋白预染 Marker、一抗稀释液、ECL 化学发光液(上海碧云天生物有限公司); BCA 蛋白试剂定量盒(美国 Pierce 公司); 一抗: 兔抗人微管相关蛋白 1 的轻链 3(light chain 3 of the microtubule associated protein 1, LC3A/B)、p62、Beclin-1、GAPDH 多克隆抗体(美国 Cell signaling 公司); 二抗: 辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔多克隆抗体(北京康为世纪生物科技有限公司); 硝酸纤

2018 - 01 - 18 接收

基金项目: 合肥市卫合科教(编号: hwk2016zc009); 安徽省自然科学基金(编号: 1708085MH184); 国家自然科学基金面上项目(编号: 81373421)

作者单位: ¹ 安徽医科大学附属省立医院妇产科, 合肥 230001

² 合肥市第三人民医院妇产科, 合肥 230022

³ 安徽医科大学组胚教研室, 合肥 230032

作者简介: 孙传名, 男, 主治医师, 硕士研究生;

赵卫东, 男, 教授, 主任医师, 责任作者, E-mail: victorzhaow@163.com;

陈晓宇, 男, 博士, 教授, 责任作者, E-mail: cxyayd@163.com

period of ZT 6 ~ 11 time, there was no obvious changes. ④ Compared with that in NS-TODS group, after five hours of sleep deprivation in the NS-SD group, the diameter of microglia in the TMN area increased significantly ($P < 0.01$), and the fluorescence intensity increased ($P < 0.05$), while there was a tendency to decrease the volume of microglia after five hours of sleep deprivation in the mino-SD group, but there was no statistical difference. **Conclusion** Microglia cells of TMN may be involved in the regulation of sleep-wake homeostasis.

Key words microglial cells; wakefulness; sleep deprivation; tuberomammillary nucleus

纤维素(nitrocellulose, NC)膜(美国 Millipore 公司);超净工作台(苏州净化设备厂);CO₂培养箱、多功能酶标仪(美国 Thermo Scientific 公司);倒置显微镜(日本 Olympus 公司);激光共聚焦显微镜(德国 Leica 公司);半干转膜仪(大连竞迈生物科技有限公司)。

1.2 宫颈癌 HeLa 细胞培养和细胞增殖实验 HeLa 细胞株常规培养于含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养液中(内置 1% 青霉素和链霉素双抗),置于 37℃、5% CO₂ 孵箱中单层传代培养。按照 5×10^3 /孔将处于对数生长期的 HeLa 细胞接种于 96 孔细胞培养板中。HeLa 细胞分为对照组、白藜芦醇组。对照组只加 RPMI-1640 培养液,白藜芦醇组(加入 Res 5、10、20、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 处理),细胞培养 48 h 后,加入 MTT 溶液继续培养 4 h,再用 DMSO 振荡溶解,于波长 490 nm 下酶标仪读取吸光度(absorbance, A)值即 A₄₉₀ 值。按下列公式计算增殖抑制率:增殖抑制率(%) = (对照组 A₄₉₀ - 白藜芦醇组 A₄₉₀) / 对照组 A₄₉₀ × 100%。

1.3 Hoechst 33258 染色检测 Res 处理 HeLa 细胞后的细胞凋亡情况 取对数生长期的 HeLa 细胞,按照 5×10^3 /孔接种于 96 孔细胞培养板中,贴壁培养 24 h 后,予不同浓度 Res(0、5、30、100 $\mu\text{mol/L}$)处理 48 h,吸尽培养液,4% 多聚甲醛溶液固定 15 min, PBS 清洗固定后的 HeLa 细胞 2 次,每次 10 min,弃去清洗液并吸干,30 μl 染色液 Hoechst 33258 避光染色 10 min, PBS 清洗,2 次,每次 10 min,荧光显微镜下观察拍照。

1.4 免疫细胞化学观察 Res 处理 HeLa 细胞后 LC3A/B 抗体表达 按照 1.0×10^5 /孔将处于对数生长期的 HeLa 细胞接种于 6 孔细胞培养板中,培养 24 h 后,加入 Res,使其终浓度为 20、100 $\mu\text{mol/L}$,置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h,吸尽培养液,4% 多聚甲醛溶液固定 15 min, PBS 漂洗 HeLa 细胞 3 次,每次 10 min。加入 0.1% TritonX-100 透膜 10 min, PBS 漂洗 HeLa 细胞 3 次,每次 10 min。山羊血清封闭 1 h,勿洗,加入 1:150 稀释的兔抗人 LC3A/B 多克隆抗体,4℃ 孵育过夜。次日 PBS 漂洗 3 次,每次 10 min 后,加入 1:100 稀释的 FITC 标记羊抗兔 IgG,37℃ 避光孵育 1 h, PBS 漂洗 3 次,每次 10 min;加入 DAPI 染核 5 min,应用抗荧光淬灭剂封固,Leica 激光共聚焦显微镜摄片。

1.5 Western blot 法检测 Res 处理 HeLa 细胞后 p62、Beclin-1 蛋白表达 25 ml 培养瓶中按照 1.0×10^6 /孔将处于对数生长期的 HeLa 细胞接种,每瓶加入含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养液 5 ml,培养 24 h 后,加入不同浓度 Res(0、10、30、100 $\mu\text{mol/L}$)处理 48 h, RIPA 裂解液提取总蛋白, Bradford 法测定蛋白浓度,取 30 μg 总蛋白 SDS-PAGE 电泳(分离胶 10%, 浓缩胶 5%)分离,半干转膜仪转移至 PVDF 膜 1 h, 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,在 4℃ 孵育 p62、Beclin-1 蛋白一抗过夜, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,加入辣根过氧化物酶标记二抗,室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min, ECL 化学发光,曝光压片,显影、定影。Alpha 化学发光凝胶成像系统照相记录结果。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件进行分析,实验计量资料数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数差异性比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),两组间比较采用 *t* 检验。检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 不同浓度白藜芦醇对 HeLa 细胞增殖情况的影响 将对照组(只 RPMI-1640 培养液)的细胞增殖的抑制率设为 0,与对照组比较,白藜芦醇组(加入 Res 5、10、20、50、100 $\mu\text{mol/L}$)处理后, HeLa 细胞增殖的抑制率逐渐增高,分别为(9.2% ± 1.5%)、(13.4% ± 1.7%)、(20.1% ± 2.1%)、(32.6% ± 2.3%)、(40.4% ± 2.8%),与对照组比较,差异有统计学意义($F = 38.17, P < 0.01$),见图 1。

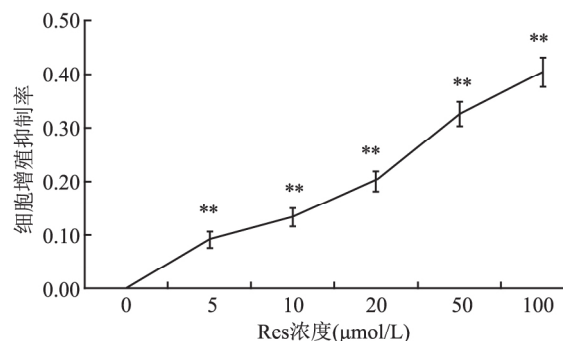


图1 不同浓度白藜芦醇对 HeLa 细胞增殖情况的影响($n = 5, \bar{x} \pm s$)
与对照组比较: ** $P < 0.01$

2.2 Res 处理 HeLa 细胞后的细胞凋亡情况 倒置显微镜下,与对照组(0 $\mu\text{mol/L}$ Res)相比, HeLa

细胞经过不同浓度 Res 溶液(5、30、100 $\mu\text{mol/L}$) 刺激 48 h 后, HeLa 细胞则呈不规则梭形、巢状聚团生长。荧光显微镜下, Hoechst 33258 染色后于观察可见, 细胞核变形或皱缩, 核染色质进一步聚集、断裂, 呈月牙状或明亮颗粒状蓝色荧光, 可见明显凋亡小体。且随着 Res 浓度的升高, 核凋亡现象更加明显。见图 2。

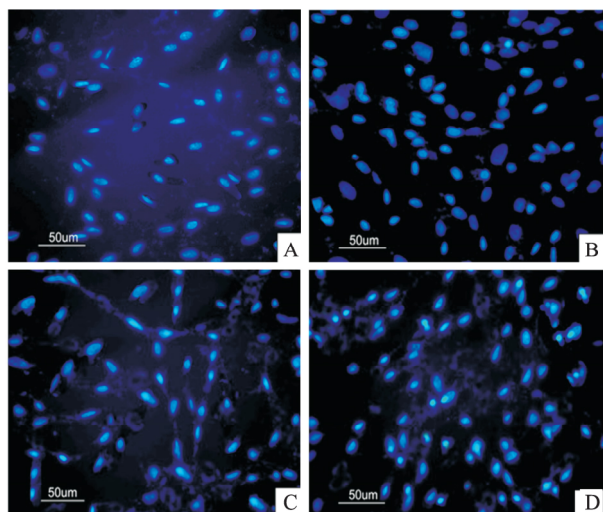


图2 不同浓度 Res 处理 HeLa 细胞后的细胞凋亡情况 Hoechst 33258 染色 $\times 100$

A: 对照组; B: Res 5 $\mu\text{mol/L}$; C: Res 30 $\mu\text{mol/L}$; D: Res 100 $\mu\text{mol/L}$

2.3 Res 处理 HeLa 细胞后 LC3A/B 表达的影响 在激光共聚焦显微镜下观察可见, LC3A/B 绿色荧光较为均匀的分布于对照组 HeLa 细胞的胞质和胞核中, 荧光强度相对较弱; 不同浓度的 Res 处理 HeLa 细胞后, HeLa 细胞的胞质和胞核中 LC3A/B 绿色荧光强度明显增强, 且较不均匀, 以 Res 高浓度 (100 $\mu\text{mol/L}$) 明显, 见图 3。

2.4 Western blot 法检测 Res 处理 HeLa 细胞后 p62 和 Beclin-1 蛋白表达情况 Western blot 检测结果表明, 与对照组比较, 使用白藜芦醇不同浓度 (10、30、100 $\mu\text{mol/L}$) 处理 HeLa 细胞 48 h 后, 随着白藜芦醇浓度增高, p62 蛋白表达逐渐降低, 而 Beclin-1 表达逐渐增强。经统计分析表明, 与对照组 p62 蛋白表达 (0.46 $\pm$ 0.09) 比较, 不同浓度白藜芦醇 (10、30、100 $\mu\text{mol/L}$) 处理 HeLa 细胞的 p62 蛋白表达 (0.35 $\pm$ 0.08)、(0.29 $\pm$ 0.06)、(0.22 $\pm$ 0.05) 差异有统计学意义 ($F = 25.71, P < 0.01$); 与对照组 Beclin-1 蛋白表达 (0.18 $\pm$ 0.05) 比较, 不同浓度白藜芦醇 (10、30、100 $\mu\text{mol/L}$) 处理 HeLa 细胞的 Bec-

lin-1 蛋白表达 (0.29 $\pm$ 0.07)、(0.41 $\pm$ 0.08)、(0.53 $\pm$ 0.11) 差异有统计学意义 ($F = 42.07, P < 0.01$)。见图 4。

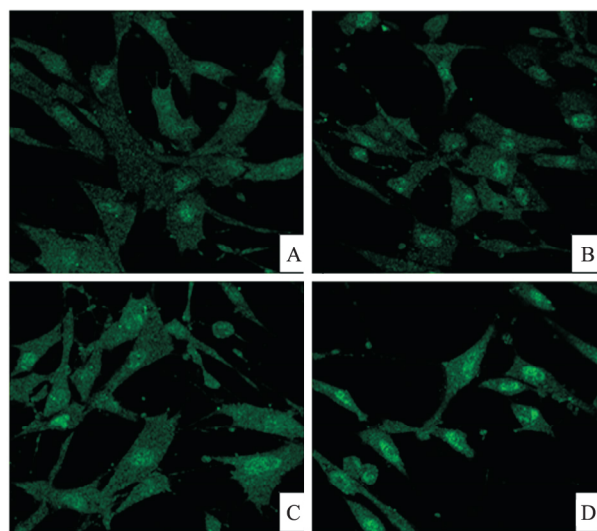


图3 不同浓度 Res 处理 HeLa 细胞后 LC3A/B 表达

激光共聚焦 $\times 400$

A: 对照组; B: Res 5 $\mu\text{mol/L}$; C: Res 30 $\mu\text{mol/L}$; D: Res 100 $\mu\text{mol/L}$

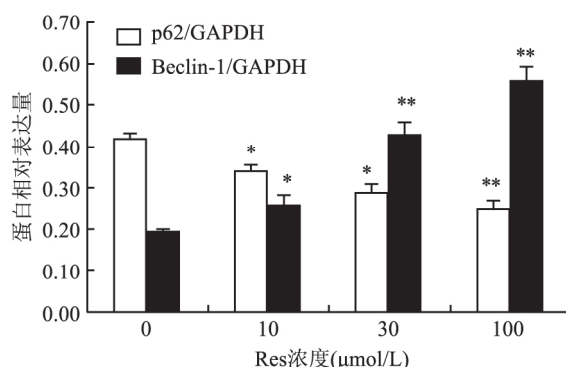
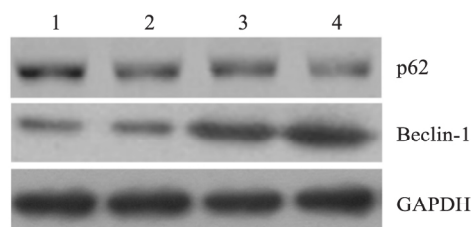


图4 Res 处理 HeLa 细胞后 p62 和 Beclin-1 蛋白表达影响 ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

1: 对照组; 2: Res 5 $\mu\text{mol/L}$; 3: Res 30 $\mu\text{mol/L}$; 4: Res 100 $\mu\text{mol/L}$; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 讨论

妇科恶性肿瘤宫颈癌发病率高、恶性程度大, 我国每年约有 2 万余名妇女死于宫颈癌^[1]。为改善宫颈癌患者预后, 降低放疗、化疗副反应和复发率, 科

研人员作出不断研究。天然的多酚类化合物 Res 具有广泛的生物学和药理学活性,在植物虎杖、葡萄、花生等广泛分布芪类化合物,研究^[2,4]显示其具有抗氧化、抗炎作用,可显著抑制肺癌、乳腺癌、神经胶质细胞瘤、肝癌、肾癌等多种肿瘤细胞生长。本研究通过人宫颈癌 HeLa 细胞为对象,观察 Res 对宫颈癌细胞生长的影响。MTT 检测结果表明,不同剂量 Res 对宫颈癌 HeLa 细胞增殖有抑制作用,该抑制作用呈剂量依赖性。

细胞凋亡是细胞在基因调控下,为适应外界环境的影响主动程序死亡的过程,在肿瘤的发生发展关系密切,形态学上,凋亡细胞变形且体积缩小,贴壁培养细胞会出现变圆、皱缩、脱落,细胞核染色质浓缩、边聚,分割成块状和凋亡小体等。Hoechst 33258 是常用的 DNA 特异性染料,与 DNA 非嵌入式的结合 DNA 的 A-T 碱基区,通过荧光显微镜,紫外光激发时发射明亮的蓝色荧光^[5]。本研究在 Hoechst 33258 染色荧光显微镜下观察到,Res 处理组宫颈癌 HeLa 细胞的胞核变形或皱缩,核染色质聚集呈月牙状或明亮颗粒状蓝色荧光,且随着 Res 浓度的升高,核凋亡现象更加明显。表明不同剂量 Res 可促进宫颈癌 HeLa 细胞凋亡形成。

恶性肿瘤的发展进程中会表现出自噬功能失调,且与其损伤 DNA、降低染色体稳定性有关^[6]。自噬是机体细胞为适应低氧、饥饿、营养夺获和环境应激(如药物应用)的自我保护机制,导致肿瘤抵抗治疗作用,故调节自噬可以有效预防和治疗肿瘤,提高肿瘤治疗过程中的化疗耐药,为肿瘤治疗提供新的思路^[7]。在激光共聚焦显微镜下,观察到 Res 处理组 HeLa 细胞后细胞质中可见大量 LC3A/B 绿色荧光分布,且荧光强度较对照组增强。LC3A/B 是自噬标记蛋白,检测细胞 LC3A/B 荧光强度可作为自噬活性的标志。本研究显示在对照组宫颈癌 HeLa 细胞中 LC3A/B 荧光强度较弱,明显低于不同浓度 Res 治疗组,表明 LC3A/B 表达下调,甚至缺失存在于宫颈癌 HeLa 细胞中;Res 升高宫颈癌 HeLa 细胞 LC3 表达,增强了 HeLa 细胞的自噬活性或潜能。

研究^[8]表明,自噬对肿瘤生长起到抑瘤作用,Beclin-1 是另一种重要的自噬标记蛋白,Beclin-1 基因敲除的小鼠患恶性肿瘤比野生型小鼠容易,缺失 Beclin-1 基因时,细胞内积累更多的异常细胞器和蛋白质;而自噬标记蛋白 p62 失活会引起自噬功能

障碍,DNA 损伤,易引起肿瘤发生,p62 表达上升是自噬损伤的标志,饥饿、营养夺获和环境应激等可上调 p62 基因转录,促进从头合成 p62 蛋白^[9]。本研究 Western blot 结果显示,与对照组比较,Res 可浓度依赖性的升高 HeLa 细胞 Beclin-1 表达;且 Res 可浓度依赖性降低 HeLa 细胞 p62 蛋白表达。表明 Beclin-1、p62 蛋白表达对 HeLa 细胞自噬活性有一定的影响,Res 可以通过调节 Beclin-1、p62 的表达量而影响 HeLa 细胞自噬。

参考文献

- [1] 韩晓慧,赵卫东,方慧英. $\Delta Np63\alpha$ 基因过表达对人宫颈癌细胞 SiHa 基因表达谱的影响 [J]. 安徽医科大学学报,2017,52(2):181-6.
- [2] Clark P A, Bhattacharya S, Elmayan A, et al. Resveratrol targeting of AKT and p53 in glioblastoma and glioblastoma stem-like cells to suppress growth and infiltration [J]. J Neurosurg,2017,126(5):1448-60.
- [3] Zhang J, Song X, Cao W, et al. Autophagy and mitochondrial dysfunction in adjuvant-arthritis rats treatment with resveratrol [J]. Sci Rep, 2016, 6(9):32928.
- [4] Chen J C, Hsieh M J, Chen C J, et al. Polyphyllin G induce apoptosis and autophagy in human nasopharyngeal cancer cells by modulation of AKT and mitogen-activated protein kinase pathways *in vitro* and *in vivo* [J]. Oncotarget, 2016,7(43):70276-89.
- [5] Ray M, Rai N, Jana K, et al. Beta catenin is degraded by both caspase-3 and proteasomal activity during resveratrol-induced apoptosis in HeLa cells in a GSK3 β -independent manner [J]. Indian J Biochem Biophys, 2015,52(1):7-13.
- [6] Alobaedi O H, Talib W H, Basheti I A. Antitumor effect of thymoquinone combined with resveratrol on mice transplanted with breast cancer [J]. Asian Pac J Trop Med,2017,10(4):400-8.
- [7] Mostafavinia S E, Khorashadizadeh M, Hoshyar R. Antiproliferative and proapoptotic effects of crocin combined with hyperthermia on human breast cancer cells [J]. DNA Cell Biol, 2016,35(7):340-7.
- [8] Li C, Han X, Zhang H, Wu J, et al. The interplay between autophagy and apoptosis induced by tanshinone IIA in prostate cancer cells [J]. Tumour Biol,2016,37(6):7667-74.
- [9] Chen Y R, Tsou B, Hu S, et al. Autophagy induction causes a synthetic lethal sensitization to ribonucleotide reductase inhibition in breast cancer cells [J]. Oncotarget,2016,7(2):1984-99.
- [10] Masuda G O, Yashiro M, Kitayama K, et al. Clinicopathological correlations of autophagy-related proteins LC3, Beclin 1 and p62 in gastric cancer [J]. Anticancer Res,2016,36(1):129-36.
- [11] Bartsch G, Jennwein L, Harter P N, et al. Autophagy-associated proteins BAG3 and p62 in testicular cancer [J]. Oncol Rep, 2016,35(3):1629-35.

(下转第 675 页)

apoptosis was determined by using Hoechst 33258. IL-1 β , IL-6, IL-10 and IL-18 levels were detected by ELISA.

Results AS rats exhibited higher TC, TG, LDLC and Ca²⁺ concentrations than normal rats ($P < 0.01$). And miR-22 was down-regulated in AS rats, while NLRP3 and caspase-1 were up-regulated ($P < 0.05$). NLRP3 was identified as the target gene of miR-22. Compared with the blank group, miR-22 was increased, NLRP3 and caspase-1 were decreased in the miR-22 mimic group. NLRP3 and caspase-1 were enhanced in the miR-22 inhibitor group. The miR-22 overexpression showed higher cell viability, decreased apoptotic cells, reduced IL-1 β , IL-6 and IL-18 levels and elevated IL-10 level ($P < 0.05$). The inhibition of miR-22 reduced cell viability, induced cell apoptosis, up-regulated IL-1 β , IL-6 and IL-18 levels and down-regulated IL-10 level ($P < 0.05$).

Conclusion miR-22 plays a protective role in myocardial microvascular endothelial cells by targeting the NLRP3 gene, reducing the apoptosis of myocardial microvascular endothelial cells and decreasing the expression of proinflammatory cytokines in rats with coronary heart disease.

Key words coronary heart disease; miR-22; NLRP3 gene; endothelial cells; inflammation factors

(上接第 667 页)

Effect of resveratrol inhibits the proliferation of cervical cancer cells with autophagy *in vitro*

Sun Chuanming^{1,2}, Fang Wenxiu², Zhou Rongsheng², et al

(¹ Dept of Obstetrics and Gynecology, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001;

² Dept of Obstetrics and Gynecology, The Third People's Hospital of Hefei City, Hefei 230022)

Abstract **Objective** To investigate the inhibitory effect of resveratrol(Res) on the proliferation and autophagy of human cervical carcinoma HeLa cells and its mechanism. **Methods** *In vitro* cultivation of cervical carcinoma HeLa cells which were divided into control group(with the only added medium being RPMI-1640), Res treated group(in which Res was added with concentrations of 5 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$, 20 $\mu\text{mol/L}$, 50 $\mu\text{mol/L}$, 100 $\mu\text{mol/L}$). The rates of the inhibitory effect on the proliferation of each group of HeLa cells were determined by MTT method, the apoptosis of HeLa cells after being treated with different concentrations of Res was determined by Hoechst 33258, the expression of LC3 A/B in HeLa cells after being treated with different concentrations of Res was determined by immunofluorescence method, the expression of proteins p62 and Beclin-1 related autophagy was determined by Western blot method. **Results** Compared with control group, the rates of inhibitory effect on the proliferation in HeLa cells which were treated by Res with different concentrations of 5 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$, 20 $\mu\text{mol/L}$, 50 $\mu\text{mol/L}$, 100 $\mu\text{mol/L}$ increased gradually($P < 0.01$); the apoptosis in HeLa cells increased significantly. Under the fluorescence microscope, more green fluorescence of LC3 A/B were distributed in cytoplasm of HeLa cells after being treated by Res with different concentrations of 30 $\mu\text{mol/L}$ and 100 $\mu\text{mol/L}$; 48 hours later Res treated HeLa cells, the expression of p62 decreased gradually with the increase of the concentration of Res, while the expression of Beclin-1 increased gradually. **Conclusion** Res *in vitro* can inhibit the proliferation of HeLa cells and induce apoptosis, and its mechanism may be related to the autophagy enhancement of HeLa cells.

Key words cervical carcinoma; resveratrol; proliferation; autophagy; apoptosis