

冬凌草甲素作用PI₃K/AKT 通路诱导 HeLa 细胞凋亡沈宏伟¹, 胡红珍², 曾海涛³, 柯佩琪¹, 杨越波³, 李小毛³, 任姿¹

(1. 中山大学附属第一医院妇产科, 广东 广州 510080, 2. 深圳市福田区人民医院妇产科, 广东 深圳 518000, 3. 中山大学附属第三医院妇产科, 广东 广州 5101630)

摘要: 【目的】研究冬凌草甲素诱导 HeLa 细胞凋亡的作用及其机制。【方法】MTT 法测定冬凌草甲素对 HeLa 细胞的生长抑制实验, Hoechst 33342 荧光染色等观察细胞核形态学变化; LDH 法研究细胞死亡的途径。流式细胞仪检测细胞的凋亡, 免疫印迹实验检测相关蛋白的表达。【结果】25 μmol/L 以上的冬凌草甲素对宫颈癌 HeLa 细胞具有明显的生长抑制作用, 并能诱导细胞发生凋亡, 随着药物浓度的增加和作用时间的延长, 细胞的生长抑制率及细胞凋亡率均明显升高, 冬凌草甲素抑制细胞生长及诱导细胞发生凋亡的过程中, 细胞端粒酶 Akt、FKHRL、GSK3 表达水平及活性显著降低。【结论】冬凌草甲素能够通过诱导人子宫颈癌 HeLa 细胞发生凋亡而发挥抑制 HeLa 细胞生长作用, 抑制 Akt 和 GSK3 的活性是冬凌草甲素体外诱导人子宫颈癌 HeLa 细胞发生凋亡的重要作用机制之一。

关键词: 宫颈癌; 冬凌草甲素; AKT/PKB

中图分类号: R714

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)05-0506-05

Oridonin Induces Apoptosis Via PI₃K/AKT Pathway in Cervical Carcinoma HeLa Cell LineSHEN Hong-wei¹, HU Hong-zhen², ZENG Hai-tao³, KE Pei-qi¹, YANG Yue-bo³, LI Xiao-mao³, REN Zi¹

(1. Department of Gynecology and Obstetrics, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080 China; 2. Department of Gynecology and Obstetrics, Futian Renmin Hospital, Guangdong 518000, China; 3. Department of Gynecology and Obstetrics, The Third Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Abstract: 【Objective】The purpose of our study was to investigate the apoptosis-inducing effect and mechanism of action of oridonin, a diterpenoid isolated from *Rabdosia rubescens*, in human cervical carcinoma HeLa cell line. 【Methods】Morphological analysis, nuclear condensation, and fragmentation of chromatin were monitored using Hoechst 33342 staining. Cell viability was assessed using the MTT colorimetric assay. Cell apoptosis and apoptosis-related proteins in HeLa cell line were evaluated by flow cytometry and Western blot analysis. 【Results】Oridonin suppressed the proliferation of several cervical carcinoma HeLa cell line in a dose- and time- dependent manner. Oridonin treatment dephosphorylated and/or inactivated constitutively active AKT, and glycogen synthase kinase 3 (GSK3). In addition, oridonin treatment of cervical carcinoma HeLa cell line down-regulated the expression of the inhibitor of apoptosis protein. 【Conclusion】Our results showed oridonin may suppress constitutively activated targets of phosphatidylinositol 3-kinase (AKT and GSK3) in cervical carcinoma HeLa cell line, inhibiting the proliferation and induction of caspase-dependent apoptosis.

Key words: cervical carcinoma; oridonin; AKT/PKB

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(5):506-510]

近年来,中药以其有效低毒的优势作为治疗肿瘤的替代疗法日益得到人们的重视,在美国草药及自然产物正被应用于肿瘤治疗的临床实验中^[1,2]。冬凌草甲素(Oridonin)是从传统中药冬凌草中提取

分离出来的一种四环二萜类化合物,近来资料证明^[3],冬凌草甲素对肺癌、前列腺癌、乳腺癌等多种细胞株均具有明显的体外抗肿瘤作用,且低毒,对骨髓、肝、肾等无明显损伤。子宫颈癌是常见的

收稿日期: 2006-12-25

基金项目: 广东省卫生厅科研基金资助项目(A2006188)

作者简介: 沈宏伟(1966-),男,广东雷州人,硕士,主治医师, E-mail: doctorshen@163.com

妇科恶性肿瘤之一^[4]。研究表明它具有抑制 HeLa 或 HL260 细胞生长的作用^[5,6],但对其抑制 HeLa 生长的作用机制目前尚不明。信号转导通路的异常改变是肿瘤细胞的重要生物学特性,其中磷脂酰肌醇-3 激酶(phosphatidylinositol-3-kinases, PI₃K)在肿瘤信号转导中起着重要的调节作用。细胞在一系列内外因素的作用下,通过启动 PI₃K/Akt 信号转导通路,诱导细胞的增殖、分化,避免细胞发生凋亡,在维持细胞恶性生物学特性中起重要作用。在肿瘤细胞逃避抗癌药物的杀伤过程中,PI₃K/Akt 信号转导通路可能起了极其重要的作用^[7,8]。因此本研究将探讨冬凌草甲素是否通过作用 PI₃K/Akt 信号转导通路在抑制 HeLa 生长,为临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人宫颈癌 HeLa 细胞株购自上海科学院细胞中心。HeLa 细胞由含有 100 mL/L 新生牛血清的 RP2MI 1640 培养液于 37℃、体积分数 5%CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱培养,实验使用细胞均为接种后 24 h 处于对数生长期细胞。

1.2 诱导细胞凋亡的形态学观察及测量

将细胞用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化,接种至 24 孔板中,每孔含细胞数 4×10^4 个,每孔 0.5 mL 的完全培养液中,置 37℃、体积分数为 5%的 CO₂ 培养 24 h,更换新鲜培养基。加冬凌草甲素,使药物终浓度分别为 0、10、20 mg/L,继续培养 48 h,加 50 g/L 多聚甲醛(PBS, pH 7.2) 4 mL,固定 20 min。加入 Hoechst 33342,使终浓度为 5 mg/L,室温暗处静置,去上清液,加 PBS (pH 7.2)洗 2 次,在多功能倒置显微镜(Nikon TE300)下观察,并用 Leica DC200 拍照。

1.3 细胞生长率测定

采用 MTT 法检测 HeLa 细胞的生长率。取对数生长期细胞,用完全培养液调整细胞数为 1×10^4 个/mL,接种于 96 孔板,24 h 后分别加入终浓度为: 2.5, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0 μmol/L 的冬凌草甲素作用 24 h,同时设置正常对照组(加实验组等体积培养液做对照),每组 6 复孔,取药物作用 24 h 后,每孔加入 5 mg/mL MTT 10 μL,摇床混匀后,继续培养 4 h,每孔吸出 100 μL 上清液,同时每孔加入

DMSO(国产) 100 μL,摇床混匀 15 min,室温静置 20 min 后,在酶标仪(波长= 495 nm/ 530 nm)测 A 值,计算细胞生长率:细胞生长率=(处理组/正常对照组) $\times 100\%$ 。并且采用上述方法检测 25.0 μmol/L 的冬凌草甲素作用 0, 6, 12, 24 h 后 HeLa 细胞的细胞生长率。

1.4 流式细胞仪检测 HeLa 细胞凋亡率

将 HeLa 细胞数按 1×10^4 /mL 置于 100 mL 培养瓶中,分对照组和药物组,药物组为 25.0 μmol/L 的冬凌草甲素,分别作用 0, 6, 12, 18, 24 h 后用于流式细胞仪检测,每组 6 复孔。细胞凋亡检测:收集对照组和药物组各 20 000 个细胞, PBS 液洗涤,加入碘化丙啶(PI)工作液 0.5 mL (浓度为 10 μg/mL) (北京岳泰生物公司),室温避光 30 min, FACScan 流式细胞仪分析和处理数据。

1.5 Western blotting 检测 Akt、GSK3、FKHRL 的表达

不同浓度的冬凌草甲素 (10.0 μmol/L, 25.0 μmol/L,)处理 HeLa 细胞 48 h 后,按常规方法裂解细胞,考马斯亮蓝法测定蛋白浓度。用 120 g/L 十二烷基硫酸钠 2 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS2PA GE) 分离蛋白,电转移至 PVDF 膜。用含 50 mL/L 脱脂奶 Tris 缓冲液封闭膜上的非蛋白结合点,4℃ 过夜。分别加入 1:200 稀释的鼠抗人 Anti-actin 抗体、Anti-phospho-Akt 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, CA), Anti-phospho-GSK3 抗体 (Cell Signaling Technologies, Beverly, MA)室温作用 4 h。漂洗 3 次后加第二抗体(辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠 IgG 抗体)室温作用 2 h,漂洗 3 次。加发光剂 (Lumi GLO),置感光盒中感光,显影,定影。实验重复 3 次。

1.6 统计处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用统计软件 SPSS 10.0 进行数据处理,组间数据采用 t 检验或秩和检验。

2 结果

2.1 冬凌草甲素诱导细胞凋亡的形态变化

在相差显微镜下,对照组细胞界限清晰,胞浆丰富,饱满;在荧光显微镜下,胞核圆形或椭圆形,染色质均匀分布,少见强荧光的胞核(处于染色体聚集的有丝分裂细胞核呈强蓝荧光)。HeLa 细胞被冬凌草甲素处理 24 h 后,凋亡细胞脱落悬浮于孔

板底部;冬凌草甲素终浓度 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞变圆,体积缩小,核呈强荧光的凋亡细胞明显多于对照组;当终浓度 25.0 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞变圆,体积缩小,表面粗糙,胞核缩小,呈强蓝色荧光,可见染色质浓缩呈斑块状,出现凋亡小体,呈典型的凋亡细胞形态(图 1)。

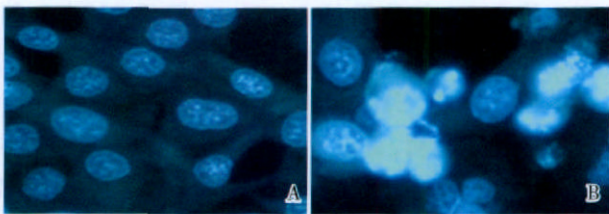


图 1 采用 Hoechst 33342 染色观察 HeLa 细胞核固缩和染色质的形态学变化

Fig.1 Nuclear condensation and fragmentation of chromatin of HeLa cells were monitored using Hoechst 33342 staining ($\times 400$)

A: Control group; B: 25.0 $\mu\text{mol/L}$ oridonin

2.2 冬凌草甲素抑制 HeLa 细胞生长

HeLa 细胞经不同浓度的冬凌草甲素处理 24 h 后, HeLa 细胞数明显减少, 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 的冬凌草甲素时, 细胞的生长率为(86.6 \pm 2.5)%, 25.0 $\mu\text{mol/L}$

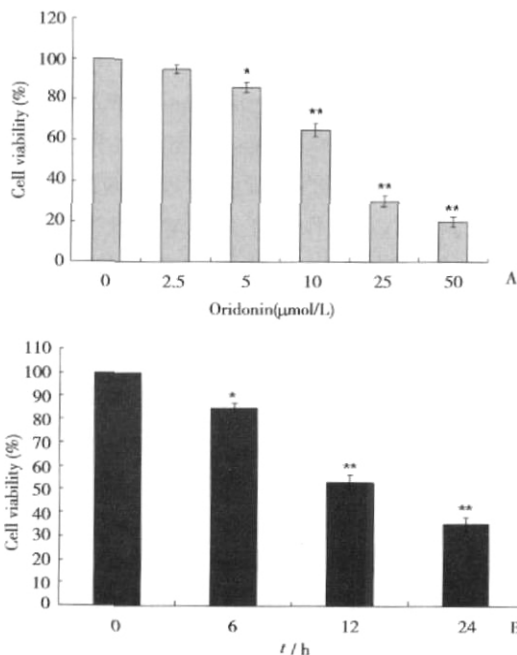


图 2 冬凌草甲素抑制 HeLa 细胞生长的作用

Fig.2 The inhibiting effect of oridonin on the HeLa cells viability

A: Dose-effect relationship of oridonin inhibiting HeLa cell growth; B: Time-effect relationship of oridonin inhibiting HeLa cell growth

L 的冬凌草甲素时, 细胞的生长率为(30.9 \pm 2.6)%。结果表明 HeLa 细胞经 25.0 $\mu\text{mol/L}$ 的冬凌草甲素处理 24 h 后, 生长受到明显抑制, 见图 2A。25.0 $\mu\text{mol/L}$ 的冬凌草甲素作用 12 h 后 HeLa 细胞的生长受到明显抑制, 见图 2B。

2.3 冬凌草甲素诱导 HeLa 细胞凋亡

25.0 $\mu\text{mol/L}$ 的冬凌草甲素作用 HeLa 细胞 0, 6, 12, 24 h 后, 细胞出现不同程度的亚 G1 峰(凋亡峰), 作用 12 h 后诱导 HeLa 细胞凋亡明显增加, 见图 3。

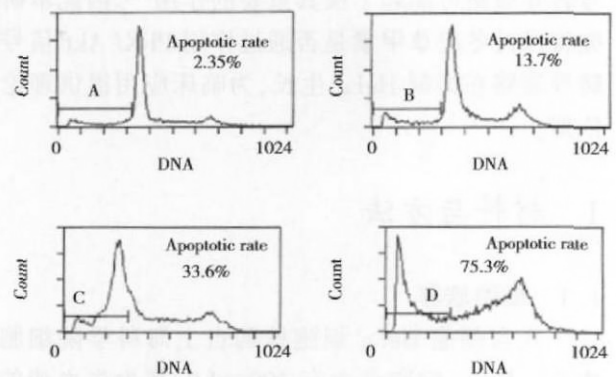


图 3 流式细胞仪检测冬凌草甲素诱导 HeLa 细胞的凋亡

Fig.3 Cell apoptosis in HeLa cell line induced by oridonin were evaluated by flow cytometry

A: Effect of 25.0 $\mu\text{mol/L}$ oridonin on HeLa cell 0 h later; B: Effect of 25.0 $\mu\text{mol/L}$ oridonin on HeLa cell 6 h later; C: Effect of 25.0 $\mu\text{mol/L}$ oridonin on HeLa cell 12 h later; D: Effect of 25.0 $\mu\text{mol/L}$ oridonin on HeLa cell 24 h later

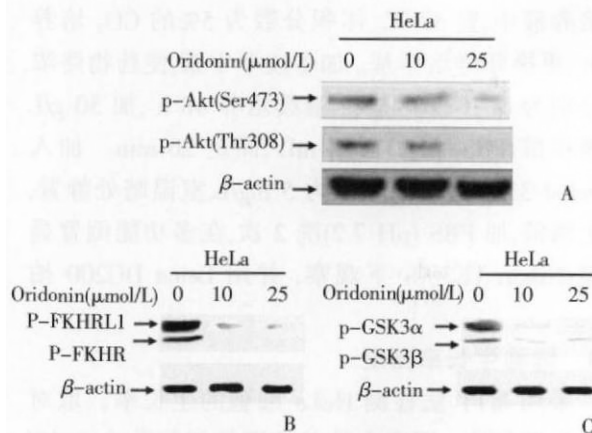


图 4 免疫印迹实验检测冬凌草甲素诱导 HeLa 细胞凋亡蛋白的表达

Fig.4 Cell apoptosis-related proteins in HeLa cell line induced by oridonin were evaluated by Western blot analysis

A: Expression of apoptosis protein Akt of HeLa cell; B: Expression of apoptosis protein FKHR1 of HeLa cell; C: Expression of apoptosis protein GSK3 of HeLa cell

2.4 冬凌草甲素对 Akt、FKHRL、GSK3 表达的影响

HeLa 细胞经过 25.0 μmol/L 的冬凌草甲素作用 24 h 后, western blotting 分析表明, HeLa 细胞的 Akt、FKHRL、GSK3 的表达均下调(P< 0.01)。

3 讨论

冬凌草甲素是从冬凌草中提取出来的一种以贝壳杉烯(ent-kaurene)为骨架的四环二萜类化合物,其化学结构为 C₂₀H₂₆O₇。大量资料证明^[9],冬凌草甲素对 EAC、HAC、S180、P388 及 L1210 等多种移植性肿瘤均具有明显的抑制作用,其对实体瘤的治疗目前已广泛的应用于临床,常用于食道癌、胃癌等多种实体瘤的治疗,并且均取得了明显的临床疗效。我们使用冬凌草甲素对宫颈癌 HeLa 细胞的作用表明, 25 μmol/L 以上的冬凌草甲素对宫颈癌 HeLa 细胞具有明显的生长抑制作用,并能诱导细胞发生凋亡,随着药物浓度的增加和作用时间的延长,细胞的生长抑制率及细胞凋亡率均明显升高,冬凌草甲素抑制细胞生长及诱导细胞发生凋亡的过程中,细胞端粒酶 Akt、FKHRL、GSK3 表达水平及活性显著降低,这在既往尚未见资料报道。

宫颈癌的发病机制复杂,是多因素、多基因、多阶段共同参与的结果。其中细胞信号传导对宫颈癌的发生发展起着至关重要的作用。癌症的发生被认为与信号传导系统的异常激活有关,在诸多的传导途径中,PI₃K/Akt 通路被认为是癌细胞存活的首要通路,有“抗凋亡途径”之称,近年来备受关注。激活后的 Akt 主要通过对含有丝氨酸 & 苏氨酸残基的底物磷酸化而发挥广泛的生物学效应,包括抗凋亡、促细胞生存功能。目前已发现多个 Akt 底物,如 Bad、Caspase-9、FKHRL、I-κB 激酶(I-κB kinase, IKK)、糖原合酶激酶 3(glycogen synthase kinase3, GSK3) 以及内皮细胞型一氧化氮合酶等,这些底物磷酸化后可能通过直接改变凋亡机器组件或间接改变编码凋亡机器组件的基因表达水平,从而发挥作用。Akt 在不同的细胞系中底物有所不同,说明其具有一定的细胞特异性^[10]^[11]。目前 Akt 促细胞生存的确切机制尚远未阐明,对其底物的深入探讨将是研究的热点。本研究发现应用冬凌草甲素可抑制 HeLa 细胞中 Akt 和 p-Akt 蛋白的表达,而且其表达呈浓度依赖性降低,

提示冬凌草甲素可通过抑制 PI₃K 活性,抑制 Akt 的表达及活化,使 Akt 和 p-Akt 蛋白的表达降低。FKHR (Forkhea like family) 受 PI₃K/Akt 通路的调节,对某些抗凋亡或促凋亡基因有调节作用,进而诱导细胞凋亡^[12]。本研究发现应用冬凌草甲素可抑制 HeLa 细胞中 FKHRL 蛋白的表达,而且其表达呈浓度依赖性降低,提示抑制 FKHRL 活性可能是冬凌草甲素抑制 PI₃K 活性促进 HeLa 细胞凋亡的作用途径之一。

研究还发现 PI₃K/Akt 与人类多种恶性肿瘤的发生、发展、侵袭、转移有关,细胞及动物实验显示 PI₃K/Akt 的抑制剂可抑制肿瘤的生长。目前认为抑制肿瘤血管生成是 PI₃K/Akt 的抑制剂的作用途径之一^[10]。PI₃K/Akt 调节血管生成的机制可能为:(1)通过激活并磷酸化内皮细胞 NO 合酶持续性地合成 NO,导致新生血管生成,促进 VEGF 诱导的内皮细胞迁移。(2)通过激活 GSK3 上调 HIF-1α 的表达,增加 VEGF、GLUT1 等的表达。(3)AKT 还能磷酸化糖原合酶激酶 3 (GSK3),使 GSK3 受到抑制,而 GSK3 能下调 β-连环蛋白的表达,而 β-连环蛋白能下调 E₂ 钙黏素表达,促进细胞运动^[10, 13]。我们发现冬凌草甲素抑制细胞生长及诱导细胞发生凋亡的过程中,细胞端粒酶 Akt、GSK3 表达水平及活性显著降低,提示冬凌草甲素还可以通过抑制 GSK3 的激活来抑制宫颈癌的发生、发展。

本研究结果表明冬凌草甲素能够通过诱导人子宫颈癌 HeLa 细胞发生凋亡而发挥抑制 HeLa 细胞生长作用;抑制 PI₃K/Akt 和 GSK3 的激活是冬凌草甲素体外诱导人子宫颈癌 HeLa 细胞发生凋亡的重要作用机制之一,从而调整细胞增殖与凋亡间的平衡。

参考文献:

- [1] MCCANN J. Texas center studies research alternative treatments [J]. J Natl Cancer Inst, 1997, 89(20): 1485-1486.
- [2] GIRGIS A, ADAMS J, SIBBRITT D. The use of complementary and alternative therapies by patients with cancer [J]. Oncol Res, 2005, 15(5):281-289.
- [3] 冯长伟,潘祥林,钟丽红,等.冬凌草甲素的提取分离 [J]. 山东中医药大学学报, 1999, 23 (5) : 461-462.
- [4] KANAVOS P. The rising burden of cancer in the developing world [J]. Ann Oncol, 2006, 17 Suppl 8: viii15- viii23.

- [5] 王 筠, 刘清芸, 华海婴, 等. 冬凌草甲素诱导 HL-60 细胞凋亡 [J]. 中国药理学通报, 2001, 17 (4): 402-404.
- [6] 张春玲, 吴立军, 田代真一, 等. 冬凌草甲素通过激活 caspase 诱导 HeLa 细胞凋亡 [J]. 中国药理学通报, 2003, 19 (5): 521-525.
- [7] OLSEN B B, BJORLING-POULSEN M, GUERRA B. Emodin negatively affects the phosphoinositide 3-kinase/AKT signalling pathway: a study on its mechanism of action [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39(1):227-237.
- [8] ARLT A, GEHRZ A, MUERKOSTER S, et al. Role of NF- κ B and Akt/PI3K in the resistance of pancreatic carcinoma cell lines against gemcitabine-induced cell death [J]. *Oncogene*, 2003, 22(21):3243-3251.
- [9] LIU H M, YAN X, KIUCHI F, et al. A new diterpene glycoside from *Rabdosia rubescens* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2000, 48(1):148-149.
- [10] WU C, HUANG J. Phosphatidylinositol 3-kinase-AKT-mammalian target of rapamycin pathway is essential for neuroendocrine differentiation of prostate cancer [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(6):3571-3583.
- [11] CIECHOMSKA I, PYRZYNSKA B, KAZMIERCZAK P, et al. Inhibition of Akt kinase signalling and activation of Forkhead are indispensable for upregulation of FasL expression in apoptosis of glioma cells [J]. *Oncogene*, 2003, 22(48):7617-7627.
- [12] BURGERING B M, KOPS G J. Cell cycle and death control: long live Forkheads [J]. *Trends Biochem Sci*, 2002, 27(7): 352-360.
- [13] REDAELLI C, GRANUCCI F, DE GIOIA L, et al. Synthesis and biological activity of Akt/PI₃K inhibitors [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2006, 6(10):1127-1136.

(编辑 张恩健)

(上接第 497 页 from page 497)

- [3] ROBARY S M, CLARKE D B, WANG Y C, et al. Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(5):1632-1636.
- [4] KOEBERLE P D, BALL A K. Neurturin enhances the survival of axotomized retinal ganglion cells in vivo: combined effects with glial cell line-derived neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor [J]. *Neuroscience*, 2002, 110(3): 555-567.
- [5] ESCHWEILER G W, BAHM M. Flunarizine enhances rat retinal ganglion cell survival after axotomy [J]. *J Neurol Sci*, 1993, 116(1): 34-40.
- [6] 韩一波. 三七总皂苷的研究进展 [J]. *中国药师*, 2005, 8(3): 197-199.
- [7] 马丽焱, 肖培根. 三七总皂苷对脑细胞内游离钙浓度的影响 [J]. *中国药理学杂志*, 1998, 33(8): 467-469.
- [8] KWAN C Y, KWAN T K. Effects of *Panax notoginseng* saponins on vascular endothelial cells in vitro [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2000, 21(12):1101-1105.
- [9] 何颖红, 李海标. 三七总皂苷对成年地鼠视网膜节细胞存活的影响 [J]. *中山医科大学学报*, 1998, 19(3): 175-178.
- [10] 马 科, 徐 亮. 视网膜定向铺片方法 [J]. *眼科*, 2002, 11(4): 238-239.
- [11] 朱永红, 李海标. IBMX 对成年金黄地鼠视网膜节细胞存活的影响 [J]. *中山医科大学学报*, 2000, 21(2):96-99.
- [12] DAS A, GARNER D P, DEL R E A M, et al. Calpeptin provides functional neuroprotection to rat retinal ganglion cells following Ca²⁺ influx [J]. *Brain Res*, 2006, 1084(1):146-157.
- [13] LIAO B, NEWMARK H, ZHOU R. Neuroprotective effects of ginseng total saponin and ginsenosides Rb1 and Rg1 on spinal cord neurons in vitro [J]. *Exp Neurol*, 2002, 173(2): 224-234.
- [14] RADAD K, GILLE G, LIU L, et al. Use of ginseng in medicine with emphasis on neurodegenerative disorders [J]. *Pharmacol Sci*, 2006, 100(3):175-186.
- [15] 韩吉安, 胡威夷, 孙增会. 颅脑损伤后钙、钙调蛋白的变化及三七总皂苷的治疗作用 [J]. *中国中西医结合杂志*, 1999, 19(4): 227-229.
- [16] 刘 雯, 吴青锋, 李 华, 等. 三七皂苷对无糖培养引起 SK-N-SH 细胞损伤的保护作用 [J]. *上海中医药杂志*, 2002, (2):46-48.
- [17] 龙在云, 伍亚民, 曾 琳, 等. 三七总皂苷对脊髓损伤后脊髓血流量和感觉诱发电位的影响 [J]. *第三军医大学学报*, 2004, 26(3):212-213.

(编辑 张恩健)