

淫羊藿苷促进宫颈癌 TC-1 细胞凋亡作用的研究*

杜道兵¹ 卢万根² 曹丛仁³ 洪乐鹏¹ 叶秉坤¹ 许孟杰¹ 郝彦利¹ 冷水龙¹

(1 广州医学院基础学院 广东 广州 510182; 2 江西省修水县第二人民医院 江西 九江 332400;

3 江西省修水县中医院 江西 九江 332400)

摘要 目的:研究淫羊藿苷体外对致宫颈癌 TC-1 细胞的增殖抑制及促凋亡作用。**方法:**利用细胞培养,用不同浓度的淫羊藿苷在一定的时间内处理致宫颈癌 TC-1 细胞,光学显微镜直接观察药物对细胞的作用;MTT 法检测淫羊藿苷对 TC-1 细胞的增殖抑制作用;Dapi 核染色、Annexin v-FITC/PI 流式细胞学检测细胞凋亡。**结果:**淫羊藿苷对 TC-1 细胞有显著的抑制作用,且呈时间、剂量依赖,20 μ g/ml 作用 72 小时后,细胞抑制率达 99%;DAPI 核染色和流式细胞术检测可发现典型细胞凋亡特征。**结论:**淫羊藿苷对 TC-1 细胞增殖有抑制和促凋亡作用,并呈时间浓度依赖性。

关键词:淫羊藿苷;宫颈癌;TC-1 细胞;细胞增殖;细胞凋亡

中图分类号:R737.33 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2011)04-646-04

Effect of Icarin in Increasing Apoptosis of Cervical Cancer TC-1 Cells*

DU Dao-bing¹, LU Wan-gen², CAO Cong-ren³, HONG Le-peng¹, YE Bing-kun¹, XU Meng-jie¹, HAO Yan-li¹LENG Shui-long^{1,Δ}

(1 Basic medical school, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182, China;

2 The Second People's Hospita of Xiushui County, Jiangxi 332400, China;

3 Xiushui County Hospital of Traditional Chinese Medicine, Jiangxi 332400, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of icariin on proliferation and apoptosis of TC-1 cells **Methods:** Based on the culture of TC-1 cells in vitro, morphological changes of icariin-treated cells were detected by Optical microscope; The effect of icariin on growth of TC-1 cells was evaluated by MTT assay; DAPI stainin and flow cytometry (Annexin V-FITC/PI) were used to determine the apoptosis. **Results:** Optical microscope and MTT assay showed that the icariin had significant antiproliferative effect on TC-1 cells in a dose-and time-dependent manner significantly. When concentration of the icariin was 20 μ g/ml, acting for 72 h, the inhibition rate of TC-1 cell growth reached to 99%; Features of apoptosis can be found by DAPI nuclear staining and flow cytometry. **Conclusions:** Icariin has a significantly effect on inhibiting proliferation and inducing apoptosis of TC-1 cells which was concentration and time dependence.

Key words: Icariin; Cervical Cancer; TC-1 cell; Proliferation; Apoptos

Chinese Library Classification: R737.33 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)04-646-04

前言

淫羊藿苷(Icariin)为小檗科植物淫羊藿、箭叶淫羊藿等的干燥茎叶提取的一种黄酮类化合物。淫羊藿苷能改善心脑血管功能、促进造血、具有补肾壮阳、抗衰老等作用^[1]。近年的研究证明淫羊藿苷还具有增强免疫,抗肿瘤等功效^[2,3]。宫颈癌是全球女性中发病仅次于乳腺癌排名第二的常见的恶性肿瘤。人乳头瘤病毒(HPV)16 E6/E7 原癌蛋白在宫颈肿瘤发生、细胞周期调控及凋亡调节中起重要作用,是宫颈癌发生、发展的重要原因^[4,5]。TC-1 细胞株来源于鼠 C57BL/6 的肺上皮细胞,是经共转染 HPV16 E6/E7 和活化的 c-H-ras 基因后转化而得到的 HPV16 E6/E7 阳性细胞株,可稳定表达和递呈 E6、E7 抗原,是理想的宫颈癌肺转移细胞模型^[6]。本实验通过体外培养宫颈癌 TC-1 细胞,用淫羊藿苷处理细胞,检测淫羊藿苷对 TC-1 细胞

增殖抑制及促进凋亡作用。

1 材料与方法

1.1 材料

淫羊藿苷(Icariin)购自中国药品生物制品检定所。TC-1 细胞,由香港中文大学何鸿燊防治传染病研究中心惠赠。胎牛血清、RPMI1640 培养基(Gibco 公司);MTT、DMSO(美国 Sigma), RPMI1640 培养基(美国 Invitrogen 公司),胎牛血清(天津 TBD 公司)。Annexin v-FITC/PI(美国 Bender Medsyste 公司),DAPI(瑞士 Roche 公司),倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司),CO₂ 培养箱(德国 Binder 公司),酶标仪(美国 Biotek 公司),流式细胞仪(美国 BD 公司),低温离心机(日本 hitachi 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养、光学显微镜直接观察细胞形态 从液氮中取出

* 基金项目:广东省自然科学基金 No.07301608,广州市教委科学基金 No.08A036,广州市科技局基金 2007J1-C0231 资助

作者简介:杜道兵,男,硕士研究生,研究方向:宫颈癌免疫治疗, E-mail:xfddb@163.com

Δ通讯作者:冷水龙,电话:020-81340179, E-mail:shuilongleng@hotmail.com

(收稿日期:2010-11-15 接受日期:2010-12-10)

TC-1 细胞,复苏后置于无菌培养瓶中培养。培养液为含 10 %胎牛血清的 RPMI1640 培养基,加入青、链霉素(其终浓度均为 100 单位/ml),5 % CO₂ 恒温 37 °C 箱培养,约 2-3 天细胞壁生长达 80-90 %时可传代。0.125 %胰酶消化,制成单细胞悬液,按 1×10^5 /ml 铺 6 孔板,每孔 2.5 ml。培养 24 小时后,换培养液并按 0、5 μ g/ml、10 μ g/ml、20 μ g/ml 浓度加淫羊藿苷,继续培养 48 小时后倒置显微镜下直接观察各组细胞形态变化。

1.2.2 细胞增殖抑制实验 按 2×10^4 /ml 铺 96 孔板,每孔培养基 200 μ l。24 小时后,换新鲜培养基并按 0、5 μ g/ml、10 μ g/ml、20 μ g/ml 浓度加淫羊藿苷,每个浓度组设 6 个复孔。分别于培养 24、48、72 小时后,每孔加 20 μ l MTT(5 mg/ml)。继续培养 4 小时后,吸弃培养液,每孔加 150 μ l DMSO,酶标仪 490 nm 测 OD 值。按照公式:抑制率(IR)=(1- 用药组平均 OD 值 / 对照组平均 OD 值) $\times$ 100 %计算抑制率。

1.2.3 DAPI 染核观察细胞凋亡 在六孔板上用不同浓度的药物处理细胞 48 小时之后,取出六孔板。吸弃培养基,PBS 漂洗 5 分钟,75 %乙醇固定 20 分钟,再 PBS 洗后 DAPI 染色 15 分钟,PBS 洗后即倒置荧光显微镜观察凋亡。

1.2.4 流式细胞学检测 按 1×10^5 /ml 浓度在 6 cm 培养皿铺细

胞,分为对照组和处理组。24 小时后换液,同时处理组加各浓度淫羊藿苷。作用 48 小时后,按照 Annexin V-FITC/PI 双染试剂盒说明操作:常规胰酶消化、PBS 洗细胞、结合缓冲液重悬细胞、调整细胞浓度至 5×10^5 /ml、取 195 μ l 细胞悬液加入 5 μ l Annexin V-FITC 在室温下孵育 10 分钟,洗细胞并用 190 μ l 结合缓冲液重悬后加 10 μ l(浓度 20 μ g/ml)PI,10 分钟后上机检测。

1.2.5 统计学分析 所有的统计资料用 SPSS13.0 统计分析软件进行分析,数据以平均值 $\pm$ 标准差表示。 $p < 0.05$ 被认为有显著性差异。

2 结果

2.1 光镜下 TC-1 细胞凋亡形态学变化

不同浓度淫羊藿苷处理 TC-1 细胞 48 小时后,倒置显微镜下直接观察细胞形态变化。可见对照组细胞贴壁生长,几乎无脱落,胞质饱满,生长舒展,相邻细胞生长融合成片。用药后,随着药物浓度的增大细胞变稀少、间距增大;细胞皱缩变为小圆形细胞,最后被清除(图 1)。

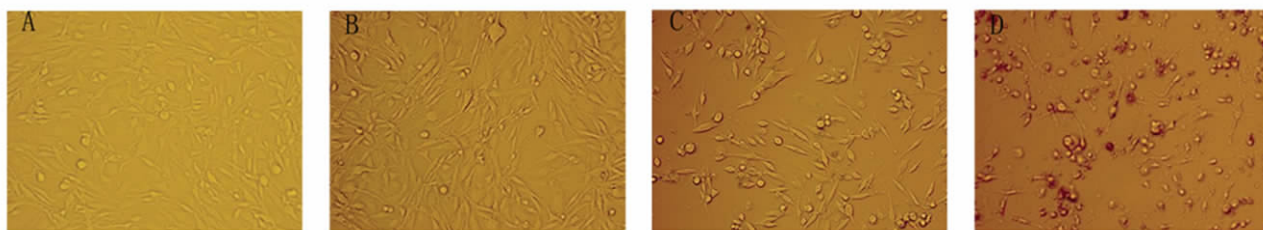


图 1 淫羊藿苷处理 48 小时观察细胞形态(200 $\times$) A 对照组 B 5 μ g/ml C 10 μ g/ml D 20 μ g/ml

Fig 1 Morphology observation of TC-1 cell after 48 h treated by icariin(200 $\times$) A control B 5 μ g/ml C 10 μ g/ml D 20 μ g/ml

2.2 淫羊藿苷对 TC-1 细胞增殖的作用

淫羊藿苷处理 TC-1 细胞 24、48、96 小时后,5 μ g/ml 浓度细胞生长抑制率分别为 6 %、7 %、12 %;10 μ g/ml 浓度抑制率为 46 %、55 %、78 %;20 μ g/ml 药物抑制率为 85 %、93 %、99 %。MTT 法检测的结果发现淫羊藿苷中、高剂量组显著抑制 TC-1 细胞的增殖,且随用药时间的延长其抑制作用增强,呈剂量和时间依赖性,大剂量组 72 小时后细胞几乎全部死亡(图 2)。

2.3 DAPI 染色观察凋亡细胞核变化

DAPI 最大激发波长 340 nm,在荧光显微镜下呈蓝色荧光。在镜下可见未用药物或低剂量时,TC-1 细胞核形完整,染色质均匀,鲜有不规则。随着药物浓度增大,出现细胞核染色质边聚,固缩。进一步核固缩,最后细胞核破裂,凋亡小体出现,核解体消失。20 μ g/ml 淫羊藿苷处理 48 小时后,视野下细胞核稀少,仅有极少量规则细胞核存在(图 3)。

2.4 流式细胞术检测结果

淫羊藿苷对照组及处理组细胞 48 小时后,Annexin V-FITC/PI 双标流式检测,结果散点图如下:右下象限 Q4(An⁺、PI⁻)为早期凋亡细胞、右上象限 Q2(An⁺、PI⁺)为晚期凋亡及坏死细胞、左下象限 Q3(An⁻、PI⁻)为活细胞。对照组早期凋亡率

(Q4 1.5 %,晚期凋亡及坏死(Q2)2.6 %,Q4+Q2=4.1 %。中、大剂量药物处理组凋亡细胞明显增多。20 μ g/ml 组早期凋亡 20.2 %,Q4+Q2=47.4 %(图 4)。

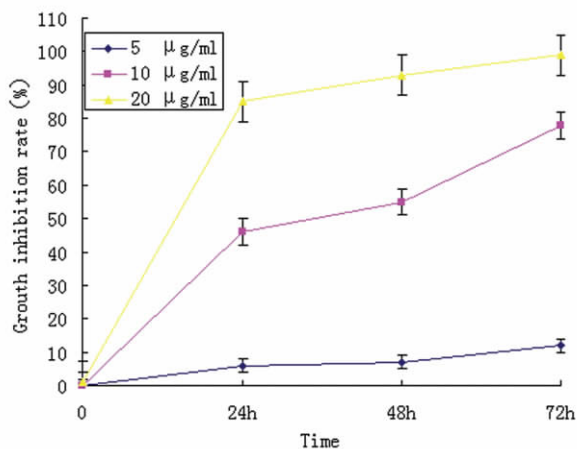


图 2 淫羊藿苷对 TC-1 细胞增殖抑制曲线图

Fig 2 Curve diagram of inhibition of icariin to TC-1 cell

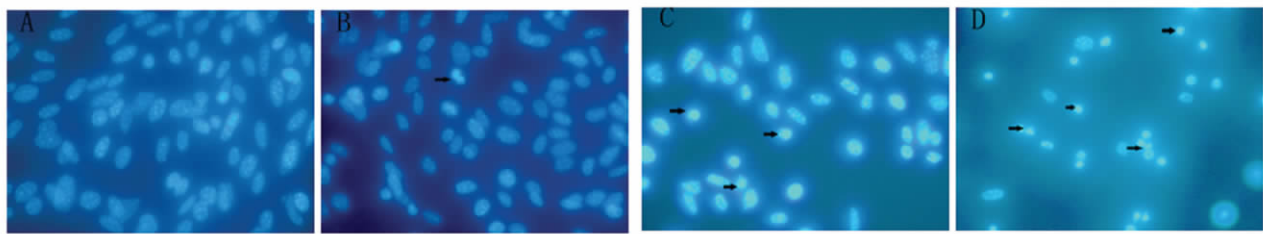


图3 淫羊藿苷处理 TC-1 细胞 48 小时后荧光显微镜(600×)细胞核形态观察。A 对照组 B 5 μg/ml 组 C 10 μg/ml 组 D 20 μg/ml 组。
黑色箭头所指为凋亡细胞

Fig.3 Icarin-induced nuclear morphological changes of TC-1 cell. TC-1 cell were treated with icaritin for 48 h, stained with DAPI and photographed with fluorescence microscopy(600×). A represent control group, B represent 5 μg/ml group, C represent 10 μg/ml group D represent 20 μg/ml group. Black arrows indicate apoptotic cells.

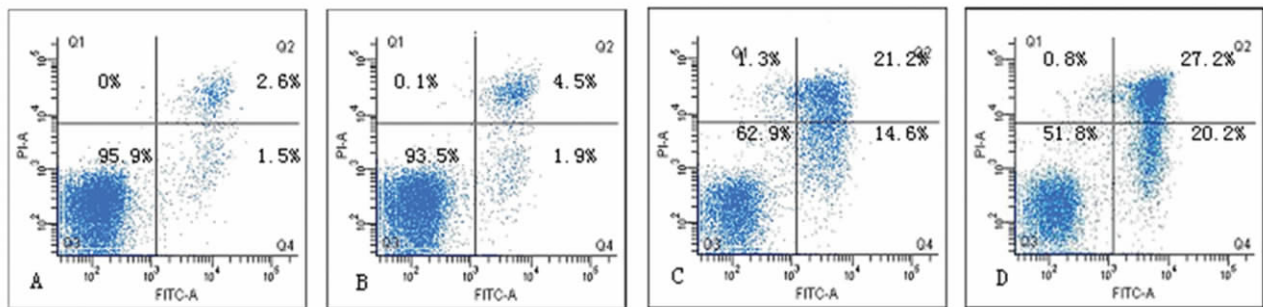


图4 Annexin V/PI 检测 TC-1 细胞凋亡 A 正常对照组 B 5 μg/ml 组 C 10 μg/ml 组 D 20 μg/ml 组

Fig.4 Apoptosis of TC-1 cell detected by Annexin V/PI. A represent control group, B represent 5 μg/ml group, C represent 10 μg/ml group, D represent control 20 μg/ml group

3 讨论

凋亡又称程序性死亡,是指细胞接受某种信号或受到某些刺激后,在特定基因调控下进行的一种主动性消亡过程,是维持内环境稳定的重要机制之一。细胞凋亡形态学特征是:细胞体积缩小,连接消失,与周围的细胞脱离,细胞质密度增加,线粒体膜电位消失,通透性改变,胞膜内侧磷脂酰丝氨酸外翻到膜表面,核质浓缩,染色体聚集在核膜周边,核膜核仁破碎,DNA 降解成为特定大小的片段,胞膜结构仍然完整,最终可将凋亡细胞分割包裹为凋亡小体,最终被吞噬细胞所吞噬^[7,8]。细胞增殖过度、凋亡受阻是肿瘤形成的主要原因,目前化疗是肿瘤治疗的常用手段,而化疗药物治疗过程中出现严重的副作用常常使治疗中断。近年来发现许多中药及其提取的有效成分可以诱导肿瘤细胞凋亡,因为中药成分对人体副作用轻微,越来越多的科研工作者开始致力于中药抗肿瘤的研究。淫羊藿是小檗科淫羊藿属植物。淫羊藿苷是淫羊藿中的主要活性成分,结构上属于 8 异戊烯基黄酮醇苷类化合物。

淫羊藿苷的抗肿瘤作用近年受到许多学者的重视,研究发现淫羊藿苷可抑制人白血病 HL-60、K562 等细胞增殖,诱导 HL-60 细胞分化和凋亡^[9-11]。王谦等发现淫羊藿苷明显抑制肝癌 HepG2 细胞增殖作用;同时发现其 FasL 的表达率显著下降,Fas 表达上升。淫羊藿苷在阻断肝癌细胞通过 Fas /FasL 途径免疫逃逸的同时,提高其对免疫效应细胞的杀伤敏感性^[12]。另有实

验用淫羊藿苷治疗接种 HepG2 瘤细胞的裸鼠,治疗组肿瘤重量及体积明显低于对照组^[13]。淫羊藿苷与雌二醇有相似的化学结构,具有植物雌激素样作用,对乳腺癌细胞有增殖抑制作用^[11],同时有抗前列腺癌功效^[14,15]。

本实验中的 TC-1 细胞转染有 HPV16 E6/E7 基因,能稳定表达和递呈 E6、E7 原癌蛋白,是宫颈癌肺转移细胞模型。通过在体外用淫羊藿苷处理细胞,MTT 法检测发现在一定浓度时,淫羊藿苷对 TC-1 细胞有明显抑制作用,并呈时间依赖性,直接镜下观察同 MTT 结果一致,DAPI 染色荧光显微镜观察细胞核形态改变可见典型细胞凋亡核形状变化,磷脂酰丝氨酸外翻 (Annexin v-FITC/PI 双标法)检测,有大量凋亡细胞出现。本实验为淫羊藿苷抗肿瘤作用提供理论依据,也为以后探讨抗癌机制及进一步体内试验打下基础。

参考文献(References)

[1] Ho JW, Jie M. Pharmacological activity of cardiovascular agents from herbal medicine Cardiovasc Hematol Agents Med Chem [J]. Cardiovasc Hematol Agents Med Chem, 2007, 5(4):273-277

[2] Yang JX, Fichtner I, Becker M, et al. Anti-proliferative efficacy of icaritin on HepG2 hepatoma and its possible mechanism of action[J]. Am J Chin Med, 2009, 37(6):1153-1165

[3] Wang Y, Dong H, Zhu M, et al. Icaritin exerts negative effects on human gastric cancer cell invasion and migration by vasodilator-stimulated phosphoprotein via Rac1 pathway [J]. Eur J Pharmacol, 2010, 635(1-3):40-48

- [4] Grce M, Matovina M, Milutin-Gasperov N, et al. Advances in cervical cancer control and future perspectives [J]. Coll Antropol, 2010, 34(2): 731-736
- [5] Vince A, Lepej SZ. Diagnostic methods and techniques in cervical cancer prevention Part II: Molecular diagnostics of HPV infection[J]. Med Glas Ljek komore Zenicko-doboj kantona, 2010, 7(1):18-25
- [6] Wu CY, Monie A, Pang X, et al. Improving therapeutic HPV peptide-based vaccine potency by enhancing CD4+ T help and dendritic cell activation[J]. J Biomed Sci, 2010, 17(1):88
- [7] 尚莹, 陆羨. 肿瘤治疗过程中凋亡与自噬的关系[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(4): 766-769
Shang Ying, Lu Xian. The relationship between apoptosis and autophagy in tumor therapy [J]. Progress In Modern Biomedicine, 2010, 10(4): 766-769
- [8] Kitsis RN, Molkentin JD. Apoptotic cell death "Nixed" by an ER-mitochondrial necrotic pathway [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(20): 9031-9032
- [9] 葛林阜, 董政军, 姜国胜, 等. 淫羊藿苷对急性早幼粒白血病细胞体内外效应的研究[J]. 肿瘤防治杂志, 2001, 8(6): 622-624.
Ge Lin-fu, Dong Zheng-jun, Jiang Guo-sheng, et al. Experimental study on the effect of ICA on HL-60 cells in vivo and in vitro [J]. China J Cancer Pre Treat, 2001, 8(6): 622-624
- [10] 郭铁军, 白厚桥, 温培娥, 等. HL-60 细胞淫羊藿甙诱导后信号传导因子表达变化与意义[J]. 国际肿瘤学杂志, 2006(4): 300-303.
Guo Tie-jun, Bai Hou-qiao, Wen Pei-e, et al. The change and significance of the signal transduction factor expression in HL-60 cells treated with ICA [J]. Journal of International Oncology, 2006(4): 300-303
- [11] Lin CC, Ng LT, Hsu FF, et al. Cytotoxic effects of Coptis chinensis and Epimedium sagittatum extracts and their major constituents (berberine, coptisine and icariin) on hepatoma and leukaemia cell growth [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2004, 31(1-2): 65-69
- [12] 王谦, 张玲, 毛海婷, 等. 中药淫羊藿苷抑制肝癌 HepG2.2.15 细胞增殖和免疫逃逸作用研究[J]. 中国免疫学杂志, 2007, (10): 908-911.
Wang Qian, Zhang Ling, Mao Hai-ting, et al. Experimental study on effects of Chinese medicine ICA on the inhibition of cell proliferation and reversion of immune escape in hepatocarcinoma cell line HepG2.2.15 cells [J]. Chinese Journal of Immunology, 2007, (10): 908-911
- [13] Yang JX, Fichtner I, Becker M, et al. Anti-proliferative efficacy of icariin on HepG2 hepatoma and its possible mechanism of action [J]. Am J Chin Med, 2009, 37(6): 1153-1165
- [14] 叶海涌, 刘健, 楼宜嘉. 淫羊藿苷衍生物的制备及其雌激素样作用研究[J]. 浙江大学学报(医学版), 2005, (2): 40-45.
Ye Hai-yong, Liu Jian, Lou Yi-jia. Preparation of two derivatives from icariin and investigation of their estrogen-like effects [J]. J Zhejiang Univ (Med Sci), 2005, (2): 40-45
- [15] 刘海平, 左文述, 李会庆. 植物雌激素与前列腺癌[J]. 肿瘤防治杂志, 2003, (3): 325-328.
Liu Hai-ping, Zuo Wen-shu, Li Hui-qing. Phytoestrogens and Prostatic Carcinoma [J]. China j cancer prev treat, 2003, (3): 325-328